

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510122059.9

[51] Int. Cl.

C12N 1/12 (2006.01)
A01G 33/00 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 10 月 22 日

[11] 授权公告号 CN 100427581C

[22] 申请日 2005.12.1

[21] 申请号 200510122059.9

[73] 专利权人 天津科技大学

地址 300222 天津市大沽南路 1038 号天津科技大学生物工程学院

[72] 发明人 贾士儒 苏建宇 何茜 陈雪峰
于海峰

[56] 参考文献

CN1530439A 2004.9.22

CN1096499C 2002.12.18

CN1174090C 2004.11.3

culture of the terrestrial cyanobacterium, nostocflagelliforme (cyanophyceae), under aquatic condition. Kunshan Gao and Changpeng Ye. J. Phycol, Vol. 39. 2003

发菜人工培养条件探索. 刘明志. 湖南农业科学, 第 1 期. 2005

审查员 滕蕾

权利要求书 1 页 说明书 4 页

[54] 发明名称

发菜细胞的固态培养方法

[57] 摘要

本发明公开了一种发菜细胞的固态培养方法。解决了发菜在人工控制或自然条件下相对快速生长的问题。其技术方案是：将活化的发菜细胞悬液，接种于固态培养基质表层，喷洒一定量事先配制好的培养液，在人工控制或自然条件下培养发菜细胞，并进行干湿节律培养，控制适宜的培养条件，实现完全人工培养或野外扩大培养。该技术突破了传统培养方式，加快了增殖速度。本发明获得的发菜细胞培养物具有较强的耐干旱能力，可长期保藏；生长中吸收空气中的二氧化碳并可固氮，向大气中释放氧气，有净化空气的作用；无需农药，不产生毒害物质；其扩大培养有利于维持干旱半干旱地区的生态平衡和荒漠化土壤的改良，具有很高的经济价值和环保价值。

1. 一种发菜细胞的固态培养方法, 其特征在于将液体悬浮培养获得的发菜细胞培养物接种于沙土基质表层, 包括以下步骤:

A. 培养液配制: NaNO_3 0.5-1.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 75 mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30-40mg/L, $\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 55-65 mg/L, K_2HPO_4 35-40 mg/L, pH7.5-8.0, 混匀备用;

B. 发菜细胞液制备: 发菜细胞培养液离心或过滤, 收集发菜细胞, 添加新鲜培养液, 使之重新悬浮, 或者将干燥发菜细胞用培养液浸泡, 使其恢复活性, 作为固态培养用种;

C. 沙粒预处理: 40 目筛网将沙粒过筛, 用水洗净, 100℃烘干至恒重, 平铺于玻璃、塑料、金属或木制浅盘上, 厚度 0.5-1.5cm;

D. 发菜细胞培养: 将发菜细胞液接种于沙土基质表层; 每天光照阶段按 1-1.5L/m² 总用量分 3 次喷施培养液或水, 沙盘表层覆盖薄膜使基质表层保持湿润, 无光照时则去除薄膜, 使基质表层干燥, 进行干湿节律培养; 培养温度 24-26℃, 光照 60-180 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 光暗周期 12h: 12h;

E. 收获: 当发菜细胞生长成团时去沙采收;

F. 干燥: 于 45℃ 以下晒干、风干或烘干;

G. 保藏: 将收集的发菜细胞室温干燥通风环境下保存。

2. 一种发菜细胞的固态培养方法, 其特征在于将液体悬浮培养获得的发菜细胞培养物接种于沙土基质表层, 包括以下步骤:

A. 培养液配制: NaNO_3 0.5-1.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 75 mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30-40mg/L, $\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 55-65 mg/L, K_2HPO_4 35-40 mg/L, pH7.5-8.0, 混匀备用;

B. 发菜细胞液制备: 发菜细胞培养液离心或过滤, 收集发菜细胞, 添加新鲜培养液, 使之重新悬浮, 或者将干燥发菜细胞用培养液浸泡, 使其恢复活性, 作为固态培养用种;

C. 发菜细胞培养: 将发菜细胞液喷洒于荒漠-半荒漠草原或丘陵裸地的沙土表层, 白天地表温度低于 40℃ 时喷施培养液或水, 保持土层表层湿润, 夜晚或地表温度高于 40℃ 时则保持干燥状态;

D. 收获: 每年 4 月底或 5 月初播种, 11 月底采收;

E. 干燥: 于 45℃ 以下晒干、风干或烘干;

F. 保藏: 将收集的发菜细胞室温干燥通风环境下保存。

发菜细胞的固态培养方法

技术领域

本发明涉及一种细胞培养技术，特别涉及一种发菜细胞培养技术，具体为可直接接种于沙粒或荒漠土壤自然沙土表层的发菜细胞固态培养方法。

背景技术

发菜 (*Nostoc flagelliforme*)，是一种原核生物，隶属于原核生物界 (Prokaryotae)，蓝藻门 (Cyanophyta)，蓝藻纲 (Cyanophyceae)，段殖体目 (Hormogonales)、念珠 (Nostocaceae)、念珠藻属 (*Nostoc*)。其营养丰富，并具有一定的药用价值，极具经济开发价值和潜力，并因发音与“发财”相似长期受到人们的青睐。发菜在我国主要分布于西北和华北部分省区的荒漠半荒漠地带，发菜既能进行光合作用，又能固氮，是一种在特殊生态条件下生活的陆生蓝藻，对干旱、高温、紫外辐射、贫瘠等恶劣环境具有很强的适应性。是荒漠生态环境中主要的固氮资源，具有重要的生态恢复作用。由于在野外发菜生长极其缓慢，加之大规模无节制的毁灭性采收不仅使其资源量锐减，而且严重破坏了草原生态系统。为了保护发菜资源和生态环境，长期以来，人们一直试图采用人工培养的方法，增加其生物量和资源量，以满足日益增长的市场需求，并开展了大量的生理生态学研究，例如，申请号为：02138828.8和03119101.0的中国专利申请，进行了发菜细胞液体悬浮培养工作，取得了一些进展。但是，完全人工培养一直没有实现。目前的培养工作基本以野外采集的发菜藻体为材料，尚无利用发菜细胞进行固态培养的报道。

发明内容

本发明是针对上述问题进行的研究，其目的是提供一种方法简单易行，操作方便，有利于发菜这一濒危物种的保护和人工生产，以期在目前发菜藻体人工培养进展缓慢的情况下，实现完全人工培养，并能在接近自然的条件下或直接接种于沙粒或荒漠土壤自然沙土表层扩大生产，使其能相对快速地生长的发菜细胞的固态培养方法。

为达到上述目的，本发明解决所述发菜细胞的固态培养方法技术问题的技术方案是，采取了以下技术措施：

1、培养液：配方为 NaNO_3 0.5-1.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 75 mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30-40mg/L, $\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 55-65 mg/L, K_2HPO_4 35-40 mg/L, pH7.5-8.0。培养液营养盐使用化学纯，溶解于自来水

中即可。配制时, 尽量避免沉淀生成, 微有沉淀析出亦可, 培养液无需进行高温灭菌。

2、发菜细胞液的制备: 将液体培养的发菜细胞液4000rpm离心或过滤, 弃去上清液, 添加新鲜培养液, 使之重新悬浮, 或者将干燥发菜细胞用培养液浸泡, 使其恢复活性, 作为固态培养用种。

3、沙粒预处理: 40目筛网将沙粒过筛, 用水洗净, 100℃烘干, 平铺于浅盘中, 厚约0.5-1.5cm。

4. 发菜细胞培养: 将发菜细胞液按400ml/m²的接种量接种于沙粒表层, 按1-1.5L/m²的总用量分3次每天在光照期间喷施培养液或水分, 沙盘上覆盖透明塑料薄膜保持沙粒表层湿润。在无光照时揭去薄膜, 使沙粒表层干燥, 进行干湿节律培养。野外培养时, 白天地表温度低于40℃时喷施培养液或水, 保持土层表层湿润, 夜晚或地表温度高于40℃时则保持干燥状态。

5、培养条件: 温度24-26℃, 光照60-180μmol·m²·s⁻¹, 光暗周期12h: 12h; 或是野外自然条件培养。

6、收获: 当沙盘上发菜细胞生长成团或野外培养到达收获季节时去沙采收。

7、干燥: 于45℃以下晒干、风干或烘干。

8、保藏: 室温干燥保存。

9、继续培养: 干燥发菜细胞于新的培养液中复水, 可进行继续培养。

本发明的优点和积极效果是: 由于采用细胞固体培养法, 改变了传统的藻体培养方式, 方法简单易行, 操作方便; 培养液无需进行高温灭菌, 与传统发菜藻体培养相比, 发菜的增殖速度更快, 有利于发菜这一濒危物种的保护和人工生产。由于进行了干湿节律培养, 因此, 本发明培养获得的发菜细胞培养物, 具有与野生发菜相类似的较强的耐干旱能力, 并可在干燥条件下长期保藏, 经扩大培养可直接用于生产, 接种于沙粒或荒漠土壤自然沙土表层; 应用该技术培养发菜细胞, 可以吸收空气中的二氧化碳并可固氮, 向大气中释放氧气, 有净化空气的作用, 并且不同于现代农业生产要用到农药和除草剂, 生产中无需任何农药和除草剂, 其培养过程中不会产生任何毒害物质; 该技术突破了传统的发菜藻体培养方式, 其扩大培养有利于维持干旱半干旱地区的生态平衡和荒漠化土壤的改良, 对草原生态系统的平衡具有一定的现实意义, 并且具有很高的经济价值和环保价值。

具体实施方式

实施例1: 发菜细胞沙盘固态培养, 其具体方法为:

A. 配制培养液: NaNO₃ 0.5 g/L, MgSO₄·7H₂O 75 mg/L, CaCl₂·2H₂O 30mg/L, NaSiO₃·9H₂O

55 mg/L, K_2HPO_4 35 mg/L, pH 7.5, 混匀备用。

B. 制备发菜细胞液：发菜细胞培养液离心或过滤，收集发菜细胞。按 10g（湿重）发菜细胞加 1L 培养液的比例，使之重新悬浮，或者采用干发菜细胞，按 2.5g 细胞粉加 1L 培养液的比例浸泡 24h，使之恢复活性，作为固态培养用种。

C. 沙粒预处理：40 目筛网将沙粒过筛，用水洗净，100℃烘干至恒重。平铺于玻璃、塑料、金属或木制浅盘上，厚度 0.5cm。

D. 细胞培养：将发菜细胞液按 400ml/m² 的接种量接种于沙粒表层，按 1L/m² 的总用量分 3 次每天在光照期间喷施培养液或水分，沙盘上覆盖透明塑料薄膜保持沙粒表层湿润。在无光照时揭去薄膜，使沙粒表层干燥，进行干湿节律培养。

E. 培养条件：温度 24℃，光照 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ，光暗周期 12h: 12h。

F. 收获：当发菜细胞生长成团或长满沙盘表层时去沙采收。

G. 干燥：于 45℃ 以下晒干、风干或烘干。

H. 保藏：将收集的发菜细胞培养物于室温干燥通风环境下保存。

I. 继续培养：将干燥的发菜细胞于新的培养液中复水，可进行继续培养。

实施例 2:

A. 配制培养液： $NaNO_3$ 1.0 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 75 mg/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 35mg/L, $NaSiO_3 \cdot 9H_2O$ 60mg/L, K_2HPO_4 37.5mg/L, pH7.25 (pH7.8), 混匀备用。

C. 沙粒预处理：40 目筛网将沙粒过筛，用水洗净，100℃烘干至恒重。平铺于玻璃、塑料、金属或木制浅盘上，厚度 1.0cm。

D. 细胞培养：将发菜细胞液按 600ml/m² 的接种量接种于沙粒表层，按 1.2L/m² 的总用量分 3 次每天在光照期间喷施培养液或水分，沙盘上覆盖透明塑料薄膜保持沙粒表层湿润。

E. 培养条件：温度 25℃，光照 120 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ，光暗周期 12h: 12h。

其余同实施例 1。

实施例 3:

A. 配制培养液： $NaNO_3$ 1.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 75 mg/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 40mg/L, $NaSiO_3 \cdot 9H_2O$ 65 mg/L, K_2HPO_4 40 mg/L, pH8.0, 混匀备用。

C. 沙粒预处理：40 目筛网将沙粒过筛，用水洗净，100℃烘干至恒重。平铺于玻璃、塑料、金属或木制浅盘上，厚度 1.5cm。

D. 细胞培养：将发菜细胞液按 800ml/m² 的接种量接种于沙粒表层，按 1.5L/m² 的总

用量分 3 次每天在光照期间喷施培养液或水分，沙盘上覆盖透明塑料薄膜保持沙粒表层湿润。

E. 培养条件：温度 26℃，光照 $180 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，光暗周期 12h: 12h;

其余同实施例 1。

实施例 4：发菜细胞野外培养，其具体方法为：

发菜细胞液按 $500\text{ml}/\text{m}^2$ 的接种量喷洒于荒漠-半荒漠草原或丘陵裸地的沙土表层，自然条件下培养。每年 4 月底或 5 月初播种，11 月底采收。夏季高温季节培养地上覆盖遮阳网，以遮蔽过于强烈的光照并降低地表温度。白天地表温度低于 40℃ 时喷施培养液或水，保持土层表层湿润，夜晚或地表温度高于 40℃ 时则保持干燥状态。其余同实施例 1（不包括人工控制的培养条件、沙粒预处理等内容）。

实施例 5：发菜细胞野外培养，其具体方法为：

发菜细胞液按 $750\text{ml}/\text{m}^2$ 的接种量喷洒于荒漠-半荒漠草原或丘陵裸地的沙土表层，其余同实施例 4。

实施例 6：发菜细胞野外培养，其具体方法为：

发菜细胞液按 $1000\text{ml}/\text{m}^2$ 的接种量喷洒于荒漠-半荒漠草原或丘陵裸地的沙土表层，其余同实施例 4。