

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.04.001

丁兰,张丽,杨宁,等. 濒危植物盘龙参种子的非共生萌发及种苗的快繁研究[J]. 广西植物, 2014, 34(4): 431–435

Ding L, Zhang L, Yang N, et al. Asymbiotic seed germination and high-frequency seedling regeneration of *Spiranthes sinensis*, an endangered orchid[J]. *Guihaia*, 2014, 34(4): 431–435

濒危植物盘龙参种子的非共生萌发及种苗的快繁研究

丁 兰*, 张 丽, 杨 宁, 刘国安

(西北师范大学 生命科学学院, 兰州 730070)

摘 要: 以盘龙参种子为材料, 筛选离体条件下适宜种子非共生萌发、种苗快繁的培养基。结果表明: 盘龙参种子在无植物生长物质的培养基中能够萌发, 但不能发育成苗; 在含有 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT、 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃ 的培养基中萌发, 并能进一步发育形成种苗; 在较高浓度生长素 ($1.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA) 的培养基中不能萌发。种苗在较高浓度细胞分裂素和较低浓度生长素配比的培养基中能够增殖, 最高增殖系数可达到 2.8, 转入壮苗生长培养基中培养 80 d 后可以移栽温室。最适增殖培养基为 $1/2\text{MS}+12.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA+ $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 腺嘌呤; 最适壮苗生根培养基为 $1/2\text{MS}+1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT+ $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA+ $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 腺嘌呤。

关键词: 盘龙参; 非共生萌发; 离体快繁

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2014)04-0431-05

Asymbiotic seed germination and high-frequency seedling regeneration of *Spiranthes sinensis*, an endangered orchid

DING Lan*, ZHANG Li, YANG Ning, LIU Guo-An

(College of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Seeds of *Spiranthes sinensis* were used to find out appropriate media for *in vitro* germination and seedling regeneration. Results showed that seeds could germinate on medium without plant growth substances, but failed to develop into seedlings; seedlings formed on medium with $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT, $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA and $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃; while seeds could not germinate on media containing lower concentration auxin ($1.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA). Seedlings could remain high proliferation rate (2.8 times) on media containing higher concentrations kinin and lower concentration auxin, they were eventually transplanted to greenhouse after cultured on hardening medium for 80 d. The suitable seedling proliferation and hardening media were $1/2\text{MS}+12.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA+ $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ adenine and $1/2\text{MS}+1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT+ $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA+ $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ adenine, respectively.

Key words: *Spiranthes sinensis*; asymbiotic germination; *in vitro* high-frequency regeneration

尽管兰科植物一枚蒴果中有多达 $10^4 \sim 10^6$ 粒种子, 但自然条件下种子萌发率很低 (Pant *et al.*, 2011), 这主要归咎于其种子极小, 缺乏代谢多糖和脂类的酶类, 不能转化形成可溶性糖 (Manning *et*

al., 1987), 种子萌发的早期发育阶段需依赖共生菌提供碳源、营养素、矿物质和水 (Long *et al.*, 2008)。休眠以及种皮坚硬、致密等因素阻碍陆生兰种子对水分和营养物质的吸收 (Rasmussen, 1992), 因而其

收稿日期: 2013-10-15 修回日期: 2013-12-22

基金项目: 国家自然科学基金(30960464); 生物学省级重点学科项目; 西北师范大学知识与科技创新工程项目(NWNU-KJXCXG-03-65)。

作者简介: 丁兰(1964-), 女, 四川德阳人, 博士, 教授, 主要研究方向为植物细胞工程和分子药理学, (E-mail)dinglan@nwnu.edu.cn。

* 通讯作者

比气生兰种子更难以萌发。此外,自然条件下兰科植物的生长周期也很长,一般需要5~10 a才能开花和产生种子,因此,世界范围内不少野生兰科植物正日益减少和濒临绝灭(Znanięcka *et al.*, 2004)。兰科植物在离体条件下的非共生萌发和快繁技术可以极大地提高兰花的增殖率,进而提供大量种苗,是实现濒危兰花种质资源保存、重新引入自然界以及满足商业需求的最有效方法(Stewart *et al.*, 2006; Deb *et al.*, 2011)。

盘龙参(*Spiranthes sinensis*),又名绶草,是兰科绶草属植物,全世界共50种,我国仅有1种,为陆生兰类,主要分布于海拔200~3 000 m的草地、河滩、沼泽以及草甸之中(中国植物志编辑委员会, 1999)。盘龙参作为重要的中草药已被收录于多部中国医学经典,其根或全草入药,具有益气滋阴、清热解毒、润肺止咳之功效(国家中医药管理局《中华本草》编委会, 1999;崔红花等, 2012)。盘龙参含有多种药理活性成分,如二氢菲类、黄酮类、苯丙素类、阿魏酸二十八醇酯、甾醇等(Dong *et al.*, 2005;张伟等, 2010; Liu *et al.*, 2012),具有明显的抗病毒、抗肿瘤作用(李文丽, 2005; Peng *et al.*, 2007)。近年来人们对盘龙参药用价值的汲汲追求而导致过度采挖,使得其野生资源数量迅速下降,现已被《野生植物保护名录》列为国家二级保护植物,同时也被《濒危野生动植物种国际贸易公约》列为国际濒危植物(国家环境保护总局, 1987)。周秀玲等(2012)观察到盘龙参种子在自然条件下萌发形成类原球茎并与真菌共生。宋晓明等(2011)的研究,发现分株后不能长出新植株,人工分株繁殖极为困难;而人工播种繁殖又需在有适宜真菌的生境地进行,并且出苗率不高。李家敏(2011)对盘龙参花梗外植体的消毒方法进行了探讨,牛玉璐等(2009)通过诱导盘龙参肉质根和花梗获得了愈伤组织,愈伤组织分化可形成不定芽,生根后获得再生植株。但关于盘龙参种子非共生萌发及快速繁殖的研究尚未见有报道。本研究对从中国西藏林芝采集的盘龙参种子进行非共生萌发研究,成功获得种苗,并实现离体条件下的种苗快速繁殖,获得大量组培苗并实现温室移栽。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

盘龙参种子于2010年8月采自西藏灵芝地区。

1.2 方法

1.2.1 果荚和种子的表面消毒 选取绿色、饱满、未开裂的盘龙参果荚(图版 I :A),用软毛刷拭去表面尘土,在流水下冲洗30 min后用洗涤剂清洗,再用蒸馏水冲洗3遍;然后在无菌条件下先后用75%乙醇浸泡3 min,用0.1% HgCl₂处理25 min,最后用无菌水冲洗4~5遍后用无菌手术刀片纵向割开果荚,挑出种子,散铺在1/3 MS附加有不同浓度和不同种类植物生长物质(KT、IAA和GA₃)的萌发培养基中(表1),所有培养基中均添加20.0%椰子汁、20.0 g·L⁻¹蔗糖和5.0 g·L⁻¹琼脂。

1.2.2 种苗的再生与增殖 将种子萌发形成的种苗切根后转至芽增殖培养基中(表2),诱导新芽产生,通过丛芽的增殖获得大量再生小植株。所用增殖培养基为1/2MS基础培养基附加不同浓度、不同种类的植物生长物质(KT、6-BA、IAA)和腺嘌呤,以及20.0%椰子汁、20.0 g·L⁻¹蔗糖、1.0%的活性炭和5.0 g·L⁻¹琼脂。每50 d转至同样的新鲜培养基中继代,连续继代5次,每次统计芽增殖率。

1.2.3 壮苗 将芽增殖培养基中的小芽转至生根及壮苗培养基中,所用生根及壮苗培养基为1/2MS附加不同浓度、不同种类的植物生长物质(KT、6-BA、IAA)和腺嘌呤(表3),其余附加成分同增殖培养基。每50 d观察1次,记录生根数目和根长。

1.2.4 移栽 将装有再生苗的三角瓶移入温室,去掉瓶盖,在(22±2)℃、湿度70%、光照强度2 000 lx条件下炼苗3 d。将健壮的再生苗移出瓶外,用清水洗去根部的培养基,栽入苗盘基质中。苗盘基质为珍珠岩与土壤混合物(2:1),每1周浇1次水。

1.3 培养条件

培养基pH均为5.8。接种后的种子先在(23±2)℃黑暗条件下培养7 d后置于光照周期12 h/d,光强500 lx的条件下培养;幼苗的生长、增殖和生根培养条件为:光照周期12 h/d,光强1 200 lx。

2 结果与分析

2.1 植物生长物质对盘龙参种子萌发的影响

盘龙参种子播种于萌发培养基上(表1),10 d后白色种子逐渐变成浅褐色,60 d后1号、2号(图版 I :B)和3号(图版 I :C)培养基上的种子开始萌发,其萌发率分别为5.0%、3.0%和1.0%;随着培养时间延长,1号和3号培养基上的已萌发种子最终

未进一步分化成苗,仅2号培养基中的已萌发种子逐渐分化出芽并生根(图版I:D),120 d后幼苗长大。另外,接种于4号、5号培养基上种子均未萌发。上述结果表明,盘龙参种子仅在2号培养基上能正常萌发。

表1 植物生长物质对盘龙参种子萌发的影响

Table 1 Effects of plant growth substances on germination of *Spiranthes sinensis*

| 培养基编号 No. | 植物生长物质 (mg · L ⁻¹) Plant growth substances | | | | 萌发率 Germination rate (%) |
|--------------|---|-----|-----|-----------------|-----------------------------|
| | NAA | KT | IAA | GA ₃ | |
| 1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 5.0 |
| 2 | 0.0 | 1.0 | 0.1 | 0.1 | 3.0 |
| 3 | 0.5 | 0.1 | 0.0 | 0.1 | 1.0 |
| 4 | 1.2 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 5 | 1.2 | 0.1 | 0.0 | 0.1 | 0.0 |

2.2 植物生长物质对盘龙参种苗增殖的影响

盘龙参种子在2号培养基上萌发后形成极小的原球茎,原球茎很快发育成幼小种苗。将发育16周的种苗切去幼根后接种于含有不同植物生长物质组合的芽增殖培养基中(表2),去根种苗在培养6周后会从基部长出新芽。新芽在高浓度细胞分裂素(12.0 mg · L⁻¹或6.0 mg · L⁻¹ 6-BA)与低浓度生长素(0.1 mg · L⁻¹ NAA)相配比的培养基中能保持较高的增殖率,平均增殖系数分别可达到2.8和2.2(图版I:E,F);随着细胞分裂素浓度的降低,新芽的增殖系数随之降低,在8号和9号培养基中新芽增殖系数为1.5、1.2,在10号培养基中不增殖。因此6号或7号培养基可作为种苗增殖培养基。

表2 植物生长物质对比对盘龙参种苗增殖的影响

Table 2 Effects of plant growth substances on seedling proliferation of *Spiranthes sinensis*

| 培养基编号 No. | 植物生长物质 (mg · L ⁻¹) Plant growth substances | | | | 腺嘌呤 Adenine (mg · L ⁻¹) | 平均增殖系数 Average proliferation time |
|--------------|---|------|-----|-----|---|--------------------------------------|
| | KT | 6-BA | NAA | IAA | | |
| 6 | — | 12.0 | 0.1 | — | 10.0 | 2.8 |
| 7 | — | 6.0 | 0.1 | — | 10.0 | 2.2 |
| 8 | — | 2.0 | 0.1 | — | 10.0 | 1.5 |
| 9 | 1.0 | — | — | 0.1 | 10.0 | 1.2 |
| 10 | 1.0 | — | — | 0.1 | — | 1.0 |

2.3 植物生长物质对盘龙参种苗生长的影响

6号和7号增殖培养基上母株基部产生的新芽在生长30 d后会逐渐有根原基产生,50 d后将带根的新芽从母株切离,转至8号、9号和10号壮苗培养基中,继续培养50 d后观察记录再生苗生长状况。从表3可以看出,9号培养基的再生苗的苗高、

根长及整体生长状况均优于8号和10号培养基(图版I:H)。8号培养基中再生苗的苗高及生长状况优于10号培养基,但根长较短(图版I:G);10号培养基中的苗生长最慢,并多伴有黄叶出现。

2.4 盘龙参种苗的移栽

当带根新芽在9号培养基上培养80 d后,幼苗的苗高为5~6 cm,平均每株生9~12片叶、3~4条根,平均根长3~4 cm。将发育良好的再生苗移入温室苗盘中,存活率在90%以上。苗龄为1 a的某些植株会出现开花现象(图版I:J,K)。

表3 植物生长物质对比对盘龙参种苗生长的影响

Table 3 Effects of plant growth substances on growth of *Spiranthes sinensis* seedlings

| 培养基编号 No. | 植物生长物质 (mg · L ⁻¹) Plant growth substances | | | | 腺嘌呤 Adenine (mg · L ⁻¹) | 根长 Root length | 苗高 Seedling height | 生长状况 Seedling growth |
|--------------|---|------|-----|-----|---|-------------------|-----------------------|-------------------------|
| | KT | 6-BA | NAA | IAA | | | | |
| 8 | 0.0 | 2.0 | 0.1 | 0.0 | 10.0 | + | ++ | ++ |
| 9 | 1.0 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 10.0 | +++ | +++ | +++ |
| 10 | 1.0 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | ++ | + | + |

a: “+”表示生长指标的程度。

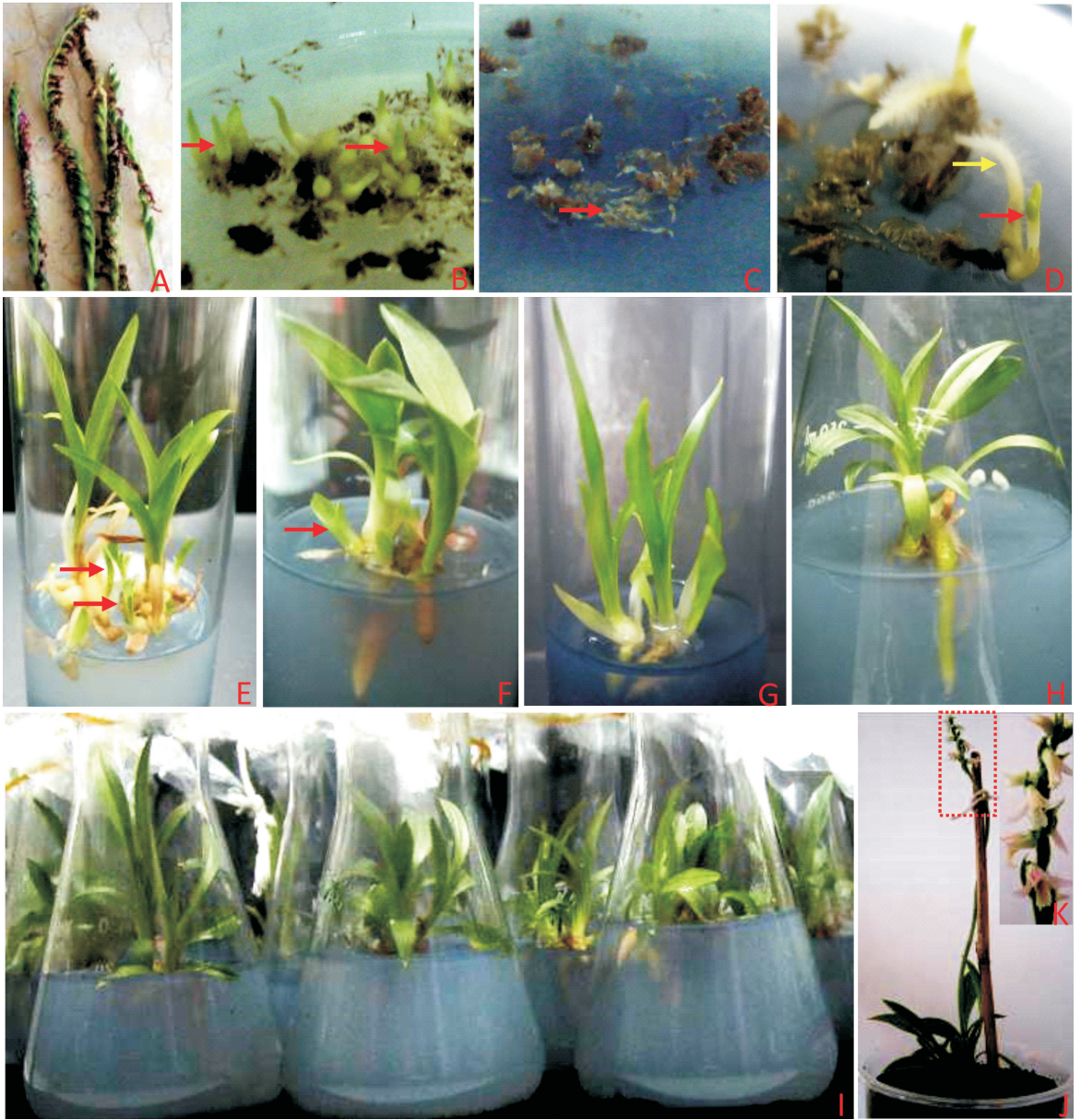
a: “+” indicates the degree of relative factors.

3 讨论与结论

野生资源的日益紧缺成为阻碍盘龙参药用价值开发的重要瓶颈,因此,建立一套种子非共生萌发和种苗快繁体系显得尤为重要。种子萌发阶段被认为是兰科植物在离体培养条件下形成完整种苗的基础(Godo *et al.*, 2010; Pant *et al.*, 2011),且许多陆生兰种子的萌发比附生兰更为困难,因为其果荚坚硬、萌发需要特殊的营养供给和环境条件(Thompson *et al.*, 2006)。本研究利用盘龙参种子,在含有KT、NAA(IAA)和GA₃的培养基上获得了发育完全的种苗,并且进一步成功建立了离体微繁体系,得到大量可移栽温室的健壮植株(图版I:I,J)。

3.1 植物生长物质对比对盘龙参种子萌发率及种苗形成的影响

Pant *et al.* (2011)发现鹤顶兰(*Phaius tancarvilleae*)种子可以在无植物生长物质培养基上萌发但不能进一步分化形成种苗,加入外源细胞分裂素(如BAP)可以提高鹤顶兰的分化能力。外源植物生长物质是陆生兰种子非共生萌发过程中胚发育所必需的添加因子(Deb *et al.*, 2011)。本研究表明,盘龙参种子在无植物生长物质培养基中可以萌发但



图版 I 盘龙参种子非共生萌发及种苗增殖 A. 盘龙参果荚; B. 种子在 2 号培养基上萌发并分化成芽(箭头); C. 种子在 3 号培养基上萌发(箭头)但不能发育成种苗; D. 2 号培养基上已萌发种子分化形成种苗(红箭头示芽,黄箭头示根); E, F. 分别示种苗在 6、7 号培养基上增殖; G, H. 分别示种苗在 8、9 号培养基上壮苗; I. 示大量组培苗; J, K. 移栽植株开花(红框)。

Plate I Asymbiotic seed germination and high-frequency seedling regeneration of *Spiranthes sinensis* A. *Spiranthes sinensis* capsules; B. Seeds germinated and pulled up on medium No.2 (arrows); C. Seeds on medium No.3 could germinate (arrow) but couldn't develop to seedlings; D. Those seeds germinated on medium No.2 differentiated into buds, shoots (red arrow) and roots (yellow arrow); E, F. Seedlings regenerated new shoots (arrows) high-frequently on medium No.6 and No.7, respectively; G, H. Seedlings culture on hardening medium No.8 and No.9, respectively; I. Large quantities of uniform healthy plantlets; J, K. Plantlets bloomed (red box).

不能进一步分化出完整种苗,其在含适宜植物生长物质的培养基上既能萌发又能形成种苗,说明外源植物生长物质对盘龙参种子萌发无促进作用,但对已萌发种子的发育成苗起关键性作用。另外,盘龙参种子在含有 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT、 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA 及 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃ 的培养基上既能萌发又能形成种

苗;在含有 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 及 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃ 培养基上种子尽管能萌发,但未能进一步发育成苗;在含有 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 和 $1.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的培养基上种子完全不能萌发。只有适宜的植物生长物质种类和浓度才能对萌发种子的进一步发育发挥调控作用,并且高浓度生长素对种子萌

发有抑制作用。野生条件下共生菌可合成细胞分裂素供给萌发中的兰科植物种子,为原球茎的进一步发育提供帮助(Stewart *et al.*, 2006)。因而非共生条件下加入一定浓度的细胞分裂素有利于种苗的正常发育。

3.2 盘龙参种苗增殖

非共生萌发条件下,附生兰和部分陆生兰种子的萌发率较高,易于形成原球茎,在适宜的培养基中可产生大量种苗(Sebastianraj *et al.*, 2006; Pant *et al.*, 2011)。但某些陆生兰的种子萌发率极低,种苗的扩大繁殖相当困难,这就需要筛选适宜的增殖培养基,通过根状茎(原球茎)或芽丛的扩大繁殖达到获得大量幼苗的目的(丁燕芬等, 2007; 范成明等, 2003)。对根状茎(原球茎)不同的切割方式(范成明等, 2003)、不同植物生长物质种类和配比(丁燕芬等, 2007)、光照条件(Kauth, 2005)对根状茎增殖均具有显著的影响。本实验中,盘龙参种子萌发后形成的原球茎极易分化成种苗,因而难以通过原球茎的大量增殖以获取大量种苗,但可以通过诱导种苗产生丛芽的增殖方式获得大量再生苗。Seeni *et al.* (1992)提出 BA 在兰花组织培养中对芽增殖起重要作用,本实验中,6-BA 对盘龙参芽的形成也发挥了关键作用,结果显示较高浓度的 6-BA ($6.0 \sim 12.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)才能使芽的增殖系数保持在 $2.2 \sim 2.8$ 之间,而相同浓度的 KT 对芽增殖诱导作用不及 6-BA (数据未显示)。当然,种苗长期在高浓度植物生长物质的培养基中继代可能导致植株产生变异,至于盘龙参种苗继代变异的问题尚需进一步研究探讨。

本实验首次成功实现了盘龙参的非共生萌发和种苗的快繁,有助于盘龙参的自然资源保护以及药用价值的可持续发展。然而,盘龙参种子的萌发率仍然很低,特别是能够萌发且发育形成种苗的种子仅有 3%(表 1; 图版 I :D),因此仍需进行与之相关的深入研究。

参考文献:

Chinese Herbalism Editorial Board, State Administration of Traditional Chinese Medicine of the People's Republic of China(国家中医药管理局《中华本草》编委会). 1999. Chinese Materia Medica(中华本草)[M]. Shanghai(上海):Shanghai Science and Technology Press,(上海科学技术出版社):755-757

Cui HH(崔红花), Tao SH(陶曙红), Wang SM(王淑美), *et al.* 2012. Optimization of the extracting method of kaempferol from *Spiranthes sinensis* through uniform design(均匀设计法优选盘龙参中山柰酚的提取工艺研究)[J]. *Chine Trad Pat Med*(中

成药). **34**(3):576-579

Delectis Florae Reipublica Popularis Sinicae Agendae Academiae Sinicae Edita(中国植物志编辑委员会). 1999. Flora Reipublicae Popularis Sinicae(中国植物志)[M]. Beijing(北京):Science press(科学出版社), **17**:227-231

Deb CR, Pongener A. 2011. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.: a multipurpose orchid[J]. *Plant Biochem Biot*, **20**(1):90-95

Ding YF(丁燕芬), Wang Y(王岩), Long CL(龙春林). 2007. Research advances in tissue culture of Chinese orchids(中国兰花组织培养研究进展)[J]. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学), **35**(8):2 247-2 248

Dong ML, Chen FK, Wu LJ, *et al.* 2005. Note: A new flavonoid from the whole plant of *Spiranthes australis* (R. Brown) Lindl [J]. *J Asian Nat Prod Res*, **7**(1):71-74

Fan CM(范成明), Li ZL(李枝林), He YQ(何月秋). 2003. Advances on orchid tissue culture and molecular biology(兰花组织培养及分子生物学研究进展)[J]. *Acta Horti Sin*(园艺学报), **30**(4):487-491

Godo T, Komori M, Nakaoki E, *et al.* 2010. Germination of mature seeds of *Calanthe tricarinata* Lindl., an endangered terrestrial orchid, by asymbiotic culture in vitro[J]. *In Vitro Cell Dev Pl*, **46**(3):323-328

Kauth P. 2005. In vitro seed germination and seedling development of *Calopogon tuberosus* and *Sacoila lanceolata* var. *lanceolata*: two Florida native terrestrial orchids[D]. Univ Florida:32-40

Li JM(李家敏). 2011. The preliminary study of tissue culture in *Spiranthes sinensis* (盘龙参组织培养的初步研究)[J]. *J Yichun Coll*, **33**(8):112-113

Li WL(李文丽). 2005. Inhibition of *Spiranthes sinensis* on sarcoma S180: an experimental observation (盘龙参抗 S180 肉瘤的实验观察)[J]. *J Math Med*(数理医药学杂志), **18**(3):255

Liu J, Su XH, Li CY, *et al.* 2012. Two new dihydrophenanthrenes from *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames[J]. *Nat Prod Res Dev*, **24**(7):866-868,872

Long S, Deb CR. 2008. Effects of different factors on immature embryo culture, PLBs differentiation and rapid mass multiplication of *Coelogyne suaveolens* (Lindl.) Hook[J]. *Indian J Exp Biol*, **46**(4):243-248

Manning JC, Van-Staden J. 1987. The development and mobilization of seed reserves in some African orchids[J]. *Aust J Bot*, **35**(3):343-353

Ministry of Environmental Protection of People's Republic of China (国家环境保护总局). 1987. China rare and endangered plants list(中国珍稀濒危保护植物名录)[M]. Beijing(北京):Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences(中国科学院植物研究所):23-28

Niu YL(牛玉璐), Cao YS(曹永胜). 2009. Research on tissue culture and rapid propagation of *Spiranthes sinensis* (绶草的组织培养与快速繁殖研究)[J]. *Anim Husb Feed Sci*, **30**(10):183-184

Pant B, Shrestha S, Pradhan S. 2011. In vitro seed germination and seedling development of *Phaius tancarvilleae* (L' Her.) Blume [J]. *Sci World*, **9**(9):50-52

Peng JY, Xu QW, Xu YW, *et al.* 2007. A new anticancer dihydroflavanoid from the root of *Spiranthes australis* (R. Brown) Lindl[J]. *Nat Prod Res*, **21**(7):641-645

(下转第 529 页 Continue on page 529)