

SSR 分子标记鉴定橡胶树异源四倍体自然减倍现象

张源源¹, 张 勇², 胡彦师¹, 李维国¹, 黄华孙¹

(¹ 中国热带农业科学院橡胶研究所 / 国家橡胶树育种中心 / 农业农村部儋州橡胶树种质资源圃 / 农业农村部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室 / 海南省热带作物栽培生理学重点实验室, 海口 571101; ² 云南省红河热带农业科学研究所, 河口 661300)

摘要: 植物体细胞染色体数目减少是一种罕见现象。本研究以同一份橡胶树野生种质的四倍体和嵌合体为材料, 通过流式细胞术分析嵌合体中四倍体细胞比例的位置效应, 利用 SSR 分子标记分析四倍体和嵌合体的来源途径。结果表明, 嵌合体植株四倍体细胞的比例在第一蓬叶处为 80.50%, 在第七蓬叶位置的比例为 65.58%, 嵌合体中四倍体细胞比例随着植株的生长而下降。18 对引物在四倍体和嵌合体中扩增出的 32 条带完全一致, 与嵌合体的二倍体砧木中的扩增结果有 28 条差异条带, 表明嵌合体来源于四倍体体细胞的自然减倍。18 个位点中 1 个位点的 2 个等位基因相对扩增产物量为 3:1, 表明该四倍体种质资源不是体细胞染色体加倍形成的同源四倍体, 而是由 2n 卵细胞和 2n 花粉经有性多倍化途径形成的异源四倍体。本研究首次发现并证实了橡胶树异源四倍体体细胞减倍现象。

关键词: 橡胶树; 野生种质; 异源四倍体; 减倍现象

Ploidy Reduction of Allotetraploid *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg. Revealed by SSR Markers

ZHANG Yuan-yuan¹, ZHANG Yong², HU Yan-shi¹, LI Wei-guo¹, HUANG Hua-sun¹

(¹ Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/State Centre for Rubber Breeding/Danzhou Rubber Tree Germplasm Repository, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Key Laboratory of Biology and Utilization of Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Hainan Provincial Key Laboratory of Cultivation Physiology of Tropical Crops, Haikou 571101; ² Yunnan Honghe Institute of Tropical Agricultural Science, Hekou 661300)

Abstract: The reduction of chromosome number in plant somatic cells is a rare phenomenon. In this study, the tetraploid and chimeric of the same wild germplasm of *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg. were used to analyze the position effect of tetraploid cell proportion in chimeras by flow cytometry, and the origins of tetraploid and chimeric identified by SSR markers. The results showed that the proportion of tetraploid cells in the chimera plants decreased to 65.58% in the seventh leaf layer from 80.50% in the first leaf layer. The 32 bands amplified by 18 pairs of primers were identical in the tetraploid and chimera, and there were 28 different bands compared with 28 bands of the diploid rootstock, indicating that the chimera was derived from the spontaneous somatic ploidy reduction of tetraploid. The peak ratio of two alleles in one of the 18 loci was 3:1, indicating that the tetraploid germplasm was not an autotetraploid produced by chromosome doubling of somatic cells, but an allotetraploid derived from sexual polyploidization of the 2n egg and 2n pollen. This study discovered and proved the phenomenon of ploidy reduction of an allotetraploid in rubber tree.

Key words: *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg.; wild germplasm; allotetraploid; ploidy reduction

收稿日期: 2020-11-05 修回日期: 2020-12-04 网络出版日期: 2021-01-11

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20201105002>

第一作者研究方向为橡胶树多倍体育种, E-mail: yuanyuanhill@sina.com

通信作者: 李维国, 研究方向为橡胶树遗传育种, E-mail: leewg23@163.com

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFD1001105); 现代农业产业技术体系 (CARS-34-YZ2)

Foundation projects: National Key Research and Development Program of China (2019YFD1001105), China Agriculture Research System (CARS-34-YZ2)

减数分裂和有丝分裂是细胞繁殖的 2 种主要方式。有丝分裂主要发生于体细胞,子细胞的染色体数目与母细胞完全一致,使母细胞的基因组信息稳定遗传给子细胞,保证多细胞生物所有体细胞染色体组的一致性。减数分裂主要发生于生殖细胞,子细胞的染色体数目较母细胞减少一半,父本和母本的染色体随机分布,同源重组产生新的等位基因组合,保证生物体的遗传多样性。极少数情况下,体细胞在有丝分裂过程中染色体数目发生改变,子细胞的染色体数目较母细胞整倍数或非整倍数减少,称之为染色体消减,又叫减倍现象、体细胞减数分裂、体细胞分离、类减数分裂、前期分组、异常有丝分裂等^[1]。染色体消减被认为可能是物种分化的动力之一^[2]。

植物组织培养可诱发染色体消减现象,在葫芦卜^[3-5]、蚕豆^[6]和拟南芥^[7]的组织培养中均观察到染色体消减现象。理化处理可人工诱导倍性降低,如 Naess 等^[8]用伽马射线照射四倍体草莓,产生了少量的双单倍体;Huskins^[9-10]在吡啶-3-乙酸处理的紫背万年青的根尖中发现部分单倍体细胞,在核糖核酸钠盐处理的洋葱根尖分生组织中观察到染色

体数目减少的现象;Sanders 等^[11]用秋水仙碱处理四倍体高粱获得了二倍体;Chen 等^[12]用咖啡因溶液处理萌发的蚕豆,在根尖细胞中观察到了类减数分裂现象。

前期采用流式细胞术进行橡胶树种质资源的倍性鉴定中,发现其中 1 份种质材料的 2 个单株分别为四倍体和二四嵌合体,推测其四倍体为 $2n$ 配子融合产生,而嵌合体为砧木和接穗融合发育而成^[13]。为验证以上推测,采用 SSR 分子标记进行基因型鉴定,分析四倍体的来源途径和嵌合体的形成途径,意外发现了橡胶树异源四倍体的减倍现象。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为国家橡胶树种质资源圃内的 1981' IRRDB 野生种质,编号为 XJ000912。2007 年定植 3 株,株行距为 $1.5\text{ m} \times 1.5\text{ m}$,现存 2 株。定植采用芽接苗,砧木为橡胶树无性系 GT1 的开放授粉子代。为便于保存,在离地 50 cm 处留桩,此后定期反复截干诱导复萌(图 1)。



A: 嵌合体植株的地上接穗; B: 截干复萌位置; C: 砧穗结合处

A: Scion of chimeric plant, B: Location of truncation and regeneration, C: Location of connection of scion and rootstock

图 1 嵌合体植株

Fig.1 Chimeric plant

高效植物基因组 DNA 提取试剂盒(DP350)购自天根生化科技(北京)有限公司;Hi-Di 去离子甲

酰胺、POP-7Polymer、GS-500LIZ 分子量内标、毛细管电泳 $10 \times$ Buffer 和 $2 \times$ Taq Plus PCR Master Mix

购自 Applied Biosystems 公司。

1.2 方法

1.2.1 倍性检测 材料的倍性使用 Sysmex Cy-Flow®Cube8 流式细胞仪检测,方法参考仪器附送试剂使用方法并略有改变,即取 200 mg 新鲜叶片或须根置于塑料培养皿中,添加 0.75 mL 裂解缓冲液,用刀片快速切碎,30 μm 孔径滤网过滤,添加 1 mL 浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 DAPI 染色液,振荡均匀后上机检测。流式数据使用 ModFit LT 3.1 (Inc, Verity Software House) 软件作图。已知二倍体作为对照。

1.2.2 四倍体细胞比例分析 每个叶蓬处随机取三出复叶的中间叶 3 片,每个叶片中部剪取 3 个叶肉组织块制作检测样品。每个样品检测颗粒数不少于 3000 个。数据使用随机自带的 CyView 15 软件进行分析。

1.2.3 基因组 DNA 提取 称取试验材料的嫩叶或须根 300 mg,参照高效植物基因组 DNA 提取试剂盒使用说明提取基因组 DNA。用 1% 的琼脂糖凝胶和 Nanodrop 2000 检测质量和纯度,工作浓度稀释至 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。

1.2.4 SSR 引物筛选及合成 34 对基因性 SSR 引物和 31 对非基因性 SSR 引物随机选取自橡胶树 SSR 引物数据库 (http://mggm-lab.easyomics.org/search/Hevea_brasiliensis.php),预测产物均为三或四碱基

重复基序,长度 200~400 bp。引物由北京睿博兴科生物技术有限公司合成,并在引物 5' 端连接 TAMRA、HEX、AM 或 ROX 荧光标记。

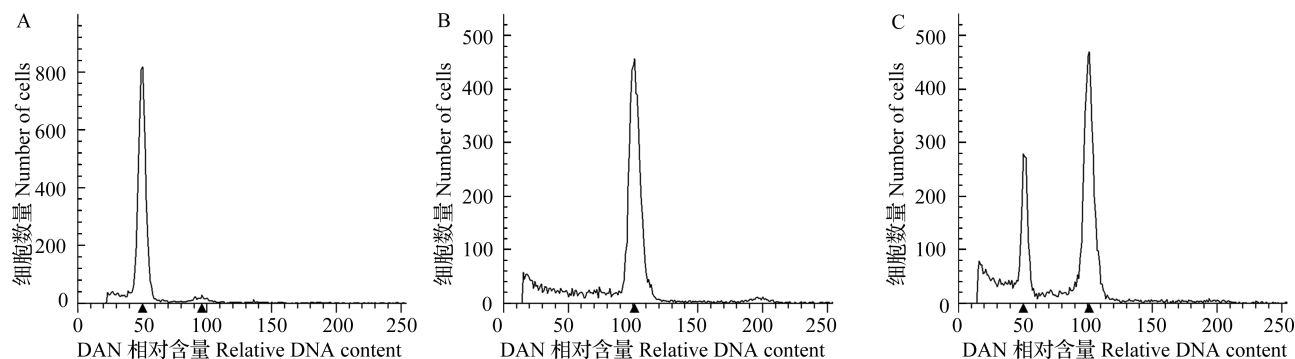
1.2.5 PCR 扩增 反应体系 10.0 μL : DNA 模板 0.5 μL , Taq Plus PCR Master Mix 5.0 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上游引物 0.1 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物 0.1 μL , 无菌水补足 10.0 μL 。扩增程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 50~60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 进行 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.6 毛细管电泳检测和 SSR 分析 4 种 PCR 产物 (分别连接 TAMRA、HEX、FAM 和 ROX 荧光标记) 各 0.3 μL 、分子量内标 0.5 μL 和去离子甲酰胺 9.5 μL 混合后加入 PCR 板, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷却, 于 ABI-3730XL 基因分析仪上检测。检测结果使用 Gene-Marker V2.20 读取分析。

2 结果与分析

2.1 砧木和接穗的倍性

使用流式细胞仪检测嵌合体的砧木 (T1)、四倍体的接穗 (T2) 和嵌合体的接穗 (T3) 的倍性 (图 2)。T1 的 DNA 相对含量为 50 (图 2A), 为二倍体; T2 的 DNA 相对含量为 100 (图 2B), 为四倍体; T3 的 DNA 相对含量在 50 和 100 位置均有波峰 (图 2C), 100 位置的波峰高于 50 位置, 为嵌合体, 且四倍体细胞比例高于二倍体细胞。



A: 嵌合体的二倍体砧木 (T1); B: 四倍体的接穗 (T2); C: 嵌合体的接穗 (T3)
A: Chimeric diploid rootstock (T1), B: Tetraploid scion (T2), C: Chimeric scion (T3)

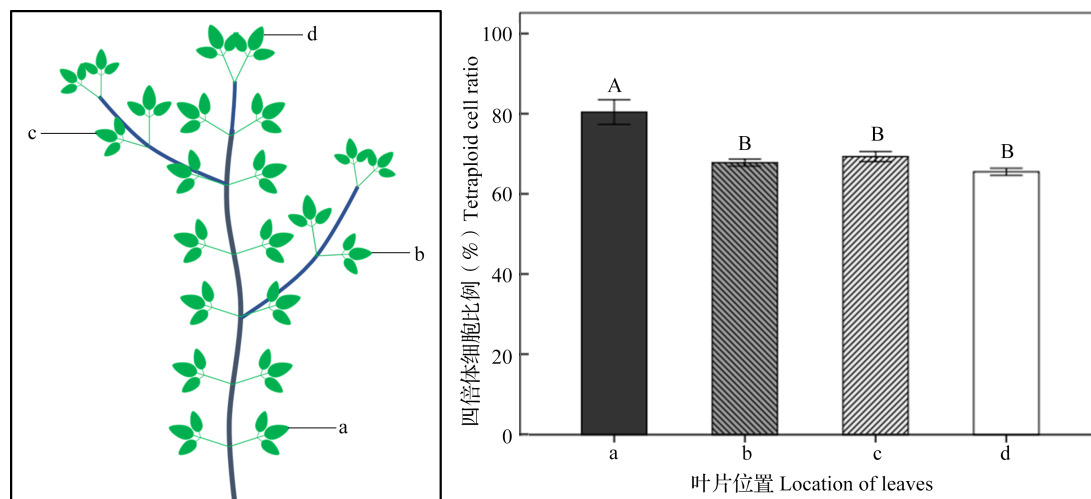
图 2 不同倍性植株流式细胞分析

Fig.2 Flow cytometry analysis of plants of different ploidy levels

2.2 四倍体细胞比例的位置效应

嵌合体植株的第一蓬叶、第三蓬叶位置侧枝上的第一蓬叶、第五蓬叶位置侧枝上的第一蓬叶、顶蓬叶 (第七蓬叶) 的四倍体细胞比例分析结果 (图 3) 显示, 顶蓬叶、第三和第五蓬叶位置侧枝上的第一

蓬叶的四倍体细胞比率分别为 65.58%、67.90% 和 69.39%, 三者之间无显著差异, 但均极显著低于第一蓬叶的 80.50%, 表明嵌合体植株四倍体细胞的比率随着植株的生长而下降, 嵌合体植株中四倍体细胞在与二倍体细胞的竞争中处于劣势。



a: 第一蓬叶; b: 第三蓬叶位置侧枝上的第一蓬叶; c: 第五蓬叶位置侧枝上的第一蓬叶;
d: 顶蓬叶(第七蓬叶)。不同大写字母表示指标间差异极显著 ($P < 0.01$)

a: First leaf layer, b: First leaf layer on lateral branch of the third leaf layer position, c: First leaf layer on lateral branch of the fifth leaf layer position, d: Apical leaf layer (the seventh leaf layer). Different capital letter indicate significant difference between the indicator ($P < 0.01$)

图3 嵌合体植株叶片位置示意图及不同部位的四倍体细胞比例

Fig.3 Schematic diagram of leaf layers and ratios of tetraploid cells in different locations of the chimeric plant

2.3 基因组 DNA 提取结果

3 个供试材料的基因组 DNA 浓度为 154.15~907.25 ng/ μ L, OD260/OD280 为 1.49~1.80, 琼脂糖凝胶电泳检测(图4)表明,提取的基因组 DNA 质量良好,条带完整,可用于后续试验。

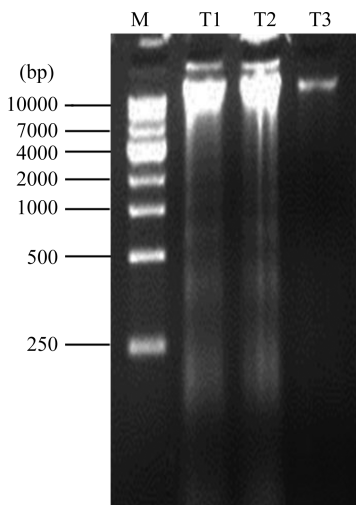


图4 基因组 DNA 电泳结果

Fig.4 Genomic DNA electrophoresis result

2.4 SSR 引物筛选结果

从 65 对引物中筛选出在 T1、T2 和 T3 中有差异条带的 SSR 引物 18 对,其中基因性位点引物 8 对,非基因性位点引物 10 对,总筛出率为 27.69%(表1)。利用 18 对引物对 3 个材料进行 PCR 扩增,共检测出 44 条多态性条带,平均每对引

物扩增出 2.4 个条带,其中 12 个位点有 2 个等位基因,4 个位点有 3 个等位基因,2 个位点有 4 个等位基因。

2.5 嵌合体来源分析

18 对 SSR 引物在 T1 中扩增出 28 个条带,在 T2 和 T3 中扩增出 32 个条带。T2 和 T3 中的条带完全一致,与 T1 相比有 28 个差异条带(图5、表2),表明嵌合体和四倍体的接穗为同一基因型,且和嵌合体的二倍体砧木的基因型不同,说明嵌合体不是由二倍体砧木和四倍体接穗融合发育形成,而是部分四倍体细胞减倍产生二倍体细胞发育而成。

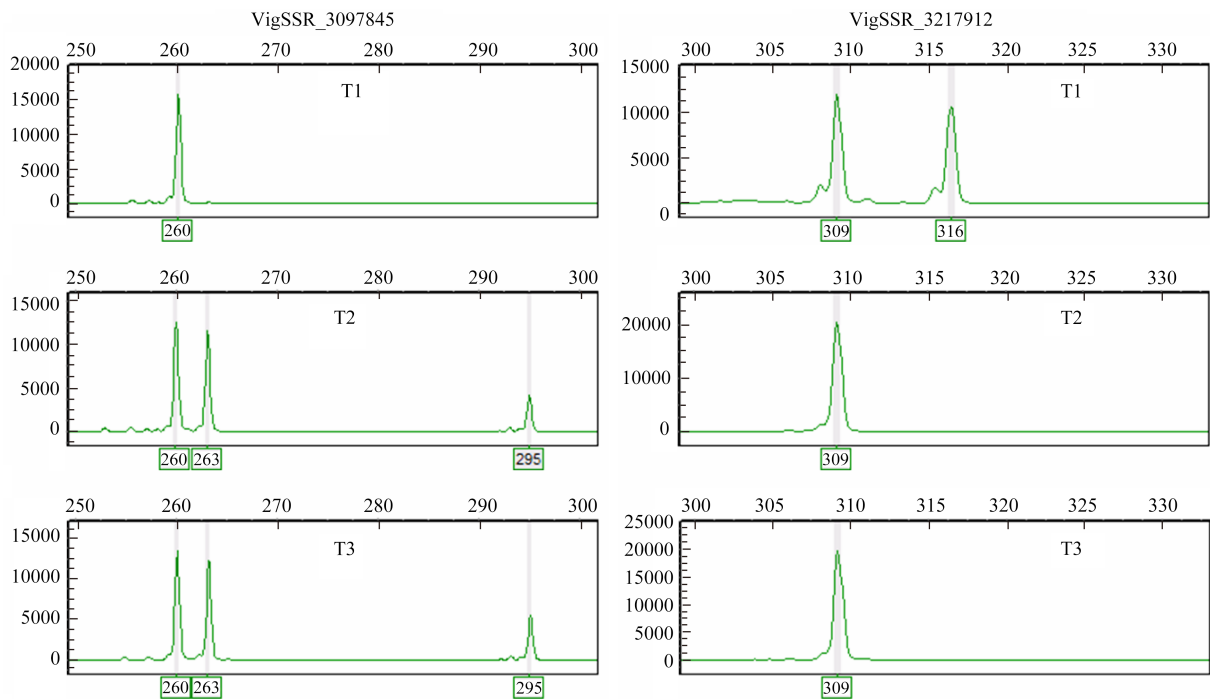
2.6 四倍体来源分析

微卫星 DNA 等位基因计数峰值比率(MAC-PR, microsatellite DNA allele counting-peak ratios)可以鉴定多倍体的等位基因的构型^[14]。本研究 18 个位点中的 1 个位点的 2 个等位基因的计数峰值比率在四倍体和二倍体中有明显差异(图6),二倍体砧木的 2 个等位基因(扩增产物长度为 226 bp 和 300 bp)的峰值为 1:1,假设其基因型为 ab,四倍体中等位基因的峰值为 1:3,即四倍体在该位点的基因型为 abbb。当四倍体来源于 ab 型二倍体的染色体组加倍时,该位点基因型为 aabb,只有当四倍体来源于 ab 和 bb 基因型的配子融合时,才能产生 abbb 型。据此推测,该种质不是二倍体加倍形成的同源四倍体,而是由 ab 和 bb 型未减数配子经有性多倍化途径形成的异源四倍体。

表 1 SSR 引物序列

Table 1 SSR primer sequences

引物编号 Primer ID	正向引物序列 Primer sequence (5' -3') F	反向引物序列 Primer sequence (3' -5') R	重复类型 Repeat type	重复序列 Repeat sequence	差异等位基因数 Number of alleles
VgSSR_3217974	ACCACCAGCTCAAAACCCAA	ACTCGATTTCGAAGCTGGCA	Tri	(TGC) 8	3
VgSSR_3217305	TGCTGATTGTATTGCACCCA	TCAGGCTGCTTTACCTATTCCC	Tri	(TAT) 6	3
VgSSR_3217912	CCACTGTCATGTCATGGGCT	AGGCGTCTCCTTTCTCCTCT	Tri	(TCT) 5	2
VgSSR_3217030	TACTCGCCAACACCACCATC	TGAAGTAGGCGCTTGTAAGGG	Tri	(TAT) 7	2
VgSSR_3217161	GCATTTGCAATGGCCAATGG	AAGTGTCAGATGCGCCGATT	Tri	(AAT) 5	2
VgSSR_3219860	TGCCTAAACCTTCAGGATTCA	GTTGGCCGCTGGAAGTTTTT	Tetra	(AAAG) 5	2
VgSSR_3220502	CATCGCTCTCCCAACACCAT	AAGAGTGGAGGTTGCTCTGC	Tetra	(TTTC) 4	4
VgSSR_3219876	ATGGGTTGCTTGCTTTGCTG	TGAATCTGGGGTTCAACCGG	Tetra	(AACA) 7	4
VigSSR_3098098	AGCTAATGCCCACTTGCCAT	GCCAAGATGTGCTCTTTGT	Tri	(TTC) 8	2
VigSSR_3097924	ATTGAGGTAGGTGGCACTGC	GGGTGGGTCGTTGAAAGAT	Tri	(CTC) 7	2
VigSSR_3097845	TCACGCGGCATCTCTTTTT	ATCCGTATGCCACATCAGCC	Tri	(TTC) 6	3
VigSSR_3097787	CGCTGCATGATGTTAGTGGTG	TCTGCCCTAACCATAACAAGGA	Tri	(ATT) 6	3
VigSSR_3098064	ACAGTGCTTCATACAGGGCC	TCCTTGGGCACACAACCTCA	Tri	(TAT) 5	2
VigSSR_3097897	CCACACCCACTTTTGCCCTTG	AGCTCTTCAAGGGCTTATCTTT	Tri	(AAT) 5	2
VigSSR_3097861	GCACGACCTATTGTGGAGG	TCTCAACTCACATCGAACACA	Tri	(AAG) 5	2
VigSSR_3126413	TGGGTTTCCCTCTCTTGGA	CCTCCCAACGCAATCCTTTC	Tetra	(AATT) 6	2
VigSSR_3126347	AGTAAGTCACACACTACGCA	GCCACGTGTCACCATCTCAT	Tetra	(ATTA) 6	2
VigSSR_3126395	CCTCAAGGCTAATTCGTTGTCG	AGCGGAGTTGCCATTGGTAA	Tetra	(AAAT) 7	2



横坐标为扩增产物长度 (bp), 纵坐标为相对荧光单位。下同

The abscissa is the length of amplification product (bp), and the ordinate is the relative fluorescence unit. The same as below

图 5 嵌合体的砧木 (T1)、四倍体的接穗 (T2) 和嵌合体的接穗 (T3) 差异条带示例

Fig.5 Examples of different bands of chimeric rootstock (T1), tetraploid scion (T2), and chimeric scion (T3)

表 2 引物扩增位点信息
Table 2 Information of primer amplification loci

引物编号 Primer ID	样品编号 Sample ID		
	T1	T2	T3
VgSSR_3217974	/	253	253
	256	/	/
	268	/	/
VgSSR_3217305	291	/	/
	/	312	312
	/	315	315
VgSSR_3217912	309	309	309
	316	/	/
VgSSR_3217030	/	369	369
	375	375	375
VgSSR_3217161	/	347	347
	401	/	/
VgSSR_3219860	218	218	218
	222	/	/
VgSSR_3220502	242	242	242
	250	250	250
	/	252	252
	254	254	254
	312	312	321
VgSSR_3219876	/	328	328
	332	/	/
	340	340	340
	/	220	220
VigSSR_3098098	232	/	/
	241	241	241
VigSSR_3097924	244	/	/
	260	260	260
VigSSR_3097845	/	263	263
	/	296	296
	259	/	/
VigSSR_3097787	265	/	/
	/	267	267
	227	227	227
VigSSR_3098064	299	299	299
	/	335	335
VigSSR_3097897	356	356	356
	/	406	406
VigSSR_3097861	430	430	430
	214	214	214
VigSSR_3126413	218	/	/
	/	202	202
VigSSR_3126347	/	386	386
	/	371	371
VigSSR_3126395	/	379	379
	379	379	379

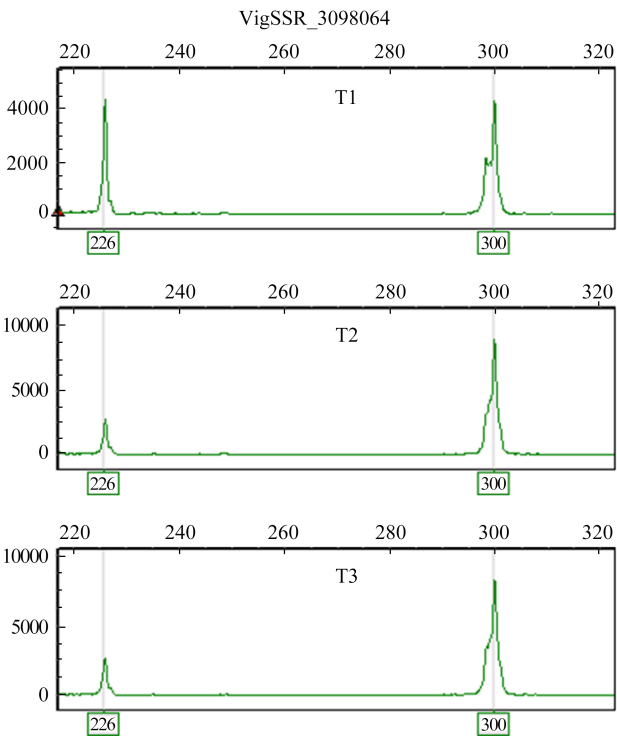


图 6 嵌合体的砧木 (T1)、四倍体的接穗 (T2) 和嵌合体的接穗 (T3) 的扩增产物量差异
Fig.6 Different yields of amplification products of chimeric rootstock (T1), tetraploid scion (T2), and chimeric scion (T3)

3 结论

植物,尤其种间杂合体植物中,存在自发的染色体数目消减现象。如 Sharma 等^[15]在豆科植物中观察到体细胞染色体数目减少现象,在棉花^[16]、小麦^[17]、大麦^[18]的种间杂合体亦发现了减倍现象。本研究中,推测橡胶树天然二四嵌合体是二倍体砧木和四倍体接穗融合发育形成,通过分子标记鉴定嵌合体的基因型同四倍体基因型一致,推翻了原来的假设,并推测嵌合体是由四倍体发生体细胞减倍形成的。分子标记分析同时发现嵌合体的同基因型的四倍体来源于异源 2n 卵细胞和 2n 花粉的融合,为异源四倍体,推测橡胶树四倍体的体细胞减倍现象可能与其为异源四倍体有关。此外,因种质资源保存需要而对接穗的反复截干诱导复萌可能是另一种诱导因素。

关于植物体细胞染色体数目消减现象,目前仅知道物理(辐射)和化学因素、离体培养会诱导其发生,是否有其他影响因素,以及体细胞染色体数目消减的发生机制尚不清楚。尽管如此,利用植物体细胞染色体数目消减现象筛选单倍体,并人工加倍创

制双单体是利用植物减倍现象的一种可能途径。针对远缘杂交不亲和现象,通过人工加倍后杂交获得异源多倍体,再人工诱导异源多倍体减倍创制新的二倍体种质资源,既克服远缘杂交不亲和,又能避免多倍化导致的育性降低,是植物减倍现象的另一种潜在利用途径。

本研究通过 SSR 分子标记鉴定橡胶树四倍体野生种质为天然 2n 雌雄配子经有性多倍化途径形成的异源四倍体,且发生体细胞自然减倍现象产生了嵌合体植株。通过流式细胞术对不同叶蓬的四倍体细胞比例分析,确定部分四倍体细胞自发减倍后,随着植株的发育,四倍体细胞的比例会逐渐下降,推测随着植株的生长,嵌合体植株最终将发育成为二倍体。

参考文献

- [1] Sytnyk K, Vdovychenko Z H, Spyrydonov V, Melnychuk M, Parii M, Zimina O. Somatic segregation: genetic evidences, consequences and applications. *Acta Horticulturae*, 2012, 961: 495-502
- [2] Rana R S. Somatic reduction in an intervarietal hybrid of chrysanthemum. *The Japanese Journal of Genetics*, 1965, 40: 199-201
- [3] Ronchi V N, Giorgetti L, Tonelli M, Martini G. Ploidy reduction and genome segregation in cultured carrot cell lines. I. Prophase chromosome reduction. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1992, 30: 107-114
- [4] Ronchi V N, Giorgetti L, Tonelli M, Martini G. Ploidy reduction and genome segregation in cultured carrot cell lines. II. Somatic meiosis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1992, 30: 115-119
- [5] Giorgetti L, Vergara M R, Evangelista M, Schiavo L F, Terzi M, Ronchi V N. On the occurrence of somatic meiosis in embryogenic carrot cell cultures. *Molecular and General Genetics*, 1995, 246: 657-662
- [6] 顾蔚. 植物激素对蚕豆胚轴愈伤组织染色体加倍和减倍的影响. *陕西师范大学学报: 自然科学版*, 1997, 27(1): 100-102
Gu W. Effect of phytohormone on chromosome polyploidization and haploidization of callus of *Vicia faba*. *Journal of Shaanxi Normal University: Natural Science Edition*, 1997, 27(1): 100-102
- [7] Chen Y, Zhang L, Geng Y, Chen Z. Meiosis-like reduction during somatic embryogenesis of *Arabidopsis thaliana*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2001, 37: 654-657
- [8] Naess S, Swartz H, Baughan G. Ploidy reduction in blackberry. *Euphytica*, 2004, 99(1): 57-73
- [9] Huskins L C. Chromosome multiplication and reduction in somatic tissues. *Nature*, 1948, 161: 80-83
- [10] Huskins L C. Segregation and reduction in somatic tissues. *Journal of Heredity*, 1948, 39: 311-325
- [11] Sanders M E, Franzke C J. Somatic reduction of tetraploid *Sorghum* to diploid mutants following colchicine treatment. *Nature*, 1962, 196: 696-698
- [12] Chen Y, Zhang L, Zhou Y, Geng Y, Chen Z. Inducing somatic meiosis-like reduction at high frequency by caffeine in root-tip cells of *Vicia faba*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2000, 452(1): 67-72
- [13] 张源源, 濮寿琴, 胡彦师, 方家林, 黄肖, 李维国, 黄华孙. 橡胶树种质资源的倍性鉴定. *热带作物学报*, 2020, 41(3): 457-463
Zhang Y Y, Pu S Q, Hu Y S, Fang J L, Huang X, Li W G, Huang H S. Ploidy identification of germplasm resources in *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2020, 41(3): 457-463
- [14] Esselink G D, Nybom H, Vosman B. Assignment of allelic configuration in polyploids using the MAC-PR (microsatellite DNA allele counting-peak ratios) method. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 109: 402-408
- [15] Sharma A K, Bhattacharjee D. Somatic reduction in untreated leguminous plants. *Genetica*, 1953, 26: 410-414
- [16] Brown M S. A case of spontaneous reduction of chromosome number in somatic tissue of cotton. *American Journal of Botany*, 1947, 34: 384-388
- [17] Gernand D, Rutten T, Varshney A, Rubtsova M, Prodanovic S, Brub C, Kumlehn J, Matzk F, Houben A. Uniparental chromosome elimination at mitosis and interphase in wheat and pearl millet crosses involves micronucleus formation, progressive heterochromatinization, and DNA fragmentation. *Plant Cell*, 2005, 17(9): 2431-2438
- [18] Sanei M, Pickering R, Kumke K, Nasuda S, Houben A. Loss of centromeric histone H3 (CENH3) from centromeres precedes uniparental chromosome elimination in interspecific barley hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(33): E498-E505