

沉香 DNA 的提取及其 ITS2-PCR 体系的优化

刘少烽¹, 陈晓东¹, 朱爽², 陈晓颖¹, 钟兆健¹, 章卫民³, 高晓霞^{1*}

(1. 广东药学院药科学院, 广州 510006; 2. 广东药学院生命科学与生物制药学院, 广州 510006;
3. 广东省微生物研究所, 省部共建华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏
与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广州 510070)

[摘要] 目的:建立沉香的总 DNA 提取方法及 rDNA 第二内转录间隔区序列(ITS2)聚合酶链式反应(PCR)扩增体系。方法:分别采用改良的 CTAB 法、改良的 CTAB 法联合 DNA 提取试剂盒法及 DNA 提取试剂盒法提取沉香总 DNA,利用通用引物 ITS2P1/ITS2P2 扩增 rDNA ITS2 目的片段,通过正交试验优选沉香的 PCR 扩增条件并对目的片段进行测序。结果:改良的 CTAB 法联合 DNA 提取试剂盒法提取总 DNA 的 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 1.79,质量浓度 $350\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,PCR 扩增目的片段产率最高。不同因素水平对沉香 ITS2-PCR 反应的影响顺序为模板 DNA > 引物 > Taq DNA 聚合酶 > dNTP。最佳反应体系为 20 μL 体系,DNA 模板 40 ng,引物 $0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,dNTP $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,Taq DNA 聚合酶 1.5 U。测序获得的目前片段长度 230 bp,与 GenBank 中瑞香科沉香属白木香序列相似性 100%。结论:CTAB 法联合 DNA 试剂盒法可简单、快速获得高质量沉香总 DNA,正交试验可快速获得 ITS2 目的片段,为沉香的分子鉴定和系统发育分析提供参考。

[关键词] 沉香; DNA 提取; ITS2; 聚合酶链式反应

[中图分类号] R283.6;R282.5;R284.1;R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)02-0007-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015020007

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141204.1002.009.html>

[网络出版时间] 2014124 10:02

Extraction of DNA from Aquilariae Lignum Resinatum and Optimization of Its ITS2-PCR System

LIU Shao-feng¹, CHEN Xiao-dong¹, ZHU Shuang², CHEN Xiao-ying¹, ZHONG Zhao-jian¹, ZHANG Wei-min³, GAO Xiao-xia^{1*} (1. College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. College of Life Science and Bio-pharmacological, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 3. Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070, China)

[Abstract] **Objective:** To establish extraction method of total DNA from Aquilariae Lignum Resinatum and its rDNA ITS2 PCR amplified system. **Method:** Modified CTAB method, DNA extraction kit method, modified CTAB method combined with DNA extraction kit were employed to extract total DNA from Aquilariae Lignum Resinatum. Fragment of rDNA ITS2 barcode amplified with universal primers of ITS2P1/ITS2P2, PCR amplified conditions were optimized by orthogonal test, rDNA ITS2 barcode was characterized by sequencing and blasting in GenBank. **Result:** $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ of total DNA from Aquilariae Lignum Resinatum was 1.79 which extracted by modified CTAB method combined with DNA extraction kit and the concentration of total DNA was $350\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, PCR amplified fragment was highest. Effects of different level factors about ITS2-PCR reaction from large to small successively was template DNA > primers > Taq DNA polymerase > dNTPs. Optimum PCR (20 μL) reaction system was template DNA of 40 ng, primers of $0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, dNTP of $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ and Taq DNA

[收稿日期] 20140713(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81102418);广东省科技计划项目(2012A030100014);广东省科学院野外科学实验站基金项目(Sytz201204)

[第一作者] 刘少烽,在读硕士,从事药物分析研究,Tel:020-39352136,E-mail:d-v-wade2007@163.com

[通讯作者] *高晓霞,博士,副教授,硕士生导师,从事中药制剂质量控制研究,Tel:020-39352136,E-mail:gaoxia91@163.com

polymerase of 1.5 U through the intuitive analysis. Both the length of two sample sequences were 230 bp, identities were 100% by comparing with *Aquilariae Lignum Resinatum* in GenBank. **Conclusion:** Total DNA from *Aquilariae Lignum Resinatum* with high quality can receive by modified CTAB method combined DNA kit method, ITS2 barcode can be quickly obtain by this optimized process, this study provides basis for molecular identification and phylogenetic analysis of *Aquilariae Lignum Resinatum*.

[**Key words**] *Aquilariae Lignum Resinatum*; DNA extraction; ITS2; polymerase chain reaction

沉香分为国产沉香和进口沉香,是中国、日本、印度及其他东南亚国家的传统名贵药材和天然香料,其中国产沉香为白木香含树脂的木材^[1]。近年由于自然原因及人们对天然珍贵沉香的大量采挖,白木香原始林遭到严重破坏,加上天然林的更新能力弱,国内野生资源已近枯竭,国产沉香产量严重不足,致使供需矛盾突出,价格不断攀升。由于不同品种、等级的沉香价格差异极大,市场上以劣充好或以假乱真(以类似品如檀香、降香等冒充)的现象较为严重。按有关标准^[1-2]检验,较难判断沉香药材的基源和真伪,给质量检验带来了一定难度。

DNA 条形码是通过比较一段通用 DNA 片段对物种进行准确、快速鉴定的技术,近年来利用基因组中标准的短 DNA 片段进行物种鉴定的 DNA 条形码技术已成为生物分类和鉴定的研究热点^[3-4]。核糖体 DNA 第二内转录间隔区序列(rDNA ITS2)在物种水平或种下水平具有明显的序列变异,由于其序列长度较短,易于扩增,可用于已降解药材的分子鉴定^[5]。Chen 等^[6]通过对黄芪属植物 6 000 余个样本,7 条常用条形码序列的比较分析,ITS2 在条形码评价指标中为最优序列,且其物种水平有高达 92.7% 的鉴定成功率。为了后续数据处理更准确可靠,ITS2 可通过去除两端 5.8 S 和 26 S 区来获得标准间隔区序列。由于 ITS2 的二级结构在提高构建系统发育树的准确性方面具有重要作用,且作为 ITS 一部分,ITS2 序列已被作为药用植物鉴别的标准条形码序列^[7]。获取高质量的 DNA 是进行 DNA 条形码研究的必要前提和关键环节。中药材的 DNA 分子标记鉴定多采用叶片,较易得到高质量 DNA,但沉香为树干心材, DNA 含量较低且有些沉香药材储存时间较长、环境复杂,降解及污染较严重,较难得到适用于聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增的高质量 DNA。本实验拟提取沉香样品的 DNA 并优选其 PCR 扩增条件,为沉香的 DNA 分子标记技术鉴定和系统发育分析提供参考。

1 材料

1.1 样品收集

1.1.1 人工诱导沉香 取种植于广东省信宜市珍稀沉香发展有限公司白木香苗圃基地(广东省信宜市金垌镇)的 6 年龄白木香进行人工诱导造香,经广东药学院中药学院严寒静副教授鉴定为瑞香科植物白木香 *Aquilaria sinensis*。镰刀菌(*Fusarium* sp. A2, 批号 EU781659, 经广东省微生物研究所章卫民研究员提供菌株和鉴定^[8])。在白木香树干距地面约 1 m 的位置钻一个直径约 0.5 cm 并且斜向下的小孔作为造香口。真菌菌丝体打碎后用水稀释至适当浓度后过滤,采用一次性注射器将真菌菌丝体稀释液(乙酸稀释液)注入白木香树干内^[9]。人工造香 12 个月后,砍伐白木香,手工割取含树脂的心材,阴干,制成沉香。本文中沉香于 2012 年 6 月 24 日进行人工诱导造香,2013 年 6 月 26 日制成成品药材 1 批,呈长条片状,表面相对平滑,木质薄脆呈棕褐色与黄白色相间斑条纹,剖面木质灰黄色,不呈朽木状。气微香,味淡。按 2010 年版《中国药典》一部相关方法进行检验,显示萜类化合物显色反应呈樱桃红色(阳性),醇溶性浸出物 20.7%。该样品室温保存至 2014 年 1 月后进行总 DNA 的提取。

1.1.2 商品沉香 市售商品沉香 1 批,2010 年 12 月 14 日购自广东省信宜市珍稀沉香发展有限公司,呈很不规则小短块,质坚,表面凹凸不平,无规律性,呈棕褐色与黄白色相间斑条纹,气味微香,味淡。经广东药学院中药学院严寒静副教授鉴定为瑞香科植物白木香 *A. sinensis* 含树脂的心材。按 2010 年版《中国药典》一部相关方法进行检验,萜类化合物显色反应呈樱桃红色(阳性),醇溶性浸出物 20.9%。该样品室温保存至 2014 年 1 月后进行总 DNA 的提取。

1.2 仪器与试剂 2720T thermal cycler 型 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司),BG-SubMIDI 型水平电泳仪(北京百晶生物技术有限公司),Tanon-4100 型全自动数码凝胶成像仪(广州誉维生物技术仪器有限公司),TGL-16G 系列离心机(长沙湘仪离心机仪器有

限公司)。引物(上海生工生物工程公司), Sybr green I 电泳染料(北京百泰克生物技术有限公司), *Taq* DNA 聚合酶(Mg^{2+} , $15 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$)和脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP, $10 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$)均购自 Takara 公司, 琼脂糖(美国 Promega 公司), 赛哲 DNA 提取试剂盒(广州赛哲生物科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 总 DNA 的提取

2.1.1 改良的 CTAB 法^[10] 取人工诱导沉香 0.1 g, 液氮研磨至粉状, 转至液氮预冷的 2 mL 圆底离心管中, 按每 1 g 样品加入于 65 °C 预热的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)裂解液[CTAB 4%, 三(羟甲基)氨基甲烷(Tris-HCl) $100 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$, 乙二胺四乙酸(EDTA) $25 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$, NaCl $1.4 \text{ mol} \cdot L^{-1}$, β -巯基乙醇 2%, PVP 1%, pH 8.0, 下同]5 mL, 震荡均匀, 65 °C 水浴 2 h, 放至室温, 离心($10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min, 下同), 取上清液加入等体积 Tris-饱和酚, 离心, 取水层。加等体积 Tris-饱和酚抽提 1 次, 取水层。用苯酚-三氯甲烷-异戊醇提取液(25:24:1)抽提 1 次, 用三氯甲烷-异戊醇提取液(24:1)抽提 2 次。取水层加入 0.8 倍量异丙醇, 加入 $3 \text{ mol} \cdot L^{-1}$ 乙酸钠使其终浓度达 $0.3 \text{ mol} \cdot L^{-1}$, -20 °C 放置 30 min, 离心, 弃上清液, 加入 70% 乙醇, 离心, 弃上清液, 重复上一步骤。加入无水乙醇, 离心, 弃上清液, 重复上一步骤。自然挥干。10 × TE 缓冲液 20 μL 溶解 DNA, -20 °C 保存。

2.1.2 赛哲 DNA 提取试剂盒法 取人工诱导沉香 0.1 g, 用液氮研磨至粉状, 按赛哲公司 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA, -20 °C 保存备用。

2.1.3 改良的 CTAB 法联合赛哲 DNA 提取试剂盒法 取人工诱导沉香 0.1 g, 液氮研磨至粉状, 转至液氮预冷的 2 mL 圆底离心管中, 按每 1 g 样品加入于 65 °C 预热的 CTAB 裂解液 5 mL, 震荡均匀, 65 °C 水浴 2 h, 放至室温, 离心, 取上清液加入苯酚-三氯甲烷-异戊醇提取液(25:24:1)抽提 2 次, 取水层。加入两倍量赛哲试剂盒裂解液, 涡旋混匀。DNA 柱子套在 2 mL 收集管中, 将涡旋后的混合液转至 DNA 柱子, 离心 1 min。弃去滤液, 加入 GDP 缓冲液 300 μL 至 DNA 柱子中, 静置 1 min, 离心 1 min。弃去滤液, 将柱子套回收集管中, 加入 DW2 缓冲液 600 μL , 离心 1 min, 弃去滤液, 把柱子套回收集管中, 重复操作 1 次, 离心 2 min。柱子套在 1.5 mL 离心管中, 加入 elution 缓冲液 20 μL 至柱子膜中央, 放置 1 min, 离心 2 min, -20 °C 保存。

2.2 rDNA ITS2 序列 PCR 扩增体系优化及序列测定

2.2.1 正交表设计与 PCR 反应因素水平的确定 扩增引物为 ITS2P1 (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') 和 ITS2P2 (5'-TTCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[11]。PCR 反应体积 20 μL , 利用四因素四水平 $L_{16}(4^4)$ 正交表考察 PCR 反应中 4 个因素(模板 DNA, dNTP, 引物, *Taq* DNA 聚合酶)对 PCR 扩增的影响, 每管加入 10 × PCR 缓冲液 2 μL , 加 3dH₂O 补足体积, 通过正交试验确定最佳反应体系, 试验安排及结果见表 1。扩增程序^[12]为 95 °C 预变 8 min, 94 °C 变性 1 min, 52 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 50 s, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 全自动数码凝胶凝胶成像仪中照相并记录分析。

表 1 沉香 DNA 的 ITS2-PCR 正交试验分析

Table 1 Orthogonal design analysis of ITS2-PCR for DNA from Aquilariae Lignum Resinatum

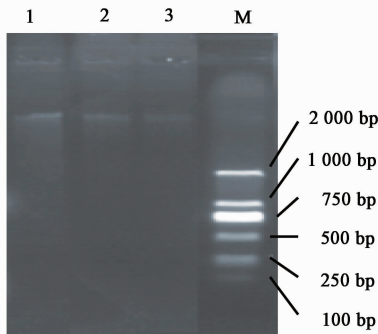
No.	<i>Taq</i> DNA 聚合酶 /U	dNTP / $\mu\text{mol} \cdot$ L^{-1}	引物 / $\mu\text{mol} \cdot$ L^{-1}	模板 DNA /ng	得分/分	
					人工诱 导沉香	商品 沉香
1	1.0	0.4	0.2	40	14	12
2	1.0	0.5	0.3	20	8	2
3	1.0	0.6	0.4	10	1	1
4	1.0	0.7	0.5	5	3	1
5	1.5	0.4	0.4	10	3	1
6	1.5	0.5	0.2	40	16	16
7	1.5	0.6	0.3	5	11	1
8	1.5	0.7	0.5	20	10	11
9	2.0	0.4	0.3	5	1	1
10	2.0	0.5	0.2	20	6	13
11	2.0	0.6	0.5	10	7	1
12	2.0	0.7	0.4	40	11	6
13	2.5	0.4	0.5	20	12	7
14	2.5	0.5	0.4	5	6	1
15	2.5	0.6	0.3	40	11	15
16	2.5	0.7	0.2	10	1	1

2.2.2 rDNA ITS2 序列测定 为了避免细菌、真菌等微生物假阳性结果的影响, 将正交试验中最优组合的 rDNA ITS2 PCR 产物送交华大基因科技股份有限公司进行直接纯化测序。测序峰图去除低质量序列及引物区, 获得 ITS2 序列。通过与国际基因数据库(GenBank)中已有的 ITS2 序列进行比较分析, 得

到该序列大概的分子系统发育关系。DNA 序列间的多重比较分析通过 Clustal X 程序 (version 1.8) 进行。

2.3 结果与分析

2.3.1 总 DNA 的提取 2.1 项下的 DNA 电泳条带较整齐、清晰,见图 1。应用紫外-可见分光光度计测定 DNA 的 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$,赛哲 DNA 提取试剂盒法为 1.62,质量浓度 $260\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,DNA 可能含有少量蛋白质或酚类物质,纯度不高且产率不高。改良的 CTAB 法联合赛哲 DNA 提取试剂盒法为 1.79,质量浓度 $350\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;改良的 CTAB 法为 1.90,质量浓度 $270\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;说明这 2 种方法均能获得较高质量的 DNA。3 种不同提取方法获得的 DNA 进行 rDNA ITS2 目的片段的 PCR 扩增,均能扩增出单一的目的片段,见图 2。与其他 2 种提取方法相比较,改良的 CTB 法联合赛哲 DNA 提取试剂盒法 PCR 扩增获得的目的片段更加清晰、明亮、单一。

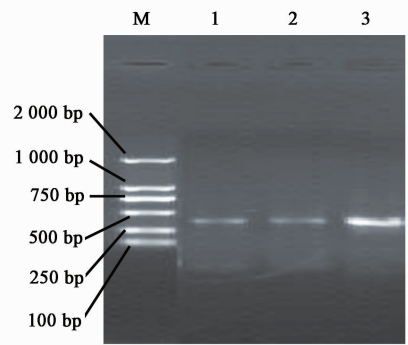


1. 改良的 CTAB 法联合赛哲 DNA 提取试剂盒法;2. 改良 CTAB 法;
3. 赛哲 DNA 提取试剂盒法;M. DNA marker DL2000

图 1 人工诱导沉香总 DNA

Fig. 1 Total DNA from artificially induced product of *Aquilariae Lignum Resinatum*

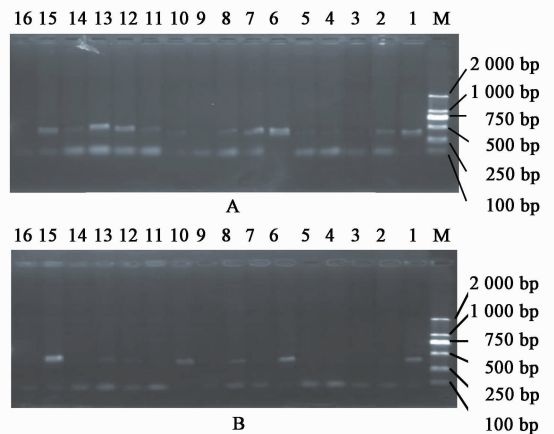
2.3.2 正交试验结果 人工诱导沉香和商品沉香以改良的 CTAB 法联合 DNA 提取试剂盒法提取的总 DNA 分别按照正交试验设计进行 PCR 扩增,PCR 产物进行电泳检测,见图 3,按扩增条带的强弱、背景色的深浅和非特异性条带的多少进行计分。条带清晰度高、背景颜色浅、无非特异性条带的最佳产物记 16 分,最差的记 1 分。由表 1 可知,人工诱导沉香及商品沉香的各因素水平对沉香 ITS2-PCR 反应的影响顺序均为模板 DNA > 引物 > *Taq* DNA 聚合酶 > dNTP,确定人工诱导沉香及商品沉香 ITS2-PCR 的最佳反应体系均为 DNA 模板 40 ng ,引物 $0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,dNTP $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,*Taq* DNA 聚合酶 1.5 U ,均与得分最高的 6 号组合所用体系相一致。



M. DNA marker DL2000;1. 改良 CTAB 法;2. 赛哲 DNA 提取试剂盒法;3. 改良的 CTAB 法联合赛哲 DNA 提取试剂盒法

图 2 人工诱导沉香 rDNA ITS2 PCR 扩增产物

Fig. 2 ITS2 PCR amplification products of rDNA from artificially induced product of *Aquilariae Lignum Resinatum*



A. 人工诱导沉香;B. 商品沉香;1~16. 样品;M. DNA marker DL2000

图 3 沉香正交试验各样品的扩增

Fig. 3 Amplification of each sample in orthogonal test of *Aquilariae Lignum Resinatum*

2.3.3 rDNA ITS2 序列分析 正交试验中第 6 组人工诱导沉香和商品沉香 rDNA ITS2 序列的长度均为 230 bp,两者序列相似度 100%,GenBank 登陆号分别为 KJ748406 和 KJ748405。将 2 个沉香样品 rDNA ITS2 与 GenBank 中已有的 rDNA ITS2 序列进行比较分析,得到与之亲缘关系相近的序列,序列间通过 Clustal X 比对和 BioEdit 计算,发现 2 个沉香样品与 GenBank 中已有的白木香序列相似性高达 100%,E 值 (expect) $8e^{-116}$,缺失或插入 0%,故将该沉香样品归类为 *A. sinensis*。

3 讨论

与新鲜、幼嫩的植物组织相比,干燥木材组织中 DNA 的含量和质量都较低^[13],而某些木材受存储时间和环境的影响,使得木材的 DNA 受到降解、断裂成小片段,以致于含量更低。同时由于木材腐朽和

真菌污染,导致 DNA 进一步降解和污染^[14],甚至有些杂质不能通过抽提除去。木材组织中降解物、污染物、杂质等严重影响到 DNA 聚合酶的活性,在 PCR 反应过程中,对引物与模板的结合造成干扰,使 PCR 反应无法进行^[15],因此从木材组织中提取出高质量 DNA 要相对困难得多。

目前用于木材 DNA 提取的方法有改良的 CTAB 法、高盐低 pH 法、试剂盒法及 CTAB-SDS 提取法等^[16-18]。这些方法已在许多木材组织中应用并成功提取 DNA。但由于不同树种木材的物理性质和化学成分存在差异,故不同种类的木材须通过摸索寻找最合适的 DNA 提取方法。本文采用改良的 CTAB 法联合 DNA 试剂盒法,既吸取 CTAB 法能对绝大多数植物组织进行 DNA 提取的优点,又拥有试剂盒柱提取法对 DNA 缓冲液中微量的 DNA 进行高质量提取的优点,避免由于 CTAB 法萃取次数过多而造成的 DNA 损失过多或者萃取次数过少而得不到高纯度的 DNA。通过直观分析获得适用于人工诱导沉香及商品沉香的 PCR 反应体系且通过对正交试验中 PCR 产物进行抽检,排除了细菌、真菌等微生物假阳性结果的影响。序列分析显示正交试验优化的 PCR 反应体系可准确扩增沉香 rDNA ITS2 目的片段,有利于后续沉香的分子鉴定和系统发育分析。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:172-173.
[2] 国家药品监督管理局. 43 种进口中药材质量标准[S]. 国食药监注[2004]144 号,2004:22.
[3] Hajibabaei M, Janzen D H, Burns J M, et al. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera[J]. Proc Natl Acad Sci,2006,103(4):968-971.
[4] Parmentier I, Duminil J, Kuzmina M, et al. How effective are DNA barcodes in the identification of African rainforest trees? [J]. PLoS One,2013,8(4):e54921.
[5] Das B, Jyrwa D B, Dutta A K, et al. Molecular characterization of the Indian poultry nodular tapeworm, *Railletina echinobothrida* (Cestoda: Cyclophyllidae;

Davaineidae) based on rDNA internal transcribed spacer 2 region[J]. J Parasit Dis,2014,38(1):22-26.
[6] Chen S, Yao H, Han J, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J]. PLoS One,2010,5(1):e8613.
[7] Chiou S J, Yen J H, Fang C L, et al. Authentication of medicinal herbs using PCR-amplified ITS2 with specific primers[J]. Planta Med,2007,73(13):1421-1426.
[8] 王磊,章卫民,潘清灵,等. 白木香内生真菌的分离及分子鉴定[J]. 菌物研究,2009,7(1):37-42.
[9] 高晓霞,周伟平,钟兆健,等. 沉香中苜基丙酮与浸出物含量相关性研究[J]. 中药材,2012,35(6):919-924.
[10] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochem Bull,1987,19(1):11-15.
[11] 高晓霞,陈晓颖,罗源生. 广佛手 rDNA ITS 序列测定及特点的初步分析[J]. 时珍国医国药,2007,18(1):162-163.
[12] 朱爽,周林,黄晓敏,等. 大叶钩藤的分子鉴定[J]. 中药材,2011,34(8):1206-1208.
[13] Reynolds M M, Williams C G. Extracting DNA from submerged pine wood [J]. Genome, 2004, 47 (5): 994-997.
[14] Asif M J, Cannon C H. DNA extraction from processed wood: A case study for the identification of an endangered timber species (*Gonystylus bancanus*) [J]. Plant Mol Biol Rep,2005,23(2):185-192.
[15] Rachmayanti Y, Leinemann L, Gailing O, et al. DNA from processed and unprocessed wood: factors influencing the isolation success [J]. Forensic Sci Int Genet,2009,3(3):185-192.
[16] 伏建国,刘金良,杨晓军,等. 进口黄檀属木材 DNA 提取与分子鉴定方法初步研究[J]. 浙江农林大学学报,2013,30(4):627-632.
[17] 余敏,张浩,周亮,等. 降香黄檀木材 DNA 提取方法的研究[J]. 安徽农业大学学报,2013,40(4):1-4.
[18] 杨星宇,杨路路,余志伟,等. 水杉木材 DNA 提取及条形码分子鉴定[J]. 湖北大学学报:自然科学版,2011,33(4):397-403.

[责任编辑 刘德文]