

欧石楠体细胞胚再生过程中遗传稳定性的RAPD和ISSR分析

王锦楠, 李际红*, 亓晓, 姚培娟, 许东

山东农业大学林学院, 农业生态与环境重点实验室, 山东泰安271018

摘要: 利用RAPD和ISSR分子标记, 研究了欧石楠体细胞胚再生过程中4个不同发育时期的遗传稳定性, 结果表明, 2种分子标记方法均能揭示材料间较高的遗传稳定性。从190对引物组合中筛选出9对适宜的RAPD扩增引物, 共扩增获得158条带, 平均每对引物可扩增出17.56条带, 其中多态性条带13条, 比例为8.23%; 材料间遗传相似系数的变化幅度为0.8403~0.9625, 平均值为0.8979。从45对引物组合中筛选出8对适宜的ISSR扩增引物, 共扩增获得143条带, 平均每对引物可扩增出17.875条带, 其中多态性条带15条, 比例为10.48%, 材料间遗传相似系数变化范围为0.8154~0.9032, 平均值为0.8618。聚类分析结果表明, 2种分子标记均能将供试材料分开, 且具有一定的相似性, 但也存在差异。

关键词: 欧石楠; 体细胞胚再生; RAPD; ISSR; 遗传稳定性

Genetic Stability Analysis in Somatic Embryo Regeneration of *Erica carnea* by RAPD and ISSR Markers

WANG Jin-Nan, LI Ji-Hong*, QI Xiao, YAO Pei-Juan, XU Dong

Key Laboratory of Agricultural Ecology and Environment, College of Forestry, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China

Abstract: Genetic diversity in *Erica carnea* field seedlings, embryogenic calli, adventitious buds and regenerated seedlings was analyzed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter simple sequence repeat (ISSR) makers. The results showed that there was a high level of genetic stability. In RAPD analysis, 9 primers screened from 190 RAPD primers were polymorphic. A total of 158 bands were observed in 9 primers with an average of 17.56 bands, among which 13 bands were polymorphic and the percentage of polymorphic bands (PPB) was 8.23%. The RAPD-based genetic similarity (RAPD-GS) among the material ranged from 0.8403 to 0.9625 with an average of 0.8979. In ISSR analysis, 8 primers screened from 45 RAPD primers were polymorphic. A total of 143 bands were detected in 8 primers, with an average of 17.875, among which 15 bands were polymorphic and PPB was 10.48%. The ISSR-derived genetic similarity (ISSR-GS) ranged from 0.8154 to 0.9032 with an average of 0.8618. The cluster analysis indicated that the tested materials could be distinguished by both RAPD and ISSR markers.

Key words: *Erica carnea*; somatic embryo regeneration; RAPD; ISSR; genetic stability

欧石楠为2006年我们项目组从华野园艺引进的适合我国北方广大地区栽植的欧洲常绿开花植物, 为了迅速推广应用, 我们已建立了欧石楠体细胞胚发生和植株再生体系(李际红等2012)。大量的研究表明, 体细胞胚繁育是遗传稳定性相对较高的一种再生方式, 熊丹等(2008)利用随机扩增多态性DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)技术对香果树(*Emmenopterys henryi*)体细胞胚繁殖中的胚性愈伤组织和再生植株之间的遗传稳定性进行研究, 发现两者之间的多态性条带比例(percentage of polymorphic bands, PPB)变异较低(为3.0%), 遗传稳定性较高。然而Rani和Raina

(2000)、冯霞等(2006)和Tripathi等(2006)的研究显示, 植物体细胞胚再生过程中也存在着一定的变异, 因此探讨欧石楠体细胞胚再生过程中的遗传稳定性具有重要的意义。RAPD和简单重复序列间多态性(inter-simple sequence repeat, ISSR)技术均可在DNA水平上检测和分析物种的遗传多样性及遗传变异(Milbourne等1997; Zietkiewicz等

收稿 2014-11-13 修定 2015-03-30

资助 山东省泰安市科技局项目(2011-2013)、山东省东营市科技局项目(2009-2011)、山东省泰安市大学生科技引领创新计划项目(2008D2010及2009D1009)。

* 通讯作者(E-mail: jhli@sdau.edu.cn; Tel: 18615226737)。

1994)。何斌等(2012)和林秀莲等(2013)利用RAPD分子标记技术分别对小蔓长春花(*Vinca minor*)和龙眼(*Dimocarpus longan*)体细胞胚再生过程中愈伤组织和再生植株遗传稳定性的研究表明, 两者之间的PPB变异较低(为5.2%和2.08%), 遗传稳定性较高。利用ISSR分子标记, 金万梅等(2009)对葡萄(*Vitis vinifera*)器官再生过程中不定芽和再生植株之间的遗传稳定性研究表明, 两者之间的PPB仅为3%, 陈龙(2013)对百合(*Lilium brownii* var. *viridulum*)鳞茎薄层胚性愈伤组织诱导再生过程中的胚性愈伤组织和再生植株之间的遗传稳定性研究显示, 两者之间PPB变异为0, 稳定遗传。以上研究无论是采用RAPD标记还是ISSR标记均是对体细胞胚再生过程中某两个时期之间的遗传稳定性进行分析, 对于体细胞胚繁育过程中各个时期的遗传稳定性分析尚未见报道, 因此, 探讨欧石楠体细胞胚再生不同发育时期的遗传稳定性, 为良种引进和推广提供理论指导具有重要的意义。

本试验在已有成熟的欧石楠体细胞胚再生体系的基础上, 利用RAPD和ISSR分子标记技术, 以我们实验室已有的欧石楠外植体、胚性愈伤组织、胚性愈伤组织诱导的不定芽和移栽苗为试验材料, 对其之间的遗传稳定性进行分析, 明确欧石楠体细胞胚再生不同发育时期的变异幅度和遗传相似系数, 以期从DNA水平上揭示欧石楠体细胞胚的遗传稳定性, 为体细胞胚繁育技术在欧石楠良种繁育过程中的应用提供一定的理论依据。

材料与方 法

1 植物材料

实验材料为: (1)采自山东农业大学林学实验站的6株八年生欧石楠(*Erica carnea* L.)母株上当年生嫩梢作为外植体(野生型)(CK); (2)实验室已有的培养约50 d的胚性愈伤组织(Y), 选用表面具球形颗粒、结构致密、颜色嫩黄者(李际红等2012); (3)培养50 d的胚性愈伤组织诱导形成的不定芽(Z); (4)生根苗移栽到大田的移栽苗(D)。

2 试验方法

2.1 DNA提取

利用CTAB法提取上述试验材料的总DNA, DNA的纯度与浓度用1.0%琼脂糖凝胶电泳和Nano-

drop核酸蛋白分析仪检测, 每个时期各选取6份纯度与浓度均适合的DNA样品, 保存于-20℃下备用。

2.2 RAPD和ISSR反应体系和程序

25 μL的RAPD-PCR反应体系含10×PCR缓冲液2.5 μL、25 mmol·L⁻¹ Mg²⁺ 2.5 μL、2.5 mmol·L⁻¹ dNTPs 2.0 μL、10 μmol·L⁻¹上、下游引物1.0 μL(表1)、1 000 ng·μL⁻¹ DNA模板1 μL、5 U·μL⁻¹ *rTaq*酶0.25 μL、无菌水15 μL。PCR程序为: 预变性95℃ 5 min; 94℃变性45 s, 38℃退火1 min, 72℃延伸2 min, 40个循环; 72℃延伸7 min后4℃保存。

表1 RAPD引物序列

Table 1 The sequence of RAPD primers

引物	序列(5'→3')	引物	序列(5'→3')
S1	GTTCGCTCC	S29	GGGTAACGCC
S8	GTCCACACGG	S31	CAATCGCCGT
S10	CTGCTGGGAC	S32	TCGGCGATAG
S12	CCTTGACGCA	S33	CAGCACCCAC
S15	GGAGGGTGTT	S35	TCCGAACCC
S17	AGGGAACGAG	S36	AGCCAGCGAA
S20	GGACCCTTAC	S37	GACCCTTGT
S23	AGTCAGCCAC	S38	AGGTGACCGT
S26	GGTCCCTCAC	S39	CAAACGTCGG
S27	GAAACGGGTG	S40	GTTCGATCC

25 μL的ISSR反应体系含10×PCR缓冲液2.5 μL、25 mmol·L⁻¹ Mg²⁺ 2.8 μL、2.5 mmol·L⁻¹ dNTPs 2.3 μL、10 μmol·L⁻¹上、下游引物1.0 μL(表2)、1 000 ng·μL⁻¹ DNA模板1 μL、5 U·μL⁻¹ *rTaq*酶0.25 μL、无菌水14 μL。PCR程序为: 预变性95℃ 5 min; 94℃变性45 s, 56℃退火1 min, 72℃延伸2 min, 40个循环; 72℃延伸7 min后4℃保存。

2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测

取40%的聚丙烯酰胺母液9 mL、70%的尿素45 mL和10%的TBE缓冲液6 mL混匀后, 加入400 μL APS和40 μL TEMED制成6%的聚丙烯酰胺凝胶, 取8 μL的PCR产物(RAPD和ISSR)与2 μL的上样缓冲液混合, 于6%的聚丙烯酰胺胶上, 180 V电压下电泳3 h, 银染后检测。

3 数据分析

RAPD和ISSR分子标记均为显性标记, 同一引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性, 为同一位点的产物, 分别以DNA Marker

表2 ISSR引物序列

Table 2 The sequence of ISSR primers

引物	序列(5'→3')	引物	序列(5'→3')
UBC807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC
UBC812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	UBC822	TCTCTCTCTCTCTCA
UBC827	ACACACACACACACACG	UBC835	AGAGAGAGAGAGAGAGTC
UBC840	GAGAGAGAGAGAGAGACT	UBC848	CACACACACACACAAG
UBC855	ACACACACACACACACT	UBC857	ACACACACACACACTG

5000和DNA Marker DL 2000 (TaKaRa)作为相对分子量标准,电泳图谱中的每一条带视为一个分子标记,并代表一个引物结合位点,在PAGE胶中,I为公共带(为在同一刻度下,体细胞胚发育4个时期均有的条带),II为特异性条带(为在同一刻度下,体细胞胚发育的4个时期表达不同的条带)。用筛选出的引物对4类样品进行扩增,按凝胶同一位置上DNA条带的有无进行统计,有带的记为“1”,无带的记为“0”,形成RAPD和ISSR带型(0、1)数据矩阵,用于试验分析。采用多样性分析软件(Popgen 32)对RAPD和ISSR扩增结果进行遗传稳定性分析,计算多态性位点及PPB、有效等位基因数(Ne)、Nei's基因多样性指数(H)及Shannon信息指数(I),利用NTSYS软件进行遗传距离和UPGMA聚类分析。

实验结果

1 欧石楠的RAPD和ISSR扩增结果

由表3可知,利用筛选出的9对适宜RAPD分析的扩增引物,对欧石楠4个体细胞胚不同时期的试材进行PAGE电泳检测,共获得158条带(平均每对引物17.56条),其中多态性条带13条(平均每对引物

1.44条),PPB为8.23%,引物组合S1-S10的PPB最高,为14.3%,S1-S36和S1-S40的PPB为0(表3)。

利用筛选出来的8对适宜ISSR分析的引物组合,对欧石楠4个体细胞胚不同时期的试材进行PAGE检测,共获得143条带(平均每对引物17.88条),其中多态性位点15个(平均每对引物1.88条),占检测位点总数的10.48%。引物组合UBC812-UBC840和UBC812-UBC835的PPB最低,为5.56%,UBC812-UBC848的PPB最高,为16.67%(表4)。

2 体细胞胚不同发育时期的遗传多样性

利用Popgen 1.32软件分别分析9对RAPD引物组合扩增获得的158条带和8对ISSR引物组合扩增得到的143条带,得到体细胞胚发育4个时期不同材料间的遗传多样性。

RAPD标记结果显示,欧石楠体细胞胚发育4个时期的Ne值为1.2097,H值为0.1174,I值为0.1701;其中引物组合S1-S23的Ne值(1.3726)、H值(0.2454)、I值(0.2646)最大,而S1-S20的Ne值(1.1447)、H值(0.0813)、I值(0.1208)最小(数据未列出)。

ISSR标记结果显示,欧石楠体细胞胚发育4个

表3 RAPD引物组合及扩增条带数

Table 3 RAPD primer combinations and the numbers of amplified products

引物	扩增条带总数	公共条带数	多态性条带数	PPB/%	特异性条带数
S1-S10	14	12	2	14.30	0
S1-S37	18	16	2	11.10	0
S1-S20	18	16	2	11.10	0
S1-S23	18	17	1	5.56	0
S1-S26	18	16	2	11.10	0
S1-S31	18	16	2	11.10	0
S1-S35	18	16	2	11.10	0
S1-S36	18	18	0	0	0
S1-S40	18	18	0	0	0
总数	158	145	13	8.23	0

表4 ISSR引物组合及扩增条带数

Table 4 ISSR primer combinations and the numbers of amplified products

引物组合	扩增条带总数	公共条带数	多态性条带数	PPB/%	特异性条带数
UBC812-UBC827	17	15	2	11.76	0
UBC812-UBC840	18	17	1	5.56	1
UBC812-UBC855	18	16	2	11.11	0
UBC812-UBC811	18	16	2	11.11	0
UBC812-UBC822	18	16	2	11.11	0
UBC812-UBC835	18	17	1	5.56	0
UBC812-UBC848	18	15	3	16.67	0
UBC812-UBC857	18	16	2	11.11	0
总数	143	128	15	10.48	1

时期Ne值为1.2538, H值为0.1404, I值为0.2031; 其中引物组合UBC812-UBC840的Ne值、H值、I值最大, 分别为1.4172、0.2333、0.3381, 而UBC812-UBC827的Ne值、H值、I值最小, 分别为1.1176、0.0588、0.0815(数据未列出)。

RAPD和ISSR两种标记的结果均显示Ne值、H值、I值都趋近于稳定值, 这表明同一对引物的不同材料之间的遗传变异较低, 其遗传稳定性较高; 比较RAPD和ISSR的结果发现, ISSR结果中的平均Ne值、H值、I值均比RAPD的高, 这表明ISSR分子标记产生的多态性条带多于RAPD标记。

3 体细胞胚发育同一时期的遗传多样性

RAPD分析结果显示, 体细胞胚发育的同一时期的遗传稳定性较高(图1, I)。由表5可见, 胚性愈伤组织的Ne值(1.0116)、H值(0.0067)、I值(0.0099)

以及PPB (1.71%)均高于外植体、不定芽和移栽苗, 表明在RAPD分析中胚性愈伤组织之间存在着一定的变异, 而其他3种材料之间遗传稳定性较高。

ISSR分析结果显示, 体细胞胚发育的同一时期之间的遗传稳定性较高(图2, I)。由表6可见, 外植体的Ne值(1.0260)、H值(0.0144)、I值(0.0213)以及PPB (4.07%)均高于胚性愈伤组织、不定芽和移栽苗, 其中不定芽的Ne值(1.0081)、H值(0.0042)以及I值(0.0059)最小, 这表明在ISSR分析中外植体之间的遗传变异率相对较高, 而不定芽之间的遗传稳定性相对较高。

由表5和表6可以看出, RAPD和ISSR标记对体细胞胚同一时期分析得到的Ne值、H值和I值都趋近于稳定值, 这说明体细胞胚发育同一时期试材的遗传稳定性好, 遗传变异极低。另外, RAPD分

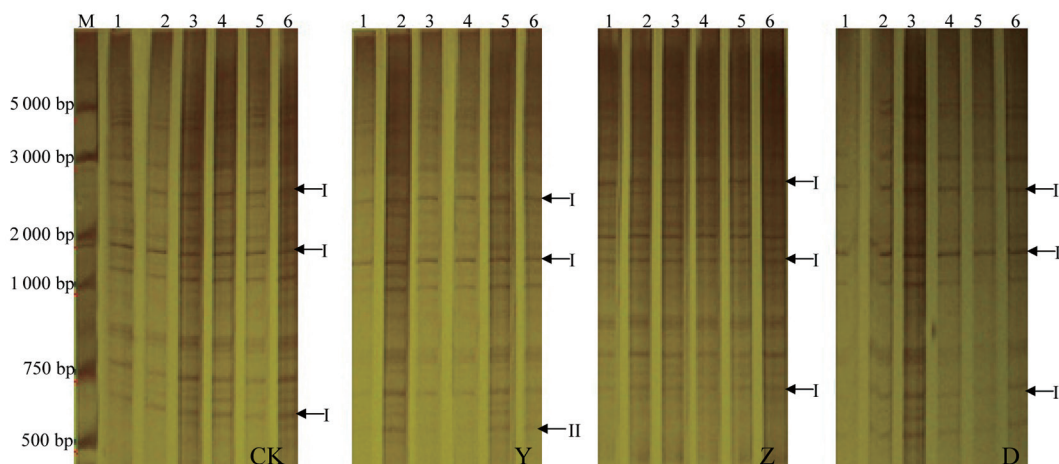


图1 引物组合S1-S23的RAPD图谱

Fig.1 RAPD profile of the primer combination S1-S23

CK: 外植体; Y: 胚性愈伤组织; Z: 不定芽; D: 移栽苗。1~6: 各个时期的6份重复材料; I: 公共条带; II: 特异性条带; M: DL5000 marker。

表5 体细胞胚再生同一时期遗传稳定性的RAPD分析

Table 5 Genetic stability analysis in the same period of somatic embryo regeneration by RAPD

不同发育时期材料	Ne	H	I	PPB/%
CK	1.0000	0.0000	0.0000	0
Y	1.0116	0.0067	0.0099	1.71
Z	1.0000	0.0000	0.0000	0
D	1.0000	0.0000	0.0000	0

子标记的结果中除了胚性愈伤组织之外, 其余材料的Ne值、H值、I值均为1.0000、0.0000、0.0000, 这说明RAPD分子标记技术并未完全将同时期的材料彻底分开, 可见, ISSR分子标记的精确度比RAPD高。

4 体细胞胚发育不同时期的相似系数和遗传距离

遗传的相似系数和遗传距离是分别从两个方

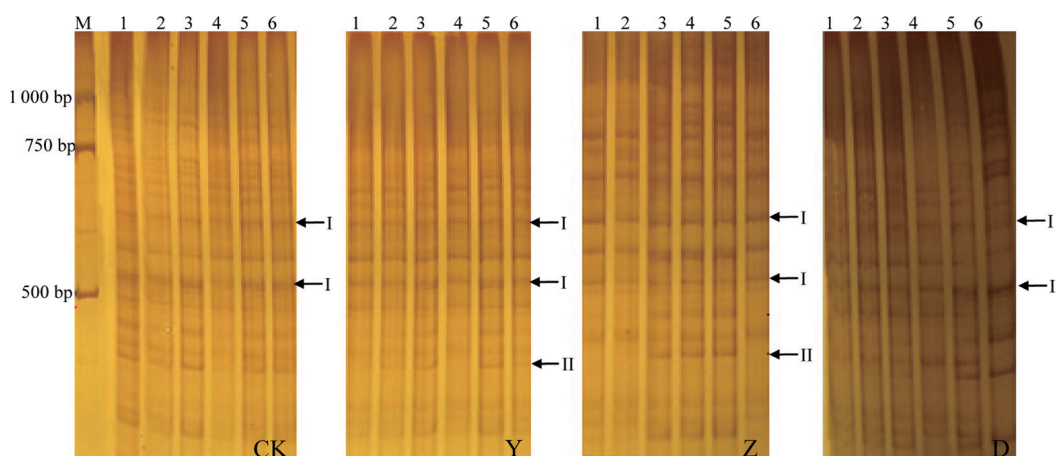


图2 引物组合UBC812-UBC835的ISSR图谱

Fig.2 ISSR profile of the primer combination UBC812-UBC835

CK: 外植体; Y: 胚性愈伤组织; Z: 不定芽; D: 移栽苗。1~6: 各个时期的6份重复材料; I: 公共条带; II: 特异性条带; M: DL5000 marker。

表6 体细胞胚再生同一时期遗传稳定性的ISSR分析

Table 6 Genetic stability analysis in the same period of somatic embryo regeneration by ISSR

不同发育时期材料	Ne	H	I	PPB/%
CK	1.0260	0.0144	0.0213	4.07
Y	1.0207	0.0114	0.0165	2.70
Z	1.0081	0.0042	0.0059	0.87
D	1.0211	0.0120	0.0177	3.05

表7 基于RAPD的4个欧石楠样品的相似系数和遗传距离

Table 7 Similarity coefficient and genetic distance of 4 *E. carnea* samples based on RAPD

材料	CK	Y	Z	D
CK	—	0.1616	0.1568	0.1246
Y	0.8403	—	0.0442	0.1024
Z	0.8541	0.9584	—	0.0810
D	0.8952	0.9113	0.9280	—

横线上方为遗传距离, 下方为相似系数。

面来衡量样品间遗传关系的指标。由表7可见, RAPD标记的4种试材间遗传相似系数变化范围为0.8403~0.9584, 平均值为0.8979, 遗传距离为0.0442~0.1616, 平均值为0.1118。其中, 外植体与胚性愈伤组织的相似系数最小(0.8403), 说明外植体与胚性愈伤组织的关系较远; 胚性愈伤组织和不定芽的遗传相似系数最大(0.9584), 遗传稳定性较高。

从表8可见, ISSR标记4种材料间的遗传相似

表8 基于ISSR的4个欧石楠样品的相似系数和遗传距离

Table 8 Similarity coefficient and genetic distance of 4 *E. carnea* samples based on ISSR

材料	CK	Y	Z	D
CK	—	0.1948	0.1719	0.1204
Y	0.8154	—	0.1089	0.1650
Z	0.8383	0.9032	—	0.1388
D	0.8903	0.8486	0.8749	—

横线上方为遗传距离, 下方为相似系数。

系数介于0.8154~0.9032, 平均为0.8618; 遗传距离为0.1089~0.1948, 平均值为0.1500, 说明欧石楠样品间保持了较高的基因相似度, 遗传距离较小。其中, 外植体与胚性愈伤组织的相似系数最小(0.8154), 遗传距离最大(0.1948), 这一结果与RAPD的结果相同, 说明由外植体到胚性愈伤组织的过程可能是体细胞胚繁殖的关键时期。

5 体细胞胚发育不同时期的聚类分析

根据RAPD和ISSR分析结果, 计算遗传相似系

数矩阵, 按UPGMA法构建了材料间的遗传关系聚类图。结果表明, 2种标记都能将4个不同发育时期的材料区分开, 聚类结果具有一定相似性, 但又不完全相同。RAPD聚类图显示, 遗传相似系数值为0.930时, 可将所有供试材料划分为两大类: CK为第I类, Y、Z和D为第II类(图3-A)。ISSR的聚类结果与RAPD有一定的相似性, 在遗传相似系数为0.850时, 可将所有供试材料划分为两大类: CK和D为第I类, Y和Z为第II类(图3-B)。

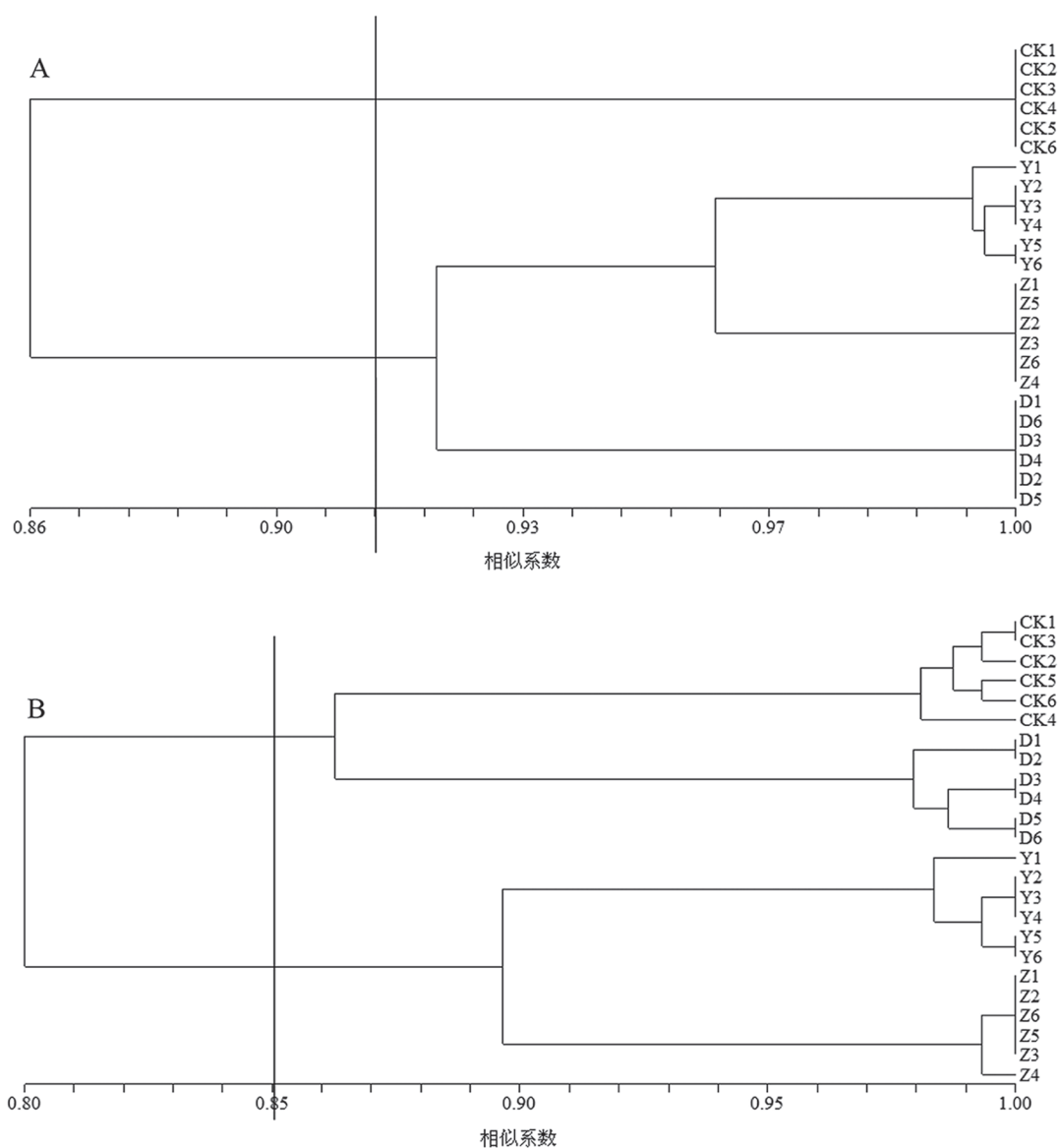


图3 基于RAPD (A)和ISSR (B)分子标记数据的4个欧石楠体细胞胚发育时期的UPGMA聚类图

Fig.3 Dendrogram for the 4 different developmental stages of somatic embryo of *E. carnea* based on RAPD (A) and ISSR (B) markers by UPGMA method

讨 论

如何保证欧石楠体细胞胚快繁体系的遗传稳定性,是当前欧石楠组织培养繁殖的关键性问题。本研究中RAPD和ISSR的分析结果显示,欧石楠体细胞胚发育4个时期的PPB为8.23%和10.48%,说明在不同发育时期之间的遗传变异率较低,遗传稳定性较高。这一结果与杨晓明等(2006)、熊丹等(2008)和王天地(2013)分别在葡萄(*Vitis vinifera*)、香果树(*Emmenopterys henryi*)和橡胶树(*Hevea brasiliensis*)胚性愈伤组织和再生植株的稳定性研究中所得到的结论相一致。欧石楠是通过体细胞胚再生途径建立的快速繁殖体系,与葡萄、香果树和橡胶树的再生途径相同,进一步说明组织培养过程中的遗传稳定性可能与其组织培养的再生途径有一定的关联。同时,RAPD和ISSR的分析结果显示,体细胞胚发育的4个时期中,外植体与胚性愈伤组织的遗传相似系数(0.8403和0.8154)均最小,外植体与胚性愈伤组织的遗传稳定性相对较低;对体细胞胚发育同一时期的遗传稳定性研究发现,胚性愈伤组织的PPB最高,遗传稳定性相对较差。由此推测,从外植体到胚性愈伤组织是体细胞胚发育的关键时期,这不仅与DNA分子水平有关,还可能受到表观遗传学的影响。

不同的分子标记技术,检测遗传稳定性水平不同,在某些情况下获得的结果甚至存在较大差异(Pejic等1998; Forster等1994)。在本研究中,RAPD和ISSR两种分子标记的分析结果具有较高的相似性,但ISSR扩增得到的条带更丰富,多态性条带数(15条)和PPB(10.48%)均高于RAPD。聚类分析显示,RAPD标记所得到的聚类图中Y、Z和D聚为一类,CK为一类,且CK、Z和D的6份重复材料一致;ISSR标记的聚类分析显示,CK和D聚为一类,Y和Z聚为一类,各个时期的6份重复材料有差异。所以,从扩增条带丰富度、聚类的信息量和精确度考虑,ISSR的分析结果可能更可靠。

欧石楠体细胞胚再生过程中表现出较高的遗传稳定性,其体细胞胚繁殖是一种较稳定的方式,这与李贵(2012)和王启业(2012)在结球甘蓝(*Brassica oleracea* var. *capitata*)和铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)中得到的结论相同,也证明不经愈伤组织直接由体细胞分化成器官,可以降低由愈伤组

织诱导产生的间接器官再生过程中细胞内染色体变异的机率,即降低组织培养过程中体细胞无性系变异机率(丰先红等2010)。但只利用随机引物和重复引物检测DNA的稳定性,鉴定结果有一定的局限性(Peredoa等2009),因此还须采用其他分子标记技术来进一步确定。

参考文献

- 陈龙(2013). 百合(*Lilium*)鳞茎薄层胚性愈伤组织诱导及再生植株遗传稳定性鉴定[硕士论文]. 杨凌:西北农林科技大学
- 冯霞,孙振元,韩蕾,彭镇华(2006). 多年生黑麦草体细胞无性系变异分析. 核农学报, 20 (1): 49-50
- 丰先红,李健,罗孝贵(2010). 植物组织培养中体细胞无性系变异研究. 中国农学通报, 26 (14): 70-73
- 何斌,侯恩太,王英娟,李多伟,步怀宇(2012). 小蔓长春花组织培养快速繁殖中的遗传稳定性. 植物生理学报, 48 (2): 197-201
- 金万梅,董静,王媛花,毛海亮,肖政,陈梅香(2009). 葡萄器官发生途径再生不定芽的遗传稳定性. 分子植物育种, 7 (2): 375-379
- 李贵(2012). 结球甘蓝的离体再生以及体细胞无性系变异的RAPD分析[硕士论文]. 南京:南京农业大学
- 李际红,邢世岩,姚培娟,谭启航,王海林(2012). 欧石楠体细胞胚发生和植株再生. 植物生理学报, 48 (11): 1043-1049
- 林秀莲,张梓浩,赖钟雄(2013). 龙眼限制生长保存EC体胚再生植株的RAPD分析. 亚热带农业研究, 9 (2): 127-132
- 王启业(2012). 铁皮石斛组织培养再生植株及遗传稳定性分析[硕士论文]. 长沙:中南林业科技大学
- 王天地(2013). 橡胶树次生体胚发生起源及再生植株遗传稳定性的研究[硕士论文]. 海口:海南大学
- 熊丹,谢伟,陈发菊,梁宏伟,王玉兵(2008). 香果树组织培养过程中遗传变异的RAPD分析. 植物生理学通讯, 44 (1): 37-41
- 杨晓明,安黎哲,王雅梅,李胜(2006). 酿酒葡萄‘神索’体胚发生及再生体系遗传稳定性分析. 园艺学报, 33 (6): 1317-1320
- Forster H, Tyler BM, Coffey MD (1994). *Phytophthora sojae* races have arisen by clonal evolution and by rare out crosses. *Mol Plant-Microbe Interact*, 7: 780-791
- Milbourne D, Meyer R, Bradshaw JE, Baird E, Bonar N, Provan J, Powell W, Waugh R (1997). Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in potato. *Mol Breeding*, 3: 127-136
- Pejic J, Ajmone-Marsan P, Morgante M, Kozumplick V, Castiglioni P, Taramino G, Motto M (1998). Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theor Appl Genet*, 97: 1248-1255
- Peredoa EL, Arroyo-Garcia R, Revilla MA (2009). Epigenetic changes detected in micropropagated hop plants. *J Plant Physiol*, 166: 1101-1111
- Rani V, Raina SN (2000). Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: a critical reappraisal. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 36: 319-330
- Tripathi SB, Mathish NV, Gurumurthi K (2006). Use of genetic markers in the management of micropropagated *Eucalyptus germplasm*. *New Forest*, 31: 361-372
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-183