

千层塔组织培养中外植体消毒灭菌研究初报

马华升¹ 孙玉强^{1,2} 童建新¹ 阮松林¹ 忻雅¹ 钱丽华¹ 祝水金²

(1. 杭州市农业科学研究院生物技术研究所, 浙江 杭州 310024; 2. 浙江大学农业与生物技术学院作物科学研究所, 浙江 杭州 310029)

摘要 本文通过对不同的外植体, 使用不同的灭菌剂, 不同的灭菌时间, 并结合紫外线照射等试验研究。初步筛选出相对有效的灭菌剂、浓度、灭菌时间及比较理想的外植体, 即: 茎尖用 HgCl_2 (0.1% w/v) 作灭菌剂灭菌时间 5~6 min 效果较好。

关键词 千层塔; 外植体; 灭菌剂

千层塔 (*Huperzia serratum* Thunb.), 又名蛇足草、蛇足石杉、金不换等, 为石杉科多年生草本植物^[1]。千层塔植株顶端具生殖芽, 落地生根成新苗; 孢子囊肾形, 淡黄色, 横生叶腋, 成熟时撒出孢子粉^[2]。千层塔全草入药, 民间主治痈疖肿毒, 跌打损伤^[3]。从“千层塔”中提取的生物碱——石杉碱甲是一种高效、可逆、选择性强的乙酰胆酯酶 (AchE) 抑制剂, 对老年痴呆症有显著疗效, 同时具有抗癌、抑制艾滋病毒、消炎等作用^[4]。千层塔主要分布在东北、长江流域以南等地区的山区林下阴湿处, 野生条件下, 通过孢子和生殖芽繁殖。孢子萌发周期长, 萌发后地下生配子体需 6~15 年才能成熟^[5]。千层塔野生资源的再生较难。因此, 有必要通过细胞工程技术来实现资源的保存和永续利用。

我们拟开展千层塔细胞工程研究, 目前国内外虽然对“千层塔”药效成分、药理方面做了一些研究^[6-9], 但是对“千层塔”组织离体培养的研究报道极少。不少研究人员曾开展千层塔组织培养研究, 利用植物细胞工程方法生产石杉碱甲, 但是, 尽管采用了各种灭菌方法, 植株总是带菌, 研究发现千层塔健康植株中生活着内生真菌^[10]。经过表面消毒灭菌处理后的外植体在培养基上生长一段时间, 又会被内生真菌所污染。所以, 寻找一种新的灭菌方案, 能有效彻底地完成外植体灭菌是“千层塔”细胞培养的关键技术之一。我们通过筛选不同的外植体, 使用不同的灭菌剂, 并结合紫外线照射, 可以使得培养的外植体不被内生真菌污染。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验所用的千层塔成年植株于 2005 年冬季采自浙江省淳安县枫树岭镇, 然后种植于杭州市农业科学院大棚以供实验取材。分别取茎尖、叶片、孢子囊、侧芽和幼根作为外植体。

1.2 外植体灭菌

外植体先用自来水冲洗干净, 在超净工作台上把茎尖, 叶片和幼根按照要求切成合适的外植体, 以备灭菌。

方法一: 用 0.1% (w/v) 的升汞溶液对 5 种外植体, 每 5 到 7 个外植体为一个样本, 分别进行 1~2 min, 3~4 min, 5~6 min 和 8~10 min;

方法二: 用 10% (w/v) 次氯酸钠处理外植体, 每 5 到 7 个外植体为一个样本, 分别进行 5 min, 和 15 min 消毒灭菌; 再用无菌水冲洗 3 次, 每次 2~3 min 振荡, 沥干, 重复 3~4 次。按照要求处理外植体, 茎尖切成 3mm 和 1~1.5mm; 叶片带叶柄或切掉叶柄;

方法三: 取新鲜的新长出的茎尖, 用 0.1% (w/v) 升汞溶液消毒 6 min 后, 放在紫外灯的正下方 20 cm 处, 分别照射 15 min, 30 min 和 60 min 作为 3 个处理, 每个处理 9 个样, 每个样本 5 个外植体。然后接种, 分别统计 7 d, 14 d 时的污染率和 14 d 时的存活率。

1.3 培养方法

刚灭菌的外植体先接种到固体 MSB 培养基, 不加激素。7 d 后挑出未污染和未白化的外植体继代到新培养基上 MSB, 激素为 2,4-D 0.1 mg/L, TDZ 0.5 mg/L, 6-BA 0.5 mg/L; 14 d 后, 未污染的外植体

作者简介: 马华升 (1962 -), 男, 浙江东阳市人, 硕士, 从事植物生物技术研究。

Tel: 0571 - 87313241, E - mail: hzhsma@163.com

继续继代。分别统计接种培养后7 d, 14 d和21 d的外植体污染率(污染率累加)和成活率。

1.4 灭菌剂和抑菌剂应用

7 d或14 d后,挑出未污染外植体后,轻微污染的外植体也继续继代,在培养基添加0.1% (w/v) 升汞溶液(HgCl_2) (浓度0.1%,分别添加1, 2, 4 ml), 12 h后继代。或者添加抗生素头孢霉素(Cef) (浓度250 mg/ml, 分别添加1, 2, 4和10 ml)。TIMENTIN (浓度250 mg/ml, 分别添加1, 2, 4 ml)。分别统计添加灭菌剂后3 d和7 d的外植体污染率和成活率。

2 结果

2.1 灭菌剂和灭菌时间选择

先用千层塔的茎尖和幼茎作为外植体,筛选合适的灭菌剂。用(10% w/v)次氯酸钠和(0.1% w/v)升汞做灭菌处理。

次氯酸钠灭菌处理外植体5 min,外植体培养7 d后全部污染;灭菌10 min,外植体培养14 d后全部污染,都是真菌污染呈灰褐色,乳白色和红褐色等(图1A, B, C)。灭菌15 min,导致白化很严重达到52%左右,外植体培养14 d后的存活率仅为4%;而且21 d后,这些存活的外植体在继续继代培养后也会白化,死亡(图1D, 表1)。这表明,次氯酸钠做灭菌剂,以茎尖为外植体培养不适合,表现为灭菌不彻底或灭菌时间过长导致外植体白化。

用0.1 (w/v)升汞进行茎尖消毒灭菌处理,从处理时间来看,灭菌时间为1~2 min和3~4 min时,外植体培养7 d到14 d都污染,污染主要以真菌为主,呈红褐色,乳白色和灰褐色等。灭菌时间为8~10 min时,灭菌效果比较好。培养7 d,约26.7%外植体出现真菌污染,同时10%左右的外植体出现白化现象;培养14 d时,约46.7%外植体出现污染,白化率达到40%;培养21 d时的污染率也是为46.7%,但是白化率达到51.1%,而存活率仅为2.2%。用升汞作为灭菌剂,处理8~10 min,这个灭菌处理需要大量的外植体,对这种珍稀的中草药来说不太适用。外植体灭菌5~6 min,培养7 d时千层塔茎尖的污染率为31.1%;培养14 d时,污染率达到60%,白化率达到17.8%,存活率达到8.9%(表2)。进一步研究发现,采用5到6月份新长出的嫩茎尖,并把茎尖切成“V”字型,培养21 d后,存活率可以达到15%。在此基础上,我们选用0.1% (w/v) 升汞,处理茎尖外植体5~6 min进行消毒灭菌。

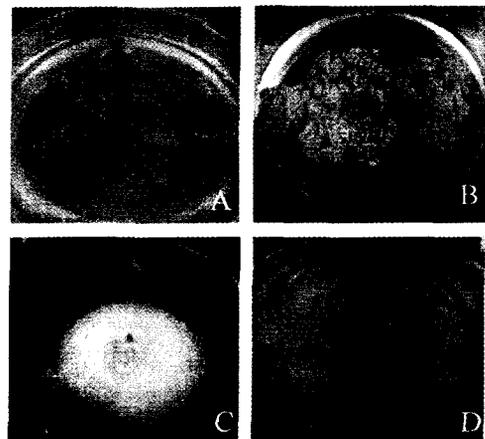
幼茎灭菌2, 4, 6和8 min后均污染。初步研究表明:“千层塔”茎部不适合作为外植体来诱导愈伤组织,表现在灭菌时间短,污染严重;灭菌时间长,细胞死亡。

2.2 叶片、侧叶、腋芽和孢子囊为外植体

采用千层塔新生的叶片,侧叶,腋芽和孢子囊作为外植体进行组织培养,用0.1% (w/v) 升汞消毒灭菌。新生叶片和侧叶经升汞灭菌后发现,体内真菌很难消除,表现在灭菌2~3 min和灭菌5~6 min,培养7 d和14 d后几乎全部污染,都是从叶柄端开始长出白色或褐色的真菌(图2A);灭菌8~10 min,污染还是比较严重,培养14 d时达到72%,同时白化很严重,剩下没有污染的外植体几乎都白化。新生叶片在灭菌处理后接种前,切除叶柄部分后进行培养,污染率稍有下降,培养2周后,也会白化。新生叶片不适合作为外植体进行组织培养。主要原因可能是千层塔叶片蜡质层很厚,其叶片中维管组织和叶脉比较丰富,其内部叶长满内生真菌,表面灭菌不能杀死其微观组织和叶脉或气孔中的真菌。

千层塔侧叶是在茎尖部,较叶片厚实。但是升汞灭菌后很容易污染和白化,而且几乎全部污染或白化,也不适合作为外植体。

腋芽作为外植体灭菌5~6 min,培养14 d时污染率可以达到70%,白化也只有10%左右,培养21 d还是鲜活的绿色(图2B)。腋芽可以很好地作为外植体进行组织培养,但是由于腋芽一般很少,每株仅有2~3个腋芽。



A. 外植体培养7 d出现红褐色细菌污染,
B. 外植体培养14 d出现灰褐色真菌污染,
C. 外植体培养7 d出现乳白色真菌污染,
D. 外植体培养14 d呈白化状

图1 以茎尖为外植体培养时污染和白化情况

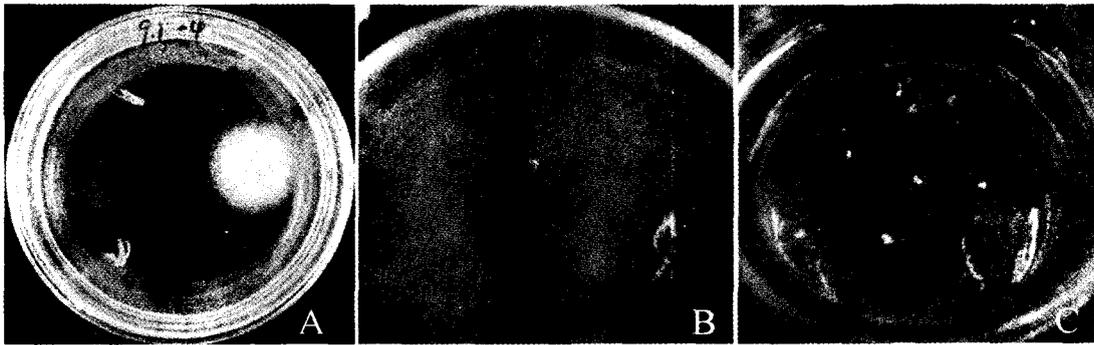
马华升等:千层塔组织培养中外植体消毒灭菌研究初报

表1 外植体茎尖用次氯酸钠(10% w/v)作灭菌剂效果

	5 min/7 d	10 min/7 d	10 min/14 d	10 min/21 d	15 min/7 d	15 min/14 d
污染率%	100±0	74±13.50	90±10.54	0	42±14.76	
白化率%	0			10±10.54		52±16.87
成活率%	0					4±8.43

表2 外植体茎尖用 HgCl₂(0.1% w/v)作灭菌剂效果

	1~2 min /7 d	3~4 min /7 d	3~4 min /14 d	5~6 min /7 d	5~6 min /14 d	5~6 min /21 d	8~10 min /7 d	8~10 min /14 d	8~10 min /21 d
污染率%	100±0	71.1±17.64	95.6±8.82	31.1±22.61	60±10	73.3±10	26.7±20	46.7±22.36	46.7±22.36
白化率%	0				17.8±12.02	17.8±15.6	10±10.54	40±28.3	51.1±22.6
成活率%	0		4.4±8.82			8.9±10.5			2.2±6.7



A. 叶片为外植体培养 14 d 后出现乳白色真菌污染, B. 培养 21 d 时存活的腋芽, C. 培养 3 个月后存活的孢子囊

图2 以叶片,腋芽和孢子囊为外植体培养时污染情况

表3 外植体叶片、孢子囊和侧叶用 HgCl₂(0.1% w/v)作灭菌剂效果

		2~3 min/7 d	5~6 min/7 d	5~6 min/14 d	8~10 min/7 d	8~10 min/14 d
叶片	污染率%	100±0	68±22.8	96±8.9	60±20	72±10.9
	白化率%	0				8±10.9
侧叶		2~3 min/7 d	2~3 min/14 d	5~6 min/7 d	5~6 min/14 d	
	污染率%	48±22.8	84±8.9	24±16.7	36±16.7	
	白化率%		16±8.9		68±16.7	
孢子囊		2~3 min/7 d	2~3 min/14 d	2~3 min/21 d		
	污染率%	11.4±15.6	14.3±20.2	20±19.1		
	白化率%			28.6±22.6		

通过对孢子囊灭菌和离体培养发现,孢子囊很容易彻底灭菌,用 0.1% 升汞仅需要灭菌 2~3 min 即可,培养 21 d 后,污染率平均 20%,白化率平均为 28.6%,灭菌效果很好,孢子囊也是进行体外培养灭菌的良好材料。但是用孢子囊作为外植体,很难萌发,培养进 3 个月仍保持原样(图 2C)。另外,孢子

囊很小,取材比较麻烦,且数量有限并受季节限制。如果用孢子囊作为外植体可能需要很长的时间,最主要的是可能要通过其它的调控方法进行促进其萌发。

2.3 紫外线结合升汞灭菌处理

取新鲜的新长出的茎尖,用 0.1% (w/v) 升汞溶

液消毒 6 min 后,放在超净工作台紫外灯正下方 20 cm 处,分别照射 15 min, 30 min 和 60 min 作为 3 个处理,每个处理 9 个样,每个样本 5 个外植体。外植体茎尖经过升汞和紫外线消毒后,培养 7 d, 3 个处理的污染率几乎差不多,都在 45% 左右;未出现污染的继代培养后,14 d 时污染率也是差别不大,灭菌 15 min 的污染 75% 左右;灭菌 30 min 的污染 78% 左右;灭菌 60 min 的污染约 73% 左右。14 d 时存活率,灭菌 60 min 稍高,到 27% 左右;灭菌 30 min 有 22% 左右,没有明显差异(表 4)。但是这些 14 d 未污染的茎尖外植体,继续培养时出现白化和再次的真菌污染。紫外线结合升汞对外植体进行消毒灭菌,并不能解决外植体消毒灭菌的问题。真菌或细菌会在潜伏一段时间后继续污染外植体。

表 4 外植体茎尖用 $HgCl_2$ (0.1% w/v) 灭菌结合紫外线消毒效果

	7 d 污染率%	14 d 污染率%	14 d 时存活率%
15 min	46.67 ± 14.14	75.56 ± 16.67	24.44 ± 16.67
30 min	44.44 ± 13.33	77.78 ± 15.63	22.22 ± 15.63
60 min	44.44 ± 13.33	73.33 ± 20	26.67 ± 20

2.4 添加灭菌剂和抑菌剂对外植体的影响

造成千层塔外植体污染主要原因是千层塔体内所含有的各种菌体,目前仅靠灭菌剂很难彻底除去外植体的菌体,很容易造成二次或三次污染等。但是,多次利用灭菌剂进行外植体消毒灭菌,对外植体也造成极大伤害,容易白化,死亡等。所以,有必要利用抑菌剂对灭过菌的外植体进行看护培养。

轻微污染的外植体继代到新培养基上,分别添加 0.1% (w/v) 升汞溶液 ($HgCl_2$) 1 ml, 2 ml 和 4 ml, 发现添加 1 ml 和 2 ml 升汞溶液,外植体周围的菌斑开始呈水渍状,5~7 d 后,菌斑又继续生长,造成外植体死亡;添加 4 ml 升汞溶液的外植体和菌斑都呈水渍状,7 d 后菌斑呈不扩大的膜状,外植体白化。

添加抗生素 (250 mg/ml) 头孢霉素 (Cef) 分别添加 1, 2, 4 和 10 ml, 都不能抑制菌斑生长,并且加速外植体白化或褐化死亡。添加另一种抗生素 (250 mg/ml) TIMENTIN, 分别添加 1, 2, 4 ml, 抑制菌斑生长的效果也不明显,不能杀死菌体,外植体和菌体和抗生素共存。外植体污染率和成活率没有统计,最后几乎都白化或褐化死亡。

3 讨论

我们选用千层塔新发的幼叶,茎尖,幼根和孢子

囊作为外植体,利用次氯酸钠和升汞作为灭菌剂进行外植体消毒灭菌研究,表明:次氯酸钠并不适合千层塔外植体(幼叶,茎尖和幼根)灭菌处理,表现在灭菌时间短则灭菌不彻底,污染严重或灭菌时间过长导致外植体白化死亡。这也说明单次灭菌并不能彻底消灭千层塔体内的多种菌体。而利用升汞进行茎尖消毒灭菌,要求茎尖是新长出来的,并且茎尖取材非常适合,那就是维管组织还没有到达茎尖的部位,这段茎尖仅仅有 0.5~1mm 左右,操作也比较困难,所需材料比较新鲜且数量较多。用升汞进行灭菌 5~6 min 比较适合,但是也会有近 90% 的污染和白化。利用孢子囊作为外植体进行消毒灭菌,可能是一种比较好的灭菌材料,用次氯酸钠灭菌 5 min 或升汞灭菌 2~3 min 就可以比较彻底解决污染问题;但是孢子囊就是培养 6 个月以上还是保持原样,也就是很难萌发或诱导愈伤组织。这可能与其生理特征相关,千层塔孢子萌发周期长,萌发后属地下生配子体,需 6~15 年才能成熟^[5]。如果能很好地解决孢子囊萌发问题,可以预见千层塔组织培养工程将会比较顺利。

参考文献:

- [1] 丁景和. 药用植物学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1991:86
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科技出版社, 1985:215
- [3] 浙江省药用植物志编写组. 浙江药用植物志[M]. 浙江:浙江科学技术出版社, 1980:51
- [4] 李军, 韩燕. 千层塔中三萜成分的研究[J]. 药学报, 1988, 23(7): 549
- [5] 中山大学生物系, 南京大学生物系. 植物学[M], 北京:人民教育出版社, 9:137
- [6] 袁珊琴. 蛇足石杉生物碱成分的研究[J]. 中草药, 1994, 25(9):453-454
- [7] 刘铁薇. 石杉碱甲的药理作用与临床研究进展[J]. 中草药, 2001. 24(10):775-776
- [8] HuiQing LIU, ChangHeng TAN, ShanHao JIANG, DaYuanZHU. Huperzine A New Lycopodium Alkaloid from *Huperzia serrata*. Chinese Chemical Letters[J], 2004, 15(3):303-304
- [9] 唐希灿. 石杉碱甲(双益平)一种有望治疗早老性痴呆症的药物[J]. 中国药理学报, 1996, 179(6):481-484
- [10] 石玮, 罗建平, 丁振华, 等. 千层塔内生真菌分离鉴定的初步研究[J]. 中草药, 2005, 36(2): 281-283