

无糖组织培养在甘蔗快繁中的应用

淡明, 李松, 卢曼曼, 余坤兴, 刘红坚, 刘丽敏, 刘俊仙 (广西农业科学院甘蔗研究所, 广西南宁 530007)

摘要 [目的]研究植物无糖组织培养技术在甘蔗快繁中的应用。[方法]选用透明硬质塑料盒为培养容器,以珍珠岩和蛭石为基质,进行甘蔗无糖组织培养。在普通培养条件及高 CO₂ 浓度条件下探讨新型培养容器和基质及 CO₂ 浓度对甘蔗快繁的影响。[结果]无糖培养的甘蔗植株株高比常规培养的植株高 1.03 cm, 差异不显著;无糖培养的植株鲜重比常规培养的重 0.73 g, 差异显著;无糖培养的甘蔗生根数和根长分别为 3.60 根和 1.08 cm, 与常规培养的差异显著。[结论]用无糖培养方式培养的甘蔗组培苗在株高、鲜重、根数和根长等生长指标上优于传统培养方式。

关键词 无糖培养;甘蔗;快繁;CO₂

中图分类号 S566.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)29-0029-02

Application of Sugar-free Tissue Culture on Sugarcane Rapid Propagation

DAN Ming, LI Song, LU Man-man et al (Sugarcane Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007)

Abstract [Objective] To study the application of sugar-free tissue culture on sugarcane rapid propagation. [Method] The sugar free tissue culture of sugarcane was made by using transparent hard plastic box as a culture vessel, with perlite and vermiculite as the matrix. The effect of the new cultivable vessel and substrate and CO₂ concentration on sugarcane was discussed under the conditions of normal culture and high CO₂ concentration. [Result] The plant height of sugar-free culture sugarcane plant was 1.03 cm higher than the normal culture, and the difference was not significant. The plant fresh weight of sugar-free culture was 0.73 g heavier than conventional culture, and the difference was significant. The root number and root length of sugar-free culture were 3.60 roots and 1.08 cm respectively, which were significantly different from conventional culture. [Conclusion] Compared with traditional training way, sugar-free culture of sugarcane was superior to the traditional culture in plant height, fresh weight, root number and root length.

Key words Sugar-free culture; Sugarcane; Rapid propagation; CO₂

植物无糖培养快繁技术是在培养基不加糖的基础上,采用环境控制手段,通过对 CO₂ 浓度、光照、温度、湿度等环境因子的调节,使组培苗加强自身的光合作用,由异养型转变为自养型,从而有效降低生产成本,达到快速繁殖优质种苗的目的^[1-3]。这种更接近自然环境的条件可以很大程度降低试管苗的污染率,提高培养效率^[4]。无糖组培技术强调采用体积较大的培养容器,在大型容器中培养植物小苗,容易得到长势整齐一致的植株,也易于统一管理作业。

甘蔗组培苗生产通常采用密闭的玻璃培养瓶,以琼脂或滤纸作为支撑物,培养液中添加大量的糖。传统的甘蔗组培生产存在一定的缺点,如污染率高、植株生长不良、生长缓慢、生根率低、驯化期死亡率高等,在继代培养时,还需要大量劳力,这些都造成甘蔗快繁生产成本增加^[5]。

该试验采用组培箱作为培养容器,以透明硬质无盖塑料盒为培养器皿,珍珠岩和蛭石的混合物为基质,在箱式培养箱内通入 CO₂ 气体,对甘蔗进行无糖组织培养。对培养过程中激素浓度、通气时间、CO₂ 浓度等环境因素进行研究,并与常规组培方式进行比较,研究出一套适合甘蔗健康种苗的无糖组织培养技术,为甘蔗的组织培养生产提供新的技术方法。

1 材料与方法

1.1 材料 供试材料为脱毒甘蔗试管苗桂糖 49,在 MS 培养基中快繁培养而成。无糖培养采用专用的培养器皿(650 mL 的硬质透明塑料盒),每个塑料盒内加珍珠岩:蛭石=1:1 的混合物作为支撑物,加入能够湿润支撑物的营养液。对照采用常规组培的 200 mL 广口玻璃瓶,2 种培养基成分见表 1。

表 1 无糖培养与常规培养培养基成分

Table 1 Composition of sugar-free culture and conventional culture medium

处理 Treatment	支撑物 Upholder	大量元素母液 Macroelement mother liquor mg/L	钙盐 Calcium mg/L	微量元素母液 Microelement mother liquor mg/L	铁盐母液 Iron salt mother liquor mg/L	维生素 Vitamin mg/L	肌醇 Inositol mg/L	6-BA 6-Benzyl- aminopurine mg/L	NAA Nicotinic acid amide mg/L	蔗糖 Sugar g/L
无糖培养 Sugar-free culture	珍珠岩+蛭石	20	5	5	5	0	0	1	0.05	0
常规培养 Conventional culture	琼脂或滤纸	20	5	5	5	5	5	1	0.05	30

1.2 方法 培养基高温高压灭菌 20 min 后,在超净工作台内进行接种。1 个甘蔗茎尖苗为 1 株,每个培养容器内接种 3 株,对照接种 1 株,每个处理各 45 株。然后放在温度 25 ~

28 °C,湿度 85% ~ 90%,光照强度 3 000 lx 的培养箱中进行培养,每日光照 12 h。接种后第 3 天,无糖培养处理开始通入 CO₂ 气体,通气时段内 CO₂ 浓度维持在 1 200 mg/L 左右。对照组温度、湿度、光强同无糖培养处理,无 CO₂ 气体输入,不另外添加营养液。培养第 30 天后观察不同处理幼苗的生长情况,统计植株生根数,测量植株的株高,称鲜重。

试验期间,无糖培养处理需要定时添加营养液,以确保

基金项目 广西农业科学院科技发展基金项目(桂农科 2012JM05)。
作者简介 淡明(1979—),女,广西龙州人,助理研究员,硕士,从事甘蔗健康种苗组织培养与分子检测研究。
收稿日期 2017-07-12

湿度保持在85%以上,对照组无需添加营养液,但在15 d左右需要转瓶1次。

1.3 数据分析 采用SPSS 17.0统计软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA),不同组间的平均值差异用Student-Newman-Keuls(S-N-K)比较。数据结果采用“平均值±标准差”表示, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

培养10 d后,无糖培养处理的植株叶片颜色不变,且无微生物污染,对照组有2瓶污染。

培养30 d时,无糖培养植株叶片增大,较直立,叶色浓

绿,幼苗健壮,有根3~5条,而对照组的植株叶片细小,叶尾卷曲,颜色鲜绿,有黄叶、枯叶,幼苗弱小,无根系。分别将2组处理的甘蔗幼苗取出、洗净,测量株高和鲜重,结果见表2。从表2可以看出,无糖培养的甘蔗植株株高比常规培养的植株高1.03 cm,差异不显著;无糖培养的植株鲜重平均为1.31 g,比常规培养的植株重0.73 g,差异显著;无糖培养的甘蔗生根数和根长分别为3.60根和1.08 cm,与常规培养的差异显著。无糖培养的生根率为100%,污染率为0,而常规培养的甘蔗生根率为0,污染率为4.4%。

表2 不同培养方式对甘蔗组培苗生长的影响

Table 2 Effects of different culture methods on growth of sugarcane tissue culture

处理 Treatment	株高 Plant height cm	鲜重 Fresh weight g	根数 Root number	根长 Root length cm	生根率 Rooting percentage %	污染率 Contamination rate %
无糖培养 Sugar-free culture	7.09 ± 2.53	1.31 ± 0.76	3.60 ± 0.97	1.08 ± 0.21	100	0
常规培养 Conventional culture	6.06 ± 2.32	0.58 ± 0.25	0	0	0	4.4
P值 P value	0.290	0.010	0.000	0.000		

3 讨论

(1)因为无糖培养是依靠植物叶片光合作用产生的有机物来维持和促进植物生长,所以无糖培养的对象必须是具有一定叶面积的外植体或小植株,无糖组培苗都是从常规有糖组培苗移植而来的^[6]。该试验中无糖培养的对象是接种已60~90 d的常规有糖甘蔗茎尖组培苗,此阶段的甘蔗组培苗有绿叶5~7片,有一定的叶面积。

(2)甘蔗无糖培养利用珍珠岩和蛭石混合物作为支撑物,营养液只添加大量元素、微量元素和铁盐母液,节省了糖和有机成分,可降低成本。无糖培养基不添加糖,使各种杂菌失去能源,可以很大程度上解决微生物污染问题^[7]。甘蔗无糖培养的支撑物是珍珠岩:蛭石=1:1的混合物,其透气性强,可促进植株根系生长,且植株健壮,可以不经过驯化直接移栽,省去常规组培中生根和驯化阶段,缩短培养周期。

(3)甘蔗无糖培养中通入了CO₂气体,加大光照强度,可提高植株的光合速率,使生长速度加快,幼苗健壮。通入CO₂气体的初始时间为接种后3 d^[8],过早或过晚通入CO₂气体,都会使叶片变黄,植株萎蔫或生长瘦弱。这可能是过早通入气体,刚接种的小植株长势较弱,光合作用能力不强,较高的CO₂浓度造成植株的生理代谢异常,同时气体流动造成培养箱内的湿度下降,使植株容易萎蔫。过晚通入CO₂气体,气体供给不及时,使得植株的光合作用受到抑制,植株生长矮小瘦弱^[4]。在无糖培养过程中,要对培养箱进行强制通风,使气体成分混合均匀。强制通风也使暗期的CO₂浓度降低,利于植株生长。

(4)甘蔗无糖培养环境中,CO₂浓度增加,替代了糖的作

用^[9],使甘蔗组培苗在相同的环境条件下,株高和叶长达到并超过常规组培苗。

(5)对组培环境增施CO₂并提高光照强度是无糖组培技术的突出特点,为了确立生产中CO₂浓度的最佳值,必须对不同CO₂浓度下组培苗的生长状况进行研究。该试验表明,植物无糖培养技术可以用于甘蔗快繁,但是对甘蔗无糖组培技术的探讨只是基础性的,对于甘蔗无糖组培苗,CO₂浓度对其光合速率的影响如何,适宜甘蔗组培苗光合速率的最佳CO₂浓度是多少,CO₂除了影响组培苗的光合作用以外,对苗呼吸是否有影响,这些问题还需进一步深入探讨。

参考文献

- [1] KOZAI T, KOYAMA Y, WATANABE I. Multiplication of potato plantlets *in vitro* with sugar free medium under high photosynthetic photon flux [J]. Acta Hort, 1988, 230: 121-127.
- [2] KOZAI T, FUJIWARA K, KITAGA Y. Modeling, measurement and control in plant tissue culture [J]. Acta Hort, 1995, 393: 63-73.
- [3] NIU G H, KOZAI T. Simulation of CO₂ concentration in the culture vessel and growth plantlets in micropropagation [J]. Acta Hort, 1998, 456: 37-43.
- [4] 屈云慧, 熊丽, 吴丽芳, 等. 无糖组培技术的应用及发展前景 [J]. 中国种业, 2003(12): 17-18.
- [5] 淡明, 李松, 刘丽敏, 等. 甘蔗健康种苗组培快繁技术的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(6): 3165-3166.
- [6] 王立文. 植物无糖组培中CO₂增施方法及其应用研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2005.
- [7] 杨玉田, 郭兴臻, 朱宗贵, 等. 无糖培养技术在甘薯快繁培养中的应用效果 [J]. 山东农业科学, 2002(5): 18.
- [8] 屈云慧, 熊丽, 张素芳, 等. 彩色马蹄莲组织苗无糖生根培养的环境控制 [J]. 植物遗传资源学报, 2004, 5(2): 166-169.
- [9] 张婕, 高亦珂. 无糖组织培养在黄芩蒲 (*Iris pseudacorus*) 中的应用 [M] // 张启翔. 中国观赏园艺研究进展 2010. 北京: 中国林业出版社, 2010.