

香榧 ISSR-PCR 扩增条件的优化和引物筛选

叶生月¹, 陈 钢¹, 张 慧², 刘建杰¹, 曾燕如¹, 吴慧敏¹

(1. 浙江林学院 浙江省现代森林培育技术重点实验室, 浙江 临安 311300; 2. 浙江省临安市林业局, 浙江 临安 311300)

摘要: 以香榧 *Torreya grandis* ‘Merrillii’ 基因组 DNA 为材料, 对影响简单序列重复区间扩增-聚合酶链式反应 (ISSR-PCR) 的 *Taq* 酶用量、 Mg^{2+} 浓度、模板 DNA 用量、磷酸碱基脱氧核苷酸 (dNTPs) 浓度和引物浓度等进行了优化试验。优化后的香榧 ISSR-PCR 扩增体系为: 总容积 20 μ L, 包括 30 ng 模板 DNA, 16.67 nkat *Taq* 酶, 0.350 μ mol·L⁻¹ 引物, 1.625 mmol·L⁻¹ Mg^{2+} , 0.250 mmol·L⁻¹ dNTPs, 10 × PCR buffer 2 μ L。PCR 扩增程序: 94 °C 变性 5.0 min; 35 个循环: 94 °C 变性 30 s, 退火 45 s, 退火温度视引物而定, 72 °C 延伸 1.5 min; 最后 72 °C 延伸 7.0 min, 4 °C 保温。在此基础上, 从 77 个 ISSR 引物中筛选出 34 个适合香榧 ISSR 分析的引物, 且通过梯度 PCR 确定了各自最适的退火温度。研究结果为香榧遗传图谱构建打下了基础。图 4 表 1 参 12

关键词: 经济林学; 香榧; ISSR-PCR; 引物筛选

中图分类号: S664.5; S722.3

文献标志码: A

文章编号: 1000-5692(2010)01-0087-06

Optimization of an ISSR-PCR system and primer screening for *Torreya grandis* ‘Merrillii’

YE Sheng-yue¹, CHEN Gang¹, ZHANG Hui², LIU Jian-jie¹, ZENG Yan-ru¹, WU Hui-min¹

(1. The Key Laboratory for Modern Silvicultural Technology of Zhejiang Province, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. Forest Enterprise of Lin'an City, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: With genomic DNA of *Torreya grandis* ‘Merrillii’, an optimization experiment was performed in terms of *Taq* DNA polymerase, Mg^{2+} , DNA template, deoxynucleotide triphosphates (dNTP)s, and primer concentration. The optimized system was as follows: a total polymerase chain reaction (PCR) volume of 20 μ L included 30 ng DNA, 16.67 nkat *Taq* polymerase, 0.350 μ mol·L⁻¹ primer, 1.625 mmol·L⁻¹ Mg^{2+} , 0.250 mmol·L⁻¹ dNTPs, and 2 μ L 10 × PCR buffer. Then, a PCR amplification program was established with denaturing at 94 °C for 5.0 min followed by 35 cycles of denaturing at 94 °C for 30 s, annealing for 45 s (annealing temperatures varied with primers) with extension at 72 °C for 1.5 min, extension at 72 °C for 7 min, and finally maintained at 4 °C. Based on this optimized system, 34 inter simple sequence repeat (ISSR) primers suitable for the species were screened from 77 primers with gradient PCR being used to propose the optimal annealing temperature. This experimental result has laid a foundation for genetic map construction in *T. grandis* ‘Merrillii’. [Ch, 4 fig. 1 tab. 12 ref.]

Key words: cash forestry; *Torreya grandis* ‘Merrillii’; inter simple sequence repeats (ISSR)-polymerase chain reaction(PCR); primer screening

收稿日期: 2009-01-06; 修回日期: 2009-04-10

基金项目: “十一五”浙江省科技计划项目(2008C2200); 浙江省重中之重学科开放基金资助项目(200505, 200602)

作者简介: 叶生月, 硕士, 从事林木生物技术研究。E-mail: ye_moon@163.com。通信作者: 曾燕如, 教授, 博士, 从事经济林培育与利用等研究。E-mail: yzeng@zjfc.edu.cn

ISSR(inter-simple sequence repeat, 简单序列重复区间扩增)是 Zietkiewicz 等于 1994 年在 SSR(simple sequence repeat, 简单序列重复标记)的基础上创建的基于 PCR (polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应)扩增的一种分子标记技术^[1], 其基本原理是在 SSR 的 5' 或 3' 端加 1~4 个锚定碱基, 并以此为引物, 来检测 2 个 SSR 之间的一段短 DNA 序列差异。它在引物设计上比 SSR 技术简单得多, 不需要知道 DNA 序列即可用引物进行扩增, 可揭示比 RFLP (restriction fragment length polymorphism, 限制性扩增片段长度多态性), RAPD(random amplified polymorphic DNA, 随机扩增多态性 DNA), SSR 更为丰富的多态性, 应用较为广泛^[2]。香榧 *Torreya grandis* 'Merrillii' 又名榧树、玉榧、野杉子, 为红豆杉科 Taxaceae 榧属 *Torreya* 常绿乔木, 是集果用、油用、药用、材用、绿化和观赏等为一体的多用途优良经济树种, 尤其以名贵干果著称。为构建高质量的香榧遗传图谱, 本研究针对可能引起香榧 ISSR-PCR 反应体系变化的 5 个影响因素进行了优化研究, 以建立一个适合香榧的 ISSR-PCR 反应体系, 并且对 77 个 ISSR 引物进行了筛选和退火温度梯度试验, 以获得扩增条带清晰, 多态性高, 可重复性强的引物及其在香榧 ISSR-PCR 反应中的最适退火温度, 满足香榧遗传图谱构建的需要。

1 材料与方法

1.1 材料

材料取自浙江林学院智能温室内香榧 3 年生半同胞子代作图群体植株的嫩叶。

引物 ISSR-1 到 ISSR-77 由上海生工生物工程技术有限公司合成; 二磷酸碱基脱氧核苷酸(dNTPs)购自上海生工生物工程技术有限公司; *Taq* DNA 聚合酶购自上海申能博彩生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 采用改良高盐十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取嫩叶 DNA 后琼脂糖凝胶电泳检测, 同时用 DV800 分光光度计(Beckman Coulter)测定吸光度值 D_{260} , D_{280} 及其比值, 以此来检测 DNA 的质量, 并计算 DNA 质量浓度。根据测定结果将各 DNA 质量浓度稀释到 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2.2 香榧 ISSR-PCR 反应体系的优化 PCR 扩增反应在 MJ RESEARCH PTC-200 上进行。基本 ISSR-PCR 反应体系为: 总容积 $20 \mu\text{L}$, 包括 20 ng 模板 DNA, $1.5 \times 16.67 \text{ nkat}$ *Taq* 酶, $0.250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物, $1.375 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$, $0.250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs, $10 \times \text{PCR buffer}$ $2 \mu\text{L}$ 。在此基础上依次对 *Taq* 酶用量、 Mg^{2+} 浓度、模板 DNA 用量、dNTPs 浓度和引物浓度等进行优化, 各个合适参数确定后, 作为后续研究的一个固定参数。*Taq* 酶设 0.5×16.67 , 1.0×16.67 , 1.5×16.67 和 $2.0 \times 16.67 \text{ nkat}$ 共 4 个梯度; Mg^{2+} 设 1.125 , 1.375 , 1.625 , 1.875 和 $2.125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 共 5 个浓度梯度; DNA 模板量设 5 , 10 , 30 , 50 , 70 和 90 ng 共 6 个梯度; dNTPs 设 0.15 , 0.25 , 0.35 , 0.45 和 $0.55 \text{ mmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 共 5 个浓度梯度; 引物设 0.15 , 0.25 , 0.35 , 0.45 和 $0.55 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 共 5 个浓度梯度。PCR 反应条件: $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5.0 min ; $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s , $52.4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s , $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min , 35 个循环; $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 7.0 min , $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温。各影响因素的优化均采用上述 PCR 反应条件。扩增产物在质量浓度为 $1.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 并加有溴化乙锭(EB)的琼脂糖凝胶中电泳分离, 150 V 电压下电泳 30.0 min 。电泳结果在 Alpha Imager 成像系统(美国 Alpha Innotech Corporation)上拍照储存。

1.2.3 引物筛选和退火温度梯度试验 利用上述初步优化的 PCR 反应体系和反应条件, 用 77 个 ISSR 引物对 4 个单株香榧基因组 DNA 进行 PCR 扩增。理论解链温度(T_m)值相近的引物在同一个退火温度下扩增, 选取能扩增出条带且条带比较清晰的引物进行下一步退火温度梯度试验。退火温度梯度的范围根据引物合成单上提供的 T_m 值加减 $6 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右形成。退火温度梯度试验后, 选择最适退火温度下条带清晰, 结果稳定, 多态性强, 背景浅的引物; 淘汰掉虽然有条带, 但经退火温度试验后仍不能获得较好效果的引物。因此, 引物筛选实际上进行了 2 次。

2 结果与分析

2.1 DNA 的提取

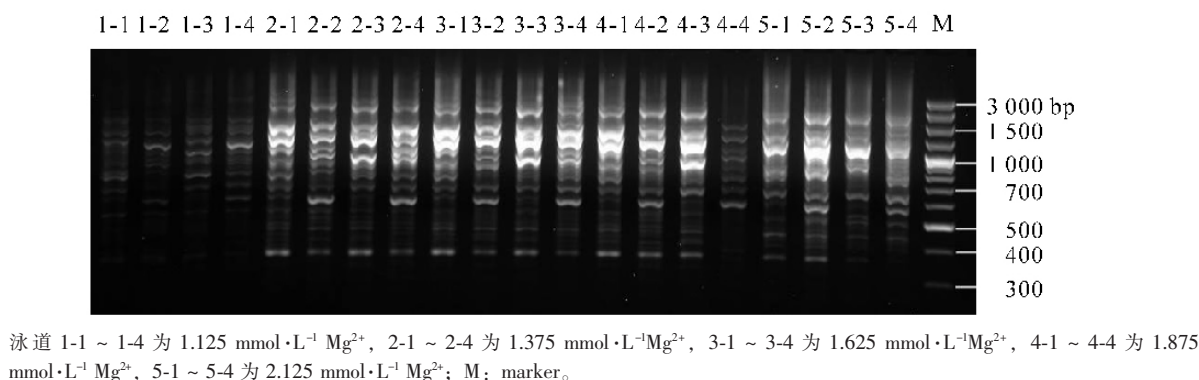
高质量的香榧 DNA 是进行 ISSR-PCR 的基础。采用改良高盐 CTAB 法提取的 DNA 呈无色絮状沉

淀, 电泳结果显示 DNA 完整, 无降解, 无 RNA 污染, 点样孔较干净。DNA 的吸光度 D_{260}/D_{280} 值为 1.75 ~ 1.90, 多数在 1.82 左右, 表明改良高盐 CTAB 法提取的香榧基因组 DNA 质量高, 可以满足分子标记分析的需要。

2.2 香榧 ISSR-PCR 反应体系的优化

2.2.1 *Taq* 酶用量对 ISSR-PCR 反应的影响 *Taq* 酶是影响 PCR 反应的重要因素。增加 *Taq* 酶量会导致反应特异性下降, 过低 *Taq* 酶量又会使合成效率降低, 条带消失。同时不同厂家的酶或者同一厂家不同批次的酶扩增效果也存在差异^[3]。本研究中, 当 *Taq* 酶用量为 0.5×16.67 nkat 时, 扩增产物较弱, 部分条带消失; 当增加到 2.0×16.67 nkat 时, 在 700 ~ 1 500 bp 间的主带亮成一片不能区分; *Taq* 酶用量在 $(1.0 \sim 1.5) \times 16.67$ nkat 时, 条带清晰, 扩增效果好。由于 *Taq* 酶用量为 1.0×16.67 nkat 时, 背景更浅, 条带易于辨读, 同时考虑经济因素, 本研究选择 1.0×16.67 nkat 为香榧 ISSR-PCR 反应体系中 *Taq* 酶最佳用量。

2.2.2 Mg^{2+} 浓度对 ISSR-PCR 反应的影响 Mg^{2+} 在 PCR 中通过影响 *Taq* 酶活性而间接影响 PCR 扩增^[4], 它还能与反应液中的 dNTPs、模板 DNA 及引物结合, 影响引物与模板的结合效率、模板与 PCR 产物的解链温度以及产物的特异性和引物二聚体的形成^[5]。本研究中, 随着 Mg^{2+} 浓度的增加, 产物逐渐增多; 当 Mg^{2+} 浓度为 $1.875 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 700 bp 以上部分条带分辨不清; 在 $2.125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 有的条带甚至消失; Mg^{2+} 浓度为 $1.375 \sim 1.625 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 都得到了较好的扩增(图 1)。考虑 $1.625 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时条带明亮, 条带亮度和条带清晰度达到一个平衡, 本研究选择 $1.625 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为香榧 ISSR-PCR 反应体系中 Mg^{2+} 的最佳浓度。



泳道 1-1 ~ 1-4 为 $1.125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$, 2-1 ~ 2-4 为 $1.375 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$, 3-1 ~ 3-4 为 $1.625 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$, 4-1 ~ 4-4 为 $1.875 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$, 5-1 ~ 5-4 为 $2.125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$; M: marker。

图 1 Mg^{2+} 浓度对 ISSR-PCR 的影响

Figure 1 Effects of Mg^{2+} concentration on ISSR-PCR

2.2.3 模板 DNA 用量对 ISSR-PCR 反应的影响 模板 DNA 用量也是影响 ISSR-PCR 扩增的重要因素之一。本研究中, 模板 DNA 用量为 5 ~ 90 ng, 均能扩增出清晰的条带, 扩增效果差异不大, 说明香榧 ISSR-PCR 反应对模板量变化反应不灵敏, 这与前人在其他物种上的研究结论一致^[6-9]。本研究选择 30 ng 为香榧 ISSR-PCR 反应体系中的模板 DNA 用量。

2.2.4 dNTPs 浓度对 ISSR-PCR 反应的影响 dNTPs 是扩增反应的原料, dNTPs 浓度的高低直接影响 PCR 扩增的效果。本研究中, dNTPs 在 $0.150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 扩增产物少, 条带弱, 主带不明显; 当浓度增至 $0.350 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 700 bp 以上主带减弱, 部分消失, PCR 扩增受到了抑制; dNTPs 增至 $0.450 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后基本不能扩增出条带(图 2)。dNTPs 浓度 $0.250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 扩增效果较好, 所以选择 $0.250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为香榧 ISSR-PCR 反应体系中最佳 dNTPs 浓度。

2.2.5 引物浓度对 ISSR-PCR 反应的影响 引物的浓度会影响特异性, 较高的引物浓度会导致非特异性产物扩增。本研究中, 引物浓度偏低时, 大片段产物优先扩增, 引物浓度偏高时, 小片段产物得到优先扩增。为得到合适片段大小的 PCR 产物, 选择了 $0.350 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为香榧 ISSR-PCR 反应体系中引物的最佳浓度。

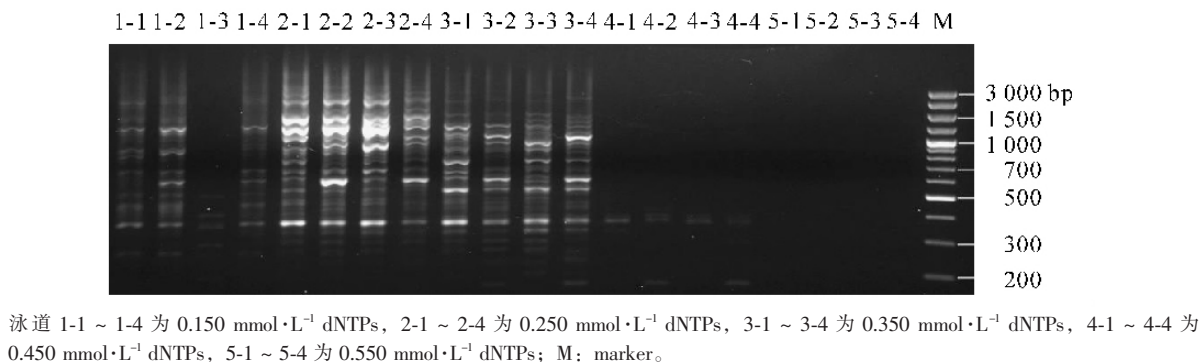


图 2 dNTPs 浓度对 ISSR 的影响

Figure 2 Effects of dNTPs concentrations on ISSR-PCR

2.2.6 引物筛选和退火温度梯度试验 采用初步优化的 PCR 体系, 用 77 个 ISSR 引物对 4 个香榧基因组 DNA 进行了扩增, 选择能扩增出条带的引物进行退火温度梯度试验, 以期获得最佳的退火温度。引物 ISSR-36 在 $46 \sim 58 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 内, 由 PCR 仪自动生成 12 个退火温度: 46.0, 46.3, 47.1, 48.0, 49.4, 51.1, 53.2, 54.9, 56.2 和 57.1 $^{\circ}\text{C}$ 。图 3 显示的是其在前 10 个退火温度下的扩增结果。退火温度过低时扩增特异性差, 大片段产物较多, 且集中不易分辨; 退火温度过高时, 产物偏少, 条带弱, 部分条带消失。当退火温度在 $53.2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 时扩增产物清晰, 背景浅, 片段大小分布均匀。因此选择 $53.2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 为引物 ISSR-36 的最适退火温度。用同样的方法从 77 个 ISSR 引物中初筛出 49 个能扩增出条带的引物, 并进行退火温度试验(引物二次筛选), 最终筛选出 34 个适合香榧 ISSR 分析的引物及引物各自最适的退火温度(表 1)。

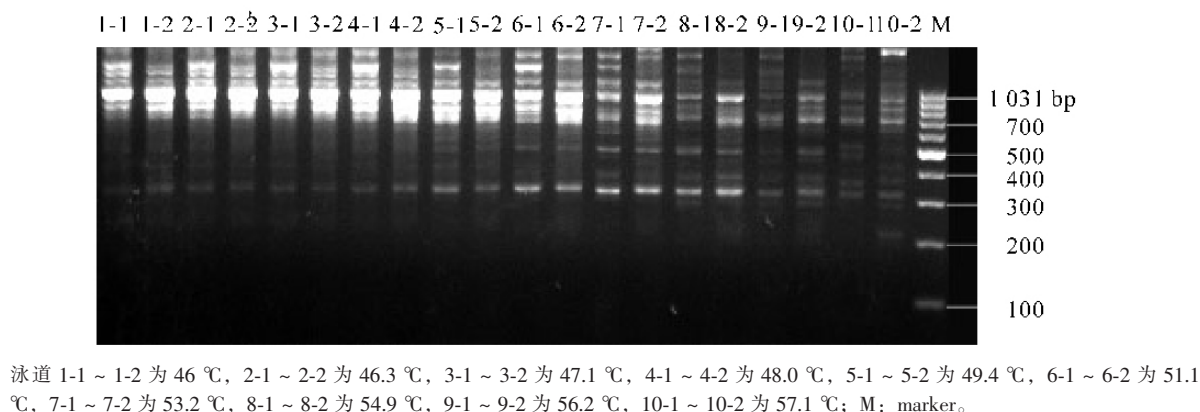


图 3 退火温度对 ISSR 分析的影响(引物 ISSR-36)

Figure 3 Effects of annealing temperatures on ISSR-PCR

3 讨论

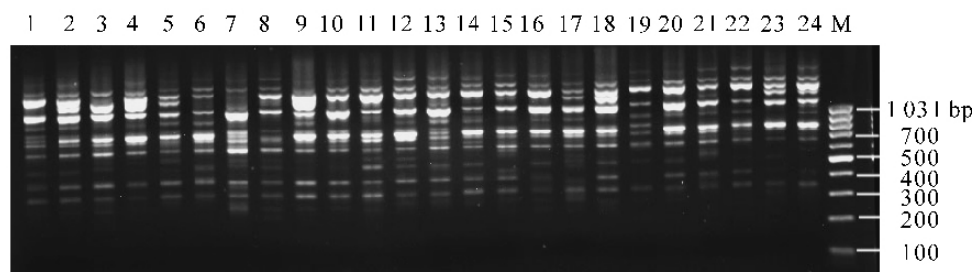
ISSR 与其他许多分子标记一样, 都是基于 PCR 技术的随机扩增, 其最终结果易受多种因素的干扰(模板 DNA, *Taq* 酶, 引物, dNTPs 以及 Mg^{2+} , 引物退火温度等), 其中一个因素的改变都会影响整个实验结果^[10]。戴正等^[11]应用 ISSR 标记对香榧 9 个实生品种和 8 个优良无性系的聚类结果, 与传统的形态学上的分类(圆籽型和长籽型)以及张党权^[12]的研究结果完全不同, 这与 ISSR 和 RAPD 等分子标记的不稳定性有关, 他们采用重复试验并读取仅在重复试验中出现的条带用于数据分析的方法来增加实验结果的可靠性, 在样品数量小的试验中是可以的, 但在如香榧遗传图谱构建那样需要样本数量大时则不适合。因此, 诸如 ISSR 标记实验体系的建立对后续的研究来讲很重要。

利用优化后的体系和筛选获得的引物, 对用于香榧遗传图谱构建的半同胞子代群体样品 DNA 进

表 1 ISSR 分析引物、序列及退火温度

Table 1 Sequences and annealing temperatures of ISSR primers screened

引物编号	序列	退火温度/℃	引物编号	序列	退火温度/℃
ISSR-1	ACACACACACACACT	55.3	ISSR-49	TGTGTGTGTGTGTGAC	51.7
ISSR-4	ACACACACACACACAG	51.8	ISSR-52	TGTGTGTGTGTGTGGA	53.6
ISSR-5	ACACACACACACACTG	57.8	ISSR-56	AGAGAGAGAGAGAGATT	50.1
ISSR-17	GACAGACAGACAGACA	48.1	ISSR-59	AGAGAGAGAGAGAGGCC	54.2
ISSR-23	ACACACACACACACTA	52.4	ISSR-61	AGAGAGAGAGAGAGGTT	50.4
ISSR-28	TGTGTGTGTGTGTGCC	58.2	ISSR-62	AGAGAGAGAGAGAGCCA	56.0
ISSR-32	AGAGAGAGAGAGAGAC	57.8	ISSR-63	AGAGAGAGAGAGAGCT	56.9
ISSR-33	AGAGAGAGAGAGAGAT	55.9	ISSR-64	AGAGAGAGAGAGAGCG	55.9
ISSR-34	AGAGAGAGAGAGAGAA	55.9	ISSR-65	AGAGAGAGAGAGAGCC	54.2
ISSR-35	AGAGAGAGAGAGAGTA	58.2	ISSR-67	TCTCTCTCTCTCTCC	50.0
ISSR-36	AGAGAGAGAGAGAGTC	53.2	ISSR-68	TCTCTCTCTCTCTCAG	50.1
ISSR-39	ACGACGACGACGACG	57.3	ISSR-69	TCTCTCTCTCTCTCTG	46.3
ISSR-40	ACCACCACCACCACC	57.3	ISSR-70	TCTCTCTCTCTCTCGA	47.1
ISSR-42	ACACACACACACACCG	55.9	ISSR-71	TCTCTCTCTCTCTCGG	51.0
ISSR-44	ACACACACACACACGA	53.2	ISSR-74	ACTGACTGACTGACTG	55.3
ISSR-46	ACACACACACACACGG	55.9	ISSR-76	AGTCAGTCAGTCAGTC	50.0
ISSR-48	TGTGTGTGTGTGTGAA	50.1	ISSR-77	ACTCACTCACTCACTC	52.2



泳道 1~24: 24 个香榧半同胞子代个体 DNA; M: marker。

图 4 香榧部分半同胞子代个体 ISSR 分析结果(引物 ISSR-68)

Figure 4 ISSR profiles generated by primer ISSR-68 for 24 semi-sib *Torreya grandis* 'Merrillii' individuals

行了 ISSR 分析, 获得了高质量结果。图 4 是引物 ISSR-68 在 24 个香榧半同胞个体中的扩增结果, 扩增的条带清晰明亮, 背景浅, 说明经过优化后的体系是适合香榧 ISSR 分析要求的, 实验结果为今后香榧遗传图谱的构建打下了坚实的基础。

参考文献:

- [1] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKIA A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, **20** (2): 176 – 183.
 - [2] ARCADE A, ANSELIN F, RAMPART P F, *et al.* Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, **100** (2): 299 – 307.
 - [3] 朱柏芳, 朱笃, 邓荣根, 等. 穗花杉 ISSR 引物反应条件的优化与筛选[J]. *植物研究*, 2006, **26** (3): 318 – 322.
- ZHU Baifang, ZHU Du, DENG Ronggen, *et al.* Optimization of experiment conditions and primer screening with ISSR

- markers for *Amentotaxus argotaenia* [J]. *Bull Bot Res*, 2006, **26** (3): 318 – 322.
- [4] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [5] 林万明, 杨瑞馥, 黄尚志, 等. PCR 技术操作和应用指南[M]. 北京: 人民军医出版社, 1993.
- [6] 洪明伟, 杨荣萍, 李文祥. 石榴 ISSR-PCR 反应体系的优化研究[J]. 云南农业大学学报, 2008, **23** (1): 15 – 18.
HONG Mingwei, YANG Rongping, LI Wenxiang. Optimizations of the inter-simple sequence repeat reaction system in pomegranate [J]. *J Yunnan Agric Univ*, 2008, **23** (1): 15 – 18.
- [7] 曹福亮, 王国霞, 李广平, 等. 银杏 ISSR-PCR 扩增反应体系的优化[J]. 浙江林学院学报, 2008, **25** (2): 186 – 190.
CAO Fuliang, WANG Guoxia, LI Guangping, *et al.* Optimizing the inter simple sequence repeat (ISSR) reaction system with *Ginkgo biloba* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2008, **25** (2): 186 – 190.
- [8] 赵振华, 严萍, 焦旭雯, 等. 何首乌 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 时珍国医国药, 2008, **19** (3): 567 – 569.
ZHAO Zhenhua, YAN Ping, JIAO Xuwen, *et al.* Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction system for *Polygonum multiflorum* Thunb. [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2008, **19** (3): 567 – 569.
- [9] 汪结明, 项艳, 吴大强, 等. 杨树 ISSR 反应体系的建立及正交设计优化[J]. 核农学报, 2007, **21** (5): 470 – 473.
WANG Jieming, XIANG Yan, WU Daqiang, *et al.* Establishment of an ISSR reaction system for poplar and optimization using orthogonal design [J]. *J Nucl Agric Sci*, 2007, **21** (5): 470 – 473.
- [10] 何桥, 梁国鲁, 谢江辉. 莲雾 ISSR 反应体系的优化与应用[J]. 果树学报, 2005, **22** (2): 186 – 189.
HE Qiao, LIANG Guolu, XIE Jianghui. Optimization of the inter-simple sequence repeat reaction system and its preliminary application in wax apple (*Syzygium samarangense*) [J]. *J Fruit Sci*, 2005, **22** (2): 186 – 189.
- [11] 戴正, 陈力耕, 童品璋. 香榧品种遗传变异与品种鉴定的 ISSR 分析[J]. 园艺学报, 2008, **35** (8): 1125 – 1130.
DAI Zheng, CHEN Ligeng, TONG Pinzhang. Genetic variation and fingerprinting of *Torreya grandis* cultivars detected by ISSR markers [J]. *Acta Horti Sin*, 2008, **35** (8): 1125 – 1130.
- [12] 张党权. 香榧主要栽培品种的 RAPD 分子鉴别[D]. 株洲: 中南林学院, 2001.
ZHANG Dangquan. *Molecular Identification of Main Cultivars of Torreya grandis by RAPD Markers* [D]. Zhuzhou: Central South Forestry College, 2001.

周国模校长应邀出席哥本哈根世界气候大会

2009 年 12 月 7 日至 18 日,《联合国气候变化框架公约》缔约方第 15 次会议(又称哥本哈根世界气候大会)在丹麦首都哥本哈根举行,商讨《京都议定书》一期承诺到期后的后续方案,就未来应对气候变化的全球行动签署新的协议。此次大会将对地球气候变化走向产生决定性的影响。浙江林学院校长周国模教授应邀出席大会。

中国是一个竹林资源丰富、竹林经营水平很高的国家。竹林是由禾本科竹亚科为单优势种而组成的木本状多年生常绿森林类型,现存量巨大,在吸收大气二氧化碳中具有独特的作用和优势。浙江林学院从 2002 年开始在竹林生态系统固碳动态和碳汇计量等方面开展了科学研究工作,为竹林碳汇计量及未来碳汇交易提供了一定依据,得到了国内外同行的认可。为此,国际竹藤组织邀请周国模校长作为国际竹藤组织代表团特邀成员参加此次哥本哈根世界气候大会,以期与国际竹藤组织合作,促进国际社会更好认同竹林资源经营在应对气候变化中的作用。