

# 西和县半夏种茎组培生产技术的理论与实践

吴二牛,张英魁,王进贤

(西和县农牧局,甘肃 西和 742100)

**摘要:**本文通过半夏组培项目的实施,实践证明半夏种茎组培是扩大种群数量、获得无病株系的有效之举,克服大田瓶颈因素的最佳途径。

**关键词:**半夏;种茎组培;途径

## 一、在半夏组培生产中取得的生产技术体系

(一)技术路线及现状 组织培养是指从体内取出器官(部分)、组织和细胞,模拟体内生理环境,在无菌、适当温度和一定培养条件下,使之生存、生长,维持其正常结构和功能的方法。

西和半夏组培按照组织培养操作程序,从种茎选择整理、初代培养、脱分化、再分化、愈伤组织、继代培养、丛生芽至炼苗移栽生产超级原种、原种的整个生产线均已实现预定目标,年配制培养基1.2万升(12万瓶),年生产无性系苗条10万瓶(120万株),年生产超级原种100万粒。西和县半夏种茎组培生产能力、生产规模及生产线的标准化程度达到了设计目标。

### (二)主要技术体系

第一,培养基配制。以MS培养基为基础,根据半夏生长发育规律与特性,设置18个处理,从中筛选出了3个不同季节、不同培养目标的改进型培养基。

第二,培养材料的采集。选择原则:性状型、带菌少(即田间植株无病症、病状)、易于诱导的2年~3年生块茎。从外界或室内选取的植物材料,都不同程度地带有各种微生物。一是将采来的植物材料除去不用的部分,将块茎细洗干净,如用适当的刷子等刷洗。洗时可加入的是表面活性物质——吐温80,然后再用自来水冲净附着在块茎表面的污物,除去脂质性的物质,便于灭菌液的直接接触。二是对材料的表面浸润灭菌。要在超净台内完成,准备好消毒的烧杯、玻璃棒、75%酒精、消毒液、无菌水、手表等。用75%酒精浸10秒~15秒。由于酒精具有使植物材料表面被浸湿的作用,加之75%酒精穿透力强,也很易杀伤植物细胞,所以浸润时间不能过长。三是用灭菌剂处理。表面灭菌剂的种类较多,可根据情况选取表1中的1种~2种使用。四是用无菌水涮洗,涮洗要每次3分钟左右,视采用的消毒液种类,涮洗3次~10次左右。

第三,接种初代培养外植体和快繁体系建设。一是接种。在无菌环境下,将处理好的块茎立即接在培养基上,每瓶接种1个,以防止交叉污染。二是封口。接种后,瓶、管仍用原无菌封口膜、双皮筋封口。三是温度。培养基大多应保持在18℃~25℃左

表1. 灭菌剂使用及效果

灭菌剂	使用浓度 (%)	持续时间 (分钟)	去除的难易	效果
次氯酸钙	9~10	5~30	易	很好
次氯酸钠	2	5~30	易	很好
氯化汞	0.1~1	5~8	较难	最好
抗菌素	4毫克/升~ 50毫克/升	30~60	中	较好

右。四是继代培养建立快繁殖体系。待块茎萌芽之后,对出早芽、晚芽及污染的全部淘汰,芽长至0.5厘米~1厘米时,剪取0.3厘米~0.6厘米芽尖进行脱分化、再分化培养愈伤组织,建立快繁体系。外植体的增殖是组培的关键阶段,在新梢等形成后为了扩大繁殖系数,需要继代培养。把材料分株或切段转入增殖培养基中,增殖培养基一般在分化培养基上加以改良,以利于增殖率的提高。增殖培养1个月左右后,可视情况进行再增殖。五是根的诱导。转到生根培养基上,进行生根培养继代培养,3个月后即可获得健壮根系的无性系苗。

第四,组培苗的炼苗移栽。试管苗从无菌到光、温、湿稳定的环境进入自然环境,必须进行炼苗。一般移植前,先将培养容器打开,于室内自然光照下放3天,然后取出小苗,用自来水把根系上的培养基冲洗干净,再栽入已准备好的基质中,基质使用前最好消毒。移栽前要适当遮荫,加强水分管理,保持较高的空气湿度(相对湿度95%左右),但基质不宜过湿,以防烂苗。

## 二、在半夏组培的关键性技术上取得的成效

(一)科学合理的材料整理达到了纯化品种的目的 自2003年4月中旬起,从当地野生驯化过来的主种品种之中,选择10万粒性状典型的半夏种茎,在2004年3月建成立0.03公顷选种圃。自出苗至收获期间,以植物学特征特性典型、无病症为标准,自出苗至封行之期,共选择了1万株,在此1万株中通过去杂去劣,到收获期入选的单株仅为0.32株,0.316万粒种茎。2005年1月用所选择的种茎进行外植体培养,用芽尖组织培养建立快繁体系、增殖培养无性系苗、炼苗移栽生产超级原种以及超级原种大田扩繁等可控条件之下又经严格的单株选择混合繁殖,遴选出了具有以下性状的品系40万粒。

第一,根。半夏为须根。种子繁殖初生根3根~5根,次生根



变化较大一般在6根~11根之间;用茎繁殖不定根一般为8根~14根。

第二,茎。种子发芽之后,茎基生变态成块茎,在大田生产中难见茎的存在。

第三,叶。叶基生,叶片全缘。一年生为单叶,卵状心形;2年~3年生为3小叶的复叶,卵状椭圆形,1.5厘米~3.2厘米,中间一片略大;网状叶脉,叶柄长8厘米~22厘米,基部有1个~2个株芽。

第四,花。单性同株,花萼长28厘米~35厘米,肉穗花序,下部为雌花,中部不育,上部为雄花,花序上端延伸鼠尾状物伸出佛焰苞之外;花期5月~7月。

第五,果。为浆果,卵形,8月成熟,成熟后为褐红色。

总之,通过该项目所生产的“西和半夏”内在品质和理化质量具有明显的地道性,植物学特征特性、药用部位的感官与《中药鉴学》、《中国药典2005年版一部》所载相同,是具有十分明显的形态特征的新品系。

(二)选育获得了不带病原物的繁殖体系 无论任何植物在自然界中都有一定数目的抗病个体。半夏大田病害严重、种茎种性退化是客观现实,究其原因种茎带菌、带毒所致。西和半夏种茎组培生产,在如上所述的培养材料选择的基础上,着重通过以下几方面的选择与整理选育无病个体。

第一,外植体选育。在种茎组培生产的3年之中,以单株选育混合繁殖的所生产的种茎为接种材料,共接种1.9万瓶。

表2. 外植体培养与选育个体统计

接种时节	组养个数(瓶)	选出的不带病的个体数(个)	百分率(%)
2005年元月	512	14	2.734375
2005年4月	5819	193	3.316721
2005年8月	8130	254	3.124231
2006年1月	3204	122	3.80774
2006年4月	1550	43	2.774194
合计	19215	626	3.257871

上述统计结果表明:从大田栽培品种之中,按照既定标准所选的半夏种茎,接种培养外植体19215个(瓶),其中不带病原物或带病原物极少的个体约为3.33%,这足以说明当地半夏种茎退化的原因及大田生产制约因素。严格的外植体选育,为无病品系建立、项目建成奠定了基础。

第二,愈伤组织选育。将外植体的芽尖、叶柄、叶片放在培养基里,伤口之处产生愈伤组织,芽尖继续生长发育,在此过程之中,有的外植体未能表现出的病症开始显症,严格淘汰由内生菌(主指病原物)、环境引起的污染。通过大量的统计,总体污染率为13.7%,其中由病原物引起的为8.26%,由操作及环境污染的为4.44%。

第三,中间增殖选育。在此间的选择包括丛芽选育与无性系苗选育两方面,以愈伤选育建立起来的快繁体系为材料,将其

放在另一类型的培养基中,培养成丛芽或无性系苗。在此过程之中,随培养基的改变、培养代数的增加促使由内生菌引起的污染再次显症,严格淘汰由内生菌、环境引起的污染。

第四,原原种生产选育。原原种生产选育包括可控温室炼苗移栽原原种生产与大田原原种扩繁两方面的选择;此期内的选择淘汰病株、异株、杂株之外,种茎选择成为主要内容,大田原原种扩繁生产中,已有2年~3年生块茎,花、果的性状又成为新的内容标准。

通过以上四方面的选择,该项目所选出的种茎原原种确系为不带病原物的种茎,在原原种大田扩繁生产中,生长周期长,自春季出苗之后,没有倒苗、死苗现象,当至深秋季节日均气温稳定在10℃以下时开始枯萎倒苗,每个种母块茎产生2个珠芽,多者3个~4个。

(三)完善脱毒消毒体系,有效控制组培生产中的污染 从污染产生来看主要有培养成物内生菌污染、环境污染两个方面;对培养成物内生病原物的脱毒主要是通过培养材料的消毒、系统的选择为主,配以抗生素处理及外植体接种前的高温钝化;对环境条件污染通过以下几个方面控制。

第一,清洗。植物组织培养用的各种玻璃器皿,特别是培养瓶和盛培养基的器皿,一定要严格清洗,以防油污、重金属离子、酸、碱等有害物质残留在瓶内,影响培养物的生长。使用过的玻璃器皿应及时清洗,先将污物如培养基、培养物倒掉,再浸入水中,然后洗涤。玻璃器皿的洗涤,可根据器皿的污染程度和性质,采用不同的方法,通常有碱洗法和酸洗法。凡有微生物污染的器皿,必须先进行高压消毒和煮沸,以杀死菌体,否则会产生孢子飞扬,污染环境,给组织培养带来严重困难。器皿洗净后,应烘干或晾干,放在规定的地方,便于取用。

第二,消毒灭菌。一是湿热灭菌(培养基):培养基在制备后的24小时内完成灭菌工序。二是灼烧灭菌(用于无菌操作的器械):在无菌操作时,把镊子、剪子、解剖刀等浸入95%的酒精中,使用之前取出在酒精灯火焰上灼烧灭菌。冷却后,立即使用。操作中可采用250毫升或500毫升的广口瓶,放入95%的酒精,以便插入工具。三是干热灭菌(玻璃器皿及耐热用具):干热灭菌是利用烘箱加热到160℃~180℃的温度来杀死微生物。由于在干热条件下,细菌的营养细胞的抗热性大为提高,接近芽孢的抗热水平,通常采用170℃持续90分钟来灭菌。四是紫外线灭菌:在接种室、超净台上或接种箱里用紫外灯灭菌。紫外线灭菌是利用辐射因子灭菌,细菌吸收紫外线后,蛋白质和核酸发生结构变化,引起细菌的染色体变异,造成死亡。紫外线的波长为200纳米~300纳米,其中以260纳米的杀菌能力最强,但是由于紫外线穿透物质的能力很弱,所以只适于空气和物体表面的灭菌,而且要求距照射物以不超过1.2米为宜。五是熏蒸灭菌:用加热焚烧、氧化等方法,使化学药剂变为气体状态扩散到空气中,以杀死空气和物体表面的微生物。这种方法简便,只需要把消毒的空间关闭紧密即可。常用熏蒸剂是甲醛,熏蒸时,房间关闭紧密,按5毫升/立方米~8毫升/立方米用量,将甲醛(下转第33页)

菌体变形,溶解而死亡,如青霉素、杆菌肽等;损伤细菌的胞浆膜通透性,从而使菌体内的必需物质渗漏外溢,导致菌体死亡,如制霉菌素等;干扰微生物蛋白质的合成,从而产生抑制和杀灭微生物的作用,如链霉素、卡那霉素、四环素、氯霉素、红霉素等。抗生素在防治畜禽传染病、感染性疾病中起着十分重要的作用,但如果用药不当,也会产生许多不良后果。

(二)使用抗生素应对症下药,并掌握好抗生素的适应症 各种抗生素的抗菌谱有所不同,这就需要根据临床诊断,弄清畜禽致病微生物的种类及其对药物的敏感性,有条件时,还应做药敏试验,并根据畜禽症状轻重而选择对病原微生物具有高度敏感、临床疗效好、不良反应较少的抗菌素,以达到对症下药的目的,这样可以明显提高治疗效果。如对革兰氏阳性菌引起的感染,可选用青霉素、红霉素和四环素药物,对革兰氏阴性菌引起的感染,可选用链霉素、氯霉素等药物;对耐青霉素及四环素的葡萄球菌感染,可选用红霉素、卡那霉素、庆大霉素等药物;对绿脓杆菌感染可选用庆大霉素等药物。

(三)严格控制使用剂量、疗程和用药方法 畜禽患病要想达到预期治疗目的和效果,就必须严格掌握用药量,同时注意血液中的抗生素含量达到有效的浓度为准则。如果用量大小则达不到治疗目的,甚至使病原体产生耐药性;用药剂量过大,会造成浪费,甚至还会出现畜禽药物中毒发生。一般开始应用时,其剂量宜稍大,给予病原微生物以有效杀灭;对家禽急性传染病,剂量也宜稍大,肝、肾功能不良的畜禽应酌情用量。疗程要视畜禽

病情而定。传染病和感染症一般应连续用药3天~5天,直至症状消失后,切忌停药过早而导致疾病复发。

(四)要防止细菌产生耐药性 除了掌握抗生素的适应症、剂量、疗程外,还要注意将有效的各种抗生素药物分期、分批地交换使用,同时不要滥用抗生素,特别是病因不明和病毒性疾病,均不要轻易使用抗生素。一般情况下,其它药物可以治好的病不要用抗生素,一种抗生素可以治好的病,不要同时用多种抗生素,抗菌谱窄的抗生素可治好的病,不要用抗菌谱广的抗生素。

(五)防止影响免疫反应 据报道,某些抗生素在治疗疾病时能抑制免疫功能,如庆大霉素、金霉素等。此外,抗生素对某些活菌苗的主动免疫过程有干扰作用,这是由于菌苗中微生物被抑制,影响抗体产生。因此,在进行各种预防菌苗注射前后数天内,以不用抗生素为宜。

(六)应当注意抗生素的配伍禁忌和质量 有些抗生素不能和其它药物混合使用,否则要产生配伍禁忌,会出现不溶解、沉淀、变色、降低效价和失效等现象,甚至带来不良后果,所以应设法避免。如四环素不能与青霉素、磺胺嘧啶等混合使用。另外,对于已变色、潮解、结块及超过有效期的抗生素,一律不可再用。

(七)要注意经济效益,防止不良反应发生 在同等效果的前提下,要尽量选用廉价的抗生素。使用抗生素时,若畜禽出现了副作用,此时要及时停药并改用其它药物。

(责任编辑 张顺全)

(上接第31页)置于广口容器中,加5克/立方米高锰酸钾氧化挥发。熏蒸时,房间可预先喷湿以加强效果。冰醋酸也可进行加热熏蒸,但效果不如甲醛。六是喷雾灭菌(物体表面):物体表面可用一些药剂涂擦、喷雾灭菌。如桌面、墙面、双手、植物材料表面等,可用75%的酒精反复涂擦灭菌,1%~2%的来苏儿溶液以及0.25%~1%的新洁尔也可以。

第三,无菌操作。入无菌室前,要洗手,去掉指甲中的污物。入室时要穿上经过消毒的工作服、帽子、口罩和鞋子等。操作前要用75%的酒精擦洗工作人员的手,操作中要经常用酒精擦洗手。不准讲话,亦不准对着操作区呼吸,以免微生物污染材料、培养基和用具。每次重新操作都要把工具在火焰上消毒。必须在酒精灯火焰处进行操作,如打开瓶口,转接材料。盖瓶盖前应将瓶口在火焰上烧一下,再将盖子也在火焰上烧一下,然后盖上。

(四)对半夏生长发育习性的更进一步认识为其原种及大田优质丰产栽培奠定了基础 半夏,由野生至人工栽培驯化历时短促,对其生物学特征特性、病虫害威胁、良种繁育体系建立等诸方面的认识与研究,与生产要求相比较,还有一定的距离,具体表现在:一是对半夏“喜光怕强、喜水怕涝、喜温怕高、喜肥怕猛”的特性缺乏认识;二是炭疽病、紫斑病、青枯病、根腐病、病毒病、杂草的应急防治缺乏有效的控制体系;三是种茎退化严重,加之生产繁育体系不健全,导致种源不足。因此,在国内其它产区仍存在着人工栽培发展依然缓慢的客观现实。

自该项目论证之时起至目前组培种茎生产达标,在以其组培种茎生产建设为中心的同时,全面观察半夏生物特征特性,加大试验研究力度,将取得的成果用于生产示范,以提高单产为中心,强化轮作制度、控制病害威胁,加大栽培密度、确保大田群体生产力为基本点,大力推广以有机农家肥为主,配方施用氮、磷复合肥的栽培体系,使大田生产栽培技术取得突破性的改进,特别是半夏种茎组培超级原种问世,以野生资源的种性纯化为基础的良好种选育取得成功,不依赖化学农药控制病害、大力推广无公害半夏生产技术、深化产品质量安全产地加工为基础的技术体系,构成了规范生产、规模发展的技术体系核心,为当地半夏安全可靠、高额丰产、规模化发展奠定了坚实的基础。

三、对半夏组培的认识

通过4年半夏种茎组培生产的实践,组织培养在农业生产之中具有培养条件可以人为控制;生长周期短,繁殖率高;管理方便,工厂化生产和自动化控制的特点十分明显。其意义也非常重大,主要表现在以下四点,一是快速繁殖优良品种、优良类型和珍贵种质资源;二是脱除各类病毒,幼化复壮植物;三是有效的培养新品种,创造新型植物种类;四是保存种质资源,避免基因的丢失和毁灭。半夏组培与其它植物组培一样,人为提供一定的温度、光照、湿度、营养、激素等条件,并需要一定设备及能源消耗,生产运营成本大,将其作为盈利性质商业产业还不现实。

(责任编辑 张顺全)