

高山杜鹃 ISSR-PCR 反应体系建立

石绍高¹, 孙正海^{2*}, 李世峰³, 解玮佳³, 刘邦⁴, 王永路² (1. 云南省昭通市永善县务基林业站, 云南昭通 657302; 2. 西南林业大学园林学院, 云南昆明 650224; 3. 云南省农业科学院花卉研究所, 云南昆明 650205; 4. 普洱市景东县住房和城乡建设局, 云南普洱 676200)

摘要 [目的]建立高山杜鹃的 ISSR-PCR 反应体系。[方法]运用正交试验分析模板 DNA、*Taq* DNA 聚合酶、Primer、 Mg^{2+} 和 dNTPs 5 个因子对杜鹃 ISSR-PCR 反应影响, 建立高山杜鹃 ISSR-PCR 反应体系。[结果]杜鹃 ISSR-PCR 25 μ l 反应体系中 5 个因子较适水平为: DNA 模板浓度为 1.6 ng/ μ l, *Taq* DNA 聚合酶浓度为 0.040 U/ μ l, Primer 浓度为 0.64 mmol/L, dNTPs 浓度为 0.68 mmol/L, Mg^{2+} 浓度为 2.08 mmol/L。[结论]研究结果为利用 ISSR 分子标记技术研究杜鹃提供了理论支持。

关键词 高山杜鹃 [*Rhododendron lapponicum* (L.) Wahl.]; ISSR-PCR 反应; 体系建立
中图分类号 S685.21 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)27-10977-03

Establishment of ISSR-PCR Reaction System for *Rhododendron lapponicum*

SHI Shao-gao et al (Wuji Forestry Station of Yongshan County, Zhaotong, Yunnan 657302)

Abstract [Objective] To establish ISSR-PCR reaction system for *Rhododendron lapponicum*. [Method] Effects of five factors (DNA template, *Taq* DNA, Primer, Mg^{2+} and dNTPs) on ISSR-PCR reaction of *Rhododendron lapponicum* were analyzed by orthogonal design for establishing and optimizing ISSR-PCR reaction system. [Result] As a result, the optimal ISSR-PCR reaction system (25 μ l) mixture contained 40.00 ng DNA template, 1.0 U *Taq* DNA, 0.64 mmol/L primer, 2.08 mmol/L Mg^{2+} and 0.68 mmol/L dNTPs. [Conclusion] Theory sustaining for researching *Rhododendron* by ISSR molecular marker were afforded from this experiment.

Key words *Rhododendron lapponicum* (L.) Wahl.; ISSR-PCR reaction; System establishment

杜鹃是世界上最著名的花卉之一, 被列入中国十大名花, 誉为“花中西施”。杜鹃属 (*Rhododendron*) 植物种类繁多, 全世界约有 1 000 余种。中国西南是杜鹃的主要分布中心, 仅云、贵、川 3 省就占全国种类的 65% 以上。高山杜鹃 [*Rhododendron lapponicum* (L.) Wahl.] 因其花冠硕大、颜色丰富、花姿优美、株型漂亮而且四季常绿, 更是杜鹃家族中的“精品”, 具有极高的观赏价值和经济价值。目前, 高山杜鹃在耐旱^[1-5]、逆境胁迫^[6-10]、栽培技术^[11-12]、根际微生物^[13]、组培^[14]、种子萌发^[15]、分类^[16-17]、光合生理^[18]和观赏^[19]等方面研究较多, 在栽培和组培 2 方面研究进展显著, 但关于高山杜鹃的分子生物学研究鲜有报道。

ISSR (Inter-simple Sequence Repeat) 由 Zietkiewicz 等^[20]于 1994 年创建, 因其具有分布广、多态性高、DNA 用量少且质量要求低、无辐射、技术难度低、操作简单、重复性高、耗时少、成本低等优点, 广泛用于遗传和物理图谱建立、基因定位与克隆、数量性状位点遗传分析、遗传多样性评估、物种起源和分子标记辅助育种等^[21-22]。因不同植物对 ISSR-PCR 反应体系要求不同, 因此在利用 ISSR 标记之前, 必须建立该种植物最适 ISSR-PCR 反应体系。笔者以高山杜鹃为研究对象, 通过正交试验分析模板 DNA、*Taq* DNA 聚合酶、Primer、 Mg^{2+} 和 dNTPs 5 个因子对高山杜鹃 ISSR-PCR 反应影响, 并据此建立高山杜鹃最适 ISSR-PCR 反应体系, 以期利用 IS-

SR 标记对高山杜鹃进行后续研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 研究对象为杜鹃叶片, 由云南省农科院花卉所室提供。试验试剂均为分析纯, 购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

1.2 方法

1.2.1 试验材料预处理。取杜鹃幼嫩叶片, 用浓度 70% 酒精擦洗杜鹃叶片表面, 于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.2.2 杜鹃基因组 DNA 提取。采用改良 CTAB 法提取杜鹃基因组 DNA^[23]。

1.2.3 杜鹃 ISSR-PCR 反应引物筛选。从加拿大哥伦比亚大学公布的 60 个 ISSR 引物中随机选择 9 个引物 837、840、841、843、846、849、856、857 和 858 (具体序列见表 1) 进行目标引物筛选。初反应体系中 *Taq* 酶浓度 0.040 U/ μ l, Mg^{2+} 浓度为 2 mmol/L, DNA 浓度为 0.24 ng/ μ l, dNTP 浓度为 0.4 mmol/L, 引物浓度为 2 mmol/L, 共计 25 μ l, 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 52.5 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 共 40 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 采用 1% 琼脂糖凝胶电泳法进行扩增产物检测。

表 1 引物序列参数

编号	引物名称	序列
1	837	TATATATATATATART
2	840	GAGAGAGAGAGAGAYT
3	841	GAGAGAGAGAGAGAYC
4	843	CTCTCTCTCTCTCTRA
5	846	CAC ACA CAC ACA CAC ART
6	849	GTGTGTGTGTGTGTGYA
7	856	ACACACACACACACAYA
8	857	ACACACACACACACACYG
9	858	TGTGTGTGTGTGTGTGRG

基金项目 云南省应用基础研究项目(2010ZC089); 国家林业局西南地区生物多样性保育重点实验室开放基金(BC2010F04); 西南林业大学博士科研启动项目; 云南省园林植物与观赏园艺重点学科建设资助。

作者简介 石绍高(1962-), 男, 云南昭通人, 工程师, 从事林学与森林培育研究, E-mail: hqswfu@gmail.com. * 通讯作者。

收稿日期 2013-08-15

1.2.4 杜鹃 ISSR-PCR 反应体系建立。对杜鹃 ISSR 反应 5 因素 (*Taq* 酶浓度、 Mg^{2+} 浓度、DNA 浓度、dNTPs 浓度、目标引物浓度) 进行 4 浓度梯度试验, 共 16 个处理 $L_{16}(4^5)$, 每处理重复 3 次, 建立杜鹃 ISSR-PCR 反应体系。

表 2 杜鹃 ISSR-PCR 反应体系的 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计

序号	DNA ng/ μ l	引物浓度 μ mol/L	Mg^{2+} mmol/L	dNTPs mmol/L	<i>Taq</i> U/ μ l
1	1.6	0.48	1.76	0.40	0.016
2	1.6	0.64	2.08	0.68	0.040
3	1.6	0.80	2.40	0.96	0.064
4	1.6	0.96	2.72	1.24	0.088
5	2.4	0.64	2.72	0.96	0.016
6	2.4	0.48	2.40	1.24	0.040
7	2.4	0.96	2.08	0.40	0.064
8	2.4	0.80	1.76	0.68	0.088
9	3.2	0.80	2.08	1.24	0.016
10	3.2	0.96	1.76	0.96	0.040
11	3.2	0.48	2.72	0.68	0.064
12	3.2	0.64	2.40	0.40	0.088
13	4.0	0.96	2.40	0.68	0.016
14	4.0	0.80	2.72	0.40	0.040
15	4.0	0.64	1.76	1.24	0.064
16	4.0	0.48	2.08	0.96	0.088

2 结果与分析

2.1 杜鹃 DNA 浓度检测 图 1 表明, 处理 8 从清晰度和带型均优于其余 7 个处理, 初步判断符合 ISSR-PCR 反应要求, 可被选中进行后续研究。

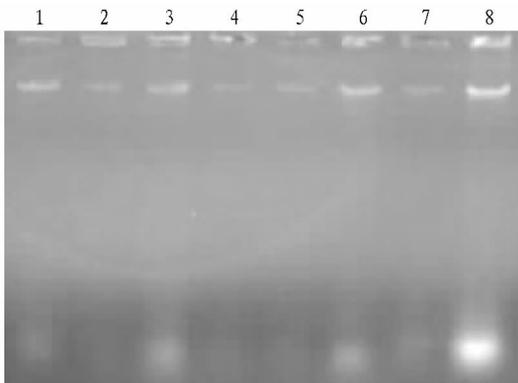


图 1 杜鹃 DNA 浓度检测结果

2.2 目标引物确定和正交试验设计 图 2 表明, 9 个 ISSR 引物只有引物 857 和 856 有明显扩增条带, 进一步比较条带多态性, 选定引物 857 为目标引物, 进行正交试验。

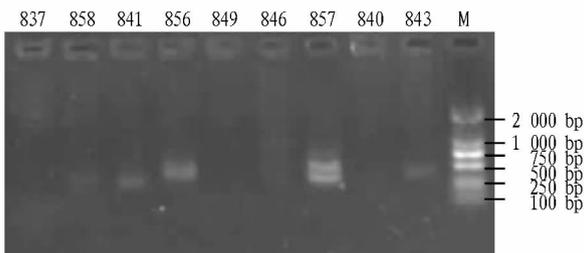


图 2 杜鹃 9 个引物 ISSR-PCR 反应结果

2.3 杜鹃 ISSR-PCR 正交试验综合分析 图 3 为 16 个处理 48 个组合高山杜鹃 ISSR-PCR 反应电泳结果。为便于对其进行准确分析, 以 Marker 为参照, 根据何正文等^[24]的正交

设计直观分析方法给为每个处理进行打分 (主要依据带的多少和亮度): 带数为 4 以上计 10 分, 带数为 3 计 8 分, 带数为 2 计 6 分, 带数为 1 计 4 分, 带数为 0 计 2 分; 亮度最亮计 10 分, 很亮计 8 分, 较亮计 6 分, 微亮计 4, 不亮计 2 分; 3 个重复组总和为最每个处理最后得分, 记录结果为表 3。

由表 3 可知, 第 2 处理得分最高为 60 分, 第 3 和第 4 处理次之, 为 48 分; 第 6、7、8、11 和 15 处理, 效果最差, 基本不见带型, 得分仅为 12 分, 第 9 处理较差, 带型少、亮度低仅为 20 分。

表 3 杜鹃 ISSR-PCR 反应 16 个处理评分

序号	带数	亮度	带数	亮度	带数	亮度	总和
1	6	6	4	4	4	4	28
2	10	10	10	10	10	10	60
3	8	8	8	8	8	8	48
4	8	8	8	8	8	8	48
5	8	8	8	8	8	8	48
6	2	2	2	2	2	2	12
7	2	2	2	2	2	2	12
8	2	2	2	2	2	2	12
9	4	4	2	2	4	4	20
10	4	4	4	4	4	4	24
11	2	2	2	2	2	2	12
12	6	6	6	6	6	6	36
13	6	6	6	6	6	6	36
14	6	6	6	6	6	6	36
15	2	2	2	2	2	2	12
16	2	2	2	2	2	4	14

2.4 杜鹃 ISSR-PCR 正交试验单因子分析

2.4.1 *Taq* 酶浓度影响。*Taq* 酶用量直接影响扩增反应成功与否, 使用高浓度 *Taq* 酶不仅成本高, 而且易产生非特异扩增产物, 但如 *Taq* 酶浓度过低, 则会导致产物合成效率下降。由表 4 可知, *Taq* 酶浓度在 0.016 ~ 0.112 U/ μ l 范围变化时, 扩增效果 (主要指扩增条带亮度和多态性, 下同) 呈先下降后升高的趋势, 但以浓度在 0.016 ~ 0.040 U/ μ l 范围为最好。因此杜鹃 ISSR-PCR 反应体系中 *Taq* 酶的浓度在 0.016 ~ 0.040 U/ μ l。

2.4.2 Mg^{2+} 浓度的影响。 Mg^{2+} 浓度对 PCR 扩增特异性和产物有明显影响。 Mg^{2+} 浓度过低, *Taq* 酶作用效率低, PCR 产物多样性不高; 浓度过高后, 容易产生非特异性弥散带。由表 4 可知, Mg^{2+} 浓度在 1.76 ~ 2.72 mmol/L 范围变化时, 反应结果趋于一直上升的趋势, 故选择 2.72 mmol/L 为杜鹃 ISSR 反应体系中 Mg^{2+} 的较适浓度。

2.4.3 dNTP 浓度影响。dNTP 作为 PCR 反应的原料, 浓度太低会使扩增不完全, 从而降低 PCR 产物产量; 浓度过高会对 Mg^{2+} 产生抑制作用, 降低 Mg^{2+} 的有效浓度, 影响 *Taq* 酶的活力, 造成浪费。由表 4 可知, 在试验设置的 4 个 (0.40 ~ 1.24 mmol/L) 浓度梯度范围内, 扩增效果呈现先升高后下降的趋势, 在浓度为 0.96 mmol/L 时, 扩增效果最好, 因此选择 0.96 mmol/L 为杜鹃 ISSR-PCR 较适浓度。

2.4.4 引物浓度的影响。由表 4 可知, 当引物浓度为 0.48 ~ 0.96 μ mol/L 时, 杜鹃 ISSR-PCR 扩增效果呈现无规律变化态势。在浓度为 0.64 μ mol/L 时, 扩增效果最好, 故选取 0.64

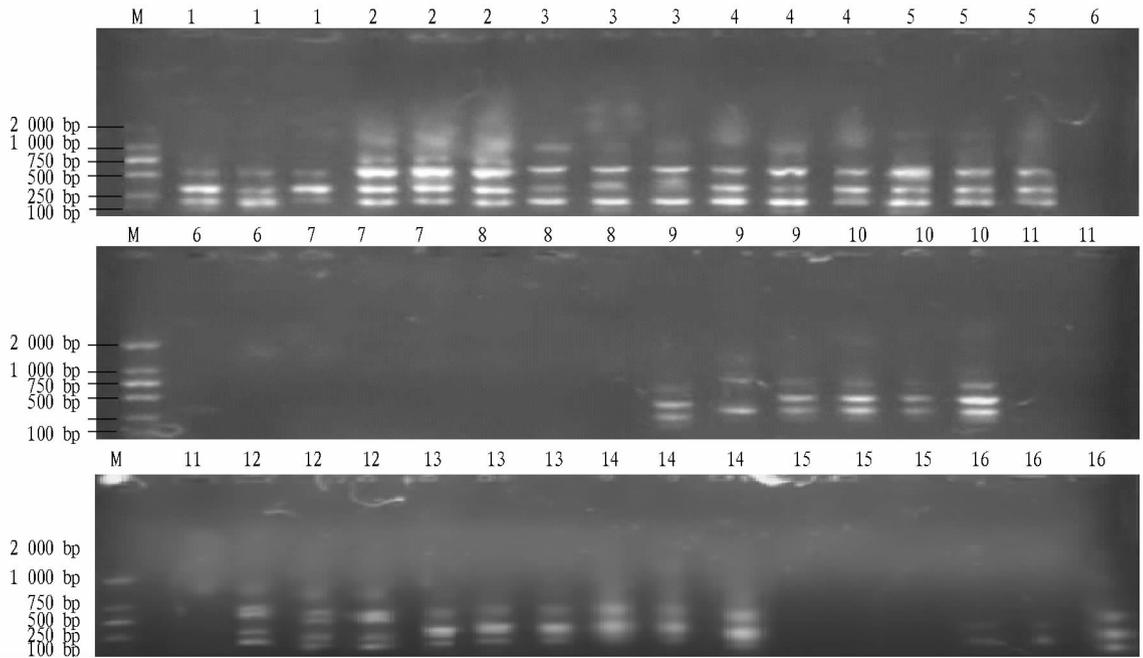


图3 杜鹃 ISSR-PCR 5 因素 4 浓度正交试验结果

$\mu\text{mol/L}$ 为杜鹃 ISSR 反应体系中引物的较适浓度。

2.4.5 模板 DNA 浓度的影响。由表 4 可知,当模板 DNA 浓度为 $1.6 \sim 4.0 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 范围变化时,扩增效果呈一直下降趋

势。在浓度为 $1.6 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 时效果最好,平均评分为 46.00 分,所以选取 $1.6 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 为杜鹃 ISSR 反应体系中模板 DNA 的最适浓度。

表 4 杜鹃 ISSR-PCR 正交试验 5 个因子评分

Mg^{2+} 浓度	平均	dNTPs 浓度	平均	引物浓度	平均	Taq 浓度	平均	DNA 浓度	平均
mmol/L	评分	mmol/L	评分	mmol/L	评分	U/ μl	评分	ng/ μl	评分
1.76	19.00	0.40	28.00	0.48	16.50	0.016	33.00	1.6	46.00
2.08	26.50	0.68	30.00	0.64	39.00	0.040	33.00	2.4	21.00
2.40	33.00	0.96	33.50	0.80	29.00	0.064	21.00	3.2	23.00
2.72	36.00	1.24	23.00	0.96	36.00	0.088	27.50	4.0	24.50

3 结论与讨论

试验结果显示,高山杜鹃 ISSR-PCR $25 \mu\text{l}$ 反应体系中 5 个因子的较适水平:引物浓度为 $0.64 \mu\text{mol/L}$,dNTPs 浓度为 0.68 mmol/L ,Taq 酶浓度为 $0.040 \text{ U}/\mu\text{l}$, Mg^{2+} 浓度为 2.08 mmol/L ,模板 DNA 浓度为 $1.6 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 。

ISSR-PCR 因其引物的非特异性,在研究基础相对薄弱的植物上应用较多,如灯盏花^[25]和三七^[26]等中药材以及茶树^[27]、铁线莲^[28]和枇杷^[29]等园林植物。正因为 ISSR 引物具有随机性,因此在利用 ISSR-PCR 反应时必须建立适宜的 ISSR-PCR 反应体系。ISSR-PCR 反应体系是一个多因子协同控制的综合反应,单独各因子对反应有影响,各因子之间也对反应结果也存在影响。基于此,试验采用正交试验设计法,即综合分析了多因子对试验结果的影响,又分析了单个因子对试验结果的影响,为进一步利用 ISSR 分子标记技术对高山杜鹃进行种质资源鉴定、遗传多样性分析及遗传图谱构建等研究奠定了基础。

参考文献

[1] 王松,蔡艳飞,李枝林,等.光照条件对高山杜鹃光合生理特性的影响[J].西北植物学报,2012,32(10):2095-21011.
 [2] 张长芹,罗吉凤,苏玉芬.六种杜鹃花的耐旱适应性研究[J].广西植物,2002,22(2):174-176.
 [3] 柯世省,杨敏文.水分胁迫对云锦杜鹃抗氧化系统和脂类过氧化的影

响[J].园艺学报,2007,34(5):1217-1222.
 [4] 柯世省.土壤干旱胁迫对云锦杜鹃水分利用效率的影响[J].河南师范大学学报:自然科学版,2007,35(2):150-153.
 [5] 柯世省.土壤干旱下云锦杜鹃光合作用的限制形式[J].云南农业大学学报,2008,23(3):387-391.
 [6] 黄承玲,陈训,高贵龙.3种高山杜鹃对持续干旱的生理响应及抗旱性评价[J].林业科学,2001,47(6):48-55.
 [7] 李倩,肖建志,李志斌,等.高山杜鹃花芽分化临界期生理生化研究[J].河北农业大学学报,2009,32(1):47-50.
 [8] 徐娟,曹玉峰,刘焕婷.不同水分胁迫对兴安杜鹃、迎红杜鹃生理指标的影响[J].中国新技术新产品,2010(7):228-229.
 [9] 柯世省,杨敏文.水分胁迫对云锦杜鹃光合特性日变化的影响[J].福建林业科技,2007,34(3):10-14.
 [10] 柯世省,杨敏文.水分胁迫对云锦杜鹃光合生理和光温响应的影响[J].园艺学报,2007,34(4):959-964.
 [11] 李志斌.高山杜鹃栽培技术研究[J].中国花卉园艺,2005(6):22-23.
 [12] 郁书君,李贞植,俞奉植.杜鹃无土栽培基质配方的研究[J].园艺学报,2004,31(2):210-214.
 [13] 边才苗,金则新.云锦杜鹃林根际微生物及其生化特性的研究[J].土壤学报,2004,41(6):949-953.
 [14] 李毅.高山杜鹃组织培养关键技术研究[D].兰州:甘肃农业大学,2006.
 [15] 边才苗,金则新,张俊会,等.云锦杜鹃种子萌发及对干旱胁迫的响应[J].植物研究,2006,26(6):718-721.
 [16] 高连明,张长芹,李德铤,等.杜鹃花属马银花亚属一些种类染色体数目报道[J].云南植物研究,2005,27(4):433-436.
 [17] 丁炳扬,方云亿.浙江杜鹃花属的研究[J].杭州大学学报,1989,16(2):194-200.

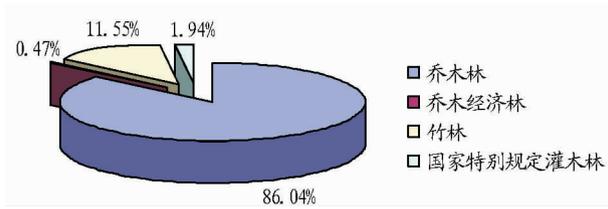


图1 不同类型林分碳储量构成

碳储量为 13 697.22 万 t (表 2), 其中针叶林碳储量为 8 591.93 万 t, 占乔木林碳储量的 62.73%; 阔叶林碳储量为 2 414.29 万 t, 占 17.63%; 针阔混交林碳储量为 2 691.00 万 t, 占 19.64%。之所以针叶林占乔木林碳储量的绝大部分, 是因为乔木林以针叶林占绝对优势, 面积占乔木林面积的 62.78%, 且针叶林中以马尾松最多, 占针叶林面积的 75.85%, 蓄积量占针叶林蓄积的 82.98%。

表2 乔木林各林分类型碳储量构成

林分类型	面积//hm ²	蓄积量//m ³	碳储量// × 10 ⁴ t	碳储量比例//%	折合成 CO ₂ // × 10 ⁴ t
针叶林	1 840 303.03	122 482 924	8 591.93	62.73	31 532.39
阔叶林	516 980.06	24 784 272	2 414.29	17.63	8 860.43
针阔混	510 695.51	34 708 228	2 691.00	19.64	9 875.96
合计	2 931 373.43	181 975 424	13 697.22	100.00	50 268.78

3 结论与讨论

研究结果表明:2012年,重庆市森林碳储量为 15 918.95 万 t,折合 CO₂ 约为 58 422.55 万 t,价值高达 3 505 353.09 万元。在不同的森林类型中,乔木林碳储量最大,占全部森林碳储量 86.04%,其余依次是竹林、国家特别规定灌木林和乔木经济林,分别占 11.55%、1.94% 和 0.47%。而在由针叶林、阔叶林、针阔混交林构成的乔木林中,针叶林、阔叶林和针阔混交林碳储量分别占乔木林碳储量的 62.3%、17.63%、19.64%。从前面的分析中可以看出之所以针叶林碳储量最高,是因为针叶林的面积最大,研究表明,针叶林的固碳能力要大于阔叶林。从龄组构成来看,在天然乔木林各龄组中,幼龄林和中龄林的面积、蓄积比重最大,二者之和面积占 88.25%,蓄积占 82.48%。幼龄林和中龄林林分正处于速生期,具有很大的碳汇潜力,因此要加强对中幼龄林的培育和经营,提高林分质量,促进林木生长;同时还要协调好市域范围内森林碳储量分布,增加阔叶林和针阔混交林的面积,从而全面提高重庆市森林碳汇能力。

研究只探讨了乔木林(包括针叶林、阔叶林、针阔混交林)、乔木经济林、竹林和国家规定特别灌木林等类型林分,而对于林下灌木层、草本层、枯落物层和土壤层碳储量的研究没有涉及,因此研究结果也相对较为保守。要全面准确地测算和掌握重庆市域森林生态系统碳储量,还要开展深入研

究,选取更为适当的测算方法。在此基础上,①还需针对不同时段开展对比研究,这样才能把握森林碳储量的动态变化,得出准确的森林生态系统年碳汇量;②要开展对不同的树种不同林龄的碳储量和碳汇能力研究,才能全面把握重庆市森林生态系统的碳储量和碳汇能力,为重庆市森林生态系统补偿以及碳排放交易市场上林业碳汇的参与提供技术支持,同时也有利于重庆市生态 GDP 核算研究的深入开展和生态文明建设。

参考文献

- 李怒云. 中国林业碳汇[M]. 北京:中国林业出版社,2007.
- 杨海军,邵全琴,陈卓奇,等. 森林碳蓄积量估算方法及其应用分析[J]. 地球信息科学,2007,9(4):5-12.
- 刘国华,傅伯杰,方精云. 中国森林碳动态及其对全球碳平衡的贡献[J]. 生态学报,2000,20(5):733-740.
- 吴亚. 重庆市林木种质资源[M]. 重庆:重庆出版社,2011.
- 何英. 森林固碳估算方法综述[J]. 世界林业研究,2005,18(1):22-27.
- 王效科,冯宗炜. 中国森林生态系统中植物固定大气碳的潜力[J]. 生态学杂志,2000,19(4):72-74.
- 赵林,殷鸣放,陈晓菲,等. 森林碳汇研究的计量方法及研究现状综述[J]. 西北林学院学报,2008,23(1):59-63.
- 叶金盛,余光辉. 广东省森林植被碳储量动态研究[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2010,34(4):7-12.
- 国家林业局应对气候变化和节能减排工作领导小组办公室. 中国绿色碳基金造林项目碳汇计量与监测指南[M]. 北京:中国林业出版社,2008.
- 黄从德,张健,杨万勤,等. 四川省及重庆地区森林植被碳储量动态[J]. 生态学报,2008,28(3):966-975.
- 杨生超,文国松,刘雪玲,等. 灯盏花种质资源遗传关系的 ISSR 分析[J]. 中草药,2010,41(9):1523-1527.
- 田斌,辛培尧,孙正海,等. 三七 ISSR-PCR 反应体系建立及优化[J]. 云南农业大学学报,2013,28(1):96-101.
- 宁静,黄建安,李娟,等. 茶树 ISSR-PCR 反应体系的正交优化[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2010,36(4):414-417.
- 孙正海,王锦,李世峰,等. 滑叶藤 ISSR-PCR 反应体系建立及优化[J]. 云南农业大学学报,2012,27(5):746-750.
- 王永清,付燕,杨芬,等. 枇杷属植物遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 林业科学,2010,46(4):49-57.
- ZHANG M, PAN D R, ZHOU Y F, et al. Analysis of the Flavonoids in the Leaves of *Rhododendron pulchrum* Sweet by HPLC-MS[J]. Medicinal Plant, 2012, 3(6):21-24.
- 陈春福,赖钟雄. 二乔杜鹃组培苗生根培养体系的优化研究[J]. 园艺与种苗,2012(12):36-39.

(上接第 10979 页)

- 柯世清,杨敏文. 水分胁迫对云锦杜鹃光合生理和光温响应的影响[J]. 园艺学报,2007,34(4):959-964.
- 李志斌,白雪霞,李萍. 高山杜鹃将成为我国高档园林绿化的新宠[J]. 中国绿化,2007(1):21-23.
- ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome finger printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20:176-183.
- 方宣钧,吴为人,唐纪良. 作物 DNA 标记辅助育种[M]. 北京:科学出版社,2001:15-16.
- 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,2005:143-150.
- 孙正海,萧凤回,曾亚文,等. 粳稻糙米钙含量 QTL 分析[J]. 西北植物学报,2010,30(3):481-486.
- 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.