

• 中药现代化论坛 •

离子束生物技术及其在药用植物育种中的应用

陈 浩, 梁运章

(内蒙古大学 内蒙古自治区离子束生物工程重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010021)

摘 要: 自 20 世纪 80 年代中期发现离子束生物效应以来, 离子注入技术已被应用于生物改良、生命起源和进化以及环境辐射生物学效应等多个研究领域。其中, 在植物遗传育种、创造新种质资源方面的成果尤为突出。药用植物是中药重要的原材料之一, 其遗传育种工作对提高中药材的产量和质量起着十分关键的作用。重点综述了离子束生物技术及取得成果, 然后指出药用植物的研究现状, 并对离子束生物技术在药用植物育种中的应用进行了展望。

关键词: 离子束生物技术; 药用植物; 育种

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)05-0641-03

Ion beam biotechnology and its application to medicinal plant breeding

CHEN Hao, LIANG Yun-zhang

(Key Laboratory of Ion Beam Biotechnology of Inner Mongolia Autonomous Region,
Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China)

Abstract: Ion beam implantation technique has been applied to many research fields, such as organism improvement, life origin and evolution, and radiobiological effect of the environment, since the mutagenic effects of ion beam had been discovered at the mid of 1980's. Especially ion beam biotechnology has obtained outstanding result in introducing plant breeding and creating new germplasm resources. Medicinal plant is one of basic materials of traditional Chinese medicinal materials, which has direct relationship with the quality and curative effects of medicines. Therefore, their genetic breeding plays a very important role in the improvement of the yield and quality of traditional Chinese medicinal materials. In this paper, ion beam biotechnology, its obtained results, and present status of research on medicinal plants are expounded. Moreover, the prospects of its application to the medicinal plant breeding are pointed out.

Key words: ion beam biotechnology; medicinal plants; breeding

20 世纪后半叶, 随着低能加速器和离子注入技术的发展, 低能离子与物质相互作用研究对半导体工业、微电子和材料科学产生了重大影响。然而, 在离子注入生物效应发现之前, 低能离子与物质相互作用研究对象仅限于气体(包括等离子体)、固体(金属、半导体等)和高分子材料这些无生命物质^[1]。直到 1986 年, 中国科学院等离子体物理研究所发现了离子注入对生物的诱变效应, 证实了质量(粒子)沉积生物效应的存在, 开辟了低能离子与生物体相互作用的新的研究方向^[2]。正如人们所预期的那样, 现已发展成为“离子束生物工程学”(也叫低能重离子生物学), 这一新兴的交叉学科, 受到国内外的关注。经过近 20 年的努力, 离子束生物工程学理论和应用研究都已取得不少

进展, 尤其在生物品种改良上取得了较大进展, 创造了较大的经济效益和社会效益^[3]。近年来, 天然药物研究和开发方兴未艾, 产值快速增长。天然药物的原材料主要来自药用植物, 深入进行药用植物研究和开发将具有十分重要的意义。为了保证和不断提高药用植物的质量(尤其是有效成分的含量)和产量, 药用植物的品种改良工作必将提到重要的议事日程^[4]。针对上述情况, 笔者认为离子束生物技术在药用植物育种的应用有着诱人的前景。

1 离子束生物技术

1.1 离子束生物技术的发展: 20 世纪 80 年代中期, 中国科学院等离子体研究所余增亮研究员等率先将离子注入技术用于农作物品种改良, 于 1986 年首次发现

收稿日期: 2004-09-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(10065001)

作者简介: 陈 浩(1977-), 男, 内蒙古呼和浩特人, 硕士研究生, 研究方向为环境生物物理。

Tel: (0471)4991529 Fax: (0471)4991529 E-mail: chenll26@eyou.com

离子注入水稻生物学效应,并在几个水稻品种离子注入诱变上,获得损伤低、突变率高、突变谱广的统计结果^[5]。随后,离子注入作为新的遗传改良方法,在小麦、水稻、棉花、玉米、花生、果树、林木、牧草和微生物等方面应用,证明低能离子注入所引发生物效应是多方面的,并取得了突出的成果^[6~8]。1988 年,余增亮研究员首次提出注入离子与生物体相互作用原初过程的三因子效应,即能量沉积效应、质量沉积效应和电荷交换效应,为离子束生物技术的机制,尤其是原初物理过程的研究奠定了基础。1996 年 7 月,余增亮研究员的专著《离子束生物技术引论》问世,标志低能离子生物学作为一门新型交叉学科正式建立起来了。

1.2 离子束生物技术的应用及取得的成果

1.2.1 离子注入生物学效应的机制研究:对低能离子注入生物种胚产生诱变的机制目前有多种认识,一种观点是:低能离子在植物种子材料中的射程浅,不足以穿过种子表皮到达胚细胞,因此细胞的损伤可能是由离子引起某些次级过程的间接作用造成的^[9]。但越来越多研究显示,高速离子能够穿过种皮,注入到子叶和种胚细胞内,通过质、能沉积造成双重损伤,进而诱发突变。余增亮等认为作物干种子结构极其复杂,多层、多相、多通道,载能离子的刻蚀作用能使这些通道连通,使得后续离子直接作用到胚上^[10]。

1.2.2 离子束应用于植物品种改良:离子注入技术应用于农作物的诱变育种研究,经过十几年的发展,现已取得了明显的成效。1994 年以来,离子束生物技术已育成 11 个水稻、小麦、玉米和番茄等农作物新品种,通过安徽、山东等省审定,其中一个小麦新品种通过国家审定。这些新品种中,有的被评为优质米新品种(如 D₉₀₅₅),有的抗虫抗病性强(如 S₉₀₄₂)。更重要的是离子束生物技术获得了一批特殊的育种材料,如用离子束介导法将几丁质酶基因转入水稻、小麦,获得抗病的水稻和小麦植株;将碳 4 循环玉米多酶系基因转入水稻,获得光合效率比原品种平均提高 80% 的一批水稻新品系等。这些特殊材料培育的成功为农产品结构调整提供了宝贵的种质资源。

1.2.3 离子束应用于微生物品种改良:离子注入近年来在微生物的品种改良上取得了较大的进展。1998 年以来,离子束在微生物育种上应用开创了崭新的局面,新菌株的选育取得丰硕的成果。鞣质酶、麦角甾醇、柠檬酸的效价分别提高 289%、60% 和 52.8%。特别值得提出的是维生素 C(VC)和花生四烯酸产生菌,其发酵水平双双创国内外新高。VC 在 300 t 发酵罐上糖酸摩尔转化率达到 94.8%,质量

转化率为 102%,接近菌种转化率的极限,被业内专家喻为“自 VC 二步法发酵发明以来的重大突破”。离子束生物工程菌生产花生四烯酸,发酵水平是当前国内论文报道的 10 倍,比国外高 50%^[11]。

1.2.4 离子束应用于植物转基因与远缘杂亲:在离子束与生物体相互作用过程中,粒子的植入、动量的传递和电荷交换可导致植物细胞表面被刻蚀,引起细胞膜通透性和跨膜电场的改变。根据这一原理,近几年来发展了一种离子束介导的转基因技术获得成功。吴丽芳等利用离子束介导分别将 *gus* 基因、几丁质酶基因(RCH8)、改良的绿色荧光蛋白基因(mGFP4)导入小麦栽培品种的成熟胚细胞,经 PCR 检测、Southern 杂交分析,证明这 3 种基因已分别整合到小麦基因组中,平均植株转化率为 1.4%~17%^[12~14]。此外,通过 Ar⁺注入,又将两个大豆品种的全 DNA 分别导入两个小麦栽培品种中。收获后,发现有两个单株的蛋白质含量分别达到 20.46% 和 25.35%,明显高于对照^[15]。说明通过离子束介导外源 DNA 转化技术,可以绕过复杂的组培过程而由成熟种子直接发育为植株,并获得带有目的性状的转化后代,为远缘物种间遗传物质交流提供了一种简便有效的途径。

2 离子束生物技术在药用植物育种中的应用

2.1 药用植物的重要性及研究现状:中医历经几千年的发展沉积,已经形成与西医完全不同的理论体系,有独特的用药规律。我国拥有丰富的中药资源,中药 12 807 种,其中药用植物 11 146 种,药用动物 1 581 种,药用矿物 80 种,对 32 种药用植物类药材统计发现总蕴藏量达 8.5×10^6 t,目前经营中药材 1 200 多种,常用药材 600 种,栽培 200 多种,野生收购药材 400 种^[16]。中药材是生产中药饮片和中成药的重要原料。保证中药材质量是保证中药饮片和中成药质量的关键和基础。

药用植物是一类具有特殊用途的经济植物。在我国,药用植物经过几千年的应用和发展,已经形成了具有悠久历史的传统中医药。中药材是我国药用植物的主要部分,是我国中医药事业的原材料,其质量的优劣直接影响中药系列产品的质量和疗效^[4]。它既是中医治疗疾病的物质基础,又是制药工业的重要原料。此外,还在食品、卷烟、保健品及化妆品等许多行业中有着重要的作用。

药材种子是药材生产和发展的源头,很大程度上决定着中药材的质量。药用植物的品种是指那些适应于当地环境条件,在植物形态、生物学特性以及

产品质量都比较一致,性状比较稳定的植株群体。药用植物的良种选育就是要通过多种途径,运用先进的科学技术,有针对性和创造性的培育出新的优良品种,不断淘汰相对较差的品种。

目前,我国药用植物的基础研究很薄弱,中药材生产长期以来处于自由发展的状态,中药材的遗传育种和良种选育工作与各种农作物比,差距很大。尤其在药用植物有关性状和化学成分调控机制和遗传规律研究方面,几乎是空白。由于缺乏遗传基础研究工作,因此药用植物的育种工作长期停留在比较初级的阶段,主要是移植和应用农作物传统应用的常规育种技术。从药用植物的生物背景和药材生产的实际需要来看,这存在很大的缺陷。

面对经济全球化和我国已经加入 WTO 给我国中药产业带来了新的机遇和挑战,中药产业必须与现代科学技术相结合与现代学术思想相结合^[16]。就药用植物而言,就是应高度重视药用植物的质量和品种改良工作,把药用植物的遗传研究和生物新技术育种作为药用植物研究工作的重要组成部分。药用植物的品种改良工作近几年在国内引起了有关部门和专家的重视。我国著名生药学家徐国钧院士和著名药用植物学家肖培根院士一致认为:药用植物资源的利用正面临一场新的世界性技术革命,必然首先受到生物工程等先进技术飞跃发展的影响^[4]。

2.2 离子束生物技术在药用植物育种中的应用及展望:考虑到离子束生物技术现有的丰富的技术积累和广阔的发展前景,完全可以将两者结合,探索一个新的改良药用植物的方法。以离子束生物技术改良药用植物为研究目标,论证采用这种新的改良药用植物方法的可行性,创造更多、更好的药用植物品种,进而提高其有效成分含量、产量、抗逆性、适应范围等特性。这对于提升我国中药材行业在整个国际市场上的竞争能力,促进中药的整体质量水平的发展都有巨大的现实意义。

离子束改良药用植物研究涉及到很多相关学科,如低能离子生物学、药用植物栽培学、中药药理学、化学分析等很多领域。当前,科学技术发展的重要特点是各学科相互影响和渗透,交叉学科不断涌现,而学科的交叉恰是创新的希望所在。

目前,已有少数的单位正在用离子束生物技术对药用植物育种工作展开研究。安徽农业大学的彭镇华等以低能 N^+ 离子的不同剂量注入银杏胚部,引起酯酶同工酶和过氧化物同工酶在数量、种类和活性上的变化;酶谱的变化与注入剂量有关,但不显

著;生理变异可通过无性繁殖遗传;突变致死剂量效应呈非指数变化。新疆大学离子束生物工程实验室对低能离子注入麻黄种子生物效应进行了初步研究。研究表明:离子注入对麻黄种子的生长起良好的生物效应。内蒙古大学内蒙古自治区离子束生物工程重点实验室正开展以药用植物为对象,用离子束生物技术进行品种改良的系列研究。通过对黄芪、沙棘和麻黄初步试验结果表明,离子束注入药用植物种子可引起明显的生物效应,具有可喜的应用前景。

可以预见,以中药产业所具有的丰富的药用植物资源和丰厚的历史底蕴,加上与离子束诱变高新技术的联合,在科技工作者的通力合作下,中药事业一定能找到合适的发展道路,发展壮大,再次获得新的国际竞争力。

3 结语

离子束在生命科学中应用的研究逐渐成为由中国兴起向国外辐射的新的研究领域,得到科技界的高度评价。近 3 年来,全国 25 个省、市 60 多个课题组到等离子体所进行科学实验,均取得了可喜的成果。一些省、区,特别是中西部地区从实践中体会到离子束生物工程学对发展当地经济和提高自身科技创新能力的重要作用,纷纷引进中国科学院等离子体物理所的经验,投资兴建省、区离子束生物工程基地,如郑州大学、新疆大学和内蒙古大学等的离子束生物工程实验室。美国、日本、英国和泰国等国也开展了这方面研究,日本还将离子束生物技术列为其“人类前沿科学计划”,作为优先发展的高科技项目,并将成为 21 世纪生命科学研究的支撑技术之一。^[11]

离子束生物工程技术从应用至今虽然仅短短近 20 年的时间,但已成为许多国家竞相开展的国际前沿课题,这项技术的发展,不仅促进了核科学的发展,而且将促进生命科学研究的变革。其在药用植物上的应用,应看作中药事业寻求向高新技术进军的重要一步。可以预见离子束生物工程技术在药用植物上的广泛应用及潜在功能的发掘,将会极大推动中药事业的发展,这一领域所能开创研究的广度和深度不可限量。

References:

- [1] Song D J, Yu Z L. Survey of study on ion beam biotechnology [J]. *Bull Nation Nat Sci Founda China* (中国科学基金), 2001; 102-105.
- [2] Wu L F, Li H. Progress in applications of ion beam biotechnology [J]. *Physics* (物理), 1999, 28(12): 708.
- [3] Jiang Z H, Peng Z H. The advances in the research on improved variety by ion implantation [J]. *J Anhui Agric Univ* (安徽农业大学学报), 1994, 21(3): 295-298.

(下转第 768 页)

2.2 对照品溶液的制备:精密称取干燥至恒重的芦丁对照品 20 mg,于 50 mL 量瓶中,加甲醇少许,温热使溶解,放冷,用甲醇定容至刻度。精密量取 25 mL 于 50 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度。

2.3 标准曲线的制备:精密吸取对照品溶液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,加适量甲醇,摇匀,先加 5% NaNO_2 溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min;加 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 1 mL,摇匀,放置 6 min;再加 4% NaOH 10 mL,用甲醇稀释至刻度,放置 15 min,用第一管作空白对照,在 500 nm 处测吸光度,以吸光度(A)为横坐标、浓度(C)为纵坐标,绘制标准曲线。其回归方程为: $C=68.50 A+0.693$, $r=0.9999$ 。线性范围为 0.2~1.4 mg。

2.4 精密度试验:精密吸取同一对照品溶液 1 mL,重复测定 6 次,结果总黄酮的 RSD 为 0.50%。

2.5 稳定性试验:精密吸取供试品溶液 1 mL,每 2 h 测定一次吸光度,共测定 6 次,结果总黄酮的 RSD 为 0.78%,表明供试品溶液在 10 h 内基本无变化。

2.6 重现性试验:取同一样品 5 份,制备供试品溶液,按测定方法测定总黄酮质量分数, RSD 为 1.18%。

2.7 回收率测定:精密吸取已知含量的供试品溶液 5 份,分别置 25 mL 容量瓶中,加入不同量的芦丁对照品,按样品测定项下方法测定,依回归方程计算质量分数,结果平均回收率为 99.89%, RSD = 1.93%。

2.8 样品测定:将不同生长期金莲花供试品溶液滤过并分别精密吸取续滤液 0.5~3 mL 于 25 mL 量瓶中,测定。依标准曲线计算茎叶总黄酮的质量分数,结果见表 1。

表 1 不同生长期金莲花茎叶总黄酮含量 ($n=5$)

Table 1 Determination of total flavanoids in *T. chinensis* stem and leaf at various growing periods ($n=5$)

样品	采收时间/月·日	总黄酮/%
1	5月20日	6.656
2	5月30日	6.458
3	6月10日	5.981
4	6月20日	4.587
5	6月30日	2.696
6	7月10日	2.555
7	7月20日	1.533
8	7月30日	1.452
9	8月10日	1.447
10	8月20日	1.211
11	8月30日	1.091

3 讨论

金莲花在大兴安岭资源十分丰富,在肯定了其茎叶具有明显抑菌作用的基础上,考察了其不同采收期总黄酮的变化规律,实验结果表明金莲花茎叶总黄酮在 5 月中下旬较高,达 6.656%,从而为金莲花茎叶合理的采收和利用提供了理论依据。

References:

- [1] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House, 1977.
- [2] Liu L J, Wang X K, Xu G, *et al.* Study on function of suppressing bacteria of stem and leaf of *Trollius chinensis* [J]. *Acta Chin Med Pharm* (中医药学报), 1992, 3:33.
- [4] Gao S L. Research progress and prospects of genetic breeding in medicinal plants [J]. *World Sci Tech - Mod Tradit Chin Med* (世界科学技术-中药现代化), 2001, 6: 58-62.
- [5] Yu Z L. Preliminary Studies on mutagenic mechanism of ion implantation rice [J]. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 1989(1): 12-16.
- [6] Yang J B, Wu Y J, Wu L J. Low energy ion beam-mediated DNA delivery into rice cells [J]. *J Anhui Agric Univ* (安徽农业大学学报), 1994, 21(3): 330-335.
- [7] Li L. Effect of ion beam irradiation on the survival and nutrition deficiency mutation of LT2 [J]. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 1995, 23(1): 6-7.
- [8] Chen R L, Song D J, Yu Z L. Study in mutation of alfalfa genome DNA due to low energy N^+ implantation using PAPD [J]. *High Technol Lett* (高技术通讯), 2001, 11(11) 12-16.
- [9] Lu T, Xie L Q. A study of biological effect on plants caused by ion implantation [J]. *Nucl Tech* (核技术), 1994, 1(7): 443-448.
- [10] Yu Z L, Shao C L. Preliminary studies on the biological samples by ion beam etching [J]. *J Anhui Agric-univ* (安徽农业大学学报), 1994, 21(3): 260-264.
- [11] Yuan C L, Yu Z L. The grand progress of low energy ion beam in life sciences [J]. *J Chin Biotechnol* (中国生物工程杂志), 2002, 22(4): 57-61.
- [12] Wu L F, Li H, Song D J, *et al.* Establishment of a method for GUS gene transferring into wheat (*Triticum aestivum* L.) embryos by low energy ion beam implantation [J]. *Acta Gene Sin* (遗传学报), 2000, 27(11): 982-991.
- [13] Wu L F. Transfer chitinase gene of rice into wheat via low energy Ar^+ implantation [J]. *Chin Sci Bull* (科学通报), 2000, 45(21): 2316-2321.
- [14] Wu L F, Li H, Song D J, *et al.* Study on transferring improved green fluorescent protein gene into wheat via low energy Ar^+ implantation [J]. *J Nanjing Agri Univ* (南京农业大学学报), 2000, 23(3): 17-20.
- [15] Wu L F, Yu Z L. Distant molecular hybrid derived from soybean and wheat with ion implantation and variation analysis [J]. *Acta Agric Nucl Sin* (核农学报), 2000, 14(4): 206-211.
- [16] Liu M Y, Yuan Y J, Zhu S B. Progress of modernization in TCM [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(3): 193-196.
- [17] Liu P, Wang C E. Overview and hotspots of the fundamental research on traditional chinese medicine resource in China [J]. *Bull Nation Nat Sci Founda China* (中国科学基金), 2004, (1): 5-9.

(上接第 643 页)