

文章编号: 1005-0906(2003)02-0028-04

玉米生物技术育种的研究

杜娟, 王罡

(中国人民解放军军需大学植物基因工程研究中心, 长春 130062)

摘要: 本文对我国重要的粮食作物玉米在细胞工程、基因工程和分子标记等生物技术的育种与应用方面的研究加以概述。

关键词: 玉米; 细胞工程; 基因工程; 分子标记

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Study on Breeding of Biotechnology of Maize

DU Juan, WANG Gang

(Research Center for Plant Genetic Engineering, the Quartermaster University of PLA, Changchun Jilin 130062)

Abstract: The breeding and application of biotechnology of cell engineering, genetic engineering and molecular marker were reviewed on maize, an important food crop of our country.

Key words: Maize; Cell engineering; Genetic engineering; Molecular marker

自从 7000 年前印第安人把野草改良成玉米以来,玉米的新品种选育受到国内外专家的普遍重视,目前利用现代生物技术进行玉米品种改良的研究已取得了令人瞩目的成就,美国 Monsanto 公司相继推出了转基因抗虫、抗除草剂和高产玉米新品种。玉米是主要的粮食及饲料作物,中国是玉米第二大生产国,吉林省是玉米的主产区,其播种面积占全球玉米面积的 3%。所以,稳定播种面积提高玉米产量、改善玉米品质和抗性,实现玉米生产的高产、优质就成为不仅是常规育种、也是生物技术研究的重要内容之一。玉米品种改良其核心问题是基础材料,在禾本科作物中玉米即使在科研和生产技术先进的国家也普遍缺乏种质资源,我国就更加缺乏高产和超高产育种所必须依赖的种质基础。因此资源的引进、鉴定、改良、创新和利用十分迫切。由于玉米作物特殊性,使得其遗传转化具有一定的难度,在禾本科作物中玉米进展比较缓慢,但近几年特别是 90 年代末期已取得了重要突破性的研究进展。

1 玉米细胞工程育种

收稿日期: 2002-12-10

作者简介: 杜娟(1966-),女(汉),吉林长春人,助理研究员,学士学位,专业方向:植物基因工程。

基金项目:“国家植物转基因中试及产业化基地”专项课题(项目编号 J99-B-001)

玉米组织和细胞培养研究同其它禾本科一样起步比较早,1975 年,Green 和 Phillips^[1]用玉米幼胚作外植体,诱导出二倍体愈伤组织,首次获得再生植株。随着体细胞培养技术的不断改进,目前已经能从幼穗^[2]、芽顶端分生组织^[3]、叶片^[4]、花药^[5]等诱导愈伤组织并再生植株,其中幼胚是最易诱导也是目前使用最多的外植体^[6,7,8,9]。其中谢友菊等人以玉米幼穗为材料,多个基因型诱导出胚性愈伤组织取得了可喜进展。由于玉米组织培养受基因型限制,因而国内成功报道并不多见。尽管难度很大但经过几年努力,我国山东大学、山东省农科院等单位张举仁等,不但建立起玉米体细胞无性系的成套技术,并注重选材以骨干玉米自交系和单交种为主,并通过细胞突变体筛选获得抗逆自交系。如对继代半年的胚性愈伤组织进行筛选,筛选培养基为加有 5%~30% 体积的小叶斑病菌培养液的改良 MS 培养基并加 2.4-D 1 mg/L。采用人工接种方法对再生植株进行抗病性鉴定,进而获得了抗小叶斑病的自交系,对综合性状优良的 921068 已组配出高产抗病早熟单交种,1997 年示范面积 1 133 hm²,比对照增产 11.62%。经耐盐筛选创造出玉米耐盐种质,从中培育出耐盐(0.5%~0.6%NaCl)自交系和耐盐(0.6%~0.9%NaCl)高产单交种,现已推广 5 533 hm²^[10]。1996 年,母秋华等通过高培养力材料为桥梁亲本与高蛋白、高糖、高配合力

等种质杂交创造了一批培养力高于 10% 的基因型重组材料。从中筛选出 50 份进行整理、编目并在国家库长期保存。通过花粉及幼胚培养建立了四个无性系,对获得的 70 份生物工程纯系分期进行了配合力测定,双 B 早 X 吉 818 参加了吉林省区域试验,军单 91049 参加了省预备试验,产量高达 12 473.7 kg/hm²[11]。1998 年,我们利用马齿、硬粒、甜质、爆裂玉米品种之间的亚远缘杂交,培养出一批增殖倍数(4 周)达 6~8 倍的体细胞无性系,并获得了甜玉米及马齿×爆裂玉米杂交代后 F₀ 的体细胞 Clone 与自交结实株系。创造性地采用 8114 全量液体培养基,对目的花粉进行匀浆处理,经 24 h 冷冻后,利用花粉管通道进行全息 DNA 的转移。获得一批后代,经过 4 个生长周期的田间选择,已获得 15 个有目的性状的自交系及突变体。对体细胞幼胚胚性愈伤组织 9577、95je6、9565 × 9563 等进行了悬浮培养及单细胞培养,建立了 9577、65×63 的悬浮系,9577、95je6 单细胞培养形成胚状体并再生植株。9577、95je6 分别是甜玉米及高油玉米,甜玉米及高油玉米单细胞培养成功尚未见报道。抗除草剂 Bar 基因转移获得抗 Basta 除草剂的 Clone 再生成熟植株。1994~1997 年同中国科学院遗传研究所合作进行 gus、Bar 抗性基因转移的研究。本课题成功地建立了 4 个玉米体细胞遗传转化授体系统,用基因枪法转移 Bar 基因获得再生植株 50 株,成活植株 2 株。用玉米双列杂交法〔12P(P-1)〕对花粉 Clone Pa10-1 等 9 个玉米细胞工程育成的纯系进行了一般配合力和特殊配合力的测定。Pa10-1、S9567、S9537 分别与 340 杂交,一般配合力及特殊配合力均达到较高水平。其中 9537(Mo17 药 3m7) × 340,产量达 14 494 kg/hm²[12]。单倍体育种也是利用组织培养方法进行禾本科作物育种的一条重要途径。所获单倍体苗加倍率也较高,但花药愈伤组织的诱导受基因型影响非常大,大多数材料难以成功。由于利用单倍体方法进行育种对于玉米更有其重要意义,可以大大缩短自交系的选育周期,加快育种进程,还可实现配子选择,提高有利基因型的入选效率。而由纯合二倍体构成的遗传群体,还是进行基因分子定位、基因互作和分子标记的宝贵材料。因此,对于玉米来说通过孤雌生殖的途径获得单倍体的研究受到了研究者关注,特别是孤雌生殖诱导系诱导单倍体的研究国外进展较快,诱导频率高、方法简单、成本低等均优于花药培养等方法。国内已经起步并已经创造出了诱导率和其它综合性状得到全面提高的新的孤雌生殖诱导系[13]。

2 玉米基因工程育种

禾本科植物尤其是重要的粮食作物小麦、水稻、玉米一直被排斥在农杆菌宿主范围外,直到 90 年代以后,由农杆菌介导转化这三大粮食作物才逐步取得成功,因此 80 年代以来,相继建立和发展了许多基因直接转移技术如基因枪技术和花粉管通道技术。80 年代末玉米原生质体再生植株的成功,为利用原生质体进行基因转化奠定了基础,常用的方法为电击法、PEG 法和阳离子介导法,所用基因多为 NPTII 等,并均能获得转化的再生植株或转化的愈伤组织,其中 PEG 和电击法的转化率可达 0.1%~0.3%,阳离子法可达 8%,但由于玉米原生质体的植株再生受基因型严格限制,无法应用于许多栽培品种。所以人们不得不放弃这些方法,而将目光又转向了基因枪、花粉管通道等技术方法。这些方法是以玉米完整细胞和组织为受体。因此,到目前为止,对于玉米基因转化方法中最为有效的、用的最多的方法是基因枪法,其受体广泛,可以是悬浮细胞系、愈伤组织、外植体(幼穗、幼胚或成熟胚)等[14]。建立良好的受体系统是玉米转基因成败的关键环节,已获得的转基因玉米大多数来源于模式自交系 A188 和 B73 及其衍生系和杂交种、以及墨西哥甜玉米等,其综合农艺性状不能满足生产要求。国内研究也仅仅局限于少数杂交种和极少数自交系。本研究室建立了玉米基因枪、农杆菌介导转基因的受体系统,通过 20 余个玉米基因型的田间与实验室筛选,确定 7922、8902、340、吉 853、4112、Mo17、846、477 为高频再生转基因受体材料。通过基因枪轰击、农杆菌侵染共获得转基因玉米移栽植株 1746 株,送往公主岭一转基因基地 1 026 株,部分转基因植株通过分子检测结果阳性[4,6,8,25,26]。这些自交系组配玉米单交种在吉林省及辽宁等地大面积推广,并继续应用于新的苗头组合,外源 Bt 基因导入稳定纯合后即可用于杂交种的组配,生产潜力巨大。国内所用基因 GUS 报道基因和 Pat 选择抗性基因、Bt 基因及细菌淀粉液化酶 SacB 基因等。大多获得可育转化植株,有的可遗传给子代或稳定遗传,如将 SacB 基因转入玉米不仅促进玉米合成具有较高经济价值的果聚糖,而且有助于研究玉米种子中蔗糖代谢和淀粉合成途径[15]。国内利用该技术研究较深入和成功的、且报道最早的是北京农业大学生物学院王国英、赵天永等。1994 年报道了赵天永、王国英、谢友菊用基因枪将 GUS 基因导入玉米和小麦的茎尖分子组织的结果。所用

基因枪为 JG-700 型火药基因枪,质粒为 PBI121,携带 NPTII 基因和由 CaMV35S 启动子控制的 GUS 基因和 nos3' 的调控区域。轰击部位为玉米萌发幼芽,检测已证明在整体水平上导入玉米茎尖分生组织并获表达,为以离体材料导入基因后再生有困难的作物提供了新的转化途径^[16]。1995 年又报道了王国英成功地用基因枪将毒蛋白基因转入玉米及转基因植株的再生^[17]。1997 年又报道了解放军农牧大学原亚萍等用基因枪法将防御素基因转入玉米并再生植株。以玉米愈伤组织为受体,用基因枪轰击将防御素基因转入玉米细胞,经卡那霉素筛选及分化培养获得一再生植株^[18]。1999 年报道了中国农科院生物技术中心董云洲等用基因枪法转化花粉获得转基因谷子和玉米,所用基因为 GUS。转玉米频率为 0.5%~0.21%,主要技术过程为收集花粉,用 JQ-700 型基因枪将 PBI121 质粒 DNA 射入花粉,经人工授粉得到大量的种子,种子在加卡那霉素的培养液中萌发生长,筛选到抗性苗,经 GUS 组织化学和分子杂交证明外源基因已整合与表达^[19]。而更早些的是 1993 年报道了北京农业大学丁群星等用子房注射法将 Bt 毒蛋白基因导入玉米的研究。为国内外首次成功地用子房注射法将 Bt 毒蛋白基因导入玉米自交系,获得一株转基因玉米(T₀)。自交留种得到 71 株 T 代植株,PCR 扩增检测有 7 株呈阳性反应,其中 4 株进行抗玉米螟虫测试呈现一定的抗虫效果,并进行了分子验证和成功的重复试验。该技术是利用自然生殖过程,简便而有效,可直接得到正常的转基因植株^[20]。1974 年中国科学院上海化学研究所周光宇设计了自花授粉后外源 DNA 导入植物的技术即花粉管通道技术。这一技术同其它转基因技术相比,具有简单、方便、育种时间短、任何基因源都可用来基因转化,并可直接运用到常规育种等优点^[21]。1983 年周光宇等人在 *Method in Enzynology* 杂志上报道了棉花通过花粉管通道法导入外源 DNA 获得成功的报道^[22]。1995 年祁永红等陆续报道了利用花粉管通道等技术成功地将外源总 DNA (包括大豆 DNA 等)导入玉米自交系,不仅建立了成熟的导入技术,同时获得了具有广泛变异的不同类型的自交系,包括与玉米品质有关的氨基酸含量的变化等^[23,24]。2002 年,王罡等将 Bt 基因通过花粉管通道法导入吉林省骨干玉米自交系^[25]。1999 年黄璐、卫志明等用带有质粒 pGIH 的根癌农杆菌 EHA101 转化玉米栽培品种的愈伤组织,获得 8.1%的转化率,而且他们还对比转化的愈伤组织中沉默外源基因的甲基化现象进行了

分析^[26]。2001 年张荣、王国英等用根癌农杆菌 LBA4404 转化 A188、B73、综 3、综 31、莱 1029 及其间的杂交种,获自交系综 3、P9-10 再生植株并结实。Southern 杂交证实了潮霉素抗性基因在 P9-10 中的整合^[27]。另外,本实验室正在进行利用转基因植物生物反应器生产口服或食用口蹄疫和爱滋病疫苗。当然,这些方法(基因枪法、子房注射法等)及所用材料,均有待继续完善和摸索,以提高转化效益和重复性,尽快进入玉米品种改良的应用阶段。

3 玉米分子标记辅助育种

在玉米品种改良中利用分子标记进行育种材料选择,称为分子标记辅助育种。近年来,世界各国都十分重视分子标记育种的研究。分子标记是 80 年代产生的以 DNA 多态性为基础的遗传标记,它具有其独特的优点,即在植物的不同发育阶段、不同环境条件下、不同组织都可以进行检测,使得对基因型的早期选择成为可能。所建立的遗传标记不仅数量大,而且在后代中表现为显性或共显性遗传,因此不仅有利于对隐性基因的选择,而且利用与目标基因紧密连锁的分子标记对育种后代材料进行相关选择,可提高选择的准确性,缩短时间,减少工作量,提高育种效率^[28]。分子标记技术 RFLP、AFLP、SSR、RAPD 等主要应用于基因标记、基因图谱绘制、指纹分析、遗传距离测定、预测杂种优势及鉴定,其中玉米的基因图谱上已标记了 600 多个位点,平均每条染色体上有 60 多个。在美国俄亥俄州立大学每份种质资源的指纹图谱都随时可从计算机中调出。该大学分子标记工作主要是想找出控制产量的基因位点,发现产量性状基因位点分布在多条染色体上,工作难度大。目前获得初步成效的是将玉米高产基因从自交系 T×303 转到 B73 中,从 Oh43 转到 Mo17 中,育成了 B73 和 Mo17 各自的增强型自交系,用这两个增强型自交系配成的杂交种比对照增产 15%^[29]。1999 年玉米科学报道了北京市农林科学院玉米研究中心赵久然等应用 RAPD 分子标记技术选配强优势玉米杂交组合的研究。他们对我国 46 个重要玉米自交系及部分优良自交系相互之间的遗传距离与其杂交组合杂交优势的关系,进行 RAPD 分子标记。结果表明应用 RAPD 分子标记测得的自交系间遗传距离与其杂交优势显著正相关,即玉米自交系之间遗传距离越大杂交种子子粒产量越高,杂交优势就越强。并得出距离 6.0 可作为预测强杂交优势的临界值^[30]。主要粮食作物的一批重要基因已被标记,如抗病虫、

耐盐基因等^[31]。随着该技术的不断完善简化,不久将成为常规育种技术中一个重要育种体系。综上所述,玉米育种改良即将进入一个新的发展时期,它同水稻、棉花一样,在生物技术领域中不断建立和完善自己的育种新体系。我省急需加强有关应用基础研究,使常规育种有一个较大的创新,在提高玉米产量、改良玉米品种品质、拓宽育种材料遗传基础、提高玉米抗逆性等方面,特别是使玉米抗虫和抗病等先有一个新突破。

参考文献:

- [1] Green C E, Phillips. R I Plant Regeneration from Tissue Cultures of Maize [J]. *Crop Science*, 1975, 15: 417-418.
- [2] 徐龙珠,张根发. 玉米幼穗离体培养体细胞胚高频发生的研究[J]. *西北植物学报*, 1997, 17(3): 405-409.
- [3] 李学红,张举仁. 玉米茎尖离体培养直接产生雌雄花序的研究[J]. *中国科学(C 辑)*, 1999, 29(2): 186-193.
- [4] 杜娟,王 罡(2001). 玉米自交系叶片培养及再生植株的研究[J]. *吉林农业大学学报*, 2001(23)3: 34-36.
- [5] 杜娟,母秋华,贾玉峰,等. 利用桥接组合的转育方法提高玉米花药诱导率的研究[J]. *玉米科学*, 1999, 7(3): 16-18.
- [6] 杜娟,余云舟,张领兵,等. 玉米自交系 II 型胚性愈伤组织诱导及遗传转化初报[J]. *吉林农业大学学报*, 2000, 22(4): 41-44.
- [7] Prioli, L M, Sondabl M R. Plant Regeneration from and Recover of Fertile Plants Protoplasts of Maize[J]. *Bio/Tech*, 1989, 7(3): 589-594.
- [8] 杜娟,常国权,季 静,等. 玉米自交系愈伤组织的诱导、RAPD 分析及扫描电镜观察[J]. *作物学报*, 2002, 28(2): 282-285.
- [9] 杜娟,季 静,贾玉峰,等. 提高玉米胚性细胞系诱导再生植株的研究[J]. *玉米科学*, 2000, 8(增刊): 3, 28.
- [10] 张举仁,等. 利用组织培养技术选育玉米抗小叶斑病突变体[J]. *生物工程学报*, 1998(4): 456-459.
- [11] 母秋华,杜娟,于树清,等. 玉米高培养力种质资源及生物技术后代保存利用的研究[J]. *玉米科学*, 1996, 4(3): 1-6.
- [12] 母秋华,原亚萍,赵 明,等. 玉米花粉幼体细胞克隆后代遗传操作以及杂种优势利用的研究[J]. *遗传(增刊)*, 1998, 20(增刊): 135.
- [13] 刘志增,等. 玉米杂交诱导孤雌生殖单倍体研究进展[J]. *玉米科学*, 1999, 7(2): 16-19.
- [14] 杜娟,王 罡,王 萍,等. 玉米遗传转化系统的研究进展[J]. *遗传*, 2001, 23(1): 69-72.
- [15] 黄璐,等. 玉米的遗传转化[J]. *植物生理学通讯*, 1997(3): 226-232.
- [16] 赵天永. 用基因枪将 GUS 基因导入玉米和小麦的茎尖分生组织[J]. *农业生物技术学报*, 1994(2): 93-94.
- [17] 王国英,等. 用基因枪将毒蛋白基因转入玉米及转基因植株的再生[J]. *中国科学 B 辑*, 1995(25): 71.
- [18] 原亚萍,等. 用基因枪法将防御素基因转入玉米并再生植株初报[J]. *吉林农业大学学报*, 1997(4): 113-115.
- [19] 董云洲,等. 用基因枪转化花粉获得转基因谷子和玉米[J]. *中国农业科学*, 1999(2): 112.
- [20] 丁群星,等. 用子房注射法将 Bt 毒蛋白基因导入玉米的研究[J]. *中国科学 B 辑*, 1993(7): 707-713.
- [21] 周光宇. 从生物化学的角度探讨远源杂交的理论[J]. *中国农业科学*, 1978(2): 16-20.
- [22] Zhou G Y, Weng J, Zeng Y. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos[J]. *Method in Enzynology*, 1983, 101: 433-481.
- [23] 祁永红,等. 玉米自交系中白芸豆 DNA 的导入转化及引起性状变异的研究初报[J]. *玉米科学*, 1995, 3(3): 29-32.
- [24] 祁永红,等. 玉米自交系授粉后外源 DNA 的导入转化及性状变异的研究初报[J]. *玉米科学*, 1996, 4(1): 19-21.
- [25] 王 罡,杜娟,张艳华. 用花粉管通道法将 Bt 杀虫基因导入玉米自交系的研究[J]. *玉米科学*, 2002, 10(1): 36-37.
- [26] 王 罡,季 静,杜娟,等. 抗虫转基因(Bt)玉米研究[C]. *军需大学 2000 年学会论文集*, 2001, 1, 4-7.
- [27] 黄璐,卫志明. 农杆菌介导的玉米遗传转化[J]. *实验生物学报*, 1999, 32(4): 381-389.
- [28] 张 荣,王国英,等. 根瘤农杆菌介导的玉米遗传转化体系的建立[J]. *农业生物技术学报*, 2001, 19(1): 45-48.
- [29] 赵久然,等. 应用 RAPD 分子标记技术选配强优势玉米杂交组合的研究[J]. *玉米科学*, 1999, 7(2): 12-15.
- [30] 辛志勇,等. 发展生物技术促进作物育种科技革命[J]. *作物杂志*, 1997(5): 13-15.
- [31] 刘海军,等. 美国玉米遗传育种与种子生产考察报告[J]. *山东农业科学*, 1997(2): 44-46.