

傅 冰. SCAR 标记在地木耳菌株分类鉴定中的运用[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(9): 64–66, 74.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.018

# SCAR 标记在地木耳菌株分类鉴定中的运用

傅 冰

(丽水职业技术学院, 浙江丽水 323000)

**摘要:**基于相关序列扩增多态性(sequence related amplified polymorphism, SRAP)建立地木耳菌株的特定序列扩增(sequence characterized amplified regions, SCAR)标记。通过随机引物组合筛选获得 EM18–ME7 作为 SRAP 标记引物, 扩增地木耳基因组后获得 1.2 kb 大小的特异性条带, 经克隆、测序, 根据测序结果利用 Primer 5.0 软件设计出 2 对特异性引物, 其中引物 F–9–F1、F–9–R1 经 SCAR–PCR 扩增出约 1.1 kb 大小的特异性片段, 说明成功构建了“菌株 3”的指纹图谱。

**关键词:**SRAP; SCAR; 地木耳; 分类鉴定; 指纹图谱; 快速鉴定; 种质资源分类

**中图分类号:**S646.602 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)09-0064-03

地木耳(*Nostoc commune* Vauch)俗称地皮菜、地耳、地软、地衣、地捡皮等, 是一种固氮型蓝细菌, 属细菌界蓝细菌门念珠蓝细菌属光能自养微生物, 在全国广泛分布, 特别适宜在潮湿阴暗处生长。地木耳富含蛋白质、多糖、维生素等, 特别是蛋白质含量占干质量的 20% 以上, 营养价值极高<sup>[1-2]</sup>, 中国多地均有将其入菜的习惯。已有研究发现, 地木耳提取物还具有一定的抗氧化、抑菌以及提高免疫力的功效, 甚至具有抑制老年痴呆以及抗肿瘤的功效, 《本草纲目》《中国药典》亦记载了地木耳的药用价值<sup>[3-4]</sup>。这主要是由于地木耳中的黄酮、多糖、藻蓝蛋白等活性成分在起作用, 研究人员分别对这些物质的理化性质及分离提取进行了研究。刁毅等发现从地木耳中提取的脂溶性物质对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等 6 种细菌有较好的抑制作用<sup>[5]</sup>; 钱森和等研究同样证明了地木耳提取物对常见微生物具有较好的抑制作用<sup>[6]</sup>。张唐伟等通过研究地木耳多糖的抗氧化作用, 发现其对·OH、DPPH 自由基有较强的清除作用, 但对 O<sub>2</sub><sup>·-</sup> 和亚硝酸盐的清除作用较小; 同样, 该研究也发现, 地木耳多糖对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌等微生物有一定的抑制作用<sup>[4]</sup>。Ploutno 等发现, 地木耳的活性物质具有抑制人鼻咽癌及直肠癌肿瘤细胞的效果<sup>[7-8]</sup>。张唐伟等采用 L<sub>9</sub> 正交试验研究时间、液料比、温度对地木耳多糖提取的影响, 得到最佳提取工艺: 控制温度为 90 ℃、液料比 60 mL:1 g 的条件提取 5 次, 提取时间为 3 h, 得率可达 13.75%<sup>[9]</sup>。厉荣玉等通过研究得到地木耳总黄酮提取的最佳工艺: 控制温度为 80 ℃、乙醇浓度为 70%、料液比为 1 g:20 mL 的条件下提取 2 次, 提取时间为 2.5 h, 得率可达 6.84%<sup>[10]</sup>。梁文裕建立了通过盐析、离子交换层析、凝胶过滤层析的分离纯化地木耳藻蓝蛋白 α、β 亚基的程序<sup>[11]</sup>。李三相等利用羟基磷灰石的柱层析以及盐析、透析的方法分离得到地木耳的藻蓝蛋白<sup>[12]</sup>。

由此可见, 地木耳是一种很好的食品开发资源。李贤煜等研发出普通型地木耳蛋白饮料、酸性地木耳蛋白饮料 2 种配方<sup>[13]</sup>; 张宗舟开发了辣味地木耳酱, 具有口味好、营养价值高等特点<sup>[14]</sup>。

地木耳虽然分布广泛, 但是对生长环境要求较为严苛, 野生资源难以满足市场需求, 阻碍了其大规模开发。因此, 部分学者对地木耳的人工栽培进行了研究。王东明等通过研究打浆后的地木耳在一定条件下的栽培情况发现, 浆体所含的片段可逐渐恢复生长<sup>[2]</sup>。邓中洋等研究跑道式培养池规模化培养地木耳结果表明: 在适宜条件下, 可以实现地木耳的人工栽培<sup>[15]</sup>。同时, 利用地木耳对环境因素敏感的特点, 地木耳可以运用到环境污染的监测中。杨学山等利用地木耳挂袋法监测大气 SO<sub>2</sub> 污染<sup>[16]</sup>; 马骥等利用地木耳的 pH 值监测大气污染的试验<sup>[17]</sup>均证明此观点。

目前, 地木耳在分子标记方面的研究很少, 仅有赵惠玲等利用随机引物及简单重复序列区间(ISSR)引物初步研究地木耳的分子生物学特性<sup>[18]</sup>。特定序列扩增(sequence characterized amplified regions, SCAR)分子标记有别于传统的分子标记技术, 具有遗传一致、序列已知、高效且重复性好等特点, 已经广泛运用到黑木耳<sup>[19]</sup>、棉花<sup>[20]</sup>、草鱼<sup>[21]</sup>等抗病育种以及分类鉴定中。本研究拟通过基于相关序列扩增多态性(sequence related amplified polymorphism, SRAP)分子标记的 SCAR 标记技术建立地木耳菌株的指纹图谱, 为地木耳菌株的快速鉴别、种质资源分类等提供便利。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 地木耳菌株 供试地木耳菌株由丽水职业技术学院王东明老师提供, 共 10 株, 具体特征见表 1。

### 1.1.2 仪器与试剂

1.1.2.1 仪器 Eppendorf Mastercycler personal PCR 仪, 德国; WEALTEC Dolphin–DOC 凝胶成像系统, 美国; DK–S24 电热恒温水浴锅, 中国; HERMLEZ 300 K 高速冷冻离心机, 德国; SHIMADZU Corporation UV–1700 紫外分光光度计, 日本。

收稿日期: 2016–03–30

基金项目: 浙江省教育厅一般项目(编号: Y201432313)。

作者简介: 傅 冰(1982—), 男, 浙江松阳人, 硕士研究生, 主要从事生物化学与分子生物学研究。E–mail: 41891514@qq.com。

表 1 供试菌株特征

菌株编号	特征 (颜色、形态)	菌株编号	特征 (颜色、形态)
1	黑色、球状	2	绿色、小球状
3	绿色、球状	4	红棕色、球状
5	绿色、带状	6	黑色、小球状
7	棕色、小球状	8	绿色、大块状
9	黑色、耳状	10	黄色、块状

1.1.2.2 试剂 DNA Marker;Trans 2k,北京全式金生物技术有限公司;EasyPure® Genomic DNA Kit 试剂盒,北京全式金生物技术有限公司;Taq 酶;EasyTaq,北京全式金生物技术有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 地木耳基因组的提取 用 EasyPure® Genomic DNA Kit 试剂盒提取地木耳基因组,用琼脂糖凝胶电泳及 UV - 1700 紫外分光光度计检测 DNA 的浓度及质量。

1.2.2 SRAP - PCR 反应体系及程序 参照李媛媛等研究<sup>[19,22]</sup>,设计地木耳 SRAP - PCR 扩增体系及程序,经实际验证后,确定扩增体系:2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、100 μmol/L dNTPs、0.8 U Taq 酶、40 ng DNA、2 μL 10 × Reaction buffer、0.3 μmol/L 上游引物、0.3 μmol/L 下游引物,用无菌蒸馏水将总体积补至 20 μL。SRAP - PCR 扩增程序:94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,36 ℃ 1 min(退火温度视引物 T<sub>m</sub> 值而定),72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 10 min;4 ℃ 保存。

1.2.3 引物筛选 SRAP 引物序列见表 2、表 3,引物由北京全式金生物技术有限公司合成。随机组合正、反向引物对地木耳基因组进行 PCR 扩增,筛选出能扩增出特异性条带的引物组合。

表 2 正向引物序列

编号	序列 (5'→3')	编号	序列 (5'→3')
Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC
Me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	Me4	TGAGTCCAAACCGGACC
Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	Me6	TGAGTCCAAACCGGTAA
Me7	TGAGTCCAAACCGGTCC	Me8	TGAGTCCAAACCGGTGC
Me9	TGAGTCCAAACCGGTCA		

表 3 反向引物序列

编号	序列 (5'→3')	编号	序列 (5'→3')
Em1	GACTGCGACGAATTAAT	Em2	GACTGCGACGAATTTGC
Em3	GACTGCGACGAATTGAC	Em4	GACTGCGACGAATTTGA
Em5	GACTGCGACGAATTAAC	Em6	GACTGCGACGAATTGCA
Em7	GACTGCGACGAATTCAA	Em8	GACTGCGACGAATTAGC
Em9	GACTGCGACGAATTACG	Em10	GACTGCGACGAATTTAG
Em11	GACTGCGACGAATTTTCG	Em12	GACTGCGACGAATTTGTC
Em13	GACTGCGACGAATTGGT	Em14	GACTGCGACGAATTCAG
Em15	GACTGCGACGAATTCGT	Em16	GACTGCGACGAATTCGG
Em17	GACTGCGACGAATTCCA	Em18	GACTGCGACGAATTTCC

1.2.4 SCAR 特异性条带测序及引物设计 利用筛选出的引物组合扩增 10 个地木耳基因组 DNA,选择明亮、清晰的特异性条带进行胶回收、克隆并测序。根据测序结果,用

Primer - 5.0 软件设计特异性引物转化生成 SCAR 标记。

1.2.5 SCAR 标记的建立 利用获得的 SCAR 标记扩增 10 个地木耳基因组,验证所获得的 SCAR 标记。参考丁炜东等研究<sup>[21,23]</sup>,优化地木耳 SCAR - PCR 反应体系:2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、120 μmol/L dNTPs、1.0 U Taq 酶、40 ng DNA、2 μL 10 × Reaction buffer,各 0.4 μmol/L 上下游引物,补水至总体积为 20 μL。优化后的程序:94 ℃ 5 min;94 ℃ 45 s,61 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,共 35 个循环;72 ℃ 10 min;4 ℃ 保存。

2 结果与分析

2.1 引物组合的筛选

随机组合表 2、表 3 中的正反向引物,以菌株 1 基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增并电泳检测,结果见图 1。从中筛选出能扩增出条带较多且清晰、明亮的一系列引物组合:EM6 - ME5、EM18 - ME8、EM18 - ME7、EM12 - ME7、EM15 - ME9。

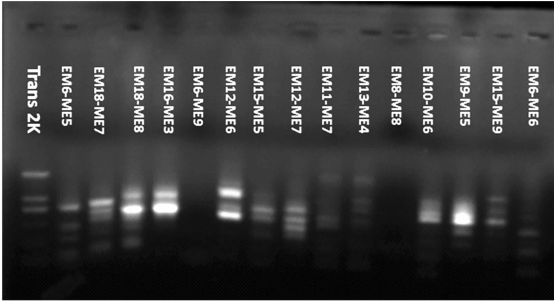


图 1 引物组合筛选电泳结果

2.2 特异性条带的筛选及测序

进一步利用所筛选的引物组合对 10 株菌株的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,最终筛选出能扩增出特异性条带的引物组合 EM18 - ME7。利用筛选出的引物组合 EM18 - ME7 进行 SCAR - PCR 扩增,扩增结果见图 2。在扩增出的位点(DNA 条带)中,挑选出 1 个条带清晰、明亮且特异性明显的 DNA 扩增位点(1.2 kb),胶回收后交予南京百斯凯科技有限公司测序,成功获得 1 个序列,详见图 3,该序列长度共计 1 211 bp。

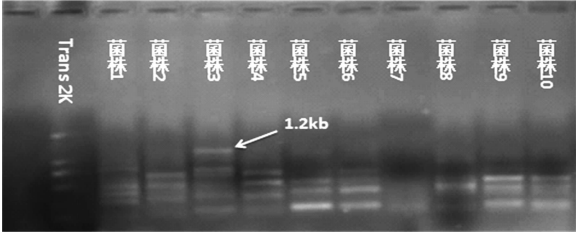


图 2 EM18-ME7 扩增结果

2.3 SCAR 特异性引物的设计与合成

根据测序结果,利用 Primer 5.0 软件设计 2 对特异性引物。引物组合 1:F - 9 - F1,5' - GTATGTACTGAGTAGAGCC - 3';F - 9 - R1,5' - TGATCCATTGACATGGCGTC - 3'。引物组合 2:F - 9 - F2,5' - GCAACGAAGTTGATTGCCTC - 3';F - 9 - R2,5' - TGACTGACAAGTACT GAGC - 3'。

2.4 SCAR 标记的建立

分别利用 2 对引物对 10 个供试菌株的基因组进行 PCR

GACTGCGACGAATTCTTGATGTGCGCTTACCCCTTTTGAAGAGCGGCTTGATTTGTATGTACTGAGTAGT  
AGCCGCTCACCAGGTGCAAGGGTGCTTTGGCGATGAACCAAGAACAATTCGGTGTCACCTCTGGCAAC  
 5'-GAAGTGTATGCTCTATTGACTCGTGGAAACTGCGATTTCTTCTCAATGGTCGAACCCGAGTGAA  
 AAGCCTGCCAGAGTCTACAGCGACCCAGCGACCATGTGATCTTCTGGCGGCTGGTATCTCCATTGTTACCC  
 GTCTTTTAGGCGGACGTGTAGATAGTTGATCGACGCCCGGGTTTGGATGGGGCTCGATGCGCTGCCGTACTT  
 CCCCAGAATAATTCTGGCTGGGCCAAACGTGTGTATGTCGCTAGCAGCTACATATTGGCTGAATGCGGGACC  
 ATTTTCATCCTCTGCGGGGAGCGCGAGCCAAAGCTGAAACCCCGAACACCGGACCTTCCGGAGGCCACC  
 GGTGTGCCAGACATCGTTTCCGGCCTGCATCCATTCCGCTCCGCTTCTCAAGAATTCCTGAGGCTCCAGT  
 GCTGTCTCATAGGTACGCGACCTTCAAGTATTACCGTCAATGTGGCGATTCGGAATGGGGGTGCATCCC  
 AAAAAAGCCCCATCCGATTAGAGATGAAAAATCGTCAAGAAAGATAAACGGCTTGATGAGGCGGCCAC  
 ATCGCCTGGGCTCATAAGCCGCGTGATAGTCCATGGACCTGGCCATTGGTACGGAAGCGGACTTCCCGAGG  
 CACAGTTCTCTGGAGCAGGAGCGTTGCCGACGGTATCTAATAAATCTAAGCTCATGACAATACCCTTAAC  
 TGAATGAAACGTGTGAAGCCAAAGTACCGAGCGATGACCTGCAGTGTCTAGCTAAAGTTGCTTCAGTT  
 CGGGCTGATACGAGAAGCTTGAAGCAATATCTGAATGGTATGGACTGGACCACTCAGGCGGAAGCCTATATA  
 TTTAGATGACACCTATCAGAAAGACCGATACATGCTTGACGCCATGTCAATGGATCAGCTGCGCACCTTCAT  
 TGCCGCGGCAGAGGAGGGAGTTTTCGCGCGCAGGCGGGAAGCTCAACGCGGCTCAGTCAGTTGTCAGTCA  
 AACTCTCGCAATCTTGAATGCAGGTGCGCTTTTCCCTTTTGTATAGGACCGGTTTGGACTCA-3'

加框部分表示 SRAP (EM18-ME7) 引物; 单下划线表示引物组合 1; 双下划线表示引物组合 2

图3 特异性条带测序结果

扩增, 其中引物组合 F-9-F1、F-9-R1 成功在泳道“菌株 3”中扩增出 1 条 1.1 kb 的特异性条带(图 4), 说明成功构建了“菌株 3”的指纹图谱; 而 F-9-F2 与 F-9-R2 组合未能扩增出 SCAR 标记。

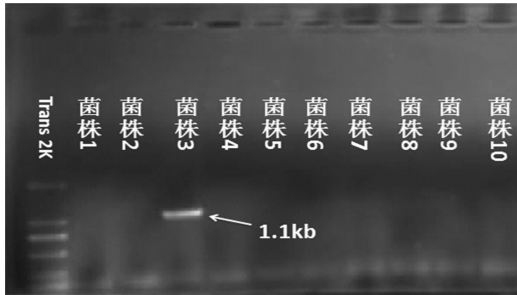


图4 F-9-F1/F-9-R1引物扩增结果

### 3 结果与讨论

本研究随机组合 SRAP 引物, 对 10 个地木耳基因组进行 SRAP-PCR, 筛选获得能扩增出特异性条带的引物组合 EM18-ME7, 进一步通过 PCR 获得 1 条 1.2 kb 的特异性条带, 经胶回收、克隆及测序后, 利用 Primer 5.0 软件设计 2 对特异性引物: F-9-F1, F-9-R1; F-9-F2, F-9-R2, 通过 SCAR-PCR 扩增 10 个地木耳基因组, 其中引物组合 F-9-F1, F-9-R1 在“菌株 3”处成功扩增出 1 条 1.1 kb 的特异性条带, 说明 SCAR 标记转化成功, 并成功构建了其指纹图谱, 证明该方法是鉴定地木耳种内、种间差异的有效手段。

目前, 有些文献资料把地木耳归为植物, 有些将其归为微生物, 但根据其细胞结构<sup>[24]</sup> 应属原核微生物, 因此认为其归属细菌界蓝细菌门念珠蓝细菌属光能自养微生物更为科学。在 SCAR 标记转化过程中, 经常会出现转化不成功现象, 究其原因可能是引物设计不合理、序列相似或者多拷贝以及甲基化作用等<sup>[25]</sup>, 甚至 PCR 反应条件也会影响最终结果。本研究设计了 2 对特异性引物, 最终仅 F-9-F1/F-9-R1 引物组合成功转化成 SCAR 标记, 可能在引物设计及反应条件上出现了问题。

随着地木耳经济价值的日渐显现, 相信对于地木耳的研究将更加深入, 本研究结果将为地木耳的抗病筛选、遗传育种以及分类鉴定等提供一定的理论依据。

### 参考文献:

- [1] 范群艳, 吴向阳, 仰榴青, 等. 地木耳的研究进展[J]. 常熟理工学院学报, 2007, 21(4): 55-59.
- [2] 王东明, 陈彪彪, 徐丹晔. 地木耳可栽培性能试验初报[J]. 南方农业学报, 2014, 45(11): 2014-2019.
- [3] 盛家荣, 范会钦, 曾令辉. 普通念珠藻的主要营养成分分析[J]. 广西师范学院学报: 自然科学版, 1998, 15(4): 68-70.
- [4] 张唐伟, 杨乐, 柳青海, 等. 地木耳多糖的抗氧化性与抑菌作用[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(6): 868-873.
- [5] 刁毅, 杨足君. 地木耳粗脂肪抗氧化活性[J]. 生物技术通报, 2013(12): 68-72.
- [6] 钱森和, 厉荣玉, 魏明, 等. 地木耳提取物对几种常见微生物的抑菌研究[J]. 湖南农业科学, 2011(17): 15-17, 21.
- [7] Ploutno A, Carmeli S. Modified peptides from a water bloom of the cyanobacterium *Nostoc* sp. [J]. Tetrahedron, 2002, 58(50): 9949-9957.
- [8] Golakoti T, Yoshida W Y, Chaganty S, et al. Isolation and structure determination of nostocyclopeptides A1 and A2 from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc* sp. ATCC53789 [J]. Journal of Natural Products, 2001, 64(1): 54-59.
- [9] 张唐伟, 李天才. 地木耳多糖的提取工艺研究[J]. 光谱实验室, 2011, 28(1): 144-148.
- [10] 厉荣玉, 钱森和, 董群, 等. 地木耳总黄酮提取及抑菌作用[J]. 皖南医学院学报, 2012, 31(3): 186-190.
- [11] 梁文裕. 地木耳藻蓝蛋白  $\alpha$  和  $\beta$  亚基分离纯化的研究[J]. 西北农业学报, 2007, 16(6): 113-116.
- [12] 李三相, 张海林, 杨亚军. 地木耳中藻蓝蛋白的分离与纯化[J]. 天水师范学院学报, 2008, 28(2): 38-39.
- [13] 李贤煜, 李砧, 冯佳, 等. 地木耳蛋白质饮料的研制[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(3): 1498-1500.
- [14] 张宗舟. 地木耳辣酱生产技术[J]. 农业科技通讯, 2000(1): 23-23.
- [15] 邓中洋, 胡征宇, 况琪军, 等. 地木耳规模化培养的初步研究[J]. 武汉植物学研究, 2004, 22(6): 578-580.
- [16] 杨学山, 王勋陵. 地木耳挂袋法监测大气  $\text{SO}_2$  污染的可行性研究[J]. 西北植物学报, 1994, 14(6): 70-75.

棚栽培 6 个月 after 多糖含量为 9.69%, 而二倍体苗在大棚栽培 6 个月 after 多糖含量仅为 8.77%, 可见在相同栽培环境下, 多倍体植株栽培 6 个月 after 多糖含量高于二倍体植株。由此可知, 多倍体金线莲的多糖含量高于二倍体植株, 得出多倍体苗多糖含量高于二倍体植株, 这与多倍体营养成分增加的特点一致, 多倍体瓶苗多糖含量高于二倍体瓶苗, 这与 Olimpienko 等研究发现四倍体铁皮石斛的可溶性糖含量高于二倍体的研究结果<sup>[27]</sup>一致。

测得二倍体苗、多倍体苗总黄酮含量分别从 1.17%、1.24% 上升到 1.27%、1.38%。得出多倍体苗总黄酮含量高于二倍体植株, 这进一步证明了多倍体营养成分增加的特点, 测得大棚栽培 6 个月的二倍体栽培苗、多倍体栽培苗总黄酮含量分别为 1.47%、1.92%, 栽培 6 个月时多倍体植株多糖、总黄酮含量高于二倍体植株(多倍体苗总黄酮含量接近野生苗的 1.97 倍)。对赤壁金线莲组培苗和栽培苗进行总黄酮含量的测定, 发现其均含有黄酮类物质, 这与曾建军等研究认为金线莲组培苗富含黄酮类物质的报道<sup>[8]</sup>一致。组培苗黄酮含量随着培养时间延长而增多, 移栽后总黄酮含量进一步增加, 黄酮是植物体内的次生代谢产物, 其含量变化受外界条件影响, 如光照刺激等对其合成有帮助<sup>[28-29]</sup>。将金线莲移栽到光照等条件较好的外界环境中, 有利于黄酮积累。

#### 参考文献:

- [1] 陈 裕, 林坤瑞. 金线莲生长发育与光照强度关系[J]. 福建热作科技, 1996, 2(4): 22-23.
- [2] 蔡文燕, 肖华山, 范秀珍. 金线莲研究进展[J]. 亚热带植物科学, 2003, 32(3): 68-72.
- [3] 王建国, 王松良, 詹巧杰, 等. 金线莲组织培养的条件优化研究[J]. 中国现代中药, 2013, 15(1): 45-49.
- [4] 黄 勇. 金线莲组织培养新体系建立及优化[J]. 北方园艺, 2010(13): 178-179.
- [5] 黄德贵, 陈振东. 金线莲组织培养与人工栽植研究: 无菌外植体建立技术和配方[J]. 福建热作科技, 1993(3): 11-14.
- [6] 武振华, 牛炳韬, 王新宇. 药用植物染色体加倍的研究进展[J]. 西北植物学报, 2005, 25(12): 2569-2574.
- [7] 周玉美, 陈 丽, 崔永一, 等. 台湾金线莲(*Anoectochilus formosanus*)快繁体系的构建[J]. 东北林业大学学报, 2009, 37(12): 43-47.
- [8] 曾建军, 李 军, 李晓红, 等. 金线莲增殖培养研究[J]. 井冈山大学学报: 自然科学版, 2013, 34(3): 34-36.
- [9] 郝丽丽, 乙 引, 申 刚, 等. 金线莲腋芽增殖培养条件的优化[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(7): 18-19.
- [10] 林兰英, 陈 钢, 王建勤. 金线莲组织培养中若干因素的研究[J]. 亚热带植物通讯, 1993, 22(2): 7-11.
- [11] 江建铭. 一种药用金线莲组织培养一步成苗快速繁殖: 中国, 200810059233.3[P]. 2008-07-09.
- [12] 何云芳, 杨 霞, 余有祥. 金线莲组培快繁技术[J]. 浙江林学院学报, 1999, 16(2): 170.
- [13] 张 铁, 田雪琪, 李 彬. 滇越金线莲快速繁殖技术研究[J]. 文山师范高等专科学校学报, 2006, 19(3): 110-114.
- [14] Chandler C K, Lyrene P M. Relationship between guard cell length and ploidy in *vaccinium*[J]. HortScience, 1982, 17(1): 53-54.
- [15] Singsit C, Ozias-Akins P. Rapid estimation of ploidy levels in *in vitro*-regenerated interspecific *Arachis* hybrids and fertile triploids[J]. Euphytica, 1992, 64(3): 183-188.
- [16] Ho I, Wan Y, Widho L M, et al. The use of stomatal chloroplast number for rapid determination of ploidy level in maize[J]. Plant Breeding, 1990, 105(3): 229-233.
- [17] 张凌媛, 郭启高, 李晓林, 等. 枇杷气孔保卫细胞叶绿体数目与倍性相关性研究[J]. 果树学报, 2005, 22(3): 229-233.
- [18] 曾雅娟, 肖华山, 黄代青. 金线莲染色体核型分析[J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2001, 17(4): 118-120.
- [19] 邵果园, 梁国鲁. 黄色马蹄莲多倍体诱导研究[J]. 浙江林学院学报, 2008, 25(5): 630-634.
- [20] 邵果园, 胡冬南, 徐荣华, 等. 美丽胡枝子多倍体诱导的初步研究[J]. 江西农业大学学报: 自然科学版, 2007, 29(1): 81-84.
- [21] 池 坚, 席梦利, 张 静, 等. 东方百合 *Siberia* 多倍体诱导及其细胞学鉴定[J]. 分子植物育种, 2008, 6(2): 291-296.
- [22] 蔡文燕, 吴水金, 潘一山. 金线莲多倍体诱导的初步研究[J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2010, 35(1): 90-93.
- [23] 王丽芳, 黄 建, 林 霞. 秋水仙素离体诱导金线莲多倍体的研究[J]. 浙江农业学报, 2010, 22(6): 760-763.
- [24] 陈 裕, 林坤瑞, 管其宽, 等. 金线莲生物学特性及生境特点的研究[J]. 亚热带植物科学, 1994, 23(1): 18-24.
- [25] 黄慧莲, 刘贤旺, 吴祥松, 等. 金线莲试管苗移栽试验研究[J]. 江西科学, 2001, 19(1): 52-54.
- [26] 胥雪峰. 金线莲的种苗繁育及栽培技术的研究栽培技术的研究[D]. 延吉: 延边大学, 2007.
- [27] Olimpienko G S, Pavlova N A. Characteristics of the distant of gamma-irradiation of seeds for diploid and poly-ploidy plants[J]. Radiacionnaya Biologiya Radioekologiya, 1995, 35(4): 518.
- [28] 吴玉香, 贺润丽, 高建平, 等. 刺果甘草多倍体诱变育种的研究[J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2004, 24(2): 116-117, 129.
- [29] 吕世民, 梁可钧, 葛传吉. 怀牛膝多倍体育种的研究[J]. 中药通报, 1988, 13(7): 11-13.
- [30] 丁炜东, 曹丽萍, 曹哲明. 草鱼种质相关 SRAP 及 SCAR 的分子标记[J]. 动物学报, 2008, 54(3): 475-481.
- [31] 傅 冰, 洪 震, 刘跃钧, 等. 蓝莓 SRAP-PCR 反应体系的建立和优化及其遗传多样性分析[J]. 北方园艺, 2013(17): 95-99.
- [32] 李秋芳, 魏 来, 吕 晶, 等. SCAR 分子标记对水貂食毛症遗传病因的初步研究[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(7): 939-945.
- [33] 闫桂琴, 桂 枝, 杜红红. 地木耳细胞生物学特征初探[J]. 山西师范大学学报: 自然科学版, 1998, 12(1): 53-56.
- [34] 孙保娟, 李植良, 黎振兴, 等. SCAR 标记转化失败的原因和对策[J]. 分子植物育种, 2010, 8(3): 589-594.

(上接第 66 页)

- [17] 马 骥, 王勋陵. 地木耳 pH 值监测大气污染的定量化研究[J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 1996(4): 120-121.
- [18] 赵惠玲, 王 青, 李 砧. 地木耳分子生物学特性初步探究[J]. 农产品加工·学刊, 2010(9): 16-19.
- [19] 李媛媛, 隋玉龙, 牛淑力, 等. SCAR 标记在黑木耳栽培菌株分类鉴定中的应用[J]. 菌物研究, 2013, 11(3): 182-185, 189.
- [20] 林忠旭, 张献龙, 聂以春, 等. 棉花 SRAP 遗传连锁图构建[J]. 科学通报, 2003, 48(15): 1676-1679.