

## 培养基中 $\text{CuSO}_4$ 和 Fe 盐浓度对小麦胚培养再生效果的影响

别晓敏, 杜丽璞, 徐惠君, 叶兴国

(中国农业科学院作物科学研究所/农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程/农业部作物遗传育种重点开放实验室, 北京 100081)

**摘要:** 以小麦基因型 CB037、新春 9 号和 Bobwhite 为材料进行成熟胚和幼胚培养, 研究了  $\text{CuSO}_4$  和  $\text{Fe}_2\text{-EDTA}$  对小麦组织培养再生效果的影响。结果发现, 培养基中添加  $0.1 \sim 4.1 \mu\text{mol/L}$   $\text{CuSO}_4$  对小麦成熟胚组织培养无显著效果, 超过  $6.1 \mu\text{mol/L}$  对愈伤组织有毒害作用; 培养基中添加  $40 \mu\text{mol/L}$  Fe 盐对小麦成熟胚组织培养和植株再生具有促进作用; 不同小麦基因型其幼胚培养对 Fe 盐的反应不同,  $40 \mu\text{mol/L} \sim 50 \mu\text{mol/L}$  Fe 盐处理对 CB037 幼胚再生效果最好,  $20 \mu\text{mol/L}$  Fe 盐浓度对新春 9 号和 Bobwhite 幼胚再生效果较好, 高浓度铁盐抑制作用显著; 在相同培养条件下, CB037 幼胚再生率最高, 新春 9 号次之, Bobwhite 最低。

**关键词:** 小麦; 组织培养;  $\text{CuSO}_4$ ; Fe 盐

## Effects of $\text{CuSO}_4$ and Iron Source on the Tissue Culture of Wheat

BIE Xiao-min, DU Li-pu, XU Hui-jun, YE Xing-guo

(Key Laboratory of Crop Genetic and Breeding, Ministry of Agriculture/National Key Facility of Crop Gene Resources and Genetic Improvement/Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

**Abstract:** To optimize the concentrations of  $\text{CuSO}_4$  and iron source used in wheat embryo culture, investigation on the influence of Fe and Cu ions in culture media on wheat regeneration was performed using CB037, Xinchun9 and Bobwhite as materials. The results showed that there was no difference from the efficiencies for embryogenic callus induction and green shoot induction when the concentration of  $\text{CuSO}_4$  was employed from  $0.1$  to  $4.1 \mu\text{mol/L}$ , however,  $\text{CuSO}_4$  at  $6.1 \mu\text{mol/L}$  was toxic for mature embryos of wheat. Regeneration efficiency from the mature embryos of CB037 was obviously improved on the media containing  $40 \mu\text{mol/L}$  iron source. The optimal concentration of iron source were  $40$  to  $50 \mu\text{mol/L}$  when the immature embryos of CB037 were used as explants, both of callus differentiation and green shoots induction in this level were higher than those in the level of  $20 \mu\text{mol/L}$  (at random). For the immature embryo culture of Xinchun9 and Bobwhite, the ideal concentration of iron source was  $20 \mu\text{mol/L}$ . The sensibility of different genotypes to iron source was discrepant. In average, the order for regeneration potential of immature embryos among the three wheat genotypes used in this study is CB037, Xinchun 9 and Bobwhite.

**Key words:** Wheat; Tissue culture;  $\text{CuSO}_4$ ; Iron source

随着小麦基因工程育种和功能基因组学发展的需要, 幼胚或成熟胚离体培养的低再生率已成为限制

小麦遗传转化的瓶颈。植物离体组织的再生培养在很大程度上取决于培养基的成分, 选择适宜的培养基

收稿日期: 2011-01-25 修回日期: 2011-03-30

基金项目: 国家自然科学基金(30971776); 国家转基因专项(2008ZX08010-004)

作者简介: 别晓敏, 硕士。研究方向: 小麦生物技术育种。E-mail: biexiaomin98@163.com

通讯作者: 叶兴国, 博士, 研究员。研究方向: 小麦生物技术育种。E-mail: yexg@mail.caas.net.cn

是建立植物高效再生体系的关键因素之一。很多植物组织培养以 MS<sup>[1]</sup> 为基本培养基,但适宜于模式植物的 MS 培养基并非完全适合其他植物。已有研究证明,培养基中无机盐含量水平对愈伤组织诱导和植株再生具有明显影响<sup>[2-5]</sup>,适宜浓度的无机盐影响外植体对植物生长调节剂的敏感性<sup>[6]</sup>,甚至可以部分代替培养基中的植物生长调节剂<sup>[7-8]</sup>。Fe 元素和 Cu 元素作为植物生长发育必需的微量元素,参与调节一些金属酶的活性。关于不同螯合方式和价态 Fe 元素对植物组织离体培养效果的研究,已有一些报道。Novotny 等<sup>[9]</sup> 以大麦和小麦花药为外植体进行比较分析,发现 EDTA-Fe 是最合适的 Fe 元素存在形式,利于花药愈伤组织的诱导。另有研究认为,螯合形式的 EDTA-Fe 中 EDTA 感光氧化,持续稳定地释放出 Fe<sup>2+</sup>,保证拟南芥组织培养过程中 Fe<sup>2+</sup> 的吸收,提高愈伤组织的分化效率,而同时添加非螯合形式的 FeSO<sub>4</sub> 和 EDTA 却降低植株再生率<sup>[10]</sup>。Carl 等<sup>[11]</sup> 研究表明,EDTA 与 Fe<sup>2+</sup> 比例失衡可能导致矿质元素的沉淀,高浓度的 EDTA 容易引起烟草愈伤组织细胞的毒害。Pullman 等<sup>[12]</sup> 研究发现,培养基中 EDTA-Fe 浓度为正常用量的 4 倍对促进火炬松成熟胚再生效果最好。在以龙爪稷为材料的研究中发现,分化培养基中 EDTA-Fe 的用量比正常用量提高 3 倍,再生率可提高 2 倍以上<sup>[13]</sup>。

关于培养基中 Cu<sup>2+</sup> 浓度对组织培养的研究,Nirwan 等<sup>[13]</sup> 以高粱成熟胚为外植体,在 MS 培养基的基础上设置了不同 CuSO<sub>4</sub> 浓度处理,表明 2.0 μmol/L CuSO<sub>4</sub> 有利于愈伤组织的诱导和植株再生。愈伤组织诱导和分化培养基中添加 CuSO<sub>4</sub> 0.5 μmol/L 能使龙爪稷愈伤组织再生率提高 4 倍,继代培养的愈伤组织则在 0.3 ~ 0.6 μmol/L 处理时再生率比对照提高 1 倍<sup>[14]</sup>。以鸭草和龙爪稷成熟胚为外植体的研究结果发现,3.0 ~ 5.0 μmol/L 的 Cu<sup>2+</sup> 浓度有利于愈伤组织生长<sup>[15]</sup>。Vain 等<sup>[16-17]</sup> 利用添加 9.5 mmol/L EDTA-Fe 和 3.75 μmol/L CuSO<sub>4</sub> 的 MSB3 培养基对短柄草幼胚进行组织培养,植株再生率提高了 2 ~ 3 倍。另有 Ali 等<sup>[18]</sup> 发现,25 ~ 100 μmol/L CuSO<sub>4</sub> 能促进假马齿苋茎段愈伤组织的形成和分化,但 200 ~ 600 μmol/L 明显抑制根和芽的生长。然而,在黑麦草成熟胚培养中发现,提高 CuSO<sub>4</sub> 浓度对愈伤组织生长和分化没有效果,提高至 50 μmol/L 时毒害作用非常明显<sup>[19]</sup>。Gori 等<sup>[20]</sup> 在烟草组织培养中发现,CuSO<sub>4</sub> 用量 0.1 ~ 50.0 μmol/L 时愈伤组织形成和分化正常,200 μmol/L 浓度时

几乎所有愈伤组织都有坏死症状。Turner 等<sup>[21]</sup> 认为,培养基中添加 93.75 μmol/L 以上浓度的 Cu<sup>2+</sup> 明显降低美国梧桐愈伤组织的生长。

总之,目前为止关于 Fe 元素和 Cu 元素对植物组织培养影响的研究主要集中于拟南芥、烟草等模式植物和黑麦草、短柄草等少数禾谷类植物,但在小麦组织培养中研究还未见报道。本文以小麦成熟胚和幼胚为外植体材料,详细研究了 Fe 元素和 Cu 元素用量对小麦组织再生效果的影响,明确了 CuSO<sub>4</sub> 和 Fe 盐的适宜用量,目的为进一步提高小麦遗传转化效率奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本研究所用小麦品种 CB037、新春 9 号和 Bobwhite 为课题组保存,全部为春性。供试小麦材料春播种植在中国农业科学院作物科学研究所实验农场,开花后 13 ~ 14 d 取未成熟子粒进行幼胚培养,成熟后收获成熟种子进行成熟胚培养。

### 1.2 培养基及 CuSO<sub>4</sub> 和 Fe 盐浓度水平设置

小麦幼胚愈伤组织诱导培养基为 SD<sub>2</sub>,成熟胚预培养培养基为 Adi,诱导胚性愈伤组织培养基为 XC-SX<sup>[22]</sup> (表 1)。CuSO<sub>4</sub> 在培养基中设置 0.1、2.1、4.1、6.1 μmol/L 4 个浓度水平。Fe 盐在培养基中设置 20 (对照)、30、40、50、60 μmol/L 5 个处理。幼胚分化采用 IEFH 培养基,成熟胚分化采用 XCFH 培养基。Adi 培养基添加 8g/L 琼脂,其他培养基添加植物凝胶 2.4g/L,所有培养基 pH 为 5.8,在 1.1kg/cm<sup>2</sup> (121℃) 条件下高压灭菌 15min。

### 1.3 幼胚培养

开花授粉后 13 ~ 14 d (幼胚直径 1mm 左右),收集未成熟子粒,用 70% 乙醇表面灭菌 1min,然后用 15% 次氯酸钠灭菌 15min,无菌水冲洗 3 ~ 5 次,在无菌培养皿中用解剖刀切去胚芽,挑出适宜大小的幼胚,盾片朝上接种于 SD<sub>2</sub> 培养基上。在不同浓度 Fe 盐培养基上每个培养皿接种 60 个幼胚,重复 3 次。25℃、黑暗条件下培养 21 d 诱导愈伤组织,然后将愈伤组织转移到 IEFH 培养基上,25℃、光照条件下分化植株 (光照强度 3500 lx,光周期为 16h 光照、8 h 黑暗)。

### 1.4 成熟胚培养

挑选子粒饱满的成熟种子,用 70% 乙醇震荡灭菌 10min,再用 25% 次氯酸钠灭菌 25min,然后用无

表 1 愈伤组织诱导培养基和分化培养基

Table 1 Compositions of media used for callus induction and regeneration.

培养基 Medium	成分 Component
SD <sub>2</sub>	MS 基本培养基(不含 MS 维生素) + 3.0% 蔗糖 + 1mg/L B <sub>1</sub> 维生素 + 150mg/L 天门冬酰胺 + 2.0mg/L 2,4-D, pH 5.8
Adi	MS 基本培养基(不含 MS 维生素) + 0.75g/L MgCl <sub>2</sub> + 15.0g/L 甘露醇 + 15.0g/L 山梨醇 + 5.0mg/L 谷氨酰胺 + 0.5g/L 水解酪蛋白 + 12.0g/L 葡萄糖 + 10mg/L B <sub>1</sub> 维生素 + 1.0mg/L B <sub>6</sub> 维生素 + 1.0mg/L B <sub>3</sub> 维生素 + 2.0mg/L 甘氨酸 + 39mg/L 乙酰丁香酮 + 2.0mg/L dicamba + 4.0mg/L AgNO <sub>3</sub> + 40.0mg/L 半胱氨酸 + 100.0g/L 维生素 C, pH 5.8
XCSX	MS 基本培养基 + 3.0% 蔗糖 + 2.0mg/L dicamba + 4.0mg/L AgNO <sub>3</sub> , pH 5.8
IEFH	MS 基本培养基 + 0.1g/L 维生素 C + 2.0% 蔗糖 + 0.2mg/L 2,4-D, pH 5.8
XCFH	MS 基本培养基(不含 MS 维生素) + 10.0g/L B <sub>1</sub> 维生素 + 1.0g/L B <sub>3</sub> 维生素 + 1.0g/L B <sub>6</sub> 维生素 + 2.0g/L 甘氨酸 + 5.0g/L 谷氨酰胺 + 2.0% 蔗糖 + 0.2mg/L IAA, pH 5.8

菌水冲洗 3~5 次,置于 25℃ 培养箱中过夜。次日早晨,用 25% 次氯酸钠表面灭菌 15min,无菌水冲洗 4~5 次,将成熟胚刮碎后接种于 Adi 培养基上,每个处理水平接种 40 个成熟胚,重复 3 次。在 Adi 培养基上暗培养 7d 后,转移到 XCSX 培养基上弱光培养 14d,胚性愈伤组织及时转移到 XCFH 培养基上进行光照培养,培养温度和光照条件同幼胚培养<sup>[22]</sup>。

### 1.5 统计及分析方法

外植体培养 14d 后统计愈伤组织诱导率,培养 21d 时统计胚性愈伤组织诱导率;转移到分化培养基上培养 21d 后统计愈伤组织分化率和绿芽诱导率。愈伤组织诱导率 = 愈伤组织数/接种外植体数 × 100%;胚性愈伤组织诱导率 = 胚性愈伤组织数/接种外植体数 × 100%;愈伤组织分化率 = 绿芽数/接种外植体数 × 100%;绿芽诱导率 = 产生绿芽总数/接种外植体数 × 100%。数据分析利用 DPS 6.85 版的 LSD 法进行。

表 2 不同浓度  $\text{CuSO}_4$  对小麦成熟胚组织培养效果比较Table 2 Culture efficiency of wheat mature embryos on the media with different concentrations of  $\text{CuSO}_4$ 

浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) Concen- tration	成熟胚数 Mature embryos	胚性愈伤 组织数 Embryonic calli	分化 愈伤数 Different- iated calli	绿芽数 No. of plantlet	胚性愈伤组织 诱导率(%) Embryonic calli frequency	愈伤组织 分化率(%) Differentiated calli frequency	绿芽诱导率(%) Plantlet produced frequency
0.1	160	140	91	87	87.5a A	56.9a A	54.4a A
2.1	120	98	68	66	81.7b A	56.7a A	55.0a A
4.1	120	105	53	64	87.5a A	44.2b A	53.3a A
6.1	120	100	48	47	83.3ab A	40.0b A	39.2b B

小写字母和大写字母分别表示 0.05、0.01 显著水平。下同

Small letters and capital letters are significant at  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ . The same as below

## 2 结果与分析

### 2.1 $\text{CuSO}_4$ 对小麦成熟胚组织培养的影响

为研究  $\text{CuSO}_4$  不同浓度处理对小麦成熟胚再生效果的影响,明确小麦成熟胚再生适宜  $\text{CuSO}_4$  浓度,以 CB037 成熟胚破碎组织为材料,在其愈伤组织诱导 Adi 和 XCSX 培养基中分别添加  $\text{CuSO}_4$  0.1、2.1、4.1、6.1  $\mu\text{mol/L}$ 。结果表明,胚性愈伤组织诱导率分别为 87.5%、81.7%、87.5%、83.3%,愈伤组织分化率分别为 56.9%、56.7%、44.2%、40.0%,绿芽诱导率分别为 54.4%、55.0%、53.3%、39.2%, $\text{CuSO}_4$  6.1  $\mu\text{mol/L}$  处理绿芽诱导率最低,与其他 3 个处理间有显著差异(表 2)。结果表明,小麦成熟胚在含  $\text{CuSO}_4$  0.1~4.1  $\mu\text{mol/L}$  培养基上培养后培养效果无显著效果,当浓度提高至 6.1  $\mu\text{mol/L}$  用量时,降低了再生效率。

## 2.2 Fe 盐对小麦成熟胚组织培养的影响

为研究不同 Fe 盐浓度处理对小麦成熟胚再生效果的影响,明确小麦成熟胚再生适宜 Fe 盐用量,在愈伤组织诱导培养基 Adi 和 XCSX 中分别添加 Fe 盐 20 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 、60 $\mu\text{mol/L}$  5 个处理,培养 CB037 成熟胚破碎组织。结果发现,Fe 盐用量为 20 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 、

40 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 、60 $\mu\text{mol/L}$  时胚性愈伤组织诱导率分别为 76.9%、83.3%、84.4%、86.3%、94.1%,愈伤组织分化率分别为 38.5%、49.0%、46.9%、46.4%、46.2%,绿芽诱导率分别为 72.1%、88.2%、91.7%、93.5%、88.2%,EDTA-Fe 50 $\mu\text{mol/L}$  处理与其他 4 个处理在绿芽诱导率上存在极显著差异(表 3),表明小麦成熟胚培养 Fe 盐的适宜用量为 50 $\mu\text{mol/L}$ 。

表 3 小麦成熟胚在含不同浓度 EDTA-Fe 培养基上的再生效果

Table 3 Effect of different concentrations of EDTA-Fe on wheat mature embryo culture

浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) Concen- tration	成熟胚数 Mature embryos	胚性愈伤 组织数 Embryonic calli	分化 愈伤数 Different- iated calli	绿芽数 No. of plantlet	胚性愈伤组织 诱导率(%) Embryonic calli frequency	愈伤组织 分化率(%) Differentiated calli frequency	绿芽诱导率(%) Plantlet produced frequency
20	104	80	40	75	76.9c C	38.5b B	72.1d D
30	102	85	50	90	83.3b B	49.0a A	88.2c C
40	96	81	45	88	84.4b B	46.9a A	91.7b B
50	153	132	71	143	86.3b B	46.4a A	93.5a A
60	119	112	55	105	94.1a A	46.2a A	88.2c C

## 2.3 Fe 盐对小麦幼胚组织培养的影响

为评价 Fe 盐对不同小麦品种幼胚组织培养再生效果的影响,确定小麦幼胚培养适宜的 Fe 盐浓度,以 CB037、Bobwhite 和新春 9 号幼胚为材料,在添加不同 Fe 盐浓度的愈伤组织诱导培养基中进行培养,调查胚性愈伤组织诱导率、愈伤组织分化率和绿苗诱导率,比较不同浓度 Fe 盐的再生效果。

### 2.3.1 CB037 幼胚培养对不同 Fe 盐浓度的反应在培养 CB037 幼胚的 SD<sub>2</sub> 愈伤组织诱导培养基中

分别加入 20 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 、60 $\mu\text{mol/L}$  Fe 盐,研究 Fe 盐对 CB037 幼胚再生的影响。结果发现,胚性愈伤组织诱导率分别为 87.5%、86.8%、90.3%、79.6%、81.5%,愈伤组织分化率分别为 48.5%、53.0%、83.4%、42.2%、50.2%,绿芽诱导率分别为 139.0%、142.2%、370.3%、102.7%、122.9%,40 $\mu\text{mol/L}$  Fe 盐处理与其他 4 个处理间有极显著差异(图 1,表 4)。由此可知,CB037 幼胚在含 40 $\mu\text{mol/L}$  Fe 盐处理的培养基上培养可显著提高再生率。

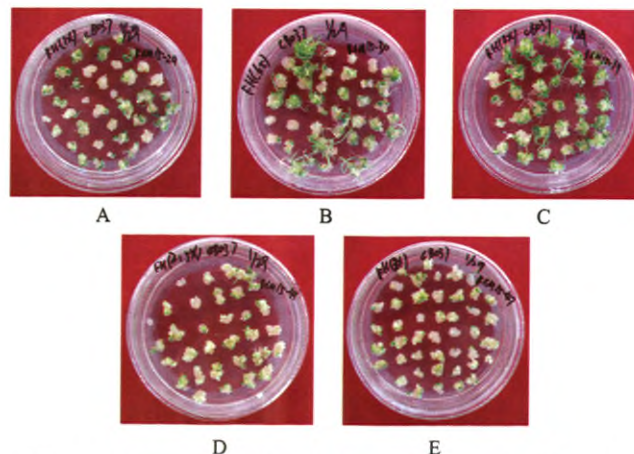


图 1 EDTA-Fe 不同处理对 CB037 幼胚再生效果的影响

Fig. 1 Effect of EDTA-Fe on the regeneration of CB037 immature embryos

A: 20 $\mu\text{mol/L}$ ; B: 30 $\mu\text{mol/L}$ ; C: 40 $\mu\text{mol/L}$ ; D: 50 $\mu\text{mol/L}$ ; E: 60 $\mu\text{mol/L}$

表 4 不同浓度 Fe 盐对 CB037 幼胚再生的影响

Table 4 Effect of EDTA-Fe on the immature embryo culture of CB037

浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) Concen - tration	成熟胚数 Mature embryos	胚性愈伤 组织数 Embryonic calli	分化 愈伤数 Different - iated calli	绿芽数 No. of plantlet	胚性愈伤组织 诱导率(%) Embryonic calli frequency	愈伤组织 分化率(%) Differentiated calli frequency	绿芽诱导率(%) Plantlet produced frequency
20	231	202	112	321	87.5a A	48.5b B	139.0b B
30	166	144	88	236	86.8a A	53.0b B	142.2b B
40	175	158	146	648	90.3a A	83.4a A	370.3a A
50	147	117	62	161	79.6a A	42.2b B	102.7d D
60	205	167	103	252	81.5a A	50.2b B	122.9c C

**2.3.2 新春 9 号幼胚培养对不同浓度 Fe 盐的反应** 新春 9 号幼胚在  $20\mu\text{mol/L}$ 、 $30\mu\text{mol/L}$ 、 $40\mu\text{mol/L}$ 、 $50\mu\text{mol/L}$ 、 $60\mu\text{mol/L}$  Fe 盐处理下胚性愈伤组织诱导率分别为 76.7%、60.9%、73.5%、49.2%、58.8%，愈伤组织分化率分别为 43.2%、14.6%、35.5%、7.9%、8.2%，绿芽诱导率分别为 134.3%、33.8%、87.4%、22.0%、12.4%，统计分析结果表明， $20\mu\text{mol/L}$  处理与其他 4 个处理间存在极显著差异(表 5)，该 Fe 盐浓度下新春 9 号幼胚再生效果显著提高。

**2.3.3 Bobwhite 幼胚在 Fe 盐不同浓度处理再生效果的研究** Bobwhite 幼胚在含  $20\mu\text{mol/L}$ 、 $30\mu\text{mol/L}$ 、 $40\mu\text{mol/L}$ 、 $50\mu\text{mol/L}$ 、 $60\mu\text{mol/L}$  Fe 盐的  $\text{SD}_2$  诱导培养基中培养后，胚性愈伤组织诱导率分别为 84.0%、73.5%、67.7%、70.1%、81.1%，愈伤组织分化率分别为 27.7%、20.6%、24.1%、13.7%、10.7%，绿芽诱导率分别为 61.7%、50.3%、58.0%、26.5%、6.1%。统计分析结果发现， $20\mu\text{mol/L}$  Fe 盐处理与其他 4 个处理间在绿芽诱导率上有极显著差异(表 6)，表明 Bobwhite 幼胚在含  $20\mu\text{mol/L}$  Fe 盐培养基上培养再生效果最好。

表 5 不同浓度 Fe 盐对新春 9 号幼胚再生效果的影响

Table 5 Regeneration of the immature embryos of Xinchun 9 effected by different concentrations of EDTA-Fe

浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) Concen - tration	成熟胚数 Mature embryos	胚性愈伤 组织数 Embryonic calli	分化 愈伤数 Different - iated calli	绿芽数 No. of plantlet	胚性愈伤组织 诱导率(%) Embryonic calli frequency	愈伤组织 分化率(%) Differentiated calli frequency	绿芽诱导率(%) Plantlet produced frequency
20	146	112	63	196	76.7a A	43.2a A	134.3a A
30	151	92	22	51	60.9bc AB	14.6b B	33.8c C
40	166	122	59	145	73.5a A	35.5a A	87.4b B
50	177	87	14	39	49.2c B	7.9c C	22.0d CD
60	170	100	14	21	58.8bc AB	8.2c C	12.4d D

表 6 不同浓度 EDTA-Fe 对 Bobwhite 幼胚培养效果的影响

Table 6 Evaluation of EDTA-Fe on the regeneration of the immature embryos of Bobwhite

浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) Concen - tration	成熟胚数 Mature embryos	胚性愈伤 组织数 Embryonic calli	分化 愈伤数 Different - iated calli	绿芽数 No. of plantlet	胚性愈伤组织 诱导率(%) Embryonic calli frequency	愈伤组织 分化率(%) Differentiated calli frequency	绿芽诱导率(%) Plantlet produced frequency
20	206	173	57	127	84.0a A	27.7a A	61.7a A
30	189	139	39	95	73.5b A	20.6ab A	50.3c B
40	195	132	47	113	67.7bc A	24.1a A	58.0b AB
50	204	143	28	54	70.1b A	13.7bc B	26.5d C
60	196	159	21	12	81.1a A	10.7c B	6.1e D

### 3 讨论

Vain 等<sup>[16-17]</sup>在添加 9.5mmol/L EDTA-Fe 的 MSB3 培养基上培养短柄草幼胚愈伤组织,发现植株再生率显著提高。本课题组参照这一结果,在添加 9.5mmol/L EDTA-Fe 的 MS 培养基上分别培养短柄草成熟胚愈伤组织和小麦幼胚愈伤组织,培养 1 周后愈伤组织全部褐化死亡。因此,本试验以 MS 培养基 Fe 盐标准用量 20 $\mu$ mol/L(1 $\times$ )为对照,设置了 30 $\mu$ mol/L(1.5 $\times$ )、40 $\mu$ mol/L(2 $\times$ )、50 $\mu$ mol/L(2.5 $\times$ )和 60 $\mu$ mol/L(3 $\times$ ) 5 个浓度梯度培养小麦成熟胚和幼胚。在本研究利用的 CB037、新春 9 号和 Bobwhite 基因型中,CB037 对 Fe 盐敏感性较差,培养基中加入较高浓度 Fe 盐明显提高其成熟胚和幼胚再生率;新春 9 号和 Bobwhite 则相反,高浓度 Fe 盐处理对愈伤组织诱导和分化具有抑制作用。Novotny 等<sup>[9]</sup>发现,大麦花药在无 Fe 元素诱导培养基上培养后基本失去再生能力,只能得到极少量的再生植株。Vagera 等<sup>[23]</sup>发现,烟草叶片在只添加 EDTA 而无 FeSO<sub>4</sub>存在的培养基中培养再生效果与对照培养基无显著差异,但前者愈伤组织生长极其缓慢。基因型是影响小麦愈伤组织形成和植株再生的重要因素之一<sup>[24]</sup>,本试验发现不同小麦基因型对相同浓度 Fe 盐敏感性不一致,相同基因型不同外植体对 Fe 盐敏感性亦有差异,幼胚比成熟胚更为敏感。在 Fe 盐相同培养条件下,CB037 幼胚再生率最高,新春 9 号次之,Bobwhite 最低。

Cu<sup>2+</sup> 是许多生化过程所需重要酶的辅助因子,Cu 酶在植物组织培养过程中扮演着重要角色<sup>[25]</sup>。添加 2.0~20 $\mu$ mol/L CuSO<sub>4</sub>的培养基能明显提高水稻愈伤组织绿苗分化,浓度过高则有抑制和毒害作用<sup>[25]</sup>。石云鹭等<sup>[26]</sup>将早稻品种 NPT 长期不分化的愈伤组织转移到添加 32 $\mu$ mol/L CuSO<sub>4</sub>分化培养基上,1 周后便有绿点发生,随后转入含有 12.8 $\mu$ mol/L CuSO<sub>4</sub>的分化培养基上,3 周后绿点形成幼芽,可见高浓度的 Cu<sup>2+</sup> 能明显促进愈伤组织分化。一项以大麦幼胚为对象的研究,发现 2 个栽培品种 Excel、Hector 分别在 5.0 $\mu$ mol/L 和 50.0 $\mu$ mol/L 浓度处理时再生效果最好,较高浓度 CuSO<sub>4</sub> 可促进愈伤组织分化<sup>[4]</sup>。小黑麦幼胚、小麦幼胚和烟草叶盘在 1~100 $\mu$ mol/L CuSO<sub>4</sub> 范围内显著提高愈伤组织分化率,而芸薹属植物愈伤组织培养效果几乎不受 CuSO<sub>4</sub> 影响<sup>[27]</sup>,40 $\mu$ mol/L CuSO<sub>4</sub> 能有效促进圆锥小

麦花药愈伤组织形成<sup>[28]</sup>,添加 58.8 $\mu$ mol/L AgNO<sub>3</sub> 和 12.5 $\mu$ mol/L CuSO<sub>4</sub> 的 MS 培养基可促进小麦成熟胚再生<sup>[29]</sup>。后猛等<sup>[30]</sup>以小麦成熟胚为外植体,发现在 CuSO<sub>4</sub> 浓度为 1 $\mu$ mol/L 的培养基上愈伤组织诱导率、胚性愈伤组织诱导率、愈伤组织分化率及植株再生率均达最高,表明适当增加培养基中的 CuSO<sub>4</sub> 浓度有助于提高小麦成熟胚培养再生率。本试验结果表明,愈伤组织诱导培养基中添加 0.1~4.1 $\mu$ mol/L CuSO<sub>4</sub> 对 CB037 成熟胚培养效果无显著影响,当浓度达 6.1 $\mu$ mol/L 时植株再生率降低极显著。较低浓度 CuSO<sub>4</sub> 处理时小麦组织培养改进效果不显著,与以上结果不完全一致,可能与小麦基因型不同有关。

### 4 结论

Fe 盐浓度 50~60 $\mu$ mol/L 有利于 CB037 成熟胚愈伤组织再生植株,60 $\mu$ mol/L 处理愈伤组织分化效果最好,50 $\mu$ mol/L 处理绿芽诱导率最高。不同基因型其幼胚对 Fe 盐的敏感度不同,40 $\mu$ mol/L 处理显著提高 CB037 幼胚愈伤组织分化,新春 9 号和 Bobwhite 幼胚培养适宜的 Fe 盐浓度为 20 $\mu$ mol/L。在相同培养条件下,CB037 幼胚再生率最高,新春 9 号次之,Bobwhite 最低。

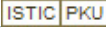
### 参考文献

- [1] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures[J]. *Physiol Plant*, 1962, 15 :473-497
- [2] Carman J G, Jefferson N E, Campbell W F. Induction of embryogenic *Triticum aestivum* L. calli. I. Quantification of genotype and culture medium effects[J]. *Plant Cell, Tissue Organ Cul*, 1987, 10 :101-103
- [3] He D G, Yang Y M, Scott K J. The effect of macroelements in the induction of embryogenic callus from immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Plant Sci*, 1989, 64 :251-258
- [4] Dahleen L S. Improved plant regeneration from barley callus cultures by increased copper levels[J]. *Plant Cell Tissue Organ Cul*, 1995, 43 :267-269
- [5] Ramage C M, Williams R R. Mineral nutrition and plant morphogenesis[J]. *In Vitro Cell DEV-PL*, 2002, 38 :116-124
- [6] DeFossard R, Myint A, Lee E C M. A broad spectrum tissue culture experiment with tobacco (*Nicotiana tabacum*) pith tissue callus[J]. *Physiol Plant*, 1974, 30 :125-130
- [7] Preece J E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators? [J]. *Plant Tissue Cul Biotechnol*, 1995, 1 :26-37
- [8] Poddar K, Vishnoi R K, Kothari S L. Plant regeneration from embryogenic callus of finger millet, *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. on higher concentrations of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> as replacement of NAA in the medium[J]. *Plant Sci*, 1997, 129 :101-106
- [9] Novotny J, Vagera J, Ohnoutková L. Effects of free and chelated





## 培养基中CuSO<sub>4</sub>和Fe盐浓度对小麦胚培养再生效果的影响

作者: 别晓敏, 杜丽璞, 徐惠君, 叶兴国, BIE Xiao-min, DU Li-pu, XU Hui-jun, YE Xing-guo  
作者单位: 中国农业科学院作物科学研究所/农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程/农业部作物遗传育种重点开放实验室, 北京, 100081  
刊名: 植物遗传资源学报   
英文刊名: Journal of Plant Genetic Resources  
年, 卷(期): 2011, 12(6)

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zwyczyxb201106022.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201106022.aspx)