

硝酸银对橡胶树次生体胚发生的影响研究

田 雯^{1,2,3}, 张子愉⁶, 徐正伟^{3,4,5}, 王笑一^{3,4,5}, 周权男³, 吉 辛⁶, 吴日智³,
夏 薇^{1,2*}, 黄天带^{3,4,5*}

1. 海南大学三亚南繁研究院, 海南三亚 572024; 2. 海南大学热带农林学院, 海南海口 570228; 3. 中国热带农业科学院橡胶研究所/海口市热带植物种苗创新重点实验室/农业农村部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室/海南省热带作物栽培生理学重点实验室/省部共建国家重点实验室培育基地, 海南海口 571101; 4. 中国热带农业科学院三亚研究院, 海南三亚 572025; 5. 热带作物生物育种全国重点实验室, 海南三亚 572025; 6. 云南农业大学热带作物学院, 云南普洱 665099

摘 要: 橡胶树次生体胚循环增殖技术实现了橡胶树体胚苗(自根幼态无性系)规模化繁育。该技术需要将子叶胚切成 2 mm×2 mm 的胚块, 伤口部位会产生大量的乙烯及活性氧, 培养过程中也会形成较多乙烯和活性氧, 乙烯及活性氧对橡胶树体胚发生产生不利影响。硝酸银(AgNO₃)是乙烯抑制剂, 同时影响酶的活性。本文研究了不同硝酸银浓度(0、2.5、5.0、10.0、15.0 mg/L)处理不同时间(7、14、21、28 d)对橡胶树胚块褐化及次生体胚发生的影响, 并评估了再生植株的表型及倍性。结果表明: AgNO₃可明显减轻胚块褐化情况, 减少胚块活性氧的产生, 5.0~15.0 mg/L AgNO₃处理较 2.5 mg/L 效果更好, AgNO₃处理 21 d 较其他 3 个处理时间效果好; 2.5~15.0 mg/L AgNO₃处理 7~28 d 未显著增加出胚胚块数, 但 5.0 mg/L AgNO₃处理 21、28 d, 10.0 mg/L AgNO₃处理 21 d, 15.0 mg/L AgNO₃处理 7~21 d 子叶胚数显著高于对照; 出胚胚块数与褐化呈负相关, 但未达显著水平, 子叶胚数与褐化呈显著负相关; AgNO₃处理的再生植株表型与对照无明显差异, 染色体倍性与对照相同。本研究结果为提高橡胶树次生体胚发生效率提供技术支撑。

关键词: 橡胶树; 硝酸银; 褐化; 乙烯; 体胚诱导

中图分类号: S576 文献标志码: A

Effect of AgNO₃ on Secondary Somatic Embryogenesis in *Hevea brasiliensis*

TIAN Wen^{1,2,3}, ZHANG Ziyu⁶, XU Zhengwei^{3,4,5}, WANG Xiaoyi^{3,4,5}, ZHOU Quannan³, JI Xin⁶, WU Rizhi³,
XIA Wei^{1,2*}, HUANG Tiandai^{3,4,5*}

1. Sanya Nanfan Research Institute, Hainan University, Sanya, Hainan 572024, China; 2. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 3. Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Haikou Key Laboratory of Tropical Plant Seedling Innovation / Key Laboratory of Rubber Tree Biology and Genetic Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Areas / Hainan Provincial Key Laboratory of Tropical Crop Cultivation Physiology / Cultivation Base of State Key Laboratory Jointly Built by Province and Ministry, Haikou, Hainan 571101, China; 4. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572025, China; 5. National Key Laboratory for Tropical Crop Breeding, Sanya, Hainan 572025, China; 6. College of Tropical Crops, Yunnan Agricultural University, Pu'er, Yunnan 665099, China

Abstract: The technology of secondary somatic embryo cyclic multiplication has realized the large-scale propagation of somatic embryo plantlets (self-rooted juvenile clones) of *Hevea brasiliensis*. This technology needs to cut the cotyledon

收稿日期 2024-12-30; 接受日期 2025-01-11

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 32271915); 国家天然橡胶产业技术体系(No. CARS33); 热带作物育种国家重点实验室项目(No. PT2400008492)。

作者简介 田 雯(1997—), 女, 硕士, 研究方向: 农艺与种业。*通信作者(Corresponding author): 夏 薇(XIA Wei), E-mail: saizjxiawei@hainanu.edu.cn; 黄天带(HUANG Tiandai), E-mail: zhuanjiyinyuzhong@163.com。

embryo into 2 mm×2 mm pieces. A large amount of ethylene and reactive oxygen species (ROS) will be produced at the wound site, and much ethylene and ROS will also formed during culture process. Ethylene and ROS have adverse effects on somatic embryogenesis of *H. brasiliensis*. Silver nitrate (AgNO_3) is an ethylene inhibitor and also affects enzyme activity. In this paper, the effects of different AgNO_3 concentrations (0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0 mg/L) and different time (7, 14, 21, 28 days) on the embryo block browning and secondary somatic embryogenesis of *H. brasiliensis* were studied, and the phenotype and ploidy of regenerated plantlets were evaluated. AgNO_3 significantly reduced the browning of embryo blocks and the production of ROS. The effect of 5–15 mg/L was better than that of 2.5 mg/L, and the effect of 21 days treatment was better than that of the other three treatments. 2.5–15.0 mg/L AgNO_3 treated 7–28 days did not significantly increase the number of embryonic blocks, but the number of cotyledon embryos in 5.0 mg/L AgNO_3 treated for 21 and 28 days, 10.0 mg/L AgNO_3 treated for 21 days, and 15.0 mg/L AgNO_3 treated for 7–21 days were significantly higher than those in the control. The number of embryonic blocks was negatively correlated with browning, but not significantly, the number of cotyledon embryos was significantly negatively correlated with browning. The phenotype of regenerated plantlets from AgNO_3 treatments had no obvious difference compared with the control, and the chromosome ploidy was the same as the control. The results would provide technical support for improving the efficiency of secondary somatic embryogenesis in *H. brasiliensis*.

Keywords: *Hevea brasiliensis*; AgNO_3 ; browning; ethylene; somatic embryogenesis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.05.009

巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 亦称“三叶橡胶”，为大戟科常绿乔木，原产于巴西亚马逊森林，是轮胎、绝缘材料、减震材料等的重要工业原料。橡胶树的生长周期长达 35 a 以上，因此种苗质量至关重要。体胚苗（自根幼态无性系）具有速生、高产等优异特性，是第三代新型种苗^[1]。HUA 等^[1]建立了橡胶树次生体胚循环增殖技术，实现了橡胶树体胚苗规模化繁育。该技术以初（次）生胚状体为外植体，将其切成 2 mm×2 mm 的胚块，这些胚块经过体胚发生，产生新的胚状体，即完成胚状体的增殖。然而切胚产生伤口，造成的细胞膜降解使得原本分离的酚类物质与多酚氧化酶（polyphenol oxidase, PPO）结合，被氧化成褐色的醌类物质^[2-3]。此外，伤口部位的细胞同时产生大量的乙烯^[4]及活性氧^[5]。培养过程中添加的各类生长调节剂、蔗糖等成分也会对培养物造成非生物胁迫，进而促进乙烯的合成和活性氧的形成^[6]。

乙烯是植物的五大类激素之一，几乎所有的高等植物都能合成微量乙烯。乙烯对再生的影响因物种、基因型及外植体、培养阶段而异^[6]。在白云杉和胡萝卜的非胚性愈伤组织中乙烯的含量比胚性愈伤组织高^[7]。乙烯促进铁皮石斛胚性愈伤体积增大，但抑制体胚发生，抑制效果与浓度呈正相关，高浓度乙烯（5.6 mg/L）的体胚数比对照下降 93.33%，几乎无法诱导体胚发生^[8]。在苜蓿愈伤组织继代培养时，加入多胺生物合成抑

制剂甲基乙二醛双脒基脲 [methylglyoxal bis (guanyldihydrazone), MGBG] 促进乙烯的生成，抑制了愈伤组织及悬浮系的生长及体胚形成，在体胚诱导阶段加入影响更大，加入 184 mg/L MGBG 的体胚数为对照的 60%（该浓度下乙烯释放量比对照增加 21.1%），而 368 mg/L MGBG 则无法诱导体胚发生（该浓度乙烯释放量比对照增加 36.8%）^[9]。苜蓿无色松软的胚性愈伤组织转入将愈伤继代培养基 [TDZ (thidiazuron) 代替 KT (kinetin)]，发现愈伤组织变绿变硬，出现管状物和芽原基的分化，其体胚发生能力丧失，且乙烯合成量升高^[10]。但部分植物体胚发生率与乙烯合成呈正相关，如大豆体胚数随着乙烯前体 ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) 增加而增加，随 ACC 合成抑制剂 AVG (aminoethoxyvinylglycine) 增加而下降^[6]。

硝酸银 (AgNO_3) 是乙烯抑制剂，一定浓度一定处理时间对于体胚分化具有促进作用。15 mg/L 硝酸银处理后的芦荟防褐化率高达 90%；培养 2 周时，未发生褐化的外植体逐渐诱导出颗粒状的愈伤组织^[11]。在花生幼叶芽再生^[12]、油菜花梗植株再生^[13]、石榴不定芽再生^[14]中也表现出明显效果。而在有些物种中，与乙烯促进体胚发生效果相反。 AgNO_3 在显著降低水曲柳外植体褐化指数和褐化率的同时也显著降低了体胚发生率^[15]。

切胚产生的活性氧爆发及组培胁迫过程产生的活性氧也抑制体胚发生。 AgNO_3 对许多酶的活

性有影响。2 mg/L AgNO₃ 降低了凤丹牡丹愈伤的褐化程度，进一步研究表明，该处理降低了 PPO、过氧化氢酶（CAT）活性，增加了过氧化物酶（POD）的活性^[16]。

本文研究 AgNO₃ 浓度及处理时间对橡胶树次生体胚胚块褐化及体胚发生的影响，并评估再生植株的表型及倍性，以期进一步提高橡胶树次生体胚发生效率。

1 材料与方法

1.1 材料

选择处于成熟子叶胚阶段的热研 73397 次生体胚，由位于海南省儋州市的海南天然橡胶新型种植材料创新基地提供。切除子叶胚子叶外围卷曲、偏薄部位，剩余较厚的子叶在超净工作台用无菌手术刀切成 2~3 mm 的胚块作为外植体，分别将其均匀接种在添加不同浓度 AgNO₃ 的愈伤诱导培养基中，每皿接种 12 块外植体。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 共设置 AgNO₃ 浓度（0、2.5、5.0、10.0、15.0 mg/L）、AgNO₃ 处理时间（7、14、21、28 d）2 个影响因素 20 个处理。将胚块接种于添加不同浓度（0、2.5、5.0、10.0、15.0 mg/L）AgNO₃ 的 M₁^[1] 培养基中，室温培养不同时间（7、14、21、28 d），AgNO₃ 处理结束后转入不添加 AgNO₃ 的 M₁ 培养基，室温继续培养至 28 d 后转入体胚诱导培养基 M₂^[1]，跟踪不同处理胚块体细胞胚形成及植株再生情况。每个处理 4 皿，每皿 12 个外植体。

1.2.2 橡胶树胚块褐化的观察及统计 每 7 d 对

经不同 AgNO₃ 浓度处理后的胚块在培养基中的褐化情况进行观察，直至 28 d。

1.2.3 活性氧（ROS）测定 对经不同 AgNO₃ 浓度及培养时间处理后的胚块随机取样进行二氨基联苯胺（diaminobenzidine, DAB）染色，观察并统计其显色情况，重复 2 次。

1.2.4 橡胶树次生体胚的诱导 对转入 M₂ 培养基，60 d 后统计子叶胚数、出胚胚块数。

1.2.5 倍性分析 每个处理取 3 株再生植株的叶片混合、切碎、解离，采用流式细胞仪进行倍性分析。

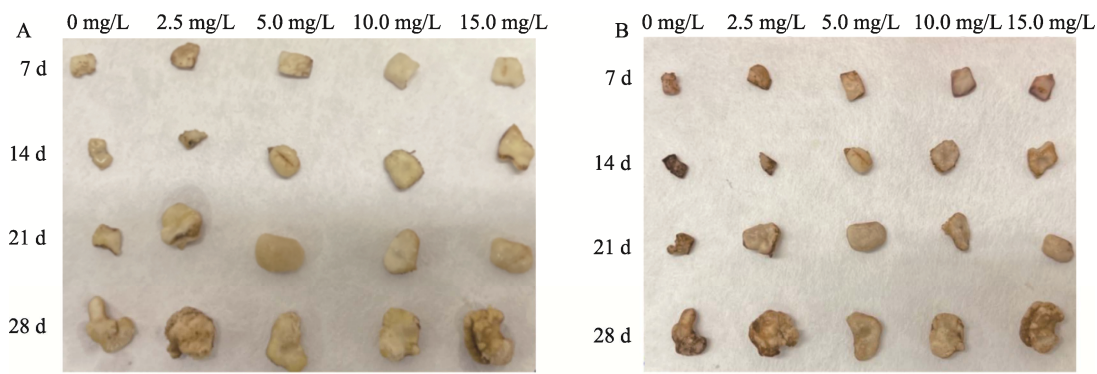
1.3 数据处理

试验数据采用 Excel 2023 和 IBM SPSS Statistics 20 软件进行整理、统计和分析。

2 结果与分析

2.1 AgNO₃ 对橡胶树体细胞胚胚块组织 ROS 的影响

橡胶树次生体胚切胚后部分胚块切口褐化，部分对培养基反应敏感的胚块褐化不明显（图 1A）。DAB 在过氧化氢酶的催化下，可与过氧化氢（活性氧的一种）反应并迅速在组织表面形成棕红色化合物，进而确定活性氧含量。DAB 染色明显看到对照（0 mg/L AgNO₃）胚块比添加 AgNO₃ 的胚块染色深；2.5 mg/L AgNO₃ 处理胚块较 5.0~15.0 mg/L AgNO₃ 处理同样时间的胚块染色深；AgNO₃ 处理 21 d 的胚块较其他 3 个处理时间染色浅（图 1B）。染色越深表明活性氧含量越高。可见，AgNO₃ 可明显减少胚块培养中活性氧的产生，5.0~15.0 mg/L 较 2.5 mg/L 效果好，处理



A: DAB 染色前; B: DAB 染色后。
A: Before DAB staining; B: After DAB staining.
图 1 AgNO₃ 处理胚块 DAB 染色
Fig. 1 DAB staining of AgNO₃ treated embryo blocks

21 d 较其他 3 个处理时间效果好。

2.2 AgNO₃ 处理对橡胶树次生体胚发生的影响

不同 AgNO₃ 浓度处理 7 d 的橡胶树出胚胚块数与对照组无显著差异; 2.5~10.0 mg/L AgNO₃ 处理的子叶型胚状体数低于对照, 15.0 mg/L AgNO₃ 处理的子叶型胚状体数高于对照, 但均未达显著水平, 15.0 mg/L AgNO₃ 处理的子叶型胚状体数显著高于其他浓度; 不同浓度间胚块在体胚诱导阶段褐化程度与对照无明显差异, 浓度间也无明显差异 (表 1)。

处理 14 d, 不同 AgNO₃ 浓度处理后橡胶树出胚胚块数与对照组无显著差异; 15.0 mg/L AgNO₃ 处理的子叶型胚状体数显著高于对照及其他 3 个浓度, 其他 3 个浓度处理的子叶型胚状体数与对照无显著差异; 5.0~15.0 mg/L AgNO₃ 处理的胚块在体胚诱导阶段褐化程度明显轻于 2.5 mg/L AgNO₃ 及对照, 而 2.5 mg/L AgNO₃ 处理的褐化程度与对照相似 (表 1)。

处理 21 d, 5.0 mg/L AgNO₃ 处理的橡胶树出

胚胚块数高于其他浓度, 但未达显著水平; 而除 2.5 mg/L AgNO₃ 处理的子叶型胚状体数与对照无显著差异外, 其余 AgNO₃ 浓度诱导的子叶型胚状体数均显著高于对照, 其中 5.0 mg/L AgNO₃ 诱导的子叶型胚状体数量最多; 2.5 mg/L AgNO₃ 处理的胚块褐化程度与对照相似, 其余 AgNO₃ 浓度处理的褐化程度均明显低于对照 (表 1)。

处理 28 d, AgNO₃ 处理的橡胶树次生体胚出胚胚块数均高于对照, 特别是 2.5~10.0 mg/L, 但未达显著水平; 5.0 mg/L AgNO₃ 处理的子叶型胚状体数显著高于对照及其他浓度, 其他 3 个浓度处理的子叶型胚状体数与对照无显著差异; 5.0、10.0 mg/L AgNO₃ 处理的胚块褐化程度较轻, 2.5、15.0 mg/L AgNO₃ 处理的胚块褐化程度中等, 与对照相似 (表 1)。

AgNO₃ 处理对出胚胚块数的影响不大, 但对子叶型胚状体数的影响较大 (表 1)。低浓度 AgNO₃ 需要处理较长时间才能显著提升子叶胚数, 2.5 mg/L AgNO₃ 处理 28 d 子叶胚数才开始上

表 1 AgNO₃ 对橡胶树次生体胚发生的影响
Tab. 1 Effect of AgNO₃ on secondary somatic embryogenesis in *H. brasiliensis*

处理时间 Processing time/d	AgNO ₃ 浓度 AgNO ₃ concentra- tion/(mg·L ⁻¹)	出胚胚块数 Number of embryonic blocks	子叶胚数 Number of cotyledon embryos	胚块褐化程度 Browning degree of embryo blocks
7	0	6.33±2.52 ^{ab}	68.00±2.00 ^{cd}	中等
	2.5	6.33±1.53 ^{ab}	36.00±6.00 ^d	中等
	5.0	4.50±2.89 ^{ab}	54.50±18.70 ^d	中等
	10.0	4.75±2.99 ^{ab}	53.00±24.01 ^d	中等
	15.0	6.33±2.08 ^{ab}	93.00±41.15 ^{bc}	中等
14	0	4.00±2.16 ^{ab}	50.00±30.24 ^d	中等
	2.5	4.75±2.36 ^{ab}	43.25±15.15 ^d	中等
	5.0	4.67±2.31 ^{ab}	50.33±13.05 ^d	较轻
	10.0	5.75±1.71 ^{ab}	65.00±17.15 ^{cd}	较轻
	15.0	6.00±2.65 ^{ab}	122.00±2.00 ^{ab}	较轻
21	0	5.33±0.58 ^{ab}	66.00±20.00 ^{cd}	中等
	2.5	6.75±2.06 ^{ab}	45.25±7.32 ^d	中等
	5.0	8.33±1.53 ^a	145.67±21.50 ^a	较轻
	10.0	5.33±2.31 ^{ab}	75.33±6.43 ^{ab}	较轻
	15.0	5.67±2.08 ^{ab}	127.00±2.00 ^{ab}	较轻
28	0	3.67±1.53 ^b	35.00±1.00 ^d	中等
	2.5	7.33±1.53 ^{ab}	56.00±14.00 ^{cd}	中等
	5.0	7.50±4.20 ^{ab}	111.50±37.65 ^{ab}	较轻
	10.0	8.00±1.00 ^{ab}	65.33±20.03 ^{cd}	较轻
	15.0	4.50±1.73 ^{ab}	58.00±36.40 ^{cd}	中等

注: 不同小写字母表示差异显著 (P<0.05)。
Note: Different lowercase letters indicates significant difference (P<0.05).

升, 5 mg/L AgNO₃ 处理 21 d 达到峰值, 28 d 略有下降, 但仍处于高值; 而高浓度的 AgNO₃ 需要相对较短的处理时间就可显著提升子叶胚诱导率, 如 15 mg/L AgNO₃ 处理的子叶胚诱导率的峰值出现在 14~21 d, 28 d 开始显著下降。

综上所述, 不同浓度 AgNO₃、不同处理时间未显著增加出胚胚块数, 但 5.0 mg/L AgNO₃ 处理 21、28 d, 10.0 mg/L AgNO₃ 处理 21 d, 15.0 mg/L AgNO₃ 处理 7~21 d 子叶胚数显著高于对照 (表 1)。

2.3 次生体胚发生与褐化的相关性分析

相关性分析结果表明, 出胚胚块数与褐化呈负相关, 相关系数为-0.342, 但未达到显著水平; 子叶胚数与褐化呈负相关, 相关系数为-0.552, 达到极显著水平。此外, 出胚胚块数与子叶胚数呈正相关, 相关系数为 0.439, 达到极显著水平(表 2)。

2.4 AgNO₃ 处理再生植株的表型及倍性分析

AgNO₃ 处理的再生植株表型与对照植株相似 (图 2)。倍性分析结果表明, AgNO₃ 处理再生植株与对照一样, 均为二倍体, 未产生倍性变异 (图 3)。

表 2 次生体胚发生与褐化的相关性
Tab. 2 Correlation between secondary somatic embryogenesis and browning

项目 Item	出胚胚块数 Number of embryonic blocks	子叶胚数 Number of cotyledon embryos	褐化等级 Browning grade
出胚 胚块数	1.000		
子叶 胚数	0.439**	1.000	
褐化 等级	-0.342	-0.552**	1.000

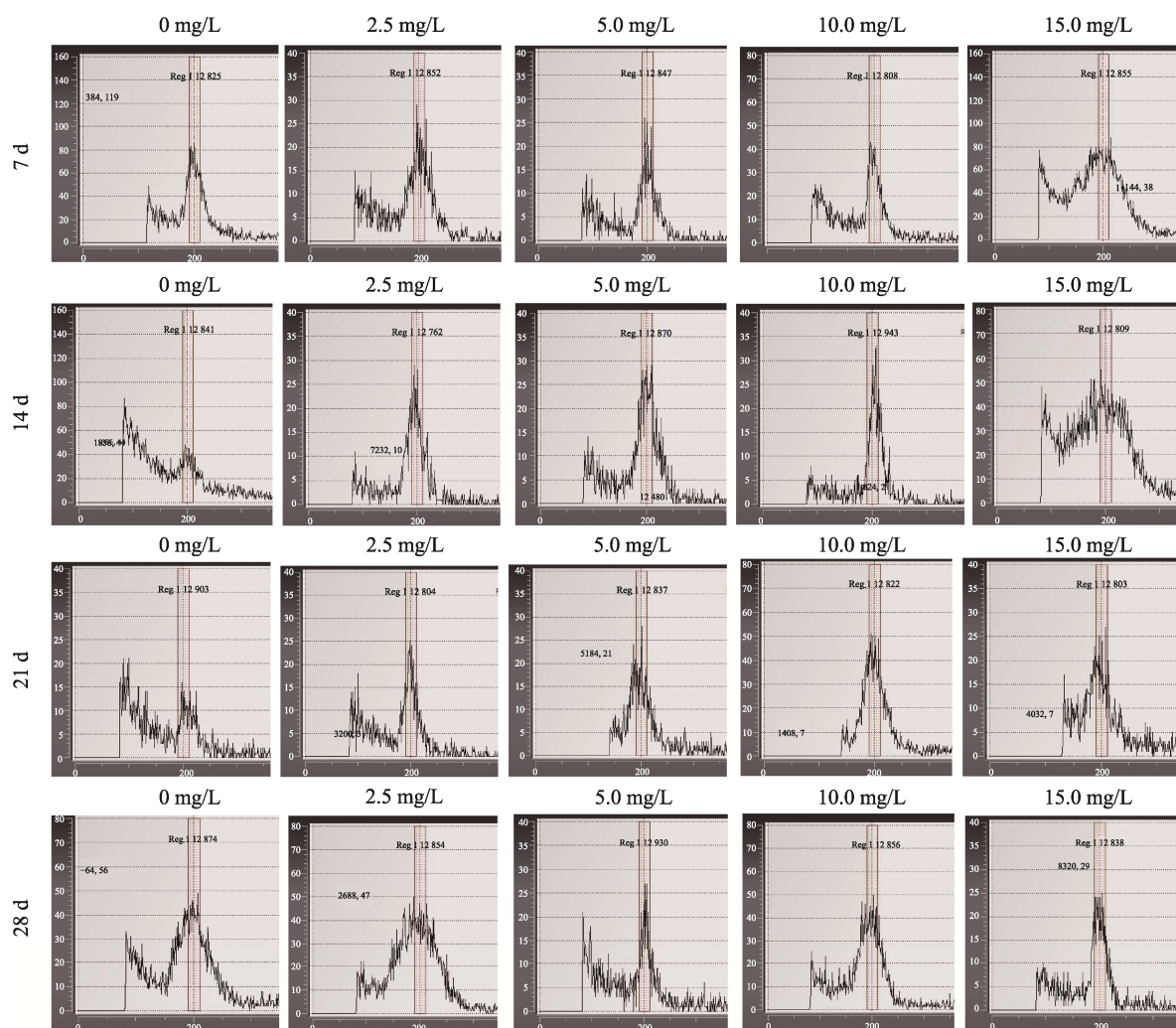
注: **表示极显著相关 (P<0.01)。
Note: ** indicates extremely significant correlation (P<0.01).

3 讨论

伤害会诱导乙烯大量合成^[17], 培养过程中添加的各类生长调节剂、蔗糖等成分也会对培养物造成逆境, 进而促进乙烯的合成^[6]。乙烯抑制白菜型油菜 (*Brassica campestris* L.)^[18]、白菜 [*Brassica pekinensis* (Lour.) Rupr.]^[19]、美洲狼尾草 (*Pennisetum glaucum*)^[20]、白云杉 (*Picea glauca*)^[21]、胡萝卜 (*Daucus carota* L.)^[22]、罗



图 2 AgNO₃ 处理的再生植株
Fig. 2 Regenerated plants from AgNO₃ treatments

图 3 AgNO_3 处理的再生植株倍性分析Fig. 3 Ploidy analysis of regenerated plants from AgNO_3 treatments

布斯塔咖啡 (*Coffea canephora*)^[23-24]、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[25]、菠菜 (*Spinacia oleracea*)^[26]、玉米 (*Zea mays* L.)^[27]、冰糖橙^[28]等物种的体胚发生。 AgNO_3 通过以银离子取代乙烯结合必须的铜离子,从而阻断乙烯信号传导,使培养物无法感受乙烯信号^[29],达到抑制乙烯发挥作用的效果。添加 AgNO_3 等乙烯抑制剂,可大幅提升体胚发生能力。如玉米幼胚胚性愈伤诱导率提高 3~10 倍,体胚发生能力提高 3 倍^[27];添加 1.70 mg/L AgNO_3 ,每块菠菜愈伤体胚数增加 3 倍^[26]。

添加乙烯后,番茄体胚发育停留在球形胚阶段^[30]。橡胶树体胚发生对乙烯也很敏感。内珠被培养需要将幼果切成薄片先诱导愈伤,再诱导体胚发生,此过程产生的乙烯会抑制胚性愈伤和体胚诱导^[31]。橡胶树内珠被培养过程中添加 0.44、

4.40 mg/L 乙烯抑制剂 AOA 及 1.00、0.01 mg/L AgNO_3 均显著提高胚性愈伤诱导率和体胚诱导率,而添加 ACC (乙烯合成前体) 则抑制胚性愈伤诱导率和体胚诱导率,在 IRCA144 和 PB260 两个品种中趋势相同。IRCA144 在 9.98 mg/L、PB260 在 0.1 mg/L AgNO_3 处理分别获得了 60 个和 7 个原胚,而对照则无法诱导出原胚^[31]。继代 4 a 以上胚性下降的橡胶树花药愈伤组织在体胚诱导第一个月添加 5 mg/L AgNO_3 显著促进了体胚发生^[32]。在其他物种中,如苜蓿^[33-34]、大豆^[35]、苏格兰松 (*Pinus sylvestris* L.)^[36]、夏雪片莲 (*Leucorum aestivum* L.)^[37] 中乙烯却可以促进体胚发生。

在非胁迫环境中,细胞内的 ROS 主要由线粒体产生,ROS 的产生和清除处于动态平衡,不会对细胞造成氧化损伤^[38]。当生物体受到非生物胁迫

迫时,呼吸作用加剧,释放出大量 ROS,超出 ROS 清除系统的清除能力,使 ROS 在细胞内积累,从而对细胞造成氧化损伤^[39]。组培对植物材料是一个非生物胁迫过程,期间会产生过量 ROS。过氧化物酶(peroxidase, POD)脱除组织中的过氧化氢和超氧阴离子,保护细胞膜的通透性。研究表明,硝酸银可提高牡丹^[16, 40]、刺梨^[41]愈伤组织 POD 的活性,减轻褐化。300 mg/L AgNO₃ 提高了黄瓜叶片 POD(过氧化物酶)和 SOD(超氧化物歧化酶)的活性^[42]。本研究也发现,AgNO₃ 通过减少胚块组织中过氧化氢的积累,进而减少活性氧的含量,提高体胚发生率。

适宜浓度的 AgNO₃ 可提高正常胚状体诱导率,但长时间和高浓度 AgNO₃ 处理容易导致体胚畸形。体胚诱导第一个月添加 5 mg/L AgNO₃ 显著促进橡胶树花药愈伤组织体胚发生,但浓度提高到 10 mg/L 处理 1 个月或 5 mg/L 处理 2 个月,畸形胚率增加^[32]。大量乙烯导致紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)植株畸形^[43]。本研究表明,5.0~15.0 mg/L AgNO₃ 在愈伤诱导阶段处理 7~28 d 提高了子叶胚诱导率,再生植株倍性正常,未发生变异。

参考文献

- [1] HUA Y W, HUANG T D, HUANG H S. Micropropagation of self-rooting juvenile clones by secondary somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*[J]. Plant Breeding, 2010, 129: 202-207.
- [2] KYOUNG M M, EUN-BIN K, BONGGI L, CHOON Y K, LILLIAN B. Recent trends in controlling the enzymatic browning of fruit and vegetable products[J]. Molecules, 2020, 25(12): 2754.
- [3] 樊会芬, 胡文忠, 庞坤. 鲜切果蔬乙烯生物合成与酶促褐变的研究进展[J]. 食品与机械, 2008(4): 128-132.
FAN H F, HU W Z, PANG K. Research progress on ethylene biosynthesis and enzymatic browning of fresh cut fruits and vegetables[J]. Food and Machinery, 2008(4): 128-132. (in Chinese)
- [4] TIANBAO Y, POOVAIAH B W. A calmodulin-binding/CGCG box DNA-binding protein family involved in multiple signaling pathways in plants[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(47): 45049-45058.
- [5] 王斌, 林薇, 袁晓. 鲜切果蔬褐变机理及防控技术研究进展[J]. 食品科学, 2025, 46(7): 367-384.
WANG B, LIN W, YUAN X. Research progress on browning mechanism and control technology of fresh cut fruits and vegetables[J]. Food Science, 2025, 46(7): 367-384. (in Chinese)
- [6] NEVES M, CORREIA S, CAVALEIRO C, CANHOTO J. Modulation of organogenesis and somatic embryogenesis by ethylene: an overview[J]. Plants, 2021, 10: 1208.
- [7] INDRA S, AJAY K, AMITA B, MADHU S, ADARSH S, PARAMVIR S A. Gradual depletion of 2, 4-D in the culture medium for indirect shoot regeneration from leaf explants of *Camellia sinensis* O. Kuntze[J]. Plant Growth Regulation, 2005, 47: 121-127.
- [8] 王凤娇. 萘氧乙酸、三碘苯甲酸和乙烯利对铁皮石斛体胚发生的影响[D]. 成都: 西南交通大学, 2009.
WANG F J. Effects of naphthoxyacetic acid, triiodobenzoic acid and ethephon on somatic embryogenesis of *Dendrobium officinale*[D]. Chengdu: Southwest Jiaotong University, 2009. (in Chinese)
- [9] 黄学林, 徐九龙, 高东微, 叶文红, 李筱菊. MGBG 对苜蓿愈伤组织生长、体细胞胚胎诱导及其乙烯生物合成的影响[J]. 植物学报, 1998(7): 54-60.
HUANG X L, XU J L, GAO D W, YE W H, LI X J. Effects of MGBG on callus growth, somatic embryogenesis and ethylene biosynthesis of *Alfalfa*[J]. Acta Botany Sinica, 1998(7): 54-60. (in Chinese)
- [10] 黄学林, 李筱菊, 傅家瑞, 劳彩玲. Thidiazuron 对苜蓿愈伤组织的乙烯生成及其体细胞胚胎发生的影响[J]. 植物生理学报, 1994(4): 367-372.
HUANG X L, LI X J, FU J R, LAO C L. Effect of Thidiazuron on ethylene production and somatic embryogenesis of *Alfalfa* callus[J]. Plant Physiology Journal, 1994(4): 367-372. (in Chinese)
- [11] 娄喜艳, 林蕊, 裴冬丽. 库拉索芦荟组织培养中防褐化技术的探索[J/OL]. 分子植物育种, 1-8. (2023-02-10)[2025-03-17]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230210.1152.006.html>.
- [12] LOU X Y, LIN R, PEI D L. Exploration of browning prevention technology in tissue culture of *Aloe vera*[J/OL]. Molecular Plant Breeding. 1-8. (2023-02-10)[2025-03-17]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230210.1152.006.html>. (in Chinese)
- [12] 周敏, 庄东红. 谷氨酰胺和硝酸银对花生幼叶芽再生的促进作用(简报)[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(3): 240-241.
ZHOU M, ZHUANG D H. Effects of glutamine and silver nitrate on the regeneration of peanut young leaf buds (brief report)[J]. Plant Physiology Journal, 2002, 38(3): 240-241. (in Chinese)
- [13] SUSAN E, LEELA G. Plant regeneration from peduncle segments of oil seed *Brassica* species: influence of silver ni-

- trate and silver thiosulfate[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1997, 51(3): 229-232.
- [14] SOUMENDRA K N, PRADEEP K C. Silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine promote *in vitro* adventitious shoot regeneration of pomegranate (*Punica granatum* L.)[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2003, 160(4): 423-430.
- [15] 王秋水, 刘春苹, 沈海龙, 杨玲, 刘洋, 谢添伊, 程雪, 张鹏. 抗褐化剂对水曲柳成熟胚外植体褐化及体胚发生的影响[J]. *东北林业大学学报*, 2019, 47(11): 32-37.
- WANG Q S, LIU C P, SHEN H L, YANG L, LIU Y, XIE T Y, CHENG X, ZHANG P. Effects of anti browning agents on explants browning and somatic embryogenesis of *Fraxinus mandshurica* mature embryos[J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2019, 47(11): 32-37. (in Chinese)
- [16] 毛沛琪, 李厚华, 李媛, 曹志秀, 韩美玲, 张延龙. 硝酸银对‘凤丹’牡丹愈伤组织褐变过程中酚类物质及相关酶活性的影响[J]. *西北林学院学报*, 2018, 33(6): 83-88.
- MAO P Q, LI H H, LI A, CAO Z X, HAN M L, ZHANG Y L. Effects of silver nitrate on phenolic substances and related enzyme activities during callus browning of *Paeonia suffruticosa*[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2018, 33(6): 83-88. (in Chinese)
- [17] THOMAS B, HANS K. Regulation of wound ethylene synthesis in plants[J]. *Nature*, 1980, 286: 259-260.
- [18] PALMER C E. Enhanced shoot regeneration from *Brassica campestris* by silver nitrate[J]. *Plant Cell Reports*, 1992, 11: 541-545.
- [19] RADKE S, TURNER J C, FACCIOITTI D. Transformation and regeneration from *Brassica rapa* using *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Plant Cell Reports*, 1992, 11: 499-505.
- [20] PIUS J, GEORGE L, EAPEN S, RAO P S. Enhanced plant regeneration in pearl millet (*Pennisetum americanum*) by ethylene inhibitors and cefotaxime[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1993, 32: 91-96.
- [21] KONG L, YEUNG E C. Effects of ethylene and ethylene inhibitors on white spruce somatic embryo maturation[J]. *Plant Science*, 1994, 104: 71-80.
- [22] ROUSTAN J P, LACHE A, FALLOT J. Stimulation of *Daucus carota* somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene synthesis: cobalt and nickel[J]. *Plant Cell Reports*, 1989, 8: 182-185.
- [23] FUENTES S R L, CALHEIROS M B, MANETTI-FILHO J, VIEIRA G E. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2000, 60(1): 5-13.
- [24] KUMAR V, RAMAKRISHNA A, RAVISHANKAR G A. Influence of different ethylene inhibitors on somatic embryogenesis and secondary embryogenesis from *Coffea canephora* Pex Fr.[J]. *Cell Development Biology Plant*, 2007, 43: 602-607.
- [25] BAI B, SU Y H, YUAN J, ZHANG X S. Induction of somatic embryos in *Arabidopsis* requires local YUCCA expression mediated by the down-regulation of ethylene biosynthesis[J]. *Molecular Plant*, 2013, 6: 1247-1260.
- [26] ISHIZAKI T, KOMAI F, MSUDA K, MEGUMI C. Exogenous ethylene enhances formation of embryogenic callus and inhibits embryogenesis in cultures of explants of spinach roots[J]. *American Society for Horticultural Science*, 2000, 125: 21-24.
- [27] VAIN P, FLAMENT P, SOUDAIN P. Role of ethylene in embryogenic callus initiation and regeneration in *Zea mays* L.[J]. *Plant Physiology*, 1989, 135: 537540.
- [28] 范永梅, 李东栋, 甘霖, 邓秀新. 硝酸银对冰糖橙胚性愈伤组织诱导的影响[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2003, 29(4): 338-340.
- FAN Y M, LI D D, GAN L, DENG X X. Effect of AgNO₃ on the induction of embryogenic callus of Bingtang orange[J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2003, 29(4): 338-340. (in Chinese)
- [29] BINDER B M, RODRIGUEZ F I, BLEECKER A B, PATTERSON S E. The effects of group 11 transition metals, including gold, on ethylene binding to the ETR1 receptor and growth of *Arabidopsis thaliana*[J]. *FEBS Letters*, 2007, 581: 5105-5109.
- [30] NEVES M. Effect of ethylene on somatic embryogenesis of tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.)[D]. Coimbra: University of Coimbra, 2018.
- [31] AUBOIRON E, CARRON M P, MICHAUX-FERRIÈRE N. Influence of atmospheric gases, particularly ethylene, on somatic embryogenesis of *Hevea brasiliensis*[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1990, 21: 31-37.
- [32] 戴雪梅, 黄天带, 李季, 杨先锋, 辛士超, 黄华孙. AgNO₃对橡胶树花药愈伤组织形态及体胚发生的影响[J]. *广西植物*, 2016, 36(12): 1426-1431.
- DAI X M, HUANG T D, LI J, YANG X F, XIN S C, HUANG H S. Effects of AgNO₃ on anther callus morphology and somatic embryogenesis of anther callus *Hevea brasiliensis*[J]. *Guihaia*, 2016, 36(12): 1426-1431. (in Chinese)
- [33] KĘPCZYŃSKA E, RUDU I, KĘPCZYŃSKI J. Endogenous ethylene in indirect somatic embryogenesis of *Medicago sativa* L.[J]. *Plant Growth Regulation*, 2009, 59: 63-73.
- [34] KPCZYŃSKA E, ZIELIŃSKA S. Disturbance of ethylene biosynthesis and perception during somatic embryogenesis in

- Medicago sativa* L. reduces embryos' ability to regenerate[J]. *Acta Physiology Plant*, 2011, 33: 1969-1980.
- [35] MANTIRI F R, KURDYUKOV S, LOHAR D P, SHAROPOVA N, SAEED N A, WANG X D, VANDENBOSCH K A, ROSE R J. The transcription factor MtSERF1 of the ERF subfamily identified by transcriptional profiling is required for somatic embryogenesis induced by auxin plus cytokinin in *Medicago truncatula*[J]. *Plant Physiology*, 2008, 146: 1622-1636.
- [36] LU J, VAHALA J, PAPPINEN A. Involvement of ethylene in somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.)[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2011, 107: 25-33.
- [37] PTAK A, TAHCHY A E, WYZGOLIK G, HENRY M, LAURAIN-MATTAR D. Effects of ethylene on somatic embryogenesis and galanthamine content in *Leucojum aestivum* L. cultures[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2010, 102: 61-67.
- [38] KALAIVANI K N. ROS homeostasis in abiotic stress tolerance in plants[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(15): 5208.
- [39] KLAUS A, HERIBERT H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, 55: 373-399.
- [40] 李新凤, 巩振辉, 孙冬青, 王军娥. 不同品种牡丹几个生理参数的比较及其与组培中褐化的关系[J]. *西北农业学报*, 2008, 17(1): 142-145.
- LI X F, GONG Z H, SUN D Q, WANG J E. Comparison of several physiological parameters of different *Peony* varieties and their relationship with browning in tissue culture[J]. *Northwest Agricultural Journal*, 2008, 17(1): 142-145. (in Chinese)
- [41] 李婷婷, 陈红. 硝酸银对刺梨愈伤组织酚类物质含量及相关酶活性的影响[J]. *中国南方果树*, 2023, 52(5): 117-122.
- LI T T, CHEN H. Effects of silver nitrate on phenolic content and related enzyme activities in *rosa Roxburghii* callus[J]. *Fruit Trees in Southern China*, 2023, 52(5): 117-122. (in Chinese)
- [42] 娄群峰, 陈劲枫, 任刚, 罗向东. 硝酸银和乙烯利对黄瓜叶片中 3 种氧化还原酶同工酶和酶活性影响的比较[J]. *植物生理学通讯*, 2003(6): 580-584.
- LOU Q F, CHEN J F, REN G, LUO X D. Comparison of effects of silver nitrate and ethephon on isozymes and enzyme activities of three oxidoreductases in cucumber leaves[J]. *Plant Physiology Journal*, 2003(6): 580-584. (in Chinese)
- [43] ELTJO G M, SIMMONDS M J. Polyamine levels in relation to growth and somatic embryogenesis in *Medicago sativa* L.[J]. *Journal of Experimental Botany*, 1988, 39(6): 787-794.