

蛇足石杉原叶体的培养及孢子体的诱导

包日双, 尹培培, 郭斌*, 尉亚辉*

西部资源生物与现代生物技术省部共建教育部重点实验室, 陕西省生物技术重点实验室, 西北大学生命科学学院, 西安 710069

摘要: 以蛇足石杉孢子囊为材料培养得到蛇足石杉原叶体, 进一步对原叶体进行增殖培养并诱导产生蛇足石杉孢子体。结果表明, 适合蛇足石杉原叶体增殖的培养基是无激素的MS培养基, 在该培养基上培养60 d, 原叶体的增殖倍数达到131.1; 较高浓度的外源激素对原叶体的增殖有抑制作用, 而低浓度的外源激素对原叶体的增殖影响不大; 原叶体在无激素培养基上培养90 d, 孢子体的诱导频率为4.0%; 通过HPLC检测蛇足石杉原叶体中石杉碱甲的含量为0.0059%, 是野生孢子体中含量的0.25倍。

关键词: 蛇足石杉; 原叶体; 孢子体; 石杉碱甲

Prothallium Culture and Sporophyte Induction of *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev.

BAO Ri-Shuang, YIN Pei-Pei, GUO Bin*, WEI Ya-Hui*

Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, Shaanxi Provincial Key Laboratory of Biotechnology, College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China

Abstract: *Huperzia serrata* prothallium was obtained from sporangium by *in vitro* culture and prothallium proliferation and sporophyte induction of *H.serrata* were studied. The results showed that MS medium without any hormone was optimal medium for prothallium proliferation and the prothallium quantity reached 131.1-fold of inoculation after 60 days. High concentration of exogenous hormones had inhibitory effect on prothallium proliferation, while low concentration of exogenous hormones didn't have obvious effect on prothallium proliferation. The induction frequency of sporophyte was 4.0% after 90 days on MS medium without any hormone. HPLC analysis results showed that the content of huperzine A in the prothallium of *H.serrata* was 0.0059%, which was a quarter of the content in wild plants.

Key words: *Huperzia serrata*; prothallium; sporophyte; huperzine A

蛇足石杉为石杉科石杉属植物, 全草入药, 药名千层塔, 具有散瘀消肿、解毒和止痛的功效(浙江药用植物志编写组1980)。研究表明从该植物中分离的石杉碱甲是一种强效、低毒的可逆性胆碱酯酶抑制剂, 具提高学习和记忆效率的功能, 对重症肌无力和老年痴呆症有良好的治疗效果(张守圭1985; Wang和Tang 2005)。然而, 蛇足石杉在自然界中繁殖缓慢, 需要15年才能生长成熟(郭斌等2009; Ma和Gang 2008), 再加上人为采集, 使该种药材资源的再生受到了极大限制, 因此人们试图通过多种途径寻找石杉碱甲新的来源。盛束军等(2000)及覃大吉等(2010)以枝条或茎梢为材料建立了蛇足石杉的扦插育苗繁殖体系, 为千层塔资源的可持续开发利用奠定了一定的技术基础; 王德立和冯锦东(2011)以蛇足石杉的芽孢为研究对象, 建立了蛇足石杉的芽孢繁育体系, 但是芽孢的数

量终究有限, 繁殖效率仍然不高。梁昊(2010)以千层塔茎尖为外植体建立了蛇足石杉的组织培养体系, 但是蛇足石杉在培养基上的生长速度并不快, 因此也未能达到组织培养快速繁殖的目的。韦景枫等(2011)以蛇足石杉孢子囊为外植体, 萌发获得蛇足石杉原叶体, 但未报道获得石杉碱甲的货源——蛇足石杉的孢子体。本实验用蛇足石杉的孢子囊萌发得到蛇足石杉原叶体, 对原叶体快速增殖的培养条件进行摸索, 并通过诱导成功获得蛇足石杉孢子体, 为蛇足石杉的快速繁殖和资源开发提供依据。

收稿 2012-01-09 修定 2012-02-03

资助 国家自然科学基金项目(31000144)和陕西省教育厅科研计划项目(09JK746)。

* 共同通讯作者(E-mail: weiyahui@nwu.edu.cn, guobin@nwu.edu.cn; Tel: 029-88303484)。

材料与方法

1 材料

蛇足石杉 [*Huperzia serrata* (Thunb.) Trev.] 采自湖北省恩施州建始县, 蛇足石杉孢子囊从成熟原植物上摘取。

2 孢子的萌发

将蛇足石杉孢子囊在清水中漂洗2~3次, 然后转入75%乙醇中浸泡30~60 s, 再用0.1%升汞灭菌6~8 min, 用无菌水漂洗3次后接种于MS培养基中。培养30 d后对孢子囊的污染情况进行统计, 90 d后对孢子囊的萌发率进行统计。在温度(25±2) °C, 光强12 μmol·m⁻²·s⁻¹, 每天14 h光照的条件下进行培养。

3 原叶体的培养

将生长60 d的蛇足石杉原叶体切成3 mm×3 mm的小块(约2.4 mg)接种于含不同浓度激素的MS固体培养基上, 分8组(表2), 每组40个外植体重复。培养60 d后对培养物的形态进行观察, 并称量每组原叶体的生物量。原叶体的增殖系数等于60 d后原叶体的生物量与接种量的比值。

4 孢子体的诱导

将生长60 d的蛇足石杉原叶体切成5 mm×5 mm的小块接种于无激素的MS固体培养基上, 然后在培养基表面铺上一层薄薄的MS液体培养基。培养90 d后统计孢子体的诱导情况, 孢子体的诱导率为长出孢子体的原叶体数与原叶体接种总数的比值。

5 组培原叶体和野生孢子体中石杉碱甲含量的检测

参考王峻等(2003)的方法检测石杉碱甲含量。精确称取石杉碱甲标准品2.50 mg于25 mL容

量瓶中以无水乙醇溶解并定容, 得到标准品溶液。样品的制备方法如下, 取在培养基上培养了60 d的蛇足石杉原叶体和野生孢子体全株分别于60 °C下烘干至恒重, 粉碎后用研钵研成粉末, 精确称取粉末0.12 g置于5 mL离心管中, 加入3 mL 2%酒石酸溶液, 密封, 在70 MHz下超声3 h后12 000×g离心5 min, 取上清液用0.22 μm微孔滤膜过滤即得样品液。

色谱条件如下, 色谱柱为Diamonsil C18不锈钢柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)(Dikma), 流动相为甲醇-0.8%醋酸铵溶液(v/v=40:60), 流速为0.8 mL·min⁻¹, 检测波长为308 nm, 柱温为25 °C, 进样量为10 μL。按上述色谱条件进样, 记录石杉碱甲峰面积, 用外标法计算样品中石杉碱甲的含量, 重复3次取平均值。

实验结果

1 孢子的萌发

本实验室对蛇足石杉孢子囊进行过多次培养, 每次的取材时间都不一样, 分别为3~4月份、7~8月份和11~12月份。其中只有11~12月份收集的孢子囊在培养3个月后成功萌发出原叶体, 萌发率为2.1%。自孢子囊萌发出肉眼可见的心形原叶体后(图1-A), 原叶体的生长速度加快, 并很快形成不规则体(图1-B)。心形原叶体生长一周后于显微镜下观察, 可见原叶体的心形下端长出大量毛状不定根, 而上端的部分细胞形成疣状突起。灭过菌的孢子囊在培养过程中部分受菌物(包括真菌、细菌、放线菌)污染(表1), 初步统计真菌的污染率为3.3%, 细菌的为0.6%, 放线菌的为0.8%。另外, 灭

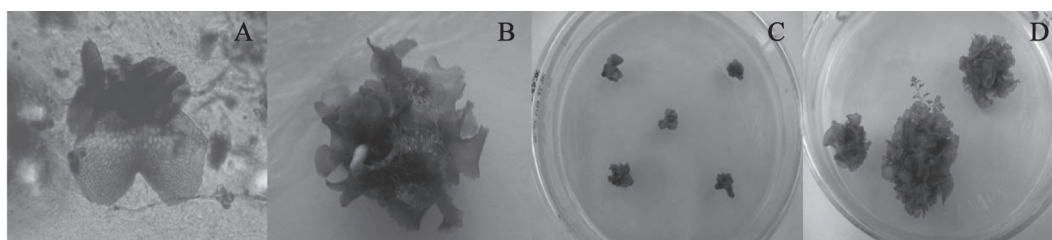


图1 蛇足石杉原叶体的离体培养

Fig.1 *In vitro* culture of *H. serrata* prothallium

A: 蛇足石杉的原叶体(心形, 培养10 d); B: 蛇足石杉的原叶体(不规则体, 培养60 d); C: 蛇足石杉的原叶体在激素诱导下形成的愈伤组织; D: 蛇足石杉的原叶体中长出孢子体。

表1 蛇足石杉孢子囊培养过程中污染率的统计

Table 1 The endophytic contamination during *H. serrata* sporangium culture

污染微生物的类型	污染率/%
绿藻	23.2
真菌	3.3
放线菌	0.8
细菌	0.6
合计	27.9

过菌的孢子囊在培养基上培养的过程中长出了一种绿色的藻类, 污染率为23.2%。

2 原叶体的培养

表2中的数据表明实验所用培养基中最适合蛇足石杉原叶体增殖的培养基是无激素的8号培养基, 在该培养基上培养60 d原叶体的增殖倍数达到131.1, 原叶体的存活状态很好。最不适合原叶体增殖的培养基是1号培养基, 在该培养基上培养60 d原叶体的增殖倍数为59.8, 并发生了严重褐化。在添加低浓度激素的4、5、7号培养基上原叶体的增殖倍数和存活状态与8号培养基上的较相近, 说明较高浓度的外源激素对原叶体的增殖有抑制作用, 而低浓度的外源激素对原叶体的增殖影响不大。实验还发现在MS培养基中含 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上的2,4-D即可诱导原叶体形成愈伤组织(图1-C, 表2)。

3 孢子体的诱导

蛇足石杉原叶体在MS培养基上培养90 d后成功繁殖出孢子体(图1-D), 诱导率为4.0%, 随后孢子体生长较缓慢。

4 组培原叶体和野生孢子体中石杉碱甲含量的测定

通过HPLC对蛇足石杉组培原叶体及野生孢子体中的石杉碱甲含量进行测定, 结果表明在蛇足石杉组培原叶体中石杉碱甲的含量为0.0059%, 是野生孢子体中石杉碱甲含量的0.25倍(图2)。

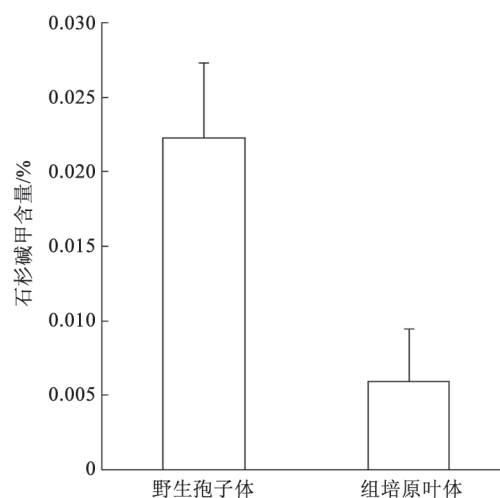


图2 野生蛇足石杉和组培原叶体中石杉碱甲含量的测定
Fig.2 Determination of hyperzine A in wild *H. serrata* and *in vitro* culture prothallium

讨 论

国内有多个实验室曾对蛇足石杉孢子囊进行培养(马华升等2008; 李贵等2009; 韦景枫等2011), 其中只有韦景枫等(2011)报道成功萌发出原叶体, 但他们的培养用了219 d才得到原叶体, 比我们的90 d要长2倍之多, 这差异可能与不同的取材有关。我们在进行蛇足石杉孢子囊萌发实验的过程

表2 不同培养基对原叶体生长的影响

Table 2 The effects of different media on growth of *H. serrata* prothallium

培养基编号	激素/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$		60 d后形成愈伤的比率/%	存活状态	60 d后培养物的平均增值倍数
	2,4-D	6-BA			
1	5.0	0.5	100	生长较缓慢, 暗绿色愈伤整体出现褐化	59.8
2	2.0	0	67	生长较快, 愈伤稍有点褐化, 原叶体叶片翠绿	76.0
3	2.0	0.5	100	愈伤呈翠绿色, 生长较快	75.5
4	0.2	0.5	0	原叶体叶片翠绿, 生长较快	126.9
5	0.2	0	0	原叶体叶片翠绿, 生长快	129.5
6	0	2.0	0	原叶体叶片翠绿, 生长较快	100.2
7	0	0.5	0	原叶体叶片翠绿, 生长较快	121.5
8	0	0	0	原叶体叶片翠绿, 生长快	131.1

中,经过表面灭菌后的孢子囊在培养基上培养30 d后开始受绿藻和各种菌物的污染,绿藻和这些菌物应该源自孢子囊内部或皮层部分;尤其是绿藻,在其中出现的频率较大,且有些原叶体萌发时周围也有大量绿藻出现,因此猜想绿藻在蛇足石杉的生活史中可能起着一定的作用,这方面的研究还在进一步进行。

我们首次对蛇足石杉原叶体进行了增殖培养。发现含 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上2,4-D的MS培养基可诱导蛇足石杉原叶体形成愈伤组织,但随2,4-D浓度的增加愈伤的生长速度减慢并伴随不同程度的组织褐化,低浓度的生长素和细胞分裂素对原叶体的生长影响不大。总的来说,外源激素对于蛇足石杉的增殖意义不大。在实验过程中我们也尝试采用不同的激素组合对原叶体外植体进行分化诱导,我们发现像蕨类这样的低等植物与被子植物有很大差异,被子植物的单倍体在激素的诱导下可以发育长成二倍体母本所具有的形态特征,只是在个体大小上比二倍体略小,然而蕨类植物的单倍体(原叶体)则不能,只能长愈伤或原叶体本身所具有的叶片。我们还发现蕨类植物即使是很小的外植体在无激素的MS上也能很好的生长发育,长成一个完整的原叶体个体并进行有性繁殖,说明蕨类植物的原叶体细胞具有极强的再生能力和全能性。

蛇足石杉原叶体人工培养3个月后长出孢子体,这也是首次在培养基上通过有性繁殖得到蛇足石杉孢子体。在实验过程中我们将生长2个月的原叶体进行切割并重新接种于新培养基上,这样反复接转,但始终不能产生孢子体(说明只有生长足够时间且个体足够大的原叶体才能产生孢子体)。实验条件下从孢子萌发至原叶体中长出孢子体的初始叶片共需要6个月以上的时间,如若用目前的方法培养得到大量蛇足石杉幼苗还远远赶不上生产的需要,因此在这方面我们还需要进行大量的工作提高育苗效率。

经HPLC检测,蛇足石杉原叶体中石杉碱甲含

量为0.0059%,仅为母本(野生孢子体)中含量(0.0223%)的0.25倍。石杉碱甲属于次生代谢产物,在植物体内的积累需要一个过程,原叶体在培养基上的培养时间远远短于天然状态下孢子体的生长时间,而且原叶体与孢子体相比分化程度较低,分化程度较低的组织其次生代谢物的含量也相对会较低(邓盾等2009)。孢子体的生长较慢,目前材料还不够石杉碱甲测定的需要,因此对组织培养得到的蛇足石杉孢子体中石杉碱甲的含量还有待检测。

参考文献

- 邓盾,王永飞,马三梅,李晓东(2009). 采用植物离体培养技术生产精油. 植物生理学通讯, (1): 97~102
- 郭斌,徐玲玲,尉亚辉,刘春朝(2009). 千层塔的研究进展. 中国中药杂志, (16): 2018~2022
- 李贵,李菁,黎有有,唐源江,魏华(2009). 蛇足石杉外植体表面消毒及内生菌消除方法. 吉首大学学报(自然科学版), 30 (4): 100~103
- 梁昊(2010). 千层塔组织培养体系的建立及激素对丛生苗生长和石杉碱甲合成的影响[硕士论文]. 合肥: 合肥工业大学
- 马华升,孙玉强,童建新,阮松林,忻雅,钱丽华,祝水金(2008). 千层塔组织培养中外植体消毒灭菌研究初报. 杭州农业科技, (4): 15~18
- 盛束军,徐建中,王志安,俞旭平,张建华(2000). 千层塔扦插繁殖研究. 资源开发与市场, 16 (5): 268~269, 293
- 覃大吉,杨永康,向极钎,曾凡忠,李亚杰,殷红清,邹迎春,马进(2010). 千层塔NFT扦插育苗技术研究. 湖北民族学院学报(自然科学版), 28 (1): 18~21
- 王德立,冯锦东(2011). 蛇足石杉的芽胞特性和芽胞繁育技术. 安徽农业科学, 39 (2): 805~807
- 王峻,吴伟,潘胜利(2003). HPLC法测定6种石杉科植物中石杉碱甲的含量. 中草药, 7: 607~608
- 韦景枫,陶文丞,钟漫,蒙先举,张声涛,覃凤好(2011). 千层塔孢子萌发研究初报. 黑龙江生态工程职业学院学报, 24 (5): 9~10
- 张守圭(1985). 治疗重症肌无力新药——石杉碱甲通过鉴定. 中国新药与临床杂志, 4: 235
- 浙江药用植物志编写组(1980). 浙江药用植物志. 杭州: 浙江科学技术出版社, 51
- Ma XQ, Gang DR (2008). *In vitro* Production of Huperzine A, a promising drug candidate for Alzheimer's disease. *Phytochemistry*, 69: 2022~2028
- Wang R, Tang XC (2005). Neuroprotective effects of huperzine A. A natural cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Neurosignals*, 14: 71~82