

Ce(NO₃)₃ 对盾叶薯蓣茎段愈伤组织生长和不定根诱导影响的研究

王建安¹, 沙莎², 李艳芝¹, 徐增莱³, 吴国荣²

(1. 济宁医学院药学院, 山东 日照 276826; 2 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046

3. 江苏省中国科学院植物研究所, 江苏 南京 210014)

[摘要] 为研究硝酸铈对盾叶薯蓣快速繁殖的影响, 采用以盾叶薯蓣茎段为外植体, 在其愈伤诱导培养基、丛生芽培养基及生根培养基中添加不同浓度的 Ce³⁺. 结果表明, 含 Ce³⁺ 为 5 mg/L 的培养基可显著提高愈伤组织诱导率, 含 Ce³⁺ 1 mg/L 的培养基丛生芽诱导率最高; 1~15 mg/L 的 Ce³⁺ 对盾叶薯蓣组培苗生根有明显的促进作用, 5 mg/L 的 Ce³⁺ 显示出最强的促进效应. 可以认为, 一定浓度 Ce³⁺ 对诱导愈伤组织生长、丛生芽萌发及不定根生长有促进作用, 但高浓度的 Ce³⁺ 均对其呈现抑制效应.

[关键词] 铈, 盾叶薯蓣, 愈伤组织, 不定根

[中图分类号] S282.1 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2010)01-0094-04

Effect of Ce(NO₃)₃ on Callus Growth and Adventitious Root of Stem From *Dioscorea Zingiberensis*

Wang Jian'an¹, Sha Sha², Li Yanzhi¹, Xu Zenglai³, Wu Guorong²

(1. College of Pharmaceutical Science, Jining Medical University, Rizhao 272826, China

2. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China

3. Jiangsu Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract To study the effect of rare earth Ce(NO₃)₃ on rapid clonal propagation of *Dioscorea zingiberensis*. Using stems of *Dioscorea zingiberensis* as explants, different concentrations of Ce(NO₃)₃ were supplemented to the medium (1/2MS + 0.5 μmol/L IBA) to study the effect of Ce³⁺ on the callus induction medium, adventitious bud initial medium and adventitious root medium. The callus induction was stimulated by 5.0 mg/L Ce³⁺; 1.0 mg/L Ce³⁺ stimulated the bud initial induction, while 1~15 mg/L stimulated adventitious root. The callus induction, adventitious bud initial and rooting was stimulated by the low concentrations of rare earth elements, but higher concentration inhibited them.

Key words cerium, *Dioscorea zingiberensis*, callus, adventitious root

稀土元素具有特殊的理化性质. 研究表明一定浓度的稀土元素有利于作物对营养元素的吸收和叶绿素的合成^[1, 2], 对植物生长具有一定的调节和刺激作用^[3-5]. 近年来, 稀土元素在组织培养上的应用性研究也有一些报道^[6-7].

盾叶薯蓣 (*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright) 是我国特有种, 其根状茎中富含薯蓣皂苷元 (Diosgenin), 是合成甾体激素药物的前体^[8]. 由于过去对盾叶薯蓣大量无节制地采挖, 致使野生资源遭到严重破坏, 濒临枯竭, 且人工栽培的盾叶薯蓣也面临着种质退化现象. 应用植物组织培养技术进行药用植物的快速繁殖, 恢复其优良品质, 是当前人们关注的热点.

本试验对盾叶薯蓣成熟茎段进行离体培养, 在愈伤组织诱导和生根培养的过程中添加一定浓度的稀土 Ce³⁺, 观察稀土元素对愈伤组织诱导和生根的影响, 旨在筛选适合盾叶薯蓣茎段愈伤组织诱导及生根培养的最适 Ce³⁺ 浓度.

收稿日期: 2009-07-20

基金项目: 科技部项目 (2003DEB6J 074), 江苏省科技厅项目 (BG2001045).

通讯联系人: 王建安, 讲师, 硕士, 研究方向: 药用植物与生药学研究. E-mail: anan_ser@163.com

1 材料和方法

1.1 材料

实验材料取自江苏省中国科学院植物研究所(经江苏省中科院植物研究所徐增莱副研究员鉴定),移栽至实验室,成活后取成熟茎段做诱导材料.培养基中所用各种试剂均为分析纯, $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ 为化学纯试剂,配成 1 mg/mL 的母液,灭菌待用.

1.2 盾叶薯蓣离体茎段愈伤组织的诱导

1.2.1 外植体处理

将成熟茎段流水冲洗 12 h 后,再用肥皂液洗去表面污物,蒸馏水洗净;于 70% 酒精中消毒 30 s ,再用 0.1% 升汞消毒 $8\sim 10\text{ min}$, 无菌蒸馏水冲洗 $5\sim 6$ 次,用无菌滤纸吸去表面水分,将茎剪成 1 cm 左右的小段.

1.2.2 愈伤组织与丛生芽的诱导

愈伤组织与丛生芽诱导均采用 $\text{MS} + 6\text{-BA } 2.0\text{ mg/L} + \text{NAA } 0.1\text{ mg/L}$ 基本培养基,在上述培养基的基础上添加不同浓度的 Ce^{3+} 进行诱导、分化培养,浓度设置为 $0.1\ 0.5\ 1\ 5\ 10\ 15\ 20\ 30\text{ mg/L}$ 共 7 个梯度,以不加 Ce^{3+} 的作为对照,每瓶接种 10 个茎段,每个处理各 3 瓶,调节 pH 值 $5.8\sim 6.0$ 光照强度 2000 lx 光暗均为 12 h/d 接种 30 d 后统计出愈率、外植体褐化率及培养后愈伤组织的质量.

将诱导成功的愈伤组织继续进行生芽分化,每瓶接种 10 个愈伤组织,每个处理各 3 瓶, 40 d 后统计愈伤组织丛生芽分化率、褐化率.

1.3 生根培养

待芽长至 2 cm 左右时,转至以 $1/2\text{MS} + 0.5\ \mu\text{mol/L IBA}$ 的基本培养基中,添加不同浓度的 Ce^{3+} 进行生根培养,以不加 Ce^{3+} 元素的作为对照,浓度设置为 $0.5\ 1\ 5\ 10\ 15\ 20\ 30\text{ mg/L}$ 共 7 个浓度梯度,以不加 Ce^{3+} 的作为对照,每处理均重复 5 次,每瓶接入 6 株外植体.培养温度 $(25\pm 1)^\circ\text{C}$ 左右,光照强度 2000 lx 光暗均为 12 h/d 接种后观察组培苗的生根时间,培养 15 d 后分别统计生根率、单株发根条数、新根条数等.

2 结果与分析

2.1 Ce^{3+} 对盾叶薯蓣愈伤组织形成和生长的影响

离体茎段接入培养基后,实验发现不同浓度 Ce^{3+} 处理对外植体的膨大时间基本无影响,在接种后 $5\sim 6\text{ d}$ 左右,茎段两端均开始膨大.添加 Ce^{3+} 处理的茎段愈伤组织的形成均早于对照 $1\sim 2\text{ d}$ 从实验结果看,各浓度的 Ce^{3+} 处理对盾叶薯蓣离体茎段愈伤组织的诱导率、褐化率及增殖的影响较为明显(见表 1). Ce^{3+} 对盾叶薯蓣离体茎段愈伤组织的诱导率影响比较明显,在 5 mg/L 时,愈伤组织的诱导率为 87.4% ,为对照的 1.5 倍;经 SPSS 17.0 统计软件包分析,在 $0.5\sim 5\text{ mg/L}$ 时愈伤组织的诱导率与浓度呈显著正相关 ($R = 0.983\ P < 0.01$);在 $5\sim 10\text{ mg/L}$ 浓度处理下,均与对照之间达到极显著差异 ($P < 0.001$). 随浓度的增加则表现出抑制作用,当浓度为 30 mg/L 时,愈伤组织的诱导率为 16.1% ,仅为对照的 29% ($P < 0.001$). 在 $0.5\sim 30\text{ mg/L}$ 范围内愈伤组织的诱导率与浓度呈极显著负相关 ($R = -0.735\ P < 0.01$).

低浓度的 Ce^{3+} 处理可以显著降低愈伤组织的褐化率,在 5 mg/L 处理时愈伤褐化率最低,只有 13.8% ,较对照低;但高浓度处理组则表现为明显的褐化现象,在培养 25 d 左右, 15 mg/L 处理的愈伤组织呈黄色,质地较为疏松, 25 mg/L 浓度处理的愈伤组织表面出现褐色现象(见图 1),在 30 mg/L 的处理时褐化率最高,达到 67.0% ,与对照相比达到极显著差异 ($P < 0.001$). 在试验的浓度范围内,愈伤组织质量变化明显(见表 1),在 5 mg/L 浓度处理时,愈伤组织平均质量达到 0.427 g 是对照的 3.8 倍,但随 Ce^{3+} 浓度的增加愈伤组织的质量也表现为下降趋势,在浓度 30 mg/L 时,愈伤组织平均质量达到 0.098 g 较对照低,整体表现为显著负相关 ($R = -0.598\ P < 0.05$).

2.2 Ce^{3+} 对盾叶薯蓣茎段芽的分化的影响

愈伤组织接种 30 d 左右开始有不定芽出现,实验发现, Ce^{3+} 对愈伤组织幼芽的诱导率没有显著影响,但对幼芽的分化率影响较明显(见表 1), 0.5 mg/L 和 1 mg/L 的 Ce^{3+} 处理能明显促进芽的分化,芽的分化

率分别为 82% 和 94.5%, 分别是对照的 1.19 倍和 1.37 倍. 当浓度大于 15 mg/L 时则表现出抑制作用, 浓度越高, 抑制作用越强, 当浓度达到 15 mg/L 时, 芽的分化率为 40.6%, 芽的诱导率与浓度表现为显著负相关 ($R = -0.893$ $P < 0.01$).

表 1 不同浓度 Ce^{3+} 对盾叶薯蓣愈伤组织形成和生长的影响

Table 1 Effects of different concentration of Ce^{3+} on the callus formation and growth of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright

Ce^{3+} 浓度 / (mg/L)	茎段数 / 个	愈伤组织诱导率 / %	愈伤褐化率 / %	愈伤组织平均质量 / g	芽分化率 / %
0(ck)	80	58.61	32.03	0.112	68.93
0.5	80	63.00*	29.00*	0.124	82.00***
1	80	61.10**	21.06***	0.242	94.5***
5	80	87.34***	18.80***	0.427	79.3**
10	80	73.0**	37.13*	0.358	82.4***
15	80	76.4**	31.20*	0.158	40.6***
20	80	43.6***	48.00***	0.121	47.3***
30	80	16.12***	67.0***	0.098	35.4***

注: * 表示 $P < 0.05$ ** 表示 $P < 0.01$ *** 表示 $P < 0.001$

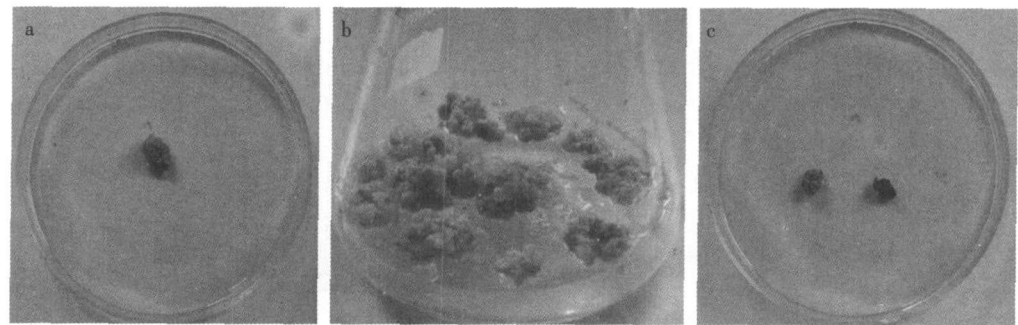


图 1 不同浓度 Ce^{3+} 处理对盾叶薯蓣愈伤组织诱导的影响

Fig. 1 Effect of Ce^{3+} on the callus induction of *Dioscorea zingiberensis*

a 1 mg/L Ce^{3+} 处理; b 15 mg/L Ce^{3+} 处理 (愈伤疏松); c 25 mg/L Ce^{3+} 处理 (褐化)

2.3 Ce^{3+} 对盾叶薯蓣试管苗生根的影响

将诱导产生的约 2 cm 左右的不定芽从愈伤组织上切割下来, 接种到生根培养基上继续培养. 15 d 后即开始测量发根率及发根数, 隔天 1 次, 直至第 40 d 结束. 由表 2 可知, 添加 Ce^{3+} 浓度在 0.5~5 mg/L 对根的诱导没有影响, 但当 Ce^{3+} 浓度超过 10 mg/L 时开始表现为抑制作用, 在 Ce^{3+} 浓度为 30 mg/L 时生根率最低, 生根率与 Ce^{3+} 浓度表现为极显著负相关 ($R = -0.917$ $P < 0.01$). 试验发现, 在 5 mg/L 时生根效果达到最佳, 显著高出对照 ($P < 0.01$), 且明显高于其它浓度的处理, 且根系明显较对照粗壮, 须根产生较多. 随着浓度的增加, 试管苗的生根率逐渐降低, 发根条数逐渐减少, 当 Ce^{3+} 浓度达到 30 mg/L 时, 部分苗基部与根甚至出现褐化现象, 表现为明显的抑制作用, Ce^{3+} 浓度与发根数表现为显著负相关 ($R = -0.507$ $P < 0.05$).

表 2 Ce^{3+} 对盾叶薯蓣试管苗生根的影响

Table 2 Effects of different concentration of Ce^{3+} on the rooting of *Dioscorea zingiberensis*

Ce^{3+} 浓度 / (mg/L)	接种数量 / 株	生根率 / %	单株发根均数 / 条	新根均长 / cm
0(ck)	40	100	1.70	0.95
0.5	40	100	2.25*	1.01
1	40	100	3.73***	1.65***
5	40	100	5.21***	1.71***
10	40	87.06***	4.85***	1.60***
15	40	67.47***	3.62***	1.43***
20	40	58.05***	2.84**	1.24
30	40	40.21***	1.41	1.10

注: * 表示 $P < 0.05$ ** 表示 $P < 0.01$ *** 表示 $P < 0.001$

在生根培养第 25 d 后即开始测量发根长度,隔天一次,直到第 44 d 结束.由表 2 可见, Ce^{3+} 在 1~20 mg/L 浓度处理时促进根系生长效果明显,根系长度显著高于对照.经 SPSS17.0 统计软件包分析发现,与对照组相比均有显著差异 ($P < 0.05$).表明适当浓度的 Ce^{3+} 处理能加快根组织细胞的分裂和伸长.

3 讨论

3.1 Ce^{3+} 对愈伤组织培养及不定芽分化的影响

稀土元素对植物生长能起一定调节和刺激作用,是促进植物生长的有益元素^[9-11].卢萍,鲁宽科^[11]等的研究发现,低浓度的 Eu^{3+} 能促进黄连、大黄愈伤组织的生长^[12].

本实验在 MS 基本培养基的基础上,添加一定浓度的稀土元素 Ce^{3+} 来诱导盾叶薯蓣成熟茎段愈伤组织的形成与芽的形成分化.实验结果显示:添加一定浓度的 Ce^{3+} 能促进盾叶薯蓣茎段愈伤组织的形成、生长及丛生芽的分化,0.5 mg/L 和 1 mg/L 的 Ce^{3+} 处理能明显促进芽的分化,随浓度的增高则表现为抑制作用,且愈伤组织的褐化率随处理浓度的升高而表现为增大趋势.这可能与高浓度的 Ce^{3+} 通过与细胞壁物质紧密结合,使细胞壁变成黑色有关^[13].对于诱导愈伤组织而言,添加 Ce^{3+} 的最佳浓度为 5 mg/L.对于促进丛生芽分化则以 1 mg/L 为最佳.

3.2 Ce^{3+} 对盾叶薯蓣试管苗生根效应的影响

根系是植物吸收水分和营养、合成有机物的主要器官,根系的生长发育和生理活动直接影响着植物整体的生长发育和生理活动.稀土元素能促进根系的生长和不定根的发生,影响细胞的分化和根的形态建成.宋卫平^[14]等利用 10~30 $\mu\text{mol/L}$ $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ 或 $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ 处理可明显加快白沙枇杷组培苗根愈伤组织的形成和不定根的分化,显著提高生根率和促进根系的生长发育.本试验表明,在盾叶薯蓣茎段组织培养中添加一定浓度的 Ce^{3+} 元素对盾叶薯蓣组培苗生根有明显促进作用.为解决盾叶薯蓣组培苗快速繁殖过程中生根困难的问题提供了一定的理论依据,具有一定的应用价值.组培苗不定根的生根数与稀土元素浓度成正相关,但高浓度的 Ce^{3+} 处理则盾叶薯蓣组培苗生根具有明显抑制作用,并且明显引起组织褐化.这主要是因为高浓度的 Ce^{3+} 削弱了 SOD 等保护酶等对活性氧的清除能力和增加了对植物细胞伤害的可能性有关^[15].

我国稀土资源丰富,是世界上稀土第一资源国,我国也是世界上使用和出口药用植物资源最多的国家,在药用植物组织培养过程中添加适宜的稀土元素,并与目前正在开展的 GAP 标准化栽培相结合,对真正实现国家倡导的资源的可持续利用具有非常重要的意义.

[参考文献]

- [1] 曹心得,赵贵文.土壤中可给态稀土元素的研究进展[J].稀土,1997,18(4):66
- [2] 廖铁军,黄云,苏彬彦,等.稀土对作物的生物学效应研究[J].稀土,1994,15(5):26
- [3] 郑海雷,张春光,赵中秋,等.氯化镧对水稻幼根质膜标准氧化还原系统的影响[J].中国稀土学报,2002,19(5):465
- [4] 胡勤海,叶兆杰.稀土元素的植物生理学效应[J].植物生理学通讯,1996,32(4):296
- [5] 汤锡珂.稀土元素对白菜、黄瓜的生长及其活力的影响[J].园艺学报,1988,15(3):186
- [6] 陈汝民,罗虹,叶庆生,等. La^{3+} 对墨兰根状茎的调节作用[J].植物学报,1997,39(5):483
- [7] 杜红梅,张效平.稀土元素对春菊组培苗增殖及其干物质分配的影响[J].上海交通大学学报:农业科学版,2001,19(7):102
- [8] 聂凌鸿,林淑英,宁正祥.薯蓣属植物中薯蓣皂苷元的研究进展[J].中国生化药物杂志,2004,25(5):318
- [9] 曾韶西,王以柔.低温胁迫对黄瓜叶抗氧化酶活性和谷胱甘肽含量的影响[J].植物生理学报,1990,16(1):37
- [10] 张在德,彭涛,夏吉珍,等.稀土[J].1990,11(2):26
- [11] 刘洪章,李亚东,等.稀土对黑穗醋栗的若干生理效应的影响[J].中国稀土学报,1995,13(3):283
- [12] 卢萍,郭洪祝,鲁宽科,等.稀土对黄连愈伤组织生长及生物碱含量的影响[J].中国药学杂志,1999,34(3):153-155
- [13] 徐勤松,施国新,沙莎,等.铈在水鳖叶片内的分布及生理和结构效应分析[J].中国稀土学报,2008,26(4):293-299
- [14] 宋卫平,洪法水,万志刚,等.镧、铈对白沙枇杷试管苗生根效应的研究[J].中国稀土学报,2002,10(5):458-462
- [15] 金春雁,王建安,徐增荣,等.铈(III)对盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright)组培苗生根及生理生化效应的研究[J].中国稀土学报,2006,24(3):380-384

[责任编辑:孙德泉]