



## 抑制玉米幼胚愈伤组织褐化的研究

宋钦虎, 郭新梅, 裴玉贺, 宋希云

(青岛农业大学农学与植物保护学院/青岛市主要农作物种质创新与应用实验室, 山东青岛 266109)

**摘要:** 褐化是植物组织培养中一种常见的问题, 直接影响组织培养能否成功。为了控制植物组织培养中的褐化现象, 选取3个玉米自交系丹黄25、P138、H21的幼胚为外植体, 着重探讨胚龄, 2,4-D、甘露醇、L-脯氨酸和AgNO<sub>3</sub>浓度对玉米幼胚愈伤组织褐化的影响。结果表明, 选取授粉11天的‘丹黄25’幼胚、13天的P138和H21幼胚接种到诱导培养基中, 待长出愈伤后转移到添加2 mg/L 2,4-D、10 g/L甘露醇、10 mg/L L-脯氨酸、10 mg/L硝酸银的继代培养基上, 愈伤组织褐化率显著降低, 表明培养基的种类及添加物对愈伤组织的生长有重要影响。

**关键词:** 玉米幼胚; 愈伤组织; 组织培养; 褐化

中图分类号: S513

文献标志码: A

论文编号: 2011-0939

### Primary Study on Reducing Browning of Callus Induced from Maize Immature Embryo

Song Qinhu, Guo Xinmei, Pei Yuhe, Song Xiyun

(Qindao Key Lab of Germplasm Innovation and Application of Major Crops/College of Agronomy and Plant Protection Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong, China)

**Abstract:** Material browning was a universal phenomenon in plant-tissue culture, and it play a vital role in plant-tissue culture. To control the browning of plant-tissue culture, the immature embryos of three maize inbred lines (Danhuang 25, P138, H21) were used in the experiment. Effect of embryo age, 2,4-D concentration, mannitol concentration, L-proline and silver nitrate concentration on the browning of maize calli were studied. The results showed that the embryos selected from ‘Danhuang 25’ (11-day after self-pollination), P138 and H21 (13-day after self-pollination) were inoculated into induction medium and then their callus browning could be significantly inhibited by addition of 2 mg/L 2, 4-D, 10 g/L mannitol, 10 mg/L L-proline, 10 mg/L silver nitrate in subculture medium, indicated that the type of medium and additived have a major impact on callus growth.

**Key words:** Maize Immature Embryo; Callus; Tissue Culture; Browning

### 0 引言

褐化是植物组织培养中普遍存在的问题, 与污染和玻璃化并称为植物组织培养的三大难题。植物组织培养中的褐化是指在外植体诱导初分化或再分化过程中, 自身组织从表面向培养基释放褐色物质使培养基逐渐变褐, 外植体也随之变褐而死亡的现象<sup>[1]</sup>。引起

外植体褐化的因素有很多, 机理也比较复杂。多数研究认为褐化的发生可以分为两种形式, 一是由于细胞受胁迫条件造成的细胞死亡或细胞的自然死亡而形成的褐化现象; 二是细胞中的酚类物质被多酚氧化酶(PPO)氧化成棕褐色的醌类, 从而抑制细胞内其他酶的活性, 使细胞内的代谢改变, 导致外植体变褐死

**基金项目:** 山东省科技厅良种产业化工程项目“高产优质抗逆加工用玉米新品种培育”(620936); 青岛市科技支撑计划“玉米优质高产品种选育及产业化开发”(09-1-1-70-nsh); 山东省泰山学者岗位项目“作物栽培学与育种学”。

**第一作者简介:** 宋钦虎, 男, 1987年出生, 山东青岛人, 硕士, 主要从事玉米分子育种工作。通信地址: 266109 山东省青岛市城阳区长城路700号 青岛农业大学生命科学学院09级研究生, E-mail: songqinhu.love@163.com。

**通讯作者:** 宋希云, 男, 1961年出生, 教授, 博士, 主要从事植物遗传育种与分子生物学方面的研究。通信地址: 266109 山东省青岛市城阳区长城路700号 青岛农业大学农学与植物保护学院, Tel: 0532-86080009, E-mail: songxy@qau.edu.cn。

**收稿日期:** 2011-11-07, **修回日期:** 2012-02-20。



亡<sup>[2]</sup>。陈秀芳等<sup>[3]</sup>研究证明褐变程度与总酚含量以及PPO活性之间存在一定的关系,但因品种而异。而罗晓芳等<sup>[4]</sup>的研究表明,多酚氧化酶的活性与组织培养材料的褐变不呈正相关,但酚类物质的总含量与褐变有一定的关系,同时易褐变材料的褐变程度随培养时间的延长不断增加。但目前国内研究报道中未找到能够显著抑制玉米幼胚褐化的方法。

在组织培养过程中,影响外植体褐化的因素主要分为2个方面<sup>[5]</sup>:(1)外植体自身的原因,包括外植体的基因型、生理状态、遗传特性等;(2)外植体所处的环境,包括培养基的种类以及培养条件等。笔者针对褐化产生的原因,以玉米自交系‘丹黄25’、P138、H21自交授粉10~15天的幼胚为外植体,对玉米幼胚胚龄、2,4-D、甘露醇、硝酸银和L-脯氨酸多个因素对愈伤组织褐化的影响进行了探讨,以期降低愈伤组织诱导和继代过程中的褐化率,为建立玉米幼胚培养体系奠定基础。本研究旨在建立广泛使用的玉米幼胚再生体系,为进一步完善玉米品种选育的方法、提高遗传转化的成功率提供理论基础和技术方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

玉米自交系‘丹黄25’、P138和H21,由青岛农业大学玉米分子育种室提供。2011年5月在青岛农业大学城阳试验田试验田种植。

### 1.2 培养基

1.2.1 诱导培养基 N6基本培养基+10 mg/L AgNO<sub>3</sub>+100 mg/L 肌醇+4 mg/L 2,4-D+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂粉,pH 5.8,121℃、20 min 高温高压灭菌。

1.2.2 继代培养基 N6基本培养基+2 mg/L 甘氨酸+0.5 mg/L 烟酸+500 mg/L 水解酪蛋白+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂粉(pH 5.8),并添加不同浓度的2,4-D(0,1,2,3 mg/L)、甘露醇(0,10,20,30 g/L)、AgNO<sub>3</sub>(0,10,20,30 mg/L),pH 5.8,121℃、20 min 高温高压灭菌。

### 1.3 数据统计分析

实验数据采用DPS 7.05统计软件处理,试验中胚龄、2,4-D、甘露醇、L-脯氨酸和AgNO<sub>3</sub>4个因素,每处理分别选用600、400、400、500个幼胚,每个处理3次重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 胚龄对胚性愈伤组织褐化的影响

分别取胚龄为9、11、13、15天的果穗接种幼胚,26℃暗培养,待长出愈伤后统计褐化率。由表1可知,同一自交系不同胚龄幼胚诱导出的愈伤组织褐化率差距较大。胚龄15天的‘丹黄25’幼胚诱导的愈伤组织

表1 胚龄对愈伤组织褐化的影响

胚龄/d	基因型	平均褐化率/%	5%显著水平	1%显著水平
9	丹黄25	73.03	bc	ABC
	P138	79.32	ab	ABC
	H21	80.82	a	AB
11	丹黄25	50.56	d	D
	P138	68.74	c	C
	H21	70.77	c	ABC
13	丹黄25	69.54	c	C
	P138	54.90	d	D
	H21	56.91	d	D
15	丹黄25	81.37	a	A
	P138	69.98	c	BC
	H21	71.70	bc	ABC

褐化率最高,达到81.37%;11天的幼胚诱导愈伤组织褐化率最低,只有50.56%。胚龄13天的P138和H21幼胚诱导的愈伤组织褐化率最低,分别为54.90%、56.91%。

胚龄对胚性愈伤组织的褐化率影响差异比较显著。从技术的可操作性和培养性状来讲,12天左右的幼胚一般在1.5 mm左右,幼胚容易从果穗上剥离,可操作性强,易大量培养<sup>[6]</sup>。胚龄较大的幼胚在诱导培养基上容易生根生芽不易形成胚性愈伤组织;胚龄较小诱导出的愈伤组织发粘、胚性差,不能继代。综合幼胚大小和胚龄2个因素,P138和H21自交系最适接种时期为授粉后13天,而‘丹黄25’是11天。

### 2.2 2,4-D浓度对胚性愈伤组织褐化的影响

2,4-D作为生长激素,在植物愈伤组织诱导和继代培养中广泛使用,它能诱发细胞脱分化,产生愈伤组织<sup>[7]</sup>,是玉米幼胚胚性愈伤诱导的关键因素。2,4-D不仅影响愈伤组织的诱导率,而且还对愈伤组织的颜色、质地、形态及生长状况都有很大影响<sup>[8]</sup>。

将长势接近的愈伤接种于2,4-D浓度为0、1、2、3 mg/L的继代培养基中,愈伤组织连续继代2次后,统计褐化率。从表2可以看出,在一定范围内随着2,4-D浓度的提高,3个自交系褐化率均出现降低趋势,当2,4-D浓度为2 mg/L时,3个自交系褐化率最低,分别是33.77%、38.19%、37.17%;当2,4-D浓度小于2 mg/L时,愈伤组织均呈现不同程度的水渍状,褐化率升高;当2,4-D浓度为3 mg/L时,愈伤组织出现生长迅速、褐化严重的现象。试验发现当2,4-D浓度为2 mg/L时幼胚诱导的愈伤组织大多为胚性愈伤组织。综上考虑,继代培养基中最适2,4-D浓度为2 mg/L。



表2 2,4-D浓度对愈伤组织褐化的影响

2,4-D浓度/(mg/L)	基因型	平均褐化率/%	5%显著水平	1%显著水平
0	丹黄25	63.02	a	AB
	P138	55.11	bc	ABC
	H21	65.06	a	A
1	丹黄25	42.52	d	DE
	P138	44.06	d	DE
	H21	40.45	de	E
2	丹黄25	33.77	e	E
	P138	38.19	de	E
	H21	37.17	de	E
3	丹黄25	51.95	c	CD
	P138	54.32	bc	BC
	H21	61.37	ab	ABC

### 2.3 甘露醇浓度对胚性愈伤组织褐化的影响

在继代培养初期,未添加甘露醇的部分愈伤组织呈水浸状,白色半透明,质地松软,不能转化为正常的胚性愈伤组织,发生这种现象主要是由于培养基的渗透压太低,细胞吸水过度;在继代培养后期,大部分愈伤组织相继呈水渍型,逐渐褐化死亡。当加入10 g/L的甘露醇后,愈伤组织生长状况较好,水渍型愈伤组织基本不出现;当甘露醇增加到20~30 g/L时,褐化率保持在较低水平,但多次继代后,愈伤组织开始变白,质地变硬,呈紧缩颗粒状,再分化困难(表3)。因此,综合褐化率和愈伤组织分化的表现,继代培养基中甘露醇浓度以10 g/L为宜。

表3 甘露醇浓度对愈伤组织褐化的影响

甘露醇浓度/(g/L)	基因型	平均褐化率/%	5%显著水平	1%显著水平
0	丹黄25	72.37	bc	BC
	H21	77.52	ab	AB
10	丹黄25	59.23	d	D
	H21	65.32	c	C
20	丹黄25	73.67	bc	BC
	H21	71.79	c	BC
30	丹黄25	77.43	ab	AB
	H21	81.97	a	A

### 2.4 L-脯氨酸和AgNO<sub>3</sub>对胚性愈伤组织褐化的影响

AgNO<sub>3</sub>在胚性愈伤组织的诱导及提高质量方面有一定的作用<sup>[9]</sup>,继代培养基中添加一定浓度的AgNO<sub>3</sub>可以减缓愈伤组织褐化的发生。从表4中可以看出,当AgNO<sub>3</sub>浓度在0~10 mg/L范围内,有利于‘丹黄25’和H21胚性愈伤组织的诱导,褐化率明显降低;当

表4 AgNO<sub>3</sub>浓度对褐化的影响

AgNO <sub>3</sub> 浓度/(mg/L)	基因型	平均褐化率/%	5%显著水平	1%显著水平
0	丹黄25	74.84	de	BC
	H21	81.03	bc	AB
10	丹黄25	62.39	f	D
	H21	70.09	e	C
20	丹黄25	74.57	de	BC
	H21	79.61	cd	AB
30	丹黄25	87.57	a	A
	H21	86.36	ab	A

AgNO<sub>3</sub>浓度在20~30 mg/L时,愈伤组织出现只长根,不长芽的现象,不能正常分化成幼苗,且褐化率明显变大。

当继代培养基中AgNO<sub>3</sub>浓度确定为10 mg/L时,分别向培养基中加入0、10、20、30 mg/L的L-脯氨酸。如表5所示,当L-脯氨酸的浓度为20 mg/L,‘丹黄25’、H21的褐化率分别由以前的74.57%、79.61%降低至70.37%、75.32%;当L-脯氨酸的浓度为30 mg/L,褐化率分别由87.57%、86.36%降低至72.38%、78.58%;当L-脯氨酸的浓度为10 mg/L,褐化率由62.39%、70.09%降到55.29%、64.1%。所以,培养基中L-脯氨酸的浓度为10 mg/L时,能够显著降低愈伤组织的褐化率,改善愈伤的质量;L-脯氨酸浓度过高或过低,对愈伤组织的诱导和生长影响不大。

表5 添加10 mg/L的AgNO<sub>3</sub>条件后, L-脯氨酸浓度对褐化的影响

L-pro浓度/(mg/L)	基因型	平均褐化率/%	5%显著水平	1%显著水平
0	丹黄25	71.38	c	BC
	H21	79.28	a	A
10	丹黄25	55.29	e	E
	H21	64.1	d	D
20	丹黄25	70.37	c	C
	H21	75.32	b	AB
30	丹黄25	72.38	bc	BC
	H21	78.58	a	A

## 3 结论与讨论

近年来,随着转基因技术、无毒苗和无性繁殖技术的发展,植物组织培养中的褐化问题成为一大障碍。幼胚胚龄是影响胚性愈伤组织褐化率的重要因素。胚龄不同,体内激素水平和代谢水平不同,直接影响愈伤组织的诱导<sup>[10]</sup>。胚龄过大,分化能力较强,易长成植



株,不能或只出现少量的愈伤组织;幼胚过小,诱导出胚性愈伤组织质量较差,诱导率也较低。本试验结果表明,‘丹黄25’最适接种时期为授粉后11天,而P138和H21是13天。

2,4-D对玉米胚性愈伤组织的诱导及生长是必不可少的。在玉米组织培养过程中,2,4-D虽然可以起到诱导作用,但对愈伤组织的伤害作用较大<sup>[11]</sup>,故培养基中的浓度不宜过大,以减少组织培养中的无性系变异<sup>[12]</sup>。因此,在继代培养过程中要根据愈伤的生长状况及时调整2,4-D的浓度,使愈伤保持长时间的生长和分化能力。本实验中3个玉米自交系的愈伤组织在2,4-D浓度为2 mg/L时诱导率最高,生长良好,这与大多数研究的结论相符<sup>[13-15]</sup>。

甘露醇作为培养基中的渗透压调节剂,可以改善已经诱导出的愈伤组织的质量,使其更松软、更适合后期转化使用<sup>[16]</sup>。对于本身不能诱导出愈伤组织的品种,渗透调节剂对提高胚性愈伤组织的诱导作用不显著<sup>[16]</sup>。本试验中当继代培养基甘露醇浓度为10 g/L时,能够得到质量较高的愈伤组织,而王宏伟等<sup>[17]</sup>用‘沈农266’、‘沈农糯玉米’、‘沈农黄玉米’、‘东糯2号’诱导胚性愈伤,证明添加20 g/L甘露醇时愈伤组织质量最好。这可能是玉米的基因型不同所造成的。

AgNO<sub>3</sub>能够促进单子叶和双子叶植物离体形态的发生<sup>[18-19]</sup>。植物细胞在体外培养过程中会产生乙烯,高浓度的乙烯会影响植物细胞的生长发育,而Ag<sup>+</sup>通过与细胞膜上的乙烯受体蛋白竞争性结合,从而消除或降低乙烯的作用<sup>[20]</sup>。玉米组织培养中也有使用AgNO<sub>3</sub>的报道,但浓度差异较大,主要是基因型造成的。基因型之间可能存在着银离子的感受性、耐受性和反应的差异性,这说明基因型决定了最适合的AgNO<sub>3</sub>浓度<sup>[21]</sup>。本研究结果表明,随着AgNO<sub>3</sub>浓度的增加,控制褐化的效果先增强后减弱,AgNO<sub>3</sub>浓度为10 mg/L时效果最好;浓度过高或过低,褐化率急剧上升,说明AgNO<sub>3</sub>浓度存在一个临界值<sup>[22]</sup>。因此,继代培养基中可以设计更加精确的AgNO<sub>3</sub>梯度浓度,以期得到AgNO<sub>3</sub>最适浓度。另外,笔者还发现L-脯氨酸配合AgNO<sub>3</sub>使用能够有效地降低愈伤的褐化现象,国内的研究还未见报道。原因可能是L-脯氨酸能在一定程度上减轻多余的银离子对愈伤组织细胞的毒害作用。

褐化现象在愈伤组织培养中一直不同程度的存

在,引起褐化的因素是复杂的,既有培养物本身的原因,也有培养环境的原因,而且往往是多种因素共同作用的结果。对于影响褐化的因素,除笔者在研究中所讨论的外,培养基的种类及硬度,培养基中活性炭的浓度,抗氧化剂的浓度,外植体的消毒,温度,光照,材料的预处理,加快继代转瓶的速度等众多因素对褐化有影响<sup>[4]</sup>。因此,抑制褐化的方式多种多样,在试验中可将不同处理综合使用。本研究表明,自交授粉11天后的丹黄25幼胚、13天后的P138和H21幼胚,在继代培养基中添加2 mg/L的2,4-D、10 g/L的甘露醇、10 mg/L硝酸银、10 mg/L的L-脯氨酸后,能够有效地抑制或减轻愈伤组织褐化的产生。但不同基因型的愈伤组织对培养基及环境因素有不同要求。因此,不同的基因型采取与之相对应的处理,并在实践中不断试验,以期能够找到一种适合大多数基因型愈伤组织生长的培养基。

## 参考文献

- [1] 翟晓巧.木本植物组织培养褐化控制策略[J].河南林业科技,2008,28(1):38-40.
- [2] Asmus, Hanneh. Enzymatic browning of vegetables calibration and analysis of variance by multiway methods[J]. Chemometrics Intelligent Laboratory Systems,1996(34):85.
- [3] 陈秀芳,王坤范.桃果实发育中褐变因子变化规律的研究[J].园艺学报,1995,22(3):230-234.
- [4] 罗晓芳,田砚亭,姚洪亭.组织培养过程中PPO活性和总酚含量的研究[J].北京林业大学学报,1999,21(1):92-95.
- [5] 郭艳,杨海玲.植物组织培养中的褐化现象及解决途径[J].山西农业科学,2009,37(7):14-16.
- [6] 李慧芬,李芬,宋桂茹,等.玉米优良自交系E28愈伤组织继代及再生[J].吉林农业大学学报,1999,21(2):10-12.
- [7] Green C E, Philips R I. Plang regeneration from tissue cultures of maize[J]. Crop Science,1975(15):417-418.
- [8] 陈桂信,谢文龙,潘东明,等.幼胚胚性愈伤组织诱导的研究[J].江西农业大学学报,2006,28(1):44-49.
- [9] 肖莉杰,苍晶,徐仲,等.黑龙江省骨干玉米自交系愈伤组织的诱导及植株再生[J].东北农业学报,2003,34(1):63-67.
- [10] 付凤玲,冯质雷,渠柏艳,等.玉米未成熟胚胚性愈伤组织诱导率与内源激素含量的关系[J].核农学报,2006,20(1):10-14.
- [11] 黄璐,卫志明.不同基因型玉米的再生能力和胚性与非胚性愈伤组织的DNA的差异[J].植物生理学报,1999,25(4):332-338.
- [12] 王雷,张君,于彦春,等.胚龄和2,4-D浓度对玉米自交系幼胚愈伤组织诱导率的影响[J].玉米科学,2001,9(3):26-28.
- [13] 王汉宁,张金文,孔维萍,等.玉米幼胚愈伤组织诱导及再生[J].玉米科学,2006,14(5):71-73.
- [14] 王小红.影响玉米幼胚愈伤组织诱导及植株再生因素的研究[J].湖南农业科学,2010,2(3):20-22.



- [15] 牛亚玲,王丕武,曲静,等.优良玉米自交系丹598和丹988幼胚愈伤组织的诱导和再生[J].分子植物育种,2009,7(4):716-720.
- [16] 高武军,孙富丛,魏开发,等.玉米胚性愈伤组织诱导与分化的影响[J].华北农学报,2005,20(1):27-30.
- [17] 王宏伟,史振声,邢志远.玉米幼胚组织培养褐化发生因素的研究[J].安徽农业科学,2006,34(18):4665-4666.
- [18] 王洋,崔继哲,李翠玲.大白菜高频再生体系的建立及策略[J].园艺学报,2005,32(4):701-703.
- [19] 何盛莲,崔党群,陈军营,等.小麦幼胚培养特性对外源物质响应的研究[J].西北农业学报,2006,15(2):49-53.
- [20] Songstad D D, Armstrong C L, Peterson W L. AgNO<sub>3</sub> increases type II callus production from immature embryos of maize inbred B73 and its derivatives[J]. Plant Cell Reports, 1991, (9): 699-702.
- [21] Chi G L, Barfield D G, Sim G E. Effect of AgNO<sub>3</sub> and aminomethoxyvinylglycine on recalcitrant brassica genotypes[J]. Plant Cell Reports, 1990(9):195-201.
- [22] 马丽.玉米自交系幼胚高效再生系统的建立[J].西北农业学报, 2007,16(6):85-89.

#### (上接第4页)

- [25] 肖国华,欧阳先辉,陈同旺,等.稻草覆盖还田晚稻免耕节水栽培技术应用研究[J].作物研究,200,20(3):220-222.
- [26] 谭周进,李倩,陈冬林,等.稻草还田对晚稻土壤微生物及活性的影响[J].生态学报,2006,26(10):3385-3392.
- [27] 金海洋,姚政,等.秸秆还田对土壤生物特性的影响研究[J].上海农业报,2006,22(1):39-41.
- [28] 刘天学,纪秀娥.焚烧秸秆对土壤有机质和微生物的影响研究[J].土壤,2003,35(4):347-348.
- [29] 何虎.稻草全量还田下氮肥运筹对晚稻产量形成的影响及其机理[D].南昌:江西农业大学,2010.
- [30] 李新举,张志国,李贻学.土壤深度对还田秸秆腐解速度的影响[J].土壤学报,2001,38(1):135-138.
- [31] 李正风,张晓海,夏玉珍.秸秆还田改良土壤提高烟叶品质的应用初探[J].农业网络信息,2007(5):237-240.
- [32] 李正风,张晓海,夏玉珍.秸秆还田在植烟土壤性状改良上应用的研究进展[J].中国农学通报,2007,23(5):165-170.
- [33] 志贺一一,龙习才,杨国治.水稻土中各种有机物质的分解过程[J].土壤学进展,1991,19(6):34-39.
- [34] 王维敏.麦秸、氮肥与土壤混合培养时氮素的固定、矿化与麦秸的分解[J].土壤学报,1986,23(2):97-104.
- [35] 陈尚洪.还田秸秆腐解规律特征及其对稻田土壤碳库的影响研究[D].成都:四川农业大学,2007.
- [36] 顾丽.长期与短期秸秆还田后稻米品质的差异性变化研究[D].扬州:扬州大学,2008.
- [37] 徐国伟.种植方式、秸秆还田与实地氮肥管理对水稻产量与品质的影响及其生理的研究[D].扬州:扬州大学,2007.
- [38] 刘阳.不同生态条件下稻米品质对施氮反应的差异[D].扬州:扬州大学,2006.
- [39] 韩惠芳,宁堂原,田慎重,等.土壤耕作及秸秆还田对夏玉米田杂草生物多样性的影响[J].生态学报,2010,30(5):1140-1147.