甘蔗的植物组织培养

李军生 李春瑶

(广西师范大学生物系)

摘要 本文综述了二十多年来国内外有关甘蔗组织培养的文献。着重讨论了影响甘蔗愈伤组织发生及形态建成的有关问题，包括各种内外因子的影响和目前对甘蔗组培植株再生途径的有关争论。同时，文章还收集整理了有关甘蔗组培生理生化研究方面的资料。最后，文章展示了甘蔗组培在选育新品种及无性快速繁殖方面的应用前景。

关键词 甘蔗；组织培养；胚胎

自 Nickell(1961年)最初进行甘蔗组织培养的研究以来，甘蔗组织培养已取得很大进展。Babar 和 Nickell 1969年首次突破从甘蔗组织培养物中实现植株再生[1]。另外，在我国台湾、以及斐济、澳大利亚、菲律宾等地也进行了有关甘蔗组培的研究，并成功地应用此项技术于甘蔗品种的选育和改良，以及一些甘蔗病害如斐济病、眼点病及露菌病的去除等[2]。我国大陆在1976年后也开始了这项研究，关于1979—1983年间把这一技术应用于优良品种的快速繁殖[3]。除了固体培养外，甘蔗的细胞悬浮培养也取得了成功[4]。原生质体培养也成功地获得了再生植株[5]。这为进一步进行甘蔗体细胞杂交和选育新品种开创了新的途径。关于甘蔗组培中的生理生化研究也进行了一些工作。下面就所收集到的有关甘蔗组培及组培中生理生化研究的资料作一整理，综述如下，供同行们参考。

一、甘蔗的组织培养和形态发生

(一)影响甘蔗愈伤组织产生的内外因素

(1)外植体：不同生理状态的外植体对诱导脱分化和再分化的影响明显不同。许多研究者的工作表明，不同的甘蔗品种、不同的器官来源及在不同的季节里取材做外植体、愈伤组织的诱导及分化的质量明显不同。韩光禧等[6]比较了春、夏、秋、冬取材的甘蔗幼叶的诱导效果，发现冬春季接种不仅诱导效率低，愈伤组织质量也不好，酚污染亦严重；而夏秋接种的材料，酚污染轻，愈伤组织诱导率高，质地疏松，色鲜黄，生长快。特别是秋季接种的最为理想。王敬驹等[7]比较了甘蔗休眠芽、幼茎、根尖、叶鞘及幼叶作为外植体的培养效果，结果表明，以幼叶鞘诱导愈伤组织的效果最佳，幼叶次之。Larkin也观察到同样现象[8]。Ho和Vasil[9]也认为，以茎生长点以上0—5 cm的负一叶以内的幼叶或叶鞘诱导效果较好。在此值得一提的是，不同品种的诱导效果及酚污染程度差别很大[7,10]。

(2)培养基：在甘蔗组培中用得最多的基本培养基是MS及N_6培养基[6,7,9]。White培养基也有应用，但它不利于植株分化[1]。Ho和Vasil[9]认为NH_4^+是诱导胚性愈伤组织的关键因素之一，以NO_3^-取代培养基中的NH_4^+，则只能诱导非胚性愈伤组织的形成。

• 本文得到梁倩华，杨继华二位老师的帮助和审阅，特此致谢。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

此外，培养基中 NH_4^+/NO_3^- 比例对愈伤组织成苗有明显的影响，愈伤组织在仅含 NH_4^+ 或高 NH_4^+/NO_3^- 比率的培养基上芽原基分化受到抑制，低总氮量（低于20mM）亦抑制芽原基形成；培养基仅含 NO_3^- 或有低 NH_4^+/NO_3^- 比率或培养基总氮量高于20mM有利于形成更多的芽原基[8]。Heinz等[2]认为氨基酸是甘蔗细胞生长最重要的氮源，其中以天冬氨酸和谷氨酸的效果最好。椰子汁及酵母提取液有利于培养物的生长，部分原因可能就是增加了培养基中氨基酸的含量。碳水化合物起着提供能量和碳骨架的作用，不同糖类物质对甘蔗愈伤组织的诱导、生长和分化的影响有明显的差异。王敬驹等[7]比较了蔗糖、葡萄糖、果糖、麦芽糖、可溶性淀粉及甘露醇等六种碳水化合物的作用，发现蔗糖的效果最好，果糖和葡萄糖次之，并且两者混合的效果也不及蔗糖。麦芽糖的效果最差。蔗糖常用的浓度为3—5％。

（3）温度：温度是影响甘蔗愈伤组织诱导及分化的一个重要因素，丘芹等[11]观察到，愈伤组织的鲜重与温度有密切关系。在一定的范围内，愈伤组织的诱导率随温度的升高而提高。但是，褐变的程度也随培养温度的升高而加强。因此，在甘蔗组培中，不宜采用较高的温度，一般以25—30℃适宜。但在愈伤组织诱导始期，对温度的要求并不那么严格[6]。

（二）愈伤组织的形成与培养

外植体在含2,4—D的MS培养基上，4天就能产生肉眼可见的愈伤组织[9]2—3星期后愈伤组织大量形成。Ho和Vasil把愈伤组织分为三类：(a)致密型。愈伤组织结构紧密，表面光滑，主要由小而圆、细胞核大、细胞质浓厚的细胞组成，此类愈伤组织叫胚性愈伤组织。(b)松软型。此类愈伤组织结构松散，半透明，主要由排列疏松、大而伸长的细胞组成，这类愈伤组织只能偶尔分化出根。(c)粘糊型。愈伤组织松软、粘糊状，不具有胚性能力，亦不能进行继代，主要由伸长而高度分散的细胞组成。

培养基中的2,4—D是诱导甘蔗幼叶及叶鞘脱分化的关键因素，没有2,4—D存在不能进行脱分化[6]。不同2,4—D浓度对产生愈伤组织的质和量不同，Ho和Vasil[9]认为，最适宜诱导胚性愈伤组织产生的2,4—D浓度为0.5—1.5mg/l，而2.5—3mg/l 2,4—D则有利于胚性愈伤组织的继代培养。我们发现，2,4—D浓度低于0.5mg/l或高于5mg/l，则外植体脱分化主要产生非胚性愈伤组织。

（三）植株的再生

目前，甘蔗组培再生植株被认为是通过以下途径：①不定芽途径，即通过愈伤组织诱导长出不定芽再成根成苗[12,13]；②胚状体途径，即植株再生是通过一个类似合子胚的发育阶段形成完整植株[6,9,10,13,14]。早期，许多研究者认为甘蔗组培再生植株是通过愈伤组织分化芽途径而没有提到胚状体途径[1,2,12,15,16,17,18]，但是早在1974年就有人观察到了体细胞胚现象[19]。在这之后，Nadar[14]，曾吉恕[10]，Ho和Vasil[9]以及罗紫娟[13]等都观察到了体细胞胚胎发生现象。罗紫娟[13]等还发现甘蔗组培再生植株可以通过不定芽和胚状体两条途径。许多研究者认为在禾谷类植株中，组培植株再生主要是通过胚状体途径而不是象早期所认为的那样通过器官发生途径，并认为早期的观点在很大程度上是由于禾本科植物胚状体在发育过程中存在着“早熟萌发”的现象而产生的误解所致[20,21,22]。Ho和Vasil也认为甘蔗组培再生植株可能是通过体细胞胚胎发生途径而不是过去所认为

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的不定芽发生途径[9]。他们指出可能由于以下原因使研究者们忽视了这一点：① 由于没有进行细致的形态学观察；②在离体情况下产生的体细胞胚往往不很典型，不完全和合子胚一致；③由于胚状体的早熟萌发，使胚状体成苗误为不定芽成苗；④很多实验证明细胞分裂素类物质具有促进胚状体多芽现象出现。他们在实验中观察到了许多非典型胚状体及胚状体早熟萌发现象出现。通过ABA，ACC及AZG可以抑制早熟萌发，使非典型胚状体正常发育。罗紫娟等在她们的实验中观察到甘蔗组培再生植株确有不定芽和胚状体两条途径存在[19]。她们在培养基中添加有细胞分裂素类物质。这是不是细胞分裂素类物质造成了胚状体多芽丛生，将胚状体途径误为不定芽途径，还是真正存在着两条途径？这个问题目前还不清楚，有待进一步弄清。

二、原生质体培养

禾本科作物原生质体的分离和培养，是国内外公认的难题，也是生产上急待解决的一项技术[23]。自从 Maretzki 和 Nickell[24] 首次分离甘蔗组织原生质体以来，Evans[25]，Larkin[8] 分别观察到甘蔗原生质体进行细胞分裂，并形成了小细胞团。颜秋生等[28] 也获得了大量愈伤组织。Krishnamurthi还成功地实现了几种甘蔗细胞原生质体间的融合，并观察到融合细胞能进行细胞分裂[26]。但是甘蔗原生质体培养的研究很长一段时间一直处于一种停滞不前的状态，没有什么重大进展。最近，颜秋生等已成功地获得了甘蔗原生质体再生植株[5]。这是十多年来甘蔗原生质体培养研究的巨大突破，它不仅完善了甘蔗组培技术，而且为甘蔗的遗传育种展示了美好的前景。

三、甘蔗组织培养的生理生化研究

甘蔗组培的生理生化研究，前人做了部分工作。韦一能观察到一般愈伤组织与胚性愈伤组织中游离氨基酸大部分是相同的，但也有不同之处[27]。杨继华等认为胚性愈伤组织代谢旺盛，分化力强是与其中酯酶，过氧化物酶活性高相关联[28]。罗紫娟[29]等的实验结果表明，胚性愈伤组织中核酸，蛋白质的变化与细胞分裂高峰出现密切相关，即细胞分裂旺盛，核酸、蛋白质含量增加。Higa 也观察到了同样的现象[30]。

过氧化物酶及其同工酶的变化与植物生长发育有关[31]，可以作为生长分化的指标[32,33]。罗紫娟等认为在甘蔗组培育苗中，过氧化物酶同工酶与胚性愈伤组织的分化程度有关[34]。

Dwivedi 等[35,36]观察到磷酸葡萄糖异构酶、丙酮酸激酶，6－磷酸葡萄糖脱氢酶等糖代谢酶以及硝酸还原酶在愈伤组织分化芽过程中的活性都比不分化芽的要高。在器官发生之前，谷氨酸合成酶，谷氨酰胺合成酶等酶的活性是逐渐升高的，而不分化的愈伤组织其酶活性是逐渐下降的。在谷氨酰胺合成酶，谷氨酸合成酶的活性达到最高且谷氨酸脱氢酶活性最低时，大量分化芽。此外，芽的分化还与呼吸代谢途径的变化有关。这些结果说明，甘蔗组培芽的分化与氮、碳代谢有关。目前，有关甘蔗组培再生植株的机理尚未研究清楚，有待进一步研究。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

四、甘蔗组织培养的应用及前景

（1）快速无性繁殖

广西甘蔗研究所等单位协作，对新育成的良种桂糖11号用组培方法进行繁殖，已成功地在短短的两年间繁殖了八千亩，比常规繁殖法快了近三百倍[3]。几年来的研究表明组培育苗基本上保持了原来品种的性状。组培苗具有比原种分蘖力强，茎数多，茎变细等特点。也出现极少数的双芽、多芽、分叉芽、曲茎等形态差异。但这些特点随着无性繁殖次数增加逐渐消失。

（2）选育高产，抗病良种

Heinz 和 Mee 1971年观察到在37株再生试管苗中除一株外，其余的其染色体均为嵌合体，并且其四种酶的同工酶谱也发生了变化[37]。陈子云观察到再生品系和供体之间不仅外部及其农艺性状发生了变异，染色体及同工酶也有变异[38]。因此，可以认为甘蔗组培方法本身就有诱变作用。在常规组培技术的基础上，采用物理及化学诱变，可以选育出高产，抗病的甘蔗新品种。目前，育种学家想利用组培技术达到以下目的：①培育晚开花或不开花的品种成为早开花的亚无性系，以利杂交育种；②在低糖品种中筛选高糖高产新品种；③筛选抗病亚无性系；④从生产的农艺类型诱导出耐寒品系[39]。我们深信，随着甘蔗组培技术的不断完善和应用到各个领域，必将给甘蔗组织培养带来更广阔的前景。

参 考 文 献

〔1〕 Barba, R., Nickell, L.G., 1969: Planta, 89, 299—302.

〔2〕 Heinz, D.J., et al, 1977: Plant Cell, Tissue Culture (J. Reinert and Y. P. S. Bajaj, ed.) springer-Verlag, Berlin Heidleberg, 1977, PP 3—17.

〔3〕 轻工部甘蔗糖业研究所等，1985：中国甘蔗栽培学。农业科学出版社，PP139—141。

〔4〕 Ho & Vasil, 1983: Ann, Bot。51, 719—726。

〔5〕 颜秋生等，1987：植物学报。29（3）P242—246。

〔6〕 韩光禧等，1983：广西农学院学报。1983（2）83—94。

〔7〕 王敬驹等，1983：甘蔗糖业（甘蔗分刊）。1983（4）11—15。

〔8〕 Larkin, P.j, 1982: Plant Cell, Tissue and Organ Culture, (1) 149—164。

〔9〕 Ho, W.J., and Vasil, I.K., 1983: Protoplasma 118, 169—180.

〔10〕 曾吉恕，1979：植物生理学报。5（4）411—416。

〔11〕 丘 芹等，1980：甘蔗糖业（甘蔗分刊）。（4）25—26

〔12〕 叶树茂等，1979：植物生理学通讯。（5）13—16。

〔13〕 罗紫娟等，1984：植物生理学通讯。（2）29—32。

〔14〕 Nadar, H.M., et al, 1978: Crop Sci, 18: 210—216.

〔15〕 Nadar, H.M., Heinz, D.J., 1977: Crop Sci 17: 814—816.

〔16〕 Heinz, D.J. and Mee, G.W.P., 1969: Crop Sci 9: 346—349.

〔17〕 Kalaw, E.P., et al, 1977: Philippine I.Crop Sci 2: 193—196.

〔18〕 Koga, Y., and kudo, M., 1977: IARQ 11: 193—197.

〔19〕 Liu, M.C. and Chen, W.H., 1974: Proc. Congr. Int. Soc. Sugarcane Technol

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(South Africa) 15: 118
〔20〕 Vasil, I.K., 1982: In: Plant improvement and Somatic Cell Genetics (I.K.Vasil et al eds.) pp179—203, Academic Press.
〔21〕 Vasil, I.K. et al 1982: in Variability in plant regenerated from tissue culture (Earle, E.D. et al eds.) Praeger Press, New York. pp3—21.
〔22〕 王大元，1984：细胞生物学杂志。6(1)p16—20。
〔23〕 颜秋生等，1983：科学通报。28(12)752—755。
〔24〕 Maretzhi, A et al, 1973: Colloq. Internat. C.H.R.S., Paris, 212, 51—63.
〔25〕 EvanS, D.A., 1980: Z. Pflanzenphysiol, 98: 355—358.
〔26〕 Krishnanurthi, M., 1976: Euphytica, 25: 145—150.
〔27〕 韦一能，1986：植物生理学通讯。(1)29—30。
〔28〕 杨继华等，1983：广西农业科学。(1)26—28。
〔29〕 罗紫娟等，1985：广西植物。5(1)60—64。
〔30〕 Higa, A., 1975: Plant and cell Physiol. 16: 247—256.
〔31〕 Glston, A.W., et al, 1966: Science, 51: 452—453.
〔32〕 Scandalios, J.G. et al, 1977: in Applied and foundamental Aspects of Plant Cell Tissue Culture (J. Reinert and Y.P.S.Bajaj ed.) Springer—Verlag, Berlin Heidleberg, 1977: PP719—730.
〔33〕 Rawal, S.K., et al, 1982: Plant Science Letters 24: 67—77.
〔34〕 罗紫娟等，1986：云南植物研究。8(1)67—72.
〔35〕 Dwivedi, V.N., et al. 1984: J. Plant physiol 117(1)7—16.
〔36〕 Rawal, S.K., et al, 1985: J.Plant Physiol. 119(3) 191—200.
〔37〕 Heinz, D.J. et al, 1971: Amer. J. Bot. 58: 257—262.
〔38〕 陈子云，1987：甘蔗糖业(甘蔗分刊)。(1)8—14。
〔39〕 Miller, J. D., 1986: 国外农学(甘蔗)。(1)19—23.

附：本文缩写词：2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)；ABA(脱落酸)；CCC(矮壮素)；AZG(氮鸟嘌呤)。

PLANT TISSUE CULTURE OF SUGARCANE

Li, Jun Sheng and Li, Chun Yao
(Department of Biology, Guangxi Teachers University)

Abstract The paper has summarized the articles in the last twenty years on plant tissue culture of sugarcane. It mainly deals with the interior and exterior factors which affect the formation of callus and plant regeneration. It also discussed the idea on the passways of plant regeneration in vitro. In addition, it reviews the studies on physiology and biochemistry in plant tissue culture of sugarcane and shows the vistas in applying plant tissue culture techniques in breeding and fast clonal propagation of sugarcane.

Key words sugarcane; tissue culture; callus; embryoid; precocious germination

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net