

利用间歇浸没式生物反应器进行 甘蔗组培快繁的研究

杨 柳^{1,2}, 秦 钢², 杨丽涛¹, 吴建明^{1,2}, 罗瑞鸿², 魏源文², 李杨瑞^{1,2}

(1 广西大学农学院, 亚热带农业生物资源利用与保护国家重点实验室, 广西南宁 530004; 2 中国农业科学院甘蔗研究中心, 广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 广西甘蔗遗传改良重点实验室, 广西南宁 530007)

摘要:以甘蔗(新台糖22号)茎尖脱毒组培苗为材料,利用间歇浸没式生物反应器(TIBs)进行组培快繁的技术体系研究.结果表明:TIBs系统可使甘蔗组织培养一代增殖40倍以上,远远高于传统方法;TIBs系统以第3代继代的材料为宜;10~15株/瓶的接种密度最有利于组培苗的增殖;激素选择与传统方法相似,0.5~1.0 mg/L 6-BA 适合甘蔗组织的增殖,4 mg/L NAA 有利于根的诱导;浸没间歇频率以浸没1 min 间歇3 h 处理的增殖和生长表现比较优异,而6 h 时则有利于根的诱导和根的生长.

关键词:间歇浸没式生物反应器;甘蔗;组培快繁

中图分类号:S5.035.3

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2011)03-0037-05

Optimization of Sugarcane Rapid Propagation in Temporary Immersion Bioreactors System

YANG Liu^{1,2}, QIN Gang², YANG Li-tao¹, WU Jian-ming^{1,2}, LUO Rui-hong², WEI Yuan-wen², LI Yang-rui^{1,2}
(1 State Key Laboratory for Subtropical Agri-Bioresources Conservation and Utilization, Agriculture College of Guangxi University, Nanning 530004, China; 2 Guangxi Key Laboratory of Sugarcane Genetic Improvement, The Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Laboratory, Sugarcane Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

Abstract: A new protocol was established for sugarcane propagation in a temporary immersion bioreactors system (TIBs). The results showed that TIBs increased a multiplication rate to more than 40 times in one subculture, the most suitable starting materials were the third sub-cultured plantlets and the most suitable density inoculums were 10 – 15 plantlets per liter in TIBs. 0.5 – 1.0 mg/L 6-BA was suitable for multiplication and 4 mg/L NAA was suitable for rooting. Temporary frequency of 1 min per 3 h was suitable for multiplication, 1 min per 6 h for rooting.

Key words: temporary immersion bioreactors system; sugarcane; rapid propagation

我国与印度、新几内亚是世界三大甘蔗起源中心.我国已有3 000多年的甘蔗生产记录^[1].位于亚热带季风气候区的广西壮族自治区,光照充足,雨水丰沛,适宜甘蔗生长.2007—2008年榨季广西食糖产量941万t,占全国甘蔗糖产量的68.6%,食糖总

产量的63.4%,是名副其实的“中国糖都”.

甘蔗迅速大量繁殖试管苗可通过2种方式:一种是诱导嫩叶外植体产生愈伤组织,由愈伤组织分化植株^[2-3];另一种是培养茎顶生长点附近的芽(顶芽和腋芽),使之大量分蘖繁殖,繁殖一定数量后,诱

收稿日期:2010-01-12

作者简介:杨 柳(1983—),男,博士研究生;通信作者:李杨瑞(1957—),男,教授,E-mail:liyangrui40@hotmail.com

基金项目:国家科技支撑计划项目(2007BAD30B03);科技部国际合作项目(2008DFA30600,2009DFA30820);广西自然科学基金(桂科自0832087)

导芽生根,形成完整植株^[4-5].目前,以幼嫩茎尖组织作为外植体的茎尖离体培养技术结合热处理,获得健康脱毒的甘蔗种苗,并用于生产,可使甘蔗增产20%~40%、蔗糖含量增加0.5%以上(绝对值)^[6].

传统组织培养方法在各个操作过程中需要大量的手工劳动,是一种劳动密集型的技术,液体培养具有更多灵活性适应大规模生产^[7-9],但培养时间过久容易造成玻璃化畸形等生理问题.为了克服传统方法存在的弊端,在液体培养的基础之上利用自动化、机械化方法进行组织培养来降低生产成本逐渐成为研究的热点^[10-11].因此,改善培养工艺,建立新的培养方法体系,减少劳动力耗费,实现自动化培养是降低成本实现商业生产的一种趋势.广西农业科学院率先从古巴甘蔗研究中心引进间歇浸没式生物反应器(TIBs)系统,进行甘蔗组织培养和甘蔗次生代谢物质研究^[12].本文介绍利用TIBs系统进行甘蔗组培快繁的研究过程和结果.

1 材料与方法

1.1 材料

甘蔗材料,经过茎尖培养脱毒的新台糖22号组培苗,由广西甘蔗研究所提供.

TIBs系统根据Lorenzo等^[13]的设计思路建立,TIBs系统中培养瓶和储液瓶都为3L的大口白色玻璃瓶,瓶高30cm,直径15cm.储液瓶中液体培养体积为1L.

1.2 方法

1.2.1 TIBs系统与传统的甘蔗组培方法的比较 传统的甘蔗增殖培养基配方为MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 白砂糖30 g/L,生根培养基配方为MS + NAA 3.0 mg/L + 白砂糖40 g/L. TIBs系统各参数参照Lorenzo等^[13]的设计方案,即间歇频率按浸没1 min 间歇3 h,接种密度为20株/瓶. TIBs系统增殖培养阶段为40 d、生根培养阶段为20 d.传统方法则20 d继代1次,继代2次后生根培养20 d.比较2种方法的增殖率、株高、功能根数等.

1.2.2 接种不同代数的继代材料对TIBs系统中甘蔗增殖的影响 利用继代数为1~5代的组培苗为材料,增殖培养基为MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 白砂糖30 g/L, TIBs系统间歇频率按浸没1 min 间歇3 h、接种密度为20株/瓶.

1.2.3 不同接种密度对TIBs系统中甘蔗增殖的影响 试验材料为经3次继代的组培苗,增殖培养基为MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 白砂糖

30 g/L, TIBs系统间歇频率按浸没1 min 间歇3 h,接种密度为5、10、15、20、30株/瓶.

1.2.4 6-BA和PP₃₃₃质量浓度对TIBs系统中甘蔗组培增殖的影响以及NAA质量浓度对生根的影响

试验材料为第3代继代苗,接种密度为10株/瓶, TIBs系统增殖与生根阶段的间歇频率按浸没1 min 间歇3 h, 6-BA质量浓度为0、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L, PP₃₃₃质量浓度为0、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L, NAA质量浓度为1、2、3、4、5 mg/L.

1.2.5 间歇频率对TIBs系统中甘蔗组培的影响

试验材料为第3代继代苗,接种密度为10株/瓶,增殖培养基为MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 白砂糖30 g/L,生根培养基为MS + NAA 4 mg/L + 白砂糖40 g/L. 浸没间歇频率按浸没1 min 分别间歇1、3、6、12、24 h共5个处理.

培养条件为:培养室温度(26 ± 1) °C,光照度2000 lx,光周期16 h光照:8 h黑暗.以上各试验均为每处理TIBs系统5套,各个试验重复3次,采集增殖率、株高、茎径、功能根数等数据进行分析比较,数据处理用SPSS统计软件进行,使用Excel软件作图比较.

2 结果与分析

2.1 TIBs系统与传统的甘蔗组培方法的比较

利用TIBs系统进行甘蔗组织培养,第1代增殖率在40倍以上,3L的培养瓶中超过400株苗,比传统方法高出3~4倍.在株高方面TIBs系统中的组培苗也高过传统方法,差异达到显著水平($P < 0.05$);在功能根数方面传统方法高于TIBs系统,但差异不显著($P > 0.05$)(表1).

表1 TIBs系统与传统的组培方法的比较¹⁾

Tab.1 Comparison of TIBs derived method with conventional method in sugarcane tissue culture

培养方式	增殖率/倍	株高/cm	功能根数
TIBs系统	43.1a	12.3a	3.8a
传统方法	8.1b	6.7b	4.2a

1) 同列数据后凡是有一个小写字母相同者,表示在0.05水平差异不显著(Duncan's法).

2.2 不同代数继代材料在TIBs系统中的培养反应

增殖阶段在TIBs系统中利用不同代数的继代材料进行培养.结果(表2)显示,在第3代以前的继代材料增殖率都在20倍以上,从第4代开始降低,其中第6代材料的增殖率在10倍左右,与第3代相比

差异达显著水平 ($P < 0.05$),但在利用 TIBs 系统进行甘蔗组培快繁的过程为了保证有足够的材料又不降低增殖率,所以选择第3代苗为接种材料较好。随着继代苗代数的增高萌芽推迟,但第1代与第6代差异不明显 ($P > 0.05$),都在6d左右开始萌芽;不同继代材料对株高的影响不大。

表2 甘蔗不同代数继代材料在 TIBs 系统中的培养效果¹⁾

Tab.2 Influence of different subcultured materials on sugarcane multiplication in TIBs

继代数	增殖率/倍	株高/cm	萌芽时间/d
1	22.6ab	3.7bc	6.0d
2	23.0a	3.8b	6.2cd
3	21.5b	3.6c	6.5b
4	17.3c	4.1a	6.8a
5	12.3d	3.6c	6.4bc
6	10.4e	4.0a	5.9d

1) 同列数据后凡是有一个小写字母相同者,表示在0.05水平差异不显著(Duncan's法)。

2.3 不同接种密度对 TIBs 系统中甘蔗组培增殖的影响

表3的结果表明,在增殖阶段 TIBs 系统接种密度太低(5株/瓶)时增殖率比较低,与其他处理相比均达到显著水平 ($P < 0.05$),随着密度的增加增殖率开始提高,15株/瓶处理的增殖率最大为20.8倍,在

表3 TIBs 系统中不同接种密度对甘蔗组培增殖的影响¹⁾

Tab.3 Influence of inoculation density on sugarcane multiplication in TIBs

接种密度/ (株·瓶 ⁻¹)	增殖率/倍	株高/cm	萌芽时间/d
5	10.6 d	6.5a	6.2b
10	18.9b	5.7b	6.0c
15	20.8a	4.7c	6.3b
20	18.5bc	3.8 d	6.7a
30	18.2c	2.6e	6.8a

1) 同列数据后凡是有一个小写字母相同者,表示在0.05水平差异不显著(Duncan's法)。

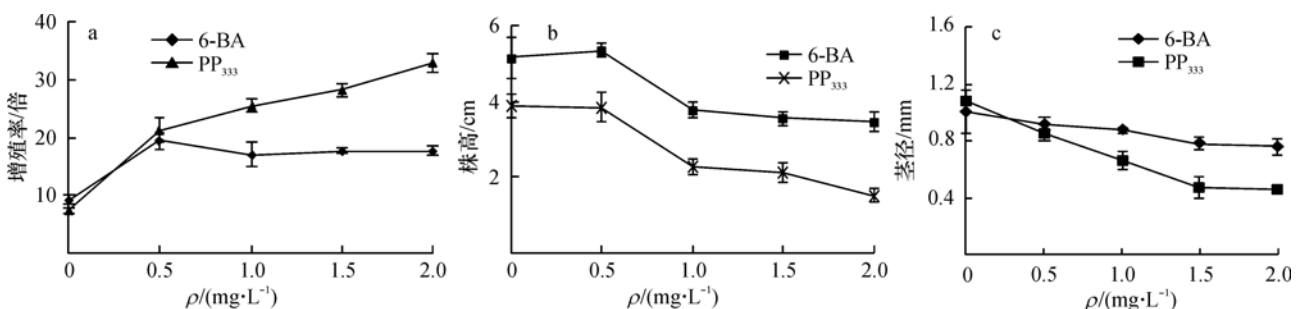


图1 TIBs 系统中不同质量浓度的6-BA和 PP_{333} 对组培苗增殖和茎径的影响

Fig.1 Influence of 6-BA and PP_{333} concentrations on sugarcane proliferation and stem diameter in TIBs

超过15株/瓶时开始降低,但20与30株/处理间差异不显著;接种密度对株高的影响比较明显,随着密度的增加株高逐渐降低,10株/瓶处理与20株/瓶处理差异达到极显著水平 ($P < 0.01$),且20、30株/瓶处理的苗表现为团状苗,增加了变异的机率;接种密度对芽萌动的时间影响也不明显,都在6d左右开始萌芽。

2.4 TIBs 系统中甘蔗组培快繁激素的筛选

6-BA和 PP_{333} 都可以促进甘蔗组培苗的增殖,6-BA质量浓度超过0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 后,对增殖的影响不明显,随着 PP_{333} 质量浓度的增加对增殖有明显的促进作用,在2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到30倍以上(图1a);6-BA和 PP_{333} 质量浓度的增加都降低了组培苗的高度,但6-BA对株高的影响差异不是很大,除0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与其他处理差异显著以外,其他处理之间差异均不显著 ($P > 0.05$),而 PP_{333} 质量浓度的增加明显地降低了组培苗株高,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与其他处理均达到极显著水平 ($P < 0.01$),其中2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的组培苗株高平均只有2.6 cm,且呈团状(图1b)。随着6-BA和 PP_{333} 质量浓度的增加组培苗的茎径也有所降低,但6-BA与 PP_{333} 相比对茎径降低的影响较小,6-BA处理组培苗的茎径在0.8 mm以上,而当 PP_{333} 质量浓度超过1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时茎径只有0.5 mm左右,组培苗比较细弱而且叶片卷曲(图1c)。

生根阶段随着NAA质量浓度的增加有利于根的萌发,也增加了功能根的数量和根的长度。发根时间随着NAA质量浓度的增加而提前,超过3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的发根时间在11d左右;功能根数量随着NAA质量浓度的增加而增加,3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时为2.6条,4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时为3.5条,差异显著 ($P < 0.05$),4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理与5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理之间差异不显著 ($P > 0.05$);根长度也随着NAA质量浓度的增加而增加,1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理根长为2.01 cm,与5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理根长(3.9 cm)差异达到显著水平 ($P < 0.05$),而4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理与5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理的根长差异不显著 ($P > 0.05$)(表4)。

表4 TIBs系统中不同质量浓度的NAA对组培苗生根的影响
Tab.4 Influence of NAA concentrations on sugarcane rooting in TIBs

$\rho(\text{NAA})/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	根数/条	根长/ cm	发根时间/ d
1	1.9c	2.0e	16.2a
2	2.3bc	2.3d	12.7b
3	2.6b	2.9c	11.7c
4	3.6a	3.4b	10.0d
5	3.7a	3.9a	10.5d

1) 同列数据后凡是有一个小写字母相同者,表示在0.05水平差异不显著(Duncan's法)。

2.5 TIBs系统中甘蔗组培快繁间歇频率的筛选

随着浸没间歇时间的增加增殖率降低,其中1和3h之间差异不显著($P > 0.05$),3、6、12和24h之间差异达到显著水平($P < 0.05$);延长浸没间歇时间对组培苗的生长有一定的促进作用,其中24h的株高平均达到4.87cm,与3h的株高(3.22cm)达显著水平($P < 0.05$);浸没间歇时间对芽的萌发没有太大的影响,一般都在6~7d左右开始萌芽(表5)。

随着浸没间歇时间的延长有利于根的提前萌发,但超过6h又延长了发根时间,其中6h的发根时间为10.4d,低于其他处理;浸没间歇时间的增加有利于功能根生长,6h时功能根为4.0条,与1h的3.0条差异呈显著水平($P < 0.05$),但当间歇时间超过6h时,功能根数又有所减少,24h时功能根为3.4条,与6h的差异达到显著水平($P < 0.05$);间歇时间的增加对根的伸长有促进作用,24h根长达到4.7cm,远高于1h的2.4cm,6h的根长为3.4cm,与1h的差异均达到了显著水平($P < 0.05$)(表5)。

表5 TIBs系统中不同间歇频率对组培苗生根的影响

Tab.5 Influence of different immersion frequencies on sugarcane rooting in TIBs

间歇 频率/h	增殖率/ 倍	株高/ cm	萌芽 时间/d	根数/ 条	根长/ cm	发根 时间/d
1	19.7a	2.95d	5.78d	3.0c	2.4e	13.4a
3	19.4a	3.22c	6.22b	3.4b	2.8d	12.0b
6	13.4b	4.23b	6.02c	4.0a	3.4c	10.4c
12	12.6c	4.33b	7.12a	3.6ab	4.3b	11.0c
24	11.4d	4.87a	7.18a	3.3b	4.7a	12.8ab

1) 同列数据后凡是有一个小写字母相同者,表示在0.05水平差异不显著(Duncan's法)。

3 讨论与结论

TIBs系统是一套集植物组织培养和植物次生代谢物质研究为一体的设备,其原理是利用液体培养基以经过过滤的空气压力为动力对植物组培苗进行

间歇式的培养,间歇浸没式生物反应器为植物在液体培养的过程中提供了一个良好的环境,可以很好地进行容器中气体和培养基中气体的交换^[14],有效地防止营养成分的沉积和有害物质的积累,使组培苗可以更有效地利用培养基的营养成分^[15]。国外利用此套系统进行研究的作物品种也在不断增多,目前研究报道的植物种类有香蕉^[16-17]、苹果^[18]、咖啡^[19]、桉树^[20]、山药^[21]、菠萝^[22]等。

利用TIBs系统进行甘蔗组织培养快繁,在同样培养条件下增殖率可以达到40倍以上,远高于传统方法,同时减少了继代转接的劳动成本,是降低生产成本的主要途径^[13]。据Lorenzo等^[23]报道,利用古巴的一个甘蔗品种一代增殖可以达到40倍,而且在田间的生长情况也比传统方法获得的组培苗适应性要好。Angela等^[24]报道,利用澳大利亚的几个不同甘蔗品种在不同生物反应器进行试验比较,其中利用TIBs系统的甘蔗组培苗一代增殖率也都超过20倍。

为了控制组培苗的变异率,甘蔗组培苗商业化生产的代数一般不会超过6代,在利用甘蔗茎尖脱毒苗为材料进行TIBs系统中甘蔗组织培养快繁,第3代苗保持了较高的增殖能力,也可以提供足够的材料。Angela等^[24]在2009年报道,利用SmartSet琼脂培养基结合RITA系统来获得足够初代苗材料在TIBs中进行组培快繁可以提高几个品种的增殖效率。TIBs系统中接种密度在10~15株/瓶时增殖率较高,甘蔗组培苗的生长情况也较好。Lorenzo等^[13]发现C-1051-73在TIBs系统中的接种密度在15~20株/瓶的时候表现最好。TIBs系统中相对于PP₃₃₃来说,6-BA对于甘蔗组培苗的生长情况较优异。随着NAA质量浓度的提高对组培苗生根有促进作用,这与传统方法甘蔗组培也有所相似。

TIBs系统中组培苗对浸没间歇频率的要求比较严格,新台糖22号在增殖阶段以3h有利于增殖和组培苗的生长,生根阶段则以6h对诱导生根最为有利。根据Lorenzo等^[13]研究发现4h时最有利于古巴的甘蔗C-1051-73品种增殖,但Angela等^[24]则发现24h对甘蔗品种Q165和Q117的增殖较好,甘蔗品种Q205的最佳浸没间歇频率为12h。所以,不同的品种对于浸没间歇频率的要求有很大的差异。

根据《2008—2009亚洲国家蔗糖产量降低的原因及应对措施》国际交流研讨会的报告,2008—2009年榨季亚洲各国和巴西等国家都面临甘蔗蔗糖产量降低的威胁,除气候、种植面积、政府政策等原因外,最主要的是病虫害的大面积发生,而甘蔗健康种苗的应用是应对这一灾害的主要解决办法。但就目前

传统的商业生产方法而言,由于成本较高、增殖率低、劳动量大等原因,还无法满足生产的需要。所以利用大规模的生物反应器进行甘蔗健康种苗的快速繁殖和生产是以后甘蔗种植产业和蔗糖产业的理想选择。

参考文献:

- [1] 李杨瑞. 正在崛起的中国甘蔗糖业[J]. 广西农业科学, 2005, 36(1): 79-81.
- [2] DANIELA C, ALINE C R, ANDREA L, et al. *In vitro* morphogenesis patterns from shoot apices of sugarcane are determined by light and type of growth regulator[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 2007, 90: 181-190.
- [3] GURPREET S S, SANDHU K, MADHU M K S, et al. *In vitro* induction and characterization of somaclonal variation for red rot and other agronomic traits in sugarcane[J]. Euphytica, 2008, 160: 35-47.
- [4] LAKSHMANAN P, GEIJSKES J R, WANG L, et al. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture[J]. Plant Cell Rep, 2006, 25: 1007-1015.
- [5] SABAZ A K, HAMID R, CHAUDHARY M F F, et al. Rapid micropropagation of three elite sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) varieties by shoot tip[J]. African Journal of Biotechnology, 2008, 7(13): 2174-2180.
- [6] 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, 2001(1): 13-17.
- [7] ETIENNE H, BERTHOULY M. Temporary immersion in plant micro-propagation[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 2002, 69: 215-231.
- [8] NI J J, PETER M C. Evaluation of genetic diversity in rice subspecies using microsatellite markers[J]. Crop Science, 2003, 43: 601-608.
- [9] BE L V, DEBERGH P C. Potential low cost micro-propagation of pineapple (*Ananas comosus*) [J]. South African J Bot, 2006, 72: 191-194.
- [10] AKITA M, TAKAYAMA S. Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semi-continuous liquid medium surface level control[J]. Plant Cell Rep, 1994, 13: 184-187.
- [11] LEVIN R, GABA V, BENI T. Automated plant tissue culture for mass propagation [J]. Bio/Technology, 1998, 6: 1035-1038.
- [12] ARENCIBIA A D, BERNAL A, YANG L, et al. New role of phenylpropanoid compounds during sugarcane micropropagation in temporary immersion bioreactors (TIBs) [J]. Plant Science, 2008, 175: 487-496.
- [13] LORENZO J C, GONZA L, ESCALONA B M. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1998, 54: 197-200.
- [14] LEATHERS R, SMITH J. Automation of the bioreactor process for mass propagation and secondary metabolism [M]//AITKEN-CHRISTIE J, KOZAI T, SMITH M A L. Automation and environment control in plant tissue culture. Dordrecht: Kluwer Acad Publ, 1995: 187-214.
- [15] DORAN P M. Design of reactors for plant cells and organs [J]. Bioprocess Design Control, 1993, 48: 116-169.
- [16] ROELS S, ESCALONA M, CEJAS I, et al. Optimization of plantain (*Musa AAB*) micro-propagation by temporary immersion system [J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 2005, 82: 57-66.
- [17] IKRAM U A, MUHAMMAD U D, et al. Effect of permanent and temporary immersion on banana micro-propagation [J]. Pak J Bot, 2007, 39(5): 1763-1772.
- [18] ZHU L H, LI X Y, WELANDER M. Optimisation of growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle [J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 2005, 81: 313-318.
- [19] HERVÉ E, DECHAMP E, BARRYV E D. Bioreactors in coffee micropropagation [J]. Braz J Plant Physiol, 2006, 18(1): 45-54.
- [20] McALISTER B, FINNIE J, WATT M P. et al. Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forests (SA) [J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 2005, 81: 347-358.
- [21] MANUEL C J, RAFAEL GOME K, MILAGROS B P, et al. Production of yam microtubers using a temporary immersion system [J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 2005, 83: 103-107.
- [22] MARITZA E, GUY S, CARLOS Y D. Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets [J]. *In Vitro Cell Dev Biol: Plant*, 2003, 39: 651-656.
- [23] LORENZO J C, OJEDA E, ESPINOSA A, et al. Field performance of temporary immersion bioreactor-derived sugarcane plants [J]. *In Vitro Cell Dev Boil: Plant*, 2001, 37: 803-806.
- [24] ANGELA M M, JEAN A B, PRAKASH L. et al. Development of a temporary immersion system (RITA®) for mass production of sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) [J]. *In Vitro Cell Dev Boil: Plant*, 2009, 45: 450-457.