

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810150738.0

[51] Int. Cl.

A01H 4/00 (2006.01)

A01G 31/00 (2006.01)

A01D 91/04 (2006.01)

A01C 21/00 (2006.01)

C12N 5/04 (2006.01)

[43] 公开日 2010 年 2 月 24 日

[11] 公开号 CN 101653096A

[22] 申请日 2008.8.20

[21] 申请号 200810150738.0

[71] 申请人 汉中植物研究所

地址 723000 陕西省汉中市汉台区将坛西路
市科技局院

共同申请人 蒋武轩

[72] 发明人 蒋武轩

权利要求书 2 页 说明书 6 页

[54] 发明名称

铁皮石斛组培繁育及仿野生栽培方法

[57] 摘要

本发明公开了一种铁皮石斛组培繁育及仿野生栽培方法，将铁皮石斛幼嫩茎杆切片接种到培养基上，在 22~24℃、1000~1500Lx 条件下培养，先诱导愈伤组织生长，形成原球茎，再使原球茎增殖生长，继而长成 5~8cm 的健壮幼苗，然后移出培养室，在常温下炼苗 3~5 天后移栽到平地大棚中。棚内栽培畦的平面基层具有间隔透气孔，上层是栽培基质，幼苗按 12×8cm 的行、株距栽培，棚内温度为 0~28℃，湿度 60~70%，遮阴度 70~80%，按时进行病虫害防治和施肥，3~4 年即可采收。本发明将铁皮石斛自然年繁殖系数扩大了近十倍，能为大规模种植提供充足种苗，并解决了仿野生栽培问题，使栽培达到规模化。

1. 一种铁皮石斛组培繁育及仿野生栽培方法，其特征在于按照下述步骤进行：

(1) 将铁皮石斛幼嫩茎杆切片接种到 MS+BA4~5 的培养基上，在 22~24℃、1000~1500Lx 条件下培养 40~60 天，诱导愈伤组织生长，形成原球茎；

(2) 将愈伤组织接种到灭菌后的 MS+BA2.0~4.0+NAA0.2~0.5 增殖培养基上，在 22~24℃、1000~1500Lx 条件下培养 40~60 天，使原球茎增殖生长；

(3) 将原球茎接种到 MS+BA0.2~0.5+NAA0.05~0.1 发芽培养基上，在 22~24℃、1000~1500Lx 条件下培养 60 天，使之长出 2~3 cm 长的生根铁皮石斛苗；

(4) 将发芽苗移入 MS+NAA0.05~0.1+酪蛋白 40 mg/L 的发芽苗培养基上，在 22~24℃、1000~1500Lx 条件下培养 60~80 天，使之生长成 5~8 cm 的健壮铁皮石斛苗；

(5) 将铁皮石斛苗培养瓶移出培养室，去掉瓶盖，在常温下炼苗 3~5 天，将培养苗用镊子轻轻取出，洗净培养基，移栽；

(6) 栽培畦的制作：在海拔高度为 450~1200 米之间的平地上建设高度为 3~5 米的大棚，棚内用两层砖平铺成具有间隔透气孔的栽培畦平面基层，在该基层上平铺栽培基质，该栽培基质的下层是 4~5 cm 厚的 \varnothing 0.8~1.2 cm 的石灰石颗粒，上层是 4~5 cm 厚的 \varnothing 0.5~0.8 cm 石灰石和 1~2cm 大小颗粒树皮的混合体，畦宽 1.2~1.5 米，畦长约 20 米，畦间行距为 24 cm；

(7) 栽培：按 12×8 cm 的行、株距将铁皮石斛苗栽培到畦面上，每窝 4~5 株，用水浇透；

(8) 管理：大棚内温度控制为 0~28℃，湿度为 60~70%，遮阴度达到 70~

80%，棚外四周通风良好，排水方便，每1~2月进行一次病虫害防治，病害采用医用青霉素、链霉素防治，用药浓度为1000ml水加40万单位一支，两种药交替使用，虫害可用生物农药防治，每年春季可在栽培畦表面追施腐熟、粉碎后的有机肥 $1.5\sim 2.5\text{kg/m}^2$ ，追肥采用叶面喷施多微磷酸二氢钾或营养液；

(9) 采收：人工栽培铁皮石斛3~4年即可采收，采收时间为立冬至清明前植株未萌芽前，用剪刀从铁皮石斛基部将老植株剪下，留下嫩株。

2. 按照权利要求1所述的铁皮石斛组培繁育及仿野生栽培方法，其特征在于：所述步骤(1)~(4)中种苗的组培繁育的光照时间为每天12小时，平均每隔1小时间歇一次。

3. 按照权利要求1所述的铁皮石斛组培繁育及仿野生栽培方法，其特征在于：所述步骤(1)~(4)中种苗的组培繁育为无菌式培育。

4. 按照权利要求1所述的铁皮石斛组培繁育及仿野生栽培方法，其特征在于：所述步骤(6)中栽培畦上层石灰石和树皮混合体的比例为1:1。

铁皮石斛组培繁育及仿野生栽培方法

技术领域

本发明属于通过组织培育技术的植物再生领域，具体涉及的是铁皮石斛组培繁育及仿野生栽培方法。

背景技术

石斛为兰科石斛属植物，主要药用石斛品种有环草石斛、马鞭石斛、黄草石斛、铁皮石斛和金钗石斛。尤以铁皮石斛和金钗石斛药用价值最高，药用石斛主要用于滋阴清热，可以治疗具有阴虚症的急性及慢性咽喉炎、急性支气管炎、结核病、甲状腺机能亢进、糖尿病、慢性萎缩性胃炎和免疫功能低下等症，并对中老年人群具有增强肌体免疫力、抗衰老的保健功效。

铁皮石斛自然野生环境特殊，均生长在几十米高的悬崖峭壁之上，自然繁殖系数极低，再由于人为过度采收，已属濒危物种。近些年人们想通过人工栽培方法来繁衍铁皮石斛，虽有一些进展，但一直无法解决成活率低，生产成本低和不能大规模生产等问题。中国专利申请号 200410017380.6 公开了“一种铁皮石斛的培育方法”，该技术在组培苗光照强度上采用 2000~3000lx 光照，其优点是可以缩短光照时间和组培苗培养周期，但存在叶片因光照强度大而发生紫红色，叶绿素含量低，不利于组培苗健壮生长；中国专利申请号 200410084496.1 还公开了一种“铁皮石斛的人工大面积栽培方法”，该方法在组培苗来源上采用铁皮石斛种子进行组培繁育，然后采用两段式将组培苗移栽，先是经过 4~5 个月的炼苗移栽，然后再将炼苗后的石斛苗移栽到生产大田。这种方法优点是种子繁殖量大，易形成原球茎，并能提高移栽成活率，其不足在于种子繁殖易发生性状分离，群体性状不稳定，生产成本低，工作量大，不利于规模化生产。

发明内容

本发明的目的在于克服现有技术中的不足，提出一种铁皮石斛组培繁育及仿野生栽培方法，并通过该方法进行规模化生产栽培。

实现上述目的的技术方案是：

一. 种苗的组培繁育

(1) 将铁皮石斛幼嫩茎杆切片接种到 MS+BA4~5 的培养基上，在 22~24℃、1000~1500Lx 条件下培养 40~60 天，诱导愈伤组织生长，形成原球茎；

(2) 将愈伤组织接种到灭菌后的 MS+BA2.0~4.0+NAA0.2~0.5 增殖培养基上，在 22~24℃、1000~1500Lx 条件下培养 40~60 天，使原球茎增殖生长；

(3) 将原球茎接种到 MS+BA0.2~0.5+NAA0.05~0.1 发芽培养基上，在 22~24℃、1000~1500Lx 条件下培养 60 天，使之长出 2~3 cm 长的生根铁皮石斛苗；

(4) 将发芽苗移入 MS+NAA0.05~0.1+酪蛋白 40 mg/L 的发芽苗培养基上，在 22~24℃、1000~1500Lx 条件下培养 60~80 天，使之生长成 5~8 cm 的健壮铁皮石斛苗；

(5) 将铁皮石斛苗培养瓶移出培养室，去掉瓶盖，在常温下炼苗 3~5 天，将培养苗用镊子轻轻取出，洗净培养基，移栽。

上述光照时间为每天 12 小时，平均每隔 1 小时间歇一次。

上述种苗的组培繁育步骤 (1) ~ (4) 为无菌式培育。

二. 仿野生栽培

(1) 栽培畦的制作

在海拔高度为 450~1200 米之间的平地上建设高度为 3~5 米的大棚，棚内

用两层砖平铺成具有间隔透气孔的栽培畦平面基层，在该基层上平铺栽培基质，该栽培基质的下层是4~5 cm厚的 ϕ 0.8~1.2 cm的石灰石颗粒，上层是4~5 cm厚的 ϕ 0.5~0.8 cm石灰石和1~2cm大小颗粒树皮的混合体，所述混合体的比例为1:1，畦宽1.2~1.5米，畦长约20米，畦间行距为24 cm；

(2) 栽培

按12×8 cm的行、株距将铁皮石斛苗栽培到畦面上，每窝4~5株，用水浇透；

(3) 管理

大棚内温度控制为0~28℃，湿度为60~70%，遮阴度达到70~80%，棚外四周通风良好，排水方便，每1~2月进行一次病虫害防治，病害采用医用青霉素、链霉素防治，用药浓度为1000ml水加40万单位一支，两种药交替使用，虫害可用生物农药防治，每年春季可在栽培畦表面追施腐熟、粉碎后的有机肥1.5~2.5kg/m²，追肥采用叶面喷施多微磷酸二氢钾或营养液；

(4) 采收

人工栽培铁皮石斛3~4年即可采收，采收时间为立冬至清明前植株未萌芽前，用剪刀从铁皮石斛基部将老植株剪下，留下嫩株。

本发明的技术特点在于：

(1) 组培采取的是植株幼嫩茎杆作为外植体培养，其性状稳定，不易发生分离；

(2) 采用1000lx的光照强度，并采取间隙性光照时间，叶片深绿，组培苗生长健壮，能提高移栽成活率；

(3) 采用从试管苗一次性移植到大田的方法，不但降低了工作量和生产成本，而且一次性移栽成活率达到了90%以上；

(4) 在栽培畦做法上采用砖体码砌苗床法, 成本低, 易操作, 畦底有间隔通气孔, 既可将多余的水分排出, 又可起到通气、保湿的作用, 田间利用率可达到 80%, 每亩大棚可栽培 20 万株以上。

(5) 栽培基质底部大石子利于通气, 上部的树皮粒既保湿又通气, 腐烂过程中还提供一定的养分, 利于根系生长, 成活率也较高, 能形成较好的产量。

本发明将铁皮石斛自然年繁殖系数 1~2 倍扩大到年繁殖数十倍, 能为大规模种植生产提供充足的种苗, 并且解决了铁皮石斛仿野生栽培问题, 通过作畦、遮阴、遮雨、保湿、增加通气等手段, 满足了野生所需的环境条件, 使栽培能够达到规模化。

具体实施方式

下面结合实施例对本发明作进一步说明。

实施例:

一、铁皮石斛种苗的组培繁育

1、诱导愈伤组织: 采用 MS+BA4~5 的培养基配方, 将培养基配制后分装到培养瓶, 在 0.12MPa 下灭菌 30 分钟后, 在超净工作台上将铁皮石斛幼嫩茎杆材料切成 1.2 mm 厚的切片, 接种到培养基上, 在 22~24℃、1000~1500Lx 条件下培养 40~60 天即可生长出愈伤组织, 进而形成原球茎。

2、原球茎增殖: 采用 MS+BA2.0~4.0+NAA0.2~0.5 增殖配方, 灭菌后将愈伤组织接种到原球茎增殖培养基上进行增殖培养, 在 22~24℃、1000~1500Lx 条件下培养 40~60 天后可继续转接进行增殖培养。

3、原球茎生根发芽培养: 采用 MS+BA0.2~0.5+NAA0.05~0.1 原球茎生根发芽配方, 灭菌后将原球茎接种到发芽培养基上, 在 22~24℃、1000~1500Lx 条件下培养 60 天后即可长出 2~3 cm 长的生根铁皮石斛苗。

4、壮苗培养：采用 MS+NAA0.05~0.1+酪蛋白 40 mg/L 的固体或液体培养基，将发芽苗移入固体培养基或将液体培养基灌入发芽苗培养瓶中，在 22~24℃、1000~1500Lx 条件下培养 60~80 天，幼苗可成为 5~8 cm 的健壮铁皮石斛苗。壮苗培养环节有利于提高铁皮石斛苗移栽成活率。

5、炼苗移栽：将铁皮石斛苗培养瓶移出培养室，去掉瓶盖，在常温下炼苗 3~5 天，将培养苗用镊子轻轻取出，洗净培养基即可移栽。

在整个种苗的组培繁育期间，光照时间为每天 12 小时，采用微电脑开关自动控制，每次开、关各 1 小时。

二、铁皮石斛的仿野生栽培：

1、栽培畦的制作：畦宽 1.2~1.5 米，畦长 20 米左右，先将地整平，将机砖顺长排列，间距 12 cm，然后再将砖块横向排列放在第一层砖上，全部放齐之后形成一个平面，畦底每隔 12cm 有一个 4x12cm 的通气孔，通气孔与四周及走道相联，然后将畦面四周升高超过畦面两层平砖的高度，畦与畦之间行距为 24 cm，即为走道。走道要预留间隙形成透气孔。整个栽培畦制作要根据砖块的长度形成有效的连接，而不至于倒塌，这样制作的栽培畦既利于排水并保持畦内温度，有利于根系通风透气，适宜于铁皮石斛的生长条件。

2、栽培基质：在栽培畦表面先铺一层 4 cm 厚的 ϕ 1.2 cm 的石灰石颗粒，再铺上一层 4 cm 厚的 ϕ 0.8 cm 石灰石和树皮的混合颗粒，树皮采用种植香菇，木耳的废树皮，粉碎成 1~2cm 大小颗粒，石灰石和树皮的的比例为 1: 1，整平后即可移栽。

3、栽培：按 12×8 cm 的行、株距将铁皮石斛苗均匀地栽培到畦面上，深度达到 2—3 cm，每窝栽培 4~5 株，每平方米栽培 400 株，全部栽培结束后用洒水壶浇透水并冲洗掉植株上的树屑。

4、管理：

人工栽培海拔高度在 450~1200 米之间，温度控制在 0~28℃ 范围内，棚内湿度控制在 60~70%，遮阴度达到 70~80%，棚内高度达到 3~5 米，要求大棚四周通风良好，排水方便。

①遮阴及防雨：栽后在苗上方 2~3 米处盖上遮阴度 70%的遮阴网，遮阴度 50%的可盖两层，并将四周全部用遮阴网盖好，防止阳光直射。在遮阴网的上方可盖一层可移动的塑料薄膜，在晴天可除去薄膜，下雨天可将薄膜盖上，防止雨水直接淋在栽培畦上。冬春季节可将薄膜放下压实，以增加棚内的温度，可提高铁皮石斛生长量。

②喷水：喷水要做到及时、适量，总的原则为夏季宁湿勿干，冬春季节宁干勿湿，要保持苗床的湿度达到 60~70%，过湿过干都不利于铁皮石斛的生长，喷水最好用孔径比较细小的洒水壶进行。

③病虫害防治：病害采用医用青霉素、链霉素防治，每 1~2 月进行一次，用药浓度为 1000ml 水加 40 万单位一支，两种药交替使用。虫害可用生物农药防治，严禁使用毒性大，有残留的农药防治病虫害。

④施肥：每年春季可在栽培畦表面追施腐熟、粉碎后的有机肥 3~5 斤/平方米，施后用水冲洗掉落在植株上的肥料，追肥可采用叶面喷施多微磷酸二氢钾或营养液的方法。

⑤采收：人工栽培 3~4 年即可采收，采收时间以立冬至清明前植株未萌芽前收获为佳，采收是用剪刀从基部将老植株剪下，留下嫩株继续生长，以便来年继续收获。