

文章编号: 1007-4627(2007)01-0059-06

离子束介导技术在生物体遗传改良上的发展趋势^{*}

黄群策

(郑州大学离子束生物工程省重点实验室, 河南 郑州 450052)

摘要: 在利用离子束介导技术对生物体进行遗传改良的研究领域内仍然存在着 7 大研究难题值得注意。明确提出了离子束介导技术进一步发展的技术思路, 即立足于离子束介导技术这一物理学技术平台, 注重研究两个关键性问题(即离子束介导异源遗传物质进入受体基因组的机理和受体发生异源基因重组的机制)。在研究中完成 3 个有效转变(从形态学鉴定为主有效地转变为对其遗传学规律进行研究, 从对介导当代群体的变异效应的研究为主有效地转变为研究突变性状在多个世代内所表现的后效性, 从对单一性状的研究为主有效地转变为研究突变性状的综合表现), 寻找 4 个方面的实验证据(形态学、生理生化、细胞和分子生物学的证据), 研究 5 大生物学特性(生殖特性、发育特性、光合特性、抗逆性和品质等特性)。

关键词: 离子束介导技术; 研究难题; 技术思路

中图分类号: Q691 **文献标识码:** A

1 引言

从生物体遗传改良的发展历程来看, 研究者主要围绕着 4 大问题展开研究, 即创造出遗传性变异、筛选出优良的新种质、尽快稳定优良的基因型和迅速扩大优良基因型的群体, 其中, 研究者在创造生物体遗传性变异群体方面的研究成果特别突出。现代生物体遗传改良在研究方法上的创新主要围绕两个方面进行探索: (1) 如何通过物种内或物种间遗传物质的交流或重组之后在生物体后代群体内更有效地创造出更加丰富多彩的遗传性变异个体; (2) 如何准确地变异群体内筛选出具有实用价值的优良新种质。

在 20 世纪 80 年代初, 中国科学院等离子体物理研究所的余增亮研究员率先提出了“借助于离子注入技术使生物体的特征特性发生变化, 进而对其进行有效的遗传改良”的设想。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, 其技术的实用性和对生物体遗传改良效果的普遍性已经被大量的实验

结果所证实。在利用离子束注入技术对生物体进行遗传改良的实际应用中涉及到两个方面的研究主题, 即对特定基因型的诱变效应和促进异源遗传物质转移的介导作用。随着离子束生物技术的实用性和普遍性的研究范围的不断拓宽, 离子束生物工程的学科发展将更加迅速, 有望建立一个高效的实用技术体系。从建立离子束介导技术体系的发展历程来看, 研究者主要围绕离子束介导外源遗传物质的技术、离子束介导特异性目的基因的遗传转化和离子束介导总 DNA 导入受体的遗传转化开展研究。关于离子束介导外源遗传物质的技术研究, 研究者主要研究了通过离子注入后在受体组织内形成离子通道的可能性、不同注入离子的特殊效果和离子注入中所涉及到的物理学技术参数这 3 方面的问题。关于离子束介导特异性目的基因的遗传转化研究, 前人分别以多种作物为受体从其介导实验中获得了一些有意义的实验结果。关于离子束介导总 DNA 导入受体的遗传转化研究, 涉及到的作物主要是水稻、小麦、棉花和西瓜, 外源遗传物质的供

* 收稿日期: 2006-07-03; 修改日期: 2006-08-05

* 基金项目: 国家“十五”科技攻关基金资助项目(2001BA302B)

作者简介: 黄群策 (1958-), 男(汉族), 广西全州人, 教授, 博士, 博士生导师, 河南省特聘教授, 从事水稻生殖生物学和离子束生物技术研究; E-mail: quncehuang@zzu.edu.cn

体种类比较多,研究结果的实际影响比较大。通过这 3 个方面的探索和研究,离子束介导技术的实用性得到了充分的肯定。然而,从目前的研究现状来看,离子束介导技术在实际应用中仍然存在着一些值得注意的问题,迫切需要提出相应的研究对策和新的技术思路,以便促进其在生物体遗传改良中得到更好的应用。

2 离子束介导技术应用中需要注意的一些问题

在离子束生物工程的起始阶段,余增亮先生大胆地提出了生物体被离子注入后会因为能量沉积、质量沉积和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的交叉领域的高度关注,由此揭开了离子束生物工程的研究序幕^[1, 2]。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。在具体的实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,在损伤程度比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^[3-5]。通过对离子束生物技术的机理研究后已经证实,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;通过对照射剂量的控制,可以在细胞和组织上形成可修复的微孔,这为外源遗传物质进入细胞提供了良好的通道^[6-8]。从离子束介导技术的发展趋势来看,在近缘物种间和远缘物种间建立离子束生物工程的高效介导技术体系将是值得探索的新的研究方向。为了进一步完善离子束介导技术、拓宽其应用范围和挖掘其潜在的实用价值,迫切需要对该研究领域内目前存在的局限性有比较清晰的认识。从目前的研究资料来看,在利用离子束介导技术完成异源遗传物质转移的研究领域内尚存在着 7 大问题值得注意。

在利用离子束介导技术促进异源遗传物质在不同物种间或同一物种内不同基因型之间进行交流和

转移的研究中,遗传物质的供体与受体在分类学上的亲缘关系与其遗传转化效果的相关性是值得注意的第 1 个学术问题。生物体经过长期的进化之后,以物种为单位的基因库和物种之间的生殖隔离状况已经形成,由此确保了物种的相对稳定性和限制了物种间遗传物质的交流和转移。现代生物体遗传改良的主要任务就是如何更有效地促进物种内或物种间遗传物质的交流,进而创造出更加丰富多彩的遗传性变异个体。在利用离子束介导异源遗传物质进行遗传转化实验中,除了将银杏的遗传物质转入西瓜为受体的遗传转化实验涉及到异源遗传物质在不同科植物之间进行交流之外,其它的遗传转化实验所涉及到的供体与受体均没有超出分类学上的界限^[9, 10]。从我们近年来的研究结果来看,供体与受体在分类学上的亲缘关系与其遗传转化效果的相关性因实验材料的种类不同而异,在分类学的一定范围内呈现出正相关性;超出分类学的一定范围则呈现出负相关性。在今后的介导实验中供体和受体的选择和搭配值得引起高度注意。

在该研究范围内的实验资料比较零散,缺乏系统性和完整性是值得注意的第 2 个问题。在 20 多年的探索中,研究者所采用的生物种类比较多,但对每一种生物的研究深度还比较肤浅;对某些生物内特定材料研究得比较多,而忽视了同一种生物体的不同基因型对离子束介导作用所表现出的不同的生物学效应;在通过介导外源遗传物质对受体进行遗传改良的过程中对后代的表现型效应研究得比较多、而对其细胞学机理、生理生化基础和分子生物学机制的研究比较少;在实验材料的选择上采用杂合体材料比较多,而对纯合体材料采用得比较少;在实验设计上单因子研究和一次性实验比较多,而多因子研究和重复性实验比较少;在不同生物中发现了许多因离子束介导异源遗传物质所引起的特殊的生物学现象,但没有在抓住这些特异性现象后进一步揭示其产生的根源。从研究中所存在的局限性来看,关键性的原因就是介导实验中根本没有采用比较完整的实验设计或实验设计存在着一定的局限性。

对介导实验的后效性研究,其中包括对介导后代群体内突变性状表达的规律性没有进行系统的跟踪研究,对离子束介导的当代效应研究得比较多,而对其后效性并没有给予高度重视,这是值得

注意的第 3 个问题。从目前公开报道的研究资料来看，无论是以水稻为受体或以小麦为受体的介导实验还是以西瓜为受体的介导实验，除了实验设计比较简单之外，研究者并没有对后代群体内单株性状的变异特征和突变体性状的分离动态进行深入研究，对其异源遗传物质在受体内发生遗传重组后所导致的后效性以及由此所表现的规律性仍然感到模糊不清。在某些实验中研究深度不够，研究者并没有抓住某些突变体的特征特性进行更加深入的遗传学分析和研究，以致于目前对一些具有特异性学术价值或潜在实用价值的突变体材料及其后代的遗传动态仍然没有清晰的认识，进而使研究的深度很有限。

在介导实验的突变体后代群体内寻找发生遗传转化的生物学证据时所存在的片面性是值得注意的第 4 个问题。从生物学的发展历程、生物学研究层次和遗传改良的研究体系来看，借助于现代生物技术完成了异源遗传物质从供体向受体转移之后，在受体的后代群体内变异的特征特性会不定向地涉及到生物学的各个方面，其中包括外观的形态学变异、细胞学水平的变异、染色体区段的结构变异、生理生化特性的变异和在分子水平上特定基因的变异等等。在现有的研究中，有相当一部分研究者在介导后代群体内寻找介导实验成功的证据时，往往只迷信于寻找分子生物学证据而对于突变体在其它方面的特征特性往往没有引起足够的重视，以致于在介导实验中的一些很明显的实验证据通常被研究者所忽视，进而导致在介导后代群体内的一些很可能具有潜在研究价值和实用价值的新种质随着世代的推移而丢失。

在介导实验中研究的重复性很少引起研究者的关注，这是值得注意的第 5 个问题。在生物学研究中实验设计的重复性有助于消除实验误差，而实验次数的重复性有助于寻找出生物学的客观规律。从目前公开发表的有关离子束介导实验的研究论文来看，单一性的实验设计比较多，而重复性的实验设计很少；对于已经获得良好介导实验效果的实验，研究者通常都没有按照原有的实验设计再次进行重复性实验。正因为如此，研究者对介导实验中所存在的实验误差往往估计不足，很难寻找出特定介导实验中所存在的突变体性状的遗传动态及其生物学客观规律。

关于离子束介导实验的机制和机理，研究者仍然感到模糊不清，这是值得注意的第 6 个问题。继离子束生物技术的“三因子”假说提出之后，研究者进一步证实“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，可以在生物体的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^[7, 8]”。值得肯定的是，借助于离子束介导后某些异源遗传物质可以进入受体并在其后代可以表达，即离子束介导技术的实用性已经得到大量实验结果的证实。然而，关于异源遗传物质如何进入受体的问题仍然值得进一步研究，而异源遗传物质在受体遗传组成中如何发生基因重组的方式和机制问题更有待于深入探索。

关于离子束介导技术的超前性研究问题，很少有研究者进行深入探讨，这是值得注意的第 7 个问题。随着人类社会的不断发展，人们的社会需求也会发生相应的变化。生物体遗传改良的效果在很大程度上决定于是否能满足社会的需求和人们的需要。离子束作为一种具有一定特异性的诱变源对于促进异源遗传物质的交流，特别是促进异源物种间遗传物质的交流具有重要的生物学意义。从现有的文献报道结果来看，在离子束介导异源遗传物质的研究领域内跟踪性研究比较多，而具有战略性意义的超前性研究太少，由此很可能导致其在进一步发展的历程中出现明显的局限性。

3 探讨不断完善离子束介导技术的近期目标

随着离子束介导技术在生物体遗传改良中的实用性和遗传转化的普遍性被大量的实验结果所肯定，其研究难度不断加大。从学科的发展趋势来看，离子束介导技术的近期发展目标就是迫切需要在进一步完善离子束生物工程学科的理论框架和对目前所存在的主要问题有比较清晰认识的前提下，形成一个更加完整的技术体系，即利用离子束介导技术有效地促进异源遗传物质在不同物种间或同一物种内不同基因型之间进行交流和转移，进而对受体材料进行有效的遗传改良。与此同时，也迫切需要借助于其它学科的研究成果和发展思路形成一个相互补充的技术集成体系，以便不断拓宽离子束介导技术的实用性研究范围。基于这一认识，本人提出不

断完善离子束介导技术的近期发展目标,即立足于离子束介导技术这一物理学技术平台,重点研究介导机理上的两个关键性问题,在对介导后代群体进行研究和筛选时注重 3 个有效转变,在寻找遗传转化的实验证据时从 4 个方面展开,在对受体后代进行鉴定时以 5 大生物学特性作为遗传改良的育种目标。

离子束介导技术必须立足于以离子束作为新的诱变源这一物理学技术平台,采用离子注入技术使受体组织形成离子通道,由此促进异源遗传物质进入受体的遗传组成中,进而对生物体进行有效的遗传改良。从学科的发展趋势来看,围绕离子束注入所涉及的一些物理学基本问题仍然需要进一步研究和探索。对于“三因子”假说,还需要从生物物理学的角度加以进一步论证。在靶室内离子束的均匀性和可控性、离子束束线直径的最小化、离子定点注入的装置系统和技术体系、离子定点注入装置的小型化、靶室内温度的可控性、从物理学角度提高被注入材料成活率的技术研究等问题亟待解决。围绕离子束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,将有助于为离子束介导技术的进一步拓展和建立一个良好的物理学平台,由此更有利于进一步完善离子束生物工程的技术体系。

在进一步完善离子束介导技术的过程中必须注重研究两个关键性问题,即离子束介导异源遗传物质进入受体基因组的机理和受体发生异源基因重组的机制,该研究有助于从根本上确定离子束介导技术在生物体遗传改良中的科学性。在离子束介导技术的实际应用中迫切需要完成 3 个有效转变,即从对受体后代个体的形态学鉴定和筛选有效地转变为在注重形态学变异特征的同时关注其变异性的遗传学规律和遗传机理;从对介导当代群体内所表现的变异效应的研究为主有效地转变为在注重当代群体内所表现的效应的基础上研究突变性状在多个世代内所表现的后效性;从对突变体所表现的单一性状效应的研究为主有效地转变为在研究其单一性状效应的同时进一步研究突变性状的综合表现。可以肯定的是,在离子束介导技术的实际应用中完成 3 个有效转变是学科发展的需要,由此将提高其学术研究水平,克服其研究的局限性。在离子束介导技术的进一步发展中力求从形态学、生理生化、细胞

(亚细胞)和分子水平等 4 个层次寻找异源遗传物质在受体发生基因重组和适时表达的证据。遗传学的研究结果已经证实,生物体表现型的出现是在特定时间和特定空间由特定基因或基因群与相应的环境条件相互作用的结果,从基因型到表现型还涉及到一系列复杂的生化代谢反应和生理代谢反应。在离子束介导技术的机理研究中,除了在分子水平进一步寻找异源遗传物质在受体基因组内发生基因重组和适时表达的实验证据或特异性之外,还迫切需要从其它研究层次上进一步寻找其特异性。从离子束生物工程学科的发展趋势来看,对于 4 个研究层次的探索性研究工作均需要进一步深化,同时,也迫切需要将各个层次的研究结果相互补充和互相验证,以便从中寻找到更加客观的生物学规律。在离子束介导技术的实际应用中迫切需要生殖、发育、光合、抗逆和品质等 5 大生物学特性发生变异的单株进行深入的研究。在对突变体后代的生殖特性进行研究时需要注意实验材料的生殖特点,其中包括减数分裂是否正常、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,以及是否存在特异的生殖现象(雄性不育现象、雌性不育现象和无融合生殖现象等)。以突变体后代的生殖特性为筛选目标,将有可能从中发现具有特异性生殖方式的突变体,进而为生物体杂种优势的利用和固定杂种优势效应提供有用的新种质。在对突变体后代的发育特性进行研究时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等。以突变体后代的发育特性为筛选目标,将有可能从中发现具有特异性发育方式的新种质,这将有助于培育具有优良株叶形态、旺盛的生长势和适应特定生态条件的新品种。在对突变体后代的光合特性进行研究时需要注意其光合强度、光合势和叶绿体的光合效率,由此将筛选出具有高光效特性的新种质,这将有助于进一步挖掘植物体的产量潜力。在对突变体后代的抗逆特性进行研究时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。以突变体后代的抗逆特性为筛选目标,将有可能从中发现具有特异的抗性新种质,由此将培育出具有抗旱性、抗寒性、耐盐性和耐碱性等特性的新品种。在对突变体后代的品质特性进行

研究时需要注意社会的发展趋势, 尽量满足人们的需求, 不断提高生物新产品的市场品位和市场价格。以突变体后代的品质特性为筛选目标, 将有可能从中发现具有优良品质的新种质, 由此培育出的新品种将具有良好的产品品质、食味品质、营养品质、外观品质和加工品质等, 进而提高其经济价值。

4 展望

随着全球形势的变化和我国社会不断地发展, 人类的需求也会发生相应的变化。在借助于离子束介导技术对生物体进行有效的遗传改良的过程中, 在确保生物体产品具有优质特性和绿色特性(抗逆性强和无污染)的前提下, 采取何种有效措施和更合理的技术路线更好地挖掘生物新品种的产量潜力则是值得进一步探索的问题。从离子束介导技术的发展思路来看, 近期的发展目标就是迫切需要在进一步完善离子束生物工程学科的理论框架的前提下, 形成一个更加完整的离子束介导异源遗传物质, 进而对受体材料进行有效的遗传改良的研究体系, 也需要借助于其它学科的研究成果和发展思路形成一个相互补充的技术集成体系, 以便不断拓宽离子束介导技术的实用性研究范围。

随着离子束生物技术的实用性和普遍性的研究范围不断的拓宽, 离子束生物工程的学科发展将更加迅速, 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^[11, 12]。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介导技术体系将是值得探索的新的研究方向。

参考文献 (References):

[1] Yu Zengliang. *Physics*, 1997, **26**(6): 333(in Chinese).

- (余增亮. *物理*, 1997, **26**(6): 333.)
- [2] Yu Zengliang. *Introduction to Ion Beam Biotechnology*. Hefei: Anhui Science Technology Press, 1998, 223—263(in Chinese).
(余增亮. *离子束生物技术引论*. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1998, 223—263.)
- [3] Li Xingliang, Wei Zengquan, Li Wenjian, *et al.* *Nuclear Physics Review*, 2001, **18**(2): 125(in Chinese).
(李兴林, 卫增泉, 李文建等. *原子核物理评论*, 2001, **18**(2): 125.)
- [4] Zhou Guangming, Li Wenjian, Wang Jufang, *et al.* *J Radiat Res Radiat Proess*, 2001, **19**(3): 289(in Chinese).
(周光明, 李文建, 王菊芳等. *辐射研究与工艺学报*, 2001, **19**(4): 289.)
- [5] Wei Zengquang, Xie Hongmei, Liang Jianping, *et al.* *Nuclear Physics Review*, 2003, **20**(1): 38(in Chinese).
(卫增泉, 颜红梅, 梁剑平等. *原子核物理评论*, 2003, **20**(1): 38.)
- [6] Lu Ting, Zhu Fengsui. *Nuclear Techniques*, 1994, **17**(7): 443(in Chinese).
(陆挺, 朱凤绥. *核技术*, 1994, **17**(7): 443.)
- [7] Song Daojun, Yao Jianming, Shao Chunlin. *Nuclear Techniques*, 1999, **22**(3): 129(in Chinese).
(宋道军, 姚建明, 邵春林. *核技术*, 1999, **22**(3): 129.)
- [8] Wu Lifang, Yin Ruochun, Gu Yunhong, *et al.* *Acta Biophysica Sinica*, 2001, **17**(4): 725(in Chinese).
(吴丽芳, 尹若春, 谷运红等. *生物物理学报*, 2001, **17**(4): 725.)
- [9] Song Daojun, Wang Cen. *Advance of Natural Science*, 2001, **11**(3): 327(in Chinese).
(宋道军, 汪岑. *自然科学进展*, 2001, **11**(3): 327.)
- [10] Wang Haobo, Gao Xiubin. *Plasma Science & Technology*, 2002, **4**(6): 1591.
- [11] Huang Qunce, Liang Qiuxia, Li Yufeng, *et al.* *Acta Laser Biology Sinica*, 2003, **12**(5): 355(in Chinese).
(黄群策, 梁秋霞, 李玉峰等. *激光生物学报*, 2003, **12**(5): 355.)
- [12] Huang Qunce, Qin Guangyong. *Journal of Zhengzhou University*, 2003, **35**(4): 31(in Chinese).
(黄群策, 秦广雍. *郑州大学学报*, 2003, **35**(4): 31.)
- [13] Huang Qunce, Peng Jianjun. *Acta Laser Biology Sinica*, 2005, **14**(6): 25(in Chinese).
(黄群策, 彭建军. *激光生物学报*, 2005, **14**(6): 25.)

Future Strategy and Puzzles of Heavy Ion Beam Mediated Technique in Genetic Improvement of Biological Bodies^{*}

HUANG Qun-ce¹⁾

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

Abstract: The 7 research puzzles in the genetic improvement of biological bodies made by ion beam mediated technique, are worth noticed. The technical ideas, including one mediated technique in physics, 2 significant subjects, 3 effective changes, the mediated evidences of 4 aspects and 5 biological characteristics, were particularly put forward according to the existing states in the field. The 2 significant subjects consist of the mechanics of the allogenic materials entering into the acceptor and they being to be recombined. The 3 effective changes include from studying morphology to genetic laws, from researching M1 generation to the next generations, from determining the single character to the synthetic traits. The mediated evidences of 4 aspects come from morphology, physiology and biochemistry, molecule biology. The 5 biological characteristics are mainly reproduction, development, photosynthesis, bad condition-resistant and quality.

Key words: ion beam mediated technique; research puzzle; technical idea

* **Received date:** 3 Jul. 2006; **Revised date:** 5 Aug. 2006

* **Foundation item:** National Science and Technology Subject of China of Tackling Key Problems in 10th Five-year Stage(2001BA302B)

1) E-mail: quncehuang@zzu.edu.cn