

玉米 EMS 突变体库构建及突变体初步鉴定

樊双虎¹, 郭文柱^{2,4}, 路小铨^{3,4}, 张春义^{1,4*}

(1. 西南科技大学生命科学与工程学院, 四川绵阳 621010; 2. 华中农业大学植物科学技术学院, 湖北武汉 430070; 3. 齐鲁师范学院生命科学学院, 山东章丘 250200; 4. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要 [目的] 构建玉米诱变体库, 创制玉米新种质资源。[方法] 采用甲基磺酸乙酯(EMS)诱变玉米优良自交系 B73 和郑 58, 构建突变体库; 选取小叶夹角突变体 *rla1*、*rla2* 进行密植产量测定和遗传学分析。[结果] 2 个突变体库的 M₂ 代含有表型丰富的突变体, 尤其是一些突变体表现出优良农艺性状, 如叶夹角小、棕色叶中脉、矮化、抗性, 具有重要的育种价值。*rla1*、*rla2* 表型相似, 较初始材料耐密植, 在试验各种种植密度下, 单位面积产量均高于对照组; 且产量随着密度增大而提高, 其最大密植度在 100 000 株/hm²。遗传学分析显示, *rla1*、*rla2* 都是单基因隐性突变, 而且是等位基因突变。[结论] B73 和郑 58 的 EMS 突变体库为玉米育种提供了宝贵的材料资源。

关键词 甲基磺酸乙酯; 突变体库; 种质资源; 叶夹角

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)11-03162-04

Construction and Preliminary Identification of EMS Mutant Library in Maize

FAN Shuang-hu, ZHANG Chun-yi et al (School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan 621010; Biotechnology Institute of CAAS, Beijing 100081)

Abstract [Objective] The aim was to construct mutant libraries of maize and create new maize germplasm resources. [Method] Mutant libraries of maize inbred B73 and Zheng 58 were constructed by EMS mutagenesis. Measurement the yield under high density and genetic analysis of *rla1* and *rla2* was carried out. [Result] The M₂ generation contained various phenotypes of mutants. Above all, some mutants showed excellent agronomic traits, such as small leaf angle, brown leaf midrib, dwarfism and resistance, which were very valuable in maize breeding. The narrow leaf angle mutants *rla1* and *rla2* had similar phenotype, and allowed higher planting densities than the wild type line. Under different planting densities in this study, the yields of *rla1* and *rla2* per unit area were higher than control, and increased as the increase of planting density, whose proper maximum density would be more than 100 000 plants per hectare. The results of genetics analysis indicated that the mutant phenotype of *rla1* and *rla2* was caused by recessive mutation in a single locus, and *rla1* and *rla2* were two alleles of the same gene. [Conclusion] The EMS mutant libraries of B73 and Zheng 58 provided valuable germplasm resources for maize breeding.

Key words Ethyl methane sulfonate; Mutant library; Germplasm resource; Leaf angle

玉米是食用和能源两用作物, 是目前世界上应用价值最高的作物之一, 自 2012 年已成为我国第一大粮食作物。培育优良品种, 提高玉米产量, 对满足我国粮食、食品、能源需求具有重要意义。当前我国玉米生产和育种所依赖的种质基础仅局限于 3~4 个种群中的数个骨干自交系, 生产用种质的遗传脆弱性和创新能力不足成为选育突破性新品种的瓶颈。玉米种质资源的创新, 对拓宽我国玉米种质的遗传基础具有重要理论价值和现实意义。传统育种技术选择效率低、周期长, 不能满足当前玉米生产对优良品种的需求。化学诱变可以提高突变频率, 加快新种质的创制速度。

甲基磺酸乙酯(EMS, ethyl methane sulfonate)是一种高效诱变剂, 诱变频率高, 突变位点在基因组中分布均匀, 对基因组伤害小, 优良的突变体材料可以直接用于育种^[1-2]。1978 年 Neuffer 用 EMS 的石蜡油溶液诱变玉米花粉并获得成功, 之后 Garst Seed Co. 用 EMS 处理玉米自交系花粉获得了抗除草剂突变体^[3], 美国 ICI 公司从玉米 EMS 诱变群体中先后筛选到抗除草剂 Pursuit 突变体、糯质突变体和甜质突变体^[4]。Allen Wright 从 EMS 诱变的 B73 M₃ 后代中分别筛选到高油、高亚油酸、高赖氨酸、高蛋白、高油酸和低棕榈酸突变株。Victor Roboy 也从玉米 EMS 诱变后代中筛出了高油突变体^[4]。国内外研究表明, EMS 诱变玉米花粉可以产生丰富

的种质资源, 而且到目前为止 EMS 诱变是玉米突变体创制最成功的方法。试验用 EMS 诱变 B73 和郑 58 花粉, 分别建立 B73 和郑 58 的突变体库, 在突变体库中筛选表型丰富的突变体, 以期为后期的育种实践提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 试验诱变亲本为玉米自交系 B73 和郑 58, 均为实验室培育; 诱变剂甲基磺酸乙酯(ethyl methane sulfonate, EMS)与载体剂轻质石蜡油, 均购自 sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 EMS 诱变处理^[5]。参照 Neuffer 的方法来配制 EMS 石蜡油溶液, 并诱变 B73、郑 58 花粉。在通风橱内将 EMS 和石蜡油按 1:100(V/V)配成 1% 母液, 然后用搅拌器搅拌 1 h。选择生长良好的植株, 在雌穗吐丝前套袋, 待花丝长出适当长度即可用于诱变处理。诱变处理前 1 d 下午用杂交袋套好雄穗, 将 1% EMS 母液用石蜡油稀释至 0.067% 的工作液。处理当天上午在露水退去后, 收集新鲜花粉, 筛子过滤后, 将花粉和 EMS 工作液按 1:10(V/V)混合, 在 28 ℃ 摇床上摇 5 min, 间隔 5 min, 如此重复, 持续 45 min; 然后用毛笔将石蜡油和花粉的混合液均匀地刷在玉米花丝上, 将雌穗套袋并做好标记。B73、郑 58 各自诱变 200 株。

1.2.2 EMS 突变体库繁育及突变体筛选。EMS 突变体库繁育小区行长 5 m, 行距 60 cm, 株距 25 cm。EMS 诱变果穗成熟后得到 M₁ 种子, M₁ 种子全部单粒播种。从 M₁ 自交所得的每个 M₂ 果穗上随机选取 20 粒种子, 单粒播种成 1 行, 即穗行种植, 每行为一个 M₂ 家系, 每 15 行突变体设有 1 行野

基金项目 山东省高校科研发展计划项目(J13LJ02)。**作者简介** 樊双虎(1987-), 男, 山西忻州人, 硕士研究生, 研究方向: 玉米功能基因组学。* 通讯作者, 研究员, 从事植物代谢调控及生长发育机制研究。**收稿日期** 2014-03-01

生型对照。在每一个 M_2 家系中,筛选突变体并做表型记录,突变体全部自交(不育的例外),无明显突变表型的自交 5 株,每个 M_2 家系及突变体都挂牌标记。

1.2.3 密植试验设计。采用裂区试验设计,3 种植密度为主处理,*rla1* 的 M_4 代、*rla2* 的 M_4 代、野生型 B73 为副处理,重复 3 次,小区面积为 3 m×6 m,统计每个小区的产量,并换算成每公顷的产量。

表 1 种植密度设计

编号	行长//m	行距//m	株距//m	密度//株/hm ²
1	3	0.60	0.25	66 667
2	3	0.60	0.20	83 333
3	3	0.50	0.20	100 000

1.2.4 遗传学分析。*rla1*、*rla2* 分别与 B73 野生型回交,观察 F_1 表型,统计 F_2 群体中的野生表型和突变表型的数量。*rla1* 和 *rla2* 杂交,观察 F_1 后代表型。

2 结果与分析

2.1 突变体库建立 EMS 诱变分别得到 B73、郑 58 的 M_1 种子 9 736 和 9 258 粒,全部单粒播种,出苗 5 592 和 5 713 株,出苗率分别为 57.44% 和 61.71%。相同栽培条件下分别统计野生型 B73、郑 58 的出苗率分别为 92.72% 和 94.08%。 M_1 种子携带有大量的致死突变,包括无胚突变,印象种子萌发,因此 M_1 种子出苗率大幅度下降^[6]。B73、郑 58 的 M_1 植株自交分别获得 4 328 和 4 657 个 M_2 果穗,穗行播种成 4 328 和 4 657 行,单株分别有 69 265 和 77 026 株。

2.2 突变体表型统计 B73、郑 58 突变体库的 M_2 代反应了丰富的遗传变异,包括叶色、叶型、分蘖、表皮毛、抗性和株高等性状(表 2)。其中,矮化突变率最高,分别达到 0.608% 和 0.458%,而郑 58 的抗虫和抗旱表型的突变频率仅为 0.003%。

表 2 M_2 代突变体表型统计

表型	B73		郑 58	
	突变株数	突变率//%	突变株数	突变率//%
白化	93	0.134	86	0.112
黄化	142	0.205	93	0.121
棕色叶中脉	0	0	18	0.023
细叶	13	0.019	32	0.042
小叶夹角	12	0.017	8	0.010
分蘖	15	0.022	0	0
表皮毛多	23	0.033	0	0
抗虫	0	0	2	0.003
抗旱	0	0	2	0.003
匍匐茎	0	0	72	0.093
矮化	421	0.608	353	0.458
合计	719	1.038	666	0.865

2.2.1 叶色突变体。叶色突变体也称为叶绿素突变体^[7],B73 的 M_2 代有 93 株白化苗(图 1A),142 株黄化苗(图 1B),突变率分别为 0.134% 和 0.205%;郑 58 的 M_2 代中有 86 株白化苗(图 1C)和 93 株黄化苗(图 1D),突变率分别为 0.112% 和 0.121%。这类突变体直接或间接影响叶绿素的

合成或降解,绝大部分随着生长时间增长都枯萎死亡。但是某些浅绿色叶片突变体能够正常生长发育(图 1E)。

2.2.2 棕色叶中脉突变体。玉米叶中脉一般是浅绿色的,郑 58 的 M_2 群体有 9 个的家系 18 株棕色叶中脉突变体(*bm*, Brown midrib)(图 1F、G),变率为 0.023%。除了叶中脉,雄穗和茎秆也呈现棕色(图 1H、I)。*bm* 的木质素含量较低^[8-9],可提高青贮玉米的营养价值。但在 B73 背景下,没有得到 *bm* 的突变体。

2.2.3 叶型突变体。B73 和郑 58 的 M_2 群体里都有叶型突变体,包括叶片变细、叶夹角变小突变类型。B73 群体有 9 个家系 13 株细叶突变体(图 1J),郑 58 群体有 21 个家系 32 株细叶突变体(图 1K),突变率分别为 0.019% 和 0.042%。叶夹角突变体极少,B73 群体仅有 5 个家系 12 株小叶夹角突变体(图 1L),郑 58 群体有 3 个家系 8 株小叶夹角突变体(图 1M),突变率分别为 0.017% 和 0.010%。

2.2.4 分蘖突变体。玉米的近缘种大白草分蘖很多,玉米一般没有分蘖,在 B73 的突变库中发现了 3 个家系 15 株分蘖突变体(图 2A),突变频率为 0.022%。但在郑 58 背景下没有发现分蘖增加的突变体。

2.2.5 表皮毛增多突变体。表皮毛是植物组织表面一种毛状结构附属物,在 B73 的突变库中共发现了 7 个家系 23 株叶鞘表皮毛增多突变体(图 2B),突变频率为 0.033%。

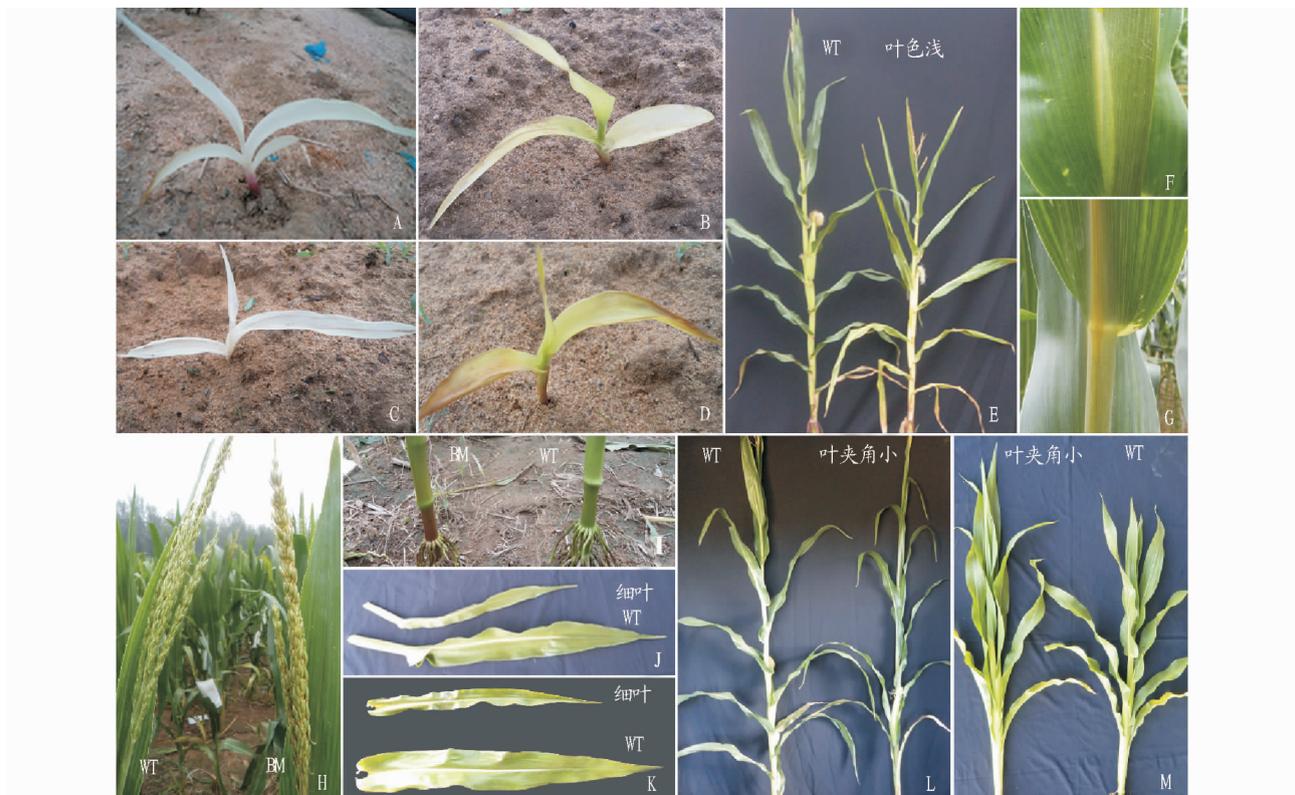
2.2.6 抗性突变体。从郑 58 的 M_2 群体中筛选到抗虫和抗旱突变体各 2 株(图 2C~E),此种突变类型较为少见,突变率都为 0.003%。

2.2.7 匍匐茎突变体。在郑 58 突变群体的 13 的家系里发现了 72 株匍匐茎突变体(图 2F),突变频率为 0.093%。此突变体茎秆匍匐在地,但可以正常开花结实。但在 B73 背景下没有筛选到匍匐茎的突变体。

2.2.8 矮化突变体。B73 和郑 58 经过 EMS 诱变后,株高受到很大影响,在突变体库中发现了大量的矮化突变体,也是最多的一类突变体,B73 突变群体有 285 个家系 421 株矮化突变体(图 2G),郑 58 突变群体有 198 个家系 353 株矮化突变体(图 2H),突变率分别为 0.608%、0.458%。

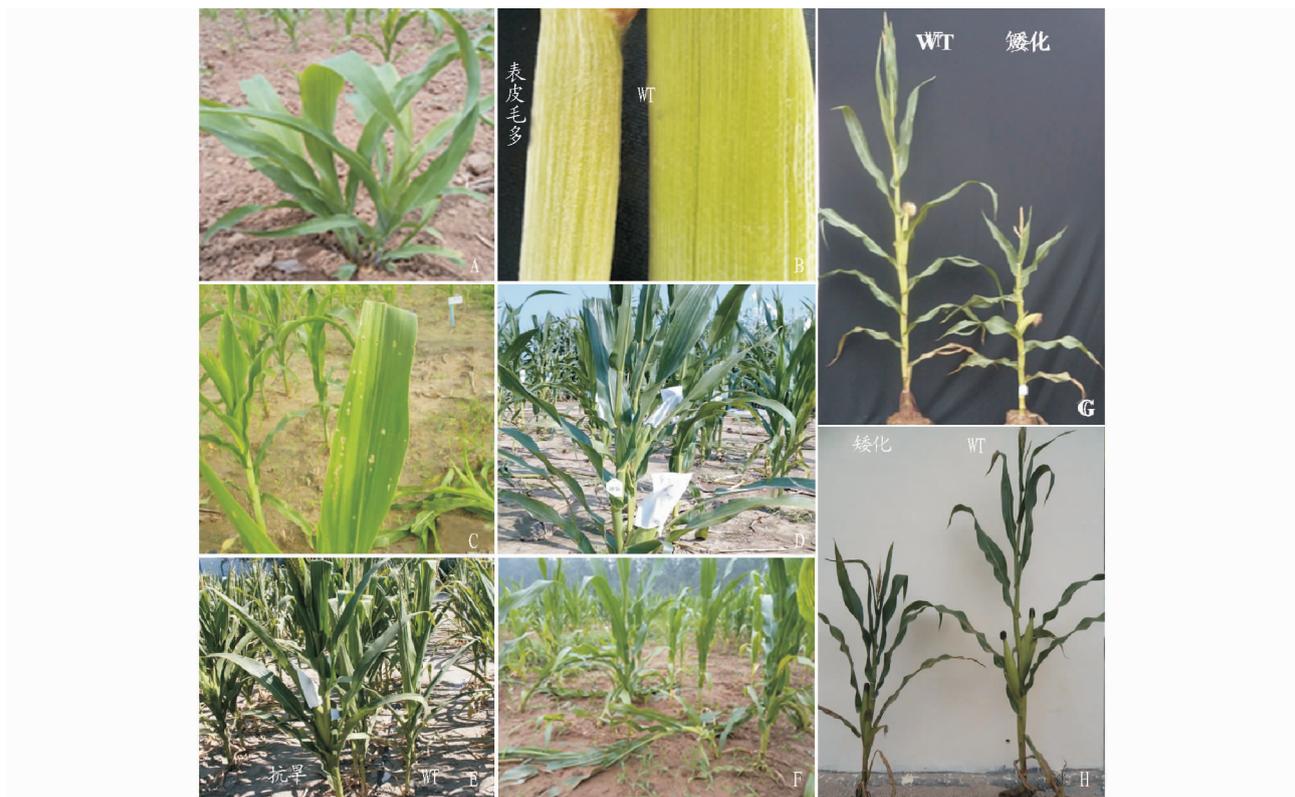
2.3 小叶夹角突变体表型鉴定及密植测产 小叶夹角是玉米优良的农艺性状,具有密植的潜力。从 B73 的 12 株小叶夹角突变体中选出 2 株(图 3A),这 2 株来自不同的 M_2 家系,将其命名为 *rla1*、*rla2*。这 2 个小叶夹角突变体表型相似,穗下叶夹角较开展,角度为 15 度,穗上叶片几乎紧贴茎干生长,叶片开展角度为 5°(图 3C),而野生型穗下叶片的开展角度为 55°,穗上叶片开展角度为 27°(图 3B)。进一步观察发现 *rla1* 和 *rla2* 突变体无叶舌(图 3D)。

在每种种植密度下,随机选取并统计 B73、*rla1*、*rla2* 的果穗各 15 穗,结果显示,在 66 667 株/hm² 密度下,野生型和突变体果穗大小和重量相差不大(图 3E 和表 3),经方差分析可知野生型和突变体单穗重差异不显著($P>0.05$)。随着种植密度增加,野生型和 2 个突变体单穗重都下降,但是突变体单穗重下降幅度相对较小;密度为 83 333 株/hm² 时,



注:A为B73白化苗;B为B73黄化苗;C为郑58白化苗;D为郑58黄化苗;E为B73浅绿色叶片突变体;F和G为郑58野生型和*bm*突变体的叶中脉;H为郑58野生型和*bm*的雄穗;I为郑58野生型和*bm*的茎秆;J为B73野生型和细叶突变体的叶片;K为郑58野生型和细叶突变体的叶片;L为B73野生型和小叶夹角突变体;M为郑58野生型和小叶夹角突变体。

图1 叶片突变体图片



注:A为分蘖突变体;B为表皮毛增多突变体;C和D为郑58野生型和抗虫突变体;E为郑58野生型和抗旱突变体;F为匍匐茎突变体;G为B73野生型和矮化突变体;H为郑58野生型和矮化突变体。

图2 茎秆及抗性突变体



图3 B73 野生型与 *rla1*、*rla2* 的叶片及果穗

rla1、*rla2* 单穗重降低 8.23% 和 8.08%；密度为 100 000 株/hm² 时，*rla1*、*rla2* 单穗重降低 15.22% 和 13.68%（表 3）。单位面积产量数据显示，在 66 667 株/hm² 密度下，*rla1*、*rla2* 与野生型的产量差异不显著（ $P > 0.05$ ）。随着种植密度提高，野生型产量下降，而 *rla1*、*rla2* 的产量提高。与 66 667

株/hm² 密度下的产量相比，在 83 333 株/hm² 密度下，*rla1*、*rla2* 分别增产 14.19% 和 14.67%；在 100 000 株/hm² 密度下，*rla1*、*rla2* 分别增产 27.18% 和 28.00%。在各种植密度下 *rla1*、*rla2* 的产量相近。可见 2 个叶夹角突变体适宜密植，且在试验条件下密植潜力高于 100 000 株/hm²。

表 3 单株及单位面积产量

密度 株/hm ²	单穗重//g			单穗重变化//%			密度//株/hm ²			产量//kg/hm ²		
	B73	<i>rla1</i>	<i>rla2</i>	B73	<i>rla1</i>	<i>rla2</i>	B73	<i>rla1</i>	<i>rla2</i>	B73	<i>rla1</i>	<i>rla2</i>
66 667	57.61	58.07	58.32	-	-	-	3 802.50	3 852.83	3 885.52	-	-	-
83 333	42.30	53.30	53.61	-26.58	-8.23	-8.08	3 491.83	4 399.55	4 455.42	-8.17	14.19	14.67
100 000	31.25	49.23	50.34	-45.75	-15.22	-13.68	3 082.84	4 899.87	4 973.62	-18.93	27.18	28.00

2.4 *rla1*、*rla2* 遗传学分析 *rla1*、*rla2* 各自回交 B73 的 F₁ 后代均表现正常的野生型叶夹角，F₂ 代出现野生表型和突变表型分离，经卡方检验， $\chi^2 < \chi_{0.05}^2 = 3.84$ （表 4），即野生表型和突变表型个体之比符合 3:1 分离比，即 *rla1*、*rla2* 都是单基因隐性突变。

由于 *rla1*、*rla2* 表型相似，密植产量相当，而且都是单基因隐性突变，因此将 *rla1* 和 *rla2* 杂交，其 F₁ 全部表现为小叶夹角，与亲代相似，未出现野生型表型，可见 *rla1* 和 *rla2* 是等位基因突变。

表 4 F₂ 分离群体统计结果

基因	野生表型	突变表型	3:1 分离 χ^2
<i>rla1</i>	573	168	2.02
<i>rla2</i>	607	181	1.63

3 结论与讨论

试验采用浓度为 0.067% 的 EMS 溶液分别处理 B73、郑

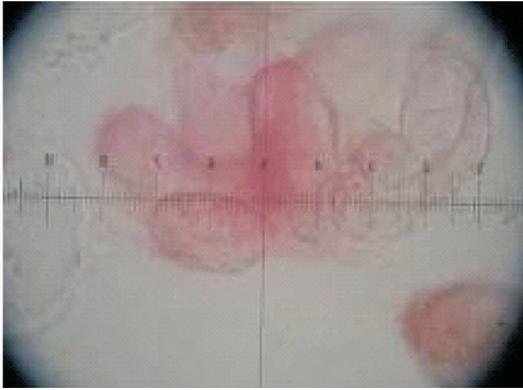
58 的成熟花粉，建立突变体库。在突变体 M₂ 代中出现了丰富的遗传变异，包括叶型、叶色、多分蘖、抗性和矮化等突变，肉眼可见的总变异率分别达到 1.038% 和 0.865%。B73 各类突变体的突变率在 0.017% ~ 0.608% 变化，郑 58 各类突变体的突变率在 0.003% ~ 0.458% 变化。2 个突变体库中出现的突变体种类并不完全相同。比如 B73 有表皮毛增多、多分蘖突变，而郑 58 没有此类突变；郑 58 有 *bm*、匍匐茎、抗虫和抗旱突变体，而 B73 没有。由此可见，即使诱变剂 EMS 的浓度相同，遗传背景不同的玉米自交系也会产生不同种类的突变体，这可能是由于玉米自交系之间变异较大导致的^[10]。

B73、郑 58 突变体库提供了丰富的种质资源，尤其是 *bm*、抗性突变体、矮化突变体和小叶夹角突变体，在玉米育种上具有应用价值。目前，已有的 4 个玉米 *bm* 突变体的木质素含量均降低^[11-12]，郑 58 突变体库中有 18 株 *bm* 突变体，

（下转第 3185 页）

延缓组织的衰老并增强蛋白质的合成。低浓度的生长素可促进植物的生长,高浓度的则抑制植物生长,甚至杀死植物,同时过高的细胞分裂素会导致愈伤组织的畸形发育,过低则

体现不出其作用,因此适当的细胞分裂素与生长素组合才能得到较高的出愈率,0.3 mg/L 6-BA 与 1.8 mg/L 2,4-D 组合,出愈率较高。



注:左图为处理组,右图为对照组。

图4 用间苯三酚对电场处理和未处理的外植体染色结果

电场处理外植体后,出愈率明显提高,特别是在 $f = 3.85$ kHz, $E = 2$ kV/cm, $T = 20$ min 时,下胚轴出愈率为 91.4%,高于未处理的出愈率 81.2%。并且电场处理后的外植体木质化程度加强,可能是促进木质素的沉积使细胞壁变得坚硬牢固,其具体原因需进一步去探讨。在后续的试验中,将会用不同激素浓度组合的培养基诱导胚状体,找出诱导分化率的最佳组合。因此,静电场对紫花苜蓿外植体的出愈率等均有刺激作用,但其作用机理仍有待今后继续研究。

参考文献

- [1] 王秀文,王荣毅. 静电高压场中植物生长的研究[C]//中国物理学会静电专业委员会学术及交流资料. 北京:中国物理学会,1983:21-25.
- [2] 叶家明. 静电高压场对植物有丝分裂的影响[C]//中国物理学会静电生物效应在农业上的应用学术交流资料. 北京:中国物理学会,1984:76-77.
- [3] 宋占海. 静电场处理作物种子对其活力的影响及机理初探[J]. 种子,1993(1):43-46.
- [4] 王莘,李肃华,闵伟红,等. 高压静电场对月见草种子萌发期的生物学

效应[J]. 生物物理学报,1997,13(4):668-670.

- [5] 吴旭红,孙为民,张红燕,等. 高压静电场对南瓜种子萌发及幼苗生长的生物学效应[J]. 种子,2004,23(2):27-30.
- [6] 王清元,卢贵忠,赵玉清. 高压静电场对水稻种子萌发的试验研究[J]. 云南农业大学学报,2005,20(1):147-150.
- [7] 邓红梅,韩寒冰,熊建平. 高压静电场对黄瓜种子萌发期生理指标的影响[J]. 武汉植物学研究,2006,24(1):87-89.
- [8] 白希尧,马文田,刘慎言,等. 静电技术在农业中的应用[J]. 自然杂志,1984,7(12):902-906.
- [9] 姜彦成,党荣理. 植物资源学[M]. 乌鲁木齐:新疆人民出版社,2002:165-166.
- [10] 闵继淳,肖凤. 新疆当家草种紫花苜蓿生产有关问题[J]. 新疆畜牧业,1986(S1):79-82.
- [11] 姚爱兴. 苜蓿组织培养研究进展[J]. 宁夏农学院学报,1991,12(1):60-64.
- [12] 张秀海. 植物抗旱基因工程研究进展[J]. 生物技术通报,2001(4):21-25.
- [13] CROUGHAN T P, STAVAREK S J, RAINS D W. Selection of a NaCl Tolerant Line of Cultured Alfalfa Cells[J]. Crop Science, 1978,18:959-963.

(上接第 3165 页)

进一步研究其秸秆中木质素的结构和含量,有望为生物乙醇生产提供优良资源,提高乙醇生产率。郑 58 的抗虫和抗旱突变体无其他不良性状,不用经过转基因审批,可直接用于抗虫和抗旱玉米育种。矮化玉米抗倒伏,耐密植,群体光能利用效率高,郑 58、B73 突变体库中矮化突变体最多,可用于矮化育种,培育耐密植型矮化玉米新品种。叶夹角是玉米株型的重要方面,小叶夹角可明显提高玉米的种植密度和群体光合效率,进而增加产量。小叶夹角突变体 *rla1*、*rla2* 株型紧凑,耐密植,而且密植潜力大于 100 000 株/hm²,为密植型玉米新品种的培育提供了宝贵的种质资源。

参考文献

- [1] 祝丽英,池书敏,刘志增,等. 甲基磺酸乙酯(EMS)在创造玉米新种质中的应用[J]. 玉米科学,2001,9(3):14-17.
- [2] 赵永亮,宋同明. 玉米化学诱变研究进展[J]. 华北农学报,1996,11(4):24-28.
- [3] 薛守旺,周洪生,邓迎海,等. 化学诱变及其在玉米育种上的应用[J].

玉米科学,1998,6(2):10-17.

- [4] 刘治先. 玉米育种新技术[J]. 玉米科学,1995,3(4):12-15.
- [5] NEUFFER M G. Paraffin oil technique for treating mature corn pollen with mutagens[J]. Maydic,1978,23(1):21-28.
- [6] BENNETZEN J L, HAKE S. Handbook of maize: Genetics and Genomics [M]. New York: Springer,2009:67-67.
- [7] 吕典华,宗学凤,王三根,等. 两个水稻叶色突变体的光合特性研究[J]. 作物学报,2009,35(12):2304-2308.
- [8] VIGNOLS F, RILGAU J, TORRES M A, et al. The brown midrib3 (bm3) Mutation in Maize occurs in the Gene Encoding Caffeic Acid O-Methyltransferase [J]. Plant Cell,1995,7(4):407-416.
- [9] 刘豪,许庆方. 褐色叶中脉突变体的研究进展[J]. 畜牧与饲料科学,2009,30(9):75-76.
- [10] BUCKLER E S, GAUT B S, MCMULLEN M D. Molecular and functional diversity of maize[J]. Curr Opin Plant Biol,2006,9(2):172-176.
- [11] MARITA J, VERMERIS W, RALPH J, et al. Variations in the cell wall composition of maize brown midrib mutants [J]. J Agric Food Chem, 2003,51(5):1313-1321.
- [12] BARRIÈRE Y, RALPH J, MÉCHIN V, et al. Genetic and molecular basis of grass cell wall biosynthesis and degradability. II. Lessons from brown midrib mutants [J]. C R Biologies,2004,327(9/10):847-860.