

植物诱变技术的研究进展

徐 明, 路铁刚*

中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

摘 要:植物诱变技术是指利用外界因素加快物种遗传变异,在短期内获得有利用价值的突变体,为培育新种质、新品种及基因功能的研究等创造条件。相对于自然的选择,诱变技术具有高频率、广突变、周期短等特性。主要论述了常用的化学诱变、物理诱变、空间诱变和生物诱变等诱变手段,并详细介绍了上述诱变技术的诱变机理、生物学效应、常用的诱变方式及其在植物应用中的研究现状。针对现行各种诱变技术的不足提出了今后努力的方向。

关键词:化学诱变;物理诱变;空间诱变;生物诱变;研究进展

DOI:10.3969/j.issn.2095-2341.2011.02.03

Research Progress of Plant Mutagenesis Technology

XU Ming, LU Tie-gang*

Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract:Plant mutagenesis technology is using external factors to accelerate species variation and acquire some valuable mutants in the short period. This technology has been an important tool for new materials breeding, variety cultivation and gene function research. Compared with the natural selection, plant mutagenesis technology has more advantages, such as a higher mutant frequency, larger mutation range and shorter mutation period. This paper mainly introduces the mutational mechanism and biological effects of chemical, physics, space, biology mutagenesis, and their research progress of applications in plant in detail. Also some disadvantages of these technologies are mentioned and good suggestions for future development are proposed.

Key words:chemical mutagenesis; physics mutagenesis; space mutagenesis; biology mutagenesis; research progress

生物进化实质上是对产生的各种变异进行选择的过程。自然状态下,物种会因自身因素及外界环境的不稳定,发生自发突变,但这种变异发生的频率极低,因而自然界中大量存在的遗传差异是物种内部变异长期积累的结果^[1]。

长期以来,各种优良种质和材料的发现与获得可以明显提高育种效率和增加物种的遗传多样性^[2],特异突变体的产生有利于我们阐明基因的功能与作用机理。而我国在育种及基础研究方面可供利用的优异种质资源范围非常狭窄,这就迫切需要我们不断地去发现和创造新材料、新资源等,无疑使得诱变技术成为一种重要可行的手段。通过诱变改变生物内部结构等,从而产生出新的性状与有价值的突变体,在品种的选育及基因的

研究方面起着关键的作用。

20 世纪以来,人们逐渐掌握了创造突变体的各种手段,如利用化学因素(如烷化剂、叠氮化物等化学诱变剂)、物理因素(如 X 射线、 γ 射线、离子束等)以及生物因素(外源 DNA、T-DNA、转座子)等诱发植物产生遗传变异,进而获得自然界没有的或一般常规方法难以获得的新表型、新突变、新基因,丰富了遗传变异范畴等。

1 化学诱变

化学诱变研究始于 20 世纪初。1910 年 Morgan 等人相继发现化学物质能提高果蝇及某些微生物的突变率。1941 年, Auerbach 等^[3]第一次发

收稿日期:2011-04-26; 接受日期:2011-06-02

基金项目:国家自然科学基金项目(30700516)资助。

作者简介:徐 明,硕士研究生,研究方向为植物功能基因组学与蛋白质组学。* 通讯作者:路铁刚,研究员,博士,主要从事植物功能基因组研究。Tel:010-82106131; E-mail:tiegang@caas.net.cn

现芥气可以诱发基因突变,从而揭开了化学诱变育种的序幕。1943年,Oehlkers^[4]用脲脞处理的月见草发生了染色体的畸变,使化学药剂的诱变作用得到了肯定。之后前苏联 Rapoport 博士^[5]在世界上率先开展化学诱变育种研究,此后化学诱变在全世界得到广泛的推广与应用。

化学诱变剂的确定主要取决于诱变的目的、诱变材料的性质及试验条件等,可以分为两类,一类是针对植物倍性改良的诱变剂,另一类则通过植物细胞在复制、转录过程中渗入细胞内,发生碱基的替代或嵌入碱基之间,造成染色体变异,进而发生复制或转录错误。简要介绍几种有效且常用的化学诱变技术。

1.1 烷化剂 EMS 诱变技术

1953年,Klmark^[6]首次报道了烷化剂双环氧丁烷可以有效的诱导物种突变。从此,烷化剂开始广泛被应用到作物诱变育种中。烷化剂通常带有一个或多个活性烷基,此基团能够转移到其他电子密度高的分子上去,在许多位置的碱基上增加了烷基,具有在多方面改变氢键的能力。EMS (ethyl methan sulfonate) 是一种常用的烷化剂。EMS 的烷化作用主要发生在 DNA 的鸟嘌呤 N-7 位置上,当烷基取代 H^+ 后,使之成为一个带正电荷的季铵基团,从而发生两种遗传效应:一是由于鸟嘌呤的 N-7 烷基活化,糖苷键断裂造成脱去嘌呤,该 DNA 分子进一步复制时,原来鸟嘌呤的位置成为一个空位,使其互补位置上的碱基不受严格的配对限制,4 种碱基都有机会进入,从而造成一种置换现象;二是烷化的鸟嘌呤能够与胸腺嘧啶配对,导致碱基替换即 G:C 变为 A:T,发生转换型突变。此外,EMS 还可以使遗传物质发生糖-磷酸骨架断裂,产生染色体缺失等^[7]。

由继红等^[8]用 EMS 处理紫花苜蓿叶片诱导产生的愈伤组织,获得抗寒性突变体。南京农业大学陈忠明等^[9]通过 EMS 诱变水稻恢复系品种“9311”种子,筛选到了大粒水稻突变体 M316。EMS 诱变在玉米中使用较广,尤其以 EMS-石蜡油混合处理效果更显著,郭丽娟等^[10]用不同浓度的 EMS 处理白玉米单倍体胚性细胞无性系,获得了能稳定遗传的抗玉米小斑病突变体。陈绍江等^[11]使用 EMS 对玉米花粉进行诱变处理,获得

了高油玉米突变体,最高含油量达到 13.82%。可以说 EMS 在诱变产生新品种、新材料等方面起着十分重要的作用。

1.2 叠氮化钠 (NaN_3)

叠氮化钠 (NaN_3) 是一种有效的点诱变剂,其机理为在 pH 为 3.0 的溶液中产生中性的 NH_3 分子,而 NH_3 分子可以自由透过细胞膜进入细胞,并以碱基替换的方式影响着 DNA 的正常合成,从而产生诱变^[12]。因其诱变机理的特殊性,所以处理种子最适宜的时间应为在 DNA 开始合成之时。 NaN_3 具有使用简便、高效、无残留性和费用低廉的优点,且产生的突变体主要为基因水平的突变。

从 Spence^[13]1965 年发现 NaN_3 对大麦的诱变作用以来,国内外的许多研究者对 NaN_3 在农作物上的诱变作用进行了广泛的研究,特别在禾本科作物(大麦、小麦和水稻)方面取得了一系列的成果。王萍等^[14]研究表明, NaN_3 能够引起油菜的生理损伤,损伤效应随浓度增加而提高,而且 NaN_3 可抑制过氧化氢酶活性,使细胞代谢迟缓,幼苗生长延滞。姜振峰等^[15]用 NaN_3 处理大豆,田间 M_1 代成活率降低,出现了晚熟和矮化的现象。

1.3 平阳霉素 (PYM)

平阳霉素 (PYM) 最早是由中国医学科学院抗菌研究所和华北制药厂从浙江平阳采集的土壤样品中分离的轮枝链霉菌平阳新变种 *Streptomyces verticillus* var. *pinyangensis* n. Var 中研制而成的抗肿瘤抗生素^[16]。现认为平阳霉素诱变的分子机理可能为诱发的 DNA 损伤不能被 DNA 聚合酶修复,而且以产生 3'-磷酸末端的方式切断 DNA。在植物中产生的染色体畸变类型有染色体断裂、缺失、易位及染色体环等,有时还可见大量的微核和染色体散碎等。

关于平阳霉素的在植物中的诱变研究已开展很多。沈光平等^[17]用平阳霉素处理蚕豆根尖,结果根尖细胞产生了多种类型的染色体畸变。赵丽梅等^[18]研究了平阳霉素对大麦的诱变效应,以 0.3% 浓度的甲基磺酸乙酯 (EMS) 处理作为对照。平阳霉素处理的大麦 M_1 代在苗高方面表现出抑制作用,根尖细胞染色体有致畸作用,效果显著于 EMS 的诱变等。张秋英等^[19]用平阳霉素溶

液注射孕穗初期的小麦叶脉,在 M_2 代出现了明显的突变表型,如早熟、株高变矮、籽粒颜色发生改变等,而且某些突变性状能稳定的遗传下去。

1.4 其他化学药剂

另外一些化学物质也被广泛的用于植物诱变,如碱基类似物,作用于复制中的 DNA,其作用机理为因其结构类似于核酸碱基,容易作为合成 DNA 的成分渗入引起 DNA 复制错误,从而产生机体的突变。有些无机化合物则可以使 DNA 分子的嘌呤嘧啶脱去氨基造成 DNA 复制紊乱;还有些抗生素类的也被作为诱变剂,如秋水仙素、吖啶等。

2 物理诱变

典型的物理诱变剂有 X 射线、 γ 射线、 α 射线、 β 射线、紫外线、快中子、微波、超声波、电磁波、激光处理、重离子注入和高静水压等。自 1927 年, Muller^[20] 用 X 射线辐射果蝇,诱发产生了大量多种类型的突变体,随后 X 射线被广泛应用于植物诱变。下面详细地介绍在诱变育种中常用的几种物理诱变剂。

2.1 射线处理

射线辐射指利用 X 射线、 γ 射线、 α 射线或 β 射线等使生物体的某些较容易受辐射敏感的部位受到撞击而电离,从而直接或间接的引起 DNA 结构的变化,直接的效应为碱基、脱氧核糖及糖-磷酸各自化学键的断裂等;间接效应为因电离而产生的自由基较易作用于嘧啶,从而引起缺失和损伤,造成基因突变及染色体到位、缺失和易位等畸变。

陈佑良等^[21] 利用钴圆慢照射小麦不同发育阶段的植株,结果发现除照射四分体前植株的诱变效果比照射种子低外,其他发育阶段照射均高于种子照射。陈善福等^[22] 用 ^{60}Co - γ 射线直接照射龙特甫 B 干种子,诱发获得了多种类型叶色突变体。何家庆等^[23] 发现用 ^{60}Co - γ 射线辐照对花魔芋 (*Amorphophallus konjac*) 诱发产生了一些叶片大、耐寒性、鞭状茎分化少、球茎增重系数高等有益农艺性状的突变体。沈圣泉等^[24] 以 350Gy 的 γ 射线辐照水稻粳型恢复系 K1722 干种子,经

加代筛选后,获得了粒色分别为红黑色和红褐色的 2 份有色突变体 RK172221 和 RK172222,而且该突变体均为显性单基因控制,这表明该诱变技术可以创造色稻新资源,还容易获得遗传简单的色稻新材料。

2.2 激光处理

激光对生物体作用的研究已有 40 多年的历史,随着科学技术的发展及对激光诱变机理的深入了解,从而使其在植物品种改良、生产实践中得到了广泛推广和应用。其能量积累的机理可解释为激光源的频率与生物体内某分子振动频率相同引起共振,能量的大量积累很容易使分子的化学键断裂产生新的分子,从分子生物学的角度可理解为使细胞内 DNA 分子因吸收聚集能量并进行能量的再分配,处于一种易发生突变的状态,继而发生诸如聚合、断键、交联等变化最终导致变异等。激光诱变除了能量,还带来热、压力、电磁场等,所以说激光诱变的生物学效应直接来源于其产生的光、电、热、压力和磁效应的综合作用^[25~27]。目前在育种上常用的有铍玻璃激光器、氮分子激光器、红宝石激光器、二氧化碳激光器和氦-氟激光器等。

相对于传统的紫外诱变手段,激光诱变具有高效、稳定、高选择性、回复突变率低、定向变异率高、辐射损伤轻、当代变异、无污染等优点,并且激光还可促使作物增产、提高植物的光合效率、根尖有丝分裂频率等生物效应的发生,逐渐受到了研究人员的关注。

我国激光诱变育种是从 1972 年开始的,四川大学生物系率先进行激光诱变油菜种的研究,之后相继育成了油菜、番茄、黄瓜、菜豆和蚕豆等新品种^[28]。张俊国等^[29,30] 对吉粳 88 水稻种子及减数分裂期幼穗进行了不同波长、功率及照射时间的激光辐照处理, M_1 、 M_2 代中出现了早熟变异、粒重变异、芒性变异、穗粒数变异、着粒密度变异和株高变异等,从而为水稻激光育种提供了必需的科学依据。张显志等^[31] 利用 He-Ne 激光辐照小麦干种子,经过多年努力,育成了产量高、抗病性强、品质优良、易脱粒等优质新品种白粒 4 号。

2.3 离子(束)注入

离子(束)注入技术是一项最早被应用于金

金属材料表面改性的高新技术。20世纪80年代中期,余增亮等^[32]人率先将其应用于生物品种改良,经过20多年的发展,对其作用机制和产生的生物学效应有了很大的认识,这为诱变育种技术奠定了很好的基础。

对离子(束)注入诱变机制大量研究后,科学家们提出了动量、能量和质量沉积生物效应的概念。能量沉积效应表现为当离子注入生物体表面时,不仅可以直接引起离子溅射,同时部分入射离子将能量传给生物体表面粒子后也会使其产生溅射,随着注射的持续性,生物体表面被层层剥离,使后来的离子可以穿行较长的距离落在预定的位置上。质量沉积效应表现为刚注入的离子能量高,能使生物分子电离或激发,导致电离损伤,随着入射离子在生物体内深度的增加,能量也逐渐降低,随着进一步的降低,能量损失在入射离子到达终位时达到峰值。此时若注入的是活性离子,则它们在沉积过程中将不断与生物分子发生键合、置换或者填充空位等,形成新的分子基团。电荷交换效应表现为当注入负离子时可使生物体负电性增强,注入的若为正离子则使负电性降低甚至引起极性的改变。电性的变化将改变细胞跨膜物理场,深刻影响着细胞内外能量的转换、物质运送、信息传递、代谢调控等生物学过程^[33,34]。因此,离子注入可能是使染色体发生断裂、重排、缺失等造成碱基分子结构的改变进而诱发的突变。

离子束诱变在谷物育种的研究和应用最早见于水稻的诱变育种^[34],黄群策等^[35]以低能氮离子束为诱变源,对同源四倍体水稻进行注入处理,第二代群体中除了叶鞘变异和米质变异这两个变异性状能稳定遗传之外,其他变异性状在群体内都发生了明显的性状分离现象。李兴林等^[36]选用能量为20MeV¹²C⁶⁺离子注入小麦胚乳,发现M₁代植株中POD酶活性显著高于野生型,过氧化氢酶活性(CAT)、丙二醛含量(MDA)和蛋白质含量则表现出较大程度的下降。刘志生等^[37]利用2.0 MeV氮离子束在不同的剂量下注入玉米自交系478种子胚,结果表明,以 $1 \times 10^{16}/\text{cm}^2$ 的剂量处理后,后代主要性状变异明显,出现了比亲本早熟23 d的自交系和籽粒产量特高的自交系等。王新绘^[38]利用氮离子注入彩棉并将注射后的种

子扫描电镜观察,得出随着注入剂量的增高,离子束对种子表面的刻蚀作用加强,生物体受损程度加大。

2.4 高静水压诱变

自从19世纪末人们发现深海生物起,就开始注意到高静水压对生物体的影响,但直到近20年这一领域才引起了物理学及生物学的广泛关注^[39]。

通过对高压诱变产生的突变体进行传统的遗传学研究及开展分子生物学简单重复序列扩增多态性(ISSR)的研究,已证实高压诱变产生的变异是由于遗传物质的变化所引起的^[40]。至于高压诱变的具体机制现认为吸涨萌动的种子,该细胞恰好处于DNA复制和RNA转录的状态,此时压力的增加将改变DNA复制的正常环境,这有可能直接导致碱基配对发生错误或可能使修复酶系统受到影响,引起DNA分子序列的改变;同时DNA空间结构可能的改变也会导致不同RNA转录变化,由于种子受到高压处理,将会产生一些滞后的生理生化改变,以上因素的复杂变化都能够引起DNA分子发生序列变异^[41]。

随着高压理论和技术的发展,高压生物学的研究已经深入到生物学的多个领域,徐世平等^[42]首次报道了通过高压对水稻品种粤香占进行诱变,结果显示当代植株的分蘖数和产量都有所增加,产生的变异至F₂及F₃代,变异的性状都能稳定的遗传。龙国徽等^[43]利用不同静水压力处理萌动的大麦种子,保压2 h,发现高压对大麦种子萌发及幼苗生长均有一定的抑制作用,大麦发芽率和成苗率明显下降,压力达到200 MPa时不再有幼苗成活。高压处理后,幼苗中出现了表型发生变异的植株。

3 空间诱变

空间诱变指借助返回式卫星、太空飞船等在太空飞行时处于微重力、弱地磁、高能粒子、宇宙射线及高真空的特殊环境而使材料发生诱变的一种技术^[44]。20世纪60年代初期,前苏联科学家首次报道了空间飞行对植物种子会产生影响,从而拉开空间诱变育种的序幕^[45]。至此尽管国内

外学者对空间诱变产生的机理做了大量的研究,仍未获得清晰的认识,但也取得了很多的研究进展。目前主要产生了几种假说。一是微重力学说:当植物进入太空后,首先重力极大的降低,这将使植物对重力的感受、转换、传输、反应都会或多或少发生变化,从而产生直接或间接的变异;二是太空辐射学说:太空中的各种辐射都将是产生诱变的重要因素;三是转座子活化假说:太空中的特殊环境使潜伏放入的转座子激活,活化的转座子通过移位、插入和丢失,可以导致基因的变异和染色体的畸变,四是弱地磁生物学效应:因太空环境的一个显著特征为弱地磁现象,所以这也可能是空间诱变的一个因素。另外,太空中的大气结构、超真空、飞船发射和着落过程中重力的变化、飞行过程中的压力状况、气温等^[44,46],这些因素综合作用的结果将导致空间诱变具有变异范围广、变异类型独特、突变效果明显而且容易稳定等优点。目前,国内外的研究主要集中在形态学、生理生化等方面变异的筛选。我国的空间诱变技术走在世界前列,利用卫星搭载的植物品种涉及粮食作物、油料作物和蔬菜花卉等,而且已经培育出了一些新品系。

有研究表明,经太空飞行的春小麦种子与地面的对照组相比,表现出较高的发芽率和出苗率,而且幼苗生长快速;同时 M_2 代出现较为广泛的正向变异,提供了宝贵的育种资源^[47]。丘运兰等^[48]发现太空环境对玉米种子发芽率无影响,但对萌发后种子存在着生长抑制现象。湖南省原子能农业应用研究所将晚粳品种中作 59、海香搭载高空处理后,获得了株高、生育期、穗型、稃尖颜色、育性、粒性和种皮颜色等发生突变的后代^[49]。

4 生物诱变

生物诱变是指利用具有一定生命活性的生物因素来诱发变异,进而产生有利用价值的突变体的一种技术。生物诱变因素主要包括外源 DNA、T-DNA、转座子、反转座子等。随着各种转化技术体系的成熟,如根癌农杆菌介导法、花粉管通道法、基因枪法、PEG 化学法等,使得利用生物诱变获得优良的变异材料成为了一种常用的技术。常用的生物诱变主要有插入突变、基因沉默、同源重组等。

4.1 插入突变

4.1.1 T-DNA 插入突变 插入突变是一种较有效的变异方式,利用 T-DNA 插入可建立起大规模的突变群体,有利于筛选出有价值的基因或个体。T-DNA 来自根癌农杆菌 Ti 质粒,约 20 kb,包含冠瘿碱合成和冠瘿瘤生长的基因,其能利用质粒两端 25 bp 的同向重复序列随机且稳定地整合到植物基因组中^[50]。目前,对 T-DNA 是如何转移和整合到植物中的机制尚不完全清楚。由于 T-DNA 本身片段很大,可作为产生突变体的一种较好的突变源。其插入产生突变的机理为:当 T-DNA 插入到基因的编码区,有可能造成无义突变或基因功能的失活;当插在启动子或 3' 端非翻译区,有可能导致基因的表达量降低;当存在插入多个拷贝时,则可能使多个基因失活;T-DNA 插入还可能引起染色体的重排等^[51]。闫双勇等^[52]利用农杆菌介导转化中花 11 成熟胚愈伤组织,共获得 1 489 个独立转化的 T-DNA 插入突变株系。利用 T-DNA 插入突变,在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中已经成功建立了接近饱和的插入突变体库,该突变体库包含超过 225 000 个独立的 T-DNA 插入株系^[53]。由于 T-DNA 的特殊性,被加以改造从而成为一种标签技术,为后续的功能基因组的研究提供了至关重要的作用。至 2009 年已经构建了多种类型的水稻突变群体,包括普通的插入突变、激活标签、基因捕获和增强子捕获等,所得到的 T-DNA 插入标签总数已超过 300 000 份^[54]。

4.1.2 转座子突变 插入突变的另一种有效方式是转座子插入突变。自 1951 年美国 McClintock 在玉米中首先发现了 DNA 转座子以来,转座子的研究经历了快速的发展^[55]。转座子常被称跳跃因子,其实质是具有特定长度的 DNA 片段,可以从染色体的一个位点“跳”到另一个位点,或从一条染色体转移到另一条染色体上。转座子在结构上有两个特点:一是在转座子端分别有一个 DNA 倒置重复序列;二是其重新整合的位点,转座子一侧有一个正向 DNA 重复序列。现普遍认为转座的机制是 DNA 的扩增和重组,当转座子插到新的位点上产生交错切口,形成的突出单链末端与转座子两端的反向重复序列相连,然后由 DNA 聚合酶填补缺口,DNA 连接酶封闭切口等^[56]。其产生突变的机理为:转座子在转座时可

以使染色体发生断裂、缺失、倒位、重复等变异,同时插入后或影响转录,或影响翻译,从而引起被插入基因的遗传不稳定性或突变。

转座子可分为 DNA-DNA 方式转座和 DNA-RNA 方式的反转座。DNA-RNA 方式通过 DNA 复制或直接切出 2 种方式获得可移动的片段,重新插入到基因组中,导致基因的重组或突变,但不改变基因组的大小。目前研究最多的植物转座子是 Ac/Ds 和 Spm/dSpm 系统。Greco 等^[57]利用 enhancer trap 载体建立了 Ac/Ds 水稻插入突变库,该群体中 62% 的 T₀ 代植株表现出了转座活性。Shimamoto 等^[58]利用 Ac/Ds 系统,通过杂交筛选,获得了大量水稻矮化、花期改变的突变体。最近, Singh Bhau^[59]等在禾谷草中发现了一个 Ac 家族的转座子,该转座子同时存在于大麦、小麦和水稻染色体的相同位置,序列的保守性暗示了其在禾本科植物中可能具有重要的作用。

反转座是以 DNA-RNA-DNA 的方式来实现转座。转座因子的 DNA 首先被转录成 RNA,转录的 RNA 在反转录酶 RNaseH 的作用下被反转录成 DNA,最后插入到新的染色体上。特殊的作用方式增加了转座元件拷贝数的同时也增大了植物基因组,不过反转座子一般在胁迫条件下被激活。与转座子相比,反转座子也能通过插入基因附近或内部的方式来产生突变,但其特异地保留了插入位点的复制模式,使其产生的突变相对稳定。Tos17 是水稻中第 1 个被鉴定的最有活性的逆转录转座子,也是研究的较为详细的一个反转座子, Hirochika 等^[60]建立了容量约为 50 000 独立的 Tos17 插入的突变体库。

4.2 基因沉默突变

基因沉默普遍存在于生物界,指体内特定的基因由于种种原因不表达的一种现象。可以发生在两种水平上,一是转录水平上的沉默,往往由于启动子失活而导致基因转录无法进行;另一种转录后水平上的沉默,即基因正常转录,但所转录的 mRNA 在细胞质内积累量很低或根本检测不到,研究认为外源基因转录产生的大量 mRNA 进入细胞质后,与具有同源的內源基因 mRNA 形成双链并发生了核酸降解,导致共抑制^[61]。基于后者产生的 RNAi 技术得到了广泛的发展与应用。

RNAi 作用原理是当 dsRNA 进入细胞后,就会激活由核酸内切酶和解旋酶等组成的 Dicer 酶复合体,被激活的 Dicer 识别 dsRNA 并将其切割成短的双链 RNA (21 ~ 23nt),短双链 RNA 又可以进一步激活 Dicer,并与 Dicer 相结合,形成 RNA 诱导的沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC)。RISC 通过 Dicer 中的解旋酶将双链 RNA 变成两个互补的单链 RNA,此单链 RNA 即可识别并结合到细胞内与其互补的靶 RNA 分子上,然后 Dicer 中的核酸内切酶将靶 RNA 切割,使其失去功能。RISC 在切割靶 RNA 后又产生更多的短双链 RNA,然后短双链 RNA 又会形成更多的 RISC,这种放大效应将最终清除所有的靶 RNA。在这个过程中,短双链 RNA 发挥着特异性识别和定位的重要作用,这种短双链 RNA 称作小干涉 RNA (short interfering RNA, siRNA)^[62,63]。RNAi 技术产生突变体的机制是通过导入的外源片段导致内源性基因沉默,或对內源基因起阻抑降低表达等,从而产生相应功能缺失的突变体。利用基因沉默已在线虫突变体库中得到广泛应用,但在植物中也不乏应用。如可以利用 Gateway 系统基于单个基因突变后汇总成 RNAi 文库,可以利用酶学工程方法构建 RNAi 文库等。罗彦忠等^[64]依据滚环复制的原理,创建了新的发卡 RNA 构建系统,利用拟南芥 cDNA 文库,首次构建出 2 个拟南芥 RNAi 文库。

4.3 其他生物突变

随着对生物体各种机制的深入研究,作为自然变异的另一种主要来源的遗传重组也得到了广泛的研究与应用,其中同源重组依赖大范围的 DNA 同源序列的联会、交换等也能产生突变。这种方式在动物中应用相对较多^[65]。

5 小结

随着诱变技术的深入研究,诱变也凸显出一些不足,如诱变的频率和幅度还不够高、诱变的方向具有不确定性、诱变的效果不理想及一些新的诱变技术的研究与应用还刚刚起步,有关的条件、方法、理论等还亟待进一步探索与完善等,所以在今后的研究中,应该采用最先进的诱变技术,扩大

诱变技术的种类,寻找更多的诱变源;改变诱变材料、部位、生长时期,扩大群体及增加诱变技术等;加强诱变机制的研究,掌握各自诱变技术的作用机理,深入开展物理、化学、生物、空间等复合诱变的研究与应用,探索出新的无毒高效的诱变剂和新的诱变方法,从而提高诱变的效率、效果及安全性。充分利用生物技术与育种技术,分析诱变后代基因型,开展新种质、新品种、新材料的研究;利用分子生物学的方法,对有益变异的基因进行克隆,进行深入的基础研究,探明有益基因的作用机理等,同时还可通过遗传工程的手段,将其转入到其它植物的基因组中,使目的基因得以表达,合成蛋白质,使诱变工作能够定向发展,从而更好的造福人类等。

参 考 文 献

- [1] 宋 炜,刘志增,陈景堂,等. 诱变技术在植物育种中的应用[J]. 河北农业大学学报,2003,26(Z1):116-119.
- [2] 高兰英,马 庆. 诱发突变技术在小麦育种研究中的应用[J]. 山西农业科学,2009,37(6):7-12.
- [3] Auerbach C, Robson J M. Chemical production of mutations[J]. Nature,1946,157:302.
- [4] Oehlkers F. Die Auslösung von Chromosomenmutationen in der Meiosis Durch Einwirkung von Chemikalien[J]. Mol. Gen. Genet., 1943,81(1):313-341.
- [5] Rapoport I A. Carbonyl compounds and the chemical mechanism of mutations[J]. Compt. Rend. Acad. Sci. URSS, 1946,54:65-67. (in Russian, English abstract)
- [6] Klmark G. Differential response to mutagens as studied by the Neurospora reverse mutation test[J]. Hereditas,1953,39:270-276.
- [7] 安学丽,蔡一林,王久光,等. 化学诱变及其在农作物育种上应用[J]. 核农学报,2003,17(3):239-242.
- [8] 由继红,杨文杰,李淑云. 紫花苜蓿抗寒性突变体的筛选[J]. 东北师大学报,1996,2:84-87.
- [9] 陈忠明,王秀娥. 水稻强优势恢复系 9311 粒重的诱变改良[J]. 分子植物育种,2005,3(3):353-356.
- [10] 郭丽娟,胡启德,康绍兰,等. 诱发玉米抗小斑病突变体的研究IV. 从玉米单倍体胚系细胞无性系筛选抗玉米小斑病突变[J]. 遗传学报,1987,14(5):355-362.
- [11] 陈绍江,宋同明. EMS 花粉诱变获得高油玉米突变体[J]. 中国农业大学学报,2002,7(3):12.
- [12] 欧 平. 工业微生物化学诱变育种研究及应用进展[J]. 贵州学院学报,24(3):139-144.
- [13] Spence R K. The influence of sodiumazide on the biological effects of ionizing radiation in moist barley seeds [D]. Washington DC; Washington State Univerisity, MS thesis,1965.
- [14] 王 萍,王 昱,倪文艳,等. 叠氮化钠对油菜生物学效应的研究[J]. 中国油料,1996,18(4):17-19.
- [15] 姜振峰,刘志华,李文滨,等. 叠氮化钠对大豆 M1 的生物学诱变效应[J]. 核农学报,2006,20(3):208-210.
- [16] 朴铁夫,孙云农,齐 晶,等. 平阳霉素诱变研究的进展[J]. 核农学报,1999,13(5):316-320.
- [17] 沈光平. 平阳霉素三种成分诱发染色体畸变的研究[J]. 遗传学报,1984,2:109-112.
- [18] 赵丽梅. 平阳霉素(pingmycin)对大麦的诱变效应[J]. 核农学报,1990,4(4):199-205.
- [19] 张秋英,叶定生,金美玉. 平阳霉素诱导小麦农艺性状变异的研究[J]. 麦类作物学报,2002,22(4):66-69.
- [20] Muller H J. The effects of X-radiation on genes and chromosomes[J]. Science,1928,67:82.
- [21] 陈佑良,杨平华,谢玉康,等. 钴源慢照射小麦不同发育阶段植株的诱变效果[J]. 西南农业学报,1991,4(2):17-24.
- [22] 陈善福,舒庆尧,吴殿星,等. 利用 γ 射线辐照诱发水稻龙特甫 B 叶色突变[J]. 浙江大学学报,1999,25(6):569-572.
- [23] 何家庆,黄训端,周立人,等. $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐照对花魔芋农艺性状的影响[J]. 激光生物学报,2004,13(5):377-382.
- [24] 沈圣泉,王彩霞,叶红霞,等. γ 射线诱发水稻粒色突变体的研究[J]. 核农学报,2006,20(5):358-360.
- [25] 向 洋. 激光诱变及生物学作用机制研究[J]. 光电子·激光,1994,5(2):87-91.
- [26] 刘录祥,程俊源. 植物诱变育种新技术研究进展[J]. 核农学报,1997,4:187-190.
- [27] 周章印. 玉米诱变育种研究进展[J]. 河北农业科学,2008,12(7):54-57.
- [28] 郝丽珍,侯喜林,王 萍,等. 激光在农业领域应用研究进展[J]. 激光生物学报,2002,11(2):149-153.
- [29] 张俊国,张三元,张学臣,等. 水稻激光育种的研究 I. 种子及减数分裂期幼穗激光处理诱发变异分析[J]. 吉林农业科学,2005,30(2):17-20.
- [30] 张俊国,张三元,张学臣,等. 水稻激光育种的研究 II. 糙米激光处理诱发变异分析[J]. 吉林农业科学,2005,30(5):3-6.
- [31] 张显魁,曾级芳. 激光辐照育成优质高产小麦新品种白粒 4 号(摘要)[J]. 激光生物学报,2005,3:225.
- [32] 余增亮,何建军,邓建国,等. 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.
- [33] 王 悦,胡正明,马继凤. 离子注入植物诱变育种技术研究进展[J]. 作物研究,2006,5:465-469.
- [34] 龚洪恩,吕芳德. 离子束生物技术在植物育种中的应用[J]. 经济林研究,2008,26(1):113-116.
- [35] 黄群策,梁秋霞,李玉峰,等. 低能氮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.
- [36] 李兴林,卫增泉,王晓娟,等. $^{12}\text{C}^{6+}$ 注入小麦种子胚乳引起 M_1 代的变化[J]. 激光生物学报,2000,9(4):276-279.
- [37] 刘志生,陈吉法,范广华,等. 等离子束玉米自交系选育初探[J]. 激光生物学报,2002,11(2):142-144.
- [38] 王新绘. 氮离子注入对彩棉的诱变效应研究[D]. 乌鲁木齐:新疆大学,硕士学位论文,2004.
- [39] Claude B, Ruan K C. An emerging field in bioscience. high

- hydrostatic pressure study[J]. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 1999,31(6):619-624.
- [40] 徐世平,郭丽秀,翁克难,等. 水稻高压诱变与突变体的ISSR分析[J]. *高压物理学报*,2005,19(4):305-311.
- [41] 申斯乐,徐世平,翁克难,等. 高静水压处理水稻诱导稳定遗传变异系的DNA分析[J]. *高压物理学报*,2004,18(4):289-294.
- [42] 徐世平,廖耀平,翁克难,等. 水稻压致变异和高压对水稻生长发育的影响[J]. *高压物理学报*,2001,12:241-248.
- [43] 龙国徽,纪媛,余涛,等. 高压对大麦种子萌发的影响及诱变的DNA分子指纹分析[J]. *吉林大学学报(理学版)*, 2007,45(2):305-310.
- [44] 袁存权,李云,管耀义,等. 航天诱变育种机理研究进展[J]. *河北林业科技* 2009,B09:39-43.
- [45] 刘录祥,郑企成. 空间诱变与作物改良[M]. 北京:原子能出版社,1997.
- [46] 杨致芬,郭春绒. 空间诱变育种研究进展及其在辣椒中的应用[J]. *山西农业科学*,2008,36(6):21-25.
- [47] 王广金,闫文义,孙岩,等. 春小麦航天育种效果的研究[J]. *核农学报*,2004,18(4):257-260.
- [48] 丘运兰. 太空飞行对玉米种子的生物学效应[J]. *华南农业大学学报*,1994,15(2):100-105.
- [49] 彭选明,庞伯良,彭伟正,等. 湖南水稻空间诱变育种研究进展及其展望[J]. *湖南农业科学*,2009,5:1-3.
- [50] 苏红,印莉萍. 插入突变在水稻功能基因组学中的研究进展[J]. *生物技术通报*,2009,5:1-4.
- [51] 路铁刚,丁毅. 分子遗传学[M]. 北京:高等教育出版社,2008.
- [52] 闫双勇,智庆文,刘欣洁,等. 水稻T-DNA插入突变体库的构建及突变类型的分析[J]. *遗传学报*,2004,31(12):1388-1394.
- [53] Alonso M, Anna N, Stepanva I, *et al.* Genome wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Science*,2003, 301:653-657.
- [54] 吕亚慈. 水稻T-DNA插入突变技术研究[J]. *衡水学院学报*,2009,11(1):45-47.
- [55] Hugh M. Robertson. The mariner transposable element is widespread in insects[J]. *Nature*,1993, 362:241-245.
- [56] 马艳平,刘永生,张杰,等. 转座子应用的研究进展[J]. *江西农业学报*,2009,21(5):108-110.
- [57] Greco R, Ouwerkerk P B, De Kam R J, *et al.* Transpositional behaviour of an Ac/Ds system for reverse genetics in rice[J]. *Theor. Appl. Genet.*, 2003,108:10-24.
- [58] Izawa T, Ohnishi T, Nakano T, *et al.* Transposon tagging in rice[J]. *Plant Mol. Biol.*, 1997,35:219-229.
- [59] Bhau, Syed, Marshall, *et al.* Gary-A non-transposing transposon[A]. In: *Plant & Animal Genomes XIII Conference Abstract* [C]. San Diego, CA: Town&Country Convention Center,2005.
- [60] Hirochika. Contribution of the Tos17 retrotransposon to rice functional genomics[J]. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2001, 4(2):118-122.
- [61] 田野,曹雪松. 植物基因沉默的研究进展[J]. *聊城大学学报(自然科学版)*,2010,23(1):45-48.
- [62] 张丽娜,于玲,俞诗源,等. RNA干涉研究进展[J]. *西北师范大学学报(自然科学版)*,2006,42(5):105-111.
- [63] 井长勤,张秀华,刘涌涛,等. RNA干涉技术研究进展[J]. *安徽农业科学*,2007,35(13):3780-3781.
- [64] 罗彦忠. 拟南芥RNAi文库的构建及其突变体库的初步创制[D]. 北京:中国农业科学院,博士学位论文,2010.
- [65] 孟凡立,张卫国,陈庆山. 插入突变在功能基因组学研究中的应用[J]. *生物信息学*,2006,1:38-40.