

付亚娟, 乔洁, 侯晓强. 珍稀濒危药用植物大花杓兰的研究现状[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(10): 328-331.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.107

珍稀濒危药用植物大花杓兰的研究现状

付亚娟, 乔洁, 侯晓强

(廊坊师范学院生命科学学院/河北省高校食用菌应用技术研发中心, 河北廊坊 065000)

摘要:大花杓兰是珍稀濒危药用植物, 大花杓兰资源的保护和再生引起了国内外学者的广泛关注。为及时把握大花杓兰的研究现状和最新研究成果, 以 1997—2014 年国内外关于大花杓兰的研究论文为基础, 对其基础生物学、繁殖生物学、授粉生物学、植物菌根共生机制、濒危机制、保护策略等方面的研究成果进行总结与分析。

关键词:大花杓兰; 人工繁殖; 研究现状

中图分类号: S567.23⁺9.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)10-0328-04

大花杓兰(*Cypripedium macranthos*) 是兰科杓兰属的多年生草本植物。近年来, 由于人为过度采挖及其生存环境的破坏, 致使大花杓兰野生种群的数量急剧减少, 总体处于濒危状态^[1]。大花杓兰极具观赏价值和药用价值, 其研究引起了国内外学者的普遍关注。大花杓兰种子细小, 缺乏为其萌发提供营养的器官—胚乳, 在自然条件下很难萌发。只有在适宜的温度、湿度等条件下, 遇到特异的真菌并与之建立共生关系才能促进种子萌发^[2]。目前, 大花杓兰种子的非共生萌发、与真菌共生萌发、快速繁殖技术已取得一定进展, 但仍处于少量微繁殖(micropropagation)阶段, 其原因在于原球茎诱导率低、褐化死亡率高、幼苗生长缓慢、幼苗移栽成活率低。以 1997—2014 年国内外发表的研究论文为基础, 对大花杓兰的研究现状进行分析和评述, 有助于及时了解和掌握我国大花杓兰的研究水平、优势、不足, 对丰富与拓展大花杓兰的研究领域具有重要意义。

1 文献来源及方法

通过中文期刊数据库(CNKI), 以“大花杓兰”为检索词进行全文检索, 获得 1997—2014 年关于大花杓兰的中文文献; 通过 NCBI PubMed, Science Direct, Springerlinker 外文期刊数据库, 以“*Cypripedium macranthos*”为检索词检索 1997—2014 年关于大花杓兰的外文文献, 并去掉 3 个数据库中重复的论文。采用 Excel 软件进行文献相关的数据分析。

2 大花杓兰的研究概况及主要研究方向

自 1997—2014 年 18 年期间, 国内外学者共发表大花杓兰研究论文 31 篇, 其中中文期刊论文 17 篇, SCI 收录论文 14 篇。研究论文发表数量较少, 表明大花杓兰的研究刚刚起步,

基础较为薄弱。在 SCI 论文中, 日本学者发表多达 11 篇, 中国学者发表 2 篇, 韩国学者仅发表 1 篇, 表明大花杓兰的研究主要以日本、我国为主, 这与大花杓兰自然分布于俄罗斯、朝鲜半岛、我国、日本^[3]密切相关。自 2009 年后, 我国学者在国内外刊物发表大花杓兰研究论文的数量不断增加, 目前为止共发表论文 19 篇, 其中 SCI 收录 2 篇, 表明我国大花杓兰的研究起步更晚, 近 10 年才引起普遍关注并处于平稳发展时期。华北和东北是我国大花杓兰的主要分布区^[4], 因此我国的研究以北京百花山、吉林长白山的大花杓兰为主。对 31 篇论文的研究内容进一步分析表明, 关于大花杓兰体外人工繁殖的研究最多, 约占论文总数的 39%; 其次是关于大花杓兰叶片、表皮、胚、珠被、种子、花粉的形态研究, 约占论文总数的 19%; 随着分子生物学的发展和关于大花杓兰研究的不断深入, 关于大花杓兰的遗传多样性、内生真菌多样性、植物—菌根真菌共生机制等方面的研究也日益广泛。

3 大花杓兰的研究进展

大花杓兰具有重要的观赏价值、药用价值、科学研究价值, 并具有广泛的应用潜力。本研究对大花杓兰的生物学、繁殖生物学、传粉生物学、菌根共生机制、濒危机制、保护策略等方面进行论述, 以展示近年来大花杓兰的主要研究成果。

3.1 基础生物学研究

我国学者对野生花卉、兰科植物资源、濒危保护植物资源、观赏植物资源等进行野外调查时均有提及大花杓兰, 主要涉及其分布、生境、花色、数量、花期、果期等^[5-11]。大花杓兰是我国北方温带地生兰的典型代表物种, 主要分布于高山草甸、林下、林间草甸、林缘, 因过度采集和生态环境的破坏, 野生资源几近枯竭, 成零星状态分布。大花杓兰极具观赏价值, 花期为 6—7 月, 通常为粉紫色或紫红色。经野外调查发现, 吉林长白山区天桥岭的大花杓兰花色多样性较高, 具有纯黄色、纯白色、从红色渐变为白色的多种花色。Sugiura 等对日本 Ruben 岛的大花杓兰进行野外调查时发现, Ruben 岛大花杓兰基本为黄白色或白色, 紫红色大花杓兰非常罕见^[12]。

陈丽飞等对长白山地区大花杓兰的叶片表皮细胞、成熟种子、花粉的微形态进行研究时发现, 其叶片表皮细胞形状不规则, 细胞垂周壁呈深波状, 圆形或近圆形气孔随机分布于下

收稿日期: 2015-04-17

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31100314); 河北省自然科学基金(编号: C2012408007); 廊坊师范学院博士基金(编号: LSLB201405); 廊坊师范学院微生物学重点学科项目。

作者简介: 付亚娟(1981—), 女, 河北赤城人, 博士, 讲师, 主要从事兰科菌根分子机制的研究。E-mail: fuyajuan501@163.com。

通信作者: 侯晓强, 博士, 副教授, 主要从事菌根生物学研究。E-mail: xqhoul979@126.com。

表皮,叶片表皮有 4 节柔毛^[13];其种子呈长卵形,种皮表面有浅褐色网状条纹,网纹多为矩形,网壁边缘粗糙或光滑^[14];其花粉呈长球形,表面有圆形凹陷,凹陷内部有 1 个球形内容物,未见明显萌发孔,花粉外壁有光滑的外壁纹饰^[15]。张毓等研究发现,授粉 6 周后的大花杓兰种胚发育至球形胚,之后没有进一步分化,直至种子成熟仍保留球形胚形态,且成熟种子具有内外双层种皮^[16]。由此可见,致密干膜质内种皮可能是大花杓兰对自然环境的一种保护性适应,也可能是造成其成熟种子萌发困难的主要原因。

3.2 繁殖生物学研究

大花杓兰具有克隆生长习性,可通过分株进行无性繁殖,但 1 株大花杓兰成株每年只能长出为数不多的潜伏芽,繁殖系数较低。此外,长期分株繁殖可能导致品种退化,抗病虫害能力下降。人工繁殖、栽培、引种驯化等技术可以克服分株无性繁殖的不足,并能在短时间内获得大量再生植株。

3.2.1 共生萌发及繁殖 国内外学者对大花杓兰种子-真菌共生萌发技术展开研究并取得了一定进展。目前已证实,对大花杓兰种子共生萌发有促进作用的菌根真菌均属于瘤菌根菌属(*Epulorhiza*)。从 *C. macranthos* var. *rebutense* 成株分离得到的菌根真菌 WO97、WO034、WC035 促萌发率最高,分别为 21.1%、20.9%、24.1%;从幼苗、原球茎分离得到的菌根真菌促萌发率较低,为 0.6%~6.6%;从 *C. macranthos* var. *speciosum* 分离得到的菌根真菌也能促进 *C. macranthos* var. *rebutense* 种子萌发,但萌发率较低,仅为 1.1%~4.2%;其他兰科植物的共生真菌 *Rhizoctonia repens* 对 *C. macranthos* var. *rebutense* 种子萌发没有任何促进作用^[17]。在不同生长发育阶段,宿主植物与其共生真菌对种子的促萌发能力存在明显差异,并具有种属特异性。张毓等从吉林长白山野生大花杓兰的根中分离得到 1 株瘤菌根菌属的真菌 Cm-J-R-2,并证实该菌株能很好地促进大花杓兰种子萌发,平均萌发率为 29.34%^[18]。大花杓兰与共生真菌之间有很高的专一性,且已证实对大花杓兰种子有促萌发作用的菌根菌均为瘤菌根菌属真菌,共生真菌对种子的促萌发率基本稳定在 20%~30%。

3.2.2 非共生无菌萌发及繁殖 非共生无菌萌发是目前兰花种子人工繁育中最为常用的方式。Miyoshi 等研究发现,将 NaClO 或 Ca(ClO)₂ 处理、4℃冷处理打破种子休眠、细胞分裂素 Kinetin(1 μM)三者有效结合可使大花杓兰成熟种子的萌发率达到 60%~70%^[19]。Shimura 等成功建立了 *C. macranthos* var. *rebutense* 的微繁殖技术:成熟种子经 1% NaClO 消毒 30~60 min 后播种于含有 1 μmol/L NAA 和 BA 的培养基中;4℃冷处理 3 个月以解除种子休眠;转至 20℃继续培养,直至种子萌发形成类原球茎的愈伤组织;每个直径为 5 mm 的类原球茎每年可再生约 10 株幼苗;幼苗经低温驯化(10℃1 个月,4℃2 个月)后移栽到花盆中(栽培基质为粗火山灰和黏土),约 80% 幼苗能较好地发育并长出新叶子^[20]。Taniguchi 等研究发现,*C. macranthos* var. *rebutense* 未成熟种子萌发的最适培养基为 T 培养基或 MS 培养基^[21]。适宜的人工培养条件(温度、湿度、培养成分、光照),加上种子和幼苗数次 4℃冷处理,使人工繁殖的 *C. macranthos* var. *rebutense* 第 1 朵花在温室里盛开,从种子萌发到开花历时 7 年。王艳丽等以移栽 2 年的野生大花杓兰未开裂的黄绿色蒴

果种子进行组织培养与快速繁殖,种子在 Harvais、VWD 培养基上萌发形成白色原球茎,原球茎分化诱导出芽,根后,选择高度 1.5 cm 以上、根系发达、长势良好的幼苗移入移栽基质(珍珠岩、蛭石、草炭灰、树叶的比例为 1:1:1:1)中,精心呵护 1 个月后幼苗成活率达 70% 以上^[22],但种子萌发率、原球茎诱导分化率、幼苗生长率、是否开花结实均未提及。张毓等研究发现,大花杓兰未成熟绿荚种子(种胚发育形成球形胚,但内种皮未形成干膜前)在 VW 改良培养基(2.0 mg/L 6-BA)上培养,萌发率高达 60.54%^[23]。邓莲等研究发现,大花杓兰(北京百花山)授粉后 6~8 周,种子萌发率明显高于幼嫩或成熟种子;在 VWD 改良培养基上培养,种子萌发率高达 68%;1.2 mg/L KT 是既能促进大花杓兰种子萌发,又能维持原球茎低褐化率的适宜激素浓度;有机添加物(如 100 mL/L 椰乳或马铃薯)有利于大花杓兰种子的萌发^[24]。朴仁哲等对吉林长白山移栽 2 年的野生大花杓兰进行人工辅助授粉,并以授粉 13 周后的半成熟种子为试验材料,从种子处理、培养基、生长激素等方面探讨大花杓兰无菌萌发。研究表明,经 0.5% NaClO 处理 160 min 的种子萌发率最高,可达 68% 以上;最适培养基为 Harvais 培养基,最适 pH 值为 5.5~5.8;6-BA 对种子的促进萌发效果明显优于 KT;添加马铃薯、苹果均可促进大花杓兰种子的无菌萌发,但马铃薯的促萌发效果更为明显^[25]。

NaClO 浓度、作用时间、低温预处理、培养基、培养温度、激素、有机添加物对大花杓兰种子的无菌萌发均有一定影响,但低温预处理、有机添加物并非无菌萌发所必需的。成熟种子和未成熟种子均可在实验室条件下进行无菌萌发,且萌发率高达 60% 左右,明显高于萌发率仅为 20%~30% 的共生萌发。种子的无菌萌发也有一定局限性,未成熟的种子不耐储存,采摘后须立即试验,1 年只有 1 次试验机会,且未成熟种子的最佳采摘时期不易把握。

3.3 传粉生物学研究

Sugiura 等对日本 Ruben 岛分布的大花杓兰进行野外资源调查时发现,熊蜂的蜂王是大花杓兰唯一的传粉者,同时也是马先蒿(*Pedicularis schistostegia*)的传粉者;大花杓兰与马先蒿花色相同,且花期重叠,在野外生境混生,但大花杓兰出现的频率相对较低;觅食的熊蜂有时会混淆大花杓兰和马先蒿;大花杓兰和马先蒿在空间分布上有很程度的重叠,临近 2 个植物的植株高度基本一致;大花杓兰和马先蒿的淡黄色、白色花朵恰在大黄蜂的可见光谱范围内^[12,26]。上述研究发现表明,*C. macranthos* var. *rebutense* 通过拟态伴生植物马先蒿来引诱熊蜂传粉,其传粉机制完全不同于杓兰^[27](*Cypripedium calceolus*)等杓兰属的其他种类,这可能是适应环境变化的一种进化机制。

3.4 菌根共生机理

菌根真菌与兰科植物的关系十分密切,兰科植物的种子萌发、幼苗生长、植株形成都离不开菌根真菌。在自然条件下,大花杓兰种子不易萌发,需依赖真菌的侵染并与其建立共生关系,才能促进种子的萌发。目前,大花杓兰与菌根菌的共生机制尚不明确,似乎与其他陆生植物和菌根菌之间的互惠共生关系不同,而是生与死(life-and-death)的斗争关系^[28]。Shimura 等从大花杓兰幼苗中分离鉴定了 2 种抗菌活

性物质 lusianthrin 和 chrysin,并证实 lusianthrin 在大花杓兰种子与真菌共生萌发过程中起着重要作用,而 chrysin 作为植物抗毒素保护大花杓兰免受病原菌侵害^[28]。开花成株的大花杓兰菌根真菌分离率明显高于其幼苗和原球茎,且成株分离到的菌根真菌更能有效促进种子萌发^[17]。张亚平对吉林地区大花杓兰不同生长发育阶段的内生真菌分布进行调查,发现开花植株在萌芽期、展叶期的内生真菌分离率分别为 34.52%、55.95%,而开花期内生真菌分离率仅为 4.00% 左右^[29]。可能是生境上的差异造成了大花杓兰不同的共生营养模式,从而造成二者结果的差异。张亚平首次报道,分离鉴定的 3 株鸡油菌目(Cantharellales)内生真菌均能极显著提高原球茎的花芽分化率,并能降低褐化死亡率,促进大花杓兰原球茎的生长和发育。在整个生命周期中,大花杓兰可能与不同真菌建立共生关系并产生多种抗菌活性物质,有些抗菌活性物质将参与大花杓兰种子与真菌的共生萌发。上述研究结果为大花杓兰菌根共生的分子机理研究奠定了基础。

3.5 濒危机制及保育策略

大花杓兰的野生种群逐渐衰退,数量急剧减少,处于濒危状态。大花杓兰濒危的主要原因并非其对现有自然环境的适应,而是人类活动导致的生态环境破坏以及非法滥采乱挖所致^[30]。林大影通过对北京濒危植物的分布及其生存群落特征的研究,计算出大花杓兰的生态位宽度为 0.024,表明适于其生存的生境较少,急需优先保护^[31]。为更好地保护、研究、开发利用大花杓兰植物资源,国内外学者对其开展了人工繁殖、引种驯化及相关的基础性研究,并提出一些保育策略:加强植物生境的保护;制定和完善相关法律法规,加强宣传教育,提高社会公众保护生物多样性的自觉意识;建立植物资源数据库,开展就地保护和监测;注重科研院所与高校合作研究,加强科研攻关,进行大花杓兰植物传粉、种子扩散等机理研究,从而提供合理的保护措施;迁地保护或离体保护;人工辅助进行种子原位就地播种^[8,10,32-34]。

3.6 其他方面

随着分子生物学技术的发展,大花杓兰的研究领域得以不断拓展。Izawa 等应用等位酶标记技术对日本 Ruben 岛分布的大花杓兰野生种群进行遗传多样性研究,发现 *C. macranthos* var. *rebutense* 比其他植物类群具有更高的遗传多样性^[34]。蒋明等克隆并分析了 10 种杓兰属植物的 ITS 序列,序列长度为 522~572 bp,变异位点十分丰富,其中高山杓兰和大花杓兰的 ITS 片段缺失现象尤为明显^[35]。2014 年,大花杓兰叶绿体基因组(登录号:KF92543)的测序工作已完成,丰富了兰科植物叶绿体基因组的多样性^[36]。这些研究结果为兰科植物遗传多样性、分子系统发育的研究奠定了理论基础,对制定合理的大花杓兰保护策略具有指导意义。另外,秦瑀研究证实了大花杓兰的水提醇液具有利尿作用^[37],但其药用化学成分分离纯化与结构鉴定有待进一步深入研究。

4 展望

目前,国内外学者对大花杓兰人工繁殖及其应用的研究已取得一定进展,但由于其褐化率死亡率高、幼苗生长缓慢等研究瓶颈尚未突破,致使大花杓兰人工繁殖至今仍处于少量微繁殖阶段。大花杓兰是珍稀濒危国家重点保护野生植物,其研究

材料的相对匮乏导致国内外对大花杓兰内生菌多样性、菌根真菌的生理生化特性,尤其是大花杓兰-菌根真菌共生分子机理的认识十分有限,一定程度上限制了大花杓兰菌根化应用技术的发展。近年来,随着分子生物学技术的发展,ITS 和 DNA 条形码技术等已被应用于大花杓兰遗传多样性的研究中^[38],为今后大花杓兰的原地或迁地保育提供理论基础。

从国内外发表的大花杓兰期刊论文来看,大花杓兰的研究起步较晚且发展缓慢,很多领域有待进一步深入研究。鉴于我国大花杓兰的研究现状、应用价值、开发利用前景,对我国未来大花杓兰的研究提出如下建议:全面开展大花杓兰植物资源的现状调查,系统了解其分布、生境、数量、生长及繁殖状况,深入开展生态学、居群生物学等基础性研究,为制定合理、有针对性的保育策略提供理论基础。应用 mRNA 差异显示技术、RT-PCR、RACE 方法等强有力的技术手段,筛选参与共生萌发的关键候选基因,为深入研究大花杓兰植物菌根共生的分子机理提供科学线索。建立优良菌株的筛选、培养、评价体系,筛选能有效促进大花杓兰植物种子萌发、原球茎分化、幼苗生长发育的菌根真菌,为应用菌根共生技术实现大花杓兰植物资源的保护和规模化繁殖奠定基础。结合 DNA 条形码技术、野外生态学开展人工繁殖大花杓兰“回归自然”的相关研究,这是缓解大花杓兰濒危程度、恢复其野生种群最为直接有效的技术手段,也是深入开展其他研究工作的重要基础。

参考文献:

- [1] 张毓. 长在深山人未识——记北京的杓兰[J]. 大自然, 2010(5): 14-17.
- [2] 李志清, 潘晓茹, 汤君, 等. 长白山区大花杓兰资源调查及生物学特征研究[J]. 林业实用技术, 2010(6): 54-55.
- [3] Cribb P. The genus *Cypripedium* [M]. Portland: Timber Press, 1997.
- [4] 陈心启, 吉占和. 中国兰花全书 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1998.
- [5] 迟雁鹏, 梁春胜, 王军, 等. 白石砬子野生兰科植物资源调查及利用研究[J]. 辽宁林业科技, 2005(2): 20-22.
- [6] 郑宝强, 肖建忠, 王廷录, 等. 驼梁山野生观赏植物资源调查研究[J]. 河北林果研究, 2006, 21(1): 83-87.
- [7] 冯宁, 杨平厚, 徐振武, 等. 陕西省兰科植物种类及其分布研究[J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2007, 35(2): 83-86.
- [8] 沐先运, 刘晓, 林秦文, 等. 北京百花山自然保护区兰科植物多样性及保护评价[J]. 北京林业大学学报, 2010, 32(S1): 14-17.
- [9] 吕惠子, 邱爽, 杨威, 等. 长白山区天桥岭野生杓兰属植物的多样性研究[J]. 中国野生植物资源, 2012, 31(6): 72-73, 77.
- [10] 李南岍, 吴记贵, 蒋万杰, 等. 北京松山国家级自然保护区兰科植物多样性及其保护评价[J]. 植物科学学报, 2013, 31(5): 510-516.
- [11] 李国权. 云雾山森林公园野生珍稀濒危植物保护的初探[J]. 河北林业科技, 2014(4): 61-63.
- [12] Sugiura N, Goubara M, Kitamura K, et al. Bumblebee pollination of *Cypripedium macranthos* var. *rebutense* (Orchidaceae); a possible case of floral mimicry of *Pedicularis schistostegia* (Orobanchaceae) [J]. Plant Systematics and Evolution, 2002, 235(1/2/3/4): 189-195.
- [13] 陈丽飞, 孙叶迎, 王满玲, 等. 长白山区杓兰属植物的叶片表皮研究[J]. 北方园艺, 2012(23): 68-70.
- [14] 陈丽飞, 刘淑英, 孙叶迎, 等. 长白山区杓兰属植物的种子微形

- 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.