

朱砂根愈伤组织分化根的研究

邓素芳^{1,2}, 杨 旻¹, 赖钟雄¹

(¹福建农林大学园艺植物生物工程研究所, 福州 350002; ²福建省农业科学院农业生态研究所, 福州 350013)

摘要:为了研究朱砂根愈伤组织分化根的能力, 寻求高频率再生根的新途径, 将不同类型的愈伤组织用于根分化的研究, 并制成石蜡切片进行细胞学观察, 比较不同类型愈伤组织分化根的能力和不同培养基及光照条件对根分化的影响。分化试验和细胞学观察结果均表明: 淡黄色颗粒状和绿色块状愈伤组织较易分化根。以降低无机盐浓度的1/2MS为基本培养基的培养基中根分化率最高, 而且不添加任何激素, 附加3%蔗糖就可以使淡黄色颗粒状愈伤组织分化丛状根, 弱光有利于愈伤组织根的分化。

关键词:朱砂根; 愈伤组织; 分化; 石蜡切片

中图分类号: Q943

文献标志码: A

文章编号: 2009-2207

A study on Root differentiation from callus in *Ardisia crenata*

Deng Sufang^{1,2}, Yang Yang¹, Lai Zhongxiong¹

(¹Institute of Horticultural biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002;

²Agricultural Ecology Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013)

Abstract: In order to investigate the root differentiation capability of *Ardisia crenata* callus, seek a new way of high frequency of root regeneration, different types callus of *Ardisia crenata* were used in root differentiation test and made into paraffin sections for cytology observation to compare their capabilities of root differentiation and analyze the effects of different medium and light conditions on root differentiation. The results both showed that yellow granular callus and yellowish-green nubby callus can differentiate root easier than others. On the 1/2MS basic medium which mineral concentration halved, root differentiation rate was the highest. The weak light was beneficial to root differentiation.

Key words: *Ardisia crenata*; Callus; Differentiation; Paraffin sections

0 引言

朱砂根(*Ardisia crenata* Sims.), 紫金牛科紫金牛属常绿小灌木, 产于中国西藏东南部至台湾, 湖北至海南岛等地区^[1], 是传统的药用植物, 其根煎水服可治腹痛, 根、叶可祛风除湿、散瘀止痛、通经活络; 根中的矮地茶素有止咳平喘作用, 其60%乙醇提取物有较好抗生育、抗病毒作用, 也是医治咽喉肿痛、痢疾、肾炎及风湿性关节炎和跌打损伤的良药^[2-4]。国内外的研究都表明朱砂根的药用成分多集中分布在根上^[5-8], 而朱砂根的愈伤组织也有合成岩白菜素的能力^[9]。因此, 如果能利用离体培养的方法通过诱导朱砂根愈伤组织高频

率地再生根, 并用作次生物质生产的原料, 将具有可观的经济效益。而目前关于朱砂根愈伤组织分化方面的研究还未见报道, 鉴于此, 此试验以长期继代保持的朱砂根愈伤组织为材料, 对愈伤组织分化再生根做了初步研究, 以期朱砂根商业价值的开发和次生物质的生产提供科学依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于2007年在福建农林大学园艺植物生物工程研究所内进行, 以长期继代的四种不同类型的朱砂根愈伤组织(I——白色湿软状、II——白色冰砂状、

基金项目: 本研究得到国家科技支撑计划(2007BAD07B03)和武平县政府及林业局的资助。

第一作者简介: 邓素芳, 女, 1982年出生, 硕士。研究方向: 园林植物生物技术。通信地址: 350013 福建省福州市新店铺觉农业生态研究所, Tel: 0591-87595590, E-mail: d.sufang@163.com。

通讯作者: 赖钟雄, 男, 1966年出生, 博士, 研究员, 博士生导师。研究方向: 园艺植物生物技术与遗传资源。E-mail: Laizx01@163.com。

收稿日期: 2009-10-23, **修回日期:** 2009-10-28。

Ⅲ——淡黄色颗粒状、Ⅳ——黄绿色块状,详见图版1)为材料。

1.2 方法

1.2.1 不同类型愈伤组织分化根的效果及其细胞学观察

将四种不同类型的愈伤组织接种在以下12种培养基中,每种培养基接10瓶,每瓶接3团。接种后观察各种愈伤组织分化根的情况。

T1: MS+0.1 mg/L 2,4-D+5 mg/L KT+100 mg/L 肌醇+4%蔗糖+3%甘露醇+5%椰汁

T2: MS+0.1 mg/L 2,4-D+100 mg/L 肌醇+4%蔗糖+3%甘露醇

T3: MS+100 mg/L 肌醇+4%蔗糖+3%甘露醇+5%椰汁

T4: MS+100 mg/L 肌醇+3%蔗糖

T5: MSy+0.1 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L KT+4%蔗糖+3%甘露醇+5%椰汁

T6: MSy+0.1 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L KT+4%蔗糖+3%甘露醇+5%椰汁

T7: MSy+0.1 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L KT+4%蔗糖+3%甘露醇+5%椰汁

T8: MSy+0.1 mg/L 2,4-D+1 mg/L KT+4%蔗糖+3%甘露醇+5%椰汁

T9: 1/2MS+3%蔗糖

T10: 1/2MS+1 mg/L IBA+3%蔗糖

T11: 1/2MS+1 mg/L IBA+0.5 mg/L KT+3%蔗糖

T12: 1/2MS+1 mg/L IAA+3%蔗糖

其中,MSy: MS基本培养基中有机物含量加倍;1/2MS: MS基本培养基中大量元素含量减半。

同时,采用爱氏苏木精前染法^[10]将不同类型的愈伤组织制成石蜡切片进行细胞学观察。

1.2.2 不同光照强度对朱砂根愈伤组织根分化的影响

选取生长势强、无褐变的愈伤组织在遮光、弱光、1000 lx光照下进行培养,比较不同光照强度对愈伤组织根分化的影响。

1.3 培养条件

以上培养基在未标注的情况下均是添加6 g/L琼脂,pH调至5.8,培养温度(25±2)℃,弱光培养。

2 结果与分析

2.1 不同类型愈伤组织分化根的效果

选取生长势强、无褐变的4种不同类型朱砂根愈伤组织接种于T1~T12培养基中,进行分化培养,白色冰砂状和白色湿软状愈伤组织均未发现根的分化,在黄绿色块状愈伤组织上有少量根分化外,多数根都由淡黄色颗粒状愈伤组织分化而来。

2.2 不同类型愈伤组织的细胞结构比较

将各类型的愈伤组织制成石蜡切片进行细胞学观察比较,从图版1(图 I -IV)可以看出,各类型的愈伤组织细胞结构存在明显差异,而且随着各类型愈伤组织形成的顺序,细胞结构存在一定的渐近性:白色冰砂状愈伤组织的细胞分布最松散,没有固定的细胞形状,细胞壁多破碎;白色湿软状愈伤组织细胞也很分散,细胞形状仍不规则,但开始出现完整细胞壁的细胞;淡黄色颗粒状愈伤组织细胞分布变得更加紧密,细胞都具有完整的细胞壁,大部分细胞形状规则,细胞核清晰可见;黄绿色块状愈伤组织细胞分布紧实,细胞形状规则,细胞壁完整,细胞核较大,细胞质稠密。

细胞学观察的结果表明:有根分化的愈伤组织细胞分布紧实、胞质稠密、胞核较大、胞壁较厚,四种愈伤组织类型中,仅有淡黄色颗粒状与黄绿色块状愈伤组织的细胞结构接近或具有分化根细胞的结构,这与分化试验的结果一致。同时在已分化根的愈伤组织细胞结构图(图 V)上可以看出,根由愈伤组织的表层细胞分化而来,属于外起源。

2.3 基本培养基对愈伤组织分化根的影响

将淡黄色颗粒状愈伤组织分化根的结果,统计于表1中。从表1可以看出,在朱砂根愈伤组织的分化过程中都伴随着材料的褐变。在以MS为基本培养基的T1培养基中,能分化根的愈伤组织团数目最多,T2~T4培养基也都有根的分化,但分化率低,根数目少。

表1 不同培养基对朱砂根愈伤组织根分化的影响

培养基代号	基本培养基	接种数/块	发根愈伤数/块	愈伤褐变程度	根形态描述
T1	MS	30	10	++	根向上生长,根尖先为嫩白色,光照下转绿,木质化(见图VI-1)
T2	MS	30	2	+	根向上生长,黄色
T3	MS	30	4	++	根向上生长,绿色
T4	MS	30	2	++	根向上生长,黄绿色
T5	MSy	30	1	+	根向上生长,黄绿色
T6	MSy	30	2	+	根向上生长,黄色

续表 1

培养基代号	基本培养基	接种数/块	发根愈伤数/块	愈伤褐变程度	根形态描述
T7	MSy	30	2	+	根向上生长,黄色
T8	MSy	30	4	+	根向上生长,黄绿色
T9	1/2MS	30	8	+	向上生长的丛状根,黄绿色,多达每丛8根(见图VI-2)
T10	1/2MS	30	5	++	与自然生长的根一样向下生长,根尖白色(见图VI-3)
T11	1/2MS	30	4	++	根向上生长,绿色(见图VI-4)
T12	1/2MS	30	8	++	根向上生长,发根数为2~5根/块,初为白色,后木质化转黄,有的玻璃化(见图VI-5)

注:-:表示无褐变;+:表示轻度褐变;+:表示较严重褐变。



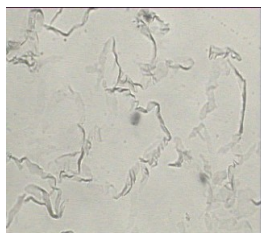
I-1 白色冰砂状愈伤组织



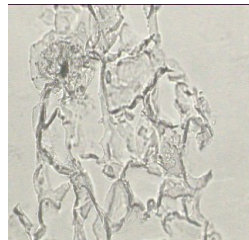
II-1 白色湿软状愈伤组织



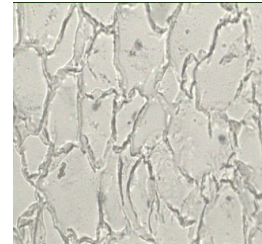
III-1 淡黄色颗粒状愈伤组织



I-2 白色冰砂状愈伤组织(×400)



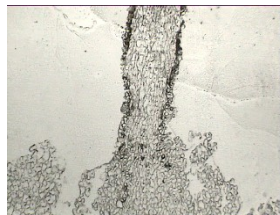
II-2 白色湿软状愈伤组织(×400)



III-2 淡黄色颗粒状愈伤组织(×400)



IV-1 黄绿色块状愈伤组织



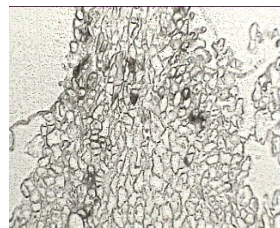
V-1 愈伤组织分化根(×40)



VI-1 T1培养基中分化的根



IV-2 黄绿色块状愈伤组织(×400)



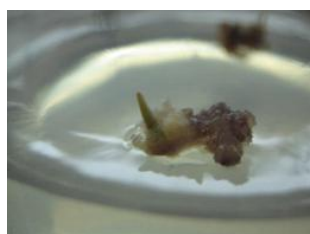
V-2 愈伤组织分化根(×100)



VI-2 T9培养基中分化的根



VI-3 T10培养基中分化的根



VI-4 T11培养基中分化的根



VI-5 愈伤组织分化的根

图版 1 不同类型朱砂根愈伤组织的细胞学观察

T1~T4培养基中根分化所需时间较长,通常需要2个月左右,同时必须在添加肌醇的条件下才有根的分化;将MS中的有机酸部分加倍后的MSy基本培养基,能使朱砂根愈伤组织转为鲜绿色,同时使愈伤组织变得紧实,而根的分化却很少;以降低了MS中无机盐浓度的1/2MS为基本培养基的T9~T11,不添加任何激素就可以使朱砂根愈伤组织分化丛状根,而添加不同激素诱导出的根形态不同,数量也不同。

2.4 不同光照强度对朱砂根愈伤组织根分化的影响

试验中将愈伤组织接种在T1培养基中,分别放在遮光、弱光和1000 lx光照下培养,观察愈伤组织根分化的情况,结果见表2。

表2 不同光照强度对朱砂根愈伤组织分化根的影响

光照	根分化情况	褐变程度
遮光	根数目少,透明玻璃化	+
弱光	根数目多,初期嫩白色,后慢慢转黄绿色	+
1000lx	根数目少,粗,木质化程度高,黄棕色	++

注:--表示无褐变;+表示轻度褐变;++表示较严重褐变。

从表2可以看出,光照强度不仅对根的发生量有影响,还对根的质地有影响。遮光培养条件下,愈伤组织分化根的能力不仅下降,而且分化出的根透明玻璃化;在每天1000 lx强度下光照12 h,愈伤组织分化根的能力也比弱光时下降了,而且由于光照的影响,根木质化程度高;而在弱光条件下,愈伤组织分化根的能力相对较高,发根率高,且为多根丛生,愈伤组织的褐变程度也相对较轻。因此,可以说,弱光较有利于朱砂根愈伤组织分化根。

3 讨论

3.1 愈伤组织的细胞结构与分化的关系

离体培养的植物细胞和组织可以由脱分化状态重新进行再分化,它包括细胞水平、组织水平和器官水平的再分化,而无论是组织水平的再分化,还是器官水平的再分化都必须通过细胞水平的再分化来实现。细胞水平的再分化中首先可见的是细胞壁变厚、假导管细胞的形成及酶水平的变化和明显的机能分化,从而形成各种类型的细胞。而器官水平的再分化,从解剖学角度来看,是外植体脱分化后形成一些分生细胞团,其细胞内充满稠密的原生质,细胞核显著增大,一段时间后,在器官纵轴上出现单向性,从而形成不同的器官原基。对朱砂根不同类型愈伤组织的细胞直接观察发现,从最初的白色冰砂状愈伤组织逐步发展到能够分化根的淡黄色颗粒状和黄绿色块状愈伤组织,在外部形态和内部结构上的变化都存在渐进性,表现为细胞分布从稀松到紧密,细胞核由小到大,细胞壁从破碎到完整,由薄到厚,细

胞形状从不规则到规则,内含物从稀薄到稠密等等。这些与细胞水平分化和器官水平分化的解剖学特征一致。对于朱砂根各种类型愈伤组织的解剖学观察,为我们了解朱砂根愈伤组织的形成和分化提供了直观资料,并为调控朱砂根愈伤组织的分化提供科学依据,至于如何调控朱砂根愈伤组织的分化,还有待于进一步研究。

3.2 朱砂根愈伤组织分化根的必要条件

综上所述,朱砂根愈伤组织的类型是分化根的关键。然而,合适的培养基和光照是分化根的必要条件。培养基中无机盐的浓度直接决定根分化速率的高低。而激素的添加与否以及添加激素的种类影响根发生的方式、形态和数目。光照强度的选择不仅影响着愈伤组织根的分化率,关键是影响了根的质量和形态。

试验中,愈伤组织分化根的频率仍然较低,这将直接影响其商业利用的价值高低。有研究表明,在不同外源生长素的培养基上生长出的烟草髓愈伤组织具有显著不同的分化根的潜力,如用2,4-D得到的脱分化组织似乎较NAA得到的更易分化根^[11],因此,朱砂根愈伤组织分化根的能力是否与愈伤组织的来源有关有待于进一步的研究。另外,如果能利用发根农杆菌Ri质粒载体基因成功转化朱砂根,高频率地产生大量的毛状根,对利用朱砂根再生根工厂化生产其有效药用物质岩白菜素具有重要意义。因此,提高愈伤组织分化根的频率是下一步研究的重点。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志[M].北京:科学出版社,1979,58:70
- [2] 丁惟培.抗生育植物药研究初报[J].武汉医学院计划生育研究所,1985:5.
- [3] 张清华.紫金牛属植物化学成分研究概况[J].华西药学杂志,1994,9(2):99-103.
- [4] 周大云.矮地茶镇咳祛痰作用的药理试验研究[J].基层中药杂志,1998,12(1):39-41.
- [5] 刘姝,李颖,郭济贤,等.中国紫金牛属的分类及其岩白菜素的含量[J].复旦学报(医学报),1993:20(1):49-53.
- [6] Kazuo Koike, Zhonghua Jia, Saori Ohura, et al. Minor Triterpenoid Saponins from *Ardisia crenata*[J].Chem. Pharm. Bull.,1999,47(3):434-435.
- [7] Zhang Y, Lai XR, Meng XL, et al. the HPLC assay OF Bergenin in medicinal plants in *Ardisia* AND resources exploitation [J]. China J Chin Mat Med, 1996, 21(8):458-460.
- [8] Piacente S, Pizzi C, De Tommasi N, et al. Constituents of *Ardisia Japonica* and their in vitro anti-HIV activity[J].J Nat Prod, 1996,59:565-569.
- [9] 彭光天,黄上志,黄仲立,等.朱砂根愈伤组织诱导及其岩白菜素含量的测定[J].热带亚热带植物学报,2004,12(1):51-56.
- [10] 孙敬三,钱迎倩.植物细胞学研究方法[M].北京:科学出版社,1987:69-71.
- [11] 朱青松,梅康凤,王沙生.外源生长素对烟草髓愈伤组织分化和内源IAA含量的影响[J].北京林业大学学报,1999,(1):28-31.