

不同 NAA 和 N⁶-BA 浓度对比对半夏组织培养的生物效应

陈亮^{1,2}, 许鸿源¹, 周凤珏¹, 韦丽娟¹, 唐丽雪¹, 伍燕辉¹

(1. 广西大学农学院, 南宁 530005; 2. 广西科学活动中心, 南宁 530022)

摘要:为建立半夏组织培养的技术体系,以其球茎为外植体,MS为基本培养基,添加不同浓度配比的NAA和N⁶-BA对无茵叶柄切段进行继代培养,结果证明:(1)适宜的添加配比为N⁶-BA 2.0~3.0/NAA 0.1~0.2,切段在这些培养基上7d脱分化出愈伤组织,15d再分化出胚状体,30d可形成根苗完整的再生植株,增殖倍数达6~10。(2)单独添加N⁶-BA或NAA,切段亦可发生愈伤组织,但难以再分化。(3)低浓度NAA(0.1)配高浓度N⁶-BA(4.0)时,可使已经分化成的小球茎与再生幼苗再次脱分化为愈伤组织。若适当提高NAA浓度,可缓解这种现象。

关键词: 半夏; 组织培养; NAA; N⁶-BA; 生物效应; 再生植株

中图分类号: S567.23 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-4705(2008)08-0030-04

Bio-effectives of Different Prescription with NAA and N⁶-BA on the Tissue Culture of *Pinellia ternate*(Thunb.) Breit. in Vitro.

CHEN Liang^{1,2}, XU Hong-yuan¹, ZHOU Feng-jue¹,

WEI Li-juan¹, TANG Li-xue¹, WU Yan-hui¹

(1. Agricultural college, Guangxi University, Nanning 530005, China;

2. Guangxi centre for scientific Activities, Nanning 530022, China)

Abstract: For setting up the technological system of tissue culture of *Pinellia ternate*(Thunb.) Breit., took corms as explants, MS as basic medium and added different compounds of NAA / N⁶-BA, to culture the cuttings of leafstalk. Results showed that: 1. The suitable compounds of media were MS + NAA 0.1 - 0.2 / N⁶-BA 2.0 - 3.0, normally on such media explants dedifferentiation forming callus needed 7 d, forming embryoids 15 d, set up regenerated plantlets with shoot and adventitious root 30 d. multiple of proliferation reached to 6 - 10. 2. If added only NAA or N⁶-BA to MS, the cuttings may forming callus, but it was difficult to re-differentiating. 3. If MS added low concentration of NAA (0.1) and paired up with high concentration of N⁶-BA (4.0) would induce the embriods and regenerated plantlets de-differentiating and formed callus again. But raised the concentration of NAA, such appearance would be put off.

Key words: *Pinellia ternate*(Thunb.) Breit; tissue culture; NAA; N⁶-BA; bio-effects; regenerated plantlet

半夏 [*Pinellia ternate*(Thunb.) Breit.] 是天南星科 (*Araceae*) 半夏属 (*Pinellia* Ten) 多年生草本植物, 以地下块茎干燥炮制后入药, 具有燥湿化痰、降逆止

呕, 消痞散结之功效, 不仅是我国重要的传统中药材, 也是重要的出口产品^[1,2]。

通常半夏的繁殖方法有3种: 种子繁殖、珠芽繁殖和块茎繁殖。但是因为种子和珠芽体积小、成熟时间长, 而且不一致, 采集不便, 实际生产中多采用块茎繁殖。然而, 块茎繁殖不仅效率低, 还易传播病害和引起品种退化, 成本也较高。随着滥采乱挖及除草剂的大量使用, 野生块茎资源已日趋枯竭, 而市场需求却持续走高。因此, 近年来陆续有学者展开半夏组织培养与快繁技术的研究^[3-10], 以期为人工规模化种植开辟新

收稿日期: 2008-03-26

基金项目: 广西教育厅专利专项基金(C160009)和植物学硕士点重点建设基金(D1008)资助。

作者简介: 陈亮(1979-), 男, 广西罗城县人; 技术员, 主要从事植物组织培养和作物栽培工作。

通讯作者: 许鸿源, 广西大学农学院 6988 信箱; E-mail: xuhy08@126.com。

的优质种源。本文拟报道 NAA(萘乙酸)和 N⁶-BA(N⁶-苄基腺嘌呤,BA)不同浓度配比在半夏组织培养中一些生物效应的部分研究结果,以求对建立有效的组培技术体系有所帮助。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料由淮北煤炭工业学院生物系薛建平教授提供,广西药用植物园钟仕强主任中药师鉴定为天南星科植物半夏 [*Pinellia Ternate* (Thunb.) Breit.] 球茎。N⁶-BA 和 NAA 购自南宁医药站。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体处理

选取直径约 1 cm 的健壮半夏块茎,用果蔬洗洁精清洗 15 min,自来水冲洗至无泡沫为止。在净化工作台上用 75% 酒精消毒 30 s,0.1% 升汞(加 3~5 滴吐温-80)消毒 8 min,无菌水洗涤 6 遍以上,备用。

1.2.2 培养基配制

(1)外植体启动培养基:采用薛建平^[7]的配方,MS + N⁶-BA 2.0 mg/L(单位下同) + NAA 0.1。(2)继代增殖培养基:以 MS 为基本培养基,N⁶-BA 和 NAA 的添加浓度配比如表 1,共组成 20 种培养基,分别以英文大写字母为代号

表 1 不同继代增殖培养基的代号及其中 N⁶-BA 和 NAA 的浓度

		N ⁶ -BA(mg/L)				
		0.0	1.0	2.0	3.0	4.0
	0.0	A(MS,ck)	B	C	D	E
NAA	0.1	F	G	H	I	J
(mg/L)	0.2	K	L	M	N	O
	0.3	P	Q	R	S	T

注:*MS 为基本培养基。

以上各种培养基均添加蔗糖 30 g/L,琼脂 4.5 g/L,调节 pH 6.0。

1.2.3 无菌材料的准备

将上述消毒后的球茎外植体接种到启动培养基。每瓶 1 个球茎,共接 360 瓶。除去污染瓶,获得无菌苗,待其长至 4~5 cm 高后,选长势较一致者,取其叶柄形态学下部约 2 cm,再切成 1 cm 长左右的叶柄切段(下简称“切段”),备用。

1.2.4 不同 N⁶-BA 和 NAA 浓度配比的比较试验

将上述无菌切段分别随机接种于表 1 所列的 20 种继代增殖培养基中,每种培养基 5 瓶,每瓶 4~6 个

切段,即每个试验组有 20~30 个切段。逐日观察愈伤组织发生(脱分化)、胚状体与不定根的形成(再分化)及胚状体萌发出苗(实为叶片)等形态的动态变化,均以肉眼可辨为准。每种培养基选 3 瓶无污染者作记录,以其形态变化的平均发生率(发生变化切段数/接种切段数×100%)≥5% 作为该变化的认定标准。而将平均发生率达 50%±5% 的时间(d)定为该项变化在表 2 中的记录时间。若发生率<5%,则仅看作是个体差异导致的偶然现象,只在文中叙述,不在表 2 中记录。

1.2.5 培养条件

光照 12 h/d,光强 1 000 lx;昼/夜温度为(25±1)℃/(20±1)℃。

2 结果与分析

2.1 获得无菌材料

外植体接种后每天检查并及时除去污染瓶。15 d 后基本达到稳定,30 d 苗高可达 4~5 cm,共得无菌苗 273 株(瓶),占接种总数 360 瓶的 75.8%。去除长势明显不良的 12 瓶,尚余 261 瓶(株),切得 522 个叶柄切段,供继代培养随机使用。

2.2 不同 N⁶-BA 和 NAA 浓度对比生物效应的对比

2.2.1 无 N⁶-BA 和 NAA 的效应

在单纯的 MS 培养基(A 组)上,半夏叶柄切段基本没有发生分化或脱分化现象(表 2),也少有增粗和弯曲。但是 60 天后,个别切段发生脱分化形成少许愈伤组织,绝大多数逐渐变白死亡(图 1)。



图 1 半夏叶柄切段在 MS 上的表现(培养 60 d)

2.2.2 无 NAA 时,不同 N⁶-BA 浓度的效应

表 2 显示,在无生长素 NAA 条件下,单独添加细胞分裂素 N⁶-BA 的 B,C,D,E 各组培养基上,切段于 2~3 周后均可发生脱分化,陆续形成少量愈伤组织。而且在实验范围内,N⁶-BA 浓度越高,脱分化越早。同时切段的伸长、增粗和弯曲也越甚(图 2)。不过,绝大多数切段最终也没能再分化出其它器官。仅 D,E 两

组 60 天后才有个别球形胚状体发生,致死也未能萌发成苗。

表2 半夏叶柄切段在不同培养基上脱分化及器官再分化的相对动态

	7 d	15 d	30 d	45 d	60 d
	愈胚芽根	愈胚芽根	愈胚芽根	愈胚芽根	愈胚芽根
A	x x x x	x x x x	x x x x	x x x x	x x x x
B	x x x x	x x x x	√ x x x	√ x x x	√ x x x
C	x x x x	x x x x	√ x x x	√ x x x	√ x x x
D	x x x x	√ x x x	√ x x x	√ x x x	√ x x x
E	x x x x	√ x x x	√ x x x	√ x x x	√ x x x
F	√ x x x	√ x x x	√ x x x	√ x x √	√ x x √
G	√ x x x	√ x x x	√ √ x x	√ √ x √	√ √ x √
H	√ x x x	√ x x x	√ √ x √	√ √ x √	√ √ √ √
I	√ x x x	√ √ x √	√ √ √ √	√ √ √ √	√ √ √ √
J	√ x x x	√ √ x √	√ √ x √	√ √ √ √	(再次脱分化)
K	√ x x x	√ x x x	√ x x x	√ √ x x	√ √ x √
L	√ x x x	√ x x x	√ √ x x	√ √ √ √	√ √ √ √
M	√ x x x	√ √ √ x	√ √ √ √	√ √ √ √	√ √ √ √
N	√ x x x	√ √ √ x	√ √ √ √	√ √ √ √	√ √ √ √
O	√ x x x	√ √ √ x	√ √ √ √	√ √ √ √	(再次脱分化)
P	√ x x x	√ x x x	√ √ x x	√ √ x √	√ √ x √
Q	√ x x x	√ √ x x	√ √ x √	√ √ √ √	√ √ √ √
R	√ x x x	√ √ x x	√ √ x √	√ √ √ √	√ √ √ √
S	√ x x x	√ √ x x	√ √ √ √	√ √ √ √	√ √ √ √
T	√ x x x	√ √ x x	√ √ √ √	√ √ √ √	√ √ √ √

注:(1)表中“愈”-愈伤组织;“胚”-胚状体,“芽”-胚状体萌芽成苗;“根”-发生不定根。(2)“√”加粗示 N^6 -BA 和 NAA 适宜浓度配比的良好效果。



图2 半夏叶柄切段在 MS + BA 上的表现(培养 60 d)

至于经过长时间(>50 d)培养后,A组个别材料形成少量愈伤组织及D、E两组形成少数胚状体的现象,笔者认为,半夏在不适宜的激素环境中力求本物种生存繁衍是一种抗争。这是一个艰难的适应过程,需要通过代谢程序的变化,逐步调节内源激素的平衡水平才能达到的结果,所以只有少数“强者”才有机会。

当然,这还需要进一步对内源激素的变化进行测定来证实。

2.2.3 无 N^6 -BA 时,不同 NAA 浓度的效应

从表2的F、K、P三组可见,在无 N^6 -BA 的条件下,单独添加不同浓度的 NAA,切段可在1周内开始脱分化生成愈伤组织,并迅速增殖(图3),其增殖速率与 NAA 浓度呈正相关。F、K、P三组愈伤组织总量明显比B、C、D、E组(图2)多,而切段的增粗和弯曲却不甚明显。因此,在促进切段脱分化方面,外源生长素(NAA等)显然比外源细胞分裂素(N^6 -BA等)的作用更大。再者,NAA浓度稍低(0.1)时,培养40天后有不定根发生;浓度较高(≥ 0.2)时,则有少量胚状体发生。但是,在无 N^6 -BA 的培养基上,这些胚状体都不能萌发成苗。



图3 MS + NAA 0.1 ~ 0.3 诱导半夏叶柄切段发生大量愈伤组织(培养 15 d)

2.2.4 改变 N^6 -BA/NAA 浓度配比的效应

从表2内G、H、I、J;L、M、N、O;Q、R、S、T各组的結果看,在本实验中,凡是 N^6 -BA 和 NAA 配合使用的各种培养基几乎都能较快地脱分化,形成大量愈伤组织,多数愈伤组织都能再分化出极性明显的球形胚状体,并由白色逐渐转绿,进一步长成为小球茎(图4),继而可以萌发形成带有不定根的完整再生植株(见图5)。

若固定 NAA 0.1 或 0.2 不变,增高 N^6 -BA 浓度有利于胚状体分化和萌发成苗。但是当 N^6 -BA 增至 4.0 mg/L(J、O 两组)时,随培养时间延长(>50 d),已经分化形成的胚状体,甚至是再生幼苗,都会再次脱分化,蜕变成愈伤组织(图6)。这和笔者^[11]在罗汉果组培中观察到的再生苗又脱分化的情况很相似。从而再次证明,植物器官的脱分化与再分化是可逆的生理过程。不过,当 NAA 浓度较高(0.3, T 组)时,这种再次脱分化的现象又被缓解或停止。可见,器官的脱分化和再分化直接受生长素(NAA等)与细胞分裂素(N^6 -BA等)相对比值变化的控制。

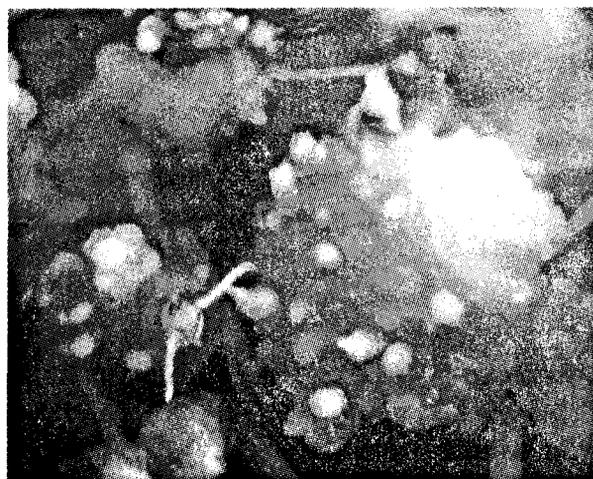


图4 MS + N⁶-BA 1.0~2.0 + NAA 0.1~0.2 诱导半夏叶柄切段发生大量愈伤组织并分化出胚状体(培养 15 d)

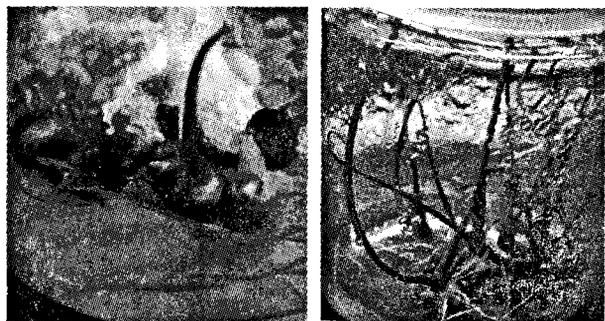


图5 胚状体长成球茎并萌发成完整再生植株(培养 25~35 d)

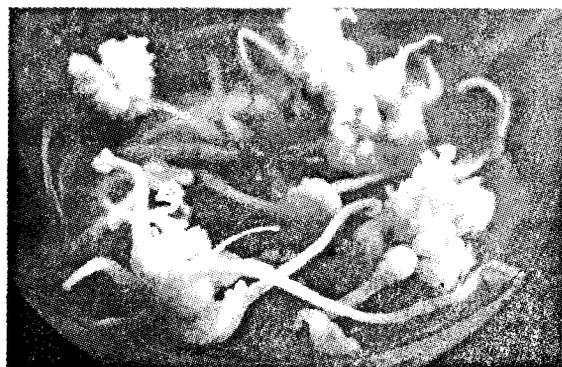


图6 胚状体与再生幼苗再次脱分化

3 小结

(1)单纯的 MS 基本培养基难以诱导半夏叶柄切段脱分化和再分化。添加适量的生长素(NAA 等)和细胞分裂素(N⁶-BA 等)是必须的。

(2)MS 单独添加 NAA 0.1~0.3 或单独添加 N⁶-BA 1.0~4.0 均可诱导切段脱分化生成愈伤组织,而 NAA 作用更强。

(3)MS 添加 NAA 和 N⁶-BA 的不同浓度配比,均

能使切段发生脱分化和再分化,其适宜范围为 NAA 0.1~0.2/N⁶-BA 2.0~3.0。继代培养 30 d 左右可获得根苗齐全的再生植株。每个切段得 3~5 株。若以一个外植体球茎为基础,增殖倍数达 6~10。

(4)在低浓度 NAA 配高浓度 N⁶-BA 条件下,可能使已分化出的新器官再次脱分化为愈伤组织,生产中不宜采用。

参考文献:

- [1]中国医科学院药物研究所. 中药志. 第2册第2版[M]. 北京:人民卫生出版社,1993:38-42.
- [2]江苏省植物研究所. 新华本草纲要第三册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1990:548.
- [3]毛了成,彭下松. 半夏快速繁殖体系的研究进展[J]. 中国中药杂志,2003,28(3):193-195.
- [4]章艳玲,李关荣,位运粮. 中药半夏的研究进展[J]. 中国农业通报. 2007,23(7):163-166.
- [5]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.
- [6]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.
- [7]薛建平,张爱民,盛玮,等. 钾盐对半夏试管块茎诱导的影响[J]. 中国中药杂志,2006,31(7):546-548.
- [8]赵玮,魏莉霞. 活性炭对半夏组培苗改良的研究[J]. 甘肃农业,2005(5):50.
- [9]白雨,高山林. 半夏组织培养诱导胚状体的正交试验[J]. 植物资源与环境学报,2003,12(4):16-20.
- [10]马维平,黄连超,顾红卫,等. 荆半夏组织培养及快速繁殖的研究[J]. 西北药学杂志,2006,21(2):57-59.
- [11]蓝桃菊,许鸿源,何冰,等. 罗汉果不同器官直接分化再生苗的研究[J]. 生物技术通报,2006(增刊):514-516.

通 知

各位作者:

由中国种子协会举办的优秀论文评选活动已圆满结束。本刊推荐论文获奖情况如下:一等奖两篇(陶芳等,周曙东等);二等奖四篇(胡小荣等,郭建夫等,李红霞等,朱建忠等);三等奖五篇(戴惠学等,李华胜等,冯光文等,欧行奇等,阮晓亮)。获奖证书已于8月15日寄出,请各位获奖作者注意查收。

《种子》编辑部