



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106359092 B

(45)授权公告日 2018.12.14

(21)申请号 201610772610.2

(22)申请日 2016.08.30

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106359092 A

(43)申请公布日 2017.02.01

(73)专利权人 中国科学院昆明植物研究所  
地址 650201 云南省昆明市蓝黑路132号

(72)发明人 杨红 李萍 刘莉 鲁元学  
章成君

(74)专利代理机构 昆明协立知识产权代理事务  
所(普通合伙) 53108

代理人 旃习涵

(51)Int.Cl.

A01H 4/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 1685809 A,2005.10.26,全文.

KR 2001-0096680 A,2001.11.08,全文.

潘一廷等.小立碗藓愈伤组织诱导和培养.  
《植物生理学通讯》.2005,第41卷(第3期),第  
293-296页.

Xiaoqin Wang et.al.,.Tissue Culturing  
and Harvesting of Protonemata from the  
Moss Physcomitrella patens.《bio-  
protocol》.2015,第5卷(第15期),材料和试剂、  
方法部分.

审查员 陈仕高

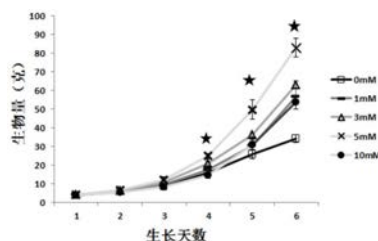
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

小立碗藓原丝体快速繁殖方法

(57)摘要

本发明提供小立碗藓原丝体快速繁殖方法,将生长5天的的小立碗藓原丝体材料经过机械打磨粉碎继代,设置以BCD培养基为基础培养基的不同钙离子浓度的测试平板,经过打磨继代后接种于各种不同浓度的CaCl<sub>2</sub>的BCD培养基平板上,进行生长状态观测,最终确定原丝体生长及分化状态最佳的钙离子浓度.本发明针对小立碗藓的原丝体培养进行了培养及配方的改进实验表明,在控制培养箱温度为23℃,80 μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>光强,16小时长日照下,5mM钙离子浓度可获得生长最旺盛、材料最多的植物原丝体,为后期原生质体制备及转化重组实验提供了技术基础.



1. 小立碗藓原丝体快速繁殖方法,取小立碗藓孢子,经过两次植物组织快繁培养后,将继代用的无菌培养小立碗藓材料在23℃,16h光照,8h黑暗,光强 $80\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的培养箱中培养1周后,取其植株材料,经机械打磨粉碎后接种于BCD+CaCl<sub>2</sub>的培养基平板中,CaCl<sub>2</sub>浓度为5mM,置于23℃,16h光照,8h黑暗,光强 $80\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的培养箱中培养一周,期间定期显微镜进行原丝体生长状态观测,并进行原丝体生物量测量和分枝数统计;

所述BCD培养基配方为:MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1μM,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 18.4μM,KNO<sub>3</sub> 10μM,FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 45μM;CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.22μM,H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 10μM,CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.23μM,Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.1μM,ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.19μM,MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 2μM,KI 0.17μM,酒石酸铵5mM,琼脂0.8%,121℃,20min灭菌。

2. 如权利要求1所述的小立碗藓原丝体快速繁殖方法,其特征在于所述机器打磨是用匀浆仪打磨,采用10s/次、3次/材料打磨参数进行材料打磨与继代快繁。

3. 如权利要求1所述的小立碗藓原丝体快速繁殖方法,其特征在于所述小立碗藓原丝体生长状态观测是采用光学显微镜及带荧光通道的显微镜进行不同放大倍数下的原丝体生长状态观测,并每天拍照记录,对比原丝体分枝及生长状态。

4. 如权利要求1所述的小立碗藓原丝体快速繁殖方法,其特征在于所述小立碗藓原丝体生物量测量和分枝数统计是随机挑选每个时间点每个浓度下不少于10个显微照片,使用ImageJ测量生物量,统计分枝数,用student's t-test进行统计分析。

## 小立碗藓原丝体快速繁殖方法

[0001] 所属领域

[0002] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种小立碗藓原丝体组织培养快速繁殖方法,尤其涉及一种促进小立碗藓原丝体快速大量繁殖的培养基。

### 背景技术

[0003] 苔藓是最古老的陆生植物之一,在进化地位上位于藻类之后、蕨类和种子植物之前,和微管植物属于单起源系统上的姐妹进化支,具有极其重要的研究地位(Kidron,2014;曹同等,2014)。全世界约有21200种,遍布除海洋外的地球上每个角落,甚至生长于荒漠、冻原及岩石上,耐旱、耐寒、耐贫瘠,适应力极强,是大自然的先锋与拓荒者(Kidron,2014;曹同等,2014)。

[0004] 小立碗藓是葫芦藓目(Funariales)葫芦藓科(Funariaceae)小立碗藓属(Physcomitrium)的藓类。因其具有较高的核DNA同源重组率及较特殊的系统进化地位,已经成为研究植物功能基因组学等方面的模式植物。小立碗藓是以单倍体世代占优势的植物,作为基因组学研究模式系统主要是利用其原丝体阶段进行原生质体制备及同源重组的外源基因转化。以小立碗藓为对象开展的基因组学和分子生物学研究发现,为适应陆地生活,小立碗藓获得耐干旱基因、耐高温基因、感光基因、紫外修复基因等陆地胁迫响应基因(Rabara et al.,2013;Rensing et al.,2008)。此外,还具有易培养、生活周期短、基因组与外源基因具有极高的同源重组率、生活史中单倍体的配子体阶段占优势、基因敲除后突变表型易于观察等独特的研究优势(Schaefer and Zrýd,1997)。而且由于其抗逆能力极强,能经历长期脱水而迅速恢复再生,对于研究植物抗逆性形成机制和进化意义非常有价值(Hiss et al.,2014)。然而作为转基因材料的主要来源原丝体的生长状态和数量是限制转基因效率的主要因素,现有技术的繁殖效率较低,急需改良方法来增加繁殖效率。

### 发明内容

[0005] 本发明旨在提供一种小立碗藓原丝体的组织培养方法,公开一种原丝体快速繁殖的培养基配方,为基因功能研究打下了基础。该方法利用5mM终浓度的CaCl<sub>2</sub>与BCD完全培养基进行小立碗藓的组织培养繁殖,使小立碗藓原丝体在快繁3-5天分化效率最高,并在快繁5天仍能维持较高的繁殖效率。

[0006] 为了实现本发明的上述目的,本发明提供了如下的技术方案:

[0007] 小立碗藓原丝体快速繁殖方法,取小立碗藓孢子,经过两次植物组织快繁培养后,将继代用的无菌培养小立碗藓材料在23℃,16h光照,8h黑暗,光强80μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>的培养箱中培养1周后,取其植株材料,经机械打磨粉碎后移液管接种于BCD+CaCl<sub>2</sub>的培养基平板中,设置0mM,1mM,3mM,5mM,10mM五种不同CaCl<sub>2</sub>浓度,置于23℃,16h光照,8h黑暗,光强80μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>的培养箱中培养一周,期间定期显微镜进行原丝体生长状态观测,并进行原丝体生物量测量和分枝数统计。

[0008] 如所述的小立碗藓原丝体快速繁殖方法,其中所述BCD培养基配方为:MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

1 $\mu$ M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 18.4 $\mu$ M, KNO<sub>3</sub> 10 $\mu$ M, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 45 $\mu$ M; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.22 $\mu$ M, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 10 $\mu$ M, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.23 $\mu$ M, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.1 $\mu$ M, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.19 $\mu$ M, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 2 $\mu$ M, KI 0.17 $\mu$ M, 酒石酸铵5mM, 琼脂0.8%, 121 $^{\circ}$ C, 20min灭菌。

[0009] 如所述的小立碗藓原丝体快速繁殖方法, 其中所述的培养基中设置为含有5mMCaCl<sub>2</sub>浓度。

[0010] 如所述的小立碗藓原丝体快速繁殖方法, 其中所述机器打磨是用匀浆仪打磨, 采用10s/次, 3次/材料打磨参数进行材料打磨与继代快繁。

[0011] 如所述的小立碗藓原丝体快速繁殖方法, 其中所述小立碗藓原丝体生长状态观测是采用光学显微镜及带荧光通道的显微镜进行不同放大倍数下的原丝体生长状态观测, 并每天拍照记录, 对比原丝体分支及生长状态。

[0012] 如所述的小立碗藓原丝体快速繁殖方法, 其中所述小立碗藓原丝体生物量测量和分枝数统计是随机挑选每个时间点每个浓度下不少于10个显微照片, 使用ImageJ测量生物量, 统计分枝数, 用student's t-test进行统计分析。

[0013] 本发明的小立碗藓组织培养快繁方法, 是将继代用的无菌培养小立碗藓材料在23 $^{\circ}$ C, 16h光照, 8h黑暗, 光强80 $\mu$ mol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>的培养箱中培养1周左右, 取其植株材料, 经机械打磨粉碎后移液管接种于BCD+CaCl<sub>2</sub>的培养基平板中, 设置0mM, 1mM, 3mM, 5mM, 10mM五种不同CaCl<sub>2</sub>浓度, 置于23 $^{\circ}$ C, 16h光照, 8h黑暗, 光强80 $\mu$ mol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>的培养箱中培养一周左右。BCD培养基配方为: MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 $\mu$ M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 18.4 $\mu$ M, KNO<sub>3</sub> 10 $\mu$ M, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 45 $\mu$ M; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.22 $\mu$ M, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 10 $\mu$ M, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.23 $\mu$ M, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.1 $\mu$ M, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.19 $\mu$ M, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 2 $\mu$ M, KI 0.17 $\mu$ M, 酒石酸铵5mM, 琼脂0.8%, 121 $^{\circ}$ C, 20min灭菌。培养条件为: 23 $^{\circ}$ C, 16h光照, 8h黑暗, 光强80 $\mu$ mol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>的培养箱。小立碗藓原丝体在5mM CaCl<sub>2</sub>浓度下, 可以达到原丝体的最大量分枝生长, 并在培养5天后依旧维持原丝体旺盛生长状态。

[0014] 与现有技术相比, 本发明的原丝体的分枝数增加了3倍, 生物量增加了1.6倍, 极大的提高了后续作为转基因材料的应用潜力。本发明通过培养材料的显微观测进行原丝体生长状态的判断及记录。本发明方法的使用能以最适条件促进小立碗藓原丝体的分枝及生长, 在短时间内获得大量的小立碗藓原丝体材料。

#### 附图说明:

[0015] 图1为本发明小立碗藓原丝体生长状态显微镜照片, 从上至下对应机械粉碎继代后生长1-6天; 从左至右对应培养基中CaCl<sub>2</sub>浓度0mM, 1mM, 3mM, 5mM, 10mM; 图1为显微镜观测目镜16倍前提下, 物镜放大倍数20倍自然光下的原丝体生长形态;

[0016] 图2为不同钙离子浓度梯度下原丝体生物量测量数;

[0017] 图3为不同钙离子浓度梯度下原丝体分枝数鉴定统计数。

#### 具体实施方式

[0018] 下面结合附图, 用本发明的实施例来进一步说明本发明的实质性内容, 但并不以此来限定本发明。

[0019] 实施例1:

[0020] 1.材料和方法:

[0021] 1.1研究材料:

[0022] 本发明使用材料为小立碗藓 (*Physcomitrella patens*) GD2004种,经过多代植物组织快繁培养保存在实验室培养箱中。

[0023] 1.2研究方法:

[0024] 1.2.1实验设计:将生长5天的小立碗藓原丝体材料经过机械打磨粉碎继代,设置以BCD培养基为基础培养基的不同钙离子浓度的测试平板,经过打磨继代后接种于各种不同浓度的CaCl<sub>2</sub>的BCD培养基平板上,进行生长状态观测,最终确定原丝体生长及分化状态最佳的钙离子浓度。

[0025] 1.2.2原丝体组织培养快繁技术:利用匀浆仪进行植物材料的机械打磨,将植物匀浆接种于培养基上,置于23℃,16h光照,8h黑暗,光强80μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>的培养箱,本发明使用匀浆仪为:IKA (ULTRA TURRAX Tube Drive),采用10s/次,3次/材料打磨参数进行材料打磨与继代快繁。

[0026] 1.2.3培养基设置:本发明利用BCD基础培养基作为背景培养基,该培养基配方为:MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1μM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 18.4μM, KNO<sub>3</sub> 10μM, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 45μM; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.22μM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 10μM, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.23μM, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.1μM, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.19μM, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 2μM, KI 0.17μM, 酒石酸铵5mM, 琼脂0.8%, 121℃, 20min灭菌。在该培养基基础上进行0mM, 1mM, 3mM, 5mM, 10mM五种不同CaCl<sub>2</sub>浓度的设置。

[0027] 1.2.4小立碗藓原丝体生长状态观测:采用光学显微镜及带荧光通道的显微镜进行不同放大倍数下的原丝体生长状态观测,并每天拍照记录,对比原丝体分支及生长状态。本发明使用显微镜为中国科学院昆明植物研究所生物技术平台荧光显微镜,仪器型号:Leica DM5500B。

[0028] 1.2.5小立碗藓原丝体生物量测量和分枝数统计:随机挑选每个时间点每个浓度下不少于10个显微照片,使用ImageJ测量生物量,统计分枝数,用student's t-test统计分析。

[0029] 2.结果与分析

[0030] 2.1不同钙离子浓度下小立碗藓原丝体形态:

[0031] 小立碗藓是单倍体占优势的植物,其再生能力极强,经过植株材料的机械粉碎后无菌条件下接种培养基可进行大量繁殖。新生植物组织为小立碗藓的原丝体形态,原丝体为在培养基表面匍匐生长,通过不断地细胞分枝及细胞延长获得生物量的增加。功能基因组学的研究一般是利用原丝体生长状态的小立碗藓进行原生质体的制备,进一步进行基因转化。分枝越多和生物量越大是制备原生质体的最佳条件。我们利用显微观测的方式进行不同钙离子浓度下小立碗藓原丝体生长状态观测,依据同一视野下新生细胞分支判断植物材料的活力及原丝体的生长状态,发现0mM和10mM生长最缓慢,主枝延生,但基本上不新生分枝,在5mM钙离子浓度下,小立碗藓原丝体分枝及活力最为旺盛(图1,箭头显示新生分枝)。标尺=100μm。

[0032] 2.2不同钙离子浓度下小立碗藓原丝体生物量

[0033] 统计结果显示,置于23℃,16h光照,8h黑暗,光强80μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>的培养箱中时,在5mM钙离子浓度下,小立碗藓原丝体的生物量最高(图2)。星号显示t-test检测5mM

钙离子浓度生物量与其他钙离子浓度生物量在 $p < 0.01$ 水平上的显著性差异;数据表示为平均值 $\pm$ 标准误, $n \geq 10$ 。

[0034] 2.3不同钙离子浓度下小立碗藓原丝体分枝数统计

[0035] 计数每一种培养下新生分枝或侧枝数,发现0mM和10mM生长最缓慢,主枝延生,但基本上不新生分枝,在5mM钙离子浓度下,小立碗藓原丝体分枝最多(图3)。星号显示t-test检测在5mM钙离子浓度分枝数与其他钙离子浓度分枝数 $p < 0.01$ 水平上的显著性差异;数据表示为平均值 $\pm$ 标准误, $n \geq 10$ 。

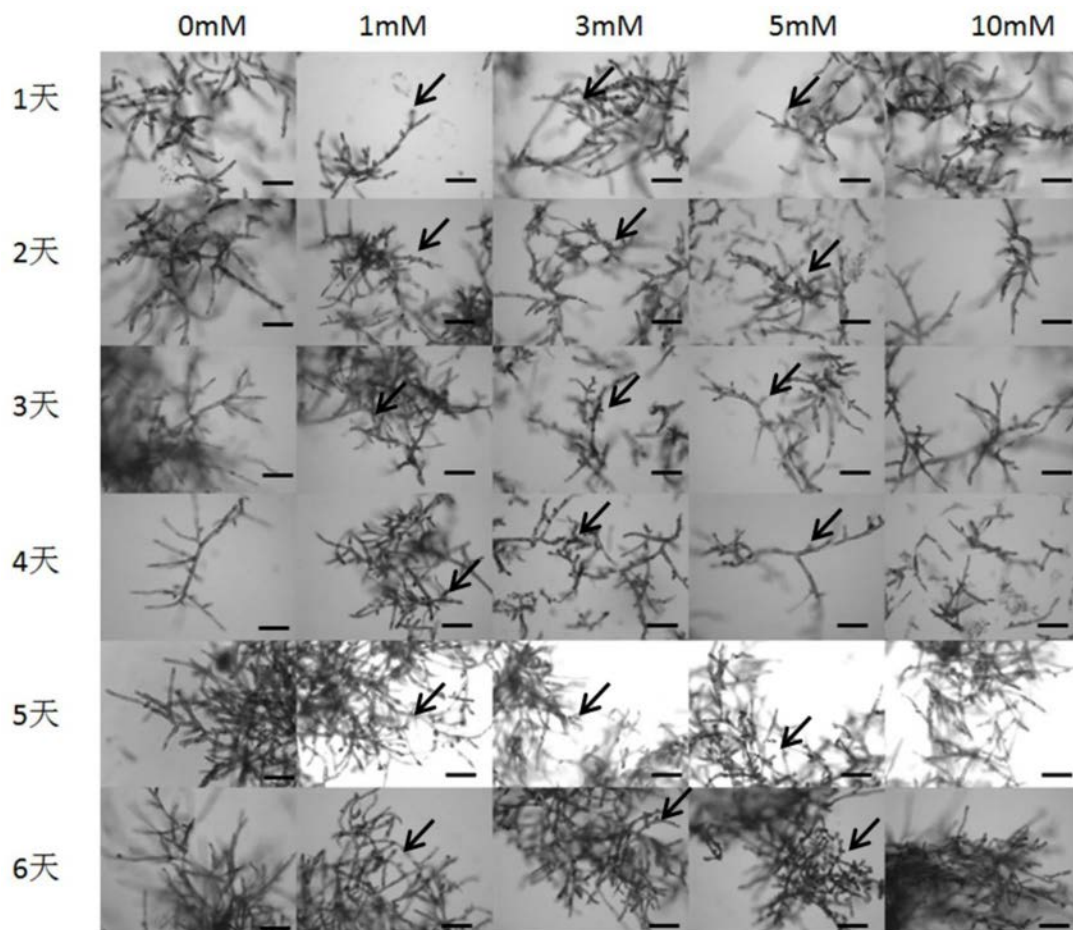


图1

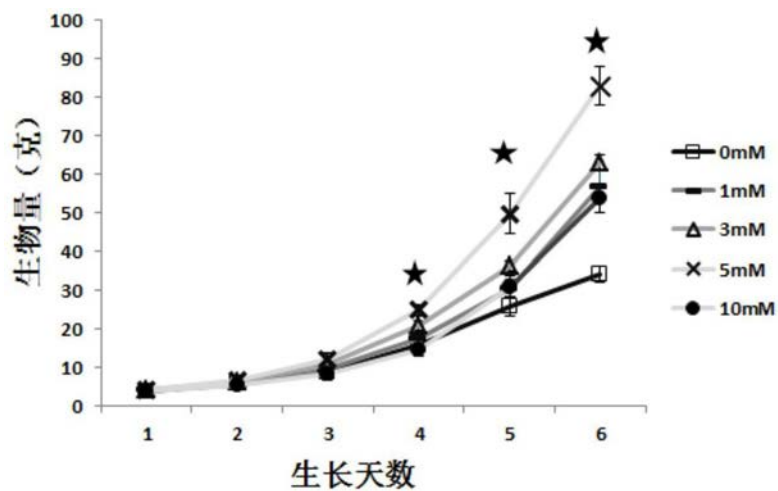


图2

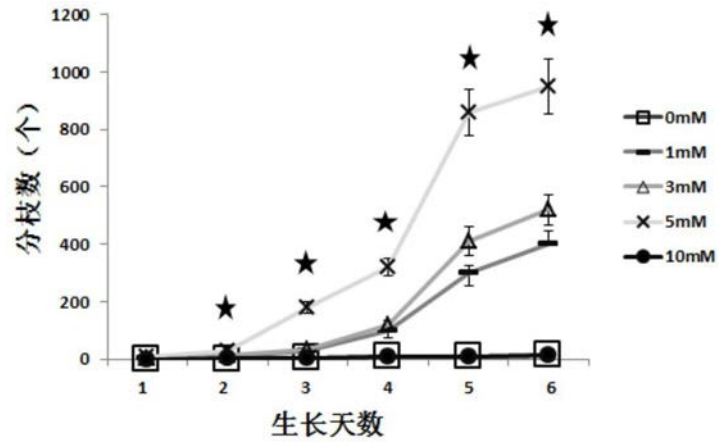


图3