

文章编号: 1005-0906(2007)04-0063-04

玉米转基因育种回顾

武淑香^{1,2}, 李晓辉¹, 殷奎德², 刘德璞¹

(1. 吉林省农业科学院生物技术研究中心, 长春 130124; 2. 黑龙江八一农垦大学, 黑龙江 大庆 163319)

摘要: 自从 1990 年首次获得可育的玉米转化体以来, 转基因玉米研究与产业化取得飞速发展。应用转基因技术培育了一批抗除草剂、抗虫、抗病、抗逆、优质的转基因材料, 转基因玉米生产已实现产业化。本文就近年来玉米转基因研究在转化技术体系、影响因素、筛选、鉴定等方面的进展做一概述, 并就有关问题提出建议。

关键词: 玉米; 转基因; 分子育种

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Progresses on Transgenic Maize and Molecular Breeding

WU Shu-xiang^{1,2}, LI Xiao-hui¹, YIN Kui-de², LIU De-pu¹

(1. Center of Agri-biotechnology, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130124;

2. College of Agronomy, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319, China)

Abstract: Research and commercialization of transgenic maize has made quick development since the first transgenic plant was obtained in 1990. A large number of transgenic materials with herbicide tolerance, insect resistance, disease resistance, stress tolerance and good quality have been cultivated. The production of transgenic maize abroad has realized commercialization. This paper described advances on transgenic maize in recent years for transformation system, influencing factors, selection, identification, etc.

Key words: Maize; Transgene; Molecular breeding

自 1990 年 Gordon-Kamm 首次报道用基因枪转化玉米悬浮细胞系获得了可育的转化体以来, 应用转基因技术进行品种改良已取得许多突破性的成果, 包括对玉米螟、除草剂的抗性以及玉米营养品质的提高等。至 2006 年, 全世界种植转基因玉米已达 2 500 万 hm², 仅次于大豆。转基因玉米的研究与开发在我国也受到重视, 并且取得了显著的进展。本文就近年来玉米转基因研究在转化技术体系、影响因素、筛选及鉴定等方面的进展做一概述。

1 玉米转化技术体系

以实现转化的途径和受体形式可分为三类: 一是外源 DNA 直接转化; 二是以载体介导的遗传转化; 三是生殖系统的遗传转化^[1]。

1.1 外源 DNA 的直接转化

外源 DNA 的直接转化亦称无载体 DNA 介导转化技术, 不需依赖生物媒体, 将特殊处理的裸露的 DNA 直接导入玉米细胞, 实现基因的转化。包括 PEG 法、基因枪法、电击法、聚乙二醇法、超声波法等。其中以基因枪法应用最为广泛。

PEG 法建立较早。原生质体作为转化受体, 具有转化效率高、嵌合体少等优点, 但由于原生质体培养周期长, 再生频率低, 技术复杂, 再生出的植株变异大且再生植株受基因型限制, 使得以原生质体作为转化受体的转化体系的应用范围存在很大的局限性。

脉冲电泳 (Pulsed field gel electrophoresis, PFGE) 法是新近发展起来的一种新型的转基因技术。程备久以玉米成熟种子为转化起始材料, 用脉冲电泳技术以 *Bar* 基因和 *Bt* 基因转化玉米种胚直接成苗, 并获得稳定表达^[2]。

在已报道的转基因玉米中, 大多数是通过基因枪法进行转化的^[3]。玉米基因枪转化的受体系统是幼胚、胚性愈伤组织和悬浮培养胚性细胞系。基因枪

收稿日期: 2007-01-20

基金项目: 国家转基因植物中试与产业化基地(吉林)专项(JY03-17-1)

作者简介: 武淑香(1982-), 女, 黑龙江人, 在读硕士, 主要从事玉米转基因分子检测。

刘德璞为本文通讯作者。E-mail: liudp@cjaas.com

技术的转化效率主要受基因枪的轰击参数和受体生理因素的影响^[4]。其中基因枪的轰击参数包括微弹的运动速度、微弹的射程、弹膛内的真空度、轰击次数、DNA 纯度与浓度以及 DNA 沉淀剂的浓度等。受体的生理因素主要指受体细胞或组织的生理状态,一般认为生理活性高的组织或细胞有利于外源 DNA 的摄入与整合。基因枪法的优点是不用进行原生质体再生培养,不受基因型的限制,可适用于不同物种以及同一物种的不同品种的转化。但该方法存在转化频率低,插入位点、插入拷贝数不定等缺点。

1.2 载体介导的转化

玉米主要是农杆菌 Ti 质粒介导的转化系统,简称农杆菌介导转化。农杆菌介导转化植物时的影响因素很多,包括基因型、菌株、外植体、载体质粒、Vir 区的活化、共培养培养基的组成成分等,除此而外还有外植体的渗透处理、预培养及共培养时间、农杆菌浓度、外植体的干燥、抗坏死处理、温度、表面活性剂、接种以及抗生素的使用等方面^[5]。

用于农杆菌介导转化的主要受体是幼胚和被称为 II 型愈伤组织的胚性愈伤组织。II 型愈伤组织黄绿色、颗粒状、较紧密、易碎、生长快,可以产生胚状体。但是 II 型胚性愈伤组织的诱导明显受到基因型的限制,能诱导较高频率胚性愈伤组织的报道目前仅局限在 A188 等少数基因型材料中,大多数材料还不能诱导出胚性愈伤组织或诱导率低,有的材料在继代过程中容易丧失胚性。愈伤组织的诱导及玉米愈伤组织再生受培养条件、培养基成分、外植体的生理状态和放置方式的影响^[6,7]。

1.3 生殖系统的遗传转化

生殖系统转化技术指外源 DNA 借助生物自身的种质系统或细胞结构功能实现的转化。进展比较大的是花粉管通道法和子房注射法。以生殖细胞直接作为受体细胞,外源基因导入后会随着正常的受精过程而得到稳定转化,为植物基因转化避开组织培养提供了可能,因此是很有潜力的受体系统^[8~10]。

影响花粉管通道法转化频率的因素包括质粒载体、DNA 浓度、转化受体的雌性器官结构、转化时受体受精生理时期以及不同的导入方法等。对于玉米来说,它的雌蕊与其它植物的雌蕊有明显不同,相比之下外源遗传物质通过的花柱显得格外长,外源 DNA 分子是如何进入胚囊以及进入的过程是受何种动力作用等问题还需要进行更加深入细致地研究。为解决玉米花粉管通道(花柱)过长造成外源 DNA 导入成功率较低的问题,在保证不受污染的条件下,

采取将雌穗的外包叶剥开,从花丝基部扯去后直接涂抹子房的方法导入,提高了转化效率。

2 转化频率

转化频率是转化研究关注的问题。转化频率是转化技术体系是否成功和成熟程度的重要标志。特别是转基因到了产业化阶段,规模化转基因要求转化技术的转化率、成功率要有大的提高,有大量的转化体才能够提供足量的材料用以转基因育种选择。因此,不断提高转化技术的转化率是改善、创新转基因技术的工作目标。

目前国内玉米的转化频率为 2.0%~4.0%,这一频率反映的是通过选择剂选出来的初选转基因苗。在已发表的文章中,所描述的频率说法不一,有的是抗性愈伤组织,有的是抗性苗,有的是经过分子验证稳定表达的转基因植株。计算转化频率应以独立转化转基因植株占初始转化操作的幼胚或外植体数的百分率比较合适。就发表的文章而言,这个频率还是在小量试验中(即获得的植株数<50)得到的数据,大批量转化尚无报道。

3 受体基因型

受体基因型是基因转化成功的重要限制因素,特别是对于那些以组织培养技术为基础的转化,转化的成功与否很大程度依赖于受体基因型。因而,转化研究不得不把筛选基因型作为转化工作的第一步。然而,尽管做了很大努力,成功的转化仍然限制在很少的基因型内。国外成功的转化仅限于 A188 自交系和 A188×B73 的杂交种 Hi II;国内研究者虽然在基因型材料上做了大量工作,但成功的基因型只占极少数。国内基因型材料已报道的也仅有黄早四等少数基因型。

4 玉米转基因分子育种

转基因技术已广泛用于玉米育种,涉及诸多目标性状,有些性状的基因转化取得了突破性进展,如抗虫、抗除草剂等基因工程已进入商业化应用阶段。

1981 年, Schnepf 等首次成功地克隆了一个编码为 *Bt* 杀虫晶体蛋白基因,揭开了利用基因工程培育抗虫植物的序幕。1996 年,美国正式批准转 *Bt* 基因玉米进入商品化生产。目前,中国农业大学、国家植物转基因中试与产业化基地(吉林)等国内单位的抗虫转基因玉米已进入环境释放试验。

将抗除草剂基因引入玉米,使玉米具有对除草

剂的抗性而发挥化学除草的作用,是现代农业一种高效、低成本的控制杂草的手段,且带有除草剂抗性的转基因玉米不受除草剂伤害而显著提高产量。截至目前,已培育出抗草甘磷、草铵磷、咪唑啉酮、稀禾定、Poast 和绿黄隆等抗除草剂转基因玉米^[11]。

利用转基因技术可以将外源种子蛋白基因或人工合成基因导入玉米来改良玉米的营养品质。张秀君等^[12]、赵倩等^[13]、Torrent 等^[14]先后选育出赖氨酸含量明显提高的转基因玉米。柴晓杰等^[15]通过花粉管通道法将玉米淀粉分支酶基因导入玉米自交系,提高直链淀粉的含量。

利用基因工程技术进行分子育种,除在抗虫、抗除草剂方面已进入商品化生产外,国内外还在耐旱、耐盐、抗病(真菌、病毒)、雄性不育等方面进行了探索,获得了预期效果,获得了一些转基因植株。

5 转基因筛选与检测

5.1 筛选

玉米转基因已到了分子育种阶段,转基因的筛选工作越来越重要。一方面对于经过遗传转化的初始转化体要采用一定的筛选方法,使其与未转化体区分开来;另一方面,在获得 T₁、T₂ 及至以后世代的转基因纯系的过程中,始终伴随着筛选,去除分离中的阴性和去除杂合体。

5.1.1 早期转基因植株筛选

在转化过程中的筛选主要用选择性标记基因。目前玉米遗传转化中使用的标记基因有 *Npt II*、*Hpt*、*Bar* 和 *DHFR* 等,根据标记基因选用相应的抗生素。近年来一种新的安全选择系统磷酸甘露糖异构酶(PMI)法建立起来,与传统筛选体系不同,它以甘露糖为筛选剂对转化细胞进行正筛选,PMI 能将甘露糖-6-磷酸转化成果糖-6-磷酸,使转化细胞以甘露糖为惟一或主要碳源而正常生长;非转化细胞由于不能利用甘露糖而停止生长。目前已应用于多种模式植物和经济作物的转基因筛选^[16]。

5.1.2 大规模选择

对于大规模生产来说,必须建立一个准确、快捷、省时、省力又省资金的筛选方法。这个过程需要筛选标记选择结合分子生物学技术检测而达到分子育种目的。对于玉米转基因研究,标记基因对于转化初始筛选十分重要,在其后的株系选择培育也很必要,因为在转基因系的筛选与培育中使用筛选剂除去非转基因植株显得比较容易方便。抗除草剂基因(*Bar*)是比较适用的,抗除草剂 PPT 的 *Bar* 基因不仅

可作为转化的筛选剂在转化过程中利用,作为一个农业生产中可用的功能性基因也可用于培育抗草铵磷除草剂作物。因此,在培育无选择标记基因作物的转基因研究中,以有标记基因作初期转化、纯合后再剔除标记基因的策略为可取的。另外,在转基因分子育种及产业化制种中,为保证种子生产的纯度,分子生物学检测还要发挥作用,还需要建立快速、价廉的大规模、高通量分子鉴定技术与平台。

5.2 检测

从一个外源基因向受体植物转化开始,转化过程、筛选、后代分析及至转基因植物的生产,每一步都离不开对所转基因的检测。随着玉米转基因研究和产业化的推进,检测的目的由单纯的分子验证向转基因产品的纯度和表达效率发展;检测内容及规模由对少量转化植株的选择向大批量转化株选择、后代的大通量鉴定及种子生产的转基因监测发展。

5.2.1 外源基因整合的检测

整合到植物基因组中的外源基因多以单拷贝形式存在,也有的是多拷贝的。多拷贝的转基因对植物来讲是不利的,多拷贝的外源基因是产生基因沉默现象的主要原因^[17]。检测植物基因组是否整合有外源基因、插入基因的拷贝数可采用 Southern 杂交、反向 PCR(Inverse-PCR, IPCR)和实时荧光 PCR 技术。

利用 Southern 杂交,不仅能够检测外源 DNA,而且能够确定外源基因在植物基因组中的排列情况、拷贝数及转基因植株后代外源基因的稳定性^[18]。除 Southern 杂交外,IPCR 是近年来发展起来的一种检测外源基因在植物基因组中整合拷贝数的好方法。由于不同整合位点的外源基因旁侧的植物基因组序列不同,所以植物基因组上有多少个外源基因的拷贝,经 IPCR 扩增及扩增产物电泳后,就会有多少条电泳带^[19,20]。实时荧光 PCR 是大通量鉴定转基因产品的技术,不仅可用于转基因产品的监测检测,而且也是转基因过程中对拷贝数检测的一种鉴定技术。

5.2.2 外源基因表达的检测

转基因的成功与否在很大程度上取决于导入基因的表达水平。外源基因与受体基因组的同源性、基因的插入位点等多种因素均会影响基因的表达效率^[21]。Northern 杂交是检测基因在 RNA 水平表达的权威方法。Western 杂交可定性检测出目的基因是否表达出蛋白质。ELISA 是一种利用免疫学原理检测抗原、抗体的技术。此检测外源基因表达蛋白的灵敏度高于 0.1%,并且具有可定量分析、快速特异、定量

准确、操作简单和经济实惠的优点,特别适合于大批量检测。

5.2.3 外源基因稳定性分析

导致外源基因的非孟德尔分离的因素很多,外源基因在植物核基因组中整合时,整合的 DNA 结构变异大、整合位点多、拷贝数多、基因沉默、损失或丢失整合的遗传效应复杂,导入外源基因的植株的花粉生活力弱,竞争不过不含外源基因植株的花粉,会导致不规则的遗传^[22]。因此,它们在有性繁殖过程中传递的遗传规律比较复杂,稳定性较差,常出现异常分离。

6 展 望

伴随着转基因玉米产业化进程的不断推进,转基因技术在玉米育种中将发挥出越来越重要的作用,以基因工程为核心的分子育种的前景显而易见地显现出来。在转基因玉米研究与产业化过程中,首要工作是:①挖掘更多功能明确、效果明显的有益基因,使转基因技术有的放矢,最终实现分子设计育种。②建立完善的高频再生体系和安全、高效、规模化的转化体系,提高各种转化技术的转化频率;加强技术创新,力求在转化技术上有所突破。③在基因的表达、稳定性的研究方面注入力量,提高转基因植株的表达量,增强稳定性。随着研究的深入和技术的发展,产生一些新的技术方法,如 ELISA、实时荧光 PCR、IPCR 等,这些鉴定方法对转基因后代植株的整合、表达、稳定性及其机理研究会起到推动作用。④加快建立转基因玉米的大通量检测和监测技术平台,加强玉米转基因后代的快速、大批量筛选、纯合等方面的探索工作。在国内转基因玉米即将进入商业化的形势下和转基因植物的安全管理体系日趋严格、规范和完善的背景下,充分借鉴转基因棉花的产业化研究经验,严格进行转基因玉米各环节(转化、鉴定、培育、种子生产、商业化种植)、各种水平的检测和监测,从而使转基因玉米产业化步入健康、有序、快速发展的道路,最终实现转基因玉米产业化的目的。

参考文献:

[1] 白云凤,王国英. 玉米转基因和育种改良[J]. 玉米科学,2003,11

(3):9-12.

- [2] 程备久,李培金,朱苏文,等. 利用脉冲电泳技术转化玉米获得转基因植株研究[J]. 激光生物学报,2004,13(1):52-56.
- [3] 王兆玉. 农杆菌介导 *GNA* 基因转化玉米骨干自交系及转基因玉米的抗虫抗病性分析[D]. 博士学位论文,山东大学,2005.
- [4] Jelli T O. *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of Plants: emerging factors that influence efficiency[J]. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2006, 1(1): 12-20.
- [5] 向凤宁,张举仁,陈惠民,等. 玉米胚性愈伤组织的长期继代及其染色体分析[J]. 西北植物学报,1994,14(3):157-163.
- [6] 袁 鹰,刘德璞,郑培和,等. 东北玉米自交系胚性愈伤组织的诱导[J]. 玉米科学,2001,9(1):37-38.
- [7] 丁群星,谢友菊,戴景瑞,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,1993,23(7):707-713.
- [8] 王景雪,孙 毅,杜建中. 玉米转基因研究进展[J]. 生物技术通报,2001(2):12-16.
- [9] 张慧英,吕 平,庾韦花,等. 甘蔗 DNA 导入糯玉米自交系后代性状变异的研究[J]. 玉米科学,2006,14(4):32-34.
- [10] 程焉平. 转基因玉米的研究与应用[J]. 黑龙江农业科学,2003(1): 28-31.
- [11] 张秀军, 刘俊起. 用基因枪将高赖氨酸基因导入玉米及转基因植株的检测[J]. 农业生物技术学报,1999,7(4):363-367.
- [12] 赵 倩,于静娟,敖光明,等. 高赖氨酸基因导入玉米自交系的研究[J]. 农业生物技术学报,2001,9(2):156-158.
- [13] Torrent M, Alvarez I, Geli M I. Lysine-rich modified α -zeins accumulate in protein bodies of transformed maize endosperms[J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, 34: 139-149.
- [14] 柴晓杰,王丕武,关淑艳,等. 玉米淀粉分支酶基因反义表达载体的构建和功能分析[J]. 作物学报,2005,31(12):1654-1656.
- [15] Reed J, Privalle M, Powell L. Phosphomannose isomerase: an efficient selectable marker for plant transformation[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2001, 37: 127-132.
- [16] 韦 珂,黄 艳,何勇强. 植物转基因沉默及控制[J]. 广西植物,2003,23(1):31-35.
- [17] 孙红伟,朱常香,杨崇良,等. 玉米基因枪转化基因的研究[J]. 山东农业科学,2004(3):19-22.
- [18] 章 冰,黄健秋,卫志明. 利用 Inverse PCR 快速筛选单个 T-DNA 拷贝转基因水稻植株的方法[J]. 实验生物学报,1999, 32:207-210.
- [19] 南相日. Inverse-PCR 法快速测定转基因马铃薯中 T-DNA 的拷贝数[J]. 中国马铃薯,2006,20(2):78-80.
- [20] 付金峰. 转 *Bt* 基因玉米后代抗虫性鉴定方法研究[D]. 河南农业大学硕士学位论文,2004.
- [21] 谢小波,崔海瑞,沈圣泉,等. 水稻转基因植株后代中外源基因异常分离的研究[J]. 遗传学报,2002,29(11):1005-1009.

(责任编辑:尹 航)