

# 灰毡毛忍冬工厂化快繁生产体系的建立及再生苗遗传稳定性的分子鉴定

陈泽雄<sup>1,2</sup>, 胡凯<sup>1,\*</sup>, 刘奕清<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>重庆文理学院林学与生命科学学院, 重庆 402160; <sup>2</sup>重庆市特色植物种苗工程技术研究中心, 重庆 402160)

**摘要:** 以灰毡毛忍冬 (*Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz.) 腋芽为材料, 建立了一套适合工厂化生产的离体再生技术体系。该体系包括腋芽诱导培养基 MB + 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.2 mg · L<sup>-1</sup> NAA, 继代增殖培养基 MB + 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.5 mg · L<sup>-1</sup> IAA 和 MB + 1.5 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.8 mg · L<sup>-1</sup> IAA 和生根培养基 1/2MB + 2.0 mg · L<sup>-1</sup> IBA + 0.2 mg · L<sup>-1</sup> IAA。分别从继代 12、24、36 个月的再生植株中随机抽取 8 株进行 SRAP 分析其遗传的变化。在检出的 147 条 SRAP 条带中, 继代 12 个月的再生植株未发现变异, 继代 24 个月的再生植株中有 2 株发生变异, 继代 36 个月的再生植株中有 4 株发生变异。结果表明, 建立的腋芽再生培养体系在一定继代周期内是稳定可靠的, 适合灰毡毛忍冬的规模化生产。

**关键词:** 灰毡毛忍冬; 快繁体系; 遗传稳定性; 分子鉴定

**中图分类号:** S 68

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2013) 12-2520-07

## Establishment of Rapid Propagation System and Molecular Identification of Genetic Stability on *Lonicera macranthoides*

CHEN Ze-xiong<sup>1,2</sup>, HU Kai<sup>1,\*</sup>, and LIU Yi-qing<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Forestry and Life Science, Chongqing University of Arts and Sciences, Chongqing 402160, China;

<sup>2</sup>Engineering Research Center for Special Plant Seedlings, Chongqing 402160, China)

**Abstract:** An efficient mass propagation system of *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz. was established based on axillary bud-derived meristems. The optimal media of tissue culture involving in the bud-induction medium (MB medium supplemented with 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA, 0.2 mg · L<sup>-1</sup> NAA), subculture medium (MB medium supplemented with 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA, 0.5 mg · L<sup>-1</sup> IAA or 1.5 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA, 0.8 mg · L<sup>-1</sup> IAA) and root-induction medium (1/2MB medium supplemented with 2.0 mg · L<sup>-1</sup> IBA and 0.2 mg · L<sup>-1</sup> IAA) were selected. Thereafter, the genetic variation of 8 plants randomly sampled from regeneration plants cultured for 12, 24 and 36 months respectively was investigated by SRAP analysis and there were 0, 25% and 50% in variation rate found in regeneration lines respectively based on the 147 bands detected by SRAP markers. The results showed that regeneration culture system can maintain genetic stability during certain subculture cycles, indicating that it can be readily employed for large-scale propagation.

**收稿日期:** 2013-07-09; **修回日期:** 2013-11-27

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (31200512); 重庆高校优秀成果转化项目 (KJZH11220); 重庆文理学院特色林木种质资源创新重点实验室平台建设; 重庆市教委项目 (KJ121210)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: hukai1980@sina.com)

**Key words:** *Lonicera macranthoides*; rapid propagation system; genetic stability; molecular identification

灰毡毛忍冬 (*Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz.) 是忍冬科一种重要的植物, 具清热解毒、抗氧化等多重功效, 是中国中医领域的常用药材 (肖聪颖 等, 2011)。与忍冬科其它植物相比, 其核心药用成分绿原酸的含量更高, 鲜花入药或制备高端茶品, 深受市场青睐, 产业发展十分迅猛 (周日宝和童巧珍, 2003)。近些年已有一些关于灰毡毛忍冬组培快繁的研究报道 (唐效蓉 等, 2005; 王晓明 等, 2006; 李永兴和张丽云, 2010), 但仅限于实验室研究阶段, 尚未见其工厂化生产体系建立的报道, 这可能是灰毡毛忍冬组培规模化繁育存在初代启动慢、增殖率低、生根十分困难等众多问题, 限制了其产业化生产。

本研究中建立了年产 500 万株优质灰毡毛忍冬组培苗的产业化生产技术体系, 在此基础上, 应用 SRAP (相关序列扩增多态性, sequence-related amplified polymorphism) 分子标记技术 (Li & Quiros, 2001), 首次系统地对不同培养代数的灰毡毛忍冬组培再生植株进行了遗传稳定性鉴定, 为灰毡毛忍冬组培种苗工厂化高效安全生产提供技术支撑。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 外植体及培养条件

试验于 2009—2011 年进行。灰毡毛忍冬 ‘渝蕾 1 号’ 植株引种自重庆市秀山红星中药材开发有限公司, 定植于温室。以当年生半木质化枝条为外植体, 除去叶片后, 剪成长度 2 cm 左右、带单腋芽的茎段, 在自来水下反复冲洗干净, 超净工作台上用 0.1%  $\text{HgCl}_2$  溶液表面消毒 6 min, 无菌水冲洗 4~6 次, 接种于不同培养基中进行光照培养。培养基 pH 5.8, 培养温度  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 光照时间  $12\text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ , 光照强度  $2\ 000 \sim 3\ 000\ \text{lx}$ 。

### 1.2 离体再生

茎段外植体接种在 MS、B5、MB [ $\text{KNO}_3\ 1\ 400\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}\ 150\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{Ca}(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7)_2\ 1\ 000\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2\ 220\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4\ 170\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{NH}_4\text{NO}_3\ 410\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}\ 35\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\ 200\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、烟酸  $0.5\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、肌醇  $100\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、盐酸吡哆素  $0.5\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、盐酸硫胺素  $0.1\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、甘氨酸  $2\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、微量元素含量分别为 MS 培养基对应元素的 2/3、铁盐分别与 MS 对应元素相同] 和 WPM 等 4 种基本培养基附加 6-BA  $1.0\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、NAA  $0.2\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的启动培养基上诱导腋芽萌发。外植体腋芽伸长至 2~3 cm 左右时, 切割转接到以最适培养基为基本培养添加不同种类和浓度植物生长调节剂的继代培养基中大量增殖; 选取高度为 3~5 cm 生长健壮的继代苗接种到不同的生根培养基中诱导生根。

### 1.3 生根苗的移栽

待组培苗根长 1 cm 左右可将其转移到温室大棚, 炼苗 3~5 d 后移栽, 移栽基质为草炭土: 蛭石 = 4:1。温室温度控制在  $23 \sim 28^\circ\text{C}$ , 相对湿度逐渐由 90% 下降为 70% 左右。2 周后增施复合肥, 60 d 后可移栽至大田规模化培育。

### 1.4 DNA 提取

分别从继代 12、24、36 个月的再生植株中随机抽取 8 株, 共 24 株 (依次编号为 1~8、9~16、

17 ~ 24) 作为体细胞无性系变异分析的材料。采用 CTAB 法, 从组培苗的幼嫩叶片中提取基因组 DNA, 基因组 DNA 的完整性用 0.8% 琼脂糖胶检测, 浓度经 NANO DROP1000 (Thermo) 测定, 最终稀释至  $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  储存备用。

### 1.5 SRAP 分析

将各材料的 DNA 抽取少量混合在一起, 建立 SRAP 标记的 PCR 体系。从随机组合的 80 对 SRAP 引物 (表 1) 中筛选到稳定性和重复性较好的 12 对 SRAP 引物组合 (表 5) 进行后续试验分析。

优化后的 PCR 条件,  $20 \mu\text{L}$  反应体系中包含:  $10 \text{ ng}$  模板 DNA,  $0.5 \text{ U}$  *Taq* 酶 (TaKaRa 公司),  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$ ,  $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs, 上下游引物各  $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $1 \times$  buffer, 用无菌水补齐至  $20 \mu\text{L}$ 。扩增在 bio-rad T1000 PCR 仪上按如下程序进行:  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  预变性  $4 \text{ min}$ ;  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  变性  $1 \text{ min}$ ,  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  复性  $45 \text{ s}$ ,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸  $90 \text{ s}$ , 共 5 个循环; 之后 35 个循环,  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  变性  $1 \text{ min}$ ,  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  复性  $1 \text{ min}$ ,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸  $90 \text{ s}$ , 最后  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸  $5 \text{ min}$ ;  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  保存。取 SRAP 反应产物  $10 \mu\text{L}$  用 8% 变性聚丙烯酰胺胶检测。电泳过程在 BIO-RAD DCODE 突变检测系统进行,  $1 \times$  TAE 电极液中恒压  $200 \text{ V}$  电泳约  $3.5 \text{ h}$ , gelred 染料染色  $30 \text{ min}$  后, 在 Gel Doc XR 凝胶成像系统 (BIO-RAD) 成像。上述所有试验均重复 3 次, 数据统计分析使用 SPSS11.5 软件完成。

表 1 SRAP 引物  
Table 1 Primer of SRAP

上游引物 Forward primer	上游引物序列 Forward primer sequence	下游引物 Reverse primer	下游引物序列 Reverse primer sequence
ME1	TGAGTCCAAACCGGATA	em1	GACTGCGTACGAATTAAT
ME2	TGAGTCCAAACCGGAG	em2	GACTGCGTACGAATTGTC
ME3	TGAGTCCAAACCGGAAT	em3	GACTGCGTACGAATTGAC
ME4	TGAGTCCAAACCGGACA	em4	GACTGCGTACGAATTTGA
ME5	TGAGTCCAAACCGGACC	em5	GACTGCGTACGAATTAAC
ME6	TGAGTCCAAACCGGTAG	em6	GACTGCGTACGAATTGCA
ME7	TGAGTCCAAACCGGTGT	em7	GACTGCGTACGAATTATG
ME8	TGAGTCCAAACCGGTG	em8	GACTGCGTACGAATTCAA
		em9	GACTGCGTACGAATTCAG
		em10	GACTGCGTACGAATTCTG

## 2 结果与分析

### 2.1 高效茎段离体快繁体系的建立

灰毡毛忍冬茎段外植体接种到供试的 4 种类型培养基中启动培养, 15 d 左右茎段腋芽开始不同程度萌发。试验结果 (图 1, 表 2) 表明, 不同类型的培养基对腋芽诱导影响较大: MS 培养基中腋芽萌发速度慢, 叶片较大, 茎段几乎不伸长且玻璃化现象较严重; B5 培养基中腋芽萌发能力较好, 但叶片淡黄色且萌发的腋芽瘦弱; WPM 培养基中腋芽诱导率最低, 且生长缓慢, 茎段伸长慢; MB 培养基是根据前期预备试验的外植体反应以 B5 培养基和 MS 培养基为基础, 针对性的大幅度调整各类物质浓

表 2 不同基本培养基对灰毡毛忍冬腋芽诱导的影响  
Table 2 Effects of different base medium on axillary buds induction of *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz.

基本培养基 Base medium	接种茎段数量 Number of inoculation stems	再生芽数量 Number of axillary shoots
MS	30	$14.00 \pm 2.65 \text{ bc}$
MB	30	$22.67 \pm 1.53 \text{ a}$
B5	30	$17.33 \pm 1.53 \text{ ab}$
WPM	30	$11.67 \pm 2.52 \text{ c}$

注: 3% 蔗糖; 每组数值为 30 株外植体经 3 次重复的数据, 数  
据后相同字母表示在  $P \leq 0.05$  水平上差异不显著。

Note: 3% sucrose; Each value is the mean  $\pm$  standard error of 30  
explants three replicates, and values followed by the same letter are not  
significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

度而形成的, 在该培养基中腋芽平均诱导率最高, 且腋芽长势好 (图 1, B)。

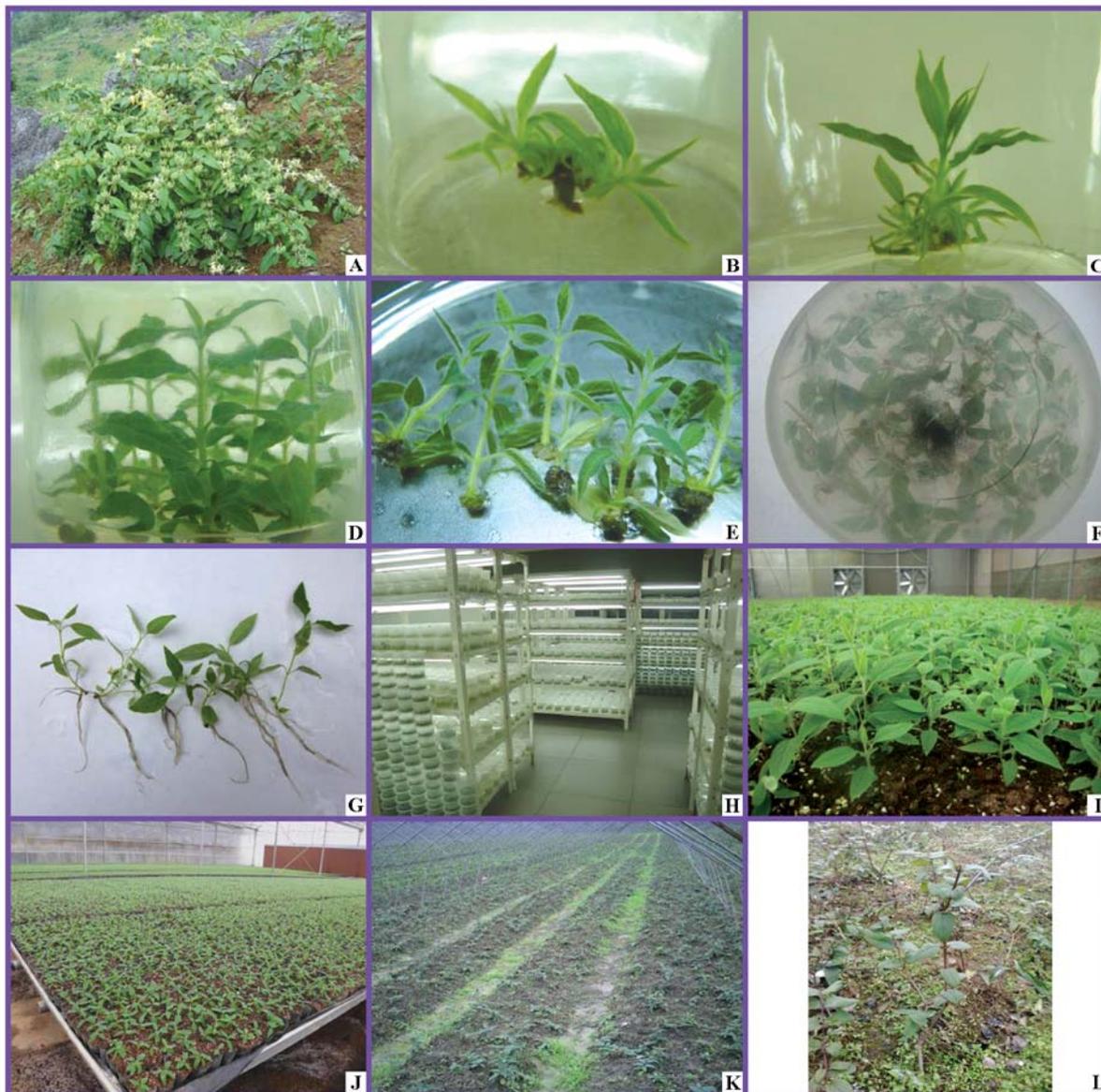


图 1 灰毡毛忍冬高效离体再生体系

A. 母株; B、C. 接种的外植体产生的新芽及继代培养诱导产生的芽丛; D、E. 健壮的继代培养再生芽; F、G. 生根培养 20 d;  
H. 组培车间规模化繁育; I、J. 规模化移栽后在温室中生长; K、L. 再生苗在室外生长。

Fig. 1 Efficient regeneration system *in vitro* of *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz.

A. The donor mother plant; B, C. Examples of a primary explant producing new buds and several axillary buds subcultured for several times; D, E. The robust shoots subcultured in the elongation medium; F, G. Root development on the root-induction medium for 20 days; H. Large-scale breeding in culturing rooms; I, J. Transplanted plantlets growing in the greenhouse; K, L. Plants established in the field.

诱导出的腋芽在诱导培养基中培养 1 个月后转入以 MB 为基本培养基, 添加不同种类及浓度植物生长调节剂的继代培养基中进行增殖培养 (表 3)。总体来看, 6-BA 与 IAA 组合的增殖效果整体好于 6-BA 与 NAA 的组合。在供试的试验组合中, 细胞分裂素与生长素的比值越高, 增殖系数相对越高, 其中以 MB + 6-BA  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + IAA  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和 MB + 6-BA  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + IAA  $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  最为理想 (图 1, D、E), 平均增殖系数分别为 4.13 和 4.16, 而且随着继代次数的增加, 植株逐渐

健壮且伸长。

继代苗经过 1 个月的培养可长高 3 ~ 5 cm, 将其健壮、叶形叶色正常的单株切割下来转至生根培养基中培养。生根培养基均以 1/2MB 为基本培养基, 添加不同浓度的生长调节剂 (表 4)。

表 3 不同激素浓度组合对灰毡毛忍冬组培苗增殖的影响

Table 3 Effects of different hormone concentration combination on bud multiplication of *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz.

6-BA/ (mg · L <sup>-1</sup> )	NAA/ (mg · L <sup>-1</sup> )	IAA/ (mg · L <sup>-1</sup> )	增殖系数 Multiplication coefficient
0.5	0.1	0	2.63 ± 0.12 ef
0.5	0.2	0	1.55 ± 0.11 h
1.0	0.1	0	3.97 ± 0.21 ab
1.0	0.2	0	3.07 ± 0.15 de
1.0	0.5	0	1.90 ± 0.19 gh
1.5	0.2	0	3.61 ± 0.17 bc
1.5	0.5	0	2.37 ± 0.04 fg
0.5	0	0.3	2.87 ± 0.15 e
0.5	0	0.5	2.71 ± 0.11 ef
1.0	0	0.5	4.13 ± 0.15 a
1.0	0	0.8	3.35 ± 0.20 cd
1.0	0	1.0	3.01 ± 0.11 de
1.5	0	0.8	4.16 ± 0.13 a
1.5	0	1.0	3.76 ± 0.27 abc

注: 基本培养基 MB, 3%蔗糖; 每组数值为 30 株外植体经 3 次重复的数据, 数字后相同字母表示在  $P \leq 0.05$  水平上差异不显著。

Note: MB basal medium, 3% sucrose; Each value is the mean ± standard error of 30 explants three replicates, and values followed by the same letter are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

试验结果表明: 经过 15 d 左右的培养, 大多数浓度配比都能诱导出根系, 以 1/2MB + IBA 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + IAA 0.2 mg · L<sup>-1</sup> 组合最好, 根系健壮发达且基部无愈伤组织 (图 1, F、G), 平均生根率可达 83.37% (表 4)。不同培养配方获得的生根苗质量相差较大, 根系发达、基部无愈伤组织的生根苗在温室炼苗 3 ~ 5 d 后移栽, 平均成活率可达 84.53%。

利用这套技术体系, 已在重庆市农业产业化龙头企业重庆市秀山红星中药材开发有限公司进行了成果转化和产业化生产 (图 1, H ~ L)。截至 2013 年 10 月, 已繁育灰毡毛忍冬组培种苗 800 余万株, 成苗率超过 90%, 极大的满足了武陵山区灰毡毛忍冬产业化发展。

## 2.2 再生苗遗传稳定性检测

12 对 SRAP 引物共计扩增出 147 条条带, 平均每对引物产生 12.25 条条带 (表 5)。5 号 (ME2 + em8) 引物组扩增产生的条带最多为 19 条, 3 号 (ME2 + em5) 和 10 号 (ME6 + em1)

表 4 不同激素浓度对比对灰毡毛忍冬组培苗生根率的影响

Table 4 Effects of different hormone concentration combination on rooting percentage of *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz.

IBA/ (mg · L <sup>-1</sup> )	IAA/ (mg · L <sup>-1</sup> )	生根率/% Rooting percentage
1.0	0.1	21.13 ± 5.10 e
1.5	0.1	32.23 ± 3.87 de
2.0	0.1	25.57 ± 8.36 e
1.0	0.2	52.20 ± 10.18 bcd
1.5	0.2	63.33 ± 6.65 ab
2.0	0.2	83.37 ± 5.77 a
1.0	0.3	56.67 ± 8.84 bc
1.5	0.3	50.00 ± 10.00 bcd
2.0	0.3	33.37 ± 11.55 cde

注: 基本培养基 1/2MB, 2%蔗糖; 每组数值为 30 株外植体 3 次重复的数据, 数字后注相同字母表示在  $P \leq 0.05$  水平上差异不显著。

Note: 1/2MB basal medium, 2% sucrose; Each value is the mean ± standard error of 30 explants three replicates, and values followed by the same letter are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

表 5 SRAP 引物组合的扩增结果

Table 5 Amplified results of SRAP primer combinations

序号 Number	引物组合 Primer combination	总带数 Total number of band	多态性带数 Monomorphism number of band
1	ME1 + em5	14	1
2	ME1 + em9	12	0
3	ME2 + em5	9	0
4	ME2 + em7	10	0
5	ME2 + em8	19	3
6	ME3 + em3	13	1
7	ME4 + em6	11	2
8	ME4 + em10	16	0
9	ME5 + em8	12	1
10	ME6 + em1	8	0
11	ME7 + em9	11	0
12	ME8 + em6	12	2
总和 Total		147	10
平均/比例 Average/Ratio		12.25	6.8%

引物产生的条带最少, 扩增片段的分子量主要集中在 0.2 ~ 2.5 kb。从带型上看, 5 号 (ME2 + em8) 引物检测出最多 3 条多态性带, 属于共有新增条带缺失 (图 2), 其余引物没有检测出多态性条带。平均多态比例为 6.8% (表 5)。

从图 2 中可以发现继代 12 个月的样本 (1 ~ 8) 没有发生变异, 继代 24 个月 (9 ~ 16) 的第 11、13 号样本新增 1 条条带 (箭头所示), 继代 36 个月 (17 ~ 24) 的第 18、20、21、23 号样本新增 3 条条带, 这可能是因为在培养过程中发生了基因扩增或基因迁移。

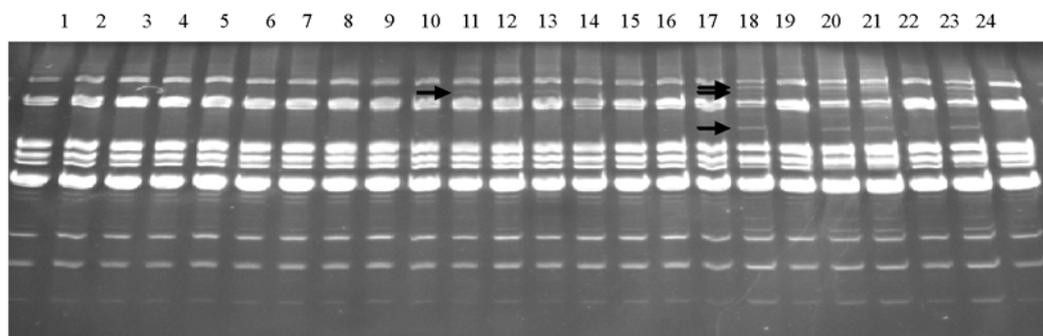


图 2 利用 SRAP (ME2 + em8 引物组合) 检测灰毡毛忍冬再生苗遗传稳定性的电泳图

1 ~ 24 泳道为灰毡毛忍冬再生植株。箭头所示为新增条带。

Fig. 2 An example of genetic stability of the regeneration plants of *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz. as revealed by SRAP analysis (primer combination ME2/em8)

The 24 analyzed propagates (lanes 1 - 24) showed an identical pattern and indicated by the arrows were new bands.

### 3 讨论

灰毡毛忍冬的组织培养已有报道 (王晓明 等, 2006; 李永兴和张丽云, 2010), 但未实现产业化。本试验中创新性的设计了灰毡毛忍冬培养的 MB 培养基, 有效的解决了培养过程中诱导的芽玻璃化严重、节间短、增殖系数不高、生根苗基部愈伤及生根率等问题, 实现了产业化生产。截至目前, 已在国内率先建立了年产 500 万株灰毡毛忍冬组培种苗的工厂化生产线, 生产灰毡毛忍冬组培种苗超过 800 万株。

灰毡毛忍冬再生苗后代遗传变异结果显示, 继代一定次数后变异增多, 这与在刺槐、香花槐、菊花等相关研究结果 (Soneji et al., 2002; Guo et al., 2006; 聂丽娟 等, 2008) 较为一致, 但是与在栗树、日本石楠、马铃薯等中的研究结果 (Carvalho et al., 2004; 李毅丹 等, 2009; 白建明 等, 2010) 不同。究其原因, 栗树、日本石楠等树种木质部相对致密, 在组织培养过程中能保持较好的木质化程度, 并且所用激素浓度整体较低, 可能降低了体细胞无性系变异产生的几率 (李毅丹 等, 2009)。马铃薯则可能是因为采用了超低温保存的手段, 加之继代次数较少, 所以保持了后代的遗传稳定性。

本试验中的灰毡毛忍冬木质化程度较低, 加之为保证初代诱导的成功率, 采用的外植体大多为半木质化, 培养过程中组培苗始终保持较低的木质化程度, 随着继代次数的增加, 组培种苗体内积累的激素越来越多, 加大了变异的可能, 这可能是导致组培苗在继代一定次数后遗传稳定性逐渐下降的主要原因, 这与刺槐、香花槐、菊花等 (Soneji et al., 2002; Guo et al., 2006; 聂丽娟 等, 2008) 后代产生变异的原因类似。

但从本试验结果来看, 在 12 个月的继代周期内组培苗的遗传稳定性是可靠的, 从理论上保证了产业化生产的安全性。从当前植物组织培养产业化生产来看, 大部分企业在植物快繁过程中均是以

1 年的期限为继代周期, 从而保证组培种苗的遗传稳定性和安全性。

## References

- Bai Jian-ming, Chen Xiao-ling, Lu Xin-xiong, Guo Hua-chun, Xin Xia, Zhang Zhi-e, Xin Ping-ping. 2010. Cryopreservation of *in vitro* shoot tips of potato by droplet vitrification and genetic stability of regenerated plantlets. *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (9): 1431 - 1438. (in Chinese)  
白建明, 陈晓玲, 卢新雄, 郭华春, 辛霞, 张志娥, 辛萍萍. 2010. 马铃薯茎尖小滴玻璃化法超低温保存及其再生植株的遗传稳定性. *园艺学报*, 37 (9): 1431 - 1438.
- Carvalho L C, Goulao L, Oliveira C, Goncalves J C, Amancio S. 2004. RAPD assessment for identification of clonal identity and genetic stability of *in vitro* propagated chestnut hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77: 23 - 27.
- Guo W L, Li Y D, Gong L, Li F X, Dong Y S, Liu B. 2006. Efficient micro-propagation of *Robinia ambigua* var. *idahoensis* (Idaho Locust) and detection of genomic variation by ISSR markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84: 343 - 351.
- Li G, Quiros C F. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theor Appl Genet*, 103: 455 - 461.
- Li Yi-dan, Tan Hua, Shan Xiao-hui, Li Feng-xia, Liu Yan-zhi. 2009. Efficient micropropagation of Japanese photinia [*Photinia glabra* (Thunb.) Maxim.] retaining genetic and epigenetic stability. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (7): 1071 - 1076. (in Chinese)  
李毅丹, 谭化, 单晓辉, 李凤霞, 刘艳芝. 2009. 日本石楠工厂化快繁体系的建立及再生苗遗传稳定性的分子鉴定. *园艺学报*, 36 (7): 1071 - 1076.
- Li Yong-xing, Zhang Li-yun. 2010. Research on tissue culture and rapid propagation of Honeysuckle *Lonicera macranthoides*. *Modern Agricultural Science and Technology*, (12): 101 - 102. (in Chinese)  
李永兴, 张丽云. 2010. 金银花灰毡毛忍冬组培快繁技术研究. *现代农业科技*, (12): 101 - 102.
- Nie Li-juan, Wang Zi-cheng, He Yan-xia. 2008. The variation of DNA methylation variation during successive transfer culture of chrysanthemum (*Dendranthema × grandiflorum*). *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (11): 1689 - 1694. (in Chinese)  
聂丽娟, 王子成, 何艳霞. 2008. 菊花组织培养继代过程中的 DNA 甲基化变化. *园艺学报*, 35 (11): 1689 - 1694.
- Soneji J R, Rao P S, Mhatre M. 2002. Suitability of RAPD for analyzing spined and spineless variants and regenerants in pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *Plant Molecular Biology Reporter*, 20: 307a - 307i.
- Tang Xiao-rong, Li Wu-ping, Peng Xiao-feng. 2005. Tissue culture and rapid propagation of *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz. *Plant Physiology Communications*, 41 (5): 642. (in Chinese)  
唐效蓉, 李午平, 彭晓锋. 2005. 灰毡毛忍冬的组织培养与快速繁殖. *植物生理学通讯*, 41 (5): 642.
- Wang Xiao-ming, Yi Ai-qin, Song Qing-an, Nie Qi-ying, Li Yong-xin. 2006. Tissue culture and rapid propagation of *Lonicera macranthoides* cv. 'Yinculei'. *Plant Physiology Communications*, 42 (3): 474. (in Chinese)  
王晓明, 易霭琴, 宋庆安, 聂启英, 李永欣. 2006. 灰毡毛忍冬新品种 '银翠蕾' 的组织培养及快速繁殖. *植物生理学通讯*, 42 (3): 474.
- 肖聪颖, 汪冶, 田兰, 郑钦方. 2011. 关于《中国药典》金银花、山银花标准的几点修订建议. *中国中药杂志*, 36 (10): 1406 - 1407.
- Zhou Ri-bao, Tong Qiao-zhen. 2003. Comparative study on content of chlorogenic acid in *Lonicera japonica* and *L. macranthoides*. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 26 (6): 399 - 400. (in Chinese)  
周日宝, 童巧珍. 2003. 灰毡毛忍冬与正品金银花的绿原酸含量比较. *中药材*, 26 (6): 399 - 400.