

何碧珠,杨超,朱萍,等.金线莲多倍体诱导研究[J].江苏农业科学,2016,44(9):70-74.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.020

# 金线莲多倍体诱导研究

何碧珠<sup>1</sup>,杨超<sup>1</sup>,朱萍<sup>1</sup>,蒋继宏<sup>2</sup>

(1.福建农林大学园艺学院,福建福州 350002; 2.江苏师范大学/江苏省药食植物生物技术国家重点实验室培育点,江苏徐州 221116)

**摘要:**采用秋水仙素溶液浸泡法、涂抹法、加入培养基法诱导金线莲多倍体,研究不同秋水仙素浓度、处理时间、处理方式金线莲多倍体的诱导效果,并将诱变植株进行繁殖。结果表明:以 700 mg/L 秋水仙素加入培养基处理 15 h 诱变率最高,达 53.00%;以 500 mg/L 浸泡法处理 24 h,诱导效果最佳,诱变率为 51.67%;以 700 mg/L 涂抹法涂抹在金线莲茎节处诱导效果较好,诱变率为 35.00%;3 种多倍体诱导的效果顺序为加入培养基法 > 浸泡法 > 涂抹法。

**关键词:**金线莲;多倍体;秋水仙素;诱变率

**中图分类号:** S567.23<sup>+</sup>9.043 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0070-05

金线莲(*Anoectochilus roxburghii*)是我国传统珍贵药材,属兰科(Orchidaceae)开唇兰属(*Anoectochilus*)植物<sup>[1]</sup>。由于人为掠夺性采挖,金线莲生境遭受严重破坏,加上金线莲自身繁殖特性,种子细小,发育不完全,自然状态下萌发率和繁殖率低等特点,野生金线莲存量已越来越少<sup>[2-5]</sup>。多倍体植物具有营养器官大、抗逆性强、药用活性成分含量高等特性<sup>[6]</sup>。金线莲组织培养方面报道虽多<sup>[7-13]</sup>,但尚未见将一次性成苗培养技术应用于多倍体植株诱导方面应用的报道。本研究运用秋水仙素对一次性成苗培养植株进行多倍体诱导,

以期作为多倍体金线莲工厂化生产提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

将在福建省永泰藤山自然保护区赤壁景区内采集的野生苗一次性成苗培养的第二代瓶苗作为试验材料,选择生长一致、茎部粗壮的植株进行试验处理。

### 1.2 方法

采用 3 种方法进行多倍体诱导试验,每种方法均设置若干组处理时间和浓度梯度,研究不同取材部位(茎段、茎尖)、处理方法、秋水仙素浓度及处理时间对多倍体诱变率的影响。  
1.2.1 秋水仙素溶液浸泡法 选取生长一致、茎节粗壮组培瓶苗,在无菌条件下将瓶苗植株切成长 1~2 cm 的带节茎段,放入经过高压灭菌浓度为 300、500、700 mg/L 的秋水仙素溶液分别浸泡 10、20、30、40、50、60 h,每个处理重复 3 次,以无菌水浸泡处理材料为对照(CK)。将各处理后材料在超净工

收稿日期:2016-03-29

基金项目:中央财政林业科技推广示范项目(编号:[2014]YC14号)。  
作者简介:何碧珠(1960—),女,福建福州人,高级实验师,主要从事园艺植物生物技术及遗传资源研究。E-mail:954196684@qq.com。

通信作者:蒋继宏,教授,主要从事药食植物生物技术研究。Tel:(0516)83403515;E-mail:jhjiang@jsnu.edu.cn。

在小麦组织培养过程中,不同种类和含量的激素组合在愈伤组织诱导和再生植株的获得方面具有不同的效果。本研究通过探索小麦组织培养的最适条件,并初步建立起较为稳定的小麦再生体系,本试验结果对于今后小麦遗传转化体系的建立和品质的改良具有重要的理论和现实意义。

## 参考文献:

- [1] Chin J C, Scott K J. Studies on the formation of roots and shoots in wheat callus cultures[J]. Ann Bot, 1997, 41: 473-481.
- [2] 覃建兵,何光源.不同小麦基因型及其不同外植体离体培养研究初探[J].华中农业大学学报,2001,20(6):522-527.
- [3] 李娜,焦滨,谷运红,等.小麦组织培养研究进展[J].河南农业科学,2005(8):11-15.
- [4] Delporte F, Mostade O, Jacquemin J M. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2001, 67: 73-80.
- [5] 李根英,黄承彦,隋新霞,等.小麦不同外植体的组织培养效果研究[J].麦类作物学报,2006,26(1):21-25.
- [6] 何勇刚,林刚,刘曼西,等.小麦不同生理状态的幼穗和幼胚盾

- 片与诱导分化能力关系的研究[J].武汉植物学研究,2001,19(5):363-368.
- [7] 李新玲,曲敏,闫玉清,等.影响小麦成熟胚培养及植株再生因素的研究[J].植物研究,2005,1(1):49-52.
- [8] Machii H, Mizuno H, Hirabayashi T, et al. Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from anther and immature embryo cultures[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1998, 53: 67-74.
- [9] He G Y, Rooke L, Cannell M, et al. Current status of transformation in bread and durum wheats and modifications of gluten quality[J]. Acta Agronomica Hungarica, 1998, 46(4): 449-462.
- [10] 毕瑞明,王洪刚.小麦成熟胚的组织培养[J].中国农学通报,2007,23(2):53-57.
- [11] 陶丽莉,殷桂香,叶兴国.小麦成熟胚组织培养及遗传转化研究进展[J].麦类作物学报,2008,28(4):713-718.
- [12] Patnaik D, Khurana P. Genetic transformation of Indian bread (*T. aestivum*) and pasta (*T. durum*) wheat by particle bombardment of mature embryo-derived calli[J]. BMC Plant Biology, 2003, 3(5):1-11.

作台上用无菌水冲 3~4 遍后,接种在一次性成苗培养基 MS + 1 mg/L 6-BA + 1.5 mg/L NAA + 150 g/L 土豆 + 3% 蔗糖 + 0.65% 琼脂 + 0.2% 活性炭上培养,将茎节和顶芽分开培养。培养条件:温度(23±2)℃,光照强度 1 000~1 500 lx,光照时间 10 h/d。每瓶接种 4 个茎段或 4 个顶芽,每个处理接种 5 瓶,每个处理重复 3 次。

1.2.2 培养基添加 选取生长一致、茎节粗壮组培瓶苗,在无菌条件下将瓶苗切成长 1~2 cm 的带节茎段,接种到分别添加 300、500、700 mg/L 秋水仙素溶液的上述一次性成苗培养基上培养的植株,培养时间分别为 5、10、15、20、25、30 d,以不加秋水仙素培养基为对照(CK),将处理后的材料转入不含秋水仙素的培养基中继续培养,将茎节和顶芽分开培养,培养条件同“1.2.1”节。每瓶接种 4 个茎段或 4 个顶芽,每个处理接种 5 瓶、重复 3 次。

1.2.3 秋水仙素蘸在材料处 选取生长一致、茎节粗壮组培瓶苗,在无菌条件下将瓶苗切成长 1~2 cm 的带节茎段,在超净工作台中用无菌棉签蘸上经高压灭菌的秋水仙素溶液,涂抹在茎节处,再将涂抹过秋水仙素的材料接种到“1.2.1”节所述一次性成苗培养基上培养的植株,将茎节和顶芽分开培养,秋水仙素溶液浓度分别为 300、500、700 mg/L,共 3 个处理。每瓶接种 4 个茎段或 4 个顶芽,每个处理接种 5 瓶、重复 3 次,以无菌水处理材料为对照(CK)。

### 1.3 多倍体鉴定

1.3.1 形态学观察 从植株大小以及叶片大小、颜色、厚度等形态特征上比较经过秋水仙素处理的植株与对照植株的差异,从而初步筛选出诱导植株。分别测量培养 3、5 个月二倍体苗和四倍体苗叶长、叶宽、叶厚、茎直径、株高。

选择生长一致的诱导植株和对照植株,分别撕取叶片下表皮,置于载玻片上制成临时装片,在日本产 Olympus 倒置式生物显微镜下观察。在 10×10 倍镜下,随机选择 10 个视野,

计算每个视野中的气孔数目;在 10×40 倍镜下,随机选择 10 个视野,测量视野中的气孔长度、宽度。

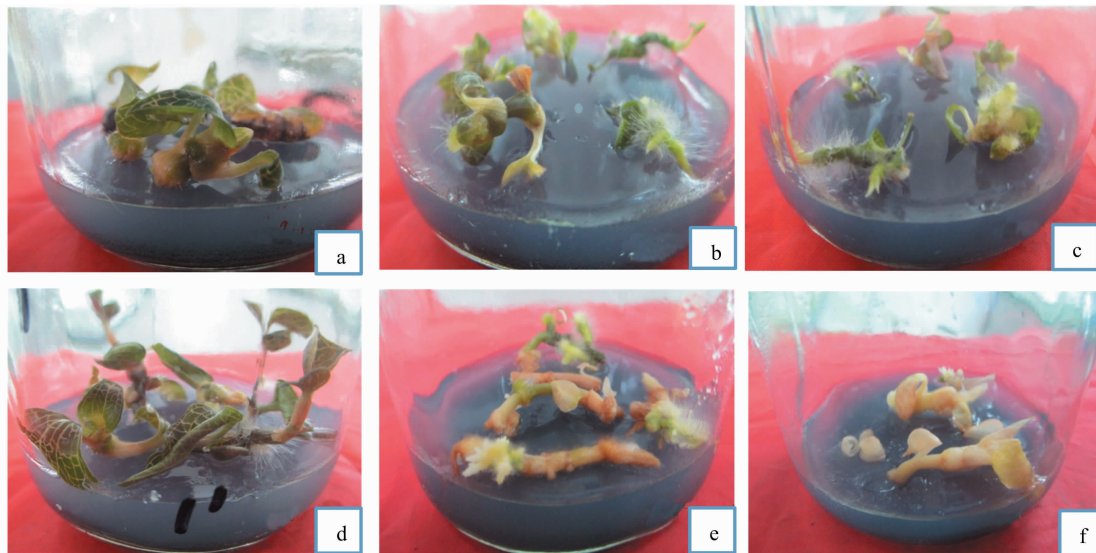
1.3.2 染色体观察 对外部形态和气孔明显变大的植株,采用改良苯酚品红染色法进行根尖染色体鉴定。在 08:00—10:00 切取植株根尖,先置于 4℃ 冰箱中预处理 8 h,后用卡诺固定液(冰乙酸:乙醇=1:3,V:V)在室温下固定 18 h,蒸馏水漂洗 2~3 次后,用 90%、80%、70% 乙醇溶液各浸泡 30 min,再用蒸馏水漂洗 2~3 次,用 1 mol/L HCl 溶液在 60℃ 水浴中解离处理 30 min,解离好的根尖用蒸馏水洗净并吸干水分,用改良苯酚品红溶液染色 5 min 压片,将压片置于显微镜下镜检观察染色条数。

## 2 结果与分析

### 2.1 金线莲多倍体诱导研究

2.1.1 浸泡处理对金线莲多倍体离体诱导效果 不同浓度秋水仙素溶液浸泡处理后培养 1 个月时,茎节处未出现芽萌动现象,顶芽没有伸长生长。培养 2 个月后,40% 茎节间开始膨胀,腋芽发白,逐渐突起并伸长,抽出主芽,随后分化出二级、三级侧芽;5% 生长出畸形芽;一部分出现褐化现象;一部分出现玻璃化现象;一部分刚开始有芽分化出来,随后逐渐萎蔫死亡。与对照相比,处理 2、12 h 对材料抑制作用不明显,芽长势好,侧芽多,部分处理长出丛生芽;处理 24、36、48、60 h 对材料生长抑制作用明显,茎段芽萌动缓慢,生长慢,侧芽较少。

比较秋水仙素溶液对茎节、顶芽生长的影响,茎节较顶芽容易分化出侧芽,顶芽未分化出芽,主要表现为伸长生长,生长较快。试验发现,秋水仙素对顶芽毒害作用比对茎节严重,顶芽生长受到明显抑制,顶芽膨大后,部分生长停止并逐渐死亡,相同秋水仙素溶液浓度、相同处理时间下,顶芽成活率明显低于茎节(图 1)。



a—茎段培养 15 d; b—顶芽培养 15 d; c—茎段培养 30 d; d—顶芽培养 30 d; e—茎段培养死亡情况; f—顶芽培养死亡情况

图1 秋水仙素处理下金线莲茎段、顶芽生长情况

由表 1 可知,材料成活率随着秋水仙素溶液浓度升高、处理时间延长而逐渐降低,尤其以 700 mg/L 秋水仙素溶液处理 60 h 下,材料成活率最低,仅为 13.33%。相同秋水仙素浓度

下,随着处理时间延长,材料成活率也逐渐降低,300 mg/L 秋水仙素溶液处理 2 h 下材料成活率为 96.67%,而处理 60 h 时材料成活率降至 35.00%;500 mg/L 秋水仙素溶液处理 2 h

下材料成活率为 93.33%,而处理 60 h 时材料成活率降至 25.00%;700 mg/L 秋水仙素溶液处理 2 h 下材料成活率为 88.33%,而处理 60 h 时材料成活率降至 13.33%。相同处理时间下,随着秋水仙素溶液浓度升高,材料成活率显著降低。

由表 1 可知,不同浓度秋水仙素溶液处理不同时间后,对四倍体诱变率的影响有显著差异。在相同秋水仙素浓度下,随着处理时间延长,四倍体诱变率先升高后降低。300 mg/L 秋水仙素溶液处理 2 h,诱变率为 0%,而其他时间处理下诱变率为 3.33%~48.33%,尤其是处理 36 h 下诱变率最高,为 48.33%。500 mg/L 秋水仙素溶液处理 2 h,诱变率为 0%,而其他时间处理下诱变率为 8.33%~51.67%,尤其是处理 24 h 下诱变率最高,为 51.67%。700 mg/L 秋水仙素溶液处理下诱变率为 8.33%~50.00%,尤其是处理 12 h 下诱变率最高,为 50.00%。秋水仙素对试验材料有一定伤害,随着秋水仙素浓度升高和处理时间延长,伤害程度加重,导致死亡率升高,因此四倍体诱变率反而降低。

表 1 秋水仙素浸泡对金线莲发生诱变的影响

秋水仙素浓度 (mg/L)	处理时间 (h)	处理数量 (个)	成活数量 (个)	成活率 (%)	四倍体数量 (个)	诱变率 (%)
300	2	60	58	96.67a	0	0m
	12	60	55	91.67c	2	3.33l
	24	60	46	76.67f	15	25.00g
	36	60	40	66.67g	29	48.33b
	48	60	35	58.33i	20	33.33d
	60	60	21	35.00l	11	18.33h
500	2	60	56	93.33b	0	0m
	12	60	50	83.33e	5	8.33k
	24	60	40	66.67g	31	51.67a
	36	60	35	58.33i	20	33.33d
	48	60	29	48.33j	16	26.67f
	60	60	15	25.00m	9	15.00i
700	2	60	53	88.33d	8	13.33j
	12	60	24	40.00k	30	50.00a
	24	60	36	60.00h	25	41.67c
	36	60	21	35.00l	18	30.00e
	48	60	13	21.67n	11	18.33h
	60	60	8	13.33o	5	8.33k
CK		60	58	96.67a	0	0m

注:同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。下表同。

2.1.2 加入培养基法对多倍体离体诱导的效果 与对照相比,处理 5 d 对材料抑制作用不明显,芽长势好,侧芽多,部分长出丛生芽;处理 10~30 d 对材料生长抑制作用明显,茎段萌动缓慢,侧芽较少,顶芽生长慢。

将秋水仙素加入培养基中对茎节和顶芽生长产生一定影响,茎节较顶芽容易分化出侧芽,顶芽未分化出芽,主要表现为伸长生长,生长较快。观察发现,将秋水仙素加入培养基中对茎段毒害作用比对顶芽严重,茎段萌动受到明显抑制,部分不萌动并逐渐死亡,相同秋水仙素浓度、处理时间下,茎段成活率明显降低,这与浸泡处理结果相反。

由表 2 可知,将材料接种到加入不同浓度秋水仙素的培养基,培养时间对材料死亡率产生影响。随着秋水仙素溶液浓度升高、培养时间延长,材料死亡率随之升高,尤其以 700 mg/L 秋水仙素处理 30 d,材料死亡率最高,为 80.00%。低

浓度秋水仙素下,延长处理时间,材料死亡率保持在相对较低水平;高浓度秋水仙素下,延长处理时间,材料死亡率升高很快。

表 2 加入不同浓度秋水仙素对金线莲诱变率的影响

秋水仙素浓度 (mg/L)	处理时间 (d)	处理数量 (个)	死亡数量 (个)	死亡率 (%)	四倍体数量 (个)	诱变率 (%)
300	5	60	0	0l	0	0m
	10	60	2	3.33k	2	3.33l
	15	60	3	5.00j	3	5.00k
	20	60	6	10.00i	5	8.33j
	25	60	9	15.00h	7	11.67i
	30	60	13	21.67g	8	13.33f
500	5	60	0	0l	0	0m
	10	60	6	10.00i	5	8.33j
	15	60	19	31.67e	29	48.33b
	20	60	25	41.67d	20	33.33d
	25	60	34	56.67c	16	26.67e
	30	60	40	66.67b	9	15.00f
700	5	60	7	11.67i	5	8.33j
	10	60	15	25.00f	20	33.33d
	15	60	24	40.00d	32	53.33a
	20	60	33	55.00c	25	41.67c
	25	60	40	66.67b	17	28.33e
	30	60	48	80.00a	9	15.00f
CK		60	0	0l	0	0m

由表 2 还可知,低浓度秋水仙素下,延长处理时间,诱变率没有明显增加;高浓度秋水仙素下,延长处理时间,诱变率先升高后降低。300 mg/L 秋水仙素溶液处理 5~30 d,诱变率为 0%~13.33%;而 700 mg/L 秋水仙素溶液处理 5~30 d,诱变率从 8.33% 上升至 53.33% 后,又降至 15.00%。秋水仙素对材料有一定伤害,随着浓度升高和处理时间延长,伤害程度加重,导致死亡率升高,因此四倍体诱变率反而降低。

2.1.3 涂抹法对多倍体离体诱导效果的影响 涂抹法较浸泡法、加入培养基法对材料伤害作用较轻,且节约药品,但对四倍体诱导效果明显较差。由表 3 可见,秋水仙素浓度为 300 mg/L 时,四倍体诱变率为 13.33%,随着秋水仙素浓度升高诱变率逐渐增加,当秋水仙素浓度为 700 mg/L 时,诱变率为 35.00%,诱导效果明显不如浸泡法、加入培养基法,因此该方法不适用于金线莲多倍体诱导。

表 3 不同浓度秋水仙素处理对金线莲诱变率的影响

秋水仙素浓度 (mg/L)	处理数量 (个)	成活数量 (个)	成活率 (%)	四倍体数量 (个)	诱变率 (%)
300	60	51	85.00a	8	13.33c
500	60	49	81.67b	20	33.33b
700	60	43	71.67c	21	35.00a

2.2 诱导植株形态学观察

与对照相比,处理组植株在株高、茎粗、叶片大小、叶片厚度、茎节等外部形态特征上发生明显变化。对茎段处理后,前期诱导分化慢,营养器官明显增大,主要表现在植株高大,茎秆粗壮,茎节明显且长,叶片肥厚,叶片变小,叶脉金色加深等,与二倍体差异明显(表 4)。

气孔大小、气孔密度及保卫细胞大小等可作为鉴定多倍体与二倍体的间接指标<sup>[14-17]</sup>。镜检发现,诱导植株气孔明显增大,气孔长度、宽度均明显大于对照植株(图 2-a 至图 2-

d)。由表 5 可见,诱导植株气孔为 44.64  $\mu\text{m} \times 27.78 \mu\text{m}$ ,对照植株气孔为 32.24  $\mu\text{m} \times 17.36 \mu\text{m}$ ,诱导植株气孔长度、宽度分别比正常植株增加 38.46%、37.51%。每个视野气孔数量明显少于对照植株,为对照植株的 53.85%。

表 4 金线莲二倍体与四倍体形态特征比较

组培苗	植株类型	叶长 (cm)	叶宽 (cm)	叶厚 (mm)	茎粗 (cm)	株高 (cm)
组培 3 个月苗	正常植株	1.04	0.81	0.564	0.216	4.52
	诱导植株	0.83	0.53	0.821	0.287 3	5.73
	诱导株比正常株增加比例(%)	-20.19	-34.51	45.57	33.01	26.77
组培 5 个月苗	正常植株	1.36	0.88	0.423	0.218	7.06
	诱导植株	1.54	1.22	0.537	0.293	7.54
	诱导植株比正常植株增加比例(%)	13.24	38.64	50.59	34.40	6.80

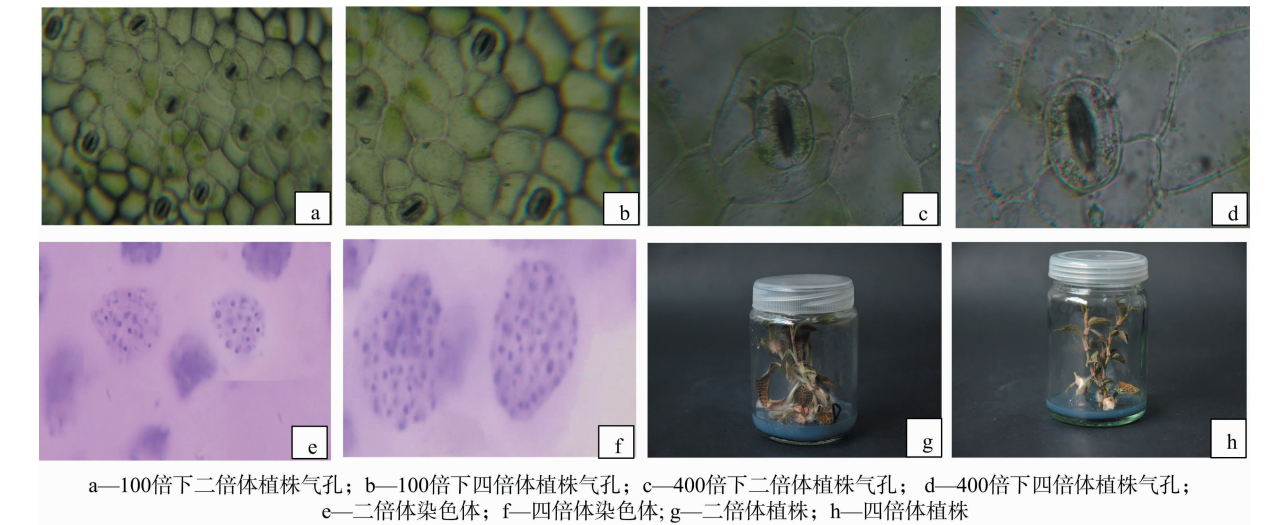


图 2 金线莲二倍体与四倍体气孔特征及植株表现情况( $\times 10$ )

表 5 金线莲二倍体与四倍体气孔特征比较

类型	气孔长度 ( $\mu\text{m}$ )	气孔宽度 ( $\mu\text{m}$ )	每个视野气孔数 (个)
正常植株	32.24	17.36	39
诱导植株	44.64	27.78	21
诱导植株比正常植株 增加比例(%)	38.46	60.02	46.15

2.3 诱导植株根尖染色体数目观察

从形态学和解剖学上初步筛选出诱导植株,进行根尖染色体鉴定。曾雅娟等研究表明,金线莲染色体数目为  $2n = 40$ <sup>[18]</sup>。对诱导植株和对照植株进行根尖染色体制片(图 2-e、图 2-f),由于金线莲染色体数目较多,染色体出现重叠,未能清晰算出染色体数目,但可以明显看出诱导植株根尖细胞体积变大,细胞核增大,部分细胞形态发生变化,染色体数目增多。

3 结论与讨论

将化学诱导剂和组织培养技术相结合进行人工诱导多倍体,已经在许多植物上取得成功。以往研究表明,掌握秋水仙素浓度及处理时间是多倍体诱导成功的关键<sup>[19-21]</sup>。秋水仙素浓度太低或处理时间太短无法达到诱导目的;而秋水仙素浓度过高或处理时间太长,虽能达到诱导效果,但植株受伤害严重,死亡率高。秋水仙素诱导处理方法有浸泡法、涂抹法、注射法、加入培养基等方法,在实际操作中常需要根据植物材

料和部位选择适宜的处理方法。

本研究采用浸泡、涂抹、加入培养基等 3 种方法来诱导多倍体。其中浸泡法以 500 mg/L 秋水仙素溶液处理 24 h 下诱导效果最佳,诱变率为 51.67%,这与蔡文燕等的研究结果略有差异,蔡文燕等用 0.1%、0.2% 的秋水仙素溶液浸泡,结果表明,用 0.1% 秋水仙素浸泡 48 h 条件下,诱导效果最好,诱变率为 48%<sup>[22]</sup>。这说明相同处理方法下,秋水仙素浓度不同,诱导效果也会不同,诱导效果还与培养时间、培养方法有关,金线莲品种差异、取材部位与时间不同等都会影响试验结果。在秋水仙素加入培养基试验中,以 700 mg/L 秋水仙素处理 15 d 诱变率最高,达 53%。王丽芳等用 300 mg/L 秋水仙素处理金线莲茎段、顶芽 3~19 d,结果表明处理 13 d 的加倍效果最好,加倍率为 72%<sup>[23]</sup>;而本研究中用 300 mg/L 秋水仙素处理 15 d,诱变率仅为 5%,这与王丽芳等研究结果不一致。涂抹法中,以 700 mg/L 秋水仙素涂抹在茎节的诱导效果较好,诱变率为 35%,涂抹法的诱变率较浸泡法、加入培养基法低,但对材料伤害作用较轻,同时也节省药品。

秋水仙素处理后外植体前期诱导分化慢,后期生长较快,营养器官明显增大,表现为植株高大、茎秆粗壮、茎节多且明显,叶片变多、变短且肥厚,叶脉金色加深等特点;诱导植株气孔明显增大,气孔长度和宽度均显著大于对照,其形态和气孔特征的诱导与通常的多倍体诱导结果一致<sup>[24-26]</sup>。

测得组培苗阶段二倍体苗、多倍体苗的多糖含量分别从 10.13%、14.05% 上升到 15.91%、18.91%,多倍体瓶苗在大



棚栽培 6 个月 after 多糖含量为 9.69%, 而二倍体苗在大棚栽培 6 个月 after 多糖含量仅为 8.77%, 可见在相同栽培环境下, 多倍体植株栽培 6 个月 after 多糖含量高于二倍体植株。由此可知, 多倍体金线莲的多糖含量高于二倍体植株, 得出多倍体苗多糖含量高于二倍体植株, 这与多倍体营养成分增加的特点一致, 多倍体瓶苗多糖含量高于二倍体瓶苗, 这与 Olimpienko 等研究发现四倍体铁皮石斛的可溶性糖含量高于二倍体的研究结果<sup>[27]</sup>一致。

测得二倍体苗、多倍体苗总黄酮含量分别从 1.17%、1.24% 上升到 1.27%、1.38%。得出多倍体苗总黄酮含量高于二倍体植株, 这进一步证明了多倍体营养成分增加的特点, 测得大棚栽培 6 个月的二倍体栽培苗、多倍体栽培苗总黄酮含量分别为 1.47%、1.92%, 栽培 6 个月时多倍体植株多糖、总黄酮含量高于二倍体植株(多倍体苗总黄酮含量接近野生苗的 1.97 倍)。对赤壁金线莲组培苗和栽培苗进行总黄酮含量的测定, 发现其均含有黄酮类物质, 这与曾建军等研究认为金线莲组培苗富含黄酮类物质的报道<sup>[8]</sup>一致。组培苗黄酮含量随着培养时间延长而增多, 移栽后总黄酮含量进一步增加, 黄酮是植物体内的次生代谢产物, 其含量变化受外界条件影响, 如光照刺激等对其合成有帮助<sup>[28-29]</sup>。将金线莲移栽到光照等条件较好的外界环境中, 有利于黄酮积累。

#### 参考文献:

- [1] 陈 裕, 林坤瑞. 金线莲生长发育与光照强度关系[J]. 福建热作科技, 1996, 2(4): 22-23.
- [2] 蔡文燕, 肖华山, 范秀珍. 金线莲研究进展[J]. 亚热带植物科学, 2003, 32(3): 68-72.
- [3] 王建国, 王松良, 詹巧杰, 等. 金线莲组织培养的条件优化研究[J]. 中国现代中药, 2013, 15(1): 45-49.
- [4] 黄 勇. 金线莲组织培养新体系建立及优化[J]. 北方园艺, 2010(13): 178-179.
- [5] 黄德贵, 陈振东. 金线莲组织培养与人工栽植研究: 无菌外植体建立技术和配方[J]. 福建热作科技, 1993(3): 11-14.
- [6] 武振华, 牛炳韬, 王新宇. 药用植物染色体加倍的研究进展[J]. 西北植物学报, 2005, 25(12): 2569-2574.
- [7] 周玉美, 陈 丽, 崔永一, 等. 台湾金线莲(*Anoectochilus formosanus*)快繁体系的构建[J]. 东北林业大学学报, 2009, 37(12): 43-47.
- [8] 曾建军, 李 军, 李晓红, 等. 金线莲增殖培养研究[J]. 井冈山大学学报: 自然科学版, 2013, 34(3): 34-36.
- [9] 郝丽丽, 乙 引, 申 刚, 等. 金线莲腋芽增殖培养条件的优化[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(7): 18-19.
- [10] 林兰英, 陈 钢, 王建勤. 金线莲组织培养中若干因素的研究[J]. 亚热带植物通讯, 1993, 22(2): 7-11.
- [11] 江建铭. 一种药用金线莲组织培养一步成苗快速繁殖: 中国, 200810059233.3[P]. 2008-07-09.
- [12] 何云芳, 杨 霞, 余有祥. 金线莲组培快繁技术[J]. 浙江林学院学报, 1999, 16(2): 170.
- [13] 张 铁, 田雪琪, 李 彬. 滇越金线莲快速繁殖技术研究[J]. 文山师范高等专科学校学报, 2006, 19(3): 110-114.
- [14] Chandler C K, Lyrene P M. Relationship between guard cell length and ploidy in vaccinium[J]. HortScience, 1982, 17(1): 53-54.
- [15] Singsit C, Ozias-Akins P. Rapid estimation of ploidy levels in *in vitro*-regenerated interspecific *Arachis* hybrids and fertile triploids[J]. Euphytica, 1992, 64(3): 183-188.
- [16] Ho I, Wan Y, Widho L M, et al. The use of stomatal chloroplast number for rapid determination of ploidy level in maize[J]. Plant Breeding, 1990, 105(3): 229-233.
- [17] 张凌媛, 郭启高, 李晓林, 等. 枇杷气孔保卫细胞叶绿体数目与倍性相关性研究[J]. 果树学报, 2005, 22(3): 229-233.
- [18] 曾雅娟, 肖华山, 黄代青. 金线莲染色体核型分析[J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2001, 17(4): 118-120.
- [19] 邵果园, 梁国鲁. 黄色马蹄莲多倍体诱导研究[J]. 浙江林学院学报, 2008, 25(5): 630-634.
- [20] 邵果园, 胡冬南, 徐荣华, 等. 美丽胡枝子多倍体诱导的初步研究[J]. 江西农业大学学报: 自然科学版, 2007, 29(1): 81-84.
- [21] 池 坚, 席梦利, 张 静, 等. 东方百合 *Siberia* 多倍体诱导及其细胞学鉴定[J]. 分子植物育种, 2008, 6(2): 291-296.
- [22] 蔡文燕, 吴水金, 潘一山. 金线莲多倍体诱导的初步研究[J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2010, 35(1): 90-93.
- [23] 王丽芳, 黄 建, 林 霞. 秋水仙素离体诱导金线莲多倍体的研究[J]. 浙江农业学报, 2010, 22(6): 760-763.
- [24] 陈 裕, 林坤瑞, 管其宽, 等. 金线莲生物学特性及生境特点的研究[J]. 亚热带植物科学, 1994, 23(1): 18-24.
- [25] 黄慧莲, 刘贤旺, 吴祥松, 等. 金线莲试管苗移栽试验研究[J]. 江西科学, 2001, 19(1): 52-54.
- [26] 胥雪峰. 金线莲的种苗繁育及栽培技术的研究栽培技术的研究[D]. 延吉: 延边大学, 2007.
- [27] Olimpienko G S, Pavlova N A. Characteristics of the distant of gamma-irradiation of seeds for diploid and poly-ploidy plants[J]. Radiacionnaya Biologiya Radioekologiya, 1995, 35(4): 518.
- [28] 吴玉香, 贺润丽, 高建平, 等. 刺果甘草多倍体诱变育种的研究[J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2004, 24(2): 116-117, 129.
- [29] 吕世民, 梁可钧, 葛传吉. 怀牛膝多倍体育种的研究[J]. 中药通报, 1988, 13(7): 11-13.
- [30] 丁炜东, 曹丽萍, 曹哲明. 草鱼种质相关 SRAP 及 SCAR 的分子标记[J]. 动物学报, 2008, 54(3): 475-481.
- [31] 傅 冰, 洪 震, 刘跃钧, 等. 蓝莓 SRAP-PCR 反应体系的建立和优化及其遗传多样性分析[J]. 北方园艺, 2013(17): 95-99.
- [32] 李秋芳, 魏 来, 吕 晶, 等. SCAR 分子标记对水貂食毛症遗传病因的初步研究[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(7): 939-945.
- [33] 闫桂琴, 桂 枝, 杜红红. 地木耳细胞生物学特征初探[J]. 山西师范大学学报: 自然科学版, 1998, 12(1): 53-56.
- [34] 孙保娟, 李植良, 黎振兴, 等. SCAR 标记转化失败的原因和对策[J]. 分子植物育种, 2010, 8(3): 589-594.

(上接第 66 页)

- [17] 马 骥, 王勋陵. 地木耳 pH 值监测大气污染的定量化研究[J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 1996(4): 120-121.
- [18] 赵惠玲, 王 青, 李 砧. 地木耳分子生物学特性初步探究[J]. 农产品加工·学刊, 2010(9): 16-19.
- [19] 李媛媛, 隋玉龙, 牛淑力, 等. SCAR 标记在黑木耳栽培菌株分类鉴定中的应用[J]. 菌物研究, 2013, 11(3): 182-185, 189.
- [20] 林忠旭, 张献龙, 聂以春, 等. 棉花 SRAP 遗传连锁图构建[J]. 科学通报, 2003, 48(15): 1676-1679.