

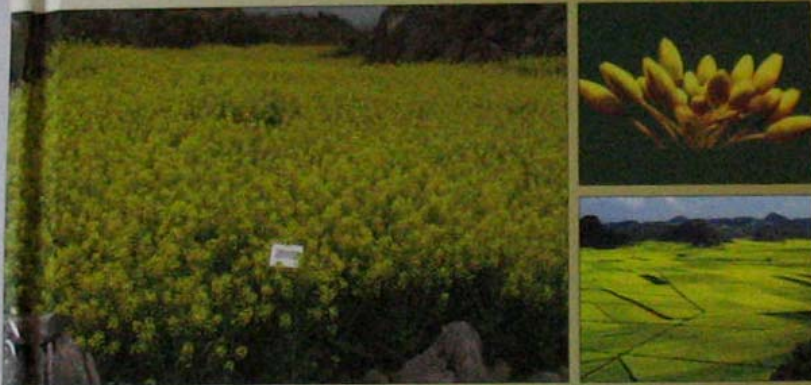


贵州农业研究系列

侯国佐 主编

贵州油菜

GUIZHOU YOUCAI



贵州出版集团
GUIZHOU PUBLISHING GROUP
贵州科技出版社

《贵州油菜》编辑委员会

主 编 侯国佐

副主编 张太平 肖吉中 饶 勇 高登祥

执笔人 (按姓氏笔画排序)

王 华 王京奇 甘功勋 冯泽蔚 李大雄 杜才富 张太平 肖吉中

肖华贵 吴俊明 张瑞茂 杨世尧 陈 静 侯国佐 侯 燕 饶 勇

赵继献 陶贵祥 徐 涵 高登祥 黄先群 黄泽素 黄俊明 魏志芬

审稿人 高登祥 肖吉中 陈德寿

图书在版编目(CIP)数据

贵州油菜 / 侯国佐主编. — 贵阳: 贵州科技出版社,
2008. 12

ISBN 978 - 7 - 80662 - 766 - 2

I. 贵… II. 侯… III. 油菜 - 蔬菜园艺 - 贵州省
IV. S634.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 015319 号

出版 贵州科技出版社
发行

地址 贵阳市中华北路 289 号 邮政编码: 550004

经销 贵州省新华书店

印刷 深圳市新联美术印刷有限公司

开本 850 mm × 1 168 mm 1/16

字数 880 千字

印张 29 印张

插页 0.75 印张

版次 2008 年 12 月第 1 版

印次 2008 年 12 月第 1 次印刷

定价 96.00 元

目 录

第一章 贵州油菜发展简史	(1)
第一节 贵州油菜生产概况	(1)
第二节 贵州油菜品种的演变	(3)
第三节 贵州油菜耕作栽培技术的重大变革	(5)
第四节 贵州油菜加工技术的发展	(6)
第五节 贵州油菜研究与科技实力的演进	(8)
第二章 贵州油菜发展前景和战略	(12)
第一节 国内外油菜生产概况	(12)
第二节 贵州发展油菜生产的优势	(14)
第三节 油菜在增加贵州农民经济收入中的作用	(15)
第四节 贵州油菜发展的前景与战略措施	(16)
第三章 贵州油菜栽培的气候条件	(18)
第一节 贵州油菜栽培的气候概述	(18)
第二节 贵州油菜栽培的温度条件	(25)
第三节 贵州油菜栽培的降水条件	(27)
第四节 贵州油菜栽培的光照条件	(28)
第五节 贵州油菜栽培的气候优势	(30)
第六节 贵州油菜栽培的气象灾害及防御	(31)

第四章 贵州油菜栽培的土壤条件.....	(36)
第一节 贵州油菜栽培的土壤类型及特征.....	(41)
第二节 贵州油菜栽培的土壤肥力.....	(47)
第五章 贵州油菜种植区划.....	(47)
第一节 贵州油菜种植规划概述.....	(49)
第二节 贵州油菜区划分区评述.....	(55)
第六章 贵州油菜种质资源.....	(55)
第一节 油菜种质资源的地位和作用.....	(57)
第二节 贵州油菜种质资源搜集与整理.....	(58)
第三节 贵州油菜种质资源的来源和特点.....	(60)
第四节 贵州油菜种质资源研究鉴定.....	(69)
第五节 贵州油菜种质资源的保存和利用.....	(74)
第六节 优异油菜种质资源创新.....	(77)
第七章 油菜的自交遗传效应及选择育种.....	(77)
第一节 油菜自交的遗传效应.....	(80)
第二节 油菜的自交技术.....	(81)
第三节 不同类型油菜的繁殖方式.....	(84)
第四节 油菜育种中的系统选择.....	(92)
第八章 油菜杂交育种.....	(92)
第一节 油菜的花器构造与开花习性.....	(95)
第二节 油菜的自交与杂交技术.....	(96)
第三节 油菜的育种目标.....	(98)
第四节 杂交亲本选配原则.....	(99)
第五节 杂交组合配置方式.....	(100)
第六节 杂交亲本组合数.....	(100)
第七节 杂交后代的处理.....	(101)
第八节 油菜的杂种优势.....	(101)
第九节 夏繁.....	(101)
第九章 油菜品质育种.....	(103)
第一节 油菜品质上存在的问题.....	(103)
第二节 油菜品质育种概况.....	(104)
第三节 贵州油菜品质育种的目标和意义.....	(107)

第四节 油菜品质育种的途径和方法	(109)
第五节 油菜品质育种综合指标及展望	(123)
第十章 隐性核不育两系杂交油菜育种	(126)
第一节 油菜细胞核雄性不育材料的来源与分类	(126)
第二节 双隐性核不育材料的发现、转育及遗传规律研究	(129)
第三节 双隐性核不育材料可育型与不育型在生育和植物学形态上的差异	(136)
第四节 双隐性核不育系的转育技术	(140)
第五节 双隐性核不育两用系的组合测配技术	(147)
第六节 贵州隐性核不育杂交油菜育种及利用情况	(150)
第十一章 细胞质雄性不育三系杂交油菜育种	(153)
第一节 细胞质雄性不育材料的主要类型及特点	(153)
第二节 细胞质雄性不育的遗传及特征特性	(157)
第三节 环境对油菜细胞质雄性不育的影响	(162)
第四节 细胞质雄性不育系的选育	(164)
第五节 油菜细胞质雄性不育恢复系的选育	(169)
第十二章 油菜杂种优势利用的其他途径	(176)
第一节 油菜自交不亲和系杂交育种	(176)
第二节 隐性细胞核雄性不育三系杂交油菜育种	(184)
第三节 显性细胞核雄性不育三系杂交油菜育种	(195)
第四节 细胞核+细胞质不育杂交种的选育	(204)
第五节 其他杂种优势利用途径	(212)
第十三章 油菜生物技术	(223)
第一节 油菜组织培养	(223)
第二节 油菜基因工程	(231)
第三节 贵州油菜生物技术研究概况及展望	(239)
第十四章 常规油菜良种繁殖	(253)
第一节 油菜良种退化的原因及防止途径	(253)
第二节 油菜种子的繁殖特性与繁殖程序	(257)
第三节 常规油菜良种繁殖	(261)
第十五章 杂交油菜制种	(264)
第一节 制种和亲本繁殖隔离区的选择与布局	(264)
第二节 杂交油菜制种亲本的繁殖	(270)

第三节 杂交油菜制种的一般配套栽培技术	(273)
第四节 提高杂交油菜制种母本结实率的技术	(280)
第五节 隐性核不育两系杂交油菜制种拔除可育株的技术	(284)
第六节 贵州生态条件下胞质不育杂交油菜的制种技术	(288)
第七节 自交不亲和系杂交油菜制种技术	(297)
第八节 贵州隐性核不育杂交油菜高产制种的生育模式与调控技术	(298)
第九节 油菜杂种的纯度鉴定	(303)
第十六章 贵州油菜耕作制度与种植技术	(308)
第一节 贵州油菜的耕作制度	(308)
第二节 贵州油菜的土壤耕作	(310)
第三节 油菜的育苗移栽	(312)
第四节 油菜直播栽培技术	(320)
第五节 油菜种植密度	(325)
第十七章 油菜栽培的田间管理	(329)
第一节 油菜大田期的生长发育	(329)
第二节 油菜匀苗、补苗、定苗,保证全苗	(336)
第三节 油菜的营养与施肥	(337)
第四节 油菜萎缩不实症和硼肥施用技术	(346)
第五节 油菜的中耕与培土	(353)
第六节 贵州油菜的病虫与防治	(354)
第七节 贵州油菜杂草防治	(360)
第八节 油菜的灌溉及排水	(361)
第九节 贵州油菜生产中常出现的问题及管理	(364)
第十节 油菜的收获与贮藏	(365)
第十八章 高产油菜栽培途径与调控技术	(370)
第一节 油菜壮苗早发栽培	(370)
第二节 贵州油菜高产生育模式栽培	(375)
第三节 数学模拟选优模型化栽培	(383)
第十九章 优质油菜保优栽培技术	(386)
第一节 国内优质油菜发展现状、主要问题及区域布局	(386)
第二节 优质油菜商品产区与非优质油菜商品产区的隔离	(389)
第三节 优质油菜产区油菜的统一供种	(392)

目 录

第四节 优质油菜的保优栽培技术措施	(392)
第五节 优质油菜商品籽的收购与贮藏	(397)
第二十章 优质油菜籽的加工	(399)
第一节 优质油菜在产业化开发中的地位和作用	(399)
第二节 优质油菜加工中新产品的开发	(402)
第三节 贵州油脂加工业现状	(403)
第四节 贵州优质油菜开发现状与发展措施	(406)
附录	(408)
附录一 贵州油菜部分育成品种简介	(408)
附录二 贵州油菜部分获奖成果简介	(432)

第十三章 油菜生物技术

生物技术亦称生物工程,通常包括细胞工程(泛指组织培养)、基因工程、酶工程和发酵工程。在油菜育种上应用较多的是组织培养和基因工程,而基因工程亦需要组织培养作为基础技术。本章就油菜在这两个方面的国内外研究进展做一个简要综述,对贵州油菜生物技术研究的主要内容和进展做一总结性回顾。

第一节 油菜组织培养

植物组织培养是指在无菌条件下,将植物体器官、组织、细胞以及原生质体培养在人工配制的培养基上,给予适当条件进行培养,使其产生完整植株的过程。由于是脱离母体进行培养,所以也称离体培养。

1902年德国植物学家 Haberlandt 提出细胞全能性学说,认为植物体的每个细胞都具有和植物个体一样的性质和能力,有可能通过离体培养发育成一个新个体,这为植物组织培养奠定了理论基础。1958年,Steward 首次通过组织培养技术将胡萝卜根髓细胞培养成完整植株,它不仅证实了植物细胞的全能性,也是植物组织培养的第一个大突破^[1]。此后,植物组织培养技术在世界各地蓬勃开展。20世纪80年代以后,随着分子生物学技术(如分子克隆和分子标记技术)在育种上的应用、发展和不断完善,作物育种水平提高到了一个崭新的层次。人们可以改良作物某个性状和个别基因,避免了将供体亲本的整体遗传背景(也包括不利基因)转移到受体亲本,缩小了选择群体和节省了时间,并且能将更远缘的有利基因转移到作物中,为作物育种开创了新的途径。

国内外油菜组织培养研究起步于20世纪70年代。1974年,Kartha等^[2,3]首先将来源于甘蓝型油菜的茎段和叶肉原生质体的愈伤组织培养生成再生植株;20世纪70年代中、后期,Thomas等^[4]从花粉单倍体植株的叶肉原生质体,Keller和Armstrong^[5]和广东植物研究所遗传研究室^[6]从花药、颜昌敬和赵庆华^[7]从茎段、许志宏等^[8]从花茎组织均诱导生成再生植株。此后,通过组织培养获得了来源于不同类型、倍性和外植体的油菜再生植株,其主要研究内容包括无性系快速繁殖、胚和子房培养、花药和小孢子培养、原生质体培养和体细胞杂交等。

一、无性系快速繁殖

油菜无性系快速繁殖主要是利用子叶、下胚轴、茎基段、茎尖以及叶片等器官作为外植体,通过离体培养方式进行无性繁殖,在短期内获得大量再生株系的技术。该技术可以用来快速繁殖某些特殊个体,如新的突变材料、远缘杂种、体细胞植株、转基因植株等供研究、育种和生产之用。目前已从

甘蓝型、芥菜型和白菜型三大类型油菜的不同器官和组织中建立了快繁体系。

(一) 起始于子叶(节)和下胚轴的快速繁殖

利用子叶和下胚轴做外植体快繁,可以直接诱导生成不定芽;也可以先诱导脱分化产生愈伤组织再分化成芽。组织学观察表明,带柄子叶外植体的不定芽是由子叶柄基部维管束薄壁组织分化形成的^[9]。

顾亨森等^[10]、杨业正^[11]分别从三大类油菜的子叶(节)和下胚轴诱导培养,产生愈伤组织或直接诱导出芽,利用愈伤组织或芽分化出根形成再生植株。蔡得田等^[12]、田志宏和扬成军^[13]、Zebajadi等认为子叶比下胚轴具有更高的愈伤组织和芽诱导率。邹高治等^[14]从八倍体甘蓝型油菜的下胚轴愈伤组织诱导也分化成苗。石淑稳和周永明^[15]、杨业正和董晓峰^[17]分别用甘蓝型油菜的半粒种子和其子叶进行试管繁殖获得再生植株。

基因型对油菜子叶和下胚轴再生影响很大。钟蓉^[18]对3个甘蓝型油菜品种的下胚轴进行了培养,芽再生频率分别是19%、66%和68%。卢长明等^[19]利用子叶和下胚轴等对自交特别困难的5个人工合成的甘蓝型油菜新品系进行试管繁殖,芽再生频率的变幅为3%~21%。赵云等^[20]研究了核质基因互作对子叶外植体再生的影响,认为愈伤组织诱导频率和生长速度受细胞核基因影响,细胞质基因互作对子叶外植体再生的影响,认为愈伤组织诱导频率和生长速度受细胞核基因影响,细胞质基因也起了明显的作用。石淑稳等认为,在同一培养条件下,甘蓝型油菜子叶比白菜型油菜的再生能力强^[21]。Dale等认为,春油菜子叶芽的再生频率(54%~99%)比冬油菜(2%~43%)高^[22]。

激素在分化和增殖中起着决定性作用。据报道,基因型和激素对油菜下胚轴和子叶再生频率的影响均达到极显著水平,激素的影响大于基因型,且两者之间存在显著的互作效应^[20,21,22]。在油菜子叶和下胚轴的培养中,6-BA和ZT可以防止油菜下胚轴的徒长^[24];2,4-D对器官的发生具有很强的启动作用^[25]。此外,油菜素内酯(简称BR)具有诱导愈伤组织形成和分化的双重作用,并促进芽苗增殖^[26];三十烷醇浓度在0.1~10.0mg/L范围内对下胚轴的诱导效应随浓度增加而增加^[27]。

对子叶和下胚轴预培养和添加AgNO₃可提高芽再生频率。在分化培养基中加入适量AgNO₃,芽苗分化频率成倍提高,以加入AgNO₃20μmol/L的分化频率最高^[28,29]。通过对芽苗分化率的方差分析表明,基因型、AgNO₃及两者互作对植株再生的影响均达到极显著水平,其影响程度为基因型>AgNO₃>基因型×AgNO₃^[30]。

利用消毒种子萌发的无菌苗的子叶及下胚轴作为外植体,常用苗龄为4~7d,其中以4~5d最佳^[21,29]。将子叶预培养3d后转入芽分化培养基,可明显提高芽再生频率,再生周期可缩短三分之一,但延长预培养时间则导致再生频率下降^[31]。外植体的“生理年龄”能影响到由它分化出的小植株的发育状态,由甘蓝型油菜花器官(花丝、花托、花序轴切段等)诱导的小植株,在培养瓶内即现蕾开花^[32]。

(二) 起始于茎段的快速繁殖

利用茎段做外植体快繁,可以直接诱导生成不定芽。在B₅培养基上,5~10mg/L的6-BA、ZT和KT均可使茎段分化成苗,但6-BA和ZT效果好,KT较差;激素配合使用有利于苗的分化,其中以6-BA 2mg/L+ZT 1mg/L效果最好^[33]。用MS培养基加1mg/L的6-BA,亦可以从甘蓝型油菜单倍体茎段切片的基部诱导产生不定芽芽簇,当芽被转移到含有NAA 0.2mg/L的培养基中可很快长出根^[34]。Shukla等进行了甘蓝型油菜野生类型和细胞核雄性不育系节间片段离体培养的再生能力比较,结果表明离体培养基中添加NAA和6-BA,细胞核雄性不育系外植体产生更多的根而野生型外植体产生更多的芽,表明不同基因型对激素类型及浓度的要求不尽相同^[35]。

甘蓝型油菜愈伤组织的诱导及再生频率最高的部位为茎基段,其次是茎叶,最低的是长柄叶;开花前的诱导及再生频率均高于开花后^[2]。无芥酸品种的茎基段几乎不能分化出苗,高芥酸和“双低”品种茎基段分化出苗数优于无芥酸品种^[36]。而低温冷藏后再切段培养的茎基段,其分化出苗效果最佳;低温冷藏达 90d,仍不影响茎基段的分化出苗率^[37]。

(三) 茎尖快速繁殖

以油菜无菌苗茎尖为起始外植体,采用 MS 培养基附加 6-BA 和 NAA 进行培养,每个腋生枝平均可获得 4 个不定芽,不定芽诱导生根可获得再生植株^[38]。利用甘蓝型油菜与埃塞俄比亚芥的杂种无菌苗茎尖进行快速繁殖,可获得再生植株^[39]。不同芸薹属物种外植体芽再生取决于遗传和环境两因素^[40]。

高浓度的细胞分裂素有促进油菜离体枝尖营养生长并抑制其生殖生长的作用。2,4-D,6-BA,ZT 和 GA3 的配合使用对愈伤组织的形成和器官发生起着决定性作用^[41]。腋生分生组织内两类激素平衡的破坏(即生长素过少,细胞分裂素过多),可能会改变腋生分生组织正常发育,形成玻璃腋生枝。生长素有引起维管束分化的作用,玻璃化苗或玻璃腋生枝的维管束发育不良,木质素含量低,也说明玻璃腋生枝的形成与分生组织内生长素过少有关^[41]。

一定的低温处理是启动油菜离体茎尖分化的必要条件。从茎尖培养的再生植株和经腋芽直接诱导不定芽繁殖的再生植株能正常生长、成熟,并且形态正常,其主要农艺性状与供体植株的有性后代无明显差异;由愈伤组织诱导的再生植株,整齐度及一些主要农艺性状与供体植株有较大的差异。经腋芽繁殖 1-3 代的再生植株,不经春化即可开花;继代 4-5 次后的无性系则需春化才能开花;愈伤组织再生的植株,必须经春化才能开花^[41]。

据 Chopra(1986)报道^[44],在芸薹属外植体培养直接再生植株时,CC 基因组的甘蓝和 BB 基因组的黑芥在相当广的激素组合下均有极强的再生力;AA 基因组的白菜再生率最低。复合种中,甘蓝型油菜(AACC)和埃塞俄比亚芥(BBCC)基因组的再生能力则介于两个基本种之间。比较 A、AC、AAC 发现,在 AC 中,C 基因组可中和 A 对芽分化的抑制效应,在 AAC 中,两份 A 基因已足以抑制 C 基因组的形态建成能力。

二、子房和胚培养

远缘杂交是获得新种和雄性不育材料、改善品质和抗性的重要途径。油菜种间、属间常规杂交的杂种胚,一般在心形期,有的甚至在球形期便解体,多表现不育、败育或种子无发芽力,难以获得有效种子。子房、胚珠和胚培养是将发育不良或不能发育的胚(胚珠)接种到培养基上,在人工条件下培养,让其发育成成熟胚或有效种子的技术,这是克服远缘杂交时胚发育不良或败育的有效手段之一。

(一) 子房培养

在高体子房培养中,不同类型的品种和杂交材料,要求的培养基类型及培养条件不同。油菜子房培养一般多采用 B5、MS 或 LS 培养基,蔗糖浓度在 12% - 18% 较宜,补加水解乳蛋白或水解酪蛋白对促进子房生长和种子形成有良好作用^[45,46]。

通过授粉子房培养获得的甘蓝型油菜 × 兰花子的杂种率(28.6%)比常规杂交的杂种率(0.2%)有很大提高^[47]。甘蓝型油菜 × 芝麻菜杂交 4d 后的带柄子房在 MS 培养基上培养可获得杂种种子,杂种植株具有父本特有的表皮刺毛特征^[48]。将甘蓝型油菜与紫罗兰进行属间杂交子房离体培养,在杂种后代中获得了形态倾向母本甘蓝型油菜、农艺性状较好、育性正常、染色体数为 38 ($2n=38$)的单株,该植株的 α -亚麻酸含量达 12.4%,比母本甘蓝型油菜奥罗增加 37.8%^[49]。

油菜与诸葛菜属间杂交既存在受精前雌雄不亲和障碍,也存在受精后胚胎发育障碍,子房离体

小孢子受损伤较少,而且还有可能是某些未知的花药因子促进小孢子向胚胎或苗的形态发生。当然,相反的情况也存在。而在实际应用中,采用何种培养方式需要根据具体的培养目的、所具有的实验条件及人力、财力等综合因素才能确定。但是,只要条件允许,应尽量选择游离小孢子胚胎发生途径。

(一) 花药培养

花药培养产生单倍体有两种方式:一种是经过胚胎形成单倍体植株;另一种是经过愈伤组织再分化成苗。油菜花药培养中,花药胚状体的诱导频率受很多因素的影响,如受体植株的基因型、杂交方式、花粉发育时期、培养基、温度、激素等。

汤惠雨^[70]培养了16个甘蓝型油菜F₁的花药,其中有14份材料能诱导愈伤组织,变幅在3%~40%;仅有6个材料分化出绿苗,变幅在6%~25%。李尚^[71]也报道诱导花药产生愈伤组织的频率与品种有关,变幅在6%~62%。寸守铁和张小雷^[72]的研究结果表明,甘蓝型油菜的诱导率比芥菜型油菜高,正交F₁产胚率可高达52%,其反交仅为2%。一般而言,母本的影响大于父本而起主导作用,因此在花药培养中,应把亲本性状最优良且诱导率较高的材料作为母本,以得获得更多的再生植株,增加选择机会。

油菜花药在多种培养基上均能产生愈伤组织,而以Miller培养基较好,其次是MS培养基,最后是Nitch培养基,也有报道在B₅培养基中附加6-BA和NAA对诱导花药产生愈伤组织有促进作用^[73,74]。在Miller培养基中激素浓度以2,4-D 2mg/L,KT 0.5 mg/L诱导愈伤组织的频率最高,达14.8%^[71]。同时,在预处理和诱导培养基中加入适量的多效唑,胚状体的诱导率可以从71.5%提高到411.1%^[75]。培养基蔗糖浓度以6%~10%为最佳,液体培养基诱导甘蓝型油菜花药的胚形成优于固体培养基^[76],而以液固双层培养效果最好,胚产量远比在单层培养基和固体培养基上的高^[77]。采用液体漂浮分步培养法,甘蓝型油菜花粉胚状体的诱导率高达800个胚状体/100个花药以上^[78]。

温度刺激是提高油菜花粉胚状体诱导频率和正常胚率的有效途径。花药经低温处理,2周后诱导出胚胎,而没有进行冷处理的8周后才有胚胎发生^[72]。低温预处理24h产胚率最高,达51.4%;预处理2d和3d的分别为21.7%和5.1%,低温预处理4d的花药未能产生胚状体^[79]。变温处理能明显提高供试材料花药胚状体诱导频率和正常胚比率^[74]。George等^[80]报道,无论是新鲜的花药,还是仅单独经受过2~15d的预冷处理或单独高温处理的花药均不能产生胚,只有经历过预冷(花蕾保持在10℃以下3d)和升温(花药在31℃培育4d)联合处理的花药能产生正常胚。李红梅等报道^[81],4℃5d低温预处理的花芽,再经过33℃2d和30℃6d的培养后,花药的出愈率明显高于其他处理。同时,花药胚状体的诱导率与供体植株的生长温度有关,供体植株生长温度为15℃有利于胚状体产生;而胚状体成活率则受35℃处理时间的影响更大,胚状体产量最高的处理为35℃2d^[82]。白菜型油菜作材料时,35℃预处理2d对胚的形成效果最好^[83]。

从抽薹到初花期的单核期花药容易诱导出愈伤组织,花药培养取材以2~3mm的花蕾效果最好^[71],但不同品种和材料之间会存在一定的差异。甘蓝型油菜强雄蕊花粉的发育程度比弱雄蕊花粉高,但在花粉愈伤组织的诱导率方面,弱雄蕊花粉平均诱导率高于强雄蕊^[84]。适当增加培养花药的密度,同样可增加胚的数量。在培养基中添加大蒜素溶液可减轻油菜花药愈伤组织的褐化,降低玻璃化苗的分化频率^[84],加入活性炭会降低胚状体的诱导率^[85]。

(二) 小孢子培养

小孢子培养通常是指未成熟花粉培养。游离小孢子的获得有两种方法,一是将剥出的花药置于液体培养基上漂浮培养,任其散落花粉;二是直接磨碎花蕾,过滤、离心分离小孢子,悬浮于液体培养基中培养。目前绝大多数研究者采用第二种方法,但前者对小孢子不造成损伤。小孢子胚分化受基

因型、培养基成分、温度和发育阶段等诸多因素影响。

基因型对小孢子的产胚率有明显影响。刘泽等^[66]报道,不同基因型小孢子胚一次性成苗率为11.5%~61.5%。春油菜小孢子培养的产胚量明显高于冬油菜^[67]。胚状体发生能力主要由基因的加性效应控制,高的胚发生能力由显性核基因控制^[68]。

自 Lichter 于1982年使用改进的 NLN 培养基后,很多实验都证实了该培养基的有效性^[69]。Keller 等报道,将大量元素降至 NLN 的1/2时,能提高胚状体频率;而在 B₁ 和 MS 培养基上未能诱导形成胚状体^[70]。余凤群和刘后利报道,小孢子培养的培养基成分以 NLN 为最佳,但1/2MS 和1/2B₁ 培养基上亦可形成少量胚状体^[71]。培养基的 pH 值以 5.8 为佳,蔗糖以 13% 较适宜,培养基中加入活性炭可提高胚状体诱导频率^[72,73]。

温度条件是影响小孢子培养的关键因素。植株生长在较低温度条件下(10℃/5℃),有利于诱导胚状体形成。人工气候室中生长的植株比温室中的植株其小孢子发育同步化程度较高,有利于接种到最佳时期。对转移到诱导培养基上的胚进行4℃冷激处理,其胚萌发率与植株再生率最高,分别达到了90.0%和58.46%,并能促进胚的萌发与植株再生^[74]。对大部分基因型来说,胚状体产生的频率在32℃时最高;低温培养,胚的质量较好;变温处理(32℃,3d;接着25℃,14d左右)效果最佳,可得到优质高产的胚状体^[75]。

最适于小孢子培养的时期通常为单核晚期至双核早期,即第一朵花开后3~7d的花蕾。此时在细胞结构上,小孢子处在细胞核靠近小孢子细胞壁的单核靠边期,或是在核的有丝分裂期(包括末期);在生理上,此时小孢子核质指数高,新陈代谢活跃,有利于小孢子脱分化,且成胚率最高。根据油菜类型、品种或生长环境不同,处于这一时期的油菜花蕾的长度也不同。田间生长的植株单核期花蕾比温室内生长的短0.5~1.0mm^[76]。Jang 等^[77]报道,甘蓝型春油菜处于单核晚期至双核早期花蕾长度为3.2~4.1mm,冬油菜为3.1~3.6mm,芥菜型油菜为2.9~4.1mm,白菜型油菜为2.9~3.4mm。黄先群等^[78]利用荧光染色对甘蓝型油菜小孢子的发育时期进行检测,观察到长度为3.5mm花蕾中大部分的小孢子处于单核靠边期,这与 Jang 等的报道一致的。

外源生长调节剂对诱导甘蓝型油菜小孢子胚胎发生的作用因材料不同而异。甘蓝型油菜 Topas 的小孢子胚胎诱导不需要外源生长调节剂^[79]。属间杂种小孢子在不附加任何激素的 NLN 培养基上产生了3.9个胚状体/花药,在附加2,4-D 0.01mg/L 的同样培养基上仅产生0.98个胚/花药;在附加低浓度的 NAA 和 6-BA 的处理中则没产生胚状体,这似乎表明激素在这一基因型小孢子胚的诱导过程中是不必要的^[80]。但也有报道认为,当每升培养基中添加0.1mg/L 2,4-D 时小孢子产生胚状体,在不含2,4-D 的培养基中没产生胚状体;NLN 培养基中添加0.01~0.1mg/L 的2,4-D 或者添加0.05~0.1mg/L 的6-BA 能提高胚的诱导率^[82,100]。

(三) 单倍体加倍

花药和小孢子培养中,不是所有胚诱导的再生植株都是单倍体,即存在自然加倍的现象。自然加倍的频率随基因型不同而异,非单倍体中的多数(>90%)是二倍体和少量多倍体^[101]。Xu Han 等^[81]报道,从小孢子开始进行细胞分裂起一直到小孢子胚胎形成和后来的植株营养生长和生殖生长期,染色体自然加倍都普遍存在,但离体小孢子染色体自发加倍产生双单倍体植株的频率较低,约占小孢子再生植株群体的10%~30%。然而,一些基因型油菜花粉胚状体再生的绿苗,尽管经过多次继代培养,染色体仍很难自然加倍。秋水仙碱处理后的小孢子再生植株中,双单倍体频率为44%~93%^[102]。

秋水仙碱处理加倍有两种方法:一是秋水仙碱处理再生的单倍体植株,以0.05%秋水仙碱+1.5%二甲基亚砷混合液在单倍体植株移栽时浸根4d,植株成活率和加倍率可达91%和94%^[103];另一种方法是秋水仙碱直接处理离体小孢子。Chen 和 Snyder 报道^[104],秋水仙碱直接处理离体小孢子可

使70%的植株整体加倍,同时还刺激了小孢子的胚胎发生,从而提高植株再生率,比处理再生植株和小孢子胚效果好。分离的小孢子在10~50mg/L的秋水仙碱的NLN培养基中处理48h后,接种在无秋水仙碱的NLN培养基诱导胚状体,再生植株加倍率80%以上,全株的花均能自交结籽,嵌合体植株很少^[102];或以0.6g/L的秋水仙碱处理离体小孢子5.0h和3.4g/L的处理1.5h,也能提高植株成活率和加倍率^[103]。

获得小孢子胚状体后,移至摇床暗培养7~10d(50~80rpm,24~26℃),再转入B₁或MS固体培养基中培养,2~3周转换1次培养基直到植株生长成为正常不定芽苗,然后再生根培养基和盆栽驯化,最后移栽大田。

四、原生质体培养与体细胞杂交

植物原生质体是Hanstein于1880年首先提出的,是指“通过质壁分离,能够和细胞壁分离的那部分细胞物质”,即除去全部细胞壁的“细胞”,或是一个为原生质膜所包围的“裸露细胞”。自Takebe等(1971)首次利用烟草叶片分离原生质体,并获得再生植株以来,各种作物原生质体培养研究都取得了很大的进展。

植物原生质体可作为基础研究、作物改良和转基因的理想材料,许多遗传操作如体细胞杂交、细胞质重组、外源DNA的摄入和转移等都依赖于原生质体的再生。由原生质体培养发展起来的原生质体融合(体细胞杂交)技术虽然有其随机性的缺陷,但是却有常规育种技术所不具有的优点。

(1)由于它同时可以转移基因组和细胞质基因组控制的农艺性状,因此可以更大程度地、更好地利用基因资源。

(2)利用原生质体融合能从远缘或野生物种中转移有关重要的抗性、品质性状及其他重要农艺性状基因(尤其是控制数量性状的多基因),扩大变异范围,获得新的种质。

(3)单倍体原生质体在培养过程中其隐性变异可在当代表现,有利于诱变和筛选,获得的杂种二倍体可直接应用于生产,从而克服二倍体原生质体融合后代育性因多倍化而降低,导致作物减产的矛盾。因此,利用体细胞杂交配合常规育种技术可望选育到优良品种。

(一)原生质体培养

油菜是较早由原生质体培养获得再生植株的作物之一。自从1974年Kantha等首次在甘蓝型油菜叶肉原生质体培养中获得再生植株以来,各国科学家相继从三大类油菜的不同外植体中分离出原生质体,并获得再生植株。

基因型对原生质体培养植株再生影响较大。一般来说,甘蓝型和芥菜型油菜的原生质体再生植株比较容易,而白菜型油菜较难。Glimelius^[104]用白菜型油菜的下胚轴原生质体培养取得成功,但再生频率很低(1%)。

供体组织的选择影响着原生质体分离纯化效果,也是原生质体培养成功与否的关键因素。用做分离原生质体的外植体中,使用较多的是叶片和下胚轴。叶片产率高但不易纯化,生长慢,易褐化。下胚轴分裂快、分裂频率高和再生能力强,但产率较低。罗科等^[105]发现用试管苗的叶柄为材料分离原生质体进行培养,再生能力高,并且遗传上同质的试管苗可通过无性繁殖大量获得。试管苗叶柄既可综合叶片和下胚轴的优点,又可克服它们的缺点,是一种很好的原生质体供体材料。此外,子叶、根、茎的皮层组织用来游离原生质体和培养再生植株均有成功报道。

油菜原生质体培养最初多采用浅层液体培养。1985年Chuong等^[106]在甘蓝型油菜下胚轴原生质体培养中首次使用漂浮法;1986年Barsby等^[107]采用液固双层培养使原生质体早期的快速分裂一直持续到愈伤组织形成;同年,Spangenberg等^[108]采用矿物油覆盖防止蒸发的方法,进行单个原生质

体微滴培养获得成功,培养的原生质体分裂率达65%;1994年程振东等^[12]用琼脂糖包埋法对甘蓝型油菜原生质体进行培养,培养7d后即可见到15个细胞左右的细胞团,第10d肉眼就能看到多细胞团和小愈伤组织;胡张华等^[13]以甘蓝型油菜下胚轴为材料,通过琼脂糖包埋法,建立了原生质体高频分裂及植株再生体系。

激素对原生质体的培养再生具有决定性的作用。试验证明,自开始培养到形成愈伤组织大多用2,4-D,也有用2,4-D与NAA,6-BA,KT等相结合的;将愈伤组织转入分化培养基则需降低或除去2,4-D,同时适量增加6-BA,KT或ZT^[14,15]。

将无菌苗进行4℃低温预处理,分离得到的原生质体大小均匀、胞质丰富,可明显提高原生质体活力;与未经处理的相比,其原生质体更易漂浮在液面与沉淀的杂质分开,故有利于纯化,产率也高^[16]。周书扬等^[17]比较了15℃与25℃条件下生长的甘蓝型油菜无菌苗原生质体活力,发现15℃条件下生长的无菌苗更利于获得高活力的原生质体。田志宏和孟金陵报道^[18],15℃的低温预处理培养的无菌苗,下胚轴原生质体活力达92.1%,培养7d后的细胞分裂频率达26.2%。

光照对原生质体活力影响明显。程振东等^[19]在甘蓝型油菜原生质体培养中发现,光照使原生质体分裂频率提高1倍左右。但白菜型油菜不同,如果种子在光照条件下培养,子叶原生质体易于破碎,根本不进行分裂^[16]。依物种不同,光照强度和光质不同,其结果差异较大。

在芸薹属原生质体培养中存在褐化和集聚两大问题。漂浮在液体培养基表层的细胞易于分裂和进一步生长,沉在底层的则往往死亡或难以进一步分裂。通气和早期的快速生长是解决褐化问题的关键。在油菜中,一般采用Ficoll或高浓度的蔗糖溶液使原生质体漂浮在液体的表面,从而使原生质体与碎片分开,达到纯化的目的,同时也解决了通气的问题。这种方法不仅能促进原生质体早期分裂和快速生长,尽早使细胞在褐化之前就转到新的培养基上,而且能在转至固体培养基后很快分化,从而提高了分化率,缩短了原生质体再生周期,大大减轻或避免了褐化。集聚可使褐化加重,从而降低再生率。在原生质体培养中,可用低熔点琼脂糖半固体薄层漂浮法,使包埋的原生质体漂浮在液体表面,防止原生质体集聚,减少因集聚而引起的褐化,又改善了通气状况,从而使分裂频率比液体浅层培养有大的提高。同时在培养后每隔7d加入0.1%的硫代硫酸钠的稀释液,抑制酚类物质的形成,控制了细胞团的褐化,植板率达2%~5%^[18]。

(二)原生质融合(体细胞杂交)及其应用

1. 原生质融合

原生质融合有对称融合和非对称融合。对称融合一般是指种内或种间完整原生质体的融合,可产生核与核、胞质与胞质间重组的对称杂种,并可发育为遗传稳定的异源双二倍体杂种植株;非对称融合是用物理或化学方法处理原生质体,使一方细胞核失活,或使另一方胞质基因组失活,再进行的原生质体融合。

一般的诱导融合是用双亲原生质体进行,它们带有各自亲本的全部遗传信息。从尽量减少种间不亲和性障碍的角度来考虑,多采用不对称细胞杂交、胞质杂交或微细胞杂交等非对称融合途径。但由于远缘组合中存在着双亲染色体的相互排斥现象,诱导融合后常常自发地发生两个亲本或一个亲本的基因组部分丢失,从而形成不对称杂种细胞。诱导融合常常与再生能力不良、育性下降有关。胞质杂种提供了细胞核以外遗传物质异源性融合的机会,其结果可以得到一系列的核质组合。与一般细胞杂种不同,胞质杂种只具有一个亲本的核基因组,但有双亲的细胞质。

一般在融合产物中叶绿体与线粒体是独自组合的。通常在诱导融合后的再生植株中只有一个亲本的叶绿体,虽然在融合产物的后代也发现过有双亲叶绿体混合的情况,但甚少发生叶绿体DNA重组或者是很难测到。在对称细胞杂种中叶绿体分离是随机的,而在不对称细胞杂种中是偏倚的,

其程度与细胞核不对称程度有关。至于线粒体的情况较为复杂,在从原生质体培养得到再生植株时,它们还常常会发生分离。在诱导融合的愈伤组织或再生植株中,经常可见到各种非亲本的线粒体 DNA(mtDNA)类型;有的加入到亲本 mtDNA 中,甚至取代了亲本的 mtDNA,因此常常测到两个融合亲本的 mtDNA 片段或是新片段,这是 mtDNA 重组的证明^[119]。

2. 应用

1983年,法国农业科学院的 Pelletier 等^[120]将由线粒体基因组控制的具雄性不育基因的甘蓝型油菜和由叶绿体基因组编码的具抗莠去津基因(除草剂抗性)的白菜型油菜通过原生质体融合,组成了一种全新的甘蓝型油菜类型,它同时表现出抗莠去津和细胞质雄性不育的特性。线粒体和叶绿体均为母性遗传,将这两种性状结合在一起是常规有性杂交无法做到的,这一工作可以被认为是原生质体融合技术在芸薹属作物改良中应用的开端。随后,Chuang 等^[121]利用原生质体融合也得到了具抗莠去津基因的波里马不育系。

胡琼等^[122]利用原生质体融合技术,获得了甘蓝型油菜品种中双4号与新疆野生油菜野油18的对称性体细胞杂种,杂种当代的6株植株中有2株雄性不育;用中双4号做轮回亲本与不育株回交,不育株率随回交代数增加而升高,到BC4代不育性稳定;经检测表明,该雄性不育胞质与Pol不育胞质不同。梅德圣等^[123]利用甘蓝型油菜与诸葛菜、新疆野生油菜进行体细胞杂交,产生甘蓝型油菜雄性不育材料NO CMS和NSa CMS,该不育材料的恢保关系明显不同于陕2A CMS和波里马 CMS的细胞质雄性不育材料,其不育性由单隐性核基因控制。

Heath 等^[124]运用原生质体融合技术育成了低亚麻酸含量的甘蓝型油菜植株,含量仅3.4%,而生产品种在5%~10%,且含油量由29%上升到36%。此外,原生质体还可以作为受体,进行基因转化获得转基因植株,如程振东等^[125]利用PEG法把外源基因导入甘蓝型油菜原生质体并获得了再生植株。

第二节 油菜基因工程

20世纪90年代以来,基因工程不断取得重大进展,基因合成、扩增技术、基因修饰技术、基因克隆技术、基因芯片技术以及新型表达载体等新技术、新方法不断涌现;功能基因的分离、克隆和开发应用,转基因植物和动物技术等有了重大突破。21世纪以来,模式植物拟南芥和水稻基因组图谱的完成,为植物改良和培育高产、优质、抗逆的农作物新品种奠定了基础。随着其他模式植物基因组的破译,后基因组时代的到来,确定所有的基因及其表达图谱,了解基因所编码蛋白质的空间结构、修饰加工和蛋白质之间的相互作用等将是新的生物科技发展热点。在基因工程的发展中,基因组学被认为是21世纪最重大的科研计划之一,有人甚至将其与当年的原子弹计划,当今的航天计划相提并论,是当前生命科学和生物产业的重要创新源泉。

模式植物拟南芥基因组全序列已于2000年公布,整个基因组共有1.2亿个碱基对,包含25000个基因。油菜与拟南芥的功能基因有高达86%的同源性,利用拟南芥基因组学研究中发掘和积累的知识、信息和资源来开展油菜基因组学研究,将会极大地促进油料作物的遗传改良。多国合作的芸薹属基因组计划已经成为芸薹属基因组学和遗传学的研究重点,且该计划强调考虑公共资源的协调利用,信息的释放和交流,其内容主要包括标准遗传图谱构建、作图群体创建、SSR标记开发、甘蓝基因组序列研究等(<http://www.brassica.info>)。多国合作的白菜基因组计划旨在对550Mbp的白菜基因组进行测序,第一阶段工作已经完成,内容包括澳大利亚、加拿大、法国、德国、韩国、英国和美国等国在内的研究小组对1101000 BACS末端测序^[126]。

目前,英、德、法、加等国已启动各自的油菜基因组研究计划,在油菜基因组全序列及其功能基因

组的研究上已取得部分阶段性成果。有关人士认为,不久,国外具有自主知识产权的油菜基因成果将有可能造成对我国油料产业发展的挤压,因此,我国计划每年投入不少于100万元的经费,开展油菜功能基因组研究。其主要内容是研究与油菜高产、抗病、抗虫、抗逆等有关的基因的位置、结构及其具有的功能。从研究单条染色体开始,绘制出有关染色体的物理图谱,最终为培育高产、优质等综合性状强势的油菜新品种而获取一批实用基因。中国农业科学院油料研究所现已专门成立了“油菜功能基因组计划学术委员会”以及“协调工作领导小组”,负责对该研究计划的项目立项、研究目标、研究内容、技术路线、考核目标等予以论证和评审,并由协调领导小组对项目实施过程中涉及的学科交叉等一系列工作关系予以统筹协调,在仪器设备和实验条件等方面予以优先配套支持(《农民日报》,http://www.monsanto.com.cn)。

一、分子标记技术在油菜育种中的应用

遗传标记有形态标记、细胞学标记、蛋白质(同工酶)标记和分子标记。分子标记是20世纪80年代随着分子生物学及分子克隆技术的发展和完善而诞生的。它直接反映DNA结构的遗传变异,与传统遗传的标记相比,具有标记数量大、不受外界环境和组织发育阶段的影响等优点。

目前,用于油菜的分子标记主要有RFLP(Restriction fragment length polymorphism,限制性片段长度多态性)、RAPD(Random amplified polymorphic DNA,随机引物扩增多态性)、AFLP(Amplified fragment length polymorphism,扩增片段长度多态性)、SSR(Simple sequence repeat,微卫星标记)和SRAP(Sequence-related amplified polymorphism,相关序列扩增多态性)等。这几种分子标记技术在油菜遗传图谱绘制、功能基因定位、标记辅助选择育种、亲缘关系及资源遗传多样性评估等方面都已得到深入研究 and 广泛应用,为开发油菜新品种、提高产量、改善品质、增强抗性提供了空前的发展机遇。

(一) 构建遗传图谱

传统的遗传图谱是利用形态学、细胞学以及蛋白质标记构建的,在遗传学研究中起过重要作用。近年来发展起来的遗传图谱是利用分子标记方法找出做图群体的标记位点,检测位点间的连锁,从而把标记之间的顺序和遗传距离算出来,再绘制出遗传连锁图。用分子标记构建的遗传连锁图谱可以大大提高图谱的“饱和”程度,深入了解基因组的全部序列和遗传信息,为基因定位和克隆奠定基础。同时,大多数重要的农艺性状特别是产量性状又属于数量遗传,对它们的遗传分析和育种操作均较困难。利用高密度的分子标记图谱和区间作图法,可以将复杂的多基因数量性状(QTLs)分解成若干单一的遗传组分进行分析,并将它们一定位在相应的连锁群中,从而可以精确地分析控制数量性状的基因的数目、功能及基因间的互作,并进一步对这些基因进行操作^[126]。

在构建遗传图谱中,常用的群体有 F_2 、DH(双单倍体)、RIL(重组自交系)和BC(回交群体)等。DH群体是永久性作图群体,便于进行连续性研究及不同实验室间的交流,对于数量性状的定位,用 F_2 等群体的单个植株估计往往不可靠,DH群体是遗传分析的理想群体,但由于控制小孢子胚产量基因是多等位基因呈加性效应,DH群体产生过程会发生严重的偏离DNA分子标记的偏分离现象,这与小孢子胚胎发生能力有关。而一些芸薹属种类小孢子或花粉培养并不容易,很难建立DH群体。RIL群体也是永久性群体,利用该群体可通过在不同地点、不同时期的生长调查,更能直接精确地评价数量性状的误差。

1990年,美国学者率先发表了芸薹属甘蓝的RFLP遗传图谱,从而揭开了构建油菜及其相关物种遗传连锁图的序幕。2002年文献报道,仅甘蓝型油菜就至少有10份遗传连锁图谱已公开发表^[127]。根据人工合成甘蓝型油菜(已知连锁群的基因组来源)与天然甘蓝型油菜杂种后代的RFLP分析,已能确定甘蓝型油菜中分属于A和C基因组的连锁群及其部分同源关系。利用附加系做材

料进行研究,在寻找到附加系识别标志的同时,也把分子标记连锁图与细胞遗传学图整合起来,把连锁群落实到特定染色体上。

在甘蓝型油菜基因图谱的构建方面,20世纪90年代,大多采用 RFLP、RAPD 和同功酶来进行标记,如 Landry 等^[129]用 RFLP 分子标记,构建了含 126 个标记位点,覆盖长度为 1 413cM 的连锁图谱,绝大部分位点分布于 19 个连锁群中,并认为覆盖甘蓝型油菜基因组需 400~500 个遗传标记;Uzanova 等^[129]用两个冬油菜品种的杂交 F_2 代双单倍体群体,构建了包含 204 个 RFLP 标记,2 个 RAPD 标记和 1 个表型标记的甘蓝型油菜连锁图,组成了 19 个连锁群,总长度为 1 441cM,可能已覆盖了甘蓝型油菜基因组一半的长度;Foisset 等^[130]用 152 个 DH 群体,通过 254 个 RAPD、RFLP 和同功酶标记分析,得到了总长度为 1 765cM 遗传图谱,覆盖了 19 个连锁群,包括了油菜基因组的约 71%,等等。

21 世纪以来,用于构建遗传图谱的分子标记逐渐增多。李加纳等^[131]利用 F_2 群体的 132 个单株作为构群体,对 F_2 群体中具有多态性的 295 个 AFLP、SSR、RAPD 及 SCAR 标记进行遗传连锁图谱构建,获得含 174 个标记遗传图谱,分布在 22 个连锁群上,总长度为 2 688.5cM,标记间平均距离为 15.5cM。Plieske 等^[132]利用 1 001 个 SSR 和 395 个 SNP 标记构建了一个具有 1 645 个位点的甘蓝型油菜遗传图谱,这些标记分布在 19 个连锁群上,覆盖了油菜基因组 2 263.5cM 的序列。李媛媛等^[133]以甘蓝型油菜自交不亲和系与其恢复系组配得到的 184 个 F_2 单株为群体,构建甘蓝型油菜遗传图谱,该图谱共包含 21 个连锁群,137 个 SRAP 标记,143 个 SSR 标记和 118 个 AFLP 标记,图谱总长 1 949.8cM,标记间平均图距为 4.9cM,并认为 SRAP 标记体系可能是比 AFLP 标记更适合于图谱的构建。陆光远等^[134]在显性细胞核雄性不育系 Rsl046A 和双低油菜品种 Samourai 构建的回交分离群体中,运用 AFLP 和 SSR 两种标记技术构建了一个甘蓝型油菜的分子标记遗传连锁图谱。该图谱共包含 138 个 AFLP 标记,83 个 SSR 标记和 1 个形态标记,分布于 18 个主要连锁群上,图谱总长度为 2 646cM,显性细胞核雄性不育基因 Ms 被定位到第 10 连锁群上。Lombard 等^[135]构建的整合图包含较多的位点数,覆盖了几乎整个甘蓝型油菜基因组,位点间的平均距离只有 4.5cM,基本上趋于饱和。

在芥菜型和白菜型油菜基因图谱的构建方面,Cheung 等^[136]利用芥菜型油菜双低和高含油量品系杂交 F_2 形成的 DH 群体,通过 RFLP 标记,构建了一个总长为 2 073cM,具有 343 个分子标记位点的遗传图谱。Chyi 等^[137]用 269 个基因组 DNA 克隆做出了含 360 个标记座位,长度为 1 877cM 的白菜型油菜的详细分子标记图谱,图谱中的分子标记都集中于 10 条连锁群上,这些连锁群可能分别对应于 A 基因组中的 10 条染色体。Gupta 等^[138]采用 AFLP、RFLP 和 SSR 标记构建了一张包括 1 432 个标记的高密度的芥菜型遗传图谱,利用这个图谱,对控制芥酸合成的两个基因 FAE 的 SNPs 定位在连锁图谱上,两个控制种皮色泽的基因被定位在 SSR 标记附近。

甘蓝型油菜遗传图谱和基因定位的研究已取得较大进展,但是有些问题尚待进一步研究。首先,连锁图中许多标记座位间图距相对较小,但在每一个连锁群上都有一些区域的毗邻标记间图距较大。这些大图距可能代表着“重组热点”,或归因于这些区域作用探针的 DNA 克隆较少,因而造成图谱不很饱和的缘故。因此,连锁图的饱和程度还不能满足育种工作的要求,尚不足以进行基因操作。虽然有很多控制重要农艺性状的基因已经定位在连锁图上,但甘蓝型油菜的基因组较大(约 1 150Mbp),缺乏重要经济性状的功能基因限制了油菜基因工程的发展^[139]。其次,目前的连锁图大多是以 RFLP 标记绘制的。由于各个实验室构建的 RFLP 图谱所用的探针不同,各种图谱可比性不是很大,需要将图谱中的 RFLP 标记转化成 PCR 标记。只有选用永久性的作图群体,利用可比性分子标记才能有利于不同实验室之间的研究交流,从总体上探索芸薹属的进化关系^[140]。

(二) 功能基因定位

1. 种皮颜色基因

李加纳等^[131]利用遗传图谱对控制甘蓝型黄籽油菜种皮色泽进行了 QTL 分析,共检测到分布在 2、5 及 19 三个不同的连锁群上的 6 个 QTLs 位点,解释表型变异 8% - 61.6%,其中有 3 个 QTL 位点贡献率都在 60% 左右。梅澹圣等^[140]应用 AFLP 和 SSR 标记对甘蓝型油菜渝黄 1 号的黄籽性状进行研究,鉴定出与显性黄籽基因连锁的 1 个 AFLP 标记 E35M52180 和 1 个 SSR 标记 PO39230 标记,它们与显性黄籽基因的交流率分别为 4.9% 和 2.5%。

2. 油脂成分基因

Uzunova 等^[132]将 4 个与硫甙含量有关的 QTLs 分别定位于第 2、9、16 和 18 连锁群上,这 4 个 QTLs 分别可解释亲本表型变异的 74% 和 DH 群体表型变异的 61.7%。Toroser 等^[141]检测到 5 个影响种子总硫甙含量的 QTLs,可解释 71% 的表型变异。刘雪平等^[142]利用 RAPD 标记对花色与芥酸含量的关系进行了分析,结果表明白花与高芥酸紧密连锁,重组频率为 5.8%;采用 BSA 法,筛选到 1 个与黄花和低芥酸含量紧密连锁的 RAPD 标记 S92-1400,图距分别为 2.2cM 和 5.4cM。Jourdrea 等^[143]应用 RAPD 标记和双单倍体 (DH) 后代的混合分离分析方法,绘制了与油菜 α -亚麻酸 (C18:3) 基因连锁的遗传图, QTL 分析清楚地表明 α -亚麻酸存在两个主要的 QTL 位点,它们占表型变异的 71%。Barkowiak-Broda 和 Poplowska^[144]利用 RAPD 标记在低硫甙 cms 系与高硫甙恢复系杂种的 F₂ 中,筛选低硫甙及纯合恢复基因植株,解决了甘蓝型油菜 Ogu cms 恢复系的恢复基因与硫甙基因连锁的问题。

3. 不育基因

在细胞核雄性不育 (CMS) 研究中,廖颖和陈林蛟^[145]用 RAPD 从白菜型油菜核不育两用系中筛选出了 1 个与白菜型油菜育性基因连锁的 RAPD 标记,该 DNA 片段大小约 0.72kb,与育性基因之间的遗传连锁距离为 6.08cM。陆光远等^[146]通过 BSA 法对油菜核不育材料进行分子标记,找到了与不育基因紧密连锁的两个 AFLP 标记 (EA03MC1599 和 EA07MC01235)。徐金星等^[147]通过甘蓝型雌性核不育材料与具有紫茎苗期形态标记材料杂交及后代家系跟踪分析,证实 P6-9 紫茎性状与可育性状的连锁关系,其交换值在 1.9% - 8.5% 之间。王俊霞等^[148]采用恢、保回交群体和集群分离法 (BSA),筛选了 860 个随机引物,找到了与甘蓝型油菜波里马细胞质雄性不育系 (Pol cms) 育性恢复基因 (Rf) 连锁的两个 RAPD 标记 AH19690 和 AH16630。Delourme 等^[149]从 138 个随机引物中筛选出与油菜 ogu CMS 育性基因紧密连锁的 4 个 RAPD 标记片段,证实带有恢复基因的萝卜 F 染色体片段通过同源重组转移到 DY 第 15 连锁群。这些标记的发掘,对运用分子标记辅助选择技术来改良显性细胞核雄性不育两型系及其恢复系具有重要意义。

4. 性状基因

谭小力等^[150]利用 RAPD 标记,结合近等基因系和集群分离法,得到了与控制花瓣性状基因紧密连锁的分子标记 S352-580,并通过对比无花瓣品系和有花瓣品种的标记进行了验证。Foisset 等^[151]发现 RAPD 标记 OPM07-730 与甘蓝型油菜矮秆基因位点紧密连锁。Monkolporn 等^[152]利用 BSA 法分析 F₂,发现与抗寒裂性有关的 3 个 RAPD 标记。Ferreira 等^[153]将控制甘蓝型油菜开花时间的单个主效基因定位于 RFLP 图谱的第 6 连锁群上。Osborn 等^[154]也发现对甘蓝型油菜开花时间影响最大的 QTL 位于第 6 连锁群上,另外两个有较大影响的 QTL 分别位于第 12、16 连锁群上,这 3 个 QTLs 可以解释 2/3 以上的表现型变化。张书芬等^[155]运用 SRAP、AFLP 和 SSR 三种标记构建了遗传图谱,并对油菜株高和分枝高度进行 QTL 定位,共检测到 7 个与这些性状相关的 QTLs 位点,单个 QTL 解

解性状表型变异的变幅 8.5% ~ 54.6%。

王丽侠等^[161]在用拟南芥 EST 克隆和油菜 DNA 克隆做探针定位了甘蓝型油菜一系列重要性状的基础上,对 25 个与油菜雄性不育恢复基因、磷高效利用基因、抗菌核病 QTL 及油菜种间杂种营养优势相关联的克隆进行了测序,在拟南芥基因组数据库中寻找到与这 25 个克隆高度同源的序列,根据这些高度同源序列在拟南芥染色体上的相对位置,将油菜 DNA 克隆整合到了拟南芥遗传图谱上,表明了利用基因组间的相互比较作用来精确定位芸薹属作物重要基因的可能性。

(三) 分子标记辅助选择

分子标记辅助选择(MMAS)是通过分析与目标基因紧密连锁的分子标记来判断目标基因是否存在,即对目标性状进行间接选择,从而提高育种效率和育种过程的预见性,达到对作物产量、品质、抗性等综合性状的改良。有些杂交变异早期无法鉴定和筛选,如产量、品质、成熟期等,有些特异性变异则需在逆境条件下才表现,如抗寒、抗旱、抗盐碱等。常规育种在性状选择时,相当数量的优良性状因群体和环境条件的限制而被过早淘汰,如果利用与目标性状紧密连锁的分子标记的追踪和对数量性状的标记,便可在早期准确定位一些其他方法难以确定的目标性状。一些优良性状不仅能够早代选择,而且不需创造逆境条件,这样就大大减少世代间隔和育种的盲目性。与表型选择相比,分子标记辅助选择具有省时、省费、简单、不受外界环境和发育阶段的影响、多态性丰富等优点,并且许多分子标记呈共显性,能够提供完整的遗传信息,从而给植物品种改良带来了一场革命,把育种技术从宏观水平提高到分子水平,已成为作物品种改良的前导技术。

目前分子标记辅助选育主要用于目标基因的研究和转移。Thormann 等^[162]将与控制黄色种皮的基因 Y1s 紧密连锁的分子标记位点用于高油酸品种选育的早期鉴定。王俊霞等^[163]用 BSA 法从 860 个随机引物中筛选出与 Pol cms 育性恢复基因(RF)连锁的 2 个 RAPD 标记 AH 19.690 和 AI 16.830,现已把这 2 个 RAPD 标记用于选育 Pol cms 新恢复系的研究。Kuginaki 等^[164]利用由欧洲型油菜引入的白菜抗性材料,发现 3 个标记同抗性主效基因连锁,由此推测芸薹种的抗性同欧洲型油菜一样,均由 1 个主效基因加上一些微效基因控制。Pleske 和 Struss^[165]利用 AFLP 和 RFLP 对甘蓝油菜黑胥病抗性性状进行标记辅助选择,从而达到对作物产量、品质及抗性等综合性状的改良。易斌等^[166]采取复合区间作图法,检测到与油菜产量及其相关性状有关的 QTL 共 17 个,其中与主效 QTLs 连锁的标记,可用于油菜产量性状的分子标记辅助选择。

分子标记辅助选择的 QTL 定位目前只是初级定位,很少能做到精细定位。DNA 分子标记在质量性状的辅助选择方面已初显成效,并逐步应用于作物数量性状改良。随着分子生物学技术的日新月异及分子数量遗传学的进一步发展,QTL 定位的准确性及 QTL 作图效率将会进一步提高,分子标记技术与传统育种手段结合将会大大加速作物改良进程。

(四) 亲缘关系及资源遗传多样性评估

近年来,我国用分子标记分析油菜的亲缘关系已经取得了很大进展。所用的分子标记有 RFLP、RAPD、AFLP、SSR 和 ISSR 等。许多文献报道,应用分子标记,能够对不同的种质资源进行精确、系统的区分,为选育杂交种提供了重要的理论基础。通过对不同地理来源和个体水平差异的白菜型油菜、甘蓝型油菜、芥菜型油菜等进行指纹图谱分析,表明这些品种和材料之间具有丰富的遗传多样性^[167-169]。形态标记与分子标记所揭示的遗传差异并不总是一致的,形态标记与分子标记相结合是构建作物核心种质资源的有效方法。

马朝芝等^[164]利用 ISSR(intersimple sequence repeats)技术比较了 24 份中国半冬性、瑞典冬性和瑞典春性甘蓝型油菜的遗传多样性,结果表明研究所用的中国半冬性油菜与瑞典冬性油菜的遗传关系比瑞典春性油菜的关系近,ISSR 技术是估计油菜种质资源遗传多样性的有效手段。陈碧云等^[167]

以2004-2005年度全国冬油菜区试的89份参试品种为材料,运用筛选确定的4对AFLP核心引物对这些品种进行分子标记分析,聚类结果显示,同一单位育成的品种的遗传距离较近;三系杂种的遗传多样性程度最高,常规种居中,两系杂交种最低。雷天刚等^[166]利用42对SSR引物对19个甘蓝型黄籽油菜品种(系)进行遗传多样性分析,对SSR扩增结果进行UPGMA分析,可将19个品种(系)分为4个群体,聚类结果与系谱来源比较一致,并且只需NAS99、NAS98、NAS91及NAS31共4对多态性高的引物即可将19个材料区分开来。

蒲晓斌等^[167]选取以西南地区为主的73份芥菜型油菜资源,分别进行14个随机引物RAPD标记多态性分析,聚类分析结果显示为三大类,四川盆地资源为第一大类,盆周及盆周高原和云南部分资源为第二大类,云贵高原及长江两岸为第三大类。西南地区芥菜型油菜资源间差异明显,具有丰富的遗传多样性,分类主要遵循地域和生态环境规律。李宗芸等^[168]利用基因组原位杂交(CISH)技术,研究了甘蓝基因组与芸薹其他5个近缘物种基因组间的相互关系,结果表明,在长期的进化过程中,甘蓝与白菜型油菜、甘蓝型油菜的亲缘关系较近,基因组的分化程度较小;而甘蓝与黑芥的亲缘关系较远,基因组的分化程度较前者高;甘蓝与芥菜型油菜和埃塞俄比亚芥间的亲缘关系介于上述二者之间。赵志伟等^[169]参照拟南芥BAN基因和cDNA的保守序列设计引物,对甘蓝型、白菜型、芥菜型油菜、拟南芥及其他十字花科栽培品种的基因组总DNA进行PCR扩增,均获得与拟南芥BAN基因扩增片段大小极其相似的PCR扩增产物,表明BAN基因可能广泛存在于十字花科植物中。

(五) 品种和杂交种的纯度鉴定

根据指纹图谱来鉴别油菜品种已在美国、澳大利亚和法国成功应用。利用分子标记可以比较快速、准确地鉴定杂交品种的混杂情况,了解杂交制种中假杂种的来源,为品种审定、保存、保护提供依据。在品种纯度鉴定方面,选择合适的引物进行标记分析,不仅是杂交品种种子纯度分析的有效手段,而且通过多种引物的交互使用,也是进行品种之间鉴别和资源保护的重要方法之一。

穆建新等^[170]通过对100对SSR引物筛选,获得了1对可将杂交油菜泰优7号及其亲本区分开来的SSR引物SA82,扩增产物杂交种表现为双亲的互补带型。干滢等^[171]以100个随机引物对蜀杂6号的亲本进行RAPD分析,将RAPD标记转化为特异序列扩增标记(SCAR),建立了用SCAR-PCR检测杂交油菜蜀杂6号杂种纯度的方法,将待鉴定100个单株中的5个不育单株标记为假杂种,与田间育性调查的结果完全一致。刘杰等^[172]采用RAPD分子标记技术对育成的油菜新品种杂油59的亲本和 F_1 代种子纯度进行了鉴定,找出了双亲的特征带,在 F_1 中这两条带互补,且结果稳定。Lombard等^[173]用17个AFLP引物分析了83个甘蓝型油菜品种的遗传关系,表明AFLP标记能准确地鉴定品种。Charters等^[174]用SSR引物分析了20个甘蓝型油菜品种,2个引物产生的56条多态性带将20个品种明显区分开。这些研究结果从DNA水平上反映基因的多态性,为快速准确鉴定品种和杂交种提供了技术支撑。

(六) 遗传距离与杂种优势

不同地区的油菜品种具有不同遗传特征,分子标记可以用来研究和分析油菜品种间、种属间的遗传距离,从而了解亲本的遗传背景,为选配组合提供参考。Lefort-Buson等^[175]研究认为,油菜遗传距离与株高和产量的超亲优势高度相关,但其估计值并不总能鉴定最好组合。胡胜武等^[176]报道,亲本遗传距离与杂种产量、产量杂种优势、特殊配合力的相关关系都未达到显著水平,表明不能根据亲本RAPD遗传距离的大小预测杂种产量及产量杂种优势。于澄宇等^[178]等认为,同工酶和RAPD显示的遗传变异与农艺性状的QTL的相关性不明确。沈金雄等^[177]还认为SSR及ISSR标记的遗传距离难以预测甘蓝型油菜杂种产量、含油量及其优势。

基因型杂合性与杂种优势的相关性在不同物种、不同类型、不同地域材料或不同方法中存在很

大差异。从理论上讲,如果目标性状杂种优势产生的原因是显性效应引起的,根据中亲优势和遗传距离的函数,则杂合度(或遗传距离)与杂种优势呈直线回归关系,预测效果好;反之,若二者不存在直线关系则难以用于预测。在弄清杂种优势的遗传基础及表达之前,用遗传标记做杂种优势的预测将难以获得满意的结果。

二、油菜转基因育种

(一) 油菜转基因育种概况

目前,我国面临着人口持续增长、耕地仍在减少、水资源严重匮乏、生态环境日益恶化、人们需求增加等一系列的问题。先天脆弱的生态环境,庞大的人口规模、长期的过度开发、快速的工业发展,以及社会各项事业发展中科学规划不够等因素,加剧了我国生态退化的程度和速度,导致了多种生态和环境问题同时存在并相互影响,生态环境“局部改善、整体恶化”的态势没有得到根本扭转。

最近,世界银行发表的《用于发展的知识》报告中,把以转基因植物为核心的“生物技术”作为促进农业发展、满足食物需求、提高农民收入的最好途径。采用生物技术手段,以及生物技术和传统农业相结合的方式,是保证世界 21 世纪农业可持续增长和解决未来 80 亿~100 亿人吃饭问题的最佳途径(“农业生物技术与生物安全的现状及对策”,中国作物种质资源信息网, <http://www.labbase.net/News,2007-08-05>)。世界各国已普遍注意到,生物技术还将在解决人口、健康、环境、能源等诸方面的社会经济重大问题中发挥重要的作用,成为 21 世纪国民经济发展的支柱产业。生物技术及其产业的发展,将真正实现科技含量高、经济效益好、资源消耗低、环境污染少、人力资源和自然资源优势得到充分发挥的新型现代化产业发展之路,是实现高效农业的重要手段,包括培育高产、优质、抗逆境、植物新品种等。

随着转基因农作物的大规模推广,经济效益将会成倍地增长,同时,将会有更多的转基因作物新品种源源不断地推向市场。有人预测,到 2010 年全世界 90% 以上的农作物可能是经过基因工程改良的转基因植物。经过十多年的努力,目前我国已克隆出抗病、抗虫、抗病毒、抗逆、雄性不育、品质改良及发育方面的基因;建立了多种主要农作物的遗传转化技术,应用这些转化技术已获得具有不同性状的转基因植物进入中试或大田试验,有些已进入商品化阶段。抗虫水稻、抗病马铃薯、抗虫玉米等均进入了田间试验阶段,预计近几年内即可进入商业化生产阶段。此外,在抗旱耐盐生物技术育种、品质改良生物技术育种以及人工创造雄性不育等方面的研究均取得了重要的进展(<http://icgr.caas.net.cn/paper>)。

(二) 油菜转基因育种进展

用于油菜遗传转化的方法主要有显微注射法、基因枪轰击法、激光微束穿孔法、聚乙烯醇法、电击穿孔法、农杆菌介导法等,其中农杆菌介导法是应用最广泛和最成功的方法,在油菜中约有 80% 的遗传转化是由农杆菌介导转化的。这种转化方法包括根癌农杆菌和发根农杆菌介导的转化法。对甘蓝型油菜进行转化结果显示,发根农杆菌转化效率比根癌农杆菌低,并且发根农杆菌转化易引起转基因植株形态的改变,所以大多数研究选择了根癌农杆菌作为遗传转化载体。1986 年 Mathews 及其合作者首先将 NPTII 基因利用根癌农杆菌介导法转入芥菜型油菜中,自此以后,油菜的基因转化研究在三大类型油菜的抗性、品质改良、杂种优势等方面都相继取得了突破性进展。目前,通过农杆菌介导法,利用油菜的下胚轴、子叶柄、子叶原生质体、小孢子等为外植体,已经成功地将外源基因导入油菜中,并且得到了转基因植株,育成了一些转基因油菜品种并在生产中应用。

王道杰等(1999)已将烟草花叶病毒基因和花椰菜花叶病毒外壳蛋白基因分别转入白菜型油菜和甘蓝型油菜中,使转基因植株获得抗病性^[75]。通过子叶柄与农杆菌共培养,将表达载体 pBt₀ 中

科杂草的基因漂移率,表明抗性油菜对芥菜、碎米荠、播娘蒿、猪鬃蒿、凤花等7种十字花科杂草无生态风险,抗性基因漂移率为零。在自然授粉条件下,除草剂油菜的抗性基因不会通过花粉漂移到十字花科杂草上,种植转基因油菜对被鉴定的7种十字花科杂草是安全的。

实际上,转基因油菜和其他转基因作物在食品、农业和环境层面上都面临同样的安全性问题,不同的食品加工和食用方式,不同的农业区划和环境特点以及不同的社会习俗、社会形态和社会发展阶段对转基因作物的安全性要求也各不相同。这些因素自然反映到国家乃至国际法律层面上^[10]。因此,在启动转基因油菜的项目时,除了充分考虑所转基因的知识产权、转基因作物的农业价值外,还必须对上述安全性问题做出周密的计划。

第三节 贵州油菜生物技术研究概况及展望

一、贵州油菜生物技术研究进展

(一)20世纪80年代研究概况

1. 花药培养

贵州油菜生物技术研究起步还是较早的,贵州省农业科学院中心实验室^[11]在1977年就进行了油菜花药组织培养的研究。试验选用46个杂交一代组合材料,分别采用附加激素的N₁和MS培养基进行愈伤诱导和芽的分化。试验结果表明,一般在接种后20~35d内形成的愈伤组织绿苗分化率较高,形成愈伤组织的时间愈晚则愈伤组织绿苗分化率也愈低;在相同培养基及培养条件下,不同材料有着不同的愈伤组织及绿苗诱导率,体现了材料的遗传异质性;两亲本诱导率均强的杂交组合其诱导率中等;两亲本诱导率均弱的杂交组合其诱导率也更弱;两亲本诱导率一强一弱的组合其诱导率中等;不同杂交方式中,正反交的组合有不同的诱导率,母本的影响大于父本而起主导作用,因此在花药培养中,当选配亲本进行单倍体育种时,应把亲本性状最优良且诱导率较高的材料作为母本,以得获得更多苗株,增加选择机会。

2. 油菜子叶节和下胚轴的快速繁殖

贵州农学院(现贵州大学)的杨业正等自1982年起,陆续研究报道了油菜子叶节和下胚轴的快速繁殖,建立了以此为起始外植体的快繁体系和获得了再生植株。将甘蓝型、芥菜型油菜的子叶节和下胚轴切段培养在含有不同激素成分的B₁培养基中,在25℃和每天8h光照和条件下培养,芥菜型油菜品种的1个子叶节经14d培育后可形成9个芽,甘蓝型油菜品种的1个子叶节经28d培育后可形成6~10个芽。芽经分割成单芽后转移到同样培养基上和在同样条件下培育,芥菜型材料每隔14d可由1个单芽形成具有7个芽的芽簇;甘蓝型材料每隔28d可形成具有6~10个芽的芽簇。把芽簇分割继续繁殖,在无激素的B₁培养基中诱导生根,成功地诱导出了大量愈伤组织和分化出了一些幼苗,证明了油菜营养器官在组织培养中脱分化较易,再分化亦不难。利用该技术快速繁殖的油菜自交不亲和系,其植株的外形均保持原品种特性^[11,12,13]。

在B₁基本培养基中单独加0.5mg/L的2,4-D即可促进油菜子叶和下胚轴脱分化而得到很高的愈伤组织诱导频率;再附加0.2mg/L的6-BA则可促进愈伤组织的生长。当KT或6-BA的浓度为1.0~5.0mg/L,且附加0.2~0.5mg/L的NAA时,可得到较高的愈伤组织诱导频率且分化出芽;将芽转到无激素的培养基中可再分化出根成苗^[13]。6-BA、ZT及KT单独使用或与IBA配合使用对种子发芽势和发芽率均无明显影响。在抑制苗的伸长、诱导形成多芽苗及根的生长方面,BA的效果最显著,ZT次之,KT无效或效果不明显^[13]。6-BA的浓度在0.1~12.5mg/L的范围内,3种

类型(甘蓝型、芥菜型和白菜型)油菜种子的发芽势和发芽率无显著差异,但随6-BA浓度增加,幼苗顶芽和根的生长均受抑制;在此浓度范围,芥菜型油菜多芽苗的诱导频率最高,甘蓝型油菜次之,而白菜型油菜最低^[11]。

杨业正采用芥菜型油菜品种遵义竹枝探讨了棉花脱叶剂TDZ对无性系快繁的效应,结果表明,无论以纯品的10% DMSO溶液或可湿性粉剂Dropp水悬浮液的形式加入到B₅培养基中,均能比6-BA更有力地诱导形成多芽苗;在芽簇继代繁殖中,TDZ促进芽苗增殖的能力比6-BA大100倍以上;促进油菜芽苗快速繁殖最适TDZ浓度为0.1 μM;由TDZ诱导形成的芽簇分割出的单芽,当转移到不含细胞分裂素的培养基上后,能正常生根和形成再生小植株^[10]。

杨业正等^[10]利用油菜子叶节为外植体,研究了离体培养芽苗对温光的反应。结果表明,半冬性的芥菜型油菜品种遵义竹枝的芽簇继代时间长达1月余以上者,无论在长日或短日条件下诱导出的植株均会在培养瓶阶段就现蕾开花;“奥罗”、“托尔”为加拿大种植的甘蓝型春性油菜,芽簇经2个月以上冷处理者,无论在长日或短日条件下诱导出的植株均会在培养瓶中开花,似乎低温有促进其发育的作用。一些甘蓝型半冬性品种,其芽簇经4个月冷处理后分化出的植株会现蕾开花,而另一些半冬性品种的芽簇虽经低温处理4个月,分化出的植株仍能保持单纯的营养生长,看来归因于它们的完整幼苗需长到一定大小后才能感受低温发生春化作用,而以子叶节为外植体建立的芽簇尚不能感受低温发生春化作用。因此油菜离体培养芽苗在培养瓶阶段是否现蕾开花,既与油菜品种的温、光生态特性有关,又与芽簇保存及诱导再生过程中的温度和光周期有关。为防止春性和半冬性品种再生小植株在培养瓶阶段就现蕾,芽簇增殖和单芽生根均应在常温和短光照条件下进行。

3. 子房培养

杨业正等^[10]利用不同蔗糖浓度的B₅培养基进行了油菜子房离体培养的研究。将授粉4d后的甘蓝型油菜带柄子房进行离体培养,50d后,大都能形成具有发芽力的成熟种子。与田间同品种同部位角果比较,离体培养子房所形成的角果较短,角果数目少于在田间植株上发育的对照,千粒重亦较低。培养基中10%和15%的蔗糖浓度对形成种子较有利,15%的蔗糖浓度培养的角度结籽数目最高,附加水解乳蛋白对形成种子有良好作用。

4. 原生质体分离

杨业正等^[10]利用三种类型的油菜进行了原生质体分离的研究。结果表明,在苗龄为22~49d(全展真叶数3~10)的范围内,不同油菜类型(白菜型、芥菜型和甘蓝型油菜)及不同苗龄对酶解2h原生质体产量均无明显影响。采样时的天气状况对原生质体产量有一定影响,一般的趋势是晴天的原生质体产量比阴天的高。

(二)20世纪90年代研究概况

1. 茎段快速繁殖核不育系研究

20世纪90年代中期,贵州省农业科学院的黄先群等陆续研究报告了利用油菜茎段为起始外植体的快速繁殖核不育系材料的技术。在初花期用消毒刀片切取尚未开花的上部分茎段,用70%酒精擦拭切口进行表面消毒,用创可贴封住切口。除去叶片将茎段于0.1% HgCl₂中消毒10min,用无菌水冲洗6次后切片接种在分化培养基(B₅+6-BA 2mg/L+谷氨酸胺 2.0mg/L+KT 1.0mg/L+GA 30.5mg/L+水解乳蛋白 500mg/L)上进行分化培养,培养温度20~25℃,光照10~12h,10d左右茎段接触培养基的切面膨大,分化出愈伤组织,20d左右有芽点突起,30d左右分化出2~3cm的不定芽。将不定芽切下,接种到增殖培养基(B₅+6-BA 2~8mg/L)中培养,30d后每个芽可增殖形成3~10棵不定芽苗。将不定芽苗接种到生根培养基(B₅基本培养基)中诱导生根。培养20d左

行,每棵不定芽苗上可长出3~8条长3~8cm的根,形成完整的再生小植株^[199]。再生植株生长和结实均正常,分枝数多。比较不同分枝部位茎段分化出苗的能力,结果表明,植株中部的分枝茎段比上、下部分枝茎段的正常出苗块率高,分化苗数最多,无效苗率低^[199]。

黄先群等还研究了快速繁殖油菜隐性核不育制种技术。结果表明,父母本的行比设置以1:4较苗过程中所花费的时间和所需的人力、物力和财力,试验采用组培苗直接移栽的方法,组培苗成活率可达90%(资料未发表)。利用甘蓝型油菜核不育株茎段快繁,可在短期内获得大量遗传特性不变、丰产性较好的再生核不育植株,不育株率达100%。由于是单基因控制的隐性核不育,与可育亲本的配合力较强,应用于杂交一代种的制作,可增加制种产量,提高制种纯度,省工、省时^[199]。

黄先群等^[199]报道了10个隐性核不育系材料的植株再生能力与基因型之间的关系,认为不同基因型材料之间,其再生植株效率的差异达极显著水平。最高的SS不育系分化苗率可达60.7%,最低B₁基本培养基上,试验其对试管苗增殖和生根的调控作用。结果表明,6-BA促进试管苗增殖的适宜浓度为8~10mg/L;在生根培养基中加入适量多效唑(0.1~2.0mg/L),能有效地抑制试管苗的徒长,促进根的发育和生长,健壮幼苗,提高试管苗的抗性和移栽成活率。多效唑的后效作用还延续到育杂种及三系茎段的离体培养中发现,杂种F₁的分化出苗率、正常苗块率及每块苗数均优于其三系亲本^[200]。

2. 油菜子房和胚培养

黄先群等将油菜与诸葛菜、兰花子、白芥进行杂交。在4d后取子房进行离体培养或在授粉后35d内切取幼胚进行培养,培养基采用MS基本培养基,子房培养不添加激素;胚培养添加适量的6-BA;培养条件温度为常温,光照为光12h/暗12h。共做了78个组合,每个组合做25朵花,与兰花与这三个属间亲本杂交结实的难易程度排序:诸葛菜(结实率10.10%)(结实率:收获种子数/组合数×25) > 白芥(8.56%) > 兰花子(1.52%)(资料未发表)。

甘蓝型油菜远缘杂交组合中,选择了2个组合进行胚培养的试验,在杂交40d后切取子房进行胚培养,每个材料培养40个胚。很多胚在早期就停止了发育(约90%以上)。这类胚即使进行胚培养也不能再生长,仅有5%左右的胚能够发育(资料未发表)。F₁材料表现生长优势,可育,但结实率低,多数植株呈现萝卜角。从F₁育性的分离情况看,有全部可育(34.0%),类似核不育类型的不育株分离(44.0%),似微粉的不育类型(8.0%),全部不育(14.0%)。在类似核不育类型的分离中,Rebel×诸葛菜、Cesar×白芥组合的可育株与不育株的分离比例约为3:1,这表明其不育性是受1对核基因控制的(隐性基因控制不育性状)。

试验结果表明,仅从克服远缘杂交不孕性的角度来看,子房培养技术比胚培养技术更为经济、实用和有效。对杂后材料简单的细胞学切片观察结果,远缘杂交种子的胚乳大多发育不良,多数中途停止发育,有的弱小,有的变褐死亡。

(三)2000年以来的研究概况

1. 小孢子培养

小孢子培养的关键环节是选择合适的小孢子发育期。最适合游离小孢子培养的时期是单核靠边期和二核早期。黄先群等^[201]利用镜检、花蕾长度和开花时期综合指标进行选择。采用Hoechst荧光染色来观察小孢子的发育情况。结果在开花3~7d的3.5mm的花蕾中,观察到70%以上的小

孢子处于单核靠边期。单核靠边期小孢子所占比例大,诱导率高。通过荧光染色观察,就试验所用
的甘蓝型油菜材料而言,一般1.5mm花蕾的小孢子处于四分体时期和单核早期,2-3mm的花蕾有
部分单核靠边期出现,3.5mm的有70%左右的小孢子处于单核靠边期,4.0mm以上的又逐渐减少。
因此,取样最适的花蕾大小为3.5mm。

黄先群等^[20]报道,在贵阳地区,1月和2月上中旬取样的材料,在培养2d后,游离小孢子没有膨
大,也没有胚产生;2月下旬到3月初取材的小孢子膨大率较高(50%左右),材料胚胎发生率为
8.3-33.3%;3月中旬取材材料小孢子有膨大,但没有胚产生。在产生胚的9个材料中,有6个是3
月1日取的样,说明取样时间对胚胎发生率有一定的影响。此外,在试验的40个参试材料中,有9
个杂交组合产生胚(22.5%),仅4个杂交组合(10.0%)获得了再生植株,平均为0.25个/花蕾,表明
小孢子胚胎发生能力受基因型的影响。

试验中发现,一般情况下,小孢子膨大率高的材料比较容易产生胚,胚胎发生率也高;而膨大率
低的胚产生率较低或难以产生胚;没有膨大的材料则不能产生胚^[20]。但试验中,也有个别材料膨大
率较高,但不能产生胚,表明膨大率高的的小孢子能否产生胚,与后期的发育条件也有一定关系。但在
热激培养2d后小孢子是否膨大和膨大率是否高,是小孢子产生胚的一个基本条件,也是衡量小孢子
胚胎能否发生的一个有效指标。这表明,小孢子培养密度和膨大小孢子的密度可能都具有集体效
应。这种集体效应促使小孢子偏离配子体发育途径。小孢子的膨大过程和起因以及联动机制是今
后小孢子胚胎发生机制的重点研究课题^[20]。

贵州省油料研究所的饶勇等报道^[20],在9个供试材料中,只有3个材料形成了胚状体并成长为
植株,其他6个材料没有胚状体产生,说明不同基因型材料产生小孢子胚状体的数量不同;不同接种
密度对产胚率也有影响,在每个培养皿(∅60mm)中培养2个花蕾,效果最好,低于或者超过2个花
蕾其成胚率下降,甚至不能形成胚状体。贵州省油料研究所的李超等报道^[20],2月底,当供体植株
的第1朵花开时,取长度在2.5-3.5mm的花蕾通过离心分离出小孢子,并在NLN-13液体培养基
中浅层培养诱导胚状体产生;培养30d左右,可见到多种类型的胚状体产生;20mg/L浓度的多菌灵
和链霉素可以提高胚状体的成苗率;将胚状体接种于含有0.05mg/L 2,4-D和0.01mg/L 6-BA的
MS培养基中培养,愈伤组织能快速分化形成不定根和丛芽。

2. 分子标记

贵州省油料研究所的李超等^[20]采用改良的SDS法对油菜叶片总DNA进行提取,经琼脂糖凝胶
电泳和紫外分光光度计分析,所提取的DNA浓度和纯度都高,不同时期叶片DNA的含量不一样,苗
期幼叶DNA含量比青荚期无柄叶DNA含量高。李超等^[20]还对RAPD分析中主要的几种影响因素
进行了条件优化,提出“黔油12号”亲本及杂交种的RAPD最佳反应体系:在25.0μl的反应体系中,
10倍Buffer,2.0mmol/L的MgCl,0.2mmol/L的dNTPs,0.7mol/L的引物,1.5μl的TaqDNA聚合酶以
及50.0μg的模板DNA。但是,由于TaqDNA聚合酶、引物,以及引物中GC含量的不同,在进行
RAPD分析之前,最好对各因素进行条件优化分析,以提高试验的准确度。

贵州省油料研究所的肖华贵等报道^[20],利用RAPD标记对黔油12号进行多态性分析,表明杂交
种及亲本的产量、经济性状的亲本优势、超亲优势、杂种优势指数与DNA多态性预测的结果趋势基本
一致,筛选出9条引物用于分子鉴定,对品种纯度鉴定和知识产权保护提供分子水平的理论依据。

贵州省农业生物技术重点实验室的李丽和黄先群采用RAPD标记,对27份贵州省芥菜型油菜
的遗传多样性进行了分析。结果表明,16条RAPD随机引物共扩增出148条带,其中85条带具有多
态性,多态率达57%。通过UPMGA法建立了贵州省27份芥菜型油菜的亲缘关系聚类图,在遗传距
离0.30740上,27个品种分为I、II两个类群,第I类群2个品种,第II类群25个品种;在遗传距离

0.90337上,第Ⅱ类群划分为3个亚族ⅡA、ⅡB、ⅡC;亚族ⅡA 1个品种,亚族ⅡB 7个品种,亚族ⅡC 17个品种。万山苦油菜和镇远苦油菜之间的遗传距离最小,为0.44168,亲缘关系最近。贵州芥菜型油菜资源间差异明显,具有丰富的遗传多样性(资料未发表)。

安良英和黄先群以贵州白菜型油菜的13个地方品种为材料,用10个RAPD引物进行PCR扩增。在引物筛选和实验条件优化的过程中,排除了没有扩增出条带和扩增条带不清晰的引物,优化了实验条件,筛选出多态性好、重复性好的3个引物对供试材料进行标记。经过PCR扩增及琼脂糖凝胶电泳,共得到190条RAPD条带,均分布于100~2000bp,其中有114条为多态性位点条带,多态性比例为60.00%。平均每个引物扩增出63.33条,多态性条带为38.00条。结果表明,13个白菜型油菜地方品种亲缘关系较远(资料未发表)。

3. 转基因研究

贵州大学农业生物工程重点实验室的赵德刚课题组开展了油菜转基因方面的研究,建立了油菜外源基因遗传转化的技术体系。以拟南芥FAD8基因构建正义和反义表达载体,正义和反义基因的表达可以从增加和抑制两个不同角度研究该基因对油菜脂肪酸代谢和抗寒性的影响,目前已获得转基因植株。研究结果表明,在转化anti-FAD8油菜种子中,油酸含量提高了17.8%,亚油酸含量降低了6%,亚麻酸降低了1.6%,而硬脂酸除4号单株有少量的提高外,其余也都出现降低的趋势;对植株抗寒性。转基因油菜植株在低温处理下表现出良好的抗寒性,转化正义FAD8植株抗寒指数为0.68,优于转化反义FAD8的植株(抗寒指数为0.51),两者抗寒性均显著高于对照者(抗寒指数为0.27)。利用转基因油菜表达鸡干扰素基因也获得转基因植株。此外,还构建了外源基因清除系统的表达载体遗传转化油菜,研究进展顺利,为安全应用转基因油菜奠定了基础(资料未发表)。

沈奇和赵德刚^[20]根据甘蓝型油菜不同品系下胚轴分化能力的不同,选用再生率及苗质均较好的特选4号作为受体材料,研究了各因素对其再生及转化效率的影响。结果表明,6d苗龄的下胚轴分化能力较强。以MS+6-BA 3mg/L+NAA 0.1mg/L+AgNO₃ 6mg/L作为分化培养基诱导频率最高。培养基中添加5mg/L Kan(卡那霉素)就能筛选出转化芽苗;预培养3d的下胚轴在稀释10倍的农杆菌菌液(OD 0.4~0.5)侵染30s后,再进行共培养2d获得的转化率最高。根据上述条件的优化,建立了以常规油菜品种特选4号下胚轴为转化受体的再生及转化体系,转化率可达8%。试验还发现,若NAA浓度高,在分化过程中会产生大量根,抑制芽的分化;AgNO₃的添加对特选4号外植体再生的影响不大,但可使再生小苗生长旺盛,降低褐化率。

沈奇和赵德刚^[20]还选用了9个不同基因型的油菜,采用单因素方差分析法,研究了不同基因型对油菜再生及转化后芽苗分化能力的影响。结果表明,油菜再生及转化频率受基因型影响,不同品种在既定的培养基及培养条件下,分化频率(3.0%~33.0%)差异显著;基因型对油菜再生分化的影响程度大于转化后分化的程度;不同油菜品种再生分化芽苗效率及转化分化芽苗效率之间并不存在严格的相关性。不同油菜品种对农杆菌的敏感性不同,这是影响转化效率的关键。外植体对农杆菌菌株适应力及其携带的外源基因对植物生理过程影响决定了农杆菌转化的能力。如能通过分子标记等手段找到控制其分化能力的连锁基因及相关因素,可大大提高基因转化效率,解决油菜分化再生受基因型影响大、分化率低的问题,促进油菜基因工程的发展。

二、展望

2007年全球原油价格大幅上涨,推动生物柴油生产迅速发展,欧美等国家豆油、菜油和棕榈油工业消费快速增加。另外,由于燃料乙醇产业的需求,美国大面积扩种玉米,导致大豆产量大幅下降,

加上加拿大油菜籽减产,全球大豆和油菜籽产量减少,库存大幅下降。食用油生产的增长不能满足消费的增长,全球食用油库存大幅下降至10年来的最低水平。在此背景下,2007年第二季度以来全球主要食用油品种市场价格总体呈现快速上涨态势,突破历史高点,并多次刷新纪录。我国2007年主要油料作物减产,国产油料只可榨油1050万t,远不能满足消费需求,油料和食用油进口继续增长。2007年1-11月,共进口油料(含大豆)2889.1万t,同比增长7.8%;共进口食用植物油772.2万t,同比增长28.5%。预计进口油料榨油和直接进口食用油共计1000万t以上,占国内食用油总供给的50%左右。2007年油菜籽收购价格大幅上涨,加上单产提高,油菜种植收益明显增加。此外,国务院下发《关于促进油料生产发展的意见》,实施了油菜良种补贴、生产大县奖励等政策措施,调动了农民种植油料的积极性,预计2008年主要油料作物如油菜等播种面积将有所增加(“2007年食用油进口增幅明显”,山东农业信息网,http://www.sdny.gov.cn/)。

贵州油菜生物技术研究起步较早,如贵州省农业科学院中心实验室在20世纪70年代就进行了油菜花药组织培养的研究报道,贵州大学的杨业正等进行了油菜子叶节和下胚轴的快速繁殖等研究,贵州省农业科学院的黄先群等报道了利用油菜茎段为起始外植体的快速繁殖技术等。进入21世纪以来,贵州油菜生物技术研究有了较大发展,贵州大学和贵州省农业科学院相继开展了油菜分子生物学和基因工程技术方面的研究,取得了很好的成效。但也应该看到,贵州从事生物技术工作的技术力量还很薄弱,投入的经费较少,生物技术与油菜育种结合的紧密度有待提高,在育种和产业应用上的应用有限,取得的成效不多。希望能加大投入和扶持力度,扩大合作面和技术引进,使贵州生物技术研究水平能有更好的发展,在生产上发挥更大的作用。

鉴于国际和国内食用油供求的形势,为了贵州经济的快速发展,有必要加强油菜生物技术这一领域的研究力度,投入必要的资金和设备,培养一支高水平的油菜生物技术研究队伍。此外,有必要进行以下的研究和储备:①深入开展包括改变脂肪酸成分、提高油分营养价值和饼(粕)蛋白质含量、高芥酸油菜生产工业用油、农作物抗性方面的研究;②开展油菜分子标记辅助育种方面的研究,利用分子标记技术有针对性地选育和聚合有利基因,提高品种的品质、产量和抗性;③从保护贵州生态多样性和特有资源的角度出发,有必要系统地开展贵州特有地方油菜品种资源的分子鉴定,构建贵州油菜审定品种的指纹图谱库等;④通过转基因和基因聚合,培育超高产、多抗、广适性,适宜构建贵州油菜审定品种的指纹图谱库等;⑤利用油菜作为生物反应器生产口服疫苗等高效集约化生产的低碳链“生物柴油”原料专用油菜品种;⑥随着我国转基因产品的逐步释放,为了保护贵州特有的生物资源和生物多样性,保护贵州的绿色天然商品的市场份额,同时促进贵州经济的发展,为贵州的农副产品进出口提供方便和安全保障,转基因商品认定工作的重要性日益突出,有必要加强贵州农业转基因产品的评价、检测和监控等管理体系。

目前,农业生物技术研究在贵州已逐步引起重视。“十五”期间,贵州省科技厅投资近千万元建立了动、植物农业生物技术重点实验室,分别依托于贵州大学和贵州省农业科学院,并同国内外先进大专院校、研究所建立合作关系。随着技术力量的配备、设备的完善和研究水平的提高,贵州油菜生物技术研究将取得长足发展,并为推动贵州省农业发展、促进贵州省经济腾飞和社会进步发挥重大作用。

参考文献

- [1] Steward F C. Growth and organized development of culture cells. III. Interpretations of the growth from free cell to carrot plant [J]. *Am Bot*. 1958, 45: 709-713.

- [2] Kartha K K, Michayluk M R, Kao K N, et al. Callus formation and plant regeneration from mesophyll protoplasts of rape plant (*Brassica napus* L. CV. Zephyr) [J]. *Plant Sci. Lett.*, 1974(3): 265-271.
- [3] Kartha K K, Gamborg O L, Conatabel F. In vitro plant formation from stem explants of rape (*Brassica napus* CV. Zephyr) [J]. *Physiol. Plant.*, 1974(3): 217-222.
- [4] Thomas E, Hoffmann F, Potrykus L, et al. G. Protoplast regeneration and stem embryogenesis of haploid androgenetic rape [J]. *Molec. gen. Genet.*, 1976(145): 245-247.
- [5] Keller W A, Armstrong K C. High frequency production of microspore derived plants from *Brassica napus* anther cultures [J]. *Z. Pflanzenzüchtg.*, 1978(80): 100-108.
- [6] 广东植物研究所遗传研究室. 从油菜花药培养出花粉植株的研究 [J]. *植物学报*, 1975(2): 167.
- [7] 顾昌敏, 赵庆华. 油菜高脚茎段分化成苗 [J]. *上海农业科技*, 1976(6): 31-32.
- [8] 许智宏, 卫志明, 王雄, 等. 油菜花茎组织培养中器官的形成 [J]. *实验生物学报*, 1979(4): 349-352.
- [9] 何小兰, 吴敬音, 朱卫民, 等. 6-BA 和 AgNO₃ 对甘蓝型油菜茎叶外植体不定芽再生的影响 [J]. *江苏农业学报*, 2000(4): 211-214.
- [10] 顾亨森, 尤华贤, 马佑国, 等. 油菜幼茎下胚轴、根和子叶外植体器官分化的初步研究 [J]. *植物生理学通讯*, 1983(3): 37-38.
- [11] 杨业正. 油菜多芽苗的诱导形成及其在无性系快速繁殖上的应用 [J]. *植物生理学通讯*, 1982(2): 30-32.
- [12] 蔡得田, 祝虹, 余丰. 双低油菜品种组织培养的反应 [J]. *中国油料*, 1987(4): 17-21.
- [13] 田志宏, 杨成军. 生长调节剂和外植体对油菜离体培养愈伤诱导的影响 [J]. *湖北农业科学*, 2003(4): 41-43.
- [14] Zeharadi A, Avaran M, Salmasian A H, et al. 农杆菌介导的甘蓝型油菜遗传转化和植株再生——A. 十字花科油料作物可持续发展. 第12届国际油菜大会论文集[C]. 武汉, 2007.
- [15] 鄒高治, 葛扣麟, 叶鸣明, 等. 八倍体胜利油菜下胚轴和花粉愈伤组织的植株再生 [J]. *遗传学报*, 1985(1): 46-50.
- [16] 石淑德, 周永明. 油菜半粒种子的试管快繁技术 [J]. *中国油料*, 1996(2): 7-8.
- [17] 杨业正, 董晓峰. 油菜低芥酸半粒组织培养快速繁殖. 中国植物生理学会第四次全国会议论文集摘要汇编[C]. 重庆, 1986.
- [18] 杨业正. 油菜雄性不育基因工程的研究[D]. [博士论文]. 成都: 四川联合大学, 1996.
- [19] 卢长明, 肖玲, 张斌, 等. 人工合成甘蓝型油菜的繁育特性与试管繁殖 [J]. *中国油料作物学报*, 2003(4): 5-10.
- [20] 赵云, 王茂林, 邢洪武, 等. 细胞核雄性不育油菜无性繁殖研究——I. 细胞核不育油菜试管繁殖 [J]. *中国油料*, 1997(1): 1-5.
- [21] 石淑德, 周永明, 王新发. 影响油菜子叶外植体不定芽高频率再生的因素 [J]. *西北植物学报*, 1998(4): 477-482.
- [22] Dale P, Ball L F. Plant regeneration from cotyledonary explant in a range of Brassica species and genotypes A. In: the Proceedings of 8th International Rapeseed Congress, 1991(4): 1122-1127.
- [23] 王景雪, 孙毅, 崔贵梅, 等. 在油菜组织培养中激素及基因型对下胚轴分化的影响. *中国油料作物学报*, 2000(1): 11-18.
- [24] 杜建中, 王景雪, 孙毅, 等. 影响芸薹属植物 (*Brassica*) 组织培养过程中外植体褐化的因素 [J]. *山西农业科学*, 2004(1): 29-32.
- [25] 杨凡, 姜金红, 王劲, 等. 甘蓝型油菜萝卜脂膜不育恢复材料测交后代 TC'121 的下胚轴高频率植株再生因素的研究 [J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 2001(3): 418-420.
- [26] 从金桥, 蔡得田. 油菜素内酯对油菜种子萌发及子叶组织培养的影响 [J]. *中国油料*, 1988(4): 18-22.
- [27] 尤华贤, 高崇华, 周倩莉. 三十烷醇在油菜外植体不定根诱导中的作用 [J]. *中国油料*, 1988(4): 48-50.
- [28] 余小玲, 李梅. 油菜下胚轴再生频率影响因素研究. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2000(6): 418-421.
- [29] 唐桂香, 周伟军. AgNO₃ 对甘蓝型油菜子叶外植体植株再生的影响 [J]. *中国油料作物学报*, 2001(3): 9-12.
- [30] 李会珍, 张志军, 周伟军. 基因型和 AgNO₃ 对甘蓝型油菜子叶外植体植株再生的影响 [J]. *中国油料作物学报*, 2003(4): 20-22.
- [31] 潘刚, 石淑德, 魏泽兰, 等. 甘蓝型冬性和半冬性油菜子叶高效快速再生体系的建立 [J]. *中国油料作物学报*, 2004

- [33] 上海植物生理研究所细胞分化组. 油菜花器培养中器官分化能力的研究[J]. 植物学报, 1977(4): 309-316.
- [34] 颜昌敬, 赵庆华. 生长激素对油菜花器分化成苗的影响[J]. 植物生理学报, 1980(1): 83-89.
- [35] Stringan G R. 油菜单倍体茎移植的再生[J]. 国外农业科技, 1979(11): 37-39.
- [36] Shukla A, 等. 甘蓝型油菜野生类型和细胞核雄性不育系的节间片段离体培养的再生能力比较[J]. 国外农学——油料作物, 1993(3): 25-26.
- [37] 颜昌敬, 赵庆华, 赵华, 等. 油菜花器分化出苗和芥酸含量关系的初步研究[J]. 中国油料, 1982(2): 22-24.
- [38] 颜昌敬, 赵庆华. 低温冷藏对油菜花器分化及成苗成活率的影响[J]. 中国油料, 1984(4): 25-28.
- [39] 颜亨森, 高翠华. 油菜的试管繁殖及试管苗的性状[J]. 中国油料, 1987(1): 70-71.
- [40] 刘兴望, 孟金陵, 胡文安. 甘蓝型油菜 × 埃塞俄比亚芥杂种苗快速繁殖及激素效应. 植物生理学通讯, 1992(3): 97-99.
- [41] Pashpa K, Chowdhury B. 适宜芸薹属种子外植体再生的通用培养基[J]. 国外农学——油料作物, 1996(1): 55.
- [42] 白守信, 梁红卫, 吴耀武. 油菜叶片和花序轴培养中的器官发生和再生植株的初步研究[J]. 植物生理学通讯, 1982(3): 35-38.
- [43] 颜亨森. 油菜花器培养枝的形态特征及影响其形成的因素[J]. 中国油料, 1989(2): 22-25.
- [44] 颜亨森, 高翠华, 王淑芬. 油菜试管苗的形态特征及产量构成因素分析[J]. 中国油料, 1988(1): 45-47.
- [45] Chopra D L. In Workshop on Biotechnology for Crop Improvement, Potentials and Limitations A. IRRRI, Philippines, 1986.
- [46] 罗鹏, 王智勤, 邓洁, 等. 子房与花托培养方法在油菜远缘杂交育种中的应用. 见: 胡含, 王恒立主编. 植物细胞工程与育种. 北京: 北京工业大学出版社, 1990.
- [47] 石淑懿, 蔡明. 影响十字花科植物离体子房培养的某些因素[J]. 中国油料, 1988(4): 75-79.
- [48] 四川大学植物遗传研究室. 生物技术在油菜育种中的初步应用[J]. 中国油料, 1991(4): 2-6.
- [49] 刘玉贞, 黄静娴, 任良中. 油菜属间杂种子房的高体培养[J]. 植物生理学通讯, 1985(3): 30-31.
- [50] 罗鹏, 董泽莲, 周顺东. 甘蓝型油菜 × 紫罗兰属间杂应用于油菜育种的初步试验——A. 食物与营养安全战略中的中国油料. 中国作物学会油料作物专业委员会第五届学术年会论文集[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004.
- [51] 赵云, 潘博, 王茂林, 等. 油菜与诸葛菜属间远缘杂交的初步研究[J]. 中国油料, 1993(1): 7-9.
- [52] 李琳, 董泽莲, 陈祥荣, 等. 影响甘蓝型油菜与诸葛菜远缘杂交结实率的几个因素[J]. 中国油料, 1997(4): 6-7.
- [53] 李再云, 刘后利, 吴建国, 等. 甘蓝型油菜与诸葛菜属间杂种无性系的变异研究[J]. 遗传学报, 1996(4): 315-321.
- [54] Zankleer M, Maheswaran G, 等. 白菜型和甘蓝型油菜胎座离体授粉研究[J]. 国外农学——油料作物, 1987(4): 30-32.
- [55] 罗鹏. 油菜胚珠培养及其应用[J]. 湖南农业科学, 1983(1): 44-46.
- [56] 孟金陵, 吴中华, 丁效华. 甘蓝型油菜与芥菜型油菜杂种胚培养获得杂种植株[J]. 中国油料, 1988(3): 83-84.
- [57] Manzoni T, 等. 运用胚珠培养育成芸薹属与萝卜属的种属间杂种[J]. 贵州农业科学, 1981(6): 66-67.
- [58] 石淑懿, 孟金陵, 刘后利. 用组织技术挽救埃塞俄比亚芥与芥菜型和白菜型油菜杂交的杂种胚[J]. 中国油料, 1992(2): 77-78.
- [59] 陈正华, 寸守俊, 陈之征, 等. 用细胞工程技术选育油菜“双低”新品种. 植物细胞工程与育种[M]. 北京: 北京工业大学出版社, 1990.
- [60] 周丕才. 双低油菜德油7号及栽培技术[J]. 作物杂志, 1996(6): 14.
- [61] 吴江生, 石淑懿, 周永明, 等. 甘蓝型双低油菜品种华双3号的选育和研究[J]. 华中农业大学学报, 1999(1): 1-4.
- [62] 王汉中, 刘贵华, 郑元本, 等. 抗病核病双低油菜新品种中双9号的选育[J]. 中国油料作物学报, 2002(4): 71-73.
- [63] 王新发, 王汉中, 刘贵华, 等. 具双价基因的甘蓝型油菜游离小孢子的遗传转化[J]. 农业生物技术学报, 2004(2): 138-142.
- [64] 陈军, 王兰岚, 刘澄清, 等. 用激光微束照射法转化甘蓝型油菜小孢子的研究[J]. 激光生物学报, 1998(2): 103-107.
- [65] Teresa C T, Tomasz P, Laurence A. 冬性甘蓝型油菜中一种利用小孢子胚进行转基因的方法——A. 十字花科油料作物可持续发展. 第12届国际油菜大会论文集摘要集[C]. 武汉, 2007.
- [66] 石淑懿, 周永明, 王慧, 等. γ 射线和X射线对甘蓝型油菜小孢子胚状体再生的影响[J]. 中国油料作物学报, 2004(2): 6-9.

- [66] 和江明,王超乔,陈薇,等. EMS对甘蓝型油菜离体小孢子胚胎发生能力的影响[J]. 西南农业学报,2004(6):690-693.
- [67] 何冬丽,杨光子. 甘蓝型油菜单倍体诱导及其效应的 AFLP分子标记检测[J]. 中国油料作物学报,2005(6):10-14.
- [68] 和江明,王超乔,陈薇,等. 用EMS诱变和小孢子培养快速获得甘蓝型油菜高油酸种质材料的研究[J]. 西南农业学报,2003(2):34-36.
- [69] 刘勇,刘红雨,曾正宜. 利用小孢子培养技术筛选油菜抗黄萎病材料[J]. 西南农业学报,1997(10):108-112.
- [70] 黄润华,陈瑞菊,周志耀,等. 应用小孢子和花药培养技术筛选油菜抗黄萎病材料[J]. 植物生理学通讯,2001(3):226-227.
- [71] 杨惠周. 油菜花药愈伤组织的诱导及分化试验——A. 花药培养学术讨论论文集[M]. 北京:科学出版社,1977.
- [72] 李尚. 油菜单倍体的遗传及应用[J]. 中国油料,1982(1):7-12.
- [73] 林响,李加纳,何凤发,等. 甘蓝型黄籽油菜花药培养中若干因素影响研究[J]. 西南农业大学学报,2000(5):421-423.
- [74] 钟维强,方光华,唐克轩,等. 甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)花药培养中若干因素对花粉胚状体诱导和植株再生的影响[J]. 上海农业学报,1990(2):7-14.
- [75] 万前,邱仕芳,寸守祺,等. 多效唑对提高油菜花药培养诱导花粉胚的影响[J]. 西南农业学报,1997(2):57-60.
- [76] 李红梅,李旭辉,廖衍慧,等. 影响油菜萝卜胞质不育系恢复材料花药培养的若干因素[J]. 生物工程学报,1999(3):315-321.
- [77] 王群,冉毅东,王汉宁,等. 不同培养基对甘蓝型油菜花药和花粉培养的效果比较[J]. 中国油料,1996(2):1-5.
- [78] 陈之旺,陈正华. 高频率诱导油菜花粉胚状体的研究[J]. 科学通报,1983(5):300-303.
- [79] 钟维强,方光华,唐克轩,等. 温度对甘蓝型油菜花粉胚状体的诱导及其类型的影响[J]. 中国油料,1990(3):34-38.
- [80] George L, 等. 芥菜型油菜花药培养诱导花粉胚和小植株[J]. 国外农学——油料作物,1984(2):13-14.
- [81] 李红梅,李旭辉,廖衍慧,等. 影响油菜萝卜胞质不育系恢复材料花药培养的若干因素[J]. 生物工程学报,1999,15(3):315-321.
- [82] Danville M. 基因型、供体植株生长温度及花药培养温度对油菜(*Brassica napus* ssp. *oleifera*)花粉胚状体形成的影响[J]. 国外遗传与育种,1985(2):28-29.
- [83] 唐祥发,刘以福,王泽松,等. 油菜强雄雄蕊花药诱导率的差异[J]. 安徽农业科学,1988(3):51-53.
- [84] 刘选明,官春云,李尚,等. 油菜花药离体培养研究[J]. 西南农业大学学报,2000(3):185-189.
- [85] 原玉香,蒋武生,张晓伟,等. 人工合成甘蓝型油菜的花药培养[J]. 河南农业大学学报,2004(4):414-417.
- [86] 刘泽,周永明,石殿稳,等. 甘蓝型油菜离体小孢子胚胎发生能力的遗传分析[J]. 作物学报,2000(1):104-108.
- [87] Kang Y S, Kim C W, Choi I H, et al. 通过用芸苔属小孢子培养过程中的花蕾大小和胚胎形成比较小孢子的发育时期——A. 十字花科油料作物可持续发展第12届国际油菜大会论文集摘要集[C]. 武汉:2007.
- [88] 张凤兰,高田义人. 甘蓝型油菜小孢子培养胚发生能力的遗传分析[J]. 华北农学报,2001(1):27-32.
- [89] Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus* [J]. Z Pflanzenphysiol. 1982,105:427-434.
- [90] Keller W A, Fan Z, Pechar P, et al. An efficient method for culture of isolated microspores of *Brassica napus* [M]. Rapeseed Cong., Poland, 1988.
- [91] 余凤群,刘后利. 供体材料和培养基成分对甘蓝型油菜小孢子胚状体产量的影响[J]. 华中农业大学学报,1995(4):327-332.
- [92] 石殿稳,周永明,吴江生,等. 甘蓝型油菜小孢子培养、染色体加倍、试管苗继代培养和田间移栽配套技术的研究及其在油菜育种中的应用[J]. 中国农学通报,2001(2):57-59.
- [93] 黄先群,蒋敏华,毛莹芬,等. 影响油菜游离小孢子培养再生因素的研究进展. 种子,2006(10):37-43, (11):46-50.
- [94] 张国庆,许玲,周伟军. 甘蓝型油菜小孢子诱导脱分化、干燥与去子叶处理提高植株再生率研究——A. 食物与能源安全战略中的中国油料. 中国作物学会油料作物专业委员会第五届学术年会论文集[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2004.

- [95] 王亦菲, 陆瑞菊, 孙月芬, 等. 大田油菜游离小孢子培养高频率体诱导及植株再生[J]. 中国农业通报, 2002, 18(1): 20-23.
- [96] 刘勇, 刘红雨, 曹正江. 甘蓝型油菜 (*Brassica napus*) 小孢子胚状体的诱导和培养[J]. 西南农业学报, 1997(10): 1-5.
- [97] 黄先群, 毛莹芬, 李丽, 等. 浅析几个因子对甘蓝型油菜游离小孢子胚发生的影响[J]. 种子, 2008(2): 33-39.
- [98] Xu Han (徐涵), Xing H C, Cheng X F, et al. Polyplodization in embryogenic microspore cultures of *Brassica napus* L. cv. Topas enables the generation of doubled haploid clones by somatic embryogenesis[J]. Protoplasma, 1999(208): 240-247.
- [99] 石淑艳, 李再云, 刘后利. 甘蓝型油菜与诸葛菜的杂种小孢子胚发生和小苗的形态[J]. 中国油料, 1994, 16(1): 63-64.
- [100] 刘雪平, 刘志文, 涂金星, 等. 甘蓝型油菜小孢子培养技术的几项改进[J]. 遗传, 2003(4): 433-436.
- [101] Keßer W A, Armstrong K C. 通过花药和小孢子培养产生甘蓝型油菜单倍体[J]. 国外农学——油料作物, 1985(1): 13-15.
- [102] 王根, 吴江生, 石淑艳, 等. 甘蓝型油菜离体小孢子染色体加倍及其基因型的反应——A. 食物与营养安全战略中的中国油料. 中国作物学会油料作物专业委员会第五届学术年会论文集[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004.
- [103] 朱彦涛, 李殿荣, 胡新强. 甘蓝型油菜小孢子植株加倍方法及对植株农艺性状的影响研究[J]. 陕西农业科学, 1998(2): 1-4.
- [104] Chen Z Z, Snyder Z G. 采用甘蓝型油菜离体小孢子染色体加倍来提高双单倍体植株的生产效率[J]. 作物研究, 1996(4): 34-36.
- [105] 石淑艳, 吴江生, 周永明, 等. 甘蓝型油菜小孢子单倍体二倍化技术的研究[J]. 中国油料作物学报, 2002(1): 1-5.
- [106] 星晓蓉, 杜德志, 李秀萍. 春性甘蓝型油菜小孢子培养技术研究[J]. 西北农业学报, 2007(1): 114-118.
- [107] Glenselius K. High growth rate and capacity of hypocotyle protoplasts in some *Brassicaceae* [J]. Physiol. Plant. 1984(61): 38-44.
- [108] 罗科. 甘蓝型油菜与诸葛菜细胞及原生质体培养的研究[D]: [博士论文]. 成都: 四川大学, 1990.
- [109] Chuong P V, Pauls K P, Beversdorf W D. A simple culture method for *Brassica* hypocotyle protoplasts [J]. Plant Cell Rep., 1985(4): 4-6.
- [110] Barsby T L, Yarrow S A, Shepard F. A rapid and efficient alternative procedure for the regeneration of plants from haploidy protoplasts of *Brassica napus* [J]. Plant Cell Rep., 1986(5): 101-103.
- [111] Spangenberg G, Koop H V, Lichter R, et al. Microculture of single protoplasts of *Brassica napus* [J]. Physiol. Plant., 1986(66): 1-8.
- [112] 程振东, 卫志明, 许智宏. 甘蓝型油菜下胚轴原生质体培养的研究[J]. 生物工程学报, 1994(1): 30-33.
- [113] 胡张华, 郎春秀, 刘智宏, 等. 甘蓝型油菜下胚轴原生质体培养再生植株[J]. 浙江农业学报, 2002(5): 278-280.
- [114] 田志宏, 孟金陵. 甘蓝型油菜原生质体培养及植株再生的研究[J]. 中国油料作物学报, 2002(2): 10-13.
- [115] 夏德康. 植物原生质体培养和细胞杂交. 见: 余叔文, 汤章城主编. 植物生理与分子生物学[J]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1998.
- [116] 周音, 张智奇, 钟维瑾, 等. 油菜原生质体培养研究进展[J]. 上海农业学报, 1996(2): 91-95.
- [117] 周伟扬, 余建明, 陆维忠, 等. 甘蓝型油菜原生质体培养获得再生植株的研究[J]. 江苏农业学报, 1988(1): 46-47.
- [118] 贾士荣, 杨美珠. 芸薹属作物的原生质体培养和细胞融合[J]. 植物生理学通讯, 1988(5): 7-12.
- [119] Pelletier G, Primard C, Vodel F, et al. Intergenic cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion [J]. Mol. Gen. Genet. 1983(191): 244-250.
- [120] Chuong P V, 等. 利用单倍体原生质体融合组合甘蓝型油菜施磺胺草剂抗性和雄性不育性[J]. 中国油料, 1988(3): 88-89.
- [121] 胡琼, 李云昌, 梅德圣, 等. 属间体细胞杂交创建甘蓝型油菜细胞质雄性不育系及其鉴定[J]. 中国农业科学, 2004(3): 333-338.
- [122] 梅德圣, 李云昌, 胡琼. 甘蓝型油菜属间体细胞杂种雄性不育材料的研究[J]. 中国油料作物学报, 2003(1): 72-75.
- [123] Heath D W, Earle E D. Synthesis of low linoleic acid rapeseed (*Brassica napus*) through protoplast fusion [J]. Euphytica, 1997(3): 339-343.
- [124] 程振东, 卫志明, 许智宏. 用 PEG 法把外源基因导入甘蓝型油菜原生质体再生转基因植株[J]. 实验生物学报, 1994

- (3), 341-351.
- [125] King G. 芸薹属基因组学时代的到来: 应对解析和改良作物性状的挑战——A. 十字花科油料作物可持续发展. 第12届国际油菜大会论文摘要集[C]. 中国武汉, 2007.
- [126] 危文亮, 孟金波. 油菜及其相关作物的分子标记遗传连锁图谱[J]. 中国油料, 1995(4): 45-69.
- [127] 梅德圣, 王汉中, 李云昌. 与甘蓝型油菜重要性状连锁的分子标记及相关基因的图谱定位研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2002(4): 80-83.
- [128] Landry B S, Hubert N, Etoh T, et al. A genetic map for *Brassica napus* based on restriction fragment length polymorphisms detected with expressed DNA sequences[J]. *Genome*, 1991(34): 543-552.
- [129] Uzunova M, Ecker W, Weisleder K, et al. Mapping the genome of rapeseed (*Brassica napus* L.)——I. Construction of an RFLP Linkage map and localization of QTLs for seed glucosinolate content[J]. *Theor Appl Genet*, 1995(90): 194-204.
- [130] Fomset N, Delourme R, Barret P, et al. Molecular tagging of the dwarf RHEDZ1 (Bsh) gene in *Brassica napus* [J]. *Theor Appl Genet*, 1995(91): 756-761.
- [131] 李加纳, 崔利, 张学昆, 等. 甘蓝型黄籽油菜的研究与思考——A. 食物与能源安全战略中的中国油料. 中国作物学会油料作物专业委员会第五届学术年会论文集[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004.
- [132] Pflücke, Durstewitz G, Grazer E M, et al. 在 Trait Genomics 进行的五年时间的甘蓝型油菜分子标记的研究——A. 第12届国际油菜大会论文摘要集[C]. 中国武汉, 2007.
- [133] 李媛媛, 沈金雄, 王同华, 等. 利用 SRAP, SSR 和 AFLP 标记构建甘蓝型油菜遗传连锁图谱[J]. 中国农业科学, 2007(6): 1118-1126.
- [134] 陆光远, 杨光圣, 傅廷栋. 甘蓝型油菜分子标记连锁图谱的构建及显性细胞核雄性不育基因的图谱定位[J]. 遗传学报, 2004(11): 1309-1315.
- [135] Lombard V, Deloume R. A consensus linkage map for rapeseed (*Brassica napus* L.); construction and integration of three individual maps from DH population[J]. *Theor Appl Genet*, 2001(4): 491-507.
- [136] Cheung W Y, Friesen I, Rakow GFW, et al. RFLP-based linkage map of mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern [J]. *Environ. TAG*, 1994, 841-851.
- [137] Chyi Y S, Hoenocro M E, Serryn L. A genetic linkage map of restriction fragment length polymorphism loci for *Brassica rapa* (Syn. *Campestris*) [J]. *Genome*, 1992(35): 746-757.
- [138] Gupta V, Pradhan A K, Bishi NK, et al. 芥菜型油菜重要农艺性状基因作图和定位——A. 十字花科油料作物可持续发展. 第12届国际油菜大会论文摘要集[C]. 中国武汉, 2007.
- [139] 刘后利. 油菜遗传育种学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2000.
- [140] 梅德圣, 李去昌, 王汉中, 等. 甘蓝型油菜黄1号黄籽性状的 AFLP 和 SSR 标记[J]. 中国油料作物学报, 2004(3): 6-9.
- [141] Toroser D, Thormann C E, Osborn T C et al. RFLP Mapping of quantitative trait loci controlling seed aliphatic-glucosinolate content in oilseed rape (*Brassica napus* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 1995(91): 802-808.
- [142] 刘雷平, 徐金星, 陈宝元, 等. 人工合成甘蓝型油菜中花色与芥酸含量的遗传连锁分析[J]. 遗传学报, 2004(4): 357-362.
- [143] Lourden C, et al. 油菜中与亚麻酸基因连锁的 RAPD 标志的鉴定[J]. 国外作物育种, 1997(1): 50-54.
- [144] Bartkowiak-broda I, Poplawska W. Characteristics of double low winter rapeseed lines with introduced restorer gene for CMS ogura. A Proceedings of the 10th Inter Rapeseed Congress Abstract[C], Canberra-Australia, 1999.
- [145] 廖颖, 陈林蛟. 应用 Bulked-DNA 寻找白菜型油菜核雄性不育基因的 RAPD 标记[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2000(5): 682-685.
- [146] 陆光远, 杨光圣, 傅廷栋. 甘蓝型油菜显性细胞核雄性不育基因的 AFLP 标记[J]. 作物学报, 2004(2): 104-107.
- [147] 徐金星, 傅廷栋. 甘蓝型油菜核不育遗传标记的初步研究——II. 16-9 芥酸基因与可育基因连锁的分子证据[J]. 作物学报, 1999(6): 669-673.
- [148] 王俊霞, 杨光圣, 傅廷栋, 等. 甘蓝型油菜 Pst CMS 育性恢复基因的 RAPD 标记[J]. 作物学报, 2000(5): 575-578.

- [149] Delourme R, Bouchereau A, Hubert N, et al. Identification of RAPD markers to fertility restorer gene for *organs malik* cytoplasmic male sterility of rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 1994, 88: 741-748.
- [150] 覃小力, 李殿录, 王强, 等. 一个与甘蓝型油菜无花败性基因连锁的 RAPD 标记 [J]. *西北植物学报*, 2003 (4): 561-565.
- [151] Monkolporn O, Pang E C K, Kadkol G P. Molecular markers linked to shatter resistance genes in *Brassica campestris* L. (syn. *Rapa* L.) A. Wratten N., Salisbury P. A., Proceedings of the 10th Inter Rapeseed Congress Abstract [J]. Canberra, Australia, 1999 (p): 363-369.
- [152] Ferreira M E, Satagopan., Yandell B S, et al. Mapping loci controlling vernalization requirement and flowering time in *Brassica napus* [J]. *TAG*, 1995 (91): 1 279-1 283.
- [153] Oubsen T C, Kole C, Figdore S, et al. Comparison of flowering time of gene in *Brassica rapa*, *B. napus* and *Arabidopsis thaliana* [J]. *Genetics*, 1997 (145): 1 123-1 129.
- [154] 张书芬, 傅廷栋, 宋家成, 等. 甘蓝型油菜株高和分枝高度的 QTLs 定位与上位性分析——A. 十字花科油料作物可持续进展. 第 12 届国际油菜大会论文集摘要集 [C]. 中国武汉, 2007.
- [155] 王丽侠, 赵建伟, 徐芳森, 等. 与甘蓝型油菜重要经济性状有关的 DNA 克隆在拟南芥遗传图谱中的整合 [J]. *遗传学报*, 2002 (8): 741-746.
- [156] Thormann S E, Romero, Mentet, et al. Mapping loci controlling the content of erucic and linolenic acids in seed oil of *Brassica napus* L. [J]. *TAG*, 1996 (93): 282-286.
- [157] Kuznetsov Y, Asaka H, Yui M, et al. RAPD markers linked to a clubroot-resistance locus in *Brassica rapa* L. [J]. *Euphytica*, 1997 (98): 149-154.
- [158] Pleske, Struss D. STS markers linked to *Phoma* resistance genes of the *Brassica* B-genome revealed sequence homology between *Brassica nigra* and *Brassica napus* [J]. *TAG*, 2001, 102 (4): 483-488.
- [159] 屈斌, 陈伟, 马朝芝, 等. 甘蓝型油菜产量及相关性状的 QTL 分析 [J]. *作物学报*, 2006 (5): 676-682.
- [160] 何余堂, 陈宝元, 傅廷栋, 等. 白菜型油菜在中国的起源与进化 [J]. *遗传学报*, 2003 (11): 1 003-1 012.
- [161] 曹晓斌, 王茂林, 梁丽, 等. 中国西南地区芥菜型油菜资源遗传多样性分析 [J]. *中国农业科学*, 2007 (8): 1 610-1 621.
- [162] 伍宁丰, 伍晓明. 中国甘蓝型油菜遗传多样性的 RAPD 分子标记 [J]. *生物多样性*, 1997 (4): 246-250.
- [163] 孟金陵, 钱秀珍. 用 RFLP 标记分析甘蓝型油菜的遗传多样性 [J]. *遗传学报*, 1996 (4): 293-306.
- [164] 马朝芝, 傅廷栋, Turesson, S 等. 用 ISSR 标记技术分析中国和瑞典甘蓝型油菜的遗传多样性 [J]. *中国农业科学*, 2003 (11): 1 403-1 408.
- [165] 陈碧云, 张冬晓, 伍晓明, 等. 89 份油菜区试品种的 AFLP 指纹图谱分析 [J]. *中国油料作物学报*, 2007 (2): 9-14.
- [166] 雷天刚, 张学昆, 李加纳, 等. 甘蓝型黄籽油菜 SSR 标记遗传多样性 [J]. *中国油料作物学报*, 2005 (1): 41-45.
- [167] 李宗堂, 伍晓明, 王秀琴, 等. 甘蓝与芸薹属 5 个近缘物种的基因组原位杂交分析 [J]. *中国油料作物学报*, 2003 (4): 16-19.
- [168] 赵志伟, 曹凡亚, 赵云, 等. 甘蓝型油菜 BAN 同源基因片段克隆与序列分析 [J]. *中国油料作物学报*, 2001 (4): 7-10.
- [169] 穆建新, 李殿录, 郭国光, 等. SSR 分子标记在杂交油菜种子纯度检测中的应用——A. 十字花科油料作物可持续进展. 第 12 届国际油菜大会论文集摘要集 [C]. 中国武汉, 2007.
- [170] 于能, 曹凡亚, 赵云, 等. 杂交油菜“蜀杂 6 号”特异序列扩增标记 (SCAR) 建立及其在杂种鉴定中的应用 [J]. *作物学报*, 2000 (6): 722-728.
- [171] 刘杰, 刘公社, 李殿录, 等. RAPD 方法鉴定油菜“杂油 59”种子纯度的研究 [J]. *应用与环境生物学报*, 2000 (6): 526-529.
- [172] Lombard V, Baril C P, Duhrault F, et al. Genetic relationships and fingerprinting of rapeseed cultivars by AFLP: consequences for varietal registration [J]. *Crop Sci.*, 2000 (5): 1 417-1 425.
- [173] Charters Y M, Robertson A, Wilkinson M, et al. PCR analysis of oilseed cultivar (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) using 5'-anchored simple sequence repeat (SSR) primers [J]. *Theor. Appl. Genet.*, 1996 (92): 442-447.

- [174] Lebert-Buisin M, Guillot-Lemoine B, Dutech Y. Heterosis and genetic distance in rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. *Cross between European and Asian seedlines. Genome*, 1987(29):413-418.
- [175] 胡胜武, 于澄宇, 赵惠贤, 等. 恢复系和保持系 RAPD 分子标记与甘蓝型油菜杂种优势关系的研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2003(6):66-70.
- [176] 于澄宇, 胡胜武, 郭国光, 等. 遗传标记与甘蓝型油菜杂种表现的关系——A. 食物与能源安全战略中的中国油料. 中国作物学会油料作物专业委员会第五届学术年会论文集[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004.
- [177] 仇金雄, 傅廷栋, 杨光圣. 甘蓝型油菜 SSR (ISSR) 标记的遗传多样性及其与杂种表现的关系[J]. 中国农业科学, 2004(4):477-483.
- [178] 王道杰, 王颖, 李殿荣. 生物技术在油菜遗传改良中的应用[J]. 西北农业大学学报, 1999(2):90-93.
- [179] 卢爱兰, 陈正华, 孔令洁, 等. 抗黄萎病转基因甘蓝型油菜的研究[J]. 遗传学报, 1996(1):77-83.
- [180] 陈德清, 黄锐之. 油料作物基因工程育种[J]. 中国生物工程杂志, 2004(5):24-28.
- [181] 宜春云. 油菜转基因育种研究进展——A. 食物与能源安全战略中的中国油料. 中国作物学会油料作物专业委员会第五届学术年会论文集[J]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004.
- [182] 林良斌, 周小云, 宜春云, 等. 转基因抗虫油菜的 ELISA 分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2001(3):179-181.
- [183] 刘胜毅, 周必文, 胡小加, 等. 转基因油菜外源基因飘移及其影响因素研究——A. 食物与能源安全战略中的中国油料. 中国作物学会油料作物专业委员会第五届学术年会论文集[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004.
- [184] 谢惠明, 戚存扣, 张洁夫, 等. 转基因抗除草剂油菜对近缘植物的基因漂移研究——A. 食物与能源安全战略中的中国油料. 中国作物学会油料作物专业委员会第五届学术年会论文集[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004.
- [185] 李健, 宜春云, 李梅等. 转 Bt 基因抗虫油菜花粉对蜜蜂生存的影响[J]. 中国油料作物学报, 2003(2):78-79.
- [186] 于辉, 徐颖. 基因工程与国际生物安全规范[J]. 中国国际法年刊, 1997:71-105.
- [187] 贵州省农业科学院中心实验室. 油菜花药培养研究初报[J]. 贵州农业科学, 1980(5):56-60.
- [188] 戴培庸, 杨业正. 油菜子叶与下胚轴诱导愈伤组织和分化幼苗[J]. 贵州农业科学, 1987(2):62-67.
- [189] 杨业正. 甘蓝型油菜自交不亲和系组织培养繁殖法[J]. 中国油料, 1983(4):22-26.
- [190] 杨业正. 三种细胞分裂素诱导油菜形成对芽苗的效果比较——A. 中国植物生理学会第三次全国会议论文摘要汇编[C]. 昆明, 1982:220.
- [191] 杨业正. TDZ 对油菜微型繁殖的影响[J]. 贵州农学院学报, 1988(2):12-18.
- [192] 杨业正, 卢萍, 蔡志红. 油菜离体培养芽苗随光反应研究[J]. 贵州农业科学, 1984(4):5-8.
- [193] 杨业正, 卢萍, 蔡志红. 油菜幼角果离体培养试验初报[J]. 贵州农业科学, 1982(5):37-33.
- [194] 杨业正, 韦宏恩, 戴培庸. 油菜叶内原生质体分离的研究[J]. 贵州农业科学, 1980(3):31-36.
- [195] 黄先群, 唐丽, 黄燕芬, 等. 甘蓝型油菜核不育系组织培养快速繁殖[J]. 植物生理通讯, 1995(2):119-120.
- [196] 黄燕芬, 黄先群, 唐丽, 等. 甘蓝型油菜雄性核不育系快速繁殖植株性状初步研究[J]. 贵州农业科学, 1996(2):23-26.
- [197] 黄先群, 颜怀珍, 黄燕芬, 等. 甘蓝型油菜不同分枝阶段离体培养分化出苗能力比较[J]. 贵州农业科学, 1994(3):11-14.
- [198] 黄先群, 唐丽, 黄燕芬, 等. 基因型效应对甘蓝型油菜核不育系组织培养再生植株的影响[J]. 种子, 1997(5):25-29.
- [199] 黄先群, 黄燕芬, 唐丽, 等. BA 和 PP333 对油菜试管苗生长的影响[J]. 贵州农业科学, 1999(1):10-13.
- [200] 黄先群, 杨业正, 黄燕芬, 等. 油菜 (*Brassica napus* L.) 胞质雄性不育杂种及其三亲本离体培养分化出苗能力比较[J]. 西南农业学报, 1993(4):108-110.
- [201] 黄先群, 毛堂芬, 李丽, 等. 浅析几个因子对甘蓝型油菜离小孢子培养的影响[J]. 种子, 2008(2):33-39.
- [202] 饶勇, 徐颖, 毛堂芬, 等. 单倍体育种技术在油菜育种材料创新上的应用研究——I. 甘蓝型油菜离小孢子胚状体的诱导发生[J]. 种子, 2003(1):66-67.
- [203] 李超, 饶勇, 陈静, 等. 单倍体育种技术在油菜育种材料创新上的应用研究——II. 胚状体培育及试管苗驯复[J]. 种子, 2004(6):68-70.
- [204] 李超, 饶勇, 陈静, 等. RAPD 标记在油菜雄性核不育两系及杂种纯度检验上的应用研究——I. DNA 快速制备及纯

- 度检测[J]. 种子, 2004(8):13-16.
- [205]李超, 饶勇, 陈静, 等. RAPD 标记在油菜隐性核不育两系及杂种纯度检验上的应用研究——II. 反应体系的优化构建[J]. 种子, 2005(6):15-17.
- [206]肖华贵, 陈静, 李超, 等. 双低、高产、抗(耐)病杂交油菜黔油 12 号的选育研究——III. 杂交种选育、指纹图谱及杂种优势与分子标记预测研究[J]. 种子, 2007(7):92-95.
- [207]沈奇, 高媛媛, 赵德刚. 油菜植株再生和农杆菌介导遗传转化的影响因素[J]. 山地农业生物学报, 2006(5):377-381.
- [208]沈奇, 邓颖天, 赵德刚. 甘蓝型油菜再生与农杆菌介导转化芽苗分化差异[J]. 山地农业生物学报, 2007(5):377-380.

(黄先群 徐 涵)