

化学诱变及其在玉米育种上的应用

薛守旺* 周洪生 邓迎海 吕宗言*

(中国农业科学院作物育种栽培研究所,北京 100081)

摘 要 本文综述了化学诱变育种的基本原理,详细分析了诱变剂的种类、作用机理、诱变材料的选择、处理方法等,比较了传统化学诱变方法和在此基础上发展起来的 NG(或 EMS)-石蜡油溶液诱变方法的优缺点。作者认为,化学诱变方法在特用玉米育种上有广泛的应用前景。

关键词 玉米 育种 化学诱变 EMS NG

化学诱变就是用化学诱变剂处理作物的植株、种子、花粉、花药、合子或单细胞组织培养物等,以引起碱基置换、染色体断裂、基因重组或基因突变等生物学效应,使后代产生变异。将化学诱变应用于作物育种,根据育种目标从后代中选出新品系、特用品种或新种质不失为一种快速、高效的现代育种方法。

自从 1943 年 Oehlkers 用脲烷处理月见草以后,化学诱变育种就开始在世界上广泛应用。如: Custafsson(1948)用芥子气处理大麦, Nilan(1967)用硫酸二乙酯育成大麦新品种。1978 年前苏联用亚硝基乙脲处理小麦获得矮秆品种“Polukarlikovaya - 49”^[1]。此外,在玉米、水稻、绿豆等作物上的应用也获得了一定的效果。

1 化学诱变剂的种类及作用机制

化学诱变剂大体有 5 种,它们是:烷化剂、碱基类似物、碱基异构体、染色体断裂剂、中草药。

1.1 烷化剂(亲电子反应物)

带有一个或多个活泼的烷基。烷基能够转移到其它电子密度较高的分子(亲核中心)中去而置换掉该分子中的氢原子,即: $X^- + RY \rightarrow RX + Y^-$, 其中 X 取代 Y(烷基)的速度取决于 X、Y 及烷基 R 的相对的亲核能力。这类试剂有:氮芥类、乙烯亚胺类、重氮烷、环氮化合物、磺酸脂类、亚硝基化合物。因为二功能基与多功能基的烷化剂毒性比单功能基的大,能显著引起生物致死,所以一般用单功能基的烷化剂。

1.2 碱基类似物

该类化合物在不妨碍 DNA 复制的情况下作为 DNA 的组成成分参加合成。因为碱基类似物在某些取代基上与正常碱基不同,所以参与后使 DNA 复制发生偶然错配,引起碱基对的交换,从而引起变异。如 5-溴尿嘧啶类似物, 2-氨基-嘌呤类似物等。

1.3 碱基异构体

如马来酰肼是尿嘧啶异构体,能与细胞内的巯基起作用。

1.4 染色体断裂剂

* 山东省阳谷县农业局。

如抗生素、丫啶等能打断染色体。

1.5 中草药

如长春花碱等可阻止纺锤体形成,抑制细胞分裂。

2 化学诱变剂的诱变机理

按作用方式的不同分为 5 种。

2.1 直接作用 DNA 模板

改变模板性质,改变核苷酸中碱基的化学结构或以某种方式破坏 DNA 复制。

2.2 参与复制

在 DNA 复制时,碱基类似物象正常的三磷酸核苷那样参入 DNA 链。

2.3 嵌入 DNA 碱基间

引起碱基的缺失或添加从而造成读码节段的改变,引起移码突变。

2.4 打断染色体

形成染色体片断,双着丝点染色体等。

2.5 抑制纺锤体的形成

作用于细胞分裂期,使细胞分裂在中期停止。

3 诱变材料的选择

诱变材料的遗传背景即基因型对诱变效果有重要影响。基因差异可影响突变频率和突变谱。因此,选择材料的一般原则是:选综合性状优良,适应性好,但又须改良某个缺点的品种或品系。处理后稳定快,能很快再用于生产。选用杂合材料可增加重组率,提高诱变效果,但稳定慢。可用于创造新种质上。选用优良的品系或自交系,通过诱变改变某一个基因位点,迅速培育出有应用价值的特用品种或更优系。

4 处理方法

处理方法有处理植株、处理种子、处理合子等。

4.1 处理植株

包括茎部吸收、注射、涂抹等。茎部吸收:劈茎插管子,或切浅口用棉团引入处理液,让植物慢慢吸收。注射:用注射针管将适量的处理液注入要处理的器官。涂抹:用棉团或毛刷将诱变剂涂到要处理的器官上。加入培养基中:在培育植株的培养基中加入低浓度的诱变剂。以上方法多用于慢性诱变剂,或者用于研究植物不同的生长发育阶段对化学诱变剂的敏感性和特异性等。

4.2 种子处理

干种子:直接把干燥种子放入诱变剂溶液中浸泡一段时间。因为干种子要先吸胀,所以此法不易控制剂量。浸泡过的种子:放在一定浓度的处理液中处理一定时间,水洗后立即播种,或者重新干燥后待播。此法是目前育种中常用的一种方法,尤其用于禾谷类作物。

4.3 合子处理

在授精后合子期将生长着的穗子插入处理液中处理一段时间。将诱变剂滴入合子期的花冠内。如棉花、豆科作物等。

4.4 单细胞或组织培养物处理

培养前用诱变剂处理培养物,然后再培养,或在培养基中加入一定量的诱变剂进行培养。

4.5 花药或花粉处理

在临近开花时将穗子剪下插入处理液中,开花时收集花粉,或采用花粉薰蒸,即在密闭容器中用诱变剂薰蒸花粉,或用处理液处理成熟花粉,如用 EMS 石蜡油溶液处理玉米花粉^[2],或在花药组培前将小穗剪下插入诱变剂中,处理一定时间后,取出培养。

4.6 花丝诱导

用诱变剂处理未授粉的玉米花丝,诱导花丝孤雌生殖^[3]。

5 影响诱变效应的因素

在处理前、处理中、处理后都可能存在一些因素影响处理效果。

5.1 预先浸泡

其效果一般是提高种子对药物的敏感性。

5.2 诱变剂的水解或分解产物

使作用过程变得复杂,副作用明显。

5.3 金属离子

一般是加入后能提高诱变效应,但也易引起混乱。

5.4 药物后效

对种子处理而言,就是指种子处理后到萌发生长这一段时间内诱变剂的效应。后效原因有二,药物残留和再烷化作用,后效时间的长短取决于诱变剂的物理特征、化学特性、水解速度及处理条件。如水洗时水的温度、贮藏温度等。

5.5 处理材料本身的特性

用诱变剂处理种子与处理植株和处理花粉,诱变剂的效应是不一样的。

5.6 复合处理

可阻止 DNA 的修复。如 EMS 的苯甲酰胺复合处理水稻的组织培养物^[4]。

5.7 处理后材料的生长条件

已处理材料只有生长在最适条件下才能表现出真正的处理效果。

6 衡量诱变效果的指标及后代选择

衡量诱变效果的指标有突变频率、突变率、微核百分率等。

6.1 突变频率

诱变二代(M_2)出现的各种突变体个数与供检个体数的比值,又叫总诱变率。

6.2 突变率

某个基因突变为另一个基因的概率。

6.3 微核百分率

染色畸变产生的断片、落后染色体等可随细胞发育逐渐融合成团,形成在显微镜下看到的微核。一般是镜检胚根根尖细胞,计算带微核的细胞数与镜检细胞数的比。

处理后的材料会产生各种突变类型,应根据诱变后代的特点及育种目标进行选择。对于那些诱变频率较低的突变性状,应加大处理的群体数量;对于隐性性状,要自交所有的 M_1 植株,在 M_2 代进行选择。

7 化学诱变在玉米育种上的应用

早在 60 年代,EMS(Ethyl Methane Sulfonate 甲基磺酸乙酯的简称)就被用于诱变育种。但是,当时是用 EMS 水溶液浸种子,诱变效率很低,原因是:①EMS 与水起作用产生不起诱变作用但有有毒的化合物:甲磺酸和乙醇: $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{OC}_2\text{H}_5 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{SO}_2\text{OH} + \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$,甲磺酸显著地引起植物损伤和不育。②胚细胞在成熟的种子中被许多有生命的细胞包围,再加上细胞膜的双透性就阻碍了 EMS 进入了胚细胞。③产生的突变基因难固定致终。种子的胚细胞在分化出配子体以前,要经过无数次的细胞分裂和分化,一些突变因子在染色体无数次的复制过程中不易表达而丢失。

美国密苏里大学(University of Missouri)的 Neuffer^[2]等从 1963 年开始就一直致力于化学诱变剂处理玉米雄穗的研究。1978 年他发现成熟玉米花粉可在轻质石蜡油中贮藏几个小时而仍然保持活力^{[5][6]}。于是他将 EMS 和 NG(Nitrosoguanidine,亚硝基胍)溶在石蜡油中配成乳浊液和悬浊液处理玉米成熟花粉。此法诱变效果极好,诱变育种获得成功。同时还证明 NG 的处理效果优于 EMS,用 NG 处理的花粉中 54% 的有效花粉至少产生一个具有性状表现型的基因突变,而用 EMS 处理的花粉中 26% 的有效花粉至少产生一个具有性状表现型的突变^{[2][7]}。但因为 NG 是晶体不如 EMS 易操作而未广泛应用。

1986 年 Garst Seed Co. 用 EMS 处理优良玉米自交系的花粉获得了单一核苷酸抗除草剂突变体,并于 1988 年申请国际专利^[8]。1987 年美国 ICI 种子分公司处理花粉获得糯质、甜质突变体^[8]。

1991 年张铭堂利用 EMS 处理,发现糯质基因 Wx 的诱变频率为 0.2%。1992 年 Allen Wright(依阿华大学)用 EMS 处理 B73 的花粉从 M₃ 后代中选出了 10 个高赖氨酸(0.41% ~ 0.53%)材料。^[8]

总之,以石蜡油-EMS 处理玉米花粉技术已获成功,且已在国外应用,但国内的应用还极少。我们于 1996 年进行了石蜡油-EMS 诱变玉米成熟花粉的研究。我们使用的材料是玉米自交系黄早 4、CN56、多黄 22、7230、7287、中 01、7316。雌穗抽出后用纸袋套住,雄穗抽出后于盛花期前一天用纸袋套住雄穗,第二天取花粉放入 EMS 或 NG 诱变悬液中,处理 25min 或 45min,然后用小毛刷将花粉涂沫到花丝上,套上纸袋,挂牌记录。待种子成熟后收获所有的穗子和未处理而自交的穗子进行观察、考种、统计分析。

从考种结果看,结实率一般在 30% ~ 80% 之间,说明花粉经过石蜡油浸泡基本不影响其生长萌发。从 M₁ 植株苗期的生长情况来看,出现一些黄花苗、致死苗等。详细结果另文报道。

我们之所以选择玉米自交系进行诱变,在于 EMS 直接与花粉中的核 DNA 发生作用,影响核苷酸组成^[8],携带变异的雄配子与雌配子结合后即是后代种子,因此,保留的变异类型较多,实验效果好。对于纯合稳定的自交系来说,显性突变可望在处理当代的雌穗上或 M₁ 植株上观察到,隐性突变则在 M₂、M₃ 中分离出来,且选出的突变体能很快地稳定地遗传下去。可望选出黄早 4、多 22 等自交系的 wx、sh、su 等近等基因系突变体。

由于玉米的许多重要性状受一对基因控制,如:大斑病抗性(Ht)、锈病抗性(RP)单基因、矮秆(D)、甜玉米(su、sh、bt)、糯玉米(wx)等,所以处理花粉易获得此突变性状。虽然诱变的方向是不确定的,诱变后代会出现多种变异类型,但只要诱变的群体足够大,就可能选出目标突变。研究结果表明,就单一基因位点来说显性基因的诱变率是万分之一,隐(下转第 17 页)

(上接第 13 页)性基因的诱变率是千分之一^[7]。所以只有处理相当多的植株数,从中选择方能获得目标基因型。

8 结束语

NG、EMS-石蜡油诱变技术不仅速度快,成功率也高,被许多科学家认为是最成功的新技术之一^[8],应成为当今玉米育种,尤其是特用玉米育种和改良自交系的重要工具,以及创造新种质,改良农艺性状的重要方法。该方法省时、省力、效果好,应在我国大力推广。

参 考 文 献

- 1 蔡旭等.植物遗传育种学(第二版).科学出版社,1988,P536-569
- 2 Neuffer, M. G., 1978. Paraffin Oil Technique For Treating Mature Corn Pollen With Chemical Mutagens, Maydica XXIII 21-28
- 3 赵佐宇等.遗传学报,1984,11(1):39-46
- 4 朴铁夫等.EMS和苯甲酰胺复合处理对水稻成熟胚愈伤组织出愈率和植株分化率的影响.核农学通报,1996,17(1):39-40
- 5 Neuffer M. G., 1989. Induced Mutations in Biological and Agronomic Research, Science for Plant Breeding, 16:165-178
- 6 Neuffer M. G., 1978. Induction of Genetic Variability, "Maize Breeding and Genetics", D. B. Walden(ed), New York, John Wiley & Sons Inc. P579-600
- 7 张铭堂.玉米之遗传.科学农业(台湾),44(1,2):37-52。
- 8 刘治先.玉米育种新技术.玉米科学,1995,3(4):12-12。

(责任编辑:王晓丽)