

生物技术*在玉米育种上的应用

张建国

(黑龙江省农科院玉米研究中心, 哈尔滨 150086)

摘要: 系统介绍了 RFLP、RAPD 概念、原理及特点以及国内外 RFLP、RAPD 在玉米育种应用上研究现状, 同时概述了转基因技术发展现状。

关键词: RFLP; RAPD; 转基因

中图分类号: S 513.035.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2001)05-0032-03

The Utilization of Biotechnology in Maize Breeding

ZHANG Jian-guo

(Maize Research Center of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: In this paper the concept, principle and character of RFLP and RAPD were systematically introduced and utilization of them in maize breeding at home and abroad was also discussed. At the same time, the development of transgene technique at home and abroad was accounted.

Key words: RFLP; RAPD; transgene

近年来, 分子生物学发展异常迅速, 其中与作物遗传育种密切相关的分子标记 (molecular marker) 更是令人瞩目。以往对玉米自交系种质类群的划分, 多利用系谱关系或同工酶等方法进行, 然而对近年新育成的自交系因种质交叉的渗透, 使这些研究结果受材料、环境或研究方法等因素的限制, 很难准确反映遗传差异。作物 RFLP 和 RAPD 研究短短几年在大田作物玉米、大豆、水稻等都已建立了具有一定规模的分子标记遗传连锁图, 这一领域的研究得到了广泛重视, 对于准确划分类群提供有力的依据。同时转基因作物应用日趋广泛, 目前, 对玉米抗虫基因转育以及抗虫转基因杂交种的理论研究, 国内外专家学者取得了一定的成效。美国已批准 30 种转基因植物产品进入市场, 澳大利亚亦批准可使用 5 种转基因产品, 我国在抗虫基因转入研究取得了一定进展。

1 分子标记技术在玉米种质类群划分上的应用

1.1 RFLP 所谓 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms 限制性片段长度多态性), 概括起来, 就是从生物中提取总 DNA 用限制性酶降

解总 DNA, 生成许多长短不同的小片段, 经凝胶电泳分离这些小片段, 把经过凝胶电泳分离的 DNA 再通过 Southern 印迹法转移到永久滤膜上, 然后用放射性标记的探针与滤膜上的 DNA 杂交, 洗去多余的杂交探针, 永久性滤膜经放射性自显影就可发现与探针杂交的 DNA 限制性片段, 不同的限制性酶, DNA 和探针组合会有不同的特异试验结果, 利用这些不同的组合结果就可以构建起 RFLP 分子标记图谱 (Bernatzky 和 Tanksley 1989 D; crs 等 1992)。

国内外许多科研工作者曾试图利用形态学差异, 地理来源的不同, 系谱关系及生理生化指标等多种方法探索划分杂种优势的可能性, 但这些方法有一定的局限性, 利用 RFLP 标记则克服以上几种缺陷, 具有稳定性高和重复性好的优点。1980 年 Botstein 等首次建议利用 Randomly dispersed RFLPs 作为人类一种新遗传标记以来, 该技术在生物技术领域得到了广泛应用。玉米中, Riven (1983) Burr 等 (1983) 和 Helentjaris (1986) 等报道了利用重复或简单拷贝 DNA 序列作探针检测到玉米不同自交系中

* 收稿日期: 2001-05-02

作者简介: 张建国 (1974-) 男, 黑龙江省绥化市人, 硕士, 从事玉米育种研究。

的显著多态性。Helentjanis 等(1986)利用 500—1 000bp 的简单序列克隆 100 多个以 H427×761 的 F₂ 群体,建立了玉米第一张 RFLPS 分子标记遗传图谱(113 个 RFLP 标记位点)。此后 10 年,这一领域的研究得到广泛重视,通过不同群体,不同探针及限制内切酶,已构建了接近饱和的玉米 RFLP 标记图谱。Messmer 等(1992)利用 RFLP 数据对 57 个欧洲自交系进行杂种优势群的研究,Mumm(1994)利用 RFLP 标记,用 46 个探针和酶的组合,将 148 个美国自交系分为两个杂种优势主群和 11 个杂种优势亚群,这些研究表明利用此项技术对玉米种质进行杂种优势群的划分是可行且有效的。

国内一些研究者用 RFLP 研究了不同群体的遗传变异和自交系的亲缘关系以及优势群的划分,开拓了分子标记在种质研究方面的新途径。黄益勤等采用 54 个 RFLP 探针酶组合,检测了在我国南方玉米区广泛利用的 41 份自交系和代表美国主要玉米杂种优势群的千份美国自交系的 RFLP 多态性。结果将供试材料划分为 6 大类群,对杂种优势的利用具有重要的指导意义。

RFLP 从应用角度进行分子标记,进行玉米数量性状的辅助选择以便有效地解决数量性状特别是产量性状的改良已取得突破性进展。

1.2 RAPD 所谓 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA 随机扩增多态性 DNA)是利用寡核苷酸的 DNA 引物(Primer)与生物的总 DNA、DNA 多聚酶 4 种 DNTPS 和相应的缓冲液混合置混合液于特定温度循环体系中,使与 DNA 引物结合的 DNA 片段扩增,扩增结束后用凝胶电泳分离扩增 DNA,分析带型,不同生物个体的 DNA 序列差异都会引起 DNA 引物结合位点的变化,因而导致带型变化,从带型变化得知遗传变异(Williams 等 1993、Rafal-ski 等 1994)。赵久然等利用 RAPD 技术对我国 28 个玉米骨干自交系进行了分析,从 300 个引物中筛选出 40 个多态性好的引物,结果发现仅使用 DPI10 一个引物扩增的 DNA 指纹图谱就能区别开 15 个自交系,增加引物 OPBT 可以区分 26 个自交系再增加 OPC19、OPC、OPA、OPI11、OPG14 中任何一个引物就可将 28 个自交系完全分开,研究还表明亲缘关系很近利用同工酶方法无法区分的姊妹系材料(478.4)。刘勋甲等采用 RAPD 标记技术评估中国西南地方优良种质巫溪(W)、美国玉米带坚秆综合种 RSSS9(B)、墨西哥热带种质资源墨黄九(M)及以它们为主体亲本人工合成的 WBMCO 基础群改

良一轮 WBM C1 群体的遗传变异,得出结论:人工合成的广基玉米群体遗传多样性比亲本群体丰富,且这种多样性属 DNA 变异,并非环境造成,经过一轮选择后的 C1 群体保持了群体内广泛的遗传变异。赫忠友等对适用于玉米的 RAPD 实验体系进行研究,摸索出适用于玉米 RAPD 的反应适宜条件,建立了稳定的 RAPD 的分析体系。通过 RAPD 分析找到了一个与温敏型核雄性不育材料 Q_{ms} 基因连锁的分子标记。田曾元、王懿波等利用 RAPD 技术对 321 个玉米自交系进行了分析,结果划分成的五大类群与依据系谱关系配合力及杂种优势划分基本吻合。

对于 RAPD 国内学者研究很深入,在自交系区分、优势群的划分、玉米数量性状标记、杂种优势类群及杂优模式构建以及玉米雄性不育的研究领域已取得了突破性进展。

采用 RAPD、RFLP 等分子标记可以在较为广泛的基因组范围内检测任一群体基因型种类并计算每一种类基因型率,为直接比较各群体的遗传组成或选择前后基因型变化提供了方便,还可将各种基因,各位点与其数量性状对应作统计分析为寻找与数量性状有关的基因提供可能途径。对玉米自交系优势种质群的划分、组合的配制提供重要的理论依据。

2 转基因技术在玉米育种上的应用

上世纪 80 年代开始,科学家试图利用基因工程技术,将外源或经体外修饰后的内源基因(统称转基因 Transgene)导入植物,改良植物的性状,并获得成功。

近年来,由于生物工程技术的兴起和发展,特别是基因工程技术在改良作物抗性的广泛应用,为培育抗性品种提供了新的手段,从而开辟了玉米抗性育种的新时代。转基因技术将玉米基因库中不具有的抗性基因导入玉米,实现了传统育种方法无法实现的基因重组,大大提高了育种水平。目前玉米抗性基因的转化常用方法有基因枪法、阳离子介导法、PEG 法、电击法等,其中 PEG 和电击法的转化率可达 0.1%~0.3%,阳离子法可达 8%,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,而基因枪法以玉米完整细胞和组织为受体,因其受体广泛而成为目前采用较多的方法。

国外在转基因技术上研究的时间较长,目前美国、法国、澳大利亚等国已获准 30 多种转基因作物产品进入市场,美孟山都公司的保铃抗虫棉已先后

在我国河北、安徽等进行商业化生产。

国内利用该技术一直在深入研究阶段。早些报道见于丁群星用子房注射法将 Bt 毒蛋白基因导入玉米的研究,为国内外首次成功利用此方法将 Bt 毒蛋白基因导入玉米自交系获得一株转基因玉米 (T_0),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。

河南农业大学刘宗华等为弄清 Bt 基因通过雌雄配子的传递规律采用回交转育的方法,将已有 Bt 基因转入 4 个常用玉米自交系中并对不同自交世代转基因后代进行田间抗虫性鉴定。结果表明,同一转基因材料不同回交世代抗虫性差异很大,经选择,随回交世代的增多抗虫性逐渐提高,正反双向抗虫性存在显著差异,中抗以上抗虫率分别为 39.68% 和 30.20%,外源 Bt 基因通过雌配子的传递率显著高于通过雄配子的传递率。不同转基因材料之间及同一转基因材料的不同单株间抗虫性很大,有少量植株表现高度抗性,个别植株几乎无抗性;在不同的遗传背景当中抗虫基因的表达效果不同。

中国农科院生物技术中心董云洲(1999)用基因枪法转化花粉获得转基因玉米,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,用基因枪将 PBI121 质粒 DNA 射入花粉,经人工授粉得到大量种子,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和表达。

中国农业大学王守才(1997)对转基因在玉米中的遗传分离与整合特性作了深入研究,用 PCR 和 DNA 分子杂交方法研究了转基因 Bt 在 3 种不同方法获得的 8 个转化体后代中的遗传分离、整合性质及稳定性,结果表明,转基因在大多数转化体中呈孟德尔遗传,在 R_1 至 R_2 代,部分家系中转化体比例偏低,有的发生转基因丢失,但 R_3 代以后均趋于正常的孟德尔遗传方式,在群体中固定下来;转基因在不

同转体中的整合类型有一定差异,但整合的位点和拷贝数都较少,且多呈串联或紧密连锁的整合,在部分家系中发现了个体间 Southern 杂交带型改变的现象,尤其在 J_4 的两个 R_5 家系中表现较复杂。

在玉米育种技术不断更新的今天,转基因技术对玉米自交系拓宽种质素材、杂交种抗逆、抗病、产量的提高将扮演越来越重要的角色,为育种工作者将科技转化为现实生产力提供重要的理论依据。我国自行研制的双价抗虫棉已在河北、山东等进行田间试验,玉米抗虫基因导入当地主栽品种在中国农科院作物所已进入试验阶段。

参考文献:

- [1] 惠东威,陈受宜. RAPD 技术及应用,生物工程进展[J]. 1992, 12(6): 1-8.
- [2] Baltazar B M & Mansuri. Identification of restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) to map soybean cyst nematode resistance genes in soybean. Genetics News Letter, 1992, 120-124.
- [3] Yang X, Couiros. Theor Appl Genet 1993, 86: 205-212.
- [4] 张国栋. 大豆 RFLP 和 RAPD 研究现状[J]. 东北农业大学学报, 1996, 27(3): 299-305.
- [5] 赫忠友. RAPD 在玉米温敏型核雄性不育研究中的应用[J]. 热带作物学报, 1998, 19(3): 53-56.
- [6] 田曾元. RAPD 及其在玉米研究的应用[J]. 河南职业技术学院学报, 1998, 26(2): 41-45.
- [7] 王关林,方宏钧. 植物基因工程与技术[J]. 北京: 科技出版社, 1998.
- [8] 王守才,王国英,丁群星等. 转基因在玉米中的遗传分离与整合特性的研究[J]. 遗传学报, 1999, 26(3): 254-261.
- [9] 赵久然. 利用 RAPD 技术鉴定玉米自交系[J]. 玉米科学, 1998, 6(4): 6-9.
- [10] 刘勋甲,郑用琰,刘纪麟,等. 玉米轮回选择群体遗传多样 RAPD 分子标记评价[J]. 中国农业科学, 1999, 32(3): 14-20.
- [11] 温学江,朱常香. 转录后基因沉默与植物的病毒抗性[J]. 生物工程学报, 2001, 17(3): 231-235.
- [12] 邱少辉,薛锐,李西明,等. 水稻转基因技术的现状及在育种上的应用[J]. 生物工程进展, 1998, 18(5): 45-49.
- [13] 丁群星. 用子房注射法将 Bt 毒蛋白的基因导入玉米的研究[J]. 中国科学, 1993, (7): 707-713.
- [14] 董云洲. 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.