

· 技术方法 ·

仙鹤藓的孢子萌发及愈伤组织诱导

吴小凤, 胡若洋*, 李学东

首都师范大学生命科学学院, 北京 100048

摘要 通过对采自河北雾灵山海拔1 500 m的仙鹤藓(*Atrichum undulatum*)的孢子萌发以及原丝体发育的观察,发现仙鹤藓孢子无休眠现象,孢子接种3天左右萌发;其原丝体发育分为绿丝体和轴丝体两个阶段。扩大培养实验结果表明,仙鹤藓茎叶体在添加2%葡萄糖的MS培养基上,置于25°C/20°C、14小时光照/10小时黑暗、36 μmol·m⁻²·s⁻¹条件下培养,产生新生茎叶体最多,且茎叶体长势最好,可以获得大量无菌材料。仙鹤藓愈伤组织诱导实验显示,形成愈伤组织的最佳培养基为添加2%葡萄糖和1.0 mg·L⁻¹ 6-BA的MS培养基。

关键词 仙鹤藓, 愈伤组织, 孢子萌发

吴小凤, 胡若洋, 李学东 (2013). 仙鹤藓的孢子萌发及愈伤组织诱导. 植物学报 48, 651–657.

苔藓是地球上古老的非维管陆生植物,它作为从水生到陆生的过渡生物类群,对其研究具有重大的系统进化意义。但相对于种子植物,苔藓类植物具有更为复杂的生活史,造成对苔藓类植物的组织培养以及再生体系建立比较困难,导致苔藓植物研究远落后于种子植物。

我国对苔藓植物的认识和利用较早,但缺少系统深入的培养研究。1990年,李文安(1990)首次报道了地钱(*Marchantia polymorpha*)在离体条件下无性繁殖、脱分化及再分化的研究。陈阜东和刘家熙(1994)对葫芦藓(*Funaria hygrometrica*)的离体培养和多倍化进行了研究。张朝晖等(1998)采用液体培养基研究了pH值对贵州喀斯特生境苔藓植物孢子萌发及原丝体生长的影响。刘晓红(1998)用组织培养的方法探讨了细胞分裂素和钙调蛋白专一性抑制剂对葫芦藓发育过程的影响。陈蓉蓉等(1998)分析了钙离子浓度对喀斯特生境苔藓孢子萌发及原丝体生长的影响。赵建成等(2002)对红蒴立碗藓(*Physomitrium eurystomum*)、无疣墙藓(*Tortula mucronifolia*)、钟帽藓(*Venturiella sinensis*)等10种藓类植物的孢子萌发及原丝体发育过程进行了研究。Gang等(2003)报道了几种药用苔藓植物的培养及生物学特性,其中包括部分仙鹤藓孢子萌发原丝体的探索性工作。

愈伤组织可以提供大量比较纯净的实验材料,有

关苔藓植物愈伤组织诱导的研究始于1950–1960年。Allsopp(1957)率先成功诱导出苔类的愈伤组织。Ward(1960)则首次诱导了藓类的愈伤组织。1962年,Machlis和Doyle(1962)培养西亚立碗藓(*Hyscomitrium coorgense*)配子体的叶和颈卵器壁并获得愈伤组织。Takami等(1988)诱导角苔类的愈伤组织,并且建立了悬浮培养体系。Sokal等(1997)从波叶仙鹤藓(*Atrichum undulatum*)、丛生真藓(*Ryum caespiticium*)和金发藓及提灯藓(*Plagiomnium affine*)的原丝体培育出配子体。同年,Kowalczyk等(1997)也从苔类的大萼苔(*Cephalozia bicornuta*)诱导形成愈伤组织,并且再生出配子体。根据Felix于1994年的统计,苔藓植物中共有31种苔类、18种藓类和1种角苔类成功诱导出了愈伤组织。此外,已有27种苔类、16种藓类和1种角苔类成功建立了细胞悬浮培养体系。然而,有关苔藓植物组织培养研究远不如其它高等植物细胞培养研究得深入,所取得的成果仍然不能充分满足各研究领域的需要(Felix, 1994)。

仙鹤藓(*Atrichum undulatum*)是金发藓科(Polytrichaceae)的较小属种,在苔藓植物当中属于结构较为复杂、演化水平较高的类型。仙鹤藓为主要药用苔藓植物,具有止血消炎的作用(王振杰等, 2008)。据我们观察,雾灵山生长的仙鹤藓对寒冷和干燥具有很强的抵抗能力,可能蕴含重要的抗性资源,并且其配子

体染色体数目为7, 远远少于应用较多的模式植物小立碗藓(*Physcomitrella patens*)的27条染色体(Reski et al., 1994)。目前尚未见其组织培养方面较全面系统的报道。本研究建立了针对仙鹤藓的增殖培养体系, 通过该体系可以简便高效地获得大量无菌材料, 同时还建立了愈伤组织诱导再生体系, 这为进行仙鹤藓基因组学及蛋白质组学研究奠定了系统的实验基础。

1 植物材料

1.1 材料

本研究所用材料仙鹤藓(*Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv)取自河北雾灵山(40°34'N, 117°28'E)海拔约1 500 m的林缘山坡湿土层。采集时选取整体健壮、孢蒴饱满且色泽深绿的植株。将材料连同其下层土壤取下, 密闭于保鲜袋, 置于4°C冰箱中保存备用。

1.2 材料表面消毒

选取健康成熟的仙鹤藓孢蒴进行消毒。先用无菌蒸馏水清洗材料5次, 每次3分钟; 再用75%乙醇消毒5秒, 用无菌蒸馏水清洗5次, 每次1分钟; 最后用0.05% $HgCl_2$ 消毒120秒, 用无菌蒸馏水清洗5次, 每次1分钟。

2 培养基成分与培养条件

2.1 无菌接种培养基

将消毒并洗净后的材料置于无菌蒸馏水中, 剥离蒴壁, 制成适当浓度的孢子悬浊液, 在无菌条件下接种于Beneke培养基($200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}NH_4NO_3$, $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}MgSO_4\cdot7H_2O$, $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}KH_2PO_4$, $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}CaCl_2$, $FeCl_3\cdot6H_2O$ 微量)上。

2.2 愈伤组织诱导的激素类型及组合

初步筛选愈伤组织诱导培养基以MS(Murashige and Skoog, 1962)及MS+40 g·L⁻¹葡萄糖为基本培养基, 并分别附加相同浓度($1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的6-BA、2,4-D、IAA、IBA、NAA、KT。经过大量筛选实验后, 确定选用不同浓度的6-BA、2,4-D激素组合, 共设置25个组合, 进一步诱导愈伤组织。所有固体培养基均附加6 g·L⁻¹琼脂, 灭菌前pH值为5.8–5.9。

2.3 孢子萌发培养条件

将无菌条件下接种在Beneke培养基上的孢子悬浊液置于25°C/20°C昼夜变温、14小时光照/10小时黑暗、 $36\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光强下培养。定期观察并记录生长情况。

2.4 增殖培养条件

以无菌条件下由孢子萌发得到的原丝体为材料, 破碎成2 mm左右的匀浆片段, 分别接种在含有不同浓度葡萄糖的增殖培养基上, 置于与孢子萌发相同的培养条件下培养。定期观察并记录生长情况。

2.5 愈伤组织诱导培养

将前期增殖培养获得的仙鹤藓材料, 分别接种于含有相同浓度或不同浓度的不同激素组合的脱分化培养基上, 置于与孢子萌发相同的培养条件下培养。定期观察并记录生长情况。

3 结果与结论

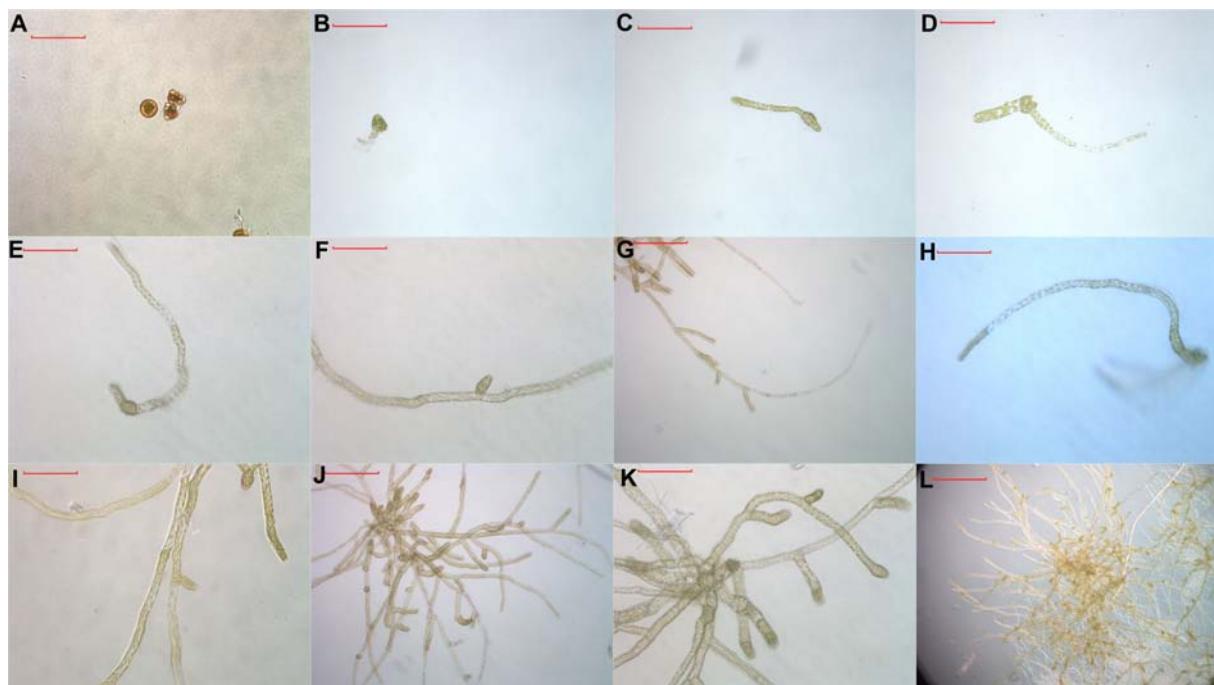
3.1 孢子萌发培养

接种第1天, 孢子吸水膨胀。接种第2天, 孢子内部有叶绿体出现(图1A)。接种第3天, 叶绿体移至细胞核周围, 孢子壁向一侧突起, 孢子呈不均质, 同时细胞核分裂为二, 在孢子内形成横向壁。4天左右, 孢子分裂为绿丝体和轴丝体原始细胞(图1B), 很少萌发出初生假根。

培养5–6天, 绿丝体原始细胞横分裂(图1C), 产生绿丝体基原细胞和绿丝体母细胞, 轴丝体原始细胞则分裂(图1D)为轴丝体基原细胞和轴丝体母细胞。绿丝体母细胞的顶端细胞不断进行横分裂, 形成单列细胞不分枝的丝状体(图1E), 非顶端细胞的任一细胞, 向侧方斜向分裂, 产生出分枝细胞(图1F)。顶端细胞也可发生斜向分裂产生出轴丝体和顶端假根(图1G)。轴丝体母细胞经连续的横分裂(图1H)或斜分裂(图1I), 形成轴丝体系统(图1J, K)及假根系统(图1L)。

3.2 增殖培养

将材料放置在含有不同浓度葡萄糖的Beneke和MS培养基上进行继代培养, 大约1周开始出现原丝体, 随着原丝体的增多, 约15天后发育成1株新的茎叶

**图1** 仙鹤藓孢子萌发和原丝体发育

(A) 孢子; (B) 绿丝体原始细胞和轴丝体原始细胞; (C), (D) 绿丝体原始细胞和轴丝体原始细胞横分裂; (E) 绿丝体顶端细胞横分裂为单列细胞不分枝丝状体; (F) 绿丝体非顶端细胞斜向分裂产生分枝细胞; (G) 绿丝体分化出顶端假根; (H) 轴丝体母细胞进行横分裂; (I) 轴丝体母细胞进行斜分裂; (J) 绿丝体顶端细胞分化成轴丝体; (K) 轴丝体两细胞间细胞接触面呈“球面接触”; (L) 丛生的假根。Bar=50 μm

Figure 1 Spore germination and protonema development of *Atrichum undulatum*

(A) Spore; (B) The original cell of the chloronemata and caulinema; (C), (D) The cross separatist for the original cell of chloronemata and caulinema; (E) The apical cell of the chloronemata transversely divides into single-row cells unbranched filaments; (F) The non-apical cell of the chloronemata obliquely divides into branched cells; (G) The chloronemata differentiates into the top rhizoid; (H) The caulinema metrocyste undergoes transverse fission; (I) The caulinema metrocyste undergoes oblique fission; (J) The apical cells of the chloronemata differentiate into the caulinema; (K) The contact surface for the intercellular cells of the caulinema presents spherical contact; (L) Cluster rhizoids. Bar=50 μm

表1 葡萄糖浓度对仙鹤藓新生茎叶体数目影响**Table 1** Number of new leafy gametophyte of *Atrichum undulatum* in different concentrations of glucose

Glucose concentration (%)	0	0.5	1.0	2.0	4.0
Beneke	4±1	6.33±1.53	7.67±1.53	11.67±0.57	0
MS	11.33±1.53	20.67±2.08	38±1	56±2	0

体。产生新茎叶体的个数以及长势因培养基种类和葡萄糖浓度不同而异(表1; 图2)。实验结果表明, 在一定浓度范围内, 葡萄糖可促进原丝体生长。随着葡萄糖浓度的升高, 原丝体生长更旺盛, 产生的新茎尖数目也越多; 且葡萄糖浓度越高, 茎叶体颜色越绿, 植株更茁壮。

3.3 组织培养

3.3.1 愈伤组织诱导激素筛选

将材料放在含有不同激素的MS脱分化培养基上进行继代培养, 大约7天左右, 所有处理组均长出新的原丝体。21天后, 在含有6-BA的脱分化培养基上, 原丝

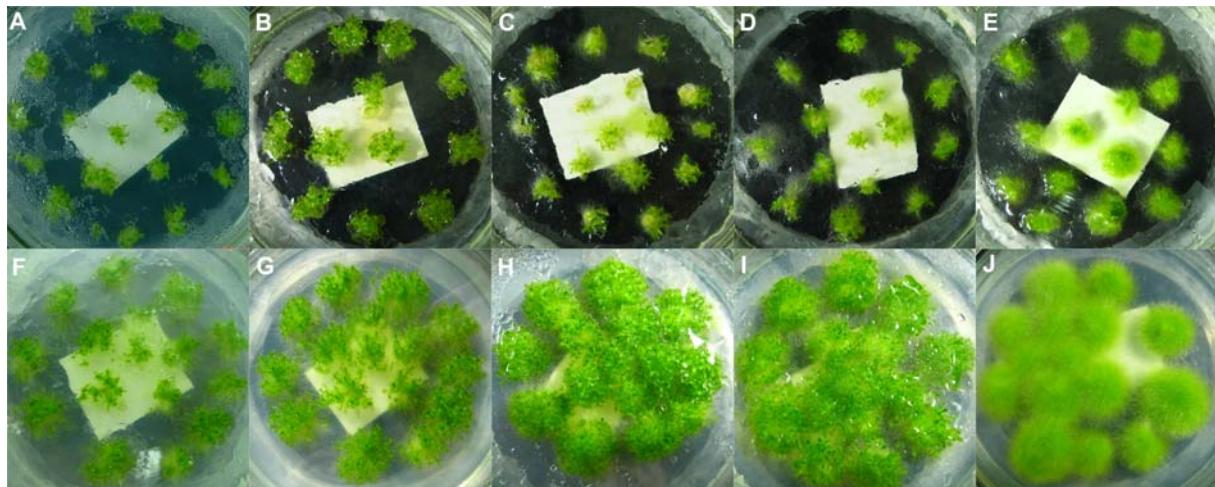


图2 不同浓度葡萄糖对仙鹤藓生长状况的影响

(A)–(E) Beneke培养基, 葡萄糖浓度分别为0 (A)、0.5% (B)、1.0% (C)、2.0% (D)和4.0% (E); (F)–(J) MS培养基, 葡萄糖浓度分别为0 (F)、0.5% (G)、1.0% (H)、2.0% (I)和4.0% (J)

Figure 2 Influence of glucose concentrations on *Atrichum undulatum*

(A)–(E) Beneke media, the glucose concentrations are 0 (A), 0.5% (B), 1.0% (C), 2.0% (D) and 4.0% (E); (F)–(J) MS media, the glucose concentrations are 0 (F), 0.5% (G), 1.0% (H), 2.0% (I) and 4.0% (J)

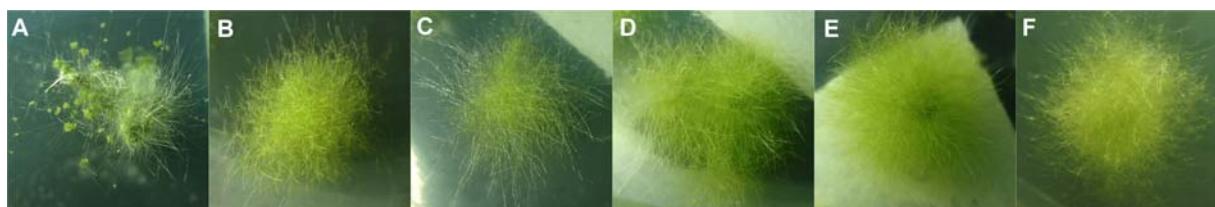


图3 不同激素(浓度均为 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)对仙鹤藓愈伤组织诱导的影响

(A) 6-BA; (B) 2,4-D; (C) IAA; (D) IBA; (E) KT; (F) NAA

Figure 3 Influence of different phytohormones (concentration: $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) on callus induction of *Atrichum undulatum*

(A) 6-BA; (B) 2,4-D; (C) IAA; (D) IBA; (E) KT; (F) NAA

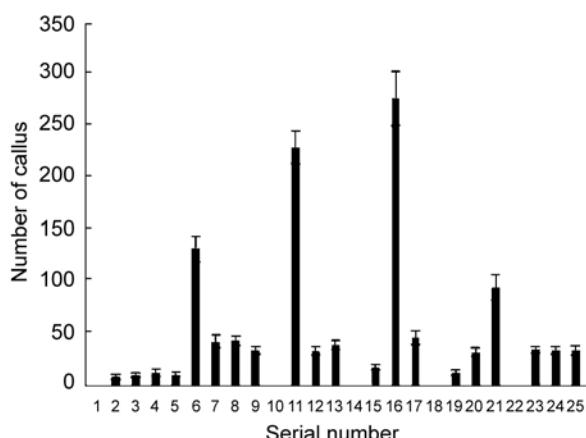
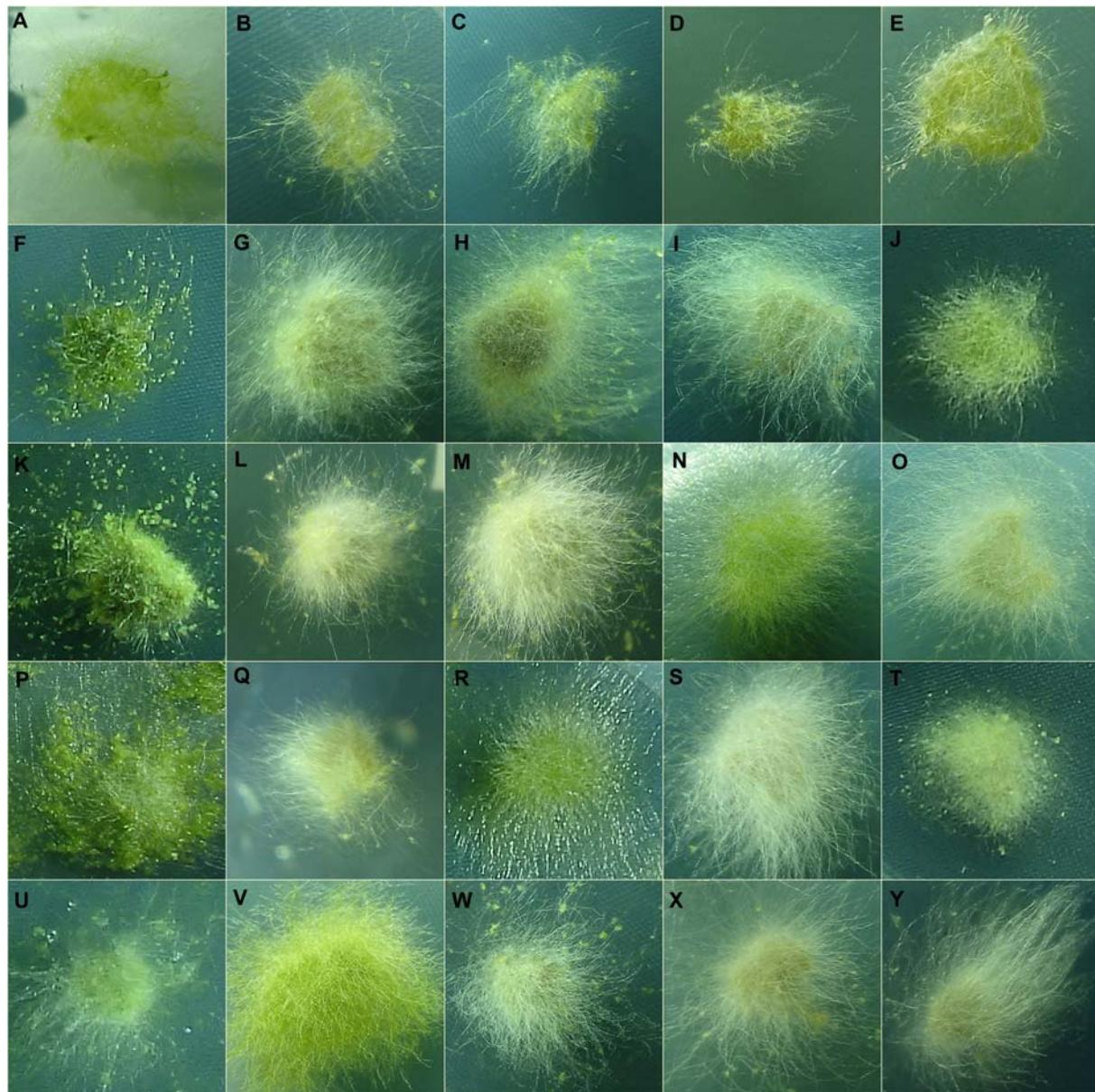


图4 不同浓度葡萄糖、6-BA和2,4-D组合对仙鹤藓愈伤组织数量的影响
编号同表2。

Figure 4 Influence of glucose, 6-BA and 2,4-D in different concentrations on callus number of *Atrichum undulatum*
The serial number is the same as Table 2.

体再生出绿色斑块, 初步鉴定为愈伤组织。30天后, 仅有含6-BA的脱分化培养基上形成了若干小块愈伤。其它组合中均无愈伤组织形成(图3)。



**图5 不同浓度葡萄糖、6-BA和2,4-D组合对仙鹤藓愈伤组织诱导的影响
A-Y分别对应表2编号1-25。**

Figure 5 Influence of glucose, 6-BA and 2,4-D in different concentrations on callus induction of *Atrichum undulatum*
A-Y corresponding to No. 1-25 in Table 2.

3.3.2 不同浓度葡萄糖、6-BA和2,4-D组合对愈伤组织诱导的影响

25组75个对照实验显示, 60天后, 愈伤组织表面长出白色绒毛。16号组合(2%葡萄糖、 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA和 $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D)愈伤斑块最多(图4), 堆积最高, 愈伤面

积最大(图5P); 其次为11号组合(1% 葡萄糖、 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA和 $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D)(图5K)、6号组合(0.5% 葡萄糖、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA和 $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D)(图5F)和21号组合(4% 葡萄糖、 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA和 $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D)(图5U), 表现为愈伤组织颜色深绿, 表面的白色绒毛

表2 不同浓度葡萄糖、6-BA和2,4-D的正交组合
Table 2 Different concentrations of glucose, 6-BA and 2,4-D of orthogonal combination

Serial number	Glucose (%)	2,4-D ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	6-BA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	0	0	0
2	0	0.25	0.5
3	0	0.5	1.0
4	0	1.0	1.5
5	0	1.5	2.0
6	0.5	0	0.5
7	0.5	0.25	1.0
8	0.5	0.5	1.5
9	0.5	1.0	2.0
10	0.5	1.5	0
11	1.0	0	1.0
12	1.0	0.25	1.5
13	1.0	0.5	2.0
14	1.0	1.0	0
15	1.0	1.5	0.5
16	2.0	0	1.0
17	2.0	0.25	1.5
18	2.0	0.5	0
19	2.0	1.0	0.5
20	2.0	1.5	1.0
21	4.0	0	2.0
22	4.0	0.25	0
23	4.0	0.5	0.5
24	4.0	1.0	1.0
25	4.0	1.5	1.5

较少。1、10、14、18、22号组合(6-BA含量均为0)无愈伤组织出现(图5A, J, N, R, V)。2、3、4、5号组合(葡萄糖含量均为0)中有愈伤组织形成,但数量较少,原丝体呈绿色且不发达(图5B-E);其余组合均有愈伤斑块产生,且表面覆有白色丝状体(图5G, H, I, L, M, O, Q, S, T, W, X, Y)。

三因素组合的正交实验结果是16号组合(2%葡萄糖+0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA)愈伤组织最大,22号组合(4%葡萄糖+0.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA)原丝体和茎叶体长势最好。实验结果进一步验证了葡萄糖和6-BA能共同促进仙鹤藓愈伤组织的诱导和生长,而且最适浓度为2%葡萄糖+1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA。与6-BA相比,2,4-D不能诱导出仙鹤藓愈伤组织。

参考文献

- 陈阜东, 刘家熙 (1994). 苔藓植物离体培养和多倍体研究. 植物学通报 **11**, 90–90.
- 陈蓉蓉, 刘宁, 杨松, 张朝晖 (1998). Ca^{2+} 浓度对黔灵山喀斯特生境中几种苔藓植物生长的影响. 贵州师范大学学报(自然科学版) **16**, 4–7.
- 李文安 (1990). 地钱在离体条件下的无性繁殖及脱分化与再分化的研究. 植物学报 **32**, 852–857.
- 刘晓红 (1998). 细胞分裂素、氯丙嗪对葫芦藓发育过程的影响. 西南师范大学学报(自然科学版) **23**, 476–480.
- 王振杰, 黄士良, 金红霞, 赵建成, 王炳富 (2008). 雾灵山药用苔藓植物资源及开发利用前景. 安徽农业科学 **36**, 3735–3736.
- 赵建成, 李秀芹, 张慧中 (2002). 十种藓类植物孢子萌发与原丝体发育的初步研究. 干旱区研究 **19**, 32–38.
- Allsopp A (1957). Controlled differentiation in cultures of two liverworts. Nature **179**, 681–682.
- Felix H (1994). Calli, cell and plantlet suspension cultures of bryophytes. *Candollea* **49**, 141–158.
- Gang YY, Du GS, Shi DJ, Wang MZ, Li XD, Hua ZL (2003). Establishment of *in vitro* regeneration system of the *Atrichum* Mosses. *Acta Bot Sin* **45**, 1475–1480.
- Kowalczyk A, Przywara L, Kuta E (1997). *In vitro* culture of liverworts. *Acta Biol Cracov Bot* **39**, 27–33.
- Machlis L, Doyle WT (1962). Submerged growth of pure cultures of the liverwort *Sphaerocarpos donnellii*. *Physiol Plant* **15**, 351–353.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**, 473–497.
- Reski R, Faust M, Wang XH, Wehe M, Abel WO (1994). Genome analysis of the moss *Physcomitrella patens* (Hedw) BSG. *Mol Gen Genet* **244**, 352–359.
- Sokal I, Kuta E, Przywara L (1997). Callus induction and gametophyte regeneration in moss cultures. *Acta Biol Cracov Bot* **39**, 35–42.
- Takami S, Yasunaga M, Takio S, Kimura J, Hino S (1988). Establishment of suspension cultures of cells from the hornwort, *Anthoceros punctatus* L. *J Hattori Bot Lab* **64**, 429–435.
- Ward M (1960). Callus tissues from the mosses *Polytrichum* and *Atrichum*. *Science* **132**, 1401–1402.

Spore Germination and Callus Induction of *Atrichum undulatum*

Xiaofeng Wu, Ruoyang Hu*, Xuedong Li

School of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100048, China

Abstract We studied the spore germination and protonema development of *Atrichum undulatum* collected from Wuling Mountain, Hebei Province (1 500 m a.s.l.). The dormancy stage is absent during spore development. Spores in incubation culture take 3 days to germinate. Spores germinate exogenously by forming a protonema in 2 growth phases: chloronema and caulonema. The best growth conditions were MS medium with 2% glucose at 25°C/20°C, 14 h light/10 h dark, 36 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. The optimal medium for callus induction is MS medium supplemented with 2% glucose and 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA to obtain high-quality cormus for large-scale cultivation.

Key words *Atrichum undulatum*, callus, spore germination

Wu XF, Hu RY, Li XD (2013). Spore germination and callus induction of *Atrichum undulatum*. *Chin Bull Bot* **48**, 651–657.

* Author for correspondence. E-mail: hruoyang@aliyun.com

(责任编辑: 白羽红)

致谢审者

本刊编辑部衷心感谢以下审稿专家对我刊工作的大力支持和帮助!

(统计时间: 2012年10月31日至2013年10月31日。姓名按姓氏拼音排序)

安海龙	曹毅	常杰	陈发棣	陈凡	陈化榜	陈立群	陈受宜	陈玉玲	陈月琴	程须珍
程佑发	程祝宽	种康	储成才	崔洪霞	崔素霞	戴绍军	戴思兰	董爱武	段俊	段礼新
段明瑞	冯玉龙	傅向东	傅永福	高歌	高辉远	高锦明	高连明	高群玉	葛磊	葛学军
巩志忠	顾明亮	顾正彪	郭龙彪	郭水良	郭延平	郭毅	韩天富	郝东云	何东健	何光华
何洪林	何维明	何晓明	何业华	何振艳	胡克林	胡琼	胡玉欣	胡章喜	黄芳	黄学林
黄益宗	黄泽春	黄卓烈	汲玉河	贾渝	姜闯道	蒋高明	靳晓白	孔宏智	蒯本科	乐捷
黎家	李博生	李传友	李德红	李海航	李洪清	李玲	李美茹	李明军	李娘辉	李凝
李添	李韶山	李淑彬	李向东	李新海	李岩	李悦	廖伯寿	廖红	林汉明	林金星
林忠平	凌宏清	刘宝	刘保东	刘春明	刘国琴	刘洪涛	刘玫	刘美珍	刘楠	刘全儒
刘伟	刘新	龙新宪	卢从明	卢孟柱	吕应堂	麻密	马三梅	孟征	彭长连	彭华
彭建宗	戚存扣	漆小泉	钱前	秦跟基	瞿礼嘉	饶广远	上官周平		石东乔	施和平
石雷	石磊	石培礼	师生波	宋纯鹏	宋松泉	苏都莫日根		苏震	孙敬三	孙蒙祥
孙颖	腾胜	田长恩	田长彦	田秋英	田世平	汪俏梅	王宝兰	王宝山	王臣	王戈亮
王红芳	王建波	王俊	王亮生	王宁宁	王台	王涛	王小菁	王晓娟	王秀杰	王艳
王英典	王英强	王幼群	王子成	韦朝阳	魏伟	魏孝义	温晓刚	吴德邻	吴鸿	吴学文
夏光敏	萧浪涛	肖仕	肖娅萍	谢关林	谢旗	徐凤霞	徐国华	徐云远	阎恩荣	阳成伟
杨惠敏	杨淑华	杨维才	杨永	姚楠	叶兴国	喻德跃	于飞海	于福同	袁明	曾大力
曾庆银	张爱民	张大兵	张大维	张峰	张钢民	张海文	张红生	张建华	张劲松	张金屯
张丽静	张莉枝	张鹏	张其德	张强	张守仁	张宪春	张相歧	张玉娥	张运春	张治国
张忠明	赵亮	赵敏桂	赵艳	郑成超	郑海雷	郑延海	周广胜	周庆源	周世良	周伟军
周奕华	朱立煌	朱相云	庄楚雄							