

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201706020

引文格式: 宋莲, 杨俊旭, 刘丹, 等. 墨兰‘绿墨素’×大花蕙兰‘世界和平’F1代多倍体诱导初报[J]. 广西植物, 2018, 38(2):188-194
SONG L, YANG JX, LIU D, et al. Polyploid induction in *Cymbidium sinenthesse* ‘Lv mosu’×*Cymbidium hybridum* ‘Shijieheping’ F1 generation [J]. *Guihaia*, 2018, 38(2):188-194

墨兰‘绿墨素’×大花蕙兰‘世界和平’ F1代多倍体诱导初报

宋 莲, 杨俊旭, 刘 丹, 李枝林, 王玉英*

(云南农业大学 园林园艺学院, 昆明 650201)

摘 要: 该研究以墨兰‘绿墨素’(*Cymbidium sinense* ‘Lv mosu’)和大花蕙兰‘世界和平’(*Cymbidium hybridum* ‘Shijieheping’)杂交兰F1代原球茎为材料,采用浸泡法研究不同浓度秋水仙素和不同处理时间诱导植株加倍的效果。结果表明:0.03%秋水仙素处理72 h,诱导变异率为36%,死亡率为36%,诱导效果最佳;多倍体植株与二倍体植株相比,表现为植株根部木质化加剧,植株矮壮,叶色深绿,叶片变厚、变宽,叶面粗糙,少部分有双叶脉、叶尖开裂、叶片扭曲,生长缓慢等;且多倍体植株气孔大,气孔密度减小;经流式细胞仪分析,二倍体墨兰×大花蕙兰F1代植株的荧光通道值为88,多倍体植株荧光通道值是176,多倍体植株为四倍体。该研究结果为培育兰花新品种奠定了基础。

关键词: 墨兰‘绿墨素’×大花蕙兰‘世界和平’F1代,原球茎,秋水仙素,多倍体诱导

中图分类号: Q949.9, Q321 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2018)02-0188-07

Polyploid induction in *Cymbidium sinenthesse* ‘Lv mosu’× *Cymbidium hybridum* ‘Shijieheping’ F1 generation

SONG Lian, Yang Junxu, LIU Dan, LI Zhilin, WANG Yuying*

(*Institute of Landscape Plants, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China*)

Abstract: Technique of mutation breeding in protocorm of *Cymbidium sinense* ‘Lv mosu’×*C.hybridum* ‘Shijieheping’ F1 generation of hybrids was studied by means of tissue culture and chemical mutagenesis. The results showed that 0.03% colchicine treatment for 72 h, induced mutation rate was 36%, the mortality rate of 36%, the induced effect was the best; the polyploidy plant had more lignified roots than the diploid plants, the plants were dwarfed, the veins, leaves were dark green, the leaves were thickened and broadened, rough and double leaf twist, slow growth and so on, while the stomata and guard cells were larger and the stomatal density was decreased. DNA ploidy was analyzed by flow cytometry and the values of fluorescence channel were 88 in diploid plants and 176 in polyploid plants, the polyploid plants were tetraploid.

Key words: *Cymbidium sinense* ‘Lv mosu’×*Cymbidium hybridum* ‘Shijieheping’ F1 generation, protocorm, colchicine, polyploidy induction

收稿日期: 2017-10-11

基金项目: 云南省重点新产品开发项目(2012BB008);云南省昆明市科学技术局重点项目(2015-1-N-00984)[Supported by the Key New Product Development of Yunnan Province, China (2012BB008); the Key Program of Kunming Bureau of Science and Technology of Yunnan Province, China (2015-1-N-00984)]。

作者简介: 宋莲(1991-),女,云南玉溪人,硕士研究生,主要从事园林植物资源利用与创新研究,(E-mail)1164141920@qq.com。

*通信作者: 王玉英,博士,副教授,主要从事植物资源的利用和创新研究,(E-mail)wysxp@126.com。

墨兰 (*Cymbidium sinense*) 因其多在春节前后开放, 又名入岁兰、报岁兰、丰岁兰或拜岁兰, 是我国传统兰花之一, 有“花中四君子”之一的美称, 在国兰中花枝最高、株型最大。由于其花瓣香气浓郁, 色彩清脆如玉, 叶片独特飘逸, 象征着幽芳高洁的情操, 所以倍受广大花卉爱好者青睐, 是传统迎春年花佳品之一。大花蕙兰 (*C. hybridum*) 又名虎头兰、蝉兰、东亚兰、新美娘和喜姆比兰, 由于与蕙兰 (*C. faberi*) 较相似且花朵硕大 (钱张, 2007), 有重要的经济价值和观赏价值而命名为大花蕙兰, 现已成为五大盆栽兰花 (大花蕙兰、蝴蝶兰、石斛兰、卡特兰、中国兰) 之一, 是重要的切花兰花种类之一 (张宇欢等, 2016), 也是四大元宵盆花 (蝴蝶兰、大花蕙兰、红掌和凤梨) 之一 (冯秋霞和王庆平, 2007), 享有“兰花皇后”的美誉。在兰属花卉观赏方面, 人们对其优良性状的要求不断提高, 只有通过多途径新种质创制技术, 研究培育出新品种花卉, 才能满足市场需求。利用传统杂交育种技术, 获得墨兰×大花蕙兰 F1 代植株, 以期选育出具有国兰的香和洋兰的艳的兰花新品系 (张宇欢等, 2016); 同时通过化学方法进行多倍体诱导, 拟获得具有花大、抗性等特点的株系, 丰富新种质类型, 为兰花新品种选育奠定基础。

近年来, 通过多倍体育种技术, 相继获得了多种花卉新品种。多倍体植物具有较高抗性、叶片肥厚、花色艳丽、花期长、花瓣多等特点, 具备新奇变异特性, 观赏价值普遍提高, 在花卉育种中, 是不可或缺的种质资源。目前通过人工加倍技术获得多倍体已在甜菊、百合、党参枸杞、丹参、川白芷、牵牛属、金鱼草属和鸡冠花等植物上获得成功 (詹忠根和徐程, 2011; 张晓曼等, 2004)。关于兰属多倍体诱导有春兰 (林芬和邓国础, 1997)、沉香虎头兰 (李涵等, 2005)、墨兰×大花蕙兰的 F1 代 (张志胜等, 2005)、素心黄 (邓樱等, 2008) 等染色体加倍的报道。但尚未见有秋水仙素对墨兰‘绿墨素’和大花蕙兰‘世界和平’F1 代多倍体诱导研究报道。本研究在已建立的墨兰‘绿墨素’和大花蕙兰‘世界和平’F1 代再生体系基础上, 以其无菌原球茎为材料, 采用组织培养结合秋水仙素诱导

的方法, 旨在为培育兰花新品种奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

墨兰×大花蕙兰 F1 代组培原球茎由云南农业大学花卉研究所提供。

1.2 方 法

1.2.1 多倍体诱导 在无菌条件下, 选择转接培养 20 d 增殖的原球茎, 将其切成面积约为 1 cm^2 块状, 浸泡在浓度为 0、0.03%、0.05%、0.10% 的秋水仙素溶液中, 分别处理 24 h、48 h 和 72 h 后用无菌水冲洗 3~4 次, 用滤纸吸干水转接到 $1/2\text{MS}+6\text{-BA } 1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{NAA } 0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+80\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 香蕉泥培养基上。40 d 观察苗体的死亡情况, 90 d 观察苗体的变异情况, 并统计出与二倍体植株外观形态差异植株数量。培养条件: 光照强度为 $1\ 000\sim 1\ 800\text{ lx}$, 光照时间为 $12\sim 14\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$; 温度为 $22\sim 26\text{ }^\circ\text{C}$; pH 为 5.8。

1.2.2 多倍体分化培养 将植株外观形态变异植株, 接入 $1/2\text{MS}+6\text{-BA } 1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{NAA } 0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+80\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 香蕉泥增殖培养基中进行 3~5 次继代分化培养。培养条件: 光照强度为 $1\ 000\sim 1\ 800\text{ lx}$, 光照时间为 $12\sim 14\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$, 温度为 $22\sim 26\text{ }^\circ\text{C}$, pH 为 5.8。

1.2.3 多倍体鉴定

1.2.3.1 形态学观察 以已知二倍体形态为参照, 观察记录变异植株株高、叶片颜色、叶形等相关数据。所选测量植株均有 4 片完全展开的叶片, 取植株基部数起第 3 片叶为测量对象。用电子数显卡尺对植株的叶长、叶宽和株高进行测量。二倍体和变异植株各检测 20 株。

1.2.3.2 气孔鉴定 植物保卫细胞的长度是鉴定染色体倍性的一个指标 (范光年, 1990)。取二倍体植株和变异植株相同部位的叶片, 平均分成上、中、下三部分, 撕取叶片中部下表皮, 按常规制片方法进行制片, 于 BM-2000 显微镜下观察, 将 Canon 数码相机安装在显微镜上拍照, 用 Photo-shopCS3 测量气孔的大小和保卫细胞的大小, 并用

表 1 不同秋水仙素浓度和处理时间对墨兰×大花蕙兰 F1 代原球茎多倍体诱导的影响

Table 1 Effects of different colchicine concentrations and different treatment time on polyploidy induction

浓度 Concentration (%)	处理时间 Treatment time (h)	处理苗数 Number of treatment	死亡数 Number of death	死亡率 Rate of death (%)	变异数 Number of mutation	变异率 Rate of mutation (%)
0	24	50	0	0	0	0
	48	50	0	0	0	0
	72	50	0	0	0	0
0.03	24	50	9	18	13	26
	48	50	19	38	12	24
	72	50	18	36	18	36
0.05	24	50	21	35	13	26
	48	50	28	56	9	18
	72	50	29	58	13	26
0.10	24	50	23	46	16	32
	48	50	29	52	10	20
	72	50	26	58	8	16

表 2 墨兰与大花蕙兰杂交种二倍体和多倍体叶片形态学外形指标比较

Table 2 Comparison of morphological indexes between diploid and polyploidy

植株 Plant	叶片数 Number of leaf	株高 Plant height (mm)	叶长 Leaf length (mm)	叶宽 Leaf width (mm)	叶面积 Leaf area (mm ²)	叶形指数 Leaf index
二倍体 Diploid	6.00±0.86	75.42±11.92A	43.37±16.50A	4.50±1.33A	212.89±130.77	9.56±2.17A
变异株 Variant	6.20±0.70	50.53±16.39B	31.26±10.96B	7.01±2.60B	240.10±186.47	4.56±1.24B

注：其中大写字母不同表示差异极显著($P<0.01$)。下同。

Note: Lowercase letters represent extremely significant differences($P<0.01$). The same below.

椭圆面积近似公式($S = \text{长径} \times \text{短径}$)求气孔的面积(李雪娇等, 2010), 各测量 30 个气孔。

1.2.3.3 流式细胞术检测倍性 以二倍体墨兰×大花蕙兰 F1 代为对照, 对多倍体植株的倍性进行测定。每个样品重复 2 次, 按试剂盒 (Partec CyStain UV Precise P) 说明书流程操作。分别取待测二倍体植株和多倍体植株新鲜植物叶片 0.5 cm², 置于培养皿中取 400 μL 的细胞核裂解液 (CyStain UV Precise P, Partec GmbH) 加于植物叶片之上用刀片将叶片切碎: 横向充分切碎后, 纵向充分切碎裂解提取 1 min 将液体用 30 μm 滤网过滤至样品管中加入 1 600 μL 染液 (CyStain UV Precise P), 避

光 60 s 后, 样品进入流式细胞仪 (Partec CyFlow Space) 的蓝色荧光通道进行分析。

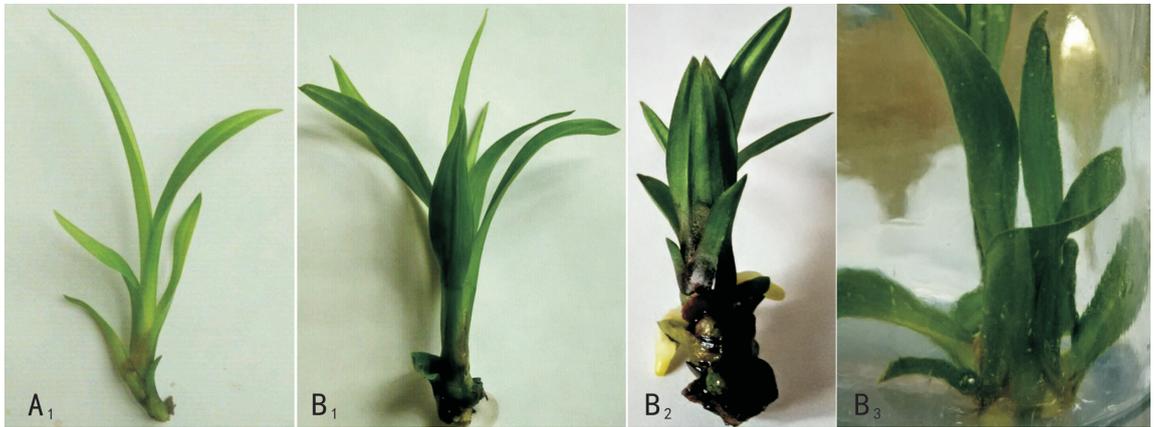
1.3 数据统计

采用 Excel 2010 进行数据记录整理, SPSS 2.0 进行方差分析, 使用 LSD 进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同浓度和不同处理时间条件下秋水仙素诱导效果

表 1 结果显示, 不同的秋水仙素浓度和处理时间对墨兰×大花蕙兰 F1 代原球茎多倍体诱导的影



注: A₁. 二倍体植株; B₁, B₂, B₃. 变异植株。

Note: A₁. Diploid plants; B₁, B₂, B₃. Mutation plants.

图 1 墨兰与大花蕙兰杂交种二倍体植株和变异植株外型比较

Fig. 1 Appearance comparison between diploid plants and mutation plants

表 3 墨兰与大花蕙兰杂交种二倍体与多倍体气孔、保卫细胞比较

Table 3 Comparison of stoma and guard cells between diploid and polyploidy

植株 Plant	长径 Long diameter (μm)	短径 Short diameter (μm)	面积 Area (μm^2)	保卫细胞长 Guard cell length (μm)	保卫细胞宽 Guard cell width (μm)
二倍体 Diploid	85.81 ± 14.37B	54.42 ± 14.93B	4 708.05 ± 1 618.02B	181.16 ± 21.80B	41.52 ± 10.01B
多倍体 Polyploidy	106.50 ± 18.74A	63.05 ± 7.98A	6 760.21 ± 1 630.19A	217.84 ± 30.11A	55.79 ± 8.34A

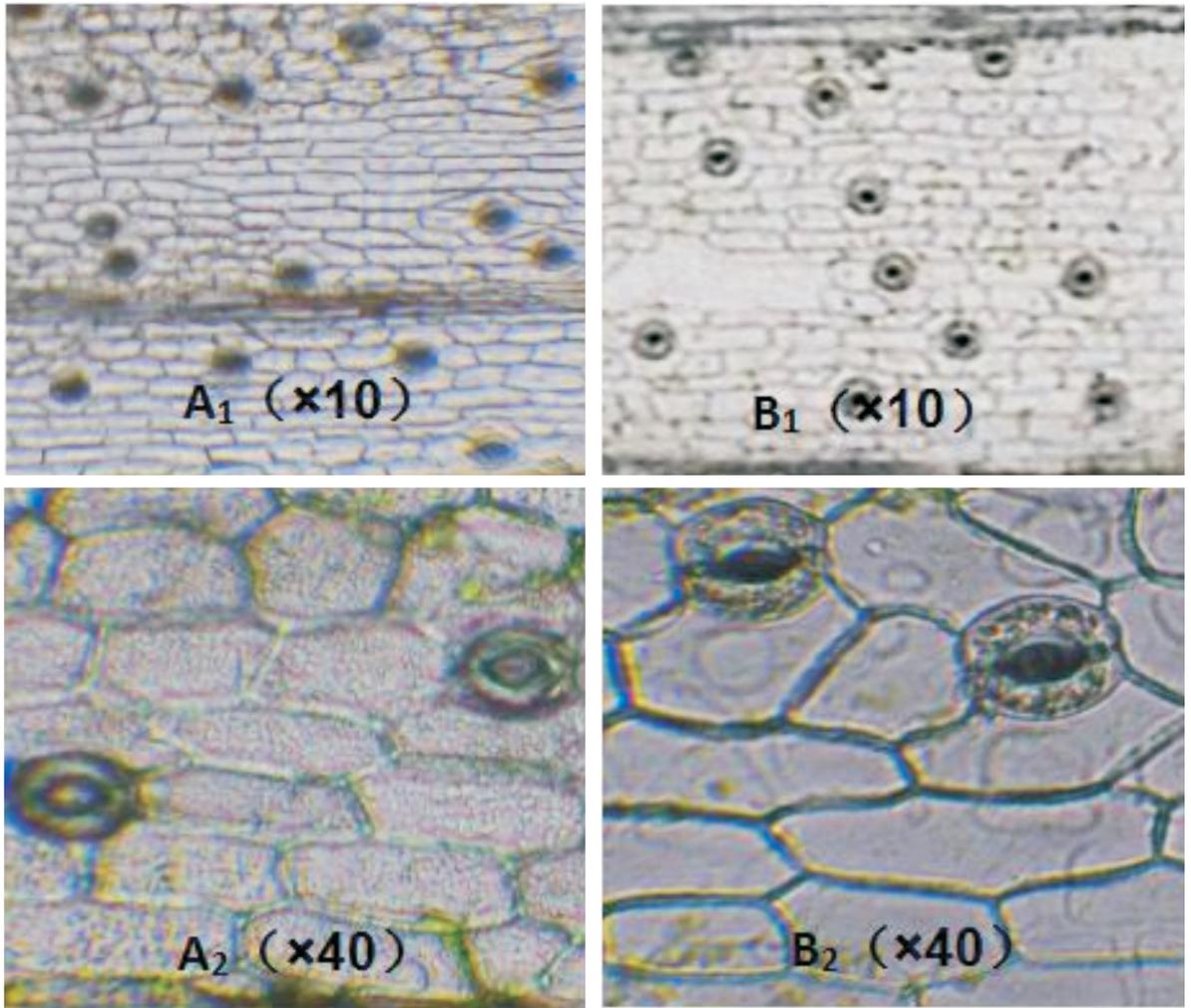
响差异较大。与对照组(即秋水仙素浓度为 0)相对比,在同一处理时间条件,秋水仙素浓度越高,原球茎死亡率越高,秋水仙素浓度为 0.05% 处理 72 h 和 0.10% 处理 48 h 的条件下,死亡率最高,达 58%;原球茎变异率在处理 24 h,随着秋水仙素浓度的增加,变异率出现上升趋势。综合上述,0.03% 秋水仙素处理 72 h,墨兰‘绿墨素’和大花蕙兰‘世界和平’杂交兰 F1 代原球茎变异率为 36%,死亡率为 36%,诱导效果最佳。

2.2 多倍体鉴定

2.2.1 形态学观察结果 从外观形态来看,多倍体植株(A₁)和原植株有明显的差别。主要表现为多倍体植株根部木质化,植株矮壮,叶色深绿,叶片变厚、变宽,叶面粗糙,少部分有双叶脉(B₁)、叶尖开裂(B₂)和叶片扭曲(B₃)等(图 1)。

由表 2 可知,多倍体植株的株高、叶长和叶形指数分别比原植株减少 33.00%、27.92%、52.30%,而叶宽和叶面积分别比原植株增加 55.78%、12.78% ($P < 0.01$)。这说明墨兰与大花蕙兰杂交种多倍体植株与二倍体植株在株高、叶长、叶宽和叶形指数上差异极显著,叶片形态学外形指标用来初步筛选变异植株是可行的。

2.2.2 气孔、保卫细胞鉴定 图 2 结果显示,多倍体植株(B₁、B₂)叶片的气孔比二倍体植株(A₁、A₂)大,且单位面积内的气孔数减少。气孔和保卫细胞的统计结果见表 3。从表 3 可以看出,墨兰与大花蕙兰杂交种变异植株的气孔长径、气孔短径、气孔面积、保卫细胞长和保卫细胞宽分别比二倍体植株增加 24.11%、15.86%、43.59%、20.25%、34.37% ($P < 0.01$)。表明所测数据均达差异极显



注: A_1 . 二倍体植株气孔($\times 10$); A_2 . 二倍体植株气孔($\times 40$); B_1 . 多倍体植株气孔($\times 10$); B_2 . 多倍体植株气孔($\times 40$)。

Note: A_1 . Diploid stoma($\times 10$); A_2 . Diploid stoma($\times 40$); B_1 . Polyploidy stoma($\times 10$); B_2 . Polyploidy stoma($\times 40$).

图 2 墨兰与大花蕙兰杂交种二倍体与多倍体气孔比较

Fig. 2 Comparison of stoma between diploid plants and polyploidy plants

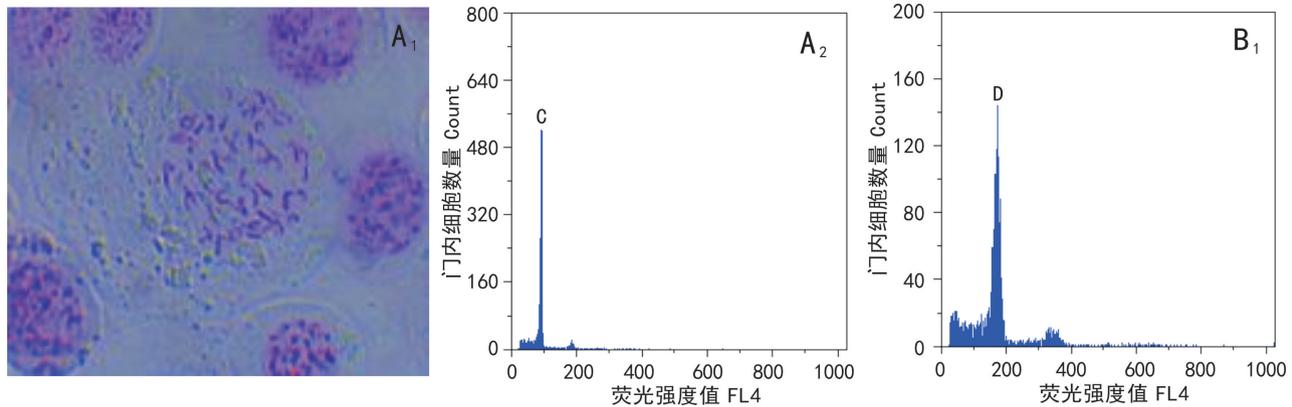
著水平,气孔大小和保卫细胞大小可以作为鉴定变异植株的参数。

2.2.3 倍性鉴定 细胞核 DNA 含量的比较,一般以 G0-G1 期细胞核 DNA 含量 $2C$ 相对值的高低来表示。C 峰二倍体墨兰 \times 大花蕙兰植株(图 3: A_2)、D 峰是多倍体植株(图 3: B_1)。其中二倍体墨兰 \times 大花蕙兰植株的荧光通道值为 88,多倍体植株荧光通道值是 176。已知墨兰 \times 大花蕙兰 F1 代植株为二倍体($2n=40$)(图 3: A_1),结合图与荧光通道值即可看出墨兰 \times 大花蕙兰多倍体植株为 $4x$ 。因此,经流式细胞仪分析,墨兰 \times 大花蕙兰多倍体植

株为四倍体。

3 讨论

诱导材料在很大程度上决定着植物的诱变效果,所以选择合适的诱导材料至关重要。由于秋水仙素只能作用于有丝分裂时期的细胞,故选取的诱导材料必须是幼嫩、分裂旺盛的组织或器官。目前用于多倍体诱导的植物体材料主要有原球茎、丛生芽、茎尖、愈伤组织、种子和幼叶等。在兰科植物中,类原球茎(proto-corm like-body, PLB)被



注: A_1 . 二倍体植株染色体图; A_2 . 二倍体植株出峰效果图; B_1 . 四倍体的出峰效果图。

Note: A_1 . Chromosome map of diploid plants; A_2 . Peak values of diploid plants; B_1 . Peak values of tetraploid plants.

图 3 墨兰与大花蕙兰杂交种二倍体、四倍体的染色体图和出峰效果图

Fig. 3 Chromosome map, peak values of diploid plants and tetraploid plants

认为起源于单细胞,相当于双子叶植物体胚。《植物生物学词典》(1994 年)中将之定义为植株基部由一团尚未分化的薄壁细胞组成的上端有顶端生长点和叶原基,下端有很多不定根、初具球茎形态的球状体,是兰科植物的一种再生方式。目前大量研究表明通过诱导 PLBs 可以获得更高的植株诱导率和繁殖系数(李茂娟等,2012;曾桢迦等,2014;朱根发等,2004;Jatd et al, 2006;Le et al, 2004)。此外,由于兰科植物形态特征及繁殖方式的限制,对兰花进行多倍体育种通常采用化学诱变结合组织培养方式,即在组织培养阶段对原球茎或不定芽进行处理,来达到染色体加倍的目的(李智等,2010)。本实验以墨兰‘绿墨素’× 大花蕙兰‘世界和平’杂交兰的原球茎为诱导材料,成功诱导出四倍体植株,说明原球茎为墨兰‘绿墨素’× 大花蕙兰‘世界和平’杂交兰多倍体诱导的有效材料。

秋水仙素主要是对分裂期的细胞产生作用,会对纺锤丝的效果产生抑制,所以可以得到染色体加倍细胞(李涵等,2005)。在兰花多倍体育种中,秋水仙素处理浓度通常在 0.001%~5%之间,具体地视兰花的种类及处理方法而定(李智等,2010)。尹翠翠等(2010)在探讨了杂交兰四倍体之后发现,通过 0.10%浓度的秋水仙素处理 2 d 后

能够获得最佳变异效果,其变异率为 36%。王玉英等(2014)对野生黄蝉兰多倍体诱导研究表明以 0.06%秋水仙素处理 72 h 的诱导效果最佳,最佳变异率高达 62.5%。Kim et al(1997)用 0.01%和 0.05%秋水仙素处理寒兰根状茎,处理 1 周根状茎的存活率分别为 82.3%和 57.2%,在再生植株中,0.01%处理 2 周、0.05%和 0.1%处理 1 周的多倍体($2n:66\sim 80$)诱导率分别为 4.5%、5.2%和 6.7%。杂交兰茎尖的染色体加倍,生长速度就会降低,对培养基营养进行调节,并改变生长调节剂浓度,对植株激素进行调控,逐渐降低 NAA 的浓度至 $0.10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,使其正常生长,获得了株型粗壮,叶片粗糙宽厚的杂交兰四倍体无菌苗(杨丽娟等,2008)。本试验采用 0.03%~0.1%的秋水仙素对杂交兰原球茎的诱导均有效,0.03%处理 72 h 的条件下墨兰与大花蕙兰杂交种的变异率最高,获得杂交种四倍体材料,研究结论与前人一致。

参考文献:

- DENG Y, ZHOU Y, CHEN JM, 2008. Methods of polyploid induction of *Cymbidium* with colchicine [J]. Subtrop Plant Sci, 37(2): 38-40. [邓樱, 周晔, 陈继敏, 2008. 秋水仙素诱导兰属“素心黄”多倍体的方法研究 [J]. 亚热带植物科学, 37(2): 38-40.]

- FAN GN, 1990. Is the guard cell of plants related to chromosome ploidy? [J]. *Plant J*, (1):22-23. [范光年, 1990. 植物的保卫细胞与染色体倍性有关吗? [J]. *植物杂志*, (1):22-23.]
- FENG QX, WANG QP, 2007. Comprehensive evaluation for market value of *Cymbidium hybridus* [J]. *J Shanghai Jiaotong Univ (Agric Sci Ed)*, 25(6):595-599. [冯秋霞, 王庆平, 2007. 大花蕙兰商品价值的综合评价 [J]. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 25(6):595-599.]
- JATD S, CHAN MT, CHAI ML, et al, 2006. Priming abiotic factors for optimal hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae) PLB and callus induction, plantlet formation, and their subsequent cytogenetic stability analysis [J]. *Sci Hortic*, 109(4):368-378.
- KIM M, WON JY, SONG C, et al, 1997. Polyploid induction of *Cymbidium kanran* by treatment of colchicine *in vitro* [J]. *J Hortic Sci*, 39(1):73-76.
- LIN F, DENG GC, 1997. Study on induction of mutation of *Cymbidium goeringii* [J]. *J Hunan Agric Univ*, 3(4):39-43. [林芬, 邓国础, 1997. 春兰人工诱变的研究 [J]. *湖南农业大学学报*, 3(4):39-43.]
- LI H, LONG CL, ZHENG SX, et al, 2005. Polyploid induction of *Cymbidium iridioides* and its biological characteristics [J]. *Acta Hortic Sin*, 32(5):853-853. [李涵, 龙春林, 郑思乡, 等, 2005. 沉香虎头兰多倍体诱导及其鉴定 [J]. *园艺学报*, 32(5):853-853.]
- LI XJ, LI ZL, HUANG LP, 2010. Induction and identification of polyploids in wild *Cymbidium lowianum* [J]. *Chin Agric Sci Bull*, (13):261-266. [李雪娇, 李枝林, 黄丽萍, 2010. 野生碧玉兰多倍体诱导及鉴定 [J]. *中国农学通报*, (13):261-266.]
- LI MJ, TAN BT, DENG SH, et al, 2012. Aseptic sowing and tissue culture of *Cymbidium hybridum* [J]. *Hunan For Sci Technol*, 39(3):26-29. [李茂娟, 谭柏韬, 邓少华, 等, 2012. 大花蕙兰无菌播种与组培快繁技术研究 [J]. *湖南林业科技*, 39(3):26-29.]
- LE VTH, TAKAMURA T, TANAKA M, 2004. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium orchid* [J]. *Plant Sci*, 166(6):1443-1449.
- LI Z, YANG GS, YIN JM, 2010. Research advances on orchid polyploid breeding [J]. *Chin J Trop Agric*, (12):34-38. [李智, 杨光穗, 尹俊梅, 2010. 兰花多倍体育种研究进展 [J]. *热带农业科学*, (12):34-38.]
- QIAN ZH, 2007. Research on rapid propagation technology of tissue culture of *Cymbidium hybridus* [J]. *Mod Agric Sci Technol*, 17:16. [钱张, 2007. 大花蕙兰组培快繁技术研究 [J]. *现代农业科技*, 17:16.]
- WANG YY, LI GH, LI ZM, et al, 2014. Preliminary study on polyploid induction in *Cymbidium iridioides* D. Don [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 42(4):132-134. [王玉英, 李光宏, 李志敏, 等, 2014. 野生黄蝉兰多倍体诱导初报 [J]. *江苏农业科学*, 42(4):132-134.]
- YIN CC, ZHANG Y, ZHANG JH, et al, 2010. Tetraploid induction by colchicine and identification in *Cymbidium interspecific hybrids* [J]. *J Nucl Agric Sci*, 24(3):518-521. [尹翠翠, 张燕, 张景华, 等, 2010. 秋水仙素诱导杂交兰四倍体及倍性鉴定 [J]. *核农学报*, 24(3):518-521.]
- YANG LJ, GAO SP, ZOU ZL, 2008. Primary studies on polyploid induction of *Cymbidium hybrid in vitro* [J]. *Chin Seed Indus*, (12):60-61. [杨丽娟, 高素萍, 邹宗兰, 2008. 秋水仙素离体诱导大花蕙兰多倍体试验 [J]. *中国种业*, (12):60-61.]
- ZHANG YH, LI XY, WANG YY, et al, 2016. Effect of different LED light qualities on the growth and the physiological indices of F1 of *Cymbidium sinense* × *Cymbidium hybridum* [J]. *Chin J Trop Agric*, 36(9):1-6. [张宇欢, 李夏媛, 王玉英, 等, 2016. LED不同光质对墨兰×大花蕙兰F1代组培苗生长及生理指标的影响 [J]. *热带农业科学*, 36(9):1-6.]
- ZHAN ZG, XU C, 2011. Study on colchicoid of dendrobium of ficinale induced by colchicines [J]. *J Zhejiang Univ (Sci Ed)*, 38(3):321-325. [詹忠根, 徐程, 2011. 秋水仙素诱导铁皮石斛多倍体研究 [J]. *浙江大学学报(理学版)*, 38(3):321-325.]
- ZHANG ZS, XIE L, XIAO AX, et al, 2005. Effects of colchicine treatment on growth, differentiation and mutagenesis of protocorm-like-body (PLB) of orchid [J]. *Acta Agric Nucl Sin*, 19(1):19-23. [张志胜, 谢利, 萧爱兴, 等, 2005. 秋水仙素处理兰花原球茎对其生长和诱变效应的影响 [J]. *核农学报*, 19(1):19-23.]
- ZENG ZJ, LI F, JIA H, et al, 2014. Optimization of conditions for rapid propagation of *Cymbidium hybridum* protocorm [J]. *J Yibin Univ*, (12):118-120. [曾桢迦, 李芳, 贾黄, 等, 2014. 大花蕙兰原球茎快速繁殖条件的优化 [J]. *宜宾学院学报*, (12):118-120.]
- ZHU GF, CHEN ML, LUO ZW, et al, 2004. Induction and propagation of hybrid protocorm like-body of crosses between *Cymbidium sinense* and *Cymbidium hybridum* [J]. *Acta Hortic Sin*, 31(5):688-690. [朱根发, 陈明莉, 罗智伟, 等, 2004. 墨兰与大花蕙兰种间杂种原球茎的诱导及增殖研究 [J]. *园艺学报*, 31(5):688-690.]
- ZHANG XM, ZHOU HJ, ZHANG QX, et al, 2004. The study on flora polyploid breeding [J]. *Hebei J For Orch Res*, 19(3):288-293. [张晓曼, 周怀军, 张启翔, 等, 2004. 花卉多倍体育种研究 [J]. *河北林果研究*, 19(3):288-293.]