

DOI:10.11686/cyxb2023438

http://cyxb.magtech.com.cn

张鹤山, 陆皎云, 朱伟, 等. N^+ 和 Ar^+ 注入红三叶种子的诱变效应研究. 草业学报, 2024, 33(7): 160—171.
ZHANG He-shan, LU Jiao-yun, ZHU Wei, *et al.* A study of the mutagenic effect in red clover induced by N^+ and Ar^+ . Acta Prataculturae Sinica, 2024, 33(7): 160—171.

N^+ 和 Ar^+ 注入红三叶种子的诱变效应研究

张鹤山¹, 陆皎云¹, 朱伟², 田宏¹, 熊军波¹, 吴新江¹, 刘洋^{1*}

(1. 湖北省农业科学院畜牧兽医研究所, 湖北省动物胚胎及分子育种重点实验室, 湖北 武汉 430064; 2. 咸宁市农业科学院, 湖北 咸宁 437100)

摘要:离子注入技术是创制植物新种质的有效手段。为探究离子注入红三叶的诱变效应,以不同注入能量和剂量的 N^+ (能量 30 或 50 keV, 剂量 5×10^{14} 或 5×10^{15} ions $\cdot\text{cm}^{-2}$, 分别记为 N3014、N3015、N5014、N5015)和 Ar^+ (能量 30 或 50 keV, 剂量 5×10^{14} ions $\cdot\text{cm}^{-2}$, 分别记为 Ar3014 和 Ar5014)注入“鄂牧 5 号”红三叶种子,研究种子诱变后的萌发特征和生物学特性,并通过株高、单株分枝数、单株花序数、花序小花数、叶片长度、叶片宽度、花序长度以及花序宽度等农艺性状对诱变单株进行变异分析。结果表明,离子注入后红三叶种子表皮具有明显的“灼伤”现象,种皮颜色变成黑褐色。相比于对照,Ar3014 处理下发芽率指标值略有提高,处理 N3014 和 N3015 的发芽率指标值略有降低,但与对照均差异不显著。N5014 处理显著降低了种子发芽率($P<0.05$),比对照低约 10%,处理 N5015 和 Ar5014 发芽率更是降低超过 30%($P<0.05$)。注入能量为 30 keV 的 2 个 N^+ 处理显著增加了胚根体积和胚根长度($P<0.05$)。经离子诱变的种子(M_1 代)种植后生产 M_2 代种子,依次生产 M_3 和 M_4 代种子。 M_2 代植株各性状平均值显著低于对照($P<0.05$),但表现出更大的性状变异特征,为进一步筛选突变材料奠定基础。50 keV 的 N^+ 和 Ar^+ 诱变处理具有更大的诱变效应,但主要是不利突变。红三叶适宜的 N^+ 诱变能量为 30 keV,剂量为 $5\times10^{14}\sim5\times10^{15}$ ions $\cdot\text{cm}^{-2}$ 。经过 4 个世代选育,获得 8 个性状稳定并具有潜在利用价值的 M_4 代突变体材料,为红三叶诱变育种提供基础资料。

关键词:红三叶;氮离子;氩离子;诱变;生物学效应

A study of the mutagenic effect in red clover induced by N^+ and Ar^+

ZHANG He-shan¹, LU Jiao-yun¹, ZHU Wei², TIAN Hong¹, XIONG Jun-bo¹, WU Xin-jiang¹, LIU Yang^{1*}

1. Hubei Key Laboratory of Animal Embryo and Molecular Breeding, Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China; 2. Xianning Academy of Agricultural Sciences, Xianning 437100, China

Abstract: Ion implantation technology is an effective means to create new plant germplasm lines. In order to explore the biological effect on red clover (*Trifolium pratense*) induced by ion implantation, the seeds of *T. pratense* cv. ‘Emu 5’ were implanted with N^+ ions at energies of 30 or 50 keV and doses of 5×10^{14} or 5×10^{15} ions $\cdot\text{cm}^{-2}$ (N3014, N3015, N5014 or N5015, respectively) or Ar^+ ions with energies of 30 or 50 keV and a dose of 5×10^{14} ions $\cdot\text{cm}^{-2}$ (Ar3014 and Ar5014, respectively). The germination characteristics and biological characteristics of irradiated seeds were studied and the variation in agronomic traits, including plant height, branch number per plant, flower number per plant, flower number per inflorescence, leaf length, leaf width, inflorescence length and inflorescence width, was analyzed. We found that the epidermis of red clover seed displayed an obvious ‘burn’ phenomenon after ion implantation, and the color of seed coat changed from yellowish brown to black-brown. Compared to control (CK), the Ar3014 treatment numerically increased seed germination, while the N3014 and

收稿日期:2023-11-17;改回日期:2023-12-15

基金项目:湖北省农业科技创新中心(2021-620-000-001-021)和国家现代农业产业技术体系(CARS-34)资助。

作者简介:张鹤山(1979—),男,山东乐陵人,副研究员,硕士。E-mail: sdzhanghs@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: liuyang430209@163.com

N3015 treatments numerically decreased seed germination; however, these trends were not statistically significant. The N5014 treatment significantly decreased germination by approximately 10% compared to CK and the N5015 and Ar5014 treatments both significantly decreased germination by more than 30%. Radicle volume and length were both significantly increased, compared to CK, by the two N30 irradiation treatments. The irradiated seeds (M_1 generation) were grown and allowed to set seed, which was also grown to produce an M_2 generation. This cycle was repeated twice more to produce M_3 and M_4 generation seeds. The mean values of measured traits in M_2 generation plants were usually significantly lower than those in CK plants ($P < 0.05$), but showed greater character variation among mutagenic plants, which provided a basis for further screening of mutant materials. N^+ and Ar^+ mutagenic treatments at energies of 50 keV showed greater mutagenic effects than those observed at 30 keV, but the majority of mutations were adverse characters. The mutagenic effect was optimal for red clover in the N3014 and N3015 treatments and after four generations of breeding, eight mutant materials from the M_4 generation with stable characters, potentially usable for breeding purposes, were obtained. Our study provides basic data for mutation breeding in red clover.

Key words: red clover; nitrogen ion; argon ion; mutagenesis; biological effect

诱变育种对农业生产具有重要意义^[1],全世界通过诱变技术已经培育超过 3000 多个作物品种(mutant variety database, <https://nucleus.iaea.org/sites/mvd/SitePages/Home.aspx#>)。尽管这些作物品种多数由 γ 射线诱变而来,但越来越多研究表明,离子束诱变育种对材料损伤轻、突变率高、突变谱广^[2],具有比 γ 射线更高效的诱变效应^[3],因此,利用离子束注入技术进行植物诱变育种是创造新材料(突变体)的有效方式,已被育种工作者成功用于水稻(*Oryza sativa*)、蔬菜、花卉等种质创制和新品种选育^[4]。我国离子束诱变育种始于 20 世纪 80 年代^[5],首先应用于水稻突变体的筛选^[6],育成早籼 14^[7]、晚粳 M1148^[8] 等多个水稻品种,此后在小麦(*Triticum aestivum*)^[9]、玉米(*Zea mays*)^[10]、大豆(*Glycine max*)^[11]、高粱(*Sorghum bicolor*)^[12]、番茄(*Solanum lycopersicum*)^[13],以及观赏植物菊花(*Chrysanthemum morifolium*)^[14]、康乃馨(*Dianthus caryophyllus*)^[15] 等物种中广泛应用,已成为世界上利用诱变技术培育新品种数量最多的国家(mutant variety database, <https://nucleus.iaea.org/sites/mvd/SitePages/Home.aspx#>)。

红三叶(*Trifolium pratense*)是豆科车轴草属优良牧草,起源于地中海地区^[16],在世界各地被广泛栽培,我国在 19 世纪引进后在湖北巴东地区作为“养马草”进行栽培^[17],现已分布于中国大部分地区,广泛用于南方草山草坡改良和人工草地建设,对当地草食畜牧业发展发挥了重要作用。我国红三叶育种工作起步较晚,全国已审定登记红三叶品种 7 个,占审定草品种数量的 1.1%,远不能满足草食畜牧业生产对优良红三叶品种的需求。当前牧草育种技术主要采用杂交、野生驯化等常规手段,诱变育种在饲草中应用较少。截至 2022 年,我国采用诱变技术培育的牧草新品种仅有 13 个,占总数量的 2.1%,且多数是通过航空诱变或 ^{60}Co 辐照技术获得的,利用离子束诱变育种方法培育的牧草品种未见报道。因此,开展离子束注入红三叶诱变育种相关研究对于加快红三叶育种进程,提高红三叶有益材料的突变效率具有重要支撑作用。

氮离子(N^+)是最早应用于离子束诱变育种的离子之一^[18],广泛应用于水稻和小麦等作物诱变育种^[9,19]。郑冬官等^[20]利用 N^+ 注入棉花(*Gossypium hirsutum*)种子获得了早熟、抗倒伏性材料;高铁等^[21]利用 N^+ 注入小麦种子获得低秆小麦新品系。氩离子(Ar^+)也是重要的离子束诱变源,不仅在作物诱变育种中得到应用^[22],而且对植物抗逆性具有影响。黄洪云^[23]发现 Ar^+ 可以提高大豆种质的抗旱性,葛娟等^[24]研究表明 Ar^+ 注入促进紫花苜蓿(*Medicago sativa*)根系生长,提高幼苗过氧化物含量。然而,每个物种对适宜离子注入能量和剂量的需求不同,过小的剂量诱变效果差,剂量过大又会造成种子萌发率太低^[25]。许多物种采用 30 keV 的注入能量^[26-29],但 25 keV 的注入能量在多个物种上也已应用^[30-31]。为探究离子注入对红三叶种子的诱变效应,本研究以 N^+ 和 Ar^+ 为诱变源,研究红三叶离子束诱变的适宜注入条件,并分析其突变后代生物学效应,以期获得有益的红三叶突变体材料,为优质高产红三叶新品种选育提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为“鄂牧5号”红三叶种子,由湖北省农业科学院畜牧兽医研究所提供。试验地点位于湖北省武汉市江夏区国家牧草种质资源圃(武汉),地理位置东经114.14°,北纬30.26°,海拔23 m。土壤为丘陵黄土,肥力中等。试验时间为2018—2022年。

1.2 试验方法

1.2.1 诱变处理 选择饱满一致、干燥的红三叶种子随机分成7份,每份1000粒。采用 N^+ 和 Ar^+ 注入进行诱变,根据前期预试验,设计7个诱变处理(能量和剂量),4个为 N^+ 注入处理,包括注入能量30 keV,剂量分别为 5×10^{14} ions \cdot cm $^{-2}$ (记为N3014)和 5×10^{15} ions \cdot cm $^{-2}$ (记为N3015),注入能量50 keV,剂量分别为 5×10^{14} ions \cdot cm $^{-2}$ (记为N5014)和 5×10^{15} ions \cdot cm $^{-2}$ (记为N5015)。2个 Ar^+ 注入处理,注入剂量均为 5×10^{14} ions \cdot cm $^{-2}$,能量分别为30 keV(记为Ar3014)和50 keV(记为Ar5014),另设1个对照(记为CK)。离子注入工作由武汉大学离子束功能与材料实验室协助完成,靶室真空度低于 8×10^{-4} Pa。

1.2.2 发芽试验 经离子诱变后的种子即为 M_1 代种子。发芽试验参照《草种子检验规程 发芽试验》(GB/T 2930.4-2017)^[32]标准执行。每个发芽盒内放置2层滤纸,加入20 mL的蒸馏水,均匀摆放 M_1 代种子100粒,于人工气候箱(LRH-550-GSI,广州)进行培养,培养箱温度(20 ± 1) $^{\circ}$ C,16 h黑暗/8 h光照,每个处理3次重复。种子萌发第10天统计发芽数及测定相关指标。

1.2.3 田间评价 为观测 M_1 代种子的物候期,2019年2月27日将每个诱变处理的种子在营养钵中育苗,待长出4~5片真叶后移栽至大田,每个处理种植300株,株行距60 cm;种子成熟后每个处理单独收种,即为 M_2 代。2019年9月将获得的 M_2 代种子按不同处理单独混合均匀后随机取部分种子育苗,每个处理育苗300株,长至4~5片真叶后移栽至大田,株行距60 cm。2020年测定各单株农艺性状,根据植株高矮、花序多少、早晚熟等性状筛选突变单株,单独标记收种,即为 M_3 代突变材料。2020年9月将 M_3 代突变单株种子用上述方法育苗移栽,按株系种植,株行距60 cm,2021年以饲草产量和种子产量为主要筛选指标对株系进行评价筛选,获得优良株系,将优良株系单独收种(M_4 代)。同年秋季将 M_4 代优良株系育苗移栽至大田,株行距60 cm,2022年评价优良株系相关农艺性状。每一世代以未诱变种子为对照,对照和每个处理各种植1个小区,小区间隔2 m。田间评价流程见图1。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 萌发性状测定 发芽率(germination ratio, GR):统计

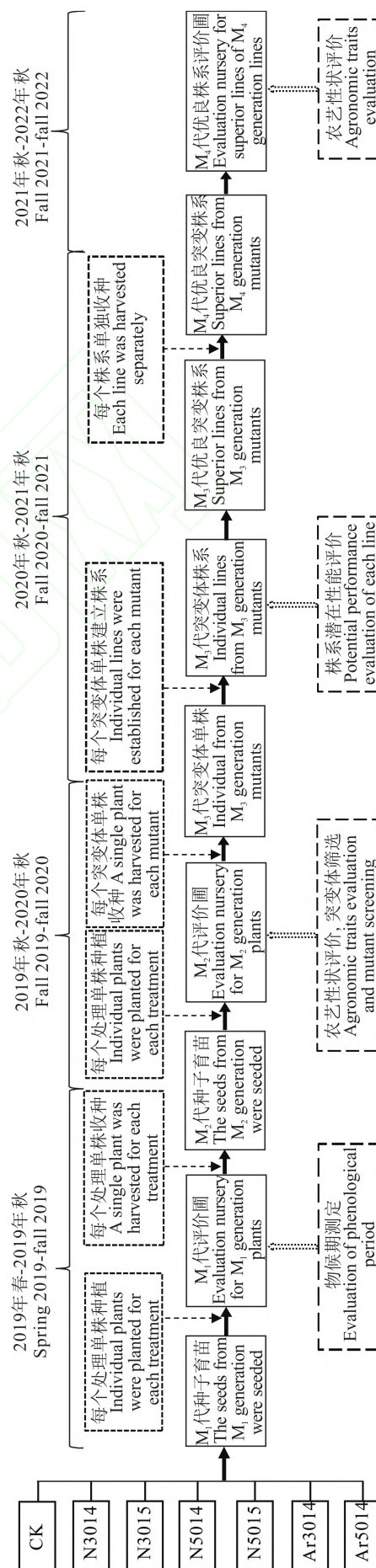


图1 田间评价流程

Fig. 1 A flow chart for characteristic evaluation in the filed

每个发芽盒内的发芽种子数,以发芽种子数占总种子数的百分比表示发芽率;胚根长度(radicle length, RL)、胚根直径(radicle diameter, RD)、胚根体积(radicle volume, RV)、胚芽长度(germ length, PL)和胚芽直径(germ diameter, PD):利用扫描仪(Expression 10000XL,日本)扫描根系后,用根系分析系统(WinRHIZO software 5.0, Regent instruments, Quebec, Canada Inc.)进行分析,每重复测定10次,取平均值。

1.3.2 物候期观测 播种期(sowing date, SD)、出苗期(germination date, GD)、分枝期(branching date, BD)、现蕾期(flower bud date, FD)、初花期(early flowering date, EFD)、盛花期(full bloom date, FBD)、结荚期(pod bearing date, PBD)、种子成熟期(seed maturity date, SMD)和生育天数(growth days, GD)等指标按照《三叶草种质资源描述规范和数据标准》^[33]测定。

1.3.3 农艺性状评价 农艺性状指标测定在盛花期进行,每个指标3个重复,每个重复测定20次,取平均值。株高(plant height, PH):从地面至植株顶部的绝对高度;单株分枝数(branches number per plant, BNP):每个植株主枝上的一级枝条数量;叶片长度(leaf length, LL):植株中部三出复叶的顶生小叶从小叶柄基部至叶尖的长度;叶片宽度(leaf width, LW):植株中部三出复叶的顶生小叶最宽处的长度;单株花序数(inflorescence number per plant, INP):每个单株上所有花序的数量,包括现蕾期的花序;花序长度(inflorescence length, IL):植株中部花序基部至顶部的长度;花序宽度(inflorescence width, IW):植株中部花序最宽位置处的长度;花序小花数(flower number per inflorescence, FNI):单个花序上所有小花朵的数量。

1.3.4 突变单株筛选 根据红三叶生长特性和实际生产需求,主要以潜在生物产量、潜在种子产量和种子熟性作为筛选目标,具体标准为:植株高度高于对照平均值20%认为有良好的潜在生物产量,定义为高大类型;植株高度低于对照平均值20%定义为低矮类型,考察其抗逆性;单株花序数高于对照20%认为有良好的潜在种子产量,定义为多花型;种子成熟早于或晚于对照5 d及以上的单株定义为早熟型或晚熟型。

1.4 数据处理

采用EXCEL和SPSS (IBM SPSS Statistics 21)软件进行统计分析,多重比较采用Duncan法。

2 结果与分析

2.1 离子注入对M₁代红三叶种子的影响

经N⁺或Ar⁺注入的红三叶种子表皮颜色发生了明显的变化(图2)。相比于对照,经离子注入的种子表皮颜色暗黄或发黑。相同注入能量下,离子注入剂量越高对种子表皮的“灼伤”越严重,表现为种皮变得更暗黄或黑色(图2中N3015和N5015);相同剂量和能量下N⁺和Ar⁺对红三叶种子表皮颜色的影响并不明显。

离子注入后的M₁代种子发芽率、胚根和胚芽性状特征见图3。N⁺注入的种子发芽率均低于对照,为对照的54.7%~93.3%。在30 keV的N⁺注入能量下,5×10¹⁴和5×10¹⁵ ions·cm⁻²剂量下的发芽率分别比对照降低1.0%和2.8%,注入能量在50 keV时,2个剂量处理(5×10¹⁴和5×10¹⁵ ions·cm⁻²)下的发芽率均显著低于对照($P<0.05$)。此外,2个剂量处理(5×10¹⁴和5×10¹⁵ ions·cm⁻²)在注入能量为30 keV时发芽率差异不显著,但在注入能量为50 keV时发芽率差异达显著水平($P<0.05$)。相对于N⁺对红三叶种子萌发的抑制作用,低能量低剂量的Ar⁺注入(30 keV, 5×10¹⁴ ions·cm⁻²)促进了红三叶种子萌发,发芽率较对照提高2.9%,而高能量高剂量的Ar⁺注入(50 keV, 5×10¹⁴ ions·cm⁻²)显著抑制了种子萌发,发芽率为对照的69.7%($P<0.05$)。在相同离子注入能量和剂量条件下,低能量时(30 keV)N⁺注入对种子萌发的抑制作用强于Ar⁺,但在高能量(50 keV)时则相反,且发芽率在2个剂量水平间显著差异($P<0.05$)。

N⁺或Ar⁺注入对红三叶胚根和胚芽的生长发育亦有显著影响(图3)。N3014和N3015处理下的胚根长度显著高于对照($P<0.05$),分别为对照的1.72和1.50倍。N5015处理下胚根生长受抑最严重,其长度仅为对照的30%($P<0.05$),其胚芽长度也显著低于对照($P<0.05$)。相同离子注入条件下,Ar⁺对胚根和胚芽生长的抑制作用比N⁺更强($P<0.05$)。胚根体积具有和胚根长度相似的变化趋势,N3014和N3015处理下胚根体积显著高于对照($P<0.05$),其他处理则低于对照($P<0.05$)。N⁺注入下的胚根直径相比于对照有升高也有降低,但均与对照差异不显著。低剂量Ar3014处理下胚根直径显著高于对照,而高剂量Ar5014处理胚根直径显著低于对照

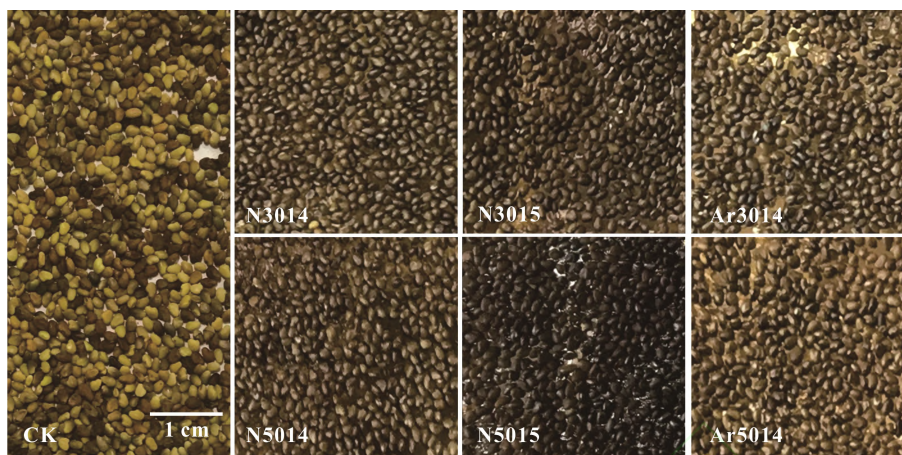


图2 离子注入后红三叶种子表皮特征

Fig. 2 Phenotypic characteristics of seeds of red clover after ion beam injection

CK: 对照; N3014: N^+ 注入, 能量为 30 keV, 剂量为 5×10^{14} ions \cdot cm $^{-2}$; N3015: N^+ 注入, 能量为 30 keV, 剂量为 5×10^{15} ions \cdot cm $^{-2}$; N5014: N^+ 注入, 能量为 50 keV, 剂量为 5×10^{14} ions \cdot cm $^{-2}$; N5015: N^+ 注入, 能量为 50 keV, 剂量为 5×10^{15} ions \cdot cm $^{-2}$; Ar3014: Ar^+ 注入, 能量为 30 keV, 剂量为 5×10^{14} ions \cdot cm $^{-2}$; Ar5014: Ar^+ 注入, 能量为 50 keV, 剂量为 5×10^{14} ions \cdot cm $^{-2}$ 。下同。CK: Control; N3014: N^+ ion implantation, 30 keV, 5×10^{14} ions \cdot cm $^{-2}$; N3015: N^+ ion implantation, 30 keV, 5×10^{15} ions \cdot cm $^{-2}$; N5014: N^+ ion implantation, 50 keV, 5×10^{14} ions \cdot cm $^{-2}$; N5015: N^+ ion implantation, 50 keV, 5×10^{15} ions \cdot cm $^{-2}$; Ar3014: Ar^+ ion implantation, 30 keV, 5×10^{14} ions \cdot cm $^{-2}$; Ar5014: Ar^+ ion implantation, 50 keV, 5×10^{14} ions \cdot cm $^{-2}$. The same below.

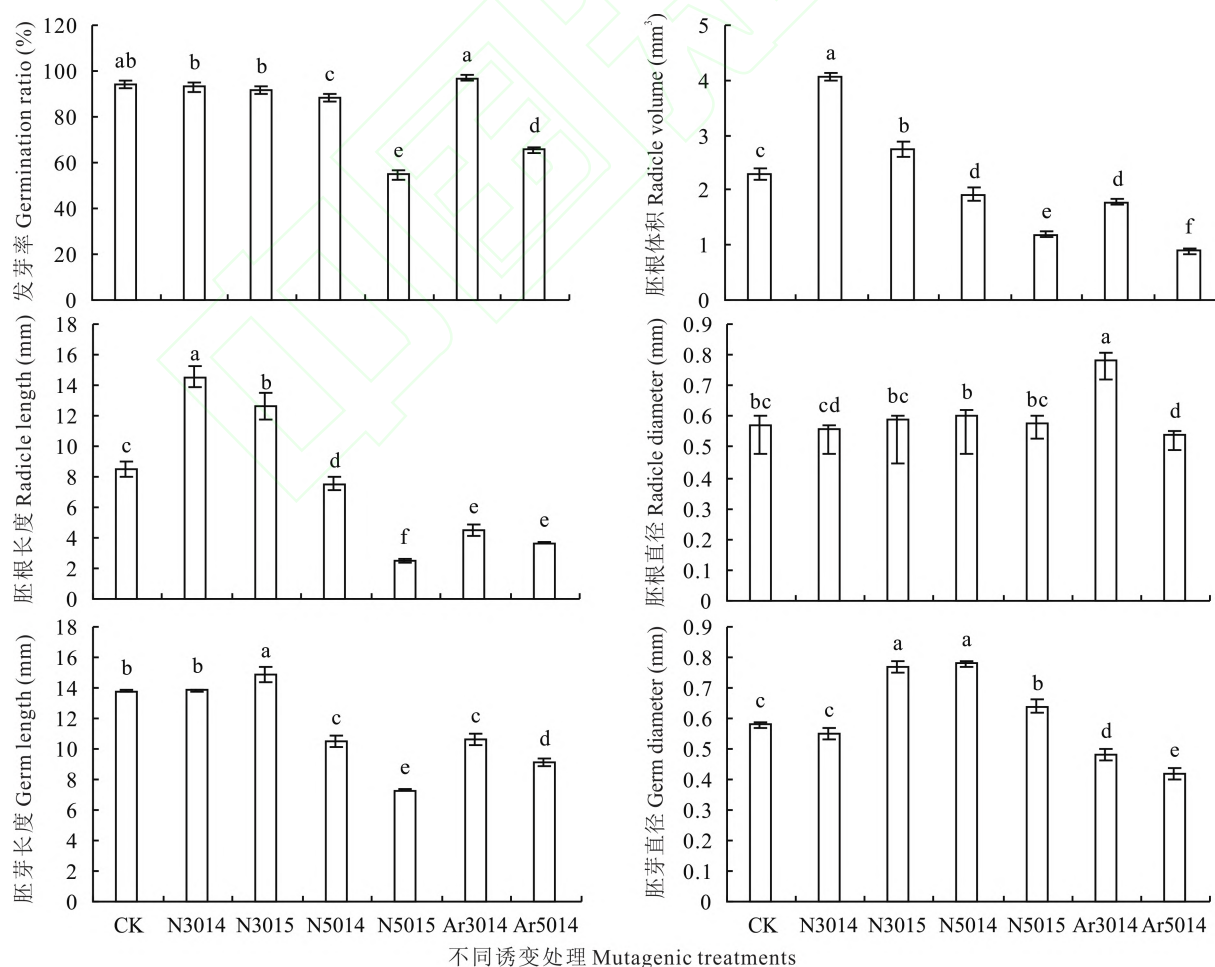


图3 不同诱变处理下的 M_1 代红三叶种子萌发特征

Fig. 3 Germination characteristics of M_1 progeny red clover under different mutagenic treatments

不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

($P<0.05$); Ar^+ 注入处理显著降低胚芽直径($P<0.05$),除 N3014 外其他 N^+ 注入处理胚芽直径均显著高于对照($P<0.05$)。

2.2 离子注入对红三叶 M_1 代植物候期的影响

离子注入的红三叶 M_1 代植株物候期见表 1。低能量(30 keV)的 N^+ 处理下种子出苗与对照一致,高能量(50 keV) N^+ 处理延迟种子出苗 2~3 d; $\text{Ar}5014$ 处理延迟种子出苗 1 d,而 $\text{Ar}3014$ 处理与对照无差异。在此后各生育阶段,经 N^+ 或 Ar^+ 处理的种子物候期相比于对照大多数有不同程度的延迟,N5015 处理下盛花期比对照延迟 7 d,种子成熟期延迟时间缩短为 5 d,而 N3014 处理在盛花期延迟 1 d,在种子成熟期较对照提前 1 d。生育周期最长的是处理 N5015,为 152 d,比对照延长 5 d;生育天数最短的是处理 N3014,比对照缩短 1 d。

表 1 不同诱变处理下 M_1 代植株物候期

Table 1 Phenological period of M_1 progeny plants under different mutagenic treatments

诱变处理	播种期	出苗期	分枝期	现蕾期	初花期	盛花期	结荚期	种子成熟期	生育天数
Mutagenic treatments	Sowing date	Germination date	Branching date	Flower bud date	Early flowering date	Full bloom date	Pod bearing date	Seed maturity date	Growth days (d)
	(日/月 Day/month)	date (日/月 Day/month)	date (日/月 Day/month)	date (日/月 Day/month)	date (日/月 Day/month)	date (日/月 Day/month)	date (日/月 Day/month)	ty date (日/月 Day/month)	
CK	27/2	9/3	15/4	20/5	28/5	11/6	1/7	23/7	147
N3014	27/2	9/3	15/4	21/5	28/5	12/6	30/6	22/7	146
N3015	27/2	9/3	15/4	20/5	28/5	12/6	4/7	24/7	148
N5014	27/2	11/3	19/4	24/5	30/5	16/6	6/7	26/7	150
N5015	27/2	12/3	19/4	27/5	3/6	18/6	8/7	28/7	152
Ar3014	27/2	9/3	16/4	21/5	26/5	12/6	1/7	23/7	147
Ar5014	27/2	10/3	19/4	24/5	30/5	15/6	5/7	25/7	149

2.3 离子注入对红三叶 M_2 代农艺性状变异的影响

N^+ 和 Ar^+ 注入诱变的红三叶 M_2 代植株主要农艺性状指标发生明显变化(表 2)。相比于对照,经诱变处理的植株群体性状指标平均值显著降低($P<0.05$),表现在植株高度降低,单株分枝数减少,叶片变小,花序数量和单花序小花数不同程度地减少。在 N^+ 注入的所有处理下,植株高度、叶片宽度、单株花序数和单花序小花数均显著低于对照($P<0.05$),并且注入能量和剂量越大,其越低。除 $\text{Ar}3014$ 处理下的叶片长度和花序长度外, Ar^+ 处理下所有性状指标值均较对照显著降低($P<0.05$),且注入能量越大其指标值越低。在相同离子注入能量和剂量下, Ar^+ 比 N^+ 处理具有更低的对应指标值,但不同注入能量下其差异程度有所不同。在注入能量 30 keV 时, Ar^+ 诱变处理只有花序宽度显著低于 N^+ 处理($P<0.05$);而在注入能量 50 keV 时, Ar^+ 处理下的株高、单株分枝数、叶片长度、叶片宽度、单株花序数和花序长度等性状指标均显著低于 N^+ 处理($P<0.05$)。

株高和花序长度在 N5015 处理下具有最大的变化幅度,其极差分别为 53.7 和 1.40 cm,分别为对照(CK)的 2.08 和 2.46 倍;单株分枝数和花序小花数在 N5014 处理下具有最大的变化幅度,其极差分别为 8 条·株⁻¹和 70 朵·花序⁻¹,为对照的 2.67 和 1.75 倍;叶片长度、单株花序数和花序宽度在 Ar5014 处理下具有最大的变化幅度,其极差分别为 1.62 cm、68 个·株⁻¹和 1.15 cm,分别为对照的 3.00、2.96 和 2.67 倍;而叶片宽度在 N3015 和 Ar3014 处理下具有较大的极差值(0.97),为对照的 1.21 倍。进一步的变异分析表明, N^+ 和 Ar^+ 处理下的植株性状具有比对照更大的变异系数(仅 N5014、Ar5014 处理下的叶片宽度和 Ar3014 处理下的花序小花数变异系数低于对照)。所有处理中,N5015 处理下的单株花序数变异系数最大(23.53%),其次为 Ar5014 处理下的花序宽度(21.55%)和单株分枝数(21.15%)。方差分析表明, N^+ 或 Ar^+ 注入处理的 8 个性状平均变异系数均显著高于对照($P<0.05$),其中平均变异系数最大的是 Ar5014 处理,其值为 16.03%,其次为 N5015(15.41%)和 N5014 处理(13.78%)。

表2 不同诱变处理下M₂代植株农艺性状变异

Table 2 Agronomic character variation of M₂ progeny plants under different mutagenic treatments

性状 Traits	指标 Index	诱变处理 Mutagenic treatments						
		CK	N3014	N3015	N5014	N5015	Ar3014	Ar5014
株高 Plant height	最小值 Min (cm)	100.2	89.6	84.4	81.8	62.3	79.2	58.7
	最大值 Max (cm)	126.0	132.5	133.0	124.2	116.0	128.0	110.4
	平均值 Average (cm)	107.5a	105.7b	105.6b	104.0b	99.1c	104.2b	88.7d
	变异系数 CV (%)	7.07e	13.16d	18.55b	16.63c	19.22b	16.26c	20.54a
单株分枝数 Branches number per plant	最小值 Min (branches·plant ⁻¹)	12	10	9	9	8	11	8
	最大值 Max (branches·plant ⁻¹)	15	16	17	17	17	15	15
	平均值 Average (branches·plant ⁻¹)	13.2a	13.1ab	12.5b	12.6ab	12.5b	12.4b	11.1c
	变异系数 CV (%)	6.08e	12.97d	16.00c	15.91c	18.92b	18.95b	21.15a
叶片长度 Leaf length	最小值 Min (cm)	4.43	4.26	4.12	3.62	3.93	4.03	3.20
	最大值 Max (cm)	4.97	4.83	5.02	5.06	4.80	5.10	4.82
	平均值 Average (cm)	4.62a	4.58a	4.53ab	4.34c	4.45bc	4.56ab	4.19d
	变异系数 CV (%)	3.96e	4.12e	7.25d	9.58b	7.06d	7.71c	12.72a
叶片宽度 Leaf width	最小值 Min (cm)	2.33	2.10	2.28	2.24	2.19	2.10	2.16
	最大值 Max (cm)	3.13	3.01	3.25	3.12	3.12	3.07	2.83
	平均值 Average (cm)	2.69a	2.58b	2.61b	2.52cd	2.51d	2.57bc	2.46e
	变异系数 CV (%)	8.84b	8.66bc	8.98b	8.62bc	10.68a	10.66a	8.28c
单株花序数 Inflorescence number per plant	最小值 Min (inflorescence·plant ⁻¹)	100	90	87	72	65	83	61
	最大值 Max (inflorescence·plant ⁻¹)	123	126	122	133	128	124	129
	平均值 Average (inflorescence·plant ⁻¹)	112.3a	106.9b	102.5c	98.2d	87.0e	104.2c	89.4e
	变异系数 CV (%)	6.12g	10.67e	9.36f	17.67c	23.53a	11.62d	20.89b
花序长度 Inflorescence length	最小值 Min (cm)	2.39	2.20	2.10	2.00	1.72	1.93	1.89
	最大值 Max (cm)	2.96	3.02	3.12	2.88	3.12	2.97	2.88
	平均值 Average (cm)	2.54ab	2.52b	2.42c	2.49bc	2.48bc	2.60a	2.28d
	变异系数 CV (%)	6.14e	10.85cd	10.57d	10.53d	15.17a	12.93b	11.19c
花序宽度 Inflorescence width	最小值 Min (cm)	1.63	1.30	1.57	1.12	1.26	1.23	1.12
	最大值 Max (cm)	2.06	2.22	2.20	1.99	1.98	2.19	2.27
	平均值 Average (cm)	1.87a	1.77b	1.80ab	1.67c	1.65c	1.67c	1.64c
	变异系数 CV (%)	8.51f	12.73d	10.70e	13.12d	14.84c	18.60b	21.55a
花序小花数 Flower number per inflorescence	最小值 Min (flower·inflorescence ⁻¹)	102.0	94.0	100.0	84.0	81.0	109.3	86.0
	最大值 Max (flower·inflorescence ⁻¹)	142.0	144.0	136.0	154.0	132.0	136.6	126.3
	平均值 Average (flower·inflorescence ⁻¹)	125.7a	118.4b	116.0b	108.7c	102.2d	118.1b	108.6c
	变异系数 CV (%)	9.90d	13.17b	10.10d	18.18a	13.84b	6.89e	11.91c
平均变异系数 Average CV (%)		7.08e	10.79d	11.44d	13.78b	15.41a	12.95c	16.03a

注：不同字母表示差异显著(P<0.05)。下同。

Note: Different letters indicate significant difference (P<0.05). The same below.

2.4 离子诱变红三叶M₂代突变单株筛选

筛选出的具有潜在目标性状的突变单株见表3。总计调查了1639株红三叶M₂代单株,筛选出突变单株68株。根据植株性状特征,将突变材料分成高大型、低矮型、多花型、早熟型和晚熟型5个类型,其中高大型突变单株6株,低矮型突变单株35株,多花型突变单株6株,早熟型突变单株9株,晚熟型突变单株12株,低矮型突变单株占了突变单株总数量的51.47%。处理N5015产生24株突变单株,其中15株为低矮型;其次为处理N5014,筛

选出 13 株突变单株;处理 N3014 筛选出的突变单株数量最少,只有 4 株,但有 2 株(50%)为高大型,更符合本研究的预期目标。所有处理平均突变率为 4.15%,其中处理 N5015 具有最高的突变率,为 8.45%,其次为 N5014 处理,为 4.91%,处理 N3014 突变率最低,仅为 1.43%。

表 3 红三叶 M₂代主要突变类型统计

Table 3 Statistics of main mutation types in M₂ progeny of red clover

诱变处理 Mutagenic treatments	突变类型 Mutational types					总突变数量 Total muta- genic plants	调查数量 Total sur- vey plants	突变率 Mutagenic ratio (%)
	高大型 Higher plant type	低矮型 Shorter plant type	多花型 More flowers plant	早熟型 Early maturity plant	晚熟型 Late maturity plant			
N3014	2	0	1	1	0	4	279	1.43
N3015	3	2	1	1	2	9	288	3.13
N5014	0	6	2	3	2	13	265	4.91
N5015	0	15	1	3	5	24	284	8.45
Ar3014	1	3	1	1	1	7	277	2.53
Ar5014	0	9	0	0	2	11	246	4.47
总计 Total	6	35	6	9	12	68	1639	4.15

2.5 突变材料主要农艺性状特征

将 M₂代获得的 68 个突变单株单独建立株系,评价 M₃代每个株系的一致性和潜在生产性能,将具有稳定遗传性状且生长一致的株系收种后作为 M₄代优良突变材料,最终从 68 个突变单株中获得 8 个具有潜在目标性状的优良 M₄代突变材料(表 4)。8 个优良突变材料有 2 个来自 N3014 诱变处理,3 个来自 N3015 诱变处理,2 个来自 N5014 诱变处理,1 个来自 Ar3014 诱变处理。突变材料 M-1、M-2、M-3、M-4 和 M-5 的植株高度显著高于对照 ($P<0.05$),表现出良好的潜在生产性能;材料 M-1、M-4 和 M-6 单株分枝数优于对照;材料 M-1、M-3、M-4 和 M-7 单株比对照具有更多的花序数,具有潜在的种子生产性能;突变材料和对照在叶片大小方面没有显著差异,仅突变材料 M-2 的叶片宽度显著优于对照 ($P<0.05$)。尽管材料 M-8 主要性状指标低于对照,但其具有更紧凑的株型。突变材料 M-1 和 M-4 聚合了饲草和种子高产的潜在优良性状,其单株分枝数、单株花序数和叶片宽度等性状指标值较对照有所提高。

表 4 突变材料 M₄代农艺性状特征

Table 4 Agronomic characteristics of M₄ progeny mutant

诱变处理 Mutagenic treatments	性状 Traits					
	来源 Origin	株高 Plant height (cm)	单株分枝数 Branches number per plant (branches·plant ⁻¹)	单株花序数 Inflorescence number per plant (inflorescence·plant ⁻¹)	叶片长度 Leaf length (cm)	叶片宽度 Leaf width (cm)
CK	/	106.8±3.5c	13.5±0.5abc	109.2±7.5bcd	4.63±0.10ab	2.70±0.09bcd
M-1	N3014	124.6±6.7a	14.3±0.9a	124.3±7.8a	4.81±0.16a	2.81±0.11b
M-2	N3014	117.7±4.0ab	13.5±0.4abc	94.5±6.5e	4.71±0.19ab	3.01±0.12a
M-3	N3015	124.6±8.1a	12.5±0.8cd	114.9±6.7abc	4.75±0.19ab	2.72±0.17bc
M-4	N3015	116.7±5.0ab	13.7±0.8abc	119.7±6.4ab	4.66±0.23ab	2.45±0.10e
M-5	N3015	121.3±3.5a	11.5±0.6d	82.4±4.9f	4.69±0.29ab	2.77±0.09b
M-6	Ar3014	111.8±5.0bc	13.8±0.6ab	99.2±8.6de	4.65±0.21ab	2.55±0.11cde
M-7	N5014	103.2±4.5cd	12.1±1.0d	114.2±5.7abc	4.57±0.28ab	2.43±0.12e
M-8	N5014	96.1±5.0d	12.6±0.4bcd	102.1±7.2cde	4.35±0.22b	2.51±0.11de

注: M-1~M-8 分别为从 68 个株系中筛选出的 8 个优良突变体株系。
Note: M-1—M-8 represent the eight superior lines selected from the 68 mutant lines, respectively.

3 讨论

许多物种在离子注入后种子发芽率呈现独特的“马鞍型”剂量效应趋势,即在一定剂量范围内种子发芽率随剂量的增加出现“降低—升高—降低”的现象,如紫花苜蓿种子在 Ar^+ 注入剂量为 $6 \times 10^{16} \sim 12 \times 10^{16} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 时,发芽率出现“降低—升高—降低”的现象^[24]; N^+ 注入后(剂量 $6.24 \times 10^{16} \sim 9.36 \times 10^{16} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$)的甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)存活率也呈现“马鞍型”变化趋势^[34]。本研究所有 N^+ 注入处理的红三叶种子发芽率均低于对照,发芽率并没有呈现“马鞍型”变化趋势,在 N^+ 注入大麦(*Hordeum vulgare*)、高羊茅(*Festuca elata*)和桔梗(*Platycodon grandiflorus*)种子时也得出类似结论^[30,35],这可能是与不同试验材料或品种对离子注入的耐受性或敏感性差异有关^[36-37]。另外,本研究主要考察不同的离子注入能量和剂量对红三叶诱变的生物效应,在试验设计上以注入能量和剂量双因素处理,并没有在同一注入能量下设置多个剂量梯度,再者本研究所用剂量指数级为 10^{15} ,而具有“马鞍型”效应的处理剂量指数级为 10^{16} ,可能也是发芽率变化曲线不同的一个因素。尽管如此,后续的生物学研究也说明了本试验设计在创造红三叶突变体材料方面的有效性。

离子注入生物体会伴随着化学效应、物理效应和生物学效应,这些作用引起的表型和内部变异是获得潜在利用价值突变材料的基础,而适宜的离子注入能量和剂量水平是获得良好诱变效应的关键。本研究表明,红三叶种子在 N^+ 注入能量50 keV,剂量 $5 \times 10^{15} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 时,种子表皮有“灼伤”现象,前期预试验也表明在 N^+ 注入能量达到80 keV,红三叶种子被“烧焦”,种子不能发芽,这可能是由于高能离子注入时的热效应造成的^[26],因此,许多物种如紫花苜蓿^[38]、高羊茅^[30]、大豆^[23]、棉花^[26]等植物种子 N^+ 注入能量控制在30 keV以下,在保证诱变效应的情况下减少种子的物理损伤。不同植物物种所需适宜的离子注入能量和剂量水平有差异,大多数作物、蔬菜、花卉等物种离子注入能量为25~50 keV时,诱变效果较好,注入剂量指数级通常为 10^{16} 。研究表明, N^+ 注入能量30 keV,剂量 $4 \times 10^{16} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 时可显著提高大豆的单株荚果数量^[39],并能增加万寿菊(*Tagetes erecta*)植株高度,使茎秆变粗,叶片变大^[40],而注入能量在35 keV时可显著提高番茄产量^[13]。 Ar^+ 在注入能量25 keV时, $3.9 \times 10^{16} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 剂量下能提高大豆幼苗抗旱性^[23],在 $3 \times 10^{17} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 剂量下显著提高樱桃萝卜(*Raphanus sativus*)的过氧化物酶活性,进而提高抗逆性^[41]。本研究表明,无论 N^+ 还是 Ar^+ 诱变,红三叶 M_2 代主要表型性状如株高、单株分枝数、单株花序数等性状变异程度显著高于对照(表2),并且在注入能量50 keV时具有比30 keV相对更高的变异系数,这一结论与在小麦诱变育种中的结果相似^[42],说明50 keV能量对红三叶表型性状具有更高的诱变效应,但这种诱变效应多为不利诱变,如植株变矮,生长畸形等。本研究中 N^+ 和 Ar^+ 在注入能量为30 keV,剂量指数级为 $10^{14} \sim 10^{15} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 时对红三叶有更大的有利诱变效应,如更高的株高、更多的花序(表4),这与舒世珍等^[43]在甜菊(*Stevia rebaudiana*)诱变育种中的研究结果一致。此外,不同诱变源对植物的诱变效应有所差异。周长芳等^[44]研究表明相比于 N^+ , Ar^+ 对狐米草(*Spartina patens*)种子萌发的抑制作用更强,并显著降低其愈伤组织超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性,经 N^+ 注入的谷子(*Setaria italica*)相比 γ 射线能产生更多的有利突变^[45]。本研究表明,在相同 Ar^+ 和 N^+ 注入条件下, Ar^+ 对红三叶的性状变异效应更大,这可能由于 Ar^+ 的刻蚀作用强于 N^+ 处理,使得其对种皮的渗透更强^[46]。

表型性状易于观测和筛选,常作为突变体材料筛选的指标^[47-48]。但 M_1 代植株多为生理损伤,一些隐性表型突变在 M_1 代不会突显^[47],因此研究者多在 M_2 代进行突变材料的筛选^[49]。本研究在 M_2 代从株高、株丛、花序、叶片等性状特征方面筛选了68个具有潜在价值的突变单株,经过 M_3 代稳定后构建了8个性状稳定的红三叶突变系。实际上,许多突变性状是无益的,68个突变单株中矮化单株占50%以上,具有潜在生产性能的高大型和多花型单株仅占调查总数量的0.73%。尽管如此,这一数值远远高于红三叶的自然突变率,因此,利用 N^+ 或 Ar^+ 注入红三叶进行诱变育种是可行且有效的。

4 结论

离子注入对红三叶种子及诱变后代植株的表型变异具有显著影响。在注入能量为50 keV的 N^+ 处理抑制红三叶种子萌发,发芽率下降; Ar^+ 在注入能量50 keV时显著抑制种子萌发。50 keV的 N^+ 或 Ar^+ 注入能量可以产生

更大的表型性状变异,但多为不利诱变,不利于突变材料的筛选。 N^+ 注入能量 30 keV,剂量 $5 \times 10^{14} \sim 5 \times 10^{15}$ ions $\cdot\text{cm}^{-2}$ 时红三叶具有最优的诱变效应。

参考文献 References:

- [1] Yoshihiro H, Yusuke A, Satoshi K, *et al.* Development of an efficient mutagenesis technique using ion beams: Toward more controlled mutation breeding. *Plant Biotechnology*, 2012, 29(3): 193–200.
- [2] Yu Z L, Deng J G, He J J. Mutation breeding by ion implantation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 1991, 59/60: 705–708.
- [3] Tanaka A, Shikazono N, Hase Y. Studies on biological effects of ion beams on lethality, molecular nature of mutation, mutation rate, and spectrum of mutation phenotype for mutation breeding in higher plants. *Journal of Radiation Research*, 2010, 51(3): 223–233.
- [4] Zhao L S, Liu L X. Research progresses in irradiation-induced mutation breeding in crops. *Acta Laser Biology Sinica*, 2017, 26(6): 481–489.
赵林姝, 刘录祥. 农作物辐射诱变育种研究进展. *激光生物学报*, 2017, 26(6): 481–489.
- [5] Chen H L, Lyu J, Zeng X X. Advances in research and application of mutation breeding with ion beam implantation. *Biotechnology Bulletin*, 2005(2): 10–13.
陈恒雷, 吕杰, 曾宪贤. 离子束诱变育种研究及应用进展. *生物技术通报*, 2005(2): 10–13.
- [6] Yu Z L, He J J, Deng J G, *et al.* Preliminary studies on the mutagenic mechanism of the ion implantation rice. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 1989, 39(1): 12–16.
余增亮, 何建军, 邓建国, 等. 离子注入水稻诱变育种机理初探. *安徽农业科学*, 1989, 39(1): 12–16.
- [7] Wu J D, Wu Y J, Tong J P, *et al.* Biological characters of a new early Indica rice ‘Zaoxian 14’ and its cultural technique. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2000, 28(3): 306–307.
吴敬德, 吴跃进, 童继平, 等. 早籼 14 生物学特性和栽培技术. *安徽农业科学*, 2000, 28(3): 306–307.
- [8] Wu J D, Wu Y J, Tong J P, *et al.* A new late japonica rice variety—M1148. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2001, 29(6): 724.
吴敬德, 吴跃进, 童继平, 等. 晚粳新品种 M1148 的特征特性及栽培技术研究. *安徽农业科学*, 2001, 29(6): 724.
- [9] Ren J C, Xu Y. Primary report of ion beam mutation creation of new winter wheat germplasm. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2013, 41(7): 658–659, 671.
任杰成, 许瑛. 氮离子束诱变创制冬小麦新种质研究初报. *山西农业科学*, 2013, 41(7): 658–659, 671.
- [10] Gong G A, Qian L, Zou C. A preliminary study on the mutagenic effect of ion beam injection on maize inbred lines. *Liaoning Agricultural Sciences*, 2014(5): 79–81.
宫国安, 钱朗, 邹畅. 离子束注入对玉米自交系诱变效应的初步研究. *辽宁农业科学*, 2014(5): 79–81.
- [11] Bao F, Lin M Y, Li R Y, *et al.* Genetic variation analysis of agronomic characters in soybean M_2 by ion beam injection. *Journal of Beijing University of Agriculture*, 2013, 28(7): 10–12.
包放, 林美玉, 李冉阳, 等. 离子束注入后大豆 M_2 农艺性状的遗传变异分析. *北京农学院学报*, 2013, 28(7): 10–12.
- [12] Cao Y, Li X H, Dong X Y, *et al.* Primary research on the effect of N^+ ion injected into Chinese sorghum. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, 2003, 17(5): 358–360.
曹阳, 李学慧, 董晓宇, 等. N^+ 离子注入对高粱作用的初步研究. *核农学报*, 2003, 17(5): 358–360.
- [13] Wu B S, Ling H Q, Mao P H, *et al.* Mutation effect of ion implantation on tomato breeding. *Nuclear Techniques*, 2003, 26(5): 346–348.
武宝山, 凌海秋, 毛培宏, 等. 离子注入在番茄育种中的诱变功效. *核技术*, 2003, 26(5): 346–348.
- [14] Song W, Zhu P F. Study on ion implantation method mutation on chrysanthemum and separation of chimera. *Northern Horticulture*, 2010(3): 135–138.
宋威, 祝朋芳. 离子注入法诱变菊花及嵌合体分离的研究. *北方园艺*, 2010(3): 135–138.
- [15] Nakayama M, Tanikawa N, Morita Y, *et al.* Comprehensive analyses of anthocyanin and related compounds to understand flower color change in ion-beam mutants of cyclamen (*Cyclamen* spp.) and carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Plant Biotechnology*, 2012, 29(3): 215–221.
- [16] Taylor N L, Smith R R. Red clover breeding and genetics. *Advances in Agronomy*, 1979, 37(1): 125–155.
- [17] Zhang H S, Chen M X, Tian H, *et al.* A study on the variation in phenotypic characters of wild red clover. *Acta Agriculturae*

- Universitatis Jiangxiensis, 2012, 34(1): 44—49.
- 张鹤山, 陈明新, 田宏, 等. 野生红三叶种群表型性状变异研究. 江西农业大学学报, 2012, 34(1): 44—49.
- [18] Zhang X Y, Chen X X. Advances on mutation mechanism and biological effect of mutagenic breeding by low energy ions. Guangdong Agricultural Sciences, 2008(6): 20—22, 26.
- 张晓勇, 陈秀霞. 低能离子诱变育种作用机理及生物学效应研究进展. 广东农业科学, 2008(6): 20—22, 26.
- [19] Huang Y Q, Li J Z, Ye Z W, *et al.* Mutagenic effects of irradiation with nitrogen ion beam on photosynthetic characteristics of black rice. Journal of Nanyang Institute of Technology, 2017, 9(6): 110—113.
- 黄雅琴, 李尽哲, 叶兆伟, 等. 氮离子束对黑稻光合性状的诱变效应. 南阳理工学院学报, 2017, 9(6): 110—113.
- [20] Zheng D G, Fang Q Y, Huang D X, *et al.* Mutagenesis effect of ion implantation on cotton breeding. Journal of Anhui Agricultural University, 1994, 21(3): 315—317.
- 郑冬官, 方其英, 黄德祥, 等. 离子注入在棉花育种中的诱变功效. 安徽农业大学学报, 1994, 21(3): 315—317.
- [21] Gao F, Zhang M, Xia R J, *et al.* Mutagenic effect of wheat seeds injection with low energy N^+ ion beam. Guizhou Agricultural Sciences, 2020, 48(3): 6—9.
- 高飞, 张明, 夏仁江, 等. 小麦种子注入低能氮离子束的诱变效应. 贵州农业科学, 2020, 48(3): 6—9.
- [22] Deng H M, Man T, Lu Y G, *et al.* Application of gas pedal argon ions in rice breeding. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 1994, 8(2): 70—74.
- 邓红梅, 曼彤, 卢永根, 等. 加速器氩离子在水稻育种中的应用. 核农学报, 1994, 8(2): 70—74.
- [23] Huang H Y. Effect of Ar^+ implantation on drought resistance of soybean seedlings. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2015, 27(5): 724—728.
- 黄洪云. Ar^+ 注入对大豆幼苗抗旱性的影响. 浙江农业学报, 2015, 27(5): 724—728.
- [24] Ge J, Qi L J, Zhao H X, *et al.* Effect of low energy Ar^+ ion implantation on seed spouting, growth and lipid peroxidation of alfalfa seedling. Seed, 2005, 24(2): 38—41.
- 葛娟, 齐丽杰, 赵惠新, 等. Ar^+ 离子注入对紫花苜蓿发芽、生长及幼苗脂质过氧化的影响. 种子, 2005, 24(2): 38—41.
- [25] Guo M M, Fan J W, Chen F, *et al.* Effects of different N ion implantation doses on growth and development and characteristics of photosynthesis of wheat. Journal of Northern Agriculture, 2019, 47(1): 18—23.
- 郭明明, 樊继伟, 陈凤, 等. 不同剂量氮离子注入对小麦生长发育及光合特性的影响. 北方农业学报, 2019, 47(1): 18—23.
- [26] Zhou L R, Fan J, Cheng B J. Effects of induced mutation in cotton seeds by N^+ ion implantation with different energy. Journal of Anhui Agricultural University, 1998, 25(4): 371—374.
- 周立人, 范军, 程备久. 不同能量的氮离子注入棉花种子的诱变效应研究. 安徽农业大学学报, 1998, 25(4): 371—374.
- [27] Zhang C Y, Wang M, Zhang Z X, *et al.* Mutagenic effect of $^{60}Co-\gamma$ ray and Ar^+ treatment on wheat and POD isoenzyme analysis. Acta Laser Biology Sinica, 2008, 17(6): 780—786.
- 张从宇, 王敏, 张子学, 等. $^{60}Co-\gamma$ 和 Ar^+ 处理对小麦的效应诱变及POD同工酶分析. 激光生物学报, 2008, 17(6): 780—786.
- [28] Liu P, Li F H, Xu M, *et al.* Study of genomic instability of *Arabidopsis thaliana* induced by low-energy-ion radiation. Nuclear Physics Review, 2008, 25(2): 191—195.
- 刘萍, 李方华, 徐敏, 等. 低能离子诱导拟南芥基因组不稳定性的研究. 原子核物理评论, 2008, 25(2): 191—195.
- [29] Peng L, Ji L. Preliminary study on biological effect of soybean by nitrogen ion beam implantation and $^{60}Co-\gamma$ radiation. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(14): 6399—6402.
- 彭琳, 季良. 氮离子束注入和钴60伽玛辐射对大豆生物学效应研究初报. 安徽农业科学, 2009, 37(14): 6399—6402.
- [30] Liu R F, Zhang Z F, Liu W D, *et al.* Effects of N^+ ion beam implantation on the germination rate of *Festuca arundinacea*. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2008, 28(5): 81—88.
- 刘瑞峰, 张志飞, 刘卫东, 等. N^+ 离子束注入对高羊茅种子发芽率的影响. 中南林业科技大学学报, 2008, 28(5): 81—88.
- [31] Jia D M, Yao R S, Li M, *et al.* Nitrobenzene removal from aqueous solutions by perennial ryegrass with N^+ ion implantation and physiological responses. Environmental Chemistry, 2008, 27(5): 634—638.
- 贾冬梅, 姚日生, 李森, 等. 离子束处理黑麦草对水体中硝基苯的去除及其生理响应. 环境化学, 2008, 27(5): 634—638.
- [32] Wang Y R, Yu L, Hu X W, *et al.* Rules of seed testing for forage, turfgrass and other herbaceous plant—The germination test, GB/T 2930.4-2017. Beijing: China Standards Press, 2017.
- 王彦荣, 余玲, 胡小文, 等. 草种子检验规程 发芽试验, GB/T 2930.4-2017. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [33] Gao H W, Wang Z, Yuan Q H, *et al.* Descriptors and data standard for clover (*Trifolium* spp.). Beijing: Chinese Agriculture

- Press, 2007.
- 高洪文, 王赞, 袁庆华, 等. 三叶草种质资源描述规范和数据标准. 北京: 中国农业出版社, 2007.
- [34] Wei S L, Liu J N, Wang T, *et al.* Effects of nitrogen ion implantation on seed germination and root development in *Glycyrrhiza uralensis* and possible mechanism. *Acta Prataculturae Sinica*, 2004, 13(5): 112–115.
- 魏胜林, 刘竞男, 王陶, 等. N^+ 注入对甘草种子萌发和根发育效应及作用机制. *草业学报*, 2004, 13(5): 112–115.
- [35] Zhang R B, Li S F, Li B, *et al.* Effects of different treatments on *Platycodon grandiflorum* seeds germination. *Seed*, 2010, 29(5): 84–85.
- 张瑞博, 李思峰, 黎斌, 等. 不同处理方法对桔梗种子萌发的影响. *种子*, 2010, 29(5): 84–85.
- [36] Li Q, Ren L K, Chen F, *et al.* Application research on mutation breeding of wheat with nitrogen ion beam. *Shandong Agricultural Sciences*, 2016, 48(7): 18–22.
- 李强, 任立凯, 陈凤, 等. 小麦 N 离子束注入诱变育种的应用研究. *山东农业科学*, 2016, 48(7): 18–22.
- [37] Chang S H, Shu H Y, Su M J, *et al.* The effects of different implanted N^+ dose on several traits of maize seedling. *Journal of Maize Sciences*, 2006, 14(4): 97–103.
- 常胜合, 舒海燕, 苏明杰, 等. 不同剂量的低能 N^+ 离子束照射对玉米种子当代幼苗期性状的影响. *玉米科学*, 2006, 14(4): 97–103.
- [38] Li Y F, Liang Y Z, Yu Z L. Bio-effects of low energy N^+ implantation on alfalfa. *Pratacultural Science*, 2006, 23(1): 13–17.
- 李玉峰, 梁运章, 余增亮. 低能 N^+ 注入紫花苜蓿生物学效应初步研究. *草业科学*, 2006, 23(1): 13–17.
- [39] Ji L, Wang X, Peng L, *et al.* Effects of nitrogen ion beam implantation and $^{60}\text{Co}-\gamma$ irradiation on yield traits and quality of soybean. *Soybean Science*, 2013, 32(2): 189–192.
- 季良, 王仙, 彭琳, 等. 氮离子束注入和钴 60 伽玛辐射对大豆产量性状和品质的影响. *大豆科学*, 2013, 32(2): 189–192.
- [40] Mao P H, Hao W L, Jin X, *et al.* The biological effects of the some flowers seeds by ion implantation. *Northern Horticulture*, 2003(5): 56–57.
- 毛培宏, 郝微丽, 金湘, 等. 离子注入某些花卉种子的生物效应. *北方园艺*, 2003(5): 56–57.
- [41] Liang Q X, Cao G Q, Huang Q C, *et al.* Study on biological effects of low energy Ar^+ ions implantation in *Dian Dian Hong*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2005, 21(3): 70–73.
- 梁秋霞, 曹刚强, 黄群策, 等. 低能 Ar^+ 注入樱桃萝卜点点红种子后的生物学效应. *中国农学通报*, 2005, 21(3): 70–73.
- [42] Li L Z, Qin G Y, Huo Y P, *et al.* A preliminary research report on the application of ion beam in wheat mutation breeding. *Journal of Henan Agricultural University*, 2001, 35(1): 9–12.
- 李兰真, 秦广雍, 霍裕平, 等. 离子注入在小麦诱变育种上的应用研究初报. *河南农业大学学报*, 2001, 35(1): 9–12.
- [43] Shu S Z, Zhu F S, Lu T. Preliminary study on effects of ion implantation on stevia seeds. *Journal of Anhui Agricultural University*, 1994, 21(3): 299–302.
- 舒世珍, 朱凤绥, 陆挺. 离子注入甜菊种子效应初报. *安徽农业大学学报*, 1994, 21(3): 299–302.
- [44] Zhou C F, Qin P, Xie M. Effect of ions implantation on several physiological and biochemical indexes of *Spartina patens*. *Plant Physiology Communications*, 2002, 38(3): 237–239.
- 周长芳, 钦佩, 谢民. 离子束注入对狐米草几种生理生化指标的影响. *植物生理学通讯*, 2002, 38(3): 237–239.
- [45] Ren Y, Niu X W, Han M Q, *et al.* Mutagenic effect of N^+ ions implantation on millet. *Journal of Shanxi Agricultural University (Nature Science Edition)*, 2006, 26(1): 7–9, 12.
- 任祎, 牛西午, 韩美清, 等. 氮离子注入谷子诱变效应研究. *山西农业大学学报(自然科学版)*, 2006, 26(1): 7–9, 12.
- [46] Bian P, Huo Y P, Qin G Y, *et al.* α transmission energy spectrum studies on the tomato skin etched by low energy ion beam. *Acta Biophysica Sinica*, 1999, 15(3): 551–555.
- 卞坡, 霍裕平, 秦广雍, 等. 低能离子束刻蚀番茄果皮的 α 透射能谱研究. *生物物理学报*, 1999, 15(3): 551–555.
- [47] Wang X, Liu C K, Tu B J, *et al.* Irradiation-induced mutation and its application in soybean breeding. *Soils and Crops*, 2018, 7(3): 293–302.
- 王雪, 刘长锴, 涂冰洁, 等. 辐射诱变及其在大豆育种中的应用. *土壤与作物*, 2018, 7(3): 293–302.
- [48] Liu T Z, Xie X C, Zhang J M. Mutagenic effect of $^{60}\text{Co}-\gamma$ irradiation on turf characteristics of *Paspalum vaginatum*. *Acta Prataculturae Sinica*, 2017, 26(7): 62–70.
- 刘天增, 谢新春, 张巨明. 海滨雀稗 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐射诱变突变体筛选. *草业学报*, 2017, 26(7): 62–70.
- [49] Chen X Z, Xie H, Luan T. Relationship of the agronomic character in M_2 of soybean treated by $^{60}\text{Co}-\gamma$ ray. *Journal of Beijing Agricultural College*, 2001, 16(3): 13–17.
- 陈学珍, 谢皓, 栾涛. $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐照处理后大豆 M_2 农艺性状相关分析. *北京农学院学报*, 2001, 16(3): 13–17.