

文章编号:1000-1638(2006)05-0531-04

N⁺注入对同源四倍体水稻花药组织培养体系的影响^{*}

李玉峰^{1,2}, 梁运章^{1,2}, 黄群策³

(1. 内蒙古大学理工学院, 呼和浩特 010021; 2. 内蒙古自治区离子束生物工程重点实验室, 呼和浩特 010021;
3. 郑州大学离子束生物工程省重点实验室, 郑州 450052)

摘要:选择三种同源四倍体水稻为实验材料,研究了氮离子注入对其花药诱导愈伤分化成苗组织培养体系影响.结果显示,低剂量范围($1.0 \times 10^{15} \sim 2.0 \times 10^{15} \text{N}^+/\text{cm}^2$)的N⁺注入能明显提高愈伤诱导率.其可能原因为:低剂量N⁺注入可使花药组织的膜透性增强,新陈代谢加快,从而使诱导率增加.另外,无论注入剂量大小,N⁺注入都能明显改善愈伤生长状态,抑制其褐化衰老的进程,还能提高绿苗分化率.对此,从生化角度进行了一定的理论分析.

关键词:同源四倍体水稻;花药;N⁺注入;组织培养

中图分类号:Q689 **文献标识码:**A

低能离子(30~180 keV)注入生物体诱变育种技术,作为一种新型诱变育种技术,相比传统的辐射诱变育种技术具有轻损伤、高突变率、广突变谱、安全性等特点,现已应用于多种粮食作物及经济作物的诱变育种,并取得可喜的经济和社会效益^[1,2].但此技术应用于诱变育种,大多注入对象都是作物种子,对于以组织培养材料为注入对象的研究还不多见.如果能把离子注入技术和组织培养技术有效集成形成一种创新的集成技术,那样既丰富了离子束生物工程学的内容,也为诱变育种提供一种新方法.

组织培养单倍体育种是加速杂种后代稳定,缩短育种年限,提高选择准确性的一种好方法.花培技术应用于育种,关键是要大量获得可供选择的二倍体植株,其决定因素是绿苗率与加倍率的乘积.而同源四倍体在进行花药培养时,所诱导的花粉植株不需人工和自然加倍即可直接获得二倍体,这无疑大大增加了育种的选择群体,提高了育种效率.另外,同源四倍体花粉培养能够形成各种非整倍体^[3].由此可见同源四倍体水稻花培在育种上的重要价值.本文探讨了N⁺注入对同源四倍体水稻花药组织培养体系的影响,并进行了一定的理论分析.

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为IR36四倍体、紫血稻四倍体、AP_N四倍体,以下分别用IR36(4N)、紫血稻(4N)、AP_N(4N)表示.各种生化试剂来自上海sangon公司.

1.2 方法

1.2.1 实验所用培养基 花药愈伤诱导和继代培养基为N6^[4]基本培养基,加水解乳蛋白400 mg/L、

• 收稿日期:2005-09-30;修回日期:2006-01-18

基金项目:国家自然科学基金(10065001).

作者简介:李玉峰(1974~),男(蒙古族),内蒙古科右中旗人,博士.主要从事离子束生物工程学方面研究工作.

E-mail:liyufeng00@yahoo.com.cn&liyufeng00@tom.com.

肌醇 100 mg/L、蔗糖 50 g/L、8 g/L 琼脂、2,4-D 2 mg/L、KT 0.5 mg/L、NAA 0.2 mg/L、6-BA 0.2 mg/L、玉米素(ZT) 0.2 mg/L. 分化培养基采用基本培养基 MS, 附加水解乳蛋白 800 mg/L、肌醇 100 mg/L、蔗糖 30 g/L、KT 2 mg/L、NAA 0.5 mg/L、6-BA 0.2 mg/L、玉米素(ZT) 0.2 mg/L. 小苗培养基为 1/2 MS 基本培养基, 加 NAA 0.2 mg/L. 以上各培养基的 pH 值均调到 5.8, 高温(121.13 ℃) 灭菌 20 min.

1.2.2 N^+ 注入处理 随机选择小孢子处于单核靠边期的新鲜幼穗分成各处理组和对照组, 8~10 ℃低温处理 7~15 d. 消毒处理后, 分别浸入 1% 的 DMSO 溶液中, 室温下浸泡 20 min. 无菌滤纸吸干水分后, 各处理组在超净台上剥开颖壳, 露出花粉, 开口朝上接受能量为 25 keV 不同剂量 N^+ 的脉冲式注入处理. 注入剂量范围为 $1.0 \times 10^{15} \sim 4.0 \times 10^{15} N^+ / cm^2$, 每处理组间隔 $1.0 \times 10^{15} N^+ / cm^2$. 对照组同样放入靶室中, 但不接受离子注入处理. 无菌条件下将离子注入过的处理组和对照组花药接种于愈伤诱导培养基上, 每 2 周继代一次, 继代 3~4 次后, 转入分化培养基. 分化小苗长至 3 cm 高后, 转入小苗培养基培养 2~4 周, 移栽入大田.

1.2.3 数据统计 上述实验重复三次, 分别计算以下指标, 统计平均值.

愈伤组织诱导率 = 愈伤组织块数 / 接种花药数 $\times 100\%$

绿苗分化率 = 分化绿苗愈伤组织块数 / 转接愈伤组织块数 $\times 100\%$

愈伤组织增重倍数 = (n+1 次继代时愈伤重量 - n 次继代时愈伤重量) / n 次继代时愈伤重量

2 结果与分析

2.1 N^+ 注入对花药诱导愈伤和分化成苗的影响

实验结果显示, N^+ 注入对诱导率有显著的影响. 低剂量 ($1.0 \times 10^{15} \sim 2.0 \times 10^{15} N^+ / cm^2$) 注入能显著提高同源四倍体水稻花药愈伤诱导率. 在 N^+ 注入剂量为 $3.0 \times 10^{15} N^+ / cm^2$ 时诱导率下降明显, N^+ 注入剂量继续升高到 $4.0 \times 10^{15} N^+ / cm^2$ 时, 诱导率骤降. 例如, IR36(4N) 的诱导率由对照的 10.3% 下降到 4.3%. N^+ 注入能明显提高愈伤的绿苗分化率, 无论离子注入剂量大小, 三个同源四倍体水稻材料各处理组愈伤的绿苗分化率都比对照高, 紫血稻(4N) N^+ 注入剂量为 $1.0 \times 10^{15} N^+ / cm^2$ 的处理组相比对照增加最多为 5.5 个百分点, IR36(4N) N^+ 注入剂量为 $4.0 \times 10^{15} N^+ / cm^2$ 的处理组相比对照增加最少, 也有 2.6 个百分点(表 1).

表 1 不同剂量 N^+ 注入同源四倍体水稻花药愈伤诱导率和绿苗分化率
Table 1 Callus-induced rate and differentiation rate of CK and treatments

水稻材料	考察项目(%)	0	1	2	3	4
IR36(4N)	愈伤诱导率	10.3±0.7	13.7±0.9	13.6±1.2	9.2±1.2	4.3±0.7
	绿苗分化率	11.1±0.8	15.2±1.4	14.3±1.2	14.1±1.3	13.7±1.0
紫血稻(4N)	愈伤诱导率	9.7±0.8	13.2±1.1	10.5±0.9	7.6±0.5	2.7±0.9
	绿苗分化率	10.2±0.7	15.7±1.4	15.2±0.9	14.6±1.1	14.9±0.8
AP _n (4N)	愈伤诱导率	9.7±1.0	14.5±0.9	12.1±1.3	6.2±1.0	3.1±0.9
	绿苗分化率	9.7±1.1	13.2±0.7	14.1±1.2	14.3±0.8	13.9±0.8

注: 0 为未经离子注入的对照组; 1~4 为随注入剂量增加的各处理组.

2.2 N^+ 注入对花药愈伤生长的影响

愈伤生长状况的好坏直接影响之后的绿苗分化再生. 我们用一定时间内愈伤增重倍数来定量衡量愈伤生长的快慢. 从我们的实验结果可知, N^+ 注入能使愈伤增重加快. 在同一次数继代时, 注入剂量范围为 $1.0 \times 10^{15} \sim 4.0 \times 10^{15} N^+ / cm^2$ 的各 N^+ 注入能明显提高愈伤组织增重倍数, 说明 N^+ 注入能明显加快愈伤组织的生长速度(表 2).

N^+ 注入花药后, 除了使其诱导的愈伤生长速度有所加快外, 还能提高愈伤的质量. 形态观察表明, 愈伤在继代初期无明显差异, 均为淡黄色团块. 经三次继代, N^+ 注入处理组和对照组之间表现出明显差异, 对照愈伤出现质地疏松、粒状非胚性愈伤组织特征, 而且颜色逐渐变暗, 进而褐化; N^+ 注入

处理组愈伤仍然保持鲜黄、组织紧密、瘤状的胚性愈伤组织特征。经4次继代培养时,对照愈伤都不同程度地出现严重褐化现象,N⁺注入各处理组愈伤才出现轻微褐化现象。

表2 不同剂量N⁺注入同源四倍体水稻花药愈伤组织增重倍数

Table 2 Weight multiple of callus increased CK and treatments

水稻材料	考察项目	0	1	2	3	4
IR36(4N)	B1	2.50±0.30	2.71±0.28	3.15±0.29	3.06±0.37	2.87±0.40
	B2	2.44±0.42	2.86±0.38	3.43±0.29	3.27±0.30	3.05±0.48
	B3	2.04±0.44	2.48±0.40	2.49±0.47	2.38±0.27	2.12±0.37
紫血稻(4N)	B1	2.13±0.35	2.47±0.35	2.56±0.42	2.42±0.43	2.33±0.30
	B2	1.95±0.29	2.34±0.34	2.44±0.31	2.39±0.47	2.00±0.32
	B3	1.67±0.37	2.18±0.31	2.32±0.34	2.21±0.39	1.90±0.25
AP _w (4N)	B1	2.30±0.29	2.74±0.34	3.05±0.41	2.80±0.39	2.60±0.40
	B2	2.21±0.41	2.78±0.31	2.96±0.35	2.73±0.36	2.64±0.31
	B3	1.86±0.39	2.45±0.27	2.67±0.42	2.41±0.37	2.30±0.40

注: B1~B3为随愈伤继代次数增加的各愈伤增重倍数; 0为未经离子注入的对照组; 1~4为随注入剂量增加的各项处理组。



图1 花药诱导的愈伤组织块

Fig. 1 Anther induced Callus



图2 转接继代培养的愈伤组织块

Fig. 2 Callus of transferring into succeeding medium



图3 愈伤组织芽点分化转绿

Fig. 3 Green growth point of callus differentiation



图4 在小苗培养基上生长的分化再生植株

Fig. 4 Differentiation plant on seedling medium

3 讨论

3.1 低剂量 N^+ 注入增加花药愈伤诱导率

低剂量范围($1.0 \times 10^{15} \sim 2.0 \times 10^{15} N^+/cm^2$)的 N^+ 注入能明显提高同源四倍体水稻材料的愈伤诱导率. 我们分析其可能原因是低剂量离子注入对生物体的刺激效应所导致, 根据前人的结果, 离子注入可使活体组织的膜透性增强, 新陈代谢加快, 促进组织生长^[5]. 在实验里表现为低剂量离子注入使花药的愈伤诱导率增加.

在注入剂量增加到较高范围($3.0 \times 10^{15} \sim 4.0 \times 10^{15} N^+/cm^2$)时, N^+ 注入会使愈伤诱导率有所下降. 这可能是因为离子注入对花药的损伤作用所致, DMSO 随注入剂量增加真空失水保护效应的变化可能是关键因素. 注入剂量较高时, 离子注入会在样品表面刻蚀形成许多孔洞, 这些孔洞会加剧水分的散失, DMSO 的保护已基本失去作用. 此时在愈伤诱导率上的表现为骤降.

3.2 N^+ 注入提高愈伤质量、加快愈伤生长

N^+ 注入能明显改善愈伤组织的质量, 抑制褐化衰老的过程, 并且能提高愈伤的产愈量和绿苗分化率. 就以上现象的可能机理分析如下: 众所周知, 离子注入能增加生物体内自由基的含量^[6], 为了使体内自由基的含量保持在一个比较稳定的状态, 以免受自由基的伤害. 自由基的增加会刺激胚芽内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)的活性增强, 相应一些非酶类自由基清除物质如谷胱甘肽的含量也有所增加, 在注入剂量还不能使生物体受到严重的或致死突变时, 离子注入就会促进愈伤的生长, 也相应会提高愈伤的绿苗分化率.

参考文献:

- [1] Yu ZengLiang. Ion Beam Application in Genetic Modification [J]. *IEEE Transaction on Plasma Science*, 2000, 28(1):128~132.
- [2] 余增亮. 离子束生物技术引论 [M]. 合肥:安徽科学技术出版社, 1998.
- [3] 秦瑞珍, 宋文乡, 郭秀平. 同源四倍体水稻花药培养在育种中的应用 [J]. *中国农业科学*, 1992, 2(1):6~10.
- [4] 朱至清, 王敬驹, 孙敬三. 通过氮源比较实验建立一种较好的水稻花药培养基 [J]. *中国科学*, 1975, 5:484~490.
- [5] 李玉峰, 梁运章, 吕剑刚. 低能 N^+ 注入对紫花苜蓿生理生化的影响 [J]. *内蒙古大学学报(自然科学版)*, 2003, 34(2):192~196.
- [6] 邢春林, 齐藤真弘, 余增亮. DNA 双链断裂的组成与自由基清除效能的关系 [J]. *物理化学学报*, 2000, 16(2):184~187.

(责任编辑 李国栋)

Effect of N^+ Implantation on Autotetraploid Rice Anther Tissue Culture

LI Yu-feng^{1,2}, LIANG Yun-zhang^{1,2}, HUANG Qun-ce³

(1. Inner Mongolia Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Hohhot 010021, China;

2. College of Sciences and Technology, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China;

3. Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: The effect of N^+ implantation on autotetraploid rice anther tissue culture is studied with 3 materials. As a result, N^+ implantation of low dosage ($1.0 \times 10^{15} \sim 2.0 \times 10^{15} N^+/cm^2$) can heighten callus-induced rate. The reason is that the effect of low dosage N^+ implantation can stimulate membrane permeability and metabolism of anther tissue culture. Callus quality is distinctly improved, and browned process and caducity of callus are slowed down, and the callus productivity and green seedling differentiation rate are improved after N^+ implantation. This phenomenon is analyzed from the viewpoint of biochemistry.

Key words: autotetraploid rice; anther; N^+ implantation; tissue culture