



半夏组织培养研究进展

□ 楚雄师范学院 675000 王朝英 李璐 王静 邱璐

摘 要: 半夏组织培养以根、茎、叶、种子、珠芽等做外植体, 以浓度为 0.2% 的 HgCl_2 消毒 4min (雨季消毒 4.5min)。以 MS 为基本培养基, 以 KT、ZET、2ip 配合 NAA 诱导不定芽及愈伤组织, 以 NAA 为 0.5~1.0mg/L+ 活性碳 0~0.3% 诱导根形成, 以浓度为 3% 的蔗糖作为碳源, 以 $\text{CH}_300\text{mg/L}$ 、琼脂 8g/L 控制褐化, pH 值为 5.8, 光强为 1500IX, 光照时间为 12h/d, 黑暗 12h/d, 培养温度为 25~28℃。

关键词: 半夏; 组织培养; 外植体; 消毒剂; 培养基; 激素; 外界条件

半夏为天南星科多年生草本植物, 高 15~35cm, 块茎近球形, 单叶, 全缘, 成株叶 3 全裂。肉穗花序顶生, 花粉粒球形, 无孔沟。浆果成熟时为红色, 果内有种子 1 粒。半夏喜温暖、潮湿的气候和隐蔽的环境, 半夏根系浅, 吸水能力较弱。半夏叶辛, 性温, 有毒, 具有燥湿化痰、消痞散结的功效。

1 半夏外植体的选择

1993 年, 朱宝成等取掌叶半夏成熟种子, 剥去膜质种皮, 接种取得植株。另取掌叶半夏当年生块茎种植于室内花盆中, 待长出幼叶后将幼叶和叶柄切下, 接种取得植株。2004 年, 范美华等取半夏幼嫩叶柄诱导半夏愈伤组织获得成功。2004 年, 罗成科等将半夏块茎播种于沙壤土中萌芽, 取 3~4cm 长的幼叶作外植体进行半夏疏松愈伤组织诱导获得成功。1994 年, 曾令波等人取自大田的半夏幼苗, 以叶片、叶柄为外植体, 对半夏组织培养中不同的植物生长调节物质对形态发生的效应进行了研究。2003 年, 彭正松等选用半夏块茎、株芽、叶片、叶柄等作为外植体, 对半夏组织培养一步成苗技术进行研究。1997 年, 李亮亮等用半夏种子诱导再生植株。2006 年, 邱璐等取半夏叶、块茎、叶柄作为外植体, 对半夏组织培养进行了研究。

2 消毒灭菌的方法

1993 年, 吴爱民等在用 0.1% HgCl_2 消毒 10min, 无菌水冲洗 4~5 次, 用滤纸吸干水分, 再接种到培养基上, 而幼叶和叶柄用 0.1% HgCl_2 消毒 5min, 水洗, 再接种到培养基上。2004 年, 刘树南等用幼嫩叶柄, 流水冲洗, 用 70% 乙醇消毒

30s, 无菌水冲洗 3 次, 再放入 0.1% 的升汞溶液中浸泡 10 min, 无菌水冲洗 3 次, 无菌滤纸吸干表面水分, 再接种到培养基上。2006 年, 邱璐采用洗涤剂代替饱和洗衣粉水, 取消酒精消毒步骤, 用浓度为 0.2% 的 HgCl_2 代替 0.1% 的 HgCl_2 消毒 4 min, 取得较好效果。0.2% HgCl_2 优于 0.1% HgCl_2 的原因在于高浓度的 HgCl_2 能迅速杀死外植体表面的微生物, 达到迅速杀菌的作用。另外, 由于灭菌时间较短, 仅 4min, 消毒剂对外植体细胞的损伤小, 外植体易于恢复生长。外植体大小对实验成功起着重要作用, 外植体太大, 给消毒灭菌带来困难, 消毒不彻底, 但外植体太小, 容易受消毒液损伤, 难以恢复生长。一般取 3~4 cm 左右大小, 剪去老叶, 进行消毒。另外消毒完毕后, 剪去切口, 切出被 HgCl_2 损伤的细胞, 再将外植体切成需要的大小, 用无菌水冲洗去伤口分泌物, 再进行接种, 效果最好。

3 基本培养基的选择

半夏对培养基的适应性与半夏的基因型密切相关, 不同品种的半夏对培养基的适应程度不同。半夏组织培养常用的培养基有 MS 和 B5。2004 年, 范美华等使用不同激素, 在 MS 培养基上观察到半夏愈伤组织的诱导。结果表明: MS + 1.5 mg/LKT + 2.0 mg/L2,4-D 对半夏愈伤组织的诱导效果最好, MS + 0.2 mg/L6-BA + 0.5 mg/LNAA 增殖培养的愈伤组织较适合于器官的分化, MS + 0.5 mg/L6-BA + 6.0 mg/L2,4-D 增殖培养的愈伤组织较适合于做细胞悬浮培养的材料。1993 年, 朱宝成等用 MS 和 B5

培养基为基本培养基, 培养掌叶半夏获得成功。2004 年, 彭正松等用不同浓度配比的 2,4-D 和 BA 两种植物激素的 MS 基本培养基, 对半夏疏松愈伤组织诱导率和长势进行研究, 结果表明: 当 MS + 3.0 mg/L2,4-D + 0.5 mg/LBA 时, 愈伤组织诱导率和长势最好。1994 年, 赵洁等人对半夏叶片、叶柄进行离体培养, 探讨不同植物生长调节物质对其形态发生的效应, 结果表明: NAA, 2,4-D + 0.5 mg/LBA 时, 愈伤组织形成, 而且附加 2,4-D 有利于芽的分化, 6-BA 促进芽的分化效果显著。2006 年, 邱璐选用 BA, NAA, KT, 2IP, 2,4-D 等不同激素的浓度配比, 附加在 MS 培养基上, 对地珠半夏组织培养进行了进一步的研究, 结果表明: 附加 2,4-D, NAA, BA 的培养基中的半夏生长效果最好。

4 激素对半夏组织培养的影响

4.1 愈伤组织的诱导

1999 年, 张腾国在半夏组织培养快繁技术研究中, 以 MS 为基本培养基加不同浓度的 2,4-D 和 BA 后组成诱导培养基, 具体如下:

(MS1) MS + 2,4-D 1.0 mg/L + BA 3.0 mg/L

(MS2) MS + 2,4-D 2.0 mg/L + BA 3.0 mg/L

(MS3) MS + 2,4-D 0.5 mg/L + BA 3.0 mg/L

(MS4) MS + 2,4-D 3.0 mg/L + BA 3.0 mg/L

(MS5) MS + 2,4-D 3.0 mg/L + BA 3.0 mg/L

将消毒过的半夏块茎及从分化苗上



切取的茎尖、叶片、叶柄接种于种诱导培养基上观察其诱导效果计不同培养基的诱导率。在4种外植体中,以茎尖的愈伤组织诱导效果最好,其在MS1、MS2、MS4、MS5培养基上的诱导率均达100%;其次为块茎,愈伤组织诱导率为71%~91%;叶柄和叶片的诱导效果较差,愈伤组织诱导率分别为11%~60%和35%~71%。从不同培养基对不同外植体的诱导效果看,MS2为较理想的诱导培养基,其对茎尖、块茎、叶片的愈伤组织诱导率分别为100%、91%、71%,均高于其他4种培养基。从不同培养基上愈伤组织的生长情况看,MS1、MS2、MS3培养基上形成的愈伤组织致密、坚硬,绿色或浅绿色,易形成类似珠芽的组织块,并分化出了芽,而MS4、MS5培养基上形成的愈伤组织则质地疏松,白色透明或半透明,不利于进一步分化。

4.2 根的诱导

2006年郝会军、刘英、王洪波等在“半夏组织培养与快速繁殖的研究”中,发现不同生长调节剂组合对根的分化影响不同(如表所示):

表1

生长调节剂组合	接种数(个)	分化数(个)	分化率(%)
2, 4-D 0.2 + KT 0.2	10	9	90
NAA 0.2 + KT 2.0	10	0	0
6-BA 0.5 + 2, 4-D 0.1	10	5	50
6-BA 0.5 + NAA 0.5	10	7	70
6-BA 0.5 + 2, 4-D 0.5	10	6	60
6-BA 0.5 + NAA 1.5	10	4	40

结果表明:2, 4-D 0.2 + KT 0.2有利于根的分化。在2, 4-D 0.2 + KT 0.2组合和NAA 0.2 + KT 2.0组合中,随着KT浓度的变化,根的分化率变化有显著差异。浓度低时根的分化率较高,高浓度根的分化率低,甚至无根产生。在6-BA 0.5 + 2, 4-D 0.1和6-BA 0.5 + NAA 1.5组合中,当2, 4-D和NAA浓度在0.1~0.5mg/L范围内时,形成的根细长,为正常根,但根分化率低,最高为70%。在0.5~1.5mg/L时形成粗壮不正常幼根,表面绒毛也少,可能是由于细胞分裂素浓度较高所致。

4.3 芽的诱导

2005年,巢建国等在将应用组织培养法对半夏快速繁殖的研究中,将愈伤组织接种到不同浓度6-苄氨基嘌呤

(6-BA)和萘乙酸(NAA)2种激素组合的分化培养基上,培养7d后,其表面均分化出许多致密而平滑的突起。这些突起多为淡黄色,14d后可见许多绿色芽点并分化形成绿色小块茎,30d后长出许多具单叶的半夏再生植株,观察芽分化率。不同激素组合对愈伤组织分化芽的影响及接种愈伤组织分化每块分化培养基(mg·L⁻¹)的块数芽平均数见下表:

表2

培养基(mg·L ⁻¹)	接种数(个)	分化的愈伤组织块数(块)	每块分化块数(个)	分化芽平均数(个)
MS+6-BA3.0+NAA0.5	16	12	8~12	
MS+6-BA3.0+NAA0.4	16	15	12~15	
MS+6-BA3.0+NAA0.3	16	13	10~13	
MS+6-BA2.0+NAA0.3	16	11	9~13	
MS+6-BA2.0+NAA0.4	16	11	7~11	
MS+6-BA2.0+NAA0.5	16	12	8~12	

结果表明:6组分化培养基均有较强的分化芽的能力,说明半夏愈伤组织有较强的再分化能力。

5 其他外界条件对半夏组织培养的影响

5.1 pH值

半夏喜欢酸性环境,pH值控制在5.0~6.0较好,超过6.0将严重影响半夏的增殖、生根及愈伤形成。2006年,邱璐在地珠半夏组织培养研究中发现,pH值为6.0时,培养效果最好。

5.2 光照

半夏组织培养光照强度为1500LX,每天光照12h,黑暗12h,效果最好。

5.3 培养温度

半夏生长的最适温度为25±2℃。该温度下半夏愈伤组织、芽、根均正常生长。

5.4 碳源

使用蔗糖做碳源优于果糖、葡萄糖。蔗糖对愈伤的形成本质部及韧皮部的分化是必要的,而且3%优于2%。

5.5 培养基的硬度

一般培养基的硬度大,不利于半夏的生长发育,在培养基中加入6.0%~7.0%的琼脂对半夏培养效果最好。

6 转基因

2001年,姚剑虹、孙小芬等在半夏凝集素基因的克隆中,利用RACE-PCR技术从半夏花序中克隆出半夏凝集素的全长CDNA,通过比较半夏同其他天南星科植物的凝集素基因序列和推测的氨基酸序列,发现半夏凝集素基因具有信

号肽的前体蛋白。半夏凝集素同其他天南星科植物凝集素一样,为具有3个甘露糖专一结合的凝集素,是目前唯一只与甘露糖而不与葡萄糖结合的一种具有凝集作用的蛋白质。它是一种具有抗早孕活性、抗肿瘤作用的植物凝集素。1999年,吴皓、唐志坚等在“正交法与药典法姜半夏中成分含量及对动物作用的比较”中,比较“正交法”和“药典法”两种炮制工艺炮制的姜半夏中成分的含量及两种炮制品对动物的作用。方法:总生物碱含量测定采用重量法、酸性染料比色法,浸出物、灰分测定采用药典附录法,毒性采用LD50测试,胃液分泌采用大鼠幽门结扎,以紫外分光光度法测定PGE2含量,酸度计测试胃酸,改良Met法测定胃蛋白酶活性。结果:总生物碱含量以“正交法”较高,灰分、浸出物含量以药典法较高,两种姜半夏混悬液、水煎液灌胃均未见明显毒性,但水煎液腹腔注射以药典法毒性较大,其LD50为(13.346±0.019)g/kg,两种姜半夏对大鼠胃液中PGE2含量、胃蛋白酶活性均呈促进作用,但对胃液量无明显影响。结论:两种工艺炮制的姜半夏无明显差异,以“正交法”炮制品较好。

2003年,唐东芹、钱虹妹等在根癌农杆菌介导半夏凝集素基因pBIXPTA对百合的转化中,将半夏凝集素基因pBIXPTA通过农杆菌导入百合基因组中,获得了转基因植株,分子检测证明pBIXPTA已整合到百合基因组中,为最终培育出抗虫新品系奠定了良好基础。

7 分子标记

2006年,成玉、陈成彬等应用 AFLP 技术探讨半夏属五个种的亲缘关系中,利用扩增酶切片断多态性(AFLP)方法研究半夏属内5个种之间的亲缘关系。应用POPGENE及SPSS软件对所得“1”、“0”二元矩阵进行遗传距离、遗传相似性及聚类分析。实验发现鹞落坪半夏与虎掌之间的遗传差异小,鹞落坪半夏可能是虎掌的一个特化分支群体;虎掌和鹞落坪半夏组与本属其他种之间遗传差异较大,相似性较小,盾叶半夏和滴水珠是姐妹群关系,盾叶半夏虽然叶形与同属其他种有显著差异,但遗传距离及相似性分析对比不支持其独立于半夏属

浅谈文山州辣椒露地高产栽培技术

□文山州种子管理站 663000 谢会琼

□文山州经作站 663000 郑鹏飞

摘 要:文山州辣椒栽培种植历史悠久,全州八县均有种植,常年播种面积在 1.33 万 hm^2 ,随着农业产业结构的进一步调整,人民生活水平的不断提高,生产、加工对辣椒的需求越来越大,辣椒种植进入一个快速发展的时期。通过调查、了解、总结有关辣椒生产的经验,就如何做好文山州辣椒露地高产栽培技术、提高辣椒产量和品质、增加收入作如下探讨。

关键词:辣椒;分类;露地栽培;高产技术

1 辣椒的作用

辣椒果实含有丰富的蛋白质,维生素 C 含量为菜中之冠。医药专家认为,辣椒能缓解胸腹疼痛,制止痢疾,杀抑胃内的寄生虫,控制心脏病及冠状动脉硬化,还能刺激口腔黏膜引起胃的蠕动,促进唾液分泌增强食欲,促进消化。辣味品因具有杀菌、防腐、调味、营养、驱寒等功能,为人类防病、治病,改良基因,促进人类进化起到了积极的作用,因此,在人们的日常菜肴中适当摄入一点辣椒,对身体健康大有益处。

2 辣椒的分类与品种

辣椒属于茄科辣椒属,按果实特征分为五个类型:

1) 长角椒类。株型矮小至高大,分枝性强,叶片较小或中等,果实长角形,微弯曲似羊角、线形。一般具有辛辣叶,其中肉薄辛辣味强的主要供干制、盐制。辣味适中的主要供鲜食。果实一般下垂,个

别品种也有朝天的。产量较高,栽培最为普遍。我国著名的内外销辣椒干均属这一变种,如河南永城县大羊角、线椒,陕西牛角椒,耀县线辣子,四川二金条,山西代县长辣椒,福建宁化牛角椒,云南丘北辣椒等。适合鲜食的有湖南长牛角椒、伏地尖、杭州鸡爪椒。

2) 甜柿椒类。又称柿子椒、甜椒或灯笼椒。味甜或具轻辣味,主要适于鲜食。植株中等或矮小,分枝性弱。叶片较大,卵圆形或椭圆形。果实硕大、圆球形、扁圆形、短圆、锥形。果面常具 3~4 条纵沟。果肉肥厚,大者单果重达 200g 以上,结果数较少。耐热与抗病性不及辣味品种,冷凉地区栽培比炎热地区的产量高。全国著名品种有上海茄门甜椒,吉林三道筋、四方头甜椒。

3) 簇生椒。株型中等或较高,分枝性不强,叶片较长大,果实簇生,每簇 3~5 个或 7~8 个。果梗朝天或下垂,果色深

红,果肉薄、辛辣味强、油分高、晚熟、耐热,产量低,主要供干制调味,如四川七星椒、陕西线椒、湖南线椒。

4) 樱桃椒类。株型中等或矮小,分枝性强,叶片较小,卵圆或椭圆形,先端渐尖。果实朝天或斜生,圆形或圆锥形,小如樱桃,故名。果实有红紫、黄色。果肉薄,种子多,辛辣味强。云贵一带栽种较多。

5) 圆锥椒类。株型中等或矮小,叶片中等大小,卵圆形,果实呈圆锥形或短圆柱形,果梗朝天或下垂,果肉较厚,辣味中等,主要鲜食青果,如南京早椒、成都二斧头、昆明牛角椒等。

上述品种虽然种类、品种繁多,但栽培技术大体相近。现以文山州的丘北辣椒为例,重点讲述丘北辣椒露地高产栽培技术措施。

3 丘北辣椒的特性

丘北辣椒属茄科、辣椒属。为一年生

其他种,而作为完全独立进化类群的结论,为半夏属分类及系统进化关系提供了分子生物学证据。

2006 年,张君毅、郭巧生对我国不同地区半夏 rDNA 序列进行了分析,研究我国不同地区半夏核糖体 ITS 碱基序列差异及其与其地理分布和外部形态的相关性。方法:运用 PCR 法对半夏 ITS1-5.8S-ITS2 序列扩增后直接测序,用软件 CLUSTAL 1.83 和 MEGA 3.1 分析测序结果。结果:得到我国半夏主要的 16 个居群 18 个样本 rDNA 中的 ITS 和 5.8S rDNA 完全序列。ITS1、5.8S 和 ITS2 序列

长度分别为 276、162、246 bp。ITS2 碱基频率差异显著,ITS1 较为保守。根据两者序列以邻接法建立分子系统发生树。结论:半夏 rDNA 变异与其地理分布相关,与其外部形态关系有待进一步研究。

【参考文献】

- [1] 朱宝成,吴爱民,成亚利等.药用植物掌叶半夏组织培养及药物成分分析[J].作物学报,1995,21(4):3~16
- [2] 范美华,周吉源,彭瑜,刘树南.半夏愈伤组织的诱导及增殖反应[J].山东中医杂志,2005,24(3):168~171

[3] 罗成科,彭正松.半夏组织培养一步成苗技术的研究进展[J].安徽农业科学学报,2003,31(5):798~799

[4] 曾令波,周吉源,赵洁,熊丽等.半夏组织培养中不同植物生长调节物质对形态发生的效应[J].安徽师大学报,1995,18(3):42~45

[5] 罗成科,彭正松.半夏疏松愈伤组织的诱导的研究[J].西华师范大学学报,2005,26(1):37~43

[6] 李亮亮,朱宝成等.掌叶半夏组织培养过程中的染色体变异[J].农业生物技术学报,1998,6(1)

供应:

江西省会昌县英雄电器厂向广大用户提供系列专业电脑控制孵化机以及多功能烘干成套设备。
电话:0797-5622999 短信索取详细资料:13507070404

31