(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103238470 B
(45)授权公告日 2014.04.23

(21)申请号 201310152744.0

(22)申请日 2013.04.27

(73)专利权人 陕西师范大学
地址 710062 陕西省西安市长安南路 199 号

(72)发明人 肖娅萍 吕鼎豪 牛俊峰 王喆之 任倩俐

(74)专利代理机构 西安永生专利代理有限责任公司 61201
代理人 高雪霞

(51)Int.Cl.
A01G 7/00(2006.01)
A01G 31/02(2006.01)

(56)对比文件
CN 102612966 A,2012.08.01, 全文.
盛春玲等.《硬叶兰种子的迁地共生萌发及有效共生真菌的分离和鉴定》.《植物生态学报》.2012, 第 859-869 页.
吴慧凤.《铁皮石斛种子的室内共生萌发》.《生态学报》.2012, 第 2491-2497 页.
MarkC.BRUNDRETT et.al.《Development of insitu and exsitu seed baiting techniques to detect mycorrhizal fungi from terrestrial orchid habitats》.《The British Mycological Society》.2003, 第 1210-1220 页.
柯海丽等.《兰科植物种子原地共生萌发技术及其应用前景》.《林业科学》.2007, 第 125-129 页.
董芳.《几种兰科植物菌根真菌的筛选及种子萌发条件的研究》.《中国优秀硕士学位论文全文数据库》.2009, 全文.

审查员 吴锦娣

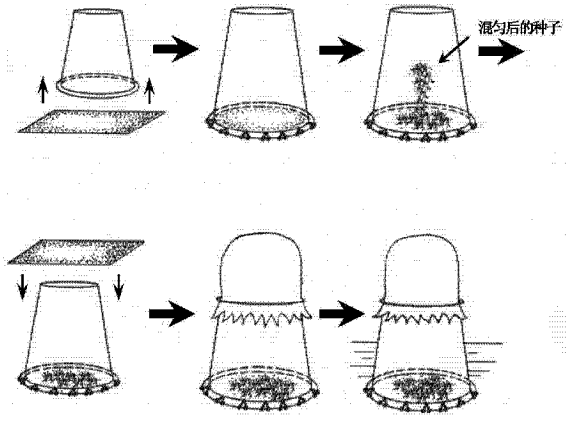
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

用于诱导兰科植物内生真菌的方法

(57)摘要

一种用于诱导兰科植物内生真菌的方法，以育苗杯替代种子袋进行兰科植物种子的原地共生萌发及有效内生真菌的诱导，解决了兰科植物在传统的原地共生萌发中所遇到的种子结团、萌发率低、易受气候条件等不良因素干扰的问题。本发明方法操作简单、取材方便、成本较低，且种子出苗率高，可以根据需要选取不同发育阶段的幼苗进行有效菌种的分离，为濒危兰科植物的保护和种苗的培育开辟了一条新的可行途径。



CN 103238470 B

1. 一种用于诱导兰科植物内生真菌的方法，其特征在于它由下述步骤组成：

（1）果荚的低温处理

选取健壮且性状优良的兰科植株进行人工杂交，待授粉 18 周后采摘形态饱满发育成熟的果荚，放入冰箱中 4℃保存；

（2）制作育苗杯

取透明的一次性塑料杯，将尼龙网覆于塑料杯杯口，用回形针卡死，再用剪刀除去杯底，制作成育苗杯；

（3）种子播种

将步骤（1）低温处理后的果荚沿纵肋刨开，取出果荚内的种子，将种子与草木灰按体积比为 1:500 ～ 1000 混合拌匀，将制作好的育苗杯倒置，用毛笔蘸取拌匀后的种子，按 3 ～ 5 粒 /cm^2 的密度由育苗杯杯底残口处均匀地播洒在杯内的尼龙网上，在育苗杯底的残口处覆一层纱布，用橡皮筋固定包扎；

（4）样地的选择

选取生长状况良好的野生兰科植株，在靠近成年植株的根部周围挖深度为 3 ～ 5cm 的圆柱形坑，坑的口径与塑料杯口直径相同，将育苗杯倒置于挖好的坑内，播洒种子的尼龙网与坑底的土壤充分接触，用土填埋空隙加固育苗杯，洒水浇透育苗杯周围的土壤，土壤的含水量为 60% ～ 80%；

（5）内生真菌的分离筛选

定期观测育苗杯内种子的萌发状况，根据需要选择不同生长阶段的兰科植物幼苗，采用常规分离方法分离纯化有效内生真菌。

2. 根据权利要求 1 所述的用于诱导兰科植物内生真菌的方法，其特征在于：所述的兰科植物为白及或铁皮石斛。

用于诱导兰科植物内生真菌的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及兰科植物原地共生萌发的一项容器育苗技术，对于濒危兰科植物的保护和培育种苗工作开辟了一条新的可行途径。

背景技术

[0002] 兰科植物是一个十分庞大的家族，在被子植物中仅次于菊科植物。在某种程度上兰科植物的保护也就意味着对地球生物多样性未来的保护。兰科植物的种子数量庞大，一般每个蒴果内都有上万粒种子，最多可达 40 万粒种子。然而兰科植物种子细小，无胚乳，仅有发育不完全的原胚，自然条件下种子萌发所需的营养物质必须借助于共生的真菌来提供。通常对于兰科植物种子的萌发，都采用种子无菌萌发的方式进行非共生培养，萌发率很高，但是在成苗移栽过程中，由于缺乏与其对应的共生菌建立互惠共生的关系，因而存活率较低。目前对于种子共生萌发研究所用的真菌多是从兰科植物菌根中分离得到的。而根系中所具有的微生物是一个庞大复杂的体系，在菌根中含有对种子萌发有益的真菌和大量作用未知的内生真菌，这使得有益真菌的筛选工作变得复杂而繁琐。因此如何有效获得兰科植物种子萌发的促生菌成为了兰科植物保护的重要决定因素。

[0003] 兰花分布范围狭窄再加上种子微小，在种子萌发的最初阶段它们很难被发现，因而人们对其共生真菌的了解也甚少。目前人们通常采用种子袋原地共生萌发的技术分离促生真菌，即将兰科植物的种子装入特制的种子袋，埋于兰科植株原生环境中。一段时间后，回收种子袋并观察种子是否萌发，进而分离并筛选出促进种子萌发的有益真菌。但是由于种子袋自身空间体积的限制，以及埋在土壤中缺乏光照因素的刺激，极大程度上阻碍了兰科植物种子的萌发及生长。在前人所做的种子袋原地共生萌发试验中，所得结果并非十分理想。其中很大一部分兰科植物的种子没有萌发或萌发周期较长，少部分种子萌发后又由于种子袋网孔口径过窄，或是空间限制的因素。种子的萌发往往停留于原球茎的阶段，不能很好地发育成苗，因而造成了在研究兰科植物与共生真菌相互作用和生物间的协同进化时一直处于两个极端的状态。而我们知道兰科植物由于生长习性的特殊导致在植物自身发育的不同阶段都会有不同的共生菌对该植物起到促生作用，因此需要进行动态的研究分析。由于种子袋无法满足需求，而且种子袋选材的特殊性致使制作步骤繁琐、造价成本过高，观察记录时也会存在众多问题。因而近些年来国内外对于兰科植物种子原地共生萌发的研究一直未有突破性的进展。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题在于克服上述种子袋原地共生萌发方法存在的缺点，提供一种操作简单、成本低的用于诱导兰科植物内生真菌的方法。

[0005] 解决上述技术问题所采用的技术方案由下述步骤组成：

[0006] 1、果荚的低温处理

[0007] 选取健壮且性状优良的兰科植株进行人工杂交，待授粉 18 周后采摘形态饱满发

育成熟的果荚，放入冰箱中 4℃保存。

[0008] 2、制作育苗杯

[0009] 取透明的一次性塑料杯，将尼龙网覆于塑料杯杯口，用回形针卡死，再用剪刀除去杯底，制作成育苗杯。

[0010] 3、种子播种

[0011] 将步骤 1 低温处理后的果荚沿纵肋刨开，取出果荚内的种子，将种子与草木灰按体积比为 1:500 ～ 1000 混合拌匀，将制作好的育苗杯倒置，用毛笔蘸取拌匀后的种子，按 3 ～ 5 粒 /cm2 的密度由育苗杯杯底残口处均匀地播洒在杯内的尼龙网上，在育苗杯底的残口处覆一层纱布，用橡皮筋固定包扎。

[0012] 4、样地的选择

[0013] 选取生长状况良好的野生兰科植株，在靠近成年植株的根部周围挖深度为 3 ～ 5cm 的圆柱形坑，坑的口径与塑料杯口直径相同，将育苗杯倒置于挖好的坑内，播洒种子的尼龙网与坑底的土壤充分接触，用土填埋空隙加固育苗杯，洒水浇透育苗杯周围的土壤，土壤的含水量为 60% ～ 80%。

[0014] 5、内生真菌的分离筛选

[0015] 定期观测育苗杯内种子的萌发状况，根据需要回收不同生长阶段的兰科植物幼苗，采用常规分离方法分离纯化有效内生真菌。

[0016] 本发明方法可用于白及、铁皮石斛等兰科植物。

[0017] 本发明步骤 3 中所述的尼龙网的孔径可以根据具体兰科植物种子的体积大小来确定。

[0018] 本发明的有益效果：与现有的种子袋技术相比，本发明方法中所采用的育苗杯更为牢固稳定，能很好的为兰科植物种子的萌发提供一个有效的保护屏障，从而抵挡恶劣的气候条件及其他不良因素的干扰，有效地解决了在使用种子袋中遇到的种子流动结团的问题。同时由于育苗杯具有优良的透光性以及空间体积较大等优点，因而更有利于兰科植物种子的萌发和幼苗的发育，且在观察时，可以直接透过育苗杯壁或揭开纱布从育苗杯的顶端来观察种子的萌发状况，而不会对发育中的幼苗造成任何损害。本发明方法操作简单、取材方便、成本较低，且种子出苗率高，可以根据需要选取不同发育阶段的幼苗进行有效菌种的分离，为濒危兰科植物的保护和种苗的培育开辟了一条新的可行途径。

附图说明

[0019] 图 1 是育苗杯的制作流程及使用方法示意图。

[0020] 图 2 是原地共生萌发试验中育苗杯的实例图。

[0021] 图 3 是播种 1 个月后育苗杯内白及种子的萌发状况。

[0022] 图 4 是播种 3 个月后种子萌发生成的白及幼苗。

具体实施方案

[0023] 下面结合附图和实施例对本发明进一步详细说明，但本发明不限于这些实施例。

[0024] 实施例 1

[0025] 1、果荚的低温处理

[0026] 选取健壮且性状优良的白及植株进行人工杂交，并作套袋处理，待授粉 18 周后采摘形态饱满发育成熟的白及果荚，将采摘的果荚装入牛皮纸袋中，置于通风阴凉处晾至果荚的颜色变为棕黄色且果荚外壳完全脱水，置于冰箱中 4℃保存。

[0027] 2、制作育苗杯

[0028] 如图 1 所示，选取 450mL 透明无色的一次性塑料杯，按照塑料杯杯口的口径剪取单层 40 目的尼龙网，并覆于塑料杯杯口，用回形针卡死，再用剪刀除去塑料杯的杯底。

[0029] 3、种子播种

[0030] 用刀片将步骤 1 低温处理后的白及果荚沿纵肋刨开，取出果荚内的种子，将种子与草木灰按体积比为 1:500 混合拌匀，将步骤 2 制作好的育苗杯倒置，用毛笔蘸取拌匀后的白及种子，按 5 粒 /cm^2 的密度由育苗杯杯底残口处均匀地播洒在杯内的尼龙网上，在育苗杯底的残口处覆一层纱布，并用橡皮筋固定包扎。

[0031] 4、样地的选择

[0032] 选取生长状况良好且生于阴坡的野生白及植株，在其周围用小铲挖深度为 3cm 的圆形小坑，坑的口径与育苗杯杯口直径一致，将育苗杯放置于挖好的坑内，确保播洒种子的尼龙网与坑底的土壤充分接触，同时在地表以上遗留一部分的育苗杯，以利于阳光的照射及育苗杯的监测回收，最后用土填埋空隙以加固育苗杯，并洒水浇透其周围的土壤，使土壤的含水量为 60%。

[0033] 5、内生真菌的分离筛选

[0034] 定期透过塑料杯壁或揭开纱布从育苗杯的顶端观察种子的萌发状况，根据需要选择不同生长阶段的的白及幼苗，采用常规分离方法分离纯化有效内生真菌。

[0035] 实施例 2

[0036] 1、果荚的低温处理

[0037] 选取健壮且性状优良的铁皮石斛植株进行人工杂交，并作套袋处理，待授粉 18 周后采摘形态饱满发育成熟的铁皮石斛果荚，置于冰箱中 4℃保存。

[0038] 2、制作育苗杯

[0039] 选取 450mL 透明无色的一次性塑料杯，按照塑料杯杯口的口径剪取单层 60 目的尼龙网，并覆于塑料杯杯口，用回形针卡死，再用剪刀除去塑料杯的杯底。

[0040] 3、种子播种

[0041] 用刀片将步骤 1 低温处理后的铁皮石斛果荚沿纵肋刨开，取出果荚内的种子，将种子与草木灰按体积比为 1:1000 混合拌匀，将步骤 2 制作好的育苗杯倒置，用毛笔蘸取拌匀后的铁皮石斛种子，按 3 粒 /cm^2 的密度由育苗杯杯底残口处均匀地播洒在杯内的尼龙网上，在育苗杯底的残口处覆一层纱布，并用橡皮筋固定包扎。

[0042] 4、样地的选择

[0043] 选取生长状况良好的野生铁皮石斛植株，在其周围用小铲挖深度为 3cm 的圆形小坑，坑的口径与育苗杯杯口直径一致，将育苗杯放置于挖好的坑内，确保播洒种子的尼龙网与坑底的土壤充分接触，同时在地表以上遗留一部分的育苗杯，以利于阳光的照射及育苗杯的监测回收，最后用土填埋空隙以加固育苗杯，并洒水浇透其周围的土壤，使土壤的含水量为 80%。

[0044] 5、内生真菌的分离筛选

[0045] 定期透过塑料杯壁或揭开纱布从育苗杯的顶端观察种子的萌发状况，根据需要选择不同生长阶段的的铁皮石斛幼苗，采用常规分离方法分离纯化有效内生真菌。

[0046] 为了证明本发明的有益效果，发明人采用实施例 1 的方法在陕西省安康旬阳县白柳镇羊山野生白及抚育基地对白及植株进行原地共生萌发育苗，育苗杯使用过程中的样地选择以及埋藏的深度可以根据具体的实际情况而定(如图 2 所示)，图 3 是播种 1 个月后育苗杯内白及种子的萌发状况，图 4 是播种 3 个月后白及种子萌发生成的幼苗。

[0047] 由图 3 可见，播种 1 个月后白及种子的萌发率高，出苗量大，且出苗速度快。由图 4 可见，育苗杯内的白及幼苗叶片为深绿色，生长发育良好，长势较强。因此，我们可以选取不同生长阶段的白及进行内生真菌的分离。

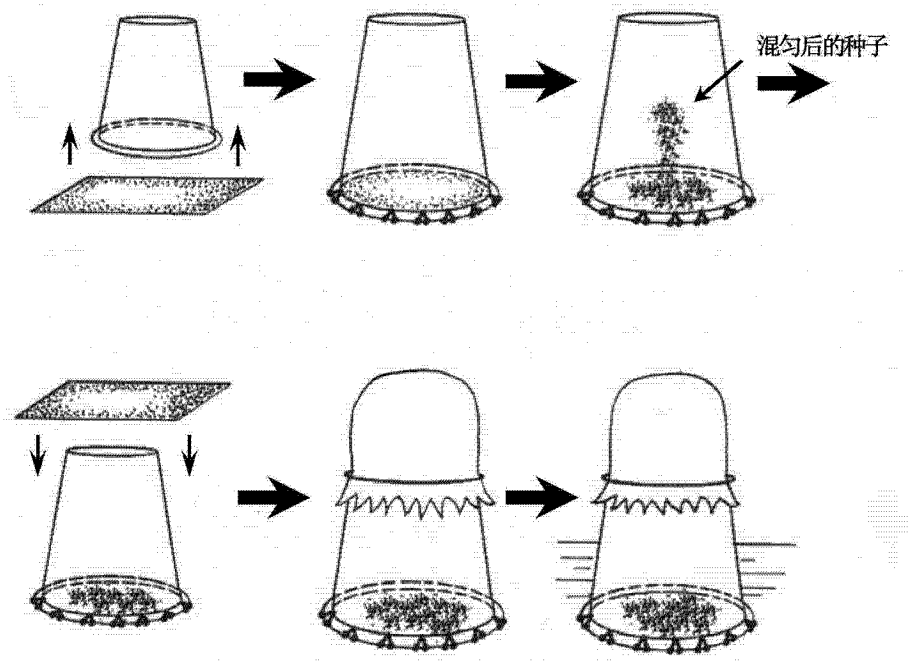


图 1



图 2

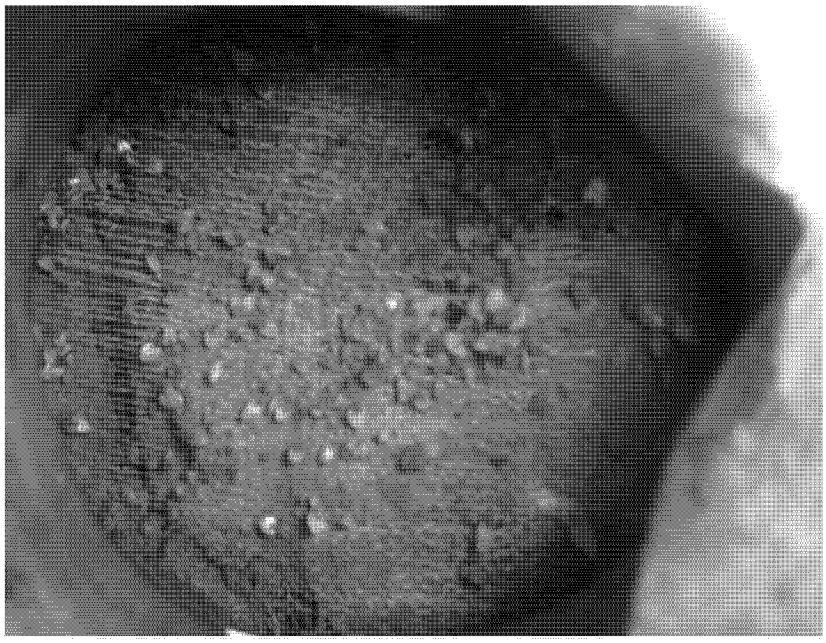


图 3



图 4