

马 辉,张 甜,梁丽君,等. 春兰杂交种子无菌萌发及植株再生培养技术[J]. 江苏农业科学,2017,45(21):49-52.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.21.013

春兰杂交种子无菌萌发及植株再生培养技术

马 辉,张 甜,梁丽君,包建忠,陈秀兰,孙 叶

(江苏里下河地区农业科学研究所,江苏扬州 225007)

摘要:研究了春兰种内杂交种和种间杂交种的结实情况,种子无菌萌发和植株再生培养技术。结果发现,春兰种内杂交、春兰与蕙兰种间正反交结果率和种子量都比较正常,春兰种内杂交种萌发率明显高于种间杂交种;春兰种内杂交种第 1 年杂交种子萌发数大于 50 的占到 11.11%,第 2 年杂交种子萌发数大于 50 组合为 2.4%,第 3 年杂交种子萌发数大于 50 的占到 38.27%,春兰品种自交种、种子萌发原球茎出现不同程度的白化变异;春兰和大花蕙兰种间正反交结果率差异较大,蒴果种子量少,但种子萌发数多,种子培养第 1 年萌发数均大于 100;春兰种内杂交种子萌发后根状茎增殖和芽诱导体液培养方式的增殖生长量和形成优势数明显优于固体培养。在“环球荷鼎×九章梅”杂交种组培小苗根诱导试验中,当活性炭浓度为 1 g/L,NAA 浓度为 0.5 mg/L 时,组培苗平均新根数和平均新根长数最大。

关键词:春兰;人工杂交;无菌萌发;植株再生

中图分类号:S682.310.4⁺3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)21-0049-03

春兰(*Cymbidium goeringii*)是兰科兰属地生兰类多年生草本,是传统中国兰的代表种,原产于我国长江流域或西南地区,日本和朝鲜半岛也有分布。春兰名优品种具有很高的观赏价值和经济价值,在东南亚特别是日本、韩国和台湾地区十分受欢迎。春兰的花期恰逢农历春节,在年宵花市场有很大的开发潜力。利用春兰名优品种作为亲本,进行种内杂交和种间杂交,是丰富春兰花期、花型、花色性状,选育春兰优良新种质的有效途径,人工杂交育种和组培快繁技术对春兰产业的发展有十分重要的意义。

1 材料与与方法

1.1 材料

试验材料春兰、蕙兰(*C. faberi*)、大花蕙兰(*C. hybrids*)由江苏里下河地区农业科学研究所“香兰苑”中国兰种质资源圃提供;无菌播种材料为 2009 年以来人工杂交获得的杂交种;增殖培养和芽分化材料为杂交种 2012 年无菌萌发后形成的原球茎或根状茎;根诱导试验材料为“环球荷鼎×九章梅”杂交组合杂交种经无菌萌发,增殖培养和芽诱导培养后的 3~4 cm 无根组培苗。

1.2 方法

1.2.1 人工杂交 2009—2015 年春,对花期相遇的春兰、蕙兰、大花蕙兰作为亲本进行人工授粉杂交。杂交组合主要分为春兰种内品种间杂交、春兰与蕙兰的种间杂交、春兰与大花蕙兰的种间杂交。授粉时用干净的镊子把母本的花粉取下,将父本的花粉块放入母本的蕊腔中,用记号笔在花盆上和试验记录本上写明杂交组合名称、杂交时间,3 个月后登记结果

率;分别在无菌播种后 12、24、36 个月统计杂交种萌发率。

1.2.2 种子无菌播种及萌发时间统计 采收成熟度为 5—7 个月、果皮略黄但尚未裂开的蒴果,种子前处理后,播于固体培养基,每个蒴果播 10 瓶,统计相对种子量。培养基配方为 1/2MS+0.5 mg/LNAA+0.5 g/L 蛋白胨+20 g/L 蔗糖+0.5 g/L 活性炭+7.0 g/L 琼脂,pH 值 5.1~5.4。播种后暗培养,室温为 25~28℃,种子萌发后见光培养 10~12 h/d,3 个月后每月统计杂交组合的杂交种子萌发数。

1.2.3 增殖培养、芽分化诱导的基本培养 增殖培养、芽分化诱导的基本培养基为 1/2MS+0.5 g/L 蛋白胨+20 g/L 蔗糖+0.5 g/L 活性炭,pH 值 5.1~5.4,固体培养基加 7 g/L 琼脂粉,液体培养基不添加琼脂粉。3 因素随机区组试验,A 因素为不同杂交组合,5 个材料;B 因素为 NAA 和 6-BA 浓度配比,5 个水平;C 因素为培养方式,液体培养或固体培养。每个处理培养 4 g 根状茎,10 个重复,培养 3 个月后称质量统计,统计根状生长量和优势芽数。

1.2.4 生根诱导的基本培养 生根诱导的基本培养基 基本培养基为 1/2MS+0.5 g/L 蛋白胨+20 g/L 蔗糖+0.5 g/L 马铃薯粉,pH 值 5.1~5.4。2 因素试验,A 因素为活性炭浓度,3 个水平,B 因素为 NAA 浓度,3 个水平。每个处理接种 6 株无根小苗,5 个重复,培养 90 d 后测量和统计每处理的平均新根数和平均新根长。

2 结果与分析

2.1 春兰人工杂交的结果率及杂交组合萌发情况

研究发现,春兰种内及春兰、蕙兰种间杂交的结果率和种子量都很正常。春兰种内杂交的组合萌发率为 52.5%,较春兰种间杂交高;大花蕙兰作为母本和春兰杂交不容易获得蒴果,种子发育不正常,没有萌发的组合;春兰作为母本与大花蕙兰杂交结果率达 80%,但种子量较正常杂交种少,但由于兰花杂交种子总量大,春兰和大花蕙兰杂交种种子萌发后群体仍然很大,并不影响种苗快繁和新品种选育(表 1)。

收稿日期:2016-05-26

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(13)5071]。

作者简介:马 辉(1987—),男,江苏泰州人,研究实习生,主要从事花卉组织培养研究。E-mail:mhhao520@qq.com。

通信作者:孙 叶,硕士,副研究员,主要从事花卉育种和组织培养研究。E-mail:sunye9999@126.com。

表 1 春兰人工杂交结果率和组合萌发率

组合 (母本×父本)	杂交类型	配对 组合数	结果率 (%)	种子量 ¹⁾ (%)	组合萌发率 ²⁾ (%)
春兰×春兰	种内	200	100	100	52.5
春兰×蕙兰	种间	20	100	100	20
蕙兰×春兰	种间	20	100	100	15
春兰×大花蕙兰	种间	20	80	<1	25
大花蕙兰×春兰	种间	20	4	0	0

注:1)此处为相对种子量,以母本自交果实中的种子量作对照,记为 100%。2)无菌播种后萌发组合占的百分率。

2.2 春兰品种间杂交种的种子萌发情况

春兰和蕙兰种间杂交部分杂交种能正常萌发,但种子萌发时间较长,种子萌发数较低,均小于 50(表 2)。春兰和大花蕙兰杂交,杂交组合第 1 年就能大量萌发,第 2 年少少量萌发,第 3 年基本已不萌发(表 3)。

春兰种内杂交种子第 1 年萌发数大于 50 的组合占到 11.11%,第 2 年杂交种子萌发数大于 50 组合为 2.4%,第 3 年杂交种子萌发数大于 50 的组合占到 38.27%。其中第 1 年萌发数较大的组合以种子萌发大于100为主,第2、第3年

表 2 春兰与蕙兰种间杂交组合杂交种子萌发情况

春兰、蕙兰种间杂交 (母本×父本)	种子萌发数(个)		
	第 1 年	第 2 年	第 3 年
仙绿×大富贵	0	0	12
老极品×雪山	0	0	20
满天华×新品荷	0	0	4
荷形春剑×郑孝荷	0	0	15
西神同乐×老极品	0	0	12
雪山×大叠彩	0	3	7
秀水素×郑孝荷	3	18	12

表 3 春兰与大花蕙兰杂交组合杂交种子萌发情况

春兰、大花蕙兰种间杂交 (母本×父本)	种子萌发数(个)		
	第 1 年	第 2 年	第 3 年
宋梅×黄金岁月	>50	15	0
宜春仙×红霞	>50	23	0
和尚素×红霞	>100	28	0
新春梅×红霞	>100	41	0
大富贵×韩国小姐	>100	32	0

萌发数较大的组合以种子萌发大于 50 为主。所有萌发组合中,种子萌发量较大的组合占到 51.78%(表 4)。

表 4 春兰品种间杂交组合种子萌发情况

杂交组合 (母本×父本)		种子萌发数(个)			杂交组合 (母本×父本)		种子萌发数(个)			杂交组合 (母本×父本)		种子萌发数(个)		
		第 1 年	第 2 年	第 3 年			第 1 年	第 2 年	第 3 年			第 1 年	第 2 年	第 3 年
天绿梅×簪蝶	>100				绿英×簪蝶	0	21	>50		桂圆梅×环球荷鼎	0	0	>50	
天绿梅×同乐梅	0	5	>50		绿英×春元梅	0	5	>50		宪荷×环球荷鼎	0	0	5	
天绿梅×贺神梅	>100				绿英×文漪	0	4	15		张荷素×环球荷鼎	0	>50		
天绿梅×龙字	0	10	>50		绿英×红阳	0	0	>50		宋梅×环球荷鼎	0	5	12	
天绿梅×红阳	0	21			绿英×红花春剑	0	3	>50		翠盖×环球荷鼎	>100			
簪蝶×五彩蝴蝶	>100				龙字×凝香紫	0	26	>50		红阳×环球荷鼎	0	22	>50	
簪蝶×绿英	0	32	>50		龙字×福荷素	0	7			小打梅×环球荷鼎	>100			
簪蝶×大熊猫	0	5			龙字×绯宝	0	0	>50		环球荷鼎×九庄梅	>100			
簪蝶×蕊蝶	0	17			龙字×簪蝶	0	28	>50		环球荷鼎×蔡梅素	15	36	>50	
玉梅素×蕊蝶	22	36	>50		龙字×织姬	0	10	>50		簪蝶×大富贵	0	19	>50	
张荷素×蕊蝶	0	9	20		赤富贵×龙字	0	17	30		龙字×大富贵	0	0	35	
簪蝶×蕊蝶	0	3	15		大富贵×龙字	0	4			蕊蝶×大富贵	0	0	40	
黄春梅×余蝴蝶	>100				玉梅素×龙字	0	0	>100		玉梅素×大富贵		15	>50	
凝香紫×五彩蝴蝶	0	2			福荷素×龙字	0	0	5		赤富贵×大富贵	0	0	16	
大富贵×余蝴蝶	0	0	23		凝香紫×龙字	0	23	>50		大友贵×大富贵	0	0	>50	
织姬×宋梅	0	7	13		张荷素×扬氏素	0	0	>50		绿花春剑×大富贵	0	0	4	
黄龙字×宋梅	7	32	>50		九庄梅×蔡梅素	0	0	>50		大富贵×赤富贵	0	0	10	
红花春剑×宋梅	0	5	14		福荷素×凝香紫	0	5	>50		大富贵×红阳	0	3	15	
羽前小町×宋梅	0	0	9		吉字×玉梅素	0	16	>50		大富贵×瑞梅	>50			
翠苑×宋梅	0	0	14		吉字×扬氏素	0	0	3		大富贵×凝香紫	0	0	18	
红阳×宋梅	0	3	31		杂龙宋×雪山	3	13			天兴梅×赤富贵	12	36	40	
和尚素×宋梅	0	23	>50		杂西神×雪山	5	24			瑞梅×赤富贵	0	22	>50	
宋梅×织姬	0	2			贺神梅×歌侣	0	5	25		逸品×大友贵	0	4	30	
鹤市×黄春梅	18	2	0		集圆×碧瑶	>100				黄龙字×大魁荷	0	11		
桂圆梅×扬氏素	0	0	>50		集圆×春元梅	10	27	>50		系兰小花×大魁荷	0	0	17	
桂圆梅×织姬	0	6	>50		瑞梅×浩德的光	0	9	30		满天华×新品荷	0	12	>50	
吴风×荷梅	0	>50			富士的夕映×桂圆梅	0	10			红阳×翠盖	0	13	40	
绯牡丹×辉煌	>100				辉煌×绯牡丹	>100				绿英×碧瑶	8	>50		

春兰自交种子 3 年内种子萌发数较大的组合占 63.64%,但自交种萌发后出现原球茎白化现象的组合占 72.73%,白化率最高达到 36.4%。这些白化材料能正常增殖和芽分化,培养出白化苗,但组培苗成苗率较低,绿色材料能正常培养,组培苗出瓶后生长性状也比较稳定(表 5)。

2.3 春兰品种间杂交种的增殖培养和芽分化诱导

不同杂交组合的杂交种根状茎在 NAA 浓度为 0.5 mg/L 的液体培养基增殖培养生长量较大,与固体培养基比较,液体培养基中培养根状茎增殖生长量大;根状茎在 NAA、6-BA 浓度为(0+2) mg/L 和(1+3) mg/L 时,优势芽较多,同一激素浓度下,液体培养基较固体培养基平均优势芽多;不同杂交组合的根状茎生长和芽诱导的最佳培养基配方和最佳培养方

表 5 春兰自交组合杂交种子萌发情况

春兰自交组合	种子萌发数(个)			白化率
	第 1 年	第 2 年	第 3 年	
天绿梅	>100			14.2
宋梅	0	15	>50	36.4
龙字	0	11		11.2
大友贵	0	25		15.4
玉梅	>50			14.5
秀水	0	30	>50	0.0
集圆			>50	24.9
扬氏素	5	40	>50	19.7
绯宝	0	0	25	0.0
逸品	8	18	>50	7.9
辉煌	0	3	13	0.0

表 6 影响春兰杂交种根状茎增殖和芽分化的因素

杂交组合 (母本×父本)	激素添加处理		根状茎增殖生长量(g)		平均优势芽(个)	
	NAA(mg/L)	6-BA(mg/L)	液体培养基	固体培养基	液体培养基	固体培养基
天绿×簪蝶	0.5	0	10.037cdef	6.86ab	0.0a	0.0a
	0.0	2	7.060a	8.237cdefgh	16.6h	3.3cde
	0.5	2	7.167a	9.015fghi	10.0g	0.0a
	0.5	3	8.494abc	6.254a	10.0g	4.8e
	1.0	3	10.194cdef	7.843bcdef	8.4defg	4.8e
环球荷鼎×九章梅	0.5	0	12.690gh	10.467jkl	0.0a	0.0a
	0.0	2	7.625ab	10.493jkl	9.4fg	4.4e
	0.5	2	11.328efgh	10.777kl	5.3cdef	0.3ab
	0.5	3	10.151cdef	8.647defgh	7.0defg	0.4ab
	1.0	3	8.825abcd	10.103ijk	17.3h	1.5abcd
福娃梅×雪山	0.5	0	13.557hij	8.880fgh	0.0a	0.0a
	0.0	2	11.502efgh	11.335l	5.7cdefg	1.5abcd
	0.5	2	11.460efgh	10.455jkl	0.6ab	0.0a
	0.5	3	15.435ij	9.431hij	1.2abc	0.4ab
	1.0	3	13.327hi	8.858efgh	4.6abcde	3.6de
龙字×凝香紫	0.5	0	15.712k	7.674bcde	0.0a	0.0a
	0.0	2	10.924defg	8.081cdefg	4.5abcd	1.0abc
	0.5	2	8.377abc	8.911fghi	9.2efg	0.2a
	0.5	3	10.071cdef	7.212abc	4.3abcd	1.3abcd
	1.0	3	9.603bcde	7.529bcd	9.4fg	2.7bcde
簪蝶×五彩蝴蝶	0.5	0	12.368fgh	8.054cdefg	0.3ab	0.0a
	0.0	2	8.086abc	9.177ghi	6.6defg	1.8abcd
	0.5	2	8.834abcd	7.839bcdef	4.5abcd	0.4ab
	0.5	3	8.339abc	7.177abc	5.3cdef	1.6abcd
	1.0	3	8.937abcd	7.821bcdef	4.8bcdef	0.0a

表 7 活性炭和 NAA 对根诱导的影响

活性炭 (g/L)	NAA (mg/L)	平均新根数 (条)	平均新根长 (cm)
0	0.00	1.83ab	2.29a
	0.25	2.43bc	4.71c
	0.50	2.96cd	5.54d
0.5	0.00	1.41a	2.47a
	0.25	2.62bcd	4.47c
	0.50	3.45d	5.61d
1.0	0.00	1.44a	3.52b
	0.25	2.48bc	4.47c
	0.50	3.53d	7.60e

交种结果率很高,杂交组合萌发率达 52.5%,种子萌发时间长达 3 年左右,1 年内萌发,种子萌发数大的杂交种仅占 5.8%,这与以往的研究结果^[5]一致。春兰杂交种的萌发特

式不同(表 6)。

2.4 春兰品种间杂交种的根诱导

当活性炭浓度为 1.0 g/L、NAA 浓度为 0.5 mg/L 时,组培苗平均新根数和平均新根长最大。NAA 浓度相同时,随着活性炭浓度增加平均新根数增加,但无显著影响,活性炭浓度相同时,随着 NAA 的浓度增加平均新根数和平均新根长增加,且影响显著(表 7)。

3 结论与讨论

春兰的品种创新水平严重落后于国外兰科花卉,主要原因是人工杂交选育还未成为中国兰品种创新的主要途径。兰科植物人工杂交选育新品种的主要技术瓶颈为杂交种子的无菌萌发和植株再生培养^[1-4],本研究结果表明,春兰品种间杂

点增加了人工杂交育种的难度,因此增加杂交组合的数量,延长杂交种子的萌发时间是提高杂交种萌发率的有效途径。

春兰、蕙兰都属于兰属地生兰种,亲缘关系较近,大花蕙兰是通过兰属中的大花附生种、小花垂生种以及一些地生兰经过多代人工杂交育成的品种群。本研究发现春兰种间杂交组合中,春兰和蕙兰正反交结果率都正常,但杂交种萌发率低,种子萌发时间长,种子培养 2~3 年后才萌发,且种子萌发数也较少,均未超过 50 个。春兰和大花蕙兰的正反交杂交种的结果率差异明显,春兰为母本时能得到杂交蒴果,但杂交种种子量较正常杂交种少,杂交种萌发时间短,以种子→原球茎→完整植株途径生长发育成苗,这是附生兰种子发育的特点。以往研究结果也发现具有附生兰血统的大花蕙兰与地生兰杂交具有此特点^[6-10],因此推测,春兰、蕙兰杂交种的种子萌发困难、萌发时间长是由地生兰的特性决定的,研究相关内容可

谢 昆,王丽仙,王 靖,等. 家蚕抗菌肽基因 *BmMoricin* 的克隆及重组蛋白的自诱导表达[J]. 江苏农业科学,2017,45(21):52-54.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.21.014

家蚕抗菌肽基因 *BmMoricin* 的克隆 及重组蛋白的自诱导表达

谢 昆^{1,2}, 王丽仙¹, 王 靖¹, 朱灵明¹, 尹建华¹, 叶青霞¹, 孙 艳¹

(1. 红河学院生命科学与技术学院, 云南蒙自 661199; 2. 云南省高校农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室, 云南蒙自 661199)

摘要: 抗菌肽是构成昆虫体液免疫的主要方式, *BmMoricin* 是家蚕免疫系统中 1 种重要的抗菌肽, 具有极强的抑菌活性。以家蚕中肠组织总 RNA 为模板, 设计 1 对特异性引物, 通过 RT-PCR 技术扩增 *BmMoricin*, 构建 pET32a-*BmMoricin* 原核表达载体, 采用自诱导表达系统表达 *BmMoricin* 重组蛋白。结果表明, *BmMoricin* 基因片段的大小为 201 bp, 编码 66 个氨基酸, 自诱导表达的 *BmMoricin* 重组蛋白大小约为 19 ku, 表达产率比异丙基- β -D-疏基半乳糖苷(IPTG)诱导的重组蛋白表达产率高, 为 *BmMoricin* 抗菌肽的生物学活性鉴定及应用奠定了基础。

关键词: 家蚕; 抗菌肽; *BmMoricin*; 重组蛋白; 自诱导

中图分类号: Q785; S881.2⁺4

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2017)21-0052-03

在昆虫细胞中, 天然免疫是主要的免疫屏障, 抗菌肽在阻止微生物入侵和预防感染方面具有重要的作用。抗菌肽具有分子量低、热稳定性强、抗菌性广谱、抑菌活性强等优点^[1], 绝大部分的抗菌肽由复杂的基因家族编码, 因此大量的抗菌

肽是宿主抵抗微生物感染的主要方式^[2-3]。在细胞内抗菌肽的诱导表达受 Toll 和 IMD 信号途径的调控^[4], 然而, 抗菌肽的生物学功能也各有差异, 抗菌肽 Cecropins 和 Moricin 具有极强的抗革兰氏阳性和革兰氏阴性菌活性, 但抗真菌活性较弱, 而 Drosomycin 具有极强的抗真菌活性, 不同的抗菌肽家族成员之间抗菌机理也不同^[5-6]。在家蚕细胞中, 家蚕抗菌肽 *BmMoricin* 最先是家蚕血淋巴中分离得到, 主要对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌有抑菌活性, *BmMoricin* 包含 61 个氨基酸残基, 前 22 个形成预测的分泌肽, 成熟的 *BmMoricin* 含 39 个氨基酸, 通过其氨基端 α -螺旋插入到细菌质膜, 增加细菌的渗透压来抗革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌, 在 *BmMoricin* 家族的 12 个基因成员中, 含 8 个 B 亚家族

收稿日期: 2016-06-30

基金项目: 云南省大学生创新创业训练计划(编号: DCXM163018); 红河学院大学生科技创新项目(编号: SZ1520); 红河学院应用型科学研究项目(编号: XJY15Z07); 红河学院博士专项(编号: XJ15B13)。

作者简介: 谢 昆(1975—), 男, 云南昆明人, 博士, 副教授, 主要从事动物生物化学与分子生物学研究。E-mail: xk_biology2@126.com。

能是解决中国兰杂交种萌发困难、萌发时间长问题的关键。

春兰的组培快繁是实现规模化生产的重要前提, 植物组培用培养基有固体培养基和液体培养基, 液体培养基相对固体培养基组织培养量大, 可培养时间长, 工序简单, 节省成本, 本研究结果证明液体培养基增殖培养和诱芽培养效果优于固体培养基, 与已有研究报道^[11-13]一致, 但还未受到广泛关注, 液体培养方式对于春兰大规模组培快繁有很高的应用价值, 可尝试推广。

参考文献:

- [1] 李子红, 贾 燕. 珍品兰花快速繁殖与养护[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006.
- [2] 徐 程, 詹忠根, 张 铭. 中国兰的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(2): 171-174.
- [3] 黄 磊, 贺筱蓉, 郑立明. 春兰种子非共生萌发的研究[J]. 种子, 2003, 132(6): 40-41.
- [4] 孙崇波, 刘 玫, 施季森. 蕙兰种子无菌萌发及植株再生[J]. 浙江农业学报, 2008, 20(4): 231-235.
- [5] 庞惠仙, 杨红明, 马 骏, 等. 春兰、豆瓣兰、莲瓣兰和春剑 4 种国

兰种子萌发特性研究初报[J]. 西部林业科学, 2010, 39(3): 56-60.

- [6] 孟 英, 闻永慧, 李慧敏, 等. 虎雪兰与朱砂兰、蕙兰正反交育种及种子无菌萌发与增殖研究[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(13): 3812-3814.
- [7] 张志胜, 何琼英, 傅雪琳, 等. 中国兰花远缘杂交及杂交种子萌发的研究[J]. 华南农业大学学报, 2001, 22(2): 62-65.
- [8] 朱根发, 王碧青, 陈明莉, 等. 大花蕙兰与兰属植物种间杂交研究[J]. 植物学通报, 2005, 22(4): 445-448.
- [9] 曾碧玉, 常 强, 许传俊. 杂交兰品种“韩国小姐”与墨兰品种“企剑黑墨”杂交坐果及无菌播种研究[J]. 热带作物学报, 2015, 36(3): 510-515.
- [10] 朱根发, 陈明莉, 罗智伟, 等. 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, 2004, 31(5): 688-690.
- [11] 孙 叶, 包建忠, 刘春贵, 等. 春兰杂交种子无菌萌发及根状茎增殖的研究[J]. 金陵科技学院学报, 2012, 28(1): 76-79.
- [12] 陈银龙. 国兰无菌播种技术研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(17): 4291.
- [13] 王利民. 大花蕙兰杂交育种研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2007.