

玉米雄性不育基因的利用

邓迎海 周洪生

(中国农业科学院作物育种栽培研究所,北京 100081)

The Utilization of Genic - male Sterility Genes in Maize

Deng Yinghai Zhou Hognsheng

(Institute of Crop Breeding and Cultivation, CAAS, Beijing, 100081)

Abstract The history and current focus on maize genic - male sterility(GMS)research were discussed with emphasis on the utilization of this kind of sterility resource in maize production. Four methods including GMS marker gene, double - heterozygous line, photo - and thermosensitive gene, and engineering male sterility were compared with their advantages and restrictions. Some propositions on the future research of this field were given accordingly.

Key words: Maize(*Zea mays* L.), Genic - male sterility, Marker gene, Engineering male sterility

摘 要 本文回顾了玉米核雄性不育(又称基因雄性不育)研究和发展的历史,总结了这一领域的最新研究动态,围绕如何利用核雄性不育这一主题,比较分析了以核不育标记基因、双杂合系、光温敏不育基因和工程雄性不育基因为代表的各种方法的优缺点,提出了解决有关问题的措施和办法以及今后研究的重点和方向。

关键词 玉米 核雄性不育 标记基因 工程雄性不育

玉米核雄性不育又称基因雄性不育(genic - male sterility)是指纯由细胞核基因控制的雄性不育类型。1930年 Singleton 和 Jones 发现首例核不育基因并定名为 *msl*。它位于第6染色体的长臂上,属隐性基因。随后其它学者又相继发现了许多新的 *ms* 基因。到目前为止,已正式定位命名的玉米核不育基因有25个,它们分别是 *msl*、*ms2*、*ms3*、*ms5*、*ms7*、*ms8*、*ms9*、*ms10*、*ms11*、*ms12*、*ms13*、*ms14*、*ms17*、*ms18*、*ms19*、*ms20*、*ms21*、*ms22*、*ms23*、*ms24*、*ms28*、*Ms41*、*Ms42*、*Ms43*、*Ms44*。其中 *Ms41*、*Ms42* 和 *Ms44* 属显性基因,其余为隐性基因。

随着研究手段和工具的不断改进,人们对各个核不育基因也作了深入细致的研究。如何利用这些不育基因一直是研究者关心的问题,而且也是一个难题。因为要利用核不育系生产杂交种也需要解决“三系”配套的问题。对于隐性核不育基因控制的不育系,其恢复系很容易找到,任何一个正常系便是一个恢复系,但是保持系则不易找到。如何能找到使核不育系后代不育性保持稳定不分离的保持系便成了利用核不育基因的关键。多年来许多研究人员进行过

艰苦的探索,这方面的经验也越来越丰富、思路也越来越广。尤其是 T 型胞质不育系被禁用后,胞质基因的应用受到挑战;人们便更加重视核不育基因的利用问题。这方面的研究又成为新的热点。现将有关研究内容综述如下:

1 利用连锁的标记基因解决育性分离问题

早在 1930 年 Single 和 Jones 便提出利用玉米第 6 染色体长臂上的不育基因 *msl* 和控制胚乳色泽基因 *y* (白色胚乳) 之间的紧密连锁关系来生产杂交种。这种方法的原理是利用紧密连锁基因之间存在的很低的重组率,将白色胚乳基因 *y* 与不育基因 *msl* 重组连锁在一起,这样便可通过子粒颜色来区分可育种子和不育种子(图 1)。

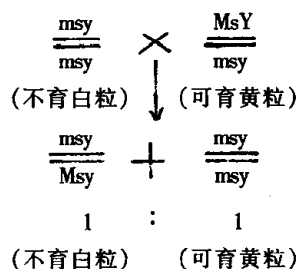


图 1 以粒色为标记来区分可育株与不育株

这似乎使问题得以解决,可实际操作起来仍有一定的困难。首先,由于 *ms* 与 *y* 之间存在着低重率使我们有可能选到 *msy*//*msy* 基因型,同时它也带来了一些负面影响。它们之间的交换将会产生少数白粒可育的种子。据早期报道二者交换值在 5% 以上,Neuffer 等(1968)认为低于 1%,Benner 和 Phillips(1986)三次三点测验的结果分别为 2.6%、0.94%、1.3%,季良越等(1989)、李竞雄(1995)测定的结果分别是 5% 和 5.72%。若按 5% 的交换值计算,在抽雄散粉初期应摘除母本行 2%~3% 的可育雄穗,否则将会产生一定数量的自交种子,影响杂种纯度。其次,当恢复系为黄粒时,所生产杂交种后代发生黄白粒分离,这将严重影响玉米的商品价值。

另一个有望通过这种方式加以利用的核不育基因是位于玉米第 9 染色体上的 *ms2* 基因。它与一个三叶期黄绿苗基因(*v*)紧密连锁(交换值为 1%),黄绿苗基因(*v*)在 3~4 叶期表现黄绿苗而后自动转绿。用上述同样原理,先将 *ms2* 与 *v* 重组在一起,然后在苗期间掉绿苗,留下的黄绿苗即为雄性不育株。

1992 年李竞雄、周洪生等从美国引入黄绿苗基因(*v*)材料,首先在国内开展了这方面的工作(图 2)。若 *ms2* 与 *v* 之间的连锁程度能够确保杂种纯度的话,此法不失为一种较理想的标记方法。目前正在进行最后的鉴定工作。

2 利用玉米双杂合体来保持不育系的不育性

这里提到的双杂合系是指核不育基因(*Ms* 和 *ms*)的杂合和重复-缺失染色体与正常染色体之间的杂合(图 3)。这种方法是 Patterson(1973)首次提出的,主要是利用雌、雄配子对重复-缺失染色体敏感程度的差异来达到不育性的目的。重复-缺失染色体只能通过雌配子传递而不能通过雄配子来传递,因此双杂合体可产生可育的 *msl* 花粉和可育的 *msl* 及 *Msl* 卵子。用双杂合系的花粉给不育系(*msl msl*)授粉便可得到 100% 的不育后代,而双杂合系通过自交又可以得到保存和繁衍(图 3)。

这种方法虽然解决了核不育系不育性保持的问题,但由重复-缺失带来的不平衡效应,使保持系生长势弱,难以充分发挥杂种优势。其次是转育过程复杂,技术条件要求高。重复-缺失杂合体配制的杂交种,1979 年占美国杂交制种的 0.5%(Darrah, 1985),到 1984 年为 0%。我国也曾有人尝试过(刘仲元, 1982; 季良越等, 1993),但至今未见在生产上大面积应用。

3 温、光敏核不育基因的利用

近年来,我国在水稻、小麦等作物上相继发现了温、光敏核雄性不育材料,使农作物“两系法”杂种优势利用取得了可喜的进展。玉米温敏型雄性不育株(Qms)是 1992 年由海南省农科院赫忠友在玉米自交系繁种田中发现的,经 3 年 6 个世代的研究,发现其主要特点是:在雄穗发育的特定时期,温度条件能导致雄花育性的转换,即在高温(25℃ 以上)条件下,雄穗花药发育不良,药内花粉大部分败育,内外颖呈闭合状态;在低温(25℃ 以下)条件下,表现正常开花散粉。这一特性受核基因控制并能稳定遗传。通过育种程序,可将温敏育性基因导入不同自交系,以育成温敏不育系,从而有希望为玉米雄性不育“两系法”杂优育种和基因雄性不育的利用开辟一条新的途径。

自从石明松(1981)发现了水稻光敏雄性不育以来,科学家在大麦(王前和,1991)、小麦(何觉民,1992)等作物中发现了光温敏雄性不育材料。1994 年冬季,周洪生和田志国在海南省三亚南宾发现,自交系 CA507 共 2 行 38 株全部不散粉,雄花闭颖不开,花药内无正常花粉。用卡诺试剂固定花药,镜检发现,花粉粒不规则,遇碘-碘化钾不着色,属于碘败型花粉败育型雄性不育。后经 2 年 4 个世代不同地点、不同光温条件下的观察研究,初步确定该材料属光敏不育型,受核基因控制。光周期为 11~12 h 时,均表现雄性不育;光周期为 14.5~15.5 h 时,可育株和不育株并存;光周期超过 17 h 时,均表现可育。进一步的遗传研究正在进行。

玉米中温、光敏不育性的发现为核不育基因的利用带来新的希望。如何能选到光温敏感性,不育性和可育性反应稳定的材料是问题的关键。这就需要首先弄清光温敏不育基因的作用机理及遗传方式,然后针对存在的问题,利用细胞遗传的方法或现代生物工程的手段,对这些材料加以改造和利用。水稻上有许多成功的经验可以借鉴。

4 工程雄性不育系的利用

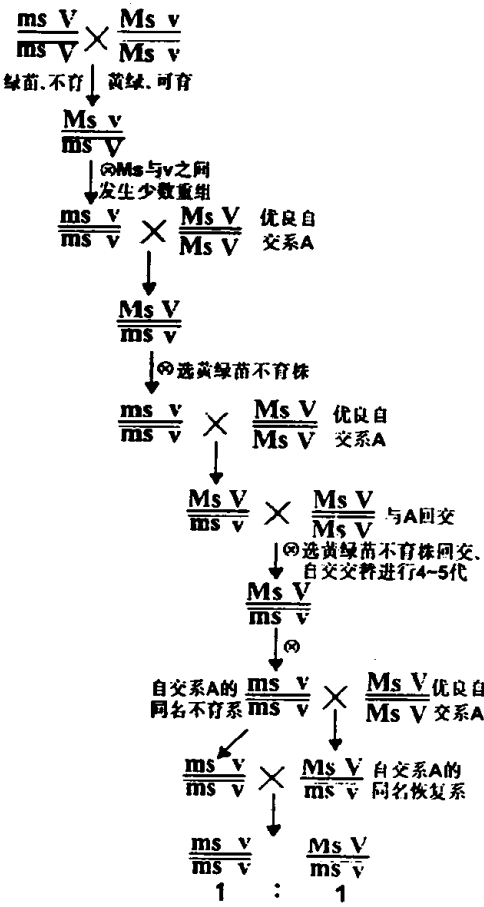


图 2 黄绿苗标记雄性不育自交系及其保持系的选育过程

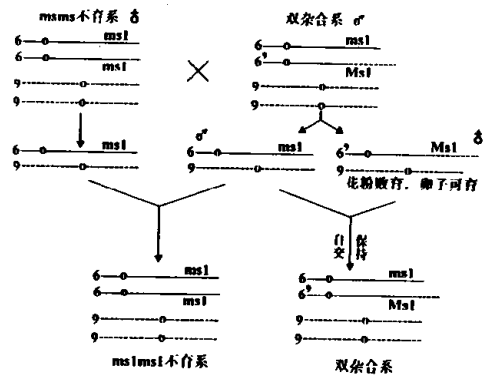


图 3 双杂合系作为核不育系的保持系及其自身的繁衍

随着生物技术的飞速发展,一些学者开始求助于基因工程的手段来创造一些雄性不育材料即工程不育系,并取得了许多可喜的成果。1990年 Mariani 报道了首例烟草和油菜工程不育系的建成,随后又在棉花、水稻、拟南芥等植物上陆续获得成功。1992年 Mariani 又用基因工程的方法创建了工程不育基因的恢复基因。目前最成功的工程不育基因系统是 PGS 公司开发设计的烟草花药特异表达启动子 TA29 与 Barnase/ Barstar 组合而成的不育-恢复系统,该成果在烟草、棉花和玉米等作物上的成功报道。其原理见图4(引自 Williams M. E., 1995)。

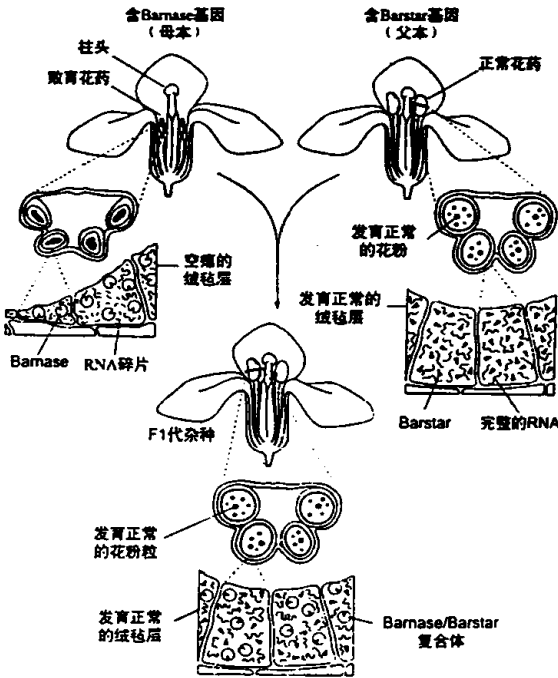


图4 工程不育基因(Ms)与恢复基因(Rf)的相互作用过程。它们分别与花药特异表达启动子(如TA29)相连,以保证其在花药发育期间特异表达。其中前者(Ms)选择性的降解绒毡层细胞,使花粉败育。而后者(Rf)则有效抑制前者的作用,使不育系的育性得以恢复

展很快,多种不育基因和花药特异表达启动子也陆续被发现(表1),有的来源于植物本身,有的来源于微生物,其作用机理有所不同;有的是通过破坏花药内的激素平衡来造成雄性不育

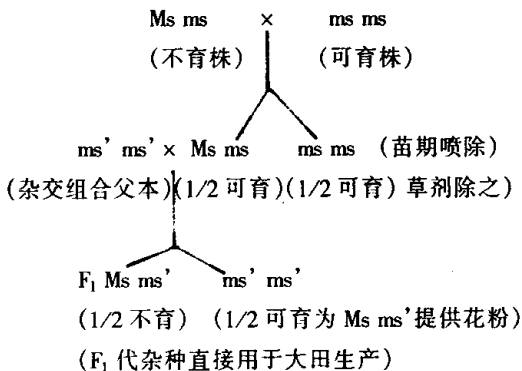


图5 利用工程不育系及恢复系配制玉米杂交种

Barnase 来自 *Bacillus amyloliquefaciens* 其表达产物为核酸酶能选择性降解绒毡层细胞内的 RNA,从而杀死绒毡层细胞,使花粉的发育终止,造成雄性不育。Barstar 也是来自 *Bacillus amyloliquefaciens*, 它的产物是一种阻遏蛋白,能与 Barnase 基因的表达产物形成复合体,从而使之失去活性。它们分别与花药特异表达启动子 TA29、抗除草剂基因相连便构成了相应的不育基因和恢复基因。然后利用生物工程的方法分别将它们转入目标植物,便得到了该植物的工程不育性和恢复系。这种工程不育系也属核基因不育系,同样存在着后代育性分离的问题。苗期可通过喷洒除草剂即可除掉不含不育基因的可育株,极其简便。如图5所示。

利用工程不育系的显著优点是不受作物本身不育和恢复资源的限制,另外不育系的后代分离问题即不育系的保持问题较易得到解决。由于这种不育性受单基因控制,所以很容易在不同系之间进行交流。缺点是技术要求高、成本高。此外对粮食、饲料作物业涉及到转基因植物的安全问题。目前,这方面研究进展很快,多种不育基因和花药特异表达启动子也陆续被发现(表1),有的来源于植物本身,有的则通过反义阻遏(反义 CHS cDNA)来控制雄性不育(Taylor L. P. 1992);还有的是通过特种酶的表达来破坏花药、花粉细胞内的代谢平衡而造成花粉败育(如 β -1,3-Glucanase, Barnase, DTA)。机理的多样性为工程不育系的构建提供了更大的选择范围。抗除草剂基因工程的发展,为我们提供了许多好的选择标记基因(如 Bar 基因、抗溴苯晴基因、抗 2,4-D 基因),使得我们不仅可以针对单、双子叶来选择不同的抗除

草剂基因,而且还可以从长远考虑,选择一些经济有效的除草剂及其抗性基因,为今后生产上大面积应用、降低成本打下基础。恢复基因的作用在整个工程不育系的应用过程中起着举足轻重的作用。目前主要有两种方法来构建不育基因的恢复基因,一是克隆自然存在的,能够抑制不育基因活性的基因(如 Barstar 基因);二是通过反义阻遏基因来抑制不育基因的表达(Izant,J.G.1985)。此外还有一些针对不育基因本身特性而设计的恢复措施(Ylstra.B.J.1994)。

表 1 显性核雄性不育基因组合(引自 Williams,M.E.,1995 年)

基因组合	实施对象	对雌蕊育性影响	育性恢复的鉴定
p35S - rolC	烟草 马铃薯 拟南芥菜	是	是(通过反义法)
pTA29 - DTA	烟 草	不确定	否
pTA29 - Barnase	烟草 油菜 玉米 棉花	否	是(阻遏蛋白)
pTA29 - RNaseT1	烟草 油菜 玉米 棉花	否	否
pA3, A9 - β - 1,3 - Glucanase	烟 草	否	否
pA9 - Barnase	烟 草	否	否
pCHS - 反义 CHS cDNA	矮牵牛	否	否
pCHS - CHS cDNA(共阻遏)	矮牵牛	否	否
pAP3 - DTA	拟南芥菜	否	否
p - rolB	烟 草	否	否
pBCP1 - 反义 BCP1 cDNA	拟南芥菜	否	否

综上所述,尽管玉米核雄性不育普遍存在,但真正能在玉米杂种优势利用中发挥作用的却不常见。这方面工作很有潜力可挖,尤其在胞质不育系的利用越来越受到专化性病害威胁的今天,如何开发利用核不育资源显得更为重要。随着人们对生命科学不断深入地探索,一些新观点、新思路和新方法不断涌现;一些陈旧的认识也得到升华。我们也应站在新起点、新高度来重新认识和研究核雄性不育。

参 考 文 献

1 季良越等. 河南农业大学学报,1987,23(1):6~11
2 季良越等. 作物学报,1993,19(2)
3 李竞雄 周洪生. 高产不是梦. 湖南科技出版社,1995,P40
4 刘仲元. 遗传学报,1982,9(1):78~84
5 石明松. 湖北农业科学,1981,7:1~3
6 王前和 程朋飞. 湖北农业科学,1991,11:14~16
7 Benner M.S.and Phillips R.L.,1986.MNL 60:113~114.
8 Darrah L.L.and Zuber M.S.,1985.Crop Sci.26:1109~1113
9 Mariani.C.,et al.,1990.Nature 347:~741
10 Mariani.C.,et al.,1992.Nature 357:384~87
11 Neuffer M.G.,et al.,1968.The Mutants of Maize,Madison,Wisconsin,Published by the Crop Science Society of America,p33
12 Paterson,E.B.,1973.Genetic male sterility and hybrid maize prouduction.Preceedings of the seventh meeting of Eucarpia:maize and sorghum section,Part I,Agreb,Yugoslavia.
13 Singleton W.and Jones,1930.Hered,21:266~268
14 Spena.A.,et al.,TAG.84:520~527
15 Williams M.E.,1995.TIBTECH,13:344~349
16 Ylstra.B.,et al.,1994.Plant.J.6:201~212
17 Izant,G.and H.Wentraub.1985,Sciences.229

(责任编辑:王晓丽)