

# 微量元素对半夏组织培养诱导率及分化率的影响

魏莉霞

(甘肃省农业科学院 啤酒原料研究所特作研究室 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 研究微量元素 Mn、Fe、Zn 对半夏组织培养诱导率、分化率的影响。分别以半夏无菌试管苗的叶片、叶柄、块茎为外植体,以 MS+2, 4-D 0.5 mg/L+6-BA 1 mg/L 为基础培养基,改变其中 Mn、Fe、Zn 的浓度,每个因素设 3 个水平,正交试验设计,共选 9 个组合,每种外植体进行不同组合试验,寻找最佳的微量元素组合配方。结果表明:培养叶片叶柄的最佳微量元素浓度水平为 Mn 5.5 mg/L, Fe 为 9.5 mg/L, Zn 为 2.0 mg/L; 培养小块茎的最佳微量元素浓度水平为 Mn 7.5 mg/L, Fe 9.5 mg/L, Zn 为 1.0 mg/L。

**关键词:** 微量元素; 半夏; 诱导率; 分化率

**中图分类号:** S 567.23<sup>+</sup>9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)08-0254-03

半夏 (*Pinellia ternate* Briet) 是天南星科半夏属多年生草本植物,以块茎入药<sup>[1]</sup>,具有润燥化痰、降逆止呕、消痞散结之功,为常用大宗中药材。半夏多为野生,由于药用和出口量大,加上大量的采挖和山区开发,使得野生资源日趋枯竭而难以满足目前的需求。随着灾害性气候的影响,加之人工栽培过程中多年沿用块茎和株芽无性繁殖的方法,植株感染病毒严重,产量质量下降,致使半夏的栽培生产受到较大的限制,造成半夏的贮量越

来越少,而国内外对半夏的需求有增无减,市场价格逐年攀升<sup>[2]</sup>。

近年来,学者们对半夏的生物学特性、化学成分、炮制方法、药用功效、引种驯化栽培技术、组织培养技术等方面进行了广泛的研究<sup>[3,8]</sup>,尤其在植物生长调节剂对半夏组织培养和植株再生快速繁殖方面做了大量研究,但对于半夏组培快繁中微量元素的影响研究甚少。在长期对半夏组织培养的研究中,发现微量元素对半夏组织培养的影响效应,在诱导培养基中添加不同浓度的 Mn、Fe、Zn,以叶片、叶柄和块茎为外植体,研究微量元素对半夏外植体直接诱导形成小块茎的影响,以期进一步提高半夏试管块茎的诱导分化率,为半夏组培快繁培养基的改良提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**作者简介:** 魏莉霞(1976-),女,甘肃武都人,助理研究员,主要研究方向是中药材的组织培养及遗传育种。E-mail: weili.xia2008@163.com.

**基金项目:** 甘肃省农业生物技术研究与应用开发资助项目(CNSW-2005-05)。

**收稿日期:** 2009-03-20

## Study on the Explant Screening and Rapid Propagation Condition through Tissue Culture of *Capparis spinosa* L

CAO Rui, MA Sheng-jun, ZHOU Xuan, ZHOU Lin, WANG Ying

(College of Pharmaceutical Science, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China)

**Abstract:** *Capparis spinosa* L, An Uyghur Traditional Herbal Medication from Turpan in Xinjiang as the experimental material. The stem, leaf, bud, flower and sepal were selected for tissue culture. In the condition of the best sterilization which use 0.1% HgCl<sub>2</sub> plus Tween-20 for five minutes. The results show that MS+0.6 mg/L 6-BA+1.0 mg/L 2,4-D+3.0 mg/L NAA was the best medium. Induction rate all above 65% of five explant, especially in stem and leaf. Multiplication coefficient and bud number was rising with the concentration of NAA increasing in proliferation medium. The optimum medium of root was MS+0.8 mg/L IBA+300 mg/L activated Carbon.

**Key words:** *Capparis spinosa*; Explant; Tissue culture and rapid propagation

半夏材料为该实验室组培继代 3~4 代的半夏无菌试管苗。

## 1.2 方法

1.2.1 试验设计 采用 MS+2, 4-D 0.5 mg/L+6-BA 1 mg/L 为基础培养基, 附加不同浓度的 Mn、Fe、Zn (见表 1), 共配成 A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>C<sub>1</sub>、A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>、A<sub>1</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>、A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>、A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>、A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>、A<sub>3</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>、A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>、A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub> 9 个组合, 其中 MS+2, 4-D 0.5 mg/L+6-BA 1 mg/L 为对照。蔗糖浓度为 20 g/L, 琼脂浓度为 6 g/L, pH 5.8。

表 1 试验因素及水平 mg/L

水平	锰(A)	铁(B)	锌(C)
1	5.5	5.5	0
2	6.5	7.5	1.0
3	7.5	9.5	2.0

1.2.2 愈伤组织的诱导与培养 剪取无菌试管苗的叶片、叶柄和小块茎, 分别接种于不同的培养基中, 各外植体在每种培养基上接种 10 瓶, 重复 3 次。叶柄切为 1 cm 段, 每瓶接种 8~10 段; 叶片切为 0.5 cm×0.5 cm, 叶面朝上每瓶接种 7~8 片, 小块茎每瓶接种 10 个。培养温度 25℃左右, 光照强度为 1 500 lx, 10 h/d。30 d 后统计叶片、叶柄、块茎的诱导率、分化率。

1.2.3 试验分析 采用 Duncan's 新复极差测验, 比较其差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 叶片诱导及分化

在培养 35 d 后, 叶片在不同培养基上的诱导、分化生长状况见表 2; 不同培养基组合中叶片诱导率及分化率见表 3。对叶片的诱导分化培养, 通过统计分析比较, 其最佳诱导分化培养基为 3 号培养基, 其愈伤组织生长致密, 为深绿色, 分化苗生长健壮, 诱导率居第 2 位, 分化率居第 1 位, 适宜做叶片培养基。其次是 1 号培养基, 其诱导率居第 1 位, 而其分化率低于 3 号培养基, 居第 2 位。其余培养基有些叶片基本未被诱导, 随之枯死, 有些有诱导, 但愈伤组织呈白色疏松, 分化率很低, 分化苗生长状态差, 因此不适宜做叶片培养基。

表 2 不同培养基对叶片诱导及分化的影响

组合号	组合	生长状态
1	A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	形成绿色愈伤组织, 分化苗生长健壮, 此组合适宜做叶片培养基
2	A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	叶片诱导状况差, 不宜做叶片培养基
3	A <sub>1</sub> B <sub>3</sub> C <sub>3</sub>	愈伤组织生长致密, 深绿色, 分化苗生长健壮, 适宜做叶片培养基
4	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> C <sub>2</sub>	诱导、分化状况都很差, 直接排除
5	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>3</sub>	诱导、分化效果都较差, 不宜做叶片培养基
6	A <sub>2</sub> B <sub>3</sub> C <sub>1</sub>	诱导、分化状况一般, 长势弱
7	A <sub>3</sub> B <sub>1</sub> C <sub>3</sub>	诱导、分化效果都差, 直接排除
8	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	形成白色疏松非胚性愈伤组织, 可分化的少
9	A <sub>3</sub> B <sub>3</sub> C <sub>2</sub>	诱导、分化效果不显著, 排除
10	CK	诱导率可以, 但分化苗生长细弱

表 3 处理组合对叶片诱导率及分化率试验结果

组合号	诱导率均值/%	差异显著性		组合号	分化率均值/%	差异显著性	
		0.05	0.01			0.05	0.01
1	91.7	a	A	3	83.3	a	A
3	88.9	a	A	1	76.2	a	AB
10	77.9	ab	AB	10	60.9	ab	ABC
8	67.9	abc	AB	6	50.1	bc	BCD
5	63.3	abc	AB	5	35.1	cd	CD
6	60.97	abc	AB	8	35.0	cd	CD
9	60.6	abc	AB	9	34.4	cd	CD
7	53.7	bc	AB	2	23.0	d	D
2	50.2	bc	AB	7	18.1	d	D
4	40.2	c	B	4	17.0	d	D

### 2.2 叶柄诱导及分化

在培养 32 d 后, 叶柄在不同培养基上的诱导及分化生长状况见表 4; 不同培养基组合中叶柄诱导率及分化率见表 5。通过试验观察统计, 不同处理组合对叶柄诱导率在一定范围内影响不很显著, 而对叶柄分化率影响很显著。3 号培养基为培养叶柄最佳的培养基, 其分化率可达到 74.1%, 比对照 52.8% 增加了 18.6%, 且 3 号培养基所诱导的愈伤组织为绿色致密的愈伤组织, 具有很强的生活力, 分化苗生长健壮。其次为 9 号培养基, 其叶柄两端形成带绿色芽点的愈伤组织, 生长健壮。因此, 用半夏叶柄作为外植体培养首选 3 号培养基, 其次是 9 号培养基, 其他的几种培养基培养叶柄后大部分形成白色疏松、或浅黄色水浸状的非胚性愈伤组织, 能分化成苗的芽点少, 有些培养基培养, 叶柄被诱导后不能分化成丛生芽或苗, 最后褐化死亡, 例如 5 号培养基, 其诱导率平均为 88.7%, 居第 1 位, 而分化率只有 34.8%。可分化的芽点少, 所以也不宜作叶柄培养基。

表 4 不同培养基对叶柄诱导及分化的影响

组合号	组合	生长状态
1	A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	诱导率、分化率都很低, 已经分化的生长良好, 形成绿色芽点
2	A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	形成白色、疏松愈伤组织, 能分化的很少, 不宜做叶柄培养基
3	A <sub>1</sub> B <sub>3</sub> C <sub>3</sub>	形成大量绿色致密的愈伤组织, 分化苗生长健壮, 适宜做叶柄培养基
4	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> C <sub>2</sub>	诱导很少, 几乎未分化, 直接排除
5	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>3</sub>	形成白色疏松非胚性愈伤组织, 能分化成苗的少, 不宜做叶柄培养基
6	A <sub>2</sub> B <sub>3</sub> C <sub>1</sub>	诱导、分化都较差, 不宜做叶柄培养基
7	A <sub>3</sub> B <sub>1</sub> C <sub>3</sub>	诱导、分化效果都差, 直接排除
8	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	生长状况一般, 可分化的芽点少, 形成疏松、淡黄色水浸状愈伤组织
9	A <sub>3</sub> B <sub>3</sub> C <sub>2</sub>	叶柄两端形成带绿色芽点的愈伤组织
10	CK	诱导出淡黄色愈伤组织, 生长状态一般

### 2.3 块茎诱导分化结果

通过对半夏块茎的培养, 发现除 2 号培养基外, 其余培养基上其诱导率都比较高, 几乎达到 100% 的诱导, 但是分化生长状态各不相同, 玻璃化现象严重, 分化生长不好, 大部分植株生长不旺盛, 根系生长细弱, 只有 9

号培养基为培养块茎最好的培养基, 其诱导分化后分化苗生长健壮, 所形成的小植株生长最旺盛, 根系发育粗壮。因此 9 号培养基最适宜做块茎诱导分化培养基。

表 5 处理组合对叶柄诱导率、分化率试验结果

组合号	诱导率		差异显著性		组合号	分化率		差异显著性	
	均值/%	0.05	0.01	均值/%		0.05	0.01		
5	88.7	a	A	3	71.4	a	A		
3	86.8	a	A	9	59.2	a	AB		
8	84.3	a	A	10	52.8	ab	ABC		
2	77.8	a	A	5	34.8	bc	BCD		
10	74.8	a	AB	8	34.0	bc	BCD		
6	73.9	a	AB	6	27.8	c	CDE		
9	72.2	a	AB	2	15.6	cd	DE		
7	40.4	b	BC	1	15	cd	DE		
1	23.3	bc	C	7	4.9	d	DE		
4	9.7	c	C	4	0.3	d	E		

表 6 不同培养基对块茎诱导、分化的影响

组合号	组合	生长状态
1	A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	可分化的愈伤组织少, 生长状态一般, 不宜做块茎培养基
2	A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	基本未诱导, 生长状态差, 直接排除
3	A <sub>1</sub> B <sub>3</sub> C <sub>3</sub>	有叶片枯死现象, 偶有玻璃化, 不宜做块茎培养基
4	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> C <sub>2</sub>	分化较好, 叶片较小, 根系较弱, 可做分化扩繁培养基
5	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>3</sub>	分化不好, 根系基本未发育, 玻璃化严重, 有叶片枯死现象, 不宜做块茎培养基
6	A <sub>2</sub> B <sub>3</sub> C <sub>1</sub>	分化差, 玻璃化严重, 根系基本未发育, 不宜做块茎培养基
7	A <sub>3</sub> B <sub>1</sub> C <sub>3</sub>	分化不好, 愈伤组织有玻璃化现象, 根系未发育, 不宜做块茎培养基
8	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	分化较好, 植株生长旺盛, 但偶有玻璃化现象, 根系生长一般
9	A <sub>3</sub> B <sub>3</sub> C <sub>2</sub>	分化良好, 植株生长最旺盛, 生长速度最快, 根系生长旺盛, 适宜做块茎培养基
10	CK	分化状态一般, 生长状态一般, 根系生长细弱

### 3 讨论

微量元素作为植物生长必需的营养元素, 虽然含量较少, 但在代谢过程中与大量元素一样具有很重要的功

能。锰是许多酶的活化剂; 铁硫蛋白参与氧化还原反应, 铁的电子得失在呼吸过程中有非常重要的功能; 锌是生长素前身色氨酸合成所必需, 缺锌植株内吲哚和丝氨酸不能合成色氨酸, 因而不能合成生长素, 植物生长受阻<sup>[9]</sup>。

该研究通过对半夏外植体不同部位的培养试验, 找到最佳的微量元素组合配方。结果表明: 培养叶片叶柄的最佳微量元素浓度水平是: Mn 5.5 mg/L、Fe 为 9.5 mg/L、Zn 为 2.0 mg/L, 培养小块茎的最佳微量元素浓度水平是: Mn 7.5 mg/L、Fe 9.5 mg/L、Zn 为 1.0 mg/L。不同的外植体部位进行组织培养, 其所需的微量元素浓度组合不同。根据培养需求, 使用相应的培养基组合, 这样可以进一步提高半夏试管块茎的诱导分化率, 为半夏试管块茎的规模化生产提供技术支持。

### 参考文献

- [1] 罗广明. 半夏的快速繁殖研究[J]. 中药材, 2003(10): 26.
- [2] 薛建平, 张爱民, 盛玮, 等. 钾盐对试管块茎诱导的影响[J]. 中国中药杂志, 2006(7): 546-548.
- [3] 冉懋雄. 半夏、水半夏、附子[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2002.
- [4] 中医研究院中药研究所, 北京中医学院中药系. 半夏炮制前后毒性的比较[J]. 中草药, 1985, 16(2): 14.
- [5] 孔今武, 孙海峰. 现代实用中药栽培养殖技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [6] 白权, 杨仕彦. 半夏 SOP 研究 GAP 基地建设简报[J]. 川北医学院学报, 2002, 17(1): 71-73.
- [7] 夏海武, 战克勤, 赵月玲. 半夏组织培养研究[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(12): 720-721.
- [8] 罗光明, 刘贤旺, 姚振生, 等. 半夏的组织培养和植株再生[J]. 江西中医学院学报, 2000, 12(3): 125-126.
- [9] 江苏农学院. 植物生理学[M]. 北京: 农业出版社, 1990: 121-123.

## Effect of Microelement on The Inductivity and Tissue Differentiation of *Pinellia ternata* Tissue Culture

WEI Lixia

(Special Crops Laboratory of Beer Material Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070, China)

**Abstract:** To study the effect of Mn, Fe, Zn on the inductivity and tissue differentiation from different explants of *Pinellia* tissue culture. Leaves, petioles and tubers of *Pinellia* were cut and cultured on the MS+2, 4-D 0.5 mg/L+6-BA 1 mg/L medium with different concentration of Mn, Fe, Zn. The effects were studied by means of 3 factors and 3 levels orthogonal design experiments. The result indicated Mn 5.5 mg/L, Fe 9.5 mg/L and Zn 2.0 mg/L combine were advantageous to the culture of leaves and petioles; Mn 7.5 mg/L, Fe 9.5 mg/L and Zn 1.0 mg/L combine were advantageous to the tubers.

**Key words:** Microelement; *Pinellia ternata*; Inductivity; Differentiation rate