

麻楝 ISSR-PCR 反应体系的建立及优化

武冲, 仲崇禄, 张勇, 姜清彬, 陈羽, 陈珍

(中国林业科学研究院 热带林业研究所, 广东 广州 510520)

摘要: 模板 DNA、引物、三磷酸碱基脱氧核苷酸(dNTPs), 镁离子(Mg^{2+})浓度、*Taq* DNA 聚合酶的用量以及退火温度是影响简单序列重复区间扩增-聚合酶链式反应(ISSR-PCR)的主要因素。以麻楝 *Chukrasia tabularis* 叶片基因组 DNA 为试验材料, 系统地测试这 6 个因素对麻楝 ISSR-PCR 反应结果的影响。结果表明: 最优的反应体系为 20 μ L 反应体系中含 30 ng 模板 DNA, 1.00 μ mol \cdot L $^{-1}$ 随机引物, 0.15 mmol \cdot L $^{-1}$ dNTPs, 2.50 mmol \cdot L $^{-1}$ Mg^{2+} , 2.50 \times 16.67 nkat *Taq* DNA 聚合酶。最佳退火温度为 56 $^{\circ}$ C, ISSR-PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5.0 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 7.0 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。应用优化的 ISSR-PCR 反应体系对 24 份麻楝个体材料进行扩增, 均能扩增出丰富稳定的条带。图 8 表 1 参 27

关键词: 林木育种学; 麻楝; ISSR; PCR 条件; 优化

中图分类号: S722.3 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2012)04-0620-07

Establishment and optimization of an ISSR-PCR system for *Chukrasia tabularis*

WU Chong, ZHONG Chonglu, ZHANG Yong, JIANG Qingbin, CHEN Yu, CHEN Zhen

(Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou 510520, Guangdong, China)

Abstract: The genomic DNA from twenty-four varieties of germplasm material for *Chukrasia tabularis* leaves was systematically analyzed for template DNA, primer, dNTPs, Mg^{2+} concentration, dosage of *Taq* DNA polymerase, and annealing temperature with an inter simple sequence repeat(ISSR)-polymerase chain reaction (PCR). Results showed that the optimal reaction system for the ISSR was a 20 μ L system containing 30 ng template DNA, 1.00 μ mol \cdot L $^{-1}$ random primers, 0.15 mmol \cdot L $^{-1}$ dNTPs, 2.50 mmol \cdot L $^{-1}$ Mg^{2+} , and 2.50 \times 16.67 nkat *Taq* DNA polymerase. The optimal annealing temperature was 56 $^{\circ}$ C with the PCR procedure pre-denaturized at 94 $^{\circ}$ C for 5.0 min, denaturized at 94 $^{\circ}$ C for 45 s, and annealed at 56 $^{\circ}$ C for 45 s with an extension at 72 $^{\circ}$ C for 1.5 min, a reaction of 40 cycles, and re-extension at 72 $^{\circ}$ C for 7 min. These products were then stored at 4 $^{\circ}$ C. Results indicated that stable bands could be amplified. [Ch, 8 fig. 1 tab. 27 ref.]

Key words: forest tree breeding; *Chukrasia tabularis*; inter simple sequence repeat (ISSR); polymerase chain reaction (PCR) conditions; optimization

麻楝 *Chukrasia tabularis* 是中国热带和南亚热带珍贵乡土速生用材树种。麻楝木材纹理交错, 结构细且均匀, 质量及硬度属中等, 干燥状况良好, 干燥后木材稳定, 耐腐蚀, 易加工, 切面光泽性强, 用途广泛, 径面刨切单板花纹鲜艳夺目, 为胶合板材的优良贴面材料, 也是名贵高档家具、房屋建筑、室内装修、音箱、钢琴壳、雕刻、仪器箱盒等用途的高档木材^[1]。仲崇禄等^[2]初步分析了麻楝在中国华南地区的发展潜力, 建议在广东和福建种植麻楝人工林。此外, 麻楝还是一种药用树种^[3], 近年来对麻楝挥发油成分研究较多^[4-6]。目前, 对麻楝人工经营技术了解甚少, 同时世界上对麻楝遗传改良工作也刚刚

收稿日期: 2012-06-19; 修回日期: 2012-10-04

基金项目: 国家引进国际先进农业科学技术计划(“948”计划)项目(2009-4-02)

作者简介: 武冲, 博士研究生, 从事林木种质资源与遗传多样性研究。E-mail: wuchongge@163.com。通信作者: 仲崇禄, 研究员, 博士, 从事林木遗传育种等研究。E-mail: zclritf@gmail.com

开始, 还不了解麻楝种源变异规律以及人工林的生长特点等。因此, 了解麻楝的遗传变异结构, 开展麻楝种源筛选及有效繁殖技术以提高麻楝人工林产量等研究是亟待解决的重要问题。因此, 利用简单序列重复区间扩增 (ISSR) 标记技术探讨麻楝种质资源的遗传多样性, 对麻楝的开发和利用具有重要意义。ISSR (inter-simple sequence repeat) 是 1994 年 Zietkiewicz 等^[7]在简单重复序列 (SSR) 的基础上, 基于聚合酶链式反应 (PCR) 创建的一种新的分子标记技术, 现已在遗传图谱构建^[8-9]、基因定位^[10]、遗传多样性分析^[11]、种质资源鉴定^[12]等方面得到广泛应用。该标记具有模板需求量少, 操作简单, 成本低, 多态性丰富, 重复性好且稳定等优点^[13]。本研究以麻楝叶片基因组 DNA 为模板, 分析了模板 DNA 用量、引物浓度、三磷酸碱基脱氧核苷酸 (dNTPs)、镁离子 (Mg^{2+}) 浓度、*Taq* DNA 聚合酶用量及退火温度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响, 建立了适合麻楝 ISSR 分析的反应体系, 旨在为 ISSR 分子标记技术应用于麻楝的遗传变异分析、分子辅助育种、系统进化等研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

麻楝幼叶于 2012 年 2 月采自广州中国林业科学研究院热带林业研究所珍贵树种育苗基地 (2011 年 6 月播种) 半年生的麻楝幼苗。建立 ISSR-PCR 反应体系的试材基因组 DNA 为来自老挝 (LAOS) 种源的 2 个单株, 分别记为 L1 和 L2。

1.2 主要试剂和仪器

用于 ISSR-PCR 反应的 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、 Mg^{2+} 均购自上海生工生物技术有限公司, 引物序列由上海生工生物技术有限公司合成。DNA 浓度和纯度检测使用 NanoDrop 2000 紫外分光光度计 (Thermo Fisher)。PCR 反应在 Applied Biosystem PCR 仪上进行。

1.3 试验方法

1.3.1 麻楝基因组 DNA 的提取 麻楝基因组 DNA 提取是以十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法^[14]为基础, 结合其他多种提取方法进行优化^[15-16]。DNA 纯度及浓度用紫外分光光度计检测, 用 EB 染色后, $12.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。

1.3.2 ISSR-PCR 反应体系的优化 ISSR 基本反应体系为 $20.0\ \mu\text{L}$ 的反应体系, 其基本组成为 $2.0\ \mu\text{L}$ $10\times$ 缓冲液 (buffer) [三羟甲基氨基甲烷-盐酸 (Tris-HCl) $100.0\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 9.0), 氯化钾 (KCl) $100\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 表面活性剂 NP-40 $5.0\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 硫酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $80.0\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$], $1.00\times 16.67\ \text{nkat}$ *Taq* DNA 聚合酶, $0.1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs, $1.0\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mg^{2+} , $0.4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ISSR 引物, $20.0\ \text{ng}$ 模板 DNA, 最后补加双蒸水至 $20.0\ \mu\text{L}$ 。ISSR-PCR 基本扩增程序为 $94\ ^\circ\text{C}$ 预变性 $5.0\ \text{min}$, $94\ ^\circ\text{C}$ 变性 $30\ \text{s}$, $55\ ^\circ\text{C}$ 退火 $45\ \text{s}$, $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 $90\ \text{s}$, 40 次循环, 最后 $72\ ^\circ\text{C}$ 再延伸 $7.0\ \text{min}$, $4\ ^\circ\text{C}$ 保存。取 PCR 扩增产物 $10.0\ \mu\text{L}$ 加入 $2.0\ \mu\text{L}$ 的溴酚蓝染料混匀, 于 $18.0\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的琼脂糖凝胶上电泳, 然后在 UVP 型凝胶成像分析系统成相保存。根据预实验结果, 选定引物 807 (AGA GAG AGA GAG AGA GT) 为 ISSR 体系优化引物。反应体系的优化参数及各参数的优化梯度见表 1, 逐一优化每个参数, 优化后的参数保持不变, 再进行下一个参数的优化。

表 1 影响 ISSR-PCR 扩增的主要参数

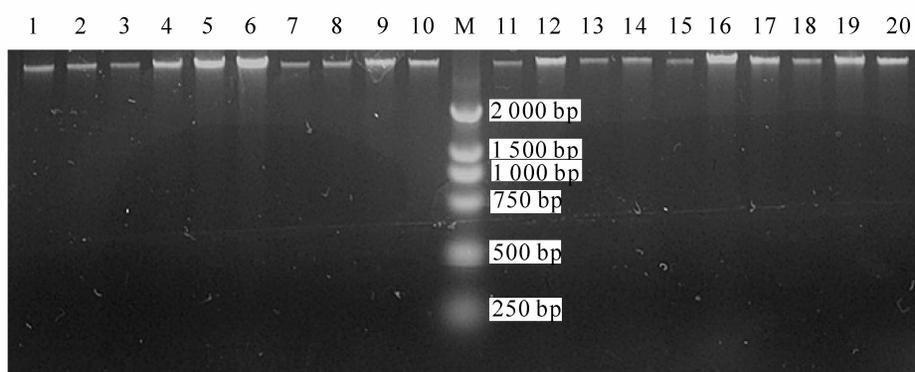
Table 1 Primary parameters influencing amplification of ISSR-PCR

梯度	模板 DNA/ng	引物浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	dNTPs/ $(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	镁离子/ $(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	<i>Taq</i> DNA 聚合酶/nkat	温度/ $^\circ\text{C}$
1	5	0.20	0.05	0	0.25×16.67	50
2	10	0.40	0.10	1.00	0.50×16.67	52
3	20	0.60	0.15	150	1.00×16.67	54
4	30	0.80	0.20	2.00	1.25×16.67	56
5	40	1.00	0.25	2.50	1.75×16.67	58
6	50	1.20	0.30	3.00	2.00×16.67	60

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 纯度及浓度测定

本试验提取的麻楝叶片基因组 DNA 呈无色絮状沉淀, 真空干燥后加 200.0 μL 1 \times TE 缓冲液溶解, 之后在紫外分光光度计上检测 DNA 纯度和浓度。结果表明: 麻楝基因组 DNA 的纯度 R 值 ($R=D(\lambda)_{260}/D(\lambda)_{280}$) 均为 1.8~1.9, 说明样品 DNA 中蛋白质、多糖等杂质含量较少, DNA 纯度高。DNA 电泳检测结果条带清晰, 质量较好(图 1)。说明用改良 CTAB 法提取的麻楝 DNA 可以满足后续的 ISSR-PCR 优化试验。



M: D2 000 DNA 梯度标记(ladder)

图 1 20 个样品的基因组电泳图

Figure 1 Electrophoresis pattern of genomic DNA from 20 samples

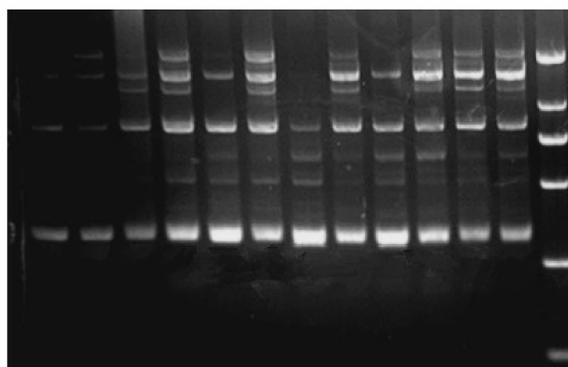
2.2 模板 DNA 浓度对 ISSR-PCR 的影响

模板 DNA 质量和用量是影响 ISSR-PCR 扩增能否实现的重要因素^[17]。低浓度的模板 DNA 扩增产物不稳定甚至无法扩增出目的产物, 而高浓度的模板 DNA 又会导致非特异性扩增^[18]。如图 2 所示, 当模板 DNA 为 5.0 ng 时, 扩增出的条带少且模糊; 模板 DNA 为 50.0 ng 时, 扩增条带模糊有阴影; 模板 DNA 为 20.0~40.0 ng 时, ISSR-PCR 扩增带型基本一致, 其中以模板为 30.0 ng 时条带明亮清晰, 扩增效率最高。因此, 20.0 μL 反应体系中模板 DNA 用量为 30.0 ng 对 ISSR-PCR 扩增较适合。

2.3 引物浓度对 ISSR-PCR 的影响

引物质量与浓度是 PCR 扩增特异性反应的关键, PCR 扩增产物的特异性取决于引物与模板 DNA 的互补程度^[19-20]。由图 3 知: 引物浓度为 0.2~1.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时均能扩增出条带, 当引物浓度为 0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

L1-1L1-2L1-3L1-4 L1-5L1-6L2-1L2-2L2-3L2-4L2-5L2-6 M L1-1L1-2L1-3L1-4 L1-5L1-6L2-1L2-2L2-3L2-4L2-5L2-6 M

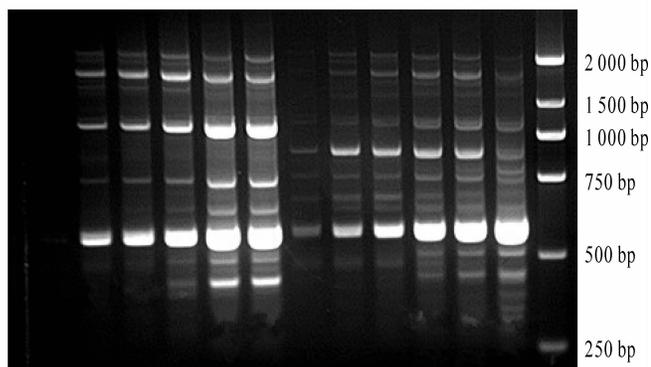


M: D2 000 DNA 梯度标记(ladder)

L1-1和L2-1, L1-2和L2-2, L1-3和L2-3, L1-4和L2-4, L1-5和L2-5, L1-6和L2-6模板分别为5, 10, 20, 30, 40, 50 ng

图 2 模板浓度对 ISSR 扩增的影响

Figure 2 Effects of template DNA concentrations on ISSR results



M: D2 000 DNA 梯度标记(ladder)

L1-1和L2-1, L1-2和L2-2, L1-3和L2-3, L1-4和L2-4, L1-5和L2-5, L1-6和L2-6引物浓度分别为0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

图 3 引物浓度对 ISSR 扩增的影响

Figure 3 Effects of primer concentrations on ISSR results

时, 扩增条带少且模糊; 当引物浓度为 $1.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 扩增条带有阴影; 引物浓度为 $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 扩增条带清晰、稳定。因此确定引物浓度为 $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时是 ISSR-PCR 反应体系的最适引物浓度。

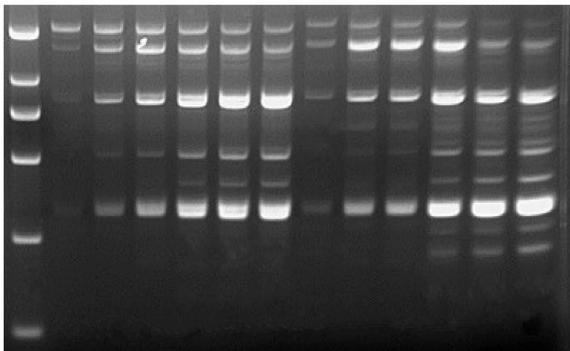
2.4 *Taq* DNA 聚合酶浓度对 ISSR-PCR 的影响

Taq DNA 聚合酶是 PCR 反应中最关键因素, 其质量与用量关系到扩增能否正常进行^[21], *Taq* DNA 聚合酶含量低使 PCR 反应扩增不出目的产物, *Taq* DNA 聚合酶用量过高也会产生非特异性扩增, 造成假阳性^[22]。本试验设置了 6 个 *Taq* DNA 聚合酶浓度梯度进行优化反应。在 $20.0 \mu\text{L}$ 反应体系中加 $0.25 \times 16.67 \text{ nkat}$ *Taq* DNA 聚合酶时, 扩增产物条带较少, 且不清晰; $(0.50 \sim 1.00) \times 16.67 \text{ nkat}$ 时, 条带虽然清晰, 但是没有扩增出小于 500 bp 的条带; $(2 \sim 3) \times 16.67 \text{ nkat}$ 时, 条带清晰, 扩增效率较高(图 4)。因此, 综合比较本试验选择 $2.50 \times 16.67 \text{ nkat}$ *Taq* DNA 聚合酶浓度为 $20 \mu\text{L}$ 反应体系的最适浓度。

2.5 镁离子(Mg^{2+})浓度对 ISSR-PCR 的影响

Mg^{2+} 浓度是 ISSR-PCR 反应的一个主要变化因素^[23]。 Mg^{2+} 作为 *Taq* DNA 聚合酶的辅助因子, Mg^{2+} 不仅可以影响 *Taq* DNA 聚合酶的活性, 还可以与反应体系中的 dNTPs, 模板 DNA 及引物结合, 从而影响引物与模板的结合效率和模板与 PCR 产物的解链温度以及产物的特异性以及引物二聚体的形成^[24]。本试验设置了 6 个 Mg^{2+} 浓度梯度进行优化反应。结果显示: Mg^{2+} 浓度为 $0 \sim 3.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 均可以扩增出条带; 虽然在对比反应体系中未加 Mg^{2+} , 但也可以扩增出条带产物, 这是因为缓冲液中含 Mg^{2+} , 但其含量不足以满足 PCR 反应所需用量, 所以扩增出的条带少且不清晰。综合比较, 当 Mg^{2+} 浓度为 $2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 条带最清晰, 主次分明(图 5)。因此, 确定 $2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为 ISSR-PCR 反应的最适 Mg^{2+} 浓度。

M L1-1L1-2L1-3L1-4 L1-5L1-6L2-1L2-2L2-3L2-4L2-5L2-6



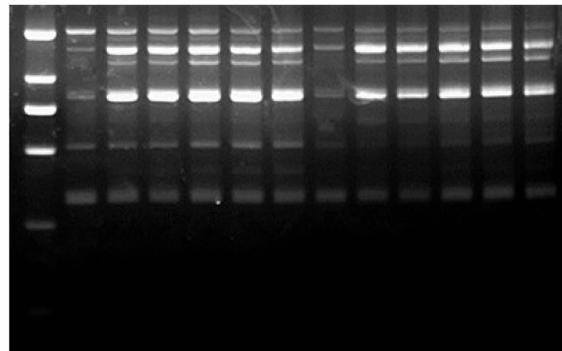
M: D2 000 DNA 梯度标记(ladder)

L1-1和L2-1, L1-2和L2-2, L1-3和L2-3, L1-4和L2-4, L1-5和L2-5, L1-6和L2-6 *Taq* 酶分别为 $(0.25, 0.50, 1.00, 1.25, 1.75, 2.00) \times 16.67 \text{ nkat}$

图 4 *Taq* DNA 聚合酶对 ISSR-PCR 的影响

Figure 4 Effects of *Taq* DNA polymerase concentrations on ISSR results

M L1-1L1-2L1-3L1-4 L1-5L1-6L2-1L2-2L2-3L2-4L2-5L2-6



M: D2 000 DNA 梯度标记(ladder)

L1-1和L2-1, L1-2和L2-2, L1-3和L2-3, L1-4和L2-4, L1-5和L2-5, L1-6和L2-6 镁离子(Mg^{2+})浓度分别为 $0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

图 5 Mg^{2+} 浓度对 ISSR-PCR 的影响

Figure 5 Effects of Mg^{2+} concentrations on ISSR results

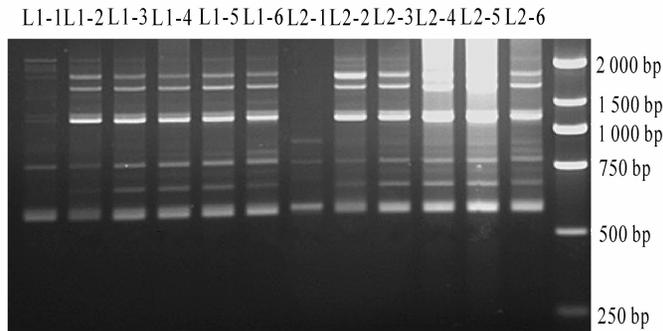
2.6 dNTPs 浓度对 ISSR-PCR 的影响

dNTPs 在 PCR 反应体系中为 DNA 序列扩增提供原料, 它的质量和浓度与 PCR 扩增效率有密切的关系^[25]。本试验设置了 6 个 dNTPs 浓度梯度进行优化反应。结果显示: dNTPs 浓度在 $0.05 \sim 0.30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时均可以扩增出条带, 而以 dNTPs 浓度为 $0.15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 扩增效率最高, 条带最清晰, 且主次分明; 当 dNTPs 浓度小于 $0.15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 扩增条带少, 条带很弱, 不清晰; 当 dNTPs 浓度大于 $0.15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 扩增条带出现阴影不清晰(图 6)。因此, 本试验采用 $0.15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 dNTPs 浓度为最适反应浓度。

2.7 退火温度对 ISSR-PCR 的影响

退火温度影响 ISSR-PCR 反应扩增条带的式样, 不同引物具有不同的最适退火温度(T_m)^[26]。本试验根据 ISSR 引物 807 的理论 T_m 值, 设置了 6 个温度梯度, 分别为 $50, 52, 54, 56, 58$ 和 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 。由图 7 知: 退火温度在 $50 \sim 60 \text{ }^\circ\text{C}$ 之间都可以扩增出条带, 但是在退火温度为 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 $52 \text{ }^\circ\text{C}$ 时, 扩增条带少, 且

条带模糊;当退火温度为 60 ℃时,扩增产物明显降低,且条带很弱;最终根据扩增产物的条带的多少和条带的清晰度,确定 56 ℃为引物 807 的最适退火温度(图 7)。

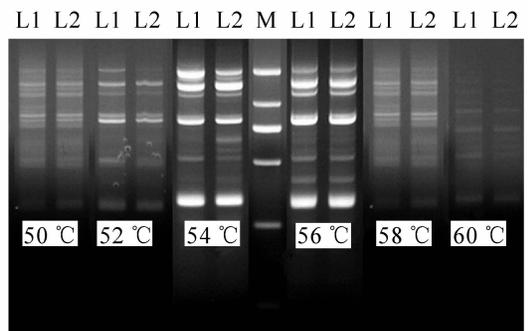


M: D2 000 DNA梯度标记(ladder)

L1-1和L2-1, L1-2和L2-2, L1-3和L2-3, L1-4和L2-4, L1-5和L2-5, L1-6和L2-6 dNTPs浓度分别为0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30 mmol·L⁻¹

图 6 dNTPs 对 ISSR-PCR 的影响

Figure 6 Effects of dNTPs concentrations on ISSR results



M: D2 000 DNA梯度标记(ladder)

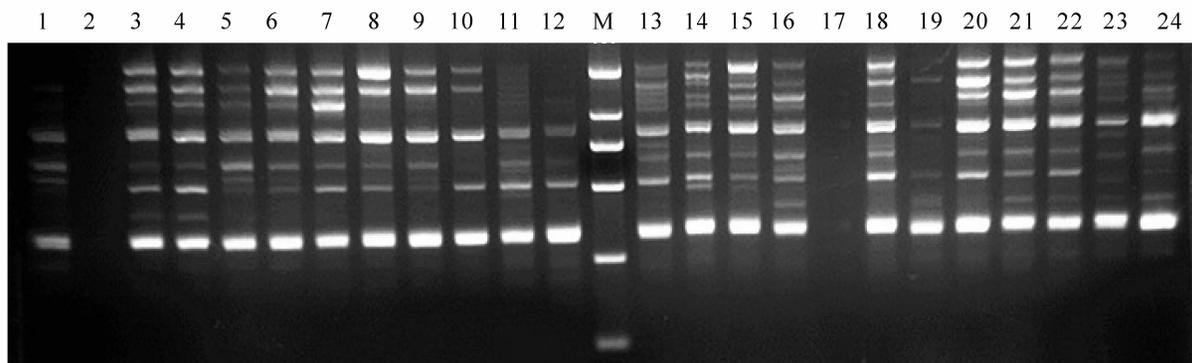
图 7 温度对 ISSR-PCR 的影响

Figure 7 Effects of temperature on ISSR results

3 结论与讨论

采用 ISSR 分子标记技术对麻楝种质资源进行遗传多样性研究,必须以高质量的 DNA 为材料基础,因此, DNA 的提取就显得尤为重要。试验证明:以改良十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法可以提取高质量的麻楝基因组 DNA。

ISSR 标记技术所使用的引物较长,退火温度较高,对 PCR 反应的敏感性较低,但基于 PCR 的分子标记受诸如退火温度、*Taq* DNA 酶用量、引物浓度、dNTPs 浓度以及 Mg²⁺浓度等因素的影响^[27]。为了得到具有较高的稳定性、可重复性和可靠的试验结果,我们对影响因子 *Taq* DNA 酶用量、Mg²⁺浓度、dNTPs 浓度、引物浓度进行了梯度试验,以 807(AGA GAG AGA GAG AGA GT)为引物,筛选出的麻楝最适宜 ISSR-PCR 反应体系(20 μL)含 30 ng 模板 DNA, 1.00 μmol·L⁻¹ 随机引物, 0.15 mmol·L⁻¹ dNTPs, 2.50 mmol·L⁻¹ Mg²⁺, 2.50×16.67 nkat *Taq* DNA 聚合酶,最佳退火温度为 56 ℃; ISSR-PCR 反应程序为 94 ℃预变性 5.0 min, 94 ℃变性 45 s, 56 ℃退火 45 s, 72 ℃延伸 1.5 min, 40 个循环, 72 ℃再延伸 7.0 min, 4 ℃保存。图 8 为 24 个样本的扩增效果图。



M: D2 000 DNA梯度标记(ladder)

图 8 24 个样本扩增效果

Figure 8 24 samples' amplification results

参考文献:

- [1] KALINGANIRE A, PINYOPUSARERK K. *Chukrasia: Biology, Cultivation and Utilisation*. ACIAR Technical Reports No.49 [R]. Canberra: CSIRO Forestry and Forest Products, 2000: 35.

- [2] 仲崇禄, 洪长福, 白嘉雨, 等. 麻楝属树种种源苗期试验及其在我国发展潜力分析[J]. 广东林业科技, 2001, **17**(4): 11 - 16.
ZHONG Honglu, HONG Changfu, BAI Jiayu, *et al.* An experiment on ten provenances of *Chukrasia* seedlings and their analysis on development potential in southern China [J]. *J Guangdong For Sci Technol*, 2001, **17**(4): 11 - 16.
- [3] PURUSHOTHAMAN K K, SARADA A, MATHURAM V, *et al.* Pharmacognostic and chemotaxonomic studies of some Indian medicinal plants [J]. *Acta Hort*, 1988, **188** A: 165 - 167.
- [4] RAJBIR K, SAROJ A. Chemical constituents and biological activities of *Chukrasia tabularis* A. Juss.: a review [J]. *J Med Plants Res*, 2009, **3**(4): 196 - 216.
- [5] RAJBIR K, UPENDRA S, BIKRAM S, *et al.* Antimutagenic and antioxidant characteristics of *Chukrasia tabularis* A. Juss. extracts [J]. *Int J Toxicol*, 2011, **30**: 21 - 34.
- [6] RAJBIR K, UPENDRA S, BIKRAM S. Antioxidant activity of the phenol rich fractions of leaves of *Chukrasia tabularis* A. Juss. [J]. *Bioresour Technol*, 2008, **99**: 7862 - 7869.
- [7] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, **20**(2): 176 - 183.
- [8] BORNET B, BRANCHARD M. Nonanchored inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome finger-printing [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2001, **19**(3): 209 - 215.
- [9] SANKAR A A, MOORE G A. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in *Citrus* and extension of the genetic linkage map [J]. *Theor Appl Gen*, 2001, **102**(2/3): 206 - 214.
- [10] RATNAPARKHE M B, SANTRA D K, TULLU A, *et al.* Inheritance of inter-simple-sequence-repeat polymorphisms and linkage with a fusarium wilt resistance gene in chickpea [J]. *Theor Appl Gen*, 1998, **96**(3/4): 348 - 353.
- [11] LUAN S, CHIANG T Y, GONG X. High genetic diversity vs. low genetic differentiation in *Nouelia insignis* (Asteraceae), a narrowly distributed and endemic species in China, revealed by ISSR finger tinting [J]. *Ann Bot*, 2006, **98**(3): 583 - 589.
- [12] ESCANDON A S, ZELENER N, de la TONE M P, *et al.* Molecular identification of new varieties of *Nierembergia linariaefolia* (Graham), a native *Argentinean ornamental* plant [J]. *J Appl Gen*, 2007, **48**(2): 115 - 123.
- [13] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学中的应用[J]. 遗传, 2002, **24**(5): 613 - 616.
WANG Jianbo. ISSR markers and their applications in plant genetics [J]. *Hereditas*, 2002, **24**(5): 613 - 616.
- [14] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isohtion procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytechem Bull*, 1987, **19**: 11 - 15.
- [15] 刘军. 毛红椿天然居群遗传结构的研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2007.
LIU Jun. *The Study of Natural Population Genetic Structure of Pubescens*[D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2007.
- [16] 高大伟. 樟科植物 DNA Barcode 及香樟系统地理学的初步研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2008.
GAO Dawei. *Preliminary Study of Lauracese Plants DNA Barcode and Camphor Phylogeography* [D]. Shanghai: East China Normal University, 2008.
- [17] 曹嵩晓, 李娟玲, 刘国民, 等. 利用单因子和正交设计双重实验方法优化广藿香 ISSR-PCR 实验体系[J]. 热带生物学报, 2011, **2**(1): 35 - 41.
CAO Songxiao, LI Juanling, LIU Guomin, *et al.* Optimization of ISSR-PCR experimental system for *Pogostemon cabfin* with the dual experiment methods of the single factor and the orthogonal design [J]. *J Trop Org*, 2011, **2**(1): 35 - 41.
- [18] 杨华, 宋绪忠, 尹光天, 等. 黄藤 ISSR 反应体系的条件优化[J]. 福建林学院学报, 2006, **26**(2): 152 - 155.
YANG Hua, SONG Xuzhong, YIN Guangtian, *et al.* Optimization of ISSR reaction system for *Daemonorops margaritae* [J]. *J Fujian Coll For*, 2006, **26**(2): 152 - 155.
- [19] 张维铭. 现代分子生物学实验手册[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 251.
- [20] 姜荣波, 姜景民, 刘军, 等. 红楠 ISSR-PCR 反应体系的建立和优化[J]. 林业科学研究, 2011, **24**(2): 194 - 199.
JIANG Rongbo, JIANG Jingmin, LIU Jun, *et al.* Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction system' of

- Machilus thunbergii* [J]. *For Res*, 2011, **24**(2): 194 – 199.
- [21] 马琴. 基于 ISSR 分子标记的肉苁蓉遗传多样性分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2011
MA Qin. *Based on ISSR Molecular Marker Analysis of Genetic Diversity of Cistanche* [D]. Huhhot: Inner Mongolia University, 2011.
- [22] 曲超, 孙群, 丁自勉, 等. 栝楼 ISSR-PCR 反应体系的建立和优化[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, **28**(1): 127 – 131.
QU Chao, SUN Qun, DING Zimian, *et al.* Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction system of *Trichosanthes kirilowii* Maxim [J]. *Gen Appl Biol*, 2009, **28**(1): 127 – 131.
- [23] 袁德义, 何小勇, 莫文娟, 等. 朱砂根 ISSR 反应体系的建立与优化[J]. 浙江林业科技, 2008, **28**(4): 60 – 63.
YUAN Deyi, HE Xiaoyong, MO Wenjuan, *et al.* Optimization of ISSR reaction condition in *Ardisia crenata*[J]. *J Zhejiang For Sci Technol*, 2008, **28**(4): 60 – 63.
- [24] 乔燕春, 林顺权, 杨向晖, 等. 均匀设计在枇杷 ISSR-PCR 反应体系优化中的应用[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, **28**(1): 123 – 126.
QIAO Yanchun, LIN Shunquan, YANG Xianghui, *et al.* Uniform design in loquat ISSR-PCR reaction system optimization [J]. *Gen Appl Biol*, 2009, **28**(1): 123 – 126.
- [25] 莫文娟. 泡桐种质资源遗传多样性的 ISSR 研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2011.
MO Wenjuan. *ISSR Study of Paulownia germplasm Resources Genetic Diversity* [D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2011.
- [26] 王彦华, 侯喜林, 徐明宇. 正交设计优化不结球白菜 ISSR 反应体系研究[J]. 西北植物学报, 2004, **24**(5): 899 – 902.
WANG Yanhua, HOU Xilin, XU Mingyu. Study on optimization for ISSR reaction system in *Brassica campestris* ssp. *chinensis* using orthogonal design [J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2004, **24**(5): 899 – 902.
- [27] 冯夏莲, 何承忠, 张志毅, 等. 毛白杨 ISSR 反应体系的建立及优化[J]. 北京林业大学学报, 2006, **28**(3): 61 – 65.
FENG Xialian, HE Chengzhong, ZHANG Zhiyi, *et al.* Establishment and optimization of an ISSR reaction system for *Populus tomentosa* Carr.[J]. *J Beijing For Univ*, 2006, **28**(3): 61 – 65.