

玉米幼胚组织培养褐化发生因素的研究

王宏伟¹, 史振声¹, 邢志远² (1. 沈阳农业大学玉米研究所, 辽宁沈阳 110161; 2. 辽宁省高速公路管理局, 辽宁沈阳 110000)

摘要 以5个不同基因型玉米为材料, 对影响玉米幼胚组织培养褐化发生的因素进行了初步研究。结果表明, 基因型不同的材料发生褐化的程度不同。参试材料以沈农糯玉米和白糯1号褐化率较低; 培养基添加20 g/L甘露醇后褐化率由高于30%降到10%以下; 培养温度为24~25℃时, 幼胚褐化率最低。

关键词 玉米幼胚; 组织培养; 褐化

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2006)18-4665-02

Study on the Factors Affecting the Browning in Maize Immature Embryo Tissue Culture

WANG Hong-wei et al (Maize Institute of Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract 5 different genotypes of maize varieties were used as materials in the study. The results indicated the browning rate was different because of different genotype materials. The browning rates of Shennong Nuo maize and Bainuo No. 1 were lower than those of other materials. The browning rate dropped to lower than 10% from higher than 30% with 20 g/L D-Mannitol added in the medium. The browning rate of maize immature embryo was the lowest while the temperature was 24~25℃ in the tissue culture.

Key words Maize immature embryo; Tissue culture; Browning

褐化是组织培养过程中经常遇到的问题, 是影响组织培养成功与否的重要因素之一。褐化严重者不能产生愈伤组织, 有时即使产生白色颗粒状的愈伤, 质地也很硬, 无分化能力; 继代过程中, 褐化会使愈伤组织生长受到抑制, 其发育质量受到影响, 愈伤组织难以保存; 分化过程中, 褐化影响根的形成和发育, 严重的甚至腐烂死亡。适宜的外植体、培养基和培养条件可以控制某些组织培养过程中的褐化问题。徐振彪建立了一种半固体系统可以控制分化过程中的褐化, 半固体培养系统中琼脂的用量是一个关键因素, 1.0~1.5 g/L琼脂效果最佳^[1]。姚洪军等指出, 适量的无机盐成分、激素、蔗糖、温度及黑暗条件可以明显减轻材料的褐变^[2]。为减轻褐化对玉米组织培养造成影响, 笔者初步研究了玉米幼胚诱导和继代培养过程中可能引起褐化的因素。

1 材料与方法

1.1 材料 选用基因型不同的玉米品种, 即沈农266、沈农糯玉米、沈农黄玉米、东糯2号(均由沈阳农业大学玉米研究所提供)和白糯1号(由中国农业大学提供)。

1.2 培养基

1.2.1 诱导培养基。改良MS培养基+30 g/L蔗糖+8 g/L琼脂+700 mg/L水解酪蛋白+1 000 mg/L L-脯氨酸+4 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA+1.5 mg/L AgNO₃, 121℃高温条件下高压灭菌20 min, pH值为5.8~6.0。

1.2.2 继代培养基。继代培养基组成与诱导培养基相同, 但2,4-D浓度降为2 mg/L。

1.3 方法

1.3.1 愈伤组织诱导培养。接种时, 取授粉11~14 d的雌幼穗, 去苞叶, 用75%酒精浸泡10 min后用无菌水冲洗3~4次。选取穗中部1.5~2 mm幼胚, 盾片朝上接种, 每瓶接种幼胚8~10个, 每个处理接种幼胚30~50个。黑暗, (26±1)℃条件下进行培养, 1周左右去胚芽, 3周后调查愈伤组织诱导率。消毒和取胚接种均在超净工作台上进行。

1.3.2 愈伤组织继代培养。将诱导获得的Ⅱ型愈伤组织夹成2 mm左右小块, 接种在继代培养基中, 每培养皿30块左右。培养条件与愈伤组织诱导条件相同。

2 结果与分析

2.1 外植体材料对褐化的影响 表1表明, 不同基因型材料经诱导和愈伤组织继代培养后褐化率不同。所试验的5个材料中沈农糯玉米的诱导褐化率和继代褐化率都最低; 其次为白糯1号, 其褐化率都在10%以下; 其他3个材料的褐化率都超过10%, 最高可达33.3%。所以, 相同培养条件下, 应选择发生褐化程度较轻的材料作为组织培养的基本材料。

除与材料本身基因型有关外, 诱导过程中幼胚发生褐化还和幼胚的受伤程度有关。材料伤口分泌的酚类化合物会在多酚氧化酶作用下转变为褐醌^[3]。所以, 挑取幼胚时应尽量小心, 以免伤口分泌酚类物质, 加重幼胚褐化。

表1 不同外植体材料诱导和继代培养的褐化情况 %

	诱导褐化率	继代褐化率
沈农266	13.3	11.4
沈农糯	6.4	5.1
沈农黄	33.3	20.5
东糯2号	26.0	25.6
白糯1号	8.3	8.2

2.2 甘露醇浓度对褐化的影响 在胚性愈伤诱导初期, 即接种后5~7 d, 水渍型愈伤就在盾片不同部位出现。这些愈伤呈水浸状, 白色, 半透明, 质地松软, 多次继代仍不能转化为正常胚性愈伤。在后期大部分水渍型愈伤逐渐褐化死亡。即使有的盾片产生少量鲜黄、致密的正常愈伤, 后期也会逐渐水渍化。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。在诱导培养基中加入甘露醇来调节渗透压, 可以降低幼胚褐化死亡频率。

表2表明, 甘露醇改善了幼胚的褐化, 但加入量不同, 结果也不同。当加入10 g/L甘露醇时, 对降低褐化的作用不大; 当甘露醇增加到20和30 g/L时, 褐化率降低到10%以下。继代2~3代后, 加入30 g/L甘露醇培养基上的胚性愈伤组织开始泛白, 质地变硬, 颗粒状胚性愈伤组织紧缩, 表明

基金项目 沈阳农业大学青年教师科研基金资助项目(200310)。

作者简介 王宏伟(1974-), 女, 辽宁朝阳市人, 在读博士, 助理研究员, 从事玉米遗传育种及生物技术研究。

收稿日期 2006-07-28

愈伤组织分化困难,即使分化也只能得到生长势弱的矮化畸形苗。所以,综合褐化率和愈伤组织分化,培养基中以加入 20 g/L 甘露醇为宜。

表 2 甘露醇浓度对幼胚褐化的影响

甘露醇浓度/g/L	材料	诱导褐化率	继代褐化率
10	沈农 266	13.1	10.8
	沈农黄	30.0	12.7
	东糯 2 号	27.1	22.0
20	沈农 266	8.9	5.6
	沈农黄	4.7	3.2
	东糯 2 号	6.0	7.5
30	沈农 266	10.2	5.2
	沈农黄	4.0	8.7
	东糯 2 号	4.0	2.0

2.3 培养条件对褐化的影响 培养条件也是引起褐化的主要原因,主要包括温度、光照和 pH 值。该试验只就温度对沈农 266 幼胚组织培养褐化的影响进行了研究。

研究表明,培养温度为 22℃ 时,虽然未见褐化的幼胚,但幼胚生长缓慢,培养 3 周只有少量的愈伤诱导;温度为 24 和 25℃ 时,幼胚褐化率接近,且都低于 10%;当温度升高到 26~27℃ 时,幼胚生长较快,且诱导的愈伤表面水渍化严重,导致褐化率升高。所以,幼胚培养温度不宜过高也不宜过低,对于该试验所选材料 24~25℃ 为最佳培养温度。

据报道,光照也会使组织培养的褐化率提高。其原因可能是酚类物质在合成醌类物质的过程中,需要受光诱导酶的参与^[4]。培养环境充分通风透气,保证氧气供应充分,也会降低因环境对外植体造成胁迫而引起褐化程度。

2.4 其他因素对褐化的影响 周洪生报道添加 1 g/L NaCl 和 0.5 g/L KCl 以调节培养基渗透压,可明显改善愈伤组织的褐化^[5]。培养基中加入抗坏血酸、半胱氨酸等还原剂对褐化也有较强的抑制作用^[6]。黄浩等认为水解乳蛋白有一定的抗褐化作用^[7]。培养基状态对褐化也有一定的影响。一般降低琼脂用量,使用半固体培养基时,外植体溢出的毒害物质很快扩散,对外植体伤害较轻。诱导培养基和继代培养基

使用较高浓度 2,4-D(4 mg/L)和添加一定浓度的 AgNO₃ 也能在一定程度上防止愈伤组织的水渍化和褐化。

3 讨论

褐变是植物组织培养中的一种常见现象,目前已成为植物组织培养发展的一大障碍。褐变分为酶促和非酶促褐变 2 种,而植物组织培养中的褐变主要是由多酚氧化酶(PPO)引起的^[8]。关于褐变发生的机制还不是很清楚。叶梅等报道有 3 种假说,即酚、酚酶的区域性分布假说、自由基伤害假说和保护酶系统假说^[9]。叶梅等推测在正常条件下,多酚类物质分布在细胞液泡内,而酚酶则分布在各种质体或细胞质内,这种区域性分布使底物与酚酶由质膜分隔开来。在外植体处于机械损伤等逆境时,细胞膜结构遭到了破坏,超氧化歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶三者作用失调,活性氧的产生和清除平衡体系被打破,使植物细胞受到了伤害。同时,酚酶催化天然底物酚类化合物,使其发生氧化形成棕褐色的醌类物质和水,醌又经非酶促聚合,形成黑褐色物质(羟醌与黑色素等),最终导致褐变的发生。所以,只有深入了解引起褐变的机制,切断褐变底物和酚酶作用的途径,才能从根本上解决褐变产生有毒物这一关键性问题。

参考文献

- [1] 徐振彪. 植株组织培养过程中的褐化现象[J]. 外国农业——杂粮作物, 1997, 17(1): 55-56.
- [2] 姚洪军. 植物组织培养外植体褐变的研究进展[J]. 北京林业大学学报, 1999, 21(3): 78-84.
- [3] 颜昌敬. 植物组织培养手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990.
- [4] CREASEY L L. The increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in strawberry leaf disks and its correlation with flavonoid synthesis[J]. Phytochem, 1968, 7: 441.
- [5] 周洪生. 甜玉米胚性愈伤组织的诱导、继代、植株再生的研究[J]. 作物学报, 1993, 19(1): 55-62.
- [6] 刘曼西. 有机酸对马铃薯 PPO 活性的影响[J]. 植物生理学通讯, 1991, 27(5): 350.
- [7] 黄浩, 鲁明波. 红豆杉细胞培养中抗褐变剂的筛选[J]. 华中理工大学学报, 1999, 4(2): 107.
- [8] ASMUS B, HANNE H. Enzymatic browning of vegetables calibration and analysis of variance by multiway methods[J]. Chemometrics Intelligent Laboratory Systems, 1996, 34: 85.
- [9] 叶梅, 王伯初, 段传人. 植物组织培养外植体褐变的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2004, 15(4): 246-248.

(上接第 4651 页)

2 结果与分析

根据茯苓菌原生质体数目的多少,可以计算出正交试验各因素同一水平指标之和的平均数,从而确定最佳组合。表 2 表明,茯苓菌原质体制备最佳条件为酶液温度 41℃,酶液浓度 2.0%,酶解 pH 值 5.5~6.0,酶解时间 3 h。试验表明,4 个因素极差 R 的大小顺序依次为 D(10.33) > B(3.67) > A(1.34) > C(1.00),因此酶解时间对单核化数目影响最大,其次为酶液浓度,再次为酶解温度,影响最小的为酶解时的 pH 值。

3 小结与讨论

对影响茯苓菌单核化的酶液浓度、酶解时间、酶解温度、酶解时间设计一个 4 因素 3 水平的 L₉(3⁴) 正交试验,按其得到原生质体数目的多少,确定最佳配方。试验表明,原生质体数目随温度的升高呈升高趋势,但其最适温度是否

为 41℃ 有待于进一步验证,可以在 33~41℃ 间再取值进行试验。该试验中酶液浓度对原生质体制备影响较大,酶液浓度越高其酶解效果越好,因而确定该试验范围内最适酶液浓度为 2.0%。酶解时间越长应该去壁效果越好,但随着酶解时间的延长,已制备的原生质体会破裂,在试验中原生质体数目出现先增后减的趋势,在酶解时间为 3 h 条件下观察到的原先质体数目最多,因而确定最佳酶解时间为 3 h。pH 值对原生质体制备的影响不大。茯苓菌原生质体制备最适条件为:酶解温度 41℃,酶液浓度 2.0%,酶解 pH 值 5.5~6.0,酶解时间 3 h。

参考文献

- [1] 赵永昌, 张树庭. 食用菌原生质体研究的发展史[J]. 中国食用菌, 1995, 14(4): 3-7.
- [2] 廖汉泉, 邱景芸, 吴月嫦. 香菇菌丝原生质体分离与再生条件的研究[J]. 遗传, 1990(7): 8-11.