

生物技术在玉米育种中应用的现状和展望

曹士亮, 王成波

(黑龙江省农业科学院玉米研究所, 哈尔滨 1500860)

摘要: 生物技术和常规育种技术的结合, 加速了玉米育种技术的进步, 使育种水平得到了提高。介绍了以单倍体育种为代表的玉米细胞工程、分子标记辅助育种及基因工程等方面的进展, 综述了近年来玉米采用生物技术育种取得的一些新的进展, 总结了这些领域存在的问题, 并对今后生物技术在玉米育种中的应用提出了展望。

关键词: 玉米育种; 生物技术; 细胞工程; 分子标记辅助育种; 基因工程

中图分类号: S513 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2008)03-0014-03

Current Status and Prospect of Application of Biotechnology in Maize Breeding

CAO Shi-liang, WANG Cheng-bo

(Maize Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Science, Harbin 150086)

Abstract: Combination of biotechnology and routine technique has accelerated the progress of maize breeding technique. The progress of maize biotechnology breeding was introduced in the aspects of maize cell engineering, molecular marker assistant breeding and gene engineering. The problem of these aspects was summarized and the prospect of using biotechnology in maize breeding was proposed.

Key words: maize breeding; biotechnology; cell engineering; molecular marker assistant breeding; gene engineering

玉米(*Zeamays* L.)在全世界广泛种植, 是世界第三大作物, 中国第二大作物。随着人口的增加和经济的发展, 玉米的需求量不断上涨。耕地面积的减少, 环境变化的加剧使生产上对高产、优质、抗逆性强的玉米新品种的需求日趋迫切。常规的育种技术由于育种周期长、选择效率低等特点很难在短时间内选育出生产所需要的品种。近年来, 单倍体育种技术、基因工程育种、分子标记辅助育种等生物技术手段与常规育种技术的有机结合提高了玉米育种的效率, 开辟了玉米育种的新途径。从我国的玉米育种现状来看, 利用单倍体育种技术选育自交系已经成为自交系选育的重要手段。利用分子标记划分玉米杂种优势群和杂种优势模式已经得到了大家的认可并在育种实践中加以应用, 转基因玉米已经逐步从实验室走向田间, 并将很快实现产业化。而高成本、掌握难、重复性和通用性差等问题仍然制约着生物技术在玉米育种中应用。

1 生物技术在玉米育种中应用的现状

1.1 玉米单倍体育种技术研究越来越深入, 取得了新进展

加快自交系的选育和纯化历来是玉米育种工作的主要内容和基础。采用单倍体育种技术选育自交系, 可使材料的纯合从常规育种的 5~7 a 缩短到 1~2 a, 大大地提高了育种效率。组织或细胞的离体培养和体内发生是诱导产生单倍体的两个主要途径。

1.1.1 细胞、组织培养等方法诱导玉米单倍体 从 20 世纪 70 年代中期至 80 年代, 人们陆续开始了玉米花药培养方面的研究, 并取得了一定的成果。广西玉米研究所杭玲等育成了国内外第一个玉米花培杂交种桂三 1 号于 1992 年通过广西壮族自治区品种审定。山东农业大学育成的花培玉米杂交组合 B218×多 27, 综合性状良好, 抗病抗倒伏。杨宪民利用玉米花培纯系选育出优良杂交种花单 1 号。李冬郁等^[1]报道了以玉米为材料进行了化学药物诱导孤雌生殖的试验, 成功地获得了自交系并组配了杂交组合。尽管如此, 大量的研究表明, 不同材料间诱导率存在很大的差异, 诱导成功与否还受到诱导时间、培养体系等多个因素的影响。王子霞等^[2]研究

收稿日期: 2007-11-28
第一作者简介: 曹士亮(1980-), 男, 黑龙江省阿城市人, 硕士, 研
实, 从事玉米遗传与育种研究。Tel: 0451-86696922,
13946013375; E-mail: caoshiliang2003@126.com。

了新玉 9 号等 10 个玉米材料在 5 种培养基中的诱导情况, 其中的 4 个材料共接种了 16 900 枚花药, 但未出现一块愈伤。由于诱导材料基因型的差异及对培养基的选择性, 现在还没有形成统一的培养体系供玉米育种应用。

1.1.2 采用孤雌生殖诱导玉米单倍体 拥有遗传标记显著、花粉量大、抗病性好的诱导系是开展孤雌生殖诱导玉米单倍体的先决条件, 国内外许多学者都在进行这方面的研究。德国科学家 F K Rober 等^[3] 利用俄罗斯诱导系 KEMS 和法国诱导系 WS14 杂交后代 F₅ 分离出新的高频诱导系 RWS, 平均诱导率达到 8.1%。刘志增等^[4] 从单倍体诱导系 Stock6 与高油玉米群体 BHO 的杂交后代中经过不断的测交和选择, 育成了我国第一个孤雌生殖的单倍体诱导系—农大高诱 1 号。其平均单倍体诱导率为 5.34%, 以黄绿苗自交系 Syn695yg 为测验种, 高诱 1 号的诱导率达 5.8%, 较 Stock6 高出 5 倍, 同时其籽粒标记选择更明显, 花粉量达, 繁殖容易。农大高诱 1 号的育成缩小了我国在该领域与先进国家的差距。

1.2 分子标记技术广泛应用, 带来了玉米育种的新变革

分子标记技术应用到了玉米育种的许多环节, 带来前所未有的变革, 真正实现了由表型选择向基因型选择的过渡。在玉米育种中分子标记技术主要应用于玉米自交系及群体杂种优势群的划分、种子纯度的鉴定、种子真伪性鉴定、玉米遗传图谱构建, 数量性状 QTL 定位以及分子标记辅助育种等方面。

1.2.1 鉴定玉米种质亲缘关系, 预测杂种优势 建立合适的杂交优势利用模式, 将大大减少育种的盲目性, 提高育种效率。在分子标记出现以前, 人们主要根据形态特征差异、系谱来源、大量亲本测交观测配合力表现以及同工酶测定的方法来划分玉米类群。采用 DNA 分子标记技术因操作简单, 样品用量少, 多态性丰富, 不受环境条件和发育阶段的影响, 经济快捷等优点而被广泛应用。当前, 在划分玉米自交系及群体亲缘关系类群应用较多的是 RAPD、SSR 分子标记等。赵久然等^[5] 应用 RAPD 对我国骨干自交系进行类群划分。袁力行等^[6] 比较了采用 RFLP、SSR、AFLP 和 RAPD 4 种分子标记方法对 15 个玉米 (*Zea mays* L.) 自交系的遗传多样性分析效果, 认为 SSR 和 RFLP 两种分子标记方法适合进行玉米种质遗传多样性的研究。谢传晓^[7] 等以 70 对均匀分布于全基因组的简单序列重复 (SSR) 基因座对 187 份重要的玉米自交系进行分析, 采用联合连锁位点与混合模型分析推测了这些自交系的基因组构成及分子亲缘关系, 在把我国种

质认定为 6 个亚群的基础上推测了 187 份自交系的基因组分别来源于或相似于各种质的比例, 为自交系的合理组配提供了重要的参考。

1.2.2 玉米分子标记遗传连锁图谱的构建 高密度分子标记遗传连锁图谱的构建, 可为基因定位、物理图谱构建和以图谱为基础的目的基因克隆奠定基础, 还可为分子标记辅助选择创造条件。根据构建图谱所利用的分子标记的不同, 可分为 RFLP 连锁图谱、RAPD 图谱、SSR 图谱及 AFLP 图谱等, 各种连锁图谱均有其各自优缺点。近年来, 多种分子标记并用的方法常常被人们应用到玉米数量性状 QTL 定位当中。张帆等^[8] 用已构建的包括 88 个 AFLP 标记和 151 个 SSR 标记的遗传图谱和 230 个 F₂ 植株用于玉米抗穗粒腐病 QTL 定位研究, 为玉米抗穗粒腐病育种奠定了基础。

1.2.3 玉米分子标记辅助选择育种 分子标记辅助选择 (MAS) 是分子标记在育种应用中最主要的方面, 在育种实践中, 借助分子标记对目标性状的基因型进行选择, 大大地提高了对玉米一些复杂性状的选择效率。田清震等^[9] 通过对回交家系 (黄早四//CA335/CA335) 赖氨酸分析和 SSR 分子标记检测结果比较, 论证了采用 SSR 分子标记对回交后代几经选择的可行性并提出了优质蛋白玉米的分子标记辅助选择策略。杨华等^[10] 利用第 7 和第 1 染色体上与抗病 QTL 紧密连锁的两个标记 phi116 和 umc1044 对 (CML270×478)×CML270 回交后代 13 份 BCF_{6,7} 选系进行了抗性分子标记辅助选择, 谱带结果与病情指数相关系数达极显著水平, 标记鉴定和表型鉴定相结合, 提高了选择玉米纹枯病抗病自交系的选择效率。

1.2.4 玉米种子纯度的分子鉴定 种子纯度是影响种子质量和产量的重要因素, 玉米种子纯度检验和真伪性鉴别是种子生产者和管理部门的重要工作之一。近年来玉米生产中使用的种质日益集中, 单纯依靠形态、蛋白或同工酶标记部分杂交种难以鉴定。人们在采用国家规定玉米种子盐溶蛋白检验时常常结合 DNA 分子标记。赵妹华等^[11] 以 12 份玉米自交系及其组配的 8 个杂交种为材料, 采用 RAPD 的标记方法, 筛选确定了 8 个杂交种种子纯度检测引物, 制定检测标准标记图谱, 建立了海禾 3 号纯度分析的 SCAR 标记。高文伟^[12] 等利用 SSR 标记技术分别筛选出玉米杂交种农大 108 和豫玉 27 的特异性引物, 结合单籽粒 DNA 快速提取方法, 建立了两个品种的种子纯度鉴定试剂盒。黑龙江省种子管理已经开始应用分子标记结合盐溶蛋白检测对参试品种进行纯度和真实性检测。尽管 DNA 分子标记方法还没有大规模地应用于种子纯度鉴定, 但随着分子生物技术的飞速发展和不断完善, DNA

分子标记技术必将为高精度种子纯度检测和品种鉴定展示出美好、广阔的前景。

1.3 玉米基因工程成就显著

植物基因工程是在分子水平上定性重组遗传物质,改良植物性状,培育优质高产作物新品种的分子育种技术。玉米基因工程在改变玉米抗性和品质方面得到了广泛的应用。在过去的十年中,转基因玉米的研究和品种推广取得了举世瞩目的成就。转基因玉米已经成为世界上最重要的转基因作物之一。1999 年,全球 12 个国家种植的 4 个主要转基因作物中,玉米占转基因作物总种植面积的 28%^[13]。当前的玉米转基因技术主要有:以农杆菌 Ti 质粒介导的载体转化技术,利用基因枪、电穿孔等直接导入的转化技术及通过花粉管通道、子房注射的转化技术,其中以基因枪导入和农杆菌介导的方法应用最多。中国从 1986 年开始投入力量研究转基因技术,我国已经建成了先进的基因转化平台,克隆了一批具有自主知识产权的功能基因,培育出了一批性状优异的转基因玉米材料,并具备了工厂化生产的能力。我国在 1999 年正式启动实施了“国家转基因植物研究与产业化专项”,玉米转基因中试与产业化基地在吉林建成,已经具备了一定的生产能力。

2 玉米生物技术育种面临的问题

现代的生物技术是建立在分子生物学和分子遗传学基础上的新兴技术,它涉及内容繁多,操作复杂,融合了遗传学、信息学、工程学、计算机科学等学科的最新知识。这就要求从事玉米生物技术研究 and 利用的人员必须具备以上几个方面的专业知识,才能更快更好地掌握和利用这项技术。此外,高昂的费用,让许多育种单位望而却步。生物技术实验中所用到的关键仪器,PCR 仪、冷冻离心机、基因枪等设备,都在万元以上有的达到几十万甚至百万以上,而且使用和维护起来的费用也高得惊人。这对于大多数省属的或私营育种单位是难以承受的。即便具备了一些设备,其使用起来的费用也是高得惊人。

就生物技术本身而言,还有许多不成熟的地方。玉米育种中一些重要的农艺性状往往是数量性状,即便实现了基因定位也很难实现相关基因的转化。在分子标记辅助育种方面,还缺乏有效的与性状紧密连锁的标记,可供选择利用的标记还很少或与性状的连锁关系不紧密,降低了选择的效果;在 DNA 实验操作方面,自动化程度还很低,造成试验周期长,难以大规模展开;数据处理和整合难,往往许多人重复了大量的工作其结果无法实现有效的整合,人为影响也比较大;由于基因沉默效应的存在,插入的基因往往不表达。玉米转基因植株往往出现矮化、散粉结实性差的现象,因此一些玉米转基因研究

仍然停留在试验阶段,还没有实现产业化。以上大量因素的存在,制约着玉米生物技术育种的发展。

3 展望

21 世纪是生物技术的世纪,其蓬勃发展的趋势已经不可阻挡。不可否认常规技术仍然是玉米育种的主要手段,在整个育种体系中占据着不可替代的地位。尽管开展玉米生物技术育种还存在很多限制性因素,但这个潮流已不可逆转。玉米生物技术育种特别是其中的分子标记辅助育种和转基因育种已经逐渐成为现代玉米育种技术竞争的核心,一些新开发的分子标记和功能基因、修饰基因等已经被申请专利成为商业机密,谁掌握了这些基因资源、技术体系谁就会在竞争中取胜。有鉴于此,开展生物技术育种已经刻不容缓,我们认为应该重视以下几方面的工作:

一是提高从事玉米生物技术育种人员的知识和技术操作水平,特别是分子遗传学、数量遗传学、分子数量遗传学等知识的水平和应用能力。既可以进行实验又可以设计实验,并能够对实验结果进行有效地分析。

二是以利用为主。育种的最终目标是为生产提供符合要求的品种。所以对于育种单位而言,应把重点放在生物技术的应用上。首先从分子水平上对所掌握的育种材料有一个遗传上了解。利用已经公开发表的被证明和一些性状紧密连锁或就是性状本身的标记开展分子标记辅助育种工作,吉林省农科院已经开展了这方面的工作并取得了成效。考虑到当前可利用的标记比较少,有条件的单位可以尝试开发简单、有效的标记供育种应用。

三是加强联系与合作。生物技术发展时间短,进展迅速。国内外的生物技术发展水平很不平衡。我国的生物技术平台多集中在国家重点的大专院校和科研院所。他们具有较高的科研能力和技术水平,加强和这些单位的合作与交流可以更易于接触和掌握世界先进的生物技术知识和技能,提高育种单位自身的水平。

参考文献:

[1] 李冬郁, 杨宪民, 滕少花. 利用孤雌生殖技术选育玉米自交系和杂交种初报[J]. 玉米科学, 2005, 13(增刊): 23-25.

[2] 王子霞, 杨克锐, 海热古力, 等. 玉米花药培养的初步研究[J]. 新疆农业科学, 2001, 38(6): 346-347.

[3] Rober F K, Aordillo G A, Geiger H H. In vivo haploid induction in maize-performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding[J]. Maydica, 2005, 50: 275-283.

[4] 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): 571-574.

[5] 赵久然, 郭景伦, 郭强, 等. 用 RAPD 分子标记技术对我国骨干玉米自交系进行类群划分[J]. 华北农学报, 1999, 14(1): 32-37.

分子标记技术及其在大豆疫霉根腐病研究中的应用

赵伯福¹, 张俊华²

(1. 黑龙江省肇东市农业推广中心, 肇东 151100; 2. 东北农业大学, 哈尔滨 150030)

摘要: 随着遗传学的不断发展, 遗传标记的种类和数量也不断增加。与其他标记技术相比, 分子标记技术具有许多明显的优越性, 因而应用也日趋广泛。综述了 RFLP、RAPD、SSR、AFLP、SCAR、SNP、SRAP 等几种主要 DNA 分子标记技术原理和方法及其在大豆疫霉根腐病研究中的应用。

关键词: 分子标记; DNA 多态性; 大豆疫霉根腐病

中图分类号: S435.651 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2008)03-0017-05

Molecular Marker Techniques and Their Application in the Studies of Soybean Phytophthora Root Rot Disease

ZHAO Bo-fu¹, ZHANG Jun-hua²

(1. Agricultural Technology Extension Center of Zhaozhong County in Heilongjiang Province, Zhaozhong 151100; 2. Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract: With the continuously development of genetics, the types and quantities of genetic marker techniques also increased rapidly. Compared with other marker techniques, molecular marker techniques had been applied widely for their superiority. This paper summarized the principle and method of several leading molecular marker techniques such as restriction fragment length polymorphism (RFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD), simple sequence repeats (SSR), amplified fragments length polymorphism (AFLP), sequence characterized amplified region (SCAR), single nucleotide polymorphism (SNP) and sequence related amplified polymorphism (SRAP) and their application in the studies of soybean phytophthora root rot disease.

Key words: molecular marker; DNA polymorphism; soybean phytophthora root rot disease

遗传标记是指可追踪染色体、染色体某一节段或者某个基因座在家系中传递的任何一种遗传特

性。它具有两个基本特征, 即可遗传性和可识别性。因此, 生物中任何有差异表型的基因突变型均可作为遗传标记。遗传标记在遗传学的建立和发展过程中具有举足轻重的作用, 同时也是生物遗传育种的重要工具。

目前遗传标记有四种: (1) 形态标记: 这是传统的最重要的鉴定方法。(2) 生化标记: 这是建立在现代仪器分析的基础上主要依据部分化学成分, 尤其

收稿日期: 2008-01-31
基金项目: 黑龙江省教育厅资助项目(10541019)
第一作者简介: 赵伯福(1972-), 男, 黑龙江省肇东市人, 学士, 农艺师, 主要从事植物保护技术推广工作。E-mail: zdtgz@163.com。
通讯作者: 张俊华(1973-), 男, 黑龙江省北安市人, 博士, 副教授, 主要从事分子植物病理学研究。E-mail: podozjh@163.com。

[6] 袁力行, 傅骏骅, Warburton M, 等. 利用 RFLP, SSR, AFLP 和 RAPD 标记分析玉米自交系遗传多样性的比较研究[J]. 遗传学报, 2000, 27(8): 725-733.

[7] Xie Chuankun, Zhang Shihuang, Li Mingshun, et al. Inferring genome ancestry and estimating molecular relatedness among 187 Chinese maize inbred lines[J]. Journal of Genetic and Genomics, 2007, 34(8): 738-748.

[8] 张帆, 万雪琴, 潘光堂. 玉米抗穗粒腐病 QTL 定位[J]. 作物学报, 2007, 33(3): 491-496.

[9] 田清震, 李新海, 李明顺, 等. 优质蛋白玉米的分子标记辅助选择[J]. 玉米科学, 2004, 12(2): 108-110, 113.

[10] 杨华, 杨俊品, 荣廷昭, 等. 利用 phi116 和 umc1044 标记选育抗纹枯病玉米品系[J]. 分子植物育种, 2007, 5(3): 347-352.

[11] 赵姝华, 李玥莹, 王鹤, 等. 利用分子标记技术检测玉米杂种纯度研究[J]. 生物技术, 2003, 3(5): 19-21.

[12] 高文伟, 李晓辉, 田清震, 等. 利用 SSR 标记快速鉴定玉米杂种农大 108 和豫玉 27 的种子纯度[J]. 种子, 2004, 23(5): 32-33.

[13] 黎裕, 王宇, 石云素. 转基因玉米的研究现状与未来[J]. 玉米科学, 2000, 8(4): 20-22.