

甘蔗脱毒种苗培育技术研究*

周明强, 易代勇, 班秀文, 龚德勇, 刘凡值

(贵州省亚热带作物科学研究所, 贞丰 562200)

[摘要] 对甘蔗进行改良热处理脱毒及材料的培养, 甘蔗茎尖的诱导培养及培养基的筛选, 甘蔗茎尖大小对成苗率的影响, 甘蔗脱毒苗的增殖培养, 抗多酚氧化污染的措施, 甘蔗脱毒苗的炼苗、移栽, 甘蔗脱毒苗的脱毒效果等方法进行了研究, 探讨了甘蔗脱毒苗的培育技术。结果表明: 采用改良热处理脱毒和组织培养的方法能有效去除甘蔗病毒, 对其它病害也具有一定的抑制作用。不同生长调节剂对甘蔗茎尖成苗的影响有差异。不同的培养基对甘蔗茎尖分生组织培养存在一定差异, 以 I 号培养基效果较好 (MS+2.5 mg/L BA+0.2 mg/L NAA+0.5 g/L AC+2.5% 蔗糖); 外植体甘蔗茎尖大小不但对植株再生能力、成苗率有影响 (呈正相关), 同时甘蔗茎尖大小对脱毒效果也有影响 (呈负相关), 以 1~2 mm, 带有 1~2 叶原基的茎尖较为适宜。多酚氧化污染是甘蔗组培中最大的污染源, 在组培初期采用一段时间的暗培养和加入活性炭能有效抑制多酚氧化污染, 同时也带来一定的副作用, 本试验采用在培养基中加入 0.5 g/L AC 和经 5~7 d 暗培养是适宜的。

[关键词] 甘蔗; 茎尖; 脱毒; 组织培养**[中图分类号]** S566.1.043**[文献标识码]** A

Study on Cultivation Techniques for Virus-free Seedling of Sugarcane

ZHOU Min-qiang, YI Dai-yong, BAN Xiu-wen, GONG De-yong, LIU Fan-zhi

(Guizhou Institute of Subtropical Crops, Zhenfeng 562200, China)

Abstract: The culture techniques including treatments of sugarcane buds by hot water, induction culture of sugarcane stem apex, selection of culture medium, effects of survival rate of seedling on size of stem apex, multiplicative culture of virus-free seedling, measures to control contamination from multi-phenol oxidation training and transplanting of virus-free seedlings and virus-free effects of virus-free seedling are studied. The results show that the hot water treatment and tissue culture can eliminate sugarcane virus effectively, the different medium have the different effects on meristematic tissue of sugarcane stem apex, the different growth hormones reveal different effects on survival rate of seedlings cultured from sugarcane stem apex. The better culture results can be obtained when stem apexes with 1~2 cm and 1~2 leaf primordium are cultured on No. 1 medium (MS+2.5 mg/L BA+0.2 mg/L NAA+0.5 g/L AC+2.5% sucrose). The contamination from multi-phenol oxidation can be effectively controlled when the medium is added with 0.5 g/L AC.

Key words: sugarcane; stem apex; virus-free; tissue culture

甘蔗是蔗茎腋芽进行无性繁殖的作物, 由于多年种植后受到各种病原物的反复侵染, 造成产量和品质下降, 严重者甚至失收。目前世界上已发现的甘蔗病害有 120 种以上, 其中真菌病害 78 种, 细菌性病害 9 种, 病毒病 7 种, 类菌质体病 2 种, 还有线虫和寄生植物等。我国大陆蔗区近年来通过调查, 发现的甘蔗病虫害有 39 种, 其中真菌性病害 23 种、细菌性病害 3

种、病毒病 2 种, 已发现 8 个危害甘蔗的线虫属、寄生植物 1 种等。而甘蔗病害都是通过种苗传播, 如黑穗病、霜霉病和宿根矮化病等和几乎所有的病毒病。采用无病的种苗是防治病害最有效的措施, 其中使用脱毒健康种苗的研究及应用已受到普遍的重视^[1]。贵州蔗区长期以来受黑穗病、宿根矮化病、嵌纹病等的重复侵染, 造成植株节间短密、变矮变小、纤维多、品质差,

[收稿日期] 2005-03-25; 2005-05-27 修回**[作者简介]** 周明强(1965—), 男, 高级农艺师, 从事甘蔗科研和植保研究工作。

* 贵州省农业厅项目(2002-2005)。

不仅能提高土壤氮素含量, 而且是作物所需磷、钾素的主要来源, 同时能增强土壤的缓冲能力, 促进土壤团粒结构的形成, 取得了较好的改土效果。利用豆科作物固定大气中的氮素, 将茎秆还田, 尤其是将花生、蚕豆等鲜嫩茎叶压青, 可增加土壤有机质和氮素含量。

3.4 水稻肥料施用试验

硅钙磷肥对水稻经济性状的影响主要表现为实粒数、结实率的提高。与普通过磷酸钙相比, 穗实粒数增加 5.1~17.5 粒/穗, 平均增加 11.77 粒/穗, 结实率提高 8.1%~15.2%, 平均结实率提高 12.67%。

硅钙磷肥对水稻穗颈稻瘟有明显增强抗性作用。与普通过磷酸钙比较, 减少穗颈稻瘟发病率 7.4%。肥料试验表明, 改善水稻植株体内硅氮营养代谢, 生育

前期增施硅肥对氮的吸收影响不明显, 但从始穗至成熟期单株吸氮量均比不施硅区增加, 抽穗期高 4.50~5.42 mg/株, 成熟期高 0.99~3.96 mg/株。表明施硅后在生育后期加速氮素营养积累和运转, 尤以穗部全氮的含量更明显。抽穗期、成熟期分别增加 0.53%、0.35%, 提高了氮肥利用率。

[参 考 文 献]

- [1] 钱晓刚. 土壤改良与土壤培肥[M]. 北京: 农业出版社, 1998.
- [2] 唐志坚. 大力改造中低产田土 促进贵州农业持续发展[J]. 贵州农业科学, 1999, 27(6): 67-70, 57.
- [3] 李阳兵, 高明, 等. 土地利用对岩溶山地土壤质量性状的影响[J]. 山地学报, 2003, 21(1): 41-49.

(责任编辑: 陈德寿)

一般减产 30%~50%，并逐年加重。为此，我们进行了甘蔗脱毒种苗培育技术研究。

1 材料与方方法

1.1 试验材料

贵州蔗区宿根年限较长的甘蔗品种 F134、Badila (果蔗)、黔糖 4 号(78/130)。

1.2 试验方法

1.2.1 材料的脱毒及培育 采用改良热处理脱毒方法进行脱毒。将选好的材料砍成单芽或双芽，用烧蒸馏水的废水(温度控制在 52~55℃)处理 30 min 后取出，并用 1000 倍的多菌灵浸泡 1 d，然后置于消毒后的室内沙床上培养 20~25 d 或在 38℃ 恒温条件下培养 10~15 d，可见材料发芽及正常生长。每天观察沙床的温湿度及恒温培养的湿度，并根据具体情况用净水处理或用甲基托布津按规定用量进行灭菌或控制病害发生，保证材料的正常生长。实验表明，材料生长情况较好，出苗率在 85% 以上。

1.2.2 培养基的筛选和制备 根据甘蔗分生组织茎尖诱导培养的条件和要求，结合前人的研究，拟定以下几种培养基进行试验。茎尖诱导培养基：(I) MS+2.5 mg/L BA+0.2 mg/L NAA+0.5 g/L AC+2.5% 蔗糖；(II) MS+2.5 mg/L BA+0.2 mg/L NAA+2 mg/L 2,4-D+0.5 g/L AC+2.5% 蔗糖；(III) MS+3.0 mg/L BA+2 mg/L 2,4-D+0.5 g/L AC+2.5% 蔗糖；(IV) MS+2 mg/L KT+0.2 mg/L NAA+0.5 g/L AC+2.5% 蔗糖。继代培养基：MS+2 mg/L BA+0.1 mg/L NAA+0.5 g/L AC+2.5% 蔗糖。生根培养基：1/2MS+2.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA+0.5 g/L AC+2.5% 蔗糖。用 MS 作基础培养基，pH 5.8~6.0，加 10% 琼脂，将配好的培养基分装在三角瓶中并封瓶和消毒(在 121℃ 消毒 15~20 min)，取出培养基静培 2~3 d，观察培养基的污染情况再进行接种。

1.2.3 材料的消毒及接种 将选好的培养材料用水冲洗，用 75% 的酒精消毒，去掉叶鞘和心叶，小心剥出茎尖生长点，用 75% 的酒精消毒 3~5 s 后，用二重蒸馏水冲洗 3~4 次，再用 0.1% 的升汞水消毒 10 min，再用二重蒸馏水冲洗 3~4 次，并在无菌水中浸泡 20~30 min，在无菌条件下将茎尖接种到茎尖诱导培养基上进行培养。

1.2.4 培养条件及培养过程 将接种后的培养基转移到 25~30℃ 的培养室中进行暗室培养 5~7 d，待培养材料分离膨大，然后在光照 10~12 h、光强 1500~2000 Lx、温度 25~30℃、相对湿度 85%~90% 的条件下进行分化培养。经 20~30 d 有不定芽萌动长出 2~4 片小芽，再转移到生根培养基进行培育。待 18~20 d 可见幼细白色根长出，到 2~4 片叶时再进行继代诱导丛芽分离增殖，待小苗长到 2~4 片叶进行炼苗、移栽。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对甘蔗分生组织培养存在一定差异

从表 1 可见，不同培养基对甘蔗分生组织培养存在一定差异，不同生长调节剂对甘蔗茎尖成苗有差异，生长调节剂 BA 较 KT 有利甘蔗茎尖成苗，同样加 2,4-D 也有利于甘蔗茎尖成苗。不同浓度的 BA 与 NAA、2,4-D 组合对茎尖成苗影响不大，其中以处理 II 效果最佳，即：MS+2.5 mg/L BA+0.2 mg/L NAA+2 mg/L 2,4-D+0.5 g/L AC+2.5% 蔗糖，但由于 II 号培养基加入了 2,4-D，对脱毒后代的株高、茎径、锤度的恢复有一定的影响，需要 1~2 代才能恢复其生产性。所以，我们认为 I 号培养基较好，可推广应用，即：MS+2.5 mg/L BA+0.2 mg/L NAA+0.5 g/L AC+2.5% 蔗糖。

表 1 不同培养基对脱毒种苗诱导的影响

培养基	接种瓶数	接种污染瓶数	酚害污染瓶数	茎尖转绿瓶数	成苗瓶数	成苗率 (%)
I	40	9	14	17	5	29.4
II	40	7	10	20	8	34.8
III	40	8	22	8	3	30.0
IV	40	12	17	5	2	18.9

注：成苗率=成苗数/(接种瓶数-接种污染瓶数-酚害污染瓶数)。

表 2 甘蔗茎尖大小对成苗率的影响

茎尖大小 (mm)	接种瓶数	接种污染瓶数	酚害污染瓶数	成苗数	成苗率 (%)	酚害污染率 (%)
1	20	2	12	2	11.0	67.0
1~2	20	3	5	4	23.5	29.4
3	20	3	2	7	38.9	11.8

注：成苗率=成苗数/(接种瓶数-接种污染瓶数-酚害污染瓶数)；

酚害污染率=酚害污染瓶数/(接种瓶数-接种污染瓶数)。

2.2 外植体甘蔗茎尖大小对成苗率的影响

从表 2 可知，外植体甘蔗茎尖大小对成苗率有一定的相关性，外植体越大，成苗率越大；外植体越小，酚害感染率越高，越难成苗，而茎尖太大，不易脱毒。从成苗率、脱毒率两项指标考虑，以把一个茎尖切成两半(1.0~2.0 mm)，并带有 1~2 个叶原基进行培养为宜。

2.3 甘蔗脱毒苗的增殖培养

植物组培苗的生长流程一般是经过外植体→诱导→继代增殖→生根培养→成苗等几个阶段，而在甘蔗茎尖苗的培养中，我们采用了外植体(茎尖)→诱导→生根壮苗培养→继代增殖培养→生根壮苗培养的工艺流程。因为，甘蔗茎尖经诱导的幼小丛生芽较弱，不易分株增殖，如直接进行增殖培养，由于生长量小，增殖速度较慢；而经生根壮苗培养后再进行诱导丛芽，进行继代增殖，能迅速提高增殖效果，提高繁殖率，每代可增殖 3~5 倍。用 MS+2 mg/L KT+0.2 mg/L NAA+0.5 g/L AC+2.5% 蔗糖进行继代培养，随着继代培养次数的增加，茎尖苗对试管生长逐渐适应，本身能够合成部分激素，逐步激素自养，再加上生长调节剂的积累，对生长调节剂的用量要逐渐减少，而且增殖培养的代数不宜过多，应控制在 6~8 代为宜。

2.4 抗多酚氧化污染的措施

(1)在培养基的制备中加入适量的活性炭,具有防止多酚氧化污染的作用。活性炭具有很强的吸附作用,能吸附多酚物质,减少甘蔗茎尖的多酚氧化作用。但活性炭在吸附多酚氧化物质时,同时也吸附了培养基中的养分、激素,对甘蔗脱毒苗的培养不利。所以,活性炭的使用量应控制,本试验采用0.5g/L是适宜的。

(2)在初期培养过程中,采用一定时间的暗培养,对防止多酚氧化污染具有一定的作用。黑暗会抑制多酚氧化酶活性,减轻多酚氧化污染,有利于甘蔗茎尖膨大、增殖、萌发,有利于根系的诱导和形成。待解除黑暗后,多酚氧化酶活性恢复,继续发生多酚氧化污染,但膨大的甘蔗茎尖组织对多酚氧化污染的抵抗力增强,可以减轻多酚氧化的污染。但暗培养的时间过长,会造成甘蔗茎尖组织的黄化变弱,在光照下,不能正常转绿,不利于茎尖的形成。对暗培养的时间应控制在1周左右,本试验采用5~7d是适宜的。

2.5 甘蔗脱毒苗的炼苗、移栽

当甘蔗脱毒苗经继代增殖生根培养后到小苗长到2~4片叶时,解除瓶口的透气膜,将小苗移到培养室外,经过5~7d的炼苗,确定小苗炼苗成活后,将小苗从罐头瓶中取出,用水冲洗干净,再移栽到已消毒的沙床上进行生长,待小苗长到10~15cm时再移到大田进行稀植、精管,确保脱毒苗的存活。

2.6 甘蔗脱毒的效果

对移到大田进行稀植、精管的57株(其中F134脱毒苗18株、果蔗Badila脱毒苗23株、黔糖4号脱毒苗16株)脱毒苗的观察发现,有5株(果蔗Badila有3株,F134有2株)不同程度感染花叶病,出现褪绿、花叶等症状,52株苗已脱毒,没有表现出花叶症状。用同一批种茎种植的74株(其中F134苗29株、果蔗Badila苗34株、黔糖4号21株)苗中发现17株(其中F134有5株、果蔗Badila有9株、黔糖4号3株)不同程度感染花叶病。说明采用改良热处理脱毒和茎尖组织进行培养的方法能有效地除去甘蔗病毒,对其它病害也具有一定的抑制作用。

3 讨论

3.1 采用改良热处理脱毒和组织培养的方法能成功地去除甘蔗病毒,对其它病害也具有一定的抑制作用。热处理具有钝化病毒,阻碍病毒进入甘蔗分生组织的作用,经过脱毒材料的培育后取茎尖组织进行组织培养。甘蔗茎尖是甘蔗较细嫩的组织,本身不容易污染病毒和其它病菌,经脱毒处理后,采用甘蔗茎尖组织进行组织培养,更有效地减轻或杜绝了病毒或其它病原物的侵入,从而达到脱毒和减少其它病原物侵入的目的,成功去除甘蔗病毒,同时对其它病原物也具有一定的抑制作用。

3.2 在培养基的筛选和组织培养中,植物生长调节

剂对于细胞分裂、器官形成等起着重要的调节作用。不同的培养基对甘蔗茎尖分生组织培养存在一定差异;不同生长调节剂对甘蔗茎尖成苗也有差异。生长调节剂BA较KT有利甘蔗茎尖成苗,2,4-D也有利于甘蔗茎尖成苗,不同浓度的BA与NAA、2,4-D组合对茎尖成苗影响不大,由于2,4-D对脱毒苗的株高、茎径、锤度等生产性有一定的影响,需要1~2代才能恢复甘蔗的生产性。因此,我们认为I号培养基较好,可在生产中推广应用,即MS+2.5mg/L BA+0.2mg/L NAA+0.5g/L AC+2.5%蔗糖。

3.3 外植体甘蔗茎尖大小对植株再生能力、成苗率有影响(呈正相关)。茎尖越大,带有的叶原基越多,越能进行正常生理代谢,吸收的养分越多,越容易成苗,反之,则越难成苗;茎尖越大,抵抗多酚物质在多酚氧化酶作用下,使外植体组织逐渐被氧化成褐色醌类物质,阻止茎尖组织的正常生理代谢和养分吸收的能力越强,越易存活并分化成苗,反之,则越难成苗。同时甘蔗茎尖大小对脱毒效果也有影响(呈负相关),茎尖越大,带有的叶原基越高,脱毒率越低,反之,脱毒率越高。综合两项指标,本试验采用1~2mm,带有1~2叶原基的茎尖较为适宜。

3.4 在甘蔗的组织培养中,外植体组织在多酚氧化酶的作用下,逐渐氧化成褐色的醌类物质,致使组织褐化、坏死,造成的污染是甘蔗组培中最大的污染源。如何解决甘蔗组培中的多酚污染是关系到甘蔗组培成功与否的关键之一。在组培初期采用一段时间的暗培养和加入活性炭能有效抑制多酚害污染,同时也带来一定的负作用。本试验在培养基中加入0.5g/L AC和经5~7d暗培养是适宜的。

3.5 在甘蔗脱毒苗的继代增殖培养中,并不是继代增殖的代数越多越好。继代增殖培养的次数越多,脱毒苗就越弱,表皮角质层越不发达,蒸腾越小,不利于光合作用,移栽成活率越低。所以,继代增殖培养应控制在6~8代为宜。

[参考文献]

- [1] 黄诚梅,李扬瑞,谭裕模,等.甘蔗脱毒技术及其检测方法[J].甘蔗,2002,9(4):1-6.
- [2] 游建华,何为中,曾慧,等.谈脱毒健康种苗在广西甘蔗生产的应用及效益展望[J].甘蔗糖业,2002(1):13-17.
- [3] 姚伟,周会,陈如凯.果蔗Badila的组织培养和植株再生[J].植物生理学通讯,2002,38(3):251.
- [4] 卢文祥,韦小强,秦皮,等.甘蔗腋芽液体培养快繁技术的研究进展[J].广西蔗糖,2002,28(3):19,22.
- [5] 许莉萍,陈如凯,李跃平.利用愈伤组织培养和茎尖培养去除甘蔗花叶病毒[J].福建农业大学学报,1994,23(3):253-256.
- [6] 章文水,潘大仁,林彦松,等.果蔗Badila花叶病茎尖脱毒技术研究[J].甘蔗,2002,9(2):8-13.
- [7] 田波,裴美云.植物病毒研究方法[M].北京:科学出版社,1987,42-44.
- [8] 高山林.甘蔗脱毒技术及其增产效果[J].甘蔗,2001,8(1):30-31.