

文章编号:1000-5641(2008)02-0085-07

膨叶唇鳞苔原丝体发育及油体的观察

于传梅, 郑敏, 朱瑞良

(华东师范大学 生命科学学院, 上海 200062)

摘要: 首次研究了膨叶唇鳞苔(新拟)(*Cheilolejeunea ventricosa*)的孢子萌发、原丝体和油体发育及配子体发生的过程, 结果表明: (1) 使用经过改良的 MS 培养基(不加氨基酸和维生素, pH 值为 6.2, 琼脂和蔗糖浓度均为 1%)能在 55 d 左右的时间利用孢子培养获得植物体; (2) 用 0.1% 的次氯酸钠溶液, 消毒 5 s 是消毒孢子的最佳方案; (3) 油体在孢子萌发初期为均一型, 到幼叶发生后, 成为可见的聚合型, 但聚合的程度比野生材料要弱. 膨叶唇鳞苔的孢子萌发类型属于细鳞苔型(*Lejeunea* type).

关键词: 膨叶唇鳞苔; 苔类植物; 油体; 孢子; 组织培养; 孢子萌发

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A

Protonema development and observation on oil bodies of *Cheilolejeunea ventricosa* (Schiffn.) X. L. He

YU Chuan-mei, ZHENG Min, ZHU Rui-liang

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: The spores of *Cheilolejeunea ventricosa* (Schiffn.) X. L. He were cultured on MS media (without acid and vitamin, pH = 6.2, with 1% agar and 1% sucrose). The sporeling development and oil body ontogeny were observed. After a 55-day-long axenic culture, young plants were obtained successfully. Sodium hypochlorite solution was used to sterilize the capsules. Our results revealed that the sterilizing treatment with 0.1% Sodium hypochlorite solution for a period of 5 seconds was optimal. Oil bodies in primary protonemata are nearly homogeneous, but distinctly compound in the leaf cells of the primary leafy shoots. The spore germination and sporeling of *Cheilolejeunea ventricosa* belongs to *Lejeunea* type.

Key words: *Cheilolejeunea ventricosa*; liverworts; oil body; spores; tissue culture; sporeling

0 引 言

苔藓植物是现存高等植物中最原始的类群, 保守的估计至少有 18 000 种, 物种的数量

收稿日期: 2007-02

基金项目: 教育部博士学科点专项科研基金(20030269003); 国家自然科学基金(30470142, 30670155)

第一作者: 于传梅, 女, 硕士研究生, 研究方向为植物组织培养. E-mail: chuanmei1213@163.com.

通讯作者: 朱瑞良, 男, 教授, 研究方向为苔藓植物和药用植物. E-mail: lejeunea@163.com.

仅次于被子植物^[1]. 由于苔藓植物分布广, 生境多样化以及对恶劣环境的特殊适应, 多数的苔藓植物能产生特别丰富的次生代谢物质, 被认为是生物活性物质的源泉之一^[2,3]. 由于苔藓植物个体小, 常与其他植物混生, 要从野外获取一定量的纯样品相当困难, 这已经成为开展苔藓植物研究和大规模开发利用的瓶颈.

植物组织培养是现代生物技术之一. 早在 1902 年, Haberlandt 就利用苔藓植物进行植物组织培养, 开创了植物组织培养的先河^[4], 但可能由于经济价值的原因, 苔藓植物组织培养的研究和应用一直比不上其它高等植物. 近几年随着人们对苔藓植物重要性的进一步认识, 苔藓植物的组织培养技术在分子生物学的带动下已经获得了广泛的应用, 苔藓分子农场的出现为苔藓植物的广阔利用带来了希望^[4]. 然而, 要筛选合适的苔藓分子农场的材料, 需要积累大量苔藓植物的组织培养技术. 在以小立碗藓为代表的藓类植物组织培养获得巨大成功的同时, 探讨具有油体的苔类植物的组织培养技术具有重要的科学价值.

油体是苔类植物特有的一个细胞器, 其形态结构的多样性已经成为苔类植物最重要的分类依据之一^[5], 其内含的萜类化合物和芳香族化合物被认为是构成苔类植物生物活性成分的主要化合物^[6]. 从苔类植物(特别是从它的油体)中寻找结构新颖的, 具有生物活性的化合物已经成为近几年苔藓植物学的研究热点之一. 由于离体材料的油体很容易解体, 加上多数的苔类植物已经远离大城市, 要获得足够量的野生新鲜材料变得越来越困难, 而组织培养无疑是解决这一难题以及拯救稀有濒危植物的有效途径之一.

膨叶唇鳞苔(新拟)(*Cheilolejeunea ventricosa* (Schiffn.) X. L. He) 隶属于细鳞苔科, 腹叶 2 裂, 腹瓣大, 顶端与背瓣通过 2~3 个细胞相连, 叶片卵圆形, 为亚洲-大洋洲分布的稀有苔类植物(图 1(c)和(d)), 在我国的云南、海南和香港有零散分布^[7]. 由于其油体大, 数量少, 它是研究油体发育过程的理想材料. 本研究的目标是以膨叶唇鳞苔孢子为材料, 尝试

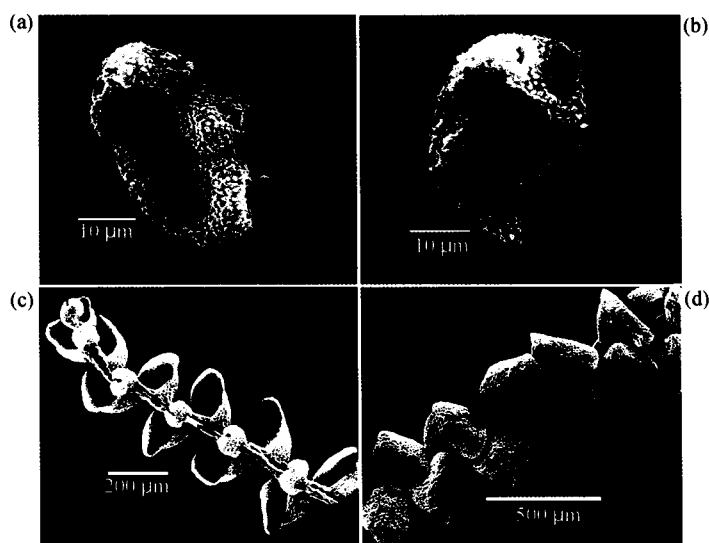


图 1 膨叶唇鳞苔的植物体和孢子

(a), (b) 孢子的扫描电镜照片; (c), (d) 植物体的扫描电镜照片 ((c) 腹面观, (d) 背面观)

Fig. 1 Spores and plants of *Cheilolejeunea ventricosa*

(a), (b) SEM pictures of spores; (c), (d) SEM pictures of plants ((c) ventral view, (d) dorsal view).

无菌培养的可能性,摸索组织培养的条件,确定孢子萌发类型,观察在人工培养条件下油体的形态结构,了解人工培养条件和野生条件下油体的形态结构差异,为探讨油体在苔类系统分类中的价值提供科学依据。

1 材料和方法

膨叶唇鳞苔的野生材料于 2005 年 9 月采自于海南吊罗山自然保护区,海拔 600 m 的树干,新鲜的材料连同基质置于培养皿中,外包保鲜袋后置于智能人工气候培养箱(温度 15℃,光照周期 12 h 明暗交替)培养,直到孢子体完全成熟。

实验所用的 MS 培养基按 Murashige & Skoog(1962)^[8]和 Sokal et al.(1997)^[9]配制,但不加氨基酸和维生素,加 1% 的蔗糖和 1% 的琼脂,pH 值调至 6.2,按常规方法灭菌和分装到无菌的培养皿中待用。

培养用的孢子采自培养箱中已成熟但还没有开裂的孢蒴,先截取还没有开裂的孢蒴,用 70% 的酒精消毒,然后用无菌水漂洗 3~4 次,再用次氯酸钠溶液消毒,用无菌水漂洗 4 次,并制成孢子悬浮液接种到培养基上。膨叶唇鳞苔的孢子为不规则长条形或亚方形,大小(34~80)μm×(14~28)μm,表面文饰乳头状,并具几个莲座(图 1(a)和(b)),常在孢蒴中预萌发。接种后的培养皿置于 1200 Lux,18℃ 的连续光照培养箱中培养,每隔 5 d 在奥林巴斯(BX51)显微镜下观察拍照。扫描电镜的材料未经处理,直接放在载物台的双面胶纸上,喷金后在 Jeol (6380lv) 扫描电镜下观察和拍照。凭证标本保存在华东师范大学植物标本馆(HSNU)。

2 结 果

2.1 孢子的消毒

孢子是苔藓植物的繁殖体,是苔藓组织培养中最常用的。由于多数藓类植物的孢子具有较厚的壁,相对而言,孢子的消毒和灭菌要比其它细胞和组织容易些。然而,本文所涉及的“孢子”实际上多数是初期的原丝体,因此,对膨叶唇鳞苔孢子的消毒灭菌成为本实验的关键步骤之一。

次氯酸钠溶液是组织培养常用的消毒剂,由于消毒后,氯气很容易挥发,不会因为消毒剂残留在材料中而对材料造成伤害,这种消毒剂已被广泛用于苔藓植物的组织培养^[9-11]。在本实验中,也选用了次氯酸钠溶液作为孢子的消毒剂,并用不同浓度的次氯酸钠溶液和不同的时间间隔处理孢子(表 1)。

表 1 次氯酸钠消毒的浓度和处理的时间

Tab. 1 Concentration and time treated of Sodium hypochlorite solution

浓度	时间/s	总接种数/瓶	未污染数/瓶	未污染率* /%	成活率** /%
2%	3	50	50	100.0	0.0
	5	50	50	100.0	0.0
	10	50	50	100.0	0.0
1%	3	50	50	100.0	0.0
	5	50	50	100.0	0.0
	10	50	50	100.0	0.0

续表 1

浓度	时间/s	总接种数/瓶	未污染数/瓶	未污染率* / %	成活率** / %
0.1 %	3	50	3	6.0	6.0
	5	50	45	90.0	90.0
	10	50	45	90.0	10.0

注: * 未污染率 = 未污染瓶数/总接种数 $\times 100\%$; ** 成活率 = 成活的瓶数/总接种数 $\times 100\%$

从表 1 可以看出, 1% 和 2% 的次氯酸钠溶液无论多长时间都导致材料褐变致死, 尽管 0.1% 的次氯酸钠消毒 10 s 可以很好地消毒材料, 未污染率达到 90.0%, 但成活率仅 10.0%, 远低于消毒时间为 5 s 的 90.0%。可见, 0.1% 的次氯酸钠, 消毒 5 s 是膨叶唇鳞苔孢子的最佳消毒方案。

2.2 孢子的萌发

原丝体是苔藓植物孢子萌发形成的一个丝状或片状的结构, 是苔藓植物生活史中特有的一个阶段。苔藓植物具有多样化的孢子萌发类型^[12], 不同类群的孢子萌发特征无论在系统发生学上, 还是在分类学上都扮演着重要的角色^[13-15]。

在改良的 MS 培养基上, 我们观察了膨叶唇鳞苔孢子萌发的过程。结果发现, 膨叶唇鳞苔的多数孢子在成熟的孢蒴(图 2(a))中已经预萌发(细胞在孢子壁内进行分裂, 成为 3~4 个细胞的“孢子”)。培养 5 d 后, 孢子内的细胞进一步分裂, 成为一个丝状体(图 2(b)), 培养 10 d 后, 原丝体中间的细胞开始纵向分裂(图 2(c)), 当培养 15 d 以后, 整个原丝体就超过 10 个细胞, 此时, 原丝体的一侧细胞出现了 1~2 个假根(图 2(d)和(e)), 20 d 以后假根的长度可达 45 μm 左右, 而且 53.8% 的原丝体具有 2 个假根, 15.4% 的原丝体具有 1 个假根, 其余的假根尚未产生。直到培养了 25 d 以后, 原丝体的中间细胞开始分化, 顶端细胞侧向分裂成两列侧向细胞, 进而分化成初生的带叶的幼枝(图 2(f)和(g))。55 d 以后, 幼枝进一步发育成具有七片小叶片的植物体(图 2(h))。值得注意的是, 在幼枝发育的早期, 已经有腹瓣和背瓣的分化, 但未见腹叶的出现(图 2(g)和(h))。

从实验结果可以看出, 膨叶唇鳞苔的孢子是内生萌发(endosporous germination), 原丝体为多细胞的圆柱状, 依据 Nehira(1983)的分类系统^[12], 膨叶唇鳞苔的孢子萌发属于细鳞苔型(*Lejeunea* type), 这与以前其它唇鳞苔属的孢子萌发类型一致。

2.3 油体的形态结构

我们发现, 油体在孢子阶段已经存在, 在萌发初期的圆柱状原丝体有明显的圆球形的油体, 其大小通常在直径 2.5 μm 左右, 每个细胞 1~5 个, 在油镜下比其它细胞器显得更加透明(图 3(a)和(d)), 在后期的原丝体阶段, 油体大小并没有多大变化, 只是在感观上显得更加闪亮耀眼(图 3(c)和(d))。当原丝体上分化出幼叶细胞时, 幼叶细胞中的油体明显比原丝体上的要大, 大小平均为 3.5 $\mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$, 并开始出现椭圆形的油体(图 3(e))。当完整的叶出现后(45~55 d), 茎先端的叶片出现了聚合形的椭圆形油体, 大小可达 12.5 $\mu\text{m} \times 3.75 \mu\text{m}$ (图 3(f)), 这种油体与野生材料中的成熟油体在形态结构方面有差异, 野生材料中的成熟油体大小为(2.2~18) $\mu\text{m} \times (2.2 \sim 5) \mu\text{m}$, 聚合型结构更明显, 聚合的小球更多(图 3(g)和(h))。

3 讨 论

苔藓植物无菌培养的成功与否, 苔藓细胞或组织材料的消毒是决定性的一步。Sokal

等^[9]曾用 5% 的次氯酸钠溶液消毒仙鹤藓和丛生真藓等 5 种藓类的孢蒴,消毒 5 min 获得满意的结果^[9]. 然而,用他们的消毒方案消毒本实验的膨叶唇鳞苔孢蒴,其结果无一成活. 仙鹤藓和丛生真藓等是喜光的藓类植物,其孢蒴和孢子壁要比膨叶唇鳞苔的厚得多,同样的时间和浓度对膨叶唇鳞苔孢蒴和孢子来说,可能无法忍受. 这表明苔藓植物孢蒴或其它组织和细胞的消毒需要考虑不同物种的结构特点及其生长环境,本实验的消毒方案能为生长在阴湿环境下的附生植物的孢子消毒提供参考.

细鳞苔科是苔类植物中最大的科,具有 2 种类型(*Lopholejeunea* type, *Lejeunea* type)的孢子萌发类型^[12]. 膨叶唇鳞苔孢子发育的第一步是细胞在孢子的外周壁内分裂,形成圆柱状的原丝体,当分裂到一定程度(大约 10 个细胞左右),圆柱状原丝体中间的细胞分化成具幼叶的幼枝(图 2). 这种发育过程与前人从白鳞苔属和细鳞苔属发现的类型基本一致,是典型的细鳞苔型(*Lejeunea* type).

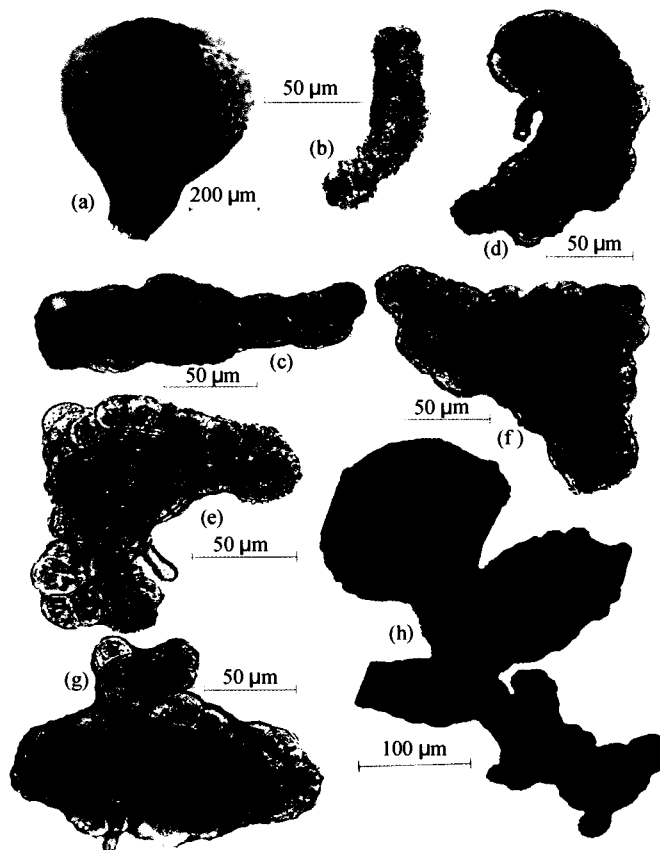


图 2 膨叶唇鳞苔的孢子萌发

Fig. 2 Germination of spores of *Cheilolejeunea ventricosa*

- (a) 蒴萼(具有幼小的孢子体);(b) 培养 5 d 的原丝体;(c) 培养 10 d 的原丝体;(d) 培养 15 d 的原丝体;
(e) 培养 20 d 的原丝体;(f) 培养 25 d 的原丝体;(g) 培养 30 d 的原丝体;(h) 培养 55 d 的植物体
(a) Perianth (with juvenile sporophyte); (b) Protonema cultured for 5 days; (c) Protonema cultured for 10 days; (d) Protonema cultured for 15 days; (e) Protonema cultured for 20 days; (f) Protonema cultured for 25 days; (g) Protonema cultured for 30 days; (h) Plant cultured for 55 days

本文首次对膨叶唇鳞苔的组织培养作了尝试,并对在培养条件下的油体进行了初步观察,发现原丝体阶段的油体在大小,形状,数量和结构方面均与野生条件下的成熟叶细胞油体有差异.这说明了油体在发育过程中与器官分化有着复杂的联系.今后,在本实验的基础上将完善组织培养技术,运用透射电镜和冰冻切片技术研究油体的发育过程,探讨环境因子对油体发育的影响,揭示油体结构分化的机理.

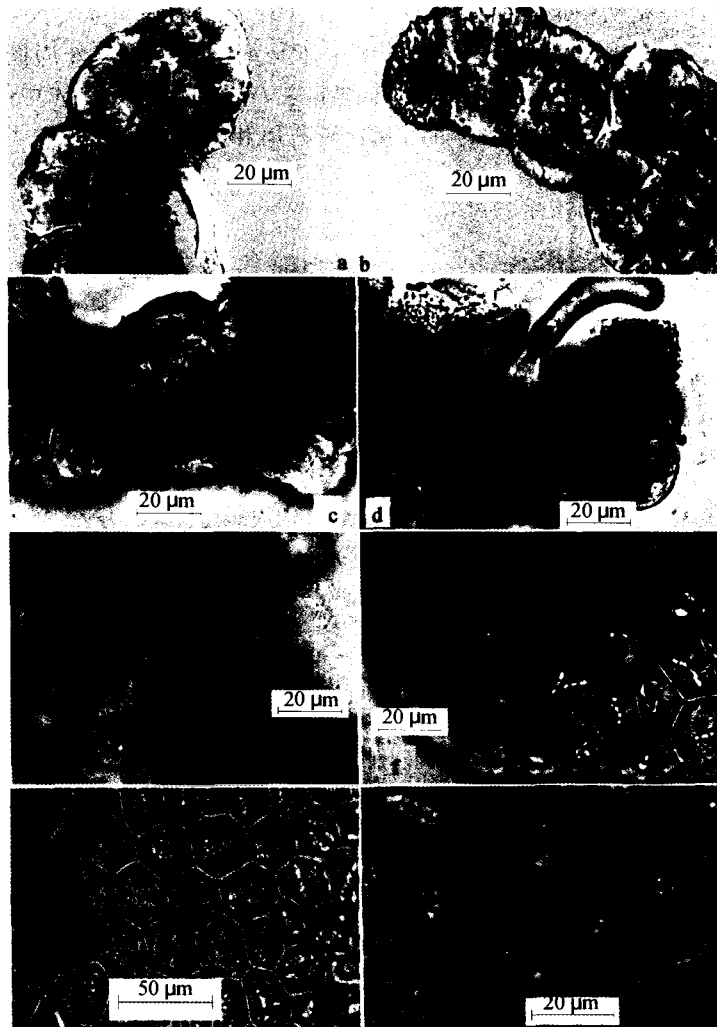


图 3 膨叶唇鳞苔的油体

Fig. 3 Oil bodies of *Cheilolejeunea ventricosa*

(a) - (b) 原丝体发育前期细胞中的油体; (c) - (d) 原丝体发育后期细胞中的油体; (e) 初生叶(最早分化的叶)叶细胞中的油体; (f) 叶片细胞中的油体; (g) - (h) 野生叶片细胞中的油体

(a) - (b) Oil bodies of primary protonema; (c) - (d) Oil bodies of well-development protonema; (e) Oil bodies of initial leaves of primary leafy shoots; (f) Oil bodies of apical leaves of primary leafy shoots; (g) - (h) Oil bodies of leaf cells of wild plants

[参 考 文 献]

- [1] ZHU R L, WANG D, XU L, et al. Antibacterial activity in extracts of some bryophytes from China and Mongolia [J]. J Hattori Bot Lab, 2006, 100: 603-615.
- [2] ASAKAWA Y. Biologically active compounds from bryophytes[J]. J Hattori Bot Lab, 1998, 84: 91-104.
- [3] ZINSMEISTER H D, BECKER H, EICHER T. Bryophytes, a source of biologically active, naturally occurring material? [J]. Angew Chem Int Edit, 1991, 30: 130-147.
- [4] HOHE A, RESKI R. From axenic spore germination to molecular farming one century of bryophyte in vitro culture[J]. Plant Cell Rep, 2005, 23: 513-521.
- [5] ZHU R L, GRADSTEIN S R. Oil bodies of selected species of Chinese Lejeuneaceae (Hepaticae)[J]. J Hattori Bot Lab, 2003, 94: 187-195.
- [6] ASAKAWA Y. Chemosystematics of the Hepaticae[J]. Phytochemistry, 2004, 65: 623-669.
- [7] ZHU R L, LAI M J. *Cheilolejeunea decursiva* (Sande Lac.) R. M. Schust. and *Cheilolejeunea ventricosa* (Schiffn.) X. L. He (Lejeuneaceae, Hepaticae), new to Australia[J]. J Hattori Bot Lab, 2005, 98: 193-203.
- [8] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. Physiol Plant, 1962, 15: 473-497.
- [9] SOKAL I, KUTA E, PRZYWARA L. Callus induction and gametophyte regeneration in moss culture[J]. Act Biol Cracov Bot, 1997, 39: 35-42.
- [10] ONO K, MURASAKI Y, TAKAMIYA M. Induction and morphogenesis of cultured cells of bryophytes[J]. J Hattori Bot Lab, 1988, 65: 391-401.
- [11] GONZÁLEZ M L, MALLÓN R, REINOSO J, et al. In vitro micropropagation and long-term conservation of the endangered moss *Splachnum ampullaceum*[J]. Biol Plant, 2006, 50: 339-345.
- [12] NEHIRA H. Spore germination, protonema development and sporeling development[C]//Schuster R M. New manual of Bryology. Nichinan; The Hattori Bot Lab, 1983: 343-385.
- [13] FULFORD M. Sporeling patterns in the leaf Hepaticae[C]//8th Inter Bot Congr Rapp Comm Sect, 1954, 16: 55-64.
- [14] HATCHER R E. Sporeling development in the genus *Lepidolaena* [J]. J Hattori Bot Lab, 1963, 26: 10-14.
- [15] 胡人亮. 苔藓植物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1987.

(上接第 58 页)

- [8] SHIMADA N, KAWATA T, MARUO T, et al. Evidence that the *Dictyostelium* STAT protein Dd-STATa plays a role in the differentiation of inner basal disc cells and identification of a promoter element essential for expression in these cells[J]. Differentiation, 2005, 73(1): 50-60.
- [9] MAEDA Y. Regulation of growth and differentiation in *Dictyostelium*[J]. Int Rev Cytol, 2005, 244: 287-332.
- [10] HAN Z, FIRTEL R A. The homeobox-containing gene *Wariai* regulates anterior-posterior patterning and cell-type homeostasis in *Dictyostelium*[J]. Development, 1998, 125(2): 313-325.