

甘蔗组织培养育苗的培养基代用品试验

梁倩华 罗紫娟 吴佳德
(广西师范学院生物系)

NOTES ON THE MEDIUM SUBSTITUENT TEST IN TISSUE CULTURE OF SUGAR-CANE

Liang Qian-hua Luo Zi-juan and Wu Jia-de
(Department of Biology, Guangxi Teacher's College)

引 言

几年来,我区甘蔗组织培养工作取得很大成绩。现在组织苗已大面积用于生产,加速了良种推广,因而受到群众的欢迎。然而,组织苗如按常规方法培养,所用的药品特别是琼脂、激素和蔗糖的价格比较高,为寻求成本低、效果好的代用品,特于1980年进行试验,本文报导这一试验的结果。

材 料 与 方 法

1. 供试材料:毛里求斯、桂糖2号、桂糖11号的胚性细胞团。

2. 培养基的配制:本试验所用的南瓜、荸荠和黄瓜,均从市场上购得,品种名称不详。

先将南瓜、荸荠或黄瓜切成 $1 \times 1 \times 0.5$ cm大小的小块,分别放进试管至 $1/5$ 高度。然后加入 N_0 的基本培养液,加至南瓜或荸荠体积的 $1/2$,黄瓜体积的 $1/3$ (因黄瓜本身含水量多)。这样的组织块来作培养物的支持物,代替琼脂。因此培养液不能太多,以免接种时胚性细胞团沉在营养液中被淹死。每升培养液约需南瓜2斤,荸荠1.5斤,黄瓜2.5斤,可分装60管。

3. 南瓜、荸荠、黄瓜中的植物激素的提取和生物测定法:

植物激素的提取:将样品(南瓜、荸荠或黄瓜)洗净去皮,称取50克,切成小块研磨。立即用去过氧化物的乙醚100ml提取24小时。重复提取2次,每次2小时。合并乙醚提取液,在 40°C 的水浴上蒸馏,回收乙醚,蒸完乙醚,再用95%乙醇1ml洗下激素作层析点样用^[4,5,6,7]。

激素的层析:层析滤纸为新华No.3。长21cm,宽2.5cm。在其一端的中间点0.5

ml 样品(相当 25 克鲜重),用正丁醇: 12% NH_4OH : 95% 乙醇 (13:3:3) 作为溶剂系统,在室温用上行法展开,当上沿到达 20cm 时取出滤纸烘干。将层析纸谱按 R_f 值分为 10 段,分别放入小烧杯中,用磷酸缓冲液 pH5.3—5.8 为洗脱液(2 ml),洗脱 24 小时,洗脱液供生物鉴定用。用小麦芽鞘垂直生长法进行鉴定。^[4]

另外取 50 克样品,提取植物激素,方法与上同,蒸完乙醚,用 1 ml 乙醇洗下激素,用蒸馏水定容到 10 ml。此 10 ml 提取液供 IAA 和 KT 生物效应用。

结 果

一、南瓜、荸荠、黄瓜可作继代培养基。培养基配方:

- (1) $\text{N}_0 + 2,4-D$ 1.5mg/升 + 南瓜 2斤/升
- (2) $\text{N}_0 + 2,4-D$ 2.4mg/升 + 南瓜 2斤/升 + 1% 白糖
- (3) $\text{N}_0 + 2,4-D$ 3 mg/升 + 南瓜 2斤/升 + 2% 白糖
- (4) $\text{N}_0 + 2,4-D$ 3 mg/升 + 荸荠 1.5斤/升
- (5) $\text{N}_0 + 2,4-D$ 3 mg/升 + 荸荠 1.5斤/升 + 2% 白糖

1. 用毛里求斯胚性细胞团分别接到荸荠、南瓜的培养基上。每管的接种量为 2—3 块。培养 20—30 天之后,观察结果如表 1, 2。

表 1 南瓜作培养基代用品试验 甘蔗品种: 毛里求斯

接种日期	培养基	接种数 (管)	观察日期 (月, 日)	形成胚性细胞团		淹死数 (管)	不形成胚性 细胞团数量 (管)	生长率 (%)
				数量(管)	生长情况			
1980, 3, 6	南 ₁	20	4, 3	13	生长较好	7	0	65
1980, 3, 13	南 ₁	28	4, 3	24	生长中等	0	0	80
1980, 3, 6	南 ₂	18	4, 3	18	生长较好	0	0	90
1980, 3, 14	南 ₃	10	4, 3	9	生长较好	1	0	90
1980, 4, 11	南 ₁	19	5, 11	14	生长中等	3	2	74
1980, 4, 11	南 ₂	20	5, 11	18	生长较好	0	2	90
1980, 4, 12	南 ₁	10	5, 11	8	生长较好	0	2	80
1980, 4, 12	南 ₂	15	5, 11	14	生长较好	0	1	93

注 南 1, 2, 3, 即为上述培养基号数

标准: 生长好的培养一个月左右长满试管, 未长满试管的为中等, 长不多的为一般。

表 2 荸荠作培养基代用品试验 甘蔗品种: 毛里求斯

接种日期	培养基	接种数(管)	观察日期 (月, 日)	形成胚性细胞团		不形成胚性 细胞团数量 (管)	生长率 (%)
				数量(管)	生长情况		
1980, 3, 6	荸荠 ₅	10	4, 3	10	生长较好	0	100
1980, 3, 13	荸荠 ₅	20	4, 3	16	生长中等	4	80
1980, 3, 14	荸荠 ₅	10	5, 11	6	生长中等	4	60
1980, 4, 19	荸荠 ₄	8	5, 11	8	生长中等	0	100
1980, 4, 19	荸荠 ₅	8	5, 11	7	生长一般	1	99
1980, 4, 12	荸荠 ₅	9	5, 11	8	生长较好	1	88

从表 1, 2 说明 N₆ 的无机盐加 2, 4-D 和南瓜或荸荠都可作胚性细胞团的继代培养基。可省去 IAA 和 KT, 老南瓜本身含糖多, 加糖或不加糖都可以。

2. 胚性细胞团在不同培养基上干物重的比较, 结果如下表。

接 种 日 期	培 养 天 数	胚性细胞团的干物重(克/管)	
		南 瓜	荸 荠
1980, 4, 11	30	0.078	0.166
1980, 4, 12	31	0.089	0.104
1980, 4, 12	30	0.084	0.177
1980, 4, 12	31	0.066	—

注 ①取好、中、差 3 或 6 管求每管的平均数。

②培养后每批干物重数值不是太接近, 原因是每次接种量只是大致相同。

从表 3 (干物重的比较) 来看, 荸荠比南瓜好。

3. 黄瓜汁的试验

培养基配方

N₆⁽¹⁾ + 2, 4-D 3mg/升 + 15% (v/v) 黄瓜汁⁽³⁾ + 0.6% 琼脂 + 0.5% 白糖

品 种	培 养 基	接 种 日 期	接 种 数 (管)	观 察 日 期	形 成 胚 性 细 胞 团		不 长 胚 性 细 胞 团 数 (管)	生 长 率 (%)
					数 量 (管)	生 长 情 况		
毛里求斯	加黄瓜汁	5,23	16	9,29	16	最好	0	100
桂糖二号	加黄瓜汁	7,7	15	9,27	15	中等	0	100
桂糖二号	加黄瓜汁	7,7	18	9,27	18	较差	0	100

从表 4 说明用黄瓜汁可以省去 IAA 和激动素。这些农产品中有天然激素, 因此可以省去价格昂贵的 IAA 和 KT, 仍能使甘蔗胚性细胞团生长好。

二、分化率鉴定

为了检验用代用品继代繁殖的细胞团是否会降低分化率, 我们曾做了 5 批分化率测定, 都能分化绿芽和根, 分化率达 80% 以上。

三、南瓜、荸荠、黄瓜中的生长调节物质的生物测定:

1. 代用品中生长调节物质的生物测定

南瓜、荸荠、黄瓜的激素提取液, 分别经纸层析分离后, 作小麦芽鞘的生物鉴定。在立体解剖镜中用测微尺量小麦芽鞘的伸长度。芽鞘切段长度占对照%为纵座标, Rf 值为横座标。从图 1 表明南瓜、荸荠、黄瓜生长促进物质都分布在 Rf 0.1—0.2, 0.3—0.8 这两区段。0.6—0.8 和业经报导的吲哚乙酸的 Rf 值基本一致⁽⁴⁾。以 Rf 0.3—0.8 的生长促进物质质量

为最多,以 Rf 0—0.1, 0.8—1 这两区段有抑制物质。惟南瓜在 Rf 0.5—0.6 也有抑制物质,和文献所指分布最广的抑制剂 $-\beta$ 相符合^[1]。

2. 代用品中生长物质的测定

称取50克样品,提取蒸馏完乙醚后用95%乙醇1ml洗下,用蒸馏水定容至10ml。黄瓜本身含水分多,最后还有14.55ml。将此提取液作生物测定。取不同的提取液加磷酸缓冲液,总量为2ml。

从表5可见,提取液在0.25ml以下,都有促进生长的作用。0.5ml就抑制生长。说明荸荠、南瓜、黄瓜有生长物质的效应。

3. 代用品中细胞分裂素的测定

取上述提取液不同浓度,用磷酸缓冲液总量到5ml的培养皿中,加20对小白菜子叶(20颗)在30瓦的日光灯下培养五天,称干重比较不同提取液对子叶生长的变化。

从表6说明:南瓜、荸荠、黄瓜等不同提取液均含有细胞分裂素,以0.05ml提取液浓度效果最好,可促进子叶生长;过浓则抑制生长。

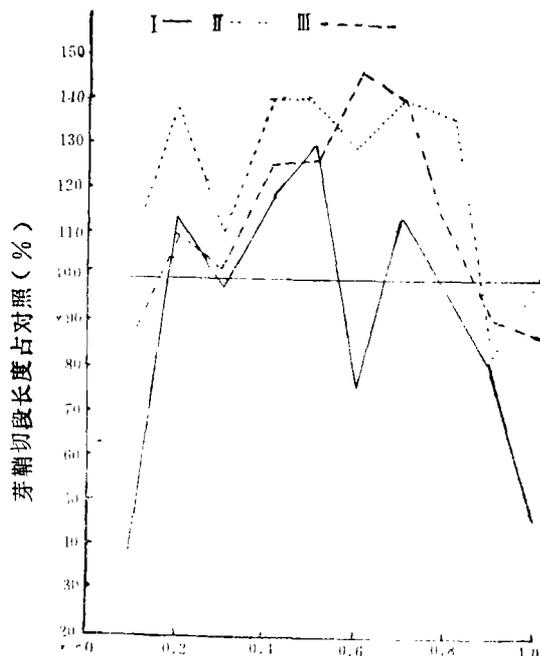


图1 I. 南瓜 1981年6月22—23日
II. 荸荠 1981年6月8—9日
III. 黄瓜 1981年6月16—17日

表5

不同提取液对芽鞘切段伸长的影响

代用品	提取液浓度		芽鞘切段伸长(%)
	提取液 (ml)	缓冲液 (ml)	
荸荠	0.05	1.95	17.02
	0.10	1.90	17.41
	0.25	1.75	4.98
	0.50	1.50	抑制伸长
南瓜	0.05	1.95	10.20
	0.10	1.90	4.48
	0.25	1.75	抑制伸长
	0.50	1.50	抑制伸长
黄瓜	0.05	1.95	2.60
	0.10	1.90	10.04
	0.25	1.75	13.00
	0.50	1.50	抑制伸长

表 6 不同提取液与小白菜子叶增重的比较

代用品	提 取 浓 度		小白菜子叶增重(克)
	提取液(ml)	缓冲液(ml)	
南 瓜	0	对照5.00	0.0158
	0.05	4.95	0.0177
	0.10	4.90	0.0149
	0.20	4.80	0.0156
黄 瓜	0	5.00	0.0158
	0.05	4.95	0.0166
	0.10	4.90	0.0165
	0.20	4.80	0.0151
荸 荠	0	5.00	0.0203
	0.05	4.95	0.0438
	0.10	4.90	0.0349
	0.20	4.80	0.0193

讨 论

甘蔗诱导培养基为：

$N_6 + 2,4-D 2 - 3 \text{ mg/升} + IAA 0.2 \text{ mg/升} + KT 1 \text{ mg/升} + \text{糖} 4\% + \text{琼脂} 0.5\%$

1980年3—4月间进行甘蔗组织培养育苗的培养基代用品试验。不加 IAA、KT和琼脂，为什么甘蔗胚性细胞团长得很好？从南瓜、荸荠、黄瓜中的生长调节物质的生物测定来分析，得知如下几点：

1. 甘蔗胚性细胞团的生长与代用品的生长调节物质有关。代用品中虽然同时存在有生长促进物质和抑制物质，但生长物质超过抑制物质，所以能使甘蔗胚性细胞团继代繁殖。

2. 甘蔗胚性细胞团的生长与代用品中吲哚乙酸有关。代用品中含有吲哚乙酸，所以使小麦芽鞘伸长。在提取液的0.25ml以下浓度都有促进生长的作用。南瓜抑制物较多，0.25ml的提取物就会抑制芽鞘的伸长。黄瓜生长物质较多，所以0.25ml提取液还促进伸长，在0.25ml以下伸长与浓度成正比。

3. 甘蔗胚性细胞团的生长与细胞分裂素有关。细胞分裂素使细胞分裂加快，细胞数目是生长的基础，所以使小白菜子叶干物增重。0.05ml提取液促进增殖，干物增加最高，而0.1、0.2 ml的提取液干物重比0.05 ml的还低，可能是由于浓度高产生抑制作用。

4. 甘蔗胚性细胞团的分化与代用品中生长素和细胞分裂素比值有关。

南瓜、荸荠中生长素和细胞分裂素的比值适合于促进细胞团生长，但黄瓜和对照的培养基比值适合于分化。

实验过程中我们计算了培养基的成本。以南瓜、荸荠或黄瓜代替琼脂、激素和蔗糖作培养基，成本可降低85%，利于节约开支。

参 考 文 献

- [1] 朱至清等, 1975: 通过氮源比较试验建立一种较好的水稻花药培养基。中国科学(5): 484—490
- [2] 广东农科院水稻生态研究室, 1977: 甘蔗叶组织培养研究初报。植物学报19(4): 311—312
- [3] 叶树茂等, 1979: 甘蔗愈伤组织的诱导和植物再生。植物生理通讯(3): 13—15
- [4] 吕忠恕等, 1964: 生长调节物质与杨树冬季休眠的关系。植物生理学报(1): 100—107
- [5] 陆宪辉等, 1979: 毛竹笋体生长及退败过程中生长调节物质的研究。植物生理通讯(1): 21—24
- [6] Boo, L. 1961: The effect of gibberellic acid on the inhibitor—B complex in resting potato. *Physiol. Plantarum* 14: 676—681
- [7] Blommaekt, L. T. ,1954: Growth and inhibiting substance in relation to the rest period of potato tuber. *Nature* 174: 970