

王华宇,陈乃明,何贵整,等.黑麦冬工厂化育苗关键技术研究[J].江苏农业科学,2014,42(2):138-140.

黑麦冬工厂化育苗关键技术研究

王华宇,陈乃明,何贵整,陈丽文,时 群,赖崇健

(广西壮族自治区钦州市林业科学研究所,广西钦州 535000)

摘要:基于消毒成功的黑麦冬无菌组培苗,对继代、壮苗、生根及培养过程中几个重要的技术环节进行了研究,结果表明:最佳增殖培养基为 MS + 6 - BA 4 mg/L + NAA 0.4 mg/L;最佳壮苗培养基为 MS + 6 - BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L;最佳生根培养基为 1/2MS + NAA 0.1 mg/L + IBA 0.1 mg/L。增殖过程中进行小丛芽增殖,光照强度设定为 800 ~ 1 300 lx,可以获得较高的增殖系数和生长量;在培养过程中制定分级标准,对组培苗进行分级,可以节省接种材料,得到一致性较好的种苗。

关键词:黑麦冬;组织培养;工厂化育苗

中图分类号: S688.404⁺.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)02-0138-03

黑麦冬 (*Ophiopogon planiscapus* cv. *Arabicus*) 别名黑龙,为百合科沿阶草属多年常绿簇生草本植物,是近年来引进的新品种之一。其株高 15 cm 左右,叶片近黑色,狭长状,长 10 ~ 15 cm,形如韭菜。黑麦冬耐寒性、抗逆性强,是优良的地被观叶植物,在欧洲和北美园林应用较多,对种苗的需求呈现供不应求的局面,但在国内目前应用尚少。黑麦冬通常依靠分株繁殖,但由于其生长缓慢、繁殖系数极低,很难满足市场需求。目前,关于麦冬属植物离体快繁的研究较多^[1-4],但利用组培技术进行黑麦冬工厂化生产方面的技术和工艺研究尚未见报道。本研究在黑麦冬组织培养再生完整植株的工作基础上,开展了工厂化生产过程中的若干关键技术研究,形成了一套高效的黑麦冬组培苗扩繁工艺,实现了组培苗的工厂化生产。

1 材料与方法

1.1 材料

以黑麦冬茎尖诱导培养的优良组培苗为试验材料。

1.2 工厂化生产中的若干关键技术研究

1.2.1 培养基配方设计 增殖培养和壮苗培养以 MS 为基本培养基,生根培养以 1/2MS 为基本培养基。(1) 增殖培养基:细胞分裂素 6-BA 和生长素 NAA 协同使用时,其浓度比例设为 10 : 1,具体配方如下: MS + 6 - BA 1 mg/L + NAA 0.1 mg/L; MS + 6 - BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L; MS + 6 - BA 3 mg/L + NAA 0.3 mg/L; MS + 6 - BA 4 mg/L + NAA 0.4 mg/L; MS + 6 - BA 4 mg/L; MS + 6 - BA 5 mg/L + NAA 0.5 mg/L; MS + 6 - BA 6 mg/L + NAA 0.6 mg/L; (2) 壮苗培养基: MS; MS + 6 - BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L; MS + 6 - BA 1 mg/L + NAA 0.1 mg/L; MS + 6 - BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L; MS + 6 - BA 3 mg/L + NAA 0.3 mg/L; (3) 生根培

培养基: 1/2MS + NAA 0.05 mg/L; 1/2MS + NAA 0.1 mg/L; 1/2MS + IBA 0.1 mg/L; 1/2MS + NAA 0.2 mg/L; 1/2MS + NAA 0.1 mg/L + IBA 0.1 mg/L。

1.2.2 培养条件 除特别说明外,上述培养基均添加 3% 蔗糖和 0.6% 琼脂粉, pH 值 5.8 ~ 6.0。培养室温度为 (25 ± 2) °C,光照时间 12 h/d,增殖接管光强为 800 ~ 1 300 lx,生根阶段光强为 2 000 ~ 3 000 lx。

1.2.3 切割方法对增殖的影响 将增殖苗按照单芽、小丛芽 (2 ~ 3 芽/丛,下同) 切除愈伤组织、小丛芽基部愈伤保留 2/3、小丛芽基部愈伤全保留的方式切割,观察不同切割方法对增殖苗生长的影响。

1.2.4 光照强度对组培苗生长的影响 以散射光状态下 (约 500 lx) 生长的增殖苗为对照,观察不同光强对黑麦冬生长的影响。设置光强为 800 ~ 1 300 lx、1 500 ~ 2 000 lx、2 000 ~ 3 500 lx。

1.2.5 试管苗分级标准的制定 在增殖阶段,按照组培苗生长状态制定分级标准,达到一定规格的进行壮苗培养,小芽和愈伤继续增殖培养;在壮苗阶段,制定分级标准,达到一定规格的进行生根培养,小芽和愈伤继续进行增殖或壮苗培养。

2 结果与分析

2.1 不同激素配比对组培苗增殖的影响

挑选生长健壮的丛生芽,保留基部愈伤组织 2/3 左右,以 2 ~ 3 株/丛的团块转入增殖培养基,培养 5 周观察生长情况进行统计。不同激素组合对黑麦冬的增殖率和长势影响不同 (表 1)。随着 6-BA 浓度的增加 (1 ~ 6 mg/L),增殖系数随之增加。6-BA 浓度提高 3 mg/L 时,增殖率可以达到 100%;当 6-BA 浓度达到 4 mg/L 时,增殖系数可以达到 2.8,生长状态良好,同时添加 0.4 mg/L 的 NAA 可以促进组培苗抽叶 (图 1-A);当 6-BA 浓度提高到 5 ~ 6 mg/L 时,增殖系数虽然分别达到 2.8 和 3.1,芽点较多,但丛生芽有僵化、玻璃化趋势,影响正常生长。因此选用培养基 MS + 6 - BA 4 mg/L + NAA 0.4 mg/L 为金叶苔草继代增殖的最佳培养基。

2.2 不同切割方法对组培苗增殖的影响

由表 2 可知,不同的切割方式对组培苗的增殖效率和生

收稿日期:2013-06-09

基金项目:珍稀树种苗木培育技术推广项目 (编号:桂林科字[2011]第 02 号)。

作者简介:王华宇 (1981—),男,河南南阳人,硕士,工程师,从事植物组织培养和园艺栽培学研究。E-mail:hywangsky@163.com。

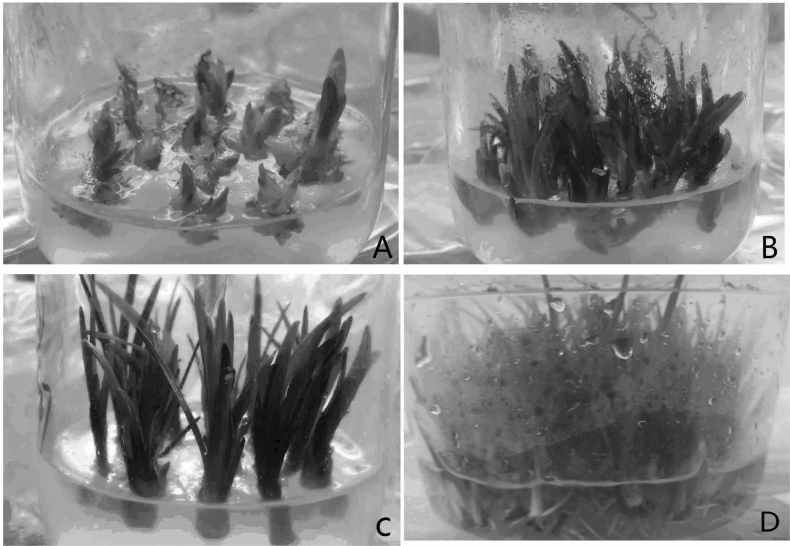
长状况影响较大。单芽的方式接种,产生的芽点少,增殖率只有 83%,且生长势差,有黄叶出现。采用丛芽接种的方式时,全部切除愈伤后会产生较多新的愈伤,但芽点较少;全部保留

愈伤组织,老化的组织变为黑褐色,阻碍营养吸收,影响增殖。基部保留 2/3 愈伤组织的情况下,新生的芽点数量和生长状态最佳。

表 1 不同激素配比对黑麦冬组培苗增殖的影响

培养基(mg/L)	接种数(株)	增殖率(%)	增殖系数	芽生长状况
MS+6-BA 1+NAA 0.1	150	94	1.4	芽点少,苗细,长势弱
MS+6-BA 2+NAA 0.2	150	98	1.9	芽点较少,苗细
MS+6-BA 3+NAA 0.3	150	100	2.3	芽点较多,较粗壮
MS+6-BA 4+NAA 0.4	150	100	2.8	芽点多,苗粗壮
MS+6-BA 4	150	100	2.7	芽点多,抽叶较少
MS+6-BA 5+NAA 0.5	150	100	2.8	芽点多,稍有玻璃化
MS+6-BA 6+NAA 0.6	150	100	3.1	芽点多,有玻璃化

注:增殖率=(增殖株数/接种数)×100%;增殖系数=增殖芽数/出芽株数。表 2、表 3 同。



A—黑麦冬增殖苗; B—壮苗阶段; C—生根阶段; D—出货阶段

图1 黑麦冬组培苗不同阶段生长情况

表 2 不同切割方法对黑麦冬组培苗增殖的影响

切割方式	接种数(株)	增殖率(%)	芽生长状况
单芽	100	83	芽点少,有黄叶
2~3 株/丛(切除基部愈伤)	100	100	新生芽点少,有新愈伤形成
2~3 株/丛(基部愈伤留 2/3)	100	100	芽点多,有新愈伤形成
2~3 株/丛(基部愈伤全留)	100	100	芽点多,有黑褐色愈伤

2.3 不同壮苗培养基对试管苗生长的影响

选取高度 2 cm 以上的丛生芽接入不同的壮苗培养基中,每瓶接种 10 丛,培养 5 周时进行观察统计。如表 3 所示,不同的壮苗培养基具有不同的增殖系数,6-BA 浓度的对组培苗的增殖系数和生长状况影响很大。当不添加 6-BA 或浓度不高于 1 mg/L 时,抽出的苗较细弱,生长势较弱,愈伤组织

分化较慢;当 6-BA 浓度达到 2 mg/L 时,组培苗粗壮,芽点抽出较多且生长势良好(如图 1-B);当 6-BA 浓度达到 3 mg/L 时,植株矮化且愈伤化比较严重,不利于后期生根。综合丛生芽的株高和长势情况,选取 MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L 为金叶苔草的壮苗培养基。通过壮苗阶段,可以提高金叶苔草种苗的质量和一致性,有利于后期生根。

表 3 不同激素配比对黑麦冬壮苗的影响

培养基(mg/L)	接种数(株)	增殖系数	生长状况
MS	150	1.1	苗极细,愈伤组织抽芽慢,黄叶多
MS+6-BA 0.5+NAA 0.05	150	1.2	苗细,愈伤组织抽芽慢,有黄叶
MS+6-BA 1+NAA 0.1	150	1.5	苗较细,芽点抽出较均匀
MS+6-BA 2+NAA 0.2	150	1.8	苗粗壮,芽点抽出均匀
MS+6-BA 3+NAA 0.3	150	2.3	苗粗壮,矮化,愈伤组织多

2.4 不同激素种类和浓度对试管苗生根的影响

当壮苗培养 5 周时,选取高度 3 cm 以上的植株切去基部愈伤组织,转接入生根培养基进行生根培养(图 1-C),培养 6 周后进行统计。由表 4 可以看出,当选择 NAA 和 IBA 配合使用时,黑麦冬根系发达,生根率达到 93%,且试管苗长势良好(图 1-D)。单独添加 NAA 时,浓度从 0.05 mg/L 递增至

0.2 mg/L,生根率随之增加,但浓度达到 0.15 mg/L 时,基部会有愈伤组织产生,影响根系质量。单独添加 IBA 0.1 mg/L 时,效果比较微弱,生根率只有 73%。当配合 NAA 使用,选用培养基 1/2MS + NAA 0.1 mg/L + IBA 0.1 mg/L 时,可以得到最佳的生根效果。

表 4 不同植物生长调节剂对黑麦冬组培苗生根的影响

培养基(mg/L)	接种数(株)	生根系数	生根率(%)	根系生长状况
1/2MS + NAA 0.05	100	4.1	85	一致性差,根较细长
1/2MS + NAA 0.1	100	4.7	89	一致性较好,根较粗壮
1/2MS + IBA 0.1	100	3.9	73	一致性差,根细长
1/2MS + NAA 0.1 + IBA 0.1	100	5.1	93	一致性好,根粗壮
1/2MS + NAA 0.15	100	5.0	91	一致性较好,有愈伤组织
1/2MS + NAA 0.2	100	4.7	93	有愈伤组织,根粗短

注:生根率=(生根株数/接种数)×100%;生根系数=生根数量/接种株数。

2.5 不同光照强度对组培苗生长的影响

对组培苗增殖阶段进行报纸覆盖遮光、调整日光灯数量和功率进行光照强度设置,培养 5 周后,进行观察统计。从表 5 中可以看出,在完全散射光条件(500 lx)下,增殖苗叶片较嫩叶色较浅;光照超过 1 500 lx 又不利于黑麦冬的伸长生长。选择光照强度 800~1 300 lx 光照,12 h/d 作为培养条件,可以实现试管苗的正常生长,并能够达到最大的增殖效率和较大的生长量。据测算,封闭工厂化组培中水电费约占组培成本的 45%,其中主要是电费^[5]。所以降低光照强度对于降低生产成本具有重要意义。

表 5 不同光照强度对黑麦冬增殖的影响

光照强度(lx)	样本数(株)	死亡率(%)	试管苗生长情况
500	260	1.2	株高 3~4 cm,叶片较嫩,有玻璃化
800~1 300	260	0	株高 3~4 cm,植株健壮,长势良好
1 500~2 000	260	0	株高约 3 cm,植株健壮,有黄叶
2 000~3 000	260	4.1	株高 2~3 cm,长势差,有黄叶

2.6 试管苗分级对工厂化生产的影响

在增殖和壮苗过程中,依据组培苗的高度、愈伤和芽点的情况进行分级,有利于减少接种材料的浪费、提高接种效率,从而得到一致性较好的种苗。分级标准和操作方式如表 6 所示。

表 6 黑麦冬增殖阶段和壮苗阶段的分级标准和处理方式

样本状态	处理标准	处理方式
增殖阶段	高度≥2 cm	2~3 株/丛转入壮苗培养基
	高度<2 cm	带愈伤组织小团块转入增殖培养基
壮苗阶段	高度≥4 cm	单株转入生根培养基
	高度≥2 cm	2~3 株/丛转入壮苗培养基
	高度<2 cm	带愈伤组织小团块转入增殖培养基

2.7 生产工艺

黑麦冬工厂化生产工艺流程如图 2 所示。

3 结论与讨论

黑麦冬的增殖系数相对较低,本试验中增殖系数达到 2.8,与此前报道结果相符^[1]。如果继续增高 6-BA 浓度,增殖系数稍有提高,但组培苗会出现玻璃化趋势,所以减少接种材料的浪费,对于规模化生产显得尤为重要。通过对比试验,发现保留基部愈伤组织 2/3 左右,以 2~3 株/丛的团块增殖,

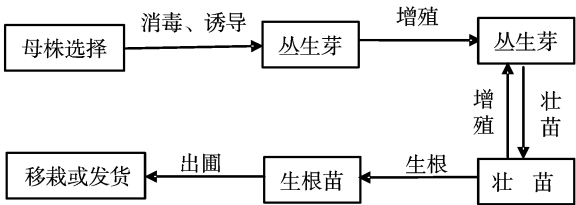


图2 黑麦冬工厂化生产工艺流程

可有效地减少材料浪费,提高接种效率。

在组培过程中针对组培苗的不同阶段,制定分级标准对提高生产效率、生产标准一致的种苗非常重要。在石斛的组培生产中,早已有类似的标准^[6-7]。本试验中针对增殖和壮苗环节制定了筛选标准,有利于优化生产流程、合理使用接种材料。若在后期生根环节进行种苗规格分级,可得到一致性较好的移栽苗,便于进行管理和出售。

在上述研究的基础上,进行了黑麦冬种苗的规模化生产,生产出种性一致的种苗 20 余万株,为进一步推广黑麦冬的应用奠定了种源基础。目前黑麦冬组培苗以外销居多,国内园林应用尚为稀少,但黑麦冬以其特殊的叶色及其良好的适应性,有望成为我国广大地区的优良地被植物。

致谢:本研究中的试验材料和技术方法得到了上海师范大学郑志仁博士的大力帮助,在此表示衷心感谢!

参考文献:

[1] 郑志仁,娄玉霞,钱宇,等. 黑麦冬的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2008,44(1):119-120.
[2] 雷加容,余金龙,罗红蓉,等. 麦冬组培与快速繁殖技术研究[J]. 西南农业学报,2005,18(3):368-369.
[3] 王蔚,高山林,刘蓁,等. 川麦冬脱病毒和组织培养技术的研究[J]. 药物生物技术,2006,13(4):274-278.
[4] 曾守君,吴坤林,陈国华,等. 矮生沿阶草的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2004,40(3):350.
[5] 谢玲玲,王尔惠. 工厂化生产组培苗的成本控制技术[J]. 湖北农业科学,2007,46(1):30-32.
[6] 化海霞,郑志仁,王莉莉,等. 铁皮石斛试管种苗分级标准研究[J]. 上海农业学报,2012,28(2):41-44.
[7] 孙志蓉,陈明颖,王美云,等. 环草石斛试管苗生长节律及分级标准研究[J]. 中草药,2009,40(3):443-447.