

Cu^{2+} 对小麦幼胚脱分化和高频再生特性的影响^{*}

陈耀锋¹, 王丽敏¹, 丁云姣², 李春莲¹, 郭月霞¹,
韩德俊¹, 任慧莉¹, 郭东伟¹, 奚亚军¹

(1 西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100; 2 中共陕西省委党校, 陕西 西安 710000)

[摘 要] 以小麦品种(系)千斤早和 9848 的幼胚组织为材料, 研究了 Cu^{2+} 对小麦幼胚组织脱分化和再分化特性的影响。结果表明, 诱导培养基中的 Cu^{2+} 对小麦幼胚愈伤组织的形成无显著影响, 但可显著提高被诱导愈伤组织的再分化能力。在供试 Cu^{2+} 浓度范围内, 千斤早的愈伤组织再分化率比对照提高了 37.9%~72.4%, 9848 比对照提高了 8.2%~21.2%。分化培养基中的 Cu^{2+} 对小麦幼胚愈伤组织再分化的影响表现出低浓度促进、高浓度抑制的效应, 对愈伤组织再分化的最佳正向效应浓度千斤早为 $1.0 \mu\text{mol/L}$, 比对照提高 101.4%; 9848 为 $1.0 \sim 5.0 \mu\text{mol/L}$, 分别比对照提高 102.5%~116.6%; Cu^{2+} 对小麦幼胚愈伤组织再分化的影响远高于对幼胚组织脱分化的影响。

[关键词] 小麦幼胚; Cu^{2+} ; 愈伤组织诱导; 再生频率

[中图分类号] S512.103.53

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)10-0001-04

小麦是世界上种植面积最大, 总产量最高, 贸易量最大, 加工制品最为丰富的粮食作物。在我国, 小麦是最重要的粮食作物之一, 其生产状况直接关系到国计民生。在小麦生产中应用广适、多抗、优质、高产品种是稳定和提高小麦产量的重要措施。近年来, 随着细胞工程^[1,2]、基因工程^[3,4]等育种技术的建立和发展, 为小麦品种改良提供了新的途径并取得了一些重要进展。在这些新技术的应用上, 作为重要的遗传修饰系统和基因工程受体系统, 离体培养小麦细胞的再生能力差已成为影响新技术在品种改良中应用的“瓶颈”。因此, 进一步探索影响离体培养小麦细胞分化的因素及大幅度提高其分化频率, 仍然是目前小麦细胞工程、基因工程育种研究的重要内容。 Cu^{2+} 是植物生活细胞中重要的元素之一, 据报道^[5,6], Cu^{2+} 具有显著提高水稻愈伤组织增殖和愈伤组织分化的特性。本研究在小麦离体培养的培养基中加入适量 Cu^{2+} , 研究了 Cu^{2+} 对小麦幼胚组织脱分化和再分化特性的影响, 旨在探索 Cu^{2+} 在小麦离体培养中的作用, 大幅度提高小麦品种幼胚组织脱分化和再分化效率, 为小麦基因转化中高频再生受体系统的建立奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为西北农林科技大学农学院细胞工程实验室田间种植的小麦品种千斤早和小麦新品系 9848。

1.2 试验方法

1.2.1 材料消毒与处理 剪取田间种植的胚龄为 14 d 的小麦品种千斤早和小麦新品系 9848 的穗置于 4℃ 冰箱内保存。接种时将麦穗取出, 剥出籽粒, 在无菌条件下用体积分数 75% 的乙醇消毒 30 s, 体积分数 0.1% 升汞(HgCl_2)消毒 10 min, 无菌水冲洗 4 次, 然后剥出幼胚接种于诱导培养基上。

1.2.2 培养基与培养条件 小麦幼胚愈伤组织诱导培养基为 $\text{MS} + 2, 4\text{-D } 2.0 \text{ mg/L} + \text{KT } 0.5 \text{ mg/L} + \text{Su } 30 \text{ mL/L} + \text{Ag } 5.5 \text{ mL/L}$ 。为了研究 Cu^{2+} 对小麦幼胚愈伤组织诱导的影响, 使用了附加不同浓度 Cu^{2+} 的诱导培养基, 以不附加 Cu^{2+} 的诱导培养基为对照。将在无菌条件下剥离的幼胚组织接种到含不同浓度 Cu^{2+} 的小麦幼胚愈伤组织诱导培养基上, 每处理接 5 瓶, 每瓶 16~20 枚。接种后的培养瓶于散光光照 (25 ± 3)℃ 条件下培养。15 d

^{*} [收稿日期] 2004-03-18

[基金项目] 国家“863”高技术研究发展计划项目(2001AA 241037); 国家转基因专项(GY03-B-23-02); 陕西省科技攻关项目(2003K03-G1-04)

[作者简介] 陈耀锋(1956-), 男, 陕西岐山人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事作物遗传育种、农业生物技术研究。

后,统计出愈率(出愈率= 出愈伤组织的幼胚数/接种的幼胚数),然后将愈伤组织转移到不含 Cu^{2+} 的分化培养基上。分化培养基为 $\text{MS} + \text{KT} 0.5 \text{ mg/L} + \text{Su} 25 \text{ mL/L} + \text{Ag} 5.5 \text{ mL/L}$ 。每处理 5 瓶,每瓶 6~10 块。将转分化培养的培养瓶置 $2\,000 \sim 3\,000 \text{ lx}$ 光照, $(25 \pm 3)^\circ\text{C}$ 条件下培养。16 d 后,统计分析愈伤组织分化率(分化率= 分化出苗的愈伤组织数/转分化的愈伤组织)。

研究 Cu^{2+} 对小麦幼胚愈伤组织分化的影响时,首先按常规方法接种幼胚于小麦幼胚愈伤组织诱导培养基中,15 d 后将诱导出的愈伤组织转入到附加不同浓度 Cu^{2+} 的愈伤组织分化培养基中,以不附加

Cu^{2+} 的分化培养基为对照,16 d 后统计分析愈伤组织分化率。

2 结果与分析

2.1 诱导培养基中的 Cu^{2+} 浓度对小麦幼胚愈伤组织诱导的影响

诱导培养基中 Cu^{2+} 含量对小麦幼胚愈伤组织诱导的影响结果见表 1。由表 1 可知, Cu^{2+} 对小麦幼胚愈伤组织的诱导出愈率影响较小。千斤早除个别幼胚死亡外,出愈率在 $90.2\% \sim 100.0\%$; 9848 除 Cu^{2+} 浓度为 $5.0 \mu\text{mol/L}$,由于幼胚成苗影响了愈伤组织的形成,在其他浓度下的出愈率基本相近。

表 1 诱导培养基中的 Cu^{2+} 对小麦幼胚愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effect of copper in induction medium on formation of wheat immature embryo calli

品种 Varieties	诱导培养基中 Cu^{2+} 浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ Concentration of copper in induction medium	接种幼胚数 No. of immature embryos planted	产生愈伤组织数 No. of immature embryos giving calli	出愈率/% Induction frequency of calli
千斤早 Qianjinza	0.0(CK)	100	100	100.0
	1.0	80	80	100.0
	10.0	79	78	98.7
	30.0	102	92	90.2
	50.0	75	68	90.7
	120.0	99	99	100.0
	0.0(CK)	104	99	95.2
9848	1.0	120	120	100.0
	5.0	104	76	73.1
	30.0	111	110	99.1
	50.0	119	117	98.3
	120.0	100	100	100.0

2.2 诱导培养基中 Cu^{2+} 浓度对幼胚愈伤组织再分化的影响

将从含不同浓度 Cu^{2+} 的诱导培养基上得到的愈伤组织,转入到不含 Cu^{2+} 的分化培养基上,研究诱导培养基中 Cu^{2+} 浓度对小麦幼胚愈伤组织再分化的影响。结果(表 2)表明,诱导培养基中添加 Cu^{2+} 可以使愈伤组织的再分化能力显著提高。在供试浓度范围内,小麦幼胚愈伤组织的再分化频率随着 Cu^{2+} 浓度的提高先上升后下降,但均为正向效应; Cu^{2+} 对 2 个供试品种(系)的再分化频率影响存在差异,千斤早比对照提高了 $37.9\% \sim 72.4\%$,9848 比对照提高了 $8.2\% \sim 21.2\%$ 。

2.3 分化培养基中 Cu^{2+} 浓度对小麦幼胚愈伤组织再分化的影响

分化培养基中的 Cu^{2+} 浓度对小麦幼胚愈伤组

织再分化的影响结果(表 3)表明,分化培养基中 Cu^{2+} 对小麦幼胚愈伤组织的再分化作用明显。 Cu^{2+} 对 2 个供试品种(系)幼胚愈伤组织的再分化均表现为低浓度促进和高浓度抑制作用。千斤早在 Cu^{2+} 浓度为 $0.1 \sim 5.0 \mu\text{mol/L}$ 时,再分化率比对照提高了 $71.4\% \sim 101.4\%$; 在 $10.0 \sim 120.0 \mu\text{mol/L}$ 时,再分化率比对照降低了 $23.6\% \sim 72.1\%$,并随着 Cu^{2+} 浓度的提高,降低幅度逐渐加大。9848 在 Cu^{2+} 浓度为 $0.1 \sim 10.0 \mu\text{mol/L}$ 时,再分化率比对照提高了 $15.9\% \sim 116.6\%$; 在 $30.0 \sim 120.0 \mu\text{mol/L}$ 时,再分化率比对照降低了 $10.8\% \sim 61.8\%$,并随着浓度的提高,降低幅度逐渐加大。 Cu^{2+} 浓度对 2 个供试品种幼胚愈伤组织再分化的影响有相同的趋势,即在低浓度时,正向效应非常显著。

表 2 诱导培养基中 Cu²⁺ 对小麦幼胚愈伤组织再分化的影响

Fig 2 Effect of copper in induction medium on regeneration of wheat immature embryo calli

品种 Varieties	诱导培养基中 Cu ²⁺ 浓度/ (μmol · L ⁻¹) Concentration of copper in induction medium	转分化的 愈伤组织数 No. of calli transferred to regeneration medium	再分化 愈伤组织数 No. of calli regenerating	再分化率/% Regeneration frequency of calli	较对照提高 比率/% Increased rate
千斤早 Q ianjinza	0 0(CK)	52	3	5 8	
	1 0	34	3	8 8	51. 7
	5 0	40	4	10 0	72. 4
	10 0	49	4	8 2	41. 4
	30 0	50	4	8 0	37. 9
9848	0 0(CK)	39	9	23 1	
	1 0	20	5	25 0	8 2
	5 0	50	14	28 0	21. 2
	10 0	41	11	26 8	16 0
	30 0	20	5	25 0	8 2

表 3 分化培养基中 Cu²⁺ 对小麦幼胚愈伤组织再分化的影响

Fig 3 Effect of copper in regeneration medium on regeneration of wheat juvenile embryo calli

品种 Varieties	分化培养基中 Cu ²⁺ 浓度/ (μmol · L ⁻¹) Concentration of copper in regeneration medium	转分化的 愈伤组织数 No. of calli transferred to regeneration medium	再分化 愈伤组织数 No. of calli regenerating	再分化率/% Regeneration frequency of calli	较对照提高 比率/% Increased rate
千斤早 Q ianjinza	0 0(CK)	50	7	14 0	
	0 1	50	12	24 0	71. 4
	1 0	39	11	28 2	101. 4
	5 0	31	8	25 8	84 3
	10 0	28	3	10 7	- 23 6
	30 0	28	2	7. 1	- 49 3
	120 0	51	2	3 9	- 72 1
9848	0 0(CK)	51	8	15 7	
	0 1	44	8	18 2	15 9
	1 0	44	14	31 8	102 5
	5 0	50	17	34 0	116 6
	10 0	50	13	26 0	65 6
	30 0	50	7	14 0	- 10 8
	120 0	50	3	6 0	- 61 8

3 结论与讨论

Cu²⁺ 是植物体内一些重要酶类(多酚氧化酶、抗坏血酸氧化酶、酪氨酸酶等)的成分,与植物体内的氧化还原过程及氮素代谢等重要的生理生化代谢活动有关,也是植物生长发育所必需的元素。植物体内 Cu²⁺ 浓度的变化会对其生理生化代谢活动产生影响,从而改变植物体的发育过程。Purnhauser 等^[7]首先注意到植物组织离体培养条件下,培养基中较高浓度的 Cu²⁺ 可以提高大麦、小麦、小黑麦、烟草等作物的某些愈伤组织的再分化能力;YANG Yue-sheng^[5,6]证实,Cu²⁺ 具有显著提高水稻愈伤组

织增殖和愈伤组织再分化的特性。本研究表明,在小麦幼胚组织培养中,提高诱导培养基中的 Cu²⁺ 浓度,对小麦胚愈伤组织的形成无显著影响,但可显著提高被诱导愈伤组织的再分化能力。

本研究首次证实,诱导培养基和分化培养基中的 Cu²⁺,对小麦幼胚愈伤组织分化的影响是不同的,诱导培养基中 Cu²⁺ 浓度为 0.1~30.0 μmol/L 时,对小麦幼胚愈伤组织的分化均具有正向效应,提高 2 种基因型愈伤组织分化的最佳 Cu²⁺ 浓度千斤早为 1.0~5.0 μmol/L,分别比对照提高 51.7%~72.4%;9848 为 5.0~10.0 μmol/L,分别比对照提高 16.0%~21.2%。分化培养基中的 Cu²⁺ 在低浓度

条件下,对小麦幼胚愈伤组织的分化均具有正向效应;随着诱导培养基中 Cu^{2+} 浓度的提高,千斤早在高于 $50\ \mu\text{mol/L}$, 9848 在高于 $100\ \mu\text{mol/L}$ 时,均表现出显著的负效应;分化培养基中的 Cu^{2+} 对小麦幼胚愈伤组织分化的正、负效应在不同浓度间差异较大,效应显著。分化培养基中的 Cu^{2+} 对愈伤组织分化的最佳正向效应浓度千斤早为 $10\ \mu\text{mol/L}$, 比对照提高 101.4%; 9848 为 $10\sim 50\ \mu\text{mol/L}$, 分别比对照提高 102.5%~116.6%。说明 Cu^{2+} 对小麦幼胚愈伤组织的脱分化和再分化均有重要影响,但对再分化效应的影响远高于对幼胚组织脱分化的影

响。

研究同时证实, Cu^{2+} 对小麦幼胚组织分化和再分化特性的影响还表现出基因型之间的差异, Cu^{2+} 对千斤早幼胚组织脱分化特性的影响比对 9848 的影响大,对千斤早愈伤组织再分化特性的影响比对 9848 的小。但 Cu^{2+} 浓度对不同基因型小麦幼胚组织脱分化和再分化特性影响的总趋势是一致的。

综合分析证明, Cu^{2+} 在小麦幼胚组织脱分化和再分化中作用显著,适当应用,能大幅度提高小麦幼胚愈伤组织的再分化率,是建立小麦高效基因工程受体系统的重要因子之一。

[参考文献]

- [1] 陆维忠,程顺和.细胞工程在小麦抗赤霉育种中的利用[J].江苏农业学报,1998,14(1):9-14
- [2] 陈耀锋,韩德俊,李春莲.普通小麦抗赤霉细胞工程育种研究 I:抗镰刀菌毒素细胞变异系的分离[J].农业生物技术学报,1998,6(3):217-222
- [3] Barro F, Rooke L, Bekes F, et al. Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties[J]. Nature Biotechnology, 1997, 15: 1295-1299
- [4] Altpeter F, Vasil V, Srivastava V, et al. Accelerated production of transgenic wheat plants[J]. Plant Cell Reports, 1996, 16: 12-17
- [5] YANG Yue-sheng. Copper enhances plant regeneration in callus culture of rice[J]. Chinese J Rice Sci, 1999, 13(4): 95-98
- [6] YANG Yue-sheng. A further study on the effects of copper in rice callus culture[J]. Chinese J Rice Sci, 1999, 13(4): 245-247
- [7] Purnhauser L, Gyulai G. Effect of copper on shoot and root regeneration in wheat, triticale, rape and tobacco tissue culture[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1993, 35: 131-139

Effect of copper on dedifferentiation and high frequency regeneration of immature embryos in wheat (*Triticum aestivum* L.)

CHEN Yao-feng¹, WANG Lin-lin¹, DING Yun-jiao², LI Chun-lan¹, GUO Yue-xia¹,
HAN De-jun¹, REN Hui-li¹, GUO Dong-wei¹, XI Ya-jun¹

(1 College of Agronomy, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Shaanxi Party School of CCP, Xi'an, Shaanxi 710000, China)

Abstract Differentiation and redifferentiation characteristics of wheat immature embryos were studied using media containing copper. The results showed that the copper supplemented in the induction medium promoted wheat immature embryo callus differentiation significantly. The regeneration frequency of Qianjinzhao callus from the induction medium supplemented with $10\sim 300\ \mu\text{mol/L}$ copper was 37.9% - 72.4% higher than that of control and that of 9848 was 8.2% - 21.2% higher than that of control. On the other hand, the copper supplemented in the differentiation medium promoted wheat immature embryo callus differentiation in lower concentration and inhibited wheat immature embryo callus differentiation in higher concentration significantly. Using the most suitable concentration of copper could increase the efficiency of wheat immature embryo callus differentiation significantly. It was found that the regeneration frequency of Qianjinzhao callus from the regeneration medium supplemented with $10\ \mu\text{mol/L}$ copper was 101.4% higher than control and regeneration frequency of 9848 callus from the regenerated medium supplemented with $10\sim 50\ \mu\text{mol/L}$ copper was 102.5% - 116.6% higher than control.

Key words wheat immature embryo; copper; calli induction; regeneration frequency