

## 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

杭璐璐, 张楠, 季梦成

(浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 浙江 临安 311300)

**摘要:** 将细叶小羽藓 *Haplocladium microphyllum* 孢子接种在 Beneck, 1/2MS (Murashige and Skoog), MS, Knop, 改良 Knop 等 5 种培养基上, 用 pH 酸度计将酸碱度调至 pH 7.0。分别加入适量蔗糖, 5 种培养基各设置不同蔗糖质量浓度: 40, 30, 20, 10, 0 g·L<sup>-1</sup>, 定时镜检孢子的萌发情况。结果表明: 当蔗糖质量浓度为 0 ~ 30 g·L<sup>-1</sup> 时随蔗糖质量浓度升高孢子萌发率升高, 蔗糖质量浓度为 30 g·L<sup>-1</sup> 时孢子萌发率最高, 当蔗糖质量浓度超过 40 g·L<sup>-1</sup> 时, 孢子萌发受抑制。在蔗糖质量浓度为 30 g·L<sup>-1</sup> 的培养基上培养 7 天后, MS 培养基上孢子萌发率最高, 高达 95.93%; Knop 培养基上孢子最终萌发率最低, 仅为 60% ~ 75%。图 6 参 14

**关键词:** 植物学; 细叶小羽藓; 孢子萌发; 培养基; 蔗糖质量浓度

**中图分类号:** Q945.3      **文献标志码:** A      **文章编号:** 2095-0756(2012)03-0383-05

### *Haplocladium microphyllum* spore germination with different culture mediums and sucrose concentrations

HANG Lu-lu, ZHANG Nan, JI Meng-cheng

(School of Landscape Architecture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

**Abstract:** Spores of *Haplocladium microphyllum* were inoculated on Benecke, 1/2MS (Murashige and Skoog), MS, Knop, and improved Beneck's culture mediums, and pH was adjusted to 7.0 with a pH meter. Sucrose at 40, 30, 20, 10, and 0 g·L<sup>-1</sup> was added, and germination of the spores was observed by microscope after 24 h. Results showed that for treatments from 0-30 g·L<sup>-1</sup> sucrose concentration increased. Germination of the spores was highest with 30 g·L<sup>-1</sup> sucrose concentration and inhibited with 40 g·L<sup>-1</sup>. After 7 d, the spore germination rate was greatest with the MS medium at 30 g·L<sup>-1</sup> (at 95.93%) and least with the Knop medium (60%-75%). It indicates the spore germination of *Haplocladium microphyllum* need certain osmotic pressure, but it would be inhibited in high osmotic pressure caused by high sucrose concentration. [Ch, 6 fig. 14 ref.]

**Key words:** botany; *Haplocladium microphyllum*; spore germination; culture medium; sucrose concentration

苔藓植物作为孢子植物, 代表着从水生向陆生过渡的高等植物类型, 在其发育过程中不可或缺的孢子萌发过程是其区别于其他植物的重要特征<sup>[1-2]</sup>。Jeffrey<sup>[3]</sup>对苔藓植物的组织培养进行了系统的研究。自高谦等<sup>[4]</sup>对中国苔藓植物的孢子萌发有了初步的研究后, 包文美等<sup>[5]</sup>、赵建成等<sup>[6]</sup>、李敏等<sup>[7]</sup>对多种藓类植物孢子萌发进行了系统研究。王智慧等<sup>[8]</sup>、黄士良等<sup>[9]</sup>、刘世彪等<sup>[10]</sup>探讨了光照、温度及 pH 值等对藓类植物孢子萌发的影响, 但国内外目前均未见蔗糖浓度对孢子萌发影响的研究。吴璐璐等<sup>[11]</sup>、张敏<sup>[12]</sup>的研究表明细叶小羽藓 *Haplocladium microphyllum* 分布广, 易采集且对环境指示作用强, 并具有一定的药用价值和较高的观赏价值。对细叶小羽藓孢子萌发过程的研究, 将为该种藓类植物的工厂化生产和园林应用等提供科学依据, 推进对其今后的开发利用。

收稿日期: 2011-05-01; 修回日期: 2011-09-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31070188); “十一五”浙江省科技计划项目(2009C32066)

作者简介: 杭璐璐, 从事园林植物研究。E-mail: joh8510@gmail.com。通信作者: 季梦成, 教授, 从事苔藓植物分类及园林植物应用研究。E-mail: mchji@163.com

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

细叶小羽藓的成熟孢蒴取自浙江农林大学风景园林与建筑学院温室苔藓苗圃。

### 1.2 试验方法

本试验采用 Beneck, 1/2MS(Murashige and Skoog), MS, Knop, 改良 Knop 等 5 种培养基配方, 琼脂为适马(SIGMA)公司出品, 蔗糖质量浓度取 40, 30, 20, 10, 0 g·L<sup>-1</sup>。

1.2.1 培养基的制备 以上 5 种培养基配方, 加 6.7 g·L<sup>-1</sup> 的琼脂, 并分别加入适量蔗糖, 用 pH 酸度计将酸碱度调至 pH 7.0, 煮沸, 倒入直径为 60 mm 的培养皿中, 凝固后成固体培养基。用报纸包好, 121 °C 下高温灭菌 15 min, 冷却凝固后放入超净工作台上待用。

1.2.2 孢子悬浮液的制备 取细叶小羽藓成熟的孢子体, 在无菌条件下用无菌水冲洗 3 次, 1 min·次<sup>-1</sup>→用体积分数为 70%乙醇表面消毒 6 min→用无菌水冲洗 3 次, 1 min·次<sup>-1</sup>→用 250 g·kg<sup>-1</sup> 次氯酸钠消毒 5 min→用无菌水清洗 3 次, 1 min·次<sup>-1</sup>→用镊子和解剖针打开孢蒴, 将孢子散入适量的无菌水中, 制成适当浓度的孢子悬液。

1.2.3 孢子的接种 用 10 μL 移液枪将稀释后的孢子悬液分别接种在固体培养基上。

1.2.4 培养条件 培养皿放在 RXZ-300B 型光照培养箱中培养。培养温度为(25±1) °C, 空气相对湿度 80%~90%, 光照时间为 12 h·d<sup>-1</sup>, 光照强度为 2 000 lx。

1.2.5 统计方法 接种后隔 24 h, 将培养瓶放在倒置显微镜上观察孢子萌发情况, 并统计孢子萌发率。统计时, 每一瓶随机选取 5 个视野, 统计每一视野的孢子萌发率, 每一质量浓度求平均值即为该质量浓度的孢子萌发率<sup>[13]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 细叶小羽藓的孢子形态

细叶小羽藓的孢子为单细胞, 球形或近球形, 直径为 11.5(9.6~17.4) μm, 可能具近极薄壁区。外壁厚度约为 0.8 μm, 分层不清楚。纹饰在光学显微镜下为小疣状突起, 扫描电镜观察则显示小疣状突起形状不规则, 大小不等, 排列较密, 上面具不明显的微突起。

### 2.2 不同培养基及蔗糖质量浓度对孢子萌发的影响

2.2.1 Beneck 培养基孢子萌发情况 细叶小羽藓在接种 24 h 后均已开始萌发。在 Beneck 培养基中, 蔗糖质量浓度为 30 g·L<sup>-1</sup> 时, 孢子萌发率始终最高, 在 0~120 h 内孢子萌发保持线形增长; 120 h 时孢子萌发率已高达 84.45%。蔗糖质量浓度为 20 g·L<sup>-1</sup> 的 Beneck 培养基孢子萌发率在 0~120 h 内低于蔗糖质量浓度为 10 g·L<sup>-1</sup> 的培养基; 120 h 后, 孢子萌发率开始超过蔗糖质量浓度为 20 g·L<sup>-1</sup> 培养基的萌发率。蔗糖浓度为 40 g·L<sup>-1</sup> 培养基孢子萌发率 0~60 h 内均高于未添加蔗糖的培养基孢子萌发率, 但随后孢子萌发速率减慢, 低于未添加蔗糖的孢子萌发率, 说明添加蔗糖在初始阶段均能促进细叶小羽藓孢子的萌发, 但当蔗糖质量浓度过高时, 一段时间后又开始抑制孢子的萌发(图 1)。

2.2.2 1/2MS 培养基孢子萌发情况 在 1/2MS 培养基中, 蔗糖质量浓度为 30 g·L<sup>-1</sup> 孢子萌发率始终最高, 其次为 20 g·L<sup>-1</sup>, 蔗糖质量浓度为 40 g·L<sup>-1</sup> 和 10 g·L<sup>-1</sup> 时孢子萌发率差异不大, 未添加蔗糖的培养基孢子萌发率最低(图 2)

2.2.3 MS 培养基孢子萌发情况 在 MS 培养基中, 蔗糖质量浓度为 30 g·L<sup>-1</sup> 孢子萌发率始终最高, 在接种 24 h 后观察时孢子萌发率已高达 39.83%, 接种 168 h 后孢子萌发率高达 95.93%。蔗糖质量浓度为 10, 20, 40 g·L<sup>-1</sup> 时, 在 0~96 h 内萌发率相差不大, 96 h 后, 20 g·L<sup>-1</sup> 孢子萌发速度加快, 孢子萌发率从高到底蔗糖质量浓度依次为 20, 10 和 40 g·L<sup>-1</sup>。未添加蔗糖的培养基孢子萌发率始终最低(图 3)。

2.2.4 Knop 培养基孢子萌发情况 在 Knop 培养基中, 蔗糖质量浓度为 30 g·L<sup>-1</sup> 和 20 g·L<sup>-1</sup> 时, 孢子萌发率始终相差不大, 且孢子萌发率最高, 其次为 10 g·L<sup>-1</sup> 和 40 g·L<sup>-1</sup>, 未添加蔗糖的培养基孢子萌发率最低。在 Knop 培养基中, 孢子最终的萌发率相比其他培养基最低, 仅为 60%~75%(图 4)。

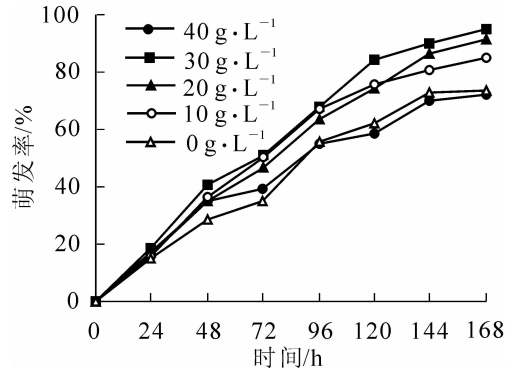


图 1 Beneck 培养基中不同蔗糖质量浓度对孢子萌发率的影响

Figure 1 Effect of concentration on the spore germination in Beneck medium

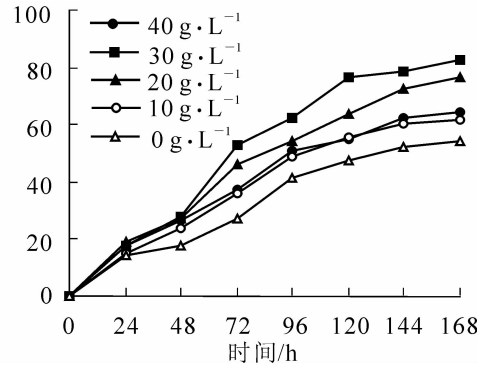


图 2 1/2MS 培养基中不同蔗糖质量浓度对孢子萌发率的影响

Figure 2 Effect of concentration on the spore germination in 1/2MS medium

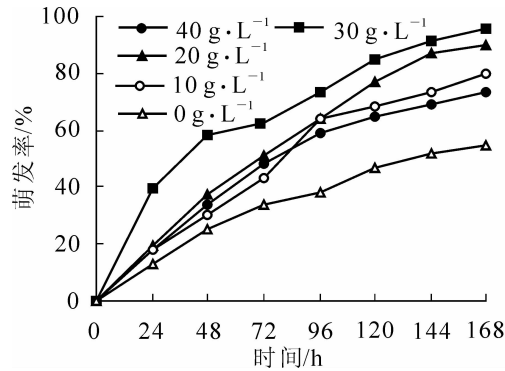


图 3 MS 培养基中不同蔗糖质量浓度对孢子萌发率的影响

Figure 3 Effect of concentration on the spore germination in MS medium

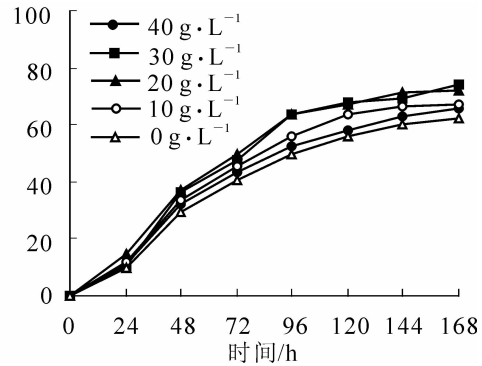


图 4 Knop 培养基中不同蔗糖质量浓度对孢子萌发率的影响

Figure 4 Effect of sucrose concentration on the spore germination in Knop medium

2.2.5 改良 Knop 培养基孢子萌发情况 在改良 Knop 培养基中，由孢子的萌发曲线可以看出，各蔗糖质量浓度孢子萌发趋势大致相同，蔗糖质量浓度为  $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  孢子萌发率始终最高， $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  孢子萌发率次之，未添加蔗糖的培养基孢子萌发率最低(图 5)。在不同培养基中，除 Beneck 培养基中添加  $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  蔗糖在 96 h 后开始低于未添加蔗糖孢子萌发率外，添加蔗糖均能促进孢子的萌发。当蔗糖质量浓度为  $0\sim 30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  时，随蔗糖质量浓度的升高，对孢子萌发的促进作用增大；当蔗糖质量浓度超过  $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  时，蔗糖质量浓度对孢子萌发的促进作用降低；蔗糖质量浓度为  $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  时最利于细叶小羽藓孢子的萌发。

2.2.6 蔗糖质量浓度为  $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  时各培养基孢子萌发情况 图 6 显示：蔗糖质量浓度为  $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  时，不同培养基 24 h 观察时，孢子萌发率均在 10% 以上，MS 培养基在  $0\sim 48\text{ h}$  内萌发速度最快，48 h 时孢子萌发率即达到 58.22%。以后速度减慢，但萌发率始终最高，168 h 时孢子萌发率为 95.93%。Beneck 培养基在  $0\sim 120\text{ h}$  内孢子萌发速度均较快，并在 120 h 时接近 MS 培养基的孢子萌发率，120 h 后与 MS 培养基孢子萌发率相差不大。改良 Knop 培养基在  $0\sim 144\text{ h}$  内均保持较高的孢子萌发速率，随后孢子萌发率减慢，在 168 h 时孢子萌发率为 87.91%。1/2MS 培养基在 48 h 观察时孢子萌发率最低，为 27.46%，随后速度加快。在  $72\sim 120\text{ h}$  内与改良 Knop 培养基孢子萌发率相差不大，但随后孢子萌发速率逐渐降低，168 h 时显著低于改良 Knop 培养基孢子萌发率。Knop 培养基 24 h 观察时孢子萌发率最低，仅为 10.52%，随后孢子萌发速度加快。在  $48\sim 96\text{ h}$  内与改良 Knop 培养基孢子萌发率相差不大，

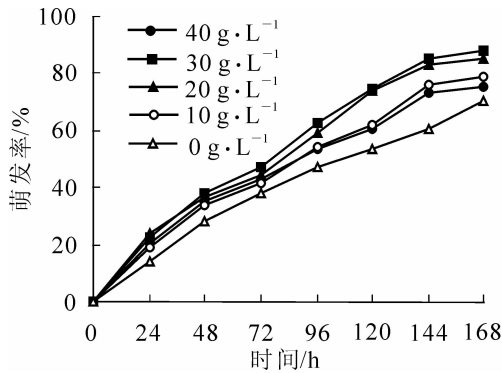


图5 改良Knop培养基中不同蔗糖质量浓度对孢子萌发率的影响

Figure 5 Effect of concentration on the spore germination in improved Knop

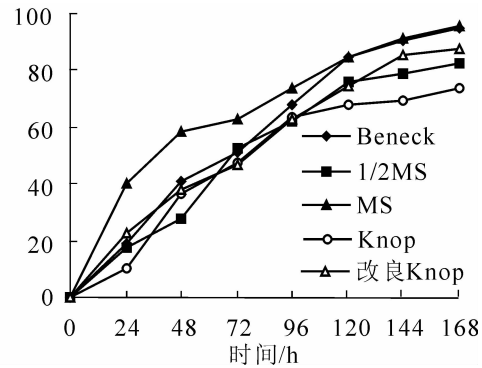


图6 蔗糖质量浓度为 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时不同培养基对孢子萌发率的影响

Figure 6 Effect of culture medium on the spore germination in  $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

但随后孢子萌发率显著降低, 168 h时孢子萌发率在五种培养基种萌发率最低, 为73.97%。

### 3 讨论

王振杰等<sup>[14]</sup>研究了Knop, SH(Schenk and Hildebrandt)及N6培养基对金灰藓 *Pylaisiella polyantha* 孢子萌发的影响, 并指出在Knop培养基上孢子萌发率最高, 培养72 h萌发率达10%, 培养168 h后萌发率可达95%以上。本研究中, MS培养基上孢子萌发率最高, 48 h时孢子萌发率即达到58.22%, 168 h时孢子萌发率高达95.93%, Knop培养基上孢子最终萌发率最低。5种培养基中24 h后第1次观察时, 细叶小羽藓孢子萌发率均在10%以上, 说明不同藓类植物孢子破壁需要的时间及最适培养基有很大差异。

本研究发现: 蔗糖的添加促进细叶小羽藓孢子的萌发, 当蔗糖质量浓度为 $0\sim 30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 随蔗糖质量浓度升高孢子萌发率升高, 蔗糖质量浓度为 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时孢子萌发率最高, 当蔗糖质量浓度超过 $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 孢子萌发受抑制。说明细叶小羽藓孢子的萌发需要一定的渗透压, 但当高糖造成的渗透压过高时, 细叶小羽藓孢子的萌发会受到抑制。

在显微镜下观察细叶小羽藓孢子萌发情况时发现, 部分孢子褐化, 是其本身遗传因素还是蔗糖及培养基种类对其造成的影响需要进一步探讨。

#### 参考文献:

- [1] 吴鹏程. 苔藓植物生物学[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 10.
- [2] 范庆书, 赵建成, 于树宏, 等. 苔藓植物孢子萌发与原丝体发育研究进展[J]. 植物学通报, 2003, **20** (3): 280 - 286.  
FAN Qingshu, ZHAO Jiancheng, YU Shuhong, *et al.* Progress in study on spore germination and protonema development of the bryophytes [J]. *Chin Bull Bot*, 2003, **20** (3): 280 - 286.
- [3] JEFFREY G, DUCKETT J B, PAUL W, *et al.* In vitro cultivation of bryophytes: a review of practicalities, problems, progress and promise [J]. *J Bryol*, 2004, **26**: 3 - 20.
- [4] 高谦, 张钺. 中国藓类植物孢子萌发和原丝体发育的初步研究[J]. 武汉植物学研究, 1986, **4** (2): 123 - 132.  
GAO Qian, ZHANG Yue. A preliminary study on spore germination and protonema development of mosses in China [J]. *J Wuhan Bot Res*, 1986, **4** (2): 123 - 132.
- [5] 包文美, 曹建国. 泥炭藓及其孢子萌发和有性生殖[J]. 生物学通报, 2001, **36** (1): 8 - 9.  
BAO Wenmei, CAO Jianguo. Spore germination and sexual reproduction of *Sphagnum* [J]. *Bull Biol*, 2001, **36** (1): 8 - 9.
- [6] 赵建成, 李秀芹, 张慧中. 10种藓类植物孢子萌发与原丝体发育的初步研究[J]. 干旱区研究, 2002, **19** (1): 32 - 38.  
ZHAO Jiancheng, LI Xiuqin, ZHANG Huizhong. A preliminary study on spore germination and protonema develop-

- ment of ten species of mosses [J]. *Arid Zone Res*, 2001, **36** (1): 8 – 9.
- [7] 李敏, 李茜, 胡晶晶, 等. 7 种真藓科(Bryaceae)植物孢子萌发与原丝体发育研究[J]. 贵州师范大学学报: 自然科学版, 2010, **28** (4): 17 – 20.
- LI Min, LI Qian, HU Jingjing, *et al.* A study on spore germination and protonema development of seven species in family Bryaceae (Musci) [J]. *J Guizhou Norm Univ Nat Sci Ed*, 2010, **28** (4): 17 – 20.
- [8] 王智慧, 张朝晖, 钟本固. pH 和钙离子浓度对葫芦藓暖地变种孢子萌发的影响[J]. 贵州科学, 1995, **13** (4): 33 – 35.
- WANG Zhihui, ZHANG Zhaohui, ZHONG Bengu. Influence of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and pH on spore germination of *Fuaria hygrometrica* Hedw. var. *calvescens* Kind [J]. *Guizhou Sci*, 1995, **13** (4): 33 – 35.
- [9] 黄士良, 李敏, 张秀萍, 等. 3 种植物生长调节剂对密叶绢藓(*Entodon challengeri*)孢子萌发、原丝体发育及芽体发生的影响[J]. 武汉植物学研究, 2007, **25** (1): 65 – 69.
- HUANG Shiliang, LI Min, ZHANG Xiuping, *et al.* Effect of three growth regulator on spore germination, protonema development and bud differentiation in *Entodon challengeri* [J]. *J Wuhan Bot Res*, 2007, **25** (1): 65 – 69.
- [10] 刘世彪, 陈军, 李菁, 等. 光照和温度对尖叶拟船叶藓孢子萌发及原丝体发育的影响[J]. 西北植物学报, 2003, **23** (1): 101 – 106.
- LIU Shibiao, CHEN Jun, LI Jing, *et al.* Effects of light and temperatures on spore germination and protonema development of *Dolichomitriopsis diversiformis* [J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2003, **23** (1): 101 – 106.
- [11] 吴璐璐, 严雄梁, 季梦成. 浙江药用苔藓植物资源[J]. 浙江林学院学报, 2009, **26** (1): 68 – 75.
- WU Lulu, YAN Xiongliang, JI Mengcheng. Medicinal bryophytes in Zhejiang Province, China [J]. *J Zhejiang For Coll*, **26** (1): 68 – 75.
- [12] 张敏. Pb, Cd 污染胁迫对 4 种苔藓植物生长发育的影响[D]. 南京: 南京林业大学, 2005.
- ZHANG Min. *Effects of Lead and/or Cadmium Pollution on the Growth and Development of Four Mosses* [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2005.
- [13] 刘丽, 胡光珍, 王幼芳, 等. 萘乙酸(NAA)对葫芦藓(*Fuaria hygrometrica*)孢子萌发及原丝体生长的影响[J]. 华东师范大学学报: 自然科学版, 2004 (4): 138 – 141.
- LIU Li, HU Guangzhen, WANG Youfang, *et al.* Effect of NAA on spore germination and protonema growth of *Fuaria hygrometrica* [J]. *J East China Norm Univ Nat Sci Ed*, 2004 (4): 138 – 141.
- [14] 王振杰, 黄士良, 李志, 等. 不同 pH 值和培养基对金灰藓(*Pylaisiella polyantha*)孢子萌发的影响[J]. 河北师范大学学报: 自然科学版, 2008, **32** (6): 813 – 816.
- WANG Zhenjie, HUANG Shiliang, LI Zhi, *et al.* The effect of different pH and cultures on the *Pylaisiella polyantha* spore germination [J]. *J Hebei Norm Univ Nat Sci Ed*, 2008, **32** (6): 813 – 816.