



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103718948 B

(45)授权公告日 2016.08.17

(21)申请号 201310653515.7

CN 101213941 A,2008.07.09,

(22)申请日 2013.12.06

CN 102388797 A,2012.03.28,

(73)专利权人 广西壮族自治区林业科学研究院
地址 530002 广西壮族自治区南宁市兴宁
区邕武路23号

CN 102657078 A,2012.09.12,

CN 102257964 A,2011.11.30,

JP 2006094859 A,2006.04.13,

(72)发明人 龚建英 王华新 龙定建 孙利娜
林茂 李进华 陈宝玲 陈尔
王珠娜

符岸军等.石斛兰 绿色星辰 出水芙蓉 杂
交种子无菌萌发与组培快繁研究.《安徽农业科
学》.2011,第39卷(第5期),第2577-2580页.

付传明等.铁皮石斛与钩状石斛杂交及种子
无菌播种快繁研究.《种子》.2013,第32卷(第9
期),第115-117页.

(74)专利代理机构 广西南宁公平专利事务所有
限责任公司 45104

代理人 杨立华

审查员 方晓云

(51)Int.Cl.

A01H 1/02(2006.01)

(56)对比文件

CN 101536668 A,2009.09.23,

权利要求书2页 说明书6页

(54)发明名称

观赏石斛新种质的培育方法

(57)摘要

本发明公开了一种观赏石斛新种质的培育方法,发明人选择肿节石斛优良单株为母本、大苞鞘石斛优良单株为父本进行人工种间杂交,通过人工授粉、授粉后的管理,果实采收、果实表面灭菌,萌发培养、增殖分化培养、壮苗生根培养和炼苗移栽等步骤,获得了大量生长健壮的杂交子代成苗。该批种间杂交子代苗集合了其父母本各自的优良遗传背景,为培育自主知识产权的观赏石斛品种提供了新种质。本发明克服了前述两种石斛种间杂交亲和性较低、杂交种子萌发率低、增殖难的问题,为进一步培育茎花俱美、综合性状优良的观赏石斛新品种打下了基础,为观赏石斛新品种选育提供了有效的途径。

1. 一种观赏石斛新种质的培育方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 杂交亲本选配:选择肿节石斛优良单株作为母本,大苞鞘石斛优良单株作为父本;

(2) 人工授粉:母本植株的待授粉花朵开放后2天至10天为授粉适宜时期,父本植株供粉花朵开放后的2天至5天为采集花粉块的适宜时期;杂交授粉于晴天上午9:00~11:00或下午16:30~17:30进行;

(3) 授粉后的管理:授粉后24小时以内,母本植株禁止浇水施肥,其后恢复正常管理;

(4) 果实采收:杂交授粉后150至300天,在果皮颜色由绿色转变为淡黄色,蒴果开始变软但未开裂前,适时采收;

(5) 果表面灭菌:未开裂的石斛杂交蒴果,以洗洁精清洗干净表面,使用75%的医用酒精浸湿杂交果实表面,将果实置于无菌不锈钢盘中,点燃酒精,通过燃烧对果实表面进行高温灭菌,果实冷却后备用;

(6) 萌发培养:灭菌好的蒴果纵向切开,用镊子取出种子均匀散于无菌播种培养基中,暗培养7天后转为光照培养40-55天;播种培养基配方为1/2MS+白糖25g/L+琼脂粉4.2g/L+活性炭0.5g/L+椰汁100ml/L+6-苄氨基嘌呤0.1~0.6mg/L;

(7) 增殖分化培养:萌发的种子转接到增殖分化培养基上,培养60至75天;增殖分化培养基为1/2MS+蛋白胨2~3g/L+白糖25g/L+琼脂粉4.2g/L+活性炭1.0g/L+土豆150g/L+香蕉50g/L+6-苄氨基嘌呤0.1~0.6mg/L+奈乙酸0.05~0.2mg/L;

(8) 壮苗生根培养:生长正常的分化苗转接到壮苗生根培养基中,培养60至75天;壮苗生根培养基为1/4N6+蛋白胨2~3g/L+白糖25g/L+琼脂粉4.5g/L+活性炭2.0g/L+土豆100g/L+香蕉50g/L+奈乙酸0.05~0.3mg/L+IBA0.05~0.3mg/L;

(9) 炼苗移栽:将培养杂交子代植株的生根苗培养瓶置于温棚中炼苗一周后,打开瓶盖继续炼苗1至3天;取出生根苗并洗净培养基,生根苗以0.1%的多菌灵浸泡10min,滤干水分,在阴凉处摊放荫干至根系发白;按3株/丛,种植于装有基质的培养盘中,种植20-30天;待长出新根和新芽后进行正常水、肥、药管理;所述基质由刨花、松树皮、木屑、木炭按体积比2:2:1:1混合而成;其中,刨花、松树皮和木屑预先以沸水煮1小时,木炭以太阳暴晒;

所述培养条件为光照2000-3000lux、10-12h/d,温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

2. 根据权利要求1所述的观赏石斛新种质的培育方法,其特征在于:所述肿节石斛优良单株株型中等,节肿大呈明显算珠状、节间距短,花朵具突出的清香味,综合性状优良,生长良好;所述大苞鞘石斛优良单株花多,花径大,花朵紧凑,唇瓣斑眼色泽艳丽,单花性状特别突出。

3. 根据权利要求1所述的观赏石斛新种质的培育方法,其特征在于所述人工授粉按以下操作进行:使用牙签除去大苞鞘石斛的药帽,取下其花粉块,将花粉块移至肿节石斛合蕊柱顶端的柱头上,让蕊腔分泌出的粘液将花粉块粘住,剔除其自身的花药,去除唇瓣,外套硫酸纸袋隔离保护授粉花朵。

4. 根据权利要求3所述的观赏石斛新种质的培育方法,其特征在于所述授粉后的管理按以下操作进行:交替施用花多多平衡肥和高钾肥,施用浓度均为0.1%;座果后及时去除硫酸纸袋。

5. 根据权利要求4所述的观赏石斛新种质的培育方法,其特征在于:所述花多多平衡肥配比为N:P:K=20:20:20,高钾肥配比为N:P:K=5:11:26。

6. 根据权利要求1所述的观赏石斛新种质的培育方法,其特征在于:

所述MS培养基的配方为 KNO_3 1900mg/L, NH_4NO_3 1650mg/L, KH_2PO_4 170mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 370mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 440mg/L, KI 0.83mg/L, H_3BO_3 6.20mg/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 22.3mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.60mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025mg/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.025mg/L, $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 37.30mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27.80mg/L,肌醇100mg/L,甘氨酸2.00mg/L,盐酸硫胺素0.10mg/L,盐酸吡哆醇0.50mg/L和烟酸0.50mg/L;

所述N6培养基的配方为 KNO_3 2830mg/L, NH_4SO_4 463mg/L, KH_2PO_4 400mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 185mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 166mg/L, KI 0.80mg/L, H_3BO_3 1.60mg/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 4.4mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5mg/L, $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 37.30mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27.80mg/L,甘氨酸2.00mg/L,盐酸硫胺素1.00mg/L,盐酸吡哆醇0.50mg/L和烟酸0.50mg/L。

观赏石斛新种质的培育方法

技术领域

[0001] 本发明属于植物育种技术领域,尤其涉及一种观赏石斛新种质的培育方法。

背景技术

[0002] 石斛(*Dendrobium* spp.)是兰科石斛属植物的总称,具有重要的观赏价值,其花形花姿优美、花色鲜艳、花期长,许多种类具有芳香,既可作切花,也可盆栽观赏,深受人们的喜爱,被誉为“四大观赏洋兰”之一,在国际兰花市场上具有重要地位。目前,国内栽培生产的石斛品种大都从国外引进,国内尚无自主知识产权的石斛新品种。

[0003] 肿节石斛(*Dendrobium pendulum* Roxb.),附生,株型中等,长30—50cm,假鳞茎节间距短,节肿大呈优美的算珠状,总状花序生于落叶茎上部,花径5—6cm,花期3—4月,具有清香,适应性强,综合性状优良,是石斛杂交育种重要的亲本。大苞鞘石斛(*Dendrobium wardianum* Warner),附生,株型大,长50—85cm,假鳞茎圆柱形,叶薄革质,凋落,总状花序生于落叶茎上部,花径6—10cm,花期3—4月,花瓣椭圆形,白色带紫色先端,唇盘金黄色,基部具2个紫黑色斑块,单花性状突出,作为父本可提供重要的遗传基因。肿节石斛与大苞鞘石斛进行杂交,可望集合父母本各自的优良性状,是培育茎、花俱美的观赏石斛新品种的有效途径。

[0004] 目前,关于石斛专利和文献的报道较多,主要集中在资源分布、无菌播种、组织培养以及药用成分和药理作用等,关于石斛的育种研究较少,未见肿节石斛与大苞鞘石斛种间杂交培育观赏石斛新种质的方法。同时,由于石斛种间杂交亲和性的原因,杂种胚存在发育不全,无菌播种不萌发或萌发率极低。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是提供一种观赏石斛新种质的培育方法,所得新种质集合了肿节石斛和大苞鞘石斛的优良遗传性状,克服了前述两种石斛种间杂交亲和性较低、杂交种子萌发率低、增殖难的问题。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明采用以下技术方案:观赏石斛新种质的培育方法,包括以下步骤:

[0007] (1)杂交亲本选配:选择肿节石斛优良单株作为母本,大苞鞘石斛优良单株作为父本;

[0008] (2)人工授粉:母本植株的待授粉花朵开放后2天至10天为授粉适宜时期,父本植株供粉花朵开放后的2天至5天为采集花粉块的适宜时期;杂交授粉于晴天上午9:00~11:00或下午16:30~17:30进行;

[0009] (3)授粉后的管理:授粉后24小时以内,母本植株禁止浇水施肥,其后恢复正常管理;

[0010] (4)果实采收:杂交授粉后150至300天,在果皮颜色由绿色转变为淡黄色,蒴果开始变软但未开裂前,适时采收;

[0011] (5)果表面灭菌:未开裂的石斛杂交蒴果,以洗洁精清洗干净表面,使用75%的医用酒精浸湿杂交果实表面,将果实置于无菌不锈钢盘中,点燃酒精,通过燃烧对果实表面进行高温灭菌,果实冷却后备用;

[0012] (6)萌发培养:灭菌好的蒴果纵向切开,用镊子取出种子均匀散于无菌播种培养基中,暗培养7天后转为光培养40-55天;播种培养基配方为1/2MS+白糖25g/L+琼脂粉4.2g/L+活性炭0.5g/L+椰汁100ml/L+6-苄氨基嘌呤0.1~0.6mg/L;

[0013] (7)增殖分化培养:萌发的种子转接到增殖分化培养基上,培养60至75天;增殖分化培养基为1/2MS+蛋白胨2~3g/L+白糖25g/L+琼脂粉4.2g/L+活性炭1.0g/L+土豆150g/L+香蕉50g/L+6-苄氨基嘌呤0.1~0.6mg/L+奈乙酸0.05~0.2mg/L;

[0014] (8)壮苗生根培养:生长正常的分化苗转接到壮苗生根培养基中,培养60至75天;壮苗生根培养基为1/4N6+蛋白胨2~3g/L+白糖25g/L+琼脂粉4.5g/L+活性炭2.0g/L+土豆100g/L+香蕉50g/L+奈乙酸0.05~0.3mg/L+IBA0.05~0.3mg/L;

[0015] (9)炼苗移栽:将培养杂交子代植株的生根苗培养瓶置于温棚中炼苗一周后,打开瓶盖继续炼苗1至3天;取出生根苗并洗净培养基,生根苗以0.1%的多菌灵浸泡10min,滤干水分,在阴凉处摊放荫干至根系发白;按3株/丛,种植于装有基质的培养盘中,种植20-30天;待长出新根和新芽后进行正常水、肥、药管理。

[0016] 肿节石斛优良单株株型中等,节肿大呈明显算珠状、节间距短,花朵具突出的清香味,综合性状优良,生长良好;大苞鞘石斛优良单株花多,花径大,花朵紧凑,唇瓣斑眼色泽艳丽,单花性状特别突出。

[0017] 人工授粉按以下操作进行:使用牙签除去大苞鞘石斛的药帽,取下其花粉块,将花粉块移至肿节石斛合蕊柱顶端的柱头上,让蕊腔分泌出的粘液将花粉块粘住,剔除其自身的花药,去除唇瓣,外套硫酸纸袋隔离保护授粉花朵。

[0018] 授粉后的管理按以下操作进行:交替施用花多多平衡肥和高钾肥,施用浓度均为0.1%;座果后及时去除硫酸纸袋。

[0019] 花多多平衡肥配比为N:P:K=20:20:20,高钾肥配比为N:P:K=5:11:26

[0020] 步骤(9)炼苗移栽中基质由刨花、松树皮、木屑、木炭按体积比2:2:1:1混合而成;其中,刨花、松树皮和木屑预先以沸水煮1小时,木炭以太阳暴晒。

[0021] MS培养基的配方为 KNO_3 1900mg/L, NH_4NO_3 1650mg/L, KH_2PO_4 170mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 370mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 440mg/L, KI 0.83mg/L, H_3BO_3 6.20mg/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 22.3mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.60mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025mg/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.025mg/L, $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 37.30mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27.80mg/L,肌醇100mg/L,甘氨酸2.00mg/L,盐酸硫胺素0.10mg/L,盐酸吡哆醇0.50mg/L和烟酸0.50mg/L;

[0022] N6培养基的配方为 KNO_3 2830mg/L, NH_4SO_4 463mg/L, KH_2PO_4 400mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 185mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 166mg/L, KI 0.80mg/L, H_3BO_3 1.60mg/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 4.4mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5mg/L, $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 37.30mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27.80mg/L,甘氨酸2.00mg/L,盐酸硫胺素1.00mg/L,盐酸吡哆醇0.50mg/L和烟酸0.50mg/L。

[0023] 培养条件为光照2000-3000lux、10-12h/d,温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 。

[0024] 结合肿节石斛和大苞鞘石斛的观赏性状优良、互补性强的特点,发明人选择肿节石斛优良单株为母本、大苞鞘石斛优良单株为父本进行人工种间杂交,建立了本发明观赏

石斛新种质的培育方法。该法根据观赏石斛育种目标选配杂交亲本,选择综合性状优良的单株、适宜的授粉时间进行人工授粉,并在授粉后开展合理的水肥管理,解决了石斛种间杂交亲和性较低的问题,促进杂交果实的发育,杂交结实率可达22%;针对杂种胚发育不全、无菌播种萌发率低的问题,适时采收果实,并选择适宜的培养基为杂种胚提供营养,显著提高了杂种胚萌发率,种子萌发率可达90%,增殖倍数达5-8倍。本发明从人工授粉、经无菌播种到成苗移栽的最短周期约为12个月,显著缩短了观赏石斛种间杂交新种质的培育周期,并获得了大量生长健壮的杂交子代成苗,它集合了父母本各自的优良遗传背景,为培育自主知识产权的观赏石斛品种提供了新种质,为进一步培育茎花俱美、综合性状优良的观赏石斛新品种打下了基础,为观赏石斛新品种选育提供了有效的途径。

具体实施方式

[0025] 以下结合实施例进一步说明本发明,其中:

[0026] 肿节石斛优良单株株型中等,节肿大呈明显算珠状、节间距短,花朵具突出的清香味,综合性状优良,生长良好;大苞鞘石斛优良单株花多,花径大,花朵紧凑,唇瓣斑眼色泽艳丽,单花性状特别突出。

[0027] 步骤(9)炼苗移栽中基质由刨花、松树皮、木屑、木炭按体积比2:2:1:1混合而成;其中,刨花、松树皮和木屑预先以沸水煮1小时杀菌并除去有害物质,木炭以太阳暴晒杀菌。

[0028] MS培养基的配方为 KNO_3 1900mg/L, NH_4NO_3 1650mg/L, KH_2PO_4 170mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 370mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 440mg/L, KIO_3 0.83mg/L, H_3BO_3 6.20mg/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 22.3mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.60mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025mg/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.025mg/L, $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 37.30mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27.80mg/L,肌醇100mg/L,甘氨酸2.00mg/L,盐酸硫胺素0.10mg/L,盐酸吡哆醇0.50mg/L和烟酸0.50mg/L;

[0029] N6培养基的配方为 KNO_3 2830mg/L, NH_4SO_4 463mg/L, KH_2PO_4 400mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 185mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 166mg/L, KIO_3 0.80mg/L, H_3BO_3 1.60mg/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 4.4mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5mg/L, $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 37.30mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27.80mg/L,甘氨酸2.00mg/L,盐酸硫胺素1.00mg/L,盐酸吡哆醇0.50mg/L和烟酸0.50mg/L。

[0030] 美国施可得公司生产花多多平衡肥和高钾肥,配比分别为N:P:K=20:20:20和N:P:K=5:11:26。

[0031] 培养条件为光照2000-3000lux、10-12h/d,温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 。

[0032] 实施例1

[0033] 所用培养基配方如下:

[0034] 播种培养基配方为1/2MS+白糖25g/L+琼脂粉4.2g/L+活性炭0.5g/L+椰汁100ml/L+6-苄氨基嘌呤0.1mg/L;

[0035] 增殖分化培养基为1/2MS+蛋白胨2g/L+白糖25g/L+琼脂粉4.2g/L+活性炭1.0g/L+土豆150g/L+香蕉50g/L+6-苄氨基嘌呤0.1mg/L+奈乙酸0.05mg/L;

[0036] 壮苗生根培养基为1/4N6+蛋白胨3g/L+白糖25g/L+琼脂粉4.5g/L+活性炭2.0g/L+土豆100g/L+香蕉50g/L+奈乙酸0.05mg/L+IBA0.05mg/L;

[0037] (1)杂交亲本选配:选择肿节石斛优良单株作为母本,大苞鞘石斛优良单株作为父本;

[0038] (2)人工授粉:2012年3月17日(母本植株的待授粉花朵开放后2天,父本植株供粉花朵开放后的2天),晴,上午9:00~10:30进行杂交授粉;使用牙签除去大苞鞘石斛的药帽,取下其花粉块,将花粉块移至肿节石斛合蕊柱顶端的柱头上,让蕊腔分泌出的粘液将花粉块粘住,剔除其自身的花药,去除唇瓣,外套硫酸纸袋隔离保护授粉花朵,挂牌标明父母本和授粉时间。授粉花朵数共计11朵。

[0039] (3)授粉后的管理:授粉后24小时,授粉母本植株禁止浇水施肥,其后恢复正常浇水施肥;交替施用花多多平衡肥和高钾肥,促进果实发育,施用浓度均为0.1%,避免水肥直接喷施于授粉花朵上;座果后及时去除硫酸纸袋;雨季注意防雨,高温高湿季节注意控水和通风管理,以免造成落果;

[0040] (4)果实采收:授粉120天,座果数为2,座果率为18%;杂交授粉后150天后,采收蒴果(果皮颜色由绿色转变为淡黄色,蒴果开始变软但未开裂);

[0041] (5)果表面灭菌:未开裂的石斛杂交蒴果,以洗洁精清洗干净表面,使用75%的医用酒精浸湿杂交果实表面,将果实置于无菌不锈钢盘中,点燃酒精,通过燃烧对果实表面进行高温灭菌,果实冷却后备用;

[0042] (6)萌发培养:灭菌好的蒴果纵向切开,用镊子取出种子均匀散于无菌播种培养基中培养,先暗培养7天后转入光下培养;培养10~14天,种胚膨大变绿;培养40~55天,形成绿色锥形球茎,种子萌发率达88%;

[0043] (7)增殖分化培养:萌发的种子形成的绿色锥形球茎转接到增殖分化培养基上,培养60至75天,苗高2~3cm,叶片1~2片,叶色深绿,增殖率达5倍;

[0044] (8)壮苗生根培养:生长正常的分化苗转接到壮苗生根培养基中,培养60至75天,苗高6~8cm,茎粗0.2~0.3cm,叶片3~4片,根数5~7条,叶色深绿,健壮植株;

[0045] (9)炼苗移栽:将培养杂交子代植株的生根苗培养瓶置于温棚中炼苗一周后,打开瓶盖继续炼苗1至3天;取出生根苗并洗净培养基,生根苗以0.1%的多菌灵浸泡10min,滤干水分,在阴凉处摊放荫干至根系发白;按3株/丛,种植于装有基质的培养盘中,种植20~30天;待长出新根和新芽后进行正常水、肥、药管理,并注意保持温度和湿度,做好遮荫、控温、保湿和防病防虫工作,成活率达90%以上。

[0046] 实施例2

[0047] 所用培养基配方如下:

[0048] 播种培养基配方为1/2MS+白糖25g/L+琼脂粉4.2g/L+活性炭0.5g/L+椰汁100ml/L+6-苄氨基嘌呤0.2mg/L;

[0049] 增殖分化培养基为1/2MS+蛋白胨2g/L+白糖25g/L+琼脂粉4.2g/L+活性炭1.0g/L+土豆150g/L+香蕉50g/L+6-苄氨基嘌呤0.3mg/L+奈乙酸0.1mg/L;

[0050] 壮苗生根培养基为1/4N6+蛋白胨3g/L+白糖25g/L+琼脂粉4.5g/L+活性炭2.0g/L+土豆100g/L+香蕉50g/L+奈乙酸0.1mg/L+IBA0.1mg/L;

[0051] (1)杂交亲本选配:选择肿节石斛优良单株作为母本,大苞鞘石斛优良单株作为父本;

[0052] (2)人工授粉:2012年3月18日(母本植株的待授粉花朵开放后3天,父本植株供粉花朵开放后的3天),晴,下午16:30~17:30进行杂交授粉;使用牙签除去大苞鞘石斛的药帽,取下其花粉块,将花粉块移至肿节石斛合蕊柱顶端的柱头上,让蕊腔分泌出的粘液将花

粉块粘住,剔除其自身的花药,去除唇瓣,外套硫酸纸袋隔离保护授粉花朵,挂牌标明父母本和授粉时间。授粉花朵数共计9朵。

[0053] (3)授粉后的管理:授粉后24小时,授粉母本植株禁止浇水施肥,其后恢复正常浇水施肥;交替施用花多多平衡肥和高钾肥,促进果实发育,施用浓度均为0.1%,避免水肥直接喷施于授粉花朵上;座果后及时去除硫酸纸袋;雨季注意防雨,高温高湿季节注意控水和通风管理,以免造成落果;

[0054] (4)果实采收:授粉120天,座果数为2个,座果率为22%;杂交授粉后210天后,采收蒴果(果皮颜色由绿色转变为淡黄色,蒴果开始变软但未开裂);

[0055] (5)果表面灭菌:未开裂的石斛杂交蒴果,以洗洁精清洗干净表面,使用75%的医用酒精浸湿杂交果实表面,将果实置于无菌不锈钢盘中,点燃酒精,通过燃烧对果实表面进行高温灭菌,果实冷却后备用;

[0056] (6)萌发培养:灭菌好的蒴果纵向切开,用镊子取出种子均匀散于无菌播种培养基中培养,先暗培养7天后转入光下培养;培养10~14天,种胚膨大变绿,45~60天,形成绿色锥形球茎,种子萌发率达90%;

[0057] (7)增殖分化培养:萌发的种子形成的绿色锥形球茎转接到增殖分化培养基上,培养60至75天,苗高2~3cm,叶片1~2片,叶色深绿,增殖率达8倍;

[0058] (8)壮苗生根培养:生长正常的分化苗转接到壮苗生根培养基中,培养60至75天,苗高6~8cm,茎粗0.2~0.3cm,叶片3~5片,根数6~8条,叶色深绿,健壮植株;

[0059] (9)炼苗移栽:将培养杂交子代植株的生根苗培养瓶置于温棚中炼苗一周后,打开瓶盖继续炼苗1至3天;取出生根苗并洗净培养基,生根苗以0.1%的多菌灵浸泡10min,滤干水分,在阴凉处摊放荫干至根系发白;按3株/丛,种植于装有基质的培养盘中,种植20~30天;待长出新根和新芽后进行正常水、肥、药管理,并注意保持温度和湿度,做好遮荫、控温、保湿和防病防虫工作,成活率达90%以上。

[0060] 实施例3

[0061] 所用培养基配方如下:

[0062] 播种培养基配方为1/2MS+白糖25g/L+琼脂粉4.2g/L+活性炭0.5g/L+椰汁100ml/L+6-苄氨基嘌呤0.6mg/L;

[0063] 增殖分化培养基为1/2MS+蛋白胨2g/L+白糖25g/L+琼脂粉4.2g/L+活性炭1.0g/L+土豆150g/L+香蕉50g/L+6-苄氨基嘌呤0.6mg/L+奈乙酸0.2mg/L;

[0064] 壮苗生根培养基为1/4N6+蛋白胨3g/L+白糖25g/L+琼脂粉4.5g/L+活性炭2.0g/L+土豆100g/L+香蕉50g/L+奈乙酸0.3mg/L+IBA0.3mg/L;

[0065] (1)杂交亲本选配:选择肿节石斛优良单株作为母本,大苞鞘石斛优良单株作为父本;

[0066] (2)人工授粉:2012年3月26日(母本植株的待授粉花朵开后10天,父本植株供粉花朵开后的5天),晴,上午9:00~11:00进行杂交授粉;使用牙签除去大苞鞘石斛的药帽,取下其花粉块,将花粉块移至肿节石斛合蕊柱顶端的柱头上,让蕊腔分泌出的粘液将花粉块粘住,剔除其自身的花药,去除唇瓣,外套硫酸纸袋隔离保护授粉花朵,挂牌标明父母本和授粉时间。授粉花朵数共计12朵。

[0067] (3)授粉后的管理:授粉后24小时,授粉母本植株禁止浇水施肥,其后恢复正常浇

水施肥;交替施用花多多平衡肥和高钾肥,促进果实发育,施用浓度均为0.1%,避免水肥直接喷施于授粉花朵上;座果后及时去除硫酸纸袋;雨季注意防雨,高温高湿季节注意控水和通风管理,以免造成落果;

[0068] (4)果实采收:授粉300天,座果数为2,座果率为16%;杂交授粉后300天后,采收蒴果(果皮颜色由绿色转变为淡黄色,蒴果开始变软但未开裂);

[0069] (5)果表面灭菌:未开裂的石斛杂交蒴果,以洗洁精清洗干净表面,使用75%的医用酒精浸湿杂交果实表面,将果实置于无菌不锈钢盘中,点燃酒精,通过燃烧对果实表面进行高温灭菌,果实冷却后备用;

[0070] (6)萌发培养:灭菌好的蒴果纵向切开,用镊子取出种子均匀散于无菌播种培养基中培养,先暗培养7天后转入光下培养;培养10~14天,种胚膨大变绿,45-60天,形成绿色锥形球茎,种子萌发率达85%;

[0071] (7)增殖分化培养:萌发的种子形成的绿色锥形球茎转接到增殖分化培养基上,培养60至75天,苗高2~3cm,叶片1~2片,叶色深绿,增殖率达7倍;

[0072] (8)壮苗生根培养:生长正常的分化苗转接到壮苗生根培养基中,培养60至75天,苗高6~8cm,茎粗0.2~0.3cm,叶片3~4片,根数6~8条,叶色深绿,健壮植株;

[0073] (9)炼苗移栽:将培养杂交子代植株的生根苗培养瓶置于温棚中炼苗一周后,打开瓶盖继续炼苗1至3天;取出生根苗并洗净培养基,生根苗以0.1%的多菌灵浸泡10min,滤干水分,在阴凉处摊放荫干至根系发白;按3株/丛,种植于装有基质的培养盘中,种植20-30天;待长出新根和新芽后进行正常水、肥、药管理,并注意保持温度和湿度,做好遮荫、控温、保湿和防病防虫工作,成活率达90%以上。