

# 脱毒食用仙人掌工厂化快繁技术研究

艾鹏飞, 魏景芳 (河北科技大学生物科学与工程学院, 河北石家庄 050018)

**摘要** 试验结果表明: '米帮塔' 幼龄掌片上的刺座芽块经 70% 酒精 30 s, 0.1%  $\text{HgCl}_2$  浸泡 10 min, 无菌水漂洗 4~5 遍后切下芽体(约 5 mm)接种到含 6-BA 1.0 mg/L 和 NAA 0.1 mg/L 的 MS 培养基中, 萌发的新芽接种到 6-BA 0.5 mg/L 和 NAA 0.05 mg/L 的 MS 培养基中继代培养 4 周, 增殖倍数超过 10; 新梢转接到含 NAA 0.1 mg/L 的 1/2MS 培养基中诱导生根, 生根率 100%; 生根的试管苗移栽到蛭石: 砂土 = 1:1 的混合基质中成活后移植到大田, 成活率 95% 以上。研究结果为脱毒食用仙人掌种苗的工厂化快繁提供技术支持。

**关键词** 食用仙人掌; 组织培养; 快速繁殖

**中图分类号** S339.4 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2006)03-0446-02

## Study on Rapid Propagation of Virus-free *Opuntia milpa alta* Haw.

AI Peng-fei et al (College of Biological Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018)

**Abstract** Effects of key factors for rapid propagation of virus-free *Opuntia milpa alta* Haw. were studied. And the result showed latent buds under the spine-base of *Opuntia milpa alta* Haw., as explants, were dipped in  $\text{HgCl}_2$  for 10 min following sterilize in alcohol solution 70% for 30 s and rinsed in sterile water for 4~5 times. Bud-tips, 5 mm in size, that were incised from those latent buds, were primitively cultured in MS medium supplemented with 6-BA 1.0 mg/L and NAA 0.1 mg/L. After germination, the sprouts were subcultured in MS medium added with 6-BA 0.5 mg/L and NAA 0.05 mg/L for multiplication and growth of shoots at a 10-fold rate after 4 weeks. And these shoots were cultured in 1/2MS medium with NAA 0.1 mg/L and produced rootlets at up to 100%. After that, the plantlets were transplanted to mixed materials composed with vermiculite and sand in equal proportion for days and planted in field with up to 95% survival. Thus, the simple and reliable protocol provided a strategy for high frequency propagation of virus-free cactus.

**Key words** *Opuntia milpa alta* Haw.; Plant tissue culture; High frequency propagation

食用仙人掌 (*Opuntia dillenii* Haw.) 含丰富的蛋白质、矿物质和多种维生素, 集食用、观赏、医疗和保健于一体, 且易于栽培, 成本低, 是一种良好的无害绿色新型蔬菜, 开发前景广阔<sup>[1]</sup>。但其常用分株法繁殖种苗, 自然繁殖率低<sup>[2]</sup>。最近, 通过组织培养快速繁殖食用仙人掌种苗的研究已获得成功, 但其成本偏高, 在实际生产中难于推广和应用<sup>[3,4]</sup>。笔者选用食用白砂糖代替蔗糖、价格低廉的激素成分, 以降低生产成本, 为实现脱毒食用仙人掌工厂化快繁提供技术支持。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 河北省高邑北方园艺中心大棚栽培的 '米帮塔' 食用仙人掌 (*Opuntia milpa alta* Haw.), 种源引自墨西哥。

### 1.2 方法

**1.2.1 外植体处理。** 选取幼龄 (10~30 日龄) 的掌片, 分别切取不同部位的带 1 个刺座芽的茎块 (约 1  $\text{cm}^3$ ) 自来水冲洗 30 min, 滤纸吸干。在超净工作台上灭菌处理: 70% 酒精 30 s, 无菌水漂洗 1 遍, 0.1%  $\text{HgCl}_2$  浸泡不同时间后无菌水漂洗 4~5 遍。

**1.2.2 芽的诱导和分化。** 切除刺座基部多余的部分, 芽体约 5 mm 接种到含不同浓度的 6-BA 和 NAA 的 MS 培养基中。其中, 灭菌效果和取材部位的处理均接种在含 6-BA 1.0 mg/L 和 IAA 0.1 mg/L 的 MS 培养基中。

**1.2.3 芽的增殖和生长。** 将诱导的新芽接种到附加不同浓度的 6-BA 和 IAA 的 MS 培养基中。

**1.2.4 试管苗的生根。** 将高度超过 2 cm 的新梢从基部切取后转接到添加有不同浓度 NAA 的 1/2MS + 蔗糖 20 g/L + 琼脂 6 g/L 的培养基中, 暗培养 1 周后转移到正常光照下。4 周后调查生根情况。

**1.2.5 试管苗的移栽。** 生根试管苗开瓶 5~7 d 后假植到过

渡移栽基质, 保湿。以上处理的培养基中均添加有白砂糖 30 g/L 和琼脂 7 g/L, pH 值 5.8 (除特殊说明外)。培养条件: 温度 (25 ± 2) °C, 光照 16 h/d, 光强 1 500~2 000 lx。每处理接种材料 30 个, 重复 3 次, 4 周后统计萌发或生长情况。

## 2 结果与分析

**2.1  $\text{HgCl}_2$  灭菌时间对萌发成活率的影响** 试验表明 (表 1): 芽体经 0.1%  $\text{HgCl}_2$  处理 5 min 的材料近一半在培养中细菌死亡, 成活率仅 56.7%; 处理 15 min 的材料也有部分被  $\text{HgCl}_2$  杀死, 成活率 73.6%; 处理 10 min 较适当, 萌发成活率最高达 98.9%, 达显著性水平 ( $p < 0.05$ )。以后的灭菌时间都采用 10 min。

表 1  $\text{HgCl}_2$  处理时间对食用仙人掌萌发成活率的影响

处理	时间//min	成活率//%
1	5	56.7 b
2	10	98.9 a
3	15	73.6 b

注: 英文字母表示经邓肯氏新复极差法检验在  $p = 0.05$  水平上的差异显著性。下表同。

**2.2 外植体的取材部位对芽萌发生长的影响** 食用仙人掌形态特殊, 茎膨大成掌状, 内含大量的贮水组织, 取材时宜选用幼龄的嫩掌片 (30 日龄内)。试验结果表明 (表 2): 掌片上不同部位的刺座芽灭菌后诱导培养的萌发生长情况, 顶部和边缘茎块上的刺座芽萌发率都在 95% 以上, 明显高于中部的。这一现象可能与不同部位的芽体内部生理条件有关, 具体原因还有待探讨。

表 2 不同取材部位对食用仙人掌芽萌发生长的影响

取材部位	外植体数	萌发的芽数	诱导率//%
顶部	65	64	98.4 a
边缘	68	66	97.1 a
中部	63	31	49.2 b

**2.3 不同培养基对外植体萌发生长的影响** 表 3 显示, 不同的培养基对食用仙人掌芽的诱导萌发效果不一样, 其中在

**基金项目** 石家庄市科技局项目 (02149045A)。

**作者简介** 艾鹏飞 (1974-), 男, 湖北潜江人, 博士, 副教授, 从事植物细胞工程与分子生物学研究。

**收稿日期** 2005-09-06

含 0.1 mg/L NAA + 1.0 mg/L 或 2.0 mg/L 6-BA 的萌发率最高, 较其他培养基处理呈显著性差异 ( $p < 0.05$ )。但在添加有 0.1 mg/L NAA 和 2.0 mg/L 6-BA 的培养基中萌发生长的芽体基部带有少量的愈伤组织, 这易引起遗传变异。故选用添加 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 进行仙人掌茎块刺座芽的诱导更理想。

表 3 不同培养基对食用仙人掌芽诱导萌发的影响

培养基	激素 // mg/L		萌发率 // %
	6-BA	NAA	
MS	0	0.1	9.6 d
MS	0.5	0.1	34.5 c
MS	1.0	0.1	98.4 a
MS	2.0	0.1	99.6 a
MS	0	0.3	11.2 d
MS	0.5	0.3	65.3 bc
MS	1.0	0.3	81.2 ab
MS	2.0	0.3	53.1 c

**2.4 不同培养基对新芽增殖和生长的影响** 初代萌发的新芽(约 1 cm)继代到添加有不同浓度的 6-BA 和 NAA 组合中培养(激素组合: A, 6-BA 0 mg/L + IAA 0.1 mg/L; B, 6-BA 0.5 mg/L + IAA 0.05 mg/L; C, 6-BA 0.5 mg/L + IAA 0.1 mg/L; D, 6-BA 1.0 mg/L + IAA 0.05 mg/L; E, 6-BA 1.0 mg/L + IAA 0.1 mg/L; F, 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L; G, 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L), 结果见图 1。组合 B、C、D、F 中的增殖倍数(每外植体增殖的新梢数)都较高, 在 10 倍以上; 组合 A、C、F 中的有效新梢率(高度超过 2 cm 的新梢数占总新梢数的百分比)都超过 80%。实际生产中, 在诱导出较多新梢的基础上又要保证较高比例的有效新梢, 故组合 C 和 F 较可取。组合 C 和 F 相比较, 组合 F 中采用 NAA 0.05 mg/L 替代了组合 C 中的 IAA 0.1 mg/L, 本着经济的原则, 在实际生产中宜采用组合 F(6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L)进行仙人掌种苗规模化生产(图 2)。

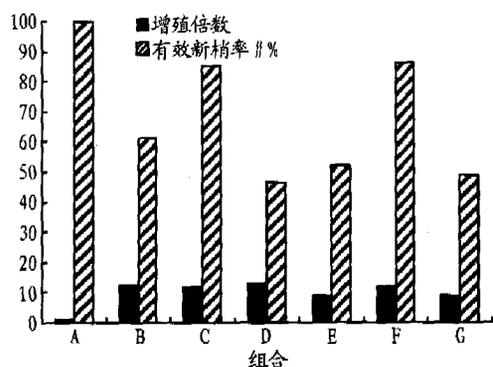


图 1 不同的培养基对食用仙人掌芽增殖和生长的影响

**2.5 不同培养基对试管苗生根的影响** 表 4 显示, 食用仙人掌易生根, 在没有 NAA 的条件下即能达到较高的生根率 (75.3%), 但其平均根条数较少 (1.8 条); 在其他 3 种添加有 NAA 的培养基中都能 100% 生根, 根条数也较多 (6 条以上), 但当 NAA 浓度为 1.0 mg/L 时, 生根试管苗的基部长出较多的愈伤, 长势弱 (基本停止生长); 在 NAA 浓度 0.1 和 0.5 mg/L 的培养基中, 苗仍然保持较强的生长势 (继续生长), 就其 NAA 的用量而言, 实际生产中, 以 0.1 mg/L 较经济 (图 3)。



图 2 仙人掌‘米帮塔’新梢继代培养(4周)



图 3 仙人掌‘米帮塔’试管苗诱导生根(2周)

表 4 不同培养基对食用仙人掌试管苗生根的影响

培养基	NAA // mg/L	生根率 // %	平均根条数	试管苗长势
1/2 MS	0	75.3	1.8	+
1/2 MS	0.1	100	6.3	+++
1/2 MS	0.5	100	7.8	++
1/2 MS	1.0	100	9.1	

注: “+”表示生根的试管苗长势的强度。

**2.6 生根试管苗移栽** 将生根培养 30 d 达到移栽标准的试管苗在培养室打开瓶口 5~7 d, 适应外界环境后移到过渡基质, 即蛭石: 砂土 = 1:1 的混合基质中。移栽后喷少量水, 保持相对湿度 80% 左右, 成活率高达 95%。

**2.7 仙人掌试管苗种苗的大田移植** 在生根培养基上, 小仙人掌并不直接表现出自然状态下的“掌片状”, 而呈“扁棒状”。但当其带土移植到大田 60 d 后, 根系迅速生长扩大, 营养状况得到加强, 生长旺盛, 棒状的小肉质茎上迅速发出第一批恢复掌片状的子茎, 子茎茎片明显增大, 此后发出的各级掌片层层增大, 商品性好。

### 3 结论

通过离体培养食用仙人掌的刺座芽, 直接诱导分化丛芽, 这种“芽生芽”的快繁方式, 保持了原品种优良种性, 成功攻克了食用仙人掌繁殖困难的技术难题, 可在短时间内繁殖出大量供生产用的种苗, 从而实现其工厂化生产, 商品化供应。

试验表明, 食用仙人掌工厂化快繁技术流程如下: 幼龄掌片上的刺座芽块经 70% 酒精 30 s, 0.1%  $HgCl_2$  浸泡 10 min, 无菌水漂洗 4~5 遍后切取大小约 5 mm 芽体, 接种到含 6-BA 1.0 mg/L 和 NAA 0.1 mg/L 的 MS 培养基中, 萌发的新芽接种到 6-BA 0.5 mg/L 和 NAA 0.05 mg/L 的 MS 培养基中继代培养, 增殖生长的新梢转接到含 NAA 0.1 mg/L 的 1/2MS 培养基

(下转第 486 页)

表1 益生菌对三黄鸡体重的影响 g/羽

时间	对照组	试验组
初生	26.12 ± 0.09	26.04 ± 0.07
1周龄末	36.21 ± 0.14	37.30 ± 0.15*
2周龄末	55.88 ± 0.50	57.62 ± 0.25
3周龄末	86.94 ± 0.03	93.82 ± 0.28**
4周龄末	125.27 ± 2.14	135.60 ± 0.82*
5周龄末	157.64 ± 0.45	180.28 ± 0.74**
6周龄末	229.82 ± 2.02	255.50 ± 1.32**

注: \*表示与对照组差异显著( $P < 0.05$ ), \*\*表示与对照组差异极显著( $P < 0.01$ )。下同。

表2 益生菌对三黄鸡采食量、增重及料重比的影响

时间	平均日采食量//g/羽		平均日增重//g/羽		耗料/增重	
	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组
第1周	3.24 ± 0.00	3.07 ± 0.00	1.44 ± 0.06	1.61 ± 0.09**	2.25 ± 0.01	1.91 ± 0.02**
第2周	6.71 ± 0.005	6.53 ± 0.00	2.81 ± 0.37	2.90 ± 0.10	2.39 ± 0.03	2.25 ± 0.01
第3周	10.73 ± 0.01	10.53 ± 0.02	4.44 ± 0.47	5.17 ± 0.03**	2.42 ± 0.05	2.03 ± 0.03*
第4周	13.54 ± 0.05	13.93 ± 0.01	5.48 ± 2.11	5.97 ± 1.10	2.47 ± 0.09	2.33 ± 0.05
第5周	15.49 ± 0.08	19.20 ± 0.03	4.62 ± 1.68	6.38 ± 1.56*	3.35 ± 0.28	3.01 ± 0.13
第6周	25.89 ± 0.10	24.16 ± 0.09	10.31 ± 1.56	10.75 ± 0.58*	2.51 ± 0.01	2.25 ± 0.08*
0~6周	12.60 ± 0.04	12.90 ± 0.02	4.85 ± 1.94	5.46 ± 1.26**	2.60 ± 0.03	2.36 ± 0.05*

表3 三黄鸡健康状况

组别	总数//羽	腹泻死亡总数//羽	腹泻死亡率//%
对照组	780	25	3.20
试验组	780	19	2.44

表4 益生菌对三黄鸡肠道主要菌群浓度的影响 lgCFU/g

组别	空肠细菌计数		盲肠细菌计数	
	大肠杆菌	乳酸菌	大肠杆菌	乳酸菌
对照组	7.25 ± 0.065	6.28 ± 0.31	8.93 ± 0.31	8.17 ± 0.25
试验组	5.25 ± 0.24*	7.29 ± 0.02	6.65 ± 0.08*	9.09 ± 0.02

### 3 讨论与结论

**3.1 讨论** 事实上,动物只有处于健康状态下才能使机体的其他功能(如消化功能等)增强,发挥出最大的生产潜力。在饲料中添加益生菌的目的是通过增加动物消化道内的有益菌数量来抑制有害菌的生长繁殖,促进动物肠道内的微生态平衡,促进动物健康生长。此次试验使用的益生菌由植物乳杆菌和芽胞杆菌组成。植物乳杆菌是兼性乳酸杆菌的一种,能迅速地将单糖转化为乳酸,降低肠道的pH值,从而抑制大肠杆菌等有害菌的生长。芽胞杆菌是一类需氧菌,抗逆性强,耐酸、碱、热,主要作用是消耗肠道中的氧气,给乳酸菌创造缺氧的生长环境;同时能将淀粉转化为单糖,供乳酸菌利用,而且还具有较强的蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶活性,促进动

### 2.2 益生菌对三黄鸡健康状况及其肠道主要菌群的影响

表3显示,在整个试验期间,试验组和对照组的腹泻死亡总数都很少,两组间的腹泻死亡率差异不大。表4显示,试验组空肠和盲肠的大肠杆菌浓度分别比对照组低27.61% ( $P < 0.05$ )和25.57% ( $P < 0.05$ );乳酸菌浓度分别比对照组高16.12% ( $P > 0.05$ )和11.28% ( $P > 0.05$ )。结果表明,使用该种益生菌能明显地抑制肠道有害菌的生长,同时还增加了有益菌的数量,从而维持了肠道的微生态平衡,减少腹泻,促进雏鸡健康生长。

物对营养物质的利用。因此,这两种菌进入动物消化道后起着相互协同和促进的作用<sup>[1,4,5]</sup>。此次试验结果表明,使用益生菌使乳酸菌的数量远远大于大肠杆菌的数量(大于100倍),成为肠道的优势菌,有效地维持了肠道的微生态平衡;雏鸡的增重和饲料转化率提高的结果进一步证实了该种益生菌的作用效果。

试验中,益生菌降低腹泻发生率和死亡率的效果不显著,主要原因可能是试验期间的饲养管理控制得比较严格,从根本上减少了鸡群感染疾病的机会。

**3.2 结论** 乳酸杆菌和芽胞杆菌复合益生菌对0~6周龄三黄鸡有明显的促生长作用,并能显著地提高饲料利用率,有效地改善肠道内的微生态平衡。由此表明植物乳杆菌和芽胞杆菌复合益生菌可以作为一种有效的绿色饲料添加剂,用于三黄鸡的规模化无公害生产。

### 参考文献

- 张庆华. 益生菌在饲料中的应用[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(2): 47-48.
- 王冉, 邵春荣, 胡来根, 等. 益生菌在肉鸡中替代抗生素的试验[J]. 饲料研究, 2002, (1): 15-17.
- 陈永秉编著. 数理统计浅说[M]. 北京: 农业出版社, 1983.
- 杨洁彬, 郭兴华, 凌代文, 等编. 乳酸菌——生物学基础及应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996.
- Giraud E, Brauman A, Keleke S, et al. Isolation and physiological study of an arylyolytic strain of *Lactobacillus plantarum*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1991, 36: 379-383.

(上接第447页)

中诱导生根后炼苗、移栽和移植。这样,成苗率高,成本低。

通常,植物幼嫩的茎尖分生组织,病毒难以入侵,且茎尖中含有高水平的内源生长素,可抑制病毒增殖。该试验由茎尖再生植株,生长旺盛、叶色浓绿、整齐,可能无病毒,具体情况有待进一步试验证实。

### 参考文献

- 雷中英, 雷泽湘. 新型蔬菜食用仙人掌的开发利用[J]. 湖北农业科学, 2001, (5): 66-67.
- 戴幼斌, 杨海兵. 食用仙人掌的引种栽培技术[J]. 长江蔬菜, 2000, (10): 12-14.
- 陈丽静, 潘英, 马慧, 等. 食用仙人掌的离体培养及其快速繁殖[J]. 园艺学报, 2001, 28(4): 327-330.
- 赵长增, 陆璐, 陈佰鸿. 食用仙人掌“米帮塔”的试管快繁[J]. 园艺学报, 2003, 30(5): 609-611.