

技术与方法 Techniques and Methods

植物组织培养因子与培养基中 pH 值的关系

蒋小满* 柏新富 赵建萍 司朝师

烟台师范学院生命科学学院, 山东烟台 264025

Relationship Between Plant Tissue Culture Factors and pH Value of Medium

JIANG Xiao-Man*, BAI Xin-Fu, ZHAO Jian-Ping, SI Chao-Shi

School of Life Science, Yantai Normal College, Yantai, Shandong 264025, China

提要 MS 培养基中添加不同种类和浓度的植物生长调节剂时, 灭菌前后培养基中 pH 值均有一定幅度的下降, pH 的变化值(Δ pH)为-0.2~-0.5, 下降幅度因植物生长调节剂的种类和浓度而异; 培养基中 pH 值随材料培养时间的延长而递减, 降幅可达 1.5, 下降幅度与转接材料种类和多少也有关系。

关键词 组织培养因子; pH 值; 植物生长调节剂; 灭菌; 培养基

植物组织培养所用的培养基一般是一些非缓冲性体系, 在接种植物材料之前, 需要将培养基的 pH 值调至设定值, 然后, 经过蒸汽高压或过滤灭菌^[1]。因过滤灭菌操作较为麻烦, 通常都采用蒸汽高压灭菌。但灭菌以后, 培养基中 pH 值会有一定幅度的变化, 而偏离原来所设定的 pH 值^[2~4], 这对那些对培养基 pH 值敏感植物的离体培养会产生较大影响。本文探讨了灭菌前后培养基中 pH 值的变化, 以便为精确设定培养基 pH 值, 提高外植体的培养成功率提供参考, 同时也有助于解决组织培养过程中由于 pH 值变化而产生的一些生理问题。

材料与方 法

1 培养基的配制

基本培养基为 MS 培养基, 根据实验要求添加不同种类和浓度的生长调节物质或改变大量元素和蔗糖的量。琼脂浓度为 0.6%。常规蒸汽灭菌条件为 121~122℃, 20 min。

2 pH 值的测定

灭菌前培养基 pH 值调至 5.80 左右, 灭菌后待培养基温度降至 70℃ 左右时测其 pH 值, 所测得 pH 值均进行温度补偿换算为 25℃ 时 pH 值。每个处理测定 5~7 瓶。数据采用 Microsoft Excel 加载宏进行方差分析^[5], 然后根据所求得的 P 值与可信度 α 比较, 即得出各种因子对灭菌前后 pH 值

的影响; 正交设计试验数据处理采用极差分析法。

结果与讨论

1 培养基成分对灭菌前后培养基中 pH 值的影响

表 1~3 显示:

表1 灭菌前后含不同浓度细胞分裂素类调节物的培养基中 pH 值的变化

细胞分裂素 浓度/mg·L ⁻¹	pH 值		pH 值变化 (- Δ pH)	F 值 ($\alpha=0.05$)	
	灭菌前	灭菌后			
6-BA	0	5.81	5.410±0.046	0.400	2.60×10 ⁻⁵
	0.1	5.78	5.388±0.052	0.392	
	0.2	5.79	5.328±0.063	0.462	
	0.4	5.78	5.298±0.026	0.482	
	0.8	5.82	5.342±0.043	0.478	
	1.6	5.81	5.380±0.019	0.430	
	3.2	5.79	5.504±0.039	0.316	
	6.4	5.79	5.504±0.039	0.316	
K T	0	5.82	5.438±0.030	0.382	8.13×10 ⁻⁶
	0.5	5.78	5.392±0.028	0.388	
	1.0	5.79	5.361±0.031	0.429	
	1.5	5.82	5.324±0.019	0.496	
	2.0	5.80	5.342±0.034	0.458	
	2.5	5.80	5.394±0.025	0.406	
3.0	5.79	5.387±0.018	0.403		

收稿 2005-03-22 修定 2005-08-29

*E-mail: jiangxiaomam@163.com, Tel: 0535-6672497

(1) 基本培养基 MS 中分别添加不同浓度的 6-BA、KT、NAA、IAA 和 IBA, 灭菌前后培养基的 pH 值均有下降, 降低的幅度 (ΔpH) 与植物生长调节剂的种类和浓度有关: 培养基中添加细胞分裂素类生长调节物(6-BA 和 KT) 的, 灭菌后其 pH 下降幅度比未加的大(表1); 添加生长素类生长调节物(NAA、IAA 和 IBA) 的, 灭菌后 pH 值下降幅度反而比未加的小(表2)。在我们所加的各类生长调节剂浓度范围内, 6-BA 和 KT 表现为中等浓度(如 6-BA 为 $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 KT $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的培养基中 pH 值变化显著, $-\Delta\text{pH}$ 接近 0.5, 而高和低浓度的 ΔpH 相对较小。NAA、IAA 和 IBA 的 ΔpH 值变化似乎有随浓度增加而递减的趋势, 这在 IAA 较为明显。这可能与高压灭菌后 IAA 易降解有关^[1]。由于各组实验中所求得的 P 值均小于可信度 α ($\alpha=0.05$), 所以, 加各种植物生长调节剂的培养基中 pH 值灭菌前后的变化较为显著。

(2) 通过极差分析表明, 在大量元素、蔗糖、6-BA、NAA 四因子的正交试验中, 6-BA 对 $-\Delta\text{pH}$ 影响最大, 极差为 0.2220, 蔗糖次之, 极差为

表2 灭菌前后含不同浓度生长素类调节物的培养基中 pH 值的变化

生长素浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	pH值		pH值变化 ($-\Delta\text{pH}$)	P 值 ($\alpha=0.05$)	
	灭菌前	灭菌后			
NAA	0	5.78	5.386 ± 0.035	0.394	2.68×10^{-8}
	0.05	5.79	5.410 ± 0.035	0.380	
	0.1	5.80	5.416 ± 0.023	0.384	
	0.2	5.81	5.374 ± 0.025	0.436	
	0.4	5.78	5.382 ± 0.037	0.398	
	0.8	5.82	5.516 ± 0.029	0.304	
IAA	1.6	5.81	5.534 ± 0.018	0.276	3.64×10^{-10}
	0	5.81	5.442 ± 0.061	0.368	
	0.1	5.81	5.388 ± 0.024	0.422	
	0.2	5.82	5.516 ± 0.034	0.304	
	0.4	5.79	5.592 ± 0.016	0.298	
	0.8	5.82	5.546 ± 0.027	0.274	
IBA	1.6	5.80	5.528 ± 0.033	0.272	9.33×10^{-7}
	3.2	5.80	5.580 ± 0.031	0.220	
	0	5.78	5.386 ± 0.035	0.394	
	0.1	5.80	5.420 ± 0.035	0.380	
	0.2	5.82	5.522 ± 0.030	0.298	
	0.4	5.78	5.464 ± 0.034	0.316	
	0.8	5.80	5.510 ± 0.008	0.290	
	1.6	5.81	5.502 ± 0.024	0.308	
	3.2	5.80	5.412 ± 0.015	0.388	

表3 大量元素、蔗糖、6-BA 及 NAA 对灭菌前后培养基中 pH 值的影响

试验号	大量元素	蔗糖/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	6-BA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	NAA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	pH值		pH值变化 ($-\Delta\text{pH}$)
					灭菌前	灭菌后	
1	1/2MS	15	0.1	0.05	5.78	5.534 ± 0.036	0.246
2	1/2MS	15	0.1	0.25	5.81	5.544 ± 0.032	0.266
3	MS	30	0.1	0.50	5.83	5.356 ± 0.027	0.474
4	MS	30	0.1	1.00	5.78	5.298 ± 0.029	0.482
5	1/2MS	30	0.5	0.05	5.82	5.192 ± 0.019	0.628
6	1/2MS	30	0.5	0.25	5.79	5.180 ± 0.016	0.610
7	MS	15	0.5	0.50	5.80	5.228 ± 0.019	0.572
8	MS	15	0.5	1.00	5.79	5.244 ± 0.017	0.546
9	MS	15	1.0	0.05	5.82	5.282 ± 0.022	0.538
10	MS	15	1.0	0.25	5.79	5.324 ± 0.034	0.466
11	1/2MS	30	1.0	0.50	5.82	5.170 ± 0.031	0.650
12	1/2MS	30	1.0	1.00	5.78	5.088 ± 0.019	0.692
13	MS	30	2.0	0.05	5.82	5.278 ± 0.015	0.542
14	MS	30	2.0	0.25	5.79	5.222 ± 0.024	0.598
15	1/2MS	15	2.0	0.50	5.81	5.252 ± 0.033	0.558
16	1/2MS	15	2.0	1.00	5.79	5.292 ± 0.039	0.498
\bar{x}_1	0.5185	0.4613	0.3670	0.4885			
\bar{x}_2	0.5273	0.5845	0.5890	0.4850			
\bar{x}_3			0.5865	0.5635			
\bar{x}_4			0.5490	0.5545			
R	0.0088	0.1232	0.2220	0.0785			

\bar{x}_1 、 \bar{x}_2 、 \bar{x}_3 、 \bar{x}_4 分别代表每个因素由低到高各水平的 $-\Delta\text{pH}$ 的平均数。 R 表示各水平平均数的极差。

0.123, 说明除 6-BA 对培养基 pH 值有明显的影响外, 蔗糖用量也是影响培养基中 pH 值变化的一个主效因子, 这与文献 6 的报道一致。而大量元素的用量对培养基 pH 值的变化影响不大(表 3)。

2 植物类别对培养基 pH 值的影响

以一品红、草莓组培苗为材料, 分别接转在

不同成分的培养基中, 接种量为每瓶 2 棵或 3 棵, 每隔 1 周测定培养基中 pH 值。结果(表 4)表明, 接转不同植物(草莓或一品红) 30 d 后的培养基中 pH 值均有下降, 降低幅度因接种植物类别而异。这可能与不同植物生长中吸收或分泌能力不同有关。

表4 植物类别对培养基 pH 值的影响

植物类别	培养基成分	灭菌后培养基中 pH 值	30 d 后培养基中 pH 值	pH 值变化 (Δ pH)
草莓“幸之乡”	MS+6-BA 0.5+NAA 0.1	5.358±0.007	4.437±0.053	-0.921
草莓“丰香”	MS+6-BA 1.0+NAA 0.1	5.583±0.006	4.323±0.046	-1.160
一品红“自由红”	MS+6-BA 0.25+IAA 0.2	5.373±0.006	4.045±0.003	-1.328
一品红“塔巴璐卡”	1/2MS+IBA 0.8+NAA 0.1	5.760±0.028	4.453±0.015	-1.307

另外, 同一种植物的接转数量不同(2 或 3 棵·瓶⁻¹), 培养基中 pH 值下降幅度也不同。接转的多, 随着培养进程培养基中 pH 值的下降值也大(图 1)。

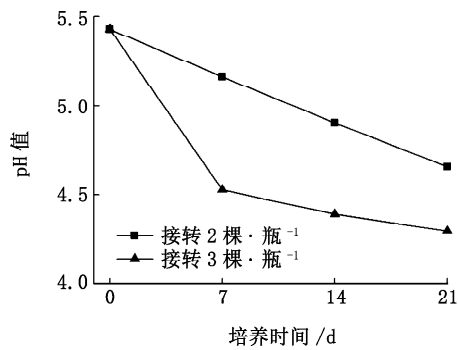


图1 培养过程中接转植物材料的数量对培养基 pH 值的影响

培养基成分: MS+6-BA 0.8+NAA 0.2。

总之, 高温灭菌对培养基中 pH 值有影响, 所以植物组培时应考虑植物生长调节剂种类和蔗糖用

量对培养基中 pH 值的影响, 灭菌前可适当调高培养基 pH 值 0.2~0.5 个单位, 这样可以确保灭菌后的 pH 值与原设计值接近。同时, 在接转材料时, 应考虑植物的种类和数量以及对培养基 pH 值的敏感性, 在组培时还应适当减少每瓶的接转数。

参考文献

- 1 李浚明. 植物组织培养教程. 第2版. 北京: 中国农业大学出版社, 2002. 16~23
- 2 梁海曼. 高压灭菌对培养基成分的影响. 植物生理学通讯, 1995, 31(5): 389~392
- 3 莫成凡, Williams RR. 影响培养基 pH 值变化的因素. 植物学报, 1997, 39(4): 347~352
- 4 黄斌. 高压灭菌前后培养基 pH 值和渗透压变化. 植物生理学通讯, 1984, (4): 30~31
- 5 李春喜, 王志和, 王文林. 生物统计学. 第2版. 北京: 科学出版社, 2000. 81~149
- 6 汪良驹, 刘友良, 马凯等. 高温高压灭菌对 MS 培养基 pH 值的影响. 植物生理学通讯, 1997, 33(1): 10~14