

化学诱变剂在玉米育种上的应用

史桂荣

(黑龙江省农科院玉米研究中心)

随着玉米杂种优势的研究和利用的进一步深入,对育种材料的要求越来越高,创造具有丰富遗传基础的育种材料是目前玉米育种工作者迫切需要解决的问题。化学诱变作为一种有效的手段,越来越被育种工作者们所重视。本文根据近几年来国内外期刊的报道,综述了主要化学诱变剂的特点及在玉米育种上的应用,以供育种者参考。

在诱变育种中,最有效的化学诱变剂是烷化剂,特别是甲基磺酸乙酯(EMS)和亚硝基胍(MNNG或NG)。其它亚硝基类化学诱变剂,尽管对原核生物的诱变效果很好,但对玉米却效果不佳。其原因尚不完全清楚,可能是诱变剂不容易接近真核细胞的DNA,以及原核细胞与真核细胞的DNA修复机制不同。

与离子辐射相比,化学诱变剂诱变产生的点突变的频率较高,而染色体重排相对较低。化学诱变具有以下四个特点:(1)主要是引起染色体的断裂,如果在DNA复制后实施诱变处理,那么染色体断裂很少发生。(2)断裂后不再连接起来。(3)具有位点特异性,即染色体的某些部位比其它部位更容易发生突变。(4)染色体畸变的比例相对较少,且很少有致死型发生。

现将主要的化学诱变剂EMS—溴尿嘧啶和NG及其它一些常用化学诱变剂的特点及应用介绍如下:

1 甲基磺酸乙酯—EMS

1.1 EMS的诱变机理及诱变特点

EMS是甲基磺酸乙酯的英文名Ethyl Methane Sulfonate的字头缩写,是一种良好的化学诱变剂。EMS为无色液体,密度1.203,沸点85~86℃,水容量8%,分子式为 $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{CH}_2\text{CH}_3$,分子量为124。自1953年Kolmark首次发现EMS的诱变作用后,EMS便被广泛地应用于动物、植物和微生物的诱变育种实践中,并取得了显著的成果。

1.1.1 EMS的诱变机理 主要是将烷基加到DNA的核苷酸鸟嘌呤上,使得DNA在复制时错误地将G—C碱基对转换为A—T碱基对,或者这些被烷基化的鸟嘌呤自动降解,在DNA链上出现空位,使DNA链断裂、易位乃至使细胞死亡。当然,EMS也可以使腺嘌呤烷基化,使A—T碱基对转换为G—C碱基对,或者出现颠换及其它类型的突变,只是后几种的突变频率相对较低而已。

1.1.2 EMS的诱变特点 诱变效率较高即产生的点突变的频率相对较高,而染色体畸变相对较少,因而可被用来对玉米的某一种特殊性状进行改良,并且容易出现高产、质佳的变异体。

出现的突变体类型较多,尽管主要引起的是G—C、A—T碱基对之间的转换,同时也可出现其它各种类型的突变体,因而具有多效性。

若引起染色体损伤的话,主要是使染色体单体断裂,且断裂后不再连接起来。

与其它诱变剂相比,EMS诱变后产生的显性突变体相对较多,因而易于突变体的筛选。它的诱发突变频率较高,用EMS处理玉米花粉,突变频率可高达78%。

1.2 EMS 在玉米育种上的应用

1.2.1 突变体的诱导 种子处理。将玉米种子悬浮于 EMS 水溶液中,可诱导胚发生变异,产生生殖性突变体,有时突变频率较高。不过,由于玉米是雌雄同株型作用,因而,处理玉米种子通常没有处理其它作物的种子有效。

进行诱变处理时,应使玉米种子完全被诱变剂浸透,确保有足够的药液进入细胞。处理干种子时的剂量一般为 0.5~0.6%EMS,浸泡 10~24 小时;若将种子先用水浸泡使其吸水膨胀后再进行处理,使用的剂量则应大大降低,一般为 0.1~0.3%EMS,浸泡 2~4 小时。低温能使 EMS 溶液保持一定的稳定性,高温可以促进反应速度和增强诱变效应,所以,一般是先在低温条件下把种子浸泡在诱变剂溶液中,使药液有足够的时间进入细胞,然后将种子转移到 40℃ 的新鲜诱变剂中进行处理,以提高诱变剂在种子内的诱变效果。

EMS 具有很高的活性,能和水反应,产生没有诱变作用,但有毒的甲磺酸。其水解的速率用半衰期(药液原有量消失一半所需要的时间)来表示。EMS 的半衰期与温度有密切的关系,如在 20℃、30℃、和 37℃ 时 EMS 的半衰期分别为 93 小时、26 小时和 10.4 小时。所以在诱变处理时应注意以下三点:一是用 pH7.0 的 0.06M 磷酸盐缓冲液配制 EMS 溶液;二是使用前临时配制,勿存放过久;三是严格控制处理的温度和时间。此外,有文献报道, Zn^{++} 、 Ca^{++} 、等离子能够提高 EMS 诱导产生的染色体畸变率,因而为了减少染色体畸变,增加点突变率,应使用去离子水制备磷酸缓冲液。

花粉处理。花粉处理是获得突变体的简便、有效方法,而且得到的突变体也易于解释。因为每个花粉粒代表一个被处理的基因组,产生的每个 M_1 子粒带有一套被处理的和一套未被处理的基因组,这时鉴定不同的突变体和比较突变频率都很容易。花粉处理后,产生的显性突变体在 M_1 代就可立即被检测到;隐性突变体只要将 M_1 自交后就可可在 M_2 代检测到。如果 M_1 仍为 F_1 ,即母本为隐性合子,被处理的父本为显性合子,那么隐性突变体也可在 M_1 代检测到,这在用胚乳突变体检验诱变剂功效时特别有用。

花粉处理的方法是将花粉混合于 0.06%EMS 石蜡油悬浮液中,维持 45 分钟,然后用柔软的毛刷将花粉涂于新鲜的花丝上进行授粉。玉米花粉在石蜡油中 1 小时以上仍保持完好,对萌发力影响不大。

处理植株、雌穗、雄穗及愈伤组织。人们曾用下述各种方法把 EMS 水溶液施于玉米各部位上,诸如:割破幼苗的根、叶使之吸收的方法;在茎、雌穗、雄穗等部位用注射器注射的方法;将纱布或棉布缠到雄穗上,再使纱布浸足 EMS 溶液等方法。实践证明,只有后一种方法比较有效。

在进行细胞或组织培养时,将 EMS 加到培养液中,可明显地提高突变率,但这种方法产生的突变体不容易筛选和回收。

1.2.2 突变体的筛选和保持 为了鉴定出尽可能多的突变材料,获得具有优良特性的突变体,需要制定一个周密的定性鉴定计划,以便正确、简便地处理几千份的 M_1 代和 M_2 代材料。

用 M_1 幼苗鉴定显性突变体,将那些被鉴定出的突变体与标准系杂交,以保存这些突变体,并测试其遗传特性。然后将所有的 M_1 植株自交,以产生 M_2 系。

检验 M_1 穗,以分离半不育及子粒突变体。从大部分 M_1 穗上取 40 个子粒,进行砂培,用来分离幼苗突变体。同时从每一份 M_1 穗上取 20 粒种子播于田间,以便在成熟期鉴定整个生育期的突变情况。 M_1 穗余下的子粒冷藏,作为一级贮备材料,以便今后需要时随时取样。

将在 M_1 代与标准测试系杂交后得到的似显性突变体杂交种再与标准测试系杂交,并播

种 F_1 , 以证实是否遵循 1:1 分离规律。将在 M_2 观测到的隐性突变体与标准测试系杂交; 并将得到的 F_1 自交, 验证其是否按孟德尔传递规律遗传。随着表现型的进一步明朗, 可将突变体标出暂时性的代, 并编出分类目录号, 然后将如此得到的变异体分类, 并将这些异合子材料存贮起来, 作为二级贮备材料。当确定了基因的突变位点后, 便可将独立的突变体命名永久性的基因符号, 这样便得到了新的突变体。

2 5-溴尿嘧啶等碱基类似物

5-溴尿嘧啶的结构与 DNA 中的碱基十分相似, 因而被称为碱基类似物。这类诱变剂的稳定性较正常碱基小, 在细胞内能因其异构变动而以不同形式存在。如 5-溴尿嘧啶就能以酮式或稀醇式状态存在, 当它处于酮式状态时, 能与腺嘌呤配对; 但当它处于烯醇式状态时, 却能与鸟嘌呤配对。所以, 如将细胞在含有 5-溴尿嘧啶的培养液中培养时, DNA 能发生 AT-GC 或 GC-AT 的转换突变。这种诱变过程需要通过 DNA 合成作用才能发生, 对停止生长的细胞不发生作用。所以, 这类诱变剂对玉米正在进行组织培养的组织及花粉诱变效果较好, 而对成熟的玉米种子则不起作用。与 5-溴尿嘧啶作用相似的碱基类似物包括 2-氨基嘌呤、5-氨基尿嘧啶、8-氮鸟嘌呤及 6-氯嘌呤等。

3 亚硝基胍(NG)及其它药剂

亚硝基类化合物, 特别是 N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍(MNNG 或 NG)也是一类有效的诱变剂。用 NG 处理玉米的花粉试验结果表明, NG 除了有通常的烷基化作用, 产生一系列有益突变体外, 还出现了很高比率的奇异表现型, 最典型的是小植株综合症。

乙基亚硝基胍(ENU)是一种很有潜力的诱变剂。当用 ENU 溶液对玉米种子进行处理时, 其诱变效率与 EMS 相比是多效的, 在 y_8z 位点产生的正突变是相同浓度的 EMS 产生的 3.8 倍。同时产生很多染色体拼集现象, 因而 ENU 可能是更有效的诱变剂。

叠氮钠是一种比较有效的诱变剂。用它的水溶液处理玉米种子后, M_1 种子的发芽率、幼苗高度及成株高度都降低了。把叠氮钠加到玉米组织培养的愈伤组织中, 产生的突变体可在高浓度的赖氨酸和苏氨酸中生存。用这种方法分离到一株赖氨酸和苏氨酸含量都较高的突变体。

其它一些化合物, 尽管对其它生物较有效, 但对玉米的诱变效果都不好。

综上所述, 尽管化学诱变还存在一些尚未解决的问题, 但这不失为一条丰富育种材料的有效手段。经化学诱变后, 玉米可产生新的等位基因以克服目前常用自交系的某些缺点。这样可避免通过杂交手段从外来品种中带来的大量的不良基因, 提高育种效率。