

瞿印权, 徐 雯, 沈 露, 等. 大头典竹 ISSR 反应体系建立与优化[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(10): 34–39.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.10.009

# 大头典竹 ISSR 反应体系建立与优化

瞿印权<sup>1</sup>, 徐 雯<sup>1</sup>, 沈 露<sup>1</sup>, 何天友<sup>2</sup>, 魏建文<sup>3</sup>, 荣俊冬<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; 3. 福建省东山赤山国有防护林场, 福建东山 363400)

**摘要:**以大头典竹叶片为材料, 采用单因素分析法和正交设计直观分析法, 对影响 PCR 扩增效果的  $Mg^{2+}$ 、dNTPs、TaqDNA 聚合酶、引物、模板 DNA 含量这 5 个 PCR 反应体系主要成分以及退火温度和循环次数进行筛选。通过研究建立了适合大头典竹的 ISSR-PCR 反应体系: 20  $\mu$ L 反应液中含 2.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.25 mmol/L dNTPs, 1.25 U TaqDNA 聚合酶, 0.6  $\mu$ mol/L 引物, 10 ng 模板 DNA, 2  $\mu$ L 10 $\times$ Buffer, 10.55  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。相应反应程序为 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 45 s, 54.5  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4  $^{\circ}$ C 保存。应用建立的优化反应体系成功地筛选出 16 条多态性较高的引物, 表明该体系具有较高稳定性、重现性、适用性, 可较好地应用于大头典竹不同地理种源间的遗传多样性研究。

**关键词:**大头典竹; ISSR; 反应体系; 优化

**中图分类号:** S795.901 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)10-0034-06

地球上的竹类植物共有 88 属 1 400 多种, 主要分布在亚太区、美洲区、非洲区<sup>[1]</sup>。中国竹类主要分布于长江中下游, 其中以福建、浙江、江西、湖南 4 省最多, 占全国竹林面积的 60.7%<sup>[2]</sup>。大头典竹 [*Dendrocalamopsis beecheyana* var. *pubescens* (P. F. Li) Keng f.] 属于竹亚科 (Bambusoideae) 绿竹属 [*Dendrocalamopsis* (Chia et H. L. Fung) Keng f.] 的丛生竹, 别称新竹、荣竹, 具有繁殖生长快、根系发达、适应性广等特点。目前, 在我国关于大头典竹在分子生物方面的研究较少。

近年来, 随着现代分子生物学的快速发展, 分子标记技术被广泛应用于遗传多样性以及指纹图谱构建的研究<sup>[3-5]</sup>。目

前应用最为广泛的分子标记技术主要有 RFLP、RAPD、AFLP、ISSR、SRAP 等<sup>[6]</sup>。其中 SSR 序列广泛分布在高等生物的染色体上, 因此利用该简单重复序列标记 (inter simple sequence repeat, ISSR) 技术可以获得较多的分子标记。ISSR 的引物长度较 RAPD 引物长, 因此 ISSR 具有重现性的特点, 可以获得较可靠的遗传多样性信息, 有利于植物种间及种内的鉴别<sup>[7]</sup>。已有研究表明, 竹亚科植物不同地理种源间的遗传变异较丰富<sup>[8]</sup>, 为了进一步证实上述观点, 本试验采用 ISSR 方法对大头典竹的种群差异进行研究, 旨在建立 ISSR-PCR 最佳反应体系, 为其地理种源的遗传多样性分析和亲缘关系的鉴定奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试的材料来源于福建省东山国有赤山林场的大头典竹地理种源试验样地。采摘洗净的竹叶 3~5 张, 放入自封袋并冰袋保存, 尽快转移至 -80  $^{\circ}$ C 冰箱, 以备 DNA 的提取。

### 1.2 试剂与仪器

主要试剂: ISSR 引物都参考哥伦比亚大学公布的 100 条

Molecular Ecology, 1999, 8(4): 693–695.

[16] 杨子祥, 冯 颖, 陈晓鸣. 一种有效的蚜虫基因组 DNA 提取方法[J]. 林业科学研究, 2005, 18(5): 641–643.

[17] Gomi K, Gotoh T, Noda H. Wolbachia having no effect on reproductive incompatibility in *Tetranychus kanzawai* Kishida (Acari: Tetranychidae)[J]. Applied Entomology and Zoology, 1997, 32(3): 485–490.

[18] 韩玉翠, 吕 芃, 侯升林, 等. 2 种蚜虫 DNA 提取方法的比较与改进研究[J]. 中国农学通报, 2014, 30(16): 272–277.

[19] Sunnucks P, England P R, Taylor A C, et al. Microsatellite and chromosome evolution of parthenogenetic sitobion aphids in Australia[J]. Genetics, 1996, 144(2): 747–756.

[20] 马丽滨, 许升全. 蚂蚁 DNA 提取方法的研究[J]. 陕西师范大学学报, 2006, 34(1): 85–87.

[21] 张 拓, 庞春杰, 韩岚岚, 等. 大豆蚜基因组 DNA 四种提取方法的比较[J]. 大豆科学, 2013, 32(4): 473–476.

[22] 张 烨, 李克斌, 尹 姣, 等. 几种适合蚜虫基因组 DNA 提取方法的比较研究[C]//中国植物保护学会. 中国植物保护学会 2008 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2008: 658–661.

[23] 滕 希, 武 强, 万方浩. 盐析法提取烟粉虱基因组 DNA[J]. 生物技术通报, 2009(8): 166–168.

[24] 胡尊端, 吴晓云, 张翌楠, 等. 桃蚜 DNA 提取方法的研究[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(33): 12823–12825.

引物,由上海生物工程技术服务有限公司合成。*Taq*DNA 聚合酶、dNTPs Mixture、 $Mg^{2+}$ 、RNA 降解酶、DNA ladder Marker、10 × PCR Buffer、6 × loading Buffer 均购上海生物工程技术服务有限公司;琼脂糖、核酸染料均购自北京赛西盛公司。

主要仪器:JS-680 全自动数码凝胶成像分析仪、T6 新世纪紫外分光光度计、Lab Cycler PCR 仪、DYY-8C 电泳仪、TGL-20M 台式高速冷冻离心机等。

1.3 DNA 的提取与检测

大头典竹 DNA 的提取采用博日公司 Biospin 植物基因组 DNA 提取试剂盒提取的方法。将提取出的 DNA 用紫外分光光度计检测其浓度、纯度,再用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性及是否有降解现象。

1.4 ISSR 原初扩增程序和反应体系

原初设定的扩增程序为 94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性

45 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 90 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 保存。原初扩增反应体系为 2.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ ,0.25 mmol/L dNTPs,1 U *Taq*DNA 聚合酶,0.6  $\mu$ mol/L 引物,50 ng 模板 DNA,2  $\mu$ L 10 × Buffer,9.8  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。原初扩增程序和反应体系均参考李炎梅的方法<sup>[9]</sup>。

1.5 试验设计

经过初步的引物筛选,引物 UBC810 能产生清晰度高、多态性好的条带,因此可以用于 ISSR-PCR 体系的筛选(图 1)。分别采用单因素多水平梯度试验法和正交设计分析法(表 1、表 2)对影响 PCR 反应的  $Mg^{2+}$  浓度、dNTPs 浓度、*Taq*DNA 聚合酶含量、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。最后建立最优反应体系,并利用该体系从 100 条引物中筛选出 16 条最适宜的引物。

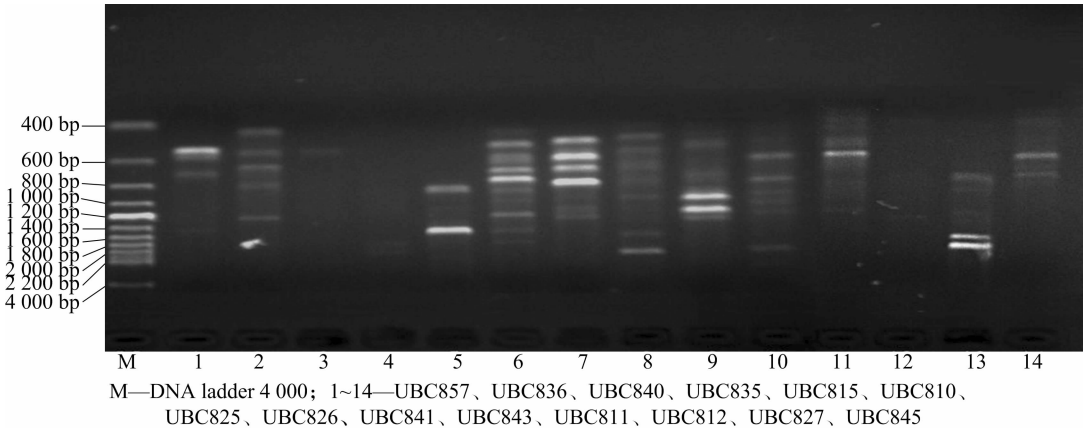


图1 ISSR 部分引物初始筛选

表 1 扩增体系单因素筛选

水平	因素				
	$Mg^{2+}$ 浓度 (mmol/L)	dNTPs 浓度 (mmol/L)	<i>Taq</i> 酶浓 度(U)	引物浓度 ( $\mu$ mol/L)	模板 DNA 量(ng)
1	1.0	0.05	0.5	0.3	10
2	1.5	0.1	0.75	0.4	20
3	2.0	0.15	1.0	0.5	40
4	2.5	0.2	1.25	0.6	60
5	3.0	0.25	1.5	0.7	80
6	3.5	0.3	1.75	0.8	100
7	4.0	0.35	2.0	0.9	120

1.6 扩增产物检测

取 9  $\mu$ L 的 PCR 产物,加入 1.5  $\mu$ L 6 × loading Buffer 并混匀,上样到加有核酸染料的 1.5% 琼脂糖凝胶上,电泳 1 h,电压设为 5 V/cm。待电泳时间结束到紫外凝胶成像分析仪观察和拍照。

2 结果与分析

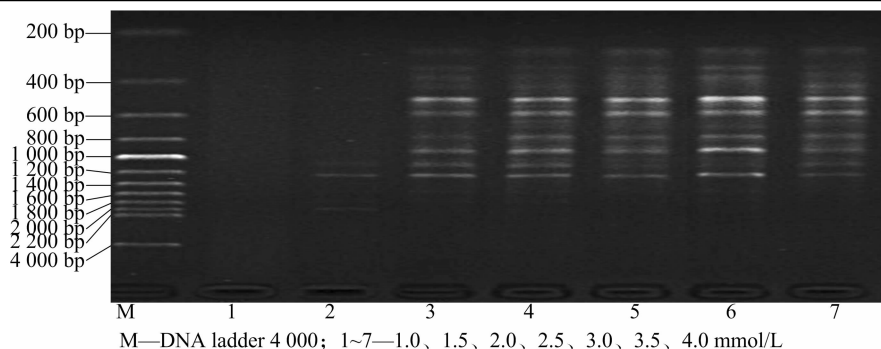
2.1 单因素多水平梯度试验结果分析

2.1.1  $Mg^{2+}$  浓度对 ISSR-PCR 扩增的影响  $Mg^{2+}$  浓度变化直接影响反应液中 *Taq* DNA 聚合酶的活性,也间接影响引物与模板 DNA 的双联杂交体的解链和退火温度以及扩增产物的特异性<sup>[10]</sup>,因此选择合适的  $Mg^{2+}$  浓度对 ISSR-PCR 反

表 2 ISSR-PCR 反应的因素水平  $L_{16}(4^5)$  正交试验设计

编号	$Mg^{2+}$ 浓度 (mmol/L)	dNTPs 浓度 (mmol/L)	<i>Taq</i> 酶含 量(U)	引物浓度 ( $\mu$ mol/L)	模板 DNA 含量(ng)
1	1.0	0.05	0.5	0.3	10
2	1.0	0.15	1.0	0.5	40
3	1.0	0.25	1.5	0.7	80
4	1.0	0.35	2.0	0.9	120
5	2.0	0.05	1.0	0.7	120
6	2.0	0.15	0.5	0.9	80
7	2.0	0.25	2.0	0.3	40
8	2.0	0.35	1.5	0.5	10
9	3.0	0.05	1.5	0.9	40
10	3.0	0.15	2.0	0.7	10
11	3.0	0.25	0.5	0.5	120
12	3.0	0.35	1.0	0.3	80
13	4.0	0.05	2.0	0.5	80
14	4.0	0.15	1.5	0.3	120
15	4.0	0.25	1.0	0.9	10
16	4.0	0.35	0.5	0.7	40

应至关重要。研究发现, $Mg^{2+}$  浓度为 1.0 mmol/L 时,无扩增条带出现;在  $Mg^{2+}$  浓度为 1.5 mmol/L 时,扩增出的条带极少且模糊; $Mg^{2+}$  浓度为 2.0~4.0 mmol/L 时,扩增条带数一致,但  $Mg^{2+}$  浓度在 2.5 mmol/L 时,扩增条带较多清晰(图 2)。因

图2 不同  $Mg^{2+}$  浓度对 ISSR-PCR 扩增的影响

此,反应液中  $Mg^{2+}$  最佳浓度定为 2.5 mmol/L。

2.1.2 dNTPs 浓度对 ISSR-PCR 扩增的影响 dNTP 是 ISSR-PCR 反应的原料,其浓度的高低直接影响产物的产量和特异性<sup>[11]</sup>。研究发现,dNTPs 浓度为 0.25 mmol/L 时,扩增的条带较为清晰明亮;当 dNTPs 浓度低于 0.25 mmol/L 时,

扩增产物条带模糊;dNTPs 浓度过低会影响底物与引物的酶促反应速度的下降,导致扩增条带产率低、效果差;当 dNTPs 浓度大于 0.25 mmol/L 时,PCR 扩增条带较一致(图 3)。因此,从降低成本考虑,dNTPs 浓度选用 0.25 mmol/L。

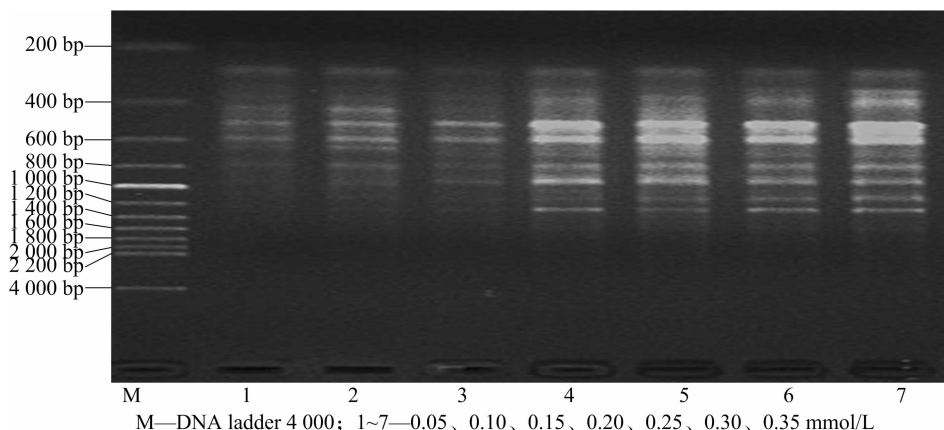
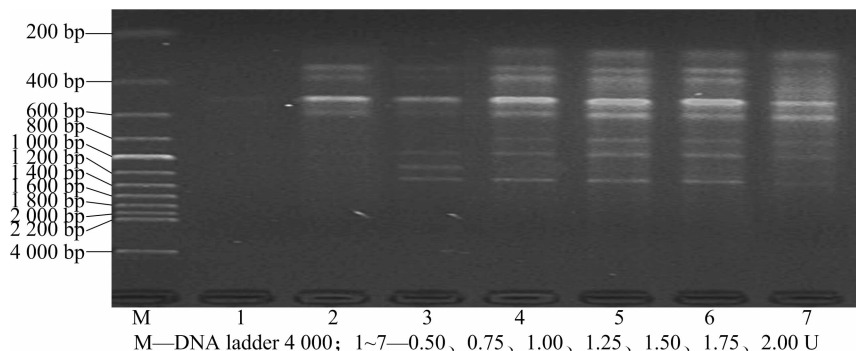


图3 不同 dNTPs 浓度对 ISSR-PCR 扩增的影响

2.1.3 *Taq*DNA 聚合酶对 ISSR-PCR 扩增的影响 在 ISSR-PCR 反应中,*Taq*DNA 聚合酶是影响扩增效果的关键因素之一。*Taq*DNA 聚合酶用量过多会引起非特异性扩增,过低则会使得扩增产物减少<sup>[12]</sup>。另外 *Taq*DNA 聚合酶的活性还受  $Mg^{2+}$ 、dNTPs 浓度的影响<sup>[13]</sup>。研究发现,当 *Taq*DNA

聚合酶含量为 0.5 ~ 1.0 U 时,扩增的条带较少,总体条带数较为模糊,但扩增条带随着 *Taq*DNA 聚合酶含量的增加依次增加;当 *Taq*DNA 聚合酶含量为 1.25 ~ 2.00 U 时,扩增条带数增加,条带清晰(图 4)。因此,*Taq*DNA 聚合酶含量选用 1.25 U。

图4 不同 *Taq*DNA 浓度对 ISSR-PCR 扩增的影响

2.1.4 引物浓度对 ISSR-PCR 扩增的影响 引物的浓度过高时容易引起引物二聚体的形成,从而导致扩增条带模糊或减少,还会产生新的非特异性位点;过低则会使 PCR 反应提前结束,使扩增条带减少甚至没有条带出现<sup>[14]</sup>。研究发现,当引物浓度为 0.3、0.4  $\mu\text{mol/L}$  时,扩增的条带数目减少且模

糊;当引物浓度为 0.5、0.6  $\mu\text{mol/L}$  时,条带清晰,扩增条数比 0.3、0.4  $\mu\text{mol/L}$  时的条带数增多;当引物浓度大于 0.6  $\mu\text{mol/L}$  时,条带清晰度明显减弱(图 5)。因此,本试验选用 0.6  $\mu\text{mol/L}$  引物浓度为 ISSR-PCR 反应体系的最佳浓度。

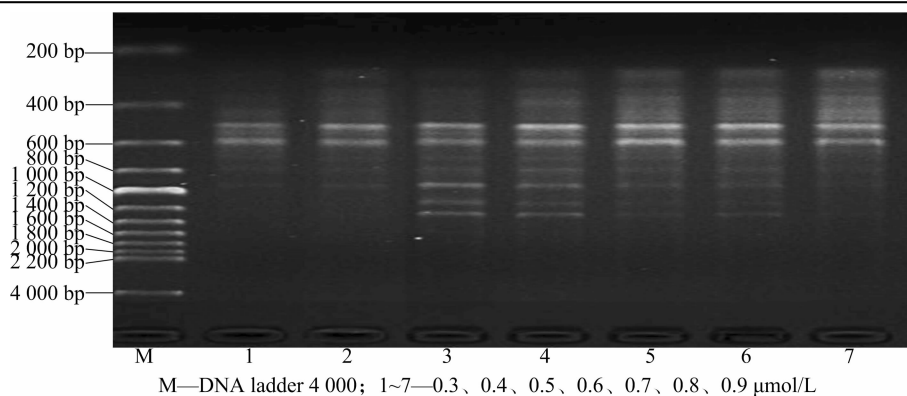


图5 不同引物浓度对 ISSR-PCR 扩增的影响

2.1.5 模板 DNA 用量对 ISSR-PCR 扩增的影响 一般情况下,模板 DNA 含量过低,会导致无扩增产物,过高则会引起非特异性产物的出现或扩增条带的模糊<sup>[15]</sup>。少数情况下,模板 DNA 含量对 ISSR-PCR 扩增影响不大<sup>[16]</sup>。研究发现,本

试验设计的 7 个梯度水平的 DNA 含量均能扩增出清晰、明亮的条带且无明显差异(图 6)。考虑到 DNA 用量越少越好,因此本试验选择 10 ng 模板 DNA 为 ISSR-PCR 反应体系的最佳用量。

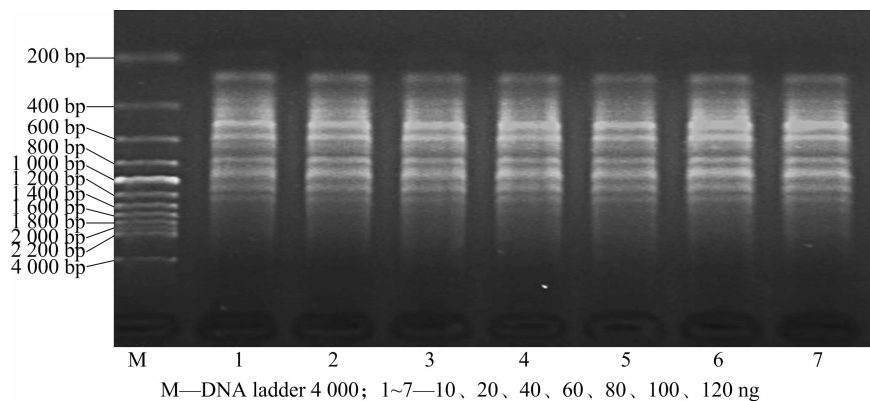


图6 不同模板 DNA 浓度对 ISSR-PCR 扩增的影响

## 2.2 正交试验设计的直观分析

本试验的主要影响因素浓度,以单因素多水平梯度试验的数据为基础,设计成 5 个影响因素、4 个水平、16 个试验处理的正交设计,并建成关于大头典竹的 ISSR-PCR 标记的反应体系表。研究发现,处理 4、处理 7、处理 8 扩增条带最为清

晰,条带数比较多,而处理 3、处理 11、处理 16 没有扩增条带。参照何正文等的方法<sup>[17]</sup>,根据 PCR 扩增条带的多少、条带的亮暗程度和清晰度进行评分。最好的评 16 分,最差的评 1 分,依次对 16 条扩增条带进行评分。16 个处理的分依次依次为 6、11、1、16、13、7、14、15、12、8、1、12、5、10、9、1 分(图 7)。

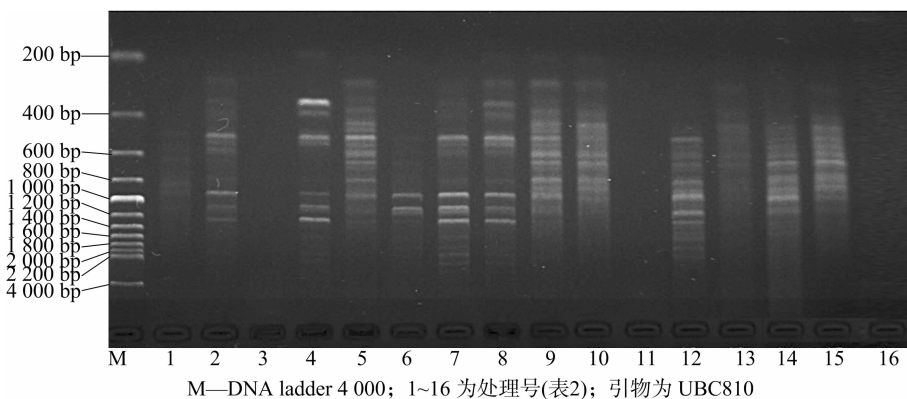


图7 ISSR-PCR 正交试验结果

根据评分结果求出每个因素同一水平下的试验值之和  $K_i$  以及每一因素同水平下的数据平均值  $k_i$  并求出同一因素不同水平间平均值的极差  $R$ 。极差  $R$  反应各影响因素对反应体系的影响, $R$  越大则影响越显著<sup>[12]</sup>。各因素水平变化对 ISSR-PCR 反应体系影响从大到小排序为  $Taq$  酶含量 >

$Mg^{2+}$  浓度 > 引物浓度 > dNTPs 浓度 > 模板 DNA 含量(表 3)。每一因素同水平下的数据平均值  $k_i$  反应影响因素各水平对 ISSR-PCR 反应体系的影响情况, $k_i$  越大,水平对反应体系越有利<sup>[12]</sup>。因此,正交设计试验下,大头典竹的 ISSR-PCR 反应体系的最佳浓度为 2.0 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.35 mmol/L

表 3 正交设计直观分析

试验号	因素				
	Mg <sup>2+</sup> 浓度	dNTPs 浓度	Taq 酶 含量	引物 浓度	模板 DNA 浓度
K <sub>1</sub>	34	36	15	42	38
K <sub>2</sub>	49	36	45	32	38
K <sub>3</sub>	33	25	38	23	25
K <sub>4</sub>	25	42	43	44	40
k <sub>1</sub>	8.50	9.00	3.75	10.50	9.50
k <sub>2</sub>	12.25	9.00	11.25	8.00	9.50
k <sub>3</sub>	8.25	6.25	9.50	5.75	6.25
k <sub>4</sub>	6.25	10.5	10.75	11.00	10.00
极差 R	6.00	4.25	7.50	5.25	3.25

dNTPs,1.0 U TaqDNA 聚合酶,0.9 mol/L 引物,120 ng 模板 DNA。

2.3 扩增程序参数的调整

2.3.1 退火温度的筛选 退火温度是影响 PCR 特异性反应的重要因素,退火温度不同,产生引物和模板 DNA 间的错

配<sup>[18]</sup>。一般来说,每一个引物都有各自的理论退火温度。合理的退火温度一般 55~70℃,退火温度一般在设定引物的理论退火温度±5℃范围内。在一定的温度范围内,退火温度越高,扩增的特异性也越高,退火温度越低,扩增产物的特异性也降低。如果退火温度过高,则引物与模板结合差,电泳条带差,甚至没有扩增。如果温度过低,则扩增特异性差,杂带较多,背景深<sup>[19]</sup>。本研究发现,当退火温度为 50~54.5℃时,扩增的条带逐渐增多,条带逐渐清晰,当退火温度大于 54.5℃时,扩增条带清晰度逐渐降低,条带数逐渐减少(图 8)。因此选择最佳退火温度为第 6 泳道的 54.5℃,与 UBC810 引物的理论退火温度 52.2℃相差不超过 5℃,符合文献报道<sup>[20]</sup>。

2.3.2 循环次数的筛选 PCR 的循环次数对 PCR 反应有重要的影响,循环次数太低,会引起扩增产物的减少。循环次数太高,又会产生非特异性产物<sup>[21]</sup>。本试验对循环次数设了 3 个梯度,分别为 30、35、40 次。研究发现,当循环次数为 40 次时,扩增条带最为清晰(图 9),因此 40 次循环作为大头典竹 ISSR-PCR 反应最佳反应的循环次数。

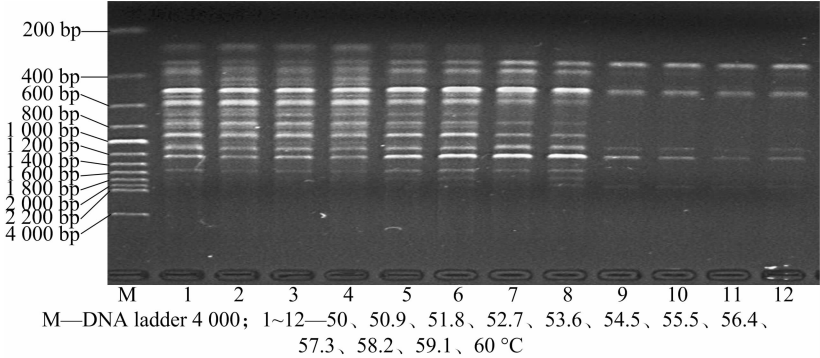


图 8 退火温度对 ISSR-PCR 的影响

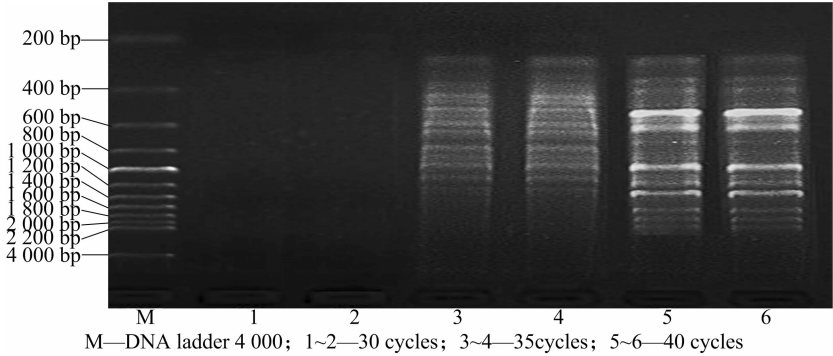


图 9 循环次数对 ISSR-PCR 的影响

2.3 ISSR 有效引物的筛选

利用建立好的大头典竹的最佳反应体系,对 100 条引物进行扩增。研究发现在选用不同的引物时,绝大部分都能扩增出清晰、明亮的条带,只有少部分引物不能扩增出条带(图 10)。研究结果说明,该反应体系稳定,并具有重复性。

3 结论与讨论

ISSR 分子标记技术具有稳定性高、重复性好、DNA 用量少等其他分子标记技术无法比拟的优势<sup>[9]</sup>,同时,也受到 ISSR-PCR 反应体系中 Mg<sup>2+</sup>、dNTPs、Taq 酶、引物、模板 DNA

等因素的影响<sup>[17]</sup>。有关巨竹属植物的 ISSR-PCR 反应体系的优化的研究表明,模板 DNA 含量对 ISSR-PCR 扩增有较大的影响<sup>[18]</sup>。而在本试验中,模板 DNA 含量对大头典竹 ISSR-PCR 扩增反应没有太大影响,可能是因为不同竹亚科植物间的 DNA 含量对扩增反应的影响也是有差别的。

在 ISSR-PCR 反应的建立和优化中,通常采用单因素试验方法和正交试验方法<sup>[19-25]</sup>。本试验分别采用 2 种方法,对反应体系和扩增程序进行和优化,确定各影响因素浓度和循环次数,并在建立好的体系上对有效引物进行筛选。通过对 2 种试验方法的比较证实了单因素试验可以直接地反应出各

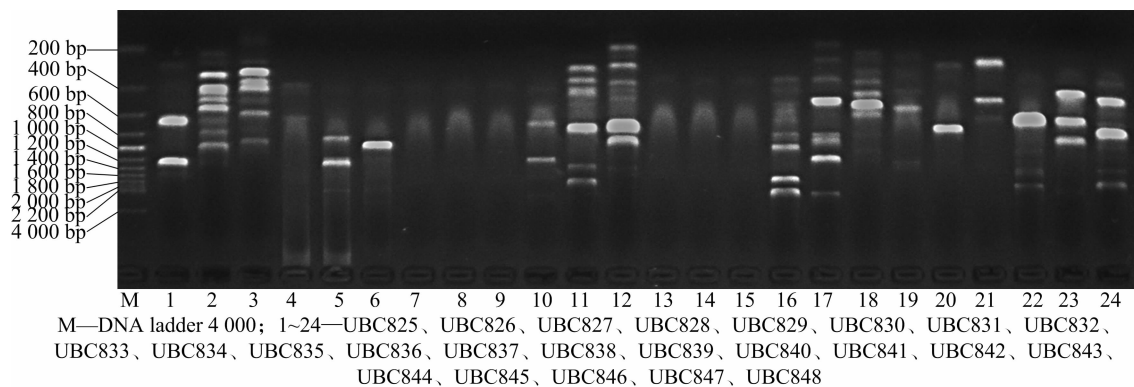


图10 ISSR 有效引物的筛选

影响因素的浓度或含量大小对反应体系的影响,试验操作要求比较简单。正交试验可以考虑到各因素的交互作用,确定各因素的主次关系,但操作比较复杂,试验时间过长,影响酶等主要成分的活性<sup>[9]</sup>。本试验结果表明,2个试验方法所得结果差异比较明显,且正交试验方法,有部分产物未能扩增出来。因此选择较为常用的单因素试验方法来进行 ISSR-PCR 体系建立与优化。

综上,本试验建立了大头典竹最佳优化体系:20  $\mu\text{L}$  的反应液中含 2.5 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$ , 0.25 mmol/L dNTPs, 1.25 U *Taq* DNA 聚合酶, 0.6  $\mu\text{mol/L}$  引物, 10 ng 模板 DNA, 2  $\mu\text{L}$  10  $\times$  Buffer, 10.55  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O, 该体系将为大头典竹不同地理种源的遗传多样性研究和亲缘关系评价提供技术基础。

#### 参考文献:

- [1] 郑林. 酸竹属遗传多样性研究[D]. 福州:福建农林大学, 2011.
- [2] 肖永太. 大明竹属指纹图谱的研究[D]. 福州:福建农林大学, 2011.
- [3] 朱岩芳, 祝水金, 李永平, 等. ISSR 分子标记技术在植物种质资源研究中的应用[J]. 种子, 2010, 29(2): 55-59.
- [4] Farooq S, Azam F. Molecular markers in plant breeding - I: Concepts and characterization [J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2002, 5(10): 1135-1140.
- [5] Landjeva S, Korzun V, Börner A. Molecular markers: actual and potential contributions to wheat genome characterization and breeding [J]. Euphytica, 2007, 156(3): 271-296.
- [6] Weng M L, Liu B, Jin D M, et al. Identification of 27 porphyra lines (rhodophyta) by DNA fingerprinting and molecular markers [J]. Journal of Applied Phycology, 2005, 17(1): 91-97.
- [7] Lai J A, Yang W C, Hsiao J Y. An assessment of genetic relationships in cultivated tea clones and native wild tea in Taiwan using RAPD and ISSR markers [J]. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 2001, 42(2): 93-100.
- [8] 黄树军, 陈礼光, 肖永太, 等. 大明竹属遗传多样性 ISSR 分析及 DNA 指纹图谱研究[J]. 生态学报, 2013, 33(24): 7863-7871.
- [9] 李炎梅. 竹亚科各属命名种遗传多样性的 ISSR 分析及原理应用研究[D]. 福州:福建农林大学, 2012.
- [10] 冯夏莲, 何承忠, 张志毅, 等. 毛白杨 ISSR 反应体系的建立及优化[J]. 北京林业大学学报, 2006, 28(3): 61-65.
- [11] 钱志瑶, 周道堂, 黄秀平, 等. 黔产宽叶缙草 ISSR 反应体系的建立与优化[J]. 生物技术通报, 2015, 31(7): 69-75.
- [12] 田艳玲, 李志辉, 杨模华, 等. 钩栗 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 中南林业科技大学学报, 2015, 2(2): 32-37.
- [13] 武创, 司龙亭, 姜晶. 萝卜 ISSR-PCR 反应体系的正交设计优化[J]. 分子植物育种, 2010, 8(1): 186-190.
- [14] 汪结明, 项艳, 吴大强, 等. 杨树 ISSR 反应体系的建立及正交设计优化[J]. 核农学报, 2007, 21(5): 470-473, 513.
- [15] 徐爽, 张耀川, 李树成, 等. 银杏 ISSR-PCR 扩增反应体系的建立与优化[J]. 生物技术通讯, 2012, 23(1): 80-85.
- [16] 吴鑫, 雷天刚, 何永睿, 等. 柑桔 SRAP 和 ISSR 分子标记技术体系的建立与优化[J]. 分子植物育种, 2008, 6(1): 170-176.
- [17] 何正文, 刘运生, 陈立华, 等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件[J]. 湖南医科大学学报, 1998, 4(4): 76-77.
- [18] 郭凌飞, 邹明宏, 曾辉, 等. 澳洲坚果 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 林业科学, 2008, 44(5): 160-164.
- [19] 李炎梅, 何天友, 陈凌艳, 等. 巨竹 ISSR 反应体系的建立与优化[J]. 亚热带农业研究, 2012, 8(1): 51-56.
- [20] 代红艳, 张志宏, 周传生, 等. 山楂 ISSR 分析体系的建立和优化[J]. 果树学报, 2007, 24(3): 313-318.
- [21] 廖丽, 郭巧生. 夏枯草 ISSR 分子标记技术的建立与体系优化[J]. 中草药, 2009, 7(7): 1131-1135.
- [22] 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.
- [23] 桂腾琴, 伍伟, 卢鹏, 等. 正交设计优化荷花品种 ISSR-PCR 反应体系[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(7): 71-73.
- [24] 曹嵩晓, 李娟玲, 刘国民, 等. 利用单因子和正交设计双重实验方法优化广藿香 ISSR-PCR 实验体系[J]. 热带生物学报, 2011, 2(1): 35-41.
- [25] 雷雪峰, 易津, 侯丽丽. 利用正交设计建立与优化北美驼绒藜 ISSR-PCR 反应体系[J]. 植物研究, 2008, 28(6): 693-697.