

蛇足石杉的离体培养

马英姿*, 刘江海, 许欢, 刘芬

中南林业科技大学生命科学与技术学院, 长沙410004

摘要: 本研究以蛇足石杉活体顶芽为外植体, 研究了其表面及内生菌灭菌方法、外植体的增殖和生根方法。结果表明, 表面灭菌后再采用 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 孔雀石绿及 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的AAS联合灭菌, 可获取较好的外植体灭菌效果。灭菌后的外植体仍带有一种内生真菌, 但外植体可与该内生菌共生培养, 并获得了蛇足石杉的增殖侧芽, 侧芽极易从主茎分离, 且生根率较顶芽高, 30 d生根率可达90%, 培养的根也呈二叉分枝状。

关键词: 蛇足石杉; 离体培养; 内生真菌; 共生

In Vitro Culture of *Huperzia serrata*

MA Ying-Zi*, LIU Jiang-Hai, XU Huan, LIU Fen

College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China

Abstract: In this study, the terminal buds of *Huperzia serrata* were used as explants, to study the surface and endophytic bacteria sterilization, the explant proliferation and rooting method. The results showed that after the surface sterilization, the combined sterilization of $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ malachite green and $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AAS could obtain good effect on sterilization of explant. After sterilized, the explants still contained an endophytic fungus, but could symbiosis culture with the endophytic fungus. And the proliferation buds of *H. serrata* were obtained, these buds were separated from the stem easily, had a higher rooting rate than that of terminal buds. The rooting rate reached 90% after 30 d, and the root were two forks branch.

Key words: *Huperzia serrata*; culture *in vitro*; endophyte; symbiotic

蛇足石杉, 系石杉科石杉属多年生植物, 又名千层塔、金不换等, 民间常用于治疗痈疽肿毒、跌打损伤等症(余红英等2011)。蛇足石杉内含石杉碱甲, 它是乙酰胆碱脂酶的有效抑制剂, 能阻止体内乙酰胆碱的衰竭, 被广泛用于治疗阿尔茨海默氏症疾病(张守圭1985; Wang和Tang 2005)。蛇足石杉在自然界中生长缓慢, 其孢子约需15年才能自然萌发(郭斌等2009; Ma和Gang 2008), 过度地开发采集, 使该种药材资源的再生受到了极大限制。因此, 建立合适的人工繁殖体系成为解决和保护蛇足石杉野生资源的重要途径。

关于蛇足石杉的繁殖问题一直受到关注, 盛束军等(2000)及覃大吉等(2010)研究了蛇足石杉的扦插繁殖, 王德立和冯锦东(2011)研究了蛇足石杉的芽胞繁育, 国内还有多个实验室对蛇足石杉孢子囊进行诱导培养(马华升等2008; 李贵等2009)。但仅有韦景枫等(2011)以蛇足石杉孢子囊为外植体, 诱导获得了蛇足石杉原叶体, 但未从原叶体获取孢子体。包日双等(2012)对蛇足石杉孢子进行诱导获得了原叶体, 并将原叶体诱导获得了少量

的孢子体。

由于蛇足石杉内生菌丰富, 而植株的叶片薄, 消毒极为困难, 成为蛇足石杉组织培养研究的最大障碍。梁昊(2010)以茎尖为外植体建立了蛇足石杉的组织培养体系, 但并未获得增殖侧芽, 因此也未能达到组织培养快速繁殖的目的。国外对同属的另一种石杉*Huperzia selago*的顶芽进行了离体培养研究(Szypula等2005), 在其顶芽处培养出绿色小球, 并进一步培养成二叉分枝的芽。目前, 尚未有关于石杉属植物成功培养侧芽的报道。因此, 蛇足石杉的组织培养研究还有待进一步的努力。本研究以蛇足石杉顶芽为外植体, 通过消毒后进行离体培养, 首次获取了携带一种内生真菌共生的试管苗, 并对试管苗进行培养观察, 研究其不同生长形态及增殖、生根等过程, 为蛇足石杉的快速繁殖和资源开发提供重要参考依据。

收稿 2014-11-25 修定 2015-03-12

资助 湖南省教育厅科学研究重点项目(2012A0146)和湖南省科技厅科技计划项目(2013TZ2024)。

* 通讯作者(E-mail: ma_yingzi@163.com; Tel: 0731-85623494)。

材料与方法

1 材料

蛇足石杉 [*Huperzia serrata* (Thunb.) Trev.] 活体植株采自湖南省浏阳大围山。材料由中南林业科技大学喻勋林教授鉴定。

2 蛇足石杉外植体消毒

2.1 外植体表面灭菌

剪取蛇足石杉顶芽3 cm长, 先用清洁剂在水中清洗, 然后在自来水下冲洗3 h, 之后将材料浸入0.01 mol·L⁻¹ HCl+5% NaClO+0.0024 mol·L⁻¹ 柠檬酸配成的溶液中1 min, 再将材料先后置于70%乙醇中1 min, 5% NaClO中15 min, 7% H₂O₂中10 min, 依次消毒, 无菌水冲洗干净后, 接种于1/2MS培养基中, 在25 °C、5~10 μmol·m⁻²·s⁻¹、12 h·d⁻¹的光照条件下培养20 d。

2.2 内生菌灭菌培养

将培养20 d后的表面没有微生物污染的顶芽移入含有不同浓度的孔雀石绿(malachite green oxalate)和混合抗生素(AAS)的1/2MS培养基中进行内生菌消毒, 每100 mg AAS溶液中包含30 mg青霉素、50 mg的链霉素及125 μg的两性霉素, 将孔雀石绿配成0.1、0.5和1.0 mg·L⁻¹的浓度, AAS配成50、100和500 mg·L⁻¹的浓度单独使用或联合使用(表1)。每种处理10瓶, 每瓶接种1个外植体, 实验重复3次。接种后置于2.1节中同样的条件下培养20 d。

3 外植体的初代培养

将进行过2次消毒后的无明显感染的外植体, 修剪因消毒引起的黄叶及茎基部, 转入不同配方的改良MS培养基(表2)中。培养条件同2.1节, 30 d后统计外植体存活率。存活率=存活的外植体数/接入初代培养基中的外植体数×100%。

所有培养基中均添加7 g·L⁻¹琼脂、20 g·L⁻¹蔗糖, 高压灭菌前调pH值为5.75, 再在121 °C、1.1 kg·cm⁻²条件下灭菌20 min。

4 试管苗的继代培养

将经过初代培养后存活下来的外植体在1/2MS培养基上继续培养, 每60 d换一次培养基, 观察其生长中出现的形态变化, 包括分枝、增殖及孢子的形成过程。

5 试管苗的生根培养

选择MS、1/2MS、1/3MS、1/4MS作为生根

基本培养基, 截取培养的蛇足石杉2~3 cm的顶芽及1.5~2 cm的侧芽, 分别接种到生根培养基中。每种生根培养基接种10瓶, 每瓶接种1株, 试验重复3次, 60 d后统计生根率。基本培养基中添加20 g·L⁻¹蔗糖和2.0 mg·L⁻¹谷氨酰胺。

实验结果

1 蛇足石杉外植体的灭菌

成功培养蛇足石杉试管苗的非常关键的环节就是对初始外植体的有效消毒。经过表面消毒后培养20 d的培养, 40%的外植体没有微生物污染迹象; 10%的外植体无感染, 但出现消毒过度逐渐死亡的现象。

用孔雀石绿和AAS对植物内生微生物进行消毒的方法已广泛被应用(Szypula等2005)。将培养20 d后的表面没有微生物污染的顶芽移入含有不同浓度的孔雀石绿和AAS的1/2MS培养基中进行内生菌消毒。

如表1所示, 单独使用0.1和0.5 mg·L⁻¹的孔雀石绿, 及单独使用AAS进行内生菌灭菌时, 感染率达100%。单独使用1.0 mg·L⁻¹的孔雀石绿消毒, 或0.5 mg·L⁻¹孔雀石绿+500 mg·L⁻¹ AAS混合消毒时, 外植体没有被感染的现象, 但所有的外植体在14 d后迅速死亡。只有当0.5 mg·L⁻¹孔雀石绿+50、100 mg·L⁻¹ AAS联合使用时, 获得最佳的内生菌灭菌效果, 通过14 d的培养后, 20%无感染的外植体存活。

表1 灭菌后蛇足石杉的外植体存活率

Table 1 Explants survival rate of *H. serrata* after sterilization

编号	孔雀石绿浓度/mg·L ⁻¹	AAS浓度/mg·L ⁻¹	外植体感染率/%	外植体存活率/%
1	0.1	0	100	0
2	0.5	0	100	0
3	1.0	0	0	0
4	0	50	100	0
5	0	100	100	0
6	0	500	100	0
7	0.1	50	100	0
8	0.1	100	100	0
9	0.1	500	90	10
10	0.5	50	80	20
11	0.5	100	80	20
12	0.5	500	0	0

2 蛇足石杉外植体的初代培养

孔雀石绿和AAS联合杀灭内生菌,但也会对植株造成损害,故时间不宜过长。本研究在添加孔雀石绿和AAS混合液的1/2MS培养基中培养14 d后,转入初代培养基中进行初代培养,30 d后统计外植体的存活率。如表2所示,培养30 d后,发现MS基本培养基及加植物激素的培养基内的外植体全部逐渐变褐死亡。1/2MS和1/4MS培养基中都有外植体存活,但1/2MS培养基中的外植体存活率可达80%,比1/4MS培养基的存活率高,且外植体在1/2MS培养基内的生长状态较1/4MS好。

表2 不同基本培养基对蛇足石杉初代成活率的影响

Table 2 Effects of different media on primary explants survival rate of *H. serrata*

培养基	肌醇浓度/ mg·L ⁻¹	烟酸浓度/ mg·L ⁻¹	IBA浓度/ mg·L ⁻¹	KT浓度/ mg·L ⁻¹	外植体存 活率/%
MS	100	0.5	0	0	0
1/2MS	100	0.5	0	0	80
1/4MS	100	0.5	0	0	50
1/2MS	100	0	0.05	1.0	0
1/4MS	100	0	0.05	1.0	0

3 蛇足石杉的侧芽(增殖)培养

将初代培养的外植体继续在原培养基中培养,约60 d后,发现有黑色内生真菌在原始外植体的茎基部出现,生长缓慢;约90 d后,内生菌生长成一团愈伤组织状堆积在茎基,对外植体的生长没有不良的影响,其菌种的鉴定将另文发表。

在内生菌生长的同时,外植体并没有出现明显的不良变化,说明该内生真菌对外植体没有不良影响,故继续培养。约90 d后,外植体开始出现生长变化,主要有两种变化类型:一种为外植体本身没有出现明显的生长,但靠近茎基部的同一节点处开始分化出新芽,且新芽的数量较多,最多可达到7个(图1-A),丛芽状。内生菌的存在没有影响新芽的生长,新芽产生后生长60 d,芽高度可达2~3 cm,同时原始外植体的茎叶出现枯黄,逐渐趋于死亡,这可能是由于新芽较多,在基部将营养吸收,主茎得不到足够的营养导致死亡。另一种变化为外植体有少量的生长,且在茎的上部形成了多个小侧芽(图1-B),一个节点处可以形成1个侧芽,也

可以形成2个侧芽。

3.1 侧芽的分离生长培养

将外植体初代培养形成的侧芽从母株上分离,接种在新的1/2MS培养基上,分离侧芽时发现,侧芽与母体仅有较细的维管束相连,用镊子轻轻撕扯,侧芽即可脱离母体。

侧芽接种后生长良好,生长状况有两种:一是从母株基部产生的侧芽,在分离时携带了内生真菌,培养一段时间后,侧芽长势良好,生长成幼苗同时,内生真菌也继续生长(图1-C和D);二是在母株中部或上部产生的侧芽,分离培养后,侧芽生长后没有发现内生菌出现(图1-E),说明内生真菌存在于蛇足石杉植株的下半部,并没有侵入外植体的上端,因而也没有侵入上部产生的侧芽。

侧芽从母体分离后培养,初期生长相对较快,30 d后伸长约1.5 cm;60 d顶芽开始分化,形成新的二叉分枝;90 d后,新分化的二叉分枝芽伸长约3 cm(图1-E)。

3.2 新二叉分枝的继代培养

为了使新分化的二叉分枝(第1次分叉)芽能更好的生长,当二叉分枝芽长到3 cm左右,将其从分叉处剪断,分离成2株新的植株,又分别接种于1/2MS培养基上进行继代培养。培养60 d后又可形成新的二叉分枝(第2次分叉);90 d后可同样从分叉处将新的顶芽剪下,再次分离培养可形成新的二叉分枝(第3次分叉)。试管苗在3次分叉后,生长时形成新的枝条,在外形上基本相同,无明显差异。

3.3 侧芽3次二叉分枝后的成熟生长

将第3次二叉分枝生长后的顶芽分离后培养,苗的生长速度减慢,在30 d后,顶芽的分化缓慢;60 d后,顶芽逐渐开始出现新的生长,且新产生的叶形也出现了明显的差异,新产生的叶为小叶,且在叶腋内开始分化产生孢子囊(图1-H和I);继续培养至90 d,可见枝的上端多处产生新的侧芽(图1-H)。

4 试管苗的生根培养

将蛇足石杉新芽接种到生根培养基中,观察不定根的生长情况,40 d后发现产生的根也出现二叉分枝状(图1-G)。试管苗的生根情况依试管苗的来源而不同,生根培养的试管苗来源有两种:一种是主枝上产生的侧芽,一种是截取主枝的顶芽。实验结果表明,MS基本培养基不利于蛇足石杉试

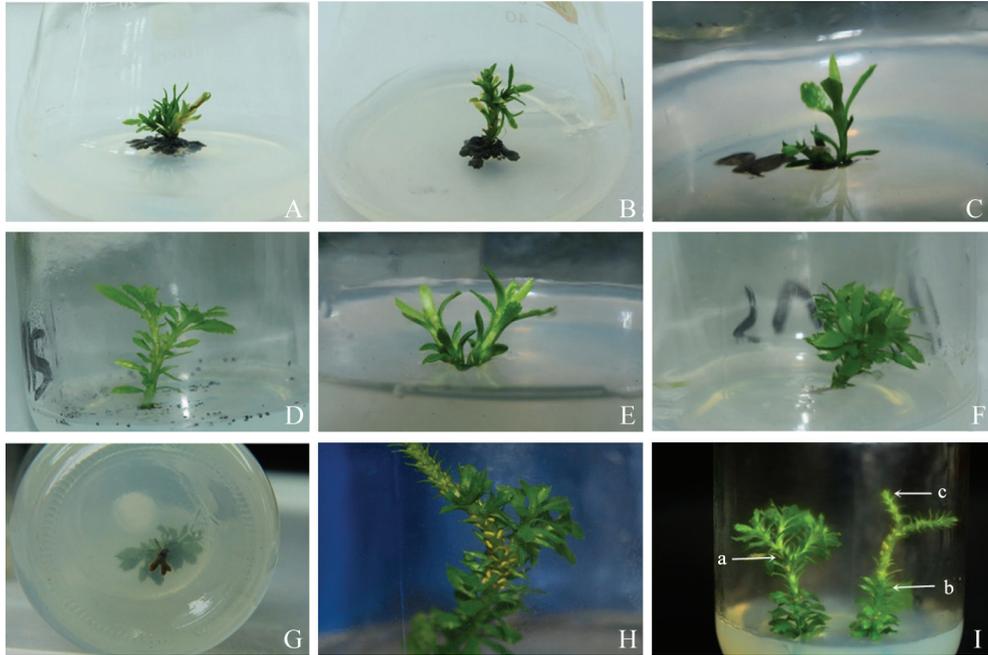


图1 不同培养时期蛇足石杉试管苗的形态变化

Fig.1 Morphological changes of *H. serrata* tube seedling in different culture duration

A: 外植体基部产生多个侧芽; B: 外植体上部不同点产生多个侧芽; C: 基部侧芽分离后继代培养(含内生菌); D: 带内生真菌侧芽继代培养后长势良好形成二叉分枝; E: 上部侧芽与母体分离后继代培养(不含内生菌); F: 侧芽继代培养90 d后, 顶芽展开后出现了四叉分枝; G: 侧芽生根培养后产生二叉分枝状的不定根; H: 第3次二叉分枝后的顶芽再次继代培养, 出现了大小叶之分, 叶腋内形成了孢子囊, 240 d后在枝条上部又产生了多个侧芽; I: 第3次二叉分枝后的顶芽分离后再次继代培养120 d, 产生了三叉分枝(a)、二叉分枝及大叶(b)和小叶(c)交替现象。

试管苗的生根, 60 d后侧芽及顶芽的生根率都为0。来源于侧芽的试管苗比来源于顶芽的试管苗更容易生根(表3), 60 d后来源于侧芽的试管苗在1/2MS、1/3MS、1/4MS的基本培养基中的生根率都可达30%, 而来源于顶芽的试管苗在1/2MS、1/3MS和1/4MS的基本培养基中的生根率仅达10%。在基本培养基中添加IBA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺, 对试管苗的生根率有明显的促进作用, 其中在1/3MS基本培养基上添加的效果最好, 侧芽的生根率可达90%, 顶芽的生根率也可达30%。分析其原因, 可能是侧芽的基部仅有细小的部分与主枝相连, 茎基部的伤口创面细小, 幼嫩, 较易生根。

5 植株培养过程中的形态发生

5.1 侧芽的发生

在自然界中, 蛇足石杉的生长呈二叉分枝状, 除此以外, 仅有关于芽胞的形成报道(王德立和冯锦东2011), 尚未发现有侧芽的形成。自然生长中, 蛇足石杉叶腋内着生半月形孢子囊, 无腋芽存在,

表3 不同培养基对蛇足石杉生根培养的影响

Table 3 Effects of different media on rooting of *H. serrata*

培养基	生根率/%	
	侧芽	母株顶芽
MS	0	0
MS+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA+ $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺	0	0
1/2MS	30	0
1/2MS+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA+ $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺	60	10
1/3MS	30	10
1/3MS+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA+ $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺	90	30
1/4MS	30	10
1/4MS+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA+ $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺	40	30

因此, 无法像其它高等植物一样采用扦插繁殖而产生新植株个体。曾汉元和张伍伯(2008)对蛇足石杉的营养繁殖进行了研究, 发现去顶芽的茎段扦插后可以长根, 但扦插2年后仍未长出新芽。本研究发现, 蛇足石杉试管苗在生长过程中, 主茎上的某些叶腋内不产生孢子囊而能产生侧芽(图1-A、B和H), 且侧芽的数量不定, 有1~7个, 发生的

部位可以是枝条的基部,也可以在枝条的上部。这些侧芽的基部与主茎的连接细弱,其侧芽基部仅有细弱的维管束与主茎相连,用镊子轻轻撕扯,即可将侧芽从主茎上分离,侧芽脱离母体后生长较好,且较易生根。

5.2 顶芽的多叉分化

蛇足石杉的正常生长为二叉分枝,即每次其顶芽分化出2个新芽,但我们在培养过程中发现,除了形成正常的二叉分枝外,试管苗还出现了三叉分枝和四叉分枝,即一次从顶芽分化出3个新芽(图1-I)和4个新芽(图1-F)。多叉分枝形成前,其顶芽的分化时间较长,比正常的产生二叉分枝顶芽的分化时间长,形态也较正常的二叉分枝芽膨大,这种变异是我们期待的,但多叉分枝的顶芽经过继代培养后,又可恢复到正常的二叉分枝,说明这种变异不具有稳定的遗传性。多个顶芽的形成可能与培养条件有关,特别是与光照强度增强有关。

5.3 大小叶交替出现及孢子囊的产生

自然界中多年生蛇足石杉茎上有大叶与小叶交替产生的现象,通常每年各产生一次,每年产生的所有大叶或所有小叶称为一个叶层。齐耀和冯锦(2011)对没有出现明显叶层分化的小苗称为幼苗,有叶层但没有生成孢子囊的植株称为幼株,有孢子囊产生的植株称为成株。本研究中发现,试管苗在培养在1年后,明显出现了叶层的分化(图1-H和I)。试管苗第1次孢子囊的形成,在二月底或三月初开始分化,七、八月生长成熟,但随着进一步的培养,试管苗产生孢子囊的时间并不确定,可以在任何季节形成,这可能是由于培养条件与外界自然条件不同,没有四季温度和光照的变化原因。

讨 论

获得具有完全生长活性的无菌外植体是蛇足石杉组织培养初始取得成功的重要因素。而蛇足石杉的叶片表面角质层薄,极易被消毒过度而死亡。为了有效地进行表面消毒,本研究将蛇足石杉顶芽依次浸泡在:次氯酸钠液、柠檬酸、酒精和过氧化氢等几种不同的溶液中进行表面消毒。以往的研究认为,在建立无污染的新芽培养过程中主要的困难是由内生细菌和真菌引起的污染。本研究对外植体的内生菌消毒方法进行了优化,采用

两性霉素B、链霉素、青霉素配成的AAS消毒液和孔雀石绿对外植体内生菌的抗菌效果进行研究,发现同时使用剂量为 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的孔雀石绿与50和 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的AAS消毒液,能达到最佳的内生菌杀菌效果。

β -内酰胺类抗生素在高浓度下依靠与核糖体30S亚基的结合来阻止叶绿体分离,这也是为高剂量的青霉素可能导致外植体死亡的原因,但是剂量在 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的时候对外植体几乎没有损害,青霉素也可能是在组织培养中唯一能够安全使用的抗生素。

本研究中有两个创新点,一是证明了蛇足石杉的组织培养时可以携带部分内生真菌共同培养,当内生真菌灭菌不彻底时,可以继续培养观察,只要内生真菌的生长速度不影响外植体的生长即可继续培养。本研究中,外植体内还存留了一种内生真菌(子囊菌纲),但事实证明,真正的内生真菌并不会影响外植体的生长,因为内生真菌在植物体内生的长是缓慢的,离开植物体后在植物培养基上的生长也很慢,可能对外植体的侧芽分化反而有促进作用。本研究的另一个创新点,是在培养过程中获得了蛇足石杉的侧芽,在自然界,蛇足石杉的叶腋内是着生的肾形的孢子囊,不形成侧芽,只在8月左右可在顶芽处形成少量的芽孢,但在本研究中,在试管苗的培养过程中获得了不同部位的侧芽,且在茎的同一个节点上可以同时长出多个侧芽,这种变化正是蛇足石杉组织培养所期待的结果,为以后蛇足石杉的组织培养提供了很好的参考价值。

参考文献

- 包日双,尹培培,郭斌,尉亚辉(2012). 蛇足石杉原叶体的培养及孢子体的诱导. 植物生理学报, 48 (4): 393-396
- 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[学位论文]. 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
- 齐耀,冯锦(2011). 海南蛇足石杉天然居群结构与生境因子研究. 南

- 方农业学报, 42 (10): 1241~1244
- 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, 殷红青, 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
- 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
- 余红英, 孙远明, 杨跃进(2001). 草药蛇足石杉的研究进展. 中草药, 32 (3): 279~281
- 曾汉元, 张伍佰(2008). 药用植物蛇足石杉的营养繁殖. 怀化学院学报, 27 (8): 49~51
- 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
- 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
- Szypula W, Pietrosiuk A, Suchocki P, Olszowska O, Furmanowa M, Kazimierska O (2005). Somatic embryogenesis and *in vitro* culture of *Huperzia selago* shoots as a potential source of huperzine A. *Plant Sci*, 168: 1443~1452