

药用植物半夏细胞悬浮培养和植株再生体系建立研究

丁 兰¹, 欧巧明^{1,2}

(1. 西北师范大学 生命科学院 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省农业科学院生物技术研究所 甘肃 兰州 730070)

摘 要: 为了建立甘肃产药用植物半夏的细胞悬浮培养和植株再生体系, 通过对其不同外质体筛选、愈伤组织诱导和悬浮培养的愈伤组织类型、激素水平、起始密度、震荡速率等影响因素以及细胞生长状态、生长曲线和 pH 值变化等指标的研究。结果表明: 以叶柄为外质体, 选择“松散型”愈伤组织和 2×10^5 个/mL 的起始培养密度, 在附加 2, 4-D 2.0 mg/L + BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L 的 1/2 MS 培养基上培养, 温度 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$, 转速 90 rpm, pH 值 6.0, 黑暗培养为最适悬浮培养体系; 经检测细胞生长曲线呈“S”型, 培养液 pH 随着细胞的生长先上升后下降, 18 d 时细胞基数达到最大值; 悬浮继代培养后通过降低或停止震荡转速, 在添加 BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L 的 MS 液体和固体培养基上可诱导分化出芽和根, 进一步形成完整的植株。

关键词: 药用植物; 半夏; 愈伤组织; 悬浮培养; 植株再生

中图分类号: S 567.23⁺9; S 035.3 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2007)09-0187-04

半夏 (*Pinellia ternata* Briet.) 是天南星科半夏属多年生草本植物, 为我国传统的中草药之一, 具有润燥化痰、消肿散节、抗肿瘤等多种功效^[1,2]。目前, 在自然条件下甘肃半夏主要靠无性繁殖, 繁殖系数低, 出现品种退化、过度开发等问题, 加之半夏生长环境要求荫、湿^[3], 即使是人工栽培也不能解决繁殖系数低的问题^[3], 半夏野生资源遭到严重破坏。以往对半夏的研究主要集中在组培快繁、品质改良、药用成分分析及药理学等方面^[4-10], 关于甘肃药用植物半夏的细胞悬浮培养和细胞再生植株研究尚不多见。试验拟通过对其最适愈伤组织的筛选, 建立其细胞悬浮培养和快速植株再生体系, 并对相关影响因素进行研究, 以期为甘肃产半夏的植物细胞生物反应器、生物转化体系的建立及利用其悬浮培养细胞进行多倍体诱导等提供研究模型和理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料: 野生种半夏 (*Pinellia ternate* Breit.) 当年生块茎, 由甘肃省农业科学院生物技术研究所提供。

1.2 试验方法

1.2.1 半夏愈伤组织诱导与继代培养 半夏块茎播于温室沙土中, 待萌发后取长约 5 cm 的幼叶, 清洗后, 经

0.1% HgCl₂ 溶液消毒 10 min, 无菌水冲洗 5~6 次, 叶片切成约 0.5×0.5 mm² 的小块, 叶柄切成约 0.5 mm 长的切段, 接种于附加 2, 4-D 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 mg/L + BA 0.5 mg/L 的 MS 培养基上, 蔗糖 3%, 琼脂 0.7%, pH 5.8 (23 ± 2)^{°C}, 黑暗培养。每种培养基接种不同外质体各 30 枚。待诱导愈伤组织后, 将其转接到 MS + 2, 4-D 2.0 mg/L + BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L 培养基上进行继代培养, 每 20 d 继代 1 次, 培养条件同上。

1.2.2 细胞悬浮培养体系的建立 继代培养 2~3 次后, 选取生长旺盛、质地疏松、分散性高的白色颗粒状愈伤组织约 2.0 g, 接种于装有 80 mL 的 4 种附加不同浓度激素的 1/2 MS 或 MS 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 蔗糖 3%, pH 6.0, 温度 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$, 转速为 90 rpm, 黑暗条件下悬浮振荡培养。每 14 d 后添换新鲜培养基, 即先将悬浮培养物等量分装 2 个三角瓶中, 再加入等量新鲜培养液 (后面全部用此方法添换培养基), 连续继代 2~3 次。筛选出适宜培养基和悬浮培养细胞系后, 将细胞悬浮培养物用 100 目镍网过滤, 滤液分装后继续培养, 作为起始悬浮培养液。

1.2.3 细胞生长的检测 用血球计数板检测细胞数, 计算起始密度。然后根据需要的起始密度补加新鲜培养液, 分装后继续培养。培养过程中, 隔天检测细胞密度与培养液 pH 值, 用亚甲蓝染液检测活细胞数, 并用倒置显微镜观察细胞及细胞团形态、大小, 持续检测 20 d; 取 3 次重复平均值, 绘制细胞生长曲线。

1.2.4 悬浮培养细胞植株再生 上述悬浮细胞继代 3~4 次后, 降低震荡转速为 20~30 rpm, 继续培养, 待细胞分裂形成肉眼可见的直径约为 1.0~3.0 mm 的细胞团

第一作者简介: 苒 (1964-), 女, 四川德阳人, 副教授, 博士, 主要研究方向: 细胞工程与天然植物化学。

通讯作者: 欧巧明 (1977-), 男, 助研, 在读硕士, 主要从事植物生物技术及天然药物活性研究。

基金项目: 甘肃省教育厅资助项目 (0601-27)。

收稿日期: 2007-04-04

时,继代于添加BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L的MS液体培养基上,继续震荡或停止震荡,温度(23±2)℃,光强1 500~2 000Lx,每天光照12 h。直至细胞团增大至为5 mm左右时,进一步将其转移至同样的固体培养基上,相同条件下培养直至分化出芽和根,获得完整的小植株。

2 结果与分析

2.1 半夏愈伤组织诱导与继代培养

以不同外植体培养,一般在接种后2~3 d切口处即出现膨大,两端翘起。5 d后可见膨大处出现瘤状突起,逐渐延及整个外植体边缘,最终形成愈伤组织。可将其分为3种类型(见图1):I为松散型,呈浅黄或白色,不规则颗粒状,质地疏松,易分散;II为坚实型,呈浅绿或白色,表面光亮,结构致密,易分化;III为海绵型,呈白色,半透明状,质地柔软,含水量高,不易分化。这与朱宝成等(1996)报道的类型相同^[8]。I型愈伤组织胚性度高,适于作细胞悬浮培养。

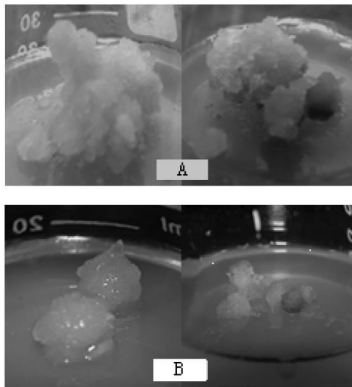


图1 半夏松散型和海绵型愈伤组织类型的照片

注:A 松散型愈伤组织;B 海绵型愈伤组织

表1 不同激素水平对半夏愈伤组织诱导情况的影响

| 培养基号 | 激素浓度/mg·L ⁻¹ 2,4-D | 激素浓度/mg·L ⁻¹ BA | 出愈时间/d | 愈伤组织诱导率/% | 愈伤组织类型及生长状态 |
|------|----------------------------------|-------------------------------|--------|-----------|-----------------------|
| 1 | 0.5 | 0.5 | 13 | 46.7d | II或III生长缓慢,很难继代转变为I型。 |
| 2 | 1.0 | 0.5 | 11 | 63.3b | I,II少量III生长旺盛,诱导增殖较快。 |
| 3 | 2.0 | 0.5 | 7 | 89.3a | 大多为I,少量II生长旺盛,诱导增殖快 |
| 4 | 4.0 | 0.5 | 7 | 83.7a | I或II黄褐色,生长增殖缓慢。 |
| 5 | 6.0 | 0.5 | 10 | 53.3c | I或II黄或黑褐色,生长慢,易褐化干枯。 |

注 MS 基本培养基 愈伤组织诱导率(%)=(形成愈伤组织的外植体数/接种外植体的总数)×100 %;数据经 Duncan's 新复极差测验(P<0.05),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。

试验中半夏幼叶和叶柄最终都能诱导出较多的愈伤组织,但前者愈伤组织诱导率低,诱导缓慢,叶片易褐化枯死;后者诱导效果更好,且I、II型愈伤组织较多。可选定叶柄作为愈伤组织诱导的适宜外质体。同时发现不同2,4-D 浓度对叶柄愈伤组织诱导和继代生长有很

大影响(见表1)。

2.2 半夏细胞悬浮培养体系的建立

试验设3个起始细胞密度梯度:1×10⁵、2×10⁵、4×10⁵个/mL。选用继代3次的I型愈伤组织转接到液体培养基,进行细胞悬浮培养。细胞块很快分散于其中。继代3~4 d后培养液中即有大量游离单细胞和细胞团,单细胞体积小,多为圆形、椭圆形、肾形、梭形和长条形,液泡化程度低,分裂能力较强;细胞团大小不均匀,几个到十几个细胞不等。继代14 d后用100目的镍网滤除大细胞团块,继续震荡培养,每14 d继代1次。

试验发现,第1代继代细胞有较长的延迟期(5 d),启动分裂时间长,生长缓慢,生长量很小。经2~3次继代,启动分裂时间逐渐缩短(2~3 d),分裂增生迅速,生长量逐渐增大,可得到近乎单细胞悬浮系,并趋于稳定。镜检表明该细胞悬浮系在换液后10 d左右,单细胞含量最高,还有小型细胞团组成(约2~5个细胞);单细胞大多数细胞呈圆形和椭圆形,细胞质浓厚,分裂增殖旺盛,多为均等分裂,分散度良好,是进行研究的最好时期。

2.3 半夏悬浮培养细胞的生长特性及影响因素

2.3.1 不同培养基种类和激素水平对半夏I型愈伤组织细胞悬浮培养的影响 试验发现不同培养基种类和激素水平对半夏I型愈伤组织细胞悬浮培养影响很大,A号培养基的细胞胚性化最好,生长增殖快,单细胞和活细胞率最高,细胞系稳定,分散度好,是最适宜的悬浮培养基类型(见表2)。除了适宜的激素浓度外,这可能与悬浮液渗透压对悬浮细胞的影响有关^[11]。

表2 不同种类培养基和激素水平对半夏愈伤组织细胞悬浮培养的影响

| 培养基号 | 基本培养基种类 | 激素浓度/mg·L ⁻¹ 2,4-D | 激素浓度/mg·L ⁻¹ BA | 激素浓度/mg·L ⁻¹ NAA | 悬浮细胞类型及生长状态 |
|------|---------|----------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--|
| A | 1/2MS | 2.0 | 0.5 | 0.5 | 细胞胚性化最好,生长增殖快,单细胞最多,活细胞率最高,细胞系稳定,不易分化。 |
| B | MS | 2.0 | 0.5 | 0 | 细胞胚性化好,生长增殖快,单细胞较多,活细胞率较高,细胞系稳定,不易分化。 |
| C | MS | 4.0 | 0.5 | 0 | 细胞胚性化好,生长增殖缓慢,单细胞少,死细胞率高,细胞系不稳定,悬浮液粘稠。 |
| D | MS | 1.0 | 0.5 | 0 | 细胞胚性化差,生长增殖快,单细胞少,易结团,活细胞率较高,细胞系不稳定,易分化。 |

2.3.2 不同起始密度对悬浮培养细胞的生长曲线、生长状态及细胞形态的影响 经检测,半夏悬浮生长曲线同其它药用植物,如麻黄^[12]、枸杞^[13]、董菜^[14]、甘薯^[15 16]、蒜头果^[7]、菰蓝^[18]等一样,呈“S”型(见图2),可分为延迟期(0~4 d)、对数生长期(5~17 d)和衰亡期(18 d后),静止期不明显,基本上呈逐步上升的趋势。当培养至衰亡期前(18 d),细胞数量达到最大值。因此半夏悬浮细

胞培养不应超过 18 d。

不同起始密度对半夏细胞悬浮培养系细胞形态、生长状态及周期有一定影响。起始密度过大($>4\times10^5$ 个/mL), 则延迟期缩短, 虽然对数期生长迅速, 细胞基数大, 但对数期短, 后期裂解死亡的细胞较多; 起始密度过小

($<1\times10^5$ 个/mL), 虽然对数期生长稳定而长, 后期裂解细胞较少, 但延迟期过长, 对数期细胞基数小(见图 2、表 3)。并且发现当细胞起始密度小于 10^4 个/mL 时, 细胞延迟期很长, 甚至不能分裂增殖。因此 2×10^5 个/mL 是半夏较适合的起始培养密度。

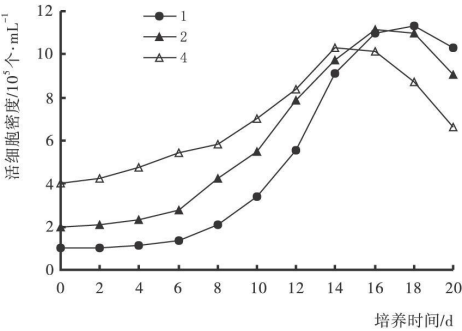


图 2 不同起始细胞密度对半夏细胞生长曲线变化的影响

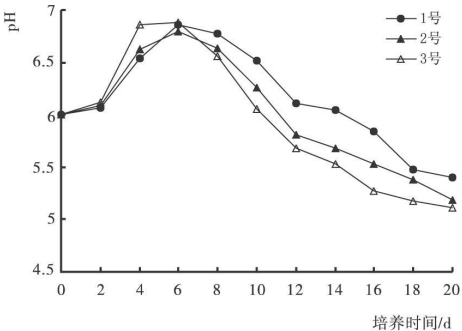


图 3 不同起始细胞密度细胞悬浮培养液 pH 变化

另外, 在各个生长阶段, 各类细胞所占比例及生长状态不同。延迟期内椭圆形、肾形、梭形和长形细胞约占 60% 以上, 对数生长期圆形、椭圆细胞逐渐增多, 占 70% 以上, 至衰亡期逐渐下降(见表 3)。

表 3 不同起始密度和培养时间对半夏细胞形态和生长的影响

| 培养时间 /d | 不同起始细胞培养密度下细胞生长特征 | | |
|------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | 1×10^5 个·mL ⁻¹ | 2×10^5 个·mL ⁻¹ | 4×10^5 个·mL ⁻¹ |
| 1 | 细胞分裂缓慢, 较均一。 | 分裂极旺, 细胞大小较均一。 | 分裂较旺, 有超大裂殖细胞。 |
| 2~4 | 分裂出芽旺盛, 单个小细胞极少。 | 分裂出芽旺盛, 小细胞增多, 出芽细胞占 65% 以上。 | 出芽旺盛, 小细胞增多, 出芽细胞占 85% 以上。 |
| 5~10 | 分裂出芽旺盛, 单个小细胞增多, 大小不均。 | 单个小细胞增多, 出芽细胞逐渐减少, 小而均一。 | 单个小细胞增多, 大小均一, 出芽细胞逐渐减少。 |
| 10~16 | 分裂出芽逐渐减少, 大小均一, 有裂解细胞。 | 有出芽, 大小均一, 出现裂解细胞。 | 出芽极少, 大小不均, 裂解细胞较多。 |
| 16~20 | 分裂出芽很少, 大小不均, 裂解细胞增多。 | 分裂出芽很少, 大小不均, 裂解细胞增多。 | 分裂出芽很少, 大小不均, 死亡裂解细胞很多, 悬浮液浑浊。 |

2.3.3 不同起始细胞培养密度下细胞悬浮培养液 pH 的变化 半夏悬浮培养液 pH 值变化如图 3 所示, 细胞培养液 pH 值随时间延长有明显变化。不同起始细胞密度对培养液 pH 值变化趋势无明显差异, 但均是先升高而后持续下降(最低达 5.11)。这与对紫草细胞悬浮培养结果类似, 但也有培养过程中 pH 会略有下降的报道^[9], 这可能与其品种和地域有关。培养前期 pH 值升高似乎和细胞密度是呈正相关, 这与细胞旺盛代谢、生长分裂有关^[14 19 20]; 而培养后期, 随着细胞的衰老、裂解, 细胞密度下降, 代谢减慢, 同时不同离子的利用和新物质的形成、释放等可能引起 pH 值的下降^[19]。

2.4 半夏悬浮培养细胞的分化及植株再生

半夏悬浮细胞经连续 3~4 次继代, 即趋于稳定后。此时降低震荡转速为 20~30 rpm 继续培养。可见悬浮细胞迅速增殖成直径为 1.0~3.0 mm 的较大愈伤组织团。此时再转接到添加 BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L 的 MS 液体培养基上, 继续震荡或停止震荡, 愈伤组织团继续迅速增殖变大(直径约为 5~9 mm), 呈白色或淡绿色。将其转移至同样的固体培养基上后, 即可不断分化发育并发芽, 继续延长培养可同时诱导生根, 进一步形成小植株, 每个细胞团增殖得到多株再生植株。若要移栽则还须进一步壮苗培养。

3 讨论

对于半夏的愈伤组织诱导、悬浮细胞培养及植株再生研究已有不少报道, 但因为品种和栽培地域的差异, 其研究尚有许多不同之处。试验通过对甘肃药用植物半夏的研究得出:

3.1 适宜的外质体、激素水平、继代次数及愈伤组织松散性是半夏细胞悬浮培养体系建立所必需。

3.2 2×10^5 个/mL 的细胞起始密度有利于延长对数生长期和保持细胞优良的生长状态。这可能是因为悬浮细胞生长需要一个最低临界生长密度; 低于此密度, 细胞生长速率降低或根本不生长, 分化能力低; 而高于此值则生长周期, 尤其是对数期缩短, 后期细胞生活率低。这可能涉及到悬浮培养系统中细胞的“群体效应”^[21]。

3.3 半夏愈伤组织悬浮细胞的生长状态受生长激素, 尤其是 2, 4-D 浓度的调节。2, 4-D 浓度过高, 则细胞易褐化, 培养液粘稠, 死细胞率高, 后期可抑制其体细胞胚胎发生; 过低则易转变为“坚实型”愈伤组织, 细胞体积较大, 易结块, 振荡中易受损死亡。

3.4 虽然不同起始培养密度对 pH 值变化影响无明显差异,但植物细胞生长的最适 pH 值一般为 5.8~6.0。而该试验在培养后期 pH 值低达 5.1。因此可根据不同研究需要,适当提高起始培养的 pH 值。

3.5 震荡会对植物细胞产生剪切力,过度震荡易造成机械损伤,影响细胞形态、代谢等^[23]。该试验发现,当震荡转速超过 100 rpm 时,出现细胞损伤破碎,内容物释放,活细胞率降低等,不利于悬浮培养和后期的增殖分化。

3.6 确定半夏细胞悬浮培养的最适条件为:起始培养密度 2×10^5 个/mL,温度 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$,转速 90 rpm, pH 值 6.0,黑暗培养。

3.7 该试验采用降低震荡转速和适宜的培养条件,可直接经大块愈伤组织团分化发育成苗。

试验可为甘肃药用半夏的组培快繁、植物细胞生物反应器、生物转化体系的建立以及利用其悬浮细胞进行多倍体诱导等问题提供研究模型和理论参考。

参考文献

- [1] 中国医科学院药物研究所. 中药志[M]. 第2册. 2版. 北京:人民卫生出版社, 1993: 38.
- [2] 郭余龙, 贾永芳, 杨星勇, 等. 半夏的组织培养及其成分比较[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(3): 259-262.
- [3] 江年琼. 半夏天南星[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2001: 27.
- [4] 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): 39-41.
- [5] 万美亮, 陈宏康. 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.
- [6] 朱宝成, 吴爱民, 成亚利, 等. 药用植物掌叶半夏组织培养及药物成份分析[J]. 作物学报, 1995, 21(4): 475-478.
- [7] 吴爱民, 朱宝成, 李庆余. 掌叶半夏悬浮培养下的体细胞胚胎发生的

研究[J]. 作物学报, 1996, 22(1): 66-71.

- [8] 朱宝成, 吴爱民, 成亚利, 等. 掌叶半夏细胞悬浮培养及单细胞培养再生植株[J]. 作物学报, 1996, 22(2): 197-200.
- [9] 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.
- [10] 王祖秀, 彭正松, 何舜昆. 三叶半夏(*Pinellia ternata*)雄配子败育的遗传分析[J]. 作物学报, 2000, 26(1): 84-86.
- [11] 张宁, 戴朝曦. 建立高质量马铃薯细胞悬浮培养物的研究[J]. 中国马铃薯, 2002, 14(4): 195-198.
- [12] 曹有龙, 许兴, 赵军, 等. 麻黄愈伤组织细胞的悬浮培养[J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6(1): 36-38.
- [13] 胡博然, 徐文彪, 马峰旺. 枸杞胚细胞悬浮培养系统建立的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2003, 31(1): 97-100.
- [14] 陈由强, 代容春, 朱锦懋, 等. 蔓茎堇菜细胞悬浮培养的研究[J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6(1): 43-47.
- [15] 刘庆昌, 鲁迪惠, 马彪, 等. 甘薯细胞悬浮培养及有效植株再生[J]. 农业生物技术学报, 1996, 4(3): 238-242.
- [16] 陈克贵, 张义正. 甘薯细胞悬浮培养的建立及其生长研究[J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5(3): 275-278.
- [17] 赖家业, 兰健, 刘凯, 等. 蒜头果细胞悬浮培养的研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2004, 41(3): 656-660.
- [18] 陈薇, 梅文泉, 赵丰萍, 等. 菰蓝下胚轴愈伤组织细胞悬浮培养[J]. 西南农业大学学报, 2002, 24(2): 105-107.
- [19] 范美华, 刘树楠, 张国彬, 等. 半夏细胞悬浮培养中生理生化指标的测定[J]. 生物技术, 2004, 14(5): 78-81.
- [20] 崔红, 陈亮, 沈明山, 等. 甘薯胚性悬浮系的建立及其细胞生长特性研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2002, 41(5): 555-558.
- [21] 陈崇顺, Robert Jonard. 杏茎脆散型愈伤组织的获取及细胞悬浮培养的建立[J]. 植物资源与环境, 1994, 3(3): 22-26.
- [22] 刘春朝, 王玉春, 郑重, 等. 剪切力对植物细胞悬浮培养的影响[J]. 化工冶金, 1998, 19(4): 380-383.

System of Calli Cell Suspension Cultural and Its Plant Regeneration and Its Influencing Factors from Medicinal *Pinellia ternata* Briet.

DING Lan¹, OU Qiao-ming^{1,2}

(1. College of Life Science, Northwest Normal University, Gansu Lanzhou 730070, China; 2. Bio-tech Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Gansu Lanzhou 730070, China)

Abstract: The systems of cell suspension cultures and efficient plant regeneration of Medicinal *Pinellia ternata* Briet. were studied as the objective in this paper. Some effecting factors and index were studied, such as choosing of explants, inducing of calli, type of calli, primary cultural density, shake rate and cell character, growth status, growth curve, pH value et al. The results showed that stem of leaf as explants and "loose" calli were choosed in the experiment. The most suitable condition of cell suspension cultures was found to be 1/2 MS medium supplemented with 2, 4-D 2.0 mg/L + BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L, primary cultural density: 2×10^5 个/mL, temperature: $23 \pm 2^\circ\text{C}$, shake rate: 90 rpm, pH value: 6.0 and dark cultures. Suspension cell growth curves were like "S". The pH value cultured mediums were increased at first, and then reduced gradually. Cell number approached its maximum value in 18d. After subculture, calli was induced to regenerated shoots and roots by reducing and stopping shake rate on medium MS supplemented with BA 0.5 mg/L and NAA 0.5 mg/L. Further, Complete plants were obtained gradually.

Key words: Medicinal plant; *Pinellia ternata* Briet.; Calli; Suspension culture; Plant regeneration