

离子注入诱变技术在木本植物育种中的应用

辛培尧^{1,2}, 唐军荣^{1,2}, 孙正海¹, 王大玮^{1,2}, 韩国伟², 段安安^{1*}

(1. 西南林业大学 国家林业局西南地区生物多样性保育重点实验室, 云南 昆明 650224;

2. 西南林业大学 林学院, 云南 昆明 650224)

摘要: 简述了离子注入技术的诱变机制和诱变后的生物学效应, 继而概述了该技术在木本植物遗传改良中的应用及成果。最后, 就离子注入诱变在木本植物中的应用提出一些建议, 以期能为植物遗传育种工作提供理论参考。

关键词: 离子注入; 木本植物; 育种; 应用

中图分类号: S335.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)04-0017-04

Application of Ion Implantation-induced Mutation in Woody Plant Breeding

XIN Pei-yao^{1,2}, TANG Jun-rong^{1,2}, SUN Zheng-hai¹, WANG Da-wei^{1,2},

HAN Guo-wei², DUAN An-an^{1*}

(1. Key Laboratory of Biodiversity Conservation in Southwest China of State Forestry Administration,

Southwest Forestry University, Kunming 650224, China; 2. College of Forestry,

Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract: Mutation mechanism and biological effects of ion implantation technique were briefly introduced. Then application and achievements of this technique in woody plant breeding were summarized. At last, some suggestions for the application of ion implantation technique in woody plant breeding were put forward, so as to provide theoretical reference for breeding.

Key words: ion implantation; woody plant; breeding; application

诱变育种是指人为利用物理或者化学等因素诱使植物遗传物质发生变异, 并通过对诱变后代的人工选择, 在一定时间内获得有利用价值的植物新品种(良种)的育种方法^[1]。随着该育种技术的不断发展, 诱变育种已由最初的 γ 和 X 射线进行诱变处理, 或者用化学诱变剂处理等较简单方法发展到一个全新的境界, 先后出现了空间技术诱变、离子注入诱变以及等离子体诱变等育种手段^[2-4]。其中, 离子注入诱变技术近年来在植物遗传改良中得到了较为广泛的应用, 其利用离子束注入技术诱使生物发生变异。在诱变过程中, 注入离子与生物体之间的相互作用不仅有物理和化学的, 而且还会和生物体相

互作用引起强烈的生物学效应, 产生各种各样的变异, 然后, 从变异群体中选出人们所期望的优良变异, 经过多代培育而形成性状稳定的新品种^[5]。自余增亮^[6]发现离子注入植物后能引起很大生物学效应, 低能离子与生物相互作用的研究迅速开展起来, 在生物种质改良及其作用机制研究方面取得了较大成绩。最初, 离子注入诱变技术被广泛应用于作物及微生物等短生命周期生物的遗传改良中, 随着该技术的不断完善, 离子注入诱变技术也被用于木本植物的遗传育种, 并取得了一定的成果。在介绍离子注入诱变育种相关理论的基础上, 对近年来离子注入诱变技术在木本植物种质改良方面的相关研究

收稿日期: 2013-09-10

基金项目: 云南省应用基础研究基金项目(2009CD071); 西南林业大学科研启动项目; 西南林业大学校级重点学科林木遗传育种学项目(XKX200904)

作者简介: 辛培尧(1975-), 男, 甘肃临洮人, 副教授, 博士, 主要从事植物遗传育种方面的教学与研究。

E-mail: xpytgyx@163.com

* 通讯作者: 段安安(1961-), 男, 陕西武功人, 教授, 博士, 主要从事林木遗传育种学方面的教学与研究工作。

进展作一概述,并对该技术在木本植物改良中的应用提出一些建议,以期为植物遗传育种工作提供理论参考。

1 注入离子与生物体的相互作用过程

1.1 物理阶段

当注入离子束作用在生物体表面后,引起离子溅射和电子溅射。由于 2 种溅射作用的存在,生物细胞产生比较严重的刻蚀。这种刻蚀作用随着注入离子能量和剂量的增加而逐渐加强^[7]。刻蚀作用不仅损伤细胞壁,而且也会损伤细胞膜,在注入剂量较大的情况下,持续不断地刻蚀,会使细胞表面形成瞬时的微孔或洞,并深入到细胞内部损伤细胞质和 DNA^[8]。可以利用离子注入生物体后的这一特性,进行离子束介导的转基因遗传改良^[9]。研究表明,在相同的注入能量下,刻蚀程度与离子束的剂量成一定的线性关系^[10]。刻蚀现象是离子束注入后的特有现象,是物理原因引发生物体表面产生腐蚀的一种过程。

1.2 化学阶段

注入的离子随着注入后能量的损失会沉积下来。如果注入离子具有活性,在沉积过程中将不断与生物体内的分子发生键合、置换或填充空位,形成新的分子基团^[5,11]。黄卫东等利用气象色谱-质谱联用仪对 N^+ 注入甘氨酸的样品进行分析,发现 N^+ 注入甘氨酸后产生了 2 个稳定产物^[12]。在这个过程中,注入离子与靶分子之间还会发生能量的交换,这种交换的能量被急剧地释放出来,则会造成 DNA 双链或单链的断裂,引起 DNA 的畸变,已有研究证实了这一点^[13]。其次,离子注入还可以诱使 DNA 的修复合成。王崇英等^[14] 研究发现, N^+ 注入小麦种胚后,能引起小麦种胚 DNA 损伤的修复合成,且该合成效应在较高剂量的 N^+ 处理下表现出较高的水平,两者呈现一定程度的正相关关系。离子注入可引起 DNA 碱基间的替换和颠换,其突变“热点”常在 TG 与 CT 之间^[15]。研究还表明,细胞在试图修复辐射引起的损伤时,会引起串联重复序列的改变,继而引发生物体的基因突变。离子注入同时诱导 DNA 的损伤与修复是生物体诱变育种的分子遗传依据^[16]。

1.3 生物学阶段

注入离子与生物体内分子的每一次碰撞,都有可能失去或得到电子。注入离子有可能导致生物电性的极性改变,引起细胞跨膜物理场的变化,然后影响到细胞内外能量的转换、物质的运送、信息的传递

以及代谢调控等各种生理生化过程^[17-19]。另外,入射离子将能量传递到生物体内分子后,产生电离和激发的分子,经过反应产物的不断作用,发生一系列连锁反应,然后产生大量的生物自由基。后续的继发反应,又加重了靶分子(特别是 DNA)的损伤,最终加大了损伤后的修复难度^[20]。受损后的生物分子通过生物体的新陈代谢作用,将损伤程度“放大”,最终表现为可观察到的生物突变。染色体的畸变类型主要有小核、微核、游离染色体、染色体桥以及落后染色体等。研究表明, H^+ 注入棉花和麦类,主要诱变产生染色体桥,而 N^+ 注入更易诱发落后染色体。染色体畸变种类和频率与所注入离子的类型及剂量有关^[16]。离子注入生物体内后,可引起复杂的生物学效应。同一种生物体,注入的离子类型不同,其诱变效果不同,而注入的离子种类相同,对不同生物体诱变产生的突变存在明显差异。有些突变在其后代中成为可遗传的突变,经过育种工作者的选择、培育,最终成为生产实践中能加以利用的新品种(良种)。

可见,离子注入诱变育种和常规射线诱变育种存在明显的不同。离子注入过程中,能量的沉积、质量的沉积以及电荷的交换效应^[6],使得该技术在诱变过程中不仅造成生物体遗传物质的机械损伤,而且还向生物体内部输入能量、物质和电荷,最终使得该技术较常规辐照技术可产生更高的变异率和更广的变异谱。

2 离子注入在木本植物诱变育种中的应用

随着离子注入诱变技术在诸多短周期植物上应用取得较大成就,该手段逐渐被育种工作者应用到生长周期较长的木本植物中。离子注入诱变育种与传统的物理辐射、航天技术育种相比较,具有诱变效率高、诱变谱广以及变异稳定快的特点,可以大大加速木本植物的遗传改良进程。因此,在木本植物育种中有着较广泛的应用空间。黄丽群等^[21] 进行相同能量下不同剂量的 N^+ 注入光皮桦种子的相关研究,结果发现,超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性呈先升后降的趋势,而丙二醛(MDA)含量却表现出先升后降再升的现象。以能量为 30 keV/10 mA 的 N^+ 注入光皮桦时, $7 \times 10^{16} N^+ / cm^2$ 的注入剂量为较适宜剂量。这为进一步研究光皮桦离子注入诱变育种提供了理论依据。中国林业科学研究院对 6 个巨桉和尾叶桉的全同胞和半同胞家系进行了离子注入处理,并观察桉树种子萌发和苗期生长的情况。结果表明,离子

注入对桉树苗高和侧根的数量有明显的促进作用,而抑制其地径、叶长、叶宽和根的生长;虽然离子注入各家系的平均生物量均低于未注入离子的,但差异并不显著。最终从所有的处理苗中选出33株突变苗作为后期进一步选育的材料^[22]。在此研究的基础上,他们以能量为30 keV的 N^+ ,采用 10^{14} 、 $10^{15} N^+/cm^2$ 这2种剂量注入16个桉树家系的种子后发现,桉树幼叶的结构发生了明显变化^[23]。14个月幼苗的光合特性在各家系间存在显著差异,注入家系的水分利用率显著高于未进行离子注入家系。可见,离子注入有利于提高光合特性。以光能和水分利用效率进行家系的选择,选出的一个家系表现为高光效和低耗水的优良特性^[24]。对离子注入的桉树各家系在生长1.5、2.5、3.5 a后的各性状与适应性进行分析,选出了6个表现为适应性广且速生丰产的家系^[25]。可见,通过离子注入处理和选择,选育出抗性较强、适应性广的速生桉树家系或无性系是切实可行的。 N^+ 注入能引起美洲黑杨和银杏的酯酶(EST)同工酶和POD同工酶的数量、种类和活性发生变化,注入剂量与酶谱的变化存在一定的关系,并且可通过无性繁殖的方法将生理特性的变异加以固定^[26]。胡惠露^[27]的研究表明,低能 N^+ 注入后,银杏的生长特征发生了较大的变化。芽的萌动时间提早,展叶率增加,成活率提高,增加了开花和花枝的数量以及引起黄酮含量的变化。 N^+ 注入银杏种子后,显微观察 M_1 细胞,发现多核、游离染色体、染色体桥和落后染色体等现象,畸变频率高达0.8%~11.2%。变异频率及变异幅度随注入剂量的增大而提高^[28]。项艳等^[29]将 N^+ 注入板栗冬芽,嫁接后对植株的成活率、叶面积和最大新梢长度、EST和POD同工酶谱等进行分析,结果发现: N^+ 注入能促进板栗生长,提高其经济价值,并能使EST和POD同工酶的数量、种类和活性发生较大变化。经离子注入诱变的后代材料,抗病能力也比原品种有明显提高。经试验,就不同的板栗品种提出了不同的最佳 N^+ 注入剂量。研究发现, N^+ 注入茶树不同品种无性系的种子,其 M_1 代单株在叶片特性、萌芽期、抗寒性等性状上出现了较大的变化^[30-31]。张和禹等^[32]对不同品系桑树的冬芽进行 N^+ 注入处理后,次年再将发生变异的 M_1 代单芽嫁接,并调查 M_2 代桑苗的变异情况,以各品系同时进行嫁接繁殖作为 M_2 代的对照。结果发现, M_2 代部分桑苗生长特性及桑叶POD同工酶谱较其对照产生了较大变异。RAPD分析也表明,突变植株与对照间的DNA图谱出现了较大的差异。离子注入诱

变育种有望在改善桑叶品质,进而提高蚕丝质量方面作出贡献。育种工作者还利用离子注入诱变技术诱使沙棘产生了明显的生物学效应,获得了提前2 a挂果的沙棘新种质,该方面的研究对沙漠地带的植被恢复有着重要的指导意义^[33-34]。在夏蜡梅的 N^+ 注入诱变育种试验中发现,能量为25 keV时, $1\ 000 \times 2.6 \times 10^{13} N^+/cm^2$ 是夏蜡梅遗传改良的较佳剂量^[35]。此外,还有育种工作者对山核桃和金合欢属植物的种子进行了离子注入诱变育种研究^[36]。

上述研究表明,离子注入木本植物可引起其形态学、生物学以及生理生化方面的明显变化。不同的离子注入能量、不同的诱变剂量以及相同诱变条件下的不同植物可能产生有明显差异的诱变效果。虽然我国是最早利用离子束注入技术进行植物遗传改良的国家,但近年来,日本、泰国及美国等着力开展了许多离子注入诱变育种的研究,已使我国在该技术的进一步发展方面明显落后^[13,19]。因此,要使该项技术在木本植物乃至生物育种工作中取得更多的成果,需要大量物理学和生物学的科研人员相互协作进行更多深层次的试验研究。

3 木本植物离子注入诱变育种建议

1)目前,离子注入植物诱变育种的理论研究落后于应用研究。从育种的角度来考虑,系统地研究离子注入的分子、细胞遗传学规律和机制,注入离子不同质量、能量及其之间的互作等^[37],将有助于对离子辐射诱变机制的阐述,从而进一步提高诱变率,扩大突变谱,创育更多的优良木本植物育种资源,这方面的工作是该技术领域首先且必须要加强的。

2)对于木本植物来说,快速、有效地对利用离子注入诱变技术获得的大量性状各异的突变材料进行筛选是育种研究的关键所在。利用易于鉴定的遗传标记进行早期辅助选择是提高育种效率的手段之一。其中,分子标记(MAS)由于具有种种优越特性,可作为在早期进行选择的最佳标记。分子标记辅助早期选择对控制质量性状的基因有效,而且对多基因控制的数量性状也有效。离子注入诱变应当与分子标记辅助技术相结合,对诱变 M_1 代进行早期筛选。这样可以大大提高木本植物变异材料的选择效率,减少育种的盲目性,缩短育种年限。

3)将通过离子注入诱变获得的木本植物新材料,通过诸如扦插、嫁接或组织培养等手段大量快速繁殖,并对有应用潜力的优良变异材料进行遗传测定与生产试验,以加速优良的变异材料尽早应用于生产实践。

4)通过离子注入诱变获得的变异材料,要经过多年年代测定,才能确定其优良性状的稳定性。尤其对生长周期较长的木本植物来说,这项工作需时更长。因此,需要育种工作者兢兢业业,坚持不懈,最终才能选育出新品种。

参考文献:

- [1] 刘忠松,罗赫荣.现代植物育种学[M].北京:科学出版社,2010:195.
- [2] 杨兆民,张璐.我国太空育种的成就与展望[J].现代化农业,2010(11):19-20.
- [3] 李万云,张璐.离子注入诱变育种技术的研究与开发利用进展[J].种子科技,2007(6):39-41.
- [4] 陈红玉,马光跃,郝学金,等.等离子体注入枣树接穗的诱变试验[J].山西农业科学,2013,41(1):11-14.
- [5] 王悦,胡正明,马继凤.离子注入植物诱变育种技术研究进展[J].作物研究,2006,41(5):465-469.
- [6] 余增亮.离子束生物技术引论[M].合肥:安徽科学技术出版社,1998:176-194.
- [7] 卫增泉,颜红梅,韩光武,等.110 keV $^{56}\text{Fe}^{1+}$ 离子注入麦胚中的能量沉积分布[J].安徽农业大学学报,1994,21(3):250-254.
- [8] 宋道军,姚建铭,吴丽芳,等.离子注入对微生物细胞刻蚀与对 DNA 的损伤及修复[J].遗传,1999,21(4):37-40.
- [9] Yu Z L, Yang J B, Wu Y J, *et al.* Transferring *GUS* gene into intact rice cells by low energy ion beam[J]. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, 1993, 80(2):1328-1331.
- [10] 余增亮,霍裕平.离子注入生物研究评述[J].安徽农业大学学报,1994,21(3):211-225.
- [11] 刘录祥,程俊源.植物诱变育种新技术研究进展[J].核农学通报,1997(4):187-190.
- [12] 黄卫东,余增亮.氮离子束注入固体甘氨酸和酪氨酸研究[J].安徽农业大学学报,1994,21(3):342-348.
- [13] Ren H Y, Huang Z L. Effects of nitrogen ion implantation on lily pollen germination and the distribution of the actin cytoskeleton during pollen germination[J]. Chinese Sci Bull, 2000, 45(18):1677-1680.
- [14] 王崇英,王如娟,杨汉民.低能 N^+ 重离子注入处理后小麦种胚内的 DNA 期外合成[J].辐射研究与辐射工艺学报,1994,12(2):104-108.
- [15] Yang J B, Wu L Q, Li L, *et al.* Sequence analysis of *lacZ*⁻ mutations induced by ion beam irradiation in double-stranded M13mp18 DNA[J]. Science in China (Series C), 1997, 40(1):107-112.
- [16] 司婧,张红,武振华.离子注入技术在植物育种中的应用与研究进展[J].辐射研究与辐射工艺学报,2012,30(6):321-327.
- [17] 余增亮.离子束与生命科学——一个新的研究领域[J].物理,1997,26(6):333-338.
- [18] 邵春林,余增亮.离子束注入生物分子的电荷交换效应[J].核技术,1997,20(2):70-75.
- [19] 宋道军,余军,余增亮.低能离子束对微生物细胞的直接作用与间接作用研究[J].高技术通讯,1999,11(1):47-50.
- [20] Cerutti P. Anticarcinogenesis and radiation protection [M]. New York: Plenum Publishing Corporation, 1983:527-538.
- [21] 黄丽群,郑丰河,张斌,等.氮离子注入对光皮桦幼苗生理生化特性的影响[J].中南林业科技大学学报,2011,31(3):135-138.
- [22] 李光友,徐建民,白嘉雨,等.离子注入对桉树萌发及苗期生长的影响[J].中南林业科技大学学报,2007,27(5):44-48.
- [23] 李光友,徐建民,白嘉雨,等.离子注入对桉树苗期叶性状的影响[J].安徽农业科学,2008,36(8):3223-3225,3261.
- [24] 李光友,徐建民,杜志鹄,等.离子注入对桉树苗期光合特性的影响[J].中南林业科技大学学报,2011,31(1):54-58.
- [25] 李光友,徐建民,杜志鹄,等.离子注入桉树大田生长的变异与选择[J].华北农学报,2010,25(增刊):90-95.
- [26] 彭镇华,胡惠露,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.
- [27] 胡惠露.银杏 N^+ 离子诱变相关育种效应研究[J].安徽农业大学学报,1998,25(3):296-299.
- [28] 胡惠露,彭镇华,周蜀生,等.离子注入引起银杏种子 M_1 代染色体畸变的研究[J].安徽农业大学学报,1994,21(3):286-289.
- [29] 项艳,刘正祥,胡蕙露,等. N^+ 离子注入板栗生物学效应研究[J].激光生物学报,2004,13(1):47-51.
- [30] 江昌俊,李卓民,房国宾,等.利用 N^+ 离子诱变选育茶树良种初报[J].安徽农业大学学报,2000,27(1):48-50.
- [31] 江昌俊,李卓民,史生南,等. N^+ 离子注入茶树种子引起 M_1 代幼苗变异的研究[J].茶业通报,1995,17(4):21-22.
- [32] 张和禹,吴家喜,赵正龙,等.桑树注入 N^+ 离子后过氧化酶同工酶及 RAPD 分析[J].蚕业科学,2002,28(1):14-16.
- [33] 贾瀚超,张澜,周云龙.低能离子注入技术在生物学中的研究和应用[J].生物学通报,2007,42(2):2-5.
- [34] 陈浩,梁运章.离子束生物技术及其在药用植物育种中的应用[J].中草药,2005(5):641-643.
- [35] 邵果园.氮离子注入夏腊梅种子的 M_1 代早期表型观察[J].热带农业科技,2006,29(2):12-14.
- [36] 龚洪恩.山核桃和金合欢属植物离子注入诱变育种的研究[D].长沙:中南林业科技大学,2008.
- [37] 曲颖,李文建,周利斌,等.重离子辐射植物的诱变效应研究及应用[J].原子核物理评论,2007,24(4):294-298.