

# H.11648 麻珠芽组织培养技术研究

李愿平, 文尚华, 揭进, 郑学文, 张曼其, 刘伟清  
(广东省湛江农垦科学研究所, 广东 湛江 524094)

**摘要** 用 H.11648 剑麻珠芽为材料, 进行组织培养技术的研究, 结果表明: 在 MS + 6-BA5mg/L+NAA0.3mg/L + 白糖 3% + 琼脂 0.65%培养基中, 诱导产生不定芽, 其诱导率为 72%, 不定芽在 MS + 6-BA3mg/L + NAA0.1mg/L + 白糖 5% + 琼脂 0.8%培养基中, 诱导产生丛芽, 其诱导倍数是 1.57, 对丛芽进行继代培养、实现丛芽平均每代的增殖率 228%。用 MS + NAA1.0mg/L + IBA0.3mg/L + 活性炭 0.2% + 白糖 3%培养基诱导生根, 其生根率为 82%; 将生根苗移至菇渣 5: 塘泥 3: 表土 1: 河沙 1 配方基质的苗床假植, 移栽平均成活率为 84%。该项技术的研究成功, 为今后剑麻种苗的工厂化生产, 提供了技术支撑, 也为开展剑麻的生物工程育种提供了技术基础。

**关键词** 剑麻 珠芽 组织培养 研究

剑麻 ( *Agave sisalana perrine* ) 属龙舌兰科 ( *Agavaceae* ) 龙舌兰属, 多年生单叶草本硬质纤维作物。具有纤维拉力强, 质地坚韧, 耐海水浸泡, 耐酸硷, 耐摩擦, 不易脆断, 不易打滑等优点, 因而在国防、渔捞航海、交通运输、工矿、林业等具有广泛的用途。目前全球种植剑麻有巴西、墨西哥、坦桑尼亚、肯尼亚和中国等 10 多个国家, 年产纤维量仅 30 多万吨, 而需求量每年约 50 ~ 80 万吨。我国是亚州最大的剑麻生产基地, 现有剑麻面积约 1.33 万公顷, 年产纤维约 3.3 万吨, 而需求量将超过 8 万吨, 缺口很大, 可见发展剑麻产业有良好的市场前景。

剑麻的常规育苗一般采用珠芽、吸芽或地下茎等钻心剥叶, 通过假植育苗再促发侧芽和疏植壮苗等环节获得生产用种苗。这些传统的育苗方法具有繁殖系数低、花工多、时间长和不易获得良好育苗材料等缺点, 有时还会误用老态走茎芽, 造成

剑麻提前开花, 缩短生产周期和出现品种退化现象, 远不能满足生产发展对良种繁殖的需要。而选择优良母株和优选母株珠芽, 采用剑麻组织培养方法, 具有繁殖系数高, 保持原品种特性, 避免种性分离, 种苗不带病毒, 生长一致等优点。使种苗生产达到规模化、标准化和工厂化的目标, 为剑麻种苗繁殖开辟新途径。

国内对剑麻组培已有少量研究, 但对于工厂化生产技术和大田生产应用尚未见报道。2003 年底我所选取剑麻 H.11648 珠芽进行组织培养技术研究, 至今获得成功, 已培育出完整植株 30000 株, 经三批移至荫棚栽培 11309 株, 成活 9500 株, 移栽平均成活率达 84.0%, 初步探索成功了一套剑麻组培苗工厂化生产的技术。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

在种植已达 12 龄的 H.11648 高产麻田中, 选择 600 片叶以上产量高、生长旺盛、

含纤维率高、抗病力强的健康优良单株作为母株，采其花轴中部生长健壮的珠芽，种植于荫棚假植苗床，经 1 个月的培育出根后，作组培的试验材料。

## 1.2 方法

### 1.2.1 外植体的消毒与接种

于晴天，取假植苗床的珠芽，用自来水冲洗干净，剥去外叶，切除内叶和根，留住芽茎尖 2~4cm，继续冲洗约半小时，然后置于室内凉干，待次日接种。在超净台上接种时，用锋利的手术刀片，小心切割去所有叶鞘，只截取芽茎尖 2cm 左右(见图 1)，将材料用 75%酒精液和 0.1%升汞溶液消毒，再用无菌水冲洗 5~6 次待用。



图 1 茎尖接种材料

Fig.1 The inoculation with

将消毒好的外植体，切去基部的老化纤维组织，然后根据外植体的大小，分别切为 2~4 块，每块约 1×1.5cm，接种在启动培养基上。

### 1.2.2 培养条件 *pinnacle stem*

整个培养过程中，以 MS 或 1/2MS 为基础培养基，依培养阶段的不同配以不同的激素组合进行比较试验，所有培养基均加 3.0%~5.0%的白糖，0.6~0.8%的琼脂，PH5.8，培养温度为 25±2，夏季光照 10h/d，冬季 15h/d，光照强度 1200Lx 左右。

### 1.2.3 增殖与生根培养

将接种好的材料培养 15d 左右，外植体生长点周围长出 1~2 个不定单芽(见图 2)，继续培养到 20~25d，不定芽高 2~5cm，将芽切下转入分化培养基，继续增殖培养，使其分化为丛生芽群(见图 3)。通过丛生芽的大量发生和不断继代增殖培养，使芽的数量不断增殖。



图 2 不定单芽

Fig.2 Singly adventitious bud



图 3 丛生芽群

Fig.3 Overgrowing buds



图 4 生根芽群

Fig.4 Seedling rooted in glass

在丛生芽中选择高度 3cm 以上，有 3~5 片小叶的无根苗，将其切下接种于生根培养基中，培养完整植株，15d 左右开始出根，25~30d 后长出 4~5 条 3cm 以上

的根(见图 4)，此时可进行炼苗或移栽。

### 1.2.4 生根苗的炼苗移栽

先将已生根的瓶苗搬到室外，光线充足而又无直射光的地方，进行变温锻炼约

10d 左右才开始移栽。移栽时打开瓶盖，取出苗，洗去苗上的培养基，小心操作勿折断叶片和伤根，将洗净的苗根部浸在 1000 倍高锰酸钾液中消毒 2min，然后假植在基质苗床上，苗床基质先用 1% 的高锰酸钾液淋湿消毒，待过片刻后才可种苗，整个移栽过程必须在荫棚中进行。

夏季移栽阳光较强，须加盖两层遮光网，冬季温度低于 5 时要加盖薄膜保温。15d 后苗长新根，每星期喷施 1 次叶面肥，当苗长至 20cm 高时，可移出荫棚到大田

疏植。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同的消毒时间对接种污染的影响

外植体全部采用珠芽，首先统一采用 75% 酒精消毒 1min，无菌水洗 2 次，再用 0.1% 升汞消毒，消毒时间设 18、20、22、25min 4 种处理，然后用无菌水浸洗 5~6 次，在无菌条件下接种，接种培养半个月左右统计其污染率，结果列于表 1。

表 1 不同消毒时间对接种污染率的影响  
Table 1 Effect of different disinfected time on rate of contamination

0.1% 升汞处理时间	接 种	污染瓶	污染率 (%)
18 min	60	6	10
20 min	180	13	7
22 min	175	9	5
25 min	264	3	1

从表 1 的结果可看到，升汞消毒时间的掌握较严格，少于 22min 时，其接种污染率均超过 5%，只有消毒时间达到 25min 时，其污染率才降到 1%。说明消毒时间控制在 22~25 min 效果最好。

### 2.2 不同的切割方法对诱导出芽的影响

剑麻组培外植体的切割方法不同，对芽的存活及芽的诱导影响极大，如果外植体保持原状不切割，其吸收植物激素与养分的截面小，尽管存在顶端优势，但出芽较慢，有的甚至会死亡（见图 5）。表 2 说明：把外植列结果表体切成 4 块后，由于增加了吸收面，在打破内源生长素，与分

裂素原有平衡关系的基础上，增加细胞分裂素比例的同时，提高了外植体对外源激素及养分的吸收，获得较好的诱导出芽率，本试验主要选择了此切割方法。



图 5 已死亡的茎尖材料  
Fig.5 The deceased material of pinnacle stem

表 2 切割方法对诱导出芽的影响

Table 2 Effect of incising method on the bud induction

处 理	接种 (块)	30d 调查		出芽率 (%)
		存活 (块)	出芽 (个)	
外植体保持原状不切	28	24	1	4
外植体纵切为 2 块	103	95	49	52
外植体纵切为 4 块	144	136	98	72

### 2.3 光、暗培养对诱导出芽的影响

根据剑麻走茎芽是由地下走茎穿出面萌发而生的原理, 本试验特探讨了光、暗培养比较, 其结果 (表 3): 在采取同一外植体材料, 同一种切割方法的基础上, 接种后暗培养 11d, 新抽叶片变黄似豆芽,

恢复光照 50d 后, 其诱导出芽率明显低于全期光照培养的, 主要原因可能是剑麻属强光照热带、亚热带耐干旱作物, 走茎芽也是要在见光后才能形成。本试验证明剑麻组培必须在较强光照条件下进行, 才能获得较理想的效果。

表 3 光、暗培养对诱导出芽的影响

Table 3 Effect of light/dark on the bud induction

培养条件	接种数	50d 调查		出芽率 (%)
		存 (块)	出芽 (个)	
光培 15h/d	26	21	29	130
暗培 11d	6	6	5	83

### 2.4 芽的诱导与增殖

#### 2.4.1 不同激素浓度及组合对诱导剑麻不定芽的影响

用剑麻珠芽作外植体接种, 本试验采

用 MS 基本培养基, 附加不同的激素配比, 从表 4 列举的七组培养基各组合在 40d 内都不同程度地诱导出不定芽, 2ip (异戊烯氨基嘌呤) 浓度在 0.5 ~ 3mg/L 范围内, 诱

表 4 不同激素及组合对剑麻不定芽的影响

Table 4 Effect of different hormonal combination on the auxiliary buds of *Agave sisalana*

培养基代号	激素配比 (mg/L)	接种 40d 外植体		诱导出芽率%	接种 70d 外植体		
		存 (块)	不定芽 (个)		存 (块)	正常芽%	玻化率%
1	2ip0.5	52	16	31	34	76	24
2	2ip 1.0	45	16	36	30	80	20
3	2ip2.0	45	23	51	28	64	36
4	2ip3.0	48	31	65	29	55	45
5	TDZ0.5	79	48	61	86	69	31
6	TDZ1.0	78	37	47	103	29	71
7	TDZ2.0	77	31	40	121	21	79

导出芽率随着 2ip 浓度的提高而提高，但在 70 天时调查，诱导的不定芽出现程度不同的玻璃化现象，而且 2ip 用量在 3mg/L 时玻璃化率近乎一半，因此 2ip 的最适用量应是 0.5mg/L。当改用激素 TDZ（噻二唑苯基脲）时，接种 40d，范围在 0.5 ~ 2mg/L 反映的结果与 2ip 正好相反，TDZ 在用量低时诱导出芽率反而高，到 70d 出现玻璃化现象，低浓度诱导正常芽出芽率仍然居高，而用量在 2mg/L 时正常芽率就大幅度下降，相反玻璃化率剧增，所以 TDZ 用量也应在 0.5mg/L 以下。否则就会产生玻璃化苗，玻璃化苗叶片膨大，叶色浓绿，呈透明状，不能成为正常苗（见图 6）。所以激素用量是保证不定芽增殖的



图 6 玻璃化苗  
Fig6: Vitrification

关键。

#### 2.4.2 糖浓度对诱导芽的影响

糖作为碳源，除为细胞提供合成新化合物的碳骨架，同时也为细胞的新陈代谢提供底物与能源。糖还用以维持一定的细胞渗透势，不同的植物对糖浓度的要求也有所不同。本试验分别采取 3%、5%糖浓度对比，结果表明糖浓度在 3%时剑麻不定芽诱导率只有 35%，而随着糖浓度增加到 5%时，诱导率达 62%。

#### 2.4.3 不定芽的诱导培养

将剑麻珠芽外植体接种到 MS + 6-BA5mg/L + NAA0.3mg/L + 白糖 3% + 琼脂 0.65%的培养基上，并采取同一切割方法接种诱导不定芽，经三次接种试验，接种 30d 调查，不定芽的诱导率较为稳定，在 67.3 ~ 79.2%之间（结果见表 5），平均诱导率达 72.0%，为丛芽的诱导和增殖提供了条件。

表 5 不定芽的诱导  
Table 5 Induction of auxiliary buds

接种日期	接种（块）	接种 30d		出芽率（%）
		存（块）	单芽（个）	
10.19	69	68	48	70.6
10.20	60	48	38	79.2
10.20	60	52	35	67.3
合计		168	121	72.0

#### 2.4.4 丛芽的诱导与增殖培养

将诱导形成的不定单芽切割后，接种到增殖培养基 6-BA1 ~ 3mg/L + NAA0.1mg/L + 白糖 5% + 琼脂 0.8%和不同激素用量的 4 组培养基上（见表 6），进行丛芽诱导，此时陆续形成小丛芽块（见图 7），表 6 结果看出 2 号培养基的诱导倍数

最高为 1.57 倍。在丛芽高度达 3 cm 时，约需 20 ~ 25d，将高度达 3cm 以上的丛芽分切出来，进行生根培养。其余小丛芽又继代增殖，每瓶放小丛芽一



图 7 小丛芽块  
Fig.7 The small overgrowing bud

块，平均每块有不定芽 6 个以上，这些芽生长密集，增殖率达 228%，所以丛芽的诱导与增殖的最佳培养基为 2 号培养基。

此阶段的技术关键是丛生芽的分化与完整植株的分离培养同步进行。

表 6 丛芽诱导与丛芽增殖的效果  
Table 6 Efficiency of induction and multiplication of fascicular buds

培养基编号	30 天不定芽个数	25 天丛芽(块)	诱导倍数	25 天新增丛芽(块)	增殖率(%)
1	28	28	1.0	87	211
2	37	58	1.57	190	228
3	36	56	1.56	154	175
4	32	33	1.03	99	200

## 2.5 根的诱导

将增殖培养过程中高达 3 cm 以上的无根苗，单独分离切割，进行生根培养。切下的单芽分别接种于 4 组培养基中，生长 30 天后统计生根率，结果列于表 7。从表

中可看到，4 组培养基对根的诱导培养都有较好的效果，生根率全部达到 70% 以上，3 号培养基增加了 NAA 浓度，生根率达到 82%。

表 7 不同培养基对生根的影响  
Table 7 Effect of different medium on the root induction

编号	培养基(mg/L)			活性炭 (%)	白糖 (%)	接种 (株)	生根 (株)	生根率(%)
	NAA	IBA						
1	1/2MS	0.3	0.3	0.2	3	435	350	80
2	MS	0.3	0.3	0.2	3	125	88	70
3	MS	1.0	0.3	0.2	3	3650	2984	82
4	MS	0.2	0.1	0.2	3	1030	756	73

## 2.6 不同基质对移栽成活率的影响

剑麻组培苗移栽要选择通气性好、透水性强的基质。本试验选用了菇渣、塘泥、表土、河沙四种基质，按不同的比例配置三种基质配方进行比较，结果见表 8。三

组基质的成活率都在 70% 以上，在 3 号配方中菇渣比例较高，再加入适量塘泥基质后通气透水性好，故移栽成活率比其它两组要高，达 84%。

表 8 不同基质对移栽成活率的影响  
Table 8 Effect of different medium on the surviving rate of transplanted shoots.

编号	基质比例				移栽株数	成活株数	成活率(%)
	菇渣	塘泥	表土	河沙			
1	3	5		2	412	336	82
2	4		5	1	450	321	71
3	5	3	1	1	706	594	84

### 3 讨论

3.1 有关剑麻组织培养的报道目前国内尚不多见,大批量地进行剑麻组培苗的工厂化生产更是没有。本项目通过对剑麻珠芽进行组织培养技术的研究,采用以芽繁殖途径,诱导出不定芽,再对不定芽进行增殖培养,诱导出不定芽获得成功,为剑麻种苗的快速繁殖提供了新的技术。

3.2 在丛芽的继代分化阶段,将高度达到3 cm的芽切割分离出来,进行生根培养,成为完整植株,其余丛芽继续进行分化增殖培养,使到丛芽的分化与完整植株的培养同步进行。

3.3 在本研究中,注意到了外植体的消毒时间,改进了外植体的切割方法,合理配备生长素、激动素等。实现外植体单芽诱导率达到72%,丛芽诱导倍数为1.57,对丛芽进行继代培养,实现丛芽平均每代的增殖率达到228%,完整植株的移栽成活率达84%,该项技术的研究成功,为今后剑麻优质种苗工厂化生产,提供了技术支撑。

3.4 剑麻组培过程中,对激素浓度较为敏感,如细胞分裂素浓度过低,不易诱导出芽,浓度过高,容易出现植株玻璃化现象,因此,激素浓度的调配应得予重视。生根培养时,由于芽诱导期培养基中的激素影响,导致有部分苗生根困难,有待进一步探索提高。

### 参考文献

- [1] 朱德蔚.主编.植物组织培养与脱毒快繁技术[M].北京:中国科学技术出版社.2001
- [2] 陈振光.主编.植物组织培养与试管育苗.[M]北京:中国农业科学技术出版社.2004

#### Study of the tissue culture of *Agave sisalana* H.11648 bulbil

LI Yuan-ping, WEN Shang-hua, JIE Jin, ZHENG Xue-wen, LIU Wei-qing, ZHANG Man-qi  
(Zhanjiang State Farms Bureau Sciences Research Institute, Zhanjiang Guangdong 524094,China)

**Abstract :** The tissue cultural technology of *Agave sisalana* H.11648 has been established by using bulbil as explant. The result showed that 72% induction rate of auxiliary buds could be reached on MS basal medium supplemented with 5mg/L 6-BA, 0.3mg/L NAA, 3%(w/v) sugar and 0.65% agar. On MS basal medium added with 3ml/L 6-BA, 0.1mg/L NAA, 5%(w/v) sugar and 0.8% agar, one auxiliary bud was induced to differentiate 1.57 fascicular buds. Subculture of the fascicular buds obtained proliferation rate of 228% on average. Adding 1.0mg/L NAA, 0.3mg/L IBA, 0.2% AC (w/v) and 3% (w/v) sugar in MS medium could efficiently induced the buds to root with rooting rate of 82%. The rooted shoots were transplanted on seedbed and 84% of them were survived. The medium in seedbed was mixed with residue of mushroom-culture medium, clay of pond, surface soil and sand at a ratio of 5:3:1:1. This study supplied technology for the large-scale production of *Agave sisalana* seedlings and established a method for the bioengineering breeding of *Agave sisalana*.

**Key words:** *Agave sisalana*, bulbil, tissue culture, study.