



# 藓类植物孢子生活力的快速检测方法初探

李秋萍<sup>1</sup>,吴思萍<sup>1</sup>,鲁蓓蓓<sup>1</sup>,张 煜<sup>2</sup>,王 健<sup>1\*</sup>,朱瑞良<sup>1</sup>

(1 华东师范大学 生命科学学院,上海 200241;2 成都市石室小学,成都 610058)

**摘要:**通过对温度和光照条件的实验探索,筛选出金发藓(*Polytrichum commune*)和细叶小羽藓(*Haplocladium microphyllum*)2种藓类孢子萌发的最适条件。采用碘-碘化钾染色法、TTC染色法、红墨水染色法、亚甲基蓝染色法对6种藓类植物孢子的生活力进行测定,并将测得的生活力结果与孢子萌发率进行了比较分析。结果表明,亚甲基蓝染色法测定的藓类植物孢子平均生活力百分率与孢子平均萌发率最为接近,且染色效果明显,可用于苔藓植物孢子生活力的快速测定。亚甲基蓝染色法测得的孢子生活力(*x*)与其离体萌发率(*y*)的相关性达到极显著水平( $r=0.976$ ),其回归方程为 $y=-8.547+1.069x(P<0.01)$ ,可通过孢子生活力方便预测萌发率。

**关键词:**苔藓植物;孢子生活力;孢子萌发率;检测方法

中图分类号:Q94-331 文献标志码:A

## A Rapid Detection Method of Moss Spore Viability

LI Qiuping<sup>1</sup>, WU Siping<sup>1</sup>, LU Beibei<sup>1</sup>, ZHANG Yu<sup>2</sup>, WANG Jian<sup>1\*</sup>, ZHU Ruiliang<sup>1</sup>

(1 School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200241, China; 2 Shishi Primary School, Chengdu 610058, China)

**Abstract:** Temperature and light conditions were explored to find out the optimum conditions of spore germination of *Polytrichum commune* and *Haplocladium microphyllum*. To find the suitable method for rapid detect of spore viability of mosses, I<sub>2</sub>-KI reaction method, TTC reaction method, red ink staining method, and methylene blue staining method were studied based on six species of mosses by comparing the spore viability with the germination results. The results indicated that methylene blue staining method got the most similar results with the germination rate of moss spores and showed clear staining effect, which can be used for the rapid detection of the viability of bryophyte spores. The correlation between spore viability (*x*) detected by methylene blue staining and germination rate (*y*) *in vitro* reaches a very significant level ( $r=0.976$ ). The regression equation between spore germination ratio (*y*) and viability (*x*) can be obtained:  $y=-8.547+1.069x(P<0.01)$ . The germination rate can be detected conveniently by spore viability.

**Key words:** bryophyte; spore viability; spore germination ratio; detection method

苔藓植物是一类以孢子作为有性繁殖方式的高等植物,为了长期保护珍稀、濒危的种类,国际上针对苔藓植物配子体的保存研究工作已经开展<sup>[1-2]</sup>,但是关于苔藓植物孢子的保存研究较少,原因可能在于苔藓植物孢子体生长具有季节性,很难获得成熟

的孢子体材料。而要进行苔藓植物孢子保存研究首先要能够成功地测定孢子的生活力。目前,主要还是通过对材料的组织培养,根据离体萌发率来评价苔藓植物孢子的生活力,该方法耗费时间长并需要复杂的无菌操作,而一些珍稀、濒危种类不具备较多

收稿日期:2013-05-27;修改稿收到日期:2013-09-04

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金;华东师范大学大夏科研基金(KY2012DX-034)

作者简介:李秋萍(1985—),女,在读硕士研究生,主要从事苔藓植物种质资源保存研究。E-mail:51101300023@ecnu.cn

\*通信作者:王健,助理研究员,主要从事苔藓植物分类及种质资源保存研究。E-mail:jwang@bio.ecnu.edu.cn/lejeunea@163.com

的孢子材料用于离体萌发检测。因此,探索快速又节省材料的孢子生活力检测方法具有重要意义。

目前,已经有多种方法成功地应用于种子和花粉生活力的检测<sup>[3-7]</sup>,但是关于苔藓和蕨类等孢子植物孢子的生活力检测还未见报道,笔者通过选择几种常用的种子及花粉生活力测定方法对6种藓类植物孢子生活力进行测定,并将测定结果与孢子离体萌发率进行比较,旨在寻找一种简单、快捷的苔藓植物孢子生活力检测方法,为苔藓植物孢子保存研究中的萌发率快速检测体系的建立提供技术支持,也为蕨类植物等其他孢子植物的孢子活力检测提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

参试的6种藓类植物(表1)中金发藓的孢子材料于2011年采自浙江西天目山,其余5种藓类植物的孢子都于2012年分别采自四川、云南两地,在野外将新鲜材料放置于培养皿中带回实验室于人工智能气候培养箱(温度15℃,光照周期12 h明暗交替)培养,直至孢子体成熟,凭证标本存于华东师范大学植物标本馆(HSNU)。

### 1.2 孢子萌发率测定

通过对温度(变化周期12 h/12 h,设计20℃/13℃、25℃/18℃和30℃/23℃3个水平)、光照强度(变化周期12 h/12 h,其中夜晚光照强度为0 Lx,白天光照强度设计成2 000~2 200、3 000~3 200 Lx和4 000~4 200 Lx3个水平)的正交实验设计,采用Knop培养基和无菌水2个条件培养金发藓和细叶小羽藓的孢子,共设置9个不同培养条件的实验组,每个Knop培养基做3个平行重复,每个条件做一个无菌水对照组。保持培养环境相对湿度为(80±5)%,每天观察并记录孢子萌发情况。

实验所用的Knop培养基参照李晓毓等<sup>[8]</sup>的方法配制,其中硫酸亚铁( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )调整为0.025 g/L,硫酸锰( $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )调整为0.0075 g/L,蔗糖和琼脂均为1%,pH 5.8,高压灭菌后分装到培养皿中待用。选取饱满、未开裂的成熟孢蒴,先用无菌水清洗3次,然后用75%酒精消毒1 min,再用无菌水清洗3次,接着用0.5%次氯酸钠(NaClO)消毒1 min,再用无菌水清洗3次,并在1.5 mL Ep管中挤破孢蒴,制成1 mL孢子悬液,接种到Knop培养基上。接种后每天在显微镜下统计萌发率,直到萌发率稳定。

无菌水培养通过将3~4 mL无菌水倒入培养皿中,再将消毒过的孢子悬液接种到培养皿中,封口膜密封好。接种后每天在显微镜下统计萌发率,直到萌发率稳定。

### 1.3 孢子生活力测定

**1.3.1 I<sub>2</sub>-KI染色法** 参照杨发君等<sup>[3]</sup>的测定方法,选取成熟藓类孢蒴置于1 mL Ep管中,加入几滴I<sub>2</sub>-KI染液,充分振荡使孢子从孢蒴中完全释放并悬浮均匀,用吸管吸取适量孢子悬液于载玻片上,盖上盖玻片并在光学显微镜下计数,孢子壁被染成淡蓝色的孢子具有活力,未染色的缺失活力。

**1.3.2 TTC(2,3,5-氯化三苯基四氮唑)染色法** 参照张志良等<sup>[9]</sup>方法配制成0.5%TTC染液,取成熟的孢蒴打开将孢子直接撒在载玻片上,加2滴染液,用解剖针将孢子搅拌均匀,盖上盖玻片,置于35℃恒温箱中30 min。然后在显微镜下观察,具有活力的孢子被染成红色,无色的为没有活力的孢子。

**1.3.3 红墨水染色法** 将成熟的藓类孢蒴放入1 mL的Ep管中,加入几滴5%普通红墨水,充分振荡使孢子从孢蒴中完全释放并悬浮均匀,水浴1 h后用吸管吸取适量孢子液于载玻片上,并在光学显

表1 实验材料  
Table 1 Materials and information of collections

种名 Species	采集地 Collection site	采集时间 Collection time	生境 Habit
金发藓 <i>Polytrichum commune</i>	浙江西天目山 West Tianmu Mt., Zhejiang	2011.11	土生, 海拔920 m Epigaeus, Altitude 920 m
反扭藓 <i>Timmiella anomala</i>	云南贡山 Gongshan, Yunnan	2012.07	石生, 海拔1 444 m Epilithic, Altitude 1 444 m
梨蒴珠藓 <i>Bartramia pomiformis</i>	云南贡山 Gongshan, Yunnan	2012.07	石壁生, 海拔1 404 m On cliff, Altitude 1 404 m
卵叶泥炭藓 <i>Sphagnum ovatum</i>	四川黑水 Heishui, Sichuan	2012.08	土生, 海拔3 579 m Epigaeus, Altitude 3 579 m
侧枝匍灯藓 <i>Plagiomyrium maximoviczii</i>	云南金平 Jinping, Yunnan	2012.11	岩面薄土生, 海拔1 927 m On rock with a thin layer of soil, Altitude 1 927 m
近缘紫萼藓 <i>Grimmia affinis</i>	四川黑水 Heishui, Sichuan	2012.08	树干生, 海拔3 691 m On tree trunks, Altitude 3 691 m
细叶小羽藓 <i>Haplocladium microphyllum</i>	上海华东师范大学 East China Normal University, Shanghai	2012.04	土生, 海拔15 m Epigaeus, Altitude 15 m

微镜下计数,被染成红色的孢子不具生活力,未染色的孢子具有活力。

**1.3.4 亚甲基蓝染色法(也称吕氏碱性美兰染色法)** 参照杨发君等<sup>[3]</sup>的方法配制染液,将成熟的孢子置于载玻片上,加1滴0.1%的亚甲基蓝溶液,用解剖针搅拌均匀,盖片染色2 min。在光学显微镜下观察,凡是染成蓝色的为有活力的孢子,没有染蓝或染色较浅的为不具活力的孢子。

以上实验中每种方法均重复3次,每个重复选取3个视野观察,然后计算孢子活力的百分率和孢子萌发率。孢子活力百分率和孢子离体萌发率的计算公式如下:

$$\text{孢子活力} = (\text{有生活力孢子数}/\text{孢子总数}) \times 100\%$$

$$\text{孢子萌发率} = (\text{已萌发的孢子数}/\text{孢子总数}) \times 100\%$$

#### 1.4 数据分析

采用SPSS 19.0程序对实验结果进行统计分析,均值的多重比较采用邓肯氏(Duncan)新复极差检验和LSD法检验,检验水平 $\alpha=0.05$ 。相关性分析通过将孢子生活力百分率与萌发率进行对比,通过线性回归分析的方法,研究孢子生活力与萌发率

之间的相关性。

## 2 结果与分析

### 2.1 光照和温度条件对2种藓类孢子萌发率的影响

表2显示,在相同光照条件下,2种藓类的孢子萌发率均在25℃/18℃下最高,且Knop培养基高于无菌水培养;而在相同温度条件下,2种藓类的孢子萌发率均以4 000~4 200 Lx光强下最低,其余2个光强处理接近,但3 000~3 200 Lx下Knop培养基与无菌水培养更接近;同时,金发藓孢子萌发率最高值(79.12%)出现在25℃/18℃、3 000~3 200 Lx下Knop培养基上,而细叶小羽藓孢子萌发最高值(87.51%)出现在25℃/18℃、3 000~3 200 Lx下无菌水培养中。综合以上结果筛选出适合于金发藓和细叶小羽藓孢子萌发的最佳组织培养条件为光强3 000~3 200 Lx、温度25℃/18℃,湿度保持在(80±5)%,此时金发藓和细叶小羽藓孢子的萌发率在Knop培养基上分别为79.12%和86.45%,而且在这个条件下的无菌水和Knop培养基所培养的孢子萌发率差异最小,绝对差值仅为1%左右。

表2 不同光照和温度条件下金发藓和细叶小羽藓孢子萌发率  
Table 2 Spore germination rates of *P. commune* and *H. microphyllum*  
under different light intensities and temperatures/%

种名 Species	温度 Temperature /℃	光照强度 Light intensity/Lx					
		2 000~2 200		3 000~3 200		4 000~4 200	
		Knop	无菌水 Sterile water	Knop	无菌水 Sterile water	Knop	无菌水 Sterile water
<i>P. commune</i>	20/13	35.39	25.77	40.43	31.27	30.95	21.27
	25/18	78.95	73.92	79.12	78.05	69.76	72.86
	30/23	61.28	41.84	60.36	41.64	53.94	43.13
<i>H. microphyllum</i>	20/13	81.65	73.05	79.46	74.32	75.52	67.94
	25/18	87.42	83.06	86.45	87.51	86.91	75.38
	30/23	85.07	76.06	86.59	78.64	84.32	76.19

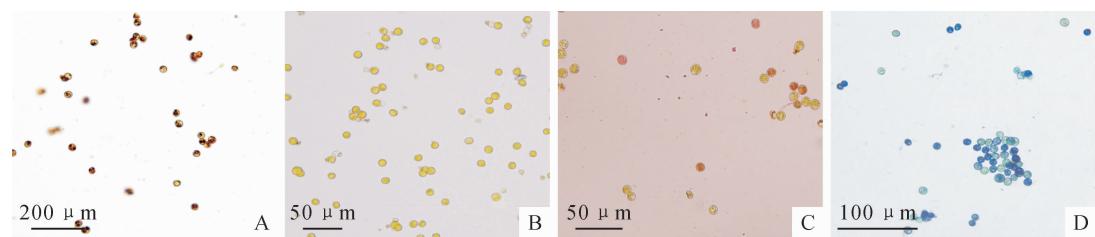


图1 4种孢子染色方法效果比较

A. 金发藓孢子I<sub>2</sub>-KI染色结果;B. 金发藓孢子TTC染色结果;C. 反扭藓孢子红墨水染色结果;D. 反扭藓孢子亚甲基蓝染色结果

Fig. 1 Results of four kinds of spores staining methods

A. The staining effect of spores of *P. commune* with I<sub>2</sub>-KI; B. The staining effect of spores of *P. commune* with TTC;

C. The staining effect of spores of *T. anomala* with red ink; D. The staining effect of spores of *T. anomala* with methylene blue

表3 4种孢子生活力测定方法比较  
Table 3 Comparison of four methods on spore viability detection

处理方法 Treatment method	有生活力 Viability	缺失生活力 No viability	清晰度 Definition	染色时间 Staining time
I <sub>2</sub> -KI	孢子壁呈蓝色 Spore wall is blue	未着色 Unstained	不清晰 Unclear	5 min
TTC	未着色 Unstained	未着色 Unstained	—	30 min
红墨水 Red ink	未着色 Unstained	红色 Red	清晰 Clear	35 ℃水浴 1 h 35 ℃ bath 1 h
亚甲基蓝 Methylene blue	蓝色 Blue	未着色或染色较浅 Unstained or light stained	清晰 Clear	2 min

表4 6种藓类新鲜孢子平均萌发率及4种方法测得的孢子平均生活力  
Table 4 Average germination rates and viability of six mosses based on four detection methods

种名 Species	平均萌发率 Average germination rate/%	平均生活力 Average viability/%			
		I <sub>2</sub> -KI	TTC	红墨水 Red ink	亚甲基蓝 Methylene blue
金发藓 <i>Polytrichum commune</i>	79.12±3.30c	91.15±1.38b	—	95.03±1.07a	80.34±1.29c
反扭藓 <i>Timmiella anomala</i>	79.55±2.13b	90.06±2.03a	—	71.45±4.36c	84.52±3.53ab
梨蒴珠藓 <i>Bartramia pomiformis</i>	87.50±2.64b	—	—	96.10±2.00a	91.22±0.79b
卵叶泥炭藓 <i>Sphagnum ovatum</i>	81.21±2.87b	—	—	98.65±0.58a	84.37±2.49b
侧枝匍灯藓 <i>Plagiomnium maximoviczii</i>	89.28±1.84b	98.17±1.45a	—	76.32±2.67c	89.91±1.46b
近缘紫萼藓 <i>Grimmia affinis</i>	98.68±1.10a	93.21±1.10b	—	91.86±1.80b	99.87±0.10a

注:—表示无法分辨染色效果的孢子。平均生活力和平均萌发率以平均值±标准差表示,3次重复;6种藓类孢子独立进行生活力与萌发率的差异显著性比较,同行字母不同者表示在0.05水平差异显著。

Note:—presents spores that are unable to distinguish the effect of staining; Average viability and average germination rate were expressed as mean±standard deviation with 3 times repeat; Significant comparison have been done between viability and germination of six kinds of spores separately. The different normal letters stand for significant difference at 0.05 level.

## 2.2 不同测定方法下藓类孢子活力的比较分析

采用4种不同染色方法对6种藓类孢子活力的测定结果见表3。其中,I<sub>2</sub>-KI染色法只能将有活力的孢子壁边缘染成淡蓝色,经过35℃温水浴、敲击孢子外壁以及延长染色时间等处理,其染色效果都不明显,不利于孢子活力的统计(图1,A);TTC染色法对6种藓类的孢子都没效果,孢子和孢子壁基本都不着色(图1,B);红墨水法和亚甲基蓝染色法的染色效果都很明显,都可用于藓类孢子活力的检测,但是红墨水染色法需要经过1 h的水浴处理,增加了操作的复杂性(图1,C,D)。

## 2.3 各方法孢子活力与萌发率检测结果比较

6种藓类孢子活力的不同测定方法所得结果见表4。结果表明,反扭藓的孢子活力在红墨水法与I<sub>2</sub>-KI和亚甲基蓝2种方法间都有显著性差异,而其在亚甲基蓝法与I<sub>2</sub>-KI法间无显著性差异;近缘紫萼藓的孢子活力在亚甲基蓝法与I<sub>2</sub>-KI和红墨水2种方法间都有显著性差异,而在I<sub>2</sub>-KI与红墨水2种方法间无显著性差异;其他4种藓类的孢子活力在各种染色法间差异均达显著水平( $P<0.05$ )。同时,I<sub>2</sub>-KI染色法、TTC染色法和红墨水

染色法所测得的孢子平均生活力百分率与平均萌发率之间均存在显著性差异,只有亚甲基蓝染色法测得的平均生活力百分率与其平均萌发率之间不存在显著性差异。

另外,用SPSS软件对上述6种藓类亚甲基蓝染液测得的孢子生活力与萌发率数据进行回归分析,设亚甲基蓝染色法所测的孢子平均生活力为x,离体萌发法测得的孢子平均萌发率为y,求得回归方程 $y=-8.547+1.069x$ ,相关系数为0.976。且经检测得生活力与萌发率的回归关系达到极显著水平( $P<0.01$ )。根据所建立的回归方程,可以通过测得孢子的生活力来预测孢子的离体萌发率。

## 3 讨 论

苔藓植物的孢蒴一般在春季和夏秋季成熟,金发藓孢蒴采集最佳时间是春夏之交,卵叶泥炭藓的成熟孢蒴获得最佳时间是夏季,而反扭藓、梨蒴珠藓、侧枝匍灯藓和近缘紫萼藓等4种藓类的成熟孢蒴从春季到秋季都可获得<sup>[10]</sup>。除了金发藓以外,本研究所涉及的5种藓类孢蒴均在孢蒴成熟的最佳时间获得,并将野外采集的材料带回实验室中置于人

工智能气候培养箱中培养,直至孢子体成熟。有研究显示,7月份采集的金发藓孢子3 d就可以达到最高萌发率(75.5%)<sup>[11]</sup>,而本研究中采于11月份的金发藓孢子第4天才开始萌发,第8天才达到最高萌发率(79.12%),这表明藓类植物孢子活力强弱可能与季节因素具有一定的相关性。

苔藓植物的孢子遇到适宜的温度、湿度和光照即开始萌发,在适宜的条件下,本实验中的金发藓和细叶小羽藓孢子在无菌水和Knop培养基中萌发率差异不大,说明苔藓植物孢子萌发初期对外界的养分要求并不苛刻,利用孢子自身提供的营养即可萌发。而且,无菌水培养的孢子萌发得更快(2种藓类孢子接种于无菌水中第2天即开始萌发,形成萌发管,第6天萌发率就趋于稳定;而在Knop培养基中第4天才开始萌发,第8天萌发率趋于稳定)。虽然无机营养对孢子的萌发不起关键作用,但对孢子萌发后原丝体的生长与发育起到一定的作用(无菌水比Knop培养基培养的金发藓孢子萌发后的原丝体较细,且细胞中的叶绿体稀少)。

由于孢子休眠等原因<sup>[12]</sup>,有些苔藓植物孢子即使在适宜的环境条件下也不能萌发,因此找到一种检测孢子生活力的方法对于孢子的保存研究至关重要。然而生活力只能代表孢子潜在的萌发能力,其与离体萌发率的关系是孢子生活力测定方法准确性判断的主要依据。本实验的4种染色法中只有亚甲

基蓝染色法所测得的平均生活力百分率与孢子的平均萌发率最为接近,染色效果也明显,且此方法操作简便,染色快速,无需恒温水浴等处理,适合于藓类孢子生活力的快速检测。 $I_2$ -KI染液只能将孢子外壁染成淡蓝色,可能由于孢子中的淀粉含量较低引起,有研究也证明藓类植物孢子中的脂肪含量特别高,明显高于其他营养成分<sup>[13]</sup>。TTC法被广泛用于种子活力的测定,是最有希望代替种子常规发芽试验的方法<sup>[6-8]</sup>,但却不能用于苔藓植物孢子活力的测定,有研究也证明TTC法在花粉的活力测定中不起作用<sup>[4-5]</sup>,说明苔藓植物孢子在呼吸及孢壁结构方面与种子有很大的区别,而与花粉相似。

本研究通过对6种藓类植物孢子生活力检测方法的比较分析,证明亚甲基蓝染色法适用于藓类孢子的生活力测定,并通过活力检测结果与萌发率之间关系的回归分析,推导出萌发率(y)与生活力(x)之间的回归方程为 $y = -8.547 + 1.069x$ ,根据这个方程通过测定的孢子生活力就可以推测出孢子的离体萌发率,为进一步开展对苔藓植物孢子保存研究中的萌发率检测提供了快速、简便的方法,通过这种方法还可以在种质资源保存中选择活力比较高的孢子进行保存。在接下来的孢子超低温保存研究中,将进一步使用该方法测定藓类植物孢子超低温保存后的生活力,并分析其与萌发率的相关关系。

## 参考文献:

- [1] BURCH J,WILKINSON T. Cryopreservation of protonemata of *Ditrichum cornubicum* (Paton) comparing the effectiveness of four cryoprotectant pretreatments[J]. *Cryo Letters*, 2002, **23**(3):197—208.
- [2] ROWNTREE J K, RAMSAY M M. How bryophytes came out of the cold: successful cryopreservation of threatened species[J]. *Biodiversity and Conservation*, 2009, **18**(5):1 413—1 420.
- [3] YANG F J(杨发君), ZHANG Y(张 婉), ZHANG J(张 建), et al. Research on the determining methods of the pollen viability and stigmatic receptivity of *Saposhnikovia divaricata*[J]. *Ginseng Research*(人参研究), 2010, **22**(2):22—25(in Chinese).
- [4] QIN Y Y(秦永燕), YAN G Q(闫桂琴), FEI X M(费兴梅), et al. Study on the pollen vitality of *Elaeagnus mollis*[J]. *Journal of Shanxi University*(Nat. Sci. Edi.) (山西大学学报·自然科学版), 2007, **30**(3):390—393(in Chinese).
- [5] LIU R N(刘若楠), YANG ZH L(杨志玲), YU H H(于华会), et al. Detection viability of *Gardenia jasminoides* seeds and its correlation with germination rate[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*(安徽农业科学), 2010, **38**(27):14 922—14 923,14 931(in Chinese).
- [6] LIU X J(刘小金), XUD P(徐大平), YANG Z J(杨曾奖), et al. Study on methods for rapid determination of seed viability of *Santalum album*[J]. *Journal of Nanjing Forestry University*(Nat. Sci. Edi.) (南京林业大学学报·自然科学版), 2012, **36**(4):67—70(in Chinese).
- [7] ZHANG Y(张 瑜), BAI CH J(白昌军). TTC method for testing seed viability of *Pigeonpea*[J]. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*(热带农业科学), 2012, **32**(1):12—14(in Chinese).
- [8] LI X Y(李晓毓), WU C ZH(吴翠珍), XIONG Y X(熊源新), et al. The tissue culture and microscopic observations of *Plagiommium cuspidatum*[J]. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*(山地农业生物学报), 2006, **25**(3):217—222(in Chinese).
- [9] 张志良,瞿伟菁.植物生理学实验指导(第3版)[M].北京:高等教育出版社,2003:206.
- [10] SCHOFIELD W B. Introduction to Bryology[M]. New York: Macmillan Publishing Company, 1985:403—404.
- [11] YU Y, GUO S L. Influences of in vitro factors on spore germination of *Polytrichum commune* (Bryopsida; Musci)[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*(中山大学学报·自然科学版), 2008, **47**(S1):91—97.
- [12] GLIME J M. Bryophyte Ecology. Volume 1. Physiological Ecology[EB/OL]. (2013-08-30) [2013-09-03]. <http://www.bryoecol.mtu.edu/>.
- [13] FANG Y, ZHU R L. *Haplolygonium microphyllum* (Hedw.) Broth. Capsules as food for *Agrotis* sp. (Lepidoptera) larvae[J]. *Journal of Bryology*, 2012, **34**(2):108—113.