

文章编号: 1001-1498(2008)02-0194-06

油桐 ISSR-PCR 最佳反应体系的建立

李 鹏^{1,2}, 汪阳东², 陈益存², 张小平^{1*}

(1. 安徽师范大学生命科学学院, 安徽 芜湖 241000; 2 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

摘要:在油桐遗传多样性研究中,为了获得清晰可靠、重复性强的 ISSR 扩增结果,综合采用单因子试验和正交设计两种方法对影响油桐 ISSR-PCR 反应结果的 4 个因素 (Taq 酶、 Mg^{2+} 、dNTP、引物)进行优化试验。单因子试验分别研究各因素对 ISSR-PCR 反应的影响,找出最佳反应水平。正交设计选用 $L_9(3^4)$ 方案,采用直观分析获得影响因素最佳反应水平。通过综合比较分析,最终建立了油桐 ISSR-PCR 反应的最佳反应体系,即在 20 μ L 反应体系中, Taq DNA 聚合酶 1.0 U, Mg^{2+} 2.0 mmol \cdot L⁻¹, dNTP 0.20 mmol \cdot L⁻¹, 引物 0.4 μ mol \cdot L⁻¹, 1 \times PCR 缓冲液, 40 ng 模板 DNA。

关键词:油桐; ISSR-PCR; 单因子试验; 正交设计

中图分类号: S794.3 文献标识码: A

Establishment of Optimum ISSR-PCR Reaction System in Tung Oil Tree (*Vernicia fordii*)

LI Peng^{1,2}, WANG Yang-dong², CHEN Yi-cun², ZHANG Xiao-ping¹

(1. College of Life Science, Anhui Normal University, Wuhu 241000, Anhui, China;

2. Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

Abstract: To apply ISSR to genetic breeding of tung oil tree (*Vernicia fordii*), both the single factor test and the orthogonal diagram were used to optimize the ISSR amplification system of tung in four factors (Taq DNA polymerase, Mg^{2+} , dNTP, primer) at three levels respectively. There were some differences between the results of the two methods. Through comprehensive analysis, a suitable ISSR-PCR reaction system was established: 20 μ L reaction system containing 1.0 U Taq DNA polymerase, 2.0 mmol \cdot L⁻¹ Mg^{2+} , 0.20 mmol \cdot L⁻¹ dNTP, 0.4 μ mol \cdot L⁻¹ primer, 1 \times PCR buffer, 40 ng template.

Key words: *Vernicia fordii*; ISSR-PCR; single factor tests; orthogonal design

油桐 (*Vernicia fordii* (Hemsl.) Airy-Shaw) 是我国特有的木本油料树种, 榨取桐籽获得的桐油是环保型新型化工原料, 具有重要的经济价值^[1]。我国油桐分布广泛、品种种植分散, 相互间的亲缘关系也不甚清楚, 给油桐种质资源鉴定以及良种选育工作带来较多困难, 且目前油桐育种仍主要以传统方式为主^[2], 育种周期较长, 费时耗力, 信息量少, 严重阻碍了油桐良种选育的进程。分子标记辅助育种克服

了传统育种的缺点, 并且不受环境和时空限制, 逐渐成为油桐良种选育的重要手段之一。

分子标记种类很多, 不同的标记类型各有优缺点, 其中 ISSR (inter-simple sequence repeat) 分子标记技术, 即简单重复间序列标记, 是近几年在微卫星 (microsatellite) 或简单序列重复 (simple sequence repeat, SSR) 技术上发展起来的一种新的分子标

收稿日期: 2007-08-06

基金项目: 浙江省重大科技攻关项目“油茶油桐乌桕三种木本油料能源树种新品种选育及中试”(2006C12016)

作者简介: 李鹏 (1983—), 男, 安徽淮北人, 在读硕士, 主要从事植物生物技术研究。

* 通讯作者。

记^[4-5]。与 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)、RAPD (random amplified polymorphism DNA)、SSR 相比, ISSR 技术可以揭示更多的多态性,但比 SSR 技术简单,并具有更高的稳定性和重复性,现已在遗传图谱构建^[5-6]、基因定位^[7]、遗传多样性分析^[8]、种质资源鉴定^[9]等方面广泛应用。在油桐分子辅助育种方面,曾有报道采用了 RAPD 技术,对 3 个类型 6 个品种家系进行了检测^[10],但未见 ISSR 技术用于油桐相关研究的报道。

鉴于 ISSR 是一种基于聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 的分子标记,扩增反应易受到组分浓度的影响,需通过试验反应对 PCR 扩增体系中的主要组分如引物、 Mg^{2+} 、dNTP 及 Taq 酶等试剂浓度进行摸索,建立 ISSR 技术的最佳反应体系,以提高该技术的扩增效率和稳定性。目前,对 ISSR-PCR 反应体系进行优化主要采用单因子试验或正交设计两种方法。单因子试验分别研究各因素对 PCR 扩增反应的影响,已广泛应用于 PCR 反应体系的建立和优化。正交试验设计具有均衡分散、综合可比及可伸可缩、效应明确的特性,可了解各因素之间的内在规律,较快地找到最优的水平组合^[11]。本研究分别采用上述两种方法综合分析不同因素对油桐 ISSR-PCR 反应的影响,建立油桐 ISSR-PCR 反应的最佳反应体系,为油桐分子标记辅助育种提供良好的技术平台。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2007 年 4 月中旬于浙江省金华市婺城区东方红林场国家级油桐基因库采集油桐幼嫩叶片,置于 -20℃ 保存备用。

1.2 主要试剂及仪器

用于 ISSR-PCR 反应的 Taq DNA 聚合酶、dNTP、 Mg^{2+} 购自宝生物工程 (大连) 有限公司,引物序列由加拿大哥伦比亚大学 (UBC) 提供,上海生工生物工程技术有限公司合成。DNA 浓度检测使用 UV-3100PC 紫外可见分光光度计,PCR 反应在 GeneAmp PCR System 9600 PCR 仪上进行。

1.3 试验方法

1.3.1 油桐基因组 DNA 提取 根据 Doyle 等^[12] 的 CTAB 法,稍做改进,提取基因组 DNA,利用紫外分光光度计检测 DNA 浓度及纯度,0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。

1.3.2 单因子试验 根据前期试验结果,设计 Taq 酶、 Mg^{2+} 、dNTP、引物 4 个因素 3 个水平 (表 1) 对 ISSR-PCR 反应体系的影响,3 次重复,反应总体积 20 μ L。模板 DNA 浓度均为 40 ng,引物为 855 (AC)₈YT。反应程序:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 45 s,56℃ 退火 75 s,72℃ 延伸 1.5 min,循环 45 次,72℃ 延伸 8 min,4℃ 保存。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,EB 染色,紫外成像。对结果进行直观评价,初步确立各个因素的最佳反应浓度。

表 1 油桐 ISSR-PCR 反应中的各因素水平

影响因素	因素水平 (体系终浓度)		
	1	2	3
Taq 酶 / ($U \cdot (20 \mu L)^{-1}$)	1.0	1.5	2.0
Mg^{2+} / ($mmol \cdot L^{-1}$)	1.5	2.0	2.5
dNTP / ($mmol \cdot L^{-1}$)	0.20	0.25	0.30
引物 / ($\mu mol \cdot L^{-1}$)	0.3	0.4	0.5

1.3.3 ISSR-PCR 反应因素水平的正交设计 针对影响 PCR 反应的 Taq 酶、 Mg^{2+} 、dNTP、引物 4 个因素,选用 $L_9(3^4)$ 正交表在 3 个水平上试验^[13] (表 2),重复 3 次。参加 PCR 反应的因素水平同单因子试验。

ISSR-PCR 扩增程序、PCR 产物检测与单因子试验相同。在正交试验结果进行直观分析的基础上,结合单因子试验结果进行综合分析,建立油桐 ISSR-PCR 反应的最佳反应体系。

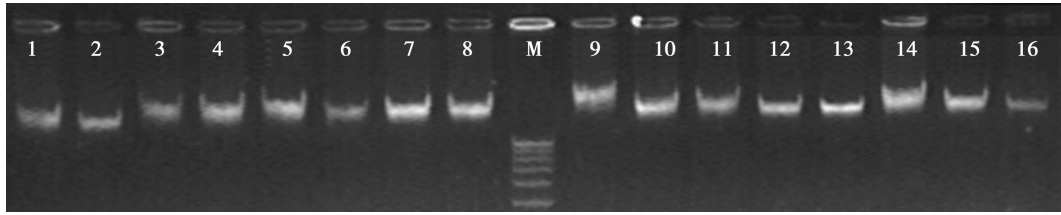
表 2 PCR 正交设计表

处理号	影响因素			
	Taq 酶 / ($U \cdot (20 \mu L)^{-1}$)	Mg^{2+} / ($mmol \cdot L^{-1}$)	dNTP / ($mmol \cdot L^{-1}$)	引物 / ($\mu mol \cdot L^{-1}$)
1	1.0	1.5	0.20	0.3
2	1.0	2.0	0.25	0.4
3	1.0	2.5	0.30	0.5
4	1.5	1.5	0.25	0.5
5	1.5	2.0	0.30	0.3
6	1.5	2.5	0.20	0.4
7	2.0	1.5	0.30	0.4
8	2.0	2.0	0.20	0.5
9	2.0	2.5	0.25	0.3

2 结果与分析

2.1 DNA 提取

高质量的油桐 DNA 是进行 ISSR-PCR 的基础。采用改良后的 CTAB 法提取的 DNA 呈无色絮状沉淀,电泳结果显示 DNA 完整,无明显降解,无 RNA 污染,点样孔较干净 (图 1)。DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 为 1.82,表明改良后的 CTAB 法提取的高质量油桐



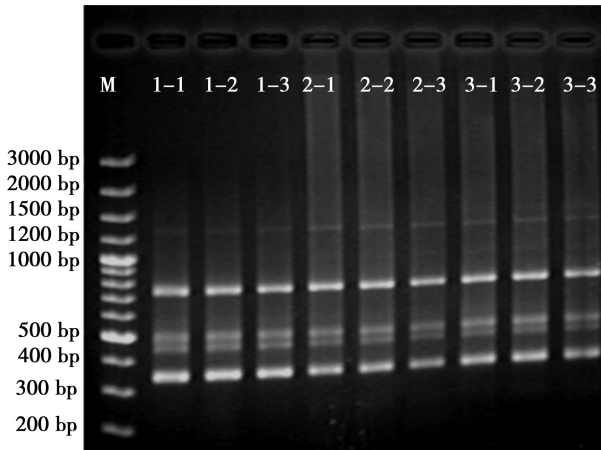
1~16: 样品号; M: 标准分子量 DNA

图 1 16个油桐样品基因组 DNA

基因组 DNA 可以满足将要进行的分子标记的需要。

2.2 单因子试验结果分析

2.2.1 Taq 酶用量对 ISSR-PCR 的影响 在 PCR 反应体系中, Taq 酶用量直接关系扩增的质量, 浓度过高会产生非特异性扩增, 过低则不能扩增。本试验在 20 μL 的反应体系中对 Taq 酶设置了 1.0、1.5、2.0 U 3 个梯度进行扩增, 结果表明随着酶浓度的增加, 非特异性扩增增加, 产生拖尾现象 (图 2)。酶用量为 1.0 U \cdot (20 μL)⁻¹ 时的扩增效果明显好于其他两个水平, 初步确定 1.0 U \cdot (20 μL)⁻¹ 为油桐 ISSR-PCR 反应体系中 Taq 酶的最佳浓度。



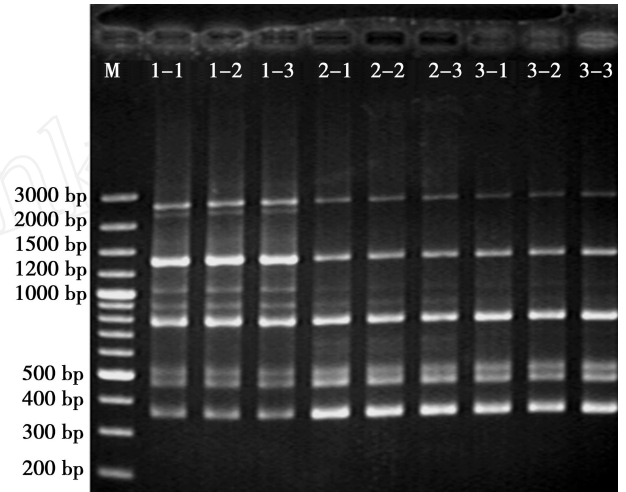
1-1~1-3, 2-1~2-3, 3-1~3-3: Taq 酶用量分别为

1.0、1.5、2.0 U; M: 标准分子量 DNA

图 2 不同 Taq 酶用量的 ISSR-PCR 电泳结果

2.2.2 dNTP 浓度对 ISSR-PCR 的影响 dNTP 浓度直接影响扩增反应的效率。从图 3 可以看出, 当 dNTP 浓度为 0.20 mmol \cdot L⁻¹ 时的效果最好, 条带清晰度高, 多态性好, 初步确定为油桐 ISSR-PCR 反应体系中 dNTP 的最佳浓度。

2.2.3 Mg²⁺ 浓度对 ISSR-PCR 的影响 Mg²⁺ 在 PCR 中的作用是激活 Taq 酶, 通过影响 Taq 酶活性而间接影响 PCR 扩增^[14], 还能与反应液中的 dNTP、模板 DNA 及引物结合, 影响引物与模板的结合效

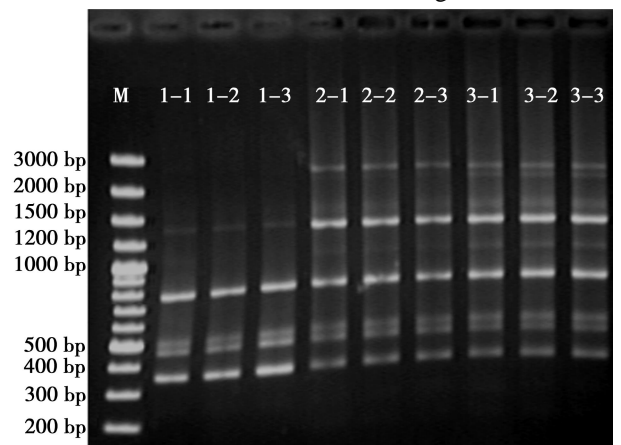


1-1~1-3, 2-1~2-3, 3-1~3-3: dNTP 浓度分别为

0.20、0.25、0.30 mmol \cdot L⁻¹; M: 标准分子量 DNA

图 3 不同 dNTP 用量的 ISSR-PCR 电泳结果

率、模板与 PCR 产物的解链温度以及产物的特异性和引物二聚体的形成^[15]。从图 4 可以看出, Mg²⁺ 浓度在 2.0 mmol \cdot L⁻¹ 和 2.5 mmol \cdot L⁻¹ 时扩增效果较好, 但两者之间无显著差异, 结合节省试剂等因素, 初步将 2.0 mmol \cdot L⁻¹ 确定为 Mg²⁺ 反应浓度。

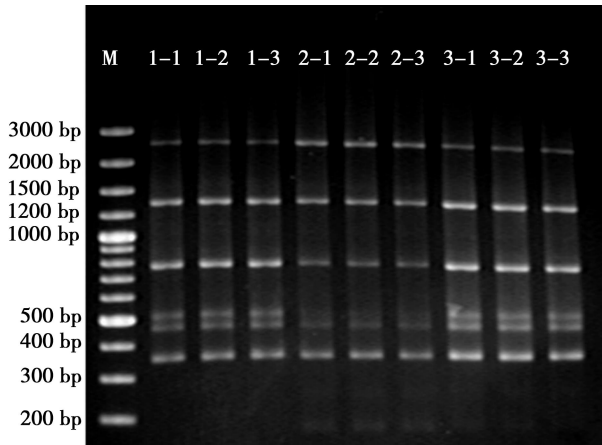


1-1~1-3, 2-1~2-3, 3-1~3-3: Mg²⁺ 浓度分别为 1.5、

2.0、2.5 mmol \cdot L⁻¹; M: 标准分子量 DNA

图 4 不同 Mg²⁺ 用量的 ISSR-PCR 电泳结果

2.2.4 引物浓度对 ISSR-PCR 的影响 引物浓度也是影响 PCR 反应的重要因素之一,浓度过低不能产生扩增,过高会增加引物二聚体的形成,导致条带不清晰或者产生新的特异性位点。在引物浓度为 $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时条带虽然比其他两水平弱,但在 200 bp 附近多出一条带(图 5),所以初步将 $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为油桐 ISSR-PCR 反应体系中引物的最佳浓度。



1-1~1-3, 2-1~2-3, 3-1~3-3: 引物浓度分别为 0.3 、 0.4 、 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; M: 标准分子量 DNA

图 5 不同引物用量的 ISSR-PCR 电泳结果

2.3 PCR 正交设计直观分析

根据 PCR 产物条带的强弱和杂带的多少对正交试验结果(图 6)进行直观分析,最好的记为 9 分,最差的记为 1 分。9 个组合的分数依次为 4、7、9、2、5、6、3、8、1。根据分数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 (表 3)。

表 3 正交设计直观分析

结果	影响因素			
	Taq 酶	Mg^{2+}	dNTP	引物
K_1	20	9	18	10
K_2	13	20	10	16
K_3	12	16	17	19
k_1	20/3	3	6	10/3
k_2	13/3	20/3	10/3	16/3
k_3	4	16/3	17/3	19/3
R	8/3	11/3	8/3	3

注: K_i : 每个因素同一水平下的试验值之和; k_i : 每一因素水平下的数据平均值; R : 同一因素不同水平间平均值的极差。

极差 R 反映了各因素对反应体系的影响情况,极差越大,表明影响越显著。由表 3 可知各因素对 PCR 反应影响最大的是 Mg^{2+} , 其次是引物, Taq 酶和 dNTP 的影响相当。

每一因素水平下的数据平均值 k_i 反映了影响因素各水平对反应体系的影响情况, k_i 值越大, 反应水平越好。由表 3 可知, 由正交设计所得出的 ISSR-PCR 反应中 4 个因素的最佳反应水平分别为: Taq DNA 聚合酶 $1.0 \text{ U} \cdot (20 \mu\text{L})^{-1}$, Mg^{2+} $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, dNTP $0.30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 引物 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Taq 酶、 Mg^{2+} 最佳浓度单因子试验和正交试验结果均一致, 因此分别将 $1.0 \text{ U} \cdot (20 \mu\text{L})^{-1}$ 和 $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 确定为 Taq 酶和 Mg^{2+} 最佳浓度; dNTP 在单因子试验中最佳浓度为 $0.20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 与正交试验结果存在差异, 由于 dNTP 浓度过高时会与 Mg^{2+} 螯合而对扩增反应起抑制作用^[14], 因此选择 $0.20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为油桐 ISSR-PCR 反应体系中 dNTP 的最佳浓度; 单因子试验中引物最佳浓度为 $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 正交试验结果中最佳浓度为 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 为减少非特异性扩增, 加强重复性, 本试验将 $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为油桐 ISSR-PCR 反应体系中引物的最佳浓度。

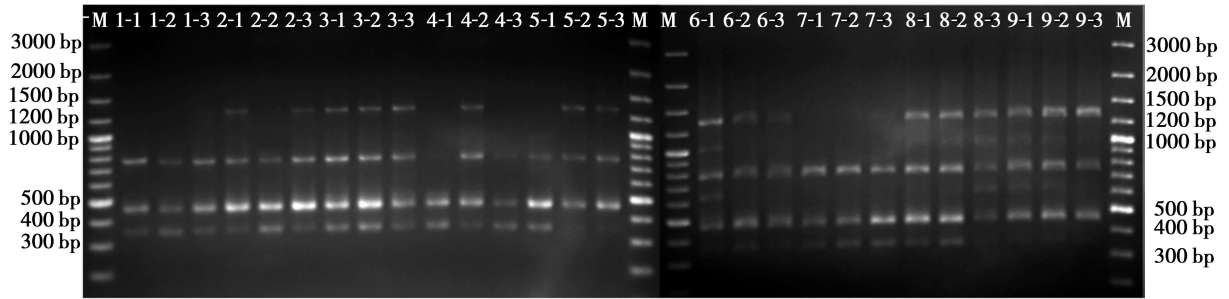
由于所得 Taq 酶与 dNTP 最佳浓度都是试验中浓度范围的最低值, 为确保结果的可靠, 又以低于上述浓度重新设定, 分别将 Taq 酶、dNTP 在 0.4 、 0.6 、 0.8 、 $1.0 \text{ U} \cdot (20 \mu\text{L})^{-1}$ 和 0.14 、 0.16 、 0.18 、 $0.20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内做进一步的验证。由图 7 看出, Taq 酶、dNTP 仍然在浓度分别为 $1.0 \text{ U} \cdot (20 \mu\text{L})^{-1}$ 和 $0.20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时扩增效果最好, 与上述结果一致。

综合分析结果, 确定油桐 ISSR-PCR 反应的最佳反应体系为: Taq DNA 聚合酶 $1.0 \text{ U} \cdot (20 \mu\text{L})^{-1}$, Mg^{2+} $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, dNTP $0.20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 引物 $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $1 \times$ PCR 缓冲液, 40 ng 模板 DNA。用其对 16 个油桐品种模板 DNA 进行扩增, 取得了较好的效果(图 7)。

3 小结与讨论

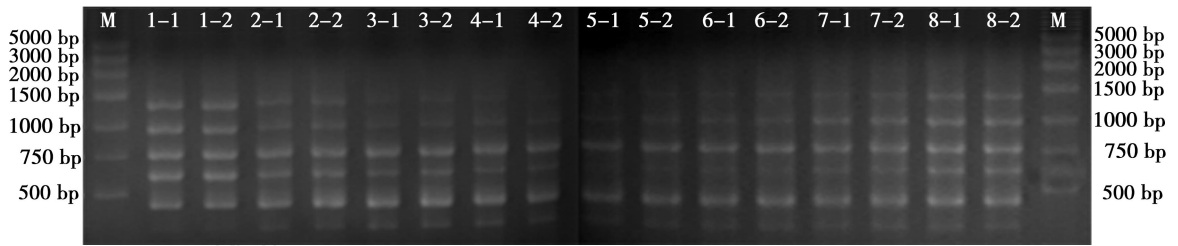
油桐组织中含有大量的蛋白、多糖以及酚、单宁等次生代谢物质, 采用改进后的 CTAB 法可有效地去除这些物质对 DNA 提取的影响, 得到高质量的油桐基因组 DNA。

模板浓度也是 PCR 反应体系的一个因素。在进行单因子试验和正交试验之前, 已经对 $20 \mu\text{L}$ 的 ISSR-PCR 反应体系的模板浓度进行了 5 、 10 、 20 、 40 、 60 、 80 、 100 ng 的梯度试验, 结果显示 40 ng 的浓度最佳, 因此将 $40 \text{ ng} \cdot (20 \mu\text{L})^{-1}$ 确定为本试验的模板浓度。



1~9:处理号 (同表 2); M: 标准分子量 DNA

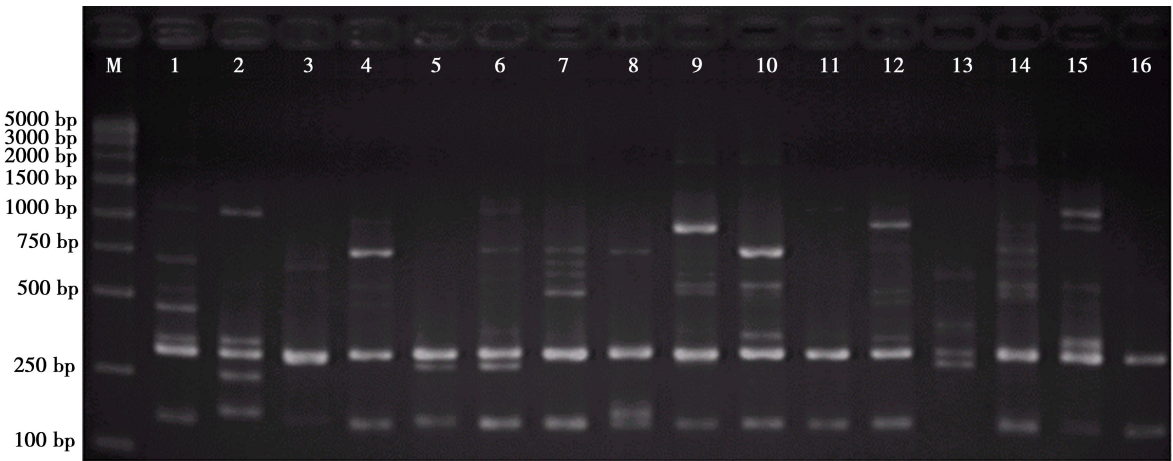
图 6 ISSR-PCR正交试验结果



1 - 1, 1 - 2, 2 - 1, 2 - 2, 3 - 1, 3 - 2, 4 - 1, 4 - 2: dNTP浓度分别为 0.20, 0.18, 0.16, 0.14 mmol · L⁻¹;

5 - 1, 5 - 2, 6 - 1, 6 - 2, 7 - 1, 7 - 2, 8 - 1, 8 - 2: Taq酶浓度分别为 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 U · (20 μL)⁻¹; M: 标准分子量 DNA

图 7 不同 dNTP和 Taq酶用量的 ISSR-PCR电泳结果



1~16: 样品号; M:标准分子量 DNA

图 8 16个油桐品种的 ISSR-PCR最佳反应体系扩增结果

在各影响因素反应浓度范围的选择上,本试验参考了夏腊梅 (*Sinocalycanthus chinensis* (Cheng et S. Y. Chang))^[16]、桑树 (*Morus spp.*)^[17]、银叶树 (*Heritiera littoralis* Dryand)^[18]、杯萼海桑 (*Sonneratia alba* J. Smith)^[19]等 ISSR 的反应体系。Taq 酶是 PCR 反应的重要因素,浓度过高会产生弥散现象,过低则降低扩增效率。资料显示,ISSR 扩增体系中,酶的用量在 1.0 U · (20 μL)⁻¹ ~ 1.0 U · (10 μL)⁻¹ 之间均能扩增,物种之间差异较大,可能也与不同厂家酶的活性不尽相同有关。本试验所得 Taq 酶最佳浓度为 1.0 U · (20 μL)⁻¹,既能保证实验结

果的可靠,又能节省实验成本。反应体系中, Mg²⁺ 能定量地与 dNTP 分子中的磷酸基团结合,所以两者有效浓度相互影响。在本试验中, Mg²⁺ 与 dNTP 最佳浓度分别确定为 2.0 mmol · L⁻¹ 和 0.20 mmol · L⁻¹。过高的引物浓度易导致碱基错配、引物二聚体的形成,过低扩增产量会下降。本试验确定 0.5 μmol · L⁻¹ 为引物最佳浓度。

利用正交设计对 PCR 反应体系能迅速得到最佳的试验条件的组合,但也存在局限性,不能很好地估计实验误差,对结果的评价带有一定的主观成分,使各因素最佳反应水平的确定缺乏可靠性。虽然已

有研究^[20-21]也对正交试验的结果做了统计学的方差分析,但仍不可避免主观因素造成的影响。采用单因素 PCR 优化设计对各个影响因素逐一进行研究,对最佳水平的确定更直观,缺点是过程繁琐,且不能兼顾各成分之间的交互作用。本试验分别用两种方法分析影响油桐 ISSR-PCR 体系的因素,并综合分析优化反应体系,可在一定程度上有效克服两种方法各自的局限性,所得到的 Taq 酶、Mg²⁺ 最佳浓度是一致的,表明了试验的可信度;在另外两种成分 dNTP 和引物最佳浓度的确定上,两种方法的结果存在差异,这可能与 PCR 反应的不稳定性有关,也可能是由于两者各自局限性所造成,所以在最佳因素水平的确定上,结合实验实际,综合了两种方法的结果,以尽可能地减少实验误差。最后采用最佳因素水平组合进行的 ISSR-PCR 扩增结果也较好,说明两种方法相结合能有效地保证试验的可靠性。本试验所构建的油桐 ISSR-PCR 反应体系,为油桐品种 ISSR 指纹图谱建立、品种鉴定、新品种选育、数量性状基因定位等工作奠定了良好的技术基础。

参考文献:

- [1] 范义荣,毛迎春,夏道鸿,等. 油桐育种程序系列研究 [J]. 林业科学, 1997, 33(5): 403 - 411
- [2] 方嘉兴,何方. 中国油桐 [M]. 北京:中国林业出版社, 1998
- [3] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20: 176 - 183
- [4] Godwin ID, Aitken EA, Smith LW. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics[J]. Electrophoresis, 1997, 18(9): 1524 - 1528
- [5] Bomet B, Branchard D. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2001, 19: 209 - 215
- [6] Sankar A A, Moore GA. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in *Citrus* and extension of the genetic linkage map [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 102: 206 - 214
- [7] 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: 348 - 353
- [8] 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: 583 - 589
- [9] Escandón A S, Zelener N, de la Torre M P, et al. Molecular identification of new varieties of *Nierembergia linaiaefolia* (Graham), a native Argentinean ornamental plant [J]. J Appl Genet, 2007, 48(2): 115 - 123
- [10] 吴开云,费学谦,姚小华. 油桐 DNA 快速提取以及 RAPD 扩增初步研究 [J]. 经济林研究, 1998, 16(3): 28 - 30
- [11] 续九如,黄智慧. 林业试验设计 [M]. 北京:中国林业出版社, 1998
- [12] 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
- [13] 杜荣骞. 生物统计学 [M]. 2版. 北京:高等教育出版社, 2003
- [14] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂,等译. 3版. 北京:科学出版社, 2002
- [15] 林万明,扬瑞馥,黄尚志,等. PCR 技术操作和应用指南 [M]. 北京:人民军医出版社, 1993
- [16] 金则新,李钧敏. 珍稀濒危植物夏腊梅遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 应用生态学报, 2007, 18(2): 247 - 253
- [17] 赵卫国,苗雪霞,臧波,等. 中国桑树选育品种 ISSR 指纹图谱的构建及遗传多样性分析 [J]. 遗传学报, 2006, 33(9): 851 - 860
- [18] Jian S G, Tang T, Zhong Y, et al. Variation in inter-simple sequence repeat (ISSR) in mangrove and non-mangrove populations of *Heritiera littoralis* (Sterculiaceae) from China and Australia [J]. Aquatic Botany, 2004, 79: 75 - 86
- [19] 李海生,陈桂珠. 中国怀萼海桑遗传多样性的 ISSR 研究 [J]. 植物学报, 2004, 46(5): 515 - 521
- [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] 林萍,张含国,谢运海. 正交设计优化落叶松 ISSR-PCR 反应体系 [J]. 生物技术, 2005, 15(5): 34 - 37