

doi:10.11937/bfyy.20171032

荆半夏类原球茎组培快繁体系的优化

李先良¹, 赵志常²

(1. 荆楚理工学院 生物工程学院, 湖北 荆门 448000; 2. 中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所, 农业部华南作物基因资源与种质创制重点开发实验室, 海南 儋州 571737)

摘要:以荆半夏为试材, 采用正交实验设计, 研究了不同外植体及消毒方法对内生菌的影响, 并系统地研究了外植体及细胞分裂素对类原球茎诱导的影响、类原球茎向种茎转化的方法, 以期提升半夏类原球茎途径组培快繁效率提供参考。结果表明: 叶片未展开时叶柄作外植体, 内生菌污染较少, 诱导类原球茎效果好。外植体用升汞浸泡前用 0.1% 苯扎溴铵溶液浸泡 3 min 有助于降低内生菌污染率。幼嫩的叶柄在培养基 MS+TDZ 0.5~1.0 mg·L⁻¹ 上能较好地形成类原球茎。类原球茎在组培过程中形成根和叶柄后移栽较好, 类原球茎在培养基 1/3MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹ 上能较好形成丛生苗, 丛生苗移栽后可形成小块茎。

关键词:荆半夏; 类原球茎; 组培快繁; 优化

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2018)01-0014-05

半夏(*Pinellia ternata*)属天南星科半夏属多年生草本植物, 以块茎入药, 其主要含有生物碱、β-谷甾醇、多糖、半夏蛋白、氨基酸、挥发油及无机元素等多种化学成分^[1-2], 具有燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结等功效^[3]。近年来, 半夏蛋白具有抗早孕、抗肿瘤^[4-6], 抗心律失常、抗衰老^[7-8]的特殊功效。半夏主产于四川、湖北、河南、贵州、安徽等地^[9], 据《中国道地》《药物出产辨》及《湖北通志》记载, 产于湖北荆州的半夏以色白、质坚实、粉性足而被誉上品, 被称为“荆半夏”。

半夏自然状态下主要以珠芽的形式进行无性繁殖^[10]。通过组织培养的方法是一种高效无性繁殖方法。以块茎作为组培快繁的目标相较于以组培苗为目标更有优势, 半夏块茎比种苗应用于

生产更方便。在组织培养过程出现块茎可分为 2 种类型, 一种是外植体直接再生形成的块茎^[11-12], 另一种是经历苗期阶段后形成的块茎^[13]。通过类原球茎途径进行种茎快繁一种有商业化生产半夏种茎潜力的方法。类原球茎芽点众多, 如芽点通过进一步培养发育成高质量的块茎, 无疑是一条高效的块茎快繁途径。李光胜等^[13]利用半夏块茎、叶柄及叶片诱导出不规则的小块茎, 也可称为类圆球茎。江艳华等^[14]研究了半夏不同外植体类圆球茎的诱导和分化及驯化移栽技术。这些研究为半夏组培快繁开辟了新的途径, 但类圆球茎途径作为一种可应用的组培快繁途径还有一定的距离。推进类原球茎组培快繁体系的应用, 首先要求面对并解决好半夏内生菌组培污染的问题, 另一方面, 要充分利用类原球茎的优点, 类原球茎作为一种带有众多芽或芽点的块茎, 其上每一个芽或芽点都具有发育成植株并转变成种茎的潜能, 如果每个芽或芽点均能形成一个种茎, 无疑是一种高效的方法。

该研究以荆半夏为试材, 采用正交实验的方法, 研究外植体及其消毒方法对内生菌的影响, 以

第一作者简介:李先良(1976-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为园艺植物遗传改良和分子生物学。E-mail: libusher@sina.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31471850); 荆门市科技局科学基金资助项目(110588); 湖北省教育厅资助项目(B2016265)。

收稿日期:2017-07-13

期为降低半夏内生菌的污染、建立高效可应用的半夏种茎快繁体系提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试半夏种茎取自荆门市京山县永澧镇,该种茎种植在荆楚理工学院实验田中,所用外植体来源于其中竹叶形半夏。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体及消毒方法对类圆球茎诱导的影响

取半夏块茎、叶片、叶柄接入培养基 MS+TDZ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 中。叶片取 2 个发育时期,分别是刚展开的叶片和已有珠芽形成时的叶片,记作叶片 1 和叶片 2。叶柄取 3 个发育时期,分别是叶片没展开时的叶柄、叶片展开且珠芽没有形成时期、珠芽已形成时期,记作叶柄 1、叶柄 2 和叶柄 3。采用 3 种外植体消毒方法:方法 1 是采自田间的外植体先用自来水冲洗 30 min,然后在超净工作台内用 75%乙醇浸泡 30 s,用无菌水冲洗 3 遍,再用 0.1%升汞溶液浸泡 10 min,最后用无菌水冲洗 5 遍;方法 2 是用 75%乙醇浸泡,无菌水冲洗后增加一步,即用 0.1%苯扎溴铵溶液浸泡 3 min 后,用无菌水冲洗 3 遍;方法 3 是用 75%乙醇浸泡,无菌水冲洗后增加一步,即用 0.1%苯扎溴铵溶液浸泡 6 min 后,用无菌水冲洗 3 遍。灭菌的外植体在接种前放在灭菌后滤纸上吸干表面附着水。培养基表面无积水。叶片均切成 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 大小,叶柄切成 1 cm 接入培养基。外植体接入培养基培养 1 周后统计污染率,污染率(%)=污染外植体/接种外植体 $\times 100$,并记录污染的微生物类型。培养 20 d 后统计类原球茎诱导率,类原球茎诱导率(%)=形成类原球茎外植体/无污染外植体 $\times 100$ 。每个处理接种 20 个外植体,重复 3 次。

1.2.2 细胞分裂素对类圆球茎诱导的影响

分别使用不同浓度 6-BA 与 TDZ,均设置 3 个浓度梯度 0.5、1.0、2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。培养基基本成分为 MS 或 1/2MS 培养基, pH 5.8,蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,琼脂 $7.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。外植体为幼嫩叶柄,即叶柄 1。每个处理接种 20 个外植体,重复 3

次。20 d 测定诱导率和每个外植体平均芽或芽点数,35 d 后观察类原球茎状态,以观察不同种类和浓度对类原球茎诱导的影响。类原球茎诱导率计算同 1.2.1。每个外植体芽或芽点数=每个处理形成芽或芽点总数/外植体数。

1.2.3 类圆球茎形成种茎的正交实验

选取约包含 10 个芽点的类原球茎接入培养基,培养基设置细胞分裂素(6-BA)、生长素(NAA)、多效唑(PP₃₃₃)和 MS 培养基基本成分 4 个因素。设置 L₉(3⁴)正交实验,正交设计见表 1,观察 4 个因素对类原球茎成苗进而形成种茎的影响。每个处理接种 3 个类原球茎,重复 3 次。30 d 后统计成苗率,成苗率(%)=形成叶柄和根的种类原球茎/接种种类原球茎 $\times 100$ 。然后将该处理形成的苗驯化移栽,在正常情况下生长 3 个月统计该处理获得种茎数和种茎大小。

表 1 L₉(3⁴)正交实验因素及水平

Table 1 Factors and levels of L₉(3⁴) orthogonal test

因素 Factor	水平 Level		
	1	2	3
NAA/(mg·L ⁻¹)	0.00	0.05	0.10
6-BA/(mg·L ⁻¹)	0.00	0.50	1.00
PP ₃₃₃ /(mg·L ⁻¹)	0.00	0.10	0.50
培养基 Medium	1/3MS	1/2MS	1MS

2 结果与分析

2.1 外植体及消毒方法对类圆球茎诱导的影响

对于高效组培快繁体系,首先要避免污染,对于半夏而言,污染主要是来自内生菌。由表 2 可知,叶片相对叶柄而言,其受内生菌的污染较小。不同发育时期的叶柄对污染有影响,幼嫩的叶柄污染率相对较低,而且幼嫩的叶柄形成类原球茎的效果较其它时期的叶柄更好。从外植体消毒方法来看,增加用 0.1%苯扎溴铵溶液浸泡 3 min 的环节有利于降低内生菌的污染,但时间增加到 6 min 容易造成外植体死亡进而导致类原球茎诱导率降低。

从外植体的诱导效果来看,不同发育时期叶片和叶柄均能形成类原球茎,但叶柄的效果好于叶片。叶片形成的类圆球茎主要是在叶脉区,形成类原球茎相对较小,往往是由芽组成,由叶柄形

成的类原球茎体积相对较大,其上主要是芽点,芽点比较密集,突起没有芽明显。理论上来说,这些芽点是另一种形式的芽,具有发育成芽进而形成完整植株的潜力。因此,这样的芽或芽点越多,越

有利于形成更多的完整植株乃至种茎。从污染和诱导效果 2 个方面来看,叶片未展开的幼嫩叶片作为外植体比较合适。

表 2 外植体及消毒方法对类原球茎诱导
Table 2 Influence of explants on induction of protocorm-like bodies

外植体 Explants	灭菌方法 Sterilization methods	污染率 Contamination rate/%	类原球茎诱导率 Induction rate of protocorm-like bodies/%	类原球茎状态 State of protocorm-like bodies
叶片 1	1	0.00	88.3±7.64	类原球茎较小,芽少
叶片 2	1	1.67±2.89	75.0±5.00	类原球茎较小,芽少
	1	3.33±2.89	100.0	类原球茎大,芽点多
叶柄 1	2	0.00	98.3±2.89	类原球茎大,芽点多
	3	0.00	91.7±2.89	类原球茎大,芽点多
	1	11.7±2.89	86.2±2.84	类原球茎大,芽点多
叶柄 2	2	3.33±2.89	80.2±2.93	类原球茎大,芽点多
	3	1.67±2.89	81.3±3.23	类原球茎大,芽点多
	1	45.0±5.00	94.2±5.04	类原球茎大,芽点多
叶柄 3	2	33.3±2.89	82.4±4.79	类原球茎大,芽点多
	3	33.3±5.77	67.5±3.64	类原球茎大,芽点多

2.2 细胞分裂素对类原球茎诱导的影响

细胞分裂素对类原球茎诱导起着关键作用,为此,设置不同种类和浓度的细胞分裂素进行对比。由表 3 可知,随着 6-BA 或 TDZ 浓度增加,类原球茎芽或芽点数增加。培养基中添加 6-BA

形成芽在后期最终会形成完整植株,而添加 TDZ 诱导的类原球茎芽点会继续保持芽点的状态,这可能是由于 TDZ 细胞分裂素活性较强。因此,随着细胞分裂素活性增强,所形成芽或芽点越多,同时芽点突出愈加不明显。

表 3 细胞分裂素对类原球茎诱导的影响
Table 3 Cytokinin influence on induction of protocorm-like bodies

序号 No.	细胞分裂素种类及浓度 Cytokinin kinds and concentration /(mg·L ⁻¹)	接种后 20 d 20 days after inoculation		接种后 35 d 类原球茎状态 State of protocorm-like bodies after 35 days post inoculation
		诱导率 Induction rate/%	芽或芽点平均数/叶柄个数 Average numbers of buds per petiole/Number of petiole	
1	6-BA 1.0	91.7±2.89	3.23±0.21	芽点形成叶柄,叶片,有根系产生
2	6-BA 2.0	100.0±0.00	4.17±0.14	芽点大部分形成叶柄、叶片,有少量根系产生
3	6-BA 4.0	93.3±2.89	5.85±0.14	小部分形成叶柄
4	TDZ 0.5	100.0±0.00	8.95±0.18	类原球茎及芽点增大
5	TDZ 1.0	100.0±0.00	9.23±0.28	类原球茎及芽点增大
6	TDZ 2.0	100.0±0.00	9.58±0.38	类原球茎膨大,芽点不明显

2.3 培养基对类原球茎形成种茎的影响

类原球茎是带芽或芽点的块茎,因此,芽或芽点在一定条件下可以发育成叶柄和叶片,并能产生根。由表 4 可知,6-BA 对类原球茎成苗有较大影响,其次是 NAA 和 PP₃₃₃,培养基基本成分对成苗率影响不大。从成苗率来看,最佳组合是 A₂(或 A₃)B₂C₁D₁。从种茎数来看,4 个因素影响

的大小顺序为: B > A > C > D, 最佳组合为 A₃B₃C₁D₁。从种茎平均直径看,4 个因素影响的大小顺序为: A > D > C > B, 最佳组合为 A₁B₂C₂D₁。总体来看,类原球茎形成丛生苗是关键,如不能形成苗,不可能通过移栽形成种茎。因此,类原球茎形成种茎最佳组合为 A₃B₂C₁D₁,即 1/3MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹。

表 4 培养基对类原球茎形成种茎影响的正交实验

Table 4 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal test about the influence of media on the formation of seed stem from protocorm-like bodies

培养基 Medium	萘乙酸 Naphthylacetic acid(A)	6-苄氨基嘌呤 6-Benzylaminopurine (B)	多效唑 Paclobutrazol (C)	培养基基本成分 Medium basic ingredients(D)	成苗率 Seedling rate/%	成苗质量 Seedling quality	种茎数 Number of seedling stems	种茎平均直径 Average diameter of seedling stems/mm
1	0.0	0.0	0.0	1/3MS	11.1	乙	5	7.9
2	0.0	0.5	0.1	1/2MS	66.7	乙	22	7.8
3	0.0	1.0	0.5	MS	33.3	乙	11	7.8
4	0.1	0.0	0.1	MS	11.1	甲	7	7.9
5	0.1	0.5	0.5	1/3MS	88.9	甲	62	7.8
6	0.1	1.0	0.0	1/2MS	100.0	甲	82	7.2
7	0.1	0.0	0.5	1/2MS	0.0			
8	0.1	0.5	0.0	MS	100.0	甲	88	7.5
9	0.1	1.0	0.1	1/3MS	100.0	甲	85	7.6
K_1	111.1	22.2	211.1	200.0				
K_2	200.0	255.6	177.8	166.7				
K_3	200.0	233.3	122.2	144.4				
R_a	88.9	233.4	88.9	55.6				
K_4	38	12	175	152				
K_5	151	172	114	104				
K_6	173	178	73	106				
R_b	135	166	102	48				
K_7	23.5	15.8	22.6	23.3				
K_8	22.9	23.1	23.3	15.0				
K_9	15.1	22.6	15.6	23.2				
R_c	8.4	7.3	7.7	8.3				

注:成苗质量“甲”表示该类原球茎形成的叶柄和根均在 10 以上,“乙”表示在该数值以下; R_a 表示成苗率极差; R_b 表示种茎数极差; R_c 表示种茎平均直径极差。

Note: Seedling quality, ‘甲’ represents the average protocorm-like body with more than 10 petioles and roots, ‘乙’ represents the average protocorm-like bodies with less than 10 petioles and roots. R_a means range of seedling rate; R_b means range of number of seedling stems; R_c means range of average diameter of seedling stems.

3 讨论与结论

已有较多报道表明半夏存在内生菌^[15-17],且一些内生菌参与半夏生物碱生物合成^[15-16]。因此,半夏内生菌可能对其活性成分的合成具有积极意义,但是对半夏组培快繁是不利的。该研究比较了不同外植体内生菌污染,发现叶片内生菌污染较少发生,幼嫩叶柄内生菌污染也发生较少,相对而言,已形成珠芽的叶柄内生菌污染较多。如内生菌在半夏一些活性成分的生物合成中不可或缺,那么,这些内生菌必然通过某种方式传递给珠芽。已形成珠芽的叶柄内生菌污染较多,说明此时期叶柄内生菌较多,很有可能在珠芽形成阶段,内生菌从块茎传递到珠芽中,从而使珠芽在形成块茎后仍然包含一些活性成分生物合成不可或缺的内生菌。事实上,采用块茎和珠芽作外植体,污染比叶片和叶柄更严重。在半夏组培过程中,发现的内生菌主要是黏菌,在培养基上具有往培

培养基里面生长的特点,有理由相信半夏内生菌很有可能属于厌氧菌。这很可能是增加苯扎溴铵消毒环节能降低内生菌污染的原因,因为苯扎溴铵是强氧化性灭菌剂。需要指出的是,采用幼嫩叶柄作外植体和增加苯扎溴铵消毒环节能较好地解决内生菌对外植体在培养基上生长的影响,但不意味着外植体内部不存在内生菌。在继代过程中,类原球茎被切开并转接到培养基上仍然会产生一些内生菌污染。

类原球茎是带芽或芽点的块茎,众多具有发育成完整植株的芽或芽点是类原球茎组培快繁途径具有高效潜力的原因。通过尽可能简单的方法将芽或芽点转变成植株进而形成种茎是实现类原球茎潜力的途径。类原球茎的芽或芽点相互之间比较紧密,且芽或芽点进一步成苗潜力存在差异。将芽或芽点直接切开再转接存在操作工作量大、容易发生内生菌污染的问题,因此,通过培养使类原球茎形成叶柄和根,进而使其在自然生长过程

中芽或芽点相互尽可能分开和膨大是高效的方法。该研究发现,类原球茎形成丛生苗需要添加低浓度的细胞分裂素(6-BA)和生长素(NAA),这也是影响类原球茎形成丛生苗2个重要因素,同时,也决定了丛生苗的质量,从而能形成更多种茎。

综上所述,采用幼嫩叶柄作为外植体,在外植体消毒过程增加苯扎溴铵消毒环节能减少内生菌污染。采用幼嫩叶柄为外植体,接种于培养基MS+TDZ 0.5~1.0 mg·L⁻¹能获得较好类原球茎。类原球茎在培养基1/3MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹上能较好形成丛生苗,丛生苗移栽后可形成小块茎。

参考文献

- [1] 楼之岑,秦波.常用中药材品种整理和质量研究[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1995:919.
- [2] 李先端,胡世材,杨边菊,等.半夏类药材氨基酸与无机元素分析[J].中国中药杂志,1990,15(10):37.
- [3] 国家药典委员会.中国药典一部[M].北京:中国医药科技出版社,2010:110.
- [4] 李玉先,刘晓东,朱照静.半夏药理作用的研究述要[J].辽宁中医学院学报,2004,6(6):459-460.
- [5] 张科卫,吴皓,李伟.HPLC同时测定半夏药材中鸟次黄嘌呤核苷、鸟嘌呤核苷的含量[J].药物分析杂志,2005,25(5):487-489.
- [6] 郑国灿.半夏提取液的抗肿瘤性研究[J].四川中医,2004,22(9):9-11.
- [7] 张小丽,谢人明,冯英菊.四种中药对血小板聚集性的影响[J].西北药学杂志,2000,15(6):260-261.
- [8] 蒋文跃,杨宇,李燕燕.化痰药半夏、瓜蒌、浙贝母、石菖蒲对人鼠血液流变性的影响[J].中医杂志,2002,43(3):215-216.
- [9] 郭巧生.半夏研究进展[J].中药研究与信息,2000,2(10):15-20.
- [10] 顾德兴,李云香,徐炳声.半夏的繁殖生物学研究[J].植物资源与环境学报,1994,3(4):44-48.
- [11] 薛建平,朱艳芳,张爱民,等.半夏试管块茎直接再生技术的研究[J].作物学报,2004,30(10):1060-1064.
- [12] 张爱民,杨生玉,薛建平,等.多种因素对半夏外植体直接诱导形成试管小块茎的影响[J].中国中药杂志,2005,30(8):576-579.
- [13] 李光胜,张志立,毛文岳.应用组织培养方法系统选育三叶半夏[J].植物学报,1992(1):59.
- [14] 江艳华,李艾莲,陈彩霞,等.半夏类原球茎的诱导及其植株再生研究[J].中国农学通报,2013,29(19):153-158.
- [15] 刘建玲,陈宝宝,雷毅,等.半夏产生物碱内生菌的分离及其抑菌活性的初步研究[J].西北植物学报,2010,30(4):645-651.
- [16] 刘建玲,陈宝宝,刘永红,等.半夏内生菌的分离培养与鉴定[J].中国中药杂志,2009,34(18):2305-2307.
- [17] 张洁,万芬,李玉权,等.半夏内生细菌的分离与鉴定[J].贵州农业科学,2014,42(3):94-97.

Optimization of Protocol of Tissue Culture and Rapid Propagation of *Pinellia ternata* of Protocorm-like Body

LI Xianliang¹, ZHAO Zhichang²

(1, College of Bioengineering, Jingchu University of Technology, Jingmen, Hubei 448000; 2, Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China, Danzhou, Hainan 571737)

Abstract: Jing *Pinellia ternata* was used as test material, in way of orthogonal test method, the influence of the explants and their sterilization methods on contamination from endophyte was studied. And on this base the influence of the explants and the cytokinin on the induction of protocorm-like body and the method of the transformation from protocorm-like body to seed stems were further studied systematically to provide references for rapid propagation of *Pinellia ternata* seed stems. The results showed that using the young petioles with unopened leaves as explants and adding the step of using benzalkonium bromide with the concentration of 0.1% soak the explants for 3 minutes could reduce the contamination rate. The young petioles inoculated on the medium of MS+TDZ 0.5-1.0 mg·L⁻¹ could be better induced into protocorm-like bodies. The protocorm-like bodies inoculated on the medium of 1/3MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹ could form more clustered plantlets, and then more seed stems.

Keywords: *Pinellia ternata*; protocorm-like body; tissue culture and rapid propagation; optimization