

双色真藓的组织培养和发育研究

李育中^{1,2}, 沈霏^{1,2}, 范静¹, 王晓霞¹, 李骏盈¹, 王建光¹, 陈穗云^{1*}

(1. 云南大学生命科学学院, 昆明 650091; 2. 中国医学科学院医学生物学研究所, 昆明 650118)

摘要: 对双色真藓(*Bryum dichotomum* Hedw.)的孢子发育过程及愈伤组织的诱导和培养进行了研究。结果表明, 双色真藓孢子萌发和原丝体发育属于典型的真藓型。将双色真藓原丝体接种在含有 2.0 mg L⁻¹ 的硅酸钠和 3.0 mg L⁻¹ 6-BA 的 MS 固体培养基上, 可诱导双色真藓原丝体分化为愈伤组织。愈伤组织在含有 2.0 mg L⁻¹ 的硅酸钠、1.0 mg L⁻¹ 2,4-D 和 1.0 mg L⁻¹ 6-BA 的 MS 固体培养基上可以长期继代培养。而愈伤组织在含有 2.0 mg L⁻¹ 的硅酸钠、1.0 mg L⁻¹ 2,4-D 和 1.0 mg L⁻¹ 6-BA 的 MS 液体培养基中可以悬浮培养, 且生长迅速, 培养 28 d 达到接种鲜重的 9.25 倍。

关键词: 双色真藓; 组织培养; 发育; 愈伤组织

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2012.01.007

Tissue Culture and Development of the Moss *Bryum dichotomum* (Hedw.) *in vitro*

LI Yu-zhong^{1,2}, SHEN Fei^{1,2}, FAN Jing¹, WANG Xiao-xia¹, LI Jun-ying¹, WANG Jian-guang¹, CHEN Sui-yun^{1*}

(1. School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China; 2. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Kunming 650118, China)

Abstract: The spore development and callus induction of *Bryum dichotomum* Hedw. *in vitro* culture were studied. The results showed that the spore germination and protonema development of *B. dichotomum* Hedw. were *Bryum*-type. The calli were successfully induced from protonema cultured on solid MS medium supplemented with 3.0 mg L⁻¹ 6-BA and 2.0 mg L⁻¹ sodium silicate. The calli could be subcultured at long term on solid MS medium supplemented with 2.0 mg L⁻¹ sodium silicate, 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D and 1.0 mg L⁻¹ 6-BA. The fresh weight of calli cultured for 28 days was about 9.25 times to original weight under suspension culture, when incubated in liquid MS medium supplemented with 2.0 mg L⁻¹ sodium silicate, 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D and 1.0 mg L⁻¹ 6-BA.

Key words: *Bryum dichotomum*; *In vitro* culture; Development; Calli

苔藓植物是现存陆生植物中较大的类群之一, 约有 23000 余种, 仅次于被子植物, 隶属于高等植物中较为低等的类群^[1]。目前地球上包括南极在内, 除 5000 m 以上的高山及海洋外, 不同的生态系统中均有苔藓植物的足迹^[2]。由于分布广, 生境多样化以及对恶劣环境的特殊适应机制, 多数的苔藓植物能产生特别丰富的次生代谢物质, 所以苔藓植物被认为是生物活性物质的源泉^[3]。在民间, 苔藓植物被广泛用于治疗创伤、烧伤、感染、肺结核、神

经衰弱、惊厥、烫伤和肺炎等症, 而几乎所有的苔藓植物都不被动物采食, 也不受细菌、真菌或病毒感染, 这些表明苔藓植物中存在着某些活性物质^[4], 有可能成为药用植物资源, 造福人类。然而, 由于苔藓植物形体小, 混杂丛生, 种间不易区别和分离, 难以采集足够量的样品进行研究和工业化应用, 导致苔藓植物的研究开发滞后, 因此苔藓植物还未能作为药用植物而广泛应用。对苔藓植物进行组织培养, 可以在相对较短的时间内, 获得大量单一种

收稿日期: 2011-03-25 接受日期: 2011-07-21

作者简介: 李育中(1985 ~), 男, 硕士, 主要从事动物细胞培养和植物应用研究, email: bjbslyz@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, email: chensuiyun97@gmail.com

类的材料,为苔藓植物的应用研究奠定基础。

另一方面,对于苔藓植物的外部形态解剖结构是其重要的分类学特征,但苔藓植物的孢子萌发和原丝体发育特征、规律与经典分类不谋而合^[5]。1983 年 Nehira 系统总结了苔纲、藓纲、角苔纲的孢子萌发和原丝体发育的类型^[6]。然而迄今为止,对苔藓植物的孢子萌发和原丝体发育研究较少^[7]。本文选取双色真藓(*Bryum dichotomum* Hedw.)为材料,对其孢子发育过程和愈伤组织的诱导进行研究,探讨其孢子萌发和原丝体发育特征,筛选适宜的诱导愈伤组织的条件,为进一步研究和开发利用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料和培养条件

双色真藓(*Bryum dichotomum* Hedw.)于 2005 年 9 月采自云南省澄江县抚仙湖附近山坡光照充足的岩面薄土上。基本培养基采用改良的 MS 培养基^[8],即 MS + 2.0 mg L⁻¹ 硅酸钠。孢子萌发及原丝体生长培养基为基本培养基 + 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D; 愈伤组织诱导培养基为基本培养基 + 3.0 mg L⁻¹ 6-BA; 愈伤组织悬浮培养基为基本培养基(不含琼脂) + 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1.0 mg L⁻¹ 6-BA。所有培养基均添加 2.0% 的蔗糖和 5.5% 的琼脂, pH 5.8, 培养条件均为温度(25 ± 2)℃, 光照强度 100 μmol m⁻² s⁻¹, 光照时间 14 h d⁻¹。

1.2 孢子培养和发育观察

挑选双色真藓成熟饱满的孢蒴,剪断蒴柄用清水洗净表面,用 75% 的酒精短暂浸泡孢蒴。在无菌条件下,用 0.2% 的氯化汞 + 1.0% 洗涤剂进行表面消毒 2.0 min 后,再用无菌水浸泡清洗孢蒴 4 次。用无菌镊子固定蒴柄,以无菌眼科剪刀横向切断孢蒴顶部,将内部的孢子散入适量的蒸馏水中,制成孢子悬液。然后用微量移液器将稀释后的孢子悬液接种在基本培养基 + 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D 的培养基表面,轻轻晃动培养皿,使孢子均匀散布。每天定时镜检孢子的萌发情况,接种后的第 1 周,每 12 h 观察 1 次,以后每 24 h 观察 1 次,同时进行显微照相。

1.3 愈伤组织诱导和培养

将由孢子萌发而来的原丝体转移到基本培养基 + 3.0 mg L⁻¹ 6-BA 的培养基上诱导培养 3 周,可

获得嫩绿的愈伤组织。挑选嫩绿、颗粒松散、体积约 2 ~ 4 mm³ 的愈伤组织块分别接种到添加 6-BA (0.5、1.0、3.0 mg L⁻¹)、2,4-D (0.5、1.0、2.0 mg L⁻¹) 和 NAA (0.5、1.0 mg L⁻¹) 的基本培养基上培养,每个浓度 5 个重复。

以苔藓愈伤组织每周的鲜重增长率为指标,考察愈伤组织的生长状况,增长率 = [(培养后的鲜重 - 原来的鲜重) / 原来的鲜重] × 100%, 同时统计愈伤组织的褐化率和分化率。

1.4 愈伤组织悬浮培养

用镊子轻轻夹取 1.6 g 继代 2 次以上、生长旺盛、结构疏松的双色真藓愈伤组织,放入装有 100 mL 悬浮培养基的 250 mL 三角瓶中,接种 15 瓶,轻微振荡制成单细胞悬浮液,在 100 ~ 110 r min⁻¹ 的摇床上培养。培养温度为 24℃ ~ 27℃,光源为漫射光,光强为 100 μmol m⁻² s⁻¹。每隔 7 d 取 3 瓶测定 pH 值,然后用布氏漏斗抽滤称取细胞鲜重。

1.5 统计学分析

统计分析采用 SPSS11.5 软件处理,结果用平均值 ± 标准差 (Mean ± SD) 表示; 组间差异使用 One-Way Anova 分析,方差齐时用 LSD 检验, 方差不齐时用 Tamhane's 检验; 当 $P < 0.05$ 时,表示差异显著, $P < 0.01$ 时,表示差异极显著。

2 结果

2.1 发育过程

双色真藓的孢子为较规则球形,黄绿色,不透明,表面无明显疣,内含油滴,为单细胞型孢子。孢子在固体培养基上可以直接萌发,时间约 4 h 到 2 d 不等。双色真藓孢子萌发有明显的极向,一般为单极(图 1A, B),少部分有双极。原丝体上形成多级侧枝,分生侧枝叶绿体逐渐减少(图 1C, D),细胞团聚加粗,特化成轴丝体(图 1E)。轴丝体向光生长,并生长出初生假根。当双色真藓的原丝体发育 20 d 时,在绿丝体分枝的基部或轴丝体上开始分化产生多个叶绿体含量少且顶端膨大的细胞,此即配子体原始细胞,其膨大的顶端细胞主要通过 3 个分裂面不断进行分裂,从而形成桑椹状的幼小芽体(图 1F); 芽体的顶端细胞中含有大量叶绿体,且伸向培养基外侧。同时幼小芽体的基部有大量无色假根生成,桑椹状芽体的顶部细胞进行多方向分裂,形成分生细胞团。分生细胞团再连续分裂即形成

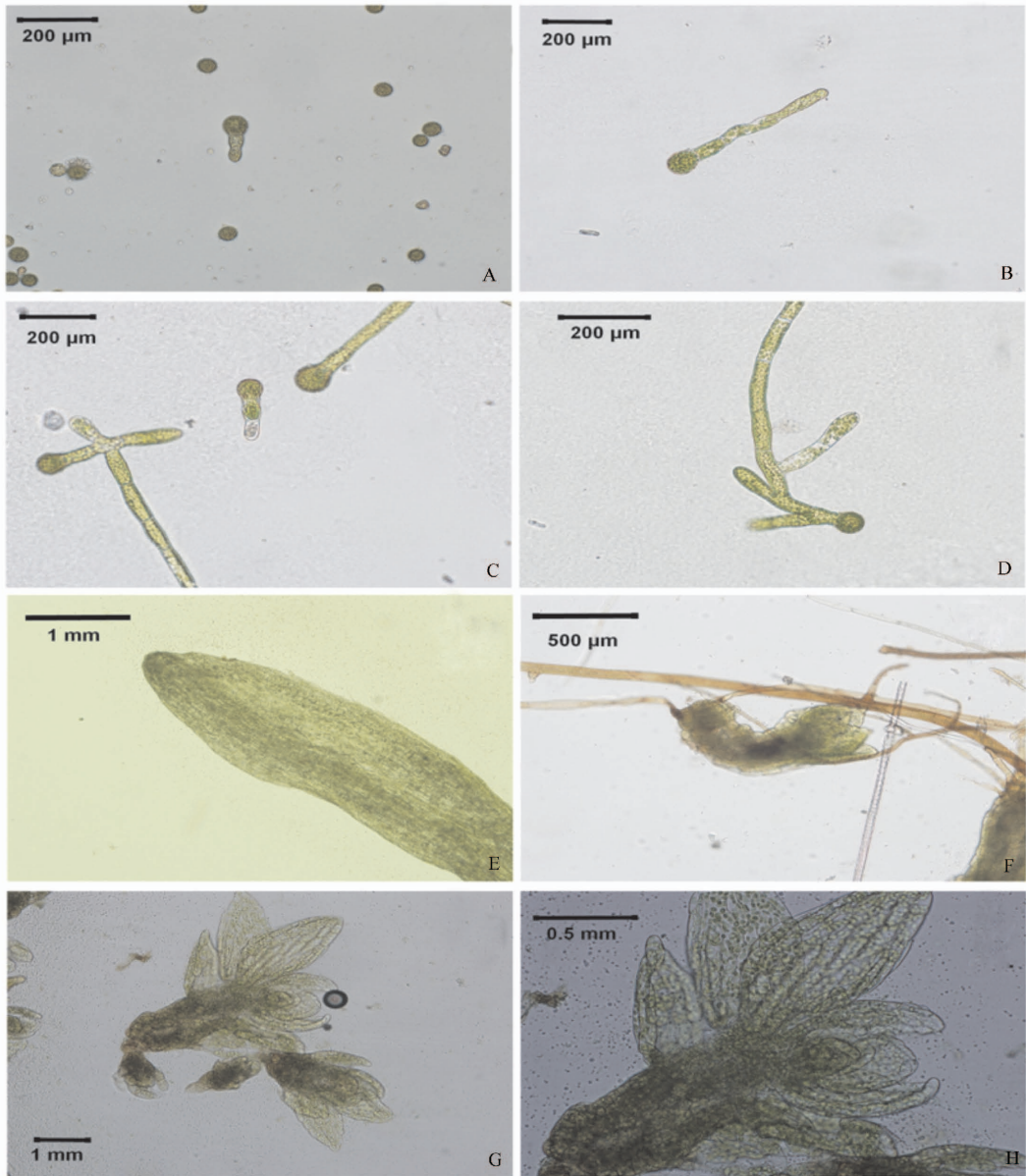


图 1 双色真藓的孢子萌发和原丝体的发育。A:孢子萌发;B~D:原丝体生长;E:绿丝体;F:茎叶体发生及假根出现;G~H:配子体形成。
Fig. 1 Spore germination and protonema development of *Bryum dichotomum*. A: Spore germination; B~D: Growth of protonema; E: Caulonemata; F: Cormus and rhizoids appear; G-H: Gametophyte form.

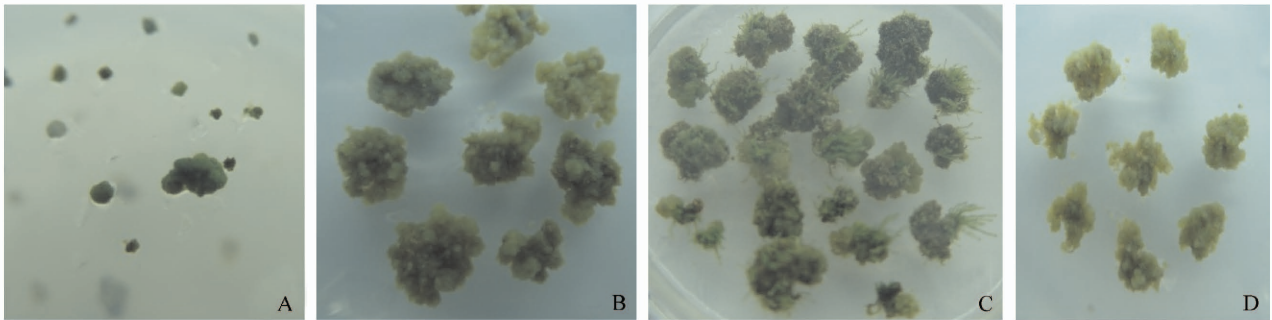


图 2 植物生长调节剂对双色真藓愈伤组织生长的影响。A:初次诱导;B:1.0 mg L⁻¹ 2,4-D+1.0 mg L⁻¹ 6-BA;C:3.0 mg L⁻¹ 6-BA;D:1.0 mg L⁻¹ 2,4-D。
Fig. 2 Effects of plant growth regulators on callus growth of *Bryum dichotomum*. A: Calli induced from protonema; B: 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 1.0 mg L⁻¹ 6-BA; C: 3.0 mg L⁻¹ 6-BA; D: 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D.

几个细胞的叶状体,叶状体继续生长形成幼叶,并伸向培养基外侧。培养 30 d 时,由 5~8 个幼叶构成的配子体已见雏形(图 1G,H)。

2.2 不同植物生长调节剂对愈伤组织的影响

从表 1 可见,培养基添加植物生长调节剂与否,愈伤组织均能生长,但生长速率有明显差别;在含有植物生长调节剂的培养基上其鲜重增长率明显较高。在仅含 6-BA 的培养基中,愈伤组织发生明显的分化,褐化率也较高(图 2C);而在

仅含 2,4-D 的培养基中,愈伤组织基本不分化,且褐化率低(图 2D);但其鲜重增长率在仅含 6-BA 的培养基比仅含 2,4-D 的明显较高。当在含 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D 和 1.0 mg L⁻¹ 6-BA 的培养基中(图 2B),愈伤组织分化率和褐化率最低,且鲜重增长率最高,培养 14 d 的增长率达 482%。因此,该培养基比较适合愈伤组织的继代培养,现已成功继代 100 多代。

表 1 植物生长调节剂对双色真藓愈伤组织生长的影响
Table 1 Effects of plant growth regulators on callus growth of *Bryum dichotomum*

植物生长调节剂 (mg L ⁻¹) Plant growth regulators	增长率(%) Increase rate	分化率(%) Differentiation rate	褐化率(%) Brown rate
0	154 ± 11 hF	56	10
2,4-D(0.5)	179 ± 12 gF	0	5
2,4-D(1.0)	177 ± 10 gF	0	5
2,4-D(2.0)	184 ± 13 gF	0	5
6-BA(0.5)	211 ± 12 fE	55	20
6-BA(1.0)	273 ± 15 eD	65	20
6-BA(3.0)	340 ± 13 cB	75	20
2,4-D(0.5) + 6-BA(0.5)	260 ± 12 eD	30	10
2,4-D(1.0) + 6-BA(0.5)	311 ± 11 dC	15	10
2,4-D(0.5) + 6-BA(1.0)	357 ± 12 bB	5	15
2,4-D(1.0) + 6-BA(1.0)	482 ± 16 aA	0	5

n = 5; 数据后不同小写和大写字母分别表示差异显著(*P* < 0.05)和极显著(*P* < 0.01)。
n = 5. Data followed different small and capital letters indicate significant difference at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

2.3 愈伤组织悬浮培养体系的建立

在悬浮培养体系中,双色真藓愈伤组织生长状态良好。从图 3 可以看出,悬浮培养过程中,愈伤组织的生长量随着时间的延长而增加,在 7 d 左右达到接种重量的 1 倍;而在 28 d 达到最大值,为接种鲜重的 9.25 倍。但是,随着愈伤组织细胞的生长,培养基的 pH 值不断下降,在培养 35 d 时,培养基的 pH 值只有 2.6,这可能是在悬浮培养条件下有酸性次生代谢物质生成所造成的。可见,培养的 0~7 d,细胞分裂慢,生长迟缓,是生长的延迟期;7~21 d 生长速度最快,细胞鲜重迅速增加,为指数增长期;而 21 d 以后,生长速度增长缓慢,到 28 d 后生长速度开始下降直至生长完全停止。所以,悬浮培养的细胞必须在 21~28 d 之间进行继代,以保持其旺盛的分裂能力和细胞活性。

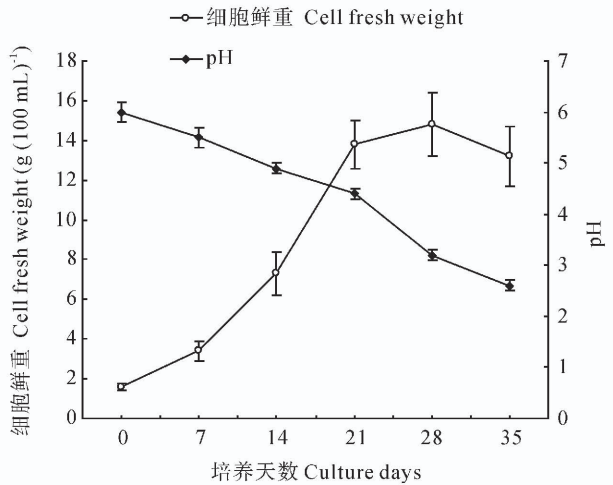


图 3 双色真藓愈伤组织悬浮培养生长曲线和培养基 pH 值的变化
Fig. 3 Growth curve of *Bryum dichotomum* callus and changes in pH of medium under suspension culture

3 讨论

本实验观察表明,双色真藓的原丝体发育特征为外生孢子萌发类型;孢子萌发多为一至两极,能直接发育成绿丝体;轴丝体仅在绿丝体上产生;假根的产生方式主要有两种:绿丝体直接分枝产生或其顶端膨大细胞特化形成;配子体原始细胞产生于绿丝体分枝的基部或轴丝体上。根据原丝体的发育特点,并参照 Nishida^[5]对藓类植物孢子萌发类型的划分,双色真藓应属于真藓型孢子萌发型(*Bryum*-type)。除了真藓科植物外,还有一些非真藓科植物也属于真藓型孢子萌发型。因此,对藓类植物的原丝体发育特征进行研究,可为探讨藓类植物类群间的亲缘关系及其系统地位提供一定的佐证。

植物生长调节剂在植物培养中扮演着很重要的角色,且对植物不同生长阶段的作用明显不同。本文对双色真藓的培养结果表明,双色真藓的孢子可以在含 2.0 mg L^{-1} 2,4-D 的基本培养基上直接萌发,且倾向于保持原丝体生长状态,原丝体发生分化的时间较长,个体较少,有利于对原丝体阶段的研究。原丝体在含 3.0 mg L^{-1} 6-BA 的基本培养基上可诱导产生愈伤组织。这说明植物生长调节剂 6-BA 是诱导双色真藓愈伤组织所必须的,但对于不同的苔藓植物所需剂量不同,魏华等用 $1.0\sim1.5\text{ mg L}^{-1}$ 的 6-BA 从尖叶拟船叶藓(*Dolichomitriopsis diversiformis*)原丝体中诱导出愈伤组织^[9]。

苔藓植物的细胞悬浮培养始于 20 世纪 70、80 年代,利用植物悬浮培养技术可以获得大量的细胞次生代谢物质,有的已经利用生物反应器大规模生产苔藓植物的次生代谢物质^[10]。本文的研究结果表明,双色真藓的愈伤组织在悬浮培养条件下生长

良好,增殖迅速,这为双色真藓的进一步开发应用奠定了基础。

致谢 感谢中国科学院昆明植物研究所黎兴江研究员在苔藓鉴定方面给予的帮助!

参考文献

[1] Gao Y C(高永超), Sha W(沙伟), Zhang H(张晗). Tissue culture of bryophytes [J]. Plant Physiol Commun(植物生理学通讯), 2002, 38(6): 607-610.(in Chinese)

[2] 吴鹏程. 苔藓植物生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 1-20.

[3] Cove D, Bezanilla M, Harries P, et al. Mosses as model systems for the study of metabolism and development [J]. Annu Rev Plant Biol, 2006, 57(1): 497-520.

[4] Zinsmeister H D, Becker H, Eicher T. Bryophytes, a source of biologically active, naturally occurring material [J]. Angewandte Chemie: Inter Edit Eng, 1991, 30(2): 130-147.

[5] Nishida Y. Studies on the sporeling types in mosses [J]. J Hatt Bot Lab, 1978, 44: 371-454.

[6] Nehira K. Spore germination, protonema development and sporeling development [C]// Schuster R M. New Manual of Bryology. Nichinan: The Hattori Botanical Laboratory, 1983: 343-379.

[7] Zhao J C(赵建成), Li X Q(李秀芹), Zhang H Z(张慧中). A preliminary study on spore germination and protonema development of ten species of mosses [J]. Arid Zone Res(干旱区研究), 2002, 19(1): 32-38.(in Chinese)

[8] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J]. Physiol Plant, 1962, 15(3): 473-497.

[9] Wei H(魏华), Li J(李菁), Chen J(陈军), et al. Primary study on the callus induction of *Dolichomitriopsis diversiformis* [J]. J Jishou Univ (Nat Sci)(吉首大学学报: 自然科学版), 2008, 29(1): 87-89.(in Chinese)

[10] Hohe A, Reski R. From axenic spore germination to molecular farming: One century of bryophyte *in vitro* culture [J]. Plant Cell Rep, 2005, 23(8): 513-521.