

文章编号: 1007-4627(2004)03-0238-05

## 重离子辐照玉米种子 $M_1$ 代诱变效应研究\*

罗红兵<sup>1,2</sup>, 赵 葵<sup>1,3</sup>, 郭继宇<sup>1</sup>, 隋 丽<sup>1</sup>, 倪帽楠<sup>1</sup>,

梅俊平<sup>1</sup>, 路秀琴<sup>1</sup>, 周 平<sup>1</sup>, 孔福全<sup>1</sup>

(1 中国原子能科学研究院核物理所, 北京 102413;

2 湖南农业大学农学院, 湖南长沙 410128;

3 北京师范大学射线束技术与材料改性教育部重点实验室, 北京 100875)

**摘 要:** 用重离子<sup>7</sup>Li 和<sup>12</sup>C 以及<sup>60</sup>Co 的  $\gamma$  射线分别辐照玉米种子胚, 研究重离子束辐照玉米种子  $M_1$  代的生物学效应. 结果表明: <sup>60</sup>Co 的  $\gamma$  射线使种子的发芽势和发芽率降低, 重离子<sup>7</sup>Li 和<sup>12</sup>C 对发芽势和发芽率的抑制作用不明显; 重离子辐照后, 单株之间光合速率差异增大;  $M_1$  代植株在雄性育性、叶片颜色及株高等方面发生了多种变化, 并产生了一株双胚苗. 应用随机多态性 DNA 分析技术, 发现双胚苗的大、小苗之间及其与亲本自交系 478 在随机多态性 DNA 指纹上存在的差异, 从分子水平上初步证实了双胚苗为自交系 478 的变异类型.

**关键词:** 重离子; 变异; 玉米; 随机多态性 DNA

**中图分类号:** Q691; S513.035 **文献标识码:** A

### 1 引言

离子注入是一种新的作物育种方法<sup>[1]</sup>. 与  $\gamma$  射线、电子束和激光相比, 利用离子注入技术进行作物品种改良具有损伤轻、突变率高、突变谱宽、处理安全和无污染等优点, 是人工诱变方法的一个新发展<sup>[2, 3]</sup>. 玉米在我国农作物生产中占有重要地位. 利用杂种优势是玉米育种和增产的有效途径. 细胞质雄性不育在杂种优势利用中具有重要作用<sup>[4]</sup>. 用低能离子束注入玉米种子已成功地选育出突变体<sup>[5, 6]</sup>, 但至今关于重离子辐照作物雄性不育材料的生物效应的报道还较少. 作者利用中国原子能科学研究院 HI-13 串列加速器国家实验室提供的不同剂量的两种传能线密度的重离子<sup>7</sup>Li 和<sup>12</sup>C 以及<sup>60</sup>Co 的  $\gamma$  射线分别辐照普通玉米自交系、玉米 GDS 细胞质雄性不育系和不育型胞质杂交种的种子, 以探讨重离子辐射对玉米产生的多种诱变效应.

### 2 材料和方法

#### 2.1 供试材料

玉米 GDS 不育系及其保持系 BG、不育型杂交

组合 SF<sub>1</sub> 和自交系 478.

#### 2.2 方法

**辐照处理** 利用中国原子能科学研究院 HI-13 串列加速器提供的<sup>7</sup>Li 和<sup>12</sup>C 重离子束, 经过电磁扫描获得强度分布均匀的辐照离子. 重离子束穿过 25  $\mu$ m 的 Kapton 膜, 在大气环境下对玉米种子进行辐照. 将种子用双面胶粘在靶面上, 胚部向外, 正对离子束, 用金硅面垒半导体探测器监测辐射剂量, 实现对种子的胚部进行均匀辐照. <sup>60</sup>Co  $\gamma$  射线照射处理玉米种子在中国原子能科学研究院辐照中心进行. 用未经任何处理的同批种子作对照. 各种辐照处理的物理参数见表 1 左部.

**发芽实验** 将辐照处理及对照的种子各 60 粒, 均匀排列在两个培养皿内, 加入适量蒸馏水, 放在人工气候箱中发芽. 发芽实验的条件设置: 温度 25  $^{\circ}$ C, 相对湿度 85 %, 每天 6:00-17:00 为光照时间. 4 天后, 观察记载发芽种子数, 以发芽数与供试种子数之比的百分数表示发芽势; 待发芽至 7 天时, 再统计发芽数, 以发芽数与供试种子数之比的

收稿日期: 2003-12-11; 修改日期: 2004-01-07

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(10175095); 国家博士后基金资助项目

作者简介: 罗红兵(1968-), 男(汉族), 湖南邵东人, 副研究员, 博士, 现在中国原子能科学研究院进行博士后研究工作.

通讯作者: 赵 葵, 女, 中国原子能科学研究院研究员. 电话: (010)69357491, E-mail: kuiz@iris.ciae.ac.cn

表 1 辐射处理的物理参数及不同辐照处理对 478 发芽势和发芽率的影响

辐照类型	物理参数			对 478 发芽势和发芽率的影响			
	射线能量 /MeV	传能线密度 LET* / (keV · μm <sup>-1</sup> )	剂量 /Gy	发芽势 / (%)	相对发芽势 / (%)	发芽率 / (%)	相对发芽率 / (%)
<sup>7</sup> Li	26.0	116.4	2	78.33	100.00	91.67	100.00
			10	70.00	89.36	91.67	100.00
			30	71.67	91.49	86.67	94.54
			40	68.33	87.23	88.33	96.36
<sup>12</sup> C	87.5	226.9	2	75.00	95.74	80.00	90.00
			10	66.67	85.11	88.33	96.36
			20	66.67	85.11	86.67	94.54
			30	71.67	91.49	80.00	90.00
<sup>60</sup> Coγ	1.25	0.27	10	73.33	93.62	80.00	90.00
			40	71.67	91.49	86.67	94.54
			100	60.00	77.60	76.67	83.64
			200	50.00	63.83	63.33	69.09
			300	41.67	53.19	51.67	56.36
			500	31.67	40.43	43.33	47.27
			6.67	8.51	11.67	12.72	

\* 为穿过 25 μm 的 Kapton 膜和 0.5 cm 的空气, 辐射到玉米表面的离子的 LET 值。

百分数表示发芽率。

**田间试验** 将发芽后的种子播于大田。单粒播种, 行距 60 cm, 株距 25 cm。于生长期观察不同辐照类型、不同辐射剂量的生长发育情况。

**育性鉴定** 抽雄吐丝期采用田间鉴定和室内花粉 I-KI 染色镜检相结合的方法鉴定。

**光合速率测定** 抽雄吐丝期用 Li-Cor6400 型光合作用测定仪测定穗上第一叶的光合速率, 每处理至少选 5 株以上生长势较为接近的植株。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同辐照处理对发芽势和发芽率的影响

由于不同辐照处理对不同材料的发芽势和发芽率的影响情况相似, 在此只列出自交系 478 各种不同处理的发芽势和发芽率, 如表 1 所示。由于处理的种子数有限, 未能进行方差分析, 但表 1 表明, <sup>60</sup>Co γ 射线辐照能明显降低种子的发芽势和发芽率, 且剂量愈大, 抑制作用表现愈明显, 当剂量为 200 Gy 时, 相对发芽势和相对发芽率为 50% 左右。实验所采用剂量的重离子 <sup>7</sup>Li 和 <sup>12</sup>C 辐照玉米种胚对发芽率的影响不大, 所有辐照处理的相对发芽率

在 90% 以上, 对发芽势具有一定的抑制作用。另外根据田间实验, <sup>60</sup>Co γ 射线辐照剂量大于 200 Gy, 成苗率较低。

### 2.2 不同重离子处理对光合速率的影响

表 2 列出了 SF<sub>1</sub> 和 478 不同重离子处理抽雄吐丝期穗位叶的光合速率。表 2 说明, 自交系 478 的光合速率平均值比 GDS 不育型杂交组合 SF<sub>1</sub> 低。同一材料经重离子辐照处理后光合速率的平均值与对照接近, 但绝大部分重离子辐照处理光合速率的变异系数增大, 这表明重离子辐照处理后单株之间的光合速率差值增大。

### 2.3 不同辐照处理对各种玉米 M<sub>1</sub>代植株外观形态的影响

#### 2.3.1 双胚苗及其基因组 DNA 的 RAPD 分析

自交系 478 用 20 Gy 的 <sup>12</sup>C 辐照后, 发芽实验中出现了一粒双胚芽种子(见 240 页图 1(a)), 经营养钵育苗, 移栽至花钵, 长成一大一小双苗(见图 1(b))。大苗表现出多穗性, 雄花育性正常, 小苗花粉部分不育, 镜检 1 259 个花粉, 正常染色花粉数 812, 典败花粉数 398, 圆败花粉数 49, 不育花粉占

表 2 不同重离子处理对光合速率的影响  $\mu\text{molCO}_2/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$

辐照处理 及剂量	SF <sub>1</sub>		478	
	光合速率	变异系数	光合速率	变异系数
CK	39.38±6.57	7.24	33.28±1.14	3.43
<sup>7</sup> Li 2	40.2±4.41	10.79	34.56±3.42	9.90
<sup>7</sup> Li 10	38.62±7.17	18.57	32.43±4.17	12.86
<sup>7</sup> Li 30	38.02±5.28	13.98	32.00±3.61	11.28
<sup>7</sup> Li 40	40.20±4.16	10.35	32.20±5.55	17.24
<sup>12</sup> C 2	38.08±5.01	13.16	33.55±2.14	6.38
<sup>12</sup> C 10	38.98±6.57	16.85	32.87±2.61	7.94
<sup>12</sup> C 20	40.60±2.88	7.09	33.60±2.18	6.49
<sup>12</sup> C 30	37.55±5.23	13.93	33.20±2.01	6.05



图 1 玉米种子辐照处理后 M<sub>1</sub> 植株的形态变化

(a) 自交系 478 用 20 Gy 的 <sup>12</sup>C 辐照后出现的双胚芽；(b) 双胚芽经营养钵培养形成双胚苗；(c) <sup>7</sup>Li 和 <sup>12</sup>C 辐照 478 引起雄性不育，示雄小穗完全退化；(d) 30 Gy 的 <sup>7</sup>Li 辐照 SF<sub>1</sub> 种子，M<sub>1</sub> 出现的雄性可育植株；(e) SF<sub>1</sub> 种子经 30 Gy 的 <sup>12</sup>C 辐照后，M<sub>1</sub> 苗期叶色加深；(f) 40 Gy 的 <sup>60</sup>Co  $\gamma$  辐照 GDS 不育系，M<sub>1</sub> 植株增高。

35.5%。以对照(未辐照)株及双胚苗的大、小苗植株幼嫩叶片为提取材料，提取基因组 DNA，并做了

随机多态性 DNA(简称 RAPD)分析<sup>[2]</sup>。从 40 种 10 bp 随机引物中筛选出 6 个，可得到清晰扩增产物且

扩增带数在 2 条以上. 用它们对双胚苗的大、小苗基因组 DNA 以及对照的基因组 DNA 分别进行了 PCR 扩增, 结果获得了显著的 RAPD 差异, 图 2 显示的是其中的两个例子. 在引物 OPH12 图谱中(图 2 左), 478 自交系扩增出 2 000, 1 100, 950, 700, 450 和 400 bp 共 6 条片段, 大苗只产生 1 300, 1 000 和 700 bp 3 条谱带, 而小苗则产生 1 300, 1 000, 800, 700 和 450 bp 共 5 条片段. 在引物 OPS03 图谱中(图 2 右), 双胚苗的大、小苗比 478 多了 800 bp 片断.

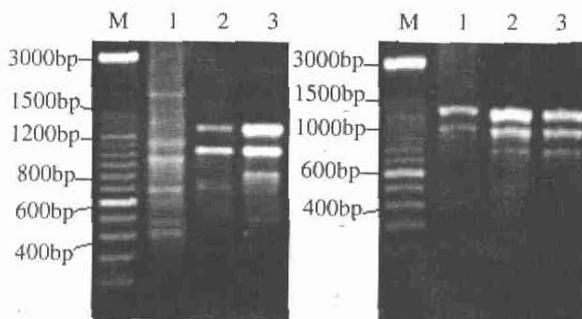


图 2 双胚苗和亲本自交系 478 的扩增图谱(左:引物 OPH12;右:引物 OPS03)

M: Marker; 1: 478 自交系; 2: 双胚苗大苗; 3: 双胚苗小苗.

以上结果表明, 双胚苗植株的大、小苗之间, 以及它们与亲本自交系 478 之间在基因组水平上具有遗传异质性.

### 2.3.2 可育材料中雄性育性发生变化

自交系 478 用 10 Gy 的<sup>12</sup>C、30 和 40 Gy 的<sup>7</sup>Li 及 100 Gy 的<sup>60</sup>Co  $\gamma$  辐照后, 每组后代中都出现了一株完全雄性不育植株. 这说明重离子和<sup>60</sup>Co  $\gamma$  射线都可以引起雄性不育. 重离子<sup>7</sup>Li 和<sup>12</sup>C 引起 478 雄性不育, 雄小穗完全退化(见图 1(c)), 不育性状非常彻底, 如能遗传, 可望培育出新的雄性不育类型. 保持系 BG 在用 10 Gy 的<sup>12</sup>C 辐照后也出现一株完全雄性不育植株.

自交系 478 经 10 Gy 的<sup>12</sup>C 辐照, 一株出现雄穗主穗完全不育而分枝可育.

### 2.3.3 不同辐射对 GDS 不育系及不育型杂交组合 SF<sub>1</sub> 雄花育性的影响

在所用剂量范围内, 三种辐射都不能改变玉米 GDS 细胞质雄性不育系的雄花育性; <sup>12</sup>C 及<sup>60</sup>Co 的  $\gamma$  射线也不能改变不育型 GDS 胞质杂交种的雄花育性, 而在经 30 Gy 的<sup>7</sup>Li 辐照过的不育型胞质杂

交种子长成的植株中, 出现了一株雄性可育植株(见图 1(d)), 现已得到了自交种子. 镜检 1 370 个花粉粒, 正常可育花粉数 1 102, 典败花粉数 133, 圆败花粉数 135, 恢复度达 80.44%.

### 2.3.4 对苗期叶色的影响

SF<sub>1</sub> 种子经 30 Gy 的<sup>12</sup>C 辐照后, 苗期有 2 株叶色特别深(见图 1(e)), 其中一株叶片卷缩向下生长, 失去了顶端优势的能力而死亡, 另一株茎基部长出瘤状物而死亡. GDS 种子经 30 Gy 的<sup>12</sup>C 辐照后, 出现了一株花斑叶.

### 2.4.5 对株高的影响

在成活植株中, 许多处理出现了比对照矮化的植株, 但 40 Gy 的<sup>60</sup>Co  $\gamma$  辐照 GDS 不育系, 出现三株高植株(见图 1(f)).

## 3 讨论

(1) 本实验研究结果初步表明, 重离子辐照玉米种子, 从发芽、出苗、抽雄开花等阶段, 都出现了变异现象, 这说明重离子辐照能引起明显的当代效应, 同以往的研究结果相一致. 所选用的重离子在同一能量的不同剂量下, 种子的相对发芽率在 90% 以上, 对种子的出苗率影响不大. 在以后的辐照实验中, 还要加大重离子的辐照剂量. 而对于<sup>60</sup>Co  $\gamma$  射线剂量为 200 Gy 时, 发芽率为 51.67%, 且成苗率不高. 重复实验时, 宜采用 200 Gy 以下的剂量.

(2) 对于玉米, Ducan 等研究了 22 个杂交种, 证明光合速率是一个稳定的遗传性状<sup>[8]</sup>. 实验中测定光合速率时选用的植株生长势与对照植株相近似, 对于某些处理引起的植株生长势明显增强或降低的单株未采用. 由于重离子辐照引起单株之间光合速率的实际差异会增大, 如果经重离子辐照后植株光合速率增强的特性能够稳定遗传, 那么通过育种手段, 可培育出强光合速率的特异种质材料.

(3) 本实验所涉及到的双胚苗是在重离子辐照后的材料中出现的, 因只出现了一株, 为了观察它的生物学性状, 未进行胚胎学和细胞学观察, 不能确定它的具体来源和染色体数. RAPD 分析结果表明, 双胚苗植株的大、小苗之间, 以及它们与亲本自交系 478 之间, 在基因组 DNA 上具有多态性, 作者假定该双胚苗的出现是由于某种原因自然形成并受到重离子辐照的影响, 或者是重离子辐照引起

玉米成熟胚的再分裂. 这些均有待今后的实验进一步验证.

(4)  $M_1$  代同时交织着突变效应和生理效应, 辐射诱变大多引起隐性突变, 隐性突变也不可能在

$M_1$  代表现,  $M_2$  代变异将更丰富.  $M_2$  代的选择以及重离子辐照玉米种子引起基因组 DNA 的变化分析正在进行之中.

#### 参 考 文 献:

- [1] 余增亮. 离子束生物技术引论. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1996, 223—240.
- [2] 卫增泉, 颜红梅, 梁见平等. 原子核物理评论, 2003, 20(1): 38.
- [3] 陆挺, 谢靖, 朱凤绥等. 核技术, 1994, 17(7): 443.
- [4] 李竟雄, 周洪生, 孙荣锦主编. 玉米雄性不育生物学. 北京: 中国农业出版社, 1998, 1—30.
- [5] 刘志生, 陈吉法, 范广华等. 激光生物学报, 2002, 11(2): 142.
- [6] 阙显照, 程备久, 陈冬生等. 生物学通报, 2003, 38(6): 11.
- [7] 罗红兵, 赵葵, 张根发等. 生物物理学报, 待发表.
- [8] 李少昆, 赵明, 许启凤等. 中国农业科学, 1999, 32(2): 53.

## Study of $M_1$ Mutagenic Effects of Heavy Ion Irradiation on Maize Seeds\*

LUO Hong-bing<sup>1,2</sup>, ZHAO Kui<sup>1,3</sup>, GUO Ji-yu<sup>1</sup>, SUI Li<sup>1</sup>, NI Mei-nan<sup>1</sup>, MEI Jun-ping<sup>1</sup>,  
LU Xiu-qin<sup>1</sup>, ZHOU Ping<sup>1</sup>, KONG Fu-quan<sup>1</sup>

(1 Department of Nuclear Physics, China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413, China;

2 College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

3 The Key Laboratory of Beam Technology and Material Modification of Ministry of Education, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

**Abstract:** In order to study  $M_1$  biological effects of heavy ion irradiation on maize seeds, the embryos of dry maize seeds are irradiated with  $^7\text{Li}$  ions and  $^{12}\text{C}$  ions as well as  $^{60}\text{Co}$  gamma rays. The results are as follows:  $^{60}\text{Co}$  gamma rays decrease germination impetus and germination rate of maize seeds, while the inhibitory effects of germination impetus and germination rate induced by the heavy ions  $^7\text{Li}$  and  $^{12}\text{C}$  are not significant. The difference of photosynthetic rates among the plants irradiated with  $^7\text{Li}$  ions and  $^{12}\text{C}$  ions becomes larger. The changes in the male fertility, the color of leaf and the height of plant are also presented. By means of random amplified polymorphic DNA (RAPD) method, the results show that the bands of the large seedling of the twin seedlings are different from that of the small one, and there are different bands compared with their parents, inbred line 478. The above results show the twin seedlings may be a new variety of inbred line 478 in the molecular levels.

**Key words:** heavy ion; variation; maize; random amplified polymorphic DNA

\* Foundation item: National Natural Science Foundation of China(10175095), China Postdoctoral Foundation