

大花蕙兰原球茎增殖、分化与离体保存的研究

胡燕梅¹, 方中明^{2*}, 郭云贵², 夏景波³

(1. 江汉大学期刊社, 武汉 430056; 2. 武汉生物工程学院生命科学与技术学院, 武汉 430415;

3. 暨南大学生物科技学院发育与再生生物学系, 广州 510632)

摘要:以大花蕙兰原球茎为材料,从培养时间、基本培养基、糖浓度、培养方式及切割方式5个方面探讨了原球茎增殖、分化及离体保存的问题。结果表明,2个月内随着培养时间的延长,原球茎增殖与分化越显著,但培养2个月后,原球茎增殖不明显,分化却持续增加;1/2MS基本培养基利于原球茎增殖与分化,而3MS基本培养基利于原球茎保存;糖浓度的高低对原球茎增殖与分化影响显著,20 g L⁻¹蔗糖适于原球茎保存,50 g L⁻¹蔗糖适于原球茎增殖,而原球茎分化成苗应选用30 g L⁻¹白糖;在3种培养方式中,固体培养利于原球茎分化,液体振荡培养利于原球茎增殖,液体静置培养利于原球茎离体保存;片状切割法利于原球茎增殖与分化,整体剥离接种法利于原球茎保存。即以2.0 mg L⁻¹ 6-BA+0.1 mg L⁻¹ NAA为激素组合时,以片状切割法接种原球茎于1/2MS+50 g L⁻¹蔗糖的培养基中并以液体振荡方式培养时利于原球茎增殖;以片状切割法接种原球茎于1/2MS+30 g L⁻¹白糖的培养基中并以固体方式培养时利于原球茎分化成试管苗;以整体剥离法接种原球茎于3MS+20 g L⁻¹蔗糖培养基中并以液体静置方式培养时利于原球茎保存。上述结论为大花蕙兰试管苗快速繁殖与离体保存提供了有效的技术支持。

关键词: 大花蕙兰;原球茎;增殖与分化;离体保存;褐变

中图分类号: S682.31

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2016)01-0067-06

Proliferation, differentiation and conservation *in vitro* of *Cymbidium hybridum* protocorm-like body

HU Yanmei¹, FANG Zhongming², GUO Yungui², XIA Jinbo³

(1. Journal Department, Jiangnan University, Wuhan 430056;

2. Life Science and Technology College, Wuhan Bioengineering Institute, Wuhan 430415;

3. Department of Developmental and Regenerative Biology, School of Life Science and Technology, Ji'nan University, Guangzhou 510632)

Abstract: Using the protocorm-like body (PLB) of *Cymbidium hybridum*, the effects of culture time, basic medium, sugar concentration, cultivation form, and cutting way on proliferation, differentiation and conservation *in vitro* were studied. The results showed that the PLB proliferated and differentiated in two months culture with the differentiation being more effective after two months culture. Half-strength MS medium was beneficial to PLB proliferation and differentiation, while 3 MS medium was favorable to PLB preservation. Sucrose at 20 g L⁻¹ was good for PLB preservation, while 50 g L⁻¹ sucrose was suitable for PLB proliferation. Sucrose at 30 g L⁻¹ was effective for PLB differentiation. Solid culture had an obvious effect for PLB differentiation, while liquid culture was good for PLB proliferation. PLB conservation *in vitro* could use static liquid culture. The sheet-cutting method was suitable for PLB proliferation and differentiation and the whole-peeling method was good for PLB preservation. The best PLB proliferation condition was 1/2 MS+50 g L⁻¹ sucrose +2.0 mg L⁻¹ 6-BA

收稿日期: 2015-09-10

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(31301250), 湖北省教育厅科学技术研究项目(B20094008, B2015394)和武汉市高校科学研究资助项目(2008K079)共同资助。

作者简介: 胡燕梅, 副教授。

* 通信作者: 方中明, 博士, 讲师。E-mail: zmfang@mail.hzau.edu.cn

+0.1 mg L⁻¹ NAA in liquid culture with the sheet-cutting method. The best PLB differentiation condition was 1/2 MS+ 30 g L⁻¹ sugar in solid culture with the sheet-cutting method. The best PLB conservation condition was 3 MS+ 20 g L⁻¹ sucrose in liquid culture with the whole peeling method. It indicated that this method is effective for rapid propagation and conservation of *Cymbidium hybridum* *in vitro*.

Key words: *Cymbidium hybridum*; protocorm-like body(PLB); proliferation and differentiation; conservation *in vitro*; browning

近年来,利用组织培养技术进行大花蕙兰种苗规模化生产已取得较多研究成果^[1-3],但培养过程中由于技术还不成熟仍然存在不少问题,其中原球茎增殖、分化与离体保存是种苗快速生产的关键环节^[4-8]。在实际生产中要求快速获得种苗时则要求原球茎快速增殖与分化,但种苗生产暂停时则需要原球茎能更长时间地离体保存。本试验中笔者探讨了培养时间、无机盐浓度、糖浓度、培养方式以及切割方式5个方面对原球茎增殖、分化及离体保存的影响,为大花蕙兰快繁及工厂化育苗提供一定技术依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

大花蕙兰原球茎由武汉生物工程学院细胞工程实验室提供。试验选取生长状况一致的原球茎作为接种材料,将原球茎切成大小均匀直径约3 mm的小块接入培养基中,培养温度为(25±2)℃,光照强度1000~2000 lx,光照周期为每日12 h。

1.2 试验设计

1.2.1 培养时间对大花蕙兰原球茎培养的影响 以MS+2.0 mg L⁻¹ 6-BA +NAA 0.1 mg L⁻¹+30 g L⁻¹蔗糖+7 g L⁻¹琼脂+2 g L⁻¹活性炭+100 mL L⁻¹椰乳(pH为5.8±0.2)为培养基,分别记录原球茎培养15 d、30 d、45 d、60 d和75 d后的试验结果。

1.2.2 基本培养基对大花蕙兰原球茎培养的影响 基本培养基设置5个处理,即1/4MS、1/2MS、MS、2MS和3MS。附加物为2.0 mg L⁻¹ 6-BA +0.1 mg L⁻¹ NAA+30 g L⁻¹蔗糖+7 g L⁻¹琼脂+2 g L⁻¹活性炭+100 mL L⁻¹椰乳(pH为5.8±0.2)。

1.2.3 糖对大花蕙兰原球茎培养的影响 设置20、30、40和50 g L⁻¹蔗糖,30 g L⁻¹白砂糖5个处理。培养基为MS基本培养基,附加物为2.0 mg L⁻¹ 6-BA +0.1 mg L⁻¹ NAA+7 g L⁻¹琼脂+2 g L⁻¹活性炭+100 mL L⁻¹椰乳(pH为5.8±0.2)。

1.2.4 培养方式对大花蕙兰原球茎培养的影响 设置固体培养,液体静置培养,液体振荡培养3种培养方式。以MS为基本培养基,固体培养基附加物

为2.0 mg L⁻¹ 6-BA +0.1 mg L⁻¹ NAA +30 g L⁻¹蔗糖+2 g L⁻¹活性炭+100 mL L⁻¹椰乳+7 g L⁻¹琼脂(pH为5.8±0.2),液体培养基附加物为2.0 mg L⁻¹ 6-BA +0.1 mg L⁻¹ NAA+30 g L⁻¹蔗糖+2 g L⁻¹活性炭+100 mL L⁻¹椰乳(pH为5.8±0.2)。液体振荡培养条件为90 r min⁻¹,每10 d转接1次。

1.2.5 切割方式对大花蕙兰原球茎培养的影响 将原球茎采用5种不同的切割方式进行切割,即横切、竖切、片状切割、整体剥离、“十”字切割。培养基同1.2.1。

1.3 数据统计与分析

试验设计中各处理组初始接种数均为50块原球茎,培养60 d后统计有效接种数及其增殖率及增殖系数、分化率及分化系数、生根系数及褐变率。

有效接种数指原球茎经培养后未污染的接种数(块)。

原球茎增殖率/%=(原球茎发生增殖了的接种数/有效接种数)×100%。

原球茎的增殖系数是以每个原球茎经培养60 d后所形成的原球茎个数的平均值(以3 mm左右的原球茎小块为标准进行统计)。

原球茎分化率/%=(原球茎分化出苗的接种数/有效接种数)×100%。

分化系数指每个原球茎经培养60 d后原球茎上分化出苗的总数的平均值(苗长≥1 cm)。

褐变率/%=原球茎发生了褐变的接种数/有效接种数×100%。

生根系数指每个原球茎经培养60 d后原球茎上分化出苗长出的根总数的平均值(根长≥1 cm)。

采用Excel 2003对数据进行处理,采用Spss13.0软件中完全随机单因素试验方差分析邓肯氏新复极差法(Duncan's Multiple Range Test)评估各试验处理间差异显著性。文中各表中数据为平均值±标准差;同列数据中不同英文字母表示数据间差异显著($P<0.05$)。

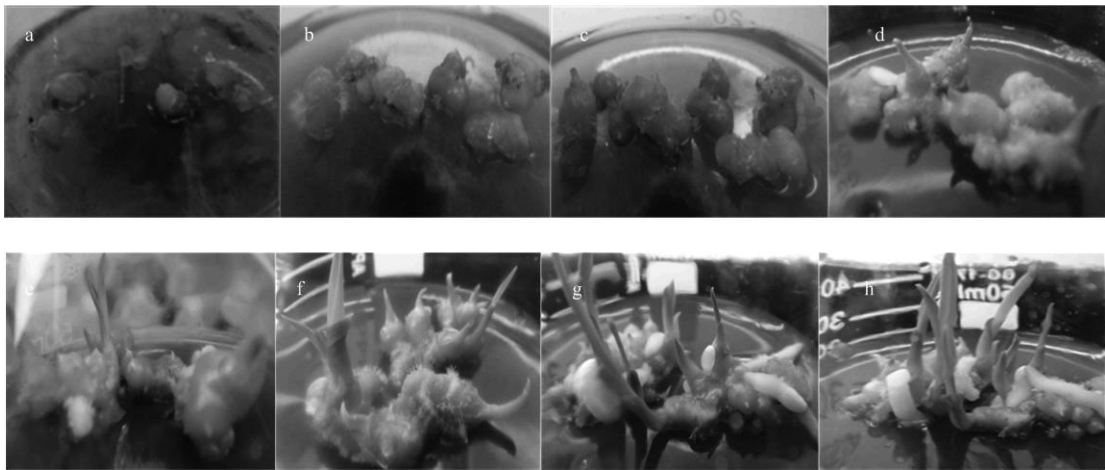
2 结果与分析

2.1 培养时间对大花蕙兰原球茎培养的影响

在不同的生长阶段,原球茎长势有很大的变化。

试验过程中发现, 刚接入的原球茎在第 1 周内并无明显变化, 10 d 后原球茎的切割面周边逐渐有淡黄色颗粒状原球茎形成; 培养 15 d 后原球茎切割面已被新长出的原球茎覆盖, 并且有成团生长的趋势, 此时, 因褐变死亡的原球茎块与增殖的原球茎块能明显区分。至 30 d 时, 颗粒状原球茎由淡黄色变为绿色, 原球茎团明显变大, 呈桑葚状, 表面有毛状物长出。培养至 45 d 时, 原球茎体积继续增大, 分

化的芽生根明显, 此时原球茎增殖率和分化率均达到 100%。培养至 60 d 时, 原球茎增殖速度放缓, 芽苗生长速度加快。继续培养至 75 d 观察, 原球茎增殖现象不明显, 但从生芽生长迅速, 分化速度增快, 根也迅速生长。不同培养时期原球茎生长状态见图 1。统计试验结果见表 1。



(a) 0 d; (b) 10 d; (c) 15 d; (d) 20 d; (e) 30 d; (f) 45 d; (g) 60 d; (h) 75 d

图 1 培养不同时间后的原球茎生长状态

Figure 1 PLB growth state after various incubation times

表 1 培养时间对大花蕙兰原球茎培养的影响

Table 1 Effect of culture time on *Cymbidium hybridum* PLB culture

培养时间/d	有效接种数/块	增殖系数	分化系数	生根系数
Culture time	Effective incubation number	Multiplication coefficient	Differentiation coefficient	Rooting coefficient
15	50	0.86±0.21 ^d	0±0 ^d	0±0 ^d
30	47	2.05±0.19 ^c	0.90±0.56 ^{cd}	0.67±0.22 ^c
45	45	4.08±0.14 ^b	1.62±0.61 ^c	1.50±0.18 ^c
60	41	4.59±0.17 ^a	2.72±0.10 ^b	2.50±0.07 ^b
75	32	4.72±0.09 ^a	4.08±0.28 ^a	3.84±0.22 ^a

表 2 基本培养基对大花蕙兰原球茎培养的影响

Table 2 Effect of basic medium on *Cymbidium Hybridum* PLB culture

基本培养基	有效接种数/块	增殖系数	分化系数	生根系数
Basic medium	Effective incubation number	Multiplication coefficient	Differentiation coefficient	Rooting coefficient
1/4 MS	42	5.23±0.13 ^a	2.90±0.11 ^b	2.56±0.07 ^b
1/2 MS	36	5.39±0.10 ^a	3.20±0.7 ^a	3.00±0.09 ^a
MS	45	4.59±0.17 ^b	2.72±0.10 ^c	2.50±0.07 ^b
2MS	38	4.66±0.21 ^b	2.60±0.05 ^c	2.32±0.04 ^c
3MS	36	4.26±0.08 ^c	2.28±0.09 ^d	2.47±0.06 ^b

表 3 糖浓度对大花蕙兰原球茎培养的影响

Table 3 Effect of sugar concentration of *Cymbidium Hybridum* PLB culture

糖类	有效接种数/块	增殖系数	分化系数	生根系数
Sugar	Effective incubation number	multiplication coefficient	differentiation coefficient	Rooting coefficient
	number	coefficient	coefficient	coefficient

20 g L ⁻¹ 蔗糖 Sucrose	40	4.26±0.06 ^d	2.38±0.04 ^c	2.56±0.19 ^a
30 g L ⁻¹ 蔗糖 Sucrose	41	4.47±0.05 ^{bc}	2.63±0.10 ^b	2.55±0.07 ^a
40 g L ⁻¹ 蔗糖 Sucrose	36	4.35±0.11 ^{cd}	2.51±0.05 ^{bc}	2.68±0.10 ^a
50 g L ⁻¹ 蔗糖 Sucrose	32	4.69±0.04 ^a	2.80±0.10 ^a	2.53±0.07 ^a
30 g L ⁻¹ 白砂糖 White sugar	39	4.55±0.08 ^b	2.88±0.05 ^a	2.63±0.08 ^a

由表 1 可知, 培养初期, 原球茎增殖速度缓慢, 增殖系数仅有 0.86, 且无芽分化。培养至 30 d 时, 原球茎增殖显著, 原球茎增殖系数是培养 15 d 时的 2.38 倍, 分化系数和生根系数仍保持较低。由 30 d 培养至 45 d 时, 原球茎增殖显著, 原球茎增殖系数是培养 30 d 时的 2.34 倍, 原球茎分化系数和生根系数也显著增加。而当继续培养至 60 d 时, 原球茎增殖速度减慢, 增殖系数为培养 45 d 时的 1.13 倍, 其分化系数和生根系数显著增加。当培养至 75 d 时, 原球茎增殖不明显, 增殖系数仅为培养 60 d 时的 1.03 倍, 但是分化系数和生根系数却仍然呈显著性增加, 达到最高。考虑到随着培养时间的延长后期污染增加, 故在 2.2~2.5 试验中均以培养 60 d 时统计试验结果。

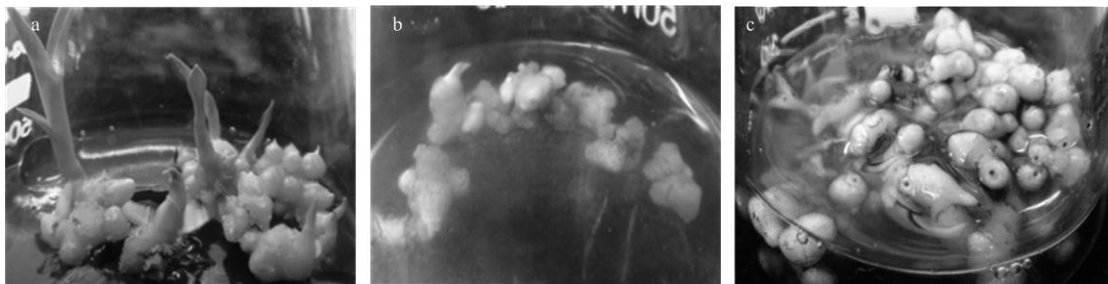
实验结果表明, 培养 15 d 至 60 d 期间原球茎增殖系数、分化系数、生根系数显著升高, 表明原球茎培养 2 个月内, 随着培养时间延长增殖越明显,

但培养 2 个月后, 原球茎增殖已不再呈显著性上升, 而分化与生根仍呈现显著性增加趋势。说明若需获得大量原球茎, 则培养时间应以 2 个月为适, 但若以获得试管苗为主, 则原球茎需培养 2 个月以上才能获得较好的分化系数。

2.2 基本培养基对大花蕙兰原球茎培养的影响

从表 2 可以看出, 在同样的培养条件下, 1/2MS 为基本培养基时原球茎增殖系数达到显著性最高, 即 5.39, 同时发现分化系数与生根系数同样达到显著性最高。而 3MS 为基本培养基时, 原球茎增殖系数明显减小, 其分化系数与生根系数也最低。

实验结果表明, 低浓度的无机盐即 1/2MS 有利于原球茎增殖, 也利于原球茎分化; 而高浓度的无机盐即 3MS 虽不利于原球茎生长, 但仍可维持原球茎存活状态。在实际生产中若需离体保存原球茎可考虑使用 3MS 为培养基质。



(a) 固体培养 Solid culture; (b) 液体静置培养 Static liquid culture; (c) 液体振荡培养 Rotating liquid culture

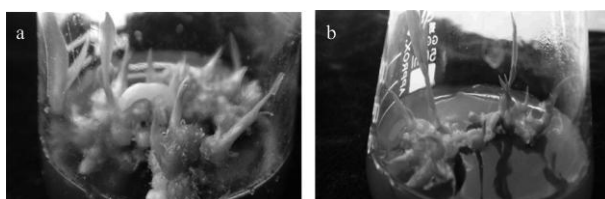
图 2 不同培养方式下的原球茎生长状况

Figure 2 PLB growth status in different culture conditions

表 4 培养方式对大花蕙兰原球茎培养的影响

Table 4 Effect of cultivation way on the culture of *Cymbidium Hybridum* PLB

培养方式 Cultivation form	有效接种数/块 Effective incubation number	增殖系数 Multiplication coefficient	分化系数 Differentiation coefficient	生根系数 Rooting coefficient	褐变率/% Browning percentage
固体培养 Solid culture	42	4.49±0.15 ^b	2.80±0.12 ^a	2.53±0.08 ^a	18.33±0.59 ^a
液体静置培养 Static liquid culture	36	2.14±0.05 ^c	0±0 ^c	0±0 ^c	3.39±0.13 ^c
液体振荡培养 Rotating liquid culture	45	10.79±1.17 ^a	0.73±0.07 ^b	0.46±0.04 ^b	8.84±0.04 ^b



(a) 片状切割培养的原球茎; (b) 整体剥离培养的原球茎
(a) PLB growth status under sheet cutting way; (b) PLB growth status under whole peeling way

图 3 两种切割方式下原球茎的生长状态

Figure 3 PLB growth status under two cutting ways

2.3 糖浓度大花蕙兰原球茎培养的影响

表 3 结果显示糖浓度的高低及种类对原球茎增殖系数与分化系数的影响有显著性差异,但对生根系数无显著性差异。其中 50 g L^{-1} 蔗糖处理较其他处理在原球茎增殖与分化生长上达到显著性最高,其增殖系数达到 4.69,分化系数达到 2.80。

实验结果表明,糖浓度的高低对大花蕙兰原球茎增殖与分化有显著性影响,蔗糖浓度越高,越利于原球茎增殖与分化,而浓度越低,却利于原球茎保存。即 20 g L^{-1} 蔗糖适于原球茎保存, 50 g L^{-1} 蔗糖适于原球茎增殖,但白糖作为碳源效果表现良

好,从经济节约成本角度出发,原球茎分化成苗应选用 30 g L^{-1} 白砂糖。

2.4 培养方式对大花蕙兰原球茎培养的影响

原球茎在固体培养基上增殖较慢,个体较小,颜色深绿,但分化试管苗效果好;液体振荡培养时原球茎增殖速度快,个体较大,色泽浅黄绿色,出芽生根的情况明显很少;在液体静置培养时,原球茎增殖缓慢,个体呈翠绿色,色泽介于固体培养与液体振荡培养的原球茎之间,新生出的原球茎呈淡黄色,几乎无出芽生根的情况。原球茎生长状态见图 2 (a) ~ (c)。统计数据见表 4。

表 5 切割方式对大花蕙兰原球茎培养的影响

Table 5 Effect of cutting way on the culture of *Cymbidium Hybridum* PLB

切割方式 Cutting way	有效接种数/块 Effective incubation number	增殖系数 Multiplication coefficient	分化系数 Differentiation coefficient	生根系数 Rooting coefficient	褐变率/% Browning percentage
横切 Cross cutting way	41	4.35 ± 0.05^c	2.80 ± 0.09^{ab}	2.62 ± 0.10^{bc}	16.72 ± 2.99^c
竖切 Vertical cutting way	43	4.47 ± 0.07^c	2.65 ± 0.04^{bc}	2.74 ± 0.11^{ab}	17.65 ± 2.18^c
片状切割 Sheet cutting way	35	5.42 ± 0.04^a	2.93 ± 0.05^a	2.85 ± 0.04^a	48.48 ± 3.77^a
整体剥离 Whole peeling way	44	3.91 ± 0.11^d	2.08 ± 0.06^d	1.78 ± 0.11^d	6.67 ± 0.85^d
“十”字切割 “Cruciate” cutting way	40	4.62 ± 0.04^b	2.57 ± 0.16^c	2.53 ± 0.65^c	28.33 ± 5.83^b

从表 4 可以看出,液体振荡培养的原球茎增殖系数显著性高于其他 2 组,达到 10.79,为固体培养的 2.40 倍,但是其分化系数与生根系数却显著性低于固体组。而固体培养原球茎分化系数与生根系数显著性高于另外 2 个处理。液体静置培养原球茎增殖缓慢,其分化系数与生根系数均为 0,且不易褐化。液体静置培养虽然不利于原球茎增殖,但是可以很好地控制增殖和分化速度并保持较低的褐变率,所以液体静置培养原球茎可以用于原球茎的保存。同时将液体静置培养的原球茎继续培养 4 个月后仍能保持较低的增殖系数和分化系数,且褐化较少,将此原球茎取出接种于固体培养基恢复正常培养,仍能保持正常的增殖和分化效果(实验数据未发表)。

实验结果表明,液体振荡培养有利于原球茎增殖,固体培养有利于原球茎分化成苗,而液体静置培养却利于原球茎离体保存。

2.5 切割方式对大花蕙兰原球茎培养的影响

5 种切割方式的原球茎进行切割培养 60 d 后长势差异较大,其中片状切割和整体剥离培养后的原球茎长势见图 3 (a) 和图 3 (b)。由表 5 可以看出,片状切割接种法对原球茎增殖与分化的促进效果均显著性高于其他切割法,其增殖系数达到 5.42,分

化系数与生根系数也分别达到 2.93 和 2.85,但其褐变程度也显著性高于其他试验组,达到 48.48%。整体剥离接种试验组褐变程度最低,褐变率仅有 6.67%,但其增殖系数、分化系数和生根系数却要显著性低于其他 4 个试验组。

实验结果表明,片状切割法利于原球茎的增殖与分化,建议在试管苗快速生产过程中使用;原球茎整体剥离接种培养不利于增殖与分化,且褐变最轻,可在原球茎离体保存中使用此法接种。

3 讨论

培养时间、无机盐浓度、糖浓度、切割方式和培养方式对大花蕙兰原球茎的增殖、分化与离体保存都有显著性影响。原球茎在增殖过程中以高增殖率和增殖系数为标准,而原球茎分化出试管苗的能力则以高分化率、分化系数及生根系数为判断标准,原球茎的离体保存则要求原球茎处于不生长、不分化、不褐变但又维持生长的状态,即以低增殖低分化低褐化为判断标准。所以,为了更好地测量原球茎的生长情况,本实验测量的指标采用了增殖率及增殖系数、分化率及分化系数、生根系数及褐变率。

无机盐的增加不利于原球茎的增殖,因此在原球茎增殖培养基中应适当降低无机盐的浓度,这与

谭甜等^[9]、陈小强等^[10]的研究结果相同,减少了大量元素的 1/2 MS 培养基对大花蕙兰原球茎进行增殖培养较为合适。而高浓度的无机盐即 3MS 培养基上原球茎表现为低分化和低生根,因此可用于原球茎保存。

本试验中采用液体振荡培养利于原球茎的增殖,这可能是因为通过振荡可以使原球茎与培养基充分接触,能更好地吸收营养物质从而促进生长。另一方面,在液体培养基中原球茎的褐变率要远远低于固体培养,可能是液体培养基中酚类物质不会发生堆积,会很容易地扩散开,由此减少褐变效应。固体培养基中能始终保持较高的苗分化率和生根率,所以若是要原球茎分化和生根时,固体培养明显好的多。但固体培养褐变发生严重,并且容易分化和生根,不过污染率能保持很低;液体振荡培养适于快速短时间内进行原球茎增殖,但是培养过程中继代次数频繁,由此产生的污染率较高,所以在需要对原球茎进行保存时,既能控制原球茎增殖和分化速度,又能保证褐变率和污染率较低,应是原球茎保存的理想方法。

5 种切割方式中片状切割法培养的原球茎增殖速度最快,可能是由于片状原球茎能有效地与培养基进行接触,从而大量促进原球茎增殖。但是片状切割培养原球茎的褐变程度也最高,而整体剥离培养的原球茎褐变率却低得多。褐变是由于切割时伤害了切口处的细胞,受伤细胞就分泌多酚氧化酶,在接触空气中的氧气后,氧化酚类物质形成有毒的醌类物质,切口处逐渐变成褐色或其他颜色,然后再扩散到培养基中,抑制其他酶活性,从而毒害整个外植体^[8]。由于片状切割导致大面积受伤细胞与空气直接接触,因此褐变严重。横切、竖切、“十”字切割三者的增殖速度差异不大,但是“十”字切割的原球茎褐变率要高于横切、竖切试验组,这也说明了创伤面积的增大能加重褐变。整体剥离的原球茎由于受伤面积较少,其增殖效果虽不如其他试验组,但却能保持极低褐变率,因此可以用于原球茎保存培养时的接种方式。

本试验中所探讨的是在常温条件下通过控制营养达到保存原球茎的方法,而王爱华等^[11]和赵喜亭

等^[12]报道了植物生长延缓剂多效唑(PP₃₃₃)、比久(B₉)、甘露醇等均可延缓试管苗生长,且存活率高,表明 PP₃₃₃、B₉、甘露醇等可用于材料的离体保存。周旭红等^[13]和赵喜亭等^[14]研究使用包埋玻璃化超低温保存法也可以获得理想的保存效果,表明超低温保存技术也是一种有效的种质资源离体保存的方法。但这些方法在大花蕙兰原球茎离体保存中效果如何需另行探讨。

参考文献:

- [1] 徐宏英,王芳,谢海军. 大花蕙兰的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(6): 534.
- [2] 赵海红,张晓申,王慧珍. 大花蕙兰组织培养快速繁殖的研究[J]. 安徽农学通报, 2006, 12(9): 62.
- [3] 刘丽锋,张健. 丛生芽-大花蕙兰快速繁殖的新途径[J]. 四川大学学报, 2004, 22(2): 150-152.
- [4] 胡燕梅,夏景波,方中明,等. 大花蕙兰快速繁殖体系的初步建立[J]. 江汉大学学报(自然科学版), 2015, 43(3): 248-252.
- [5] 马文卿,李青,刘燕. 大花蕙兰试管苗增殖过程中的褐化研究[J]. 中国农学通报, 2010, 26(7): 186-190.
- [6] 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.
- [7] 赵鹏,杨晖,梁巧玲. 几种因素对大花蕙兰组培的影响[J]. 浙江农业科学, 2009(2): 285-287.
- [8] 叶梅. 大花蕙兰组培培养的关键性技术研究[D]. 重庆:重庆大学, 2004.
- [9] 谭甜,季勤,张云峰,等. 不同培养基对大花蕙兰原球茎诱导与增殖影响的研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(21): 9867-9868; 9943.
- [10] 陈小强,马毅,孙宁,等. 大花蕙兰原球茎增殖条件研究[J]. 天津农学院学报, 2009, 16(1): 9-12.
- [11] 王爱华,文晓鹏. 半夏缓慢生长法保存及体细胞变异的ISSR检测[J]. 西北植物学报, 2012, 32(8): 1698-1073.
- [12] 赵喜亭,邵换娟,李明军,等. 植物生长延缓剂多效唑和比久对怀山药离体保存的影响[J]. 河南农业科学, 2012, 41(3): 120-124.
- [13] 周旭红,何艳,欧阳德爱,等. 玻璃化法超低温保存香石竹种质资源的研究[J]. 西南农业学报, 2011, 24(1): 248-252.
- [14] 赵喜亭,王苗,邵换娟,等. 山药种质包埋玻璃化超低温保存再生植株的稳定性分析[J]. 华北农学报, 2012, 27(1): 234-238.