



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112293253 B

(45) 授权公告日 2022.02.18

(21) 申请号 202011175008.3

(22) 申请日 2020.10.28

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112293253 A

(43) 申请公布日 2021.02.02

(73) 专利权人 中国科学院昆明植物研究所
地址 650201 云南省昆明市盘龙区青松路
19号

(72) 发明人 何俊 李村富 李春芳

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
代理人 苏士莹

(51) Int. Cl.
A01H 4/00 (2006.01)

审查员 胡佳

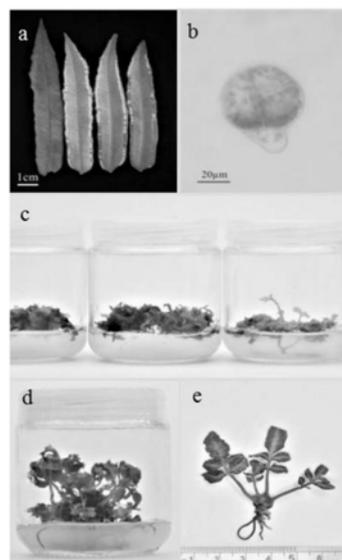
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种福建莲座蕨离体保存培养基及离体保存方法

(57) 摘要

本发明提供了一种福建莲座蕨离体保存培养基及离体保存方法,涉及种质保存技术领域。本发明所述离体保存培养基包括以下成分:花宝2号3g/L、NAA 0.5mg/L、蔗糖20g/L、活性炭1g/L和琼脂6g/L,pH值为5.8。利用所述离体保存培养基进行离体保存时,萌发培养15d后孢子萌发,30d后镜检孢子萌发率可达67.32%,50d左右发育成幼原叶体;将幼原叶体接种于增殖培养基中,每瓶接种4个,幼原叶体继续长大和增殖,30d继代一次,增殖率可达1:3;将原叶体团转接到离体保存培养基上,每瓶接种4个,原叶体长条形,中间厚边缘薄,原叶体团的继代周期可延长至1.5年以上。为后续莲座蕨属植物相关野生种质资源的开发、利用及保护提供理论基础和技术支持。



1. 一种福建莲座蕨离体保存方法,其特征在于,包括以下步骤:(1)收集福建莲座蕨羽片中的棕色孢子囊,灭菌后与水混合,制备孢子悬浮液;所述灭菌包括:在无菌环境中,将收集的棕色孢子囊用体积百分含量为75%的乙醇溶液浸泡20s,再置于质量百分含量为0.2%的氯化汞水溶液中灭菌4min,无菌水漂洗4~5次;

(2)将所述孢子悬浮液接种至孢子无菌萌发培养基上进行萌发培养,得幼原叶体;所述孢子无菌萌发培养基以1/10MS培养基为基本培养基,还包括:蔗糖20g/L和琼脂6g/L,pH值为5.8;所述萌发培养的温度为 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$,光照强度为1000lx,光照时间为12h/d;

(3)将所述幼原叶体接种于增殖培养基上进行增殖培养,得原叶体团;所述增殖培养基以1/2MS培养基为基本培养基,还包括:蔗糖20g/L和琼脂6g/L,pH值为5.8;所述增殖培养的温度为 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$,光照强度为1000lx,光照时间为12h/d;

(4)将所述原叶体团转接至福建莲座蕨离体保存培养基上进行离体保存;所述离体保存培养基由以下成分组成:花宝2号3g/L、NAA 0.5mg/L、蔗糖20g/L、活性炭1g/L和琼脂6g/L,pH值为5.8;所述离体保存的温度为 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$,光照强度为1000lx,光照时间为12h/d。

2. 根据权利要求1所述离体保存方法,其特征在于,步骤(1)所述收集包括:采集无病虫害且着生有棕色孢子囊但未开裂的福建莲座蕨小羽片,在解剖镜下取下完整孢子囊装入经灭菌的DNA纯化柱中,所取孢子囊数量为40个/DNA纯化柱。

3. 根据权利要求1所述离体保存方法,其特征在于,将经所述灭菌的棕色孢子囊与无菌水混合,刺破孢子囊,形成孢子悬浮液。

4. 根据权利要求1所述离体保存方法,其特征在于,所述增殖培养时,每30天继代一次。

一种福建莲座蕨离体保存培养基及离体保存方法

技术领域

[0001] 本发明属于种质保存技术领域,具体涉及一种福建莲座蕨离体保存培养基及离体保存方法。

背景技术

[0002] 福建莲座蕨(*Angiopteris fokiensis*)隶属于合囊蕨科莲座蕨,多年生草本植物,分布于浙江、福建、江西、湖北、广东、海南、广西、贵州、四川和云南等地,因其根状茎上马蹄形的宿存叶柄(基部)排成莲座状而得名。福建观音莲座株型优美,古朴挺拔,叶色青翠亮绿,具有热带风韵,其独特的莲座别具特色,具有很高的观赏价值,可用于室内盆景的观叶植物和园林绿化配植。其根状茎可食用或提取淀粉以及具有清热解毒、利湿、止痛、凉血止血等功效,在民间有较广泛的应用,而且现代植物化学与药理学研究表明,其植株含有良好药用生物活性的化合物,具有防治心脑血管、抗肿瘤、抗真菌等作用。在自然条件下,福建莲座蕨以有性繁殖为主,但配子体到孢子体诱导率低,自然种群更新速度慢。特别是近年来由于生境破坏和人为的掠夺式采掘,其野生资源濒临灭绝。开展福建莲座蕨种质资源保存方法相关研究,将对莲座蕨属植物野生种质资源的保护、开发和利用提供理论基础和技术支持。目前,关于福建莲座蕨组织培养技术进行离体保存方面未见报道。

发明内容

[0003] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种福建莲座蕨离体保存培养基及离体保存方法,建立福建莲座蕨离体保存体系,科学性强、实验操作简单,为后续莲座蕨属植物相关野生种质资源的开发、利用及保护提供理论基础和技术支持。

[0004] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0005] 本发明提供了一种福建莲座蕨离体保存培养基,所述离体保存培养基包括以下成分:花宝2号3g/L、NAA 0.2~0.8mg/L、蔗糖20g/L、活性炭1g/L和琼脂6g/L,pH值为5.8。

[0006] 本发明还提供了所述福建莲座蕨离体保存培养基在福建莲座蕨离体保存中的应用,所述离体保存的时间为1.5年以上。

[0007] 本发明还提供了一种福建莲座蕨离体保存方法,包括以下步骤:(1)收集福建莲座蕨羽片中的棕色孢子囊,灭菌后与水混合,制备孢子悬浮液;

[0008] (2)将所述孢子悬浮液接种至孢子无菌萌发培养基上进行萌发培养,得幼原叶体;所述孢子无菌萌发培养基以1/10MS培养基为基本培养基,还包括:蔗糖20g/L和琼脂6g/L,pH值为5.8;

[0009] (3)将所述幼原叶体接种于增殖培养基上进行增殖培养,得原叶体团;所述增殖培养基以1/2MS培养基为基本培养基,还包括:蔗糖20g/L和琼脂6g/L,pH值为5.8;

[0010] (4)将所述原叶体团转接至福建莲座蕨离体保存培养基上进行离体保存;所述离体保存培养基包括以下成分:花宝2号3g/L、NAA 0.5mg/L、蔗糖20g/L、活性炭1g/L和琼脂6g/L,pH值为5.8。

[0011] 优选的,步骤(1)所述收集包括:采集无病虫害且着生有棕色孢子囊但未开裂的福建莲座蕨小羽片,在解剖镜下取下完整孢子囊装入经灭菌的DNA纯化柱中,所取孢子囊数量为40个/DNA纯化柱。

[0012] 优选的,步骤(1)所述灭菌包括:在无菌环境中,将收集的棕色孢子囊用体积百分含量为75%的乙醇溶液浸泡20s,再置于质量百分含量为0.2%的氯化汞水溶液中灭菌4min,无菌水漂洗4~5次。

[0013] 优选的,将经所述灭菌的棕色孢子囊与无菌水混合,刺破孢子囊,形成孢子悬浮液。

[0014] 优选的,步骤(2)所述萌发培养的温度为 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$,光照强度为1000lx,光照时间为12h/d。

[0015] 优选的,步骤(3)所述增殖培养的温度为 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$,光照强度为1000lx,光照时间为12h/d。

[0016] 优选的,所述增殖培养时,每30天继代一次。

[0017] 优选的,步骤(4)所述离体保存的温度为 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$,光照强度为1000lx,光照时间为12h/d。

[0018] 本发明提供了一种福建莲座蕨离体保存培养基,利用所述离体保存培养基进行离体保存时,通过孢子无菌萌发、原叶体增殖和离体保存等步骤,建立福建莲座蕨离体保存体系,科学性强、实验操作简单。利用本发明所述离体保存方法,萌发培养15d后孢子萌发,30d后镜检孢子萌发率可达67.32%,50d左右发育成幼原叶体;将幼原叶体接种于增殖培养基中,每瓶接种4个,幼原叶体继续长大和增殖,30d继代一次,增殖率可达1:3;将原叶体团转接到离体保存培养基上,每瓶接种4个,原叶体长条形,中间厚边缘薄,原叶体团的继代周期可延长至1.5年以上。为后续莲座蕨属植物相关野生种质资源的开发、利用及保护提供理论基础和技术支持。

附图说明

[0019] 图1为福建莲座蕨的离体保存过程,其中a为小羽片;b为孢子萌发;c为孢子体诱导;d为离体保存材料;e为再生植株。

具体实施方式

[0020] 本发明提供了一种福建莲座蕨离体保存培养基,所述离体保存培养基包括以下成分:花宝2号3g/L、NAA 0.2~0.8mg/L、蔗糖20g/L、活性炭1g/L和琼脂6g/L,pH值为5.8。

[0021] 本发明所述离体保存培养基中,花宝2号基本培养基中添加细胞生长素萘乙酸(NAA)可促进原叶体团的缓慢生长,但不至于增殖太快。本发明所述离体保存培养基中,所述NAA的浓度优选为0.5mg/L。本发明对所述离体保存培养基中各成分的来源并没有特殊限定,利用本领域的常规市售试剂即可。

[0022] 本发明还提供了所述福建莲座蕨离体保存培养基在福建莲座蕨离体保存中的应用,所述离体保存的时间为1.5年以上。本发明所述离体保存时的温度优选为 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$,光照强度为1000lx,光照时间为12h/d。利用本发明所述离体保存培养基,经过1.5年以上的离体保存后,原叶体团转入其增殖培养基中依然可以诱导增殖。

[0023] 本发明还提供了一种福建莲座蕨离体保存方法,包括以下步骤:(1)收集福建莲座蕨羽片中的棕色孢子囊,灭菌后与水混合,制备孢子悬浮液;

[0024] (2)将所述孢子悬浮液接种至孢子无菌萌发培养基上进行萌发培养,得幼原叶体;所述孢子无菌萌发培养基以1/10MS培养基为基本培养基,还包括:蔗糖20g/L和琼脂6g/L,pH值为5.8;

[0025] (3)将所述幼原叶体接种于增殖培养基上进行增殖培养,得原叶体团;所述增殖培养基以1/2MS培养基为基本培养基,还包括:蔗糖20g/L和琼脂6g/L,pH值为5.8;

[0026] (4)将所述原叶体团转接至福建莲座蕨离体保存培养基上进行离体保存;所述离体保存培养基包括以下成分:花宝2号3g/L、NAA 0.5mg/L、蔗糖20g/L、活性炭1g/L和琼脂6g/L,pH值为5.8。

[0027] 本发明收集福建莲座蕨羽片中的棕色孢子囊,灭菌后与水混合,制备孢子悬浮液。本发明所述收集优选包括:采集无病虫害且着生有棕色孢子囊但未开裂的福建莲座蕨小羽片,在解剖镜下取下完整孢子囊装入经灭菌的DNA纯化柱中,所取孢子囊数量为40个/DNA纯化柱。本发明对所述收集得到的棕色孢子囊进行灭菌,所述灭菌优选包括:在无菌环境中,将收集的棕色孢子囊用体积百分含量为75%的乙醇溶液浸泡20s,再置于质量百分含量为0.2%的氯化汞水溶液中灭菌4min,无菌水漂洗4~5次。本发明在所述灭菌后制备孢子悬浮液,优选的将经所述灭菌的棕色孢子囊与无菌水混合,刺破孢子囊,形成孢子悬浮液。本发明对所述无菌水的用量并没有特殊限定。

[0028] 得孢子悬浮液后,本发明将所述孢子悬浮液接种至孢子无菌萌发培养基上进行萌发培养,得幼原叶体;所述孢子无菌萌发培养基以1/10MS培养基为基本培养基,还包括:蔗糖20g/L和琼脂6g/L,pH值为5.8。本发明所述萌发培养的温度优选为 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$,光照强度优选为1000lx,光照时间优选为12h/d。在本发明所述无菌萌发培养基上,利用所述条件进行萌发培养,15d后孢子萌发(图1中b),30d后镜检孢子萌发率可达67.32%,50d左右发育成幼原叶体。

[0029] 得幼原叶体后,本发明将所述幼原叶体接种于增殖培养基上进行增殖培养,得原叶体团;所述增殖培养基以1/2MS培养基为基本培养基,还包括:蔗糖20g/L和琼脂6g/L,pH值为5.8。本发明将所述幼原叶体接种至所述增殖培养基上后,幼原叶体继续长大,将培养90d后的原叶体团切成 0.5cm^3 大小,继续在所述增殖培养基上继代扩繁,每瓶接种4个,30d继代一次,增殖率可达1:3。本发明所述增殖培养的温度为 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$,光照强度为1000lx,光照时间为12h/d。

[0030] 得原叶体后,本发明将所述原叶体团转接至福建莲座蕨离体保存培养基上进行离体保存;所述离体保存培养基包括以下成分:花宝2号3g/L、NAA0.5mg/L、蔗糖20g/L、活性炭1g/L和琼脂6g/L,pH值为5.8。本发明所述离体保存的温度优选为 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$,光照强度优选为1000lx,光照时间优选为12h/d。利用本发明所述离体保存培养基进行离体保存时,原叶体长条形,中间厚边缘薄,原叶体团继代周期可延长至1.5年以上。

[0031] 下面结合实施例对本发明提供的一种福建莲座蕨离体保存培养基及离体保存方法进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0032] 实施例1

[0033] 1.外植体获取及接种

[0034] 在9~10月份采集无病虫害着生有棕色孢子囊但未开裂的福建莲座蕨小羽片(图1中a),在解剖镜下取下完整孢子囊装入经灭菌的DNA纯化柱中,所取孢子囊数量为40个/DNA纯化柱。在超净工作台中,将收集的外植体用75%乙醇浸泡20s,0.2%氯化汞灭菌4min,无菌水漂洗4~5次,加入无菌水并戳破孢子囊,制成孢子悬浮液,接种到孢子无菌萌发培养基(1/10MS+20g/L蔗糖+6g/L琼脂,pH为5.8),接种10瓶,培养温度 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$,光照强度1000lx,光照时间12h/d。15d后孢子萌发(图1中b),30d后镜检孢子萌发率可达67.32%,50d左右发育成幼原叶体。

[0035] 2. 原叶体增殖

[0036] 将原叶体转接到培养基(1/2MS+20g/L蔗糖+6g/L琼脂,pH为5.8),原叶体进一步长大,将培养90d后的原叶体团切成 0.5cm^3 大小继续在此培养基上继代扩繁,每瓶接种4个,30d继代一次,增殖率可达1:3。

[0037] 3. 离体保存

[0038] 将增殖得到的直径大小约1cm的原叶体团转接到离体保存培养基(花宝2号3g/L+NAA 0.5mg/L+20g/L蔗糖+1g/L活性炭+6g/L琼脂,pH为5.8)上,每瓶接种4个。原叶体长条形,中间厚边缘薄,原叶体团的继代周期可延长至1.5年以上。同时,在此培养基中培养半年后,可获得少量孢子体,分化率约10%(图1中e)

[0039] 对比例1

[0040] 采用与实施例1相同的种质来源和技术流程,不同的是步骤1中接种时,直接接种完整孢子囊,经观察发现,培养20d后孢子囊变黑死亡。

[0041] 对比例2

[0042] 采用与实施例1相同的种质来源和技术流程进行福建莲座蕨离体保存试验,不同的是步骤3中离体保存培养基更换为1/2MS+20g/L蔗糖+6g/L琼脂,pH为5.8。原叶体片状不规则,卷曲,离体保存9个月后原叶体开始泛黄,基部褐化死亡,需继代更新培养基。

[0043] 对比例3

[0044] 采用与实施例1相同的种质来源和技术流程进行福建莲座蕨离体保存试验,不同的是步骤3中离体保存培养基更换为1/10MS+20g/L蔗糖+6g/L琼脂,pH为5.8,离体保存2个月后原叶体开始泛黄,逐渐形成球状,这可能是氮等营养缺乏造成,7个月后原叶体团块基部褐化死亡,需继代更新培养基。

[0045] 对比例4

[0046] 采用与实施例1相同的种质来源和技术流程进行福建莲座蕨离体保存试验,不同的是步骤3将增殖得到的原叶体团切成2cm大小转接到孢子体诱导培养基MS+20g/L蔗糖+6g/L琼脂,pH为5.8,培养6~7个月后有孢子体分化(图1中c),分化率约13%。将分化得到的孢子体转接至同样的培养基上进行离体保存(图1中d),每瓶接种1~2个,继代周期为1年左右。

[0047] 对实施例1和对比例1~4的不同离体保存培养基的离体保存效果进行对比,如表1所示:

[0048] 表1不同培养基对福建莲座蕨离体保存的影响

	处理	继代周期	原叶体/孢子体的生长情况
[0049]		(d)	
	实施例 1	510	原叶体有增殖，中间厚边缘薄，分化出少量孢子体/原叶体团继代周期 1.5 年左右
	对比例 1	0	未获得原叶体/-
[0050]	对比例 2	270	有增殖，片状，绿色/-
	对比例 3	210	生长缓慢，球状，泛黄/-
	对比例 4	360	分化出孢子体/孢子体可离体保存 1 年左右

[0051] 以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

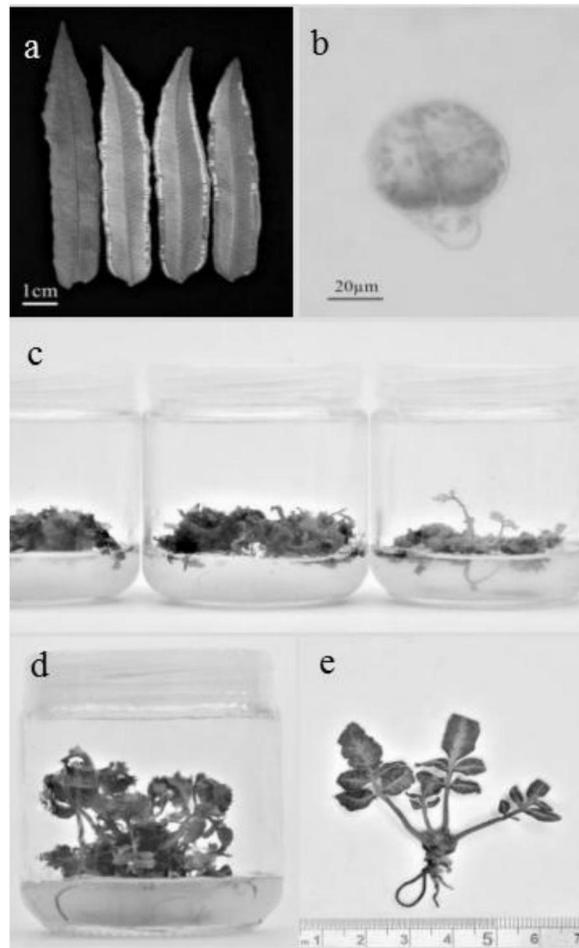


图1