

藤中原花青素[J]. 食品工业科技, 2017, 38(1): 112-115, 120.

[10] 李少华. 硫酸盐稀溶液中多金属综合回收[D]. 长春: 吉林大学, 2015.

[11] 张 帆, 信云霞, 贾学五. 大孔树脂对过氧化氢热稳定性的影响[J]. 无机盐工业, 2017, 49(8): 73-76.

[12] 臧宝霞, 金 鸣, 李金荣. 大孔树脂-凝胶柱层析法大规模制备纯品羟基红花黄色素 A[J]. 心肺血管病杂志, 2008, 27(6): 363-365.

[13] 陈 坤, 李 琪, 胡 茜, 等. 大孔树脂 D-101 纯化黑骨藤复方药物有效部位工艺研究[J]. 离子交换与吸附, 2017, 33(4): 322-330.

[14] 粟 敏, 汤 婷, 唐玮蔚, 等. 大孔树脂富集纯化黄蜀葵花总黄酮的工艺研究[J]. 中药材, 2017, 40(6): 1402-1405.

[15] 舒祝明, 蒋剑平, 王建平, 等. 大孔树脂纯化胡柚皮总黄酮的工艺研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(5): 649-653.

[16] 齐 兵, 何志勇, 秦 肪, 等. 陈皮中橙皮苷的提取与纯化工艺研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(24): 343-346.

[17] 刘 韶, 阳秀娟. 大孔树脂分离纯化陈皮中多甲氧基黄酮类化合物[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(10): 1562-1567.

[18] 崔蕊静, 刘秀凤, 常学东. 安梨皮渣中总黄酮微波辅助提取工艺优化[J]. 中国酿造, 2014, 33(12): 85-88.

[19] 朱孔岳, 冯 琦, 盘赛昆, 等. 响应面分析法优化超临界 CO₂ 萃取陈皮精油工艺的研究[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(13): 56-58, 68.

[20] 董爱君, 刘华臣, 刘 冰, 等. 肉桂酸薄荷酯的合成及抑菌活性研究[J]. 食品科技, 2017, 42(5): 253-256.

[21] 舒祝明, 蒋剑平, 王建平, 等. 大孔树脂纯化胡柚皮总黄酮的工艺研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(5): 649-653.

[22] 王沙沙, 刘 洋, 牛真真, 等. 大孔吸附树脂分离纯化猪毛菜总黄酮及其抗氧化活性[J]. 精细化工, 2018, 35(1): 58-64.

[23] 张 星, 董 欣, 刘振春, 等. 大孔树脂纯化黑豆异黄酮的工艺优化[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2018, 46(1): 136-145, 154.

[24] 项 想, 孙成静, 宿树兰, 等. 丹参茎叶酚酮有效部位的提取纯化工艺研究[J]. 中草药, 2018, 49(1): 120-127.

[25] 任丽平, 李先佳, 金少举. 大孔树脂分离纯化迷迭香叶总黄酮及抗氧化活性研究[J]. 中国调味品, 2017, 42(4): 69-73.

[26] 邵金华, 何福林, 陈 霞, 等. 梓树根皮总黄酮分离纯化及其抑菌活性研究[J]. 食品与机械, 2017, 33(2): 140-144, 220.

白及 SSR-PCR 扩增体系的优化

徐德林, 陈红波, 马 激, 周 婷, 石忠令, 李 林, 钱 刚*
(遵义医学院, 贵州 遵义 563003)

摘要: **目的** 优化白及 SSR-PCR 扩增体系。 **方法** 响应面法对 10 μL 扩增体系中的模板 DNA 质量浓度、引物浓度、2 × PCR mix 用量进行配比寻优, 再取 5 对 EST-SSR 引物和 4 份种质, 分别在 10、25 μL 扩增体系中对上述方案进行扩增验证。 **结果** 10 μL 白及 SSR-PCR 中模板 DNA 质量浓度、引物浓度、2 × PCR mix 用量最优配比分别为 1.60 ng/μL、12 μmol/L、6.98 μL。在 5 对引物分别于 4 份种质的扩增中, 以最优配比构建的 2 种体系均能扩增出稳定清晰的条带。 **结论** 本实验可对白及 SSR 分子标记的研究奠定坚实基础。

关键词: 白及; SSR-PCR 扩增体系; 响应面法

中图分类号: Q75 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)12-2672-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.12.012

Optimization of SSR-PCR amplification system of *Bletillae Rhizoma*

XU De-lin, CHEN Hong-bo, MA Ji, ZHOU Ting, SHI Zhong-ling, LI Lin, QIAN Gang*
(Zunyi Medical University, Zunyi 563003, China)

收稿日期: 2018-03-28
基金项目: 国家自然科学基金项目 (31560079, 31560087); 贵州省科学技术基金项目 (黔科合 LH 字 [2014] 7549); 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项项目 (黔科合 ZY 字 [2013] 3002); 遵义市 2014 年度“15851”人才工程项目 (201424); 遵义医学院精英人才工程项目 (2016)
作者简介: 徐德林 (1981—), 男, 副教授, 研究方向为中药材遗传育种。Tel: (0851) 28609592, E-mail: xudelinqin2000@163.com
***通信作者:** 钱 刚 (1969—), 男, 博士, 教授, 从事植物细胞与分子遗传学工作。E-mail: pengjiaqiong@163.com

KEY WORDS: *Bletillae Rhizoma*; SSR-PCR amplification system; response surface method

白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 为兰科白及属多年生草本植物, 药理作用广泛, 全世界已知该属植物共 6 种, 主要分布在中国、日本、缅甸北部等亚洲国家^[1], 其中在我国有白及、小白及 *B. formosana* (Hayata) Schltr.、黄花白及 *B. ochracea* Schltr.、华白及 *B. sinensis* (Rolfe) Schltr., 均可入药, 以白及为主^[2]。该药材主要以块茎入药, 具有收敛止血、抗菌消炎、抗病毒^[3]、抗肿瘤抗癌^[4]、消肿生肌、活血美白等功效^[5-6], 不仅药用价值突出, 在欧美国家还是一种重要的观赏植物。然而, 随着白及被无节制滥采挖, 导致野生资源日渐枯竭, 目前已被列为国家Ⅱ级珍稀濒危保护植物, 并收录于《濒危野生动植物国际贸易公约》^[7]。

受白及市场价格持续走高和供不应求的影响, 市场流通中该药材假冒伪劣现象十分常见, 传统药材鉴别又以形态特征为主, 客观准确性常遭受质疑, 从而导致对中药材准确鉴别难度大。近些年日臻成熟的 DNA 鉴别技术 (亦称分子标记技术) 由于不受环境因素影响、鉴别结果稳定可靠等优点, 被广泛应用于各物种种内与种间的研究分析^[8-11], 但由于当前可用的白及分子标记较少, 对其鉴别仍以传统的人为形态辨别方式为主, 分子鉴别方面研究鲜有报道^[12-13]。

SSR 全称简单重复序列, 又称微卫星 DNA, 是一类广泛分布于基因组编码区和非编码区、主要以 1~6 个碱基为重复基元的串联重复序列, 由于其具有共显性、多等位基因、多态性检出率高等特征, 拥有比 AFLP、RAPD 等鉴别技术更高的可靠性^[14], 从而被广泛用于物种遗传多样性研究^[15-16]、指纹图谱构建及物种鉴别^[17-20]、功能基因定位^[21-23]等领域。然而, 目前白及 SSR 分子标记领

域的研究鲜有报道, 并且主要集中于指纹图谱构建和群体遗传多样性^[24-25], 尚无作为白及 SSR 分析基础的 SSR-PCR 体系筛选优化。因此, 本实验旨在利用响应面法对白及 SSR-PCR 扩增体系进行优化, 以期为基于 SSR 分子标记技术的白及种群结构分析、指纹图谱研究、功能基因定位及分子辅助育种等相关研究奠定坚实基础。

1 材料

白及采自遵义医学院医学细胞生物学教研室中药材遗传育种课题组的白及种质基地 (表 1), 经专家鉴定为正品。选取生长状态良好的新鲜嫩叶, 进行基因组 DNA 提取。

表 1 药材基本信息

Tab. 1 Basic information of medicinal materials			
试验	代码	花色、果色	来源
响应面优化	I	紫花、紫果	贵州遵义
最优扩增体系验证	HH	黄花、紫果	贵州遵义
最优扩增体系验证	BH	白花、紫果	贵州遵义
最优扩增体系验证	ZS	紫花、紫果	陕西
最优扩增体系验证	LS	紫花、绿果	陕西

MICRO 21/21R 型冷冻离心机 (美国 Thermo 公司); DYCP-31DN 型水平电泳仪 (北京六一生物科技有限公司); C1000™ Thermal Cycler 型 PCR 仪、Gel Doc™ XR+ 型凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司); DY-CZ-30C 型垂直电泳仪 (北京市六一仪器厂); AG 22331Hamburg 型紫外分光光谱仪 (德国 Eppendorf 公司)。2×PCR mix 购自北京擎科梓熙生物科技有限公司; CTAB、EDTA、Tris (分析纯) 等均购自上海生工生物技术有限公司。优化方案筛选所用引物为 ZYBS-2, 最优组合验证所用引物为 ZYBS-17、ZYBS-33、ZYBS-34、ZYBS-46、ZYBS-48, 具体见表 2。

表 2 引物基本信息

Tab. 2 Basic information of primers					
引物	引物序列 (5'→3')	长度/bp	T _m /℃	重复序列	扩增长度/bp
ZYBS-2	正向 GCTGCTTTCCATTTCAGCC	20	60. 11	(T)13	249
	反向 GCAGTAAGCAAGCTGAAGAGC	21	59. 87		
ZYBS-17	正向 TAAAGAGAGCGAGCAAGCCA	20	59. 39	(GA)8	213
	反向 AGCTTCCATCCCAACAAACAGA	22	60. 16		
ZYBS-33	正向 CACGTTGTGGGATTAAGGCT	20	58. 18	(TC)7	277
	反向 TAAAGGGGAGGAGGCAAGA	20	59. 88		
ZYBS-34	正向 TCGCCTTTCTTGCTTGCTCT	20	59. 89	(TA)7	226
	反向 GCCATCAGCGAATGTGATAGC	21	59. 80		
ZYBS-46	正向 GCGGCAGATCAGATCAAAG	20	60. 04	(CAA)6	246
	反向 GGATTGTGACTGACGCGGAA	20	60. 04		
ZYBS-48	正向 AGGCATCATTCTGGTGGGTG	20	60. 03	(GAA)6	202
	反向 GAGGGAATATGCGCGGTAA	20	59. 97		

2 方法

2.1 基因组 DNA 提取 采集 5 份药材新鲜嫩叶，75% 乙醇表面擦拭以消除外源性污染，晾干表面乙醇后，改良 CTAB 法提取叶片基因组 DNA，紫外分光光度计检测 DNA 浓度及纯度，并调整成质量浓度为 20 ng/μL 的工作液作为 SSR-PCR 反应体系的 DNA 模板，于 -40 ℃ 下保存备用。

2.2 SSR-PCR 10 μL 反应体系响应面设计 选择模板 DNA 质量浓度（A）、引物浓度（B）、2 × PCR mix 用量（C）作为影响因素，响应面法优化方案设计（表 3），中心试验点设置 5 个重复，共得到 17 种处理（表 4）。然后，将设计所得的 17 种处理方案在 PCR 仪上进行扩增，扩增所用引物为 ZYBS-2。

表 3 因素水平
Tab.3 Factors and levels

水平	因素		
	A 模板 DNA/ (ng·μL ⁻¹)	B 引物/ (μmol·L ⁻¹)	C 2 × PCR mix/μL
1	5	4	2
2	15	8	5
3	25	12	8

2.3 PCR 扩增和电泳结果统计 PCR 采用 TD-PCR 程序进行扩增，具体步骤为 94 ℃ 预变性 4 min，35 个循环：首先 94 ℃ 变性 30 s，60 ℃ 退火 30 s，72 ℃ 延伸 30 s，共 5 个循环，然后退火温度每降 1 ℃ 各进行 5 个循环，直至 58 ℃，接着在 58 ℃ 进行最后 25 个扩增循环；最后 72 ℃ 延伸 5 min，16 ℃ 下保存。扩增产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳（120 V、30 min）分离后，凝胶成像仪拍照保存。参照文献 [26-29] 在 SSR-PCR 优化体系构建中对电泳结果的赋值评分法，将 17 组处理中扩增效果最优组赋值 17 分，未能扩增组赋值 1 分，其余组根据条带亮度、清晰度、杂带数和拖带等情况予以具体赋值，平行 3 次，取平均值，结果见表 4。

2.4 验证试验 本试验选用 5 对 SSR 引物，即 ZYBS-17、ZYBS-33、ZYBS-34、ZYBS-46、ZYBS-48，并以 4 份种质分别进行 10、25 μL 体系扩增验证，扩增程序和扩增结果检测与记录同前。

3 结果

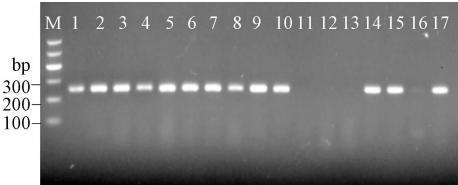
3.1 基因组 DNA 提取与检测 基因组 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均在 1.8 左右，平均质量浓度为 121.1 ng/μL，满足本实验要求，并将全部受试药材的终质量浓度调节至 20 ng/μL，-40 ℃ 下保存备用。

表 4 试验设计及结果

Tab.4 Design and results of tests

试验号	A 模板 DNA/ (ng·μL ⁻¹)	B 引物/ (μmol·L ⁻¹)	C 2 × PCR mix/μL	平均评分
1	5	4	5	8
2	5	8	8	14
3	25	8	8	14
4	15	4	8	9
5	25	12	5	16
6	15	8	5	15
7	15	8	5	15
8	25	4	5	9
9	15	12	8	17
10	5	12	5	14
11	15	4	2	1
12	15	12	2	1
13	25	8	2	1
14	15	8	5	15
15	15	8	5	14
16	5	8	2	1
17	15	8	5	13

3.2 扩增结果及赋值统计 图 1 显示，方案 9 的扩增条带最清晰，并且无杂带，赋值 17；方案 11 ~ 13、16 均无扩增，赋值 1；其余方案根据电泳实际情况赋值。



注：M 为 DNA Marker

图 1 PCR 产物电泳图

Fig.1 Electrophorogram of PCR products

3.3 响应面分析 将表 4 数据通过 Design-Expert 软件进行拟合，得到赋值评分（Y）回归方程为 $Y = 14.40 + 0.37A + 2.63B + 6.25C + 0.25AB + 2.00BC - 1.07A^2 - 1.57B^2 - 5.83C^2$ ，三因素一次项系数均为正值，表明随着各因素正向增加，相应响应值（赋值评分）也随之增大，同时三者二次项系数均为负值，表明该方程抛物面开口向下，拥有最大值，满足最佳扩增组合预测需求。

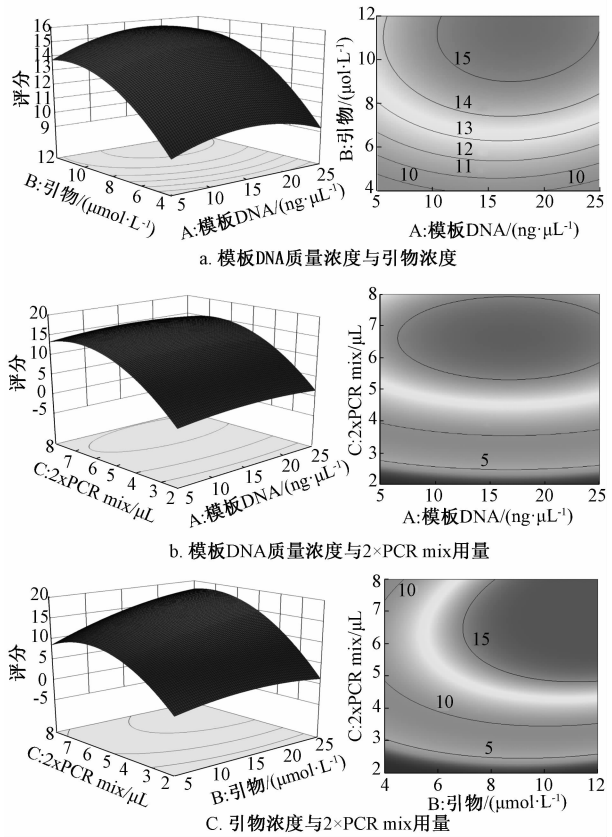
方差分析（表 5）显示，模型 $P < 0.000 1$ ，失拟项 $P > 0.05$ ， $R^2 = 0.985 8$ ， $R^2_{adj} = 0.967 6$ ，表明有 96.76% 的响应值可通过该模型予以确定；因素 B（引物浓度）、C（2 × PCR mix 用量） $P < 0.01$ ， B^2 、 C^2 $P < 0.05$ ，表明两者对于 SSR-PCR 体系扩增有显著影响，响应面分析^[30-31]见图 2。综上所述

述, 各因素影响程度依次为 2 × PCR mix 用量 > 引物浓度 > 模板 DNA 质量浓度。

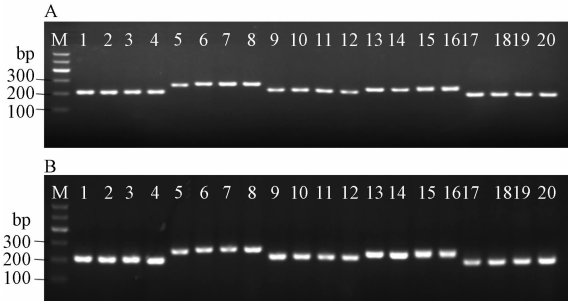
表 5 方差分析
Tab.5 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	552.17	9	61.35	54.02	<0.000 1
A	1.13	1	1.13	0.99	0.352 8
B	55.13	1	55.13	48.54	0.000 2
C	312.50	1	312.50	275.16	<0.000 1
AB	0.25	1	0.25	0.22	0.653 2
AC	0.00	1	0.00	0.000	1.000 0
BC	16.00	1	16.00	14.09	0.007 1
A ²	4.87	1	4.87	4.28	0.077 2
B ²	10.44	1	10.44	9.20	0.019 0
C ²	142.87	1	142.87	125.79	<0.000 1
残差	7.95	7	1.14	—	—
失拟项	4.75	3	1.58	1.98	0.259 3
绝对误差	3.20	4	0.80	—	—
总和	560.12	16	—	—	—

$R^2=0.985\ 8, R^2_{\text{adj}}=0.967\ 6$



由此可知, 最佳扩增组合为模板 DNA 质量浓度 1.60 ng/μL, 引物浓度 12 μmol/L, 2 × PCR mix 用量 6.98 μL, 其余用灭菌后的 ddH₂O 补足, 预测赋值评分 18.735, 再进行验证试验, 结果见图 3。由图可知, 在 10、25 μL 验证体系中, 5 对引物均能在 4 份种质中稳定扩增, 而且条带清晰、无杂带, 表明该组合扩增效果良好, 稳定可靠。



注: M 为 Marker, A 为 10 μL 扩增体系, B 为 25 μL 扩增体系, 1 ~ 4 为 ZYBS-17, 5 ~ 8 为 ZYBS-33, 9 ~ 12 为 ZYBS-34, 13 ~ 16 为 ZYBS-46, 17 ~ 20 为 ZYBS-48

图 3 扩增组合验证试验
Fig.3 Verification tests for amplification systems

4 讨论

PCR 是 SSR 分子标记技术相关研究的基础, 其结果易受 PCR 体系与扩增程序的影响, 并且不同物种对于 PCR 扩增的灵敏度和要求也不尽相同, 同时各影响因素之间还存在互作效应, 故对于白及 SSR-PCR 体系的构建与优化非常必要。

在设计因素选择中, 除了模板 DNA 与引物之外, 本实验还采用了当前市场中常用的 2 × PCR mix, 可让 PCR 实验程序更简便, 同时也更便于操作。通过对响应面设计方案的扩增分析得知, 5 个重复对照之间的扩增结果无明显差异, 表明结果稳定性良好; 通过拟合方程的方差分析可知, 白及 SSR-PCR 体系拟合方程模型可靠, 完全满足最佳体系预测计算的需求; 结合效应面图得知, 各因素对扩增结果的影响程度依次为 2 × PCR mix 用量 > 引物浓度 > 模板 DNA 质量浓度, 最佳扩增组合为模板 DNA 质量浓度 1.60 ng/μL, 引物浓度 12 μmol/L, 2 × PCR mix 6.98 μL。另外还发现, 2 倍 PCR mix 加入 PCR 反应体系时, 最佳使用量并非按照 2 × 来使用。

综上所述, 本实验探索出白及 SSR-PCR 中 DNA 模板质量浓度、引物浓度、2 × PCR mix 用量的最佳扩增配比组合, 从而避免了实验材料浪费,

图 2 各因素响应面图
Fig.2 Response surface plots for various factors

节省了时间和试剂耗材成本，为基于 SSR 分子标记技术的白及相关研究提供坚实基础。

参考文献：

[1] He X R, Wang X X, Fang J C, *et al.* *Bletilla striata*: Medicinal uses, phytochemistry and pharmacological activities [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 195: 20-38.

[3] Sun A J, Liu J Q, Pang S Q, *et al.* Two novel phenanthraquinones with anti-cancer activity isolated from *Bletilla striata*[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26(9): 2375-2379.

[3] 饶文龙, 张 浩, 张熹玮, 等. 白及药理作用研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2015, 49(8): 91-93.

[4] 蒋 俊, 陈红霞, 汤兴利, 等. 基于中医药美白理论的白及研发思考 [J]. 中草药, 2017, 48(11): 2313-2320.

[5] 陆峻波, 刘亚辉, 杨永红, 等. 从文献分析看我国白芨研究进展 [J]. 云南农业大学学报 (自然科学版), 2011, 26(2): 288-292.

[6] 仇 硕, 赵 健, 唐凤鸾, 等. 白及产业的发展现状、存在问题及展望 [J]. 贵州农业科学, 2017, 45(4): 96-98.

[7] Shi Y, Zhang B, Lu Y Y, *et al.* Antiviral activity of phenanthrenes from the medicinal plant *Bletilla striata* against influenza A virus [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17: 273.

[8] 石达理, 王孟虎, 陈思有, 等. 基于 ITS2 序列多种龙胆属植物及药材的 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 中药材, 2018, 41(1): 79-83.

[9] 丁 鸽, 张代臻, 丁小余, 等. 石斛资源分子水平研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(4): 208-215.

[10] 高 婷, 辛天怡, 宋洁洁, 等. 市售中药材冬葵子和苘麻子 ITS2 条形码鉴定 [J]. 中草药, 2017, 48(13): 2740-2745.

[11] 陈红波, 余金芮, 杨春先, 等. 药用植物研究中的分子标记技术应用进展 [J]. 湖北农业科学, 2017, 56(13): 2401-2405.

[12] 赵 丹, 周 涛, 江维克, 等. 基于 ITS2 序列 SNP 位点鉴定白及药材及其混伪品 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(18): 3573-3578.

[13] 管婧姣. 药用植物白及的遗传资源评价、组织培养与分子鉴定研究 [D]. 南京: 南京师范大学, 2013.

[14] Schlötterer C. The evolution of molecular markers-just a matter of fashion? [J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(1): 63-69.

[15] 徐 蕾, 刘 莉, 彭少丹, 等. 利用 SSR 标记研究铁皮石斛的遗传多样性 [J]. 分子植物育种, 2015, 13(7): 1616-1622.

[16] Yang G S, Wang Y, Sun C Y, *et al.* SSR analysis of genetic diversity of *Panax ginseng* [J]. *Med Plant*, 2010, 1(7): 50-53.

[17] Gulsen O, Uzun A, Canan I, *et al.* A new citrus linkage map based on SRAP, SSR, ISSR, POGP, RGA and RAPD markers [J]. *Euphytica*, 2010, 173(2): 265-277.

[18] 包文泉, 乌云塔娜, 赵 罕, 等. 基于 SSR 标记的仁用杏主栽品种鉴别和指纹图谱构建 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2017, 45(6): 163-169.

[19] 李海波, 丁红梅, 陈友吾, 等. 12 个油茶品种的 SSR 特征指纹鉴别 [J]. 中国粮油学报, 2017, 32(10): 171-178.

[20] 李 群, 张文兰, 田 茜, 等. 利用 SSR 标记技术鉴别玉米品种先玉 696 和先玉 335 的研究 [J]. 种子, 2017, 36(9): 121-123.

[21] 赵久云, 罗洪发, 江 燕, 等. 水稻窄叶突变体 Narrow leaf 11 (nal11) 的基因定位 [J]. 南方农业学报, 2017, 48(7): 1133-1138.

[22] 杨晓梦, 杜 娟, 曾亚文, 等. 大麦籽粒蛋白质及其相关功能成分含量的 QTL 分析 [J]. 中国农业科学, 2017, 50(2): 205-215.

[23] 李凌雨, 邢亚静, 闫彩清, 等. 用 SSR 标记进行玉米功能基因定位及 QTL 分析 [J]. 玉米科学, 2005, 13(4): 16-19.

[24] 周天华, 黎 君, 丁家玺, 等. 白及种质资源及其近缘物种的 SSR 指纹图谱研究 [J]. 西北植物学报, 2017, 34(7): 673-681.

[25] 黎 君, 杨 恒, 周天华. 白芨 SSR 引物筛选及群体遗传多样性研究 [J]. 西北植物学报, 2016, 36(7): 1343-1350.

[26] 贾新平, 孙晓波, 梁丽建, 等. 绣球 SSR-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. 华北农学报, 2016, 31(4): 68-73.

[27] 赵雅楠, 王 颖, 张东杰, 等. 小豆 SSR-PCR 反应体系优化及引物筛选 [J]. 江苏农业科学, 2017, 45(11): 33-37.

[28] 赵雅楠, 王 颖, 张东杰. 绿豆 SSR-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. 江苏农业科学, 2017, 45(8): 23-26.

[29] 李琳琳, 严 林, 王海春, 等. 枸杞棉蚜 SSR-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. 江苏农业科学, 2017, 45(7): 40-44.

[30] Ye Z, Wang W, Yuan Q, *et al.* Box-Behnken design for extraction optimization, characterization and *in vitro* antioxidant activity of *Cicer arietinum* L. hull polysaccharides [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 147: 354-364.

[31] 张 嘉, 沈丹虹, 郑晓冬, 等. 1 株高产油脂酵母菌株的诱变选育及其发酵条件研究 [J]. 浙江大学学报 (农业与生命科学版), 2009, 35(5): 497-502.