

黄花白及多倍体种质创制研究

何佳敏^{1,2}, 郑苏瑾^{2,3}, 曾歆花^{2,3}, 罗韶凡², 兰思仁¹, 黄卫昌^{1,2,3*}

1. 福建农林大学风景园林与艺术学院, 福建福州 350002; 2. 上海辰山植物园/华东野生濒危资源植物保育中心, 上海 201602; 3. 上海辰山植物园/上海市资源植物功能基因组学重点实验室, 上海 201602

摘要: 本研究以黄花白及 (*Bletilla ochracea* Schltr.) 种子为诱变材料, 采用不同浓度秋水仙素溶液和不同处理时间进行多倍体诱导处理, 以期找到诱导黄花白及多倍体植株的试验条件。结果表明: 以 0.25%秋水仙素溶液浸泡黄花白及种子 6 d 为诱导黄花白及四倍体的最佳方式, 可获得较高的种子存活率和诱导率, 其中种子存活率为 35.66%, 诱导率为 45%。从形态学方面观察, 四倍体植株平均高度、叶数、叶宽、茎粗、块茎、根长和根粗均大于二倍体植株, 并且四倍体植株气孔明显变大, 气孔密度降低。本研究创制的黄花白及四倍体新种质将为黄花白及等药用兰科植物的遗传性状的改良提供技术参考和研究材料。

关键词: 黄花白及; 多倍体; 秋水仙素; 流式细胞术; 染色体计数

中图分类号: S326 文献标志码: A

Polyploid Germplasm Induction of *Bletilla ochracea* Schltr.

HE Jiamin^{1,2}, ZHENG Sujin^{2,3}, ZENG Xinhua^{2,3}, LUO Shaofan², LAN Siren¹, HUANG Weichang^{1,2,3*}

1. College of Landscape Architecture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China; 2. Shanghai Chenshan Botanical Garden / Eastern China Conservation Centre for Wild Endangered Plant Resources, Shanghai 201602, China; 3. Shanghai Chenshan Botanical Garden / Shanghai Key Laboratory of Plant Functional Genomics and Resources, Shanghai 201602, China

Abstract: To generate polyploid *B. ochracea* Schltr and find out the optimal induction condition, the seeds of diploid *B. ochracea* were treated with different concentration of colchicine solution under a range of treatment time. The results of the study suggested that the seeds treated with 0.25% colchicine solution for six days was effective in polyploid induction for *B. ochracea*, with a 35.66% survival rate of treated seeds and a 45% induction rate. The tetraploid gave a significant enhancement on various agronomic traits, including plant height, leaf number, leaf width, stem diameter, bulb length and root diameter. In addition, tetraploid *B. ochracea* showed increased stomatal aperture and decreased stomatal density. The tetraploid *B. ochracea* was generated in this study, which would provide technical support and basic material for improving the genetic traits of medicinal orchids.

Keywords: *Bletilla ochracea* Schltr.; polyploidy; colchicine; flow cytometer; chromosome counting

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.04.011

黄花白及 (*Bletilla ochracea* Schltr.) 是兰科 (Orchidaceae) 白及属 (*Bletilla*) 多年生草本植物, 在陕西、重庆、湖北、湖南、江西、广西等地区分布。黄花白及花序具 3~8 朵, 花朵常黄色, 叶片为长形披针状, 花朵淡雅, 叶片秀丽, 具有较高的园艺观赏价值。此外, 黄花白及和小白及

[*B. formosana* (Hayata) Schltr.] 与白及 [*B. striata* (Thunb.) Reichb. f.] 为同属植物, 均为我国传统中草药^[1], 其块茎具备药用价值, 在我国常被用作白及的替代品。前人研究发现白及与黄花白及、小白及之间 HPLC 指纹图谱相似度较高, 这表明白及与黄花白及所含化学成分类似^[2]。近期研究

收稿日期 2024-11-27; 接受日期 2024-12-05

基金项目 中央财政林业科技推广示范资金项目 (沪[2023]TG01)。

作者简介 何佳敏 (2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 兰花育种。*通信作者 (Corresponding author): 黄卫昌 (HUANG Weichang), E-mail: huangweichang@csnbgsh.cn。

表明黄花白及多糖与白及多糖具有相似的结构,具有抗肿瘤疗效^[3]。此外,相关研究发现黄花白及还具有促凝血^[4]和抗胃溃疡^[5]等作用。然而,近年由于对植物源性药物市场需求的不断增加,黄花白及也面临野生资源被过度采集和生境退化或丧失而导致数量锐减等问题^[6]。黄花白及已被列入《世界自然保护联盟濒危物种红色名录》(IUCN)和国际贸易公约(CITES)附录Ⅱ,在我国属于濒危(EN)保护植物。

目前黄花白及的研究多集中在其药用化学成分的分析 and 菌根共生等方面,对于黄花白及新种质创新研究鲜有报道。因此,加快培育出性状更优良的黄花白及新品种对于满足不断增长的药材市场需求和保护黄花白及野生资源显得更加迫切。多倍体诱导作为育种工具中的有效技术之一,对于优良物种培育、品种杂交、性状改良、生产和商业化等具有重要作用^[7-8]。为创制表型和栽培性状更优良黄花白及新种质,本研究采用秋水仙素溶液浸种法对黄花白及进行倍性诱导,通过流式细胞术、染色体计数、气孔观察等方法鉴定黄花白及表型变异植株。黄花白及倍性新种质的培育可为药用兰科植物育种提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

选取上海辰山植物园科研中心兰科植物资源圃的黄花白及自交蒴果为试验材料。

1.2 方法

1.2.1 种子活力检测 采用 TTC 改良染色法^[9]对黄花白及种子活力进行检测(适用于新鲜采摘的种子),根据 TTC 染色结果计算种子活力率,选取活力良好的种子进行后续试验。将种子混样后加入 1.0%TTC 染液没过种子并摇匀,将其置于 40℃ 环境下避光染色 12 h 后吸取种子置于载玻片上,在体视显微镜下观察染色情况。种子种胚颜色越红,说明种子活力越高;若种胚不变色,说明种子无活力。随机取 3 个视野,进行统计并计算种子活力率,活力率=胚染上红色种子数/有胚种子总数×100%,本试验所选取种子活力率为 89.29%。

1.2.2 倍性诱导 以黄花白及种子为诱变材料,采用秋水仙素浸泡法进行倍性诱导。在超净工作台对种子进行无菌处理,先用 75%酒精浸泡

3 min,再用 3%次氯酸钠浸泡杀菌 5 min,无菌水冲洗 3 次后用无菌滤纸吸干水分。接着将种子分别转移至 0.25%、0.50%、1.00%秋水仙素溶液(诱导液添加不超过 2.0% DMSO)中避光诱导,对照组则用无菌水浸泡处理,各处理组均置于 120 r/min 转速摇床暗处理 3、6、9 d。每个处理种子数量约为 100 粒,每个处理重复 5 次。诱导处理结束后,用无菌水冲洗 3 次,利用无菌滤纸吸干水分后置于播种培养基使其恢复正常生长。30 d 后统计种子存活率,并继代 1 次,90 d 后再转至壮苗培养基,待植株生长到 210 d 后,筛选形态变异植株并对其进行倍性鉴定。

1.2.3 流式细胞检测 每个处理选取 20 株诱变株进行流式细胞检测,取 0.50~1.00 cm² 的样本叶片,置于冰上的培养皿中,加入预冷的细胞核提取缓冲液,用锋利的双面刀片快速垂直切碎叶片 30~60 s,此过程尽量将材料浸没于裂解液中。吸取混合溶液经滤膜过滤,转移至测定管内,得到细胞核悬浮液,加入染色液(染色缓冲液+碘化丙啶+RNaseA 储备液),混匀后置于 4℃ 避光染色 15~30 min,随后使用 PARTEC CyFlow 流式细胞仪进行检测。具体试验操作参照 GALBRAITH 等^[10]的方法。

1.2.4 根尖染色体计数 参考王乐乐等^[11]和 MORAES 等^[12]的方法。从植株上切取 3~4 mm 长势旺盛根尖,将根尖置于对二氯苯饱和溶液中,并在 4℃ 条件下浸泡处理 5 h,然后用 Carnoy 溶液[乙醇:乙酸,3:1(v/v)]在 4℃ 条件下固定 12 h。再将固定的根尖用无菌水冲洗 3~5 次,将水吸干后,置于 2.0%纤维素酶和果胶酶溶液,并在 37℃ 水中解离约 15~20 min。根尖分生区细胞核用卡宝品红染液染色 3~5 min,压片,最后置于显微镜下观察根尖细胞染色体。

1.2.5 形态学观察 参考前人研究方法^[13-14],对植株株高、叶片大小、数量、茎秆、块茎大小、分蘖数等形态特征进行统计、测量,对比加倍植株与对照植株的形态变化。此外,气孔特征通常是检测倍性水平的重要指标。采用 OMIDBAIGI 等^[15]的方法,取对照和诱变植株叶片,用速干透明指甲油进行处理之后,在光学显微镜观察气孔大小,并计算气孔密度。

1.3 数据处理

采用 Image J 软件和 IBM SPSS Statistics 27 软件进行试验数据处理。样本间差异的显著性采

用独立样本 T 检验。使用 Microsoft Excel 2021 软件和 Adobe Photoshop 2024 软件绘制图表。

2 结果与分析

2.1 秋水仙素诱导黄花白及

通过不同浓度的秋水仙素对黄花白及进行处理，结果如表 1 所示，处理浓度越高且处理时间越长，植株存活率越低。在处理时间均为 6 d 的情况下，秋水仙素浓度为 0.50% 和 1.00% 的处理植株死亡率达到 100%。黄花白及在 0.25% 秋水仙素条件下处理 6 d 的诱导率达到 45%，其次是 1.00% 秋水仙素处理种子 3 d，诱导率为 40%，但该处理条件

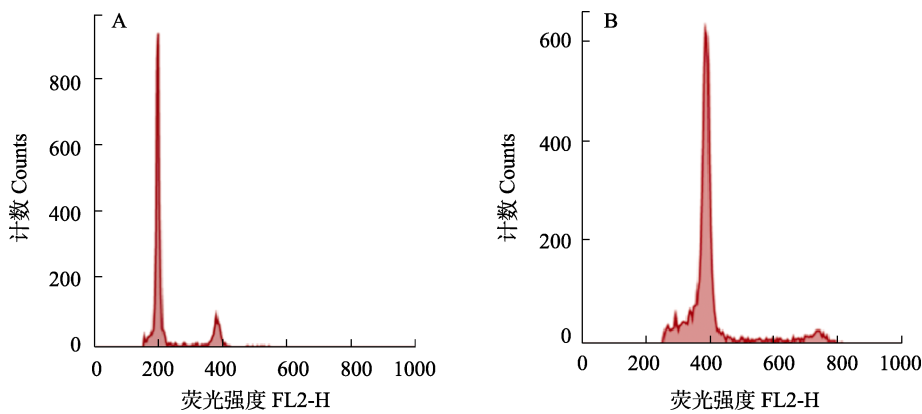
下存活率只有 8.69%。结合诱导率和存活率结果得出，黄花白及种子经 0.25% 秋水仙素处理 6 d 是诱导出四倍体植株的最佳处理方式。

2.2 流式细胞术检测

诱导处理 210 d 后，采用流式细胞术对诱变植株进行 DNA 含量检测和分析，以未经处理的二倍体黄花白及为对照，根据二倍体黄花白及和诱变株黄花白及荧光强度比值进行快速鉴定，如图 1 可见，二倍体黄花白及荧光强度大概在 200 处达到峰值，诱变株黄花白及荧光强度大概在 400 处达到峰值，约为对照组的 2 倍。由此可见该诱变株为四倍体黄花白及。

表 1 不同浓度秋水仙素处理不同时间对黄花白及的影响
Tab. 1 Effects of colchicine concentration and treatment time on *B. ochracea*

秋水仙素浓度 Colchicine concentration/%	处理时间 Treated time/d	存活率 Survival rate/%	检测株数 Test number	四倍体株数 Tetraploid number	非整倍体株数 Aneuploid number	变异率 Variation rate/%	诱导率 Induction rate/%
0.25	3	56.85	20	1	5	30	5
	6	35.66	20	9	2	55	45
	9	19.70	20	4	4	40	20
0.50	3	27.29	20	1	2	15	5
	6	0.00					
	9	0.00					
1.00	3	8.69	20	8		40	40
	6	0.00					
	9	0.00					
CK	0	72.15					



A: 二倍体黄花白及；B: 经秋水仙素多倍体诱导黄花白及。
A: Diploid *B. ochracea*; B: Polyploidized *B. ochracea* treated with colchicine.

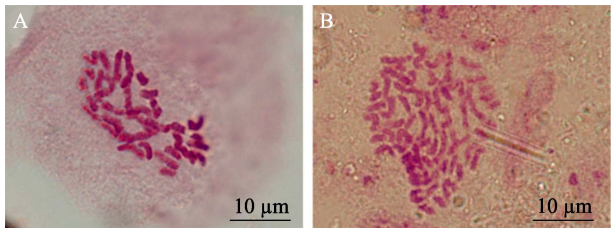
图 1 流式细胞术分析二倍体黄花白及和多倍体诱导黄花白及叶片核 DNA 含量

Fig. 1 Histograms of flow cytometry analysis of nuclear DNA content of leaves from diploid and polyploidized *B. ochracea*

2.3 根尖染色体计数

对经过流式基因组检测的加倍植株的根尖进行染色体压片处理，结果表明，未处理对照黄花

白及根尖染色体数目为 $2n=2x=34$ ，经流式鉴定的基因组加倍黄花白及根尖染色体数目为 $2n=4x=68$ （图 2）。



A: 二倍体黄花白及; B: 经秋水仙素多倍体诱导黄花白及。
A: Diploid *B. ochracea*; B: Polyploidized *B. ochracea* treated with colchicine.

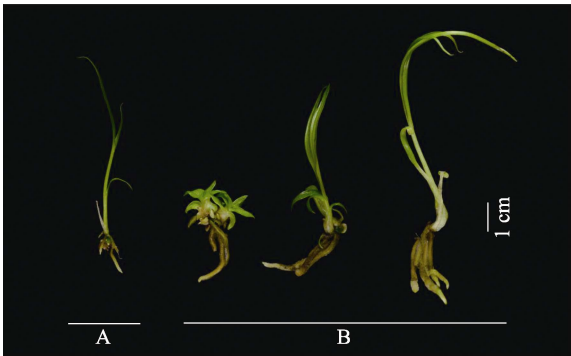
图 2 黄花白及根尖细胞染色体计数

Fig. 2 Chromosome counting from root tip cells of *B. ochracea*

2.4 表型性状分析

在相同的培养条件下，对黄花白及四倍体和二倍体植株进行形态比较分析。如图 3 和表 2 所示，黄花白及四倍体植株表型发生显著性变化，其植株株高、叶片数量、叶宽、茎粗、块茎直径、根长和根粗平均数值均高于二倍体植株。其中四倍体黄花白及的叶宽、块茎直径和根粗数值分别比二倍体黄花白及增加 75.0%、52.4%和 45.5%，具有显著性差异 ($P<0.05$)。此外，四倍体植株表

型同时具有矮化（最矮株高为对照最矮的 0.325 倍）和变大（最高株高为对照最高的 1.44 倍）趋势，并均与二倍体黄花白及表型差异明显。与二倍体黄花白及对照相比较，四倍体植株叶片更宽更厚，根增长加粗，这些都可作为四倍体黄花白及辅助鉴定的特征。



A: 二倍体黄花白及; B: 多倍体诱导黄花白及。
A: Diploid *B. ochracea*; B: Polyploidized *B. ochracea*.

图 3 二倍体黄花白及和诱导四倍体黄花白及苗龄 210 d 表型

Fig. 3 Phenotypic comparisons between 210-day-old plants of diploid *B. ochracea* and polyploidized *B. ochracea*

表 2 黄花白及对对照和四倍体植株的形态学特征比较

Tab. 2 Morphological characteristics between diploid and tetraploid *B. ochracea*

指标 Index	二倍体 Diploid		四倍体 Tetraploid	
	平均值 Mean	范围 Range	平均值 Mean	范围 Range
株高/cm	6.16±1.57	4.00~7.50	6.31±3.33	1.30~10.80
叶宽/cm	0.28±0.02**	0.24~0.32	0.49±0.13**	0.30~0.80
叶片数量	2.60±0.55	2~3	3.93±1.38	3~8
茎粗/cm	0.16±0.04	0.12~0.22	0.26±0.11	0.15~0.50
块茎直径/cm	0.21±0.03*	0.13~0.29	0.32±0.08*	0.23~0.50
根数量	2.60±0.40	2~4	4.10±2.36	2~11
根长/cm	1.23±0.93	0.30~3.50	1.50±0.71	0.30~3.70
根茎直径/cm	0.11±0.01***	0.10~0.13	0.16±0.02***	0.14~0.20

注：*表示差异显著 ($P<0.05$)；**表示差异极显著 ($P<0.01$)；***表示差异极显著 ($P<0.001$)。

Note: * indicates significant difference ($P<0.05$); ** indicates extremely significant difference ($P<0.01$); *** indicates extremely significant difference ($P<0.001$).

2.5 气孔观察

通过光学显微镜对二倍体黄花白及和四倍体黄花白及叶表皮气孔进行观察和拍照，使用 ImageJ 软件测量气孔长度、气孔宽度和气孔面积大小。结果显示（表 3、图 4A、图 4B），四倍体黄花白及叶表皮气孔显著大于二倍体黄花白及，同时气孔密度变小。此外，叶片解剖结构也受到多倍体化的影响，与二倍体植株相比，四倍体植株叶片整体比二倍体叶片厚 46.31%（图 4C、图 4D）。

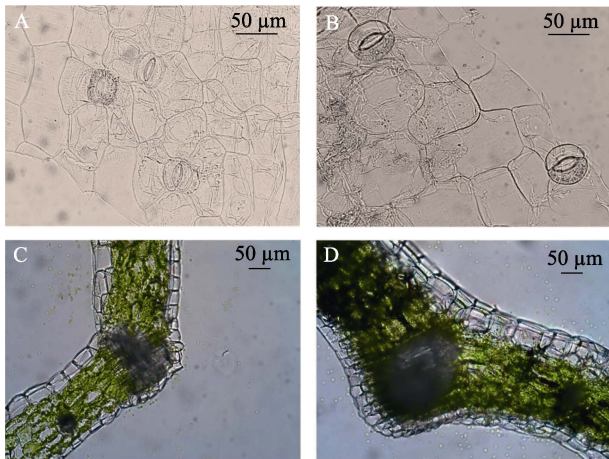
3 讨论

黄花白及兼具观赏与药用价值，随着药用植物市场对植物源性药物的需求增长，黄花白及面临过度采集和生境退化或丧失等挑战。并且黄花白及在我国属于濒危（EN）植物，已被列入《世界自然保护联盟濒危物种红色名录》（IUCN）。多倍体诱导能使植物获得改良性状，如更大的器官（叶、花等）^[16]，更高的生物量，耐旱性和抗病性增强^[17-18]，这些特性的改变甚至可以使多倍体

表 3 黄花白及二倍体和四倍体植株叶片气孔大小和气孔密度
Tab. 3 Leaf stomata density and area in diploid and tetraploid plants of *B. ochracea*

样本 Sample	保卫细胞长度 Guard cell length/ μm	保卫细胞宽度 Guard cell width/ μm	气孔面积大小 Stomatal area/ μm^2	气孔密度 Stomatal density/ mm^2
二倍体	36.5 $\pm$ 5.14***	13.0 $\pm$ 2.21***	1276.1 $\pm$ 350.48**	7.7 $\pm$ 0.82***
四倍体	45.6 $\pm$ 3.09***	17.7 $\pm$ 1.76***	1740.6 $\pm$ 225.28**	4.4 $\pm$ 0.50***

注：**表示差异极显著 ($P<0.01$)；***表示差异极显著 ($P<0.001$)。
Note: ** indicates extremely significant difference ($P<0.01$); *** indicates extremely significant difference ($P<0.001$).



A: 二倍体上表皮气孔; B: 四倍体上表皮气孔;
C: 二倍体叶片横截面; D: 四倍体叶片横截面。
A: Stomata on upper epidermis of diploid; B: Stomata on upper epidermis of tetraploid; C: Cross-sections of leaf blade in diploid; D: Cross-sections of leaf blade in tetraploid.
图 4 二倍体和四倍体黄花白及植株叶片气孔和叶横截面
Fig. 4 Leaf stomata and blade cross section in diploid and tetraploid plants of *B. ochracea*

植物占据新的生态位^[19-20]。并且这些多倍性状的变化提高了它们在农艺用途的可能性^[16]。因此, 培育出产量更高, 抗性更强等优良性状的黄花白及品种将成为黄花白及可持续健康发展的关键途径。

多倍体诱导成功的因素涉及物种、抗有丝分裂剂、外植体材料类型、处理浓度和时间等。种子、不定芽、从生芽、原球茎、类原球茎、茎尖、带节茎段等分裂旺盛组织常作为兰科植物多倍体诱导的材料^[21]。同其他植物一样, 秋水仙素也是兰科植物倍性育种最常用的抗有丝分裂剂^[21-22]。例如, LI 等^[23]使用秋水仙素对白及种子进行多倍体诱导, 得出经 0.1%秋水仙素处理 7 d 后, 四倍体诱导率高达(40.67 $\pm$ 0.89)%。崔广荣等^[24]利用 0.2%~0.4%秋水仙素处理文心兰 (*Oncidium*) 类原球茎薄片 10~20 d, 四倍体诱导率可达 26.70%。由于植物具有表皮蜡、种皮, 或较厚的角质层细胞等诸多物理屏障, 因此抗有丝分裂剂的有效性会受到溶剂影响。DMSO 可通过增加细胞渗透性从而提升化学试剂的吸收率, 根据

HAMILL 等^[25]研究, 与溶于水的秋水仙素对照相比, 用溶于 2%或 4% DMSO 的秋水仙素处理降低了香蕉外植体的存活率, 但诱导获得的四倍体植株数目增加。

本研究发现, 秋水仙素浓度和处理时间与存活率呈负相关趋势, 这与 LI 等^[23]诱导白及种子结果相似, 随着秋水仙素浓度和处理时间延长, 存活率逐渐降低, 在 0.4%浓度处理 9 d 时死亡率最高。此外, 在 LIU 等^[26]诱导铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*) 研究中, 也是随着秋水仙素浓度提高和处理时间延长, 各处理组原球茎存活率均降低, 以 0.4%浓度处理 48 h 死亡率最高。在本研究中, 黄花白及在 0.50%和 1.00%秋水仙素条件下处理 6 d 的死亡率最高达到了 100%, 这可能是由于秋水仙素浓度太高、处理时间太长以及添加了 DMSO 对种子毒害太强导致。不同物种对抗有丝分裂剂浓度和处理时间所呈现的效果也不同, 因此, 找到诱导率和存活率都较高的处理条件是倍性育种的关键。本研究黄花白及在 0.25%秋水仙素条件下处理 6 d 时诱导率和变异率分别高达 45%和 55%, 存活率为 35.66%, 其次是 1.00%秋水仙素处理种子 3 d, 诱导率和变异率均为 40%, 但该处理条件下存活率只有 8.69%。对比各处理组的诱导率和存活率数据, 0.25%秋水仙素处理时间 6 d 是创制黄花白及四倍体植株的最佳方式。

本研究通过流式细胞术和染色体计数检测出 23 株四倍体, 观察发现大部分四倍体黄花白及呈现叶片变宽变厚、茎秆变粗、块茎变大、根系变粗、气孔变大和气孔密度变小等性状, 与白及^[23]、铁皮石斛^[26-27]、荧光蝴蝶兰 (*Phalaenopsis bellina*)^[14]、紫毛兜兰 (*Paphiopedilum villosum*)^[28]、纹瓣兰 [*Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.]^[29]等多倍体植株器官粗大化特征相一致。在大多数情况下, 物种基因组加倍后植株器官(叶、花)通常会呈现“巨体效应 (gigas effect)”特征。然而, 在本研究中, 出现部分四倍体植株较二倍体植株叶片更厚更

宽、叶表皮更粗糙、气孔更大,但整体植株更矮小现象。在前人的研究中也具有类似情况,如 PODWYSZYNSKA 等^[30]诱导的四倍体郁金香 (*Tulipa gesneriana*) 出现了矮化现象,与二倍体郁金香相比,四倍体郁金香的叶、花以及整体植株均显著变小。除此之外,LI 等^[31]诱导的三倍体木槿 (*Hibiscus moscheutos*) 的花比二倍体小; REGALADO 等^[32]诱导的四倍体矮牵牛 (*Petunia axillaris*) 比二倍体矮牵牛矮,但叶片比二倍体矮牵牛紧凑 (54%); FETOUH 等^[33]诱导的四倍体日本女贞 (*Ligustrum japonicum*) 平均数据比二倍体矮 31.0%,冠幅小 33.1%; 以及 PADOAN 等^[34]诱导的三倍体柑橘 (*Citrus clementine*) 的叶比二倍体亲本小。相关学者推测该现象可能是由于在高倍性水平下,细胞周期成本更高,细胞分裂延迟,导致细胞数量更少和器官更小^[35-36]。由于培育时间不足,后续的试验还需进一步探究四倍体黄花白及与二倍体植株开花性状、块茎药用成分等方面的变化。总之,本研究诱导出的黄花白及四倍体植株与原二倍体植株形态变异显著,为药用兰花种质库增添了“gigas”化和矮化的表型性状的多倍体植物新材料,可为黄花白及遗传性状改良等研究和实践应用提供帮助。

致谢 本项研究由国家重要野生植物种质资源库支持。另外,感谢邵文、闫晓芳、刘凤来、邵丽和倪子轶老师们给出的宝贵建议和帮助。

参考文献

- [1] 黄璐琦, 张本刚, 覃海宁. 中国药用植物红皮书[M]. 北京: 科学技术出版社, 2022.
HUANG L Q, ZHANG B G, QIN H N. Red book of Chinese medicinal plants[M]. Beijing: Science and Technology Press, 2022. (in Chinese)
- [2] 陈美君, 李峰庆, 陈鸿平, 刘珈羽, 刘友平. 中药白及与黄花白及的 UPLC 指纹图谱研究[J]. 中药与临床, 2017, 8(5): 8-14.
CHEN M J, LI F Q, CHEN H P, LIU J Y, LIU Y P. Study on UPLC fingerprints of Rhizoma Bletillae and Bletilla ochracea[J]. Pharmacy and Clinics of Chinese Materia Medica, 2017, 8(5): 8-14. (in Chinese)
- [3] NIU J F, WANG S P, WANG B L, CHEN L J, ZHAO G M, LIU S, WANG S Q, WANG Z Z. Structure and anti-tumor activity of a polysaccharide from *Bletilla ochracea* Schltr[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 154: 1548-1555.
- [4] 梁光焰, 郭秀美, 胡江苗, 李金玉. 黄花白及中 1 个新的苄酯苷类化合物及促凝血活性[J]. 中草药, 2023, 54(20): 6580-6586.
LIANG G Y, GUO X M, HU J M, LI J Y. A new glucosyloxybenzyl derivative from *Bletilla ochracea* and their procoagulant activity[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2023, 54(20): 6580-6586. (in Chinese)
- [5] 方榕泽, 曾奇, 吴红梅, 刘明, 唐秀胜. 基于网络药理学和分子对接结合体内实验探究黄花白及抗胃溃疡的作用机制[J]. 遵义医科大学学报, 2023, 46(11): 1067-1075.
FANG R Z, ZENG Q, WU H M, LIU M, TANG X S. Network-based pharmacology combined with *in vivo* experiments to investigate the mechanism of action of *Bletilla ochracea* against gastroduodenal ulcers[J]. Journal of Zunyi Medical University, 2023, 46(11): 1067-1075. (in Chinese)
- [6] 张燕君, 孙伟, 何艳, 王淑慧, 王庆, 袁芳, 杨路路, 梁琮. 白及属植物资源评价与可持续利用的现状与展望[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(22): 4397-4403.
ZHANG Y J, SUN W, HE Y, WANG S H, WANG Q, YUAN F, YANG L L, LIANG Q. Current situation and prospect of resource evaluation and sustainable utilization on *Bletilla*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2018, 43(22): 4397-4403. (in Chinese)
- [7] YANG F X, GAO J, LI J, WEI Y L, XIE Q, JING J P, LU C Q, ZHU W, WONG S M, ZHU G F. The China orchid industry: past and future perspectives[J]. Ornamental Plant Research, 2024, 4(1): e002.
- [8] PENNA S, JAIN S M. Innovative technologies and advancements in designing custom-made ornamental plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1348949.
- [9] 边子星, 颜彩燕, 姚肖健, 杨福孙. 濒危华石斛种子活力测定方法研究[J]. 热带作物学报, 2017, 38(3): 403-407.
BIAN Z X, YAN C Y, YAO X J, YANG F S. Determination of seed viability in endangered orchid of *Dendrobium sinense*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2017, 38(3): 403-407. (in Chinese)
- [10] GALBRAITH D W, HARKINS K R, MADDOX J M, AYRES N M, SHARMA D P, FIROOZABADY E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues[J]. Science, 1983, 220(4601): 1049-1051.
- [11] 王乐乐, 卢晓雨, 关文灵, 李叶芳. 滇丁香化学诱变的多倍体及其鉴定研究[J]. 中国农学通报, 2024, 40(1): 38-45.
WANG L L, LU X Y, GUAN W L, LI Y F. Chemical mutagenesis and identification of polyploid in *Luculia pinciana*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2024, 40(1): 38-45. (in Chinese)
- [12] MORAES A P, KOEHLER S, CABRAL J S, GOMES S S L, VICCINI L F, BARROS F, FELIX L P, GUERRA M,

- FORNI-MARTINS E R. Karyotype diversity and genome size variation in neotropical Maxillariinae orchids[J]. *Plant Biology*, 2017, 19(2): 298-308.
- [13] LAN M O, CHEN J H, FEI C, XU Q W, TONG Z K, HUANG H H, DONG R H, LOU X Z, LIN E P. Induction and characterization of polyploids from seeds of *Rhododendron fortunei* Lindl[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2020, 19(8): 2016-2026.
- [14] MIGUEL T P, LEONHARDT K W. *In vitro* polyploid induction of orchids using oryzalin[J]. *Scientia Horticulturae*, 2011, 130(1): 314-319.
- [15] OMIDBAIGI R, YAVARI S, HASSANI M E, YAVARI S. Induction of autotetraploidy in dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) by colchicine treatment[J]. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 2010, 18(1): 23-35.
- [16] OSBORN T C, PIRES J C, BIRCHLER J A, AUGER D L, CHEN Z J, LEE H S, COMAI L, MADLUNG A, DOERGE R W, COLOT V, MARTIENSSEN R A. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids[J]. *Trends in Genetics*, 2003, 19(3): 141-147.
- [17] SATTTLER M C, CARVALHO C R, CLARINDO W R. The polyploidy and its key role in plant breeding[J]. *Planta*, 2016, 243: 281-296.
- [18] ZHANG X Y, HU C G, YAO J L. Tetraploidization of diploid *Dioscorea* results in activation of the antioxidant defense system and increased heat tolerance[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167(2): 88-94.
- [19] JACKSON J A, TINSLEY R C. Parasite infectivity to hybridising host species: a link between hybrid resistance and allopolyploid speciation?[J]. *International Journal for Parasitology*, 2003, 33(2): 137-144.
- [20] BANIAGA A E, MARX H E, ARRIGO N, BARKER M S. Polyploid plants have faster rates of multivariate niche differentiation than their diploid relatives[J]. *Ecology Letters*, 2020, 23(1): 68-78.
- [21] 罗远华, 方能炎, 樊荣辉, 黄敏玲. 兰科植物多倍体诱导研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2022, 50(1): 6-13.
- LUO Y H, FANG N Y, FAN R H, HUANG M L. Research progress of polyploid induction of Orchidaceae[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2022, 50(1): 6-13. (in Chinese)
- [22] ENG W H, HO W S. Polyploidization using colchicine in horticultural plants: a review[J]. *Scientia Horticulturae*, 2019, 246: 604-617.
- [23] LI M, DING B, HUANG W P, PAN J L, DING Z S, JIANG F S. Induction and characterization of tetraploids from seeds of *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f[J]. *BioMed Research International*, 2018, 2018(1): 3246398.
- [24] 崔广荣, 张子学, 张从宇, 胡能兵, 隋益虎, 李杰勤. 文心兰多倍体诱导及其鉴定[J]. *草业学报*, 2010, 19(1): 184-190.
- CUI G R, ZHANG Z X, ZHANG C Y, HU N B, SUI Y H, LI J Q. Polyploid induction and identification of *Oncidium*[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2010, 19(1): 184-190. (in Chinese)
- [25] HAMILL S D, SMITH M K, DODD W A. *In vitro* induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micro-propagated diploids[J]. *Australian Journal of Botany*, 1992, 40(6): 887-896.
- [26] LIU Y, DUAN S D, JIA Y, HAO L H, XIANG D Y, CHEN D F, NIU S C. Polyploid induction and karyotype analysis of *Dendrobium officinale*[J]. *Horticulturae*, 2023, 9(3): 329.
- [27] ZHANG X, GAO J. *In vitro* tetraploid induction from multi-genotype protocorms and tetraploid regeneration in *Dendrobium officinale*[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2020, 141: 289-298.
- [28] HUY N P, TAMA A T T, LUAN V Q, TUNG H T, HIENA V T, NGANA H T, DUYB P N, NHUT D T. *In vitro* polyploid induction of *Paphiopedilum villosum* using colchicine[J]. *Scientia Horticulturae*, 2019, 252: 283-290.
- [29] TARATIMA W, ROHMAH K N, PLAIKHUNTOD K, MANEERATTANARUNGROJ P, TRUNJARUEN A. Optimal protocol for *in vitro* polyploid induction of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw[J]. *BMC Plant Biology*, 2023, 23(1): 295.
- [30] PODWYSZYNSKA M, TRZEWIK A, MARASEK-CIOLAKOWSKA A. *In vitro* polyploidisation of tulips (*Tulipa gesneriana* L.): phenotype assessment of tetraploids[J]. *Scientia Horticulturae*, 2018, 242: 155-163.
- [31] LI Z, RUTER J M. Development and evaluation of diploid and polyploid *Hibiscus moscheutos*[J]. *HortScience*, 2017, 52(5): 676-681.
- [32] REGALADO J J, CARMONA-MARTIN E, QUEROL V, VELEZ C G, ENCINA C L, PITTA-ALVAREZ S I. Production of compact petunias through polyploidization[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2017, 129: 61-71.
- [33] FETOUEH M I, KAREEM A, KNOX G W, WILSON S B, DENG Z N. Induction, identification, and characterization of tetraploids in Japanese privet (*Ligustrum japonicum*)[J]. *HortScience*, 2016, 51(11): 1371-1377.
- [34] PADOAN D, MOSSAD A, CHIANCONE B, GERMANA M A, KHAN P S S V. Ploidy levels in Citrus clementine affects leaf morphology, stomatal density and water content[J]. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 2013, 25: 283-290.
- [35] COMAI L. The advantages and disadvantages of being polyploid[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2005, 6(11): 836-846.
- [36] TSUKAYA H. Controlling size in multicellular organs: focus on the leaf[J]. *PLoS Biology*, 2008, 6(7): e174.