

棉花黄萎病菌遗传多样性的 ISSR 分析

宋培玲^{1,2}, 李子钦¹, 杨家荣²

(1 内蒙古农牧业科学院 植物保护研究所, 内蒙古 呼和浩特 010031;

2 西北农林科技大学 植物保护学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】利用 ISSR 分子标记技术, 对不同地理来源的棉花黄萎病菌株进行分子指纹分析, 以了解其遗传关系。【方法】选用 25 条引物, 对来自于我国 11 个省(市、自治区)的 28 个棉花黄萎病菌株进行分子指纹分析, 研究各菌株间的遗传相似性。【结果】从 25 条 ISSR 随机引物中筛选出 9 条多态性好、条带稳定的引物, 用其对 28 个棉花黄萎病菌株进行扩增, 共获得 1 989 条谱带, 其中 1 908 条为多态性条带, 多态性比率为 95.9%, 表明 ISSR 标记对棉花黄萎病菌具有较高的多态性; 通过对棉花黄萎病菌 ISSR 遗传相似系数的统计与分析, 得到其相关系数 $r=0.88$, 该 r 值介于 0.8 和 0.9 之间, 表明进化树符合较好, 故将 ISSR 标记应用于棉花黄萎病菌的遗传多样性分析, 具有较高的一致性和可信度。ISSR 多态性与棉花黄萎病菌的落叶型有一定的相关性, 而与菌落形态类型、地理来源未表现出相关性。【结论】供试的不同地理来源的棉花黄萎病菌株遗传相似性较高, 基因多样性较低, 且 ISSR 多态性与地理来源未表现出相关性。

【关键词】 棉花; 棉花黄萎病菌; 遗传多样性; ISSR(Inter simple sequence repeat)

【中图分类号】 S435.621.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)01-0113-06

Genetic diversity of *Verticillium dahliae* of cotton with ISSR markers

SONG Pei-ling^{1,2}, LI Zi-qin¹, YANG Jia-rong²

(1 Plant Protection Institute, Inner Mongolia Academy of Agricultural&Animal Husbandry Sciences, Hohhot,

Inner Mongolia 010031, China; 2 College of Plant Protection, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture,

Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】ISSR markers were used to study the strains of *Verticillium dahliae* of cotton collected from different areas to understand their genetic relationship. 【Method】Twenty five primes were chosen to determine 28 strains of *V. dahliae* of cotton collected from 11 different provincial areas in China to study their genetic similarity. 【Result】Nine primers having informative and consistent amplification in the analysis of 25 primers were selected to amplify DNA of 28 strains of *V. dahliae*. There were 1 989 fragments obtained by amplification of ISSR with those 9 primers. Among them, 1 908 were polymorphic. It indicated that ISSR molecular analysis had comparatively high polymorphism in *V. dahliae* of cotton and the polymorphic rate reached 95.9%. A correlation coefficient ($r=0.88$) was obtained by calculation of ISSR markers of *V. dahliae* of cotton and r value between 0.8—0.9 showed that the phylogenetic tree coincided well, so ISSR molecular marker technique had the high consistency and confidence to detect the genetic diversity of *V. dahliae* of cotton. By using cluster analysis, it was found that ISSR polymorphism was related to defoliating type of *V. dahliae* of cotton, but there was no relation to colony morphology and geographical

* 【收稿日期】 2010-05-19

【基金项目】 国家公益性农业科研专项(3-19); 高等学校学科创新引智计划项目(B07049)

【作者简介】 宋培玲(1981—), 女, 内蒙古乌兰察布人, 助理研究员, 硕士, 主要从事植物病理学研究。

E-mail: songpeiling2006@163.com

【通信作者】 杨家荣(1956—), 男, 四川蓬溪人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物病害综合防治研究。

E-mail: yjrong@nwsuaf.edu.cn

distribution.【Conclusion】 There were higher and lower genetic diversity between the strains of *V. dahliae* of cotton collected from different areas,and ISSR polymorphism was not related to geographical distribution.

Key words:cotton;*Verticillium dahliae* Kleb;genetic diversity;ISSR(Inter simple sequence repeat)

棉花黄萎病(*Verticillium dahliae* Kleb)是一种土传植物维管束萎蔫病害,自 20 世纪 30 年代传入我国以来,现已对我国广大棉区造成了严重危害,并成为限制我国棉花生产可持续发展的重要制约因素之一^[1]。因此,研究棉花黄萎病菌的基因多样性,对指导棉花抗病育种具有十分重要的实际意义。ISSR(Inter simple sequence repeat)技术是由 Zietkiewicz 等^[2]根据 SSR 的特点,于 1994 年创立的一种快速、可靠、可以提供基因组丰富信息的 DNA 指纹技术,目前已在植物品种鉴定、遗传作图、基因定位、遗传多样性及分子生态型等的研究中得到了广泛应用^[3-14]。

黄萎病菌的分子生物学研究报道始见于 20 世纪 90 年代初,前人主要采用的是 RFLP 及 RAPD 等技术,而将 ISSR 标记应用于黄萎病菌研究的报

道较少。本研究采用 ISSR 分子标记技术,探究了不同地理来源棉花黄萎病菌菌株的遗传亲缘关系,构建了其遗传亲缘关系树状图,揭示了 ISSR 基因型与病原菌表现型(如落叶型、地理来源、菌落形态)之间的相关性,以期了解我国不同地区棉花黄萎病菌不同地理居群的遗传变异和基因流动情况,进而为病原菌的分布、病害预报及种子检疫提供可靠的信息,并为棉花抗病品种的合理布局及病害防治措施的制定提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

本研究所用的 28 个棉花黄萎病菌株分别来自于我国 11 个省(市、自治区)的不同地区,各菌株来源情况详见表 1。

表 1 不同地区棉花黄萎病菌株的症状类型及菌落形态

Table 1 Pathotype and colony morphology of 28 strains of *V. dahliae* in different areas

菌株编号 Code of strain	采集地点 Place of sampling	症状类型 Pathotype	菌落形态 Colony morphology	菌株编号 Code of strain	采集地点 Place of sampling	症状类型 Pathotype	菌落形态 Colony morphology
JD	陕西泾阳斗口 Doukou, Jingyang, Shaanxi	落叶 Defoliation	AVH	SC	四川射洪 Shehong, Sichuan	非落叶 Non-defoliation	AVM
SQ	陕西乾县 Qianxian, Shaanxi	落叶 Defoliation	AVH	SC2	四川射洪 Shehong, Sichuan	非落叶 Non-defoliation	AVS
SM	陕西眉县 Meixian, Shaanxi	非落叶 Non-defoliation	AVH	SC3	四川简阳 Jianyang, Sichuan	非落叶 Non-defoliation	AVH
SX	陕西兴平 Xingping, Shaanxi	落叶 Defoliation	AVM	SC4	四川 Sichuan	非落叶 Non-defoliation	AVS
JJ	陕西泾阳泾燕 Jingyan, Jingyang, Shaanxi	非落叶 Non-defoliation	AVH	BJ	北京 Beijing	非落叶 Non-defoliation	AVS
PY	陕西蒲城永丰 Yongfeng, Pucheng, Shaanxi	非落叶 Non-defoliation	AVH	HuB	湖北 Hubei	非落叶 Non-defoliation	AVH
SS	陕西三原 Sanyuan, Shaanxi	非落叶 Non-defoliation	AVH	YN	云南大理 Dali, Yunnan	非落叶 Non-defoliation	AVH
SL	山西临汾 Linfen, Shanxi	非落叶 Non-defoliation	AVS	AH	安徽 Anhui	非落叶 Non-defoliation	AVM
SL1	山西临汾 Linfen, Shanxi	非落叶 Non-defoliation	AVM	AH1	安徽 Anhui	非落叶 Non-defoliation	AVH
JS	江苏 Jiangsu	非落叶 Non-defoliation	AVH	AH2	安徽 Anhui	非落叶 Non-defoliation	AVS
JS1	江苏 Jiangsu	非落叶 Non-defoliation	AVM	HN	河南安阳 Anyang, Henan	非落叶 Non-defoliation	AVM
HB	河北 Hebei	非落叶 Non-defoliation	AVH	HN2	河南安阳 Anyang, Henan	落叶 Defoliation	AVS
HB1	河北邯郸 Handan, Hebei	非落叶 Non-defoliation	AVH	HN3	河南安阳 Anyang, Henan	非落叶 Non-defoliation	AVS
SD	山东 Shandong	落叶 Defoliation	AVH	XJ	新疆 Xinjiang	落叶 Defoliation	AVS

注:AVH. 菌核型;AVS. 菌丝型;AVM. 中间型。
Note:AVH. Sclerotia type;AVS. Mycelium type;AVM. Intermediate type.

1.2 棉花黄萎病菌基因组 DNA 的提取

分别采用 Saghai 等^[15]和易润华等^[16]的 CTAB 法及胡小平^[17]的改进 SDS 法提取棉花黄萎病菌 DNA。

1.3 棉花黄萎病菌基因组 DNA 的 ISSR-PCR 扩增

本试验选用 25 条 ISSR 引物,对 28 个棉花黄萎

病菌株进行 ISSR 分子指纹分析。

1.3.1 引物的设计与合成 参考李海莲^[18]和姜占发^[19]的学位论文,设计了 25 个 ISSR 引物(表 2)。所设计引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

表 2 25 个 ISSR 引物及其序列
Table 2 Sequence of 25 ISSR primes

引物编号 Code of primer	序列(5'-3') Sequence	引物编号 Code of prime	序列(5'-3') Sequence
4	ACACACACACACACAG	67	TCTCTCTCTCTCTCTCC
5	ACACACACACACACTG	812	GAGAGAGAGAGAGAGAA
9	CTCCTCCTCCTCCTCTC	815	CTCTCTCTCTCTCTCTG
10	GAAGAAGAAGAAGAAGAA	818	CACACACACACACACAG
24	ACACACACACACACTC	825	ACACACACACACACACT
25	ACACACACACACACCA	836	AGAGAGAGAGAGAGAGCA
26	ACACACACACACACCC	848	CACACACACACACACAAG
32	AGAGAGAGAGAGAGAGAC	864	ATGATGATGATGATGATG
40	ACCACCACCACCACCACC	866	GGTGGGGTGGGGTGT
45	ACACACACACACACGC	886	CTCCTCTCTCTCTCTCT
47	ACACACACACACACGT	885	GAGGAGAGAGAGAGAGA
50	TGTGTGTGTGTGTGTGAG	888	CACCACACACACACACA
60	AGAGAGAGAGAGAGAGGG		

1.3.2 ISSR-PCR 扩增 采用 PE9700 型 PCR 仪进行扩增,在冰上建立棉花黄萎病菌的 ISSR-PCR 反应体系。25 μL 的反应体系中,有 10×PCR Buffer 2.5 μL,200 μmol/L dNTP,0.75 μmol/L 引物,150 mmol/L Mg²⁺,1 U *Taq* DNA 聚合酶和 40 ng 模板 DNA;最后以矿物油覆盖。反应程序为:94 ℃预变性 3 min,各引物在最佳退火温度下退火 45 s,72 ℃延伸 1.5 min;94 ℃变性 30 s,退火 45 s,72 ℃延伸 1.5 min,循环 34 次;72 ℃延伸 10 min,4 ℃保存。

1.4 ISSR-PCR 扩增产物的电泳检测

反应结束后,将 PCR 产物在 15 g/L 琼脂糖凝胶中电泳 1 h,在含有 0.5 μg/mL EB 的染色液中染色后,用 Dolphin-DocWealTec 型凝胶图像分析仪检测、照相,并记录结果。

1.5 数据处理与统计分析

各引物的 PCR 反应分别重复进行 3~4 次,将可重复的电泳条带全部列入统计范围,对少数不能重复者于统计时忽略不计。在 ISSR 谱带中,对于同一引物的扩增产物,将每个多态性条带作为一个遗传位点进行统计,按扩增条带的有无计数,有条带存在的记为 1,缺失则记为 0,从而将图形资料转换成数据资料并输入 EXCEL5.0/95 工作表中建立特征数据矩阵,用于进一步分析。采用 NTSYS PC

(Version 2.10e)软件计算菌株间的遗传相似系数,并用 UPGMA 法构建聚类树状图。

2 结果与分析

2.1 棉花黄萎病菌基因组 DNA 的提取

经核酸蛋白检测仪测定,发现用 CTAB 和改进 SDS 2 种方法所提取的棉花黄萎病菌 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 差异较大,用 CTAB 法提取的棉花黄萎病菌 DNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值为 1.8~2.0 的占 72.1%,低于 1.8 的占 0.7%,高于 2.0 的占 27.2%;而用改进 SDS 法提取的棉花黄萎病菌 DNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值为 1.8~2.0 的占 62.3%,低于 1.8 的占 37.7%。相比较而言,CTAB 法提取的 DNA 纯度较高,杂质较少。

2.2 棉花黄萎病菌基因组 DNA 的 ISSR-PCR 扩增

研究结果显示,在所设计选用的 25 个 ISSR 引物中,有 5 个引物对供试的所有棉花黄萎病菌株的基因组 DNA 均没有扩增产物;有 11 个引物仅对部分供试菌株的基因组 DNA 有扩增产物,而且结果的重复性较差;有 9 个引物对供试所有菌株的基因组 DNA 均有扩增产物,且条带清晰、多态性理想、重复性较好,其中引物 47 及引物 885 对供试菌株的扩增结果如图 1,2 所示。

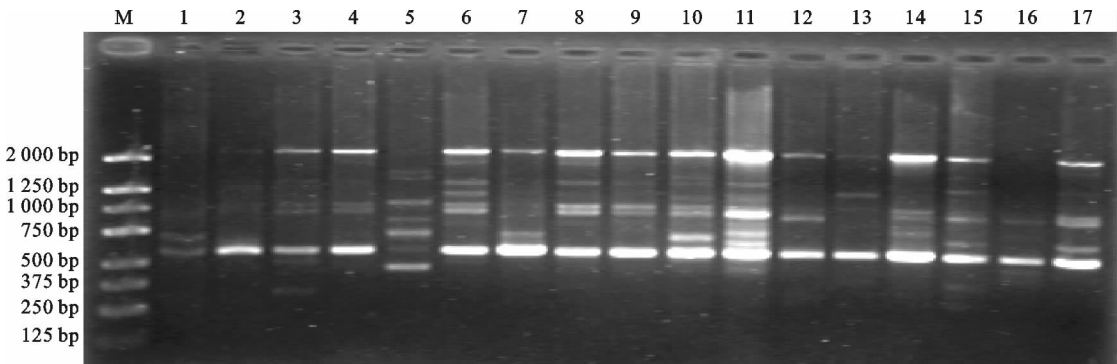


图 1 引物 47 对部分棉花黄萎病菌基因组 DNA 的扩增结果

M. DNA Marker;1~17. 依次为 JD、SM、PY、HB、BJ、SC、XJ、AH、SL、JS、SD、HN、SS、AH1、HN3、YN、JJ

Fig. 1 The results of PCR electrophoresis products amplified by primer 47 with DNA of *V. dahliae* of cotton

M. DNA Marker;1~17. JD,SM,PY,HB,BJ,SC,XJ,AH,SL,JS,SD,HN,SS,AH1,HN3,YN,JJ, respectively

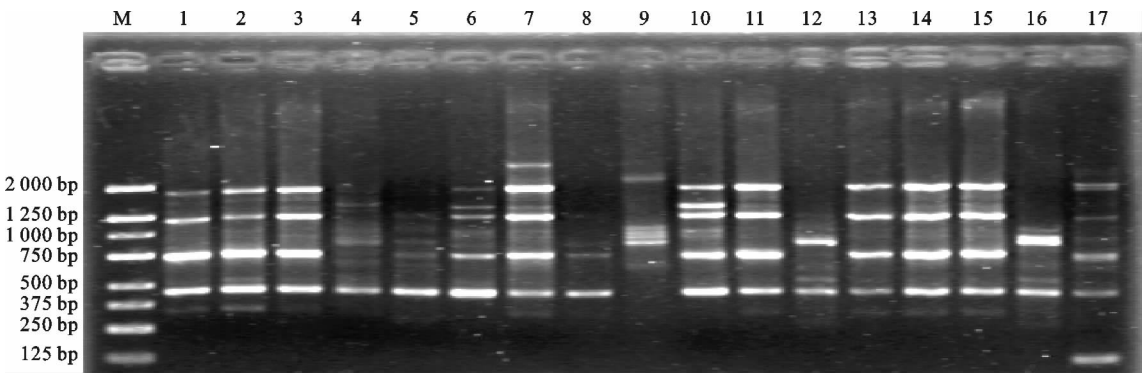


图 2 引物 885 对部分棉花黄萎病菌基因组 DNA 的扩增结果

M. DNA Marker;1~17. 依次为 JD、SM、PY、HB1、BJ、SC4、XJ、AH、AH1、HN3、YN、JJ、SL、JS、SD、HN、SS

Fig. 2 The results of PCR electrophoresis products amplified by primer 885 with DNA of *V. dahliae* of cotton

M. DNA Marker;1~17. JD,SM,PY,HB1,BJ,SC4,XJ,AH,AH1,HN3,YN,JJ,SL,JS,SD,HN,SS, respectively

9 个扩增条带清晰、多态性良好引物对棉花黄萎病菌株的 ISSR 分析结果见表 3。由表 3 可见，所筛选出的这 9 个引物对供试的 28 个棉花黄萎病菌株均可扩增出很好的多态性条带，9 个引物共扩增出了 1 989 条 ISSR 条带，其中 1 908 条为多态性标

记，多态性标记达到 95. 9%，平均每个引物扩增出 212 条多态性条带。9 个引物中，引物 866 扩增出的多态性条带最多，其次是 60，4，25，818，24 和 885 等，说明类似于这些引物的重复序列在棉花黄萎病菌中普遍存在。

表 3 所筛选的 9 个 ISSR 引物及其对 28 个棉花黄萎病菌株的扩增结果

Table 3 Polymorphic ISSR markers amplified by 9 primers with DNA of 28 isolates of *V. dahliae*

引物编号 Code of primer	引物序列(5'-3') Primer sequence	标记数 Marker number	多态性标记数 Polymorphic marker
4	ACACACACACACACAG	277	263
24	ACACACACACACACTC	139	129
25	ACACACACACACACCA	240	231
47	ACACACACACACACGT	89	83
60	AGAGAGAGAGAGAGGG	408	398
885	GAGGAGAGAGAGAGAGA	104	98
818	CACACACACACACAG	200	189
888	CACCACACACACACA	74	70
866	GGTGGGGTGGGGTG	458	447

2. 3 基于 ISSR 的棉花黄萎病菌的遗传多样性分析

2.3.1 遗传相似系数分析 利用上述 9 个 ISSR

引物对 28 个棉花黄萎病菌株进行扩增，共扩增出 1 908 个多态性位点，对凝胶电泳条带统计后，用

NTSYS PC (Version 2. 10e) 软件进行处理, 计算样品间的 Nei's 遗传距离, 结果表明, 样品间的遗传相似系数为 0. 47~1. 00。

2. 3. 2 聚类分析 利用 NTSYS-PC (Version 2. 10 e) 软件进行遗传分析, 结果见图 3。由图 3 可见, 在遗传相似系数为 0. 65 时, 可以将来源于 11 个省 (市、自治区) 的 28 个棉花黄萎病菌株分为 2 个类

群; 第 1 类群包括 JS1 (江苏)、SC (四川) 和 SS (陕西三原) 3 个菌系; 第 2 类群包括 JD (陕西泾阳斗口)、HN (河南安阳)、BJ (北京)、XJ (新疆)、SC (四川)、YN (云南)、SD (山东) 等多个省 (市、自治区) 的其他 25 个菌系。但这 2 大类并未将来源于不同省 (市、自治区) 的菌株严格区分开来, 即 ISSR 多态性与地理来源之间未表现出相关性。

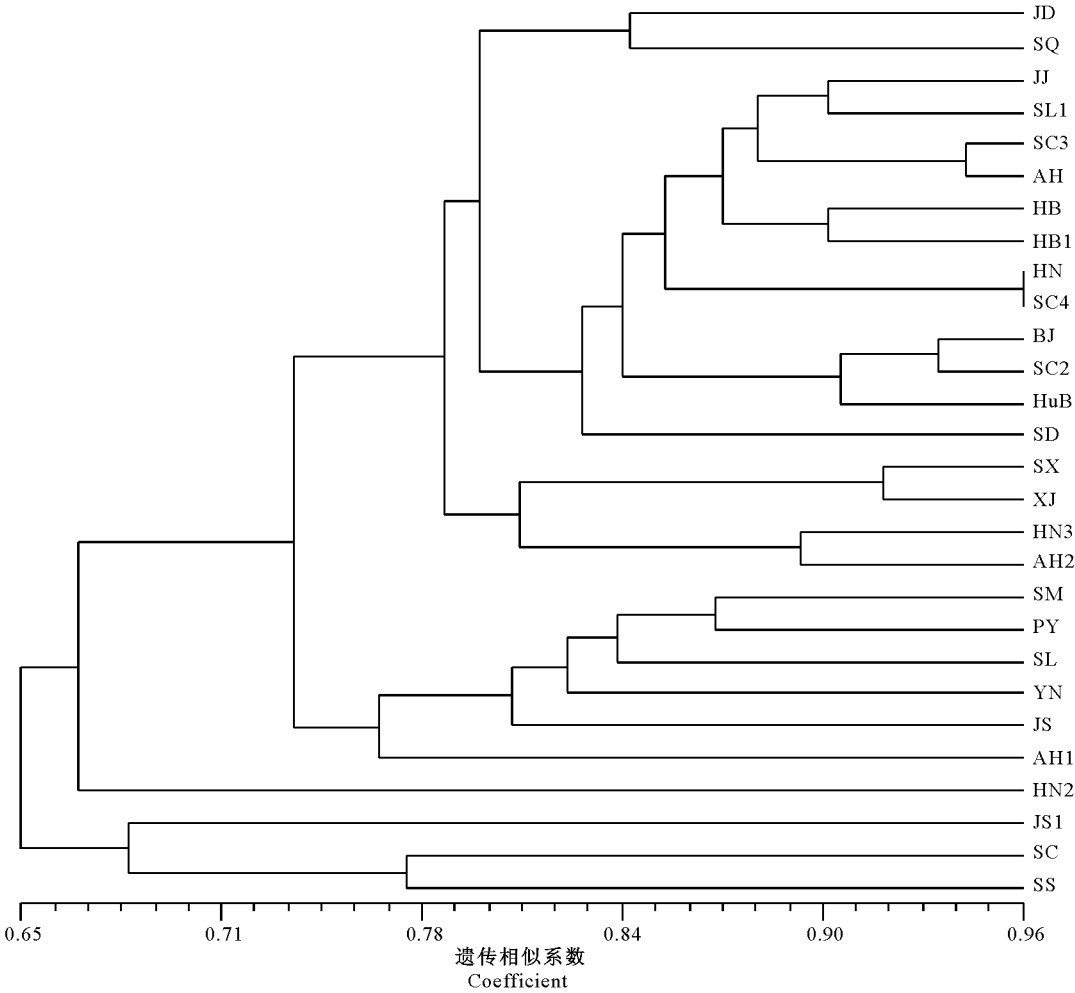


图 3 基于 ISSR 的 28 个棉花黄萎病菌株的聚类树状图

Fig. 3 Dendrogram based on ISSR fingerprints of 28 isolates of *V. dahliae* of cotton

由表 1 棉花黄萎病菌的症状类型及其在图 3 中的分布可知, 当遗传相似系数为 0. 65 时, 落叶与非落叶型 2 种致病类型的棉花黄萎病菌株并未区分开来; 而当遗传相似系数为 0. 84 时, 2 种致病类型的菌株才得以区分。由此可见, ISSR 的多态性和病原菌的落叶与否具有一定的相关性。

对 ISSR 聚类结果与菌株的菌落形态进行比较发现, 聚类结果未能将菌核型 (AVH)、菌丝型 (AVS)、中间型 (AVM) 3 种不同的菌落形态区分开。由此表明, ISSR 的多态性与菌落形态类型之间

未表现出相关性。

3 讨论

Encarnación 等^[20] 对棉花黄萎病落叶型和非落叶型菌株与 RAPD 多态性的相关性进行了研究, 结果发现落叶型和非落叶型菌株分别聚在了不同的类群中。本研究结果与其相似, 在遗传相似系数为 0. 65 时, 虽未能将落叶型、非落叶型菌株严格区分开来, 但在遗传相似系数为 0. 84 时, 可以将落叶型与非落叶型菌株严格区分开。由此证实, ISSR 的多态性与病

原菌落叶与否的症状表型具有一定的相关性。

ISSR 标记在棉花黄萎病^[19]、茄子黄萎病^[18]指纹图谱构建中的研究表明,不同菌株之间亲缘关系的远近均与其地理来源没有相关性。姜占发^[19]利用 ISSR 技术对我国主产棉区大丽轮枝菌进行分子指纹分析,结果发现其多态性与地理来源未表现出相关性。李海莲^[18]对来自我国不同地区的 14 个茄子黄萎病菌进行了 ISSR 分子指纹分析,结果表明 ISSR 多态性与地理来源亦未表现出相关性。林华峰等^[21]利用 RAPD 技术对白僵菌不同菌株扩增图谱与地理来源的分析表明,菌株多态性与采集地之间不存在相关性。本研究利用 ISSR 技术探究了 28 株不同地理来源棉花黄萎病菌菌株的亲缘关系,从其遗传多样性和地理来源之间的关系看,在遗传相似系数为 0.65,即遗传相似性最小时,未能将不同地理来源的菌株严格区分开来,故其 ISSR 基因型与地理来源的相关性不大。另外,ISSR 标记的聚类结果未能与棉花黄萎病菌的菌落形态类型相统一,即棉花黄萎病菌 ISSR 多态性与菌落形态类型之间也未表现出相关性。

4 结 论

本研究结果显示,供试的 28 株棉花黄萎病菌株在遗传相似系数为 0.65 时才能分开,说明其遗传相似性较高,基因多样性较低。ISSR 标记在棉花黄萎病菌上具有较高的多态性,该标记技术对棉花黄萎病菌遗传多样性的分析具有较高的一致性和可信度。ISSR 多态性与棉花黄萎病病原菌的病害症状(落叶与否)有一定的相关性,而与菌落形态类型和地理来源的相关性不大。此外,由于本研究所用的棉花黄萎病菌株的样本数量比较少,还有必要增加样本数量,对群体进行研究,从而对此结论进行进一步验证。

[参考文献]

- [1] 喻树迅,范术丽.我国棉花遗传育种进展与展望[J].棉花学报,2003(2):120-124.
Yu S X, Fan S L. The evolutions and prospect of cotton genetics and breeding in China [J]. Cotton Science, 2003 (2): 120-124. (in Chinese)
- [2] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprint by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20: 176-183.
- [3] 罗海燕,陈业渊. ISSR 分子标记及其应用 [J]. 安徽农学通报, 2008, 14(19): 45-46.
Luo H Y, Chen Y Y. ISSR molecular marker and its using [J].

- Anhui Agricultural Science Bulletin, 2008, 14(19): 45-56. (in Chinese)
- [4] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用 [J]. 遗传, 2002, 24(5): 613-616.
Wang J B. ISSR markers and their applications in plant genetics [J]. Hereditas, 2002, 24(5): 613-616. (in Chinese)
- [5] Pradeep Reddy M, Sarla N, Siddiq E A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding [J]. Euphytica, 2002, 128: 9-17.
- [6] Li J M, Jin X Z. Genetic structure of endangered *Emmenopterysh-enryi* Oliv based on ISSR polymorphism and implications for its conservation [J]. Genetics, 2008, 133: 227-234.
- [7] Fang D Q, Roose M L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 95: 408-417.
- [8] 吴振兴,王慧中,施农农,等. 兰属 *Cymbidium* 植物 ISSR 遗传多样性分析 [J]. 遗传, 2008, 30(5): 627-632.
Wu Z X, Wang H Z, Shi N N, et al. The genetic diversity of *Cymbidium* by ISSR [J]. Hereditas, 2008, 30(5): 627-632. (in Chinese)
- [9] Ammiraju S S, Dholakia B B, Santra D K, et al. Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 102: 726-732.
- [10] Ratnaparkhe M B, Tekeoglu M, Muehlbauer F J. Inter-simple sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 97: 515-519.
- [11] Danilova T V, Karlov G I. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism for detection of sex-specific molecular markers in hop (*Humulus lupulus* L.) [J]. Euphytica, 2006, 151: 15-21.
- [12] Casasoli M, Mattioni C, Cherubini M, et al. A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR and isozyme markers [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 102: 1190-1199.
- [13] Gaurab G, Subhash K R, Kaushik G, et al. Sex detection of *Carica papaya* and *Cycascircinalis* in pre-flowering stage by ISSR and RAPD [J]. Current Science, 2007, 92(4): 25.
- [14] Tikunov Yu M, Khurstaleva L I, Karlov G I. Application of ISSR markers in the genus *Lycopersicon* [J]. Euphytica, 2003, 131: 71-80.
- [15] Saghai M A, Soliman K M, Jorgensen R A, et al. Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley; mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81(24): 8014-8018.
- [16] 易润华,朱西儒,周而勋. 简化 CTAB 法快速微量提取丝状真菌 DNA [J]. 湛江海洋大学学报, 2003, 2(6): 72-73.
Yi R H, Zhu X R, Zhou E X. Micro-simplified CTAB method for rapid DNA extraction of filamentous fungi [J]. Journal of Zhanjiang Ocean University, 2003, 2(6): 72-73. (in Chinese)