

## 基于流式细胞术的兰属杂交后代倍性鉴定

冷青云, 陆锦萍, 黄少华, 徐世松, 李海燕, 牛俊海, 尹俊梅\*

中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/农业农村部华南作物基因资源与种质创制重点开放实验室/海南省热带观赏植物种质创新利用工程技术研究中心/海南省热带作物资源遗传改良与创新重点实验室, 海南海口 571101

**摘要:** 倍性鉴定是热带花卉种质资源鉴定及新品种选育的基础工作之一。本研究利用流式细胞仪对兰属杂交后代进行倍性鉴定。针对裂解液种类、试验材料组织器官等关键环节, 以细胞核解离情况、主峰清晰程度、变异系数及取材容易程度等方面为评价指标, 建立鉴定体系, 并比较不同倍性植株的气孔性状差异。结果表明: CyStain UV Precise P 为 3 种裂解液中最优, 组织器官以嫩叶为宜; 从 3 个杂交组合后代中鉴定出三倍体 6 株, 四倍体 2 株, 不同倍性间的气孔长度、宽度和密度均差异显著 ( $P < 0.05$ ), 气孔长度和宽度的排序为四倍体 > 三倍体 > 二倍体, 而气孔密度的排序则相反。该研究结果对杂交兰多倍体选育及开展不同倍性间杂交育种具有重要应用价值。

**关键词:** 流式细胞术; 兰属; 倍性鉴定

中图分类号: S682.3 文献标识码: A

## Ploidy Identification of *Cymbidium* Hybrid Seedlings by Flow Cytometry

LENG Qingyun, LU Jinping, HUANG Shaohua, XU Shisong, LI Haiyan, NIU Junhai, YIN Junmei\*

Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Hainan Provincial Engineering Technology Research Center of Tropical Ornamental Plant Germplasm Innovation and Utilization / Key Laboratory of Tropical Crops Germplasm Resources Genetic Improvement and Innovation of Hainan Province, Haikou, Hainan 571101, China

**Abstract:** Ploidy identification is one of the basic tasks for germplasm resources and new variety breeding of tropical flowers. In this study, flow cytometry was used to identify the ploidy level of *Cymbidium* hybrid seedlings, aiming at the key links such as the type of dissociated liquid, the tissue organ of the test material, evaluation indexes such as the nuclear dissociation, the clear degree of the main peak, the easy degree of sampling, and the coefficient of variation. A technique system was established and the stomatal traits of different ploidy were analyzed. The results showed that CyStain UV Precise P was the best of the three dissociated liquid and young leaves were most suitable. Six triploid and two tetraploid were identified from the offspring of the three hybrid combinations. There were significant differences in stomatal length, width and density between different ploidy ( $P < 0.05$ ). The rank of stomatal length and stomatal width was tetraploid > triploid > diploid, while stomatal density was reversed. This study is valuable for the polyploid selection and use of different ploidy germplasm resources for cross breeding of *Cymbidium* hybrid.

**Keywords:** flow cytometry; *Cymbidium*; ploidy identification

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.11.010

兰属 (*Cymbidium* Sw.) 是兰科 (Orchidaceae) 重要观赏类群之一, 原生种约 86 种<sup>[1]</sup>, 主要分布于亚洲热带和亚热带地区, 向南到澳大利亚北部,

中国是该属的分布中心和多样性中心, 分布于秦岭山脉以南地区, 约有 63 种<sup>[2]</sup>。种内品种及种间杂种和品种间杂交种超过 2 万种, 截至 2022 年,

收稿日期 2023-08-02; 修回日期 2023-09-14

基金项目 国家热带植物种质资源库建设项目 (No. NTPGRC2023); 国家大宗蔬菜产业技术体系花卉海口综合试验站专项资金项目 (No. CARS-23-G60)。

作者简介 冷青云 (1985—), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 热带花卉遗传育种与种苗繁育。\*通信作者 (Corresponding author): 尹俊梅 (YIN Junmei), E-mail: yinjunmei2004@163.com。

在国际兰花杂种登录权威机构 (International Registration Authority for Orchid Hybrids, RHS) 上登录的兰属植物杂交种有超过 17 363 个<sup>[3]</sup>。

兰属育种方式有选择育种、杂交育种与诱变育种等, 其中杂交育种是兰属植物的主要育种手段。在杂交育种工作中, 了解亲本及杂交后代的倍性和育性十分重要, 有利于提高育种的成功率。通过染色体计数法对一些兰属原生种及杂交品种 (杂交兰和大花蕙兰) 进行倍性鉴定研究, 原生种及杂交兰主要是二倍体, 大花蕙兰 (*Cymbidium hybridum*) 的染色体倍性多样化, 有二倍体、三倍体、四倍体、六倍体和非整倍体<sup>[4-10]</sup>。然染色体计数法对细胞学操作技术要求较高, 且费时费工, 面对大规模种质资源及杂交后代群体的倍性鉴定需要寻找一种快速便捷、高通量鉴定的方法。

流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 是 20 世纪 70 年代发展起来的一种对悬浮的单细胞进行高速分析和分选的技术。在植物学研究中, 常用于倍性分析、细胞计数、细胞周期分析及植物基因组大小估算等研究, 具有分析速度快、灵敏度高、可靠性好等优点<sup>[11-12]</sup>。近年来在红掌<sup>[13]</sup>、香蕉<sup>[14]</sup>、橡胶<sup>[15]</sup>、火龙果<sup>[16]</sup>、茉莉花<sup>[17]</sup>、桂花<sup>[18]</sup>、三角梅<sup>[19-20]</sup>等植物倍性鉴定中应用。在兰科植物研究中, 已有超过 26 属 70 种的基因组大小是通过 FCM 评估, 包括兰属、兜兰属 (*Paphiopedilum*)、树兰属 (*Epidnedium*) 等<sup>[21-25]</sup>, 另外, FCM 也应用于对化学诱变剂处理后的蝴蝶兰 (*Phalaenopsis*)、石斛 (*Dendrobium*)、白芨 (*Bletilla*) 倍性鉴定<sup>[26-29]</sup>。本研究通过流式细胞术对兰属 3 个杂交后代群体进行倍性鉴定, 以期快速鉴定杂种后代倍性提供技术方法, 并获得优良的多倍体植株, 为今后的多倍体育种提供种质材料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

试验材料为亲本黄金小神童 (*Cymbidium Golden Elf*, 'Sundust'), 冬凤兰 (*Cymbidium dayanum* Rchb. f)、美花兰 (*Cymbidium insigne* Rolfe) 以及其杂交后代群体, 其中, 黄金小神童为杂交种, 其他为原生种, 具体组合及杂交后代数量见表 1。所有材料均保存于中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所八队热带花卉种质资源圃。

表 1 兰属杂交组合情况表

Tab. 1 List of *Cymbidium* hybrid seedlings

序号 No.	母本 Female parent	父本 Male parent	后代数量 No. of hybrids
1	黄金小神童	冬凤兰	126
2	黄金小神童	美花兰	98
3	黄金小神童×冬凤兰	美花兰	56

### 1.2 方 法

1.2.1 兰属流式细胞术倍性检测技术体系构建  
裂解液种类、试验材料组织部位是影响倍性检测的关键环节。本试验应用了 3 种裂解液 Galbraith's buffer (GLB) (30 mmol/L  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、45 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ 、20 mmol/L 3-[n-morpholino]propanesulfonic acid)、0.1% Triton X-100 (w/V), pH 7.0)、Woody Plant Buffer (WPB) (0.2 mol/L Tris-HCl, 86 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 焦亚硫酸钠, 4 mmol/L  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 2 mmol/L  $\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1% PVP-10, 1% (V/V) Triton X-100, pH 7.5<sup>[26]</sup>、CyStain UV Precise P 试剂盒, 以黄金小神童幼嫩叶片、根尖组织、花梗、花萼片为材料, 利用流式细胞仪测定相对荧光强度 (relative fluorescence intensity of PI-stained nuclei, FL) 和  $G_0/G_1$  期的变异系数 (coefficient of variation, CV), 筛选出最适合裂解液及组织部位, 每个处理重复 3 次。

1.2.2 兰属杂交后代流式细胞术倍性检测  
基于黄金小神童为试验材料构建的兰属流式细胞术倍性检测技术体系: 解离液为 CyStain UV Precise P, 幼嫩叶片为试材, 检测其倍性。

将样品置于含 1.0 mL 预冷的 GLB 解离液的培养皿中, 用锋利的刀片切碎, 2 min 后用 300 目尼龙网过滤, 滤液加入预冷的碘化丙啶 (PI) 和 RNAase 溶液, 工作浓度均为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。置于冰上避光染色 0.5~1 h 后上机检测, 仪器为 Sysmex CyFlow<sup>®</sup> Ploidy Analyser, 激发光为 488 nm, 每次检测收集 5000 个颗粒, 仪器自带软件作图分析, 变异系数控制在 5% 以内。每份材料重复 3 次。

1.2.3 不同倍性气孔形状观察  
叶片气孔大小和密度比较: 取不同倍性叶片, 在叶片下表皮均匀涂上一层透明指甲油, 待指甲油干后, 用镊子挑取其表皮置于有蒸馏水的载玻片上, 吸取多余的水分, 加盖玻片后在 Leica DM2500 生物显微镜 40×物镜下观察测量。每片至少观察 10 个视野, 记录每个视野内气孔器的个数, 每片选取 30 个气孔, 测量每个气孔器的长度和宽度。

## 2 结果与分析

### 2.1 兰属流式细胞术倍性检测技术体系构建

2.1.1 不同裂解液对细胞核解离的影响 以黄金小神童嫩叶为供试材料, 利用流式细胞仪研究 3 种裂解液对兰属植物的裂解效果 (图 1, 表 2), 发现 3 种裂解液均能较好地保证完整的细胞核从破碎细胞中裂解出来, 同时可降解细胞中的次生代谢产物。对于 FL 值, 3 种裂解液有显著差异, 其中 GLB 裂解液裂解样品得出的 FL 值最低, 最高的 FL 值出现在 CyStain UV Precise P 裂解的样品中, 且显著高于另外 2 个裂解液。在用 3 种裂解液对兰属进行流式分析中, CV 值差异不显著, 最高的为 WPB 裂解液, CV 值为 5.66%, 大于 5%; 最低为 GLB 裂解液, 为 3.93%。裂解液的选择标准为有最高的 FL 值和最低的 CV 值, 通过表 2 发现, CyStain UV Precise P 在 3 种裂解液中最佳。从图 1 也可看出, CyStain UV Precise P 制备的样品流式细胞图出峰清晰、稳定、杂峰少, 并且可以清晰地观察到 G<sub>2</sub> 期。因此, 选定 CyStain UV Precise P 试剂盒为本研究后期的裂解液。

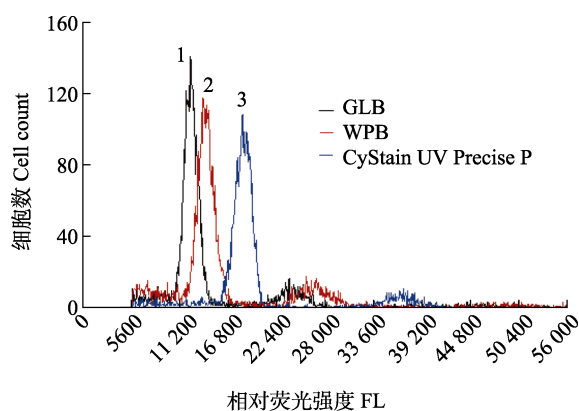


图 1 3 种裂解液的流式覆盖图

Fig. 1 Overlays of distributions obtained with three buffers by FCM

表 2 3 种细胞裂解液流式细胞术参数评定

Tab. 2 Assessment of flow cytometric parameters in three nuclear isolation buffers

裂解液 Nuclear isolation buffers	相对荧光强度 FL	变异系数 CV/%
GLB	12 495.67±145.36 <sup>a</sup>	3.93±0.46 <sup>a</sup>
WPB	13 838.33±609.45 <sup>b</sup>	5.66±1.09 <sup>a</sup>
CyStain UV Precise P	18 676.33±117.12 <sup>c</sup>	4.04±0.76 <sup>a</sup>

注: 同列数据后不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

Note: Different lowercase letters after the same column of data indicate significant difference ( $P<0.05$ ).

2.1.2 不同组织部位对植物倍性的影响 本研究分别使用植株的嫩叶、根尖、花梗和花萼片来验证不同组织器官对植物倍性检测结果准确性的影响。由图 2 可知, 4 种组织器官均能裂解出细胞核, 嫩叶和花梗有一个明显峰值, 其峰值清晰, 细胞碎片少, 根尖和花萼片流式 DNA 含量直方图显示出 2C、4C、8C 共 3 个峰值, 根尖在 2C、4C 处峰值等高, 花萼片的主峰值出现在 4C 处, 是叶片主峰值的 2 倍, 这 2 种组织呈现体内多倍化现象, 不适合作为兰属倍性检测的组织材料, 花梗能较好地出峰, 也无多倍化细胞干扰, 但其取材时间只能在开花期特定时间采集, 而叶片可以在任何季节取材, 是理想的兰属倍性检测组织部位。在后续的研究中选择以幼嫩叶片为材料开展流式细胞术检测。

### 2.2 兰属杂交后代流式细胞术倍性检测

以 CyStain UV Precise P 试剂盒为裂解液, 利用流式细胞仪对 3 个亲本及其杂交后代进行倍性检测。测定结果见图 3, 3 个亲本流式细胞图出峰清晰、稳定、杂峰少, 荧光强度在 12 251~13 509 之间, 差异不大。因 3 个亲本均为二倍体, 将杂交后代 DNA 相对含量峰值在 12 800 左右定为二倍体, 三倍体峰值在 19 200 左右和四倍体峰值在 25 600 左右。杂交后代倍性检测统计结果见表 3, 共检测出多倍体 8 株, 其中黄金小神童×美花兰后代检测出三倍体 1 株, 占比为 1.02%; (黄金小神童×冬凤兰)×美花兰后代检测出三倍体 5 株, 占比 8.92%; 四倍体 2 株, 占比 3.57%。

### 2.3 不同倍性气孔形状比较

兰属二倍体、三倍体和四倍体的气孔性状分析结果表明 (表 4, 图 4), 不同倍性间的气孔长度、宽度和密度均差异显著 ( $P<0.05$ ); 气孔长度和宽度的排序为四倍体>三倍体>二倍体, 而气孔密度的排序则相反。

## 3 讨论

目前, 流式细胞术是大规模检测植物倍性的有效手段, 具有快速、准确、操作简便和可重复性强等优点。其中裂解液种类和试验材料组织部位是影响其准确性的关键因素。前人研究发现 GLB 对兰属裂解效果最好<sup>[24-25]</sup>。本研究在对兰属植物裂解试验中, 发现 CyStain UV Precise P 试剂盒裂解液是所用 3 种裂解液中效果最佳的, CyStain UV Precise P 为专利产品, 配方成分未公

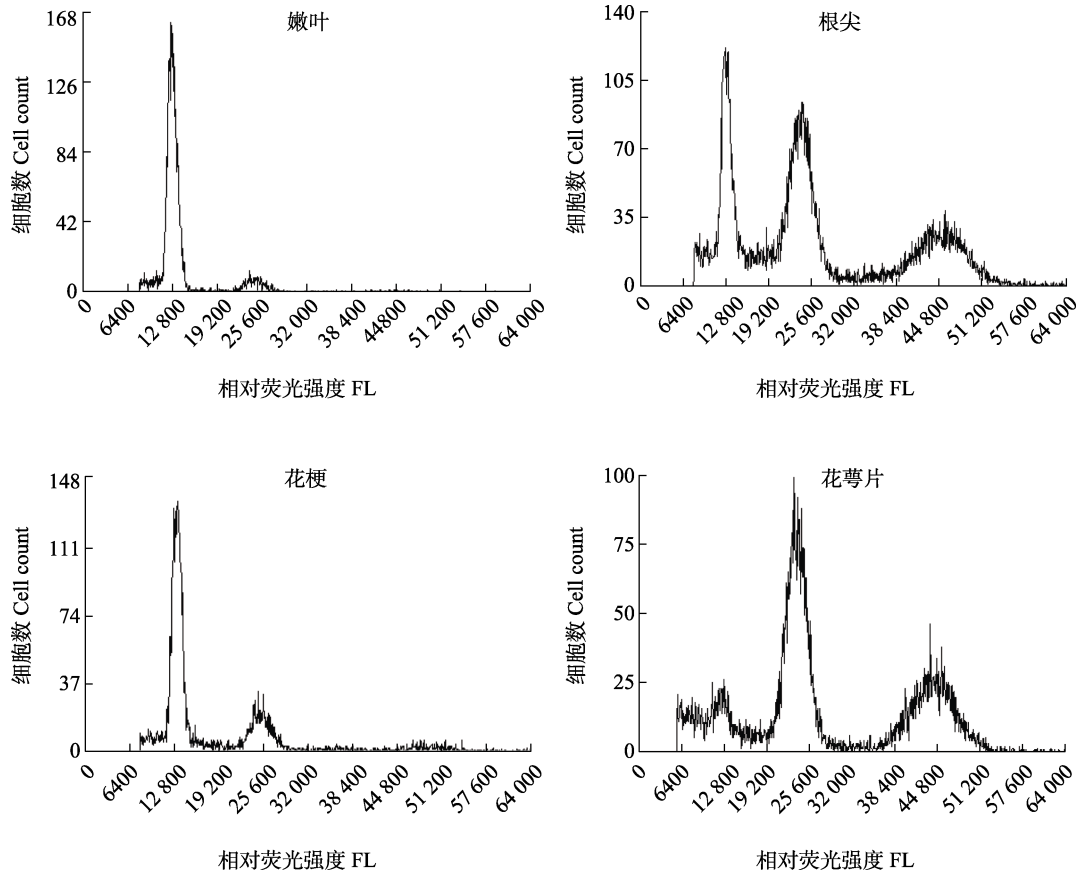


图 2 不同组织器官流式细胞仪测定直方图

Fig. 2 Histograms of different tissue parts using flow cytometry

表 3 杂交后代倍性检测结果

Tab. 3 Ploidy analysis of hybrid seedlings

序号 No.	母本 Female parent	父本 Male parent	后代数量 No. of hybrids	二倍体数 Diploid/%	三倍体数 Triploid/%	四倍体数 Tetraploid/%
1	黄金小神童	冬凤兰	126	126(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
2	黄金小神童	美花兰	98	97(98.98)	1(1.02)	0(0.00)
3	黄金小神童×冬凤兰	美花兰	56	49(87.50)	5(8.92)	2(3.57)

表 4 不同倍性兰属种质叶片气孔特征比较

Tab. 4 Comparison of different ploids stomatal characters in *Cymbidium* hybrids

倍性 Ploids	气孔长度 Stomatal length/ $\mu\text{m}$	气孔宽度 Stomatal width/ $\mu\text{m}$	气孔密度 Stomatal density/(个 $\cdot\text{mm}^{-2}$ )
二倍体	18.13±0.38 <sup>a</sup>	11.39±0.58 <sup>a</sup>	101.85±14.80 <sup>a</sup>
三倍体	23.93±1.13 <sup>b</sup>	13.06±0.71 <sup>b</sup>	71.06±7.11 <sup>b</sup>
四倍体	26.65±1.05 <sup>c</sup>	20.23±0.47 <sup>c</sup>	49.74±7.10 <sup>c</sup>

注：同列数据后不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Note: Different lowercase letters after the same column of data indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

开，且售价偏高，GLB 含有柠檬酸钠和 TritonX-100，能清除兰属植物叶肉细胞中含有大量的糖

类、酚类等黏性物质，其裂解的细胞悬浮液也能出较好的峰值，因此在对兰属物种进行流式细胞技术测定时，无法获得 CyStain UV Precise P 试剂盒裂解液的情况下，也可选择 GLB 进行试验。兰科普遍存在核内再复制现象<sup>[12]</sup>，兰属组织器官中也均存在多倍体化<sup>[30]</sup>。本研究所选的 4 种植物组织中，根尖和花萼片均存在不同程度的内源多倍体化现象，内源多倍体化在植物倍性鉴定中会造成倍性改变的假象，对结果的准确性产生影响；嫩叶和花梗出峰稳定，因嫩叶不受开花等影响，在幼苗期及成苗期均可以采样，是兰属倍性检测的最佳组织材料。

多倍体育种是观赏植物育种的重要方向之一。

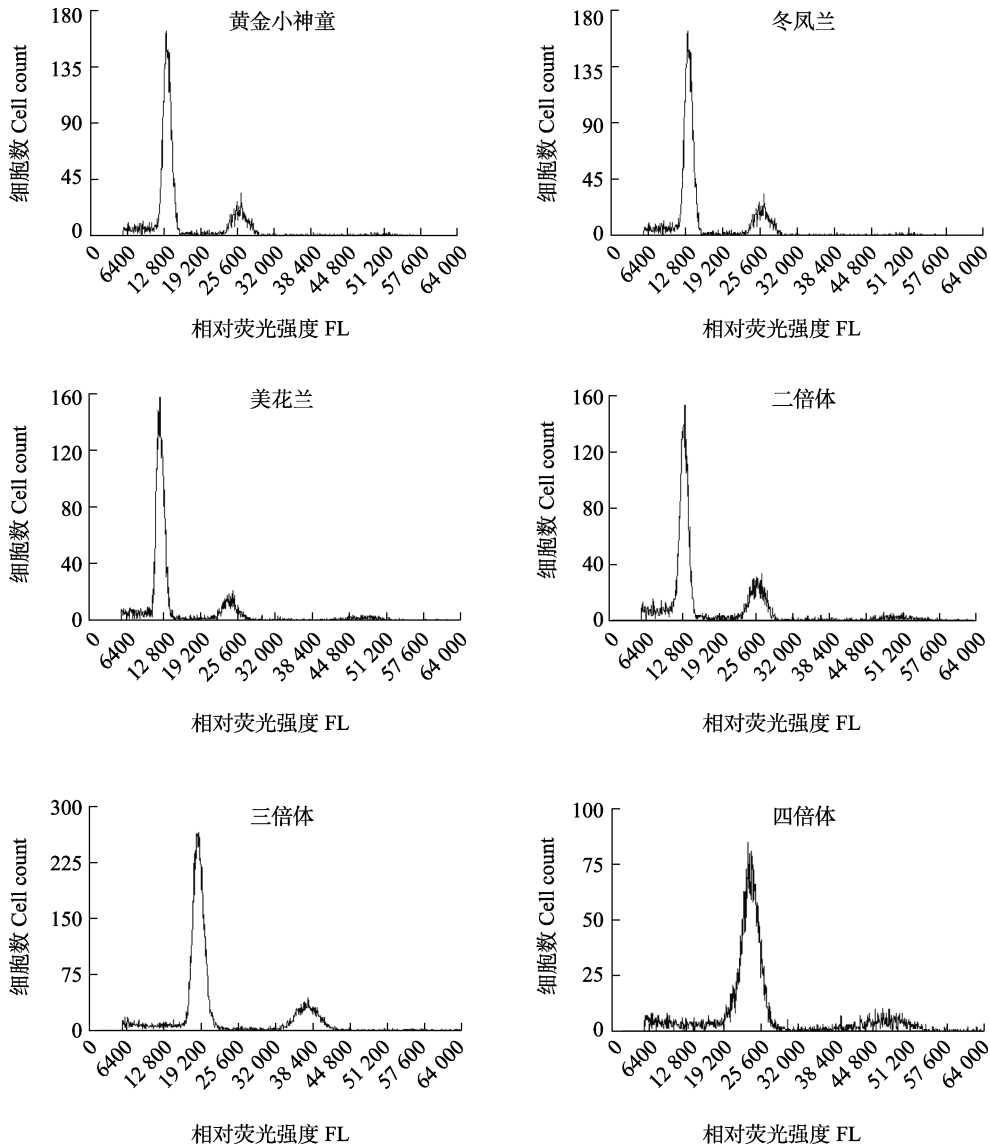
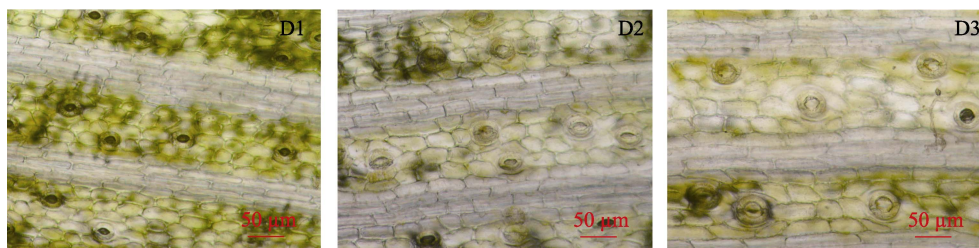


图 3 不同种 (品种) 流式细胞仪测定直方图

Fig. 3 Histograms of different species (varieties) using flow cytometry



D1: 二倍体; D2: 三倍体; D3: 四倍体; 比例尺: 50 μm。

D1: Diploid; D2: Triploid; D3: Tetraploid; Scale: 50 μm.

图 4 不同倍性兰属种质叶片气孔特征

Fig. 4 Stomatal characters of different ploids in *Cymbidium* hybrids

目前商业化的大花蕙兰品种多数为多倍体。不同倍性品种间杂交是兰属多倍体的主要选育途径，三倍体可由四倍体为亲本与二倍体杂交产生，四倍体由四倍体和四倍体杂交产生，二倍体品种间

杂交也能产生四倍体的子代<sup>[8, 10]</sup>。本研究在 2 个二倍体为亲本的杂交组合后代中检测到三倍体和四倍体，四倍体可能是由二倍体合子经体细胞加倍后发育成植株，三倍体是由未减数分裂的  $2n$  配

子和经减数分裂  $n$  配子受精融合发育而成, 其中  $2n$  配子来源于母本的概率大于父本, 因为在获得多倍体杂交组合的母本均为杂交种, 黄金小神童是建兰(*C. ensifolium*)和大花蕙兰(*C. Enid Haupt*)的杂交种, 经多次杂交选育而成, 具有 50%建兰、12.5%美花兰和 6.25%独占春的血统[英国皇家园艺学会(RHS)的兰科植物品种国际登录网]。有研究表明远缘杂交是获得高效发生  $2n$  配子资源的有效手段, 杂交种在配子形成过程中减数分裂异常, 出现  $2n$  配子概率显著高于原生种<sup>[31-32]</sup>。从本研究中杂交组合 3 比组合 2 出现多倍体比例高的现象, 也可发现杂交代数越高, 遗传背景越复杂, 获得可育配子比例低, 产生后代数量也相对少, 但更容易出现多倍体。在兰属杂交育种中, 亲本选择可以亲缘关系较远, 亲本至少有一方是经过多代杂交后的杂交种, 这样子代植株倍性会相对丰富。

染色体组的加倍会导致基因表达和调控的改变, 从而造成植物形态和生理上的相应变化, 如叶片变宽、变厚, 花瓣变厚、颜色变深, 气孔长度和宽度增大、密度降低、育性和抗性改变等。本研究发现, 随着倍性的提高气孔的长度和宽度均增大, 气孔密度变小。这与张源源等<sup>[33]</sup>在橡胶多倍体研究中的结果相似。而株型、花朵数量、大小和颜色、花期长短、抗性及其育性等特性有待进一步观察。

## 参考文献

- [1] Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew[DB/OL]. [2023-07-12]. [http:// www.Plants of the world online.org/](http://www.Plants of the world online.org/).
- [2] CHEN X Q, LIU Z J, ZHU G H, LANG K Y, JI Z H, LUO Y B, JIN X H, PHILLIP J C, JEFFREY J W, STEPHAN W G, PAUL O, JAAP J V, HOWARD P W, DUDLEY C, ALEXANDRA B. Flora of China (Vol. 25)[M]. Beijing: Sciences Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2009.
- [3] 徐婉, 林雅君, 赵莊, 周庄. 兰属植物资源与育种研究进展[J]. 园艺学报, 2022, 49(12): 2722-2742.  
XU W, LIN Y J, ZHAO Z, ZHOU Z. Advances in genetic resources and breeding research of *Cymbidium*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2022, 49(12): 2722-2742. (in Chinese)
- [4] 李玉阁, 郭卫红, 吴伯骥. 国产七种和一变种兰属植物的核型研究[J]. 植物分类学报, 2002, 40(5): 406-413.  
LI Y G, GUO W H, WU B J. A karyological study of seven species and one variety of *Cymbidium* from China[J]. Acta Phytotaxonomica Sinica, 2002, 40(5): 406-413. (in Chinese)
- [5] 李玉阁, 郭卫红, 吴伯骥. 4种国产兰属植物的核型比较研究[J]. 西北植物学报, 2002, 22(6): 1438-1444.  
LI Y G, GUO W H, WU B J. Studies on karyotypes of four species of *Cymbidium* in China[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2002, 22(6): 1438-1444. (in Chinese)
- [6] 李玉阁, 郭卫红, 吴伯骥. 六种国产兰属植物的核型研究[J]. 云南植物研究, 2003, 25(1): 83-89.  
LI Y G, GUO W H, WU B J. A karyological study of six Chinese species of *Cymbidium*[J]. Acta Botanica Yunnanica, 2003, 25(1): 83-89. (in Chinese)
- [7] 吕复兵, 朱根发, 王碧青. 广东四个墨兰品种的核型研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2005, 13(5): 423-428.  
LYU F B, ZHU G F, WANG B Q. Karyotypes of four *Cymbidium sinense* cultivars in Guangdong[J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2005, 13(5): 423-428. (in Chinese)
- [8] 朱根发, 吕复兵, 王碧青. 大花蕙兰品种的染色体数目分析[J]. 园艺学报. 2006, 33(2): 417-421.  
ZHU G F, LYU F B, WANG B Q. Chromosome analysis of hybrid *Cymbidium*[J]. Acta Horticulturae Sinica. 2006, 33(2): 417-421. (in Chinese)
- [9] 冷青云, 莫饶, 彭彬, 黄明忠, 罗远华, 王家保. 六种兰属植物的核型分析[J]. 园艺学报, 2009, 36(2): 291-296.  
LENG Q Y, MO R, PENG B, HUANG M Z, LUO Y H, WANG J B. A karyological study of six species of *Cymbidium*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2009, 36(2): 291-296. (in Chinese)
- [10] 谢佩吾, 李早文, 伍爱萍, 朱根发, 江南. 17 个杂交兰及 3 个大花蕙兰品种的染色体研究[J]. 广东农业科学, 2015, 42(8): 26-28.  
XIE P W, LI Z W, WU A P, ZHU G F, JIANG N. Study on chromosome of 17 cultivars of hybrid *Cymbidium* and three cultivars of *Cymbidium hybridum*[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2015, 42(8): 26-28. (in Chinese)
- [11] DOLEZEL J, GREILHUBER J, LUCRETTI S, MEISTERM A, LYSAK M A, NARDI L, OBERMAYER R. Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison[J]. Annals of Botany, 1998, 82(Suppl. A) : 17-26.
- [12] 李春楠, 傅巧娟, 沈国正, 赵福康, 张晓莹, 阮若昕. 流式细胞术在兰科植物中的应用[J]. 核农学报, 2020, 34( 5) : 973-981.  
LI C N, FU Q J, SHEN G Z, ZHAO F K, ZHANG X Y, RUAN L X. Applications of flow cytometry in Orchidaceae[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2020, 34(5): 973-981. (in Chinese)

- [13] 冷青云, 牛俊海, 尹俊梅, 杨光穗, 黄少华, 徐洪伟. 红掌品种‘樱桃红’变异株的倍性鉴定[J]. 热带作物学报, 2014, 35(11): 2139-2143.  
LENG Q Y, NIU J H, YIN J M, YANG G S, HUANG S H, XU H W. Identification of the tetraploid variant in *Anthurium andraeanum* ‘Cherry Red’[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2014, 35(11): 2139-2143. (in Chinese)
- [14] 吕顺, 任毅, 王芳, 胡桂兵, 黄秉智, 刘文清, 何建齐, 刘建平, 曾莉莎, 周建坤, 麦景郁, 张珂恒. 利用流式细胞术快速鉴定 169 份香蕉种质资源的染色体倍性[J]. 果树学报, 2018, 35(6): 668-684.  
LYU S, REN Y, WANG F, HU G B, HUANG B Z, LIU W Q, HE J Q, LIU J P, ZENG L S, ZHOU J K, MAI J Y, ZHANG K H. Ploidy identification of 169 *Musa* germplasms by flow cytometry[J]. Journal of Fruit Science, 2018, 35(6): 668-684. (in Chinese)
- [15] 张源源, 濮寿琴, 胡彦师, 方家林, 黄肖, 李维国, 黄华孙. 橡胶树种质资源的倍性鉴定[J]. 热带作物学报, 2020, 41(3): 457-463.  
ZHANG Y Y, PU S Q, HU Y S, FANG J L, HUANG X, LI W G, HUANG H S. Ploidy identification of germplasm resources in *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg.[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2020, 41(3): 457-463. (in Chinese)
- [16] 黄黎芳, 武志江, 梁桂东, 陆贵锋, 黄凤珠, 刘朝安, 邓海燕. 利用流式细胞术对 29 份火龙果种质染色体的倍性鉴定[J]. 热带作物学报, 2021, 42(4): 966-970.  
HUANG L F, WU Z J, LIANG G D, LU G F, HUANG F Z, LIU C A, DENG H Y. Ploidy determination of 29 *Pitaya ermpasms* using flow cytometry[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(4): 966-970. (in Chinese)
- [17] 李春牛, 李先民, 黄展文, 卢家仕, 李琴, 黄昌艳, 卜朝阳. 利用流式细胞术鉴定茉莉花基因组大小和染色体倍性[J]. 热带作物学报, 2021, 42(5): 1231-1236.  
LI C N, LI X M, HUANG Z W, LU J S, LI Q, HUANG C Y, BU Z Y. Genome size estimation and ploidy identification of *Jasminum sambac* by flow cytometry[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(5): 1231-1236. (in Chinese)
- [18] 段一凡, 李岚, 杨欣欣, 王贤荣, 张敏, 张成, 柴子涵. 桂花及其近缘种倍性和基因组大小分析[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2021, 45(5): 47-52.  
DUAN Y F, LI L, YANG X X, WANG X R, ZHANG M, ZHANG C, CHAI Z H. Study on ploidy and genome sizes of *Osmanthus fragrans* and its related species[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition), 2021, 45(5): 47-52. (in Chinese)
- [19] 陈宜木, 周群, 钟颖颖, 张万旗, 李可威, 林悦其. 利用流式细胞术鉴定 68 份三角梅基因组大小与染色体倍性[J]. 亚热带植物科学, 2022, 51(6): 417-423.  
CHEN Y M, ZHOU Q, ZHONG Y Y, ZHANG W Q, LI K W, LIN Y Q. Genome size estimation and ploidy identification of 68 servings *Bougainvillea* by flow cytometry[J]. Subtropical Plant Science, 2022, 51(6): 417-423. (in Chinese)
- [20] LI H Y, NIU J H, SUN L P, LI Y, LENG Q Y, CHEN J H, ZHANG J R, YUAN Y N, MA C, HERNAN A L. Ploidy levels and DNA contents of *Bougainvillea* accessions determined by flow cytometry analysis[J]. Hortscience, 2022, 57(12): 1502-1506.
- [21] COX A V, ABDELNOUR D G, BENNETT M D, LEITCH I J. Genome size and karyotype evolution in the slipper orchids (Cypripedioideae: Orchidaceae)[J]. American Journal of Botany, 1998, 85(5): 681-687.
- [22] JONES W E, KUEHNLE A R, ARUMUGANATHAN K. Nuclear DNA content of 26 orchid (Orchidaceae) genera with emphasis on *Dendrobium*[J]. Annals of Botany, 1998, 82(2): 189-194.
- [23] MARQUE I, DRAPER D, RIOFRIO L, NARANJO C. Multiple hybridization events, polyploidy and low postmating isolation entangle the evolution of neotropical species of *Epidendrum* (Orchidaceae)[J]. BMC Evolutionary Biology, 2014, 14(1): 20.
- [24] 汪琛颖, 张坤, 梁芳, 崔波, 马润林. 蕙兰(*Cymbidium faberi* Rolfe)基因组大小测定[J]. 北方园艺, 2015(11): 86-90.  
WANG C Y, ZHANG K, LIANG F, CUI B, MA R L. Estimation of genome size of *Cymbidium faberi* Rolfe[J]. Northern Horticulture, 2015(11): 86-90. (in Chinese)
- [25] 林瀚, 韩晓文, 兰思仁, 马晓开. 基于流式细胞技术两种兰属植物基因组大小的测定[J]. 森林与环境学报, 2019, 39(6): 616-620.  
LIN H, HAN X W, LAN S R, MA X K. Estimation of genome size of two *Cymbidium* by flow cytometry[J]. Journal of Forest and Environment, 2019, 39(6): 616-620. (in Chinese)
- [26] CHEN W H, TANG C Y, KAO Y L. Ploidy doubling by *in vitro* culture of excised protocorms or protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* species[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2009, 98(2): 229-238.
- [27] GROSSO V, FARINA A, GIORGI D, NARDI L, DIRETTO G, LUCRETTI S. A high-throughput flow cytometry system for early screening of *in vitro* made polyploids in *Dendrobium* hybrids[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2018, 132(1): 57-70.
- [28] HAN P P, LIU W X, LIANG H H, XIANG Z X. *In vitro* induction and identification of autotetraploid of *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb.f. by colchicine treatment[J]. Plant Cell

- Tissue and Organ Culture, 2018, 132(3): 425-432.
- [29] LOUREIRO J, RODRIGUEZ E, DOLEZEL J, SANTOS C. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species[J]. *Annals of Botany*, 2007, 100(4): 875-888.
- [30] FUKAI S, HASEGAWA A, GOI M. Polysomaty in *Cymbidium*[J]. *HortScience*, 2002, 37(7): 1088-1091.
- [31] ZENG R Z, ZHU J, XU S Y, DU G H, GUO H R, CHEN J J, ZHANG Z S. Unreduced male gamete formation in *Cymbidium* and its use for developing sexual polyploid cultivars[J]. *Frontier in Plant Science*, 2020(11): 558.
- [32] 郭和蓉, 朱娇, 杜国辉, 黄紫婷, 谢利, 魏倩, 张志胜. 墨兰×兔耳兰杂交后代 $2n$ 雄配子发生及其细胞学机制[J]. 华中农业大学学报, 2021, 40(3): 152-158.
- GUO H R, ZHU J, DU G H, HUANG Z T, XIE L, WEI Q, ZHANG Z S.  $2n$  male gametogenesis and its cytological mechanism in hybrids of *Cymbidium sinens* × *C. lancifolium* [J]. *Journal of Huazhong Agriculture University*, 2021, 40(3): 152-158. (in Chinese)
- [33] 张源源, 郭涵, 袁红章, 王祥军, 黄肖, 李媛, 李维国. 橡胶树不同倍性的气孔性状差异研究[J]. 热带作物学报, 2017, 38(3): 389-394.
- ZHANG Y Y, GUO H, YUAN H Z, WANG X J, HUANG X, LI Y, LI W G. Stomatal differences among diploid, triploid and tetraploid in rubber tree[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2017, 38(3): 389-394. (in Chinese)