

不同山茶种质组培条件下染色体倍性的维持与变化

李雅暄^{1,2}, 李辛雷¹, 李纪元¹, 殷恒福^{1*}

(1. 林木遗传育种全国重点实验室 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 杭州 311400; 2. 南京林业大学, 南京 210037)

摘要: 植物染色体的倍性维持和变化受环境因素影响, 组培再生过程由于培养条件等因素往往导致染色体的结构和倍性变化。为探索组培条件下山茶种质的倍性变化, 该研究利用山茶种质的愈伤组织诱导体系, 通过流式细胞仪分析倍性变化情况, 并结合秋水仙素处理条件对组培再生条件下倍性的稳定性和变化进行分析。结果表明: (1) 10 个山茶属种质材料中 6 个为二倍体、2 个四倍体、1 个六倍体和 1 个十倍体, 并且在组培诱导愈伤及再生过程中不同倍性的种质材料能够保持稳定的倍性。(2) 结合耐冬山茶组织培养再生体系, 获得了秋水仙素处理的最适诱导条件, 即培养基配方为秋水仙素浓度 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 愈伤增殖培养 10 d。

(3) 对 56 个独立样品 (含愈伤和芽) 开展了倍性检测, 发现有 38 个组织的倍性在 1.5~2.5 倍之间, 11 个组织样品产生了低于 1.5 倍性的特异现象。该研究结果进一步探索了不同山茶种质资源之间的倍性关系, 为山茶属植物的倍性调控和多倍体诱导提供了理论基础。

关键词: 山茶属, 染色体倍性, 组织培养, 秋水仙素, 流式细胞术

中图分类号: Q943

文献标识码: A

文章编号: 1000-3142

Studies on the maintenance and variation of ploidy under tissue regeneration in *Camellia* plants

LI Yaxuan^{1,2}, LI Xinlei¹, LI Jiyuan¹, YIN Hengfu^{1*}

(1. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Hangzhou 311400; 2. Nanjing Forestry University, Nanjing 210037)

基金项目: 国家自然科学基金 (32271839, 山茶 BPC 转录因子介导的基因表达抑制参与调控花型发育的机制)。

第一作者: 李雅暄(1998-), 硕士研究生, 主要从事园林植物遗传育种研究, (E-mail) liyaxuan8806@163.com。

***通信作者:** 殷恒福, 博士, 研究员, 研究方向为林木分子生物学和基因组学研究, (E-mail) hfyin@caf.ac.cn。

Abstract: The maintenance and changes of ploidy in plants are influenced by environmental factor; and the tissue culturing conditions can often cause changes of chromosome structure and ploidy levels. In this study, (1)we analyzed the ploidy levels of ten germplasms of *Camellia* spp. by flow cytometry under tissue-culturing conditions, six of them is diploid, two of them is tetraploid besides one hexaploid and one decaploid; we showed that the germplasm materials largely maintain stable ploidy levels during the tissue regeneration processes. (2)The optimum conditions for colchicine treatment were obtained as follows: callus was cultured in treatment medium containing colchicine at $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ for 10 days, followed by regeneration in tissue-differentiation culture. (3)The ploidy analyses were carried out on the treated tissues in different differentiation states, and the results showed that most of the independent tissues (including 56 callus and shoots) were found to be aneuploids, 38 tissues had ploidy between 1.5 to 2.5 , and 11 tissues produced less than 1.5 . The present study provides a basis for an in-depth study of ploidy regulation and polyploid induction of *Camellia*.

Key words: *Camellia* spp., chromosome ploidy, tissue culture, colchicine, flow cytometry

山茶 (*Camellia japonica*) 隶属山茶科 (Theaceae) 山茶属 (*Camellia*) 是我国传统木本观赏花卉 (闵天禄, 1992; Gao et al., 2005)。山茶花原产于中国, 17 世纪中叶山茶由日本传入欧洲, 由此在欧洲、美洲、澳洲等地开始进行了广泛的种植 (陈国方等, 2013)。如今根据国家山茶协会的统计, 山茶花的品种已经达到 3 万多个 (Wang et al., 2021)。观赏山茶种质资源的地理起源复杂, 并且存在种间杂交, 使得其染色体倍性存在较大的差异 (Tanaka et al., 2006; Hembree et al., 2019)。在山茶科里, 山茶属与核果茶属的基本染色体数都是 $1n=1x=15$, 但是其他属的基本染色体数量并不完全一致, 如紫茎属 $1n=1x=15$ 或者 $1n=1x=17$, 福兰茶属、大头茶属、木荷属的基本染色体数为 $1n=1x=15$ 或 $1n=1x=18$ (Hembree et al., 2019)。山茶属植物的倍性存在多种多样的变异, 从三倍体到十倍体都有被报道, 其中六倍体为较常见的多倍体 (Kondo, 1975; Hembree et al., 2019)。

植物染色体倍性的变化会影响到许多性状 (Serrano-Mislata et al., 2015)。比如, 来自不同倍性的杂交的种子发育后, 可能会引起胚乳发育失败, 最终产生生活力低或者没有活力的种子; 另外奇数倍性的植物, 在生育力上也不及偶数倍性的作物 (Kondorosi et al., 2000)。产生多倍体变异的原因包括自然变异和诱变变异等, 其中诱变变异又可以分为物理诱导和化学诱导。目前大多数人工诱导多倍体的方法都指的是用化学试剂 (包括秋水仙素、氟乐灵、

氨磺灵等)对正在产生细胞分裂的植物器官、组织、细胞等进行处理,诱导其产生多倍体(彭尽晖 等, 2004; 程红英, 2010)。化学试剂秋水仙素在植物多倍体诱变上被应用的最为广泛。秋水仙素主要提取于百合科秋水仙(*Colchicum autumnale*)的种子和鳞茎中提取, 具有较强毒性(彭尽晖等, 2004)。秋水仙素的主要作用机制是: 通过与有丝分裂细胞接触中, 秋水仙素可以与微管蛋白异二聚体结合, 导致有丝分裂中期染色体不能在赤道板上进行排列, 影响染色体的分布(彭尽晖等, 2004)。

组培再生过程中由于培养条件和介质因素导致体细胞变异、染色体的结构重排、倍性变化等非常普遍(Leite et al., 2018)。Phillips 等(1994)研究发现, 不同培养基的组培再生条件下, 染色体畸变、非整倍体和多倍体经常发生在体外再生体中。在马铃薯、小麦、水稻等农作物中体细胞无性系等植株中可以出现染色体畸变、DNA 甲基化、基因突变等多种方式(韦彦余等, 2004)。在山茶属植物中开展组培扩繁体系具有应用意义, 但是组培条件下不同倍性种质的染色体完整性研究还比较缺乏。

山茶属种质资源有较复杂和高频率的染色体倍性变化, 二倍体、四倍体、六倍体常有出现, 那么不同倍性的材料在组培条件下能否维持完整倍性, 是否会发生倍性的变化还值得研究。

因此, 本试验参考了先前在山茶属植物中建立的再生体系(刘海英, 2011; 吴斌, 2013), 为明确山茶属观赏材料的倍性情况, 并研究不同倍性材料之间形态学上与不同组织培养阶段下的染色体倍性变化情况, 拟探讨以下问题(1)收集到的 10 个山茶种质资源的倍性情况;(2)秋水仙素处理使得耐冬山茶染色体加倍的浓度和时间条件。本研究结果通过对山茶染色体倍性检测分析了不同山茶种质倍性情况, 并探索了山茶染色体变异诱导的最适条件, 为多倍体育种的理论奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料与采样

本试验所使用的山茶种质资源采自中国林业科学院亚热带林业研究所种质资源圃以及金华山茶物种园: 采样时间为 2021 年 7—8 月, 样品类型为幼嫩叶片、花芽等组织(表 1)。具体的种质信息: 美人茶 *Camellia uraku*、浙江红山茶 *Camellia Chekiangoleosa*、滇山茶 *Camellia reticulata*、大花红山茶 *Camellia magniflor*、峨眉红山茶 *Camellia omeiensis*、全缘红山茶 *Camellia subintegra*、山手 *Camellia japonica* ‘Shanshou’、南山茶 *Camellia semiserrata*、尖萼红山茶 *Camellia edithae*、金蝶飞叶 *Camellia japonica* ‘Jindiefeyi’。

表 1 山茶不同品种、采集地点及用于培养的部位

Table 1 Different varieties with different collection sites of <i>Camellia japonica</i> and source		
种质资源（种/品种）	采集地点	外植体来源
Germplasm resources	Collection location	Source
美人茶（种）	金华山茶物种园	花芽、嫩叶
<i>Camellia uraku</i>	Jinhua Camellia Species Garden	Flower bud、leaf
浙江红山茶（种）	金华山茶物种园	花芽、嫩叶
<i>Camellia chekiangoleosa</i>	Jinhua Camellia Species Garden	Flower bud、leaf
滇山茶（种）	金华山茶物种园	花芽
<i>Camellia reticulata</i> Lindl.	Jinhua Camellia Species Garden	Flower bud
大花红山茶（种）	金华山茶物种园	种子
<i>Camellia magniflora</i>	Jinhua Camellia Species Garden	Seed
峨眉红山茶（种）	金华山茶物种园	花芽、嫩叶
<i>Camellia omeiensis</i>	Jinhua Camellia Species Garden	Flower bud、leaf
全缘红山茶（种）	金华山茶物种园	花芽、嫩叶
<i>Camellia subintegra</i>	Jinhua Camellia Species Garden	Flower bud、leaf
南山茶（种）	金华山茶物种园	花芽、嫩叶
<i>Camellia semiserrata</i>	Jinhua Camellia Species Garden	Flower bud、leaf
尖萼红山茶（种）	金华山茶物种园	花芽
<i>Camellia edithae</i>	Jinhua Camellia Species Garden	Flower bud
山手（品种）	亚热带林业研究所山茶资源圃 RISF,	花芽
<i>Camellia japonica</i> L. ‘Shanshou’	Camellia Germplasm Garden	Flower bud
金蝶飞叶（品种）	亚热带林业研究所山茶资源圃 RISF,	花芽
<i>Camellia japonica</i> L. ‘Jindiefeiye’	Camellia Germplasm Garden	Flower bud

1.2 山茶种质资源愈伤组织的培养

前期采集获得了 10 种山茶种质资源的样品，经过自来水冲洗和外植体消毒后，使用 MS-D2 培养基诱导愈伤组织。MS-D2 培养基配方为：琼脂 6.5 g·L⁻¹、蔗糖 30 g·L⁻¹、MS 培养基粉末 4.43 g·L⁻¹、NAA 0.5 mg·L⁻¹、2,4-D 0.5 mg·L⁻¹、6BA 1 mg·L⁻¹、椰汁 50 mL·L⁻¹。外植体消毒流程为：使用 75%酒精浸泡并摇动外植体，使其充分接触 2 min；用灭菌后的纯水冲洗两次后，使用 5%次氯酸钠消毒 10 min；剥离外部已褐化的外层苞片后、切开并接种进

培养基。经暗培养约 1 个月后，待脱分化的愈伤组织长到约 0.5 cm × 0.5 cm 大小后，将已褐化的原外植体切除后，移入组织培养瓶中进行光照培养，条件为 12h / 12h 光暗、光照强度 4 000 lux、温度(25±2) °C。

1.3 山茶种质资源愈伤组织的流式细胞仪分析

(1) 取适量愈伤组织(约 0.1~0.2 g)放入 3.5 cm 培养皿中，培养皿中放入 2 mL 的细胞裂解液(Tris 200 mmol·L⁻¹、MgCl₂ 4 mmol·L⁻¹、Triton 0.5%, pH 7.5)，用锋利的刀片切成小块后冰上放置约 15 min。(2) 使用移液枪吸取塑料培养皿中的上清液，将上清液经过孔径 40 μm 的尼龙滤膜过滤，转移至 2 mL 的圆底塑料管中、并做好标记。根据滤液体积，加入 1 / 100 体积的 PI 染料(100 mg·L⁻¹)，轻轻混匀后用锡箔纸封闭，置于冰上保存至上机检测。(3) 本实验使用 BD Accuri C6 流式细胞仪对山茶愈伤组织以及诱导后的组织进行倍性测量，使用 FL2-A 作为 x 轴，SSC-H 作为纵轴对测定值进行分析。

1.4 耐冬山茶组织秋水仙素处理与培养

依据秋水仙素设定的处理浓度，配置 CS4 培养基(琼脂 6.5 g·L⁻¹、蔗糖 30 g·L⁻¹、MS 培养基粉末 4.43 g·L⁻¹、TDZ 1 mg·L⁻¹、PAA 15 mg·L⁻¹、NAA 0.3 mg·L⁻¹、椰汁 50 ml·L⁻¹)对耐冬愈伤组织进行培养。秋水仙素浓度分别为 10、20、30 mg·L⁻¹，处理的时间为 10、15、20 d，处理完成后转入不含秋水仙素的 CS4 培养基中，利用流式细胞仪测定 DNA 含量估算染色体倍性。为了快速检测处理效果，倍性检测首先采用混测法，即将 5~6 个愈伤组织混合检测，根据倍性变化结果对每个愈伤组织样本进行单个测定，每个样品重复三次用于数据处理和分析。

2 结果与分析

2.1 建立 10 个山茶种质资源愈伤组织与组培再生

结果表明，山茶种质的外植体经过约 30 天的诱导和继代出现愈伤组织(表 1)，获得愈伤组织的山茶种质包括大花红山茶、滇山茶、峨眉红山茶、尖萼红山茶、金蝶飞叶、南山茶、全缘红山茶、山手。其中全缘红山茶的愈伤组织较为松散，其它山茶种质培育的愈伤组织较为紧密，且获得的愈伤组织未出现明显的死亡与褐化等情况，说明现有体系能够高效获得愈伤(图 1)，其中 FCM-1 代表诱导的初代愈伤组织、FCM-2 为愈伤继代培养后阶段，FCM-3 为愈伤组织转入组织分化培养(CS4 培养基)阶段，其后通过 2~3 次继代(30~50 d)获得部分分化的愈伤组织或者芽状组织。

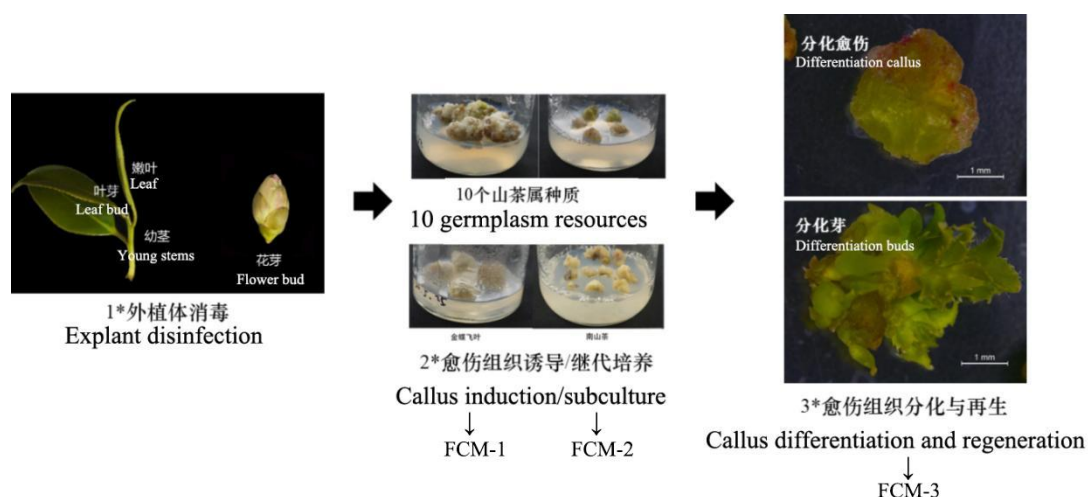


图 1 山茶属种质组培再生与染色体倍性检测

Fig. 1 Overview of the tissue-culturing process and experimental design of ploidy analysis in *Camellia* spp.

2.2 山茶属植物种质不同培养阶段的染色体倍性检测

根据实验室前期结果,利用遗传稳定的二倍体耐冬山茶(*Camellia japonica* ‘NaiDong’))为参照比对,通过流式细胞仪分析检测 10 个山茶属种质材料,根据估算其核内 DNA 的含量推断染色体倍性(表 2)。结合图 1 所示的组培再生过程,分别选取不同培养阶段的组织(FCM1、FCM2、FCM3)开展了流式细胞仪分析。研究发现,不同培养条件下的染色体 DNA 含量在同一个材料当中变化细微,其倍性没有发生明显变化(表 2)。结果显示,检测的山茶属种质组织材料中,包含 6 个二倍体,2 个四倍体,1 个六倍体,1 个十倍体(表 2),说明所选用种质存在较大的倍性变化,但是在当前组培再生条件下其倍性保持稳定。

表 2 山茶种质资源染色体倍性流式鉴定

Table 2 Flow cytometry results of 10 germplasms of *Camellia*

编号	种质资源名称	流式测定 1	流式测定 2	流式测定 3	倍性
Number	Name of germplasm resource	FCM1	FCM2	FCM3	Ploidy
耐冬(对照)(种) <i>Camellia</i>					
1	<i>japonica</i> L. ‘NaiDong’	—	—	—	二倍体
	(control)				Diploid
美人茶(种) <i>Camellia uraku</i>					
2	Kitamura.	2.09	2.11	2.06	四倍体
					Tetraploid

3	浙江红山茶（种） <i>Camellia chekiangoleosa</i> Hu.	0.96	0.99	1.03	二倍体 Diploid
4	滇山茶 <i>Camellia reticulata</i> Lindl.（种）	1.08	1.06	1.10	二倍体 Diploid
5	大花红山茶（种） <i>Camellia magniflora</i> Chang.	3.30	3.22	3.34	六倍体 Hexaploid
6	峨眉红山茶（种） <i>Camellia omeiensis</i> Melch.	1.09	1.02	1.12	二倍体 Hiploid
7	全缘红山茶（种） <i>Camellia subintegra</i> P. C. Huang	0.98	0.96	1.01	二倍体 Diploid
8	南山茶（种） <i>Camellia semiserrata</i> Chi.	4.90	5.11	5.03	十倍体 Decaploid
9	尖萼红山茶（种） <i>Camellia edithae</i> Hance	1.17	1.19	1.09	二倍体 Diploid
10	山手（品种） <i>Camellia japonica</i> L. ‘shanshou’	1.24	1.31	1.33	二倍体 Diploid
11	金蝶飞叶（品种） <i>Camellia japonica</i> L. ‘Jindiefeiye’	2.21	2.31	2.33	四倍体 Tetraploid

2.3 耐冬山茶多倍体诱导

随着处理浓度和处理时间的增加，秋水仙素会使得植物愈伤组织失去生命活力（张焕玲等, 2008）。为了探究在秋水仙素处理条件对山茶组织染色体的影响，我们利用组培再生体系，设置了耐冬山茶秋水仙素处理条件（表 3）。结果发现，在浓度 10 mg·L⁻¹的条件下致死个体数量未达到半数，达到半致死天数约为 48 d；在浓度 20 mg·L⁻¹的条件下 10 d 处理后约有预期效果（表 3）。因此，秋水仙素浓度 20 mg·L⁻¹培养基下 10 d 处理被选为处理的最适合条件，进而开展耐冬山茶的处理研究。

表 3 不同浓度和不同时间处理之下的耐冬死亡率

Table 3 The death ratio of callus under different concentration and treatment time in *Camellia japonica* ‘NaiDong’

秋水仙素浓度	处理时间	处理个数	死亡个数	半致死条件 Half-death
Colchicine concentration (mg·L ⁻¹)	Treat time (d)	Number of processes	Death count	
10	10	32	3	
	15	32	4	~48 d
	20	32	3	
20	10	32	4	
	15	32	7	~35 d
	20	32	9	
30	10	32	7	
	15	32	9	~27 d
	20	32	11	

2.4 秋水仙素处理耐冬山茶组织的倍性检测

通过流式细胞仪，测定了 56 个独立愈伤来源的分化组织（其中含有 4 个芽组织）经秋水仙素处理后（浓度 20 mg·L⁻¹，处理 10 d）的倍性变化情况（图 2：A）。结果发现，通过秋水仙素诱导对耐冬山茶的倍性产生了显著的改变，除了少数的愈伤组织为二倍体，大部分愈伤组织和芽组织中倍性呈现出非整倍性的梯度性变化（图 2：B），其中最小倍性为 1.2 倍，最大倍性为 3.2 倍。结果说明，秋水仙素处理造成了耐冬山茶染色体倍性的不稳定变异，但是整倍性的加倍或者减少事件出现比例较低。

A 愈伤倍性的检测；**B** 倍性分别情况。

A The ploidy analysis of each sample;

B. the distribution of ploidy level. Blue. Ploidy level less than 1.5 Red. Ploidy level more than 2.5 Red dashed lines indicate the variation range of 15% compared to the control samples.

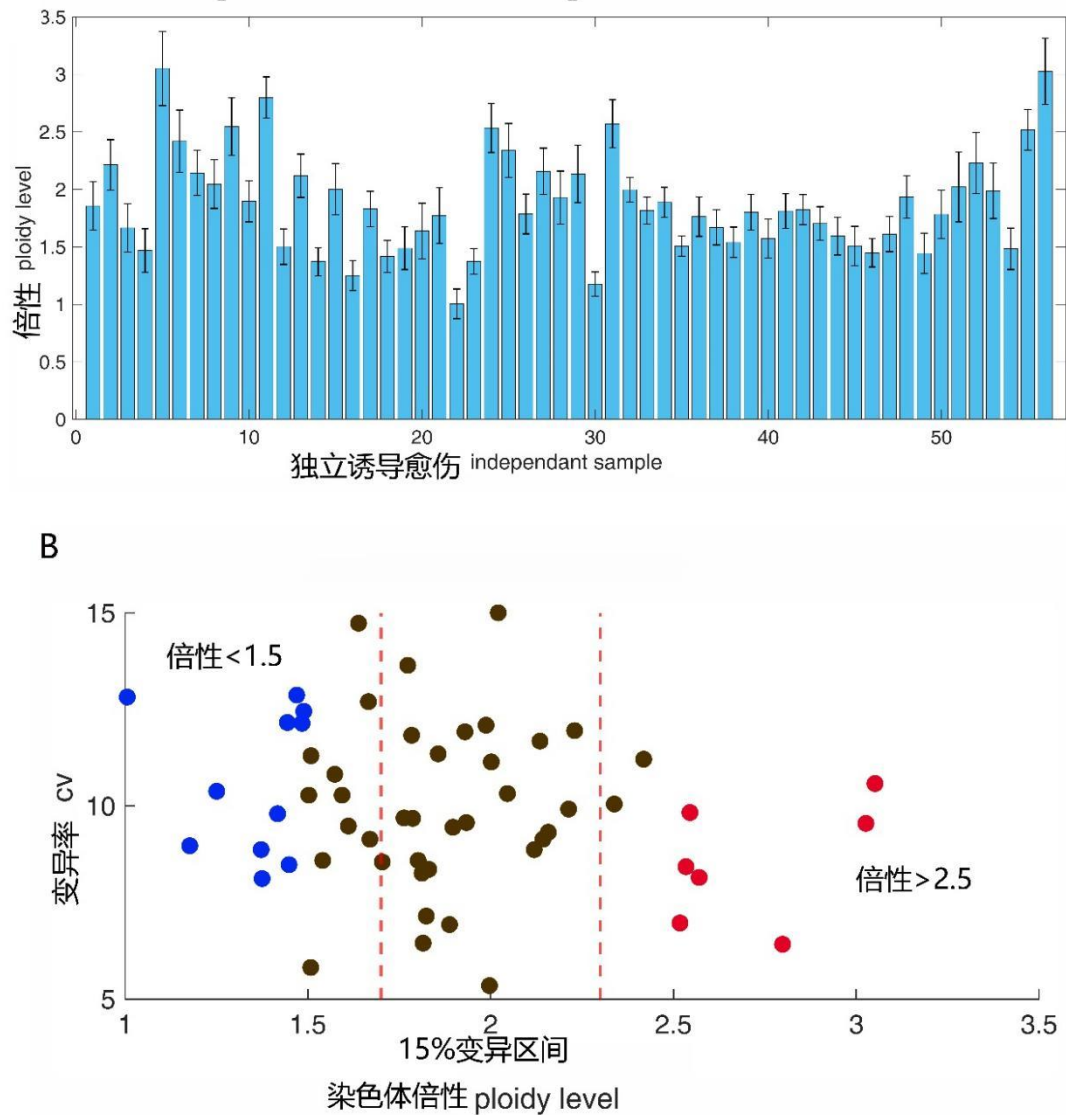


图 2 流式检测结果图及秋水仙素处理耐冬山茶组织倍性变化

Fig. 2 Flow cytometry results and the changes of ploidy level in the tissues treated by colchicine

3 讨论与结论

3.1 山茶属植物组培再生和染色体倍性维持

在染色体倍性的鉴定中，与核型鉴定方法相比，流式细胞术由于准确性较高、检测速度较快等特性被广泛推广，适用于大规模组织样品进行倍性监测分析，有利于高效获得染色体倍性的变化信息（瑞菲尔·努纳兹等, 2005；李靖等, 2008）。山茶属植物的组织中含有多种

次生代谢物质，其中单宁化合物在流式分析过程能够跟荧光染料（如碘化丙啶）结合，造成较强的背景信号（Huang et al., 2013）。在山茶属植物中，通过优化细胞核裂解液和选取次生代谢物含量低的幼嫩组织，流式细胞分析通常能解决背景信号的问题（Huang et al., 2013）。但是，一些山茶属植物材料（例如油茶、茶梅等）中单宁类质含量较高，使得在流式分析的重复性不高（贾文庆，2015）。Weber 等(2010)研究发现，植物愈伤组织均为未分化的、较为幼嫩的细胞团，其中的次生代谢物含量较少，有利于开展流式细胞仪检测。本试验使用脱分化的愈伤组织进行流式细胞仪分析，能获得重复性较高的细胞核分离效果，增强了检测的稳定性。因此，本研究方案减少了杂质对山茶倍性测定时的影响，避免了山茶新鲜组织中单宁等物质的背景荧光，提高了实验的准确性与可重复性。

Syed 等（2021）研究表明组织培养及其再生的过程能够造成染色体的断裂、重组等从而影响染色体倍性的变异。比如在香芹（*Coriandrum sativum*）中的研究发现，基因组大小在体胚诱导组织与种子萌发苗之间存在较大的变异，说明培养基条件能够影响基因组的稳定性（Ali et al., 2017）。我们发现，在常规的组织再生过程中，不同倍性的山茶属种质资源的染色体倍性相对稳定，因此保障了研究方案中不同处理对染色体倍性的连续性研究。但是，不同的组培条件对山茶属基因组稳定性的影响研究还不充分。山茶属植物组培再生途径周期较长，激素的组成、培养时间等条件对染色体倍性的维持和变化的研究还有待进一步深入。

3.2 秋水仙素处理山茶属植物后染色体倍性的变化

观赏植物的染色体加倍的报告中，使用秋水仙素对植物进行诱导的成功率是最高的（Manzoor et al., 2019）。例如，在与山茶属近缘的杜鹃花（*Rhododendron fortune*）中，利用 0.1%秋水仙素处理 24 小时就能高效地诱导出多倍体组织（Mo et al., 2020）。本研究发现，山茶属植物对秋水仙素具有较高的抵抗性：在 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基中其半致死的时间约为 1 个月。本试验选择了使用固体培养基对山茶进行了培养，研究表明秋水仙素的处理能够造成再生组织的染色体倍性发生显著的变化，但是极少（约为 1%）出现类似整倍性的变化。我们的研究发现，秋水仙素处理后的山茶组织呈现频繁的非整倍体细胞。尽管类似的结果在其他植物中也有发现，如柑橘（Gmitterjr et al., 1991）、葡萄（Kara et al., 2019），Lee 等（2017）研究指出，由于非整倍体植物通常表现出发育异常、不育或致死性，因此很少评估非整倍体植物的经济用途。Park 等（1999）报道了通过使用未成熟种子培养和随后的胚培养，从 184 个不同的三倍体杂交葡萄藤之间的各种杂交中回收了 5 个染色体数目在 51~59 之间的非整倍体植物。在山茶属植物中的非整倍体出现的较多（56 个样品中有 38 个组织的倍性在 1.5~2.5 倍之间，推断其形成原因可能有：（1）秋水仙素处理对组培不同类型的细胞中纺锤丝的作用

用存在特殊性：山茶属植物的组培条件下细胞处于不均匀一等分裂状态，其抑制纺锤丝的效果不径相同，因此产生的并不是完整的多倍体，并存在染色体的缺失、染色体嵌合体等情况，造成倍性检测的结果不均一；（2）山茶属植物对秋水仙素的响应存在差异：尽管前期实验设计中的秋水仙素浓度对愈伤组织组织的生长抑制作用不明显，但是处理浓度及其作用时间可能在细胞增殖过程中存在敏感性的差异，这可能是导致不完整倍体形成另一个原因。另外，研究发现 11 个组织样品（19.6%）产生了低于 1.5 倍性的特异现象，我们推测这可能是由于有丝分裂过程中，秋水仙素的处理导致细胞中染色体加倍过程出现障碍，造成丢失了部分染色体。综上结果，秋水仙素对山茶属植物处理条件（如秋水仙素的处理浓度、处理时间、处理部位等）需要进一步优化，以达到最佳的整倍体诱导的效果。

本实验通过探索组培条件下山茶种质资源的维持与变化，测试了使用秋水仙素对山茶种质资源加倍的最适条件，为今后探索山茶种质资源加倍提供了基础，并为山茶多倍体育种打下了基础。

参考文献:

- 陈国方, 何海平, 俞琳, 2013. 山茶花品种的历史演化及其园林应用[J]. 科技创新导报, 13: 230-231.
- 程红英, 2010. 秋水仙素诱导樟树多倍体的研究[D]. 中国武汉, 华中农业大学, 11-12. [CHENG HY, 2010. Study on Polyploid Induction of *Cinnamomum camphora* by colchicine[D]. Wuhan, Huazhong Agri Uni: 11-12.]
- 贾文庆, 2015. 山茶花生殖生物学及倍性育种基础研究[D]. 中国北京, 中国林业科学研究院. [JIA WQ, 2015. Fundamental Study on Reproductive Biology and Ploidy Breeding of *Camellia flower*[D]. Beijing, Chinese Academy of Forestry.]
- 李靖, 李成斌, 顿文涛等, 2008. 流式细胞术(FCM)在生物学研究中的应用[J]. 中国农学通报, 24(6):1142-1146.
- 刘海英, 2011. 油茶组培再生体系建立及愈伤组织诱导[D]. 中国武汉, 华中农业大学. [LIU HY, 2011. Plant Regeneration and Callus Induction of *Camellia oleifera*[D]. Wuhan, Huazhong Agric. Univer.]
- 闵天禄, 1992. 山茶属茶组植物的订正[J]. 云南植物研究, 14(2):115-32. [MIN TL, 1992.]
- 瑞菲尔·努纳兹, 刘秉慈, 徐增禄等. 2005. 流式细胞术原理与科研应用简明手册[M]. 化学工业出版社. 北京: 化学工业出版社.

- 彭尽晖, 张良波, 彭晓英, 2004. 秋水仙素在植物倍性育种中的应用进展[J]. 湖南林业科技, 31: 22-25.
- 韦彦余, 赵民安, 王晓军, 2004. 植物体细胞无性系变异在植物性状改良中的应用[J]. 植物生理通讯, 40(6): 763-771.
- 吴斌, 李纪元, 范正琪等, 2013. 山茶 ‘耐冬’愈伤组织诱导与植株再生[J]. 植物生理学报, 49(4): 343-346.
- 张焕玲, 李俊红, 李周岐, 2008. 秋水仙素处理杜仲种子诱导多倍体的研究[J]. 西北林学院学报, 23(1): 78-81.
- PARK SM, WAKANA A and HIRAMATSU M, 1999. Most hypotetraploid seedlings from self-pollinated tetraploid grapes (*Vitis complexes*) have abnormal cotyledons[J]. J Fac Agr, 44(1/2): 81-89.
- PHILLIPS RL, KAEPPPLER SM, OLHOFT P, 1994. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls [J]. Proc Nati Acad Sci, 91(12): 5222-5226.
- SERRANO-MISLATA A, SCHIESSL K, SABLowski R, 2015. Active Control of Cell Size Generates Spatial Detail during Plant Organogenesis [J]. Curr Biol, 25: 2991-2996.
- SYEED R, MUJIB A, MALIK MQ, et al., 2021. Mass propagation through direct and indirect organogenesis in three species of genus *Zephyranthes* and ploidy assessment of regenerants through flow cytometry [J]. Mol Biol Rep, 48: 513-526.
- TANAKA J, TANIGUCHI F, HIRAI N, et al., 2006. Estimation of the genome size of tea (*Camellia sinensis*), camellia (*C. japonica*), and their interspecific hybrids by flow cytometry [J]. Chagyo Kenkyu Hokoku (Tea Res. J.), 101: 1-7.
- WANG Y, ZHUANG H, SHEN Y, et al., 2021. The dataset of *Camellia* cultivars names in the world [J]. Biodivers Data J, 9: e61646
- WEBER J, GEORGIEV V, PAVOLV A, et al., 2008. Flow cytometric investigations of diploid and tetraploid plants and in vitro cultures of *Datura stramonium* and *Hyoscyamus niger* [J]. Cytometry Part A: J Int Soc Anal Cytol, 73(10): 931-939.
- ALI M, MUJIB A, TONK D, et al., 2017. Plant regeneration through somatic embryogenesis and genome size analysis of *Coriandrum sativum* L [J]. Protoplasma, 254: 343-352.
- GAO JY, PARKS CR, DU YQ, 2005. Collected species of *Camellia* – an illustrated outline [M]. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press.

- GMITTER FG, LING XB, CAI CY, et al., 1991. Colchicine-induced polyploidy in *Citrus* embryogenic cultures, somatic embryos, and regenerated plantlets [J]. *Plant Sci*, 74(1): 135-141.
- HEMBREE W, RANNEY T, JACKSON BE, et al., 2019. Cytogenetics, ploidy, and genome sizes of *Camellia* and related genera [J]. *Hortic Sci*, 54(7): 1124-1142.
- HANG H, TONG Y, ZHANG QJ, et al., 2013. Genome size variation among and within *Camellia* species by using flow cytometric analysis [J]. *PLoS ONE*, 8(5): e64981.
- KARA Z, SABIR A, YAZAR K, et al., 2019. Effects of colchicine treatments on some grape rootstock and grape varieties at cotyledon stage [J]. *Selcuk J Agric Food Sci*, 32(3): 424-429.
- KONDO K, 1977. Chromosome numbers in the genus *Camellia* [J]. *Biotropica*, 63(1): 86-94.
- KONDOROSI E, ROUDIER F, GENDREAU E, 2000. Plant cell-size control: growing by ploidy? [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 3(6): 488-492.
- LEE MG, PARK YS, JEONG, SH and PARK SM, 2017. Production of Hypo- and Hyper-tetraploid Seedlings from Open-, Self-, and Cross-Pollinated Hypo- and Hyper-tetraploid Grape. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 152-153.
- LEITE CT, FERREIRA DA, VIEIRA AT, et al., 2019. *In vitro* responses in *Passiflora* species with different chromosome numbers, ploidy levels and nuclear 2C values: revisiting and providing new insights [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult (PCTOC)*, 136: 549-560.
- MANZOOR A, AHMAD T, BASHIR MA, et al., 2019. Studies on colchicine induced chromosome doubling for enhancement of quality traits in ornamental plants [J]. *Plants*, 8(7): 194.
- MO L, CHEN J, LOU X, et al., 2020. Colchicine-induced polyploidy in *Rhododendron fortunei* Lindl. [J]. *Plants*, 9(4): 424.