

山墙藓组织培养条件研究

魏志颖, 沙伟, 张梅娟

(齐齐哈尔大学 生命科学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要:以山墙藓幼嫩茎尖为外植体,采用 $L_{12}(3 \times 2^4)$ 正交设计方法,对山墙藓配子体消毒方法及培养基类型进行了筛选;通过梯度设计研究不同浓度的蔗糖对配子体形态发生的影响,以建立有效的山墙藓(*Tortula ruralis*)组织培养快繁体系。结果表明:山墙藓配子体的最佳消毒方法为浓度 3% 的次氯酸钠溶液消毒 5 min 后,浓度 0.05% 的升汞溶液二次消毒 20 s, Beneck 培养基为最适消毒培养基;蔗糖对于山墙藓原丝体的形成和扩展生长均具促进作用,浓度为 30 g/L 时原丝体形成时间最早,扩展直径最大,但抑制了芽体的分化,浓度为 15 g/L 时对芽体分化具明显促进作用。

关键词:山墙藓;配子体;消毒方法;培养基;蔗糖浓度

中图分类号:Q 949.35⁺2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)18-0114-04

苔藓植物是从水生向陆生过渡的植物类群,在进化上比较低等,有着不同于其它高等植物的形态结构和生理特性,其中有些种类具有极强的抗旱能力。如旱藓(*Indusiella thianschanica* Broth)、山地紫萼藓(*Grimmia montana* Bruch)、细叶筛齿藓(*Schistidium liliputanum*)能够通过内部结构变化来应对干旱^[1]。丛藓(*Anoetangium compactum*)能够在干旱十几年后复水恢复正常生命活动^[2]。山墙藓(*Tortula ruralis*)甚至能够经受几十年的干旱而保持活力^[2]。

山墙藓属丛藓科(Pottiaceae)墙藓属(*Tortula*),植物体黄绿色,老时呈红棕色,疏丛生,高 5~8 cm;茎单一,基部多假根,钙土藓类;分布于温带及暖热带地区,多生于石灰岩及钙质土上,在我国内蒙古、贺兰山北麓、东北山沟林地上、灌丛下、阴湿的岩石和土坡上均有分布^[3]。

这种极度耐旱藓类具有强大的储水和旱后复苏能

力,能够加速生物土壤结皮形成,在干旱地区可以起到防风固沙和促进植被恢复与重建的作用,具有重要的生态应用价值。山墙藓的极度耐旱能力,早就引起研究者的特别关注,国外先后有很多学者对其进行多方面的研究。Mahan 等^[4]曾研究在山墙藓干旱和再水化过程中硝酸还原酶的活性。Proctor^[5]曾研究山墙藓在耐旱过程中其耐脱水性和恢复的模式。Wood 等^[6]研究指出,山墙藓在干旱胁迫过程中的转译调控为应对干旱山墙藓配子体内形成 mRNPs;Wood 等^[7]又指出为应对干旱和再水合反应,山墙藓有一种特殊的转录调节基因:聚腺苷酸化信号存在于 cDNA3' 末端;Oliver 等^[8]曾对山墙藓作环境干旱胁迫耐受性的研究。Charron 等^[9]曾研究山墙藓在脱水和再水合过程中的细胞和分子反应。Tamas 等^[10]还曾用山墙藓作为生物指示调查布达佩斯的 2 种重金属污染情况。随着研究的不断进行,山墙藓已经成为研究干旱胁迫诱导细胞反应过程的模式植物^[11],并通过其已建立的表达序列文库识别、确定了大量新的植物基因^[12]。

山墙藓在植物耐旱机理研究、植物耐旱基因调控及细胞修复机制揭示和生态功能方面的研究越来越受关注,目前已达分子水平,但迄今为止,研究者所用材料均

第一作者简介:魏志颖(1983-),女,硕士研究生,研究方向为苔藓植物生物学。E-mail:wzy19830515@163.com.

责任作者:沙伟(1963-),女,博士,教授,博士生导师,研究方向为苔藓植物遗传学和分子生物学。E-mail:shw1129@263.net.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31070180;31270254)。

收稿日期:2014-05-05

Abstract: Taking fine ornamental lily of Conca D'or as test material, tissue culture with its bulbus was studied. The results showed that the best sterilization modes and time were 75% ethanol 30 s + 0.1% HgCl₂ 15 minutes, the contamination rate was 30.00%. The best combination of medium and hormone was MS+0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA, the average induced buds number was 5.87, and the average adventitious bud number was 2.87, the inside of the downward was the best ways of place on medium.

Keywords: ornamental lily; Conca D'or; tissue culture

为野生材料,这不可避免的会因材料的遗传背景差异而造成研究结果的不同程度的偏差,且野外采集受时间限制,也很难保证采集的数量。利用组织培养技术可以解决这一问题,获得大量的、纯净的材料。该研究以山墙藓配子体为试材,对其消毒方法、接种培养基类型和适宜的蔗糖浓度进行了探索,以期建立成熟的配子体再生体系,为山墙藓的抗旱研究和生态保护、园林绿化等方面的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

山墙藓于 2012 年 10 月采自内蒙古赤峰市,凭证标本(T-20121007)保存于齐齐哈尔大学生命科学与农林学院标本馆。

1.2 试验方法

1.2.1 材料处理 将保存的材料充分复水,去除基质和杂藓,于流水下冲洗数小时,洗净后放在光照培养箱中进行培养。培养温度(23±1)℃、光照强度 47 μmol·m⁻²·s⁻¹、光照时间 12 h/d。培养一段时间后,选取长势良好的茎段,切取长度约 0.5 cm 的茎尖部分备用。

1.2.2 消毒 将备好的材料转至超净台上,先将外植体浸入次氯酸钠(NaClO)消毒剂中消毒,无菌水冲洗 3 遍,每次冲洗停留 30 s 以上,再将外植体浸入升汞(HgCl₂)消毒剂中二次消毒,无菌水冲洗 6 遍,每次冲洗停留 30 s 以上,然后将材料在无菌滤纸上吸干表面水分,接到 MS 和 Beneck 培养基上(培养基配方参照文献[13])。采用 L₁₂(3×2⁴)的正交设计筛选消毒剂浓度、消毒时间及接种培养基,按表 1 进行材料消毒,12 个处理,每个处理 10 瓶,每瓶接 2 个外植体,做 3 次重复,在光照培养箱中进行培养,培养温度(23±1)℃、光照强度 47 μmol·m⁻²·s⁻¹、光照时间 12 h/d,15 d 后统计污染情况。外植体的污染率、死亡率、成活率统计参照赖玉洁等^[14]的方法;污

表 1 山墙藓配子体消毒方法筛选的正交实验设计

Table 1 The orthogonal test design for the screening of the disinfection methods for *T. ruralis* gametophyte

编号 No.	NaClO /%	NaClO 消毒时间 Disinfection time/min	HgCl ₂ /%	HgCl ₂ 消毒时间 Disinfection time/s	培养基类型 Medium type
1	1	3	0.05	20	MS
2	1	3	0.05	10	Beneck
3	1	5	0.10	20	Beneck
4	1	5	0.10	10	MS
5	2	3	0.10	20	MS
6	2	3	0.10	10	Beneck
7	2	5	0.05	20	MS
8	2	5	0.05	10	Beneck
9	3	3	0.10	20	Beneck
10	3	3	0.05	10	MS
11	3	5	0.05	20	Beneck
12	3	5	0.10	10	MS

染率(%)=染菌外植体数/接种外植体数×100%;死亡率(%)=死亡外植体数/接种外植体数×100%;成活率(%)=未污染且存活外植体数/接种外植体数×100%。

1.2.3 蔗糖浓度筛选 为观察蔗糖浓度对山墙藓形态发生的影响,筛选出最佳消毒方法后,选取长势一致的成活外植体接种在 Beneck 培养基上,添加的蔗糖质量浓度分别为 0、15、30 g/L。接种后的材料在光照培养箱中进行培养,培养温度(23±1)℃、光照强度 3 000 lx、光照时间 12 h/d,每天观察记录,45 d 后统计结果。

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 20.0 软件进行处理分析。

2 结果与分析

2.1 山墙藓外植体消毒条件筛选

采用 L₁₂(3×2⁴)的正交设计筛选山墙藓的消毒方法,结果如表 2 所示,处理 3、5、9、11、12 的污染率都在 10%及以下,差异不显著,而与其它处理 1、2、4、6、8、10 之间差异显著;处理 2、11 的死亡率分别为 10%、0%,差异不显著,而与其它处理 1、3、4、5、7、9、10、12 之间差异显著;处理 11 的未染菌成活率显著高于其它各处理。由此可见,处理 11 的消毒效果最好,3% NaClO 消毒 5 min 后 0.05% HgCl₂ 二次消毒 20 s 是适合于山墙藓配子体消毒的最适方法,Beneck 培养基为最适消毒培养基(图 1)。

表 2 山墙藓配子体消毒方法筛选的结果

Table 2 The screening results of the disinfection methods for *T. ruralis* gametophyte

编号 No.	接种外植体数 Number of inoculated explant/个	污染率 Pollution rate /%	死亡率 Death rate /%	成活率 Survival rate /%
1	60	70.00 c	91.67 d	8.33 cd
2	60	96.67 d	10.00 ab	3.33 cd
3	60	3.33 a	68.33 c	3.33 cd
4	60	66.67 c	95.00 d	1.67 cd
5	60	0.00 a	100.00 d	0.00 d
6	60	70.00 c	18.33 b	26.67 b
7	60	18.33 b	95.00 d	5.00 cd
8	60	91.67 d	13.33 b	8.33 cd
9	60	0.00 a	90.00 d	10.00 c
10	60	93.33 d	93.33 d	6.67 cd
11	60	8.33 ab	0.00 a	85.00 a
12	60	10.00 ab	91.67 d	8.33 cd

注:不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

Note: Different lowercase letters show significant difference at 0.05 level.

2.2 蔗糖浓度对山墙藓形态发生的影响

从表 3 可以看出,蔗糖对山墙藓原丝体的形成和扩展生长均具促进作用。蔗糖浓度越高,原丝体形成的时间越早,原丝体扩展直径越大,它们之间存在正相关性。而在芽体个数上,B1 培养基上仅长出 1 个芽体,B2 培养基上长出 7 个芽体,B3 培养基上未见芽体,由

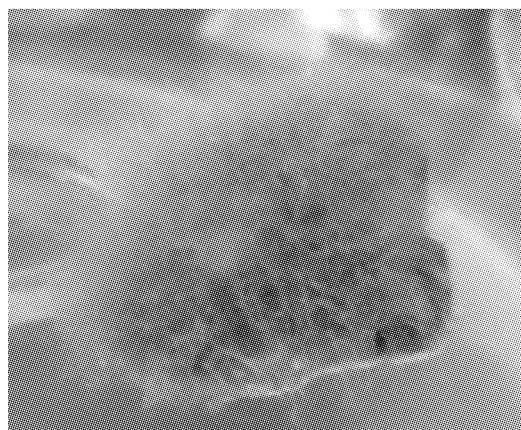


图1 山墙藓原丝体

Fig. 1 Protonema of *Tortula ruralis*

表3 蔗糖质量浓度对山墙藓生长的影响

Table 3 Effect of different sucrose concentrations on *T. ruralis* growth

编号 No.	蔗糖浓度 Sucrose concentration /(g · L ⁻¹)	原丝体形成时间 Time of protonema development/d	原丝体直径 Protonema diameter/cm	芽体个数 Number of bud/个
B1	0	23	0.56	1
B2	15	16	0.68	7
B3	30	12	0.85	0

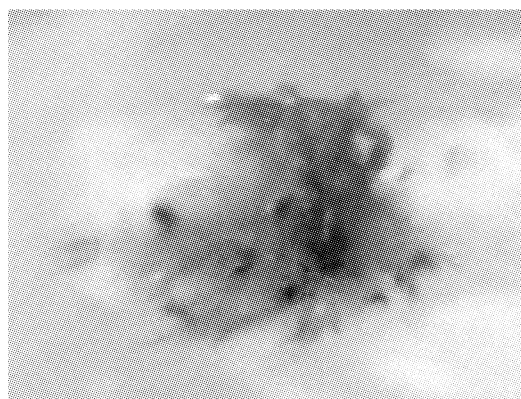


图2 长有芽体的原丝体

Fig. 2 Buds of protonema

此可见,15 g/L 的蔗糖能够促进芽体的形成(图2),30 g/L 的蔗糖抑制了芽体的形成。

3 结论与讨论

苔藓植物组织培养的关键是外植体的消毒,由于苔藓植物结构简单,组织培养材料在消毒时容易受到伤害,消毒剂种类和浓度的选择成为消毒是否取得良好效果的重要环节。有研究表明对苔藓植物消毒前进行培养或进行2次灭菌能增加成功的几率^[15]。该试验中所用材料为室温下干燥的材料,消毒之前进行了预培养,使之恢复正常的代谢功能,处理1个月左右的材料,茎尖部分和叶腋处长出1 cm左右的新生分枝,挑选其中

长势一致的用于消毒,以减少由于材料差异引起的染菌率、成活率的差异。消毒过程中,采取了 NaClO 消毒剂 and HgCl₂ 消毒剂进行2次灭菌。NaClO 的杀菌原理是其能够在水中形成次氯酸,作用菌体蛋白质,次氯酸不仅可与细胞壁作用,且因分子小,不带电荷,故侵入细胞内与蛋白质发生氧化作用或破坏其磷酸脱氢酶,使糖代谢失调而致细胞死亡;HgCl₂ 最主要的杀菌力所在是 Hg²⁺ 可与带负电荷的蛋白质结合,使细菌蛋白变性、酶失活^[16]。该试验进行了在山墙藓组织培养消毒过程中使用2种无机消毒剂的尝试,消毒效果比较理想,未染菌成活率达到85%。

培养基的种类对于组织培养试验至关重要。于传梅^[17]曾使用 1/2MS、MS、Beneck、Knop 对短月藓 (*Brachymenium nepalense*) 进行组织培养研究,结果表明复杂的 MS 和 1/2MS 培养基使萌发的孢子发生褐变,而简单的无机培养基 Knop 和 Beneck 促进孢子萌发,并能够在 50 d 左右生长出茎叶体。崔巍等^[18]曾使用 MS、Knop、Beneck 3 种培养基进行毛尖紫萼藓 (*Grimmia piliifera*) 的消毒试验,结果 MS 培养基使外植体发黑,返绿情况很差,Knop 和 Beneck 培养基上接种的材料返绿情况较好,但几天后接种于 Knop 培养基上的外植体逐渐死亡,只有 Beneck 培养基上的外植体生长情况较好。MS 是应用范围最广泛的培养基,在固体培养条件下培养愈伤组织、在液体培养条件下做细胞悬浮培养、还用在形态发生方面的研究,都得到了很好的效果,但对于苔藓植物一些种类的培养并不适用,而相对简单的无机培养基反而更适用。该试验中采用 MS 作为消毒培养基,外植体成活率都没达到 10%,可能是 MS 培养基中的营养物质浓度高,会使某些成分发生累积,产生抑制作用,而成分简单的无机培养基 Beneck 适合山墙藓的消毒培养。

蔗糖是植物组织培养过程中重要的碳源,是细胞生长的能量来源和构成细胞骨架的重要成分,并能够维持一定的渗透压^[19]。杭璐璐等^[20]曾研究不同质量浓度蔗糖对细叶小羽藓 (*Haplodium microphyllum*) 孢子萌发的影响,结果表明蔗糖质量浓度为 30 g/L 时孢子萌发率最高,当蔗糖质量浓度超过 40 g/L 时,孢子萌发受抑制。Aneta 等^[21]曾研究蔗糖和无机盐对仙鹤藓 (*Atrichum undulatum*) 形态发生方面的影响,结果表明当无机盐浓度相同且为低浓度时,蔗糖浓度对外植体的增殖效果具有显著作用。Ahmed 等^[22]曾在牛角藓 (*Cratoneuron filicinum*) 的组织培养过程中发现培养基中添加高质量浓度蔗糖对配子体的伸长生长和分枝生长具有负效应,低质量浓度的蔗糖具有促进作用。该试验中培养基中不添加蔗糖,由于细胞得不到足够的碳源而生长缓慢。培养基中添加蔗糖对原丝体的形成和扩展生长具有一定

的促进作用,30 g/L 蔗糖促进作用最明显,原丝体形成时间最早,原丝体扩展直径最大,但没有芽体形成,出现明显的基质抑制效应,其原因可能是因为在这种高渗透环境中细胞的活力受到抑制。而 15 g/L 蔗糖在原丝体形成和扩展生长方面具有一定的促进作用,在芽体的形成过程中促进作用则非常明显。从该试验中可以看出,山墙藓培养过程中蔗糖是不可缺少的成分,在不同的生长阶段对蔗糖的需要量不同,表现出营养阶段性。

参考文献

- [1] 王虹,阿不都拉·阿巴斯,赵建成.新疆三种旱生藓类植物的比较解剖学观察[J].干旱区研究,1999,16(4):28-31.
- [2] Bewley J D. The conservation of polyribosomes in the moss *Tortula ruralis* during total desiccation[J]. J Exp Bot,1972,23:642-698.
- [3] 高谦.中国苔藓志[M].北京:科学出版社,1996:253-255.
- [4] Mahan J R,Oliver M J,Sherman T D. Nitrate reductase activity during desiccation and rehydration of the desiccation-tolerant moss *Tortula ruralis* [J]. Environmental and Experimental Botany,1998,39:67-76.
- [5] Proctor M. Patterns of desiccation tolerance and recovery in bryophytes [J]. Plant Growth Regulation,2001,35:147-156.
- [6] Wood A J,Oliver M J. Translational control in plant stress; the formation of messenger ribonucleoprotein particles (mRNPs) in response to desiccation of *Tortula ruralis* gametophytes[J]. The Plant Journal,1999,18(4):359-370.
- [7] Wood A J,Duff R J,Zeng Q,et al. Molecular Architecture of Bryophyte Genes; Putative Polyadenylation Signals in cDNA 3'-ends of the Desiccation-tolerant Moss *Tortula ruralis*[J]. The Bryologist,2000,103(1):44-51.
- [8] Oliver M J,Velten J,Wood A J. Bryophytes as experimental models for the study of environmental stress tolerance: *Tortula ruralis* and desiccation-tolerance in mosses[J]. Plant Ecology,2000,151:73-84.
- [9] Charron A J,Quatrano R S. Between a Rock and a Dry Place: The Water-Stressed Moss[J]. Molecular Plant,2009,2(3):478-486.
- [10] Tamas N,Andras B,Istvan K,et al. Comparison of two metal surveys by moss *Tortula ruralis* in Budapest, Hungary[J]. Environ Monit Assess,2007,134:279-285.
- [11] Melvin J,Jeff A J. Bryophytes as experimental models for the study of environmental stress tolerance: *Tortula ruralis* and desiccation-tolerance in mosses[J]. Measurement Science and Technology,2000(1):73-84.
- [12] Wood A J,Duff R J,Oliver M J. Expressed Sequence Tags (ESTs) from Desiccated *Tortula ruralis* Identify a Large Number of Novel Plant Genes [J]. Plant Cell Physiol,1999,40(4):361-368.
- [13] 付素静.五种观赏藓类植物的配子体发生与组织培养[D].南京:南京林业大学,2006.
- [14] 赖玉洁,路丙社,陈书明,等.青榨槭外植体消毒方法初步研究[J].河北林果研究,2007,22(2):143-145.
- [15] Rowntree J K. Development of novel methods for the initiation of *in vitro* bryophyte cultures for conservation[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,2006,87:191-201.
- [16] 黄作喜,邱超,曾桢迦,等.植物组织培养中消毒剂的应用研究进展[J].内江师范学院学报,2013,28(6):26-30.
- [17] 于传梅.五种苔藓植物的组织培养[D].上海:华东师范大学,2007.
- [18] 崔巍,张梅娟,沙伟.毛尖紫萼藓外植体消毒方法及接种培养基的筛选[J].北方园艺,2012(10):138-140.
- [19] 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.
- [20] 杭璐璐,张楠,季梦成.不同培养基和蔗糖质量浓度对细叶小羽藓孢子萌发的影响[J].浙江农林大学学报,2012,29(3):383-387.
- [21] Aneta S,Tijana C,Sabvojevic M. Establishment and development of the Catherine's *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv. (Polytrichaceae) in *in vitro* conditions[J]. Archives of Biological Sciences,2006,58(2):87-93.
- [22] Ahmed M G U,Shin S L,Lee C H. *In vitro* culture responses of *Cratoneuron decipiens* (Brid.) G. roth gametophyte for micropropagation[J]. Horticulture Environment and Biotechnology,2011,52(6):614-620.
- [23] 杨丽琴,李瑞,王俊,等.植物组织培养的三大难题[J].北方园艺,2008(4):104-107.
- [24] 肖显华,王顺珍,杜荣双,等.植物材料表面消毒方法的改进[J].生物技术,1999,9(1):43-45.
- [25] 郎玉卓,阚世超,刘伟才,等.大羽藓组培初代培养适宜消毒方法的筛选[J].安徽农业科学,2008,36(34):14892-14893.

Study on Tissue Culture Conditions of *Tortula ruralis*

WEI Zhi-ying, SHA Wei, ZHANG Mei-juan

(College of Life Science, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006)

Abstract: Taking apical shoots of *Tortula ruralis* as the explant, adopting $L_{12}(3 \times 2^4)$ orthogonal design method, the disinfection method and medium type were chosen in *in vitro* culture, the effect of different sucrose concentrations on gametophyte morphogenesis were investigated through the gradient design in order to establish effective propagation system of *Tortula ruralis*. The results showed that the best way of *T. ruralis* gametophyte sterilization was as follows: 3% Sodium hypochlorite disinfecting for 5 minutes, then 0.05% Mercuric chloride disinfecting for 20 seconds, as a basal medium for establishment of *in vitro* culture, Beneck was the appropriate medium. The sucrose concentrations tended to have a positive effect on protonema formation and elongation, when 30 g/L sucrose was added in the medium, protonema form at the earliest time and extend the largest diameter, but it inhibited buds formation, when 15 g/L sucrose was added in the medium, it obviously promoted buds formation.

Keywords: *Tortula ruralis*; gametophyte; sterilization method; medium; sucrose concentration