

离子束生物技术在小麦育种上的应用

姬生栋¹, 王育水², 马柯³, 秦广雍⁴, 耿飒¹, 刘红梅¹, 冯伟森¹, 徐存拴¹, 霍裕平⁴

(1 河南师范大学, 河南 新乡 453002; 2 焦作教育学院; 3 郑州牧业工程高等专科学校;

4 郑州大学离子束诱变育种及生物工程重点实验室)

摘要:阐述了离子束生物技术在小麦育种领域应用情况, 概括介绍了离子束诱变育种和离子束介导转基因技术的原理及方法, 对离子束小麦育种过程中涉及的主要技术参数作了详细描述。还介绍了最近发现的离子束诱变小麦遗传新规律和离子束辅助外源裸露大分子 DNA 转移在小麦育种中的新进展, 提出了离子束生物技术在育种领域急待解决的问题和应用前景。

关键词:离子束; 小麦; 育种; 介导

中图分类号: S512.1 文献标识码: A 文章编号: 1004—3268(2004)05—0006—05

Application of Biotechnology of Ion Beam on the Wheat Breeding

Ji Sheng-dong¹, WANG Yu-shui², MA Ke³, QIN Guang-yong⁴, GENG Sa¹,

LIU Hong-mei¹, FENG Wei-sen¹, XU Cun-shuan¹, HUO Yu-ping³

(1 College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxian 453002, China;

2 Department of Biology, Jiaozuo Educational College; 3 Zhengzhou Animal Husbandry Engineering College;

4 Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Zhengzhou University)

Abstract: The applications of ion beam technology on the wheat breedings were elucidated, the principles and methods of breedings through ion-beam-induced mutation and ion-beam-mediated transgene were summarized and the parameters involved in wheat breedings in detail were described. The new genetic laws observed recently in the ion-beam-induced wheat, and the advance in wheat breedings through ion-beam-mediated transfer of null DNA molecule, were also presented thus pointing out the critically unsolved questions and perspectives of ion beam technology in the field of wheat breedings.

Key words: Ion beam; Wheat; Breedings; Mediating

低能重离子生物技术(简称离子束生物技术或离子注入生物技术)创建于 20 世纪 80 年代中

期, 是由我国科学家首先提出并逐步建立起的一门新的交叉边缘学科。在育种领域它具有独特的

收稿日期: 2003—11—28

作者简介: 姬生栋(1963—), 男, 河南沁阳人, 实验师, 本科, 主要从事小麦育种研究及分子细胞生物学教学和科研工作。

参考文献:

- [1] 陈贵, 康宗利, 张立军. 低温胁迫对小麦生理生化特性的影响[J]. 麦类作物, 1998, 18(3): 42—43.
- [2] 陈翠莲, 马平福. 抗冷性不同的小麦、水稻品种脯氨酸含量的比较试验[J]. 华中农业大学学报, 1989, 8(2): 176—179.
- [3] 刘祖棋, 王洪春. 植物耐寒性及防寒技术[M]. 北京: 北京学术书刊出版社, 1990. 20—144.
- [4] 王爱国, 罗广华. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究

[J]. 植物生理学报, 1983, 9(1): 77—83.

- [5] 白宝漳, 汤学军. 植物生理学测试技术[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1993. 76—157.
- [6] Garaham D, Patterson BD. Responses of plants to low nonfreezing temperatures: proteins metabolism, and acclimation[J]. Annu Rev Plant Physiol, 1982, 33: 347—372.
- [7] 王毅, 杨宏福, 李树德. 园艺植物冷害与抗冷性的研究[J]. 园艺学报, 1994, 21(3): 239—244.

原理、简单的操作程序和很强的适用性。低能离子束既是一种新的有效的诱变源,又是一种转基因(或辅助外源大分子 DNA 转移)的新方法^[1~4]。近几年来,离子束生物技术在美、日、英、泰、澳大利亚等国受到重视,已成为新的研究热点。1995 年,离子束介导大分子 DNA 转移的优势被美国《遗传工程新闻》第 1 期列为当前国际生物技术研究的热点之一,引起国内外关注。在国内已有多家高校、科研院所和育种单位开展了离子束作物育种研究,培育出了一批优良作物新品种和有价值的育种新材料。在离子束小麦育种方面,已成功育出 3 个小麦新品种(皖麦 32、皖麦 42、皖麦 43)和一批具有特色的高产、优质、多抗的新品系、新类型。这些新品种已得到大面积推广和应用,创造了巨大的经济效益和社会效益^[5]。河南开展离子束诱变培育小麦新品种研究工作有 5 年时间,已选育出了一批高产、优质、多抗的小麦突变株系。同时,还利用离子束辅助基因群转移技术,将具有特异性状的远缘大分子 DNA 导入小麦胚细胞中,获得一批稳定遗传 2 代或 3 代的蛋白质含量高于 18% 的优质高产新株系,还得到大量具有特异性状的育种新材料。并通过对上述诱变材料的大量系统分析,发现了离子束诱变小麦遗传新规律^[6~8],为离子束小麦育种奠定了理论基础。

1 离子束诱变育种

1.1 离子束诱变育种特点

低能重离子束(简称离子束)是指能量在 $10^4 \sim 10^5 \text{ eV}$ 水平,原子序数大于 He 的元素离子化加速后的粒子线。离子束生物诱变的基本特点是加速后的离子具有质量、能量和电荷三种作用势,当荷能离子注入生物体后,会产生质、能、电共同作用于生物体的集体效应,在生物体的局部产生高密度的电离和激发,引发生物学效应。离子束除了像一般辐射一样由于能量的作用引起生物体 DNA 的损伤,从而诱导和激发细胞对损伤 DNA 的修复,引起基因突变^[1,3]。还具有质量、能量、电荷三因素协同作用,引起大量受体原子移位、重组、基因修饰等多重损伤,形成新的分子结构,产

生丰富的基因突变^[9]。

1.2 离子束诱变育种方法

1.2.1 注入离子种类 目前的研究报道中,利用离子注入技术进行诱变育种研究,所用的元素离子多为 N^+ 、 C^+ 、 O^+ 、 Ar^+ 、 Ne^+ 、 Fe^+ 等^[5,7,10~12],但应用最多的元素是 N^+ 。这是因为 N^+ 是一种活性离子,注入生物样品后可掺入靶分子形成新物质,容易诱导生物体产生变异^[13,14]。如果注入细胞的是活性离子,慢化后它将与周围的移位原子、本底原子发生化学反应,产生新的分子或基团,这就是离子注入所产生的“质量沉积效应”。王相勤等研究发现, N^+ 和 Ar^+ 注入尿嘧啶后,尿嘧啶中氨基的数量随注入剂量的加大而增加。在相同的能量和剂量下 Ar^+ 注入尿嘧啶所产生的氨基多于 N^+ 。这是由于 Ar^+ 的质量大于 N^+ ,通过反复和级联碰撞能产生更多的分子重排和重组^[14]。

1.2.2 注入离子的能量和剂量 适宜的注入离子能量和剂量是获得最佳诱变效果的关键。离子注入小麦的目的是创造有利的可遗传的变异材料。秦广雍等通过对不同能量 N^+ 注入的研究,发现 30 keV 的 N^+ 进行小麦干种子诱变效果较好,这与同样能量的 N^+ 注入棉花种子的诱变效果一致^[15]。他们还研究了能量为 50 keV 的 N^+ 注入小麦种子的效果,发现成苗率虽然降低,但诱变率却升高,并且在成熟期方面表现为晚熟的不利变异较多。他们认为这可能是 50 keV 的热效应等因素的负效应大,不利于田间选择,在多次试验中都证明了这一点。

传统的辐射育种一般多采用半致死剂量(LD_{50})作为辐射处理的诱变剂量。杨赞林等对 3 个小麦品种作了剂量试验,研究结果是:注入剂量为 $60 \times 10^{15} \text{ N}^+ / \text{cm}^2$ 时,发芽率急剧下降,不同基因型间存在差异;离子注入半致死剂量大约为 $60 \times 10^{15} \text{ N}^+ / \text{cm}^2 \sim 80 \times 10^{15} \text{ N}^+ / \text{cm}^2$ ^[3]。河南省离子束诱变育种重点实验室选用 5 个小麦品种,进行注入剂量研究,结果发现,不同品种对剂量的敏感程度有显著差异;低剂量对种子成苗率几乎无影响;当剂量达到 $10 \times 10^{17} \text{ N}^+ / \text{cm}^2$ 时,成苗率接近但仍未达到半致死剂量。通过对注入剂量的综

合分析,认为在能量为 30 keV 时,注入剂量在 $4 \times 10^{17} \text{N}^+/\text{cm}^2 \sim 6 \times 10^{17} \text{N}^+/\text{cm}^2$ 是小麦干种子反应相对敏感区域。这一结果与杨赞林等的报道不尽相同。分析认为,可能是由于注入机型号不同,剂量率不同或其他因素的影响。

实践证明,在突变率相同情况下,离子束照射要比传统辐射诱变育种损伤轻得多,因此,传统辐射育种所采用的半致死剂量对离子注入诱变育种并不适应。同时还应注意,不同品种对离子束辐射敏感性差别较大,在确定最佳诱变剂量时要考虑品种的特性,以及品种与剂量间的相互效应。研究确定各材料最佳的诱变剂量,对离子束诱变育种具有重要的理论和实践意义。

1.3 离子束诱变育种新规律

离子束是一种安全、无污染、高效(也可以说是目前最有效的)的诱变源,并显著区别于其他诱变源;离子束诱变育种具有损伤轻、突变率高、突变谱广等优点^[1,3,6]。通过对大批诱变材料系统分析,发现离子束辐照诱变小麦遗传的新规律:其一,在合适的剂量下,离子束辐照在当代就能产生高达百分之几的明显各类突变(不是辐射损伤),且有很宽的突变谱;其二,绝大多数一代突变株的二代株系内很少分离,突变性状也基本保持,即第一代突变已具有遗传性;其三,三代以后基本不分离,明显的突变性状也基本保持^[6]。从上述规律可以看出,离子束诱变育种能够明显缩短小麦新品种选育周期,而且突变体的选择将更为有效,离子束诱变将会是创造新遗传材料的有效手段。即使在小麦范围内,新规律的进一步确认和完善,必将给遗传的一般看法提出许多新的问题^[6]。

2 离子束介导转基因(或辅助外源 DNA 转移)

2.1 离子束介导转基因特点

低能离子束介导外源基因(或大分子 DNA)转移技术的突出优点是:第一,刻蚀和溅射作用。荷能离子对生物材料具有极强的刻蚀和溅射作用,使细胞形成利于外源基因进入的可修复的微通道。第二,射程的可控性和集束性。利于精确控制被处理组织细胞的刻蚀程度、损伤范围。第

三,静电作用。带正电离子注入细胞后,电荷交换使微通道积累正电荷,便于吸收带负电的外源 DNA 主动进入细胞。第四,离子注入造成靶细胞 DNA 链的损伤,受体细胞对损伤的 DNA 的修复,利于外源 DNA 与受体 DNA 的重组与整合。第五,利用成熟种子的胚和愈伤组织做为外植体,便于取材和批量操作,同时也省去了原生质体制备和再生植株的麻烦,既方便又有效^[2,4]。

2.2 离子束介导转基因方法

2.2.1 注入离子类型 离子束介导转基因小麦(或辅助外源大分子 DNA 转移)研究晚于诱变,目前所用的元素离子种类没有诱变领域的多,主要有 2 种: N^+ 和 Ar^+ ^[16~23]。安徽开展离子束介导转基因较早,多用 Ar^+ 作为注入离子^[16,17,22,23]。他们认为 Ar^+ 是一种惰性元素,不会与生物靶组织发生化学反应而沉积下来,最终以氩气的形式逸出靶面^[13,14]。卞坡等进一步研究表明,在相同的能量和剂量下, Ar^+ 的刻蚀效果优于 N^+ ^[24]。但是,吴丽芳等研究认为,用相同剂量,相同能量的 N^+ 和 Ar^+ 处理小麦成熟胚,结果 2 种离子对小麦成熟胚出愈率的影响差异不显著^[6]。河南省在进行外源大分子 DNA 转移时,多用 N^+ 注入,其变异效果和三代的稳定情况并不比用 Ar^+ 的差^[7,8,18~21]。看来,拓宽离子束介导转基因所用的注入元素离子的种类,仍是今后研究的重点。

2.2.2 注入离子的能量和剂量 注入离子的能量、剂量和脉冲剂量直接关系到离子介导转化的效果。吴丽芳等研究认为,用离体小麦成熟胚为受体,以 *GUS* 基因(*GFP* 基因)为供体,选用的离子注入能量在 20~25 keV 时,介导转基因效果较好。在能量为 25 keV,脉冲剂量为 $2.6 \times 10^{15} \text{ions}/\text{cm}^2$ 条件下,对小麦成熟胚进行处理,发现低剂量处理未导致出愈率降低,反而略有升高。然而,当剂量大于 $5 \times 10^{16} \text{ions}/\text{cm}^2$ 时,会导致出愈率急剧下降。他们认为,选用 $4.68 \times 10^{16} \text{ions}/\text{cm}^2$ 作为离子束介导转基因的注入剂量较为合适^[6]。吴丽芳等在以外源大分子裸露 DNA 为供体,成熟种子胚为受体(不是离体胚)时,所用的照射能量为 30 keV,剂量为 $7 \times 10^{16} \text{Ar}^+/\text{cm}^2$ ^[17]。

秦广雍等用俄罗斯制造的 TITAN 全元素注入机,进行离子束辅助外源 DNA 转移时,所用的照射能量为 30 keV,束流 200 mA,脉宽 400 ms,频率 25Hz,剂量为 $2 \times 10^{17} \text{ N}^+ / \text{cm}^{2[8]}$ 。看来,不同单位由于所用的离子注入机的差别,可能是离子注入的适宜参数存在一定差异的重要原因。所以在进行转基因操作时,要摸索合适的参数条件。

2.2.3 受体前处理 首先要挑选种子,然后进行消毒,先用 70%乙醇表面消毒 1 min,无菌双蒸水冲洗干净,接着用 0.1%升汞浸泡 15 min(或 20%次氯酸钠处理 30 min),然后用无菌双蒸水冲洗净,超净台中吹干备用。若以离体的成熟胚为受体,消毒后的种子要在超净工作台中进行无菌取胚,然后进行离子辐照^[16~23]。

2.3 研究现状

离子束生物技术的另一个突出功能是介导外源基因转化,这一技术是我国科学家余增亮先生首次提出,并率先用离子束介导的方法将报告基因(*GUS* 和 *CAT*)导入水稻成熟胚和悬浮细胞,并获得成功^[4]。2000 年,吴丽芳等首次报道了以携带 β -葡萄糖苷酸酶的质粒为供体,小麦成熟胚为受体,用离子束介导转基因技术进行了报告基因转化研究,分子生物学依据表明, *GUS* 基因已整合到小麦基因组中,并得到表达;她还将改良的绿色荧光蛋白基因(*mGFP4*)导入到小麦成熟胚细胞,获得转化植株^[16]。吴丽芳等用同样的方法,同年在《科学通报》上报了将水稻几丁质酶基因导入小麦获得成功。这标志着离子束介导转化的供体已由报告基因转向了目的基因,证明离子束介导转基因小麦的技术体系已初步形成。以质粒为载体的植物遗传转化为作物改良虽带来了希望,但同时也带来了安全性问题,况且成功的例子并不多。随后,人们把目光转向利用低能离子束辅助外源(远缘)大分子裸露 DNA 转移技术,培育小麦新品种和创造小麦新种质工作中。首先是将大豆基因组 DNA 转入小麦,获得高蛋白后代(籽粒蛋白含量达到 20%以上)^[7,8,19,21,23],这些高蛋白后代的部分株系已基本稳定遗传 2 代或 3 代^[7,8,25]。同时还获得了一批具有育种价值的遗传新材料^[7,8,25,26]。实践证明,离子束辅助外

源(远缘)大分子裸露 DNA 转移是实现远缘分子杂交的一种有效手段。由于作物的许多重要经济性状往往是多基因控制的数量性状,这些基因分布于同一染色体的不同位置或不同染色体上,涉及 DNA 区段较大,克隆困难,用质粒为载体转化这类基因很困难。离子束辅助基因群转移技术使上述困难得以顺利解决,实现了大片段 DNA 转移。

3 存在问题

离子束生物技术虽然在农业育种上取得了举世瞩目的成绩,但它还是非常年轻的一门学科,仅在育种领域就有许多问题急待解决。比如,拓宽注入离子的种类;多离子同时注入生物效应问题;对细胞“加工”定位精确度不够,若将离子束聚焦到微米以下或单离子束,控制好离子的射程和作用部位,就可以对细胞进行定点遗传操作以及对叶绿体、线粒体等细胞器实施“手术”;由于注入过程目前仍在真空条件下进行,使得注入材料多是休眠状态下的成熟种子或微生物孢子,制约了对水分含量较高的活体组织的研究;离子束对作物生长发育的刺激作用;离子束生物效应的机理;离子束辐照后表现出的细胞旁近效应的机理;离子束育种出现的新的遗传规律,等等。

4 应用前景

离子束生物技术的诞生和发展,始终和作物育种相伴。十多年来,每次离子束作物育种的成功,都标志着离子束生物技术的进一步成熟和完善。离子束诱变小麦遗传新规律的发现和有关离子束辅助基因群转移的研究,进一步丰富了离子束生物技术的遗传学内涵及离子束小麦育种理论。研究表明,用离子束技术培育小麦,突变体的选择可以从当代开始,由于当代群体不大,筛选较容易。更重要的是提早了选择世代,缩短了育种进程^[9]。离子束生物技术的独特作用引起世界关注,作物育种仍将是今后离子束生物技术研究 and 应用的热点之一。相信,随着离子束生物技术研究深入,离子束生物技术必将给农业乃至整个生物界带来一场革命。

参考文献:

- [1] 余增亮. 离子注入水稻诱变育种机理初探[J]. 安徽农业科学, 1989, 39(1): 12—16.
- [2] 余增亮. 粒子束与生命科学——一个新的研究领域[J]. 物理, 1997, 26(6): 333—338.
- [3] Yu Z L, Deng J G, He J J. Mutation breeding by ion implantation[J]. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research. 1991, B59/ 60: 705—708.
- [4] Yu Z L, Yang J B, WUYJ, et al. Transferring GUS gene into intact rice cells by low energy ion beam[J]. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research. 1993, B80/ 81: 1 328—1 331.
- [5] 杨赞林, 甘斌杰, 余增亮, 等. 离子注入小麦诱变育种的回顾与展望[A]. 第一次国际离子束生物工程学术研讨会论文集[C]. 2002. 62—65.
- [6] 霍裕平, 秦广雍, 苏明杰, 等. 离子束诱变小麦遗传新规律的研究[A]. 第一次国际离子束生物工程学术研讨会论文集[C]. 2002. 87—90.
- [7] 霍裕平. 有关离子束辅助基因群转移的研究[A]. 第一次国际离子束生物工程学术研讨会论文集[C]. 2002. 121—123.
- [8] 秦广雍, 霍裕平, 王卫东, 等. 离子束辅助大豆基因群转移小麦后代的蛋白质变异分析[A]. 第一次国际离子束生物工程学术研讨会论文集[C]. 2002. 159—164.
- [9] 杜海彪, 邱冠英, 杜严华. 三种类型辐射对质粒超螺旋 DNA 损伤的研究[J]. 生物物理学报, 1997, 13(2): 261—265.
- [10] 颜红梅, 卫增泉, 李文建, 等. 中能离子束注入与贯穿辐射对小麦种子萌发生长的影响[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 1996, 14(1): 50—54.
- [11] 李兴林, 卫增泉, 王小娟, 等. $^{12}\text{C}^{6+}$ 注入小麦种子胚乳引起 M1 代的变化[J]. 激光生物学报, 2000, 9(4): 5—8.
- [12] 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.
- [13] 王相勤, 邵春林, 姚建铭, 等. 低能离子束与生物有机小分子相互作用机制的初步研究[J]. 化学学报, 2000, 58(4): 443—447.
- [14] Wang X Q, Han J W, Yu Z L. Study on Damage of Molecular Structure of Solid Uracil induced by Low Energy Argon Ions Implantation[J]. Acta Biophys Sinica, 1998, 14(2): 201—206.
- [15] 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[J]. 安徽农业大学学报, 1998, 25(4): 371—374.
- [16] 吴丽芳, 李红, 宋道君, 等. 建立低能离子束介导小麦转基因方法并获得转 GUS 基因植株[J]. 遗传学报, 2000, 27(11): 982—991.
- [17] 吴丽芳, 李红, 宋道君, 等. 低能亚离子束介导将绿色荧光蛋白基因导入小麦的研究[J]. 南京农业大学学报, 2000, 23(3): 17—20.
- [18] 姬生栋, 李吉学, 徐存拴, 等. 离子束介导大豆 DNA 小麦后代的蛋白质变异性分析[J]. 麦类作物学报, 2001, 21(3): 18—21.
- [19] 姬生栋, 李吉学, 赵俊杰, 等. 低能离子束介导外源 DNA 转入小麦种胚中对小麦幼苗叶片蛋白水解酶酶谱的影响[J]. 麦类作物学报, 2001, 21(3): 5—8.
- [20] 赵俊杰, 王莹, 姬生栋. 离子注入法转大豆 DNA 小麦成熟期 α -Aorry 的研究[J]. 河南职技师院学报, 2001, 29(3): 1—3.
- [21] 姬生栋, 李吉学, 赵俊杰, 等. 低能离子束介导转基因小麦叶片蛋白指纹分析[J]. 麦类作物学报, 2001, 21(4): 52—55.
- [22] 吴丽芳, 李红, 冯慧云, 等. 用低能离子束介导将水稻几丁质酶基因导入小麦[J]. 科学通报, 2000, 45(21): 2 316—2 321.
- [23] 吴丽芳, 余增亮. 离子束注入法获得大豆——小麦分子远缘杂种及后代的变异分析[J]. 核农学报, 2000, 14(4): 206—211.
- [24] 卞坡, 霍裕平, 秦广雍, 等. 低能离子束刻蚀番茄皮的 A 透射能谱研究[J]. 生物物理学报, 1999, 15(3): 551—555.
- [25] 王卫东, 王雪青, 秦广雍, 等. 离子束介导转大豆 DNA 豫麦 52 当代及二代蛋白质分析[A]. 第一次国际离子束生物工程学术研讨会论文集[C]. 2002. 152—155.
- [26] 姬生栋, 秦广雍, 耿飒, 等. 低能离子束介导大豆 DNA 的小麦雄性不育变异体蛋白水解酶分析[J]. 作物学报, 2003, 29(5): 797—800.