

文章编号: 1005-0906(2006)01-0055-04

一个新的玉米雄性不育材料的发现 及其初步遗传分析

徐小逊, 荣廷昭, 曹墨菊

(四川农业大学玉米研究所, 四川 雅安 625014)

摘要: 研究从农杆菌介导法所获得的转 Bt 基因再生植株后代中得到大量不育株。用受体自交系 18(红)授粉保种后, 获得稳定不育的株系。通过两年、两点的种植, 并结合与 18(红)的多代回交以及与多个自交系的测交鉴定, 对其遗传行为进行了初步研究。研究结果表明, 其不育性状表现稳定, 呈现出质核互作雄性不育的遗传特点。PCR 检测及田间鉴定表明, 外源基因是否整合到受体基因组内与不育性状的形成没有直接关系。雄性不育突变体的出现可能是组织培养过程所形成的体细胞克隆变异。

关键词: 玉米; 细胞质雄性不育; 遗传分析; 转基因

中图分类号: S513.035.1

文献标识码: A

Discovery and Genetic Study of New Male Sterile in Maize

XU Xiao-xun, RONG Ting-zhao, CAO Mo-ju

(Maize Research Institute, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: In this research, we obtained a great deal of sterile plants from the offspring of transgenic Bt maize by agrobacterium. Obtained stable male sterile inbreds when this materials were pollinated by acceptor inbred lines of "18 red". The sterile stability was observed in 2 locations, for 2 years and 3 generations. In order to analyse the kind of male sterile, many normal inbred lines were used to cross with this mutant. The main results are as the follow: the male sterile mutant is stable, inheritable in different years and different locations. It attributes to cytoplasmic male sterility. The appearance of male sterile mutant is the conclusion of somaclonal variation.

Key words: Maize; Cytoplasmic male sterile; Genetic study; Transgene

雄性不育是在高等植物中普遍存在的一种现象, 尽管雄性不育对于植物的生长发育是一种不正常的性状, 但是这种特性对于杂种优势的育种有十分重要的作用。利用雄性不育生产杂交种是实现玉米杂种优势的重要途径之一^[1]。

许多因素可以引起玉米的雄性不育, 例如辐射、化学药物处理、遗传突变等^[2]。在转基因技术应用于作物育种时, 由于多种不可控制或不可预测因素的影响, 如组织培养中使用的化学药剂、转基因插入位置不当等, 都可能使转基因再生植株出现额外的表型变异^[3]。转基因再生植株中出现不育变异的报道有很多。例如, 高水平表达雪花莲凝集素的转基因水稻植株, 呈现不育和发育受阻^[4], 抗病转基

因水稻植株与非转基因植株相比明显矮小, 开花迟, 部分不育^[5]。四川农业大学玉米研究所在转 Bt 基因玉米 T₂ 代再生植株中发现大量不育株, 现已从中获得新的细胞质雄性不育材料, 本文主要报道对该不育材料的鉴定及遗传分析结果。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以玉米自交系 18(红)作为受体材料, 利用农杆菌介导法将 Bt 基因导入其中, 并获得大量转基因再生植株。T₁ 代经 PCR 检测成阳性的植株自交后于 2003 年继续播种于四川省雅安, PCR 检测成阴性的植株自交后留种备用, 同时种植未经转化的自交系 18(红)作为对照观察。T₂ 代各株系编号为 1-1~1-3, 2-1~2-8, 3-1~3-4, 4-1~4-5, 分别来自于 T₀ 代的 4 个果穗, 株系内单株编号如下所示: 1-1T₂₋₁~T_{2-n}。授粉期间, 田间调查发现多个株系分离出不育株。

收稿日期: 2005-02-24; 修回日期: 2005-03-25

作者简介: 徐小逊(1979-), 男, 在读硕士, 主要从事玉米遗传育种研究。Tel: 0835-2889783 13882440412

E-mail: flying3386@126.com

1.2 试验方法

1.2.1 田间试验

所有材料均采用 4 行区,每行 7 穴,每穴定苗 2 株,宽窄行行距分别为 90 cm 和 70 cm,穴距 50 cm。播种前用地膜覆盖育苗,精细管理,不间苗,播种后采用常规大田管理。

1.2.2 不育性状的鉴定

育性鉴定采用室内花粉镜检与田间鉴定相结合。散粉前,每小区逐株取雄穗上、中、下 3 个部位的小穗,用卡诺氏液固定,剥取花粉,用 I-KI 染色,每小穗观察 3 个视野,分别计数可染、半可染和不染花粉粒数。散粉后,参照 Duvick 提出的 5 级育性鉴定标准,在田间逐株进行育性鉴定^[6]。

(1)不育性状与转基因关系。根据 Bt 基因序列设计与其互补的引物,提取阳性植株自交后代的总 DNA 进行 PCR 检测,通过检测探讨外源基因的插入与不育性状形成的关系。同时种植阴性植株的自交后代进行育性比较。

(2)不育性状的遗传分析。于不同年份、不同地点种植该不育材料各世代进行观察,鉴定不育性状的稳定性。同时将不育株系与其它自交系广泛测交,根据 F₁、F₂ 代的育性表现,研究不育性状的遗传。

(3)不育性状的初步分组。据郑用琰(1982)提出的分组方法,将待测的不育株系分别与测验系恢 313 和自凤 1 测交,鉴定 F₁ 的育性以及 F₂ 的育性分离比例,并初步区分败育时期^[7]。

待测不育系×恢 313

{

被恢复的品系

S 组

{

被保持的品系×自凤 1

{

被恢复的品系

C 组

{

被保持的品系

T 组

2 结果与分析

2.1 T₂ 代植株及对照两年育性观察

2003 年由于种植植株较少,不能真实反映出各株系的育性表现,有 6 个株系没有观察到不育株。2004 年每个株系成株都在 50 株以上,这样增大了样本容量,减小了试验误差,较准确地反映了各株系的育性分离情况。两年试验结果见表 1。

表 1 T₂代植株及对照连续两年种植育性表现

年 份	世代/名称	株系数 (个)	不育株的株系数 (个)	可育株 (株)	不育株 (株)	不育株率 (%)
2003	T ₂	20	14	50	35	41.18
2003	18(红)	3	0	42	0	0
2004	T ₂	20	20	816	327	28.61
2004	18(红)	10	0	140	0	0

表 1 结果表明,不育性状只出现在经过农杆菌转化所获得的转基因再生植株后代中,而未经转化的对照自交系没有不育株出现。因此初步推断该不育性状的产生不是由环境条件所致,而是与遗传物质的改变有关。

2.2 不育性状与转基因关系

于苗期提取植株总 DNA 进行 PCR 检测,试验结果表明,转基因成分在后代中继续分离,只有部分 T₂ 代植株经 PCR 扩增后得到与预期长度一样大小的片段(743 bp)。育性调查发现,PCR 检测成阳性的植株既有可育株也有不育株。同时,种植 T₁ 代 PCR 检测为阴性即转基因成分已丢失的植株的自交后代 552 株,共出现 187 株不育株,不育株率为 33.88%。

以上结果说明,外源基因在受体基因组内是否整合并不影响不育性状的产生,转基因的位置效应并不是导致不育性状产生的因素^[8]。由此推断,在外源基因导入受体基因组之前的组织培养过程可能是诱发不育性状产生的原因^[9]。

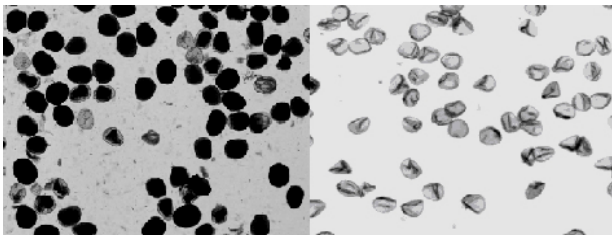
2.3 不育性状的遗传分析

对不育株采用同行可育株授粉(以下称为姊妹交)或用受体自交系 18(红)授粉保种,同年冬于云南省元江种植保种后代及授粉株自交后代进行观察,结果如下:

(1)大部分姊妹交的 F₁ 代出现育性分离,而其对应的授粉株自交后代也出现育性分离(表 2)。花粉镜检显示,可育株花粉粒正常染色,不育株内有许多如三角形或椭圆形的畸形花粉粒,且花粉粒不染色(图 1),说明花粉已经败育。

表 2 不育株与同行可育株姊妹交及授粉株自交后代育性表现

材 料	F ₁ 育性表现		自交后代育性表现	
	可育株	不育株	可育株	不育株
1-1T ₂₋₂ ×1-1T ₂₋₄	1	4		
1-1T ₂₋₄ ⊗			11	14
1-2T ₂₋₁ ×1-2T ₂₋₃	12	4		
1-2T ₂₋₃ ⊗			12	7
1-2T ₂₋₂ ×1-2T ₂₋₃	4	3		
1-2T ₂₋₃ ⊗			12	7
3-3T ₂₋₁ ×3-3T ₂₋₃	2	6		
3-3T ₂₋₃ ⊗			7	5
3-3T ₂₋₂ ×3-3T ₂₋₄	4	6		
3-3T ₂₋₄ ⊗			6	8



可育株正常花粉 不育株败育花粉

图1 花粉粒 I-KI 染色结果

试验结果表明,授粉株的细胞核中有恢复育性的显性基因,但大多数可育株中控制育性的核基因处于显性杂合状态,因此对不育株授粉,杂交当代会出现育性分离。可育株自交后代分离出不育株,说明这些可育株的细胞质基因也是不育的。这充分

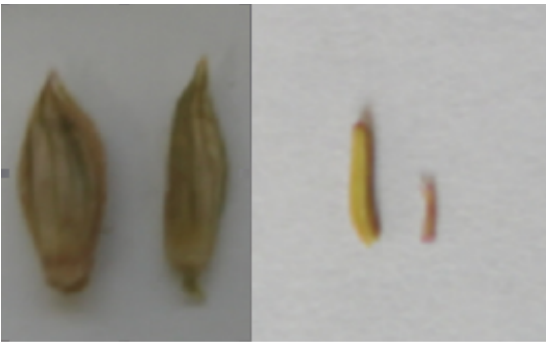
说明,该不育性状受细胞核不育基因与细胞质不育基因互作而共同控制。进一步肯定该变异不是由环境条件的改变所引起,也不是组织培养的后续效应(生理效应),而是组织培养过程中所形成的体细胞克隆变异^[9]。

(2)1-1T₂₋₁(A1)用 18(红)授粉保种,同年于元江播种 F₁ 代种子,得到 18 株完全不育株(下面用 A1 表示该不育株)。A1 用 18(红)回交 13 株,自交系 48-2 授粉 5 株。2004 年春将 A1 剩余种子及 A1×18(红)播种于多营,同年秋在元江种植 A1×18(红)及 A1×18(红)²,散粉后每 3 d 观察和记载 1 次育性表现,用卡方测验适合性,两年的试验结果如表 3。

表 3 A1 用 18(红)授粉、回交育性表现比较

材 料	年 份	地 点	观察株数 (株)	各级育性株数(株)					期望比例 不育:可育	适合性测定	
				I	II	III	IV	V		X ² C 值	P
A1	2003. 11	云南. 元江	18	12	6	0	0	0	1:0	0.010	1
A1	2004. 4	四川. 多营	54	14	30	10	0	0	1:0	1.670	0.10~0.25
A1×18(红)	2004. 4	四川. 多营	551	492	52	7	0	0	1:0	0.080	0.75~0.90
A1×18(红)	2004. 10	云南. 元江	196	196	0	0	0	0	1:0	0.001	1
A1×18(红) ²	2004. 10	云南. 元江	623	623	0	0	0	0	1:0	0.004	1

表 3 表明,A1 及 A1×18(红),A1×18(红)² 在元江育性表现非常稳定,均为完全不育株。与正常可育花药相比,不育株花药全部干瘪,不露出颖壳,大约只有正常花药的 1/2 大小(图 2)。花粉镜检表明,花药内几乎不含花粉粒,花粉败育彻底。四川种植观察时,在吐丝 1 周后,部分植株出现育性的恢复。卡方测验结果,P>0.1,不育株与可育株分离比例为 1:0,即育性不发生分离。以上结果表明,不育性状表现基本稳定,但两地气候条件上的差异,可能对育性造成一定的影响。



可育 不育 可育 不育

图 2 可育株与不育株的小穗(左)及花药(右)

(3)A1 与 48-2 杂交后,F₁ 代 266 株植株育性全部恢复,F₂ 代可育株为 74 株,不育株为 67 株,可育株与不育株分离比例为 9:7。另外从 A1×18(红)中选株与四川农业大学玉米研究所常年使用的 9 个自交

系测交,其中 20FS207、丹 598、自凤 1 这 3 个自交系对不育性有恢复作用;恢 313、18 白、5003、975-12、齐 205、黄 C 这 6 个自交系对不育性有保持作用(表 4)。由于找到了多个保持系和恢复系,进一步验证了该不育材料属于细胞质核互作雄性不育。

表 4 不育株与 10 个自交系测交 F₁ 及 F₂ 代育性表现 株

组 合	F ₁		F ₂	
	可育株	不育株	可育株	不育株
A1×48-2	266	0	74	67
[A1×18(红)]×20FS207	102	0	待测	待测
[A1×18(红)]×丹 598	70	0	待测	待测
[A1×18(红)]×自凤 1	149	0	待测	待测
[A1×18(红)]×恢 313	0	88		
[A1×18(红)]×18 白	0	77		
[A1×18(红)]×齐 205	0	32		
[A1×18(红)]×黄 C	0	92		
[A1×18(红)]×5003	0	79		
[A1×18(红)]×975-12	0	12		

注:因为生长季节关系,3 个恢复型组合{[A1×18(红)]×20FS207/丹 598/自凤 1}的 F₂ 代育性调查要 2005 年夏才能完成。

2.4 不育性状的初步分组

据郑用璣提出的不育胞质分组方法,用胞质分类测验系恢 313 和自凤 1 与 A1×18(红)测交,测交结果(表 4)表明,恢 313 能保持其不育性,自凤 1 则能恢复其育性,这与 C 组测验结果相同,可初步将该不育材料划入 C 组细胞质雄性不育。

3 讨 论

(1)本研究发现转 Bt 基因再生植株后代中出现的不育性状可能是组织培养过程中所产生的体细胞克隆变异。一些研究者认为体细胞克隆变异的产生可能与细胞培养周期的脱分化有关^[9],细胞培养中使用的激素如生长素、细胞分裂素等物质由于剂量、选用种类以及培养方法的不同,可能使雄蕊和花粉发育过程中植物内源激素平衡发生改变,从而导致雄性不育产生^[10]。

(2)不育系 A1 及其与 18(红)的回交后代在四川省的两年种植中均出现了育性部分恢复,而在云南省的两年种植中不育性状表现很稳定。我们认为育性部分恢复的原因可能与两地气候条件的差异有关。四川省雅安地处北纬 30°14',属亚热带季风性湿润气候,春季播种,随着植株的生长气温逐渐升高,日照增长。而云南省元江地处北纬 23°19',属亚热带边缘气候,分别于 10 月和 11 月播种,随着植株的生长气温逐渐下降,日照变短。这种气候上的差异可能使某些控制育性的微效基因对开花散粉的某些性状发生修饰和干预,致使小孢子败育时间一定程度的延迟,不育性状受到一定影响。

(3)本研究采用的育性恢复专效性鉴定法是根据育性恢复专效性原理对不育胞质进行分类的,其最大优点是可测用结合,但周期长、用工量大,而且育性表现易受环境影响^[11]。本试验供试不育材料被恢 313 保持,被自凤 1 恢复,与 C 组测验结果一致。然而恢复型组合 A1 × 48-2 的 F₂ 代育性呈 9:7 分离,这与 C 组细胞质雄性不育的两对恢复基因作用有重叠效应,F₂ 代呈 15:1 或 3:1 的育性分离比例不相符合。恰恰与 T 组细胞质雄性不育的两对恢复基因有互补作用,F₂ 代呈 9:7 的育性分离比例一致。荣廷昭等曾报道自凤 1 对 Mo17、黄早四、1792、292 和玉 30 转育的 T 组同质异核不育系也可完全恢复^[12]。由此看来,把自凤 1 用作区分 C 组与 T 组不育胞质

的测验种,在有些情况下可能会受核背景条件影响。因此,不能简单将该不育材料划入 C 组不育系,还需要结合其他恢复型组合 F₂ 代育性分离情况做进一步验证。另外,下一步的研究工作应该结合小斑病 T 小种接种^[13],mtDNA RFLP 分析等胞质分类方法^[14],这样才能对该不育材料做出较准确的不育胞质分类,为今后在生产上的应用打下基础。

参考文献:

- [1] 刘纪麟. 玉米育种学(第二版). 中国农业出版社, 2004. 257-270.
- [2] 李竞雄,周洪生. 玉米雄性不育生物学. 北京:中国农业出版社, 1998. 3-5.
- [3] 杜春芳,李润植. 转基因植物的表型变异、分子检测与遗传分析[J]. 生物技术通讯, 2003, 14(5): 422-427.
- [4] Maqbool S B, Christon P. Multiple traits of agronomic importance in transgenic indica rice plants: analysis of transgene integration patterns, expression levers and stability[J]. Mol Breed, 1999, 5: 471.
- [5] Lynch P T, James J, Blackhall N W, et al. The phenotypic characterization of R2 generation transgenic rice plants under field and glasshouse condition[J]. Euphytica, 1995, 85: 395.
- [6] Duvick Dn. Cytoplasmic pollen sterility in corn. Adv. Genet, 1965, 13 (1): 1-56.
- [7] 郑用琰. 若干玉米细胞质雄性不育类型(CMS)育性机理的研究[J]. 华中农学院学报, 1982, 15: 44-68.
- [8] 王关林,方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京:科学出版社, 2002. 638-649.
- [9] 郑易之. 几种转基因植物体细胞克隆变异的多样性研究[J]. 植物研究, 2001, 21(2): 266-271.
- [10] 何长征,萧浪涛. 植物激素与雄性不育关系的研究进展[J]. 中国农学通报, 2002, 18(3): 65-69.
- [11] 李小琴, 万邦惠. 玉米细胞质雄性不育材料 WBM_s 的胞质分类研究[J]. 作物学报, 2004, 30(4): 304-307.
- [12] 荣廷昭,李晚忱. 玉米细胞质雄性不育分组鉴定研究[J]. 中国农业科学, 2002, 35(9): 1055-1059.
- [13] 温振民. 玉米雄性不育胞质鉴定与分类问题的探讨[J]. 遗传学报, 1983, 10(4): 477-482.
- [14] 韦桂旺,郑用琰. 玉米 CMS 材料线粒体 DNA 遗传多样性的研究[J]. 遗传学报, 1997, 24(1): 66-77.