

利用热水处理结合心叶愈伤组织培养脱除甘蔗宿根矮化病菌研究*

陈仲华 沈万宽

(广州甘蔗糖业研究所 广东省甘蔗改良与生物炼制重点实验室, 广州 510316)

摘 要 甘蔗宿根矮化病 (Ratoon Stunting Disease, RSD) 是我国蔗区普遍发生且造成严重经济损失的一种甘蔗病害, 研究其防治措施非常重要。本文应用 50℃ 2 h 热水处理感病种茎, 以其长成植株的心叶为外植体进行愈伤组织培养, 应用斑点酶标记免疫试验 (Dot blot enzyme immunoassays, DB-EIA) 对愈伤组织培养瓶苗、假植苗、再生植株蔗茎进行 RSD 病菌检测, 以检验该种方法的脱菌效果。结果表明: 瓶苗、假植苗、再生植株蔗茎均未能检测出 RSD 病菌, 该法可有效的去除甘蔗 RSD 病菌, 且经田间观察再生植株生长健壮、未发现变异植株。

关键词 甘蔗; 宿根矮化病; 热水处理; 愈伤组织培养; 斑点酶标记免疫试验

0 引言

甘蔗 (*Saccharum* spp.) 是我国主要的糖料作物, 也是具有良好发展前景的生物能源作物。甘蔗宿根矮化病 (Ratoon Stunting Disease, RSD) 是一种世界性的重要甘蔗病害^[1], 也是我国蔗区普遍发生并造成严重经济损失的一种甘蔗病害^[2-7]。RSD 是一种经种苗传播的细菌病害 (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, Lxx), 对甘蔗产量影响较大, 一般新植蔗产量损失 10% ~ 15%, 宿根蔗产量损失 20% ~ 25%^[1]。RSD 不但严重导致甘蔗产量损失, 而且影响宿根蔗年限, 是甘蔗品种退化的重要原因之一。甘蔗 RSD 病原细菌寄居于蔗茎维管束中, 尚无有效的化学防治方法; 同时由于缺乏抗源材料, 甘蔗 RSD 抗病育种成效不大, 至今未育成抗性较好的生产品种, 有效的控制措施是种植健康种苗。

甘蔗宿根矮化病和嵌纹病等种苗传播病害, 对甘蔗产量和品质都有不同程度的影响。甘蔗健康种苗的重要作用之一是脱除种苗病害。利用组

织培养技术脱除甘蔗嵌纹病病毒已有不少报道。许利萍等^[8]利用甘蔗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, 茎尖组织培养也有一定的脱毒效果。高山林^[9]采用热处理 + 茎尖分生组织培养技术对甘蔗花叶病进行脱毒, 脱毒效果显著, 脱毒蔗可增产 50% 以上。潘大仁等^[10]报道以果蔗 (*Badila*) 为材料采用茎尖 (0.5 mm ~ 1 mm) 培养和心叶愈伤组织培养均能有效地脱除花叶病毒, 其后代的脱毒率分别为 77.7% 和 100%。利用组织培养脱除甘蔗 RSD 病菌报道较少, 杨本鹏等^[11]利用热处理、温热处理结合茎尖分生组织培养对甘蔗 RSD 进行脱菌, 结果表明可有效地脱除 RSD 病菌, 但利用愈伤组织培养脱除甘蔗 RSD 病菌尚未见报道。本文利用热水处理结合心叶愈伤组织培养对甘蔗 RSD 进行脱菌, 应用斑点酶标记免疫试验^[12] (Dot blot enzyme immunoassays, DB-EIA) 对瓶苗、假植苗、第 1 代再生蔗茎进行 RSD 病菌检测, 科学评价热水处理结合心叶愈伤组织培养脱除甘蔗 RSD 病菌的效果, 为今后甘蔗健康种苗生产提供科学依据。

* 广东省科技攻关项目 (2006A20207001), 农业部 “948”项目 (2006-G37) 和广东省科技计划项目 (2006B60101039) 资助

1 材料与方 法

1.1 材料

供试材料为 7 个月株龄的粤糖 00-236 正常生长的蔗茎。

1.2 试验方法

1.2.1 宿根矮化病 DB-EIA 检测

(1)蔗汁样本提取

供试材料取每条甘蔗茎的基部 1~4 个节中的一个节,用蔗汁压榨器压取该节部蔗汁,收集于 1.5 mL 的离心管中,5000 rpm 离心 5 min 取上清液,每样品取上清液 100~200 μ L。

瓶苗、假植苗及第 1 代再生植株蔗茎分别取生根瓶苗 3 瓶、假植苗(苗高约 35 cm)5 株、第 1 代再生植株蔗茎(第 1 次株龄 6 个月,株高 1 m,第 2 次株龄 8 个月,株高约 1.5 m),提取汁液并离心取上清液。

样液编号并及时放入 -20℃ 超低温冰箱中速冻保存,3 d 之内检测。

(2)病菌 Lxx 检测:依据文献^[12],应用斑点酶标记免疫试验(DB-EIA)检测甘蔗 RSD 病原菌 Lxx。其主要实验步骤:压板、点样、晾干、干燥、封闭、洗膜、加入 RSD 兔抗体(一抗)、洗膜、加入羊抗兔碱性磷酸酶标记抗体(二抗)、洗膜、加入底物显色、洗膜、漂白、晾干、拍照、记录结果。

1.2.2 试验材料的热水处理及催芽种植

2005 年 6 月从广州甘蔗糖业研究所湛江甘蔗研究中心试验基地采集甘蔗新品种粤糖 00-236 主茎 5 条,取 20 个有效单芽,经 50℃ 水浴处理 2 h,用保鲜袋装好,加少量水并盖上湿报纸封好袋口,放在 35℃ 培养箱中催芽 3 d,催芽后种植于玻璃温室中。2006 年 1 月上旬取生长健壮的蔗株的梢头部取组织培养外植体。

1.2.3 外植体消毒及愈伤组织诱导

选用生长点以上 3~5 cm 的嫩叶叶鞘,按无菌操作程序操作,剥去甘蔗外层老的叶鞘,留 3~

4 环叶心,用小烧杯装好,放在超净工作台,用 0.1% HgCl_2 溶液倒入小烧杯中,加入几滴 80% 的吐温,将心叶消毒 10 min 后用无菌水冲洗 3 次,剥去外层组织,切去两端切口,再用解剖刀切成厚约 1 mm 的小环作为接种材料,将接种材料接入愈伤组织启动诱导培养基: $\text{N}_6 + 2,4\text{-D } 2.5 \text{ mg/L} + \text{琼脂 } 0.7\% + \text{蔗糖 } 30 \text{ g/L}$, pH 6.2,每瓶接 4 片。在 28℃ 黑暗条件下培养,20 d 左右将外植体切碎,接种于 $\text{N}_6 + 2,4\text{-D } 2 \text{ mg/L} + \text{琼脂 } 0.7\% + \text{蔗糖 } 30 \text{ g/L}$, pH 6.2,继续暗培 20 d 左右。

1.2.4 愈伤组织不定芽分化

选取坚实、粒状、淡黄色的愈伤组织接种于 $\text{N}_6 + \text{琼脂 } 0.7\% + \text{蔗糖 } 30 \text{ g/L}$, pH 6.2。接种后先暗培养 5 d,然后强光照下培养,每天光照 12 h 以上,目的是让愈伤组织分化不定芽。

1.2.5 增殖培养

将愈伤组织分化出的不定芽转接于培养基 $\text{MS} + 6\text{-BA } 0.2 \sim 0.5 \text{ mg/L} + \text{IBA } 0.2 \text{ mg/L} + \text{水解酪酸蛋白 } 500 \text{ mg/L}$, pH 6.2 中,在 28℃ 散射光下培养,15~20 d 继代一次。

1.2.6 促根

将长至 5~6 cm 高的小苗转接于生根培养基 $1/2 \text{ MS} + \text{IBA } 2 \text{ mg/L} + \text{NAA } 0.1 \text{ mg/L} + \text{蔗糖 } 50 \text{ g/L}$,充分光照培养 30 d 左右。

1.2.7 假植与移栽

当小苗长至 6~8 cm 高,根系发育健壮后,将生根苗移到自然光下炼苗 2~3 d,取出洗去苗上的培养基,种植于塘泥、泥炭土和河沙混合的基质上,种植后 7 d 内每天淋水 1~2 次,约 7 d 小苗返青后薄施水肥,45 d 后苗高 35~45 cm,生长健壮,即可移栽于大田。大田定植株距 30 cm,行距 1 m,定植时压实根土、淋透定根水,定植后 7 d 内,每天淋水 1~2 次,返青后加强水、肥及管理、及时拔除杂草。

2 结果

2.1 参试材料 RSD 病菌检测结果

经 DB-EIA 检测, 参试的粤糖 00-236 的 5 条主茎均为强阳性 (图 1), 说明 5 条蔗茎均严重感染甘蔗 RSD。



注: 1~5 为参试蔗茎, 6 为阳性 CK, 7 为阴性 CK

图 1 参试材料 DB-EIA 检测结果

2.2 蔗茎热水处理及心叶愈伤组织诱导

粤糖 00-236 的 20 个有效单芽经 50℃ 2 h 热水处理催芽后萌芽率 100%。利用热水处理后的种苗长成植株的心叶作为外植体, 愈伤组织诱导率 95% 以上, 愈伤组织褐化率较低, 胚性细胞团较多, 胚性愈伤组织呈淡黄色, 较坚实, 质量较好 (见图 2A)。

2.3 不定芽分化与继代培养

胚性愈伤组织在分化培养基上培养 8 d 左

右, 可分化出小苗 (图 2B)。当小苗成丛生状, 苗高达 1 cm 以上时可进行继代。在无菌条件下, 每瓶接 3 丛幼苗, 使之彼此依靠直立, 培养基厚 1.5 cm, 28℃ 散射光下培养, 15~20 d 继代一次, 繁殖系数可达 4~5 倍 (见图 2C)。

2.4 生根培养

当增殖苗繁殖至一定数量 (最多不超过 8 代), 苗高 3~5 cm 时, 可转入生根培养。一般在光照充足条件下培养 20 d 左右, 小苗可长出 3~5 条小白根, 苗高 5~8 cm, 生根率可达 100%。小苗长势良好, 即可炼苗、假植 (图 2D)。

2.5 假植与移栽

本试验在广州甘蔗糖业研究所内进行, 4~8 月份假植苗成活率达 90% 以上, 假植 45 d 左右假植苗苗高 35~45 cm, 根系发达且白色根多, 叶色青绿, 即可出圃移栽于大田 (见图 2E)。只要大田移栽后 7 d 内水份有保证, 移栽成活率可达 95% 左右。

2.6 瓶苗、假植苗及第 1 代再生植株蔗茎 RSD 检测

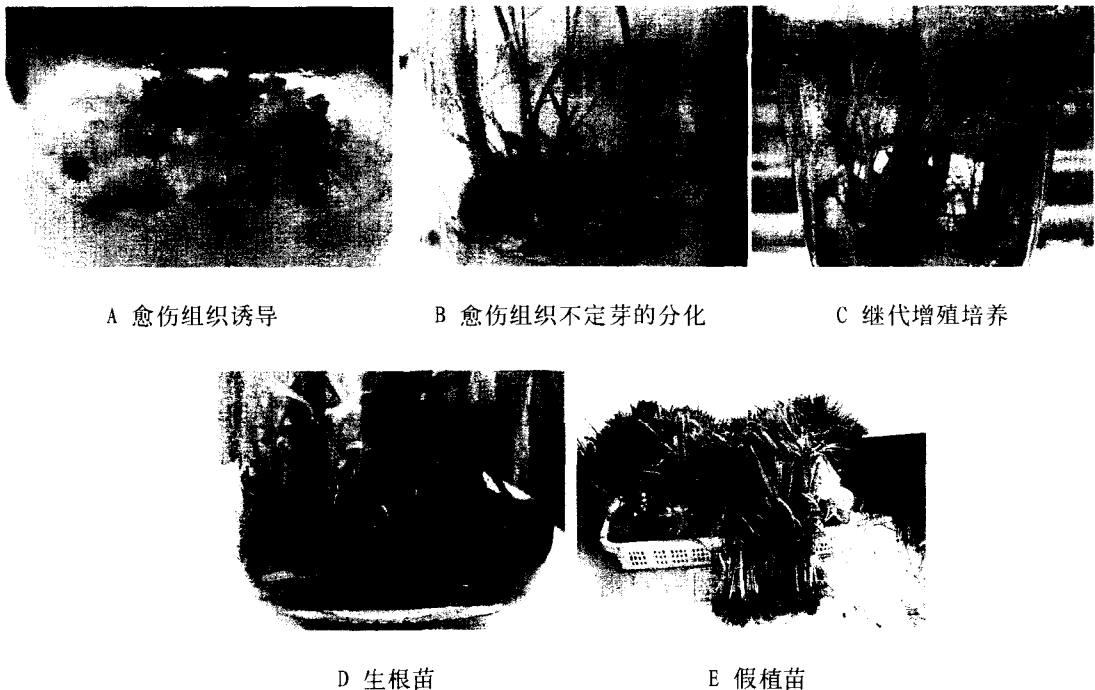


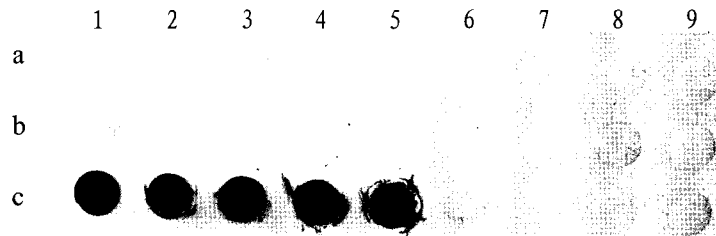
图 2 甘蔗愈伤组织苗的培育

检测结果表明: 经热水处理和愈伤组织培养

生产的已生根瓶苗、假植苗及第 1 代蔗茎 (株龄

6 个月及 8 个月) 经 DB-EIA 检测均为阴性, 表明均未能检测出甘蔗 RSD 病菌。这证明用热水处

理结合愈伤组织培养可有效脱除甘蔗 RSD 病菌。其部分样品 DB-EIA 检测结果见图 3。



注: a1~a9、b1~b9 为第 1 代再生蔗茎样品; c1~c4 为未经该法脱 RSD 菌的对照蔗茎样品; c5 为阳性 CK; c6 为阴性 CK; c7~c9 为空白

图 3 第 1 代再生蔗茎 (株龄 6 个月) 部分样品 DB-EIA 检测结果

3 结论与讨论

甘蔗宿根矮化病菌是一种寄居于甘蔗维管束中的杆状细菌, 以寄居于蔗茎维管束中为主。经我们用 DB-EIA 检测, 其在蔗茎中的含量分布规律为成熟蔗茎高于未成熟蔗茎, 蔗茎基部含量极显著的高于蔗梢部, 茎尖生长点及其附近的心叶含量极低或没有。热水处理 (50℃, 2~3 h) 种茎, 是一种常用的防治甘蔗 RSD 的方法, 经我们试验与检测能显著的降低再生植株蔗茎中的 RSD 病菌的含量, 但极难完全去除 Lxx (另文发表)。本研究中, 我们对严重感染 RSD 的蔗茎先用热水处理 (50℃, 2 h) 种茎, 以大大减少再生植株中的 Lxx 含量, 再取 Lxx 含量极低或没有的未成熟蔗茎梢部生长点附近的心叶作外植体进行愈伤组织培养, 以达到完全去除甘蔗 Lxx 的脱菌目的。本研究结果表明, 利用热水处理 (50℃, 2 h) 种茎, 以其再生植株心叶为外植体进行愈伤组织培养, 可以完全脱除甘蔗 RSD 病菌 Lxx。

在组培苗生产过程中, 随着继代次数的增加, 会产生少量的变异苗, 如白花苗、畸形苗等, 以白花苗较多见。在继代培养时, 宜及时剔除变异苗。根据我们调查统计, 心叶愈伤组织培养继代次数 8 代以内变异苗率极低, 一般在 0.1% 左右, 10 代以上变异苗率增多, 可达 0.5% 以上,

所以愈伤组织继代次数一般控制在 8 代以内。本试验在培养过程中及时剔除变异苗, 继代次数不超过 8 代, 田间种植的第 1 代再生植株中未发现变异株, 遗传性状稳定。

目前我们已采用热水处理结合茎尖生长点培养的方法生产甘蔗健康种苗。本研究证实了用热水处理结合心叶愈伤组织培养可以脱除甘蔗 RSD 病原细菌, 此法的繁殖系数一般要比茎尖培养的高, 但其在生产上是否具有优势尚有待作进一步研究。

参考文献

- [1] 马丁 J P, 阿伯特 E V, 休兹 C G (陈庆龙译). 世界甘蔗病害: 第一卷 [M]. 北京: 农业出版社, 1982.
- [2] 罗宗爵. 台湾甘蔗宿根矮化病调查报告 [J]. 台湾糖业, 1954, 5 (2): 67-76.
- [3] 伍承芳, 黄孟群. 我国大陆发现甘蔗宿根矮化病 [J]. 甘蔗糖业: 甘蔗分刊, 1986 (3): 29-30.
- [4] 黄孟群, 肖镇杰. 广东甘蔗宿根矮化病调查报告 [J]. 甘蔗糖业: 甘蔗分刊, 1987 (2): 39-40.
- [5] 郑加协, 甘勇辉. 福建甘蔗宿根矮化病的发生及其诊断 [J]. 甘蔗糖业, 1998 (5): 20-24.
- [6] 邓展云, 王伯辉, 刘海斌, 等. 广西甘蔗宿根矮化病的发生及病原检测 [J]. 中国糖

料, 2004 (3): 35-38.

[7] 沈万宽, 郑学文, 陈仲华, 等. 湛江农垦蔗区甘蔗宿根矮化病调查研究[J]. 中国农学通报, 2007, 23(4): 387-391.

[8] 许莉萍, 陈如凯, 李跃平. 利用愈伤组织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.

[9] 高山林. 甘蔗脱毒技术及增产效果[J]. 甘蔗, 2001, 8(1): 30-31.

[10] 潘大仁, 章文水, 许莉萍. 果蔗花叶病脱毒技术及增产效应的研究[C]. 广东省甘蔗学会交流材料, 2001, 广州.

[11] 杨本鹏, 张树珍, 杨学, 等. 甘蔗健康种苗培育体系的建立[J]. 热带作物学报, 2006, 27(4): 74-77.

[12] 沈万宽, 邓海华, 周国辉, 等. 应用 DB-EIA 技术快速检测甘蔗宿根矮化病研究[J]. 植物保护, 2007, 33(2): 110-113.

Studies on Eliminating *Leifsonia xyli* subsp. *Xyl*, the Causal Agent of Sugarcane Ratoon Stunting Disease by Combining Hot Water Treatment with Callus Culture Technique

CHEN Zhong-hua, SHEN Wan-kuan

(Guangzhou Sugarcane Industry Research Institute, Guangdong Key Lab. of Sugarcane Improvement and Biorefinery, Guangzhou 510316)

Abstract Sugarcane Ratoon Stunting Disease (RSD) is known to be an economically important disease in China. It is necessary to study the method for controlling this disease. Using RSD-infected seedcane as material, the method of eliminating causal bacterium of RSD, *Leifsonia xyli* subsp. *Xyl* (Lxx) was studied by combining hot water treatment (50°C for 2 hours) with callus culture using young leaves as explants. Dot blot enzyme immunoassays (DB-EIA) was employed to confirm the eliminating results of RSD. The results from DB-EIA assay of the regenerated plantlets in medium culture stage, in nursery stage and the mature cane in the field showed that this method was very effective for getting rid of the disease. The field observation of the crop developed from the disease-free seedlings indicated that the cane plants replants grew well without any variation.

Keywords Sugarcane; Ratoon stunting disease (RSD); Hot water treatment; Callus culture; Dot blot enzyme immunoassays (DB-EIA)

(本篇责任编辑: 李金玉)

(上接第 42 页)体灭活及其在育种上的应用[J]. 国外医药抗生素分册, 1990, 11(6): 9-13.

[5] 刘向勇, 张小华, 鲍晓明. 酿酒酵母工业菌株胁迫条件耐受性分析[J]. 中国酿造, 2006 (1): 13-16.

[6] 王丽威. 原生质体融合构建增香型猕猴桃酒酵母的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2004: 37.

[7] Ste'phane Guyot, Eric Ferret, Patrick

Gervais. Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to Thermal Stress [DB/OL], Published online 18 July 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/bit.20600.

[8] Daizo Kawamura. Breeding of yeast strains able to grow at 42 °C [M]. Biosci. Biotechnol. Biochem, 1999, 63(3): 560-562.

(本篇责任编辑: 朱涤荃)