

半夏疏松愈伤组织诱导及高产半夏蛋白悬浮株系筛选

章伟标¹, 王姿云¹, 张莹莹¹, 田 晖², 金晓锋¹, 徐 涛¹

(1. 浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018; 2. 杭州职业技术学院, 杭州 310018)

摘 要: 筛选高产半夏蛋白悬浮株系。从半夏块茎、叶柄、叶片三种植物组织中选出最优外植体,以正交实验分析该外植体组织培养和继代培养最适条件,建立半夏蛋白悬浮株系,采用单因子法筛选高产株系。结果显示:以半夏块茎为外植体诱导愈伤组织效果最好,其愈伤组织诱导最适培养基为:MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L;其继代增殖最适培养基为:MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L;高产半夏蛋白悬浮株系最优培养基为:MS+6-BA 0.4 mg/L+NAA 0.1 mg/L,生长良好且可生产较多半夏蛋白。

关键词: 半夏; 外植体; 愈伤组织; 悬浮培养; 半夏蛋白

中图分类号: R282.2 **文献标识码:** A

半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit 为天南星科半夏属植物半夏的块茎,具有燥湿化痰,降逆止呕,消痰散结的功效,是中医常用中药之一。此外,半夏还具有抗早孕、抗肿瘤、抗心律失常等作用,研究发现半夏蛋白是主要有效成分^[1-6]。近年来,由于半夏的遗传不均性,病毒侵染,繁殖系数低等原因导致半夏资源日趋紧缺。因而利用生物技术培养半夏,继而达到大量生产半夏药用成分的目的,是解决该问题的有效途径之一。

目前,国内外对半夏组织培养的研究较多,对茎间^[7]、叶片、叶柄、块茎等外植体均已能培养成功,且技术已经成熟,对其培养的各个阶段所需条件及变化都有较多研究。半夏细胞悬浮培养及植株再生^[8]、胚状体诱导^[9]、原生质体诱导、人工育种^[10]等也均有报道。但对半夏蛋白高产悬浮株系的培养以及筛选的报道基本未见。本研究,首先筛选出合适的外植体,选择最佳愈伤组织诱导以及继代培养条件,得到优良胚性愈伤组织后,建立半夏组织悬浮株系,通过筛选悬浮培养条件,最终建立高产半夏蛋白悬浮株系。研究结果为半夏蛋白的深入研究奠定了坚实基础。

1 材料与方法

1.1 材料以及试剂

半夏试管苗由浙江理工大学生命科学学院温室提供,半夏块茎来源于浙江桐庐县胡庆余堂半夏种植基地。

基本培养基均选用 MS 培养基,附加不同种类、不同浓度的植物生长调节剂。所有培养基蔗糖浓度为 3%,琼脂浓度为 0.7%,pH 值为 5.8。2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)、6-BA(6-苄氨基嘌呤)和 NAA(萘乙酸)购自于上海生工生物工程技术有限公司,其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 不同外植体诱导愈伤组织优选试验

半夏块茎洗净,剥皮,流水冲洗 2 h,在超净台内用 75%的酒精浸泡 10~15 s,然后用无菌水漂洗 2 次,

收稿日期: 2010-11-15

基金项目: 浙江省新苗计划项目(14530031660809,14530131661027);杭州市科技局项目(20080632B18);浙江理工大学科研启动基金项目(116152A4Y07067)

作者简介: 章伟标(1984-),男,浙江绍兴人,硕士研究生,主要从事植物组培快繁及半夏蛋白研究。

通讯作者: 徐 涛,电子邮箱: xutao1998cn@yahoo.com.cn

每次 1~2 min;再用 0.1% 的升汞水溶液消毒 10~20 min,振摇,无菌水漂洗 7 次,每次 1~2 min。将处理好的半夏块茎带芽端(大约半夏块茎的 2/5)切下,去除外围组织,切成 5 mm × 5 mm 的薄片,每瓶 5~6 块;将半夏试管苗的叶柄切成 5~8 mm 小段,每瓶接种 10~15 小段;半夏试管苗的叶片用刀划痕,每瓶接种 3~4 片。固体培养基均为 MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L。7 d 后,比较不同外植体诱导形成的愈伤组织性状及诱导时间,筛选最佳诱导愈伤组织的外植体。

1.2.2 半夏块茎诱导愈伤组织正交试验

半夏块茎按上述方法,分别接种于加有不同植物激素(2,4-D、6-BA 和 NAA)不同浓度配比的 MS 培养基上(表 1)。培养条件为温度(26±2)℃,光照周期 12 h/d,光照强度 2 000~3 000 lux。筛选出适合诱导半夏疏松愈伤组织的最佳激素配比。一周后统计结果。

1.2.3 继代培养

将疏松愈伤组织转接到加有不同激素不同浓度配比的 MS 培养基上进行继代培养,培养条件同上(表 2)。7 d 后,观察愈伤组织的生长情况。选取其中较佳条件进行继代培养,每隔 7 d 继代 1 次,每次继代剔除衰老组织,挑选生长旺盛的组织进行培养。

1.2.4 高产半夏蛋白悬浮株系的筛选

选择色彩鲜艳、生长旺盛、结构酥脆型的愈伤组织接种于不同激素不同浓度配比的 MS 液体培养基中(表 3)。接种好的三角瓶置于摇床内培养,80 r/min,26℃,光照周期 14 h/d,光照强度 2 000~3 000 lux,悬浮培养。每 3~5 d 换一次培养液,及时清理被污染的样品。继代 2~3 次后,比较不同液体培养基中悬浮细胞的生长情况。

将不同液体培养基中得到的半夏细胞块晒干,各称取相同质量,分别置研钵中,加石英砂和 30% NaOH,研磨成浆状。再加 60% 碱性乙醇,研磨 5 min,离心(4℃,8 000 r/min,10 min),取上清,用 60% 碱性乙醇稀释定容,摇匀后即可比色。在紫外分光光度计上,于 280 nm 和 260 nm 波长下分别测定吸光度。然后根据公式:蛋白质(mg/mL)=(1.45×A₂₈₀-0.74×A₂₆₀)×稀释倍数,进行计算。

2 结果分析

2.1 不同外植体诱导愈伤组织优选试验结果

分别利用半夏块茎,叶柄,幼叶作为外植体,在固体培养基 MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 上诱导愈伤组织,均获得成功,但不同外植体,产生的诱导效果也不相同。块茎诱导形成的愈伤组织较为疏松,且诱导时间较短(图 1);叶柄诱导形成的愈伤组织也较为疏松,但诱导时间较长;而半夏叶片诱导形成的愈伤组织较为坚硬,且生长缓慢。另外,以半夏块茎为外植体,取材方便,价格便宜,因此实验选择半夏块茎作为外植体。

2.2 半夏块茎诱导愈伤组织正交试验结果

结果表明,不同的激素种类和不同浓度对比半夏愈伤组织的诱导有着明显的影响。表 1 中 *K* 值越大,则该因子在此浓度时的诱导效果越好;由表中生长率的 *R* 值分析可以看出,3 种激素对愈伤组织诱导的作用强度依次为:NAA>2,4-D>6-BA,但是 NAA 的优水平为 0 mg/L,说明 NAA 不利于诱导半夏愈伤组织,因此,2,4-D 对半夏愈伤组织诱导的效果最显著,其次为 6-BA。2,4-D 的 *K*₃ 均比 *K*₁、*K*₂ 大,说明较高浓度的 2,4-D 最适于愈伤组织的诱导。6-BA 的 *K*₂、*K*₃ 与 *K*₁ 差异较大,但 *K*₂、*K*₃ 之间相差较小,说明 6-BA 在 1.0~1.5 mg/L 最适于半夏愈伤组织的诱导(表 1)。

表 1 显示,愈伤组织的类型可分为两种:I 为疏松型,呈浅黄或白色,质地疏松易碎;II 为紧密型,呈黄或白色,结构致密,不易分散。不同的激素类型和对比愈伤组织的质地影响较大,愈伤组织在含有 2,4-D 的培养基上生长快、质地疏松,而 NAA 的诱导愈伤组织的效果较 2,4-D 差,且质地紧密(表 1)。生长素和细胞分裂素对保持愈伤组织的快速生长是必要的,特别是两者使用时,能更强烈地刺激愈伤组织的形成。

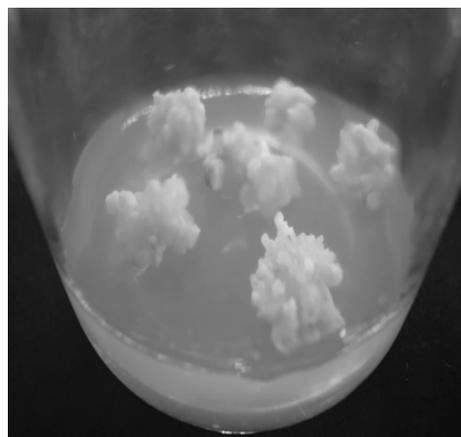


图 1 半夏块茎诱导形成的愈伤组织

表1 $L_9(3^3)$ 正交设计及实验结果

培养基编号	2,4-D/(mg/L)	6-BA/(mg/L)	NAA/(mg/L)	诱导率/%	质地	颜色
1	0.5	0.5	0.0	43.64	紧密	白色
2	0.5	1.0	0.5	21.54	较疏松	淡黄色
3	0.5	1.5	1.0	23.64	较疏松	淡黄色
4	1.0	0.5	0.5	12.00	紧密	淡黄色
5	1.0	1.0	1.0	34.55	紧密	黄色
6	1.0	1.5	0.0	26.15	较疏松	淡黄色
7	2.0	0.5	1.0	20.00	紧密	淡黄色
8	2.0	1.0	0.0	40.00	较蓬松	黄色
9	2.0	1.5	0.5	42.86	紧密	淡黄色
K_1	88.82	75.64	109.79			
K_2	72.7	96.09	76.4			
K_3	102.86	92.65	78.19			
k_1	29.44	25.21	36.60			
k_2	24.23	32.03	25.47			
k_3	34.29	30.88	26.06			
R	10.06	6.82	11.13			

注:诱导率=形成愈伤组织的外植体块数/接种外植体块数 $\times 100\%$

综上分析,MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 对半夏块茎愈伤组织的诱导效果最佳,诱导率高且质地疏松,适于悬浮培养。

2.3 疏松愈伤组织的继代培养

实验结果显示,NAA 对愈伤组织的增殖方面较2,4-D 效果好,但NAA 促进不定根的生长,适当降低NAA 浓度,则不定根明显减少。考虑到,2,4-D 有利于疏松愈伤组织的形成,NAA 有利于愈伤组织的增殖(表2)。综合分析,最终的继代培养基选为MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L。

2.4 悬浮细胞系的建立

继代3~5次后,观察悬浮培养状况(见图2、表3)。从表3可得③、⑤对半夏悬浮组织的增殖效果较好,且能在第2~3代得到较大的组织团块;①对半夏的悬浮培养效果较一般;②、④则可促进半夏愈伤组织生根,且继代的组织团块较分散、体积较小,有分化趋势。用各激素配比的悬浮细胞团块提取半夏蛋白,发现⑤的蛋白含量最高,为9.11%。



图2 半夏悬浮培养组织团块

表2 不同激素配比对半夏愈伤组织继代培养的影响

激素配比		生长情况
2,4-D	6-BA	
0.5	0.5	生长缓慢
1.0	0.5	大部分变黄
NAA	6-BA	
0.2	1.0	生长较好,大部分为白色,有较多不定根
0.1	1.0	生长较好,大部分为白色,不定根较少

表3 不同激素配比对半夏悬浮细胞培养的影响及其蛋白含量测定

	激素配比		生长情况	A_{280}	A_{260}	总蛋白含量/%
	6-BA	NAA				
①	0.6	0.1	一般	0.187	0.276	3.15
②	0.6	0.2	长根	0.096	0.120	3.37
③	0.5	0.1	良好	0.175	0.271	3.33
④	0.5	0.2	长根	0.120	0.210	1.16
⑤	0.4	0.1	良好	0.347	0.483	9.11

3 讨论

如何获得生长速度快、疏松型愈伤组织是建立半夏悬浮细胞株系的基础。在新鲜培养基上,愈伤组织可无限地进行细胞分裂,而维持其不分化的状态^[11]。一般选用颗粒细小、疏松易碎、外观湿润、鲜艳的白色或淡黄色的愈伤组织,比较疏松易碎,经过几次筛选、继代稳定后,可用于诱导形成悬浮细胞系。

本研究对三种植物组织进行比较,实验中发现半夏块茎和叶柄的愈伤组织诱导形态均较好,但叶柄诱导所需时间较长,考虑到半夏蛋白在块茎细胞中的含量要远高于叶柄中,以及后续试验所需,最终选定半夏块茎为最佳外植体。白雨等^[9]认为以生长率和生物碱为指标时,最佳外植体则为叶柄。半夏组织培养中,不同的激素类型和浓度对比对半夏愈伤组织的诱导有着明显的影响。本实验采用加有不同激素配比的MS培养基诱导半夏愈伤组织,按照正交试验法进行实验。结果显示,2,4-D与6-BA的组合对半夏愈伤组织的诱导效果最好。NAA不利于诱导愈伤组织,但是NAA在愈伤组织的继代培养中发挥重要作用,这与其他研究者的结果相近^[12-13]。综合2,4-D与NAA的不同作用,将6-BA、2,4-D、NAA的组合对愈伤组织进行增殖,效果显著。较高浓度的NAA不利于愈伤组织的增殖。因此选择较低浓度的NAA和6-BA组合,对半夏疏松愈伤组织进行悬浮培养,不仅组织长势良好,而且半夏蛋白含量较高。

参考文献:

- [1] 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]. 上海医科大学学报, 1999, 26(6): 455-458.
- [2] 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, 1998, 19(3): 141-143.
- [3] 王明艳. 不同粒径半夏抗肿瘤复方对人食道癌 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.
- [4] 张科卫,吴皓,沈绣红. 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.
- [5] 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的影响[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(1): 51-58.
- [6] 中国医学科学院药物研究所. 中药志:第2册[M]. 北京:人民卫生出版社, 1993: 38.
- [7] 夏海武,赵月玲,战克勤,等. 半夏组织培养研究[J]. 中国中药杂志, 1994, 11(12): 720-721.
- [8] 贾永芳,侯玉杰. 三叶半夏细胞悬浮培养和植株再生的研究[J]. 河南师范大学学报:自然科学版, 2004, 32(4): 141-143.
- [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] Xue J P, Zhang A M, Ge H L, et al. Technique on artificial seeds of *Pinellia ternata*[J]. *Zhongguo Zhongyao zazhi*, 2004, 29(5): 402-405.
- [11] 巩振辉,申书兴. 植物组织培养[M]. 北京:化学工业出版社, 2007: 66.
- [12] 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, 1998, 1(11): 86-89.
- [13] 武宗信,解红娥,赫建平. 半夏快速繁殖研究[J]. 山西大学学报, 2005, 28(3): 315-317.

Loose Callus Induction and Screening of Cell Suspension Lines with High Pinellin from *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit

ZHANG Wei-biao, WANG Zi-yun¹, ZHANG Ying-ying¹, TIAN Hui², JIN Xiao-feng, XU Tao¹

(1. School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2. Hangzhou Vocational and Technical College, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Screening of cell suspension lines with high pinellin from *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit Tuber. Screening of the best explant from three plant tissues which are tuber, petiole, leaf of *Pinellia ternata*. For the best explant, analysing the optimal conditions of tissue culture and subculture by orthogonal experiment. Establishing cell suspension lines with pinellin, and screening of high-yielding strain by single-factor method. The results show that the best explant which induces the callus is the tuber of *Pinellia ternata*. The best medium of inducing the callus is that: MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L; The best medium of subculture is that: MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L; Cell suspension lines with high pinellin is that: MS+6-BA 0.4 mg/L+NAA 0.1 mg/L, which can grow well and produce more pinellin.

Key words: *Pinellia ternata*; explant; callus; suspension culture; pinellin

(责任编辑:许惠儿)