

# 玉米低能离子束辐照诱变研究

李永亮, 秦广雍, 霍裕平 (郑州大学河南省离子束生物工程重点实验室, 河南郑州 450052)

**摘要** 在概述低能离子束辐照诱变研究进展的基础上, 提出了低能离子束诱变研究存在的 3 大困难, 着重介绍了玉米作为低能离子束辐照诱变研究材料的优势, 报道了玉米花粉离子束辐照诱变的初步研究结果。

**关键词** 玉米; 离子束; 辐照; 诱变

**中图分类号** S513 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)29-12803-03

## Study on the Low Energy Ion Beam Radiation Mutation of Maize

LI Yong-liang et al (Henan Key Lab of Ion Beam Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052)

**Abstract** Based on summarizing the research progress in low energy ion beam radiation mutation, the three difficulties in this research field were pointed out. Advantage of maize as the material of low energy ion beam radiation mutation was discussed. And the preliminary research result of ion beam radiation mutation of maize pollen was reported.

**Key words** Maize; Ion beam; Radiation; Mutation

低能离子束一般是指由离子注入机产生, 能量在几 eV 至几十 keV 的离子束流<sup>[1]</sup>。20 世纪 80 年代起, 余增亮等首先开展了低能离子束生物诱变的研究, 并取得了一系列研究进展, 使得低能离子束细胞刻蚀技术成为我国拥有自主知识产权的新技术<sup>[1-2]</sup>。经过 20 多年的发展, 我国在低能离子束生物工程研究方面已处于国际前列。许多学者在离子束诱变对象开拓、诱变材料表型性状、细胞学形状、同工酶生物化学指标变化、突变体分子标记等方面进行了大量研究, 并取得了一系列研究进展<sup>[3-6]</sup>。水稻是国内最早开展离子束诱变研究的作物之一<sup>[7-8]</sup>。其间, 研究者们分别以小麦<sup>[9-10]</sup>、玉米<sup>[11-12]</sup>、西瓜<sup>[13]</sup>、谷子<sup>[14]</sup>等多种材料进行了离子束诱变的表型性状变异效应研究, 结果表明, 较高剂量会引起较多的生理损伤, 主要表现为抑制效应, 在 M<sub>2</sub> 代变异中, 有些是可遗传的表型突变体。同时, 慎玫等研究发现, 离子束能引起水稻功能、性状突变<sup>[15-18]</sup>。在主要农作物新品种选育上, 我国科研工作者通过离子束诱变已经选育出晚粳 D9055、S9042 等水稻品种, 皖麦 32 号、皖麦 42 号等小麦品种, 显示了离子束在农作物诱变育种上具有巨大的应用前景。近期以来, 关于离子束诱变效应研究已延伸到了分子领域, 如对突变体与同种材料原群体的同源关系研究的分子标记, 就有人进行了 RAPD<sup>[19]</sup>、AFLP<sup>[20]</sup>、SSR<sup>[21]</sup> 等分子标记技术分析, 这为离子束诱变开辟了分子研究新领域。尽管如此, 低能离子束诱变研究作为一个新兴的研究领域, 还存在着较多的问题。

## 1 当前低能离子束诱变研究存在的问题

**1.1 干种子作为离子束辐照处理对象效果不理想** ①种子外部包被的种皮或果皮成为低能离子束透入种子内部难以逾越的障碍; ②种子作为完整的繁殖器官, 本身具有复杂的结构, 其包含的较大的胚、胚乳或子叶等都可能影响离子束对胚的辐照效应的发挥; ③即使胚部某些细胞或细胞团发生了遗传物质的突变, 随后也大多表现为难以解决的嵌合体现象; ④从处理干种子诱变变异到传递至后代要经过漫长的营养生长、生殖生长的淘汰漂失过程, 在该过程中, 绝大多数的

早期突变细胞因中和或汰选而消失。由于以上种种障碍的影响, 虽然植物干种子离子束诱变开展了大量的研究工作, 但至今尚未取得突破性进展。

**1.2 难以建立较大的辐照样本群体** 因离子注入机自身原因, 每次辐照的群体有限, 对小麦、水稻等植物种子而言, 单次仅能处理几百粒种子, 这就很难得到较大的处理样本群体, 给分析统计研究辐照效应和筛选突变体带来很大的实际困难。如有学者报道的辐照效应的马鞍形曲线问题就很难在小样本群体内得到确证。小样本群体与极低的突变几率存在难以克服的矛盾等。

**1.3 辐照研究材料本身存在的困难** 目前离子束辐照对象主要是水稻和小麦。以小麦为例, 因其为六倍体, 遗传背景复杂, 遗传修复强, 显性突变体表现的几率小。其跨年度长达 8 个月的生长周期, 给深入研究造成了很大困难。对水稻而言, 同样存在生长周期长、栽培复杂、环境影响大等困难。

## 2 以玉米为材料开展低能离子束诱变及其机理研究的优势

**2.1 玉米生长周期短, 有利于开展诱变后的多代研究** 通常玉米生育期在 90~120 d, 夏播一般 3 个月左右, 生长周期短。在黄淮海地区可分春播、夏播 2 个播季进行研究。目前我国已成熟利用的玉米海南加代繁育技术, 使一年多代种植成为现实, 这样就大大缩短了开展诱变后代研究的年限, 使突变体育种成为可能。在这方面, 小麦、水稻还无法实现。因此, 较短的生育期、一年多代种植技术使玉米成为开展离子束辐照诱变研究的良好材料。

**2.2 玉米种子构造特殊, 使离子束辐照种皮障碍问题得以解决** 玉米是一种大籽粒种子, 其胚和胚乳以独立可分离状态包裹在种皮内, 这就为手工操作剥取离体胚和去除种皮提供了极大的便利。种子可以离体胚、去除种皮裸露出胚的种子、完整种子等形式进行辐照处理, 从而可以分别研究种皮对辐照诱变的隔离效应、离体胚辐照诱变效应、整粒种子辐照诱变效应等, 为开展诱变机理研究, 探索增强离子束辐照效应的方法提供了极好的突破口。与此相对应, 小麦及水稻胚过小, 离体胚成苗困难, 使离体胚辐照研究难于开展; 覆盖小麦及水稻种子胚部的种皮结合紧密, 剥离困难, 都使种皮对辐照的隔离效应难以排除。

**2.3 玉米花粉诱变是离子束辐照诱变的突破口** 笔者通过

**作者简介** 李永亮 (1974-), 男, 河南驻马店人, 博士研究生, 研究方向: 玉米分子遗传育种。

**收稿日期** 2008-07-30

多年研究认为,花粉作为离子束辐照诱变研究的材料具有特别的优势:①花粉为单细胞,大多呈游离状态,结构简单,可以与入射离子束形成很大的接触面积,裸露的单细胞由于没有外来遮挡,为离子束穿透和发挥诱变作用提供了极大的方便;②经离子束处理的数目巨大的花粉经过授粉结实很容易形成庞大的变异群体,为在当代及其后代筛选突变体提供了基础;③花粉作为单倍体生殖细胞,可以直接通过授精形成后代,省去了种子处理所经历的漫长的从营养生长到生殖生长过程中对变异的淘汰漂失作用,避免了前述种子处理的嵌合体现象,一旦发生了遗传物质损伤的处理花粉形成了种子,就有较大可能在后代中传递;④利用离子束诱变花粉创造突变体库,可以为育种工作提供优良种质资源,同时特异突变体的获得也可为开展基因研究提供难得的机遇。

**2.4 其他优势** 对玉米花粉而言,作为离子束诱变研究材料除具有上述优点外,还具有无可比拟的独特优势:①玉米遗传基础相对其他作物较为简单,且已开展了广泛深入的分子生物学研究,研究基础好;②玉米雌雄异花且异位,花粉获取容易;③玉米花粉量大,材料来源丰富,授粉操作简单高效;④玉米花粉可以存活几个小时到几十个小时,与禾本科作物水稻及小麦的几分钟到几十分钟的存活时间相比,存活时间相对较长,可以保证离子束辐照操作及随后的授粉操作的完成。

### 3 玉米花粉离子束诱变研究

目前,花粉离子束诱变研究极少。周立人等对棉花花粉进行处理,发现杂交后代出现偏母遗传<sup>[22]</sup>。程备久等用玉米花粉进行了离子束处理,研究了处理花粉的基因组DNA损伤<sup>[23]</sup>。李国平等对长寿油松花粉进行了离子束辐照处理,研究了处理花粉本身结构及生化指标的变化,未进行授粉及后代研究<sup>[24-25]</sup>。王浩波等对西瓜花粉进行离子束处理,提出了当代西瓜坐果率下降,种子结实率下降的结论<sup>[13]</sup>。现有文献中大都未涉及花粉处理及田间授粉的详细方法,也未提及当代种子结实情况,诱变后代的研究也鲜有报道。故此,以玉米花粉为研究对象,探索建立花粉离子束诱变创造突变体库的新方法,开辟离子束诱变研究的新领域具有重要的理论和应用价值。

**3.1 花粉存活率测定方法的筛选** 由于花粉对离子束处理高度敏感,存在自然失水致死、真空致死、离子束辐照致死、田间高温授粉致死等诸多致死因素,故花粉从采集到预处理、抽真空、离子束辐照剂量及能量选择等都需要对花粉生活力进行全程监控,以便建立最佳的处理方法。

试验采取TTC(氯化三苯基四氮唑)测定法、I<sub>2</sub>-KI染色测定法和培养液花粉萌发测定法<sup>[26]</sup>。研究表明,TTC染色测定中,由于成熟玉米花粉呼吸作用较弱,试验中花粉显色极浅甚至无颜色变化,故不适合用于玉米花粉活力测定;I<sub>2</sub>-KI染色测定中,由于所选玉米花粉本身为成熟花粉,且在离子束辐照前后花粉内含淀粉物质无显著变化,故亦不适合用于离子束辐照前后花粉活力的测定。在培养液与培养基研究中,BK因所含蔗糖浓度较低,造成花粉细胞迅速大量破裂死亡,无法进行花粉萌发测定,为此,该试验自配了几种不同配方的培养液,通过对硼酸、硝酸钙及蔗糖浓度的筛选发现,随

着蔗糖浓度的提高,花粉破裂呈减少趋势。结合以上研究,以配方30%蔗糖、0.01% H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、0.03% Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>培养液花粉萌发测定法最为适用。

### 3.2 花粉离子束处理方法的建立

**3.2.1 花粉在靶室内固定的方法。**前人所用花粉的固定方法主要是胶水粘接固定法。如程备久等用胶水涂布培养皿上,然后直接撒上花粉<sup>[23-25]</sup>。上述方法在应用中存在几个问题:首先,胶水粘接干燥后花粉很难取下,操作复杂。而且花粉相互的粘连不易剥离,2个或多个连成一体的花粉很难在玉米花丝上萌发,这些直接影响花粉处理的数量和质量,很难得到大量处理花粉用于授粉,导致试验难以进行;其次,胶水本身对花粉萌发孔及花粉壁造成堵塞直接影响花粉萌发;再次,涂布胶水人为引入了水分,对靶室真空有不利影响。

为解决花粉固定造成的复杂操作问题,采用了如下操作:将花粉置于50 ml离心管中,于管口套3层纱布并用橡皮筋扎牢,然后倒置离心管,轻轻振荡,使花粉呈单层均匀散布在4℃预冷的培养皿底。以培养皿为底,外套倒圆锥形固定罩,以消解抽真空的吸力,同时还可使吸走的花粉重新均匀滑落回培养皿底部。经以上方法,可以代替涂布胶水操作,同时也避免了前人所用涂布胶水操作的种种不利影响。与直接置于培养皿进行辐照处理相比,减少70%的花粉因吸走的损失,提高了2倍工作效率,可以迅速获得大量处理花粉。

**3.2.2 离子束处理玉米花粉剂量及能量指标筛选。**采用氦离子为辐照离子,设50、30 keV共2种能量及1×10<sup>14</sup>、3×10<sup>14</sup>、5×10<sup>14</sup>、8×10<sup>14</sup>、10×10<sup>14</sup>、20×10<sup>14</sup>、30×10<sup>14</sup>共7种剂量,3次重复,筛选最佳处理方法。研究表明,能量30keV,1×10<sup>14</sup>剂量的氦离子辐照为试验的最佳处理方法。另外,不同基因型的花粉对辐照的敏感性不同。

**3.2.3 田间花粉采集及授粉方法。**在玉米进入抽穗吐丝期前,雌穗预先套袋隔离,以备授粉。玉米材料进入散粉盛期后,于前一天下午18:00田间选株雄穗套袋,于第2天上午9:00取花粉密闭封装于50 ml离心管并迅速置冰盒中送往室内冰箱中4℃预冷90 min备用;花粉置于50 ml离心管管口套3层纱布,倒置管口轻轻振荡使花粉成单层紧密均匀分布于预冷的培养皿底部,培养皿上套倒圆锥形外罩,防止花粉流失,然后将培养皿放入离子注入机小靶室内准备注入;以预先试验选择的合适能量及剂量进行离子注入,经过处理的花粉迅速倒入1 ml小离心管中密闭置于低温冰盒内,待花粉样品处理结束后,迅速送往大田授粉;雌穗于授粉前1 d预先剪去较长的部分花丝,留下整齐花丝授粉部位套袋备用。在防止外来花粉混杂的前提下,每次迅速取出一管花粉,打开离心管盖,管口套3层纱布,并用橡皮筋固定,倒置管口于玉米雌穗花丝上方振荡授粉,套袋,完成授粉操作。因玉米田间授粉正值高温天气,故快速完成所有授粉操作,尽量减少花粉离开冰盒暴露在高温环境中的时间是授粉成败的关键。

**3.3 辐照诱变处理后代变异效应** 试验表明,处理花粉授粉后所结实种子种植后,在F<sub>2</sub>代群体中筛选到花粉囊颜色黄色突变体1株(图1);F<sub>2</sub>代籽粒中出现了发育停滞突变体

和粉色籽粒突变体(图2);在 $F_3$ 代中出现了白化苗突变体(图3)。由此可见,以玉米花粉为材料,进行低能离子束诱



图1  $F_2$ 代植株黄色花粉囊突变体

Fig.1 Anther mutant of  $F_2$  with yellow flower



图2 籽粒发育停滞突变体(A)和粉色籽粒突变体(B)

Fig.2 Seed mutant with the arrest of growth(A) and mutant of pink seed(B)



图3  $F_3$ 代白化苗突变体

Fig.3 Mutant of  $F_3$  albino seedling

变,在 $F_2$ 代和 $F_3$ 代都发现了突变体,这初步证明玉米花粉离子束诱变是一种非常有方法。

#### 参考文献

- [1] 余增亮. 离子束生物技术引论[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,1998.
- [2] FENG H Y, YU Z L, CHU P K. Ion implantation of organisms[J]. Materials Science and Engineering:R:Reports,2006,54:49-120.
- [3] 余增亮,霍裕平. 离子注入生物学研究述评[J]. 安徽农业大学学报,1994,21(3):221-225.
- [4] 曾宪贤,武宝山,吕杰. 离子束生物学在生命科学中的应用[J]. 核技术,2006,29(2):112-115.
- [5] 常凤启,朱至清. 低能离子的生物效应及在植物生物技术上的应用[J]. 农业生物技术学报,2004,12(2):206-211.
- [6] 袁成凌,余增亮. 低能离子生物学研究进展[J]. 辐射研究与辐射工艺学报,2004,22(1):1-7.
- [7] 余增亮,何建军,王学栋,等. 离子注入水稻诱变育种机理初探[J]. 安徽农业科学,1989(1):12-16.
- [8] 吴跃进,王学栋,刘贵富,等. 离子束注入水稻诱变效应的研究[J]. 安徽农业科学,1989(2):10-13.
- [9] 甘斌杰,杨赞林,张少华,等. 离子注入小麦的变异效应[J]. 安徽农业大学学报,1993,21(3):120-122.
- [10] 周小云,计巧灵,刘亚萍. 低能离子注入对小麦种子发芽及幼苗生理生化影响[J]. 生物技术,2005,15(2):69-72.
- [11] 周柱华,邱登林,张凤云,等. 玉米自交系辐射效应的研究[J]. 玉米科学,2001,9(3):8-11.
- [12] 黄中文,王春风,崔秀珍.  $N^+$ 离子束注入对玉米的生物学效应[J]. 河南科技学院学报:自然科学版,2005,25(3):20-24.
- [13] 王浩波,高秀武,王凤辰,等.  $N^+$ 离子束对萌发西瓜种子及西瓜花粉诱变效应的研究[J]. 中国西瓜甜瓜,2005(1):4-6.
- [14] 任伟,牛西午,韩美清,等. 氮离子注入谷子诱变效应研究[J]. 山西农业大学学报,2006,26(1):7-12.
- [15] 慎玫,王彩莲,陈秋芳. 离子注入水稻种子的细胞生物学效应[J]. 安徽农业大学学报,1994,21(3):265-268.
- [16] 吴跃进,余增亮. 离子注入水稻种子萌发过程中的自由基和SOD酶研究[J]. 作物学报,1996,22(3):320-324.
- [17] 朱立武,洪泽. 氮离子注入对西瓜种子萌发及同工酶谱的影响[J]. 中国西瓜甜瓜,1996(4):12-14.
- [18] 彭镇华,胡蕙露,康忠铭,等. 离子注入杨树和银杏的同工酶研究[J]. 安徽农业大学学报,1994,21(3):255-259.
- [19] 陈若雷,宋道军,李玉峰,等. 低能 $N^+$ 离子束注入香瓜种子引起的变异及后代基因组的RAPD分析[J]. 激光生物学报,2002,11(2):75-78.
- [20] 王松丽,黄群策,王铁固,等. 低能 $N^+$ 离子束注入水稻的生物学效应研究[J]. 核农学报,2006,20(6):454-459.
- [21] JI L, LI Y W, WANG C S, et al. Studies on wheat mutants induced by nitrogen ion beam implantation[J]. Acta Genetica Sinica,2005,32(11):1176-1183.
- [22] 周立人,李爱青. 离子注入加速棉花陆海杂种农艺性状遗传稳定性的研究[J]. 激光生物学报,1998,7(3):184-187.
- [23] CHENG B J, KAN X Z. A preliminary study on DNA mutation induction of maize pollen implantation by low energy  $N^+$  beam[J]. Plasma Science & Technology,2001,3(1):659-664.
- [24] LI G P, HUANG Q, QIN G Y, et al. The effects of low-energy nitrogen ion implantation on pollen exine substructure and pollen germination of *Cedrus deodara*[J]. Plasma Science & Technology,2005,7(6):3176-3180.
- [25] LI G P, HUANG Q, QIN G Y, et al. Effects of ion implantation on *in vitro* pollen germination and cellular organization of pollen tube in *Pinus thunbergii* Parl. (Japanese black pine)[J]. Plasma Science & Technology,2006,8(5):618-623.
- [26] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,2000.

(上接第12798页)

了大气层结的不稳定,有利于不稳定能量的储存;地面中尺度低压和风场辐合线造成强烈的动力辐合上升,触发了不稳定能量的释放,形成了大暴雨中心;莱芜“喇叭口”型的地形,对大暴雨的形成起了增幅作用。

#### 参考文献

- [1] 曹钢锋,张善君,朱官忠,等. 山东天气分析与预报[M]. 北京:气象出版社,1988.
- [2] 王西磊. 2000年8月9~10日鲁中山区连续大暴雨过程分析[J]. 山东气象,2001(2):18-20.