

外源基因定向插入甘蓝型油菜 C 基因组

李俊 方小平* 王转 李均 罗莉霞 胡琼

(农业部油料作物遗传改良重点实验室, 中国农业科学院油料作物研究所, 武汉 430062. * 联系人, E-mail: xpfang@public.wh.hb.cn)

摘要 外源基因定向插入 C 基因组对于降低转基因甘蓝型油菜(*Brassica napus*, AACC)的生态环境风险具有十分重要的作用. 本研究利用农杆菌介导的遗传转化方法将抗除草剂 *bar* 基因转入到芥蓝(*B. oleracea* var. *alboglabra*, CC)中, 以转 *bar* 基因的芥蓝(C^bC^b)为父本, 非转基因的白菜(*B. rapa*, AA)为母本, 通过种间杂交、子房培养和染色体加倍, 获得 *bar* 基因定向插入 C 基因组的人工合成甘蓝型油菜株系 67 个. PCR 结果表明, 人工合成的甘蓝型油菜 *bar* 基因为阳性的株系 31 个, 阴性的株系 36 个. Basta[®] 喷施结果表明, 分子检测阳性的人工合成甘蓝型油菜高抗除草剂, 分子检测阴性人工合成甘蓝型油菜则不抗. Southern blotting 分析结果表明, 外源 *bar* 基因已整合到人工合成甘蓝型油菜的基因组中.

关键词 *bar* 基因 C 染色体组 定向转基因 人工合成甘蓝型油菜

转基因油菜在加拿大、美国等国家已广泛种植, 在我国虽然转基因食品政策尚未开放, 但转基因菜籽油作为生物柴油的前景特别看好. 因此, 转基因甘蓝型油菜的环境释放导致外源基因扩散到其野生近缘种是否会形成超级杂草已引起人们广泛关注. 大量的研究表明, 甘蓝型油菜向其近缘种, 特别是向野生白菜(*B. rapa*, $2n = 20$, AA)和芥菜(*B. juncea*, $2n = 36$, AABB)的基因漂移是不可避免的^[1-4]. 加拿大已经在野生白菜种群中发现了抗除草剂基因^[5]. 因此, 当前转基因油菜的生态安全研究重点应放在降低转基因向其近缘种扩散的生态环境风险上^[6].

白菜型和芥菜型油菜是较常见的田间和地头杂草. 在自然条件下, 芸薹属 AC 染色体组的甘蓝型油菜与 A 染色体组的白菜类物种^[7,8]和 AB 染色体组的芥菜类物种^[9]容易发生自然杂交、获得天然种间杂种, 但与 C 染色体组的甘蓝类植物极难发生天然杂交、获得杂种^[10,11]. 因此, 降低外源基因向 A 或 AB 基因组物种扩散的几率是解决转基因甘蓝型油菜生态风险的关键因素之一.

Mikkelsen 等人^[12]首先提出甘蓝型油菜中可能存在基因安全整合位点的假说. 该假说认为, 甘白杂种在与 *B. rapa* 回交时的染色体重组过程中, 基因位于不同基因组染色体上将决定该基因向其回交后代中的传递频率. Metz 等人^[8]和 Zhu 等人^[13]在研究转基因甘蓝型油菜与白菜杂交及回交后代中转基因遗传行为时也发现, 有些转基因株系与白菜的回交后代中外源基因的消失速率明显比其他株系快. 他们认为, 当外源基因插入甘蓝型油菜 C 染色体上时基因扩散

的生态风险小. Lu 等人^[14]根据甘蓝型油菜与白菜杂交回交后代不同染色体数目植株分布概率, 建立 3 个数学模型分析无选择压和施加选择压条件下, A 和 C 染色体组转基因油菜外源基因扩散后, 不同回交世代的外源基因消失速率. 研究结果支持 Metz 等人^[8]提出的 C 染色体转基因油菜基因扩散生态风险小的结论.

但前人关于 C 染色体组转基因风险评价的研究^[8,12,14]均存在如下两个问题: () 仅从理论上推测认为回交后代中转基因消失速率快的甘蓝型油菜其转基因位于 C 染色体组上, 未能提供直接的实验证据; () 未能解决如何获得具有低生态风险的 C 染色体组转基因甘蓝型油菜. 甘蓝型油菜染色体小, 且 A 和 C 基因组具有较高的同源性, 区分较为困难^[15], 以甘蓝型油菜为受体材料又无法保证将目的基因转到 C 基因组中. 因此, 本研究先将 *bar* 基因转入芥蓝(CC)基因组中, 再以转基因芥蓝(CC, $2n = 18$)与非转基因白菜(AA, $2n = 20$)杂交, 以人工合成甘蓝型油菜(AACC, $2n = 38$)的方式, 保证将目的 *bar* 基因定向整合到甘蓝型油菜的 C 基因组中, 获得 C 基因组转 *bar* 基因甘蓝型油菜. 本研究为甘蓝型油菜特异染色体组定向转基因、创建低生态风险转基因甘蓝型油菜新品系进行了新的尝试. 获得的 C 染色体组转基因甘蓝型油菜为研究转基因在其近缘物种杂交后代种群中的消长规律, 进一步从实验证据上明确甘蓝型油菜 C 染色体组转基因扩散的生态风险, 以及研究基因在甘蓝型油菜 A 和 C 基因组间的交换频率奠定了良好的材料基础.

1 材料与方 法

() 植物材料. 遗传转化所用的甘蓝品种为香港尖叶中花芥蓝(CC, 2n = 18). 8 个白菜(AA, 2n = 20) 品种: 黑叶白(编号: QF01)、蓉优矮抗青(QF04)、特早 50 白菜薹(QF05)、黄金地小白菜(QF06)、黄金小白菜(QF08)、九月鲜红菜薹(QF10)、潮汕甜白菜(QF11) 和一个双低白菜型油菜品种(QF15). 除双低白菜型油菜来自加拿大外, 其余供试材料均来自我国.

() 菌株与质粒. 根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株为 LBA4404, 所用质粒载体为 pCAMBIA3300. 细菌筛选标记为 *NPT* 基因, 植物筛选标记为 *bar* 基因(图 1).

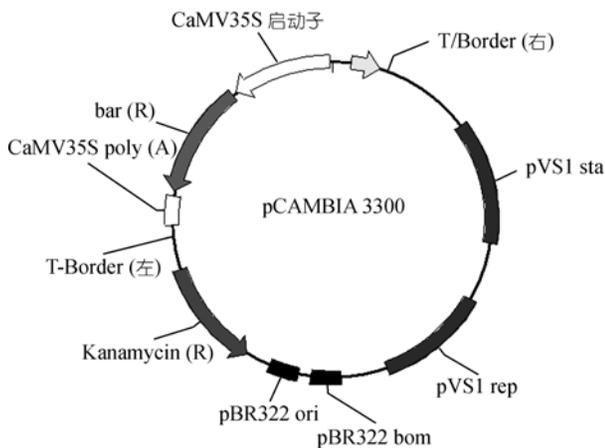


图 1 pCAMBIA3300 质粒图谱

() 芥蓝遗传转化. 将含有 *bar* 基因表达载体 pCAMBIA3300 质粒的农杆菌菌株 LBA4404 划线接种于附加 50 mg/L 卡那霉素的 YEB 平板上, 在 28℃ 下倒置培养 2~3 d. 待菌落长出后, 从 YEB 平板上挑取一个单菌落, 接种于 5 mL YEB (内含 50 mg/L 卡那霉素) 液体培养基中, 置摇床上 200 r/min, 28℃ 下培养过夜. 取菌液划线接种于附加 50 mg/L 卡那霉素的 YEB 平板上, 在 28℃ 下倒置培养 2 d, 见菌落长出后, 将培养皿至于 4℃ 冰箱备用. 每次实验时, 取一个单菌落接种于附加 50 mg/L 卡那霉素的 YEB 平板培养基上, 28℃ 培养 1~2 d, 用 1/2MS 液体培养基(pH 5.4)洗下菌体, 并将菌液稀释至 A₆₀₀ = 0.08, 作为侵染用菌液.

选择籽粒饱满的香港尖叶中花芥蓝种子消毒 (70%酒精 5~10 s, 1%二氯异氰尿酸(dichloroisocya-

nic acid, DICA) 8~15 min、无菌水洗 3~4 次), 植入 1/2 MS 培养基上生长 4~5 d (25℃, 光 16 h/暗 8 h), 切下叶柄长约 1~2 mm 的子叶和长约 0.5~0.7 cm 的下胚轴分别作为具柄子叶和下胚轴外植体.

将外植体置于农杆菌菌液中, 22℃ 侵染 5~10 min, 其间轻轻摇动. 在无菌吸水纸上吸干菌液, 转至 MS+1 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L 6-BA 培养基上, 22℃ 暗培养 2~3 d, 然后转到 MS+4.5 mg/L BA+5 mg/L AgNO₃+500 mg/L Cb(羧苄)上延迟培养 5~7 d, 再转到筛选培养基 MS+4.5 mg/L BA+5 mg/L AgNO₃+500 mg/L Cb+10 mg/L 草胺膦(PPT)上培养 3~4 周, 每 2 周转接新培养基. 待再生绿苗长至 1~2 cm 时, 切下小绿苗, 植入生根培养基 MS+0.2 mg/L NAA+10 mg/L PPT 上, 待形成完整植株时, 经炼苗移栽花盆中遮荫保湿培养.

() T₁ 转基因芥蓝的 PCR 检测. 为尽量避免 T₀ 代转基因植株的假阳性和农杆菌污染, 选取用 PPT 筛选呈阳性的 T₀ 代株系植株进行剥蕾自交, 获得 T₁ 代种子. 将 T₁ 代种子播入网室, 苗期用 1:200 倍稀释 13.5% 的 Basta[®] 喷施. 取抗性转基因芥蓝和非转基因芥蓝植株的幼嫩叶片, 采用 CTAB 法提取植物基因组 DNA [16]. 采用 20 μL 反应体系对目的基因进行 PCR 扩增, 设阴性对照 (以非转基因芥蓝植株总 DNA 为模板) 和阳性对照 (以质粒 DNA 为模板). 反应程序为: 95℃, 2 min; 94℃, 30 s, 50℃, 30s, 72℃, 1 min; 35 循环; 72℃, 5 min. PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测.

检测 *bar* 基因所用的正向引物为 5'-GAT CTC GGT GAC GGG CAG GA-3', 反向引物为 5'-GGC GGT CTG CAC CAT CGT CAA-3', 由上海博亚生物技术有限公司合成.

() 转基因芥蓝后代的遗传分析. 对 T₁ 代转基因芥蓝植株, 花期剥蕾自交, 获得 T₂ 代种子. 将 T₂ 代种子于 2004 年春播入网室, 喷施 1:200 倍稀释的 13.5% 的 Basta[®] 药液, 苗期调查成活与死亡植株数, PCR 检测成活植株中的 *bar* 基因, 计算 *bar* 基因分离比例, 进行 χ² 检验.

() 甘蓝型油菜的人工合成. 2004 年春在青海省农林科学院试验地以 8 个白菜品种作母本、T₁ 代转 *bar* 基因香港尖叶中花芥蓝作父本进行种间杂交. 取授粉 7 d 后的子房, 消毒 (70%酒精 5~10 s, 1% DICA 消毒 8~10 min, 无菌水洗 3~4 次) 后进行培养, 培养基

为附加 500 mg/L 水解酪蛋白的 MS 培养基(琼脂浓度 0.8%, 蔗糖浓度 3.0%)。待子房培养约 35~40 d 后, 剥出子房中的种子, 将剥出的瘪小种子接种在 MS 培养基上萌发, 直到长成正常小苗。切下幼苗移植于含 0.01% 秋水仙碱的 MS 培养基上处理 7~10 d, 进行染色体加倍。然后转接到生根培养基(MS+0.2 mg/L NAA)上生根和扩繁植株, 每株系至少扩繁 3 株以上。待健壮根系形成后, 经炼苗移栽花盆中遮荫保湿培养。

() 细胞学观察。在人工合成甘蓝型油菜花期, 每个株系选取一株, 剥取幼小花蕾中的雌蕊, 用 0.002 mol/L 8-羟基喹啉处理 4 h, 经卡诺液固定 24 h 后, 4 °C 保存于 70%乙醇中, 观察时取所用材料, 在 60 °C 下, 用 1 mol/L 盐酸水解 10 min, 移至玻片上, 加一滴改良的卡宝品红染液, 压片镜检^[17], 进行染色体数观察。

() 转基因油菜的除草剂抗性及分子检测。用 1:200 倍稀释的 13.5% 的 Basta[®] 喷施人工合成油菜植株叶片, 5 d 后调查叶片药害表现, 设非转基因油菜喷施对照。在培养基中加入 15 mg/L 的 PPT, 接入幼苗, 13 d 后调查植株药害及死亡情况, 设非转基因对照。PCR 分子检测方法同转基因芥蓝检测方法。

基因组Southern blotting分析: 取各材料基因组总DNA约 20 µg, 分别用内切酶EcoR 将其完全消化后在 0.8%琼脂糖凝胶上电泳分离。预杂交、杂交和洗膜的程序按Sharpe等人^[18]的方法进行。所用探针为质粒PCR扩增bar基因的 0.5 kb片段, 检测使用地高辛标记试剂盒进行(Roche Diagnostics, Swiss)。

() 花粉活性观察。上午 9~10 时取新鲜花粉用 1%醋酸洋红进行染色, 观察死、活花粉数, 计算花粉成活率。花粉成活率(%) = 着色的花粉粒数目/花粉粒总数×100, 每种花粉观察 3 个视野, 约 500~1000 粒左右花粉, 以普通油菜中双 6 号品种为对照。

2 结果与分析

2.1 农杆菌介导的芥蓝遗传转化

() 农杆菌介导的芥蓝遗传转化。在芥蓝的遗传转化中, 对 3 批次的子叶和下胚轴转化率分别作了统计, 由表 1 可以看出, 利用子叶作为外植体的平均转化率为 8.04%, 利用下胚轴作为外植体的平均转化率为 6.81%。移栽后共获 29 株独立转基因阳性植株,

其中通过子叶侵染获得 21 株, 通过下胚轴侵染获得 8 株。

() 转 bar 基因芥蓝的 PCR 检测。将 T₀ 转基因植株自交获得的 T₁ 代植株进行 PPT 抗性筛选, 出现了抗感分离。敏感植株叶片似水渍状, 随后枯萎死亡, 而抗性植株叶片未出现明显变化(图 2(a))。取 T₁ 抗性植株叶片进行 bar 基因的 PCR 检测, 均扩增出了与阳性对照大小一致的条带; 阴性对照均未扩增出任何谱带(图 2(b))。结果初步表明, bar 基因已整合到芥蓝细胞核基因组中。

表 1 农杆菌介导的子叶与下胚轴遗传转化结果

批次	外植体	外植体数	产绿芽外植体数	转化率(%)
	子叶	165	14	8.48
	下胚轴	187	13	6.95
	子叶	241	20	8.29
	下胚轴	279	20	7.17
	子叶	231	17	7.36
	下胚轴	254	16	6.30



图 2 T₁ 代转 bar 基因芥蓝的分子检测

(a) 苗期喷洒 PPT 筛选; (b) PCR 检测。M, DNA Marker; 1, 空白对照; 2, 阴性对照; 3, 阳性对照; 4~10, 转基因芥蓝植株

() 转基因芥蓝的遗传分析。对部分 T₁ 转基因芥蓝植株自交获得的 T₂ 代芥蓝进行了苗期的 PPT 抗性鉴定并对抗除草剂植株进行 PCR 检测, 结果表明, 株系 QR306, QR307 和 QR308 在 T₁ 代出现抗、感分离, 抗、感分离比分别为 2.93:1, 3.3:1, 2.9:1, χ^2 检验分析符合 3:1 分离比, 呈孟德尔遗传规律(表 2)。结果说明, 这 3 个株系中都插入了单拷贝的 bar 基因, 且外源 bar 基因可以稳定遗传。这 3 个转基因芥蓝株系被选为亲本进行甘蓝型油菜的人工合成。

2.2 甘蓝型油菜的人工合成

() 芥蓝与白菜杂交。本研究中, 对 8 个白菜×芥蓝组合的 3992 个子房进行培养, 共获得 154 粒种子, 得到 92 株杂种苗, 经组织培养扩繁后获得 67 个株系, 平均杂种获得率为 2.30%。从表 3 中可以看出, 对不同的杂交组合进行子房培养, 杂种获得率差异

表 2 T₀代转基因株系的遗传分析^{a)}

转基因株系	调查总株数	PPT 抗性植株	PPT 敏感植株	$\chi^2(3, 1)$
QR306	55	41	14	0.006
QR307	99	76	23	0.165
QR308	156	116	40	0.034

a) $\chi^2_{0.05} = 3.84$

极大。其中黄金小白菜×芥蓝杂种获得率最高，达 14.8%，而黄金地小白菜×芥蓝和九月鲜红菜薹×芥蓝的获得率为 0。但多数组合杂种获得率低，在 4.0% 以下。

() 染色体观察。对 PPT 筛选为抗性的 31 株人工合成油菜染色体计数观察表明，除一株染色体可能为 34 条，3 株染色体为 19 条(可能未加倍)外，其余 27 株均观察到了 38 条染色体，为白菜和芥蓝的染色体数总和(*B.rapa*, $n=10$; *B.oleracea*, $n=9$)(图 3(g))。

() 农艺性状表现。从植株形态上看，人工合成甘蓝型油菜生长健壮，兼具有父母本的性状。但多数叶片较宽大，裂叶数较少，叶色较浅，跟母本相似。调查结果显示，95% 组合叶片光滑无毛，80% 组合叶柄短，叶片大而厚，96% 组合有叶耳，82% 组合的角果较短，仅 4~8 粒种子/荚(数据未列出，图 3(e))。合成油菜花色均为乳白色(或黄白色)(图 3(d))，与现有甘蓝型油菜品种杂交结实表现正常，无明显生殖障碍。合成油菜花期较长，分枝能力强，分枝与主茎夹角小，表现出较强的抗逆性，比现有甘蓝型油菜晚熟 8~15 d(图 3(h))。

() 转基因检测。我们对获得的 67 个人工合成油菜株系进行 PCR 分子检测，结果表明，人工合成的甘蓝型油菜 *bar* 基因阳性株系 31 个(图 3(f))，阴性株系 36 个。阳性植株转入附加 15 mg/L PPT 和 0.2 mg/L NAA 的 MS 培养基中(图 3(c))或移栽后用 1 200 倍稀释 13.5% 的 Basta[®] 喷洒植株叶片，结果也与 PCR 分子检测结果相符合。随机抽取 3 个 PCR 及

Basta[®] 检测为阳性的人工合成油菜株系(同一转基因父本)及其父本芥蓝进行基因组 Southern blotting 分析，结果表明，外源 *bar* 基因已经整合到了人工合成甘蓝型油菜的基因组中(图 4)，而且随机酶切的杂交带型表明来源于父本芥蓝中的 *bar* 基因可能在这 3 个人工合成甘蓝型油菜株系中没有与 A 基因组发生交换。

() 花粉育性观察。对 11 个人工合成油菜株系共 25 株的花粉育性情况观察表明，人工合成油菜同一株系的不同植株之间的花粉育性变异较大，有 3 个株系的花粉育性的变异幅度达到了 20% 以上(表 4)。但花粉育性的平均值大多在 60%~90% 之间(普通油菜对照的花粉染色率为 98.88%)。

3 讨论

与其他远缘杂交不同，甘蓝(*B. oleracea*)与白菜(*B.rapa*)杂交，通过染色体加倍获得的新双二倍体杂种与栽培的普通甘蓝型油菜同种，是一个甘蓝型油菜新类型。在真假杂种的鉴定上，我们选取父母本间的差异性状如白花等作为标记性状，结合染色体观察、其他农艺性状表现、*bar* 基因鉴定和花粉育性调查，从而保证杂种的真实性。从理论上说，杂种应具有很好的花粉活力，但实际上它们的活力却降低了 [19]。Jørgensen 和 Andersen [20] 报道，杂种花粉的活性在 16%~86%，我们观察到的花粉可染率 58.61%~88.95%。

研究表明，甘蓝型油菜 A、C 基因组具有较高的序列同源性，但一般不能很好地配对，基因间相互交换的可能性相对较小 [14,18,21,22]。Namai 等人 [23] 观察发现，在白菜与甘蓝型油菜杂种一代减数分裂中期三价体频率为 13%~72%。Lu 等人 [24] 研究认为，C 染色体与 A 染色体的基因重组频率应小于 0.7%~4.0%。而且当基因位于着丝粒附近时，交换频率可能会更低。本

表 3 白菜×芥蓝子房培养杂种获得率^{a)}

杂交组合	培养子房数	获得种子数	杂种苗数	结实率(%)	杂种获得率(%)
QF01×J	766	9	5	1.17	0.65
QF04×J	493	19	17	3.85	3.45
QF05×J	378	15	3	3.97	0.79
QF06×J	525	11	0	2.10	0
QF08×J	399	78	59	19.55	14.8
QF10×J	462	3	0	0.62	0
QF11×J	483	8	3	1.66	0.62
QF15×J	486	11	5	2.26	1.03
合计	3992	154	92	3.86	2.30

a) J, 转 *bar* 基因芥蓝; 结实率=获得种子数/子房数×100%; 杂种获得率=杂种苗数/子房数×100%。

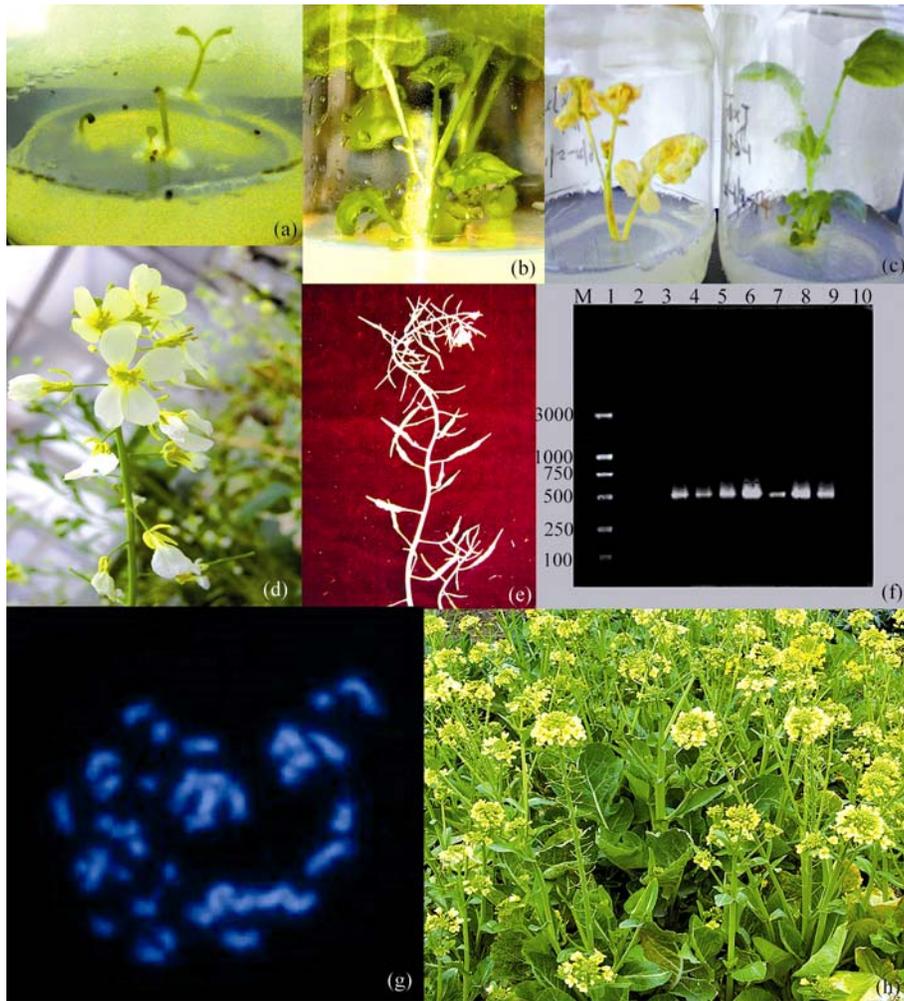


图3 人工合成 C 基因组转 *bar* 基因甘蓝型油菜

(a) 杂种种子在 MS 培养基上的萌发情况; (b) 杂种苗转入附加 0.2 mg/L NAA 的 MS 培养基中的生长状况; (c) 杂种苗在附加 15 mg/L PPT 和 0.2 mg/L NAA 的 MS 培养基中筛选; (d) 植株花期表现; (e) 植株结荚表现; (f) *bar* 基因 PCR 扩增结果; (g) 合成油菜染色体图片; (h) 合成油菜花期图片. M, DNA Marker; 1, 空白对照; 2, 阴性对照; 3, 阳性对照; 4~10, 人工合成甘蓝型油菜

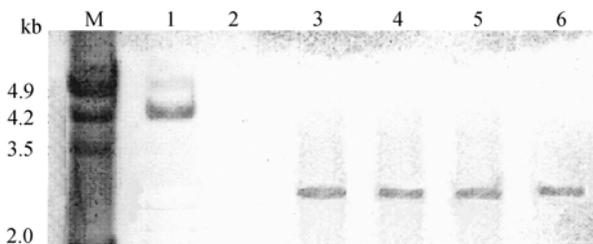


图4 人工合成油菜的基因组 Southern blotting 分析
所用探针为 PCR 扩增质粒 pCAMBIA3300 的 *bar* 基因片段(0.5kb). M, Marker; 1, 质粒正对照; 2, 阴性对照; 3, 转基因芥蓝基因组 DNA; 4~6, 人工合成油菜基因组 DNA

试验的基因组 Southern blotting 分析结果在一定程度上也能说明外源 *bar* 基因在人工合成油菜中没有发

生 A, C 基因组间的交换. 因此, 在 95% 的概率水平上我们已获得了 C 染色体组转基因甘蓝型油菜. 以该外源 *bar* 基因为目标基因, 利用 A 和 C 基因组的特异性(如 RAPD)标记和 GISH 等方法对该转基因油菜进一步进行遗传分析将会为研究 A, C 染色体组上基因的交流频率、探明其交换机制提供直接的实验证据.

在甘蓝型油菜(*B. napus*, AAC, $2n = 38$)与白菜(*B. rapa*, AA, $2n = 20$)杂交后形成的三倍体杂种(AAC, $2n = 29$)中, C 染色体向配子中的分配是随机的 [25]. 在与白菜的回交世代中, 配子中的 C 染色体在受精时因没有与其同源的染色体配对而容易丢失 [26]. Lu 等人 [26] 的研究发现, 带有 C 染色体的个体由于其染色体非整倍性而降低了生活力, 减数分裂时甘

表 4 人工合成油菜的花粉育性^{a)}

杂交组合	株系编号	观察株数	观察花粉数(平均)	花粉育性平均值(%)
QF01×J	1	2	671	71.27±0.97
QF01×J	3	6	635	88.95±33.30
QF01×J	4	2	777	75.30±26.80
QF05×J	1	1	597	79.06
QF08×J	5	1	708	87.57
QF08×J	22	2	723	86.72±1.36
QF08×J	34	2	805	76.90±7.44
QF08×J	39	2	993	58.64±20.82
QF08×J	41	4	856	58.61±15.10
QF08×J	51	1	785	73.89
QF11×J	3	2	787	82.13±1.08

a) 观察花粉数(平均) = 同一株系各株观察的花粉数之和/观察株数

杂种所形成的 $n = 10\sim 19$ 的配子中, $n = 10$ 配子的相对适应性是其他 $n = 11\sim 19$ 配子的 10~50 倍, 因此随着回交世代的增加, 回交后代植株的染色体数目不断趋向于 20. 大量研究表明, A 染色体组上转基因向甘白杂种回交后代中传递频率为 50% 左右 [8,13,14,25,27]. Metz 等人 [8] 研究表明, 在使用除草剂时两个转基因株系外源转基因向 BC_1 中的传递频率为 26% 和 46%. Lu 等人 [14] 认为, C 染色体组上转基因向 BC_1, BC_2, BC_3 和 BC_4 中的传递频率分别为 39.9%, 7.7%, 1.2% 和 0.1%; Metz 等人 [8] 研究表明, C 染色体组上转基因向 BC_2, BC_3 和 BC_4 中的传递频率分别为 5%, 11%, 9%. Zhu 等人 [13] 研究认为, 位于 A 和 C 基因组上的转基因在 BC_1 代均呈 1 : 1 分离, 但在 BC_2 代以后, C 基因组上的转基因在向其回交后代中的传递频率明显比 A 基因组上转基因低, 有一个株系在 BC_4 代时转基因已丢失. Lu 等人 [14] 认为, 在不反复种植转基因甘蓝型油菜和不人为对转基因进行筛选的情况下, 回交后代中位于 C 染色体组上的转基因在多代以后可能会消失. 因此与位于 C 染色体上的基因相比, 基因位于甘蓝型油菜 A 基因组上更容易转移到 A 基因组的白菜或 AB 基因组的芥菜中 [8]. 但在对 C 染色体组上转基因向其杂交及回交后代的传递频率上仍存在分歧. 笔者认为, 造成这种分歧的原因可能是由于转基因在油菜基因组中的位置不明确. Tomiuk 等人 [28] 也认为 Metz 等人 [8] 所用的 2 个转基因油菜品系外源基因的插入位点无法确定. 因此, 获得 C 染色体转基因甘蓝型油菜对于探明前人在 C 染色体组上转基因的传递频率存在差异的原因, 明确转基因在其杂交及回交后代中的传递规律具有十分重要的意义.

人工合成甘蓝型油菜是当前拓宽油菜遗传资源、进行油菜遗传育种的一条重要途径. 转基因是当前进行作物遗传改良最有效的手段, 但由于转基因的环境释放所带来的生态风险问题限制了转基因育种的应用与发展. 本研究基于前人所提出的甘蓝型油菜的安全整合位点理论 [12] 和芸薹属物种间特殊的亲缘关系 [29], 结合当前育种实际, 提出了利用转基因甘蓝 (CC) 与非转基因白菜杂交从而获得 C 染色体转基因甘蓝型油菜的新策略, 获得的 C 染色体组转基因甘蓝型油菜, 为开展不同染色体组转基因甘蓝型油菜的基因飘逸生态风险研究奠定了材料基础, 为进一步明确 C 染色体上转基因甘蓝型油菜的安全性, 揭示甘蓝型油菜中 A, C 基因组间的基因交换规律, 创建培育我国低生态风险转基因甘蓝型油菜新材料应用于生产开辟了一条新途径. 进一步的研究工作正在进行之中.

致谢 感谢卢长明博士、陆光远博士为本文提出了宝贵的修改意见. 本工作为国家高技术研究发展计划(批准号: 2002AA212011, 2003AA222101 和 2005AA241030)和国家自然科学基金(批准号: 30270791)资助项目.

参 考 文 献

- 1 Wilkinson M J, Elliott L J, Allainguillaume J, et al. Hybridization between *Brassica napus* and *B. rapa* on a national scale in the United Kingdom. *Science*, 2003, 302: 457—459 [DOI]
- 2 Mikkelsen T R, Jensen J, Jørgensen R B. Inheritance of oilseed rape (*Brassica napus*) RAPD markers in a backcross progeny with *Brassica Campestris*. *Theor Appl Genet*, 1996, 92: 492—497 [DOI]
- 3 Snow A A, Andersen B, Jørgensen R B. Costs of transgenic herbicide resistance introgressed from *Brassica napus* into weedy *Brassica rapa*. *Mol Ecol*, 1998, 8: 605—615 [DOI]

- 4 Hauser T P, Shaw R G, Østergård H. Fitness of F1 hybrids between weedy *Brassica rapa* and oilseed rape (*B. napus*). *Heredity*, 1998, 81: 429—435 [\[DOI\]](#)
- 5 Warkwick S I, Simard M J, Légère A, et al. Hybridization between transgenic *Brassica napus* L and its wild relatives: *B. rapa* L, *Raphanus raphanistrum* L, *Sinapis arvensis* L, and *Erucastrum gallicum*(wild) O. E. Schulz. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 528—539 [\[DOI\]](#)
- 6 Metz P L J, Nap J P. A transgene-centered approach to the biosafety of transgenic plants: overview of selection and reporter genes. *Acta Bot Neerl*, 1997, 46: 25—50
- 7 Hauser T P, Jørgensen R B, Østergård H. Fitness of backcross and F₂ hybrids between weedy *Brassica rapa* and oilseed rape (*B.napus*). *Heredity*, 1998, 81: 436—443 [\[DOI\]](#)
- 8 Metz P L J, Jacobsen E, Nap J P, et al. The impact on biosafety of the phosphinothricin-tolerance transgene in inter-specific *B. rapa*×*B. napus* hybrids and their successive backcrosses. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 442—450 [\[DOI\]](#)
- 9 Jørgensen R B, Andersen B, Hauser T P, et al. Introgression of crop genes from oilseed rape (*Brassica napus*) to related wild species: An avenue for the escape of engineered genes. *Acta Horticulturae*, 1998, 459: 211—217
- 10 Scheffler J A, Dale P J. Opportunities for gene transfer from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) to related species. *Transgenic Res*, 1994, 3: 263—278 [\[DOI\]](#)
- 11 Eastham K, Sweet J. Genetically modified organisms (GMOs): The significance of gene flow through pollen transfer. Environmental Issue Report No 28, Copenhagen: European Environment Agency, 2002. 75
- 12 Mikkelsen T R, Andersen B, Jørgensen R B. The risks of crop transgene spread. *Nature*, 1996, 380: 31 [\[DOI\]](#)
- 13 Zhu B, Lawrence J R, Warwick S I, et al. Inheritance of GFP-Bt transgenes from *Brassica napus* in backcrosses with three wild *B rapa* accessions. *Environ Biosafety Res*, 2004, 3: 45—54 [\[DOI\]](#)
- 14 Lu C M, Kato M, Kakihara F. Destiny of a transgene escape from *Brassica napus* into *Brassica rapa*. *Theor Appl Genet*, 2002, 105: 78—84 [\[DOI\]](#)
- 15 Snowdon R J, Friedrich T, Friedt W, et al. Identifying the chromosomes of the A- and C-genome diploid *Brassica* species *B. rapa* (syn. *campestris*) and *B. oleracea* in their amphidiploid *B. napus*. *Theor Appl Genet*, 2002, 104: 533—538 [\[DOI\]](#)
- 16 Doyle J J, Doyle J I. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990, 12: 13—15
- 17 Li Z, Liu H L, Luo P. Production and cytogenetic hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus*. *Theor Appl Genet*, 1995, 91: 131—136
- 18 Sharpe A G, Parkin I A, Keith D J, et al. Frequent nonreciprocal translocations in the amphidiploid genome of oilseed rape (*Brassica napus*). *Genome*, 1995, 38: 1112—1121
- 19 Beversdorf W D, Weiss-Lerman J, Erickson Lr, et al. Transfer of cytoplasmically inherited triazine resistance from bird's rape to cultivated oilseed rape (*Brassica campestris* and *B.napus*). *Can J Genet Cytol*, 1980, 22: 167—172
- 20 Jørgensen R B, Andersen B. Spontaneous hybridization between oilseed rape (*Brassica napus*) and weedy *B. campestris* (*Brassicaceae*): A risk of growing genetically modified oilseed rape. *Am J Bot*, 1994, 81: 1620—1626 [\[DOI\]](#)
- 21 Parkin I A P, Sharpe A G, Keith D J, et al. Identification of the A and C genomes of amphidiploid *Brassica napus* (oilseed rape). *Genome*, 1995, 38: 1122—1131
- 22 Parkin I A P, Lydiate D J. Conserved patterns of chromosome pairing and recombination in *Brassica napus* crosses. *Genome*, 1997, 40: 496—504
- 23 Namai H, Sarashima M, Hosoda T. Interspecific and inter-generic hybridization. In: Tsunoda S, Hinada K, Gomez-Campo C, eds. *Brassica Crops and Wild Allies Biology and Breeding*. Tokyo: Japanese Science Society Press, 1980. 191—202
- 24 Lu C M, Xiao L, Wu Y H. Ecological risk assessment of transgenic rapeseed in China. *J Agric Biotechnol*, 2005, 13(3): 267—275
- 25 Nozaki T, Mishiba K, Mii M, et al. Construction of synteny groups of *Brassica alboglabra* by RAPD markers and detection of chromosome aberrations and distorted transmission under the genetic background of *B. campestris*. *Theor Appl Genet*, 2000, 101: 538—546 [\[DOI\]](#)
- 26 Lu C M. Fertilization fitness and relation to chromosome number in interspecific progeny between *Brassica napus* and *B rapa*: a comparative study using natural and resynthesized *B. napus*. *Breed Sci*, 2001, 51: 73—81 [\[DOI\]](#)
- 27 Snow A A, Andersen B, Jørgensen R B. Costs of transgenic herbicide resistance introgressed from *Brassica napus* into weedy *B rapa*. *Mol Ecol*, 1999, 8: 605—615 [\[DOI\]](#)
- 28 Tomiuk J, Hauser T P, Jørgensen R B. A- or C- chromosomes, does it matter for the transfer of transgenes from *Brassica napus*. *Theor Appl Genet*, 2000, 200: 750—754 [\[DOI\]](#)
- 29 U N. Genomic analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japan J Bot*, 1935, 7: 389—452

(2006-02-27 收稿, 2006-04-17 接受)