

太子参微块根发育的解剖学与组织化学定位

叶祖云¹, 阮少江¹, 王雅英², 田惠桥^{3,*}

¹宁德师范高等专科学校生物系, 福建宁德 352100; ²厦门医学高等专科学校, 福建厦门 361008; ³厦门大学生命科学学院, 福建厦门 361005

摘要: 采用植物组织培养、解剖学及组织化学定位方法研究太子参试管微块根发育的形态结构与营养物质积累特征的结果表明: 太子参微块根由组培苗膨大的腋芽基部长出的不定根发育而成, 经历了初生结构与次生结构发育, 其膨大加粗是由于不定根的次生生长。维管形成层向内形成大量的次生木质部构成微块根的主要部分。淀粉粒是太子参微块根的主要营养存储方式。随着微块根的次生生长, 淀粉粒先在次生木质部薄壁细胞中形成, 随后在次生韧皮薄壁细胞中也大量积累。膨大的微块根可以合成太子参皂苷, 成熟微块根中次生韧皮部的皂苷含量略高于次生木质部。离体太子参微块根的生长发育和营养物质的积累与块根中的相同。

关键词: 太子参; 微块根; 组织化学; 淀粉粒; 皂苷

Micro-Root Tuber Development and Histochemistry Study of *Pseudostellaria heterophylla* Miq.

YE Zu-Yun¹, RUAN Shao-Jiang¹, WANG Ya-Ying², TIAN Hui-Qiao^{3,*}

¹Department of Biology, Ningde Teachers College, Ningde, Fujian 352100, China; ²Xiamen Medical College, Xiamen, Fujian 361008, China; ³School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China

Abstract: The feature of morphology and structure of *in vitro* micro-root tubes of *Pseudostellaria heterophylla* Miq. and their nutrition accumulation were studied using anatomy and histochemistry methods. The micro-root tubers came from inflated adventitious roots of axillary bud. The secondary growth of micro-root tubers made them enlarge. Its vascular cambium formed a large number of xylem parenchyma cells which consisted of main structure of the tuber. The micro-root tubers synthesized starches during its enlargement. Starches were the mainly storage material in the micro-root tubers, which were stored in xylem parenchyma cells. With the secondary growth of micro-root tubers, starches were firstly formed in secondary xylem parenchyma cells, and then abundant starches were also accumulated in most secondary phloem parenchyma cells. In later micro-root tubers, the xylem and phloem parenchyma cells synthesized saponin materials which could be detected using a histochemical method. The development and nutrition accumulation of *in vitro* micro-root tubers of *P. heterophylla* are as same as *in vivo*, which will provide an assay system of *P. heterophylla* to investigate its tuber development and application.

Key words: *Pseudostellaria heterophylla*; micro-root tuber; histochemistry; starches; saponin

太子参为石竹科(Caryophyllaceae)孩儿参属植物, 是我国地道中药材, 以块根入药, 具有益气生津、补肺健脾之功效(中华人民共和国卫生部药典委员会 2005)。据报道, 太子参具有抗疲劳、抗应激、提高免疫力、延年益寿、抗菌抗病毒等作用(余永邦等 2003)。药理学实验表明, 多糖和皂苷是太子参的有效成分, 能明显延长小鼠负重游泳时间和小鼠常压缺氧情况下的存活时间(龚祝南等 2001)。太子参也可提高小鼠的耐低温能力, 增加小鼠免疫器官的重量, 提高正常小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬率和吞噬指数, 对小鼠非特异性免疫功能有

促进作用(刘训红等 2000a, 2000b; 蔡晶等 2005)。我们曾诱导了太子参试管微块根的形成, 查明太子参微块根与块根的形成周期相同, 具有一样的生长特性, 可用于快速繁殖(叶祖云等 2009)。本文进一步研究微块根不同发育时期的形态结构特征和主要有效成分的积累变化规律, 为微块根の利用提供参考资料。

收稿 2009-08-19 修定 2009-09-23
资助 厦门市科技计划项目(3502Z20084037)和宁德市科技计划项目(20090024)。

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

材料与方法

太子参(*Pseudostellaria heterophylla* Miq.)是福建省柘荣县太子参国家中药规范化栽培(GAP)基地‘柘参1号’品种。

诱导微块根形成时,将生长健壮的太子参组培苗剪成带顶芽或腋芽的单茎接入MS固体培养基中。培养基含4.5%蔗糖和0.7%琼脂,pH值为5.8。培养温度为(25±1)℃,光照时间为14 h·d⁻¹,光照强度为27 μmol·m⁻²·s⁻¹。具体方法参见叶祖云等(2009)。

固定与切片微块根时,取不同发育时期的微块根中部,用2.5%戊二醛和1%锇酸双固定,按电镜超微结构固定操作流程对微块根进行固定、脱水、渗透,用Epon812环氧树脂包埋,用超薄切片机切成厚度为1 μm的半薄切片,用于多糖和脂类的染色观察。取不同发育时期的新鲜微块根,用Leica-CM1850冷冻切片机切成厚度为30~40 μm的冰冻切片,用于太子参皂苷的染色观察。

微块根的组织化学定位采用显示环氧树脂厚切片中多糖和脂类的细胞化学方法(胡适宜和徐丽云1990)对不同发育时期微块根半薄切片进行组织化学定位。用高碘酸-席夫试剂(periodic acid-Schiff, PAS)染色显示细胞中的淀粉粒和多糖,呈现红色;用苏丹黑B复染细胞中的脂类物质,呈现黑色。三萜类化合物在无水条件下,与强酸或中强酸作用,发生羟基脱水、双键迁移和双分子缩合等反应,生成的共轭二烯结构单元在酸作用下可形成正碳离子而呈现颜色(姚新生2001)。根据香草醛与三萜酸类成分有较好选择性显色反应特点,常采用等量的5%香草醛-冰醋酸和高氯酸混合试剂作为三萜皂苷的显色剂以促使三萜皂苷成分呈现淡红-红-紫红的颜色变化,且颜色深浅与皂苷含量成正比(郑友兰和李向1986;林如等2002;谭玲玲等2007)。新鲜微块根的冰冻切片放置于载玻片上,滴加上述混合试剂,对太子参皂苷进行显色。对照切片先用水浸泡,溶去皂苷后,再用上述混合试剂显色。

实验结果

1 微块根的诱导形成

太子参试管微块根起源于组培苗茎节处的腋芽。通常靠近培养基表面的一对腋芽中的一个先

生长。培养20 d左右,生长的腋芽基部就长出白色的不定根(图1-a);随着不定根的伸长并接触到培养基,其基部逐渐膨大形成肉眼可见的微块根(图1-b)。培养60 d左右,微块根进入较快的膨大生长期(图1-c)。培养120 d左右,不定根不再膨大,成为成熟的微块根(图1-d)。成熟的微块根形状与块根相似,呈纺锤形,顶端有芽。成熟的微块根长度为0.5~1.0 cm,约为块根的1/10;直径为0.2~0.3 cm,约为块根的1/3;重量为0.04~0.10 g,约为块根的1/20。太子参微块根与块根形成的周期大致相同。组培苗的其他位置长出的不定根不会膨大,不能形成微块根。

2 微块根发育各个时期的结构

腋芽基部长出的不定根经历了初生生长与次生生长期2个发育阶段,形成初生结构和次生结构。在次生生长期中不定根膨大加粗,形成微块根。其具体结构和发育过程为:

2.1 不定根的初生结构 不定根初生结构由表皮(epidermis, E)、皮层(cortex, C)和维管柱(vascular parenchyma, VP)组成(图1-e)。表皮细胞较小,排列紧密,有些表皮细胞形成根毛。皮层由表皮以下的3~4层近圆形薄壁细胞组成,细胞体积较大,液泡化明显,由外向内呈现出由大到小的特征。皮层占据了初生不定根的大部分体积。维管柱位于皮层以内,细胞较小,排列紧密,初生木质部(primary xylem, PX)多为三原型,也有二原型或四原型。初生韧皮部与初生木质部呈辐射状相间排列(图1-e)。

2.2 不定根的次生结构 不定根的次生结构主要由次生维管组织构成,以维管薄壁细胞为主。次生维管组织包括次生韧皮部(secondary phloem, SP)、维管形成层(vascular cambium, VC)和次生木质部(secondary xylem, SX)。随着不定根基部的膨大加粗,皮层细胞被挤压而逐渐破毁脱落。次生生长期初期,维管形成层刚形成,但不明显(图1-f);当不定根处于快速膨大期(图1-c),其横切面上的维管形成层很明显,由2~3层体积较小、排列紧密的分生细胞组成(图1-g)。维管形成层细胞分裂向外产生少量次生韧皮部,向内形成大量的次生木质部,随着次生木质部薄壁细胞数量增多、体积增大,使不定根膨大加粗,是微块根的主要组成部分。

2.3 成熟微块根的结构 培养120 d以后,微块根体

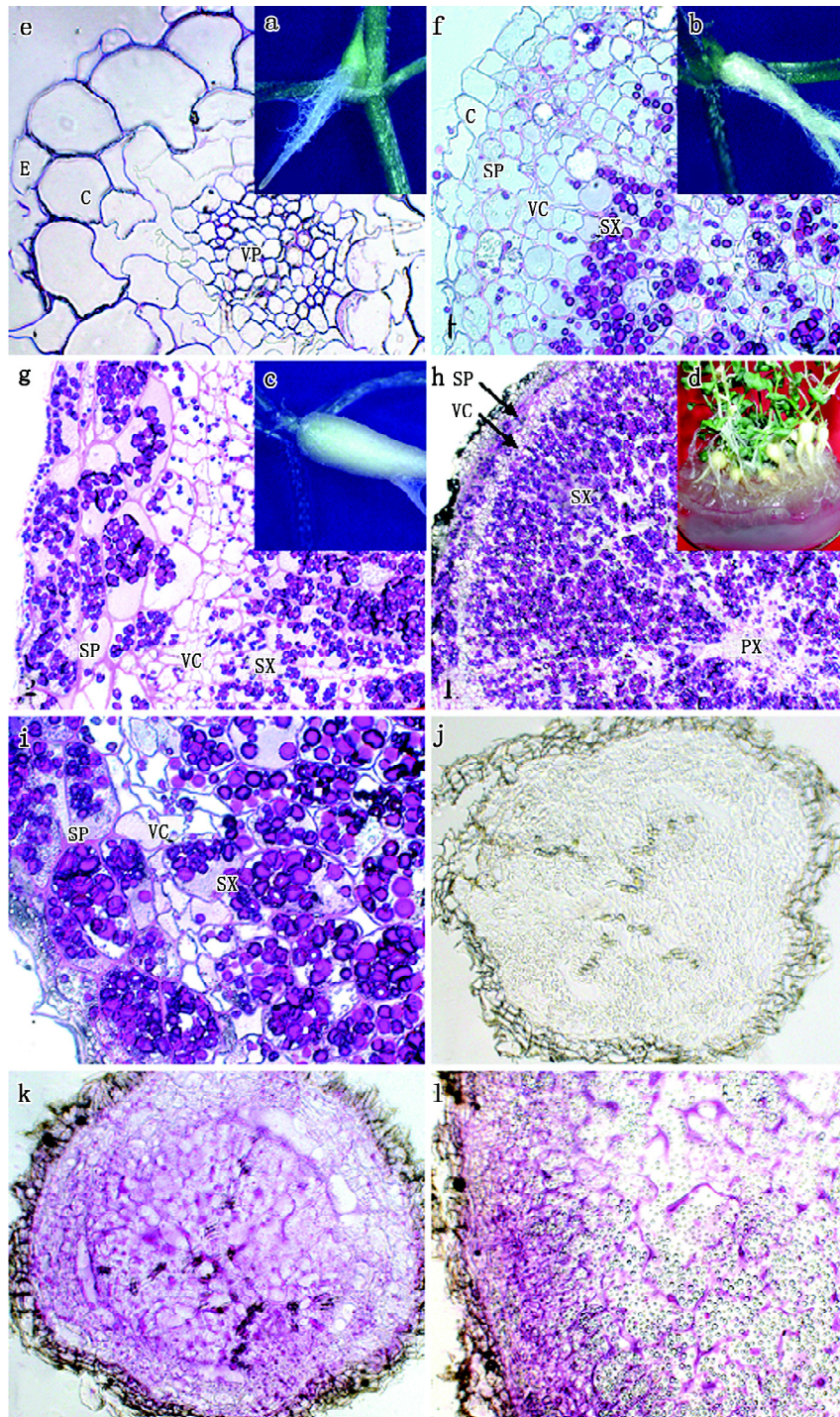


图1 太子参微块根发育和组织化学定位

Fig.1 Development and histochemistry location of micro-root tuber of *P. heterophylla*

a: 太子参组培苗膨大的腋芽基部长出的不定根; b: 基部开始膨大的不定根; c: 迅速膨大的不定根; d: 太子参组培苗产生的成熟微块根; e: 初生不定根的横切面($\times 150$); f: 刚形成的次生不定根的横切面, 次生维管薄壁细胞中开始积累淀粉($\times 120$); g: 膨大不定根的横切面, 维管形成层明显, 次生韧皮部薄壁细胞中也逐渐积累淀粉($\times 100$); h: 成熟微块根的横切面, 在次生维管薄壁细胞中积累了大量淀粉($\times 50$); i: 维管形成层停止分裂并膨大, 次生韧皮部和次生木质部主要由薄壁细胞构成, 含大量淀粉($\times 200$); j: 正在膨大的不定根冰冻切片用水浸泡后, 皂苷显色剂不显色($\times 80$); k: 正在膨大的不定根冰冻切片, 皂苷显色剂使次生维管组织呈现紫红色($\times 80$); l: 成熟微块根中, 皂苷显色剂使次生维管组织呈现紫红色, 次生韧皮部的颜色比次生木质部的略深, $\times 80$ 。E: 表皮; C: 皮层; VP: 维管柱; PX: 初生木质部; VC: 维管形成层; SP: 次生韧皮部; SX: 次生木质部。

积不再增加,组培苗逐渐枯死。成熟微块根横切面由外至内依次是周皮、次生韧皮部、维管形成层、次生木质部和初生木质部(图1-d、h)。不定根膨大形成微块根的过程中,其维管形成层向内产生的次生木质部多,向外产生的次生韧皮部少,成熟微块根主要由次生木质部构成。成熟微块根的周皮由几层死细胞组成;其内的次生韧皮部由3~5层薄壁细胞组成,形成层细胞停止分裂,呈现出高度液泡化状态(图1-i)。次生木质部主要为木质部薄壁细胞,导管很少,呈稀疏的放射状分布。微块根中央保留的初生木质部所占体积较小,主要由导管组成(图1-h)。

3 微块根形成过程的组织化学定位

太子参块根中所含的多糖和皂苷是该种植物的重要药用成分,分别分析如下:

3.1 多糖的组织化学定位 在太子参微块根初生结构中,各类组织细胞中均没有淀粉粒积累(图1-e)。随着不定根的次生生长,维管形成层活动产生次生维管组织后,先在次生木质部的薄壁组织细胞内积累淀粉粒(图1-f),随着微块根的膨大加粗及维管薄壁细胞的生长发育,淀粉粒出现在韧皮部薄壁细胞中(图1-g)。在成熟微块根中,次生韧皮部薄壁组织细胞和次生木质部中积累了大量的淀粉粒,而周皮和维管形成层细胞不含淀粉粒。在次生木质部中,淀粉粒主要分布在后来形成的薄壁细胞中,而在中央的原初生木质部中的淀粉粒较少(图1-h)。在韧皮部中,淀粉粒的分布呈团状。两层维管形成层细胞停止分裂,细胞体积有所增加,但不含淀粉粒。占微块根主要体积的次生木质部薄壁细胞内累积了大量的淀粉粒(图1-i)。另用苏丹黑B染液显示脂类的实验中均未显色,表明太子参微块根中没有脂类物质积累。

3.2 皂苷的组织化学定位 含有皂苷的微块根细胞可与香草醛反应,呈现红色。而没有皂苷的细胞不发生显色反应。在不定根的次生结构中,阴性对照各组织都未有明显的皂苷显色反应(图1-j)。在不定根阳性反应中,除了最外面的周皮组织以外,次生韧皮部和次生木质部均被皂苷显色剂染成紫红色(图1-k、l)。在处于迅速膨大的微块根中,次生维管组织显色的程度大致相同,都呈紫红色(图1-k);在成熟的微块根中,次生韧皮部呈现的皂苷红颜色比次生木质部的深一些,而次生木质部越接近中央,

呈现的皂苷红色越淡一些(图1-l)。淀粉粒在皂苷显色剂中未被染色(图1-l)。

讨 论

太子参微块根是组培苗腋芽基部长出的不定根膨大加粗形成的,而其他部位长出的不定根不会膨大,不能形成微块根。成熟的微块根与块根一样,顶端有芽,可作为无性繁殖器官(叶祖云等2009)。微块根的增粗是由不定根的次生生长、维管形成层向内产生大量的次生木质部薄壁细胞以及这些细胞的生长所产生。成熟的微块根中绝大部分由次生生长产生的维管薄壁细胞构成。与彭华胜等(2008)研究太子参块根的发育解剖学的结果相比,本文中太子参试管微块根的形成过程、外部形态和内部结构与体内块根基本一致,因此认为可作为研究块根发育的实验材料。

太子参块根中所含的多糖和皂苷是该种植物的重要药用成分,应用组织化学定位技术来确定药用成分在植物器官组织中的分布和积累状态可作为开发、利用太子参的依据之一。由离体培养形成的微块根除了体积小以外,其他特征都与体内块根相同,微块根中的营养物质代谢和积累是否也与块根一样,尚待进一步研究。高碘酸的多糖反应结果表明,淀粉粒是微块根的主要营养存储物质。随着不定根的次生生长,淀粉粒在维管木质部薄壁细胞中积累。在停止生长的成熟微块根中,大量淀粉粒积累于次生木质部和韧皮部管薄壁细胞。在太子参微块根冰冻切片的皂苷染色反应中,微块根的次生结构中积累太子参皂苷。在成熟的微块根中,太子参皂苷主要分布在次生木质部和韧皮部维管薄壁细胞中。离体培养的微块根可以积累太子参多糖和皂苷等有效成分,而且微块根积累皂苷的方式与太子参在体块根的皂苷积累方式相似(彭华胜等2009)。太子参离体微块根中能积累多糖物质并合成皂苷类物质表明其依然保持主要生理特征,因此可以作为研究块根发育的实验材料。

太子参组培苗形成的肉质微块根主要是由薄壁细胞构成的,与太子参块根一样,是营养物质的贮存器官。太子参微块根在离体人工培养的条件下也能合成其特有的药用有效成分——皂苷,这一特色可能具有商品化生产的潜力。

参考文献

- 蔡晶, 李孝栋, 陈旭征, 郑良朴, 林久茂(2005). 太子参多糖粗提物对小鼠免疫功能的影响. 福建中医学院学报, 15 (3): 33~35
- 龚祝南, 戴岳, 马辉, 王峥涛, 余国奠(2001). 8个不同产地太子参对脾虚及免疫功能的影响. 中药材, 24 (4): 281~282
- 胡适宜, 徐丽云(1990). 显示环氧树脂厚切片中多糖、蛋白质和脂类的细胞化学方法. 植物学报, 32 (11): 841~846
- 林如, 曹玉芳, 胡正海(2002). 绞股蓝营养器官的结构及其人参皂甙的组织化学定位研究. 西北植物学报, 22 (4): 796~800
- 刘训红, 陈彬, 王玉玺(2000a). 太子参多糖抗应激和免疫增强作用实验研究. 江苏中医, 21 (10): 51~52
- 刘训红, 陈彬, 王玉玺(2000b). 太子参总皂甙药理作用的初步研究. 江苏药学与临床研究, 8 (3): 6~8
- 彭华胜, 胡正海, 刘文哲, 谭玲玲(2008). 栽培太子参块根的发育解剖学研究. 西北植物学报, 28 (5): 861~867
- 彭华胜, 刘文哲, 胡正海, 张玲(2009). 栽培太子参块根中皂苷的组织化学定位及其含量变化. 分子细胞生物学报, 42 (1): 1~10
- 谭玲玲, 胡正海, 蔡霞, 陈莹, 史文静(2007). 北柴胡营养器官中主要化学成分的组织化学定位及其含量比较. 分子细胞生物学报, 40 (4): 214~222
- 姚新生(2001). 天然药物化学. 第3版. 北京: 人民卫生出版社
- 叶祖云, 王雅英, 田惠桥(2009). 太子参试管微块根形成及其应用初探. 植物生理学通讯, 45 (3): 263~266
- 余永邦, 秦民坚, 余国奠(2003). 太子参化学成分、药理作用及质量评价研究进展. 中国野生植物资源, 22 (4): 1~7
- 郑友兰, 李向(1986). 吉林人参参与西洋参生药和组织化学的比较研究. 吉林农业大学学报, 8 (4): 30~35
- 中华人民共和国卫生部药典委员会主编(2005). 中华人民共和国药典(一部). 北京: 化学工业出版社, 46