

DOI:10.14188/j.ajsh.2020.01.006

兰科杓兰属(*Cypripedium*)植物种子非共生萌发研究进展

徐可^{1,2}, 王涛¹, 张毓^{1*}

(1. 北京市植物园 北京市花卉园艺工程技术研究中心城乡生态环境北京实验室, 北京 100093;
2. 天津师范大学 地理与环境科学学院, 天津 300387)

摘要: 兰科杓兰属(*Cypripedium*)植物主要分布于东亚、北美等温带地区和亚热带山地。杓兰不仅具有极高的观赏价值, 而且其经济价值和科研价值也越来越受到人们的重视。近年来对杓兰属植物人工繁殖的相关研究不断深入, 主要集中于种子的非共生萌发等方面。本文对濒危兰科杓兰属植物进行了简要介绍, 并就其种子非共生萌发研究从种子成熟度、预处理和有机关添加物的作用、培养基的配置等方面进行综述, 为目标杓兰种类的非共生萌发试验方案的制定奠定基础, 将有助于温带/高山兰科植物保育研究的发展。

关键词: 杓兰属; 非共生萌发; 离体培养; 研究进展

中图分类号: Q94-3

文献标识码: A

文章编号: 2096-3491(2020)01-0043-06

Advances in the study of asymbiotic germination of *Cypripedium* seeds

XU Ke^{1,2}, WANG Tao¹, ZHANG Yu^{1*}

(1. Beijing Floriculture Engineering Technology Research Centre, Beijing Laboratory of Urban and Rural Ecological Environment, Beijing Botanical Garden, Beijing 100093, China;
2. School of Geographic and Environmental Sciences, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China)

Abstract: *Cypripedium* plants are mainly distributed in temperate Asia and North America. They not only have very high ornamental value, but also their economic value and scientific research value are more and more concerned by people. In recent years, researches on propagation of *Cypripedium* have been deepened, mainly focus on asymbiotic germination of the seeds. This paper briefly introduces the endangered orchids of *Cypripedium*, and summarizes the research progress of seed asymbiotic germination from aspects of seed maturity, pretreatment, the role of organic additives, and the configuration of media. The study lays the foundation for the asymbiotic germination experiment program of the orchid species, and promotes the research and development of orchid plant conservation.

Key words: *Cypripedium*; asymbiotic germination; *in vitro* culture; research progress

1 杓兰属植物简介

杓兰属(*Cypripedium*)植物属兰科(Orchidaceae)植物大家族, 为多年生宿根花卉, 因其花唇瓣特化成兜状、杓状或拖鞋状而得名, 西方人称为拖鞋兰, 即“lady's slipper”, 台湾称作“仙履兰”。杓兰独

特的外形, 高观赏价值以及在植物保育中的旗舰地位, 被称为“植物中的大熊猫”^[1]。杓兰属植物全世界约有 50 种, 北温带地区主要分布于温带的亚洲和北美洲, 南至喜马拉雅地区和中美洲^[2,3]。我国是杓兰属植物的世界分布中心, 共有 36 种, 其中 25 种为我国特有种, 广泛分布于东北至西南的山地和台湾

收稿日期: 2019-10-09 修回日期: 2019-11-20 接受日期: 2019-12-03

作者简介: 徐可(1995-), 男, 硕士, 主要从事园林植物研究。E-mail: xuke19951010@126.com

* 通讯联系人: 张毓(1971-), 女, 博士, 教授级高级工程师, 主要从事珍稀濒危植物保护研究。E-mail: bjyzyang@hotmail.com

基金项目: 北京市共建项目专项; 北京市公园管理中心项目“菌根真菌对北京杓兰属植物的促生机制研究”

引用格式: 徐可, 王涛, 张毓. 兰科杓兰属(*Cypripedium*)植物种子非共生萌发研究进展[J]. 生物资源, 2020, 42(1): 43-48.

Xu K, Wang T, Zhang Y. Advances in the study of asymbiotic germination of *Cypripedium* seeds [J]. Biotic Resources, 2020, 42(1): 43-48.

高山,尤以四川和云南为多^[4]。杓兰种子极为细小,无胚乳,自然条件下需与适宜的真菌共生,形成共生菌根才能萌发^[5]。自然环境的破坏和人为过度采挖,加上种子休眠机制等自身因素,野生杓兰资源日趋减少,野外种群自然更新缓慢,已有11个种被列入世界自然保护联盟(international union for conservation of nature, IUCN)濒危名录^[6]。亟需采取有效的迁地和就地保育措施,非共生萌发是实现濒危杓兰属植物人工繁育,资源再生的重要途径。本文将从以下方面对杓兰种子非共生萌发研究进展进行概述。

2 杓兰属植物非共生萌发研究

为尽可能多地保存遗传多样性的丰富度,以保育为目的的繁殖方式,常常采用有性繁殖方式——种子播种。兰科植物种子萌发有非共生萌发(无真菌参与)和共生萌发(与真菌共生)两条途径。其中非共生萌发是指由人工培养基提供营养,不需要任何真菌侵染就可以使杓兰种子萌发的繁殖方式,它能够在短期内获得一定数量的,具有遗传差异的植株群体^[7],是目前兰科植物人工繁殖的主流繁育方式。

2.1 种子非共生萌发的影响因素

杓兰种子萌发成功与否和萌发率的影响因素很多,一方面受种子质量和发育成熟度影响^[8~12];另一方面受培养条件的影响,如培养基的组成、有机添加物的种类和浓度、激素、pH值、活性炭和温度等。

2.1.1 种子成熟度

杓兰是典型的高山植物,种子在严冬来临前成熟,如果成熟后即萌发,幼嫩的个体会在低温中夭折,因此在漫长的进化过程中形成了以休眠来应对的自我保护机制。

杓兰种子特别微小,结构简单,胚乳缺失,仅由一个简单的球形胚和外面包被着的种皮构成^[13]。杓兰的种子由于缺乏胚乳供给萌发生长早期所需要的充足养分,萌发时需要由外界提供营养帮助其种子萌发及早期的生长发育^[14~16]。研究发现,来自温带和高山地区的杓兰比热带附生兰的萌发困难得多,一般需要特殊的培养基配方和培养条件^[15]。为提高无菌萌发效率,确定最佳采种时期,对多种杓兰种子在不同发育阶段的内源激素水平进行了测定,认为高水平的脱落酸(abscisic acid, ABA)是抑制种子萌发的重要因素之一^[17,18]。通过观察种子结构发现,杓兰成熟种子具有内外双层(珠被)种皮,且种皮木质化程度较高^[19],这可能是杓兰进化中的一种保护

性适应,但也成为导致杓兰成熟种子萌发困难的原因之一^[4,18,20]。

杓兰种子无菌条件下的离体培养进展缓慢,目前只有部分种类能顺利萌发。大量研究表明,特定发育阶段的杓兰未成熟种子比成熟种子更易萌发^[4,17,21]。Hsu等^[22]研究表明,对叶杓兰(*C. debile*)授粉150天后采集的成熟种子具有最佳萌发率(达75%),相同培养条件下,授粉后30~90天的未成熟种子未见萌发,120天未成熟种子萌发率为72.7%。然而Pauw和Remphrey^[23]研究发现釉白杓兰(*C. candidum*)授粉后8周采收的种子发芽率最高。Lee等^[24]采集授粉后60、90和135天的台湾杓兰(*C. formosanum*)绿果荚进行无菌播种试验,结果表明授粉60天以前的种子不能萌发,授粉90天的种子萌发率最高(达70%)。张毓等^[25]和邓莲等^[26]的研究均表明,大花杓兰(*C. macranthos*)授粉后56天的种子萌发率最高,萌发率可达68.08%,相同培养条件下,授粉后发育时期低于28天和高于84天时种子萌发困难,萌发率为零。Jiang等^[4]研究表明,长瓣杓兰(*C. lentiginosum*)在授粉后90~105天采集的未成熟种子具有最佳萌发率(可达57.8%)。对大花杓兰不同发育时期的种子进行切片观察,认为离体萌发最佳采种期是胚体已发育成球形胚,但内珠被还未发育成内种皮的时期^[25]。

2.1.2 培养基成分

不同种的杓兰属植物的最适基本培养基各不相同,不同种类及同一种类不同时期在相同培养基上的萌发率也不同。Peterson和Remphrey^[23]等研究发现,不同培养基对釉白杓兰种子萌发的影响存在差异,主要受年份、采收日期和品种的影响。朴仁哲等^[27]将大花杓兰播种在五种培养基中(MS、Hyponex、VWD、Harvais、改良Harvais),结果显示Harvais培养基是大花杓兰萌发的优选培养基。将未成熟(授粉后105 d)的长瓣杓兰种子播种在(1/2, 1/4, 1/8和1/10)的MS培养基中,结果表明在1/4和1/2 MS培养基上种子萌发率最高(分别为54.1%和52.8%)^[4]。Huh等^[28]将大花杓兰播种在2倍MS, MS, 1/2MS, 1/4MS和1/8MS的培养基中,结果显示,在1/4MS培养基下具有最高萌发率(68.1%)。浓度过高的MS培养基对大花杓兰种子的萌发具有抑制作用,浓度过低营养不足也会影响种子的萌发和原球茎生成率。

糖类物质作为培养基的能源物质和渗透调节剂,对种子萌发和原球茎的生长影响较大,不同种类和浓度的糖源对杓兰萌发的作用不同。Harvais^[11]

对皇后杓兰(*C. reginea*)的萌发研究表明,葡萄糖、果糖和蔗糖三种糖源的浓度均为1%的萌发效果好于2%;在同一浓度下,蔗糖优于葡萄糖,葡萄糖优于果糖。Huh等^[29]的研究表明,将大花杓兰种子播种在不同蔗糖浓度(0, 10, 20, 30, 40 g/L)的MS培养基中,在含有10 g/L蔗糖的培养基上,萌发率最高,可达65.8%。

2.1.3 有机添加物

兰花种子胚乳缺失,缺乏内源性营养物质供种子在萌发过程中使用,因此在常规植物组织培养基中添加适宜的天然有机物或者抽提物可以促进杓兰种子的萌发已得到众多研究证实^[26,30~32]。目前常用于杓兰种子萌发的有机添加物包括椰子水、苹果匀浆、马铃薯匀浆液等天然物质。虽然还没有关于椰子水促进兰花种子萌发的具体机理研究,但作为一种植物液体胚乳,常常是效果最佳、最常用的促进杓兰种子萌发的有机添加物。Chu等^[30]研究表明,将杓兰(*C. calceolus* var. *pubescens*)种子播种在添加100 ml/L椰子水的1/4 MS培养基中,种子萌发的整齐度增强且可以促进原球茎的健康发育。朴仁哲等^[27]发现在改良的Harvais培养基中加入马铃薯匀浆液或苹果匀浆时,可以促进大花杓兰种子萌发。Huh等^[29]研究表明,将大花杓兰播种在不同椰子汁浓度(0, 50, 100, 200 ml/L)的MS培养基中,含有100 ml/L椰子汁的基础培养基中萌发率(70.8%)最高。

2.1.4 激素

不同植物激素的作用机理不同,且不同种杓兰萌发所需的外源激素种类和浓度也不同。Miyoshi和Mil^[33]研究表明,大花杓兰种子播种在加入植物激素(1/3 MS+1 μ mol/L 6-BA)的培养基中,萌发率可达58%~70%,不加植物激素的对照组(1/3 MS)萌发率仅17%。黄家林和胡虹^[34]的研究进一步证实,外源细胞分裂素可以作为一种萌发诱导物质直接起作用,明显促进种子萌发。在黄花杓兰(*C. flavum*)未成熟种子萌发中,外源细胞分裂素起明显的促进萌发作用,而且低浓度的KT(kinetin)和6-BA(6-benzylaminopurine)即可使黄花杓兰^[34]、斑花杓兰(*C. guttatum*)、大花杓兰^[20,26,27]、长瓣杓兰^[4]种子无菌萌发率成倍提高。将未成熟(授粉后105 d)的大花杓兰种子播种在补充有1 μ mol/L的2IP、6-BA以及TDZ的培养基中,只有2IP对种子萌发具有促进作用^[4]。

对多种杓兰种子在不同发育阶段的内源激素水平进行测定,认为高水平的ABA是抑制种子萌发的

重要因素之一^[17,18],因此越来越多的研究认为,植物激素促进种子萌发的机理是激素拮抗ABA的抑制作用而促使种子萌发。由于较高浓度的植物激素对杓兰幼苗的分化有一定的负面影响,因此,在不添加激素能达到萌发目的的条件下,尽量避免使用或者少用植物激素来促进种子的萌发^[35]。在必需激素帮助种子萌发的情况下,萌发以后也要尽快转移到不含激素的培养基中。

2.1.5 培养方式

液体培养可以稀释兰花种皮中产生的抑制物质而促进萌发^[8]。Chu和Mudge^[30]对杓兰(*C. calceolus* var. *pubescens*)的研究发现,液体培养能代替低温处理提高种子的萌发率,同时增加种子萌发的同步性。1/4MS液体培养基比固体培养基更能促进对叶杓兰成熟种子萌发^[22]。至于哪种培养方式更适合杓兰种子的萌发,还需进一步研究。

2.1.6 pH值

大多数杓兰植物非共生萌发的研究表明,培养基pH值通常设置在5.5~5.7^[4,30,36,37]。但是Oliva和Arditti^[38]的研究表明,加州杓兰(*C. californicum*)和山地杓兰(*C. montanum*)在pH值为7.0~7.5的范围内萌发率最高。皇后杓兰种子在pH 4.5的培养基中萌发和生长状态优于pH 5.5的培养基^[12]。

2.1.7 活性炭

Curtis^[39]尝试在兰花培养基中加入活性炭,随后越来越多杓兰相关研究证明,在培养基中加入活性炭可以提高一些杓兰种类的萌发率^[32,36,37]。但是,不同的杓兰种类也有差异。比如Chu等^[30]研究表明,活性炭对杓兰(*C. calceolus* var. *pubescens*)种子萌发没有显著影响。活性炭不仅可以吸收酚类等培养过程中产生的代谢物质,而且在一定程度上营造部分黑暗环境,并维持pH值相对稳定^[40]。此外,活性炭可以改善通气并添加微量元素^[41],这有利于种子萌发和幼苗生长。同时,活性炭也会吸附某些化合物,包括某些维生素和植物激素,降低他们的浓度,这可能对种子非共生萌发和幼苗的生长产生负面的影响^[42]。因此针对不同的植物种类和发育阶段,活性炭的使用及浓度需经过试验进行优选。

2.2 预处理对成熟种子非共生萌发的影响

杓兰的种子在成熟后可以有长达数年的休眠期^[16],在人工繁育中,这些保护机制则成为需要逾越的障碍。打破杓兰种子休眠的方法有很多,前人也进行了大量的相关研究。

2.2.1 适度破坏种皮

成熟的杓兰植物种子可以通过腐蚀种皮来提高

萌发率,比如用NaClO或Ca(ClO)₂对种子进行预处理。Lauzer等^[43]的研究表明,在播种前对基叶杓兰(*C. acaule*)种子进行NaClO预处理是影响种子萌发的重要因素。NaClO预处理的时间由40 min提高到2 h,其萌发率也由3.9%提高到10.4%。Miyoshi等^[33]研究表明,用0.5%NaClO处理大花杓兰1 h,或用3.2%的Ca(ClO)₂处理7 h,萌发率可达到70%。但是,当处理时间达到5 h时,种子则不再萌发,原因可能是NaClO长时间接触种子,使种子内部的种胚失去了活性。Bae等^[36]用1%的NaClO处理成熟的斑花杓兰和大花杓兰种子30 min,萌发率分别为77.3%和27.8%。将长瓣杓兰成熟种子在播种前用0.5%或1%NaOCl预处理15、30、45或60 min,结果表明45 min时萌发率最高(56.9±6.4%, 60.3±6.1%)^[4]。

2.2.2 低温处理

研究发现,低温处理是打破成熟种子休眠的有效方式之一。对皇后杓兰的研究表明,成熟种子必须通过2个月以上的低温处理才能打破休眠萌发^[10]。同样,对杓兰(*C. calceolus* var. *pubescens*)的研究表明,将种子放在5℃低温处理8周,萌发率从44.8%提高到91.7%^[30]。低温处理可以影响大花杓兰和扇脉杓兰(*C. japonicum*)种子的萌发^[44]。将杓兰(*C. macranthos* var. *rebunense*)成熟种子在4℃条件下处理3个月后,通过添加NAA和细胞分裂素的改良Hyponex-peptone培养基进行萌发培养成功获得杓兰原球茎^[45]。但同时也有研究表明,低温处理并不能提高杓兰种子的萌发率,有时甚至起抑制作用。不同条件的冷处理对袖白杓兰萌发的影响是可变的^[15]。对基叶杓兰研究表明,灭菌播种后的种子在萌发培养基上做低温处理6个月,结果萌发率并未提高^[43,46],说明杓兰属不同种类萌发习性差异大,不同的原生种萌发要求不同,这也是杓兰繁育习性的一个特点。

3 展 望

对于杓兰属植物种子非共生萌发,研究者要解决的问题是如何使种子高效萌发,围绕这一目标,需要探究的是种子萌发过程中需要哪些营养物质、何种培养条件,分析不同种类、生境的杓兰属植物种子萌发的需求异同点,并从中总结规律,优化杓兰种子繁育技术体系。以杓兰属植物为代表的温带(高山)兰科植物是繁殖和栽培都十分困难的类群,通过对杓兰属植物非共生萌发繁育体系的研究,有利于为高山兰科植物种子萌发提供指导依据,推动珍稀濒

危高山兰科植物的保育研究工作。

参考文献

- [1] 罗毅波,贾建生,王春玲. 中国兰科植物保育的现状和展望[J]. 生物多样性, 2003, 11(1): 70-77.
Luo Y B, Jia J S, Wang C L. A general review of the conservation status of Chinese orchids [J]. Chin Biodivers, 2003, 11(1): 70-77.
- [2] Cribb P, Sandison M S. A preliminary assessment of the conservation status of *Cypripedium* species in the wild [J]. Bot J Linn Soc, 1998, 126: 183-190.
- [3] Wu Z Y, Raven P H, Hong D Y. eds. Flora of China. Vol. 25 (Orchidaceae) [M]. Beijing: Science Press and St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2009: 22-33.
- [4] Jiang H, Chen M C, Lee Y I. *In vitro* germination and low-temperature seed storage of *Cypripedium lentiginosum* P. J. Cribb & S. C. Chen, a rare and endangered lady's slipper orchid [J]. Sci Hortic, 2017, 225: 471-479.
- [5] 安曼云. 云南杓兰菌根真菌组成及共生关系研究[J]. 广西植物, 2017, 37(6): 763-767.
An M Y. Composition of mycorrhizal fungi and symbiotic relationship of *Cypripedium yunnanense* [J]. Guihaia, 2017, 37(6): 763-767.
- [6] 刘思思,陈娟,郭顺星. 兰科植物种子萌发的研究进展[J]. 种子, 2015, 34: 43-50.
Liu S S, Chen J, Guo S X. Review on germination of orchid seeds [J]. Seed, 2015, 34: 43-50.
- [7] 朱泉,田甜,杨澍,等. 兰科植物种子的非共生萌发研究进展[J]. 江苏农业科学, 2009, 37(4): 205-208.
Zhu Q, Tian T, Yang S, et al. Review on non-asymbiotic germination of orchid seeds [J]. Jiangsu Agri Sci, 2009, 37(4): 205-208.
- [8] Arditti J. Factors affecting the germination of orchid seeds [J]. Bot Rev, 1967, 33(1): 1-97.
- [9] Arditti J. Micropropagation of orchids, Volume I - II. 2nd ed [M]. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2008.
- [10] Ballard W W. Sterile propagation of *Cypripedium reginae* from seeds [J]. Amer Orchid Soc Bull, 1987, 56: 935-946.
- [11] Harvais G. Growth requirements and development of *Cypripedium reginae* in axenic culture [J]. Can J Bot, 1973, 51(2): 327-332.
- [12] Harvais G. An improved culture medium for growing the orchid *Cypripedium reginae* axenically [J]. Can J Bot, 1982, 60(12): 2547-2555.
- [13] 胡适宜. 被子植物胚胎学[M]. 北京: 人民教育出版社, 1982: 103-113.
Hu S Y. Embryology of angiosperms [M]. Beijing: Peo-

- ple's Education Press, 1982: 103-113.
- [14] Arditti J, Pridgeon A. Orchid biology: reviews and perspectives [M]. London: Kluwer Academic Publisher, 1997: 32-73.
- [15] Peterson R L, Uetake Y, Zelmer C. Fungal symbioses with orchid protocorms [J]. Symbiosis 1998, 25(1): 29-55.
- [16] Arditti J, Ernst R. Physiology of germinating orchid seeds. In: Arditti J, ed Orchid biology: reviews and perspectives III [M]. Ithaca, New York: Cornell University Press, 1984: 176-222.
- [17] Lee Y I, Chung M, Yeung E C, *et al.* Dynamic distribution and the role of abscisic acid during seed development of a lady's slipper orchid, *Cypripedium formosum* [J]. Ann Bot, 2015, 116(3): 403-411.
- [18] Yan X N, Tian M, Liu F, *et al.* Hormonal and morphological changes during seed development of *Cypripedium japonicum* [J]. Protoplasma, 2017, 25460: 2315-2322.
- [19] Barsberg S T, Lee Y I, Rasmussen H N. Development of C-lignin with G/S-lignin and lipids in orchid seed coats-an unexpected diversity exposed by ATR-FT-IR spectroscopy [J]. Seed Sci Res, 2018, 28(1): 41-51.
- [20] 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]. Sci Hortic, 2013, 164: 130-136.
- [21] Wagner J, Hansel A. *In vitro* seed germination of *Cypripedium calceolus* L. at various embryogenic stages [J]. Angew Bot, 1994, 68: 5-9.
- [22] Hsu R C C, Lee Y I. Seed development of *Cypripedium debile* Rehb. f. in relation to asymbiotic germination [J]. Horts, 2012, 47(10): 1495-1498.
- [23] De Pauw M A, Remphrey W R. *In vitro* germination of three *Cypripedium* species in relation to time of seed collection, media, and cold treatment [J]. Can J Bot, 1993, 71(6): 879-885.
- [24] Lee Y I, Lee N, Yeung E C, *et al.* Embryo development of *Cypripedium formosanum* in relation to seed germination *in vitro* [J]. J Am Soc Hortic Sci, 2005, 130(5): 747-753.
- [25] 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.
- Zhang Y, Zhang Q X, Zhao S W, *et al.* Embryo and integument development of the endangered species *Cypripedium macranthos* Sw. [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2010, 37(1): 72-76.
- [26] 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.
- Deng L, Zhang Y, Wang M M, *et al.* Study on non-asymbiotic germination of *Cypripedium macranthos* seed [J]. Seed, 2012, 31(6): 31-34, 39.
- [27] 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.
- Piao R Z, Wang Y L, Zhao H Y. Preliminary exploration on *in vitro* seed culture conditions of *Cypripedium macranthos* Sw. [J]. J Anhui Agri Sci, 2011, 39(30): 18428-18429, 18445.
- [28] Huh Y S, Lee J K, Nam S Y, *et al.* Effects of altering medium strength and sucrose concentration on *in vitro* germination and seedling growth of *Cypripedium macranthos* Sw. with organic additives [J]. J Plant Biotechnol, 2016, 43: 138-145.
- [29] Huh Y S, Lee J K, Nam S Y, *et al.* Improvement of asymbiotic seed germination and seedling development of *Cypripedium macranthos* Sw. with organic additives [J]. J Plant Biotechnol, 2016, 43(1): 138-145.
- [30] Chu C C, Mudge K W. Effects of prechilling and liquid suspension culture on seed germination of the yellow lady's slipper orchid, *Cypripedium calceolus* var. *pubescens* [J]. Lindleyana, 1994, 9: 153-159.
- [31] Steele W K. Growing *Cypripedium reginae* from seed [J]. Am Orchid Soc Bull, 1995, 64: 383-391.
- [32] Yan N, Hu H, Huang J L, *et al.* Micropropagation of *Cypripedium flavum* through multiple shoots of seedlings derived from mature seeds [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2006, 84(1): 114-118.
- [33] Miyoshi K, Mii M. Stimulatory effects of sodium and calcium hypochlorite, pre-chilling and cytokinins on the germination of *Cypripedium macranthos* seed *in vitro* [J]. Physiol Plant, 1998, 102(4): 481-486.
- [34] 黄家林, 胡虹. 黄花杓兰种子无菌萌发的培养条件研究[J]. 云南植物研究, 2001, 23(1): 105-108.
- Huang J L, Hu H. Seed germination requirements of *Cypripedium flavum* in axenic culture [J]. Acta Botanica Yunnanica, 2001, 23(1): 105-108.
- [35] Steele W K. Large scale seedling production of North American *Cypripedium* species. In C. Allen ed, North American Native Terrestrial Orchid Propagation and Production [C]. N. American Native Terrestrial Orchid Conference, Germantown, Maryland. 1996: 234-242.
- [36] Bae K H, Kwon H K, Choi Y E. *In vitro* germination and plantlet conversion from the culture of fully mature seeds of *Cypripedium guttatum* Swartz. [J]. Propagation of Ornamental Plants, 2009, 9(3): 160-165.
- [37] Bae K H, Kim C H, Sun B Y, *et al.* Structural changes of seed coats and stimulation of *in vitro* germination

- of fully mature seeds of *Cypripedium macranthos* Swartz (Orchidaceae) by NaOCl pretreatment [J]. Propag Ornament Plants, 2010, 10(2): 107-113.
- [38] Oliva A P, Arditti J. Seed germination of North American orchids II. native California and related species of *Aplectrum*, *Cypripedium* and *Spiranthes* [J]. Bot Gazette, 1984, 145(4): 495-501.
- [39] Curtis J T. Germination and seedling development in five species of *Cypripedium* [J]. Am J Bot, 1943, 30(3): 199.
- [40] Rasmussen H N. Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant [M]. New York: Cambridge University Press, 1995.
- [41] Johansson L B, Calleberg E, Gedin A. Correlations between activated charcoal, Fe-EDTA and other organic media ingredients in cultured anthers of *Anemone canadensis* [J]. Physiol Plant, 1990, 80(2): 243-249.
- [42] Yam T W, Ernst R, Arditti J, et al. Charcoal in orchid seed and tissue culture media: a review [J]. Lindleyana, 1990, 5: 256-265.
- [43] Lauzer D, St-Arnaud M, Barabe D. Tetrazolium staining and *in vitro* germination of mature seeds of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae) [J]. Lindleyana, 1994, 9: 197-204.
- [44] Tomita M, Tomita M. Effects of culture media and cold treatment on germination in asymbiotic culture of *Cypripedium macranthos* and *Cypripedium japonicum* [J]. Lindleyana, 1997, 12: 208-213.
- [45] Shimura H, Koda Y. Micropropagation of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* through protocorm-like bodies derived from mature seeds [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 2004, 78(3): 273-276.
- [46] St-Arnaud M, Lauzer D, Barabe D. *In vitro* germination and early growth of seedlings of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae) [J]. Lindleyana, 1992, 7: 22-27.

□

(编辑: 杨晓翠)