

低能氮离子注入对同源四倍体水稻双胚苗特性的影响

黄群策, 贾宏汝, 赵帅鹏

(郑州大学 河南省离子束生物工程重点实验室, 河南 郑州 450052)

摘要: 利用低能离子注入技术对同源四倍体水稻进行注入处理, 在其后代群体内筛选到具有双胚苗特征的突变单株。在突变单株的纯化过程中对其多胚苗性状的表现进行了观察鉴定。随后, 在突变体后代的主要农艺性状趋于稳定时对两个株系在不同温度条件下的多胚苗频率进行了鉴定。结果表明, 利用离子注入技术可以对同源四倍体水稻进行有效地改良, 由此可以获得具有遗传变异特点的新种质, 其双胚苗特性随着自交世代的推进而得到保持。同源四倍体双胚苗材料在其性状表达特征、性状表达频率和性状表达条件等方面均显现出一定的特异性。在试验材料的群体内多胚苗发生频率因材料种类不同或发芽温度不同而表现出一定的差异性。种子经过去颖壳处理后可以使其双苗频率提高 32.4 %~36.0 %。在同源四倍体双胚苗材料中, 其苗位特征表现出明显的多样性。

关键词: 同源四倍体; 双胚苗水稻; 形态特征; 性状稳定性

中图分类号: S511 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2007)11-0034-04

Characteristic Stability of Autotetraploid Twin-embryo Seedling Rice after Low-energy N^+ Ion Beam Implantation

HUANG Qun-ce, JIA Hong-ru, ZHAO Shuai-peng

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

Abstract : The off-springs of autotetraploid rice were treated by low-energy N^+ ion beam, then the mutant seedlings with twin-embryo character was elected. When the main agronomic characters of the twin-embryo seedling plants trends to be stable, two lines were selected to study the frequencies of twin-embryo seedlings in different temperatures. The results showed that autotetraploid rice might be effectively improved by ion beam bio-technique, from which the new germ-plasm with heritable twin-embryo seedling could be selected. The twin-embryo seedling plants showed obviously the specificity in the expressing feature, frequency and condition of goal traits. The frequencies of twin-embryo seedlings were various in different experimental material and different germinating temperatures. The frequency of twin-embryo seedlings could be increased by 32.4%—36.0% by husking the seed hull. The morphological characteristics of twin-embryo seedling plants presented apparent multiplicity.

Key words: Autotetraploid; Twin-embryo seedling rice; Morphological characteristics; Stability of characters

收稿日期: 2007-04-06

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2001BA302B)

作者简介: 黄群策(1958-), 男, 广西全州人, 教授, 博士, 博士生导师, 河南省特聘教授, 主要从事水稻生殖生物学研究。

根据杂交水稻育种的战略设想^[1,2],在我国超级稻育种已经取得突破性进展并且在生产上也产生了巨大经济效益的大环境中,研究者目前有必要注重水稻遗传改良中仍然遗留下来的难点问题——固定水稻杂种优势效应和简化水稻杂种优势利用的技术程序。如何利用现代生物技术创造水稻新种质,进而从生殖生物学角度寻找具有特殊生殖发育特性的新材料或新的基因资源则是值得进一步探索的研究方向。20世纪80年代中期,在我国被发现和挖掘的重离子束生物技术,在创造生物体遗传性变异群体方面虽具有新颖性,但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。在具体的试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。经过20多年的研究和探索,重离子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试验结果所证实^[3]。本研究立足于以氮离子束为诱变源,对同源四倍体水稻进行遗传改良,由此获得了同源四倍体双胚苗水稻。在此基础上,对双胚苗的形态特征及其性状稳定性进行了研究,旨在更好地认识同源四倍体双胚苗水稻的外观特征,进而为更深入地开展多倍体水稻的生殖生物学研究积累新的资料。

1 材料和方法

1.1 离子注入及材料筛选

以同源四倍体水稻品系 99-01₍₄₎和相应的二倍体水稻品种 99-01₍₂₎为材料,前者是以后者为材料通过种芽诱导法所筛选到的性状稳定的同源四倍体水稻品系^[4]。

在试验中以能量为 25keV 的低能氮离子束为诱变源,离子注入剂量为 $4.0 \times 10^{16} \text{ N}^+/\text{cm}^2$,在真空靶室内对试验材料的种胚进行离子注入处理。在离子注入处理中所采用的仪器设备为中国科学院等离子体物理研究所自制的 LCD-1000 多功能离子注入机。在试验中首先将每份水稻种子去壳,将其插入并固定在盛有花泥的培养皿中。种子的胚部露在花泥的外面(即种胚朝上露出),以便能直接受到低能氮离子束的照射。在静真空度和工作真空度均为 10^{-6} Pa 的条件下进行离子辐照处理。随后,按照常规水稻的浸种催芽方法,在 30℃条件下进行浸种和催芽,再将已经成苗的材料寄栽到实验盆内。

当材料具有 5~6 片真叶时按照 $30 \text{ cm} \times 25 \text{ cm}$ 行株距将其移栽至大田让其在自然条件下生长发育。成熟期,分别筛选一些比较特殊的变异单株,在隔离条件下让其自交繁殖,按单株留种,由此形成第二代群体,对其变异性状的稳定性进行观察研究和进一步筛选。

1.2 多胚苗形态特征和表达频率的观察鉴定

从 M₃ 到 M₅ 以群体内的单株为单位对其多胚苗发生情况进行观察鉴定。在观察鉴定试验中,首先按照试验设计将各份试验材料的种子放入温度恒定在 30℃的清水中浸泡 2d。随后,将其放入铺有湿润滤纸的培养皿中催芽和培养,10d 后分别统计其群体内双胚苗、三胚苗和四胚苗的数目,由此计算多胚苗的发生频率。(多胚苗发生频率=双胚苗数/发芽总数 $\times 100\%$;三胚苗频率=三胚苗数/发芽总数 $\times 100\%$;四胚苗频率=四胚苗数/发芽总数 $\times 100\%$;多胚苗频率=双胚苗频率+三胚苗频率+四胚苗频率)。此外,在多胚苗中各种类型的相对频率采用另外的计算公式统计,即双胚苗频率=双胚苗数/多胚苗总数 $\times 100\%$;三胚苗频率=三胚苗数/多胚苗总数 $\times 100\%$;四胚苗频率=四胚苗数/多胚苗总数 $\times 100\%$ 。

对于同源四倍体水稻群体内所出现的双胚苗突变材料,按照单株筛选法对其进行 2 个世代的筛选和纯化,待其主要农艺性状稳定后按照试验设计对其双胚苗的形态特征及其性状稳定性进行了研究。以同源四倍体双胚苗株系 ASDOR05-01 和 ASDOR05-02、同源四倍体水稻 99-01₍₄₎和相应的二倍体水稻 99-01₍₂₎为研究材料。4 次重复,在每一重复中每份材料的 4000 粒种子分为留壳和去壳两种处理,在 25℃条件下浸种,在 30℃条件下催芽,对试验材料的特征特性进行观察鉴定,统计其双胚苗的发生频率。同时,对双胚苗的形态特征进行观察鉴定。

2 结果与分析

2.1 离子注入后代群体的筛选结果

经过低能氮离子束注入后,在试验材料的当代群体内出现了一些突变体,其突变体的类型和变异频率因材料种类不同和离子注入剂量不同而异^[5]。对于各种突变体材料按照不同材料类型单株收种。随后,在经过低能 N^+ 注入剂量为 $4.0 \times 10^{16} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 的处理中,在同源四倍体水稻 99-01₍₄₎的 M₂ 代群体内发现了 1 株具有多胚苗特征的突变株(命

名为“99—01₍₄₎—双”)。观察结果表明,该突变株所形成的两株苗为均势双苗,即形成的两株苗在生长势上大小相当,没有表现出强弱之分。以该双胚苗突变株的根尖为材料进行染色体鉴定的结果表明,这两株苗的细胞内所携带的染色体数目均为 48 条。通过将双胚苗植株中的两个单株分别进行标记后,获得了两个单株分别产生的 M₃ 群体。在 M₃ 群体内各个单株在主要农艺性状上仍然表现出明显的分离现象。发芽试验的统计结果表明,在 M₃ 群体内除了双胚苗之外,还出现了三胚苗和四胚苗,多胚苗频率为 2.26%。在全部多胚苗材料中,双胚苗、三胚苗和四胚苗出现的相对频率分别为 81.95%, 9.72% 和 8.33%。然而,在随后的世代中没有发现三胚苗材料和四胚苗材料。

以突变株所产生的低世代材料为基础对其双胚苗频率进行了观察鉴定。通过将双胚苗植株中的两个单株分别进行标记后,获得了由两个单株分别产生的 M₄ 群体。对 M₄ 群体的两个株系进一步的鉴定结果表明,在一个群体(定名为 A 群体)内双胚苗出现的频率为 2.35%,在另一个群体(定名为 B 群体)内双胚苗出现的频率为 2.16%,两者没有明显的差异。随后,在由两个群体产生的 M₄ 后代内分别随机地收取种子,对其双胚苗发生频率进行鉴定。

结果表明,在 A 群体内双胚苗出现的频率为 2.08%,在 B 群体内双胚苗出现的频率为 2.11%,两者也没有明显的差异。由此可见,在同源四倍体水稻 99—01₍₄₎中所筛选到的双胚苗单株,随着分离世代的不断推进和个体特征特性的不断分化其双胚苗特性表现出一定的可遗传性,但其双胚苗频率较低,这有待于进行深入研究。

2.2 稳定群体内双胚苗性状的特异性

在试验中以具有双胚苗特性的 A 群体和 B 群体为基础分别进行 2 个世代的株系选择,随后获得了农艺性状相对稳定的两个株系(ASDOR05—01 和 ASDOR05—02),再以这两个稳定株系为材料对其多胚苗发生频率进行鉴定。结果表明,作为对照的同源四倍体水稻 99—01₍₄₎和相应的二倍体水稻 99—01₍₂₎在 4 种温度条件下进行发芽试验,在群体内均没有发现多胚苗个体,这说明它们不具有多胚苗特性。在两份多胚苗株系中均出现了多胚苗个体,但在群体内多胚苗发生频率因材料种类不同而异,或发芽的温度条件不同会促使其频率表现出一定的差异(表 1)。从双苗性状发生频率的总体平均值来看,ASDOR05—01 的双苗频率(4.3%)要高于 ASDOR05—02 的双苗频率(1.3%)。在发芽温度为 30℃的条件下,ASDOR05—01 和 ASDOR05—02

表 1 在不同温度条件下试验材料的发芽率和双苗率 (%)

温度(℃)	ASDOR05—01		ASDOR05—02		99—01 ₍₄₎		99—01 ₍₂₎	
	发芽率	双苗率	发芽率	双苗率	发芽率	双苗率	发芽率	双苗率
20	82.6	2.5	80.5	0.5	86.5	0	76.5	0
25	84.0	4.5	85.0	0.5	89.0	0	80.0	0
30	86.0	6.8	88.5	2.5	90.5	0	82.0	0
35	83.5	3.3	87.1	1.6	87.5	0	83.0	0
平均值	84.0	4.3	85.3	1.3	88.4	0	80.4	0

注:表内试验数据为 4 次重复的平均数

的双苗频率均为最高值,分别为 6.8%和 2.5%。根据前人的研究结果,种子颖壳的有无对双苗频率和发芽率有一定的影响^[9]。在本试验中,试验材料在 25℃条件下浸种,在 30℃条件下进行催芽,对于试验材料颖壳的有无所导致的效应进行了研究。结果表明,对于所有的试验材料而言,种子去壳有利于提高其发芽率,发芽率提高的幅度大约为 3%左右。在两份对照材料[99—01₍₄₎和 99—01₍₂₎]中没有发现双胚苗个体,而在 ASDOR05—01 和 ASDOR05—02 群体内均出现了双胚苗个体。在 ASDOR05—01 群体内,种子去颖壳处理后使其双

苗频率提高至 9.0%,这比同样条件下种子不去颖壳的处理结果(6.8%)提高了 32.4%。在 ASDOR05—02 群体内,种子去颖壳处理后使其双苗频率提高至 3.4%,这比同样条件下种子不去颖壳的处理结果(2.5%)提高了 36.0%。由此可见,在水稻双胚苗频率的鉴定试验中种子颖壳的有无在一定程度上影响着其双胚苗性状的表达频率。

根据对双苗材料的苗位进行观察的结果表明,其双苗苗位存在着两种类型,即非完全双苗和完全双苗。在非完全双苗中主要有单胚轴单胚根双苗和单胚根异胚轴双苗两种类型。在完全双苗中有正常

双苗(即双苗的生长势比较均匀,没有明显的大小苗之分)和异常双苗(即双苗的生长势很不均匀,存在着明显的大小苗之分)。由此可见,在同源四倍体双胚苗材料中,其苗位特征表现出明显的多样性和差异性。

3 讨论

水稻遗传改良的难题之一就是在确保水稻产量潜力的前提下如何简化利用水稻杂种优势的技术程序,即固定水稻的杂种优势。前人的研究结果表明,固定水稻杂种优势的最好途径是有效地利用无融合生殖基因,进而建立挖掘水稻无融合生殖潜力的技术程序^[1]。从目前的研究现状来看,其他国家已经将选育具有无融合生殖特性的农作物品种作为又一次绿色革命的突破口而受到高度重视,正加紧在高粱、玉米、小麦、珍珠粟和水稻等农作物中开展无融合生殖的研究。我国水稻无融合生殖的研究主要集中在筛选和鉴定多胚苗水稻,对于多胚苗水稻的形态学、胚胎学和遗传学的研究已经获得了一些有价值的资料^[6-10]。然而,前人关于多胚苗水稻的研究主要在二倍体水平展开探索,而关于同源四倍体多胚苗水稻的研究目前尚未见报道。根据禾本科植物中无融合生殖物种的特异性,在多倍体水平寻找水稻无融合生殖种质成功的可能性比较大^[11]。本研究表明,通过离子束注入处理后在同源四倍体水稻群体内所获得的具有双胚苗特性的突变材料,在其自交后代株系内仍然按照一定的频率保持着双胚苗特性,其变异特征属于遗传性变异。随着自交世代的推进,在主要农艺性状趋于稳定的同时其双胚苗特性的表达频率发生了一定的变化。在高世代的两份多胚苗株系中均出现了双胚苗个体,但群体内双胚苗发生频率因材料种类不同或发芽温度条件不同而表现出一定的差异性。从双苗性状发生频率的总体平均值来看,ASDOR05-01的双苗频率(4.3%)要高于ASDOR05-02的双苗频率(1.3%)。在发芽温度为30℃的条件下,ASDOR05-01和ASDOR05-02的双苗频率均为最高,分别为6.8%和2.5%。在双胚苗频率的鉴定试验中种子颖壳的有无在一定程度上影响着其双胚苗性状的

表达频率。在ASDOR05-01群体内,种子去颖壳处理后使其双苗频率提高至9.0%,这比同样条件下种子不去颖壳的处理结果(6.8%)提高了32.4%。在ASDOR05-02群体内,种子去颖壳处理后使其双苗频率提高至3.4%,这比在同样条件下种子不去颖壳的处理结果(2.5%)提高了36.0%。在同源四倍体双胚苗材料中,其苗位特征表现出明显的多样性。由此可见,利用离子注入技术对同源四倍体水稻进行改良则可以获得一些具有遗传性变异特点的新种质,同源四倍体双胚苗材料在其性状表达特征、性状表达频率和性状表达的条件等方面均显现出一定的特异性。然而,关于ASDOR05-01和ASDOR05-02的特征特性还有许多问题值得进一步研究。

参考文献:

- [1] 袁隆平. 杂交水稻的育种战略设想[J]. 杂交水稻, 1987, 2(1): 1-3.
- [2] 袁隆平. 杂交水稻超高产育种[J]. 杂交水稻, 2001, 16(1): 1-3.
- [3] 黄群策, 李玉峰. 离子束生物技术在水稻育种中的应用前景[J]. 杂交水稻, 2002, 17(5): 53-56.
- [4] 黄群策, 孙敬三, 朱生伟. 种芽诱导获得同源四倍体水稻的技术[J]. 中国农学通报, 1997, 3(6): 21-23.
- [5] 黄群策, 代西梅. 低能氮离子对不同倍性水稻的诱变效应[J]. 杂交水稻, 2004, 19(3): 57-61.
- [6] 郭学兴. 中国水稻无融合生殖研究进展[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1991.
- [7] 黄群策. 被子植物的无融合生殖[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 2000.
- [8] 刘向东, 卢永根, 徐雪宾, 等. 多胚水稻品系APIV胚囊的结构及其遗传多样性研究[J]. 植物学报, 1996, 38(8): 594-598.
- [9] 罗万勋, 周开达. 水稻双胚苗(Rice Twins)遗传研究[J]. 四川农业大学学报, 1992, 10(3): 453-459.
- [10] 黄群策, 孙敬三. 多胚苗水稻APIV不同颖花的多卵和多胚苗频率研究[J]. 植物学通报, 1999, 16(3): 280-283.
- [11] 黄群策, 孙梅元, 邓启云. 多倍体水稻及其潜在价值[J]. 杂交水稻, 2001, 16(1): 1-3.