

甜叶菊甲基磺酸乙酯离体诱变及耐盐变异体的 SRAP 检测

周玉丽¹, 崔广荣^{2*}, 胡能兵², 何克勤², 林平², 舒英杰²

1. 安徽科技学院生命科学学院, 安徽 凤阳 233100

2. 安徽科技学院农学院, 安徽 凤阳 233100

摘要: 目的 建立甜叶菊甲基磺酸乙酯(EMS)离体诱变体系,通过 SRAP 检测鉴定获得甜叶菊耐盐突变体。方法 将“皖甜1号”-B1 甜叶菊组培苗茎段接种在含有不同质量浓度 NaCl 的 MS 培养基中,进行耐盐临界 NaCl 质量浓度的筛选;用不同浓度的 EMS 处理甜叶菊组培苗茎段不同时间,筛选 EMS 诱变甜叶菊的适宜浓度和时间;将经过 EMS 诱变过的甜叶菊组培苗茎段接种在含有临界 NaCl 质量浓度的 MS 培养基上进行耐盐变异体的筛选,对存活的变异株通过 SRAP 标记进行耐盐性鉴定。结果 甜叶菊组培苗耐盐临界 NaCl 质量浓度为 1.0%;EMS 诱变甜叶菊组培苗茎段的适宜浓度和时间范围为 0.8%~1.0% EMS 处理 8~10 h;筛选出 41 株甜叶菊耐盐变异株,SRAP 分子标记表明,4 株在 DNA 水平上发生了变异,突变比率为 9.76%。结论 初步建立了甜叶菊 EMS 离体诱变体系,为甜叶菊高产耐盐新品种的选育提供了一种新的育种途径。

关键词: 甜叶菊;EMS 诱变;耐盐变异体;SRAP 标记;皖甜1号

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)24-3612-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.24.021

In vitro mutation induced by ethylmethane sulfonate in *Stevia rebaudiana* and SRAP identification of salt-tolerant mutants

ZHOU Yu-li¹, CUI Guang-rong², HU Neng-bing², HE Ke-qin², LIN Ping², SHU Ying-jie²

1. College of Life Science, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China

2. College of Agronomy, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China

Abstract: Objective The *in vitro* mutation system of *Stevia rebaudiana* induced by ethylmethane sulfonate (EMS) was established, and the salt-tolerant mutants were identified by SRAP. **Methods** *S. rebaudiana* plantlets were inoculated on MS media containing NaCl with different concentration to screen the salt-tolerant critical concentration. Plantlets were treated with EMS at different concentration and for different time periods, and EMS mutagenized stems were inoculated on MS medium containing critical NaCl concentration to screen the tolerant variants by SRAP markers. **Results** The critical salt concentration of *S. rebaudiana* plantlets was 1.0%, and the suitable concentration and time of EMS were 0.8%—1.0% and 8—10 h. Among the screened 41 *S. rebaudiana* tolerant mutants by SRAP molecular markers, four were mutated at DNA level, and the mutation rate was 9.76%. **Conclusion** The *in vitro* mutagenesis system of *S. rebaudiana* with EMS has been established, which provides a new breeding way for high-yield salt-tolerant *S. rebaudiana*.

Key words: *Stevia rebaudiana* Bertoni; EMS mutagenesis; salt-tolerant mutant; SRAP marker; *S. rebaudiana* plantlets

甜叶菊 *Stevia rebaudiana* Bertoni 又名“甜菊”、“甜草”,菊科甜叶菊属,原产南美洲巴拉圭的 Amambay 及 Mbaxacayu 山脉^[1],甜叶菊糖苷有控制血糖、降低血压、促进新陈代谢的作用,具有治疗糖尿病、肥胖症、调节胃酸、恢复神经疲劳之功效^[2-3],可用于医药工业作矫味剂和辅料,因此,甜叶菊逐渐成为医药领域研究和开发的热点。但甜叶菊是一种盐敏感植物,土壤的盐碱化对甜叶菊的生

长及品质影响较大,而我国的耕地随着化肥的大量使用盐碱化现象越来越严重,因而选育耐盐性强、适应性广的甜叶菊新品种就显得尤为重要。鉴于常规育种周期长,加之甜叶菊属于异花授粉植物,不利于杂交种后代的纯合及优良品种的防杂保纯,采用诱变与组织培养技术相结合的离体化学诱变方法可以提高突变频率,因此化学诱变不失为甜叶菊育种中一种行之有效的技术手段。

收稿日期: 2014-04-19

基金项目: 安徽科技学院自然科学基金项目(ZRC2013379);安徽省甜叶菊工程技术研究中心建设项目

作者简介: 周玉丽(1975—),女,甘肃敦煌人,硕士,实验师,主要从事园艺植物生物技术和实验室管理工作。E-mail: zhouyuli051010@163.com

*通信作者 崔广荣,教授,硕士生导师。E-mail: cuigr64@sina.com

作为一种应用较多的化学诱变剂, 甲基磺酸乙酯(EMS)在植物诱变育种中得到广泛的应用^[4]。通过组织培养技术有目的筛选耐盐变异体是获得耐盐品种的有效途径之一, 目前人们已在多种植物中通过离体培养筛选耐盐突变体获得成功, 如番茄^[5]、草莓^[6]、百合^[7]、猕猴桃^[8]等。国内外有关甜叶菊组织培养方面的研究已开展了30多年, 无论在理论上还是技术上都取得了长足发展^[9], 但有关甜叶菊 EMS 离体诱变的研究尚未见报道。本研究以甜叶菊无菌组培苗带腋芽(腋芽未萌发)茎段为试验材料, 以 EMS 为诱变剂进行耐盐变异体的诱变和筛选, 并通过相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)标记进行鉴定, 以期对甜叶菊耐盐突变体的应用提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为安徽科技学院农学组培室提供的甜叶菊“皖甜1号”组培苗。化学诱变剂 EMS 无色油状透明液体为美国 Sigma 公司生产。本实验基本培养基为 MS 培养基, 诱变培养基采用 MS+蔗糖 30 g/L+琼脂 5.5 g/L 的普通培养基。培养条件为温度(25±2)℃, 光照 2 000~4 000 lx、14 h/d, 相对湿度 60%左右。

1.2 方法

1.2.1 甜叶菊组培苗耐盐性适宜 NaCl 浓度的筛选 配制含 NaCl 为 0、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0% 和 1.2% 的 MS 培养基, 将生长良好的甜叶菊组培苗, 接种于上述培养基中。40 d 后观察甜叶菊组培苗生长状况, 统计甜叶菊的存活率和生根率, 以存活率 0~10% 为甜叶菊耐盐性筛选的临界浓度^[10]。

1.2.2 甜叶菊 EMS 诱变适宜浓度和时间的筛选 选取生长健壮的甜叶菊组培苗, 剪去叶片, 剪成含 2 个腋芽的茎段(长 1~1.5 cm), 置于装有不同质量

分数 EMS (0、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0% 和 1.2%) 的无菌三角瓶中, 在转速为 60 r/min 的摇床上分别浸泡 2、4、6、8、10、12 h, 共 42 个处理。处理完毕后用无菌水冲洗 4~5 次、无菌滤纸吸干表面水分, 接种于 MS 培养基上, 每处理 9 瓶, 每瓶 4 个外植体, 接种 45 d, 考察组培苗的存活率, 选成活率约为 50% 时的处理时间和质量分数为 EMS 适宜的诱变质量分数和时间。

1.2.3 甜叶菊耐盐变异体的筛选 在筛选出甜叶菊 EMS 诱变适宜的时间和质量分数基础上, 建立约含 300 个左右腋芽的诱变群体。将腋芽剪下接种于含 1.0% NaCl 的 MS 培养基上进行耐盐性变异体的初步筛选。接种 45 d 观察甜叶菊组培苗生长状况, 并将存活的单株编号, 继代培养后用于后续的 SRAP 分子鉴定。

1.2.4 甜叶菊耐盐变异体的 SRAP 分子鉴定 将经诱变后在 1.0% NaCl 质量分数下存活的单株进行扩繁, 用胡能兵等^[11]改良的 CTAB 法提取甜叶菊叶片 DNA, 通过 SRAP 分子标记对耐盐变异体进行分子鉴定。首先以未作任何处理的甜叶菊组培苗为材料, 对 36 个引物组合进行引物筛选(引物具体序列见表 1, 由上海生工生物工程技术有限公司合成), 以条带清晰的 8 对引物(F2R2、F2R5、F3R3、F4R4、F4R5、F4R6、F5R1 和 F5R4)对 41 个变异株进行 SRAP 检测。SRAP 反应体系为: Taq DNA 聚合酶(5 U/μL) 1.0 μL, 10×DNA 缓冲液(含 15 mmol/L MgCl₂) 3.0 μL, 2.5 mmol/L 的 dNTPs 1.2 μL, DNA 模板 0.5 μL, 10 μmol/L 正、反引物各 0.75 μL, 双蒸水 12.8 μL。PCR 反应程序为: 94℃变性 1 min, 35℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min, 5 个循环; 接着 94℃变性 1 min, 50℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min, 35 个循环, 最后 72℃延伸 10 min, 4℃保存。银染方法参照文献方法^[12]。

表 1 选用 SRAP 引物代号及序列

Table 1 Code numbers and sequences of Selected SRAP primers

正向引物	序列 (5'→3')	反向引物	序列 (5'→3')
F1	TGAGTCCAAACCGGAAA	R1	GACTGCGTACGAATTAAA
F2	TGAGTCCAAACCGGAAT	R2	GACTGCGTACGAATTAAAT
F3	TGAGTCCAAACCGGAAC	R3	GACTGCGTACGAATTAAAC
F4	TGAGTCCAAACCGGAAG	R4	GACTGCGTACGAATTAAAG
F5	TGAGTCCAAACCGGATA	R5	GACTGCGTACGAATTATA
F6	TGAGTCCAAACCGGATT	R6	GACTGCGTACGAATTATT

2 结果与分析

2.1 甜叶菊组培苗耐盐性临界 NaCl 质量分数的确定

由图 1 可知,随着 NaCl 质量分数的升高,甜叶菊组培苗长势逐渐变弱;当 NaCl 为 0.8%时,甜叶菊组培苗生长受到明显抑制,植株变矮,叶片瘦弱并伴有黄化现象,接近培养基的叶片变褐,

部分茎段出现生长缓慢;当 NaCl 增加到 1.0%时,甜叶菊组培苗停止生长,叶片变小变黄,随着胁迫时间延长叶片开始脱落,几乎所有植株都不能生根;当 NaCl 增加到 1.2%时,甜叶菊组培苗全部出现焦化现象,生长受到绝对抑制,全部死亡,致死率达 100%。

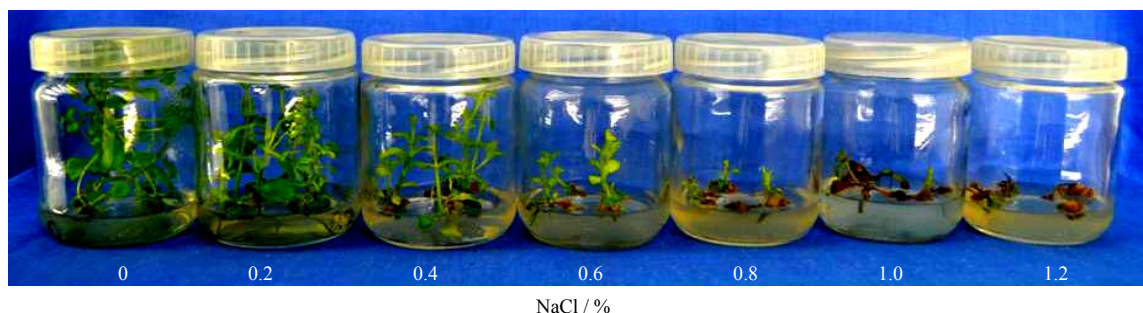


图 1 不同质量分数 NaCl 处理甜叶菊组培苗生长情况

Fig. 1 Growth situation of *S. rebaudiana* tissue culturing seedlings under different NaCl concentration

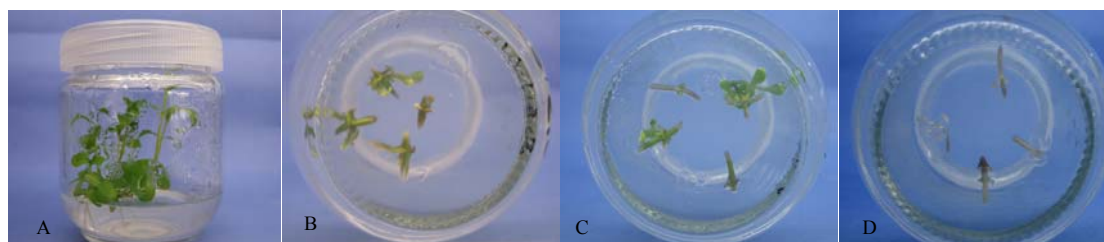
甜叶菊组培苗接种至含有不同 NaCl 质量分数的 MS 培养基 40 d 统计存活率和生根率。随着 NaCl 处理质量分数的增加,甜叶菊组培苗存活率和生根率逐渐下降;当 NaCl 质量分数小于 0.4%时,甜叶菊组培苗的存活率与 CK 无显著差异,NaCl 质量分数大于 0.6%时差异显著;当 NaCl 质量分数小于 0.2%时,甜叶菊组培苗的生根率与 CK 无显著差异,NaCl 质量分数大于 0.4%时差异显著;当 NaCl 质量分数为 0.8%时,存活率(32.50%)和生根率(27.50%)均低于 50%;当 NaCl 质量分数为 1.0%,存活率为 3.13%,生根率为 0;当 NaCl 质量分数为 1.2%时组培苗全部死亡。刘艳萌等^[10]研究认为,筛选真正的耐盐变异体,选择压力必须达到足以能够使绝大多数个体不能正常生长发育,因此,本实验结合甜叶菊组培苗的长势、存活率、生根率,初步确定甜叶菊(“皖甜 1 号”)耐盐胁迫的临界 NaCl 质量分

数为 1.0%。

2.2 EMS 诱变甜叶菊组培苗适宜质量分数和时间的确定

甜叶菊组培苗在 EMS 不同质量分数和处理时间下的生长情况有很大区别,随着 EMS 质量分数的增大和处理时间的延长,甜叶菊组培苗长势逐渐变弱,株高逐渐变小,顶芽和腋芽生长速度较慢;与未经 EMS 处理的甜叶菊组培苗(CK)相比茎较细,叶片数量减小,茎叶失绿黄化,甚至死亡。CK 在基本培养基中生长旺盛,苗较粗,叶片肥大,叶色深绿且有光泽,根较长(图 2-A);当 EMS 质量分数超过 0.8%,处理时间超过 8 h 后,有约一半的甜叶菊茎段死亡,甜叶菊生长缓慢,叶片黄化(图 2-B~C);当 EMS 质量分数达到 1.2%和处理时间为 12 h,甜叶菊茎段全部死亡(图 2-D)。

表 2 为 EMS 处理后的甜叶菊组培苗存活率。由表 2 可知,低质量分数 EMS、短时间的处理,对甜叶



A-CK B-1.0% EMS, 8 h C-0.8% EMS, 10 h D-1.2% EMS, 12 h

图 2 EMS 处理质量分数和时间组合对甜叶菊组培苗生长的影响

Fig. 2 Effect of combination of EMS concentration and treatment time on growth of *S. rebaudiana* tissue culturing seedlings

表 2 不同 EMS 质量分数和处理时间对甜叶菊组培苗存活率的影响

Table 2 Effect of different EMS concentration and treatment time on survival rate of *S. rebaudiana* tissue culturing seedlings

处理时间 / h	存活率 / %						
	0	0.2% EMS	0.4% EMS	0.6% EMS	0.8% EMS	1.0% EMS	1.2% EMS
2	100.00	96.67	95.00	95.00	95.00	95.00	91.67
4	100.00	98.33	98.33	96.67	93.33	93.33	71.67
6	100.00	96.67	95.00	93.33	91.67	91.67	41.67
8	98.33	95.00	91.67	68.33	68.33	48.33	16.67
10	93.33	93.33	91.67	68.33	51.67	41.67	10.00
12	98.33	86.67	75.00	60.00	43.33	38.33	0.00

菊组培苗存活率影响相对较小,随着 EMS 质量分数的升高和处理时间的延长,甜叶菊组培苗存活率明显降低。当 EMS 质量分数在 1.0% 以内,处理时间在 2~6 h,甜叶菊组培苗存活率均保持在 90% 以上;当 EMS 质量分数大于 1.0%,处理时间长于 8 h 或质量分数大于 0.8%,处理时间长于 10 h,甜叶菊组培苗的存活率均在 50% 以下。通常以组培苗的半致死剂量作为 EMS 处理的最适宜剂量,综合考虑诱变效果及组培苗的存活率,本实验初步确定 EMS 诱变甜叶菊(“皖甜 1 号”)组培苗茎段(带腋芽)的适宜质量分数和时间范围为 0.8%~1.0% EMS 处理 8~10 h。

2.3 甜叶菊组培苗耐盐变异体的初步筛选

挑选培养 25 d 左右生长健壮的甜叶菊生根组培苗,剪成长约 1 cm 带腋芽的茎段(剪去叶片),经 1%~1.0% EMS 处理 8~10 h 后接种在 MS 继代培养基上,将存活的组培苗继代 3 次后,再接种在含 1.0% NaCl 的 MS 培养基上进行诱变苗的耐盐性筛选,反复筛选 3 代后,利用非突变体的不可遗传性,去除生理适应性甜叶菊苗,存活的植株即为耐盐变异株。将耐盐变异株接种到 1.0% NaCl 的 MS 培养基上(处理和对照各接种 300 个茎段),45 d 统计存活率,经过 EMS 处理过的甜叶菊茎段存活 41 株,存活率为 13.67%,对照存活 10 株,存活率为 3.33%。

2.4 甜叶菊耐盐变异体的 SRAP 鉴定

为进一步确定经 EMS 处理后植株的耐盐性,将经过 1.0% NaCl 反复筛选出来的 41 株甜叶菊组培苗分别编号扩繁后提取 DNA 并进行 SRAP 分子标记鉴定。图 3 为部分引物对甜叶菊变异株 SRAP 扩增图谱。在所用的引物对中, F2R2、F4R4、F5R5 可以从 DNA 水平检测突变体,引物 F2R2 可检测出

2 个变异单株,分别为第 16、25 号,与 CK 相比,16 号单株共缺失 4 条带(箭头所示),但在 100~200 bp 比其他单株多扩增 1 条带,25 号单株则在 1 000 bp 的位置缺失 1 条带。引物 F4R4 能够检测出 3 个变异单株,分别为 25、32 和 34 号,与 CK 相比,3

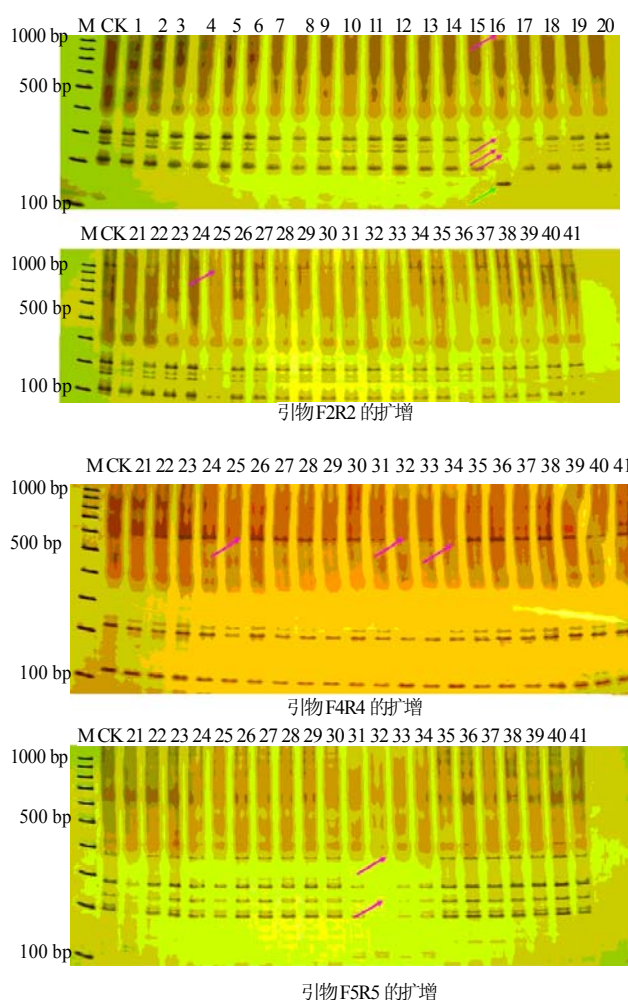


图 3 部分引物的甜叶菊变异株 SRAP 扩增图谱

Fig. 3 SRAP amplification map of *S. rebaudiana* mutants by several primers

个单株都是在约 600 bp 处缺失 1 条带。引物 F5R5 能检测出 32 号变异单株, 具体表现为在 200~300 bp 和 300~400 bp 处各缺失 1 条带。由此可知, EMS 可以引起甜叶菊组培苗在 DNA 水平发生变异, 经 SRAP 分子标记检测, 其特征主要表现为部分扩增带的缺失或增加。基于上述结果, 41 株变异株有 4 个单株在 DNA 水平发生了序列的改变, 突变率为 9.76%。

3 讨论

3.1 甜叶菊组培苗耐盐临界质量分数的确定

不同植物、不同品种的耐盐性一般存在一个阈值, 这主要是由于基因型和植物起源地的生境所决定的。研究表明, 草莓离体叶片再生植株耐盐的临界质量分数为 0.8%^[10], 猕猴桃组培苗的耐盐阈值为 1.2 g/L^[8], 百合组培苗耐盐阈值以 1.0%为宜^[13]。本实验综合考虑不同盐质量分数胁迫下的长势、存活率和生根率认为, 甜叶菊组培苗耐盐阈值为 1.0%较合适, 此结论与在铁皮石斛上研究结果有所不同, 高于铁皮石斛茎叶分化耐盐筛选的临界质量分数为 0.5%^[14]。有关不同品种甜叶菊组培苗的耐盐性临界质量分数的确定还需进一步广泛系统研究。

3.2 甜叶菊组培苗 EMS 诱变适宜质量分数和时间的确定

目前 EMS 已在多种植物的诱变育种中得到了广泛应用, 并获得了有研究或利用价值的突变体。但是在药用植物上的应用却相对较少。周立名等^[8]研究表明, 当诱变率达 50%致死剂量时, EMS 处理质量分数为 6%、处理时间为 2 h 时, 对猕猴桃的处理效果最佳。郑文娟等^[15]用 EMS 诱变越橘时表明, 诱变处理的组合为 3% EMS 处理 4 h。薛惠丹等^[16]用 EMS 诱变花椒愈伤组织的 LD₅₀ 为 0.3% EMS 处理 6 h、0.5% EMS 处理 4 h、0.7% EMS 处理 2 h。从上述的研究结果可知, 不同的植物材料 EMS 诱变适宜质量分数和时间差异较大, 一般即愈伤组织和叶片诱变所需的 EMS 质量分数较小 (0.2%~0.4% EMS)、时间短 (2~4 h), 茎段和种子诱变所需的 EMS 质量分数约为 0.6%~1.0%, 诱变时间短 6~10 h。本实验结果表明, 随着 EMS 质量分数的升高和处理时间的加长, 甜叶菊茎段组培苗存活率逐渐下降, 考虑到高质量分数的 EMS 会对植株造成很大的损伤, 综合考虑诱变效果与植株存活率, 本实验最终确定 EMS 诱变甜叶菊 (“皖甜 1 号”) 组培苗茎段的适宜质量分数和 LD₅₀ 组合

为 0.8%~1.0% EMS 处理 8~10 h。

3.3 甜叶菊组培苗耐盐变异体的分子鉴定

突变体鉴定中目前应用较多的分子标记有随机扩增多态性 DNA (RAPD)、限制性片段长度多态性 (RFLP)、简单重复序列 (SSR) 及 SRAP 等, 与其他标记相比, SRAP 标记具有简便、高效、产率高、高共显性、重复性好、易测序、便于克隆目标片段的特点, 到目前为止, 已成功应用于丹参^[17]、灵芝^[18]、川续断^[19]、忍冬^[20]等药用植物的分子鉴定。本实验 SRAP 标记结果表明, 从 41 株存活的甜叶菊组培苗耐盐变异体中检测出 4 个 DNA 序列发生改变的单株, 单株变异率为 9.75%, 高于李彩华等^[21]运用 EMS 在唐菖蒲中的报道, 但低于何克勤等^[22]运用 NaN₃ 在甜叶菊的研究。

由于本研究的主要目的是建立甜叶菊 EMS 离体诱变体系, 并通过 SRAP 鉴定获得甜叶菊耐盐突变体。为了更全面、系统地鉴定甜叶菊组培苗耐盐突变体, 还需从形态、细胞学以及田间表现等方面综合鉴定; 变异株与非变异株的抗性、解剖结构与化学成分 (糖苷) 等的比较是今后研究的重点。

参考文献

- [1] Yao Y, Ban M, Brandle J A. genetic linkage map for *Stevia rebaudiana* [J]. *Genome*, 1999, 42(4): 657-611.
- [2] Chan P, Tomlinson B, Chen Y J, et al. A double-blind placebocontrolled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension [J]. *Brit J Clin Pharm*, 2000, 50(3): 215-220.
- [3] 林美珍. 甜叶菊的生药鉴定 [J]. 井冈山学院学报, 2006, 27(8): 51-52.
- [4] 朱保葛, 路子显, 耿玉轩, 等. 烷化剂 EMS 诱发花生性状变异的效果及高产突变系的选育 [J]. 中国农业科学, 1997, 30(6): 87-89.
- [5] 陈火英, 张建华, 张晓宁. 栽培番茄耐盐突变体的离体筛选 [J]. 上海交通大学学报, 2002, 20(1): 1-6.
- [6] 刘艳萌, 张学英, 葛会波, 等. 草莓离体诱变及耐盐筛选技术初探 [J]. 河北农业大学学报, 2008, 31(6): 26-29.
- [7] 刘艳妮, 王 飞. 百合离体抗盐变异体的筛选及生理特性研究 [J]. 西北林学院学报, 2010, 25(2): 70-75.
- [8] 周立名, 王 飞, 王 佳. EMS 诱变处理定向筛选猕猴桃耐盐突变体研究 [J]. 西北农业学报, 2009, 18(5): 330-335.
- [9] 周玉丽, 崔广荣, 张子学, 等. 甜叶菊组织培养研究进展 [J]. 中国糖料, 2012(3): 68-71.

- [10] 刘艳萌, 张学英, 葛会波, 等. EMS 处理对草莓离体叶片再生植株耐盐性的影响 [J]. 河北农业大学学报, 2006, 29(6): 25-28.
- [11] 胡能兵. 紫色辣椒再生体系的建立及种质亲缘关系分析 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2008.
- [12] Sanguinetti C J, Dias N E, Simpson A J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels [J]. *Bioltechniques*, 1994, 17(5): 914.
- [13] 华智锐, 马锋旺, 李小玲, 等. 百合组培苗对盐胁迫的生理反应 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(4): 179-184.
- [14] 李国树, 徐成东, 李天星, 等. 铁皮石斛组培苗耐盐性研究 [J]. 北方园艺, 2011(1): 153-156.
- [15] 郑文娟, 石佳, 任广炼, 等. EMS 诱变越橘的研究 [J]. 西南师范大学学报, 2012, 37(2): 102-108.
- [16] 薛惠丹, 李周岐. 花椒愈伤组织 EMS 诱变及变异研究 [J]. 西北林学院学报, 2012, 27(2): 98-101.
- [17] 宋振巧. 丹参种质资源的遗传多样性研究 [D]. 济南: 山东农业大学, 2008.
- [18] 许美燕, 唐传红, 张劲松, 等. 利用 SRAP 和 ISSR 建立快速鉴定灵芝属菌株的 SCAR 标记 [J]. 菌物学报, 2008, 27(5): 707-717.
- [19] 艾强, 周涛, 江维克, 等. 川续断种质资源遗传多样性的 SRAP 分析 [J]. 中草药, 2013, 44(15): 2155-2159.
- [20] 李小侠, 陶正明, 吴志刚, 等. 采用 ISSR 和 SRAP 技术评价浙南忍冬属药材遗传多样性 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 2030-2035.
- [21] 李彩华, 刘辉, 李晓芳. 唐菖蒲花瓣无性系的建立与离体诱变研究 [J]. 现代化农业, 2013(8): 21-25.
- [22] 何克勤, 胡能兵, 周玉丽, 等. 甜叶菊离体诱变与分子初检 [J]. 热带作物学报, 2012, 33(5): 866-870.