

# 甘蔗组织培养研究进展

杨柳, 李杨瑞, 李小辉 (1. 广西大学农学院, 广西南宁 530005; 2. 广西省农业科学院, 广西南宁 530007)

**摘要** 从甘蔗脱毒技术、甘蔗组织培养防止褐变、甘蔗组织培养基的优化、甘蔗组织培养在遗传工程和抗性选育上的应用及生物反应器在甘蔗组织培养上的应用等方面论述了甘蔗组织培养的应用及存在问题。

**关键词** 甘蔗; 酚害; 组织培养; 生物反应器

中图分类号 Q943.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)12-03490-03

自1934年美国学者 White 等用番茄(*Lycopersicon esculentum*)根进行组织培养,首次建立了活跃生长的无性繁殖系以来,经过70多年的研究,植物组织培养现已成为一门日臻完善的技术<sup>[1]</sup>。甘蔗是第1个组织培养成功的禾本科植物<sup>[2]</sup>。甘蔗是我国最主要的糖料作物,其产糖量占全国总产糖量的90%以上<sup>[3]</sup>。组织培养技术的广泛推广和应用为甘蔗品种的快速繁殖和良种推广提供了有效的手段,不仅大大增加了繁殖系数,节省种苗,而且在脱毒苗生产、抗性选育方面都有不可替代的应用价值。

## 1 甘蔗脱毒技术与无毒苗的获得

甘蔗系无性繁殖作物,多年连作后,因土壤中某些有害物质积累,极易引起甘蔗品种退化。目前,危害甘蔗生产的主要病害有凤梨病、赤腐病、黑穗病、赤斑病、嵌纹病(又名花叶病)、宿根矮化病等,其中嵌纹病、宿根矮化病等病害目前还没有很好的防治方法,采用无病种苗是防治病害最有效的措施。巴西、古巴等国早在20世纪70年代末,就对甘蔗健康种苗进行了研究,80年代中期,健康种苗生产已获成功,并在甘蔗生产上推广使用<sup>[4-6]</sup>。目前巴西、古巴等国90%蔗区实现甘蔗用种健康、无毒化。巴西已通过政府立法,在全国建立甘蔗脱毒健康种苗生产繁殖体系<sup>[7]</sup>。

获得甘蔗健康种苗的脱毒技术众多,有物理法、化学法、抗病育种法、茎尖培养法等<sup>[8]</sup>,这些方法均有一定的脱毒效果,但在实际应用时均有优缺点。物理法简单,但不适合大批量甘蔗用种需要;化学法简单易行,但由于蔗茎节的纤维化和表皮的不渗透性及发芽时间长等因素破坏了药剂的作用,防病效果欠佳。因此,以上2种方法需要与其他脱毒方法相结合。抗病育种也是一条最新途径,但抗病品种的选育需要较长的年限。随着茎尖培养脱毒方法的兴起,这项技术应用到甘蔗脱毒已经受到关注。

现已证明,顶端分生组织培养对甘蔗波条病、嵌纹病、宿根矮化病和白条病的脱毒是有价值的<sup>[9]</sup>。国外已采用愈伤组织、茎尖、热处理和分生组织相结合的方法对感花叶病毒的植株进行脱毒,均有一定的效果<sup>[10]</sup>。李增生和Iqmcio Santana Aguilár 研究表明:利用甘蔗茎尖培养技术结合热处理,可根除蔗株上的花叶病、宿根矮化病,生产无病、无毒的健康种苗<sup>[11]</sup>。在国内,广西甘蔗研究所自1998年开始对桂糖11号等品种进行茎尖脱毒健康种苗的研究<sup>[5]</sup>。随后黄诚梅又在黑皮果蔗 Badla 等品种上进行研究<sup>[12]</sup>。许莉萍等利用

愈伤组织培养和茎尖培养去除甘蔗花叶病毒。结果表明,心叶愈伤组织培养脱毒效果显著,但后代产生的变异较大;茎尖组织培养有一定的脱毒效果,后代遗传稳定性高<sup>[6]</sup>。高山林采用热处理—分生组织脱毒技术,脱毒效果显著,可增产50%以上<sup>[13]</sup>。据报道,脱毒健康种苗的使用使甘蔗增产达20%~40%,蔗糖含量提高0.5%以上(绝对值)<sup>[7]</sup>。肖关丽等在甘蔗茎尖脱毒培养过程中,选用附加浓度合适的BA或BA+NAA,能使茎尖分生组织诱导出较多茎尖芽<sup>[14]</sup>。

植物茎尖组织培养脱毒技术,不仅对提高作物产量、质量和恢复种性都有显著作用,而且在植物病理学上也有重大意义,它丰富了植物病理学的内容,从过去消极的拔除、销毁病株到病株的脱毒再利用,是一个积极有效的途径。

## 2 防止褐变的研究

**2.1 褐变的机理** 褐变(又称酚污染或酚害)是植物组织培养中普遍存在的问题,褐变现象产生的主要原因是因为PPO(多酚氧化酶)作用与天然底物酚产生醌引起的。当多酚氧化酶被激活,酚类物质被氧化,产生醌类物质,使植物组织变褐并产生毒害作用。褐变包括酶促褐变和非酶促褐变。目前的研究结果表明,外植体的褐变属于酶促褐变<sup>[15]</sup>。

### 2.2 褐变的成因

**2.2.1 甘蔗外植体的部位和采集时间。**在甘蔗组织培养中,由于在生长点附近的酚类物质、酶比较多,所以甘蔗的芽繁殖培养的褐变程度远远大于嫩叶的组织培养。外植体的最佳采集时期是每年的6~8月,此时甘蔗生长处于拔节期,而冬季采集的外植体容易褐变且诱导期长<sup>[16]</sup>。

**2.2.2 培养基的组成成分。**培养基的成分会影响褐变的过程,贤武等发现用降低激素含量的MS培养基可提高茎芽成活率和丛芽诱导率,而且可大大降低酚害<sup>[5]</sup>。秦延豪研究表明外源激素会增加植物组织培养过程中酚害现象的产生,这是因为激素有刺激多酚氧化酶活性提高的作用<sup>[17]</sup>,不同激素水平与不同组合产生的褐变程度也不一样,褐变最严重的激素组合为BA+KTT,最轻的为BA和BA+NAA,且浓度越低褐变越轻<sup>[18]</sup>。

**2.2.3 培养条件。**温度过高、光照过强都会增加PPO的活性,从而加速培养组织褐变;甘蔗胚性细胞在光照2500 lx以上时细胞团表面会出现褐变,在弱光下易出现绿色芽点<sup>[15]</sup>。甘蔗组织培养的外界温度一般26~28℃,从而减轻褐变<sup>[15]</sup>。

**2.3 防止褐变的方法** 在防止褐变的过程中最常用的就是添加吸附剂或褐变抑制剂。黄诚梅的研究表明,甘蔗茎尖组织预先在无菌水中浸泡30 min,再接种到6-BA 2.0 ng/L、NAA 0.1 ng/L MS培养基中,可减轻外植体的褐变;茎尖诱导培养

基中直接附加适量的活性炭(AC,以0.02%为宜,最高不超过0.05%),减轻茎尖组织酚害的效果最理想。另外,在培养基中附加抗氧化剂(如聚乙烯吡咯烷酮,PVP),或根据外植体的褐变情况及时转移到新鲜的培养基中,均能减轻甘蔗茎尖组织的酚害<sup>[19]</sup>。贤武等认为液体滤纸桥震动培养效果最好,褐变最轻,茎尖存活数多,丛芽诱导率高<sup>[5]</sup>。这是因为液体培养有利于外植体周围的有害物质扩散,减少了对外植体的毒害。另外在防止褐变中多次转接也可以减轻褐变,但此方法需要耗费大量的物力和人力。

### 3 培养基的优化

早期的甘蔗组织培养,主要采用 White's 或 MS 或它们的改良培养基,包括附加复杂的物质如椰子汁、酵母提取液、番茄汁、麦精等。目前,常用作甘蔗愈伤组织诱导的基本培养基是 MS 或 NB 以及它们的改良物。韩光禧等<sup>[20]</sup>指出,MS 和 NB 培养基对诱导愈伤组织的效果比较稳定,形成的愈伤组织质量好,继代和分化的后作用较明显。罗素兰<sup>[21]</sup>指出在 MS 和 NB 基本培养基附加 2,4-D 3 ng/L 的情况下,均能从甘蔗心叶组织诱导出愈伤组织,但其诱导的效果不同。在 NB 培养基上愈伤组织的诱导率较高,其愈伤组织多为松散、黄白色颗粒状,而且生长迅速。MS 培养基对甘蔗愈伤组织的诱导率较低,且有促进愈伤组织分化出根或芽的作用。并且筛选出最适合甘蔗心叶愈伤组织诱导和继代的培养基是:NB + 2,4-D 3 ng/L + 肌醇 100 mg/L + 0.5 g/L 活性炭。陈彪等<sup>[22]</sup>在研究甘蔗组织培养不同激素效应中发现在 MS 培养基中较高浓度的 KT 和 6-BA,不仅有利于促进分化芽的增殖,而且可以获得健康的分化苗。罗素兰<sup>[21]</sup>研究证明 MS + 2,4-D 1 ~5 ng/L 培养基均可诱导愈伤组织的增殖;MS + KT 1.5 ~2.0 ng/L + 6-BA 2 ng/L 培养基对愈伤组织分化不定芽的效果最佳;1/2MS + NAA 1 ~4 ng/L 培养基对生根较好。

### 4 甘蔗组织培养遗传转化过程中对抗生素抗性的研究及在遗传育种上的应用

组织培养是进行抗性研究和遗传育种研究最常用的手段,由于甘蔗的遗传背景较复杂,依靠常规的育种方法难以快速有效地进行各种优良性状的改良。但随着现代遗传工程的发展,植物再生体系的建立和外源基因在植物细胞中表达的研究不断深入,利用基因工程技术进行作物品种改良在甘蔗上已有了相关的报道<sup>[23-24]</sup>。

罗素兰等<sup>[25]</sup>通过“福农 81-745”和“Badila”2 个甘蔗品种在不同质量浓度 G418、Hyg、PPT 培养基中的反应,确定筛选浓度,为甘蔗遗传转化提供了前提。试验证明,在相同的质量浓度下,Hyg 对 2 品种甘蔗愈伤组织诱导生长、芽分化阶段的毒性作用比 G418 更快些,即 (Hyg) = 30 ng/L 在 20 d 内就能完全抑制愈伤组织的生长与分化,并将其完全致死;而 G418 需在 30 d 后才能完全抑制其生长与分化。甘蔗对 PPT 的敏感性最高,(PPT) = 0.75 ng/L 时,只 28 d 就可完全抑制愈伤组织生长与分化,并致死;(PPT) = 1.00 ng/L 时就能完全抑制幼苗生根,而 Hyg 和 G418 均需 30 ng/L 才能完全抑制。由此以为:甘蔗对 PPT 最敏感,其次为 Hyg 和 G418;2 个甘蔗品种对 3 种药剂的敏感性相似;甘蔗组培的 3 个阶段对 G418 和 Hyg 的敏感性是一致的,最终选择质量浓度均为 30

ng/L。对 PPT 的敏感性则不完全一致,在愈伤组织诱导生长与芽分化、生长 2 个阶段,PPT 最适的质量浓度均为 0.75 ng/L;在生根阶段为 1.00 ng/L。G418、Hyg 和 PPT 均适宜作为所试甘蔗品种的选择试剂。

### 5 利用生物反应器进行甘蔗组织培养

间歇浸泡式生物反应器是近年来国际上新研究开发的一种用于植物组织培养和植物次生代谢产物生产研究的培养系统<sup>[26]</sup>。它利用空气压力定时控制瓶内的液体培养基在 2 个培养瓶内相互流动,培养物间歇性地浸泡在培养基内,并可以通过控制温度、光照,通入 CO<sub>2</sub> 代替蔗糖作为碳源等模拟环境条件,增强组培苗自身的光合作用能力,让组培苗从异养发展到自养,增强组培苗的自养能力,对外界环境适应能力强。与传统的培养方式相比,它具有自动化程度高,减少培养基配置,组培苗转接等程序,节省人力物力,且繁殖系数高,一代增殖达到几万倍<sup>[27-28]</sup>;所培养的苗质量好,自养能力强,移栽成活率高。美国、日本、台湾、韩国、古巴、荷兰、西班牙、比利时和法国等国家在名贵花卉、凤梨、马铃薯和林业植物等方面已经利用生物反应器作为大规模微繁生产技术<sup>[29-36]</sup>。广西农科院在古巴学者 Ariel 博士协助下建立了一套反应器,用于甘蔗次生代谢产物研究。

甘蔗组织培养是一种高效繁殖技术,可加速甘蔗良种的快速繁殖,解决甘蔗因用种量大而消耗大量原料蔗的问题。近些年来国内外又将组织培养作为一种有效的脱毒技术,为甘蔗组织培养开辟了一个新内容。通过茎尖组织培养与愈伤组织培养获得甘蔗健康种苗,可以有效地消除甘蔗花叶病和宿根矮化病。随着生物工程技术的发展,利用组织培养的手段进行遗传育种的研究会更有效,可有力推动甘蔗产业和甘蔗糖业的发展。

### 参考文献

- [1] 梁一池,杨华.植物组织培养技术的研究进展[J].福建林学院学报,2002,22(1):123.
- [2] 许莉萍.甘蔗组织培养——一种值得发展的生物技术[J].国外农学——甘蔗,1992(2):1-5.
- [3] 李奇伟.现代甘蔗改良技术[M].广州:华南理工大学出版社,2001.
- [4] 章文水,潘大仁,林彦铨.果蔗 Badila 花叶病茎尖脱毒技术的研究[J].甘蔗,2002,9(2):8-14.
- [5] 贤武,王伦旺,王天算.甘蔗茎尖脱毒培养研究初报[J].广西甘蔗,2000,12(4):3-5.
- [6] 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:自然科学版,1994,23(3):253-256.
- [7] 游建华,何为中,曾慧.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,2001(1):13-17.
- [8] 刘祖祺,张石城.植物抗性生理学[M].北京:中国农业出版社,1994.
- [9] IRVING J E, BCNDA GAT. Sugarcane mosaic virus in plantlets regenerated from diseased leaf tissue[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1985, 5(2):101-106.
- [10] DEAN J L. Failure of sugarcane mosaic virus to survive in cultured sugarcane tissue[J]. Plant Disease, 1982, 66(11):1060-1061.
- [11] LEE T S G. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum* spp.) [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1987, 10:45-47.
- [12] 黄诚梅,李杨瑞,叶燕萍.甘蔗组织培养与快速繁殖[J].作物杂志,2005(4):24-26.
- [13] 高山林.甘蔗脱毒技术及其增产效果[J].甘蔗,2001,8(1):30-31.
- [14] 肖关丽,杨清辉,李富生,等.甘蔗愈伤组织分化绿苗内源激素变化规律研究[J].西南农业大学学报,2002(24):338-341.
- [15] 姚洪军,罗晓芳,田砚亭.植物组织培养外植体褐变的研究进展[J].北京林业大学学报,1999,5(3):78-84.
- [16] 卢文祥,韦小强,秦波.甘蔗腋芽液体培养快速繁殖技术的研究进展[J].广西蔗糖,2002(3):16-18.
- [17] 秦延豪.浅析甘蔗组织培养中的酚害[J].甘蔗,1997(2):12-14.

- [18] 陈彪, 梁钊贤, 陈伟栋. 甘蔗组织培养配方中不同激素效应的研究[J]. 华南农业大学学报, 2001, 2(1): 60 - 62.
- [19] 黄诚梅, 李杨瑞, 叶燕萍. 甘蔗茎尖培养中减轻酚害[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(1): 39 - 41.
- [20] 韩光禧, 陆耀邦, 韦鹏霄. 甘蔗愈伤组织和胚性细胞团的诱导与分化因素的研究[J]. 广西农学院学报, 1983(2): 83 - 94.
- [21] 罗素兰, 陈如凯, 黎仁艾, 等. 甘蔗组织培养中培养基的优化[J]. 海南大学学报, 2002, 20(2): 120 - 122.
- [22] 陈彪, 陈伟栋, 梁钊贤. 利用聚乙烯吡咯烷酮防止甘蔗组织培养接种物褐变的研究[J]. 华南农业大学学报, 1999, 20(3): 63 - 66.
- [23] 张树珍, 郑学勤. 海藻糖合酶基因的克隆及转化甘蔗的研究[J]. 农业生物技术学报, 2000, 8(4): 385 - 388.
- [24] 林彦铨, 陈如凯. 甘蔗育种发展和今后研究方向[J]. 甘蔗, 1999, 6(4): 39 - 45.
- [25] 罗素兰, 林皎月, 长孙东亭. 甘蔗组织培养中不同阶段的抗生素及PPT抗性筛选试验[J]. 海南大学学报, 2003, 21(3): 259 - 262.
- [26] LEVIN R V, TAL G B, HRSCHS, et al. Automated plant tissue culture for mass propagation[J]. Bio Technology, 1998, 6: 1035 - 1040.
- [27] LEVIN R, STAV R, ALPER Y, et al. A technique for repeated non-axenic subculture of plant tissues in a bioreactor on liquid medium containing sucrose[J]. Plant Tissue Culture Biotech, 1997, 3: 41 - 45.
- [28] ALVARD D, COLE F, THESSON C. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation[J]. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 1993, 32: 55 - 60.
- [29] THESSON C, ALVARD D. A new concept of plant in vitro cultivation liquid medium temporary immersion[M]// TERZI M, CELLA R, FALAMIGNA A. Current issues in plant molecular and cellular biology. The Netherlands: Kluwer Acad Publ, Dordrecht, 1995: 105 - 110.
- [30] TAKAYAMA S, AKITA M. Bioreactor techniques for large scale culture of plant propagules[J]. Adv Hort Sci, 1998, 12: 93 - 100.
- [31] ZIV M. The effect of growth retardants on shoot proliferation and morphogenesis in liquid cultured gladiolus plants[J]. Acta Hort, 1990, 280: 207 - 214.
- [32] ZIV M. Morphogenesis of gladiolus buds in bioreactors: implication for scaled up propagation of geophytes[M]// NIJKAMP H J J, L H W VAN DER PLAS, VAN AARTUJK. Progress in plant cellular and molecular biology. The Netherlands: Kluwer Acad Publ, Dordrecht, 1990: 119 - 124.
- [33] ZIV M. Vitification: Morphological and physiological disorders of in vitro plants[M]// P G DEBERGH, R H ZIMMERMAN. Micropropagation: Technology and application. The Netherlands: Kluwer Acad Publ, Dordrecht, 1991: 45 - 69.
- [34] ZIV M, RONEN G, RAMI M. Proliferation of non-stemmatic clusters in disposable presterilized plastic bioreactors for large-scale micropropagation of plants[J]. Vitro Cell Dev Biol Hort, 1998, 34: 152 - 158.
- [35] PREIL W. Application of bioreactors in plant propagation[M]// DEBERGH P C, ZIMMERMAN R H. Micropropagation: Technology and Application. The Netherlands: Kluwer Acad Publ, Dordrecht, 1991: 425 - 455.
- [36] ZIV M. In vitro acidification[M]// AITKEN CHRISTIE J, KOZAI T, SMITH MA L. Automation and environmental control in plant tissue culture. The Netherlands: Kluwer Acad Publ, Dordrecht, 1995: 493 - 516.