

甘蔗新品种黔糖 4 号腋芽离体快繁技术研究

易代勇¹, 周琦², 龚德勇¹, 刘凡值¹, 周正邦¹, 雷朝云¹

(¹ 贵州省亚热带作物科学研究所, 贵州贞丰 562200;

² 贵州省农业厅信息处, 贵阳 550000)

摘要: 用黔糖 4 号作供试材料, 选择蔗茎嫩梢部茎腋芽作接种外植体进行离体培养; 外植体消毒采用 75% 酒精浸泡 8~10s 后用 0.1% HgCl₂ 消毒 15min 复合消毒, 多次清洗再接种; 腋芽诱导培养基采用 (液态) 1/2MS+0.25mg/L (6-BA); 丛芽诱导增殖培养基采用 (固态) MS+2.5mg/L (L-BA)+0.2mg/L (KT), 每隔 15~20d 转基继代一次, 繁殖倍数可达 30 倍以上; 生根培养基采用 (固态) 1/2MS+3.0mg/L (NAA)+0.1mg/L (IBA), 添加 2.5mg/L 的 MET, 使丛苗根粗苗壮; 炼苗后移至“沙土沙”的苗床假植, 再单株假植至 20cm 左右高的苗时进行大田定植; 摸索总结了一套黔糖 4 号腋芽离体快繁种苗技术, 并详细介绍了操作要领, 提出了有关环节中应注意的五个问题和相应的解决方法。

关键词: 黔糖 4 号; 甘蔗腋芽; 离体快繁; 种苗

Study on The Leaving Fosters Rapid Propagation Technique for Axillary Bud of Sugar Cane Qian Tang-4

Yi Daiyong¹, Zhou Qi², Gong Deyong¹, Liu Fanzhi¹, Zhou Zhengbang¹, Lei Chaoyun¹

(Gui zhou institute of subtropical crops, Zhenfeng Gui zhou 562200;

The Information Spot of Agriculture Government Guizhou Province, Guiyang 550000)

Abstract: Use Qian-Tang 4 for supplying experiment materials Choose the axillary buds on the young shoots of sugarcane for being tissue culture of inoculation from outward plant body to be parted from body utilize 75% alcohol steep 8~10S and 0.1% Hgcl₂ antiseptis 15 min multilication antiseptis Clean again and again, then inoculate in axillary buds inducing culture utilize 1/2 MS+0.25mg/L(6-BA) (tiquid state); In thicket shoot indncing to increase culture, utilize MS+2.5mg/L(L-B)+0.2mg/L(KT) (solid state) Continue to change a generation once every 15-20d Breeding multiple is more than 30 times During growing root time utilize 1/2 MS+30mg/L (NAA)+0.1mg/L (IBA) (solid state) Append 2.5mg/L MET in order to make seedings strong After refining seedings transplant them on the seed bed of sand-soil-sand for hardening, then harden individual plant to about 20cm high Finally let it be planted in the fields so groke a set of quick muliplication seedings skiu of Qian-Tang 4 axillary buds which are parted from body And introduce operate essentials particularly Pose relevant links that we should pay attention to five problems of them and try to find good ways to solve .

Key words: Qian Tang-4, Sugar cane axillary bud, Leaving fosters rapid propagation, Seedling

采用现代生物技术, 利用甘蔗腋芽离体快速繁殖技术繁殖种苗, 它一年的繁殖倍数可高达数万倍, 具有常规繁殖不可比拟的优点^[1], 是现代甘蔗生产快速繁殖优质种苗最有效途径。因此, 为探讨甘蔗新品种

黔糖 4 号快速繁殖种苗技术, 笔者等人借鉴前人成功的研究报道, 于 2003—2004 年间, 以自育品种黔糖 4 号作供试材料在贵州省亚热带作物科学研究所组培室和良种繁殖园进行了“甘蔗新品种黔糖 4 号腋芽

基金项目: 贵州省农业厅资助项目“黔糖 4 号繁殖技术及应用开发研究”部分内容[黔农科学 2001--08]。

第一作者简介: 易代勇, 男, 1965 年出生, 高级农艺师, 主要从事甘蔗育(引)、繁、推等研究工作, 主持选育甘蔗新品种一个(黔糖 4 号), 在多种学术刊物上发表研究论文 30 余篇。E-mail: ozgnth586@sina.com。

收稿日期: 2005-10-20, 修回日期: 2005-10-31。

离体繁殖种苗技术”的试验研究,获得了不少经验,基本掌握了全程技术,现将其综述如下。

1 工艺流程

外植体(黔糖4号腋芽)→化学灭菌
培养基配制、分装→高压灭菌→单芽接种、
培养→丛芽诱导→转基培养→丛生苗→生根培养基
培养→芽培苗→炼苗→丛苗移栽(一级苗圃)→
单株假植(二级苗圃)→种苗(大田定植)

2 外植体的选择与消毒处理

2.1 外植体的选择

6—8月是甘蔗生长处于拔节伸长期,其腋芽生长点比较活跃,是采集外植体的最佳时期,且通常在雨后8~10d采种,接种成功率高。从黔糖4号原种圃里选采生长健壮、无病虫害的蔗株中上部,剥去外表老叶片和叶鞘后,用肥皂水洗净后(切勿伤芽),用解剖刀切下蔗茎梢部幼嫩茎带腋芽的单芽段(约1cm),即外植体。

2.2 外植体的消毒处理

将上述外植体用自来水清洗净,剥去3~4层叶鞘后,用5%次氯酸钠液浸泡15min,转至超净台继续剥,每剥一层用75%酒精湿润的棉球擦一次,直至将叶鞘全部剥除,尔后用75%酒精浸泡剥净叶鞘的腋芽段(带少量茎节组织,即外植体)8~10s,再用0.1%氯化汞液消毒15min,接着用无菌水反复冲洗4~5次^[2],即外植体的消毒(亦称无菌材料的制备),待用。

3 培养基与培养条件

3.1 培养基^[3]

①腋芽诱导培养基 1/2MS+0.25mg/L(6-BA);②丛芽诱导增殖培养基 MS+2.5mg/L(6-BA)+0.2mg/L(KT);③促根生根培养基 1/2MS+3.0mg/L(NAA)+0.1mg/L(IBA)。腋芽诱导培养基为液态,蔗糖量20g/L,活性碳量为0.5g/L,促根生根的基本培养基为固态加蔗糖量60g/L,其它培养基为固态,加蔗糖量30g/L和活性炭量0.2~0.5g/L,pH值均为5.8。

3.2 培养条件

培养室光照培养,光照强度为1500~2000Lx,光照时间为10~12h/d,培养室温度25~28℃^[2]。

4 腋芽离体培养的技术环节

4.1 腋芽彻底消毒是确保腋芽离体快繁种苗获得成功的关键技术

由于蔗茎腋芽外被叶鞘和芽鳞片包裹,特别是幼嫩蔗茎部分(梢部)叶鞘包裹层数多,杂菌藏匿隐避,腋芽鳞片亦常藏匿杂菌,这就给消毒灭菌带来很大困难。因此,在外植体消毒灭菌时,要确保彻底消毒

灭菌,又不伤及腋芽,就必须细心操作,合理精准选用好消毒剂,此项技术中选用的75%酒精浸泡外植体8~10s后再用0.1%氯化汞液消毒15min进行复合消毒,效果很好。

4.2 无菌是确保腋芽离体快繁种苗获得成功的重要条件

在材料接种和室内培养时,都必须保持无菌操作和无菌培养,其中无菌操作中:一是培养基须经高压灭菌(121℃,18~20min),冷却后转至无菌接种室,静置3d后再接种;二是接种人员须身着无菌工作服,戴口罩,保证洁净无菌;三是接种用具必须彻底消毒,且接种速度越快越好。另外,培养室也要彻底消毒灭菌,保持清洁无杂菌,将接种后的培养基及时转至无菌培养室,进行培养,无菌培养是甘蔗腋芽快繁种苗获得成功的重要条件。

4.3 诱导甘蔗腋芽丛芽形成、继代增殖和促根生根培养是此项技术的核心

丛芽产生是增殖的基础,继代培养是增殖快繁的“催化剂”,是提高繁殖系数和加快繁殖速度的重要手段,促根生根则是关系到腋芽离体培养快繁种苗成功与否的关键技术。因此,有关环节培养基与激素配方和相应的技术要领就必须掌握。

4.3.1 腋芽诱导培养 黔糖4号品种腋芽诱导培养基采用(液态):1/2MS+0.25mg/L(6-BA)+20g/L(Sucrose)+0.3g/L(AC)。将消毒处理好的外植体(单芽段)在无菌条件下接种于该培养基上,每瓶一芽,及时封盖贴标签,转置培养室内暗培养3d后,及时光照培养(光培条件前述),注意管理观察,确保培养环境条件,由于6-BA添加量0.25mg/L,有利于主芽生长,不产生丛芽,待8~10d后主芽萌动生长。

4.3.2 丛芽诱导与转基继代培养 丛芽诱导分化培养基采用(固态):MS+2.5mg/L(6-BA)+0.2mg/L(KT)+30g/L(Sucrose)+0.5g/L(AC)。当腋芽苗长至约3~4cm时,将其转移到新鲜的丛芽诱导培养基上进行诱导丛芽分化培养,每瓶2个芽苗,光照培养。约30d左右丛生芽形成,当每个芽苗的丛生苗有6~7株时,将其与外植体分离,再转基继代增殖培养,采用MS+2.0mg/L(6-BA)+30g/L(Sucrose)+0.5g/L(AC)(固态)。其间每隔15~20d转基继代一次,继代增殖扩繁以6~7代为宜,繁殖倍数可达30倍以上,不能超过10代,即可进行生根培养。

4.3.3 促根生根培养 其培养基采用1/2MS+3.0mg/L(NAA)+0.1mg/L(IBA)+60g/L(Sucrose)(固态)。当继代增殖培养代数达6~7代时,将丛芽苗切成4~5株

为一丛接种到促生根培养基中进行诱导生根培养,通常4~10d有白色根长出,当每丛苗有6~8条根,主根2cm长时,就可进行炼苗,炼苗3d后就可进行假植育苗。

5 炼苗技术

炼苗的目的是培育壮苗,使之能适应外界自然生长条件。其炼苗技术措施有两点:一是在诱导生根过程中培养基添加浓度为2.5mg/L(MET)^[2],可促进丛苗根粗苗壮,能提高丛苗自身的抗逆性;二是在丛苗移栽前进行常温炼苗时,将瓶盖打开,每天上午(9:00~10:00)在自然光(切忌阳光直射)下晒苗2~3h,处理3d后便可移栽。

6 苗圃建设与管理

甘蔗腋芽苗是经过特殊条件与特定环境下培育而成的试管苗,其组织十分幼嫩,抗逆境能力弱,要使芽培苗从特殊环境过渡到自然环境下正常生长,要成功的培育出适应大田生产的甘蔗腋芽种苗是一项技术性很强的工作,稍有疏忽就会前功尽弃。因此,必须抓好苗床制备,苗的移栽、设施防护、病虫害防治等精心管理工作,从而逐渐过渡到适应自然环境条件下正常生长,提高移栽成活率,确保腋芽繁殖种苗的顺利成功,所以,可按以下步骤认真做好各环节工作。

6.1 苗圃建设要求

选择地势平坦,土壤肥力上等,水源方面,易于管理的土地建圃。苗床的具体做法是:将土壤细碎平整后再起畦,畦面宽1m左右;在畦面上平铺一层2~3cm厚淘洗干净的细河沙,再铺一层5cm左右细壤土,再在土上铺一层2~3cm细河沙,做成“沙—土—沙”的苗床^[2],其中沙和土均要进行消毒处理,用40%五氯硝基苯1000倍液或用0.3%的多菌灵液消毒,这样的苗床易排水和透气,对甘蔗腋芽苗的根系发育和苗的生长都很有好处。同时应设置塑料拱棚和遮荫网(75%)进行保护(有条件可建盖塑料大棚)。

6.2 丛苗移栽与管理(一级苗圃假植)

丛苗移栽是芽培苗过渡到大田苗的第一步,也是整个芽培苗圃管理的重点与难点。其主要是围绕着为芽培苗创造一个适宜生长的环境,使其逐步适应,健壮生长。要求技术指标①温度控制在25~40℃之间,以30℃为好;②苗床湿度适中,不宜过大;③防止苗床霉菌生长,施药防治;④适当追肥,促进丛苗生长。

6.2.1 丛苗消毒处理 将炼苗后的丛苗从培养瓶中取出,清洗掉附着根系上的培养基,减少霉菌感染,然后用剪刀剪掉披散叶片和黄叶片,并剪去假茎上部1/3的叶片,再将其用0.3%的多菌灵稀释溶液浸泡根

部5min灭菌后才进行假植。

6.2.2 丛苗移栽 先淋湿苗床后,用拇指大小的木棒打孔,孔深2~3cm,然后回填少量细沙,再将丛苗植入土1cm左右,用细土轻压丛苗基部。其假植时按4cm×7cm或者9cm×15cm的株行距栽种,视苗大小而定。及时浇定根水,及时搭建约100cm高的小拱棚,盖上市膜,同时遮盖上80%的遮荫网,防止丛苗被烈日暴晒而失水死亡。

6.2.3 丛苗苗圃管理 丛苗移栽后要精心管理,每天应多次观察,苗床温湿度可以用揭膜、盖膜、遮荫、浇水等方式进行调节。刚移栽时要求湿度略大,后期应结合炼苗适当控制苗床的温度、通风、透气等。定植5d内是关键时期,这时幼苗非常弱,根系不发达而且几乎未产生根毛,稍有不慎就可能死苗。而且在高温高湿的小环境中,苗床比较容易滋生霉菌,通常每3~4d用0.3%多菌灵或0.3%敌克松杀菌剂液于下午5:00喷雾施用防治。同时移栽一周后,每3~4d用0.2%CO(NH₂)₂和KH₂PO₄液于下午5:00左右喷施补充营养。其后浓度可逐渐适当加大,到半个月后,可揭膜炼苗,隔天用1%的复合肥(15:15:15)液浇洒苗床,提供苗期所需营养,待丛苗长至15~18cm时,即可切分成单株移栽。

6.3 单株移栽与管理(二级苗圃假植)

6.3.1 上袋假植 采用8cm×10cm的营养袋装好营养土,营养土采用普通栽培土壤细碎过筛后与磷肥(过磷酸钙)拌匀,其比例按土:肥为50:1制成营养土。然后将丛苗小心取出(不要损伤根系),剪去部分披散老叶片和过长根系,切分成单株植入已装好土壤的营养袋内,及时浇足定根水,用遮荫网遮阴,待成活返青后可揭掉遮荫网。

6.3.2 管理 常用N:P₂O₅:K₂O比例为15:15:15的复合肥1%浓度的肥液于下午5:00后淋洒,每隔一周一次追施营养,蔗苗快速生长提供营养。当蔗苗假茎长至20~25cm时,即可移至大田定植,其间注意病虫害防治。

6.4 大田定植

采用开沟定植,行距1m,株距春、夏植30cm、秋植40cm。底肥充足,以农家肥15t/hm²+复合肥750kg/hm²+呋喃丹50kg/hm²混匀撒施覆3cm土壤再植苗,及时淋足定根水,返青后适当追施提苗肥(90kg尿素+300kg过磷酸钙)/hm²,覆土5~8cm,促进蔗苗正常生长。但由于经该技术培育的种苗是利用甘蔗腋芽在人工控制的条件下培育而成,受培养基中激素和人工条件的影响,其种苗的生长特性与自然状态下生长的甘蔗特性有明显的差异,主要表

现为:苗期生长慢、分蘖茎增多、茎径较原种小、蔗糖分含量偏低等,通常要经过大田种植三采三植后才能恢复品种原种特性。故在恢复原种特性之前一般只能作繁殖种源,而不能用作原料蔗。因此,可利用腋芽种苗作种源再进一步采用两年三采繁殖法^[4]或反复取茎繁殖法^[5]来加快种苗繁殖速度,增加种苗繁殖量,提高繁殖系数,同时有助于种苗原种特性恢复,缩短繁殖进程,尽快提供生产上生产原料蔗所需的优质种苗。

7 需要注意的问题

(1)在外植体消毒处理中,由于75%酒精具有湿润作用和很强的穿透能力,既可排除外植体上的空气,又有利于其它消毒剂的渗入,但稍有不慎就会杀死材料活细胞或生长点,因此要严格控制处理时间,切勿过长。而且 HgCl_2 属剧毒剂,使用后汞不易除去,但消毒效果较好,所以,消毒后必须多次冲漂洗除去残余的汞害,方可接种。

(2)甘蔗腋芽离体快繁种苗技术中,培养基配方因甘蔗品种不同而不同,细胞分裂素(CTK)种类选择和使用量对丛芽诱导起决定性,对继代增殖有明显制约作用,应针对不同品种、不同培养阶段筛选适宜的培养基及配方,以便能顺利的快繁种苗。

(3)在甘蔗腋芽诱导发生过程中,腋芽伤口处产生

的酚类化合物是影响芽发生的重要因素之一,因此,在培养基中添加0.5g/L(AC)以吸附有毒性的酚类物质,且对腋芽的诱导有显著效果。

(4)在诱导芽培苗生根的过程中,在促根生根的培养基里加入适量的MET,有助于芽培苗根粗苗壮,提高移栽成活率。

(5)在苗圃的建设与管理中,必须抓好①丛苗苗床的土壤配方“沙土沙”;②棚内温湿度的控制;③丛苗移栽前期的遮荫问题;④丛苗移栽后叶面追肥的浓度控制;⑤病虫害防治技术;⑥大田定植时用肥种类和肥与种苗隔土防伤根死苗。

参考文献

- 1 张献龙,唐克轩.植物生物技术[M].北京:科学出版社,2004.9~34
- 2 曹孜义,刘国民.实用植物组织培养技术教程(修订本)[M].兰州:甘肃科学技术出版社,2001.301~306
- 3 易代勇,周明强,刘凡值,等.甘蔗新品种黔糖4号腋芽繁殖培养基与激素配方的研究[J].中国农学通报,2005,(10):57~59
- 4 易代勇,周正邦,刘凡值,等.黔糖4号甘蔗蔗茎快繁原种新技术的研究与应用[J].云南农业大学学报,2005,(3):10~14
- 5 周明强,易代勇,等.甘蔗脱毒种苗到生产用种的快繁技术研究[J].广西蔗糖,2005,(3):14~15

(责任编辑:秦守亮)