

正交设计优化地枫皮 ISSR-PCR 反应体系

唐 辉, 陈宗游*, 史艳财, 柴胜丰, 王满莲, 孔德鑫

中国科学院广西植物研究所, 广西 桂林 541006

摘要: 目的 建立稳定性高、重现性好, 适合地枫皮遗传差异分析的 ISSR-PCR 反应体系。方法 利用正交试验设计, 对地枫皮 ISSR-PCR 反应的 5 个因素 (Mg^{2+} 、dNTPs、引物、Taq 酶和模板 DNA 浓度) 进行优化, PCR 结果用 SPSS 统计软件分析, 在此基础上对 PCR 反应过程中的退火温度和循环次数进行梯度检测。结果 大部分因素的不同水平对 PCR 反应有显著影响, 其中 Taq 酶影响最大; 地枫皮 ISSR-PCR 最佳反应体系 (20 μ L) 为: Mg^{2+} 1.60 mmol/L、dNTP 0.22 mmol/L、引物 0.90 μ mol/L、Taq 酶 0.50 U、模板 DNA 70.00 ng; 最佳退火温度和循环次数分别为 51.8 $^{\circ}$ C 和 40 次; 从 62 条引物中筛选出 13 条扩增稳定、多态性丰富的 ISSR 引物。结论 建立的地枫皮 ISSR-PCR 反应体系, 经过 16 份地枫皮样品检验, 证明该体系稳定可靠, 可用于地枫皮遗传差异分析。

关键词: 地枫皮; ISSR-PCR; 正交设计; 最佳退火温度; 最佳循环次数; 遗传差异

中图分类号: R282.7 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)05-0610-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.05.022

Optimization for ISSR-PCR reaction system of *Illicium difengpi* by orthogonal design

TANG Hui, CHEN Zong-you, SHI Yan-cai, CHAI Sheng-feng, WANG Man-lian, KONG De-xin

Guangxi Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China

Abstract: Objective To establish a stable, reproducible, and suitable reaction system for ISSR analysis of genetic differences in *Illicium difengpi*. **Methods** The ISSR-PCR amplification system on *I. difengpi* in five factors (Mg^{2+} , dNTPs, primers, Taq DNA polymerase, and DNA template) was optimized by orthogonal design, and the PCR result was analyzed by SPSS. Then based on the optimal ISSR-PCR amplification system, the annealing temperature and cycle times in PCR were proposed by gradient determination. **Results** Most of the factors in different levels had the significant effects on the result of PCR, and the most remarkable factor was the quantity of Taq DNA polymerase. The optimized ISSR-PCR reaction system (20 μ L) for *I. difengpi* was constructed of Mg^{2+} (1.60 mmol/L), dNTP (0.22 mmol/L), primer (0.90 μ mol/L), Taq polymerase (0.50 U), and DNA template (70.00 ng). The optimized annealing temperature and cycle times were 51.8 $^{\circ}$ C and 40 cycles, respectively. Thirteen ISSR primers with stable amplification and abundant polymorphism were selected from 62 ISSR primers. **Conclusion** The established and optimized ISSR reaction system is stable and credible according to the testing results of 16 samples of *I. difengpi*, and provides the basis for the genetic analysis of *I. difengpi*.

Key words: *Illicium difengpi* K. I. B. et K. I. M.; ISSR-PCR; orthogonal design; optimized annealing temperature; optimized cycle times; genetic difference

地枫皮 *Illicium difengpi* K. I. B. et K. I. M. 是木兰科八角属植物, 又名钻地枫、追地枫、高山龙等, 是广西西南部石灰岩山上的一种特产药材^[1], 以干燥树皮入药, 其味微辛、涩, 性温, 具有祛风除湿、消肿止痛等功效, 主治风湿痹痛、腰肌劳损、蜈蚣咬伤等疾病^[2], 为《中国药典》2010 年版收载品种。由于乱采滥伐, 连年剥皮, 加上石灰岩地区生态环

境的持续恶化, 地枫皮资源日益减少, 种内资源遗传多样性丧失严重, 已被列入《中国植物红皮书》渐危种。开展地枫皮种质资源遗传多样性研究, 了解其遗传变异水平、种群遗传结构等, 对野生地枫皮种质资源的保护、管理及引种驯化有重要的指导意义。

ISSR 具有重复性好、稳定性高、多态性丰富等

收稿日期: 2012-08-19

基金项目: 中国科学院“西部之光”人才培养计划项目 [(2009) 24]; 广西科技创新能力与条件建设 (0992028-10); 广西区专项基金 [(2008) 80]; 广西科技攻关项目 (10124008-1); 广西植物研究所基本业务费项目 (09030)

作者简介: 唐 辉 (1972—), 男, 广西兴安人, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事药用植物资源评价及分子生物学研究。E-mail: th@gxib.cn

*通信作者 陈宗游 Tel: 13978318408 E-mail: 214524140@qq.com

优点, 已广泛用于种内遗传多样性水平的检测、探讨种间的遗传关系、种质资源鉴定与分类、遗传图谱的构建等方面^[3-9], 但其反应体系易受 Mg^{2+} 、引物、dNTPs 及 TaqDNA 聚合酶浓度等因素的影响。建立精确的 ISSR-PCR 反应体系对保证 ISSR 试验结果的准确可靠非常重要。本实验利用正交试验设计对地枫皮 ISSR-PCR 反应体系进行了优化, 为地枫皮遗传多样性的研究奠定了基础。

1 仪器与材料

PCR 仪 (美国 Bio-Rad 伯乐公司, Model: PTC—200); DYCP—34 型电泳槽 (北京市六一仪器厂); 离心机 (珠海黑马医学仪器有限公司); CDYY—6C 型电泳仪 (北京市六一仪器厂); UVP 凝胶成像系统。

样品于 2010 年 9 月采自广西马山县白山镇古腰村的石灰岩山顶上, 经笔者鉴定为地枫皮 *Illicium difengpi* K. I. B. et K. I. M.。采集成年植株的当年生嫩叶, 采后即进行 DNA 提取; $MgCl_2$ 、dNTPs、Taq DNA 聚合酶等均购于宝生物工程 (大连) 有限公司; 引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成, 经初步

筛选以引物 U815(CT)₈G 作为此次正交试验的引物。

2 方法

2.1 DNA 提取与检测

采用改良后 CTAB 法^[10]提取地枫皮的总 DNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳法检验 DNA 质量, 用紫外分光光度计检测 DNA 浓度, 并将其稀释至 20 ng/ μ L, 置 4 °C 冰箱中保存。

2.2 ISSR-PCR 反应体系的正交试验

采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计, 试验因素及水平见表 1, 具体方案见表 2。PCR 反应体系总体积是 20 μ L, 每个体系还含有 2 μ L 的 10 $\times$ PCR 缓冲液, 用超纯水补至 20 μ L。每一组合设 4 次重复。初步反应程序为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 52 °C 退 45 s, 70 °C 延伸 1.5 min, 40 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。取 10 μ L 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳 1.5 h, EB 液 (0.5 μ g/mL) 染色 20 min, 然后置 UVP 凝胶成像系统中拍照。

2.3 退火温度的确定

根据正交试验结果, 选择最佳反应体系对退火

表 1 正交试验的因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素				
	Mg^{2+} / (mmol·L ⁻¹)	dNTP / (mmol·L ⁻¹)	引物 / (μ mol·L ⁻¹)	Taq 酶 / U	模板 DNA / ng
1	1.30	0.13	0.30	0.50	10.00
2	1.60	0.16	0.50	1.00	30.00
3	1.90	0.19	0.70	1.50	50.00
4	2.20	0.22	0.90	2.00	70.00

表 2 ISSR-PCR 正交试验 $L_{16}(4^5)$

Table 2 $L_{16}(4^5)$ orthogonal test for ISSR-PCR

序号	Mg^{2+} / (mmol·L ⁻¹)	dNTPs / (mmol·L ⁻¹)	引物 / (μ mol·L ⁻¹)	Taq 酶 / U	模板 DNA / ng
1	1.30	0.13	0.30	0.50	10.00
2	1.30	0.16	0.50	1.00	30.00
3	1.30	0.19	0.70	1.50	50.00
4	1.30	0.22	0.90	2.00	70.00
5	1.60	0.13	0.50	1.50	70.00
6	1.60	0.16	0.30	2.00	50.00
7	1.60	0.19	0.90	0.50	30.00
8	1.60	0.22	0.70	1.00	10.00
9	1.90	0.13	0.70	2.00	30.00
10	1.90	0.16	0.90	1.50	10.00
11	1.90	0.19	0.30	1.00	70.00
12	1.90	0.22	0.50	0.50	50.00
13	2.20	0.13	0.90	1.00	50.00
14	2.20	0.16	0.70	0.50	70.00
15	2.20	0.19	0.50	2.00	10.00
16	2.20	0.22	0.30	1.50	30.00

温度进行梯度试验。在 PCR 梯度扩增仪上设置最小退火温度为 46 ℃, 最大为 60 ℃, PCR 仪自动形成 12 个梯度, 即 48.0、48.3、49.2、50.4、51.8、53.2、54.8、56.2、57.6、58.8、59.7、60.0 ℃, 每梯度设 2 次重复。

2.4 循环次数的确定

设置 34、36、38、40、42、44 这 6 个不同循环次数, PCR 反应体系和扩增程序中的退火温度分别为正交试验结果确定的最佳反应体系和温度梯度 PCR 试验结果确定的最佳退火温度。设 2 次重复。

2.5 最佳反应体系的验证

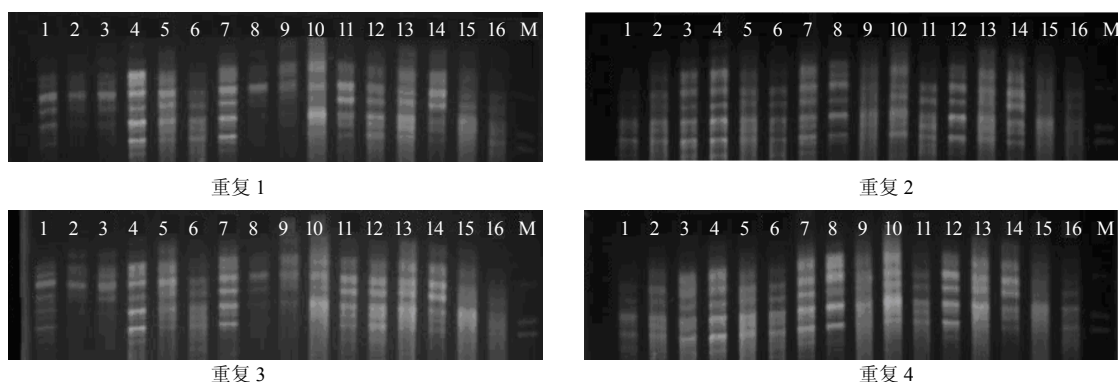
用筛选获得的最佳反应体系和反应程序, 选用

2 条引物 [U811(GA)₈C 和 U815(CT)₈G] 对 16 份地枫皮样品进行稳定性验证。

3 结果与分析

3.1 ISSR-PCR 正交设计直观分析

正交试验 PCR 产物电泳结果见图 1, 16 个处理 4 组重复均有谱带产生。参照何正文等^[11-12]的方法, 依据谱带的多少、强弱和杂带的多寡对 PCR 扩增结果依次打分。条带数量丰富、清晰、稳定的最佳产物记 16 分, 条带数量稀少、暗淡的最差的记 1 分。4 次重复分别独立进行统计, 16 个处理的分数见表 3。



1~16-分别为表 2 中的 1~16 处理 M-Marker; 下同

1—16-treatment number shown in Table 2 M-Marker; same as below

图 1 地枫皮 ISSR-PCR 正交试验电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis of orthogonal test of ISSR-PCR products in *I. difengpi*

表 3 16 个处理的评分表

Table 3 Scores of 16 treatments

处理	评 分				处理	评 分			
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4		重复 1	重复 2	重复 3	重复 4
1	14	4	10	6	9	4	1	7	2
2	2	5	4	9	10	7	7	6	5
3	3	10	5	10	11	12	9	13	7
4	15	14	14	14	12	13	12	12	12
5	10	8	11	8	13	11	6	9	4
6	8	11	8	11	14	9	15	15	15
7	16	13	16	16	15	5	2	2	1
8	1	16	3	13	16	6	3	1	3

3.2 ISSR-PCR 正交设计方差分析

将上述处理的评分结果用 SPSS 11.5 进行方差分析, 结果见表 4。由 F 值可知, 该正交设计中 5 个因素对反应影响从大到小依次为 Taq 酶、模板 DNA、 Mg^{2+} 、引物、dNTPs。除 dNTPs 和重复组外, 其余各因素 (Mg^{2+} 、引物、Taq 酶、模板 DNA) 的 P 值均大于 0.05, 表明这些因素水平间存在显著差异, 可进一步进行因素内的多重比较分析。重复组间的差异不显著, 说明 4 次重复评分结果有较强的

一致性。

3.3 因素内各水平对 ISSR-PCR 结果的影响

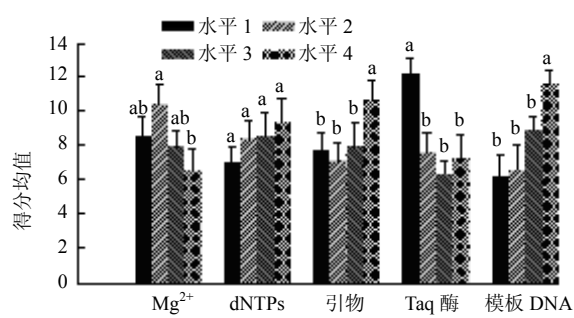
采用 SPSS 11.5 统计软件中的 S-N-K 法对各因素不同水平的结果进行多重比较, 确定因素的最佳水平。各因素水平均值结果见图 2。

3.3.1 Mg^{2+} 浓度 Mg^{2+} 浓度对 ISSR-PCR 的影响, 在 4 个浓度中, 除 1.60 与 2.20 mmol/L 水平间差异显著外, 其余两两间差异不显著 (图 2)。 Mg^{2+} 浓度在 1.30~1.60 mmol/L 时, 随着浓度的增大,

表 4 正交设计方差分析

Table 4 Variance analysis of orthogonal design

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Mg ²⁺	143.547	3	47.849	5.169	0.004
dNTPs	58.922	3	19.641	2.122	0.111
引物	97.922	3	32.641	3.526	0.022
Taq 酶	344.047	3	114.682	12.388	0.000
模板 DNA	297.422	3	99.141	10.709	0.000
重复组	1.172	3	0.391	0.042	0.988
误差	416.578	45	9.257		
总计	5 899.000	64			
校对后合计	1 359.609	63			



小写字母表示各水平间显著差异 ($P < 0.05$)
Lowercase letters stand for significant difference ($P < 0.05$)

图 2 各因素水平得分值

Fig. 2 Scores of each factor and level

评分结果均值呈现上升趋势；当 Mg²⁺浓度超过 1.60 mmol/L，评分结果均值呈下降趋势。最终根据多重比较结果确定 1.60 mmol/L 为 Mg²⁺的最佳浓度。

3.3.2 dNTPs 浓度 dNTPs 作为扩增的底物，其浓度变化直接影响 PCR 扩增结果。本实验中 dNTPs 浓度对 ISSR-PCR 的影响，在 4 个浓度水平间差异不显著（图 2），但随着 dNTPs 浓度的增加，评分结果均值呈现上升趋势，在 dNTPs 浓度为 0.22 mmol/L 时，评分结果均值达到最大值，故该浓度为 dNTPs 的最佳浓度。

3.3.3 引物浓度 引物浓度在 0.30、0.50、0.70 μmol/L 3 个水平间对 ISSR-PCR 的影响差异不显著（图 2），0.9 μmol/L 与其他 3 个水平间对 ISSR-PCR 的影响差异显著。在 0.30~0.50 μmol/L 水平上，评分结果均值呈下降趋势，但随着浓度的增加开始上升。当浓度为 0.90 μmol/L 时，达到最大值，所以选择该浓度为引物的最佳水平。

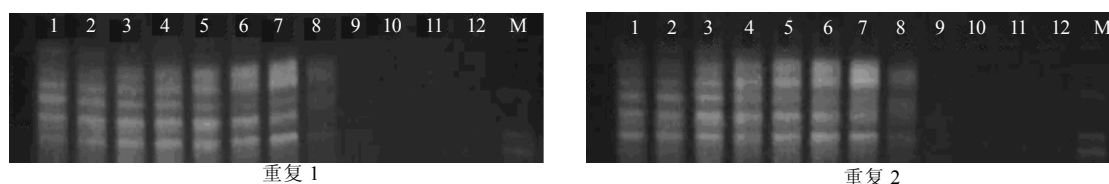
3.3.4 Taq 酶浓度 Taq 酶用量在 1.00、1.50、2.00 U 3 个水平间对 ISSR-PCR 的影响差异不显著（图 2），0.50 U 与以上 3 个水平间差异显著。在 0.50~1.50 U 水平上，评分结果呈下降趋势，但随着浓度的增加，得分均值开始上升。本实验中，Taq 酶在 0.50 U 水平时效果最好，所以该水平为 Taq 酶的用量的最佳反应水平。

3.3.5 模板 DNA 浓度 模板 DNA 在 10.00、30.00、50.00 ng 3 个水平间对 ISSR-PCR 的影响差异不显著（图 2），70.00 ng 与以上 3 个水平间差异显著。随着模板 DNA 浓度的增加，评分结果均值呈现上升趋势，在模板 DNA 为 70.00 ng 时，评分结果均值达到最大值，因此选择 70.00 ng 为最佳反应浓度。

3.3.6 ISSR-PCR 退火温度的选择 从图 3 可以看出，不同退火温度扩增的效果是不同的。在 48.0 °C 和 48.3 °C，温度偏低，条带多，但条带不够清晰；在 53.2~60.0 °C，温度偏高，条带变弱、减少，甚至无法扩增出条带；在 49.2~51.8 °C，扩增的带型基本一致，条带清晰明亮，依据就高不就低的原则，选择 51.8 °C 为最佳的退火温度。

3.3.7 ISSR-PCR 循环次数的选择 如图 4 所示，本实验分别进行了 34、36、38、40、42 和 44 次循环扩增，6 个循环梯度上均能扩增出条带，但 34、36 和 38 次循环扩增出的条带稍微弱一些，44、42 和 44 次循环扩增的结果基本一致，为了节省时间，本实验确定地枫皮 ISSR-PCR 反应的最佳循环次数为 40 次。

3.3.8 最佳反应体系的验证与引物筛选 用筛选获得的最佳反应体系及扩增程序，选用引物 U811 和 U815 对 16 份地枫皮 DNA 进行 ISSR 扩增，结果见



1~12 退火温度分别为 48.0、48.3、49.2、50.4、51.8、53.2、54.8、56.2、57.6、58.8、59.7、60.0 °C
Lane 1 to 12 indicate the annealing temperature at 48.0, 48.3, 49.2, 50.4, 51.8, 53.2, 54.8, 56.2, 57.6, 58.8, 59.7, and 60.0 °C

图 3 退火温度对 ISSR 反应的影响

Fig. 3 Effects of different annealing temperatures on ISSR reaction

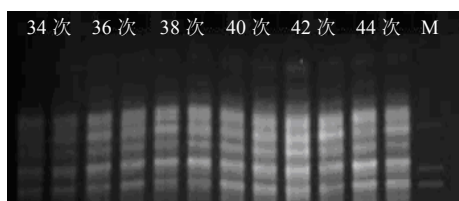


图 4 循环次数对 ISSR-PCR 扩增的影响

Fig. 4 Effects of different cycle times on ISSR-PCR amplification

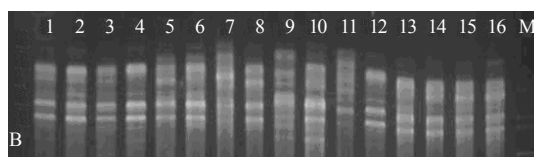


图 5 引物 U811 (A) 和 U815 (B) 在 16 份地枫皮样品中的 ISSR 扩增结果

Fig. 5 ISSR profiles generated by Primers U811 (A) and U815 (B) in 16 samples of *I. difengpi*

表 5 筛选出的 13 条 ISSR 引物

Table 5 Selected 13 bands of ISSR primers

引物	引物序列 (5'→3')	引物	引物序列 (5'→3')
U811	(GA) ₈ C	U846	(CA) ₈ RT
U815	(CT) ₈ G	U848	(CA) ₈ RG
U827	(AC) ₈ G	U849	(GT) ₈ YA
U834	(AG) ₈ YT	U852	(TC) ₈ RA
U840	(GA) ₈ YT	U853	(TC) ₈ RT
U841	(GA) ₈ YC	U862	(AGC) ₆
U844	(CT) ₈ RC		

Y = (C, T), R = (A, G)

可重复的条带, 必须针对供试样品、不同来源的试剂和反应程序等影响 PCR 扩增的主要因子进行适当的调整、筛选和优化^[14]。正交设计是从复因子试验中挑选出部分有代表性的水平组合进行试验, 相对于单因素设计和完全组合设计减少了处理组合。通过统计分析可考察各组分不同水平对扩增的差异显著性, 对结果的分析更加科学和完善。该方法也

图 5。2 个引物扩增谱带清晰、多带性条带丰富, 说明该反应体系稳定、重复性好, 适合地枫皮 ISSR 反应。最后, 利用相同的反应体系及扩增程序, 以地枫皮的基因组 DNA 为模板, 对 62 条 ISSR 引物分别进行了扩增, 依据所扩增带型清晰而重复性好的原则, 最终筛选出 13 条有效引物, 见表 5。

4 讨论

ISSR 分子标记的扩增结果会受反应条件、扩增程序以及物种不同的影响^[13]。要获得较稳定、清晰、

存在局限性, 如对试验结果本身的评价带有主观成分, 打分的先后次序直接影响分析结果, 使影响因素最佳反应水平的确定缺乏可靠性^[15]。增加正交试验处理的重复次数, 从而增加对 PCR 扩增结果的评判次数, 以达到减少打分误差, 是保证正交设计优化 PCR 反应体系试验结果可信的重要途径。本研究对 Mg^{2+} 、dNTPs、Taq 聚合酶、引物和模板 DNA 浓度 5 个因子采用正交设计方案, 设计 4 次重复, 优化了地枫皮 ISSR-PCR 反应体系, 确定最佳扩增反应条件, 即在 20 μ L 的体系中含 Mg^{2+} 1.60 mmol/L, dNTP 0.22 mmol/L, 引物 0.90 μ mol/L, Taq 酶 0.50 U, 模板 DNA 70.00 ng, 10 $\times$ 缓冲液 2.00 μ L。同时探讨了退火温度和循环次数对 ISSR-PCR 的影响, 确定地枫皮的 ISSR-PCR 最佳退火温度和循环次数分别为 51.8 °C 和 40 次。

有研究认为 Mg^{2+} 对试验结果影响最大, dNTPs 次之, Taq 酶和模板 DNA 对 ISSR-PCR 的影响最小^[16]。本实验中, 各因素对试验影响大小依次为 Taq

酶、模板 DNA、 Mg^{2+} 、引物、dNTPs, 与安静等^[17]的研究结果相似。胡甦等^[18]发现 dNTPs 在不同的物种上对产物结果影响差别很大, 各因素对实验影响的大小可能与物种和因素水平设计不同有关。在 ISSR-PCR 反应中, Taq 酶用量的变化影响实验结果, 用量过多易产生非特异扩增的积累; 过低则会降低新链的合成效率。模板 DNA 用量少, 引物与模板结合率低, 导致扩增产物稳定性下降, 甚至扩增不出产物; 模板 DNA 用量过多, 导致过量扩增或增加非特异性扩增, 使电泳图出现弥散现象^[19]。 Mg^{2+} 是 Taq 酶的激活剂, 同时还能与反应液中的 dNTPs、模板 DNA 及引物结合, 影响 PCR 扩增的效率以及扩增的特异性^[15]。本实验中发现 Mg^{2+} 浓度较低时扩增产物较少且条带较弱, 而浓度过高时又会出现条带弥散, 背景模糊的现象。

本实验所建立的 ISSR-PCR 反应稳定体系为地枫皮品种鉴定、亲缘关系分析、遗传作图、遗传多样性研究等奠定了基础。

参考文献

- [1] 张本能. 中药地枫皮原植物的研究 [J]. 植物分类学报, 1977, 15(2): 76-80.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编辑委员会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [3] 熊忠臣, 史艳财, 漆小雪, 等. 壮药战骨种质资源遗传多样性 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 2040-2044.
- [4] 李喜凤, 邱天宝, 张红梅, 等. 蒲公英遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 2025-2029.
- [5] Kojima T, Nagaoka T, Noda K. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in einkorn wheat in relation to that of RFLP markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 37-45.
- [6] 战晴晴, 隋春, 魏建和, 等. 利用 ISSR 和 SSR 分子标记构建北柴胡遗传图谱 [J]. 药学报, 2010, 45(4): 517-523.
- [7] 卢洋海, 张俊红, 斯金平, 等. 利用 ISSR 标记辅助选育红李新品种 [J]. 浙江林业科技, 2008, 28(6): 51-52.
- [8] 刘颖嘉, 黄宇, 荣俊冬, 等. 巴戟天遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 福建林学院学报, 2011, 31(3): 203-206.
- [9] Wei X, Hong L C, Jiang Y S, *et al.* Population genetic structure of *Camellia nitidissima* (Theaceae) and conservation implications [J]. *Bot Studies*, 2008, 49: 147-153.
- [10] 邹喻萍, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [11] 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, 23(4): 403-404.
- [12] 原勤勤, 文亚峰, 何钢, 等. 用正交设计优化枣树 ISSR-PCR 反应体系 [J]. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(2): 70-74.
- [13] 林万明. PCR 技术操作和应用指南 [M]. 北京: 人民军医出版社, 1993.
- [14] 李长春, 阳天泉, 戴余军, 等. 正交设计优化莲藕 ISSR-PCR 反应体系研究 [J]. 北方园艺, 2011(1): 121-123.
- [15] 邵清松, 郭巧生, 谢作成. 基于方差分析优化菊花 ISSR-PCR 反应体系 [J]. 中草药, 2009, 40(2): 285-288.
- [16] 孙雯雯, 孙俊, 周军永, 等. 枣 ISSR 反应体系的建立及其指纹图谱构建 [J]. 安徽农业大学学报, 2011, 38(6): 940-945.
- [17] 安静, 徐刚标, 申响保, 等. 杉木 ISSR-PCR 反应体系的正交优化 [J]. 中南林业科技大学学报, 2011, 31(3): 156-159.
- [18] 胡甦, 王永清, 陶炼. 三角紫叶酢浆草 ISSR 反应体系的建立与优化 [J]. 草业科学, 2011, 20(5): 143-150.
- [19] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999.