

离子束生物技术在蔬菜遗传改良中的展望

黄群策

(河南省郑州大学离子束生物工程省重点实验室, 450052)

摘要:简述了离子束生物技术的研究现状;明确提出了离子束生物技术在蔬菜遗传改良中值得注意的3大问题,即离子束介导技术比离子束诱变技术具有更大的潜在价值、遗传物质的供体与受体在亲缘关系上的远近在很大程度上决定着遗传改良的效果、建立高效的筛选体系将有助于提高离子束生物技术在蔬菜遗传改良中的效率。探讨了离子束生物技术在蔬菜遗传改良中的发展思路。

关键词:离子束生物技术;蔬菜遗传改良;发展思路

中图分类号:S 63.03.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)07-0059-04

在蔬菜遗传改良已经取得明显效果的前提下,如何采用新的现代生物技术进一步挖掘蔬菜的潜在利用价值,是值得研究的问题。前人的研究经验已经证实,生物体新材料或新基因的发现、生物体遗传改良新方法或新技术的建立和研究生物体新思路的提出,都有可能明显地促使生物体遗传改良的操作水平得到明显提高,进而能有效地挖掘其潜在的实用价值。从生物体遗传改良的发展进程来看,研究方法的创新主要围绕两个方面展开,即如何更有效地在生物体后代群体内创造出具有实用价值的遗传性变异个体和怎样更有效地筛选出具有潜在价值的优良基因型。大量的研究表明,在创造生物体遗传性变异群体的过程中,无论是物理学方法还是化学方法,都会涉及到多种多样的诱变源或诱变剂。20世纪80年代中期在我国被发现和挖掘的离子束生物技术,在创造生物体遗传性变异群体方面具有新颖性和实用价值。经过20多年的研究和探索,离子束生物工程作为一门新兴的交叉学科已经显现出其应有的技术特色,其技术的实用性和遗传改良的普遍性已被大量的试验结果所证实^[1]。在多种蔬菜的遗传改良中离子束生物技术的特异性和实用性也相当明显^[2-4]。然而,关于离子束生物技术在蔬菜遗传改良中的一些技术问题还值得进一步研究和探讨。

1 离子束生物技术的发展

离子束生物工程的兴起主要受益于物理学研究的阶段性研究成果。在20世纪80年代初,随着低能加速器配件技术的改进和离子注入技术的革新,国内外掀起

了借助于离子束注入技术对物质材料的表面进行改性和重塑的研究热潮。中国科学院等离子体物理研究所的余增亮先生首先提出了“借助于低能离子注入技术使生物体的特征特性发生本质变化,进而对生物体进行遗传改良”的设想。1986年春季在安徽省合肥市以水稻为试验材料经过离子注入处理之后所获得的研究结果表明,在水稻苗期就观察到高频率的叶绿体畸变现象,这种变异现象类似于⁶⁰Co- γ 对水稻所引起的诱变效应,由此揭开了离子束生物工程的研究序幕。随后,余增亮先生提出了离子注入后会因为能量沉积、质量沉积、电荷交换而引起生物学效应的“三因子”假说,由此引起了国内外相关学者对这一具有我国独立知识产权、涉及到物理学和生物学交叉领域的关注。

在离子束生物工程的初期阶段,国内外相关研究领域的学者对其提出了一些善意的疑问,其中包括离子束生物技术在实际应用中的普遍性和实用性以及新兴学科的发展迫切需要与国际接轨的问题,由此促进了离子束生物工程的快速发展和其实用技术的不断完善。目前,离子束生物技术的研究范围主要涉及到6个主要方面,即离子注入生物学效应的定量研究、注入离子与生物体相互作用的研究、离子注入后细胞生物学效应的研究、离子注入后在分子生物学水平上的效应研究、离子束介导外源遗传物质转移的研究和创造生物体新种质的实用技术研究。在离子注入生物学效应的定量研究方面,通过微束或单离子束加速器的改进、细胞定位照射系统的完善、受体细胞图象重建技术的优化和精确定位系统的调整,使得低能离子束生物技术的研究已经从定性研究成功地向定量研究拓展。大量的研究结果已经证实,离子束生物技术的基本原理就是荷能离子束本身所具有的质量、能量和电荷对生物体会产生直接的作用效应,其中包括质量沉积、能量沉积、电荷沉积、电子

作者简介:黄群策(1958-),男,教授,博士生导师,河南省特聘教授,研究方向为生殖发育生物学。

基金项目:国家“十五”科技攻关资助项目(2001BA302B)。

收稿日期:2007-02-17

溅射、离子溅射、局部刻蚀和通道作用。除此之外,通过直接作用于生物体内所产生的自由基或特殊的化学物质,再对生物体产生间接的作用效应,引起细胞内的遗传物质发生变异。离子束生物技术本身具有独特的技术原理和简单的操作程序,在作物育种中其实用性已经被越来越多的研究结果所证实,也引起了越来越多研究者的关注和重视。大量的研究表明,在荷能离子被注入生物体后所表现的生物学效应具有局部性、双重性和不易修复性。在具体的试验操作过程中荷能离子束的注入射程具有可控性、集束性和方向性,在损伤程度较轻的情况下可以获得比较高的突变率和比较宽的突变谱。通过对离子束生物技术的机理进行研究后已经证实,荷能离子束对细胞的加工属于动量交换的冷加工作用,不会伤及未被照射的邻近组织或细胞,而电子束或激光对细胞的加工属于损伤性的热加工作用,对未被照射的邻近组织或细胞有比较大的损伤,所以,荷能离子束对细胞的加工效应明显地优于电子束或激光对细胞的加工效应。离子束对细胞的超微加工使得细胞的通透性发生明显的改变;通过对照射剂量进行控制,可以在细胞和组织上形成可以修复的微孔,这为外源遗传物质进入细胞提供了良好的通道^[5,9]。

经过 20 多年的探索和研究,离子束生物工程的学科框架已经形成,其技术体系进一步得到完善,在生物体遗传改良的实际应用中其技术效果的普遍性和实用性已经得到充分地证实。从离子束生物工程技术特点来看,利用离子注入后在受体组织中形成带微正电的离子通道,进而促进供体的遗传物质向受体转移,由此可望达到异源遗传物质发生重组和产生新的变异后代的目的^[7]。利用离子束生物技术对多种蔬菜进行遗传改良的研究结果表明,经过离子注入处理或介导处理之后,其后代群体内的变异类型相当丰富,这为蔬菜的遗传改良提供了一条新的途径^[8,9]。

2 离子束生物技术在蔬菜遗传改良中的问题

经过 20 多年的不断探索,在离子束生物技术的发展过程中,其生物学效应的实用性和普遍性已经被越来越多的实验结果所证实,一些简单的生物学问题已经被阐明,离子束生物技术的一些简单机理已经被证实,一些实用性技术体系已经建立并不断得到完善。为了促进离子束生物技术的不断完善,迫切需要形成一个更加完整的研究体系。离子束生物工程是利用离子束作为诱变源对生物体进行遗传改良的交叉学科,其中包括对生物体进行诱变后的遗传改良和通过介导外源遗传物质后对受体的遗传改良。在借助于离子束生物技术对蔬菜进行遗传改良的过程中,有 3 大问题值得注意和探讨。

2.1 离子束介导技术比离子束诱变技术具有更大的潜在价值

在离子束生物工程的未来发展中,必须瞄准 2 个发展方向,即离子束对生物体的诱变作用和异源遗传物质的介导作用。从学科的发展趋势来看,诱变效应的研究和应用主要瞄准对生物物种内不同遗传型的改良,其中包括对特定物种内不同亚种、不同生态型、不同品种和品系的遗传改良;介导作用的研究和应用主要瞄准对生物物种间遗传物质的交流展开技术探索,其中包括对受体亲本的改造、生物体新类型的创造、生物体新亚种或新物种的形成。尽管如此,离子束生物工程必须立足于对生物体进行有效地遗传改良,加速生物体的进化历程,充分挖掘其增产潜力和实用价值。因此,在借助于离子束生物技术对蔬菜进行遗传改良的过程中,离子束介导技术比离子束诱变技术具有更大的潜在价值。利用离子束介导技术将有助于打破蔬菜物种间的生殖隔离,促进异源物种间遗传物质的交流和遗传重组,由此有望创造出更加丰富的遗传性变异群体,为蔬菜遗传改良找到了新的研究方向。

2.2 遗传物质的供体与受体在亲缘关系上的远近在很大程度上决定着遗传改良的效果

离子束介导技术的最明显的技术特点就是通过离子注入之后在受体细胞和组织上形成可以修复的带有微电荷的微孔,这为外源遗传物质进入受体细胞提供了良好的通道,进而可以打破生物物种之间所存在的生殖隔离,促进远缘遗传物质在物种之间的相互交流。大量的研究表明,在借助于离子束生物技术对蔬菜进行遗传改良的过程中,遗传物质的供体与受体在亲缘关系上的远近在很大程度上决定着遗传改良的效果。在一定范围之内,遗传物质的供体与受体在亲缘关系上越远则其后代的变异类型越丰富,后代群体内的性状分离越明显,获得稳定群体的时间也越长;反之,则其后代的变异类型比较少,后代群体内的性状分离不很明显,获得稳定群体的时间也比较短。根据近年来所获得的研究结果,在蔬菜的介导试验过程中采用同一属内不同的物种分别作为供体与受体,则有可能获得比较好的介导效果,而采用不同属内的不同物种分别作为供体与受体则很难获得比较好的介导效果。

2.3 建立高效的筛选体系有助于提高离子束生物技术在蔬菜遗传改良中的效率

在蔬菜的遗传改良中主要包括 4 个基本的技术环节,即创造遗传性变异群体、筛选优良的基因型个体、尽快促使优良个体的基因型趋于稳定和扩大优良基因型的个体数目。借助于离子束生物技术对蔬菜进行遗传改良,其主要目的就是促使试验材料发生遗传性变异,由此创造出具有遗传性变异特征的后代。随后,如何能够高效率地从中筛选出具有研究价值和实用价值的优良个体则是研究者值得注意的问题。无论是采用离子

束诱变技术对蔬菜材料进行遗传改良还是采用离子束介导技术对其完成异源遗传物质的转移和交流,这都是对蔬菜进行遗传改良的基本技术环节之一,随之而来的重要工作就是对其后代群体进行鉴定和筛选,迫切需要建立高效的筛选体系。在利用离子束生物技术对蔬菜材料进行遗传改良的过程中,应主张采用“种子—处理—无性系—个体”的筛选体系,即以种子为材料经过诱变处理或介导处理后使其完成脱分化的培养,由此产生无性系,随后通过促使无性系再分化而产生再生植株。采用这一技术性筛选体系将有助于提高离子束生物技术在蔬菜遗传改良中的效率。

3 离子束生物技术在蔬菜遗传改良中的应用前景

随着离子束生物技术在蔬菜遗传改良中的实用性和普遍性的范围不断拓宽,将会促进离子束生物工程的学科发展,由此有望建立一个高效的实用技术体系。从近10多年来离子束生物工程的研究结果来看,其研究和探索的范围主要局限在对生物体某一物种内特定品种或品系的研究,尚未跳出生物体常规遗传改良的技术范畴。从目前生物体常规遗传改良的发展趋势来看,试图在特定物种内对生物体进行遗传改良,进而期望获得突破性成果的难度会越来越大,而打破物种间的生殖隔离和增加异源遗传物质的遗传隔离,促进异源遗传物质在不同物种间进行交流和重组的发展方向,则向人类展现出广阔的研究前景。离子束对生物体的溅射作用会破坏细胞壁和细胞膜结构,为外源遗传物质进入细胞提供良好的微通道;伴随着离子注入的质量沉积会降低细胞表面的负电性,减弱受体对外源遗传物质的静电排斥作用;离子束对生物体的直接作用和间接作用会打断细胞内染色体的部分结构,这有利于外源遗传物质整合到基因组中。因此,在近缘物种间和远缘物种间建立离子束生物工程的高效的介导技术体系将是值得探索的新的研究方向。

离子束生物技术在蔬菜遗传改良中有其特殊的意义,值得进一步探索。展望这一研究领域的发展动态,研究者将立足于离子束这一物理学技术平台,瞄准2个发展方向,促进3个有效转变,分清4个研究层次,注重5大生物学特性。离子束生物工程是立足于以离子作为新的诱变源这一物理学技术平台,采用离子注入技术对生物体进行遗传改良的新兴的交叉学科领域。围绕着诱变源的实用性和高效性以及针对不同生物样品进行遗传改良的适应性展开探索和研究,将有助于为离子束生物工程的进一步拓展而建立起一个良好的物理学平台。离子束生物工程必须瞄准2个发展方向,即低能离子束对生物体的诱变作用和异源遗传物质的介导作用。从学科的发展趋势来看,诱变效应的研究和应用主要瞄准对生物物种内不同遗传型的改良,其中包括对特定物种

内不同亚种、不同生态型、不同品种和品系的遗传改良;介导作用的研究和应用主要瞄准对生物物种间遗传物质的交流展开技术探索,其中包括对受体亲本的改造、生物体新类型的创造、生物体新亚种或新物种的形成。离子束生物工程的研究范围内需要促进3个有效转变,即从对生物体的形态学研究转变为在注重形态学效应的同时探索性状表现的遗传学规律和遗传机理、从对当代效应的研究为主转变为在注重当代效应的基础上进一步研究突变性状的后效性、从对单一效应的研究为主转变为在研究单一效应的同时进一步研究突变性状的综合效应。在离子束生物工程的研究范围内需要分清4个研究层次,即在群体水平的研究、个体水平的研究、在细胞(亚细胞)水平的研究和在分子水平的研究。在离子束生物工程的研究工作中需要注重对蔬菜材料的5大生物学特性进行研究,即经过离子注入或介导处理后对后代的生殖特性、发育特性、光合特性、抗逆特性和品质特性的研究。在生殖特性的研究中需要注意试验材料的减数分裂是否正常、雌雄配子或雌雄配子体的发生状态和发育状态、受精作用是否异常、幼胚和胚乳的发育状态、是否存在雄性不育现象、雌性不育现象和无融合生殖现象。在发育特性的研究中需要注意幼苗和植株的株叶形态、生长势、光周期特性和春化特性。在光合特性的研究中需要注意光合强度、光合势和叶绿体的光合效率。在抗逆特性的研究中需要注意对非生物性抗逆性(抗旱性、抗寒性、耐盐性和耐碱性等)的筛选是主要的研究目标,而对生物性抗逆性(抗病性和抗虫性等)的筛选是次要的研究目标。在品质特性的研究中需要注意满足人们需求,不断提高蔬菜产品的市场品位和市场价格。

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] 梁秋霞, 曹刚强, 黄群策, 等. 超低能离子束注入后番茄的生物学效应[J]. 激光生物学报, 2006, 15(4): 388-393.
- [3] 梁秋霞, 曹刚强, 黄群策. 低能 Ar^{+} 注入樱桃萝卜点红种子后的生物学效应[J]. 中国农学通报, 2005, 21(3): 70-73.
- [4] 代西梅, 黄群策, 黄延伟. 低能氮离子束注入马齿苋的生物学效应[J]. 中国农学通报, 2005, 21(1): 29-31.
- [5] 吴丽芳, 李红, 冯慧云, 等. 利用低能氩离子束介导将水稻甲壳素酶基因导入小麦[J]. 科学通报, 2001, 46(4): 46-48.
- [6] 余增亮, 何建军, 邓建国, 等. 离子束对水稻的诱变机理研究[J]. 安徽农业科学, 1998, 39(1): 12-16.
- [7] 黄群策, 彭建军. 低能离子束生物工程的发展趋势[J]. 激光生物学报, 2005, 14(6): 25-30.
- [8] 梁秋霞, 曹刚强, 黄群策, 等. 超低能离子束注入后番茄的生物学效应[J]. 激光生物学报, 2006, 15(4): 388-393.
- [9] WANG Hao-bo, Huang Qunce. Genetic transformation of watermelon with pumpkin DNA by low energy ion beam-mediated introduction[J]. Plasma Science & Technology, 2002, 4(6): 1591-1596.
- [10] 黄群策, 梁秋霞, 李玉峰, 等. 低能离子注入同源四倍体水稻的生物学效应[J]. 激光生物学报, 2003, 12(5): 355-359.

分子生物学技术在枸杞研究上的应用

何 军^{1,2}, 李晓莺¹, 曹有龙¹, 刘 萍², 平吉成²

(1. 宁夏农林科学院枸杞工程技术研究中心, 银川 750002; 2. 宁夏大学农学院, 银川 750021)

摘 要: 分子生物学是从分子水平研究生物大分子的结构与功能, 从而阐明生命现象本质的科学。自 20 世纪 50 年代以来, 分子生物学一直是生物学的前沿与生长点, 推动着整个生命科学的发展。但分子生物学技术在枸杞上的应用还处于刚刚起步阶段, 只进行了一些分子标记、cDNA 文库构建、功能基因的分离克隆、外源基因转入枸杞基因组的研究, 现将分子生物学技术在枸杞研究上的应用进展进行全面综述, 为今后的研究提供经验。

关键词: 分子生物学; 枸杞; 分子标记

中图分类号: Q 75; S 793.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)07-0062-03

从 20 世纪 50 年代以来, 以生物大分子为研究目标的分子生物学逐步形成了独立的学科, 并迅速成为现代生物领域中最具有活力的学科。目前科学家已经建立了一整套分子生物学研究的方法、系统和一般的逻辑推理原则^[1]。应用分子生物学技术不仅对人类、动物、植物、微生物基因组进行了研究, 而且对农作物抗病虫害、品质改良、抗病毒等方面进行了研究, 对当代农业发展起到了重要的推动作用。枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 属茄科枸杞属落叶灌木, 是我国重要的药用植物资源, 随着枸杞需求量的不断增大, 人们对枸杞的研究也不断深入。自 20 世纪末以来, 分子生物学技术被应用到枸杞研究上, 并取得了一些成绩, 现综述分子生物学技术在枸杞上的应用情况, 为今后的研究工作提供一些经验。

第一作者简介: 何军(1978-), 男, 在读硕士研究生, 主要从事植物遗传育种研究, E-mail: hejun1978@126.com。

基金项目: 宁夏回族自治区重大科技攻关资助项目(05GG-10601)。

收稿日期: 2007-03-05

1 分子生物学技术在枸杞研究上的应用

1.1 枸杞基因组总 DNA 和 RNA 的提取

基因组 DNA 和 RNA 的提取通常用于构建基因文库、Southern 杂交(包括 RFLP)及 PCR 分离基因等。利用基因组 DNA 较长的特性, 可以将其与细胞器或质粒等小分子 DNA 分离。加入一定量的异丙醇或乙醇, 基因组的大分子 DNA 即沉淀形成纤维状絮团漂浮其中, 可用玻棒将其取出, 而小分子 DNA 则只形成颗粒状沉淀附于壁上及底部, 从而达到提取的目的。

1.1.1 枸杞基因组总 DNA 的提取 李树华等^[2]用 SDS-I、SDS-II 和 CTAB 3 种方法提取枸杞果实 DNA, SDS-I 和 CTAB 法提取的枸杞 DNA 纯度和得率都较低, SDS-II 提取的纯度为 $OD_{260}/OD_{280} = 2.8$, 说明含有较多的 RNA, $OD_{260}/OD_{230} = 1.61$, 得率 $180.9 \mu\text{g/g}$ 。孙晓东等^[3]用 CTAB 法提取枸杞果实 DNA, 提取的 DNA 含量为 $100 \mu\text{g/mL}$, 纯度值 $OD_{260}/OD_{280} = 1.3$, 虽未达到比值 1.8 的理想纯度, 经 RAPD 法扩增后进行琼脂糖电泳分析表明对枸杞有 DNA 分子标记意义。张满效

Prospect of Ion Beam Bio-technique in Genetic Improvement of Vegetable Crop

HUANG Qunce

(Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bio-engineering, Zhengzhou University, Henan 450052)

Abstract: The research was on ion beam bio-technique and its three problems. The three problems were that the medium-technique of ion beam has larger potential value than the mutation-technique of ion beam, that the effects of genetic improvement on vegetable crops were mainly depended on the distance of the family relation between the supplier and the acceptor of the genetic materials, that the good system of identification and selection in the later generations promoted to gain higher efficiency of breeding on vegetable crops. The technical ideas, including the 1 technique basis in physics, the 2 developmental directions, the 3 effective changes, the 4 research hierarchies and the 5 biological characteristics worthy of notice, were particularly put forward and discussed.

Key words: Ion beam bio-technique; Genetic improvement of vegetable crops; Technical ideas