

实验简报

管花肉苁蓉与怪柳试管苗离体接种的研究^①

马东明 杨太新 陈庆亮 翟志席 郭玉海^②

(中国农业大学农学与生物技术学院 北京 100094)

摘要 用去果皮的种子对怪柳长根实生苗和试管苗进行接种, 建立管花肉苁蓉种子与怪柳的离体接种体系, 用体视显微镜观察接种情况并用整体透明方法观察侵染情况。结果表明, 寄主怪柳的试管苗与管花肉苁蓉种子的共培养能够建立管花肉苁蓉-怪柳接种复合体, 这将为研究寄主-寄生物相互关系提供有效的实验体系。

关键词 管花肉苁蓉, 离体, 接种

In vitro Inoculation of *Cistanche tubulosa* Seeds on Tube Seedlings of *Tamarix chinensis*

MA Dong-Ming YANG Tai-Xin CHEN Qing-Liang ZHAI Zhi-Xi GUO Yu-Hai^②

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

Abstract To develop an *in vitro* inoculation system of *Tamarix chinensis* with seeds of *Cistanche tubulosa*, we removed the pericarp before seeds were inoculated on roots of tube seedlings and seedling plants of *T. chinensis*. Investigations of inoculation were carried out by stereo microscopy, and observations of infection involved use of the whole clearing method. *C. tubulosa*-*T. chinensis* inoculation complex can be established through culture of seeds of *C. tubulosa* together with radicated *T. chinensis*, which may offer an effective experimental system for the study of host-parasite interactions.

Key words *Cistanche tubulosa*, *In vitro*, Inoculation

管花肉苁蓉(*Cistanche tubulosa*)为列当科(Orobanchaceae)肉苁蓉属多年生寄生草本植物, 常寄生于沙生灌木怪柳属(*Tamarix*)的根部, 它通过一个称为吸器的特有结构从怪柳体内吸取水分、无机和有机营养来维持其生存。管花肉苁蓉以干燥带鳞叶的肉质茎入药,

具有补肾阳、益精血及润肠通便等功效(屠鹏飞等, 1994; 宋志宏等, 2000)。目前管花肉苁蓉已在内蒙古(李天然等, 2002)和河北吴桥引种栽培成功, 但存在的突出问题是种子接种成功率低、接种成功的周期长且接种上的肉苁蓉寄生生长不同步。自然条件下由于土壤中复

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

② 通讯作者。Author for correspondence. E-mail: jzjysh@cau.edu.cn

收稿日期: 2005-03-29 接受日期: 2005-05-27 责任编辑: 白羽红

杂的成分(如土壤微生物)及田间难以控制因素的影响,使寄生植物和寄主植物之间寄生关系的研究较为困难。在无菌培养条件下建立起寄生植物和寄主的接种体系,可以使寄生植物和寄主相互作用的生化及生理机制的研究(如寄主分泌何种物质刺激寄生植物种子的萌发,寄生植物和寄主建立寄生关系的过程等)得以简化。在离体接种方面, Losner-Goshen 等(1996)用列当(*Orobanchae aegyptiaca*)成功侵染了寄主番茄(*Lycopersicon esculentum*); Zhou等(2004)用列当(*Orobanchae minor*)种子离体接种寄主番茄和红三叶草(*Trifolium pratense*)以及欧洲油菜(*Brassica napus*)也获得了成功。管花肉苕蓉和寄主柽柳的离体接种体系还未见报道。对管花肉苕蓉-柽柳接种复合体的探索,将为管花肉苕蓉种子萌发刺激物质的确定、研究种子萌发、吸器发育乃至寄生过程以及工厂化组培生产管花肉苕蓉种苗都具有一定的理论价值和实践意义。

1 材料与方法

1.1 材料来源

管花肉苕蓉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教授提供,经鉴定为管花肉苕蓉(*Cistanche tubulosa*),采收年份为2002年。管花肉苕蓉的寄主中国柽柳(*Tamarix chinensis*)来自中国农业大学科学园温室。

1.2 实验方法

1.2.1 柽柳离体快速繁殖体系的建立 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。

1.2.2 管花肉苕蓉种子的处理 经过初步分级的种子放于冰箱(2~5℃)进行为期2周到2个月的低温层积,完成生理后熟。将种子剥去果皮后浸于70%乙醇30秒,然后用2%次氯酸钠消毒3~5分钟,再用无菌水冲洗5次。

1.2.3 管花肉苕蓉种子与生根柽柳试管苗的接种 将已长根的柽柳实生苗和再生苗从三角瓶转移到盛有MS培养基的9cm培养皿中,转移时要倾斜45°接入,以使根系可以沿着培养基表面向下生长而不至于使根扎入培养基中,并使根尽量处于培养皿中央,绿色的茎叶部分处于边缘。然后把剥去果皮并消毒过的管花肉苕蓉种子在无菌条件下接种于柽柳试管苗的根周围。用折成长方形的铝薄纸把处于培养皿中央的柽柳试管苗的根和管花肉苕蓉种子包裹上,以使培养皿的中央尽量保持黑暗;培养皿的边缘则不包,使少量漫射光得以进入来维持绿色茎叶的生长。每只培养皿约接60粒种子,3次重复,培养皿置于(25±2)℃条件下培养,定期用OLYMPUS SZH10型体视显微镜观察管花肉苕蓉种子萌发和接种于寄主根的情况,记录并照相。

1.2.4 柽柳根(管花肉苕蓉种子已成功侵染)的整体透明 把已接种管花肉苕蓉种子的柽柳根用FAA(5mL冰醋酸、5mL甲醛和90mL浓度为70%的乙醇)固定液固定并保存。材料以爱氏苏木精进行染色,在冬青油中透明后用OLYMPUS SZH10型体视显微镜观察。此方法参考杨弘远(1986)对胚珠和子房的整体染色透明方法并加以修改。

2 结果与讨论

2.1 管花肉苕蓉种子萌发与初生吸器的形成

生根柽柳试管苗与管花肉苕蓉种子的共培养方式见图1A。30天后统计种子萌发和接种情况,结果见表1。从表1中可以看出,有试管苗的培养基中的种子萌发率都显著高于对照(无柽柳试管苗的培养皿);而一次成苗和生根诱导两种培养方式下的种子萌发率差异显著,前者的种子萌发率高于后者。共培养下的种子萌发的形态与对照的有所不同:对照培养中种子一般形成芽管(germ tube)(图1B),进而发育为圆锥状的顶端膨大的初生吸器

表1 共培养下的管花肉苁蓉种子萌发和接种情况

Table 1 Seed germination and inoculation of <i>Cistanche tubulosa</i> in the presence of host roots							
Type of tube seedling	Number of treated seeds	Number of germinated seeds	Ratio of germination (%)	Significance of difference*	Number of seeds parasitizing on host roots	Ratio of inoculation (%)	Significance of difference*
Regeneration of seedling after multiplication	180	45	25.0	b	8	4.4	b
Direct regeneration of seedling	180	57	31.6	a	15	8.3	a
Control	180	10	5.5	c	-	-	-

* 在 0.05 水平上差异显著 * Means significance of difference at 0.05 level

(primary haustorium)(图 1 C)。共培养方式下萌发的种子一般首先是珠孔端呈现“露白”,而后逐渐突起,使原来类似球状种子变为近似椭球状,进而发育为类似瘤状物的器官(图 1 D, E)。

印度学者 Rangan 和 Rangaswamy (1968) 研究了 *Cistanche tubulosa* 种子在人工培养基中的萌发情况,发现在无寄主根系分泌物的 WB 培养基(加入一定量的椰乳和水解酪蛋白)上种子萌发形成一种叫芽管的器官。本实验发现在不加入柽柳试管苗根系分泌物的 MS 培养基上的管花肉苁蓉种子也能够萌发,芽管状器官与 Rangan 和 Rangaswamy (1968) 所观察到的芽管形态类似。管花肉苁蓉初生吸器(图 1C)的形态与盛晋华等(2004)描述的荒漠肉苁蓉种子的初生吸器形态相似。实验中还观察到在没有寄主根存在(对照)的条件下,种子形成初生吸器后便停止发育,这可能是由于缺乏寄主的某种刺激吸器进一步发育的刺激因子所致,这也是导致共培养下的种子萌发的形态与对照的不同的原因之一。

Kadry 和 Tewfic (1956) 的研究认为,列当科植物 *Orobancha crenata* 在有寄主存在的情况下种子的球形胚能够形成一团不规则的组织,他把这种组织称为瘤状物。李天然等(1989)在田间研究荒漠肉苁蓉种子的萌发与寄

主梭梭(*Haloxylon ammodendron*)的关系时也发现这种瘤状物。本实验观察到在有寄主根系分泌物情况下也有此种瘤状物的出现。笔者认为把这种瘤状物称为“附着器”(holdfast)比较合适。这种附着器固定到寄主植物上后,通过附着器与寄主根的某种作用机制来促使功能性吸器的发育,从而建立起寄生植物与寄主间的桥梁,寄生植物即是通过吸器从寄主中吸收水分、营养来维持自身的生存。这种功能性吸器诱导因子的本质是什么还有待进一步研究。

2.2 管花肉苁蓉种子与寄主根生长的关系

与柽柳根的相对距离大于 1 cm 的管花肉苁蓉种子虽然在寄主根的某种萌发刺激物质的影响下能够萌发,但往往因为萌发的种子在伸长过程中逐渐耗尽胚乳中储藏的营养物质而停止生长,萌发种子的远端常常接触不到寄主根,该种子萌发所形成的瘤状物在继续发育的过程中逐渐进行脱分化,最终形成淡黄色松散的愈伤组织(图 1F)。

与柽柳根相对距离较近的种子所形成的“瘤状物”(附着器官)在接触到寄主根的情况下,以一种寄生植物所特有的机制刺穿柽柳根的皮层,并与寄主根连接,从而建立寄生关系(图 1G)。接种成功的根用爱氏苏木精和冬青油处理后可以观察到柽柳的皮层和韧皮部均

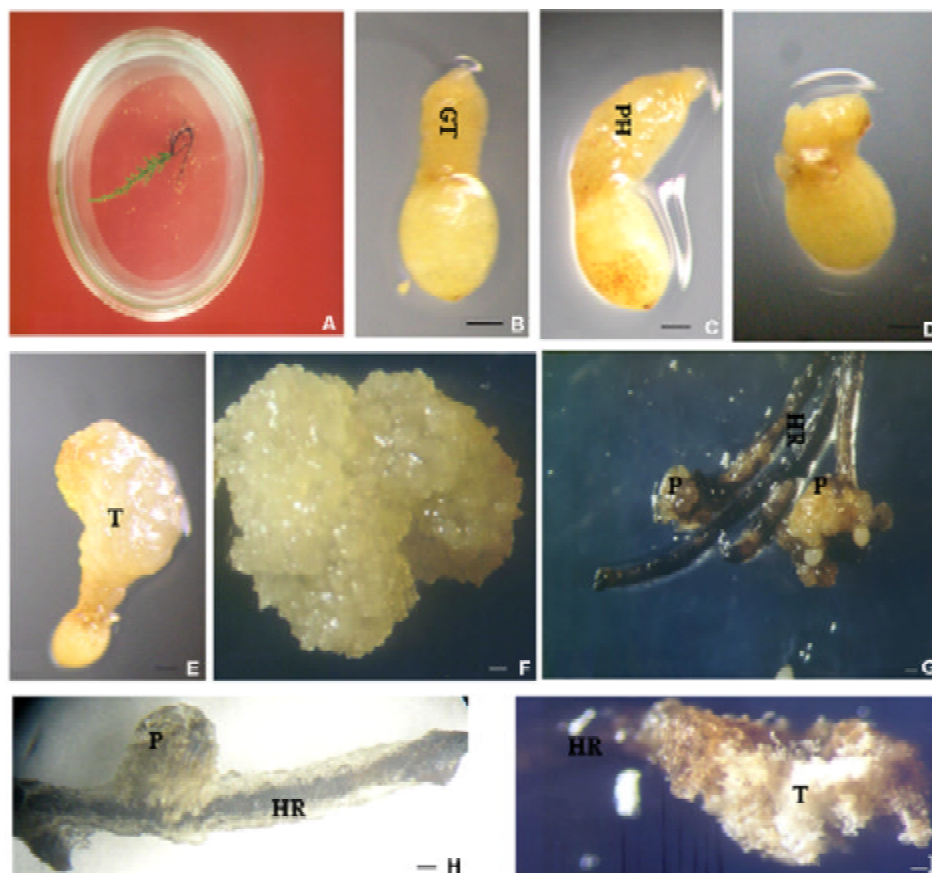


图1 管花肉苁蓉与柽柳试管苗的离体接种

A. 生根的柽柳与管花肉苁蓉种子的共培养; B. 管花肉苁蓉种子的芽管; C. 管花肉苁蓉种子的初生吸器; D, E. 瘤状物的形成; F. 萌发种子形成的愈伤组织; G, H. 种子成功感染寄主根; I. 瘤状物虽与寄主接触, 但未能与寄主成功建立寄生关系。GT. 芽管; PH. 初生吸器; T. 瘤状物; HR. 寄主根; P. 寄生物。比例尺 = 0.5 mm

Fig. 1 In vitro inoculation of *Cistanche tubulosa* seeds on tube seedling of *Tamarix chinensis*

A. Culture of seeds of *Cistanche tubulosa* together with radicated *Tamarix chinensis*; B. Germ tube of *Cistanche tubulosa*; C. Primary haustorium of *Cistanche tubulosa*; D, E. Tubercle formation; F. Callus of germinated seeds; G, H. The successful infection on host roots; I. A tubercle failed to develop parasitic connection with host roots even though it was attached to host. GT. Germ tube; PH. Primary haustorium; T. Tubercle; HR. Host root; P. Parasite. bar=0.5 mm

变得透明。管花肉苁蓉的吸器与寄主柽柳的木质部相连接(图1H), 但也有个别种子发育成的瘤状物虽然与寄主根相接触, 但未能与寄主成功建立寄生关系而逐渐黄化, 以致死亡(图1I)。

本实验用再生苗和实生苗对管花肉苁蓉离体接种率进行了比较。发现一次成苗所生

的根对接种有稍好的效果, 接种率达8.3%, 增殖后生根所得的试管苗与种子的接种率为4.4%, 并且两者对管花肉苁蓉种子接种率方面有显著差异(表1)。一次成苗培养方式下的种子萌发率和接种率均比生根诱导方式高, 这可能是一次成苗生成的根较壮, 更有利于萌发刺激物质和吸器诱导分子的合成。

离体条件下管花肉苁蓉种子成功接种的几率和种子与根的相对位置有关,多数种子是与寄主根的尖端“融合”生长,这主要发生在根毛区。只有很少的种子与寄主建立寄生关系的部位发生在非根毛区。这是否与柽柳根分泌刺激物质的部位主要为根毛区有关?

这还有待验证。通过寄主柽柳的离体快速繁殖得到的试管苗能与管花肉苁蓉种子建立管花肉苁蓉-柽柳接种复合体,但形成接种复合体的接种率还较低,实验方法和接种装置的设计还有待进一步改进。

参 考 文 献

- 李天然, 曹瑞, 马虹, 李西荣, 崔金虎 (2002) 管花肉苁蓉在内蒙古栽培成功. 中国野生植物资源, 21(5): 54-54
- 李天然, 许月英, 戈建新, 徐梅英 (1989) 肉苁蓉种子的萌发与寄主梭梭的关系. 内蒙古大学学报(自然科学版), 20: 395-400
- 盛晋华, 翟志席, 郭玉海 (2004) 荒漠肉苁蓉种子萌发与吸器形成的形态学研究. 中草药, 35: 1047-1049
- 宋志宏, 莫少红, 陈燕, 屠鹏飞, 赵玉英, 郑俊华 (2000) 管花肉苁蓉化学成分的研究. 中国中药杂志, 25: 728-730
- 屠鹏飞, 何燕萍, 楼之岑 (1994) 肉苁蓉类药源调查与资源保护. 中草药, 25: 205-208
- 杨弘远 (1986) 用整体染色与透明技术观察胚囊、胚、胚乳和胚状体. 植物学报, 28: 575-581
- Kadry AER, Tewfic H (1956) Seed germination in *Orobanche crenata* Forssk. *Svenska Botaniska Tidskriften*, 50: 270-286
- Losner-Goshen D, Ben-Hod G, Mayer AM, Joel DM (1996) Aseptic broomrape infection of tomato root culture. *Israel Journal of Plant Sciences*, 44: 89-94
- Rangan TS, Rangaswamy NS (1968) Morphogenic investigations on parasitic angiosperms *Cistanche tubulosa* (Orobanchaceae). *Canadian Journal of Botany*, 46: 263-266
- Zhou WJ, Yoneyama K, Takeuchi Y, Iso S, Rungmekarat S, Chae SH, Sato D, Joel DM (2004) *In vitro* infection of host roots by differentiated calli of the parasitic plant *Orobanche*. *Journal of Experimental Botany*, 55: 899-907