

同源四倍体铁皮石斛的生长及多糖积累

江金兰^{1,*}, 叶炜^{1,*}, 李永清¹, 周建金¹, 雷伏贵¹, 魏道智^{2,**}

¹三明市农业科学研究院药用植物研究所, 福建沙县365509; ²福建农林大学生命科学学院, 福州350002

摘要: 通过秋水仙素诱导铁皮石斛多倍体, 以外观形态、气孔、染色体数目筛选多倍体植株, 分析多倍化对铁皮石斛多糖累积及生长的影响。结果表明, 同源四倍体铁皮石斛茎、叶及原球茎的多糖含量分别是二倍体的1.31、1.83及1.95倍, 但生长速度显著或极显著低于对照。ISSR分析显示, 同源四倍体植株产生较明显的基因变异。

关键词: 铁皮石斛; 多倍体; ISSR; 多糖

Growth and Polysaccharides Accumulation in Autotetraploid *Dendrobium officinale*

JIANG Jin-Lan^{1,*}, YE Wei^{1,*}, LI Yong-Qing¹, ZHOU Jian-Jin¹, LEI Fu-Gui¹, WEI Dao-Zhi^{2,**}

¹The Institute of Medicinal Plant, Sanming Academy of Agricultural Science, Shaxian, Fujian, 365509, China; ²College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: Polyploidy *Dendrobium officinale* was induced by colchicine. Autotetraploid plantlets were screened by appearance, stoma and chromosome number. The accumulation of polysaccharides and growth rate in autotetraploid were also analyzed. Results indicated that, the contents of polysaccharides in stem, leaf, and protocorm-like body of autotetraploid were 1.31, 1.83 and 1.95 fold to diploid, but the growth rate were significantly or very significantly lower than the control. Obviously genomic mutations were observed by ISSR molecular marker analysis in autotetraploid plants.

Key words: *Dendrobium officinale*; polyploid; ISSR; polysaccharide

铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)系兰科(Orchidaceae)石斛属植物, 为我国传统中药材, 已有2000多年悠久的药用历史, 在《神农本草经》、《名医别录》、《本草纲目》等古代中医药典籍中均有收录, 具有益胃生津, 滋阴清热等功效, 为九大仙草之首, 药界有“北有人参, 南有石斛”之说。现代医学研究发现, 石斛还具有抗肿瘤、治疗白内障、抗氧化、镇痛、抗炎症、抗血小板凝聚、抑菌等生理作用(Lee等1995; 邓银华等2002; 毕志明等2003; Gong等2004; 魏小勇和龙艳2008; Chanvorachote等2013; Kowitdamrong等2013)。石斛属植物药用成分复杂, 其主要有效成分有石斛类多糖、生物碱、微量元素及氨基酸、酚类、萜类、芪类、甾酮类、倍半萜类、甾体类及香豆素等(邓银华等2002)。其中, 石斛多糖是铁皮石斛的重要品质标准, 根据2010版药典规定(国家药典委员会2010), 铁皮石斛干重多糖含量应不低于25%, 并且甘露糖含量在13.0%~38.0%之间。

多倍体是物种进化的重要动力之一, 几乎所有开花植物都经历染色体的加倍以延展其物种的

丰富程度(Bowers等2003; Hahn等2012)。多倍体可产生类型丰富的性状。由于多倍体植株较二倍体植株具有更高的光合效率(Wullschlegler等1996)和对逆境的适应能力(Otto 2007), 使多倍体变异株较二倍体植株更容易存活下来(Mable 2003), 同时, 同源多倍体还可能提高铁皮石斛的自交可育性, 为铁皮石斛的三倍体育种提供了可能(Comai 2005)。多倍体提高植物次生代谢物积累已在多种植物上得到验证(唐宁和高山林2006; 陈素萍2010; 客绍英2010; Caruso等2011; 喻祖文和张旺凡2011; Bernard等2012; Lavania等2012), 如四倍体菘蓝(客绍英2010)、白术(唐宁和高山林2006)、党参(陈素萍2010)多糖含量高于二倍体。但多倍化对多糖含量的影响在不同类型的植物有差异, 如黄精(喻祖

收稿 2013-12-17 修定 2014-02-26

资助 三明市科技计划项目(2011-K-1)和三明市农业科学研究院立项目(2013-Y-01)。

* 共同第一作者。

** 通讯作者(E-mail: weidz888@sohu.com; Tel: 0598-5862594)。

文和张旺凡2011)在四倍体及二倍体栽培种的多糖含量对比中没有显著差异。值得注意的是,虽然多倍化能增加次生代谢物积累,但同样可能对植物的生长速度造成影响(Eelco等1999; Lavania等2012)。因此,综合考量多倍化对铁皮石斛生物产量及多糖积累的影响具有重要的现实意义。

铁皮石斛虽然已有多倍体研究报道,但仅限于多倍体的诱导效率及形态、细胞学鉴定(廖苏梅2002; 唐娅梅等2010; 詹志根和徐程2011; 张青华等2011),关于多倍体对铁皮石斛生物产量及多糖积累的影响还未见报道。本研究通过秋水仙素诱导铁皮石斛原球茎,并通过外观形态、气孔直径及染色体数目筛选多倍体植株,通过检测同源四倍体与对照二倍体铁皮石斛的原球茎、茎、叶中多糖含量差异,原球茎及植株生长速度差异,分析多倍化对铁皮石斛多糖累积及生长的影响,此外,本试验还进行了同源四倍体植株ISSR分子标记初步分析,以期对铁皮石斛的多倍体育种提供参考。

材料与amp;方法

1 材料

本试验所使用材料为浙江天目山红杆铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)原球茎及无菌苗,由三明市农科院药用植物所保存。材料为二倍体植株($2n=2x=38$)。

2 方法

2.1 多倍体诱导

取继代培养30~45 d生长旺盛原球茎,接种于含0.04%过滤灭菌秋水仙素的液体1/2MS培养基(附加蔗糖20 g·L⁻¹, pH 5.6),置于80 r·min⁻¹、16 h·d⁻¹光照、25 °C摇床培养48 h,取出用无菌滤纸吸干液体培养基,移至1/2MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA固体培养基(附加20 g·L⁻¹蔗糖、50 g·L⁻¹香蕉泥, pH 5.6),进行分化培养,培养45 d后,取分化苗转入相同培养基进行壮苗培养,培养45 d后进行相关鉴定工作。

2.2 染色体数目鉴定

参照周建金(2008)方法,采用改良苯酚染色法对诱导植株进行根尖染色体数目观测,具体操作步骤为:于上午9时取继代培养25 d左右植株根尖,2 mmol·L⁻¹ 8-羟基喹啉4 °C预处理2 h,4 °C卡诺固定液固定过夜,于1 mol·L⁻¹ HCl 60 °C解离3~4 min,

蒸馏水清洗2~3次,置于蒸馏水2~3 h备用,于显微镜下染色观察、拍照,以二倍体植株染色体数目为对照,染色体数目 $2n=4x=76$ 确定为多倍体植株。

2.3 气孔观测

参照叶炜等(2011)方法,利用碘-碘化钾染色法,取叶片下表皮于碘-碘化钾染液染色1 min,置于显微镜观察拍照,10×物镜下观测单位视野内气孔密度,40×物镜下观测气孔直径(纵向),以二倍体植株叶片为对照,统计气孔密度与气孔直径,每个株系观察20株,重复3次。

2.4 同源四倍体植株形态分析

以移栽4个月同源四倍体植株为材料,对植株的叶长、叶宽(从上至下第三片叶)、叶面积、茎节间长、茎粗及株高进行观测,以二倍体植株为对照,每个株系观察20株,重复3次。

2.5 同源四倍体植株生长量分析

以同源四倍体原球茎和植株(2 cm左右小苗)为启动材料,二倍体材料为对照,接种于1/2MS+25 g·L⁻¹马铃薯泥+25 g·L⁻¹香蕉泥培养基中,每个处理接种5瓶,重复3次。继代45 d后统计原球茎(包含部分分化小芽)和植株的生长量。

2.6 同源四倍体植株多糖分析

参照苯酚-硫酸法(国家药典委员会2010)测定多糖含量。统计继代45 d同源四倍体原球茎(含部分分化小芽)多糖含量,以二倍体植株为对照,每个株系观察5瓶,重复3次;统计同源四倍体45 d生根培养苗茎、叶多糖含量,以二倍体植株为对照,每个株系观察20株,重复3次。

2.7 铁皮石斛同源四倍体ISSR的多态性分析

取已分离鉴定的8个同源四倍体单株叶片,以正常二倍体植株叶片为对照,CTAB法提取总DNA。从100条ISSR引物中筛选的11条条带清晰引物(表1,引物购自上海生工)进行基因多态性分析。25 μL PCR反应体系:10×PCR buffer (plus Mg²⁺) 2.5 μL, dNTPs (2.5 mmol·L⁻¹) 0.5 μL,引物(10 μmol·L⁻¹) 1 μL, Taq酶(5 U·μL⁻¹) 0.2 μL,模板1 μL, ddH₂O 19.8 μL。PCR反应程序:94 °C预变性4 min;94 °C变性45 s,依引物温度退火45 s,72 °C延伸2 min,40个循环;最后72 °C延伸10 min。PCR产物于1.5%琼脂糖凝胶电泳分析,拍照,DPS软件进行聚类分析并统计变异率。

表1 同源四倍体铁皮石斛ISSR分子标记分析引物

Table 1 Primers for ISSR molecular marker analysis in autotetraploid *D. officinale*

引物编号	引物序列(5'→3')	退火温度/°C
I08	AGAGAGAGAGAGAGAGC	54.59
I10	GAGAGAGAGAGAGAGAT	52.18
I11	GAGAGAGAGAGAGAGAC	54.59
I35	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	56.16
I41	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	56.16
I42	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	56.16
I66	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	61.86
I73	GACAGACAGACAGACA	51.55
I78	GGATGGATGGATGGAT	51.55
I80	GGAGAGGAGAGGAGA	53.57
I91	HVHTGTGTGTGTGTGTG	52.98

Y=C/T; H=A/C/T; V=A/C/G.

实验结果

1 多倍体铁皮石斛诱导

本试验以0.04%秋水仙素诱变48 h, 转入分化培养基培养, 45 d后, 所有原球茎可正常增殖, 但部分原球茎出现难以正常分化成苗的现象。此外, 分化的苗中出现叶色(红叶、白化)、叶形(圆叶、尖叶、狭长叶及异形叶)、茎色(绿杆、红杆)等变

异性状。为选育高多糖类型变异植株, 本试验挑选已分化植株进行壮苗培养, 45 d后, 根据石斛及其他兰科植物多倍体植株特征(叶炜等2011; 詹忠根和徐程2011; 张青华等2011), 挑取株形相对正常, 叶色浓绿、厚度增加、纹理粗糙、节间缩短的植株作为待测株(图1), 进一步鉴定。

2 铁皮石斛多倍体植株染色体数目观察

为确定诱导植株染色体数目, 本试验以改良苯酚法观察多倍体铁皮石斛根尖染色体, 以正常株(视为二倍体)为对照。在15个待测株中, 共观察到具有多倍体细胞植株7株, 其中5株同时具有同源四倍体及二倍体细胞, 仅2株未观察到二倍体细胞, 同源四倍体细胞染色体数目为 $2n=4x=76$, 而正常株为 $2n=2x=38$ (图2)。将同源四倍体植株分离进行进一步增殖培养, 以备后续观察。

3 同源四倍体铁皮石斛气孔观察

将同源四倍体植株叶片下表皮于碘-碘化钾液染色, 以二倍体植株为对照, 于10×物镜下观察拍照(图3-A、B), 在单视野面积下, 同源四倍体气孔较为稀疏, 数目平均为11.25个, 极显著低于二倍体的38.51个(图3-E)。将气孔于40×物镜下观察气孔直径(纵径)(图3-C、D)发现, 同源四倍体铁皮石

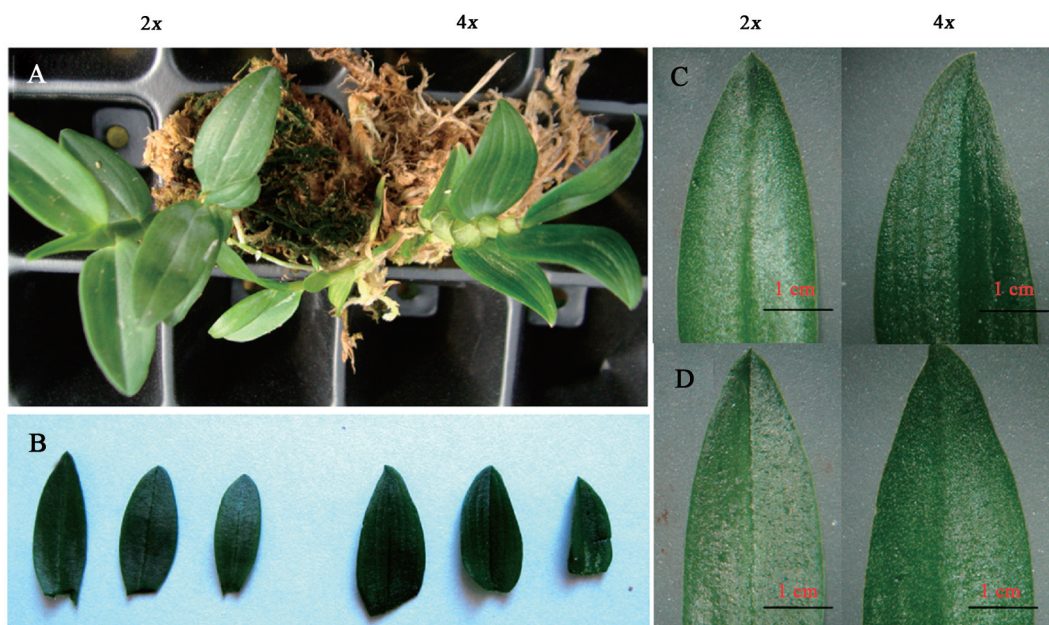


图1 同源四倍体铁皮石斛植株形态对比

Fig.1 Morphology comparison of autotetraploid *D. officinale*

A: 移栽4个月二倍体(2x, 下同)与同源四倍体(4x, 下同)全株形态对比; B: 二倍体植株与同源四倍体植株叶片形态对比; C: 二倍体植株与同源四倍体植株叶片正面细部对比(叶片为从上至下第3片叶, 下同); D: 二倍体植株与同源四倍体植株叶片背面细部对比。

斛气孔直径为43.1 μm , 极显著大于二倍体的30.5 μm (图3-E)。此外, 可见同源四倍体叶肉细胞亦较

二倍体叶肉细胞粗大, 同源四倍体气孔保卫细胞可见更为密集的叶绿体(图3-D)。

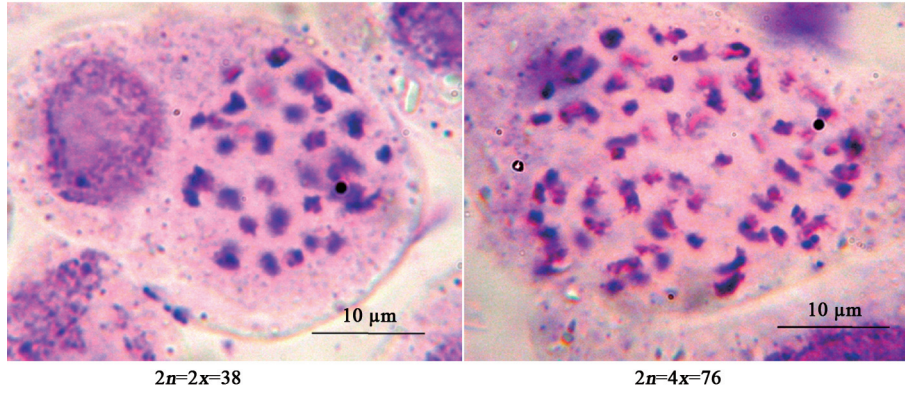


图2 同源四倍体铁皮石斛植株染色体数目分析
Fig.2 Chromosome number analysis in autotetraploid *D. officinale*

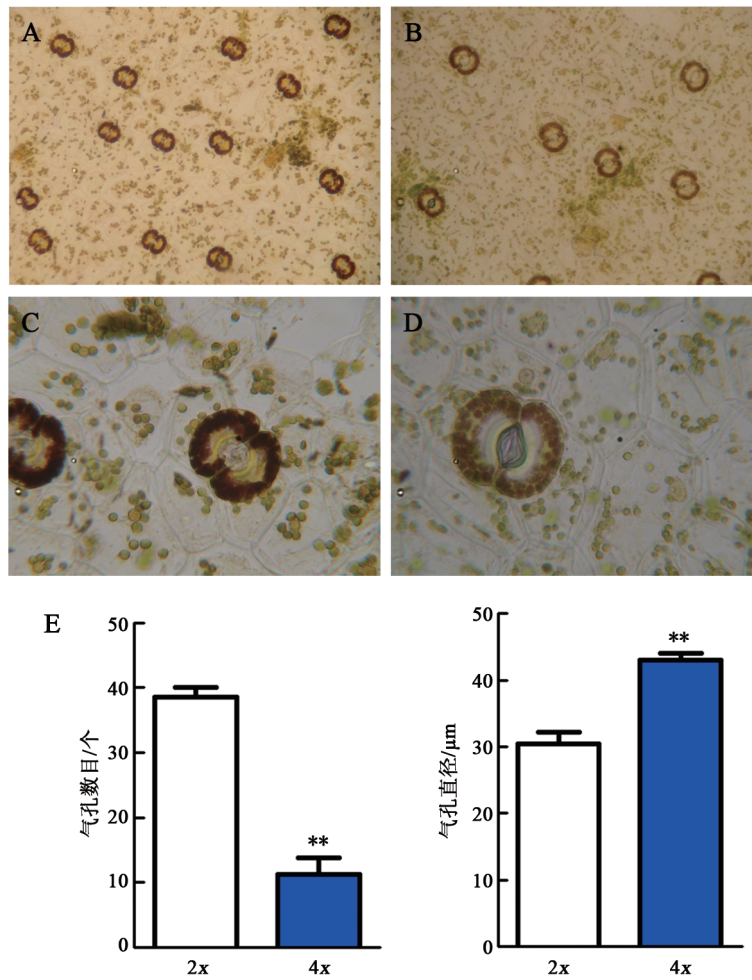


图3 同源四倍体铁皮石斛植株气孔直径及数目分析

Fig.3 Analysis of number and diameter of stoma in autotetraploid *D. officinale*

A、B: 10 \times 物镜下二倍体(A)与同源四倍体(B)气孔数目差异; C、D: 40 \times 物镜下二倍体(C)与同源四倍体(D)气孔数目差异; E: 二倍体与同源四倍体铁皮石斛植株气孔直径及数目统计分析, **: 同源四倍体与二倍体差异极显著($P < 0.01$)。

4 同源四倍体铁皮石斛植株形态观察

由于多倍体常可带来器官增大的性状, 本试验对比观测移栽4个月的四倍体铁皮石斛及正常株的叶长、叶宽、叶面积、茎节间长、茎粗及株高(表2)。在叶片方面, 同源四倍体植株叶宽极显著高于二倍体植株, 叶长略小于二倍体植株, 使叶形更大且接近圆形, 同源四倍体叶面积极显著大

于二倍体植株; 茎部方面, 同源四倍体植株的茎粗极显著高于二倍体植株, 但在茎节间及株高方面略小于二倍体植株, 使植株外观表现短小、粗壮。

5 同源四倍体铁皮石斛生长量分析

为了考查铁皮石斛加倍后对生长的影响, 对同源四倍体及二倍体的原球茎及无菌苗进行了生长量的测定(图4)。在相应培养基继代培养45 d后,

表2 二倍体与同源四倍体铁皮石斛植株形态比较

Table 2 Morphology comparison of diploid and autopolyploid *D. officinale*

倍性	叶长/cm	叶宽/cm	叶面积/cm ²	茎节间长/cm	茎粗/cm	株高/cm
二倍体	2.47±0.22	0.89±0.07	2.20±0.11	0.70±0.13	0.57±0.08	4.26±0.66
同源四倍体	2.31±0.29	1.30±0.12**	3.02±0.36**	0.63±0.10	0.67±0.05**	3.79±0.82

数据为平均数±SD; **: 同源四倍体与二倍体差异极显著($P<0.01$)。

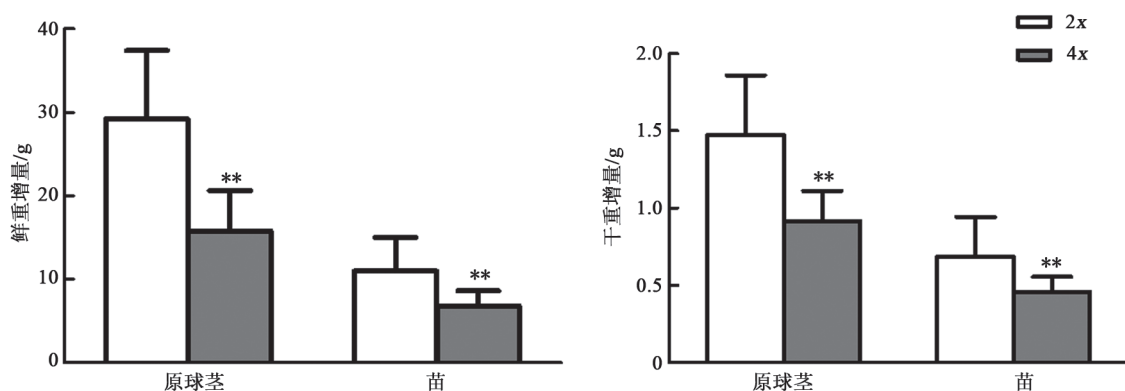


图4 同源四倍体铁皮石斛原球茎和植株的生长量对比

Fig.4 Comparison of growth rate of protocorm-like body and plantlets in autotetraploid and diploid *D. officinale*

**: 同源四倍体与二倍体差异极显著($P<0.01$)。

同源四倍体原球茎的鲜、干重均极显著低于对照二倍体, 其生长量分别为二倍体的54.1%和62.0%; 同源四倍体植株(约2 cm)的鲜、干重亦显著低于对照二倍体, 其生长量分别为二倍体的62.5%和66.5%。表明相对于二倍体, 同源四倍体原球茎和植株的生长速度较慢, 但在干物质含量方面, 略高于二倍体材料。

6 同源四倍体铁皮石斛多糖积累分析

测定了继代培养45 d多倍体铁皮石斛茎、叶及原球茎总多糖含量(干重), 结果表明, 同源四倍体铁皮石斛茎、叶及原球茎多糖含量分别是二倍体植株的1.31、1.83及1.95倍(图5), 其中, 叶片及原球茎均极显著高于对照, 茎部多糖略高于二倍体

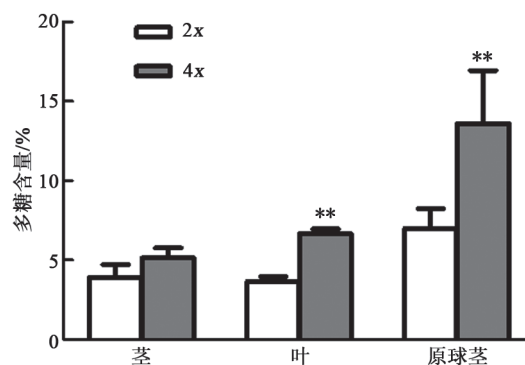


图5 同源四倍体铁皮石斛多糖含量分析

Fig.5 Analysis of contents of polysaccharides in autotetraploid *D. officinale*

**: 同源四倍体与二倍体差异极显著($P<0.01$)。

植株但无显著差异。综上所述,同源四倍体铁皮石斛的原球茎和无菌苗多糖的累积能力显著高于二倍体。

7 同源四倍体铁皮石斛ISSR分子标记分析

为了考查秋水仙素对铁皮石斛基因变异的影响,本试验选用条带清晰的11条ISSR引物对8株同

源四倍体植株(1~8)及1株二倍体植株(2x)进行了分析(图6显示了两条引物的扩增结果),结果表明,11条引物共扩增条带55条,其中多态性条带20条,多态性比率达36.4%。将所扩增位点经DPS 7.05版软件进行UPMGA聚类分析表明(图7),同源四倍体样

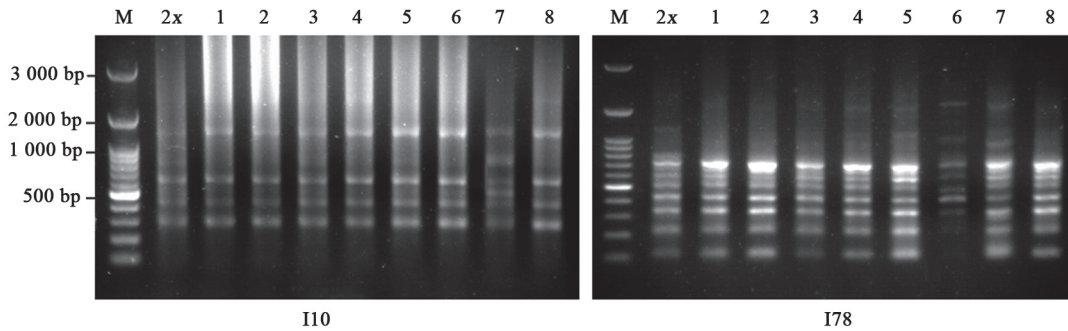


图6 ISSR引物I10及I78的PCR扩增结果

Fig.6 PCR amplification results of ISSR primer I10 and I78

M: 100 bp marker; 1~8: 同源四倍体单株; 2x: 二倍体单株。

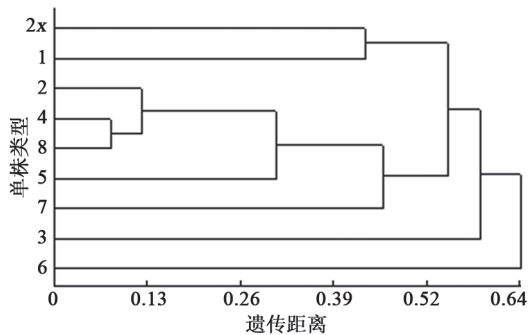


图7 同源四倍体铁皮石斛ISSR标记聚类分析

Fig.7 Analysis of ISSR molecular marker in autotetraploid

D. officinale

1~8: 同源四倍体单株; 2x: 二倍体单株。

在0.0769至0.657之间,8个单株相互之间没有完全一致的类型,表明秋水仙素可以诱导铁皮石斛产生丰富的变异类型。

讨 论

1 铁皮石斛多倍体植株细胞和器官增大但生长较缓慢

多倍体植株通常表现器官增大现象,如茎粗短、叶片变厚,呈粗糙或折皱,花、果和种子变大,

生育期延长等(Bowers等2003; Otto 2007; 唐娅梅等2010)。本试验通过秋水仙素诱导铁皮石斛原球茎获得多种变异类型铁皮石斛植株,通过对比外观形态、气孔及染色体数目,发现变异植株主要表现为植株茎短而粗壮,叶色深绿,叶片面积变大,纹理折皱、粗糙,气孔变大、稀疏,此结果与其他种石斛多倍体的性状变化一致(Chaicharoen和Saejew 1981; 郑宝强等2009; 张青华等2011)。Mable和Otto (2001)认为四倍体细胞的容积较二倍体增大(约1.5倍体积),可以使单个细胞容纳更大的细胞器。在本试验中,同源四倍体铁皮石斛叶片中观察到的气孔直径为二倍体的1.41倍,并且更为稀疏,其保卫细胞中累积密集的叶绿体。Mishra (1997)发现,多倍体植株气孔密度的降低可能是上皮细胞增大的结果,利用气孔密度、保卫细胞的长度以及保卫细胞内的叶绿体数目对多倍体的预测准确率可达83%~87%,是替代繁琐的染色体数目鉴定,快速鉴定多倍体的辅助方法之一(Mishra 1997; te Beest等2011)。

值得注意的是,多倍体细胞体积的增大可能也是造成多倍体植株生长缓慢的重要原因,四倍体细胞表面积随体积的增大而增大,但相对二倍

体细胞,其表面积/体积比缩小,可能导致多倍体植株生长变慢(Mable和Otto 2001)。此外,多倍体细胞分裂周期更长,需要消耗更多的氮、磷矿质元素用于合成核酸物质,在自然界中,生长快速的植物通常具有小基因组(Hessen等2010)。但并不是所有的多倍体都会导致植株生长变慢,Lavania等(2012)比较6个不同种香茅属(*Cymbopogon*)植物的同源四倍体与二倍体发现,不同种香茅属植物多倍体相对二倍体的生物产量同时呈现增高与降低,这与香茅属植物次生代谢物精油组分的类型密切相关。以柠檬醛为主的乙醛型精油香茅属植物四倍体植株呈现生物产量的降低,但以香叶醇为主的乙醇型精油香茅属植物四倍体植株呈现生物产量的增高。Lavania等(2012)认为这种差异与合成精油的代谢途径长短有关,短代谢途径(乙醇型精油)有利植物对物质高效的利用。由于所有的四倍体香茅属植株都产生更高比例的精油,长代谢途径类型精油(乙醛型)的积累需要产生更多的中间产物,营养物质的竞争导致四倍体植株的生长受到更大的抑制。兰科特别是附生兰类为典型的景天酸代谢植物,生长速度缓慢(Kerbauy等2012)。在本试验中,多倍体石斛相对二倍体石斛生长更为缓慢,生物量仅为二倍体的54.1%~66.5%,这与张青华等(2011)的观点一致。铁皮石斛中是否存在能同时提高多糖含量及生物产量的四倍体资源类型仍有待进一步研究。此外,多倍体虽然给石斛带来生物产量降低的不利一面,但在实际生产中,多倍体可能对逆境具有更高的适应性(Schlaepfer等2010; te Beest等2011),因此,多倍体铁皮石斛的实际应用价值仍有待进一步的研究。

2 同源加倍有利铁皮石斛植株多糖的累积

利用多倍体促进植物次生代谢物积累已在菘蓝(*Isatis indigotica*) (客绍英2010)、白术(*Atractylodes macrorcephala*) (唐宁和高山林2006)、党参(*Codonopsis pilosula*) (陈素萍2010)得到验证。本试验发现,同源四倍体铁皮石斛茎、叶及原球茎多糖含量较二倍体高1.31~1.95倍,其中叶片与原球茎多糖含量增加最为显著。值得关注的是同源四倍体植株与二倍体植株多糖累积器官顺序相反,叶片多糖显著高于茎多糖,这可能与同源四倍体植株细胞巨大化导致叶片肥厚,同化产物得以更

多在叶片留存有关。

3 同源四倍体铁皮石斛的遗传稳定性

兰科植株原球茎为单细胞起源(Chen和Chang 2000)的器官发生,秋水仙素对其诱导可能产生均一的四倍体植株。本试验共发现5个植株根尖细胞同时具有二倍体细胞及同源四倍体细胞,证明原球茎诱导产物中存在嵌合体现象。廖苏梅(2002)利用流式细胞仪观测铁皮石斛诱变株发现,原球茎诱导产生的变异株中均存在嵌合体现象,在其他种石斛中,嵌合体现象也有报道(李涵等2005; 郑宝强等2009)。在本试验中,进一步分离的铁皮石斛同源四倍体植株变异性状在组织培养条件下得到较为稳定的保留,说明秋水仙素诱导的原球茎同源四倍体植株发生模式可能同时存在单细胞起源和多细胞起源的现象。

在多倍体植物中,基因水平的表达并不跟随等位基因的叠加而提高(Guo等1996),全基因组重组、等位基因屏蔽、高度甲基化等现象常伴随染色体加倍迅速发生(Song等1995; te Beest等2011; Lavania等2012),以避免过于剧烈的变化导致功能缺陷(Comai 2005; Otto 2007; te Beest等2011)。本试验利用ISSR分子标记初步测定了同源四倍体变异株的基因组变化情况,标记位点的阳性或阴性变化表明铁皮石斛的多倍化过程并非简单的染色体数目复制。在齿瓣石斛(*D. devoniabium*) (李涵等2005)、生姜(*Zingiber officinale*) (王志敏等2013)、桑树(*Morus alba*) (赵卫国等2011)等植物上亦有类似发现。此外,多倍体常使有丝分裂与减数分裂受阻,在多倍体自交后代中,可以迅速形成更为丰富的变异类型(Song等1995),本试验对铁皮石斛同源四倍体变异株的ISSR分子标记分析,可为进一步进行的多倍体杂交后代遗传稳定性分析提供参考。

参考文献

- 毕志明,王峥涛,徐珞珊,徐国钧(2003). 流苏石斛化学成分研究. 药学学报, 38 (7): 526~529
- 陈素萍(2010). 党参多倍体植株二代的形态及细胞学观察. 科技情报开发与经济, 29 (34): 177~178
- 邓银华,徐康平,谭桂山(2002). 石斛属植物化学成分与药理活性研究进展. 中药材, 25 (9): 677~680
- 国家药典委员会编(2010). 中华人民共和国药典. 北京: 中国医药科技出版社

- 客绍英(2010). 菘蓝组培快繁体系的建立及四倍体株系选育和品质鉴定[学位论文]. 北京: 北京林业大学
- 李涵, 郑思乡, 龙春林(2005). 齿瓣石斛多倍体的诱导初报. 云南植物研究, 27 (5): 552~556
- 廖苏梅(2002). 铁皮石斛多倍体诱导及鉴定[硕士论文]. 杭州: 浙江大学
- 唐宁, 高山林(2006). 白术同源四倍体株系的鉴定和有效成分的含量测定. 药物生物技术, 13 (2): 102~106
- 唐娅梅, 张臣良, 苏兵, 成倩, 纳海燕(2010). 铁皮石斛多倍体诱导与鉴定研究. 北方园艺, (17): 147~149
- 王志敏, 牛义, 汤青林, 宋明(2013). 生姜二倍体与四倍体基因组DNA的RAPD和ISSR分析. 西南大学学报(自然科学版), 35 (2): 1~6
- 魏小勇, 龙艳(2008). 金钗石斛生物碱抗糖性白内障作用及蛋白质组学效应的实验研究. 天然产物研究与开发, 20: 617~621
- 叶炜, 刘敏, 吴高杰, 林玉玲, 赖钟雄(2011). 文心兰原球茎继代培养及无性系变异的初步鉴定. 见: 连勇主编. 植物组织与细胞离体培养技术. 北京: 中国科学技术出版社, 201~207
- 喻祖文, 张旺凡(2011). 多倍体黄精中多糖和皂苷的提取及含量测定. 中国现代中药, 13 (5): 20~22
- 詹忠根, 徐程(2011). 秋水仙素诱导铁皮石斛多倍体研究. 浙江大学学报(理学版), 38 (3): 321~325
- 张清华, 李枝林, 唐敏, 许春城, 席会鹏(2011). 秋水仙碱诱导铁皮石斛多倍体研究初报. 云南农业大学学报, 26 (5): 678~682
- 赵卫国, 苗雪霞, 黄勇平, 潘一乐(2011). 桑树二倍体及其同源四倍体遗传差异的ISSR分析. 蚕业科学, 31 (4): 393~397
- 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
- 周建金(2008). 不同倍性蝴蝶兰杂交亲和性及其后代倍性研究[硕士论文]. 广州: 华南农业大学
- Bernard F, Moghbel N, Hassannejad S (2012). Treatment of licorice seeds with colchicine: changes in seedling DNA levels and anthocyanin and glycyrrhizic acid contents of derived callus cultures. Nat Prod Commun, 7 (11): 1457~1460
- Bowers JE, Chapman BA, Rong J, Paterson AH (2003). Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. Nature, 422 (6930): 433~438
- Caruso I, Lepore L, De Tommasi N, Dal Piaz F, Frusciante L, Averzano R, Garramone R, Carputo D (2011). Secondary metabolite profile in induced tetraploids of wild *Solanum commersonii* Dun. Chem Biodivers, 8 (12): 2226~2237
- Chaicharoen S, Saejew K (1981). Autopolyploidy in *Dendrobium phalaenopsis*. J Sci Soc Thai, 7: 25~32
- Chanvorachote P, Kowitdamrong A, Ruanghirun T, Sritularak B, Mungmee C, Likhitwitayawuid K (2013). Anti-metastatic activities of bibenzyls from *Dendrobium pulchellum*. Nat Prod Commun, 8 (1): 115~118
- Chen JT, Chang WC (2000). Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae). Plant Sci, 160 (1): 87~93
- Comai L (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. Nat Rev Genet, 6 (11): 836~846
- Eelco TW, Pras N, Quax WJ (1999). Seasonal variations of *Artemisinin* and its biosynthetic precursors in tetraploid *Artemisia annua* plants compared with the diploid wild-type. Planta Med, 65 (8): 723~728
- Gong YQ, Fan Y, Wu DZ, Yang H, Hu ZB, Wang ZT (2004). *In vivo* and *in vitro* evaluation of erianin, a novel anti-angiogenic agent. Eur J Cancer, 40 (10): 1554~1565
- Guo M, Davis D, Birchler JA (1996). Dosage effects on gene expression in a maize ploidy series. Genetics, 142 (4): 1349~1355
- Hahn MA, Buckley YM, Muller-Scharer H (2012). Increased population growth rate in invasive polyploid *Centaurea stoebe* in a common garden. Ecol Lett, 15 (9): 947~954
- Hessen DO, Jeyasingh PD, Neiman M, Weider LJ (2010). Genome streamlining and the elemental costs of growth. Trends Ecol Evol, 25 (2): 75~80
- Kerbauy GB, Takahashi CA, Lopez AM, Aline TM, Hamachi L, Félix LM, Natália PP, Freschi L, Mercier H (2012). Crassulacean acid metabolism in epiphytic orchids: current knowledge, future perspectives. In: Najafpour MM (ed). Applied Photosynthesis. Rijeka: In Tech, 81~104
- Kowitdamrong A, Chanvorachote P, Sritularak B, Pongrakhananon V (2013). Moscatilin inhibits lung cancer cell motility and invasion via suppression of endogenous reactive oxygen species. Biomed Res Int, 2013: 765894.
- Lavana U, Srivastava S, Lavana S, Basu S, Misra N, Mukai Y (2012). Autopolyploidy differentially influences body size in plants, but facilitates enhanced accumulation of secondary metabolites, causing increased cytosine methylation. Plant J, 71 (4): 539~549
- Lee YH, Park JD, Baek NI, Kim SI, Ahn BZ (1995). *In vitro* and *in vivo* antitumoral phenanthrenes from the aerial parts of *Dendrobium nobile*. Planta Med, 61 (2): 178~180
- Mable BK (2003). Breaking down taxonomic barriers in polyploidy research. Trends Plant Sci, 8 (12): 582~590
- Mable BK, Otto SP (2001). Masking and purging mutations following EMS treatment in haploid, diploid and tetraploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Genet Res, 77 (1): 9~26
- Mishra MK (1997). Stomatal characteristics at different ploidy levels in *Coffea* L. Ann Bot, 80: 689~692
- Otto SP (2007). The evolutionary consequences of polyploidy. Cell, 131 (3): 452~462
- Schlaepfer DR, Edwards PJ, Billeter R (2010). Why only tetraploid *Solidago gigantea* (Asteraceae) became invasive: a common garden comparison of ploidy levels. Oecologia, 163 (3): 661~673
- Song K, Lu P, Tang K, Osborn TC (1995). Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution. Proc Natl Acad Sci USA, 92 (17): 7719~7723
- te Beest M, Le Roux JJ, Richardson DM, Brysting AK, Suda J, Kubesova M, Pysek P (2011). The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. Ann Bot, 109 (1): 19~45
- Wullschlegel SD, Sanderson MA, McLaughlin SB, Biradar BS, Rayburn AL (1996). Photosynthetic rates and ploidy levels among populations of switchgrass. Crop Sci, 36 (2): 306~312