

玉米生物技术育种研究进展^{*}

钱 华

(黑龙江省农科院生物技术研究中心, 哈尔滨 150086)

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研究与应用方面的进展做以概述。

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 **文章编号:** 1002-2767(2000)04-0044-03

玉米是我国也是黑龙江省主要粮食作物、饲料作物和重要的工业原料。无论从播种面积还是从产量上看,玉米在农业生产中均占有重要地位。我国常年玉米播种面积在 2 000 万 hm^2 左右,总产居世界第二位。黑龙江省历年玉米播种面积为 200 万 hm^2 左右,占粮食总播种面积的 26% 以上,总产占 44% 以上^[1,2,3]。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

玉米组织和细胞培养研究同其它禾本科一样起步比较早,1974 年 Green 等就首先获得了玉米再生植株,并筛选出抗小叶斑病的细胞系和再生植株,到了 80 年代玉米组织培养成功的报道已在国外大量出现,能高效率地从多种基因型诱导出胚性愈伤组织并再生植株。与此同时国内也开展了此项研究,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 1mg/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 hm^2 ,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 hm^2 ^[4]。

利用花药培养进行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。玉米也不例外地进行了有关实验研究,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^[5]。

2 玉米基因工程育种

由于单子叶植物的转化受农杆菌寄主的限制,

^{*} 收稿日期: 1999-10-20

作者简介: 钱华 (1964-), 女, 副研究员, 从事生物技术研究。

加之玉米原生质体的再生又仅限于可数的几个基因型,因此近年玉米的遗传转化成功的结果主要是利用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。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。上述方法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^[6]。

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PBII21,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^[7]。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^[8]。

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^[9]。

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PBII21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^[10]。

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^[11]。

从90年代初开始黑龙江省农科院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。近年她们正对这些自交系进行选配,有些具有重要的育种价值,为玉米品种、品质改良开辟了一条新途径^[12,13]。

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^[14]。

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 TK 303 转到 B73 中,从 Oh43 转到 M017 中,育成了 B73 和 M017 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%^[15]。

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^[16]。

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^[14]。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。我省急需应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] 张世煌,等.玉米育种研究的发展方向[J].作物杂志,1997,

(5): 5~ 8.

- [2] 苏俊,等.黑龙江省玉米育种的问题及建议[J].黑龙江农业科学,1996,(1): 29~ 31.
- [3] 吴建宁,等.玉米抗病遗传育种的研究进展[J].玉米科学,1999,(2): 6~ 11.
- [4] 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.
- [5] 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,(2): 16~ 19.
- [6] 黄璐,等.玉米的遗传转化[J].植物生理学通讯,1997,(3): 226~ 232.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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): 29~ 32.
- [13] 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,(1): 19~ 21.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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,(2): 12~ 15.

(上接第 31 页)

高剂量处理 (75kg/hm²) 与对照药 3% 克百威颗粒剂 (60kg/hm²) 的防效相当。3% 甲基异柳磷颗粒剂对大豆根潜蝇的防效较高,三个处理分别达到 90%、100%、100%。

2.3 对大豆孢囊线虫的防治效果 经试验,3% 甲基异柳磷颗粒剂沟施,对大豆孢囊线虫的防效较高,三个处理的防效分别为 69.0%、67.4%、69.3%,对照 3% 克百威的防效为 72.8%。经方差分析,3% 甲基异柳磷各处理对大豆孢囊线虫的防效与对照 3% 克百威处理的防效之间无显著差异。

2.4 测产结果 结果显示,利用 3% 甲基异柳磷颗粒剂防治大豆害虫,有一定的增产作用。三个处理

产量分别为 2 876.7kg/hm²、2 886.7kg/hm²、2 916.7kg/hm²,对照 3% 克百威的产量为 2 853.3kg/hm²,CK 产量为 2 773.3kg/hm²,因此,3% 甲基异柳磷三个处理比 CK 分别增产 3.7%、4.1%、5.2%,而对照药剂增产为 2.9%。

3 结论

经田间小区试验,3% 甲基异柳磷颗粒剂沟施,对大豆安全,能提高出苗率,降低大豆苗期的被害株率,对大豆根潜蝇防效达 90%~ 100%,对大豆孢囊线虫的防效达 67.4%~ 69.3%,并能提高大豆产量。在生产中建议用量 45~ 60kg/hm² 为宜。