

不同能区重离子束在小麦育种上的比较研究*

颜红梅¹ 卫增泉¹ 张金莲² 韩光武¹ 李文建¹ 周光明¹ 高清祥³
黄 涛¹ 李 强¹ 党秉荣¹ 王菊芳¹ 蔡喜臣¹ 何 静¹

1 (中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

2 (甘肃省农科院 兰州 730070)

3 (兰州大学 兰州 730000)

摘要 介绍了三个不同能区的重离子用于小麦育种的室内实验方法和大田培育情况,并对半致死剂量、细胞学观察和育种情况分别给出了初步结果。最后探讨了三种不同能区的重离子在作物育种上的诱变机理。

关键词 荷能重离子, 离子注入, 离子贯穿, 作物育种, 诱变机理

我国从80年代中期开始出现了荷能重离子诱变育种的尝试^[1],其中大部分是利用离子注入机进行的,离子束能量在30—140keV,在小麦种子内的最可几射程不足 $0.5\mu\text{m}$ ^[2,3],故称为超低能区浅层离子注入;利用串列加速器或大型重离子加速器的离子束进行诱变育种则可分为低能区深层离子注入(相应能量在几十MeV至几百MeV,在小麦种子内的射程在100—1000 μm 之间)和中能区离子贯穿(相应单核能量在45MeV/u以上,一般以贯穿水稻、小麦种子(线度约5—6mm)为准)。到80年代末、90年代初这项试验已经取得了明显效果^[4]。我国有关的农学界、物理学界人士对此引起了浓厚的兴趣,在一个时期形成了“离子束作物育种”热,不少研究人员也同时开展了离子束作物育种诱变机理的研究。

我们利用近代物理所和兰州重离子加速器国家实验室所提供的各种能区的重离子束开展了小麦诱变育种及其机理的研究,并进行了初步比较。

1 材料与方法

1.1 试材

样品取自甘肃省农科院89-78、88-12、定西24、81529和82-579五个品系的春小麦种子,挑选其大小均匀、籽粒饱满、无破损、无霉菌污染的风干种子作为试样。

1.2 辐射处理及剂量学

(1) 采用中国科学院近代物理研究所200kV离子注入机,离子种类有C、N、Fe、Cu、Zn等,电荷态为+1,能量为110keV(射程 $<0.5\mu\text{m}$),束流强度 $0.1\text{—}50\mu\text{A}$,束流扫描截面为 $\phi 55\text{mm}$,均匀度好于95%,采用束流积分仪监测离子剂量,范围在 $10^{11}\text{—}10^{17}\text{cm}^{-2}$ 。筛

* 国家自然科学基金“八五”资助项目

收稿日期:1997-07-17, 修回日期:1998-01-22

选好的种子插入 $\phi 55\text{mm}$ 样品盘, 胚朝上面向离子束, 在真空条件下($\sim 10^{-3}\text{Pa}$)进行辐照。另外以未照种子和放置在真空系统内但未受离子束照射的种子作为自然本底和真空本底进行对照。

(2) 采用兰州重离子加速器国家实验室重离子研究装置(HIRFL)的离子束, 经过真空隔离Ni窗引出到常温常压的大气环境中, 穿过离子探测器和15mm左右空气隙到达样品表面, 离子种类、电荷态和能量分别为 $^{12}\text{C}^{6+}$, $\sim 46.6\text{MeV/u}$ (射程 $\sim 6.5\text{mm}$); $^{14}\text{N}^{7+}$, $\sim 45.8\text{MeV/u}$ (射程 $\sim 5.5\text{mm}$)和 20MeV/u (射程 $\sim 1.1\text{mm}$); $^{16}\text{O}^{6+}$, $\sim 7\text{MeV/u}$ (射程 $\sim 180\mu\text{m}$); $^{40}\text{Ar}^{15+}$, $\sim 21\text{MeV/u}$ (射程 $\sim 650\mu\text{m}$)。束流强度 $0.01\text{--}1\text{nA}$, 束流经散焦, 截面为 $\phi 60\text{mm}$, 均匀度 $\sim 55\%$, 采用空气电离室监测离子剂量, 范围在 $7 \times 10^4\text{--}1 \times 10^9\text{cm}^2$, 将筛选好的种子用双面胶粘在直径 $\phi 40\text{mm}$ 的小样品盘内, 胚朝上面向离子束, 每10个小样品盘安装在一个可旋转的大盘上, 大盘固定在HIRFL辐照终端 TL_2 的步进马达上, 用微机远程控制马达, 使样品依次受照, 剂量控制及数据获取和处理均由微机自动操作^[3]。另外, 以未照种子和放置在 TL_2 附近但未直接受照的种子为自然本底和辐射环境本底进行对照。

1.3 大田培育

M_1 代采用裂区设计排列, 品种为主因子, 剂量为副因子。田间播种后调查出苗率, 并对不同剂量随机取样20株测定幼苗高度等能够表明辐射处理后生长发育受抑制的性状。生长发育期间记载出苗率、抽穗期、成熟期等, 还观察当代是否出现变异, 收获后每个剂量取10株考种, 研究不同剂量对株高、分蘖及穗部结实性能的影响。试验区行长 1.2m , 每个剂量种3行, 每行点播41粒种子。

M_2 代采用穗行或混合种植, 每行点播21粒种子, 根据种子数量每个剂量50—130行。每隔19行以同一品种未处理的对照种子种一行, 出苗后, 逐区观察记载, 田间选育中对变异性状重点挂牌标记, 对突变体的出现频率进行调查, 成熟收获后单株考种, 再进行一次籽粒丰产性等方面的选育。

M_3 代每一单株种4行为一区, 每一单穗种2行为一区, 每隔4个单株或9个单穗以同一品种未处理的对照种子种一区。对变异性状的遗传情况进行观察研究。

M_4 代试验区行长 1.2m , 行距 0.2m , 每行点播31粒种子。每一单株或株系种4—10行, 每单穗种1—4行, 每隔4个单株或约15个单穗以同一品种未处理的对照种子种一区。试验区周围种植了条锈病诱发行, 继续依照育种目标对突变性状及突变体进行田间及室内考种选育。

1.4 室内萌发

将各剂量组及对照的种子50—100粒分成两组, 均匀排列在两个培养皿内, 加入适量清水, 室温下培养, 每日换水一次, 观察记录发芽情况。在萌发的幼苗中, 待胚根长出约 $1\text{--}2\text{cm}$ 时, 截取主根根尖, 用Carnoy氏液固定24h后, 换入70%乙醇中暂时保存。待发芽至第七天时, 统计各组及对照的发芽数, 以发芽数与供试种子数之比的百分数表示发芽率, 发芽结束后, 分别测量植株第一叶高度, 以平均值表示它们的生长势。

细胞观察时, 分别取各剂量组根尖, 经 60°C $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 热HCl水解14min后, 用Schiff氏试剂染色30min以上, 截除根冠和伸长区部分, 只留2—3mm长的分生区, 加45%醋酸一滴, 用压片法制作临时封片, 在显微镜下每组至少观察10个根尖共 10^4 个细胞, 统计胚根细胞中染色体畸变类型和频率。

2 结果

2.1 半致死剂量 D_{50} 值的差别

以“定西24”种子为例,经过典型的不同能区的氮离子辐照后,出苗率随剂量的变化曲线如图1所示。由图1可以求得不同能区辐照时的半致死剂量 D_{50} 值为:超低能离子注入 $D_{50} \approx 2.5 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$,低能离子注入 $D_{50} \approx 5 \times 10^7 \text{ cm}^{-2}$,中能贯穿 $D_{50} \approx 2 \times 10^8 \text{ cm}^{-2}$ 。

2.2 大田培育结果

(1) 超低能重离子注入春小麦干种子后,对其田间出苗率及幼苗生长都有比较明显的影响,达5%显著性水准。得到了一些变异类型,例如旱地春小麦“定西24”,原是一个较晚成熟的品种,经过辐射处理后连续培育2年,均出现了早熟突变体,一般抽穗期提前3—4天。第一年以出现早熟突变穗行占种植穗行的方法计算,出现频率为12.3%,第二年混合种植以早熟突变体占种植群体的百分比计算,出现频率为17%。两年出现频率都比较高,且在 M_3 代其早熟性状遗传稳定。在 M_5 代旱地鉴定试验中早熟5天,生长势强,粒大饱满,每亩增产可达16.6%—24.2%。

(2) 低能重离子注入春小麦干种子后,当代田间出苗及幼苗生长均受到明显抑制,一株双穗频率为3%;在 M_4 代培育后,经田间选育,室内考种测产共获得矮秆突变系9个,其中“82-579”和“88-12”一般植株在80cm左右,比原株降低20cm以上,抗锈。经小区测产,比对照增产11.0%—57.4%。

(3) 中能重离子贯穿春小麦干种子后,当代田间出苗均受抑制,出现了双苗、双穗。在 M_2 代出现了早熟、植株降低等突变类型,突变频率一般可达千分之几十。

2.3 方差分析和极差测验

经过统计分析,离子贯穿春小麦种子后,经生物统计学上的方差分析与多重比较,剂量间差异达极显著水准(表1)。 5×10^6 、 $1 \times 10^7 \text{ cm}^{-2}$ 与对照间差异不显著,而 1×10^8 、 $1 \times$

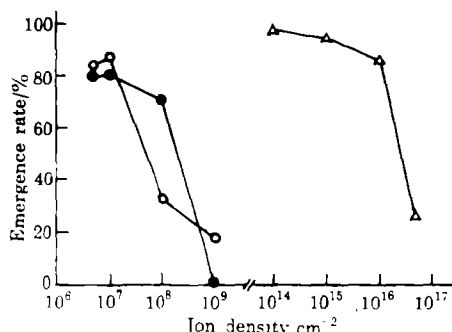


图1 定西-24出苗率与离子密度的关系
△ 110keV $^{14}\text{N}^{1+}$, □ 20MeV $^{14}\text{N}^{7+}$,
● 45.8MeV $^{14}\text{N}^{7+}$

Fig.1 Dependence of emergence rate(%) of the "Dingxi-24" in the field on ion density

表1 离子贯穿春小麦干种子后裂区试验的方差分析
Table 1 Variance analysis of the split-plot experiment for ion-penetrated dry seeds of spring wheat

变异来源	Source of variation	DF	SS	MS	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
主区部分	区组 Block	2	378.93	189.47	1.00	6.94	
Wain-plot	品种(A) Strain	2	401.59	200.80	1.06	6.94	
	E_a	4	759.96	189.99			
	总变异 Total variation	8	1540.48				
副区部分	剂量(B) Dose	5	69364.59	13872.92	293.42**	2.53	3.70
Sub-plot	$A \times B$	10	629.30	62.96	1.33	2.16	2.98
	E_b	30	1418.44	47.28			
	总变异 Total variation	53	72952.81				

10^9 cm^{-2} 与对照之间差异达极显著水准(表2、3)。表1中,DF为自由度;SS为平方和;MS为均

方: E_a 为品种间误差; E_b 为剂量间误差; $F = MS/E_a$ 为差异显著性测验值; $F_{0.05}$ 表示可信度达 95%; $F_{0.01}$ 表示可信度达 99%; 表 3 中, a、b、c、d 表示不同等级的差异显著性均达到 95%; A、B、C 表示不同等级的差异显著性均达到 99%。

表2 离子贯穿春小麦干种子后处理剂量新复极差测验最小显著极差
Table 2 New composite range test significant range for ion-penetrated dry seeds of spring wheat

P	2	3	4	5	6	备注 Remarks
LSR _{0.05 30}	59.62	62.71	64.36	66.01	67.04	SE = $(r \cdot a \cdot S^2 E_b)^{1/2}$
LSR _{0.01 30}	80.24	83.75	85.81	87.05	89.11	= 20.628

表3 离子贯穿春小麦干种子后处理剂量新复极差测验
Table 3 New composite range test for ion-penetrated dry seeds of spring wheat

处理剂量 Irradiation dose, cm ⁻²	田间出苗数(三个重复合计数) Emergence number in the field (Sum for three parallel samples)	差异显著 Deviation significance	
		5 ₀	1 ₀
辐照本底 Irradiation background	915	a	A
1×10 ⁷	883	a	A
自然本底 Nature background	876	a	A
5×10 ⁶	869	a	A
1×10 ⁵	764	b	B
1×10 ⁹	5	c	C

离子注入春小麦干种子后, 5 × 10⁶、1 × 10⁵、1 × 10⁹ cm⁻² 三种处理的田间出苗率明显低于对照的田间出苗率。1 × 10⁷ cm⁻² 略高于或略低于对照。经方差分析与多重比较, 剂量间差异达极显著水准(表4)。5 × 10⁶ cm⁻² 与对照间差异达显著水准, 1 × 10⁵、1 × 10⁹ cm⁻² 与对照间差异达极显著水准, 1 × 10⁷ cm⁻² 与对照间差异不显著(表5、6)。

表4 离子注入春小麦干种子后裂区试验的方差分析
Table 4 Variance analysis of the split-plot experiment for ion-implanted dry seeds of spring wheat

变异来源 Source of variation	DF	SS	MS	F	F _{0.05}	F _{0.01}
主区部分						
区组 Block	2	284.33	142.17	2.69	6.96	
Wain-plot						
品种(A) Strain	2	836.66	418.17	7.90*	6.96	
E_a	4	211.67	52.92			
总变异 Total variation	8	1332.33				
副区部分						
剂量(B) Dose	5	88398.17	17679.63	366.27**	2.53	
Sub-plot						
A × B	10	1608.33	160.83	3.33**	2.16	
E_b	30	1448.00	48.27		3.70	
总变异 Total variation	53	92786.83				

表5 离子注入春小麦干种子后处理剂量新复极差测验最小显著极差
Table 5 New composite range test significant range for ion-penetrated dry seeds of spring wheat

P	2	3	4	5	6	备注 Remarks
LSR _{0.05 30}	60.23	63.35	65.02	66.69	67.73	SE = $(r \cdot a \cdot S^2 E_b)^{1/2}$
LSR _{0.01 30}	81.07	84.61	86.69	87.94	90.03	= 20.84

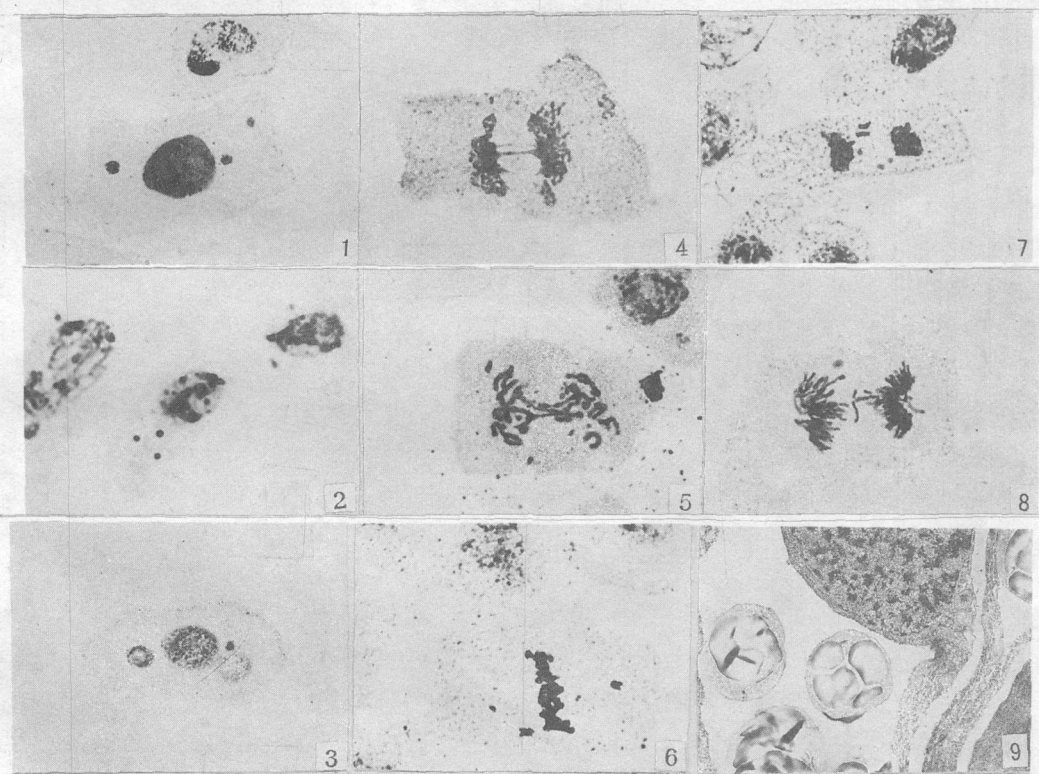
表6 离子注入春小麦干种子后处理剂量新复极差测验

Table 6 New composite range test for ion-penetrated dry seeds of spring wheat

处理剂量 Irradiation dose/cm ⁻²	田间出苗数(三个重复合计数) Emergence number in the field (Sum for three parallel samples)	差异显著 Deviation significance	
		5%	1%
辐照本底 Irradiation background	964	a	A
1×10 ⁷	960	a	A
自然本底 Nature background	915	a	A
5×10 ⁶	844	b	A
1×10 ⁸	202	c	B
1×10 ⁹	108	d	C

2.4 表面形貌及细胞、亚细胞观察

超低能离子注入的春小麦干种子:胚部表面发黑,顶部如常。将种子冷冻后掰开,内部断面细胞未见异常。种子萌发后观察其根尖细胞,得到了微核、桥和落后染色体等畸变类型,微核率约为0.43%,总畸变率为0.65%(对照为0.05%)。

图2 ¹⁶O⁸⁺离子辐照小麦后根尖细胞中的染色体畸变类型

1、2. 微核, 3. 小核, 4、5. 桥, 6. 游离染色体, 7、8. 落后染色体, 9. 淀粉粒增大

Fig.2 The chromosomal aberration types in (root-tip) cells of wheat seeds induced by the ¹⁶O⁸⁺ ion irradiation

1、2. Micro-nucleus, 3. Little-nucleus, 4、5. Bridge, 6. Dissociated chromosome, 7、8. Lag-behind chromosome, 9. Farina accretion

低能离子注入的春小麦干种子:胚部干枯收缩,有裂纹,顶部如常。种子经冷冻后掰

并, 胚部断面上细胞变形, 扭曲, 塌陷形成‘空洞’, 胚乳细胞如常。对胚经超薄切片, 电镜观察, 亚细胞结构受损; 线粒体形态异常, 嵴数减少, 排列紊乱; 内质网稀疏, 固着核糖体减少; 叶绿体内基粒发育不良, 类囊体数目减少; 高尔基体增多, 体积膨大; 胞质中出现少数指纹状或多层环状溶酶体。还观察到了核膜内陷, 核周腔局部扩大, 细胞核断裂或穿壁。根尖细胞染色体总畸变率可达31.6%(对照为0.05%), 包括有微核、小核、桥、断片, 游离染色体、落后染色体和环形染色体等(图2), 微核率达30.6%。

中能离子贯穿的春小麦干种子: 胚部皱褶, 顶部干缩。种子冷冻掰开后, 在胚和胚乳断面上都观察到细胞损伤。电镜观察超薄切片, 还发现淀粉粒变大, 流质粘连。根尖细胞染色体总畸变率达29.6%(对照0.05%), 包括如上一样的畸变类型, 微核率可达28.4%。在 M_2 代花粉粒中还发现有双萌发孔或8字萌发孔(在一株中约占40%)。

3 讨论

3.1 三种不同能区的离子束小麦育种, 在能量转移上的比较

由图1得到的各 D_{50} 值可推知, 以超低能离子注入时, 与 D_{50} 值相当的剂量为 1.6×10^{10} Gy; 低能离子注入时, 相当于9.65Gy; 中能离子贯穿麦粒(~ 5 mm)时, 整个麦粒处在氮离子Bragg曲线坪段, 其 $LET = 650 \text{ MeV} \cdot \text{cm}^2/\text{g}$ 基本保值不变, 其 D_{50} 值相当于20.8Gy。故有 $D_{50\text{超低能注入}} \gg D_{50\text{贯穿}} > D_{50\text{低能注入}}$ 。如果超低能离子注入时, 其生物效应是注入离子直接作用的话, 则这样大的剂量早就把胚细胞轰击得“体无完肤”了。以常规 γ 射线育种的 $D_{50(\gamma)} \approx 200 \text{ Gy}$ 来计算, 此 D_{50} 剂量要比 γ 射线 D_{50} 大近 10^8 倍, 种子是不可能存活的, 但现在的事实是不仅存活, 而且产生了较好的育种效果。因此, 这种效应应是由注入离子的间接效应产生的, 例如超软特征X-射线, 热效应等。这是由于离子射程很短, 它们只是轰打在果皮上, 虽果皮可以被打得“体无完肤”, 但它却无碍于胚细胞的存活; 而在果皮被轰击时, 产生了特征X射线, 由于它产生的几率较小(原子电离截面 $\sim 10^{-18} \text{ cm}^2$, 荧光产额 $\sim 10^{-3}$), 而且进入深层的强度呈指数衰减^[6], 所以胚细胞要对这种X射线有反应, 必须要有足够多的注入离子产生足够强的X射线。从这一定性分析, $10^{10} \text{ Gy} (\sim 10^{16} \text{ cm}^{-2})$ 就可以认为比较合理了。

如果以种子出苗率50%为生物学终点的指标, 且以 $D_{50(\gamma)} = 200 \text{ Gy}$ 计, 则对于低能离子注入 $D_{50} = 9.65 \text{ Gy}$ 其 $RBE = 200/9.65 = 20.7$ 。对于中能离子贯穿 $D_{50} = 20.8 \text{ Gy}$ 时, 它的 $RBE = 200/20.8 = 9.6$ 。

3.2 超低能离子注入的间接作用

由电镜观察辐照种子内部的细胞损伤形貌可知, 超低能离子注入诱变育种只能是间接作用。有人认为麦皮(包括果皮+种皮)是多孔松散结构, 尽管离子射程很短, 但注入离子可以钻孔而入, 仍能直接作用到深层胚细胞; 但从我们的细胞形貌观察没有见到钻孔而入的离子损伤细胞的证据。还有人认为, 离子注入时可把麦皮溅射掉(所谓蚀刻掉)或溅射使得麦皮变薄, 以致注入离子可以直接作用于胚细胞; 同样, 从细胞学观察也未见其证据。对于超低能离子注入引起种子诱变的机理, 我们从理论上和实验上进行过比较系统的研究, 结果否定了超低能重离子注入小麦种子时碰撞产生级联原子的直接作用^[7], 也否定了由注入离子溅射产生级联推进直接引起植物种子生物效应的可能性^[8]。超低能重离子注入诱变育种的一种重要机理是超软特征X射线间接的作用过程^[9,10]。

3.3 低能、中能离子的直接作用

在低能离子注入情况下,引起种子胚细胞突变的原因除了能量转移外,还应当存在质量沉积和电荷交换过程。质量沉积可以引起DNA分子组成与结构的变化,这样形成的新分子可能对种子和植株的生理生化功能及遗传效应产生重大影响。在离子注入时还有大量电荷交换给受体,这就破坏了受体中原电荷平衡的正常状态,扰乱了细胞或生物活体正常的生理生化功能或造成遗传变异,这些还有待以后作进一步研究。

参 考 文 献

- 1 全国第一次离子注入生物效应研究学术讨论会,安徽农学院学报,1991,18(4):256-329
- 2 卫增泉,颜红梅,韩光武,等.核技术,1995,18(2):81-84
- 3 颜红梅,卫增泉,李文建,等.核技术,1997,20(2):105-107
- 4 全国第二次离子注入生物效应研究学术讨论会,安徽农业大学学报,1994,21(3):226-375
- 5 卫增泉,刘玉岩,王桂玲,等.核技术,1991,14(6):341-346
- 6 韩光武,卫增泉,马受武,等.核技术,1995,18(10):615-620
- 7 韩光武,马受武,卫增泉,等.核技术,1995,18(12):759-764
- 8 韩光武,卫增泉.核技术,1996,19(3):152-154
- 9 Wei Zengquan, Xie Hongmei, Han Guangwu, *et al.* Nucl Instr Meth, 1995, 95B:371-378
- 10 卫增泉,韩光武,周光明,等.生物物理学报,1996,12(2):315-320

Comparative research on wheat breeding by heavy ion irradiation with different energies

XIE Hongmei¹ WEI Zengquan¹ ZHANG Jinlian² HAN Guangwu¹ LI Wenjian¹
ZHOU Guangming¹ GAO Qingxiang³ HUANG Tao¹ LI Qiang¹
DANG Bingrong¹ WANG Jufang¹ CAI Xichen¹ HE Jing¹

1 (Institute of Modern Physics, the Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000)

2 (Gansu Institute of Agricultural Science, Lanzhou 730070)

3 (Lanzhou University, Lanzhou 730000)

Abstract

Dry wheat seeds were irradiated with heavy ions belonging to three different energy regions. The indoor experimental method and culture process in the field for the irradiated seeds are introduced. Preliminary results on half-lethal dose, cytological observation and breeding situation are presented. Finally, the mutation mechanisms of crop breeding are discussed according to three different energy regions.

Key words Energetic heavy ion, Ion implantation, Ion penetration, Crop breeding, Mutation mechanism