

尖叶匍灯藓的组织培养及显微观察

李晓毓¹, 吴翠珍², 熊源新², 姜业芳², 杨志平², 何 林²

(1. 贵州大学 农学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学 生命科学学院, 贵州 贵阳 550025)

摘 要:以尖叶匍灯藓 *Plagiomnium cuspidatum* 为材料, 以 MS、Benencke 和 Konp 为基本培养基, 研究尖叶匍灯藓的组织培养条件, 初步建立了尖叶匍灯藓的再生体系, 并初步确定最适宜尖叶匍灯藓生长的基本培养基为 Konp 培养基。在 MS、Benencke 和 Konp 培养基的基础上分别添加蔗糖, 发现蔗糖对尖叶匍灯藓的生长没有明显的促进作用。同时, 在 MS 培养基的基础上添加植物激素 6-BA 和 2,4-D, 根据生长状况和显微观察结果, 初步认为 6-BA 和 2,4-D 对尖叶匍灯藓的生长在外形上无明显影响, 而在显微结构上有影响。

关键词:尖叶匍灯藓; 组织培养; 显微观察; 显微结构

中图分类号:Q949.352.02; Q944.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1008-0457(2006)03-0217-06

The tissue culture and microscopic observations of *Plagiomnium cuspidatum*

LI Xiao-yu¹, WU Cui-zhen², XIONG Yuan-xin², JIANG Ye-fang², YANG Zhi-ping², HE Lin² (1. Agricultural College, Guizhou University, Guizhou Guiyang 550025, China; 2. College of Life Science, Guizhou University, Guizhou Guiyang 550025, China)

Abstract: The study established preliminarily the regeneration system of *Plagiomnium cuspidatum*, using MS medium, Benecke medium and Konp medium as the basic mediums and considered Konp medium is the most favorable medium for the tissue culture. Adding sucrose to the former three mediums shows that sucrose has no active effect on the tissue culture of *Plagiomnium cuspidatum*. Furthermore, the author used MS medium as the frame of reference, added different plant growth substance (6-BA and 2,4-D) to MS medium respectively, and the microscopic observation of *Plagiomnium cuspidatum* also shows that different plant growth substance (6-BA and 2,4-D) has no obvious effect on the appearance of *Plagiomnium cuspidatum*, but has active effect on the microstructure to some extent.

Key words: *Plagiomnium cuspidatum*; tissue culture; microscopic observations; microstructure

苔藓植物是高等植物中一类特殊的类群, 在植物形态学与实验细胞学研究上具有重要意义。苔藓细胞结构简单, 形态分化样式单纯, 染色体数目少(一般 $n=6\sim10$), 生长速度快, 倍增时间短, 而且是单倍体细胞, 是研究遗传特别是研究基因表达、调控的有用材料^[1]。从苔藓植物组织培养中可以获得各个发育时期的单细胞, 便于植物的形态建成、内部生理生化过程、染色体分析和遗传变异等研究。此外, 苔藓植物中含有许多具有生物活性的化合物, 对疾病治疗和虫害防治有很好的效果^[2], 可以通过苔藓植物组织培养大量生产, 因而, 研究苔藓植物组织培养无论在理论上还是在生产实践中都有很高的价值。但目前来看, 国内对苔藓植物的研究与国际相比还相对落后, 在组织培养方面, 已见报道的种类不多, 仅有仙鹤藓、牛角藓、刺叶墙藓等几种^[3-7]。

尖叶匍灯藓 *Plagiomnium cuspidatum* 是五倍子 *Rhus chinensis* 蚜虫的越冬宿主之一, 与五倍子蚜虫的繁殖有着十分密切的关系。大量发展五倍子生产, 提高其产量, 可以从大量人工培育提灯藓科植物着手。本研究在建立尖叶匍灯藓离体培养体系的基础上, 探索了使其快速繁殖和健壮生长的适合培养基, 以及在培养基上分别加蔗糖和植物激素对其生长状况的影响, 为进一步的科学研究和生产实践奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

尖叶匍灯藓 *Plagiomnium cuspidatum* 采自贵州大学校园内。

1.2 培养条件

1.2.1 基本培养基成分 MS 培养基 (Murashige and Skoog's, 1962) 略;

Benecke 培养基 (BM) (Benecke, 1903): NH_4NO_3 ($0.2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0.1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、 KH_2PO_4 ($0.4\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、 CaCl_2 ($0.1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 以及痕量 $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$;

Konp 培养基 (KM): $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($1.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、 KNO_3 ($0.25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、 KH_2PO_4 ($0.25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0.25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($3\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$);

各培养基均附加 0.8% 琼脂, pH 值在灭菌前调至 5.8~6.0。

1.2.2 初代培养基 MS+3% 蔗糖

1.2.3 继代培养基 (1) MS0; (2) MS+3% 蔗糖; (3) MS+2,4-D $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 3% 蔗糖; (4) MS+6-BA $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 3% 蔗糖; (5) Benecke + 3% 蔗糖; (6) BM0; (7) Konp + 3% 蔗糖; (8) KM0。

培养室温度 (20 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, [光] 照度 1 500~2 000lx, 光照时间 $16\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

1.3 外植体的表面消毒及初代培养

取新鲜的尖叶匍灯藓绿色配子体的顶端, 用自来水反复冲洗, 洗掉表面的泥土等, 然后转入无菌条件下, 再用无菌水冲洗若干次。将清洗干净的外植体剪成 1cm 的带叶小段, 浸入 0.05% 升汞水消毒 60 s, 取出后用无菌水冲洗 5 次, 第 1 次浸泡 20min, 其余每次 5min, 彻底除去残留的 HgCl_2 , 避免对外植体造成伤害。将消毒后的外植体用无菌滤纸吸干后, 接种于初代培养基上, [光] 照度为 1 500~2 000lx, 光周期为 $16\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$, 温度 (20 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 。

1.4 增殖培养

选取初代培养的尖叶匍灯藓的新配子体植株, 每隔 20d 转入继代培养基中继代 1 次。3 种基本培养基是 MS、BM 和 KM, 且都分别设立添加蔗糖和不添加蔗糖 (MS0、BM0 和 KM0) 组合, 对于添加蔗糖的 MS 培养基, 又分别添加不同浓度的 2,4-D 和 6-BA ($0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 作对照。[光] 照度 1 500~2 000lx, 光周期 $16\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$, 温度 (20 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 。

1.5 显微观察

取不同培养基组合上得到的尖叶匍灯藓新配子体植株, 压片后在 Leica 光学显微镜下进行观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 外植体的表面消毒及初代培养

外植体的表面消毒是苔藓组织培养最基础也是最关键的一步。通过不同表面消毒剂及其用量和消毒时间比较 (表 1), 最后综合考虑选择 0.05% 氯化汞溶液, 消毒 60s。

表 1 不同表面消毒剂的效果比较

Tab. 1 The comparison of some different surface disinfectants

表 面 消 毒 剂 及 浓 度	消毒时间(s)	污染率(%)	死亡率(%)
85% 酒 精	60	5	85
1% 次 氯 酸 钠 溶 液	60	65	0
氯化汞	60	85	0
溶 液	60	30	5
(%)	30	0	100
0.05	60	5	5

接种的配子体顶端茎段在 MS 培养基上培养 20d 后,周围长出绿色原丝体(图 1),20~30d 后,原丝体生出直立绿色配子体。

2.2 增殖培养及不同培养基上尖叶匍灯藓的生长情况

在 MS + 3% 蔗糖培养基上培养得到的尖叶匍灯藓的新配子体植株每隔 20d 继代 1 次,20~30d 后,每株接种的配子体又可生出 20~40 株新配子体。继代 8 次后发现植株越来越矮化,叶片也越来越小,于是分别转至不同的继代培养基上进行继代,看不同的培养基以及蔗糖和植物激素对其生长状况是否有影响。

从 MS + 3% 蔗糖培养基上转至不同的继代培养基上进行继代的新配子体植株的生长情况各不相同。转至 KM 培养基(KM0 与 Konp + 3% 蔗糖)上后,无论是否添加蔗糖,生长情况均好转,叶片增大,植株增高,分枝更多;而继续在 MS 培养基(MS0 与 MS + 3% 蔗糖)上培养的植株仍然是植株矮,叶片小;转至 BM 培养基(BM0 与 Benecke + 3% 蔗糖)上后,无论是否添加蔗糖,生长情况也均有所好转,程度介于 KM 培养基和 MS 培养基之间,植株增高,叶片也变大,但茎细不健壮(图 3、4)。另外,比较每一种添加蔗糖和不添加蔗糖的培养基上植株的生长情况发现,添加蔗糖比不添加蔗糖的生长较好(图 2、3、4)。

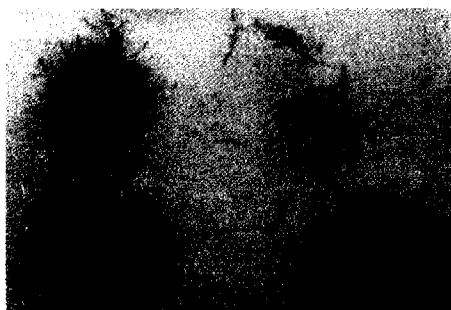


图1 接种尖叶匍灯藓配子体顶端
周围长出的绿色原丝体

Fig.1 Green protonema occurred around inoculated gametophyte tips of *Plagiommium cuspidatum* on MS0



图2 加蔗糖(左)与未加蔗糖(右)MS
培养基上尖叶匍灯藓生长情况

Fig.2 The growth state of *P. cuspidatum* on MS added sucrose(left) and MS without sucrose(right)



图3 未添加蔗糖的 MS、BM、KM(从左至右)
培养基上尖叶匍灯藓生长情况比较

Fig.3 The growth state of *P. cuspidatum* on MS, BM, KM(from left to right) added sucrose



图4 添加蔗糖的 MS、BM、KM(从左至右)
培养基上尖叶匍灯藓生长情况比较

Fig.4 The growth state of *P. cuspidatum* on MS, BM, KM(from left to right) without sucrose

2.3 显微结构观察

MS、BM、KM 3 种培养基上生长的尖叶匍灯藓植株,从微观角度进行比较,发现差别很明显(表2)。在假根类别上,BM 和 KM 相似且只有 1 种,MS 则有 2 种。分别取加蔗糖和不加蔗糖的培养基上生长的植株,从其植株生长情况以及叶片、叶细胞、叶绿体、假根方面进行比较,发现蔗糖对于尖叶匍灯藓的生长影响不大。分别取添加不同生长激素(6-BA 和 2,4-D)的 MS 培养基上生长的植株进行比较,发现未加添生长素和添加的外观上无差别(表3)。然而,添加 6-BA 和 2,4-D 上生长的植株显微结构却差别明显,叶细胞大小不同,叶绿体数目不同,假根的差别更明显(图5)。

表2 不加蔗糖的3种培养基上苔藓植株外观及细胞结构的显微观察

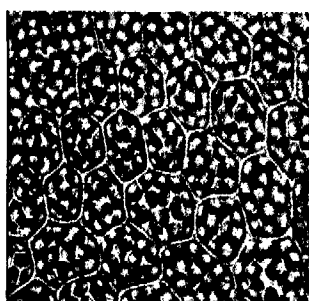
Tab.2 The appearance and microscopic observations of *P. cuspidatum* on three mediums without sucrose

项 目	KMO	BMO	MSO
植株及 叶 片	植株细长,1~3.5cm 高,分枝多,浅绿, 叶片大,2.1~2.3mm×1.4~2.1mm	植株细长,达5cm 高,分枝多,黄绿,叶 片较大,1.7~1.8mm×1.0~1.3mm	植株矮粗,1~1.2cm 高,分枝少,深绿, 叶片小,0.5~1.2mm×0.5~0.8mm,叶 片越往上越小,茎也越细,呈鞭状枝状
叶绿体	叶细胞密被卵圆形叶绿体,10~16 个	叶细胞密被各种不规则形状的叶绿体, 10~18 个	叶细胞具多数不规则形状的叶绿体, 12~16 个
假 根	长0.3cm,粗7~17.5μm,分枝少,最长 1.2cm,一般为0.6cm,细胞长宽比为 50:1~12:1	假根粗7~12μm,最长达0.6cm,一般 为0.3cm,细胞长宽比为30:1~14:1	粗7~45.5μm,一般长0.3cm,假根有2 种,一种较粗短,分枝,细胞质多,细胞 不透明,长宽比2:1;另一种不分枝,粗 细均匀,细胞透明,长宽比为20:1

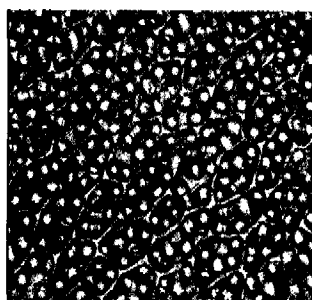
表3 蔗糖、6-BA、2,4-D 对苔藓植株外观及显微结构的影响(以 MS 为基础培养基)

Tab.3 The influence of sucrose, 6-BA, 2,4-D on the appearance and microscopic structure of *P. cuspidatum*

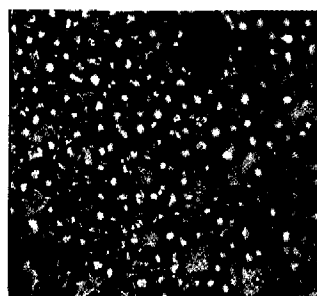
项 目	MSO	MS+S	MS+6-BA(1.0mg·L ⁻¹)	MS+2,4-D(1.0mg·L ⁻¹)
植 株	植株矮粗,约1cm 高,叶片小	植株矮粗,约1cm 高,叶片小	植株矮粗,约1cm 高,叶片小	植株矮粗,约1cm 高,叶片小
叶绿体	叶细胞具多数不规则形状 的叶绿体,12~16 个	叶细胞疏被少数圆形叶绿 体,8~14 个	叶细胞疏被圆形叶绿体, 6~8 个	叶细胞密被多数圆形叶绿 体,8~14 个
假 根	粗7~45.5μm,一般长 0.3cm,假根有2种,一种较 粗短,分枝,细胞质多,细胞 不透明,长宽比2:1;另一种 不分枝,粗细均匀,细胞透 明,长宽比20:1	粗7~28μm,假根一般长 0.2cm,细胞长宽比25:1~ 5:1,假根分枝少见	粗9~28μm,一般长0.25cm, 细胞长宽比20:1~2:1,假根 有分枝,短,有分枝的假根色 泽较深,细胞长宽比小,假根 细胞的粗细不均匀,呈纺锤形	粗7~28μm,一般长0.3cm, 细胞长宽比21:1~5:1,假 根有2种,一种细胞透明,假 根色泽淡;另一种较粗,细胞 不透明,中部原生质多



MS细胞 (391×)



MS+6-BA细胞 (391×)



MS+2,4-D细胞 (391×)

图5 MS、MS+6-BA(1.0mg·L⁻¹)、MS+2,4-D(1.0mg·L⁻¹)培养基上生长植株叶片细胞的显微结构观察

Fig.5 Cell of leaves of *P. cuspidatum* on MS, MS+6-BA(1.0 mg·L⁻¹), MS+2,4-D(1.0 mg·L⁻¹) under a light microscope×391

3 讨论

3.1 不同培养基对尖叶匍灯藓生长的影响

在 MS 初代培养基上培养得到的新配子体植株每隔 20d 继代 1 次,生长情况很好,得到很多分枝,但随着继代次数的增加,发现植株越来越矮化,叶片也越来越小,于是分别转至 MS、BM、KM 3 种不同的培养基上进行继代,发现转至 KM 和 BM 培养基上后,生长情况好转,叶片增大,植株增高,分枝增多,而继续在 MS 培养基上培养的植株仍然矮,叶片小。对得到的新植株分别从宏观和微观角度进行比较,在植株高度上,BM 和 KM 上的植株均细长,MS 上的则矮粗;在叶片颜色上,BM 和 KM 上的植株叶片浅绿,MS 上的深绿;在叶片大小上,BM 和 KM 上的植株叶片普遍比 MS 上的要大;在假根类别上,BM 和 KM 上的假根相似且只有 1 种,而 MS 上则有 2 种。因为所有的培养条件均相同,比如继代时间、继代所取的外植体、温度、光强、光周期、培养器皿等,所以推测产生这种差别最主要的原因就是培养基成分的不同。MS 是现有报道的苔藓组织培养中最为普遍采用的一种培养基配方,养分比 BM 和 KM 丰富,但从本研究结果来看,它却不太适合尖叶匍灯藓的生长,植株矮粗,叶片小,而 BM 和 KM 仅含植物生长所必须的营养元素,浓度低,恰恰适应了尖叶匍灯藓的生长特性,分枝少,植株长得高,这和 Socal 等^[8]的研究结果一致,即对于苔藓这一较为特殊的植物而言,培养基中无机盐成分并非越全越好。Socal 等用 2 种不同类型的培养基 MS 和 KN 作试验时发现,添加的无机元素和维生素类比 MS 少得多,甚至是根本不添加的 KN 培养基对苔藓的培养最适合。

另外,Martin^[9]发现对大多数种类的苔藓植物来讲,培养基浓度降为原来的 10% 对于其生长速度和形态几乎没有影响。从植株颜色深浅上来看,BM 和 KM 浅绿,MS 深绿,原因也是培养基成分不同所致。培养基中无机元素含量影响叶绿素合成,离子浓度越大,细胞中叶绿素含量越多,MS 的氮素和其他微量元素供应充足,叶片进行光合作用充分,故呈深绿色,而 BM 和 KM 培养基内可能参与光合的元素不足或缺少,故表现黄绿或浅绿。这一结果仅粗浅地从外观上与 Takami 等^[10]、高永超等^[6]的叶绿素合成与无机离子的含量呈正相关报道相符,确切的数量上的证据还需进一步实验。综上所述,笔者初步认为,MS 培养基适宜进行尖叶匍灯藓的初代培养,但长期来看 KM 培养基更适合尖叶匍灯藓的生长扩繁,其次是 BM 培养基,在此培养基上,即使是在 MS 培养基上生长不良的植株,一样也可以恢复旺盛生长。

3.2 蔗糖对尖叶匍灯藓的生长并无明显的促进作用

碳源是细胞生长的能量来源和构成细胞骨架的重要成分。很多实验已证明高浓度的蔗糖能提高培养细胞中次生代谢产物的含量,其原因之一是提高了培养基的渗透压,因而刺激次生产物的形成。刚永运等^[3]、高永超等^[4]实验表明,蔗糖是牛角藓、仙鹤藓组织培养重要的碳源,是细胞生长的能量来源和构成细胞骨架的主要成分,浓度为 $30\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 对细胞生长最为有利。但本研究分别取加蔗糖和不加蔗糖的培养基上生长的植株,从植株整体情况以及叶片、叶细胞、叶绿体、假根方面进行比较,发现对尖叶匍灯藓而言,蔗糖的存在对其生长并无多大影响,没有什么促进或抑制作用,不是其生长好坏的决定因素。这与 Ono 等^[11]研究的苔藓可以在没有激素和碳源的培养基上正常生长的结果一致,原因很可能与苔藓植物特殊的生长习性有关,苔藓本就没有真正的根,靠的是吸收空气中的养分来维持生长。另外,苔藓植物有着非常独特的生理机制,包含非常活跃的叶绿体,能够在(光)自养条件下生长存活,也可能是一个重要原因^[12]。所以,碳源对苔藓来说,远远没有对于其他高等植物重要。

3.3 植物生长激素 6-BA 和 2,4-D 对尖叶匍灯藓在显微结构上的影响明显

植物生长激素 6-BA 和 2,4-D 对尖叶匍灯藓的植株高度、叶片大小、分枝多少未见明显的促进作用,外观上无差别,浓度的不同对其也无明显影响,其原因可能是苔藓自身合成的内源激素已足够自身需要。李菁等^[13]用几种植物生长调节物质影响藓类生长的试验发现,这些物质剂量超过或未达到适宜浓度时,藓株的生长即出现抑制或受伤的现象,或促进效应不明显。苔藓植物对植物生长物质十分敏感,有些

植物生长物质有正向诱导作用,有些则有抑制作用,激素作用的不必需可能与苔藓植物自身能够合成激素物质有关^[14-15]。不过,添加 6-BA 和 2,4-D 生长出来的植株与未添加的在显微结构上却差别明显,叶细胞大小不同,叶绿体数目不同,假根的差别更明显。其原因还有待进一步研究。

另外,影响苔藓组织培养的条件错综复杂,由于本试验参试因子和范围所限,故所筛选的培养基仍有待于进一步检验。

参 考 文 献:

- [1] 吴鹏程. 苔藓植物生物学[M]. 北京:科学出版社,1998.
- [2] 汪 庆,罗 宣. 苔藓植物的主要次生代谢产物与有害生物防治[J]. 贵州科学,2001,19(4):93-100.
- [3] 刚永运,杜桂森,施定基. 仙鹤藓属藓类植物组织培养再生体系的建立[J]. 植物学报,2003,45(12):1 475-1 480.
- [4] 高永超,沙 伟,张 晗. 不同植物生长物质对牛角藓愈伤组织诱导的影响[J]. 植物生理学通讯,2003,39(1):29-31.
- [5] 高永超,薛 红,沙 伟. 蔗糖对牛角藓愈伤组织悬浮细胞的生理学影响[J]. 广西植物,2003,23(5):464-469.
- [6] 高永超,薛 红. 大量元素对牛角藓愈伤组织悬浮细胞的生理效应[J]. 植物生理学通讯,2003,39(6):595-599.
- [7] 玄雪梅,王 艳,蔡伟民. 正交设计法在刺叶墙藓原代组织培养中的应用[J]. 生物技术,2004,14(3):32.
- [8] SOCAL KUTA E, PRZYWARA L. Callus induction and gametophyte regeneration in moss cultures[J]. Acta Biol Cracov Bot, 1997,39:35-42.
- [9] MARTIN B. Developmental physiology bryophytes[M]. New Mann Bryol,1984;2 276-2 324.
- [10] TAKAMI T, YASUNAGA M, TAKIO S, et al. Establishment of suspension cultures of cells from the hornwort *Anthoceros punctatus*[J]. J Hattori Bot Lab,1988,64:429-435.
- [11] ONO K, MURASAKI Y, TAKAMIYA M. Induction and morpho-genesis of cultured cells of bryophytes[J]. Hattori Bot Lab, 1988,65:391-401.
- [12] KATOH K. Kinetics of photoautotrophic growth of *Marchantia polymorpha* cells in suspension culture[J]. Physiol Plant,1983, 59:242-248.
- [13] 李 菁,刘应迪. 植物生长物质对倍蚜虫冬寄主藓类生长的效应[J]. 隐花植物,1993(1):43-50.
- [14] HARTMANN. Über die wirkung des phytochroms beim. Laubmooskal-lus I. Photomorphogenese und stoffwechsel[J]. Beitr Biol Pflanz,1973,49:1-34.
- [15] WANG T L, HORGAN R, COVE D J. Cytokinins from the moss *Physcomitrella patens*[J]. Plant Physiol,1981,68:735-738.