

玉米诱发突变技术育种研究综述

刘忠祥

(甘肃省农业科学院作物研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 综述了诱发玉米突变的物理、化学、空间诱变等手段, 介绍了上述诱变手段的诱变机理、生物学效应、常用的诱变方式及其应用的研究现状。分析了现行各种诱变技术的不足, 提出了今后的研究方向。

关键词: 物理诱变; 化学诱变; 空间诱变; 研究进展

中图分类号: S513 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2014)01-0039-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2014.01.018

Research Summary on Breeding of Induced Mutations Technical of Corn

LIU Zhong-xiang

(Institute of Crop, Gansu Academy of Agricultural Science, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: This paper mainly introduces the mutational mechanism and biological effects of chemical, physics, space mutagenesis, and their research progress of applications in plant in detail. Also some disadvantages of these technologies are mentioned and good suggestions for future development are proposed.

Key words: Physics mutagenesis; Chemical mutagenesis; Space mutagenesis; Research progress

诱变育种是人为地利用各种物理、化学和生物等因素诱导植物遗传性状发生变异, 并根据育种目标从变异后代中选育新品种, 或获得有利用价值的种质资源的一项现代育种技术。诱变育种既能诱发基因突变, 又能促进遗传基因重新组合, 提高重组率, 在短时间内获得优良突变体以育成新品种直接利用或作为种质资源间接利用, 具有杂交育种难以替代的特点。自1928年以来, 诱发突变技术应用于农作物新材料创制和优良新品种培育, 在解决世界粮食安全与营养供给中发挥了显著作用。据不完全统计, 截至2009年9月, 世界上60多个国家在170多种植物上利用诱发突变技术育成和推广了3 088个突变品种, 其中中国在45种植物上育成了802个突变品种, 超过目前国际诱变育成品种数据库中总数的1/4而位居世界第一。中国育成的突变品种年最大种植面积900万hm², 每年为国家增产粮、棉、油10~15亿kg, 社会效益超过20亿元^[1]。

自20世纪70年代以来, 我国玉米诱变育种在品种改良和选育突变品种方面也取得了显著成效,

利用 γ 射线等诱变技术育成了自交系原武02、原辐17、鲁原133、华风100、丹340(360)、鲁原92等, 组配了杂交种鲁原单4号、鲁玉5号、掖单13、鲁单50、中原单32号等, 对玉米生产的发展起了较大作用^[2]。近10 a来, 随着现代科学技术的迅速发展和学科间的交叉渗透, 人们不断改进诱变方法, 探索新的诱变源, 其中以石蜡油EMS花粉诱变、离子注入、空间诱变等新技术, 广泛应用于玉米品种改良, 并显示出良好的发展前景。

1 物理诱变育种

物理诱变应用的射线主要有 γ 射线、 β 射线、X射线、中子、紫外线和激光等。周柱华用剂量100 Gy和50 Gy的⁶⁰Co- γ 射线照射玉米花粉后, 发现M₃代的一些性状有所改变, 如株高和穗位高降低、果穗变小或粒数减少等, 且变异幅度较大, 从而扩大了育种选择的机会^[3-4]。辐射玉米自交系, 剂量以130~210 Gy为宜, 杂交种的辐射剂量则以250~350 Gy较合适。辐照剂量率为135 Gy/Min。王兵伟等以3个微胚乳超高油玉米自交系干种子为材料, 用不同剂量的 γ -射线进行辐射的研究表

收稿日期: 2013-08-02

基金项目: 甘肃省农业科学院农业科技创新专项“优良玉米育种材料创新利用及抗逆高产优质杂交种选育”(2010GAAS07)

作者简介: 刘忠祥(1964—), 男, 甘肃清水人, 副研究员, 研究方向为玉米遗传育种。联系电话:(0)13919451665。E-mail:

lzxiang@sina.com

明, 在所使用的剂量范围内, 辐射当代苗高降低, 随着辐射剂量的增加降低越明显。根据苗高降低的程度确定该类型玉米自交系干种子的适宜辐射剂量为120~180 Gy^[5]。

低能重离子是指能量为104~105 eV、原子序数大于He、壳层电子被部分或全部剥离的原子。利用低能重离子轻损伤、高突变率、突变谱广和安全等特点可进行生物诱变育种, 创造新种质资源。郭陈会以郑单958、郑58和昌7-2为材料, 种子经N⁺离子束注入处理, 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术, 研究了离子束注入对玉米POD和SOD同工酶的影响, 发现处理过的玉米同工酶酶谱发生了改变, 而且同一时期不同器官和不同时期同一器官同工酶的变化是不同的; 不同剂量间玉米同工酶的变化也不相同, 主要表现在同工酶的活性和酶带数目变化上, 既有同工酶活性的增强, 又有同工酶活性减弱, 也有酶带数目的增减^[6]。常胜合等以豫玉32和豫玉33干种子为原始材料, 用低能N⁺离子注入, 观察并记载低能N⁺离子注入玉米干种子后对当代玉米幼苗期几个性状的影响, 发现不同品种的玉米种子对相同剂量的N⁺离子注入的敏感程度不同; 低能N⁺离子对种子的发芽率、幼苗的根长、株高都有很大的影响; 从玉米防倒伏的角度考虑, 1.0×10^{17} ion/cm²可能是对豫玉33和豫玉32进行诱变的最佳剂量^[7], 为下一步大规模地开展玉米低能N⁺离子诱变打下了基础。唐掌雄采用5个能量的¹²C, 即4、8、12、16和45 MeV/u和4个注量, 即 5×10^7 、 10×10^7 、 12×10^7 和 40×10^7 粒子/cm²进行辐照玉米试验, 观察当代幼苗生长状况。发现当¹²C能量为4~16 MeV/u时其辐射损伤随能量的增加而加大, 呈现为注入式能量, 其中16 MeV/u的辐射损伤最大。而当能量为45 MeV/u时辐射损伤反而减小, 表现为贯穿能量, 在M₂代出现早熟、矮秆和多穗等有益变异, 雄花和雌穗的也有明显变化。初步观察认为高能¹²C离子辐照玉米引起的变异率远高于 γ 辐射^[8]。罗红兵等用重离子⁷Li和¹²C分别辐照玉米品种农大108种子胚的结果表明, 所用能量和剂量的重离子⁷Li和¹²C对M₁出苗率影响不明显; 重离子辐照后, M₁代产生了5株黄化苗、6株雄性不育、2株无雄穗和1株抽雄期提早等多种变异植株, M₂代获得了多穗玉米突变类型, 变异材料可供进一步选择^[9]。丘运兰用高能离子(²⁰Ne 245 MeV/u、⁴⁰Ar 400 MeV/u、⁵⁶Fe 600 MeV/u)辐照玉米, 发现利用200 Gy高剂量的 γ 辐射会引起明显的生理损伤, 生理抑制明显; 而低剂量的高能离子辐射仍保持较高的诱变频率, 说明其相对生物效应远大于 γ 辐射^[10]。

2 化学诱变育种

化学诱变育种即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, 直接或间接地培育生产上能利用的农作物新品种。化学诱变剂的种类很多, 如烷化剂、亚硝基化合物、叠氮化物、碱基类似物、抗生素、羟胺和吡啶等。甲基磺酸乙酯(EMS)是目前在玉米上使用最广和使用效果最好的化学诱变剂, 早在20世纪60年代就被用于玉米诱变育种。1966年Coe发现玉米花粉可以在石蜡油中悬浮几个小时仍保持生命力, 把它们涂到花丝上, 仍能正常授精结实^[11]。后来Neuffer将此发现加以引伸, 进一步把化学诱变剂悬浮于石蜡油中, 而后与玉米花粉混合进行诱变, 获得成功^[12]。1986年美国ICI种子子公司Greaves等用EMS的石蜡油溶液处理玉米自交系的成熟花粉40 min, 在M₂代用除草剂进行筛选, 获得9株抗除草剂普杀特(Pursuit)的突变体^[13]。1992年刘治先用EMS处理B73的花粉, 从M₃后代中选出10个高赖氨酸(0.41%~0.53%)、8个高蛋白、7个高油、4个高亚油酸、3个高油酸和9个低棕榈酸材料^[14]。赵永亮等采用含有EMS的石蜡油处理玉米自交系黄早4和7822的花粉, 在2个世代就创造了所有特用玉米类型, 包括白玉米、甜玉米、糯玉米、超甜玉米和高直链淀粉玉米^[15]。1996年薛守旺等用石蜡油-EMS诱变玉米自交系黄早4、CN56、多黄22、7230、7287、中01、7316成熟花粉, 结果得到中01浅黄粒突变体、多黄22显性核不育突变体和近等基因系SulSul型甜玉米^[16]。李海军利用EMS石蜡油诱导玉米成熟花粉, 经M₁、M₂代选择和M₃代田间鉴定, 得到了早熟、晚熟和株型等有利用价值的突变体, 且得出低浓度EMS石蜡油溶液(0.667×10^{-3})有利于产生早熟突变体, 而高浓度EMS石蜡油溶液($>10^{-3}$)有利于产生晚熟突变体^[17]。郭丽娟等用EMS处理玉米八趟白单倍体胚性细胞无性系, 以玉米小斑病菌的致病毒素为选择剂, 获得了抗玉米小斑病突变体^[18]。安学丽等采用EMS、NaN₃和苯甲酰胺复合剂、PYM 3种诱变剂处理2个玉米自交系的结果表明, EMS, NaN₃和苯甲酰胺复合剂在M₁代引起了较大的生理损伤, 并出现了较高频率的染色体畸变; PYM作为一种新兴的诱变剂对玉米的诱变效果并不显著, 2个自交系品种对诱变剂的敏感性有差异^[19]。甲基磺酸乙酯(EMS)是目前在玉米上使用最广和使用效果最好的化学诱变剂。

3 空间诱变育种

空间诱变育种是利用返回式卫星、高空气球及高空模拟实验塔搭载生物种质材料, 在近地空

间物理和化学因素影响下,使生物后代发生变异,经过地面选育而培育新品种的方法^[20]。1997年 Peterson等报道了美国阿波罗飞行中,具特殊遗传标记(LW1/IW1)的玉米种子受宇宙射线中高能重离子轰击后因体细胞突变在2~9片叶子上均出现黄色条纹^[21]。1994年丘运兰等的研究表明,太空环境对玉米种子发芽率无影响,但发现部分飞行种萌发后存在生长抑制现象^[22],当代植株的株高、叶片数显著降低,植株叶片产生黄白条纹,株色由绿株变为黄绿株;一些植株的根尖细胞中有染色体桥、染色体断片和微核。透射电镜观察表明,黄色条纹叶片的叶绿体中基粒较少,片层不清晰,白色条纹叶的叶绿体发育不全。1998年李社荣等研究了玉米自交系种子经返回式卫星搭载后在田间生长发育和叶片超微结构的变化^[23],结果表明对多数自交系的幼苗高度、叶长、叶宽有正(增加)效果,但少数自交系上出现负(减少)效果;所有自交系的叶片均变黄,叶片细胞结构发生变化:细胞质壁分离及细胞液泡化,内容物减少,细胞壁加厚及扭曲,胞间连丝增多,细胞核、叶绿体变形,核膜缺刻,线粒体、内质网增多、体积增大等。曹墨菊通过返回式实验卫星搭载玉米自交系S37的种子,结果发现空间条件可以使自交系性状发生改变,并扩大变异范围,从而改变纯系材料后代株系的配合力^[24]。张琳碧等利用cDNA-AFLP技术对太空诱变玉米核雄性不育材料的花药进行差异表达分析,并对差异片段进行回收、克隆和测序,结合半定量RT-PCR方法,分析差异片段在可育株和不育株中的表达情况^[25]。利用16对引物共回收得到9个差异序列,其中2个为来自不育株的特有片段,7个为来自可育株的特有片段;序列分析发现,来自不育株的2个EST序列未检测到同源性较高的序列,来自可育株的4个EST序列分别与水稻上推断的查尔酮合成酶、脂酰CoA脱氢酶、蛋白激酶PK12、甘氨酸脱羧酶具有较高的同源性。曹墨菊等采用高效液相色谱法(HPLC)分析了太空诱变玉米核不育突变体姊妹交后代可育株和不育株中的细胞分裂素(ZT)、赤霉素(GAs)、生长素(IAA)、脱落酸(ABA)的含量及比值的变化,并通过外施赤霉素试验,调查了外施赤霉素对育性表现的影响,发现外施赤霉素并不能使植株的育性发生改变^[26],苗期可育株与不育株叶片中的内源IAA、ABA含量差异达显著水平,拔节期可育株与不育株叶片中的内源ZT、GAs、IAA和ABA含量差异均达显著或极显著水平,单核小孢子期可育株与不育株雄穗中的IAA、ABA含量差异达极显著水平,

而双核花粉期可育株与不育株雄穗中仅有ABA含量差异达极显著水平。其中可育株中ZT、GAs和IAA含量高于不育株,ABA含量低于不育株。即太空诱变玉米核不育突变体不属于赤霉素敏感型,不育突变体的发生可能与ABA、IAA的关系更为密切。

4 展望

随着分子生物学的迅猛发展,诱发突变技术在继续发挥传统优势——突变品种培育与突变种质创制的同时,将在新基因发掘和功能基因组研究中发挥不可替代的重要作用。例如,随着DNA测序技术的快速发展,使我们能够很快获得许多重要作物的全基因组序列信息,结合高通量突变筛选技术(Targeting Induced Local Lesion IN Genomes, TILLING)和高分辨熔解曲线分析技术(High Resolution Melting Curves Analysis, HRM)、多样性微阵列技术(Diversity arrays technology, DaRT)、基因表达系列分析(Serial Analysis of Gene Expression, SAGE)技术等^[27-30],突变新基因的发现与鉴定将成为十分活跃的研究领域。同时,快速发展的DNA技术和海量基因组信息必将全面提升植物突变技术研究和育种水平,植物分子突变育种的时代已经来临^[31]。随着各种转化技术体系的进一步完善和成熟,插入突变、基因沉默、同源重组等生物诱变技术已成为获得优良变异材料的一种常用技术,如根癌农杆菌介导法、花粉管通道法、基因枪法、PEG化学法等^[32-37]。

尽管诱变育种技术有着非常诱人的前景,但也凸显出一些不足,如诱变的频率和幅度还不够高、诱变的方向具有不确定性、诱变的效果不理想,有关的条件、方法、理论等还急待进一步探索与完善等。所以,在今后的研究中,应扩大诱变技术的种类,寻找更多、更好的诱变源;改变诱变材料、部位、生长时期,扩大诱变群体;加强诱变机制的研究,深入开展物理、化学、生物、空间等复合诱变的研究与应用,探索出新的无毒高效诱变剂和新的诱变方法,从而提高诱变的效率、效果及安全性;充分利用生物技术与常规育种技术的紧密结合,开展新种质、新品种、新材料的研究;利用分子生物学的方法,对有益变异的基因进行克隆,并通过遗传工程的手段,将其转入到其它植物的基因组中,使目的基因得以表达,使诱变工作能够定向发展,从而更好的造福人类。

参考文献:

- [1] 刘录祥,郭会君,赵林姝,等.植物诱发突变技术育种研究现状与展望[J].核农学报,2009,23(6):1001-1007.

- [2] 魏良明, 姜鸿勋, 胡学安, 等. 植物诱变新技术及其在玉米育种上的运用[J]. 玉米科学, 2000, 8(1): 19-20.
- [3] 周柱华, 齐延芳, 邱登林, 等. γ -射线照射花粉后对玉米结实及生长影响的探讨[J]. 玉米科学, 2002, 10(4): 39-41.
- [4] 周柱华, 阴卫军, 张青, 等. 玉米辐射育种关键技术环节的研究[J]. 山东农业科学, 2006(4): 7-12.
- [5] 王兵伟, 郝小琴, 王殿君, 等. γ -射线辐射微胚乳超高油玉米适宜剂量及对苗高影响的研究[J]. 玉米科学, 2007, 15(2): 137-139.
- [6] 新疆生产建设兵团农九师164团. N^+ 离子束注入对玉米POD和SOD同工酶的影响[C]//中国科协2005年学术年会新疆现代农业论坛论文集. 北京: 中国科学技术协会学会工作部, 2005.
- [7] 常胜合, 舒海燕, 苏明杰, 等. 不同剂量的低能 N^+ 离子束照射对玉米种子当代幼苗期性状的影响[J]. 玉米科学, 2006, 14(4): 97-99; 103.
- [8] 唐掌雄, 刘志芳, 邵俊明, 等. 离子辐射育种研究进展[J]. 核农学报, 2005, 19(4): 312-316.
- [9] 罗红兵, 赵葵, 郭继宇, 等. 重离子束在玉米诱变育种中的应用研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2004, 30(4): 385-388.
- [10] 丘运兰, 梅曼彤, 何运康, 等. 加速重离子辐射对玉米的诱变效应[J]. 华南农业大学学报, 1991, 12(1): 48-54.
- [11] COE E H JR. Liquid media suitable for suspending maize pollen before pollination [J]. Proc Mo. A. cad. Sci., 1976, 3: 7-8.
- [12] NEUFFER M G. Chemical mutagens in mineral oil very effective on corn pollen maize [J]. Genet. Coop. News Lett., 1968(42): 124.
- [13] GREAVES J A, G K RUFENER, M T CHANG, *et al.* Development of resistance to pursuit herbicide in corn the IT gene [C] //proceedings of the 48th annual corn and sorghum industry. 1993: 104-118.
- [14] 刘治先, ALLEN D, WRIGHT, 等. 高油玉米突变体的诱导和遗传分析[J]. 作物学报, 1998, 24(4): 447-451.
- [15] 赵永亮, 宋同明, 马惠平, 等. 利用花粉化学诱变快速创造特用玉米新种质[J]. 作物学报, 1999, 25(2): 157-161.
- [16] 薛守旺, 周洪生. 化学诱变及在玉米育种上的应用[J]. 玉米科学, 1998, 6(2): 10-13.
- [17] 李海军, 池书敏, 刘志增, 等. 利用EMS化学诱变改造玉米自交系的研究[J]. 玉米科学, 2002, 10(3): 36-37.
- [18] 郭丽娟, 胡启德, 康绍兰, 等. 诱发玉米抗小斑病突变体的研究—IV 从玉米单倍体胚性细胞无性系筛选抗玉米小斑病突变体[J]. 遗传学报, 1987, 14(5): 355-362.
- [19] 安学丽, 蔡一林, 王久光. 几种化学诱变剂对玉米自交系的诱变效应[J]. 西南农业大学学报(自然科学版)2003, 6(25): 498-501.
- [20] 王雁, 李潞滨, 韩蕾. 空间诱变技术及其在我国花卉育种上的应用[J]. 林业科学研究, 2002, 15(2): 229-234.
- [21] 江泽慧, 彭镇华. 离子束应用于生物品种改良的研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 1994, 21(3): 295-298.
- [22] 丘运兰, 何康远, 梅曼彤, 等. 太空飞行对玉米种子的生物学效应[J]. 华南农业大学学报, 1994, 15(2): 100-105.
- [23] 李社荣, 刘雅楠, 刘敏, 等. 玉米空间诱变及其应用研究 空间条件对玉米叶片超微结构的影响[J]. 核农学报, 1998, 12(5): 274-280.
- [24] 曹墨菊, 荣廷昭. 空间条件对玉米自交系S37的诱变效应[J]. 中国农学通报, 2001, 17(1): 1-3.
- [25] 张琳碧, 荣廷昭, 潘光堂, 等. 太空诱变玉米核雄性不育材料的cDNA- AFLP分析[J]. 核农学报, 2009, 23(1): 37-41.
- [26] 曹墨菊, 程江, 汪静, 等. 太空诱变玉米核雄性不育与植物激素的关系[J]. 核农学报, 2010, 24(3): 447-452.
- [27] COLBERT T, TILL B J, TOMPA R, *et al.* High throughput screening for induced point mutations [J]. Plant Physiol., 2001, 126: 480-484.
- [28] MARTIN A, PARRY J, PIPPA J, *et al.* Mutation discovery for crop improvement [J]. Exp. Bot. 2009, 60: 2817-2825.
- [29] JACCOUD D, PENG K, FEINSTEIN D, *et al.* A solid state technology for sequence information independent genotyping [J]. Nucleic Acids. Res., 2001, 29(4): 25.
- [30] MALSUMUM H, NIRASAWA S, UERACHI R. Transcript profiling in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings using serial analysis of gene expression (SAGE) [J]. The Plant Journal, 1999, 20(6): 719-726.
- [31] SHU Q Y, LAGODA P J L. Mutation techniques for gene discovery and crop improvement [J]. Molecular Plant Breeding, 2007, 5(2): 193-195.
- [32] 苏红, 印莉萍. 插入突变在水稻功能基因组学中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2009(5): 1-4.
- [33] 闫双勇, 智庆文, 刘欣洁, 等. 水稻T-DNA插入突变体库的构建及突变类型的分析[J]. 遗传学报, 2004, 31(12): 1388-1394.
- [34] 吕亚慈. 水稻T-DNA插入突变技术研究[J]. 衡水学院学报, 2009, 11(1): 45-47.
- [35] 马艳平, 刘永生, 张杰, 等. 转座子应用的研究进展[J]. 江西农业学报, 2009, 21(5): 108-110.
- [36] 田野, 曹雪松. 植物基因沉默的研究进展[J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2010, 23(1): 45-48.
- [37] 张丽娜, 于玲, 俞诗源, 等. RNA干涉研究进展[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2006, 42(5): 105-111.

(本文责编: 杨杰)