

# 果树倍性育种研究进展

石庆华, 刘平, 刘孟军\*

(河北农业大学中国枣研究中心, 河北保定 071001)

**摘要:** 对果树倍性育种的主要研究进展进行了综述, 包括单倍体产生途径和育种应用、多倍体的诱变方法、无性多倍化和有性多倍化的途径、嵌合体的纯化、倍性鉴定方法、植物多倍化的遗传效应及其对果树生长发育和抗逆性的影响等; 提出了果树倍性育种中存在的主要问题及对策。

**关键词:** 果树; 单倍体; 多倍体; 倍性鉴定; 嵌合体纯化

**中图分类号:** S 66

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2012) 09-1639-16

## Advances in Ploidy Breeding of Fruit Trees

SHI Qing-hua, LIU Ping, and LIU Meng-jun \*

(Research Center of Chinese Jujube, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China)

**Abstract:** The research advances and achievements on ploidy breeding in fruit trees were summarized, including haploid creation paths and its application, polyploid induction methods, ways of asexual and sexual polyploidy breeding, purification of mixploids, ploidy identification, genetic mechanism of polyploidy, effects of polyploidization on development and stress resistance, etc. Furthermore, the main problems, countermeasure and prospects of fruit tree ploidy breeding were also put forward based on authors' ploidy breeding practices and experiences.

**Key words:** fruit tree; haploid; polyploid; ploidy identification; purification of mixploids

果树的童期很长, 短则 2~3 年, 长则 10 年以上, 使得常规杂交育种周期长, 效率低。和常规杂交育种相比, 倍性育种更加快速高效。此外, 果树大多可通过嫁接、扦插、组培快繁等无性繁殖能够固定多倍体的优良性状并快速推广, 在倍性利用上较大田作物更有利。作者在多年倍性育种实践(蒋洪恩和刘孟军, 2004; 刘孟军等, 2010; 路芳等, 2010)和文献积累基础上, 对国内外果树倍性育种的主要进展和取得的成就进行评述, 为今后更好地开展果树倍性育种提供借鉴和参考。

## 1 单倍体育种

### 1.1 果树单倍体产生的途径

#### 1.1.1 自然发生单倍体

自然发生的单倍体一般是由生殖过程异常引起的孤雌生殖或者无配子生殖而来。据报道, 许多

收稿日期: 2012-06-15; 修回日期: 2012-07-31

基金项目: 林业公益性行业科研专项(201004041-03, 201004017-02); 国家科技支撑计划项目(2011BAD48B01-1); 河北省科技支撑计划项目(11220103D-8); 河北省巨人计划创新团队项目

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: lmj1234567@yahoo.com.cn)

果树能自然产生单倍体,如柑橘、葡萄、苹果、梨、桃、李、杏、樱桃、猕猴桃、桑树、橄榄树、番木瓜、番荔枝、梨果仙人掌、枇杷等,但一般数量少,频率低,甚至在自然条件下不能正常生长而死亡,难以在生产实践中应用(Maria, 2006)。

### 1.1.2 人工诱导孤雌生殖获得单倍体

三倍体植株的花粉和经 $^{60}\text{Co}$ 的 $\gamma$ 射线辐射处理的花粉均可萌发,但通常无受精能力,它们可刺激未受精的卵细胞单性发育成单倍体的胚。辐射花粉法已成功用于苹果(Zhang & Lespinasse, 1991)、猕猴桃(Chalak & Legave, 1997)等果树的单倍体诱导。在柑橘(Oiyama & Kobayashi, 1993)、葡萄柚(Germanà & Chimancone, 2001)等果树上,则已分别通过三倍体花粉诱导孤雌生殖获得了相应的单倍体。另外,延迟授粉法也是孤雌生殖获得单倍体的有效途径。

### 1.1.3 雄配子离体培养获得单倍体

花药培养获得单倍体:印度学者 Guha 和 Maheshwari(1964)首次在毛叶曼陀罗(*Datura innoxia*)上通过花药培养成功获得单倍体植株,并证实是由花粉胚状体途径而来,开创了利用雄配子培育单倍体的新途径。果树花药培养单倍体的研究起步稍晚但进展迅速,先后在柑橘、苹果、葡萄、草莓、荔枝、龙眼等树种上取得成功(王茂良和冯慧, 2010)。影响果树花药培养的因素主要有供体植株的基因型、生理状态(树龄、生长条件等)、花粉发育时期、预处理、药壁因子、培养基、培养方式、培养条件等。武晓红(2008)在研究枣花药培养过程中发现,适宜离体培养的花药为其小孢子处于单核靠边期,枣花药培养诱导愈伤组织的适宜培养基为  $1/2\text{MS} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 2,4\text{-D} + 3.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂 +  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  麦芽糖;在赞皇大枣、冬枣、辣椒枣、阜平大枣和月光枣 5 个枣品种中,冬枣花药出愈率最高,达到 70.26%,阜平大枣最低,仅为 7.76%;暗培养较光培养有利于枣花药愈伤组织的发生; $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  甘露醇预处理 3 d 有利于提高枣花药的出愈率。需要注意的是,花药培养获得的愈伤组织和再生植株大多来源于花药壁(武晓红, 2008),而花药壁的基因型和体细胞的相同,因此与花药母株具有相同的倍性。在这种情况下难以获得单倍体植株,需要探索更好的单倍体人工诱导途径。

离体花粉(小孢子)培养获得单倍体:花粉培养与单细胞培养相似,能避免花药壁再生基因型和体细胞相同的植株,获得更高比例的单倍体植株。在 Germanà 等(1996)对几种橘属和枳属(*Poncirus*)的游离小孢子离体培养进行初步研究过程中,游离小孢子培养 1~4 个月后,几乎所有供试材料都产生了多核结构和小的原胚,但都没能进一步发育。Bueno 等(2004)在油橄榄游离小孢子培养中获得了多核小孢子和多细胞结构。Hofer 等(1999)首次报道了 Rene 苹果游离小孢子的胚发生诱导和植株再生。

## 1.2 单倍体育种技术的应用

在大部分植物中,由花药培养产生的愈伤组织或植株多数具有较高的倍性水平,或者非整倍体(张圣仓 等, 2011)。利用流式细胞仪鉴定 Harcot 杏(Peixe et al., 2004)花药培养获得的愈伤组织,结果显示有单倍体、二倍体、四倍体、八倍体和混倍体。倍性变异的原因主要有 2 个:一是花粉植株起源于体细胞花药组织(花药壁、花丝等);二是花粉起源的单倍体通过核内多倍性或核融合导致了染色体自然加倍。

单倍体植株染色体自然加倍频率一般较低,实施人工染色体加倍是必要的。诱导染色体加倍的传统方式是用秋水仙素(colchicine)处理,也有人用氨磺乐灵(oryzalin)等作诱变剂(Bouvier et al., 2002)。单倍体和加倍单倍体在果树方面的研究虽然起步稍晚,但已取得重大进展。目前世界上主要的栽培果树,包括柑橘属(*Citrus*)、苹果(*Malus domestica*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、野芭蕉(*Musa balbisiana*)、西洋梨(*Pyrus communis*)、沙梨(*Pyrus pyrifolia*)、桃(*Prunus persica*)、甜樱桃(*Prunus avium*)、西洋李(*Prunus domestica*)、普通杏(*Prunus armeniaca*)、猕猴桃(*Actinidia deliziosa*)、

油橄榄 (*Olea europaea*)、桑 (*Morus alba*)、番木瓜 (*Carica papaya*)、番荔枝 (*Annona squamosa*)、枇杷 (*Eriobotrya japonica*)、费约果 (*Feijoa sellowiana*) 和梨果仙人掌 (*Opuntia ficus-indica*) 等都已获得了单倍体植株或愈伤组织 (Maria, 2006; Germanà, 2006, 2009)。

单倍体育种是 20 世纪 70 年代发展起来的一项育种新技术。在单倍体水平上, 控制性状的基因无论显性还是隐性均可充分表达, 植株群体呈现丰富的遗传多态类型。对单倍体植株进行染色体加倍, 可快速获得二倍体纯系, 从而大大缩短育种年限, 提高新品种选育效率 (Maria, 2006)。单倍体和加倍单倍体技术在育种上主要应用于以下几个方面: (1) 用于快速获得纯系, 进而用于相关基础研究和育种实践 (Maria, 2006); (2) 用于诱变育种, 快速获得新种质, 即先对单倍体植株进行诱变, 再对诱变获得的目标植株加倍, 得到纯合二倍体, 从而使得突变性状在当代得以表现并稳定 (王茂良和冯慧, 2010); (3) 用于和二倍体原生质体融合, 快速获得三倍体体细胞杂交种 (Kobayashi et al., 1997); (4) 用作植物基因工程的受体, 可快速获得纯合的转基因植株 (Kumlehn et al., 2006); (5) 用于提高遗传分析、基因定位和分子标记辅助选择的效率 (Horn et al., 2005; Touraev et al., 2009); (6) 用于基因组测序, 可以大幅度降低测序成本 (Wang et al., 2010; 李英 等, 2011)。

## 2 多倍体育种

### 2.1 果树多倍体产生的途径

#### 2.1.1 天然多倍体

多倍体植物在自然界中普遍存在, 多倍化是推动植物进化的重要因素和物种形成的途径之一 (Troy et al., 2009)。果树中存在大量的天然多倍体, 如草莓生产上应用的主要栽培品种是八倍体, 柿树、猕猴桃为六倍体。苹果属的染色体基数  $x = 17$ , 经鉴定在苹果属的 40 个种中, 有 10 个为多倍体种, 10 个有多倍体类型, 其中多数为三倍体和四倍体, 少数为五倍体 (王同坤 等, 2004)。在鉴定过的 79 个西洋梨品种中, 有 18 个是三倍体 (石荫坪 等, 1986)。枣中有天然的三倍体品种 ‘赞皇大枣’ 和 ‘苹果枣’, 毛叶枣中有天然的四倍体和八倍体。李属经过鉴定的 72 个种中, 15 个为多倍体种, 6 个有多倍体类型 (王同坤 等, 2004)。

多倍体的自然发生包括合子的染色体加倍、配子的染色体未减数等方式。彭博 (2008) 对 223 个枣品种的花粉大小进行了研究, 提出枣  $2n$  花粉直径约为  $n$  花粉的 1.5 倍, 34.08% 的枣品种在自然条件下可产生  $2n$  花粉, 其中 ‘铃铃枣’ 的  $2n$  花粉比例高达 9.41%。

果树中的天然多倍体根据来源可分为自然芽变产生的多倍体和实生苗中的天然多倍体。据报道, ‘天海鸭梨’ 是 ‘鸭梨’ 的同源四倍体芽变 (蒲富慎 等, 1985)。目前已从柑橘 (郭文武 等, 1997)、枇杷 (汪卫星 等, 2011) 等的实生苗中发现三倍体、四倍体、五倍体以及混倍体的植株。

#### 2.1.2 人工诱变多倍体的方法

人工诱导多倍体主要通过物理诱变和化学诱变。机械损伤、温度激变和射线照射是常用的物理诱变方法。20 世纪初, 人们曾用切伤、嫁接、反复摘心法等使植物形成加倍的不定芽, 最初的多倍体诱导是通过番茄摘心实现的 (陶抵辉, 2010)。高温能诱导桃的配子加倍 (叶正文 等, 2010)。Smith 等 (1993) 利用  $\gamma$  射线照射小种矮型香蕉品种获得了其突变型四倍体。物理方法, 其诱变率低, 定向性差, 嵌合体严重, 目前主要在一些具营养繁殖优势的植物上有应用。

化学诱变剂以秋水仙素为主, 另外还有多种除草剂, 如氨氟乐灵 (pronamide)、氨磺乐灵 (oryzalin)、甲酰胺草磷 (amiprophose methyl, APM) 和氧乐灵 (trifluralin) 等 (赵璘 等, 2008)。一般秋水仙素的有效诱导浓度为 0.0006% ~ 1.6% (陶抵辉 等, 2007), 葡萄胚性愈伤组织 (Yang et al.,

2006) 适宜剂量为 0.2% 持续 24 h, 桑树 (Chakraborti et al., 1998) 顶芽为 0.1% 的秋水仙素持续 24 h, 枣组培苗茎段为 0.05% 持续 72 h 和 0.1% 持续 48 h。诱导枣茎尖 (蒋洪恩和刘孟军, 2004) 的适宜秋水仙素浓度为 0.15% 持续 30 h, 而诱导枣愈伤组织 (徐娟, 2010) 的适宜浓度仅为 0.05% 持续 24 h。以柑橘 (Zeng et al., 2006) 愈伤组织为材料诱导多倍体需 0.01% 秋水仙素持续 4 d, 柑橘原生质体仅需要 0.01% 秋水仙素持续 24 h。由此可见, 细胞、组织或器官发育程度越高, 需要的诱变剂量越大。

## 2.2 多倍体育种技术的应用

### 2.2.1 无性多倍化

体细胞染色体加倍。通过体细胞染色体加倍获得多倍体是果树上最常用、最简便的多倍体育种方法, 已在葡萄 (Yang et al., 2006)、柑橘 (Zeng et al., 2006)、枣 (蒋洪恩和刘孟军, 2004; 王娜等, 2005)、桑树 (Chakraborti et al., 1998)、石榴 (Shao et al., 2003)、金丝桃 (Meyer et al., 2009) 和山楂 (代红艳等, 2012) 等多种果树上取得成功。传统的体细胞染色体加倍采用在体诱导, 一般是用一定浓度的化学诱变剂对顶芽或侧芽、胚、种子等进行浸渍、涂抹、注射、滴液等处理 (徐娟, 2010), 另外, 加入二甲基亚砜 (DMSO) 等助渗剂可提高药剂的渗透性 (陶抵辉等, 2007)。在体诱变方法存在诱变率低, 嵌合率高, 后代选择难度大, 易受环境干扰并可能产生回复突变等缺点。与在体诱导相比, 离体诱导有容易控制试验条件和重复试验结果, 可通过单细胞起源的胚状体途径克服嵌合体现象等优点。王娜等 (2005) 等通过诱导 ‘冬枣’ 离体叶片的愈伤组织, 经胚状体途径一步获得了纯合的 ‘冬枣四倍体’; Zeng 等 (2006) 通过诱导柑橘愈伤组织获得了四倍体植株; Dutt 等 (2010) 通过秋水仙素诱导柑橘原生质体, 结合原生质体培养技术获得了柑橘的同质多倍体。

嵌合体的纯化。无性多倍化途径诱导多倍体经常出现嵌合体现象, 需要进一步对获得的种质进行纯化。蒋洪恩 (2003) 在田间条件下采用修剪法对枣树嵌合体进行纯化, 即在新生枣头生长过程中不断剪除未变异枝条。在离体条件下嵌合体亦可通过切割法进行分离, 及时切除未变异的部分, 获得纯合的多倍体 (宁强等, 2009)。嵌合体纯化费时费力, 大大减慢了多倍体育种速度。采用分裂旺盛的愈伤组织或悬浮培养的单细胞为诱变材料, 能大大提高多倍体纯合体的比率 (陶抵辉等, 2007)。

二次加倍和非整数加倍现象。在枣多倍体诱导过程中发现了二次加倍现象, 以二倍体枣和酸枣的愈伤组织为材料通过秋水仙素诱变获得的再生芽中, 不仅检测到四倍体, 还检测到了八倍体。从二倍体直接到八倍体经历了染色体组的两次加倍过程, 但八倍体植株弱小, 未能存活。另外, 作者还分别通过秋水仙素诱导二倍体获得了枣的五倍体和酸枣三倍体、六倍体, 出现了非整数加倍现象, 但这些材料生长异常, 均未能长时间存活。非整数加倍现象在其他树种中也有所报道, 如二倍体柑橘原生质体在秋水仙素诱导多倍体过程中产生了六倍体 (Zeng et al., 2006), 通过秋水仙素诱导二倍体梨 (Sun et al., 2009)、二倍体油棕 (Madon et al., 2005), 再生植株中检测到了三倍体。植物正常的有丝分裂机制不能解释这一现象, 其机制需要深入研究。

原生质体融合技术获得多倍体。目前至少已有 400 多种植物通过原生质体培养得到了再生植株, 并已获得多种植物的种间、属间甚至科间原生质体融合的再生植株 (Nagata & Takebe, 1971; Carlson et al., 1972; Melchers et al., 1978; Kisaka & Kameya, 1994; Davey et al., 2005)。植物中的体细胞融合的方法 (张改娜和贾敬芬, 2007) 主要有电融合法和 PEG 法。自从 Ohgawara 等 (1985) 通过 PEG (聚乙二醇) 诱导融合法获得第一例柑橘体细胞杂种植株以来, 通过 PEG 或电融合法已获得多种果树的体细胞杂种或胞质杂种 (郭文武和邓秀新, 1996)。果树原生质体融合技术在柑橘中进展最大, 已获得大量原生质体融合再生植株 (Grosser & Gmitter, 2011)。柑橘原生质体融合主要采

用“胚性愈伤组织原生质体 + 叶肉原生质体”的模式，融合方式主要有对称和非对称融合。柑橘对称融合后再生体细胞杂种的倍性一般为四倍体（刘继红 等，2002），但也有部分为二倍体（Guo et al., 2006），还有一些三倍体杂种再生的报道（Kunitakei et al., 2002），极少数组合甚至会再生五倍体、六倍体杂种（Guo & Deng, 1999）。此外还可采用配子与体细胞杂交来产生三倍体植物。Kobayashi 等（1997）通过二倍体和三倍体的体细胞杂交得到柑橘三倍体植株。另外，柑橘体细胞融合在柑橘中还实现了属间融合的突破，华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室通过电融合法对属间柑橘进行融合，得到了多种属间体细胞杂种（刘继红和邓秀新，2000；Chen et al., 2004；刘继红 等，2004）。除改良品质外，通过原生质体融合来提高柑橘植株抗性的研究也比较全面（Cabasson et al., 2001）。此外，在香蕉（Xiao et al., 2009）、猕猴桃（Xiao, 2004）等果树上也获得了少量的种内原生质体融合再生植株。赵卫峰和孙光明（2006）获得了冬枣和毛叶枣有活力的原生质体，但在枣的细胞融合方面还未见文献资料。葡萄（Natacha et al., 2010）和桑树（高丽霞和蒋冬梅，2012）等果树还处于原生质体分离阶段。

### 2.2.2 有性多倍化

配子染色体加倍。配子染色体加倍以产生  $2n$  配子为主，果树  $2n$  配子形成的途径主要包括减数分裂前失调和减数分裂失调。在枣中部分小孢子形成过程中只有一个配子前体分裂异常而产生三分体（Xue et al., 2011）；二倍体新疆草莓的  $2n$  花粉形成，主要是由于减数分裂过程中中期 II 两个纺锤体的定向发生改变所致，即由正常的十字形改变为平行形和八字形，进而导致二分体和三分体的形成，此外还发现有极少量的  $4n$  花粉，可能是四分孢子粘连、融合为一体的结果（时翠平等，2002）。配子染色体加倍后经过授粉受精获得的再生植株起源于单细胞，经历了胚的发育过程，所获多倍体都是纯合的，不会出现嵌合体现象。配子染色体加倍可分为雌配子染色体加倍和雄配子（花粉）染色体加倍。毛白杨通过雌配子染色体加倍后杂交获得了三倍体植株（李云 等，2000；李云和冯大领，2005）。花粉染色体加倍获得多倍体广泛应用于果树育种中，苹果（Shidakov, 1986）、柑橘（Geraci et al., 1975）等均已通过花粉染色体加倍获得了三倍体优良品种。

有性杂交培育多倍体。实践表明，利用二倍体和二倍体，二倍体和多倍体杂交，多倍体之间杂交均可获得多倍体（王同坤 等，2004）。二倍体之间杂交之所以可以获得多倍体，主要机理还是由于形成了未减数的  $2n$  配子的缘故，但出现多倍体的几率相对较低。通过有性杂交途径获得多倍体已在苹果、梨、葡萄等多种果树上获得成功。著名的苹果三倍体品种，如陆奥、世界一、北斗、北海道、乔纳金等都是由二倍体品种间杂交育成的。著名的葡萄品种巨峰是日本在 1936 年用 2 个四倍体品种（‘石原早生’与‘森田尼’）杂交而得。

通过胚乳培养获得三倍体。在大多数被子植物中，一个精核与两个极核融合完成双受精过程，从而产生三倍性的胚乳，因此通过胚乳培养也可以获得三倍体植株。在柑橘（王大光和张进仁，1978）、枣（石荫坪，1985）、枇杷（彭晓军和王永清，2002）等果树上均已通过胚乳培养获得了三倍体。三倍体大多具有巨大性，通过杂交获得的三倍体兼具多倍体优势和杂种优势。三倍体减数分裂异常导致果实无籽，也是人们热衷于三倍体育种的重要原因之一。

## 3 倍性的鉴定

### 3.1 染色体计数鉴定

王娜等（2005）利用去壁低渗—火焰干燥—Giemsa 染色法对冬枣组培苗秋水仙素诱导后根尖染色体数进行了鉴定。Zeng 等（2006）用苏木精染色，鉴定了柑橘的四倍体和六倍体。最近 Gamage

和 Schmidt (2009) 研制了一种新的染色体制片法, 利用常规去壁滴渗法用 DAPI 染色和荧光显微镜检测相结合, 能更清晰地看到染色体, 适用于很多种木本植物并已应用于柑橘, 是较理想的直接鉴定方法。

### 3.2 形态学水平鉴定

果树的单倍体一般表现为植株生长缓慢甚至死亡, 茎瘦弱, 节间短, 叶片窄薄、色浅等, 在柑橘 (Oiyama & Kobayshi, 1993)、苹果 (Zhang & Lespinasse, 1991)、猕猴桃 (Chalak & Legave, 1997) 等果树中都已得到验证。多倍体在形态上一般表现出巨大性。苹果四倍体树体一般生长健旺, 枝条较粗, 节间变短, 根系强壮, 角度开张, 果实硕大, 叶大而厚, 叶形指数变小 (李林光 等, 2007)。葡萄四倍体的叶基部呈二倍体所不具备的 U 形特征, 且叶片颜色深, 嵌合体的叶片则呈花斑型 (Yang et al., 2006)。柑橘四倍体叶片颜色变深, 叶片变宽, 果个变大 (Wakana et al., 2005)。枣四倍体叶片变宽变厚, 叶形指数变小 (吴改娥, 2010), 而酸枣八倍体 (路芳 等, 2010) 虽然茎粗显著增大, 但叶长、叶宽、叶面积和节间长度显著减小且植株生长缓慢。

### 3.3 组织水平鉴定

细胞的巨大性是区别植物多倍体和二倍体的重要指标之一。单倍体气孔保卫细胞显著小于二倍体 (王培 等, 1989), 气孔增大, 气孔密度下降是多倍体的典型特征 (Masterson, 1994; Ho et al., 1995), 该特征已普遍应用于苹果 (李林光 等, 2007)、梨 (Kadota & Niimi, 2002)、葡萄 (Yang et al., 2006)、桑树 (Chakraborti et al., 1998)、枣 (吴改娥, 2010)、香蕉 (Vandenhout & Qrtiz, 1995) 和菠萝 (Peggy & Robert, 1994) 等多种果树的多倍体鉴定。同源四倍体苹果较二倍体有更高的叶绿素含量 (马跃 等, 2012)。多倍体枇杷气孔叶绿体数比二倍体有明显增多 (张凌媛 等, 2005)。此外, 也可根据叶片栅栏组织的厚薄等进行鉴定。枣和酸枣四倍体的栅栏组织和海绵组织均较二倍体明显发达 (王娜 等, 2005)。Zeng 等 (2006) 利用柑橘四倍体细胞显著大于其二倍体对照, 对柑橘四倍体进行了间接鉴定。

李赟等 (1999) 对苹果不同倍性植株的叶片栅栏组织细胞超微结构进行了观察, 发现与二倍体相比, 多倍体细胞叶绿体基粒小, 片层肿胀, 细胞膜和核膜有轻微断裂, 线粒体损伤面大。

芽变选种是无性繁殖植物育种的一种有效途径, 多以嵌合体的形式存在, 特别是多倍体芽变。通过检测梢端分生组织 L1、LII、LIII 三层的细胞、细胞核及核仁的大小, 可以鉴定芽变材料倍性嵌合体的类型。Dermen (1954) 在苹果、梨、葡萄、桃自发产生的多倍体或诱变植株上进行了大量研究, 认为梢端组织多倍体细胞比二倍体细胞明显增大。王娜等 (2005) 通过此方法鉴定了冬枣和酸枣四倍体的纯度。这种方法的优越性在于能对植株的倍性类型进行全面鉴定, 可用来区分纯合多倍体和嵌合体, 还能辨别是何种形式的嵌合体。但是梢端细胞大小存在变异系数较大的现象, 其可能的原因有: (1) 观察的梢端组织切片是否为典型切片; (2) 梢端细胞排列不整齐; (3) 梢端细胞均处于活跃增殖期, 分裂阶段不同的细胞其大小也存在一定的差异。所以观测梢端细胞大小相当不容易, 其实用性尚待通过更多的检验。

花粉粒是由组织发生层的 LII 层衍生而来。一般认为, 多倍体植株的花粉粒大, 萌发孔多。同时, 多倍体花粉粒大小不均匀, 畸形花粉粒较多 (魏文娜和曹能国, 1984)。同源四倍体枣的花粉粒显著增大, 且出现二倍体所没有的四孔沟花粉 (吴改娥, 2010)。葡萄花粉大小的趋势为四倍体 > 三倍体 > 二倍体 (韩继成 等, 2005)。同源及异源四倍体柑橘的花粉粒体积平均为二倍体的 2 倍或双亲之和 (邓秀新 等, 1995)。然而, 也有一些研究认为花粉粒的大小和形状不能作为倍性鉴定的可靠指标 (Dajoz, 1993)。

此外，多倍体的育性普遍下降也是其重要生物学特征之一，表现为花粉育性下降，坐果率较低，果实内种子数下降，果实形状不规则，扁平，果实整齐度下降等。苹果四倍体品种‘天星’的畸形花粉率明显高于其对照，且花粉萌发率低（李林光 等，2011）。柑橘六倍体花粉萌发率仅为 3.7%（郭文武 等，2007）。邓秀新等（1995）研究表明，同源四倍体柑橘花粉育性低于其二倍体对照，而‘伏令夏’甜橙由于是异质结合的染色体易位突变体，其同源四倍体花粉育性则比二倍体高出 50%。枳（*Poncirus trifoliata*）与甜橙（*Citrus sinensis*）属间以及来檬（*C. aurantifolia*）与甜橙种间四倍体体细胞杂种花粉育性介于其双亲之间。葡萄二倍体的花粉萌发率最高，四倍体次之，三倍体最低（韩继成 等，2005）。诱变获得的四倍体李、桃花粉活力与二倍体无差异，但结实率显著低于二倍体，有些四倍体的结实率甚至为 0（Vandenhout & Qrtiz, 1995）。

### 3.4 流式细胞仪鉴定法

目前，用流式细胞计数法已应用于大部分果树的倍性鉴定（田新民 等，2011）。但这种方法只适用于同质多倍体的准确鉴定，对于异源多倍体和通过有性杂交获得的多倍体，无法确定其染色体的来源；对于未知染色体数的植物，无法确定其染色体数，还需结合直接鉴定法进行全面鉴定。

## 4 不同倍性的遗传效应及其对果树生长发育和抗逆性的影响

### 4.1 多倍体的遗传效应

单倍体仅有一套染色体，所有基因座位（不论是显性还是隐性）都能在 RNA 或表型水平上表现出来，因而是遗传学研究的重要工具。然而至今对单倍体基因表达和表达调控机理还了解甚少，单倍体的遗传效应在果树中研究较少。

多倍化的遗传效应包括多倍体形成后的基因组改变，基因表达上的改变和二倍化效应（宋灿 等，2012），这些遗传效应推动生物的进化。关于多倍化遗传效应的研究在果树中还处于起步阶段。

#### 4.1.1 多倍体形成后基因组的改变

新形成的多倍体最显著的特征是基因组不稳定并经历快速重构，以达到多个基因组在细胞核内的和谐共存（Comai, 2000; Chen & Ni, 2006）。如在芸薹属（*Brassica*）杂交多倍体形成后 5 代以内，就发生了大量的基因组重排与片段丢失（Song et al., 1995）。基因组结构变化主要包括删除、插入、复制、易位和转座等（Chen & Ni, 2006）。

染色体核型的改变及减数分裂的异常是多倍体形成后的表观特征，多倍体的减数分裂不遵循孟德尔遗传规律，会产生部分不育的配子（Luca, 2005）。在果树中，多倍体通常会发生染色体桥、落后染色体、不均等分离、多分孢子等异常现象。与二倍体枣品种‘辣椒枣’相比，其同源四倍体终变期染色体构型复杂，有单价体、二价体、三价体和四价体出现，并出现一大一小双核仁；中期 I 和中期 II 有部分染色体游离于赤道板外；后期 I 和后期 II 出现落后染色体及染色体桥现象；四分体时期还出现了二分体、含微核的异常三分体和含微核的异常四分体（吴改娥 等，2011）。天然的三倍体‘赞皇大枣’减数分裂不规则，终变期出现单价体、二价体和三价体，且减数分裂后期 I 和后期 II 出现落后染色体，最终产生三分体、四分体、五分体、六分体，形成不等孢子（许晓光 等，2009）。五倍体野生草莓小孢子母细胞减数分裂行为存在染色体桥、落后染色体、不均等分离、多分孢子等异常现象（雷家军 等，2009）。减数分裂的异常可能是导致不同大小花粉形成的直接原因。

近年来，荧光原位杂交（FISH）和基因组原位杂交（GISH）技术广泛应用于植物加倍后的遗传分析。Xiang 等（2008）利用 GISH 技术从 6 000 个柑橘天然杂交种子中筛选出 5 个三倍体和 9 个四

倍体, 四倍体中 7 个为同源四倍体, 2 个为异源四倍体, 而人工诱导的四倍体均为同源四倍体。He 等 (2012) 利用 3 种天然三倍体枇杷进行 GISH 分析发现, 其中 2 种的 51 条染色体均含有杂交信号, 而另一种只有 34 条染色体检测到了杂交信号, 从而推测枇杷的天然三倍体中既有同源三倍体, 也有异源三倍体。火龙果的单倍体有 1 个 rDNA 位点, 其二倍体、三倍体、五倍体对应应有 2、3、5 个 rDNA 位点 (Noemi et al., 2004)。同样, 在柿树中, 二倍体亚洲种含 2 个 5S rDNA 位点, 而其多倍体含 4~8 个相应位点 (Choi et al., 2003)。

边禹等 (2010) 采用 AFLP 技术对不同倍性‘早红 3 号’枇杷基因组进行分析, 发现枇杷三倍体和四倍体均较二倍体有特异片段的增加或消失。桑树二倍体及其同源四倍体间的 SRAP 多态性也有明显差异 (林强 等, 2011)。柑橘的体细胞杂交三倍体和四倍体植株中含有不同于父母本的特异性简单重复序列 SSR (Fu et al., 2003)。

#### 4.1.2 不同倍性在基因表达上的变化

近年来, 人们对多倍体基因表达水平的变化研究较多 (Adams, 2007; Sémon & Wolfe, 2008), 如基因沉默、表达上调或下调、无功能化、亚功能化、新功能的产生, 遗传和表观遗传机制都可能发挥作用 (Chen, 2007)。遗传机制主要是指 DNA 序列的变化, 引起 DNA 序列的永久改变或基因丢失。表观遗传上, 常通过 DNA 甲基化、组蛋白修饰、RNA 干扰、剂量补偿等方式, 来影响基因表达并产生显著的表型效应 (Liu & Wendel, 2003)。

DNA 甲基化在生物表观遗传中有较重要的作用 (Suzuki & Bird, 2008)。Li 等 (2011) 通过比较发现, 甲基化水平的倍性效应与植物种类有关, 三倍体西瓜和鼠尾草有一半基因发生了甲基化, 而 3 种木本植物 (梨、白杨、枇杷) 仅有 17.54%~33.40% 的 DNA 发生了甲基化。另外, 甲基化的奇数倍性效应高于偶数倍性效应。鸭梨的 2x、3x、4x 同源多倍体发生甲基化的位点分别占 15.5%、20.0%、16.8%, 以三倍体甲基化水平变化最明显, 总甲基化率和全甲基化率均高于二倍体和四倍体 (胡宝全 等, 2011)。

## 4.2 倍性对果树生长发育及抗逆性的影响

果树的单倍体 (张圣仓 等, 2011) 植株生长缓慢甚至死亡, 茎瘦弱, 节间短, 叶片窄薄。冬枣单倍体 (武晓红, 2008) 与其二倍体对比就表现为植株细弱, 叶片窄薄, 叶色浅且生长缓慢, 只能作为育种材料而不能应用于生产。

多倍体植物大多具有植株强壮、生长旺盛、无籽等特征。王茜龄等 (2011) 研究表明, 桑树体细胞染色体加倍以后, 光合性能增强, 不但桑叶产量和质量高, 且产果量高。柑橘二倍体和四倍体杂交后获得的三倍体后代果实无核, 且偏向于四倍体亲本特征 (Reforgiato Recupero et al., 2005)。与二倍体植株相比较, 三倍体枇杷植株树体高大, 生长旺盛, 分枝少, 叶色浓绿, 茸毛长而密, 叶缘缺刻和花器官增大明显 (汪卫星 等, 2011)。葡萄二倍体的坐果率和果实中的种子数明显高于四倍体 (闫守伟 等, 2007)。大部分果树多倍体都表现为强于亲本的性状, 但某些情况下的表现和理论相反。多倍体梨的不定梢再生率显著低于二倍体, 表明在某些情况下多倍体不一定生长旺盛 (孙清荣 等, 2012)。酸枣八倍体 (路芳 等, 2010) 茎粗显著高于其四倍体对照植株, 但叶片小于对照。作者在研究过程中, 以二倍体枣和酸枣为诱变材料, 在田间同时获得了对应的四倍体和八倍体, 四倍体枣和酸枣植株强壮, 叶片变圆, 叶色加深; 而八倍体呈现变小的趋势, 生长缓慢, 叶片变小, 节间极短, 不能在田间长时间存活。

很多真核生物的多倍体都表现较强的抗性 (Otto, 2007)。马跃等 (2012) 研究表明, 苹果同源四倍体表现出抗病的叶片结构和更优良的光合特性。葡萄三倍体长势旺盛, 且具有较强的抗病和耐盐碱能力 (Hisato et al., 2002)。柑橘与枳属间体细胞杂种抗脚腐病 (郭文武 等, 2000)。Grosser



等(1995)针对酸橙的不足有选择性地开展了一些组合,试图通过原生质体融合技术,以期能够得到保留酸橙优良特性同时又具有速衰病(CTV)抗性的新型酸橙砧木,目前已经得到酸橙+柠檬和酸橙+枳橙的杂种。周开兵等(2004)通过研究砧木对苗木生长及根和叶中抗氧化酶系活性影响的结果初步认为,红橘+枳、红橘+粗柠檬对速衰病(CTV)和裂皮病(CEV)都有一定抗性,是很有希望成为优良砧木的新型资源。经过多年的育种研究工作,目前已获得了多个综合性状优良且抗柑橘线虫穴居线虫的砧木品种,如施文格枳柚、特罗亚枳橙、卡里佐枳橙等(方治军等,2010)。四倍体猕猴桃新品种‘武植3号’,抗逆性强,丰产稳产(黄宏文等,2008)。刘雪松等(2008)研究表明,三倍体杨桃的抗寒性显著强于四倍体和二倍体杨桃,而二倍体和四倍体杨桃的耐热性较强且差异不大。综上所述,多倍体育种是提高果树抗性的有效手段。

## 5 问题与展望

### 5.1 果树倍性育种中存在的主要问题及对策

植物界天然单倍体很少,人工培育单倍体以花药或花粉培养为主。从前人研究结果看,花粉培养获得愈伤组织并不难,难的是愈伤组织进一步发育获得完整植株;花药培养虽然比较容易,但获得单倍体花粉植株的几率很低,而且单倍体一般存活难度很大。调整花粉发育过程并使其加倍成双单倍体是关键,利用加倍后的花粉或花药进行培养将使花粉培养变得更加容易。多倍体育种途径多种多样,以秋水仙素诱导体细胞加倍最为常用,但嵌合体现象严重,嵌合体纯化费时费力。通过愈伤途径或胚状体途径诱导多倍体,可望实现加倍后的单细胞再分化成苗,理论上这种途径所形成的多倍体均为纯合体,可避免嵌合体的出现,使直接诱导同质多倍体成为可能。

已有研究表明,多倍体的倍数不是越多越好。作者在试验中发现,枣树的八倍体生长缓慢,叶片没有表现出多倍体的巨大性,难以在田间存活。每种植物都有其最适的染色体倍性,应确定合适的倍性作为育种目标。从育种和生产实践来看,苹果是以二倍体和三倍体为主,葡萄和樱桃主要是二倍体和四倍体,梨和枣主要是二倍体、三倍体和四倍体,柿主要是六倍体,但无核的三倍体葡萄育种正在受到高度重视(王同坤等,2004)。

### 5.2 果树倍性育种前景展望

随着技术的创新,果树单倍体育种方法将会日益成熟,获得的单倍体或双单倍体新种质将进一步用于基因组测序,推动多年生果树的分子生物学和遗传学研究。多倍体诱导仍将以体细胞加倍为主,但体细胞加倍容易出现嵌合体,目前解决嵌合体问题的最佳方法是通过离体胚状体途径一步获得纯合多倍体,但离体条件育种对果树而言周期依然太长,因此还需探索更加快速获得能短期内开花结果的果树同质多倍体的新方法。

加倍配子和普通配子杂交获得三倍体,三倍体染色体进一步加倍获得六倍体是超级物种形成的主要模式。因此倍性育种与杂交育种相结合,同时实现基因的重组和加倍,将成为今后果树倍性育种的重要趋势。

二倍体加倍后,由于染色体组的加倍造成了与其二倍体间存在较大差异,这些差异表现为抗逆性、育性等方面的不同。虽然相关报道较多,但多是停留在表观现象上面,而引起这些差异的内在的、分子的机理研究偏少。今后应加强这方面的研究,为更好地利用多倍体资源提供基础支撑。另外,随着对多倍体的深入研究,越来越多的人认为多倍化在生物演化历史上扮演了重要的角色。因此,多倍化的遗传效应将成为今后的研究热点,以更好的解释生命进化的过程。

## References

- Adams K L. 2007. Evolution of duplicate gene expression in polyploid and hybrid plants. *Journal of Heredity*, 98 (2): 136 – 141.
- Bian Yu, Wang Wei-xing, Han Guo-hui, Liang Guo-lu. 2010. AFLP analysis of *Eriobotrya japonica* genome in different ploidies. *J Shanxi Agric Univ*, 30 (3): 209 – 211. (in Chinese)
- 边 禹, 汪卫星, 韩国辉, 梁国鲁. 2010. 不同倍性“早红3号”枇杷基因组 AFLP 分析. *山西农业大学学报*, 30 (3): 209 – 211.
- Bouvier L, Guerif P, Djulbic M, Duerl C E, Chevereau E, Lespinasse Y. 2002. Chromosome doubling of pear haploid plants and homozygosity assessment using isozyme and microsatellite markers. *Euphytica*, 123 (2): 255 – 262.
- Bueno M A, Pintos B, Prado M J, Gomez A, Manzanera J A. 2004. Androgenesis: A tool for woody plant breeding. *Recent Res Devel Genet Breed*, 1: 365 – 383.
- Cabasson C, Luro f, Ollitrault P, Grosser J. 2001. Non-random inheritance of mitochondrial genomes in *Citrus* hybrids produced by protoplast fusion. *Plant Cell Reports*, 20 (7): 604 – 609.
- Carlson P S, Smith H H, Dearing R D. 1972. Parasexual interspecific plant hybridization. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 69: 2292 – 2294.
- Chakraborti S P, Vijayan K, Roy B N, Qadri S M H. 1998. *In vitro* induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.). *Plant Cell Reports*, 17: 799 – 803.
- Chalak L, Legave J M. 1997. Effects of pollination by irradiated pollen in Hayward kiwifruit and spontaneous doubling of induced parthenogenetic trihaploids. *Scientia Horticulturae*, 68: 83 – 93.
- Chen C L, Guo W W, Yi H L, Deng X X. 2004. Cytogenetic analysis of two interspecific *citrus* allotetraploid somatic hybrids and their diploid fusion parents. *Plant Breeding*, 123 (4): 332 – 337.
- Chen Z J. 2007. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annu Rev Plant Biol*, 58: 377 – 406.
- Chen Z J, Ni Z F. 2006. Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. *Bioessays*, 28: 240 – 252.
- Choi Y A, Tao R, Yonemori K, Sugiura A. 2003. Simultaneous visualization of 5S and 45S rDNAs in persimmon (*Diospyros kaki*) and several wild relatives (*Diospyros* spp.) by fluorescent in situ hybridization (FISH) and multicolor FISH (MCFISH). *J Amer Soc Hort Sci*, 128 (5): 736 – 740.
- Comai L. 2000. Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant Mol Biol*, 43: 387 – 399.
- Dai Hong-yan, Guo Xiu-wu, He Ping, Zhang Zhi-hong. 2012. *In vitro* embryo culture and tetraploid induction of Hawthorn. *Journal of Fruit Science*, 29 (1): 71 – 74. (in Chinese)
- 代红艳, 郭修武, 何 平, 张志宏. 2012. 山楂胚离体培养及四倍体诱导研究. *果树学报*, 29 (1): 71 – 74.
- Dajoz I. 1993. Pollen aperture polymorphism and gametophyte performance in *Viola diversifolia*. *Evolution*, 47: 1080 – 1093.
- Davey M R, Anthony P, Power J B, Lowe K C. 2005. Plant protoplast technology: Current status. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27 (1): 117 – 129.
- Deng Xiu-xin, Gmitter F G, Grosser J W, Grisser J W. 1995. Pollen fertility of auto- and allo- tetraploids of *Citrus*. *Acta Horticulturae Sinica*, 22 (1): 16 – 20. (in Chinese)
- 邓秀新, Fredo Gmitter Jr, Jude W Grosser. 1995. 柑桔同源及异源四倍体花粉育性研究. *园艺学报*, 22 (1): 16 – 20.
- Dermen H. 1954. Colchiploidy in grapes. *J Hered*, 45: 159 – 172.
- Dutt M, Vasconcellos M, Song K J, Gmitter F G, Grosser J W. 2010. *In vitro* production of autotetraploid Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) using cell suspension cultures. *Euphytica*, 173 (2): 235 – 242.
- Fang Zhi-jun, Yang Yi-ling, Huang Chun-hui, Gu Qing-qing, Xu Xiao-biao. 2010. Applications of biotechnology on citrus rootstocks. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 26 (10): 226 – 229. (in Chinese)
- 方治军, 杨义伶, 黄春辉, 辜青青, 徐小彪. 2010. 生物技术在柑橘砧木上的应用. *中国农学通报*, 26 (10): 226 – 229.
- Fu C H, Guo W W, Liu J H, Deng X X. 2003. Regeneration of *Citrus sinensis* (+) *Clausena lansium* intergeneric triploid and tetraploid somatic hybrids and their identification by molecular markers. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 39 (3): 360 – 364.
- Gamage H K, Schmidt S. 2009. Short Communication. A robust method for chromosome quantification and ploidy determination in woody species. *Australian Journal of Botany*, 57: 87 – 93.
- Gao Li-xia, Jiang Dong-mei. 2012. Optimization of protoplast isolation condition in mulberry. *Guizhou Agriculture Sciences*, 40 (2): 20 – 22. (in Chinese)
- 高丽霞, 蒋冬梅. 2012. 桑树原生质体分离条件的优化. *贵州农业科学*, 40 (2): 20 – 22.
- Geraci G, Esen A, Soost R K. 1975. Triploid progenesis from  $2x \times 2x$  crosses of citrus cultivars. *J Hered*, 66: 177 – 178.

- Germanà M A. 2006. Doubled haploid production in fruit crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86 (2): 131 - 146.
- Germanà M A. 2009. Haploids and doubled haploids in fruit trees. *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, 10: 241 - 263.
- Germanà M A, Chimancone B. 2001. Gynogenetic haploids of *Citrus* after *in vitro* pollination with triploid pollen grains. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 66 (1): 59 - 66.
- Germanà M A, Scarano M T, Crescimanno F G. 1996. First results on isolated microspore culture of *Citrus*. *Proc Inter Soc Citriculture South Africa*, 2: 882 - 885.
- Grosser J W, Gmitter F G. 2011. Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: Applications for scion and rootstock breeding in *Citrus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104 (3): 343 - 357.
- Grosser J W, Gmitter F G Jr, Castle W S, Chandler J L. 1995. Production and evaluation of *Citrus* somatic hybrid rootstocks. *Progress Report Proc Fla State HortSoc*, 108: 140 - 143.
- Guha S, Maheshwari S C. 1964. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, 204: 497.
- Guo W W, Cheng Y J, Chen C L, Deng X X. 2006. Molecular analysis revealed autotetraploid, diploid and tetraploid cybrid plants regenerated from an interspecific somatic fusion in *Citrus*. *Scientia Horticulturae*, 108 (2): 162 - 166.
- Guo W W, Deng X X. 1999. Intertribal hexaploid somatic hybrid plant regeneration from electrofusion between diploids of *Citrus sinensis* and its sexually incompatible relative, *Clausena lansium*. *Theor Appl Genet*, 98: 581 - 585.
- Guo Wen-wu, Chen Chun-li, Deng Yu-yang, Deng Xiu-xin. 2007. Flowering and pollen fertility of an interspecific *Citrus* hexaploid somatic hybrid. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (1): 71 - 74. (in Chinese)
- 郭文武, 陈春丽, 邓于洋, 邓秀新. 2007. 柑橘种间六倍体体细胞杂种开花及其花粉育性. *园艺学报*, 4 (1): 71 - 74.
- 郭文武, 邓秀新. 1996. 原生质体融合与果树遗传改良. *果树科学*, 13 (1): 49 - 55.
- 郭文武, 伊华林, 邓秀新. 1997. 离体培养与柑桔三倍体育种. *中国南方果树*, 26 (6): 11 - 13.
- Guo Wen-wu, Zhou Chang-he, Yi Hua-lin, Deng Xiu-xin. 2000. Intergeneric somatic hybrid plants between *Citrus* and *Poncirus trifoliata* and evaluation of their root rot resistance. *Acta Botanica Sinica*, 42 (7): 668 - 672. (in Chinese)
- 郭文武, 周长河, 伊华林, 邓秀新. 2000. 柑橘与枳属间体细胞杂种再生及其对脚腐病抗性的评价. *植物学报*, 42 (7): 668 - 672.
- Han Ji-cheng, Zhao Sheng-jian, Guo Zi-juan. 2005. A study of pollen morphology of triploid cultivars of grape and its berry setting rate. *Journal of Fruit Science*, 22 (5): 561 - 563. (in Chinese)
- 韩继成, 赵胜建, 郭紫娟. 2005. 三倍体葡萄品种花粉形态及其坐果率的研究. *果树学报*, 22 (5): 561 - 563.
- He Q, Wang W X, Guo Q G, Xiang S Q, Li X L, Liang G L. 2012. Genetic diversity and utilization of triploid loquats (*E. japonica* Lindl). *Genetic Diversity in Plants*, 14: 103 - 116.
- Hisato K, Kohji N, Kayo T, Haruki K. 2002. Molecular and cytogenetic characterization of triploid somatic between 'Shogun' mandarin and grape fruit. *Plant Biotechnology*, 19 (5): 345 - 352.
- Horn R, Lecouls A C, Callahan A, Dandekar A, Garay L, McCord P, Howad W, Chan H, Verde I, Main D, Jung S, Georgi L, Forrest S, Mook J, Zhebentyayeva T, Yu Y, Kim H R, Jesudurai C, Sosinski B, Arús P, Baird V, Parfitt D, Reighard G, Scorza R, Tomkins J, Wing R, Abbott A G. 2005. Candidate gene database and transcript map for peach, a model species for fruit trees. *Theor Appl Genet*, 110: 1419 - 1428.
- Ho I, Wan Y, Widholm J M. 1995. The use of stomatal chloroplast number for rapid determination of ploidy level in maize. *Plant Breeding*, 105: 203 - 210.
- Hofer M, Touraev A, Heberle B E. 1999. Induction of embryogenesis from isolated apple microspores. *Plant Cell Reports*, 18 (12): 1012 - 1017.
- Hu Bao-quan, Wang Chun-guo, Fang Cheng-quan, Song Wen-qin, Lin Sheng-hua. 2011. Analysing the levels and patterns of DNA methylation in Yali pear autopolyploid. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*, 44 (2): 32 - 37. (in Chinese)
- 胡宝全, 王春国, 方成泉, 宋文芹, 林盛华. 2011. 不同倍性 (2x、3x、4x) 鸭梨基因组 DNA 甲基化水平与模式分析. *南开大学学报: 自然科学版*, 44 (2): 32 - 37.
- Huang Hong-wen, Jiang Zheng-wang, Zhong Cai-hong, Zhang Zhong-hui, Wang Sheng-mei, Huang Ren-huang. 2008. Tetraploid and high-quality kiwifruit cultivar 'Wuzhi 3'. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (10): 1554. (in Chinese)
- 黄宏文, 姜正旺, 钟彩虹, 张忠慧, 王圣梅, 黄仁煌. 2008. 优质四倍体猕猴桃新品种 '武植 3 号'. *园艺学报*, 35 (10): 1554.
- Jiang Hong-en. 2003. Study on polyploid induction in Chinese jujube [M. D. Dissertation]. Baoding: Agricultural University of Hebei. (in Chinese)

- 蒋洪恩. 2003. 枣 (*Ziziphus jujuba* Mill.) 多倍体诱导研究[硕士论文]. 保定: 河北农业大学.
- Jiang Hong-en, Liu Meng-jun. 2004. Studies on polyploid induction of Chinese jujube with colchicine. *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (5): 647 - 650. (in Chinese)
- 蒋洪恩, 刘孟军. 2004. 秋水仙碱诱导枣多倍体的研究. *园艺学报*, 31 (5): 647 - 650.
- Kadota M, Niimi Y. 2002. *In vitro* induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui). *Plant Cell Rep*, 21: 282 - 286.
- Kisaka H, Kameya T. 1994. Production of somatic hybrids between *Daucus carota* L. and *Nicotiana tabacum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 88: 75 - 80.
- Kobayashi S, Ohgawara T, Saito W, Nakamura Y, Omura M. 1997. Production of triploid somatic hybrids in *Citrus*. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 66: 453 - 458.
- Kumlehn J, Serazetdinova L, Hensel G, Becker D, Loerz H. 2006. Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnol J*, 4: 251 - 261.
- Kunitakei H, Nagasawa K, Takami K, Komatsu H. 2002. Molecular and cytogenetic characterization of triploid somatic hybrids between 'Shogun' mandarin and grapefruit. *Plant Biotechnology*, 19: 345 - 352.
- Lei Jia-jun, Fan Wen, Wang Shan-guang, Dai Han-ping. 2009. Observations on pollen characteristics and meiosis in natural pentaploid strawberry. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 40 (4): 396 - 399. (in Chinese)
- 雷家军, 范雯, 王善光, 代汉萍. 2009. 五倍体野生草莓花粉性状及减数分裂的观察. *沈阳农业大学学报*, 40 (4): 396 - 399.
- Li Ai, Hu Bao-quan, Xue Zhen-yi, Chen Li, Wang Wei-xing, Song Wen-qin, Chen Cheng-bin, Wang Chun-guo. 2011. DNA methylation in genomes of several annual herbaceous and woody perennial plants of varying ploidy as detected by MSAP. *Plant Mol Biol Rep*, 29: 784 - 793.
- Li Lin-guang, He Ping, Ou Chun-qing, Li Hui-feng, Zhang Zhi-hong. 2007. *In vitro* induction of tetraploid from mature of 'Golden Delicious' apple. *Acta Horticulture Sinica*, 34 (5): 1129 - 1134. (in Chinese)
- 李林光, 何平, 欧春青, 李慧峰, 张志宏. 2007. 金冠苹果成熟胚离体诱导四倍体的研究. *园艺学报*, 34 (5): 1129 - 1134.
- Li Lin-guang, Wang Ying, Wang Yu-xia, Zhang Zhi-hong, Yi Kai, Liu Zhi. 2011. Pollen characteristic and embryonic development of tensen apple. *Journal of Plant Genetic Resources*, 12 (4): 662 - 666. (in Chinese)
- 李林光, 王颖, 王玉霞, 张志宏, 伊凯, 刘志. 2011. 苹果四倍体品种天星的花粉形态及胚囊发育特征研究. *植物遗传资源学报*, 12 (4): 662 - 666.
- Li Ying, Wang Jia, Ji Le-xiang, Li Hao, Ye Mei-xia, Guo Bin, Chen Zhong, An Xin-min. 2011. The advance of haploid techniques and exploitation in plants. *Chinese Journal of Cell Biology*, 33 (9): 1008 - 1014. (in Chinese)
- 李英, 王佳, 季乐翔, 李昊, 叶梅霞, 郭斌, 陈仲, 安新民. 2011. 植物单倍体技术及应用的研究进展. *中国细胞生物学学报*, 33 (9): 1008 - 1014.
- Li Yun, Feng Da-ling. 2005. Advances in research into polyploidy breeding of woody plants. *Chinese Bulletin of Botany*, 22 (3): 375 - 382. (in Chinese)
- 李云, 冯大领. 2005. 木本植物多倍体育种研究进展. *植物学通报*, 22 (3): 375 - 382.
- Li Yun, Shu Huai-rui, Shi Yin-ping. 1999. Cell ultrastructure of diploids and triploids in apples. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 8 (3): 68 - 70. (in Chinese)
- 李贇, 束怀瑞, 石荫坪. 1999. 苹果三倍体和二倍体细胞超微结构观察. *西北农业学报*, 8 (3): 68 - 70.
- Li Yun, Zhu Zhi-ti, Tian Yan-ting, Zhang Zhi-yi, Kang Xiang-yang. 2000. Obtaining triploids by high and low temperature treating female flower buds of white poplar. *Journal of Beijing Forestry University*, 22 (5): 7 - 12. (in Chinese)
- 李云, 朱之梯, 田砚亭, 张志毅, 康向阳. 2000. 极端温度处理白杨雌花芽培育三倍体植株的研究. *北京林业大学学报*, 22 (5): 7 - 12.
- Lin Qiang, Qi Guang-jun, Zhao Wei-guo, Zhu Fang-rong, Qiu Chang-yu, Chen Xiao-qing, Fang Rong-jun. 2011. SRAP analysis of genetic variation between mulberry diploid and their artificial mutagenic homologous tetraploid. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 24 (3): 1104 - 1109. (in Chinese)
- 林强, 祁广军, 赵卫国, 朱方容, 邱长玉, 陈小青, 方荣俊. 2011. 桑树二倍体及人工诱导的同源四倍体遗传差异的 SRAP 分析. *西南农业学报*, 24 (3): 1104 - 1109.

- Liu B, Wendel J F. 2003. Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids. *Mol Phylogenet Evol*, 29: 365 – 379.
- Liu Ji-hong, Deng Xiu-xin. 2000. Production of tetraploid intergeneric somatic hybrid plants via protoplast electrofusion in citrus. *Scientia Agricultura Sinica*, 33 (2): 98 – 100. (in Chinese)
- 刘继红, 邓秀新. 2000. 原生质体电融合再生柑橘属间四倍体体细胞杂种. *中国农业科学*, 33 (2): 98 – 100.
- Liu Ji-hong, Hu Chun-gen, Deng Xiu-xin. 2002. Production of citrus intergeneric tetraploid somatic hybrids plant from electricity-mediated protoplast fusion. *Acta Horticulturae Sinica*, 29 (4): 372 – 374. (in Chinese)
- 刘继红, 胡春根, 邓秀新. 2002. 电场诱导原生质体融合获得柑橘属间四倍体体细胞杂种. *园艺学报*, 29 (4): 372 – 374.
- Liu Ji-hong, Xu Xiao-yong, Deng Xiu-xin. 2004. Advances on somatic hybrid and inheritance of their nuclear and cytoplasmic components. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 12 (3): 237 – 246. (in Chinese)
- 刘继红, 徐小勇, 邓秀新. 2004. 柑橘体细胞杂种及其核质遗传研究进展. *农业生物技术学报*, 12 (3): 237 – 246.
- Liu Meng-jun, Liu Ping, Jiang Hong-en, Dai Li, Wu Gai-e, Liu Zhi-guo. 2010. A new tetraploidy table Chinese jujube cultivar ‘Chenguang’. *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (9): 1539 – 1540. (in Chinese)
- 刘孟军, 刘平, 蒋洪恩, 代丽, 吴改娥, 刘志国. 2010. 四倍体鲜食枣新品种‘辰光’. *园艺学报*, 37 (9): 1539 – 1540.
- Liu Xue-song, Guo Qi-gao, Liang Guo-lu. 2008. Physiological determination of stress tolerance and photosynthesis characteristic for carambola with different ploid. *Tropical Agricultural Science & Technology*, 31 (2): 24 – 25. (in Chinese)
- 刘雪松, 郭启高, 梁国鲁. 2008. 不同倍性杨桃抗逆性及光和特性的生理测定. *热带农业科技*, 31 (2): 24 – 25.
- Luca C. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics*, 6: 836 – 846.
- Lu Fang, Dai Li, Liu Meng-jun, Zhao Jin. 2010. A study on octoploid induction of sour jujube (*Ziziphus acidujuba* C. Y. Cheng et M. J. Liu) with pendimethalin *in vitro*. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 33 (3): 42 – 45. (in Chinese)
- 路芳, 代丽, 刘孟军, 赵锦. 2010. 二甲戊乐灵离体诱导酸枣八倍体的研究. *河北农业大学学报*, 33 (3): 42 – 45.
- Ma Yue, Zhang Lei, Li Yuan-yuan, Dong Zhong-dong, Zhang Zhi-hong. 2012. Characteristics of micro-structures and chlorophyll fluorescence parameters of diploid and autotetraploid ‘Hanfu’ apple leaves. *Acta Bot Boreal–Occident Sin*, 32 (3): 477 – 483. (in Chinese)
- 马跃, 张蕾, 李元源, 东中东, 张志宏. 2012. ‘寒富’苹果二倍体及其同源四倍体叶片超微结构和叶绿素荧光参数特征. *西北植物学报*, 32 (3): 477 – 483.
- Madon M, Clyde M M, Hashim H, Mohd Yusuf Y, Mat H, Saratha S. 2005. Polyploidy induction of oil palm through colchicine and oryzalin treatments. *Journal of Oil Palm Research*, 17: 110 – 123.
- Maria A G. 2006. Doubled haploid production in fruit crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86: 131 – 146.
- Masterson J. 1994. Stomatal size in fossil plant: Evidence for polyploid in majority of angiosperm. *Science*, 264: 421 – 424.
- Melchers G, Sacristain M D, Holder A A. 1978. Somatic hybrid plants of potato and tomato regeneration from fused protoplasts. *Carlsberg Research Communications*, 43: 203 – 206.
- Meyer E M, Touchell D H, Ranney T G. 2009. In vitro shoot regeneration and polyploid induction from leaves of *Hypericum* species. *HortScience*, 44 (7): 1957 – 1961.
- Nagata T, Takebe I. 1971. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta*, 99 (1): 12 – 20.
- Natacha F, Serge D, Hernani G. 2010. A method for the isolation of protoplasts from grape berry mesocarp tissue. *Recent Patents on Biotechnology*, 4 (2): 125 – 129.
- Ning Qiang, Liu Xiao-guang, Liu Meng-jun. 2009. Research progress in polyploid breeding of *Ziziphus jujuba*. *Hebei Journal of Forestry and Orchard Research*, 24 (3): 305 – 308. (in Chinese)
- 宁强, 刘晓光, 刘孟军. 2009. 枣多倍体育种研究进展. *河北林果研究*, 24 (3): 305 – 308.
- Noemi Tel-zur, Shahal Abbo, Dudy Bar-zvi, Yosef Mizrahi. 2004. Genetic relationships among *Hylocereus* and *Selenicereus* vine cacti (Cactaceae): evidence from hybridization and cytological studies. *Annals of Botany*, 94: 527 – 534.
- Ohgawara T, Kobayashi S, Ohgawara E, Uchimiya H, Ishii S. 1985. Somatic hybrid plants protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. *Theor Appl Genet*, 71: 1 – 4.
- Oiyama I, Kobayashi S. 1993. Haploids obtained from diploid  $\times$  triploid crosses of citrus. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 62 (1): 89 – 93.

- Otto S P. 2007. The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell*, 131: 452 – 462.
- Peggy O A, Robert L J. 1994. Nuclear DNA content and ploidy levels in the genus *Ipomoea*. *J Amer Soc Hort Sci*, 119 (1): 110 – 115.
- Peixe A, Barroso J, Potes A, Pais M S. 2004. Induction of haploid morphogenic calluses from *in vitro* cultured anthers of *Prunus armeniaca* cv. Harcot. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77 (1): 35 – 41.
- Peng Bo. 2008. Study on 2n pollen in Chinese jujube [M. D. Dissertation]. Agricultural University of Hebei. (in Chinese)
- 彭 博. 2008. 枣树 2n 花粉研究 [硕士论文]. 保定: 河北农业大学.
- Peng Xiao-jun, Wang Yong-qing. 2002. Callus induction and plant regeneration from endosperm of *Loquat*. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 20 (3): 228 – 231. (in Chinese)
- 彭晓军, 王永清. 2002. 枇杷胚乳愈伤组织诱导和不定芽发生的研究. *四川农业大学学报*, 20 (3): 228 – 231.
- Pu Fu-shen, Huang Li-sen, Sun Bing-jun, Li Shu-ling. 1985. Study on the chromosome number of wild and cultivated pears (*Pyrus* sp.) in China. *Acta Horticulturae Sinica*, 12 (3): 155 – 158. (in Chinese)
- 蒲富慎, 黄礼森, 孙秉钧, 李树玲. 1985. 我国野生梨和栽培品种染色体数目观察. *园艺学报*, 12 (3): 155 – 158.
- Reforgiato Recupero G, Russo G, Recupero S. 2005. New promising *Citrus* triploid hybrids selected from crosses between monoembryonic diploid female and tetraploid male parents. *HortScience*, 40 (3): 516 – 520.
- Sémon M, Wolfe K H. 2008. Preferential subfunctionalization of slow-evolving genes after allopolyploidization in *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 8333 – 8338.
- Shao J Z, Chen C L, Deng XX. 2003. *In vitro* induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 75: 241 – 246.
- Shi Cui-ping, Ge Hui-bo, Zhang Cheng-he, Guo Zhen-huai. 2002. Cytological studies on unreduced gamete formation of strawberries (*Fragaria*). *Scientia Agricultura Sinica*, 35 (10): 1260 – 1263. (in Chinese)
- 时翠平, 葛会波, 张成合, 郭振怀. 2002. 草莓未减数配子形成的细胞学研究. *中国农业科学*, 35 (10): 1260 – 1263.
- 石荫坪. 1985. 枣胚乳三倍体的育成及生物学细胞学研究. *山东果树*, (1): 1 – 3.
- 石荫坪, 李雅志, 王强生. 1986. 果树突变育种. 上海: 上海技术出版社: 58 – 61.
- Shidakov R S. 1986. The possible effect of chemical on embryo cytology and obtaining polyploidy apple form. *Plant Breeding Abstracts*, 56 (4): 3153.
- Smith M K, Hamill S D, Langdon P W. 1993. pegg-KG. *Mutation Breeding News letter*, 40: 4 – 5.
- Song Can, Liu Shao-jun, Xiao Jun, He Wei-guo, Zhou Yi, Qin Qin-bo, Zhang Chun, Liu Jun. 2012. Polyploidy organisms. *Sci China Life Sci*, 42 (3): 173 – 184. (in Chinese)
- 宋 灿, 刘少军, 肖 军, 何伟国, 周 毅, 覃钦博, 张 纯, 刘 筠. 2012. 多倍体生物研究进展. *中国科学: 生命科学*, 42 (3): 173 – 184.
- Song K, Lu P, Tang K, Osborn T C. 1995. Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 7719 – 7723.
- Sun Q R, Sun H Y, Li L G, Bell R L. 2009. *In vitro* colchicine-induced polyploid plantlet production and regeneration from leaf explants of the diploid pear (*Pyrus communis* L.) cultivar, 'Fertility'. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 84 (5): 548 – 552.
- Sun Qing-rong, Sun Hong-yan, Xin Li, Li Hui-feng, Liu Qing-zhong. 2012. Effect of polyploidization of pear (*Pyrus communis* L.) on shoot regeneration ability from *in vitro* leaf explants. *Journal of Plant Genetic Resources*, 13 (1): 134 – 137. (in Chinese)
- 孙清荣, 孙洪雁, 辛 力, 李慧峰, 刘庆忠. 2012. 梨多倍体化对离体叶片不定梢再生能力的影响. *植物遗传资源学报*, 13 (1): 134 – 137.
- Suzuki M M, Bird A. 2008. DNA methylation landscapes: Provocative insights from epigenomics. *Nature Reviews Genetics*, 9: 465 – 476.
- Tao Di-hui. 2010. Studies and application on plant polyploids. *Biotechnology Bulletin*, 7: 22 – 27. (in Chinese)
- 陶抵辉. 2010. 植物多倍体的研究与应用. *生物技术通报*, 7: 22 – 27.
- Tao Di-hui, Liu Ming-yue, Xiao Jun-ze, Deng Jian-ping. 2007. Advances in the research on induction means of biopolyploid. *Life Science Research*, 11 (4): 6 – 13. (in Chinese)
- 陶抵辉, 刘明月, 肖君泽, 邓建平. 2007. 生物多倍体诱导方法研究进展. *生命科学研究*, 11 (4): 6 – 13.
- Tian Xin-min, Zhou Xiang-yan, Gong Na. 2011. Applications of flow cytometry in plant research—Analysis of nuclear DNA content and ploidy level in plant cells. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 27 (9): 21 – 27. (in Chinese)
- 田新民, 周香艳, 弓 娜. 2011. 流式细胞术在植物学研究中的应用——检测植物核 DNA 含量和倍性水平. *中国农学通报*, 27 (9): 21 – 27.

- Touraev A, Forster B P, Mohan J S. 2009. Advances in haploid production in higher plants. Netherlands: Springer Science + Business Media BV: 241 - 263.
- Troy E Wood, Naoki Takebayashi, Michael S Barker, Itay Mayrose, Philip B Greenspoon, Loren H Rieseberg. 2009. The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *National Acad Sciences*, 106 (33): 1387 - 13879.
- Vandenhout H, Ortiz R. 1995. Effect of ploidy on stomatal and other quantitative traits in plantain and banana hybrids. *Euphytica*, 83: 117 - 122.
- 王大光, 张进仁. 1978. 从胚乳培养再生三倍体柑桔植株. *中国科学*, 4: 247 - 250.
- Wakana A, Hanada N, Park S M, Fukudome I, Kajiwara K. 2005. Production of tetraploid forms of acid citrus cultivars by top grafting of shoots with sprouting axially buds treated with colchicine. *J Fac Agr, Kyushu Univ*, 50 (1): 93 - 102.
- Wang Mao-liang, Feng Hui. 2010. Advances of *in vitro* anther culture. *Journal of Beijing University of Agriculture*, 25 (3): 70 - 74. (in Chinese)
- 王茂良, 冯 慧. 2010. 花药离体培养研究进展. *北京农学院学报*, 25 (3): 70 - 74.
- Wang Na, Liu Meng-jun, Dai Li, Qin Zi-yu. 2005. *In vitro* tetraploid induction of *Ziziphus jujube* 'Dongzao' and *Z. acidojuzuba* (*Z. spinosa* Hu) with colchicine. *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (6): 1008 - 1012. (in Chinese)
- 王 娜, 刘孟军, 代 丽, 秦子愈. 2005. 秋水仙素离体诱导冬枣和酸枣四倍体. *园艺学报*, 32 (6): 1008 - 1012.
- Wang Pei, Chen Yu-rong, Fang Ren, Wu Lan-pei, Zhu Zhi-qing. 1989. A study on identification of pollen plant ploidy by using guard cell in wheat. *Acta Agriculturae Universitatis Pekinensis*, 15 (2): 141 - 145. (in Chinese)
- 王 培, 陈玉蓉, 方 仁, 吴兰佩, 朱至清. 1989. 用保卫细胞鉴定花粉植株倍性方法的研究. *北京农业大学学报*, 15 (2): 141 - 145.
- Wang Tong-kun, Zhang Jing-zheng, Qi Yong-shun, Pang Hai-zhen. 2004. Advances on polyploid breeding of fruit crops in China. *Journal of Fruit Science*, 21 (6): 592 - 597. (in Chinese)
- 王同坤, 张京政, 齐永顺, 庞海珍. 2004. 我国果树多倍体育种研究进展. *果树学报*, 21 (6): 592 - 597.
- Wang W X, Xiang S Q, Guo Q G, Li X L, He Q, Liang G L. 2010. Genome identification of triploid loquats by genome in situ hybridization technique. *Isis Acta Horticulturae*, 887: 1 - 49.
- Wang Wei-xing, Li Ye, Li Xiao-lin, Xiang Su-qiong, Guo Qi-gao, He Qiao, Liang Guo-lu. 2011. Morphological comparison between natural triploids and diploids in loquat. *Journal of Fruit Science*, 28 (6): 1090 - 1092. (in Chinese)
- 汪卫星, 李 晔, 李晓林, 向素琼, 郭启高, 何 桥, 梁国鲁. 2011. 天然三倍体枇杷与其二倍体植株的形态学比较. *果树学报*, 28 (6): 1090 - 1092.
- Wang Xi-ling, Yu Mao-de, Lu Cheng, Wu Cun-rong, Jing Cheng-jun. 2011. Study on breeding and photosynthetic characteristics of new polyploidy variety for leaf and fruit-producing mulberry (*Morus* L.). *Scientia Agricultura Sinica*, 44 (3): 562 - 569. (in Chinese)
- 王茜龄, 余茂德, 鲁 成, 吴存容, 敬成俊. 2011. 果叶兼用多倍体新桑品种的选育及其光合特性研究. *中国农业科学*, 44 (3): 562 - 569.
- Wang Z, Wu X, Ren Q, Chang X, Li R, Jing R. 2010. QTL mapping for developmental behavior of plant height in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, 174 (3): 447 - 458.
- Wei Wen-na, Cao Neng-guo. 1984. Studies on the meiosis of pollen mother cells of the grape cultivar Kyoho. *Acta Horticulturae Sinica*, 11 (3): 171 - 176. (in Chinese)
- 魏文娜, 曹能国. 1984. 巨峰葡萄花粉母细胞减数分裂的观察. *园艺学报*, 11 (3): 171 - 176.
- Wu Gai-e. 2010. Comparative study on diploid and autotetraploid Chinese jujube [M. D. Dissertation]. Baoding: Agricultural University of Hebei. (in Chinese)
- 吴改娥. 2010. 二倍体和四倍体枣的比较研究[硕士论文]. 保定: 河北农业大学.
- Wu Gai-e, Liu Ping, Liu Meng-jun, Liu Guan-nan. 2011. Meiotic observations of pollen mother cells in diploid and autotetraploid *Ziziphus jujuba* Mill. 'Lajiaoao'. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (5): 867 - 874. (in Chinese)
- 吴改娥, 刘 平, 刘孟军, 刘冠楠. 2011. 二倍体和同源四倍体 '辣椒枣' 减数分裂的比较. *园艺学报*, 38 (5): 867 - 874.
- Wu Xiao-hong. 2008. Plant regeneration from anther and acquirement of haploid in Chinese jujube [M. D. Dissertation]. Baoding: Agricultural University of Hebei. (in Chinese)
- 武晓红. 2008. 枣花药再生植株及单倍体的获得[硕士论文]. 保定: 河北农业大学.
- Xiang Su-qiong, Liang Guo-lu, Li Xiao-lin, Wang Wei-xing, Guo Qi-gao, He Qiao, Chen Yao. 2008. Obtaining polyploids and genome analysis of tetraploids by GISH in *Citrus grandis* cv. Shatianyou. *Scientia Agricultura Sinica*, 41 (6): 2.

- Xiao W, Huang X, Gong Q, Dai X M, Zhao J T, Wei Y R, Huang X L. 2009. Somatic hybrids obtained by asymmetric protoplast fusion between *Musa silk* cv. Guoshanxiang (AAB) and *Musa acuminata* cv. Mas (AA). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 97 (3): 313 – 321.
- Xiao Z A. 2004. An interspecific somatic hybrid between *Actinidia chinensis* and *Actinidia kolomikta* and its chilling tolerance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79: 299 – 306.
- Xu Juan. 2010. Field polyploid induction from callus in Chinese jujube [M. D. Dissertation]. Baoding: Agricultural University of Hebei. (in Chinese)  
徐娟. 2010. 田间愈伤组织途径诱导枣树多倍体研究 [硕士论文]. 保定: 河北农业大学.
- Xu Xiao-guang, Chen Long, Peng Jian-ying. 2009. Meiotic observations on the pollen mother cells of *Ziziphus spinosus* Hu. and *Ziziphus jujube* Mill. 'Zanhuang Dazao'. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (8): 1127 – 1133. (in Chinese)  
许晓光, 陈龙, 彭建营. 2009. 酸枣和赞皇大枣花粉母细胞减数分裂的观察. *园艺学报*, 36 (8): 1127 – 1133.
- Xue Z H, Liu P, Liu M J. 2011. Cytological mechanism of 2n pollen formation in Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill. 'Linglingzao'). *Euphytica*, 182: 231 – 238.
- Yan Shou-wei, Zhang Su-li, Zhang Guo-jun, Xu Hai-ying, Hu Jian-fang. 2007. Development of stigma and style and formation of seed with four grapevine cultivars. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 27 (3): 435 – 441. (in Chinese)  
闫守伟, 张素丽, 张国军, 徐海英, 胡建芳. 2007. 不同葡萄品种柱头、花柱发育与种子形成的关系. *西北植物学报*, 27 (3): 435 – 441.
- Yang X M, Gao Z Y, An L Z, Wang Y M, Fang X W. 2006. *In vitro* tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Euphytica*, 152: 217 – 224.
- Ye Zheng-wen, Du Ji-hong, Su Ming-shen, Li Liu-lin, Zhang Shao-ling. 2010. Effects of high temperature on the microsporogenesis and pollen development of peach. *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (3): 355 – 362. (in Chinese)  
叶正文, 杜纪红, 苏明申, 李六林, 张绍铃. 2010. 高温对桃花粉发育及小孢子产生的影响. *园艺学报*, 37 (3): 355 – 362.
- Zeng S H, Chen C W, Hong L, Liu J H, Deng X X. 2006. *In vitro* induction, regeneration and analysis of autotetraploids derived from protoplasts and callus treated with colchicine in *Citrus*. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 87: 85 – 93.
- Zhao Wei-feng, Sun Guang-ming. 2006. Establishment of a protoplast isolation system for *Zizyphus mauritiana* Lam and *Ziziphus jujuba* Mill., *Chinese Journal of Tropical Crops*, 27 (3): 51 – 55. (in Chinese)  
赵卫峰, 孙光明. 2006. 毛叶枣和冬枣原生质体分离体系的建立. *热带作物学报*, 27 (3): 51 – 55.
- Zhang Gai-na, Jia Jing-fen. 2007. Research progress in somatic hybridization and identification of their hybrids in plant. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 27 (1): 206 – 213. (in Chinese)  
张改娜, 贾敬芬. 2007. 植物体细胞杂交及其杂种鉴定方法研究进展. *西北植物学报*, 27 (1): 206 – 213.
- Zhang Ling-yuan, Guo Qi-gao, Li Xiao-lin, Zeng Hong, Tan Jian-min, Liang Guo-lu. 2005. Study on the relationship between the number of chloroplast in stomata guard cell and the ploidy of logquat cultivars. *Journal of Fruit Science*, 22 (3): 229 – 233. (in Chinese)  
张凌媛, 郭启高, 李晓林, 曾洪, 谭健民, 梁国鲁. 2005. 批把气孔保卫细胞叶绿体数目与倍性相关性研究. *果树学报*, 22 (3): 229 – 233.
- Zhang Sheng-cang, Wei An-zhi, Yang Tu-xi. 2011. Advances in the research and application of haploid and doubled haploid technologies in fruit trees. *Journal of Fruit Science*, 28 (5): 869 – 874. (in Chinese)  
张圣仓, 魏安智, 杨途熙. 2011. 果树单倍体和加倍单倍体 (DH) 技术研究与应用进展. *果树学报*, 28 (5): 869 – 874.
- Zhang Y X, Lespinasse Y. 1991. Pollination with gamma-irradiated pollen and development of fruits, seeds and parthenogenetic plants in apple. *Euphytica*, 54 (1): 101 – 109.
- Zhao Lin, Liu Wen-ge, Guo Jin-li, Su Fu-cai. 2008. Application of herbicides in *in vitro* chromosome doubling in plants. *Journal of Changjiang Vegetables*, (1): 30 – 33. (in Chinese)  
赵麟, 刘文革, 郭金丽, 苏福才. 2008. 除草剂在植物离体染色体加倍上的应用. *长江蔬菜*, (1): 30 – 33.
- Zhou Kai-bing, Guo Wen-wu, Xia Ren-xue, Huang Ren-hua, Hu Li-ming. 2004. Effects of somatic hybrids rootstocks on the growth of young tree and the activities of anti-oxidant enzymes in leaves and roots of Navel Orange (*Citrus sinensis*). *Plant Physiology Communications*, 40 (5): 540 – 544. (in Chinese)  
周开兵, 郭文武, 夏仁学, 黄仁华, 胡利明. 2004. 柑橘体细胞杂种砧木对脐橙幼树生长及根和叶中抗氧化酶系活性的影响. *植物生理学通讯*, 40 (5): 540 – 544.