

# 海南龙血树 ISSR-PCR 反应体系建立与有效引物筛选

郑道君, 谢良商, 曾建华, 张治礼\*

(海南省农业科学院农作物遗传育种重点实验室, 海口 571100)

**摘要:** 采用单因子试验与正交试验的方法, 研究了海南龙血树(*Dracaena cambodiana* Pierre ex Gagnep) ISSR-PCR 反应体系中的主要影响因子, 筛选出 16 条有效引物并优化了它们的退火温度, 此外还检测了体系的重复性。优化后的 25  $\mu$ L 反应体系包含: 10  $\times$  PCR buffer 2.5  $\mu$ L, 3.0 mmol/L  $MgCl_2$ , 300  $\mu$ mol/L dNTPs, *Taq* 聚合酶 3.0 U, 引物 0.2  $\mu$ mol/L, DNA 模板 20 ng。该反应体系可用于海南龙血树的遗传多样性和遗传结构的分析。

**关键词:** 海南龙血树; ISSR; 影响因子; 体系优化; 引物筛选

中图分类号: Q943

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2011)02-0177-06

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2011.02.013

## Establishment of ISSR-PCR Reaction System and Screening of Effective Primers with ISSR Marker for *Dracaena cambodiana*

ZHENG Dao-jun, XIE Liang-shang, ZENG Jian-hua, ZHANG Zhi-li\*

(Key Laboratory for Crop Genetics and Breeding, Hainan Academy of Agricultural Sciences, Haikou 571000, China)

**Abstract:** The influence factors of ISSR-PCR for *Dracaena cambodiana* Pierre ex Gagnep were studied by using single factor test and orthogonal design, and a set of ISSR-PCR reaction system was established. Sixteen ISSR primers were selected out, and their annealing temperatures were also optimized. Furthermore, the optimized reaction conditions were examined for its repeatability in *D. cambodiana*. The optimum ISSR-PCR reaction system with total 25  $\mu$ L reaction solution contain 2.5  $\mu$ L 10  $\times$  PCR buffer, 3.0 mmol/L  $MgCl_2$ , 300  $\mu$ mol/L dNTPs, 3.0 U *Taq* polymerase, 0.2  $\mu$ mol/L primers, and 20 ng DNA template, which can be used for analysis in genetic diversity and genetic structure of *D. cambodiana*.

**Key words:** *Dracaena cambodiana*; ISSR; Influence factor; Optimization system; Screening of primers

海南龙血树 (*Dracaena cambodiana* Pierre ex Gagnep), 又名小花龙血树, 为百合科(Liliaceae)龙血树属植物, 在中国仅分布于海南<sup>[1]</sup>, 是国家二级重点保护野生植物<sup>[2]</sup>和中国三级珍稀濒危保护植物<sup>[3]</sup>。海南龙血树可提取传统名贵中药材“血竭”<sup>[4-5]</sup>, 同时也是园林绿化和家庭盆栽的名贵树种。近年来野生海南龙血树资源及其生境遭受严重破坏, 亟待保护。关于海南龙血树的研究目前主要集中在组织快繁、栽培技术以及以血竭为基础的

开发利用等方面<sup>[6]</sup>, 关于该物种的保护生物学包括保护遗传学等方面的研究目前尚属空白。

简单重复序列区间扩增多态性 (Inter-simple sequence repeat, 简称 ISSR) 是 Zietkiewicz 等 1994 年创建的一种基于 SSR 的分子标记技术<sup>[7]</sup>, 近年来已在濒危植物保护遗传学, 包括居群交配系统<sup>[8]</sup>、居群遗传变异水平以及遗传结构<sup>[9-11]</sup>等研究领域得到广泛应用。在资源调查的基础上, 我们拟采用 ISSR 技术研究海南龙血树遗传变异水平和遗传结

收稿日期: 2010-09-03

接受日期: 2010-11-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(30760015); 海南省自然科学基金项目(30831)资助

作者简介: 郑道君(1979 ~ ), 男, 硕士, 助理研究员, 从事植物种质资源及保育遗传学研究, email: daojunzh@yahoo.com.cn

\* 通讯作者 Corresponding author, e-mail: zzl\_catas@hotmail.com

构,从分子水平揭示海南龙血树的濒危现状以及致危原因,为制定合理的保护策略提供科学依据。由于 ISSR 技术是一种基于 PCR 的分子标记,影响因素较多且具有物种特异性<sup>[12]</sup>,为了实现分析结果的可靠性,进行 ISSR-PCR 反应体系的优化是非常必要的。本研究利用单因子试验和正交试验相结合的方法,对海南龙血树 ISSR 分析中的主要影响因子进行了系统的研究,首次建立了一套稳定的海南龙血树 ISSR-PCR 反应体系;在此基础上,筛选出一批有效引物并确定其最佳退火温度,并对优化后的反应体系之稳定性进行了检测。

1 材料和方法

1.1 材料

编号为 1~25 的供试材料均取自海南省东方市俄贤岭海南龙血树(*Dracaena cambodiana* Pierre ex Gagnep)居群(18°59′58″N, 109°04′30″E)。利用编号 14 的材料对反应体系进行优化,其余材料用于优化后反应体系的稳定性检测。选取与俄贤岭居群生境差异较大的海南三亚市南山居群(18°18′04″N, 109°09′06″E)和东方市黑岭居群(18°46′30.0″N, 108°48′45.8″E)各 1 份材料用于有效引物的筛选。所有供试材料均为从健康树上采集的嫩芽或幼叶,常温下带回实验室保存于-20℃冰箱中备用。

1.2 主要试剂

100 条 UBC 801-UBC 900 ISSR 引物(加拿大哥伦比亚大学公布的序列及其编号)由上海生物工程有限公司合成,100 bp plus-Marker 购自北京中科瑞泰公司, *Taq* DNA polymerase 和 4 × dNTP mix 购自上海申能博彩生物科技有限公司。

1.3 基因组 DNA 提取

采用改良的 CTAB 法<sup>[13]</sup>提取海南龙血树基因

组 DNA,提取的 DNA 稀释至 20 ng μL<sup>-1</sup> 保存在-20℃冰箱中备用。

1.4 ISSR 反应体系优化设计

原始反应体系为:10 × PCR buffer 2.5 μL, 2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 200 μmol/L dNTPs, *Taq* 聚合酶 2.0 U, 引物 0.4 μmol/L 和 DNA 模板 40 ng, 用无菌超纯水补足至 25 μL。原始扩增程序为:94℃ 预变性 4 min, 94℃ 变性 40 s, 52℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 120 s, 40 个循环后 72℃ 延伸 8 min。PCR 扩增在梯度扩增仪(德国 Biometra 公司,型号:T-Gradient Themoblock)上进行。利用 1.4% 琼脂糖凝胶电泳和 Gel Doc XR 型凝胶成像分析系统观察并记录扩增结果。

利用原始反应体系和扩增程序,对引物进行初选,选择扩增条带多且清晰的引物 UBC-825 和 UBC-873 用于反应体系优化。其中,利用 UBC-873 对模板浓度进行优化,利用 UBC-825 对其它影响因子进行优化。采用单因子试验方法筛选各因子的适宜条件(每个因子设 4 个水平)(表 1)。以筛选出的适宜水平按 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>)方案设计正交试验,筛选海南龙血树最佳 ISSR-PCR 反应条件。

根据引物的理论退火温度 [ $T_m = 2 \times (A + T) - 4 \times (C + G)$ ], 设置 6 个退火温度梯度,对初选时扩增出 2 条以上条带的引物进行退火温度优化试验,确定引物的最佳退火温度。

1.5 有效引物筛选和反应体系的检验

用生境差异显著的 3 份供试材料的 DNA 为模板,在最佳反应体系和最佳退火温度下,筛选扩增条带清晰且重复性和多态性较好的有效引物。以 1~25 份供试材料的基因组 DNA 为模板,随机选择有效引物,在优化后的最佳反应体系下进行扩增,检验扩增效果及其重复性。

表 1 单因子试验中各因子的梯度水平  
Table 1 Gradient levels of each factor in single factor test

| 影响因子<br>Factors           | 水平 Levels |      |      |      |      |      |      |       |       |       |       |
|---------------------------|-----------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|
|                           | 1         | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8     | 9     | 10    | 11    |
| Template DNA (ng)         | 2.5       | 5.0  | 10.0 | 20.0 | 40.0 | 60.0 | 80.0 | 120.0 | 160.0 | 240.0 | 320.0 |
| <i>Taq</i> (U)            | 0.025     | 0.5  | 1.0  | 1.5  | 2.0  | 2.5  | 3.0  | 4.0   | 5.0   | 6.0   | 10.0  |
| Mg <sup>2+</sup> (mmol/L) | 0.25      | 0.5  | 1.0  | 1.5  | 2.0  | 2.5  | 3.0  | 3.5   | 4.0   | 5.0   | 7.0   |
| dNTP (μmol/L)             | 25        | 50   | 100  | 150  | 200  | 250  | 300  | 400   | 550   | 650   |       |
| Primer (μmol/L)           | 0.025     | 0.05 | 0.1  | 0.15 | 0.2  | 0.25 | 0.3  | 0.4   | 0.5   | 0.6   |       |

2 结果和分析

2.1 模板 DNA

25  $\mu\text{L}$  反应体系中,当模板 DNA 为 2.5 ~ 10 ng 时,虽均能扩增出清晰条带,但带型不稳定;当模板  $\geq 20$  ng 时,扩增出的条带清晰、稳定,带型一致(图 1)。由于模板浓度的增加可能会增加反应体系中抑制反应的成份,因此在 ISSR-PCR 中应尽可能降低模板的使用量。故使用 20 ~ 80 ng 的模板 DNA 用于后续正交分析较为合适。

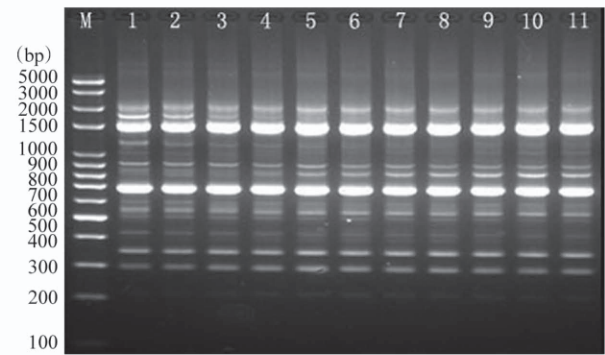


图 1 模板 DNA 浓度的影响

Fig. 1 Effects of template DNA concentration  
M: 100 bp plus Marker; 1 ~ 11: 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 120, 160, 240, 320 ng DNA.

2.2 *Taq* 聚合酶用量的影响

大量的 ISSR 试验表明,25  $\mu\text{L}$  反应体系中 *Taq* 聚合酶的用量为 1.0 ~ 2.5  $\text{U}^{[14]}$ 。从图 2 可见,当 *Taq* 酶用量小于 1.0  $\text{U}$  时,扩增条带明显减少;当 *Taq* 酶用量为 1.5 ~ 3.0  $\text{U}$  时,条带丰富,带型一致;但当 *Taq* 酶用量大于 4.0  $\text{U}$ ,背景逐渐呈现弥散状,主带开始变弱。因此,在 25  $\mu\text{L}$  反应体系中,选择 1.5 ~ 3.0  $\text{U}$  的 *Taq* 酶用量用于后续正交分析较为

合适。

2.3  $\text{Mg}^{2+}$  浓度的影响

通常认为,  $\text{Mg}^{2+}$  的适宜范围为 1.5 ~ 2.5  $\text{mmol/L}^{[15]}$ 。从图 2 可见,当  $\text{Mg}^{2+} \leq 0.5$   $\text{mmol/L}$  时,无法扩增出条带;随着  $\text{Mg}^{2+}$  浓度的增加,扩增条带数及条带的清晰度相应增加。当  $\text{Mg}^{2+}$  为 1.0  $\text{mmol/L}$  时,有扩增产物出现但条带少且弱;当  $\text{Mg}^{2+}$  达到 1.5 ~ 3.0  $\text{mmol/L}$  时,扩增条带丰富且清晰,带型稳定、一致;当  $\text{Mg}^{2+}$  达到 3.5  $\text{mmol/L}$ ,扩增条带开始变淡,并呈现迷散现象。因此,选择 1.5 ~ 3.0  $\text{mmol/L}$  的  $\text{Mg}^{2+}$  用于后续正交分析较为合适。

2.4 dNTPs 浓度的影响

从图 3 可见,在 25 ~ 300  $\mu\text{mol/L}$  范围内,随着 dNTPs 浓度的增加,扩增的条带数及其强度增加,但当 dNTPs  $\leq 100$   $\mu\text{mol/L}$  时条带不清晰,且大片段条带缺失;当浓度为 150 ~ 300  $\mu\text{mol/L}$  时,扩增出的条带多而清晰,且带型基本一致;当 dNTPs  $\geq 400$   $\mu\text{mol/L}$  时,较大的扩增条带明显缺失,出现较多弱小片段。这说明,高浓度的 dNTPs 会抑制分子质量相对较大的条带扩增。这与郑道君等<sup>[16]</sup>对木犀科苦丁茶(*Cratoxylum prunifolium*)以及杨志玲等<sup>[17]</sup>对红花石蒜(*Lycoris radiata*)的研究结果相似。因此,选择 150 ~ 300  $\mu\text{mol/L}$  dNTPs 用于后续正交分析为宜。

2.5 引物浓度的影响

引物浓度会对 ISSR-PCR 扩增的带型产生明显影响,浓度过低不能扩增条带或条带较弱,浓度太高又会产生非特异性条带<sup>[18]</sup>。从图 3 可见,引物浓度为 0.025 ~ 0.15  $\mu\text{mol/L}$  时,大小在 1000 ~ 2000 bp

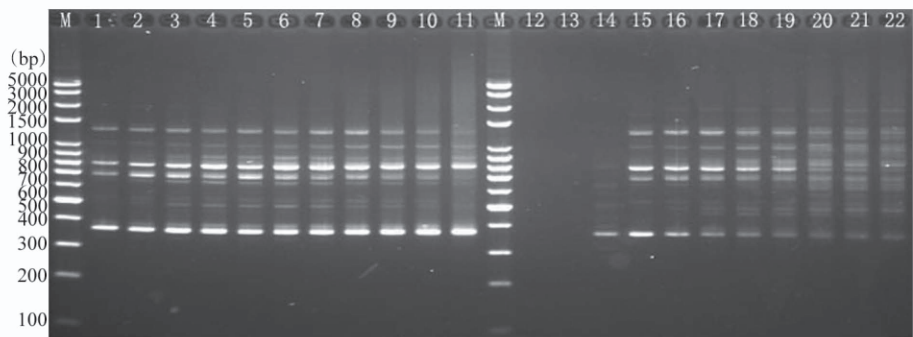


图 2 *Taq* 酶和  $\text{Mg}^{2+}$  浓度试验

Fig. 2 Effects of *Taq* DNA polymerase and  $\text{Mg}^{2+}$  concentrations  
M: 100 bp plus Marker; 1 ~ 11: 0.025, 0.5, 1.0, 15, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 10.0  $\text{U}$  *Taq* DNA polymerase; 12 ~ 22: 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 7.0  $\text{mmol/L}$   $\text{Mg}^{2+}$ .

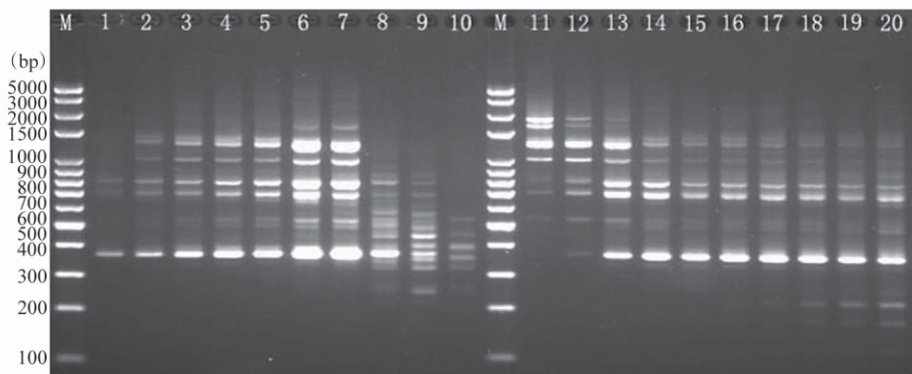


图 3 dNTPs 和引物浓度试验

Fig. 3 Effects of dNTPs and primer concentrations

M: 100 bp plus Marker; 1 ~ 11: 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 550, 650  $\mu\text{mol/L}$  dNTPs; 11 ~ 22: 0.025, 0.05, 0.1,

0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6  $\mu\text{mol/L}$  primers.

表 2 ISSR-PCR 正交实验设计结果

Table 2 Orthogonal design for ISSR-PCR

| 编号<br>No. | 影响因素 Factors      |                |                           |                            |                              | 得分<br>Score |
|-----------|-------------------|----------------|---------------------------|----------------------------|------------------------------|-------------|
|           | Template DNA (ng) | <i>Taq</i> (U) | Mg <sup>2+</sup> (mmol/L) | dNTP ( $\mu\text{mol/L}$ ) | Primer ( $\mu\text{mol/L}$ ) |             |
| 1         | 20                | 1.5            | 1.5                       | 150                        | 0.05                         | 5           |
| 2         | 20                | 2.0            | 2.0                       | 200                        | 0.1                          | 5           |
| 3         | 20                | 2.5            | 2.5                       | 250                        | 0.15                         | 11          |
| 4         | 20                | 3.0            | 3.0                       | 300                        | 0.2                          | 16          |
| 5         | 40                | 1.5            | 2.0                       | 300                        | 0.15                         | 14          |
| 6         | 40                | 2.0            | 1.5                       | 250                        | 0.2                          | 14          |
| 7         | 40                | 2.5            | 3.0                       | 200                        | 0.05                         | 4           |
| 8         | 40                | 3.0            | 2.5                       | 150                        | 0.1                          | 1           |
| 9         | 60                | 1.5            | 2.5                       | 200                        | 0.2                          | 8.5         |
| 10        | 60                | 2.0            | 3.0                       | 150                        | 0.15                         | 8           |
| 11        | 60                | 2.5            | 1.5                       | 300                        | 0.1                          | 9           |
| 12        | 60                | 3.0            | 2.0                       | 250                        | 0.05                         | 5           |
| 13        | 80                | 1.5            | 3.0                       | 250                        | 0.1                          | 3.5         |
| 14        | 80                | 2.0            | 2.5                       | 300                        | 0.05                         | 9           |
| 15        | 80                | 2.5            | 2.0                       | 200                        | 0.2                          | 6           |
| 16        | 80                | 3.0            | 1.5                       | 150                        | 0.15                         | 6.5         |
| <i>K1</i> | 37                | 31             | 34.5                      | 20.5                       | 23                           |             |
| <i>K2</i> | 33                | 36             | 30                        | 23.5                       | 18.5                         |             |
| <i>K3</i> | 30.5              | 30             | 36.5                      | 33.5                       | 39.5                         |             |
| <i>K4</i> | 25                | 28.5           | 31.5                      | 48                         | 44.5                         |             |
| <i>k1</i> | 9.25              | 7.75           | 8.63                      | 5.13                       | 5.75                         |             |
| <i>k2</i> | 8.25              | 9              | 7.5                       | 5.88                       | 4.63                         |             |
| <i>k3</i> | 7.63              | 7.5            | 9.13                      | 8.38                       | 9.88                         |             |
| <i>k4</i> | 6.25              | 7.13           | 7.88                      | 12                         | 11.1                         |             |
| <i>R</i>  | 3                 | 1.87           | 1.63                      | 6.87                       | 6.5                          |             |

的条带逐渐变弱,甚至消失,而 700 ~ 800 bp 的条带由弱变强;当引物浓度  $\geq 0.30 \mu\text{mol/L}$  时开始出现小于 200 bp 的小片段弱带,其亮度也随着引物浓度的增加而增强。随着引物浓度的增加,扩增的大片段由强至弱甚至消失,扩增小片段则由无至强。根据扩增条带的多少、强弱以及带型的稳定性,选择 0.05 ~ 0.20  $\mu\text{mol/L}$  的引物浓度用于后续的正交试验。

2.6 正交试验分析

5 个 ISSR-PCR 影响因子各 4 个水平的正交试验结果见表 2 及图 4。采用何正文等<sup>[19]</sup>和穆立蓄等<sup>[20]</sup>所用的直观分析法,按照遗传多样性分析要求,依据谱带的强弱和杂带的多少对 PCR 扩增结果依次打分。条带数量丰富、清晰的最佳产物记 16 分;最差的计 1 分。分别进行两次独立计分,

取两次的平均数。从图 4 和表 2 可知,分值最高的组合为 4 号,其扩增条带数最多(12 条),其中强带 7 条;而最差组合为 8 号,仅能扩增出 8 条弱带。根据每个因子同一水平下的试验值之和  $K_i$  以及每个因子不同水平下的平均值  $k_i$ ,求出同一因子不同水平间平均值的极差  $R$ 。极差  $R$  反映了影响因子对反应体系的影响情况,  $R$  越大,影响越显著。由表 2 可知,各因子水平的变化对海南龙血树 PCR 反应的影响依次为 dNTPs > 引物浓度 > DNA 模板浓度 >  $Taq$  聚合酶量 >  $Mg^{2+}$  浓度。

2.7 引物退火温度的确定及筛选

退火温度会影响扩增谱带的式样,它不仅与引物序列有关,还与物种的序列有密切关系<sup>[21]</sup>。采用优化的反应体系,我们对经初选后有 2 条以上扩增产物的 ISSR 引物进行了退火温度优化;确定各引

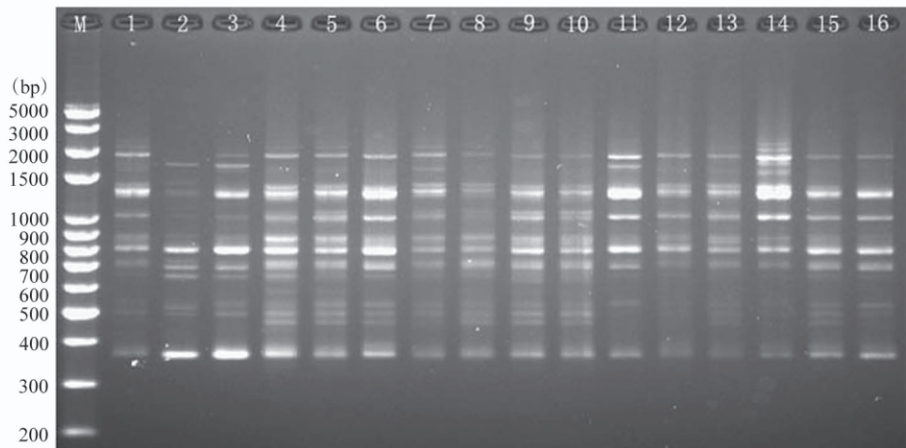


图 4 正交试验结果  
Fig. 4 Results of orthogonal design  
M: 100 bp plus Marker; 1 ~ 16 见表 2。1 ~ 16 see Table 2.

表 3 筛选出的有效引物及其最佳退火温度

| Table 3 Screening of ISSR primers and their optimum annealing temperatures |                          |                                    |               |                          |                                    |
|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------------------|---------------|--------------------------|------------------------------------|
| 引物<br>Primers                                                              | 序列 (5' ~ 3')<br>Sequence | 退火温度 (°C)<br>Annealing temperature | 引物<br>Primers | 序列 (5' ~ 3')<br>Sequence | 退火温度 (°C)<br>Annealing temperature |
| UBC-808                                                                    | (AG) <sub>8</sub> C      | 58.6                               | UBC-843       | (CT) <sub>8</sub> RA     | 53.0                               |
| UBC-811                                                                    | (GA) <sub>8</sub> C      | 57.1                               | UBC-845       | (CT) <sub>8</sub> RG     | 53.4                               |
| UBC-825                                                                    | (AC) <sub>8</sub> T      | 53.0                               | UBC-854       | (TC) <sub>8</sub> RG     | 53.4                               |
| UBC-826                                                                    | (AC) <sub>8</sub> C      | 54.3                               | UBC-855       | (AC) <sub>8</sub> YT     | 56.9                               |
| UBC-827                                                                    | (AC) <sub>8</sub> G      | 56.0                               | UBC-856       | (AC) <sub>8</sub> YA     | 58.0                               |
| UBC-834                                                                    | (AG) <sub>8</sub> YT     | 48.4                               | UBC-857       | (AC) <sub>8</sub> YG     | 53.4                               |
| UBC-835                                                                    | (AG) <sub>8</sub> YC     | 51.3                               | UBC-864       | (ATG) <sub>6</sub>       | 48.0                               |
| UBC-836                                                                    | (AG) <sub>8</sub> YA     | 54.1                               | UBC-873       | (GACA) <sub>4</sub>      | 49.3                               |

Y = C or T; R = A or G; D = A or G or T; B = C or G or T.

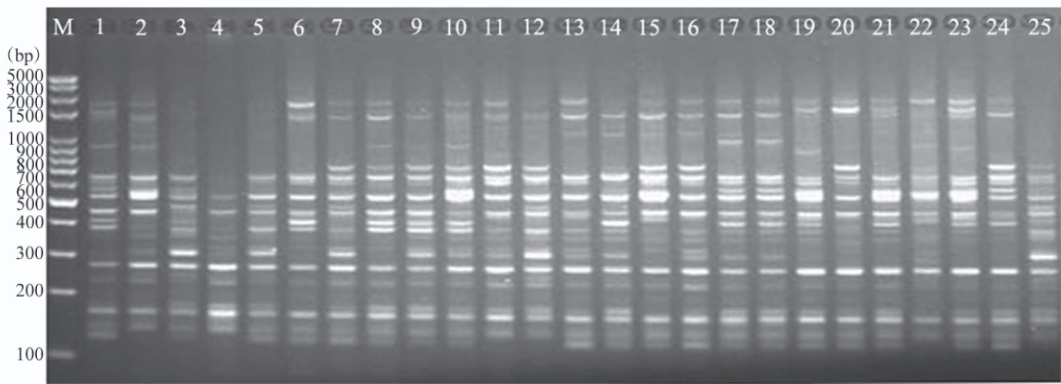


图 5 海南龙血树 ISSR-PCR 体系的稳定性检测  
Fig. 5 Testing for repeatability of *D. cambodiana* ISSR Reaction System  
M: 100 bp plus Marker; 1 ~25: EX-1 ~ EX-25.

物的最佳退火温度后, 以生境差异显著的 3 份海南龙血树材料的 DNA 为模板, 进行有效引物的筛选。研究表明: 选购的 100 条引物中有 16 条可获得多态性丰富且条带清晰的扩增结果, 它们的最佳退火温度在 48.0℃ ~ 58.6℃ 之间(表 3)。

3 ISSR-PCR 优化体系的稳定性检测

从图 5 可见, 随机选择的 UBC-811 引物可以从 25 份种质材料中扩增出清晰度高、重复性好、多态性丰富的 DNA 条带。这表明, 经过优化后建立的 ISSR-PCR 反应体系具有较好的稳定性, 可以满足海南龙血树资源遗传变异水平和遗传结构的研究。

4 结语

本研究在单因素实验找出各因子的适宜反应浓度范围的基础上, 对各因子进行正交试验优化以找出最佳反应条件, 确保了应用于正交实验设计的各因子水平的合理性, 其分析结果更加科学。研究结果表明用于海南龙血树 ISSR 分析最佳扩增条件为: 25 μL 反应体系中 10 × PCR buffer 2.5 μL, 3.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 300 μmol/L dNTPs, *Taq* 聚合酶 3.0 U, 引物 0.2 μmol/L, DNA 模板 20 ng; PCR 扩增程序为: 94℃ 预变性 4 min, 然后按 94℃ 变性 40 s, 48.0℃ ~ 58.6℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 120 s, 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 8 min。经检验, 筛选出的有效引物在此反应条件下扩增所得的 ISSR 条带清晰丰富, 可重复性好。这为利用 ISSR 技术准确分析海南龙血树的遗传多样性和遗传结构打下了基础。

参考文献

[1] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae, Agendae Academicae

Sinicae Editae(中国科学院中国植物志编委会). Flora Reipublicae Popularis Sinicae, Tomus 14 [M]. Beijing: Science Press, 1992: 276-277.(in Chinese)  
[2] 中国数字植物标本馆. 2006[EB/OL]. [2010-8-10] <http://www.cvh.org.cn/>  
[3] National Environment Protection Administration(国家环境保护局), Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences(中国科学院植物研究所). China Rare and Endangered Protective Plant Lists [M]. Beijing: Science Press, 1987: 1-38.(in Chinese)  
[4] Guangdong Institute of Botany(广东省植物研究所). Flora Hainanica, Tomus IV [M]. Beijing: Science Press, 1977: 1-155. (in Chinese)  
[5] 谢宗万. 血竭基源的本草考证 [J]. 中药材, 1989, 12(7): 4.  
[6] Zheng D J(郑道君), Xie L S(谢良商), Wang Y(王盈), et al. Research advances in Dragon's Blood plants in China [J]. Chin Wild Plant Res(中国野生植物资源), 2009, 28(6): 15-20.(in Chinese)  
[7] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20: 176-183.  
[8] Han Y C, Teng C Z, Wahiti G R. Mating system and genetic diversity in natural populations of *Nelumbo nucifera* (Nelumbonaceae) detected by ISSR markers [J]. Plant Syst Evol, 2009, 277(1/2): 13-20.  
[9] Helena A. Souza V, Lovato M B. Genetic diversity and structure of the critically endangered tree *Dimorphandra wilsonii* and of the widespread in the Brazilian Cerrado *Dimorphandra mollis*: Implications for conservation [J]. Bioch Syst Ecol, 2010, 38(1): 49-56.  
[10] Shah A, Li DZ, Gao L M, et al. Genetic diversity within and among populations of the endangered species *Taxus fuana* (Taxaceae) from Pakistan and implications for its conservation [J]. Biochem Syst Ecol, 2008, 36(3): 183-193.  
[11] Shao J W, Chen W L, Peng Y Q, et al. Genetic diversity within and among populations of the endangered and endemic species *Primula merrilliana* in China [J]. Biochem Syst Ecol, 2009, 37(6): 699-706.  
[12] Li Y(李艳), Jiang Y M(江玉梅), Lu S B(鲁顺保), et al.

- Optimization of experiment conditions and primer screening with ISSR markers for *Chimonanthus grammatus* [J]. J Wuhan Bot Res (武汉植物学研究), 2008, 26(3): 245–250.(in Chinese)
- [13] Liang Y F(梁远发), Zheng D J(郑道君), Liu G M(刘国民), et al. An effect DNA extraction method for the Kudingcha species in Oleaceae [J]. Chin Agri Sci Bull(中国农学通报), 2008, 24(3): 44–47.(in Chinese)
- [14] He Q(何桥), Liang G L(梁国鲁), Xie J H(谢江辉). Optimization of the inter-simple sequence repeat reaction system and its preliminary application in wax apple (*Syzygium samarangens*) [J]. J Fruit Sci(果树学报), 2005, 22(2): 186–189.(in Chinese)
- [15] Guo L F(郭凌飞), Zou M H(邹明宏), Zeng H(曾辉), et al. Establishment and optimization of ISSR-PCR system in *Macadamia* [J]. Sci Silv Sin(林业科学), 2008, 44(5): 160–164.(in Chinese)
- [16] Zheng D J(郑道君), Liu G M(刘国民), Liang Y F(梁远发), et al. Studies on optimization of ISSR amplified conditions in Kudingcha species in Oleaceae of China [J]. Bull Bot Res(植物研究), 2009(2): 234–241.(in Chinese)
- [17] Yang Z L(杨志玲), Feng G L(冯刚利), Tan X F(谭梓峰), et al. Establishment of ISSR-PCR in *Lycoris radiata* [J]. For Res(林业科学研究), 2006, 19(4): 509–512.(in Chinese)
- [18] Feng F J(冯富娟), Wang F Y(王凤友), Liu T(刘彤). The Influence factors of the ISSR-PCR experiment system on *Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc. [J]. Chin Bull Bot(植物学通报), 2004, 21(3): 326–331.(in Chinese)
- [19] He Z W(何正文), Liu Y S(刘运生), Shen L H(陈立华), et al. Orthogonal design-direct analysis for PCR optimization [J]. Bull Hunan Med Univ(湖南医科大学学报), 1998, 23(4): 403–404.(in Chinese)
- [20] Mu L Q(穆立蔷), Liu Y N(刘赢男), Feng F J(冯富娟), et al. Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction system for *Tilia amurensis* [J]. Sci Silv Sin(林业科学), 2006, 42(6): 26–31.(in Chinese)
- [21] Jiang J(姜静), Yang C P(杨传平), Liu G F(刘桂丰), et al. Optmization for the reaction system of birch ISSR-PCR [J]. Chin J Ecol(生态学杂志), 2003, 22(3): 91–93.(in Chinese)