

加速重离子辐射对玉米的诱变效应^{*}

丘运兰¹ 梅曼彤² 何远康¹ 卢永根¹

(农学系¹ 实验中心²)

摘要 用不同剂量的3种高传能线密度的加速重离子氦-20、氩-40及铁-56,与低传能线密度的钴-60 γ 射线分别照射具标志基因 (Lw_1/lw_1) 的玉米干种子,以当代植株叶片黄白条纹产生频率为指标,比较其诱发效应。结果表明:在所用剂量范围内,此4种辐射的剂量-效应关系曲线为直线。氦-20、氩-40及铁-56重离子束对应于钴-60 γ 射线的相对生物学效应分别为2.02、8.31和12.45。叶片具黄白条纹的植株自交,后代仍有黄白条纹。光学显微镜及透射电子显微镜观察发现黄白条纹部位的叶肉细胞及其内的叶绿体形态结构明显不同于正常绿叶。

关键词 重离子辐射; 诱变效应; 玉米;

近10多年来,随着加速器技术的进步,加速重离子辐射生物学的研究也有了较大的进展。以体外培养的哺乳动物细胞及人体细胞为材料进行的研究表明:具高传能线密度 (Linear Energy Transfer 简称LET,下同) 的重离子束在诱发细胞突变、癌性转化等方面远较低LET的X、 γ 射线有效^[7]。

在作物辐射育种研究中,近年来已取得不少成果^[3],但采用的辐射源多为 γ 射线源;与此同时,对X、 γ 射线照射植物种子效应的研究也取得相应的进展。而加速重离子辐射对植物的生物学效应的研究报导不多。Freeling等^[1]及Yang^[6]的研究均以玉米为材料,以不同指标比较X、 γ 射线与重离子辐射产生的效应,但均只以一种重离子与低LET辐射作比较,未能探讨LET与相对生物学效应 (Relative Biological Effectiveness 简称RBE,下同) 之间的关系。

用具标志基因的杂合体玉米种子为材料,以标志显性基因的缺失或功能损失而导致叶片上出现黄白条纹/条斑的频率为指标,比较不同种类电离辐射生物学效应的研究在60~70年代均有开展^[5],且其结果有助于估计某种辐射在诱变上的有效性,为进一步利用提供依据。

本试验使用具不同LET的3种重离子辐射及钴-60 γ 射线,分别照射具柠檬白基因 (Lw_1/lw_1) 的玉米干种子,比较诱发叶片黄白条纹出现的效应,了解它们诱变有效性的异同,以探讨重离子辐射在作物改良上应用的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料

^{*} 本研究为华南农业大学校长基金资助项目。本文的部分内容曾以英文摘要形式刊登于第八届国际辐射研究学术会议论文集第一卷 (1987年英国出版)。

1990年4月16日收稿。

具标志基因的玉米种子来自美国 Ratio Seeds Co.; 其第1对染色体上有一个隐性柠檬白基因(lw_1)和一个显性基因(Lw_1), 为一对显隐性基因的杂合体(Lw_1/lw_1), 植株表现为绿叶。如果种子胚细胞第1染色体上的(Lw_1)基因缺失或损伤, 会导致叶片出现黄色或白色条纹。

1.2 照射处理

不同剂量的高能 ^{20}Ne 、 ^{40}Ar 和 ^{56}Fe 离子束对玉米干种子的照射处理在美国加利福尼亚大学劳伦斯伯克莱研究所(Lawrence Berkeley Laboratory)的大型线性回旋加速器组合(Bevalac)进行。 ^{60}Co 照射处理则在华南农业大学广东辐照中心进行。用未经任何处理的同批种子作对照。各种处理的物理参数见表1。

表1 不同电离辐射的物理参数

辐射类型	射线能量	传能线密度(LET)	相对生物学效应(RBE)
^{20}Ne 离子束	425.00 MeV/u	32.00 keV/ μm	2.02
^{40}Ar 离子束	400.00 MeV/u	117.00 keV/ μm	8.31
^{56}Fe 离子束	600.00 MeV/u	190.00 keV/ μm	12.45
^{60}Co 射线	1.17Mev	0.27 keV/ μm	1.00

分批照射处理的种子于1986年3月~1987年7月分3次重复, 在华南农业大学试验农场种植。每一重复播50粒种子, 为保证全苗, 种子先播于营养杯中, 长至4片叶时移栽大田。于生长期观察不同辐射类型、不同照射剂量对生长发育的抑制情况。

观察调查各辐射处理区黄白条纹出现的情况, 以比较 ^{20}Ne 、 ^{40}Ar 、 ^{56}Fe 离子束与 ^{60}Co — γ 射线的相对生物学效应。

对部分连续出现黄白条纹的植株自交, 观察 M_2 代黄白条纹的重演性。

对叶片黄白条纹部位和正常绿叶分别用4%的戊二醛固定, 乙二醇甲基丙烯酸脂(Glycol methacrylate 简称GMA)包埋切成2 μm 的薄切片^[2], 在Olympus光学显微镜下观察叶肉细胞的形态结构; 同时, 按透射电镜生物标本制片技术进行制样, 观察叶肉细胞叶绿体的超微结构。

2 结果与讨论

2.1 不同辐射源对玉米生长的影响及诱发叶片黄白条纹的出现率

本试验用的4种电离辐射各选用不同的剂量, 电离辐射源的LET越高, 选用的照射剂量越低(图1的各坐标点); 但所选用的重离子照射的剂量均不影响玉米植株的正常生长发育、开花结苞。而在 ^{60}Co γ 射线照射的处理中, 200 Gy以上的处理区生长均受明显抑制, 植株矮小、羸弱、结苞较差(图版I-1)。

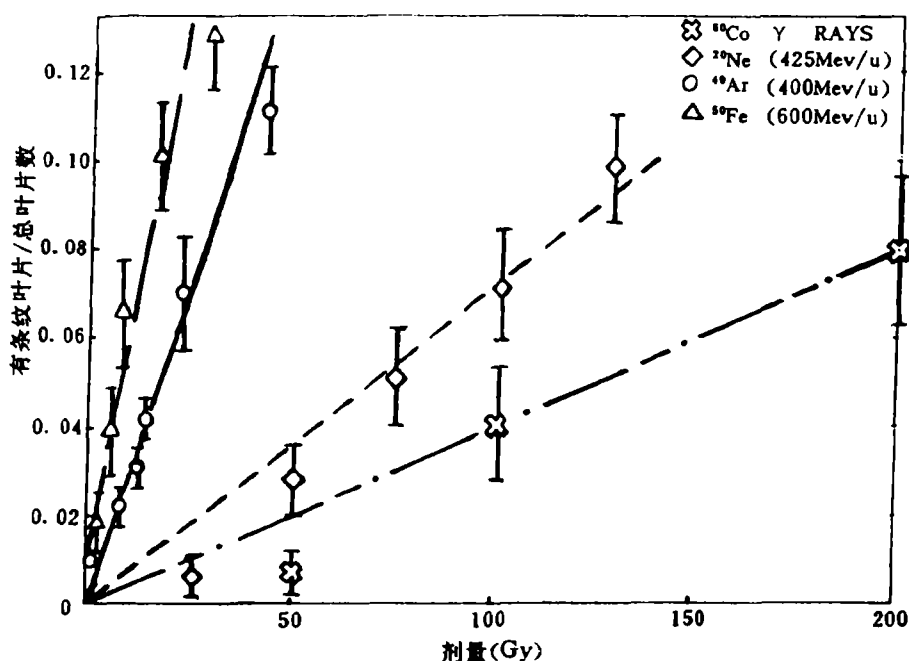


图1 剂量效应曲线

4种照射处理, 均能诱发当代植株叶片出现黄色或白色条纹(图版1-4)。条纹一般出现于第4、5片以后的叶片上, 亦有连续出现于数叶上的情况, 这与文献^[4]报导的情况类似。一般早期叶片条纹细小, 多为黄色, 在生长发育过程中会逐渐消失。而后生叶片条纹较宽、较长(图版1-3)、有黄与白2种, 且多不消失。Yang等^[6]曾以后生叶片的每个胚细胞较早生叶片经历更多的细胞分裂来解释此现象。我们解剖玉米成熟的种子胚, 观察到胚芽已分化5~6片幼叶, 它们都有可能在照射时受到辐射的损伤, 由此看来, Yang的分析有一定道理。

在 ^{40}Ar 离子束12 Gy处理区, 10%植株茎秆和叶片上连续出现条纹。有些条纹从茎、叶鞘、叶片、苞叶一直延伸至雄花(图版1-2), 雄花的颖片也是白色的。目前仍未见有关这类现象的文献报导。这可能是重离子束击中生长点细胞内第1染色体上的显性柠檬白基因(Lw_1), 使其缺失或功能损失, 导致这一细胞中的隐性基因(lw_1)得以表达, 并由这种细胞不断分裂形成连续的条纹。

把部分黄白条纹直线延伸至雄花的植株自交, M_2 代仍有黄白条纹出现(图版1-5), 说明变异可能涉及到性细胞, 还有待进一步研究证实。

2.2 叶片黄白条纹出现率与剂量的关系

统计各种辐射、不同剂量处理区出现黄白条纹的叶片数, 以有条纹叶片数与该处理区叶片总数之比作为诱变效应指标, 以最小二乘法对其与剂量关系作线性回归分析。结果表明: 回归关系非常显著, 据此绘出各辐射处理的剂量-条纹出现率关系曲线, 并标出相应的实例数据点及其标准差(图1)。从图1可见, 使用同一剂量, 高LET的电离辐射诱发条纹出现率较高。LET最高的 ^{56}Fe 离子束(表1)在低剂量下能诱发较多的叶片产生条纹, ^{40}Ar 的有效性次之, ^{60}Co γ 射线最差。40 Gy ^{40}Ar 离子束的辐射可诱发与

200 Gy ^{60}Co γ 射线同样比例的有条纹叶片,对照图版 I-1 可见,前者对生长发育基本无抑制作用,而后者则有明显的生长抑制。观察还发现,重离子辐射诱发的条纹较长而宽。可认为具较高 LET 的重离子束(如 ^{40}Ar) 在引起某些基因(如 Lw_1) 的缺失或失去功能上较为有效。在诱变育种中可设想选用较低剂量,以减少用 γ 射线高剂量照射引起的明显的生理损伤,而仍保持较高的诱变频率。

据图 1 还可计算出 ^{20}Ne 、 ^{40}Ar 、 ^{56}Fe 3 种离子对 ^{60}Co γ 射线的 RBE 分别为 2.02、8.31 和 12.45。Freeling 等^[4]曾以玉米花粉乙醇酸脱氢酶基因的突变为指标,计算得 ^{20}Ne (400 MeV/u) 重离子辐射对 220 keV X 射线的 RBE 为 5.00,高于本实验中 ^{20}Ne 对 ^{60}Co γ 射线的 RBE,可能因为他们使用的系统对不同辐射更为敏感。已有的一些实验结果还表明:以哺乳动物细胞对某些化学药物抗性突变或细胞赘性转化为指标,在 LET 为 20~200 keV/ μm 的范围内,高能粒子辐射产生的效应随 LET 增加而增加^[7],本试验使用的重离子辐射处于 LET 从 32~190 keV/ μm 的范围,LET 与 RBE 关系与上述文献报导类似。可见以出现条纹叶片率作为判断其辐射效应指标是可行的。

2.3 叶片条纹部位的显微和超显微结构

对生长已经定型叶片的白色条纹部位和正常绿叶分别用 GMA 包埋横切片,于光学显微镜下观察。正常绿叶的维管束及叶肉细胞均正常(图版 II-4),而白色条纹部位细胞解体成残渣粘连在一起(图版 II-5)。

透射电子显微镜观察发现,正常绿叶叶肉细胞的叶绿体数目多、基粒片层丰富、清晰(图版 II-1)。黄色条纹部位的叶肉细胞虽有少量的叶绿体,但其基粒片层明显减少(图版 II-3),并在细胞内见到多膜体。而白色条纹部位的叶肉细胞没有叶绿体(图版 II-2),有些细胞被降解成残渣。

研究表明,植物的光合作用是在细胞内的叶绿体膜上进行的,而这种光合膜的形成必须有光照的条件下才能进行,这已通过黄化苗转绿的试验得到证实^[1]。本试验在白色条纹部位细胞内未能观察到叶绿体,可能是电离辐射导致杂合体 (Lw_1/lw_1) 叶肉细胞内的显性基因缺失或功能损失,而抑制前质体向叶绿体转变的过程。在正常光照条件下,以生长定型叶片作观察,而在白色条纹部位发现细胞解体现象,似可用这些生长已定型而又不具光合作用功能部位的细胞较之绿色部位早衰老死亡来解释。

若电离辐射对 Lw_1 基因的损伤较轻,可能未完全抑制前质体转变为叶绿体的过程,故仍有结构较简单的叶绿体出现,但对光合作用起关键作用的叶绿素未有形成,表现为叶片上出现黄色条纹。看来, Lw_1 基因与叶绿体结构发育之间可能有一定的关系,还需进一步研究。

致谢 承美国加利福尼亚大学劳伦斯伯克莱研究所杨垂绪博士 (Dr. Tracy Yang) 提供试验用的玉米种子及协助进行重离子照射处理,谨致谢忱。

参 考 文 献

- 1 林世青, 张其德等. 小麦叶绿体膜的发育. 光合作用研究进展. 第三集, 北京: 科学出版社, 1984. 40~52
- 2 徐是雄. 塑料薄切片技术. 细胞生物学杂志, 1980, 2 (4): 31~36
- 3 Micke, A. 世界植物突变育种回顾和主要成就. 原子能农业应用增刊 (植物突变育种专辑), 1985, 1~7
- 4 Freeling, M. and Cheng, D. K. Radiation—induced alcohol dehydrogenase mutants in maize following allyl alcohol selection of pollen. Genet. Res. Camb. 1978, 31: 107~129
- 5 Micke, A. et al., Relative cytogenetic efficiency of muons and mesons in *Zea mays* (L.) and its modification by postirradiation storage. Radiation Research, 1964, 33: 537~550
- 6 Yang, T. C. and Tobias, C. A. potential use of heavy ion radiation in crop improvement. In proceeding of Gamma Field Symposia No. 18, Crop improvement by induced mutation 1979, 141~154
- 7 Yang, T. C. et al., Neoplastic cell transformation by heavy charged particles. Radiation Research, 1985, 104: S-177~S-187

MUTAGENIC EFFECTS OF ACCELERATED HEAVY ION IRRADIATION ON *ZEAMAYS*

Qiu Yunlan¹ Mei Mantong² He Yuankang¹ Lu Yonggen¹

(Department of Agronomy¹, Experimental Center²)

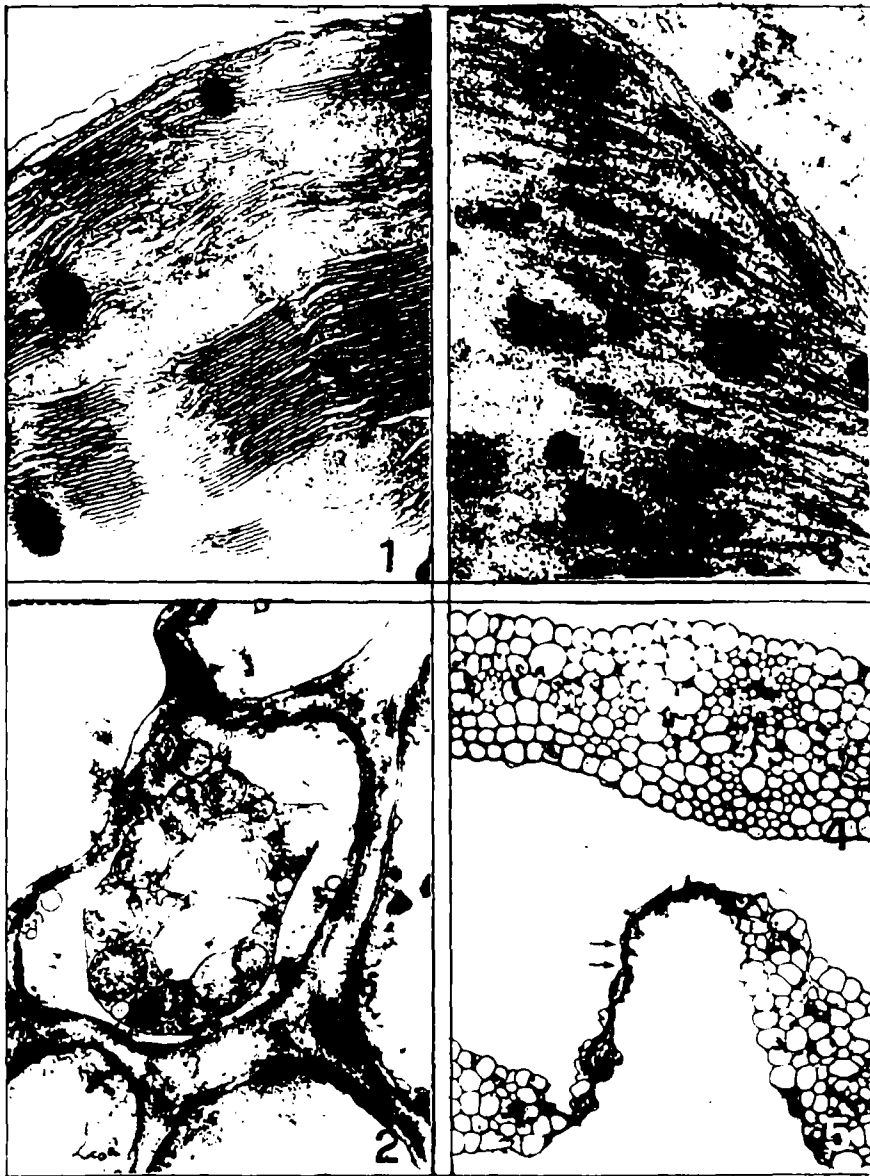
Abstract The frequency of occurrence of white—yellow stripes on plant leaves, developed from irradiated maize seeds containing lemon—white gene (Lw_1/lw_1), was used as a criterion in comparing the mutagenic effects of high LET heavy ion beam and low LET radiation. Dose—response curves for ^{20}Ne , ^{40}Ar , ^{56}Fe ion beam, and ^{60}Co gamma rays were linear. The RBE for neon, argon and iron beam, when compared with ^{60}Co gamma rays, were 2.02, 8.31, and 12.45, respectively. Lemon—white gene mutation was observed in inbred plants in the second generation. Electron microscope observation showed that both the structure and the number of chloroplasts in mesophyll cells of white—yellow stripes were significantly altered.

Key words Heavy ion irradiation; Mutagenic effect; Maize



图版 I 1 ^{40}Ar 离子束和 ^{60}Co γ 射线处理种子对生长抑制的比较, 示 ^{60}Co γ 射线对生长的抑制作用。

- 2 白色条纹从植株中部的茎、叶鞘、叶片伸至雄花 (黑、白箭头所示), 种子以 ^{40}Ar 12 Gy 处理。
- 3 大的白色条纹出现在8~13叶片上 (箭头所示), 种子以 ^{40}Ar 20 Gy 处理。
- 4 离子束处理在叶片上出现黄色条纹 (小箭头所示) 和白色条纹 (大箭头所示)。
- 5 黄白条纹出现在自交后代 (M_2) 上, 种子以 ^{40}Ar 6 Gy 处理。



图版Ⅰ 1 绿叶叶肉细胞叶绿体超微结构, 示基粒片层丰富、清晰。 $\times 30\ 000$
 2 白色条纹部位叶肉细胞超微结构, 示无叶绿体。 $\times 8\ 350$
 3 黄色条纹部位叶肉细胞叶绿体超微结构, 示基粒片层明显减少、清晰度较差。 $\times 39\ 000$
 4 绿叶的横切片。 $\times 275$
 5 白色条纹部位的横切片, 示叶肉细胞解体粘连 (箭头所示)。 $\times 275$