

翻白草总 DNA 的提取与 ISSR PCR 体系的建立与优化

罗震信, 伍贤进, 彭帅, 刘选明*

(1. 湖南大学生命科学与技术研究院, 生物能源与材料研究中心, 湖南长沙 410082; 2. 怀化学院生物工程系, 湖南怀化 418008)

摘要 [目的] 针对翻白草 ISSR 的反应特点, 建立稳定可靠的 ISSR 分子指纹标记反应体系, 为进一步研究翻白草的居群差异奠定基础。[方法] 通过筛选引物并设定影响翻白草 ISSR 反应的诸因子的不同浓度, 检测 ISSR 不同反应体系的扩增效果; 通过分析非特异性条带的产生原因并进行条件优化, 建立翻白草 ISSR 稳定可靠的反应体系。[结果] 首次建立了可用于翻白草 ISSR PCR 分析的最适宜的反应体系, 确定了 25 μ l PCR 反应体系中各试剂终浓度: 1 \times Buffer 缓冲液, 1 U Taq DNA 聚合酶, 2.5 mmol/L Mg^{2+} , 0.25 mmol/L dNTP, 0.4 μ mol/L 引物, DNA 模板约 20~30 ng, 退火温度在 50~56 $^{\circ}C$; 实验表明: Taq 酶质量、DNA 模板品质、退火温度、 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度均对 ISSR 反应结果具有较大影响。[结论] 所建立的翻白草 ISSR 反应体系具有标记位点清晰、反应系统稳定、检测多态性能力较强、重复性好等特点, 可以较好地应用于翻白草的居群鉴别及居群分子生态的研究。

关键词 翻白草; 总 DNA 提取; ISSR PCR; 体系优化

中图分类号 Q503 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)03-00895-03

Establishment and Optimization of ISSR PCR Reaction System and Genome DNA of Discolor cinquefoil Herb

LUO Yueji et al (Institute of Life Science and Biotechnology, Bioenergy and Biomaterial Research Center, Hunan University, Changsha, Hunan 410082)

Abstract To establish and optimize ISSR PCR system of Discolor cinquefoil Herb according to the ISSR PCR characters of Discolor cinquefoil Herb the effects of ISSR PCRs was examined with selected primers and different concentrations in the ISSR-PCRs, and the reliable ISSR PCR systems for Discolor cinquefoil Herb populations was established through the analysis of the reasons for occurrence of differential bands and optimizing reaction conditions. The optimal ISSR PCR system in Discolor cinquefoil Herb was reported for the first time, and 25 μ l ISSR PCR system contained 1 \times Taq buffer, 1 U Taq DNA polymerase, 2.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.25 mmol/L dNTP, 0.4 μ mol/L primer and 20~30 ng template DNA. The appropriate annealing temperature was among 50~56 $^{\circ}C$. ISSR PCRs were significantly influenced by Taq DNA polymerase, template DNA quantity and annealing temperature, concentrations of Mg^{2+} and dNTP, etc. The ISSR PCR systems, which were established in this paper for studying Discolor Cinquefoil Herb, could provide clear reliable abundant polymorphisms molecular markers and were suitable for studying population authentication and population molecular ecology of Discolor Cinquefoil Herb.

Key words Discolor cinquefoil Herb; Genome DNA extraction; ISSR PCR; Optimization of ISSR-PCR Reaction System

翻白草^[1] (*Discolor Cinquefoil* Herb), 又名天青地白、白头翁、叶下白、鸡腿苗、结梨, 为蔷薇科委陵菜属植物。翻白草具有止血、止痢、解毒、降血糖、降血脂的作用^[2], 是一种重要的中草药植物。对翻白草的研究, 我国近期来多集中对其化学成分的分析和对 2 型糖尿病、乳腺炎等疾病的治疗方面, 而对遗传多样性和亲缘关系的研究才进入初步阶段。

简单重复序列区间 ISSR (Inter simple sequence repeat) 是由 Zietkiewicz 等^[3] 1994 年发展的一种基于微卫星系列的新分子标记技术, 其随机分布于真核生物基因族内, 显性标记, 呈孟德尔遗传, 具有简便、不需预先知道序列信息、重复性强等特点, 广泛用于植物的分子标记和遗传育种^[4]。

运用 ISSR PCR 标记技术时, DNA 提取是至关重要的一步, 只有高质量的 DNA 才能扩增理想的条带。而翻白草叶片中含有较多的多糖、脂类和酚类等次生代谢物, 普通的提取方法不适合, 该研究在 CTAB 法的基础上加以改进 DNA 纯度和浓度满足 PCR 要求。探讨了以先前提取的翻白草 DNA 为模板, ISSR-PCR 中 6 种因素对扩增的影响, 以期获得翻白草 ISSR 的最佳体系, 为翻白草的遗传多样性的研究提供科学依据与基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料。 DNA 提取材料采自北京中科院、辽宁辽阳、湖南怀化和株洲等地 12 个居群, 取植物叶片置干净保鲜袋中, 带回实验室放于 -70 $^{\circ}C$ 低温冰箱保存。

1.1.2 主要试剂和仪器。 离心机(德国 Eppendorf 公司), 纯水器(美国 Millipore 公司); 765P 紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司); T GRADIENT PCR 仪(德国 Biontra 公司); 水浴锅、电泳槽等(国产); MBI Taq 酶(晶美生物有限公司); DNA Marker(北京天为时代科技有限公司)。

1.1.3 ISSR 引物。 50 条引物参照加拿大哥伦比亚大学 UBC 公司 2006 年公布的 ISSR 引物序列(http://www.michaelsmith.ubc.ca/services/NAPS/Primer_Sets/Primers_Oct2006.pdf) 由上海生工生物技术公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 翻白草 DNA 提取和浓度测定。 参照传统的 CTAB 法^[5] 和非洲菊花基因组 DNA 提取方法^[6], 根据提取材料的不同进行了适当的改进和优化。步骤: 采用改进的 CTAB 法, 取幼嫩叶约 2 g 在液氮冷冻下研磨成粉末, 加入到 3 ml 预热至 94 $^{\circ}C$ 的 2 \times CTAB 提取缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl pH 值 8.0, 20 mmol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl, 2% CTAB, 2% PVP, 0.2% β -巯基乙醇 V/V), 1 ml 溶液 PB(10% CTAB, 10% PVP, 5% NaCl), 500 μ l K 溶液(10% Na_2SO_4 , 5% VC), 0.02 g VE 混合溶液的 10 ml 离心管中, 混匀后 65 $^{\circ}C$ 水浴 1.5 h, 其间颠倒翻转离心管若干次; 取出离心管冷却至室温, 加入 500 μ l 溶液 PB, 等体积氯仿/异戊醇(24/1, V/V), 混匀, 后置于摇床上来回震荡 1 h; 取出离心管后 6 000 r/min 离心 30 min, 取上清; 加入 1 ml 溶液 PB, 等体积氯仿/异戊醇(24/1, V/V), 混匀后 6 000 r/min 离心 10 min, 取上清; 加入 -20 $^{\circ}C$ 预冷的等体积异丙醇, 轻柔混匀后静置 30 min, 出现絮状沉淀; 用玻璃钩钩出絮状沉淀, 转移至 1.5 ml 离心管中, 加入 70% 乙醇洗涤 2~3 次; 倒去乙醇, 让 DNA 自然晾干, 加入 500 μ l TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl pH 值 8.0, 1 mmol/L EDTA)

基金项目 国家科技基础条件平台建设项目(2005DKA21006)。

作者简介 罗震信(1983-), 女, 湖南株州人, 硕士研究生, 研究方向: 植物分子生物学。* 通讯作者, 教授, E-mail: sw_xml@hnu.cn。

收稿日期 2007-07-19

溶解 DNA, 加入 RNaseA 1 μ , 于 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴 1 h; 加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc, 并加入 2 倍体积的无水乙醇, 小心混匀后, 置 -20 $^{\circ}$ C 60 min, DNA 再次呈絮状沉淀析出, 钩出置 1.5 ml 离心管中; 70% 乙醇洗涤 2~3 次, 倒去乙醇, 自然晾干, 加入 100~200 μ TE 缓冲液, 4 $^{\circ}$ C 保存。采用 765 P 紫外可见分光光度计检测 DNA 浓度, 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。

1.2.2 ISSR-PCR 体系的优化。该试验以翻白草基因组 DNA 为模板, 从 50 条引物中筛选出 3 条重复性较好的引物 (UBC841, UBC842, UBC847) 为代表, 进行预备试验。根据预备试验结果, 对影响 ISSR-PCR 的主要参数设置了不同梯度处理。反应总体系为 25 μ l, 其中 DNA 模板设 100、50、20、10 和 5 ng 5 个梯度; Mg^{2+} 浓度设 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L 5 个梯度; dNTPs 浓度设 0.15、0.20、0.25、0.30 和 0.35 mmol/L 5 个梯度; Taq 酶用量设了 0.5、0.8、1.0、1.5、2.0 U 5 个梯度。另外根据不同引物的 T_m 值设 46~55 $^{\circ}$ C 退火温度 6 个梯度。

1.2.3 ISSR-PCR 反应及其电泳检测。采用的反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 46~55 $^{\circ}$ C (根据引物来定) 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 共循环 35 次; 然后 72 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保温。将 PCR 产物在含有溴化乙锭 (EB) 染料染色的 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 电泳结束后在凝胶成像系统中照相保存。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取与优化 该试验提取的 DNA 呈米白色絮状和无色沉淀 (图 1), 经紫外可见分光光度计测定, DNA 的在 260 和 280 nm 的吸收度比值 (A_{260}/A_{280}) 为 1.76~1.85。经电泳检测显示, 所提取的 DNA 中蛋白质、多糖和酚类等物质基本祛除, 纯度较高, 符合 ISSR-PCR 的要求。

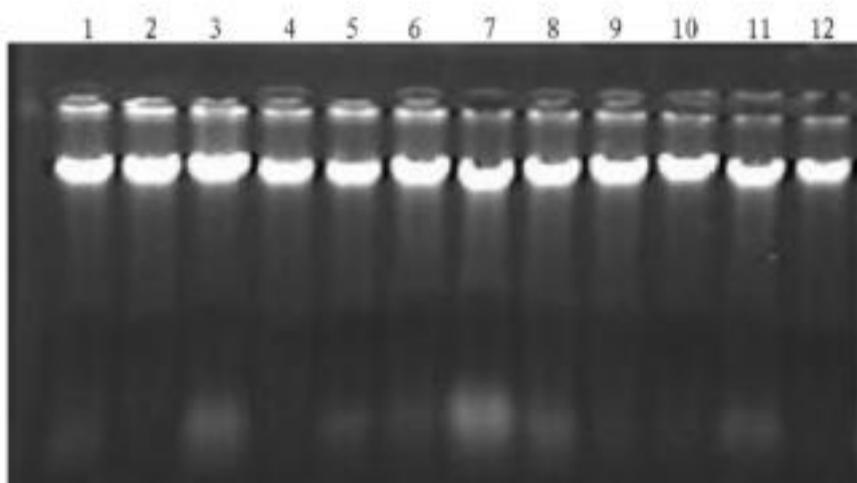


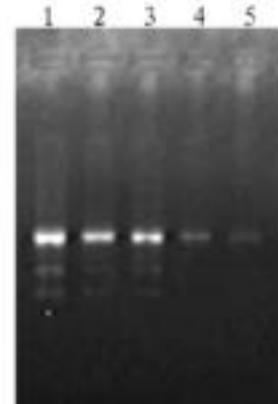
图1 12种不同地区翻白草样品所提取的DNA

Fig. 1 DNA extracted from 12 species of *Dscdor cinquefoil* Herb from different regions

2.2 ISSR-PCR 体系的优化

2.2.1 DNA 模板浓度的影响。DNA 模板浓度是影响 ISSR-PCR 扩增效果的一个重要因子。模板浓度过低, 扩增产物不稳定或无扩增产物; 模板浓度过高, 又会相应增加非特异性产物^[7]。试验设置 5 个模板浓度梯度 (分别是稀释 10、20、50、100、200 倍) (图 2) 参与 PCR 反应, 结果显示: 浓度为 5~10 ng (稀释 100~200 倍) 时, 扩增条带比较模糊; 在 20~50 ng (稀释 20~50 倍) 之间条带清晰且扩增产物带型稳定; 浓度为 100 ng 以上时, 扩增产物带型不稳定。试验选择 20~30 ng (稀释 50 倍) 为反应体系中模板的浓度。

2.2.2 Mg^{2+} 浓度的影响。 Mg^{2+} 浓度是影响 ISSR-PCR 的一个主要变量之一。作为 Taq 酶的辅助因子, Mg^{2+} 浓度不仅影响 Taq 酶活性, 还能与反应液中的 dNTPs、模板 DNA 及引物结合, 影响引物与模板的结合效率、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^[8]。该试验根据鱼腥草 ISSR-PCR 体系设计了 5 个 Mg^{2+} 浓度来比较 (图 3), 结果表明, Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L 时, 条带清晰且稳定, 为最佳浓度。而在 1.0~2.0 mmol/L 时, 条带稍模糊且不稳定, 在 3.0 mmol/L 时扩增的条带模糊且有非特异性扩增。

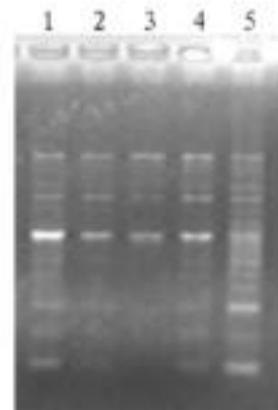


注: 1~5 泳道 PCR 反应的模板用量分别是 100、50、20、10 和 5 ng。

Note: Template dosage for PCR reaction in lane 1~5 is 100, 50, 20, 10 and 5 ng, resp.

图2 DNA 模板浓度对 ISSR-PCR 的影响

Fig. 2 Effects of DNA template concentration on ISSR-PCR



注: 1~5 泳道 PCR 反应的 Mg^{2+} 浓度分别是 1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 mmol/L。

Note: Mg^{2+} concentration for PCR reaction in lane 1~5 is 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0 mmol/L, resp.

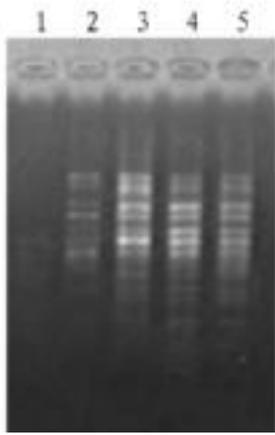
图3 Mg^{2+} 浓度对 ISSR-PCR 的影响

Fig. 3 Effects of Mg^{2+} concentration on ISSR-PCR

2.2.3 dNTPs 浓度的影响。dNTP 是 ISSR-PCR 反应的原料底物。dNTP 浓度过高, 会导致聚合酶错误的掺入, 过低又影响合成效率, 甚至会因 dNTP 过早消耗而使产物单链化, 影响扩增效果^[7,9]。结果如图 4 所示, dNTPs 浓度为 0.20~0.35 mmol/L 时均有扩增产物, dNTPs 浓度为 0.25 mmol/L 时扩增的条带最为清晰, 为最适浓度。

2.2.4 Taq 酶单位量的影响。在 PCR 反应中, Taq 酶的单位量也是影响 PCR 结果的重要因素。使用高浓度的 Taq 酶不仅增加试验成本, 而且会导致非特异性产物增加, 使用低浓度的 Taq 酶, 则会使酶过早耗完, 导致产物合成率下降^[10]。结果表明 (图 5), 0.5~0.8 U 时条带模糊不清, 1.0~2.0 U 时条带清晰且重复性好, 2.5 U 时重复性不好, 带型发生变化。因 Taq 酶成本较高, 在保证试验结果的前提下, 选择 1.0 U 为最佳单位。

2.2.5 退火温度的影响。PCR 反应的程序对 PCR 扩增效果



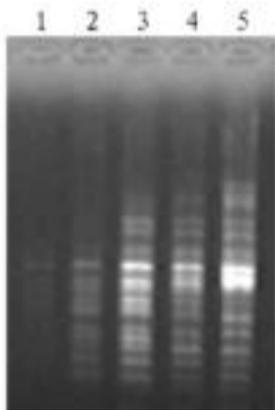
注:1~5 泳道 PCR 反应的 dNTPs 浓度分别是 0.15、0.20、0.25、0.30 和 0.35 mmol/L。

Note: dNTP concentration for PCR reaction in lane 1~5 is 0.15, 0.20, 0.25, 0.30 and 0.35 mmol/L, resp.

图4 dNTPs 浓度对 ISSR-PCR 的影响

Fig. 4 Effects of dNTPs concentration on ISSR PCR

至关重要,不同物种的扩增程序有所不同。退火温度明显影响 ISSR-PCR 扩增谱带式样。退火温度可由引物的 T_m 值确定,退火温度为(T_m 值 ± 3)^[11]。根据原初的 PCR 反应条件进行引物的初筛,选择能看到清晰条带的引物进行退火温度的测定(图6)。根据公式 $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$ ^[12], UBC841 的 T_m 为 55, 试验结果表明,退火温度为 52 时条带最清晰且特异性较高。



注:1~5 泳道 PCR 反应的 Taq 酶单位量分别是 0.5、0.8、1.0、1.5 和 2.0 U。

Note: Taq polymerase unit for PCR reaction in lane 1~5 is 0.5, 0.8, 1.0, 1.5 and 2.0 U, resp.

图5 Taq 酶单位量对 ISSR-PCR 的影响

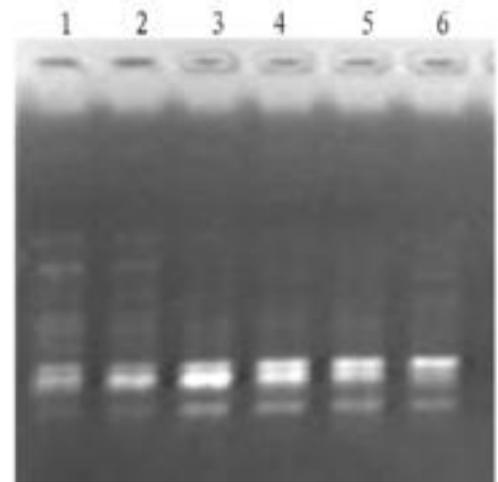
Fig. 5 Effects of Taq polymerase on ISSR PCR

最后,确立翻白草的 ISSR-PCR 体系为 25 μ l (图7): 1 \times Buffer 缓冲液, 1 U Taq DNA 聚合酶, 2.5 mmol/L Mg^{2+} , 0.25 mmol/L dNTP, 0.4 μ mol/L 引物, DNA 模板 20~30 ng, 退火温度 50~56。反应循环参数为: 94 预变性 5 min; 94 变性 30 s, 50~56 (根据引物来定) 退火 45 s, 72 延伸 1.5 min, 共循环 35 次; 然后 72 后延伸 10 min; 4 保存。

3 讨论

翻白草是一种重要的中草药,其新鲜材料的叶片中含有较多的酚类、多糖等次生代谢物,用传统的 SDS 和 CTAB 法提取 DNA 时,酚类、多糖等物质包裹并结合了部分 DNA,使其不能释放,严重影响了 DNA 的纯度,达不到 ISSR-PCR 的要求。参照 Couchu 等^[5] 和李宗菊等^[6] 提取 DNA 的方法,对 CTAB 法进行了一些优化及综合,即在提取缓冲液中加入的 PB 溶液、K 溶液、VE 及 β -巯基乙醇。PB 溶液中的 PVP 是酚的络合物,能与多酚形成一种不溶的络合物,有效地去除多酚,减少酚的污染。PVP、CTAB 和 NaCl 组成的 PB 溶液能

够有效地去除多糖。K 溶液中的 VC、VE 及 β -巯基乙醇都是抗氧化剂,其作用都是与多酚物质竞争氧,有效地防止酚氧化成醌,避免褐变^[6]。而 K 溶液中的 Na_2SO_3 是酶活性中心抑制剂,可使酶的活性减弱,当酚氧化酶活性受到抑制时,避免了酚氧化成醌,使酚容易去除。此外,在氯仿/异戊醇 (24/1, V/V) 抽提中再次加入了 PB 溶液,抽提两次后不仅将蛋白质祛除干净,也使得酚类、多糖等次生代谢物质进一步祛除,所提取的 DNA 完全符合 ISSR-PCR 的要求。

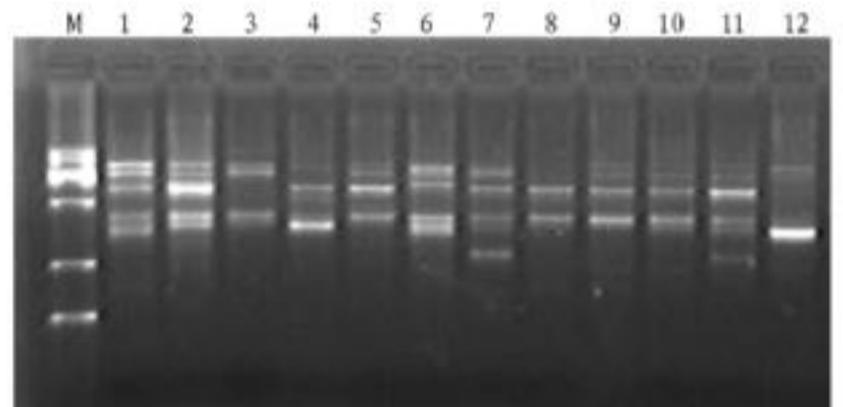


注:引物为 UBC841, 1~6 泳道 PCR 反应的退火温度分别为 48、50、52、54、56 和 58。

Note: The primers is UBC841, anneal temperature of lane 1~6 are 48, 50, 52, 54, 56 and 58, resp.

图6 退火温度对 ISSR-PCR 的影响

Fig. 6 Effects of anneal temperature on ISSR PCR



注:M 为 Marker, MD107 分子量从下往上依次为: 300、500、1000、1500、2000、2500 bp, 1~12 泳道对应相同序号 DNA 模板。

Note: M indicates Marker, molecular weight of MD107 upgrade is 300, 500, 1000, 1500, 2000 and 2500 bp, resp. Lane 1~12 indicate same number of DNA template.

图7 引物 UBC821 对 12 份翻白草的 ISSR-PCR 扩增结果

Fig. 7 Amplification results of ISSR-PCR on 12 species of Discolor cinquefoil Herb by primer UBC821

ISSR 技术是基于 PCR 上的一种分子标记技术,与 RAPD 技术相比,操作难度相应加大,但一般来说 ISSR 技术比 RAPD 技术更稳定、多态性更高^[13]。但 ISSR 技术也受反应条件和扩增程序变化以及物种的不同的影响,从而影响遗传分析的准确性。影响 ISSR-PCR 的重要因素包括 DNA 模板的浓度、 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、Taq 酶单位量和退火温度。试验发现,ISSR 反应对 DNA 模板浓度不太敏感,但 DNA 模板纯度对扩增的稳定性有较大影响,所以对提取 DNA 的方法进行优化。Taq DNA 聚合酶的使用量是影响 ISSR 扩增结果的重要因素,因为不同厂家生产的 Taq 酶性能上有差异,而且同一厂家不同批次的产品也存在一定的差异^[14-15],为了减少

(下转第 901 页)

增多309 条DNA 带,其中多态性带288 条,平均多态性比率为93.2%。该研究中,5 条ISSR 引物在25 个供试烟草种质中共扩增出100 个位点,其中多态性位点76 个,平均多态性比率76.0%。以上研究表明,ISSR 分子标记具有较好的稳定性和准确性,因而适于种质资源的遗传多样性分析。

在ISSR 分析过程中,PCR 反应与 Mg^{2+} 浓度、退火温度、模板浓度等有着相当程度的联系,所以优化实验条件以获得最佳扩增效果是很有必要的。在该实验中,参考前人的研究结果,在PCR 反应体系中加入2% 的去离子甲酰胺^[7],1% 的甘油或者0.5 mmol/L 的亚精胺^[8] 都能够一定程度上起到消除背景的作用;而在体系中加入2% ~4% 的DMSO (二甲基亚砷)^[9] 能提高PCR 反应的特异性。该研究结果表明,在制作聚丙烯酰胺凝胶的时候,加入0.8% ~2.0% 的甘油同样能消除背景,有利于扩增产物的辨别。

供试材料之间的遗传相似性系数及进化树(图1) 分析表明,3 个野生烟种质 *N. glauca*, *N. glutinosa* 以及 *N. plumbaginifolia* 具有很高的遗传多样性。野生烟 *N. plumbaginifolia*、*N. glutinosa*、*N. glauca* 与22 个栽培烟草的平均相似性系数分别为0.433、0.453、0.495。尽管 *N. glutinosa* 与普通烟草(*N. tabacum*) 都属于普通烟草亚属,而 *N. glauca* 属于碧冬烟草亚属,普通烟草与 *N. glauca* 的遗传相似性更高,这从另一方面证明碧冬烟草是普通烟草的祖先之一。我国所种植的烟草品种相当一部分是由美国优良烟草品种选育或杂交而成的,比如供试材料中“云烟87”的父本是美国品种“K326”,“辽烟14”的父本是美国品种“Coker-86”。该研究中,烤烟“红大”与美国烟草种质“K346”以及“云烟87”与“NC82”、“Coker 176”的遗传相似系数都大于0.870。何川生等^[10] 的研究也证实了国内所种植的大部分烟草都与美国的烟草有较近的亲缘关系。一些地理位置差异较大的烟草品种因为育种亲本之一相同或亲缘关系较近而在多样性分析中被聚为一类,许明辉

(上接第897 页)

试验误差,该试验中使用的是同一厂家同一批次的Tag 酶。对于退火温度来说,不同物种、不同引物、退火温度不同。为减少非特异性扩增,可在允许范围内适当提高引物的退火温度^[16]。 Mg^{2+} 浓度直接影响ISSR 扩增结果,不同材料、不同引物的 Mg^{2+} 浓度需要通过试验来确定。此外,由于dNTP 直接整合相应数量的 Mg^{2+} ,其浓度的任何改变都会影响有效 Mg^{2+} 的浓度^[17],根据鱼腥草ISSR-PCR 体系采用单因子试验,可以较为快速直观地得出该因子对试验结果的影响。需要指出的是,单因子试验不能体现各因子间的相互效应,所以在具体试验中可做进一步优化,以期达到最佳结果。

参考文献

- [1] 宋立人,洪恂,丁绪亮,等.现代中药学大辞典[M].北京:人民卫生出版社,2001:1293-2460.
- [2] 张萍.勿将委陵菜混作翻白草治疗糖尿病[J].中国中药杂志,2004,29(8):811-812.
- [3] ZETKIEWICZ E,RAFALSKI A,LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics,1994,20:17683.
- [4] TSUMURA Y,OHBA K,STRAUSS H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas fir (*Beuchstrug nartziesii*) and sug

等^[11] 在研究中也发现同样的现象。然而同一类型的材料在聚类分析中也不一定聚到一起,在该研究中,同属于白肋烟的“KY12”和“B22”没有聚到同一个亚类中,这可能与两者亲本的遗传差异有关。

除了3 个野生烟种质,其他22 个栽培烟草种质资源的亲缘关系相对较近,说明现有栽培烟草品种的遗传基础比较狭窄。究其原因,一方面可能是我国在烟草育种时亲本选择比较集中;另一方面,烟草是自花授粉作物,外来基因的引入很少,因而自然产生的变异很小。野生烟与栽培烟草之间的遗传相似性系数相对较低,说明不同烟草种间还是存在着十分可观的遗传分化。因此在今后的育种工作中,可以考虑引入这些野生烟的优良基因来拓宽栽培烟草的遗传基础,培育出优良的烟草品种用于农业生产。

参考文献

- [1] ZETKIEWICZ E,RAFALSKI A,LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics,1994,20:76-183.
- [2] 周延清.DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M].北京:化学工业出版社,2005:143-148.
- [3] 高翔,庞红喜,裴阿卫.分子标记技术在植物遗传多样性研究中的应用[J].河南农业大学学报,2002(12):356-359.
- [4] 邹喻苹,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,2001:5-16.
- [5] 杨本超,肖炳光,陈学军,等.基于ISSR 标记的烤烟种质遗传多样性研究[J].遗传,2005,27(5):753-758.
- [6] 王涛.烟草遗传多样性的RAPD 和ISSR 分析[D].福州:福建农林大学,2005:31-47.
- [7] 邱英雄,傅承新,孔航辉.杨梅不同品种的ISSR 分析[J].农业生物技术学报,2002,10(4):343-346.
- [8] 杨华,宋绪忠,尹光天,等.黄藤ISSR 反应体系的条件优化[J].福建林学院学报,2006(2):152-155.
- [9] JOSHI S P, GUPTA V S, AGGARWAL P K, et al. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Gynerium* [J]. Theor Appl Genet, 2000, 100: 1311-1320.
- [10] 何川生,何兴金,葛颂,等.烤烟品种资源的聚类分析[J].植物学报:英文版,2001,43(6):610-614.
- [11] 许明辉,郑民慧,刘广田.烟草品种RAPD 分子标记遗传差异研究[J].农业生物技术学报,1998,6(3):282-284.
- [12] (*Gynerium ajaciticum*) [J]. Theor Appl Genet, 1996, 92: 40-45.
- [13] COUCHUJ A,FRITZ P J. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics [J]. Hort Mil Bol Rep,1990(8):82.
- [14] 李宗菊,熊丽,桂敏,等.非洲菊基因组DNA 提取及ISSR PCR 扩增模板浓度优化[J].云南植物研究,2004,26(4):439-444.
- [15] 余艳,陈海山,葛学军.简单重复序列区间(ISSR) 引物反应条件优化和筛选[J].热带亚热带植物学报,2003,11(1):159.
- [16] 林万明.PCR 技术操作和应用指南[M].北京:人民军医出版社,1993:74.
- [17] 贺佳,丁小余,褚必海,等.泽泻ISSR 反应体系的建立与优化[J].南京师大学报:自然科学版,2006,29(3):86-91.
- [18] 周俊亚,宾晓云,彭云涛,等.罗汉果ISSR PCR 反应体系的建立[J].广西师范大学学报:自然科学版,2004,22(3):81-84.
- [19] 杨志玲,冯刚利,谭梓峰,等.红花石蒜ISSR PCR 反应体系的建立[J].林业科学研究,2006,19(4):509-512.
- [20] 卢盛栋.现代分子生物学实验技术[M].2 版.北京:中国协和医科大学出版社,1999:458-463.
- [21] 张青林,罗正荣.ISSR 及其在果树上的应用[J].果树学报,2004,21(1):54-58.
- [22] 席嘉宾,郑玉忠,扬中艺.地毯草ISSR 反应体系的建立和优化[J].中山大学学报:自然科学版,2004,43(2):80-84.
- [23] 张志红,谈风笑,何航航,等.红树植物海漆ISSR 条件的优化[J].中山大学学报:自然科学版,2004,43(2):63-67.
- [24] 蔡琰琳,金则新,李钧敏.大血藤ISSR PCR 反应体系的建立[J].江西农业大学学报,2006,28(4):582-586.
- [25] DEFFENBACH C W, DMEKSLER G S. PCR 技术实验指南[M].北京:科学出版社,1998.