

千层塔组织培养中的外植体愈伤组织研究

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

(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 经初培养和3至4轮继代培养,从未污染的千层塔茎尖中,获得了约5%的愈伤组织。这种存活的茎尖继代到较适合的诱导培养基SN6(2,4-D 2.0 mg/ml)上,培养70~80 d后约可观察到愈伤组织块。

关键词 千层塔;培养基;愈伤组织

“千层塔”是一种野生药用蕨类植物,“千层塔”对重症肌无力症的治疗有效率高达99.2%,并能提高脑内乙酰胆碱的含量。从“千层塔”中提取的生物碱——石杉碱甲是一种高效、可逆、选择性强的乙酰胆碱酯酶(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^[1-8]。石杉碱甲成为国际市场的优势产品,出口价格高达500万元/kg人民币,仅美国市场每年需石杉碱甲达100kg以上。因“千层塔”植株矮小,生长缓慢,散生于山林阴湿处,野生资源十分有限,且未能人工栽培,严重地限制了它的开发利用。为不丢失这些宝贵野生药用植物资源,开展“千层塔”生物技术研究刻不容缓。

我们拟开展千层塔细胞工程研究,利用千层塔细胞系进行千层塔植株再生,扩大千层塔驯化栽培的种质资源,并进行千层塔野生生长变家养提供种苗和育种资源。

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研究院大棚以供实验取材。采用5到6月份新长出的嫩茎尖,并把茎尖切成“V”字型,用0.1% (w/v) 升汞,处理茎尖外植体5~6 min进行消毒灭菌。培养21 d后,把未污染的茎尖选出进行愈伤组织诱导研究。

1.2 外植体继代培养和愈伤组织诱导

外植体培养21 d后未污染,继代诱导愈伤组织诱导培养基上(表1)。培养条件18~24℃,散光照。愈伤组织诱导过程中剔出污染和白化的外植体。存活的外植体继代,未污染的茎尖外植体可以继续把幼叶、幼茎尖和茎端分开,分别继续诱导愈伤组织。观察外植体在哪种培养基或激素组合上能够膨大,形成愈伤组织。

表1 外植体继代培养和愈伤组织诱导的培养基

基本培养基	生长素 (mg/L)	细胞分裂素 (mg/L)	添加物
MSB	IBA 0.5	KT 0.2	活性炭 5 g/L
MSB	2,4-D 0.5	KT 0.2	活性炭 5 g/L
MSB	2,4-D 0.5	TDZ 0.5	活性炭 5 g/L
MSB	2,4-D 0.5	TDZ 0.1/ BA 0.5	TIMENTIN
1/2MS	2,4-D 2.5		TIMENTIN
SN6	2,4-D 2.0		TIMENTIN
CH5	2,4-D 5.0		TIMENTIN
1/2MN	2,4-D 2.5		TIMENTIN

1.3 愈伤组织继代保存

诱导出来的愈伤组织分别用两种方式保存:一种是把愈伤组织从外植体上剥离,继代到新的培养基上;另一种是把愈伤组织和外植体一起继代到新培养基上。愈伤组织继代保存培养基是SN6培养基,添加2,4-D 2.0 mg/L,MSB培养基添加2,4-D 0.5 mg/L,TDZ 0.5 mg/L。散光照,18~24℃培养。

项目来源:杭州市科院所专项资金(计划编号:20051631N03);第38届中国博士后科学基金(计划编号:2005038273)

作者简介:孙玉强(1977-),男,湖北省枣阳市人,博士,从事植物生物技术研究。E-mail: sunyuq1109@hotmail.com

*通讯作者:马华升, Tel: 0571-87313241, E-mail: hzhsma@163.com

2 结果与分析

2.1 外植体继代培养和愈伤组织诱导

灭菌后存活的外植体,主要是茎尖。在培养前期即前 7 d,外植体很容易出现乳白色和褐色的真菌污染,污染的外植体被菌斑包裹,未污染的外植体呈浅绿色存活状态(图 1A,B);未污染继代培养时,第二次出现污染时可能会同时出现细菌和真菌污染,真菌和细菌生长迅速,很快就包裹外植体(图 1C),此时即使尚未污染的外植体多数也呈白化或褐化状态;未污染的外植体继续培养时,多数会出现红褐色的细菌污染,外植体褐化死亡(图 1D)。

经过 3 到 4 轮继代培养,约 21 ~ 28 d,未污染的茎尖和孢子囊外植体继代到愈伤组织诱导培养基上进行愈伤组织诱导。试用了 5 种培养基,包括 MSB, 1/2MS, 1/2MN, CH5, SN6 和 8 种激素组合,生长素主要是 2,4-D,外植体对其它生长素如 IBA, NAA, IAA 没有反应。外植体在这些培养基上,除了有少量外植体继续污染后,大部分会白化或褐化死亡,这几乎占培养的外植体的 50% ~ 60% 左右。剩下的外植体茎尖,能保持 3 个月以上浅绿色,然后大部分在继代培养基上慢慢褐化死掉。仅仅有 5% 左右的茎尖外植体能存活 6 ~ 18 个月,并在春季能长出新的侧芽和新叶片(图 3A)。

千层塔茎尖外植体在不同培养基上颜色和形态稍有差别,茎尖在 SN6 添加 2,4-D 2.0 mg/ml 培养基上,能保持鲜艳的浅绿色,在 1/2MN 培养基上培养 7 d 左右就逐渐稍稍黄化;在 CH5 培养基上,千层塔茎尖状态和颜色介于这两种培养基之间。培养在 SN6 培养基里的茎尖外植体适合进一步培养和诱导愈伤组织。茎尖在添加 2,4-D, TDZ 和 6-BA 的 SN6 培养基上,有些茎尖外植体会出现茎端部分膨胀,但是很长时间并没有愈伤组织产生。

这种存活的茎尖继代到愈伤组织诱导培养基 SN6(2,4-D 2.0 mg/ml)上,目前已有两皿培养基诱导出愈伤组织(诱导率不足 1%),平均从接种到可以观察到愈伤组织需要至少 70 ~ 80 d。茎尖外植体与培养基接触部分的茎端和幼叶柄端开始稍稍膨大,叶片皱缩弯曲(图 2A),从培养皿反面可以看出,茎尖的茎端仍然是绿色,叶片呈浅绿色,茎端稍微膨大,皮层裂开(图 2B)。另一个茎尖外植体横放在培养基上,整个与培养基接触的幼叶和茎部开始弯曲皱缩,继而叶片膨大(图 2C),继续培养近

50 d 后,皱缩的叶片柄端部出现浅褐色愈伤组织,茎尖部的愈伤组织呈浅绿色,紧包裹茎尖着生叶片和裸露部位,生长极其缓慢。继代后,这些愈伤组织生长缓慢,一个月几乎没有多大变化。诱导的愈伤组织继代后,继续生长 20 d 后观察到有些水渍化,部分愈伤组织会逐渐褐化,一个月后死亡。在 MSB 培养基(2,4-D 0.5 mg/L, TDZ 0.5 mg/L)尚未能观察到愈伤组织继续增殖。

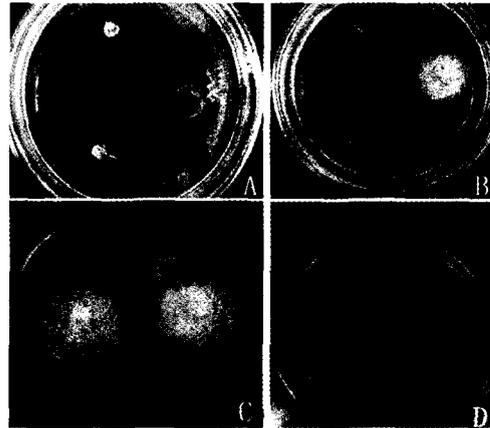


图 1 外植体继代培养时出现几种污染情况

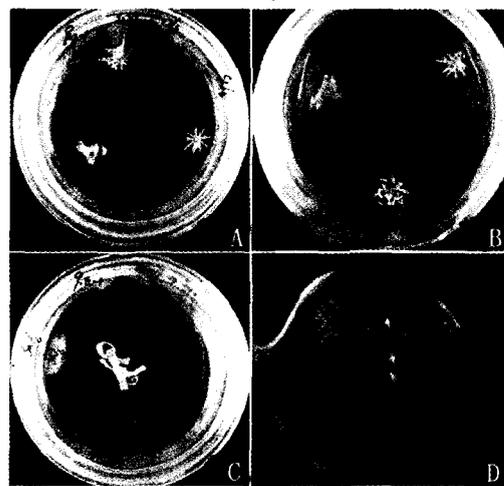


图 2 茎尖外植体诱导愈伤组织

继续从培养 45 d 左右的千层塔茎尖进行愈伤组织诱导(图 3A),经过 3 个月左右从茎尖外植体的茎端,茎尖和幼叶柄端部产生浅黄色的愈伤组织(图 3B),而叶片继续弯曲呈黄化状,没有产生愈伤组织。用相同培养基继代一样生长缓慢,但是生长较

为正常。剥离愈伤组织后,发现接种的外植体仅剩下茎尖的栓化的木质部和韧皮部(图3C)。诱导出来的千层塔愈伤组织一般呈浅绿色或浅黄色,泥状,继代后增殖非常缓慢。光照培养后容易褐化。这也说明愈伤组织来自茎尖分生组织和皮层;千层塔木质部形成迅速,真菌、细菌等随导管或筛管迅速蔓延,导致体内布满菌体,外植体灭菌困难,造成千层塔组织培养难以开展。

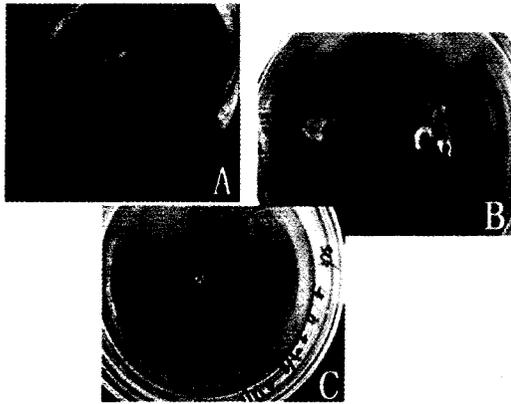


图3 千层塔茎尖外植体愈伤组织形成和继代
A. 离体培养存活的茎尖组织, B. 茎尖诱导形成的愈伤组织, C. 剥离愈伤组织后剩下的栓化木质部

图3 千层塔茎尖外植体愈伤组织形成和继代

组织培养实验表明, SN6, CH5 和 1/2MN 培养基, 对于千层塔外植体培养的影响, 差异不大。在恒温 28℃ 左右条件下培养, 发现 14/10 h 的光照/黑暗培养, 一周后外植体都发白死亡, 无法继续培养和诱导愈伤组织。只有在较暗散射光培养的条件下, 茎外植体才保持嫩绿, 在含有 5 mg/L 2,4-D 的 SN6 培养基上培养诱导成功, 两个月后长褐色的愈伤组织, 这种愈伤组织生长非常缓慢。

3 讨论

从未污染的千层塔茎尖中, 我们得到了微少的愈伤组织, 几乎是从 1000 个外植体中得到 4-5 个外植体产生愈伤组织。愈伤组织主要产生于皮层, 因为千层塔茎段的皮层非常发达, 约占茎段横切面面积 80%, 主要由薄壁细胞组成, 排列紧密。皮层中有根迹维管束、叶迹维管束散在分布同时维管组织也是健全。所以可以很明显的观察到愈伤组织从外植体上剥离后, 仅仅剩下木质部部分。而千层塔中菌体主要分布于皮层中的维管束及皮层和维管组织结合部, 也可以推断出, 菌体可能通过导管或筛管组织横向浸染皮层部分, 纵向浸染顶部。然而千层

塔组织的细胞间, 分布于叶鞘、种子、花、茎、叶片和根中分布着各种内生菌, 以茎中最多在所分离的内生真菌中以丛梗孢目居优势类群^[9]。这些真菌的存在为千层塔细胞工程研究特别外植体灭菌和愈伤组织造成很大的困难。

同时我们筛选了多种培养基和激素组合来诱导茎尖外植体产生愈伤组织。发现适合于禾本科组织培养的 SN6 培养基和 MS 都比较适合千层塔组织培养, 其中激素组合主要以 2,4-D 为主, 较高浓度的 2,4-D 比较适合千层塔茎尖诱导愈伤组织; 添加分裂素和不添加分裂素对千层塔愈伤组织诱导几乎没有影响。诱导出来的愈伤组织一般呈浅绿色或浅黄色, 泥状, 继代后增殖非常缓慢。光照培养后容易褐化。这样的愈伤组织不适合进一步培养。

从千层塔组织培养的实验清楚地认识到, 千层塔这类较低等且伴有内源真菌的蕨类植物离体培养十分困难, 如果能解决其组织培养的几个瓶颈问题如外植体选择, 外植体消毒灭菌和愈伤组织诱导和增殖, 用千层塔细胞工程进行工业化大规模生产次生代谢产物很困难。如果能得到生长状态良好的千层塔愈伤组织, 还应从提高细胞系石杉碱甲的含量和增加培养细胞的增殖速度两方面着手, 目前还有大量的基础工作需要进一步开展。

参考文献:

- [1] 李军, 韩燕. 千层塔中三萜成分的研究[J]. 药学学报, 1988, 23(7): 549
- [2] 刘嘉森. 石杉碱甲和石杉碱乙的化学研究[J]. 化学学报, 1986, 7(2): 110-112
- [3] 袁珊琴. 蛇足石杉生物碱成分的研究[J]. 中草药, 1994, 25(9): 453-454
- [4] 刘铁薇. 石杉碱甲的药理作用与临床研究进展[J]. 中药材, 2001, 24(10): 775-776
- [5] HuiQing LIU, ChangHeng TAN, ShanHao JIANG, DaYuanZHU. Huperzine A New Lycopodium Alkaloid from *Huperzia serrata*. Chinese Chemical Letters[J], 2004, 15(3): 303-304
- [6] Liu J S, Zhu Y L. The structure of Hup A and B, two new alkaloids exhibiting marked anticholinesterase activity[J]. Can J Chem. 1986, 64: 837-839
- [7] 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, 17(6): 481-484
- [8] 徐泓, 唐希灿. 石杉碱乙的抗胆碱酯酶作用[J]. 中国药理学报, 1987, 8(1): 18-22
- [9] 石玮, 罗建平, 丁振华, 吴洁. 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