

# 蛇足石杉茎尖灭菌方法与组织培养的研究

杨雪飞, 罗建平\*, 王瑛 (合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽合肥 230009)

**摘要** [目的]研究蛇足石杉组织培养的灭菌方法和培养条件。[方法]以野生孢子体茎尖为外植体,先用不同灭菌液单独或配合使用对外植体进行表面灭菌,将表面无菌外植体转到添加多种抗生素和孔雀石绿的培养基上杀灭内生菌,然后将外植体分别接种到不同的培养基上,筛选茎尖培养的最佳灭菌方法和培养条件。[结果]最佳表面灭菌方法为70%乙醇灭菌40 s,0.1%升汞溶液灭菌8 min,70%双氧水溶液灭菌10 min,培养2周,表面无菌率为63%。适宜的杀灭内生菌方法为表面无菌的外植体在附加0.5 mg/L孔雀石绿和100 mg/L抗生素AAS的培养基上培养4~6周,无菌率达52%。适宜的培养基为1/4MS矿质元素+1/2MS有机元素+2%蔗糖+4.5 g/L琼脂,pH 5.8。在此培养基上茎尖外植体可生长出新枝,并可再生根。[结论]建立了蛇足石杉茎尖组织培养的灭菌方法且筛选出适合其生长的适宜培养基,为蛇足石杉组织培养的深入研究提供实验基础。

**关键词** 蛇足石杉;孢子体;组织培养;灭菌

**中图分类号** S722.3<sup>+</sup>7 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)12-04947-02

## Studies on Tissue Culture and Sterilization Method of *Huperzia serrata*

YANG Xue-fei et al (School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui 230009)

**Abstract** [Objective] To study the culture condition and sterilization method of *Huperzia serrata*. [Method] Shoot tips of 1.0~1.5 cm of wild sporophytes were selected as explants, which underwent surface sterilization singly or combined with various disinfectants and internal sterilization with antibiotics and Malachite Green to eliminate the epiphytic and endophytic bacteria and fungi and were next placed on different modifications of MS medium to culture. [Results] Optimum sterilization method was 70% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH for 40 s followed by 0.1% HgCl<sub>2</sub> for 8 min and subsequent 70% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min, and aseptic ratio of 63% was reached. The sterilized explants were cultured on medium with 0.5 mg/L Malachite Green, 100 mg/L antibiotic AAS for 4 weeks and 52% of aseptic explants were achieved. The optimum medium for explant growth and rooting contained mineral elements of MS at quarter strength, organic elements of MS at half strength, 2% sucrose and 4.5 g/L Agar. [Conclusion] Using shoot-tip as explants, tissue culture and sterilization method of *Huperzia serrata* were established.

**Key words** *Huperzia serrata*; Sporophyte; Sterilization; Tissue culture

蛇足石杉 [*Huperzia serrata* (Thunb.) Trev.] 属石杉科石杉属,是一种珍贵的药用蕨类植物。民间常用其全草治疗跌打损伤、淤血肿毒、精神分裂等疾病<sup>[1]</sup>。其所含的石杉碱甲 A (*Huperzine A*) 已被药理实验证明,可低毒、高效、可逆且高选择性地抑制乙酰胆碱酯酶 (AChE),且已开发出多种成药<sup>[1-2]</sup>。由于人工合成的石杉碱甲 A 类似物副作用大且成本高,因此目前用于成药的石杉碱甲 A 都提取自野生蛇足石杉。蛇足石杉对生境要求苛刻、生长缓慢且因市场需求大而过度采集,造成资源急剧减少<sup>[2-3]</sup>。通过组织培养对其扩大繁殖,可扩大药材来源和保护其野生资源。目前,国内外对蛇足石杉组织培养研究较少,由于其与真菌共生,外植体灭菌很难<sup>[2-3]</sup>,至今没有成功的组织培养的报道。笔者以蛇足石杉孢子体茎尖为外植体,摸索建立了一套较好的灭菌方法且筛选出了适合其生长的培养条件,为进一步的组织培养提供了基础。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 蛇足石杉孢子体采自安徽九华山(图 1-A),切取孢子体茎尖 1.0~1.5 cm 作为组织培养外植体。蛇足石杉由中国科学技术大学顾月华教授鉴定为 *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev., 标本存于合肥工业大学生物与食品工程学院植物标本室。

## 1.2 方法

**1.2.1 外植体灭菌。**①表面菌的杀灭。将新切取的外植体用自来水冲洗干净,分别浸入 A、B、C、D 4 种灭菌液中灭菌,无菌水冲洗后接种在 M4(表 1)培养基上,于 25 ℃、光照时间

12 h/d、光照强度 800 lx 条件下培养 2~3 周。4 种灭菌方法: A,分别用有效氯含量为 0.5%、1.1%、1.8%、2.8%、5.5% 次氯酸钠(NaClO)溶液灭菌 15 min,无菌水冲洗 3 次。B,0.1% 升汞(HgCl<sub>2</sub>)溶液分别灭菌 4、8、15 min,无菌水冲洗 3 次。C,依次浸入 70% 乙醇溶液 40 s,0.1% 升汞溶液 8 min,70% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液 10 min,无菌水冲洗 3 次。D,依次浸入 1.8% 次氯酸钠溶液 1 min,2.4 mmol/L 柠檬酸溶液 2 min 预灭菌后,外植体再按 C 法灭菌。②内生菌的杀灭。参照 Wojciech<sup>[4]</sup>的方法,将 2~3 周后表面无菌外植体转到 M04(M4 附加了 0.5 mg/L 孔雀石绿和 100 mg/L 抗生素 AAS)培养基上继续培养 4~6 周,杀灭内生菌。培养条件同上。

**1.2.2 外植体培养。**外植体经 C 法表面灭菌后分别接种于不同培养基(表 1)上培养。再将培养 2~3 周后表面无菌的外植体对应转到均附加了 0.5 mg/L 孔雀石绿和 100 mg/L AAS(Sigma)的上述各培养基上,继续培养 4~6 周杀灭内生菌。最后将无菌外植体对应转到最初各培养基上继续培养。培养条件同上。

所有培养基均添加琼脂 4.5 g/L,121 ℃、104 kPa 灭菌 20 min,高压灭菌前调 pH 至 5.8。过滤灭菌(0.22 μm)后加入植物生长物质、孔雀石绿和 AAS。

## 2 结果与分析

### 2.1 蛇足石杉外植体灭菌

**2.1.1 表面灭菌。**灭菌剂浓度、灭菌方法、灭菌时间对外植体的生理状态和表面菌的杀灭效果影响很大。

**2.1.1.1 A 处理。**0.5% 次氯酸钠溶液灭菌后,茎叶无损伤,接种到 M4 后 3~4 d 其叶片和茎表面开始长出细菌、真菌,1 周时外植体全部染菌,说明浓度过低,达不到灭菌效果;1.1% 次氯酸钠溶液灭菌后,叶片上出现较多失绿变白斑点,接种 4~5 d 茎下端切口和叶白斑处出现真菌,1 周无菌率

**基金项目** 安徽省自然科学基金项目(00041508)。

**作者简介** 杨雪飞(1973-),女,四川仁寿人,硕士,工程师,从事生物技术研究与实验教学工作。\* 通讯作者。

**收稿日期** 2008-02-19

25%, 2周为8%, 继续培养仅有少数外植体存活生长; 1.8%次氯酸钠溶液灭菌后, 叶片出现大量失绿白斑, 幼叶失绿更重, 1周无菌率73%, 2周为60%, 培养2周后茎叶开始失去光泽, 后陆续失绿变白, 8周时全部发白死亡, 可能由于灭菌浓度高、灭菌时间长损伤了植物组织; 2.8%和5.5%次氯酸钠溶液灭菌后, 茎叶失绿大半, 接种1周外植体已明显黄化, 3周时全发白死亡, 6周仍无菌, 表明次氯酸钠浓度过高, 杀灭表面菌的同时也杀死了外植体组织和内生菌。

表1 蛇足石杉孢子体茎尖在不同培养基上的生长状况

Table 1 Growth status of shoot tip of *Huperzia serrata* sporophyte in different tissue culture

培养基 Tissue culture	培养基组成 Medium composition	存活率// % Survival rate
M1	MS培养基+3%蔗糖 MS+3% sucrose	0
M2	1/2MS矿质元素+MS有机元素+3%蔗糖 1/2MS mineral element + MS organic element + 3% sucrose	0
M3	1/2MS矿质元素+1/2MS有机元素+2%蔗糖 1/2MS mineral element + 1/2MS organic element + 2% sucrose	0
M4	1/4MS矿质元素+1/2MS有机元素+2%蔗糖 1/4MS mineral element + 1/2MS organic element + 2% sucrose	82
M5	1/4MS矿质元素+1/4MS矿质元素+2%蔗糖 1/4MS mineral element + 1/4MS mineral element + 2% sucrose	56
M6	B <sub>5</sub> 培养基 B <sub>5</sub> medium	0
M4-1	M4+GA <sub>3</sub> 1.0 mg/L	23
M4-2	M4+6-BA 1.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L	0
M4-3	M4+2-4D 1~3 mg/L+KT 1.0 mg/L	0

2.1.1.2 B处理。0.1%升汞溶液灭菌4 min, 培养1周无菌率34%, 2周为16%; 灭菌8~15 min, 1周无菌率68%, 2周为35%。升汞溶液灭菌15 min内, 外植体均呈绿色有光泽, 叶茎无损伤白斑, 在M4上多数都生长良好, 这与沈晓霞等报道用0.1%升汞溶液灭菌4 min以上, 大部分外植体陆续发白死亡差异较大<sup>[3]</sup>, 可能是较大的茎尖外植体对伤害的耐受性更强。

2.1.1.3 C处理。采用70%乙醇40 s, 0.1%升汞8 min, 70%双氧水10 min组合灭菌后, 外植体绿色有光泽, 叶片偶见失绿小白斑, 接种到M4上后, 1周无菌率100%, 2周为63%。接种5~6 d真菌(每一外植体大多只长一种真菌)开始仅从茎下端切口处长出, 12 d左右真菌释放达到最高峰, 后仅有极少数长真菌, 说明表面菌已灭尽。此法灭菌后外植体生长良好, 多数在4~6周可见生长。

2.1.1.4 D处理。用1.8%次氯酸钠1 min, 2.4 mmol/L柠檬酸溶液2 min预灭菌后再用C法, 灭菌后外植体绿色有光泽, 叶片上有一些失绿白斑。M4上培养1周无菌率82%, 2周为36%, 1周后长出的菌皆为真菌且均从切口和叶片失绿变白处长出, 较C法灭菌效果差, 可能由于次氯酸钠浓度高、灭菌步骤多造成。

另外, 在C法的各灭菌液中加入土温80(T-80)或将外植体先低温(4℃)处理24 h再行表面灭菌或将轻度染菌外植体二次灭菌, 效果都不理想, 无菌率低且外植体失绿多。试验还发现, 选取茎粗壮、顶芽饱满、叶片中等大小的外植体对灭菌和生长都有利。综合考虑对外植体的灭菌效果、伤害程度和灭菌步骤, 确定C法为最佳表面灭菌方法, 2周无菌率可达63%, 伤害小, 步骤较少。



注: A. 野生环境中的蛇足石杉; B. 外植体顶芽开始萌动生长; C. 切下3 mm新生顶芽再接种; D. 外植体长出的二叉分支; E. 长根3周的新生孢子体。  
Note: A. *Huperzia serrata* in wild environment; B. Growth of dormant top bud in explants; C. Reinoculation of newborn top bud cut for 3 mm; D. Binary branch of explants; E. New sporophyte after rooting for 3 weeks.

图1 蛇足石杉的生长

Fig.1 Growth of *Huperzia serrata*

2.1.2 内生菌的杀灭。将表面灭菌后于M4上培养2~3周的无菌外植体转入M04培养, 1周无菌率80%, 2周64%, 4周52%, 4周后无菌外植体再转入M4后基本不再染菌, 说明内生菌已被杀灭。到4周左右才不再染菌, 可能由于孔雀石绿和抗生素经植物吸收后需要一段时间才能起作用。M04上培养2周时, 外植体茎和叶仍有光泽、水分充盈, 部分在M04上2周左右就可见顶芽萌动, 说明孔雀石绿和抗生素AAS的浓度选择比较适宜, 能有效杀灭内生菌的同时又不影响外植体生长。另外, 将新长出3~5 mm的顶芽切下接种后生长快且均不再染菌, 也说明内生菌已杀灭完全。

2.2 蛇足石杉外植体培养 培养基成分影响茎尖外植体的存活和生长, 在M1、M2、M3上培养, 刚开始茎叶绿色有光泽, 1月后光泽逐渐失去, 茎下部开始发白, 3~4月茎叶全部发白死亡, 生长率为0。在M6上外植体3~4周内就发白死亡。在M5上培养5~6周有56%的外植体顶芽萌动生长, 生长较缓慢(2~3 mm/月)且新叶较小。接种到M4后, 一般4~5周有82%外植体顶芽萌动生长。顶芽先突起呈嫩绿色、有光泽(图1-B), 2周后长出2~3片正常叶片, 生长速度(6~8 mm/月)是M5的3倍。若等顶芽伸长到3~5 mm时切取其  
(下转第5025页)

观察其抗氧化效果,结果显示,血淋巴悬液浓度为 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6 时的悬液颜色分别为深灰色、灰色、浅灰色、褐白色(接近家蝇幼虫血淋巴冻干粉正常颜色)、褐白色。当家蝇幼虫血淋巴悬液浓度  $\leq 1:5$  时,悬液颜色基本保持不变,接近正常。

**2.3 巯基乙醇对家蝇幼虫血淋巴的抑菌效果影响** 表 1 显示,当以体积浓度  $10^{-6}$  的巯基乙醇作为抗氧化剂时,不同浓度家蝇幼虫血淋巴悬液对大肠杆菌的抑菌效果没有差异,各指示菌试验组和对照组抑菌圈直径没有明显差异。同时观察到,对照组和 1:3、1:4 两个浓度的试验组抑菌圈出现不同程度的灰化现象,而其他浓度的试验组则没有。

表 1 含  $10^{-6}$  巯基乙醇的不同浓度家蝇幼虫血淋巴的抑菌效果

Table 1 The antibacterial effect of different haemolymph in housefly larva concentration with  $10^{-6}$  mercaptoethanol

血淋巴悬液 浓度//g/ml Concentration of haemolymph suspension	抑菌圈直径//mm Diameter of <i>E. coli</i>	
	试验组 Test group	对照组 Control group
1:3	16.7	16.5
1:4	15.4	15.2
1:5	13.2	13.0
1:6	12.7	12.4
1:7	10.2	9.8

### 3 结论与讨论

对蝇蛆营养成分的分析表明,其脂肪含量为 2.6% ~ 12.0%,尤其不饱和脂肪酸含量明显高于鱼粉等其他产品<sup>[4]</sup>,这是造成蝇蛆提取物易于氧化和灰化变黑的主要原因之一。巯基乙醇为含有一SH 和一OH 的一种低分子量硫醇

类化合物,兼有硫醇和醇的化学性质,它作为还原剂可提供氢发生脱水反应生成二硫化物,从而保护脂肪尤其是多不饱和脂肪不被氧化。同时,巯基乙醇也是维持酶蛋白三级结构二硫键的主要修饰剂<sup>[6]</sup>,它的导入可破坏酶蛋白二硫键,引起酶三维结构的松散,导致酶的变性失活,从理论上讲其本身也具有抑制细菌生长的作用。另外,家蝇幼虫血淋巴的抑菌活性成分主要为抗菌肽<sup>[3]</sup>,抗菌肽属小肽,其结构(或构像)不受巯基乙醇的影响,所以在巯基乙醇最大非抑菌浓度条件下,试验组和对照组相比家蝇幼虫血淋巴的抑菌活性差异不明显(表 1)。试验结果显示,巯基乙醇对家蝇幼虫血淋巴既有抗氧化作用,本身又能抑制大肠杆菌的生长,在最大非抑菌体积浓度为  $10^{-6}$  (V:V) 时可有效保护浓度为 1:5 (m:V) 的家蝇幼虫血淋巴悬液不被氧化,而又不影响其抑菌活性。但由琼脂糖孔穴扩散法测定的家蝇幼虫血淋巴抑菌活性受指示菌种类、血淋巴的提取方法等因素影响,所以巯基乙醇在家蝇幼虫血淋巴中的适宜加入量要因具体情况通过试验来确定。

### 参考文献

- [1] 吴建伟,吴健桦,杨鹤萍,等.家蝇幼虫血淋巴抗白色念珠菌作用的初步研究[J].中国人兽共患病杂志,2002,18(3):57-59.
- [2] 许兰菊,崔淑贞,蒋媛媛,等.家蝇幼虫血淋巴对鸡免疫功能的影响[J].河南农业大学学报,2004,38(3):303-306.
- [3] 王远程,左晓峰,孙东旭,等.家蝇幼虫抗菌物质组成及其理化性质[J].微生物学报,1997,37(2):148-150.
- [4] 王达瑞,张文霞,陆源,等.家蝇幼虫营养成分的分析及利用[J].昆虫知识,1991(4):247-249.
- [5] 王远程,刘伟,扬蜂.家蝇血淋巴的提取及抗菌物质的诱导[J].微生物学报,1992,32(6):439-444.
- [6] 周海梦,王洪睿.蛋白质化学修饰[M].北京:清华大学出版社,1998.

(上接第 4948 页)

接种到 M4 后(图 1-C),生长速度(8~10 mm/月)快于未切前,可能是新组织未受到灭菌损伤,活力更强。约 10% 的外植体茎尖呈二叉分支生长,与自然条件下生长相同(图 1-D)。培养 4~6 月在生长的外植体中有 42% 从茎下端切口处长出白色或浅红褐色的根,少数根呈二叉分支(图 1-E),根刚长出时速度较快(约 6 mm/月),后逐渐减缓。比较外植体在 M3、M4、M5 上的生长情况可以看出:在该研究中 MS 矿质元素的浓度对蛇足石杉的生长影响最大,MS 有机元素的浓度对生长也有较大影响。另外,将在 M1、M2、M3 上培养 2 月后无菌且无生长迹象的外植体转到 M4 后 4~6 周,约 70% 出现生长,也进一步说明 MS 矿质元素浓度对其生长影响很大。故确定 M4 为最佳茎尖外植体生长、生根培养基。

植物生长物质不利于外植体的生长,GA<sub>3</sub> 大大降低了外植体的生长率,而 6-BA、IBA、2-4D 和 KT 反而抑制了其生长。

### 3 讨论

由于蛇足石杉与真菌共生,造成以其孢子体为外植体进行组织培养时灭菌困难,灭菌成功率低,反复灭菌又会严重伤害外植体,影响其生长。因此,如何提高灭菌成功率、获得大量受伤害小且不影响生长的外植体成为蛇足石杉组织培

养成功的一个关键。该研究先用 C 法杀灭表面菌,再用孔雀石绿和抗生素杀灭内生菌,取得了较好的灭菌效果,可获得 52% 无菌外植体。

该研究通过对多种培养基筛选,最终确定 M4 为适合生长、生根的培养基。据文献报道,与蛇足石杉具极近亲缘关系的石杉科石杉属 *Huperzia selago*<sup>[4]</sup> 和石杉科 *Lycopodiella inundata* (L.) Holub<sup>[5]</sup> 的体细胞胚胎或愈伤组织均发生在存活生长的茎尖外植体顶端分生区,于是推测蛇足石杉也极有可能先生长再产生体胚或愈伤,该研究结果为蛇足石杉的体胚或愈伤发生提供了可能。

### 参考文献

- [1] 余红英,孙远明,扬跃进.草药蛇足石杉的研究进展[J].中草药,2001,32(3):279-281.
- [2] 鲁润龙,周忠泽,鲍时来,等.药用植物蛇足石杉的生物学特性[J].中国科技大学学报,1999,29(1):118-121.
- [3] 沈晓霞,俞旭平,盛束军.千层塔茎尖组织培养灭菌方法的研究[J].中国中药杂志,2002,27(6):458-459.
- [4] WOJCIECH SZYPULA, AGNIESZKA PIETROSIUK, PIOTR SUCHOCKI, et al. Somatic embryogenesis and *in vitro* culture of *Huperzia selago* shoots as a potential source of huperzine A[J]. Plant Science, 2005, 168: 1443-1452.
- [5] AIMANE N, BLERVACQ A S, MICHAUX-FERRIERE N, et al. Histological analysis of indirect somatic embryogenesis in the Marsh clubmoss *Lycopodiella inundata* (L.) Holub (Pteridophytes)[J]. Plant Science, 2000, 156: 159-160.