

半夏组织培养诱导胚状体的正交试验

白 雨, 高山林^①

(中国药科大学, 江苏 南京 210038)

摘要: 采用茎尖组织培养技术获得了半夏 [*Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.] 的完整试管苗, 并进行了半夏叶不同部位诱导胚状体和愈伤组织的试验; 以生长率和总生物碱含量作为指标, 对不同激素配比进行了正交试验, 筛选出了最佳的培养基组成。结果表明: 诱导胚状体和愈伤组织的最佳外植体是半夏的叶柄基部, 诱导率分别为 43.6% 和 100.0%, 月生长率达 24.43 倍; 最佳培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L IAA。研究结果为半夏人工种子的进一步研究奠定了基础。

关键词: 半夏; 胚状体; 愈伤组织; 正交试验; 生物碱

中图分类号: S567.23+9.035; Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2003)04-0016-05

Orthogonal study on inducing embryoid of *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. by tissue culture BAI Yu, GAO Shan-lin^① (China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2003, 12(4): 16-20

Abstract: The plantlets *in vitro* in meristems culture of *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. were achieved. Suitable explant part of leaves for inducing embryoid and callus was investigated. Growing rate and content of total alkaloids were calculated in orthogonal test to optimize combination of phytohormones and auxins for inducing embryoid and callus. The results indicated that the most suitable part for inducing embryoid and callus was the base of petiole. The inducing rate reached as high as 43.6% and 100.0% respectively, and growing rate of them in one month was 24.43; the optimized medium for inducing embryoid and callus was MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L IAA, which will lay the base in further research of artificial seed of *P. ternata*.

Key words: *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.; embryoid; callus; orthogonal test; alkaloid

半夏 [*Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.] 为天南星科多年生草本植物, 以块茎入药, 可燥湿化痰, 降逆止呕, 消痞散结; 用于痰多咳嗽, 痰饮眩晕, 风痰眩晕, 呕吐反胃, 胸脘痞闷等。半夏是重要的药用植物之一, 据统计, 在 558 种中药处方中, 半夏使用频率居第 22 位^[1]。但其野生资源由于连年采挖日益减少, 而人工栽培又由于多年无性繁殖易感染病毒, 产量和药用成分含量均不断下降。为此, 不少国内外学者进行了半夏组织培养和植株再生研究^[2-5], 以期通过组培技术解决半夏的种苗和品质复壮问题。但是多数研究集中在用单因子比较的方法考察其愈伤组织的诱导和器官分化的影响因素。本试验采用多指标正交试验的方法对半夏胚状体和愈伤组织诱导培养基进行优化筛选, 同时以产量和主要化学活性成分——生物碱含量作为测定指标进行分析, 为进一步进行人工种子的研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料来源

供试材料采自安徽省濉溪县, 经中国药科大学生药教研室鉴定为天南星科植物半夏 [*Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.]。

1.2 试验方法

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 30s, 再放入 0.1% 升汞溶液中 (加 3~5 滴吐温

收稿日期: 2003-05-23

作者简介: 白 雨 (1979-), 女, 河南开封人, 硕士研究生, 主要从事中药生物技术研究。

^① 通讯作者

-20)消毒 15 min, 无菌水冲洗 5 次。于解剖镜下剥取其茎尖分生组织(约 0.2~0.5 mm)接种在 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L IAA 固体培养基上。培养温度(25 ± 1)℃, 光照 1 500 lx, 每天 12 h。约 60 d 后, 获得完整的半夏试管苗。

1.2.2 半夏叶不同部位诱导胚状体和愈伤组织试验 分别切取茎尖培养获得的半夏试管苗的叶片、叶柄上部和叶柄基部, 接种在 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L IAA 培养基上, 每瓶 4 块材料, 每种材料 12 瓶, 培养条件同上。30 d 后收获称重, 计算愈伤组织诱导率、胚状体诱导率及生长率。

1.2.3 激素配比试验 按 $L_9(3^4)$ 表正交安排试验(见表 1), A、B 和 C 3 个考察因素即 6-苄基腺嘌呤(6-BA)、 α -萘乙酸(NAA)和吲哚乙酸(IAA)各取 3 水平。将愈伤组织诱导率和胚状体诱导率及生长率都较高的最佳外植体接种在附加上述生长素和细胞分裂素不同配比的培养基中, 培养条件同上。30 d 后, 分别以生长率和总生物碱含量为指标进行分析。

表 1 因素水平表 [$L_9(3^4)$]

Table 1 Factor and level table [$L_9(3^4)$]

水平 Level	A 6-BA (mg/L)	B NAA (mg/L)	C IAA (mg/L)
1	1.0	0.0	0.0
2	1.5	0.1	0.1
3	2.0	0.2	0.2

1.2.4 总生物碱含量测定 采用酸性染料比色法测定总生物碱含量^[6,7]。干燥至恒重的盐酸麻黄碱标准品制成 0.1 mg/mL 的标准溶液, 分别精密吸取 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mL 置于 25 mL 分液漏斗中, 加蒸馏水至 1.0 mL, 再加入 10 mL pH 6.0 柠檬酸钠缓冲液、10 mL 氯仿和 1 mL 溴麝香草酚兰标准液, 充分振摇, 静置 0.5 h, 分取氯仿层, 以氯仿为空白对照, 于 420 nm 测定吸光值。以浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标求得回归方程为 $Y = 5.8516X - 0.1810$, $r = 0.9988$ ($n = 5$)。

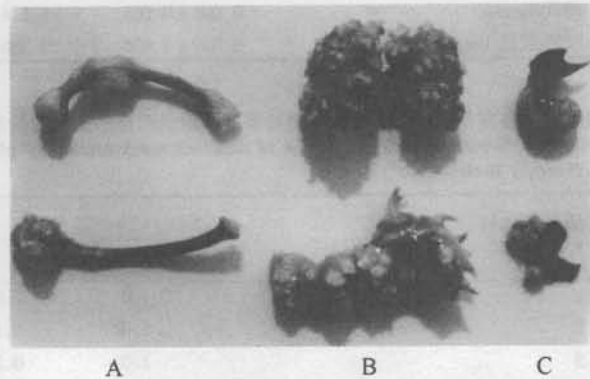
将诱导物烘干, 研碎, 粉末过 50 目筛。精密称定 0.5 g, 加浓氨水 0.5 mL, 湿润后加氯仿 10 mL, 冷浸 3 h, 超声提取 0.5 h, 过滤, 残渣用 10 mL 氯仿分 3 次洗涤, 洗液与滤液合并。80℃ 下减压回收氯仿至干, 精确加入 10 mL 氯仿使其溶解, 再加入缓冲液 10 mL 转移至 25 mL 分液漏斗中, 加入 1 mL 溴麝香草

酚兰标准液, 振摇, 静置 0.5 h。分取氯仿层, 于 420 nm 测定吸光度。按回归方程计算总生物碱含量。

2 结果与分析

2.1 半夏叶不同部位诱导胚状体和愈伤组织的效果

将半夏叶各部位接种在 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L IAA 培养基上, 10 d 后各材料切口处均有淡绿色愈伤组织出现; 20 d 后明显可见不同: 叶柄基部周身被深绿色胚状体覆盖; 叶片由边缘至中心大部分形成芽点, 但胚状体较少; 而叶柄上部大部分通体发白, 其上偶有绿色芽点点缀(见图 1)。



A: 叶柄上部 Upper part of petioles;
B: 叶柄基部 Base of petioles; C: 叶片 Leaves

图 1 半夏叶不同部位诱导的胚状体和愈伤组织(接种后 30 d)
Fig. 1 Embryoid and callus induced from different parts of leaves of *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. (30 d after inoculating)

半夏叶不同部位诱导胚状体和愈伤组织的比较结果见表 2。结果表明, 在添加 2.0 mg/L 6-BA 和 0.2 mg/L IAA 组合的培养基上, 半夏叶的不同部位均可不同程度地诱导出愈伤组织, 其中叶片和叶柄基部的诱导效果较好, 均为 100.0%, 而叶柄上部则较差, 仅为 65.5%。另外, 叶柄上部诱导出的愈伤组织不能分化为胚状体, 叶柄基部和叶片诱导出的愈伤组织则有不同的分化率, 但叶柄基部的生长率高于叶片且其诱导出的愈伤组织分化成胚状体的百分率也最高, 达 43.6%。由于胚状体是人工种子的的重要组成部分, 因此, 综合考虑上述因素, 可以认为半夏的叶柄基部是诱导胚状体和愈伤组织的最佳外植体。

2.2 激素对比对胚状体及愈伤组织生长和总生物碱含量的影响

2.2.1 激素对比对半夏胚状体和愈伤组织生长量的影响 不同激素对比对半夏叶胚状体及愈伤组织生长和总生物碱含量影响的正交试验结果见表 3。观察结果表明,叶柄基部接种在附加不同激素的 9 种 MS 培养基上,5 d 后均开始出现膨大,10 d 后陆续有愈伤组织产生,20 d 后达到高峰。7、8 和 9 号

培养基的愈伤组织生长于叶柄基部切段的两端,形似哑铃状,黄色致密,芽点少,产愈量少;3、5 和 6 号培养基上生长的愈伤组织有的密布周身,深绿色,芽点多,有的则长于两端,黄色;1、2 和 4 号培养基上生长的愈伤组织完全覆盖原来的外植体,芽点数量很多,形成颗粒大小不等的“葡萄串”样结构,外面包裹着绿色外层,类似半夏的珠芽。

表 2 半夏叶不同部位诱导胚状体和愈伤组织试验结果的比较

Table 2 Comparison of experiment results for inducing embryoid and callus from different parts of leaves of *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.

外植体 Explant	接种量(g) Inoculated weight ($\bar{X} \pm SD$)	收获量(g) Harvested weight ($\bar{X} \pm SD$)	愈伤组织诱导率(%) Rate of inducing callus	胚状体诱导率(%) Rate of inducing embryoid	生长率 Growing rate ($\bar{X} \pm SD$)
叶柄基部 Base of petioles	0.088 ± 0.014	2.278 ± 0.230	100.0	43.6	24.429 ± 0.470
叶片 Leaves	0.093 ± 0.005	1.524 ± 0.141	100.0	25.3	14.504 ± 0.183
叶柄上部 Upper part of petioles	0.099 ± 0.005	0.360 ± 0.072	65.5	0.0	1.645 ± 0.070

表 3 半夏胚状体和愈伤组织诱导培养基中激素对比的正交试验设计[L₉(3⁴)]及结果表¹⁾

Table 3 Results of orthogonal test of different concentration of phytohormones in medium for inducing embryoid and callus of *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. [L₉(3⁴)]¹⁾

培养基编号 No. of medium	因素 Factor				生长率 Growing rate	总生物碱含量(%) Content of total alk.
	A	B	C	D		
1	1.0	0.0	0.0	1	13.3	0.049 1
2	1.0	0.1	0.1	2	16.6	0.044 1
3	1.0	0.2	0.2	3	7.6	0.031 1
4	1.5	0.0	0.1	3	11.1	0.031 1
5	1.5	0.1	0.2	1	6.0	0.023 3
6	1.5	0.2	0.0	2	5.7	0.014 8
7	2.0	0.0	0.2	2	4.9	0.050 5
8	2.0	0.1	0.0	3	1.3	0.007 7
9	2.0	0.2	0.1	1	4.9	0.028 0
生长率 Growing rate	K ₁	37.5	29.3	20.3	24.2	$\sum_{i=1}^9 y_i = 71.4$
	K ₂	22.8	23.9	32.6	27.2	
	K ₃	11.1	18.2	18.5	20.0	
	R	26.4	11.1	14.1		
总生物碱含量 Content of total alk. (%)	K ₁	0.124 3	0.130 7	0.071 6	0.100 4	$\sum_{i=1}^9 y_i = 0.279 7$
	K ₂	0.069 2	0.075 1	0.103 2	0.109 4	
	K ₃	0.086 2	0.073 9	0.104 9	0.069 9	
	R	0.055 1	0.056 8	0.033 3		

¹⁾ A: 6-BA 浓度 concentration of 6-BA (mg/L); B: NAA 浓度 concentration of NAA (mg/L); C: IAA 浓度 concentration of IAA (mg/L);

D: 误差列 error column; $CT = \frac{1}{n} (\sum_{i=1}^n y_i)^2$

由表 3 生长率的 R 值分析可以看出,3 种激素对生长率的影响从大至小依次为 6-BA、IAA 和 NAA。方差分析结果显示(见表 4),6-BA 的浓度对生长率影响较大,而 NAA 和 IAA 的影响较小。所以,就生长率这一指标而言,通过对试验结果进行的正交分析,可以确定胚状体和愈伤组织诱导的最佳条件为

A₁B₁C₂, 即 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L IAA。

2.2.2 激素对比对半夏胚状体和愈伤组织中总生物碱含量影响 在上述 9 种培养基上诱导的半夏愈伤组织和胚状体中总生物碱含量见表 3。从表 3 中总生物碱含量的 R 值大小可以看出,3 种激素对总生物碱含量的影响从大至小依次为 NAA、6-BA 和

IAA;表5的方差分析结果表明,6-BA和NAA浓度对总生物碱含量影响不显著,IAA则无影响。由此,就总生物碱含量这一指标而言,通过对实验结果进行的正交分析,可以确定诱导半夏胚状体和愈伤组织的最佳条件为 $A_1B_1C_3$,即MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L IAA。

表4 半夏胚状体及愈伤组织生长率的方差分析表¹⁾
Table 4 Variance analysis of growing rate of embryoid and callus of *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.¹⁾

方差来源 Source of variance	离均差平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	方差 Variance	F值 F value	P值 P value
A	116.66	2	58.33	13.38	$0.05 < P < 0.1$
B	20.54	2	10.27	2.36	$P > 0.1$
C	39.26	2	19.63	4.50	$P > 0.1$
D	8.72	2	4.36		
SSe	8.72	2	4.36		

¹⁾ A: 6-BA 浓度 concentration of 6-BA (mg/L); B: NAA 浓度 concentration of NAA (mg/L); C: IAA 浓度 concentration of IAA (mg/L); D: 误差列 error column; SSe: 误差的离均差平方和 sum of squares of error. $F_{0.10}(2,2) = 9.00$, $F_{0.05}(2,2) = 19.00$

表5 半夏胚状体及愈伤组织中总生物碱含量的方差分析表¹⁾
Table 5 Variance analysis of content of total alkaloids in embryoid and callus of *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.¹⁾

方差来源 Source of variance	离均差平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	方差 Variance	F值 F value	P值 P value
A	0.000 531	2	0.000 266	2.04	$P > 0.1$
B	0.000 703	2	0.000 351	2.70	$P > 0.1$
C	0.000 235	2	0.000 117		
D	0.000 286	2	0.000 143		
SSe = SSC + SSD	0.000 521	4	0.000 130		

¹⁾ A: 6-BA 浓度 concentration of 6-BA (mg/L); B: NAA 浓度 concentration of NAA (mg/L); C: IAA 浓度 concentration of IAA (mg/L); D: 误差列 error column; SSe: 误差的离均差平方和 sum of squares of error; SSC: 因素 C 的离均差平方和 sum of squares of factor C; SSD: 因素 D 的离均差平方和 sum of squares of factor D. $F_{0.10}(2,4) = 4.32$

综合分析上述 2 项指标,根据单项分析的 2 组最佳条件,6-BA 浓度可确定为 1.0 mg/L, NAA 可确定为 0.0 mg/L。就总生物碱含量这指标而言,IAA 可以任取一水平,但考虑到生长率这一指标,所以,IAA 应为 0.1 mg/L。据此,最终确定出最佳的激素配比,即诱导半夏胚状体和愈伤组织的最佳培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L IAA。

3 讨 论

1) 根据细胞全能性理论,植物任何器官都可以

用作外植体,但不同组织器官培养成功的难易程度是不同的,同一种植物不同的组织和器官再生能力也有很大差异^[8],接种材料的组织部位、植株年龄、取材季节以及植株的生理状态等都会直接影响培养效果^[9]。本研究采用取材最容易的半夏叶作为培养材料,实验中观察到,诱导胚状体和愈伤组织,叶柄基部效果最好,叶片次之,叶柄上部最差。叶柄诱导效果优于叶片,在以往半夏组织培养实践中均有所体现^[2,4,10,11],而本试验对作为外植体的叶柄进行了更细致地划分,得到的试验结果与报道有所不同,其机理有待进一步探讨。

2) 在组织培养中,激素的种类、浓度和配比对试验结果有相当大的影响。本试验采用正交设计试验方式,能够在传统的单因子比较方法的基础上容纳更多的因素和水平,同时大大减少试验次数,提高准确率。试验结果表明,6-BA 浓度对愈伤组织诱导量和胚状体形成量影响较大,其最适浓度为 1.0 mg/L;而生长素 NAA 和 IAA 影响则次之。

据报道^[12],组织培养条件下,通过胚胎学观察半夏的分化过程为:随着愈伤组织的增殖,表面出现很多绿色的结节状小颗粒,继续发育,经球形胚、心形胚、鱼雷形胚最终形成成熟胚;通常一整块愈伤组织一方面增殖,另一方面各个时期的胚状体也不断发育,形成颗粒大小不等(1~5 mm)的“葡萄串”样的结构;颗粒结构外包裹着绿色外层,类似半夏的珠芽。本研究中半夏叶柄基部在 1、2 和 4 号培养基上同样有类似过程,可明显看到如上所述的“葡萄串”样结构。本实验室应用优化的 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L IAA 培养基诱导出了大量成熟胚状体,这为人工种子的进一步研究奠定了基础。

3) 半夏化学成分主要为生物碱、挥发油、氨基酸和 β -谷甾醇等,其中生物碱是其药理作用的主要物质基础。本试验中培养基的 3 种激素浓度对比对半夏愈伤组织和胚状体总生物碱含量的影响从高至低依次为 NAA、6-BA、IAA,其中 NAA 和 6-BA 影响不显著,而 IAA 则无影响。

4) 本研究采用分生组织培养技术,起始材料为 0.2~0.5 mm 的生长点。分生组织培养一般具有较好的脱病毒效果,为此将对半夏病毒种类、脱毒鉴定技术以及人工种子的制作技术等做进一步研究报道。

参考文献:

- [1] 毛子成,彭正松. 半夏研究进展[J]. 江西科学,2002,20(1):42-46.
- [2] 何奕昆,刘刚,路铁刚,等. 半夏茎尖培养及块茎的品质改良[J]. 植物学报,1994,36(1):39-44.
- [3] Shoyama Y. Clonal regeneration of *Pinellia ternata* Breit. via plant tissue culture[J]. Planta Medica,1983,49(1):14-16.
- [4] 万美亮,陈宏康,詹亚华,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.
- [5] 赵月玲,夏海武,万永霞. 半夏的组培快繁[J]. 植物杂志,1999,(1):29.
- [6] 吴皓,唐志坚,邱鲁婴,等. “正交法”与药典法姜半夏中成分含量及对动物作用的比较[J]. 中国中药杂志,1999,24(1):25-28.
- [7] 于超,张明,王宇,等. 紫外分光光度法测定不同产地半夏中总生物碱的含量[J]. 时珍国医国药,2002,13(2):73-75.
- [8] 毛子成,彭正松. 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.
- [9] 江苏省植物组织培养研究协会. 经济植物组织培养实用技术[M]. 南京:江苏科学技术出版社,1988. 34.
- [10] 宋佩伦,郑建国. 白术及半夏的组织培养[J]. 中草药,1989,20(7):27-29.
- [11] 张苏锋,谢素霞. 半夏组织培养快速繁殖的研究[J]. 信阳师范学院学报(自然科学版),1998,11(1):86-88.
- [12] 吴伯骥,肖亮,覃章铮. 从三叶半夏(*Pinellia ternata* Breit.)叶肉原生质体再生植株[J]. 中国科学(B辑),1986,3(3):267-271.

《云南植物研究》2004年征订启事

《云南植物研究》是国家科委(79)国科发条字341号文批准创办的植物学专业学报,是中国科学院主管的全国性自然科学期刊,现已成为我国植物科学研究发表论文的主要学术性刊物之一,为中国生物学类科技核心期刊,中国自然科学核心期刊。本刊荣获中科院优秀期刊二等奖(1996)及一等奖(2000)、第二届全国优秀期刊三等奖(1997)及云南省优秀科技期刊一等奖(1997)等,2001年进入国家期刊方阵,并入选国家“双效期刊”。所发表的论文被CA、BA、CABS、中国生物学文摘、中国林业文摘、中国药学文摘、中国科学引文数据库、万方数据库及中国学术期刊(光盘版)等国内外数据库所收录。

本刊报道植物学各分支学科具有创新水平的原始研究论文和简报,植物学领域的新发现及有重大应用价值的

成果快报;结合本人研究工作,反映国际最新研究水平的短篇综述等。中英文稿件均受欢迎。撰稿格式请参见本刊2003年(25卷4期)“征稿简则”要求。本刊论文发表周期6~10个月,热情欢迎同行学者赐稿。

《云南植物研究》为双月刊,双月25日出版,2004年每期定价15元,需要的单位或个人请到当地邮局订阅,邮发代号:64-11,若错过订阅时间,可将款直接汇至编辑部,我部将按期定时给您邮寄。联系地址:云南昆明市北郊黑龙潭中国科学院昆明植物研究所,邮政编码:650204; E-mail: BianJi@mail.kib.ac.cn, YOKE@chinajournal.net.cn; Telephone: 0871-5223032; FAX: 0871-5223163; 网址: http://YOKE.chinajournal.net.cn, http://www.kib.ac.cn/editor/