

· 基础理论 · Basic research

# 氮离子注入对同源四倍体水稻成熟胚组织培养体系的影响

李玉峰<sup>1,2</sup>, 黄群策<sup>2,3</sup>, 梁运章<sup>1</sup>

(1. 内蒙古大学 离子束生物工程自治区重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010021; 2. 湖南科技大学 生命科学院, 湖南 湘潭 411201; 3. 郑州大学 离子束生物工程省重点实验室, 河南 郑州 450052)

**摘 要:** 选择 3 份同源四倍体水稻为材料, 研究了氮离子注入对其成熟胚诱导愈伤组织和分化成苗的影响。结果显示, 低剂量范围 ( $1.0 \times 10^{16} \sim 2.0 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>) 的 N<sup>+</sup> 注入能明显提高愈伤组织诱导率; 无论离子注入剂量大小, N<sup>+</sup> 注入能明显改善愈伤组织的发育状态, 抑制其褐化衰老的进程, 提高愈伤组织的绿苗分化率。

**关键词:** 同源四倍体水稻; N<sup>+</sup> 注入; 成熟胚组织培养; 愈伤组织诱导率; 绿苗分化率

**中图分类号:** Q689; S511.035.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-3956(2006)04-0061-03

自美国 White 在烟草愈伤组织培养中得到再生植株后, 植物组织培养技术蓬勃发展起来<sup>[1]</sup>。无论是愈伤组织培养还是细胞培养, 培养细胞均处在不断分生状态, 容易受培养条件和外界压力(如射线、化学物质等)的影响而产生诱变, 从中可以筛选出对人们有用的突变体, 从而育成新品种。目前, 用这种方法已筛选到抗病、抗盐、高赖氨酸、高蛋白、矮秆高产的突变体, 有些已用于生产<sup>[2-3]</sup>。

低能离子(30 ~ 180 keV)注入生物体诱变育种技术是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, 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<sup>[4-5]</sup>。但此技术应用于诱变育种, 注入对象都是作物种子, 然后进行传统育种方式操作, 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技术, 那样既可丰富离子束生物工程学的内容, 也可为诱变育种提供一种新方法。

本文通过对四倍体水稻成熟胚进行氮离子注入处理, 探讨了离子注入对四倍体水稻成熟胚组织培养体系影响的规律, 从而为以后的应用研究做好理论铺垫和方法准备。

## 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<sub>IV</sub> 四倍体, 以下分别用 IR36(4)、紫血稻(4)、AP<sub>IV</sub>(4)表

示。各种生化试剂来自上海 sangon 公司。

### 1.2 方 法

**1.2.1 N<sup>+</sup> 注入处理** 取当年收的新鲜水稻种子, 去壳, 软化处理, 切下胚部, 均匀排列于无菌培养皿中, 在超净台上无菌吹干后, 接受能量为 25 keV 的不同剂量 N<sup>+</sup> 的脉冲式(脉冲间隔 60 s)注入处理。注入剂量范围为  $1.0 \times 10^{16} \sim 4.0 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>, 每处理组间隔  $1.0 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>。对照组种子同样放到靶室中, 但不接受离子注入处理。

**1.2.2 实验所用培养基** 成熟胚愈伤组织诱导和继代培养基为 N6<sup>[6]</sup> 基本培养基, 加水解乳蛋白 400 mg/L、肌醇 100 mg/L、蔗糖 30 g/L、琼脂 8 g/L、2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-D) 2 mg/L、激动素(KT) 0.5 mg/L、 $\alpha$ -萘乙酸(NAA) 0.2 mg/L、6-苄氨基嘌呤(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, 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、ZT 0.2 mg/L。小苗培养基为 1/2MS 基本培养基, 加 NAA 0.2 mg/L。以上各培养基的 pH 值 5.8, 高温(121.13℃)灭菌 20 min。

**1.2.3 成熟胚组织培养** 将离子注入的各处理组和对照组成熟胚随机取 200 个, 用体积分数为 70%

收稿日期: 2005-10-08

基金项目: 国家自然科学基金(10065001); 湖南科技大学博士基金(E54141); 湖南省教育厅基金资助项目

作者简介: 李玉峰(1974-), 男(蒙古族), 内蒙古科尔沁右中旗人, 讲师, 博士。电话: 13314871874; E-mail: liyufeng00@yahoo.com.cn; liyufeng00@tom.com。

的乙醇表面消毒 30 s 后,用质量分数为 20% 的次氯酸钠溶液处理 30 min,然后用无菌水冲洗至少 3 次。超净台中用无菌手术刀切下胚部,接种在愈伤组织诱导培养基上。每 14 d 继代 1 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 14~28 d,移栽入大田。

1.2.4 数据统计 成熟胚愈伤组织诱导率 = 愈伤组织块数/接种成熟胚数 × 100%; 成熟胚绿苗分化率 = 分化绿苗愈伤组织块数/转接愈伤组织块数 × 100%; 愈伤组织增重倍数 = (某次继代时愈伤组织重量 - 上一次继代时愈伤组织重量)/上一次继代时愈伤组织重量。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同剂量 N<sup>+</sup> 注入对愈伤组织生长状况的影响

愈伤组织生长状况的好坏直接影响愈伤组织分化再生情况。笔者用一定时间内愈伤组织增重倍数来定量衡量愈伤组织生长的快慢。从实验结果可知,不同 N<sup>+</sup> 注入能使成熟胚诱导的愈伤组织增重加快(表 1)。在同一继代时,注入剂量范围为  $1.0 \times 10^{16} \sim 4.0 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup> 的各 N<sup>+</sup> 注入处理组都比对照组的愈伤组织增重倍数明显提高,说明 N<sup>+</sup> 注入能明显加快愈伤组织的生长速度。并且在不同的注入剂量范围,愈伤组织增重倍数增加的趋势有所不同。N<sup>+</sup> 注入剂量范围为  $1.0 \times 10^{16} \sim 2.0 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup> 时,愈伤组织增重倍数随注入剂量的增加而增大,N<sup>+</sup> 注入剂量范围为  $2.0 \times 10^{16} \sim 4.0 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup> 时,愈伤组织增重倍数随注入剂量的增加而减少。另外,随继代次数的增加,对照组和处理组的愈伤组织增重倍数都有所下降,但 N<sup>+</sup> 注入处理组的愈伤组织增重倍数比对照组增加的幅度反而有提高的趋势。例如,就 IR36(4)N<sup>+</sup> 注入剂量为  $1.0 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup> 的处理组而言,第 2 次继代测量的愈伤组织增重倍数(B<sub>1</sub>)比对照组增加 0.21;第 3 次继代测量的愈伤组织增重倍数(B<sub>2</sub>)比对照组增加 0.42;第 4 次继代测量的愈伤组织增重倍数(B<sub>3</sub>)比对照组增加 0.44。

N<sup>+</sup> 注入同源四倍体水稻成熟胚后,除了使其诱导出的愈伤组织的生长速度加快外,还能提高愈伤组织的质量。形态观察表明,3 个水稻材料的愈伤组织在继代初期无明显差异,均为淡黄色团块。经 3 次继代后,N<sup>+</sup> 注入处理组和对照组之间表现出明显差异,对照组 3 个水稻材料的愈伤组织出现质地疏松、粒状非胚性愈伤组织特征,而且颜色逐渐变

表 1 不同剂量 N<sup>+</sup> 注入同源四倍体水稻成熟胚愈伤组织增重倍数

Table 1. Callus increased ratio in weight of mature embryo of autotetraploid rice via N<sup>+</sup> implantation of various dosages.

水稻材料 Rice material	调查时间* Testing time	N <sup>+</sup> 注入剂量/(10 <sup>16</sup> ions·cm <sup>-2</sup> ) N <sup>+</sup> dosage				
		0	1	2	3	4
IR36(4)	B <sub>1</sub>	2.50	2.71	3.15	3.06	2.87
	B <sub>2</sub>	2.44	2.86	3.43	3.27	3.05
	B <sub>3</sub>	2.04	2.48	2.49	2.38	2.12
紫血稻(4) Zixuedao(4)	B <sub>1</sub>	2.13	2.47	2.56	2.42	2.33
	B <sub>2</sub>	1.95	2.34	2.44	2.39	2.00
	B <sub>3</sub>	1.67	2.18	2.32	2.21	1.90
AP <sub>IV</sub> (4)	B <sub>1</sub>	2.30	2.74	3.05	2.8	2.60
	B <sub>2</sub>	2.21	2.78	2.96	2.73	2.64
	B <sub>3</sub>	1.86	2.45	2.67	2.41	2.30

\*: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> 分别表示第 2, 3, 4 次继代时调查。\*: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub> represent testing at the 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> subculture, respectively.

表 2 不同剂量 N<sup>+</sup> 注入同源四倍体水稻成熟胚的愈伤诱导率和绿苗分化率

Table 2. Callus-induced rate and differentiation rate of mature embryo of autotetraploid rice via N<sup>+</sup> implantation of various dosages.

N <sup>+</sup> 注入剂量 (10 <sup>16</sup> ions·cm <sup>-2</sup> ) N <sup>+</sup> dosage	愈伤组织诱导率/% Callus-induced rate			绿苗分化率/% Differentiation rate		
	IR36(4)	紫血稻(4) Zixuedao(4)	AP <sub>IV</sub> (4)	IR36(4)	紫血稻(4) Zixuedao(4)	AP <sub>IV</sub> (4)
0	85.5	81.9	81.7	24.5	14.1	23.7
1	86.7	83.6	84.1	25.7	16.2	24.6
2	88.6	86.3	84.9	28.3	19.3	27.2
3	84.3	81.2	81.3	27.4	17.2	25.3
4	80.2	79.1	79.2	27.2	15.1	24.8

暗,进而褐化;N<sup>+</sup> 注入处理组 3 个水稻材料的愈伤组织仍然保持鲜黄,组织紧密,呈瘤状的胚性愈伤组织特征。经 4 次继代培养后,3 个水稻材料的对照组愈伤组织均不同程度地出现严重褐化现象,N<sup>+</sup> 注入各处理组 3 个水稻材料的愈伤组织才出现轻微褐化现象。

## 2.2 不同剂量 N<sup>+</sup> 注入对成熟胚诱导愈伤组织和分化成苗的影响

不同剂量 N<sup>+</sup> 注入对成熟胚的愈伤组织诱导率有明显的影响(表 2)。N<sup>+</sup> 注入剂量范围为  $1.0 \times 10^{16} \sim 2.0 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup> 时,离子注入处理组成熟胚愈伤组织诱导率比对照显著提高;N<sup>+</sup> 注入剂量范围为  $3.0 \times 10^{16} \sim 4.0 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup> 时,离子注入处理组的愈伤组织诱导率比对照略低,其原因可能是离子注入对成熟胚的损伤效应使一部分成熟胚致死而影响了愈伤组织诱导率。在不同的注入剂量范围,愈伤组织诱导率变化的趋势有所不同。N<sup>+</sup> 注入剂量范围为  $1.0 \times 10^{16} \sim 2.0 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup> 时,3 个品种成熟胚的愈伤组织诱导率随注入剂量的增加而增大,N<sup>+</sup> 注入剂量范围为  $2.0 \times 10^{16} \sim 4.0 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup> 时,愈伤组织诱导率随注入剂量的增加而减少(表 2)。说明适当剂量的 N<sup>+</sup> 注入能提高成熟胚愈伤组织诱导率。

N<sup>+</sup> 注入能明显提高愈伤组织绿苗分化率。本实验中无论离子注入剂量大小,3 个四倍体水稻材料各处理组愈伤的绿苗分化率都比对照高,其中紫血稻(4)N<sup>+</sup> 注入剂量为  $2.0 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup> 的处理组比对照增加幅度最大,增加 5.2 个百分点(表 2)。

## 3 讨论

### 3.1 低剂量 N<sup>+</sup> 注入增加愈伤组织诱导率

低剂量范围( $1.0 \times 10^{16} \sim 2.0 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>)的 N<sup>+</sup> 注入能明显提高同源四倍体水稻材料的愈伤组织诱导率。分析其原因,可能是低剂量离子注入对生物体的刺激效应所导致,注入剂量为  $1.0 \times 10^{16} \sim 2.0 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup> 的 N<sup>+</sup> 注入可使成熟胚的膜透性增加,新陈代谢加快,胚芽的淀粉酶活性增强<sup>[7]</sup>,刺

激胚发育,使成熟胚的发芽率提高,从而使成熟胚的愈伤组织诱导率增加。在注入剂量增加到较高剂量范围( $3.0 \times 10^{16} \sim 4.0 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>)时,N<sup>+</sup> 注入会使愈伤组织诱导率下降。

### 3.2 N<sup>+</sup> 注入提高愈伤组织质量,加快其生长

N<sup>+</sup> 注入能明显改善由成熟胚诱导的愈伤组织的质量,明显抑制褐化衰老的进程,并且能提高愈伤组织的产愈量和绿苗分化率。这可能是由于剂量范围( $1.0 \times 10^{16} \sim 4.0 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>)的 N<sup>+</sup> 注入还不能使成熟胚受到严重的或致死突变,仅仅适量增加了成熟胚内自由基的含量,适量自由基的增加会刺激成熟胚愈伤组织内超氧化物歧化酶(SOD)活性和过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)的活性相应增加,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,从而愈伤组织的质量得以改善,衰老的进程得以抑制,愈伤组织的生长得以促进,绿苗分化率得以提高。

## 参考文献:

- [1] 梁一池,杨华.植物组织培养技术的研究进展[J].福建林学院学报,2002,22(1):1-3.
- [2] 王文静,袁道强,高松洁.植物组织培养的应用现状[J].河南师范大学学报(自然科学版),2000,28(3):137-139.
- [3] 黄群策.我国水稻细胞工程的研究进展[J].科技导报,1996,(12):16-19.
- [4] Yu Zengliang. Ion beam application in genetic modification[J]. IEEE Transaction on Plasma Science, 2000,28(1):128-132.
- [5] 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.
- [6] 张玲,谢崇华,李卫峰.水稻成熟胚组织培养研究[J].杂交水稻,2002,17(2):44-46.
- [7] 李玉峰,黄群策.N<sup>+</sup> 离子注入对同源四倍体水稻种子萌发的影响[J].杂交水稻,2006,21(1):65-67.

## Effect of N<sup>+</sup> Implantation on Tissue Culture of Mature Embryo of Autotetraploid Rice

LI Yu-feng<sup>1,2</sup>, HUANG Qun-ce<sup>2,3</sup>, LIANG Yun-zhang<sup>1</sup>

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

2. Department of Life Sciences, Hunan Science and Technology University, Xiangtan, Hunan 411201, China;

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

**Abstract:** The effect of N<sup>+</sup> implantation on the callus induction and plantlet differentiation was studied with three autotetraploid rice lines as the materials. The results showed that low dosages ( $1.0 \times 10^{16} \sim 2.0 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>) of N<sup>+</sup> implantation increased the callus-induced rate; all of the tested dosages of N<sup>+</sup> implantation improved the growth and quality, delayed the browning and aging and increased the plantlet differentiation rate of callus.

**Key words:** autotetraploid rice; N<sup>+</sup> implantation; tissue culture of mature embryo; callus-induced rate; plantlet differentiation rate