



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105519416 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 27

(21) 申请号 201510992749. 3

C12N 1/14(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 12. 28

(83) 生物保藏信息

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 云南省西双版纳傣族自治州勐  
腊县勐仑镇中国科学院西双版纳热带  
植物园

(72) 发明人 邵士成 高江云 刘强 黄晖

(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

(51) Int. Cl.

A01G 31/00(2006. 01)

权利要求书2页 说明书5页

(54) 发明名称

一种齿瓣石斛共生种苗的人工繁育方法

(57) 摘要

本发明公开了一种齿瓣石斛共生种苗的人工繁育方法。将胶膜菌(*Tulasnella* sp.), CGMCC No. 9551 通过放大发酵培养, 过滤菌丝体加适量无菌水并用匀浆机打碎制成真菌悬浮液, 加入齿瓣石斛种子制成种子-真菌悬浮液, 用椰糠、树叶和树皮制成育苗基质, 每平方米基质喷洒 50 ~ 500ml 的种子-真菌悬浮液, 并保持育苗基质的含水量在 50% ~ 90%, 至 45 天时即可获得大量共生幼苗。本发明能够显著缩短种子成苗时间, 降低育苗成本, 一次性获得较大量的齿瓣石斛幼苗, 提高共生幼苗的生长速度及移植到自然环境中的存活率均要高于非共生萌发幼苗。该方法实现了齿瓣石斛种子获取种苗的新途径, 具有重要的现实推广和应用价值。

1. 一种齿瓣石斛共生种苗的人工繁育方法,包括以下步骤:

(1)采集野外自然结实并成熟但果荚尚未开裂的齿瓣石斛种子保存备用;

(2)真菌悬浮液的制作:

2.1培养基的制作:以锥形瓶10%体积的量将PDA液体培养基装瓶,封口后装入灭菌锅,于121°C,115KPa条件下灭菌20min,备用;

2.2将活化培养3~10天的胶膜菌(*Tulasnella* sp.),CGMCC No.9551接种于备用的PDA液体培养基,于23~28°C,120~200rpm条件下发酵培养5~10天;

2.3用纱布过滤发酵液获取菌丝体,用无菌水冲洗菌丝体3~5次并沥水以去除残留的葡萄糖,将菌丝体和5~50倍质量的无菌水放入匀浆机打碎制成真菌悬浮液;

(3)种子-真菌悬浮液的制作:将齿瓣石斛种子与真菌悬浮液混匀制成种子-真菌悬浮液,控制种子-真菌悬浮液中有活力的齿瓣石斛种子密度为20~200个/ml;

(4)苗架和苗盘准备:

4.1在苗床上方安装荫蔽度为60~90%的遮阴网;

4.2将椰糠、树皮和树叶分别用清水浸泡一周,然后按椰糠占基质总体积50%~95%的比例混合均匀,于121°C,115KPa条件下灭菌20min,作为育苗基质;

4.3将育苗基质均匀的装入苗盘,厚度1.5~2.0cm,然后在基质表面平铺一块面积略大于苗盘的尼龙网布以防止种子漏出苗盘,尼龙网布的孔径为20~40 $\mu$ m,在尼龙网布上再均匀覆盖一层厚度0.4~0.6cm的育苗基质,喷水至基质饱和,备用;

(5)齿瓣石斛种子与真菌苗圃共生萌发播种:

5.1按照每平方米基质喷洒50~500ml的比例将制作好的种子-真菌悬浮液均匀喷洒在备用的苗盘上;

5.224小时后,每天在非太阳直射条件下喷洒雾化水以保持育苗基质的含水量在50%~90%;

5.3种子共生萌发至45天时,即可形成共生种苗。

2. 根据权利要求1所述的齿瓣石斛共生种苗的人工繁育方法,其特征在于:步骤(2.2)中所述的培养条件优选为28°C,150rpm,7天。

3. 根据权利要求1所述的齿瓣石斛共生种苗的人工繁育方法,其特征在于:步骤(2.3)中所述的制作真菌悬浮液所用无菌水的质量为菌丝体的10倍。

4. 根据权利要求1所述的齿瓣石斛共生种苗的人工繁育方法,其特征在于:步骤(3)中所述的齿瓣石斛种子密度为185个/ml。

5. 根据权利要求1所述的齿瓣石斛共生种苗的人工繁育方法,其特征在于:步骤(4.1)中所述的遮阴网荫蔽度为75%。

6. 根据权利要求1所述的齿瓣石斛共生种苗的人工繁育方法,其特征在于:步骤(4.2)中所述的育苗基质中椰糠、树皮和树叶的体积比为8:1:1。

7. 根据权利要求1所述的齿瓣石斛共生种苗的人工繁育方法,其特征在于:步骤(4.3)中所述的尼龙网布的孔径优选为30 $\mu$ m。

8. 根据权利要求1所述的齿瓣石斛共生种苗的人工繁育方法,其特征在于:步骤(5.1)中,每平方米基质喷洒300ml的种子-真菌悬浮液。

9. 根据权利要求1所述的齿瓣石斛共生种苗的人工繁育方法,其特征在于:步骤(5.2)

中,保持育苗基质的含水量为70%~80%。

10.根据权利要求1所述的齿瓣石斛共生种苗的人工繁育方法,其特征在于:步骤(5.2)中,喷洒雾化水的时间为每天早上9点前或下午6点后。

## 一种齿瓣石斛共生种苗的人工繁育方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于石斛栽培技术领域,具体是涉及一种利用真菌处理齿瓣石斛种子以快速获得大量齿瓣石斛共生种苗的人工繁育方法。

### 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,其栽培规模仅次于铁皮石斛,甚至在有些地区(如云南省龙陵县)已成为支柱产业。目前石斛的主要栽培模式有企业的集约化种植及其采用的“公司+基地+农户”模式,还有部分小企业或农户采用简易棚架小规模集约化种植,以及少量企业或个人进行的仿生态种植。各种栽培模式的种苗来源主要为组培苗,少部分为野生植株,罕有共生种苗。主要原因是石斛育苗借助组培技术流程相对稳定,易于工厂化规模生产。尽管石斛组培育苗技术已发展相对成熟,但仍存在着成本高、周期长,技术难度较大需要专门的工作人员操作,在自然条件下移栽成活率偏低,后期生长发育缓慢等诸多缺陷。种苗来源成为石斛栽培产业发展的瓶颈,严重影响了产业的健康、可持续发展。

[0003] 基于齿瓣石斛的基本生物学特征:种子非常细小,成熟的种子没有胚乳或子叶,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。如果能够通过齿瓣石斛种子共生萌发技术获得大量的共生幼苗,则可以克服现有组培育苗的缺陷,不仅可以提高种苗数量,简化幼苗生产过程,缩短种子成苗时间,明显降低生产成本,更重要的是能显著提高幼苗回归到自然环境中后的存活率和幼苗生长速度,增强种苗的环境适应性。但现有技术中尚没有成功的报道。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于针对现有技术的不足,提供一种快速获得大量齿瓣石斛共生种苗的方法,以缩短齿瓣石斛种苗培育时间,降低种苗培育成本,提高种苗数量,改善齿瓣石斛幼苗的环境适应性。

[0005] 本发明的目的通过以下技术方案予以实现。

[0006] 除非另有说明,本发明所采用的百分数均为质量百分数。

[0007] 一种齿瓣石斛共生种苗的人工繁育方法,包括以下步骤:

[0008] (1)采集野外自然结实并成熟但果荚尚未开裂的齿瓣石斛种子保存备用;

[0009] (2)真菌悬浮液的制作:

[0010] 2.1培养基的制作:以锥形瓶10%体积的量将PDA液体培养基装瓶,封口后装入灭菌锅,于121℃,115KPa条件下灭菌20min,备用;

[0011] 2.2将活化培养3~10天的胶膜菌(*Tulasnella* sp.),CGMCC No.9551接种于备用的PDA液体培养基,于23~28℃,120~200rpm条件下发酵培养5~10天;

[0012] 2.3用纱布过滤发酵液获取菌丝体,用无菌水冲洗菌丝体3~5次并沥水以去除残留的葡萄糖,将菌丝体和5~50倍质量的无菌水放入匀浆机打碎制成真菌悬浮液;

[0013] (3)种子-真菌悬浮液的制作:将齿瓣石斛种子与真菌悬浮液混匀制成种子-真菌悬浮液,控制种子-真菌悬浮液中有活力的齿瓣石斛种子密度为20~200个/ml;

[0014] (4)苗架和苗盘准备:

[0015] 4.1在苗床上方安装荫蔽度为60~90%的遮阴网;

[0016] 4.2将椰糠、树皮和树叶分别用清水浸泡一周,然后按椰糠占基质总体积50%~95%的比例混合均匀,于121℃,115KPa条件下灭菌20min,作为育苗基质;

[0017] 4.3将育苗基质均匀的装入苗盘,厚度1.5~2.0cm,然后在基质表面平铺一块面积略大于苗盘的尼龙网布以防止种子漏出苗盘,尼龙网布的孔径为20~40μm,在尼龙网布上再均匀覆盖一层厚度0.4~0.6cm的育苗基质,喷水至基质饱和,备用;

[0018] (5)齿瓣石斛种子与真菌苗圃共生萌发播种:

[0019] 5.1按照每平方米基质喷洒50~500ml的比例将制作好的种子-真菌悬浮液均匀喷洒在备用的苗盘上;

[0020] 5.224小时后,每天在非太阳直射条件下喷洒雾化水以保持育苗基质的含水量在50%~90%;

[0021] 5.3种子共生萌发至45天时,即可形成大量共生种苗。

[0022] 进一步的,步骤(2.2)中所述的培养条件优选为28℃,150rpm,7天。

[0023] 步骤(2.3)中所述的制作真菌悬浮液所用无菌水的质量为菌丝体的10倍。

[0024] 步骤(3)中所述的齿瓣石斛种子密度为185个/ml。

[0025] 步骤(4.1)中所述的遮阴网荫蔽度为75%。

[0026] 步骤(4.2)中所述的育苗基质中椰糠、树皮和树叶的体积比为8:1:1。

[0027] 步骤(4.3)中所述的尼龙网布的孔径优选为30μm。

[0028] 步骤(5.1)中,每平方米基质喷洒300ml的种子-真菌悬浮液;

[0029] 步骤(5.2)中,保持育苗基质的含水量为70%~80%。

[0030] 步骤(5.2)中,喷洒雾化水的时间为每天早上9点前或下午6点后。

[0031] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0032] 1、相比种子无菌萌发技术,本发明能够大幅降低育苗成本,仅需要配制扩繁真菌所用的PDA液体培养基和育苗基质即可完成种苗繁殖过程。在繁殖过程中不需要经过多次转接,也无需炼苗,显著缩短了种子成苗时间。

[0033] 2、在同样的培养环境和条件下,对照试验即无菌萌发所播种的齿瓣石斛种子不能萌发形成幼苗,有文献报道野外自然条件下兰科植物种子的萌发率不超过0.03%,而应用本发明后萌发率大大提高,能够在较短的时间获得大量的共生种苗。

[0034] 3、同时,幼苗前期已经和真菌建立的共生关系,因此共生幼苗的生长速度及移植到自然环境中的存活率均要高于非共生萌发幼苗。

[0035] 4、本发明实现了齿瓣石斛种子获取种苗的新途径,具有重要的现实推广和应用价值,为产业发展提供了全新的思路。

[0036] 保藏生物材料的说明

[0037] 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.),保藏号为CGMCC No.9551。

## 具体实施方式

[0038] 以下通过实施例对本发明做进一步的详细说明,但实施例并不是对本发明技术方案的限制。

[0039] 实施例1:

[0040] 1、齿瓣种质的获得与保存

[0041] 采集野外自然结实并成熟但尚未开裂的齿瓣石斛种子保存备用。所用的齿瓣石斛种子采自云南省保山市龙陵县的野外种群。

[0042] 2、真菌的悬浮液的制作

[0043] 2.1培养基的制作:PDA液体培养基常规做法,适量。以每瓶50ml平均分装入70瓶500ml三角瓶,封口后用报纸包裹瓶口,装入灭菌锅于121℃,115KPa条件下灭菌20min,备用。

[0044] 2.2将活化培养7天的菌株-胶膜菌(*Tulasnellasp.*)CGMCC No.9551,接种于上述灭菌的含50ml液体培养基的三角瓶,于28℃,150rpm培养条件下发酵培养7天。

[0045] 2.3用纱布过滤培养好的发酵液获取菌丝体并用无菌水冲洗菌丝体4次,每次沥水以去除残留的葡萄糖。按质量比为1:10的沥水菌丝体和无菌水放入匀浆机打碎制成真菌悬浮液。

[0046] 3、种子-真菌悬浮液的制作

[0047] 3.1按常规TTC方法检测备用的齿瓣石斛种子活力,以确认种子活力有无及有活力种子的比例,根据有活力种子的比例确认种子用量。本实施例中具活力种子比率为79.6%。

[0048] 3.2将一个齿瓣石斛果荚内约30%的种子加入真菌悬浮液混匀制成种子-悬浮液。取200 $\mu$ l悬浮液6次徒手制片在显微镜下检测种子数,计算每毫升所含种子数量即得悬浮液种子密度。本次共制得种子-真菌悬浮液共计360ml,种子密度为147个/ml。

[0049] 3.3同时准备CK空白对照:100ml 0.1%的琼脂水溶液加一个齿瓣石斛果荚内约20%的种子制成空白悬浮液,种子密度共测量6次,种子密度375个/ml。

[0050] 4、简易苗架和苗盘的准备

[0051] 4.1用遮阴度为75%的遮阴网将苗床上方约2m高的空间做遮阴处理,占地面积约15平米。

[0052] 4.2将椰糠和在育苗地附近的山林中收集的树皮、落叶提前浸泡一周,然后按椰糠、树皮和树叶体积8:1:1的比例混合均匀做成育苗基质,转入容器内于在121℃,115KPa条件下灭菌20min,备用。

[0053] 4.3把准备好的基质取出,均匀的平覆在苗盘上厚度约1.5-2.0cm(苗盘大小为:长 $\times$ 宽 $\times$ 高=53 $\times$ 26 $\times$ 6cm),此时在基质表面平铺一块略大于苗盘面积的孔径为30 $\mu$ m的尼龙网布以防止种子漏出苗盘,然后顺序在尼龙网布均匀的平覆一层厚度约为0.5cm的相同基质,喷洒自来水至基质含水量饱和,备用。

[0054] 5、2015年06~7月在中科院西双版纳热带植物园苗圃育苗地开展齿瓣石斛种子与真菌共生萌发实验,平均气温23℃~31℃。

[0055] 5.1取40ml已制作好的种子-真菌悬浮液用喷壶均匀喷洒在装有基质的苗盘上。同时,喷洒琼脂-种子悬浮液作为对照实验,对照苗盘放置距离共生育苗苗盘50m以上以防真

菌污染。

[0056] 5.2第二天起,每天早上9点前或下午6点后喷洒适量的雾化水以保持人工基质的湿度。

[0057] 5.330天时开始注意观察原球茎的发育情况、数量并做好实验记录。发现原球茎时取部分实验样品带回实验室对其进行显微观察:原球茎内的菌根形态,结构,菌丝团颜色等等。

[0058] 6、数据分析

[0059] 种子-真菌共生萌发实验45天时发现有大量的原球茎和幼苗,甚至有原球茎原生分生组织进一步分化形成两片叶子,此时每个苗盘的原球茎数量见表1。不接菌的空白对照组没有观察到有原球茎或者幼苗形成。接种菌株的原球茎形成率 $4.95 \pm 3.48\%$  ( $n=9$ )显著高于空白对照处理。结果分析表明,齿瓣石斛种子只有接菌处理才能萌发,形成原球茎和幼苗。相对于空白试验,本发明的真菌共生萌发技术对促进齿瓣石斛种子萌发具有显著作用。

[0060] 表1各实验处理和对照实验原球茎数量

[0061] Table 1 The protcorm number of each seedling plate and control test plate

序号	原球茎数量	萌发率 (%)
苗盘 1	640	10.88
苗盘 2	220	3.74
苗盘 3	70	1.19
[0062] 苗盘 4	360	6.12
苗盘 5	400	6.80
苗盘 6	160	2.72
苗盘 7	540	9.18
苗盘 8	90	1.53
苗盘 9	140	2.38
平均值	291	4.95
[0063] CK1	0	0
CK2	0	0

[0064] 实施例2

[0065] 重复实施例1,有以下不同点:

[0066] 2015年01~02月在中科院西双版纳热带植物园科研中心内的空地搭建一简易苗床,用遮阴度为75%的遮阴网将苗床上方约1m高的空间做遮阴处理,该苗床占地面积约9平方米。平均气温 $13^{\circ}\text{C} \sim 24^{\circ}\text{C}$ 。

[0067] 取100ml已制作好的种子-真菌悬浮液用喷壶均匀喷洒在装有基质的苗盘上,悬浮液的种子密度为185个/ml,共播种4苗盘。同时,喷洒琼脂-种子悬浮液作为对照实验,种子密度为320个/ml,对照苗盘放置距离共生育苗苗盘30m以上以防真菌污染,共播种2苗盘。其余培养条件一致。

[0068] 种子-真菌共生萌发实验约50天时发现有大量的原球茎和幼苗,甚至有部分原球茎分生组织进一步分化形成两片叶子,每个苗盘的原球茎数量见表2。接种菌株的原球茎形成率 $5.34 \pm 1.80\%$  ( $n=4$ )显著高于对照处理。结果分析表明,齿瓣石斛种子只有接菌处理才能萌发,形成原球茎和幼苗。相对于对照试验,本发明的真菌共生萌发技术对促进齿瓣石斛种子萌发具有显著作用。

[0069] 表2各实验处理和对照实验原球茎数量

[0070] Table 2 The protcorm number of each seedling plate and control test plate in summer

[0071]	序号	原球茎数量	萌发率 (%)
	苗盘 1	360	4.86
	苗盘 2	240	3.24
	苗盘 3	560	7.56
	苗盘 4	420	5.67
[0072]	平均值	395	5.34
	CK1	0	0
	CK2	0	0

[0073] 本发明在开放环境条件下对齿瓣石斛种子和真菌共生萌发开展了研究,成功的获得了大量的共生种苗,虽然平均萌发率较低(分别为: $4.95 \pm 3.48\%$  ( $n=9$ )和 $5.34 \pm 1.80\%$  ( $n=4$ )且每个苗盘萌发原球茎数量不均一,但是,鉴于齿瓣石斛果荚种子含量极多达数万至数十万(本实验室曾测量数值约为18.3万)、且该方法播种操作简单、成本低廉和无需炼苗等诸多优点,故本次播种所获得的萌发率仍然有重要的应用价值,为齿瓣石斛栽培产业种苗的获取提供了可行方法。