

文章编号: 1007-4627(2007)02-0124-05

离子束诱变水稻多胚苗突变株的筛选及其多胚来源*

代西梅, 黄群策, 胡秀明, 秦广雍

(郑州大学离子束生物工程省重点实验室, 河南 郑州 450052)

摘要: 以低能氮离子束为诱变源, 通过对同源四倍体水稻品系“IR36-4X”进行离子注入后在其第 2 代群体内筛选得到了 1 株具有多胚苗性状特征的突变株(IR36-双), 对该突变株后代的多胚苗形态特征及其多胚来源进行了研究。结果表明, 多胚苗突变株系“IR36-双”在双胚苗性状的表现形态上有其特异性, 在同一纯合株系的群体内双胚苗的苗位有非完全双苗和完全双苗两种类型。非完全双苗包括单胚轴单胚根双苗和单胚根异胚轴双苗这两种类型; 完全双苗也可以进一步划分为正常双苗和异常双苗两种类型。在多胚苗材料中, 单胚根单胚轴双苗所占的比例相对较大。其多胚(额外胚)的来源主要有 4 种可能性, 即双套胚囊形成多胚、多卵卵器形成多胚、反足细胞团发育形成不定胚及胚乳细胞形成不定胚(胚乳细胞胚状体)。由此可见, “IR36-双”植株表现双胚苗性状有其胚胎学根源。

关键词: 离子注入; 同源四倍体水稻; 多胚苗突变体

中图分类号: Q691 **文献标识码:** A

1 引言

水稻是世界上最重要的粮食作物之一, 在世界粮食生产与消费中占有极其重要的地位。水稻育种是提高水稻产量的有效途径。目前, 我国水稻育种面临着两大难题有待攻关, 即怎样通过有效的方法和途径在现有的产量水平上更有效地挖掘水稻的杂种优势效应和固定水稻的杂种优势效应。固定杂种优势的途径可能有多种, 其中以培育无融合生殖系最有前途^[1]。而通过筛选多胚苗来寻找无融合生殖材料是一种较为有效的途径。20 世纪 80 年代中期发展起来的离子束生物技术具有独特的技术原理和简单的操作程序, 在作物育种中其实用性已经被越来越多的研究结果所证实, 也引起了越来越多研究者的关注和重视^[2]。离子束作为新的诱变源具有质量、能量和电荷三位一体的功效, 在损伤比较轻的诱变状态中, 可以获得比较高的诱变率和比较宽的诱变谱^[3]。有研究表明, 同源四倍体水稻比二倍体水稻对低能氮离子束注入处理更敏感^[4]。本文利用低能氮离子束注入同源四倍体水稻, 在其 M_2 代植

株中发现 1 株具有多胚苗特性的突变株, 对其多胚苗形态特征和多胚起源的细胞学机制做了研究。

2 材料与方法

2.1 实验材料

IR36 同源四倍体水稻(IR36-4X): 由本实验室利用秋水仙碱处理 IR36-2X, 使其染色体成功加倍且稳定的同源四倍体水稻体系。

2001—2003 年离子注入后的种子和对照种子(未注入)及其后代在温箱中催芽, 然后单株播种于合肥中国科学院等离子体物理研究所的水稻实验田。2004—2005 年将实验材料种植于河南新乡市农业科学研究院水稻研究所的实验田, 采用常规管理。

2.2 实验方法

2.2.1 低能 N^+ 注入

将水稻种子去壳后胚朝上置于铺有花泥的培养皿中, 采用间隔为 50 s 的脉冲注入, 在靶室中经能量 25 keV 的不同剂量 N^+ 注入, 注入剂量范围是

* 收稿日期: 2007-01-11

* 基金项目: 国家“十五”科技攻关资助项目(2001BA302B)

作者简介: 代西梅(1974-), 女(汉族), 河南郑州人, 讲师, 博士, 从事植物遗传育种方面的研究;

E-mail: daiximei@yahoo.com.cn

2.0×10^{16} — 10.0×10^{16} ions/cm², 每个处理组间隔 2.0×10^{16} ions/cm²。对照组同样放置在靶室中, 但不经离子注入。离子注入实验 2001 年在中国科学院等离子体物理研究所进行。

2.2.2 多胚苗突变株多胚来源的观察

用核荧光染色和子房整体透明技术对水稻双受精过程和胚胎发育过程进行观察。具体方法是, 分别取开花后 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 和 12 h 以及 1, 2, 3, 5 和 7 d 的颖花用 FAA 固定液固定, 并保存于 FAA 固定液中。每个时期约取颖花 50 个。观察前用 70% 的酒精冲洗一下, 然后在解剖镜下分离出子房, 保存于 70% 酒精中备用。染色前, 各个时期的水稻子房经 50%, 30% 和 15% 乙醇直至蒸馏水进行复水处理, 每次 20 min。用 pH 8.2 磷酸盐缓冲液预处理 2 h, 然后用 0.005% 水溶性苯胺蓝溶液染色 2 h。蒸馏水冲洗 2—3 次, 再用 1 μg/ml 的 DAPI 溶液染色 12 h。用蒸馏水冲洗 2—3 次, 乙醇梯度(15%, 30%, 50%, 70%, 85% 和 95%)脱水, 每级 20 min, 随后将子房放入无水乙醇中脱水两次, 每次脱水时间为 2 h, 接着, 再转入无水乙醇中过夜。第 2 天将已经脱水的材料在无水乙醇和水杨酸甲酯组成的混合液(1:1)中过渡 1 h, 然后再用水杨酸甲酯透明处理 3 次。在前两次透明处理时, 每次 2 h, 最后一次处理的时间为 15 h。试验材料经过水杨酸甲酯透明处理后可以在水杨酸甲酯中保存备用。观察前, 用镊子轻轻将处理好的子房夹出, 置于凹玻片上, 用丁香油封片(注意加盖玻片时不要挤压, 防止子房变形或破裂)。将制备好的载玻片倒置于 Leica SP2 激光共聚焦扫描显微镜上, 用 488 nm 波长的激光激发, 扫描获得双受精及胚胎发育过程的各个时期的清晰图片, 并用 Leica 相关软件对系列扫描图片进行 3 D 重建。对于受精后子房较大的材料, 可直接放在和激光扫描共聚焦显微镜相配套的小培养皿中, 用同样的方法进行激光扫描共聚焦显微镜观察。

3 结果与分析

3.1 多胚苗突变株的筛选及其株系的建立

IR36-4X 经各种剂量的低能 N⁺ 注入处理后, 成苗率除在剂量为 2.0×10^{16} ions/cm² 时稍有增加外, 经其它剂量 N⁺ 注入处理后, 成苗率均比对照组有所下降, 其中以剂量为 10.0×10^{16} ions/cm² 成

苗率最低, 仅有 20% 左右。在当代没有发现明显的变异现象。收取所有的 M₁ 代种子, 并于第 2 年(2002 年)种植 M₂ 代。

在剂量为 4.0×10^{16} ions/cm² 的低能 N⁺ 注入处理 IR36-4X 的 M₂ 代植株中, 发现了一株多胚苗突变株(命名为“IR36-双”), 即在 1 粒水稻种子中萌发出了两个稻苗。该突变株形成的两个苗为均势双苗。即形成的两个苗在长势上大小相当, 没有强弱之分。该双胚苗突变株经根尖染色体鉴定, 两个单苗染色体数目均为 48 条(见图 1(a)), 比我们观察的二倍体水稻 IR36-2X 的染色体数目(见图 1(b))增加了 1 倍。保持了其原始亲本 IR36-4X 的染色体数目, 因此应为同源四倍体双胚苗水稻。值得特别提出的是, 我们在对其对照 IR36-4X 的观察过程中, 没有发现任何双胚苗或多胚苗植株。这说明我们筛选到的“IR36-双”双胚苗植株是经低能氮离子束处理后的突变植株。

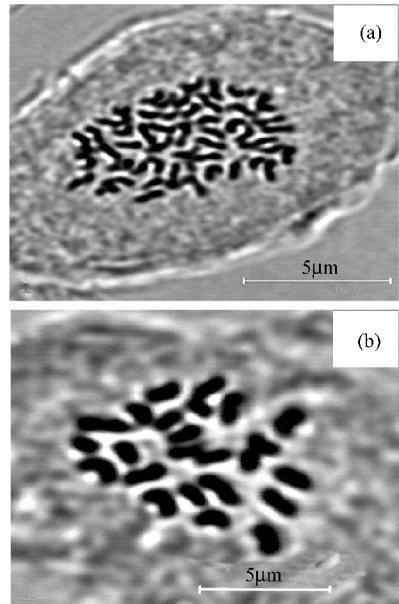


图 1 (a) “IR36-双”染色体; (b) IR36-2X 染色体

当年成熟后单株收获该双胚苗突变株, 共收取 576 粒种子。于第 3 年(2003)种成 M₃ 代株系, 并对该多胚苗突变株系的苗位进行了跟踪调查。

3.2 “IR36-双”双苗苗位的观察

邓鸿德等^[5]根据对多胚水稻胚位与苗位的观察研究, 将多胚水稻双苗分为非完全双苗和完全双苗两类。非完全双苗又可进一步分为单胚轴单胚根双苗、单胚轴异胚根双苗和单胚根异胚轴双苗; 完全双苗又可分为正常双苗和异常双苗(大小苗)。

根据对“IR36-双”双苗苗位的观察，发现其双苗苗位也有非完全双苗和完全双苗两种情况。非完

全双苗中主要有单胚轴单胚根双苗(见图 2(a))和单胚根异胚轴双苗(见图2(b),(c),(d))两种；完

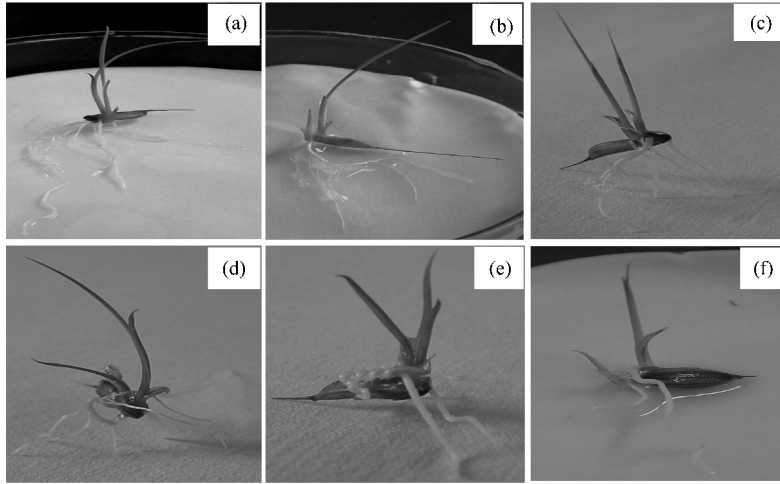


图 2 (a) 单胚轴单胚根双苗；(b)—(d)单胚根异胚轴双苗；(e) 正常双苗；(f)异常双苗

全双苗中有正常双苗(见图 2(e))和异常双苗(大小苗)(见图 2(f))。在“IR36-双”双苗中，单胚根单胚轴双苗所占比例相对较大。

3.3 “IR36-双”多胚苗中多胚的可能来源

根据对“IR36-双”双受精过程和胚胎的发育过

程的观察，认为“IR36-双”多胚苗的多胚主要有以下几个来源。第一，卵器中的卵细胞与类卵细胞分别受精形成多胚。在“IR36-双”成熟胚囊中以及开花后的胚囊中都存在一定频率的多卵卵器，多卵卵器中的卵细胞和类卵细胞可以分别受精而形成多

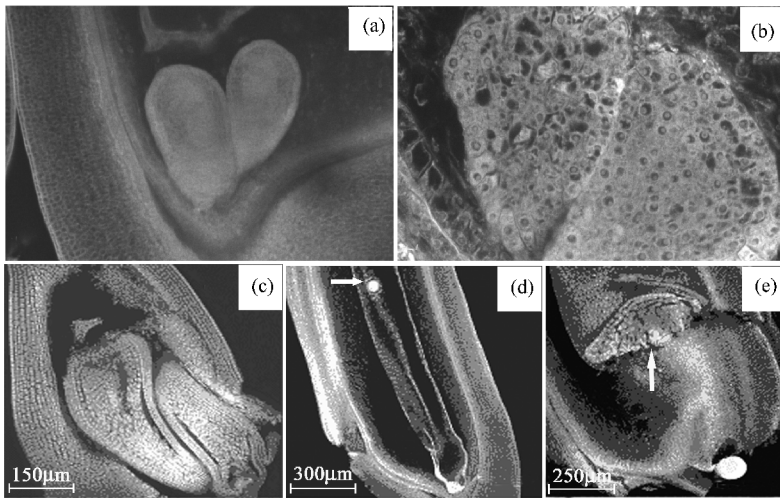


图 3 “IR36-双”双胚的来源

(a), (b) 在胚囊的珠孔端有两个大小均等的胚，可能是两个卵细胞分别受精形成的；(c) 双套胚囊；(d) 在开花后 3 d 的胚囊内，反足细胞团发育成类似于合子胚状的球型胚(如箭头所示)；(e) 在开花后 5 d 的胚囊内，胚乳细胞形成 1 个胚乳胚状体(如箭头所示)。

胚(见图 3(a), (b))。第二，来源于双套胚囊形成的假多胚。在对“IR36-双”成熟胚囊的观察过程中，发现有一定频率的双套胚囊的存在，双套胚囊中各有一套卵器，可以分别受精而发育成假多胚(见图 3(c))。第三，反足细胞发育形成多胚。在对“IR36-

双”胚胎发育过程的观察中发现，有一定频率的胚囊内的反足细胞在开花后 3 d 左右并不解体消失，反而逐渐发育成胚(见图 3(d))，这也可能是“IR36-双”形成多胚的来源之一。第四，胚乳细胞发育成胚乳胚状体。在对“IR36-双”胚胎发育过程的观察中

发现, 胚乳细胞可以发育成胚乳胚状体, 胚乳胚状体的发育进度比合子胚要快。胚乳胚状体已经开始分化, 而合子胚还处在球型胚阶段(见图 3(e))。

4 讨论

水稻育种的历史经验已经充分地说明, 育种新材料的发现、育种新方法的建立、育种新思路的提出都有可能使水稻育种水平得到明显提高。离子束生物工程是 20 世纪 80 年代在我国兴起的新的研究领域, 其原理是利用低能离子束注入生物体, 由于加速后的离子注入生物体后会产生质量沉积、能量沉积和电荷交换, 由此会导致生物材料产生一定的生物学效应。这为农作物的遗传改良开拓了新途径。因此离子束生物技术发展起来以后, 在农作物育种和遗传改良中得以广泛应用。关于利用低能离子束生物技术对二倍体水稻及四倍体水稻进行遗传改良的研究已有一些报道^[6-8]。本文通过利用低能 N^+ 对同源四倍体水稻 IR36-4X 进行注入处理, 在其 M_2 代筛选出了一株多胚苗突变株(“IR36-双”)。通过对“IR36-双”双受精过程及胚胎的发育过程的观察, 推测“IR36-双”多胚可能由以下几个来源: (1)来源于双套胚囊形成的假多胚; (2)多卵卵器中的卵细胞与类卵细胞分别受精形成多胚; (3)反足细胞发育形成不定胚; (4)胚乳细胞发育成胚乳胚状体。“IR36-双”多胚突变体的形成很可能是由于低能离子束的诱变作用引起控制雌配子体发育基因的突变引起的。雌配子体在植物生殖发育过程起着非常重要的作用, 它参与诱导花粉管的定向生长、双受精过程及胚和胚乳的发育过程等^[9]。植物基因组中包含大量雌配子体表达基因, 在雌配子体各个发育时期进行表达。任何一个基因的突变都会引起雌配子体发育的异常或败育。注入离子与生物体内靶分子、原子碰撞、级联碰撞和反冲, 不仅发生能量沉积过程, 而且发生质量沉积过程和电荷交换过程。大量研究证明, 离子在生物体内的能量沉积、质量沉积和电荷交换可以引起染色体的破坏和基因的突变^[10-13], 从而导致一系列遗传变异现象的发生。本项研究在一定程度上证实了离子注入技术在创造多倍体水稻新种质中的实用性, 这将为水稻无

融合生殖种质材料的寻找提供一条新途径。

致谢 郑州大学离子束生物工程重点实验室的霍裕平院士对本研究提供了大力支持, 深表感谢!

参考文献(References):

- [1] Yuan Longping. Hybrid Rice, 1987, **1**: 1(in Chinese). (袁隆平. 杂交水稻, 1987, **1**: 1.)
- [2] Yu Zengliang. Introduction to Ion Beam Biotechnology. Hefei: Anhui Science & Technology Publishing House, 1998, 1—3(in Chinese). (余增亮. 离子束生物技术引论. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1998, 1—3.)
- [3] Yu Zengliang, Yang Jianbo, Wu Yuejin, *et al.* Nucl Instr and Meth, 1993, **B80/81**: 1 328.
- [4] Huang Qunce, Liang Qiuxia, Li Yufeng, *et al.* Acta Laser Biology Sinica, 2003, **12**(5): 355(in Chinese). (黄群策, 梁秋霞, 李玉峰等. 激光生物学报, 2003, **12**(5): 355.)
- [5] Deng Hongde, Tan Zhijun, Huang Yi qiang. Acta Bot Boreal, 1992, **12**(1): 1(in Chinese). (邓鸿德, 谭志军, 黄逸强. 西北植物学报, 1992, **12**(1): 1.)
- [6] Wang Cailian, Shen Mei, Chen Qiufang, *et al.* Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 1995, **9**(1): 13(in Chinese). (王彩莲, 慎玫, 陈秋方等. 核农学报, 1995, **9**(1): 13.)
- [7] Qi Xifang, Zhao Chengzhang, Yang Changdeng. Journal of Anhui Agricultural Science, 1993, **21**(2): 102(in Chinese). (戚秀芳, 赵成章, 杨长登等. 安徽农业科学, 1993, **21**(2): 102.)
- [8] Huang Qunce, Dai Ximei. Hybrid Rice, 2004, **19**(3): 57(in Chinese). (黄群策, 代西梅. 杂交水稻, 2004, **19**(3): 57.)
- [9] Yadegari R, Drews G N. The Plant Cell, 2004, **16**: S133.
- [10] Yu Zengliang, He Jianjun, Dong Jianguo, *et al.* Anhui Agric Sci, 1989, **39**(1): 12—16(in Chinese). (余增亮, 何建军, 邓建国等. 安徽农业科学, 1989, **39**(1): 12—16.)
- [11] Yu Zengliang. IEEE Transactions on Plasma Science, 2000, **28**(1): 128.
- [12] Du Yanhua, Huang Shenghai, Tang Zheng, *et al.* Chin Sci Bull, 1999, **44**(8): 711.
- [13] Chen Yu, Jiang Bingyao, Chen Youshan, *et al.* Radiat Environ Biophys, 1998, **37**: 101.

Screen of Polyembryonic Mutant Rice Induced by Ion Beam Implantation and Initiation of Its Additional Embryo^{*}

DAI Xi-mei¹⁾, HUANG Qun-ce, HU Xiu-ming, QIN Guang-yong
(Henan Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bio-engineering,
Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: In the present study, the autotetraploid rice IR36-4X was treated with ion implantation technique by nitrogen ion beams and a polyembryonic seedling mutant (named as the IR36-Shuang) was identified in M_2 generation. The mutant line was systematically investigated about the location of seedling in polyembryonic seedling, and the cytological initiation of the additional embryo in the IR36-Shuang was observed and determined. The results are as follows: The location of seedling in the polyembryonic rice IR36-Shuang could be differentiated into 2 types: the uncomplete twin seedlings and the complete twin seedlings. There were 2 types in the uncomplete twin seedlings, i. e. the twin seedlings with single plumule axis and single radicle and the twin seedlings with single radicle and twin plumule axis. The complete twin seedlings also included 2 types, i. e. the normal twin seedlings and the abnormal twin seedlings. The double-embryo was observed during different embryo development stage of the IR36-Shuang. The additional embryo in the IR36-Shuang might arise from the double set of embryo sacs in single ovary, multi-egg-cell egg apparatus, antipodal cells or endosperm cells. The results revealed the practicability of ion beam implantation technique in creating new polyploidy idioplasm, which could provide a new approach for searching the material with apomixis.

Key words: ion beam implantation; autotetraploid rice; polyembryonic seedling mutant

* Received date: 11 Jan. 2007

* Foundation item: National Key Projects of China (2001BA302B)

1) E-mail: daiximei@yahoo.com.cn