

# 三叶半夏叶片一步成苗离体培养技术

罗成科<sup>1,2</sup>, 彭正松<sup>1\*</sup>, 蔡鹏<sup>1</sup>

(1. 西华师范大学 生命科学学院, 四川南充 637002; 2. 宁夏大学 新技术应用研究开发中心, 银川 750021)

**摘要:** 以药用植物三叶半夏叶片为材料, 通过比较直接和间接器官发生两种途径, 建立了半夏一步成苗的快速繁殖技术体系。结果表明, 经过愈伤组织阶段的一步成苗培养基为 MS+0.5 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L KT, 90 d 左右方可得到再生植株, 植株分化率为 74%, 每个外植体上分化的块茎数为  $5.61 \pm 1.04$ 。附加 NAA 与 BA 两种激素对一步成苗培养基进行优化, 筛选出一步成苗最佳培养基 MS+0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L BA, 60 d 后就可直接发育成完整植株, 植株分化率为 76%, 每个外植体上分化的块茎数高达  $9.97 \pm 0.81$ , 对这种培养基上的再生小植株进行移栽, 1 个月后, 移栽成活率达 100%。

**关键词:** 半夏; 器官发生; 一步成苗; 植株再生

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2007)02-0260-05

## *In-vitro* regeneration of *Pinellia ternata* from leaf explants

LUO Cheng-Ke<sup>1,2</sup>, PENG Zheng-Song<sup>1\*</sup>, CAI Peng<sup>1</sup>

(1. College of Life Sciences, China West Normal University, Nanchong 637002, China; 2. Applied Research and Development Center for the New Technology, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

**Abstract:** Leaf blade of *Pinellia ternata* as explant, a system of rapid propagation was established via comparing two pathways of direct and indirect organogenesis. The results showed that when the young leaf blade segments were cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L KT, callus was induced, and the plants were regenerated in 90 days, and the differentiation frequency was 74%, each explant produced  $5.61 \pm 1.04$  tubercles. As 0.5 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA were added to the MS medium, the medium was optimized. After 60 days culture, plants were regenerated directly from the young leaf blade explants without visible callus formation, the differentiation frequency was 76%, and the tubercles differentiated from each explant reached  $9.97 \pm 0.81$ . One month after transplanting, 100% of the plantlets survived.

**Key words:** *Pinellia ternata*; organogenesis; one-step culture; plant regeneration

三叶半夏(*Pinellia ternata*)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, 其块茎被称为半夏, 是许多中药配方及中成药的必要成分, 用量较大。半夏具有润燥化痰、降逆、止呕、抗早孕、抗肿瘤等多种功效(中国

医学科学院药物研究所, 1993; 江年琼, 2001)。近年来, 因其市场走俏和特殊的药用价值倍受国内外关注。长期依赖采集野生半夏入药的状况, 导致野生资源日益枯竭, 迫使人们试用半夏属近缘植物作为替代品使用(吴艳, 2003), 但近缘属植物的药效一直

收稿日期: 2006-04-27 修回日期: 2006-11-20

基金项目: 四川青年科技基金(05ZQ026-041); 宁夏大学青年教师科研启动基金(QN0522)[Supported by Science and Technology Foundation for Youth Scholars of Sichuan Province(05ZQ026-041); Initial Scientific Research Foundation for Youth Teachers of Ningxia University(QN0522)]

作者简介: 罗成科(1979-), 男(回族), 宁夏海原人, 硕士, 主要从事植物细胞、组织培养等研究, (E-mail) chkluo2002@yahoo.com.cn.

\* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: pzs8833@163.com)

难以肯定, 医药行业仍然希望用道地的三叶半夏入药。为应市场之需, 进行半夏的人工栽培势在必行(龚成文, 2005; 马开森等, 2004), 但其自然繁殖系数很低(Peng, 2005), 导致人工栽培生产成本高, 为此人工快速繁殖成为亟待解决的一大难题。

组织培养技术是加速繁殖的有效途径。通过愈伤组织阶段得到再生植株, 前人已做了大量报道(Shoyama, 1983; 任家惠等, 1983; 朱鹏飞等, 1985; 苏新, 1989; 万美亮等, 1995; 罗光明等, 2003)。然而愈伤组织经长期继代往往会产生大量的突变(其中绝大多数是不利的), 一些突变可能会降低药效, 甚至危害人畜健康, 这在医药行业中是必须避免的; 最近有不经愈伤组织阶段直接得到半夏再生植株的实验报道(薛建平等, 2004; 张爱民等, 2005), 但其再生频率还不是很高(分化率 8.3%, 每个外植体分化块茎数 3~5 个)。为克服这一难题, 我们以叶片为材料, 研究不同激素组合对半夏一步成苗的影响, 通过优化间接器官发生途径, 探索出不经过愈伤组织这一环节的一步成苗快速繁殖培养方法, 使其能从实验室研究成果转变为可直接用于大量生产商品苗的实用技术体系。

## 1 材料与方 法

### 1.1 外植体与接种

三叶半夏(*P. ternata* Breit.) 采自四川省南充市西充县境内, 经西华师范大学生命科学学院秦自生研究员鉴定, 种植两年后取 3~4 cm 长的幼叶作为外植体。外植体灭菌方法: 自来水冲洗 1 h, 然后在超净工作台上用 70% 酒精消毒 30 s, 再在 0.1% 升汞溶液中灭菌 10 min, 无菌水冲洗 5~6 次, 自叶柄顶端剪取叶片, 远轴面向下, 接种在培养基表面。每瓶接种 5 个叶片, 每处理 3~4 瓶, 重复 3 次, 共 50 个外植体。

### 1.2 培养基

基本培养基均为 MS。按实验设计添加生长调节物质组合。培养基均附加蔗糖 30 g/L, 琼脂 7.0 g/L, pH 5.8。培养基分装于 150 mL 的三角瓶中, 每瓶 25 mL, 均在 121 °C、1.1 kg/cm 高温高压灭菌 15 min。

### 1.3 培养条件

培养温度为 25±2 °C, 光照周期为 12 h·d<sup>-1</sup>, 光照强度为 2 000~3 000 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>。

## 1.4 结果调查与统计分析

叶片接种后, 每隔 2 d 观察 1 次, 记录外植体的脱分化和再分化过程以及愈伤组织的色泽、质地、根芽分化的先后顺序和试管苗的生长状况等性状, 30 d 后统计诱导率(愈伤组织诱导率=产生愈伤组织的叶片数/接种的叶片总数×100%); 40 d 后统计分化率(分化率=分化出块茎的愈伤组织块数/总愈伤组织块数×100%, 分化率=分化出块茎的总叶片数/接种叶片总数×100%); 统计每个外植体分化的块茎数(每个外植体分化的块茎数=分化出的块茎总数/分化出块茎的总愈伤组织块数, 每个外植体分化的块茎数=分化出的块茎总数/分化出块茎的总叶片数); 实验数据经 T 测验后, 用 ANOVA 进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 间接器官发生和植株再生

2.1.1 愈伤组织的形成及形态发生 以叶片切块培养, 接种后 11 d, 外植体开始上翘或拱起, 切口端开始膨大, 颜色变浅, 约 25 d 左右形成淡黄色、结构松散的愈伤组织。30 d 后, 可见从愈伤组织上出现白色绒毛状物, 随后绒毛状物中间伸出许多的突起, 这些突起迅速伸长成为密被白色绒毛的细根。50 d 后, 在生根的愈伤组织表面分化出绿色的芽点, 芽点后来增大形成球状体, 类似于自然生长的珠芽, 其上生叶。球状体连接着根和芽的绿苗, 90 d 左右形成了结构完整的再生植株。

表 1 2,4-D 对半夏离体叶片一步成苗的影响

Table 1 Effect of 2,4-D on the one-step culture of excised leaf in *P. ternata*

2,4-D (mg/L)	愈伤组 织数 No. of callus	诱导率 Induction rate (%)	分化率 Differen- tiation rate (%)	每个外植体 分化块茎数 No. of differential tubercles per explant
0		0	14	3.16±1.26 ab
0.5	30	60	74	5.61±1.04 a*
1.0	5	10	83	1.16±2.02 bc
2.0	15	30	0	0.00±0.00 c

\* 同一列中平均数后有相同字母时差异显著性未达到 α=0.05 水平。下同。

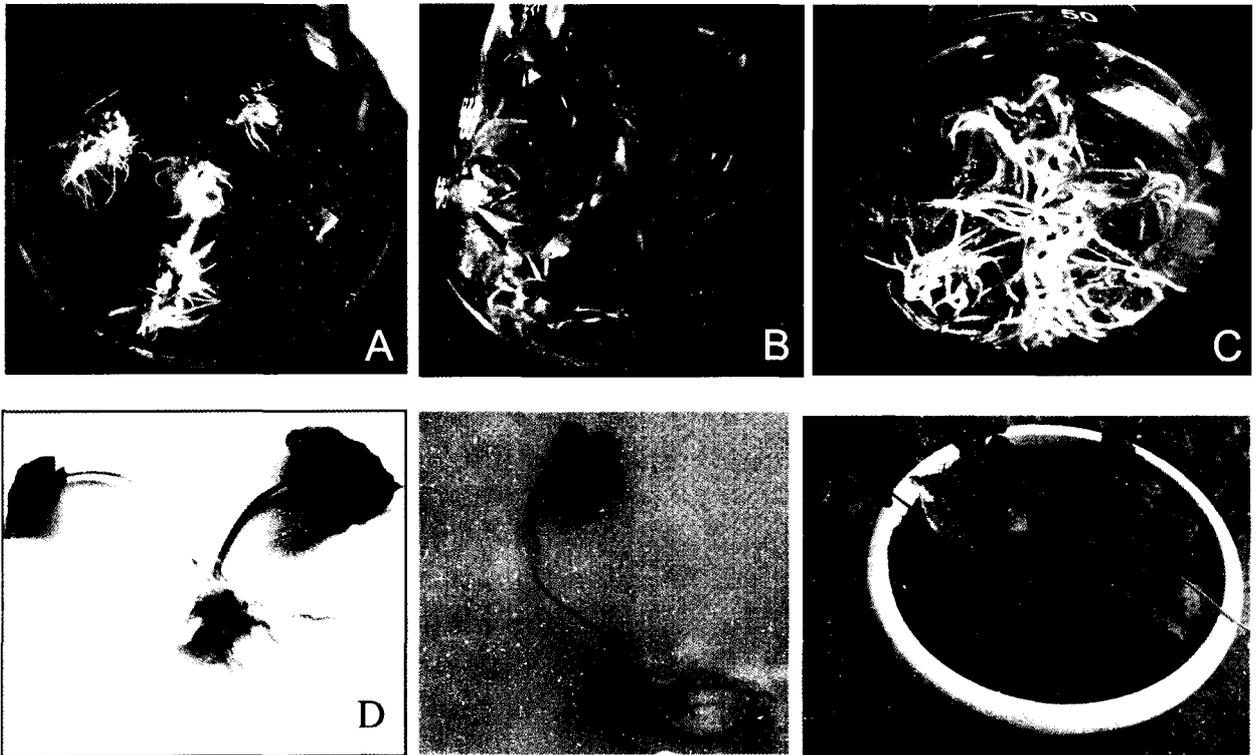
\*\* Same letter in the column means no significant difference at α=0.05 according to Duncan's multiple test. The same below.

### 2.1.2 2,4-D 对半夏离体叶片一步成苗的影响

KT 浓度为 1.0 mg/L 时, 2,4-D 的浓度明显地影响

愈伤组织的诱导、分化及成苗情况,其结果见表1。不加2,4-D时,不形成愈伤组织,而是直接从外植体上长出球状体,分化出芽,产生极少量根或无根形成。加入2,4-D后均能产生愈伤组织,但随2,4-D浓度(0.5~2.0 mg/L)的增加,愈伤组织诱导率从60%下降到30%,每个外植体分化的块茎数从 $5.61 \pm 1.04$ 个减少到没有块茎分化。当2,4-D浓度为2.0 mg/L时,甚至无分化。0.5 mg/L 2,4-D和1.0

mg/L KT的组合,1.0 mg/L 2,4-D和1.0 mg/L KT的组合都有利于根的分化,但0.5 mg/L 2,4-D和1.0 mg/L KT的组合所形成的根较健壮,根系发达;而1.0 mg/L 2,4-D和1.0 mg/L KT的组合形成的根稀少。在所有的激素组合中,0.5 mg/L 2,4-D和1.0 mg/L KT的激素组合有利于半夏离体叶片一步成苗,因为它的愈伤组织诱导率为60%,分化率为74%,每个外植体分化的块茎数最高,达



图版 I A.分化出球状体(小块茎)和绒毛状根; B.分化出苗; C.形成正常根; D,E.再生小植株; F.移栽三个半月后的再生植株。

Plate I A: Differentiated glomerations (tubercles) and villiform roots; B: Differentiated seedlings; C: Formed normal roots; D, E: Regenerated plantlet; F: The plantlets transplanted after three and a half months.

$5.61 \pm 1.04$ 个。

## 2.2 直接器官发生和植株再生

### 2.2.1 脱分化及形态发生

以叶片切块培养,接种后7 d,外植体开始上翘或拱起,切口端开始膨大,颜色变浅,约24 d左右在增厚的边缘没有明显的愈伤组织形成,而是出现白色绒毛状物,28 d后绒毛状物中间伸出许多的突起,这些突起分化成绿色的芽点,后来扩展至整个外植体表面,不久下方迅速伸长成为密被白色绒毛的细根(图版 I:A)。芽点不久增大形成球状体,类似于自然生长的珠芽,其上生叶。球状体连接着根和芽的绿苗,60 d左右形成了结构完整的再生植株(图版 I:B、C、D、E)。

### 2.2.2 NAA对半夏离体叶片一步成苗的影响

BA

浓度为0.5 mg/L时,NAA的浓度明显地影响着外植体的分化及成苗情况,其结果见表2。不加NAA时,外植体的分化率很低,为4%,而且每个外植体上分化出的块茎数较少,仅3个,根、苗都显得不健壮。加入NAA后明显提高了分化率,但随NAA浓度(0.1~4.0 mg/L)的增加,分化率先从61%增加到76%,然后又下降到48%;平均每个外植体分化的块茎数从 $8.99 \pm 1.06$ 个逐渐减少到 $5.94 \pm 0.47$ 个。NAA浓度为0.1 mg/L时,外植体分化的块茎小;NAA浓度在0.5~4.0 mg/L范围内时,外植体分化的块茎大。只有当NAA浓度为0.5 mg/L时,植株的分化率和每个外植体上分化的块茎数达到最高,分别为76%和 $9.97 \pm 0.81$ 。

2.2.3 组培苗的移栽 采用四种方式对 MS+0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L BA 培养基上的组培苗进行移栽。一个月后的观察结果表明,四种不同的移栽方式对再生小植株的成活有一定影响(表 3),其中 IV 为最佳移栽方式,成活率高达 100%(图版 I:F)。

表 2 NAA 对半夏离体叶片一步成苗的影响  
Table 2 Effect of NAA on the one-step culture of excised leaf in *P. ternata*

NAA (mg/L)	分化块茎的外植体数 No. of explants formed tubercles	分化率 Differentiation frequency (%)	每个外植体分化块茎数 No. of differentiated tubercles per explants
0	2	4	3
0.1	31	61	8.99±1.06 a
0.5	38	76	9.97±0.81 a* *
1.0	35	68	6.54±0.74 b
2.0	23	40	6.76±1.24 b
4.0	24	48	5.94±0.47 b

表 3 移栽方式对再生小植株成活率的影响  
Table 3 Effects of different transplant way on survival rate of regenerated plantlets

移栽方式 Type of transplantation	成活率 Survival rate (%)
I 直接移栽,基质为未经蒸煮消毒的腐质土	87.5
II 炼苗后移栽,基质为未经蒸煮消毒的腐质土	92.6
III 直接移栽,基质为经蒸煮消毒的腐质土与细沙的等量混合	96.7
IV 炼苗后移栽,基质为经蒸煮消毒的腐质土与细沙的等量混合	100

## 3 讨论

### 3.1 外植体的选择

在半夏的组织培养中,前人曾用块茎,茎尖,珠芽,叶柄,叶片,嫩茎段,种子等均实现了外植体的脱分化和植株的再生,但究竟用哪个外植体效果最佳,众说不一。任家惠等(1983)、韩献忠等(1989)、朱忠荣等(1991)认为叶片的诱导能力较其它器官强,万美亮等(1995)认为叶柄的诱导能力最好,夏海武等(1994)、罗光明等(2003)的结果表明块茎最适合于作为外植体。白雨等(2003)更是把最佳外植体精细地划分到了叶柄基部。这说明外植体的脱分化和植株的再生受多种因子的影响,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况等都会直接影响培养效果(江苏省植物组织培养协会,1988),

另外不同种类、不同浓度激素及其配比以及培养条件等对培养效果影响很大。为了尽量缩小遗传组成的差异,本实验中一律采用同一居群的半夏叶片作为培养材料,取得了良好的效果。之所以选用叶片是因为,相比其它外植体,叶片易于获得,消毒也容易,更为重要的是,培养材料用量大时,同一居群中,换用其他器官作为外植体可能不够,只有叶片数量最多,能保证组织培养的顺利进行。

### 3.2 不同激素组合对半夏离体叶片一步成苗的影响

植物组织培养再生途径主要为外植体完全脱分化形成愈伤组织,然后将愈伤组织转移到分化培养基上分化出芽,再将其转移到生根培养基上诱导生根,但该途径较烦琐,种质易产生变异,再生频率不高。而一步成苗法就是外植体在脱分化后,不需要转移到分化培养基上,而是直接在原培养基上再分化,分化的顺序通常是先根后芽,直至形成健壮的全苗(罗成科等,2003)。其具有的特征是:再生周期短,再生频率高,易操作,培养程序简单,不影响增殖率,能保持原种特性,便于大规模生产。半夏的一步成苗方面,前人作过一些试探性工作,但缺乏系统性,实验结果中反应不出高频率再生,况且一步成苗过程中大多要经过愈伤组织阶段。在本研究中,我们探索了半夏一步成苗的两种途径:一种是经过愈伤组织阶段的一步成苗,一种是不经过愈伤组织阶段的一步成苗。其中,后者无论在植株分化率、每个外植体上分化的块茎数还是成苗时间的早晚上都优于前者;而且后者一步成苗过程中不经过愈伤组织这一环节,因而没有突变产生,可以忠实地保留原用半夏材料的一切遗传特性和药效。所以综合这几个指标考虑,我们选用 MS+0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L BA 作为半夏高频率再生的最佳培养基。

半夏组织培养如果激素配比适当,可在一种培养基上一次获得试管苗。所用的激素种类和浓度要兼顾外植体的脱分化及形成健壮的足够多的根和芽。在本研究新用的 MS+0.5 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L KT 配方中,细胞分裂素的浓度高于与之搭配的生长素浓度,这与任家惠等(1983)、韩献忠等(1989)、朱忠荣等(1991)、李光胜等(1992)、万美亮等(1995)的研究结果一致。然而最佳配方 MS+0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L BA 中,细胞分裂素的浓度与所搭配的生长素浓度相当,就其原因有待进一步研究。

### 3.3 组培苗的移栽

组培苗移栽到土壤中,是组培苗从无菌到有菌、异养到自养和恒定条件到可变环境的剧烈变化过程,多数植物需要一个炼苗过程,成活率较高。本实验采用四种不同方式,对根叶完整的再生植株进行了移栽。通过对比分析表明,组培苗经过一周炼苗,在蒸煮消毒过的腐质土与细沙的等量混合基质中移栽1个月后,成活率达到100%。实验中发现有些植株在移栽后的前几天,地上部分生长不良,甚至萎蔫,但随后几天内又会重新发出芽来,直至形成完整植株。另外对一些有根无芽、有芽无根和还未明显根芽分化的小块茎进行了移栽,发现它们也可成活,这说明半夏试管苗的成活与否取决于新生的小块茎,小块茎具有分化器官的潜能,这与李光胜等(1992)的结果一致。关于再生植株的遗传稳定性及其品质尚有待进一步研究。

### 参考文献:

- 江年琼. 2001. 半夏·天南星[M]. 北京:中国中医药出版社
- 江苏省植物组织培养协会. 1988. 经济植物组织培养实用技术[M]. 南京:江苏科学技术出版社
- 中国医学科学院药物研究所. 1993. 中药志. 第2期[M]. 北京:人民卫生出版社
- Bai Y(白雨), Gao SL(高山林). 2003. Orthogonal study on inducing embryoid of *Pinellia ternata* by tissue culture(半夏组织培养诱导胚状体的正交实验)[J]. *J Plant Res Environ* (植物资源与环境学报), 12(4):16-20
- Gong CW(龚成文). 2005. Study of comprehensive cultivation techniques of *Pinellia ternata*(半夏综合栽培技术研究)[J]. *China J Chin Mat Med* (中国中药杂志), 30(16):1 240-1 242
- Han XZ(韩献忠), Zhang ZG(张治国), Liu H(刘骅), et al. 1989. Study on the technology of one-step culture in *Pinelloia ternata*(半夏组织培养一次性成苗的研究)[J]. *Chin Trad Herb Drugs* (中草药), 20(11):45
- Li GS(李光胜), Zhang ZL(张志立), Mao WY(毛文岳). 1992. Primary report of breeding seedling from tissue culture of *Pinellia ternata*(半夏组织培养育苗初报)[J]. *J Chin Med Mat* (中药材), 15(7):13-14
- Luo CK(罗成科), Peng ZS(彭正松). 2003. Advanced research on the technology of one-step culture in *Pinelloia ternata*(半夏组织培养一步成苗技术的研究进展)[J]. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 31(5):798-799
- Luo GM(罗光明), Yang YQ(杨雅琴), He Y(何雁). 2003. Study on fast multiplication of *Pinellia ternata*(半夏的快速繁殖研究)[J]. *J Chin Med Mat* (中药材), 26(10):699-701
- Ma KS(马开森), Ding JC(丁季春), Zhong GY(钟国跃), et al. 2004. Contrast cultivation test of *Pinellia ternata* provenance in different regions(不同来源地的半夏种源对比栽培实验)[J]. *China J Chin Mat Med* (中国中药杂志), 29(2):184-185
- Peng ZS, Cheng KC. 2005. The reproductive biology investigation of *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit[J]. *Pakistan J Bot*, 31(15):125-128
- Ren JH(任家惠), Chen KR(陈克润), Xu QF(徐琼芳). 1983. Study on inducing of *in-vitro* shoots in *Pinellia ternata*(三叶半夏试管苗器官的诱导)[J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 4:44
- Shoyama Y. 1983. Clonal regeneration of *Pinellia ternata* [J]. *Planta Med*, 49(1):14
- Su X(苏新). 1989. Study on inducing of callus tissue and regenerating of plant in *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit(半夏愈伤组织的诱导和植株再生的研究)[J]. *China J Chin Mat Med* (中国中药杂志), 14(11):15-17
- Wu Y(吴艳). 2003. Identification of *Pinellia ternata* and *Pinellia pedatisecta*(半夏与其易混品天南星的鉴别)[J]. *Lishizhen Medicine Medical Res* (时珍国医国药), 14(1):33-34
- Wan ML(万美亮), Chen HK(陈宏康), Zhan YH(詹亚华), et al. 1995. Studies on tissue culture and rapid prolmgation of *Pinellia ternata*(半夏组织培养与快速繁殖研究)[J]. *China J Chin Mat Med* (中国中药杂志), 20(9):526-528
- Xue JP(薛建平), Zhu YF(朱艳芳), Zhang AM(张爱民), et al. 2004. Research on direct formation of microtubers from *Pinellia ternata*(半夏试管块茎直接再生技术的研究)[J]. *Acta Agronom Sin* (作物学报), 30(10):1 060-1 064
- Xia HW(夏海武), Zhao YL(赵月玲), Zhan KQ(战克勤), et al. 1994. Studies on tissue culture of *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit(半夏组织培养的研究)[J]. *China J Chin Mat Med* (中国中药杂志), 19(12):720-721
- Zhang AM(张爱民), Yang SY(杨生玉), Xue JP(薛建平), et al. 2005. Effect of different factors on direct induction of microtubers from explants in *Pinellia ternata*(多种因素对半夏外植体直接诱导形成试管小块茎的影响)[J]. *China J Chin Mat Med* (中国中药杂志), 30(8):576-579
- Zhu PF(朱鹏飞), Mao WY(毛文岳), Wang DJ(王殿久), et al. 1985. Plant regeneration from tissue culture of *Pinellia ternata* (三叶半夏组织培养获得再生植株)[J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 3:26
- Zhu ZR(朱忠荣), Wang YS(王永树), Yang YZ(杨业正), et al. 1991. Studies on rapid clonal propagation *in-vitro* in *Pinellia ternata*(三叶半夏组织培养快速繁殖研究)[J]. *J Guizhou Agric Coll* (贵州农学院学报), 10(1):40-45