

蛇 苔 组 织 培 养 初 探

韩 继 臣, 沙 伟

(齐齐哈尔大学 生命科学与工程学院 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘 要:以蛇苔配子体为材料,以 Prat 和 MS 为基本培养基,初步研究了蛇苔组织培养的基本条件。结果表明:在 Prat 培养基上蛇苔未经原丝体阶段直接长出配子体。在不添加任何生长调节物质的 MS 培养基上,仅加入 3%~5%的葡萄糖,即可以诱导出蛇苔愈伤组织。蛇苔愈伤组织在 MS+4%葡萄糖+1.0 mg/L 2,4-D 上分化长出叶状蛇苔配子体。

关键词:蛇苔;组织培养

中图分类号:S 682.34; S 603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)07-0117-03

蛇苔又称蛇地钱(*Conocephalum conicum*)为蛇苔科苔类植物,植物体叶状,深绿色,革质,略具光泽,花纹很像一种蛇的皮。生于溪边林下阴湿碎石和土上,在我国各地均有分布。世界范围内主要分布于欧洲、美洲、亚洲中部及东部^[1],资源比较丰富。蛇苔具有较为浓烈的香气,国外的天然药物化学家从日本蛇苔乙醚提取物中分离得到了几个倍半萜类化合物^[2,3],结构骨架比较新

颖。蛇苔提取物主要化学成分为蛇苔甲素、Glutamic dehydrogenase、蛇苔乙素、Glutamateoxalatetransaminase、 α -杜松烯和糖醛酸(Uronic acid)、半月苔酸(Lunularic acid)等。用于治疗清热解毒、消肿止痛、疮痛肿、毒蛇咬伤、外伤骨折、烧烫伤等具有很高的药用价值。蛇苔提取物产品已出口欧美、日本、法国等国家。蛇苔虽然分布广,生物量相对较大,但也难以满足生产需要,长期大量采集必将造成环境破坏,物种灭绝。该研究希望能够利用组织培养解决这一问题,并就此作了一些探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

蛇苔(*Conocephalum conicum* L. Dumort)采自小兴安岭地区。

第一作者简介:韩继臣(1982-),男,硕士,主要研究方向为植物遗传。

通讯作者:沙伟(1963-),女,教授,博士生导师,现从事植物学和植物遗传学教学与科研工作。

收稿日期:2009-02-10

[14] 江泽鹏,刘善荣,王东雪.不同肉桂种源苗期生长差异及质量评价[J].林业科技开发,2008,22(2):74-76

[15] 李光友,徐建民,白嘉雨,等.离子注入对桉树萌发及苗期生长的影

响[J].中南林业科技大学学报,2007,27(5):44-48.

[16] 梁秋露,黄群策,曹刚强,等.低能离子束注入不同蔬菜种子后的剂量效应[J].北方园艺,2007(5):1-4.

Effects of Implanted Ion on Plant Growth and Development of *Lupinus Polyphyllus*

WANG Qing¹, LIU An-cheng¹, YAN Yi-xin², PANG Chang-min¹

(1. Xi'an Botanical Garden of Sha'anxi Province, Xi'an, Shanxi 710061, China; 2. Xi'an Technological University, Xi'an, Shanxi 710032, China)

Abstract: The growth and development of *Lupinus polyphyllus* seeds with different ion at different dosage implanted were studied. Results showed that the seedling emergence rate and survival rate was induced in the dosage 3×10^{17} , $5 \times 10^{17} \text{ H}^+ / \text{cm}^2$, but improved in the dosage 1×10^{13} , $5 \times 10^{13} \text{ C}^+ / \text{cm}^2$. It's no significant impact on plant height, plant width, diameter of leaf, flower color and setting percentage, but can be ahead of florescence 14~20 days with different ion.

Key words: *Lupinus polyphyllus* lindl.; Ion implantation; Growth and development

1.2 方法

1.2.1 消毒条件筛选 以幼嫩蛇苔配子体为材料,利用浓度为 1%、0.05%、0.025%的升汞和浓度为 0.1%、1%、2%的次氯酸钠溶液,采用不同消毒时间梯度,对试验材料进行消毒条件筛选。

1.2.2 愈伤组织诱导培养基的制备 试验分别采用了 Prat 和 MS 培养基,诱导蛇苔愈伤组织。Prat 培养基 NH_4NO_3 2.5 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.83 g/L、 KH_2PO_4 0.74 g/L, pH 值 5.8~6.2。以 MS 培养基为基本培养基,附加不同种类和浓度的碳源和生长调节物质,配制成了 15 种不同配比的培养基(表 1),用以筛选诱导蛇苔愈伤组织。每处理 20 个。

表 1 不同配比培养基															
培养基号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
蔗糖浓度/%	0	2	3	4	5	0	0	0	0	3	3	3	0	0	0
葡萄糖浓度/%	0	0	0	0	0	2	3	4	5	0	0	0	3	3	3
KT/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0	0	0.5	0	0
6-BA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0	0	0.5	0
2,4-D/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0	0	0.5

1.2.3 愈伤组织再分化培养基的制备 选取在愈伤组织诱导试验中生长状况良好,大小一致的愈伤组织,转入添加不同植物激素的分化培养基上。分化培养基,以 MS+4%葡萄糖为基本培养基,分别添加不同浓度的 6-BA、KT、2,4-D、IAA 和 NAA (0.5、1.0、2.0 mg/L)。每处理 20 个。

表 2 不同激素浓度的分化培养基															
培养基号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
KT/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.5	1.0	2.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6-BA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0	0	0	0.5	1.0	2.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,4-D/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0	0	0	0	0	0	0.5	1.0	2.0	0	0	0	0	0	0
IAA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	1.0	2.0	0	0	0
NAA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	1.0	2.0

1.2.4 接种 将消毒处理好的蛇苔,在无菌条件下,垂直于中肋切成 0.5 cm 宽,1 cm 左右长的小块,要求每块都要有中肋,并且均匀摆放在固体培养基上,每皿 3~5 块,置于光照培养箱中培养。

1.2.5 培养条件 培养温度 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光照强度 3 000 lx、光照周期 12 h/12 h,每隔 15 d 转接 1 次。

2 结果与分析

2.1 蛇苔外植体消毒条件筛选

由表 3、4 可见,浓度为 0.05%的升汞消毒 90 s,无污染率高,成活率高是最好的灭菌处理方法。1%的次氯酸钠消毒 3 min,这种消毒方法次之。蛇苔叶状体由单层细胞组成,生命力较为脆弱,虽然使用 1%的次氯酸钠消毒 3 min 也可得到较好的成活率,但由于消毒时间长,对蛇苔叶状体影响严重,多数外植体边缘细胞已失去活力,仅剩中间部位保持较好的活力,不利于蛇苔愈伤组织诱导。所以在后续试验中均采用浓度为 0.05%的升

汞消毒 90 s。

表 3 次氯酸钠消毒蛇苔配子体的浓度和处理的时间

浓度/%	时间/min	总接种数/个	未污染数/个	无污染率/%	成活率/%
2	4	50	50	100.0	0.0
2	3	50	50	100.0	0.0
2	2	50	41	82.0	17.0
1	4	50	49	98.0	36.0
1	3	50	47	94.0	62.0
1	2	50	4	8.0	6.0
0.1	4	50	0	0	0.0
0.1	3	50	0	0	0.0
0.1	2	50	0	0	0.0

表 4 升汞消毒蛇苔配子体的浓度和处理的时间

浓度/%	时间/min	总接种数/个	未污染数/个	无污染率/%	成活率/%
0.1	120	50	50	100.0	0.0
0.1	90	50	50	100.0	0.0
0.1	60	50	39	78.0	32.0
0.05	120	50	46	92.0	48.0
0.05	90	50	44	88.0	74.0
0.05	60	50	21	42.0	30.0
0.025	120	50	3	6.0	6.0
0.025	90	50	0	0.0	0.0
0.025	60	50	0	0.0	0.0

2.2 不同培养基对蛇苔愈伤组织诱导的影响

2.2.1 Prat 培养基对蛇苔愈伤组织诱导的影响 在 Prat 培养基上,接种培养后自 14 d 开始,在蛇苔配子体腹面中肋切口处,首先长出芽状配子体及少量假根(图 1)。在约 20 d 后,芽状配子体继续生长,数量逐渐增加,面积不断扩大,形成二歧分枝宽带状叶状配子体,且有大量假根出现(图 2)。由此可见蛇苔外植体经过适宜的培养基的培养,可以从切口处直接长出配子体,而不经原丝体阶段。该结果与唐伟斌的研究结果基本一致。中肋细胞体积小、结构紧凑、代谢旺盛,有利于细胞分裂和新配子体的生成,与叶片细胞相比,具有形成时间短、生活力强、易进行脱分化和再分化等特点。新长出的配子体细胞一般都处于外植体边缘的位置,可能与外缘细胞吸收培养基成分较多,代谢旺盛有关。

2.2.2 不同 MS 培养基对蛇苔愈伤组织诱导的影响 试验发现在不添加任何植物生长调节物质的 MS 培养基上,仅添加 3%~5%的葡萄糖,即可诱导出蛇苔愈伤组织。且葡萄糖浓度为 4%时诱导率最高,约为 30%。蛇苔愈伤组织细胞形态为墨绿色粘稠状且易于分散,这与其他高等植物愈伤组织有所不同(图 3)。仅添加蔗糖不添加植物生长调节物质的培养基,不能诱导出蛇苔愈伤组织。而在添加有 3%葡萄糖或 3%蔗糖的 MS 培养基上,添加 KT、6-BA 和 2,4-D,同样没能得到蛇苔愈伤组织。这表明,葡萄糖是诱导蛇苔愈伤组织产生的一个关键因素,在诱导蛇苔愈伤组织期间,生长调节物质并不是必需的成分。

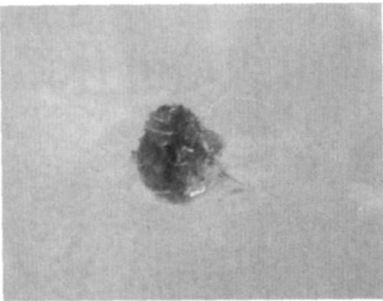


图 1 蛇苔配子体上直接长出大量芽状配子体和少量假根

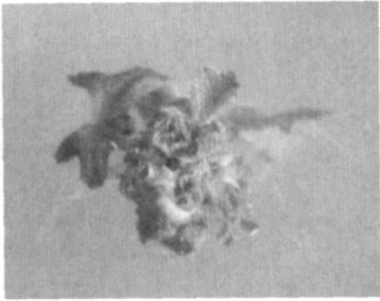


图 2 二岐分枝宽带状叶状配子体和假根

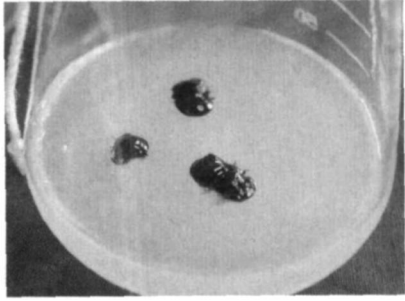


图 3 蛇苔愈伤组织

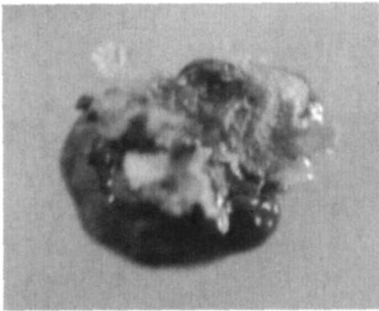


图 4 蛇苔愈伤组织分化出的配子体

2.3 不同植物激素对蛇苔愈伤组织再分化的影响

在 MS 培养基上添加 1.0 mg/L 的 2,4-D, 愈伤组织分化效果最好, 在培养 20 d 后可再分化出芽状蛇苔配子体, 在 30 d 可以长成蛇苔叶状体(图 4), 并伴随少量假根出现。添加 0.5 mg/L 的 NAA 的 MS 培养基, 也分化出少量蛇苔配子体, 但效果相对较差。添加其它植物激素的 MS 培养基未发现蛇苔愈伤组织分化现象。

3 讨论

Prat 培养基诱导蛇苔, 可直接在切口处长出配子体, 而不经原丝体阶段, 这与培养葫芦藓(*Funaria hygrometrica*)叶片状配子体先生成原丝体, 再在原丝体上形成配子体植株的发育过程明显不同。苔藓植物愈伤组织诱导一般以 MS 为基础培养基, 加入 2%~5% 的葡

萄糖, 而不加植物生长调节物质, 只有少数物种需要加入低浓度水平的生长调节物质。试验中发现 MS 培养基仅添加 3%~5% 的葡萄糖即可诱导出蛇苔愈伤组织, 可见葡萄糖是诱导蛇苔愈伤组织的关键因素, 生长调节物质在蛇苔愈伤组织诱导过程中并不是必需的成分。不添加生长调节物质的培养基可以诱导出蛇苔愈伤组织, 而含有生长调节物质的培养基却抑制了愈伤组织的出现, 可能是蛇苔愈伤组织不需或仅需很低的外界生长调节物质诱导, 具体原因还有待于进一步研究。利用组织培养不仅可以大量获得试验材料, 还可以为工业生产提供原材料, 减少野外采集, 保护蛇苔, 保护环境。蛇苔次级代谢产物可以通过悬浮培养分离获得, 蛇苔组织培养的实现在为悬浮培养提供了基础。本研究实现了蛇苔的组织培养, 对今后蛇苔的研究具有重要的意义。

参考文献

[1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴[M]. 北京: 科学出版社, 1975: 632.
[2] Stephanie M, Ute W, Wilfried A, et al. Two aromadendrane type alcohols from the liverwort *Conocephalum conicum*[J]. *Phytochemistry*, 1999, 51: 277-280.
[3] Klaus PA, Rodney C. Monoterpene biosynthesis in the liverwort *Conocephalum conicum* demonstration of sabinene synthase and bornyl diphosphate synthase[J]. *Phytochemistry*, 1995, 38(1): 364-379.
[4] 唐伟斌, 石晓云, 刘占牛. 蛇苔叶状配子体组织培养与观察[J]. *生物学通报*, 2005(4): 23.
[5] 朱至清. 植物细胞工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.

Preliminary Report on Tissue Culture of *Conocephalum conicum*

HAN Ji-chen, SHA Wei

(College of Life Science and Engineering, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China)

Abstract: The study established preliminarily regeneration system of gametophyte of *Conocephalum conicum*, used MS medium and Prat medium as the basic mediums. The study focused on grown conditions of callus induction. The results show that the *Conocephalum conicum* grow gametophyte directly without stage of aprecursor on Prat medium. Callus induction of *Conocephalum conicum* was induced on MS medium without any growth hormone with 3~5% glucose. Callus induction of *Conocephalum conicum* can induced to gametophyte on MS+4% glucose+1.0 mg/L 2,4-D.

Key words: *Conocephalum conicum*; Tissue culture