

文章编号 :1003- 8701(2012)06- 0021- 04

EMS 诱变技术在我国玉米育种中的 研究与应用(综述)

姜 昱 ,李毅丹 ,刘相国 ,郝文媛 ,
王 浩 ,金峰学 ,林秀锋

(吉林省农业科学院农业生物技术研究所 ,长春 130033)

摘 要 :甲基磺酸乙酯(EMS)作为化学诱变剂,由于具有诱变率高的特点,已被广泛应用于玉米诱变育种,成为玉米种质创新和自交系改良的有效工具之一。本文对 EMS 诱变玉米花粉的作用机理、诱变处理技术、诱变后代所产生的突变性状及 EMS 诱变在玉米育种中的应用进行了概述。

关键词 :EMS ;诱变技术 ;玉米 ;突变体

中图分类号 :S513.035.2

文献标识码 :A

Researches and Application of EMS Mutagenesis in Maize Breeding in China

JIANG Yu, LI Yi-dan, LIU Xiang-guo, HAO Wen-yuan, WANG Hao, JIN Feng-xue, LIN Xiu Feng
(*Agricultural Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun*
130033, China)

Abstract: Ethylmethane sulphonate (EMS), an effective chemical mutagen, has widely been used in mutation breeding of maize. EMS mutation method, has character of high mutation rate, has been an effective tool in maize germplasm creation and improvement. The mechanism of EMS mutagenesis maize pollen, mutation processing technology, characteristics of mutagenic offspring and its application in maize breeding were briefly introduced in the paper.

Keywords: Ethylmethane sulphonate (EMS); Mutation Technique; Maize; Mutation

作物化学诱变育种是利用化学诱变剂诱发作物发生突变,再通过多世代选择和鉴定,直接或间接地培育成生产上能利用的农作物新品种^[1]。随着生产水平提高和新品种推广,作物育种所利用的优异遗传资源集中到少数种质上,由此导致作物育种遗传基础狭窄,以至于近十几年来作物育种始终处于“徘徊”和“艰难爬坡”状态,一直未有突破性的品种问世^[2]。所以进行种质创新是我国育种事业走过“爬坡”阶段的关键所在^[3]。

EMS(甲基磺酸乙酯)作为一种有效的化学诱变剂已被广泛应用在玉米、水稻、大豆、高粱、小麦等

农作物的相关遗传研究^[4-8]和诱变育种工作中^[9]。EMS 直接作用于 DNA 鸟嘌呤部分引起点突变及染色体损伤,具有诱变率高,诱变范围广等特点,自 1978 年 Neuffer 将 EMS 悬浮于石蜡油中,与玉米花粉混合进行诱变获得成功^[10],经过以后不断改进和完善,现在这项技术已经成为国内外玉米诱变育种的主要手段^[11],是目前在玉米上应用最成功的诱变方法,也是玉米种质创新和自交系改良的有效工具^[12-13],在玉米诱变育种上取得了显著成绩。

1 EMS 作用机制

EMS 作为一种烷化剂,自 1953 年被首次报道可有效诱导突变以来,已被广泛应用在作物诱

收稿日期 2012- 03- 31

作者简介:姜 昱(1961-),女,研究员,主要从事转基因玉米育种工作。

变育种中,并且得到很好的应用效果^[14]。EMS 所诱发的突变主要诱导 G(鸟嘌呤)的 N7 位置上被烷基化,使之成为带一个正电荷的季铵基团。这个季铵基团产生两个效应:一是促进第一位氨基上氢解离,使 G 不再与 C 配对而与 T 配对,从而造成 G:C-A:T 转换;二是 N7 成为季铵基团后,减弱了 N9 位上的 N-糖苷键,而产生了去嘌呤作用。大部分的无嘌呤位点都可以被无嘌呤内切酶系统所修复,但是有时复制在修复之前进行,则在无碱基位置上可以通过插入任何一个碱基,在第二轮复制以后,则原来的 G:C 对可以变为任何碱基对 G:C、C:G、A:T、T:A,既有转换,又有颠换。此外,它也可与核苷结构的磷酸反应,形成酯类而将核苷酸从磷酸与糖分子之间切断,产生染色体的缺失^[15]。

2 EMS 诱变处理技术

用化学诱变剂处理作物不同器官有不同的诱变效果。在化学诱变育种中常用种子作处理对象,因为处理种子比较简便。但种子是多细胞组织,在突变发生过程中容易产生细胞间的竞争,使突变细胞受到抑制或消亡,并且产生的突变性状以嵌合体的形式出现,很难获得稳定的突变个体。诱变剂直接作用于配子,不仅能排除突变细胞被淘汰的可能性,而且配子对化学诱变剂较敏感,诱变率高,诱变范围广,且产生的突变体多为点突变。研究发现,用石蜡油处理成熟玉米花粉,花粉可在几小时内保持活力。在此基础上 Neuffer 和 Coe 以石蜡油作为化学诱变剂的载体处理玉米花粉而获得成功^[10,16],目前以 EMS-石蜡油处理玉米花粉已成为最成功的玉米化学诱变技术得到广泛的应用^[4,17]。其具体方法为:在雌穗花丝尚未抽出时套袋隔离,EMS 与石蜡油混合制备成适宜浓度,诱变前一天套雄穗,如果雌穗花丝过长,剪至 2 cm 左右,诱变当天上午 9~10 时收集新鲜花粉,除掉花药,与处理液充分混合搅拌 45 min 后,用毛笔涂在相应的花丝上,套袋标记^[18]。

在诱变处理中,诱变剂浓度直接影响诱变效果。通常采用花粉的半致死剂量作为大田处理浓度。但由于不同的材料对化学诱变剂的敏感性不同,其半致死剂量也存在显著差异。因此,针对不同的材料确定其适宜的处理浓度是花粉化学诱变工作中关键的一步。如果对敏感性不同的材料采用同一处理浓度进行处理,对于敏感性强的材料,会造成结实率过低,使 M₁ 群体太小,不利于对诱变后代的选择;而对敏感性弱的材料,虽然结实率

高,但诱变后代的突变率低,诱变效果不理想^[11]。刘晓丽等的研究结果表明:经 EMS 处理的花粉离体培养后萌发率随 EMS 浓度的增加而降低,离体培养处理花粉的萌发率与处理当代的结实率呈正相关,相关系数达 0.985 1 以上,因此,可根据观察离体花粉萌发率的结果来确定田间的处理浓度^[19]。

3 EMS 诱变育种的研究与应用

3.1 M₁ 代、M₂ 代变异类型的种类及其变异率

利用 EMS 处理玉米自交系花粉或种子,在 M₁ 代、M₂ 代引起了不同程度的生理损伤和生物学效应。主要表现为 M₁ 种子的生命力下降,发芽势严重下降,发芽率、出苗率、成株率、结实率均降低,出苗迟缓且持续时间长,幼苗发育不良^[19]。苗高、根长、根数较对照明显降低,果穗变短、粒重减轻,并致使雄花不育、雄花两性、叶片皱缩变厚、叶片上有黄色、白色条纹或黄色斑块等植株性状发生畸变^[9]。EMS 诱变对于种子活力的影响延续到了 M₂ 代,M₂ 代的出苗率和成株率虽然较 M₁ 代的普遍提高,但是仍明显低于未处理材料^[18]。这与 M₁ 代植株雌穗瘦小、子粒发育不良、粒重低有关^[9]。

在苗期,M₁ 代主要表现为叶色变异^[18-20]、叶型变异等^[20]。叶色变异以条纹叶变异为主^[18-19],个别品种出现黄化苗和白化苗变异^[18];叶型变异较少发生^[19]。M₂ 代主要以叶色变异为主,如白化苗、黄化苗、条纹叶等^[13,20],其中黄化苗所占比例最大,占叶色变异的 41.7%^[13];叶型变异多为叶片皱缩不能伸展^[9]等。

M₂ 代在成株期为形态变化高峰期,主要有雄穗变异、生育期和植株性状 3 种变异类型^[13,19-20]。在雄穗变异中,M₁、M₂ 代均以雄性不育株居多。M₁ 代雄穗的花粉量少,散粉慢,持续时间长,少部分分枝出现小花败育现象;也有少部分植株雌雄不调,不能结实^[19]。M₂ 代田间出现了雄花结实、无雄穗、雌穗着生于顶部及雄穗无分枝等变异^[9]。在生育期变异中,M₁ 代晚熟突变率较高,占总变异率的 28.4%,早熟变异占总变异率的 4.6%,说明 M₁ 群体中易出现晚熟类型的变异^[19-20]。M₂ 代同一材料内的熟期差异变化不如 M₁ 代明显,而且早熟所占比率多于晚熟。因此可推断从 M₁ 代到 M₂ 代中,大部分晚熟变异并没有真实遗传。这可能是由于 EMS 诱变处理造成了 M₁ 代子粒和植株代谢失常所致^[20]。在植株性状变异方面,M₁ 代、M₂ 代均会出现矮化变异。M₂ 代株高、穗位高、茎周长和穗上叶片长等数量性状出现了较高的突变频率,而叶鞘

色、花丝色、穗轴色和粒色等质量性状未发生明显变异。因此,在选育矮秆品种^[9]、早熟品种和进行株型改造方面,通过 EMS 花粉诱变将能提供大量有益的备选材料^[13]。在子粒性状变异方面,有报道 M₁ 代果穗出现了黄粒和浅黄粒分离^[19],M₂ 代子粒出现了皱缩、无胚、种皮颜色、百粒重降低等变异^[18]。M₂ 代果穗各性状的变异系数与其对照的变异系数都有一定差异,表现为:百粒重 > 穗长 > 行粒数 > 穗行数 > 穗粗,但苗期和成株期及果穗变异率大小之间并无对应的关系^[13]。

3.2 M₃ 代的变异

经 EMS 诱变,玉米 M₁ 和 M₂ 代都有不同程度的生理损伤和生物学效应,M₂ 代比 M₁ 代的损伤程度轻一些,至 M₃ 代玉米生理上的损伤已基本恢复,部分变异性状也基本稳定^[18]。

在 M₃ 代,每个突变果穗上突变子粒与正常子粒的分离均符合 3:1 的分离比例。白胚乳、浅黄胚乳、凹陷胚乳和缺损粒是 M₃ 代子粒突变的主要类型。M₃ 代种子也出现了皱缩、无胚、种皮颜色等方面变异^[21]。

焦杨等^[18]对 M₃ 代种子进行营养含量测定,发现 EMS 非定向的影响营养物质含量,对各个品种的影响也不尽相同,如 K12 的蛋白质含量明显提高,而 136 明显提高的则是淀粉含量。张景萍等^[22]以 EMS- 石蜡油诱变西农单交 2 号获得的 4 种稳定的 M₃ 代白色子粒突变玉米为材料,比较其壮苗期代谢特性及抗性,发现突变体的代谢及抗性均弱于非突变体材料。但也发现在四种白色突变体中,白 2 幼苗根系活力、叶绿素含量、POD 活性、SOD 活性、脯氨酸含量均有提高。说明在四种突变体玉米中白 2 表现出苗期生活力增强,生长势好,对环境的适应能力提高,且抗逆性增强等生物学特征,可作为进一步获得优质玉米材料的初选依据。

4 EMS 诱变在玉米育种中的应用

2001 年,陈绍江、宋同明利用 EMS- 石蜡油悬浮法处理农大 108 杂交种花粉,获得了高油突变体^[23]。1998 年,薛守旺等利用 EMS- 石蜡油诱变 6 个稳定自交系的成熟花粉,结果得到浅黄粒突变体、母株发芽突变体、粒顶凹陷突变体、粉质高赖氨酸突变体、显性核不育突变体和近等基因系 su1 su1 型甜玉米^[1]。1992 年,刘治先等用 EMS 处理 B73 自交系花粉,筛选出 2 类高油酸突变体、10 个高赖氨酸突变体、8 个高蛋白突变体、7

个高油突变体、4 个高亚油酸突变体和 9 个低棕榈酸突变体等。这些突变体为特用玉米育种和遗传研究提供了可贵的材料^[24]。

2000 年,TILLING 技术的发明^[25-26],为 EMS 诱变在玉米中的应用提供了新的思路。在此基础上,一系列的 EMS 诱发点突变的检测方法相继发明,如依靠 Licor 系统的电泳检测方法^[4]、依靠 Lightscanner 系统的高通量溶解曲线检测方法^[27],都相继在玉米 EMS 诱变群体突变体检测过程中得以应用。这些方法的发明,解决了表型筛选无法精细检出所有点突变位点的技术困难,促进了 EMS 诱变在玉米诱变育种中的应用。

综上所述,EMS- 石蜡油处理玉米花粉,由于玉米花粉量大,操作方法简便易行,已被广泛使用。但也存在着诸多问题:相关理论研究欠缺,点突变检出困难,对诱变效应的研究多侧重于直观描述,突变体的筛选还停留在大田的直接选择上,单纯依靠传统的表型筛选检出效率低^[28];EMS 诱变的变异是随机发生的,其诱发产生有益突变的频率不够高,目前尚难以控制变异的方向和性质,一般需要比杂交育种更大的选择群体^[29],筛选和鉴定工作量很大,且实际操作中又非常容易混杂等不足。

随着分子生物学技术的不断发展,EMS 化学诱变技术研究的逐步深入,相关分子检测手段的发明,不仅可以直接利用 EMS 化学诱变技术创造出玉米特异新种质和育种新材料,而且还可以与常规育种、分子标记辅助育种等生物技术相结合,从而提高诱变育种效率、选择的准确性和突变体的利用率。

参考文献:

- [1] 薛守旺,周洪生.利用花粉化学诱变创造玉米自交系的研究[J].作物杂志,1998(6):6-8.
- [2] 刘旭.种质创新的由来与发展[J].作物品种资源,1999(2):1-4.
- [3] 李海军,张丽华,祝丽英,等.利用花粉诱变技术改造热带玉米种质的研究[J].玉米科学,2005,13(1):22-24.
- [4] Till BJ, Reynolds SH, Weil C, et al. Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING [J]. BMC Plant Biol, 2004(4): 12.
- [5] Till BJ, Cooper J, Tai TH, et al. Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING [J]. BMC Plant Biol, 2007(7): 19.
- [6] Cooper JL, Till BJ, Laport RG, et al. TILLING to detect induced mutations in soybean[J]. BMC Plant Biol, 2008(8): 9.
- [7] Xin Z, Wang ML, Barkley NA, et al. Applying genotyping (TILLING) and phenotyping analyses to elucidate gene function in a chemically induced sorghum mutant population [J].

- BMC Plant Biol, 2008(8): 103 .
- [8] Uauy C, Paraiso F, Colasuonno P, et al. A modified TILLING approach to detect induced mutations in tetraploid and hexaploid wheat[J]. BMC Plant Biol, 2009(9): 115 .
- [9] 安学丽, 蔡一林, 王久光, 等. 甲基磺酸乙酯(EMS)对玉米自交系诱变效应的研究[J]. 玉米科学, 2003, 11(3): 74-75, 84 .
- [10] Neuffer MG, Ficsor G. Mutagenic Action of Ethyl Methanesulfonate in Maize[J]. Science, 1963, 139(3561):1296-1297 .
- [11] 祝丽英, 池书敏, 刘志增, 等. EMS 对玉米花粉诱变效应的研究[J]. 河北农业大学学报, 2002, 25(1): 17-20, 28 .
- [12] 赵亮亮, 宋同明. 玉米化学诱变研究进展[J]. 华北农学报, 1996, 11(4): 26-30 .
- [13] 刁钰婵, 陈志斌, 焦 杨, 等. EMS 诱变玉米花粉 M₂ 代生物学效应研究[J]. 河南农业科学, 2008(3): 33-35, 68 .
- [14] 宋 炜, 刘志增, 陈景堂, 等. 诱变技术在植物育种中的应用[J]. 河北农业大学学报, 2003, 26(增刊): 116-119 .
- [15] 张铭堂. 诱变[J]. 科学农业, 1996, 44(2): 37-52 .
- [16] Neuffer MG, Coe EH. Paraffin oil technique for treating corn pollen with chemical mutagens[J]. Maydica, 1978(22): 21-28 .
- [17] Okagaki RJ, Neuffer MG, Wessler SR. A deletion common to two independently derived waxy mutations of maize [J]. Genetics, 1991, 128(2):425-431 .
- [18] 焦 杨, 陈志斌, 刁钰婵, 等. 玉米 EMS 诱变后代变化趋势的研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(26): 8143-8144 .
- [19] 刘晓丽, 杨 镇, 李 刚. EMS 诱变玉米花粉 M₁ 代生物学效应研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2006, 37(6): 806-810 .
- [20] 杨 镇, 刘晓丽, 李 刚. EMS 诱变剂对玉米自交系改造效果的研究[J]. 辽宁农业科学, 2006(5): 7-10 .
- [21] 柴 欣. 玉米 TILLING 突变库的构建及高直链淀粉基因 ac 的筛选[D]. 吉林大学硕士学位论文, 2009 .
- [22] 张景萍, 吴珍岭. EMS 诱变玉米突变体苗期生理生化特性研究[J]. 激光生物学报, 2004, 13(1): 41-43 .
- [23] 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 .
- [24] 刘治先. 高油酸玉米突变体的诱导和遗传分析 [J]. 作物学报, 1998, 24(4): 447-451 .
- [25] McCallum CM, Comai L, Greene EA, et al. Targeted screening for induced mutations[J]. Nat Biotechnol, 2000, 18(4): 455-457 .
- [26] McCallum CM, Comai L, Greene EA, et al. Targeting induced local lesions IN genomes (TILLING) for plant functional genomics[J]. Plant Physiol, 2000, 123(2): 439-442 .
- [27] Li YD, Chu ZZ, Liu XG, et al. A cost-effective high-resolution melting approach using the EvaGreen dye for DNA polymorphism detection and genotyping in plants [J]. J Integr Plant Biol, 2010, 52(12): 1036-1042 .
- [28] 韩微波, 刘录祥, 郭会君, 等. 小麦诱变育种新技术研究进展[J]. 麦类作物学报, 2005, 25(6): 125-129 .
- [29] 梁任繁, 何龙飞. EMS 在作物育种应用中的研究进展[J]. 种子, 2008, 27(2): 47-49 .

(上接第 11 页)栽培技术、耕作技术)落后, 倒伏和早衰等现象严重。对吉林省玉米高产的限制程度分别为 19.0%(13.4%、5.6%), 16.3%(9.9%、6.4%), 23.2%(8.9%、8.5%、5.7%), 5.5%, 4.6%。针对以上主要限制因子, 通过改进耕作栽培措施(夏季深松蓄水、秋季整地保墒、增施有机物料等)、高产土壤定向培肥及农艺措施(选择适宜品种、提高播种密度与质量)、优化现有技术组合, 可望实现吉林省春玉米的大面积高产。

同时, 从大面积增产和资源增效的长期可持续性出发, 土壤质量更是在整个吉林省普遍存在的问题。大量试验结果及文献资料总结表明, 造成玉米倒伏早衰的因素(旱害、涝害、病害、土壤腐生微生物)均与土壤的不良环境有关^[2]; 季节性干旱的解决也有待于土壤质量(蓄水保水能力)的进一步提高。这均需要通过长期有效的高产土壤培肥技术来实现^[5]。如玉米秸秆有效还田、增加土壤碳储量等; 未来需要在土壤耕层下层实施培育技术^[8], 提升耕地质量^[9]; 平衡施肥^[10]等方向开展持续深入的

研究。

参考文献:

- [1] 王立春, 边少锋, 任 军, 等. 提高春玉米主产区玉米单产的技术途径[J]. 玉米科学, 2007, 15(6): 133-134 .
- [2] 岳德荣. 胡吉成文集[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 2006 .
- [3] 王立春, 边少锋, 任 军, 等. 吉林省玉米超高产研究进展与产量潜力分析[J]. 中国农业科技导报, 2004, 6(4): 33-36 .
- [4] 陈国平, 高聚林, 赵 明, 等. 近年我国玉米超高产田的分布、产量构成及关键技术[J]. 作物学报, 2012, 38(1): 80-85 .
- [5] 任 军, 边秀芝, 郭金瑞, 等. 黑土区高产土壤培肥与玉米高产田建设研究[J]. 玉米科学, 2008, 16(4): 147-151 .
- [6] 任 军, 边秀芝, 刘慧涛, 等. 吉林省不同生态区玉米高产田适宜施肥量初探[J]. 玉米科学, 2004, 12(3): 103-105 .
- [7] 吉林省统计局. 吉林统计年鉴[K]. 北京: 中国统计出版社, 2012 .
- [8] 任 军, 边秀芝, 刘慧涛, 等. 吉林省玉米高产土壤与一般土壤肥力差异[J]. 吉林农业科学, 2006, 31(3): 41-43 .
- [9] 刘武仁, 郑金玉, 罗 洋, 等. 东北黑土区玉米保护性耕作技术模式研究[J]. 玉米科学, 2007, 15(6): 86-88 .
- [10] 谢佳贵, 王立春, 尹彩侠, 等. 吉林省不同类型土壤玉米施肥效应研究[J]. 玉米科学, 2008, 16(4): 167-171 .