

玉米转基因育种技术的研究进展

李金良¹, 于凤丽²

(1. 黑龙江省农业科学院黑河分院, 黑河 164300; 2. 黑河学院, 黑河 164300)

摘要: 转基因技术是植物分子生物学研究的重要领域之一, 随着分子生物学的迅猛发展, 玉米转基因技术的研究取得了很大的进展。简要介绍了转基因技术在玉米遗传育种上的应用、所取得的成就及转基因玉米的研究前景。

关键词: 玉米; 转基因; 进展

中图分类号: S513 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2008)01-0114-03

Research Progress of Transgenic Breeding in Maize

LI Jin-liang¹, YU Feng-li²

(1. Heihe Sub-academy, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Heihe 164300; 2. Heihe Academy, Heihe 164300)

Abstract: Transgenic technique is one of the important fields in molecular biology. With the swift development of molecular biology, the research of transgenic technique in maize acquired great progress. The application, achievement and prospect of transgenic technique of breeding in maize were introduced in brief.

Key words: maize; transgene; progress

玉米是我国主要的粮食及饲料作物之一。近年来, 玉米育种家采用常规的育种方法, 已经培育出许多优良杂交种, 对农业生产做出了重大贡献。但玉米的常规遗传改良一直存在育种周期长、优良组合的预见性差、优良亲本自交系的当选率低、遗传连锁难以打破等缺点。

转基因技术的迅猛发展, 使转基因植物育种成为可能, 并取得了传统常规育种技术难以达到的效果和效益。转基因技术是农业生物技术的核心领域, 它正在成为作物育种的一种重要辅助手段。

1 玉米的转基因育种技术

玉米的基因导入方法主要有两大类: 根癌农杆菌介导转化和无需载体的 DNA 直接导入的转化。DNA 直接导入转化主要包括基因枪法、花粉管通道法、子房注射法、PEG 法、电击法、阳离子转化法等。

1.1 根癌农杆菌介导法

农杆菌介导法是转基因技术中经常采用的一种手段。农杆菌在双子叶植物上的遗传转化方法已经十分完善, 由于单子叶植物不是农杆菌的天然宿主,

在单子叶植物上的遗传转化研究落后于双子叶植物。Grimsly 等首次以玉米为材料, 用农杆菌将玉米条纹病毒(MSV)的 cDNA 导入玉米植株中, 使植株表现了系统感染症状, 这个报道有力地证明了农杆菌能侵染玉米。这是玉米转基因育种的一个重要转折点, 它开创了农杆菌应用于玉米转基因育种的新纪元。Gould 等利用农杆菌转化玉米茎尖分生组织获得转基因植株, Southern 杂交分析结果显示外源基因稳定遗传到 R₁ 代。Ishida 用含超二元载体的农杆菌转化玉米幼胚 A188 获得成功。黄璐等^[1], 报道了用根癌农杆菌介导的方法转化玉米栽培品种, 获得转化植株, 并对转化的愈伤组织中沉默的外源基因的甲基化现象进行了分析。

农杆菌介导法具有简单易行, 不需昂贵的设备, 成本低, 转化频率高, 拷贝数少, 遗传表达稳定性较好等优点, 许多研究工作者仍热衷于不断完善这一转化体系, 尤其近几年在单子叶植物特别是禾谷类作物上的突破性进展, 表明农杆菌是很有潜力的一种转化方法。

1.2 基因枪介导法

基因枪法是通过基因枪击发火药爆炸、高压气体释放或高压放电所产生的推力使携带了外源基因的金属微弹穿透植物的组织、细胞壁和膜结构, 将外源

收稿日期: 2007-05-31

第一作者简介: 李金良(1978-), 黑龙江省黑河市人, 学士, 硕士, 从事育种与栽培研究。Tel: 13845677843; E-mail: hhnksyljl@163.com.

基因送入细胞核, 进而整合到植物基因组中, 实现遗传转化。基因枪转化的受体类型非常广泛, 能被基因枪微弹穿透的组织都可以作为转化的受体, 是玉米目前遗传转化的主要方法。受体组织的类型对基因枪的转化也有一定的影响, 具有潜在分化能力的细胞容易接受外来 DNA, 转化率高。基因枪法不受基因型的限制, 但缺点是外源基因整合的拷贝数多^[3]。

1989 年, Klein 第一次使用基因枪法转化玉米, 并获得成功^[3]。Philippe 等用山梨糖醇和甘露醇处理玉米的胚性悬浮细胞, 用基因枪把 GUS 基因导入玉米中, 而且, 经山梨糖醇和甘露醇处理过的细胞, 其转化频率提高了 2.7~6.8 倍。在我国, 许多研究者均使用基因枪法获得遗传转化的成功。

1.3 种质系统转化法

种质系统转化, 或称生物媒体转化系统, 即利用花粉粒、花粉管通道或利用子房、幼穗及种胚注射外源 DNA 等方法, 实现外源基因的导入。

子房注射法是指利用显微注射仪或微注射针把外源 DNA 溶液注入子房中, 靠子房产生的压力及卵细胞的吸收使外源 DNA 进入受精的卵细胞中。丁群星等^[4]首次报道用子房注射法将 Bt 抗虫毒蛋白基因导入玉米自交系, 经 Southern 及 PCR 检测证明目的基因已整合, 同时对转基因后代植株分子检测也呈阳性, 对玉米螟饲喂显示一定的抗虫效果。在农大 60 品种上重复试验, 也获得成功。沈世华等^[5]利用离体子房注射法转化普通玉米获得成功, 比非离体转化效率有所提高。目前, 该方法转化率还不高, 影响转化效率和结实率的原因是子房经注射受害较深而导致败育。应改进注射技术和注射工具, 尽量减轻对子房的伤害, 提高注射的准确度, 并且 DNA 和注射工具均不能带菌。尽管如此, 这一方法仍然具有优势, 经过进一步探索, 将是玉米基因转化的一个重要方法。

1.4 其它转化方法

迄今报道在玉米上应用的其它基因直接导入方法还有 PEG 介导法、电激穿孔法、碳化硅纤维介导法、阳离子转化法等等, 这些方法往往以原生质体为受体材料。尽管已有许多研究表明, 外源基因被导入原生质体在细胞中能瞬时表达, 并且在再生愈伤组织中稳定整合和表达, 然而由此获得的转基因可育植株却很少。玉米原生质体再生植株强烈地依赖于基因型, 仅有少数几例对生产价值不大的品系如 A 188 等能再生植株, 无法应用于许多栽培品系或品种, 因此这些转化方法受到很大限制。

2 转基因技术在玉米育种中的应用

玉米转基因技术应用领域十分广泛, 主要应用在抗虫转基因玉米、抗除草剂玉米、特种玉米等方

面。近年来, 美国许多公司都推出了自己的转基因玉米品种, 抗虫、抗除草剂基因工程已进入商业化应用阶段。至 2001 年底, 转基因玉米种植面积已达 5 260 万 hm², 经济效益和社会效益明显。

2.1 抗虫转基因玉米

虫害是制约玉米生产的一大因素。目前, 解决玉米虫害的主要方法是在玉米植株生长过程中喷施化学杀虫剂。化学杀虫剂不但杀死害虫, 也杀死害虫的天敌, 长此以往会造成生态平衡的破坏和环境污染的日益严重。同时由于害虫对农药产生抗药性使人们不断加大使用剂量, 会造成环境污染的恶性循环。转基因抗虫玉米是替代杀虫剂的更有效方法, 同时应采取有效的方法防止害虫对转基因植株产生抗性, 如继续使用部分传统的玉米种子, 并加快培养新一代的抗虫玉米杂交种。

抗虫转基因玉米主要应用的是 Bt 毒蛋白基因, Bt(苏云金芽孢杆菌)在芽孢形成的过程中产生杀虫晶体蛋白(ICP), Bt 毒蛋白在体孢晶体中以原毒素的形式存在, 被昆虫摄取后在昆虫幼虫的肠道内的微碱性条件下经蛋白酶水解转变为毒性多肽分子。可与昆虫肠道上敏感的表面特异受体相互作用, 扰乱细胞的渗透平衡, 从而导致幼虫停止进食, 最终死亡。美国孟山都公司等改造成成了多种 Bt 杀虫蛋白基因, 并转入玉米。1996 年美国正式批准 Bt 转基因玉米进入商品化生产, 当年推广面积达 31 万 hm², 1997 年其种植面积达 320 万 hm², 试验结果表明, 玉米植株对玉米螟等害虫具有明显的抗虫效果, 平均增产 9%。

国内在“863”高新技术计划的资助下, 合成了 Cry1A 基因。王国英等把 Cry1A(b)基因导入玉米, 育成了稳定的抗虫玉米。李慧芬等^[6]把抗虫融合基因 Cry1Ac3-cpti 导入了玉米。目前我国的转基因玉米已开始环境释放试验。

2.2 抗除草剂转基因玉米

抗除草剂基因工程植物在国外很受重视, 将抗除草剂耐性基因引入玉米是增加其对除草剂选择的安全性一种新的途径, 也是一种高效、低成本、无公害的控制杂草的手段。IMI 玉米是美国一家公司开发的抗除草剂, 它对除草剂具有高度耐受性, 允许在其上喷撒除草剂, 以控制一年生杂草和宽叶杂草。该产品于 1996 年已实现商品化。SR 玉米是 BASF 公司开发的抗除草剂玉米, 对除草剂具有高度耐受性, 在出芽后喷施可防治大多数禾本科的杂草。

在抗除草剂基因中以 Bar 基因应用最广而且最为成功。来源于吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)的 Bar 基因被广泛用作玉米基因转化中的选择标记基因, 除草剂抗性基因的利用不仅可作选择标记, 同时还具有农业生产用途, 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。用基因枪将来自拟南芥突变体中的抗除草剂基因 *als* (*acetolactate synthase*) 导入玉米细胞, 经检测具有抗除草剂特性。

近年来, 随着基因转化技术的不断完善, 科学工作者培育出了一大批抗除草剂转基因玉米品种。如抗咪唑啉酮玉米、抗稀禾定玉米、抗 Liberty 玉米、抗农达玉米、抗 Poast 玉米、抗草甘膦玉米、抗草铵膦玉米、抗草丁膦玉米等。

2.3 利用转基因玉米作载体生产特殊蛋白

利用转基因玉米生产特种蛋白已成为另一种研究方向。美国德克萨斯大学实验站已将遗传工程玉米天然产生的特别蛋白推向市场。首批大量销售的两种产品是抗生素蛋白和葡萄糖苷酸酶。因为玉米基因易被修饰而且其基础条件已经具备, 用标准技术可以很容易的将所需物质提取出来, 所以该公司选择以玉米为载体通过一定的基因工程手段使其生产特殊蛋白。此外, 抗病毒、高淀粉、高赖氨酸以及转入两种以上的目的基因的转基因玉米正处于试验阶段, 有待于进一步的开发和利用。

2.4 抗病转基因玉米

抗病转基因玉米的主要目标是抗病毒和抗真菌病害。研究发现玉米矮花叶病毒 (MDMV) B 株外壳蛋白在转基因植株中表现出对 MDMV 的抗性。另外, 转几丁质酶基因玉米被认为具有抗真菌病害的效果^[4]。

2.5 改良品质

赖氨酸是玉米蛋白质中的限制性氨基酸, 含量高低直接关系到玉米的营养价值。孙学辉等^[7]通过基因工程提高了玉米的赖氨酸含量。国外已经报道了通过转基因玉米生产鸡蛋抗生素蛋白, 并已进入商业化生产。

3 玉米转基因存在的问题和育种应对策略

目前一些人们恐惧基因工程创造的转基因新物

种带来的危害如环境危害和食品安全性。但鉴于转基因玉米的独特优势, 我们没有理由仅仅因为它存在一些潜在的风险就视之不理或采取敌视的态度。相反, 我们应该正视现实, 积极解决问题。

3.1 除加强转基因本身的研究外, 还要加强新基因鉴定和基因分离克隆的研究, 给转基因提供有用的基因源。

3.2 在玉米转基因研究中, 应认真借鉴别的国家先进经验成果并结合我国的具体实践, 如应把研究重点从玉米转化研究转向转基因的表达研究, 把抗性基因转移转向品质性状基因转移等。

3.3 在我国亟待进行玉米基因组研究, 这对转基因玉米研究和品种培育十分重要。基因组作图、表达序列标签 (EST) 测序、mRNA 转录本作图和蛋白质鉴定等, 将是今后近年玉米分子生物学研究的前沿领域。

3.4 为了解决市场问题, 转基因玉米研究中还必须加强针对玉米的安全性评估。

参考文献:

[1] 黄路, 卫志明. 农杆菌介导的玉米遗传转化[J]. 实验生物学报, 1999, 2(4): 381-387.

[2] Bytchier B F, Deboeck F, Greve H D. T-DNA organization in tumor cultur and transgenic plants of the monocotyledon *Asparagus officinalis* [J]. Pr Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 5345-5349.

[3] Klein T M, Wolf E D, Wu R et al. High velocity microprojectiles for deliver in nucleic acids into living cells [J]. Nature, 1987, 327: 70-73.

[4] 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(7): 669-672.

[5] 沈世华, 张秀君, 郭奕明等. 玉米基因转化的离体子房注射及其转基因植株的鉴定[J]. 植物学报, 2001, 43(10): 1055-1057.

[6] 李慧芬, 刘翔, 曲强, 等. 转抗虫融合基因 (*cry1Ac3-cpti*) 玉米 (*Zea mays* L.) 植株的获得及其抗性分析[J]. 自然科学进展, 2002, 12(1): 37-41.

[7] 孙学辉, 敖光明, 于静娟. 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.

几种主要文献的著录格式

1 标准

著录格式: 主要责任者(任选). 标准编号, 标准名称[S].

例: [1] GB/T 7714-2005, 文后参考文献著录规则[S].

2 专利

著录格式: [序号] 专利申请者或所有者. 专利题名: 专利国别, 专利编号[P]. 公告日期或公布日期.

例: [1] 姜锡洲. 一种温热外敷药制备方案: 中国, 88105607.3[P]. 1989-07-26.

3 报纸文章

著录格式: 主要责任者. 文献题名[N]. 报纸名, 出版日期(版次).

例: [1] 谢希德. 创造学习的新思路[N]. 人民日报, 1998-12-25(10).

4 电子文献

著录格式: [序号] 主要责任者. 题名[文献类型标志/文献载体标志]. 出版地: 出版者, 出版年(更新或修改日期)[引用日期]. 获取和访问路径.

例: [1] 萧钰. 出版业信息化迈入快车道[EB/OL]. (2001-12-19)[2002-04-15].
<http://www.booktide.com/news/20011219/200112190019.html>.