

# 东亚砂藓组织培养技术方法研究

张梅娟<sup>1</sup>, 沙伟<sup>1,2\*</sup>

(1. 东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040; 2. 齐齐哈尔大学生命科学与农林学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006)

**摘要:** 以东亚砂藓(*Racomitrium japonicum*)配子体为外植体, 比较了不同消毒液对消毒效果的影响, 对接种消毒外植体的培养基进行了尝试性筛选, 并研究了蔗糖浓度对东亚砂藓配子体生长的影响。结果显示, 将东亚砂藓配子体用2%洗洁精溶液浸泡数分钟后, 再用0.02%的升汞处理45~60 s的消毒效果最佳; 有机培养基是无菌外植体接种的最佳培养基; 3%的蔗糖更有利于无菌外植体产生的原丝体团和幼嫩配子体的生长。

**关键词:** 东亚砂藓; 外植体; 消毒方法; 培养基; 蔗糖浓度

中图分类号: Q943. 1

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2013)06-0616-07

## Research on Tissue Culture Technology of *Racomitrium japonicum*

ZHANG Mei-Juan<sup>1</sup>, SHA Wei<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Life Science Northeast Forestry University, Harbin, 150040, China;

2. College of Life Science and Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang, 161006, China)

**Abstract:** The effects of different disinfectants on explants of *Racomitrium japonicum* were studied here. Suitable inoculation media were screened tentatively, and the effects of sucrose concentrations on growth of *R. japonicum* gametophytes were investigated. The results showed that a concentration of 0.02% HgCl<sub>2</sub> for 45–60 seconds was optimal for initiation cultures from fragments of gametophytes pre-immersed in 2% detergent for a period of time. The suitable inoculation medium for sterile explants was organic culture medium MS. Protonemal colonies and young gametophytes then grew well when 3% sucrose was added.

**Key words:** *Racomitrium japonicum*; Explants; Sterilization method; Medium; Sucrose concentration

苔藓植物是由水生向陆生过渡的植物类群, 是现存高等植物中最原始的类群之一, 总数仅次于被子植物<sup>[1]</sup>。东亚砂藓(*Racomitrium japonicum*)属紫萼藓科砂藓属(*Racomitrium*), 生于低海拔地区的岩面、岩面薄土或沙土上, 广泛分布于中国的黑龙江、吉林、辽宁、河南、江西等南北各省, 日本、朝鲜、俄罗斯(西伯利亚东南)、越南、澳大利亚等地也有分布<sup>[2]</sup>。东亚砂藓在群落、茎叶及假根结构、生理上都具有对旱生环境适应的特征, 为典型的小型耐旱藓类, 是较好的抗旱基因资源,

也是从基因水平上研究藓类植物耐旱分子机理的重要实验材料。然而从野外采集的藓类材料往往来源于不同的母本, 给实验带来了不便, 通过组织培养的方法可以获得均一、优质化的藓类材料, 这是进行分子试验的最佳选择。

苔藓植物是进行组织培养最先选用的材料<sup>[3]</sup>, 但在很长时间内的相关研究极少, 直到20世纪50年代末才开始增加这方面的工作, 并取得了一定进展<sup>[4]</sup>。然而, 由于苔藓植物个体微小, 叶片一般由单层细胞组成, 对其消毒很困难, 成功率低; 但

收稿日期: 2013-06-09, 修回日期: 2013-10-05。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31070180, 31270254)。

作者简介: 张梅娟(1982-), 女, 山东省海阳人, 博士研究生, 从事苔藓植物分子生物学研究(E-mail: zhangmeijuan\_002@163.com)。沙伟(1963-), 女, 黑龙江省齐齐哈尔人, 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。

\* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: shw1129@263.net)。

孢子外有一层孢子壁的保护, 消毒较易, 成功率高。所以苔藓植物组织培养的材料大多是通过孢子培养获得的<sup>[5-9]</sup>。Duckett 等<sup>[10]</sup>认为, 进行苔藓植物组织培养时若没有获得孢子体, 配子体就可作为外植体进行消毒培养, 以便获得配子体再生体系。目前, 国内外已有一些成功报道。Sabovljevic 等<sup>[8]</sup>用芦荟藓(*Aloina aloides*)、角齿藓(*Ceratodon purpureus*)和垫丛紫萼藓(*Grimmia pulvinata*)等几种藓类的茎尖作为培养物, 成功培育出了配子体。Ahmed 等<sup>[11]</sup>以 *Cratoneuron decipiens* 的茎尖和叶片为原始培养物, 获得了无菌原丝体, 并成功得到了无菌配子体。在国内, 高永超等<sup>[12]</sup>用牛角藓(*Cratoneuron filicinum*)的幼嫩茎尖成功获得了无菌材料, 并培养得到了疏松易碎的愈伤组织。李晓毓等<sup>[13]</sup>对尖叶匍灯藓(*Plagiomnium cuspidatum*)配子体进行了组织培养, 初步建立了其再生体系。Chen 等<sup>[14]</sup>以暖地大叶藓(*Rhodobryum giganteum*)茎尖为试验材料, 研究了组织培养的条件, 并获得了无菌原丝体。目前, 国内外还未见利用东亚砂藓孢子体或配子体作为外植体进行组织培养的研究报道。在野外采集中, 东亚砂藓的孢子体很难采到, 故我们以东亚砂藓配子体为材料, 通过对消毒方法、接种培养基和蔗糖浓度进行探索研究, 以期建立成熟的东亚砂藓配子体再生体系, 为苔藓植物生理生化和分子生物学研究提供充足的纯正试验材料和奠定理论基础, 从而使苔藓植物资源得到更好的开发利用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

东亚砂藓(*Racomitrium japonicum*)配子体于2009年6月末采自黑龙江省五大连池老黑山, 采集后用封口袋保存带回实验室, 放入培养箱中培养(培养条件: 20℃±1℃、光照12 h, 光强3000 lx)。凭证标本(20090627)存放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 培养基的配置

基本培养基为: MS+0.9%琼脂; 改良的Beneck+0.9%琼脂; 改良的Knop+0.9%琼脂。pH

值均调至5.8~6.2。

改良的Knop培养基配方:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$  1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.25 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5 g/L,  $\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  微量; 改良的Beneck培养基配方:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.2 g/L,  $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.1 g/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  微量。

#### 1.2.2 消毒方法和接种培养基的筛选

选取长势较好的东亚砂藓配子体, 在自来水下洗掉泥土杂物, 放入空培养瓶中, 用纱布盖好, 放在水龙头下用自来水冲洗数小时; 用洗洁精浸泡10 min左右(同时设置对照: 不用洗洁精溶液浸泡), 再于流水下冲洗30 min左右, 转入超净工作台, 分别用70%酒精、升汞、次氯酸钙溶液进行消毒, 接种到不同培养基上, 形成多种组合。70%酒精设置4个时间梯度(10 s、20 s、30 s、40 s); 升汞设置4个浓度(0.01%、0.02%、0.05%、0.1%)和4个时间梯度(15 s、30 s、45 s、60 s); 次氯酸钙设置4个浓度(0.1%、0.5%、1%、2%)和4个时间梯度(30 s、60 s、90 s、120 s)。各种消毒液消毒完后均于无菌水下冲洗7~8次, 每次至少停留1 min以上, 尽可能洗掉残留的液体, 减少对配子体的损害。用刀片将外植体切成5~10 mm左右的小段, 分别接种于1.2.1所述培养基上, 于培养箱中进行培养(培养条件: 20℃±0.2℃、光照12 h、光强3000~5000 lx)。每个组合接种10瓶, 每瓶接种10个外植体段, 做3次重复。接种完后, 每天观察其情况, 记录污染个数和死亡个数, 将未染菌的外植体段继代到新培养基上继续培养, 每种组合需继代数次; 10 d后计算其污染率、成活率和死亡率。

#### 1.2.3 蔗糖浓度筛选

将无菌的外植体继代到MS与不同蔗糖浓度(0、1%、2%、3%、4%)组配的培养基上, 观察不同蔗糖浓度对外植体生长状况的影响。

#### 1.3 数据处理和分析

外植体的污染率、成活率和死亡率<sup>[15]</sup>计算公式为:

$$\text{污染率} = \frac{\text{污染外植体数}}{\text{接种外植体数}} \times 100\%;$$

$$\text{成活率} = \frac{\text{返绿外植体数}}{\text{接种外植体数}} \times 100\%;$$

死亡率=死亡外植体数/接种外植体数×100%。

用 SPSS 19.0 统计软件进行单因素方差分析得出最佳方案。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同消毒液和接种培养基对东亚砂藓配子体的影响

试验结果显示, 70% 酒精处理的外植体无论接种到何种培养基上都无污染, 随着培养时间的延长均未见返绿现象, 所接种个体全部死亡。说明 70% 酒精对东亚砂藓外植体的杀伤力特别大, 不适合作为东亚砂藓的消毒液。在后续结果分析不再考虑此消毒液的影响。

洗洁精的主要成分是十二烷基苯磺酸钠, 是一种表面活性剂, 能够使蛋白质变性, 起到一定的杀菌作用。试验结果表明, 未用洗洁精溶液浸泡的外植体在接种到上述所有培养基上后第 2 天就有部分染菌, 约 3 d 后基本上全部染菌; 而用洗洁精溶液浸泡过的外植体在 3 d 后开始部分染菌, 说明洗洁精对细菌起到了一定的抑制作用。

在以往的试验中, 消毒完的外植体一般接种于某单一培养基上用于筛选最佳消毒方法, 但是无机和有机培养基是否都可作为接种东亚砂藓消毒材料的培养基并不知晓, 因此本试验对此进行了尝试性的筛选。结果发现, 用次氯酸钙和升汞处理的外植体接种到改良的 Beneck 和 Knop 培养基上, 在培养到第 6 天时外植体染菌率很高, 为 100% (图 1), 在此基础上加大消毒液浓度和消毒时间, 也得到同样结果; 而消毒时间太长、消毒液浓度太高

时外植体则基本死亡, 故我们认为以改良的 Beneck 和 Knop 为基础的无机培养基不适合作为东亚砂藓消毒外植体的接种培养基。而接种到有机 MS 培养基上的外植体染菌率相对较低, 当培养 10 d 左右时发现, 无菌外植体基本不会再染菌。故最终确定 MS 培养基为接种东亚砂藓消毒外植体的最佳培养基。

试验结果表明, 不同消毒液浓度和消毒时间对接种到 MS 培养基上外植体的影响是不同的。次氯酸钙因所含氯气很容易挥发, 对材料的毒害作用小, 已成为苔藓植物组织培养材料常用的消毒剂。但从本试验结果也可看出, 用次氯酸钙消毒, 当培养到第 10 天时, 尽管外植体死亡率很低, 但污染率极高, 达 60% 以上(表 1), 说明次氯酸钙不适合作为东亚砂藓的消毒液, 故不做方差分析。而升汞的整体消毒效果较好, 用 0.02% 升汞处理 45~60 s 的外植体, 在第 10 天时存活率最高, 且差异不显著, 污染率显著降低(表 2)。随着升汞浓度的增加和处理时间的延长, 污染率和成活率显著降低, 而死亡率显著升高, 甚至全部死亡。所以东亚砂藓的最佳灭菌方法是: 将外植体用 2% 洗洁精溶液预先浸泡 10 min, 再用 0.02% 的升汞处理 45~60 s。

### 2.2 蔗糖对东亚砂藓配子体的影响

蔗糖是藓类植物组织培养中最重要的碳源。本试验结果表明, 蔗糖浓度对东亚砂藓配子体的生长产生了重要的影响。无菌配子体在 MS 与不同蔗糖浓度(0、1%、2%、3%、4%)组配的培养基上培养约 20 d 时, 大部分开始返绿, 当蔗糖浓度为 4%

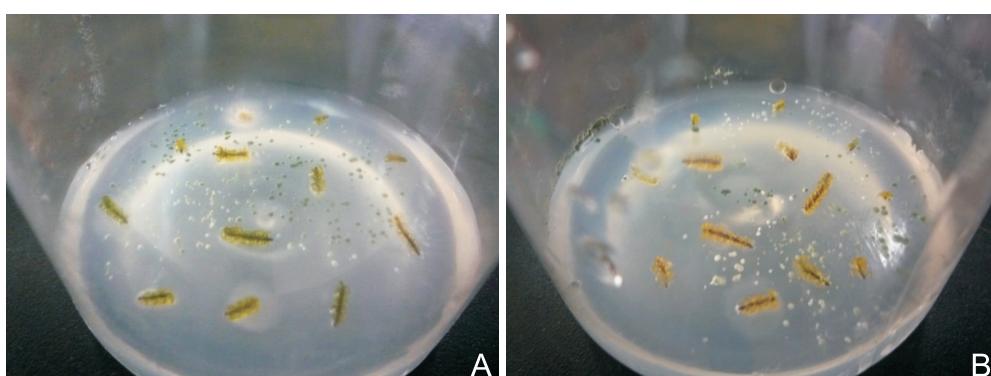


图 1 改良的 Beneck 培养基(A)和改良的 Knop 培养基(B)上东亚砂藓染菌状况

Fig. 1 Contamination status of *Racomitrium japonicum* on modified Beneck medium (A) and Knop medium (B)

表 1 次氯酸钙对东亚砂藓配子体的消毒效果(培养 10 d)  
Table 1 Influence of  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  on explants of *R. japonicum* (cultured 10 d)

次氯酸钙(%) Calcium hypochlorite	消毒时间(s) Disinfection time	污染率(%) Contamination rate	成活率(%) Survivability rate	死亡率(%) Death rate
0. 1	30	100.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	60	100.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	90	96.67 ± 1.15	3.33 ± 1.15	0.00 ± 0.00
	120	93.33 ± 1.15	6.67 ± 1.15	0.00 ± 0.00
0. 5	30	94.00 ± 2.00	6.00 ± 2.00	0.00 ± 0.00
	60	92.67 ± 1.15	7.33 ± 1.15	0.00 ± 0.00
	90	88.67 ± 1.15	11.33 ± 1.15	0.00 ± 0.00
	120	83.33 ± 3.06	16.67 ± 3.06	0.00 ± 0.00
1. 0	30	84.67 ± 1.15	15.33 ± 1.15	0.00 ± 0.00
	60	78.00 ± 2.00	20.00 ± 2.00	2.00 ± 0.00
	90	74.00 ± 2.00	22.67 ± 3.06	3.33 ± 1.15
	120	70.00 ± 2.00	25.33 ± 1.15	4.67 ± 1.15
2. 0	30	75.33 ± 2.31	20.67 ± 1.15	3.33 ± 1.15
	60	68.00 ± 2.00	27.33 ± 1.15	4.67 ± 1.15
	90	60.00 ± 2.00	31.33 ± 1.15	8.67 ± 1.15
	120	59.33 ± 2.31	30.67 ± 1.15	10.00 ± 2.00

表 2 升汞对东亚砂藓配子体的消毒效果(培养 10 d)  
Table 2 Influence of  $\text{HgCl}_2$  on explants of *R. japonicum* (cultured 10 d)

升汞(%) Mercuric chloride	消毒时间(s) Disinfection time	污染率(%) Contamination rate	成活率(%) Survivability rate	死亡率(%) Death rate
0. 01	15	88.00 ± 2.00 a	12.00 ± 2.00 h	0.00 ± 0.00 i
	30	74.67 ± 3.06 b	25.33 ± 3.06 g	0.00 ± 0.00 i
	45	54.00 ± 2.00 c	46.00 ± 2.00 e	0.00 ± 0.00 i
	60	44.00 ± 3.46 d	56.00 ± 3.46 d	0.00 ± 0.00 i
0. 02	15	43.33 ± 1.15 d	56.67 ± 1.15 cd	0.00 ± 0.00 i
	30	23.33 ± 1.15 e	66.67 ± 1.15 b	10.00 ± 0.00 h
	45	12.00 ± 4.00 f	76.00 ± 6.00 a	12.00 ± 0.00 h
	60	6.00 ± 0.00 g	76.00 ± 0.00 a	18.00 ± 0.00 g
0. 05	15	12.67 ± 3.06 f	66.00 ± 2.00 b	21.33 ± 2.31 f
	30	12.00 ± 2.00 f	60.67 ± 1.15 c	27.33 ± 2.31 e
	45	2.67 ± 1.15 gh	49.33 ± 2.31 e	48.00 ± 2.00 d
	60	2.00 ± 0.00 h	32.67 ± 3.06 f	65.33 ± 3.06 c
0. 1	15	1.33 ± 1.15 h	14.67 ± 4.16 h	84.00 ± 4.00 b
	30	1.33 ± 1.15 h	1.33 ± 1.15 i	98.00 ± 2.00 a
	45	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 i	100.00 ± 0.00 a
	60	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 i	100.00 ± 0.00 a

注: 同列数据后不同小写字母表示在  $p < 0.05$  水平差异显著, 下同。

Note: Means with different small letters in the same column are significantly different at the 0.05 level. The same below.

时配子体则不返绿而褐化死亡。随着培养时间的延长(约 40 d), 可观察到 2 种生长情况: 在切口处产生鲜绿的原丝体, 成团生长; 在叶腋处分化出新的嫩绿配子体(图 2)。不添加蔗糖时, 所分化出的原丝体和配子体生长状况最差; 当蔗糖浓度为 3% 时, 原丝体团直径、原丝体长度和分化出的配子体数最大; 其余蔗糖浓度对其影响差异不大(表 3)。

另外, 在本试验过程中发现, 部分无菌配子体茎段周围会产生一种粉红色的细菌(图 3)。Luretta 等<sup>[16]</sup>曾从苔藓植物原丝体中分离出该种细菌, 并认为是一种甲烷氧化菌; Hornseuhuh 等<sup>[17]</sup>在研究葫芦藓原丝体发育时也发现有此菌, 且这种细菌在少量分泌时会促进原丝体分化出芽体。高永超等<sup>[12]</sup>报道, 在牛角藓的愈伤组织培养中分离出一

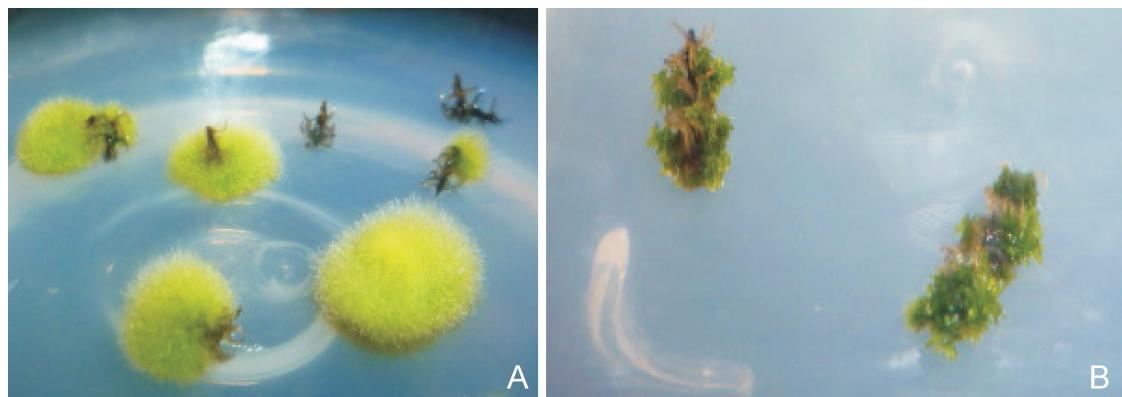


图 2 MS+3%蔗糖培养基上东亚砂藓生长状况(A: 原丝体; B: 配子体)

Fig. 2 Growth status of *R. japonicum* on MS medium with 3% sucrose  
(A: Protonemal colony; B: Gametophytes)

表 3 蔗糖对东亚砂藓外植体生长的影响

Table 3 Effects of sucrose on protonemal colony diameters  $\pm$  SD induced from gametophytes of *R. japonicum* in initial culture

蔗糖(%) Sucrose	原丝体直径(cm) Protonema diameter	原丝体长度(cm) Protonema length	配子体数(个) Number of gametophytes
0	0.48 $\pm$ 0.02c	0.43 $\pm$ 0.03c	1.67 $\pm$ 0.58c
1	0.68 $\pm$ 0.02b	0.66 $\pm$ 0.02b	5.67 $\pm$ 0.58b
2	0.71 $\pm$ 0.06b	0.68 $\pm$ 0.01b	6.00 $\pm$ 0.00b
3	1.05 $\pm$ 0.03a	0.86 $\pm$ 0.02a	10.67 $\pm$ 1.15a



图 3 本试验中观察到的粉红色细菌

Fig. 3 The pink bacterium observed in this experiment

种粉色细菌，初步认定为一种杆状菌。周甜甜<sup>[18]</sup>在对毛尖紫萼藓(*Grimmia pilifera*)进行组织培养时也分离出该粉红色的细菌，但未鉴定。本试验所观察到的究竟是不是同一种菌，尚待进一步鉴定。

### 3 讨论

植物组织培养成功的重要一步就是材料的消毒，苔藓植物也是如此。由于苔藓植物茎、叶仅有一层或几层细胞组成，消毒不彻底染菌率高，消毒过度会褐化死亡，因此选择合适的消毒液种类、浓度和消毒时间是关键。Sabovljevic 等<sup>[7]</sup>发现，密枝尖喙藓(*Eurhynchium praelongum*)茎尖在次氯酸钙浓度为 9% 时存活率最高(为 67.5%)。Rowntree<sup>[8]</sup>在研究几种藓类植物的新消毒方法时发现，用 0.5% NaDCC 对苔藓植物的配子体消毒具有较好的效果。郎玉卓等<sup>[19]</sup>采用正交法对大羽藓(*Thuidium cymbifolium*)消毒方法进行了筛选，结果显示最佳消毒方法为：0.5% NaClO+0.05% HgCl<sub>2</sub> 消毒 60 s。梁红柱等<sup>[20]</sup>认为，适度的 NaClO 溶液消毒外植体 30 s 有利于大叶藓(*Rhodobryum roseum*)配子体组织培养。Chen 等<sup>[14]</sup>用 0.1% 的 HgCl<sub>2</sub> 对暖地大叶藓的茎尖消毒 8 min 时存活率最高。苔藓植物因长期生长于野外，茎段上所带杂菌较多，容易使消毒不彻底，Duckett 等<sup>[10]</sup>曾用洗洁精作为表面活性剂对孢子体进行消毒，起到很好的作用。本试验在消毒前加入数滴洗洁精作为表面活性剂也得到了较好的效果。本试验确定最佳消毒液浓度和消毒时间为：0.02% 升汞消毒 45~60 s。另外，本试验除了从东亚砂藓外植体的切口处得到原丝体外，有些在叶腋处还直接分化形成了配子体，这与 Chen 等<sup>[14]</sup>所得的结

果一致。

Basile 认为<sup>[21]</sup>在进行苔藓植物的组织培养时, 应至少尝试 3 种大量元素培养基以便挑选最佳培养基。不同苔藓植物对培养基质的要求是不同的, 一直以来, 寻找每种苔藓植物的合适培养基已成为研究的重点。本试验选择 MS、改良的 Knop、改良的 Beneck 培养基用于东亚砂藓组培的初始试验。其中 MS 培养基为有机培养基, 改良的 Knop 和 Beneck 培养基为无机盐培养基。经过一系列的试验发现, 消毒完的配子体接种到无机盐培养基上时几乎所有材料都染菌, 而在有机培养基 MS 上染菌率低, 生长状况较好。分析其原因可能是东亚砂藓所含基因及代谢机制不同于其他苔藓植物, 存有一套独特的细胞分化机制, 能在有机培养基上长势良好, 也可能是有机物质调控了基因的表达, 抑制了其他有害菌的滋生, 而促进了东亚砂藓配子体的生长。目前, 还未见有这种现象的相关报道, 有待进一步的深入研究。

糖能为苔藓植物的生长提供碳源, 且对不同苔藓植物的影响是不同的。Sabovljevic 等<sup>[22]</sup>指出果糖能促进真藓(*Bryum argenteum*)原丝体的生长和配子体的分化, 但抑制了波叶仙鹤藓(*Atrichum undulatum*)的生长。Ahmed 等认为<sup>[11]</sup>1%蔗糖对 *Cratoneuron decipiens* 配子体的生长起作用, 而高浓度蔗糖(4%)会对配子体的生长产生负作用。张楠等<sup>[23]</sup>研究发现, 蔗糖对细叶小羽藓(*Haplocladium microphyllum*)植株生长的促进作用不明显, 并抑制原丝体的生长。本试验中, 高浓度的蔗糖会使东亚砂藓无菌配子体褐化至死亡, 3%蔗糖对促进配子体分化出新的原丝体和配子体效果明显。Smeekens 等<sup>[24,25]</sup>提出, 糖类在植物的整个生活史中有很重要的信号转导功能, 糖类信号控制基因的表达。因而, 在东亚砂藓组织培养过程中, 糖类也很有可能参与了信号转导, 从而调控配子体的生长。

总之, 本研究虽然从技术方面看并不十分复杂, 却成功解决了以东亚砂藓配子体为试验材料消毒难的问题, 该方法具有操作简单, 成本低, 省时

省力等优点, 可为其它苔藓植物组织培养提供一定的参考。

## 参考文献:

- [1] 吴鹏程. 苔藓植物生物学[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 1-357.
- [2] 黎兴江. 中国苔藓志: 第3卷[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 54-57.
- [3] Ohta Y, Hirose Y. Induction and characteristics of cultured callus from some liverworts of Jungermanniales[J]. *J Hattori Bot Lab*, 1982, 53: 239-244.
- [4] Hatcher R E. Sporeing development in the genus *Lepidolaena*[J]. *J Hattori Bot Lab*, 1963, 26: 10-14.
- [5] Mehra P N, Pahwa M S. Phenotypic variations in *Fossombronia himalayensis* Kash. *In vitro*-effect of sugars, auxins, growth substances and growth inhibitors[J]. *J Hattori Bot Lab*, 1976, 40: 317-395.
- [6] Sharon E B B. The sporeing ontogeny of *Pellia epiphylla* (L.) Cord and *Pellia neesiana* (Gott.) Limpr. With special reference to the protonema [J]. *J Hattori Bot Lab*, 1996, 79: 115-128.
- [7] Sabovljevic M, Bijelovic A, Dragicevic I. *In vitro* culture of mosses: *Aloina aloides* (K. F. Schultz) Kindb., *Brachythecium velutinum* (Hedw.) B. S. G., *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid., *Eurhynchium praelongum* (Hedw.) B. S. G. and *Grimmia pulvinata* (Hedw.) Sm. Turkish [J]. *J Bryol*, 2003, 27: 441-446.
- [8] Rowntree J K. Development of novel methods for the initiation of *in vitro* bryophyte cultures for conservation[J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2006, 87: 191-201.
- [9] Vujicic M, Sabovljevic A, Sabovljevic M. Axenically culturing the bryophytes: A case study of the moss *Dicranum scoparium* Hedw. (Dicranaceae, Bryophyta) [J]. *Botanica Serbica*, 2009, 33 (2): 137-140.
- [10] Duckett J Q, Burch J, Fletcher P W, Matcham H W, Read D J, Russell A J, Pressel S. *In vitro* cultivation of bryophytes: a review of practicalities, problems, progress and promise [J]. *J*

- Bryol, 2004, 26: 3–20.
- [11] Ahmed M G U, Shin S L, Lee C H. *In vitro* culture responses of *Cratoneuron decipiens* (Brid.) G. Roth gametophytes for micropropagation [J]. *Hort Environ Biotechnol*, 2011, 52(6): 614–620.
- [12] 高永超, 沙伟, 张晗. 不同植物生长物质对牛角藓愈伤组织诱导的影响[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(1): 29–32.
- [13] 李晓毓, 吴翠珍, 熊源新, 姜业芳, 杨志平, 何琳. 尖叶匍灯藓的组织培养及显微观察[J]. 山地农业生物学报, 2006, 25(3): 217–222.
- [14] Chen Y Y, Low Y X, Guo S L, Cao T. Successful tissue culture of the medicinal moss *Rhodobryum giganteum* and factors influencing proliferation of its protonemata [J]. *Ann Bot Fenn*, 2009, 46 (6): 516–524.
- [15] 肖显华, 王顺珍, 林荣双, 郑秋生. 植物材料表面消毒方法的改进[J]. 生物技术, 1999, 9(1): 43–45.
- [16] Luretta D S, Barbara B L, James A L. Bacteria isolated from moss and their effect on moss development [J]. *Bot Gaz*, 1981, 142(4): 512–518.
- [17] Hornsehuh M, Grotha R, Kutsehera U. Epiphytic bacteria associated with the bryophyte *Funaria hygrometrica*: Effect of *Methylobacterium* strains on protonema development [J]. *Original Paper*, 2002, 682–687.
- [18] 周甜甜. 几种藓类植物配子体再生体系的建立[D]. 曲阜: 曲阜师范大学, 2009.
- [19] 郎玉卓, 阚世超, 刘伟才, 周金川, 熊源新. 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.
- [20] 梁红柱, 郭晓莉, 赵建成. 大叶藓属(*Rhodobryum*)植物组织培养研究[J]. 贵州师范大学学报: 自然科学版, 2010, 28(4): 21–25.
- [21] Basile D V. A comparison of some macronutrient media used to culture bryophytes [J]. *Bryologist*, 1975, 78: 403–413.
- [22] Sabovljevic A, Sabovljevic M, Grubisic D, Konjevic R. The effect of sugars on development of two moss species (*Bryum argenteum* and *Atrichum undulatum*) during *in vitro* culture [J]. *Belg Journ Bot*, 2005, 138(1): 79–84.
- [23] 张楠, 杜宝明, 季梦成. 细叶小羽藓(*Haplodium microphyllum*)配子体组织培养的消毒方法及蔗糖浓度筛选[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2012, 38(3): 288–292.
- [24] Smeekens S, Rook E. Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants [J]. *Plant Physiol*, 1997, 115: 7–13.
- [25] Smeekens S. Sugar induced signal transduction in plants [J]. *Ann Rev Plant Physiol Mol Bio*, 2000, 51: 49–81.

(责任编辑: 张平)