



## 研究报告

### Research Report

# 菜豆 ISSR-PCR 体系的优化与验证

杨晶 , 张广臣 

吉林农业大学, 长春, 130118

 通讯作者, [gczh2005@126.com](mailto:gczh2005@126.com);  作者

豆科基因组学与遗传学, 2013 年, 第 4 卷, 第 4 篇 doi: 10.5376/lgg.cn.2013.04.0004

收稿日期: 2013 年 04 月 18 日 接受日期: 2013 年 04 月 18 日 发表日期: 2013 年 04 月 18 日

© 2013 BioPublisher 生命科学中文期刊出版平台

本文首次发表在《分子植物育种》2013 年, 第 11 卷, 第 4 期上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), 协议对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。



**摘要** 用试剂盒法提取菜豆 (*Phaseolus vulgaris* L.) 嫩叶的基因组 DNA, 并以此为模板对影响 ISSR-PCR 反应体系的 *Taq* 酶量、模板浓度、dNTP 浓度、 $Mg^{2+}$  浓度、引物浓度 5 个因素进行了优化。结果表明总体积为 25  $\mu$ L 的菜豆 ISSR-PCR 反应最优体系为: 45 ng 模板 DNA, 1 U *Taq* 酶, 2 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.6  $\mu$ mol/L 引物和 0.1 mmol/L dNTP, 在此基础上对循环次数进行优化, 最终确定最佳循环次数为 45 次。利用该体系, 选取引物 823 对 8 份材料进行扩增, 验证了该体系的稳定性。本研究旨在建立菜豆 ISSR 反应的最优体系, 为今后利用该分子标记技术进行有关菜豆种质及遗传方面的研究奠定技术基础。

**关键词** 菜豆; ISSR; 体系优化

## Optimization of ISSR-PCR Reaction System and Its Verification in Common Bean

Yang Jing , Zhang Guangchen 

Jilin Agricultural University, Changchun, 130118

 Corresponding author, [gczh2005@126.com](mailto:gczh2005@126.com);  Authors

**Abstract** The genomic DNA of common bean was extracted from tender leaves by DNA secure plant kit method, and optimized ISSR reaction condition with it as template. We established optimum ISSR-PCR system for common bean using ISSR-PCR amplification with five factors (*Taq* DNA polymerase, DNA template, dNTP,  $Mg^{2+}$  concentration and primer). The optimum reaction system with 25  $\mu$ L total reaction volume contains 45 ng DNA template, 1 U *Taq* DNA polymerase, 2 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.6  $\mu$ mol/L ISSR primer and 0.1 mmol/L dNTP. The suitable cycles was 45 cycles that screened from three different treatments. 8 soybeans were easily amplified with primer 823 under the optimized reaction conditions. This reaction system will provide a technological base for germplasm and genetic study in common bean.

**Keywords** *Phaseolus vulgaris* L., ISSR, System optimization

菜豆 (*Phaseolus vulgaris* L.) 是世界上栽培面积最大的食用豆类 (郑卓杰, 1997, 中国农业出版社, pp.222-249), 在中国大部分省(市、区)均有栽培, 是中国重要的食用蔬菜。中国较大的地理纬度跨度及多样化的生态环境造就了菜豆品种的多样性。以往主要是通过细胞学特征和表型性状研究菜豆品种资源的遗传多样性, 随着分子生物学的发展, 利

用分子标记进行菜豆资源鉴定和分类、构建分子遗传图谱、基因定位和品种抗性鉴定方面已取得一定进展。目前应用的分子标记主要包括 RAPD (Beebe et al., 2000; 栾非时和祖元刚, 2002; 孙晓丹, 2003), SSR (田甜等, 2012; 王坤等, 2009) 和 SCAR (古瑜等, 2011) 标记, 关于菜豆 ISSR 分子标记的研究报道很少。

ISSR (inter-simple sequence repeats)是用于扩增 2 个距离较近的相邻 SSR 位点间序列的一种 DNA 分子标记技术(Zietkiewicz et al., 1994)。其原理是同一 ISSR 引物序列同时与两个较近但方向相反的 SSR 重复序列互补结合,并扩增这 2 个 SSR 位点间的序列。ISSR 分子标记的 PCR 产物可提供比 RAPD、SSR 和 RFLP 更为丰富的多态性,试验重复性好,现被广泛应用于植物的品种鉴定(Tantasawat et al., 2010)、遗传图谱构建(邱英雄等, 2002)、基因定位(赵国芳, 2003)和种质资源的遗传多样性分析(李红等, 2012)等方面的研究。本研究通过单因素设计研究最优的菜豆 ISSR-PCR 反应体系,为今后利用该分子标记技术进行有关菜豆种质及遗传方面的研究奠定技术基础。

## 1 结果与分析

### 1.1 DNA 浓度检测

提取的基因组 DNA 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,由图 1 可知,用试剂盒法所提取的 DNA 片段无拖尾现象且较整齐,可用于后期 ISSR-PCR 反应。用紫外分光光度计检测 DNA 浓度为 126.1 ng/μL, OD<sub>260</sub> 与 OD<sub>280</sub> 比值为 1.89,可知 RNA 杂质很少。OD<sub>260</sub> 与 OD<sub>230</sub> 比值为 2.20,说明溶液中无盐和小分子杂质,所提取 DNA 质量较好,可用于 ISSR 扩增。

### 1.2 ISSR-PCR 反应中各影响因素的确定

#### 1.2.1 ISSR-PCR 反应中 Taq 酶用量的确定

Taq 酶为反应的主要影响因素(吴小丽等, 2007),其用量及种类直接影响扩增反应是否成功。由图 2 可知, Taq 酶为 1.0 U 时产生清晰稳定的扩增条带,当 Taq 酶量小于 1.0 U 时扩增产物量少,随着 Taq 酶量增加,扩增条带的亮度明显增加,但扩增条带有弥散和缺失现象,说明 Taq 酶量 1.0 U 已接近使用上限。所以在 25 μL 反应体系中,最佳

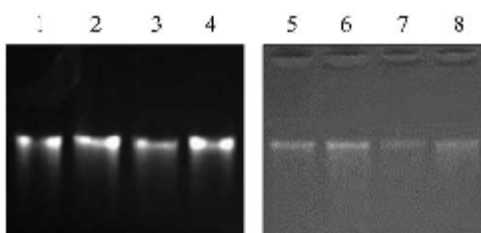


图 1 菜豆 DNA 电泳结果 注: 1~8: 表 1 所列菜豆品种  
Figure 1 Electrophoresis result of DNA on common bean

Note: 1~8: Varieties of common bean listed in the following table 1

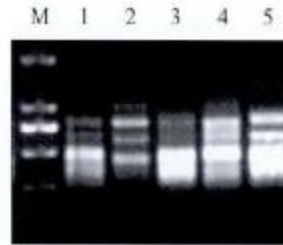


图 2 Taq 酶量对 ISSR 的影响

注: M: DL2000 marker; 1: 0.5 U; 2: 1.0 U; 3: 1.5 U; 4: 2.0 U; 5: 2.5 U

Figure 2 Effect of Taq DNA polymerase concentration on ISSR amplification

Note: M: DL2000 marker; 1: 0.5 U; 2: 1.0 U; 3: 1.5 U; 4: 2.0 U; 5: 2.5 U

Taq 酶用量为 1.0 U。

#### 1.2.2 ISSR-PCR 反应中模板用量的确定

ISSR-PCR 反应对模板浓度适应范围较大,适宜的模板用量可保证扩增的特异性,浓度太低,无扩增产物或产物不稳定;浓度太高,则会相应增加非特异性扩增产物(冒维维等, 2006)。由图 3 可知,模板用量为 25 ng、45 ng 和 55 ng 时能产生清晰稳定的扩增条带,在 65 ng 时主条带不清晰,扩增产物减少,因此建议在菜豆 ISSR-PCR 反应体系中,模板用量取 45 ng 为宜。

#### 1.2.3 ISSR-PCR 反应中 dNTP 用量的确定

dNTP 作为 PCR 反应的原料,浓度低则扩增产物少,影响效果,甚至会因 dNTP 消耗过早而导致产物单链化;浓度高会导致 PCR 错配,进而出现非



图 3 DNA 量对 ISSR 的影响

注: M: DL2000 marker; 1: 25 ng; 2: 35 ng; 3: 45 ng; 4: 55 ng; 5: 65 ng

Figure 3 Effect of DNA concentration on ISSR amplification

Note: M: DL2000 marker; 1: 25 ng; 2: 35 ng; 3: 45 ng; 4: 55 ng; 5: 65 ng

5: 65 ng

特异性扩增。由图 4 可以看出, dNTP 浓度在 0.1~0.2 mmol/L 之间时产生的条带较清晰且无拖尾现象, 经比较, 0.1 mmol/L 的 dNTP 所扩增条带分辨率较高, 当其浓度大于 0.2 mmol/L 时条带明显缺失, 故 dNTP 浓度为 0.1 mmol/L 比较适合本反应体系。

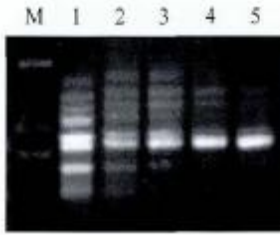


图 4 dNTP 量对 ISSR 的影响

注: M: DL2000 marker; 1: 0.10 mmol/L; 2: 0.15 mmol/L; 3: 0.20 mmol/L; 4: 0.25 mmol/L; 5: 0.30 mmol/L

Figure 4 Effect of dNTP concentration on ISSR amplification

Note: M: DL2000 marker; 1: 0.10 mmol/L; 2: 0.15 mmol/L; 3: 0.20 mmol/L; 4: 0.25 mmol/L; 5: 0.30 mmol/L

#### 1.2.4 ISSR-PCR 反应中 $Mg^{2+}$ 用量的确定

$Mg^{2+}$  浓度直接影响 *Taq* DNA 聚合酶的活性, 故其对 PCR 产率及扩增的特异性影响显著,  $Mg^{2+}$  浓度过低会降低 *Taq* 酶的活性, 使产率减少; 浓度过高, 则降低反应的特异性, 进而导致非特异性扩增。如图 5 所示,  $Mg^{2+}$  浓度在 2 mmol/L 时效果最佳。

#### 1.2.5 ISSR-PCR 反应中引物用量的确定

引物用量也是 ISSR-PCR 扩增的重要影响因素。引物浓度太低, 扩增条带弱, 产物少; 引物浓



图 5  $Mg^{2+}$  量对 ISSR 的影响 注: M: DL2000 marker; 1: 1.0 mmol/L; 2: 1.3 mmol/L; 3: 1.6 mmol/L; 4: 2.0 mmol/L; 5: 2.3 mmol/L

Figure 5 Effect of  $Mg^{2+}$  concentration on ISSR amplification

Note: M: DL2000 marker; 1: 1.0 mmol/L; 2: 1.3 mmol/L; 3: 1.6 mmol/L; 4: 2.0 mmol/L; 5: 2.3 mmol/L

度太高, 易导致碱基错配进而产生非特异性扩增, 还会增加引物二聚体的形成(曾亮等, 2012)。由图 6 可知, 引物浓度为 0.6~0.7  $\mu\text{mol/L}$  时可产生清晰稳定的扩增条带, 当引物浓度在 0.4  $\mu\text{mol/L}$  时, 条带较少且较弱。因此在能够保证条带清晰的条件下, 选用较低的引物用量, 即引物浓度为 0.6  $\mu\text{mol/L}$  为宜。



图 6 引物浓度量对 ISSR 的影响

注: M: DL2000 marker; 1: 0.4  $\mu\text{mol/L}$ ; 2: 0.5  $\mu\text{mol/L}$ ; 3: 0.6  $\mu\text{mol/L}$ ; 4: 0.7  $\mu\text{mol/L}$ ; 5: 0.8  $\mu\text{mol/L}$

Figure 6 Effect of primer concentration on ISSR amplification

Note: M: DL2000 marker; 1: 0.4  $\mu\text{mol/L}$ ; 2: 0.5  $\mu\text{mol/L}$ ; 3: 0.6  $\mu\text{mol/L}$ ; 4: 0.7  $\mu\text{mol/L}$ ; 5: 0.8  $\mu\text{mol/L}$

#### 1.2.6 ISSR-PCR 反应中循环次数的确定

ISSR-PCR 产物的产量受循环次数的影响较大, 循环次数多, 会引起非特异性扩增; 循环次数少, 则产物量较低, 条带相对较弱。本研究用引物 823 对最佳反应体系的菜豆进行 DNA 扩增, 次数依次为 35 次, 40 次和 45 次。结果表明, 45 次循环时扩增条带亮度高, 条带清晰, 且未产生非特异性扩增现象; 35 次循环和 40 次循环扩增条带均较弱。因此 45 次循环为本体系最佳循环次数(图 7)。

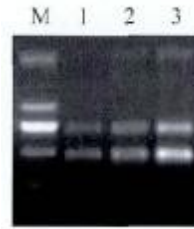


图 7 循环次数对 ISSR 的影响

注: M: DL2000 marker; 1: 35 cycles; 2: 40 cycles; 3: 45 cycles

Figure 7 Effect of cycles on ISSR amplification

Note: M: DL2000 marker; 1: 35 cycles; 2: 40 cycles; 3: 45 cycles

### 1.3 对优化后菜豆 ISSR-PCR 体系的验证

通过以上的研究最终确立适合菜豆的 ISSR 反应体系(25  $\mu$ L)为: 模板 DNA 45 ng, *Taq* 酶 1 U,  $Mg^{2+}$ 浓度 2 mmol/L, 引物浓度 0.6  $\mu$ mol/L, dNTP 浓度 0.1 mmol/L, 其它成分为无菌双蒸水; 45 次循环。

应用上述体系用引物 823 对表 1 所示的 8 份有代表性的菜豆资源进行扩增试验, 旨在检测优化后的菜豆 ISSR-PCR 体系效果。结果显示 8 份菜豆资源均能扩增出重复性好、多态性高且带型清晰的条带, 表明优化后的 ISSR-PCR 体系稳定可靠, 适用于菜豆的遗传多样性及亲缘关系等研究(图 8)。

该研究采用单因素研究方法对 *Taq* 酶量、模板 DNA 浓度、dNTP 浓度、 $Mg^{2+}$ 浓度、引物浓度、循环次数 6 个影响 PCR 反应体系的主要因素进行优化筛选分析, 建立了适合菜豆的 ISSR 反应体系: 反应总体积为 25  $\mu$ L, Buffer 2.5  $\mu$ L, 模板 DNA 45 ng, *Taq* 酶为 1 U,  $Mg^{2+}$ 浓度 2 mmol/L, 引物浓度为 0.6  $\mu$ mol/L, dNTP 浓度为 0.1 mmol/L, 其它成分为无菌双蒸水; 45 次循环。此体系为利用 ISSR 标记技术开展菜豆遗传多样性分析和构建遗传图谱奠定了基础。



图 8 引物 823 在 8 份菜豆资源中的 ISSR 扩增结果 注: M: DL2000 marker; 1~8: 表 1 所列菜豆品种

Figure 8 Result of ISSR-PCR products of 8 different varieties amplified with primer 823

Note: M: DL2000 marker; 1~8: Varieties of common bean listed in the following table 1

## 2 讨论

关于 ISSR 优化体系的建立, 多数研究都认为各因素中, *Taq* 酶浓度的影响最为主要(吴小丽等, 2007)。*Taq* 酶用量的高低直接影响 PCR 产物的多少, 浓度过低合成产物量少, 过高则易引起非特异性扩增。本研究经比较确定 *Taq* 酶的用量为 1 U, 在 8 个品种的验证试验中效果较好。 $Mg^{2+}$ 是 *Taq* 酶

实现聚合反应所必需的,  $Mg^{2+}$ 浓度低时扩增产物较少且条带较弱, 可能是因为 dNTP 对  $Mg^{2+}$ 产生拮抗作用或降低 *Taq* 酶活性, 适宜的  $Mg^{2+}$ 浓度可使 PCR 反应扩增结果更为清晰, 这与魏鑫等(2010)的研究结果一致。在研究中发现引物及 DNA 浓度对 PCR 扩增结果影响不显著, 这与何海燕等(2010)等得研究结果相一致。

ISSR 反应条件的变化对扩增结果影响较大, 引物的退火温度对 ISSR 反应的结果有重要影响, 本体系中引物的退火温度是根据以往的研究所确定, 扩增出的谱带比较清晰, 如果选用不同的引物, 还应通过试验摸索更为适合的退火温度。

## 3 材料与方法

### 3.1 供试材料

本研究以吉林省各科研院所近十年来审定的 8 份菜豆资源为试材(名称, 来源及电泳泳道见表 1), 于 2013 年 1 月种植于吉林农业大学园艺学院人工气候箱内, 取刚展开的健康幼叶于液氮中冷冻,  $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

*Taq* 酶, dNTPs 等均为 Fermentas 产品。研究所用 ISSR 引物 808 和 823 的序列分别为(AG)<sub>8</sub>C 和 (TC)<sub>8</sub>C, 由上海生工生物技术公司合成。

### 3.2 基因组 DNA 提取

采用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取菜豆 DNA, 用紫外分光光度计和 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的浓度和纯度。将所提基因组 DNA 稀释到 10 ng/ $\mu$ L, 保存于  $-18^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

### 3.3 PCR-ISSR 反应体系设计及程序

ISSR-PCR 的反应程序为:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 以下程序循环 40 次:  $94^{\circ}\text{C}$  变性 40 s,  $54^{\circ}\text{C}$  退火 45 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 80 s; 最后于  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 8 min, 于  $4^{\circ}\text{C}$  终止反应保存(表 2)。

### 3.4 PCR 产物的检测

ISSR-PCR 的扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。取 1.5  $\mu$ L 溴酚蓝指示剂与 7.5  $\mu$ L 扩增产物于一次性 PE 手套上吸打混匀后缓慢加入点样孔中, 在  $0.5\times\text{TBE}$  的电泳缓冲液中 120 V 恒压电泳, 时间约为 40 min。

表 1 菜豆试材的名称、来源及编号

Table 1 Number, varieties and sources and of samples

编号 Number	品种名称 Varieties 紫花	来源 Sources
1	地豆 Zihua didou	吉林市农业科学院园艺研究所 Horticultural Research of Jilin City Agricultural Sciences Academy
2	园丰 905 Yuanfeng 905	吉林市农业科学院园艺研究所 Horticultural Research of Jilin City Agricultural Sciences Academy
3	九架 15 Jiujia 15	吉林市农业科学院园艺研究所 Horticultural Research of Jilin City Agricultural Sciences Academy
4	紫喙油豆 Zihui youdou	吉林省蔬菜花卉科学研究所 Jilin Province Vegetables and Flowers Institute of Science
5	黄玉油豆 Huangyu youdou	吉林省蔬菜花卉科学研究所 Jilin Province Vegetables and Flowers Institute of Science
6	吉丰油豆 Jifeng youdou	吉林省蔬菜花卉科学研究所 Jilin Province Vegetables and Flowers Institute of Science
7	长农菜豆 2 号 Changnong 2	长春市农业科学院园艺研究所 Horticultural Research of Changchun Agricultural Sciences Academy
8	吉农油豆 1 号 Jinong 1	吉林农业大学园艺学院 Horticulture College of Jilin Agriculture University

表 2 ISSR 反应体系优化设计

Table 2 Design of optimal ISSR reaction system

影响因素 Influencing factors	Taq 酶(U) Taq polymerase (U)	模板(ng) Template (ng)	dNTP (mmol/L)	Mg <sup>2+</sup> (mmol/L)	引物(μmol/L) Primer (μmol/L)
1	0.5	25	0.10	1.0	0.4
2	1.0	35	0.15	1.3	0.5
3	1.5	45	0.20	1.6	0.6
4	2.0	55	0.25	2.0	0.7
5	2.5	65	0.30	2.3	0.8

### 作者贡献

杨晶是本试验的试验设计和试验研究的执行人, 并完成数据处理分析及论文初稿的写作; 张广臣是本研究的构思者及负责人, 指导试验设计和论文的修改; 全体作者都阅读并同意最终的文本。

### 致谢

本研究所用试验材料由吉林市农业科学院园艺所、吉林省蔬菜花卉科学研究所、吉林农业大学园艺学院和长春市农业科学院园艺所提供, 感谢以上单位的支持与帮助; 感谢吉林农业大学吴春燕老师的悉心指导。

### 参考文献

Beebe S., Skroch P.W., Tohme J., Duque M.C., Pedraza F., and Nienhuis J., 2000, Structure of

genetic diversity among common bean landraces of middle American origin based on correspondence analysis of RAPD, *Crop Sci.*, 40(1): 264-273

Gu Y., Han Q.H., Wang W.T., Li S.W., Sun D.L., and Wu F., 2011, Application of common bean anthracnose resistance gene SCAR markers in snap bean disease resistance identification, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 38(5): 911-920 (古瑜, 韩启厚, 王武台, 李素文, 孙德岭, 吴锋, 2011, 普通菜豆抗炭疽病基因定位菜豆抗炭疽病基于 SCAR 标记在品种抗性鉴定中的应用, *园艺学报*, 38(5): 911-920)

He H.Y., Sha W., and Zhang Y.F., 2010, Optimization for ISSR-PCR reaction system of soybean, *Dadou Kexue (Soybean Science)*, 29(3): 510-513

- (何海燕, 沙伟, 张艳馥, 2010, 大豆 ISSR-PCR 反应体系的优化, 大豆科学, 29(3): 510-513)
- Li H., Li B., Zhao H.B., Yang W.Y., and Yang Z., 2012, ISSR analysis of alfalfa germplasm resources, *Caodi Xuebao (Acta Agrestia Sinica)*, 20(1): 96-101 (李红, 李波, 赵洪波, 杨蔚然, 杨翌, 2012, 苜蓿种质资源遗传关系的 ISSR 分析, 草地学报, 20(1): 96-101)
- Luan F.S., and Zu Y.G., 2002, Repd diversity of germplasm resources on *Phaseolus vulgaris* L., *Zhiwu Yanjiu (Bulletin of Botanical Research)*, 22(4): 473-478 (栾非时, 祖元刚, 2002, 菜豆种质资源 RAPD 多样性的研究 I, 植物研究, 22(4): 473-478)
- Mao W.W., Ma J.J., Bo T.Y., Gao H.S., and Chen X.H., 2006, Study on optimization for ISSR reaction system in *Brassica campestris* L. ssp. *Chinensis* var *utilis* Tsen et Lee using orthogonal design, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 4(6S): 137-141 (冒维维, 马金骏, 薄天岳, 高红胜, 陈学好, 2006, 正交设计优化菜薹 ISSR 反应体系研究, 分子植物育种, 4(6S): 137-141)
- Qiu Y.X., Fu C.X., and Kong H.H., 2002, Inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis of different cultivars in *Myrica rubra*, *Nongye Shengwu Jishu Xuebao (Journal of Agricultural Biotechnology)*, 10(4): 343-346 (邱英雄, 傅承新, 孔航辉, 2002, 杨梅不同品种的 ISSR 分析, 农业生物技术学报, 10(4): 343-346)
- Sun X.D., 2003, Phylogeny of genus of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Heilongjiang province by RAPD, Thesis for M.S., Northeast Agricultural University, Supervisor: Qin Z.W., pp.31-33 (孙晓丹, 2003, 油豆角 (*Phaseolus vulgaris* L.) 主要种质资源亲缘关系的 RAPD 分析, 硕士学位论文, 东北农业大学, 导师: 秦智伟, pp.31-33)
- Tantasawat P., Trongchuen J., Prajongjai T., Seehalak W., and Jittayasothorn Y., 2010, Variety identification and comparative analysis of genetic diversity in yardlong bean (*Vigna unguiculata* spp. *sesquipedalis*) using morphological characters, SSR and ISSR analysis, *Sci. Hortic.*, 124(2): 204-216
- Tian T., Feng G.J., Sheng H., Liu D.J., Zhao C.M., and Wang J., 2012, Research of SSR molecular markers for *Phaseolus vulgaris* L. variety identification, *Beifang Yuanyi (Northern Horticulture)*, (4): 111-113 (田甜, 冯国军, 盛慧, 刘大军, 赵春梅, 王杰, 2012, SSR 分子标记对菜豆品种鉴定的研究, 北方园艺, (4): 111-113)
- Wang K., Wang X.M., Zhu Z.D., Zhao X.Y., Zhang X.Y., and Wang S.M., 2009, Mapping of a novel anthracnose resistance gene using SSR markers in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 35(3): 432-437 (王坤, 王晓鸣, 朱振东, 赵晓彦, 张晓艳, 王述民, 2009, 以 SSR 标记对普通菜豆抗炭疽病基因定位, 作物学报, 35(3): 432-437)
- Wei X., Wei Y.X., Wang Y., Liu C., Wang X.D., and Dong W.X., 2010, Optimization of the inter-simple sequence repeat reaction system and its verification in Ping'ou hybrid hazelnut, *Beifang Yuanyi (Northern Horticulture)*, (4): 125-128 (魏鑫, 魏永祥, 王颖, 刘成, 王兴东, 董文轩, 2010, 平欧杂种榛 ISSR 反应体系的优化与验证, 北方园艺, (4): 125-128)
- Wu X.L., Wang S.B., Cao B.S., Liu J.B., and Pan B.G., 2007, Optimization for ISSR-PCR system in *Capsicum annum* L., *Jiangxi Nongye Daxue Xuebao (Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis)*, 29(2): 288-291 (吴小丽, 王述彬, 曹碚生, 刘金兵, 潘宝贵, 2007, 辣椒 ISSR-PCR 体系优化, 江西农业大学学报, 29(2): 288-291)
- Zeng L., Li M.Q., Yang X.M., Zhao L.J., and Yang F.R., 2012, Establishment and optimization of ISSR reaction system for pea, *Caodi Xuebao (Acta Agrestia Sinica)*, 20(3): 536-539 (曾亮, 李敏权, 杨晓明, 赵丽娟, 杨发荣, 2012, 豌豆 ISSR-PCR 反应体系的建立和优化, 草地学报, 20(3): 536-539)
- Zhao G.F., 2003, Genome fingerprinting of pear cultivars by ISSR, Thesis for M.S., Agricultural University of Hebei, Supervisor: Zhang Y.X.,

pp.22-25 (赵国芳, 2003, ISSR 对梨属(*Pyrus L.*)  
栽培品种基因组的指纹分析, 硕士学位论文,  
河北农业大学, 导师: 张玉星, pp.22-25)

Zietkiewicz E., Rafalski A., and Labuda D., 1994,  
Genome fingerprinting by simple sequence

repeat (SSR)-anchored polymerase chain  
reaction amplification, *Genomics*, 20(2): 176-183