

玉米种质资源创新的途径^{*}

扈光辉

(黑龙江省农科院玉米研究中心, 哈尔滨 150086)

摘要: 种质基础狭窄, 已是当前玉米育种工作中不容回避的问题, 种质资源急需扩增。基因工程、诱变育种及单倍体育种, 已成为玉米育种的重要手段和种质资源创新的途径。

关键词: 玉米; 种质资源; 创新

中图分类号: S 513.02 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002—2767(2004)02—0035—04

New Ways of Maize Germplasm Enhancement

HU Guang-hui

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

Abstract: Narrow germplasm base has been an unavoidable problem in the maize breeding at the present, and the germplasm resource is in dire need of enhancement. Gene engineering, seed irradiation, and haploid breeding have been the important technology methods and become the new ways of germplasm enhancement.

Key words: maize; germplasm resource; enhancement

玉米是集粮、经、饲于一体的三元作物, 对国民经济和人们生活具有重要的意义。但是随着单交种的普及, 育种材料面临遗传基础越来越狭窄, 基因库日益贫乏的问题, 1990 年在我国玉米生产上四大种质所占比例为 90% 左右, 1994 年虽有所改善, 仍占 86.3% 左右^[1], 种质基础狭窄容易导致严重后果, 使农业生产遭到重大损失。1970 年美国玉米小斑病 T 小种大流行, 使 70% 的玉米杂交种严重减产。种质缺乏成为玉米育种的瓶颈, 种质创新工作成为亟待研究的课题。

科学技术的发展为玉米种质的创新开辟了许多新的途径, 提高了人们创造和利用变异的能力, 使缩短育种进程成为可能。目前, 基因工程、诱变育种、单倍体育种等技术已逐渐成为种质创新的重要手段。

1 基因工程

转基因玉米的研究开始较晚, 1990 年 Fromm 报道了第一例可育的转基因玉米, 短短十几年中, 转基因玉米已发展成重要的商品类型, 迄今利用转基因

的途径将外源基因导入玉米, 培育出了一批抗虫、抗病、抗除草剂、耐盐、抗旱、优质的玉米品种或优良种质。到 1999 年转基因玉米的种植面积已经达到 1 200 万 hm^2 , 占转基因作物总面积 28%, 占世界玉米总面积的 9% 左右^[2], 可见转基因育种在玉米种质改良上大有可为, 是新世纪玉米改良的重点。目前在玉米上应用转基因育种, 主要有以下 3 种方法。

1.1 农杆菌介导法

是以根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 和 Ti 或 Ri 质粒为载体, 将目的基因转移到受体染色体上的一种方法。Gould . J (1999) 利用含卡那霉素和 Gus 两种基因质粒的根癌农杆菌转化玉米芽尖获得成功。1999 年黄璐、卫志明等用带有质粒 PGH 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^[3]。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, 获得自交系综 3、P9—10 再生植株并结实^[4]。农杆菌介导法的重点是选择适当的菌株和玉米试材, 及找到自交系诱导的最佳时期。

* 收稿日期: 2003—07—21

作者简介: 扈光辉 (1975—), 男, 黑龙江省甘南县人, 研究, 从事玉米育种研究。

1.2 基因枪法

是将载有外源 DNA 的钨粒或金属粒加速后,射入细胞的一种物理介导方法。现有以火药、压缩气体、高压放电为动力的三种基因枪^[5]。1994 年赵天永、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,检测表明基因已导入玉米茎尖分生组织并获表达。1995 年王国英成功地用基因枪法,将毒蛋白基因转入玉米及转基因植株再生。Fromm 等(1990)用基因枪法转化玉米愈伤组织,将 GUS 和 BAR 基因导入玉米。目前,对于玉米基因转化方法中最有效的,用的最多的方法是基因枪法,其优点是受体广泛,可以是悬浮细胞系、愈伤组织和外植体(幼穗、幼胚或成熟胚)等。关键是需要建立良好的受体系统,已获得的转基因玉米,大多数是来源于自交系 A 188 和 B73,及衍生系、杂交种和墨西哥甜玉米^[6]。

1.3 花粉管通道法

本方法是由中国科学院上海化学研究所周光宇教授设计的、自花授粉后外源 DNA 导入植物的技术。该技术同其它转基因技术相比,具有简单、方便、育种时间短等优点,任何基因源都可用来作基因转化。既可向玉米导入目的基因,也可直接转移含目的性状的供体总 DNA。2002 年王昱等,将 Bt 基因通过花粉管通道法导入吉林省的骨干玉米自交系^[7]。祁永红(1996)用这个方法将大豆 DNA 转移到玉米材料中,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^[8]。

通过将特定的外源基因引入到受体细胞,并使其稳定的转化,从而超越物种的限制,实现基因的交流,产生具有特定性状的种质,是对传统育种方法的补充,同时也是提高作物产量,扩大玉米种质资源基础的希望所在。

2 诱变育种

我国玉米诱变育种成就显著。自 70 年代以来,利用 γ 射线等诱变因子,育成了原武 02、原辐 17、鲁原 133、华风 100、丹 340(360)、鲁原 9-2 等自交系,组配了鲁原单 4 号、鲁玉 5 号、掖单 13、鲁单 50 等杂交种,对玉米生产的发展起了较大作用^[9]。近 10 年来,随着现代科学技术的迅速发展和学科间的交叉渗透,人们不断改进诱变方法,探索新的诱变源。其中石蜡油-EMS 花粉诱变、离子注入育种、空间育种等诱变新技术,已开始应用于植物品种改良,并显示出良好的发展前景。

2.1 石蜡油-EMS 诱变育种

利用含有化学诱变剂和石蜡油处理玉米花粉,是近年兴起的一项诱变技术,也是目前在玉米上最成功的诱变方法,在诱变材料上优于种子处理,不仅突变率高,突变范围广,而且产生的突变体绝大多数为点突变^[10]。EMS 的诱变机理主要是将烷基加到 DNA 的核苷酸鸟嘌呤上,使得 DNA 在复制时错误地将 G-C 碱基对转换为 A-T 碱基对,或者这些被烷基化的鸟嘌呤自动降解,在 DNA 链上出现空位,使 DNA 链断裂、易位乃至使细胞死亡。当然,EMS 也可以使腺嘌呤烷基化,使 A-T 碱基对转换为 G-C 碱基对,或者出双换换及其它类型的突变,只是后几种的突变频率相对较低而已^[11]。

大量试验证明,EMS 处理玉米花粉平均每个位点上配子的隐性和显性突变率分别为 1×10^{-3} 和 2×10^{-5} ,这样一套 3 000—5 000 份 M_2 家系应该包括所有隐性基因突变。其次,这个方法在玉米上容易应用,因为玉米花粉量大,在 7 d 开花期的高峰时,每株每天能散发多达 10^7 粒花粉,并且诱变处理后授粉也很简单;若一个果穗能产生 250 粒种子,那么在一天的时间内即可获得多于 1 万粒 M_1 后代种子。而且,在玉米上已有一套完善的确定突变基因所在染色体臂的遗传手段和材料,如三体测验、B-A 相互易位系测验、A-A 相互易拉系测验等。Neuffer (1995)采用 EMS 花粉诱变方法,获得大量突变体,仅进行基因定位的就达 760 多个。由于化学诱变可诱发每一个基因位点发生突变,这样不仅可创造出新的突变种质资源,用于自交系改良创新,而且有可能对玉米在进化过程中,曾经出现过的遗传变异进行全面检索和研究,为玉米生长发育等基础性研究提供一些合适的素材。

Greaves 等(1986)采用含 0.667×10^{-3} EMS 的石蜡油处理玉米自交系的成熟花粉 40 min,在 M_2 代施以除草剂筛选环境,获得含抗除草剂显性基因 Pursuit 突变体。1987 年美国 ICI 种子子公司用 EMS 处理花粉获得糯质、甜质玉米突变体。Allen Wright 等,在 M_3 后代中筛选出 10 个高赖氨酸突变材料^[9]。

在国内,薛守旺、赵永亮等分别利用该技术获得多种特用玉米新种质,并得出结论:EMS 花粉化学诱变,使玉米主要胚乳基因的突变率比自然突变率至少提高了 100~1 000 倍以上^[12]。陈绍江、宋同明(2001)利用 EMS-石蜡油诱变花粉,获得含油量在 8%~9%的高油突变体^[13],该方法有可能解决传统群体轮回选择速度慢的问题,从而迅速扩大种质

里南丁森山后, 囚体细胞大受任 2~9 万叶于上均 主组仿寻系。h nj 塞囚的双应在任腔中形成有目

盾状体(紫色或红色),同时也能在胚乳糊粉层中产生有色顶冠,属双重遗传标记性状。这样,当使用黄色或白色子粒玉米作母本,用带有显性标记的孤雌生殖诱导系 Stock6 作父本,杂交所产生子粒就可以分为以下几种类型:(1)胚和胚乳均带有 R-nj 标记,为杂合二倍体;(2)胚乳具有 R-nj 标记,但无有色盾状体,胚乳为三倍体,胚为单倍体;(3)胚和胚乳均不带有 R-nj 标记,属异源花粉污染所致。种植第二类子粒,植株为紫色的(由父本的显性基因控制)予以淘汰,植株为绿色的即为单倍体或双单倍体^[16]。

根据试验观察,R-nj 基因的表达受遗传背景影响较大,给鉴别工作带来很大困难。因此,如何加强其表达或者导入其它标记性状,是成功利用这一方法必须解决的技术问题。

单倍体植株的性母细胞不能进行减数分裂,因此不能产生可育配子,必须经过染色体加倍才能成为可育的双二倍体纯系。目前,主要有自然加倍和化学加倍两种方法。据 Chase (1952)报道,单倍体的自然加倍频率达 10%左右。有关单倍体自然加倍的机制尚不清楚。但似乎可以认为,单倍体回复二倍体是细胞的一种本能反应。目前常用秋水仙素作为染色体的化学加倍剂,以种子浸渍和幼苗浸渍两种方法为主。秋水仙素的加倍效果与多种因素有关,药剂浓度、处理时间、处理温度与加倍都有很大的关系。研究表明,在有些情况下,如果排除可能的自然加倍,化学加倍的效果并不显著^[17]。

3.3 影响单倍体育种的主要因素

杂交诱导孤雌生殖单倍体,关键在于有一个具有良好标记性状的诱导系。Stock6 存在着许多严重的缺陷,如花粉量很少或者不散粉,自交结实性差,穗粒腐病严重,子粒的遗传标记表达较弱等,利用有一定的困难。而 Zms、Kms、Ws14 等改良成功的高频诱导系,多数已申请专利,限制了材料的交换。中国农大刘志增、宋同明等人已从 stock6 中成功的培育出了单倍体诱导率达 5%~6%的农大高诱 1 号,具备了遗传标记强、花粉量大、抗病性强等特点^[18 19],缩小了我国在该领域与先进国家的差距,为我国开展单倍体育种创造了物质基础。

影响单倍体育种的另一个关键因素是染色体的

加倍。单倍体加倍频率直接关系到单倍体育种的效率。化学加倍虽然已取得了一些成功的经验,但效果并不理想,提高加倍效率,尤其是化学加倍效率,应是一个重点研究的问题。此外,对于诱导系诱导单倍体的遗传规律及诱导机制仍不清楚,无疑限制了进一步挖掘单倍体诱导的潜能,这方面的研究,还有待于进一步的探索。

参考文献:

- [1] 彭泽斌,张世煌,刘新芝.我国玉米种质的改良创新与利用[J].玉米科学,1997,5(2):5-8.
- [2] 刘纪麟.玉米育种学[M].北京:中国农业出版社,2000.376-427.
- [3] 黄璐,卫志明.农杆菌介导的遗传转化[J].实验生物学报,1999,32(4):381-389.
- [4] 张荣,王国英,张晓红,等.根癌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(2):12-15.
- [5] 杨立国,石太渊,林凤,等.生物技术在玉米育种上的应用[J].辽宁农业科学,2000,(4):28-29.
- [6] 杜娟,王罡.玉米生物技术育种的研究[J].玉米科学,2003,11(2):29-31.
- [7] 王罡,杜鹃,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.
- [8] 祁永红,韩玉珠,李春秋,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.
- [9] 魏良明,姜鸿勋,胡学安,等.植物诱变新技术及其在玉米育种上的应用[J].玉米科学,2000,8(1):19-20.
- [10] 赵永亮,宋同明.玉米化学诱变研究进展[J].华北农学报,1996,11(4):24-28.
- [11] 史桂荣.化学诱变剂在玉米育种上的应用[J].黑龙江农业科学,1994,(6):44-46.
- [12] 李海军,池书敏,刘志增,等.利用 EMS 化学诱变改造玉米自交系的研究[J].玉米科学,2002,10(3):36-37.
- [13] 陈绍江,宋同明.EMS 花粉诱变获得高油玉米突变体[J].中国农业大学学报,2002,7(3):12.
- [14] 刘志生,陈吉法,范广华,等.等离子束玉米自交系选育初探[J].激光生物学报,2002,11(2):142-144.
- [15] 曹墨菊,荣廷昭.空间条件对玉米自交系 S37 的诱变效应[J].中国农学通报,2001,17(1):1-3.
- [16] 宋建成,姜丽君,王启柏,等.玉米孤雌生殖诱导系及标记基因的观察[J].玉米科学,1998,(1):17-20.
- [17] 刘志增,宋同明,滕文涛,等.玉米孤雌生殖诱导系的选育方法研究[J].中国农业大学学报,2000,5(3):51-57.
- [18] 刘志增,宋同明.玉米高频率孤雌生殖单倍体诱导系的选育与鉴定[J].作物学报,2000,26(5):570-574.
- [19] 刘志增,宋同明.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.