

3 讨论

植物组织培养中常用的培养基主要区别在于无机盐的种类和量。MS 培养基无机盐量较高,微量元素种类较全,质量浓度也较高,尤其是氮源质量浓度较高,可以满足植物细胞的营养要求,广泛应用于植物细胞、组织和原生质体培养,效果良好。LS 培养基是在 MS 培养基基础上演变而来的。B₅ 培养基主要特点是铵的质量浓度较低,适用于双子叶植物特别是木本植物的组织培养、细胞培养。SH 培养基是矿质盐质量浓度较高的培养基,其中铵和磷酸由 NH₄H₂PO₄ 提供。White 培养基无机盐较低,适用于生根培养基^[6]。本实验选用上述 5 种培养基悬浮培养丹参不定根,结果表明 MS 培养基最利于丹参不定根生长,SH 培养基最利于次生代谢物合成,可能是该培养基高质量浓度的矿质盐更能满足次生代谢物合成。

不同的盐强度改变培养物的离子强度和渗透压。研究发现,渗透压改变导致细胞容积改变,从而激活细胞膜上的离子通道,进而影响细胞增殖^[7]。本实验通过改变培养基中无机盐强度调节培养基的渗透压,以考察渗透压对丹参不定根生长和有效成分量的影响,结果表明 3/2MS 培养基最适于不定根生长,而低盐强度促进次生代谢物合成。

植物体在自然条件下,有机物成分是依靠自身的代谢加以调节的,而培养的离体组织、细胞以及原生质体虽能合成必需的维生素,但是数量上远远不足。为了能使组织很好地生长,在培养基中必需补充一种或几种维生素或氨基酸。一般认为 VB₁ 是一种必需的成分^[8]。本研究表明,不添加甘氨酸时,不定根生长率低于对照组,说明甘氨酸在促进不定根生

长中起一定作用,但未能明显看出 VB₁ 的必需作用。通过 HPLC 法测定丹参酮 II_A 和原儿茶醛,发现甘氨酸能促进丹参酮 II_A 的合成,培养基中缺少烟酸明显促进原儿茶醛的合成,缺少肌醇显著抑制原儿茶醛合成。

植物组织培养中,除了注意选择合适的有机物类型外,有机物质量浓度也是值得注意的问题。笔者将在以后的研究中重点探讨不同有机物质量浓度对丹参不定根生长和有效成分量的影响,从而筛选最佳的有机物类型及其质量浓度。

References:

- [1] Chen H, Chen F, Chiu F C, et al. The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Enzyme Microb Tech* 2001, 28 (1): 100-105.
- [2] Chen H, Chen F. Effects of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of a high-tanshinone-producing line of the Ti transformed *Salvia miltiorrhiza* cells in suspension culture [J]. *Process Biochem*, 2000, 35 (8): 837-840.
- [3] Yan Q, Shi M, Ng J, et al. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *Plant Sci*, 2006, 170 (4): 853-858.
- [4] Koichiro H, Takashki K. Tanshinone production in adventitious roots and regenerates of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Nat Prod*, 1991, 54 (6): 1583-1587.
- [5] Guo X H, Gao W Y, Chen H X, et al. Effects of metal ion on the accumulation of tanshinone II_A and protocatechuic aldehyde in adventitious culture of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2005, 30 (12): 885-888.
- [6] Guo Y, Cui T B, Xie X Z. *Plant Cell Culture Technology and Application* (植物细胞培养技术与应用) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004.
- [7] Yang Y M, Yuan Y J, Hu Z D. Research progress in inner production release of plant cells [J]. *Prog Biotechnol* (生物工程进展), 1998, 18 (1): 17-22.
- [8] Jiang L, Zhang W C, Ke Y. Effects of five organic elements on cell growth and formation of flavonol glycosides of ginkgo callus [J]. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), 1999, 7 (4): 373-376.

半夏工厂化育苗技术体系研究初探

张晓伟¹, 王小峰¹, 周昌华², 张兴翠^{1*}

(1. 西南大学农学与生命科学院, 重庆 400716; 2. 西南大学 科技处, 重庆 400716)

摘要:目的 建立一套半夏工厂化育苗体系, 实现半夏的快速繁殖, 解决半夏生产因用种而造成的退化问题。方法 探讨了外植体诱导、植物生长调节物质质量浓度、光照条件及继代周期对丛生芽增殖的影响。结果 外植体的诱导以 MS+6-BA (4~5) mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基为宜。组织培养中生长调节物质质量浓度为 NAA 0.2 mg/L+6-BA 2 mg/L。转接时组织块带两个或两个以上芽时, 半夏生长状况最好。结论 采用工厂化育苗技术可进行半夏的快速繁殖, 为保护和持续利用这一重要药材资源提供有效途径。

收稿日期: 2006-05-10

基金项目: 重庆市科技计划项目 (8024)

作者简介: 张晓伟 (1980—), 男, 山西省晋城人, 西南大学硕士研究生, 研究方向为药用植物规范化生产。 Tel: 13996269054

E-mail: zwx2004203@163.com

* 通讯作者 张兴翠 Tel: 13637999712 E-mail: zch001@swau.cq.cn

关键词:半夏;组织培养;工厂化育苗体系

中图分类号:R282.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)03-0432-04

Preliminary research on industrialized breeding technology system of *Pinellia ternata*ZHANG Xiao-wei¹, WANG Xiao-feng¹, ZHOU Chang-hua², ZHANG Xing-cui¹

(1. College of Agronomy and Life Science, Southwest University, Chongqing 400716, China; 2. Department of Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Objective Industrialized breeding technology system will be established to achieve the rapid multiplication of *Pinellia ternata* and to settle the problem of degeneration caused by seeds. **Methods** Explant induction and effects of plant growth regulator dosage, illumination, and subculture cycle on fasciculated shoot propagation were studied. **Results** It is good for the explant induction on medium MS+6-BA (4-5) mg/L + NAA 0.2 mg/L. *P. ternata* grows well under the circumstance of NAA 0.2 mg/L+6-BA 2 mg/L, double or more shoots. **Conclusion** Industrialized breeding technology system of *P. ternata* can make its propagation rapid and support an effective way for resources preserving and sustainable utilization.

Key words: *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.; tissue culture; industrialized breeding system

半夏为天南星科多年生草本植物,历版《中国药典》收录的半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 以干燥块茎入药,性温、味辛、有毒,是一种重要的中药材。由于受生态变化及人为因素影响,其野生资源日益减少。不能满足用药需求。人工栽培半夏用种量大,需种用块茎高达 1 500 kg/hm²[1];产量低且极不稳定,加之生产退化等问题均限制了半夏人工栽培的发展,使半夏的供应长期处于紧缺状态。因此,对半夏工厂化育苗技术体系的研究有着积极的意义。

近年来,半夏组织培养研究方面已有一些报道,这些报道大多是理论方面的成果。如任家惠等[2]以叶片和叶柄为外植体获得再生植株,朱鹏飞等[3]以珠芽和块茎为外植体诱导出再生植株,韩献忠等[4]研究出了一次性成苗的方法,朱忠荣等[5]提出了半夏组培育苗的可行性,但对试管苗移栽后的情况未作报道。本实验对应用组织培养技术进行工厂化育苗实践和种苗移栽后的生长发育情况进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 实验材料:供试材料为重庆市中药研究院张明老师采集到的天南星科半夏属半夏块茎。

1.2 方法

1.2.1 外植体诱导:取块茎洗净后先用 75%乙醇及 0.1%升汞顺序消毒及用无菌水冲洗后,在无菌条件下将块茎切成长 0.5~1.0 cm 的立方体切块作外植体用,基本培养基为 MS 培养基,含蔗糖 3%,卡拉胶 0.46%,pH5.8~6.2。把切块接入不同生长调节物质组合的培养基。采用完全随机设计(表 1),

共 30 种处理,每处理 3 瓶。在温度为(25±1)℃,每天 12 h 光照,光照强度约为 1 500 lx 的条件下进行培养(培养条件下同)。

表 1 植物生长调节物质种类、比例及处理

Table 1 Varieties and proportions of plant growth regulators and their disposal

NAA/(mg·L ⁻¹)	6-BA/(mg·L ⁻¹)					
	1.0	3.0	4.0	5.0	7.0	10.0
0	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
0.2	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
0.5	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)
1.0	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)	(24)
2.0	(25)	(26)	(27)	(28)	(29)	(30)

1.2.2 植物生长调节物质对半夏丛生芽增殖的影响:将半夏组织块接入不同生长调节物质组合的培养基中培养,共 12 种处理,每种处理 3 瓶,每瓶接半夏组织块 6 个,每个组织块带 3 个芽。培养两周。

1.2.3 光照条件对半夏丛生芽增殖的影响:用培养基(8)转接半夏分别置于强光、半荫、遮光 3 种不同的环境中,每种处理 10 瓶,每瓶接半夏组织块 6 个,每个组织块带 3 个芽。组培室培养两周,统计芽增殖,并观察其生长状况。

1.2.4 组织块大小对半夏丛生芽增殖的影响:用培养基(8)接种 3 种不同大小的组织块,即组织块带单个芽、双芽和 3 个芽,每种处理 3 瓶,每瓶接组织块 6 个。组培室光照下培养两周。

1.2.5 继代周期对半夏丛生芽增殖的影响:用培养基(8)培养半夏组织块,每个组织块带 3 个芽,分别

培养 2、3、4 周后转接,观察其生长情况和增殖倍数。

1.2.6 过渡移栽:当试管苗高达 3~5 cm,长出发达根系时,打开瓶塞,炼苗 2~3 d 后取出试管苗,洗去根部培养基后准备移栽。

在温度 15~20 ℃ 温室中将试管苗移到装有锯末和砂的塑料网筛中,保持土壤湿润,栽后观察其成活及生长情况。

2 结果与分析

2.1 外植体的诱导:两周后观察半夏组织的诱导情况发现,各种培养基中的半夏组织块均能诱导产生愈伤组织,但愈伤组织的质地各不相同,大多为不规则的松散型,少数为表面光滑的致密型。其中培养基(9)MS+6-BA4 mg/L+NAA0.2 mg/L 和培养基(10)MS+6-BA5 mg/L+NAA0.2 mg/L 诱导效果最好。培养大约一个月后愈伤组织表面产生淡绿色球状体,继续培养球状体上方会生出绿色丛芽。

2.2 植物生长调节物质不同质量浓度对半夏丛生芽的增殖的影响:比较 12 种 NAA+6-BA 配比对半夏组织块芽增殖个数的影响(表 2),结果发现总体趋势是附加低质量浓度植物生长调节物质的培养基中半夏芽健壮,数量少,易分辨;高质量浓度下形成的愈伤组织块较大,多为丛生芽,芽多但不健壮,难以分辨。

表 2 植物生长调节物质不同质量浓度对半夏丛生芽增殖的影响

Table 2 Effect of various plant growth regulator dosage on propagation of fasciculated shoots of *P. ternata*

处理号	植物生长调节剂/(mg·L ⁻¹)			芽增殖个数		
	NAA	6-BA		I	II	III
(4)	MS+	0.0	5.0	11	9	11
(16)	MS+	0.5	5.0	14	19	16
(22)	MS+	1.0	5.0	18	17	20
(31)	MS+	1.5	5.0	10	11	10
(28)	MS+	2.0	5.0	12	12	12
(32)	MS+	0.2	0.5	10	8	9
(7)	MS+	0.2	1.0	10	11	11
(8)	MS+	0.2	3.0	16	15	17
(33)	MS+	0.2	5.0	7	8	11
(11)	MS+	0.2	7.0	5	5	7
(34)	MS+	0.2	9.0	7	7	6
(35)	MS+	0.2	11.0	11	8	9

表 3 的方差分析结果表明,不同的培养基之间,半夏组织块芽增殖数在 1% 水平下,达极显著差异,对数据进行多重比较可知,处理(16)与(8),(7)与(4),(31)、(35)与(32)、(33)之间无显著差异,其余

处理间均存在显著差异。其中处理(22)、(8)、(28)、(7)、(35)、(34)间的差异达到了极显著水平。试验中处理(8)、(16)和(22)半夏长势相对较好,但处理(8)激素用量少,结合成本考虑宜选用此培养基。即较适宜的植物生长调节物质质量浓度为 NAA 0.2 mg/L+6-BA2 mg/L。

2.3 光照条件对半夏丛生芽增殖的影响:对 3 种光照处理半夏组织芽增殖数(表 4)数据进行方差分析和多重比较(表 5)可以看出,组织块的芽增殖数有显著差异,且强光与遮光条件下芽的增殖数差异达显著水平。在强光和半荫条件下,半夏芽多且比较健壮,长势好。而遮光不利于半夏的生长,芽多丛生,不易分辨,叶片长势弱。由于缺乏光照,芽和愈伤组织白化,芽尖普遍枯死。

表 3 方差分析表

Table 3 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著水平
处理间	505.56	11	45.96	26.26	** $P<0.01$
处理内	42.00	24	1.75		
总变异	547.56	35			

$$F_{0.05}(11,24)=2.22, F_{0.01}(11,24)=3.09$$

表 4 不同光照条件对半夏丛生芽增殖的影响

Table 4 Effect of various illuminations on propagation of fasciculated shoots of *P. ternata*

处理	芽增殖个数									
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
强光	31	35	27	35	29	37	34	31	35	39
半荫	32	33	38	35	29	30	26	35	30	25
遮光	27	28	27	34	27	31	25	31	32	29

表 5 方差分析表

Table 5 Analysis of variance

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著水平
处理间	88.27	2	44.13	3.43	* $P<0.05$
处理内	347.10	27	12.86		
总变异	435.37	29			

$$F_{0.05}(2,27)=3.35, F_{0.01}(2,27)=5.49$$

2.4 组织块大小对半夏丛生芽增殖的影响:不同大小组织块接种的芽增殖数和叶长情况及方差分析结果见表 6~9,两种接种方式芽增殖数和叶片长度的方差分析结果表明,组织块大小不同对芽增殖数和叶片长度有着显著影响。对统计数据分别作多重比较可知(表 7,表 9),带 3 个芽的组织块在芽增殖数方面与双芽和单芽都存在显著的差异,其中 3 个芽与单芽之间的差异达到了极显著水平。但单芽的叶长显著长于 3 个芽和双芽。总体上,3 个芽、双芽组

组织块的长势比单芽好。综合考虑,转接时组织块大小应选带两个或两个以上芽。

表 6 不同大小组织块接种对芽增殖的影响

Table 6 Effect of inoculating with various block of tissue on proliferation of buds

处理	芽增殖个数		
	I	II	III
单芽	3	1	1
双芽	6	4	4
3个芽	12	13	14

表 7 方差分析

Table 7 Analysis of variance

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著水平
处理间	206.89	2	103.44	84.64	** $P < 0.01$
处理内	7.33	6	1.22		
总变异	214.22	8			

$$F_{0.05}(2,6)=5.14, F_{0.01}(2,6)=10.92$$

表 8 不同大小组织块接种对半夏叶长的影响

Table 8 Effect of inoculating with various block of tissue on *P. ternata* leaves length

处理	叶长/cm		
	I	II	III
单芽	1.1	1.4	1.2
双芽	0.4	1.1	0.6
3个芽	0.6	0.5	0.4

表 9 方差分析表

Table 9 Analysis of variance

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著水平
处理间	0.86	2	0.43	7.92	* $P < 0.05$
处理内	0.33	6	0.05		
总变异	1.19	8			

$$F_{0.05}(2,6)=5.14, F_{0.01}(2,6)=10.92$$

2.5 继代周期对半夏丛生芽增殖的影响:用 MS+6-BA3 mg/L+NAA0.2 mg/L 培养基培养半夏组织块,每个组织块带 3 个芽,分别培养 2、3、4 周后转接,观察其生长情况和增殖倍数。观察 3 种不同继代周期半夏小块茎的增殖倍数可知,半夏小块茎在 3 周内继代增殖倍数高,生长旺盛。3 周以后继代半夏生长缓慢且增殖倍数低。

2.6 过渡移栽及温(网)室栽培:温(网)室中移栽的半夏组培苗成活率在 95%以上,生长旺盛,植株高大。移栽的组培苗当年即可收获,但所结块茎比较小,整体商品率不高。试验中发现在适度遮荫的条件

下,无菌组织培养苗第 1、2 年的 4~10 月间均未见倒苗,只是在每年的 8 月中、下旬出现新老叶交替现象,但在第 3 年 4 月出苗,5 月初就全部倒苗。收获的无菌珠芽还可作大田栽培用种。用组培苗作种能否解决倒苗问题还需作进一步探讨。

3 结论与讨论

3.1 本研究初步建立起工厂化育苗体系:块茎外植体→愈伤诱导→球状体→丛生芽增殖→试管壮苗→炼苗、温室移栽。运用这一技术体系生产半夏种苗具有生产周期短,繁殖系数高,种苗不带菌等优点,同时组培苗还可以延迟倒苗时间,延长有效生育期,提高产量。

3.2 在半夏工厂化育苗过程中,以块茎为外植体诱导出愈伤组织同时分化出丛生芽,以 MS+6-BA (4~5) mg/L+NAA0.2 mg/L 培养基诱导效果为好。在丛生芽增殖过程中,附加 NAA0.2 mg/L、6-BA 2 mg/L 的 MS 培养基最好,将丛生芽分割转入该培养基中进行继代培养,以带两个或两个以上芽的组织块为宜。理想的继代周期为两周左右,时间过短或过长,继代增殖的倍数都达不到最佳。光照是半夏组培中一个有利因素,适度的光照可使半夏生长繁茂。这与徐萍等^[6]的报道相一致。

3.3 温(网)室基质栽培清洁卫生,组培苗移栽后成活率高,第 1、2 年的 4~10 月间均未见倒苗,只是在 8 月中、下旬出现新老叶交替现象,这一发现为生产中解决倒苗问题提供了思路。

References:

- [1] Wang A, Ke F G. Key measure of high yield of *Pinellia ternate* [J]. *Res Prac Chin Med* (现代中药研究与实践), 2004, 18 (2): 7.
- [2] Ren J H, Chen K R, Xu Q F. Induction of organ of test-tube seedlings of *Pinellia ternate* [J]. *Plant Physiol Commun* (植物生物学通讯), 1983 (4): 44.
- [3] Zhu P F, Mao W Y, Wang D J, et al. Plantlets regenerated from tissue culture of *Pinellia ternate* [J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 1985 (3): 26.
- [4] Han X Z, Zhang Z G, Zhao L H, et al. Research on the technology of one-step culture in *Pinellia ternate* (Thunb.) Briet [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 20 (11): 45.
- [5] Zhu Z R, Wang Y S, Yang Y Z, et al. Tissue culture and rapid propagation of *Pinellia ternate* [J]. *J Guizhou Agric Coll* (贵州农学院学报), 1991, 10 (1): 40~45.
- [6] Xu P, Zhang X L, Wu C H. Research progress of *Pinellia ternate* [J]. *China Pharm* (中国药业), 2003, 12 (3): 76.