

水半夏组培快繁体系的建立

丁伟¹, 张立红¹, 潘晟昊¹, 陈集双^{1,2*}

1. 浙江理工大学 生物工程研究所, 浙江 杭州 310018

2. 南京工业大学 生物资源研究所, 江苏 南京 210009

摘要: **目的** 建立水半夏的组培快繁体系, 为快速、大量生产水半夏种苗提供基础。**方法** 利用不同植物激素配比的培养基, 以水半夏块茎为外植体进行试验。**结果** 愈伤培养基 MS+NAA 0.2 mg/L+KT 1.0 mg/L+蔗糖 3%+琼脂 6 g/L 可成功诱导水半夏愈伤组织; 丛生芽培养基 MS+NAA 0.2 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+蔗糖 3%+琼脂 6 g/L 诱导不定芽效果较好, 增殖倍数高; 生根培养基 1/2 MS+NAA 0.2 mg/L+IBA 0.4 mg/L+KT 0.2 mg/L+蔗糖 3%+琼脂 6 g/L+AC 0.3 g/L, 有利于水半夏不定根的快速形成, 12~14 周即可获得再生水半夏植株。培养基 MS+NAA 0.2 mg/L+6-BA 1.5 mg/L+蔗糖 3%+琼脂 6 g/L 为诱导水半夏分化一次性成苗的最佳激素配比, 5~6 周可形成试管苗, 10 周后可用于炼苗。**结论** 建立的水半夏组培快繁体系为水半夏优良品种的快速繁殖奠定基础, 且可应用于工厂化生产水半夏种苗。

关键词: 水半夏; 组织培养; 一次性成苗; 快速繁殖; 植物激素

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)03-0585-04

Establishment of tissue culture and rapid propagation system of *Typhonium flagelliforme*

DING Wei¹, ZHANG Li-hong¹, PAN Sheng-hao¹, CHEN Ji-shuang^{1,2}

1. Institute of Bioengineering, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China

2. Institute of Bioresource Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China

Abstract: **Objective** To establish the rapid propagation system and tissue culture techniques of *Typhonium flagelliforme* for large-scale seedlings. **Methods** Using media with different hormones proportions, the tuber tissue was found to be a good explant for inducing asexual propagation system. **Results** The callus culture medium consisted of MS+NAA 0.2 mg/L+KT 1.0 mg/L+sucrose 3%+agar 6 g/L could generate callus successfully. Medium consisted of MS+NAA 0.2 mg/L+6-BA 2 mg/L+sucrose 3% + agar 6 g/L was a superlative proportion of hormones concentration to generate adventitious buds efficiently, especially for higher proliferated multiples. The rooting medium consisted of 1/2 MS+NAA 0.2 mg/L+IBA 0.4 mg/L+KT 0.2 mg/L+sucrose 3%+agar 6 g/L+AC 0.3 g/L was conducive to generate roots rapidly. The explants could be acclimatized after a period of 12 to 14 weeks. Experiments of one-step-seedling formation indicated that the one-step-seedling formation medium, containing MS+NAA 0.2 mg/L+6-BA 1.5 mg/L+sucrose 3%+agar 6 g/L was the best proportion of hormone concentration, for 5 to 6 weeks, new plantlets could be developed, which will be acclimatized in 10 weeks. **Conclusion** The tissue culture techniques and rapid propagation system of *T. flagelliforme* could be used for large-scale seedlings and lay a foundation for its improved breeds.

Key words: *Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume; tissue culture; one-step-seedling formation; rapid propagation; plant hormone

水半夏 *Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume 为天南星科 Araceae 独角莲属植物戟叶犁头尖的块茎, 为一种常用中药材, 其药用历史悠久且功效与半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 相近, 临床上常

作为半夏的代用品。水半夏的野生资源在我国分布较广, 主产于广西、浙江、广东、贵州和云南等省。目前, 人们已经对水半夏的生药学、化学、药理及临床应用等方面有了一定的认识 and 了解, 但在组织

收稿日期: 2010-05-31

基金项目: 国家“863”基金项目(2002AA241121)

作者简介: 丁伟(1985—), 男, 浙江省杭州市人, 浙江理工大学生物工程研究所硕士研究生, 主要研究方向为植物组织培养。

Tel: 15990168300 E-mail: remarque2008@163.com

*通讯作者 陈集双 Tel: (0571)86483195 E-mail: biochenjs@163.com

培养方面的研究相对较少。药理研究表明,水半夏具有止咳、祛痰、平喘、镇痛、镇静、消炎和抗过敏等作用^[1-2]。目前,水半夏中已发现 1,3-苯基十三烷酸等脂肪酸、脑苷脂类和苯丙素糖苷类等多种成分^[3-5]。

近年来,国内外市场对水半夏的需求大幅增加,导致野生水半夏资源日近枯竭。本实验探讨水半夏组织培养技术,对开发水半夏资源具有极大的应用价值和经济价值。通过植物组培快繁技术可有效解决水半夏生产过程中的矛盾,为工厂化生产提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

水半夏块茎购自广西贵县,种植于浙江理工大学试验田。经浙江理工大学生命科学院陈集双教授鉴定为水半夏 *Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume. 的干燥块茎

1.2 外植体的处理

选取 1~2 年生健康水半夏植株的块茎为外植体。水半夏块茎用 10%洗衣粉溶液浸泡、漂洗 1~1.5 h 后用清水洗净,置于超净工作台。用 75%乙醇消毒处理 40~60 s,无菌水冲洗 3~4 次,再经 0.1%氯化汞水溶液消毒处理 10 min,无菌水冲洗 6~8 次。

1.3 培养基

以 MS 为基本培养基,蔗糖 3% (30 g/L),琼脂 6 g/L,培养基 pH 5.8~6.2。4 种附加植物激素 NAA、IBA、KT、6-BA 的母液质量浓度均为 1 mg/mL。培养基在 121 °C 灭菌 30 min。

愈伤诱导培养基:参照文献方法^[6],水半夏块茎切分成组织块,接种于愈伤诱导培养基 MS+NAA 0.2 mg/L+KT1.0 mg/L+蔗糖 3%+琼脂 6 g/L, pH 值为 5.8~6.0。

丛生芽增殖培养基:预试验结果表明,当 NAA 质量浓度为 0.2 mg/L 时可以得到较好的生长状态。因而采用单因素试验,考察不同质量浓度的 6-BA 对丛生芽增殖的影响。首先,设定 NAA 质量浓度为 0.2 mg/L,添加的 6-BA 质量浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/L,编号为 Z1~Z6。考察不同质量浓度的 6-BA 对丛生芽增殖的影响。Z1~Z6 每种质量浓度均配制 30 瓶。

生根培养基:在预试验的基础上,本试验采用 NAA、IBA、KT 3 种植物激素按一定比例配合,调节生根。培养基成分为 1/2MS+激素+蔗糖 3%+

琼脂 6 g/L+AC 0.3 g/L, pH 值为 6.0~6.2。3 种激素的质量浓度配比见表 1,分别编号为 W1~W12。每种质量浓度均配制 30 瓶。

一次性成苗培养基:参考文献方法^[7],利用 NAA、6-BA 两种激素组合配制培养基,配比见表 2,分别编号为 G1~G5。每种质量浓度均配制 30 瓶。

1.4 培养条件

培养温度控制在 (25±2) °C,光照强度控制在 2 000~2 500 lx,光照时间为 12 h/d。

1.5 组织培养的扩繁

在预试验的基础上,水半夏块茎灭菌后,切除外表皮再分切成大小为 0.3~0.5 cm² 的小块。分切后的组织块接种于愈伤培养基中,每瓶内放置 4~5 个,9~12 d 更换 1 次培养基。组织块发育为愈伤组织后,将萌发芽头,切下 1~2 个转移至丛生芽培养基中,每瓶内放置 4~5 个,9~12 d 更换 1 次培养基。芽头长至一定高度,转入生根培养基中,每瓶内放置 1~2 个,直至炼苗移栽。

1.6 组培苗的炼苗移栽

当生根苗生长 20 d 后,取生长健壮、根系形成良好且株高为 5~6 cm 的组培苗进行开盖炼苗,炼苗时间在 3~5 d。炼苗结束后,取出组培苗用清水清洗干净根部的培养基,转种于砾石和沙子混合的栽培基质,浇透水后置于 20~25 °C,50%湿度,适当遮荫环境下培养,每 2 天浇水 1 次。3 周后转至户外种植。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的形成与形态分化

采用 75%乙醇、0.1%氯化汞消毒处理法可以达到良好的灭菌效果。在预试验的基础上,利用愈伤培养基诱导 5~7 d,组织块膨大,逐渐形成失去分生能力的乳白色愈伤组织。接种 10~15 d 之后,愈伤组织上出现白色毛根状物,稍后愈伤组织表面将萌发出数目众多且密集的绿色芽点,芽点进一步分化形成丛生芽。

2.2 丛生芽增殖培养基的优化筛选

细胞分裂素对于丛生芽的增殖具有重要作用,其浓度及种类对丛生芽的增殖起到了决定作用。本实验利用单因素分析法,在确定 NAA 的质量浓度为 0.2 mg/L 的条件下,考察了 6 种不同质量浓度的 6-BA 对丛生芽增殖的影响,见图 1。

随着 6-BA 质量浓度的增加,增殖倍数呈现先增后减趋势。当 6-BA 质量浓度为 2.0 mg/L 时,增殖

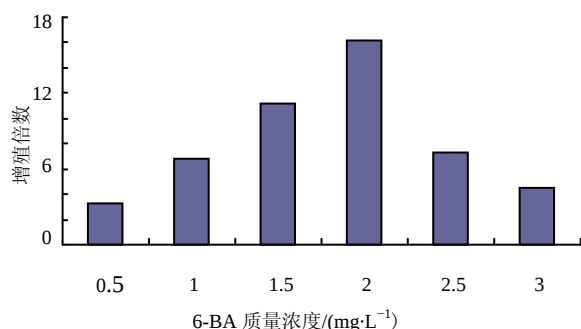


图 1 6-BA 质量浓度对丛生芽增殖倍数的影响

Fig. 1 Effect of 6-BA concentration on proliferation of multiple buds

倍数达到最大为 16.214 5。当 6-BA 质量浓度过大时, 导致叶片畸形、组织玻璃化从而降低了增殖倍数。

2.3 生根培养基的优化筛选

组培苗高度在 3 cm 时开始接种于生根培养基上, 15 d 后观察根的形成状况。预试验结果表明, 添加两种生长素 NAA、IBA 的组合即可顺利生根, 但同时发现 KT 对水半夏生根有较为明显的促进作用。所以本实验在添加 NAA、IBA 两种激素的基础上, 附加少量的 KT, 利用 3 种激素组合配制培养基。

15 d 后, 各培养基中组培苗的主根长度、生根比率、平均生根数及根的状态见表 1。

如表 1 所示, NAA、IBA 均属生长素类型的植物激素, 总的质量浓度不宜太高, 高质量浓度时将抑制根的生长, 且两种激素中 NAA 质量浓度变化对植物生根的影响较大。KT 在较低质量浓度时就可起到促进生根的作用, 继续增加 KT 质量浓度对增加生根数量影响不大。可见 W7 培养基不管是生根率还是根的状态都是最佳的。

2.4 一次性成苗培养基的筛选

水半夏块茎接种于一次性成苗培养基中, 培养 10 周后, 水半夏再生植株的高度、叶片和根系形成等生长状态见表 2。由表 2 可见, 培养基 G-3 中 6-BA、NAA 的质量浓度配比较为适宜, 一次性成苗效果较好。10 周后, 便可开盖炼苗。

2.5 组培苗的移栽

利用上述方法将水半夏组培苗移栽到户外种植, 成活率在 90% 以上 (见图 2)。

3 讨论

目前, 国内对水半夏组培的研究较少, 往往参

表 1 不同激素配比下生根情况

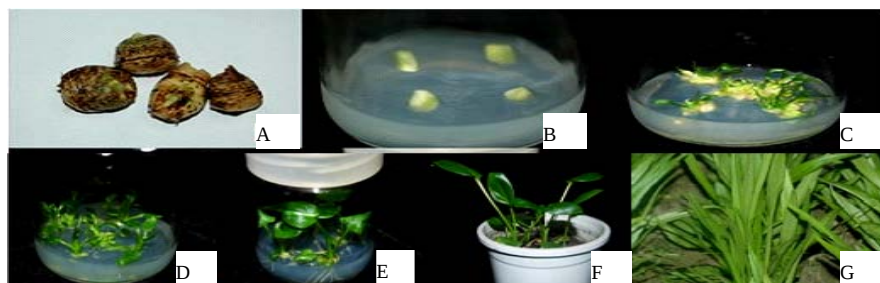
Table 1 Rooting under different hormone conditions

培养基编号	NAA/ (mg·L ⁻¹)	IBA/ (mg·L ⁻¹)	KT/ (mg·L ⁻¹)	主根长/ cm	生根率 /%	平均生根 条数	根的状态
W1	0	0	0	0.5~1.5	46.67	1.54	根少, 细长
W2	0.1	1.0	0.1	1.5~2.5	26.67	0.83	根少, 细长
W3	0.2	0.5	0.1	4.0~5.0	83.33	2.67	较好, 数量较多
W4	0.5	0.2	0.1	3.0~4.0	66.67	2.25	一般, 粗细均匀
W5	1.0	0.1	0.1	1.0~1.5	23.33	0.79	根少, 短粗
W6	0.2	0.2	0.1	4.0~5.0	66.67	2.36	较好, 较多, 粗细均匀
W7	0.2	0.4	0.2	4.5~6.0	96.67	3.13	状态良好, 根系健壮, 粗细均匀
W8	0.2	0.6	0.3	4.0~5.0	80	2.54	较好, 数量较多
W9	0.5	0.1	0.1	2.5~3.5	66.67	2.31	一般, 粗细均匀
W10	0.5	0.3	0.2	4.0~5.0	63.33	2.14	一般, 根短粗, 颜色黄
W11	0.5	0.5	0.3	1.5~2.5	50	1.63	一般, 根短粗, 颜色黄
W12	1.5	1.0	0.3	0	0	0	不生根

表 2 不同培养基对再生植株芽增殖的影响

Table 2 Effect of media on proliferation of buds

培养基编号	6-BA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)	植株高度/cm	植株叶片、根系的生长情况
G1	1.0	0.1	<5	一般, 生长速度较慢
G2	1.5	0.2	5~7	状态较好, 根系完整发达, 叶片多
G3	2.0	0.3	>8	状态良好, 根系紧密发达, 叶片数量多、健康
G4	2.5	0.4	5~6	一般, 根短粗, 叶片较少
G5	3.0	0.5	<4	早期易玻璃化, 生长受抑制, 叶有畸形, 根短粗



A-块茎 B-块茎外植体 C-块茎产生愈伤组织 D-丛生芽 E-生根苗 F-移栽的生根苗 G-生长一年的组培苗
A-tubers B-tubers as explants C-callus induced from tuber D-adventitious buds E-rooting plantlets F-rooting plantlets planted on a medium G-one year old rooting plantlets

图2 快繁体系的不同阶段

Fig. 2 Different stages of rapid propagation system

考其同科植物半夏的组培方法进行研究^[8-10]。预试验中,结果显示水半夏叶片和茎尖不易诱导形成愈伤组织,而以块茎为外植体则可顺利形成愈伤组织。组织培养过程中,人为添加植物激素(包括生长素和细胞分裂素)将调节和影响细胞的生长分化以及组织形态的形成,内、外源激素共同作用下将决定植物细胞总的生长状态。在预试验的基础上,本实验采用NAA和KT的组合诱导水半夏愈伤,最终获得了状态良好的愈伤组织。

细胞分裂素可以促进丛生芽的增殖,与低质量浓度的NAA配合使用时,随着6-BA质量浓度的增加,增殖倍数增加,当质量浓度为2.0 mg/L时达到最大,继续增大,增殖倍数变化不大,反而有下降趋势,并且逐渐出现叶片畸形、组织玻璃化等现象。结果:水半夏丛生芽增殖的最佳培养基为:MS+NAA 0.2 mg/L+6-BA 2 mg/L+蔗糖3%+琼脂6 g/L, pH 5.8~6.0。同时,水半夏这一阶段的组培过程中有明显的“芽生芽”现象。实际扩繁过程中,可利用这一特点不断分切丛生芽阶段的水半夏组织,从而节省愈伤阶段的时间,大大提高扩繁速度。

本实验选择在NAA、IBA两种激素的基础上,附加少量的KT,组合配比生根培养基。实验结果表明:当NAA质量浓度为0.2 mg/L时诱导率和根状态是最佳的。NAA质量浓度过高,根会变得短粗。KT在较低质量浓度时就可起到促进生根的作用,继续增加KT的质量浓度对增加生根数量影响不大,却易产生丛生芽。水半夏最佳生根培养基为1/2 MS+NAA 0.2 mg/L+IBA 0.4 mg/L+KT 0.2 mg/L+蔗糖3%+琼脂6 g/L+AC 0.3 g/L, pH 6.0~6.2。

适当的植物激素配比是水半夏组培一次性成苗的关键,所选植物激素的种类和质量浓度要能有序地诱导愈伤组织、丛生芽、根的形成。同样以水

半夏块茎为外植体,MS培养基下,NAA质量浓度在0.2~1 mg/L,6-BA质量浓度在1~2 mg/L,植物均不发生明显脱分化过程,5~6周后,逐渐形成试管苗,10周后可开始炼苗。结果表明:培养基MS+NAA 0.2 mg/L+6-BA 1.5 mg/L+蔗糖3%+琼脂6 g/L较适宜于水半夏的一次性成苗。

水半夏组培苗经过户外的第1次倒苗之后,生长能力更加旺盛,故可以利用组培苗,进行栽培。可见利用植物组织培养方法扩繁水半夏是一种快速、大量获得单一优良水半夏植株的方法,具有较高的经济价值。

参考文献

- [1] 钟正贤,周桂芬,陈学芬,等.水半夏提取物的抗炎、抗过敏作用研究[J].中药药理与临床,2003,19(2):25-27.
- [2] 钟正贤,周桂芬,陈学芬,等.水半夏提取物药理研究[J].中药材,2001,24(10):735.
- [3] 刘布鸣,梁凯妮,黄平,等.鲜品水半夏和水半夏药材中氨基酸成分分析[J].广西中医药,2003,26(6):51-52.
- [4] Chen X S, Goh C J, Kon O L. Fatty acids from *Typhonium flagelliforme* [J]. *Planta Med*, 1997, 63(6): 580.
- [5] 黄平, Gloria K, Peter G W. 水半夏化学成分研究[J]. 中药材, 2004, 27(3): 173-174.
- [6] 涂轶.半夏的组培快繁技术研究[J]. 实验科学和技术, 2005, 1(1): 17-19.
- [7] 杨凯,王荔,杨艳琼.不同激素浓度对比对半夏组培一次性成苗的影响[J]. 云南农业大学学报, 2005, 20(5): 615-619.
- [8] 张晓伟,王小峰,周昌华,等.半夏工厂化育苗技术体系研究初探[J]. 中草药, 2007, 38(3):432-435.
- [9] 张杰,徐涛,张建光,等.半夏栽培品遗传差异的AFLP分析[J]. 中草药, 2007, 38(12): 1884-1889.
- [10] 冉懋雄.半夏 水半夏 附子[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2002.