

离子注入技术在植物育种中的应用与研究进展

司婧^{1,2,3} 张红^{1,2,3} 武振华^{1,2,3}

¹ (中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

² (中国科学院重离子束辐射生物医学重点实验室 兰州 730000)

³ (甘肃省重离子束辐射医学应用基础重点实验室 兰州 730000)

摘要 离子束作为一种新的诱变源,具有突变谱广、突变率高、生理损伤小的特点,并且具有一定的重复性和方向性。文章阐述了离子注入的特点、诱变机理和诱变效应,综述了诱变育种取得的进展,展望了离子注入技术的应用前景。

关键词 离子注入,植物育种,诱变效应

中图分类号 Q691, S33

离子注入技术作用于植物的诱变效应,最早是在1986年,由中国科学院等离子体物理研究所余增亮研究员等人发现的,他们将离子注入到水稻等植物种子中,发现离子束作为一种有效的诱变源,具有突变谱广、突变率高、生理损伤小的特点,并且具有一定的重复性和方向性。作为一门新的交叉学科,离子束生物工程学受到国内外专家的广泛关注和重视。经过20多年的发展,以不同的植物为辐照材料,进行多种离子注入的生物效应和作用机理的研究已取得了很大进展,并获得了多个新品种,创造了较大的经济效益和社会效益。2008年,联合国粮农组织和国际原子能机构(FAO/IAEA)在维也纳召开第二届植物诱变育种国际会议,离子注入诱变作为唯一的诱变新技术列入会议六大主题之一。本工作概述了离子注入的特点、诱变机理、诱变效应和诱变育种的现状,以期对今后离子注入植物诱变育种的研究提供理论依据。

1 离子束的特点

离子束是元素的离子经高能加速器加速后获得的放射线,其在穿越介质过程中具有较高的传能线密度(LET),能够在物质中引起高密度的电离和激发,使DNA双链断裂增加,产生严重生物损伤。相同剂量辐照下,与X、 γ 射线相比,离子束具有更高的相对生物学效应(RBE),其作用于植物体后可获得比自然变异率高1000倍以上的突变率和较广的突变谱。离子束的能量损失过程随注入深度的增加呈尖锐的Bragg峰曲线分布,使生物体受到严重辐射损伤的部位只是局部的。因此,离子束作用于植物表现出较小的生理损伤,提高存活率,易于获

得更多突变体。另外,离子在固体内的直进性很好;对入射离子束进行高精度的控制,可以获得平行束或被聚焦成微细束;离子束的能量可以通过调节电场和磁场的强弱控制,进而调节入射深度,可以用来进行定点定位诱变研究,探索定向育种新技术。

能量不同的离子束对生物体系作用的过程和方式也不相同,在能量较高或受体线度较小的情况下,表现为离子束贯穿,主要是能量转移,即能量传递的一重效应;若同时存在有电荷交换,即为能量与电荷的二重效应;在能量较低或受体线度较大时,表现为离子束注入,这时便会产生能量动量转移、电荷交换及质量沉积三重效应。刘志芳等^[1]研究发现离子注入比离子贯穿对生物体造成更大的损伤,具有更高的突变频率。在相同注入剂量的情况下,能量越高的离子束造成的损伤越大。注入离子的参数多样,不同的种类、质量、能量、电荷可有多种组合,产生多种多样的诱变效应,为植物的遗传改良开辟了一条新的有效途径。

2 离子注入植物的诱变机理

生物体不像普通固体物质那样稳定,而是一个呈连续变化状态的实体。因此,离子注入后与生物体之间发生一个复杂的作用过程。可分为能量沉积、质量沉积、动量传递和电荷交换等四个方面^[2,3]。

2.1 能量沉积和动量传递效应

在离子束与靶生物体相互作用中,入射离子在单次碰撞时直接把动量传给表面粒子,会引起生物

国家重点基础研究发展计划(973)项目(2010CB834202)、甘肃省青年科技基金计划项目(Y160120SJ0)资助

第一作者:司婧,女,1981年12月出生,2010年毕业于兰州大学,植物学专业,现为中国科学院近代物理研究所助理研究员,从事辐射生物学研究,博士

通信作者:张红, Email: zhangh@impcas.ac.cn

收稿日期:初稿 2012-04-25, 修回 2012-05-22

体表面较高能量二次离子(原子、分子、碎片离子)的发射,称为溅射。同时,一部分离子能量随着动量方向指向并到达表面,也会引起溅射的发生。另一方面,入射离子的能量转移给靶原子电子,引起靶原子电离,瞬时增大的电荷积累在库仑斥力作用下,引起“库仑爆炸”,将生物分子或碎片抛射出来,称为电子溅射。离子的溅射作用和电子的溅射作用使细胞间原来不连通的通道在一定距离内连通,后来的离子就可以穿行较长的距离落在预定的位置上,从而对细胞造成严重的刻蚀。Sangyuenyongpipat等^[4]用 Cl、Xe、Mg、Fe 等不同离子轰击洋葱表皮后通过扫描电子显微镜和原子力显微镜观察发现,细胞表面微形态结构发生变化,出现直径 0.1—1 μm , 平均深度 60 nm 的小弹坑样结构。Vilaitong 等^[5]在 Ar 离子轰击植物组织的实验中也观察到这种现象,这些实验结果证实了离子注入存在刻蚀作用。Ar 离子(30 keV, $1 \times 10^{15}/\text{cm}^2$) 在 TRIM 和 PROFILE 的模拟实验中,仅能穿透 130—140 nm 的模拟细胞壁,在轰击植物组织的实验中却可以介导台盼蓝等大分子物质进入细胞,推测细胞壁表面存在很强的溅射作用,使得损伤效应得以穿过细胞壁(400 nm)达到细胞膜,为外源大分子物质开辟了进入的路径。

2.2 质量沉积效应

质量沉积效应是离子注入所产生的特有效应,注入离子在与靶分子相互作用的过程中,先是发生非弹性碰撞(电子阻止过程),使生物分子电离或激发,导致电离损伤。随着在生物体内的深入,入射离子能量逐渐降低,主要引起弹性碰撞(核阻止过程),通过一系列级联反应使原子移位,留下空位和断键。最终当入射离子能量损失殆尽时,将以高斯分布的形式沉积下来。注入离子的性质不同,与生物分子的作用机理也不相同。如果注入离子是活性离子(如 N^+ 、 C^+ 、 O^+ 、 H^+ 、 P^+ 等),则它们在沉积过程中与靶分子或自由基直接发生反应,参与其分子结构而沉积下来,发生分子重排,形成新的分子基团;如果注入的是惰性离子(如 Ar^+ 、 Ne^+ 等),它们参杂在生物靶分子内或引起分子内部原子的移位和重组;但如果注入的是金属离子(如 Fe^+ 等),则可能与靶分子或自由基结合成络合物的形式沉积,或以无机盐的形式沉积^[6]。在 25 keV 氮离子束辐照后的尿嘧啶样本中检测到了氨基,在氮离子注入 α -萘乙酸的实验中检测到了甘氨酸和偶氮化合物,这些实验都验证了离子注入时存在质量沉积效应。不同的入射材料、不同能量、不同剂量、不同种类的注入离子沉积的深度不同。荧光分析显示,200 keV V^+ 注入花生种子后,主要沉积在 15—135 μm ^[3]。王林香等^[7]测定了 20 keV Ti^+ 和 110 keV

Fe^+ 分别注入彩棉种子和花生种子的深度浓度分布,并使用蒙特卡洛方法改进了离子注入深度浓度分布的计算方法,提出了 Ti^+ 、 Fe^{2+} 离子注入种子材料的一维和二维计算模型,为实验预测提供了理论计算方法。

2.3 电荷交换效应

目前研究的细胞和绝大部分生物分子都是负电性的。入射离子在与靶原子的每一次碰撞中都有可能失去电子或从靶物质中俘获电子,使生物体电性发生改变。如果注入的是负离子,则使负电性增加;如果注入的是正离子,则使负电性减低,甚至使生物电性的极性改变。细胞表面电性的变化改变了细胞跨膜物理场,深刻影响着细胞内外能量转换、物质运送、信息传递、代谢调控等各种生物学过程。邵春林等发现注入的 N^+ 与靶分子之间会发生电荷交换作用,离子注入后生物分子晶体和细胞表面电性发生变化。正离子注入水稻种子,可以使水稻细胞的负电性减少到对比组的 40%^[8]。在低能离子注入拟南芥种子的实验中发现,注入 O^+ 和 H^+ 对细胞过氧化物酶的影响比注入 O^- 时大得多,推测注入离子所带电荷在辐射对生物体的损伤效应中起重要作用,比离子质量的影响更大^[9]。

离子注入生物体诱变技术的基本原理就是荷能离子束本身所具有的能量、质量和电荷对生物体产生的作用效应,包括能量沉积、动量传递、刻蚀作用、质量沉积、电荷沉积等作用,此过程大约在 10^{-19} — 10^{-16} s 内发生,很难区分各自独立的作用^[6]。相对于金属、半导体等固体材料来说生物体是一个复杂的系统,它由固体、液体,甚至气体组成,而且随着生长发育的过程组成也发生改变,很难研究注入离子与其之间的相互作用过程。另一方面,生物体的复杂性也使得很难构建其精确的物理模型。尽管如此,近年来在分子、细胞、组织等层面对于损伤机制的研究仍取得了显著进展。

3 离子束与植物相互作用过程

离子注入生物体后产生诱变效应分为物理阶段、化学阶段和生物学阶段三个阶段。

3.1 物理阶段

初期阶段是物理阶段,载能离子与靶原子发生碰撞,引起能量转移、原子激发、电荷交换,导致分子的构型发生改变。同时入射离子会引起生物体表面原子或原子团的发射,留下腐蚀的痕迹,产生刻蚀效应。蚀刻现象是离子束所特有的,是由物理因素引起物体表面发生腐蚀的一种物化过程。根据这一现象,余增亮等提出了离子束介导转基因的构

想。研究发现,随着注入离子能量、剂量的增加,刻蚀程度加深,形成有利于外源基因进入的“瞬时”微通道。与其他植物转基因的方法相比,由于注入的荷能离子带有正电荷,可以使受体细胞表面局部的正电荷明显增强,通过静电引力,可以将带有负电荷的外源遗传物质主动地摄入受体细胞。而且离子束具有射程在一定范围内可以控制的优势。同时,离子注入会使受体细胞的染色体结构发生可修复性损伤,有利于外源遗传物质整合到受体的基因组中。作为一种新型的转基因手段,离子束介导转基因的实际操作更为简单,取材更为容易,可以绕过复杂的组培过程由成熟种子直接发育为植株,获得带有目的性状的遗传转化后代。利用离子束介导已成功地将 GUS (葡萄糖苷酸酶基因)、CAT (氯霉素乙酰转移酶基因)、编码潮霉素磷酸转移酶的基因 *hph*、几丁质酶基因 *RCH8* 和抗菌肽基因 *shiva* 转入到水稻中,通过对遗传转化后代进行 PCR 扩增、Southern blot 等分子水平的检测证实这些基因已经被整合在受体基因组中并能在后代中稳定遗传^[10]。此外,以小麦、烟草、大豆、拟南芥、西瓜、甜瓜等植物为材料的遗传转化也均获得成功。离子束介导的转基因技术为植物遗传育种提供了简单有效的途径。

3.2 化学阶段

第二个阶段是化学阶段,慢化的原初入射离子以高斯分布形式沉积下来,活化分子的级联碰撞形成的移位原子,和本底离子三者发生化学反应,进行重排和化合,产生新的分子,表现为分子水平的诱变效应。对质粒 DNA 的研究发现,离子注入可以引起 DNA 双链或单链的断裂^[6]。离子注入小麦种胚和烟草种子后,在第一个正常的 DNA 复制高峰到来之前,观察到了 DNA 期外合成,即 DNA 损伤的修复合成,且 DNA 的期外合成效应与注入离子剂量呈正相关^[11]。期外合成峰的出现说明离子注入能够诱发 DNA 的修复合成,是细胞损伤修复能力的重要体现。离子注入引起拟南芥、谷子、大丽花、大葱、莲花和牵牛花^[12-14]等植物材料的基因组 DNA 发生了丰富的变异,表现为扩增条带的消失或新增,以及同一谱带荧光强度的变化,并且条带变异率随离子注入剂量的增加有上升趋势。离子束辐照 M13mp18 DNA (RF1) 质粒的研究发现, *lacZ* 碱基变异的类型主要有转换 (50%)、颠换 (45%) 和缺失 (5%),转换主要以 A→G 和 C→T 为主,颠换则主要以 C→A 和 C→G 为主。此外,构成 DNA 的每一种碱基都可以被替换,但胞嘧啶最容易发生变异,占到了整个突变碱基的 60%。另外,碱基变异的“热点”似乎在 TG 和 CT 碱基之间^[15]。常凤启等^[16]用 RAPD 标记了低能 N^+ 离子束注入拟南芥后

获得的稳定突变体 T80 II,条带变异率为 13.1%,平均每 16.8 个碱基出现 1 个碱基变异位点,相对于质粒 *LacZ* 基因平均 40—50 个碱基出现一次变异,表现出较高的碱基突变频率。主要的碱基突变类型是碱基转换 (66.55%) 和颠换 (30.55%),碱基缺失或者插入的比例较小 (2.91%)。在组成 DNA 的 4 个碱基中胸腺嘧啶 (T) 的辐射敏感性最高。有研究认为细胞在尝试修复辐射引起的复制能力损伤的过程中,引发了串联重复序列基因组的不稳定性,表现出显著的生物学效应和突变发生^[17]。关于突变发生和 DNA 修复的分子机制研究证明受损伤 DNA 的错误修复和错误复制引起 DNA 序列改变,导致突变的发生。离子注入能够同时诱导 DNA 的损伤与修复是植物诱变育种的分子遗传学依据。无论在植物还是质粒中,离子注入都表现为高丰度的 DNA 突变,且这些突变不是完全随机的,而是具有一定的“偏好”特点,深入研究诱变发生规律,有助于目的性地突变基因,选育品种。

此外,注入生物体的荷能离子诱导靶分子发生激发或电离,经过反应产物的不断作用,发生一系列的连锁反应,产生大量的自由基。高活性自由基很容易与靶分子发生加成反应、抽氢反应和电子转移反应,加重靶分子特别是遗传物质的损伤,加大损伤修复难度,使生物体出现损伤。龚加顺等^[18]将低能 N^+ 离子注入黑曲霉 9701 中发现,注入后的孢子都产生了较强的自由基波谱单一峰,而且各个样品的峰处于同一位置,这说明生物样品受不同剂量的 N^+ 辐射后产生了大量相同的自由基。随注入离子剂量的增加,自由基产额增加,但在一定剂量下又有所减少,最后再增加,与存活率“马鞍型”的表现趋势相同。离子注入生物体,产生长效自由基的同时,也会产生大量瞬间作用的短寿命自由基 (如氧化能力极强的 $\cdot OH$ 自由基半衰期只有 10^{-10} — $10^{-9}s$,平均扩散距离只有 1.5—3.0 nm),一般只与其周围的生物大分子发生作用而使其损伤,并导致细胞的膜脂过氧化。

3.3 生物学阶段

最后一个阶段是生物学阶段。物理阶段和化学阶段不能得到修复的分子损伤,经过生物放大过程,表现出遗传性变异,细胞死亡或突变,能量代谢紊乱,生长发育受到刺激或抑制等,引起生物体性状改变。表现为细胞水平和个体水平的诱变效应。离子注入细胞水平的诱变效应研究主要集中在染色体水平上^[19]。离子注入不仅能够诱发染色体初级结构的变异,其 3 级和 4 级连续易位等高级结构也发生变异。染色体畸变类型有微核、小核、染色体桥、游离染色体、落后染色体等。随辐照剂量的增加,

微核率、多微核率、染色体总畸变率都呈线性上升。植物存活率与染色体畸变率密切相关,随着染色体畸变率上升而下降。不同的离子注入诱发不同的染色体畸变类型。例如 H^+ 注入棉花和麦类,主要诱发染色体桥; N^+ 注入则更易于诱发落后染色体。注入离子相同,注入剂量不同也诱发不同的染色体畸变类型。低剂量的 N^+ 注入引起减数分裂后期 I 整个基因组落后,高剂量注入时引起减数分裂后期 II 落后染色体中出现双桥和着丝点提前分离等稀有结构。研究发现离子注入促使微管骨架纤维的断裂,形成异形纺锤体,阻抑中后期细胞的分裂活动,使中后期分裂细胞数量增多,体积增大。同时,离子注入引起纺锤体极向不同步移动排布和不对称形态的变化,使得染色体不能正确的分配,这可能是引起落后染色体和微核化效应的原因,最终导致了遗传变异的诱变效应。Kikuchi 等^[20]用重离子辐照小麦引起高频率的染色体畸变,进一步的研究表明染色体重排在突变株的产生中可能起重要作用。

从生物个体水平来看,离子注入后植物发芽率、成苗率、株高、根长、各种抗氧化酶活性都会受到影响。重离子辐照处理拟南芥种子后 M_1 植株表现为株高降低、叶片长度变短和叶片宽度变窄^[21]。离子注入的番茄种子正常萌发后,其幼根停止生长,幼苗和幼根逐渐腐烂导致死亡^[22]。离子注入对植物生命活动的影响与离子注入剂量有关。一般来说,低剂量注入导致刺激作用,高剂量注入则表现为抑制作用。在烟草、胡麻、大葱、甜高粱等植物中也发现了这种效应趋势。研究认为低剂量离子注入引起促进作用的机理是,注入细胞内的电荷影响基因调控,诱导产生新的修复机制,提高存活率;电荷积累形成一个弱电场,激活生物体内各种酶(特别是修复酶)从而提高修复效率;质量沉积产生新的物质与自由基结合,减轻自由基对生物体的伤害。离子注入植物后引起复杂的生物效应,不同的注入离子类型和作用植物品种都有可能引起不同的生物学诱变效应模式,有些突变在后代得以遗传固定,成为生产上得以应用的新品种或选育新品种的优良种质材料,深入研究离子注入的应用和作用机理,有助于服务于人们生产和科学探索的需求。

3.4 损伤效应的远程传导

研究表明,注入离子原初的能量沉积、质量沉积和电荷交换引起作物干种子的物理损伤、化学变化和生物学损伤效应,且损伤效应是可以远程传导的,也称作旁观者效应。Yang 等^[23]发现将在水中贯穿深度仅为 $0.07\mu m$ 的 $30 keV$ ^{40}Ar 离子注入拟南芥种子,虽然不能直接作用于距种皮约 $100\mu m$ 的芽/根的顶端分生组织,但种子的发芽率、根毛的分化

和根的伸长率均受到抑制,说明损伤信号从直接被辐射的细胞传导到芽/根的顶端分生组织,离子注入拟南芥种子的损伤效应存在远程传导的旁观者效应。在用质子辐照拟南芥胚胎芽的顶端分生组织的实验中,发现根毛的分化和根的伸长率受到抑制,证实了在拟南芥胚胎中离子注入引起的损伤也存在旁观者效应^[24]。Li 等^[25]以拟南芥植株为研究对象,通过同源重组和 *AtRAD54* 基因表达量分析的方法,证明用 α 射线照射拟南芥根尖能引起非照射组织的旁观者诱变效应。辐射诱导产生的旁观者效应,对其远程信号传导的时间进程分析表明,旁观者效应是由辐照后不同阶段产生的多种信号综合作用的结果^[26]。

4 离子注入技术在植物育种中的应用

1986 年余增亮等研究出生物物理与农业遗传育种相结合的育种技术后,离子注入诱变育种技术的研究和应用在“八五”、“九五”、“十五”期间均被列为国家重点科技攻关项目,全国 25 个省、市 60 多个课题组开展了相关研究,兴建了一批如郑州大学、浙江工业大学、南京工业大学、西安工业大学、德州学院、新疆大学和内蒙古大学等省、区离子束生物工程基地,取得了重大的社会效益。

4.1 在谷物中的应用

将离子注入技术应用于水稻诱变育种中,先后成功选育抗稻瘟病强,米质较优的早熟品种皖稻 45 (早粳 S9042)、优质米品种皖稻 20 (晚粳 D9055) 和皖稻 71 (早粳 14)、高产稳产品种皖稻 96 号 (晚粳 M002)、皖稻 42 (中粳 63) 和皖稻 44 (晚粳 M3122)、早熟高产品种皖稻 58 (晚粳 48) 和皖稻 60 (晚粳 M1148) 等新品种,在安徽、湖北、江苏、江西等省推广种植面积已达 2500 多万亩,是生产上的主要栽培品种,经济效益显著。除了早期的鄂麦 6 号和山农辐 63,离子束在小麦中还成功育成高产优质抗病品种皖麦 32、皖麦 42、皖麦 43 和皖麦 54,经区域试验和生产试验,平均亩产较对照增产在 9% 左右,综合品质和抗病性都明显优于对照,目前已在淮南和沿江等地区推广应用,增产效果明显。利用兰州重离子研究装置提供的重离子束在小麦中选育出了抗旱优质的春小麦 95-119,矮秆、抗逆、高产、优质的春小麦 M-920 和丰产、高蛋白含量、抗黑穗病的陇辐 2 号,已在甘肃省中西部地区试种近万亩。

4.2 在经济作物中的应用

采用重离子辐照育种技术,得到的当归新品系 DGA2000-02 较对照增产 15%,总灰分 4.2%,酸不

溶性灰分 0.4%，分别优于对照 16%和 33.3%，浸出物和阿魏酸也都高于规定指标^[27]。在棉花中选育出高产、优质、抗病虫和早熟的新品种。在烟草中也选育出性状稳定、优质抗病的优良新品系。利用离子束处理获得的优良育种材料配制杂交组合，培育出丰产、抗病、商品性状优良、耐贮运的金粉早冠和粉达番茄杂交新品种，在河南、山东、安徽等地累计推广面积达 20 万亩。另外，大豆、五叶茄、板栗、葡萄、西瓜、甜瓜、甜菜、玉米、茶树、甘薯和谷子等的离子束诱变育种也取得了进展。

4.3 在花卉中的应用

近年来，在花卉上进行的离子注入诱变育种也取得了重要的成果。离子注入后，得到植株形态改变、花型花色变异、更具观赏性的凤仙花、万寿菊、早小菊、百日草、籽莲新品种；得到抗旱和耐低温能力提高的新疆奥斯曼草和棕榈苗新品种。籽莲新品种“京广 1 号”千粒质量 1060 g，1 hm² 产 1350—1500 kg。此外在大秋葵、紫鸡冠、黄鸡冠、紫花、大丽花等花卉中也得到了诱变新品种。去年，西安工业大学用离子束诱变获得的鲁冰花在世界园博会上展出，受到国内外游客的欢迎。

4.4 在其他国家中的应用

日本、泰国和美国等国家也开展了许多离子辐照诱变育种的相关研究。泰国清迈大学从 1998 年起就开展了低能离子生物学效应的研究，2001 年他们利用离子束介导的转基因技术获得了很好的结果。2009 年，IAEA 资助清迈大学建设离子束生物技术中心，开展水稻和花卉离子束诱变研究。Okamura 等^[28]用碳离子辐照经切割的康乃馨离体叶片片段，通过再生培养得到多种花色、花形改变的突变株，其中红色、暗粉色和双色康乃馨等颜色突变品种在日本农林渔业部注册为新品种并用于商业化种植，获得很高的经济效益。不同剂量的氢离子和碳离子辐照玫瑰腋芽，得到花的大小、形状、颜色等改变的突变体^[29]。在稻子、荞麦、仙客来、大丽花、飞燕草、勿忘我、石竹、兰花、菊花、牵牛花和美女樱等植物中也进行了突变效应的研究。

4.5 在突变株筛选中的应用

离子注入技术对植物体的诱变效应被应用于作物育种的同时，突变体的筛选也具有很重要的研究意义。5—30 keV 氮离子注入阿魏菇菌丝体单细胞，通过营养缺陷筛选方法得到耐高温的突变体 CGMCC1762，有利于分析筛选新的高温耐受相关基因^[30]。低能离子辐照泰国茉莉稻米得到矮株、红

紫色叶鞘、黑褐色种皮和果皮、淡季生长的突变体，高退火温度的随机扩增多态性分析技术（HAT-RAPD）分析得到的 400 bp 和 450 bp 两条差异条带，分别与类黄酮 3'-羟化酶和细胞色素 P450 有很高的同源性。类黄酮 3'-羟化酶参与花青素的生物合成途径，而花青素的颜色区间在红紫色到蓝色，突变体中叶鞘、叶耳、种皮、果皮等组织的颜色改变可能是由该基因调控的结果；细胞色素 P450 在激素调控、抗毒素合成、花瓣着色等生物过程中起重要的作用，可能导致表型突变的产生^[31]。经离子注入诱变获得的拟南芥雄性不育突变株 tc243，具有叶子、株高、顶端优势、花序、花形、花粉活力等形态学缺陷。通过基因图谱和激素耐受的补充实验发现 tc243 是生长素抑制基因 AXR1 的等位基因突变体。AXR1 通过调节下游的 TIR1/COI1 基因使生长素和茉莉酸蛋白酶体途径直接连接在一起。茉莉酸是花粉成熟和花药开裂必不可少的因素，突变株的雄性不育特性似乎说明茉莉酸比生长素在其发育损伤中起更大的作用，但是突变株其他表型的畸形与茉莉酸信号无关。说明高等植物中存在不同的调控机制通过茉莉酮酸信号途径调节根的生长和产量^[32]。越来越多的研究者通过标记、定位和克隆突变体中控制特异性状的基因，深入探讨分析突变体特异性状产生的调控机制，为分子生物学方面开辟一个新的领域。

5 结论

综上所述，离子束生物工程技术在植物育种中已经取得了显著性进展，利用离子注入进行植物物种改良已在生产实践中得到广泛的应用，并取得了显著的经济效益和社会效益。随着加速器产生的离子束精确定位照射技术的不断完善，使离子束能够精确定位作用于叶绿体、线粒体等细胞器，有助于更强针对性和目的性的定向诱变育种，离子束生物工程在植物育种中的应用范围会越来越广阔。但作为一种新兴的技术手段，从应用至今仅短短二十多年的时间，还有许多领域不完善和有待开发。由于荷能离子从注入植物体到表现出生物效应，经历了物理、物理-化学、化学、生物四个阶段，是一个复杂的作用过程，离子注入的诱变机理还有待进一步深入研究，从而为离子注入的广泛应用提供理论依据。此外，目前离子注入植物体后相关效应的研究多集中在细胞学和生物学层面，对其相关基因的研究还很少，深入研究突变体中控制特异性状的基因，不仅为植物的遗传育种提供更为丰富的基因资源，还为分子生物学的研究开辟一个新的领域。

参考文献

- 1 刘志芳, 邵俊明, 唐掌雄, 等. 不同能量重离子注入农作物的诱变效应[J]. 核农学报, 2006, **20**(1): 1-5
LIU Zhifang, SHAO Junming, TANG Zhangxiong, *et al.* Effects of heavy ion implantation on crop mutagenesis [J]. J Nuclear Agricultural Sciences, 2006, **20**(1): 1-5
- 2 Yu Z L. Introduction to ion beam biotechnology, translated by Yu Liangdeng, Thiraphat Vilaithong and Ian Brown. New York. Springer, ISBN-10:0-387-25531-1. 2006: 55-86
- 3 Feng H Y, Yu Z L, Chu P K. Ion implantation of organisms [J]. Materials Science and Engineering R, 2006, **54**(3-4): 49-120
- 4 Sangyuenongpipat S, Yu L D, Vilaithong T, *et al.* Ion bombardment induced formation of micro-craters in plant cell envelopes [J]. Nucl Instr and Meth in Phys Res B, 2006, **242**(1-2): 8-11
- 5 Vilaithong T, Yu L D, Alisi C, *et al.* A study of low-energy ion beam effects on outer plant cell structure for exogenous macromolecule transferring [J]. Surface and Coatings Technology, 2000, **128-129**: 133-138
- 6 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[J]. 广东农业科学, 2008(6): 20-22
ZHANG Xiaoyong, CHEN Xiuxia. Advances on mutation mechanism and biological effect of mutagenic breeding by low energy ions [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2008(6): 20-22
- 7 王林香, 祝恒江, 郭常新, 等. 低能离子注入种子的深度浓度分布的模拟[J]. 核农学报, 2011, **25**(5): 886-891
WANG Linxiang, ZHU Hengjiang, GUO Changxin, *et al.* Simulation of the depth-concentration distribution for low energy ions implanted into seed [J]. J Nuclear Agricultural Sciences, 2011, **25**(5): 886-891
- 8 邵春林, 许安, 余增亮. 离子注入生物分子的电荷交换效应[J]. 核技术, 1997, **20**(2): 70-73
SHAO Chunlin, XU An, YU Zengliang. Charge exchange effect of ion implantation to biomolecules [J]. Nuclear Techniques, 1997, **20**(2): 70-73
- 9 Li K, Jiang S, Yu H C, *et al.* Analysis of charge and mass effects on peroxidase expressions and activities in *Arabidopsis thaliana* after low-energy ion irradiation [J]. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2009, **680**(1-2): 64-69
- 10 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, **B80/81**: 1328-1331
- 11 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): 105-108
WANG Chongying, WANG Rujuan, YANG Hanmin. Un-scheduled DNA synthesis induced by low energy N^+ heavy ion of seed embryos in *triticum aestivum* [J]. J Radiat Res Radiat Process, 1994, **12**(2): 105-108
- 12 董喜存, 李文建, 余丽霞, 等. 用随机扩增多态性 DNA 技术对重离子辐照大丽花花色突变体的初步研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2007, **25**(1): 62-64
DONG Xicun, LI Wenjian, YU Lixia, *et al.* Preliminary study on flower color mutant induced by 80MeV/u $^{12}C^{+6}$ ions in *dahlia pinnata* Cav using RAPD technique [J]. J Radiat Res Radiat Process, 2007, **25**(1): 62-64
- 13 贾彦彦, 邓传良, 高俊, 等. Fe^+ 离子注入诱变莲花突变体的 SRAP 分析[J]. 核农学报, 2011, **25**(5): 904-909
JIA Yanyan, DENG Chuanliang, GAO Jun, *et al.* SRAP analysis of M_3 lotus mutants induced by Fe^+ ion implantation [J]. J Nuclear Agricultural Sciences, 2011, **25**(5): 904-909
- 14 Krasaechai A, Yu L D, Sirisawad T, *et al.* Low-energy ion beam modification of horticultural plants for induction of mutation [J]. Surface and Coatings Technology, 2009, **203**(17-18): 2525-2530
- 15 Yang J B, Wu L Q, Li L, *et al.* Sequence analysis of lacZ mutations induced by ion beam irradiation in double-stranded M13mp18DNA [J]. Science in China (Series C), 1997, **40**(1): 107-112
- 16 常凤启, 刘选明, 李银心, 等. 低能 N^+ 辐照拟南芥诱导基因组 DNA 碱基变异分析[J]. 中国科学(C 辑), 2003, **33**(2): 117-123
CHANG Fengqi, LIU Xuanming, LI Yinxin, *et al.* Mutation of genome DNA induced by low energy N^+ implantation in *Arabidopsis thaliana* [J]. Science in China (Series C), 2003, **33**(2): 117-123
- 17 Niwa O. Indirect mechanisms of genomic instability and the biological significance of mutations at tandem repeat loci[J]. Mutat Res, 2006, **598**(1-2): 61-72
- 18 龚加顺, 刘勤晋, 肖琳, 等. 单宁酸酶产生菌氮离子注入的诱变效应研究[J]. 食品与发酵工业, 2000, **26**(5): 9-13
GONG Jiashun, LIU Qinjin, XIAO Lin, *et al.* Study on mutagenic effects of Tannase producing strain with nitrogen ions implantation [J]. Food and Fermentation Industries, 2000, **26**(5): 9-13

- 19 Kawata T, Ito H, George K, *et al.* Chromosome aberrations induced by high-LET radiations [J]. *Biol Sci*, 2004, **18**(4): 216-223
- 20 Kikuchi S, Saito Y, Ryuto H, *et al.* Effects of heavy-ion beams on chromosomes of common wheat [J]. *Triticum Aestivum Mutat Res*, 2009, **669**(1-2), 63-66
- 21 吴大利, 侯岁稳, 李文建. 离子束辐照拟南芥生物学效应及其分子机理研究进展[J]. 原子核物理评论, 2008, **25**(3): 287-293
WU Dali, HOU Suiwen, LI Wenjian. Recent advances in biological effect and molecular mechanism of *Arabidopsis thaliana* irradiated by ion beams [J]. *Nuclear Physics Review*, 2008, **25**(3): 287-293
- 22 司婧, 张红. $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照番茄种子当代效应[J]. 原子核物理评论, 2011, **28**(3): 348-351
SI Jing, ZHANG Hong. Effects of irradiation with $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beam on M1 characters of *Lycopersicon esculentum* Mill [J]. *Nuclear Physics Review*, 2011, **28**(3): 348-351
- 23 Yang G, May T, Yuan H, *et al.* Bystander/Abscopal effects induced in intact *arabidopsis* seeds by Low-energy heavy-ion radiation [J]. *Radiation Research*, 2008, **170**(3): 372-380
- 24 Yang G, Wu L J, Chen L Y, *et al.* Targeted Irradiation of Shoot Apical Meristem of *arabidopsis* embryos induces Long-distance Bystander/Abscopal effects [J]. *Radiation Research*, 2007, **167**(3): 298-305
- 25 Li F H, Liu P, Wang T, *et al.* The induction of bystander mutagenic effects in vivo by alpha-particle irradiation in whole *Arabidopsis thaliana* plant [J]. *Radiation Research*, 2010, **174**(2): 228-237
- 26 Wang T, Li F, Xu S, *et al.* The time course of Long-distance signaling in radiation-induced bystander effect in vivo in *arabidopsis thaliana* demonstrated using root micro-grafting [J]. *Radiation Research*, 2011, **176**(2): 234-243
- 27 颀红梅, 刘效瑞, 李文建, 等. 甘肃当归新品系 DGA2000-02 的选育研究[J]. 原子核物理评论, 2008, **25**(2): 196-199
JIE Hongmei, LIU Xiaorui, LI Wenjian, *et al.* Research of angelica sinensis (Oliv) diels new strain DGA2000-02 selection [J]. *Nuclear Physics Review*, 2008, **25**(2): 196-199
- 28 Okamura M, Yasuno N, Ohtsuka M, *et al.* Wide variety of flower-color and-shape mutants regenerated from leaf cultures irradiated with ion beams [J]. *Nucl Instr and Meth in Phys Res B*, 2003, **206**: 574-578
- 29 Yamaguchi H, Nagatomi S, Morishita T, *et al.* Mutation induced with ion beam irradiation in rose [J]. *Nucl Instr and Meth in Phys Res B*, 2003, **206**: 561-564
- 30 Chen H L, Wan H G, Zhang J, *et al.* Mutation induction of *Pleurotus ferulae* by low-energy N^+ ion implantation and characters of the selected mutant [J]. *Nuclear Science and Techniques (in China)*, 2008, **19**(1): 13-16
- 31 Phanchaisri B, Chandet R, Yu L D, *et al.* Low-energy ion beam-induced mutation in Thai jasmine rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) [J]. *Surface and Coatings Technology*, 2007, **201**(19-20): 8024-8028
- 32 Bian P, Xu M, Yu Z L. The isolation and characterization of an *Arabidopsis* mutant mutagenized by low-energy ion beam [J]. *Surface and Coatings Technology*, 2007, **201**(19-20): 8014-8019

Applications and research progress of plant breeding with ion implantation technique

SI Jing^{1,2,3} ZHANG Hong^{1,2,3} WU Zhenhua^{1,2,3}

¹(Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Science, Lanzhou 730000, China)

²(Key Laboratory of Heavy Ion Radiation Biology and Medicine of Chinese Academy of Science, Lanzhou 730000, China)

³(Key Laboratory of Heavy Ion Radiation Medicine of Gansu Province, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT As a new mutagen applied in mutagenic breeding, the ion beam showed many good effects including high mutagenic ratio, extensively mutagenic spectrum and low physiological damage. It also has a certain degree of directivity and reproducibility. The paper overviewed the characteristics, mutagenic mechanism, mutagenic effects of ion beam, as well as summarized the progress of ion implantation in plant breeding, and put forward the application prospect of this technology.

KEYWORDS Ion implantation, Plant breeding, Mutagenic effect

CLC Q691, S33