

半夏茎尖组织培养的研究

邱 萍, 张兴翠

西南大学 农学与生物科技学院, 重庆 400716

摘要: 以半夏茎尖作为外植体, 研究半夏茎尖培养技术. 以半夏茎尖成活率和成苗率为指标, 以时间、温度、茎尖大小为因素进行正交试验. 结果表明, 半夏块茎在 35℃ 的高温条件下处理 21 d 取出, 在解剖镜下剥去 3 层叶原基后切取茎尖培养, 可以得到较高的成活率和成苗率.

关键词: 半夏; 茎尖; 正交试验; 组织培养

中图分类号: Q949.71⁺7.2

文献标识码: A

半夏(*Pinellia ternata* (Thunb) Breit.), 又名麻芋子、麻芋头、天落星和野芋头等, 为天南星科半夏属多年生草本植物, 广泛分布于我国长江流域以及东北、华北等地区. 半夏是我国重要的传统中药材, 也是重要的出口产品^[1]. 半夏作为药用, 在我国已有 2 千多年的历史, 是一味应用十分普及、疗效比较确切的常用中药. 由于药用植物资源的超量开发与利用、野生的半夏资源日益枯竭, 目前全国各地至少有 3 属 12 种植物作为半夏的代用品使用^[2]. 半夏人工栽培的面积不断扩大, 由于病毒侵染等导致的产量下降和品质退化问题也日益严重. 随着现代生物技术的发展, 人们发现植物的顶端分生组织不受病毒感染, 采用茎尖培养便可以得到无病毒的种苗^[3-5]. 为了解决这一生产难题, 本文采用正交试验法考察了在试验培养过程中半夏高温处理的温度、时间和剥取的茎尖大小 3 个因素对半夏茎尖培养的影响, 优选出半夏茎尖的最佳组织培养技术, 为半夏的茎尖脱毒提供依据.

1 材料与方法

1.1 材 料

试验材料来自重庆中药研究院仙女山半夏基地.

1.2 方 法

1.2.1 无菌材料的获得

选取直径约 1 cm 的健壮半夏块茎, 剥去表皮, 肥皂水清洗 15 min, 用流水冲洗 1 h 左右, 在超净工作台上, 先在 75% 酒精中浸泡 30 s, 再放入 0.1% 升汞溶液中消毒 10 min, 无菌水冲洗 5 次. 于解剖镜下剥取其不同大小的茎尖分生组织接种在 MS + 4.0 mg/L 6-BA + 0.4 mg/L NAA 固体培养基上. 培养温度(25±1)℃, 光照 1 500 lx, 每天 12 h.

1.2.2 参试因素水平

a. 处理的温度. 根据实验条件和组织培养中为了提高脱毒效果进行高温处理规定的一般温度范围, 本

收稿日期: 2007-01-08

基金项目: 重庆市教委资助项目 (KJ060305).

作者简介: 邱 萍(1979-), 女, 四川内江人, 硕士研究生, 主要从事药用植物栽培研究.

通讯作者: 张兴翠.

试验选取了 3 个温度, 即 35 ℃、37 ℃和 39 ℃.

b. 处理的时间. 本试验的时间为处理 7 d、处理 14 d 和处理 21 d.

c. 剥取茎尖的大小. 鉴于试验中茎尖大小很难测定, 所以采用剥去半夏茎尖外面的叶原基层数来确定茎尖的大小. 茎尖包括: 剥去 3 层叶原基的茎尖、剥去 4 层叶原基的茎尖和剥去 5 层叶原基的茎尖.

1. 2. 3 数据统计

接种 75 d 后, 统计茎尖成活率(茎尖分生组织发育为可见的绿点谓之成活)及成苗率(成活茎尖长出带有 2 个以上叶片的小植株谓之成苗). 成活率为成活茎尖个数与接种茎尖个数之比, 成苗率为成苗个数与成活茎尖个数之比.

1. 2. 4 试验设计

试验采用正交试验设计方法设计, 设处理的温度、处理的时间和剥取茎尖的大小 3 个因素参加实验, 每个因素设 3 个水平(表 1), 以半夏成活率和成苗率为评价指标, 选用 L9 (3⁴) 正交表进行试验分析, 共 9 个处理, 每个玻璃瓶接 3 个茎尖, 每一个处理接种 10 瓶(表 2).

表 1 因素水平表(L9 (3⁴))

水 平	A	B	C
	温度/℃	时间/d	茎尖大小(剥去层数)
1	35	7	3
2	37	14	4
3	39	21	5

表 2 正交试验结果表

实验号	A	B	C	D	成活率	成苗率
1	35	7	3	1	96.67	89.65
2	35	4	4	2	93.33	82.14
3	35	1	5	3	100.00	76.67
4	37	7	4	3	83.33	84.00
5	37	14	5	1	80.00	70.83
6	37	21	3	2	93.33	85.71
7	39	7	5	2	76.67	65.22
8	39	14	3	3	86.67	84.61
9	39	21	4	1	83.33	80.00
成活率	K1 290.00	256.67	276.67	260.00	$\Sigma = 793.33$	
	K2 256.66	260.00	259.99	263.33		
	K3 246.67	276.66	256.67	270.00		
	R 43.33	19.99	20.00		CT=69 930.28	
成苗率	K1 248.46	238.87	259.97	240.48	$\Sigma = 718.83$	
	K2 240.54	237.58	246.14	233.07		
	K3 229.83	242.38	212.72	245.28		
	R 18.63	4.80	47.25		CT=57 412.95	

A: 处理温度; B: 处理时间; C: 茎尖大小; D: 误差列 error column; $CT=1/n(\Sigma)^2$

2 试验结果与分析

2. 1 不同处理对半夏茎尖成活的影响

不同处理对半夏茎尖成活影响的正交试验结果见表 2. 分析试验结果表明, 在不同的温度、处理时间和剥取茎尖大小的处理中, 半夏茎尖大部分都能启动分裂, 开始生长. 由表 2 成活率的 R 值分析可以看出, 温度 A、时间 B 和茎尖大小 C 对半夏茎尖成活率的影响从大至小依次为温度 A、茎尖大小 C 和时间 B. 方差分析结果显示(表 3), 在 5% 水平下, 温度 A 对成活率的影响差异显著, 而时间 B 和茎尖大小 C 的影响

不显著。

半夏茎尖成活率的效应分析结果显示(表 4), 按效应大小排列为 A_1, B_3, C_1 。根据最优方案下指标值的点估计式^[6]计算得出茎尖成活率的理论值约为 96.67%。所以, 就成活率这一指标而言, 通过对试验结果进行的正交分析, 可以确定半夏茎尖培养成活的最佳组合为 $A_1B_3C_1$, 即半夏块茎在 35℃ 高温下处理 21 d, 剥去 3 层叶原基后进行茎尖培养, 理论上能得到 96.67% 的成活率。

表 3 半夏茎尖成活率的方差分析表

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
A	453.508 5	2	226.754 2	9.880 54	0.01<P<0.05 P>0.1
B	129.653 6	2	64.826 8	2.824 75	
C *	44.212 27	2	22.106 13		
D	47.586 07	2	23.793 03		
SSe=SSC + SSD	91.798 34	4	25.899 17		

A: 处理温度; B: 处理时间; C: 茎尖大小; D: 误差列; SSe: 误差的离均差平方和; SSC: 因素 C 的离均差平方和; SSD: 因素 D 的离均差平方和; $F_{0.10}(2, 4)=4.32$, $F_{0.05}(2, 4)=6.69$, $F_{0.01}(2, 4)=18.0$

表 4 半夏茎尖成活率的效应分析表

列号	1	2	3	4	考察指标
行号	A	B	C		茎尖成活率
1	1	1	1	1	96.67
2	1	2	2	2	93.33
3	1	3	3	3	100
4	2	1	2	3	83.33
5	2	2	3	1	80
6	2	3	1	2	93.33
7	3	1	3	2	76.67
8	3	2	1	3	86.67
9	3	3	2	1	83.33
效应估计值	ai	bj	ck		考察指标均值
水平					88.1478
1	8.518 9	-2.591 1	4.075 5	-1.481 1	
2	-2.594 4	-1.481 1	-1.484 4	-0.371 1	
3	-5.924 5	4.072 2	-2.591 1	1.852 2	
优方案	A1	B3	C1		优=96.67

A: 处理温度; B: 处理时间; C: 茎尖大小。

2.2 不同处理对半夏茎尖成苗的影响

不同处理对半夏茎尖成苗影响的正交试验结果见表 2。分析试验结果表明, 在不同的温度、高温处理时间和剥取茎尖大小的处理中, 半夏茎尖大部分都能在成活的情况下长成具有两片叶以上的完整半夏小植株。由表 2 成苗率的 R 值分析可以看出, 温度 A、时间 B 和茎尖大小 C 对半夏茎尖成活率的影响从大至小依次为茎尖大小 C、温度 A 和时间 B。方差分析结果显示(表 5), 在 1% 水平下, 茎尖大小 C 对成苗率的影响差异极显著, 温度 A 的影响较小, 而时间 B 则无影响。

半夏茎尖成苗率的效应分析结果显示(表 6), 按效应大小排列为 A_1, B_3, C_1 。根据最优方案下指标值的点估计式^[6]计算得出茎尖成苗率的理论值约为 86.66%。由此, 就成苗率这一指标而言, 通过对试验结果进行的正交分析, 可以确定半夏茎尖培养成苗的最佳组合为 $A_1B_3C_1$, 即半夏块茎在 35℃ 高温下处理 21 d, 然后剥去 3 层叶原基后进行茎尖培养, 理论上能得到 86.66% 的成苗率。

表 5 半夏茎尖成苗率的方差分析表

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
A	28.989 27	2	14.494 63	4.706 76	0.05<P<0.1
B*	1.752 87	2	0.876 43		
C	195.830 6	2	97.915 3	31.795 5	P<0.01
D	10.565 27	2	5.282 63		
SSe=SSB+SSD	12.318 14	4	3.079 53		

A: 处理温度; B: 处理时间; C: 茎尖大小; D: 误差列; SSe: 误差的离均差平方和; SSB: 因素 B 的离均差平方和; SSD: 因素 D 的离均差平方和、 $F_{0.10}(2, 4)=4.32$, $F_{0.05}(2, 4)=6.69$, $F_{0.01}(2, 4)=18.0$

表 6 半夏茎尖成苗率的效应分析表

列号	1	2	3	4	考察指标
行号	A	B	C		茎尖成苗率
1	1	1	1	1	89.65
2	1	2	2	2	82.14
3	1	3	3	3	76.67
4	2	1	2	3	84.00
5	2	2	3	1	70.83
6	2	3	1	2	85.71
7	3	1	3	2	65.22
8	3	2	1	3	84.61
9	3	3	2	1	80.00
效应估计值	ai	bj	ck		考察指标均值
水平					78.87
1	2.95	-0.246 7	6.786 7	0.29	
2	0.31	-0.676 7	2.176 7	-2.18	
3	-3.26	0.923 3	-8.963 3	1.89	
优方案	A1	B3	C1		优=86.66

A: 处理温度; B: 处理时间; C: 茎尖大小.

综合分析上述 2 项指标, 根据单项分析的两组最佳条件都一样, 因此, 最终确定实验最佳条件, 即处理温度为 35℃, 处理的时间为 21 d, 茎尖大小为剥去 3 层叶原基的茎尖. 在这样的条件下培养, 理论上能同时得到 96.67% 的成活率和 86.66% 的成苗率.

3 小结与讨论

- a. 由试验结果分析可知, 在半夏的茎尖培养中, 通过对半夏块茎进行处理, 在 35℃ 的高温条件下处理 21 d 取出, 在解剖镜下剥去 3 层叶原基后切取茎尖培养, 理论上可以同时得到 96.67% 的成活率以及 86.66% 成苗率.
- b. 在试验中, 3 因素不同组合对半夏茎尖成活的影响从高到低依次为温度、茎尖大小、时间. 其中, 温度的影响较大, 达到了显著水平; 其次是茎尖大小的影响; 最后才是处理时间; 但茎尖大小和处理时间的影响都不显著.
- c. 3 因素不同组合对半夏茎尖成苗的影响从高到低依次为茎尖大小、温度、时间. 其中, 茎尖大小的影响较大, 达到了极显著水平; 温度影响不显著; 时间则无影响.
- d. 虽然时间的影响没有温度和茎尖大小那么显著, 但也不能说处理时间越短越好, 如果处理时间短了就达不到实验的目的, 也起不了高温处理的作用了. 因此, 时间的选择适当就行, 不能很短也不要太长.
- e. 本试验采用分生组织培养技术, 起始材料为 0.2~0.5 mm 的生长点, 再经过高温处理. 分生组织培养一般具有较好的脱病毒效果, 而高温处理又更能提高脱病毒效果, 为此将对半夏的病毒种类、脱病毒鉴定技术以及半夏人工种子的制作技术等提供依据.

参考文献:

- [1] 中国医科学院药物研究所. 中药志 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 38.
- [2] 郭巧生. 半夏研究进展 [J]. 中药研究与信息, 2000, 2(10): 15, 46.
- [3] 陈集双, 俞海琪. 引起掌叶半夏花叶病毒的芋花叶病毒 [J]. 植物病理学报, 1996, 26(1): 87—91.
- [4] 陈剑平. 植物病毒分子诊断图谱 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 103.
- [5] 盖琼辉, 王季春. 马铃薯茎尖分化成苗的培养基优化研究 [J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2005, 27(3): 370—373.
- [6] 郑少华, 姜奉华. 实验设计与数据处理 [M]. 北京: 中国建材工业出版社, 2004: 124.

Study on Shoot Tip Tissue Culture of *Pinellia Ternata*

QIU Ping, ZHANG Xing-cui

School of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: Object: *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. shoot tip was used as explants in tissue culture so as to research this plant species. Method: Survival rate and sprouting percentage were calculated in orthogonal test to optimize combination of temperature, time and size of shoot tip. Result and Conclusion: The experiment indicates: The optimum medium to get higher survival rate and sprouting percentage of tip culture was that microtubers of *Pinellia ternata* were dealt with 21 days in the higher temperature of 35℃ and taken out and then exfoliated three layers of leaf primordium under dissecting microscope.

Key words: *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit; shoot tip; orthogonal test; tissue culture

责任编辑 夏 娟