

孙 燕,傅裘平,余 乐,等.泰半夏小块茎的诱导及工厂化育苗研究[J].江苏农业科学,2014,42(12):67-69.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.019

泰半夏小块茎的诱导及工厂化育苗研究

孙 燕,傅裘平,余 乐,张 成,李成忠,何正东

(江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300)

摘要:以泰半夏的无菌叶片、叶柄为材料,通过愈伤组织分化不定芽途径,建立泰半夏工厂化育苗植株再生体系。结果表明,以叶片、叶柄为外植体,愈伤组织最适诱导培养基分别为:MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 3.0 mg/L,MS+0.5 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L 6-BA;愈伤组织在相同培养基中增殖后诱导小块茎分化的最适培养基为:MS+2 mg/L 6-BA。1/2MS+0.1%活性炭+0.5 mg/L NAA 培养基产生的根较粗壮、浓密。

关键词:泰半夏;块茎诱导;育苗

中图分类号:S567.23⁺9.043

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2014)12-0067-03

半夏(*Pinellia ternate*)别称野芋头,为天南星科多年生草本植物,以其干燥块茎入药,性温、味辛、有毒,具有降逆止呕、消痞散结等功能,是我国传统中药材。生长于江苏省泰州地区的半夏被称为泰半夏,具有个大、质坚实、色白、粉性足等优良性状,是当地著名的地道药材^[1]。泰半夏多产于旱作的高沙土农田中,以野生状态生存。随着种植制度的改革、旱改水面积的扩大,以及化肥、农药、除草剂的广泛使用,泰半夏野生资源已处于濒危状态,不能满足用药需求。人工栽培半夏用种量较大,加上生产退化等问题均导致半夏供应长期处于紧缺状态。因此,研究新的繁殖技术对于保护泰半夏地道药材种质资源有着积极意义。目前,泰州地区通常采用半夏块茎或珠芽进行繁殖,但因存在繁殖能力低及品种退化等问题而限制了泰半夏产量、质量的提高。半夏分布范围较广,近年来湖北省荆门市、甘肃省西河县、贵州省、云南省、湖南省、四川省、安徽省等地都陆续展开了保护当地地道半夏药材资源的组培研究,以块茎、叶片、叶柄或珠芽等为外植体,得到半夏的再生植株^[2-11]。本试验以从块茎为外植体获得的泰半夏无菌苗为材料,建立适宜工厂化生产的再生体系,以期保护泰州半夏种质资源,为泰半夏的工厂化育苗及规模种植奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为泰半夏组培苗,野生半夏块茎外植体采自江苏省泰兴市。选择生长旺盛、无病虫害的健壮植株的块茎,用自来水洗净,流水冲洗 30 min 以上。用 75% 乙醇充分浸没 30 s,无菌水冲洗后再用 0.1% HgCl₂ 溶液充分浸泡 10~16 min,无菌水反复漂洗 6~8 次。将块茎切成 0.5~0.8 cm

的小块,接种于诱导培养基上,形成无菌苗。

1.2 方法

1.2.1 外植体的处理 以半夏组培苗叶片及叶柄为外植体,无菌条件下,剪取生长一致的无菌苗顶部完全展开的幼嫩叶片,切成 1~2 cm 的小块,近轴面朝下接种于诱导培养基中;从生长良好的无菌苗上剪取叶柄接种于诱导培养基中。

1.2.2 基本培养基及培养条件 愈伤组织的诱导及不定芽分化培养基以改良 MS 为基本培养基,附加 30 g/L 蔗糖及 7 g/L 琼脂, pH 值为 5.8。块茎启动培养基为 MS 附加 0.2 mg/L NAA、2 mg/L 6-BA。生根培养以 1/2MS 为基本培养基,附加 15 g/L 蔗糖、7 g/L 琼脂、0.5 g/L 活性炭, pH 值为 5.8, 121 ℃ 高压灭菌 15 min。愈伤组织诱导、分化及不定芽生根培养均在以下环境中进行:培养温度(25±2)℃,光照时间 14 h/d,光照强度 2 000~2 500 lx。

1.2.3 激素处理 将无菌叶柄、叶片分别接种于不同生长调节物质组合的培养基中,采用完全随机设计。每处理 6 瓶,每瓶接种 5 个外植体,培养室培养。定期观察小块茎诱导及生长情况,21 d 后统计愈伤组织诱导率。诱导率计算公式如下:诱导率=诱导产生愈伤组织的外植体数/接种外植体总数×100%。

将诱导产生的愈伤组织切成 0.3~0.5 cm 的小块,接种至不定芽诱导增殖培养基上,培养 25 d 后统计小块茎平均诱导数量。

1.2.4 生根与壮苗 待丛生芽苗长至 3~4 cm 时,将其分株转移到不同生根培养基中,接种 21 d 后观察并记录不同处理对植株生根的影响。每处理 6 瓶,每瓶 5 株试管苗。

1.2.5 炼苗与移栽 待根长至 1~2 cm 时炼苗移栽。移栽基质设 4 种:A:园土;B:珍珠岩:泥炭:沙=1:2:2;C:育苗基质;D:育苗基质:园土=1:1。

2 结果与分析

2.1 不同激素对泰半夏愈伤组织诱导的影响

将无菌叶片、叶柄接入不同激素配比的培养基中,诱导结果见表 1。在诱导愈伤过程中,诱导启动时间差距较小。叶片外植体接种 5~7 d,叶片边缘翘起,14 d 时愈伤组织启动明

收稿日期:2014-09-18

基金项目:中央财政林业科技推广示范资金(编号:[2014]TJS05);

江苏省林业三新工程(编号:LYSX[2013]21);江苏农牧科技职业学院资助课题(编号:NSFYB1409)。

作者简介:孙 燕(1981—),女,山东淄博人,讲师,从事药用植物栽培生理及应用研究。

通信作者:何正东,高级畜牧师,从事农业推广与管理等研究。

E-mail:55942099@qq.com。

显,具叶脉的切口处是最易诱导的部位。叶片外植体诱导出淡黄色的愈伤组织,质地坚实。诱导效果随 2,4-D 浓度的升高而增强,当 2,4-D 浓度达 1.0 mg/L 时,叶片外植体诱导率较高。在一定范围内,叶片愈伤组织的诱导率随 6-BA 浓度增加而提高。当 2,4-D 浓度达 0.5 mg/L 时,叶柄外植体诱导率较高,说明叶柄外植体对 2,4-D 的诱导较叶片敏感。当 6-BA 浓度为 2~3 mg/L 时,叶柄外植体诱导率随其添加

浓度的升高而降低(除 2,4-D 浓度为 1.0 mg/L 处理)。启动叶片愈伤组织发生需要较高浓度的 2,4-D、6-BA,激素浓度过高会对继代培养产生激素积累,影响组培苗质量,因此 MS 培养基添加 2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 3.0 mg/L 为叶片愈伤组织最佳诱导培养基;叶柄最适诱导愈伤组织培养基为 MS 培养基添加 0.5 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L 6-BA。

表 1 不同激素对泰半夏愈伤组织诱导的影响

处理	2,4-D 浓度 (mg/L)	6-BA 浓度 (mg/L)	接种数 (个)	诱导时间(d)		诱导率(%)	
				叶片	叶柄	叶片	叶柄
1	0.1	0	30	14	16	33.3	55.6
2	0.1	1	30	17	14	50.0	88.9
3	0.1	2	30	17	14	58.3	88.9
4	0.1	3	30	14	14	50.0	72.2
5	0.1	4	30	15	14	25.0	55.6
6	0.5	0	30	15	14	41.7	61.1
7	0.5	1	30	15	14	58.3	66.7
8	0.5	2	30	16	14	66.7	100.0
9	0.5	3	30	14	14	83.3	50.0
10	0.5	4	30	14	14	75.0	83.3
11	1.0	0	30	16	14	66.7	33.3
12	1.0	1	30	16	14	75.0	22.2
13	1.0	2	30	16	12	66.7	22.2
14	1.0	3	30	18	14	100.0	44.4
15	1.0	4	30	18	14	83.3	33.3

注:表中所示诱导小块茎个数为接种愈伤组织的平均诱导小块茎个数。

2.2 激素浓度对小块茎诱导的影响

将愈伤组织再分化诱导产生小块茎,接种后 3~5 d 即可观察到愈伤组织有分化迹象,10 d 左右即可分化出多个明显的小块茎,25 d 左右小块茎数量保持稳定。诱导产生的小块茎数量在一定范围内随 6-BA 浓度的升高而增加。但当 6-BA 浓度高于 2 mg/L 时,诱导小块茎数量有下降趋势(除 0.5 mg/L NAA 处理)。因此最适激素比例为添加 2 mg/L 6-BA(表 2)。

表 2 激素浓度对泰半夏小块茎诱导的影响

处理	NAA 浓度 (mg/L)	6-BA 浓度 (mg/L)	接种数 (个)	诱导小块茎数 (个)
1	0	0	30	0
2	0	1	30	20.3
3	0	2	30	26.5
4	0	3	30	18.1
5	0.2	0	30	11.6
6	0.2	1	30	10.2
7	0.2	2	30	15.1
8	0.2	3	30	11.3
9	0.5	0	30	2.5
10	0.5	1	30	5.8
11	0.5	2	30	4.8
12	0.5	3	30	5.1
13	1	0	30	5.2
14	1	1	30	生根
15	1	2	30	生根
16	1	3	30	生根

2.3 激素浓度对泰半夏丛生芽诱导生根的影响

分化产生的小块茎在原培养基中继续培养,待丛生苗长至 3~5 cm 时,接入 1/2MS+0.1% 活性炭并添加不同浓度 NAA 的生根培养基中进行培养。21 d 后观察结果,1/2MS+0.1% 活性炭+0.5 mg/L NAA 培养基产生的根较粗壮、浓密。未添加任何生根剂的对照处理在接种 17 d 后块茎边缘同样产生了较细弱的根系,但是启动时间晚,延长了培养周期,且根系细弱,不利于移栽(表 3)。

表 3 激素浓度对泰半夏不定芽诱导生根的影响

处理	NAA 浓度 (mg/L)	接种苗数 (株)	启动时间 (d)	平均生根 条数(条)	平均根长 (cm)
1	0	40	17	4.5	0.3
2	0.2	40	8	12.0	1.5
3	0.5	40	6	15.0	1.2
4	1.0	40	6	19.0	1.0

2.4 移栽基质对泰半夏组培苗成活的影响

将完整的组培苗移至温室大棚驯化 3~5 d 后,于出瓶前 1 d 开盖炼苗。将根部培养基洗净后,栽植于不同的移栽基质中。直接移栽组培苗损失较大,成活率很低。因此,温室炼苗可以极大地提高移栽成活率。由表 4 可见,D 基质处理下泰半夏试管苗移栽成活率最高,且组培苗生长健壮,温室移栽成活 30 d 后即可移至室外进行大田种植。

3 结论与讨论

本研究以叶片、叶柄为外植体,建立了泰半夏工厂化育苗

表 4 不同基质对泰半夏试管苗移栽成活的影响

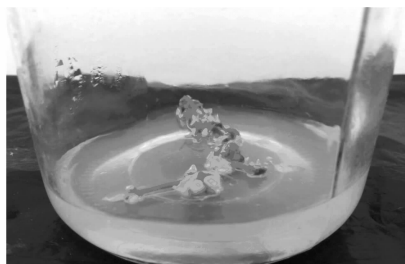
处理	基质组成	移栽株数 (株)	成活率 (%)	生长情况
1	A	200	72.6	正常, 缓苗较慢
2	B	190	88.9	正常
3	C	180	90.1	健壮
4	D	200	97.2	叶色深绿, 健壮
5	直接栽植至室外	173	40.6	叶色深, 缓苗较慢

技术体系(图 1)。以叶片、叶柄为外植体, 愈伤组织最适诱导培养基分别为: MS + 0.5 mg/L 2,4-D + 3.0 mg/L 6-BA、MS + 0.5 mg/L 2,4-D + 2.0 mg/L 6-BA; 愈伤组织在相同

培养基中增殖后诱导小块茎分化的最适培养基为: MS + 2 mg/L 6-BA。在最适培养基上叶柄形成明显的愈伤组织时间要早于叶片, 因此叶柄更适宜作为诱导愈伤组织的外植体。生根苗经温室炼苗 1 个月左右, 展开卵圆形的幼叶。5 月移栽至室外, 缓苗 10 d 左右, 陆续萌出新叶, 迅速展开为三出复叶。7 月移至大田后, 大部分幼叶变黄枯萎, 类似倒苗状态。5~7 d 卵圆形新叶重新萌出, 并很快展开三出复叶。9 月移栽至室外林下, 原叶未变黄枯萎, 7 d 左右有新叶萌出, 原叶叶色变深。张国泰等发现, 在江苏省南京市, 半夏于 7 月中旬到 8 月中旬全部倒苗越冬, 9 月重新进入秋季生长季, 11 月上中旬倒苗越冬^[12]。因此, 泰半夏在冬季大倒苗之前, 5—9 月皆可以实现移栽入林下或于遮阴地带种植。



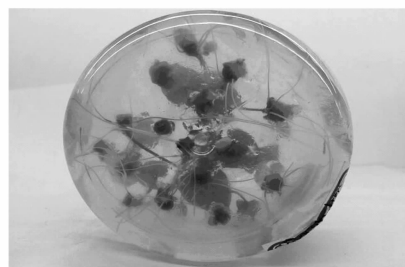
a. 叶片诱导产生愈伤组织



b. 叶柄诱导产生愈伤组织



c. 丛生苗



d. 生根



e. 炼苗移栽



f. 移栽至大田

图 1 泰半夏工厂化育苗技术流程

参考文献:

- [1] 李先良, 王学民. 荆半夏叶柄外植体快繁技术研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(6): 2247-2248, 2284.
- [2] 王学民. 荆半夏叶片外植体快繁技术研究[J]. 荆门职业技术学院学报, 2007, 22(12): 1-4.
- [3] 张腾国. 半夏组织培养快繁技术研究[J]. 甘肃农业科技, 1999(11): 15-16.
- [4] 邱璐, 黄静, 范树国, 等. 半夏愈伤组织的诱导与分化研究[J]. 江苏农业科学, 2009(6): 72-74.
- [5] 杨凯, 王荔, 杨艳琼, 等. 不同激素浓度对比对半夏组培一次性成苗的影响[J]. 云南农业大学学报, 2005, 20(5): 615-619.
- [6] 胡鹏, 宋常美, 李祥彪, 等. 贵州珍珠半夏高频再生体系的建立

- 与优化[J]. 种子, 2008, 27(5): 35-38.
- [7] 胡瑞芬, 霍国琴, 李建设, 等. 道地中药材半夏离体快繁技术研究[J]. 现代中药研究与实践, 2007, 21(6): 12-14.
- [8] 杨海龙, 李书民. 半夏组培繁殖体液体培养试验初报[J]. 陕西农业科学, 2008, 54(6): 51-51, 71.
- [9] 白雨, 高山林. 半夏组织培养诱导胚状体的正交试验[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(4): 16-20.
- [10] 陶米林, 刘清波, 黄红梅. 半夏组织培养体系的建立[J]. 北方园艺, 2013(4): 113-117.
- [11] 罗成科, 彭正松, 蔡鹏. 三叶半夏叶片一步成苗离体培养技术[J]. 广西植物, 2007, 27(2): 260-264.
- [12] 张国泰, 郭巧生, 王康才. 半夏生态研究[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(7): 395-397, 446.