

转基因技术在玉米育种中的运用

王良发, 张守林*, 卢瑞乾, 李长建, 李凤章, 王静, 张素芬 (河南省鹤壁市农业科学院 玉米研究中心, 河南鹤壁 458030)

摘要 就玉米转基因在抗除草剂、抗虫、抗病、抗盐碱等方面取得的成果进行了回顾, 以期为我国玉米分子育种研究提供参考。

关键词 玉米; 转基因; 非生物胁迫; 分子育种

中图分类号 S512 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)31-10875-02

Application of Transgene in Maize Breeding

WANG Liang-fa, ZHANG Shou-lin, LU Rui-qian et al (Maize Research Center, Hebi Academy of Agricultural Sciences, Hebi, Henan 458030)

Abstract The achievements of transgenic maize in herbicide resistance, insect resistance, disease resistance and alkali resistance were reviewed. It would be helpful for scientists who are working on the study of molecular breeding of maize in China.

Key words Maize; Transgene; Abiotic stress; Molecular breeding

玉米是人类重要食物之一, 在过去的几十年里, 传统杂交育种为人类粮食生产作出了巨大贡献。但随着人口数量的剧增, 传统育种技术已不能满足人类对食物、能源等的需求。转基因技术因能在较短时间内生产人们所需的生物性状而迅速发展。据专家预测, 到2030年, 全球50%的农产品将由转基因技术提供^[1]。笔者就玉米转基因在抗除草剂、抗虫、抗病、抗盐碱等方面的成果进行了回顾, 以期为我国玉米分子育种研究提供参考。

1 技术回顾

1.1 玉米转基因技术 将外源 DNA 片段转入玉米细胞中主要有3种方法: ①载体介导转化法, 如农杆菌介导法; ②DNA 直接导入法, 如基因枪法; ③种质系统转化法, 如花粉管通道法。

1983年, 农杆菌转化法成功运用于双子叶植物烟草, 直到1996年, ISHIDA等^[2]构建超二元载体, 以根癌农杆菌为媒介转化玉米自交系A188的幼胚, 获得了转基因植株, 农杆菌转化法得以在玉米育种中广泛运用。

基因枪法是将外源 DNA 包裹在微小的金粒或钨粒表面, 然后在高压放电所产生的推力下高速微粒射入受体细胞或组织, 使之导入细胞。基因枪法具有不受受体类型限制, 可同时转化多个基因, 转化率高的特点。

1988年, 周光宇等^[3]提出并发展了花粉管通道法, 该法的主要原理是授粉后使外源基因能沿花粉管渗入, 经过珠心通道进入胚囊, 转化尚不具备正常细胞壁的卵、合子或早期胚胎细胞。该法操作简单, 无需建立愈伤组织诱导, 省时省力, 不受植株基因型限制。

1.2 标记基因 作物转基因所应用的转化系统只能使一小部分细胞稳定转化, 因此在导入目的基因的同时还要导入标记基因, 赋予转化体特定标记以便于识别和鉴定^[4]。部分常

用于转基因玉米的标记基因见表1。

表1 常用于转基因玉米中的标记基因

标记基因	特性	标记基因	特性
<i>bar</i>	抗草丁膦和双丙氨膦	<i>luc</i>	有荧光素时发黄绿光
<i>aphIV</i>	抗潮霉素	<i>gfp</i>	表达绿色荧光蛋白
<i>Epsps synthase</i>	抗草甘膦	<i>dsRED</i>	表达红色荧光蛋白
<i>nptII</i>	抗卡那霉素	<i>gusA</i>	编码 β -葡萄糖苷酸酶
<i>ALS</i>	抗磺酰脲	<i>LC</i>	花青素合成基因
<i>mdhfr</i>	抗甲氨蝶呤	<i>C1</i>	花青素合成基因
<i>cat</i>	抗氯霉素	<i>BI-Peru</i>	花青素合成基因
<i>pmi</i>	将甘露糖-6-磷酸转为果糖-6-磷酸	<i>ipt</i>	生不定芽, 丧失顶端优势

2 转基因技术在玉米中的应用

2.1 抗除草剂 将抗除草剂耐性引入玉米是增加对除草剂选择及安全性的一种新途径, 也是一种高效、低成本、无公害的控制杂草的手段。

1996年美国孟山都公司最先注册了抗草甘膦(农达)的玉米品种, 1997年美国孟山都公司已将EPSPS转基因玉米应用于大田试验。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杂草。在抗除草剂基因中以来源于吸水链霉菌的(*Streptomyces hygroscopicus*)*Bar*基因应用最广且最成功。

近年来, 研究人员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Poast玉米、抗草铵膦玉米、抗草丁膦玉米等。

2.2 抗虫 虫害是制约玉米生产的一大因素。传统的化学杀虫剂不仅杀死害虫, 还杀死了害虫的天敌, 造成生态平衡破坏和环境污染。转基因玉米是代替杀虫剂的更有效方法。

由于玉米螟泛滥, 从苏云金杆菌分离出的Bt毒蛋白基因就是针对这类鳞翅目昆虫的, Bt毒蛋白在昆虫幼虫的肠道

基金项目 河南省重大科技专项“超高产玉米新品种选育”(121100110300)。

作者简介 王良发(1982-), 男, 四川广安人, 实习研究员, 硕士, 从事玉米育种研究。*通讯作者, 研究员, 从事玉米新品种选育研究。

收稿日期 2014-09-30

内微碱性条件下,经蛋白酶水解,转变为毒性多肽分子,可与敏感昆虫肠道上表皮细胞表面特异受体相互作用,扰乱细胞的渗透平衡,引起细胞肿胀甚至裂解,从而导致幼虫停止进食最终死亡。随后,针对鞘翅目、双翅目的基因相继发现。目前市面上已有好几种 *Bt* 基因出售。

我国从 1989 年开始转基因抗虫育种。中国农业大学玉米抗虫转基因研究课题组将 *Bt* 毒蛋白基因转入玉米获得了有抗虫性的转化体,并在后代中分离出了正常遗传的家系^[5]。王国英等^[6]成功地利用基因枪法把 *Bt* 基因转移到玉米幼胚中,再生植株中 *CryIA* 基因得到表达。王景雪等^[7]用花粉管通道法分别将几丁质酶基因和 *Bt* 基因导入玉米。

由于长时间的单一种植,一些目标害虫对抗虫植株再次出现抗性,人们开始寻找新的抗性基因。近年来,研究人员在尝试克隆植物来源的抗虫转基因代替微生物来源基因,主要涉及的基因有:①蛋白酶抑制剂抗虫基因,如豇豆胰蛋白酶抑制剂基因(*SCK*)和豇豆胰蛋白酶抑制剂基因(*CpTI*)等。②植物外源凝集素(*Lectin*)基因,如雪花莲凝集素基因(*GNA*)和半夏凝集素基因(*pta*)^[8]。也有研究者建议转基因和非转基因植株混种,以延缓抗虫群体暴发的时间。

2.3 抗病 玉米生长期常受到病毒性病害(矮花叶病、玉米粗缩病等)、真菌性病害(玉米纹枯病)和细菌性病害等侵袭而使其品质及产量下降。

向玉米植株抗矮花叶病毒的能力转入能与矮花叶病毒外壳蛋白基因互补的 hpRNA 后,玉米植株抗矮花叶病毒的能力显著提高,研究还发现抗病能力与 hpRNA 发夹结构的长度相关^[9]。沉默胱抑素基因(*CC9*)能有效地增强玉米植株对黑粉病的抗性^[10]。向玉米中转入一种来自大肠杆菌的核糖核酸内切酶基因,玉米植株表现出对玉米粗缩病的抗性^[11]。将免疫防御素基因(*NP-1*)导入玉米可有效抗大斑病^[12]。

2.4 抗非生物胁迫 当农作物对除草剂、害虫等获得抗性成功后,研究者又把关注点移向非生物胁迫因子,如干旱、盐碱、缺氮、少磷的环境。第一个商业化抗旱转基因玉米品种是孟山都公司研发的 Droughtgard 玉米,该品种含有来源于枯草芽孢杆菌的 *ospB* 基因,冷休克蛋白 *ospB* 能与 DNA 或 RNA 结合,可以促进植物适应缺水环境。LU 等^[13]向玉米中转入钼辅因子硫化酶, WANG 等^[14]向玉米中转入编码磷脂酰肌醇磷脂酶 *ZmPLC1* 基因, AMARA 等^[15]在玉米中大量表达 LEA Rab28 蛋白,都增强了玉米对干旱的耐受性。

任小燕等^[16]采用超声波辅助花粉介导法将山菠菜胆碱单加氧酶(*AhCMO*)基因转入玉米自交系“郑 58”中,结果表明,*CMO* 的转化提高了玉米的耐盐性。付光明^[17]将玉米表达甜菜碱醛脱氢酶后发现重组玉米具有较强的耐盐性。

农作物生长发育需要各种营养元素,但我国部分土壤贫瘠,严重影响了粮食生产。针对缺氮、少磷的环境,大量的试验正在进行。转盐芥 H^+ 焦磷酸酶(*TsVP*)玉米在磷酸盐充足和缺乏的条件下都表现出比对照具有较强活力的根系,在磷酸盐缺乏条件下,转 *TsVP* 玉米生长、产量、繁殖能力都优

于对照^[18]。向玉米导入 *ZmPTF1* 基因,可溶性糖在叶片和根部的含量发生改变,对缺磷的耐受性显著增强^[19]。研究表明 miRNA 表达可以增强植株对 N 缺乏发生生理适应^[20]。

3 展望

今天,转基因产品已惠及大多数人,防治乙肝病毒的乙肝疫苗和治疗糖尿病的胰岛素目前都源自转基因。由于玉米产量大,比单细胞发酵成本低,比从动物中提取更安全,研究人员开始运用玉米作为生物反应器,生产人们急需的糖类、氨基酸、维生素、医用蛋白和生物燃料等。目前,我国正通过转基因新品种培育重大专项整合国内大部分科研院所的资源,来加快玉米转基因研究步伐,这对于解决我们面临的环境恶化、资源匮乏、粮食短缺等问题具有重要作用。

参考文献

- [1] JAMES C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops:2016[R]. ISAAA Brief 46, Ithaca, 2014.
- [2] ISHIDA Y, SAITO H, OHTA S, et al. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Nat Biotechnol, 1996, 14: 745 - 750.
- [3] 周光宇, 翁坚, 龚蓁蓁, 等. 农业分子育种. 授粉后外源 DNA 导入植物的技术[J]. 中国农业科学, 1988, 21(3): 1 - 6.
- [4] 白云凤. 利用不同策略获得抗 SCMV 转基因玉米的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2004.
- [5] 刘桂玲, 陈举林, 李平海. 转基因玉米的研究进展与展望[J]. 中国农学通报, 2004, 20(4): 36 - 38.
- [6] 王国英, 张宏, 谢友菊, 等. 玉米胚性愈伤组织转化及转 *Bt* 基因植株的抗性[J]. 农业生物技术学报, 1995(3): 50 - 53.
- [7] 王景雪, 孙毅, 崔贵梅, 等. 花粉介导法获得玉米转基因植株[J]. 植物学报, 2001, 43(3): 275 - 279.
- [8] 尹祥玲, 翁建峰, 谢传晓, 等. 玉米转基因技术研究及其应用[J]. 作物杂志, 2010(6): 1 - 9.
- [9] ZHANG Z Y, YANG L, ZHOU S F, et al. Improvement of resistance to maize dwarf mosaic virus mediated by transgenic RNA interference[J]. J Biotechnol, 2011, 153(3/4): 181 - 187.
- [10] VAN DER LINDE K, HEMETSBERGER C, KASTNER C, et al. A maize cystatin suppresses host immunity by inhibiting apoplastic cysteine proteases[J]. Plant Cell, 2012, 24(3): 1285 - 1300.
- [11] CAO X L, LU Y G, DI D P, et al. Enhanced Virus Resistance in Transgenic Maize Expressing a dsRNA-Specific Endoribonuclease Gene from *E. coli* [J]. Plos One, 2013, 8(4): 60829.
- [12] 张文河, 赵倩, 于静娟, 等. 转免疫防御素基因(NP-1)玉米植株的获得及其抗病性分析[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(4): 342 - 346.
- [13] LU Y, LI Y, ZHANG J C, et al. Overexpression of Arabidopsis Molybdenum Cofactor Sulfurase Gene Confers Drought Tolerance in Maize (*Zea mays* L.) [J]. Plos One, 2013, 8(1): 52126.
- [14] WANG C R, YANG A F, YUE G D, et al. Enhanced expression of phospholipase C 1 (*ZmPLC1*) improves drought tolerance in transgenic maize [J]. Planta, 2008, 227(5): 1127 - 1140.
- [15] AMARA I, CAPELLADES M, LUEVID M D, et al. Enhanced water stress tolerance of transgenic maize plants over-expressing LEA Rab28 gene [J]. J Plant Physiol, 2013, 170(9): 864 - 873.
- [16] 任小燕, 杜建中, 孙毅. 转 *AhCMO* 基因玉米后代的获得及耐盐性鉴定[J]. 分子植物育种, 2013, 11(3): 332 - 338.
- [17] 付光明. 转 *BADH* 基因玉米后代的分子检测及耐盐性分析[D]. 大连: 大连理工大学, 2006.
- [18] PEI L, WANG J M, LI K P, et al. Overexpression of *Thellungiella halophila* H-pyrophosphatase gene improves low phosphate tolerance in maize [J]. Plos One, 2012, 7(8): 43501.
- [19] LI Z, GAO Q, LIU Y, et al. Overexpression of transcription factor *ZmPTF1* improves low phosphate tolerance of maize by regulating carbon metabolism and root growth [J]. Planta, 2011, 233(6): 1129 - 1143.
- [20] ZHAO M, TAI H H, SUN S Z, et al. Cloning and Characterization of Maize miRNAs Involved in Responses to Nitrogen Deficiency [J]. Plos One, 2012, 7(1): 29669.