



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105659979 B

(45)授权公告日 2018.11.23

(21)申请号 201610030269.3

C12N 1/14(2006.01)

(22)申请日 2016.01.18

C12R 1/645(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105659979 A

(56)对比文件

CN 103548562 A,2014.02.05,

CN 103238470 A,2013.08.14,

CN 105103924 A,2015.12.02,

(43)申请公布日 2016.06.15

(73)专利权人 云南绿辰生物科技开发有限公司

地址 674100 云南省丽江市古城区祥金山

街道金山社区新民下组

陶刚.中国贵州兰科植物白及内生真菌多样性及生态分布研究.《华中农业大学博士学位论文》.2009,

(72)发明人 寸建清

审查员 孙啸震

(74)专利代理机构 昆明正原专利商标代理有限公司

公司 53100

代理人 陈左

(51)Int.Cl.

A01G 1/08(2006.01)

A01G 18/00(2018.01)

权利要求书1页 说明书3页

(54)发明名称

一种白芨共生菌的培育方法

(57)摘要

本发明提供了一种白芨共生菌的培育方法,其特征是白芨块茎根消毒处理接入PDA培养基暗培养7~8天,得到菌丝体后,在木屑和阔叶树树叶配制的培养基上暗培养,15~20天后从另一端获取纯化菌种,提纯菌种转接到灭菌后的RM改良培养基上暗培养,7~8天后得到菌丝健壮的优良菌种,优良菌种将原种培养基暗培养,25~30天得到白芨共生菌的原种,将原种接入栽培种培养基中暗培养,28~36天后得到白芨共生菌的栽培种。使用时,将白芨共生菌的栽培种埋于土下15~20cm处后,再移栽白芨苗。使用本发明的白芨共生菌大田种植白芨,移栽后的苗成活率提高20%以上,产量增产40%以上,质量有明显的提高。

1. 一种白芨共生菌的培育方法,步骤如下:

(1) 白芨块茎根的消毒处理:取新鲜野生白芨块茎根部用清水冲洗3~5次除去泥砂杂质,用洗衣粉水浸泡15~25min后,用无菌水冲洗4~5次,然后用75%乙醇浸泡25~30s后,用无菌水冲洗3~5次,用0.1~0.2% HgCl_2 浸泡6~8min后无菌水冲洗5~6次,用无菌滤纸吸干水分;

(2) 白芨共生菌的提取:将步骤(1)消毒处理后的白芨块茎根在超净工作台上用经消毒的剪刀剪成长0.2~0.5cm小段,接入灭菌后的PDA培养基上,在24~26℃温度下暗培养,接种后7~8天获得长满整个培养基表面3~4cm长的白芨共生菌;

其特征是,还有如下步骤:

(3) 白芨共生菌的提纯:将试管截去底部,管内中间装入木屑和阔叶树树叶配制的培养基,两端加棉塞灭菌后,从一端接入步骤(2)提取得到的菌丝体后,在24~26℃温度下暗培养,菌丝吃料后向木屑深处延伸至另一端,15~20天后从另一端获取纯化菌种;

(4) 白芨共生菌的复壮:将步骤(3)得到的提纯菌种转接到灭菌后的RM改良培养基上,在24~26℃温度下暗培养,7~8天后得到菌丝健壮的优良菌种;所述的复壮用RM改良培养基配方为:蛋白胨2克,葡萄糖20克,磷酸二氢钾0.46克,磷酸氢二钾1克,硫酸镁0.5克,琼脂15~20克,马铃薯200克,蒸馏水1000毫升;

(5) 白芨共生菌的原种扩繁:将原种培养基装入玻璃培养瓶容积的2/3后,盖上棉塞灭菌后接入步骤(4)得到的复壮菌种,在24~26℃温度下暗培养,25~30天后菌丝长到瓶底,得到白芨共生菌的原种,原种培养基的质量百分比为:杂木屑39%,阔叶树树叶39%,麸皮20%,蔗糖1%,碳酸钙1%,料水质量比为1:1.3~1.5;

(6) 白芨共生菌的栽培种扩繁:将栽培种培养基装入高密度低压聚乙烯塑料袋内灭菌,冷却后接入步骤(5)得到的白芨共生菌的原种,在2~23℃温度下暗培养,28~36天后得到白芨共生菌的栽培种,栽培种培养基的质量百分比为:杂木屑30%,阔叶树树叶48%,麦麸皮10%,玉米粉10%,蔗糖1%,石膏粉1%,料水质量比为1:1.3~1.5。

2. 根据权利要求1所述的白芨共生菌的培育方法,其特征是白芨共生菌的提纯培养基的质量百分比为:杂木屑60%,阔叶树树叶30%,麸皮8%,蔗糖1%,石膏粉1%,料水质量比为1:1.3~1.6。

一种白芨共生菌的培育方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种白芨共生菌的培育方法。

背景技术

[0002] 白芨[*Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.], 又名白及, 为兰科植物。白芨假鳞茎可入药, 能止血补肺、生肌止痛、润筋行气。始载于《神农本草经》: “主痛肿、恶疮、败疽、伤阴死肌、胃中邪气”。《本草纲目》也指出: “白芨、敛气、瘳痰、止血、消痛之药也。此药质极粘腻, 性极收涩、籍苦气寒, 善入肺经, 因热壅血瘀而成疾者, 以此研口服、躯坚敛脏、封填破损、痛肿可消, 溃败可托, 死肌可去, 脓血可洁, 有抚早生新之妙用也”。过去白芨主要靠野生繁殖的, 但近年来由于白芨的需求不断增加, 野生植物资源急剧下降, 白芨已成为珍稀濒危物种, 现已列入《濒危动植物国际贸易公约》予以保护。

[0003] 为了满足市场对白芨的需求, 近年来人们开始采用人工栽培方法种植白芨。但目前研究较多的是白芨种苗的繁殖, 没有发现白芨种苗移栽到大田后的施肥技术研究, 一般采用常规农作物的施肥方法。因兰科植物和菌根真菌之间存在营养物质交换, 主要是菌根真菌供给兰科植物所需的无机盐和有机化合物, 兰科植物菌根真菌与其它菌根真菌不同的是它们无法从宿主的根部获取有机养份, 必须从周围环境中获得, 将其分解成葡萄糖等小分子碳水化合物后, 供兰科植物根系吸收利用。白芨为兰科植物, 种植到大田后如果按常规农作物的施肥方法施肥, 因缺少白芨菌根真菌, 难以吸收和满足白芨生长的营养需求, 造成白芨种苗成活率低、白芨产量低和质量差。

发明内容

[0004] 本发明的目的是针对上述不足之处, 提供一种白芨共生菌的培育方法, 培育出的白芨共生菌施到白芨种苗移栽大田后, 增加大田的白芨共生菌数量, 优化白芨生长的环境, 提高白芨种苗成活率, 提高白芨产量和质量。

[0005] 本发明包括白芨共生菌的提取、提纯、复壮、原种扩繁、栽培种扩繁等如下步骤:

[0006] 1、白芨块茎根消毒处理: 取新鲜野生白芨块茎根部用清水冲洗3~5次除去泥砂杂质, 用洗衣粉水浸泡15~25min后, 用无菌水冲洗4~5次, 然后用75%乙醇浸泡25~30s后, 用无菌水冲洗3~5次, 用0.1~0.2%HgCl₂浸泡6~8min后无菌水冲洗5~6次, 用无菌滤纸吸干水分;

[0007] 2、白芨共生菌的提取: 将步骤1消毒处理后的白芨块茎根在超净工作台上用经消毒的剪刀剪成长0.2~0.5cm小段, 接入灭菌后的PDA培养基上, 在24~26℃温度下暗培养, 接种后7~8天获得长满整个培养基表面3~4cm长的白芨共生菌;

[0008] 3、白芨共生菌的提纯: 将试管截去底部, 管内中间装入木屑和阔叶树叶配制的培养基, 两端加棉塞灭菌后, 从一端接入步骤2得到的菌丝体后, 在24~26℃温度下暗培养, 菌丝吃料后向木屑深处延伸至另一端, 15~20天后从另一端获取纯化菌种;

[0009] 4、白芨共生菌的复壮: 将步骤3得到的提纯菌种转接到灭菌后的RM改良培养基上,

在24~26℃温度下暗培养, 7~8天后得到菌丝健壮的优良菌种;

[0010] 5、白芨共生菌的原种扩繁:将原种培养基装入玻璃培养瓶容积的2/3后,盖上棉塞灭菌后接入步骤4得到的复壮菌种,在24~26℃温度下暗培养,25~30天后菌丝长到瓶底,得到白芨共生菌的原种,原种培养基的质量百分比为:杂木屑39%,阔叶树树叶39%,麸皮20%,蔗糖1%,碳酸钙1%,料水质量比为1:1.3~1.5;

[0011] 6、白芨共生菌的栽培种扩繁:将栽培种培养基装入高密度低压聚乙烯塑料袋内灭菌,冷却后接入步骤5得到的白芨共生菌的原种,在2~23℃温度下暗培养,28~36天后得到白芨共生菌的栽培种,栽培种培养基的质量百分比为:杂木屑30%,阔叶树树叶48%,麦麸皮10%,玉米粉10%,蔗糖1%,石膏粉1%,料水质量比为1:1.3~1.5。

[0012] 使用时,先将步骤5得到的白芨共生菌的栽培种埋于土下15~20cm处后,再移栽白芨苗,按常规的措施进行田间管理。在云南省丽江市古城区金山办事处经过连续三年的使用实验表明,使用本发明的白芨共生菌大田种植白芨,比不使用本发明的白芨共生菌大田种植白芨相比,移栽后的苗成活率提高20%以上,产量增产40%以上,质量有明显的提高。

具体实施方式

[0013] 本发明包括白芨共生菌的提取、提纯、复壮、原种扩繁、栽培种扩繁,其具体实施方式为:

[0014] 1、白芨块茎根消毒处理:取新鲜野生白芨块茎根部用清水冲洗3~5次除去泥砂杂质,用洗衣粉水浸泡15~25min后,用无菌水冲洗4~5次,然后用75%乙醇浸泡25~30s后,无菌水冲洗3~5次,用0.1~0.2%HgCl₂浸泡6~8min后无菌水冲洗5~6次,用无菌滤纸吸干水分;

[0015] 2、白芨共生菌的提取:将步骤1消毒处理后的白芨块茎根在超净工作台上用经消毒的剪刀剪成长0.2~0.5cm小段,接入灭菌后的PDA培养基上,在24~26℃温度下暗培养,2~3天后即见白色柔毛状菌丝长出,5~6天后菌丝已长长至3~4cm长,接种后7~8天获得长满整个培养基表面3~4cm长的白芨共生菌;PDA培养基为:马铃薯(去皮)200克,葡萄糖20克,琼脂18~20克,水1000毫升;经温度120~125℃、压力1.1~1.2Kgf/cm²下灭菌25~30min,冷却后接入白芨块茎根段材料;

[0016] 3、白芨共生菌的提纯:将试管截去底部,管内中间装入木屑和阔叶树树叶配制的培养基,培养基的质量百分比为:杂木屑60%,阔叶树树叶30%,麸皮8%,蔗糖1%,石膏粉1%,料水质量比为1:1.3~1.6,两端加棉塞后,在温度128~130℃、压力1.5~1.6Kgf/cm²下灭菌120~150min,冷却后从一端接入步骤3得到的菌丝体后,在24~26℃温度下暗培养,菌丝吃料后向木屑深处延伸至另一端,15~20天后另一端获取纯化菌种,采用木屑滤菌法进行过滤、提纯,从而达到高纯度的白芨共生菌菌种的目的;

[0017] 4、白芨共生菌的复壮:将步骤3得到的提纯菌种转接到灭菌后的RM改良培养基上,在24~26℃温度下暗培养,经观察第2天即可看到白色菌丝生长,第3~4天观察,菌落生长为园形,气生菌丝不发达,7~8天后菌丝就可长满培养基表面,此时,即可培育到生长旺盛,菌丝健壮的优良菌种,经表面观察,试管内菌丝正背面呈白色至淡红色,RM改良培养基配方为:蛋白胨2克,葡萄糖20克,磷酸二氢钾0.46克,磷酸氢二钾1克,硫酸镁0.5克,琼脂15~20克,马铃薯200克,蒸馏水1000毫升,经温度120~125℃、压力1.1~1.2Kgf/cm²下灭菌25~

30min,冷却后接入提纯菌种;

[0018] 5、白芨共生菌的原种扩繁:将原种培养基装入玻璃培养瓶容积的2/3后,盖上棉塞后在温度128~130℃、压力1.5~1.6Kgf/cm²下灭菌120~150min,冷却后接入步骤4得到的复壮菌种,在24~26℃温度下暗培养,25~30天后菌丝长到瓶底,得到白芨共生菌的原种,原种培养基的质量百分比为:杂木屑39%,阔叶树树叶39%,麸皮20%,蔗糖1%,碳酸钙1%,料水质量比为1:1.3~1.5;

[0019] 6、白芨共生菌的栽培种扩繁:将栽培种培养基装入高密度低压聚乙烯塑料袋内,培养基装到容积的2/3后盖上无棉盖体在温度95~100℃常压下灭菌18~22小时,冷却后接入步骤5得到的白芨共生菌的原种,在20~23℃温度下暗培养,25~30天后,菌丝即可长满菌袋;此时再后熟培养3~6天,即可用于白芨苗拌菌栽培,栽培种培养基的质量百分比为:杂木屑30%,阔叶树树叶48%,麦麸皮10%,玉米粉10%,蔗糖1%,石膏粉1%,料水质量比为1:1.3~1.5。