河南农业科学,2012,41(4):132-134,138
Journal of Henan Agricultural Sciences

地黄脱毒种栽无土繁育技术研究初报

张德胜[1],张振臣[1]*,王永江[1],乔　奇[1],秦艳红[1],田雨婷[1],朱　昆[2]
(1.河南省农业科学院 植物保护研究所,河南省农作物病虫害防控重点实验室,
农业部华北南部农作物病虫害综合治理重点实验室,河南 郑州 450002;
2.河南省农业科学院 科技成果示范推广处,河南 郑州 450002)

摘要:为了降低脱毒地黄种苗的推广成本,在无土栽培条件下,研究了不同基质组合、施肥、种植密度对地黄出苗率、长势和种栽产量的影响,并将收获的地黄种栽进行大田栽培试验。结果表明:春季(4月10日)使用蛭石∶珍珠岩∶草炭=3∶1∶1体积比的基质组合处理的地黄出苗率和成苗率最高,分别为93.33%和89.17%;夏季(7月15日)使用煤渣∶珍珠岩∶菇渣=2∶1∶1体积比处理地黄出苗率和成苗率最高,分别为92.50%和88.89%,且块根褐变率最低。每100 m^2基质施用复合底肥5 kg,并结合1/8MS营养液浇灌,地黄产量可达2.24 kg/m^2。栽培密度应控制在60～80株/m^2。直径不小于1 cm的种栽适合大田种植。无土栽培技术可以避免连作障碍,所繁育的脱毒地黄种栽符合大田种植要求。

关键词:地黄;脱毒;种栽;无土栽培
中图分类号:S567.23　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1004-3268(2012)04-0132-04

Preliminary Research on Breeding Techniques of Soilless Cultivation for Virus-free Seeds of *Rehmannia glutinosa* Libosch

ZHANG De-sheng[1], ZHANG Zhen-chen[1]*, WANG Yong-jiang[1], QIAO Qi[1],
QIN Yan-hong[1], TIAN Yu-ting[1], ZHU Kun[2]
(1. Institute of Plant Pretection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Henan Key Laboratory of Crop Pest Control,
IPM Key Laboratory in Southern part of North China for Ministry of Agriculture, Zhengzhou 450002, China;
2. Demonstration and Extension Department, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to reduce the promotion cost of virus-free seeding, the technology of soilless cultivation for breeding *Rehmannia glutinosa* seeds was studied, by comparing the seeding emergences, growths and yields of *Rehmannia glutinosa* under various soilless mediums and fertilizations, and cultivation of the virus-free seeds in the fields. The results showed that the medium of vermiculite∶perlite∶peat in ratio of 3∶1∶1 was best in spring with seeding emergence rate and sprout rate of 93.33% and 89.17%, respectively, while the medium of coal cinder∶perlite∶mushroom residue in ratio of 2∶1∶1 was best in summer with seeding emergence rate and sprout rate of 92.50% and 88.89%, respectively, and the root brown rate was the lowest. The yield reached 2.24 kg/m^2 by using compound base fertilizer (0.05 kg/m^2) and 1/8MS nutrient solution with the suitable planting densities of 60 to 80 plant/m^2. The diameter of virus-free seeds not less than 1 cm were suitable to plantation in the field. The continuous cropping obstacles could be solved by the technology of soilless cultivation, and the breeding virus-free *Rehmannia glutinosa* seeds were fit for plantation in the field.

Key words: *Rehmannia glutinosa*; virus-free; seeds; soilless culture

收稿日期:2011-10-20
基金项目:河南省农业科技成果转化资金项目(0536000017)
作者简介:张德胜(1978-),男,河南偃师人,助理研究员,硕士,主要从事植物病害防治研究。E-mail:zhangdesheng404@163.com
*通讯作者:张振臣(1964-),男,河南延津人,研究员,博士,主要从事植物病害防治研究。E-mail:zhangzhenchen@126.com

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

地黄(*Rehmannia glutinosa* Libosch.)是玄参科多年生草本植物,其块根及块根的加工制品是我国大宗常用药材之一。地黄生产主要采用种栽营养繁殖,一般在 7 月中旬进行倒栽,来年 3、4 月份收获种栽[1-2]。地黄易受病毒侵染,病毒在植株体内代代相传,导致品种退化,产量下降,品质降低[3]。随着茎尖脱毒技术在地黄生产上的应用,脱毒地黄的病毒病显症率明显下降,产量大幅度提高,可有效控制病毒病危害[4]。但脱毒地黄在大田栽培过程中会被病毒再侵染,至少 3 a 就要更新一次种苗[5],同时由于地黄不能重茬种植[6],脱毒地黄原原种的生产田每茬均需更换地块,附带的防虫设施也需重新架设,增加了脱毒地黄原原种繁殖的成本,成为制约推广的因素。鉴于此,针对地黄繁种不能重茬,组培苗用量大,种栽大小不均匀等问题,研究了地黄脱毒种栽无土栽培技术,以期降低脱毒地黄种栽的生产成本,加快脱毒地黄的推广应用。

1　材料和方法

1.1　供试材料

地黄品种为北京 1 号,由河南省焦作市温县农业科学研究所提供。地黄脱毒组培苗、脱毒原原种由河南省农业科学院植物保护研究所生物技术研究室提供,菇渣由河南省农科院食用菌站提供。所用煤渣颗粒可通过 1.7 mm 孔径筛网,蛭石、珍珠岩、草炭等基质和 48%撒可富复合肥($N:P_2O_5:K_2O=16:16:16$)均为市售产品,所需化学试剂均为国产分析纯。采用孔径为 0.38 mm 防虫网建造网室,网室内设底部硬化的半地上栽培池。试验所用种栽均为脱毒组培苗在防虫网室内繁育获得。

1.2　研究方法

1.2.1　不同栽培基质组合对地黄生长的影响　在预试验基础上,本试验共设 5 种基质配方处理(表 1),每个处理重复 3 次。试验分别在春季(4 月 10 日)和夏季(7 月 15 日)进行。在防虫网室内设置栽培池,种植密度为种栽 60 块/m^2,每 100 m^2 基质均匀混入 5 kg 48%撒可富复合肥。种植 3 周后调查出苗率,8 周后调查成苗率。每处理随机取样 20 株,调查叶数,测量每株倒六叶的叶片长度和宽度,参照周成明方法计算叶面积[7];收获时每个重复随机调查 100 个块根,统计块根褐变率。

表 1　地黄无土栽培不同基质处理组合

基质编号	基质组成(按体积比)
1	煤渣:珍珠岩:菇渣=2:1:1
2	蛭石:珍珠岩:草炭=3:1:1
3	蛭石:珍珠岩=3:1
4	蛭石:菇渣=1:1
5	蛭石:草炭=2:1

1.2.2　不同施肥处理对地黄产量的影响　设 3 种施肥处理,CK:不施用肥料;处理①:每 100 m^2 基质均匀混入 5 kg 48%撒可富复合肥;处理②:在处理①基础上,浇施 1/8MS 营养液[8],每 10 d 1 次。分别在基质 1(同表 1,下同)、基质 2 和基质 3 中进行试验。重复 3 次,保留健苗 60 株/m^2,收获时每个重复取 1 m^2 基质中生产的地黄块根称量鲜质量。

1.2.3　不同种植密度对地黄产量的影响　设 5 个种植密度处理,分别为 40 株/m^2、60 株/m^2、80 株/m^2、100 株/m^2、120 株/m^2,每处理重复 4 次。使用基质 1,每 100 m^2 基质均匀混入 5 kg 复合肥,每 10 d 浇施一次 1/8MS 营养液。生育期为 100 d,收获时每个重复随机取 1 m^2 基质中生产的地黄块根称量鲜质量,每处理随机取 100 块地黄称取鲜质量并调查不同大小种栽所占比例。

1.2.4　不同直径地黄种栽出苗率及大田应用试验　将种栽根据直径(d)大小分为 3 类:$d<1$ cm、1 cm $<d<$1.5 cm、$d>$1.5 cm,以未脱毒的同品种地黄种栽为对照,进行田间试验。试验在温县祥云镇进行,小区面积 100 m^2,每个处理设 3 次重复。种植密度为 9 万株/hm^2,大田正常管理。调查每种处理的地黄出苗情况,收获时测产。

2　结果与分析

2.1　不同基质组合对无土栽培地黄生长指标的影响

从表 2 可以看出,基质 1 夏季(7 月 15 日)种植的出苗率和成苗率分别为 92.50%和 88.89%,而且叶数较多,叶面积大,收获时块根褐变率最低;基质 2 春季(4 月 10 日)种植的出苗率和成苗率最高,分别为 93.33%和 89.17%,而且叶面积大,植株长势较壮;基质 3 虽然春夏两季的出苗率较高,但叶数和叶面积显著低于其他处理;基质 4 春夏两季的成苗率均较低;基质 5 虽然叶数和叶面积均表现突出,植株相对强壮,但春夏两季的出苗率和成苗率最低,而且块根褐变率最高。因此,春季最适宜的基体积配比为蛭石:珍珠岩:草炭=3:1:1,夏季为煤渣:珍珠岩:菇渣=2:1:1。

2.2　不同施肥处理对无土栽培地黄产量的影响

从表 3 可以看出,混入复合底肥并添加 1/8MS 营养液的处理(处理②)在 3 种混合基质处理中产量

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

均为最高，平均为 2.24 kg/m²，在基质 1 中产量为 2.34 kg/m²，在基质 2 中产量为 2.37 kg/m²，在基质 3 中产量为 2.02 kg/m²，显著高于其他 2 个施肥处理，而不添加肥料的 CK 的平均产量显著偏低，表明施用复合底肥和添加 1/8MS 营养液有利于提高地黄种栽产量。基质 1 和基质 2 的地黄产量均高于基质 3，表明有机基质菇渣和草炭有利于地黄生长，增加产量。

表 2 不同基质组合对无土栽培地黄生长指标的影响

播种日期(月-日)	基质编号	出苗率/%	成苗率/%	叶数/片	叶面积/cm²	块根褐变率/%
04-10	1	85.56±0.76b	82.78±0.88bc	10.43±0.15a	113.30±3.50ab	1.00a
	2	93.33±0.58a	89.17±0.76a	10.35±0.15a	117.79±2.87a	1.67a
	3	92.22±0.67a	86.67±1.06ab	9.35±0.17b	101.60±2.44c	2.00a
	4	91.67±0.52a	83.89±0.61b	10.37±0.14a	109.68±2.00b	1.67a
	5	87.22±0.76b	79.17±1.06c	10.47±0.15a	119.23±2.68a	4.00b
07-15	1	92.50±0.92a	88.89±0.88a	10.78±0.20a	147.68±5.79a	2.00a
	2	94.17±0.67a	81.39±0.79b	10.55±0.20a	145.94±4.12a	4.67bc
	3	92.78±0.56a	81.94±1.08b	9.47±0.13b	129.69±3.41b	5.00bc
	4	90.83±0.76a	76.11±1.23c	10.98±0.16a	152.04±3.61a	3.33ab
	5	72.22±1.28b	60.28±1.08d	10.83±0.15a	155.73±3.26a	6.67c

注：同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)，下同。

表 3 不同施肥处理对无土栽培地黄产量的影响

kg/m²

处理编号	基质 1	基质 2	基质 3	平均
CK	1.86c	1.88c	1.39c	1.71c
①	2.12b	2.16b	1.72b	2.00b
②	2.34a	2.37a	2.02a	2.24a

2.3 不同种植密度对无土栽培地黄产量的影响

从表 4 可以看出，不同的种植密度对地黄种栽的产量和均匀度均有明显影响。种植密度为 40～80 株/m² 时，种栽产量为 2.40～2.46 kg/m²，不同密度处理间差异不显著；种植密度为 100～120 株/m² 时，种栽产量显著低于其他密度处理。从种栽均匀度看，当种植密度为 60、80 株/m² 时，10～20 g大小的种栽所占比例分别为 54%、61%，明显高于种植密度为 40 株/m² 的处理，种栽大小更均匀，获得的可用种栽数量更多。因此，地黄种栽适宜的种植密度为60～80 株/m²。

表 4 不同种植密度对无土栽培地黄产量的影响

密度/(株/m²)	产量/(kg/m²)	不同鲜质量种栽所占比例/%		
		>20 g	10～20 g	<10 g
40	2.46a	45	39	16
60	2.43a	27	54	19
80	2.40a	23	61	16
100	2.21b	15	56	29
120	2.08c	12	57	31

2.4 不同直径种栽对大田栽培地黄出苗率及产量的影响

从表 5 可以看出，直径不小于 1 cm 的种栽的出苗率为 71.67%～73.00%，处理间差异不显著，但显著高于直径小于 1 cm 的种栽(64.67%)。利用无土栽培生产的不同直径的脱毒地黄种栽，比未脱毒的普通种栽增产 23.15%～24.25%。说明利用无土栽培生产的脱毒地黄种栽适合在大田生产中应用。

表 5 不同直径种栽对大田地黄出苗率及产量的影响

种栽直径/cm	出苗率/%	平均产量/(kg/hm²)	增产率/%
>1.5	73.00a	33 840a	23.75
1～1.5	71.67a	33 975a	24.25
<1	64.67b	33 675a	23.15
未脱毒普通种栽(CK)	73.33a	27345b	-

3 讨论

本试验初步建立了无土栽培生产脱毒地黄种栽的技术体系。在防虫网室内，在底部硬化的基质池中进行地黄栽培，春季适宜的基质体积配方为蛭石∶珍珠岩∶草炭=3∶1∶1；夏季多雨湿润时宜选用透气性强的基质组合煤渣∶珍珠岩∶菇渣=2∶1∶1。基质中应混入三元复合肥(N∶P_2O_5∶K_2O=16∶16∶16)，用量为每 100 m² 基质均匀混入 5 kg，推荐在生长期间使用 1/8MS 营养液补充肥力，最终成苗的密度应控制在 60～80 株/m²，为大田生产供种应选取直径不小于 1 cm 的种栽。

脱毒地黄增产效果显著，但由于脱毒地黄种栽的生产成本较高，限制了脱毒地黄的推广应用[9]。使用无土栽培技术，可以有效解决 (下转第 138 页)

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

多，因此，细胞生长速度比高糖 DMEM 中的快。本研究使用 10%～15%的血清浓度已经能够满足南阳牛长纤维细胞的培养要求，同时节约了成本。这与张运海等、王红梅等、陆凤花等的报道一致[6-8]。

冷冻和复苏细胞时，本试验采用 10%的 DMSO＋20% FBS DMEM 培养液作为细胞冷冻液，4℃、－20 ℃、－80 ℃平衡后直接投入液氮中保存。细胞冻存前与复苏后的存活率进行了比较，无显著差异。本试验对第 6 代南阳牛成纤维细胞进行了染色体分析，结果表明，二倍体细胞所占比例保持在 80%左右，该细胞遗传性状没有发生改变，使用该体系体外培养的南阳牛成纤维相对比较稳定，可以用于核移植和转基因的研究中。Yang 等发现了长期体外传代培养的细胞可作为核供体的可行性[9]。流式细胞仪分析结果表明，第 4 代和第 8 代细胞 G_0－G_1 期和 S 期细胞所占百分比没有很大区别，而 G_2－M期细胞所占百分比有明显区别，与 F11 代细胞相比各个时期都有明显的区别。与终末分化或衰老的细胞相比，增殖旺盛的细胞，G_1 期细胞所占比例小（因其 G_1 期时间短），而 S 期、G_2－M 期细胞所占比例则相对较大[10]。传代多次后细胞增殖分裂速度变慢，因此，最好用低代细胞进行后续的试验。

动物细胞培养技术现已成为一项比较成熟的技术，该技术在生物学研究中具有广阔的前景。本研究成功建立了南阳牛耳组织成纤维细胞系，该细胞系的建立，使南阳牛这一重要物种资源在细胞水平上得以保存，为后期核移植和转基因的研究提供了基础材料。

参考文献：

[1] 徐照学. 肉牛饲养使用技术手册[M]. 上海：上海科学技术出版社，2005：29-30.

[2] 吴常信. 动物遗传资源保存的理论与技术[J]. 云南大学学报，1999，21(S3)：7-10.

[3] 司徒振强，吴军正. 细胞培养[M]. 西安：世界图书出版公司，2004：155－164.

[4] 斯佩科特 D L. 细胞实验指南[M]. 黄培堂，译. 北京：科学出版社，2001.

[5] 张小建，李键，张兴友. 牦牛成纤维细胞的体外培养研究[J]. 湖北农业科学，2007，46(3)：344-347.

[6] 王红梅，黄俊成，刘明军. 利用动物耳皮肤组织培养成纤维细胞的研究[J]. 草食家畜，2001(S2)：210-214.

[7] 张运海，章孝荣，刘亚. 波尔山羊及黄牛耳部成纤维细胞的体外培养[J]. 安徽农业大学学报，2002，29(4)：387-390.

[8] 陆凤花，石德顺，牛向丽，等. 水牛皮肤成纤维细胞的分离与体外培养[J]. 细胞生物学杂志，2005，27(4)：451-455.

[9] Yang X，Jiang S，Farrell D，*et al*. Nuelear transfer in cattle：effect of nuclear donor cells cytoplast age co-culture and embryo transfer[J]. Mol ReProd Dev，1993，35(1)：29-36.

[10] 余从年，胡继英. 医用细胞生物学导论[M]. 北京：科学出版社，2001：161-193.

（上接第 134 页） 地黄脱毒种栽生产每茬必须更换地块的问题，因而能够使用固定的防虫设施，还可相对增加商品地黄生产用地。避免在大田繁种降低脱毒地黄再次感染病毒的几率，延长脱毒种栽使用年限。另外，无土栽培生产出的种栽大小适中、均匀，利用率高，相同产量的种栽可栽培面积远远大于大田生产的种栽。这些都会有效降低地黄种植的生产成本[10]。

地黄不耐涝，夏季在透气性较差的基质中根腐病发病率会上升，表现为种栽或块根褐变腐烂、地上部枯萎的症状，应特别注意。

参考文献：

[1] 刘红彦，王飞，刘焕民. 道地药材规范化种植技术[M]. 郑州：中原农民出版社，2008.

[2] 刘红彦，鲁传涛，宋凤仙. 地黄规范化栽培管理技术[J]. 河南农业科学，2002(4)：30-31.

[3] 雷福成，刘晓娜，王学增. 防止地黄品种退化的技术措施[J]. 中药材，1995，18(11)：545-546.

[4] 张振臣，乔奇，靳秀兰，等. 地黄脱毒技术及增产效果[J]. 植物保护学报，2004，31(4)：342-345.

[5] Matsumoto M，Shoyama Y，Nishioka I，*et al*. Identification of viruses infected in *Rehmannia glutinosa* Libosch. var *purpurea* Makino and effect of virus infection on root yield and iridoid glycoside contents[J]. Plant Cell Reports，1989，7：636-638.

[6] 刘红彦，王飞，王永平，等. 地黄连作障碍因素及解除措施研究[J]. 华北农学报，2006，21(4)：131-132.

[7] 周成明. 地黄叶面积及叶面积系数的测定[J]. 中药材，1987(2)：12，30.

[8] 曹孜义，刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州：甘肃科学技术出版社，1999.

[9] 温学森，李先恩，杨世林. 地黄病毒病及其亟待解决的问题[J]. 中草药，2001，32(7)：662-664.

[10] 张振臣，张德胜，靳秀兰，等. 脱毒地黄微型种栽无土繁育方法：中国，ZL200610106915.6[9P]. 2009-08-05.

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net