

组织培养导致的草莓DNA甲基化变异

韩柏明, 赵恺, 李贺, 高秀岩, 张志宏*

沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110866

摘要:以草莓品种‘丰香’和‘全明星’为材料, 用甲基化敏感扩增多态性(MSAP)技术研究组织培养对草莓DNA甲基化的影响。结果表明, 与普通苗相比, 组织培养导致草莓试管苗的DNA甲基化水平下降, 甲基化模式的变异以去甲基化为主。组织培养导致的DNA甲基化变异不稳定, 在田间无性繁殖过程中, 试管苗的无性繁殖后代DNA甲基化水平逐渐升高, 仅部分变异的甲基化模式能够在试管苗的无性繁殖后代中稳定传递。两个品种之间, 组织培养对DNA甲基化变异程度的影响不同。

关键词: 草莓; 组织培养; 甲基化; MSAP

DNA Methylation Variation Induced by Tissue Culture in *Fragaria ananassa* Duch.

HAN Bai-Ming, ZHAO Kai, LI He, GAO Xiu-Yan, ZHANG Zhi-Hong*

College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China

Abstract: Methylation sensitive amplified polymorphism (MSAP) was used to assess the DNA methylation variation in *Fragaria ananassa* cvs. ‘Toyonoka’ and ‘Allstar’ during the process of tissue culture. The results showed that the methylation levels were lower in micropropagated plants than in conventionally propagated runner plants (control), and that demethylation was the main DNA methylation alteration pattern. However, the variation induced by tissue culture was not constant. The methylation levels in the asexual descendants of the micropropagated plants increased gradually in the field. In the asexual reproduction descendants, only part of the variation in the methylation pattern which was induced by tissue culture could be inherited from micropropagated plants. The effect of tissue culture on the variation level of methylation was different between the two strawberry cultivars. There might be correlation between the phenotypic characteristics of strawberry plants derived from *in vitro* and the DNA methylation variation.

Key words: *Fragaria ananassa*; tissue culture; methylation; MSAP

DNA甲基化作为一种主要的表观遗传修饰, 在高等植物基因组中普遍存在。它在调控基因表达、基因组印记、抑制转座子活性和保持基因组稳定等方面起着重要的作用(Finnegan等1998)。近年来的研究表明, 生物和非生物逆境能导致高等植物DNA甲基化发生变异(潘雅姣等2009; Sha等2005)。组织培养打破了植物正常的生长环境和发育途径, 因此可视为一种逆境条件。在一些植物上的研究已经表明, 组织培养可诱导DNA甲基化的变异(Kaeppler和Phillips1993)。

近年来, 随着植物组织培养技术的发展, 草莓组织培养苗在生产中开始大量应用。关于草莓组织培养苗及其后代在田间的表现已有一些报道, 研究发现, 与普通苗相比, 在生长势、花果特性、产

量、匍匐茎抽生数量以及抗病性等方面草莓组织培养苗及其后代都存在一定程度的变异(Swartz等1981; Kinet和Parmentier1989; 张馨宇等2006)。但关于组织培养过程诱导的草莓组织培养苗DNA甲基化变异的研究还鲜有报道(Chang等2009), 而DNA甲基化变异很可能是导致草莓组织培养苗表型性状变异的一种原因, 因此本文选用来源于日本系品种和美洲系品种的两个草莓主栽品种‘丰香’和‘全明星’为材料, 应用甲基化敏感扩增多态性(methylation sensitive amplified polymorphism,

收稿 2010-04-23 修定 2010-05-27

资助 国家自然科学基金(30671432)和辽宁省优秀人才支持计划项目(RC-04-07)。

* 通讯作者(E-mail: zhang_sau@163.com; Tel: 024-88487143)。

MSAP)技术比较了组织培养苗及其后代与普通苗在甲基化水平和模式上的差异,揭示了组织培养导致的草莓基因组DNA甲基化变异的模式,为草莓组织培养苗在生产中的应用提供理论依据。

材料与方法

以草莓(*Fragaria ananassa* Duch.)主栽品种‘丰香’(‘Toyonoka’)和‘全明星’(‘Allstar’)作为试材。把未经组织培养的草莓植株定义为普通苗,作为对照。2006年6月,每个品种选9株生长健壮的普通苗剥取匍匐茎,采用常规方法进行清洗和消毒。从匍匐茎上剥取0.3~0.5 mm大小的生长点,然后接种在草莓茎尖培养基(MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ GA₃)上,茎尖分化成苗后在MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ GA₃+0.02 mg·L⁻¹ IBA培养基上进行增殖继代培养,分别建立9个组织培养微繁殖无性系。茎尖分化成苗后定义为组织培养试管苗(试管苗),进行常规继代保存和扩繁。2007年3月,每个无性系生根的试管苗一部分移栽到日光温室进行驯化,同时取另一部分试管苗幼嫩叶片保存到超低温冰箱用作DNA提取的材料。由生根的试管苗在温室内经过2个月的驯化移栽成活后定义为组织培养原种苗(原种苗),此时取原种苗叶片保存到超低温冰箱用作DNA提取的材料。由原种苗在田间一个生长季里,通过匍匐茎繁殖出的子苗定义为组织培养一代苗(一代苗);同理,由一代苗繁殖出的匍匐茎子苗定义为组织培养二代苗(二代苗)。一代苗和二代苗分别于2007年9月和2008年9月定植于白色塑料花盆内,花盆内径18 cm,高20 cm,

栽培基质为人工混合基质,在日光温室内进行半促成栽培。分别于2008年3月初和2009年3月初草莓开花期,取生长良好的一代苗和二代苗幼嫩叶片保存到超低温冰箱用作DNA提取的材料。作为对照的普通苗,其繁殖、栽培管理和取样采用与一代苗和二代苗相同的方式。每个品种随机选取2个无性系,提取试管苗及其相对应的原种苗、一代苗、二代苗和普通苗叶片的总DNA用于MSAP分析用。

DNA提取采用新型植物基因组提取试剂盒(TIANGEN)完成。

MSAP分析参照Xiong等(1999)的方法,并做适当修改。用对DNA甲基化敏感的*Hpa*II和*Msp*I同裂酶分别与*Eco*RI组合对样本DNA进行双酶切,然后在酶切片段的两端,分别加上与*Eco*RI和*Hpa*II-*Msp*I酶切位点互补的人工接头(表1)。DNA酶切和连接反应一步完成。酶切和连接产物按表1所示引物进行预扩增和选择性扩增。选择性扩增产物变性后采用4%聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染法显色。

在2009年2~5月间,参照赵密珍(2006)和邓明琴(1990)的方法,对栽培在日光温室的草莓组织培养苗的生长势和开花结果性状进行调查。

实验结果

1 草莓组织培养苗DNA甲基化水平的变异

同裂酶*Hpa*II和*Msp*I识别并切割位点均为CCGG,但二者随该位点胞嘧啶甲基化状态不同而敏感程度有所不同。*Hpa*II和*Msp*I都能识别并切

表1 接头和引物序列

Table 1 Adapter and primer sequences

接头和引物	<i>Eco</i> RI (E)	<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I (HM)
接头1	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
接头2	5'-AATTGGTACGCAGTC-3'	5'-CGCTCAGGACTCAT-3'
预扩引物	5'-GACTGCGTACCAATTC-3' (E00)	5'-GATGAGTCCTGAGCGG-3' (HM00)
选扩引物	E00+AAAC (E31); E00+AAG (E32); E00+ACC (E33); E00+ACG (E34)	HM00+CAA (HM01); HM00+CAC (HM02); HM00+CAG (HM03); HM00+TAA (HM04); HM00+TCC (HM05); HM00+CAT (HM06); HM00+CTA (HM07); HM00+CTG (HM08); HM00+CTC (HM09); HM00+TTC (HM10); HM00+CAA (HM11)

割非甲基化位点; *HpaII* 能识别并切割半甲基化即仅单链发生甲基化的位点; *MspI* 能识别并切割内侧胞嘧啶甲基化(CmCGG)的位点, 而对外侧胞嘧啶甲基化(mCCGG)的位点无活性。当 *HpaII* 和 *MspI* 与 *EcoRI* 分别组合进行酶切, 经PCR反应所扩增出的多态性片段就能反映出该位点的甲基化水平和状态。如表2所示, 将酶切产物的扩增条带划分为4种类型: 类型I, 两条泳道均有带, 无甲基化发生; 类型II, *HpaII* 有带而 *MspI* 无带, 单链DNA外部甲基化; 类型III, *HpaII* 无带而 *MspI* 有带, 双链DNA内部甲基化; 类型IV, 两条泳道均无带, 双链DNA的外部甲基化。通过比较H/M双泳道的带型, 可得出不同样本DNA甲基化状态的变化情况。

共选用30对引物进行MSAP扩增。在草莓品种‘丰香’中扩增总条带数为915条, 在‘全明星’

中扩增总条带数为939条。如表3所示, 在两个品种中, 甲基化条带数、甲基化条带比率以及全甲基化条带数、全甲基化条带比率均以普通苗最高, 试管苗最低; 由试管苗在温室中驯化的原种苗中, 以及在原种苗通过匍匐茎繁殖的后代苗即一代苗和二代苗中, 甲基化条带数、甲基化条带比率以及全甲基化条带数、全甲基化条带比率又逐渐增高。说明通过组织培养, 试管苗的甲基化水平有所下降, 而在随后的田间无性繁殖后代中甲基化水平又逐渐增高。

2 草莓组织培养苗DNA甲基化模式的变异

为比较未经过组织培养和普通苗和经过组织培养的试管苗、原种苗、一代苗、二代苗的甲基化状态变化情况, 将所扩增出的条带归为三大类10种带型(表4): A类(图1)为去甲基化带型, 即通过

表2 不同类型条带所对应的甲基化状态和同裂酶活性

Table 2 The different bands and the correspondent methylation status and digestibility of isoschizomers

带型	胞嘧啶甲基化状态	同裂酶活性和带型模式			
		<i>HpaII</i>	<i>MspI</i>	H	M
类型 I	CCGG; GGCC	有活性	有活性	+	+
类型 II	<u>CCGG</u> ; GGCC; CCGG; GGCC	有活性	无活性	+	-
类型 III	C <u>CCGG</u> ; GG <u>CC</u>	无活性	有活性	-	+
类型 IV	<u>CCGG</u> ; <u>GGCC</u>	无活性	无活性	-	-

C_u指甲基化; H和M分别指内切酶组合 *EcoRI/HpaII* 和 *EcoRI/MspI*; -: 无带; +: 有带。

表3 不同类别草莓苗的甲基化水平

Table 3 Methylation levels of different kinds of strawberry plants

品种和类别	带型				总扩增条带数	甲基化条带数	甲基化带比率/%	全甲基化条带数	全甲基化带比率/%	
	I	II	III	IV						
‘丰香’	普通苗	839	19	44	14	915	77	8.4	58	6.3
	试管苗	849	21	44	1	915	66	7.2	45	4.9
	原种苗	847	19	44	5	915	68	7.4	49	5.4
	一代苗	843	19	44	9	915	72	7.9	53	5.8
	二代苗	841	19	44	11	915	74	8.1	55	6.0
‘全明星’	普通苗	815	16	46	62	939	124	13.2	108	11.5
	试管苗	873	19	45	2	939	66	7.0	47	5.0
	原种苗	846	16	46	31	939	93	9.9	77	8.2
	一代苗	830	16	46	47	939	109	11.6	93	9.9
	二代苗	826	16	46	51	939	113	12.0	97	10.3

总甲基化条带数=II+III+IV; 全甲基化条带数=III+IV, 表示双链DNA发生甲基化。

表4 不同类别草莓苗的甲基化模式变异
Table 4 Variation of methylation pattern in different kinds of strawberry plants

类型	带型										扩增条带数	
	普通苗		试管苗		原种苗		一代苗		二代苗		‘丰香’	‘全明星’
	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M		
A1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	3	28
A2	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	4	16
A3	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	2	4
A4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	3	11
A5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	2	3
A6	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	0	1
B1	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	1	2
C1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	837	813
C2	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	19	16
C3	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	44	45

+: 有带; -: 无带; H和M分别表示 *EcoRI/HpaII* 和 *EcoRI/MspI* 酶切组合。

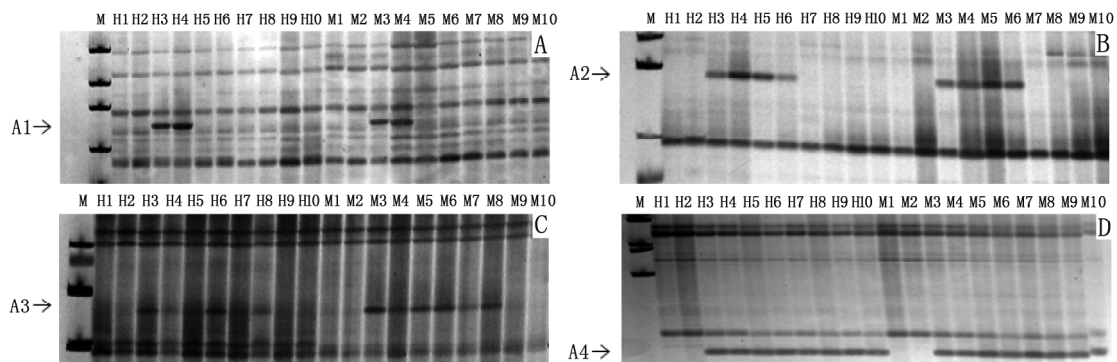


图1 ‘全明星’草莓不同类别苗的甲基化模式变异

Fig.1 Variation of methylation pattern in different kinds of ‘Allstar’ strawberry plants

A、B、C、D 分别由引物组合 E32/HM09、E33/HM05、E32/HM0、E34/HM01 扩增得到的图谱。A1、A2、A3、A4 表示 4 种 A 类类型。M: 分子量标准; H1、H2: 普通苗 *EcoRI/HpaII* 酶切; H3、H4: 试管苗 *EcoRI/HpaII* 酶切; H5、H6: 原种苗 *EcoRI/HpaII* 酶切; H7、H8: 一代苗 *EcoRI/HpaII* 酶切; H9、H10: 二代苗 *EcoRI/HpaII* 酶切; M1、M2: 普通苗 *EcoRI/MspI* 酶切; M3、M4: 试管苗 *EcoRI/MspI* 酶切; M5、M6: 原种苗 *EcoRI/MspI* 酶切; M7、M8: 一代苗 *EcoRI/MspI* 酶切; M9、M10: 二代苗 *EcoRI/MspI* 酶切。

组织培养, 在试管苗及其衍生的原种苗、一代苗和二代苗发生不同程度的去甲基化作用, 包括 A1、A2、A3、A4、A5 和 A6 等 6 种类型; B 类为甲基化类型, 与普通苗相比, 试管苗发生重新甲基化作用; C 类为普通苗与试管苗、原种苗以及一代苗和二代苗的甲基化模式完全相同的类型。‘丰香’和‘全明星’两个品种所扩增的各种类型条带总数分别为 915 和 939。其中 A 类和 B 类是多态性条带, 是组织培养导致的甲基化模式发生变异的条带, 两

个品种多态性条带数分别为 15 和 65, 多态性条带比例分别为 1.6% 和 6.9%。说明在组织培养过程中绝大多数 CCGG 位点甲基化模式保持稳定。两个品种的多态性条带中, A 类条带占多态性条带的比例分别为 93.3% 和 97.0%, 而 B 类条带所占多态性条带的比例分别为 6.7% 和 3.1%, 说明组织培养导致的甲基化模式变异主要以去甲基化为主。分析 6 种 A 类型条带发现, 组织培养过程导致的试管苗去甲基化作用不稳定, 随着其在田间驯化和田间

无性繁殖, 大部分发生去甲基化作用的位点又被重新甲基化, 仅少数发生甲基化模式变异的位点能够稳定地在无性繁殖过程中传递下去。另外, 在组织培养过程中发生的少数重新甲基化变异即 B 型带中, 发生变异的甲基化模式在试管苗的田间驯化过程中很快消失。

3 草莓组织培养苗的生长势变化

对草莓组织培养苗的生长势的调查结果表明, ‘丰香’二代苗的生长势略强于普通苗, 而一代苗的生长势并未表现出强于普通苗; ‘全明星’一代苗和二代苗的生长势均略强于普通苗(表 5)。

4 草莓组织培养苗的花和果实性状变异

组织培养对草莓植株的开花结果有显著的影响(表 6)。两个草莓品种组织培养苗的单株花序数、单株花数、单株结果数均高于普通苗, 差异显著。与普通苗相比, 除‘丰香’一代苗外, 组织培养苗的单株产量均表现出显著的增产。‘全明星’组织培养苗平均单果重和一级果重均与普通苗的差异不大; 而‘丰香’二代苗的平均单果重和一级果重均高于普通苗, 一级果重与普通苗的差异显著, 一代苗平均单果重和一级果重均低于普通苗, 其中平均单果重与普通苗的差异显著。

表 5 不同类别草莓苗的生长势差异

Table 5 The growth vigor differences of different kinds of strawberry plants

品种和类别	现蕾期			始花期			果实转白期			果实成熟期		
	叶面积/ cm ²	叶柄长/ cm	株高/ cm	叶面积/ cm ²	叶柄长/ cm	株高/ cm	叶面积/ cm ²	叶柄长/ cm	株高/ cm	叶面积/ cm ²	叶柄长/ cm	株高/ cm
‘丰香’ 普通苗	14.22 ^a	4.10 ^a	6.91 ^{ab}	48.87 ^a	14.22 ^a	20.39 ^a	50.02 ^a	15.89 ^{ab}	22.43 ^{ab}	41.21 ^a	14.23 ^a	23.26 ^b
‘丰香’ 一代苗	13.67 ^a	3.66 ^a	6.67 ^b	47.91 ^a	13.56 ^a	18.89 ^a	48.68 ^a	14.77 ^b	21.22 ^b	40.14 ^a	14.11 ^a	22.87 ^b
‘丰香’ 二代苗	14.36 ^a	4.01 ^a	7.81 ^a	50.92 ^a	14.89 ^a	21.85 ^a	52.33 ^a	16.97 ^a	24.65 ^a	44.48 ^a	14.79 ^a	25.62 ^a
‘全明星’ 普通苗	6.62 ^a	2.22 ^a	5.56 ^{ab}	30.12 ^a	7.76 ^a	12.33 ^a	43.88 ^a	10.98 ^{ab}	16.25 ^b	34.32 ^a	10.82 ^a	14.66 ^b
‘全明星’ 一代苗	7.21 ^a	2.31 ^a	5.89 ^b	32.41 ^a	7.81 ^a	12.96 ^a	46.98 ^a	13.18 ^a	17.64 ^{ab}	36.99 ^a	12.95 ^a	16.64 ^a
‘全明星’ 二代苗	7.45 ^a	2.54 ^a	5.99 ^a	33.83 ^a	8.09 ^a	13.51 ^a	48.85 ^a	13.95 ^a	18.11 ^a	38.11 ^a	13.55 ^a	16.93 ^a

表中同列数据后不同小写字母表示差异达 0.05 显著水平。

表 6 不同类别草莓苗的花和果实性状差异

Table 6 Differences of the flower and fruit characters in different kinds of strawberry plants

品种和类别	单株花序数	单株花数	单株结果数	平均单果重/g	一级果重/g	单株产量/g
‘丰香’ 普通苗	1.44 ^b	9.56 ^b	7.73 ^b	13.64 ^a	25.70 ^b	107.55 ^b
‘丰香’ 一代苗	1.75 ^a	11.95 ^a	9.12 ^a	12.26 ^b	25.11 ^b	110.31 ^b
‘丰香’ 二代苗	1.85 ^a	14.29 ^a	9.62 ^a	13.81 ^a	28.22 ^a	132.41 ^a
‘全明星’ 普通苗	1.35 ^b	10.41 ^b	8.89 ^b	13.48 ^a	25.67 ^a	120.14 ^b
‘全明星’ 一代苗	2.08 ^a	19.51 ^a	12.49 ^a	13.17 ^a	25.59 ^a	164.47 ^a
‘全明星’ 二代苗	1.92 ^a	18.21 ^a	13.51 ^a	13.04 ^a	26.10 ^a	175.56 ^a

表中同列数据后不同小写字母表示差异达 0.05 显著水平。

讨 论

本文应用 MSAP 技术对草莓品种‘丰香’和‘全明星’组织培养苗的甲基化变异情况进行了检测。与普通苗相比, 组织培养苗及其后代 CCGG/GGCC 位点甲基化修饰比例均低于普通苗。我们

的结果还表明, 随着组织培养苗在田间的驯化和无性繁殖, 其甲基化水平又逐渐升高。这说明在组织培养过程中发生的 DNA 甲基化变异是不稳定的。这种变异很可能是一种对组织培养环境的适应性变异, 当环境条件恢复后, 变异又可能会消失。在我们的试验范围内, 经过 2 年对组织培养苗在田间条

件下进行无性繁殖,虽然大部分在组织培养过程中发生变异的条带消失,但小部分发生变异的甲基化模式在田间条件下稳定地保持了2年。

我们在草莓上的试验结果表明,组织培养会导致DNA甲基化水平下降。关于组织培养诱导的DNA甲基化水平的变化,国内外的一些报道不尽一致:在香蕉(Peraza-Echeverria等2001)和豌豆(Smykal等2007)上的研究表明,组织培养导致了DNA甲基化水平的上升;而在大麦(Li等2007)和大豆(Quemada等1987)上的研究结果却表明组织培养导致了DNA甲基化水平的下降。这可能与不同的研究者所采用的试验材料、培养基组成、外植体类型以及外植体的培养过程有关。LoSchiavo等(1989)的研究表明,不同的激素浓度和组成对培养物DNA甲基化水平有影响。本文所使用的两个草莓品种,在组织培养过程中甲基化水平变异的程度有差异,‘全明星’比‘丰香’具有更高的变异率,其原因还有待研究。

田间对草莓组织培养苗性状表型的调查结果表明,草莓组织培养苗的花序数、花数和结果数显著高于普通苗。这些表型性状的变异与草莓组织培养苗DNA甲基化水平和模式的变异之间可能具有一定的相关性。

DNA甲基化在调控基因表达和抑制转座子活性上起重要作用(Finnegan等1998)。DNA甲基化水平的下降是否会导致基因表达的改变和转座子活性的激活,对组织培养诱导的差异片段的回收、序列测定和功能分析等都有待进一步研究。

参考文献

邓明琴(1990). 草莓科研文选. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 60, 121
 潘雅姣, 傅彬英, 王迪, 朱琴华, 黎志康(2009). 水稻干旱胁迫诱导DNA甲基化时空变化特征分析. 中国农业科学, 42: 3009~3018
 张馨宇, 张志宏, 高秀岩, 李贺, 杜国栋(2006). 草莓微繁殖苗及其后代性状表观遗传变异研究. 果树学报, 23: 542~546
 赵密珍(2006). 草莓种质资源描述规范和数据标准. 北京: 中国农

业出版社, 58~71

- Chang LL, Zhang ZH, Han BM, Li H, Dai HY, He P, Tian HZ (2009). Isolation of DNA-methyltransferase genes from strawberry (*Fragaria×ananassa* Duch.) and their expression in relation to micropropagation. *Plant Cell Rep*, 28: 1373~1384
- Finnegan EJ, Genger RK, Peacock WJ, Dennis ES (1998). DNA methylation in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49: 223~247
- Kaeppler SM, Phillips RL (1993). Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 8773~8776
- Kinet JM, Parmentier A (1989). The flowering behavior of micropropagated strawberry plants cv. 'Gorella': the influence of the number of subcultures on the multiplication medium. *Acta Hort*, 265: 327~334
- Li XL, Yu XM, Wang NN, Feng QZ, Dong ZY, Liu LX, Shen JL, Liu B (2007). Genetic and epigenetic instabilities induced by tissue culture in wild barley (*Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 90: 153~168
- LoSchiavo F, Pitto L, Giuliano G, Torti G, Nuti-Ronchi V, Marazziti D, Vergara R, Orselli S, Terzi M (1989). DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theor Appl Genet*, 77: 325~331
- Peraza-Echeverria S, Herrera-Valencia VA, James-Kay A (2001). Detection of DNA methylation changes in micropropagated banana plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Plant Sci*, 161: 359~367
- Quemada H, Roth EJ, Lark JK (1987). Changes in methylation of tissue cultured soybean cells detected by digestion with the restriction enzymes *HpaII* and *MspI*. *Plant Cell Rep*, 6: 63~66
- Sha AH, Lin XH, Huang JB, Zhang DP (2005). Analysis of DNA methylation related to rice adult plant resistance to bacterial blight based on methylation-sensitive AFLP (MSAP) analysis. *Mol Gen Genet*, 273: 484~490
- Smykal P, Valledor L, Rodriguez R, Griga M (2007). Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Rep*, 26: 1985~1998
- Swartz HJ, Galletta GJ, Zimmerman RH (1981). Field performance and phenotypic stability of tissue culture-propagated strawberries. *J Amer Soc Hort Sci*, 106: 667~673
- Xiong LZ, Xu CG, Saghai Maroof MA, Zhang Q (1999). Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines detected by a methylation sensitive amplification polymorphism technique. *Mol Gen Genet*, 261: 439~446