

秋水仙素诱导细毡毛忍冬同源四倍体

陈泽雄^{1,2}, 吴林¹, 刘奕清^{1,2,*}¹重庆文理学院花卉研究所, 重庆402160; ²重庆市特色植物种苗工程技术研究中心, 重庆402160

摘要: 以细毡毛忍冬叶片为外植体建立了离体再生体系, 在此基础上, 以叶片诱导出愈伤组织, 用秋水仙素诱导其同源四倍体。结果表明, 秋水仙素浓度为 $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 液体培养48 h, 四倍体诱导率最高为15.0%。四倍体细毡毛忍冬生长缓慢, 植株节间短, 茎干粗壮, 叶片颜色较二倍体浓绿, 叶形指数减少, 保卫细胞增大, 气孔密度减少, 绿原酸含量增加。

关键词: 细毡毛忍冬; 秋水仙素; 同源四倍体; 倍性鉴定

Autotetraploid Induction in *Lonicera similis* by ColchicineCHEN Ze-Xiong^{1,2}, WU Lin¹, LIU Yi-Qing^{1,2,*}¹Flower Research Institute, Chongqing University of Arts and Sciences, Chongqing 402160, China; ²Engineering Research Center for Special Plant Seedlings, Chongqing 402160, China

Abstract: To establish an effective leaf generation system and induce stable tetraploid of *Lonicera similis*, calluses were induced by using leaves of *L. similis* as explants and calluses were employed to establish the technical system of autotetraploid induction in *L. similis* by colchicines. The results showed that the highest induction rate of tetraploid, 15.0%, was obtained from the callus cultured in the liquid medium supplemented with $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ colchicine for 48 h. The plants grew slowly and showed the general characteristics of tetraploids, such as shorter internodal, thicker stem, deeper leaf, smaller leaf index, larger guard cells and less stomata density. The contents of chlorogenic acid of tetraploid plants were higher than diploid plants.

Key words: *Lonicera similis* Hemsl.; colchicines; autotetraploid; chromosome identification

细毡毛忍冬(*Lonicera similis* Hemsl.)是忍冬科忍冬属植物, 为西南地区金银花的主要来源, 分布广泛, 资源丰富, 具清热解毒、抗氧化等多重功效, 是川渝金银花的主流品种(马逾英等2008)。药用植物多倍体具有药效成分含量高, 抗逆性强等特点(向增旭和高山林2008)。细毡毛忍冬的多倍体诱导不仅可以改变其生理和形态特性, 更可能显著提高绿原酸、木犀草苷等核心药用成分含量, 具有诱人的应用前景。

关于忍冬科植物四倍体诱导的研究已有报道。向增旭和高山林(2008)、张汉超等(2011)分别对忍冬属金银花进行了同源四倍体和异源四倍体诱导及鉴定, 曹方莉等(2008)进行了花蕾型金银花同源四倍体的诱导和鉴定, 但是关于细毡毛忍冬多倍体诱导的研究国内外尚未见报道。本研究以细毡毛忍冬组培苗叶片为外植体, 建立了成熟稳定的叶片离体再生技术体系, 在此基础上以秋水仙素为诱变剂, 研究细毡毛忍冬诱变的最佳处理浓度和时间组合并进行形态学、组织学和细胞学的系统鉴定, 获得了稳定的细毡毛忍冬四倍体植株。

材料与方法

1 叶片再生体系建立

试验材料成年态细毡毛忍冬(*Lonicera similis* Hemsl.)植株于2011年3月24日从四川省南江县引进, 定植于重庆文理学院花卉研究所暨重庆市特色植物种苗工程技术研究中心温室。取其植株幼叶进行离体培养, 以MB (改良MS)为基本培养基, 愈伤组织诱导培养基: MB+2,4-D (1.0 、 1.5 、 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)+KT (0.5 、 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 不定芽分化培养基: MB+6-BA (1.0 、 2.0 、 $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)+IBA (0.1 、 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 生根培养基: $1/3$ MB+IAA (0.1 、 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)+IBA (1.5 、 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)+AC (活性炭, 50 、 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。

收稿 2013-01-04 修定 2013-03-20

资助 重庆市高校优秀成果转化项目(KJZH11220)、重庆文理学院校级科研项目(Y2010YL40)和重庆文理学院特色林木种质资源创新重点实验室平台建设项目。

* 通讯作者(E-mail: liung906@163.com; Tel: 023-49685199)。

2 四倍体诱导

试验采用固体培养和液体培养两种处理方法进行。固体培养是将继代2次生长旺盛的愈伤组织分别接种到含0、0.05、0.1和0.2 g·L⁻¹秋水仙素的固体培养基中,处理30 d,然后转接到不含秋水仙素的固体培养基中分化培养。液体培养法是将细毡毛忍冬愈伤组织材料分别接种到0.1、0.2、0.5和1.0 g·L⁻¹秋水仙素的液体培养基中,在转速为75 r·min⁻¹的摇床上振荡培养12~96 h,然后将处理后的愈伤组织用无菌水冲洗4~5次,无菌滤纸将水吸干后转接到不含秋水仙素的相同成分的固体培养基上分化培养。两种培养方法每处理均重复3次,每5瓶为1个重复,每瓶4块愈伤组织,处理在温度为25 ℃、光照强度为40 μmol·m⁻²·s⁻¹ (16 h·d⁻¹)的培养室中进行。愈伤组织诱导培养基为MB+1.5 mg·L⁻¹ 2,4-D+1.0 mg·L⁻¹ KT+30 g·L⁻¹蔗糖+6.0 g·L⁻¹卡拉胶,固体分化培养基为MB+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ IBA+30 g·L⁻¹蔗糖+6.0 g·L⁻¹卡拉胶,液体分化培养基除不添加卡拉胶外,其余成分与固体分化培养基相同。当芽长至4~5 cm时,转接到生根培养基1/3MB+2.0 mg·L⁻¹ IBA+0.1 mg·L⁻¹ IAA+20 g·L⁻¹蔗糖+6.0 g·L⁻¹卡拉胶+100 mg·L⁻¹ AC上诱导生根,对再生植株进行染色体鉴定,计算四倍体诱导率(%)=四倍体植株数(株)/接种愈伤组织数(块)×100。

3 倍性鉴定

对形态变异的植株进行染色体鉴定。采用改良苯酚品红染色法制片(杜晓华等2011),具体步骤如下:切取茎尖0.3~0.5 mm,用2.0 mmol·L⁻¹ 8-羟基喹啉于20 ℃条件下处理6 h,然后卡诺氏固定液(冰醋酸:无水乙醇=1:3)固定10~20 h,5 mol·L⁻¹盐酸中室温下解离30 min,卡宝品红染色液染色,Olympus BH-2光学显微镜观察并拍照。

对经染色体鉴定变异的植株,进一步进行细胞DNA相对含量测定:采用张俊娥等(2003)的方法,用德国Partec公司的倍性细胞仪(华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室柑橘课题组提供)测定变异植株和正常二倍体植株细胞中DNA的相对含量(用Partec DPAC软件分析)。具体步骤如下:分别取少量二倍体和四倍体植株叶片组织在0.5 mL的Partec HR-A溶液中切碎,2~5 min后将

样品通过30 μm的Partec Celltrics™微孔膜过滤,加2 mL Partec HR-B溶液于样品中,将样品上样置于倍性分析仪中,采用流式细胞测定法测定样品单个细胞核的DNA总量。

4 形态测定

分别选取经染色体鉴定和流式细胞仪鉴定确认的四倍体植株,进行气孔长度和密度的测定,以生长缓慢、叶色浓绿及叶形态指数变小为形态变异标准(王彩霞2009),以二倍体植株为对照。具体方法如下:取试管苗上部第四成熟叶片,置于FAA固定液中固定24 h,用蒸馏水擦洗叶片,在下表皮中部撕取叶片下表皮,番红染色后制片,然后于Olympus显微镜40倍物镜下用直线显微测微尺测定保卫细胞的大小,网格显微测微尺测定单位面积的气孔密度(张秀芳等2002)。

以继代20 d的二倍体和四倍体植株为对象,以顶芽以下两节叶片和茎段为观测对象,观察四倍体植株茎粗、节间距、叶色、叶长、叶宽等(张海凤等2008),每个指标测定重复3次,每次测定3株,数据的统计分析采用DPS软件处理。

5 绿原酸含量测定

叶片绿原酸含量采用张汉超等(2011)的方法,利用HPLC测定相同部位叶片的绿原酸含量,具体测定由重庆市秀山红星中药材开发有限公司完成。具体方法如下:将二倍体和四倍体植株叶片分别制备成供试品溶液,将购自中国生物制品鉴定所的绿原酸对照品制备成对照品溶液。取10 μL分别注入HPLC仪,按张汉超等(2011)的色谱条件进行测定并计算出不同样品的绿原酸含量。

实验结果

1 愈伤组织诱导

将细毡毛忍冬叶片接种到附加不同2,4-D和KT的MB培养基上,大约2周后,逐渐形成愈伤组织(图1-A),愈伤组织颜色绿,质地疏密不等。接种30 d后进行统计分析,结果(表1)表明,在供试的6个浓度配比中,培养基MB+1.5 mg·L⁻¹ 2,4-D+1.0 mg·L⁻¹ KT的诱导效果最好,愈伤组织诱导率达84.47%。

2 不定芽分化培养

将细毡毛忍冬叶片诱导产生的愈伤组织切开新的伤口,转接到不同6-BA和IBA浓度组合的不定



图1 细毡毛忍冬叶片离体再生体系

Fig.1 *In vitro* regeneration system of the leaves of *L. similis*

A: 叶片诱导的愈伤组织; B: 愈伤组织分化的不定芽; C: 不定芽的增殖; D: 生根苗。

表1 2,4-D和KT对细毡毛忍冬愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of 2,4-D and KT on callus induction of *L. similis*

2,4-D浓度/mg·L ⁻¹	KT浓度/mg·L ⁻¹	愈伤组织诱导率/%	愈伤组织生长情况
1.0	0.5	62.20±10.18 ^{Bb}	生长量较大, 质地致密
1.5	0.5	42.23±3.87 ^{Cc}	生长量中等, 质地较疏松
2.0	0.5	26.67±6.66 ^{Cd}	生长量小, 质地较疏松
1.0	1.0	73.33±6.66 ^{ABab}	生长量较大, 质地致密
1.5	1.0	84.47±3.87 ^{Aa}	生长量大, 质地致密
2.0	1.0	68.90±10.18 ^{ABb}	生长量较大, 质地较致密

方差分析采用邓肯氏新复极差检测法, 大写字母不同表示0.01水平差异, 小写字母不同表示0.05水平差异。下表同此。

芽分化培养基中, 培养约2周后愈伤组织开始分化不定芽, 不同浓度配比分化率差别较大, 继续培养2周后, 不定芽逐渐伸长长大(图1-B、C)。统计结果(表2)表明, 培养基MB+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ IBA诱导不定芽分化的效果最好, 不定芽诱导率高且生长健壮, 长势好。

3 生根培养

待再生芽苗长到2.5~3.0 cm后, 将其从愈伤组

织上切下, 接种到生根培养基中, 生根培养基以1/3MB为基本培养基, 添加不同浓度的IAA、IBA和活性炭。培养10 d左右基部开始产生白色凸起, 继而形成白色根尖, 25 d后统计生根率及生根苗生长情况(图1-D)。结果(表3)表明, 培养基1/3MB+0.1 mg·L⁻¹ IAA+2.0 mg·L⁻¹ IBA+100 mg·L⁻¹ AC生根率最高, 达到86.7%, 主侧根均较发达, 基部无愈伤组织。

表2 6-BA和IBA对细毡毛忍冬不定芽分化的影响

Table 2 Effects of 6-BA and IBA on induction of adventitious of *L. similis*

6-BA浓度/mg·L ⁻¹	IBA浓度/mg·L ⁻¹	不定芽数量	不定芽生长情况
1.0	0.1	15.67±1.53 ^{ABbc}	苗健壮, 生长较快
2.0	0.1	21.00±3.00 ^{Aab}	苗较弱, 生长较慢
3.0	0.1	18.33±2.08 ^{Aab}	苗弱, 生长慢
1.0	0.2	10.33±3.06 ^{Bc}	苗健壮, 生长慢
2.0	0.2	23.00±5.00 ^{Aa}	苗健壮, 生长快
3.0	0.2	21.67±2.52 ^{Aa}	苗稍弱, 生长较慢

表3 IAA、IBA和活性炭对细毡毛忍冬生根的影响

Table 3 Effects of IAA, IBA and AC on rooting of *L. similis*

IAA/mg·L ⁻¹	IBA/mg·L ⁻¹	AC/mg·L ⁻¹	生根率/%	芽苗生长情况
0.1	2.0	50	62.5 ^{Cc}	叶色绿, 基部愈伤组织小, 呈棕黑色
0.2	1.5	50	63.7 ^{Cc}	叶色绿, 基部愈伤组织小, 呈棕黑色
0.1	2.0	100	86.7 ^{Aa}	叶色绿, 基部无愈伤组织, 茎节上出根
0.2	1.5	100	76.3 ^{Bb}	叶色绿, 基部无愈伤组织, 茎节上出根

4 四倍体的诱导

以秋水仙素为诱变剂, 采用固体培养和液体培养的方法对细毡毛忍冬愈伤组织进行了四倍体诱导(表4)。结果表明, 在供试的秋水仙素处理浓度和处理时间范围内, 固体培养和液体培养两种方法均能有效诱导四倍体产生, 但不同处理组合效果有差异。在固体培养法中, 在0.05~0.20 g·L⁻¹的浓度范围内, 随着秋水仙素浓度增高, 四倍体诱

导率越高; 在液体培养法中, 在供试的4个组合中, 随着秋水仙素浓度越高, 四倍体诱导率呈现先升高后降低的趋势。综合来看, 秋水仙素浓度为0.20 g·L⁻¹, 液体培养48 h的处理组合四倍体诱导率最高, 为15.0%。对未经秋水仙素处理的细毡毛忍冬愈伤组织形成的124株再生植株随机挑选10株进行了染色体鉴定, 未发现四倍体植株产生。试验证明秋水仙素能有效诱导细毡毛忍冬四倍体产生。

表4 细毡毛忍冬四倍体的诱导率

Table 4 Tetraploid induction rate of *L. similis*

秋水仙素浓度/g·L ⁻¹	处理方法	处理时间/d	处理个数	分化株数	四倍体植株数	四倍体诱导率/%
0	固体培养	30.0	60	124	0	0
0.05	固体培养	30.0	60	81	1	1.7
0.10	固体培养	30.0	60	63	4	6.7
0.20	固体培养	30.0	60	42	6	10.0
0.10	液体培养	4.0	60	26	5	8.3
0.20	液体培养	2.0	60	64	9	15.0
0.50	液体培养	1.0	60	51	4	6.7
1.00	液体培养	0.5	60	43	2	3.3

5 倍性鉴定

5.1 二倍体和四倍体植株染色体数目

取形态明显的试管苗的茎尖, 采用茎尖压片法对其染色体数进行鉴定(图2)。结果表明, 未经秋水仙素处理的二倍体染色体为18条, 而经秋水

仙素加倍处理的部分再生植株染色体数为36条, 即为四倍体。

5.2 二倍体和四倍体植株DNA含量

采用流式细胞仪和Partec DPAC软件对染色体鉴定为二倍体和四倍体的植株进行了细胞DNA

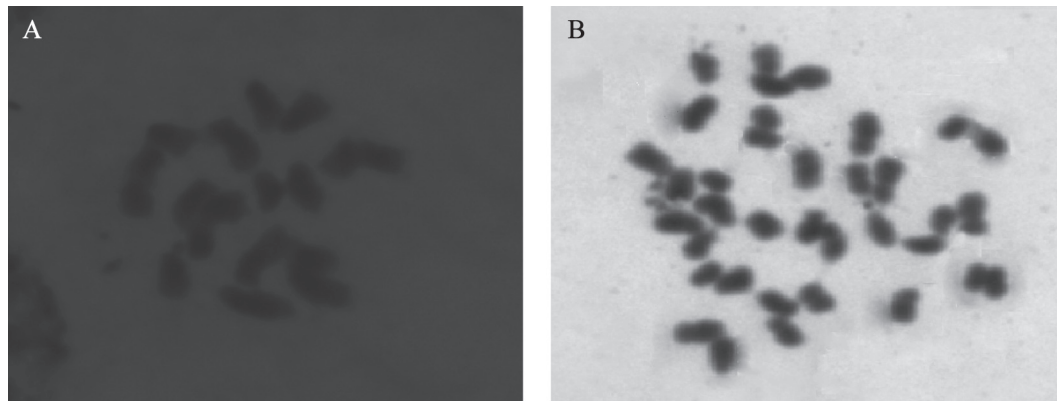


图2 二倍体和四倍体植株的染色体数目
Fig.2 Chromosome numbers of the diploid and tetraploid plants
A: 二倍体; B: 四倍体。

含量检测(图3)。结果显示, 二倍体细毡毛忍冬植株仅在相对对应荧光强度值为50左右的位置上出现1个单峰; 而经染色体鉴定的四倍体细毡毛忍冬

植株仅在相对荧光强度值为100左右的位置上出现1个单峰, 表明其细胞中DNA含量较对照增加了一倍, 为四倍体。

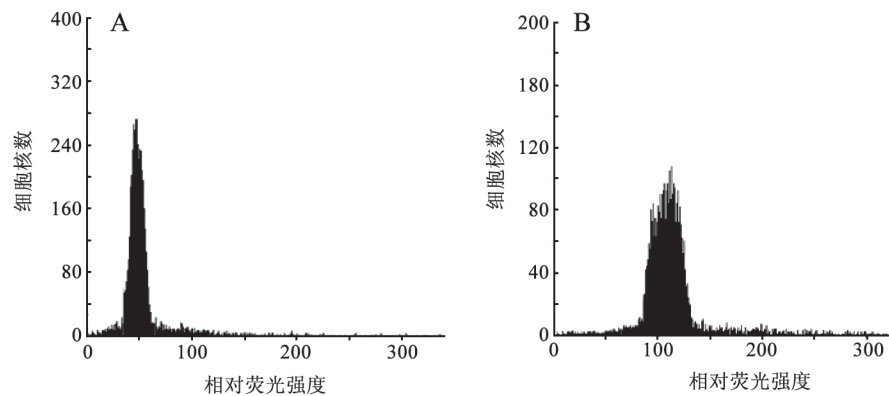


图3 二倍体和四倍体植株的DNA含量分布图
Fig.3 DNA distribution histogram of the diploid and tetraploid plants
A: 二倍体; B: 四倍体。

5.3 二倍体和四倍体植株气孔形态观察

从表5和图4可知, 四倍体植株叶片的保卫细胞与二倍体相比有明显差别。四倍体保卫细胞明显大于二倍体, 二者保卫细胞长度差异达极显著

著、保卫细胞宽度差异显著; 四倍体保卫细胞密度明显少于二倍体, 且二者差异极显著。

5.4 二倍体和四倍体植株形态学和绿原酸含量比较

从表6和图5可知, 相同生长期的四倍体细毡毛忍冬试管苗叶片颜色较二倍体浓绿; 二倍体植株叶片更长、更细, 节间距较长, 粗度较细, 而四倍体叶片相对更短、更宽, 节间距更短, 粗度更粗。此外, 四倍体植株较二倍体生长缓慢、叶边绒毛多且明显。四倍体叶片绿原酸含量高于二倍体叶片。

表5 二倍体和四倍体植株气孔保卫细胞比较

Table 5 Comparisons of stomata guard cells between diploid and tetraploid plants

倍性	保卫细胞长/ μm	保卫细胞宽/ μm	气孔密度/ mm^2
二倍体	22.83 \pm 1.86 ^{Bb}	15.70 \pm 1.55 ^{Ab}	50.00 \pm 3.61 ^{Aa}
四倍体	32.03 \pm 1.44 ^{Aa}	21.07 \pm 1.66 ^{Aa}	14.33 \pm 1.53 ^{Bb}

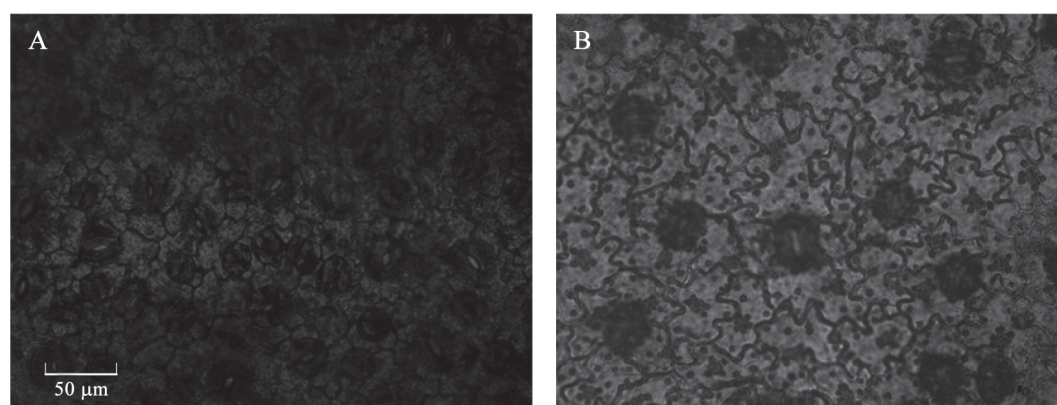


图4 二倍体和四倍体植株的气孔形态比较

Fig.4 Comparison of stomata morphology between diploid and tetraploid plants

A: 二倍体; B: 四倍体。

表6 二倍体和四倍体植株形态及绿原酸含量比较

Table 6 Comparisons of morphological characters and chlorogenic acid contents between diploid and tetraploid plants

倍性	叶长/cm	叶宽/cm	叶形指数	节间长/cm	茎段粗/mm	绿原酸含量/%
二倍体	1.59±0.03 ^{Aa}	0.48±0.02 ^{Aa}	3.40±0.32 ^{Aa}	1.13±0.10 ^{Aa}	0.07±0.01 ^{Ab}	3.87±0.12 ^{Ab}
四倍体	1.05±0.04 ^{Bb}	0.51±0.02 ^{Aa}	2.09±0.08 ^{Bb}	0.06±0.03 ^{Bb}	0.12±0.02 ^{Aa}	5.43±0.08 ^{Aa}

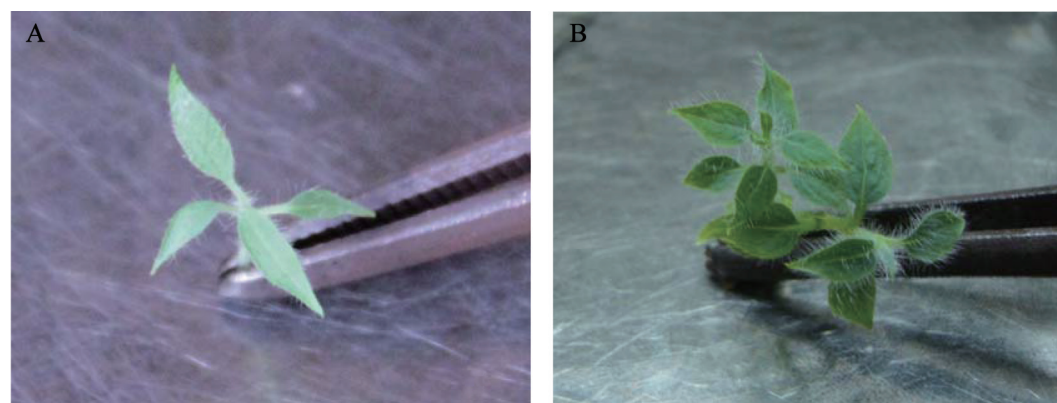


图5 二倍体和四倍体植株形态比较

Fig.5 Comparison of morphology between diploid and tetraploid plants

A: 二倍体植株; B: 四倍体植株。

讨 论

利用秋水仙素人工诱导植物多倍体是加速新品种培育、获得新材料的重要途径之一。秋水仙素诱导多倍体有固体培养和液体培养两种方法,不同方法诱导效果不同。瞿素萍等(2004)以多种方法诱导香石竹多倍体,结果表明液体培养法诱导率高于固体培养法;张志胜等(2007)比较了不同

培养方法对红掌的四倍体诱导,结果表明,两种方法均能诱导四倍体,但液体培养法高于固体培养法。本研究表明,以秋水仙素为人工诱导剂,采用液体培养法能更有效诱导细毡毛忍冬四倍体产生。

秋水仙素处理时间和浓度的组合是影响植物四倍体诱导效率的关键因素,但是不同物种、不同材料之间对秋水仙素的耐受能力大不相同。张志胜等(2007)研究表明,在含0.2 g·L⁻¹秋水仙素的

液体培养基中培养14 d,红掌四倍体诱导率最高达45.5%;娄玲玲(2011)以大青杨授粉后的雌花序为对象进行三倍体诱导,研究表明在授粉36~60 h后用0.5%秋水仙素溶液浸泡24 h诱导效果最好;张海凤等(2008)以杜仲籽苗为材料进行四倍体诱导,研究表明,0.1%秋水仙素处理生长点12 h为最佳组合,四倍体株率高达36.7%。本研究表明,在试验供试的处理组合中,0.2 g·L⁻¹秋水仙素液体培养48 h为最佳组合,四倍体诱导率最高为15.0%。

植物多倍体鉴定的方法有多种,其中,茎尖或根尖染色体鉴定是传统可靠的方法,而利用流式细胞仪检测细胞DNA鉴定则越来越多的被采用(张丽丽等2008;张蜀宁等2009)。本研究在形态特征鉴定、气孔鉴定及茎尖染色体鉴定的基础上,采用流式细胞仪检测分析了细毡毛忍冬叶片细胞DNA相对含量,结果表明,四倍体植株DNA的相对含量为二倍体的2倍。

四倍体植株通常表现为体型变大、叶型指数变小,节间变短变粗等现象(郑宝强等2009)。本试验亦表明,细毡毛忍冬四倍体叶型指数变小但粗壮且整体生长缓慢。药用植物多倍体不仅产量会增加,也往往会改变中药材的品质和含量(丁如贤等2007)。本研究结果显示,四倍体细毡毛忍冬叶片绿原酸含量高于对照二倍体,这与张汉超等(2011)在金银花的研究结果一致。绿原酸含量的提高可能与由秋水仙素引起的遗传物质加倍导致的与绿原酸合成相关基因表达量增加有关,染色体数量和结构的改变会在一定程度上改变植物体内生理代谢,进而导致代谢物质的改变,可能积累一些与二倍体植株不同的化学成分(林美珍等2011)。本研究中关于代谢产物的分析仅局限于绿

原酸,有关木犀草苷等其他重要次生代谢成分的分析有待进一步研究。

参考文献

- 曹方莉,王晓明,赵思东,李永欣(2008).花蕾型金银花同源四倍体的诱导和鉴定.安徽农业科学,36(9):3619~3621
- 丁如贤,郑水庆,邢爱婷,张汉明,陈万生(2007).决明多倍体的诱导与鉴定.中草药,38(7):1090~1091
- 杜晓华,孙涌栋,袁少寒,李倩青,巩振辉(2011).两种凤仙花多倍体的诱导.西北农业学报,20(7):56~59
- 林美珍,巫庆珍,郑松(2011).巴戟天的组织培养和多倍体诱导.中国中药杂志,36(17):2325~2328
- 娄玲玲,赵慧,祁传磊,卢倩倩,王勃,李开隆(2011).秋水仙素诱导大青杨同源三倍体.植物生理学报,47(7):699~704
- 马逾英,杨苗,马羚,杨爱薇,赵阳(2008).细毡毛忍冬与灰毡毛忍冬的形态组织学对比.华西医学杂志,23(5):511~513
- 瞿素萍,熊丽,莫锡君,王继华,张颢,苏艳(2004).香石竹的多倍体诱导及其变异研究.西南农业大学学报(自然科学版),26(5):609~613
- 王彩霞(2009).杜仲多倍体诱变育种的研究.内蒙古林业调查设计,32(1):104~106
- 向增旭,高山林(2008).金银花同源四倍体的诱导和鉴定.中国中药杂志,33(6):696~697
- 张海凤,郭宝林,张成合,杨俊霞,郭婧,陈新华(2008).杜仲四倍体的诱导与鉴定.园艺学报,35(7):1047~1052
- 张汉超,高山林,薛欣(2011).金银花异源四倍体株系诱导选育及其绿原酸含量的测定.药用生物技术,18(3):242~245
- 张俊娥,刘继红,邓秀新(2003).采用倍性分析仪鉴定柑橘愈伤组织的遗传变异.遗传学报,30(2):169~174
- 张丽丽,张蜀宁,张红梅,侯喜林(2008).同源四倍体青花菜离体再生及其倍性鉴定.园艺学报,35(10):1517~1520
- 张蜀宁,张丽丽,唐君,孔艳娥,侯喜林(2009).秋水仙素离体诱导同源四倍体青花菜.园艺学报,36(11):1681~1684
- 张秀芳,石东里,张兰(2002).观察植物气孔结构的简易方法.生物学通报,37(6):42
- 张志胜,黎扬辉,姜蕾,李运,王朱莹,夏晴,易懋升(2007).红掌四倍体的离体诱导及其鉴定.园艺学报,34(3):729~734
- 郑宝强,张莹,王雁,李振坚,朱向涛,律春燕(2009).春石斛的多倍体诱导.园艺学报,36(9):1381~1384