

狭边大叶藓 (*Rhodobryum ontariense*) ISSR-PCR 反应体系的建立与优化

汪琛颖^{1,2}, 赵建成^{1*}

(1. 河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050016; 2. 郑州师范高等专科学校生命科学系, 郑州 450044)

摘要: 研究目的是获得适用于狭边大叶藓 (*Rhodobryum ontariense*) 遗传多样性研究的 ISSR-PCR 反应标准化程序。通过单因素试验设计, 对 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、模板、引物浓度, 以及退火温度、循环次数等影响 ISSR 扩增的主要因素进行了研究和优化。结果表明, UBC808、UBC811、UBC812、UBC825、UBC826、UBC841、UBC888 及 UBC891 引物适用于该研究; 20 μ L ISSR-PCR 最适反应体系包括: 6 ng DNA 模板、0.4 μ mol/L 引物、2.25 mmol/L Mg^{2+} 、0.6 U *Taq* DNA 聚合酶、0.4 mmol/L dNTPs。扩增程序为: 94℃ 预变性 4 min; 然后 94℃ 变性 1 min, 48 ~ 50℃ (根据不同引物确定) 复性 2 min, 72℃ 延伸 1 min, 共进行 40 个循环; 最后, 72℃ 延伸 7 min, 4℃ 保存。

关键词: 狭边大叶藓; ISSR; 反应体系; 优化; 遗传多样性

中图分类号: Q943.6

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2009)06-0679-05

Optimization of ISSR-PCR Reaction System in a Rare Medicinal Plant *Rhodobryum ontariense* (Bryaceae)

WANG Chen-Ying^{1,2}, ZHAO Jian-Cheng^{1*}

(1. College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China; 2. Department of Life Science, Zhengzhou Normal College, Zhengzhou 450044, China)

Abstract: To seek a standardizing program of ISSR technique for the genetic diversity analysis of a rare medicinal plant *Rhodobryum ontariense*, a single-factor experiment was designed to optimize ISSR-PCR amplification system. A suitable ISSR reaction system was obtained, that is: 20 μ L reaction system containing 6 ng DNA template, 0.4 μ mol/L primer, 2.25 mmol/L Mg^{2+} , 0.6 U *Taq* DNA polymerase, 0.4 mmol/L dNTPs. The profile of ISSR amplification was 4 min at 94℃, followed by 40 cycles of denaturation for 1 min at 94℃, annealing for 1 min at 48 ~ 50℃ (according to specific primer), and extension for 1 min at 72℃, and ending with a final extension for 7 min at 72℃, stored at 4℃.

Key words: *Rhodobryum ontariense*; ISSR; Reaction system; Optimization; Genetic diversity

狭边大叶藓 [*Rhodobryum ontariense* (Kindb.) Paris] 隶属于藓纲真藓科大叶藓属^[1], 具有治疗心血管系统疾病的功效^[2-4]。Downing 等^[5]及 Sabovljević^[6]于 1999 年和 2006 年分别将其列为稀有、濒危物种。目前, 关于狭边大叶藓的研究报道仅零星出现在一些地方志或苔藓植物名录中^[7-9], 对能够反映其濒危机制的居群遗传结构和遗传多样性的分析研究还未见报道。开展这方面的研究, 一方面可以揭示狭边大叶藓的遗传基础和居群之间的关系, 另一方面可为此类稀有药用植物的开发利用及

保护提供必要的生物学数据。

对于植物居群涉及居群内和居群间遗传变化的研究可以借助于遗传标记技术。其中简单重复序列区间扩增多态性 (inter-simple sequence repeat, 简称 ISSR) 标记技术^[10]自创立以来, 已成功应用于许多被子植物居群遗传结构的研究, 例如, 赵卫国等^[11]对中国桑属植物、罗晓莹等^[12]对杜鹃红山茶以及 Alam 等^[13]对濒危药用植物桃儿七居群的遗传结构的研究。然而, 国内有关藓类植物居群遗传多样性研究的报道却较少, 仅见于刘丽等^[14]对鼠尾藓、李

收稿日期: 2008-12-03, 修回日期: 2009-04-07。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30670152); 河北省自然科学基金 (C2008000158) 资助; “十一五”国家科技基础条件平台建设专项 (2005DKA21403) 部分支持。

作者简介: 汪琛颖 (1968 -), 女, 副教授, 博士研究生, 主要从事苔藓植物分子生态及分子系统发生研究; 赵建成, 教授, 博士生导师, 主要从事苔藓植物生物学研究。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: zhaojiancheng@mail.hebtu.edu.cn)。

朝阳等^[15]对梵净山尖叶拟船叶藓遗传多样性的研究,而且利用的均是随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, 简称 RAPD) 技术。ISSR 技术既具有 RAPD 技术的经济、快速,事先无需知道 DNA 序列信息等优点,同时比 RAPD 技术具有更高的可重复性和能够显示更多的多态位点的优势,是进行苔藓植物居群研究的一种更为经济、实用的方法^[16]。所以,作者拟选择利用此标记技术进行狭边大叶藓居群遗传多样性的研究。

ISSR 是基于 PCR 扩增的分子标记技术,任何影响 PCR 反应的因素,势必对 ISSR 扩增结果产生重要影响。因此,在进行 ISSR 实验之前,要求对反应条件进行优化和固定,以期建立起结果清晰且稳定、重复性好的 ISSR 反应体系。

1 材料与方法

1.1 材料

狭边大叶藓 (*Rhodobryum ontariense*) 样品分别采自河北小五台山国家级自然保护区,河北阜平县驼梁山,陕西秦岭佛坪自然保护区,河南嵩县白云山国家森林公园和四川天全县喇叭河森林公园(见表 1)。样品采集后装于纸制标本袋中,空气干燥后贮存于 -80℃ 冰箱中备用。凭证标本保存于河北师范大学生命科学学院标本馆(HBNU)。

1.2 方法

选取狭边大叶藓不同居群的单个植株,使用植物基因组 DNA 提取试剂盒(Tiagen)提取狭边大

叶藓总 DNA。提取 DNA 样品的质量和浓度采用 NanoDrop™ 1000 超微量紫外光/可见分光光度计(Thermo Scientific)检测。

1.2.1 ISSR-PCR 初始条件和扩增程序

参考正交设计实验优化的银叶真藓 (*Bryum argenteum*) ISSR-PCR 反应体系(未发表),设计狭边大叶藓 20 μL ISSR-PCR 初始反应体系:1 × Taq 酶配套缓冲液, DNA 模板 15 ng, 0.2 μmol/L 引物, 2.25 mmol/L Mg²⁺, 0.4 mmol/L dNTPs, 0.6 U Taq DNA 聚合酶。PCR 扩增在 Mastercycler Gradient 5331PCR 仪(Eppendorf)上进行,扩增程序为:94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 1 min, 50℃ 复性 2 min, 72℃ 延伸 1 min, 共进行 35 个循环;最后 72℃ 延伸 7 min, 4℃ 保存。

1.2.2 ISSR-PCR 扩增产物检测

扩增产物在含 Goldview (SBS Genetech) 核酸染料的 2% (W/V) 的琼脂糖凝胶电泳中分离,电压为 4.3 V/cm。电泳结束后在 GeneGenius Super12 全自动凝胶成像分析系统(Syngene)上观察并拍照记录。

1.2.3 扩增引物的筛选

参照 Hassel 等^[16]报道的 10 条 (UBC808、UBC811、UBC812、UBC818、UBC823、UBC825、UBC826、UBC841、UBC888、UBC891) 适用于苔藓植物银叶真藓 (*Bryum argenteum*) 的 ISSR 引物用于狭边大叶藓的检验,采用 1.2.1 中的 ISSR-PCR 扩增条件及程序,以筛选适合于狭边大叶藓遗传多样性研究的 ISSR 引物。

1.2.4 狭边大叶藓 ISSR-PCR 反应体系的优化

采用单因素试验法,考虑到影响 PCR 反应的各种因子(即: Mg²⁺、dNTPs、Taq DNA 聚合酶、模板及引物等),各设 4 个浓度梯度(见表 2)。每一个合适条件确立后,即作为后续实验的一个固定条件。

表 2 ISSR 扩增反应因素的浓度梯度设计
Table 2 Designed gradients of ISSR reaction factors

因素 Factors	浓度梯度 Gradient			
MgCl ₂ (mmol/L)	1.75	2	2.25	2.5
dNTPs (mmol/L)	0.3	0.4	0.5	0.6
引物 (μmol/L)	0.1	0.2	0.3	0.4
Taq DNA 聚合酶 (U/20 μL)	0.4	0.6	0.8	1

1.2.5 退火温度及循环次数确定

在确定最适反应体系的基础上,采用梯度 PCR 模式,设定退火温度为 (48 ± 10)℃,扩增仪自动生成 12 个温度梯度,分别为: 58.7、57.8、56.2、54、51.5、48.7、46、43.4、41.1、39.3、38.2、38℃。

表 1 狭边大叶藓各居群采集情况

Table 1 The collecting information of different *Rhodobryum ontariense* populations

居群 Population	采集地 Collecting location	生境 Habit	海拔(m) Altitude	凭证标本 Herbarium voucher
YC	河北蔚县小五台 Xiaowutai, Yu county, Hebei	岩面薄土 Soil over rock	1350	李利博(L. B. Li) 20080192 (HBNU)
FP1	陕西佛坪偏崖子 Pianyazi, Fuping county, Shaanxi	树基生 Tree base	1965	王幼芳(Y. F. Wang) 298 (HBNU)
FP2	陕西佛坪凉风垭 Liangfengya, Fuping county, Shaanxi	岩面薄土 Soil over rock	2250	王幼芳(Y. F. Wang) 803 (HBNU)
FP3	陕西佛坪三官庙 Sanguanmiao, Fuping county, Shaanxi	岩面薄土 Soil over rock	1500	王幼芳(Y. F. Wang) 1309B (HBNU)
SC	河南嵩县白云山 Mt. Baiyun, Song county, Henan	岩面薄土 Soil over rock	1430	赵建成(J. C. Zhao) 970136 (HBNU)
TQ	四川天全县喇叭河 Labuhe, Tianquan county, Sichuan	土生 Soil	900	曹娜(N. Cao) 20070944 (HBNU)
FPT	河北阜平县驼梁山 Mt. Tuoliang, Fuping county, Hebei	土生 Soil	1750	曹娜(N. Cao) 051334 (HBNU)

循环次数分别设为:25、30、35、40、45、50次,对退火温度及循环次数进行优化筛选。

2 结果与分析

2.1 引物的筛选

Hassel 等^[16]报道的 10 条引物经初步检验,均能扩增出条带(见图 1),但模糊不清。表明虽然银叶真藓和狭边大叶藓同属真藓科植物,但优化的银叶真藓的 ISSR-PCR 反应体系并不完全适用于狭边大叶藓。狭边大叶藓的 ISSR-PCR 反应体系有待于进一步优化。

2.2 PCR 体系单因素试验结果

根据作者先前对银叶真藓的 ISSR 引物的筛选结果,UBC808 能对银叶真藓扩增出 8 条带(未发表)。因为在图 1 中,此引物对狭边大叶藓的扩增效果最差,所以特别选用 UBC808 为引物对影响 ISSR 扩增的 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、模板及引物的浓度及用量进行单因素试验。结果表明:各因素对 ISSR-PCR 反应体系均有较大影响(图 2)。

2.2.1 Mg^{2+} 浓度对 ISSR 扩增的影响

Mg^{2+} 浓度不仅会影响 *Taq* DNA 聚合酶的活性,而且能与反应体系中的 DNA 模板、dNTPs 及引物结合,影响引物与模板的结合效率、模板与 PCR 产物的解链温度及产物的特异性等^[17]。本研究结果显示, Mg^{2+} 浓度为 2.25 mmol/L 时产生的条带及其背景都较其它浓度的清晰。 Mg^{2+} 浓度再增大到 2.5 mmol/L 时也能扩增出条带但长片段条带缺失或背景不清晰。 Mg^{2+} 浓度减低时,扩增片段的数量较少。兼顾 PCR 反应的特异性和扩增片段的产率,确定 2.25 mmol/L 的 Mg^{2+} 为最适浓度。

2.2.2 dNTPs 浓度对 ISSR 扩增的影响

从图 2(13~16)可看出,在不同 dNTPs 浓度下均

可扩增出条带,但条带的多态性存在差异。dNTP 是 ISSR-PCR 反应的底物,dNTP 浓度过高时,会与 Mg^{2+} 螯合,抑制扩增反应或导致核苷酸错误掺入,从而出现非特异性扩增;浓度过低会影响扩增效果,扩增条带产量减少,条带模糊不清^[17]。考虑到扩增的特异性及可重复性,确定最适 dNTPs 浓度为 0.4 mmol/L。

2.2.3 引物浓度对 ISSR 扩增的影响

从图 2(9~12)可看出,不同引物浓度对扩增结果的影响。0.3 mmol/L 的引物浓度不能满足扩增体系对引物数量的要求,影响扩增的效率,扩增的条带不仅数目少且弱,模糊不清。但当引物浓度达到 0.6 mmol/L,条带的清晰度下降,背景不清。引物浓度为 0.4 mmol/L 时,主带清晰,杂带较少,故选其为最适引物浓度。

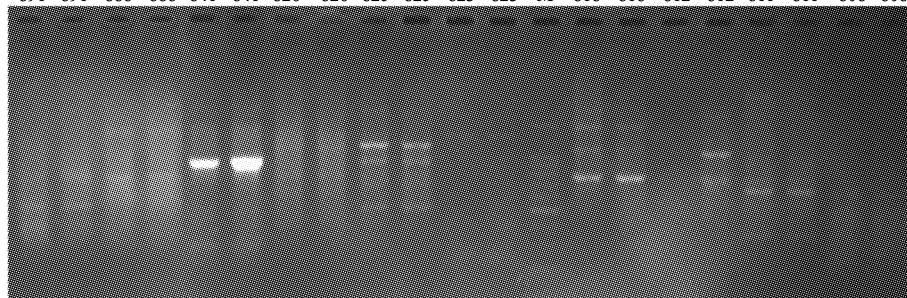
2.2.4 DNA 模板浓度对 ISSR 扩增的影响

DNA 模板用量在本研究中对 ISSR 扩增的影响最为明显。从图 2(1~4)可看出,随模板浓度的增加,扩增条带数减少,且条带弱。原因可能是模板量过高引起 ISSR-PCR 反应体系中的底物,如 dNTPs 或引物过早被消耗殆尽,最终影响到 PCR 的产物量及扩增的效率^[17]。所以,有效进行狭边大叶藓 ISSR-PCR 反应,在 20 μ L 体系中只加入 6 ng 模板 DNA。这体现了 ISSR 标记技术只需少量 DNA 模板即可进行的优点,为珍稀物种的研究提供了可能性。

2.2.5 *Taq* DNA 聚合酶用量对 ISSR 扩增的影响

Taq DNA 聚合酶用量会直接影响 ISSR-PCR 扩增的成败。使用量过大,一是增加实验的成本,再者易产生非特异性扩增。使用量过少,会导致扩增产物的合成效率降低^[17]。本研究设置的 4 个 *Taq* DNA 聚合酶用量中(图 2:5~8),0.6 U/20 μ L 产生的扩增条带较多且清晰,能够满足通过 ISSR 标记进行狭边大叶藓遗传多样性研究的需要。

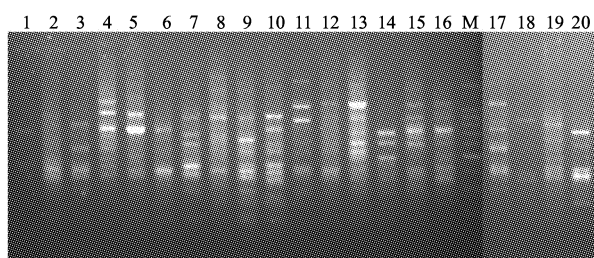
891 891 888 888 841 841 826 826 825 825 823 823 M 818 818 812 812 811 811 808 808



M:100 bp 标准分子量参照物;808、811、812、818、823、825、826、841、888、891 为不同的 UBC 引物
M:100 bp DNA ladder; 808,811,812,818,823,825,826,841,888,891 indicate the number of UBC primer

图 1 不同 ISSR 引物的扩增

Fig. 1 Amplification results of using different primers



1~4: DNA 模板浓度分别为 15、12、9、6 ng/20 μ L; 5~8: *Taq* DNA 聚合酶用量分别为 1、0.8、0.6、0.4 U; 9~12: 引物浓度分别为 0.6、0.5、0.4、0.3 μ mol/L; 13~16: dNTPs 浓度分别为 0.6、0.5、0.4、0.3 mmol/L; 17~20: Mg^{2+} 浓度分别为 2.25、2.5、2、1.75 mmol/L; M: 100 bp 标准分子量参照物

Lane 1~4: The concentration of DNA template, 15, 12, 9, 6 ng/20 μ L, respectively; 5~8: *Taq* DNA polymerase unit, 1, 0.8, 0.6, 0.4 U, respectively; 9~12: The concentration of primer, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3 μ mol/L, respectively; 13~16: The concentration of dNTPs 0.6, 0.5, 0.4, 0.3 mmol/L, respectively; 17~20: The concentration of Mg^{2+} , 2.25, 2.5, 2, 1.75 mmol/L, respectively; M: 100 bp DNA ladder

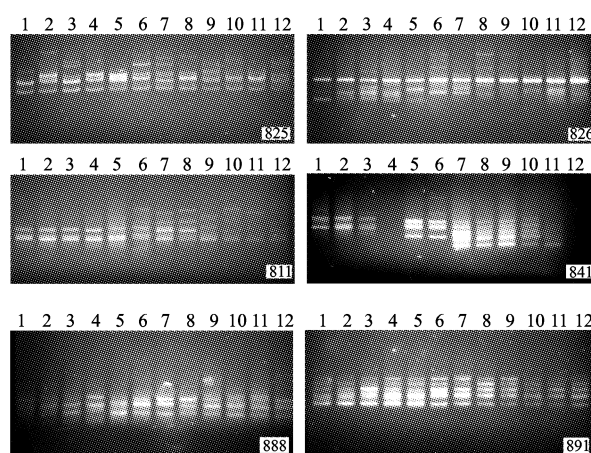
图2 dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、模板、引物、 Mg^{2+} 的浓度及用量对 ISSR-PCR 扩增的影响
Fig. 2 Influence of the concentration of dNTPs, *Taq* DNA polymerase, DNA template, primer and Mg^{2+} on ISSR-PCR amplification

2.2.6 不同引物的最适退火温度的筛选

不同的引物因其长度和 GC 含量的差异,所以解链温度(T_m)亦不同。例如 UBC808 和 UBC888 引物的长度、GC% 及 T_m 分别为: 17 bp、52.94%、54.59 $^{\circ}$ C; 23 bp、51%、53.80 $^{\circ}$ C。PCR 反应引物退火温度一般设定在其 T_m 值 $\pm 3^{\circ}$ C 范围。本研究在 38~58 $^{\circ}$ C 范围内,设置 10 个温度梯度,以便确定更为精确的退火温度,进一步获得分辨率高、重复性好的 ISSR-PCR 扩增谱带。以 UBC811 引物为例(图 3),温度较低时(38~43.4 $^{\circ}$ C)出现非特异性扩增的条带,且产物中 DNA 条带弱。随温度升高,引物与模板之间的亲和力变小,非特异扩增减少,条带清晰,温度高于 51.5 $^{\circ}$ C 后,条带亮度增加,但主带缺失。46~51.5 $^{\circ}$ C 范围内扩增的条带之间界限分明,背景清晰,带型稳定,考虑到较高的退火温度可以减少引物与模板之间的非特异性结合,提高反应的特异性,所以确定引物 UBC811 最适退火温度为 50 $^{\circ}$ C。同理,UBC808、UBC812、UBC825、UBC826、UBC841、UBC888、UBC891 的最适退火温度分别确定为 50、50、48、48、50、48、48 $^{\circ}$ C。

2.2.7 最适循环次数的确定

总循环次数设为 25 或 30 次处理的 PCR 扩增结果出现的条带非常弱且条带数目少(图 4)。35 次之后的循环处理扩增带型一致,但 40 次循环产生的条带清晰。循环次数若再增加,一是耗时,再者出现产物量过多而引起的条带间模糊,影响结果观察。



1~12 对应的温度分别为: 58.7、57.8、56.2、54、51.5、48.7、46、43.4、41.1、39.3、38.2、38 $^{\circ}$ C, 图右下角数字示不同的 UBC 引物

1~12 Corresponding to 58.7, 57.8, 56.2, 54, 51.5, 48.7, 46, 43.4, 41.1, 39.3, 38.2, 38 $^{\circ}$ C; The figure (825, 826, 811, 841, 888, 891) in the bottom right hand corner indicates the number of UBC primer

图3 退火温度的比较
Fig. 3 Comparison of results under different annealing temperatures

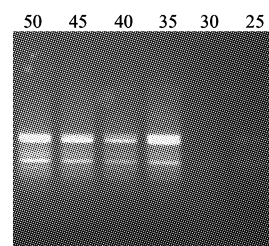


图4 不同循环次数的比较
Fig. 4 Comparison of results under different cycling numbers

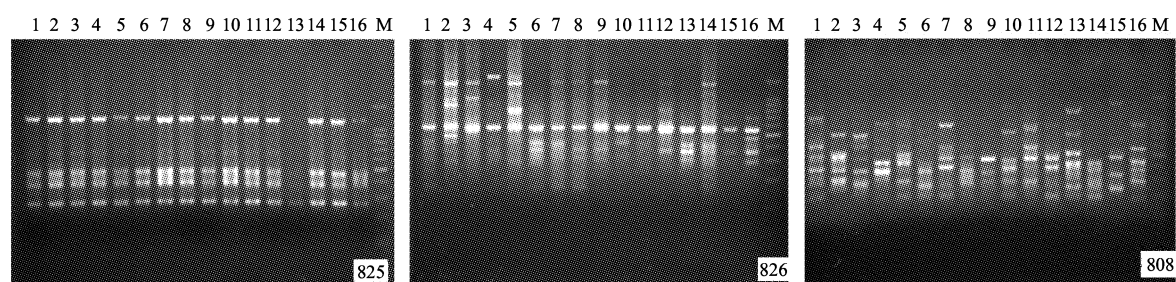
确定最适循环次数为 40 次。

2.3 优化体系的检验

为了检验试验结果,采用优化的扩增条件,对取自不同狭边大叶藓居群的 16 份样本进行扩增,不同引物(UBC808、UBC825、UBC826)的扩增结果显示出的 ISSR 扩增谱带清晰且可重复性强(见图 5)。

3 结语

我们利用单因素试验方法,对影响 ISSR-PCR 扩增的主要因素,如: Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、模板、引物浓度以及退火温度、循环次数等进行了研究,建立并优化了狭边大叶藓的 ISSR-PCR 反应体系:在 20 μ L PCR 体系中包含: 6 ng DNA 模板, 0.4 μ mol/L 引物, 2.25 mmol/L Mg^{2+} , 0.6 U *Taq* DNA 聚合酶, 0.4 mmol/L dNTPs。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 48~50 $^{\circ}$ C (视不同引物确定, 即 UBC808、UBC811、UBC812、



1~16: 示来源不同的狭边大叶藓样品。1,2 样品来自佛坪偏崖子(FP1)居群; 3,4,5 来自阜平县骆驼梁(FPT)居群; 6,7 来自佛坪凉风垭(FP2)居群; 8,9 来自佛坪三官庙(FP3)居群; 10,11 来自嵩县白云山居群(SC); 12,13 来自蔚县(YC)居群; 14,15,16 来自天全县(TQ)居群。M:100 bp 标准分子量参照物

1,2 samples from Pianyazi Fuping Population (FP1); 3,4,5 samples from Tuoliang Fuping Population (FPT); 6,7 from Liangfengya (FP2); 8,9 from Sanguanmiao (FP3); 10,11 samples from Song county Population (SC); 12,13 samples from Yu county Population (YC); 14,15,16 sample from Tianquan Population (TQ). M:100 bp DNA ladder

图5 16份狭边大叶藓样本的ISSR-PCR扩增结果

Fig. 5 Inter-simple sequence repeats (ISSR) PCR fingerprints of 16 different samples of *Rhodobryum ontariense* using primer 808, 825, 826, respectively

UBC825、UBC826、UBC841、UBC888 和 UBC891 的最适退火温度分别为 50、50、50、48、48、50、48、48℃) 复性 2 min, 72℃延伸 1 min, 共进行 40 个循环; 最后 72℃延伸 7 min, 4℃保存。经过检验, 该实验程序所得到的 ISSR 条带清晰, 可重复性好。本研究的结果为下一步开展狭边大叶藓居群遗传多样性研究打下坚实基础。

参考文献:

- [1] 黎兴江. 中国苔藓志: 第4卷[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 110-111.
- [2] Touw A. The identity of *Bryum spatulatum* (Hornsch) Pöcs[J]. *Lindbergia*, 1984, 9: 151-152.
- [3] 熊源新. 贵州大叶藓属 *Rhodobryum* 植物的分类[J]. 山地农业生物学报, 1999, 18(5): 316-321.
- [4] 乔菲, 马双成, 林瑞超. 大叶藓属植物化学及药理研究综述[J]. 中国药品标准, 2003, 4(6): 3-5.
- [5] Downing D J, Randall J B, Dale H V. Rare and disjunct plants from Whitemud Falls Ecological Reserve, Northeastern Alberta[J]. *Can Field Nat*, 1991, 105(3): 376-381.
- [6] Sabovljević M. Checklist of mosses of Croatia[J]. *Arch Biol Sci, Belgrade*, 2006, 58(1): 45-53.
- [7] Kharzinov Z, Portenier N, Ignatova E, Shhagapsoev S, Ignatov M. Rare species and preliminary list of mosses of the *Kabardino-Balkaria* (Caucasus) [J]. *Arctoa*, 2004, 13: 33-40.
- [8] Kürschner H, Erdağ A. Bryophytes of Turkey: An annotated reference list of the species with synonyms from the recent literature and an annotated list of Turkish Bryological literature [J]. *Turk J Bot*, 2005, 29: 95-154.
- [9] Hill M O, Bell N, Bruggeman Nannenga M A, Brugués M, Cano M J, Enroth J, Flatberg K I, Frahm J P, Gallego M T, Garilleti R, Guerra J, Hedenäs L, Holyoak D T, Hyvönen J, Ignatov M S, Lara F, Mazimpaka V, Muñoz J, Söderström L. An annotated checklist of the mosses of Europe and Macaronesia[J]. *J Bryol*, 2006, 28: 198-267.
- [10] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.
- [11] 赵卫国, 苗雪霞, 藏波, 张林, 潘一乐, 黄勇平. 中国桑属选育品种 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.
- [12] 罗晓莹, 庄雪影, 杨跃生. 杜鹃红山茶遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2007, 15(2): 93-100.
- [13] Alam A, Naik P K, Gulati P, Gulati A K, Mishra G P. Characterization of genetic structure of *Podophyllum hexandrum* populations, an endangered medicinal herb of Northwestern Himalaya, using ISSR-PCR markers and its relatedness with podophyllotoxin content[J]. *African J Biotech*, 2008, 7(8): 1028-1040.
- [14] 刘丽, 朱永青, 王幼芳. 鼠尾藓不同居群间形态及 RAPD 分析[J]. 云南植物研究, 2006, 28(6): 570-574.
- [15] 李朝阳, 李菁, 田向荣, 姜业芳, 陈军. 梵净山尖叶拟船叶藓遗传多样性分析[J]. 云南植物研究, 2008, 30(2): 168-170.
- [16] Hassel K, Gunnarsson U. The use of inter simple sequence repeats (ISSR) in bryophyte population studies[J]. *Lindbergia*, 2003, 28: 152-157.
- [17] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W 著. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 北京: 科学出版社, 2002: 598-618.