



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106386483 B

(45)授权公告日 2018.06.22

(21)申请号 201610772729.X

(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 106386483 A

(43)申请公布日 2017.02.15

(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 102144545 A,2011.08.10,说明书第9-20段.

CN 105475108 A,2016.04.13,全文.

赵建成等.十种藓类植物孢子萌发与原丝体发育的初步研究.《干旱区研究》.2002,第19卷(第1期),第1.1-1.2节.

Vishal Awasthi et.al.,.Morphogenetic Studies and In vitro Propagation of Two Mosses: *Philonotis thwaitesii* Mitt. and *Brachythecium plumosum* (Hedw.) B.S.G..《Taiwania》.2012,第57卷(第1期),第27-36页.

审查员 陈仕高

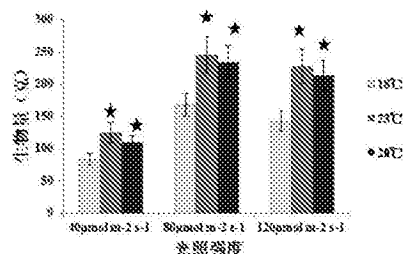
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种皱叶青藓的快速繁殖方法

(57)摘要

本发明公开了一种皱叶青藓的快速繁殖方法。包括以下步骤:野外采集皱叶青藓茎叶配子体和孢子囊,无菌水浸泡5小时;配子体冲洗干净后剪成1厘米小段,在直径5厘米的无菌小培养皿中次氯酸钠消毒1分钟,无菌水清洗5遍后打磨粉碎接种于BCD培养基,同时孢子囊置于1.5ml离心管消毒5分钟,用镊子碾碎后接种于BCD培养基;在温度为23℃,80 μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>光强,16小时长日照下的培养箱中生长2周;配子体和孢子长出新原丝体后,经机械打磨粉碎后接种于BCD培养基,一周即可得到大量繁殖的原丝体,一个月得到成熟配子体。为后期皱叶青藓的工程化生产提供技术保障。



1. 一种皱叶青藓的快速繁殖方法,其特征在于该方法包括下述步骤:配子体和孢子囊消毒后,接种于BCD培养基中,在一定的培养条件下培养,然后进行原丝体的继代和扩大,进行皱叶青藓原丝体和配子体生长状态观测,并记录生长情况和生物量,所述的配子体和孢子囊消毒是野外采集皱叶青藓茎叶配子体和孢子囊,无菌水浸泡5小时,配子体冲洗干净后剪成1厘米小段,在直径5厘米的无菌小培养皿中1.5%次氯酸钠消毒1分钟,无菌水清洗5遍后打磨粉碎接种于BCD培养基,同时孢子囊置于1.5ml离心管消毒5分钟,用镊子碾碎后接种于BCD培养基,

所述的接种是采用匀浆仪进行皱叶青藓的机械打磨,1g植物材料混合12ml无菌水粉碎后转移2ml接种于6皿培养基,置于16h长日照培养箱,匀浆仪采用10s/次,3次/材料打磨参数进行材料打磨与继代快繁;

所述的培养是待配子体和孢子囊消毒后,配子体接种于BCD培养基,孢子囊用镊子碾碎后接种于BCD培养基中培养,经过16小时长日照培养2周,配子体和孢子长出新原丝体后,经机械打磨粉碎后均匀接种于BCD培养基平板,培养一周得大量繁殖的原丝体,一个月得成熟配子体;

培养基设置是利用BCD基础培养基作为背景培养基,所述BCD基础培养基配方为:  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1 $\mu$ M,  $KH_2PO_4$  18.4 $\mu$ M,  $KNO_3$  10 $\mu$ M,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  45 $\mu$ M;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.22 $\mu$ M,  $H_3BO_3$  10 $\mu$ M,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  0.23 $\mu$ M,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  0.1 $\mu$ M,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.19 $\mu$ M,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  2 $\mu$ M, KI 0.17 $\mu$ M, 酒石酸铵5mM, 琼脂0.8%, 121 $^{\circ}C$ , 20min灭菌, 平板培养基中添加3% phytoigel;

在培养期间设置三种温度和光强梯度的培养条件,三种不同温度梯度为:18 $^{\circ}C$ , 23 $^{\circ}C$ , 28 $^{\circ}C$ ;三种不同光强梯度为:40 $\mu$ mol  $\cdot$  m<sup>-2</sup>  $\cdot$  s<sup>-1</sup>, 80 $\mu$ mol  $\cdot$  m<sup>-2</sup>  $\cdot$  s<sup>-1</sup>, 120 $\mu$ mol  $\cdot$  m<sup>-2</sup>  $\cdot$  s<sup>-1</sup>。

2. 如权利要求1所述的一种皱叶青藓的快速繁殖方法,其特征在于所述的培养期间设置培养条件为温度23 $^{\circ}C$ , 80 $\mu$ mol  $\cdot$  m<sup>-2</sup>  $\cdot$  s<sup>-1</sup>光强。

3. 如权利要求1所述的一种皱叶青藓的快速繁殖方法,其特征在于所述的皱叶青藓原丝体和配子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和配子体生长状态观测,并每天拍照记录,对比分支及生长状态。

4. 如权利要求1所述的一种皱叶青藓的快速繁殖方法,其特征在于所述的记录生长情况和生物量采用收集9种培养条件下,每一种不少于5皿材料,测量生物量,用student's t-test统计分析。

## 一种皱叶青藓的快速繁殖方法

[0001] 所属领域

[0002] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种皱叶青藓原丝体和配子体无菌快速繁殖方法。

### 背景技术

[0003] 苔藓是一类由水生向陆生过渡的高等植物类群,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)。云南的苔藓资源尤其丰富,具有全世界约36%的苔藓品种。对我国多省大型铜矿和金矿生态环境破坏严重地区的植物资源调查发现,苔藓作为先锋植物在这些维管植物无法存活的地方生长。例如,在云南东川汤丹铜矿分布着青藓、羽藓等6科22种苔藓植物,其中68%是直接生活在布满铜绿的矿岩石上,另外32%是生活在含氧化铜的矿土上。云南墙藓等广泛分布在黔西南红土型金矿、云南东川拖布卡-播卡金矿和汤丹铜矿区(Zhou&Zhang,2007;江洪和张朝晖,2012),尤其是矿区的中心区,破坏最严重的地方,除了零星的苔藓以外看不到其他植物的生长。

[0004] 皱叶青藓(*Brachytheciumkuroishicum*Besch.)是云南山坡、岩面广泛分布的一种苔藓,生境极广,林下潮湿阴暗和草地阳光充足的地方都能生长。枝叶狭长,可生长至20厘米,具有耐贫瘠、耐高温、低温等多种优点,生长繁殖周期很短,仅仅1个半月,与极端抗旱的苔藓品种山墙藓或齿肋赤藓等近一年的生育周期相比具有生产优势。目前对苔藓的应用主要停留于野外的大量挖掘,一方面造成自然环境的破坏和野生资源的匮乏;另一方面造成品种的混淆,而因为不同品种的生理差异致使后期繁殖和研究困难。孢子囊仅仅在温度交替变化时产生,但败育率较高。实现大规模的人工繁殖比较困难,目前也未见任何相关技术方法的报道。如果要将皱叶青藓商业化生产,组织培养技术将是推动其规模化高效繁殖的重要技术之一。

### 发明内容

[0005] 本发明旨在提供一种皱叶青藓无菌快速繁殖方法,包括配子体和孢子囊的消毒、培养、原丝体继代和扩大。目的是为皱叶青藓工程化生产或研究苔藓登陆的逆境适应性进化机制提供技术基础。鉴于皱叶青藓的自然生长多于夏秋之际,日照、光强和温度参考自然条件,设置以下的人工培养参数。

[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] 一种皱叶青藓的快速繁殖方法,该方法包括下述步骤:配子体和孢子囊消毒后,接种于BCD培养基中,在一定的培养条件下培养,然后进行原丝体的继代和扩大,记录生长情况和生物量。

[0008] 如所述的一种皱叶青藓的快速繁殖方法,其中所述的配子体和孢子囊消毒是野外采集皱叶青藓茎叶配子体和孢子囊,无菌水浸泡5小时,配子体冲洗干净后剪成1厘米小段,在直径5厘米的无菌小培养皿中1.5%次氯酸钠消毒1分钟,无菌水清洗5遍后打磨粉碎接种

于BCD培养基,同时孢子囊置于1.5ml离心管消毒5分钟,用镊子碾碎后接种于BCD培养基。

[0009] 如所述的一种皱叶青藓的快速繁殖方法,其中所述的接种是采用匀浆仪进行皱叶青藓的机械打磨,1g植物材料混合12ml无菌水粉碎后转移2ml接种于6皿培养基,置于16h长日照培养箱,匀浆仪采用10s/次,3次/材料打磨参数进行材料打磨与继代快繁。

[0010] 如所述的一种皱叶青藓的快速繁殖方法,其中培养基设置用:利用BCD基础培养基作为背景培养基,所述BCD基础培养基配方为: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。平板培养基中添加3%phytogeI。

[0011] 如所述的一种皱叶青藓的快速繁殖方法,其中所述的培养是待配子体和孢子囊消毒后,配子体接种于BCD培养基,孢子囊用镊子碾碎后接种于BCD培养基中培养,经过16小时长日照培养2周,配子体和孢子长出新原丝体后,经机械打磨粉碎后均匀接种于BCD培养基平板,培养一周得大量繁殖的原丝体,一个月得成熟配子体。

[0012] 如所述的一种皱叶青藓的快速繁殖方法,其中在所述的培养期间设置三种温度和光强梯度的培养条件,三种不同温度梯度为:18℃,23℃,28℃;三种不同光强梯度为:40μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>,80μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>,120μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>。

[0013] 如所述的一种皱叶青藓的快速繁殖方法,其中培养期间设置培养条件为温度23℃,80μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>光强。

[0014] 如所述的一种皱叶青藓的快速繁殖方法,其中皱叶青藓原丝体和配子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和配子体生长状态观测,并每天拍照记录,对比分支及生长状态。

[0015] 如所述的一种皱叶青藓的快速繁殖方法,其中所述的记录生长情况和生物量采用收集9种培养条件下,每一种不少于5皿材料,测量生物量,用student's t-test统计分析。

[0016] 本发明的方法也可描述为:野外采集皱叶青藓茎叶配子体和孢子囊,无菌水浸泡5小时;配子体冲洗干净后剪成1厘米小段,在直径5厘米的无菌小培养皿中次氯酸钠消毒1分钟,无菌水清洗5遍后打磨粉碎接种于BCD培养基,同时孢子囊置于1.5ml离心管消毒5分钟,用镊子碾碎后接种于BCD培养基;16小时长日照培养2周后配子体和孢子长出新原丝体后,经机械打磨粉碎后接种于BCD培养基,这是第二次继代,培养一周即可得到大量繁殖的原丝体,一个月得到成熟配子体。第二次继代培养实验期间设置温度和光强梯度,得到最佳培养条件为温度23℃,80μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>光强。三种不同温度梯度为:18℃,23℃,28℃。三种不同光强梯度为:40μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>,80μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>,120μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>。所用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。平板培养基中添加3%phytogeI,代替一般培养基中所用琼脂粉,以方便显微镜观测。皱叶青藓快繁材料的培养条件为:23℃,16h光照,8h黑暗,光强80μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>的培养箱。野外皱叶青藓消毒所用次氯酸钠浓度为1.5%。通过培养材料的显微镜观测进行配子体复绿和原丝体生长状态的判断及记录。本方法的使用可以最适条件的促进皱叶青藓原丝体的分枝及生长,在短时间内获得大量的皱叶青藓原丝体和配子体材料。

## 附图说明

- [0017] 图1为本发明皱叶青藓配子体和孢子囊消毒接种生长2周后显微镜照片；  
[0018] 图2为皱叶青藓各温度和光强梯度下的生长一周后情况(右下角标尺=100 $\mu\text{m}$ )；  
[0019] 图3为皱叶青藓各温度和光强梯度下的生物量测量。

## 具体实施方式

[0020] 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。

[0021] 实施例1:

[0022] 1.材料和方法:

[0023] 1.1研究材料:

[0024] 本发明使用材料为皱叶青藓(*Brachythecium kuroishicum* Besch.),采集地点是中国云南昆明,具体位置是Alt.1942m,北纬25°8′16″,东经102°44′38″。

[0025] 1.2研究方法:

[0026] 1.2.1实验设计:野外采集皱叶青藓茎叶配子体和孢子囊,无菌水浸泡5小时;配子体冲洗干净后剪成1厘米小段,在直径5厘米的无菌小培养皿中1.5%次氯酸钠消毒1分钟,无菌水清洗5遍后接种于BCD培养基,同时孢子囊置于1.5ml离心管消毒5分钟,用镊子碾碎后接种于BCD培养基;16小时长日照培养2周后配子体和孢子长出新原丝体后,经机械打磨粉碎后均匀接种于BCD培养基平板,培养一周即可得到大量繁殖的原丝体,一个月得到成熟配子体。实验期间设置温度和光强梯度,三种不同温度梯度为:18℃,23℃,28℃;三种不同光强梯度为:40 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,80 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,120 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。最终得到最佳培养条件为温度23℃,80 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 光强。记录每一种培养条件下的生长情况和生物量。

[0027] 1.2.2原丝体和配子体接种技术:利用匀浆仪进行植物材料的机械打磨,1g植物材料混合12ml无菌水粉碎后转移2ml接种于6皿培养基,置于16h长日照培养箱,本发明使用的匀浆仪为: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。

[0028] 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 1 $\mu\text{M}$ ,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 18.4 $\mu\text{M}$ ,KNO<sub>3</sub> 10 $\mu\text{M}$ ,FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 45 $\mu\text{M}$ ;CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.22 $\mu\text{M}$ ,H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 10 $\mu\text{M}$ ,CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.23 $\mu\text{M}$ ,Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.1 $\mu\text{M}$ ,ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.19 $\mu\text{M}$ ,MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 2 $\mu\text{M}$ ,KI 0.17 $\mu\text{M}$ ,酒石酸铵5mM,琼脂0.8%,121℃,20min灭菌。平板培养基中添加3%phytogel。

[0029] 1.2.4皱叶青藓原丝体和配子体生长状态观测: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和配子体生长状态观测,并每天拍照记录,对比分支及生长状态。本发明使用的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。

[0030] 1.2.5皱叶青藓原丝体生物量测量统计:收集9种培养条件下不少于5皿材料,分析天平测量生物量,用student's t-test统计分析。

[0031] 2.结果与分析

[0032] 2.1皱叶青藓配子体和孢子囊消毒接种生长2周后形态。

[0033] 皱叶青藓是单倍体配子体世代占优势的植物,其体细胞再生能力极强,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。同时孢子囊仅仅在温度交替变化时产生,但败育率较高,也是产生原丝体的原材料。配子体或孢子消毒接种后培养新生植物组织为皱叶青藓的原丝体形态,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。叶绿素在紫外光激发下产生红色荧光,是反应细胞活力的指标。消毒后的外植体因为叶绿素降解,在荧光显微镜观察中显示非常微弱的红色荧光,活力旺盛的细胞具有成熟的叶绿体,显示强烈的红色荧光(图1,白色箭头指示刚接种的外植体位置)。

[0034] 2.2皱叶青藓各温度和光强梯度下的生长情况

[0035] 第二次打磨继代培养期间设置温度和光强梯度,培养1周后结果显示,9种培养条件下都检测到原丝体大量繁殖,而置于23℃,光强80 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的培养箱中时,皱叶青藓原丝体生长最旺盛,18℃,光强40 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的培养条件下生长最慢(图2)。说明皱叶青藓适应的温度和光照强度范围较广,但是更喜欢较高的温度和光强度。

[0036] 2.3皱叶青藓各温度和光强梯度下的生物量测量

[0037] 统计分析9种培养条件下一周生长的生物量,结果与图2显示一致。23℃,光强80 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 培养皱叶青藓原丝体生长最快,18℃,光强40 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的培养条件下生长最慢。横坐标显示光强,纵坐标显示生物量,单位为毫克。星号显示同一光强度下数值与18℃的生物量比较时t-test检测在 $p < 0.01$ 水平上的显著性差异;数据表示为平均值 $\pm$ 标准误, $n \geq 5$ (图3)。

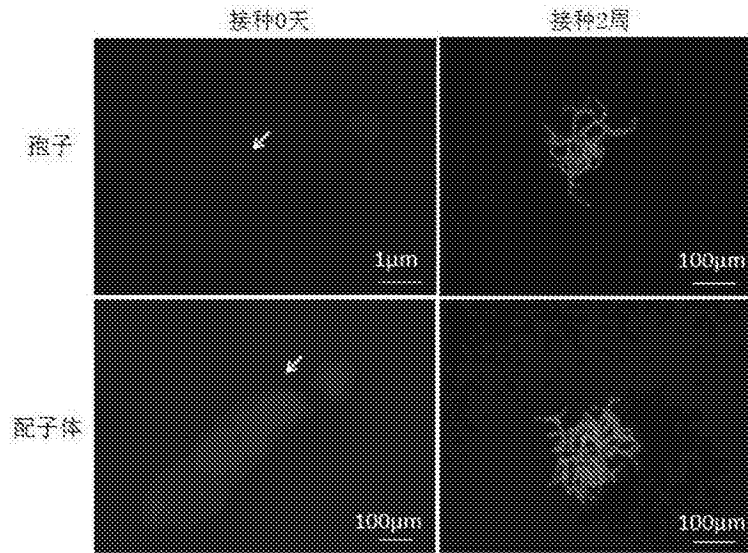


图1

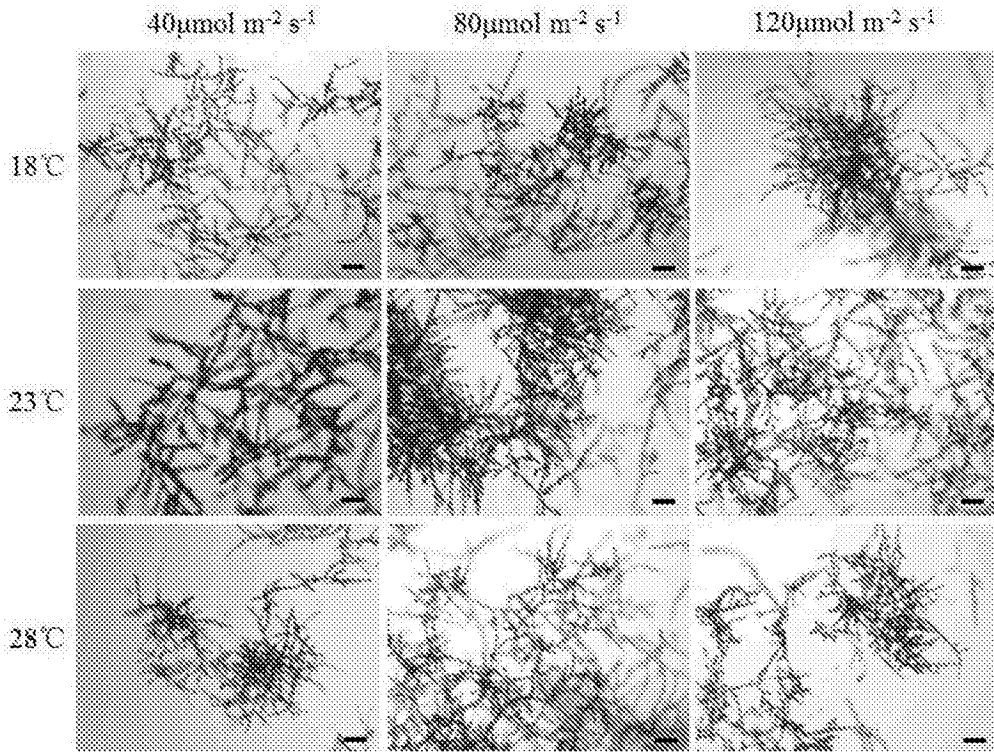


图2

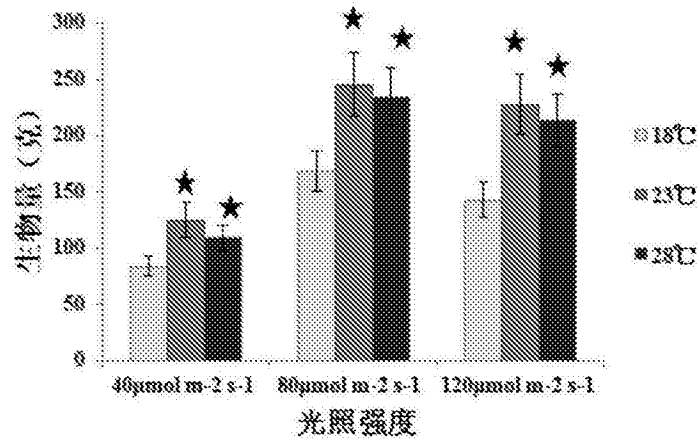


图3