

N-(2-氯-4-吡啶基)-*N'*-苯基脲(CPPU)对无疣墙藓原丝体发育与芽体发生的影响

黄士良¹ 李敏¹ 赵建成^{1,*} 张元明² 李辉¹ 范庆书¹

¹河北师范大学生命科学院, 石家庄 050016; ²中国科学院新疆生态与地理研究所, 乌鲁木齐 830011

提要 0.2、0.4、1.0及1.5 mg·L⁻¹ 4个浓度的*N*-(2-氯-4-吡啶基)-*N'*-苯基脲(CPPU)对无疣墙藓的孢子萌发没有显著影响, 但抑制绿丝体伸长和侧枝生成, 对芽体的分化有明显的促进, 且芽体发生数随浓度升高而增加。

关键词 无疣墙藓; *N*-(2-氯-4-吡啶基)-*N'*-苯基脲; 原丝体发育; 芽体发生

Effect of *N*-(2-chloro-4-pyridyl)-*N'*-phenylurea (CPPU) on Protonema Development and Bud Differentiation of *Tortula mucronifolia* Schwaegr.

HUANG Shi-Liang¹, LI Min¹, ZHAO Jian-Cheng^{1,*}, ZHANG Yuan-Ming², LI Hui¹, FAN Qing-Shu¹

¹College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China; ²Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China

Abstract The spores of *Tortula mucronifolia* Schwaegr. were treated with four different concentrations (0.2, 0.4, 1.0 and 1.5 mg·L⁻¹) of *N*-(2-chloro-4-pyridyl)-*N'*-phenylurea (CPPU). The results showed that CPPU had no evident effect on the spore germination, but inhibited the chloronema straight growth and branch formation; CPPU could promote bud differentiation significantly, and the numbers of bud increased with the increase of concentrations of CPPU.

Key words *Tortula mucronifolia* Schwaegr.; CPPU; protonema development; bud differentiation

苔藓植物的组织培养大多用植物生长调节剂处理, 诱导外植体产生愈伤组织, 再从愈伤组织上分化产生原丝体和芽体。近年来, 我们以苔藓植物的孢子为原始培养物, 用植物生长调节剂调节和诱导孢子萌发和原丝体分化, 来缩短芽体发生时间, 可在较短时间内得到大量成熟植株, 从而为苔藓植物次生代谢物和分子系统学的研究提供了丰富的实验材料^[1~7]。

植物生长调节剂*N*-(2-氯-4-吡啶基)-*N'*-苯基脲[*N*-(2-chloro-4-pyridyl)-*N'*-phenylurea, CPPU]是一种吡啶基苯脲类有机化合物。它能够促进植物生长和细胞分裂, 促使作物早熟, 增强作物的抗逆性, 且其生理活性高于一般的嘌呤型细胞分裂素, 又具低毒、低残留等特点, 所以, 经CPPU处理的苔藓植物不会造成自身伤害, 也不会因有毒物质残留而影响苔藓植物次生物质的提取^[8]。因此, 研究CPPU对苔藓植物原丝体发育和芽体发生的影响, 对缩短其芽体发生时间, 建立苔藓植物的快速人工繁殖体系具有一定的实践意义。

本文以无疣墙藓(*Tortula mucronifolia* Schwaegr.)为材料进行实验研究, 以期探讨CPPU在无疣墙藓孢子萌发、原丝体发育及其芽体发生过程中的作用。

材料与方法

无疣墙藓(*Tortula mucronifolia* Schwaegr.)是较典型的旱生藓类植物之一, 其生活周期短, 有利于实验室观察。

本文采用含有改良的Knop营养液的琼脂(Sigma公司产品)培养基质, 其组成有: 1 000 mg·L⁻¹ Ca(NO₃)₂·4H₂O、250 mg·L⁻¹ KNO₃、250 mg·L⁻¹ KH₂PO₄、250 mg·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O、3 mg·L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O、12.5 mg·L⁻¹ FeSO₄·7H₂O、微量

收稿 2004-11-17 修订 2005-03-20

资助 国家自然科学基金重大研究计划(90202019)、河北省自然科学基金(303150)和河北省教育厅项目(2002235)。*通讯作者(E-mail: zhaojiancheng@mail.hebtu.edu.cn, Tel: 0311-6269146)。

NaNO₃、1 000 mL 重蒸馏水, pH=7.0。CPPU 购自四川兰月科技有限公司。

实验步骤为: (1) 在上述改良 Knop 营养液中加入琼脂, 终浓度为 2%, 同时加入经过除菌的 CPPU, 其浓度分别为 0.2、0.4、1.0 和 1.5 mg·L⁻¹, 以不附加任何植物生长调节剂的培养基作对照, 每一浓度重复 4 次。(2) 把无疣墙藓的整个孢蒴浸入 75% 的酒精溶液中, 20 s 后取出, 并在无菌水中冲洗 5 次; 再用 10% 的次氯酸钠溶液浸泡 15 min, 无菌水冲洗 5 次后, 用镊子和解剖针将孢子挤出并散入无菌蒸馏水中, 制成适当浓度的孢子悬液。(3) 用吸管将稀释的孢子悬液接种于各培养基上。(4) 培养皿加盖后放在 250-D 型光照培养箱中培养, 温度为 (23±2) °C, 湿度为 85%, 光照度为 24 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光照时间 12 h·d⁻¹。(5) 自接种培养之日起, 每天定时镜检孢子萌发情况, 详细记录其个体发育状况, 并进行显微照相。(6) 统计孢子萌发率和芽体发生数。接种 1 d 后, 在每一个培养皿里随机抽取 3 个视野(10 倍物镜下), 统计每一视野内的孢子总数和萌发的孢子数目, 并计算孢子的单极、两极和三极萌发率, 每一浓度求其平均值即为该浓度条件下孢子的萌发率; 15 d 时, 在每一个培养皿里随机抽取 3 个视野(10 倍物镜下), 统计每一视野内的芽体总数, 每一浓度条件下求其平均值即为该浓度的芽体发生的数目。(7) 参数的测量。任意选取一个孢子萌发形成的原丝体测量。取最长的主轴原丝体测量其长度、直径及单个原丝体细胞的长度、直径, 各数值均取其最大值; 选取原丝体上最长的分枝, 测量分枝长度及直径; 对所取数值进行方差分析, 计算出结果。

实验结果

1 CPPU对无疣墙藓孢子萌发率的影响

孢子接种 2 d 后, 萌发率达到 15% 左右; 4 d 时, 孢子萌发率均达到 80% 以上; 5 d 时, 孢子的两极萌发率已达 8%。方差分析显示, 4 个浓度梯度条件下的孢子萌发率无显著差异(表 1)。

表 1 不同浓度 CPPU 对无疣墙藓孢子萌发率的影响
Table 1 Effect of different concentrations of CPPU on the spore germination rate of *T. mucronifolia*

CPPU 浓度 / mg·L ⁻¹	孢子萌发率/%			
	2 d	3 d	4 d	5 d (两极萌发率)
0 (对照)	14.1	74.1	83.3	8.5
0.2	15.4	71.6	89.4	9.3
0.4	12.9	69.5	87.7	7.2
1.0	12.7	61.4	87.3	8.2
1.5	15.1	70.8	85.1	7.2

2 CPPU对无疣墙藓原丝体发育的影响

10 d 时, 在显微镜下用测微尺测量丝状原丝体的长度、直径等性状, 观察不同浓度 CPPU 处理对无疣墙藓原丝体发育的影响。结果表明(表 2): (1) 在一定浓度范围内, 随着 CPPU 处理浓度的增加, 原丝体总长度和原丝体单个细胞的长度与直径都呈现逐渐减小的趋势; (2) 原丝体分枝长度和分枝逐渐减小; (3) 分枝数也相应随之减少; (4) 对原丝体的极向和直径的方差分析结果显示没有明显差异性。

3 CPPU对无疣墙藓绿丝体上芽体发生数量的影响

图 1 显示: 20 d 时, 未做处理和 0.2 mg·L⁻¹

表 2 不同浓度 CPPU 对无疣墙藓原丝体发育的影响

Table 2 Effect of different concentrations of CPPU on the protonema development of *T. mucronifolia*

CPPU 浓度/ mg·L ⁻¹	极向/ 个	原丝体长度/ μm	原丝体 直径/μm	原丝体单个细胞的 长度和直径/μm	分枝数/个	分枝长度/μm	分枝直径/μm
0 (对照)	1~2	366±12.6	14.2±0.75	(65.0±2.6)×(22.0±2.1)	5.5±0.28	320±11.9	23±1.5
0.2	1~2	326±12.1	13.4±0.60	(50.0±2.6)×(21.0±1.5)	4.8±0.30	300±10.2	20±1.2
0.4	1~2	318±11.2	11.4±0.65	(43.5±2.2)×(17.0±1.2)	4.4±0.27	290± 9.8	19±1.1
1.0	1~2	292±10.2	11.1±0.65	(40.0±1.8)×(16.5±0.9)	2.4±0.15	150± 9.5	17±0.9
1.5	1~2	280± 9.8	13.6±0.70	(38.0±1.6)×(16.0±0.9)	2.1±0.14	110± 8.5	16±0.6

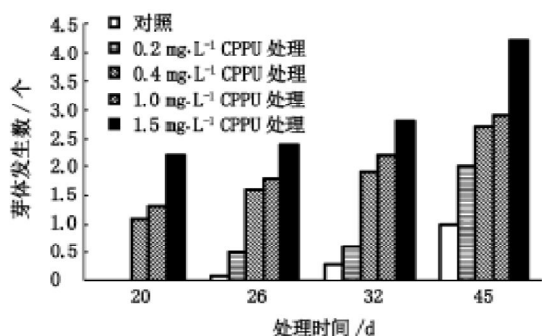


图1 不同浓度CPPU对无疣墙藓绿丝体上芽体发生数量的影响

Fig.1 Effect of different concentrations of CPPU on the numbers of bud differentiation on chloronema of *T. mucronifolia*

CPPU 处理的无疣墙藓绿丝体上均无芽体发生, 其余各浓度处理后, 均刺激芽体发生; 26 和 32 d 时, 未做处理和 0.2 mg·L⁻¹ CPPU 处理的无疣墙藓绿丝体上发生的芽体数平均 0.3 个, 0.4 mg·L⁻¹ 浓度条件下的芽体数平均 1.6 个, 1.0 和 1.5 mg·L⁻¹ 处理产生的芽体数平均 2.5 个; 45 d 时, 1.5 mg·L⁻¹ 浓度条件下的芽体数量为未做处理的 4.2 倍。

讨 论

从本文结果可初步得出如下结论:

(1) 在无疣墙藓孢子萌发阶段, 孢子萌发率几乎不受 CPPU 的影响。这说明无疣墙藓孢子萌发基本上不依赖外界营养和生长物质, 其固有的营养物质可供自身破壁萌发。

(2) CPPU 抑制无疣墙藓原丝体的发育。在无疣墙藓的绿丝体发育时期, 未做处理的绿丝体总长度为 1.5 mg·L⁻¹ CPPU 处理的 1.3 倍, 可见, CPPU 抑制绿丝体的伸长; 在无疣墙藓绿丝体的侧枝发生时期, CPPU 对其分枝数、分枝长度和直径发育的抑制作用逐渐加强, 二者呈正相关。

(3) CPPU 在无疣墙藓芽体发生过程中起促进

作用。17 d 时, 用 1.5 mg·L⁻¹ CPPU 处理的无疣墙藓的绿丝体上已经开始分化产生芽体, 比未做处理的提前了 7~8 d, 而且, 绿丝体上诱导产生的芽体数量也高出 3 倍。这显示出 CPPU 促进无疣墙藓原丝体发育的高效性。

(4) 高浓度的 CPPU (1.5 mg·L⁻¹) 会抑制芽体进一步发育形成成熟植株。在无疣墙藓芽体发生阶段, 用 1.5 mg·L⁻¹ CPPU 处理绿丝体, 其上发生的芽体有 30% 没有发育形成成熟植株, 而是变成块状的愈伤组织后坏死。其原因可能是: 1.5 mg·L⁻¹ CPPU 可破坏绿丝体内部决定桑葚状细胞团发育成芽体的生长激素的平衡, 从而导致桑葚状细胞团最终不能发育形成成熟植株, 而只产生外表尖刺状的团状组织。这种团状组织可能是绿丝体分化产生的愈伤组织, 其能否发育形成正常的成熟植株, 尚待进一步研究。

参考文献

- 1 吴鹏程主编. 苔藓植物生物学. 北京: 科学出版社, 1998. 23~55
- 2 Asakawa Y. Chemical constituents of bryophytes. *Prog Phytochem*, 1994, 65: 1~562
- 3 Braun M, Richter P. Relocalization of the calcium gradient and a dihydropyridine receptor is involved in upward bending by bulging of *Chara* protonemata, but not in downward bending by bowing of *Chara* rhizoids. *Planta*, 1999, 209: 414~423
- 4 Kasten B, Buck F, Nuske J et al. Cytokinin affects nuclear- and plastome-encoded energy-converting plastid enzymes. *Planta*, 1997, 201: 261~272
- 5 高永超, 薛红, 沙伟等. 大量元素对牛角藓愈伤组织悬浮细胞的生理效应. *植物生理学通讯*, 2003, 39(6): 595~598
- 6 李艳红, 宋秀珍, 张便勤. 不同培养基及酶对立碗藓原丝体的作用研究. *植物研究*, 2004, 24(2): 192~196
- 7 刘晓红. 细胞分裂素、氯丙嗪对葫芦藓发育过程的影响. *西南师范大学学报*, 1998, 23(4): 476~480
- 8 侯勇, 马国瑞, 夏中梅等. CPPU 研究进展. *植物营养与肥料学报*, 1999, 5(2): 106~114