

张宇思,姚正颖,刘金香,等. 基于原球茎液体培养的白芨快速繁殖研究[J]. 江苏农业科学,2015,43(10):59-62,331.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.018

基于原球茎液体培养的白芨快速繁殖研究

张宇思¹,姚正颖²,刘金香¹,张卫明²,丁小余¹,孙力军²

(1. 南京师范大学生命科学学院,江苏南京 210023; 2. 南京野生植物综合利用研究院,江苏南京 210042)

摘要:为了建立高效的白芨快繁技术体系,研究了白芨种子萌发和原球茎生长的液体培养条件,比较了全程固体培养基培养(QG)与液体固体培养基分段培养(YG)这2种培养方式的优劣。首先通过 $L_{18}(3^7)$ 正交试验,筛选了适宜种子萌发及原球茎生长的液体培养条件。结果表明,添加剂种类、大量元素、6-BA 浓度、NAA 浓度对白芨种子萌发及原球茎诱导影响最大。统计分析结果表明,最佳培养条件为 $1/4MS + 1\text{ mg/L NAA} + 0.5\text{ mg/L 6-BA} + 100\text{ g/L 马铃薯汁} + 30\text{ g/L 蔗糖}$,pH 值 5.8,培养温度为 $22\text{ }^{\circ}\text{C}$,摇床转数为 100 r/min ,每天光照时间为 8 h。另外,源于 YG 的白芨苗在移栽成活率、叶片颜色、叶片长度、苗高几个方面均优于源于 QG 的白芨苗,且差异显著。本研究创建的液体固体培养基分段培养体系将有助于保护与可持续利用白芨野生资源。

关键词:白芨;快速繁殖;分段培养;全程固体培养基;液体固体培养基

中图分类号: S567.23*9.043

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2015)10-0059-04

白芨 [*Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.] 为兰科白芨属多年生草本植物,以块茎供药用,其种子极小,结构简单且无胚乳,自然繁殖率极低^[1]。近年来,白芨的应用范围逐步扩大,加上市场需求的快速增长,野生资源遭到过度采挖,已濒临灭绝,现已被列为国家重点保护野生植物^[2]。为了保护白芨野生资源,实现白芨的人工种植,逐渐有一些关于白芨组培快繁的研究,这些研究为白芨野生资源的保护与利用提供了参考。目前,虽然白芨组织培养和设施栽培等人工繁育关键技术得到了一定的发展,但是依然面临着种苗培养周期长、成本高等问题。为了最大限度地缩短白芨快繁的时间,降低成本,提高白芨种苗的质量,仍需探索更好的白芨快繁条件。

目前白芨的常规快繁方法大多以固体培养基为主,即将白芨种子播于固体培养基上,经过原球茎、无根苗、有根苗几个阶段,最终获得可移植到大田的白芨苗^[3]。但是,利用固体培养基快繁白芨苗时,从组培瓶取出操作较费工时,且白芨种子及原球茎在固体培养基上生长较慢,繁殖效率很低。为了保护与可持续利用白芨野生资源,本试验针对单纯采用固体培养基的快繁技术的不足,研究利用白芨种子进行液体和固体培养结合的快繁方式,以期缩短白芨快速繁殖周期,建立一种新的白芨快速繁殖体系。

1 材料与方法

1.1 材料

白芨蒴果来源于安徽省宿松县,秋分节气前后采收,果荚饱满,开裂或未开裂,外表无霉变,颜色为黄绿色与褐色相间,

内部种子呈分散状。

1.2 白芨快繁操作方法

试验过程包括白芨种子的灭菌、原球茎诱导培养、增殖培养、壮苗培养、生根培养 5 个步骤,具体方法如下:

1.2.1 灭菌 对于未开裂果荚,在超净台中用 75% 乙醇将白芨蒴果消毒 30 s,再用 0.1% HgCl_2 水溶液浸泡 25 min,无菌水冲洗 5 次,然后置于干燥的灭菌滤纸上吸尽水分,用解剖刀切开蒴果,取出种子;对于开裂果荚,在超净台中,将种子取出,置于两通玻璃管中,玻璃管一端用纱布和脱脂棉封口,并用 75% 乙醇和 1% 次氯酸钠溶液各消毒 30 s 和 15 min,再用灭菌水灌洗 3 min,最后剪开纱布,收集灭菌的种子。为了避免种子因蒴果来源不一致造成较大误差,2 种方式收集的灭菌种子合二为一。为了便于统计,将得到的种子用以下方式定量与接种:用灭菌水悬浮种子,种子浓度约为 100 粒/50 μL ,用移液枪吸取种子,播于液体培养基中,每瓶接种 300 μL 。对于固体培养基,用同样的方法接种,为了让种子在琼脂培养基上分散,在接种后多加 200 μL 灭菌水,以便冲散可能聚集的种子。

1.2.2 原球茎在液体培养基中的诱导培养 将种子接种到液体培养基中,诱导原球茎生长。设计 $L_{18}(3^7)$ 正交试验,对液体培养基配方中的 7 个因素,包括大量元素浓度、NAA 浓度、6-BA 浓度、添加剂种类、培养温度、摇床转数、光照时间等进行培养条件筛选。筛选试验的因素水平见表 1。其中,添加剂含量为 100 g/L,光照度为 2 500 lx。将白芨种子接种各配方培养基后,跟踪观察种子萌发时间,测定原球茎生长速度。规定 20% 种子萌发(吐绿)作为萌发时间的记录点。接种 20 d 后(每种处理的种子萌发率均已达 97% 以上),随机选取 50 粒原球茎,测定其直径。因为用水稀释法接种的种子数并不完全一致,因此,随机选取 500 粒已测直径的原球茎,在 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境中烘干,称干质量。呈现的数据为 3 次独立试验的平均值;测量原球茎直径时,对于每个处理,所取原球茎数量大于 50 粒。

1.2.3 分化培养 将各配方培养所得的原球茎(包括来源于

收稿日期:2014-10-27

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2011BAD33B03)。

作者简介:张宇思(1986—),男,江苏南京人,博士研究生,从事植物生物技术研究。E-mail:nmczhang@126.com。

通信作者:孙力军,博士,副研究员,主要研究方向为植物生物技术。

E-mail:shengwudiqu@126.com。

表 1 白芨种子液体培养条件筛选试验的因素水平

水平	因素						
	大量元素	NAA (mg/L)	6-BA (mg/L)	添加剂种类	温度 (℃)	转数 (r/min)	光照时间(h)
-1	MS	0	0	马铃薯汁	18	20	8
0	1/2MS	0.5	0.5	香蕉汁	22	50	10
1	1/4MS	1.0	1.0	椰子汁	26	100	12

固体培养基的原球茎)转移到分化培养基上,温度 25 ℃,相对湿度 55% ~75%,光照度 2500 lx,光照周期为 10 h/14 h,进行分化培养。随后将温度调整为夜温 22 ℃,日温 25 ℃,进行壮苗培养。

1.2.4 生根培养 将白芨小苗从壮苗培养基转入生根培养基,诱导根的分化。培养条件为夜温 22 ℃,日温 25 ℃,相对湿度 55% ~75%,光照度 3000 lx,每天光照 10 h。然后将快繁苗置于遮阴度为 80% 的大棚中,在瓶中培养 3 d 后打开瓶盖,再培养 3 d,小心取出白芨苗,洗净根上黏附的琼脂,移栽至配好的基质中。培养 1 个月以后,观察生长状况。

1.3 结果统计

记录白芨种子萌发时间,利用游标卡尺测量原球茎的直径,称量原球茎干质量,并对原球茎的直观生长状况进行描述。利用 SPSS 13.0 对每次试验结果进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 4 个主要因素对种子萌发时间与原球茎生长速度的影响

本试验规定,20% 种子萌发即为种子萌发时间记录点。

表 2 白芨种子液体培养条件的正交试验方案

处理	大量元素	NAA (mg/L)	6-BA (mg/L)	添加剂种类	温度 (℃)	转数 (r/min)	光照时间 (h)	试验结果		
								萌发时间 (d)	原球茎直径 (mm)	500 粒原球茎干质量 (g)
1	MS	0	0	马铃薯汁	18	20	8	9.7 ± 0.6	1.60 ± 0.09	0.330 ± 0.010
2	MS	0.5	0.5	香蕉汁	22	50	10	11.0 ± 1.0	1.40 ± 0.04	0.257 ± 0.013
3	MS	1.0	1.0	椰子汁	26	100	12	11.7 ± 0.6	1.11 ± 0.03	0.099 ± 0.007
4	1/2MS	0	0	香蕉汁	22	100	12	8.0 ± 1.0	2.21 ± 0.04	0.335 ± 0.004
5	1/2MS	0.5	0.5	椰子汁	26	20	8	10.3 ± 1.5	1.72 ± 0.06	0.180 ± 0.011
6	1/2MS	1.0	1.0	马铃薯汁	18	50	10	6.7 ± 0.6	2.42 ± 0.03	0.402 ± 0.012
7	1/4MS	0	0.5	马铃薯汁	26	50	12	7.0 ± 0.0	2.55 ± 0.04	0.357 ± 0.008
8	1/4MS	0.5	1.0	香蕉汁	18	100	8	9.3 ± 0.6	1.52 ± 0.05	0.238 ± 0.010
9	1/4MS	1.0	0	椰子汁	22	20	10	9.7 ± 0.6	1.60 ± 0.03	0.131 ± 0.009
10	MS	0	1.0	椰子汁	22	50	8	12.0 ± 1.0	1.23 ± 0.04	0.095 ± 0.015
11	MS	0.5	0	马铃薯汁	26	100	10	10.3 ± 0.6	1.42 ± 0.04	0.090 ± 0.020
12	MS	1.0	0.5	香蕉汁	18	20	12	10.3 ± 1.2	1.31 ± 0.06	0.196 ± 0.003
13	1/2MS	0	0.5	椰子汁	18	100	10	10.7 ± 1.2	1.68 ± 0.04	0.193 ± 0.013
14	1/2MS	0.5	1.0	马铃薯汁	22	20	12	10.0 ± 0.0	1.52 ± 0.08	0.250 ± 0.007
15	1/2MS	1.0	0	香蕉汁	26	20	8	10.0 ± 1.0	1.32 ± 0.02	0.158 ± 0.009
16	1/4MS	0	1.0	香蕉汁	26	20	10	9.7 ± 0.6	1.61 ± 0.07	0.430 ± 0.018
17	1/4MS	0.5	0	椰子汁	18	50	12	9.3 ± 0.6	1.70 ± 0.02	0.179 ± 0.008
18	1/4MS	1.0	0.5	马铃薯汁	22	100	8	6.3 ± 0.6	2.69 ± 0.03	0.522 ± 0.006

对白芨种子萌发时间数据作极差分析,结果(表 3)显示,7 个因素的极差值分别为 2.283、0.916、0.633、2.284、0.500、0.617、0.300 d。其中大量元素、添加剂种类极差值较大。由于影响因素不同水平的极差大小与该因素对试验结果的影响

从图 1 可以看出,萌发的种子呈现浅绿色。随着萌发种子数量的增多,原球茎已形成。20 d 后,迅速生长中的原球茎已呈现深绿色。根据白芨及兰科其他植物种子培养条件的相关文献,选择大量元素浓度、NAA 浓度、6-BA 浓度、添加剂种类、培养温度、摇床转数、光照时间等 7 个因素作为筛选培养条件的考察对象,正交试验方案及结果见表 2。18 号处理组的种子 1 周后便开始萌发,而 3 号和 10 号处理在 12 d 左右时才开始萌发。与此对应的是,18 号处理组的原球茎直径为 2.69 mm,且颜色均一,呈现浓绿色(图 2-A);3 号(图 2-D)和 10 号处理的原球茎直径仅为 1.11 mm 和 1.23 mm,颜色不均一,许多呈现浅黄色。同时,18 号处理的 500 粒原球茎干质量约 0.522 g,而 11 号和 10 号处理的原球茎干质量仅为 0.090 g 和 0.095 g(3 号为 0.099 g)。1 号(图 2-C)和 16 号(图 2-B)原球茎直径相当,分别为 1.60 mm 和 1.61 mm,颜色也较均一,优于 3 号,劣于 18 号。



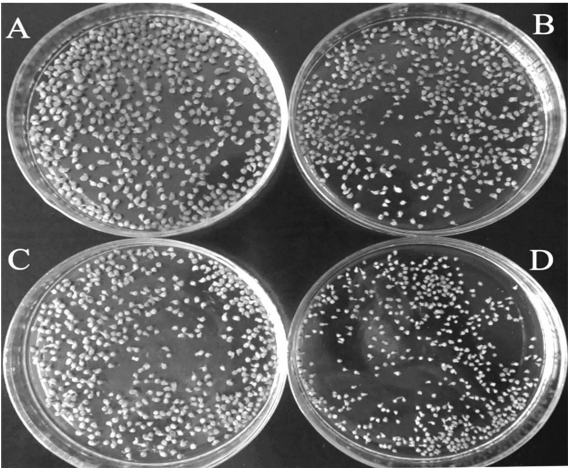
a. 20% 种子萌发状态



b. 生长 20 d 后的原球茎

图1 种子萌发状态与快速生长中的原球茎

程度呈正相关,因此由极差可以推断,对种子萌发影响的主次程度为添加剂种类 > 大量元素 > NAA 浓度 > 6-BA 浓度 > 摇床转数 > 温度 > 光照时间。对原球茎直径数据作极差分析,结果表明,4 个因素的极差较大,分别为 0.600、0.266、



A—表2中的 18 号处理；B—表 2 中的 16 号处理；C—表 2 中的 1 号处理；D—表 2 中的 3 号处理

图2 不同处理培养的白芡原球茎的外观形态

表 3 白芡种子液体培养条件的极差分析结果

因素	萌发时间(d)				原球茎直径(mm)				500 粒原球茎干质量(g)			
	均值 1	均值 2	均值 3	极差	均值 1	均值 2	均值 3	极差	均值 1	均值 2	均值 3	极差
大量元素	10.833	9.283	8.550	2.283	1.335	1.812	1.945	0.600	0.178	0.253	0.309	0.131
NAA	9.517	10.033	9.117	0.916	1.813	1.547	1.742	0.266	0.290	0.199	0.251	0.091
6-BA	9.500	9.267	9.900	0.633	1.642	1.892	1.568	0.324	0.204	0.284	0.252	0.080
添加剂种类	8.333	9.717	10.617	2.284	2.033	1.562	1.507	0.526	0.325	0.269	0.146	0.179
温度	9.333	9.500	9.833	0.500	1.705	1.775	1.622	0.153	0.256	0.265	0.219	0.046
转数	9.950	9.333	9.383	0.617	1.560	1.770	1.772	0.212	0.253	0.241	0.246	0.012
光照时间	9.600	9.683	9.383	0.300	1.680	1.688	1.733	0.053	0.254	0.250	0.236	0.018

表 4 白芡种子液体培养条件的方差分析结果

因素	F 值		
	萌发时间	原球茎直径	原球茎干质量
大量元素	56.625 *	119.1 **	52 *
NAA	8.799	22.9 *	25 *
6-BA	4.274	34.5 *	20 *
添加剂种类	55.118 *	100.6 **	101 **
温度	2.701	7.1	7
转数	4.889	17.8	0
光照时间	1.000	1.0	1

注： $F_{0.05}=19$ ， $F_{0.01}=99$ ；“*”表示影响显著($P<0.05$)，“**”表示影响极显著($P<0.01$)。

30 g/L 蔗糖，pH 值 5.8，培养温度为 22 ℃，摇床转数为 100 r/min，每天光照时间为 8 h。

2.2 2 种培养方法对白芡快繁苗质量的影响

液体固体培养基分段培养(YG)即是原球茎阶段在液体培养基中进行，从原球茎分化到生根过程则在固体培养基上进行；而全程固体培养基培养(QG)则是整个过程均在固体培养基上培养，培养时间、培养基配方、后续移栽炼苗过程均

0.324、0.526 mm，可推测对原球茎直径影响的主次程度为大量元素>添加剂种类>6-BA 浓度>NAA 浓度。然而，对 500 粒原球茎干质量的数据分析显示，影响因素主次程度却为添加剂种类>大量元素>NAA 浓度>6-BA 浓度(极差分别为 0.179、0.131、0.091、0.080 g)。

对种子萌发时间、原球茎直径、原球茎干质量的数据作方差分析(表 4)可知，添加剂种类、大量元素对种子萌发时间、原球茎直径、干质量的影响达到显著水平($P<0.05$)，与极差分析结果一致。值得注意的是，添加剂种类、大量元素对原球茎直径的影响达到极显著水平($P<0.01$)，添加剂种类对原球茎干质量的影响达到极显著水平($P<0.01$)。

综上所述，在本试验中预选的 7 个影响因素中，添加剂种类、大量元素对白芡种子萌发及原球茎诱导影响最大，其次为 6-BA 浓度、NAA 浓度。以上述数据为基础可推测，在本研究中，白芡种子萌发及原球茎诱导最佳培养基为液体 1/4MS + 1 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BA + 100 g/L 马铃薯汁 +

与分段培养一致。2 种培养方法种子萌发及原球茎诱导的培养条件均为液体 1/4MS + 1 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BA + 100 g/L 马铃薯汁 + 30 g/L 蔗糖，pH 值 5.8，培养温度为 22 ℃，每天光照时间为 8 h。结果表明，2 种方法培养在白芡苗在移栽 1 个月后的生长状况差异明显。源于 YG 的白芡苗移栽成活率为 98.33%，而源于 QG 的成活率仅为 80.53%，差异显著($P<0.05$ ，表 5)。源于 YG 的白芡苗叶片宽大肥厚，叶色浓绿(图 3)，叶片长度达到 6.17 cm，苗高为 4.20 cm；而源于 QG 的白芡苗叶片窄短，叶色浅绿(图 3)，叶片长度仅为 2.97 cm，苗高仅为 2.80 cm，差异显著($P<0.05$ ，表 5)。

3 结论与讨论

3.1 大量元素对白芡种子萌发及原球茎生长的影响

MS 是植物组培中常用的一种培养基，因其营养成分丰富，各元素比例适中，在植物的胚、原球茎、茎段等组培中得到了广泛应用^[4-8]，而且液体 MS 培养基同样适用于悬浮细胞培养^[9-12]。MS 培养基中大量元素的浓度，对植物组培有显著影响。景维杰等研究表明，当大量元素无机盐浓度调整为

表 5 2 种方法培养的同龄白芡苗性状比较

培养方式	移栽成活率 (%)	叶片长度 (cm)	苗高 (cm)	生长状态
液体固体培养基	98.33 ± 0.91a	6.17 ± 0.35a	4.20 ± 0.26a	叶色浓绿，叶片宽厚
全程固体培养基	80.53 ± 0.87b	2.97 ± 0.21b	2.80 ± 0.36b	叶色浅绿，叶片窄短

注：同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。

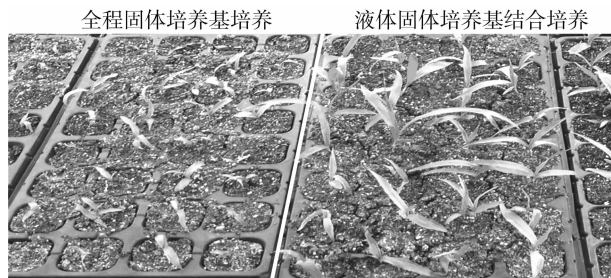


图3 2种方法培养的同龄白芨苗

1/5 时,更有利于蝴蝶兰茎尖生长点的生长;在一定浓度范围内,提高硝酸态氮的比例,或者提高钾离子浓度,均对蝴蝶兰茎尖生长点培养有利^[13]。除了兰科植物,大量元素浓度的改变对其他植物组培也有影响,如大量元素中钙盐浓度不变,其余元素浓度降低为 2/3,再与激素配合,均可以促进山桐子愈伤组织的诱导、芽的分化和增殖等^[14]。

本研究采用 MS 基本培养基,筛选试验了多个浓度的大量元素对白芨种子萌发及原球茎生长的影响,结果显示大量元素浓度的改变对白芨种子萌发时间、原球茎直径、原球茎干质量影响显著,且 1/4MS 培养基效果最佳。刘燕等报道,与白芨同为兰科植物的蝴蝶兰原球茎增殖速度随着 MS 培养基中大量元素浓度的升高而降低,即降低大量元素浓度促进了白色花系蝴蝶兰原球茎的增殖^[15]。然而,大量元素浓度影响植物组培效果的机理还需进一步研究。

3.2 外源植物激素及复合性营养物质对白芨种子萌发及原球茎生长的影响

植物激素对植物生长发育的巨大调节作用毋庸置疑,细胞分裂素与生长素的相互作用及其浓度比例决定了植物组织的发育方向——分化或脱分化^[16-17]。在本研究中,外源添加的 NAA 和 6-BA 的浓度对种子的萌发与原球茎生长发挥了重要作用,且作用显著。然而,在未添加外源 NAA 及 6-BA 时,原球茎干质量也能达到所有处理组的中等水平。这可能是因为内源的生长素及细胞分裂素作用强度高于外源添加激素的作用。

已有多个研究证明,外源添加一些复合性营养物质,如马铃薯汁、香蕉汁、椰子汁等,可以促进种子萌发及原球茎的生长发育^[18-20]。本研究结果显示,外源添加物质对白芨种子萌发时间和原球茎生长有很大影响,在考察的 7 个因素中,外源添加物质的影响程度最大。外源添加的复合营养物质对原球茎直径及原球茎干质量影响极显著。有研究表明,椰子汁可以促进白色花系蝴蝶兰原球茎的增殖^[15]。然而,本研究结果表明,蝴蝶兰与白芨虽同为兰科植物,但马铃薯汁更有利于白芨种子的萌发及原球茎的生长。这同谢玲玲等的研究结果相似,即添加了马铃薯的 KC 培养基上,白芨种子的发芽率最高^[21]。总之,外源复合性营养物质在植物组培中的积极作用被越来越多地研究证明,但是不同营养物质对哪些植物组培有影响,具体是哪些成分在起作用,还需要进一步研究证实。

3.3 培养方式对白芨快繁的影响

在植物组培过程中,最常用的是固体培养基;而在某些植物培养过程中,采用液体培养有着固体培养基不可比拟的优势。例如,在液体培养基中诱导培养的大花蕙兰原球茎质量显著优于源于固体培养基的原球茎质量,其增殖系数和鲜质

量明显提高^[22]。Zuraida 等在研究以液体振荡培养方式培养菠萝幼芽时发现,菠萝幼芽在液体培养基中的增殖速度是在固体培养基上的 9 倍^[23]。然而,在现有的报道中还很少有采用液体培养白芨种子及原球茎的研究,本研究通过第 1 阶段的液体振荡培养和第 2 阶段的固体培养,以求克服全程固体培养的弊端,在培养过程中,种子和原球茎能充分接触营养物质,吸收营养、代谢快,加快了种子萌发和原球茎生长发育速度,最终提高了白芨种子萌发率,也提高了原球茎的鲜质量和干质量。这些优势最终体现在了白芨快繁苗的质量上。此外,将原球茎从组培瓶取出放置在分化培养基上时,操作省时省力,大大减少了工作量。

值得一提的是,在用这 2 种培养方式培养兰科植物种子及原球茎时,在培养基单位体积内种子数量、原球茎数量与种子萌发速率和原球茎的生长速率也有关系^[24-26]。本试验采用定量接种,使得每个处理的液体培养基中单位体积内的种子数量基本保持一致,最大程度地降低了因接种密度不同所导致的试验误差。这种接种方法同样也适用于兰科其他植物种子萌发与原球茎生长研究。

参考文献:

- [1] 张建霞,付志惠,李洪林,等. 白芨胚发育与种子萌发的关系[J]. 亚热带植物科学,2005,34(4):32-35.
- [2] 中国重点保护野生植物名录[EB/OL]. [2014-10-01]. <http://www.plant.csdn.cn/protectlist>.
- [3] 管常东,叶静,郑晓君,等. 白芨组织快繁育苗技术研究进展[J]. 云南大学学报:自然科学版,2010,32(增刊1):416-421.
- [4] 侯大强,柴明良,庄晓英. 长期离体培养的春石斛兰类原球茎生长及生根条件的优化[J]. 核农学报,2006,20(5):392-394,397.
- [5] Asrandina S S, Tashimbayeva A, Mamutova A, et al. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Kazakhstan[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2013, 24: S125.
- [6] Berhanu R, Feyissa T. Factors affecting in vitro propagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) Euphorbiaceae, varieties of 'Kello' and 'Qulle'[J]. Ethiopian Journal of Biological Sciences, 2013, 12(1): 25-39.
- [7] Fernández Suárez K, Fernández Martín F, Declercq S. Searching of a new culture medium for *in vitro* mycorrhization of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets[J]. Cultivos Tropicales, 2013, 34(4): 9-19.
- [8] Vinterhalter B, Milošević D K, Janković T, et al. *In vitro* propagation of *Gentiana dinarica* Beck[J]. Central European Journal of Biology, 2012, 7(4): 690-697.
- [9] Abdi F, Mehrabi A A, Zarei B. Optimization of cell suspension culture in different genotypes of *Allium rotundum* L. [J]. International Journal of Biosciences, 2014, 4(11): 138-143.
- [10] Lee P L, Chen J T. Plant regeneration via callus culture and subsequent *in vitro* flowering of *Dendrobium huoshanense*[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2014, 36(10): 2619-2625.
- [11] 张玉琼,陈娜,周建辉,等. 石蒜悬浮细胞系的建立及其生物碱累积的研究[J]. 中草药,2013,44(24):3540-3545.
- [12] 张守英,阙国宁. 晚松悬浮细胞系的建立和原生质体的分离[J]. 林业科学研究,2002,15(2):247-251.

- 态特征[J]. 东北林业大学学报,2012,40(10):134-136.
- [15]陈丽飞,赵和祥,顾德峰,等. 5 种杓兰属植物花粉的微形态扫描电镜观察[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):161-163.
- [16]张毓,张启翔,赵世伟,等. 濒危植物大花杓兰胚与珠被发育的研究[J]. 园艺学报,2010,37(1):72-76.
- [17]Shimura H,Sadamoto M,Matsuura M,et al. Characterization of mycorrhizal fungi isolated from the threatened *Cypripedium macranthos* in a northern island of Japan: two phylogenetically distinct fungi associated with the orchid[J]. Mycorrhiza,2009,19(8):525-534.
- [18]张毓,赵世伟. 一种促进大花杓兰种子共生萌发的真菌及其应用:中国,CN201110402377.6[P]. 2011-11-06.
- [19]Miyoshi K,Mii M. Stimulatory effects of sodium and calcium hypochlorite, pre-chilling and cytokinins on the germination of *C. macranthos* seed *in vitro*[J]. Physiologia Plantarum,1998,102:481-486.
- [20]Shimura H,Koda Y. Enhanced symbiotic seed germination of *Cypripedium macranthos* var. *rebutense* following inoculation after cold treatment[J]. Physiologia Plantarum,2005,123(3):281-287.
- [21]Taniguchi H,Katsumi M,Yamamoto Y A,et al. *In vitro* proliferation and genetic diversity of *Cypripedium macranthos* var. *rebutense*[J]. Plant Biotechnology,2008,25(4):341-346.
- [22]王艳丽,林昊,赵洪颜,等. 大花杓兰的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2009,45(2):155-156.
- [23]Zhang Y,Lee Y I,Deng L,et al. Asymbiotic germination of immature seeds and the seedling development of *Cypripedium macranthos* Sw., an endangered lady's slipper orchid[J]. Scientia Horticulturae,2013,164:130-136.
- [24]邓莲,张毓,王苗苗,等. 濒危兰科植物大花杓兰种子非共生萌发的研究[J]. 种子,2012,31(6):31-34,39.
- [25]朴仁哲,王艳丽,赵洪颜. 濒危植物大花杓兰种子离体培养条件初探[J]. 安徽农业科学,2011,39(30):18428-18429,18445.
- [26]Sugiura N,Fujie T,Inoue K,et al. Flowering phenology, pollination, and fruit set of *Cypripedium macranthos* var. *rebutense*, a threatened lady's slipper (orchidaceae)[J]. Journal of Plant Research,2001,114(2):171-178.
- [27]Nilsson L A. Anthecological studies on the lady's slipper, *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae)[J]. Botaniska Notiser,1979,132(3):329-347.
- [28]Shimura H,Matsuura M,Takada N,et al. An antifungal compound involved in symbiotic germination of *Cypripedium macranthos* var. *rebutense* (Orchidaceae)[J]. Phytochemistry,2007,68(10):1442-1447.
- [29]张亚平. 中国北方三种杓兰内生真菌多样性及其对原球茎生长的效应[D]. 雅安:四川农业大学,2013.
- [30]刘祥君,李强,马汉喜,等. 大花杓兰濒危机制研究[J]. 国土与自然资源研究,1998,2(1):67-69.
- [31]林大影. 北京山地珍稀濒危植物分布及其生存群落特征研究[D]. 北京:北京林业大学,2008.
- [32]马莉贞. 青海省珍稀濒危保护植物的就地保护研究[J]. 安徽农业科学,2012,40(11):6760-6763,6811.
- [33]Kosaka N,Kawahara T,Takahashi H. Vegetation factors influencing the establishment and growth of the endangered Japanese orchid, *Cypripedium macranthos* var. *rebutense*[J]. Ecological Research,2014,29(5):1003-1023.
- [34]Izawa T,Kawahara T,Takahashi H. Genetic diversity of an endangered plant, *Cypripedium macranthos* var. *rebutense* (Orchidaceae): background genetic research for future conservation[J]. Conservation Genetics,2007,8(6):1369-1376.
- [35]蒋明,李温平,周晶,等. 10 种杓兰属植物 rDNA ITS 序列的克隆与分析[J]. 浙江大学学报:理学版,2012,39(6):689-695.
- [36]Luo J,Hou B W,Niu Z T,et al. Comparative chloroplast genomes of photosynthetic orchids: insights into evolution of the Orchidaceae and development of molecular markers for phylogenetic applications[J]. PLoS One,2014,9(6):e99016.
- [37]秦瑀. 大花杓兰对大鼠尿量及尿中离子浓度的影响[J]. 通化师范学院学报,2003,24(2):58-59.
- [38]Chung J M,Park K W,Park C S,et al. Contrasting levels of genetic diversity between the historically rare orchid *Cypripedium japonicum* and the historically common orchid *Cypripedium macranthos* in South Korea[J]. Botanical Journal of the Linnean Society,2009,160(2):119-129.

(上接第 62 页)

- [13]景维杰,黄容清,蒋明殿,等. 蝴蝶兰茎尖培养脱病毒技术初步研究[J]. 中国园艺文摘,2013,29(4):13-16.
- [14]李绪友,汪焱军,王海东,等. 山桐子幼根离体培养技术研究[J]. 安徽农学通报,2014,20(3):22-23.
- [15]刘晓燕,向青云,刘玲玲,等. 基本培养基及附加物对蝴蝶兰原球茎增殖效果的影响[J]. 种子,2005,24(6):18-20,26.
- [16]Su Y H,Liu Y B,Zhang X S. Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development[J]. Molecular Plant,2011,4(4):616-625.
- [17]Della Rovere F,Fattorini L,D'Angeli S,et al. Auxin and cytokinin control formation of the quiescent centre in the adventitious root apex of *Arabidopsis*[J]. Annals of Botany,2013,112(7):1395-1407.
- [18]Chen W H,Kao Y L,Tang C Y. Method for producing polyploid plants of orchids; U. S. Patent 8383881[P]. 2013-02-26.
- [19]Ng C Y,Saleh N M. *In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchid through formation of protocorm-like bodies[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,2011,105(2):193-202.
- [20]Zhao D,Hu G,Chen Z,et al. Micropropagation and *in vitro* flowering of *Dendrobium wongliangii*: A critically endangered medicinal orchid[J]. Journal of Medicinal Plants Research,2013,7(28):2098-2110.
- [21]谢玲玲,赵青华. 白及种子无菌繁殖微型种茎初探[J]. 湖北农业科学,2013,52(19):4708-4709.
- [22]李旭,朴炫春,杨金凤,等. 大花蕙兰原球茎增殖影响因素的研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(1):54-55.
- [23]Zuraida A R,Shahnad Z N A,Harteeni A,et al. A novel approach for rapid micropropagation of maspin pineapple (*Ananas comosus* L.) shoots using liquid shake culture system[J]. African Journal of Biotechnology,2011,10(19):3859-3866.
- [24]李旭,朴炫春,邵春绘,等. 接种密度、培养基中蔗糖和活性炭浓度对生物反应器内大花蕙兰原球茎增殖的影响[J]. 广东农业科学,2012,39(5):1-3.
- [25]杨丽娟. 大花蕙兰离体快繁关键技术及多倍体诱变研究[D]. 雅安:四川农业大学,2009.
- [26]张艳,钱忠英,陈军峰,等. 影响霍山石斛原球茎生长的若干因素[J]. 上海师范大学学报:自然科学版,2009,38(4):408-413.