



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104651239 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 27

(21) 申请号 201510078367. X

(22) 申请日 2015. 02. 13

(83) 生物保藏信息

为 CGMCC No. 9551 2014. 07. 18

(71) 申请人 中国科学院西双版纳热带植物园

地址 666303 云南省昆明市勐腊县勐仑镇

(72) 发明人 高江云 邵士成 字肖萌 林华

刘强

(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 谢嘉 旃习涵

(51) Int. Cl.

C12N 1/14(2006. 01)

A01H 17/00(2006. 01)

C12R 1/645(2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页

(54) 发明名称

一种促进齿瓣石斛种子萌发形成幼苗的菌株及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种促进齿瓣石斛种子萌发形成幼苗的菌株及其应用,该菌株的分类命名为胶膜菌 *Tulasnella* sp. CY, 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏号 CGMCC NO. 9551。该菌株能够显著地促进齿瓣石斛种子萌发形成幼苗, 且表现出具有较强的专一性。对于解决齿瓣石斛通过种子获取共生种苗具有十分重要的现实意义, 可用于苗圃育苗或者野外树干种子直播, 相对于组织培养具有成本低廉, 野外成活率高, 无组织退化问题等优点, 具有代替组织培养获得共生种苗的应用价值, 为解决齿瓣石斛栽培产业种苗来源瓶颈问题提供可靠的技术保障。

1. 一种促进齿瓣石斛种子萌发形成幼苗的菌株,其特征在于:该菌株的分类命名为胶膜菌 *Tulasnella* sp. CY,保藏号为 CGMCC No. 9551。

2. 权利要求 1 所述的菌株在齿瓣石斛繁育中的具体应用,其特征在于:将在培养皿内培养 10 天后长满胶膜菌. CY 菌株菌丝体的 PDA 培养基无菌状态下切成 1cm^3 大小的若干琼脂块,将消毒灭菌后的齿瓣石斛种子放入 $1\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的无菌琼脂悬浮液制成种子悬浮液,无菌状态下取 1mL 种子悬浮液播种在燕麦琼脂培养基上,同时接种含 CY 菌株菌丝体的琼脂块,在人工气候箱内 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 条件下培养获得共生幼苗。

一种促进齿瓣石斛种子萌发形成幼苗的菌株及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于植物保护技术领域,具体是涉及一种能够有效促进齿瓣石斛种子共生萌发形成原球茎,并生长发育形成大量幼苗的胶膜菌属真菌菌株。同时,本发明还涉及所述菌株在齿瓣石斛繁育中的具体应用。

背景技术

[0002] 齿瓣石斛 (*Dendrobium devonianum*) 作为传统中药材,有着极高的药用价值,其栽培规模在云南部分地州已发展成为仅次于铁皮石斛的第二支柱产业。产业所用的种苗来源大概有四种:第一种为野生植株,主要见于上世纪 90 年代一些小型个体企业,随着野生资源的匮乏,这种做法无法持续,加之国家相关部门对野生兰科植物的保护,采集野生植株用作交易已是非法的;第二种是扦插繁殖种苗,除了需要投入大量的人力外,种苗繁殖系数极低,不适合大规模产业发展;第三种方法是种子无菌萌发获取幼苗,技术相对成熟,萌发率虽高,但幼苗从无菌环境至室外过程中成活率较低、并且由于无法与自然界中的真菌建立共生关系,所以存在后期生长缓慢等致命缺陷;目前主要采用第四种方法即组织培养法,虽然可以获得大量种苗,但在炼苗和移栽过程中需要一定的技术摸索和大量的人力,幼苗生长过程中需要建造温棚、现代化的喷水设施等基础投入,更甚者需要喷施大量的农药和化肥,导致种苗品质降低。种苗来源已成为整个石斛产业的关键环节。

[0003] 上述问题很大一部分原因是由兰科植物种子本身的生物学特性决定的。兰科植物的种子非常细小没有胚乳或子叶,仅有发育不完全的胚,在自然条件下种子萌发需要完全依靠特定的共生真菌来获取营养物质。如果能够从兰科植物原球茎上分离获取有效的真菌,利用这种真菌来促进齿瓣石斛种子的共生萌发,进而促进种苗的繁育,应当可以有效地克服上述弊端。从理论上说,共生萌发不仅能简化幼苗生产过程,大幅提高种苗量,显著降低生产成本,更重要的是能显著提高齿瓣石幼苗回归到自然环境中的存活率和幼苗生长速度,使幼苗具有更好的环境适应性。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于针对现有技术的不足,提供一种能够有效促进齿瓣石斛种子萌发形成幼苗的菌株。

[0005] 本发明的目的还在于提供所述的菌株在齿瓣石斛繁育中的具体应用。

[0006] 本发明的目的通过下述技术方案予以实现。

[0007] 1、本发明从齿瓣石斛种子野外萌发形成的原球茎上分离了一株优势微生物 CY 作为试验菌株,其分类命名为胶膜菌 (*Tulasnella* sp.) CY,保藏号为 CGMCC No. 9551。

[0008] 为确认本发明菌株的生物遗传学信息,已将其 nrDNA ITS 序列提交美国国立生物技术信息中心数据库 (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 保存,其 Genbank 号为: KM226996.1。对该菌株进行 BLAST 比对分析,其与 KC928375.1 *Tulasnella* sp. 相似性最高达 96%。根据菌落、显微形态特征及分子生物学手段认定该菌株为胶膜菌属真菌。

[0009] 本发明的胶膜菌 (*Tulasnella* sp).CY 菌株在 PDA 平板上培养 7 天,其菌落呈灰白色,略显水浸状,不规则圆形发散生长,气生菌丝不发达,中等稀疏。光学显微镜下观察,菌丝具隔膜,粗 (2.0)2.5 ~ 5.5 μm ,细胞长 (16.0)21.0 ~ 74.0(78.0) μm ,分枝近直角,分枝菌丝在分枝不远处有隔膜;菌丝大致分两种类型,一类菌丝较规则,细长;另一类略显不规则,其上生有较多厚垣孢子;老菌丝细胞壁有加厚现象;培养 1 周以上开始形成串珠状的厚垣孢子,厚垣孢子数量不等 2 ~ 7 个,多数 5 ~ 6 个,孢子可生出孢子链,孢子出芽生殖或从孢子侧壁长出孢子链,孢子之间有隔膜开,孢子细胞壁稍微加厚,大小为:(9.0)9.5 ~ 16.5(17.0) \times (7.5)8.0 ~ 14.0(14.5) μm ,长宽比值 $Q = 1.1 \sim 1.8(2.2)$ 多数 1.2 ~ 1.4,近球状或窄椭球状。

[0010] 2、本发明还提供了所述胶膜菌 (*Tulasnella* sp).CY 菌株在齿瓣石斛繁育中的具体应用,即应用所述胶膜菌 CY 菌株促进齿瓣石斛种子萌发形成幼苗的方法,具体如下:

[0011] 1、制备共生萌发培养基:配制燕麦琼脂培养基置于旋口瓶中,旋紧瓶盖,灭菌、冷却后备用;

[0012] 所述的燕麦琼脂培养基 OMA, $4\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 燕麦粉 + $8\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂, $\text{pH} = 5.6 \sim 5.8$;灭菌条件 121°C , 20min。

[0013] 2、将所述的胶膜菌 .CY 菌株接种到已灭菌的 PDA 培养基中,培养 10 天,待菌丝长满整个平板,在无菌状态下将长有菌丝的培养基切成 1cm^3 大小的若干琼脂块备用;

[0014] 3、将消毒灭菌后的齿瓣石斛种子放入 $1\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的无菌琼脂悬浮液制成种子悬浮液;

[0015] 4、用移液枪取 1mL 种子悬浮液播种在准备好的共生萌发培养基上,然后接种步骤(2)备用的琼脂块,在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 条件下培养获得共生幼苗。

[0016] 与现有技术相比,本发明具有以下突出的优点:

[0017] 1、本发明以从齿瓣石斛原球茎分离获取的一株胶膜菌属真菌菌株为材料,研究了其对齿瓣石斛种子萌发的促进作用,结果证实此菌株极显著地促进齿瓣石斛种子萌发形成幼苗,且表现出具有较强的专一性,此菌株和齿瓣石斛种子共生是获取共生种苗的可靠来源。

[0018] 2、该菌株对于解决齿瓣石斛通过种子获取共生种苗具有十分重要的现实意义,可用于苗圃育苗或者野外树干种子直播,相对于组织培养具有成本低廉,野外成活率高,无组织退化问题等优点,具有代替组织培养获得共生种苗的应用价值。

[0019] 3、本发明工艺简单,操作容易,成本低,适于推广应用,在珍稀濒危兰科植物的回归、药用兰科植物的仿生态栽培、解决齿瓣石斛栽培产业种苗来源瓶颈问题等方面都具有巨大的推广价值。

[0020] 保藏生物材料的说明

[0021] 本发明的菌株,已于 2014 年 07 月 18 日,保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCG);该中心地址:中国北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号,中国科学院微生物研究所。该菌株分类命名为胶膜菌 (*Tulasnella* sp).CY,保藏号为 CGMCC No. 9551。

具体实施方式

[0022] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下通过实施例及试验数据,对本发明作进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0023] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0024] 实施例 I、胶膜菌 (*Tulasnella* sp).CY 菌株的分离与鉴定

[0025] 一、胶膜菌 CY 菌株的分离

[0026] 1、原球茎的获得:于西双版纳傣族自治州景洪市基诺乡龙帕古茶园茶树上自然生长的齿瓣石斛成年植株附近,收集自然萌发的齿瓣石斛原球茎,用茶树树干上生长的湿润苔藓包裹好后带回实验室用于后续实验。

[0027] 2、原球茎内共生真菌的诱导、分离纯化及保存:取出萌发的原球茎,放入盛有 1% 次氯酸钠 (NaClO) 溶液的灭菌烧杯中,轻轻摇动烧杯,5min 后用灭菌钝头镊子取出,用无菌水冲洗 3~4 次。在超净工作台上,用无菌刀片将原球茎切成两半,置于 PDA 培养基中 25℃ 培养箱培养。待在原球茎伤口处长出真菌菌丝,不断地切取菌丝尖端到新的 PDA 培养基上作系列转移,转移 3~5 次后,可得纯菌落。

[0028] 3、真菌保存:利用常规的试管斜面法对已纯化的真菌进行保存。将配制好的适量 PDA 培养基倒入规格为 18×20mm 的玻璃试管中,培养基倒入量约为试管体积的 1/3。硅胶塞后,放入高压灭菌锅内灭菌 (121℃, 20min)。灭菌后将试管置于超净工作台内摆成斜面待用。在超净工作台上,将纯化后的菌株用无菌接种针挑取边缘菌丝接种于 PDA 斜面上,并注明菌种、编号、日期。将接种后的试管置于人工气候箱内 25±2℃ 培养。待菌丝要长满 PDA 斜面时,将试管取出存入 4℃ 冰箱内保存。

[0029] 分离得到的菌株于 2014 年 07 月 18 日送交中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏。该菌株分类命名为胶膜菌 (*Tulasnella* sp).CY, 保藏号为 CGMCC No. 9551。

[0030] 二、胶膜菌 CY 菌株的鉴定

[0031] 为确认保藏号为 CGMCC No. 9551 菌株的生物遗传学信息,已将其 nrDNA ITS 序列提交美国国立生物技术信息中心数据库 (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 保存,其 Genbank 号为:KM226996.1。对其进行 BLAST 比对,鉴定结果表明该菌株与 KC928375.1*Tulasnella* sp. 相似性最高达 96%;根据菌落、显微形态特征及分子生物学手段认定该菌株属于胶膜菌属真菌。

[0032] 观察菌株显微形态特征使用盖玻片插片培养法,在 25±2℃ 条件下霉菌培养箱内培养 7~14 天,取插片按常规制片方法制片。根据观察需要选择不同生长时期的菌丝进行观察测量如:位于插片底部的菌丝体生长时间较长可见串珠状厚垣孢子,辅助显微镜测微标尺可对菌丝的粗细、单细胞长度,厚垣孢子大小进行测量统计。

[0033] 将保藏号 CGMCC No. 9551 的胶膜菌 CY 菌株在 PDA 平板上培养 7 天,其菌落呈灰白色,略显水浸状,不规则圆形发散生长,气生菌丝不发达,中等稀疏。光学显微镜下观察,菌丝具隔膜,粗 (2.0)2.5~5.5 μm,细胞长 (16.0)21.0~74.0(78.0) μm,分枝近直角,分枝菌丝在分枝不远处有隔膜;菌丝大致分两种类型,一类菌丝较规则,细长;另一类略不规则,其上生有较多厚垣孢子;老菌丝细胞壁有加厚现象;培养 1 周以上开始形成串珠状的厚垣孢子,厚垣孢子数量不等 2~7 个,多数 5~6 个,孢子可生出孢子链,孢子出芽生殖

或从孢子侧壁长出孢子链,孢子之间有隔膜开,孢子细胞壁稍微加厚,大小为:(9.0)9.5~16.5(17.0)×(7.5)8.0~14.0(14.5) μm,长宽比值 $Q = 1.1 \sim 1.8(2.2)$ 多数1.2~1.4,近球状或窄椭球状。

[0034] 所述的分子生物学鉴定涉及的真菌总DNA提取采用CTAB法;PCR扩增所用引物为真菌通用引物ITS4和ITS5;PCR反应体系和条件参照相应的产品说明书进行;扩增产物送上海生工生物工程有限公司测序。在美国国立生物技术信息中心数据库对所测序列进行比对分析,结合形态学特征确认其分类学地位。

[0035] 实施例II、胶膜菌CY菌株促进齿瓣石斛种子共生萌发有效性实验:

[0036] 利用种子与真菌在培养基内的共生萌发实验来检测分离到的胶膜菌CY菌株是否对种子萌发阶段有促进效果,以及对比不同真菌对种子萌发促进效果的差异。对该菌株促进齿瓣石斛种子共生萌发生长成幼苗的有效性进行检测,其检测步骤如下:

[0037] 1、接菌材料准备:将实验室保存的对兜唇石斛种子萌发具有促进作用的CGMCC No. 7552(FDaI7)菌株,对硬叶兰种子萌发具有促进作用的CGMCC No. 7553(FCb4)菌株,以及从齿瓣石斛原球茎中分离得到的CGMCC No. 9551(FDd1)菌株,分别在若干9cm PDA培养皿上进行活化,待菌丝长满约70%培养皿时,在无菌状态下将长有菌丝的培养基切成 1cm^3 大小的若干菌块备用;同时取空白PDA培养基也切成切成 1cm^3 的若干菌块备用。

[0038] 2、萌发培养基的准备:制备144皿燕麦培养基灭菌备用,三种真菌和无菌对照每个实验各36皿,包含光照/黑暗处理18皿和黑暗处理18皿;实验结果观察分别在培养20天,50天和90天时进行,共三次,每次每个处理各观察6皿。

[0039] 3、种子消毒灭菌后播种:将少量齿瓣石斛种子放入含有1%有效氯离子浓度的次氯酸钠溶液浸泡15min后,在超净工作台上分别取适量种子加入至 $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的无菌琼脂悬浮液中充分摇匀,制成种子悬浮液。用移液枪吸取定量的种子悬浮液均匀的播撒在每个培养皿中。

[0040] 步骤3所述的种子消毒灭菌不仅限于次氯酸钠,也可选择次氯酸钙和双氧水,各自浸泡的时间根据消毒液的浓度适当调整。

[0041] 4、接菌:分别将3种不同菌株菌块及PDA无菌琼脂块(空白对照)分别接入36皿燕麦培养基。

[0042] 5、设置光照培养条件:将每个接菌处理的培养皿半数(18皿)置于全黑暗(0/24h L/D)人工气候箱,剩余的(18皿)置于光照黑暗交替(12/12h L/D,光照强度2000~3000Lx)人工气候箱内。稳定设定恒温 $25\pm 2^\circ\text{C}$ 条件下进行培养。

[0043] 6、检测和数据统计分析:培养一段时间后,分别在20天,50天,90天时从各处理(接菌+光照条件)取6皿重复(考虑到可能污染损失重复),于体式镜下开盖检测播种种子总数,根据文献报道对种子萌发和原球茎发育情况进行分级,分为5个阶段,见表1;分别统计种子吸胀萌发数量(g),每个培养盒内萌发为原球茎的数量(p)和幼苗的数量(s)。根据播种数目计算原球茎比率($P' = p/t$),原球茎形成率($P = (p+s)/t$)以及幼苗形成率($S = s/t$)。观察并记录萌发情况及各阶段种子数目,并计算各阶段所占比例。分析所获取的真菌对促进齿瓣石斛种子共生萌发的有效性。并对不同处理条件下齿瓣石斛共生萌发的专一性进行分析。

[0044] 步骤6所述的种子萌发情况检测,选择20天,50天,90天对齿瓣石斛种子,原球茎

和幼苗的统计,便于观察种子至幼苗形成的整个过程,适合进行种子萌发数量统计。所述的种子萌发和原球茎发育情况参照 Stewart&Zettler(2002) 的方法对种子萌发和原球茎发育情况进行分级,分为 5 个阶段:阶段 0 描述为种胚透明,种皮完好,种子未萌发;阶段 1 描述为种胚吸水膨胀,但种皮仍然存在,视为萌发;阶段 2 描述为种胚继续膨大,突破种皮,形成原球茎;阶段 3 描述为出现原生分生组织,形成第一片突起物,即原球茎发育阶段;阶段 4 描述为长出第一片叶片,即幼苗发育初期。

[0045] 表 1 齿瓣石斛种子不同萌发阶段描述

[0046]

萌发阶段 Developmental stages	描述 Description
0	未萌发的种子 No germination
1	种胚吸水, 明显膨胀, 但种皮仍存在(视为萌发)

[0047]

2	Imbibed seed, swelled obviously and still covered by testa (= germination) 种胚继续膨大, 突破种皮(形成原球茎) Continued embryo enlargement, rupture of testa (= protocorm)
3	出现原生分生组织 (原球茎发育阶段) Appearance of protomeristem (protocorm development)
4	长出第一片叶片及后续生长 (幼苗发育初期) Emergence of first leaf and continue development (early stage of seedling development)

[0048] 7、种子萌发情况检测和数据统计分析

[0049] 7.1、齿瓣石斛种子在燕麦培养基上进行共生萌发 20 天后,除黑暗条件下空白未接菌处理,种子未能萌发,其余均有种子萌发至原球茎阶段。不同处理条件下种子萌发率和原球茎形成比率见表 2。利用广义线性混合模型 (GLMM) 分析接菌和光照及二者交互作用对种子萌发和原球茎率是否存在显著影响,其结果表明:相对于 CGMCC 7552 菌株,CGMCC 9551 菌株的作用相均无明显差异(萌发率 $p = 0.473$;原球茎率; $p = 0.857$);相对于空白实验,三者对种子萌发率及原球茎的形成率均具有极显著作用(p 值均小于 0.0001)。

[0050] 表 2 不同真菌及光照条件对齿瓣石斛种子在燕麦培养基上萌发的影响(20 天统计)

[0051]

接菌处理 Treatment	光照条件 Light Condition (L/D)	重复数 Replicatio ns	萌发率 Germination Rate (%)	原球茎率 Protocorm Percentage (%)	幼苗率 Seedling Percentage (%)
CK	12/12	5	80.76±2.84	0.88±1.21	0
	0/24	3	13.42±6.61	0	0
CGMCC 9551	12/12	5	87.99±5.15	73.90±9.00	0
	0/24	6	97.69±3.23	74.98±19.3 5	0
CGMCC 7552	12/12	6	86.71±5.74	71.27±5.40	0
	0/24	5	99.50±1.12	86.81±7.22	0
CGMCC 7553	12/12	6	89.95±6.50	57.24±18.9 4	0
	0/24	6	64.02±17.6	5.19±7.05	0

[0052]

			0		
--	--	--	---	--	--

[0053] 7. 2、齿瓣石斛种子在燕麦培养基上进行共生萌发 50 天后, 真菌、光照及二者交互作用分析结果表明, 三者对种子萌发及原球茎及幼苗的形成均具有极显著作用 (p 值均小于 0.0001)。50 天对于齿瓣石斛种子萌发是一段中长时期, 实验室 *in vitro* 共生萌发结果显示单一真菌这一因素对于种子的萌发不存在显著作用 ($p = 0.548$), 而真菌与光照互作对萌发有显著影响 (p 值小于 0.05)。而在原球茎及幼苗阶段, 接入 CGMCC 9551 菌株的种子受光照影响显著 (原球茎: $p < 0.0001$; 幼苗: $p < 0.0001$)。光照条件下接种 CGMCC 9551 菌株的齿瓣石斛种子发育为幼苗的比率为 $72.36 \pm 11.71\%$ 远高于接种 CGMCC7552 菌株的幼苗形成率 ($0.74 \pm 1.66\%$) (表 3); CGMCC 9551 菌株和空白对照均无幼苗形成。同时齿瓣石斛种子对菌株 CGMCC 9551 表现出较强的专一性。

[0054] 表 3 不同真菌及光照条件对齿瓣石斛种子在燕麦培养基上萌发的影响 (50 天统计)

[0055]

接菌处理 Treatment	光照条件 Light Condition (L/D)	重复数 Replication	萌发率 Germination Rate (%)	原球茎率 Protocorm Percentage (%)	幼苗率 Seedling Percentage (%)
CK	12/12	3	93.72±1.5 0	4.09±3.90	0
	0/24	4	94.20±2.2 0	23.52±25. 88	0
CGMCC 9551	12/12	5	92.32±3.7 6	91.63±3.8 9	72.36±11. 71
	0/24	5	93.70±4.4 4	69.24±10. 84	0
CGMCC 7552	12/12	5	87.84±6.2 4	75.00±11. 41	0.74±1.66
	0/24	5	93.43±1.1 2	81.80±12. 33	0
CGMCC	12/12	5	90.83±2.3	90.20±2.3	0

[0056]

7553			9	7	
	0/24	4	90.59±1.8 6	8.79±4.40	0

[0057] 7.3、齿瓣石斛种子在燕麦培养基上进行共生萌发 90 天后,任意接种处理包括空白对照在光照条件下均有种子发育成为幼苗(表 4),接种 CGMCC 9551 菌株的幼苗率明显高于其他处理,达到 71.17%,接种 FDa17 菌种的次之,仅为 23.59%。结果分析表明真菌、光照及二者交互作用,对种子萌发及原球茎及幼苗的形成均具有极显著作用(p 值均小于 0.0001)。90 天较长的培养时间,使得种子萌发的潜力基本都完全体现出来,故而种子萌发率在不同处理间较为接近。但菌株 CGMCC 9551 对齿瓣石斛种子在光照条件下形成幼苗具有极显著差异($p < 0.0001$),结果见表 4。

[0058] 表 4 不同真菌及光照条件对齿瓣石斛种子在燕麦培养基上萌发的影响(90 天统计)

[0059]

接菌处理 Treatment	光照条件 Light Condition (L/D)	重复数 Replication	萌发率 Germination Rate (%)	原球茎率 Protocorm Percentage (%)	幼苗率 Seedling Percentage (%)
CK	12/12	3	89.36±2.9 6	89.36±2.9 6	8.75±10.71
	0/24	3	89.00±1.1 9	41.60±23. 19	0
CGMCC 9551	12/12	5	92.77±2.3 2	91.83±1.9 9	71.17±15.64
	0/24	5	87.16±7.0 3	80.86±15. 02	0
CGMCC 7552	12/12	5	85.23±5.9 1	63.71±33. 18	23.59±24.52
	0/24	5	90.33±5.0 6	71.55±10. 35	0
CGMCC 7553	12/12	5	90.53±5.5 3	63.30±40. 17	9.08±12.51
	0/24	5	79.04±8.1 9	4.45±2.30	0

[0060] 实验证实 CGMCC No. 9551 和 CGMCC 7552 菌株在共生培养初期能极显著提高齿瓣石斛种子萌发率,即相当于缩短了种子萌发的时间,但种子萌发率仅指种胚吸水膨胀尚未突破种皮,不具有实际应用价值,更重要的指标是幼苗形成比率。共生培养后期即幼苗形成时期,虽然接种从其他兰科植物中分离得到的共生真菌(如 CGMCC 7552 或 CGMCC 7553 菌株)也可以一定程度上促进齿瓣石斛发育成为幼苗,然而从齿瓣石斛原球茎自身分离得到的 CGMCC9551 菌株有最好的促萌发效果,与光照共同作用极显著提高了齿瓣石斛种子形成原球茎和原球茎发育成幼苗的比率(见表4)。齿瓣石斛种子和本发明菌株表现出了较强的专一性,可以利用 CGMCC No. 9551 菌株和齿瓣石斛种子共生萌发生产种苗。

[0061] 兰科植物种子的萌发可以通过非共生萌发培养和共生萌发培养两种方式。虽然大多数兰科植物可通过非共生萌发培养,且具有较高的萌发率,但是此方式获得的幼苗移植到自然界中,生长缓慢,抗病原微生物能力差,存活率较低,同时由于很难与后接触的真菌建立共生关系而导致后继生长严重受阻。共生萌发培养技术是指在特定的基质(培养基)中同时播种植物种子和共生真菌,该方法可以提高种子的萌发率、幼苗的生长速度以及移植到自然环境后的幼苗存活率。由于兰科植物种子与真菌的共生关系具有专一性,故不同兰科植物种子的共生真菌不同。确定能与齿瓣石斛种子形成共生关系并促进其萌发的有效真菌是培育齿瓣石斛幼苗的关键环节。共生种苗的获取是开展齿瓣石斛原生境回归工作的基础。本发明的菌株通过共生萌发实验将齿瓣石斛种子和不同的真菌及对照分别在人工基质上培养,通过种子萌发率的比较成功的获得促进齿瓣石斛种子萌发的有效菌株,从而为利用齿瓣石斛种子和真菌共生萌发来高效培育种苗开辟了一条新的途径。