

离子束辐照结合组织培养在植物诱变中的研究进展

周利斌 李文建 曲颖 李萍

(中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

摘要 简述了植物组织培养方法与离子束辐射相结合这一新诱变技术的研究进展,从原理、操作步骤、分子机理等诸方面对该方法进行了阐释。该诱变技术具备传统辐射诱变技术所不具备的优势,从而能够为利用无性繁殖技术进行后代繁衍的植物提供新的育种思路。与此同时,使用该方法还能够开展植物组织细胞的传能线密度(Linear energy transfer, LET)生物学效应的研究,从理论上及实践上进一步优化该技术。

关键词 离子束,植物组织培养,辐射,诱变,传能线密度

中图分类号 Q691.5, Q691.8, Q506

近些年来,我国采用离子束辐照结合常规诱变育种技术已经获取了不少植物新品种,但是采用离子束辐射结合组织培养来创制植物新种质的探索2004年才开始起步。该新思路具备常规辐射育种手段所不具备的一些优势,下面将其原理及其进展情况予以介绍。

1 常规辐射结合组织培养方法进行植物诱变

植物组织培养技术(Plant tissue culture technique)是利用植物细胞全能性(Totipotency)得以发展的,植物细胞全能性即单个植物细胞包含生长发育所需全部遗传物质,在一定条件下具有分化成各种特定成熟细胞组织最终发育成整个完整植株的特性。植物组织培养进一步可以细分为:不定芽再生途径法,离体胚途径法以及顶芽或腋芽分化途径法^[1]。

辐射处理可以诱发植物遗传物质改变,组织培养过程中也能够产生一些变异,将两者结合起来进行双重变异,可以在有限的时空内进行大群体筛选,从而提高辐射诱变育种的效率,该技术已经成为植物诱变育种的一种新方法。使用传统的低传能线密度(Linear energy transfer, LET)电离辐射,如X射线和 γ 射线辐射等,结合植物组织培养技术已经在园艺植物及水果诱变育种上大显身手,培育出了许多植物新品种,比如培养出了花型、花色发生变化的菊花、荷花及玫瑰^[2-4]。国内也利用该方法进行

花卉诱变育种探索,得到了形态发生变化的菊花、杜鹃以及非洲紫罗兰^[5-7]。

植物经辐照处理后通常可发生两种效应,即原初损伤和遗传变异。前者是诱发的非遗传效应,包括形态畸变、生理及解剖方面的效应,他们不能通过组织培养传递到下一营养世代。后者是辐射引起的遗传变异,这类突变在植物有性繁殖中常因减数分裂时染色体不能配对而被消除掉,组织培养无需经过减数分裂,可以将突变性状直接保存下来,遗传到下一个营养世代。组织培养技术中的不定芽再生或离体胚再生方法中,再生植株往往是由单个或者几个细胞起源的,这样得到的突变再生植株往往是纯合的整体突变(同质突变),经过简单的几次连续世代组织培养即可得到稳定的纯合突变体^[2]。而在组织培养技术中的腋芽或顶芽分化法,其起始材料包含已分化的多细胞结构的组织,经辐照处理后,往往只是某一组织层中单个细胞发生突变,这样单个突变细胞和数量较多的正常细胞各自分裂、生长及分化,共同参与再生植株的形成,由此发育而来的再生植株就包含着由突变细胞组织和正常细胞组织构成的遗传上异质性的嵌合体(Chimera)。该嵌合体包含多种类型,如周缘嵌合体(Periclinal chimera),扇型嵌合体(Sectorial chimera)等。这种嵌合体的突变部分存在着发展成同质突变体或突变从嵌合体中消失的两种可能性,因此需要使用多次剪切,多次转接的方法来使突变得以稳定。因此,本文认为辐照处理易结合使用不定芽再生或者离体胚再生途径进行植物诱变育种操作,该操作能够在

中国科学院西部之光项目(0706100XB0)资助

第一作者:周利斌,男,1979年8月出生,2006年获粒子物理与原子核物理专业博士学位,目前主要从事生物物理及放射生物学相关工作

收稿日期:初稿 2007-04-24,修回 2007-06-04

相对较短的时间内获得遗传稳定的纯合突变体。

2 离子束辐照结合组织培养方法进行植物诱变

相对于X射线、 γ 射线,离子束具有高的LET及相对生物学效应(relative biological effectiveness, RBE),它能够在靶区沉积更多的能量,从而诱发更多的染色体畸变^[8,9]等生物学效应,因而具有高的诱变效率。据国外研究估算,碳离子束每单位剂量突变效率($1.9 \times 10^{-6} \text{ gene}^{-1} \text{ Gy}^{-1}$)是电子束($0.097 \times 10^{-6} \text{ gene}^{-1} \text{ Gy}^{-1}$)每单位剂量突变效率的20倍^[10]。其次,植物组织培养用的外植体材料含水量较干种子要高得多,辐射敏感性相应也要高得多。以紫花苜蓿为例, γ 射线辐照干种子的半致死剂量高达500-1350Gy^[10],X射线辐照组织培养用茎外植体的半致死剂量为80.5Gy,而离子束辐照组织培养用茎外植体的半致死剂量仅为18.7Gy^[9]。

因此,欧美国家从70年代起就已开始离子束辐照诱变植物研究,主要研究离子束对植物个体及细胞生命活动的影响^[11]。近年来,日本用离子束辐照联合组织培养方法培育出花色发生变化的玫瑰^[12],以及花型花色发生变化的康乃馨新品种^[13]。这方面工作国内比较滞后,2004年才开始开展^[14]。

中国科学院近代物理研究所在国内率先使用离子束辐照结合组织培养方法开展花卉诱变操作。其原理如下:取材花卉离体叶片等外植体,特定能量剂量的中能离子束辐照该样品,样品辐照后进入组织培养流程;首先进行愈伤组织诱导,此时一部分外植体死亡,存活的一部分外植体上的细胞发生突变,再进行愈伤组织芽诱导,然后生根培养;最终将组培苗移入泥土中并且观测其生长发育情况,从而得到花或叶形态颜色等发生突变的植株(图1)。经大田或者温室筛选后,获取性状满足要求的突变体。取材该突变体的离体叶片等外植体,再次进入组织培养无性繁殖体系,经过几个世代的组织培养流程,最终可以获得性状优良的植物新品种。

3 离子束辐射结合组织培养方法进行植物诱变的分子机理

与低LET辐射相比,离子束在其单位粒子径迹长度上释放更多的能量,进而诱发不同类型的染色体DNA断裂或损伤。具体包括:碱基和脱氧戊糖发生的一系列基团改变或丢失等;DNA单链断裂(Single-strand break, SSB)和双链断裂(Double-strand break, DSB);DNA链间交联

(DNA-DNA crosslink, DDC)和DNA-蛋白质的交联(DNA-protein crosslink, DPC)等(图2)。

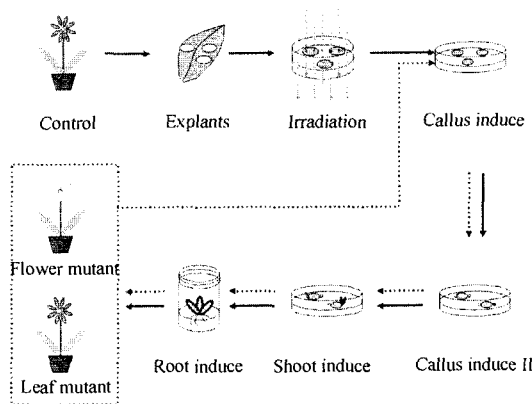


Fig.1 Schematic representation of horticultural plant mutation breeding using techniques combining plant tissue culture and heavy ion beams irradiation

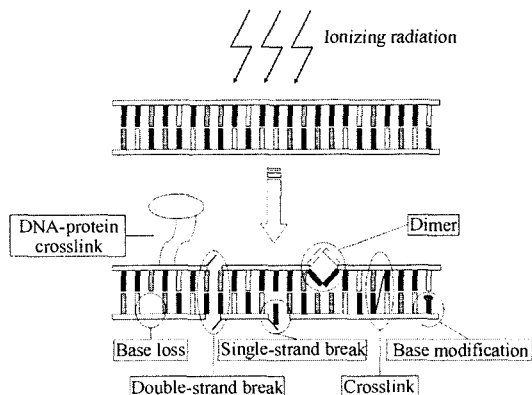


Fig.2 Radiation induced DNA damage. For clarity, the DNA double helix is drawn as a flat, ladder-like structure

各类DNA损伤中DSB是致死损伤^[15]已被广泛接受,因而我们可直观地认为辐射电离密度的增加将导致DSB产额的增加,但实验结果却并非如此^[16],这也就是说DSB诱导跟致死不存在简单的相互关系。目前基于凝胶电泳技术的DSB测量方法给出的是平均产额,单个细胞内DSB的空间分布还无法给出。例如,对于一个给定的DSB产额,其遗传物质突变的生物学效应很可能依赖于它们是在细胞核内一个很小的体积内成簇发生,还是在整个核内均匀分布发生。据文献[17],成簇的DSB将导致更为复杂的而且很难被修复的损伤,该研究表明,对于不同的电离辐射,DSB的初始产量相同,但是高LET辐射导致的剩余损伤通常比较高,这是因为对复杂损伤的修复能力降低了,这与原初损伤相比,剩余损伤描述致死或突变等事件更加合适。

关于DSB和染色体断裂的蒙特卡罗

(Monte-Carlo) 计算机模拟及现有的实验数据均表明, 发生在损伤末端的近距离链断裂和碱基损伤的数量随辐射 LET 值的增加而增加^[18]。而且现有的结果显示, 对不同 LET 辐射而言, DNA 断裂处的末端连接过程本身可能有很大的不同, DNA 链的错误修复 (mis-repair) 或者非同源末端重组 (non-homologous end-joining, NHEJ) 将诱发植物变异^[19]。遗传研究发现, 碳离子辐照诱发的拟南芥突变体主要为点状突变 (point-like mutant) 和重组 (rearrangement), 而电子束等低 LET 辐射则主要诱导点状突变^[20]。离子辐射诱导的高频率片段缺失将对植物反向遗传学非常有用。迄今为止, 日本科研工作者使用离子束已经获得了一些特殊拟南芥突变体 (*ast*, *frl*, *uvil*, *suvi*, *tt18* and *tt19*)^[21], 这些突变体的分子诱变机理正在进一步分析之中。

另外, 荧光原位杂交技术 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 显示高 LET 辐射将产生复杂的染色体结构重组, 而低 LET 辐射仅在高剂量条件下产生类似的改变^[22]。该研究表明, 由于丢失的 DNA 片段可能含有与配子发育或者成活相关的基因, 因而该类突变体无法通过有性繁殖将突变性状遗传给下一代。使用植物组织培养方法则可避免这类突变体的性状遗传丢失现象, 从而能够将离子束辐射诱变的效率进一步提高。

4 离子束辐射结合组织培养方法进行 LET 效应研究

20 世纪 80 年代甚至更早, 哺乳动物细胞的离子束辐射 LET 效应基础研究就已开始。哺乳动物体内细胞实验证明 RBE 与 LET 呈一定的相关性^[23], 实验材料常选取小鼠小肠的隐窝克隆源型细胞; 后来的离体细胞实验也发现 RBE 与 LET 具有函数相关性^[24]。这些研究探查了不同种类、不同能量和不同剂量的离子束辐照肿瘤及正常组织细胞的 LET 生物学效应, 发现在特定 LET 区间范围内的以细胞存活为生物学终止点的 RBE 最高, 但是还无法延伸至细胞生长分化范畴, 因为离体哺乳动物细胞发育成整个动物个体的技术还不够成熟。正是因为如此, 利用植物细胞全能性的组织培养技术提供了进行不同 LET 的电离辐射对植物细胞生长分化研究的条件。

到了 90 年代, 日本开始探索不同能量的离子束辐射对植物体的 LET 效应^[25,26], 他们取材模型植物拟南芥及烟草的干种子, 获得了以种子发芽率及染色体畸变为生物学终止点的 RBE 与 LET 的相关关

系, 如认为碳离子束辐射在 LET 为 250keV/ μm 时 RBE 最高, 高于或者低于该 LET 值的 RBE 均显著降低, RBE 最高意味着该 LET 辐射导致的植物半致死剂量最低或者突变率最高。这些研究最终得到若干突变体, 如抗紫外线的拟南芥以及花瓣和萼片锯齿化的拟南芥突变体^[27,28]。近年来, 日本加快了研究速度, 从细胞存活及染色体交换重组层面开始探索单个烟草细胞的 LET 效应^[29], 但是这些 LET 效应研究并未涉及植物细胞基因信号转导及细胞全能性层面的研究。

选取拟南芥干种子为材料进行 LET 研究的优点: 其一, 因为它们的厚度仅为数百微米甚至更低, 高 LET 射线的射程非常有限, 因此辐射材料的厚度对于 LET 效应研究非常关键; 其二, 拟南芥是一种模式植物, 基因组简单而且 DNA 测序工作已经完成, 因而具有良好的遗传研究背景, 是目前许多关于植物生长发育机理研究的对象。正因为如此, 拟南芥干种子离子束诱变机理的探索也已经展开^[30]。

国外研究^[2]发现, 不定芽最终起源于一个或几个细胞, 通常是表皮细胞。植物幼嫩叶片或茎等材料, 其厚度通常也是几百微米, 因此使用植物材料进行离子束诱变的 LET 效应研究是可行的, 具有原创意义 (图 3)。初步研究表明, 以组织鲜重及存活率为生物学终止点的非洲紫罗兰叶片外植体 RBE 值与离子束 LET 成相关性, 在特定区间内基于半抑制剂量 (50% inhibition dose, ID₅₀) 和半致死剂量 (50% lethal dose, LD₅₀) 的 RBE 达到最大值, 并且获得了叶绿素完全缺失的非洲紫罗兰突变体^[31]。

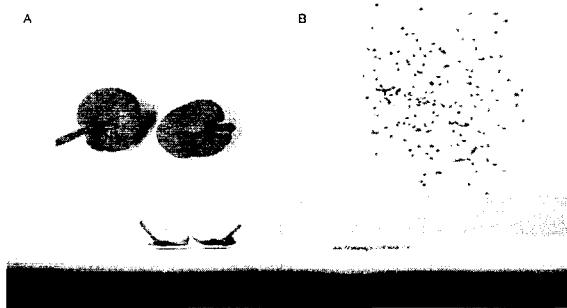


Fig.3 Comparison between the leaves of *Saintpaulia ionantha* and the dry seeds of *Arabidopsis thaliana* in thickness. A: leaves of *Saintpaulia ionantha*; B: dry seeds of *Arabidopsis thaliana*

5 结论与展望

一方面, 与常规辐照射线不同, 离子束具有高 LET 值, 诱变效率更高、诱变谱更广等特点; 另一方面, 与传统选取种子、成熟胚等为研究对象的育种操作不同, 采取含有众多具备细胞全能性的离体

细胞组织为辐照对象, 结合植物无性繁殖技术来获取植物新材料的操作方法, 具有时间短、遗传易稳定等特点。离子束辐照结合组织培养为辐照育种操作提供了一种新思路, 该思路能够在相对较短的时间内获得植物新突变材料。随着植物分子生物学及蛋白组生物学技术的迅猛发展, 能够采用 cDNA 芯片 (complement DNA microarray) 技术及双向电泳 (two-dimensional electrophoresis, 2-DE) 等技术来分析离子束辐照处理后植物组织细胞的基因转录、蛋白表达以及细胞全能性的变化, 进而尝试从机理上阐释离子束辐照结合组织培养这种新诱变思路的原理。另外, 基因组靶向定位诱导损伤技术(targeting induced local lesions in genomes, TILLING)作为反向遗传学的先进研究方法, 在大规模群体中检测点突变具有通量高、成本低、操作简单等优点, 使用该方法将对辐照结合组织培养诱发植物新突变材料的遗传物质突变机理研究提供有益的补充。

参考文献

- Chawla H S. Introduction to plant biotechnology. Beijing: Science Press, 2004. 39-56
- Ibrahim R, Mondelaers W, Debergh P C. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1998, **54**: 37-44
- Arunyanart S, Soontronyatara S. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2002, **70**: 119-122
- Misra P, Datta S K, Chakrabarty D. Biologia Plantarum, 2003, **47**: 153-156
- 林祖军, 孙纪霞, 崔广琴, 等. 山东农业科学, 2000, **7**(5): 10-11
LIN Zujun, SUN Jixia, CUI Guangqin, *et al.* Shandong Agricultural Science, 2000, **7**(5): 10-11
- 宋恒, 王长泉, 巩向忠. 核农学报, 2003, **17**(5): 347-349
SONG Heng, WANG Changquan, GONG Xiangzhong. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2003, **17**(5): 347-349
- 周利斌, 李文建, 马爽, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2006, **24**(1): 53-58
ZHOU Libin, LI Wenjian, MA Shuang, *et al.* Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2006, **24**(1): 53-58
- 康玉凡, 申庆宏, 乔玉梅. 内蒙古农牧学院学报, 1998, **19**(2): 68-74
KANG Yufan, SHEN Qinghong, QIAO Yumei. Journal of InnerMongolia Institute of Agriculture and Animal Husbandry, 1998, **19**(2): 68-74
- 周利斌. 中国科学院研究生院博士学位论文. 北京: 2006, 75-77
- ZHOU Libin. Doctoral dissertation of Graduate School. Chinese Academy of Sciences, 2006, 75-77
- Shikazono N, Suzuki C, Kitamura S, *et al.* Journal of Experimental Botany, 2005, **56**(412): 587-596
- Bork U, Gartenbach K, Koch C. Advanced Space Research, 1986, **6**: 149-152
- Yamaguchi H, Nagatomi S, Morishita T. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 2003, **206**: 561-564
- Okamura M, Yasuno N, Ohtsuka M. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 2003, **206**: 574-578
- Zhou L B, Li W J, Ma S. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 2006, **244**: 349-353
- Frankenberg-Schwager M, Frankenberg D. International journal of radiation biology, 1990, **58**(4): 569-577
- Taucher-Scholz G, Heilmann J, Kraft G. Advanced space Research, 1996, **18**: 83-92
- Scholz M. Advances in Polymer Science, 2003, **162**: 95-155
- Karlsson K H, Sternlöw B. Radiation Research, 2004, **161**: 517-527
- Lieber M R, Ma Y, Pannicke U, *et al.* Nature reviews: Molecular cell biology, 2003, **4**: 712-720
- Shikazono N, Suzuki C, Kitamura S. Journal of Experimental Botany, 2005, **56**: 587-596
- Kitamura S, Shikazono N, Tanaka A. Plant Journal, 2004, **37**(1): 104-114
- Naito K, Kusaba M, Shikazono N, *et al.* Genetics, 2005, **169**: 881-889
- Fukutsu K, Kanai T, Furusawa Y. Radiation research, 1997, **148**: 168-174
- Furusawa Y, Fukutsu K, Aoki M. Radiation Research, 2000, **154**: 485-496
- Tanaka A, Shikazono N, Yokota Y. International Journal of Radiation Biology, 1997a, **72**: 121-127
- Hase Y, Yamaguchi M, Inoue M. International Journal of Radiation Biology, 2002, **78**: 799-806
- Hase Y, Tanaka A, Baba T. Plant Journal, 2000, **24**: 21-32
- Tanaka A, Sakamoto A, Ishigaki Y. Plant Physiology, 2002, **129**: 64-71
- Yokota Y, Hase Y, Shikazono N. International Journal of Radiation Biology, 2003, **79**: 681-685
- Shikazono N, Suzuki C, Kitamura S. Journal of Experimental Botany, 2005, **56**: 587-596
- Zhou L B, Li W J, Yu L X, *et al.* International Journal of Radiation Biology, 2006, **82**(7): 473-481

Research progress in plant mutation by combining ion beam irradiations and tissue culture

ZHOU Linbin LI Wenjian QU Ying LI Ping

(Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000)

ABSTRACT About a new mutation breeding method which combines plant tissue culture technique with heavy ion beam irradiations were discussed in this paper with the principles, operation steps, molecular mechanisms, etc. The mutation method developed a few advantages coming from plant tissue culture, which can produce offspring by asexual ways. Meanwhile, using this method, the study of biological effects of high energy particles with different linear energy transfer values on plant tissues or cells can be explored and optimized in theory or practice.

KEYWORDS Ion beams, Plant tissue culture, Irradiation, Mutation, Linear energy transfer

CLC Q691.5, Q691.8, Q506