

一种简易的研究寄主中国柽柳刺激管花肉苁蓉种子萌发的技术

马东明 杨太新 翟志席 郭玉海*

中国农业大学农学与生物技术学院, 北京100094

A Simple Technique for Study on Host *Tamarix chinensis* Lour Stimulating Seed Germination of *Cistanche tubulosa* (Schenk) R. Wight

MA Dong-Ming, YANG Tai-Xin, ZHAI Zhi-Xi, GUO Yu-Hai*

College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China

提要 以组织培养方式建立了寄主中国柽柳的离体快速繁殖体系。用溶有 200 mg·L⁻¹ 亚甲基蓝指示剂的 MS 培养基研究指示剂与寄主试管苗根分泌物反应的显示, 亚甲基蓝在有寄主根生成的培养基中褪色, 而在未生根的培养基中仍为蓝色, 说明管花肉苁蓉的种子萌发刺激物质为还原性的氢醌类物质。

关键词 管花肉苁蓉; 萌发刺激物质; 亚甲基蓝

许多寄生植物的种子在适宜的温度、水分和充足的氧气条件下往往还不能萌发, 常需要有来自寄主植物的萌发刺激物质才能萌发^[1]。近些年来, 人们对一些寄生植物与寄主相互关系的研究较为深入, 陆续从寄主植物中分离鉴定出独角金醇^[2]、GR₂₄^[3]、SXSg^[4]、高粱内脂类化合物(sorgoleone^[5]和sorgolactone^[6])等刺激种子萌发的物质, 这些物质常常是倍半萜烯化合物或者氧化还原态的氢醌。刺激管花肉苁蓉[*Cistanche tubulosa* (Schenk) R. Wight]这种寄生植物种子萌发的物质还未见报道。

自然条件下, 寄主中国柽柳(*Tamarix chinensis* Lour)根系分泌的刺激管花肉苁蓉种子萌发的物质浓度很低, 加上土壤中复杂的成分和土壤微生物的干扰, 致使其难以提取、分离和鉴定。在无菌离体培养条件下得到的寄主中国柽柳试管苗, 其根系分泌物能够排除田间复杂条件的影响, 因而确定刺激种子萌发的物质可以容易些。本文以组织培养方法获得的生根寄主为实验对象, 以亚甲基蓝为指示剂, 通过寄主离体生成的根系分泌物和亚甲基蓝之间是否发生变色反应来确定刺激管花肉苁蓉种子萌发的物质。

材料与amp;方法

1 材料

管花肉苁蓉[*Cistanche tubulosa* (Schenk) R. Wight]种子来源于新疆于田种植场, 由中国科学

院新疆生物土壤沙漠研究所刘铭庭先生提供, 采收年份为2002年。管花肉苁蓉的寄主——中国柽柳(*Tamarix chinensis* Lour)来自本校科学园温室。亚甲基蓝指示剂(分析纯)购自北京化学试剂公司。

2 原理

根据碱性染料亚甲基蓝(methylene blue)作为氧化剂能与寄主根的浸出物以一定化学计量发生还原反应, 蓝色的亚甲基蓝染料接受一分子氢被还原成无色的亚甲基白的原理, 从亚甲基蓝的颜色变化确定柽柳根的分泌物是否含有还原性的刺激种子萌发的物质SXSg^[4]。

3 方法

以柽柳的幼嫩枝条为外植体, 经过起始培养、增殖培养和生根诱导建立柽柳的离体快速繁殖体系。

3.1 亚甲基蓝对柽柳根分泌物的反应 把经过MS培养基起始培养7 d后的柽柳分成两部分: 一部分柽柳茎段转入加有200 mg·L⁻¹的亚甲基蓝的MS培养基中; 另一部分柽柳茎段则转入1/2MS生根培养基中(加200 mg·L⁻¹的亚甲基蓝)。柽柳的生根和培养基的褪色情况每天观察1次。

收稿 2005-03-07 修定 2005-08-03

资助 国家“十五”科技攻关项目(2001BA70)、国家“十五”科技攻关重大项目(2002BA517402)、河北省科技攻关项目(03276408D-4)。

*通讯作者(E-mail: jzjysh@cau.edu.cn, Tel: 010-62732556)。

3.2 管花肉苁蓉种子与生根柎柳的共培养 把生根的柎柳倾斜 45° 转入到盛有 MS 培养基的培养皿中, 然后把去种皮的种子接种于柎柳试管苗的根周围。用铝薄纸包裹培养皿尽量使有种子的一部分保持黑暗, 并使少量漫射光得以进入来维持绿色茎叶的生长。培养皿置于 (25±2) °C 条件下培养, 定期用 OLYMPUS SZH10 型体视显微镜观察种子萌发和接种于寄主根的情况, 记录并照相。

结果与讨论

1 亚甲基蓝对寄主根分泌物的反应

起初溶有亚甲基蓝 (200 mg·L⁻¹) 的 MS 和 1/2MS 培养基都呈蓝色, 当把起始培养基中的柎柳茎段转入上述 2 种培养基后, 两者经过一段时间后发生明显不同的变化(表 1)。在 MS 培养基(对照)中的柎柳茎段没有根发生, 培养基的颜色自始至终呈蓝色(图1-a); 在 1/2MS 培养基中的柎柳经过 9 d 开始生根, 随着根的生长、根量增多、次级根的发生, 第 12 天培养基的蓝色开始变淡, 第 16 天原来呈蓝色的培养基几乎变成了白色(图 1-b)。另外, 1/2MS 培养基中生长的柎柳在同一三角瓶中由于根的分化与生长, 固体培养基从中裂开, 分成两个部分, 其中没有生根的部分仍然保持蓝色; 而另一部分培养基中的柎柳茎段则有根生成, 并且培养基的颜色从蓝色消退为白色(图 2)。这种褪色反应说明寄主根能分泌一种与亚甲基蓝氧化剂起氧化还原反应的还原性物质, 它能促使亚甲基蓝接受一分子氢而还原成无色的亚甲基白。

据此, 可以确定刺激管花肉苁蓉种子萌发的物质乃是一种氧化还原态的氢醌。

2 共培养下的管花肉苁蓉种子萌发和接种

管花肉苁蓉种子与柎柳试管苗的共培养方式见图 3。从表 2 可以看出, 有试管苗的培养基中的种子萌发率达 31.6%, 而无试管苗培养基中种子的萌发率仅有 5.5%。这说明柎柳的根确实分泌某种刺激萌发物质作用于管花肉苁蓉, 因而种子萌发率显著提高。这种现象与大多数寄生植物的特性相符。生根的柎柳与管花肉苁蓉种子共培养过程中, 有约 8.3% 的种子最终分化出初生吸器的固定器官, 并能与寄主的根建立寄生关系(图 4)。

共培养下管花肉苁蓉种子萌发率显著提高, 说明寄主根确实分泌一种萌发刺激物质。同时也说明管花肉苁蓉种子有一般寄生植物种子所共有的特点, 即需要寄主植物新生毛细根尖释放出某种化学物质, 刺激种胚细胞分裂, 进而促进种子萌发。另外, 处于柎柳次级根附近的种子萌发率比主根附近的萌发率高, 说明刺激种子萌发的物质是从分化的次级根分泌出来的。因此, 在人工种植管花肉苁蓉时, 应采取适当措施以促进寄主柎柳多分根, 这样, 次级根可以较好地发育; 人工接种过程中应将种子放近新生的次级根根尖附近, 这样, 种子的萌发率和接种率才会提高。

没有寄主根萌发刺激物质也未添加任何植物生长调节物质的情况下, 管花肉苁蓉有很少一部分种子萌发, 但萌发的种子不能发育成寄生植物本身特有的有功能的吸器, 最终这部分萌发的种

表 1 MS 和 1/2MS 培养基中柎柳的生根与亚甲基蓝褪色

培养基类型	接种的外植体数/个	生根的外植体数/个	生根率/%	开始生根时间/d	培养基开始褪色时间/d	培养基完全褪色	
						时间/d	颜色
MS(对照)	20	i ^a i i	i ^a	i ^a	i ^a	i ^a	蓝色
1/2MS	20	17	85.0	9	12	16	无色

表 2 共培养下的管花肉苁蓉种子萌发和接种

处理	接种的种子数/个	萌发种子数/个	萌发率/%	与寄主建立寄生关系的种子数/个	接种率/%
对照	180	10	5.5	i ^a	i ^a
试管苗	180	57	31.6	15	8.3

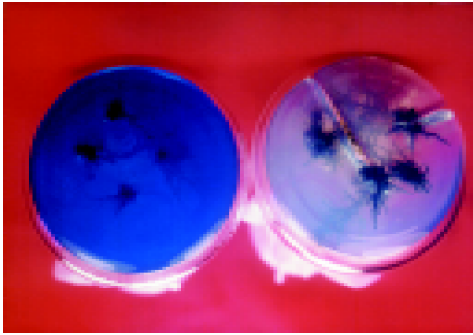


图1 柛柳对亚甲基蓝的反应

左: MS 培养基中未生根的柛柳; 右: 1/2MS 培养基中生根柛柳。

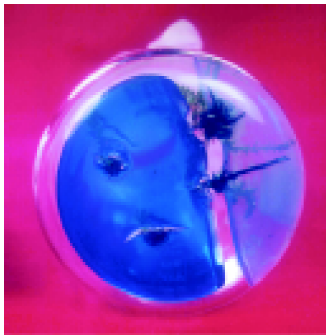


图2 1/2MS培养基中生根部分和未生根部分与亚甲基蓝的反应

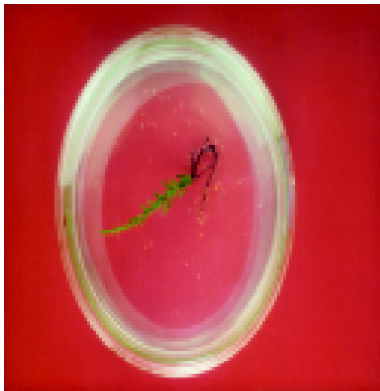


图3 生根的柛柳与管花肉苁蓉种子的共培养

子分化成松软、疏松的愈伤组织。而共培养下的管花肉苁蓉种子萌发后则可继续发育出有功能的吸器并与寄主建立起寄生关系。一般认为, 寄生植物除了种子萌发需要来自寄主植物的萌发刺激物质之外, 大部分寄生植物对寄主植物的识别, 还需要寄主植物释放的次生物质作为另一种化学信号, 才能发育成功能性的吸器, 这一化学信号通常称

图4 管花肉苁蓉种子与寄主柛柳建立的寄生关系($\times 25$)

为吸器诱导因子(haustorium induce factor, HIF)或称异源识别分子(xenogostic molecule)。Wrobel和Yoder^[8]将HIF从分子结构上划分为苯酚化合物(phenolic compound)、苯醌(quinone)、类黄酮(flavonoid)和细胞分裂素(cytokinin)4类。本文结果中能够刺激管花肉苁蓉种子发育为有功能的吸器的物质属于上述哪一种, 还有待进一步研究。

参考文献

- 1 Chang M, Lynn DG. The haustorium and the chemistry of host recognition in parasitic angiosperms. *J Chem Ecol*, 1986, 12(2): 561~579
- 2 Cook CE, Whichard LP, Tumer B et al. Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour) isolation and properties of a potent stimulant. *Science*, 1966, 154: 1189~1190
- 3 Johnson AW, Roseberry G, Parker C. A novel approach to *Striga* and *Orbanche* control using synthetic germination stimulants. *Weed Res*, 1976, 16: 223~227
- 4 Netzly DH, Buter LG. Roots of sorghum exude hydrophobic droplets containing biologically active components. *Crop Sci*, 1986, 26: 775~778
- 5 Chang M, Netzly DH, Butler LG et al. Chemical regulation of distance, characterization of the first natural host germination stimulant for *Striga asiatica*. *J Am Chem Soc*, 1986, 108: 7858~7860
- 6 Hauck C, Muller S, Schuldnecht H. A germination stimulant for parasitic flowering plants from *Sorghum bicolor*, a genuine host plants. *J Plant Physiol*, 1992, 193: 474~478
- 7 Fate GD, Chang M, Lynn DG. Control of germination in *Striga asiatica*: chemistry of spatial definition. *Plant Physiol*, 1990, 93: 201~207
- 8 Wrobel RL, Yoder JJ. Differential RNA expression of (α)-expansin gene family members in the parasitic angiosperm *Triphysaria versicolor* (Scrophulariaceae). *Gene*, 2001, 266(1~2): 85~93