

# 阳春砂辐射诱变及基于 ISSR 的变异分析

杨锦芬<sup>1</sup>, 刘卉<sup>1</sup>, 彭苑霞<sup>1</sup>, 刘艳<sup>1</sup>, 邹伟权<sup>2</sup>, 詹若挺<sup>1</sup>, 徐晖<sup>1</sup>, 陈蔚文<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心/教育部(省部共建)中药资源科学重点实验室, 广州 510006; <sup>2</sup>广东省辐照技术开发中心, 广州 510642)

**摘要:** 用组织培养结合辐射诱变的方法进行药用植物阳春砂的育种, 对于加快其育种速度、实现高产优质具有重要意义。本研究通过不同浓度的 6-BA 和 NAA 配比筛选阳春砂组织培养不定芽的最适培养基, 再以组培不定芽为材料, 设置不同辐射剂量, 进行<sup>60</sup>Co- $\gamma$  射线辐射诱变; 采用 ISSR 分子标记技术, 对部分诱变材料进行遗传变异分析。结果表明, 添加 4.0mg/L 6-BA 和 0.1mg/L NAA 的 MS 培养基不定芽诱导率和出芽倍数最高, 分别达到 91.4% 和 2.44; 用于阳春砂组培不定芽  $\gamma$  射线辐射的合适剂量为 16Gy; ISSR 分析结果显示, 16Gy 辐照获得的 2 个植株 AV16-1 和 AV16-2 在遗传上发生了明显变异, 与对照的遗传相似系数分别为 0.549 和 0.563。本研究建立了组织培养结合辐射诱变培育阳春砂新种质的方法, 为基于 ISSR 分子标记技术的诱变育种提供了参考。

**关键词:** 阳春砂; 组织培养;  $\gamma$  射线; 辐射诱变; ISSR

## Radiation Mutagenesis of *Amomum villosum* Lour. and its Mutation Analysis Based on ISSR

YANG Jin-fen<sup>1</sup>, LIU Hui<sup>1</sup>, PENG Yuan-xia<sup>1</sup>, LIU Yan<sup>1</sup>, ZOU Wei-quan<sup>2</sup>,  
ZHAN Ruo-ting<sup>1</sup>, XU Hui<sup>1</sup>, CHEN Wei-wen<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Chinese Medicine Resources of Ministry of Education/Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006;

<sup>2</sup>Irradiation Technology Development Center of Guangdong Province, Guangzhou 510642)

**Abstract:** The combinations of different concentrations 6-BA and NAA were used to screen appropriate culture media for adventitious bud induction of *Amomum villosum* Lour. The induced buds were radiated by <sup>60</sup>Co- $\gamma$  ray with different irradiation doses and ISSR molecular marker was used to analyze the genetic diversity of the mutants. The optimum culture medium for adventitious buds induction was MS + 6-BA 4.0mg/L + NAA 0.1mg/L, in which the maximum bud induction rate of 91.4% and multiplication coefficient of 2.44 was attained. The appropriate dose of  $\gamma$ -ray for buds was 16Gy. Two plants irradiated with 16Gy dose, AV16-1 and AV16-2, were mutated according to the genetic similarity coefficients, which were 0.549 and 0.563, respectively. The breeding method of *A. villosum* by combining tissue culture and radiation mutagenesis to generate new germ plasm was established in this research.

**Key words:** *Amomum villosum* Lour.; Tissue culture;  $\gamma$ -ray; Radiant mutagenesis; ISSR

药用植物阳春砂 (*Amomum villosum* Lour.) 是我国著名的“四大南药”之一砂仁的主要来源植物, 产于广东省阳春市的道地药材春砂仁具有很

高的经济价值, 但由于长期无性繁殖造成品种退化, 导致道地产区的阳春砂产量徘徊不前, 阳春砂育种研究亟待进行<sup>[1]</sup>。<sup>60</sup>Co- $\gamma$  射线是辐射诱变育

收稿日期: 2011-11-23 修回日期: 2012-01-03

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAI09B01-06); 广东省高等学校学科建设专项资金科研类项目(粤教科函[2008]3号)

作者简介: 杨锦芬, 副研究员, 主要从事中药生物技术研究。E-mail: yangjf@gzucm.edu.cn

通讯作者: 徐晖, 研究员, 博士生导师, 主要从事药效活性成分及其生物合成研究。E-mail: zyfxsherry@gzucm.edu.cn

陈蔚文, 教授, 博士生导师, 从事中药资源可持续利用研究。E-mail: chenww@gzhtcm.edu.cn

种最主要的诱变因子,不仅在农作物育种中得到广泛应用,在药用植物育种中也有成功的例子,如红花、长春花、白术等<sup>[2-4]</sup>。组织培养材料繁殖系数高,且对辐射敏感,变异率高,将组织培养技术与辐射诱变技术结合应用可提高育种效率<sup>[5-6]</sup>。唐宁<sup>[6]</sup>通过组织培养快速获得白术四倍体,并用<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 射线辐射诱变获得变异植株,检测结果表明初步优选出的白术辐射诱变株系中白术内酯 I、III 的含量均高于或接近于对照。用组织培养结合辐射诱变的方法<sup>[7]</sup>加快阳春砂育种速度,培育阳春砂新种质,对于实现阳春砂的高产优质具有重要意义,而相关研究未见报道。

ISSR(Inter-simple Sequence Repeat,简单重复序列间区)标记技术已被广泛应用于种质资源遗传多样性分析及品种鉴定<sup>[8-10]</sup>。在辐射诱变后代的遗传变异分析中,ISSR 标记技术也得到有效应用,如王文恩等<sup>[11]</sup>用 ISSR 分析了狗牙根辐射诱变后代的变异植株,发现形态变异植株与对照之间的遗传差异性明显,筛选出一个变异新株系。本研究进行组织培养结合辐射诱变培育阳春砂新种质的探索,并对诱变材料进行 ISSR 分析,为阳春砂的辐射诱变育种奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织培养

**1.1.1 材料** 8 月中下旬收集于广东省阳春市的阳春砂成熟新鲜果实,经阳春市砂仁示范试验场苏景场长鉴定。

**1.1.2 药品**  $\alpha$ -萘乙酸(NAA, naphthalene acetic acid)、6-苄基腺嘌呤(6-BA, 6-benzylamino-purine)购于上海伯奥生物技术公司。

**1.1.3 种子培育无菌苗** 手工剥去果皮,取出种子,用湿沙磨去种子表面果肉,于自然条件下阴干,4℃保存备用。参照文献<sup>[12]</sup>的方法进行种子播种前的处理和培养,待种子发芽后,转入 MS 培养基中继续培养,获得无菌苗。

**1.1.4 不定芽诱导** 诱导培养基以 MS 为基本培养基,分别添加 1~4mg/L 的 6-BA、0.1 或 0.2mg/L 的 NAA,以不添加任何激素的培养基为对照,均添加蔗糖 30g/L、琼脂粉 8g/L, pH 值为 5.8。经无菌操作将无菌苗带节茎基部(约 5mm)切下,接种于诱导培养基上,每个处理接种 20~40 个外植体。培养温度 26±2℃,光照强度 1600lx,照光 12h/d。培养 50d 后统计最终出芽情况,不定芽诱导率 =

(产生不定芽的外植体个数/总外植体个数) × 100%;出芽倍数 = 不定芽总数/产生不定芽的外植体数。

**1.1.5 植株再生** 培养 50d 后,将已生根长叶的再生幼苗转入 MS 培养基中,培养温度 26±2℃,光照强度 1600lx,光照 14h/d,培养约 30d 后长成具 7 片真叶以上的植株。开瓶炼苗 2~3d 后移栽至育苗盆中。

### 1.2 <sup>60</sup>Co- $\gamma$ 射线辐射诱变

**1.2.1 辐射剂量** 以广东省辐照技术开发中心的<sup>60</sup>Co 为辐射源,剂量率为 1.57Gy/min,预试验以 4、8、12、16Gy 进行辐照,根据预试验结果,再设置 3 个剂量 16、20、24Gy 进行辐照。

**1.2.2 辐照方法** 以长度小于 10mm 的组培不定芽为材料进行辐照,以未经辐照而其余处理相同的组培不定芽为对照,每组 12 个。辐照完毕后在添加 3.0mg/L 6-BA 和 0.1mg/L NAA 的 MS 培养基中培养,培养条件同 1.1.5。培养 10d 后将不定芽转至 MS 培养基中再生植株。辐照 90d 后统计各辐照剂量组培不定芽再生幼苗的存活率和生根率,以不长根且茎叶俱黄记为死亡;测量幼苗高度,进行矮化定级,以植株高度小于 4cm 为 I 级矮化,小于 2cm 为 II 级矮化,统计矮化率。

**1.2.3 数据计算** 存活率 = (存活的不定芽个数/总不定芽个数) × 100%;生根率 = (生根的不定芽个数/总不定芽个数) × 100%;矮化率 = (矮化的再生苗个数/总再生苗个数) × 100%。

### 1.3 ISSR 分析

**1.3.1 材料** 选择 12Gy 和 16Gy 剂量辐射获得的矮化盆栽苗各 5 株及未经辐照的对照 1 株,分别编号为 AV12-1~AV12-5、AV16-1~AV16-5 和 AV0。

**1.3.2 ISSR 引物** 根据文献<sup>[13]</sup>报道的阳春砂 ISSR 分子标记的 10 条引物,经预试验筛选其中多态性较好,条带清晰且重复性好的 8 条引物用于正式试验。引物编号、序列分别为:(1) UBC807:(AG)8T;(2) UBC808:(AG)8C;(3) UBC811:(GA)8C;(4) UBC818:(CA)8G;(5) UBC835:(AG)8C;(6) UBC836:(AG)8YA;(7) UBC840:(GA)8YT;(8) UBC842:(GA)8YG;其中 Y=C/T。以上引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

**1.3.3 试剂盒** 植物基因组 DNA 小量提取试剂盒(离心柱型)购自天根(Tiangen)公司, Premix Ex Taq 试剂盒购自宝生物工程公司。

**1.3.4 阳春砂总 DNA 的提取及 ISSR-PCR** 参照

试剂盒说明书进行总 DNA 的提取,以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测其纯度及浓度。PCR 反应体系:总体积 25 $\mu$ l, 包含 12.5 $\mu$ l Premix Ex *Taq*, 20 ng 模板 DNA, 1 $\mu$ l ISSR 引物(10 $\mu$ mmol/L)。PCR 程序同文献[13]。10 $\mu$ l PCR 产物在 1 $\times$ TAE 缓冲条件下进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,110V 恒压电泳 1 h, Gold-view 染色,凝胶成像系统拍照记录。

**1.3.5 数据处理** 将电泳图谱上清晰可见且重复出现条带(明带和暗带)的记为 1,同一位置没有出现条带的记为 0,从而生成由 1 和 0 组成的 ISSR 表型数据矩阵。统计每条引物扩增出的总带数和多态性带数,计算多态性位点百分率  $p = (k/n) \times 100\%$  ( $k$  是多态性位点数目, $n$  是所测位点总数)。采用 NTSYS-pc version 2.10e 软件计算样品间的 Nei&L 遗传相似系数,非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means,UPGMA)构建聚类树状图。

## 2 结果与分析

### 2.1 阳春砂组织培养不定芽的诱导及再生

阳春砂无菌苗带节茎基部在培养约 4d 后开始出芽,约 30d 后分化出 1~4 个芽(图 1)。接种 50d 后统计不同激素组合下的不定芽最终诱导率和出芽倍数,结果如图 2 所示。阳春砂带节茎基部在不添加外源激素的条件下也能分化出芽,6-BA 和 NAA 的配合使用提高了不定芽的诱导率和出芽倍数。以添加 4.0mg/L 6-BA 和 0.1mg/L NAA 的培养基的不定芽诱导率和出芽倍数最高,分别达到 91.4% 和 2.44,是对照的 1.4 倍和 1.8 倍。当 NAA 浓度为 0.1mg/L 时,不定芽诱导率和出芽倍数均随着 6-BA 浓度的增加而升高;当 NAA 浓度为 0.2mg 时,不定芽诱导率在 6-BA 浓度为 3.0mg/L 时达到峰值,随后下降,而出芽倍数则随着 6-BA 浓度的增加而升高。当 6-BA 浓度为 4.0mg/L 时,不定芽再生幼苗随着培养时间的延长,出现部分黄苗。综合以上结果,添加 4.0mg/L 6-BA 和 0.1mg/L NAA 的 MS 培养基不定芽诱导率和出芽倍数最高,可快速获得具有直接再生植株能力的不定芽,在不定芽出芽后可降低 6-BA 浓度至 3.0mg/L 以减少黄苗产生。

由不定芽再生的阳春砂幼苗在无激素的 MS 培养基中就可长根,无需添加激素诱导,炼苗后盆栽幼苗的存活率达 100%。

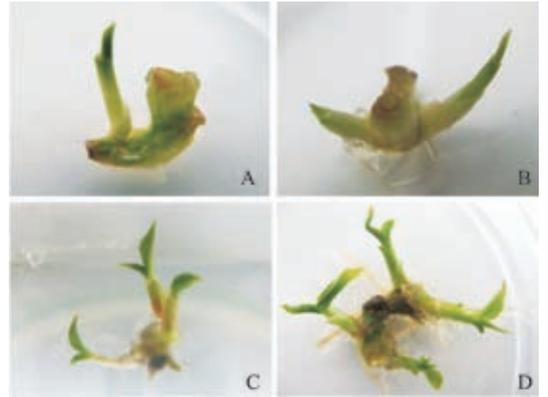


图 1 外植体分化出芽

Fig. 1 Adventitious buds differentiating from explants

A, B, C 和 D 分别为 1 个外植体诱导出 1 个、2 个、3 个和 4 个芽

A, B, C and D indicated one, two, three, and four buds differentiated from individual explant, respectively

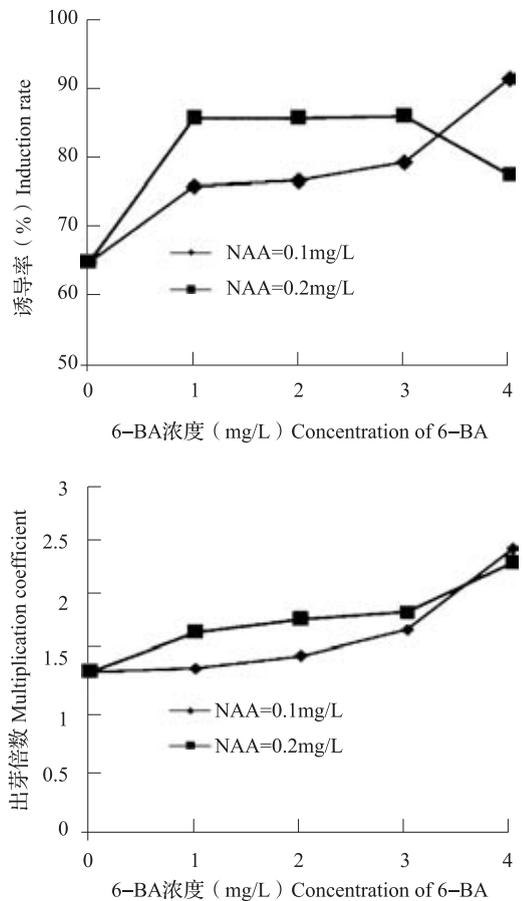


图 2 不同激素组合下的不定芽诱导率和出芽倍数

Fig. 2 Induction rate and multiplication coefficient of adventitious buds under different hormone combination

### 2.2 不定芽<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 射线辐射诱变

以阳春砂组培不定芽为材料进行了<sup>60</sup>Co- $\gamma$  射线

辐射诱变, 预试验获得的不定芽再生幼苗生长受到抑制, 但未明显致死, 正式试验提高剂量, 设置 16、20 和 24Gy 3 个剂量组, 辐照结果显示辐射处理显著降低了不定芽再生幼苗的存活率和生根率, 随着辐射剂量的提高, 存活率和生根率呈下降趋势(图 3)。20 及 24Gy 处理的再生幼苗根粗短, 不具备正常生理功能, 随着培养时间的延长(100d 后), 幼苗均停止生长, 未获得盆栽苗。最终结果表明 20 及 24Gy 辐射剂量偏高, 不适用于阳春砂不定芽的辐射育种。

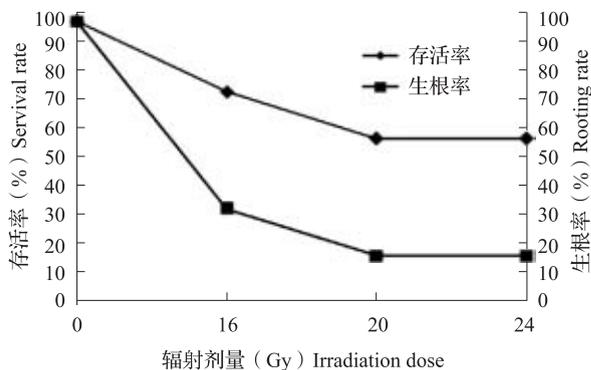


图 3  $\gamma$  射线辐射对不定芽存活率及生根率的影响

Fig. 3 Influence of  $\gamma$ -ray on the survival rate and rooting rate of the buds

经  $\gamma$  射线辐射的不定芽再生幼苗发生明显矮化, II 级矮化率随着辐射剂量的提高呈升高趋势(图 4)。不定芽辐射处理 80d 后观察, 对照组的植株平均高度达到 9.5cm, 叶形正常、叶色浓绿且能正常生根, 而 16、20 和 24Gy 处理过的不定芽大部分再生幼苗均出现了明显的植株矮化, 同时还有叶片发黄卷曲、叶形不对称、生根受抑制等现象。部分幼苗如图 5 所示。

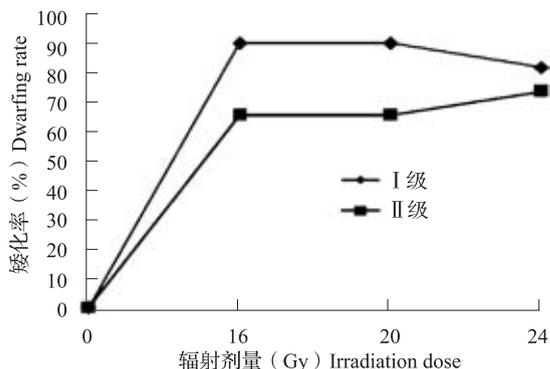


图 4 辐射不定芽再生幼苗矮化率

Fig. 4 Dwarfing rate of the seedlings regenerated from irradiated buds

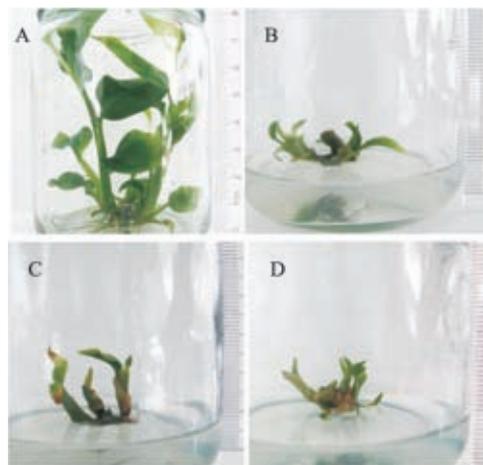


图 5 辐射不定芽再生幼苗及其对照

Fig. 5 Seedlings regenerated from irradiated and unirradiated buds

A, B, C 和 D 分别为对照、16Gy、20Gy 和 24Gy 辐射不定芽再生幼苗

A, B, C, and D indicated seedlings

regenerated from unirradiated buds and buds irradiated under 16Gy, 20Gy, and 24Gy, respectively

### 2.3 基于 ISSR 的辐射材料遗传变异分析

对供试的 11 个样品进行 ISSR-PCR, 结果见表 1, 8 条引物共扩增出 71 条带, 平均每条引物可扩增 9 条带, 其中多态性条带占 70.3%。部分引物扩增效果见图 6, 扩增的谱带分子量在 300 ~ 2200bp, 各表 1 8 条 ISSR 引物扩增多态性分析

Table 1 Analysis of amplification polymorphism of eight ISSR primers

引物 Primers	总条带 Total bands	多态性条带 Polymorphism bands	多态率(%) Polymorphism percent
BUC807	13	9	69.2
BUC808	7	6	85.7
BUC811	6	4	66.7
BUC818	9	6	66.7
BUC835	6	4	84.6
BUC836	13	11	72.7
BUC840	11	8	72.7
BUC842	5	2	40.0
总数	71	50	70.3
平均	9	6	

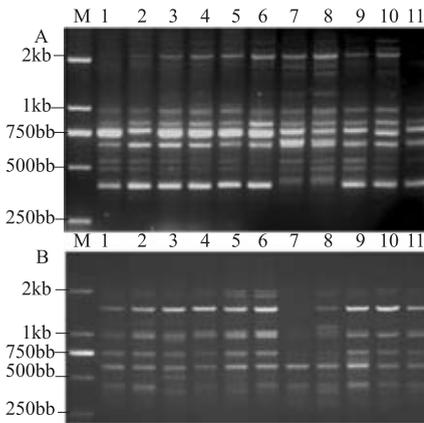


图 6 部分引物 ISSR-PCR 电泳图

Fig. 6 Electrophoretograms of ISSR-PCR with partial primers

M: DNA Marker DL2000; 1: 对照 AV0; 2 ~ 6: 12Gy 辐照材料 AV12-1、AV12-2、AV12-3、AV12-4、AV12-5; 7 ~ 11: 16Gy 辐照材料 AV16-1、AV16-2、AV16-3、AV16-4、AV16-5。A 和 B 分别为以引物 UBC807 和 UBC840 进行的 ISSR-PCR 电泳图

M: DNA Marker DL2000; 1: unirradiated control AV0; 2 ~ 6: samples irradiated with 12Gy  $^{60}\text{Co-}\gamma$ , AV12-1, AV12-2, AV12-3, AV12-4 and AV12-5, respectively; 7 ~ 11: samples irradiated with 16Gy  $^{60}\text{Co-}\gamma$ , AV16-1, AV16-2, AV16-3, AV16-4, and AV16-5, respectively. A and B are electrophoretograms of ISSR-PCR with primers UBC807 and UBC840, respectively

表 2 不同样品间的遗传相似系数

Table 2 Genetic similarity coefficients of different samples

编号 No.	AV0	AV12-1	AV12-2	AV12-3	AV12-4	AV12-5	AV16-1	AV16-2	AV16-3	AV16-4	AV16-5
AV0	1.000										
AV12-1	0.817	1.000									
AV12-2	0.761	0.831	1.000								
AV12-3	0.761	0.803	0.690	1.000							
AV12-4	0.803	0.817	0.817	0.732	1.000						
AV12-5	0.831	0.845	0.817	0.789	0.859	1.000					
AV16-1	0.549	0.479	0.507	0.563	0.493	0.578	1.000				
AV16-2	0.563	0.521	0.549	0.577	0.535	0.620	0.958	1.000			
AV16-3	0.817	0.775	0.746	0.746	0.817	0.704	0.507	0.521	1.000		
AV16-4	0.746	0.789	0.761	0.676	0.775	0.831	0.521	0.535	0.761	1.000	
AV16-5	0.789	0.831	0.718	0.803	0.789	0.732	0.507	0.549	0.859	0.704	1.000

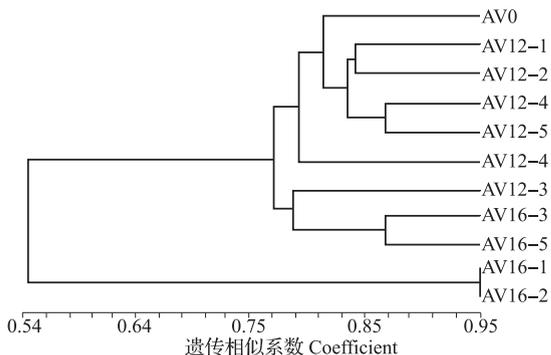


图 7 基于 ISSR 标记构建的不同样品 UPGMA 聚类树

Fig. 7 UPGMA dendrogram of different samples based on ISSR marker

引物扩增位点数相差较大,其中引物 BUC807 和 UBC836 扩增的条带数最多,而扩增条带多态率最高的是引物 UBC808。

根据 ISSR-PCR 结果,采用 NTSYS-pc version 2.10e 软件计算出各样品间的遗传相似系数(表 2)。辐射剂量为 12Gy 时,样品与对照 AV0 的遗传相似系数平均为 0.795;辐射剂量为 16Gy 时,样品与对照的遗传相似系数平均为 0.693,表明  $^{60}\text{Co-}\gamma$  射线辐射诱变造成了阳春砂遗传变异,且遗传变异的程度与辐射剂量存在量效关系。辐射剂量为 12Gy 的样品间的平均遗传相似系数为 0.824,而辐射剂量为 16Gy 的样品间的平均遗传相似系数为 0.623,其中,AV16-1、AV16-2 不管与对照,还是与 12Gy 辐照样品或 16Gy 辐照的其他样品间的遗传相似系数均明显偏小,说明这两个样品的遗传变异最明显,同时表明辐射对阳春砂遗传变异的影响存在个体差异。从聚类树状图(图 7)中也可看出,其他辐照样品与对照 AV0 均能明显区分,但仍聚为一大类,而 AV16-1 和 AV16-2 单独聚为一支,变异最明显。

### 3 讨论

以阳春砂实生苗的根茎芽为外植体进行组织快繁已获得成功<sup>[14-15]</sup>,以其无菌苗茎段诱导愈伤组织也能获得再生植株<sup>[16]</sup>,但上述方法存在外植体易污染、褐化、繁殖效率较低或生长周期较长、再生困难等问题。本研究以种子培育的无菌苗带节茎基部为外植体,在添加 4.0mg/L 6-BA 和 0.1mg/L NAA 的条件下,可快速获得大量可直接再生植株的不定芽,并可在芽分化期进行辐射诱变等育种操作。本研究还发现 MS + 6-BA 4.0mg/L + NAA 0.1mg/L 的培养基虽然不定芽诱导率和出芽倍数最高,但随着培养

时间的延长出现黄苗,与刘进平<sup>[15]</sup>在阳春砂微繁殖中发现的高浓度 6-BA (5.0mg/L) 所致黄苗现象相似。故在需要快繁时,可先用高浓度 6-BA 进行前期诱导,当分化出芽后降低 6-BA 浓度继续培养。

<sup>60</sup>Co- $\gamma$  射线应用于药用植物的育种已有报道<sup>[2-4]</sup>,本研究以组培不定芽为材料进行了<sup>60</sup>Co- $\gamma$  射线辐射诱变,预试验低剂量组未明显致死,高剂量组辐射后的不定芽再生幼苗生长受到明显抑制,大部分出现了矮化和叶片变异现象,根据存活率和生根率综合判断  $\gamma$  射线对阳春砂不定芽的合适辐射剂量为 16Gy。ISSR 分子标记技术是从 DNA 水平快速鉴定是否变异的有效方法,可排除形态或生理生化性状筛选产生的假突变体<sup>[11]</sup>。本研究选取了 12Gy 和 16Gy 辐照的诱变材料进行了基于 ISSR 的遗传变异分析,发现辐射诱变确实引起了阳春砂的遗传变异,其中植株 AV16-1 和 AV16-2 作为新种质的突变最为明显。虽然 ISSR 分析可在诱变育种早期筛选出突变体,但本研究的 ISSR 分析结果仅提供了变异是否明显的证据,尚不能据此判断变异的优劣。其他的诱变材料在 ISSR 分析水平上的变异虽不如 AV16-1 和 AV16-2 明显,但可能存在潜在的有利变异,也是后续研究的重要材料。本研究对辐射诱变材料的 ISSR 分析为后续育种过程筛选阳春砂优良性状的分子标记奠定了基础。

本课题组在前期研究中以阳春砂种子和实生苗根茎芽为材料进行了<sup>60</sup>Co- $\gamma$  射线诱变,对诱变后的材料也进行了 ISSR 分析,但未发现遗传变异<sup>[17]</sup>,而本研究对阳春砂组培不定芽辐射材料的 ISSR 分析则发现了明显的变异,证明阳春砂组培不定芽对<sup>60</sup>Co- $\gamma$  射线的敏感性高于种子和根茎芽,与前人的研究一致<sup>[6]</sup>。

本研究初步建立了组织培养结合辐射诱变培育阳春砂新种质的方法,为阳春砂育种提供了更丰富的遗传资源。优良品种的选育最终还须以产量、药

效品质等性状为判别指标。由于阳春砂生长周期长,需定植 3 年以上才进入花果期,本研究未能对变异材料的产量和药效品质等性状进行比较,其后代的遗传稳定性也有待考察。

致谢:感谢阳春市砂仁试验示范场苏景场长在阳春砂果实收集方面提供的帮助。

#### 参考文献

- [1] 陈蔚文,徐鸿华.岭南道地药材研究[M].广州:广东科技出版社,2007:33
- [2] 牛世杰,闫文蓉,王霞,等.<sup>60</sup>Co- $\gamma$  射线对红花生长及生理状况的影响[J].中国中药杂志,2009,23(2):214-216
- [3] 赵剑,李建国.<sup>60</sup>Co- $\gamma$  射线辐射诱变提高长春花生物碱含量[J].分子植物育种,2009,7(3):607-611
- [4] 唐宁.白术辐射诱变育种研究[J].安徽农学通报,2007,13(23):84-85
- [5] 杨再强,王立新.观赏植物辐射诱变育种研究进展[J].四川林业科技,2006,27(3):19
- [6] 唐宁.白术辐射诱变株系中白术内酯 I、III 的含量测定[J].安徽农学通报,2009,15(1):45
- [7] 洪亚辉,朱兆海,黄璜,等.菊花组织培养与辐射诱变的研究[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2003,29(6):457-461
- [8] 高山,林碧英,许端祥,等.苦瓜种质遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 分析[J].植物遗传资源学报,2010,11(1):78-83
- [9] 孙芳,杨敏生,张军,等.刺槐不同居群遗传多样性的 ISSR 分析[J].植物遗传资源学报,2009,10(1):91-96
- [10] Lin X C, Lou Y F, Liu J, et al. Crossbreeding of *Phyllostachys* species (Poaceae) and identification of their hybrids using ISSR markers [J]. Genet Mol Res, 2010, 9(3): 1398-1404
- [11] 王文恩,包满珠,张俊卫,等.狗牙根辐射诱变后代变异植株的形态特征比较和 ISSR 分析[J].草业科学,2009,26(12):139-145
- [12] 刘艳,杨锦芬,何瑞,等.不同发芽条件对阳春砂种子发芽的影响[J].广州中医药大学学报,2010,27(4):399-402
- [13] 黄琼林,杨锦芬,詹若挺,等.基于 ISSR 分析的阳春砂分子鉴别[J].中药新药与临床药理,2010,21(5):518-521
- [14] 贺红,刘婷娜.阳春砂的组织培养与植株再生[J].植物生理学通讯,2005,41(1):57
- [15] 刘进平.阳春砂仁微繁殖技术研究[J].亚热带植物科学,2004,33(3):37-38,33
- [16] 张雅明,董燕,周联,等.阳春砂愈伤组织诱导与植株再生[J].广州中医药大学学报,2007,24(1):66-68
- [17] 刘艳.阳春砂组织培养与辐射诱变育种的初步研究[D].广州:广州中医药大学,2010