

半夏组织培养方法的比较研究

郝会军, 陈美霞, 丁雪珍, 刘 英

(潍坊职业学院, 山东 潍坊 261031)

摘 要: 研究半夏块茎组织培养, 探讨不同灭菌方法对半夏成活率的影响及不同培养基对形态发生的影响, 结果表明: 0.1% 的升汞灭菌 15 min 效果最佳; 2,4-D 0.5 mg/L (单位下同) 与 KT 1.0 组合有利于愈伤组织形成, 诱导率最高; 6-BA 1.0 mg/L (单位下同) 与 NAA 0.2 组合有利于愈伤组织增殖, 增殖效果好; 2,4-D 0.2 与 6-BA 1.5 组合有利于芽的分化; IBA 0.3 或 NAA 0.2 诱导生根效果好。

关键词: 半夏; 组织培养; 比较研究

中图分类号: S 567.23⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)08-0188-03

半夏是天南星科半夏属多年生草本植物, 是一种重要的中药材。以块茎入药, 具镇咳祛痰、和胃止呕、祛风定惊、消肿散节等多种功效, 目前仅国内全年用量就达 5 000 t, 几乎均来自野生。且由于半夏药用和出口需要量大, 其野生资源日益枯竭而难以满足要求, 价格持续上扬。目前, 虽有人工栽培, 但由于半夏生长的环境要求荫、湿, 在灾害性天气较多的年份, 有时造成收获量不足播种量的现象, 这对半夏的栽培生产造成很大限制。用现代生物学手段提高半夏繁殖力的技术, 前人已将其用于对半夏组织培养和快速繁殖的研究。半夏块茎组织培养中, 增殖系数大, 可以在短时间内达到快速繁殖的目的。同时可以对植株进行脱毒和复壮。关于半夏组织培养的报道屡见不鲜, 但说法各有千秋, 无论在灭菌方法、愈伤组织诱导、继代增殖还是器官分化、诱导生根方面均有所不同, 对此进行了比较研究, 旨在筛选出一种较好的灭菌方法和半夏各阶段形态发生所需的培养基配方, 为当地半夏品种的快速繁殖提供了一定的依据。

1 材料和方法

1.1 材料

半夏块茎取自潍坊职业学院实训基地组培中心。

1.2 方法

1.2.1 灭菌 取半夏块茎切成 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm 立方体小块, 在流水中冲洗干净, 经灭菌后接种到 MS 培养基上, 放到培养室中进行培养, 1 周后统计成活率。灭菌方法如下: 处理 I: 取半夏块茎, 用 75% 的乙

醇表面消毒 30 s 后, 再用 0.1% 的升汞消毒 8 min, 然后无菌水冲洗 3 次^[1]。处理 II: 用 0.1% 的升汞灭菌 10~12 min, 其他操作同处理 I^[2]。处理 III: 用 0.1% 的升汞灭菌 15 min, 其他操作同处理 I。处理 IV: 用 2% 的次氯酸钠灭菌 15 min, 其他操作同处理 I^[3]。

1.2.2 愈伤组织诱导 将经过表面灭菌的半夏材料, 分别接种到不同激素种类、不同激素浓度配比的 MS 培养基上进行培养, 3 周后统计愈伤组织诱导率。不同激素组合的培养基如下: 处理 I: MS+2,4-D 0.5 mg/L+KT 1.0 mg/L (下同)^[6]; 处理 II: MS+2,4-D 2.0+KT 0.3^[4]; 处理 III: MS+2,4-D 2.0+KT 2.0^[6]; 处理 IV: MS+NAA 5.0+KT 1.0^[1]; 处理 V: MS+6-BA 0.75+NAA 0.2。

1.2.3 愈伤组织增殖 以半夏块茎诱导形成的愈伤组织为材料进行增殖, 接种到不同激素组合、不同激素浓度的 MS 基本培养基上进行培养, 2 周后统计结果。不同激素组合的培养基如下: 处理 I: MS+6-BA 2.0+NAA 0.2^[2]; 处理 II: MS+6-BA 1.0+NAA 0.2^[4]; 处理 III: MS+IAA 4.0+6-BA 0.5^[7]; 处理 IV: MS+IAA 1.0^[6]。

1.2.4 器官分化 将诱导好的愈伤组织接种到不同激素组合、不同激素浓度的 MS 培养基上。2 周后统计结果。不同激素组合的培养基如下: 处理 I: MS+2,4-D 0.2+6-BA 1.5^[3]; 处理 II: MS+6-BA 3.0+NAA 0.4^[2]; 处理 III: MS+2,4-D 0.1+KT 1.0^[1]; 处理 IV: MS+KT 1.0+NAA 0.1^[4]。

1.2.5 生根成苗 选择块茎愈伤组织形成的半夏分化苗接种到不同激素组合、不同激素浓度的 1/2 MS 培养基上, 蔗糖浓度减至 2%, 然后置于培养室培养, 不同激素组合的培养基为: 处理 I: 1/2 MS+IAA 0.3^[7]; 处理 II: 1/2 MS+NAA 0.5^[6]; 处理 III: 1/2 MS+IBA 0.3^[3]; 处理 IV: 1/2 MS+NAA 0.2^[2]。

1.3 培养基及培养条件

第一作者简介: 郝会军(1977-), 男, 陕西府谷人, 硕士, 讲师, 主要研究方向为植物营养。E-mail: haohj77@163.com。

基金项目: 潍坊市科技发展计划资助项目(潍科计字[2007]41号)。

收稿日期: 2008-02-23

选用 MS 基本培养基,除生根培养基附加蔗糖 2%,其他蔗糖浓度 3%,用 0.6%琼脂固化 pH 5.8~6.0,分装于 100~150 mL 的三角瓶中,一层封口膜加两层玻璃纸封口。121℃湿热灭菌 30 min,接种后放在培养室内培养,温度 22~26℃、湿度 80%、光照 2 000 lx、光照时间 12~16 h/d。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌方法对半夏外植体成活率的影响

在无菌条件下把半夏块茎切成小块,经灭菌后接种到 MS 培养基上,每瓶 1 块,1 周后统计成活率,结果见表 1。由表 1 可知:用 0.1%升汞灭菌,植物组织内的各种菌在 8~12 min 内不能被杀死,次氯酸钠灭菌效果虽与升汞接近,但使半夏块茎变白,致使在培养过程中丧失生活力而死亡。因此,半夏块茎用 0.1%升汞灭菌 15 min 效果最好。

表 1 不同灭菌方法对半夏外植体成活率的影响

处理	接种块数	污染率/%	成活率/%
I	20	80	20
II	20	65	35
III	20	45	50
IV	20	55	45

2.2 不同培养基对愈伤组织诱导的影响

无菌条件下把半夏切成小块,用 75%乙醇表面消毒 30 s,再用 0.1%的升汞消毒 15 min,无菌水冲洗 3 次,每次 1 min,然后分别接种到不同激素种类、不同激素浓度的 MS 培养基上,置于培养室内培养,3 周后统计结果见表 2。由表 2 可知:植物激素的种类及浓度对半夏块茎的脱分化起着重要的调节作用。不同植物激素均能诱导愈伤组织形成。接种 2 周后,切口处均不同程度产生黄绿色愈伤组织,3 周后细胞团明显增大。其中诱导愈伤组织处理 I 效果最好。

表 2 不同培养基对愈伤组织诱导的影响

处理	接种块数	成愈块数	诱导率/%	愈伤组织生长情况
I	20	20	100	愈伤组织成绿色,紧密,直径 10~12 mm
II	20	17	85	愈伤组织较多,直径 5~6 mm
III	20	16	80	愈伤组织疏松,直径 3~5 mm
IV	20	18	90	愈伤组织较紧密,呈淡绿色直径 7~8 mm
V	20	19	95	愈伤组织紧密,直径 8~10 mm

2.3 不同培养基对愈伤组织增殖的影响

将诱导好的愈伤组织在无菌条件下分别接种到不同激素种类、不同激素浓度的 MS 培养基上,置于培养室内培养,培养 1 周后,其表面分化出许多致密而平滑的突起。这些突起多为淡黄色,2 周后可见许多绿色芽点分化成绿色小块茎,增殖效果见表 3。由表 3 可知:生长素对愈伤组织的分化成苗有抑制作用,而细胞分裂素对愈伤组织的分化成苗有促进作用,处理 IV 愈伤组织生长缓慢、有苗分化但长势弱。其中愈伤组织增殖处理 II 效果最好。将分化的半夏苗分离进行继代培养,一般 20 d

左右即可继代培养 1 次,可以分化出大量的、优质半夏幼苗。

表 3 不同培养基对愈伤组织增殖的影响

处理	接种块数	增殖系数	愈伤组织生长情况
I	20	4.0	块茎下部长出较粗的根,愈伤组织疏松,长势弱有分化苗
II	20	6.0	块茎下部长根不明显,愈伤组织致密呈绿色
III	20	3.0	愈伤组织生长缓慢,没有苗的分化
IV	20	2.0	愈伤组织生长迅速,但长势弱

2.4 不同培养基对器官分化的影响

激素是植物组织培养器官分化的关键因素,形成器官的类型被培养基中不同激素及相对浓度控制,而不是这些激素的绝对浓度。为了比较不同培养基对愈伤组织分化芽的影响,将诱导好的愈伤组织在无菌条件下切成小块,分别接种到不同激素种类、不同激素浓度 MS 培养基上,置于培养室内培养,2 周后统计,结果见表 4。由表 4 可知:4 组分化培养基均有分化芽的能力,说明半夏愈伤组织有较强的再分化能力。其中半夏愈伤组织分化芽处理 I 效果最好。

表 4 不同培养基对愈伤组织分化芽的影响

处理	接种块数	愈伤组织分化芽的块数	每块分化芽平均数	芽分化率/%
I	20	16	12~15	80
II	20	12	9~13	60
III	20	8	7~11	40
IV	20	5	3~5	25

2.5 不同培养基对生根诱导的影响

将长有 2 片叶块茎在无菌条件下,去叶后分别转接到不同激素种类、不同激素浓度的 1/2 MS 培养基上,诱导产生不定根,观察生长情况,以开始出现根原基计算启动天数,结果见表 5。由表 5 可知:半夏组培苗在 4 种处理中,生根都比较容易,但在处理 I 根诱导启动时间长,处理 II 中启动时间虽短,但根较细,因此半夏块茎生根诱导处理 III、IV 效果最佳。

表 5 不同培养基对根诱导的影响

处理	启动天数	根长/cm	根数/条	发育情况
I	8~9	0.6~0.8	6~11	较粗
II	5~7	0.4~0.6	5~9	较细
III	5~7	0.8~1.0	8~10	较粗
IV	5~7	0.7~0.9	7~10	较粗

3 讨论

通过对半夏灭菌方法的比较,2%的次氯酸钠和 0.1% 升汞灭菌效果接近,但会使外植体变白,不利于其正常生长。试验得知用 0.1%升汞灭菌 15 min,效果最佳。这样杀菌效果不但好,并且对外植体损伤不大,虽有一部分外植体被杀死,但总体成活率高。

诱导愈伤组织时,处理 I、处理 V 愈伤组织生长状况差不多,但从经济效益考虑,生产上选用处理 V,即 MS+6-BA 0.75+NAA 0.2;就愈伤组织增殖倍数而言,愈伤组织增殖可选用处理 II,即 MS+6-BA 1.0+NAA

大花萱草与黄花菜杂交亲和性及其幼胚离体培养

祝朋芳¹, 张利欣¹, 刘 莉²

(1. 沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110161; 2. 辽宁省农业科学院花卉研究所, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要:以大花萱草(*Hemerocallis hybridus* Hort)品种金娃娃、东方不败、红宝、奶油卷为母本,与黄花菜(*H. citrina* Boroni)进行杂交。结果表明:上述材料间生殖隔离严重,常规花期杂交平均结籽率仅为9.28%。金娃娃与黄花菜授粉后5~6 d取胚珠最佳,此时有37.50%的胚珠离体发育为小粒种子,这些小粒种子成苗率达73.33%。

关键词:大花萱草;黄花菜;亲和性;胚珠;离体培养

中图分类号:S 682.1⁺9;S 604⁺.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2008)08-0190-02

大花萱草(*Hemerocallis hybridus* Hort)是百合科萱草属植物,株型低矮,花姿优美,花色鲜艳,花期长,耐寒,耐旱,是优良的园林绿地宿根花卉,我国许多城市引种后表现良好。黄花菜(*H. citrina* Boroni)株型高大,叶色深绿,花瓣质地厚实,芳香,以食用及药用为主,在我国

栽培历史悠久。现旨在通过大花萱草与黄花菜杂交,选育出优良矮化芳香型长花期萱草新品种,创造和丰富萱草属植物资源。目前,尚未见大花萱草与黄花菜杂交及幼胚离体培养相关报道。

1 材料与方法

杂交试验于2005~2006年进行,分别以大花萱草品种金娃娃、东方不败、红宝、奶油卷2 a生分蘖株为母本,黄花菜为父本,常规花期人工杂交,每株选留5朵花,其余摘掉。开花前2 d去雄,开花当天上午授粉,授粉后5 d去袋。幼胚离体培养试验取金娃娃与黄花菜杂交授

第一作者简介:祝朋芳(1971-),女,博士,副教授,现从事观赏园艺植物育种研究工作。E-mail: pengfangzhu@yahoo.com.cn.

基金项目:沈阳农业大学中青年硕士导师资助项目。

收稿日期:2008-02-27

0.2,增殖系数可达6.0;芽的分化过程中,处理I芽分化率最高,即MS+2,4-D 0.2+6-BA 1.5;对于诱导生根,用处理III(1/2 MS+IBA 0.3)或处理IV(1/2 MS+NAA 0.2)效果都很好。总之,通过半夏组织培养的比较研究,建立了适合当地半夏的快速繁殖体系,为半夏工厂化育苗提供了一定依据。

参考文献

[1] 张瑜,张莹,陶燕,等.应用组织培养方法对半夏快速繁殖的研究[J]. 中南药学杂志,2005,3(9):57-60.

[2] 夏海武,赵月玲.半夏组织培养研究[J]. 中国中药杂志,1994,19(12):16-20.

[3] 罗光明.半夏组织培养与植株再生[J]. 中药研究与信息,2000,2(7):13.

[4] 万美亮,陈宏康.半夏组织培养与快速繁殖研究[J]. 中国中药杂志,1995,20(9):40-45.

[5] 唐琼莲.半夏组织培养[J]. 云南林业科技,1998,82(1):26-30.

[6] 张苏锋,谢素霞.半夏组织培养快速繁殖的研究[J]. 信阳师范学院学报,1998(11):87-89.

[7] 王殿久.掌叶半夏愈伤组织诱导与植株再生[J]. 植物生理学通讯,1983,13(2):125-128.

Comparison Research of Pinellia Tissue Culture Method

HAO Hui-jun, CHEN Mei-xia, DING Xue-zheng, LIU Ying

(Weifang Vocational College, Weifang, Shandong 261031, China)

Abstract: This article mainly researched pinellia block stem tissue culture, the discussion different antiseptic method to the pinellia survival rate influence, the different culture medium to the morphogenesis influence. The result indicated 0.1% mercuric chloride antiseptic 15 min effect was best; 2,4-D 0.5 mg/L (same in after) and KT 1.0 combine were advantageous to injury the organization to form, the inductivity was highest; 6-BA 1.0 and NAA 0.2 combine were advantageous to injury the organization to multiply, the multiplication effect was good; 2,4-D 0.2 mg/L and 6-BA 1.5 mg/L combine were advantageous to buds differentiation; IBA 0.3 or NAA 0.2 induction took root the effect to be good.

Key words: Pinellia; Tissue culture; Comparison research