

甲基磺酸乙酯(EMS) 对水稻离体幼穗影响的初步研究

李学宝

(中国科学院武汉植物研究所)

提 要 用不同浓度的EMS处理水稻离体幼穗,测定培养初期的呼吸强度、细胞色素氧化酶活性和同工酶以及苹果酸脱氢酶同工酶,发现低浓度的EMS对细胞呼吸强度以及细胞色素氧化酶活性有刺激作用,而高浓度的EMS则表现为抑制效应。呼吸强度和酶活性与幼穗培养力之间具有平行关系。研究结果表明,EMS的原初生理效应是影响幼穗细胞的代谢过程,幼穗体细胞诱导频率的改变是幼穗培养初期供能系统受到影响的结果。

关键词 水稻幼穗;化学诱变剂;培养初期;脱分化启动

甲基磺酸乙酯(Ethyl Methane Sulphonate,简称EMS)是一种广泛使用的化学诱变剂。自从Carlson(1970)^[1]在单倍体烟草(*Nicotiana tabacum*)细胞培养中使用EMS诱变得营养缺陷型以来,许多研究者相继在植物组织和细胞培养中应用EMS以提高突变频率,筛选各种类型的细胞突变体和变异细胞系^[8]。然而,有关EMS对培养初期细胞生理代谢的影响,则研究甚少。本文以水稻(*Oryza sativa* L.)幼穗为材料,研究EMS对水稻幼穗培养初期的生理效应,并试图分析培养初期细胞生理代谢与其诱导分化之间的关系。

材料与方 法

供试材料为籼稻华03(*Oryza sativa* L. subsp. *indica* cv. Hua 03)、广陆矮4号(*Oryza sativa* L. subsp. *indica* cv. Guangluai 4)、桂朝2号(*Oryza sativa* L. subsp. *indica* cv. Guichao 2)、鄂早6号(*Oryza sativa* L. subsp. *indica* cv. Ecao6)。接种幼穗的发育时期为2—5期^[1]。

分别采取幼穗长度为0.5—1、1—1.5、1.5—2、2—3厘米的稻穗,在0.1%的新洁尔灭液中浸泡数秒钟,剥去外层叶,用70%的乙醇擦拭后,在无菌条件下剥取幼穗。然后用含一定浓度(分别为0, 0.15%, 0.3%, 0.6%)的EMS的液体培养基(过滤灭菌,现配现用)振荡处理幼穗3小时(120转/分, 25℃),用液体培养基冲洗3次。将幼穗切成0.2厘米长的切段,接种在固体培养基上。

所用基本培养基为禾谷类通用培养基(GM)^[9],脱分化培养基再加NAA 4毫克,2,4-D 1毫克,6-BA 1毫克,肌醇100毫克,水解乳蛋白300毫克/升,蔗糖4%。分化培养基再加NAA 0.2毫克,6-BA 2毫克,肌醇100毫克,水解乳蛋白300毫克/升,蔗糖

3%。用0.7%琼脂固化。

幼穗脱分化培养为暗培养，当幼穗体细胞愈伤组织长至2—5毫米大小时，转入分化培养基照光培养，光强2000lx。

幼穗培养初期，用微量检压法^[3]测定呼吸强度和细胞色素氧化酶活性，用聚丙烯酰胺凝胶电泳^[7]分离同工酶，细胞色素氧化酶同工酶染色用二甲基对苯二胺— α -萘酚法，苹果酸脱氢酶同工酶染色参考《植物生理学实验手册》中介绍的方法^[2]略加修改。

试验结果

1. EMS对幼穗愈伤组织诱导率和绿苗分化率的影响

幼穗体细胞愈伤组织诱导率和绿苗分化率是衡量培养效率的重要指标。本试验用不同浓度的EMS处理水稻幼穗，然后进行脱分化培养，统计20天内各处理和对照组的愈伤组织诱导率（以产生愈伤组织的幼穗块占接种幼穗总块数的百分数计算）。将愈伤组织转入分化培养基，统计45天内的绿苗分化率（以出苗丛数占总接种块数的百分数表示）。统计结果见表1。

表1 EMS对水稻离体幼穗愈伤组织诱导和分化的影响
Table 1 Effect of EMS on the induction of calli and green plantlets of rice young panicles *in vitro*

品 种 Variety	EMS浓度(%) Concentration of EMS (%)	接种总数 Total of inoculation	出愈幼穗块数 Quantity of callus	诱导率(%) Percentage of callus	绿苗丛数 Quantity of green plantlet	分化率(%) Percentage of green plantlet
华03 Hua 03	0	245	216	87.80	172	69.92
	0.15	236	218	92.37	178	75.42
	0.3	242	180	74.38	134	55.57
	0.6	228	140	61.64	76	33.33
广陆矮4号 Guang lu ai 4	0	198	168	84.85	128	64.65
	0.15	192	174	90.62	136	70.83
	0.3	204	152	74.51	110	53.92
	0.6	220	140	63.64	90	40.91
桂朝2号 Gui chao 2	0	192	186	96.88	156	81.25
	0.15	176	172	97.73	148	84.09
	0.3	170	154	90.59	110	64.71
	0.6	176	128	72.73	90	51.14
鄂早6号 E zao	0	164	160	97.56	140	85.37
	0.15	182	176	96.70	155	85.16
	0.3	184	176	95.65	142	78.26
	0.6	184	150	81.52	132	71.74

实验结果表明：

(1)低剂量的EMS对诱导率和分化率有一定的促进作用。从表1中可以看出，0.15%的EMS处理对华03、广陆矮4号、桂朝2号均有不同程度的促进作用，鄂早6号与对照组相当，这显然是由于各品种之间对EMS的敏感性不同所致。低剂量诱变剂的刺激作用早已有所发现，有人认为低剂量辐射引起生物体内修复机构的过分活动，从而刺激了生长^[12]。低剂量化学诱变剂的刺激作用，可能也有类似的机制。

(2)随着 EMS 剂量加大, 幼穗体细胞愈伤组织诱导和分化均受到抑制, 诱导率和分化率明显下降。统计分析表明, 处理与对照之间差异显著。

(3)高浓度的 EMS 延缓幼穗体细胞愈伤组织的发生。未经处理和低浓度处理的幼穗培养 8—10 天时, 即见有愈伤组织产生, 而高浓度处理需 13—15 天才见有愈伤组织产生, 比对照延迟 5—7 天。而且, 愈伤组织生长比较缓慢。

2. EMS对幼穗培养初期呼吸强度的影响

取经 EMS 处理后培养 2、4、6 天的水稻幼穗, 分别测定呼吸强度, 结果见表 2。

表 2 EMS对水稻离体幼穗呼吸强度的影响
Table 2 Effect of EMS on the respiratory intensity of rice young panicles *in vitro*

品 种 Variety	EMS浓度 Concentration of EMS	呼 吸 强 度 ($O_2 \mu l/g \cdot h$) Respiratory intensity		
		第 二 天 second day of culture	第 四 天 fourth day of culture	第 六 天 sixth day of culture
华03 Hua 03	0	727.3	918.6	973.8
	0.15	793.7	950.3	984.0
	0.3	479.9	580.4	598.0
	0.6	429.5	462.4	443.7
广陆矮4号 Guang luai 4	0	843.6	927.3	1024.0
	0.15	868.8	893.7	1036.9
	0.3	708.6	729.3	714.9
	0.6	583.0	579.9	579.3
桂朝2号 Gui chao 2	0	1692.9	1859.3	1846.7
	0.15	1803.9	1963.3	1927.9
	0.3	1675.5	1742.1	1740.2
	0.6	1231.6	1017.2	886.5
鄂早6号 E zao 6	0	1466.7	2075.9	2074.1
	0.15	1409.3	1980.5	1973.9
	0.3	1281.4	1712.7	1665.5
	0.6	884.7	1370.1	1750.1

呼吸强度以每小时每克鲜重耗 O_2 的微升数表示。

To represent respiratory intensity by quantity of used oxygen per hour per gram fresh weight.

从表 2 的实验结果可见:

(1)在 EMS 较高浓度时, 呼吸强度与 EMS 浓度呈负相关。随着 EMS 浓度增高, 呼吸强度下降。

(2)EMS 对培养幼穗具有持续的生理效应。在处理第 6 天, 呼吸仍受到抑制。联系幼穗体细胞愈伤组织诱导分化来看, 这种影响似乎一直持续到细胞的再分化过程。高浓度的 EMS 抑制细胞的呼吸代谢, 降低细胞能量水平, 因而使诱导率和分化率下降。

(3)低浓度的 EMS 对幼穗呼吸有一定的促进作用。在供试的 4 个品种中, 华03、广陆矮 4 号和桂朝 2 号低浓度处理组呼吸强度均高于对照, 这与幼穗愈伤组织诱导分化的情况也是一致的。

(4)幼穗培养初期, 呼吸强度有逐渐上升的趋势, 表明细胞内各种生理代谢活动逐

步增强, 细胞开始分化启动。

3. EMS对细胞色素氧化酶的影响

细胞色素氧化酶是植物呼吸链电子传递中的重要成分, 直接关系到氧化磷酸化作用和ATP的形成。因此, 细胞色素氧化酶活性的强弱应可反映细胞能量水平的高低, 影响该酶活性的因素必然会影响到幼穗细胞脱分化启动。本试验取培养4天的幼穗制样, 用Warburg氏呼吸计测定细胞色素氧化酶活性(表3)。

表3 EMS对水稻幼穗细胞色素氧化酶活性的影响

Table 3 Effect of EMS on the cytochrome oxidase activity in rice young panicles *in vitro*

EMS浓度 Concentration of EMS	品 种 Variety			
	华 03 Hua 03	广陆矮4号 Guang luai 4	桂朝2号 Gui chao 2	鄂早6号 E zao 6
	酶活性* Enzyme activity			
0	4.04	7.09	7.53	6.03
0.15	5.93	8.65	8.03	5.89
0.3	3.63	6.95	6.51	4.48
0.6	2.02	5.58	5.37	2.70

酶活性以每小时每毫克蛋白耗O₂微升数表示(O₂ ul/mg protein, h)

To represent activity of enzyme by quantity of used oxygen per hour per milligram protein

测定结果表明, 低浓度(0.15%)的EMS对幼穗细胞色素氧化酶活性有一定的刺激作用。除鄂早6号外, 其余3个品种的酶活性都有不同程度的提高, 华03酶活性比对照组高48%, 这与低浓度的EMS促进幼穗细胞脱分化和再分化的结果是一致的。但随着EMS浓度增高, 这种促进作用消失。在较高浓度的EMS处理时, 细胞色素氧化酶活性随着EMS浓度升高而下降, 酶活性明显受到抑制。这表明幼穗细胞的供能系统受到抑制, 能量代谢活动减弱, 从影响细胞胞的脱分化过程。

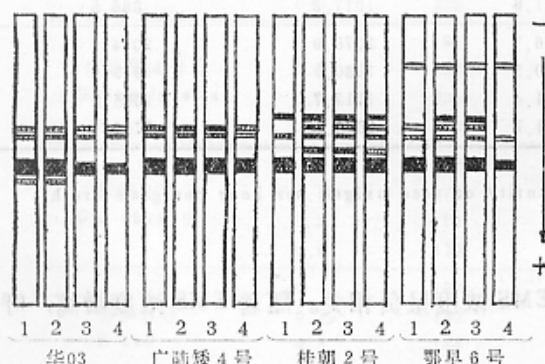


图1 EMS对水稻幼穗苹果酸脱氢酶同工酶的影响
1. 对照; 2. 0.15% EMS处理; 3. 0.3% EMS处理;
4. 0.6% EMS处理

Fig. 1 Effect of EMS on the isoenzymes of malate dehydrogenase in the young panicles of rice *in vitro*

1. Control; 2. Treatment with 0.15% of EMS;
3. Treatment with 0.3 of EMS; 4. Treatment with 0.6 of EMS

从细胞色素氧化酶同工酶(图谱未标出)来看, 幼穗培养初期EMS对同工酶的影响仅在酶带宽度和染色深度上比较明显, 但同工酶谱无大的不同。高浓度的EMS使细胞色素氧化酶同工酶带染色变浅, 酶带变窄, 有些弱带甚至完全消失, 表明较高浓度的EMS对该酶同工酶活性有抑制作用, 这与上面的分析是一致的。

4. EMS对苹果酸脱氢酶同工酶的影响

苹果酸脱氢酶同工酶存在于植物细胞的线粒体、叶绿体和细胞溶质以及细胞壁中, 具有多方面的生理功能。本试验取培

养4天的幼穗测定苹果酸脱氢酶同工酶,结果表明,水稻幼穗苹果酸脱氢酶同工酶对EMS的反应是双重的。当EMS低剂量时,同工酶活性增强,酶带染色加深,表明EMS刺激了苹果酸脱氢酶同工酶的活性。当EMS浓度进一步提高时,同工酶带变窄,染色变浅,表明同工酶活性受到抑制。EMS还诱发了同工酶谱变异,桂朝2号处理组较对照组新增加了二条酶带,鄂早6号多一条酶带(图1)。

苹果酸脱氢酶在运转物质和能量的苹果酸/草酰乙酸、苹果酸/天冬氨酸穿梭中起着十分重要的作用^[15]。幼穗培养初期,苹果酸脱氢酶的强弱显然影响到细胞的能量和物质供应。低剂量的EMS处理时,苹果酸脱氢酶活性增强,促进了苹果酸 \rightleftharpoons 草酰乙酸、苹果酸 \rightleftharpoons 天冬氨酸的相互转变,细胞内物质和能量的运转迅速,细胞物质和能量供应充足,代谢活跃,有利于细胞脱分化启动。相反,过高剂量的EMS抑制了该活性,细胞内物质和能量的运转受到阻碍,细胞能量水平下降,物质代谢减弱,因而延迟或阻碍了幼穗细胞的脱分化启动。Yang等(1975)^[16]发现,苹果酸脱氢酶有迅速的周转速度,其重新合成在3—5天内完成,认为细胞内该酶活性的增加不是由于酶蛋白的活化,而是合成了更多的这种酶。由此可以推断,EMS对同工酶活性的影响可能在酶的合成机制上起作用。

讨 论

本试验的结果表明,EMS对水稻幼穗的影响似乎具有二重性。在低剂量时,表现为刺激作用。超过刺激的“临界剂量”后,则表为抑制作用。由于品种之间对诱变剂的敏感性不同,“临界剂量”的高低也因品种而异。因此,EMS同一处理浓度对各品种的影响有差异。

胡忠等(1976)^[11]发现,化学诱变剂秋水仙碱低剂量时促进呼吸,同时也提高了水稻花粉愈伤组织的诱导率。而高剂量的秋水仙碱抑制细胞呼吸,愈伤组织诱导率也下降。庄承纪等(1982)^[6]发现化学诱变剂EMS在较低温度和低浓度下,提高梗稻花粉愈伤组织诱导频率,这与本试验的结果也是一致的。可以推测,低剂量的EMS刺激呼吸,增加与呼吸代谢有关的细胞色素氧化酶的活性,其结果是改善或维持了较高的细胞能量水平,因而有利于幼穗细胞的脱分化启动。过高剂量的EMS引起细胞内广泛的“生理损伤”,抑制细胞的生理代谢过程,降低细胞能量水平,从而抑制或延迟了愈伤组织的形成。由此可见,细胞生理代谢上的变化是先于形态发生的更为基本的变化,研究EMS在幼穗培养初期的细胞代谢过程中的作用显然是十分必要的。

研究不同浓度的EMS对水稻幼穗培养初期的影响,不难发现,幼穗细胞的呼吸代谢与幼穗培养力之间存在一定的相关性。凡是促进呼吸作用的因素,也提高幼穗愈伤组织诱导率;反之,则诱导率下降。显然,过高浓度的EMS对幼穗培养不利,由于培养力降低幅度太大,反而不能获得较多的变异细胞系或变异植株。采用中等剂量的诱变剂处理幼穗,对于细胞诱变育种,筛选细胞突变体可能是合适的。

在植物组织和细胞培养中,培养条件和影响因素是多种多样的^[4,5,6,10,11,13],诱变剂也是植物组织和细胞培养的影响因素之一。诱变剂的种类甚多,细胞代谢产物对其细

胞本身往往也是一种诱变剂。因此, 研究化学诱变剂对培养细胞代谢活动的影响, 对于阐明细胞脱分化和再分化机理, 提高诱导频率具有重要意义。本试验的研究结果表明, 在组织和细胞培养中采用低剂量, 甚至“超”低剂量的诱变剂, 可能是提高培养力的有效途径之一。

参 考 文 献

- 1 丁颖主编. 中国水稻栽培学. 农业出版社, 1985; 71—86
- 2 上海植物生理学会编. 植物生理学实验手册. 上海科学技术出版社, 1985; 346
- 3 中山大学生物系编. 生化技术导论. 人民教育出版社, 1978; 291—303
- 4 王敬驹等. 植物学报, 1974; 16(1); 43—53
- 5 叶和春. 植物学报, 1984; 26(1); 52—59
- 6 庄承纪等. 云南植物研究所, 1982; 4(4); 399—406
- 7 吴少伯. 植物生理学通讯, 1979; (1); 30—33
- 8 何卓培. 细胞生物学杂志, 1986; 8(1); 11—18
- 9 杨学荣等. 植物生理学报, 1980; 6(1); 67—74
- 10 范慈惠. 植物生理学通讯, 1981; (6); 38—39
- 11 胡忠, 梁兴汉. 植物生理学报, 1979; 5(2); 131—139
- 12 顾端琦. 植物生理学通讯, 1981; (5); 1—6
- 13 渠荣达, 陈英. 植物生理学报, 1983; 9(4); 375—381
- 14 Carlou P S. Sci. 1970; 168; 487—489
- 15 Heber U. Ann Rev Plant Physiol. 1974; 25; 393—421
- 16 Yang N S; Scudalios J G. Biochem Biophys Acta. 1975; 384; 293—306

PRELIMINARY STUDY ON THE EFFECT OF EMS UPON THE YOUNG PANICLES OF RICE IN VITRO

Li Xuebao

(Wuhan Institute of Botany, Academia Sinica)

Abstract Young panicles of rice (*Oryza sativa* L.) were treated with a range of concentration of EMS for 3 hours before cultured *in vitro*. The respiratory intensity of young panicles was determined on the second, fourth, sixth day respectively, and the cytochrome oxidase activity and isoenzymes of cytochrome oxidase and malate dehydrogenase were analysed on the fourth day. The experimental results show that the effects of EMS on respiratory intensity and activities of two enzymes of young panicles are in accordance with the effects of the mutagen on de- and re-differentiation of the young panicle cells. EMS affects metabolic processes in the cells at first and the induction rate of the young panicle callus changes consequently.

Key words Rice young panicle; Chemical mutagen; Initial stage of culture; Dedifferentiation initiation