

红楠 ISSR-PCR 反应体系的建立和优化

姜荣波¹, 姜景民¹, 刘 军^{1*}, 陈益泰¹, 栾启福¹, 岳华峰²

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; 2. 国家林业局泡桐研究开发中心, 河南 郑州 450003)

摘要:为建立稳定的红楠 ISSR-PCR 最佳反应体系,在探索红楠基因组 DNA 提取的基础上,利用单因子试验和正交试验设计对反应体系进行优化。首先采用单因子试验对 Mg^{2+} 、引物、模板 DNA、dNTPs 的不同浓度水平进行优化,找出 ISSR-PCR 反应各因素的最佳浓度;同时为进一步增加结果的可靠性,采用正交试验设计方法 [$L_9(3^4)$] 对 Mg^{2+} 、引物、模板 DNA、dNTPs 4 个因素 3 个浓度水平进行优化和筛选。综合两种试验方法结果,最终获得了红楠 ISSR-PCR 最佳反应体系:反应体系为 20 μ L, Taq 酶 0.05 U \cdot μ L⁻¹, Mg^{2+} 2.0 mmol \cdot L⁻¹, 模板 DNA 1 ng \cdot L⁻¹, dNTPs 0.3 mmol \cdot L⁻¹, 引物(835) 0.5 μ mol \cdot L⁻¹, 1 \times PCR 缓冲液。建立重复性好、稳定性优良的 ISSR-PCR 反应体系,为下一步红楠群体遗传结构和遗传变异研究提供了技术支持。

关键词:红楠;ISSR-PCR 反应体系;单因子试验;正交设计

中图分类号:S718.46

文献标识码:

Establishment and Optimization of ISSR-PCR Reaction System of *Machilus thunbergii*

JIANG Rong-bo¹, JIANG Jing-min¹, LIU Jun¹, CHEN Yi-tai¹, LUAN Qi-fu¹, YUE Hua-feng²

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China;

2. Paulownia Research and Development Center, State Forestry Administration, Zhengzhou 450003, He'nan, China)

Abstract: In order to establish stable ISSR-PCR reaction system of *Machilus thunbergii*, single factor and orthogonal experiment design were used to optimize the reaction system after exploring *M. thunbergii* DNA extraction. For finding optimal concentration of factors of ISSR-PCR, the different levels of concentration of Mg^{2+} , primer, template DNA, dNTPs were trailed by single factor experiment. Meanwhile, in order to improve the reliability of the results of the single-factor test, the authors also adopted orthogonal design [$L_9(3^4)$] by four factors, three levels for further optimizing and screening the best conditions of Mg^{2+} , primer, template DNA, and dNTPs. The best ISSR-PCR reaction system of *M. thunbergii* was eventually established by comparing the two method's results, which included 20 μ L reaction system, Taq enzyme, 0.05 U \cdot μ L⁻¹, Mg^{2+} 2.0 mmol \cdot L⁻¹ template DNA 1 ng \cdot L⁻¹, dNTPs 0.3 mmol \cdot L⁻¹, primers(835) 0.5 μ mol \cdot L⁻¹, and 1 \times PCR buffer. The establishment of the better repeatability and stability ISSR-PCR reaction system could provide technical support for further research of genetic structure and genetic variety of *M. thunbergii* group.

Key words: *Machilus thunbergii*; ISSR-PCR reaction polymorphism; single factor experiments; orthogonal design

红楠(*Machilus thunbergii* Sieb. et Zucc.)为樟科 (Lauraceae) 润楠属(*Machilus* Nees)的常绿阔叶乔

收稿日期:2010-05-19

基金项目:中国林业科学研究院所基金“亚热带珍贵阔叶用材树种收集、评价和选育技术研究”(RISF6808);浙江省科技计划面上项目“樟楠类优质用材树种优良品种选育和无性繁殖技术研究”(2009C32068)

作者简介:姜荣波(1981—),男,山东青岛人,硕士研究生,主要从事林木遗传育种、种质资源研究。

*通讯作者:刘 军(1977—),男,山东泰安人,助理研究员,博士,主要从事珍贵用材树种研究。E-mail:liujunyalin@sohu.com

木,是国家三级保护优良珍稀树种,有“红木王”美称^[1],综合利用价值高;但人为干扰(如种子采摘、林下幼苗移植)、火灾等致使其生境破坏,生境片段化严重,自然种群日趋萎缩,被列为渐危种^[2]。国外对红楠研究较多的是日本和韩国,研究领域主要包括活性物质提取利用、群落结构^[3]、遗传变异规律^[4]等方面。目前国内对红楠的研究主要集中在育苗试验^[5]、群落特性^[6]、种群种子形态变异^[7]等方面。为了更好地保护红楠种质资源,应该加强红楠遗传多样性方面的研究。

分子标记技术是遗传多样性研究的一种重要手段,包括 SSR、ISSR、ALFP 及 RAPD 等方法。ISSR (Inter-simple Sequence Repeats) 是 Zietkiewicz 等创建的一种新型的微卫星类分子标记技术,现已在遗传图谱构建^[8-9]、基因定位^[10]、遗传多样性分析^[11]、种质资源鉴定^[12]等方面广泛应用。聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)是 20 世纪 80 年代中期发展起来的体外核酸扩增技术,具有特异、快速、简便、重复性好等优点;但其扩增反应易受到 Taq DNA 酶、退火温度、 Mg^{2+} 、引物模板 DNA、dNTPs 等组分浓度的影响,因此需要探索各组分浓度的最佳浓度水平。本研究采用单因素试验初步得出红楠 ISSR-PCR 最佳反应体系,然后采用正交设计试验进行验证。正交试验设计具有均衡分散、综合可比及效应明确等特性,可了解各因素之间的内在规律,能较快地找到最优的水平组合^[13],同时也可以减少工作量。最后综合两种试验方法结果,获得红楠 ISSR-PCR 最佳反应体系,可为红楠遗传多样性及相关研究提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

红楠幼叶于 2010 年 1 月采自浙江富阳中国林科院亚热带林业研究所珍贵树种育种基地(2009 年 7 月播种),随用随采。

1.2 主要试剂和仪器

用于 ISSR-PCR 反应的 Taq DNA 聚合酶、dNTPs、 Mg^{2+} 购自北京鼎国生物技术有限公司,引物序列由加拿大哥伦比亚大学提供,北京奥科生物技术有限责任公司合成。DNA 浓度和纯度检测使用 NanoDrop 2000 紫外分光光度计(Thermo Fisher 公司生产)。PCR 反应在 TaKaPa PCR Thermal Cycler Dice PCR 仪(TP600)上进行。

1.3 试验方法

1.3.1 红楠基因组 DNA 提取 以 CTAB 法^[14]为基础,结合多种方法^[15-16]进行改进,提取基因组 DNA。主要从操作过程、试剂配制方法和材料选择方面进行改进,设置多个比较试验,优化最佳提取方法。然后利用紫外分光光度计检测 DNA 浓度及纯度,EB 染色,用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。

1.3.2 利用单因素试验优化反应体系 通过参考相关文献及反复试验摸索,以 835 引物(AGA GAG AGA GAG AGA GYC)为例开展单因素试验,反应体系为 20 μ L,退火温度 55 $^{\circ}$ C。 Mg^{2+} 、引物、模板 DNA 及 dNTPs 各设置 3 个浓度水平,分别为 Mg^{2+} :1.5、2.0、2.5 $mmol \cdot L^{-1}$;引物 P(835):0.25、0.50、0.75 $\mu mol \cdot L^{-1}$;dNTPs:0.1、0.2、0.3 $mmol \cdot L^{-1}$;模板 DNA:1、2、3 $ng \cdot L^{-1}$,分别重复 3 次。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 35 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 35 s,40 个循环,72 $^{\circ}$ C 再延伸 7 min,4 $^{\circ}$ C 保温。

1.3.3 利用正交设计试验优化反应体系 采用 $L_9(3^4)$ 正交表,对 Mg^{2+} 、引物、模板 DNA、dNTPs 4 个因素 3 个水平进行正交设计(表 1),重复 2 次,进行 PCR 扩增。为了增加试验的可比性,其它条件(引物、模板 DNA、PCR 反应程序、检测手段)和单因素试验均保持一致。最后综合两种试验方法结果,获得较可靠、重复性好的 ISSR-PCR 反应体系。

表 1 ISSR-PCR 正交设计

处理号	影响因素			
	模板 DNA/ ($ng \cdot L^{-1}$)	dNTPs/ ($mmol \cdot L^{-1}$)	引物(835)/ ($\mu mol \cdot L^{-1}$)	Mg^{2+} / ($mmol \cdot L^{-1}$)
1	1.0	0.1	0.25	1.5
2	1.0	0.2	0.50	2.0
3	1.0	0.3	0.75	2.5
4	1.5	0.1	0.50	2.5
5	1.5	0.2	0.75	1.5
6	1.5	0.3	0.25	2.0
7	2.0	0.1	0.75	2.0
8	2.0	0.2	0.25	2.5
9	2.0	0.3	0.50	1.5

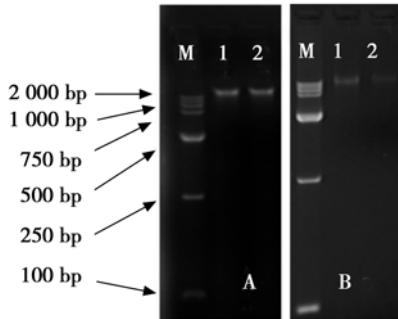
注:正交设计实验中模板 DNA 浓度与单因子实试验设计的略有差别(为了更精确找出最佳模板 DNA 浓度)。

2 结果与分析

2.1 红楠基因组 DNA 提取结果

2.1.1 操作过程对红楠 DNA 提取结果的影响 试验表明:酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)与氯仿:异戊醇

(24:1)配合使用比单独使用效果好。图1 A 为混合使用以上两种试剂提取红楠基因组总 DNA 的凝胶电泳结果,B 为单独使用酚: 氯仿: 异戊醇的提取结果。可以看出,混合使用的电泳条带明显比单独使用的清晰、明亮。

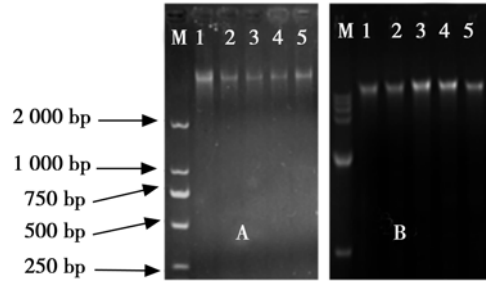


M:2 000 bp 标准分子量 DNA;1~2:DNA 样品号
图1 不同的操作对 DNA 提取结果的影响

2.1.2 试剂配制方法对红楠 DNA 提取结果的影响

在高大伟^[16]樟科(Lauraceae)植物 DNA 提取方法的基础上,经过多次试验发现,β-巯基乙醇和 PVP 用现配比配好后储存的效果好。图2 中,A 是用

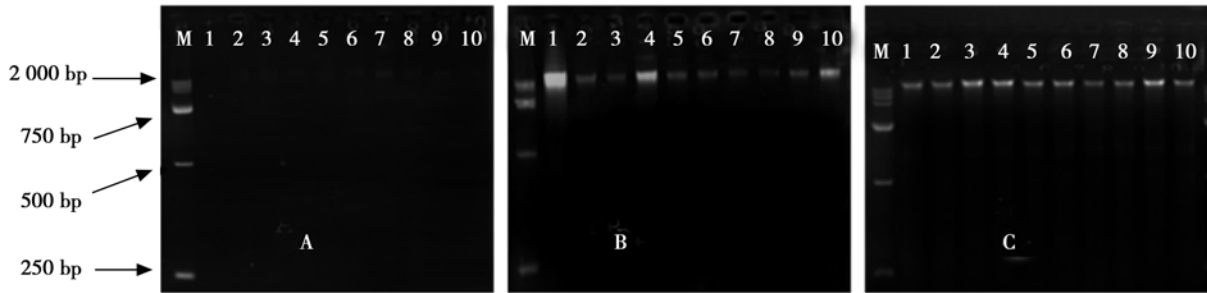
储存(4℃)20 d 的缓冲液提取 DNA 的情况,B 是用现配的缓冲液提取 DNA 的情况。可以看出,与 B 相比,A 的条带模糊,亮度低,存在降解情况,而 B 的条带整齐,明亮清晰,达到 PCR 扩增要求。



M:2 000 bp 标准分子量 DNA;1~5:DNA 样品号
图2 不同试剂配制方法对 DNA 提取结果的影响

2.1.3 所选材料对红楠 DNA 提取质量的影响

如图3 的 A、B、C 分别用了3 种提取材料,即采用硅胶干燥叶片、老叶片、幼叶片进行 DNA 提取。由图3 可以看出:用硅胶干燥叶片难提取出 DNA,叶片越嫩,提取 DNA 的质量越高。所选材料对红楠 DNA 提取质量影响较大。

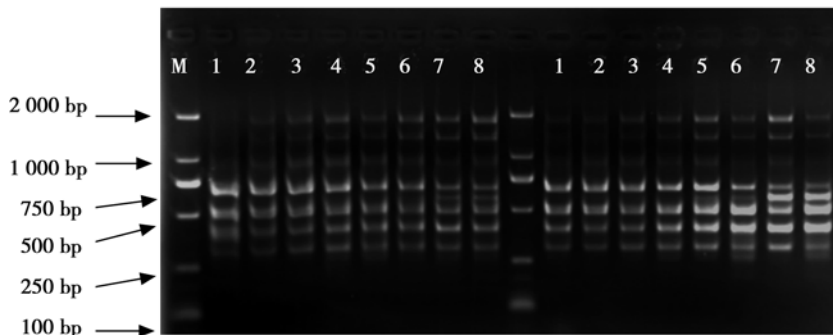


M:2 000 bp 标准分子量 DNA;1~10:DNA 样品号
图3 不同材料对 DNA 提取结果的影响

2.2 ISSR-PCR 最优退火温度的筛选

退火温度是影响 PCR 特异性的较重要因素。退火温度取决于引物的长度、碱基组成及其浓度、靶基

序列的长度,以及所选引物中 GC 碱基对的含量,通常温度范围为 45~65℃^[19]。本次试验以 835 (AGA GAG AGA GAG AGA GYC)为引物,从 48℃到 56℃

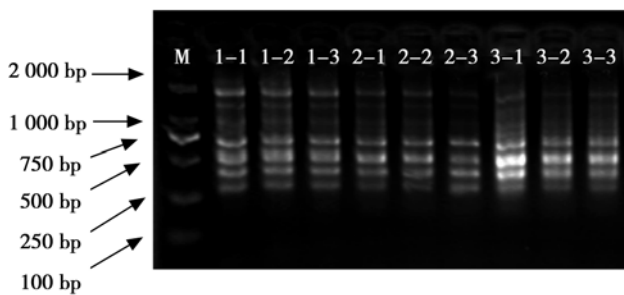


M:2 000 bp 标准分子量 DNA;1~8:温度分别为 48、49、50、52、53、54、55、56℃,右侧 1~8 号为重复 1 次
图4 不同温度对 ISSR-PCR 反应的影响

设置了 8 个退火温度,其它条件保持一致,通过琼脂糖凝胶电泳得到如图 4 所示条带,可以看出:7 号泳道的电泳条带最多,清晰度高,拖带现象不严重,因此选择 55 °C 作为引物 835 的最佳退火温度。

2.3 单因子试验结果

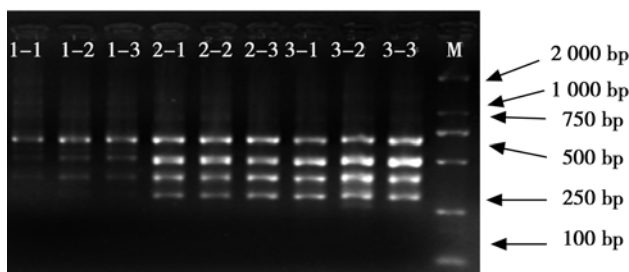
2.3.1 Mg²⁺ 浓度对 ISSR-PCR 反应的影响 引物与模板的双链杂交体的解链与退火温度受二价阳离子的影响,特别是其中的 Mg²⁺ 浓度影响。如果 Mg²⁺ 浓度过高,反应特异性降低,易出现非特异扩增;浓度过低则会降低 Taq DNA 聚合酶的活性,使反应产物减少。从图 5 可以看出:当 Mg²⁺ 浓度为 2.0 mmol · L⁻¹ 时,扩增的条带较清晰,而且点样孔较干净,因此选择 2.0 mmol · L⁻¹ 为 Mg²⁺ 的最佳反应浓度。



M: 2 000 bp 标准分子量 DNA; 1-1 ~ 3, 2-1 ~ 3, 3-1 ~ 3;
Mg²⁺ 浓度分别为 1.5、2.0、2.5 mmol · L⁻¹

图 5 不同 Mg²⁺ 浓度对 ISSR-PCR 反应的影响

2.3.2 引物浓度对 ISSR-PCR 反应的影响 引物是 PCR 特异性反应的关键,PCR 产物的特异性取决于引物与模板 DNA 互补的程度。以最低引物量产生所需要的结果为好,引物浓度偏高会引起错配和非特异性扩增,且可增加引物之间形成二聚体的机会。从图 6 可以看出:当引物 835 浓度为 0.50 μmol · L⁻¹ 时,扩增出较清晰、稳定的条带,过高或过低均达不到这种水平,因此选择 0.50 μmol · L⁻¹ 为引物的最佳浓度。

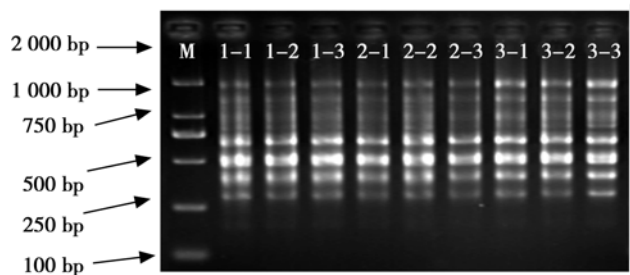


M: 2 000 bp 标准分子量 DNA; 1-1 ~ 3, 2-1 ~ 3, 3-1 ~ 3;
引物(835)浓度分别为 0.25、0.50、0.75 μmol · L⁻¹

图 6 不同浓度的引物对 ISSR-PCR 反应的影响

2.3.3 dNTPs 浓度对 ISSR-PCR 反应的影响

dNTPs 的质量与浓度和 PCR 扩增效率有密切关系,dNTPs 粉呈颗粒状,如保存不当易变性失去生物学活性。浓度过低会降低 PCR 产物的产量,过高能与 Mg²⁺ 结合,使游离的 Mg²⁺ 降低。从图 7 可以看出,当 dNTPs 浓度为 0.3 mmol · L⁻¹ 时,条带清晰,而且多态性好,因此选择 0.3 mmol · L⁻¹ 为 dNTPs 的最佳反应浓度。

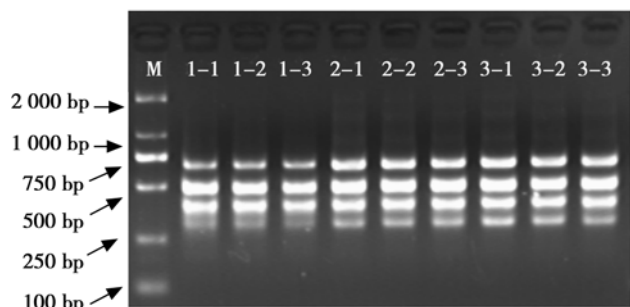


M: 2 000 bp 标准分子量 DNA; 1-1 ~ 3, 2-1 ~ 3, 3-1 ~ 3;
dNTPs 浓度分别为 0.1、0.2、0.3 mmol · L⁻¹

图 7 不同的 dNTPs 浓度对 ISSR-PCR 反应的影响

2.3.4 模板 DNA 浓度对 ISSR-PCR 反应的影响

模板 DNA 浓度是影响 ISSR-PCR 的重要因子,模板质量浓度过低,扩增不稳定或无法扩增;模板浓度过高,又会相应增加非特异性扩增的出现^[28]。此次试验对模板 DNA 设置了 3 个浓度水平(1、2、3 ng · L⁻¹),分别重复 3 次。从图 8 可以看出:浓度为 2 ng · L⁻¹ 时,条带的清晰度和 3 ng · L⁻¹ 时相差不大,但从节约资源、减少非特异性条带出现几率的角度考虑,初步选择 2 ng · L⁻¹ 作为模板 DNA 的最佳浓度。



M: 2 000 bp 标准分子量 DNA; 1-1 ~ 3, 2-1 ~ 3, 3-1 ~ 3;
模板 DNA 浓度分别为 1、2、3 ng · L⁻¹

图 8 不同模板 DNA 浓度对 ISSR-PCR 反应的影响

2.4 正交设计试验结果

根据 PCR 产物条带的数量、明暗及杂带的数量和背景状况对正交设计试验结果进行分析打分,最

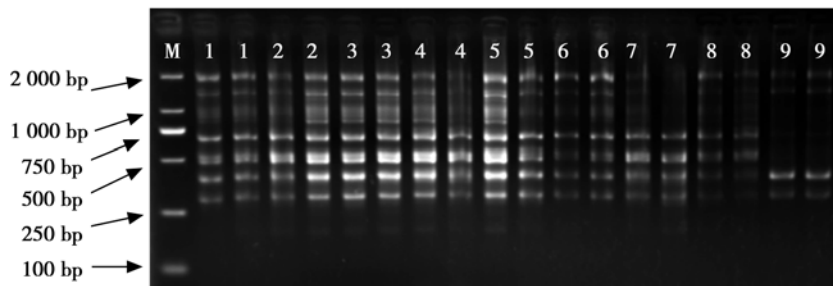
好的记为9分,最差的记为1。根据图9得出9个组合的分数依次是:5,8,9,7,4,6,3,1,2。由表2得出同一因素不同水平的极差(R),而极差反映的是各个因素对 ISSR-PCR 反应体系的影响情况, R 越大说明该因素对反应结果影响越显著。可以得出各个因素对结果影响程度从大到小依次是:模板 DNA、 Mg^{2+} 、引物(835)、dNTPs。每个因素水平下的 B1 ~ B3 平均值反映的是各个因素水平对反应结果的影响情况,平均值越大说明该因素水平的效果越好。因此通过正交设计试验得出 ISSR-PCR 最佳反应体系:模板 DNA $1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, Mg^{2+} $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, dNTPs $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,引物(835) $0.50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该结果与单因子试验结果基本吻合,综合两种试验方法结果,最终获得红楠 ISSR-PCR 最佳反应体系:反应体系为 $20 \mu\text{L}$,Taq 酶 $0.05 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,模板 DNA $1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, Mg^{2+} $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,dNTPs $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,引物

(835) $0.50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。1 × PCR 缓冲液, $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 。PCR 反应程序为: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s, $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 35 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 35 s, 40 个循环, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 再延伸 7 min, $10 \text{ }^\circ\text{C}$ 保温。最后用这一优化体系对 17 个红楠天然群体样品 DNA 进行检测(图 10),能够得出多态性好、清晰度高、主次分明的电泳条带,达到了 ISSR-PCR 反应的要求。

表2 正交设计直观分析

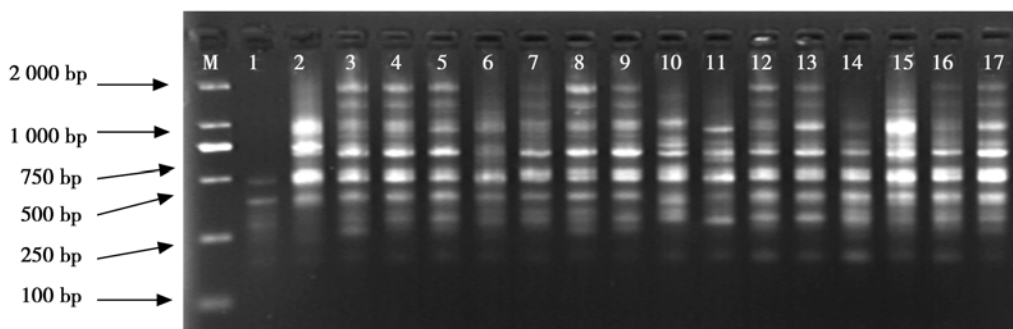
结果	影响因素			
	模板 DNA	dNTPs	引物(835)	Mg^{2+}
A1	22	15	12	11
A2	17	13	17	17
A3	6	17	16	17
B1	22/3	15/3	12/3	11/3
B2	17/3	13/3	17/3	17/3
B3	6/3	17/3	16/3	17/3
R	16/3	4/3	5/3	6/3

注:A1 ~ A3 为每个因素同一水平的实验值之和;B1 ~ B3 为每一因素水平下的平均值; R 为同一因素不同水平间的极差。



M:2 000 bp 标准分子量 DNA;1 ~ 9;处理号(同表2),重复1次

图9 正交设计试验结果



M:2 000 bp 标准分子量 DNA;1 ~ 17;17 个不同红楠天然群体混合 DNA 样本的电泳条带

图10 17 个红楠天然群体的 ISSR-PCR 最佳反应体系扩增结果

3 小结与讨论

由于红楠细胞内含有大量的多糖、多酚、鞣质以及桂皮醛、桂皮酸等次生代谢物,不仅能干扰 DNA 提取过程,而且使提取的 DNA 溶液粘稠,样品呈棕褐色,不能用作分子生物分析和研究的 PCR 模板^[17],分子生物学家称其为“顽拗植物”;然而采用 ISSR 分子标记技术对红楠进行遗传多样性研究必须以较高质量的 DNA 为材料基础,因此,红楠 DNA 的提取显得尤为重要。本研究以 CTAB 法为基础,结合多种提取方法,通过大量实验发现,所提取的 DNA 质量主要与材料选择、试剂配制方法和操作过程有关。针对这 3 个方面因素设置了多个对比试验,得出用新鲜嫩叶、现配试剂、酚:氯仿:异戊醇与氯仿:异戊醇配合使用的提取效果最佳,能够达到进一步研究的要求,为红楠 ISSR-PCR 反应体系的建立打下了基础。

正交试验设计是一种高效、经济的试验设计方法,具有布点均衡、试验次数少、结果直观等优点。本试验在获得稳定的红楠 DNA 提取方法的基础上,首先采用单因素试验,对影响 ISSR-PCR 反应体系的几个主要因素进行优化。然后再采用正交设计试验进一步优化红楠的 ISSR-PCR 反应体系,最后综合两种试验方法结果,获得了红楠 ISSR-PCR 最佳反应体系。因为正交试验设计法存在精确度较低等弊端,所以结合单因素试验能够弥补其不足。采用该反应体系对 17 个红楠天然群体的 DNA 进行扩增,能够得到清晰、亮暗分明的条带,达到了进行下一步分子生物学分析的要求,有利于今后开展红楠遗传多样性分析、遗传图谱构建及种质资源鉴定等研究。

参考文献:

- [1] 谢力文. 红楠无性繁殖技术[J]. 林业实用技术, 2005(9): 45-46
- [2] 江香梅, 俞 湘. 红楠及其研究进展[J]. 江西农业大学学报, 2001, 23(2): 231-235
- [3] Maesako Y. Community structure of *Machilus thunbergii* forests disturbed by birds (*Calonectris leucomelas*: streaked shearwater) on Kanmuriyima island, Kyoto Prefecture, Japan[J]. Japanese Journal of Ecology, 1985, 35(3): 387-400
- [4] Kim C S, Cho R M, Kim W W. Heritabilities for height and diameter at root collar and determination of proportion of selection for estimation of genetic gain in 4-yr-old open-pollinated progenies of *Machilus thunbergii*[J]. Research Report of the Institute of Forest Genetics, 1992, 28: 40-47
- [5] 邵春荣, 周芳勇, 魏 斌, 等. 红楠播种育苗试验研究[J]. 林业科技开发, 2007, 21(2): 73-76
- [6] 曾繁茂. 红楠群落特征的初步研究[J]. 福建林业科技, 1999, 26(1): 42-45
- [7] 陈 艳, 沈 浪, 应向阳, 等. 中国大陆青冈分布区东缘大金山岛种群种子形态变异[J]. 广西植物, 2007, 27(4): 555-559
- [8] Bornet B, Branchard M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2001, 19: 209-215
- [9] Sankar A A, Moore G A. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in *Citrus* and extension of the genetic linkage map[J]. Theor Appl Genet, 2001, 102(2-3): 206-214
- [10] Ratnaparkhe M B, Santra D K, Tullu A, et al. Inheritance of inter-simple-sequence-repeat polymorphisms and linkage with a fusarium-wilt resistance gene in chickpea[J]. Theor Appl Genet, 1998, 96(3-4): 348-353
- [11] Luan S, Chiang T Y, Gong X. High genetic diversity vs. low genetic differentiation in *Nouelia insignis* (Asteraceae), a narrowly distributed and endemic species in China, revealed by ISSR fingerprinting[J]. Annals of Botany, 2006, 98(3): 583-589
- [12] Escandón A S, Zelener N, de la Torre M P, et al. Molecular identification of new varieties of *Nierembergia linariaefolia* (Graham), a native Argentinean ornamental plant[J]. J Appl Genet, 2007, 48(2): 115-123
- [13] 续九如, 黄智慧. 林业试验设计[M]. 北京: 中国林业出版社, 1998
- [14] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochem Bull, 1987, 19: 11-15
- [15] 刘 军. 毛红椿天然居群遗传结构的研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2007
- [16] 高大伟. 樟科植物 DNA Barcode 及香樟系统地理学的初步研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2008
- [17] 徐 虹, 郑 敏, 章 军, 等. 3 种樟科植物的细胞总 DNA 提取[J]. 云南植物研究, 2004, 26(4): 451-457
- [18] 叶 倩. 夏腊梅、红楠的种质特异性分子标记的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006
- [19] Reddy P, Saril N, Siddiq E A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding[J]. Euphytica, 2002, 128(1): 9-17
- [20] 谢运海, 夏德安, 姜 静, 等. 利用正交设计优化水曲柳 ISSR-PCR 反应体系[J]. 分子植物育种, 2005, 3(3): 445-450
- [21] 李 鹏, 汪阳东, 陈益存, 等. 油桐 ISSR-PCR 最佳反应体系的建立[J]. 林业科学研究, 2008, 21(2): 194-199
- [22] 余 艳, 陈海山, 葛学军, 等. 简单重复序列区间 (ISSR) 引物反应条件优化与筛选[J]. 热带亚热带植物学报, 2003, 11(1): 15-19
- [23] 乔玉山, 章 镇, 房经贵, 等. 李种质资源 ISSR 反应体系的建立[J]. 果树学报, 2003, 20(4): 270-274
- [24] 杨 华, 宋绪忠, 尹光天, 等. 黄藤 ISSR 反应体系的建立[J]. 福建林学院学报, 2006, 26(2): 152-155