

文章编号: 1000-5641(2014)04-0121-05

## 细叶小羽藓孢子的超低温保存

李秋萍, 姜丽佳, 鲁蓓蓓, 刘畅, 肖田中, 吴思苹, 王健, 朱瑞良

(华东师范大学 生命科学学院, 上海 200241)

**摘要:** 通过对干燥时间及预处理温度等超低温保存条件的实验探索, 筛选出细叶小羽藓 (*Haplocladium microphyllum*) 孢子超低温最适保存条件, 利用最适保存条件对细叶小羽藓孢子进行不同时间 (1 d、15 d、30 d、90 d、180 d) 的超低温保存研究, 并与未经任何处理直接投入液氮的孢子进行比较. 结果表明: (1) 细叶小羽藓孢子在硅胶干燥 5 h、 $-20^{\circ}\text{C}$  低温预处理和室温自来水化冻的条件下的平均萌发率最高 (88.26%), 干燥 20 h、常温处理的孢子与干燥 5 h、 $-20^{\circ}\text{C}$  低温预处理的孢子平均萌发率差异不显著; (2) 液氮保存 1 d 后的孢子平均萌发率 (88.26%) 高于未用液氮保存的孢子平均萌发率 (77.90%), 保存 30 d 后的孢子平均萌发率降为 6.03%, 而保存 90 d 后平均萌发率又出现上升的趋势, 达到 88.47%, 保存 180 d 后平均萌发率仍维持在 49.46%, 相对保持率为 63.49%. 因此, 使用液氮超低温长期保存细叶小羽藓孢子是可行的.

**关键词:** 苔藓植物; 细叶小羽藓; 孢子; 超低温保存

**中图分类号:** Q945.34 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1000-5641.2014.06.016

## Cryopreservation of spores of *Haplocladium microphyllum* (Hedw.) Broth

LI Qiu-ping, JIANG Li-jia, LU Bei-bei, LIU Chang,

XIAO Tian-zhong, WU Si-ping, WANG Jian, ZHU Rui-liang

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200241, China)

**Abstract:** Drying time and pretreatment temperature were explored to find out the optimum conditions of spores of *Haplocladium microphyllum* stored in Liquid nitrogen. Different time (1 d, 15 d, 30 d, 90 d, 180 d) of cryopreservation were studied using the optimum storage conditions and without any treatment. The spore average germination rate and protonema growth were compared before and after cryopreservation. The results showed that (1) After drying 5 h,  $-20^{\circ}\text{C}$  low temperature pretreatment and thawing at

收稿日期: 2013-12

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助; 华东师范大学大夏科研基金项目(KY2012DX-034);  
上海市大学生创新活动项目(201310269071)

第一作者: 李秋萍, 女, 硕士研究生, 研究方向为苔藓植物种质资源保存.

通信作者: 王健, 男, 助理研究员, 研究方向为苔藓植物分类及种质资源保存.

E-mail: jwang@bio.ecnu.edu.cn;

朱瑞良, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为苔藓植物学及药用植物学.

room temperature conditions, the spore average germination rate was highest (88.26%), there were no significant difference between the average germination of spores of drying 5 h, 15–18 °C and 20 h, –20 °C low temperature pretreatment; (2) The average germination rate (88.26%) of spores stored in liquid nitrogen for 1 d was comparatively higher than that of the control (77.90%), the average germination rate of spores stored in liquid nitrogen for 30 d dropped to 6.03%, the spore average germination rate stored for 90 d appeared to rise and reaching 88.47%, the spore average germination rate stored for 180 d remained at 49.46% and the relative retention rate reached 63.49%. The results demonstrated the feasibility of cryopreservation for the long-term storage of spores of *Haplocladium microphyllum*.

**Key words:** bryophyte; *Haplocladium microphyllum*; spore; cryopreservation

## 0 引 言

近年来,随着全球气候的变化及人类对自然越来越多的干预,许多植物的生存环境遭到破坏.苔藓植物作为物种数量仅次于被子植物的高等植物中的最原始类群,据保守的估计有 18 000 余种<sup>[1]</sup>,其在保持森林水土及为其它小型动物提供栖息地等方面发挥着重要的生态作用.但是,由于苔藓植物个体微小、结构简单(多数植物的叶片仅由一层细胞构成),对环境的变化及人类活动的影响更为敏感,物种多样性丧失速度更快.因此,应该尽早开展对苔藓植物种质资源的保存研究.

超低温保存是指在 –80 °C (干冰温度) 到 –196 °C (液氮温度) 甚至更低的温度下保存生物材料<sup>[2]</sup>.利用超低温技术保存植物新鲜组织非常适用于植物种质资源的长期保存<sup>[3]</sup>.相对于其他高等植物,国际上针对苔藓植物的超低温保存研究起步较晚,目前只有关于苔藓植物配子体的超低温保存研究报告,如 Burch & Wilkinson 2002 年利用液氮成功地保存了曲尾藓属一种 (*Ditrichum cornubicum*) 的原丝体<sup>[4]</sup>. Rowntree & Ramsay 2009 年运用超低温 (–196 °C) 保存技术保存了 21 种藓类植物和 1 种苔类植物的配子体和原丝体<sup>[5]</sup>.

孢子是苔藓植物的主要生殖细胞之一,因其发生具有季节性,甚至部分类群极少产生孢子体,因而使得孢子材料很难获得;另外,即使获得了孢子,但是孢子的消毒比较困难,因此,国内外目前还未开展对苔藓植物孢子的保存研究.孢子寿命因种而异,从短期到几十年的都有.有人推测孢子寿命的长短可能与其保存环境有关,如泥炭藓孢子在不适宜的环境中保存几周就丧失活力<sup>[6]</sup>.同时,孢子保存所需空间小且可以大量保存,是离体保存的理想材料<sup>[7]</sup>.因此,探讨苔藓植物孢子的有效保存方法很有必要.

细叶小羽藓 (*Haplocladium microphyllum* (Hedw.) Broth.) 隶属于羽藓科 (Thuidiaceae), 广泛分布于广东、湖北、吉林、江苏、辽宁、内蒙古、陕西、四川、台湾和云南等地,为华东地区常见藓类,由于细叶小羽藓可以富集多种重金属,是良好的大气环境指示植物<sup>[8,9]</sup>.笔者在前期建立的苔藓植物孢子无菌培养体系基础上<sup>[10]</sup>,通过对细叶小羽藓孢子的干燥时间及预处理温度等超低温保存条件的试验,探索细叶小羽藓孢子超低温保存的最适条件,并利用最适保存条件对细叶小羽藓孢子进行不同时间 (1 d、15 d、30 d、90 d 和 180 d) 的超低温保存研究,旨在寻找一种有效、长期的细叶小羽藓孢子保存方法,以期为更多的苔藓植物孢子的保存提供方法及技术参考.

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

细叶小羽藓孢子于2013年4月采自上海市华东师范大学闵行校区校园内海拔2 m的土面。新鲜的材料连同基质置于培养皿中,外包保鲜袋后置于人工智能气候培养箱(温度15 °C,光照周期12 h明暗交替)培养,直到孢子体完全成熟。

### 1.2 细叶小羽藓孢子超低温保存最适条件的筛选

超低温保存孢子时,在体式显微镜下选择色泽相近、饱满、洁净的成熟细叶小羽藓孢蒴,分别放置硅胶中0 h(ck)、5 h、10 h、20 h后取出,投入1.5 mL冻存管中,分别于15 °C(ck)、4 °C和-20 °C下低温预处理1 d后迅速投入液氮中。液氮保存1 d后取出,化冻方法参照种子植物花粉和蕨类植物孢子的室温(22~25 °C)下自来水化冻方法<sup>[11-13]</sup>,然后接种至Knop固体培养基中培养<sup>[10]</sup>,光强为3 000~3 200 lx,温度25 °C/18 °C,湿度保持在(80±5)%。接种8 d后,于显微镜下检测孢子的萌发率,以孢子原生质突出一极,叶绿体进入突起中形成萌发管定为孢子已萌发,并以未经液氮保存的新鲜孢子萌发率作为对照。

### 1.3 细叶小羽藓孢子不同时间的超低温保存

在最适超低温保存条件(硅胶干燥5 h,-20 °C低温预处理)下,选取成熟的细叶小羽藓孢蒴通过设置时间梯度(1 d、15 d、30 d、90 d和180 d)进行不同时间保存试验,将未经任何处理直接投入液氮的细叶小羽藓孢子设为对照。每个处理条件保存7~8个成熟的孢蒴,保存不同时间后取出,采用室温下自来水冲洗化冻并接种至Knop固体培养基培养。接种8 d后,于显微镜下检测孢子的平均萌发率,在统计萌发率的时候,每个处理条件接种3个培养皿,每个培养皿选取3个视野于光学显微镜下观察统计孢子平均萌发率。

### 1.4 数据分析

使用Excel 2007和PhotoshopCS5进行数据处理和图表制作,采用SPSS19.0程序对试验结果进行统计分析,均值的多重比较采用邓肯氏(Duncan)新复极差检验<sup>[14]</sup>和LSD法检验<sup>[14]</sup>,检验水平 $\alpha=0.05$ ,进行显著性比较。

## 2 研究结果

### 2.1 不同干燥时间和低温预处理对超低温保存后细叶小羽藓孢子萌发率的影响

表1显示,经过干燥的细叶小羽藓孢子平均萌发率普遍高于未经干燥的孢子的平均萌发率,且未经低温预处理的孢子在干燥20 h后平均萌发率高达88.11%,而未经干燥的孢子在不同温度低温预处理下平均萌发率都比较低(最高为54.73%),说明干燥比低温预处理对细叶小羽藓孢子超低温保存更有利。孢子经不同低温预处理后的平均萌发率也存在差异,在4 °C低温预处理下,干燥5 h~20 h条件下孢子平均萌发率均达到75%以上,并在干燥20 h下达到最高86.78%;在-20 °C低温预处理下,干燥5 h的孢子平均萌发率达到最高88.26%,随着干燥时间加长,平均萌发率又逐渐降低。综合以上结果,硅胶干燥5 h、-20 °C低温预处理1 d的孢子平均萌发率最高(88.26%),可作为细叶小羽藓孢子超低温保存前的最适处理条件。硅胶干燥20 h、常温处理的细叶小羽藓孢子平均萌发率与最适处理条件下的孢子平均萌发率差异不显著。

### 2.2 细叶小羽藓孢子超低温保存不同时间后的平均萌发率

表2显示细叶小羽藓孢子在最适保存条件下超低温保存不同时间后的保存效果。在最适保存条件下,细叶小羽藓孢子液氮保存不同时间后均有一定的萌发率(6.03%~88.47%),且

保存 1 d 后平均萌发率为 88.26%, 相对保持率达 113.30%, 明显高于未经液氮保存的孢子平均萌发率 (77.90%)。随着保存时间的增长, 孢子的平均萌发率呈现先降后升再降的趋势, 至 30 d 时的孢子平均萌发率达最低, 仅为 6.03%; 超低温保存时间继续延长到 90 d 的孢子平均萌发率又升高至 88.47%, 相对保持率为 113.50%; 保存 180 d 的孢子平均萌发率又降为 49.46%, 相对保持率为 63.46%。直接液氮保存而未作其他处理的细叶小羽藓孢子平均萌发率普遍不高 (7.33%~8.13%), 保存 30 d 的平均萌发率为 0。

表 1 不同干燥时间和低温预处理对超低温保存后细叶小羽藓孢子萌发率的影响

Tab. 1 The effect of drying time and low temperature pretreatment on spores germination rate of *Haplocladium microphyllum* after cryopreservation

干燥时间/h	温度/(°C)		
	15~18(ck)	4	-20
ck	53.25±4.67 <sup>c</sup> (68.36%)	27.97±2.05 <sup>d</sup> (35.91%)	54.73±6.07 <sup>c</sup> (70.26%)
5	28.69±4.98 <sup>d</sup> (36.83%)	84.83±4.27 <sup>ab</sup> (108.90%)	88.26±4.30 <sup>a</sup> (113.30%)
10	77.15±7.40 <sup>b</sup> (99.03%)	79.93±6.61 <sup>ab</sup> (102.61%)	59.76±7.44 <sup>c</sup> (76.71%)
20	88.11±3.38 <sup>a</sup> (113.10%)	86.78±4.94 <sup>ab</sup> (111.40%)	53.76±12.50 <sup>c</sup> (69.01%)

注: 萌发率用平均值±标准差表示; 括号中的数值为相对保持率, 即 LN 保存后的平均萌发率/LN 保存前的平均萌发率。字母相同者表示差异不显著, 字母不同者表示差异显著 ( $\alpha=0.05$ )

表 2 细叶小羽藓孢子超低温保存后的萌发率

Tab. 2 Cryopreservation of spores of *Haplocladium microphyllum*

保存时间/d	平均萌发率/%	
	最适保存条件下液氮保存	液氮保存(ck)
1	88.26±5.49 <sup>a</sup> (100.50%)	7.33±3.28 <sup>d</sup> (9.41%)
15	35.93±5.72 <sup>c</sup> (46.12%)	8.13±3.75 <sup>d</sup> (10.44%)
30	6.03±1.37 <sup>de</sup> (7.74%)	0±0 <sup>e</sup> (0%)
90	88.47±7.41 <sup>a</sup> (113.5%)	0±0 <sup>e</sup> (0%)
180	49.46±3.73 <sup>b</sup> (63.49%)	0±0 <sup>e</sup> (0%)

注: 萌发率用平均值±标准差表示; 括号中的数值为相对保持率, 即 LN 保存后的平均萌发率/LN 保存前的平均萌发率。字母相同者表示差异不显著, 字母不同者表示差异显著 ( $\alpha=0.05$ )

### 3 讨 论

花粉的适宜含水量是实现其超低温保存成功的关键因素, 而低温预处理效果则与花粉含水量不同而有较大差别, 在含水量较低时, 直接投入液氮比经过低温预处理的保存效果好, 而对于含水量较高的花粉, 低温预处理则有利于细胞内的水流到细胞外结冰而发生保护性脱水, 从而提高花粉的成活率<sup>[15]</sup>。这与细叶小羽藓孢子的超低温保存效果一致, 经过硅胶干燥的细叶小羽藓孢子因含水量较低, 其超低温保存后的效果普遍要好于未经干燥的孢子。干燥时间较短含水量较高的孢子在进行 -20 °C 低温预处理 1 d 后的超低温保存效果最佳。对比所有处理条件, 硅胶干燥 5 h、-20 °C 低温预处理 1 d 是细叶小羽藓孢子超低温保存的最适处理条件。硅胶干燥 20 h、不经过低温预处理的细叶小羽藓孢子平均萌发率与最适处理条件下的孢子平均萌发率不存在显著性差异, 也可作为细叶小羽藓孢子超低温保存前的处理方法。

理论上, 活细胞在液氮保存下细胞内的物质代谢和生长活动几乎完全停止, 细胞、组织和器官在长期的超低温保存过程中不会引起遗传性状的改变, 也不会改变形态发生的潜能<sup>[13,16]</sup>。在花粉的超低温保存研究中, 超低温保存 10 年的桃花花粉和美国山核桃花粉仍具

有活力<sup>[17,18]</sup>。而细叶小羽藓孢子在超低温保存 1~180 d 后, 孢子的平均萌发率具显著性的差异, 随着保存时间的加长, 孢子平均萌发率呈现先降后升再降的趋势, 短期保存 (30 d) 的孢子平均萌发率下降最多, 保存 90 d 的孢子平均萌发率又升高至 88.47%, 保存 180 d 的孢子平均萌发率下降到 49.46%。在芍药和梅花花粉及大叶黑桫欏孢子的超低温保存中也观察到类似现象<sup>[13]</sup>, 推测这一现象可能与孢子在超低温保存过程中受到不同程度的伤害而又存在修复的过程。

虽然细叶小羽藓孢子在液氮保存 180 d 后的平均萌发率有所下降, 但与新鲜孢子平均萌发率相比仍维持在一半左右 (相对保持率在 49.46%)。因此, 利用液氮超低温方法长期保存细叶小羽藓孢子是可行的。在接下来的研究中将利用此方法保存更多种类的苔藓植物孢子, 以检验这种方法的适用性。

### [参 考 文 献]

- [1] ZHU R L, WANG D, XU L, et al. Antibacterial activity in extracts of some bryophytes from China and Mongolia [J]. Journal of the Hattori Botanical Laboratory, 2006, 100: 603-615.
- [2] 卢新雄, 陈晓玲. 我国作物种植资源保存与研究进展 [J]. 中国农业科学, 2003, 36(10): 1125-1132.
- [3] BUNN E, TURNER S, PANAI A M, et al. The contribution of in vitro technology and cryogenic storage to conservation of indigenous plants [J]. Australian Journal of Botany, 2007, 55: 345-355.
- [4] BURCH J, WILKINSON T. Cryopreservation of protonemata of *Ditrichum cornubicum* (Paton) comparing the effectiveness of four cryoprotectant pretreatments [J]. Cryo Letters, 2002, 23: 197-208.
- [5] ROWNTREE J K, RAMSAY M M. How bryophytes came out of the cold: Successful cryopreservation of threatened species [J]. Biodiversity and Conservation, 2009, 18: 1413-1420.
- [6] CLYMO R S, DUCKETT J G. Regeneration of *Sphagnum* [J]. New Phytologist, 1986, 102: 589-614.
- [7] REED B M. Plant Cryopreservation: A Practical Guide [M]. New York: Springer, 2007.
- [8] 吴鹏程. 中国苔藓志 (第六卷) [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [9] 张楠, 杜宝明, 季梦成. 不同土壤栽培对细叶小羽藓 (*Haplocladum microphyllum*) 生长发育的影响 [J]. 浙江大学学报: 理学版, 2012, 39(5): 576-581, 605.
- [10] 李秋萍, 吴思苹, 鲁蓓蓓, 等. 藓类植物孢子生活力的快速检测方法初探 [J]. 西北植物学报, 2013, 33(10): 2126-2130.
- [11] AGRAWAL D C, PAWAR S S, MASCARENHAS A F. Cryopreservation of spores of *Cyathea spinulosa* Wall. Ex. Hook. f.— an endangered tree fern [J]. Journal of Plant Physiology, 1993, 142: 124-126.
- [12] 刘燕, 张亚利. 梅花花粉超低温保存研究 [J]. 北京林业大学学报, 2004, 12 (增刊): 22-25.
- [13] 徐艳, 刘燕, 石雷. 大叶黑桫欏孢子超低温保存 [J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(1): 55-57.
- [14] 杜荣骞. 生物统计学. 2版 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2003.
- [15] 张亚利, 尚晓倩, 刘燕. 花粉超低温保存研究进展 [J]. 北京林业大学学报, 2006, 28(4): 139-147.
- [16] 简令成. 低温生物学与植物种质的长期保存 [J]. 植物学通报, 1998, 5(2): 65-68.
- [17] OMURA M, MATSUTA N, AKIHAMA T A, et al. Pollen preservation of Japanese apricot and mume [J]. Plant Genetic Resources News Letter, 1980, 43: 28-31.
- [18] SPARKS D, YATES I E. Pecan pollen stored over a decade retains viability [J]. HortScience, 2002, 37(1): 176-177.

(责任编辑 李万会)