

铁皮石斛四倍体离体诱导和鉴定及生理特性研究

杨 岚¹, 师 帅², 向增旭^{1*}

(1 南京农业大学 中药材研究所, 南京 210095; 2 江苏宜兴爱琴海太湖生态农业专业合作社, 江苏宜兴 214200)

摘 要:以铁皮石斛原球茎为材料, 经不同质量浓度的秋水仙素($C_{22}H_{25}O_6$)和 $0.02\text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 二甲基亚砜(DMSO)混合水溶液处理后进行组织培养, 通过对变异株进行形态学、细胞学及流式细胞仪鉴定, 以期获得稳定的四倍体植株并分析其生理特性。结果表明: 用 $2.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素和 $0.02\text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ DMSO 混合水溶液处理铁皮石斛原球茎 36 h 后, 植株诱导率达 20%; 诱导四倍体植株在形态上明显矮化、茎秆粗壮、叶片变小增厚、气孔直径增大; 细胞遗传学观察发现, 四倍体植株染色体 $2n=4x=76$, 二倍体植株染色体 $2n=2x=38$; 流式细胞仪分析显示, DNA 相对含量四倍体为 400, 二倍体仅为 200; 四倍体植株叶片中叶绿素含量、可溶性蛋白、可溶性糖含量均高于二倍体, 分别为 $5.03, 3.59, 2.98\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; 四倍体叶片中主要抗氧化酶 POD 和 SOD 活性均显著高于二倍体, 分别为 $9.08, 180.4\text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 且四倍体植株明显降低了 MDA 含量累积。研究认为, $2.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素和 $0.02\text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ DMSO 混合水溶液处理原球茎 36 h 可提高诱导成功率、降低嵌合体比例, 此组合为诱导四倍体较佳诱导条件。

关键词:铁皮石斛; 诱导; 四倍体; 秋水仙素; 二甲基亚砜; 生理特性

中图分类号: Q343.2⁺44; Q945.79

文献标志码: A

in vitro Induction, Identification and Physiological Characteristics of Autotetraploid *Dendrobium officinale*

YANG Lan¹, SHI Shuai², XIANG Zengxu^{1*}

(1 College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2 Jiangsu Yixing Aegean Taihu Ecological Agricultural Professional Cooperatives, Yixing, Jiangsu 214200, China)

Abstract: The original bulbs of *Dendrobium officinale* were soaked in the mixture of different mass concentration colchicine ($C_{22}H_{25}O_6$) and $0.02\text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ dimethyl sulphoxide (DMSO). The variant plants were identified in morphology, cytology, in order to obtain steady tetraploid plants and analyze its physiological characteristics. Results showed that: with $2.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ colchicine and $0.02\text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ DMSO mixed aqueous solution to deal with the original bulb for 36 hours, the plant induced rate could reach 20%. Compared with diploid plants, the tetraploid plants became dwarf; its stems were thick and short; leaves were small and thick; stomata diameter were increased. The chromosome numbers of diploid cells was $2n=2x=38$, while tetraploid cells was $2n=4x=76$. With flow cytometry, the relative DNA content of tetraploid was 400, diploid was only 200. Tetraploid plants leaf chlorophyll, soluble protein, soluble sugar contents were higher than that of diploid, were $5.03, 3.59, 2.98\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively; The main antioxidant enzyme POD and SOD activities in the leaves were significantly higher than that of diploid, were 9.08 and $180.4\text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, and the tetraploid plants significantly reduced the accumulation of MDA content. This research show that: $2.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ colchicine and $0.02\text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ mixed aqueous solution to deal with the original bulb lasting 36 hours can improve the success rate of induction, to reduce the proportion of chimeras. So, this combination is the best conditions.

收稿日期: 2013-07-08; **修改稿收到日期:** 2013-09-11

基金项目: 江苏省科技支撑项目(SEB201130258); 无锡市科技项目(CLE01N1113); 2012 年度中央高校基本科研业务费资助

作者简介: 杨 岚(1988—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事药用植物生物技术育种研究。E-mail: 2011104184@njau.edu.cn

*** 通信作者:** 向增旭, 博士, 副教授, 主要从事药用植物生物技术育种研究。E-mail: zxxiang@njau.edu.cn

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; induction; tetraploid; colchicine; dimethyl sulphoxide (DMSO); physiological characteristics

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)为传统名贵珍稀中药材,以新鲜或干燥的茎入药,具有滋阴清热、润肺明目、抗癌防老等功效^[1]。在自然环境下铁皮石斛自身繁殖率低,随着生存环境的破坏及人类长期的采挖,野生资源已濒临灭绝;目前人工组织培养繁殖是满足铁皮石斛市场需求的主要手段。但多年来只种不选的栽培模式,致使铁皮石斛品种退化严重,制约着产量与品质。多倍体育种具有改变植株形态性状、提高抗性 & 改善次生代谢积累等特点^[2]。近年来,多倍体育种作为良种培育和种质创新的重要途径,已在百合^[3]、党参^[4]、丹参^[5]、雪莲^[6]、金银花^[7]、甜叶菊^[8]等植物上通过人工加倍技术成功获得同源多倍体;而铁皮石斛多倍体育种研究发现,单一采用秋水仙素诱导处理铁皮石斛原球茎,不仅诱导率低、诱导周期长,且多为嵌合体^[9-10]。王凤宝等^[11]通过秋水仙素和 $0.02 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 二甲基亚砷混合水溶液诱导处理甘薯和豌豆后,可提高诱导成功率、减少嵌合体比例,提高工作效率。目前,对铁皮石斛四倍体生理特性的研究在国内尚未报道。本试验以铁皮石斛原球茎为诱导材料,采用不同浓度秋水仙素和二甲基亚砷混合水溶液处理,为成功诱导铁皮石斛四倍体筛选较佳诱导处理条件,同时测定四倍体植株的生理特性,进而为铁皮石斛种质创新提供有力依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

将成熟的铁皮石斛蒴果经无菌水冲洗 3 h 后,置 75% 酒精中消毒 30 s,再经 0.1% 氯化汞浸泡灭菌 15 min,无菌水漂洗干净。于无菌环境下取出灭菌后的蒴果,将成熟种胚撒播到 $\text{MS} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA} + 100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 土豆泥培养基表面,经 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,光照强度 $1\,000 \sim 1\,500 \text{ lx}$ 的无菌环境中诱导培养 45 d,选择大小一致、分化稳定的原球茎作为诱导材料。

1.2 试验方法

1.2.1 四倍体的离体诱导 将原球茎分别置于质量浓度为 $0.5, 1.0, 2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素和 $0.02 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 二甲基亚砷(DMSO)混合水溶液中(抽滤灭菌),震动摇床内培养 12、24、36、48 h,各处理重复 3 次,以清水培养为对照(CK)。将各处理后的原球茎经无菌水冲洗干净,转接于 $\text{MS} + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.2$

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA} + 100 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 椰汁培养基中进行恢复和增殖培养,经 2 次继代后,转入 $1/2 \text{ MS} + 0.06 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA} + 150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 香蕉泥培养基中分化、生根,同时观察并记录成活率及形态变化。

1.2.2 四倍体植株的鉴定 (1)形态学鉴定 经植株大小、叶片颜色、叶形等外部形态观察比较后,完成初步筛选。

(2)解剖学鉴定 选择大小一致的变异植株和对照植株分别撕取叶下表皮制临时装片,在 Olympus 显微镜下观测气孔大小及密度,并镜检拍照。

(3)染色体鉴定 于 9:00~11:00 取幼苗根尖,经 $0.002 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 8-羟基喹啉预处理 4 h,于 4°C 卡诺氏固定液固定 24 h,无菌水冲洗干净后常温下解离 1 h,改良苯酚品红染色 20 min,观察染色体数目并进一步判断植株倍性,完善植株筛选。

(4)流式细胞仪鉴定 参考张娜等^[12]的方法,并最终确定四倍体植株。

1.2.3 四倍体与二倍体植株生理指标比较 分别选取处理组与对照组的幼嫩叶片后测定叶片中叶绿素、可溶性蛋白质、可溶性糖、丙二醛(MDA)含量以及叶片中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化酶(POD)活性。各处理重复 3 次,每重复随机选取 10 株幼苗,采用 80% 丙酮研磨法测定叶绿素含量^[13];采用硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量^[14],参照高俊凤^[15]的方法测定游离脯氨酸、可溶性糖含量及抗氧化酶 SOD、POD 活性。

2 结果与分析

2.1 铁皮石斛四倍体的离体诱导

由表 1 可知,用不同浓度的秋水仙素和 $0.02 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 二甲基亚砷(DMSO)混合水溶液,经不同处理时间诱导后,对原球茎成活率的影响也不同,且原球茎成活率随秋水仙素混合液浓度升高而逐渐降低。尤以 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素混合液处理 48 h,原球茎成活率最低;同浓度处理下,随处理时间延长,原球茎成活率也呈减低趋势。当 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素混合液处理 12 h 后,诱导率为 0%,而其他处理的诱导率为 $3.33\% \sim 13.33\%$ 。其中 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素混合液处理 36 h 效果最佳,诱导率高达 20%。

2.2 四倍体鉴定

2.2.1 形态学、解剖学鉴定 与二倍体相比,四倍

表 1 不同浓度的秋水仙素和 2 g · mL⁻¹ 二甲基亚砜混合水溶液对原球茎的诱导效果

Table 1 Influence of colchicine and 2 g · mL⁻¹ DMSO with different concentrations on induction of *D. officinale*

质量浓度 Concentration /(g · L ⁻¹)	时间 Time /h	处理数 No. of samples	成活数 No. of survival samples	成活率 Rate of survival/%	四倍体数 No. of tetraploid	诱导率 Rate of tetraploid/%
0.0	0	10	10	10	0	0
	12	30	23	76.67	0	0
	24	30	19	63.33	1	3.33
	36	30	15	50.00	2	6.67
	48	30	10	33.33	2	6.67
0.5	12	30	20	66.67	1	3.33
	24	30	14	46.67	1	3.33
	36	30	12	40.00	2	6.67
	48	30	7	23.33	3	10.00
1.0	12	30	12	40.00	3	10.00
	24	30	9	30.00	4	13.33
	36	30	7	23.33	6	20.00
	48	30	3	10.00	2	6.67
2.0	12	30	12	40.00	3	10.00
	24	30	9	30.00	4	13.33
	36	30	7	23.33	6	20.00
	48	30	3	10.00	2	6.67

表 2 铁皮石斛二倍体和四倍体植株形态及气孔特征比较

Table 2 Morphological comparison,the characteristics of stomata size between tetraploid and diploid of *D. officinale*

植株形态和气孔特征 Plant morphology and the stomata characteristic	倍性 Ploidy	
	2x	4x
叶宽 Leaf width/mm	4.65±0.178a	3.38±0.097b
叶长 Leaf length/mm	12.67±0.210a	8.570±0.223b
叶厚 Leaf thickness/mm	0.28±0.045b	0.52±0.057a
叶型指数 Leaf index	4.32±0.080a	3.27±0.075b
气孔长径 Stomata length/ μ m	40.23±1.929b	60.08±3.735a
气孔短径 Stomata diameter/ μ m	31.56±3.272b	40.35±2.218a
每视野气孔数 Stomata density($\times 10$)	45±4.163a	21±3.786b
气孔面积 Stomata number/ μ m ²	1 368.23±13.76b	2 245.32±1.738a

注:同行不同小写字母表示差异达 0.05 显著水平。

Note:Data with different normal letters within the same row are significantly different at 0.05 level.

体植株表现出扭曲矮化、生长缓慢、茎秆变粗、叶片变小、叶片颜色加深、叶型指数变小、根尖变粗、原球茎分化变异等植株形态变异(图版 I,1~8)。试验结果(表 2)分析发现,四倍体植株叶宽、叶长、叶厚及叶型指数分别为 3.38 mm、8.57 mm、0.52 mm 和 3.27,与二倍体差异显著;镜检观察发现(图版 I,9、10)四倍体叶片表皮中保卫细胞的长径、短径、气孔面积分别为 60.08 μ m、40.35 μ m、2 245.32 μ m²,显著大于二倍体植株,且单位面积内气孔密度显著小于二倍体。

表 3 铁皮石斛四倍体与二倍体叶片部分指标比较

Table 3 Comparisons of some items between tetraploid and diploid of *D. officinale*

指标 Item		2x	4x
SOD	活性 Activity/(U · mg ⁻¹)	95.23	180.4
	相对比活力 Relative activity	1.00	1.89
POD	活性 Activity/(OD ₄₇₀ · mg ⁻¹ · min ⁻¹)	3.52	9.08
	相对比活力 Relative activity	1.00	2.58
MDA	含量 Content/(nmol · g ⁻¹)	0.072	0.03
	相对含量 Relative content	1.00	0.42
叶绿素 Chlorophyll	含量 Content of chlorophyll/(mg · g ⁻¹)	2.35	5.03
	相对含量 Relative content	1.00	2.14
可溶性糖 Soluble sugar	含量 Content of soluble sugar/(mg · g ⁻¹)	1.52	2.98
	相对含量 Relative content	1.00	1.96
可溶性蛋白 Soluble protein	含量 Content of soluble protein/(mg · g ⁻¹)	2.04	3.59
	相对含量 Relative content	1.00	1.76

2.2.2 细胞学鉴定 通过压片镜检发现:初步筛选的疑似四倍体 100 株,15 株为四倍体植株,56 株为嵌合体(图版 I,13)。与对照植株相比,四倍体细胞体积、核仁明显变大、染色体数目加倍。对照组植株细胞染色体数为 2n=2x=38(图版 I,11),四倍体细胞染色体为 2n=4x=76(图版 I,12)。

2.2.3 流式细胞分析 以二倍体植株为参照,对 100 株疑似植株进行流式细胞仪分析;分析 DNA 相对含量确定二倍体、四倍体和嵌合体植株。结果表明,二倍体、四倍体 DNA 相对含量分别在 200 和 400 处出现主峰值(图版 I,14、15),且二者 DNA 含量呈 2 倍关系,符合四倍体判断标准;此外嵌合体则

在 200、400 处同时突现主峰(图版 I, 16)。

2.3 四倍体与二倍体植株生理指标比较

四倍体植株叶片中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)活性增强,丙二醛(MDA)含量降低,抗氧化能力显著提高。由表 3 可知,四倍体植株 SOD、POD 活性及 MDA 含量分别为二倍体植株的 1.89、2.58 和 0.42 倍;这说明在同一培养环境下,四倍体植株的生长状态、生理特性优于二倍体,从而保证了四倍体植株的高抗逆性。

植株体内的高叶绿素含量直接反映着光合强度,其含量越高,光合作用越强,越利于生物量累积;可溶性蛋白和可溶性糖含量是植物体内主要的渗透调节物质,不但能促进植株的代谢合成,又能提高植株的抗逆性。由表 3 中发现,四倍体植株叶片中叶绿素总量($5.03 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)明显高于二倍体植株($2.35 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$),同时可溶性蛋白和可溶性糖的含量分别是二倍体植株的 1.76 和 1.96 倍。试验结果说明,铁皮石斛四倍体植株的光合作用强度、植物代谢强度及抗性都优于二倍体。

3 讨 论

王凤宝等^[16]以秋水仙素和二甲基亚砜为诱导剂,在甘薯和豌豆等方面的研究已取得成功;甘薯和豌豆分别在 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素和 $0.02 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 二甲基亚砜混合水溶液间歇处理 24 h 和 48 h 后,获得较高诱导率,而唐娅梅^[17]利用单一 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的秋水仙素处理液,诱导培养铁皮石斛拟原球茎 48

h 后,也取得较佳的诱导效果,其中成活率为 78%,四倍体变异率为 13%。本试验参照前人方法,采用 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙素和 $0.02 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 二甲基亚砜混合水溶液处理原球茎 36 h,成活率为 23.33%,四倍体诱导率高达 20%,且植株性状稳定。植株生长后期成活率降低,可能是由于二甲基亚砜的强渗透力使秋水仙素毒性增强,致使植株受到毒害,影响生长。至于二甲基亚砜的强渗透力造成的植株毒害还需更进一步科学研究。

相比简单的形态观察、细胞学观察,流式细胞仪鉴定更具可靠性。染色体鉴定多通过观察根尖细胞或花粉母细胞^[18-19]的染色体数目确定植株倍性;由于铁皮石斛生长周期长,诱导后植株生长更为缓慢,尚未开花,所以本试验选取根尖作为鉴定材料。经细胞染色体压片法确定植株染色体数目、判断倍性后,再测定其 DNA 含量,既省时又提高工作效率。

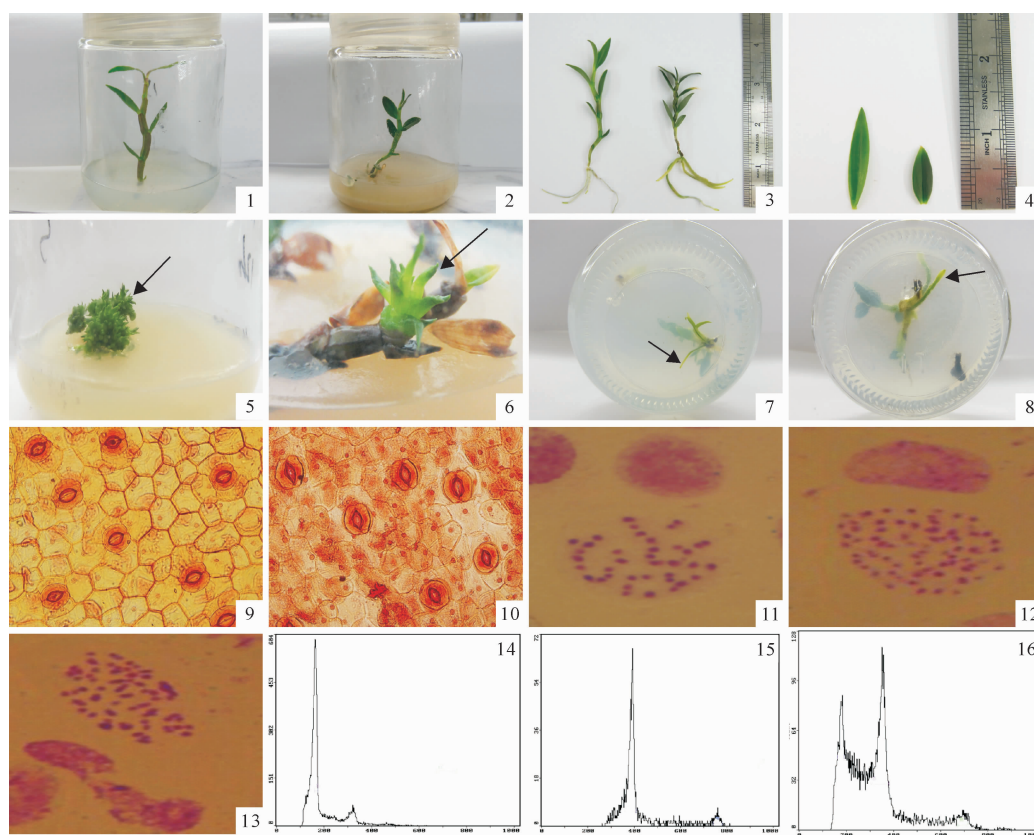
叶片中叶绿素含量反映着植株光合作用能力的强弱,SOD 作为植物体内清除活性氧的重要细胞保护酶之一,其活性高低反映出植物对逆境胁迫的适应能力;呼吸酶 POD 广泛存在于植物体内,一定水平的酶活力反映出植物体内的代谢能力^[20];膜脂过氧化过程中 MDA 的含量变化,直接反映着膜脂损伤程度。作为植物细胞内重要的渗透调节物质可溶性糖、可溶性蛋白,能够维持细胞正常代谢,提高植物的抗逆性,对植株生长发育及代谢累积有着重要意义。综合评价分析发现,成功诱导的四倍体植株具有强大的生长优势和良好的开发利用前景。

参考文献:

- [1] LI L(李 玲), DENG X L(邓晓兰), ZHAO X B(赵兴兵), et al. Advances in studies on chemical constituents in *Dendrobium candidum* and their pharmacological effects[J]. *Antitumor Pharmacy*(肿瘤药理学), 2011, **1**(2): 90—94(in Chinese).
- [2] ZHANG H M(张汉明), XU T F(许铁峰), GUO M L(郭美丽), et al. Polyploid breeding of medicinal plant[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*(中草药), 2002, **33**(7): 1—3(in Chinese).
- [3] WANG L Y(王丽艳), JING R Y(荆瑞勇). Tetraploid induction of *Lilium davidii* var. *unicolor* through colchicine treatment[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*(核农学报), 2008, **22**(5): 581—584(in Chinese).
- [4] QIAO Y G(乔永刚), MA L L(马璐琳), ZHAO X M(赵晓明), et al. Tetraploidy inducement of *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. by colchicine[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*(核农学报), 2009, **23**(4): 566—571(in Chinese).
- [5] LI X L(李秀兰), CHEN L(陈 力). Breeding for triploids of *Salvia miltiorrhiza* and its sustainable utilization[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*(中草药), 2012, **43**(2): 375—379(in Chinese).
- [6] KANG X L(康喜亮), HAO X Y(郝秀英), LIU M(刘 敏), et al. Tetraploid induction of *Saussurea involucre* Kar. et Kir. by colchicine[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.*(西北植物学报), 2011, **31**(1): 180—185(in Chinese).
- [7] ZHANG H CH(张汉超), GAO SH L(高山林), XUE X(薛 欣). Determination of chlorogenic acid content and selection of allotetra-ploid plants of *Lonicera japonica*[J]. *Pharmaceutical Biotechnology*(药物生物技术), 2011, **18**(3): 242—245(in Chinese).
- [8] LI H(李 红), YANG L(杨 岚), XIANG Z X(向增旭). *In vitro* induction and identification of autotetraploid *Stevia rebaudiana* Bertoni[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.*(西北植物学报), 2012, **32**(8): 1 692—1 697(in Chinese).
- [9] ZHANG Q H(张青华), LI ZH L(李枝林), TANG M(唐 敏), et al. Study on the use of colchicine to induce polyploidy of *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*(云南农业大学学报), 2011, **26**(5): 678—682(in Chinese).
- [10] ZHAN ZH G(詹忠根), XU CH(徐 程). Study on colchicoid of *Dendrobium officinale* induced by colchicine[J]. *Journal of Zhejiang*

University(浙江大学学报),2011,**38**(3):321—325(in Chinese).

- [11] WANG F B(王凤宝),FU J F(付金锋),*et al.* Breeding of new sweet potato cultivar Duanwan 3 with short vine by colchicine and dimethyl sulphoxide induced mutation[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*(核农学报),2008,**22**(2):169—174(in Chinese).
- [12] ZHANG N(张 娜),SUN Y H(孙玉宏),DING M(丁 鸣),*et al.* Inducement and identification of yellow flesh tetraploid watermelon [J]. *China Vegetables*(中国蔬菜),2012,(6):89—92(in Chinese).
- [13] JENSEN A,Chlorophylls and carotenoids[M]//HELLEBUST J A,CRAIGIE J S. Handbook of Phycological Methods. Cambridge:Cambridge University Press. UK,1978:59—71.
- [14] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000:136—261.
- [15] 高俊凤. 植物生理学实验技术[M]. 西安:世界图书出版公司,2000:196—197.
- [16] WANG F B(王凤宝),FU J F(付金锋),DONG L F(董立峰). Inducing autotetraploid pea with colchicine and dmsol[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Science*(核农学报),2009,**23**(2):203—208(in Chinese).
- [17] TANG Y M(唐娅梅),ZHANG CH L(张臣良),SU B(苏 兵),*et al.* Polyploid induction and identification of *Dendrobium candidum*[J]. *Northern Horticulture*(北方园艺),2010,(17):147—149(in Chinese).
- [18] 李懋学,张赞平. 作物染色体及其研究技术[M]. 北京:中国农业出版社,1996:235.
- [19] WANG Y Q(王永强),ZHI H(智 慧),LI W(李 伟),*et al.* Chromosome number identification of some wild *Setaria*[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*(植物遗传资源学报),2007,**8**(2):159—164(in Chinese).
- [20] YANG H G(杨华庚),CHEN H J(陈慧娟). Effect of high temperature stress on morphological and physiological characteristics in *Phalaenopsis* seedlings[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*(中国农学通报),2009,**25**(11):123—127(in Chinese).



图版 I 1. 二倍体组培苗;2. 四倍体组培苗;3. 移栽前二倍体(左)和四倍体(右);4. 二倍体叶片(左)和四倍体叶片(右);5. 二倍体原球茎;6. 变异的四倍体原球茎;7. 二倍体根粗细;8. 四倍体根粗细;9. 二倍体气孔大小;10. 四倍体气孔大小;11. 二倍体染色体数 $2n=2x=38$;12. 四倍体染色体数 $2n=4x=76$;13. 嵌合体染色体数 ($2x-4x$);14. 二倍体 DNA 含量分布图;15. 四倍体 DNA 含量分布图;16. 嵌合体 DNA 含量分布图。

Plate I Fig. 1. The plantlet of diploid in tissue culture;Fig. 2. The plantlet of tetraploid in tissue culture;Fig. 3. Plant of diploid(left) and tetraploid (right) before transplanting;Fig. 4. The leaves size of diploid (left) and tetraploid (right);Fig. 5. Diploid protocorm;Fig. 6. Mutated tetraploid original blub;Fig. 7. Diploid root thickness;Fig. 8. Tetraploid root thickness;Fig. 9. The length of stomata of diploid;Fig. 10. The length of stomata of tetraploid;Fig. 11. Diploid chromosome numbers, $2n=2x=38$;Fig. 12. Tetraploid chromosome numbers, $2n=4x=76$;Fig. 13. Mixoploid chromosome numbers, ($2x-4x$);Fig. 14. Diploid DNA relative content;Fig. 15. Tetraploid DNA relative content;Fig. 16. Mixoploid DNA relative content.