



房海悦. 旱半夏组织培养体系优化[J]. 黑龙江农业科学, 2019(9):28-32.

# 旱半夏组织培养体系优化

房海悦<sup>1,2</sup>

(1. 拜泉县产业项目服务中心, 黑龙江 拜泉 164700; 2. 齐齐哈尔市北方本草经济植物研究所, 黑龙江 拜泉 164700)

**摘要:**为研究旱半夏组织培养体系的最优激素配比, 本试验以旱半夏块茎为材料, 以 MS 为基础培养基, 添加不同浓度的 6-BA、NAA 激素, 设置 9 个处理, 筛选诱导愈伤组织、不定芽分化以及生根最适培养基。研究了不同激素以及不同的浓度对比对半夏组织培养的影响。结果表明: 6-BA、NAA 两种激素以及不同浓度配比均对半夏愈伤组织诱导、不定芽分化以及生根有显著影响, 其中添加  $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 和  $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 时出芽数最多, 出芽率达到 90%; 生根培养中, 添加  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 时生根数最多, 平均根长达到 6.4 cm。因此, 半夏最佳愈伤组织诱导以及不定芽分化的条件为: MS+ $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA+ $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA; 最佳生根培养基为:  $1/2 \text{ MS}+1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA。

**关键词:** 半夏; 愈伤组织; 分化; 诱导

半夏(*Pinellia ternate* Thunb.) 属天南星科, 半夏属, 多年生草本植物, 块茎圆球形, 直径 1~2 cm, 花期 5-7 月, 果期 8 月, 广泛分布于全国各地<sup>[1]</sup>。半夏是常用中药材之一, 块茎入药, 具有燥湿化痰, 降逆止呕等作用<sup>[2]</sup>。临床研究表明, 半夏还具有镇咳、抗癌、利胆等功效<sup>[3]</sup>。目前市场需求量大, 由于过度采挖导致其野生资源匮乏, 人工栽培繁殖力低, 适应性差以及品种退化等问题, 利用新方法或技术手段解决半夏繁殖能力、品种退化以及保护野生资源等问题势在必行。

随着分子遗传学和植物基因工程的迅速发展, 植物组织培养作为新兴技术手段有效的解决了以上问题, 组织培养是基于植物细胞全能性的理论下, 在无菌条件下将活器官、组织或细胞放置在适宜的培养基内, 并放置在适宜的环境中, 进行培养重新形成细胞、组织或个体<sup>[4-6]</sup>, 目前广泛应用于花卉、蔬菜、中药材等的大量生产。近年来半夏组织培养有很多研究报道, 罗成科等<sup>[7]</sup>研究发现, 以 3 叶半夏为材料, 一步成苗对于保存半夏亲本的遗传特性和药效有较好的效果。任家惠等<sup>[8]</sup>研究发现, 利用半夏叶片和叶柄进行组织培养, 叶片再生能力强于叶柄。罗光明等<sup>[9]</sup>研究报道, 生长素与细胞分裂素不同浓度对比对半夏愈伤组织

诱导影响显著。苏新<sup>[10]</sup>采用不同培养基 MS、Whit、H 等对半夏进行愈伤组织诱导, MS 培养基效果最好。万美亮等<sup>[11]</sup>研究了不同浓度的生长素和细胞分裂素的适当配比, 发现细胞分裂素浓度适当可促进芽分化, 浓度过高抑制根的形成, 生长素浓度适当可促进根的形成, 浓度过高抑制芽的形成。本研究通过对旱半夏组织培养条件的探索研究, 建立旱半夏组织培养优化体系, 为解决半夏繁殖能力低、保存新品种、扩繁等问题提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

本研究以旱半夏块茎为试验材料。将田间挖取的旱半夏清洗干净, 在超净工作台中用 75% 酒精浸泡 1 min, 无菌水反复冲洗, 升汞消毒 15 min, 再用无菌水反复冲洗, 切成 1 cm 左右小块, 在滤纸上吹干备用。

### 1.2 方 法

1.2.1 试验设计 试验于 2018 年 7-10 月在拜泉县国富中药材种植科技示范园进行。诱导培养基激素浓度的优化: 以 MS 为基础培养基, 分别添加不同浓度、不同配比的 6-BA、NAA 两种激素。培养基的琼脂比例为 0.7%, 蔗糖比例为 3%, pH5.8(表 1)。光照 2 000~2 500 lx, 温度 20~27 °C, 相对湿度 60%~80%。

收稿日期: 2019-03-26

作者简介: 房海悦(1991-), 女, 硕士, 从事植物组织培养研究。E-mail: fanghaiyue1991@126.com。

表 1 半夏不定芽诱导培养基中两种激素的组合

Table 1 Combination of two hormones in adventitious bud induction medium of <i>Pinellia ternate</i> (mg·L <sup>-1</sup> )									
激素 Hormone	培养基编号 Medium code								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
6-BA	0.6	0.6	0.6	0.8	0.8	0.8	1.0	1.0	1.0
NAA	0.2	0.4	0.6	0.2	0.4	0.6	0.2	0.4	0.6

愈伤组织培养 60 d 后,待不定芽长至 1~2 cm 时,将出芽率最高的处理转至增殖培养基,增殖培养基配方为:6-BA 0.8 mg·L<sup>-1</sup>,NAA 0.4 mg·L<sup>-1</sup>,30 d 后待不定芽长至 3~4 cm 时,把不定芽转至 1/2 MS 培养基中并添加不同浓度的 NAA 进行生根培养,设置 4 个处理:①1/2 MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup>NAA;②1/2 MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup>NAA;③1/2 MS+1.5 mg·L<sup>-1</sup>NAA;④1/2 MS+2.0 mg·L<sup>-1</sup>NAA。培养基的琼脂比例为 0.7%,

蔗糖比例为 3%,pH5.8。每个培养基接种 10 株苗,3 次重复,培养条件:光照 2 000~2 500 lx,温度 20~27 ℃,相对湿度 60%。

1.2.2 数据分析 采用 SPSS 21.0 对数据进行方差分析,利用单变量方差分析各处理的差异显著水平,显著性水平  $P<0.05$ ,进行不同处理间均值差异的显著性比较。

2 结果与分析

2.1 不同激素处理对半夏出芽的影响

半夏培养过程中,7 d 后观察切口处膨大,40 d 后出现瘤状突起,形成愈伤组织,呈绿色不规则团状,之后在愈伤组织上分化出绿色芽点。30 d 后观察不同激素诱导出芽情况(图 1)。6-BA、NAA、6-BA×NAA 的 Sig=0.000 均小于 0.01,对出芽的影响差异显著。在处理 5 的 6-BA 0.8 mg·L<sup>-1</sup>,NAA 0.4 mg·L<sup>-1</sup>时,出芽数最多,诱导率最高(表 2 和表 3)。

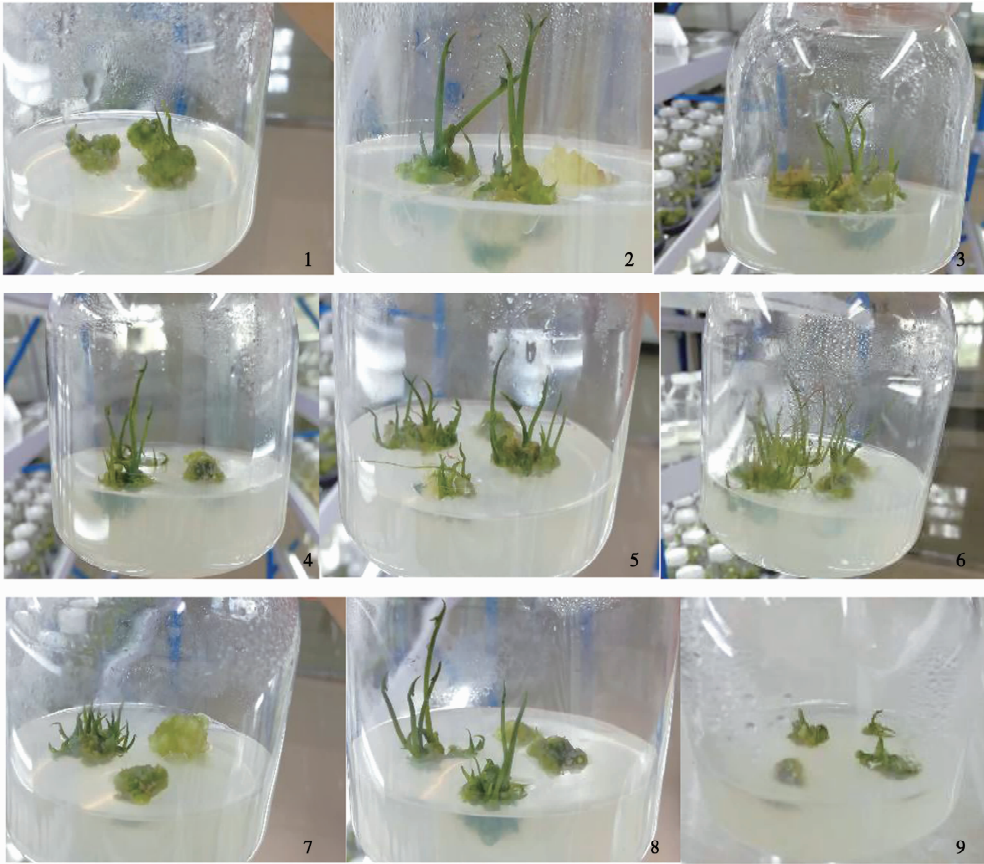


图 1 半夏愈伤组织诱导各处理长势情况  
Fig.1 Callus induction of *Pinellia ternate*

表 2 不同激素浓度幼苗表现情况

Table 2 Performance of seedlings with different hormone concentrations

处理 编号 No.	平均出芽数( $\bar{x}\pm S$ ) No. of average bud	表现情况 Performance	诱导率 Induction rate/%
1	8.20 $\pm$ 1.92 aA	长势不好,出芽较少	67
2	11.80 $\pm$ 0.84 aB	长势不好,出芽较少	75
3	12.60 $\pm$ 0.89 aC	长势良好,出芽不多	79
4	13.60 $\pm$ 1.52 bA	长势良好,出芽较多	80
5	24.00 $\pm$ 2.74 bB	长势良好,出芽较多	90
6	15.40 $\pm$ 1.14 bC	长势良好,出芽较多	81
7	11.40 $\pm$ 1.14 aA	长势良好,出芽较多	80
8	10.60 $\pm$ 0.55 aB	长势良好,出芽不多	74
9	9.40 $\pm$ 1.14 aC	长势不好,出芽较少	69

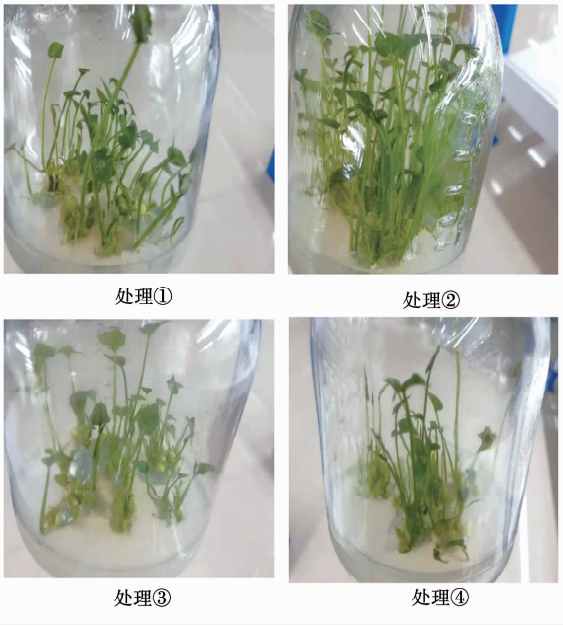


图 2 半夏生根培养基各处理长势情况

Fig. 2 Rooting medium of *Pinellia ternate*

不同小写字母表示 NAA 浓度相同时,不同 6-BA 浓度间存在显著差异( $P<0.01$ ),不同大写字母表示表示 6-BA 浓度相同时,不同 NAA 浓度间存在显著差异( $P<0.01$ )。Different lowercase letters within the same NAA concentrations indicate significant difference( $P<0.01$ ) among different 6-BA concentrations, and different capital letters within the same 6-BA concentration indicate significant difference( $P<0.01$ ) among different NAA concentrations.

表 3 激素主体间效应分析

Table 3 Analysis of the main hormone effect

激素 Hormone	df	F	Sig.
激素 1(6-BA)	2	115.125	0.000
激素 2(NAA)	2	35.531	0.000
激素 1 $\times$ 激素 2(6-BA $\times$ NAA)	4	26.063	0.000

2.2 不同激素处理对半夏生根的影响

将 2~3 cm 长的小段接入 4 种不同培养基中,15 d 后开始陆续长根(图 2),30 d 后测定各项指标(图 3),由表 4 可看出,处理②生根数和根长都优于其他处理。平均根数处理③和处理④之间差异不显著,平均根长③和④差异不显著,处理①介于处理②和处理③、④之间,说明半夏最适生根培养基为处理②:1/2 MS+1.0 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> NAA。



图 3 半夏生根培养基各处理根长测定

Fig. 3 Determination of root length in rooting medium of *Pinellia ternat*

表 4 不同培养基对半夏生根的影响

Table 4 Effect of different medium on rooting of *Pinellia ternata*

处理编号	培养苗数	平均根数	平均根长	生根率
No.	No. of seed	No. of average root	Average root length/cm	rooting rate/%
①	10	30.33±2.52 b	5.08±0.94 ab	100 a
②	10	35.00±1.00 c	6.40±1.06 b	100 a
③	10	24.33±2.08 a	4.62±0.46 a	100 a
④	10	22.00±1.00 a	3.81±0.65 a	100 a

每列不同小写字母间表示差异显著( $P<0.05$ )。  
Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at 0.05 level.

3 结论与讨论

对早半夏进行愈伤组织诱导、不定芽分化以及生根培养,设置 9 个不同的激素浓度配比,方差分析得出,6-BA、NAA 以及它们不同浓度的组合均对半夏愈伤组织诱导、不定芽再分化以及生根影响显著。半夏愈伤组织诱导最适培养基为 MS+0.8 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.4 mg·L<sup>-1</sup> NAA,最佳生根培养基为:1/2MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA。

研究表明,激素是影响半夏愈伤组织诱导、不定芽分化以及生根的重要因素,包括激素的种类及其浓度。本研究借鉴前人经验在半夏外植体诱导再生时采用的激素种类,对 6-BA、NAA 的不同组合在 不定芽诱导以及生根方面的作用进行试验。结果表明,6-BA 和 NAA 对不定芽诱导的影响明显,NAA 的浓度对生根影响显著。

植物组织培养作为新兴技术发展前景广阔,不受季节、气候等外界环境的干扰,对保存珍稀品种、加速育种进程等起到了至关重要的作用。但在实际操作中还存在一些问题,不同植物的不同品种间对激素种类和浓度配比需求不同,要综合考虑影响试验因素:不同品种、培养基种类、激素种类、试验条件等,筛选出最适培养基和激素浓度;愈伤组织形成过程中还可能 存在遗传变异等问题;操作手法不规范以及消毒不彻底等导致污染<sup>[12-14]</sup>。因此,要不断完善和改进技术手段等,建立最优植物组织培养以及快速繁殖体系。

参考文献:

[1] 牛倩,郭伟娜,黄和平,等.道地中药材颖半夏组培快繁优化研究[J].中药材,2017,40(8):1777-1779.

[2] 刘洋.半夏组培苗生根与移栽技术研究[J].北方园艺,2012(17):161-162.

[3] 李斌,程秀民,周永妍,等.半夏的研究进展[J].中国民族民间医药,2010(1):47-48.

[4] 陶阿丽,曹殿洁,华芳,等.植物组织培养技术研究进展[J].长江大学学报(自科版),2018(18):31-35.

[5] 卢思.植物组织培养技术及应用[J].科技展望,2016(11):73.

[6] 张东旭,周增产,卜云龙,等.植物组织培养技术应用研究进展[J].北方园艺,2011(6):209-213.

[7] 罗成科,彭正松.半夏组织培养一步成苗技术的研究进展[J].安徽农业科学,2003,31(5):798-799.

[8] 任家惠,陈克明,徐琼芳.三叶半夏试管苗器官的诱导[J].植物生理学通,1983(4):44-44.

[9] 罗光明,杨雅琴,何雁.半夏的快速繁殖研究[J].中药材,2003,26(1):699-701.

[10] 苏新.半夏愈伤组织的诱导和植株再生的研究[J].中国中药杂志,1989,14(11):15-17.

[11] 万美亮,陈宏康,詹亚花,等.半夏组织培养与快速繁殖研究[J].中国中药杂志,1995,20(9):526-529.

[12] 王昱淇.植物组织培养中存在的问题及其预防措施[J].南方农业,2014(57):134-142.

[13] 吕冬梅,袁媛,詹志来.药用植物大规模组织培养的相关问题探讨[J].中国中药杂志,2014(17):3413-3415.

[14] 张桂海.组织培养过程中的关键问题探讨[J].中国果菜,2006(6):28.

# Optimization on Tissue Culture System of *Pinellia ternata*

FANG Hai-yue<sup>1,2</sup>

(1. Baiquan Industrial Project Service Center, Baiquan 164700, China; 2. Qiqihar Northern Herbal Economic Plants Research Institute, Baiquan 161000, China)

**Abstract:** In order to study the optimal hormone ratio of tissue culture system of *Pinellia ternata*, the experiment used tuber of *Pinellia ternata* as material, MS as base medium, 6-BA and NAA hormones of different concentration were added, and 9 treatments were set up to screen the best medium for inducing callus, adventitious bud differentiation and rooting. The effects of different hormones and concentrations on tissue culture of *Pinellia ternata* were studied. The results showed that both 6-BA and NAA hormones and their ratios at different concentrations had significant effects on callus induction, adventitious bud differentiation and rooting of *Pinellia ternata*. Among them,  $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA and  $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA had the highest number of buds and 90% of buds, and  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA had the highest number of roots and the average length of roots in rooting culture. Therefore, the optimum conditions for callus induction and adventitious bud differentiation of *Pinellia ternata* were  $\text{MS} + 0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA, and the optimum rooting medium was  $1/2 \text{ MS} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA.

**Keywords:** *Pinellia ternata*; callus; differentiation; induce

(上接第 27 页)

**Abstract:** In order to promote rapid propagation in vitro and industrialized seedling raising of watermelon, the MS medium was chosen as the basic culture medium, the cotyledon, cotyledon node and hypocotyl were used as explants, factors affecting callus formation in watermelon were studied. The results showed that under the dark culture condition of  $25^\circ\text{C}$ , the cotyledon node of watermelon was most suitable for callus induction. The callus induction rate of cotyledon node was 87.55%, 7 d was the most suitable seedling age for callus induction, which had the highest induction rate of 89.62%, and the state of callus was good. The appropriate hormone concentration ratio for watermelon callus induction was  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D +  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA. Therefore, the optimal conditions for the formation of callus are as follows: cotyledon nodes of 7d-age watermelon seedling were used as explants, and cultured in MS basic medium with  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D +  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA.

**Keywords:** watermelon; tissue culture; explant; callus

## 《黑龙江农业科学》加入开放科学计划(OSID)

《黑龙江农业科学》于 2019 年 8 月起正式加入 OSID(Open Science Identity)开放科学标识计划。将尝试通过在文章上添加开放科学二维标识码(OSID 码),突破纸刊的局限性,立体展示科研成果,为读者和作者提供更广阔的成果展示和学术交流平台。OSID 开放科学计划,是国家新闻出版署出版融合发展(武汉)重点实验室发起的一项针对中国学术期刊的公益计划,旨在促进学术交流、扩大科研成果影响力、推进科研诚信建设、传播开放科学及融合出版理念。