

栓皮栎胚性组织低温保存技术研究

冀智清, 张存旭*, 张昌胜, 李 慧, 张文辉

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

摘 要:采用玻璃化法超低温保存栓皮栎胚性组织,不同因子对细胞存活的影响。研究结果表明,冻前保护剂浓度、预冷天数对解冻后材料的存活有很大影响,冷冻防护剂的处理时间及解冻方式对材料冻存后能否成活起到关键作用。材料在继代培养 10 d 时转至含 6%二甲亚砜(DMSO)的 MS 增殖培养基上,5℃下预培养 3 d,用 60%PVS2 处理 20 min,100%PVS2 于 0℃处理 30 min,换新鲜 PVS2 溶液,迅速投入液氮保存,于 40℃水浴中迅速化冻,冻后再培养时,细胞能恢复生长。

关键词:栓皮栎;胚性组织;玻璃化法;超低温保存

中图分类号:S792.18 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2012)06-0088-05

Cryopreservation of Embryogenic Tissues in *Quercus variabilis*

Ji Zhi-qing, ZHANG Cun-xu*, ZHANG Chang-sheng, LI Hui, ZHANG Wen-hui

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Effects of vitrification and cryopreservation on the preservation of embryogenic tissues in *Quercus variabilis* were investigated. Different factors involved in the preservation on cells viability were studied. The results showed that the viability of cryopreserved materials was affected by the concentration of cryoprotectant and the treatment time. The cryoprotectant treatment time and the melting methods were very important to the survival of cryopreserved materials. The materials were percultured for 3 days at 5 °C on the MS medium that contained 6% DMSO after subculturing for 10 days, used 60% PVS2 to treat 20 min and 100% PVS2 to treat 30 min at 0 °C, then, put into liquid nitrogen rapidly after changing the solution with fresh PVS2, cultured on the MS medium after melting at 40 °C water bath, and the cells could resume growth.

Key words: *Quercus variabilis*; embryogenic tissue; vitrification; cryopreservation

栓皮栎(*Quercus variabilis*) 属于壳斗科(Fagaceae)栎属(*Quercus*)植物,是我国重要的生态造林树种^[1]。栓皮栎通常采用种子繁殖,由于橡实象鼻虫的侵害和种子不能较长时间贮藏,且扦插繁殖困难,影响了优良基因型的推广利用。近年来开展了栓皮栎组织培养无性快繁技术的研究,并取得了一定进展^[2-5]。但传统的组培材料保存需要经常继代,耗费大量人力、物力,而且易污染和变异。超低温保存能保持植物遗传稳定性,是用于细胞系、分生组织和愈伤组织材料长期保存的较好方法^[6],但用

传统的保存方法冻存材料或组织后,结果只是部分材料存活或冻存后材料不易存活^[7]。近几年发展较快的玻璃化冻存法克服了传统离体保存的困难及传统超低温保存的局限性,该法具有设备简单、操作简便和冻存效果好等优点,并在保存器官和组织水平的结构完整性方面有很好的效果^[8]。本文以栓皮栎的胚性愈伤组织为对象,研究玻璃化冻存法中各因素对细胞存活的影响,以期建立栓皮栎胚性组织超低温保存体系奠定基础。

收稿日期:2011-12-21 修回日期:2012-07-19

基金项目:林业公益性行业专项(21004011);西北农林科技大学唐仲英育种基金(2009)。

作者简介:冀智清,女,在读硕士,研究方向:园林植物育种。E-mail: glodmm-7888@163.com

* 通信作者:张存旭,男,副教授,主要研究方向:林木遗传育种和林木生物技术。E-mail: cxzhang@nw. suaf. edu. cn

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为栓皮栎的胚性组织。从天然栓皮栎林中的优树采取未成熟合子胚,在无菌条件下剥取合子胚,撕掉膜质种皮,将裸露的合子胚向下接种于诱导培养基 $MS+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 2,4-D}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ PVP}+3.0\%\text{ 蔗糖}+0.6\%\text{ 琼脂}$ 上诱导胚性组织,然后转接于增殖培养基 $MS+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+0.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}+200.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ CH}+400.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Glu}+3\%\text{ 糖}+0.6\%\text{ 琼脂}$ 上进行增殖培养。

1.2 方法

1.2.1 预培养 选择由一个合子胚来源的生长优良的胚性愈伤组织,继代培养 10 d 后转接到附加二甲基砒(DMSO)浓度分别为 3%、4%、5%、6%、7%与 8%的增殖培养基中,每个 DMSO 浓度接种 6 瓶,每瓶 5 块(5 mm×5 mm),在 5℃ 低温下预培养,分别于 0~5 d 时每天取不同 DMSO 浓度下的材料各 1 瓶。在无菌操作台上进行 2PVS2 玻璃化溶液处理 20 min, PVS2 于 0℃ 下停留 40 min 及液氮 24 h 冷冻后,采用氯化三苯四氮唑(TTC)法来检测细胞存活率^[9]。

细胞存活率=(处理后细胞的 TTC 值/未处理细胞的 TTC 值)×100%

1.2.2 组织玻璃化处理 确定最佳的 DMSO 浓度及培养天数后,将材料移入 5 mL 冻存管中,每管含有 0.15 g 胚性愈伤组织。于常温下用相应温度的 60%的 2PVS2 玻璃化溶液分别处理 0、10、20、30 min 与 40 min;移去 2PVS2 溶液,加入 0℃ 的 PVS2 保护剂于 0℃ 下停留 0、10、20、30、40 min 与 50 min。迅速将冻存管投入液氮中保存。经冻存后每周用 TTC 法检测细胞活力,共检测 5 次,以确定最佳处理时间。

PVS2 溶液的组成:300 mL·L⁻¹甘油+150 mL·L⁻¹乙二醇+150 mL·L⁻¹DMSO+0.4 mol·L⁻¹蔗糖;2PVS2 溶液的组成:0.15 mol·L⁻¹蔗糖液体培养基与 PVS2 溶液以体积比 40:60 配制。2 种溶液(pH 5.8)在 121℃ 高温下灭菌 20 min。

1.2.3 解冻 愈伤组织材料经最佳玻璃化处理后迅速投入液氮(LN)保存 24 h,然后分别于 30℃、40℃ 与 50℃ 温水浴中,室温下,自来水流水冲洗下进行解冻。用 TTC 法检测细胞活力,确定最佳解冻方式。

1.2.4 冻存时间 经最佳玻璃化处理后的胚性愈

伤组织迅速投入液氮分别保存 0、1、2、3、4 周与 5 周,并于 40℃ 温水浴中解冻。后用 TTC 法来检测细胞存活率。

1.2.5 洗涤 冻存管中的冰解冻后,迅速弃 PVS2,先用 1.2 mol·L⁻¹蔗糖液+MS 基本培养基的洗涤液洗涤,轻轻摇动,弃培养液,再用同样培养液洗涤 2 次,每次 10 min。用 TTC 法来检测细胞存活率。

1.2.6 恢复生长 洗涤后无菌条件下吸去材料表面液体转接于增殖培养基中恢复生长,每 5 d 观察 1 次愈伤组织生长状况,同时统计 1 次愈伤组织的存活率(以愈伤组织的块数计算)。

1.3 数据处理

细胞 TTC 值测定均重复 3 次,采用 SPSS12.0 统计分析软件对试验数据进行分析,采用 Duncan's 检验法进行差异性分析。

2 结果与分析

2.1 预培养时间和冷冻保护剂对细胞存活率的影响

栓皮栎胚性愈伤组织长至 10 d 后,采用 MS 增殖培养基附加不同浓度 DMSO,在 5℃ 冰箱中预培养。TTC 法检测结果(表 1)表明,6% DMSO 处理的存活率较高且较稳定。在同一 DMSO 浓度下,不同的处理时间对细胞存活率具有不同影响;在 6 种不同 DMSO 浓度处理下,均表现为预处理 3 d 的细胞存活率最高。未经预培养的愈伤组织抗冻能力较差,细胞存活率低,随着预培养天数及 DMSO 浓度的增加其细胞存活率逐渐上升,在预培养 3 d、DM-SO 浓度达到 6%时细胞存活率最高,抗冻效果最好;之后随着天数及 DMSO 浓度的增加细胞存活率逐渐下降,到 5 d 时细胞活力降至经过处理后的最低值,但细胞活力仍比未经过处理时要高。因此最佳的预处理方式为在 6% DMSO 浓度处理下培养 3 d,细胞存活率高达 82.77%。

2.2 2PVS2 处理时间对细胞存活率的影响

随着 2PVS2 处理时间的延长,细胞存活率呈先升高后降低的趋势,在 20 min 时为最高,达到 79.09%(图 1),因此 2PVS2 的适宜处理时间为 20 min。

2.3 PVS2 脱水时间对细胞存活率的影响

栓皮栎胚性愈伤组织于 5℃ 冰箱中,在附加 6% 二甲基砒的增殖培养基中预培养 3 d,于无菌条件下 2PVS2 常温装载 20 min 后,0℃ 下用 PVS2 平衡 0、10、20、30、40 min 与 50 min 移去原液,装入新鲜的 PVS2 迅速将冷冻管投入液氮中保存,结果如图 2

所示。随着时间的延长,曲线是先升高后下降,在 30 min 处细胞存活率达最高($p<0.05$),说明脱水

时间为 30 min 时愈伤组织冻存效果最好。

表 1 预培养和 DMSO 浓度对细胞存活率的影响

Table 1 Effects of pre-culture and DMSO concentration on the cell survival rate

天数/d	DMSO 浓度/%					
	3	4	5	6	7	8
0	22.05±8.68bB	35.07±3.11aD	34.14±3.96abD	36.80±3.65aD	30.42±6.61abD	27.63±9.75abD
1	29.49±1.73dB	40.78±3.15bD	40.12±3.43bcD	49.42±3.85aC	38.26±5.01bcBC	34.01±2.82cdABC
2	31.35±6.80bAB	64.17±4.42aB	63.37±5.76aB	65.90±1.66aB	39.19±3.52bB	37.59±2.84bAB
3	40.25±2.84cA	81.58±5.09aA	80.65±1.54aA	82.77±3.33aA	52.74±2.08bA	43.31±3.43cA
4	31.61±3.68cAB	52.61±2.28aC	51.15±3.26aC	53.01±1.49aC	48.49±1.02aA	40.52±5.13bA
5	22.45±1.76bB	38.92±1.32aD	34.94±3.77abD	39.85±1.50aD	31.22±3.81bcCD	28.82±0.58cBC

注:小写字母代表每一行中不同 DMSO 浓度处理差异显著($p<0.05$);大写字母代表每一列中不同天数处理差异显著($p<0.05$)。

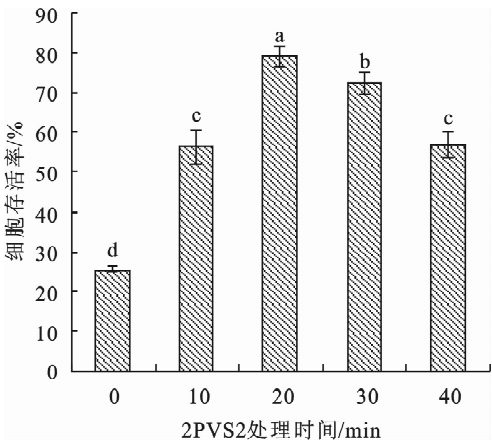


图 1 2PVS2 不同处理时间对细胞存活率的影响

Fig. 1 Effects of different 2PVS2 treatment times on the cell survival rates

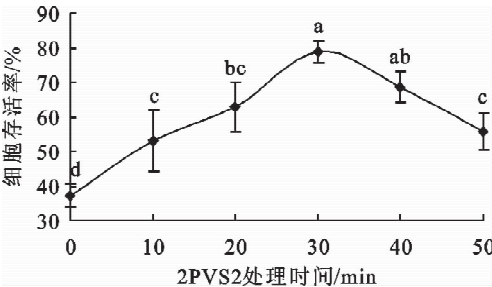


图 2 PVS2 不同处理时间对细胞存活率的影响

Fig. 2 Effects of different PVS2 treatment times on the cell survival rates

2.4 解冻方式对细胞存活率的影响

试验材料经过处理迅速投入液氮保存 1 周取出,用 5 种解冻方法解冻后,结果如图 3 所示,40℃ 下的解冻所得细胞存活率达 82.02% 为最高,其次为 30℃ 和自来水冲洗,最小为 50℃ 及室温 ($p<0.05$),说明最佳的解冻方式为 40℃ 水浴。

2.5 冻存时间对细胞存活率的影响

图 4 表明,未放入液氮冻存(0 d)处理的细胞存活率几乎达到 100%,放入液氮冻存后随着时间的

增加,发现保存 1~5 周后所得细胞存活率结果基本无差异,但与 0 d 处理相比存活率降至 60% 左右,差异显著($p<0.05$)。说明液氮中保存不同的时间对栓皮栎胚性愈伤组织细胞成活率几无影响。

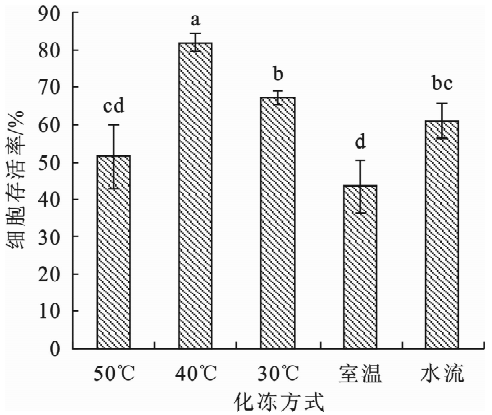


图 3 不同解冻方式对细胞存活率的影响

Fig. 3 Effects of different melting methods on the cell survival rates

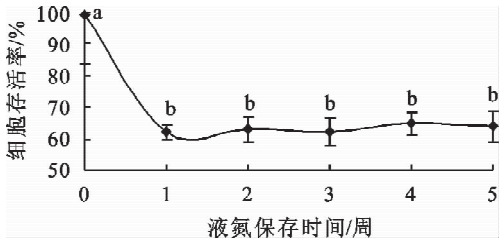


图 4 不同液氮保存时间对细胞存活率的影响

Fig. 4 Effects of different cryopreservation times on the cell survival rates

3 结论与讨论

在用 PVS2 进行快速脱水处理前,用浓度相对较低的 2PVS2 溶液进行处理,以初步降低组织的含水量,从而可以避免由于渗透压变化太大而对材料造成伤害,这是一个渗透保护的处理过程^[4]。

玻璃化法是超低温保存植物种质的新技术,其

保存关键技术在于进行快速冷冻及解冻,使材料形成玻璃化状态,避免细胞内冰晶的形成^[10]。预处理中预处理天数与冷冻防护剂的浓度也尤为重要,其为愈伤组织的冻存成功奠定了重要基础。

冷冻过程中,预培养的目的是使愈伤组织脱水、提高细胞质浓度从而提高细胞的渗透势并降低冰点在液氮冻存过程中降低水分结冰对细胞膜的伤害^[11],但在培养基中加入冷冻防护剂进行脱水时则需在5℃低温下进行,因为常温下冷冻防护剂会对细胞产生毒害作用^[10],本研究表明在5℃低温下加入6%的DMSO培养3d后,所得冷冻保存后细胞存活率最高。在5d时预培养的愈伤组织出现了轻微的褐化现象,说明随着时间和DMSO浓度的增加,在适宜的天数和浓度下冷冻防护剂使细胞脱水,增加细胞质浓度,提高细胞的渗透势,从而提高材料的抗冻能力,提高细胞的存活率,但如果DMSO处理时间过短,浓度过低,会使细胞脱水不好,细胞质达不到一定的浓度,导致抗冻能力下降;反之处理时间过长、浓度过大,冷冻防护剂则可能会对细胞产生毒害作用,表现出材料发生褐化甚至死亡^[12]。

冻存液对冻存细胞存活率的影响在于严格控制植物材料在玻璃化保护剂中的脱水时间,因为处理时间过短细胞含水量较高,细胞渗透压较低,抗冻力较差,处理时间过长细胞则会受到玻璃化溶液的毒害^[12]。而本试验结果显示细胞在2PVS2中的最佳处理时间为20min,而在PVS2中的最佳处理时间为30min,这与瓯柑愈伤组织PVS2溶液处理在0℃最佳处理时间40min^[13],高山红景天愈伤组织PVS2溶液处理在-20℃乙醇浴中最佳处理时间2h有所不同^[14],说明材料的最佳脱水时间会随着植物种类的不同而具有差异^[15]。

解冻过程中快速冷冻及解冻,使材料避免形成胞内冰晶,是玻璃化超低温保存成功的关键^[8]。40℃水浴环境中,能够使细胞具有足够快而适宜的降温速度有助于冷冻下的玻璃化细胞快速通过冰晶区,从而避免细胞内部由于再次经过冰晶生长而对细胞造成伤害^[16]。

在-196℃的液氮温度下,细胞的生长、分裂和物质的代谢活动几乎完全停止^[17],因此材料在液氮中进行不同天数的保存后解冻,于常温下恢复生长后,其细胞存活率、分化率基本没有变化。这是此玻璃化法超低温保存技术可以应用在栓皮栎胚性愈伤组织材料长期保存中的依据。本试验中冻存后新生组织长势均较优于未经冻存的新生组织,与翟晓巧^[18]等研究结果一致,可能是经冻存后存活的组织具有了一定的抗胁迫与较强的生活力。

参考文献:

- [1] GUAMA J, LINERA G. Edge effect on acorn removal and oak seedling survival in Mexican lower montane forest fragments [J]. *New Forests*, 2006, 31(3): 487-495.
- [2] 张存旭, 宋敏, 赵忠. 栓皮栎茎段离体培养的研究[J]. *西北植物学报*, 2004, 24(7): 1260-1265.
ZHANG C X, SONG M, ZHAO Z. *In vitro* cultivation of nodal segments of the cork tree (*Quercus variabilis*) [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2004, 24(7): 1260-1265. (in Chinese)
- [3] 陈春伶, 张存旭, 高小俊. 有机附加物对栓皮栎胚性组织增殖的影响[J]. *北方园艺*, 2010(13): 171-173.
CHEN C L, ZHANG C X, GAO X J. Effect of organic additives on proliferation of embryogenic tissue in *Quercus variabilis* [J]. *Northern Horticulture*, 2010(13): 171-173. (in Chinese)
- [4] 张存旭, 宋敏, 赵忠, 等. 植物生长调节物质对栓皮栎茎芽增殖和生长的影响[J]. *西北林学院学报*, 2004, 19(2): 64-66.
ZHANG C X, SONG M, ZHAO Z, *et al.* Influence of growth regulators on shoot proliferation and growth in *Quercus variabilis* [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2004, 19(2): 64-66. (in Chinese)
- [5] 张焕玲, 张存旭, 贾小明. 栓皮栎胚性愈伤组织诱导及增殖体系的建立[J]. *西北林学院学报*, 2005, 20(1): 74-77.
ZHANG H L, ZHANG C X, JIA X M. Embryogenic callus induction and proliferation lines construction of *Quercus variabilis* [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2005, 20(1): 74-77. (in Chinese)
- [6] MATSUMOTO T, MOCHIDA K, ITAMURA H, *et al.* Cryopreservation of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) by vitrification of dormant shoot tips [J]. *Plant Cell Rep.*, 2001, 20(5): 398-402.
- [7] 覃灵华, 刘华英. 玻璃化法超低温保存植物种质资源及其研究进展[J]. *作物杂志*, 2008(3): 20-23.
QIN L H, LIU H Y. Cryopreservation of plant germplasm by vitrification and its research progress [J]. *Crops*, 2008(3): 20-23. (in Chinese)
- [8] 王君晖, 黄纯农. 玻璃化法—园艺作物茎尖和分生组织超低温保存的新途径—文献综述[J]. *园艺学报*, 1994, 21(3): 277-282.
WANG J H, HUANG C N. Vitrification—a new approach for cryopreserving shoot-tips and meristems of horticultural crops [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 1994, 21(3): 277-282. (in Chinese)
- [9] TOWILL L E, MAZUR P. Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures [J]. *Canadian Journal of Botany*, 1975, 53(11): 1093-1102.
- [10] 陈品良. 植物组织培养物的超低温保存[J]. *武汉植物学研究*, 1989, 7(4): 390-398.
CHEN P L. Cryopreservation of plant tissue cultures [J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 1989, 7(4): 390-398. (in Chinese)
- [11] YAMASA T, SAKAI A, MATSUMURA T, *et al.* Cryopr-

ervation of apical meristems of white clover (*Trifolium repens* L.) by vitrification [J]. *Plant Science*, 1991, 78(1): 81-87.

[12] 王子成, 邓秀新. 玻璃化法超低温保存柑桔茎尖及植株再生[J]. *园艺学报*, 2001, 28(4): 301-306.

WANG Z C, DENG X X. Cryopreservation of citrus shoot-tips by vitrification and regeneration[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2001, 28(4): 301-306. (in Chinese)

[13] 刘剑锋, 阎秀峰, 程云清, 等. 高山红景天愈伤组织的玻璃化法保存及植株再生[J]. *北京林业大学学报*, 2007, 29(2): 147-151.

LIU J F, YAN X F, CHENG Y Q, *et al.* Cryopreservation of calli by vitrification and plant regeneration of *Rhodiola sachalinensis* [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2007, 29(2): 147-151. (in Chinese)

[14] 陈勇, 陈娴婷, 王君晖. 瓯柑愈伤组织的玻璃化法超低温保存研究[J]. *浙江大学学报: 理学版*, 2004, 31(2): 197-201.

CHEN Y, CHEN X T, WANG J H. Studies of cryopreservation of callus of *Citrus suavisissima* Hort. et Tanaka by vitrification[J]. *Journal of Zhejiang University: Sciences Edition*, 2004, 31(2): 197-201. (in Chinese)

[15] 王君晖, 严庆丰. 大麦幼穗的玻璃化法超低温保存及冻后植株再生[J]. *植物学报*, 1996, 38(9): 730-734.

WANG J H, YAN Q F. Plant regeneration from barley (*Hordeum vulgare*) immature inflorescences cryopreserved by vitrification[J]. *Acta Botanica Sinica*, 1996, 38(9): 730-734. (in Chinese)

[16] SAKAI A, KOBAYASHI S, OILAMA I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification[J]. *Plant cell Reports*, 1990, 9(1): 30-33.

[17] 王君晖, 边红武, 黄纯农. 植物样品包埋脱水法超低温保存的研究进展[J]. *植物学通报*, 1999, 16(5): 582-585.

WANG J H, BIAN H W, HUANG C N. Advances in research on cryopreservation of plant materials by encapsulation dehydration method[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 1999, 16(5): 582-585. (in Chinese)

[18] 翟晓巧, 程斐, 朱延林. 二乔刺槐愈伤组织超低温保存及适宜降温方法[J]. *林业科学*, 2009, 45(10): 49-54.

ZHAI X Q, CHENG F, ZHU Y L. Methods of lowering temperature for cryopreservation of calli of *Robinia bella-rosea* [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2009, 45(10): 49-54. (in Chinese)

(上接第 69 页)

[8] 徐小林, 徐立安, 黄敏仁. 栓皮栎天然群体 SSR 遗传多样性研究[J]. *遗传*, 2004, 26(5): 683-688.

XU X L, XU L A, HUAN M R, *et al.* Genetic diversity of microsatellites (SSRs) of natural populations of *Quercus variabilis* [J]. *Hereditas*, 2004, 26(5): 683-688. (in Chinese)

[9] 房守敏, 余泉友, 李斌. 家蚕 RAPD, AFLP 和 SSR 标记的研究及比较分析[J]. *中国农业科学*, 2007, 40(12): 2926-2930.

FANG S M, YU Q Y, LI B, *et al.* Comparison of SSR, AFLP and RAPD markers for genetic analysis of domestic silkworm[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40(12): 2926-2930. (in Chinese)

[10] POWELL W, MORGANTE M, ANDRE C, *et al.* The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis[J]. *Molecular Breeding*, 1996, 2(3): 225-238.

[11] DOYLE J J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochemical, Bulletin.*, 1987, 19: 11-15.

[12] CSAIKL U M, BASTIAN H, BRETTSCHNEIDER R, *et al.* Comparative analysis of different DNA extraction protocols: a fast, universal maxi-preparation of high quality plant DNA for genetic evaluation and phylogenetic studies [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1998, 16(1): 69-86.

[13] LEFORT F, DOUGLAS G C. An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus* [J]. *Ann. For. Sci.*, 1999, 56(3): 259-263.

[14] VOS P, HOGER R, BLEEKER M, *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(21): 4407-4414.

[15] BASSAM B J, CAETANO-ANOLLÉS G. Silver staining of DNA in polyacrylamide gels [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1993, 42(2-3): 181-188.

[16] 郭金剑, 池伟, 赵鑫珠, 等. 山核桃 AFLP 实验技术体系的建立[J]. *浙江林学院学报*, 2008, 25(4): 532-537.

GUO J J, CHI W, ZHAO X Z, *et al.* An AFLP analysis system for *Carya cathayensis* [J]. *Journal of Zhejiang Forestry College*, 2008, 25(4): 532-537. (in Chinese)

[17] 王大玮, 李煜, 周玮, 等. 杜仲 AFLP 反应体系的建立与优化[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2010, 38(6): 88-94.

WANG D W, LI Y, ZHOU W, *et al.* Establishment and optimization of AFLP reaction system in *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. *Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition*, 2010, 38(6): 88-94. (in Chinese)

[18] 雷娜, 李景富, 李烨, 等. 番茄 AFLP 技术体系的优化与建立[J]. *东北农业大学学报*, 2008, 39(3): 29-33.

LEI N, LI J F, LI Y, *et al.* Optimization and establishment of the AFLP technological system for tomato [J]. *Journal of Northeast Agriculture University*. 2008, 39(3): 29-33. (in Chinese)