

徐 雯,瞿印权,陈剑成,等. 绿竹 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 江苏农业科学,2017,45(15):34-38.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.15.008

# 绿竹 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化

徐 雯<sup>1</sup>,瞿印权<sup>1</sup>,陈剑成<sup>1</sup>,何天友<sup>2</sup>,荣俊冬<sup>1</sup>,陈礼光<sup>1</sup>,郑郁善<sup>1</sup>

(1. 福建农林大学林学院,福建福州 350002; 2. 福建农林大学艺术学院园林学院,福建福州 350002)

**摘要:**以绿竹基因组 DNA 为 ISSR-PCR 扩增模板,采用单因素试验方法,对 dNTPs、Mg<sup>2+</sup>、Taq DNA 聚合酶、引物、模板 DNA 设置 7 个不同浓度梯度进行研究,并对退火温度和循环次数进行筛选,建立绿竹 ISSR-PCR 最佳反应体系和扩增程序,并利用优化后的体系对 100 条 ISSR 引物进行筛选。最终确定的最佳反应体系为:20 μL 的扩增体系中,dNTPs 浓度为 0.2 mol/L,Mg<sup>2+</sup> 浓度为 2.0 mmol/L,Taq DNA 聚合酶用量为 1.0 U,引物浓度为 0.4 μmol/L,DNA 用量为 50 ng,10 × PCR buffer 体积为 2 μL、剩余体积用灭菌 ddH<sub>2</sub>O 补全。扩增程序为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 45 s,(根据引物的退火温度)复性 30 s,72 ℃ 延伸 90 s,循环 38 次;72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 保存。以此体系为基础进行引物筛选,在 100 条 ISSR 引物中筛选出 14 条扩增条带清晰、多态性较高、重复性好的引物。本研究建立了绿竹 ISSR-PCR 最佳反应体系并筛选出高多态性引物,为绿竹的指纹图谱、遗传多样性分析、分子育种和品种鉴定等研究提供了基础。

**关键词:**绿竹;ISSR;反应体系;扩增程序;引物筛选

**中图分类号:**S795.501 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)15-0034-05

绿竹 [*Dendrocalamopsis oldhami* (Munro) Keng f.] 是禾本科竹亚科 (Bambusoideae) 绿竹属 (*Dendrocalamopsis*) 的模式种,是绿竹属中分布最广、栽培最多的竹种<sup>[1]</sup>。绿竹分布在中亚热带南部、南亚热带的北部和中部,主要分布于东南亚等国家<sup>[2]</sup>。绿竹原产我国台湾省淡水,我国主要分布在浙江南

部、福建、台湾、广东、广西和海南等省区,是我国南方优良速生的笋材两用丛生竹种之一,具有较高的观赏价值、经济价值和社会价值<sup>[3]</sup>。

分子标记技术经过三代的发展,已经出现了十几种分子标记技术,目前使用比较广泛且成熟的技术有 SSR、RAPD、ISSR、SRAP、RFLP、AFLP、SNP 等<sup>[4-5]</sup>。ISSR 技术是 1994 年 Zietkiewicz 等在 SSR 分子标记技术的基础上发展起来的一种新的分子标记方法,它在 SSR 序列的 3' 或 5' 末端加上 1~4 个核苷酸作为反应的引物,从而扩大 DNA 序列<sup>[6]</sup>。此种分子标记技术具有简单快捷易操作、DNA 用量较少、稳定性较好、试验成本低等优点,且扩增出的条带多态性较好,重复性较高<sup>[7-8]</sup>。目前 ISSR 技术已经广泛应用于种质资源的鉴定、基

收稿日期:2017-01-10

基金项目:福建省科技重大专项(编号:2013NZ0001);福建省科技重大项目(编号:2010N5002)。

作者简介:徐 雯(1993—),女,江苏扬州人,硕士研究生,研究方向为森林培育理论与技术研究。E-mail:1243051350@qq.com。

通信作者:郑郁善,教授,博士生导师,主要从事森林培育与园林植物栽培研究。E-mail:zys1960@163.com。

Cells,2011,31(6):553-561.

[7] Wang Z, Wei P, Wu M, et al. Analysis of the sucrose synthase gene family in tobacco: structure, phylogeny, and expression patterns[J]. Planta,2015,242(1):153-166.

[8] 陈卫军,魏益民,张国权,等. 国内外谷子的研究现状[J]. 杂粮作物,2000,20(3):27-29.

[9] Punta M, Coghill P C, Eberhardt R Y, et al. The Pfam protein families database[J]. Nucleic Acids Research,2012,40(1):290-301.

[10] Schultz J, Milpetz F, Bork P, et al. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,1998,95(11):5857-5864.

[11] Marchler-Bauer A, Anderson J B, Chitsaz F, et al. CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database[J]. Nucleic Acids Research,2009,37:205-210.

[12] Wang Y, Deng D, Shi Y, et al. Diversification, phylogeny and evolution of auxin response factor (ARF) family: insights gained from analyzing maize ARF genes[J]. Molecular Biology Reports, 2012,39(3):2401-2415.

[13] Sigrist C J, Cerutti L, de Castro E, et al. PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation[J]. Nucleic Acids Research,2010,38:161-166.

[14] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. Clustal W and clustal X version 2.0[J]. Bioinformatics,2007,23(21):2947-2948.

[15] Kiefer F, Arnold K, Künzli M, et al. The SWISS-MODEL repository and associated resources[J]. Nucleic Acids Research, 2009,37:387-392.

[16] Bailey T L, Boden M, Buske F A, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching[J]. Nucleic Acids Research,2009, 37:202-208.

[17] Cardini C E, Leloir L F, Chiriboga J. The biosynthesis of sucrose[J]. Journal of Biological Chemistry,1955,214(1):149-155.

[18] An X, Chen Z, Wang J, et al. Identification and characterization of the *Populus* sucrose synthase gene family[J]. Gene,2014,539(1): 58-67.

[19] Zhang D Q, Xu B H, Yang X H, et al. The sucrose synthase gene family in *Populus*: structure, expression, and evolution[J]. Tree Genetics & Genomes,2011,7(3):443-456.

因定位、遗传多样性分析、指纹图谱的构建等方面的研究,是目前使用最广泛的分子标记技术之一<sup>[9-12]</sup>。本试验采用了单因素多水平梯度方法建立绿竹 ISSR-PCR 最佳反应体系并筛选出高多态性引物,旨在为绿竹的指纹图谱、遗传多样性分析、分子育种和品种鉴定等研究提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

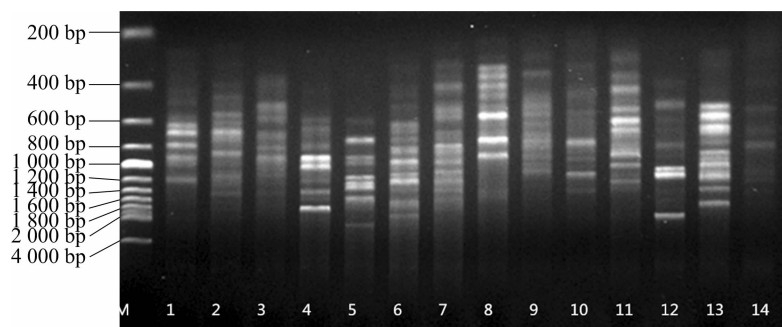
供试的材料取自于福建省东山国有赤山林场的绿竹地理种源试验样地。对不同的植株随机选取 3~5 张新鲜叶片,将采集到的新鲜叶片用变色硅胶干燥的方法保存,将干燥的材料迅速带回实验室,于 -80℃ 超低温冰箱保存。

### 1.2 DNA 的提取与检测

绿竹全基因组 DNA 的提取采用杭州博日公司 Biospin 植物基因组 DNA 提取试剂盒 (Cat#BSC13S1) 法,并对该方法略作调整。提取完后用紫外分光光度计测定 DNA 的浓度和纯度。并用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性与清晰性,看是否有降解或断裂现象,将满足试验条件的 DNA 稀释到 20 ng/μL,并置于 -20℃ 冰箱保存。

### 1.3 引物筛选

本试验 ISSR 引物采用加拿大哥伦比亚大学公布的 100 条引物序列,引物由上海生物工程技术服务有限公司合成,选择 1 个 DNA 模板对引物进行初步筛选。从中选择条带清晰、重复性好、稳定性较高、具有多态性的引物,最后确定初选引物为 U815 (图 1)。待最优反应体系建立后,再进行复筛,从 100 条引物中最终筛选出 14 条最适宜的引物。



M—200 bp marker; 1~14依次为引物UBC810、UBC811、UBC812、UBC815、UBC825、UBC826、UBC827、UBC835、UBC836、UBC840、UBC841、UBC843、UBC845、UBC857

图1 ISSR 部分引物初始筛选

### 1.4 初始 PCR 扩增程序及反应体系

参照文献[13-15]并作适当调整,确定初始扩增反应体系为:20 μL 的扩增体系中,dNTPs 浓度为 0.25 mmol/L,  $Mg^{2+}$  浓度为 2.5 mmol/L,引物浓度为 0.4 μmol/L, *Taq* DNA 聚合酶用量为 1 U, DNA 用量为 50 ng, 10 × PCR buffer 体积为 2 μL,剩余体积用灭菌 ddH<sub>2</sub>O 补齐。初始扩增程序为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 45 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 90 s,循环 35 次;72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存。

### 1.5 扩增程序的优化

本试验采用单因多水平梯度试验法对影响 PCR 反应的 dNTPs 浓度、 $Mg^{2+}$  浓度、*Taq* DNA 聚合酶用量、引物浓度、模板 DNA 含量、退火温度及循环次数 7 个主要因素进行筛选。其中 dNTPs 浓度、 $Mg^{2+}$  浓度、*Taq* DNA 聚合酶用量、引物浓度和模板 DNA 含量这 5 个因素设置 7 个梯度浓度水平 (表 1)。待最优反应体系建立后,再筛选最佳退火温度与最佳循环次

表 1 ISSR 扩增体系单因素筛选

水平	因素				
	dNTP (mmol/L)	$Mg^{2+}$ (mmol/L)	<i>Taq</i> DNA 聚 合酶 (U)	引物 (μmol/L)	DNA (ng/20 μL)
1	0.05	0.5	0.50	0.1	10
2	0.10	1.0	0.75	0.2	25
3	0.15	1.5	1.00	0.3	40
4	0.20	2.0	1.25	0.4	50
5	0.25	2.5	1.50	0.6	60
6	0.30	3.0	1.75	0.8	80
7	0.35	3.5	2.00	1.0	100

数。使用预试验中扩增效果较好的引物 U815 对绿竹的基因组 DNA 进行 ISSR 扩增,PCR 产物于 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳 45 min,电压设为 5 V/cm。并用紫外凝胶成像分析仪进行观察和拍照。

### 1.6 ISSR 有效引物的筛选

以优化的反应体系及扩增程序体系为基础进行引物筛选,在 100 条 ISSR 引物中筛选出 14 条扩增条带清晰、多态性较高、重复性好的引物。

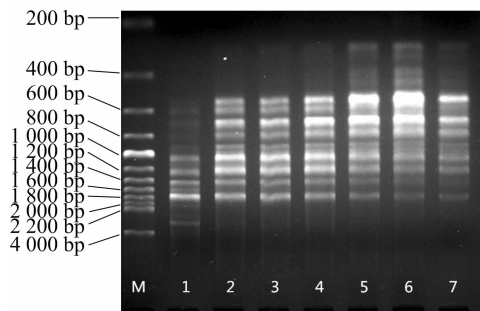
## 2 结果与分析

### 2.1 dNTPs 对 ISSR-PCR 扩增的影响

对 dNTPs 设置 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35 mmol/L 7 个不同浓度梯度,分别进行 PCR 扩增,结果如图 2 所示。当 dNTPs 浓度为 0.05 mmol/L 时,PCR 产率很低,高分子量区域条带很少,整体条带都比较暗,当 dNTPs 浓度为 0.35 mmol/L 时,扩增出的条带也较暗,当 dNTPs 浓度为 0.20~0.30 mmol/L 时,条带明亮而清晰,扩增效果较好。为降低试验成本,最终选择 dNTPs 浓度为 0.20 mmol/L。

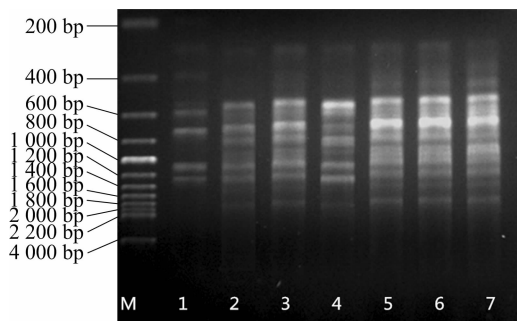
### 2.2 $Mg^{2+}$ 对 ISSR-PCR 扩增的影响

不同浓度的  $Mg^{2+}$  对绿竹 ISSR-PCR 扩增的影响显著 (图 3),过高过低都会影响扩增的结果。当  $Mg^{2+}$  浓度低于或等于 1.0 mmol/L 时,高分子量区域没有条带,扩增出的条带很暗,当  $Mg^{2+}$  浓度高于或等于 2.5 mmol/L 时,扩增出的条带又会出现弥散的现象,当  $Mg^{2+}$  的浓度为 2.0 mmol/L 时,扩增出的条带比较清晰、稳定。所以  $Mg^{2+}$  最佳用量确定为 2.0 mmol/L。



M—200 bp marker; 1~7依次为0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35 mmol/L dNTPs

图2 不同 dNTPs 浓度对 ISSR-PCR 扩增的影响

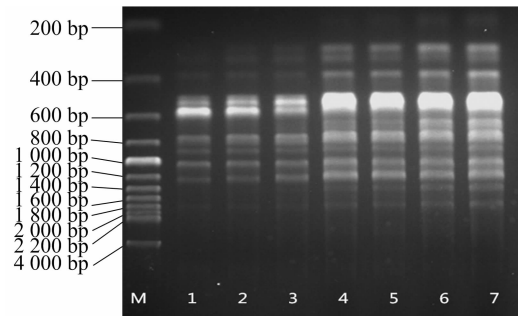


M—200 bp marker; 1~7依次为0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mmol/L  $Mg^{2+}$

图3 不同  $Mg^{2+}$  浓度对 ISSR-PCR 扩增的影响

## 2.3 Taq DNA 聚合酶对 ISSR-PCR 扩增的影响

对 *Taq* DNA 聚合酶进行单因子筛选的结果如图 4 所示,当 *Taq* DNA 聚合酶用量为 0.50 U 时,扩增出的条带较弱,当 *Taq* DNA 聚合酶用量为 1.00 U 时,扩增出的条带比较清晰。当 *Taq* DNA 聚合酶用量高于 1.00 U 时,低分子量区域出现弥散现象,不易区分,当浓度过高时还易出现非特异性扩增。所以确定 *Taq* DNA 聚合酶最佳用量为 1.00 U。

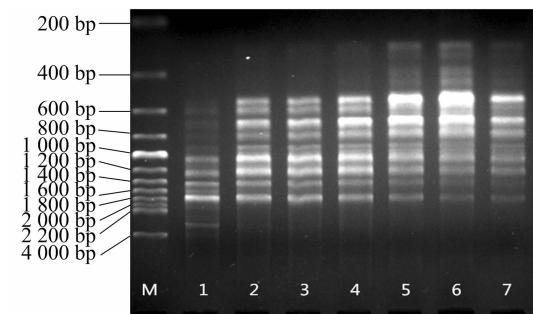


M—200 bp marker; 1~7依次为0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、1.75、2.00 U *Taq* DNA

图4 不同 *Taq* DNA 酶用量对 ISSR-PCR 扩增的影响

## 2.4 引物浓度对 ISSR-PCR 扩增的影响

由图 5 可知,当引物浓度在 0.2~0.4 mmol/L 时,扩增条带较多,而且清晰且稳定;当引物浓度高于 0.4 mmol/L 时,高分子量区域扩增出来的条带较暗,低分子量区域扩增条带不稳定,还出现非特异性扩增;当引物浓度低于 0.2 mmol/L 时,低分子量区域扩增条带数较少,且整体条带比较暗。最后确定引物最佳用量为 0.4 mmol/L。

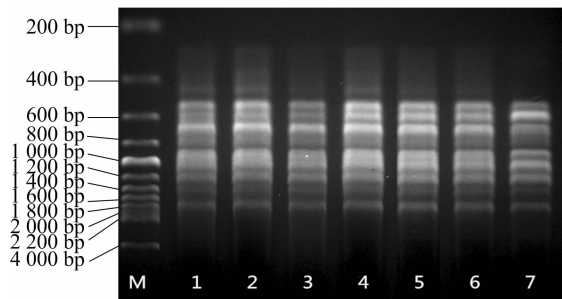


M—200 bp marker; 1~7依次为0.1、0.2、0.3、0.4、0.6、0.8、1.0  $\mu\text{mol/L}$  引物

图5 不同引物浓度对 ISSR-PCR 扩增的影响

## 2.5 模板 DNA 浓度对 ISSR-PCR 扩增的影响

对模板 DNA 用量在 10~100 ng 之间设置了 7 个梯度水平进行 PCR 扩增,结果如图 6 所示,7 个梯度均能扩增出明亮的条带,且扩增出的条带数和清晰度差不多,说明模板 DNA 浓度对 ISSR-PCR 扩增的影响较小。在 7 个梯度中,模板 DNA 含量为 50 ng 时效果最佳,确定其为最佳浓度。



M—200 bp marker; 1~7依次为10、20、40、50、60、80、100 ng 模板 DNA

图6 不同模板 DNA 浓度对 ISSR-PCR 扩增的影响

## 2.6 退火温度对 ISSR-PCR 扩增的影响

根据引物 U815 的  $T_m$  值 52.9  $^{\circ}\text{C}$ ,在 45~60  $^{\circ}\text{C}$  之间设置了 12 个温度梯度,结果(图 7)显示,退火温度对扩增影响明显,当退火温度较低时,扩增特异性较差,条带较弱且比较模糊,当退火温度升高时,电泳条带逐渐增多,清晰度也逐渐增强,当退火温度为 47.5  $^{\circ}\text{C}$  时,扩增的条带数最为清晰稳定,当退火温度大于 47.5  $^{\circ}\text{C}$  时,高分子量区域和中等分子量区域条带的扩增效率下降,直至无扩增条带,且在低分子量区域也逐渐出现弥散现象,整体电泳条带数逐渐减少,清晰度也逐渐减弱,因此,确定引物 U815 的最佳退火温度为 47.5  $^{\circ}\text{C}$ 。

## 2.7 循环次数对 ISSR-PCR 扩增的影响

PCR 的循环次数对 ISSR-PCR 扩增也有一定的影响。本试验对循环次数设置了 30、32、35、38、40 次 5 个梯度,试验结果如图 8 所示。当循环次数为 38 次时,扩增条带最为清晰明亮其稳定。所以选择 38 次循环为 ISSR-PCR 反应的最佳循环次数。

## 2.8 ISSR 有效引物的筛选

根据绿竹优化后的最佳反应体系,对 100 条引物进行扩增。部分引物筛选结果如图 9 所示。结果显示,利用建立的体系筛选不同的引物时,大部分引物都能扩增出清晰、明亮的条带,只有少部分引物扩增出的条带数较少或不能扩增出条带。说明本试验建立的绿竹的最佳反应体系具有较高的重复

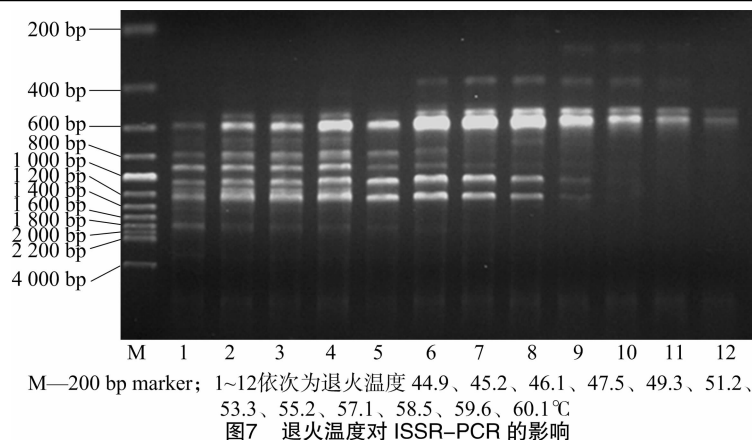


图7 退火温度对 ISSR-PCR 的影响

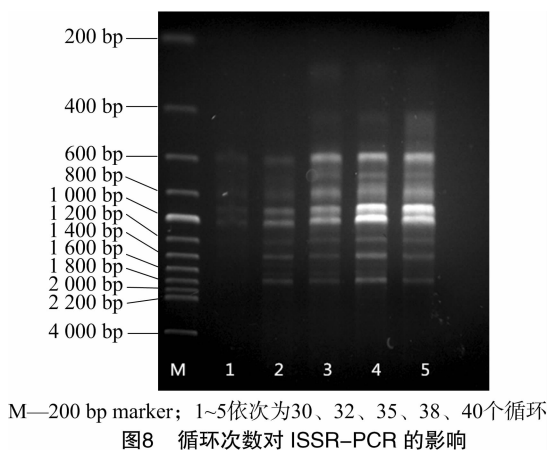


图8 循环次数对 ISSR-PCR 的影响

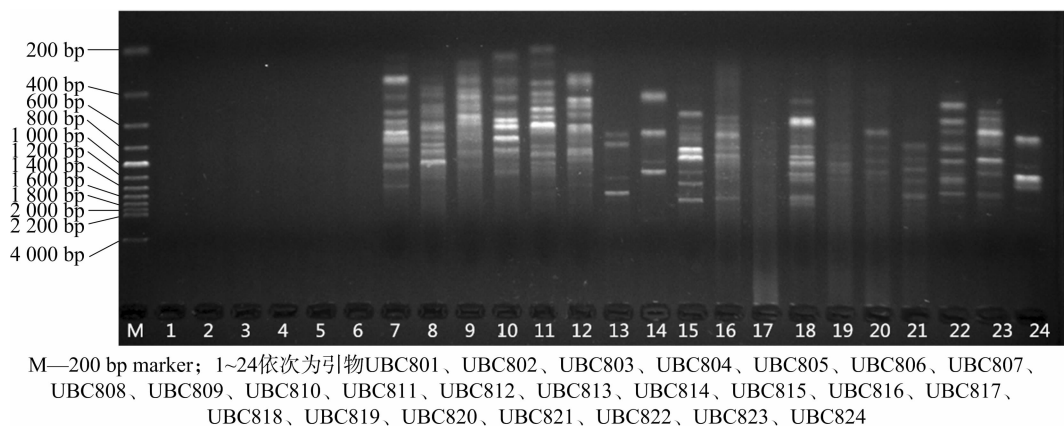


图9 ISSR 有效引物的筛选

性和稳定性。最终在 100 条引物中筛选出 14 条扩增条带清晰不拖尾,稳定性较好的引物,分别为 UBC807、UBC810、UBC811、UBC815、UBC822、UBC841、UBC856、UBC857、UBC858、UBC859、UBC868、UBC881、UBC895、UBC899。

### 3 讨论与结论

#### 3.1 讨论

dNTPs 作为 PCR 扩增的底物,对 ISSR-PCR 扩增的影响较大,由图 1 可知,当 dNTPs 浓度很低时,DNA 的合成速率很低,使得 PCR 产物单链化,扩增出的条带较暗且产量较少;当 dNTPs 浓度较高时,dNTPs 容易与  $Mg^{2+}$  相整合,使得游离的  $Mg^{2+}$  浓度降低,从而影响 *Taq* DNA 聚合酶的活性,同时还有可能导致碱基的错误渗入,使得扩增出的产物特异性下

降<sup>[16-17]</sup>。所以正确地选择好 dNTPs 的浓度非常重要。

$Mg^{2+}$  浓度对 ISSR-PCR 扩增的影响非常显著, $Mg^{2+}$  浓度变化直接影响 *Taq* DNA 聚合酶的活性,并间接影响引物与模板 DNA 的双联杂交体的解链温度、引物的退火温度、扩增产物的特异性以及引物二聚体的生成<sup>[17-18]</sup>。当引物浓度很低时,引物与模板 DNA 特异性结合不够,扩增效率较低;而当引物浓度较高时,会增加引物与模板 DNA 非特异性结合,以及引物二聚体的生成,从而导致扩增效率的下降。本试验设置的 7 个梯度差异显著,说明  $Mg^{2+}$  浓度对 SSR-PCR 扩增的影响较大。

*Taq* DNA 聚合酶直接影响 ISSR-PCR 扩增的成败,*Taq*

DNA 聚合酶的用量受到反应体系以及酶的活性等因素的影响<sup>[18-19]</sup>;当 *Taq* DNA 聚合酶的浓度较低时,扩增效率较低,条带较弱,当 *Taq* DNA 聚合酶的浓度较高时,会产生非特异性条带。所以正确地把握好 *Taq* DNA 聚合酶的用量很关键<sup>[20]</sup>。

引物浓度的高低会影响 PCR 扩增产物产量的多少。当引物的浓度过低时,扩增产物量很低,当引物的浓度过高时,又会形成引物二聚体和非特异性扩增,此二者也是 PCR 扩增的底物,它们会和靶序列竞争 dNTPs 和 *Taq* DNA 聚合酶,从而导致扩增效率的下降<sup>[19,21]</sup>。模板 DNA 浓度对 ISSR-PCR 扩增也有一定的影响,当模板 DNA 的浓度过低时,模板 DNA

和引物的结合率就很低,导致扩增产物较少;当模板 DNA 的浓度过高时,会导致扩增条带产生弥散现象,也会增加非特异性扩增。本试验中模板 DNA 用量从 10 ~ 100 ng 设置了 7 个梯度,结果发现,7 个梯度的条带数和亮度很相似,并无明显差别。说明适宜的模板 DNA 浓度范围很宽,正常情况下对 ISSR - PCR 扩增的影响不大,这与其他学者的研究结果<sup>[22-26]</sup>一致。

退火温度对 ISSR - PCR 扩增的影响也较大,当退火温度较高时,会使得模板 DNA 与引物的亲和力下降甚至不能结合,从而使得扩增的条带数较少且较模糊;当退火温度较低时,会导致模板 DNA 与引物的非特异性结合<sup>[27]</sup>。在一定的温度范围内,随着退火温度的增加,扩增出的产物特异性越好,如果扩增结果相似,尽量选择其中温度较高的,一般最佳的退火温度低于引物的真实  $T_m$  值 5 °C 左右<sup>[28]</sup>。本试验中筛选的最佳退火温度为 47.5 °C,引物 815 的真实  $T_m$  值为 52.9 °C,两者相差 5.4 °C,在理论范围内。

循环次数也会影响 ISSR - PCR 扩增,当循环次数较少时,扩增的条带数较少,且清晰度较低;当循环次数过多时,又会增加非特异性扩增。本试验中当循环次数为 38 次时,扩增产量较多,条带清晰,且稳定性较好。

### 3.2 结论

最终确定的绿竹 ISSR - PCR 最佳反应体系为:20 μL 的扩增体系中,dNTPs 浓度为 0.2 mmol/L,  $Mg^{2+}$  浓度为 2.0 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶用量为 1.0 U,引物浓度为 0.4 μmol/L,模板 DNA 用量为 50 ng,10 × PCR buffer 体积为 2 μL,剩余体积用灭菌 ddH<sub>2</sub>O 补全。扩增程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 45 s,(根据引物的退火温度)复性 30 s,72 °C 延伸 90 s,循环 38 次;72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。以此体系为基础进行引物筛选,在 100 条 ISSR 引物中筛选出 14 条扩增条带清晰、多态性较高、重复性好的引物。本研究建立了绿竹 ISSR - PCR 最佳反应体系并筛选出高多态性引物,为绿竹的指纹图谱、遗传多样性分析、分子育种和品种鉴定等研究提供了基础。

### 参考文献:

- [1]郑蓉,方伟,郑维鹏,等. 绿竹研究[J]. 竹子研究汇刊,2007(1):20-26.
- [2]中国植被编辑委员会. 中国植被[M]. 北京:科学出版社,1980:256-257.
- [3]中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第九卷第一分册)[M]. 北京:科学出版社,1996:141.
- [4]方宣钧,吴为人. 作物 DNA 标记辅助育种[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [5]邹喻苹,葛颂,王晓东,等. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [6]Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction

- amplification[J]. Genomics,1994,20(2):176-183.
- [7]Arcade A,Ansclon F,Faivare R P,et al. Application of AFLP,RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch[J]. Theoretical and Applied Genetics,2000,100(2):299-307.
- [8]Casasoli M,Mattioni C,Cherubini M,et al. A genetic linkage map of European chestnut(*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD,ISSR and isozyme markers[J]. Theoretical and Applied Genetics,2001,102:1190-1199.
- [9]雒新艳,王晨,戴思兰,等. 基于 ISSR 标记的大菊品种资源遗传多样性分析[J]. 中国农业科学,2013,46(11):2394-2402.
- [10]李晓红,张慧,王德元,等. 我国特有植物青檀遗传结构的 ISSR 分析[J]. 生态学报,2013,33(16):4892-4901.
- [11]董海燕,季孔庶,侯伯鑫,等. 基于 ISSR 标记的红花檵木品种亲缘关系分析[J]. 园艺学报,2014,41(2):365-374.
- [12]刘君,赵琴,杨志民. ISSR 分子标记对 9 种狗牙根的鉴定分析[J]. 草业学报,2012,21(6):159-165.
- [13]肖永太. 大明竹属指纹图谱的研究[D]. 福州:福建农林大学,2011.
- [14]李炎梅. 竹亚科各属命名种遗传多样性的 ISSR 分析及园林应用研究[D]. 福州:福建农林大学,2012.
- [15]孙志娟. 刚竹属部分竹种遗传多样性的 ISSR 分析[D]. 合肥:安徽农业大学,2008.
- [16]郑志雷. 厚朴遗传多样性研究及指纹图谱的构建[D]. 福州:福建农林大学,2010.
- [17]邱帅,丁信誉,席梦利,等. 东方百合 SRAP 体系优化及引物筛选[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2013,37(3):6-10.
- [18]张玲玲. 南方红豆杉 DNA 指纹图谱技术研究[D]. 福州:福建农林大学,2009.
- [19]胡延萍,王莉,包蕊,等. 正交设计优化黑褐苔草 ISSR - PCR 反应体系[J]. 草地学报,2014,22(4):911-914.
- [20]徐君,刘凤军,张国芹,等. 香稻不育系 ISSR 正交体系优化及验证[J]. 江苏农业科学,2015,43(4):21-24.
- [21]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.
- [22]孙清信,陈坚,张辉,等. 紫云英 ISSR 引物的筛选及 PCR 反应体系的优化[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(5):870-878.
- [23]胡凤荣,刘换换,国荣荣,等. 东方百合试管苗 ISSR - PCR 体系优化及引物筛选[J]. 分子植物育种,2015,13(4):903-909.
- [24]钱志瑶,周道堂,黄秀平,等. 黔产宽叶缬草 ISSR 反应体系的建立与优化[J]. 生物技术通报,2015,31(7):69-75.
- [25]张娜,李群,高兴旺,等. 葡萄 ISSR - PCR 反应体系的建立与正交设计优化[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):47-50.
- [26]胡凤荣,王斐,王志强,等. 风信子 ISSR - PCR 体系的优化及引物筛选[J]. 分子植物育种,2013,11(1):139-144.
- [27]王芳,廖柏勇,李培,等. 苦楝 SSR - PCR 反应体系优化及引物筛选[J]. 林业科学研究,2016,29(2):167-175.
- [28]Henegariu O, Heerema N A, Dlouhy S R, et al. Multiplex PCR:critical parameters and step-by-step protocol[J]. BioTechniques,1997,23(3):504-511.