

# 梨蒴珠藓愈伤组织诱导和配子体再生研究

付素静<sup>1,2</sup>, 方炎明<sup>2\*</sup>, 张启香<sup>3</sup>

(1. 贵州省铜仁学院 生化系, 贵州 铜仁 554300; 2. 南京林业大学 森林资源与环境学院, 南京 210037; 3. 浙江林学院 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300)

**摘要:** 以梨蒴珠藓无菌藓株为外植体诱导愈伤组织和配子体再生, 接种于含不同激素组合的 MS 和 Knop 固体培养基上, 分别进行愈伤组织和不定芽的分化, 并探讨愈伤组织诱导和配子体再生的适宜培养条件。结果显示, 愈伤组织诱导的最佳培养基是 MS+0.5 mg/L BA+0.1 mg/L 2,4-D, 愈伤组织诱导率为 33.3%; 不定芽诱导的最佳培养基是 MS+1.0 mg/L BA, 增殖系数为 10.0; 不含激素的基本培养基有利于配子体的再生。该研究旨在筛选出梨蒴珠藓愈伤组织的诱导体系, 并为其在系统分类上提供参考依据。

**关键词:** 梨蒴珠藓; 组织培养; 愈伤组织; 配子体再生

**中图分类号:** Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)03-0403-04

## Studies on callus induction and gametophyte regeneration of *Bartramia pomiciformis*

FU Su-Jing<sup>1,2</sup>, FANG Yan-Ming<sup>2\*</sup>, ZHANG Qi-Xiang<sup>3</sup>

(1. Department of Biology and Chemistry, Tongren University, Tongren 554300, China; 2. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 3. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, China)

**Abstract:** This research was conducted to select a suitable culture system for the callus induction and gametophyte regeneration of *Bartramia pomiciformis*. And axenic mosses were inoculated on MS and Knop solid media with different hormone combinations for callus and buds induction and differentiation. The result showed that MS medium containing 0.5 mg/L BA, 0.1 mg/L 2,4-D was optimal for callus induction, with the induction rate of 33.3%. Optimal medium for inducing gametophyte is MS+1.0 mg/L BA, and the achieved multiplication coefficient was 10.0. And Knop with no hormone was as well as MS in generation of gametophyte. This investigation could provide some important references for callus induction and systematics of *B. pomiciformis*.

**Key words:** *Bartramia pomiciformis*; *in vitro* culture; callus; gametophyte regeneration

梨蒴珠藓(*Bartramia pomiciformis*)属于珠藓科(Bartramiaceae)珠藓属(*Bartramia*)。植物体密集丛生于落叶松林、白桦-落叶松混交林下阴湿土壤、非石灰质的潮湿岩面和腐木上,多见于高山和森林的潮湿郁闭处。分布在我国黑龙江、吉林、辽宁、新疆等地区,蒙古、日本、朝鲜、俄罗斯(远东、西伯利亚)、欧洲、非洲、北美洲、南美洲、新西兰也有分布。

梨蒴珠藓具有很高的药用价值,全草药用,含有三黄酮类化合物,对淋巴细胞白血病(代朝霞等,2000)、神经胶质细胞瘤(吴玉环等,2004)等有抑制作用。

藓类植物愈伤组织的成功也较其他高等植物少,从1960年Ward首次诱导了金发藓(*Polytrichum commune*)和仙鹤藓(*Atrichum undulatum*)原丝体愈伤组织开始,迄今有50多种苔藓获得了愈伤

收稿日期: 2010-10-16 修回日期: 2011-03-28

作者简介: 付素静(1980-),女(土家族),贵州思南人,硕士,讲师,主要从事植物发育生物学研究。

\*通讯作者: 方炎明,博士,教授,博士生导师,研究方向为植物学,(E-mail)jwu4@njfu.com.cn.

组织。不管是苔类还是藓类,每种材料的愈伤组织诱导所需要的培养基和添加的激素都不同,因此,每种材料愈伤组织诱导都需要经过大量的摸索实验。国内对藓类植物的组织培养研究较晚、较少,这与我国丰富的苔藓资源(吴鹏程,1998)极不相称,目前国内藓类植物愈伤组织的成功诱导仅小立碗藓(潘一廷等,2005;陈静文等,2006)、牛角藓(高永超等,2003)、仙鹤藓(刚永运等,2003)有报道。本实验通过对梨蒴珠藓进行组织培养,摸索藓类植物组织培养方法,为苔藓植物科学科研提供依据。就梨蒴珠藓而言,尚未有其组织培养和生物发育学的相关报道,作为珠藓科的一个重要种,本文的相关研究结果将为本种植物在系统分类上提供参考依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

梨蒴珠藓于2004年7月采自吉林长白山,采集带有孢蒴的完整藓株,装入信封中带回后孢蒴低温保存直至实验。实验所用试剂BA、NAA、2,4-D均购自上海生工。

### 1.2 方法

选择健壮、饱满的梨蒴珠藓的孢子体置于流水

下冲洗2 h,然后转移到蒸馏水中浸泡待实验。等待实验就绪后把准备好的梨蒴珠藓孢子体先在滤纸上吸干水分,然后放入70%酒精中浸泡30~60 s,用无菌水冲洗2~3次,用0.1%的升汞对其进行表面消毒,消毒时间2 min,然后用无菌水反复冲洗,置于无菌滤纸上吸干备用。将梨蒴珠藓孢蒴消毒后,用灭过菌的解剖针将孢子囊挑破,让孢蒴内的无菌孢子释放出来,用适量的无菌水稀释,制成孢子悬浮液。用10  $\mu$ L的移液枪将孢子悬浮液均匀滴到约10 mL Knop 固体平板培养基上培养原丝体,用封口膜封口后水平晃动培养皿,使培养皿内的孢子悬浮液滴分散在培养基表面。培养40 d后得到无菌藓株。把培养得到的无菌藓株接种到添加了不同浓度的BA、NAA、2,4-D的愈伤组织诱导培养基中,每处理重复3次,具体实验设计见表1。把诱导所得愈伤组织或藓株分别接种到配子体再生培养基中,每处理重复10次,具体实验设计见表2。使用Olympus光学显微镜观察并拍照。

### 1.3 培养条件

蔗糖浓度4%;琼脂浓度0.65%;pH5.8;温度25  $^{\circ}$ C;光源为日光灯,12 hpd,光照强度1 500~2 000 lx(Duckett等,2004;高永超等,2002;Ono等,1987;Marko等,2003)。

表1 不同激素对梨蒴珠藓愈伤组织和芽诱导的影响

Table 1 Effects of different phytohormones on callus of *B. pomiformis*

编号 No.	培养基成分 Medium (mg/L)	生长情况 Growth	芽增殖系数/生长质量 Multiplication coefficient/quality	愈伤组织诱导率/生长质量 Frequency of callus induction/quality
1	MS	原株周围有许多细小芽	12.0/+	—
2	MS+BA0.5	有突起,有芽,突起块较大	5.0/++	—
3	MS+BA1.0	基部周围出现许多小芽	10.0/+++	—
4	MS+BA2.0	藓株底部结块,颜色变黑	—	—
5	MS+BA0.5+2,4-D 0.1	边缘有许多大突起包被	—	—
6	MS+BA0.5+2,4-D 0.5	边缘有颗粒突起,出现愈伤组织	—	33.3%/++
7	MS+BA0.5+2,4-D 1.0	有少量突起,整块色深,有愈伤组织出现	—	25.0%/+
8	MS+BA0.5+NAA 0.05	外植体周围有少量小芽	3.0/+++	—
9	MS+BA0.1+NAA0.1	外植体周围有少量小芽	3.6/+++	—

注:—无;+生长量小,生长势不明显;++生长量较大,生长势明显。下同。Note:— Nonexistence; + A few and growth potential is not obvious; ++ Many and growth potential is obvious; +++ Most and growth potential is obvious. The same below.

## 2 结果和分析

### 2.1 不同激素对梨蒴珠藓愈伤组织和芽诱导的影响

将培养得到的无菌藓株接种到添加了不同浓度BA、NAA、2,4-D的愈伤组织诱导培养基中,20 d

后,观察和统计实验结果(表1)。在添加了0.5 mg/L BA的2号培养基中,外植体周围有突起出现,经过镜检发现是高密度的芽体,有的已经有叶片分化出来(图版I:1,4)。当BA浓度升至2 mg/L时,接入的外植体周围没有突起出现,而与培养基接触处出现结块现象,颜色逐渐变黑,但并未死亡;在复

合了不同浓度 2,4-D 的培养基上,外植体的边缘都有颗粒状突起即愈伤组织发生,以 BA 0.5 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L 组合效果最好(图版 I :2),这种颗粒状的愈伤组织疏松易碎,经过镜检观察发现其由

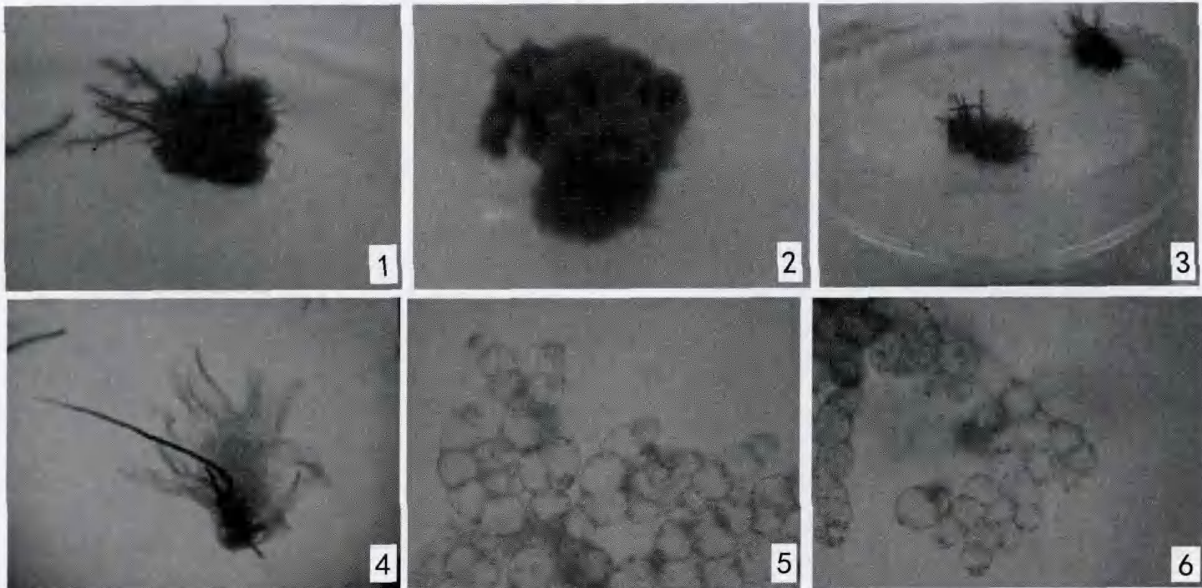
大型绿色薄壁细胞组成(图版 I :5,6),与原丝体细胞形态完全不同;当在 BA 中复合 NAA 时,外植体周围没有颗粒状突起,而是在周围有少量芽出现;当培养基中不附加任何激素时,外植体周围有许多细

表 2 不同培养基对梨蒴珠藓配子体再生的影响

Table 2 Effects of different media on regeneration of *B. pomiformis*

培养基编号 No.	培养基成分 Component of Medium	外植体来源 Resource of Explants	生长情况 Growth	芽增长情况/生长质量 Multiplication coefficient/quality	愈伤组织生长情况 Frequency of callus induction
10	Knop	愈伤组织块	有大量芽在愈伤组织上形成	+++/*	—
11	MS	愈伤组织块	有少量芽在愈伤组织上形成	+/***	—
12	Knop	无菌藓株	外植体周围长一圈小芽形成圆垫,芽较少	++/*	—
13	MS	无菌藓株	外植体周围长一圈小芽形成圆垫,芽小且密	++/**	—
14	MS+BA0.5	愈伤组织块	突起块增大,芽也增多	+++/***	—
15	MS+BA1	愈伤组织块	基部周围出现许多小芽,愈伤组织上也长出芽	++/**	—

注:—不生长;+生长量小,生长势不明显;++生长量较大,生长势明显;+++生长量大,生长势明显; \*芽细小; \*\*芽小但健壮; \*\*\*芽粗壮。



图版 I 1,4. 梨蒴珠藓在 MS+BA 0.5 mg/L 上长出突起(4. 突起放大 100×); 2,5,6. 梨蒴珠藓在培养基 MS+BA 0.5 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L 中长出愈伤组织(5,6. 愈伤组织细胞 400×); 3. 不含激素的 MS 培养出一周细小而密的芽。

Plate I 1,4. protuberance on MS+BA0.5mg/L of *B. pomiformis*(4. the protuberance consists of buds 100×); 2,5,6. calli on MS+BA 0.5 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L(5,6. cells of calli 400×); 3. little buds form a circle around on MS.

小芽体出现。

## 2.2 不同培养基对梨蒴珠藓配子体再生的影响

在无菌条件下,把梨蒴珠藓诱导所得愈伤组织分割成约 1 cm 大小的组织块或把已发育的配子体以 10 株为一单位,分别接种在不同培养基上,每瓶接种 3 个单位,每处理接种 10 瓶,约 20 d 观察各培养瓶中的变化(表 2)。

无菌藓株接入到没有激素添加的 12 号、13 号培养基中,在外植体的周围长出一圈密而小的芽,形

成直径约为 1.5 cm 的圆盘(图版 I :3),而且随着培养时间的增加,圆盘直径逐渐增大。就芽的数量而言,两种培养基之间没有很大的区别,但 MS 培养出的芽更粗壮。

把诱导所得愈伤组织分别接入到 10、11、14、15 号培养基中,结果显示,在 10、11、15 号培养基中突起不增大,但有小芽从颗粒状的愈伤组织边缘和中间长出,10 号培养基中小芽数量较多;在 14 号培养基中,突起逐渐增大,并且芽也增多,但增大的突起

并非愈伤组织而是密度很大的芽体;在15号培养基中,接入的组织块周围和中间都长出很多小芽。

用愈伤组织块作为外植体诱导配子体的再生,用不含激素的Knop培养基最好,以无菌藓株作为外植体来源的,用不含激素的MS培养基可以诱导出较壮的梨蒴珠藓芽体。

### 3 讨论

#### 3.1 不同激素对梨蒴珠藓愈伤组织和芽诱导的影响

目前,维管植物胚性愈伤组织诱导及其再生的研究已取得了较大成功,但苔藓植物相关方面的研究则刚刚开始(高永超等,2002)。

以梨蒴珠藓无菌藓株为外植体进行愈伤组织诱导的过程中,在复合了不同浓度2,4-D的培养基上,外植体的边缘都有颗粒状愈伤组织形成,以BA 0.5 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L组合效果最好,而在未添加2,4-D,仅添加有BA的培养基上,藓株外植体没有愈伤组织形成。这表明在愈伤组织诱导过程中,梨蒴珠藓与其它高等植物的激素使用相类似,2,4-D在此过程中起非常重要的作用。梨蒴珠藓愈伤组织成功诱导的激素组合与多数被子植物相似,都添加了BA和2,4-D,仅在浓度上有所差别。高永超等(2003)认为2,4-D和GA<sub>3</sub>对牛角藓愈伤组织的诱导作用十分明显,而BA对其起抑制作用;相反,陈静文等(2006)则认为低浓度(0.05 mg/L)的细胞分裂素类物质BA或者KT能诱导小立碗藓愈伤组织的发生,生长素类物质2,4-D和IAA能使愈伤组织停止脱分化产生新的植株;仙鹤藓及仙鹤藓小型变种(吴玉环等,2004)、小立碗藓(潘一廷等,2005)愈伤组织的成功诱导采用的培养基为:BCD+4%葡萄糖+1mg/L 6-BA,而2,4-D会抑制芽的发生。以上结果表明,藓类愈伤组织诱导的激素组合各不相同,进一步说明了藓类植物的种间差异比较大(高永超等,2002)。

#### 3.2 不同培养基对梨蒴珠藓配子体再生的影响

从再分化来看,梨蒴珠藓愈伤组织的再分化相当容易,甚至不用激素诱导,把愈伤组织接种到不含激素的基本培养基上就可以直接分化出藓株,这与李文安(1990)和陈静文等(2006)的结果基本一致,

虽然分化比较容易但需要20 d左右,这比藓类植物在自然界的正常生长速度要慢。如果诱导再分化的激素配比合适,再分化的时间一定会缩短,这需要进一步的探索。

#### 参考文献:

- 吴鹏程. 1998. 苔藓植物生物学[M]. 北京: 科学出版社: 35-37
- Chen JW(陈静文), Cao T(曹同), Shi DJ(施定基). 2006. The effect of plant hormones to calli inducement and differentiation of *Physcomitrella patens* (植物激素对小立碗藓愈伤组织诱导和分化影响)[J]. *J Shanghai Normal Univ; Nat Sci* (上海师范大学学报·自然科学版), **35**(4): 70-74
- Duckett JG, Burch J, Fletcher PW, et al. 2004. *In vitro* cultivation of bryophytes: a review of practicalities, problem, progress and promise[J]. *J Bryol*, **26**: 3-20
- Gang YY(刚永运), Du GS(杜桂森), Shi DJ(施定基), et al. 2003. Establishment of *in vitro* regeneration system of the *Atrichum* mosses(仙鹤藓属藓类植物组织培养再生体系的建立)[J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), **45**(12): 1475-1480
- Gao YC(高永超), Sha W(沙伟), Zhang H(张晗). 2002. Tissue culture of bryophytes(苔藓植物的组织培养)[J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), **38**(6): 607-610
- Gao YC(高永超), Sha W(沙伟), Zhang H(张晗). 2003. Effects of different plant growth substances on callus induction of *Cratoneuron filicinum*(不同植物生长物质对牛角藓愈伤组织诱导的影响)[J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), **39**(1): 29-32
- Li WA(李文安). 1990. *In vitro* propagation, dedifferentiation and redifferentiation of *Marchantia polymorpha* (地钱在离体条件下的无性繁殖及脱分化与再分化的研究)[J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), **32**(11): 852-857
- Marko S, Aneta B, Ivana D. 2003. *In vitro* culture of mosses: *Aloina aloides*, *Brachythecium velutium*, *Ceratodon purpureus*, *Eurhynchium praelongum* and *Grimmia pulvinata* [J]. *Turk J Bot*, **27**: 441-446
- Ono K, Murasaki Y, Kawachi K. 1987. Establishment and characteristics of a cell suspension culture from a moss, *Atrichum undulatum* [J]. *Bot Mag Tokyo*, **100**: 217-221
- Pan YT(潘一廷), Shi DJ(施定基), Yang ML(杨明丽), et al. 2005. Callus induction and culture of *Physcomitrella patens* (小立碗藓愈伤组织诱导和培养)[J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), **41**(3): 293-296
- Wu YH(吴玉环), Yang HY(杨海英), Luo H(罗昊), et al. 2004. Resources of medicinal bryophytes in north-eastern China and their exploitation(东北地区药用苔藓植物资源及其开发利用前景)[J]. *Chin J Ecol* (生态学杂志), **23**(5): 218