

南美蟛蜞菊毛状根的离体培养及其 提取液对种子萌发的影响

欧少云^{1,2} 施和平^{1*} 王云灵¹ 龙拥跃¹

(¹华南师范大学生命科学学院 广东省植物发育生物工程重点实验室 广州 510631)

(²广东省清远职业技术学院 清远 511510)

摘要 采用溶液培养法研究培养基的碳源、氮源和无机磷浓度对南美蟛蜞菊 (*Wedelia trilobata*) 毛状根生长以及其提取物对水稻、鬼针草、马唐种子萌发的影响。结果表明,当培养基含糖量小于5%时,以葡萄糖为碳源促进南美蟛蜞菊毛状根生长的效果最好,蔗糖次之;而大于5%时仅麦芽糖仍能促进其生长,而当麦芽糖浓度大于7%时,其生长也逐渐被抑制。培养基中添加NO₃⁻-N (263.1 μg/mL) 和NH₄⁺-N (577.2 μg/mL) 组合时,或无机磷含量为MS培养基无机磷用量的2~3倍时对毛状根生长的促进效果最佳;培养基缺Ca²⁺时,毛状根变得纤细,分枝多,生长旺盛;但随着培养基Ca²⁺浓度的增加,其生长受到抑制。毛状根的乙醇提取液比水提取液对水稻 (*Oryza sativa* L.)、鬼针草 (*Bidens pilosa* L.)、马唐 (Common crabgrass herb) 种子的萌发抑制作用强,其水提取液处理的水稻、鬼针草、马唐种子的萌发率分别是84%、93%、20%,而乙醇提取液处理的马唐种子萌发率只有3%,水稻和鬼针草种子则完全不萌发。与野生根的乙醇提取液相比,毛状根的乙醇提取液对水稻、鬼针草、马唐种子的萌发抑制作用更强。暗培养毛状根的乙醇提取液对水稻、鬼针草、马唐种子萌发的抑制作用要比光照培养的毛状根乙醇提取液的抑制作用强,光照培养的毛状根乙醇提取液处理的水稻、鬼针草、马唐种子的萌发率分别是28.7%、3.9%、18.7%,暗培养毛状根的乙醇提取液处理的水稻、马唐种子萌发率只有4%和1%,鬼针草则完全不萌发。本实验为今后规模培养南美蟛蜞菊毛状根选择合适的培养条件及将南美蟛蜞菊毛状根中的次生代谢产物应用于农业生产奠定了实验与技术基础。图9 表1 参19

关键词 南美蟛蜞菊;毛状根;浸提液;它感作用;种子萌发

CLC Q949.783.505 : Q946.8

In vitro Culture of *Wedelia trilobata* Hairy Roots and Effect of Their Extract on Seed Germination

OU Shaoyun^{1,2}, SHI Heping^{1*}, WANG Yunling¹ & LONG Yongyue¹

(¹Guangdong Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

(²Qingyuan Polytechnic College, Qingyuan 511510, Guangdong, China)

Abstract The effects of carbon and nitrogen sources and inorganic phosphorus concentrations on the growth of *Wedelia trilobata* hairy roots were investigated, as well as the effect of their extract on seed germination. The results showed that when cultured with sugar content less than 5%, the best growth of *W. trilobata* hairy roots was obtained with glucose as carbon source, followed by sucrose, while with the sugar content more than 5%, only maltose was able to promote the hairy root growth. However, when maltose concentration was higher than 7%, the growth of hairy roots was also gradually inhibited. The best stimulating effect on the growth was obtained when NO₃⁻-N (263.1 μg/mL) was combined with NH₄⁺-N (577.2 μg/mL) or supplemented with inorganic phosphorus content 2~3 times the amount of inorganic phosphorus in MS medium. When cultured without addition of Ca²⁺ into the medium, the hairy roots had vigorous growth with many branches and became thinner, but with the increasing concentration of Ca²⁺, their growth was suppressed. The inhibitory effect of seed germination was higher when the seeds of rice (*Oryza sativa* L.), *Bidens pilosa* L., and crabgrass were soaked with ethanol-soluble extract, than that of those treated with water-soluble extract. Compared to the control, when soaked with water-soluble extract of hairy roots, the seed germination rates of rice, *B. pilosa* and crabgrass were 84%, 93% and 20%, respectively, but when soaked with ethanol-soluble extract of hairy roots, the seed germination rate of crabgrass seeds was 3%, but no seed germination of rice and *B. pilosa* was observed. The seed germination was more inhibitory when with ethanol-soluble extract of hairy roots than that of wild roots. When the seeds of rice, *B. pilosa* and crabgrass were soaked with ethanol-soluble extract of light-cultured hairy roots, their seed germination rates were 28.7%, 3.9% and 18.7%, respectively, and were higher than those with ethanol-soluble extract of dark-cultured hairy roots, with which the seed germination rate was 4% for rice and 1% for crabgrass, but no germination for *B. pilosa*. This experiment provides the solid experimental and technological foundation for selecting optimal

收稿日期: 2010-01-11 接受日期: 2010-03-23

*通讯作者 Corresponding author (E-mail: shihp@scnu.edu.cn)

conditions for large scale culture of *W. trilobata* hairy roots, and for producing secondary metabolites and further application of the secondary metabolites to eliminate weeds in agriculture. Fig 9, Tab 1, Ref 19

Keywords *Wedelia trilobata*; hairy roots; extract liquor; allelopathy; seed germination

CLC Q949.783.505 : Q946.8

利用发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) Ri质粒的 T-DNA 片段在植物基因组中的插入、整合和表达所产生的生长迅速的毛状根培养物来生产植物尤其是药用植物的次生物质, 已在人参 (*Panax ginseng* L.)、长春花 (*Catharanthus roseus* L.) 和三裂叶野葛 (*Pueraria phaseoloides* L.) 等多种药用植物中获得成功^[1-3]。南美蟛蜞菊 [*Wedelia trilobata* (L.) A.S.Hitche], 别名三裂叶蟛蜞菊, 属菊科多年生草本植物。有研究表明, 其植株中含有具化感作用的倍半萜内酯成分, 能够抑制其它植物的生长^[4]。我们曾利用发根农杆菌 ATCC15834 对南美蟛蜞菊的遗传转化, 获得了能在无激素的培养基上快速自主生长的毛状根^[5]。但如何建立该毛状根离体培养的最佳培养条件, 以及离体培养的毛状根是否含具有化感作用的物质或该毛状根提取物是否具有化感作用, 就成为今后利用该毛状根的批量培养或发酵培养来生产其具有化感作用的次生物质的基础及前提条件。

植物毛状根培养所用的培养基一般由无机元素、有机附加物等组成。已往的研究表明, 培养基的重要组成成分如无机营养元素等的变化能影响植物悬浮细胞培养物^[6]以及毛状根的生长及其次生代谢物的产生^[7]。但有关这些组分在培养基中的代谢变化及其与毛状根的生长、形态变化等方面的研究较少。本研究通过对南美蟛蜞菊毛状根液体培养过程中培养基碳源、氮源及无机磷和钙消耗的测定以及离体培养的毛状根的醇溶性和水溶性提取物对一些种子萌发的影响, 为今后建立毛状根的批量培养条件以及利用离体培养的毛状根来产生高效低毒的植物性农药奠定实验基础和提供可能性。

1 材料与方 法

1.1 毛状根及其培养

采用由发根农杆菌 (*A. rhizogenes*) ATCC15834 遗传转化南美蟛蜞菊 (*W. trilobata*) 叶片外植体获得的、能在无外源激素的 MS^[7] 培养基上自主生长的毛状根为材料, 其诱导和培养方法见文献^[5]。

1.2 碳源、氮源、无机磷、Ca²⁺、pH 值和光对毛状根生长的影响

1.2.1 碳源种类及浓度对毛状根生长的影响 分别以葡萄糖、蔗糖或麦芽糖作为碳源, 配制成浓度为 0%、1%、3%、5%、7% 和 9% 的 MS 培养基。置于 121 °C 灭菌 20 min, 冷却后备用。将来自同一克隆系的生长旺盛的南美蟛蜞菊毛状根, 切成长 4~5 cm、具根尖的毛状根根段, 分别接种于上述各培养基中, 每种浓度的培养基各接种 3 瓶, 起始接种量约 0.05 g (FW)/瓶。培养 35 d, 把毛状根取出, 洗干净培养基并吸干水分测量其生物量。

1.2.2 NO₃⁻-N、NH₄⁺-N 不同配比对毛状根生长的影响 通过正交试验设计出 16 种 NO₃⁻-N 与 NH₄⁺-N 配比不同的改良 MS 培养基 (表 1)。培养基灭菌、毛状根接种与培养方法同 1.2.1, 对获得的毛状根的处理方法同 1.2.1。

1.2.3 无机磷浓度对毛状根生长的影响 制备无机磷浓度分别为 0 μg/mL、38.72 μg/mL (常用 MS 培养基配方用量)、77.4 μg/mL (常用 MS 培养基配方用量的 2 倍)、116.2 μg/mL (常用 MS 培养基配方用量的 3 倍) 和 154.9 μg/mL (常用 MS 培养基配方用量的 4 倍) 的改良 MS 培养基。培养基灭菌、毛状根接种与培养方法同 1.2.1, 对获得的毛状根的处理方法同 1.2.1。

1.2.4 Ca²⁺浓度对毛状根生长的影响 制备 Ca²⁺ 浓度分别为 0 μg/mL、119.7 μg/mL (常用 MS 培养基配方用量)、239.4 μg/mL (常用 MS 培养基配方用量的 2 倍)、359.1 μg/mL (常用 MS 培养基配方用量的 3 倍) 和 478.8 μg/mL (常用 MS 培养基配方用量的 4 倍) 的改良 MS 培养基。培养基灭菌、毛状根接种与培养方法同 1.2.1, 对获得的毛状根的处理方法同 1.2.1。

1.2.5 培养基 pH 值对毛状根生长的影响 制备 pH 值为 4.0、5.0、6.0、7.0、9.0 和 11.0 的 MS 液体培养基。培养基灭菌、毛状根接种与培养方法同 1.2.1, 对获得的毛状根的处理方法同 1.2.1。

1.2.6 光对毛状根生长的影响 制备 MS 液体培养基。培养基灭菌、毛状根接种与培养方法同 1.2.1, 对获得的毛状根的处理方法同 1.2.1。

1.3 各种根提取物对种子萌发的影响

将遗传转化鉴定呈阳性的生长旺盛的南美蟛蜞菊毛状根, 切成长 4~5 cm、具根尖的毛状根根段, 接种于 MS 培养基中, 起始接种量为约 0.05 g (FW)/瓶。一部分放在光照下, 另一部分放在黑暗处, 培养 35 d, 将毛状根取出, 洗净培养基并吸干水分测量其生物量后, 分别获得光照培养的毛状根和黑暗培养的毛状根。取生长旺盛的野生非转化的南美蟛蜞菊, 剪取带有 3 个节间的茎尖扦插在干净的河沙中, 每天浇水, 自长出根开始计算, 培养 35 d 把野生南美蟛蜞菊连根拔起, 用水把根部冲洗干净, 剪下并用吸水纸吸干水分, 获得野生南美蟛蜞菊的非转化根 (野生根)。

称取上述光照培养获得的毛状根、黑暗培养获得的毛状根及野生根各两份, 每份 50 g, 分别用组织捣碎机搅拌均匀。用等体积的 95% 的无水乙醇和蒸馏水提取, 滤渣再重复提取两次, 合并 3 次的提取液过滤, 滤液浓缩为 50 mL, 贮藏于冰箱中备用。

取上述各种提取液 2 mL 浸泡水稻 (*Oryza sativa* L.)、鬼针草 (*Bidens pilosa* L.)、马唐 (Common crabgrass herb) 种子, 以蒸馏水浸泡作对照。浸泡 12 h 后, 把各种种子分别置于铺有湿棉花的培养皿中置于 25 °C 恒温箱中进行萌发, 10 d 后统计种子的萌发率。其中, 水稻种子购自清远市种子公司; 鬼针草、马唐是田间常见的杂草, 其种子采集于清远市郊田野。

2 结果与分析

2.1 碳源种类对毛状根生长的影响

图 1 为不同碳源及其浓度对南美蟛蜞菊毛状根生长的影响。从图 1 中可见, 在不添加任何碳源的培养基中毛状根不能

生长;而在供试的添加不同浓度葡萄糖、蔗糖或麦芽糖作为碳源的培养基中培养时,以5%的葡萄糖促进毛状根生长的效果最好,其生物量(鲜重)比起始接种时增长23.9倍,而5%蔗糖的效果次之,其生物量约增加14.9倍;以5%麦芽糖促进生长的效果最差,其毛状根生物量仅比接种时增长10.8倍.在供试的不同麦芽糖中,以7%麦芽糖对毛状根生长的促进效果最好,其生物量比接种初时约增加25.1倍.而当培养基中3种碳源浓度均低于或等于5%时,以葡萄糖作为碳源对南美螞蟥菊毛状根的生长效果最好;葡萄糖浓度为1%、3%和5%时,其毛状根生物量增长率比相同浓度蔗糖培养的毛状根分别提高3.39倍、7.25倍和8.99倍,比相同浓度麦芽糖作碳源培养的毛状根分别提高8.12倍、10.5倍和13.06倍.但当培养基中碳源浓度超过5%时,以葡萄糖和蔗糖为碳源培养的毛状根的生长则受到抑制,而利用相同浓度麦芽糖作为碳源培养的毛状根仍生长良好,但当培养基中麦芽糖浓度超过7%以上时,其毛状根生长也会受到抑制.

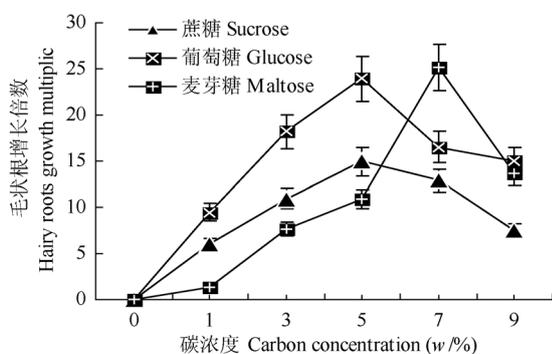


图1 碳源浓度对南美螞蟥菊毛状根生长的影响

Fig.1 Effect of carbon concentrations on the growth of *W. trilobata* hairy roots

2.2 氮源对南美螞蟥菊毛状根生长的影响

表1为不同硝态氮与氨态氮的浓度对比对南美螞蟥菊毛状根生长的影响.从表1可见,在两者都没添加的情况下,毛状根基本能维持生长,根表现为紫色(图2-A);而在只添加 NH_4^+ 而不添加 NO_3^- 的情况下,毛状根也基本能维持生长,根表现为浅绿色(图2-B、C和D),其中以毛状根在添加 NH_4^+ 为288.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1MS)用量的培养基中生长得最好(图2-B),其毛状根生物量(鲜重)增长量是对照(NO_3^- -N与 NH_4^+ -N都缺乏培养)的3.2倍,是 NH_4^+ -N含量分别为577.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和865.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的2.2倍和3.7倍.而在供试的16种 NO_3^- 和 NH_4^+ 不同配比的培养基中,以 NO_3^- (263.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)与 NH_4^+ (577.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的组合对比毛状根生长的促进效果最好,其毛状根的生物量约为其初始接种量的32倍多;其毛状根生物量增值分别约为对照和不加 NO_3^- -N但添加288.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NH_4^+ 培养的18.6倍和5.8倍.

2.3 培养基无机磷浓度对南美螞蟥菊毛状根生长的影响

图3为培养基无机磷浓度对南美螞蟥菊毛状根生长的影响.从图3可见,在一定浓度范围内,南美螞蟥菊毛状根的生长随着培养基中无机磷浓度的增加而提高;而在不含无机磷(即磷缺乏的MS培养基)的培养基中培养的毛状根颜色较其它浓度磷培养的深,呈深紫色,根长且分枝少,但生长势

表1 不同硝态氮与氨态氮对比对南美螞蟥菊毛状根生长的影响
Table 1 Effect of different ratios of NO_3^- -N and NH_4^+ -N on the growth of *W. trilobata* hairy roots

序号 No.	NO_3^- -N : NH_4^+ -N	生物量(增值倍数/瓶) Biomass multiplication per bottle
1	0(0MS) : 0(0MS)	2.65
2	0(0MS) : 1(1MS)	6
3	0(0MS) : 2(2MS)	2.79
4	0(0MS) : 3(3MS)	1.98
5	1(1MS) : 0(0MS)	0
6	1(1MS) : 1(1MS)	26.83
7	1(1MS) : 2(2MS)	32.04
8	1(1MS) : 3(3MS)	25.17
9	2(2MS) : 0(0MS)	0
10	2(2MS) : 1(1MS)	28.74
11	2(2MS) : 2(2MS)	26.43
12	2(2MS) : 3(3MS)	21.76
13	3(3MS) : 0(0MS)	0
14	3(3MS) : 1(1MS)	24.37
15	3(3MS) : 2(2MS)	15.58
16	3(3MS) : 3(3MS)	18.31



图2 NO_3^- -N与 NH_4^+ -N对南美螞蟥菊毛状根生长的影响

Fig. 2 Effects of NO_3^- -N与 NH_4^+ -N on the growth of *W. trilobata* hairy roots (A) : NO_3^- -N与 NH_4^+ -N都缺乏; (B) : NO_3^- -N缺乏, NH_4^+ -N为1MS培养基的用量; (C) : NO_3^- -N缺乏, NH_4^+ -N为2MS培养基的用量; (D) : NO_3^- -N缺乏, NH_4^+ -N为3MS培养基的用量

(A): None of NO_3^- -N and NH_4^+ -N; (B): None of NO_3^- -N and NH_4^+ -N same as the concentration of 1MS; (C): None of NO_3^- -N and NH_4^+ -N same as the concentration of 2MS; (D): None of NO_3^- -N and NH_4^+ -N same as the concentration of 3MS

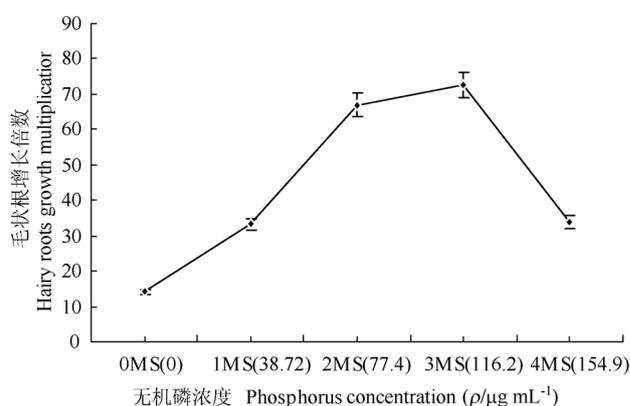


图3 培养基无机磷浓度对南美螞蟥菊毛状根生长的影响

Fig. 3 Effect of phosphorus concentration on the growth of *W. trilobata* hairy roots

较弱,至培养结束时其生物量只比初始接种时增加约14倍;而当无机磷浓度为38.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1MS,即正常MS的无机磷用量时),毛状根生长旺盛,根长且分枝较多;而无无机磷浓度为77.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (2MS,即2倍MS的无机磷用量)的培养基上培养

的毛状根与之类似,但其生物量比其起始接种时增长约66倍;而当毛状根在116.2 $\mu\text{g/mL}$ 无机磷(3MS,即3倍MS的无机磷用量)的培养基上培养时,所产生的分枝根更多,但毛状根比较细小,至培养结束时其生物量约比起始接种时增长约72倍;但当培养基的无机磷浓度增加至154.9 $\mu\text{g/mL}$ (4MS,即4倍MS的无机磷用量)时,毛状根的生长则受到抑制,表现为根纤细,分枝多,但至培养结束时其毛状根生物量的增长倍数则比116.2 $\mu\text{g/mL}$ 无机磷培养的毛状根显著降低。这可能表明,无机磷是南美蟛蜞菊毛状根生长必需的重要元素之一,其在培养基中的用量约为常规MS培养基用量的2~3倍时,最适合南美蟛蜞菊毛状根生长,但培养基无机磷缺乏或浓度过高则都不利于该毛状根的生长。

2.4 培养基 Ca^{2+} 浓度对南美蟛蜞菊毛状根生长的影响

图4为培养基 Ca^{2+} 浓度对南美蟛蜞菊毛状根生长的影响。从图4可见,随着 Ca^{2+} 浓度的增加,南美蟛蜞菊毛状根的生长逐渐被抑制;在不含 Ca^{2+} 的MS培养基中培养的毛状根根纤细,分枝多,且生长旺盛,至培养结束时其生物量比初始接种时增长约131倍;而在 Ca^{2+} 浓度分别为119.7 $\mu\text{g/mL}$ (即1MS)、239.4 $\mu\text{g/mL}$ (即2MS)、359.1 $\mu\text{g/mL}$ (即3MS)的培养基中培养的毛状根,其分枝逐渐减少,其生物量的增长倍数也明显比不加 Ca^{2+} 培养的毛状根低;当培养基中 Ca^{2+} 浓度增加至478.8 $\mu\text{g/mL}$ (即4MS)时,毛状根的生长出现明显地抑制,且几乎没有分枝根产生,至培养结束时其生物量增长倍数仅为不加 Ca^{2+} 的培养基培养的38.8%。这可能表明,培养基中不加 Ca^{2+} 不仅不影响南美蟛蜞菊毛状根的生长,反而促进其生长;但提高培养基 Ca^{2+} 浓度则不利于毛状根的生长,甚至出现抑制。

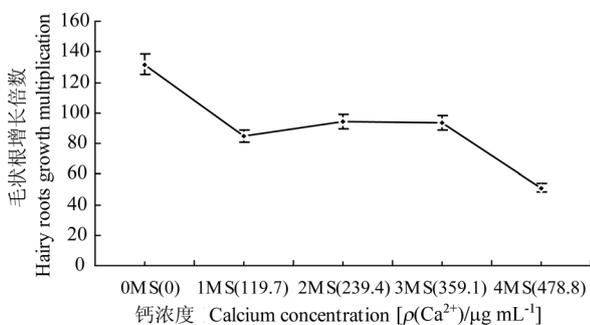


图4 培养基 Ca^{2+} 浓度对南美蟛蜞菊毛状根生长的影响

Fig. 4 Effect of Ca^{2+} concentration on the growth of *W. trilobata* hairy roots

2.5 培养基pH值对南美蟛蜞菊毛状根生长的影响

图5为培养基pH值对南美蟛蜞菊毛状根生长的影响。从图5可见,南美蟛蜞菊毛状根生长的最适pH值在6~7之间;过酸、过碱都不利于南美蟛蜞菊毛状根的生长。在pH 4的培养基中培养时,除个别毛状根保持绿色但不长出新根外,大部分毛状根坏死,至培养结束时其生物量仅约为起始接种量的2.2倍;而在pH 5的培养基中培养的毛状根虽大部分枯死,但有少数毛状根会产生新而短的侧根,至培养结束时其生物量约为其起始接种量的10倍;而在pH 6和pH 7的培养基中培养的毛状根生物量则分别为其初始接种量的24倍和38倍,其中在pH 7的培养基中培养的毛状根生长粗壮,侧根较长;然而,当毛状根在pH值为9和11的培养基中培养时,自接种后均未

观察到有生长迹象,而且随着培养时间延长,毛状根全部枯萎或坏死。

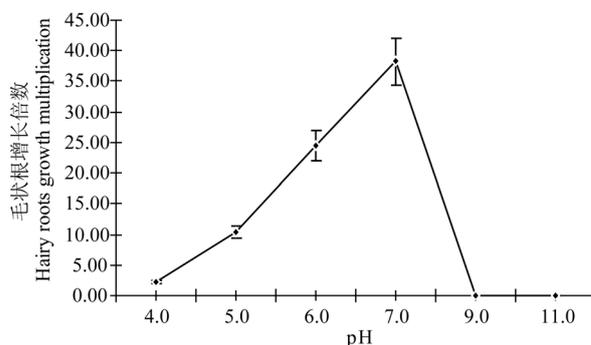


图5 pH值对南美蟛蜞菊毛状根生长的影响

Fig. 5 Effect of pH value on the growth of *W. trilobata* hairy roots

2.6 光对南美蟛蜞菊毛状根生长的影响

黑暗培养的毛状根颜色浅白,根较纤细,分枝较多;而光照培养的毛状根颜色呈墨绿色,明显老化,根较粗壮但分枝较少(图6)。此外,暗培养毛状根的生物量增长倍数约是光照培养的1.3倍。这可能表明暗培养对南美蟛蜞菊毛状根的生长较为有利。



图6 光照(左)和黑暗(右)培养的南美蟛蜞菊毛状根

Fig. 6 *W. trilobata* hairy roots cultured under light (left) and in dark (right)

2.7 各种根提取物对种子萌发的影响

2.7.1 毛状根不同溶剂提取对种子萌发的影响 图7比较了南美蟛蜞菊毛状根的乙醇提取液和水提取液对水稻等种子萌发的影响。从图7可见,毛状根水提取液处理的水稻、鬼针草、马唐种子的萌发率分别是84%、93%、20%,而毛状根乙醇提取液处理的马唐种子萌发率只有3%,水稻和鬼针草种子

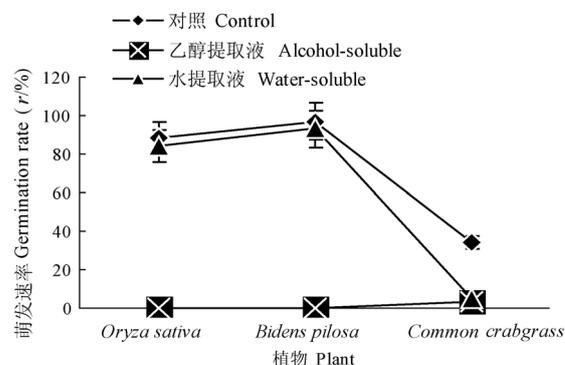


图7 毛状根的乙醇提取液和水提取液对水稻、鬼针草、马唐种子萌发的影响
Fig. 7 Effects of alcohol-solution extract and water-solution extract of hairy roots on seed germination of *O. sativa*, *B. pilosa* and crabgrass

则完全不萌发.表明毛状根乙醇提取液比水提取液对水稻、鬼针草、马唐种子的萌发抑制作用更强.

2.7.2 毛状根和野生根的乙醇提取液对种子萌发的影响 图8显示,与对照相比,南美蟛蜞菊毛状根与野生根的乙醇提取液对水稻等种子的萌发都有抑制作用,但毛状根的乙醇提取液用比野生根的乙醇提取液对种子的抑制作用更强,野生根的乙醇提取液处理的水稻、鬼针草、马唐种子的萌发率分别是52.3%、46%、20.9%,而毛状根的乙醇提取液处理的水稻、马唐种子萌发的只有4%和1%,鬼针草则完全不萌发.

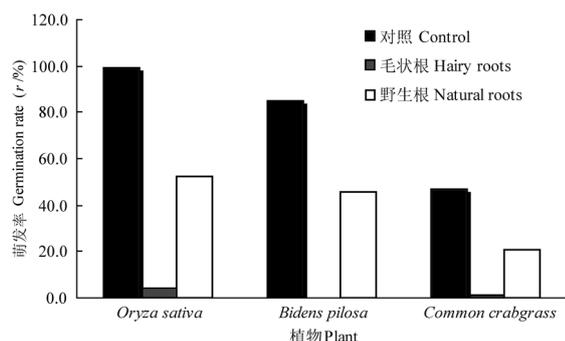


图8 毛状根与自然根的乙醇提取液对种子萌发的影响

Fig. 8 Effect of alcohol-solution extract of hairy roots and natural roots on seed germination of *O. sativa*, *B. pilosa* and crabgrass

2.7.3 光、暗培养的毛状根乙醇提取液对种子萌发的影响

图9表明,与对照相比较,暗培养毛状根的乙醇提取液和光照培养的毛状根乙醇提取液对水稻、鬼针草、马唐种子萌发都有抑制作用,但暗培养毛状根的乙醇提取液对水稻、鬼针草、马唐种子萌发的抑制作用要比光照培养的毛状根乙醇提取液的强,光照培养的毛状根乙醇提取液处理的水稻、鬼针草、马唐种子的萌发率分别是28.7%、3.9%、18.7%,而暗培养毛状根的乙醇提取液处理的水稻、马唐种子萌发的只有4%和1%,鬼针草则完全不萌发.

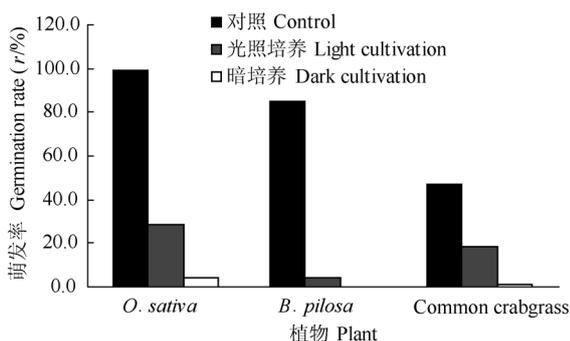


图9 黑暗和光照培养的毛状根的乙醇提取液对种子萌发的影响

Fig. 9 Effect of alcohol-solution extract of hairy roots in dark and under light on seed germination of *O. sativa*, *B. pilosa* and crabgrass

3 讨论

研究培养基中主要营养元素的代谢变化及其浓度效应是建立和确定南美蟛蜞菊毛状根最佳离体培养条件及进行次生代谢物质生产的前提和基础.糖类也是毛状根离体培养最常用的能源和碳源,其浓度高低及其在生长过程中的代谢变化与毛状根的形态生长及次生代谢物的积累密切相关.如

梁朋等发现,在培养基中添加2%~5%的蔗糖都能促进三裂叶野葛 (*Pueraria phaseoloides*) 毛状根的生长及其异黄酮类化合物的积累,但以3%蔗糖效果最好^[8].蔡国琴等也发现,在一定的浓度范围内提高蔗糖浓度能刺激青蒿 (*Artemisia annua*) 毛状根的生长,但当浓度达到8%时,根的形态则发生变化,分枝减少,根变粗,极易断裂,颜色由淡黄色变成浅黄色,生长速度也开始下降^[9].而杨睿等在使用蔗糖或葡萄糖单独做碳源培养雪莲 (*Saussurea medusa* Maxim) 毛状根时发现,以50 g/L葡萄糖的效果最好;而70 g/L蔗糖或葡萄糖都对毛状根生长和总黄酮合成不利,甚至还有严重抑制作用;而果糖则会强烈抑制毛状根生长和总黄酮合成,使毛状根生长停滞,甚至褐化死亡^[10].而这些与本实验的结果不一致.在本实验中,当供试的葡萄糖、蔗糖和麦芽糖3种碳源浓度在5%以内时,以葡萄糖作碳源对南美蟛蜞菊毛状根的生长效果最好,其次是蔗糖.在糖浓度为1%、3%和5%时,葡萄糖作碳源培养的毛状根生物量增长率分别是蔗糖作碳源培养的毛状根生物量增长率的3.39倍、7.25倍和8.99倍,是以麦芽糖作碳源培养的毛状根生物量增长率的8.12倍、10.5倍和13.06倍(图1).这可能说明,培养基中碳源对毛状根生长的影响可因植物种类的不同和碳源种类及其浓度不同而有所差异,而南美蟛蜞菊毛状根利用葡萄糖为碳源比利用蔗糖和麦芽糖为碳源对其生物量的增长更加有利.

与碳源一样,培养基中氮源(硝态氮和铵态氮)对毛状根的生长也至关重要.如培养基的硝态氮和铵态氮比率能明显影响 *Atropa belladonna* 毛状根的生长及其次生物质东莨菪碱/天仙子胺的比率;而且降低培养基的硝态氮浓度还可促进毛状根中生物碱的产生^[11].然而,也有研究表明,在培养基中添加 NO_3^- 能使 *Datura candida* × *D. aurea* 毛状根的生物量增加及显著提高天仙子胺含量,但同时会使毛状根的东莨菪碱 (Scopolamine) 含量明显降低^[12].而这些与本实验的结果不完全一致.不同的是,在本实验中,只添加 NH_4^+ 、不添加 NO_3^- 的情况下,毛状根能基本维持生长,根为浅绿色,其中以添加MS培养基标准用量 NH_4^+ 的效果最好;而在16种 NO_3^- 和 NH_4^+ 的配比中,以 NO_3^- (1MS) 与 NH_4^+ (2MS) 的配比对毛状根的生长效果最好.此外还发现,在培养基中不加铵态氮时,南美蟛蜞菊毛状根不能生长,而这与李哲等研究氮源对巴西香蕉 (*Musa* AAA Cavendish subgroup cv. Brazil) 薄片愈伤组织诱导的影响结果^[13]类似.而这种差异的产生可能表明氮源对毛状根生长的影响与植株类型及硝态氮和铵态氮比率的差异等有关.

PO_4^{3-} 作为毛状根生长发育及其次生代谢调节的必需元素.有关毛状根培养过程中培养基中磷的消耗变化及磷的状态水平如磷缺乏对毛状根生长代谢的影响已有少量报道.如张艳等发现三裂叶野葛毛状根培养16 d时培养基中的 PO_4^{3-} 被消耗殆尽^[14].而培养基中完全缺磷则严重抑制黄瓜毛状根的生长,而培养基中不同程度磷缺乏则抑制毛状根生长,使根变得纤细且长,侧根数目减少且短小^[15].但至今未见有关培养基中磷加倍或过量对毛状根生长影响的报道.在本实验中,在不含无机P的培养基中培养南美蟛蜞菊毛状根颜色较深,呈深紫色,根细长,分枝少,生长势弱;而在 PO_4^{3-} 浓度为2MS、3MS的培养基中培养的毛状根生长得最好,毛状根

增长率最高. 这表明对南美蟛蜞菊毛状根的生长而言, 添加约比MS培养基的无机磷用量高出2~3倍的量最有利于其生长; 但至于高浓度无机磷是否也会影响该毛状根的次生代谢, 则待今后深入研究.

与磷一样, Ca^{2+} 也是植物细胞生长发育必需的矿质元素之一. 本实验的结果表明, 与添加 Ca^{2+} 的培养基相比, 培养基中不添加 Ca^{2+} 更有利于南美蟛蜞菊毛状根的生长. 然而, Christen等发现, 提高培养基的 Ca^{2+} 浓度虽对天仙子 (*Hyoscyamus albus*) 毛状根的生长无明显影响, 但却能明显提高毛状根中托品生物碱的产量^[16]; 而Margarita等也曾发现, 培养基缺 Ca^{2+} 虽明显抑制*Digitalis thapsi*细胞的生长, 但却促进其次生物物质carotenoids的产生^[17]. 显然, 这与本实验的结果不一致. 而这可能表明, 培养基中 Ca^{2+} 水平对毛状根的生长或其次生物物质产生的影响程度可因植物类型和毛状根的种类不同而异. 但至于 Ca^{2+} 浓度是否也对南美蟛蜞菊毛状根次生代谢产物产生的影响, 尚待进一步研究.

有关野生南美蟛蜞菊的化学它感作用已有一些报道, 如陈贤兴等发现其茎叶水浸提液对绿豆 (*Vigna radiate* L.)、萝卜 (*Raphanus sativus* Linn.)、青菜 (*Brassica chinensis* Linn.) 等种子的发芽指数、萌发率及幼苗的苗高和根长均有不同程度的抑制作用^[18]; 而聂呈荣等在研究其浸提液对花生 (*Arachis hypogaea*)、水稻、菜心、大豆、白菜等作物种子萌发过程的影响时, 发现南美蟛蜞菊浸提液不仅抑制种子萌发, 使种子发芽势和发芽率降低, 胚根和胚芽变短, 甚至使种子腐烂; 而且可使萌发产生的植株变得矮小或生长缓慢, 叶子枯黄, 出现病斑和虫害^[19]. 然而, 到目前为止, 所有有关南美蟛蜞菊化学它感作用的研究都是以完整的非转化 (自然) 植株来进行的, 国内外也未见有关南美蟛蜞菊毛状根提取液是否也影响植物种子萌发及其 (幼苗) 生长, 以及发根农杆菌遗传转化产生的可在无外源激素液体培养中自主生长的毛状根提取物是否也含有具它感作用的次生物质的研究报道. 本实验结果表明, 与野生南美蟛蜞菊根的醇溶性浸提液一样, 南美蟛蜞菊毛状根的醇溶性浸提液均对供试种子的萌发具有不同程度的抑制作用; 而且毛状根醇溶性浸提液对供试种子萌发的抑制作用比野生南美蟛蜞菊根的醇溶性浸提液强, 而这与陈贤兴^[18]和聂呈荣^[19]所获的结果类似. 此外, 本实验还发现, 暗培养毛状根的醇溶性提取液对水稻、三叶鬼针草和马唐种子萌发的抑制效果要比光照培养毛状根的醇溶性提取液的抑制效果分别提高24.7%、3.9%和17.7%. 而与南美蟛蜞菊毛状根水溶性提取液相比, 毛状根醇溶性提取液对水稻、马唐和鬼针草种子的萌发率抑制效果分别提高约84%、2.0%和93%. 这可能表明, 暗培养毛状根提取液的它感作用较光照培养的毛状根更强, 或者说对于南美蟛蜞菊毛状根而言, 黑暗环境可能更有利于其生长及其化学它感物质的合成与积累. 但至于南美蟛蜞菊毛状根所产生的具有化学它感作用次生物质的组成和含量是否与野生植株一致, 即这些具有它感作用的醇溶性或水溶性提取液中是否与张玉虎等报道的相同的半萜内酯化合物^[4], 尚待今后进一步研究去证实. 而我们的结果为今后利用南美蟛蜞菊毛状根来生产具有化学它感的物质, 生产具有高效低毒的“生物

农药”来抑制杂草种子萌发和幼苗生长奠定了实验和技术基础.

References

- 1 Yoshikawa T, Furuya T. Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep*, 1987, 6: 449-453
- 2 Sun M (孙敏), Wang H (汪洪), Wang Y (王颖), Wu CL (伍春莲). Induction and culture of transformed hairy root in *Catharanthus Roseus*. *J Southwest China Norm Univ Nat Sci* (西南师范大学学报自然科学版), 2002, 27 (4): 549-552
- 3 Shi HP (施和平), Liang P (梁朋), Kintzios S. Culture of hairy roots in *Pueraria phaseolodes* and its puerarin production. *Acta Biol Exp Sin* (实验生物学报), 2003, 36 (6): 407-413
- 4 Zhang YH (张玉虎), Liu MF (刘梅芳), Ling TJ (凌铁军), Wei XY (魏孝义). Allelopathic sesquiterpene lactones from *Wedelia trilobata*. *J Trop & Subtrop Bot* (热带亚热带植物学报), 2004, 12 (6): 533-537
- 5 Ou SY (欧少云), Shi HP (施和平), Tsang EP (曾宝强). Induction and *in vitro* culture of *Wedelia trilobata* hairy roots. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2010, 26 (3): 378-385
- 6 Hong XW (侯学文), Guo Y (郭勇). The effect of various carbon sources on the assimilation of nutrients in Roselle suspension culture. *Guihaia* (广西植物), 1999, 19 (1): 73-77
- 7 Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 1962, 15: 473-497.
- 8 Liang P (梁朋), Shi HP (施和平), Qi Y (齐莹). Effect of sucrose concentration on the growth and production of secondary metabolites in *Pueraria phaseoloides* hairy roots. *Acta Biol Exp Sin* (实验生物学报), 2004, 37 (5): 384-390
- 9 Cai GQ (蔡国琴), Li GZ (李国珍), Ye HC (叶和春), Li GF (李国凤). Hairy root culture of *Artemisia annua* L. by Ri plasmid transformation and biosynthesis of artemisinin. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 1995, 11 (4): 315-320
- 10 Yang R (杨睿), Fu CX (付春祥), Jin ZP (金治平), Zhao DX (赵德修). Effects of physical and chemical factors on hairy root growth and flavonoids biosynthesis in the cultures of *Saussurea medusa* Maxim hairy roots. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2005, 21 (2): 233-238
- 11 Bensaddek L, Gillet F, Saucedo JEN, Fliniaux MA. The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots. *J Biotechnol*, 2001, 85: 35-40
- 12 Nussbaumer P, Kapetanidis I, Christen P. Hairy roots of *Datura candida* × *D. aurea*: Effect of culture medium composition on growth and alkaloid biosynthesis. *Plant Cell Rep*, 1998, 17: 405-409
- 13 Li Z (李哲), Huang JW (黄敬雯), Huang X (黄霞), Pan WB (潘文碧), Huang XL (黄学林), Li XJ (李筱菊). Effects of nitrogen sources on callus induction from micro-cross sections of banana (*Musa AAA* Cavendish subgroup cv. Brazil). *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni* (中山大学学报自然科学版), 2005, 44 (2): 91-93.
- 14 Zhang Y (张艳), Shi HP (施和平), Luo GY (罗刚跃). Relationship between growth and medium nutrient consumption during the culture of *Pueraria phaseoloides* hairy roots. *Life Sci Res* (生命科学研究), 2007,

- 11 (1): 52~57
- 15 Zhang Y (张悦), Shi HP (施和平). Influences of phosphate deficiency in the medium on growth, activities of antioxidant enzymes and utilization of nitrogen resource in *Cucumis sativus* Hairy Roots. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2008, **24** (9): 1604~1612
- 16 Christen P, Aoki T, Shimomura K. Characteristics of growth and tropane alkaloid production in *Hyoscyamus ablus* hairy roots transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A4. *Plant Cell Rep*, 1992, **11**: 597~600
- 17 Margarita C, Margarita M, Jorge FT, et al. Calcium restriction induces cardenolide accumulation in cell suspension cultures of *Digitalis thapsi* L. *Plant Cell Rep*, 1995, **14**: 786~789
- 18 Chen XX (陈贤兴), Ding BY (丁炳扬), Shen XL (沈夕良), He XW (何献武). The allelopathy of the water extract from *Wedelia trilobata* on several economic crops. *J Gansu Sci* (甘肃科学学报), 2005, **17** (4): 15~17
- 19 Nie CR (聂呈荣), Li HS (黎华寿), Huang JH (黄京华), Chen LQ (陈莉琼), Hong MQ (洪明祺). The allelopathic effects of *Wedelia chinensis* Merr. on peanut (*Arachis hypogaea* L.) and other crops. *J Peanut Sci* (花生学报), 2002, **31** (1): 30~32



2008中国生物技术发展报告

中华人民共和国科学技术部社会发展科技司 中国生物技术发展中心 科学出版社出版 (2010年7月)
978-7-03-028106-7 ¥148.00

内容简介

《2008中国生物技术发展报告》分为：政策篇、科学篇、技术篇、生物产业篇、国际合作篇。介绍了我国生物技术及其产业化发展的现状和主要成就，交流、总结了发展生物技术和产业的经验，宣传了政府发展生物技术的政策方针，收集反应了截至2008年底国内外生物技术研发和产业化的最新进展。

《2008中国生物技术发展报告》能为生物科技领域的科学家、企业家、管理人员和关心支持生物技术发展与产业的各界人士提供参考。

2009中国生物技术发展报告

中华人民共和国科学技术部社会发展科技司 中国生物技术发展中心 科学出版社出版 (2010年7月)
978-7-03-028105-0 ¥148.00

内容简介

《2009中国生物技术发展报告》分为政策篇、技术篇、产业篇和国际篇。介绍了我国生物技术及其产业发展的现状与成就，总结了发展生物技术及产业的经验，宣传了政府发展生物技术的政策方针，收集了截至2009年年底国内外生物技术研发和产业化的最新进展。

《2009中国生物技术发展报告》能为生物科技领域的科学家、企业家、管理人员和关心支持生物技术发展的各界人士提供参考。

2010工业生物技术发展报告

中国科学院生命科学与生物技术局 编著 科学出版社出版 (2010年7月) 978-7-03-028270-5 ¥80.00

内容简介

本书是基于工业生物技术知识环境出版的信息产品之一，主要报道了工业生物技术领域内的重大规划与政策、技术和产品的研发进展、产业发展等。为了能够全面了解工业生物技术发展的最新进展，本书设置了发展战略篇、研发进展篇和产业篇。在选题上，着重突出了工业生物技术领域的热点和前沿。为了突出各领域的技术进展并使内容更有层次感，本书在研发进展篇采用主题的形式组织稿件，重点报道了微生物资源、合成生物学、系统生物学、细胞工厂和微藻在工业生物技术领域中的研发进展等内容。为了扩大本报告的读者范围，使国外读者能了解中国工业生物技术的现状、产业情况，我们在形式上增加了英文题名、摘要，以及英文作者简介。此外，我们通过对2009年国内外工业生物技术领域重要事件的回顾，与读者一起梳理过去一年本领域发展的整体脉络。

本书可供相关科研院所、高等院校和企业等从事工业生物技术研究 and 开发工作的科研管理人员、科研工作者和研发生产人员借鉴与参考。

欢迎邮购各类图书 欢迎致电索要书目

联系人：科学出版社科学销售中心 周文宇 电话：010-64031535 E-mail: zhouwenyu@mail.sciencep.com

网上订购：www.dangdang.com www.amazon.cn

科学出版中心生物分社 电话：010-64012501 网址：www.lifescience.com.cn E-mail: lifescience@mail.sciencep.com