

# 半夏愈伤组织的诱导及植株的再生研究

潘 卫 仓<sup>1</sup>, 刘 菊 英<sup>2</sup>

(1. 天水师范学院 生命科学与化学学院, 甘肃 天水 741001; 2. 永登县第二中学 甘肃 永登 730302)

**摘 要:**以半夏 *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit 的块茎为外植体, 接种于附加了 6-BA, NAA, 2, 4-D 及其组合的 MS 培养基上, 都能诱导出愈伤组织。结果表明: MS+1.0 mg/L 6-BA+1.5 mg/L NAA 对半夏愈伤组织的诱导率最高, 植株在 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 中较 MS+1.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA 中更容易再生。

**关键词:**半夏; 组织培养; 愈伤组织; 生长调节剂

**中图分类号:**S 567.23<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001—0009(2009)11—0221—03

半夏 *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit 又名半子、三步跳、麻芋头、三兴草等, 为天南星科多年生宿根草本植物, 株高一般为 15~40 cm, 1 a 生或较小株芽为单叶, 2 a 生以上为 3 片小复叶<sup>[1,2]</sup>。雌花常生于花序基部, 而雄花则生于上端。花期 6~8 月, 果期 8~9 月<sup>[3]</sup>, 生育期为 180~210 d<sup>[4]</sup>。天水野生半夏多生于山坡, 阴湿的草丛、林下及田间, 夏季易在半阴半阳的环境中生长, 一般土壤含水量在 20%~40% 时生长最为适宜, 家种半夏以甘肃陇南、平凉, 山东菏泽等地为主。

半夏以块茎入药, 具有燥湿化痰, 降逆止呕, 消痞散结等多种功效<sup>[5,7]</sup>, 近年来, 又发现半夏蛋白有抗早孕, 抗肿瘤<sup>[1,8-12]</sup>, 抗心律失常, 抗衰老<sup>[13-16]</sup>, 去皱养颜和提高记忆力的特殊作用<sup>[16-19]</sup>。另外, 半夏有一定的毒性, 还可对有毒成分进一步研究, 根据“以毒攻毒”的思路, 开发研制一些植物杀虫剂<sup>[9]</sup>。

随着半夏用途的日益扩大, 近年来全国各大药市半夏商品货源偏少, 价格坚挺, 市场呈现购销两旺的局面, 价格从 20 世纪 90 年代的 10 元/kg 到目前的 30 元/kg, 一直在攀升<sup>[9,11,20]</sup>。近期, 半夏商品价格又升高了, 统货

收购价为 32~34 元/kg, 优质品达 38~40 元/kg<sup>[21]</sup>。有关药市行家预测, 半夏后市将继续走畅价升, 野生资源形式严峻, 由于生态环境遭到破坏, 造成半夏大面积灭绝。肆意采伐树木和开山挖田, 大量使用除草剂掠夺式采挖, 致使半夏雪上加霜。半夏家种繁殖缓慢, 667 m<sup>2</sup>地用 10~13 mm 的种茎达 100 kg, 而仅产种茎 1 000 kg 左右, 其中 3/4 做商品, 仅有 1/4 做种用, 第 2 年只能用于扩种 333 m<sup>2</sup>, 如此缓慢的发展, 再加产区又不多, 因此商品严重不足。我国对半夏的年需求量达 350 万 kg 以上, 每年出口日本的半夏达 400 t<sup>[20]</sup>。田间半夏多采用块茎、株芽等来繁殖, 所以需要大量的种茎, 而目前市场上半夏种茎达 50 元/kg, 这给药农带来严重的经济负担, 再加上产量又低, 田间繁殖致使半夏感染病毒严重, 品质下降, 因此人们的种植积极性不高, 因而半夏的供应越来越少, 但随着全球温度的升高, 肺疾的增多, 国内外对半夏的需求量却越来越大<sup>[9]</sup>。

为此, 选用中药半夏正品为材料, 进行组织培养, 以获得优质种苗, 使半夏得以快速繁殖, 为实现半夏的工厂化生产或为大田生产提供支持, 并为开展人工种子的研究作一些铺垫性的工作<sup>[22]</sup>。

## 1 试验材料

半夏块茎采自甘肃省天水。试剂和药品: 2, 4-D; 北京化工厂; NAA: 曹扬第二试剂厂; 6-BA: 新华活性材料研究所。

**Abstract:** The power of *Hemisteptia lyrata* Bunge in Changbai Mountain was extracted by ASE, and the content of total flavone was determined by ultraviolet spectrophotometry. The contents of eight trace elements including potassium, sodium, calcium, magnesium, copper, zinc, iron, manganese were determined by flame atomic absorption spectrophotometry. The results showed that there were high total flavone and rich trace elements. Among which were comparatively high potassium, calcium, magnesium, sodium, iron in *Hemisteptia lyrata* Bunge. It provided theoretical basis for the further research on wild *Hemisteptia lyrata* Bunge in Changbai Mountain.

**Key words:** Changbai mountain; *Hemisteptia lyrata* Bunge; Total flavone; Trace elements

第一作者简介: 潘卫仓(1979-), 男, 甘肃天水人, 在读硕士, 讲师。  
E-mail: pwei1999@163.com.  
收稿日期: 2009-06-20

2 试验方法

2.1 灭菌

将采回的半夏块茎用自来水冲洗干净,再用蒸馏水冲洗数次,每次 2~3 min,剥去外皮。将洗好的块茎置于超净工作台上用 70%的酒精浸泡 30 s,无菌水冲洗数次,每次约 2 min,随后用 0.1%的升汞浸泡 15~20 min,无菌水冲洗数次,每次约 2 min,备用。

2.2 接种培养

在超净工作台上将已灭菌的块茎用无菌滤纸吸干表面水分后,切成边长为 3 mm 左右的小块,接种于附加不同生长调节剂的 MS 培养基上,放置于温度(23±2)℃,光照 2 000 lx,8~10 h/d 的培养室中进行培养。

3 结果与分析

3.1 愈伤组织的诱导

单独和以不同比例搭配使用 2,4-D, NAA, 6-BA, 附加于 MS 基本固体培养基中,观察其诱导效果,诱导率按下式计算:诱导率=形成愈伤组织的外植体块数/接种外植体块数×100%<sup>[13]</sup>。

3.1.1 2,4-D, NAA, 6-BA 的单独诱导效应 由图 1 可得,2,4-D 对半夏愈伤组织的诱导效果非常显著。其愈伤组织为淡黄色疏松状,当 2,4-D 的浓度过高或过低时,均不利于愈伤组织的诱导,且愈伤组织容易褐化,生长势也较差。NAA 对半夏愈伤组织的诱导率都比较高。生长势也都很好,其中浓度为 2.0 mg/L 时诱导率最高,诱导的愈伤组织为淡黄色或白色。浓度低于 0.5 mg/L 时,愈伤组织有 3~5 条细根生出,有的并没有形成愈伤组织而是直接成苗,这说明低浓度的 NAA 有利于根的分化和苗的形成,这与万美亮,范美华等<sup>[3,22]</sup>的结果一致。6-BA 对半夏愈伤组织的诱导率都不高。当 6-BA 的浓度为 1.5 mg/L 时,其诱导率是最高的,生长势也较其它浓度的好,当 6-BA 浓度较低时,诱导出淡黄色疏松

状的愈伤组织,浓度较高时诱导出的愈伤组织比较紧密,并且上面有绿色芽点出现,说明当 6-BA 浓度较低时有利于芽的分化。

表 1 6-BA 与 NAA 对半夏愈伤组织的诱导率及生长势的影响

浓度/mg·L <sup>-1</sup>	诱导率/%	生长势
6-BA 0.5+NAA 0.5	50.0	++
6-BA 0.5+NAA 1.0	77.0	+++
6-BA 0.5+NAA 1.5	92.0	+++
6-BA 0.5+NAA 2.0	83.5	++
6-BA 1.0+NAA 1.0	87.0	+++
6-BA 1.0+NAA 1.5	90.0	++++
6-BA 1.0+NAA 2.0	82.0	+++
6-BA 1.5+NAA 1.5	94.0	++++
6-BA 1.5+NAA 2.0	100.0	++++
6-BA 2.0+NAA 2.0	80.0	+++

注:++-一般;+++ -较好;++++ -旺盛,下同。

3.1.2 6-BA 与 NAA 的诱导效应 由表 1 可得,6-BA 和 NAA 的组合对愈伤组织的诱导普遍都较高,同时,愈伤组织的产生伴随着根、芽的分化,当 6-BA 浓度一定时,NAA 的浓度较低时有利于根、芽的分化,根比较细,而随着 6-BA 和 NAA 组合浓度的逐渐升高,根和芽的分化率降低,只诱导出愈伤组织。

3.1.3 6-BA 与 2,4-D 的诱导效应 由表 2 可得,当 6-BA 和 2,4-D 组合浓度较低时,不利于愈伤组织的诱导,且具有根和芽的分化,而当 6-BA 浓度为 1.0mg/L 保持不变时,2,4-D 的浓度在 1.5 mg/L 时,只诱导出愈伤组织,且诱导率最高。

表 2 6-BA 与 2,4-D 组合对半夏愈伤组织的诱导率及其生长势的影响

浓度/mg·L <sup>-1</sup>	诱导率/%	生长势
6-BA 0.25+2,4-D 0.5	50.0	++
6-BA 0.5+2,4-D 1.0	77.0	+++
6-BA 0.5+2,4-D 1.5	92.0	+++
6-BA 0.5+2,4-D 2.0	83.5	++
6-BA 1.0+2,4-D 1.0	87.0	+++
6-BA 1.0+2,4-D 1.5	90.0	++++
6-BA 1.0+2,4-D 2.0	82.0	+++
6-BA 1.5+2,4-D 1.0	94.0	++++
6-BA 1.5+2,4-D 2.0	100.0	++++
6-BA 2.0+2,4-D 2.0	80.0	+++

3.2 MS 固体培养基中添加 6-BA 和 NAA 对半夏植株再生的影响

将诱导出愈伤组织的块茎转接于添加了不同浓度 6-BA 和 NAA 的培养基上,诱导其植株再生。培养 1 个月以后观察得:1 mg/L 6-BA 和 1 mg/L NAA 培养基上的丛生芽有分化,平均产生 6 个植株,1 mg/L 6-BA 和 0.5 mg/L NAA 的培养基上均生出丛生芽,分化较好,平均每个切片产生 9.4 个植株。

结果说明,单因子 2,4-D 和 NAA 对半夏愈伤组织的诱导率较高,效果显著,但 2,4-D 和 NAA 浓度较低时

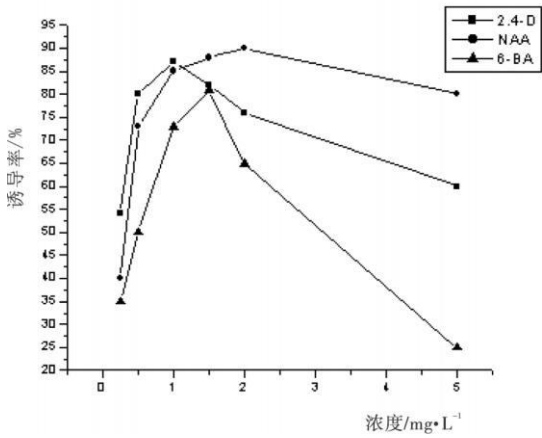


图 1 2,4-D, NAA, 6-BA 对半夏愈伤组织诱导率的影响

都会导致根的产生, 双因子 6-BA 和 NAA 组合、6-BA 和 2, 4-D 组合均在浓度较高时易诱导出愈伤组织。该试验还在继续进行, 其它因素的影响见以后的结果。

4 小结

由于半夏价格的稳定增长, 不少企业已有专业化生产的意向, 遇到的首要问题就是不易获得大量整齐一致质量有保证的种茎, 这为半夏组培快繁技术的实际应用提供了机会。前人采用的半夏再生程序也经历了愈伤组织阶段, 而有些研究者则认为半夏的无性快速繁殖最好通过建立能不断传代的愈伤组织体系完成, 这种快速繁殖体系繁殖率虽然很高, 但存在一些缺点, 如容易发生变异; 继代时需要选择愈伤组织, 要求一定的经验; 长期继代会使愈伤组织的分化能力有所下降。用半夏愈伤组织表面形成的小块茎制作人工种子在有菌和无菌条件下萌发率分别为 30%和 70%。不过, 很多人认为种植规模和效益限制了半夏快速繁殖技术的应用。野生资源的短缺和生产上的困难, 使得工厂化生产半夏已经成为半夏生产必不可少的策略。近年来, 半夏的茎、芽、根、胚等器官培养也得到迅速发展。

就药用价值来说, 有效成分至关重要。研究表明, 半夏培养物总生物碱含量明显高于野生半夏, 二者生物碱成分薄层扫描的吸收光谱完全相同, 薄层层析法图谱基本一致, 这为半夏的工厂化生产提供了可靠的依据, 但经 HPLC 分析和甲醇浸出物薄层层析图谱显示, 半夏培养物缺乏某些野生块茎的成分, 所以, 半夏的工厂化生产需做进一步的研究。半夏培养物总生物碱含量较高的原因还未见任何研究报道, 这与培养基中激素和生长调节剂的多少有关。因此, 在半夏栽培中可以通过一定的措施提高其有效成分的含量。

该试验的初步成功, 对帮助解决甘肃等地半夏种植中存在的质量、繁殖速度、价格等问题起到了很大的支持作用, 在以后半夏的各项研究中具有很大的指导意义。

参考文献

[ 1 ] Guo Q S Zhang G T, Xu L W. Effects of different propagative material on production of *Pinellia temate* Prreit [ J ]. *China Journal of Chinese Matteria*

*Medica* 1993 18(3): 140-142.  
[ 2 ] 唐琼莲. 半夏的组织培养[ J ]. *云南林业科技*, 1998(1): 80-82.  
[ 3 ] 李冬武, 消泽生, 陈松涛, 等. 半夏的利用和人工栽培[ J ]. *安徽农业科学*, 2005, 33(5): 849.  
[ 4 ] 戴邦元. 种植旱半夏可获高效益[ J ]. *特种经济动植物* 2004(1): 25.  
[ 5 ] Zhang S F, Xie S X. Study on tissue culture and rapid piopagation of *Pinellia temuta* [ J ]. *信阳师范学院学报(自然科学版)*, 1998, 11(1): 86-88.  
[ 6 ] Zhu Z R, Wang Y S, Yang Y Z. Study on rapid clonal propagation in vitro in *Pinellio ternate*(Thmb.)Priet[ J ]. *Journal of Guizhou Agriwltural College*, 1991, 10(1): 40-45.  
[ 7 ] 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* 12(3): 125-126.  
[ 8 ] Institute of Druggery Academiae Medicine Sinica. *Chinese Materia Medicu (中药志)*[ M ]; Book2. The second Edition. Beijing People's Medical Publishing House 1993: 28.  
[ 9 ] Jiang N Q. *Pingellia ternate* (Thumb)Priet. and *Arisaema Consanguineum* Schott [ M ]. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Press 2001: 114-115.  
[ 10 ] Luo G M. Study on tissue culture and plant regeneration of *Pinellia ternate*. *Chinese Materia Media and Information*. [ J ]. *中国研究与信息*, 2000 (4): 13-14.  
[ 11 ] 上海第一医学院药系药研组. 天南星的原植物调查与鉴定[ J ]. *中草药通讯*, 1978(2): 34.  
[ 12 ] 上海第一医学院妇产科医院化学教研组. 掌叶半夏治疗子宫颈癌的研究[ J ]. *上海医学* 1978 (1): 13.  
[ 13 ] 范美华, 周吉元, 彭瑜, 等. 半夏愈伤组织的诱导及增殖效应[ J ]. *山东中医杂志* [ J ], 2005, 3(3): 160-171.  
[ 14 ] 黄晓珍. 谈半夏与失眠[ J ]. *辽宁中医杂志*, 2004 31(6): 517.  
[ 15 ] 李建梅, 杨澄, 张伟云, 等. 半夏厚朴汤醇提取物对大鼠慢性抑郁模型影响[ J ]. *中国中药杂志*, 2003, 28(1): 55-58.  
[ 16 ] 沈雅琴, 张明发, 朱自平. 半夏的镇痛、抗溃疡和抗坏血栓形成作用[ J ]. *中国生化药物杂志* 1989 14(11): 15-17.  
[ 17 ] 王明艳. 不同粒径半夏抗肿瘤复方对人食道 Eca-109 细胞生长影响的比较研究[ J ]. *南京中医药大学学报*, 2002, 18(2): 92-93.  
[ 18 ] 张科卫, 吴皓, 浓绣红. 半夏总游离有机酸的作用研究[ J ]. *南京中医药大学学报* 2001, 17(3): 159-162.  
[ 19 ] 朱铭伟, 周抗美, 丁声颂. 掌叶半夏总蛋白对卵巢癌细胞株及人脐造血细胞的作用[ J ]. *中国生化药物杂志*, 1998, 19(3): 141-143.  
[ 20 ] 黄菊林. 发展旱半夏前景好[ J ]. *农村新技术*, 2005(6): 59.  
[ 21 ] 尹平孙. 旱半夏后市将走畅价扬[ J ]. *农技服务*, 2004(5): 57.  
[ 22 ] 范美华, 周吉源. 半夏的研究进展[ J ]. *西北学杂志*, 2004, 19(2): 91.

Induction of Callus and Regeration *Pinellia ternate* in Tianshu

PAN Wei-cang, LIU Ju-ying

(1. College of Life Sciences and Chemistry, Tianshui Nomal University, Tianshui, Gansu 741001, China; 2. Yongdeng No. 2 Middle School, Yongdeng, Gansu 730302, China)

**Abstract:** The callus would be induced in stem tubers of *Pinellia ternate* as exotissue inoculated to the MS mediums added with 6-BA, NAA, 2, 4-D. The test showed that the inducing rate of MS+1.0 mg/L 6-BA+1.5 mg/L NAA was the highest, plants better regenerated in MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA than in MS+1.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA.

**Key words:** *Pinellia ternate*; Tissue culture; Callus ; Growth regulator