

◇资源开发◇

旱半夏组织培养条件的优化研究

王丽艳,荆瑞勇,谭焕波,唐敏,殷奎德*

(黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院,黑龙江 大庆 163319)

摘要:目的 优化旱半夏的组织培养条件。方法 以旱半夏小块茎为外植体进行组织培养。结果与结论 使用卡拉胶代替琼脂固化,取得了良好的效果;旱半夏继代增殖最适培养基为:MS + 6 - BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L,增殖系数达到 6.5,平均苗高达 2.5 cm;生根最适培养基为:1/2MS + NAA 0.1 mg/L,生根数 4~5 条,生根率达到 100%。

关键词:旱半夏; 组织培养; 卡拉胶

中图分类号:R931.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1008-0805(2008)07-1795-02

Optimization of Tissue Culture Condition on *Pinellia tenata*(Thumb.) Breit

WANG Li-yan, JING Rui-yong, TAN Huan-bo, TANG Min, YIN Kui-de*

(Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing, Heilongjiang 163319, China)

Abstract: **Objective** To optimize tissue culture condition of *pinellia tenata*(Thumb.) Breit. **Methods** With the tuber of *Pinellia tenata*(Thumb.) Breit as explant, the culture condition of tissue culture was optimized by tissue culture. **Results and Conclusion** The effect of κ -Carrageenan replacing of agar is good. The suitable subculture Proliferation medium is MS + 6 - BA 2.0mg/L + NAA 0.5 mg/L, the coefficient of proliferation get to 6.5, the average height is 2.5 cm, the suitable rooting medium is 1/2 MS + NAA 0.1 mg/L, the rooting count is about 4~5, and the ratio of rooting gets to 100%.

Key words: *Pinellia tenata*(Thumb.) Breit; Tissue culture; κ -Carrageenan

旱半夏 *pinellia tenata*(Thunb.) Breit 为天南星科多年生草本植物,以块茎入药,是一种重要的中药材。其性温,味辛,有小毒,归脾、胃、肺,经炮制后具有润燥化痰、降逆止呕、消痞散结之功效^[1]。

旱半夏多为野生,尽管具有明显的杂草性,但其繁殖系数较低,又缺乏有效的传播方式,因而是一种开拓性差的物种^[2]。近年来随着连年采挖,野生资源日趋枯竭,远不能满足市场需求。人工栽培时,采用大块茎出售,珠芽、小块茎育苗,用种量大,成本高。小块茎无性繁殖易使半夏产量降低,品质退化,使半夏的栽培生产受到限制。利用组织培养建立半夏无性快速繁殖系统,可提高其繁殖系数,同时可防止品种退化问题。

本研究主要是对半夏组织培养条件进行优化,为大规模进行工厂化生产提供技术支持,前人研究中培养基使用琼脂固化,本研究尝试使用卡拉胶代替琼脂固化,取得了良好的效果,卡拉胶较琼脂价格低很多,因此可以为大规模进行工厂化生产节约成本。

1 材料与方法

1.1 材料 旱半夏小块茎,购于安国市北方药材种子经销站。

1.2 消毒方法 取健康的旱半夏小块茎,用清水洗净,放于超净工作台中灭过菌的空三角瓶中,先用含有吐温的 0.1% 的升汞溶液消毒 10~12 min,再用 75% 的酒精消毒 30~60 s,最后再用无菌水冲洗 5~6 次,备用。

1.3 培养基及试验设计 设计以 MS、1/2MS 为基本培养基,基于我们的研究目的旨在指导并应用于大生产,所以为尽量节约成本和适应大规模生产所需,本试验选择了细胞分裂素中效果较好且最为廉价常用的 6-BA、生长素选择了 NAA,以期筛选出适合于

半夏生产的最佳培养基。

发芽培养基:MS。

继代增殖培养基:在 MS 培养基中分别附加 BA 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 mg/L; NAA 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 mg/L; 采用二因素完全随机设计(见表 1)进行最适激素配比的筛选,共计 16 个处理组合(见表 2),每个处理接 4 株无菌苗,重复 3 次。

表 1 激素配比二因素完全随机设计因素水平

mg · L ⁻¹	
BA	NAA
A ₁ 0.5	B ₁ 0.05
A ₂ 1.0	B ₂ 0.1
A ₃ 2.0	B ₃ 0.5
A ₄ 3.0	B ₄ 1.0

生根培养基:在 1/2MS 培养基中分别附加 0, 0.01, 0.05, 0.10 mg/L NAA。

1.4 培养条件 所有培养基皆以浓度为 0.7% 的卡拉胶固化,含糖均为 3%,在高压灭菌前将 pH 值调至 5.8,温度为 (25 ± 2)℃。光照 1 500~2 000 lx,每日光照时数 12~14 h。

2 结果

2.1 无菌苗的获得 将小块茎接种到 MS 培养基中进行发芽培养,培养 4~7 d 内进行观察统计发芽情况。观察统计发现,当培养 7 d 时,小块茎的发芽率达到了 100%,继续培养无菌苗长势良好。

2.2 继代增殖培养 将小块茎发芽得到的无菌苗接种到表 2 处理组合的培养基中,培养 1 周左右无菌苗上端死亡,而在基部开始膨大,培养 2 周时形成愈伤组织(见图 1),培养 3 周时愈伤组织分化成苗(见图 2),培养 4 周时对其进行观察和相关数据统计。

从表 2 可见,1~6 号培养基中组培苗没有增殖,而 7~16 号培养基均有一定程度的分化增殖,但是差别相对较大。从分化出的苗的高度以及增殖系数来看 11 号培养基最佳,增殖系数达到 6.5,平均苗高达 2.5 cm。其他培养基的增殖系数分布在 1.2~4.0 之间,平均芽苗高分布在 1.2~2.0 之间。从而筛选出最适继

收稿日期:2007-08-06; 修订日期:2007-12-20

作者简介:王丽艳(1977-),女(汉族),内蒙古赤峰人,现任黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院讲师,硕士学位,主要从事植物资源的开发与利用方面的研究工作。

*通讯作者简介:殷奎德(1964-),男(汉族),黑龙江虎林人,现任八一农垦大学教授,博士学位,主要从事植物生物技术方面的研究工作。

代增殖培养基为: MS + 6 - BA2.0 mg/L + NAA0.5 mg/L。继代分化增殖情况见图 3。

表 2 植物激素对比对旱半夏继代增殖培养的影响

处理组合	接种数/株	平均增殖系数	平均苗高/cm
1A ₁ B ₁	12	—	—
2A ₁ B ₂	12	—	—
3A ₁ B ₃	12	—	—
4A ₁ B ₄	12	—	—
5A ₂ B ₁	12	—	—
6A ₂ B ₂	12	—	—
7A ₂ B ₃	12	1.5	1.5
8A ₂ B ₄	12	1.2	1.3
9A ₃ B ₁	12	2.5	1.5
10A ₃ B ₂	12	3.5	1.6
11A ₃ B ₃	12	6.5	2.5
12A ₃ B ₄	12	4.0	2.0
13A ₄ B ₁	12	2.4	1.2
14A ₄ B ₂	12	2.2	1.8
15A ₄ B ₃	12	3.0	2.0
16A ₄ B ₄	12	2.5	1.5



图 1 形成愈伤组织情况



图 2 愈伤组织分化情况



图 3 继代增殖情况

2.3 生根培养 选择继代培养后生长健壮并且有一定高度的试管苗,将其分成单株,分别接种到生根培养基上培养,10 d 后观察并统计结果。见表 3。

表 3 不同生长素浓度对旱半夏生根的影响

NNA/mg · ml ⁻¹	根数/条	生根率(%)
0	无	0
0.01	2~3	50
0.05	3~5	85
0.1	4~5	100

从表 3 可见,NAA 的浓度以 0.1 mg/L 时为最佳浓度,可长出 4~5 条根,生根率达到 100%,从而筛选出最适生根培养基为: 1/2MS + NAA0.1 mg/L,并且在此培养基上生长的组培苗根部无愈伤组织形成,有利于下一步移栽的成活。

2.4 移栽 选择生根良好的试管苗进行移栽,移栽前,先将试管苗从培养室中移至气温较低的室内进行练苗 2~3 d,而后再在室内开瓶练苗 2~3 d,最后,在瓶内加少许自来水练苗 1~2 d 后将其移栽至经高压灭菌的栽培土中,栽苗后需浇透水,初期加盖覆盖物,保温保湿,管理期间,土壤切忌太湿和应注意保持空气湿度。当确定苗已经成活并且长势良好时,再将覆盖物去掉暴露在空气中生长。

3 讨论

旱半夏分化增殖最适培养基为: MS + 6 - BA2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L,增殖系数达到 6.5,平均苗高达 2.5 cm;生根最适培养基为:1/2MS + NAA0.1 mg/L,生根率达到 100%。

在生根过程中选苗是很关键的,苗的高度不是主要因素,主要还是要看其健壮程度,细弱的苗生根移栽后是很难成活的。应选择健壮且有一定高度的组培苗来进行生根培养,生根后根部应没有愈伤组织形成,如果有愈伤组织即使根长的很好,移栽后也很难成活。移栽时最好在根长 1~1.5 cm 之间时,根长的太长后已老化,吸收养分的能力下降导致苗不易成活。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中国药典, I 部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000:89.
[2] 郭巧生. 半夏研究进展[J]. 中药研究与信息, 2000, 2(10):15.