

北柴胡侧根发育及影响因素探究

段莎莎, 侯大斌*, 余 马, 舒晓燕, 黄 晶, 刘 丹

西南科技大学生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621000

摘 要: 目的 探索北柴胡 *Bupleurum chinense* 侧根发育过程及影响侧根发育的因素, 为北柴胡产量提升及商品性改良提供技术支持。**方法** 对北柴胡品种川北柴 1 号主根进行石蜡切片观察侧根原基发育动态图, 以及添加不同浓度生长调节物质后进行根系参数考察。**结果** 北柴胡侧根原基起源于中柱鞘细胞, 部分内皮层细胞也参与侧根原基发育; 施加 10 $\mu\text{mol/L}$ IAA 和 Ca^{2+} 浓度均最大化促进北柴胡根系发育, 而浓度过高则抑制侧根发育; 施加 0.1 $\mu\text{mol/L}$ TIBA 和 10 $\mu\text{mol/L}$ EDTA 显著促进柴胡根系发育, 浓度过高则起抑制效果。**结论** 本研究方法还可以广泛应用于人参、当归等以根入药的药用植物中, 对药用植物栽培及育种工作具有重大意义。

关键词: 北柴胡; 侧根发育; 中柱鞘; 生长素; EDTA; TIBA

中图分类号: R282.21

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)19-4062-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.19.025

Root development in *Bupleurum chinense* and its impact factors

DUAN Sha-sha, HOU Da-bin, YU Ma, SHU Xiao-yan, HUANG Jing, LIU Dan

School of life science and engineering, southwest university of science and technology, Mianyang 621000, China

Abstract: **Objective** To identify the development process and impact factors of lateral root in *Bupleurum chinense*. **Methods** The dynamic growth of lateral root primordia was observed by applying paraffin sectioning, and by light microscopy. In addition, the influence of growth regulators treatment on lateral root growth was also investigated. **Results** The lateral root primordium formation of *B. chinense* started near the pericycle cells, part of the endodermis cells also participated in this formation; 10 $\mu\text{mol/L}$ IAA and Ca^{2+} greatly promoted the development of lateral root, but its high concentration inhibited lateral root emergence; 0.1 $\mu\text{mol/L}$ TIBA and 10 $\mu\text{mol/L}$ EDTA promoted the development of lateral root, but its high concentration inhibited lateral root emergence. **Conclusion** This research method can also be applied in other pharmaceutical plants, such as *Angelica sinensis* and *Panax ginseng*. So the study is very important to medicinal plant cultivation and breeding.

Key words: *Bupleurum chinense* DC.; lateral root development; pericycle; auxin; EDTA; TIBA

侧根分支对植物可以起到土壤锚定、支撑地上部位、摄取营养及水分等作用, 是植物适应环境的重要标志^[1-3]。植物侧根发生起源于中柱鞘细胞, 经内源生长素诱导调控, 定向分化形成侧根起始细胞, 并进一步发育形成侧根^[4-5]。模式植物拟南芥侧根起源于靠近木质部中柱鞘细胞, 单子叶植物水稻侧根起源于靠近韧皮部中柱鞘细胞, 此外, 在玉米中还发现部分内皮层细胞参与侧根的发生^[6]。因此侧根的形成由于物种间差异具有显著特异性。

相对模式植物和主要作物而言, 柴胡直接以根入药, 其侧根多少直接影响柴胡产量、药效成分量

及商品性, 但柴胡侧根原基发育过程及影响柴胡侧根发育的因素尚未见系统报道。针对这一问题, 本实验研究了川北柴 1 号柴胡幼苗侧根原基起始发育过程, 并探讨了生长调节物质生长素 IAA、生长素抑制剂 TIBA、 Ca^{2+} 以及 Ca^{2+} 螯合剂 EDTA 对柴胡侧根发育的影响, 以明确北柴胡侧根的形成机制, 为北柴胡产量提升及商品性改良提供技术基础。

1 材料

样品品种为川北柴 1 号, 经西南科技大学侯大斌教授鉴定为北柴胡 *Bupleurum chinense* DC.。选取饱满的北柴胡种子, 置于装有珍珠岩的纸杯中, 每

收稿日期: 2017-03-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81603223); 四川省“十三五”科技育种攻关项目 (2016NYZ0020)

作者简介: 段莎莎 (1992—), 女, 硕士在读, 研究方向为药用植物育种。Tel: 15196278464 E-mail: yuwen0073@126.com

*通信作者 侯大斌, 男, 博士, 教授, 研究方向为天然产物。Tel: (0816)6089523 E-mail: dbhou@126.com

个杯子中放置5颗种子,于恒温培养箱中发芽。待种子根长至3 cm左右时,移至Hoagland完全营养液中进行水培,对根部进行遮光处理。室内培养条件:昼温(25±2)℃、夜温(22±2)℃,每日光照时间16 h,光照强度约为500 μmol/(m²·s)。培养10 d后选取长势一致的柴胡幼苗进行实验处理。

2 方法

2.1 北柴胡侧根原基发育观察

在川北柴1号长出第1个侧根时,选取10棵健壮的植株幼根,对主根进行石蜡切片,经番红固绿染色后在倒置显微镜下观察并拍摄其显微结构。

2.2 生长调节物质对侧根发育的影响及参数的测定

2.2.1 生长调节物质的添加 柴胡幼苗在培养液中培养10 d后,选取长势一致的幼苗进行IAA、TIBA、Ca²⁺和EDTA处理,处理时间12 h,各浓度处理15个植株,处理浓度梯度见表1。再转入Hogland培养液15 d后测定根系参数。培养过程中每3天更换1次营养液,并用NaOH或HCl溶液调节营养液pH值,使其始终保持在pH值5.5左右,每个处理均设置3次重复。

表1 各试剂处理浓度

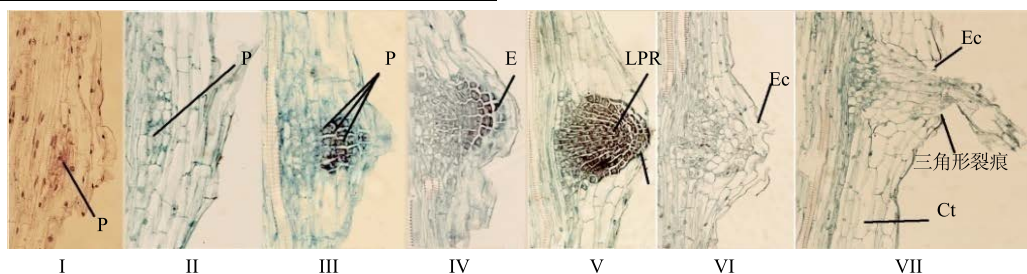
处理	浓度/(μmol·L ⁻¹)			
	IAA	Ca ²⁺	TIBA	EDTA
1	0.00	0	0.0	0
2	0.01	1	0.1	1
3	0.10	10	1.0	10
4	1.00	100	10.0	100
5	10.00	1 000	100.0	1 000
6	100.00	10 000	1 000.0	10 000

2.2.2 参数测定 将收获后的根系样品立即保存于25%的酒精溶液中,再通过数字扫描仪(EPSON PERFECTION V700 PHOTO)将完整的根系图像存入计算机,之后用WinRhizo根系分析系统软件对侧根数目、总根长度、根表面积及根体积进行定量测定。采用Microsoft Excel 2007和SPSS处理数据方差分析,使用Origin 8.0作图。

3 结果与分析

3.1 北柴胡侧根原基发育过程

川北柴1号在营养液中培养10 d后,侧根开始发生,其侧根形成的动态过程见图1-I~VII。由图1-I可见,中柱鞘细胞脱分化,进行细胞分裂,细胞质变浓,细胞核变大,染色性增强,细胞液泡化程度减小,此时中柱鞘细胞进行垂周分裂形成建成细胞(PFCs)。由图1-II、III可见,中柱鞘细胞发生垂周和平周分裂,形成2~3层侧根原基。由图1-IV可见,中柱鞘细胞继续由内向外细胞分裂形成多细胞层侧根原基,内皮层细胞也发生垂周分裂,形成包被着中柱鞘的外层细胞。由图1-V可见,侧根原基继续细胞分裂,细胞数目明显增多,细胞层数变为多细胞层,细胞核体积变大,且染色加深,此时侧根原基呈现圆锥形;在侧根原基发育过程中,内皮层细胞只进行了垂周分裂,未进行平周分裂,保持单层细胞结构。并且此时内皮层细胞的细胞核消失,细胞壁染色较深,内皮层细胞与中柱鞘原基有明显的界限。由图1-VI可见,侧根原基逐渐向外发育,不断挤压表皮,图中表皮层接近破碎,内皮层细胞核消失。由图1-VII可见,侧根原基完全突破表皮,表皮细胞与侧根原基之间形成三角形裂痕。



P-中柱鞘 E-内皮层 LPR-侧根原基 Ct-皮层 Ec-表皮细胞 I-中柱鞘细胞脱分化形成建成细胞(番红染色) II、III-中柱鞘细胞分化形成2~3层细胞 IV、V-侧根原基形成 VI-侧根原基即将突破表皮,表皮细胞出现破碎 VII-侧根原基突破表皮,表皮出现三角形裂痕
P-pericycle E-endodermis LPR-lateral root primordial Ct-cortex Ec-epidermal cells I-Pericyclic cells dedifferentiated division to form founder cells(by safranin dyeing) II, III-Pericyclic cells differentiated into 2—3 layers of cells IV, V-The formation of the lateral root primordial VI-The lateral root primordia was breaking through the epidermis, and epidermal cells were broken VII-The lateral root primordia had broken through the epidermis, and epidermal cells appeared triangular cracks

图1 石蜡切片显示北柴胡侧根发育动态过程

Fig. 1 Lateral root development of *Bupleurum chinense* by Paraffin sections

3.2 北柴胡侧根发育影响因素

3.2.1 IAA 和 TIBA 对北柴胡侧根发育的影响 随 IAA 浓度增加, 北柴胡侧根数目、总根长度(主根与一级侧根长度的和)、一级侧根长度、主根长度、根表面积及根体积逐渐增加, 当浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 时各根系表型测量值均达到最大, 之后均呈下降趋势。其中, $10 \mu\text{mol/L}$ IAA 极显著促进柴胡侧根数目、根体积增加, 显著促进总根长、主根长度生长; 100

$\mu\text{mol/L}$ IAA 浓度显著抑制侧根数目、总根长生长(图 2-A, 表 2)。与对照组相比, 低浓度的生长素抑制剂 TIBA 促进侧根发育, 浓度过高则抑制侧根发育。当 TIBA 浓度为 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 时极显著促进侧根数目增加、一级侧根生长, 显著促进总根长增加; 当 TIBA 浓度达到 $100 \mu\text{mol/L}$ 时极显著抑制总根长生长, 显著抑制主根生长; 达到 $1\ 000 \mu\text{mol/L}$ 时对柴胡幼苗有致死效果(图 2-B, 表 3)。

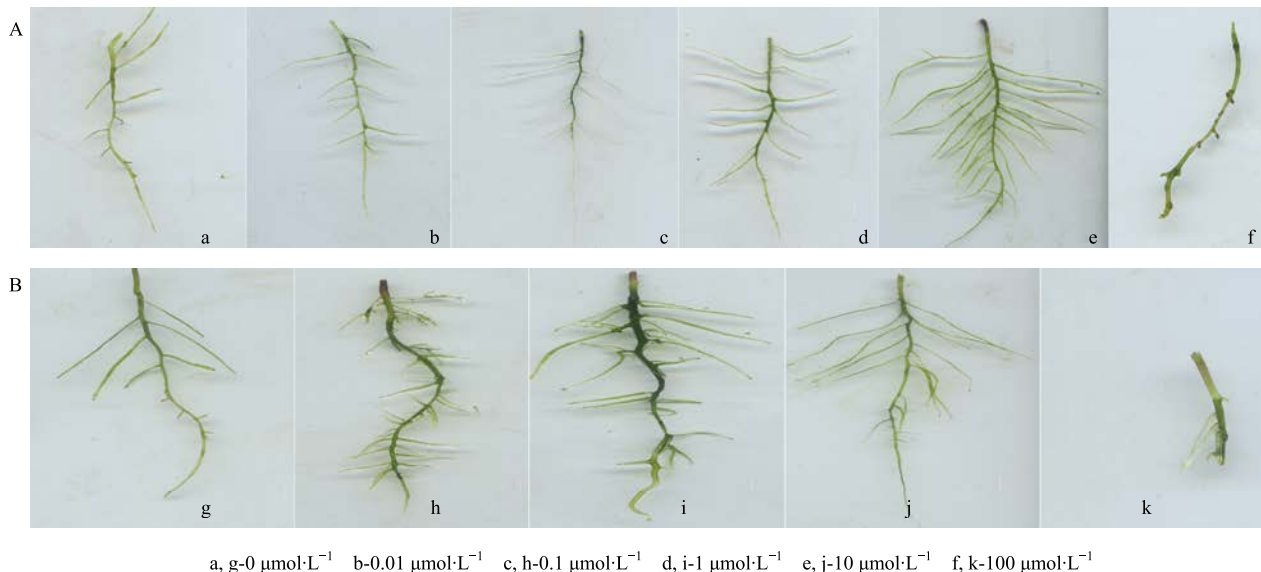


图 2 IAA (A) 和 TIBA (B) 对北柴胡根系生长状况影响

Fig. 2 Effect of IAA (A) and TIBA (B) on root growth of *B. chinense*

表 2 IAA 浓度对北柴胡侧根的影响

Table 2 Effect of IAA concentration on lateral roots of *B. chinense*

IAA/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	侧根数目/个	总根长/cm	根表面积/ cm^2	根体积/ cm^3	主根长度/cm	一级侧根长度/cm
0	10.330 0 b	18.980 0 b	1.710 0 ab	0.010 4 a	5.830 0 ab	13.000 0 ab
0.01	11.500 0 b	20.660 0 bc	1.820 0 ab	0.010 8 a	6.890 0 b	13.000 0 ab
0.10	14.750 0 b	21.390 0 b	1.960 0 ab	0.013 0 a	6.330 0 ab	15.000 0 ab
1.00	14.250 0 b	26.800 0 c	2.320 0 ab	0.014 6 a	6.850 0 b	19.000 0 ab
10.0	23.000 0 c	38.920 0 c	2.620 0 b	0.024 0 b	11.000 0 c	28.000 0 b
100.0	5.400 0 a	6.570 0 a	0.850 0 a	0.010 0 a	2.660 0 a	4.000 0 a

不同字母表示差异显著, $P < 0.05$, 下同

Different letters means $P < 0.05$, same as below

表 3 TIBA 浓度对北柴胡侧根的影响

Table 3 Effect of TIBA concentration on lateral roots of *B. chinense*

TIBA/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	侧根数目/个	总根长/cm	根表面积/ cm^2	根体积/ cm^3	主根长度/cm	一级侧根长度/cm
0	16.800 0 bc	26.110 0 bcd	3.415 7 bc	0.033 5 bc	5.000 0 c	21.000 0 b
0.1	35.350 0 d	46.210 0 d	4.930 0 c	0.039 5 c	4.700 0 bc	41.110 0 c
1.0	27.800 0 cd	42.000 0 cd	2.655 0 b	0.023 5 bc	4.300 0 bc	37.100 0 c
10.0	14.350 0 b	20.560 0 abc	2.135 0 b	0.016 0 ab	3.000 0 bc	16.110 0 b
100.0	8.200 0 ab	12.500 0 ab	1.621 4 ab	0.014 0 ab	2.000 0 ab	10.110 0 ab
1 000.0	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a

3.2.2 Ca^{2+} 和 EDTA 对北柴胡侧根发育的影响
随 Ca^{2+} 浓度增加, 北柴胡根系参数逐渐增加, 浓度达到 $10\ \mu\text{mol/L}$ 时达到最大, 之后均呈下降趋势, 浓度超过 $10\ \mu\text{mol/L}$ 抑制侧根发育。其中 $10\ \mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} 浓度极显著促进侧根发育。(图 3-A; 表 4) 外施 EDTA (Ca^{2+} 螯合剂) 对柴胡侧根发育主要起抑制作用, 随 EDTA 浓度增加, 柴胡根系参数数值逐渐增加, 浓度达到

$10\ \mu\text{mol/L}$ 达到最大, 之后均呈下降趋势, 浓度超过 $10\ \mu\text{mol/L}$ 抑制侧根发育。其中, $10\ \mu\text{mol/L}$ EDTA 浓度极显著促进总根长、一级侧根长度和根体积发育; 100 和 $1\ 000\ \mu\text{mol/L}$ EDTA 浓度抑制侧根数目、一级侧根长度和表面积减少, 但对总根长、主根长度和根体积无显著影响; $10\ 000\ \mu\text{mol/L}$ EDTA 浓度对侧根发育起抑制作用 (图 3-B, 表 5)。



l, r- $0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ m, s- $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ n, t- $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ o, u- $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ p, v- $1\ 000\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ q, w- $10\ 000\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

图 3 Ca^{2+} (A) 和 EDTA (B) 对北柴胡根系生长状况影响

Fig. 3 Effect of Ca^{2+} (A) and EDTA (B) on root growth of *B. chinense*

表 4 Ca^{2+} 浓度对北柴胡侧根的影响

Table 4 Effect of Ca^{2+} concentration on lateral roots of *B. chinense*

Ca^{2+} 浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	侧根数目/个	总根长/cm	根表面积/ cm^2	根体积/ cm^3	主根长度/cm	一级侧根长度/cm
0	10.130 0 a	18.800 0 ab	1.780 0 a	0.012 3 a	5.500 0 ab	13.300 0 a
1	12.500 0 a	26.370 0 b	2.410 0 a	0.017 0 a	6.930 0 ab	19.440 0 a
10	25.500 0 b	37.900 0 c	3.950 0 b	0.035 0 b	8.430 0 b	29.500 0 b
100	14.000 0 a	23.730 0 ab	2.410 0 a	0.019 3 a	6.750 0 ab	16.980 0 a
1 000	13.500 0 a	18.250 0 ab	1.940 0 a	0.014 8 a	5.200 0 ab	13.050 0 a
10 000	9.250 0 a	14.550 0 a	1.420 0 a	0.009 3 a	3.600 0 a	10.950 0 a

表 5 EDTA 浓度对北柴胡侧根的影响

Table 5 Effect of EDTA concentration on lateral roots of *B. chinense*

EDTA/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	侧根数目/个	总根长/cm	根表面积/ cm^2	根体积/ cm^3	主根长度/cm	一级侧根长度/cm
0	10.280 0 b	17.310 0 b	1.900 0 d	0.013 9 bc	5.050 0 b	12.010 0 b
1	12.550 0 bc	19.260 0 b	2.180 0 d	0.016 2 c	6.080 0 b	13.220 0 b
10	16.000 0 c	36.040 0 c	2.710 0 e	0.026 0 d	7.940 0 b	2.670 0 a
100	4.870 0 a	16.210 0 b	1.480 0 bc	0.009 1 b	5.000 0 b	2.130 0 a
1 000	3.660 0 a	15.950 0 b	1.050 0 b	0.009 0 b	4.160 0 b	1.630 0 a
10 000	0.670 0 a	1.000 0 a	0.100 0 a	0.001 0 a	0.500 0 a	0.250 0 a

4 讨论

传统根系取样时,由于根系与土壤间相互作用^[7],直接取样会破坏根系部分结构,影响根系完整性,造成实验数据严重偏差。本实验采用 Hogland 营养液添加植物激素的方法,该方法在不影响植株生长发育的情况下进行取样,直接观察根系动态发育过程。利用该方法可筛选出苗期根系生长优势材料,对药用植物根系改良具有重要意义。

对拟南芥、水稻、玉米、小麦等模式植物研究表明,侧根原基都是起始于中柱鞘细胞,这些细胞通常都位于主根成熟区,且正对着木质部或者韧皮部细胞。在拟南芥等双子叶植物中,侧根原基起始于靠近木质部中柱鞘细胞^[8]。而在单子叶植物水稻、小麦、玉米中,侧根原基起始于靠近韧皮部中柱鞘细胞或内皮层部位^[9]。对北柴胡研究表明,柴胡侧根原基起始于靠近木质部中柱鞘细胞,与双子叶植物一致,且有部分内皮层细胞参与侧根的发育,与部分单子叶植物侧根发育相似。说明侧根的发育在不同物种中既具有保守性,又具有物种特异性。

柴胡以根入药,根部的健壮程度直接影响柴胡的商品性。Tan 等^[10]研究发现多支根柴胡侧根数目多,皂苷量高,因此其药效高于单支根柴胡。此外,侧根发生位置和时间取决于生长素的周期性变化^[11-12],该过程需要生长素输入载体^[13]和输出载体^[14]的协同作用。并且当中柱鞘特定部位生长素浓度达到一定阈值时,侧根原基才能形成。而 Ca^{2+} 作为第二信使,参与植物生长发育的各个阶段^[15]。本研究中,当 IAA 和 Ca^{2+} 浓度均为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时有利于高皂苷多支根柴胡的培育。TIBA 作为生长素极性运输的输出抑制剂,能抑制 PIN 蛋白从胞内到质膜的循环和移动^[16],通过结合生长素输出复合体来有效地阻止 IAA 的极性运输^[17],从而导致 IAA 在细胞和组织的积累,可以刺激或者抑制根的生长。彭琼^[18]研究表明 10 $\mu\text{mol/L}$ TIBA 能显著增加第一对侧枝的长度及单株花生的侧根分枝数目。Hafiz 等^[19]研究表明,叶面喷施低浓度 TIBA 后麻风树的分枝数目也显著增加。本研究表明,0.1 $\mu\text{mol/L}$ TIBA 极显著促进北柴胡侧根数目增加,一级侧根的生长和总根长的生长,而不抑制主根生长。这与彭琼^[18]研究结果基本一致。EDTA 作为 Ca^{2+} 螯合剂,阻止 Ca^{2+} 在植物体内转运,抑制侧根形成^[20]。本研究中,当外施 TIBA

和 EDTA 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,柴胡侧根生长受到显著抑制,但此浓度下柴胡主根生长也受到抑制。因此进一步探索适宜的生长激素浓度,以协调柴胡规模化种植中的主根和侧根生长量极为必要。另外,本研究方法还可应用到人参、当归等以根入药的药用植物中,对调控中药材商品性具重大意义。

参考文献

- [1] Jung J K, McCouch S. Getting to the roots it: Genetic and hormonal control of root architecture [J]. *Plant Sci*, 2013, 4(2): 186.
- [2] Smith S, De Smet I. Root system architecture: insights from Arabidopsis and cereal crops [J]. *Philos Trans R Soc Lond Biol Sci*, 2012, 367(1595): 1441-1452.
- [3] Uga Y, Sugimoto K, Ogawa S, et al. Control of root system architecture by DEEPER ROOTING 1 increases rice yield under drought conditions [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(9): 1097-1102.
- [4] Ljung K. Auxin metabolism and homeostasis during plant development [J]. *Development*, 2013, 140(5): 943-950.
- [5] Zhao F Y, Hu F, Zhang S Y, et al. MAPKs regulate root growth by influencing auxin signaling and cell cycle-related gene expression in cadmium stressed rice [J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2013, 20(8): 5449-5460.
- [6] Hochholdinger F, Zimmermann R. Conserved and diverse mechanisms in root development [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2008, 11(1): 70-74.
- [7] Ghasemali N, Sivio S. Genetic bases of root system architecture in durum wheat seedlings [J]. *InterJ Life Sci*, 2016, 10(1): 25-28.
- [8] 石英, 韩毅强, 郑殿峰, 等. 赤霉素对拟南芥主根分生区和伸长区的调控 [J]. *植物生理学报*, 2015, 25(1): 21-28.
- [9] Perilli S, Di Mambro R, Sabatini S. Growth and development of the root apical meristem [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2012, 15(1): 17-23.
- [10] Tan X, Calderon V L, Sharon M, et al. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase [J]. *Nature*, 2007, 446(7136): 640-645.
- [11] Ren Z X, Liu R Y, Gu W T, et al. The Solanum lycopersicum auxin response factor SlARF2 participates in regulating lateral root formation and flower organ senescence [J]. *Plant Sci*, 2017, 256: 103-111.
- [12] Overvoorde P, Fukaki H, Beeckman T. Auxin control of root development [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2(6): a001537.

- [13] 安建平, 王小非, 刘 鑫, 等. 苹果省长杜输入载体 MdAUX1 的基因克隆及在拟南芥和烟草中国的遗传转化 [J]. 植物研究, 2016, 36(6): 902-908.
- [14] 曹文杰, 李贵生. 生长素输出载体 PIN 蛋白的质膜定位机制 [J]. 植物学报, 2016, 51(2): 265-273.
- [15] Zhou S. Progressive factor analysis of lateral roots growth of *Arabidopsis thaliana* regulated by Ca^{2+} [J]. *J Northwest A F Univer*, 2010, 38(2): 147-138.
- [16] Zažimalová E, Murphy A. S, Yang H, *et al.* Auxin transporters-why so many? [J]. *Cold Spr Harbor Perspect Biol*, 2010, 2(3): a001552.
- [17] Wouter van Doorn, Isabelle D, Fisun C, *et al.* Opening of Iris flowers is regulated by endogenous auxins [J]. *J Plant Physiol*, 2013, 170(2): 161-164.
- [18] 彭 琼. 花生开花下针期生长素的极性运输及分布研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2013.
- [19] Hafiz A, Steven J V S. Promoting branching of a potential biofuel crop *Jatropha curcas* L. by foliar application of plant growth regulators [J]. *Plant Growth Regul*, 2009, 58(3): 287-295.
- [20] 刘大同, 荆彦平, 陈晶晶, 等. 水稻的侧根发育及其影响因素 [J]. 作物学报, 2014, 40(8): 1403-1411.