

李先良,李居宁,张喜才,等. 荆半夏胚性愈伤组织的诱导[J]. 江苏农业科学,2017,45(3):28-30.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.03.007

荆半夏胚性愈伤组织的诱导

李先良¹, 李居宁¹, 张喜才¹, 赵志常²

(1. 荆楚理工学院生物工程学院/荆楚理工学院科技处,湖北荆门 448000;

2. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/农业部华南作物基因资源与种质创制重点开发实验室,海南儋州 571737)

摘要:以竹叶型荆半夏叶柄为外植体,研究不同培养基、激素配比、不同叶柄处理方式对愈伤组织诱导的影响。结果表明,单独添加 2,4-D 或 6-BA 均能诱导半夏叶柄愈伤组织,但诱导率较低,愈伤组织质量相对较差。叶柄不同部位对愈伤组织诱导有显著影响,叶柄下段适合愈伤组织诱导,黄化处理能提高叶柄愈伤组织诱导的效果。正交试验结果表明,4 因素对半夏愈伤组织诱导影响从大到小为 2,4-D 浓度 > 叶柄位置 > 6-BA 浓度 > 蔗糖浓度。从诱导率和愈伤组织质量考虑,取半夏叶柄下段接种于培养基 MS + 2.0 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA + 60 g/L 蔗糖上进行培养,效果较好。

关键词:荆半夏;叶柄;胚性;愈伤组织;诱导;培养基;激素

中图分类号: S567.23⁺9.043 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)03-0028-03

半夏(*Pinellia ternata*)是天南星科多年生草本植物,主要分布于湖北省、四川省、河南省、贵州省、安徽省等地,其中产于湖北省荆州市的半夏被称为荆半夏,因色白、质坚实、粉性足等优点而被誉为上品。半夏是传统中药,据对 558 个处方分析,半夏出现频率位于第 22 位。半夏以块茎入药,含半夏

生物碱、β-谷甾醇等成分^[1-2],具有燥湿化痰、降逆止呕,消痞散结等多种功效^[3-4]。近年来,半夏蛋白被发现还具有抗早孕、抗肿瘤^[4-6]、抗心律失常、抗衰老^[7-8]的特殊功效。半夏市场需求量大,市场价格比较稳定,野生半夏满足不了市场需求,人工栽培逐渐发展起来。人工栽培半夏种茎价格较高,目前湖北省半夏栽培使用种茎量为 4.5~6 t/hm²,需 9 万~12 万元/hm²。因此,降低种茎成本可以有效提高半夏人工栽培效益。

半夏自然状态下可进行有性繁殖和无性繁殖。有性繁殖形成的种子发芽率低,除了种子外,半夏通过块茎形成珠芽来进行无性繁殖,一般 2~3 年生的块茎会形成 1~2 个珠芽,无性繁殖效率较低。因此,组织培养作为一种高效繁殖方法,将其运用于半夏种苗或种茎的培育一直备受重视。半夏主要通

收稿日期:2016-08-16

基金项目:国家自然科学基金(编号:31471850);湖北省荆门市科技局科学基金(编号:110588)。

作者简介:李先良(1976—),男,副教授,研究方向为园艺植物遗传改良和分子生物学。E-mail:libusher@sina.com。

通信作者:赵志常,副研究员,研究方向为热带果树遗传育种与分子生物学。E-mail:zhaozhichang2001@163.com。

参考文献:

- [1] 曹利利,姚新华,侯洪烈,等. 柔嫩艾美耳球虫长春株 SAG2 基因的克隆与序列分析[J]. 动物医学进展,2013,34(12):115-120.
- [2] 麦博,覃宗华,于三科,等. 柔嫩艾美耳球虫杨凌株表面抗原 SAG10 基因的克隆与原核表达[J]. 中国兽医科学,2007,37(9):751-755.
- [3] Tabarés E, Ferguson D, Clark J, et al. *Eimeria tenella* sporozoites and merozoites differentially express glycosylphosphatidylinositol-anchored variant surface proteins[J]. Molecular & Biochemical Parasitology, 2004, 135(1):123-132.
- [4] Ngo H M, Hoppe H, Joiner K. Differential sorting and post-secretory targeting of proteins in parasitic invasion[J]. Trends in Cell Biology, 2000, 10(2):67-72.
- [5] Frasch A C. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*[J]. Parasitology Today, 2000, 16(7):282-286.
- [6] Lekutis C, Ferguson D, Grigg M, et al. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme[J]. International Journal for Parasitology, 2001, 31(12):1285-1292.

- [7] 韩德强,丁宏标,乔宇,等. 鸡柔嫩艾美耳球虫表面抗原基因 sag10 在毕赤酵母中的表达及鉴定[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2006, 13(4):199-203.
- [8] 蒋建林,蒋金书. 柔嫩艾美耳球虫各阶段虫体纯化方法的改进[J]. 中国农业大学学报, 1996, 1(5):99-102.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京:科学出版社, 2002:1256-1259.
- [10] 简永利,蔡建平,于三科,等. 柔嫩艾美耳球虫表面抗原 SAG2 基因的克隆与表达[J]. 畜牧与兽医, 2006, 38(6):10-13.
- [11] Jung C, Lee C Y, Grigg M E. The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins[J]. International Journal for Parasitology, 2004, 34(3):285-296.
- [12] 熊茂林,宋畅,罗荣城,等. 人糖基磷脂酰肌醇(GPI)-B7-1 真核表达载体的构建及表达[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(1):154-158.
- [13] 苏建亚,沈晋良. 棉铃虫幼虫中肠非糖基磷脂酰肌醇锚着氨肽酶 N 基因的克隆和测序[J]. 昆虫学报, 2005, 48(3):444-449.
- [14] 张云华,黄瑾. GPI 锚定蛋白的合成及功能[J]. 农垦医学, 2012, 34(1):59-62.

过器官发生途径成苗,但器官发生途径形式至少有 3 种类型,一是外植体直接成苗,通常也被称为一次成苗;二是外植体先形成带芽的球状体,该球状体经过进一步培养后成苗;三是外植体形成比较明显的愈伤组织,该愈伤组织经过分化培养后成苗。

高质量愈伤组织可以建立高效再生体系,在细胞培养和转基因体系建立等方面也具有基础性作用。高质量愈伤主要特征是良好胚性,具有较强的再生能力,从外观上看,高质量愈伤表现为颗粒状、有光泽,一般将高质量愈伤组织称为胚性愈伤组织。从半夏愈伤组织诱导所用外植体看,主要是块茎^[9-13]、叶柄^[14-18]及叶片^[19-21]。关于最佳外植体的筛选,现有研究结果存在一定差异,这可能是由外植体基因型和筛选培养基不同造成的。本研究以荆半夏竹叶形半夏叶柄为外植体,探索叶柄位置、黄化处理、培养基类型、蔗糖浓度、生长调节物质对胚性愈伤诱导的效果,为建立高效组培再生体系建立基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为荆半夏无菌苗叶柄。无菌苗通过荆半夏叶柄消毒接种到培养基 MS + 1.0 mg/L 6 - BA 上,在温度 (26 ± 2) ℃、光照周期 12 h/d、光照度 2 000 ~ 3 000 lx 下培养 30 d 即可获得。

1.2 方法

取将无菌苗叶柄下段平躺接入单独添加了 2,4 - D (浓度为 0.5、1.0、2.0、4.0 mg/L) 或 6 - BA (浓度为 0.1、0.5、1.0、2.0 mg/L) 的 MS 培养基,比较 2,4 - D 和 6 - BA 对半夏愈伤组织诱导的效果;取叶柄下段平躺接入分别添加 15、30、45、60、75、90 g/L 蔗糖的 MS + 2.0 mg/L 2,4 - D + 0.5 mg/L 6 - BA 培养基,比较蔗糖浓度对愈伤组织的诱导效果;取暗培养 10 d 和正常光照的无菌苗,取叶柄分上、中、下段,分别平躺接入培养基 MS + 2.0 mg/L 2,4 - D + 0.5 mg/L 6 - BA,考察黄化处理对愈伤组织诱导效果;以不同浓度 2,4 - D、6 - BA、蔗糖、不同叶柄位置为因素,设置 4 因素 3 水平 L₉ (3⁴) 正交试验,各因素水平见表 1,研究各因素水平对愈伤组织诱导效果。以上各处理每瓶各接 5 个,每处理重复 15 次,培养 25 d 统计愈伤组织诱导率。

表 1 荆半夏胚性愈伤组织诱导条件的 L₉ (3⁴) 正交试验因素水平表

水平	2,4 - D 浓度 (mg/L)	6 - BA 浓度 (mg/L)	叶柄部位	蔗糖浓度 (g/L)
1	1	0.1	上	30
2	2	0.5	中	60
3	4	1.0	下	90

2 结果与分析

2.1 6 - BA、2,4 - D 对半夏叶柄愈伤组织诱导效果

从表 2 可以看出,单独添加 6 - BA 或 2,4 - D 均能诱导叶柄形成愈伤组织,但诱导率及愈伤组织状态都有较大差别。添加 2,4 - D 诱导率较高,出愈时间较长,愈伤组织质地松软。添加 6 - BA 出愈较快,愈伤组织量较少,颜色呈现黄绿色,质地较硬,后期愈伤组织出现再分化成苗的现象。

2.2 蔗糖对半夏愈伤组织诱导的效果

从表 3 可以看出,低浓度 (15 ~ 60 g/L) 蔗糖处理下,增大

表 2 单一激素处理半夏叶柄愈伤组织诱导差异

激素	浓度 (mg/L)	诱导率 (%)	愈伤状态
空白		0	
6 - BA	0.1	20.0	黄绿,紧密,愈伤组织量少
	0.5	33.3	15 ~ 20 d 出现愈伤,愈伤组织薄,黄绿色,25 ~ 30 d 愈伤开始分化成苗
	1.0	73.3	15 ~ 20 d 出现愈伤,愈伤组织薄,黄绿色,紧密,25 ~ 30 d 开始分化成苗
	2.0	40.0	15 ~ 20 d 出现愈伤,愈伤组织薄,黄绿色,紧密,25 ~ 30 d 开始分化成苗
2,4 - D	0.5	60.0	淡黄、质地松散
	1.0	73.3	淡黄、质地松散
	2.0	86.7	淡黄、质地松软
	4.0	80.0	黄白、部分暗黄、部分呈水浸状

表 3 不同蔗糖浓度对半夏叶柄愈伤诱导的影响

蔗糖浓度 (g/L)	诱导率 (%)	愈伤状态
15	93.3	淡黄,质地松散
30	100.0	淡黄,质地松散
45	100.0	15 d 左右外植体膨大,愈伤组织在膨大部位分布较均匀,呈黄白色,质地松散
60	100.0	15 d 外植体膨大,愈伤组织分布均匀,呈黄白,松散
75	60.0	15 d 左右外植体膨大,愈伤组织黄白,部分外植体枯死
90	13.3	愈伤组织形成情况同上,较多外植体死亡

蔗糖利于愈伤组织诱导,叶柄膨大和出现愈伤组织的时间提前,而且愈伤组织在叶柄两端分布较均匀,相对疏松且颜色呈现黄白色。当浓度过大 (60 ~ 95 g/L) 时,可能渗透压过大,会引起外植体死亡。

2.3 黄化处理对愈伤组织诱导的影响

从表 4 可以看出,叶柄不同部位对愈伤诱导率影响差异明显,下部诱导率最高,其次是中部,上部最低,但对愈伤质量影响不大。这说明叶柄下段可能发育程度较低,脱分化相对容易。黄化处理诱导率提高,特别是对中上部叶柄,效果最为明显,黄化处理后叶柄上、中、下段诱导率差异变小,这有利于扩大合适外植体来源。

表 4 叶柄不同部位及黄化处理对愈伤组织诱导的影响

处理	叶柄部位	诱导率 (%)	愈伤状态
未处理	上	46.7	黄绿、质地松散
	中	53.3	黄、质地松散
	下	86.7	黄白、松散
黄化处理	上	86.7	黄白、松散
	中	86.7	黄白、松散
	下	93.3	黄白、松散

2.4 荆半夏胚性愈伤组织诱导条件的不同因素正交试验

由表 5 可以看出,4 个因素对无菌苗叶柄愈伤组织诱导的影响作用大小为 2,4 - D 浓度 > 叶柄部位 > 6 - BA 浓度 = 蔗糖浓度,最优组合为 A₂B₃C₃D₃,即采用叶柄下段为外植体,培养基为 MS + 2.0 mg/L 2,4 - D + 1.0 mg/L 6 - BA + 60 g/L

表 5 荆半夏胚性愈伤组织诱导条件的正交试验结果

培养基	A:2,4-D 浓度	B:6-BA 浓度	C:蔗糖浓度	D:叶柄部位	诱导率(%)	愈伤状态
1	1.0	0.1	30.0	上	33.3	淡黄、松软
2	1.0	0.5	45.0	中	47.7	黄白、松散
3	1.0	1.0	60.0	下	86.7	黄绿、紧密
4	2.0	0.1	45.0	下	93.3	黄白、松散
5	2.0	0.5	60.0	上	86.7	黄绿、松散
6	2.0	1.0	30.0	中	86.7	黄绿、紧密
7	4.0	0.1	60.0	中	66.7	暗黄、水浸状、软
8	4.0	0.5	30.0	下	73.3	淡黄、松散
9	4.0	1.0	45.0	上	66.7	黄绿、松散
k_1	55.9	64.4	64.4	62.2		
k_2	88.9	69.2	69.2	67.0		
k_3	68.9	80.0	80.0	84.4		
R	33.0	15.6	15.6	22.2		

蔗糖。但从愈伤组织质量来看,6-BA 浓度过高会使愈伤紧密,如不及时继代容易分化成苗。

3 结论与讨论

本研究以竹叶形荆半夏叶柄为外植体,考察不同部位叶柄、黄化处理 2 个月会影响外植体生理状态的因素及 2,4-D 浓度、6-BA 浓度、蔗糖浓度对愈伤组织诱导率和愈伤组织质量的影响。研究的 4 个因素中,2,4-D 浓度对半夏叶柄愈伤组织诱导影响较大,这与章伟标等的研究结果^[10,14]一致。当 2,4-D 浓度较高而 6-BA 浓度较低时,诱导的愈伤组织往往呈现暗黄色和水浸状,质地软。当 6-BA 浓度较高而 2,4-D 较低时,形成的愈伤组织呈现黄白色,质地硬而板结。因此,2,4-D 和 6-BA 合适的浓度是形成胚性愈伤组织的关键。

半夏叶柄的位置对愈伤组织诱导也具有较大的影响。从诱导率和愈伤组织质量两方面看,叶柄下段比较合适。黄化处理可改变叶柄的生理状态,从而会影响其愈伤组织诱导。经过黄化处理的试管苗上、中、下段愈伤组织诱导率差异缩小,与未经黄化处理的叶柄比较,上中段叶柄诱导率有所提高。蔗糖在培养基中的作用除了作为碳源外,另一个作用是提供合适的渗透压。在一定浓度范围内,提高蔗糖浓度可以增加叶柄两端膨大速度和程度,这可能主要是由培养基渗透压提高造成的。

参考文献:

[1]秦文娟,王 瑞,温月笙,等. 掌叶半夏化学成分的研究[J]. 中草药,1995,25(1):3-6.
[2]吴 皓,李 伟,张科卫,等. 半夏药材鉴别成分的研究[J]. 中国中药杂志,2003,28(9):836-839.
[3]白 权,李 敏,贾敏如,等. 不同产地半夏祛痰镇咳作用比较[J]. 中国药理学通报,2004,20(9):1059-1062.
[4]李玉先,刘晓东,朱照静. 半夏药理作用的研究述要[J]. 辽宁中医学院学报,2004,6(6):459-460.
[5]张科卫,吴 皓,李 伟. HPLC 同时测定半夏药材中鸟次黄嘌呤核苷、鸟嘌呤核苷的含量[J]. 药物分析杂志,2005,25(5):

487-489.
[6]郑国灿. 半夏提取液的抗肿瘤性研究[J]. 四川中医,2004,22(9):9-11.
[7]张小丽,谢人明,冯英菊. 四种中药对血小板聚集性的影响[J]. 西北药学杂志,2000,15(6):260-261.
[8]蒋文跃,杨 宇,李燕燕. 化痰药半夏、瓜蒌、浙贝母、石曹蒡对人鼠血液流变性的影响[J]. 中医杂志,2002,43(3):215-216.
[9]罗华彦,庭玉凤,宋 萍,等. 半夏快速繁殖体系的研究[J]. 植物生理学通讯,2005,41(6):777-778.
[10]章伟标,王姿云,张莹莹,等. 半夏疏松愈伤组织诱导及高产半夏蛋白悬浮株系筛选[J]. 浙江理工大学学报,2011,28(5):800-803.
[11]苏 新. 半夏愈伤组织的诱导和植株再生的研究[J]. 中国中药杂志,1989(14):15-17.
[12]潘卫仓,刘菊英. 半夏愈伤组织的诱导及植株的再生研究[J]. 北方园艺,2009(11):221-223.
[13]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.
[14]朱艳芳,毛春娜,张爱民,等. 半夏疏松愈伤组织诱导条件的优化研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(25):15275-15276,15292.
[15]范美华,周吉源,彭 瑜,等. 半夏愈伤组织的诱导及增殖效应[J]. 山东中医杂志,2005,24(3):168-171.
[16]万美亮,陈宏康,詹亚华,等. 半夏组织培养与快速繁殖研究[J]. 中国中药杂志[J]. 中国中药杂志,1995,20(9):526-529.
[17]刘鑫欣,崔晓星,刘金欣,等. 不同植物生长调节剂对半夏愈伤组织诱导效应的研究[J]. 中国中医药信息杂志,2011,18(5):57-59.
[18]程霞英,杨宗岐. 半夏愈伤组织诱导优化研究[J]. 天津农业科学,2013,19(9):4-6.
[19]罗成科,彭正松. 半夏疏松愈伤组织诱导的研究[J]. 西华师范大学学报,2005,26(1):37-39.
[20]汉丽萍,赵月玲. 半夏叶片愈伤组织诱导和快速繁殖研究[J]. 通化师院学报(自然科学版),1995(2):50-51.
[21]林秋月,曾万勇,李天佩,等. 半夏愈伤组织诱导与分化 最适培养基筛选[J]. 湖北农业科学,2014,53(3):3183-3186.