

· 综 述 ·

植物染色体倍性鉴定方法研究进展

陶抵辉¹, 李小红², 王利群², 周杰良¹, 陈 涌¹, 霍稳根³

(1. 湖南生物机电职业技术学院, 中国湖南 长沙 410127; 2. 湖南省农科院作物研究所, 中国湖南 长沙;
3. 汨罗市农业局, 中国湖南 汨罗 414400)

摘 要: 对植物染色体倍性的间接、直接鉴定方法进行了综述, 并对各种方法的优越性和不足之处进行了评述. 指出植物染色体倍性鉴定应因陋就简, 多采用早期鉴定和破坏性较小的鉴定方法, 同时各种鉴定方法综合运用, 对不同植物采用不同的鉴定办法, 为育种实践服务.

关键词: 染色体; 倍性鉴定; 流式细胞仪

中图分类号: Q-31

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2009)05-0453-06

Progresses on Determination of Cell Chromosome Ploidy Level of Plants

TAO Di-hui¹, LI Xiao-hong², WANG Li-qun², ZHOU Jie-liang¹,
CHEN Yong¹, HUO Wen-gen³

(1. College of Biological and Electromechanical Polytechnic, Changsha 410127, Hunan, China; 2. Crop Institute, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, Hunan, China; 3. Miluo Agriculture Bureau, Miluo 414400, Hunan, China)

Abstract: The direct and indirect means of ploidy identification on plant chromosome are summarized, and the advantages and disadvantages of all means are evaluated. It's mentioned that the ploidy determination of plant chromosome should be simply, thriftily, early and fewer destroyed. Multipurpose using all kinds of means and adopting different means for different plants were pointed out.

Key words: chromosome; ploidy determination; flow cytometry

(Life Science Research, 2009, 13(5): 453~458)

植物染色体倍性现象在自然界普通存在^[1], 单倍体及其加倍后的二倍体系(DH)在遗传上是一致的^[2], 单倍体及其 DH 系在植物细胞学、作物遗传及育种上具有重要作用, 可加速育种进程, 缩短育种周期, 提高选育效益^[3]. 基因加倍(Gene duplication)被认为是植物进化的加速器^[4], 染色体数的增加及其引起的基因冗余被认为是真核生物(尤其是有花植物)进化的主要原动力^[5], 多倍体经常出现一些新的表型, 如抗旱、无性生殖、抗病虫、无核、花期、器官体积、生物量的变化等, 使其更适合自身或农业生产的需要^[6]. 自 1937 年人工诱导多倍体成功以来, 多倍体育

种和应用进入了新的时代, 倍性育种为农业生产带来了可喜局面^[7-9]. 倍性鉴定是倍性育种及其应用的重要环节, 如何应用最简便、有效且尽可能早期鉴定出植株的倍性水平, 可以大大减少育种的工作量及盲目性, 降低成本, 加速育种进程, 在农作物倍性育种中具有重要意义. 本文对各种倍性鉴定方法进行了综述, 并对其优缺点进行了评述.

1 间接鉴定法

1.1 形态鉴定

根据植株器官如根、茎、叶、花、果实、种

收稿日期: 2009-03-18; 修回日期: 2009-05-28

作者简介: 陶抵辉(1965-), 男, 湖南宁乡人, 湖南生物机电职业技术学院研究员, 湖南农业大学博士研究生, 主要从事农作物遗传育种、栽培教学及研究, Tel: 0731-84637015, E-mail: dihuien@126.com.

子的形态、颜色等在各倍性之间的差异来进行倍性识别。一般情况下多倍体较之相应的二倍体植株根茎变粗、叶片变大加厚、叶色加深、叶形指数变小、花果变大,种子形状大小改变、叶色及花色改变等,在一些植物中可用来初步判断其倍性水平。Compton 和 Gray^[10]研究发现子房直径、雄花的花瓣和花粉囊直径、叶长与叶宽比是西瓜倍性水平很好的标志,如四倍体西瓜子房直径是二倍体的 1.4 倍,而叶长与叶宽比却小于相应的二倍体。陈发棣等^[11]诱导的四倍体菊花脑与二倍体对照相比,主茎增粗、叶片加厚、加宽等。郑思乡等^[12]观察离体培养条件下金鱼草多倍体表现为叶色浓绿、叶片肥厚、质地粗糙,特别是花大、花瓣厚、花色艳丽、花粉粒巨大等形态特征。Einset^[13]、Einset 和 Imhofe^[14]已报道了由于亲本染色体的加倍而出现了“大果”或“巨果”的苹果芽变植株,茎干粗壮。利用形态学鉴定倍性简单、直观、快速,无需仪器设备,实用性强,对熟悉该作物的人准确率也较高,工作量不大。不足之处是经验因素影响大,可能会因人而异,且部分材料需在植株生长发育较晚时期才能鉴定,使育种材料不能得到充分利用。

1.2 生理生化指标鉴定

植物倍性的差异引起生理特性的改变,导致生理生化指标的相应改变,可作为鉴定植物倍性的依据。如持水量、渗透压、呼吸作用、含糖量、维生素含量、矿物质含量、氨基酸含量、光合速率、蒸腾速率及同工酶、酶带变化等。张建军等^[15]在研究莴苣时发现四倍体莴苣氨基酸含量比二倍体高 9.35%,而四倍体番茄的 Vc 含量都较相应的二倍体含量高^[16]。程心旻等^[17]对白术同源四倍体及其二倍体过氧化物酶的比较研究发现,与二倍体相比,白术四倍体 POD 酶同工酶谱都出现了一条新谱带 Rf 0.31,而且酶谱的其它谱带也不尽相同;四倍体总过氧化物酶的活性变化也很大。郑思乡等^[12]在研究金鱼草多倍体时发现,四倍体 J-4 的净光合速率、蒸腾速率、气孔导度均比二倍体 J-2 高,尤其是四倍体的净光合速率比二倍体高 34.83%。陈清华等^[18]曾用过氧化物酶和酯酶同工酶来检定二倍体(2x)、三倍体(3x)、四倍体(4x)西瓜,结果表明四倍体的酯酶活性低于二倍体。马德伟^[19]也认为甜瓜四倍体过氧化物酶同工酶的活性低于二倍体。然而,能够反映染色体倍性的同工酶数量和灵敏性有限,并且同工

酶表达的多态性并不能完全代表染色体倍性的差异,同时由于植株在不同的发育时期、不同组织器官及不同生理状态,同工酶数量和活性均有很大的变化,因此必经采集同一时期同一组织器官并在相同条件下才能获得准确结果,这种鉴定法由于局限性大而极少运用。同样,其它生理生化指标也具有相对性,在同一倍性水平的不同品种间,也存在差异,依据生理生化指标仅能在一些特定植物的特定指标上进行初步判断。

1.3 生育状况鉴定

许多植物经倍性化后,表现为生长缓慢、发育迟缓、结实率降低、抗逆性增强等,可依此进行植物倍性的初步判断。笔者的研究表明(未发表):西瓜三倍体幼苗长势弱于二倍体和四倍体,而成株期长势明显优于二倍体、四倍体;抗逆性以三倍体最强,四倍体次之,二倍体相对较差;结实率上差异明显,二倍体蜜宝单瓜产籽 200~300 粒,其同源四倍体 50~80 粒,三倍体不结籽,为无籽西瓜。张振超等^[20]在研究多倍体不结球白菜时观察到四倍体结实率明显降低,抽薹较晚。杨晓明等^[21]在葡萄多倍体诱导中观察到诱变株(多倍体)与其原红提相比,发根快、多发丛生根、枝条生长旺盛、生长速度快,移栽温室后仍表现出明显的生长优势。刘文革等^[22]对蜜柑西瓜的二倍体、三倍体、四倍体采用不同浓度 NaCl 胁迫,发现不同倍性之间存在明显差异,四倍体比二倍体具有更强的耐盐性。刘惠吉等^[23]研究发现,四倍体白菜细胞的原生质水合度小、沾滞性强,因而受环境的胁迫变化小,从而导致其抗热性增强。植物生长发育状况受遗传基因的控制,倍性化后的植物虽然染色体序列没有改变,但存在基因冗余、基因沉默、甲基比、基因重组、核质互作等系列因素的影响,表现出不同的生长发育特征,而各种植物表现不尽相同,作为倍性鉴定应因不同种类、不同指标而异。

1.4 细胞学鉴定

主要通过检测各倍性水平植株的气孔大小、数量、比例,保卫细胞叶绿体数量,花粉形态大小、花粉母细胞分裂是否异常,细胞、细胞核及核仁大小变化等进行倍性的初步鉴定。马国斌等^[24]在观察不同倍性西瓜时发现四倍体叶片气孔长度明显长于二倍体,保卫细胞内叶绿体数目约为二倍体的 2 倍,认为气孔大小及气孔保卫细胞内叶绿体数目可以作为四倍体植株早期鉴定

的指标。杜胜利等^[25]在研究黄瓜倍性鉴定时发现,保卫细胞叶绿体数几乎随植株倍性成正比增加,单倍体、双单倍体、三倍体之间差异达极显著水平,认为保卫细胞叶绿体数可作为鉴定植株倍性的一个重要依据。青花菜小孢子培养获得的单倍体、二倍体、四倍体和八倍体植株其叶片保卫细胞叶绿体数(叶绿体/保卫细胞)分别为 8.3、13.6、22.1 和 30.7^[26]。陈劲枫等^[27]在研究同源四倍体黄瓜时发现同源四倍体黄瓜的花粉粒长度比原二倍体的长 27%左右,直径大 22%左右,差异极显著,四倍体花粉粒有一定频率(2.3%)的 4 孔花粉粒,且多皱缩、畸形,而二倍体花粉粒均为 3 个萌发孔,认为花粉粒的形态可作为一种快速有效的黄瓜四倍体鉴定方法。刘文革、王鸣等^[28]利用扫描电子显微镜对不同倍性西瓜花粉粒形态进行了系统观察,结果表明:二倍体花粉多为近长球形,花粉整齐一致;四倍体花粉为圆球形,有异形花粉、粘连花粉和空瘪花粉;三倍体花粉全部为空瘪花粉。杨瑞芳等^[29]研究莲多倍体时发现,莲花粉母细胞在减数分裂中有环状染色体、染色体落后、减数分裂不同步及双核核仁现象的发生。随着植物倍性的加大,表现出细胞、细胞核、核仁体积的加大,多倍体染色体的异常行为包括染色体配对不正常,有单价体和多价体,染色体落后、分离不规则、数目不均,有多极分裂和微核小孢子数目不等、大小不一致等^[30]。植物多倍化后,遗传特性和遗传行为改变,必然发生细胞形态的改变,用细胞学进行倍性鉴定可靠程度较高,尤其利用保卫细胞内叶绿体数量进行倍性鉴定在许多植物上得到广泛应用和验证,其操作较简单,作为前期鉴定不失为一种行之有效的方法。当然最根本的鉴定还应是染色体数目的鉴定。

1.5 分子水平鉴定

主要通过利用流式细胞计数法测量 DNA 的相对含量及进行 RFLP、AFLP、RAPD、指纹图谱、原位杂交及 GISH、FISH 技术等进行倍性鉴定。流式细胞仪也称倍性分析仪,它集电子技术、计算机技术、激光技术、流体理论于一体,可以定量地测定某一细胞中的 DNA、RNA 或某种特异蛋白的含量,以及细胞群体中上述成分量不同的细胞数量。随着倍性的增加,DNA 含量呈倍性增加趋势,据此可判断其倍性水平。流式细胞仪的工作原理是用染色剂对细胞进行染色后测定样品荧光密度,荧光密度与 DNA 含量成

正比,DNA 含量柱形图直接反映出不同倍性的细胞数,近年来在倍性分析中应用越来越广泛。流式细胞仪法快速鉴定植物的染色体倍性水平,不受植物取材部位和细胞所处时期限制,取材部位可以是叶片、茎、根、花、果皮、种子等,特别是在离体培养过程中,试管中的芽或植株很小或很幼嫩时,仅用 1 cm² 的样品就能鉴定出材料的倍性,其制样简单,灵敏度、分辨率及准确性较高,数据的重复性好,测试速度快,并且 DNA 含量变异可在分布图上直观地看出,特别适用于样品较多的倍性检测分析^[31];其缺点是设备昂贵,维护人员要求较高的专业水平,同时其对群体细胞的准确性高,但对单个细胞及混倍体的区别不够精确。马爱红等^[32]使用德国 Partec 公司的倍性分析仪,采用流式测定法测定细胞核的 DNA 含量对葡萄进行倍性鉴定,结果分布图上出现了不同的峰值,有二倍体、混倍体、四倍体(峰值刚好是二倍体的 2 倍)。陈斌等^[33]对花培辣椒植株通过流式细胞仪清楚地显示出每份材料叶片的 DNA 含量峰值的变化,快速检测出单倍体、二倍体、三倍体或单倍体加二倍体的混倍体,并与座果结籽的鉴别结果相一致。张振超等^[20]在利用流式细胞仪对四倍体不结球白菜进行鉴定时其结果与染色体计数法鉴定结果一致,且操作性优于染色体计数法,省时、高效,还可以检测出非整倍体以及混倍体,进行基因组大小的测量、细胞周期分析、流式核型、染色体分拣等。随着分子生物技术的发展,原位杂交技术、指纹图谱技术的日趋成熟也为多倍体的鉴定提供了全新的途径,GISH、FISH 技术的应用不仅能鉴定细胞的倍性,而且还能鉴定其亲本的来源;此外 RAPD、RFLP、AFLP 技术也已成功的应用到本领域的研究中^[34,35]。刘文革等^[36]以蜜枚和 JM 西瓜品种的纯合二倍体及其人工诱导的同源四倍体、三倍体为材料,对不同倍性西瓜 AFLP 标记的分子遗传变异进行了比较,其中,蜜枚品种西瓜具有多态性的条带有 3 条,四倍体、三倍体、二倍体各有 1 条特异带;JM 西瓜具有多态性的条带有 7 条,3 条为 JM4X 特有带,2 条为 JM3X 特有带,2 条为 JM2X 特有带。吴福川等^[37]通过对不同倍性金鱼草基因组 DNA 随机扩增多态性研究表明,二倍体与其同源四倍体金鱼草指纹图谱的差异,随不同花色品系及不同引物而变化;四倍体金鱼草在诱导过程中除染色体加倍外,

基因组 DNA 的核苷酸碱基序列也可能发生改变。

1.6 条件鉴定

植物染色体倍性化后,不同倍性植株繁殖速度、对环境条件的适应程度均有所改变,依此可对倍性材料设计一定的条件进行早期鉴定,达到“早、快、好、省”的目的,在育种实践中实现早期筛选和应用具有积极意义。郭启高等^[38]对西瓜试管苗进行早期倍性鉴定,采用增殖系数法(以一定时间内的增殖系数差异来检测倍性)、高温胁迫法(以一定高温、时间处理后的致死率判别倍性)、低温胁迫法(以一定低温、时间处理后的致死率进行倍性判断),与染色体计数法进行比较,其倍性检出平均符合程度分别达到 88%、90%和 80%。该法只需对批量再生苗作一次性短时处理,而不必对每株进行倍性鉴定,且所留下的试管苗可作快速扩繁而尽快应用于育种,实用性强。

1.7 杂交鉴定

用待测的倍性材料为母本,已知的二倍体材料为父本进行杂交,分析后代的育性及其它性状表达进行比较,可鉴定其倍性水平。但要求对该植物的遗传规律有所了解的情况下进行,且较耗时、复杂,有一定的限制。用杂交鉴定法判断西瓜四倍体变异株的准确率可达 100%^[39]。

1.8 染色中心直径和异染色质数目鉴定

染色中心直径和异染色质数目在染色体倍性的鉴定研究上有一定参考价值,可作为倍性鉴定的间接指标。在染色体制片过程中,出现频率高,容易识别和测量计数。韩毅科等^[43]在研究中发现,不同倍性黄瓜染色体中心直径和异染色质的数目差异显著与植株倍性呈正相关,其中单倍体染色体中心直径平均为 5.1 μm ,双单倍体为 13.3 μm ,单倍体异染色质数目平均为 5.0,双单倍体为 11.9。

2 直接鉴定

2.1 染色体计数

植物倍性化最本质的特征是细胞内染色体数目的变化,采用一定时期一定部位的组织细胞进行染色体染色、计数,是最直接、最准确的倍性鉴定方法。其一般步骤为:1)取材:取旺盛分裂组织以获得更多的中期分裂相,如根尖、茎尖、居间分生组织等;2)预处理:采用秋水仙素、对二氯苯、8-羟基喹啉、 α -溴萘等进行离

体或在体处理,以阻止纺锤体的形成,使分裂细胞停止于中期阶段;3)固定:一般采用卡诺氏固定液固定 2~24 h,目的是把细胞迅速杀死,使蛋白质变性或沉淀,尽量保持细胞各种结构的原有状态;4)解离:采用酸或酶处理去除细胞之间的果胶层并使细胞壁软化,以便于压片;5)染色:采用洋红、醋酸地衣红、醋酸树脂蓝、甲苯胺蓝、石炭酸品红、醋酸洋红、苏木精、孚尔根等染色剂进行染色,以便观察计数;6)镜检:在显微镜下对染色体进行计数。虽然染色体计数为最直接、最准确的倍性鉴定方法,但其制片要达到理想的计数结果技术要求高,对某些植物有一定难度。如取样部位、时间、制片过程中的各种处理方式方法、步骤影响因素多,要达到理想真实结果需进行大量深入的研究和总结。根据不同材料各步骤略有不同,包括常规压片法和去壁低渗法。

2.1.1 常规压片法

对细胞壁不作特殊处理,一般采用根尖、茎尖、卷须、愈伤组织等材料行常规压片后进行染色体计数。Peloquin 等^[40]通过染色体计数法准确鉴定出杂种香蕉的倍性水平。郭启高等^[38]在离体培养过程中利用不定芽叶尖染色体计数法,可以在组织培养早期 100% 检出西瓜植株倍性。Teodoro Cardi^[41]用茎尖染色体计数法证实了用叶绿体计数法鉴定出的马铃薯(四倍体 40%)的正确性。

2.1.2 去壁低渗法

用纤维素酶或果胶酶(或其混合酶液)对细胞壁进行去除处理,以便对染色体进行更清晰的观察和计数。一般步骤为:取材(幼芽、茎尖、幼叶、卷须等)→预处理(饱和对二氯苯溶液)→前低渗(KCl 低渗液)→前固定[甲醇:冰乙酸=3:1(V/V)]→酶解(纤维素酶、果胶酶)→后低渗(蒸馏水)→染色→压片镜检。陈瑞阳等^[42]在国内首创利用去壁低渗法进行染色体标本制备,并对 37 科 105 种植物进行制片,总结了不同植物的低渗、酶解和染色时间。韩毅科等^[43]采用卷须运用去壁低渗法进行黄瓜染色体制片得到理想结果,与取叶芽、茎尖相比,取卷须对宝贵的单倍体材料无任何损伤。孙马等^[44]利用去壁低渗染色体计数法及流式细胞术法,首次系统地对中国野生葡萄 18 个种 64 个株系的染色体倍性进行了鉴定,结果表明供试的中国野生葡萄全部为二

倍体($n=24$),两种鉴定方法的结果一致。

2.2 核仁数目与核型分析鉴定

植物倍性化后,细胞分裂间期的细胞核仁数目随倍性发生改变^[45],可据此判断倍性关系。在细胞分裂间期取待测植株的幼叶、茎尖,采用去壁低渗法制片,显微镜下统计每个细胞的核仁数目可判断其相应倍性水平。核型是由每个细胞核中各个不同的染色体按一定型式组合而成的,它是物种的特有遗传信息,有很高的稳定性和再现性,植物倍性化后核型公式随之发生改变,倍性化后部分染色体在臂比、着丝粒位置等方面存在明显差异^[46]。可据此鉴定多倍体,但需对该植物的核型已有较为深入的研究。

3 讨论

染色体倍性化在植物进化、作物品种改良上作用重大,在遗传育种、优良农艺性状利用上还将发挥越来越重要的作用。准确鉴定植物倍性水平是发挥其作用的重要环节。植物染色体倍性鉴定应当遵循这样的原则:早期筛选、破坏性小、准确度高、因陋就简。能尽早鉴定出来的应尽早鉴定,从而缩短育种时间,加速育种进程,尽快应用于育种实践;能用简单办法鉴定出来的尽量用简单办法,可节省人力物力。

各种鉴定方法结合运用,可用来判断鉴定的准确性。染色体计数法虽然准确,但某些植物制片难度较大,不易观察到真实结果;流式细胞仪法为近来兴起的新兴技术,对群体细胞鉴定的准确性高,但对单个细胞及混倍体的区别不够精确;形态鉴定法、条件鉴定法简单易行,但其准确性有待提高,且需对该植物的遗传规律有一定基础研究;生理生化指标、细胞学也有许多局限性。各种方法的综合运用,相互印证,才能摸索出各种植物倍性鉴定的正确方法。植物倍性化后,其遗传行为将更为复杂,我们不能期望统一的、标准的多倍体鉴定方法出现,必须针对各种植物分别进行深入研究,但各种植物倍性鉴定方法可以相互借鉴,达到快速、省时省力鉴定植物倍性的目的,更好地为倍性植物的利用服务。

参考文献(References):

[1] 何启谦. 园林植物育种学[M]. 北京:中国林业出版社(HE Qi-xian. Breeding of Landscape Plants[M]. Beijing: China Forestry Press), 1992. 195-217.
[2] CHOO T M. Use of haploids in barley breeding[J]. Plant Breeding, 1985, 104(3): 219-252.

[3] 曹向宇,惠秀娟,孟玲玲. 蔬菜作物染色体鉴定方法概述[J]. 辽宁大学学报(自然科学版)(CAO Xiang-yu, HUI Xiu-juan, MENG Ling-ling. Outline of vegetable crop chromosome appraisal method [J]. Journal of Liaoning University (Natural Sciences version)), 2005, 32(2): 183-186.
[4] OHNO S. Evolution by Gene Duplication[M]. London: Addison-wesley, 1970. 89-112.
[5] STEBBINS G L. Chromosome Evolution in Higher Plants[M]. London: Addison-wesley, 1971. 118-222.
[6] BAO Wen-kui, YAN Yu-rui. Octoploid triticale in China. Advance in science of China[J]. Biology, 1993, 3: 55-76.
[7] 杨万立. 生物多倍体及其在农业上的应用[J]. 生物学通报(YANG Wan-li. Biology polyploid and application in agriculture[J]. Bulletin of Biology), 2006, 41(3): 23-24.
[8] 李春铃,蒋钟仁. 甜椒花培新品种“海花三号”的育成[J]. 园艺学报(LI Chun-ling, JIANG Zhong-ren. Breeding of new variety sweet peppers “Hai Hua NO 3” flower cultivated [J]. Acta Horticulturae Sinica), 1990, 17(1): 39-44.
[9] 张爱民,常莉,薛建平. 药用植物多倍体诱导研究进展[J]. 中国中药杂志(ZHANG Ai-ming, CHANG Li, XUE Jian-pin. Progress in research on inducing the polyploid of medicinal plants[J]. China Journal of Chinese Materia Medica), 2005, 30(9): 645-649.
[10] COMPTON M E, GRAY D J, ELMSTROM G W, et al. Identification of tetraploid regenerants from cotyledons of diploid watermelon cultured *in vitro* [J]. Euphytica, 1996, 87: 165-172.
[11] 陈发棣,蒋甲福,房伟民. 秋水仙素诱导菊花脑多倍体的研究[J]. 上海农业科学(CHEN Fa-di, JIANG Jia-fu, FANG Wei-min. Study on induction on polyploidy dendranthema nankindense with colchicine[J]. Acta agricultural Shanghai), 2002, (18): 46-50.
[12] 郑思乡,雷小云,董志渊,等. 离体培养条件下金鱼草多倍体诱导研究 [J]. 云南林业科学 (ZHENG Si-xiang, LEI Xiao-yun, DONG Zhi-yuan, et al. A study of polyploid induction of *Antirrhinum majus* by *in vitro* Culture [J]. Yunnan Forestry Sciences and Technology), 2003, 12(105): 80-82.
[13] EINSET J. The spootaneous origin of polyploidy apples [J]. Proc Amer Soc Hort Sci, 1945, 46: 91-43.
[14] EINSET J, IMHOFE B. Chromosome numbers of apple varieties and sports 3 [J]. Proc Amer Soc Hrt sci, 1951, 58: 103-108.
[15] 张建军,殷丽青,张伟萍,等. 莴苣四倍体的特征及田间耐热性[J]. 上海农业学报(ZHANG Jian-jun, YIN Li-qin, ZHANG Wei-pin, et al. Features and heat resistance of shicai (*Brassica campestris*) tetraploids[J]. Acta Agricultural Shanghai), 1998, 14(2): 35-40.
[16] 邹道歉,申书兴. 四倍体番茄低稔性胚胎学研究[J]. 华北农学报 (ZOU Dao-qian, SHENG Shu-xing. Studies on the mechanism of low fertility in induced tetraploids of tomato[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica), 1990, 5(1): 10-16.
[17] 程心旻,高山林,卞云云. 白木同源四倍体诱导和鉴定及其与二倍体过氧化物酶的比较[J]. 植物资源与环境学报(CHENG Xin-min, GAO Shan-lin, BIAN Yun-yun. Induction and identification of autotetraploid of *Atractylodes macrocephala* and comparison of its peroxidase and diploid's [J]. Journal of the Plant Resources and Environment), 2003, 12(1): 16-20.
[18] 陈清华,彭庆务,黄涛,等. 西瓜过氧化物酶、酯酶同工酶酶谱及其利用研究[J]. 广东农业科学(CHEN Qing-hua, PENG Qing-wu, HUANG Tao, et al. The study and application of watermelon peroxide enzyme, the esterase isozyme enzyme spectrum[J]. Guangdong Agricultural Sciences), 1998, (2): 22-24.
[19] 马德伟,高锁柱,韩素江,等. 甜瓜过氧化物酶同工酶研究初报 [J]. 河北农业大学学报 (MA De-wei, GAO Suo-zhu, et al. Preliminary report on the study of watermelon peroxidase isozyme [J]. Journal of Hebei Agricultural University), 2003, 27(1): 1-4.

- HAN Su-jiang, *et al.* Reports of the melon peroxide enzyme isozyme research [J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 1986, 6(2) : 9-13.
- [20] 张振超, 张蜀宁, 张伟, 等. 四倍体不结球白菜的诱导及染色体倍性鉴定[J]. 西北植物学报 (ZHANG Zhen-chao, ZHANG Shu-ning, ZHANG Wei, *et al.* Induction of tetraploidy of non-heading Chinese cabbage with late-bolting and identification of chromosome configuration[J]. Acta Botanica Boreali-occidentali Sinica), 2007, 27(1) : 28-32.
- [21] 杨晓明, 王翠玲. 葡萄多倍体诱导及其特征特性研究[J]. 甘肃农业大学学报 (YANG Xiao-ming, WANG Cui-ling. Studies on induction and characteristics of grape polyploid [J]. Journal of Gansu Agricultural University), 2005, 40(6) : 741-744.
- [22] 刘文革, 阎志红, 张红梅, 等. 不同倍性西瓜发芽种子成苗过程中的耐盐性研究[J]. 中国西瓜甜瓜 (LIU Wen-ge, YAN Zhi-hong, ZHANG Hong-mei, *et al.* Study on the salt endurance in process of watermelon germinates seed to become seedling[J]. China Watermelon and Muskmelon), 2002(3) : 1-3.
- [23] 刘惠吉, 杨振兴. 二倍体、四倍体白菜体细胞的质壁分离状况与抗性关系的研究[C]//浙江农业大学. 现代蔬菜科学论文集—纪念李曙轩教授诞辰八十周年. 上海: 上海科学技术出版社 (LIU Hui-ji, YANG Zhen-xing. Study on the diploid, tetraploid cabbage somatic cell plasmolysis condition and resistant relations [C]// Zhejiang Agricultural University. Modern Vegetables Scientific Collection—Commemorates Li Shuxuan Professor 80th Anniversary[C]. Shanghai : Shangshi Science and Technology Press), 1998. 67-68.
- [24] 马国斌, 王鸣, 郑学勤. 西瓜体细胞无性系变异初探[J]. 上海农业科学 (MA Guo-bin, WANG Min, ZHENG Xue-qin. Preliminary studies on somaclonal variation of watermelon[J]. Acta Agricultural Shanghai), 2003, 19(3) : 9-12.
- [25] 杜胜利, 韩毅科, 魏爱民, 等. 黄瓜倍性鉴定方法的研究[J]. 园艺学报 (DU Sheng-li, HAN Yi-ke, WEI Ai-ming, *et al.* Ploidy determination in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. Acta Horticulturae Sinica), 2002, 29(3) : 280-281.
- [26] CHOI Miyong. Improvement of chloroplast observation technique in guard cells for ploide detection of microspore derived plants in broccolij[J]. Journal of the Korean Society for Horticultural Science, 1997, 38(6) : 666-669.
- [27] 陈劲枫, 雷春, 钱春桃, 等. 黄瓜多倍体育种中同源四倍体的合成和鉴定[J]. 植物生理学通讯 (CHEN Jin-feng, LEI Chun, QIAN Chun-tao, *et al.* Synthesis and characterization of autotetraploid in cucumber polyploid breeding[J]. Plant Physiology Communications), 2004, 40(2) : 149-152.
- [28] 刘文革, 王鸣, 阎志红. 不同倍性西瓜花粉形态观察[J]. 园艺学报 (LIU Wen-ge, WANG Ming, YAN Zhi-hong. Observation and comparison on pollen morphology of different ploidy watermelon[J]. Acta Horticulturae Sinica), 2003, 30(3) : 328-330.
- [29] 杨瑞芳, 郑思乡, 郭清泉, 等. 莲多倍体研究, 莲花花粉母细胞减数分裂行为观察[J]. 湖南农业大学学报 (YANG Rui-fang, ZHENG Si-xiang, GUO Qing-quan, *et al.* Study on polyploids of lotus, observation of meiosis of microsporophytes in lotus[J]. Journal of Hunan Agricultural University), 1998, 24(2) : 95.
- [30] YADZV R C, GRUMET R. Tendrils as an alternate tissue source for chromosome visualization [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 1994, 119 (4) : 850-852.
- [31] FARNHAMMW C L. Doubled-haploid broccoliproduction using anther culture : effect of anther source and seed set characteristics of derived lines[J]. J AM Soc Hortsci, 1998, 123 : 73-77.
- [32] 马爱红, 范培格, 孙建设, 等. 四倍体葡萄诱导技术的研究[J]. 中国农业科学 (MA Ai-hong, FAN Pei-ge, SUN Jian-she, *et al.* Study on induction of tetraploid grapes[J]. Scientia Agricultura Sinica), 2005, 38(8) : 1645-1651.
- [33] 陈斌, 耿三省, 张晓分, 等. 辣椒花药培养再生植株染色体倍数检测研究[J]. 辣椒杂志 (CHEN Bin, GENG San-sheng, ZHANG Xiao-fen, *et al.* Study of the chromosome number examination of hot pepper anther cultured[J]. Journal of Hot Pepper), 2005, 4 : 28-30.
- [34] 张有做, 楼程富, 周金妹, 等. 不同倍性桑品种基因组 DNA 多态性比较[J]. 浙江农业大学学报 (ZHANG You-zuo, LOU Cheng-fu, ZHOU Jin-mei, *et al.* Polymorphism studies on genomic DNA of diploids and polyloids in mulberry[J]. Journal of Zhejiang Agricultural University), 1998, 24(1) : 79-81.
- [35] MARK E S. Development and application of RFLPs in Polyploids [J]. Crop Sci, 1992, 32 : 1086-1091.
- [36] 刘文革, 王鸣, 阎志红. 西瓜二倍体及同源多倍体遗传差异的 AFLP 分析[J]. 果树学报 (LIU Wen-ge, WANG Ming, YAN Zhi-hong, *et al.* AFLP analysis of the genetic diversity between diploid and autopolyploid watermelon[J]. Journal of Fruit Science), 2004, 21(1) : 46-49.
- [37] 吴福川, 胡秀, 郑思乡. 不同倍性金鱼草基因组 DNA 随机扩增多态性研究[J]. 云南农业大学学报 (WU Fu-chuan, HU Xiu, ZHENG Si-xiang. Study on randomly amplified polymorphic denome DNA of diploid and tetraploid *antirrhinum majus* [J]. Journal of Yunnan Agricultural University), 2005, 20(4) : 482-485.
- [38] 郭启高, 宋明, 杨元秀, 等. 西瓜试管苗中四倍体鉴定方法研究[J]. 西南农业大学学报 (GUO Qi-gao, (SONG Ming, YANG Yuan-xiu, *et al.* Study on identification methods for tetraploids from tube cultured seedlings of watermelon (*Citrullus vulgaris*) [J]. Journal of Southwest Agricultural University), 2000, (3) : 261-262.
- [39] 全国无籽西瓜科研协作组. 无籽西瓜栽培与育种[M]. 北京: 中国农业出版社 (National Seedless Watermelons Scientific Research Cooperation Group. Cultivation and breeding on seedless watermelons [M]. Beijing : National Agricultural Press), 2001.50-51.
- [40] PELOQUIN S J, ORTIZ R, STALKER H T, *et al.* Plant Breeding in the 1990s[M]. Washington : CAB International, 1992. 485-507.
- [41] TEODORO Cardi, VITTORIA Iannamico. Study on potato cell issue and organ culture[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1993, 34(1) : 107-114.
- [42] 陈瑞阳, 宋文芹, 李秀兰. 植物染色体标本制备的去壁低渗法及其在细胞遗传学中的意义[J]. 遗传学报 (CHEN Rui-yang, SONG Wen-qin, LI Xiu-lan. The plant chromosome flaking for barleyand specimen preparation and the significance in cytogenetics[J]. Journal of Heredity), 1982, 9(2) : 151-159.
- [43] 韩毅科, 杜胜利, 王鸣. 黄瓜染色体制片及倍性研究[J]. 华北农学报 (HAN Yi-ke, DU Sheng-li, WANG Ming. Study on chromosome preparing and ploidy in Cucumber[J]. Acta Agriculturae Boreali-sinica), 2003, 18(1) : 72-74.
- [44] 孙马, 王跃进. 中国野生葡萄染色体倍性研究[J]. 西北农业科学 (SUN Ma, WANG Yue-jin. Study on the chromosome ploidy of Chinese wild vitis species[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica), 2006, 15(6) : 148-152.
- [45] 刘璐璐, 柴明良. 秋水仙素在果树多倍体育种中的研究进展[J]. 北方园艺 (LIU Lu-lu, CHAI Ming-liang. Study progress on colchicin in fruit tree polyploid breeding[J]. Northern Horticulture), 2006, (6) : 48-49.
- [46] 赵彦华, 吴国良, 药文生. 果树多倍体育种研究进展[J]. 山西果树 (ZHAO Yan-hua, WU Guo-liang, YAO Wen-sheng. Progresses on polyploid breeding in the fruit tree[J]. Shanxi Fruits) 2004 (4) 35-36.