

甘蔗健康种苗培育体系的建立

杨本鹏 张树珍 杨 学 王业桥 顾丽红 冯翠莲 蔡文伟 张显勇

中国热带农业科学院热带生物技术研究所 海口 571101
热带作物生物技术国家重点实验室

摘 要 通过热处理、温热处理结合茎尖分生组织培养建立有效的甘蔗(*Saccharum* L.)健康种苗生产的技术体系。以经过热处理和温热处理的甘蔗带芽茎段萌生的腋芽为外植体,取其茎尖分生组织接种于 MS+BA1.0 mg/L+NAA0.1 mg/L+PVP 200 mg/L+蔗糖 30 g/L 的培养基上培养 10~20 d 可诱导其产生完整的小芽,再把产生的新芽切割下来接种于 MS+6BA1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L 的培养基上培养 20 d 后便可形成由 3~5 个芽组成的丛生芽,丛生芽在继代培养过程中每 15~20 d 可增殖 3~5 倍。把丛生芽分割成单株并接种于 1/2MS+NAA 1 mg/L+蔗糖 20 g/L 培养基上培养 10~20 d 可诱导小芽形成完整的根系,小植株移栽成活率可达 98%。植株生长健壮、整齐、无变异,经分子检测证明小植株能脱去宿根矮化病和花叶病的病原。该体系的建立为甘蔗健康种苗的工厂化育苗奠定了坚实的基础。

关键词 甘蔗 热处理 茎尖分生组织培养 快速繁殖 健康种苗

中图分类号 S566.103.6

利用热处理结合甘蔗(*Saccharum* L.)茎尖培养技术,可以把蔗株上的花叶病、宿根矮化病等用常规方法难以防治的病害根除,生产无病无毒的健康种苗^[1-6]。目前,巴西在生产上使用这种脱毒健康种苗可使甘蔗增产 20%~40%(个别蔗区增产高达 60%),蔗糖分提高 0.5%以上(绝对值)^[6]。世界甘蔗生产大国巴西、古巴、美国、澳大利亚等国十分重视甘蔗脱毒健康种苗的研究、生产与应用。目前这些国家 100%蔗区实现了甘蔗生产用种健康无毒化,由于这些措施的贯彻实施,使得甘蔗优良品种的种性得以保持,其产量和质量得到进一步提高,使其甘蔗产业保持了较高的竞争力。我国台湾糖业研究所从 1991 年开始利用茎尖脱毒培养技术生产红甘蔗健康种苗。与常规苗相比,健康种苗株高增加 66 cm,节间延长 27 cm,产量增加 2.8 t/hm²,增产 30.6%^[7]。我国广西甘蔗研究所 1998 年开始对广西蔗区的主栽品种桂糖 11 号等品种进行茎尖脱毒健康种苗培养的研究,试验结果表明:热处理结合茎尖离体组织培养技术,可以从感染花叶病和宿根矮化病的甘蔗种株上获得健康种苗,这些种苗不仅生长快,而且产量增加幅度大,提高 26.6%~69.3%^[8]。前人在甘蔗健康种苗脱毒去病的效果和培养过程中是否会产生新的变异以及如何进行有效的控制健康种苗的质量等方面没有进行详细的研究。笔者通过甘蔗茎段的热处理、温热处理结合茎尖分生组织培养有效地除去了甘蔗优良品种中带有花叶病和宿根矮化病等病原菌,实现了脱毒与快繁的统一,并对甘蔗健康种苗脱毒去病的效果和培养过程中产生新变异的可能性以及如何进行有效的控制健康种苗的质量等方面进行详细的研究,旨在为甘蔗健康种苗的工厂化育苗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

甘蔗栽培品种 ROC10, ROC16, ROC22, ROC25, 粤糖 93-159, 粤糖 94-168, 巴西 7 号, 巴西 8 号, 转基因甘蔗 1, 转基因甘蔗 2 等的甘蔗健壮茎秆。

1.2 方 法

1.2.1 实验材料的宿根矮化病和花叶病的检测 宿根矮化病的检测参照文献[9]的方法进行,引物为: P1—5'-ctggcaccctgtgtgttttc 3'; P2—5'-ttcggttctcatctcagcgtc 3'; 花叶病的检测参照文献[10]的方法进行,引物为: CPC1—5'-GAGTTTGATAGGTGGTATG 3'; CPC2—5'-GCTTTCATCTGCATGTGGGC 3'。

杨本鹏 男, 1964 年生, 副研究员。研究方向: 植物种质资源的创新与应用。E-mail: ybenpeng@hotmail.com

收稿日期: 2006-08-24 修回日期: 2006-11-20

1.2.2 材料的热处理和温热处理 在田间分别取 ROC10, ROC16, ROC22, ROC25 和粤糖 93-159、粤糖 94-168、巴西 7 号, 巴西 8 号等优良品种的健壮茎杆, 将其切成带芽的茎段并用自来水洗净。茎段再用 52 ℃ 的蒸馏水恒温处理 30 min 后将其植于无菌椰糠中并置于 38~40 ℃ 的人工气候箱中连续进行温热处理 8~10 d, 待甘蔗腋芽长至 10~15 cm 高时, 即可作为外植体使用。

1.2.3 茎尖分生组织培养 分别取出在 38~40 ℃ 的人工气候箱中长约 10~15 cm 高的腋芽, 小心拨去外叶, 并在无菌条件下先用体积分数 70 % 乙醇消毒 30 s, 再浸入质量分数 0.1 % 的氯化汞溶液中消毒 10 min, 然后用无菌水洗 3~4 遍并用无菌滤纸吸干水分, 再取 1~2 mm 大小的茎尖分生组织接种于起始培养基 (MS+BA 1.0 mg/L+NAA0.1 mg/L+PVP 200 mg/L+30 g/L 蔗糖, pH5.8) 上于 25 ℃ 自然散射光下培养 10~20 d, 期间每周更换 1 次新鲜的培养基。

1.2.4 增殖培养 把在起始培养基上长出的甘蔗小芽重新接种于增殖培养基 (MS+6BA1.0 mg/L+KT0.5 mg/L+30 g/L 蔗糖, pH5.8) 上, 于光照度 1 000 lx, 光照时间 12 h/d 条件下培养, 每 15~20 d 继代培养 1 次。

1.2.5 生根和移栽 将长至 5~10 cm 高的小苗切割开来, 接种到生根培养基 (1/2MS+NAA1 mg/L+20 g/L 蔗糖, pH5.8) 上于光照度 1 000~2 000 lx, 光照时间 12 h/d 条件下培养, 待甘蔗小苗长出完整的根系后, 把生根苗移到自然光下炼苗 5~7 d, 取出洗去苗上的培养基, 直接种于疏松透气的苗床上复盖尼龙薄膜保湿 1 周后, 取掉尼龙薄膜让其自然生长, 待小植株长至 25~30 cm 高时即可单苗种植于土壤中。

1.2.6 试管苗宿根矮化病和花叶病的检测 为了检测该法的脱毒去病效果, 每个品种随机取 10 株按 1.2.1 的方法进行检测。

2 结果与分析

2.1 实验材料宿根矮化病和花叶病的检测结果

经 PCR 和 RT-PCR 检测 (见图 1), 所有取样的甘蔗茎段都带有宿根矮化病和花叶病, 其中巴西 7 和巴西 8 号是 1999 年从巴西引进的试管苗种植而成的品系, 转基因甘蔗 1 和甘蔗 2 是笔者 2001 年获得的转基因株系, 种植了 5 a。李增生等认为所有的甘蔗品种在种植 5 a 后都不可避免地会感染宿根矮化病和花叶病, 这 2 种病害是造成甘蔗品种退化和减产的主要原因^[9]。本结果与他们报道的结果是一致的。因此, 为保持甘蔗优良品种的种性和增长的潜力, 在生产上最好使用无病无毒的健康种苗。

2.2 甘蔗茎段的热处理和无菌株系的建立

采用 1.2.2 的方法处理后甘蔗腋芽可长至约 10~15 cm 高的外植体 (见图 2A); 再采用 1.2.3 的方法培养后均能诱导产生完整的小芽, 可有效地避免其褐化, 提高无菌株系的得率。

2.3 无菌苗的继代培养

采用 1.2.4 的方法培养后甘蔗小芽可形成由 3~5 个芽组成的丛生芽 (见图 2B)。再将其分割成 2~3 个为一丛的芽从转接到芽增殖培养基中进行继代培养, 每 15~20 d 可以继代 1 次, 芽也不断的长高, 其增殖系数达 3~5 倍 (见图 2C)。

2.4 试管苗的生根和移栽

采用 1.2.5 的方法处理后甘蔗小苗可长出完整的根系, 植株也不断地长高, 其生根率达 100 % (见图 2D)。小苗的移栽成活率达 95 % 以上。

2.5 试管苗的脱毒去病效果检测

检测结果表明, 经脱毒处理而得的试管苗均检测不到带有宿根矮化病和花叶病的病原, 而未经处

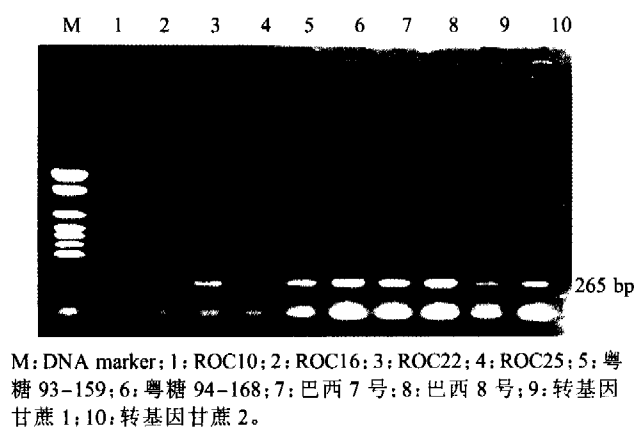


图 1 实验材料的宿根矮化病和花叶病的检测

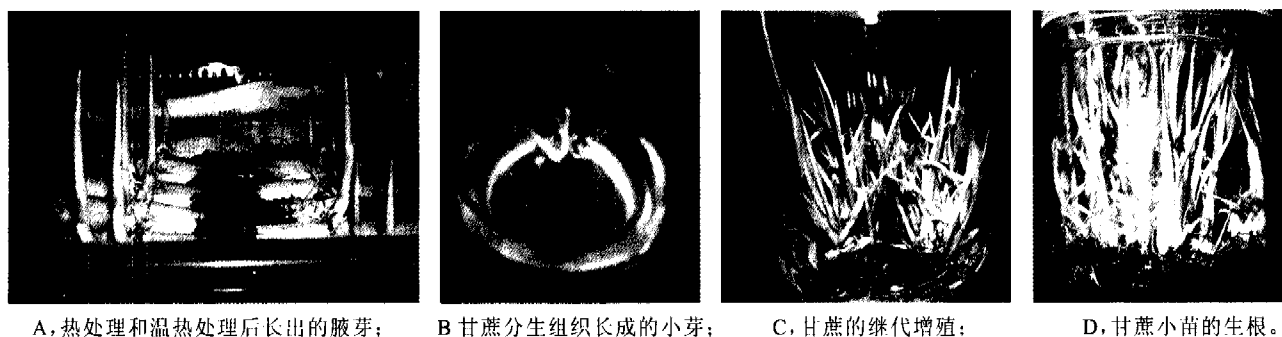
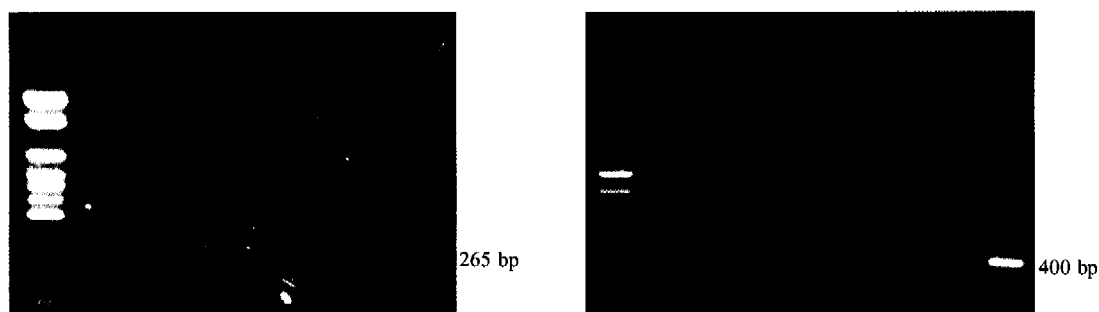


图2 甘蔗健康种苗的培育

理的试管苗均能检测到带有宿根矮化病和花叶病的病原(见图3)。这证明利用该法能有效地脱去甘蔗茎秆所带有的宿根矮化病和花叶病的病原菌,可以获得健康的种苗。



M: DNA marker; 1~7 依次为 ROC10, ROC16, ROC22, ROC25, 粤糖 93-159, 粤糖 94-168 和巴西 7 号脱毒苗; 8: 未脱毒苗。

图3 部分脱毒苗宿根矮化病(左)、花叶病(右)检测

3 讨论

甘蔗的宿根矮化病和花叶病等病原菌是通过输导组织系统(维管束)在植物体内进行传输和传播,而茎尖分生组织区域内无维管束,病原只能通过胞间连丝传递,传递的速度赶不上细胞不断分裂和活跃的生长速度,所以生长点含有病原菌和病毒的数量及其微少,几乎检测不出^[1]。在通常情况下,利用 52 °C 高温处理 30 min 可以有效地去除大部分甘蔗宿根矮化病病原并使绝大部分甘蔗花叶病的病毒失活,之后再用 38~40 °C 温热进行连续处理,一方面可以促使蔗芽快速生长伸长,另一方面又抑制病毒和病原菌的生长和传播,使茎尖分生组织离病原更近些,有利于切取不携带有病原的茎尖分生组织,从而达到彻底脱毒去病的目的^[1-6]。因此,利用热处理结合茎尖培养的技术,可以从感染花叶病和宿根矮化病的甘蔗植株中获得无病无毒的健康蔗苗。本研究利用该法对 ROC10, ROC16, ROC22, ROC25 和粤糖 93-159、粤糖 94-168、巴西 7 号、巴西 8 号、转基因甘蔗 1 和 2 进行了脱毒苗的培育,并对处理前的茎段和脱毒试管苗分别进行了宿根矮化病和花叶病 2 种病原菌的检测,结果显示前者是 100 % 带有这 2 种病原,而后者完全不带有这 2 种病原。这说明利用该法可以完全消除这 2 种甘蔗病害,生产出无病无毒的甘蔗健康种苗。所产生的无病无毒的甘蔗试管苗再经过组培快繁方式进行增殖,如果以每 20 d 增殖 3 倍的速度进行计算,1 个小芽 1 a 继代培养 10 次即可以繁殖出约 2 万株健康种苗,这样既可以使优良的甘蔗品种得以提纯复壮,克服品种退化的现象,还可为生产上提供源源不断的优质种苗,保证优良品种能够得到快速和规模化应用。

在本研究中对每次继代获得的脱毒组培苗都进行植株形态的观察,发现随着培养代次的递增,甘蔗的脱毒组培苗也会产生一些变异,变异苗的类型可分为 3 种,分别呈现花叶、白化和畸形的状态,而且这些变异苗也能进行继代增殖。在培养过程中要及时剔除这些变异苗,否则让这些变异苗进一步得到繁殖,将会严重影响甘蔗健康种苗的质量。一般变异苗在继代培养 10 代后会以 0.1 %~0.3 % 的频率

出现,培养 15 代后会达到 1%。因此继代培养的次数以 10 代以内为好,如果接种人员能有效的辨认和及时剔除变异苗,也可以继代培养 15 代。为了保证健康种苗的质量,组培苗的继代培养次数最好不要超过 15 代。

至于这样的甘蔗健康种苗当代和其宿根苗比常规苗在工农艺性状方面的优势以及这些优势能够保持多少年,目前笔者正在进行多点试验来进行证明。预计在不久的将来,甘蔗健康种苗将会在我国得到大规模的应用,这将促进我国甘蔗产业的可持续发展,并为国家食糖和能源的安全提供技术保障。

参考文献

- 1 Flynn J L, Anderlini T A. Disease incidence and yield performance of tissue culture generated seedcane over the crop cycle in Louisiana[J]. Sugar Azucar, 1989, 80: 20
- 2 Hendre R A, Mascarenhas A F, et al. Growth of mosaic virus-free sugarcane plants from apical meristems. Indian Pathology, 1975, 28: 185-198
- 3 Leu L S. Apical meristem culture and redifferentiation of callus masses to free some sugarcane systemic disease [J]. Plant Prot. Bulletin, 1978, 20: 77-82
- 4 Leu L S. Freeing sugarcane from mosaic virus by apical meristem culture and tissue culture[R]. Rep. Taiwan Sugar Exp. Sta, 1972, 57: 57-63
- 5 Waterworth R, Kahn R P. Thermotherapy and aseptic bud culture of sugarcane to facilitate the exchange of germplasm and passage through quarantine[R]. Plant Disease Report, 1978, 62: 772-776
- 6 Lee T S G. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum* spp.)[J]. Plant cell, tissue and organ culture, 1991, 10: 47-55
- 7 台湾糖业研究所. 红甘蔗健康种苗[R]. 技术简报, 1996, 第 82 号
- 8 曾 慧, 游建华, 何为中, 等. 甘蔗健康脱毒种苗生产技术方法研究初报[J]. 中国糖料, 2003 (4): 16-19
- 9 Clyn James. A review of ratoon stunting disease[J]. Sugar Cane, 1997, 4: 9-14
- 10 李利君, 周仲驹, 谢联辉. 利用斑点杂交法和 RT-PCR 技术检测甘蔗花叶病毒[J]. 福建农业大学学报, 2000, 29(3): 342-345

Establishment of a Disease-free Seed Canes Propagation System for Sugarcane

YangBenpeng ZhangShuzhen YangXue WangYeqiao GuLihong FengCuilian CaiWenwei ZhangXianyong
State Key Biotechnology Laboratory of Tropical Crops/Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences (CATAS) Haikou 571101 China

Abstract Disease-free seed canes are free from known sugarcane diseases(*Saccharum* L.) specially ratoon stunt-disease (RSD) and sugarcane mosaic virus (SCMV). Application of disease-free seed canes as planting materials in commercial production of sugarcane ensures high yield and high quality of sugarcane. An efficient technical system for producing disease-free seed canes of sugarcane involving combination of hot water treatment (HWT) and thermotherapy with apical meristem culture was developed. The axillary buds germinated from the canes, which were treated by HWT and followed by the thermotherapy, were used as explants. The apical meristems of axillary buds were inoculated on the MS medium containing 1 mg/L BA, 0.1 mg/L NAA, 200 mg/L PVP and 30 g/L sucrose for inducing shoots. After having been cultured for 10-20 days, the shoots bourgeoned. They were then transferred onto the MS medium supplemented with 1 mg/L BA, 0.5 mg/L KT and 30 g/L sucrose for inducing cluster buds. After 15-20 days, the cluster buds were formed. The proliferation ratio of the cluster buds is about 3-5 buds per 15-20 days. The cluster buds were divided into single buds and cultured on the 1/2MS medium containing 1.0 mg/L NAA and 20 g/L sucrose for inducing roots. After 10-20 days, the roots were formed and transferred onto the soil. About 98 % of plantlets survived when they were transferred onto the soil. The plantlets grew well and uniform without any variation. The results of molecular detection demonstrated that the plantlets were free from RSD and SCMV. This system will be a good foundation for commercial production of disease-free seed canes of sugarcane.

Key words sugarcane hot water treatment apical meristem culture rapid propagation disease-free seed cane