

利用体细胞无性系变异筛选水稻光温敏核不育系 株 1S 矮秆突变体

刘选明¹ 杨远柱² 陈彩艳¹ 唐平徕² 刘斌¹ 符辰建²

(¹ 湖南大学 生物技术研究院, 湖南 长沙 410081; ² 湖南亚华种业科学研究院, 湖南 长沙 410001)

Breeding of Dwarfing Variants with the Technique of Somaclonal Variation for Photo-(Thermo-) Sensitive Genic Male Sterile Line Zhu 1S

LIU Xuan-ming¹, YANG Yuan-zhu², CHEN Cai-yan¹, TANG Ping-lai², LIU Bin¹, FU Chen-jian²

(¹ Institute of Biotechnology, Hunan University, Changsha 410081, China; ² Academy of Seed Industry of Hunan Yahua, Changsha 410001, China)

Abstract: Zhu 1S is an indica male sterile line with low critical temperature of fertility change, high ability of resistance, and good combining ability. For improving its unexpected plant height, somaclonal lines were established by culturing explants including young spikelets and mature embryos. Variants were obtained from somaclonal lines by subculturing these calli and treating them with chemical reagent. The variation percentage was above 40%. Somaclonal variant lines, SV5, SV10 and SV14, were got from variants above. They were dwarfing variants and could inherit stably. Dwarfing variant SV14 had obvious superiority in combining ability and rice yield, it might be spreaded widely in rice production.

Key words: rice; somaclonal lines; dwarf; mutant; male sterile line

摘要: 以幼穗和成熟胚为外植体经组织培养成功建立了体细胞无性系,结合愈伤组织多代培养和化学物质诱导,获得了高达40%以上的体细胞无性系变异,并从中选育出遗传稳定的株1S矮秆突变体SV5、SV10和SV14。鉴定结果表明矮秆突变体SV14是矮化了的光温敏核不育系,具有优良的光温敏不育特性,配合力强,杂种优势明显,较对照可以增产10%以上,具有较大的推广价值。

关键词: 水稻; 体细胞无性系; 矮秆; 突变体; 雄性不育系

中图分类号: Q943.1; S511.035

文献标识码:A

文章编号:1001-7216(2002)04-0321-05

在两系杂交稻育种中,所用不育系为光温敏型核不育系。其育性受光照和温度双重控制,尤其是受温度变化影响更明显。目前湖南推广的不育系品种的临界温度多为23.5℃以上。但在湖南由于夏季温度的不确定性,温度低于23.5℃的情况时有发生,从而引起自交结实,降低杂交种子纯度。

不育系“株1S”由湖南亚华种业科学研究院新近选育而成,其临界温度为22.6℃,具有配合力强、生育期短、丰产性好、米质优等特性,在湖南省广为推广^[1]。但因其株型偏高,约为80cm,制种授粉时需要人工辅助,杂种后代偏高易倒伏,给生产带来不便。众多研究证实体细胞无性系变异与诱变可以成功选育突变体^[2~5]。为此,本实验采用离体细胞组织培养筛选体细胞无性系突变体的方法,通过2年多的研究,成功获得了株1S矮化突变体,除提高了其配合力外,其他性状基本不变,从而大大提高了该不育系的推广价值。

1 材料与方法

1.1 材料

以不育系水稻株1S的幼穗和成熟胚为外植体进行组织培养,以体细胞无性系试管苗为材料进行突变体的大田筛选。实验材料均为课题组选育提供。

1.2 方法

1.2.1 体细胞无性系的建立与诱变

按以往的方法,在花粉母细胞开始形成期采取水稻的幼穗,在低温4℃下处理1~2d备用。成熟胚和幼穗经消毒灭菌,在无菌条件下切成小块或小段接种到培养基上进行愈伤组织诱导培养^[5~10]。然后结合诱变进行继代、增殖和分化培养。培养条件为:每天光照12h,光照强度为2000lx,培养室温度为

(28±2)℃。以MS为基本培养基。

1.2.2 试管苗移栽和矮秆突变体筛选

将生根后的试管苗于栽种前20d移出培养室,揭去试管盖,往试管中加入少量水,炼苗1周后移栽至大田。实验地选在亚华种业科学研究院的海南省陵水县基地和湖南省长沙市大托铺基地。实验采用分株系小区栽种,并根据目的性状进行考种和分析,人工筛选矮秆突变体。实验还将R₂代矮秆突变体分别与ZR02、912-3、R63-1、902、448等恢复系杂交制种,测定矮秆突变体不育系的配合力和F₁代的杂种优势。

2 结果与分析

2.1 体细胞无性系的建立和诱变

2.1.1 愈伤组织的诱导和增殖

将幼穗、胚外植体接种于D₄(2,4-D 4 mg/L)、D₂(2,4-D 2 mg/L)、D₂B_{0.2}(2,4-D 2 mg/L, 6-BA 0.2 mg/L)、D₂B_{0.5}(2,4-D 2 mg/L, 6-BA 0.5 mg/L)、D₁(2,4-D 1 mg/L)等培养基上培养诱导愈伤组织。30d后统计愈伤组织诱导率及观察愈伤组织生长状态,分析结果发现,以幼穗和胚为外植体,培养基D₂对愈伤组织诱导较为合适,且幼穗外植体用于建立水稻体细胞无性系较为理想。

以不同浓度的2,4-D和6-BA组合,观察继代愈伤组织的生长和分化,筛选愈伤组织的继代增殖培养基。结果表明,D₂B_{0.2}培养基可以保持水稻愈伤组织旺盛增殖能力和分化能力,适宜愈伤组织的继代培养。

继代时间对愈伤组织分化有显著影响。新诱导的愈伤组织分化率不高,经培养25d后分化能力最强,然后开始下降,培养至第5代即125d达最低,以后略有回升,至第9代,即230d左右丧失分化能力。

2.1.2 矮化突变体诱导与分化

将愈伤组织在D₂B_{0.2}培养基继代培养25d后,转移到含有高浓度的2,4-D和添加化学诱变剂的培养基上继续培养25d,再将其转入D₂B_{0.2}培养基培养。分别将继代25、50、75、……、225d后的愈伤组织转移到添加2 mg/L 6-BA的MS培养基进行分化培养获得试管苗,发现经处理的愈伤组织部分褐化甚至死亡,仍有生活力的愈伤组织分化的试管苗出现了明显的变异,变异率达到75.3%,其中高矮性状的变异率为41.7%。根据高矮性状对试管苗进行初步筛选,将其分为三类:一类为侏儒株,株高

约1~2cm,不随继代时间延长而长高;二类为正常株,株高无明显变异;三类为矮化株,株高介于侏儒株与正常株之间。分别将侏儒株、矮化株及正常株试管苗从茎基部切割后再生,再生苗仍呈现出一样的高矮变化趋势。

2.1.3 水稻试管苗的生根

经诱变获得的各批试管苗,在移栽至大田前30d用MS、IAA_{0.5}(IAA 0.5 mg/L)、NAA_{0.5}(NAA 0.5 mg/L)、IAA_{0.25}NAA_{0.25}(IAA 0.25 mg/L, NAA 0.25 mg/L)、IAA_{0.5}NAA_{0.5}(IAA 0.5 mg/L, NAA 0.5 mg/L)等几种培养基诱导生根,均能诱导生根,但以NAA_{0.25}IAA_{0.25}或IAA_{0.5}NAA_{0.5}培养基生根效果最好。选择有代表性的24个试管植株分株系移栽大田进行大田的进一步筛选鉴定。

2.2 矮秆突变体的筛选与鉴定

2.2.1 变异无性系R₂性状表现

移栽大田的24个试管植株系,抽穗时分株套袋繁种,当代单株采种14个。然后于海南陵水和湖南长沙基地分株行种植R₂代,抽穗时观察,发现株高及主要农艺性状整齐一致的株行有7个,占50%。对该7个株行的R₂代进行考种和育性检查,结果分别见表1、表2。

从表1可知,无性系变异株系按株高形态可分为三类:第一类比亲本株1S矮25cm左右,如SV5、SV10、SV14;第二类比亲本矮15cm左右,如SV1、SV2、SV6、SV7;第三类比亲本矮5cm左右,如SV3、SV13。其中,经平均数比较统计分析,无性系变异株系株高与亲本株1S的差异达极显著水平($t \geq 4.34 > t_{0.01} = 3.17$)。从茎节数比较,株1S有5个明显伸长节,而无性系变异株系的第5节间不明显,只有4个伸长节,且每个节均较亲本缩短。

无性系变异株系中有的类型完全稳定,单株间株高一致,但也有株高差异较大、性状分离明显的株系。研究发现变异株系的育性与株1S完全同步,起始温度比株1S略低(表2)。敏感期用20℃冷水灌溉处理10d,其育性即可得到恢复,可育期花药肥大,开花撒粉正常,一般自交结实率在35%以上。

2000~2001年在亚华种业科学研究院进行分期播种试验,在5~9月出现连续3d以上日平均气温低于23.5℃的时段及对应低温时段开始日后推10d至低温时段结束日后推20d内开花的花粉染色率、套袋自交结实率结果列于表3。表3表明,在夏季长日照条件下,遇连续9d以上日平均气温低于22.5℃天气,育性恢复;遇连续3d日平均气温均

表 1 体细胞无性系材料(R_2)的株高Table 1. Plant height of somaclones in R_2 generation.

品系 Line	统计项 Statistic item	株高 /cm Plant height /cm	节间长 Length of internode /cm					单株穗数 No. of panicles per plant	每穗颖花数 No. of spikelets per panicle
			I	II	III	IV	V		
株 1S	$\bar{x} \pm S$	72.5 ± 2.20	2.07 ± 0.85	15.9 ± 0.54	10.6 ± 1.72	4.5 ± 2.07	0.8 ± 0.40	8.0 ± 0.73	106.0 ± 3.27
Zhu 1S(CK)	变异系数 CV /%	3.5	4.1	3.4	16.3	46.3	47.5	9.2	3.1
	$\bar{x} \pm S$	68.5 ± 1.91	19.4 ± 0.54	12.3 ± 0.62	12.0 ± 0.41	6.7 ± 0.24		10.0 ± 0.71	103.5 ± 3.18
SV3	变异系数 CV /%	2.8	2.8	5.1	3.4	3.5		7.1	3.1
	$\bar{x} \pm S$	63.6 ± 1.75	18.9 ± 1.45	13.3 ± 1.05	9.8 ± 0.87	2.3 ± 0.12		8.5 ± 0.64	114.6 ± 2.86
SV6	变异系数 CV /%	2.6	7.7	7.9	8.9	5.2		7.5	2.5
	$\bar{x} \pm S$	60.3 ± 1.75	17.1 ± 1.37	11.6 ± 0.40	9.3 ± 0.62	5.5 ± 0.41		10.5 ± 0.81	89.7 ± 2.65
SV1	变异系数 CV /%	2.9	8.0	3.5	6.7	7.4		7.7	3.0
	$\bar{x} \pm S$	55.9 ± 1.48	16.0 ± 1.47	10.8 ± 0.62	6.5 ± 1.08	1.78 ± 0.21		9.5 ± 0.92	100.8 ± 3.28
SV2	变异系数 CV /%	2.7	9.2	5.8	16.6	11.6		9.7	3.3
	$\bar{x} \pm S$	49.3 ± 1.51	15.5 ± 2.68	9.33 ± 1.25	4.83 ± 0.47	1.33 ± 0.47		10.5 ± 0.83	83.8 ± 2.51
SV10	变异系数 CV /%	3.1	17.3	13.4	9.8	35.1		7.9	3.0
	$\bar{x} \pm S$	46.3 ± 1.42	15.5 ± 2.68	9.33 ± 1.25	4.83 ± 0.47	1.33 ± 0.47		10.5 ± 0.83	83.8 ± 2.51
SV14	变异系数 CV /%	3.1	10.5	10.2	7.6	0.36		8.8	3.4
	$\bar{x} \pm S$	43.5 ± 0.82	14.1 ± 0.86	8.0 ± 1.13	2.8 ± 0.50	0.6 ± 0.08		9.0 ± 0.75	87.8 ± 1.95
SV5	变异系数 CV /%	2.0	6.1	14.0	17.7	13.6		8.3	2.2

表 2 SV14 的育性表现

Table 2. Fertility performance of SV14.

年份 Year	不育系 Sterile line	不育起止期(月-日) Sterile period (Month-Day)		历期 Sterile duration/d	自交结实率 Selfing seed setting rate/%
		Sterile line	Sterile period (Month-Day)		
2000	SV14	06-29~09-17		94	35.5
	株 1S Zhu 1S(CK)	06-29~09-16		93	42.5
2001	SV14	06-19~10-03		106	45.6
	株 1S Zhu 1S(CK)	06-20~10-04		107	45.1

表 3 低温与育性表现对应分析

Table 3. Corresponding analysis between low temperature and fertility performance.

年份 Year	不育系 Sterile line	低温时段 Low temperature period (Month-Day)		低温天数 Low temperature time /d	日均温均值 Mean of daily average temperature /C	正常花粉率 Normal pollen percentage /%	自交结实率 Selfing seed setting rate /%
		Low temperature period (Month-Day)	Low temperature time /d				
2000	SV14	06-04~06-12	9	22.33	8.3	5.2	
		09-06~09-16	11	18.97	19.6	10.6	
	株 1S Zhu 1S(CK)	06-04~06-12	9	22.33	12.9	7.8	
		09-06~09-16	11	18.97	25.0	16.7	
2001	SV14	05-26~06-04	10	21.10	35.8	30.5	
		08-11~08-13	3	22.90	0.0	0.0	
	株 1S Zhu 1S(CK)	05-26~06-04	10	21.10	20.4	17.9	
		08-11~08-13	3	22.90	0.0	0.0	

值 22.9°C 时,SV14 保持稳定不育,没有发生育性波动。可见,其育性转换起点温度在 22.5°C 左右。

2.2.2 R_3 代性状表现

在 R_2 代中进一步选出 3 个好的株系 SV4、SV10、SV14 繁殖种子种植于海南基地,对 R_3 代抽穗后进行考种(表 4)。从表 4 发现各株系中株高和其他植株农艺性状整齐一致,第 1 节到第 4 节节间长比亲本明显变短,穗颈下恢复出现第 IV 节间,但株

高较对照仍矮 20~26 cm。利用平均值比较法对 SV5、SV10、SV14 的 R_2 和 R_3 代的考种结果进行比较, $T_{SV14} = 1.91$, $T_{SV10} = 1.46$, $T_{SV5} = 1.37$, 均小于 $T_{0.01} = 3.17$ 。结果表明,3 个体细胞无性系的矮秆突变体 R_2 代与 R_3 代平均数间无明显的差异,其株高已完全稳定遗传。

2.2.3 矮秆突变体的配合力分析

将矮秆突变体 SV14 分别与早稻恢复系 ZR02、

表4 体细胞变异系(R_3)的株高Table 4. Plant height of somaclones in R_3 generation.

品系 Line	统计项 Statistic item	株高 Plant height /cm	节间长 Length of internode /cm					穗长 Panicle length/cm
			I	II	III	IV	V	
株 1S Zhu 1S(CK)	$\bar{x} \pm S$	69.3 ± 4.21	19.5 ± 2.15	14.3 ± 1.22	11.5 ± 1.37	5.7 ± 1.97	0.45 ± 0.52	16.80 ± 1.13
	变异系数 CV /%	6.1	11.0	8.5	11.9	34.6	115.6	6.7
SV10	$\bar{x} \pm S$	47.3 ± 2.15	12.7 ± 1.62	9.0 ± 0.62	5.6 ± 0.72	2.4 ± 0.81	0.48 ± 0.46	15.95 ± 1.77
	变异系数 CV /%	4.5	12.7	6.9	12.9	33.5	94.5	11.1
SV14	$\bar{x} \pm S$	44.8 ± 1.96	11.9 ± 2.24	9.0 ± 0.67	5.9 ± 10.5	2.1 ± 0.92	0.35 ± 0.24	15.51 ± 1.71
	变异系数 CV /%	4.4	18.8	7.4	17.8	41.4	70.2	12.0
SV5	$\bar{x} \pm S$	42.9 ± 0.96	12.0 ± 1.19	8.2 ± 0.85	5.5 ± 0.59	2.7 ± 0.99	0.70 ± 0.52	13.80 ± 0.87
	变异系数 CV /%	2.2	9.9	10.4	10.8	36.1	73.6	6.3

表5 体细胞无性系变异系与恢复系所配组合考种结果

Table 5. Traits of F_1 of somaclonal variant line SV14S and restorer lines.

组合 Combination	有效穗 Effective panicles per plant	每穗总数 Total spikelets per panicle	每穗实粒 Filled grains per panicle	结实率 Seed setting rate/%	千粒重 1000-grain weight /g	单株产量 Yield per plant /g	株高 Plant height /cm	节间长度 Length of internode/cm					穗长 Panicle length /cm
								I	II	III	IV	V	
株 1S/ZR02 Zhu 1S/ZR02	15.5	149.8	118.6	79.1	27.45	50.46	87.4	1.2	4.1	11.1	17.4	32.4	21.20
	SV14/ZR02	16.0	145.6	118.6	81.2	29.18	55.23	80.9	1.1	3.1	8.7	15.9	31.1
株 1S/912 Zhu 1S/912	14.0	138.0	114.5	83.0	30.29	48.55	85.4	0.8	4.2	11.9	18.3	30.2	20.20
	SV14/912	16.5	141.2	104.7	74.1	30.87	53.33	73.3	0.4	2.7	8.0	15.6	25.9
株 1S/R63-1 Zhu 1S/R63-1	13.0	153.5	123.7	80.6	29.02	46.67	88.2	1.7	6.3	12.5	16.3	29.6	21.75
	SV14/R63-1	15.5	106.7	97.3	91.1	29.55	44.57	84.3	1.8	5.9	11.9	15.9	28.8
株 1S/902 Zhu 1S/902	13.5	139.0	110.0	79.1	32.05	47.59	88.5	1.4	6.7	11.9	16.7	30.5	22.28
	SV14/902	17.0	158.5	114.9	72.5	30.41	59.40	82.6	1.4	4.3	9.0	15.4	31.3
株 1S/448 Zhu 1S/448	12.5	139.5	104.2	74.6	30.68	39.96	92.2	1.8	5.4	12.3	18.6	31.2	22.72
	SV14/448	15.0	155.9	111.3	71.4	31.30	52.26	87.2	1.9	4.9	11.5	16.2	30.1
株 1S 组合平均(Z)	13.7	144.0	114.2	79.3	29.89	46.65	88.3	1.4	5.3	11.9	17.5	30.8	21.59
SV14 组合平均(S)	16.0	141.6	109.3	27.2	30.26	52.96	81.7	1.3	4.2	9.8	15.8	29.4	21.09
S-Z	+2.3	-2.4	-4.9	-2.1	+0.36	+6.31	-6.6	-0.1	-1.2	-2.1	-1.7	-1.3	-0.50
(S-Z)/Z(%)	+16.8	-1.7	-4.3	-2.7	+1.20	+13.53	-7.5						

Z—Mean of Zhu 1S crossed to different restorer lines; S—Mean of SV14 crossed to different restorer lines.

912-3 及晚稻恢复系 R63-1、902、448 等杂交, 将 F_1 代种子于 11 月下旬于海南陵水基地, 与对照一起按常规方式进行栽培管理、考种, 结果如表 5。从表 5 可以看出, 矮秆突变体 SV14 与 5 个父本配组的 F_1 组合平均株高为 81.17 cm, 比对照株 1S 配组的 F_1 组合平均矮 6.6 cm, 矮化效果显著 ($t = 2.6 > t_{0.01} = 2.13$)。就其他经济性状而言, 矮秆突变体 SV14 与 5 个父本配组的组合 F_1 的结实率、穗粒数略有降低, 但千粒重、有效穗增加明显, 其中有效穗平均增幅达 16.8%。因此, 总的产量与对照相比, 最高增产可达 13.5%, 平均增幅达 9.9%。结果表明, 矮秆突变体 SV14 配合力强, 配组的杂种 F_1 优势显著, 具有较大的生产推广价值。

3 讨论

禾谷类植物经过体细胞培养后, 容易引起后代

的各种性状变异, 而且无性系变异经常出现一个或少数基因的突变, 特别有利在不改变品种的基本特征的情况下, 改进个别特性, 如降低株高、提高抗病性等。这些优点是杂交育种, 甚至诱变育种不具备的^[2,3]。据报道, 体细胞无性系变异频率一般为 10% ~ 20%, 甚至更低^[2,4]。由本实验的结果发现通过改变培养条件及处理措施, 其诱变频率可以达到 40% 以上, 快速获得了一批其他农艺性状基本没有改变的株 1S 的矮秆变异材料, 并从中选育出遗传稳定的矮秆突变体 SV5、SV10 和 SV14, 特别是 SV14 经过试验现有重要的生产推广价值。充分说明利用体细胞无性系变异筛选有用突变体, 改良水稻材料的技术路线是十分可行的。

矮秆突变体 SV5、SV10 和 SV14 在大田实验的遗传学统计中发现符合孟德尔的 3 : 1 遗传学规律, 表明所获得的矮秆突变体受一对等位基因所控制,

这为下一步开展矮秆基因的定位、克隆与分析提供了良好的研究材料和奠定了扎实的研究基础。同时, SV14 比对照株 1S(湖南省审定的不育系, 目前应用广泛)配合力强, 配组的 F₁ 组合千粒重、有效穗增加明显, 尽管结实率、穗粒数略有降低, 但杂种 F₁ 的增产幅度大, 表明该不育系具有良好的应用前景, 深入的研究正在进行中。

参考文献:

- 1 Yang Y Z(杨远柱), Tang P L(唐平徕). Breeding and utilization of TCMS line Zhu1S in rice. *Hybrid Rice* (杂交水稻), 2000, 15 (3): 20—26. (in Chinese)
- 2 Zhu Z Q(朱至清). Somaclonal variation and plant improvement. *Chinese Bull Bot* (植物学通报), 1991, 8 (Suppl): 1—8. (in Chinese)
- 3 Zhao C Z(赵成章). Discussion on plant somaclonal variation and crop improvement. *Progress in Biotech* (生物工程进展), 1993, 13(4): 32—36. (in Chinese)
- 4 Davoyan E I. Occurrence of mutant in rice tissue culture and acquirement of new original materials. *Agronomy Abroad: Rice* (国外农学—水稻), 1985, (2): 32—35. (in Chinese)
- 5 Chen Q F(陈启锋), Chen Z(陈璋). The establishment and application of a technical system for screening rice somatic mutant resistance to *Pyricularia oryzae* Cav. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 1992, 25(5): 50—57. (in Chinese with English abstract)
- 6 Hua Q J(华秋瑾). Screening rice somatic mutant resistance to *Pyricularia oryzae* Cav. by cell culture. *Fujian Agric Tech* (福建农业科技), 1991, (2): 17—18. (in Chinese)
- 7 Yang Y S(杨跃生), Zheng G Z(郑贵朝), Jian Y Y(简玉瑜). A further study on the effects of copper in rice cell culture. *Chinese J Rice Sci* (中国水稻科学), 1999, 13(4): 245—247.
- 8 Yang C D(杨长登). Development of haploid indica rice somaclones and its application. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 1999, 32(4): 98—100. (in Chinese with English abstract)
- 9 Liu X M(刘选明), Zhou P H(周朴华). Study on the influence factors of the somatic embryogenesis in young spikelet culture of rice. *Chinese J Biotech* (生物工程学报), 1998, 14(3): 314—319. (in Chinese with English abstract)

中国水稻研究所主办的期刊欢迎新老读者及时订阅

中国水稻科学

《中国水稻科学》2003 年继续交由邮政局发行, 请新老读者及时向当地邮政局订阅本刊, 勿错过订期。邮发代号 32-94, 每期定价 10.00 元, 全年定价 40.00 元。若错过订期可直接向编辑部订阅。

中国稻米

《中国稻米》是全面反映稻作米业发展对策、科研成果、信息知识的全国性综合性杂志。遵循提高与普及相结合, 重在普及的办刊方针, 着重报道先进实用的科技成果和生产经营经验。设有: 发展与对策、专家论坛、育种与品种、耕作栽培、新产品、生产经营、贮藏与加工、市场与流通、消费、知识窗、简讯、生资信息等栏目, 兼具技术性、信息性、学术性特点。适合水稻产区的各级技术人员(包括县、乡、村等的农业技术人员和米厂的技术人员)及农业与粮食行政管理人员、科研教学人员和稻农阅读。《中国稻米》为双月刊。邮发代号 32-31, 各地邮政局均可订阅。漏订者可直接汇款至编辑部订阅。每期定价 5.00 元, 全年 30.00 元。联系地址: 杭州市体育场路 359 号, 邮政编码: 310006。电话: (0571) 63370271。E-mail: sinorice@fy.hz.zj.cn。