

文章编号:1001-1498(2016)03-0348-06

基于马尾松反转录转座子序列的 IRAP 分子标记开发及应用

崔博文^{1,2}, 范付华^{2*}, 丁贵杰², 杨章旗³, 文晓鹏^{1**}

(1. 贵州大学农业生物工程研究院生命科学院 山地植物资源保护与种质创新省部共建教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学贵州省森林资源与环境研究中心, 贵州 贵阳 550025; 3. 广西林科院, 广西 南宁 530000)

摘要: [目的] 为了丰富马尾松遗传信息, 开发更多适用于马尾松的新型分子标记。 [方法] 依据马尾松 *Ty1-copia* 类型和 *Ty3-gypsy* 类型反转录转座子 RT 序列的保守区域设计引物, 建立了马尾松 IRAP-PCR 技术体系并以 12 个基因型个体为材料进行验证。 [结果] 42 条引物中筛选出多态性丰富、重复性好的 29 条进行 PCR 扩增, 共获得 227 条谱带, 其中多态性条带 207 个, 多态性比例为 91.19%, 平均观测等位基因数 (N_a) 为 1.9119 ± 0.2841 , 有效等位基因数 (N_e) 为 1.4680 ± 0.2882 , Nei's 基因多样性指数 (H) 为 0.2911 ± 0.1449 , Shannon's 信息指数 (I) 为 0.4472 ± 0.1953 ; 利用引物 P-12、P-15 或 R-1, 可以将栽培种与无性系两类区分开; P-2 可作为核心引物, 能将 12 份供试材料有效区分开来; 采用 IRAP 标记构建了供试种质的 DNA 指纹图谱; 供试种质的遗传相似系数为 $0.46 \sim 0.69$, 以相似系数为基础, 进行 UPGMA 聚类分析, 以 0.57 为阈值可将供试种质分为三类, 其中无性系内不同材料间也存在较大的遗传变异。 [结论] IRAP 分子标记能有效地用于马尾松种质的鉴别与亲缘关系分析等相关研究。

关键词: 反转录转座子; IRAP 标记; 马尾松; 指纹图谱; 多态性

中图分类号: S791.248

文献标识码: A

Development of IRAP Markers Based on Genomic LTR Retrotransposon Sequences in Masson Pine (*Pinus massoniana*)

CUI Bo-wen^{1,2}, FAN Fu-hua², DING Gui-jie², YANG Zhang-qi³, WEN Xiao-peng¹

(1. Key Laboratory of Plant Resource Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), Institute of Agro-bioengineering and College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. Research Center for Forest Resources and Environment of Guizhou Province, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 3. Guangxi Academy of Forestry, Nanning 530000, Guangxi, China)

Abstract: [Objective] To develop new molecular markers suitable for *Pinus massoniana*. [Method] Based on the conservative region of RT (reverse transcriptase) sequences of *Ty1-copia* and *Ty3-gypsy* type retrotransposon, the IRAP-PCR system for *P. massoniana* was established and examined with 12 individuals. [Result] Of 42 IRAP primers, 29 gave stable and polymorphic amplification profiles, thus yielded 227 bands, among which 207 were polymorphic, accounting for 91.19% of the total. The average Observed Number of Alleles, Effective Number of Alleles, Nei's Genetic Diversity and Shannon Index of Diversity in the twelve *P. massoniana* gemplasms were 1.9119 ± 0.2841 , 1.4680 ± 0.2882 , 0.2911 ± 0.1449 and 0.4472 ± 0.1953 , respectively. The cultivated types and clones could be effectively distinguished by primers P-12, P-15 or R-1, and all the genotypes might be clarified by

收稿日期: 2015-11-02

基金项目: 贵州省重大专项(20126011-1)和 863 计划(2011AA10020301)

作者简介: 崔博文(1984—), 博士生, 主要从事森林培育研究, E-mail: hbqhd16cuibowen@163.com

* 共同第一作者

** 通讯作者: 文晓鹏, 主要从事林木生物技术与遗传育种研究, E-mail: xpwense@hotmail.com.

P-2, which was labeled as the core primer for tested germplasms. The coefficient of the 12 germplasms ranged from 0.46 to 0.69, and with the threshold of 0.57, all the genotypes were grouped into three subclusters by the UPG-MA. [Conclusion] The IRAP marker technology established may effectively facilitate the identification of genetic relationship in *P. massoniana* germplasms.

Keywords: Masson pine; *Pinus massoniana*; IRAP; retrotransposon; fingerprint; polymorphism

马尾松 (*Pinus massoniana* Lamb.) 作为南方优势的用材树种,在其漫长的进化历程中,孕育了丰富的遗传多样性资源。分子标记作为一种揭示遗传物质真实性的简单直观工具,其结果不易受环境因素影响,在植物种质资源的遗传多样性评价、亲缘关系分析及遗传图谱构建等领域,显示出独特的优势。迄今报道的马尾松分子标记技术有 SSR、SRAP 等^[1-2],但这些标记开发过程复杂,成本高,多态率低,因此,开发其它有效的分子标记,对马尾松种质资源的评价和利用,尤其是近缘优良家系间的鉴定及分子标记辅助选择显得尤为必要。

IRAP (inter-retrotransposon amplified polymorphism) 由 Kalendar 等^[3] 在大麦中首先开发,是一种基于植物反转录转座子序列间多态性的分子标记,可以由同物种或近缘种的反转录转座子 RT 序列和 LTR 的保守区开发获得^[4-5]。作者所在课题组前期工作显示,IRAP 标记应用于马尾松遗传多样性评价是可行的^[6]。本文在已获得的马尾松反转录转座子 RT 序列的基础上,开发 IRAP 引物,筛选并建立 IRAP 分子标记实验体系,构建部分种质的 IRAP 指纹图谱和分析其亲缘关系,为进一步开展马尾松种质的分子系统学研究及遗传图谱构建等提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料制备

供试材料(表 1)均采自广西南宁林科所国家马尾松良种基地(广西武鸣县南宁地区林业科学研究所)的样本区,随机选取 83 号家系的 5 个无性系以及无性系 F-2 周围的 7 份栽培种质单株,采集带有新鲜健康针叶簇的多年生枝条,轻拭擦除其表面水份并封存于封口袋中,带回室内取幼嫩针叶,经液氮处理后储于 -80℃ 超低温冰箱备用。

采用天根生化科技(北京)有限公司 DP320 新型植物基因组提取试剂盒(简称 DP320),按操作方法分别提取 12 份材料的基因组 DNA,1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性及浓度,TE 稀释后保存到 -20℃ 冰箱备用。

表 1 IRAP 标记供试马尾松材料

采集区	编号	树高/m	胸径/cm	类型	性状
2-2	Y-1	-	-	栽培型	速生
2-2	Y-2	-	-	栽培型	速生
2-2	Y-3	-	-	栽培型	速生
2-2	Y-4	-	-	栽培型	速生
2-2	Y-5	-	-	栽培型	速生
2-2	Y-6	-	-	栽培型	速生
2-2	Y-7	-	-	栽培型	速生
2-8	F-1	13.6	34.2	无性系	抗旱、速生
2-2	F-2	14.3	31.3	无性系	抗旱、速生
2-2	F-3	18.9	38.8	无性系	抗旱、速生
2-2	F-4	18.8	36.5	无性系	抗旱、速生
2-4	F-5	19.6	42.0	无性系	抗旱、速生

注:“-”代表数据缺失

1.2 IRAP 扩增及 PCR 产物检测

根据马尾松反转录转座子 *Ty1-copia* 和 *Ty3-gypsy* 的 RT 序列^[7],应用 ClustalX version2 软件确定不同类型转座子氨基酸序列的保守区域(图 1),在 MEGA5.05 中将氨基酸序列转化为对应的核酸序列,并采用 Primer premier 5.0 和 Oligo6 软件,以保守区域上游(近 RT 序列 5' 端)20~24 bp 逐条设计单向引物。

IRAP-PCR 反应体系总体积 10 μL ,其中含 mix (天根生化科技有限公司)5 μL ,引物 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.3 μL ,模板 (10~15 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 1 μL ,最后加 ddH₂O 补齐。参照合成 T_m 值,采用退火温度梯度试验,确定每条引物的退火温度。PCR 扩增程序为:最初设定循环数为 35,扩增产物少的适当增加 5 个循环。

IRAP-PCR 采用如下扩增程序:

94℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 30 s,依照不同引物设定相应退火温度,反应 45 s,72℃ 延伸 1 min,35~40 个循环;72℃ 延伸 7 min,4℃ 中止反应。

反应最终扩增产物由 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 数据处理与分析

电泳检测为清晰、可重复性强的谱带按“引物号-片段长度”记录为指纹,有和无谱带分别赋值 1 和 0,建立种质的 DNA 指纹图谱及 IRAP 标记数据矩阵,通过 POPGENE1.32 软件计算平均观察等位基

因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、Nei's 遗传多样性指数(H)、Shannon's 信息指数(I)。采用 NT-SYSpC 2.01e 软件计算各材料间相似系数,利用 UP-GMA 法进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 IRAP 标记开发

根据引物设计原理,综合考虑引物长度、 T_m 值、PCR 产物等因素,从所有 79 条反转录转座子 RT 序列(图 1)中获得 42 条 IRAP 引物,其中 16 条来自于 *Ty1-copia* 家族,26 条来自 *Ty3-gypsy* 的对应区域。*PMRT12*、*REPM8*、*REPM18* 等 9 条序列都分别有两个区域可获得待检的 IRAP 引物。

IRAP-PCR 反应采用 10 μ L 体系,分别进行退火温度梯度筛选,根据扩增产物的扩增条带的数量和质量确定最优的反应退火温度。结果表明,引物 R-21 在 H(59 $^{\circ}$ C)时条带较清晰、多态性较好,但扩增产量较低,在此条件下增加反应循环数可增加拷贝数,从而获得较理想的扩增体系。经过初筛和复筛,筛选出 29 条扩增效果好、重复性强的多态性引物(表 2),多态率达到 69.04%,可用于马尾松的后续研究。

2.2 指纹图谱构建

IRAP-PCR 扩增表明,栽培种质 Y-1 到 Y-7 和无性系材料 F-1 到 F-5 都有其特异指纹组合。如表 3 所示,P-1-2200 到 R-16-2000 所有谱带在抗旱无性系材料中均出现,而在栽培材料中出现缺失带;引物 P-12 和 P-15,在指纹图中分别出现两条指示性特异条带,故仅需一条引物就可判断供试材料是否属于无性系材料。同样,表 3 中 R-16-1100 到 R-1-1500 全部谱带在栽培材料中同时出现,而在无性系材料

表 2 IRAP 引物信息

引物名	引物序列(5'-3')	位置	退火温度/ $^{\circ}$ C	GeneBank 登陆号
P-1	AGGGTAAGCAAGAAGCTGATG	68→89	54	JQ975222
P-2	GGTGACCGTGTATTTATCTGG	220→241	61	JQ975182
P-3	AGGGTAAGAAAGAAGCTGATG	68→89	58	JQ975223
P-4	GTGAAGGGTAATAAAGAAGCTGG	63→84	58*	JQ975191
P-5	TGCGGTGAAGGGTAAGAAAGAA	60→81	64	JQ975233
P-7	GGTGAGGGCTAAGAAAGAACTA	63→84	52*	JQ975190
P-8	TTTTATGGGGACTTGGCTTCAC	158→179	63	JQ975190
P-9	GCACTGAAGGGTAAGAAAGAAC	61→82	57	JQ975201
P-11	AGGTGAAAGGGAAGGAGAACT	62→83	61*	JQ975226
P-12	AACAGGCTTCAAGACAGTGTA	119→140	55	JQ975192
P-14	AGGGAAGGAGAACTAATGTGC	69→90	55	JQ975216
P-15	CAGGCTCTAAGGTACTGGTATC	121→142	52	JQ975207
P-16	AGGGTATGAGGTGAAAGGGAAGG	54→75	59	JQ975234
R-1	GCCCTGAACAAGAAGACCCT	25→44	53	JQ975242
R-3	GCCCTGAACAAGAAGACACTG	25→45	52	JQ975245
R-5	ACCGCCTTCAGATGTCACCTA	175→194	51	JQ975255
R-8	ACCACCTTCAAGACCAAACA	175→194	54	JQ975241
R-9	GATTTGCTAGTGGTTATTGC	121→141	57*	JQ975243
R-13	AGAGGTATGTGCGTGGATTA	1→20	52	JQ975250
R-14	TTGTTATGCCCTTTGGGTGTA	198→219	52*	JQ975247
R-16	AGCGGTATGTGCGTGGACTA	1→20	57	JQ975244
R-17	AGACTCAAAGAATCGCTACCC	50→71	55	JQ975244
R-19	AAAGGACAACCTACCCTACACCC	45→66	57	JQ975254
R-20	CAAGATAAGACTCAATCCGCACAA	390→413	64	JQ975254
R-21	GAAGGACAACCTACCCTACACCC	45→66	59*	JQ975249
R-22	GATAAGACTCAATCCGCACAAG	393→414	59	JQ975249
R-23	GACAACCTACCCTACACCTTCA	49→70	63	JQ975239
R-24	GATAAGACTCAATCCGCACAA	49→69	52	JQ975240
R-25	AGCGGTATGTGCGTGGATTA	1→20	55	JQ975252

注:退火温度处的“*”表明 PCR 扩增反应为 40 个循环

中有缺失现象;引物 R-1 在 1 700 bp 和 1 500 bp 处可区分这两类种质。此外,也有一些引物可以将所有供试材料区分开,如引物 P-2(图 2)的扩增产物具有各自特异的指纹标记,这一类引物可作为核心标记。

表 3 不同性状马尾松种质的 IRAP 指纹识别码

位点/bp	样品											
	Y-1	Y-2	Y-3	Y-4	Y-5	Y-6	Y-7	F-1	F-2	F-3	F-4	F-5
P-1-2200	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
P-12-1600	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1
P-12-1400	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
P-15-2000	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
P-15-1600	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
R-17-425	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
R-21-1400	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
R-1-900	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
R-3-400	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
R-16-2000	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
R-16-1100	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
R-22-1050	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
R-21-1600	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
R-1-1700	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
R-1-1500	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1

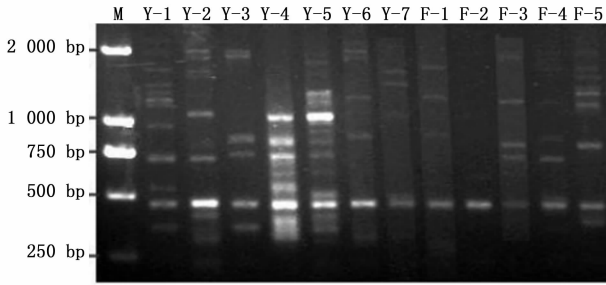


图2 引物 P-2 扩增电泳图

2.3 基于 IRAP 标记的马尾松种质亲缘关系分析

利用 29 条引物对 12 个马尾松样品进行扩增,共扩增 227 个位点,其中多态性位点 207 个,多态性比例为 91.19%,平均观测等位基因数 (N_a) 为 1.9119 ± 0.2841 ,有效等位基因数 (N_e) = 1.4680 ± 0.2882 , Nei's 基因多样性指数 (H) 为 0.2911 ± 0.1449 , Shannon's 信息指数 (I) = 0.4472 ± 0.1953 ,表明供试种质的遗传差异大。基于这些 IRAP 标记,计算 Jaccard 相似系数,所有材料相似系数 $0.46 \sim 0.69$,其中无性系材料在 $0.60 \sim 0.69$,表明马尾松无性系材料也存在一定的遗传差异。据此相似系数为基础进行 UPGMA 聚类分析,以相似系数 0.57 为阈值,供试材料可聚为三类(图 3):大部分栽培种为第一类,无性系类 F-1 到 F-4 为第二类, Y-3 和 Y-4 组成第三类;无性系 F-5 与栽培种聚在第一类,且与 Y-2 表现了较高的相似性,进一步显示马尾松无性系存在较大的遗传变异。

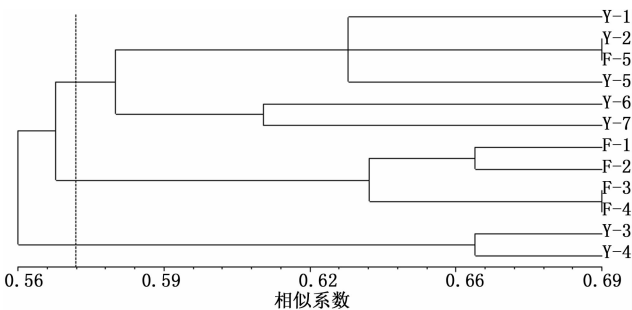


图3 马尾松种质的聚类分析图

3 讨论

反转录转座子是数量最大的可自由活动的转座子,在裸子植物基因组中以高拷贝存在,直接或间接参与植物基因组扩增、重排、突变等事件^[8-10],其特殊的生物学特性和转座机制不断引起植物进化、遗传及基因多样性研究的关注。分子标记作为一种简单直观的揭示遗传物质真实性的工具,其鉴定结果

不易受环境因素影响,IRAP 分子标记是基于同物种或近缘种的反转录转座子 RT 序列和 LTR 的保守区设计引物,对相邻 LTR 间的区域进行 PCR 扩增,而开发的一种新型分子标记^[4-5]。本文在 58 条 *Ty1-copia* 和 22 条 *Ty3-gypsy* 的 RT 序列中,分别获得引物 26 条和 16 条,从 *Ty3-gypsy* 家族 RT 序列中获得引物的潜力优于 *Ty1-copia* 家族,但因前者在松科植物基因组中的拷贝数低于后者^[7],使二者最终确定的有效多态性引物数量相差不大,引物多态率达到 69.04%,此结果优于 Bai 等^[11]开发的基因组 SSRs 引物在马尾松自然群体扩增的多态率(50%)。同时筛选出的马尾松 IRAP 标记具有较丰富的多态性,IRAP 作为一种分子辅助标记可以较好的区分供试马尾松材料。繁琐的实验步骤和冗长的实验周期会带来更多的实验误差,相对于 SSR 标记、SRAP 标记 PCR 产物采用 PAGE 胶检测^[12-13],IRAP 标记实验周期短,仅需采用一般 PCR 反应扩增体系^[14],而扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶检测就可得到较好的扩增效果^[6],因此具有操作简便的特点。

反转录转座子在同物种或同一物种不同个体间具有高度异质性,这一特性使 IRAP 标记被认为是构建 DNA 指纹图谱的理想标记技术^[15]。近年来,基于反转录转座子的分子标记被开发并在遗传多样性分析和品种鉴定等方面得以应用^[16-18],尤其对遗传距离较近或同源的物种及家系具有较好的扩增效果^[19]。本文应用较少的引物序列组合,就可构建出较清晰马尾松指纹图谱;令人感兴趣的是,优良家系 83 号的 5 个无性系,仅用一条引物(P-2)就可以全部区分开来,反应出 IRAP 标记在马尾松种质鉴定及种苗纯度检测上具有高效性,同时也说明马尾松无性系也广泛存在 DNA 水平上的遗传变异,通过体细胞变异选种也是马尾松实现遗传改良的重要途径。

通过 IRAP 技术发现,本研究所检测的 12 份马尾松材料的 Nei's 基因多样性指数 (H) 和 Shannon's 信息指数 (I) 均高于李广军等^[20]对广西古蓬 ($H = 0.2765$, $I = 0.4278$) 种源马尾松遗传多样性的研究,说明该采集区组多样性较为丰富,同时也支持了李志辉等^[21]提出的种子园的遗传多样性高于天然林的观点。

聚类分析结果显示无性系个体间的亲缘关系较近,与栽培种亲缘关系较远。理论上同一家系无性系间的遗传背景是较为一致的,而栽培种个体间差

异较大,本文的7个栽培种因相似系数差异大而被划分到两大类(图3)。由于这七个栽培种在种子园中位于优良无性系间,以避免无性系间造成自交或近交,与无性系较远的亲缘关系在分子水平佐证了该种子园区组分配的合理性。F-5与83号家系的其他无性系个体间差异较大而与栽培种Y-2表现了较高的相似性并归为一类,产生此结果可能归因于1)本文获得的IRAP标记与马尾松的一些速生基因/QTL连锁,因为F-5的胸径和树高值均大于其他4个无性系材料(表1);2)转座子发生横向传递^[22],导致F-5与Y-2间出现相似反转录转座子。

4 结论

综上所述,IRAP标记因其显性标记属性,在种质遗传多样性分析和构建遗传图谱时,无法区分基因型是纯合体还是杂合体,但其多态性丰富、重复性好。本文建立的马尾松IRAP标记体系操作简便,易于掌握,并且利用较少的引物就可以获得丰富的基因组信息,为马尾松种质鉴定、亲缘关系分析、遗传多样性评价及遗传图谱构建等相关研究提供了新途径。

参考文献:

- [1] 刘公秉,季孔庶. 基于松树 EST 序列的马尾松 SSR 引物开发[J]. 分子植物育种,2009,7(4):833-838.
- [2] 沈敬理,白天道,陈亚斌,等. 马尾松无性系种子园亲本指纹图谱构建[J]. 分子植物育种,2015,13(3):646-652.
- [3] Kalendar R, Grob T, Regina M, et al. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1999, 98: 704-711.
- [4] Guo D L, Zhang H Q, Luo Z R. Genetic relationships of *Diospyros kaki* Thunb. and related species revealed by IRAP and REMAP analysis[J]. Plant Science,2006,170:528-533.
- [5] 赵海艳,赵纯,杨爱珍. IRAP 分子标记在茄子种质资源亲缘关系分析中的应用[J]. 华北农学报,2008,23(增刊):194-197.
- [6] Fuhua F, Bowen C, Ting Zh, et al. LTR-retrotransposon activation, IRAP marker development and its potential in genetic diversity assessment of masson pine (*Pinus massoniana*) [J]. Tree Genetics & Genomes, 2014, 10:213-222.
- [7] Fuhua F, Xiaopeng W, Guijie D, et al. Isolation, identification,

- and characterization of genomic LTR retrotransposon sequences from masson pine (*Pinus massoniana*) [J]. Tree Genetics & Genomes, 2013, 9:1237-1246.
- [8] 唐益苗,马有志. 植物逆转座子及其在功能基因组学中的应用[J]. 植物遗传资源学报,2005,6:221-225.
- [9] Krom N, Recla J, Ramakrishna W. Analysis of genes associated with retrotransposons in the rice genome[J]. Genetica,2008,134:297-310.
- [10] Xiao H, Jiang N, Schaffner E, et al. A retrotransposon-mediated gene duplication underlies morphological variation of tomato fruit [J]. Science,2008,319:1527-1530.
- [11] Bai T D, Xu L A, Xu M, et al. Characterization of masson pine (*Pinus massoniana* Lamb.) microsatellite DNA by 454 genome shotgun sequencing. Tree Genetics & Genomes[J]. 2014,10:429-437.
- [12] 李 焜,季孔庶,龚 佳. 磁珠富集法筛选马尾松微卫星标记[J]. 分子植物育种,2007,5(1):141-144.
- [13] 杨会肖,刘天颐,罗 锐. 用 SRAP 标记构建松树良种指纹图谱方法的研究[J]. 广东林业科技,2012,28(5):1-8.
- [14] Ruslan K, Alan H S. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting[J]. Nature protocols, 2006,1(5):2478-2484.
- [15] Sandra C, Ana C, Luís R, et al. IRAP, REMAP and ISSR Fingerprinting in Newly Formed Hexaploid *Triticum* (*X Triticum* *Aescherson et Graebner*) and Respective Parental Species[J]. Plant Molecular Biology Reporter. 2014,32:761-770.
- [16] 孙 俊,周军永,孙其宝. 苹果元帅系和富士系芽变品种的 IRAP 鉴定[J]. 西北植物学报,2010,10:1952-1958.
- [17] Breto M P, Ruiz C, Pina J A, et al. The diversification of *Citrus clementina* Hort. exTan., a vegetatively propagated crop species [J]. Molecular Phylogenetics And Evolution,2001,21(2):285-293.
- [18] Branco CJS, Vieira EA, Malone G, et al. IRAP and REMAP assessments of genetic similarity in rice[J]. Journal of Applied Genetics,2007,48(2):107-113.
- [19] 杜晓云. 系列逆转座子分子标记的建立及其在柿属植物中的应用研究[D]. 华中农业大学博士学位论文,2008.
- [20] 李广军,郭彩萍,郭文娟. 广西古蓬种源马尾松遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中南林业科技大学学报,2011,31(9):42-45.
- [21] 李志辉,陈 艺,张东林,等. 广西马尾松天然林古蓬和浪水种源群体遗传多样性 ISSR 分析[J]. 中国农学通报,2009,25(16):116-119.
- [22] 王子成,李忠爱,邓秀新. 植物反转录转座子及其分子标记[J]. 植物学通报,2003,20(3):287-294.

(责任编辑:张 研)