

## 巴戟天离体苗不定根发育的观察

林美珍<sup>1</sup>, 郑松<sup>2</sup>, 邓炜<sup>2</sup>, 田惠桥<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>漳州卫生职业学院药理学系, 福建漳州 363000; <sup>2</sup>厦门大学生命科学学院, 福建厦门 361005

**摘要:** 以巴戟天幼嫩种子中的胚为外植体进行组织培养诱导愈伤组织, 继而诱导分化出芽, 长成小苗。将小苗转入生根培养基中, 从茎基部诱导出不定根, 再生植株。对离体苗的不定根发育进行结构观察, 发现巴戟天组培苗的不定根是由形成层细胞先分裂分化形成根原基后发育而成的。

**关键词:** 巴戟天; 组织培养; 不定根

## Observation on the Development of *in vitro* Adventitious Roots of *Morinda officinalis* How.

LIN Mei-Zhen<sup>1</sup>, ZHENG Song<sup>2</sup>, DENG Wei<sup>2</sup>, TIAN Hui-Qiao<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, Zhangzhou Health Vocational College, Zhangzhou, Fujian 363000, China; <sup>2</sup>School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China

**Abstract:** Callus was induced from immature embryo of *Morinda officinalis* and then buds were induced from the callus. When the buds grew up, the stems were transplanted in a rooting medium to induce adventitious roots. The generation and the growth of adventitious roots were observed with paraffin method. The *in vitro* adventitious roots came from the cambial cells in culture.

**Key words:** *Morinda officinalis*; tissue culture; adventitious root

巴戟天是茜草科(Rubiaceae)巴戟天属多年生攀援性木质藤本, 别名巴戟、巴吉、鸡肠风, 以肉质根入药, 和槟榔、益智、砂仁并称为我国四大南药, 具有补肾壮阳、强筋骨、祛风湿、增强免疫系统、抗衰老和抗肿瘤等功效(中华人民共和国药典委员会 2010)。巴戟天现已人工大面积种植, 主要采用扦插繁殖和种子繁殖, 以产生根多、根粗、成活率高为佳(林美珍和陈伟绩 2009)。对巴戟天组织培养的研究目前仅有以芽为外植体诱导再生植株的报道(吴昭平等 1985; 黄宁珍等 2007)。不同的植物由于内部结构的差异, 再生苗离体根发生的方式不同。本研究以巴戟天幼胚为外植体, 诱导愈伤组织, 再分化出苗和根, 建立巴戟天的离体实验体系。在此基础上, 对巴戟天组培苗不定根的发育进行显微观察, 探索巴戟天不定根的发生和发育规律, 为巴戟天的无性繁殖提供理论依据。

### 材料与方法

实验材料取自福建省漳州南靖县聚善堂中药材基地种植的巴戟天(*Morinda officinalis* How.)幼嫩种子中的胚。8月中旬摘取巴戟天幼嫩的果实,

先用自来水冲洗5 min, 再用洗衣粉水轻洗果实, 然后再用自来水冲洗3次。洗干净的果实在超净台上用70%酒精消毒30~60 s, 0.1% HgCl<sub>2</sub>浸泡10~15 min, 无菌水冲洗5次。将灭菌的果实放在无菌滤纸上, 吸干水分后, 用无菌解剖刀切开果实, 挑出杆状的幼胚。通常1个果实中含有4个幼胚。将幼胚接种到含不同浓度2,4-D和6-BA的MS愈伤组织诱导培养基中, 暗培养4~6周。将长出的愈伤组织转移到含不同浓度6-BA和NAA的MS分化培养基中光照培养。6~8周后, 愈伤组织分化出芽。将1~3 cm的茎苗转入到含1/2MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA的生根培养基中光照培养。外植体接种数均为50个。上述培养基均加30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖、6.5 g·L<sup>-1</sup>琼脂粉, pH 5.8; 培养温度为(25±1) °C, 每天光照16 h, 光强为30 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>。

茎苗在生根培养基中生长3 d后每隔1 d取样

收稿 2010-02-02 修定 2010-04-13

资助 福建省卫生厅医学创新课题(09-CXB-43)和福建省漳州市科技局课题(Z2008038)。

\* 通讯作者(E-mail: hqtian@xmu.edu.cn; Tel: 0592-2186486)。

1次, 剪取0.5~0.7 cm茎段, 放入卡诺固定液中固定24 h, 用80%和60%酒精各换洗1次, 之后用爱氏苏木精染色3 d。染色后的茎段先用蒸馏水冲洗1 d, 再用自来水换洗1 d, 然后脱水和石蜡包埋。包埋茎段切成10  $\mu\text{m}$ 的切片, 脱蜡后封片, 用Leica-DML显微镜观察并照相。

## 结果与讨论

### 1 巴戟天愈伤组织诱导

用幼胚为外植体有其优点: 第一, 幼胚在果皮的包被下处于无菌状态; 第二, 消毒液只对果实进行消毒, 对幼胚基本没有伤害; 第三, 由幼胚产生的愈伤组织较容易分化出苗。

若将幼胚接种在含0.2~3.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA的培养基上进行光照培养, 4周后, 幼胚都可发育成再生苗, 再生率达到100%。其中在1.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA+0.2  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA的培养基中, 可长出3~5个健壮的再生苗, 若培养时间延长, 还可以分化出更多的新生苗。

若将幼胚接种在含有2,4-D的培养基上进行暗培养(图1-A), 4~6周后部分幼胚长出黄色的愈伤组织(图1-B), 其中在附加2.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D和0.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA的培养基中愈伤组织的诱导率最高, 达74%。过高或过低2,4-D都会降低愈伤组织的诱导率。在含2,4-D的基础上, 加入低浓度的6-BA可使愈伤组织的诱导率提高。而不含2,4-D的培养基则无法诱导出愈伤组织(表1)。

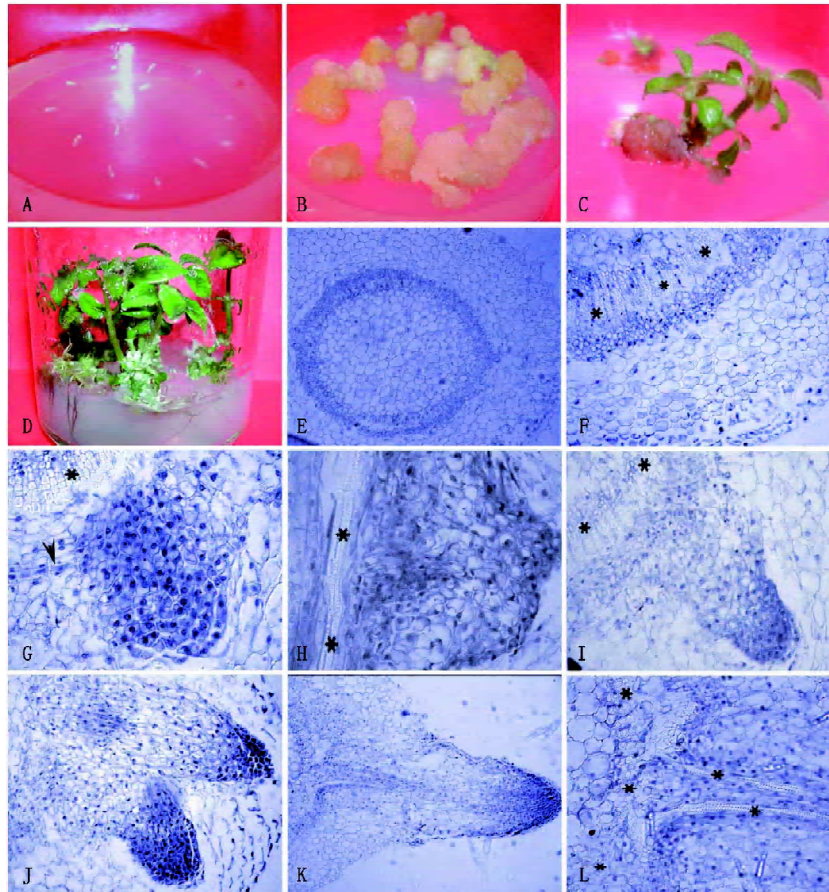


图1 巴戟天离体不定根的发生

Fig.1 Development of *in vitro* adventitious roots of *Morinda officinalis*

A: 刚接种的巴戟天幼胚; B: 以幼胚为外植体诱导产生的愈伤组织; C: 愈伤组织分化出茎苗; D: 茎苗再生出不定根; E: 组培苗茎段横切解剖结构, 在皮层和髓之间有一环形维管组织,  $\times 70$ ; F: 环状维管束的内部为较厚细胞壁的木质部, 外部为韧皮部(星印处为木质部),  $\times 140$ ; G: 茎苗培养3 d时的不定根原基(箭头示形成层; 星印处为木质部),  $\times 280$ ; H: 茎段的纵切, 示根原基的基部为茎的导管(星印处),  $\times 280$ ; I: 较大不定根原基的顶端仍保持分生细胞状态, 基部的细胞逐渐分化(星印处为茎木质部),  $\times 140$ ; J: 同一部位形成2个不定根原基,  $\times 140$ ; K: 不定根突出皮层和表皮,  $\times 70$ ; L: 不定根内部已分化出的维管组织与茎维管组织相连, 左边竖向排列的3个星印为茎木质部, 右边2个星印为不定根的导管,  $\times 280$ 。

## 2 巴戟天愈伤组织的分化

将在含有  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA 的 MS 培养基中诱导的愈伤组织转到只含 6-BA 的培养基上进行光照培养, 诱导愈伤组织分化。6~8 周后, 部分愈伤组织分化出芽(图 1-C)。其中附加  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA 的培养基中愈伤组织的分化率最高, 达 34.4%。过高或过低的 6-BA 都会降低愈伤组织的分化率。在培养基中添加 NAA 后, 诱导的效果反而下降; 而不含 6-BA 的培养基则无法诱导愈伤组织分化(表 2)。

## 3 巴戟天生根与移栽

将 1~3 cm 的巴戟天组培苗转移到含  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA 的 1/2MS 生根培养基中培养, 接种 10 d 后, 从幼苗基部长出白色的不定根, 继而长成完整的根系(图 1-D)。巴戟天组培苗比较容易生根, 生根率可达 95% 以上。每苗生根 3~7 条。当不定根长到 3~5 cm, 打开瓶盖, 室温炼苗 1 周, 取出试管苗, 洗净其根部培养基, 移栽到蛭石混合土中, 再生植株很容易成活。

## 4 巴戟天组培苗茎的横切面结构

取巴戟天组培苗的嫩茎做石蜡切片, 观察其组

织结构, 从外到内分别是表皮、皮层、韧皮部、木质部和髓。表皮由一层近长方体细胞组成, 细胞相对较小, 扁平, 排列整齐而紧密, 表皮细胞向外突起形成表皮毛。皮层由多层类球状的薄壁细胞构成, 细胞向心方向的体积逐渐增大, 排列疏松而不规则。皮层薄壁细胞细胞质较稀。维管组织中的韧皮部和木质部区分不明显。髓占茎横切面较大的比例, 细胞形态与皮层细胞相似。巴戟天组培苗的茎中维管组织在横切面上呈环状, 难以区分出髓射线结构, 也没有根原基(图 1-E)。放大后可看到, 细胞壁较厚的导管分布在维管组织的内侧, 体积小, 细胞质浓的韧皮部细胞分布在维管组织的外侧(图 1-F)。

## 5 巴戟天不定根的发生

将接种在生根培养基上 3 d 的茎基部做横切片观察, 可看到不定根原基已在茎的形成层处形成。这些根原基细胞进行平周分裂和垂周分裂, 形成一个分生细胞团。这些细胞与周围的薄壁细胞相比, 细胞呈等径多边形, 细胞较小, 细胞核大, 细胞质浓, 排列紧密并向皮层组织突起, 形成根原基轮廓

表 1 植物生长调节剂对愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effect of plant growth regulators on the callus induction

| 培养基成分   | 愈伤组织数 / 个 | 诱导率 / % |
|---|-----------|---------|
| MS  | 0         | 0       |
| MS+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D  | 10        | 20      |
| MS+ $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D  | 26        | 52      |
| MS+ $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D  | 31        | 62      |
| MS+ $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA | 35        | 70      |
| MS+ $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA | 37        | 74      |
| MS+ $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D  | 24        | 48      |

表 2 植物生长调节剂对愈伤组织分化的影响

Table 2 Effect of plant growth regulators on the callus differentiation

| 培养基成分   | 愈伤组织数 / 个 | 茎苗数 / 个 | 分化率 / % |
|---|-----------|---------|---------|
| MS  | 30        | 0       | 0       |
| MS+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA   | 30        | 5       | 16.7    |
| MS+ $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA   | 32        | 11      | 34.4    |
| MS+ $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA | 32        | 9       | 28.1    |
| MS+ $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA | 32        | 6       | 18.8    |
| MS+ $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA   | 31        | 8       | 25.8    |
| MS+ $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA   | 30        | 6       | 20.0    |
| MS+ $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA   | 21        | 2       | 9.5     |

(图1-G)。在根原基的基部,是几层扁平细胞。从茎的纵切面上可看到不定根原基止于导管处(图1-H)。由此推测,巴戟天组培苗的不定根发生于形成层细胞。

## 6 巴戟天不定根的发育

不定根原基细胞继续分裂,根的细胞数目和体积不断增加,根尖一边伸入皮层一边开始分化:最前端的一系列细胞成为根冠细胞,包围根尖分生区;其后为分生区,该部位的细胞具有典型的分生组织细胞学特征,是不定根的生长点;中后部的细胞质变淡,染色较浅,细胞体积较大,沿根原基纵轴方向延长。这些细胞将逐渐分化出维管组织并与茎中的维管组织相连(图1-I)。有时,在茎的同一个部位可形成2个大小类似的根原基(图1-J)。随着不定根原基继续伸长,最后突破茎的皮层和表皮(图1-K)。此后,不定根内部的组织分化更加明显:根原基前部细胞继续分裂,形成生长点和根冠;中部细胞的体积扩大,细胞沿根原基长轴方向伸长,逐渐形成伸长区;不定根基部细胞分化出维管分子,中央出现导管(主要为螺旋导管和环纹导管)并与母体维管系统的导管相连(图1-L)。因此,在不定根突出皮层和表皮时,其内部的维管组织已和与茎中的维管系统连通。

以巴戟天带芽茎段为外植体的组织培养已有报道(吴昭平等1985;黄宁珍等2007)。但这种组织培养结果只能达到快速繁殖的目的。另外,从野外采集的茎段外植体,其表面有茸毛,易附着菌类和病毒,不易彻底消毒,外质体的染菌率高。通过诱导愈伤组织、再生植株的实验技术可为进一步的基因工程和细胞工程研究奠定基础,也可通过愈伤组织培养过程消除病毒,获得无病毒苗。以巴戟天种子的幼胚为外植体,由于其被果皮包裹,易消毒,因而染菌率低。另外,幼胚基本为分生组织,细胞的分生能力强,诱导愈伤组织较容易。而由幼胚产生的愈伤组织也比较容易分化。因此幼胚是巴戟天进行组织培养较好的外质体。

除了外植体外,植物激素和生长调节剂也是影响巴戟天愈伤组织诱导、分化及植株再生的主要因素。在无植物激素的MS培养基上,不能从幼胚诱导出愈伤组织。一定浓度的2,4-D能促进巴戟

天幼胚产生愈伤组织,以 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D+MS效果较好(表1)。6-BA能有效诱导巴戟天愈伤组织的分化,以 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA+MS最为适合。附加NAA反而显示抑制了愈伤组织的分化(表2)。

不定根原基按其形成时间分为潜伏根原基和诱导根原基。潜伏根原基是在植株发育早期产生,然后处于休眠状态,直到在适宜环境条件下才继续发育形成不定根;诱导根原基是在外植体接种到生根培养基后才形成的根原基。在我们的试验中,没有发现潜伏的根原基,说明巴戟天不定根属于诱导根原基型。植物不定根发生的部位较复杂,维管射线细胞、韧皮薄壁细胞、形成层细胞、皮层细胞、髓射线细胞等均可能形成不定根(Ginzburg 1967;王清民等2006;李校雨等2009)。巴戟天属多年生的藤本植物,其内部结构比较特殊,维管组织没有束状结构,而呈环状,木质部在内侧,韧皮部在外侧。通过木质部和韧皮部之间形成层细胞的有限分裂使茎缓慢加粗生长(林美珍和陈伟绩2009)。在本试验中,由巴戟天离体茎很容易形成不定根。通过切片发现:在培养3 d时就有不定根原基产生,其发生可能源于形成层细胞。另外,有2个不定根原基紧密相挨,一并生长的现象,也说明巴戟天组培苗的根原基很可能起源于形成层细胞,属于不定点发生。巴戟天组培苗容易产生不定根与巴戟天茎中具有形成层的特征有关,形成层细胞的分化程度低,在培养诱导条件下容易恢复分生能力形成根原基。因此,巴戟天组培苗的不定根发生早,频率高与其特殊结构密切相关。

## 参考文献

- 中华人民共和国药典委员会(2010). 中华人民共和国药典(一部). 北京: 中国医药科技出版社, 75~76
- 黄宁珍, 付传明, 赵志国, 唐凤鸾, 李锋(2007). 巴戟天组织培养和快速繁殖研究. 广西植物, 27 (1): 127~131
- 李校雨, 吕成群, 黄宝灵, 吴庆梅, 张明环(2009). 马尾松组培苗不定根诱导及不定根解剖观察. 西北林学院学报, 24 (3): 80~84
- 林美珍, 陈伟绩(2009). 巴戟天的生物学特性和繁殖方式对其品质的影响. 亚热带农业研究, 5 (1): 22~25
- 王清民, 彭伟秀, 吕保聚, 裴东(2006). 核桃试管不定根的组织学研究. 西北植物学报, 26 (4): 719~724
- 吴昭平, 黄子复, 卢丽芬(1985). 巴戟天芽体培养. 植物生理学通讯, (3): 31~32
- Ginzburg C (1967). Organization of the adventitious root apex in *Tamarix aphylla*. Am J Bot, 54: 4~8