

甜玉米 EMS 突变体资源共享库的构建及初步鉴定

黎杰强^{1,3}, 陈舜权^{1,2}, 严 维^{1,2}, 陈舒静¹, 陈竹锋², 高彩吉¹, 唐晓艳^{1,2}

(¹ 华南师范大学生命科学学院, 广州 510631; ² 深圳市作物分子设计育种研究院,

深圳 518000; ³ 连州市东篱种养实业有限公司, 广东连州 513400)

摘要: 优良的种质资源是培育丰产、优质农作物新品种的基础和首要条件, 创制甜玉米突变体材料对优良甜玉米新品种选育和玉米分子育种研究具有重要的意义。本研究中, 采用甲基磺酸乙酯(EMS)诱变剂对甜玉米自交系华甜选 H-16-2-2-3 的花粉进行诱变及人工授粉, 构建甜玉米 EMS 诱变突变体资源库。通过田间筛选与表型考察, 共获得影响生育期、散粉抽丝间隔期、植株叶夹角、叶片大小、雄穗姿态、雄性育性、植株高、穗位高、穗行数、子粒顶端颜色、子粒大小、子粒皱缩程度等重要农艺性状的 M₂ 代突变体材料 24363 份。对其中 2000 份 M₂ 代突变体进行田间初步表型筛选, 并借助高通量测序分析对部分单隐性核基因突变引起的突变体进行基因定位分析。在上述工作基础上, 提出构建国内甜玉米种质资源共享库, 为甜玉米育种及基因功能研究提供宝贵的试验材料和基因资源, 促进甜玉米育种相关资源的共享。

关键词: 甜玉米; EMS 诱变; 突变体库; 表型筛选; 资源共享数据库

Construction of EMS-mutagenized Sweet Maize Mutant Resources Sharing Database and Primary Screening

LI Jie-qiang^{1,3}, CHEN Shun-quan^{1,2}, YAN Wei^{1,2}, CHEN Shu-jing¹, CHEN Zhu-feng²,

GAO Cai-ji¹, TANG Xiao-yan^{1,2}

(¹ School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631; ² Shenzhen Institute of Molecular Crop Design, Shenzhen 518000; ³ Lianzhou Dongli Planting and Farming Industrial Co., Ltd, Guang dong Lianzhou 513400)

Abstract: Elite germplasm resources are the basis and prerequisite for breeding new crop varieties of high yield and quality. Creating sweet maize mutant library is of great significance to the breeding of new varieties and molecular breeding research of maize. In this study, ethyl methylsulfonate (EMS) was used to mutagenize the pollen of sweet maize inbred line 'Hua-tian-xuan H-16-2-2-3' for artificial pollination and construction of the first sweet maize EMS-mutagenized mutant library in China. Through field screening and phenotypic investigation, we obtained 24363 mutant plants of M₂ generation with important agronomic traits of growth period, anthesis-silking interval, angle between stem and upper leaves, leaf size, tassel posture, male fertility, plant height, ear height, ear row number, grain color, grain size, grain shrinkage affected. Preliminary phenotypic screening of 2000 M₂ mutants was carried out in the field, and gene mapping of some mutants caused by single recessive nuclear gene mutation was analyzed by high throughput sequencing. On the basis of the above work, the first domestic sweet corn germplasm resource sharing database was proposed to provide valuable experimental materials and genetic resources for sweet corn breeding and gene function research, and to promote the sharing of sweet corn breeding related resources.

Key words: sweet maize; EMS mutagenesis; mutant library; phenotypic screening; resources sharing database

收稿日期: 2019-07-10 修回日期: 2019-08-23 网络出版日期: 2019-09-26

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190730001>

第一作者研究方向为玉米遗传育种, E-mail: lijieq@scnu.edu.cn

通信作者: 唐晓艳, 研究方向为作物分子育种, E-mail: txy@frontier-agcom

基金项目: 广东省第三批“扬帆计划”南方牧草种质创新及产业化创新团队项目(2015YT02H032)

Foundation project: Southern Forage Germplasm Innovation and Industrialization Innovation Team Project of the Third Batch of “Yang Fan Plan” of Guangdong Province (2015YT02H032)

甜玉米,也被称为果蔬玉米,不但具有脆甜的口感,而且子粒营养丰富^[1],具有较高的糖分、蛋白质、脂肪、维生素和人体必需的氨基酸等,常作为营养和保健食品之一^[2]。随着人们对甜玉米的喜爱,对甜玉米品种要求也逐渐提高。种质资源的创制及筛选是甜玉米新品种选育的基础,优异的种质是培育高产优质多抗新品种的前提条件^[3]。然而,当前我国甜玉米育种及相关研究却远远落后于普通玉米,主要存在种质资源匮乏、遗传类型单一、选育技术水平相对落后、品种遗传多样性较差等问题^[4]。因此,创新并丰富甜玉米种质资源多样性是我国甜玉米育种发展亟待解决的问题。

甲基磺酸乙酯(EMS, ethyl methylsulfonate)是一种应用广泛的化学诱变剂^[5],相对其他诱变剂而言,其诱变效率较高,且多为单个位点突变,在后代中遗传稳定,便于获得有育种价值的突变体材料^[6]。国内外研究中,已有大量研究通过诱变方法获得多种突变体育种材料,创制了多种植物种质资源。Maluszynski 等^[7]研究报道,通过 EMS 诱变获得大麦、小麦和棉花等主要农作物突变体材料,并用于育种改良;同时,诱变技术也成为观赏植物如秋海棠、菊花、康乃馨、大丽花等新品种创制的重要技术途径。Garcia 等^[8]通过化学诱变剂 EMS,诱变番茄种子,获得感兴趣的表型突变体。Acanda 等^[9]使用 EMS 对葡萄胚胎细胞悬浮液进行诱变,建立了葡萄突变体库。张凤启等^[10]利用 EMS 诱变甘蓝型油菜种子,鉴定了 M_2 代群体中子叶、叶片、花器、株型、角果、种皮等突变频率,创制了甘蓝型油菜品种遗传改良基础材料。Chang 等^[11]利用 EMS 对水稻进行诱变,获得水稻核雄性不育突变体,并利用核雄性不育基因 *OsNPI* 构建了水稻第 3 代杂交育种技术体系。EMS 在玉米诱变育种和功能基因研究的应用始于 1978 年,Neuffer 等^[12]采用 EMS 处理花粉成功获得了玉米突变体。随后,美国高斯德公司利用 EMS 诱变自交系 UE95,结合咪唑啉酮除草剂筛选,获得抗除草剂的突变体,在此突变体基础上培育出全球第 1 个抗除草剂咪唑啉酮的杂交种 G8532,并成功进行了商业化推广^[13]。樊双虎等^[14]利用 EMS 诱变,得到了叶夹角小、棕色叶中脉、矮化、具有抗性育种价值等突变体。Brunelle 等^[15]利用 EMS 处理花粉,筛选获得 45 个种胚发育突变体,并对其中 34 个突变体,通过解剖成熟胚胎对突变体的胚胎表型进行了细致的分析。陈绍江等^[16]则针对玉米农大 108 杂交种,通过 EMS 处

理其花粉,筛选获得了高油玉米突变体。李海军等^[17]选用生产上的玉米骨干自交系,使用不同浓度的 EMS 处理其成熟花粉,并在后代群体中筛选获得早熟、晚熟和其他有利用价值的株型变异突变体。Lu 等^[6]通过 EMS 处理玉米 B73 自交系,并结合外显子捕获技术与新一代测序技术检测玉米的突变位点,分析其位点对基因造成的影响,从而得到了大规模的普通玉米的 EMS 诱变突变体库。由此可见,利用 EMS 诱变玉米花粉,可以快速、有效地获得新的玉米种质资源。

随着多个玉米基因组测序和组装的完成,人们发现玉米基因组非常复杂,不同玉米品种间基因组差异大,不同玉米自交系间存在丰富的遗传多样性^[18-19]。与普通玉米相比,甜玉米虽然只是在普通玉米的基础上突变了多个糖分相关的基因^[20],但不同基因背景来源的甜玉米在其他重要农艺性状上也存在较大的差别^[21-22]。以优质甜玉米自交系为亲本构建 EMS 诱变突变体库,可为甜玉米育种和功能基因研究提供宝贵的材料。截至目前,国内外尚未见关于构建甜玉米 EMS 诱变突变体库及相关研究的报道。本研究利用 EMS 诱变甜玉米自交系华甜选 H-16-2-2-3 花粉进行人工授粉,构建了甜玉米 EMS 突变体资源库,随后在田间对突变体 M_1 代和部分 M_2 代群体进行初步表型考察与鉴定,包括生育期、散粉抽丝间隔期、植株叶夹角、叶片大小、雄穗姿态、雄性育性、株高、穗位高、穗行数、子粒颜色、子粒大小、子粒皱缩程度等。同时,本研究还将针对部分突变体进行高通量测序分析,获得 EMS 诱变突变位点信息,并对相关候选基因进行定位,进一步结合表型基因型数据,构建国内首个甜玉米突变体资源共享库,为选育优良的甜玉米新品种、基因功能研究和优异基因的挖掘及应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 甜玉米材料及田间种植管理

甜玉米自交系材料华甜选 H-16-2-2-3 由本课题组前期自主选育,其生育期为 80~85 d,种植适应性广。2017 年春季在深圳市作物分子设计育种研究院光明试验基地,以行距 65 cm、株距 30 cm 进行单粒播种,田间正常管理。在玉米雌穗抽丝之前,将全部雌穗(第 1 穗)进行人工套袋,防止串粉。同时,在诱变授粉的前一天下午将开始散粉的雄穗进行套袋,方便收集用于诱变的花粉。

1.2 诱变剂制备及诱变方法

本研究采用 EMS 作为甜玉米花粉诱变剂,在诱变试验前一天晚上采用液体石蜡油 (Sigma 公司) 配制浓度为 0.667% 的 EMS 诱变剂母液,并在振荡搅拌器上搅拌过夜。准备花粉诱变所需试剂耗材以及防护用品。甜玉米花粉诱变及授粉流程参照 Neuffer^[12] 的方法进行操作,诱变处理当天,在玉米开始散粉时,及时收集花粉,并用 100 目筛子过滤去除花药。同时,用液体石蜡油将 0.667% 的 EMS 诱变剂母液稀释为 0.0667% 工作液备用。之后,在室温条件下按照花粉:工作液=1:10 (V/V) 的比例充分混匀,使花粉与诱变剂充分接触。随后每 5 min 充分混匀 1 次,避免花粉成团结块。处理 45 min 后,用毛笔蘸取花粉涂抹玉米雌穗上长 1~2 cm 的花丝,进行人工授粉,20 min 后丢弃未用完的花粉。标记已完成人工授粉植株,并套袋防止串粉。

1.3 M₁ 代、M₂ 代种植及表型考察

对 M₁ 代材料进行单粒播种,自交授粉后单株收种获得 M₂ 代;对 M₁ 代材料中出现的不育株,则以野生型为父本/母本,进行杂交以确保留种。从 M₂ 代中随机选取 2000 份材料,分小区种植,每个 M₂ 代株系播种 20 株,行距 65 cm,株距 30 cm,田间正常管理。在玉米雌穗吐丝之前,进行人工套袋,防止串粉。针对 M₂ 代材料中出现的不育株,以 M₂ 代中同一株系的可育材料作为父本/母本,进行杂交以确保留种。按照玉米 DUS 测试方法^[23],对甜玉米突变体植株、果穗及子粒表型进行考察及筛选,具体考察的表型及数据包括:播种期、抽雄期、散粉期、抽丝期、植株上部叶夹角、叶片绿色程度、雄穗侧枝夹角、雄穗侧枝弯曲程度、雄性育性、株高、穗位高、果穗的穗行数、子粒顶端颜色、粒型、粒长、粒宽、子粒皱缩程度等。

1.4 数据统计分析

对甜玉米突变体库 M₁ 代、M₂ 代材料表型进行初步鉴定,并拍照和记录,计算反映 EMS 诱变效率的各种指标:有效果穗率=收获诱变果穗数/田间种植总株数(每株只诱变授粉 1 穗);平均每穗结实粒数=收获总粒数/收获果穗数;收获诱变种子总粒数=M₁ 代种子重量/种子千粒重×1000;出苗率=出苗株数/播种种子总数;成苗率=收获穗数/播种种子总数;突变率=各突变表型株数/出苗株数;卡方检验($\chi^2_{3:1}$)=(实际值-理论值)×(实际值-理论值)/理论值。

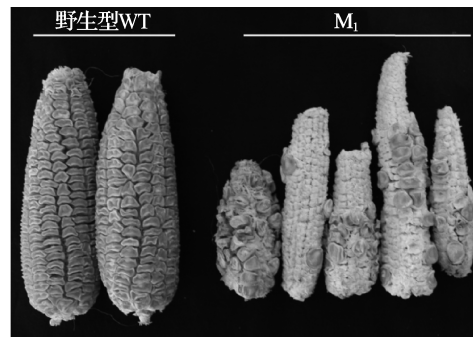
1.5 突变体测序取样方法

选取突变体 M₂ 代群体中正常子粒和突变体子粒各 50 粒,进行单粒播种,待出苗后收集各植株叶片。提取突变体叶片总 DNA 和 RNA,并分别等量混合 DNA 和 RNA,形成突变体 DNA 和 RNA 混池;取野生型叶片提取 DNA,用于后续表型-基因型连锁关系验证。

2 结果与分析

2.1 M₁ 代突变体种子的获得

采用 EMS 诱变剂处理花粉后,对田间共 10200 个单株进行人工授粉,共收获诱变果穗 5683 穗,有效果穗率约为 55.72%。一般来说,经过 EMS 诱变处理后的花粉活力会受到一定程度的影响,致使花丝无法完成正常的受精过程,严重影响玉米果穗上子粒的正常灌浆和正常发育。因此,M₁ 代果穗的子粒结实显著偏少(图 1),平均每穗结实粒数仅约为 10 粒。诱变后的子粒多表现为空瘪、无胚、千粒重降低等,种子千粒重为 318 g,共获得 M₁ 代种子为 18.9 kg(干重,约 59434 粒)。



WT: Wild type, M₁: M₁ generation after EMS mutagenesis

图 1 野生型与 M₁ 代突变体果穗表型

Fig.1 Phenotypes of ears of wild type and M₁ mutants

2.2 甜玉米突变体 M₁ 代植株表型鉴定及筛选

获得的 M₁ 代种子全部于当年正季单粒播种,共出苗 32929 株,出苗率为 55.40%;随后单株收种共获得 M₂ 代突变体材料 24363 份,成苗率约为 40.99%。甜玉米突变体 M₁ 代幼苗期,多出现生长缓慢,苗势弱,生长畸形,黄化、白化致死等突变性状。其中,出苗时间较野生型最早早 5 d,最迟晚 7 d。苗期白化的突变频率约为 1.16%;苗期生长畸形较少,突变率为 0.28%。M₁ 代在生长发育过程中,矮化突变株高达 1288 株,突变率为 3.91%。M₁ 代成熟期也出现雄穗发育畸形突变,突变频率为 2.78%;雄性不育的突变率为 0.07%。

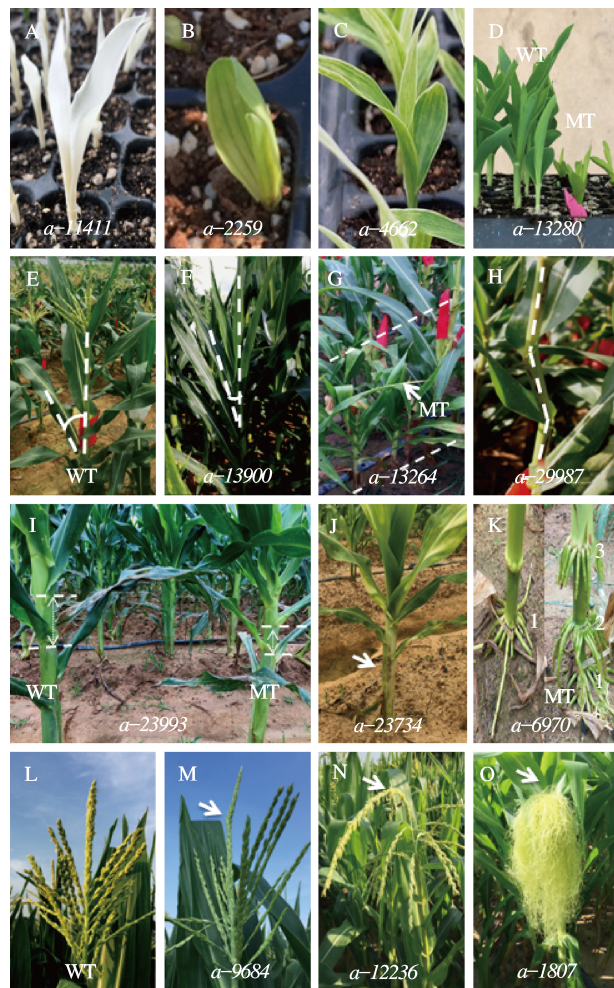
2.3 甜玉米突变体 M₂ 代表型筛选

从收获的 M₂ 代中抽选 2000 份突变体进行田间种植,并分别在苗期、生殖生长期、鲜食期和种子成熟期对表型进行考察和筛选。经初步统计分析,在 M₂ 代群体中,苗期叶色、叶形、苗势等多发生突变;营养生长期出现植株的高度、茎秆形状、叶夹角、叶片绿色程度等性状突变;生殖生长期的雄穗出现高温敏感、发育异常、雄性不育、穗型改变等突变体;果穗在鲜食期出现子粒脱水速率、子粒胚乳及顶端颜色突变等;在种子成熟期,出现子粒的皱缩程度、顶端颜色以及胚乳发育等不同突变表型(图 2、图 3)。

2.3.1 突变体苗期表型观察及筛选 突变体 M₂ 代材料采用营养土育苗方式进行育苗,并在苗期进行表型初筛。经观察发现, M₂ 代群体中出现多种叶色突变体,如白化突变体 *a-11411*, 苗期全株白色,三叶期后叶片出现萎蔫且渐转褐色,逐渐死亡(图 2A);生长受阻,叶色明显偏黄,苗期植株生长缓慢且致死突变体 *a-2259*(图 2B);苗期叶片退绿突变体 *a-4662*, 苗期叶片出现条纹表型,生长较野生型迟缓,叶尖变白且生长受阻,植株生长缓慢致死(图 2C);苗期长势迟缓,植株矮化,叶面积变小突变体 *a-13280*(图 2D)等。初步统计 2000 份 M₂ 代突变体中的突变概率发现,白化突变频率较高,约为 0.15%,而条纹退绿叶片的突变率较低,约为 0.05%,这与普通玉米 EMS 诱变相关表型的突变率相近^[14]。

2.3.2 突变体营养生长期表型观察及筛选 存活的 M₂ 代幼苗在三叶一心期移栽至田间,统一正常管理,考察并记录各植株生长发育相关性状。野生型植株为半紧凑型,茎秆直立且粗壮,株高约 165 cm,叶片数 16~18 叶,叶片宽为 6~7 cm,叶片深绿色,叶尖向下弯曲,穗上叶夹角为 55~65°(图 2E)。而 M₂ 代植株在营养生长期,则出现叶夹角大小变化、“Z”型茎秆、矮化、条纹叶片及植株早衰等突变表型。其中,叶夹角突变体 *a-13900* 的叶片宽度变窄,叶夹角变小为 30~35°,较野生型减少 20~35°(图 2F);植株矮化突变体 *a-13264* 的株高明显变矮(图 2G);茎秆形态变异突变体 *a-29987* 的茎秆弯曲呈“Z”型,但植株高度与野生型无明显差异,叶片与野生型相似(图 2H)。茎秆节间长度是影响玉米倒伏抗性的因素之一, M₂ 代突变体群体中,也发现了玉米节间变短突变体(如突变体 *a-23993*),在玉米抽雄期,突变体第 6~8 节节间明显短于野生型同一节间长度(图 2I);茎秆颜色突变体 *a-23734* 茎秆颜色变白,叶色淡绿色,植株发育缓慢(图 2J);茎秆

基部支持根数量增加的突变体 *a-6970*,支持根比野生型植株的多 2 倍,抗倒伏能力增强(图 2K)。突变率统计结果表明,在 2000 份 M₂ 代突变材料中,矮化突变体出现频率最高,突变率约为 0.55%,而茎秆颜色突变材料最少,其突变率约为 0.05%。



A: 白化突变体 (*a-11411*); B: 生长受阻突变体 (*a-2259*); C: 条纹叶片突变体 (*a-4662*); D: 矮化突变体 (*a-13280*); E: 野生型植株; F: 叶夹角突变体 (*a-13900*); G: 矮化突变体 (*a-13264*); H: “Z”型茎秆突变体 (*a-29987*); I: 茎秆节间长度突变体 (*a-23993*); J: 茎秆颜色突变体 (*a-23734*); K: 茎秆基部支持根突变体 (*a-6970*); L: 野生型雄穗; M: 雄穗不育突变体 (*a-9684*); N: 雄穗顶端下垂突变体 (*a-12236*); O: 雄穗发育突变体 (*a-1807*); WT: 野生型; MT: 突变体

图 2 野生型及 M₂ 代突变体表型

Fig.2 Phenotypes of wild type and M₂ mutants

2.3.3 突变体生殖生长期雄穗表型观察及筛选

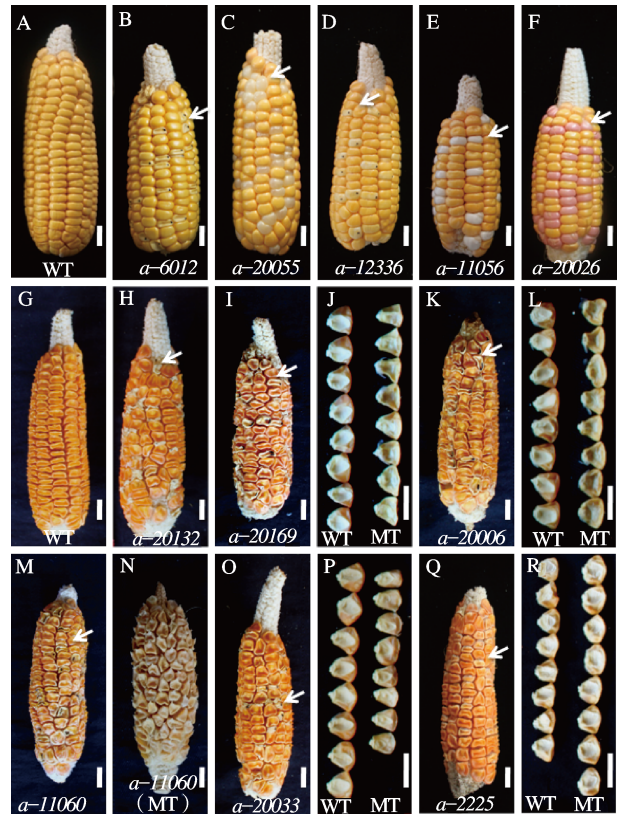
甜玉米从营养生长期进入生殖生长期后,会逐渐分化出雄穗和雌穗,并通过双受精过程产生种子。野生型亲本雄穗一般有 12~14 个分枝,雄穗分枝与主轴夹角 $60^{\circ}\sim 65^{\circ}$,花粉量充足(图 2L)。雄穗不育突变体 *a-9684*,在抽雄期至盛花期无花药不外露,花药不开裂,不能产生可育花粉(图 2M);雄穗顶端下垂突变体 *a-12236*,其雄穗主轴和分枝较柔软,分枝数量为 10~12 个,花粉量减少(图 2N);雄穗发育突变体 *a-1807*,在雄穗上长出大量花丝,雄穗发育异常,不能正常散粉(图 2O)。统计各突变体雄穗表型发现, M_2 代中出现雄性不育突变株系较多,雄性不育突变率高达 1.15%。

2.4 胚乳发育突变体表型及遗传分析

甜玉米子粒是决定甜玉米商品外观和口感品质的重要因素。经过筛选,本研究获得多个具有潜在应用价值的甜玉米子粒突变育种材料,如子粒颜色、大小和皱缩程度突变体等(图 3)。初步统计 2000 份 M_2 代材料发现,有 1.75% 的突变体胚乳发育发生变异。对部分胚乳突变体中突变表型与正常表型子粒的数目进行统计和卡方检验($\chi^2_{3:1}$),发现这些突变体的表型均由单隐性核基因控制(表 1)。这些突变体材料经过多代自交繁殖,剔除与突变表型无关的突变位点,即可获得可应用于甜玉米育种的稳定遗传株系。

2.4.1 突变体成熟期子粒突变表型观察及筛选

对 M_2 代突变体单株进行人工授粉,于完成授粉 30 d 采收果穗,并与野生型果穗进行比较,考察突变体果穗表型并标记相应信息。野生型果穗子粒顶端颜色为黄色,果穗子粒饱满(图 3A)。与野生型相比, M_2 代突变体子粒主要突变表型有子粒脱水速率快、子粒凹陷、饱满度较小,如突变体 *a-6012*(图 3B);子粒突变为水晶透明状,子粒胚乳发育发生突变,且突变子粒无胚,无法繁殖后代,如突变体 *a-20055*(图 3C);子粒顶端颜色突变,出现淡黄色(如突变体 *a-12336*,图 3D)、白色(如突变体 *a-11056*,图 3E)、粉红色(如突变体 *a-20026*,图 3F)等。通过观察发现,子粒突变体中突变子粒与正常子粒比例大多接近 1:3。卡方检验计算结果显示(表 1),突变体 *a-11056* 的检验值($\chi^2_{3:1}=0.06$)最小,其他突变体检验值($\chi^2_{3:1}$)均小于 $\chi^2_{0.05}$ 值($\chi^2_{0.05}=3.84$),说明这些子粒性状突变体可能由单隐性核基因控制。



A: 野生型(授粉 30 d); B: 子粒脱水速率突变(*a-6012*); C: 子粒突变为水晶状(*a-20055*); D: 子粒颜色突变为淡黄色(*a-12336*); E: 子粒颜色突变为白色(*a-11056*); F: 子粒颜色突变为粉红色(*a-20026*); G: 野生型干果穗(授粉 35 d); H: 子粒灌浆异常突变体杂合体果穗(*a-20132*); I: 子粒顶端颜色突变体杂合体果穗(*a-20169*); J: 野生型及子粒顶端颜色突变体种子(*a-20169*); K: 子粒种胚发育突变体杂合体果穗(*a-20006*); L: 野生型及子粒种胚发育突变体种子(*a-20006*); M: 子粒胚乳皱缩发育突变体杂合体果穗(*a-11060*); N: 子粒胚乳皱缩发育突变体纯合体果穗(*a-11060*); O: 子粒胚乳发育突变体杂合体果穗(*a-20033*); P: 野生型及子粒胚乳发育突变体种子(*a-20033*); Q: 子粒宽度突变体杂合体果穗(*a-2225*); R: 野生型及子粒宽度增加的突变体种子(*a-2225*);

标尺为 1 cm

A: Wild type (30 DAP), B: Rapid dehydration grain mutant (*a-6012*), C: Crystal-like grain mutant (*a-20055*), D: Pale yellow grain mutant (*a-12336*), E: White grain mutant (*a-11056*), F: Pink grain mutant (*a-20026*), G: Dried wild type ear (35 DAP), H: Grain filling mutant heterozygous ear (*a-20132*), I: Grain cap color mutant homozygous ear (*a-20169*), J: Wild type and grain cap color mutant seeds (*a-20169*), K: Embryo development mutant heterozygous ear (*a-20006*), L: Wild type and embryo development mutant seeds (*a-20006*), M: Endosperm shrinkage mutant heterozygous ear (*a-11060*), N: Endosperm shrinkage mutant homozygous ear (*a-11060*), O: Endosperm development mutant heterozygous ear (*a-20033*), P: Wild type and endosperm development mutant seeds (*a-20033*), Q: Grain width mutant heterozygous ear (*a-2225*), R: Wild type and increased grain width mutant seeds (*a-2225*), Scale bar: 1 cm

图 3 突变体 M_2 代子粒及种子发育表型

Fig.3 Phenotypes of kernels and seed development of M_2 mutants

2.4.2 突变体收获期种子胚乳发育表型观察及筛选
甜玉米一般在授粉 35 d 后即可收获成熟种子。野生型种子顶端颜色为深黄色,种子皱缩程度较小,种胚较为明显,能正常发育萌发(图 3G)。而 M₂ 代突变体种子则出现灌浆异常,子粒种皮颜色突变,胚乳发育突变,种胚发育不正常,子粒大小及千粒重等突变。灌浆异常突变体 *a-20132*(图 3H),可能受花粉活力、雌穗花丝识别花粉途径、灌浆发育等生殖发育过程影响,导致子粒发育受阻,灌浆不饱满,子粒空瘪,无法正常发芽和繁殖^[24-25];子粒颜色突变体 *a-20169* 子粒为淡黄色,子粒宽度变小(图 3I、J);无种胚突变体 *a-20006*,种子无法正常萌发(图 3K、L);子粒皱缩突变体 *a-11060* 可正常结实,在鲜食期间

通过口感初步判断,皱缩纯合突变果穗的甜度高于野生型鲜穗甜度(图 3M、N);另一种灌浆突变的子粒,突变体 *a-20033* 子粒宽度显著小于野生型子粒宽度,种胚及胚乳变小,千粒重减少,但仍可以正常萌发(图 3O、P);而子粒大小突变体 *a-2225* 子粒长度与野生型无明显变化,但子粒宽度显著比野生型子粒增加(图 3Q、R)。同样的,统计这些子粒突变材料的表型分离比,并进行卡方检验,发现突变子粒与正常子粒比例均接近 1:3(表 1),提示这些突变体的表型可能由单隐性核基因控制。这些子粒突变材料,可作为玉米子粒发育相关研究的材料,也为甜玉米新品种选育提供更多多样性的种质资源。

表 1 M₂ 代子粒突变性状统计分析
Table 1 Statistical analysis of grain mutation traits in M₂

编号 Mutant ID	突变类型 Type of mutant	野生型子粒数量 Number of wild type grains	突变体子粒数量 Number of mutant grains	卡方检验 $\chi^2_{3:1}$ $\chi^2_{3:1}$ test
<i>a-6012</i>	子粒脱水速率加快	176	49	1.25
<i>a-20055</i>	透明状子粒	198	51	2.71
<i>a-12336</i>	淡黄色子粒	158	40	2.43
<i>a-11051</i>	淡黄色子粒	183	64	0.11
<i>a-20169</i>	淡黄色子粒	141	56	1.23
<i>a-11055</i>	白色子粒	194	62	0.08
<i>a-11056</i>	白色子粒	98	31	0.06
<i>a-20026</i>	粉红色子粒	177	46	2.27
<i>a-20132</i>	子粒灌浆异常	172	44	2.47
<i>a-20006</i>	子粒种胚发育异常	187	53	1.09
<i>a-11060</i>	子粒胚乳皱缩	223	78	0.13
<i>a-20033</i>	子粒变小、胚乳发育异常	193	52	1.86
<i>a-2225</i>	子粒宽度增加	168	66	1.28

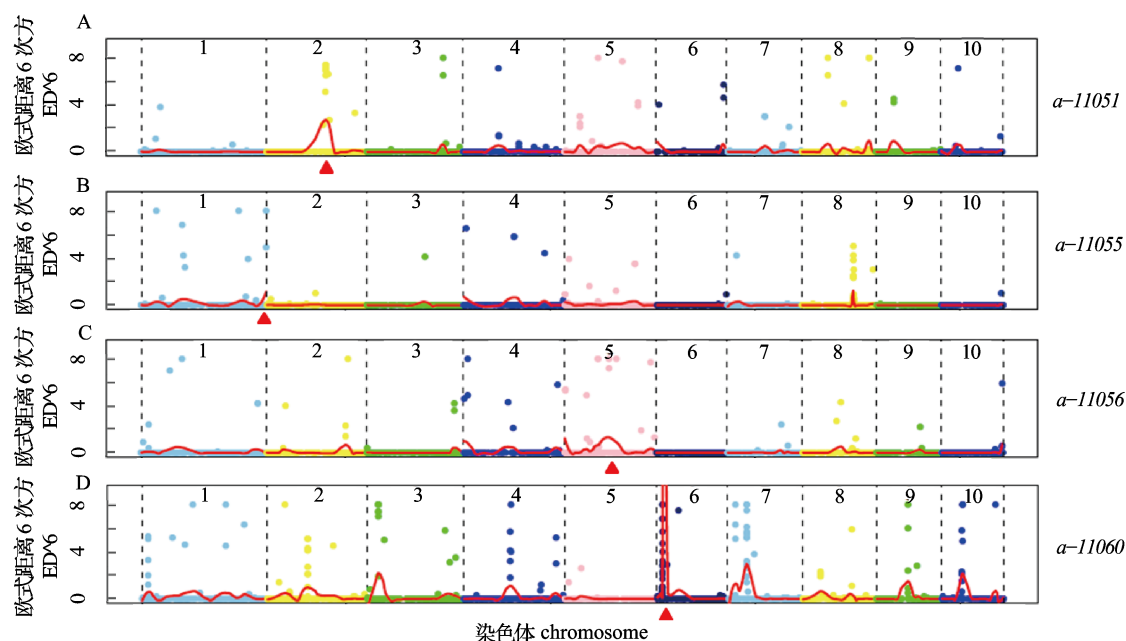
2.5 甜玉米突变体候选基因初步定位及分析

突变基因的定位和克隆对于探究未知基因功能,解析基因间复杂的互作网络,挖掘具有生产应用价值基因并应用到生产实践中至关重要。本研究选取多个单隐性核基因控制的子粒性状突变体,如 *a-11051*、*a-11055*、*a-11056*、*a-11060* 等,按照突变体测序所需取样方法,对多个突变体 RNA 混池进行测序(7 G/样),结合 SIMM 基因快速定位方法^[26],通过比较不同突变体与普通玉米 B73 参考基因组(v4)间的多态性位点,对突变基因进行初步定位,获得与性状相关的候选位点(图 4)。分析结果显示,突变体 *a-11051* 候选突变位点可能位于 2 号染色体(图 4A);突变体 *a-11055* 候选突变位点可能

位于 1 号染色体(图 4B);*a-11056* 候选突变位点可能位于 5 号染色体(图 4C);突变体 *a-11060* 候选突变位点可能位于 6 号染色体(图 4D)。

3 讨论

甜玉米营养丰富、经济效益高、市场前景大,随着甜玉米产业的迅速发展,人们对甜玉米品种要求逐渐提高。因此,甜玉米育种工作需以短、平、快手段,选育优良品种满足市场需求^[2-4]。但由于甜玉米育种方法体系显著落后于普通玉米,且种质资源狭窄,难以育成具有重大突破的优良品种。而传统玉米种质资源选育周期长、速度慢、效率低^[27],玉米种质资源储备不足、种质创新缺乏动力^[28],无法满足



不同颜色的点代表不同染色体上的突变位点
ED: Euclidean distance, the dots in various colors represent the mutations on each chromosome

图4 部分籽粒发育突变体 SIMM 分析结果

Fig.4 SIMM analysis of some of the grain development mutants

当前生产对优良品种的需求。我国甜玉米的材料血缘来自国外的少数几个品种,导致目前育成的多数甜玉米遗传背景单一^[29],极大制约了甜玉米育种研究的发展。因此,创制优异甜玉米种质资源库,对挖掘甜玉米优异种质材料具有重要意义。

自1978年Neuffer等^[12]用EMS处理花粉并成功获得玉米突变体以来,相关突变体已陆续应用到玉米诱变育种及功能基因研究中。通过EMS诱变甜玉米花粉构建突变体库,创制甜玉米种质材料,有利于快速选育出优质的自交系,提高种质创新水平,从而提高甜玉米育种的工作效率。本研究通过EMS诱变甜玉米自交系华甜选H-16-2-2-3花粉,结合表型考察及鉴定,筛选获得了大量具有生产应用价值的甜玉米突变体,包括种胚、子粒颜色、子粒大小、脱水速率和品质等发生变异的突变体。此外,本研究也获得了大量可用于基因功能研究的突变体材料,如茎秆形态突变、雄穗发育异常、雄穗高温敏感、雄穗分枝数目及与主轴夹角变异、开花-吐丝间隔期、穗位高、叶片大小改变以及果穗行数增加等突变体材料,并通过在不同时期分批种植的方法筛选获得了多个耐热、抗旱、耐冷等抗逆性突变体,可为研究玉米生育期^[30]、耐密植^[31]、生物量^[32]、抗倒伏^[33]、穗行数^[34]、种胚发育^[35]、种皮厚度^[36]、种皮颜色^[37]、子粒储存和运输^[38]等提供优良的基础试

验材料,为甜玉米种质创新、品种遗传改良提供珍贵的中间材料和育种资源。后续,我们将以甜玉米突变体库材料为出发点,结合表型-基因型数据及部分基因定位信息,构建甜玉米种质资源共享库,并以签订种子订购或合作开发协议的方式,为甜玉米育种和基因功能研究人员提供各类突变体种子。此外,我们还将提供表型和基因型上传渠道,为甜玉米的育种和基因功能研究提供规范化和信息共享平台,以此实现资源共享、信息互通,加快甜玉米相关研究的进程。

本研究构建的甜玉米EMS诱变突变体库,不仅为甜玉米基因功能研究提供了重要的遗传材料,同时也为甜玉米新品种培育创制了更丰富的优异种质资源。今后的研究中,我们将进一步采用生物信息学手段,对突变体功能基因进行定位,并结合多组学数据分析和遗传研究,构建甜玉米种质资源共享数据库。

参考文献

- [1] Ibrahim K E, Juvik J A. Feasibility for improving phytonutrient content in vegetable crops using conventional breeding strategies: case study with carotenoids and tocopherols in sweet corn and broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(11): 4636-4644
- [2] 胡建广,王志明,李余良,刘建华. 我国甜玉米育种研究概况与发展方向. *玉米科学*, 2004, 12(1): 12-15

- Hu J G, Wang Z M, Li Y L, Liu J H. General situation and development direction of sweet maize breeding in China. *Journal of Maize Sciences*, 2004, 12 (1): 12-15
- [3] 段灿星,王晓鸣,武小菲,杨知还,宋凤景,赵立萍,孙素丽,朱振东. 玉米种质和新品种对腐霉茎腐病和镰孢穗腐病的抗性分析. *植物遗传资源学报*, 2015, 16 (5): 947-954
- Duan C X, Wang X M, Wu X F, Yang Z H, Song F J, Zhao L P, Sun S L, Zhu Z D. Analysis of maize accessions resistance to *Pythium* stalk rot and *Fusarium* ear rot. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2015, 16 (5): 947-954
- [4] 姚文华,韩书莉,汪燕芬,谭静,徐春霞,陈洪梅,番兴明. 我国甜玉米育种研究现状与发展对策. *中国农业科技导报*, 2011, 13 (2): 1-8
- Yao W H, Han X L, Wang Y F, Tan J, Xu C X, Chen H M, Fan X M. Research status and development strategy for sweet corn breeding in China. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2011, 13 (2): 1-8
- [5] 祝丽英,池书敏,刘志增,王静华. 甲基磺酸乙酯 (EMS) 在创造玉米新种质中的应用. *玉米科学*, 2001, 9 (3): 14-17
- Zhu L Y, Chi S M, Liu Z Z, Wang J H. Application of EMS to create corn new germplasm. *Journal of Maize Sciences*, 2001, 9 (3): 14-17
- [6] Lu X D, Liu J S, Ren W, Yang Q, Chai Z G, Chen R M, Wang L, Zhao J, Lang Z H, Wang H Y, Fan Y L, Zhao J R, Zhang C Y. Gene-indexed mutations in maize (*Zea mays*). *Molecular Plant*, 2018, 11 (3): 496-504
- [7] Maluszynski M, Ahloowalia B S, Sigurbjornsson B. Application of in vivo and in vitro mutation techniques for crop improvement. *Euphytica*, 1995: 303-315
- [8] Garcia V, Bres C, Just D, Fernandez L, Tai F W, Mauxion J P, Le Paslier M C, Bérard A, Brunel D, Aoki K, Alseekh S, Fernie A R, Fraser P D, Rothan C. Rapid identification of causal mutations in tomato EMS populations via mapping-by-sequencing. *Nature Protocols*, 2016, 11 (12): 2401-2418
- [9] Acanda Y, Martínez Ó, Prado M J, González M V, Rey M. EMS mutagenesis and qPCR-HRM prescreening for point mutations in an embryogenic cell suspension of grapevine. *Plant Cell Report*, 2014, 33 (3): 471-481
- [10] 张凤启,黄永娟,杨甜甜,陈健美,管荣展,张红生. EMS 诱变甘蓝型油菜 M_2 代群体的表型突变研究. *植物遗传资源学报*, 2010, 11 (6): 760-765
- Zhang F Q, Huang Y J, Yang T T, Chen J M, Guan R Z, Zhang H S. Research on phenotypic mutations in M_2 population derived from EMS treatment in *Brassica napus* L.. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2010, 11 (6): 760-765
- [11] Chang Z Y, Chen Z F, Wang N, Xie G, Lu J W, Yan W, Zhou J L, Tang X Y, Deng X W. Construction of a male sterility system for hybrid rice breeding and seed production using a nuclear male sterility gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113 (49): 14145-14150
- [12] Neuffer M G, Coe E H. Paraffin oil technique for treating mature corn pollen with chemical mutagens. *Maydica*, 1978, 23 (1): 21-28
- [13] 张铭堂,才卓. 美国玉米诱变 (花粉 EMS) 育种的商业化实施典例. *玉米科学*, 2017, 25 (3): 19-22
- Zhang M T, Cai Z. Successful example of induced mutation (pollen-EMS) application in commercial maize breeding. *Journal of Maize Sciences*, 2017, 25 (3): 19-22
- [14] 樊双虎,郭文柱,路小铎,张春义. 玉米 EMS 突变体库构建及突变体初步鉴定. *安徽农业科学*, 2014, 42 (11): 3162-3165, 3185
- Fan S H, Guo W Z, Lu X Z, Zhang C Y. Construction and preliminary identification of EMS mutant library in maize. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2014, 42 (11): 3162-3165, 3185
- [15] Brunelle D C, Clark J K, Sheridan W F. Genetic screening for EMS-induced maize embryo-specific mutants altered in embryo morphogenesis. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 2017, 7 (11): 3559-3570
- [16] 陈绍江,宋同明. EMS 花粉诱变获得高油玉米突变体. *中国农业大学学报*, 2002, 7 (3): 12
- Chen S J, Song T M. High oil mutants from EMS pollen mutagenesis in maize. *Journal of China Agricultural University*, 2002, 7 (3): 12
- [17] 李海军,池书敏,刘志增,陈景堂,路鹏,张丽华. 利用 EMS 化学诱变改造玉米自交系的研究. *玉米科学*, 2002, 10 (3): 36-38
- Li H J, Chi S M, Liu Z Z, Chen J T, Lu P, Zhang L H. Studies on reform of corn inbred line by EMS. *Journal of Maize Sciences*, 2002, 10 (3): 36-38
- [18] Sun S L, Zhou Y S, Chen J, Shi J P, Zhao H M, Zhao H N, Song W B, Zhang M, Cui Y, Dong X M, Liu H, Ma X X, Jiao Y P, Wang B, Wei X H, Stein J C, Glaubitz J, Lu F, Yu G L, Liang C Z, Fengler K, Li B, Rafalski A, Schnable P S, Ware D, Buckler E S, Lai J S. Extensive intraspecific gene order and gene structural variations between Mo17 and other maize genomes. *Nature Genetics*, 2018, 50 (9): 1289-1295
- [19] Wang C, Shi X, Liu L, Li H, Ammiraju J S, Kudrna D A, Xiong W, Wang H, Dai Z, Zheng Y, Lai J, Jin W, Messing J, Bennetzen J L, Wing R A, Luo M. Genomic resources for gene discovery, functional genome annotation, and evolutionary studies of maize and its close relatives. *Genetics*, 2013, 195 (3): 723-737
- [20] Lertrat K, Pulam T. Breeding for increased sweetness in sweet corn. *International Journal of Plant Breeding*, 2007, 1 (1): 27-30
- [21] 陆大雷,刘小兵,赵久然,刘萍,王凤格,陆卫平,张凯迪. 甜玉米氮素吸收利用的基因型差异. *植物营养与肥料学报*, 2008, 14 (2): 258-263
- Lu D L, Liu X B, Zhao J R, Liu P, Wang F G, Lu W P, Zhang K D. Genotypic differences in nitrogen uptake and utilization of sweet maize. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2008, 14 (2): 258-263
- [22] Shi J, Yan B Y, Lou X P, Ma H S, Ruan S L. Comparative transcriptome analysis reveals the transcriptional alterations in heat-resistant and heat-sensitive sweet maize (*Zea mays* L.) varieties under heat stress. *BMC Plant Biology*, 2017, 17 (1): 26
- [23] 张瑞英. 玉米 DUS 测试概述. *玉米科学*, 2005, 13 (3): 130-132
- Zhang R Y. General state of maize DUS test. *Journal of Maize Sciences*, 2005, 13 (3): 130-132
- [24] Maitz M, Santandrea G, Zhang Z, Lal S, Hannah L C,

- Salamini F, Thompson R D. *rgfl*, a mutation reducing grain filling in maize through effects on basal endosperm and pedicel development. *The Plant Journal*, 2000, 23 (1): 29-42
- [25] Sun F, Zhang X Y, Shen Y, Wang H C, Liu R, Wang X M, Gao D H, Yang Y Z, Liu Y W, Tan B C. The pentatricopeptide repeat protein EMPTY PERICARP8 is required for the splicing of three mitochondrial introns and seed development in maize. *The Plant Journal*, 2018, 95 (5): 919-932
- [26] Yan W, Chen Z F, Lu J W, Xu C J, Xie G, Li Y Q, Deng X W, He H, Tang X Y. Simultaneous identification of multiple causal mutations in rice. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 7: 2055
- [27] 祁显涛, 李燕敏, 谢传晓. 玉米甜、糯性状育种的遗传学基础. *玉米科学*, 2017, 25 (2): 1-5
- Qi X T, Li Y M, Xie C X. Genetic basis for sweet and waxy maize breeding. *Journal of Maize Sciences*, 2017, 25 (2): 1-5
- [28] 任伟, 张长春, 严康, 杨旭东. 我国玉米种质资源创新的探讨. *玉米科学*, 2010, 18 (5): 39-41
- Ren W, Zhang C C, Yan K, Yang X D. Discussion on the maize germplasm resources innovation in our country. *Journal of Maize Sciences*, 2010, 18 (5): 39-41
- [29] 黄君, 冯发强, 王青峰, 张晶, 周鹏, 李小琴. 54 份甜玉米自交系的 SSR 遗传多样性分析. *华南农业大学学报*, 2012, 33 (1): 1-4
- Huang J, Feng F Q, Wang Q F, Zhang J, Zhou P, Li X Q. Study on genetic diversity of 54 sweet corn inbred lines by SSR markers. *Journal of South China Agricultural University*, 2012, 33 (1): 1-4
- [30] 于文颖, 纪瑞鹏, 冯锐, 赵先丽, 张玉书. 不同生育期玉米叶片光合特性及水分利用效率对水分胁迫的响应. *生态学报*, 2015, 35 (9): 2902-2909
- Yu W Y, Ji R P, Feng R, Zhao X L, Zhang Y S. Response of water stress on photosynthetic characteristics and water use efficiency of maize leaves in different growth stage. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35 (9): 2902-2909
- [31] Pepper G E, Pearce R B, Mock J J. Leaf orientation and yield of maize. *Crop Science*, 1977, 17 (6): 883-886
- [32] 李耕, 高辉远, 赵斌, 董树亭, 张吉旺, 杨吉顺, 王敬锋, 刘鹏. 灌浆期干旱胁迫对玉米叶片光系统活性的影响. *作物学报*, 2009 35 (10): 1916-1922
- Li G, Gao H Y, Zhao B, Dong S T, Zhang J W, Yang J S, Wang J F, Liu P. Effects of drought stress on activity of photosystems in leaves of maize at grain filling stage. *Acta Agronomica Sinica*, 2009, 35 (10): 1916-1922
- [33] Bian D, Jia G, Cai L, Ma Z, Eneji A E, Cui Y. Effects of tillage practices on root characteristics and root lodging resistance of maize. *Field Crops Research*, 2006, 185: 89-96
- [34] 张焕欣, 翁建峰, 张晓聪, 刘昌林, 雍洪军, 郝转芳, 李新海. 玉米穗行数全基因组关联分析. *作物学报*, 2014, 40 (1): 1-6
- Zhang H X, Weng J F, Zhang X C, Liu C L, Yong H J, Hao Z F, Li X H. Genome-wide association analysis of kernel row number in maize. *Acta Agronomica Sinica*, 2014, 40 (1): 1-6
- [35] 曹广灿, 林一欣, 薛梅真, 邢芦蔓, 吕伟增, 杨伟飞, 陈军营. 玉米种胚内质网胁迫相关基因对人工老化处理的响应. *中国农业科学*, 2016, 49 (3): 429-442
- Cao G C, Lin Y X, Xue M Z, Xing L M, Lv W Z, Yang W F, Chen J Y. Responses of endoplasmic reticulum stress-related genes in maize embryo to artificial aging treatment. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49 (3): 429-442
- [36] 戴惠学, 胡俏强, 陈舜权. 甜玉米果皮研究进展概述. *上海农业学报*, 2012, 28 (4): 156-159
- Dui H X, Hu Q Q, Chen S Q. Progress of research on sweet corn pericarp. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2012, 28 (4): 156-159
- [37] Tan B C, Guan J, Ding S, Wu S, Saunders J W, Koch K E, McCarty D R. Structure and origin of the white cap locus and its role in evolution of grain color in maize. *Genetics*, 2017, 206 (1): 135-150
- [38] Doll N M, Depegefargeix N, Rogowsky P M, Widiez T. Signaling in early maize kernel development. *Molecular Plant*, 2017, 10 (3): 375-388