

· 研究报告 ·

蛇足石杉离体培养物形态变化与石杉碱甲积累的研究

徐贤柱, 涂艺声*, 吉枝单, 陈曼, 蔡险峰, 杨萍

江西师范大学生命科学学院, 南昌 330022

摘要 通过蛇足石杉(*Huperzia serrata*)离体培养研究不同培养基对培养物细胞特征、总DNA特征、生物增长量和石杉碱甲含量的影响。结果表明, Sh、W和Shx三种培养基中, 培养物分化成叶状体、根状体和苔藓状体3种不同的形态, 三者的叶细胞拟由单细胞出芽成串丛生发育成组织, 苔藓状体和根状体比叶状体的细胞表面有更多的根和假根生长; 总DNA也存在差异, 35、45和55天的苔藓状体均出现DNA梯带, 表明形态变异可能与细胞凋亡相关; 叶状体、根状体和苔藓状体的生物量增长分别为(1 788±31)%、(833±27)%和(1 963±52)%, 石杉碱甲的含量分别为71.7±1.54、20.1±0.82和0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P<0.01$)。上述结果表明, 培养基成分变化可以使相同的基因型材料生成不同的形态, 且生长速度和代谢产生石杉碱甲的量等都发生明显变化, 叶状体是产生石杉碱甲的最好形态。

关键词 蛇足石杉, 石杉碱甲, 形态, 组织培养

徐贤柱, 涂艺声, 吉枝单, 陈曼, 蔡险峰, 杨萍 (2015). 蛇足石杉离体培养物形态变化与石杉碱甲积累的研究. 植物学报 50, 733–738.

蛇足石杉(*Huperzia serrata*)又名蛇足草, 隶属石杉科石杉属, 为多年生蕨类植物, 主要分布于我国长江中下游地区常绿阔叶林区域, 是名贵中药材, 可全草入药。目前, 已从蛇足石杉中提取了几十种生物碱和一些萜类等活性物质, 野生蛇足石杉中石杉碱甲的含量较低(0.001%–0.005%), 它具有保护大脑神经的作用, 可以减少可溶的 β 淀粉粉体并减慢淀粉样蛋白空斑的形成; 此外, 石杉碱甲还能激活促分裂原活化蛋白信号调节酶的信号通路, 促进海马齿状回神经的修复与再生, 增加神经干细胞的生长与分化(Ishiuchi et al., 2013; Ma et al., 2013; Huang et al., 2014)。

梁昊(2010)建立了蛇足石杉的组织培养体系, 在改良的MS培养基上出现了4种外植体形态, 即绿色球状体、二叉分支、多叉分支和无二叉分支。包日双等(2012)发现, 蛇足石杉孢子在无激素的MS培养基中培养90天可以萌发形成原叶体, 原叶体中石杉碱甲的含量为0.005 9%。王德立等(2011, 2014)对海南蛇足石杉株龄及年生长量进行了研究, 发现半年的幼苗平均高度为1.42 cm, 幼株3年生长高度平均为7.94 cm, 平均年生长量为2.0–2.5 cm。不同地域、不

同生长阶段和不同部位石杉碱甲的含量存在显著差异, 幼苗和幼株含量大于成株, 叶>茎>根(杜次等, 2013)。石杉碱甲在石杉属植物中含量最高且在其愈伤组织中也有相应的含量(Ishiuchi et al., 2013)。

现有的蛇足石杉组织培养研究主要集中在孢子体上, 在多种培养基上以叶状体为材料, 通过组织培养方式培养出不同形态培养物并进行产石杉碱甲研究还报道较少。不同形态培养物的石杉碱甲含量存在明显差异的机制还有待阐明。本文研究了来源相同的叶状体在不同培养基中的形态变化, 并对细胞发生、DNA梯带特征与特有次生代谢物石杉碱甲积累的相关影响进行了初步探讨, 将为研究蛇足石杉中石杉碱甲的生物合成途径提供表型材料。

1 材料与方 法

1.1 材 料

叶状体取自本实验室已建立的蛇足石杉(*Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trev.)离体叶状体繁殖系。

收稿日期: 2014-12-25; 接受日期: 2015-05-04

基金项目: 国家自然科学基金(No.31370390, No.81360614)、江西省自然科学基金(No.20132BAB204023)和江西省科技支撑项目(No.20121BBG70016, No.20142BBF0008)

* 通讯作者。E-mail: ystz2012@163.com

1.2 主要仪器与试剂

所用仪器包括倒置相差显微镜(Nikon)、解剖显微镜(麦克奥迪)、液相色谱仪(Waters)和电泳仪(北京六一)。石杉碱甲标准品购自上海源叶生物科技有限公司; 甲醇(色谱纯)及其它试剂均为市售分析纯。

1.3 方法

1.3.1 叶状体、根状体和苔藓状体的培养

实验用叶状体、根状体和苔藓状体的培养均采用将增殖获得的叶状体分割成小块接种于不同的培养基中, 即叶状体培养基Sh (1/4MS) (吉枝单等, 2014)、根状体培养基W (White大量元素+1/4MS微量元素)和苔藓状体培养基Shx (1/4MS+80 g·L⁻¹香蕉泥)。培养基pH值为5.8–6.2, 温度(24±2)°C, 每天光照14小时, 光照度约为1 500 lx, 培养55天收获并检测石杉碱甲。

1.3.2 培养物增殖量的计算

相对增长量=(收获量-接种量)/接种量×100%。

1.3.3 不同培养物细胞形态的观察

在培养物生长期, 分别取不同形态的培养物, 置于3%戊二醛中固定4小时, 在解剖显微镜下对组织块进行分离, 取出细小组织制片, 于光学显微镜下观察并拍照。

1.3.4 3种培养物的DNA检测

取培养35、45和55天的3种培养物, 采用CTAB法(李金璐等, 2013)提取培养物中的总DNA, 进行琼脂糖凝胶电泳, 观察DNA电泳图谱。

1.3.5 培养物中石杉碱甲的测定

石杉碱甲测定条件(吉枝单等, 2014): 色谱柱为Waters C18柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-醋酸铵(0.08 mol·L⁻¹; pH6)=3:7 (v/v); 流速0.8 mL·min⁻¹; 检测波长308 nm; 柱温25°C; 进样量15 μL。

2 结果与讨论

2.1 不同培养基上生长出形态不同的培养物

采用Sh、W和Shx三种培养基对分割的叶状体继代培

养, 发现培养物形态发生了明显异化(图1)。Sh培养基上生长的是叶状体; W培养基上生长成根状体; Shx培养基上生长出苔藓状体。这3种培养物外形有明显的区别, 叶状体是具叶形态的培养物; 根状体的根毛较为明显, 颜色发白, 分析主要是一些根毛和假根的培养物; 苔藓状体主要表现为叶分化不完全, 呈苔藓状生长。

2.2 不同培养物形态建成的细胞发生特点

从图2可以看出, 蛇足石杉叶状体的细胞拟以出芽方式增殖, 新生细胞的体积明显更小。

图2A–C是叶状体细胞增殖与发育的变化过程, 它由1个细胞成串增加, 下一串细胞由先前邻细胞的一定部位(图中红色箭头所示)分生而来, 最后形成丛生细胞串的叶状体——主体。在这一生长过程中, 细胞丛不断增加, 有的细胞另一侧出现根原基分化(图中白色箭头所示), 在叶状体边缘平行排列约3层细胞, 最外层细胞体积小, 内部细胞体积较大, 表面较光滑, 有的外层细胞特化成乳状突起(叶缘红色箭头所示)。

图2D–F是苔藓状体的生长, 它与叶状体有相似的地方, 开始都是单细胞纵向成串增殖, 进而发育成苔藓状的叶片。苔藓状体形成单层细胞后, 细胞表面的腺体和根的生长明显, 在边缘也有细胞的平周排列, 与叶状体相比细胞显得更单薄。

图2G–I为根状体的生长, 在根状体生长发育中, 细胞表面有较多的根发生点(图中白色箭头所示), 且比其它两种形态更密集。

3种培养物在不同的培养基中产生了3种形态, 且从细胞增殖开始就发生了明显的变化。3种培养基胁迫同一基因型的叶状体向着不同的方向发育, 但是其生长的基本过程没有改变, 都是由1个单细胞先成串生长, 然后再分化建成不同的形态。

2.3 不同培养物在不同时期的DNA梯带特征

接种的叶状体在不同培养基中培养40天左右, 叶状体、根状体和苔藓状体分别在Sh、W和Shx培养基中明显形成。为探明形态建成与细胞分子生物学的关系, 我们采用CTAB法提取了35、45和55天的3种培养物DNA, 经过多次琼脂糖凝胶电泳得到相同的结果, 如图3所示。叶状体DNA在55天时出现了弥散拖尾现象,



图1 3种不同培养基培养产生的叶状体(A)、根状体(B)和苔藓状体(C)

Figure 1 The different culture medium induced thallus (A), rhizomorph (B) and mossy (C)

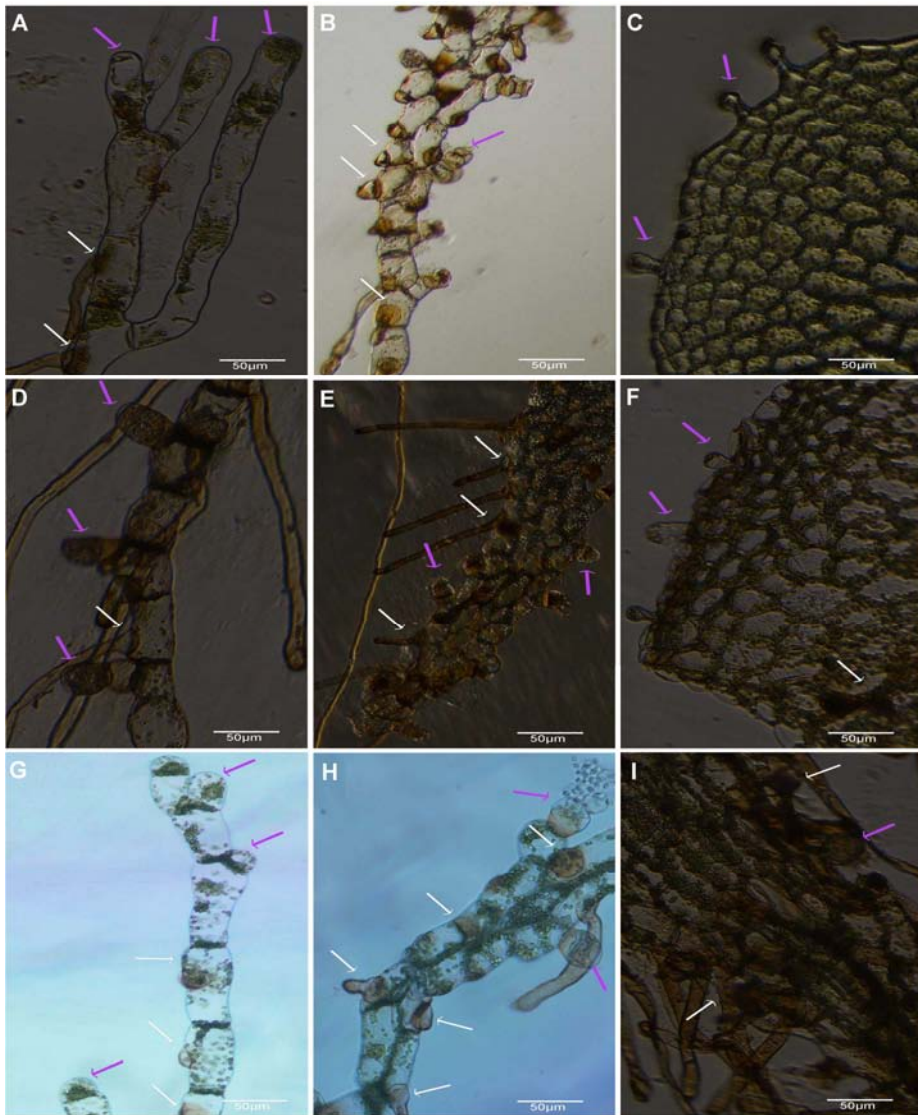


图2 叶状体(A-C)、苔藓状体(D-F)和根状体(G-I)细胞的分裂与形态特征
白色箭头示根的发生点; 红色箭头示细胞增殖点。

Figure 2 Cell division and morphological characteristics of thallus (A-C), mossy (D-F) and rhizomorph (G-I)
The above figure occurred at the root of the white; red indicates cell proliferation point.

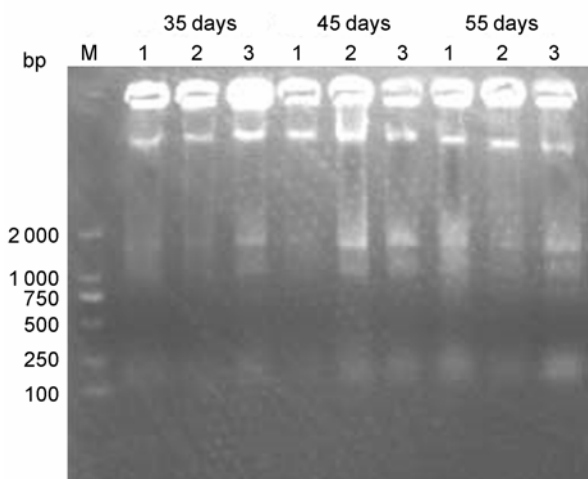


图3 不同培养物在35、45和55天的DNA
M: DNA标准分子量; 1: 叶状体; 2: 根状体; 3: 苔藓状体

Figure 3 Different culture products DNA for 35 d, 45 d and 55 d
M: DNA marker; 1: Thallus; 2: Rhizomorph; 3: Mossy

而在前2个时期总DNA完整, 没有梯带出现。分析原因可能是随着培养时间的延长, 至55天出现了一些老化细胞凋亡; 根状体45天时, 1 800与1 500 bp处出现了2个条带, 而其它2个时期没有出现, 可能是前期没有明显分化, 到了中期开始分化成根状体, 后期根状体稳定生长; 苔藓状体3个不同时期在1 800与1 500 bp等处都出现了多个条带, 可能因为叶状体在转分化成不完全叶的苔藓状体时, 发生了DNA断裂的细胞凋亡, 进而完成了该形态建成。以上结果表明, 不同培养基中不同形态建成的培养物与其细胞凋亡的DNA梯带有一定的关系。

2.4 不同形态培养物的增殖量和石杉碱甲积累的特点

分别对收获培养的3种不同形态培养物增殖量进行统计, 并对积累特有成分石杉碱甲的含量进行检测, 采用液相色谱仪分析测定, 结果见表1。

结果表明, 苔藓状体增殖能力最强, 与叶状体和根状体相比, 三者之间差异极显著($P<0.01$)。叶状体和苔藓状体增殖量比较高, 根状体的生长速度比其它2种慢1倍多, 可能与其假根数量多, 但质量轻有关。

从表1可以看出, 叶状体石杉碱甲的积累量比较

表1 不同培养基对培养物增殖量和石杉碱甲积累的影响

Table 1 Effect of biomass measurement and huperzine A for different culture medium

Medium	Morphology	Proliferation (%)	Huperzine A ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Sh	Thallus	1 788 \pm 31 A	71.7 \pm 1.54 A
W	Rhizomorph	833 \pm 27 C	20.1 \pm 0.82 B
Shx	Mossy	1 963 \pm 52 B	0 C

不同字母表示差异极显著($P<0.01$)。

Different letters indicate significant difference ($P<0.01$).

高, 超过根状体的3倍, 而在苔藓状体中未检测出石杉碱甲。石杉碱甲的含量高低与培养物形态之间有明显的关系, 培养物形态变化导致其特有代谢产物的积累发生了显著差异。

2.5 讨论

本研究首次使用蛇足石杉在不同培养基中培养获得了3种不同形态的培养物; 同时对3种培养物进行了细胞形态、DNA电泳、生物增长量和石杉碱甲含量分析。结果表明, 培养基养分差异可导致相同基因型培养物发生形态变化, 而且苔藓状体的不完全叶建成可能与细胞凋亡的DNA梯带相关。

已有研究表明, 植物受不同环境条件胁迫后, 细胞超微结构会发生明显的变化, 体内的ABA和NO等物质启动信号通路, 进而引起各种代谢产物的变化(Freschi et al., 2010; 武传兰等, 2012)。另外, 在不同培养基中, 植物的形态和代谢产物含量都会发生明显变化, 有研究表明植物激素和CLE短肽信号分子等都能调控植物维管组织的形态建成(Fukuda, 2004; Scarpella et al., 2006)。Pan等(2004)的研究发现, 不同氮源比和诱导物可有效调节产物中生物碱的含量, 植物中生物碱的合成受基因调控, 外源物在一定条件下可以刺激或调控基因的转录与表达, 从而影响培养物中生物碱的含量。养分胁迫对培养物的生长发育和次生代谢物积累会表现出显著差异, 这与生长于不同地区的相同植物积累特有成分差别大的生物应答类似。

培养物的形态差异影响了生物量的增殖速度与代谢途径。本实验结果显示, 叶状体和苔藓状体的增殖速度明显快于根状体, 但苔藓状体培养物中石杉碱甲合成积累受阻, 这主要是不同培养基中营养物诱导不同的基因转录与表达的结果; 同时, 3种不同培养基上产生了3种不同的形态, 说明形态建成受基因表

达的调控。另外, 培养物的形态也影响到石杉碱甲的生物合成途径。该形态异化模式为探索石杉碱甲的生物合成途径奠定了基础, 对于人工培养生产特有次生代谢物的生物工程, 探明培养物形态与目标代谢产物合成积累的关系均具有重要意义。

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**, 393–396.
- 杜次, 彭清忠, 田向荣, 朱越, 李菁 (2013). 湘西蛇足石杉中石杉碱甲、乙和丙含量的测定. *广西植物* **33**, 406–409.
- 吉枝单, 涂艺声, 丁明华, 陈雄, 蒋秀芳 (2014). 蛇足石杉离体培养产生有效成分的研究. *天然产物研究与开发* **26**, 645–649.
- 李金璐, 王硕, 于婧, 王玲, 周世良 (2013). 一种改良的植物DNA提取方法. *植物学报* **48**, 72–78.
- 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. pp. 5–12.
- 王德立, 甘炳春, 齐耀东, 赵祥升 (2014). 蛇足石杉不同生长阶段植株中石杉碱甲含量的地区差异及生境影响的比较观察. *中国新药杂志* **23**, 326–332.
- 王德立, 齐耀东, 魏建和, 冯锦东 (2011). 海南蛇足石杉株龄及年生长量研究. *广西植物* **31**, 87–91.
- 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* **34**, 607–608.
- 武传兰, 王长海, 梁明祥, 刘兆普, 姜超强, 郑青松 (2012). 盐胁迫对不同品系杨树幼苗生长、细胞超微结构和离子稳态的影响. *植物学报* **47**, 615–624.
- Freschi L, Rodrigues MA, Domingues DS, Purgatto E, Van Sluys MA, Magalhaes JR, Kaiser WM, Mercier H (2010). Nitric oxide mediates the hormonal control of crassulacean acid metabolism expression in young pineapple plants. *Plant Physiol* **152**, 1971–1985.
- Fukuda H (2004). Signals that control plant vascular cell differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 379–391.
- Huang XT, Qian ZM, He X, Gong Q, Wu KC, Jiang LR, Lu LN, Zhu ZJ, Zhang HY, Yung WH, Ke Y (2014). Reducing iron in the brain: a novel pharmacologic mechanism of huperzine A in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **35**, 1045–1054.
- Ishiuchi K, Park JJ, Long RM, Gang DR (2013). Production of huperzine A and other *Lycopodium* alkaloids in *Huperzia* species grown under controlled conditions and *in vitro*. *Phytochemistry* **91**, 208–219.
- Ma T, Gong K, Yan YF, Zhang LH, Tang PF, Zhang XF, Gong YD (2013). Huperzine A promotes hippocampal neurogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Brain Res* **1506**, 35–43.
- Pan XW, Xu HH, Liu X, Gao X, Lu YT (2004). Improvement of growth and camptothecin yield by altering nitrogen source supply in cell suspension cultures of *Camptotheca acuminata*. *Biotechnol Lett* **26**, 1745–1748.
- Scarpella E, Marcos D, Friml J, Berleth T (2006). Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport. *Genes Dev* **20**, 1015–1027.

***In vitro*-cultured Morphological Changes in *Huperzia serrata* and Accumulation of Huperzine A**

Xianzhu Xu, Yisheng Tu^{*}, Zhidan Ji, Man Chen, Xianfeng Cai, Ping Yang

College of Life Sciences of Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China

Abstract To study the effect of different culture media on cell morphological characteristics, DNA, biomass growth and huperzine A content in *in vitro* cultures of *Huperzia serrata*. In the different culture media, named Sh, W, and Shx, *H. serrata* differentiated into thallus, rhizomorph and mossy culture, respectively. The single cell developed into clusters and split to form tissue. Roots and rhizoids developed on rhizomorph and mossy cell surface more than on thallus. The total DNA content differed. The morphologic changes may be related to apoptosis because mossy culture showed a DNA ladder after 35, 45 and 55 days. Biomass increase was measured for thallus (1 788±31)%, rhizomorph (833±27)%, and mossy culture (1 963±52)%, and huperzine A content was 71.7±1.54, 20.1±0.82 and 0 µg·L⁻¹, respectively, with significant differences ($P<0.01$) among the 3 morphologies. Thallus grew slower than did mossy culture, but huperzine A content was the highest, and mossy growth was the fastest but produced no huperzine A content. The medium can lead to different forms for the same genotype in *H. serrata*, with changes in growth rate and huperzine A content. Thallus is the best form for producing huperzine A.

Key words *Huperzia serrata*, huperzine A, morphology, tissue culture

Xu XZ, Tu YS, Ji ZD, Chen M, Cai XF, Yang P (2015). *In vitro*-cultured morphological changes in *Huperzia serrata* and accumulation of huperzine A. *Chin Bull Bot* **50**, 733–738.

* Author for correspondence. E-mail: ysttz2012@163.com