

文章编号: 1001-411X(2002)04-0037-04

甘蔗不同基因型组织培养特性的研究

梁计南¹, 谭中文¹, 谭志勇², 张志胜¹, 孔垂华¹, 胡飞¹

(1 华南农业大学农学院, 广东 广州 510642; 2 东莞市农业种子研究所, 广东 东莞 523060)

摘要: 通过甘蔗心叶的组织培养, 研究了 11 个甘蔗基因型的组织培养特性. 结果表明, 用 200 mg/L 的 PVP 溶液浸泡外植体(心叶)20 min, 明显降低了诱导培养过程中外植体的褐化率, 同时大大提高了各个基因型的愈伤组织诱导率. 11 个甘蔗基因型在同样的培养条件下, 外植体的褐化率、愈伤组织的诱导率、愈伤组织的增殖率、愈伤组织的分化率都表现出显著的差异.

关键词: 甘蔗; 基因型; 组织培养; 愈伤组织

中图分类号: S566.1

文献标识码: A

甘蔗是一种含多元酚类较高的作物, 尤其是幼嫩茎尖和嫩叶鞘含量更高, 在进行组织培养时, 制备外植体和继代过程中容易出现褐化现象. 很多研究表明, 引起组织培养外植体褐化的因素是复杂的, 包括内因, 如材料的基因型、材料年龄、取材部位、取材时间、外植体大小都会影响褐化的发生^[1-3]. 就外因而言, 培养基的成分、外加激素的含量和比例、光照、温度等也会影响褐化的发生^[6,7]. 褐化往往是多种因素同时作用的结果. 研究证明, 选择适当外植体并建立最佳培养条件是克服材料褐化的重要手段. 有人在培养基中加入抗氧化剂(如半胱氨酸、抗坏血酸、羟乙醇、硫代硫酸钠等)用以改变外植体周围的氧化还原电势, 从而抑制酚类氧化, 减轻褐化^[8,9]; 在培养基中加入吸附剂[如活性炭、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)等]可以把有毒物质从外植体周围吸附掉, 去除酚类氧化造成的毒害效应^[10,11]; 在外植体接种之前, 用抗氧化剂水溶液浸泡一定时间, 对于减轻褐化和提高诱导率也有一定效果^[12,13].

王敬驹等^[14]指出, 甘蔗品种的遗传基础对外植体的培养反应影响很大, 凡是多酚氧化酶(PPO)活性较强、容易形成色素污染的品种, 培养效果较差. 何明^[14]观察到 4 个甘蔗材料的心叶愈伤组织诱导效果、愈伤组织发育及增殖情况很不一致. 叶树茂等^[15]和福建农学院经济作物教研组^[16]分别对 4 个甘蔗品种(品系)愈伤组织的绿苗分化的研究表明愈伤组织分化出苗的能力在品种(品系)间有很大差异.

综上所述, 组培条件的不同和基因型不同对甘

蔗组培的效果影响较大. 本试验以 11 个甘蔗基因型为材料, 并采用 PVP 预处理外植体, 探索不同基因型甘蔗的组培特性, 以获取良好的组培效果, 为不同甘蔗基因型利用组织培养方法加快种苗繁殖提供更合适的组培技术. 也为在组织细胞水平上研究不同甘蔗基因型的生化特性提供理论依据及物质基础.

1 材料与方法

1.1 试验材料

田间材料于 1999 年 2 月 17 日下种, 包括 11 个甘蔗基因型, 分别是新台糖 10 号(RoC10)、新台糖 1 号(RoC1)、Q75、桂糖 1 号(GT1)、粤糖 71-210(YT210)、粤糖 65-1240(YT1240)、粤糖 63-237(YT237)、粤糖 57-423(YT423)、印度 331(Co331)、台糖 172(F172)和拔地拉(Badila). 外植体均来自于这些基因型.

1.2 培养基

愈伤组织诱导、继代培养基: N₆ 基本培养基+3 mg/L 2, 4-D+30 g/L 蔗糖+6 g/L 卡拉粉, 用 1 mol/L KOH 调节 pH 至 5.8 后高压灭菌. 分化培养基: N₆ 基本培养基+1.5 mg/L NAA+3 mg/L 6-BA+30 g/L 蔗糖+6 g/L 卡拉粉, 用 1 mol/L KOH 调节 pH 至 5.8 后高压灭菌.

1.3 愈伤组织的诱导、继代和分化

1999 年 6 月中旬, 割取健壮蔗株尾梢, 剥去外部叶片, 无菌条件下用 75% 酒精消毒 30 s, 再切除外层和两端叶片(鞘), 留下生长点以上 1~5 cm 嫩叶(鞘), 用 200 mg/L 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)浸泡 20 min

(对照无此预处理)后,切成约 0.5 cm 的薄片,再 1/2 环切,接入诱导培养基(每个基因型接 12~15 瓶,每瓶 10 片)并在 26~28 °C 散射光培养 25~30 d 后将愈伤组织转入继代培养基(每瓶 10 块愈伤组织)定为第一代,继代或分化培养基每 25~28 d 转换一次.统计褐化率时以褐化物渗入到培养基内为标准.诱导率和分化率以出愈的心叶片数或分化的愈伤块数占接种时的总片数或总块数的百分率表示.增殖率用生长一定时间后愈伤组织增加质量与接种时愈伤组织质量的百分比表示.

2 结果与分析

2.1 PVP 预处理对外植体褐化和愈伤组织诱导的影响

表 1 是 11 个基因型的心叶接种到诱导培养基后

第 20 d 的外植体褐化率和愈伤组织的诱导率.从表 1 可见,在处理条件下,外植体的最高褐化率为 39.8%,11 个基因型的平均褐化率仅有 9.0%,而在未用 PVP 浸泡的对照中,最高褐化率达到 71.4%,平均褐化率是 26.0%. t 测验表明,甘蔗基因型的外植体褐化率用 PVP 预处理比对照明显降低,差异极显著($df=10, t=3.44 > t_{0.01}=3.17$).

从表 1 还可看到,在对照条件下,愈伤组织的最低诱导率为 14.3%,最高诱导率也仅为 39.6%.外植体经 PVP 预处理后,11 个甘蔗基因型的愈伤组织诱导率都有大幅度的提高,其中 10 个基因型的提高值在 60%以上.11 个基因型的愈伤组织平均诱导率,在处理中为 97.2%,对照是 29.2%, t 测验表明,甘蔗基因型的愈伤组织诱导率在用 PVP 预处理和对照之间差异极显著($df=10, t=25.95 > t_{0.01}=3.17$).

表 1 PVP 处理下甘蔗基因型的外植体褐化率和愈伤组织诱导率

Tab. 1 The ratios of explant browning and ratios of callus inducing of different sugarcane genotypes under different treatments

基因型 genotype	外植体褐化率 ratios of explant browning/ %			愈伤组织诱导率 ratios of callus inducing/ %		
	CK	处理 treatment	差值 difference	CK	处理 treatment	差值 difference
YT237	71.4	18.2	53.2	14.3	97.1	82.8
YT423	46.4	39.8	6.6	26.8	75.5	48.7
YT1240	40.3	12.5	27.8	34.9	100.0	65.1
RoC1	35.7	5.4	30.3	27.0	95.0	68.0
GT1	31.0	4.5	26.5	28.6	100.0	71.4
YT210	28.6	8.3	20.3	26.5	100.0	73.5
F172	16.1	3.4	12.7	33.3	95.5	62.2
Q75	6.7	1.3	5.4	34.7	100.0	65.3
Badila	4.8	2.5	2.3	25.7	100.0	74.3
Co331	4.3	2.1	2.2	20.4	100.0	79.6
RoC10	1.0	1.0	0	39.6	100.0	60.4
平均 average	26.0	9.0		29.2	97.2	

2.2 不同基因型外植体褐化的差异

从表 1 的对照中可看出, YT237 的褐化率高达 71.4%, RoC10 的褐化率只有 1.0%, Q75、Badila、Co331 的褐化率低于 10%, 其他基因型的褐化率介于 10%~50%之间. PVP 预处理后, YT423 的褐变率最高, 为 39.8%, YT237、YT1240 的褐化率分别是 18.2%和 12.5%, 其他基因型的褐变率小于 10%. χ^2 独立性检验表明, 甘蔗基因型间的心叶褐化率在对照和处理中都存在极显著差异($df=10$, 对照: $\chi^2=198.69$, 处理: $\chi^2=139.53$, $\chi^2_{0.01}=23.21$). 其中 RoC10、Q75、Badila、Co331 在 2 种方案中的褐化反应都比较迟钝; YT237、YT1240、RoC1、GT1、YT210 发生褐化的频率很高, 但外植体经过 PVP 处理后, 褐化率显著降低; PVP 对 YT423 和 RoC10 的作用不大, 表现为 YT423 对照和处理中皆有较高的褐化率, 而 RoC10

褐化率都为 1.0%, 但后者的褐化率在对照和处理中都是最低的.

2.3 不同基因型愈伤组织诱导率的差异

从表 1 的对照可知, 11 个甘蔗基因型的愈伤组织诱导率有明显的差异, 其中 YT237 的诱导率最低, 只有 14.3%; RoC10、YT1240、Q75、F172 的诱导率较高, 分别是 39.6%、34.9%、34.7%和 33.3%, 其他基因型的诱导率介于 20%~30%之间. PVP 预处理后, YT423 的诱导率为 75.5%, RoC1、F172、YT237 的诱导率分别是 95.0%、95.5%和 97.1%, 其他 7 个基因型的诱导率是 100%, χ^2 检验表明, 愈伤组织诱导率存在极显著差异($df=10$, $\chi^2=101.81 > \chi^2_{0.01}=23.21$).

2.4 不同基因型愈伤组织增殖率和分化率的差异

将 11 个甘蔗基因型的愈伤组织接入继代培养基, 30 d 后测定愈伤组织的鲜质量. 结果表明, 不同

甘蔗基因型的愈伤组织的增殖率有明显的差异(表 2), 增殖最快的是 RoC10 和 Co331, 30 d 后其愈伤组织鲜质量比接种时的鲜质量分别增加了 749% 和 582%; 增殖最慢的是 Badila 和 YT237, 为 144% 和 183%; 其他基因型的增殖率介于 205% ~ 326% 之间。

将 11 个甘蔗基因型的愈伤组织转移到分化培养基。第 28 d, 除了 Badila, 其他基因型的愈伤组织都产生了绿色分生组织区, 第 42 d, 所有的基因型都已分化。从表 2 可以看出, 基因型 Q75、YT1240、YT210、Co331 的愈伤分化率较高; Q75 前期的分化速度很快, 第 28 d 分化率就达 61.4%, 第 42 d 后一直稳定在 75% 左右; 而 RoC1、YT237、F172、GT1、RoC10、Badila 的分化率始终都在 10% 以下, 其中 Badila 最低, 只有 1.7% 的分化率, 且分化速度最慢, 第 28 d 的分化率为 0。χ² 独立性测验结果表明, 甘蔗不同基因型的愈伤组织分化率存在极显著差异 (*df* = 10, 第 28 d: χ² = 222.57, 第 42 d: χ² = 245.31, 第 62 d: χ² = 259.95, χ_{0.01}² = 23.21)。

表 2 不同甘蔗基因型愈伤组织的增殖率和不同时间的分化率

Tab. 2 The ratio of callus multiplication and ratio of callus differentiation in different stages of different sugarcane genotypes

基因型 genotypes	增殖率 ratio of callus multiplication/%	分化率 ratio of callus differentiation/%		
		28 d	42 d	62 d
RoC10	749	5.7	7.1	7.1
Co331	582	20.0	48.0	48.0
GT1	326	5.0	15.0	16.7
Q75	318	61.4	75.7	75.0
RoC1	292	1.1	3.3	7.5
YT210	268	33.3	45.0	53.3
YT1240	251	48.8	58.0	75.0
YT423	215	13.3	33.3	33.3
F172	205	2.5	6.3	7.1
YT237	183	1.7	5.0	5.0
Badila	144	0.0	1.7	1.7

2.5 甘蔗愈伤组织的生长曲线及其质地

由于培养基成分的不断变化和甘蔗细胞自身生长规律的作用, 在培养过程中愈伤组织存在着如图 1 的生长曲线。可以看出, 虽然不同基因型在同一时期的愈伤组织生长量不同, 但是其增长趋势基本一致。从接种到第 5 d 是适应期, 愈伤组织鲜质量增加幅度很小; 5 ~ 15 d 愈伤组织生长加快, 鲜质量迅速增加, 为线性生长期; 之后生长减慢, 逐渐进入相对稳定期。对甘蔗愈伤组织外观形态和细胞学的观察显示, 经过 3 ~ 4 次的继代培养, 不同基因型的愈伤组织表

现为颗粒状、淡黄-黄白色、质地较为一致。

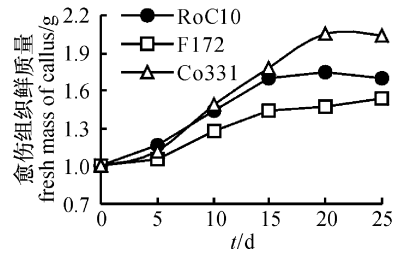


图 1 不同基因型的愈伤组织鲜质量变化

Fig 1 Variation of callus fresh mass of different genotypes

3 结论与讨论

3.1 甘蔗组织培养中的褐化现象

为减少组织培养中的褐化现象, 有人在培养基中加入抗氧化剂和吸附剂^[8~11], 也有人在接种之前, 用抗氧化剂水溶液浸泡外植体^[12, 13], 这些方法都有一定效果。但吸附剂抑制褐化有副作用, 即吸附剂在吸附酚类物质的同时, 也会吸附培养基中的生长调节剂。本试验尝试用吸附剂 PVP 的水溶液将外植体浸泡 20 min, 11 个基因型的平均褐化率由 26.0% 降低到 9.0%; 而且使得 11 个基因型的平均愈伤组织诱导率由 29.2% 提高到 97.2%, 其中有 7 个基因型的愈伤组织诱导率达到 100%。这充分说明在接种前用 PVP 水溶液浸泡外植体能有效抑制褐化发生, 同时能大大提高心叶组织的愈伤形成能力。这不仅克服了在培养基加入抗氧化剂的副作用, 也为降低外植体的褐化率和提高愈伤组织的分化率提供了新的途径。

3.2 甘蔗不同基因型组织培养特性的差异性

本试验在同样的培养条件下对不同基因型甘蔗进行组织培养, 结果表明不同基因型甘蔗心叶对酚类氧化所引起褐化反应具有不同的承受能力; 同时基因型不同, 其心叶愈伤组织的诱导率、增殖率、绿苗分化和器官建成能力也有较大的差异。这与以往的很多研究结果基本一致^[11, 14~16]。因此, 在甘蔗组织培养过程中, 为提高愈伤组织的诱导率、增殖率和分化率, 在同一基本培养基的基础上, 应注意对激素或相关成分的调整; 同时也应对引起不同基因型组织培养特性的这些差异的原因进行研究。

3.3 甘蔗不同基因型愈伤组织的稳定性

组织培养中细胞鲜质量的增加, 是由于组织细胞从培养基中吸收营养而生长的结果。不同基因型愈伤组织的鲜质量变化趋势的一致性揭示了甘蔗心叶愈伤组织的规律性生长。本研究对愈伤组织外观形态和细胞学的进一步观察显示, 经过 3 ~ 4 次的继代培养, 不同基因型的愈伤组织颜色、质地趋于相

似,说明各个基因型的愈伤组织大都处于同一发育时期,在遗传上和生理上是稳定的.因此,可以设想,采用处于同一时期且遗传上和生理上稳定的愈伤组织进行有关生理生化性状的研究,可以代表不同基因型个体水平上的有关性状的差异.

参考文献:

- [1] 曾吉恕. 甘蔗体细胞培养中的胚状体发生[J]. 植物生理学报, 1979, 5(4): 411—416.
- [2] CHEVRE A M. *In vitro* vegetative multiplication of chestnut [J]. J Hort Sci, 1983, 58(1): 23—29.
- [3] 王法照, 牟文中, 杜 鹃, 等. 苹果脱毒苗工厂化繁殖技术研究[J]. 烟台果树, 1994 (4): 14—21.
- [4] 王续衍, 林秦碧. 苹果组织培养研究简报[J]. 四川农业大学学报, 1988, 3(1): 46—48.
- [5] 蒋迪军, 牛建新. 苹果茎尖快速繁殖研究[J]. 新疆农业科学, 1992 (4): 171—173.
- [6] 李浚明. 植物组织培养教程[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1992. 349—350.
- [7] 罗士韦, 许智宏. 经济植物组织培养[M]. 北京: 科学出版社, 1988. 153—159.
- [8] 姚洪军, 罗晓芳, 田砚亭. 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.
- [9] 秦新民, 罗紫娟. 甘蔗组织培养中抗酚培养基的筛选[J]. 广西甘蔗, 1988 (1): 18—19.
- [10] 秦延豪, 邹宗兰, 吴才文. 浅析甘蔗组培中的酚害[J]. 甘蔗, 1997, 4(2): 12—14.
- [11] 王敬驹, 匡柏健, 何新民, 等. 甘蔗组织培养与细胞诱变研究[J]. 甘蔗糖业(甘蔗分册), 1983 (4): 11—15.
- [12] 许莉萍, 陈如凯, 薛其清. 甘蔗离体培养的变异机理及筛选技术: IV. 茎尖培养技术的筛选[J]. 福建农学院学报(自然科学版), 1993, 22(3): 280—284.
- [13] 许莉萍, 林俊芳, 陈如凯. 甘蔗高产高糖细胞系筛选研究: I. 甘蔗抗磷酸盐变异系的筛选[J]. 福建农业大学学报, 1997, 26(2): 143—146.
- [14] 何 明. 甘蔗组织培养技术的研究[J]. 四川甘蔗, 1988 (1): 29—33.
- [15] 叶树茂, 张绍武. 甘蔗的组织培养与育种[J]. 甘蔗科技通讯, 1980 (1): 11—16.
- [16] 福建农学院经济作物教研组. 甘蔗组织培养技术的研究[J]. 四川甘蔗科技, 1983 (4): 67—72.

Studies on the Properties of Tissue Culture of Different Sugarcane Genotypes

LIANG Ji-nan¹, TAN Zhong-wen¹, TAN Zhi-yong², ZHENG Zi-sheng¹, KONG Chui-hua¹, HU Fei¹

(1 College of Agronomy, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 Seed Research Center, Dongguan City, Dongguan 523060, China)

Abstract: Properties of tissue culture of 11 sugarcane genotypes were studied. The results showed that the ratios of explant browning were obviously decreased and the ratios of callus inducing were greatly increased after the explants were soaked in 200 mg/L polyvinylpyrrolidone (PVP) solution for 20 minutes. The ratios of explant browning, callus inducing, callus multiplication and callus differentiation of 11 sugarcane genotypes were significantly different in the same culture condition.

Key words: sugarcane; genotype; tissue culture; callus

【责任编辑 周志红】