

培养基与光照对沼兰种子非共生萌发的影响

王瑞霞^{1,4} 何明高³ 宋松泉^{2*}

¹中国科学院西双版纳热带植物园, 云南勐腊 666303; ²中国科学院植物研究所, 北京 100093; ³中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 海南儋州 571737; ⁴中国科学院研究生院, 北京 100049

摘 要 近年来由于灭绝性采挖和生态环境的恶化, 沼兰(*Malaxis monophyllos*)的自然资源遭到严重破坏, 加上沼兰种子具有萌发缓慢和萌发率低的特性, 已处于近危乃至易危的状态。为了繁殖和保护沼兰种质资源, 利用添加2%蔗糖、3%活性炭和0.8%琼脂的Knudson C (KC)培养基, 研究了萘乙酸(NAA)、6-苄基腺嘌呤(6-BA)、椰乳、香蕉泥、土豆泥和光照条件6种因素对沼兰种子非共生萌发的影响; 同时通过光学显微镜和扫描电镜观察了种子的外部形态。结果显示, 沼兰种皮细胞的平周壁方向结构平坦、没有纹络, 但是沿着细胞垂周壁方向细胞壁较厚。通过正交试验设计和冗余分析, 建立了沼兰种子非共生萌发的最佳方案, 即在含有4.5 mg·L⁻¹ NAA、10 mg·L⁻¹ 6-BA、8%香蕉泥和3%土豆泥的KC培养基上光照条件(光照强度为20 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光周期为12 h/12 h)下萌发。该方案的种子萌发率在90%以上。

关键词 非共生萌发, 沼兰, 正交设计, 冗余分析, 种子形态

Effect of media and light on asymbiotic germination of *Malaxis monophyllos* seeds

WANG Rui-Xia^{1,4}, HE Ming-Gao³, and SONG Song-Quan^{2*}

¹Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla, Yunnan 666303, China; ²Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; ³Institute of Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China; and ⁴Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract

Aims Extensive collection, environmental deterioration, slow seed germination and low germination percentage have seriously degraded the natural resources of *Malaxis monophyllos*, resulting in a vulnerable situation for the species. Our objective is to establish an asymbiotic germination system of *M. monophyllos* seeds to protect and propagate the species.

Methods Seed morphology was investigated by optical microscope and scanning electron microscope. We used Knudson C medium supplemented with 2% sucrose, 3% activated charcoal and 0.8% agar as the basic medium to investigate the effects of α -naphthalene acetic acid (NAA), 6-benzylaminopurine (6-BA), coconut milk, meshed banana, meshed potato and light on seed germination via the orthogonal test.

Important findings Periclinal walls of testa cells were smooth and had no veins, but anticlinal walls were thick and had clear surface patterns. Through the orthogonal test and redundancy analysis, an optimal formula for asymbiotic seed germination was determined: the medium supplemented with 4.5 mg·L⁻¹ NAA, 10 mg·L⁻¹ 6-BA, 8% meshed banana and 3% meshed potato in the light (12 h light/12 h dark at 20 μmol·m⁻²·s⁻¹ of light intensity). Seed germination was > 90% with this formula.

Key words asymbiotic germination, *Malaxis monophyllos*, orthogonal test, redundancy analysis, seed morphology

沼兰(*Malaxis monophyllos*)为兰科植物, 地生草本, 广泛分布于日本、朝鲜半岛、西伯利亚、欧洲、北美, 以及我国的四川、台湾和西藏等地。沼兰生于林下、灌丛中或草坡上, 分布海拔为800–4 100 m。由于过度采挖和生态环境的恶化, 该物种已处于近危乃至几近易危的状态(汪松和谢焱, 2004), 已被列入国家重点保护野生植物名录([http://](http://www.cvh.org.cn/baohu/details.asp?RecordNo=1235&mode=1)

www.cvh.org.cn/baohu/details.asp?RecordNo=1235&mode=1), 亟需对沼兰种质资源进行保护和繁殖。

兰科植物的种子非常细小, 一个蒴果中有几万到上百万粒种子。由于种子内没有胚乳, 仅有分化不完全的胚细胞, 其种子萌发阶段完全依靠菌根真菌为其提供养分(陈心启和罗毅波, 2003)。在自然条件下, 兰花种子的萌发依靠其真菌的侵染来完成

(共生萌发), 但萌发率非常低, 不能满足生产和种群更新的需要。尽管一部分兰科植物种子在人工培养基上以及控制的萌发温度和光照(非共生萌发)条件下能够萌发, 并获得较高的萌发率(陈心启和罗毅波, 2003; Kitsaki *et al.*, 2004; Shiau *et al.*, 2005; Thomas & Michael, 2007); 但地生兰种子的非共生萌发却很困难(Miyoshi & Mii, 1998)。目前, 关于沼兰属植物的离体繁殖的研究主要集中在营养繁殖(Taylor, 1967)和未成熟种子的萌发(Deb, 2006)。沼兰的主要繁殖方式为种子繁殖(Batygina *et al.*, 2003), 其种子的非共生萌发研究未见报道。

沼兰种子能否非共生萌发? 哪些因素影响其非共生萌发? 为了解决这些问题, 本文采用正交试验设计的方法, 研究了萘乙酸 (α -naphthalene acetic acid, NAA)、6-苄基腺嘌呤 (6-benzylaminopurine, 6-BA)、椰乳、香蕉泥、土豆泥和光照条件对沼兰种子非共生萌发的影响, 以期建立沼兰种子非共生萌发的最佳实验体系。

1 材料和方法

1.1 材料

沼兰蒴果于2007年9月采于四川省黄龙自然保护区(35°6' N, 109°86' E; 海拔 3 100–3 596 m)。该地区的年平均温度为5–7 °C, 年平均降雨量为717 mm, 其中5–9月的降雨量占全年的70%–73%, 属典型的高原温带-亚寒带季风气候。蒴果采集后用75%的酒精棉进行表面消毒; 然后放于纸袋内, 5 °C保存备用。

1.2 种子的形态观察

从蒴果中取出种子, 一部分直接置于载玻片上于光学显微镜(Leica DM 2500, Bensheim, German)下观察并拍照; 将另一部分种子喷金, 于扫描电镜(FEI QUANTA 200F, Hillsboro, USA, 电压20 kV)下观察和拍照, 随后测量种子的大小、描述种皮细胞的形态。

1.3 种子萌发实验

蒴果用0.5%次氯酸钙溶液表面消毒20 min, 无菌水冲洗4次, 然后用无菌滤纸吸干, 取出种子, 播种到培养基表面。培养基采用正交试验设计 $L_{16}(4)^5$, 因素种类和水平见表1。所用的基本培养基为KC (Knudson, 1946), 添加2% (w/v)蔗糖, 3% (w/v)活性炭和0.8% (w/v)琼脂, pH 5.5; 培养温度为(25 ± 2) °C, 光照(光照强度为20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光周期为12 h/12 h)或者黑暗。种子萌发率(germination percentage) = 萌发种子数/种子总数× 100%, 圆球茎诱导率(protocorm induction percentage) = 圆球茎个数/萌发种子数× 100%。

1.4 数据处理

用SPSS 13.0统计分析软件对数据进行方差分析(general linear model procedures)和多重比较(Student-Newman-Keuls)。应用CANOCO for windows 4.5中的冗余分析(redundancy analysis, RDA)对萌发率和圆球茎诱导率与各因子的相关性进行分析。

2 结果

2.1 种子形态

沼兰种子由种皮和胚组成, 无胚乳。种皮呈乳黄色, 透明, 胚位于种子的中部(图1A)。种子呈矩圆形(图1B), 长280–390 μm , 宽110–170 μm 。包裹胚的种皮由一层细胞组成, 种皮细胞的平周壁方向结构平坦、没有纹络, 但是沿着细胞垂周壁方向, 细胞壁较厚、相互连接(图1C)。

2.2 NAA、6-BA、椰乳、香蕉泥、土豆泥和光照条件对沼兰种子萌发的影响

沼兰种子萌发缓慢, 播种后140天达到最大萌发率。不同处理对种子的萌发率和圆球茎的诱导率影响较大, 呈显著性差异($p \leq 0.05$) (表2); 种子在光照和黑暗条件下均能萌发(图2A), 并诱导出

表1 正交试验设计的因素及水平
Table 1 Factors and levels for orthogonal test

水平 Level	因素 Factor				
	A, NAA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	B, 6-BA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	C, 椰乳 Coconut milk (% v/v)	D, 香蕉泥 Meshed banana (% w/v)	E, 土豆泥 Meshed potato (% w/v)
1	0	0	0	0	0
2	0.5	1	4	4	3
3	1.5	3	8	8	6
4	4.5	10	10	10	12

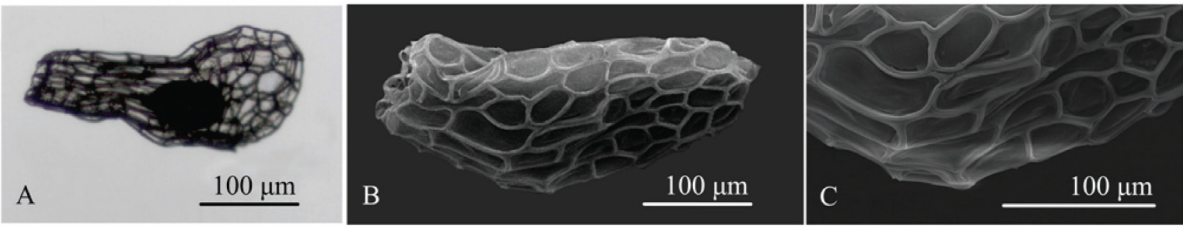


图1 沼兰种子的形态。A, 光学显微镜照片。B, C, 扫描电镜照片
Fig. 1 Morphology of *Malaxis monophylla* seed. A, Optical microscopic photograph. B, C, Scanning electron micrographs.

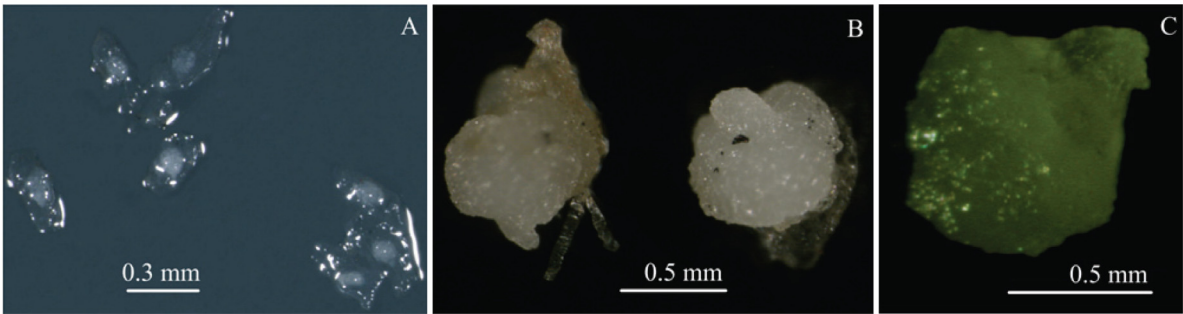


图2 萌发的沼兰种子(A)和圆球茎(B和C)。
Fig. 2 Germinated *Malaxis monophylla* seeds (A) and protocorms (B and C)。

表2 沼兰种子萌发的正交试验设计 $L_{16}(4)^5$
Table 2 Orthogonal test $L_{16}(4)^5$ of germination of *Malaxis monophylla* seeds

处理 Treatment	A	B	C	D	E	光照 Light		黑暗 Darkness	
						萌发率 Germination (%)	圆球茎诱导率 Protocorm (%)	萌发率 Germination (%)	圆球茎诱导率 Protocorm (%)
1	1	1	1	1	1	10.75 ± 1.75 ^{fg}	0.00 ± 0.00 ^d	73.00 ± 2.00 ^b	7.61 ± 1.28 ^a
2	1	2	2	2	2	45.00 ± 3.50 ^c	17.97 ± 2.51 ^a	52.50 ± 3.50 ^d	1.34 ± 1.34 ^{bc}
3	1	3	3	3	3	40.00 ± 6.00 ^{cd}	3.64 ± 0.70 ^{cd}	36.50 ± 1.50 ^e	0.00 ± 0.00 ^c
4	1	4	4	4	4	23.00 ± 4.00 ^{ef}	0.00 ± 0.00 ^d	74.00 ± 4.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^c
5	2	1	2	3	4	79.00 ± 3.00 ^b	7.89 ± 0.65 ^{abc}	76.50 ± 2.50 ^{ab}	0.00 ± 0.00 ^c
6	2	2	1	4	3	3.50 ± 2.50 ^g	0.00 ± 0.00 ^d	81.00 ± 5.50 ^{ab}	4.25 ± 0.75 ^{ab}
7	2	3	4	1	2	20.50 ± 3.50 ^{ef}	0.69 ± 0.69 ^{cd}	78.67 ± 1.67 ^{ab}	3.28 ± 0.04 ^{bc}
8	2	4	3	2	1	40.75 ± 3.75 ^{cd}	4.39 ± 1.02 ^{abcd}	2.50 ± 1.50 ^g	0.00 ± 0.00 ^c
9	3	1	3	4	2	10.75 ± 2.50 ^g	0.00 ± 0.00 ^d	2.00 ± 1.00 ^g	0.00 ± 0.00 ^c
10	3	2	4	3	1	19.67 ± 3.67 ^{ef}	16.96 ± 4.46 ^{ab}	15.50 ± 4.00 ^f	0.00 ± 0.00 ^c
11	3	3	1	2	4	86.25 ± 4.75 ^{ab}	7.61 ± 3.93 ^{abc}	85.25 ± 2.25 ^{ab}	0.00 ± 0.00 ^c
12	3	4	2	1	3	28.25 ± 2.75 ^{de}	4.55 ± 1.33 ^{abcd}	2.50 ± 1.00 ^g	0.00 ± 0.00 ^c
13	4	1	4	2	3	18.50 ± 2.50 ^{ef}	0.00 ± 0.00 ^d	83.25 ± 3.75 ^{ab}	4.47 ± 0.70 ^{ab}
14	4	2	3	1	4	36.50 ± 1.00 ^{cd}	6.23 ± 2.23 ^{abc}	61.50 ± 3.50 ^c	2.74 ± 1.88 ^{abc}
15	4	3	2	4	1	30.25 ± 0.75 ^{de}	1.61 ± 1.61 ^{cd}	8.75 ± 1.25 ^{fg}	0.00 ± 0.00 ^c
16	4	4	1	3	2	93.25 ± 2.25 ^a	8.77 ± 5.11 ^{abc}	89.50 ± 2.00 ^a	5.02 ± 0.45 ^{ab}

基本培养基为KC, 其中添加2% (w/v)蔗糖、3% (w/v)活性炭和0.8% (w/v)琼脂, pH 5.5; 种子在(25 ± 2) °C, 光照(光照强度为20 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光周期为12 h/12 h)或者黑暗中萌发140天; 重复3次, 每次150–300粒种子; 表中数据代表平均值±标准误差, 不同小写字母表示差异显著($p \leq 0.05$); A–E同表1。

Seeds were germinated on the KC medium supplemented with 2% (w/v) sucrose, 3% (w/v) activated charcoal and 0.8% (w/v) agar (pH 5.5) at (25 ± 2) °C in alternating photoperiod (12 h light / 12 h dark at 20 μmol·m⁻²·s⁻¹) or in darkness for 140 d; All values are means ± standard error by 3 replicates of 150–300 seeds each; Treatments with different letters are significantly different ($p \leq 0.05$); A–E see Table 1.

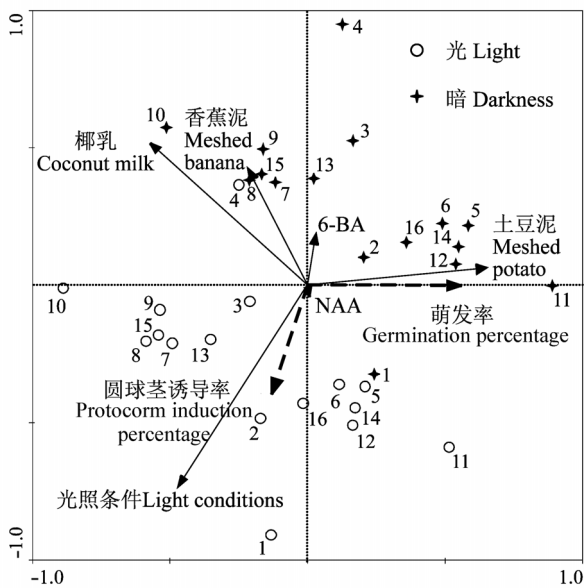


图3 影响沼兰种子萌发的6个因素的冗余分析排序图。特征值: 第1轴=0.301 ($p=0.01$), 第2轴=0.03, 前2轴共解释总变异的30.4% ($p \leq 0.01$); 前2轴物种(虚线箭头)和环境(实线箭头)的相关系数分别为0.556和0.335。

Fig. 3 Redundancy analysis ordination figure of 6 factors affecting germination of *Malaxis monophyllos* seeds. Eigenvalues: axis 1 = 0.301 ($p = 0.01$), axis 2 = 0.03; The first two axes cumulatively accounted for 30.4% of the overall variation ($p \leq 0.01$); Species (dashed line arrow) and environmental (solid line arrow) correlations for the first two canonical axes were 0.556 and 0.335, respectively.

球形圆球茎 (图2B、2C); 但在光照条件下诱导的圆球茎呈绿色或者白色; 而在黑暗条件下诱导的圆球茎呈白色, 在一些圆球茎上可长出根, 白色圆球茎转移至光下后可以变绿。

采用冗余分析来评价萌发率和圆球茎诱导率

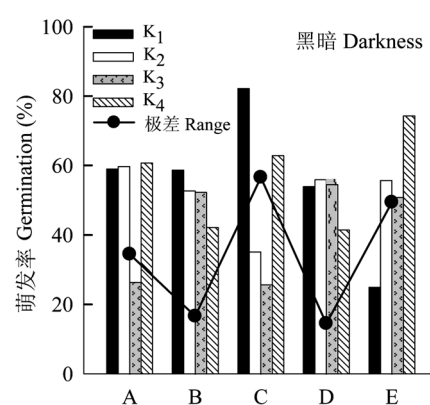
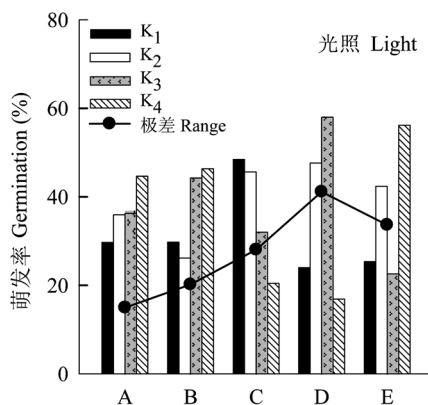


图4 正交试验设计中萌发率的极差分析。A, 萘乙酸; B, 6-苄基腺嘌呤; C, 椰乳; D, 香蕉泥; E, 土豆泥; K_j , 每个水平的平均值。

Fig. 4 The range analysis on the germination in orthogonal design test. A, NAA; B, 6-BA; C, coconut milk; D, meshed banana; E, meshed potato; K_j , means on the according levels.

与6个因素(正交设计的5个因素和光照条件)的关系, 结果如图3所示。通过对图3中带箭头线段的长短及两个线段的夹角大小进行相关性分析, 结果表明, 与萌发率的相关性分别为: 土豆泥呈正相关, 6-BA呈微弱的正相关, NAA的作用不大, 椰乳呈负相关, 香蕉泥和光照呈微弱的负相关; 与圆球茎诱导率的相关性分别为: 光照的正相关作用最大, NAA呈微弱的正相关, 6-BA呈负相关, 椰乳、土豆泥和香蕉泥呈微弱的负相关。

在光照和黑暗条件下, 种子萌发结果的方差分析表明, 5个因素对萌发的作用呈极显著性的差异 ($p < 0.001$)。另外, 正交设计中, 因素的极差值愈大, 表示该因素的作用愈重要。根据极差分析, 影响种子萌发率主次因素的顺序为: 光照条件下, 香蕉泥 > 土豆泥 > 椰乳 > 6-BA > NAA; 黑暗条件下, 椰乳 > 土豆泥 > NAA > 6-BA > 香蕉泥(图4)。无论是在光照或黑暗条件下, 培养基各因素对萌发的最佳浓度均为 $A_4B_4C_1D_3E_2$, 即第16号处理($4.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA、 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA、8%香蕉泥和3%土豆泥), 在光照或黑暗下萌发率分别为93.25%和89.50%, 二者没有显著性差异 ($p > 0.05$)。光照条件的数据表明, 光照能够有效促进圆球茎的诱导(图3), 因此相对最佳的萌发条件为有光照的条件(光照强度为 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 光周期为12 h/12 h)。

3 讨论

沼兰种皮呈乳黄色, 透明。种皮细胞在平周壁方向结构平坦、没有纹络, 在垂周壁方向细胞壁较

厚、相互连接 (图1C); 这些种子结构和表面类型的信息可用于兰花的系统分类学研究(Gamarra *et al.*, 2007)。

兰花种子萌发对光照的反应具有种的特异性(Rasmussen, 1995)。有些兰花种子的萌发被光照抑制(Stewart & Kane, 2006), 有些被促进(Whitlow, 1996), 还有一些不受光照的影响(Takahashi *et al.*, 2000)。冗余分析表明沼兰种子的萌发率与光照条件呈微弱的负相关关系(图3); 但在光照(光暗周期12 h/12 h, 光照强度 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)和完全黑暗条件下, 沼兰种子均可萌发, 而且萌发率均可达到较高水平: 在光照下93.25%, 而在黑暗下83.50%, 这与Stewart和Kane (2006)的研究结果类似。同时, 光照能促进圆球茎的诱导(表2), 且大部分圆球茎呈绿色(未列出数据)。因此, 光照对兰花种子的萌发和随后的生长是必需的, 这与某些陆生兰的研究结果一致(Arditti *et al.*, 1981)。

NAA对沼兰种子的萌发贡献较小(图3), 这与van Waes (1984)的研究结果类似, 他认为生长素对几种陆生兰种子萌发的作用不大; 但是, NAA能较小地促进圆球茎的诱导(图3), 这与Shiau等(2005)的研究结果相似, 他认为NAA有益于幼苗的生长。细胞分裂素对兰花种子的萌发具有种的特异性(Arditti & Ernst, 1984); Miyoshi和Mii (1995)研究表明, 细胞分裂素的作用还因发育阶段不同而不同。这与我们的结果类似, 6-BA促进萌发、抑制圆球茎的形成(图3)。细胞分裂素对萌发的具体作用还不清楚, 可能是因为细胞分裂素在油脂的运转中起主要作用(Dimalla & van Staden, 1977)。由于兰花种子结构简单, 没有子叶和胚乳, 胚内仅存在油脂粒作为贮藏物质(Arditti, 1979; Arditti & Ernst, 1984); 而且, 在萌发过程中这些油脂粒的运转是必需的(Manning & van Staden, 1987)。然而, 在没有6-BA的培养基上, 种子仍可萌发(表2, 处理1), 这可能是由于种子的内源细胞分裂素含量达到了萌发初始阶段所必需的水平(Lo *et al.*, 2004)。

有机添加物, 如椰乳、土豆泥和香蕉泥, 经常用于兰科植物的组织培养。已报道, 椰乳、土豆泥和香蕉泥中含有淀粉、糖、含氮化合物(蛋白质和氨基酸)、油脂、有机酸、酶、酚类化合物、矿物质和植物生长调节剂(Creswell & Brooks, 1971; Hardisson *et al.*, 2001; Kita, 2002)。然而, 这些有机添加物

对沼兰种子萌发的作用是不同的(图3)。椰乳抑制萌发、土豆泥促进萌发, 与Hadley (1970)对温带兰花种子的研究结果一致; 但对于其他一些兰花种子, 椰乳不仅提高种子萌发率, 而且促进圆球茎的形成(Kitsaki *et al.*, 2004; Thomas & Michael, 2007), 这与我们的结果相反。香蕉泥对种子萌发和圆球茎的形成抑制作用不大, Pierik等(1988)研究表明, 香蕉泥在种子萌发的初始阶段不是必须的。在兰科植物种子非共生萌发过程中, 这些有机添加物的真正作用还不清楚, 而且, 关于这些添加物中有效成分的鉴定研究也较少。

4 结论

本文通过光学显微镜和扫描电镜观察显示, 沼兰种皮细胞的平周壁方向结构平坦、没有纹络, 但沿着细胞垂周壁方向的细胞壁较厚。通过正交试验设计和冗余分析建立了沼兰种子非共生萌发的最佳方案: 在含有 $4.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA、 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA、8%香蕉泥和3%土豆泥的KC培养基上光照条件(光照强度为 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光周期为12 h/12 h)下萌发。该方案的种子萌发率在90%以上。

致谢 中国科学院知识创新工程重要方向性项目(KZCX2-YW-414)资助。

参考文献

- Arditti J (1979). Aspects of the physiology of orchids. *Advances in Botanical Research*, 7, 421–655.
- Arditti J, Michaud JD, Oliva AP (1981). Seed germination of North American orchids. I. Native California and related species of *Calypso*, *Epipactis*, *Goodyera*, *Piperia*, and *Platanthera*. *Botanical Gazette*, 142, 442–453.
- Arditti J, Ernst R (1984). Physiology of germinating orchid seeds. In: Arditti J ed. *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*. III. Cornell University Press, Ithaca, New York. 3, 176–222.
- Batygina TB, Bragina EA, Vasilyeva VE (2003). The reproductive system and germination in orchids. *Acta Biologica Cracoviensis Series Botanica*, 45, 21–34.
- Chen XC (陈心启), Luo YB (罗毅波) (2003). Advances in some plant groups in China. I. a retrospect and prospect of Orchidology in China. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 45 (Suppl.), 2–20. (in Chinese with English abstract)
- Creswell DC, Brooks CC (1971). Composition, apparent digestibility and energy evaluation of coconut oil and coconut meal. *Journal of Animal Science*, 33, 366–369.
- Deb CR (2006). *In vitro* propagation of threatened terrestrial

- orchid, *Malaxis khasiana* Soland ex. Swartz through immature seed culture. *Indian Journal of Experimental Biology*, 44, 762–766.
- Dimalla GG, van Staden J (1977). The effect of temperature on the germination and endogenous cytokinin and gibberellin levels of pecan nuts. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 82, 274–280.
- Gamarra R, Dorda E, Scrugli A, Galan P, Ortunez E (2007). Seed micromorphology in the genus *Neotinea* Rchb. f. (Orchidaceae, Orchidinae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 153, 133–140.
- Hadley G (1970). The interaction of kinetin, auxin and other factors in the development of North temperate orchids. *New Phytologist*, 69, 549–555.
- Hardisson A, Rubio C, Baez A, Martin M, Alvarez R, Diaz E (2001). Mineral composition of the banana (*Musa acuminata*) from the island of Tenerife. *Food Chemistry*, 73, 153–161.
- Kita A (2002). The influence of potato chemical composition on crisp texture. *Food Chemistry*, 76, 173–179.
- Kitsaki CK, Zygouraki S, Ziobora M, Kintzios S (2004). *In vitro* germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (Orchidaceae). *Plant Cell Reports*, 23, 284–290.
- Knudson L (1946). A new nutrient solution for germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin*, 15, 214–217.
- Lo SF, Nalawade SM, Mulabagal V, Matthew S, Chen CL, Kuo CL, Tsay HS (2004). *In vitro* propagation by asymbiotic seed germination and 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity studies of tissue culture raised plants of three medicinally important species of *Dendrobium*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27, 731–735.
- Manning JC, van Staden J (1987). The development and mobilisation of seed reserves in some African orchids. *Australian Journal of Botany*, 35, 343–353.
- Miyoshi K, Mii M (1995). Phytohormone pre-treatment for the enhancement of seed germination and protocorm formation by the terrestrial orchid, *Calanthe discolor* (Orchidaceae), in asymbiotic culture. *Scientia Horticulturae*, 63, 263–267.
- Miyoshi K, Mii M (1998). Stimulatory effects of sodium and calcium hypochlorite, pre-chilling and cytokinins on the germination of *Cypripedium macranthos* seed *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 102, 481–486.
- Pierik RLM, Sprenkels PA, van der Harst B, van der Meys QG (1988). Seed germination and further development of plantlets of *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz. *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 34, 139–153.
- Rasmussen HN (1995). *Terrestrial Orchids: From Seed to Mycotrophic Plant*. Cambridge University Press, New York. 52–55.
- Shiau YJ, Nalawade SM, Hsai CN, Tsay HS (2005). Propagation of *Haemaria discolor* via *in vitro* seed germination. *Biologia Plantarum*, 49, 341–346.
- Stewart SL, Kane ME (2006). Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86, 147–158.
- Takahashi K, Ogiwara I, Hakoda N (2000). Seed germination of *Habenaria (pecteilis) radiata* (Orchidaceae: Orchideae) *in vitro*. *Lindleyana*, 15, 59–63.
- Taylor RL (1967). The foliar embryos of *Malaxis paludosa*. *Canadian Journal of Botany*, 45, 1553–1556.
- Thomas TD, Michael A (2007). High-frequency plantlet regeneration and multiple shoot induction from cultured immature seeds of *Rhynchostylis retusa* Blume., an exquisite orchid. *Plant Biotechnology Reports*, 1, 243–249.
- van Waes J (1984). *In vitro* studie van de kiemingsfysiologie van Westeuropese orchideeën. PhD dissertation. Rijksuniversiteit Gent, Belgium.
- Wang S (汪松), Xie Y (谢焱) (2004). *China Species Red List* (中国物种红色名录) Vol. 1, Red List. Higher Education Press, Beijing. 453. (in Chinese)
- Whitlow CE (1996). Mass production of *Calopogon tuberosus*. In: Allen C ed. *North American Native Terrestrial Orchids Propagation and Production*. North American Native Terrestrial Orchid Conference, Germantown, Maryland. 5–10.

责任编辑: 骆世明 责任编辑: 李 敏