

荆半夏叶片外植体快繁技术研究

王学民

(荆楚理工学院 生物工程学院,湖北 荆门 448000)

[摘要] 以荆门地区芍药叶形半夏的叶片为外植体,分别取不同时间叶片接入不同培养基诱导形成珠芽,然后将珠芽接入不同成苗培养基并在不同培养条件下培养,使其在形成小苗过程中形成小块茎。结果表明:形成珠芽前的叶片在培养基 MS + 0.5 mg/L IAA + 0.8 mg/L 6-BA 上诱导形成珠芽的效果较好;珠芽分开后接入培养基 MS + 0.05 mg/L BA + 0.01NAA mg/L 中采用每天 10 h 光照培养可以获得适合于大田栽种的小块茎。

[关键词] 半夏;叶片;快繁;块茎

[中图分类号] S567.23*9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-4657(2007)12-0001-04

半夏(*pinellia ternate breit*)是天南星科半夏属多年生草本植物,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,是一种常用的传统中药材。生长于湖北荆门地区的半夏(荆半夏)是药材质量较好的品系之一,野生资源较丰富,但是,近年来过度采挖野生半夏也使野生半夏资源濒临枯竭。本研究希望通过组培的方法大量获得适合于生产的小块茎,为半夏的人工栽培奠定基础。

半夏可通过块茎、珠芽及种子繁殖。半夏种子较小,萌发率也不高,一般不适合做生产上的繁殖体^[1]。珠芽埋入土中能形成小苗,在这一过程中也就形成了块茎,珠芽通过一年的生长形成的块茎较小,一般直径在 0.8~1.0 cm 左右,如作为药材出售很不经济。一年生的块茎萌发成苗后,叶柄上能产生珠芽,同时块茎也在增大,但 2~3 年生块茎过大,其萌发率不如一年生小块茎,其单位面积的净增量也不如小块茎^[2]。所以,作为人工栽培采用的繁殖体最好是一年生、大小 0.8~1.1 cm 之间的小块茎。关于半夏快繁的研究报道较多,有报道用半夏叶柄或叶片为外植体直接诱导块茎成功^[3,4],直接形成小块茎可避免经历愈伤阶段从而避免产生突变,但笔者认为,从外植体到块茎的过程必然经历脱分化和再分化的过程,只是该方法的愈伤阶段不够明显。避免组培中的遗传变异主要在于减少引起变异的因素,如愈伤阶段持续的时间、高浓度激素的使用等。另外,该报道对诱导出块茎的大小和萌芽率未作讨论,是否适合做种茎也未可知,本研究紧密结合半夏的栽培实践,参照半夏的自然繁殖过程,希望通过较简单的培养程序短时间内大量获得直接用于生产的繁殖体。

1 材料与方 法

1.1 培养程序

选用荆门地区芍药叶形半夏为材料。实验分为珠芽的诱导和小块茎的形成两个环节。珠芽的诱导:于 4 月 5 日种下小块茎,分别在 5 月 1 日、5 月 25 日、8 月 15 日及 9 月 5 日取叶片接入培养基。将诱导出的珠芽进行增殖培养后接入成苗培养基,将形成的小苗移栽,等小苗自然死亡后给予适当的温度和水分,统计小块茎的萌发率。

1.2 培养基

珠芽诱导培养基:基本培养基为 MS,其中分别添加以下不同种类和不同浓度的激素:0.5 mg/L IAA 或 NAA + 6-BA(0.5, 0.8, 1.2) mg/L。块茎形成培养基:MS₀; MS + 0.05 mg/L BA + 0.01NAA mg/L;

[收稿日期] 2007-09-23

[作者简介] 王学民(1964-),男,河北唐山人,荆楚理工学院教授。研究方向:医学遗传学。E-mail:wxm641213@tom.com。

MS+0.5 mg/L BA+0.2 mg/L NAA。以上培养基其它条件均为:pH 值 5.8,琼脂 7.0 g/L,蔗糖 3%,块茎形成培养基蔗糖浓度为 1%。

1.3 接种方法和培养条件

叶片在超净工作台内按如下步骤消毒:75%酒精浸泡 30 s→无菌水清洗 1 次→0.1%升汞浸泡 10 min→无菌水冲洗 5 次。在无菌的滤纸上晾干后,切成 1.0 cm×1.0 cm 大小,并在中间划一道伤口,然后平铺在培养基上。

培养室温度均为 25 ℃,珠芽诱导培养每天光照 8 h,块茎形成培养每天光照设 8 h、10 h 及 12 h 三个对照。光照强度 2 000~3 000 lux。

2 结果与分析

2.1 珠芽的诱导培养

半夏在一年的生长过程中,往往在 7 月中下旬会有一次倒苗,8 月初再出苗,分别于 5 月中旬和 8 月下旬长出珠芽。不同时间的叶片其生理状态不同,组培反应也不同,于不同时间取材可确定适于组培的最佳时间。叶片接入培养基 10 d 后伤口处开始膨大,20 d 开始形成芽,30 d 后它们数量不再变化,统计结果列于表 1。将时间和激素两因素分别取平均数作方差分析列于表 2 和表 3。

表 1 取材时间和激素对珠芽诱导的影响

取材 时间	激素(mg/L)			接种数	形成珠芽的 外植体数	诱导率 (%)	平均每外植体数 形成的珠芽数
	NAA	IAA	6-BA				
05-01	0	0.5	0.5	15	10	66.7	1.5
05-01	0	0.5	0.8	15	14	93.3	3.5
05-01	0	0.5	1.2	15	13	86.7	3.0
05-01	0.5	0	0.5	15	8	53.3	0
05-01	0.5	0	0.8	15	10	66.7	0.5
05-01	0.5	0	1.2	15	9	60.0	1.0
05-25	0	0.5	0.5	15	6	40.0	0
05-25	0	0.5	0.8	15	7	46.7	0.7
05-25	0	0.5	1.2	15	8	53.3	0.8
05-25	0.5	0	0.5	15	5	33.3	0
05-25	0.5	0	0.8	15	5	33.3	0
05-25	0.5	0	1.2	15	6	40.0	0.2
08-15	0	0.5	0.5	15	11	73.3	1.6
08-15	0	0.5	0.8	15	14	93.3	3.3
08-15	0	0.5	1.2	15	12	80.0	2.5
08-15	0.5	0	0.5	15	9	60.0	0
08-15	0.5	0	0.8	15	9	60.0	1.0
08-15	0.5	0	1.2	15	10	66.7	1.2
09-05	0	0.5	0.5	15	6	40.0	0
09-05	0	0.5	0.8	15	6	40.0	0.5
09-05	0	0.5	1.2	15	7	46.7	0.6
09-05	0.5	0	0.5	15	4	26.7	0
09-05	0.5	0	0.8	15	5	33.3	0
09-05	0.5	0	1.2	15	6	40.0	0.2

表2 取材时间对培养效果影响的统计分析表

取材时间	诱导率(%)	平均每外植体 时间形成的珠芽数
05-01	71.1a	1.6a
05-25	41.1b	0.3b
08-15	72.2a	1.6a
09-05	37.9b	0.2b

表3 激素对培养效果影响的统计分析表

激 素			诱导率(%)	平均每外植体 形成的珠芽数
NAA	IAA	BA		
0	0.5	0.5	55.0b	0.8c
0	0.5	0.8	68.3a	2.0a
0	0.5	1.2	66.4a	1.6b
0.5	0	0.5	43.3c	0e
0.5	0	0.8	48.3c	0.4d
0.5	0	1.2	51.7b	0.7c

从表2可看出,取材时间对诱导率和平均每外植体形成的珠芽数有显著影响,5月1日和8月15日所取叶片无论是在诱导率方面还是在平均每外植体形成的珠芽数方面均明显优于其它两次所取叶片。5月1日和8月15日半夏还未形成珠芽,这时叶片比较幼嫩,分化程度相对较低,这可能是该时间取材培养效果较好的原因。从表3看,IAA和BA搭配使用总体效果较好,当采用0.5 mg/L IAA + 0.8 mg/L 6-BA组合时效果最好。综合两因素,从表1可看出,珠芽形成前取材并接入到含激素0.5 mg/L IAA + 0.8 mg/L 6-BA的培养基中效果较好。

2.2 小块茎的形成

诱导形成的珠芽经过增殖后,将其分开接入不同培养基,经不同时间光照培养后,形成小苗,然后将小苗移栽,统计移栽成活率,倒苗后挖出小块茎,统计其平均大小后播于土壤中,保持适当的湿度和温度,统计萌芽率。结果列于表4。移栽后的小苗见图1和图2。



图1 半夏珠芽形成的小苗

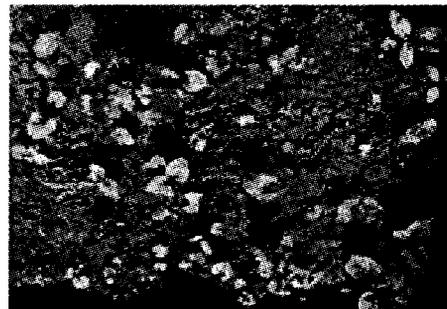


图2 移栽成活的半夏

表4 培养基和光照时间对块茎形成的影响

培养基	光照时间 (h/d)	平均成苗 时间(d)	成苗率(%)	移栽成活率 (%)	小块茎 平均大小(cm)	萌芽率(%)
1	8	25	90.0	95.8	0.85	100
1	10	25	100	96.0	0.96	95.8
1	12	26	93.3	100	1.02	100
2	8	15	96.7	96.7	0.75	96.4
2	10	14	100	100	0.89	100
2	12	15	100	100	1.01	100
3	8	10	73.3	81.8	0.70	83.3
3	10	10	70.0	90.5	0.75	84.2
3	12	11	66.7	100	0.80	90.0

注:培养基1,2,3分别代表MS₀;MS + 0.05 mg/L BA + 0.01NAA mg/L;MS + 0.5 mg/L BA + 0.2 mg/L NAA三种培养基。成苗时间为不再有小苗产生的时间。成苗率 = 形成小苗的珠芽数/接入的珠芽数 × 100%。移栽成活率 = 成活的小苗数/移栽的小苗数 × 100%。小块茎的大小指小块茎的横径长。萌芽率 = 出苗的块茎数/种下的块茎数 × 100%。所接珠芽均通过相同条件诱导获得。

从表4看出,培养基3中激素相对较高,这可以提高珠芽出苗的时间,但也造成一系列负面效果,表现在以下方面:成苗率降低,珠芽本身可作为繁殖体,其体内的激素水平和种类使其较易成苗,培养基中

过高的激素浓度反而抑制了成苗;移栽成活率较低,在较高相对浓度的刺激下,形成的小苗各种代谢可能与正常小苗存在差异,将其移栽到土壤中,小苗可能一时难以适应变化了的环境,从而容易出现移栽死亡;高浓度激素条件下形成的小块茎相对较小,这可能是由于激素提高了代谢水平,使淀粉一类的贮能物质减少。除此之外,高浓度激素条件下形成的小块茎还表现出萌发率相对较低。从培养效率的角度考虑,培养基 2 比 1 好,培养基 2 成苗时间短,快繁周期也可相对缩短。光照时间可影响移栽成活率和小块茎平均大小,光照时间提高,小苗进行光合作用的时间增长,使小苗的自养生理机能更加健全和有效,合成的贮能物质也相应增加,从而在自养条件下表现出更强的适应性,体积也相对较大。每天光照 10 h 和 12 h 对成活率造成的差异不大,对小块茎平均大小虽产生了差异,但小块茎平均大小均在 0.8 ~ 1.1 cm 较合适的范围内(培养基 3 上的情况除外),从快繁成本上考虑,每天 10 h 光照更合适。

3 讨论与结论

1)理论上讲,组培作为一种无性快繁技术应用于半夏繁殖可提高其繁殖效率,但要将其成功应用于生产取决于以下两点:一是通过组培快繁应大幅度提高繁殖效率(可用单位时间内平均每个外植体产生的繁殖体的数量来衡量),同时成本应足够低。二是通过组培获得的繁殖体应能方便地应用于生产。如用组培苗作种苗,运输成为一个麻烦,从苗圃到农民栽种的过程会有一些的损失。用块茎作繁殖体可避免这些麻烦和损失,但组培出来的块茎应大小适中而均一,栽种下去能完全萌发。本研究通过“叶片—珠芽—块茎”途径获得块茎能满足生产的需要(大小适中且百分之百萌芽),且繁殖效率较高。

2)在从叶片到珠芽这一过程中,取材时间通过影响叶柄的生理状态进而对培养效果产生影响,培养基只有对较好状态的叶柄进行诱导才能获得较好的效果。从实验结果可看出,在半夏小苗刚形成到形成珠芽这段时间内的叶片较适合诱导,培养基 MS + 0.5 mg/L IAA + 0.8 mg/L BA 诱导出的珠芽较多较好。

3)从珠芽到块茎的过程实际上是半夏自然繁殖过程的模拟,这一过程在培养基中进行,主要是因为形成的珠芽相互粘连,分开时会造成损伤。完成这一过程的培养基与土壤的功能相似,所以激素浓度不宜较高,甚至可不加,但综合考虑培养效率,这一过程的培养基以培养基 MS + 0.05 mg/L BA + 0.01NAA mg/L为好。充足的光照可锻炼组培苗的光合系统从而提高组培苗的自养能力,每天 10 h 和 12 h 光照在这方面的效果无太大差异,从成本角度考虑,每天 10 h 光照较好。

[参考文献]

- [1] 顾德兴,李云香,徐炳声.半夏的繁殖生物学研究[J].植物资源与环境,1994,3(4):44-48.
- [2] 郭巧生,张国泰,许来武,等.不同繁殖材料对半夏产量的影响[J].中国中药杂志,1993,18(3):140-142.
- [3] 薛建平,朱艳芳,张爱民,等.半夏块茎直接再生技术的研究[J].作物学报,2004,30(10):1060-1064.
- [4] 郭余龙,贾永芳,杨星勇,等.半夏的组织培养及成分比[J].农业生物技术,2003,11(3):259-262.

Study on the Rapid - propagation Technical System with the Leaves of *Pinellia Ternate* Breit as Explants

WANG Xue - min

(Jingchu University of Technology, Jingmen, Hubei, 448000, China)

Abstract: These leaves cut off from the plants in different growth periods were inoculated on different media to form buds. These buds placed onto different media were cultured under different circumstances. The results showed that these leaves cut off from bud - unforming plants and inoculated the media MS + 0.5mg/L IAA + 0.8 mg/L 6 - BA can form more buds, and that these buds placed on the media MS + 0.05mg/L BA + 0.01NAA mg/L and cultured under the 10 - hour illumination per day can form tubers.

Key words: pinellia ternate breit;leaves;rapid - propagation;tubers