

锌元素对籼稻成熟胚愈伤组织绿苗分化率的影响^{*}

赵成章

(中国水稻研究所农业部水稻生物学重点实验室, 浙江杭州 310006)

提 要 本实验就锌元素对籼稻成熟胚愈伤组织绿苗分化率的影响进行了研究, 结果指出: (1) 锌元素能明显提高籼稻成熟胚愈伤组织绿苗分化频率, 且使用浓度范围较广(0.5~10 $\mu\text{mol/L}$), 其中以锌浓度1 $\mu\text{mol/L}$ 效果较好; (2) 在本实验范围内各籼稻品种对锌元素的反应是一致的, 但品种间差异很大, 其中中早14绿苗分化率较高; (3) 锌脉冲试验指出, 锌元素对籼稻成熟胚愈伤组织绿苗分化的影响主要是诱导培养早期的作用, 而当愈伤组织形成以后, 则影响较少。

关键词 籼稻; 锌; 绿苗分化率; 愈伤组织

Effect of ZnSO_4 on Redifferentiation Frequency of Callus from Mature Embryo of Indica Rice

ZHAO Cheng-Zhang

(China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China)

Abstract The effect of ZnSO_4 on redifferentiation frequency of callus from mature embryo of *Indica* rice were studied. The experiment results indicated that (1) ZnSO_4 could increase significantly the redifferentiation frequency of callus from mature embryo of *Indica* rice and its range of applied concentration was wide from 0.5~10 $\mu\text{mol/L}$, the suitable concentration of ZnSO_4 was 1 $\mu\text{mol/L}$; (2) In this experiment range, the response of ZnSO_4 on different *Indica* varieties was same, but the redifferentiation frequency between four varieties was different, the Zhongzao 14 was better; (3) The Zn^{++} pulse treatment indicated that the major effect of ZnSO_4 on the redifferentiation frequency in *Indica* rice was early stage in induction culture and after callus occurrence, the effect of ZnSO_4 on callus redifferentiation was a few.

Key words *Indica* Rice; ZnSO_4 ; Redifferentiation frequency; Callus

锌是仅次于铁在细胞中大量存在的过渡金属, 是生物必需元素之一^[1], 缺锌使植物生育受阻。现知多种酶(主要是分解酶)的活动中心含有锌, 如锌酶是金属酶, 主要起催化水解反应。1999年 Suresh Chand 认为锌促进蛋白质合成, 酶和激素活动以及膜的完整。目前国内外有关锌元素在植物组织和细胞培养中的作用报道极少, 我们在检测水稻矿物元素成份时却发现大量锌元素存在, 但就现有水稻组织和细胞培养基成份中锌元素含量偏低, 这为本项研究提供了重要线索。水稻成熟胚是理想的转基因实验材料, 可以周年取样, 操作简便, 诱导频率也高, 但其愈伤组织绿苗分化率很低, 约10%左右, 特别籼稻成熟胚愈伤组织绿苗分

* 本实验得到农业部水稻生物学重点实验室资助。
收稿日期: 1999-12-08, 接受日期: 2000-04-26
Received on: 1999-12-08, Accepted on: 2000-04-26

化率更低,严重影响植物基因转化工作的开展。因此本试验以水稻成熟胚为起始材料,着重研究锌元素对其愈伤组织绿苗分化的影响,为进一步提高籼稻成熟胚愈伤组织绿苗分化率提供技术依据,这对植物基因转化具有重要实践意义。

1 材料和方法

1.1 材料

早籼中早14、中丝2号、虹早、加9708等品种的新鲜成熟胚, Zn^{++} 由 $ZnSO_4$ 提供。

1.2 方法

将新鲜的成熟胚脱壳种子先用75%酒精浸泡1分钟,再用0.1%升汞灭菌15分钟,最后用无菌水冲洗3次,吸干后接种在改良 N_6 [2] 培养基上进行诱导培养,诱导培养基中添加2,4-D 2 mg/L, 6-BA 1 mg/L, NAA 0.5 mg/L。培养温度 27 ± 1 , 10~12天后当愈伤组织长到0.5 cm 时,即可进行分化培养,15天后统计它们的绿苗分化率。

1.3 试验设计

(1) 锌处理浓度0.05、1.0、2.0、5.0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$; (2) 不同品种对锌离子的反应; (3) Zn 脉冲处理对水稻成熟胚诱导和分化的影响。脉冲方法是:将实验分为 CK_1 、处₁、处₂、处₃、处₄、处₅、 CK_2 等7个处理,处理1是第1天将成熟胚在含1 $\mu\text{mol/L}$ Zn^{+1} 的 N_6 培养基上培养1天,而后(第2天)转入普通 N_6 诱导培养基上继续培养;处理2是第2天将成熟胚在含1 $\mu\text{mol/L}$ Zn^{+1} 培养基上培养1天,第3天重转回到普通 N_6 诱导培养基上继续培养;其余处理依此类推,直到第10天。对照(CK_1)为不经1 $\mu\text{mol/L}$ Zn^{+1} 处理而一直在普通 N_6 诱导培养基上培养。对照2(CK_2)则一直在含1 $\mu\text{mol/L}$ Zn^{+1} 的培养基上培养; (4) 分化培养阶段锌元素对愈伤组织绿苗分化率的影响,方法是将诱导产生的愈伤组织同时转移到含不同浓度锌(0、1、2、5、10 $\mu\text{mol/L}$ Zn)的分化培养基上进行绿苗分化。分化培养基为1/2 N_6 大量,和MS微量、有机成份不变、附加6-BA 2 mg/L、NA 0.25 mg/L 蔗糖2%、洋菜0.8%、pH5.8每天光照8小时,培养温度 $27 \pm$ 。

2 实验结果

2.1 锌浓度对愈伤组织诱导和分化的影响

表1结果指出,锌元素对早籼中早14成熟胚的愈伤组织诱导率影响不大,但对愈伤组织绿苗分化率有很大促进作用,其中0.5 $\mu\text{mol/L}$ 处理绿苗分化率比对照增加一倍,1.0 $\mu\text{mol/L}$ 处理组绿苗分化率比对照增加二倍多,在0.5~10 $\mu\text{mol/L}$ 范围内,锌元素都能提高愈伤组织绿苗分化率,而且在此范围内,锌对愈伤组织出现时间影响不大,说明锌元素的使用范围较

表1 Zn^{++} 浓度对水稻成熟胚愈伤诱导和分化的影响(中早14)

Table 1 Effect of $ZnSO_4$ on Callus of formation and regeneration for mature embryo in rice

Zn 处理浓度($\mu\text{mol/L}$)	0	0.5	1.0	2.0	5.0	10	20	40
外值体数 No. of explants%	100	90	90	90	90	90	20	40
愈伤诱导率 Callus %	57	66.7	64.2	65.0	60	46	66.0	6.7
绿苗分化率 Regeneration %	22.4	48.2	61.8	56.7	56.0	50	20	0
出愈天数 Day of callus occurrence	4	4	4	4	4	5	10	13

广, 但随锌元素浓度提高出愈时间成倍增加, 而且愈伤组织变褐直至死亡。

2.2 不同基因型品种对 Zn 元素的反应

从表2结果看出, 当锌处理浓度 $1 \mu\text{mol/L}$ 时, 不同早籼品种对锌元素的反应有很大差异。锌元素对不同品种的愈伤组织诱导率影响不大, 而对不同品种愈伤组织绿苗分化率却有较大差异, 其中早籼中早14锌处理组的愈伤组织绿苗分化率比对照增加1.7倍, 而中丝2号锌处理组的愈伤组织绿苗分化率仅比对照增加28.6%。

表2 不同基因型品种对 Zn 元素的反应(中早14)
Table 2 Response of ZnSO_4 on different Indica variety

品种 Variety	中早 Zhongzao 14		中丝2号 Zhongsi		虹早 Hongzao		加9708 Gia9708	
	CK	处理 Treatment	CK	处理 Treatment	CK	处理 Treatment	CK	处理 Treatment
外植体数 No of Explants	100	90	30	30	100	100	90	100
愈伤诱导率 Callus %	57	64	37.7	34.0	96	96	22	23.0
绿苗分化率 Regeneration %	22.4	61.8	35	45	8.5	15.0	10	25

2.3 锌脉冲处理对水稻成熟胚愈伤诱导和分化的影响

从表3结果指出, 锌脉冲处理对籼稻成熟胚愈伤组织诱导率影响不大, 而对其愈伤组织绿苗分化率则有很大差别, 当成熟胚刚出现愈伤组织时(即第4天)供给锌元素能成倍增加愈伤组织绿苗分化频率, 在此时间以前提供锌元素有一定影响, 而在此时间以后提供锌元素则反而降低愈伤组织绿苗分化频率, 并使部分愈伤组织变褐。当然全培养期供锌元素最有利于愈伤组织绿苗分化, 高达85.2%。

表3 Zn 脉冲处理对水稻成熟胚愈伤诱导和分化的影响(中早14)
Table 3 Effect of ZnSO_4 pulse treatment on callus of formation and regeneration for mature embryo in rice without Zn

处理 Treatment	对照1 CK1	处理1	处理2	处理3	处理4	处理5	对照2CK2
	全培养期不供 Zn without Zn at full period	第一天 First	第二天 Second	第四天 Forth	第八天 Eighth	第十天 Tenth	全培养期供 Zn Full cultured period with Zn
外植体 No of explant	60	60	60	60	60	60	60
愈伤诱导率 Callus%	75.0	75.0	62	66	73.3	75	70
绿苗分化率 Regeneration %	36.1	40	38	61.8	27.3	15.4	85.2
出愈情况 Occurrence of callus		未出愈	未出愈	刚出愈	出愈	出愈	

2.4 锌元素对愈伤组织绿苗分化的影响

如将不经锌元素处理的成熟胚愈伤组织分别转移到不同锌浓度的 N_6 分化培养基上进行绿苗分化培养(见表4), 结果表明: (1) 低浓度($0 \sim 2 \mu\text{mol/L}$)锌处理能明显降低愈伤组织褐化率, 从而提高其绿苗分化频率, 但增幅不大; (2) 随着锌浓度的进一步提高($5 \sim 10 \mu\text{mol/L}$), 其愈伤组织褐化率成倍增加, 进而成倍降低其绿苗分化频率。因此我们认为在分化培养基中添加锌元素对提高成熟胚愈伤组织绿苗分化的作用是不明显的。

表4 Zn 对水稻成熟胚愈伤组织绿苗分化的影响(中早14)
Table 4 Effect of ZnSO₄ on the callus regeneration of mature embryo in rice

Zn 浓度 Zn concentration $\mu\text{mol/L}$	0	1	2	5	10
愈伤组织数 No of callus	50	50	40	40	40
褐化率% Brown callus %	43	18	25	70	80
绿苗分化率 Regeneration %	22.4	31	38	13	11

3 讨论

3.1 目前水稻基因转化工作最关注的难题是愈伤组织的绿苗再生, 而籼稻成熟胚愈伤组织绿苗再生更为困难。因此进一步研究提高籼稻愈伤组织绿苗再生频率成为当前水稻基因工作中急需解决的重大课题。虽然前人已做过许多有益工作, 积累了大量宝贵资料。迄今仍未根本解决。本文在以往研究工作的基础上, 根据锌元素的生理生化功能, 通过锌元素对水稻成熟胚愈伤组织的研究发现, 锌元素确能明显地提高籼稻成熟胚愈伤组织的绿苗分化率, 而且使用浓度范围也较广(0.5~10 $\mu\text{mol/L}$), 这给实际应用带来很大方便, 这在国内未见报道。在国外也只有一个简报[5], 该简报仅指出硫酸锌使用浓度在30~60 $\mu\text{mol/L}$, 这与本文结果有较大差异, 这可能与基因型和环境条件有关。虽然在现有的N₆、MS、B₅等培养基中或多或少地含有微量锌元素(1.5~8.6 mg/L), 其中MS培养基中锌元素含量最高。这对多数双子叶植物组织和细胞培养可能是合适的, 而对多数水稻品种是不够的, 因此当我们供给一定量(1~2 $\mu\text{mol/L}$) 锌元素时都能明显提高其愈伤组织绿苗分化频率, 当然浓度过高就有强烈抑制和毒害作用。

3.2 从锌元素脉冲试验结果表明, 锌元素在籼稻成熟胚诱导培养早期使用有很好效果, 说明锌元素有利于盾片胚性细胞的启动和发育, 但在愈伤组织出现后使用, 特别在愈伤组织分化阶段使用反而对愈伤组织生长和分化产生抑制和毒害作用, 表现在愈伤组织变褐数目增加, 愈伤组织绿苗分化率下降, 因此在应用上应把锌元素放在愈伤组织诱导培养基上使用。有关锌元素在籼稻胚性细胞的启动和分化中的作用机理有待进一步深入探索。

参 考 文 献

- 1 朱至清, 孙敬三, 王敬驹等. 中国科学, 1976 (5): 484~490
- 2 赵成章. 中国水稻科学, 1987. 1(3): 171~176
- 3 赵成章, 杨长登, 吴连斌等. 应用和环境生物学报, 1997. 1(2): 132~137
- 4 赵成章, 杨长登, 吴连斌等. 作物学报, 1997. (1): 39~43
- 5 Suresh Chand, A shok Kumar Sahraw at, *B iotechnology Quarterly Volume*, 1999, (37): 17
- 6 Wekh R. M. , *M icronutrient N utrition of P lants Critical R eview s in P lant Science*, 1995. 14: 49~82