



## 研究报告

### A Letter

## 丽穗凤梨 ISSR-PCR 反应体系的优化和确立

葛亚英<sup>✉</sup>, 张飞<sup>✉</sup>, 王炜勇<sup>✉</sup>, 沈晓岚<sup>✉</sup>, 刘建新<sup>✉</sup>, 张智<sup>✉</sup>

浙江省农科院花卉研究开发中心, 杭州, 311202

✉ 通讯作者: [gyy954002@126.com](mailto:gyy954002@126.com); ✉ 作者

分子植物育种, 2011 年, 第 9 卷, 第 119 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0119

收稿日期: 2011 年 11 月 04 日

接受日期: 2011 年 11 月 30 日

发表日期: 2011 年 12 月 02 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

葛亚英等, 2011, 丽穗凤梨 ISSR-PCR 反应体系的优化和确立, 分子植物育种(online) Vol.9 No.119 pp.1864-1869 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0119)

引用格式(英文):

Ge et al., 2011, Optimization and establishment of ISSR-PCR reaction system of *Vriesea* Bromeliads, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.9 No.119 pp.1864-1869 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0119)

**摘要** 为建立适宜丽穗凤梨 DNA 的 ISSR-PCR 扩增体系, 本文采用单因子试验对影响 ISSR-PCR 反应的各组分(*Taq* DNA 聚合酶, 模板 DNA, 引物, dNTPs 和  $Mg^{2+}$  浓度)进行了优化, 确立了适合丽穗凤梨的条带清晰、多态性高、重复性好的最佳 ISSR-PCR 反应体系, 即在 20  $\mu$ L PCR 反应体系中含有 10 $\times$  PCR Buffer 2.0  $\mu$ L、25 mmol/L  $MgCl_2$  1.2  $\mu$ L、10 mmol/L dNTPs 0.4  $\mu$ L、5 U/ $\mu$ L *Taq* 酶 0.25  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L 引物 3.0  $\mu$ L、20 ng/ $\mu$ L 模板 1.5  $\mu$ L, 并利用两条引物 23 个丽穗凤梨品种进行了稳定性鉴定, 为丽穗凤梨的遗传多样性分析及育种工作提供了新的技术支持。

**关键词** 丽穗凤梨; ISSR; 单因素试验; 体系优化

## Optimization and Establishment of ISSR-PCR Reaction System of *Vriesea* Bromeliads

Ge Yaying<sup>✉</sup>, Zhang Fei<sup>✉</sup>, Wang Weiyong<sup>✉</sup>, Shen Xiaolan<sup>✉</sup>, Liu Jianxin<sup>✉</sup>, Zhang Zhi<sup>✉</sup>

Research & Development Centre of Flower, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou, 311202

✉ Corresponding author, [gyy954002@126.com](mailto:gyy954002@126.com); ✉ Authors

**Abstract** To establish ISSR-PCR amplification system suitable for *Vriesea* Bromeliads, effects of five elements, *Taq* DNA polymerase, template DNA, primer, dNTPs and  $Mg^{2+}$  concentration, on ISSR-PCR were investigated and the optimum ISSR-PCR reaction system for *Vriesea* Bromeliads was established with clear band pattern, high polymorphism and good repeatability. The optimum ISSR-PCR reaction system was a total of 20  $\mu$ L containing 10 $\times$  PCR Buffer 2.0  $\mu$ L, 25 mmol/L  $MgCl_2$  1.2  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTPs 0.4  $\mu$ L, 5 U/ $\mu$ L *Taq* polymerase 0.25  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L primer 3.0  $\mu$ L and 20 ng/ $\mu$ L DNA 1.5  $\mu$ L. The established ISSR-PCR system was verified to be stable and reliable by genotyping 23 *Vriesea* Bromeliads with two different primers. The optimal system will provide a new technical assistance for breeding and genetic diversity analysis of *Vriesea* Bromeliads.

**Keywords** *Vriesea*; ISSR; Single factor test; System optimization

## 研究背景

丽穗凤梨系凤梨科(Bromeliaceae)铁兰亚科(Tillandsioideae)丽穗凤梨属(*Vriesea*)植物及其杂交种的总称, 是观赏凤梨的主要类群之一。其具有花色艳丽、易栽培、花期长和耐荫性强等特点, 观赏价值高, 有很好的经济开发前景。然而, 目前市场上畅销的丽穗凤梨品种大多数是国外育成品种, 国内育种研究滞后、自主知识产权品种的缺乏已严重限制了我国丽穗凤梨产业的健康发展, 因此, 开展丽穗凤梨资源遗传多样性和资源鉴定研究, 对其资

源保护及新品种培育具有重要意义, 而此项研究工作的前提是建立适合丽穗凤梨的分子标记体系。国内外有关丽穗凤梨的研究多集中在生产技术(王炜勇等, 2011), 地理居群(Palma-Silva et al., 2009)等方面, 而对丽穗凤梨种质资源的遗传多样性方面的研究在国内外尚未见报道。

ISSR (Inter-simlpe sequence repeat)是一种简单重复序列扩增多态性分子标记, 是由 Zietkiewicz 等(1994)创建的一种 DNA 标记技术, 其优点多, 不仅

DNA 样品用量少、实验成本低、操作简单, 而且实验多态性高、信息量大、重复性好, 目前在品种鉴定、居群遗传学、系统学比较与物种分类以及物种的进化关系等研究中已被广泛应用, 并开始在植物遗传多样性研究中运用(周延清等, 2008)。目前已成功用于菊花(缪恒彬等, 2008)、兰花(吴振兴等, 2008)、万寿菊(曾丽等, 2010)等观赏植物的遗传多样性、品种鉴定或指纹图谱构建等研究。李萍等(2007)运用 ISSR 对光萼荷属凤梨与其近源属亲缘关系进行分析研究, 但未见对其反应体系进行优化。虽然 ISSR-PCR 具有重复性高等优点, 但不同反应体系产生的结果也有可能不同(吕岩楨等, 2011), 甚至同一种植物在不同的试验条件下其研究结果都有差异(柴丹丹等, 2008)。同一反应体系在不同的实验条件下, 针对不同属的 DNA 模板对扩增效果的影响较大, 因此, 对丽穗凤梨 ISSR-PCR 体系进行优化是必要的。

本研究提取丽穗凤梨种质资源叶片的基因组总 DNA, 并对 ISSR 反应体系中主要组分 *Taq* DNA 聚合酶浓度、模板 DNA 浓度、引物浓度、dNTPs 浓度以及  $Mg^{2+}$  浓度等进行优化, 所确立的 ISSR 反应体系为进一步利用 ISSR 标记技术开展丽穗凤梨种质资源遗传多样性研究、连锁遗传图谱构建和分子标记育种等方面奠定重要基础。

## 1 结果与分析

### 1.1 丽穗凤梨基因组的 DNA 提取

将用 CTAB 法提取叶片得到的 DNA 通过琼脂糖凝胶和分光光度计来测其质量和浓度, 结果 DNA 条带清晰, 杂质含量较少, 可以满足 ISSR 的实验要求(图 1)。



图1 丽穗凤梨23份样品DNA提取

Figure 1 The DNA extracted from 23 samples of *Vriesea* Bromeliads

### 1.2 丽穗凤梨 ISSR-PCR 体系的优化

#### 1.2.1 *Taq* DNA 聚合酶用量对 ISSR-PCR 的影响

通过 5 种不同 *Taq* DNA 聚合酶用量比较(图 2)。20  $\mu$ L 反应体系中, *Taq* DNA 聚合酶用量在 0.75 U 时, 扩增条带比较弱, 且条带数少, 当 *Taq* 酶用量为 1.0~1.75 U 时, 均能扩增出明显条带, 在 1.25 U 时扩增条带最清晰, 因此, *Taq* 酶用量在 1.25 U 时为最佳。

#### 1.2.2 模板 DNA 用量对 ISSR-PCR 的影响

试验设置模板 DNA 终浓度梯度为 0.5  $ng/\mu$ L、

1.0  $ng/\mu$ L、1.5  $ng/\mu$ L、2.0  $ng/\mu$ L、3.0  $ng/\mu$ L、4.0  $ng/\mu$ L (图 3), 结果模板 DNA 用量在 0.5  $ng/\mu$ L 时扩增条带较模糊, 1.0~4.0  $ng/\mu$ L 时均能扩增出清晰带型, 通过多次重复比较试验, 且从经济角度考虑, 1.5  $ng/\mu$ L 的模板用量可以满足丽穗凤梨 ISSR-PCR 反应的要求。

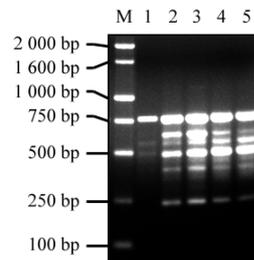


图 2 *Taq* DNA 聚合酶用量对 ISSR 反应的影响

注: M: 100 bp DNA marker; 1~5: *Taq* DNA 聚合酶用量分别为 0.75 U, 1.0 U, 1.25 U, 1.5 U 和 1.75 U

Figure 2 The effect of different *Taq* DNA Polymerase concentrations on ISSR reaction

Note: M: 100 bp DNA marker; 1~5: *Taq* DNA Polymerase concentration is 0.75 U, 1.0 U, 1.25 U, 1.5 U and 1.75 U, respectively

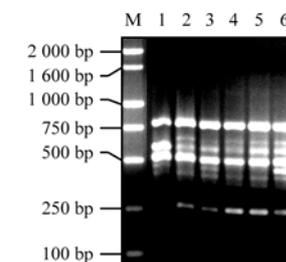


图 3 DNA 浓度对 ISSR 反应的影响

注: M: 100 bp DNA marker; 1~6: DNA 浓度依次为 0.5  $ng/\mu$ L, 1.0  $ng/\mu$ L, 1.5  $ng/\mu$ L, 2.0  $ng/\mu$ L, 3.0  $ng/\mu$ L 和 4.0  $ng/\mu$ L

Figure 3 The effect of DNA concentrations on ISSR reaction

Note: M: 100 bp DNA marker; 1~6: DNA concentration is 0.5  $ng/\mu$ L, 1.0  $ng/\mu$ L, 1.5  $ng/\mu$ L, 2.0  $ng/\mu$ L, 3.0  $ng/\mu$ L and 4.0  $ng/\mu$ L, respectively

#### 1.2.3 引物浓度对 ISSR-PCR 的影响

试验中引物浓度的变化对产物的多少和条带的亮度影响较大(图 4), 引物浓度在 0.5~1.0  $\mu$ mol/L 时虽然能扩增出产物, 但是条带数少且有些扩增条带较弱; 1.25~2.0  $\mu$ mol/L 时均能扩增出清晰的条带, 经重复比较, 以 1.5  $\mu$ mol/L 时, 反应最稳定, 条带清晰, 故将引物浓度确定为 1.5  $\mu$ mol/L。

#### 1.2.4 dNTPs 浓度对 ISSR-PCR 的影响

当 dNTPs 浓度为 0.05 mmol/L 和 0.6 mmol/L 时没有扩增条带; 0.1 mmol/L 时条带缺失现象严重, 多数条带模糊不清; dNTPs 浓度为 0.2~0.4 mmol/L

时扩增带型基本一致, 但 0.2 mmol/L 时扩增条带最清晰, 因此 dNTPs 浓度变化对 PCR 产物影响较大, 最终 dNTPs 最佳浓度为 0.2 mmol/L (图 5)。

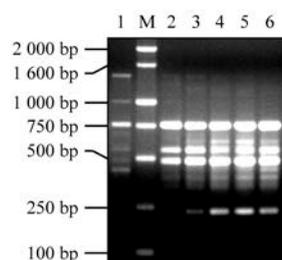


图 4 引物浓度对 ISSR 反应的影响

注: M: 100 bp DNA marker; 1~6: 引物浓度依次为 0.5 μmol/L, 0.75 μmol/L, 1.0 μmol/L, 1.25 μmol/L, 1.5 μmol/L 和 2.0 μmol/L

Figure 4 The effect of primer concentrations on ISSR reaction  
Note: M: 100 bp DNA marker; 1~6: Primer concentration is 0.5 μmol/L, 0.75 μmol/L, 1.0 μmol/L, 1.25 μmol/L, 1.5 μmol/L and 2.0 μmol/L, respectively

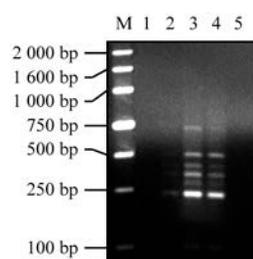


图 5 dNTPs 浓度对 ISSR 反应的影响

注: M: 100 bp DNA marker; 1~5: dNTPs 浓度为 0.05 mmol/L, 0.1 mmol/L, 0.2 mmol/L, 0.4 mmol/L 和 0.6 mmol/L

Figure 5 The effect of dNTPs concentrations on ISSR reaction  
Note: M: 100 bp DNA marker; 1~5: dNTPs concentration is 0.05 mmol/L, 0.1 mmol/L, 0.2 mmol/L, 0.4 mmol/L and 0.6 mmol/L, respectively

### 1.2.5 Mg<sup>2+</sup> 浓度对 ISSR-PCR 的影响

Mg<sup>2+</sup> 浓度对 ISSR-PCR 反应的特异性及扩增条带数的影响较大(图 6)。随着 Mg<sup>2+</sup> 浓度增加, 扩增条带数先增加后减少, 当 Mg<sup>2+</sup> 浓度为 1.5 mmol/L 时扩增产物最为丰富, 且条带最清晰。随着浓度增加, 条带逐渐模糊, 当浓度为 2.5 mmol/L 时产生非特异性扩增。因此, 最终确定为 1.5 mmol/L 的 Mg<sup>2+</sup> 浓度为最适浓度。

### 1.3 ISSR-PCR 反应体系的确立及稳定性鉴定

根据上述各影响因子试验结果, 最终确定优化后的 20 μL 反应体系中: 10× PCR Buffer 2.0 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.2 μL, 10 mmol/L dNTPs 0.4 μL, 5 U/μL *Taq* 酶 0.25 μL, 10 μmol/L 引物 3.0 μL, 20 ng/μL 模板 1.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 补充至 20 μL。应用上述反应体系,

进行引物筛选, 筛选得到的引物随机选取 2 条, 对 23 个品种进行 PCR 扩增(图 7), 引物 U808 和 U834 对每份 DNA 样品均能扩增出条带清晰、多态性丰富的 DNA 片段, 说明该 ISSR-PCR 反应体系稳定可靠, 适用于丽穗凤梨基因组 DNA 的 ISSR-PCR 扩增反应。

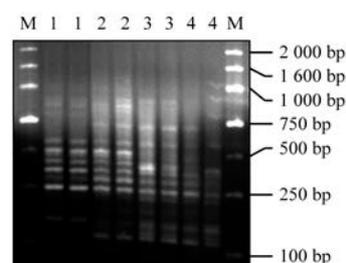


图 6 Mg<sup>2+</sup> 浓度对 ISSR 反应的影响

注: M: 100 bp DNA marker; 1~4: Mg<sup>2+</sup> 浓度依次为 1.0 mmol/L, 1.5 mmol/L, 2.0 mmol/L 和 2.5 mmol/L

Figure 6 The effect of Mg<sup>2+</sup> concentrations on ISSR reaction  
Note: M: 100 bp DNA marker; 1~4: Mg<sup>2+</sup> concentration is 1.0 mmol/L, 1.5 mmol/L, 2.0 mmol/L and 2.5 mmol/L, respectively

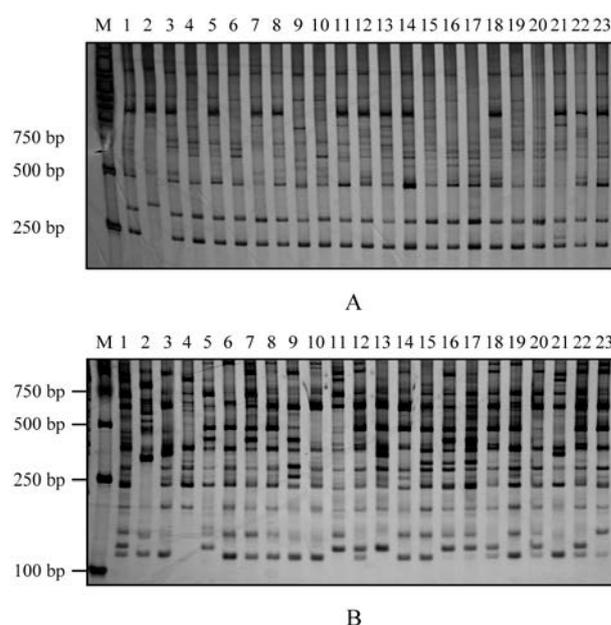


图 7 引物 U808 和 U834 在 23 个丽穗凤梨品种中的扩增

注: A: 引物 U808; B: 引物 U834; M: 100 bp DNA marker

Figure 7 ISSR profiles of 23 cultivars in *Vriesea* cultivars amplified by primer U808 and U834

Note: A: Primer U808; B: Primer U834; M: 100 bp DNA marker

## 2 讨论

ISSR-PCR 反应受反应组分变化影响较大, 此外, 不同植物种类的 PCR 扩增反应体系存在一定的

差异(陈丽静等, 2011; 刘立军等, 2006)。目前尚无丽穗凤梨 ISSR 标记的相关报道, 因此, 建立丽穗凤梨 ISSR 优化体系是必要的。大多数研究者对植物进行 PCR 扩增前, 都会对该植物进行反应体系的优化, 一般采取两种方法: 第一是运用正交试验进行优化设计(张飞等, 2009; 李健等, 2011; 邹小云等, 2010), 但是其有可能得到的实验条件并不是最优条件; 第二是采用单因子试验(陈丽静等, 2011; 杜萍和崔宝凯, 2011), 对影响 ISSR-PCR 的各个反应因子进行单独的梯度试验, 找出最佳反应条件。本试验采用第二种方法, 最终确立了丽穗凤梨 ISSR-PCR 最佳反应体系。

关于 ISSR 的反应体系优化的报道(张玉星等, 2011; 吕岩桢等, 2011)很多, 成分用量的变化对 ISSR-PCR 扩增结果影响很大。李萍等(2007)对光萼荷属凤梨与其近源属亲缘关系进行研究时采用的是 20  $\mu\text{L}$  ISSR 反应体系, 其中含 10 $\times$  PCR Buffer 2.0  $\mu\text{L}$ 、25 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  2.0  $\mu\text{L}$ 、10 mmol/L dNTPs 0.8  $\mu\text{L}$ 、5 U/ $\mu\text{L}$  *Taq* 酶 0.2  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$  引物 1.0  $\mu\text{L}$ 、10 ng/ $\mu\text{L}$  模板 1.0  $\mu\text{L}$ 。然而, 本试验优化后的丽穗凤梨 ISSR 体系中, 除 PCR Buffer 含量与其一致外, 其余组分含量与光萼荷属凤梨均存在差异。本试验在优化 ISSR-PCR 扩增体系时发现, 各组分(*Taq* DNA 聚合酶, 模板 DNA, 引物浓度, dNTPs,  $\text{Mg}^{2+}$  浓度)作为 ISSR 扩增底物, 有一个相对适宜的用量范围, 浓度过低, 不能满足扩增要求; 浓度过高, 又降低各组分的活性, 影响扩增效果。因此, 进行 ISSR 体系的优化是获得较好研究结果的关键所在。

目前尚无丽穗凤梨品种资源多样性研究。通过筛选得到的其中两条引物对丽穗凤梨 23 个品种的 ISSR 扩增结果分析, 每个品种均能扩增出清晰条带, 引物 U808 能扩增出 13 个清晰 DNA 位点, 引物 U834 能扩增出 10 个清晰 DNA 位点, 并且多态性均达 100%。验证结果证明本研究确立的 ISSR-PCR 反应体系稳定、可靠, 同时也说明 ISSR 分子标记适合对丽穗凤梨进行遗传多样性分析。这一优化的反应体系为进一步利用 ISSR 分子标记技术对丽穗凤梨资源鉴定、分类和分子遗传图谱的构建及分子标记辅助育种等分子生物学研究奠定了良好的基础。

### 3 实验材料与方法

#### 3.1 实验材料

供试材料为丽穗凤梨属 23 个品种, 2010 年采自浙江省农科院花卉研究开发中心观赏凤梨资源圃。

#### 3.2 基因组 DNA 的提取和检测

参照 Murray 和 Thomopson (1980)方法采用 CTAB 法提取丽穗凤梨基因组 DNA, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 质量和浓度,

并统一稀释至 20 ng/ $\mu\text{L}$ , 保存于  $-20^\circ\text{C}$  备用。

#### 3.3 ISSR-PCR 扩增

PCR 扩增选用的引物根据 British Columbia 大学公布的 ISSR 引物序列, 由上海生工有限公司合成; *Taq* DNA 聚合酶、dNTP、 $\text{MgCl}_2$ 、10 $\times$  Buffer 以及 100 bp DNA marker 均购自杭州鼎国生物技术有限公司。扩增程序是: 首先  $94^\circ\text{C}$  预变性 4 min; 再  $94^\circ\text{C}$  变性 30 s,  $56^\circ\text{C}$  复性 45 s,  $72^\circ\text{C}$  延伸 60 s, 共 40 个循环; 然后  $72^\circ\text{C}$  延伸 6 min, 最后  $4^\circ\text{C}$  保存。PCR 扩增反应在美国 ABI Applied Biosystems 2720 型 PCR 扩增仪上进行。

#### 3.4 ISSR-PCR 反应体系的优化试验设计

按照基本扩增反应体系(20  $\mu\text{L}$  反应体系中: 10 $\times$  PCR Buffer 2.0  $\mu\text{L}$ , 25 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  1.0  $\mu\text{L}$ , 10 mmol/L dNTPs 0.8  $\mu\text{L}$ , 5 U/ $\mu\text{L}$  *Taq* 酶 0.2  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$  引物 2.0  $\mu\text{L}$ , 20 ng/ $\mu\text{L}$  模板 1.0  $\mu\text{L}$ ), 对 *Taq* DNA 聚合酶用量、模板 DNA 含量、引物浓度、dNTPs 和  $\text{Mg}^{2+}$  浓度 5 个影响 ISSR-PCR 扩增的主要因素进行单因子试验, 各反应参数作 4~6 个水平的梯度优化(表 1), PCR 扩增产物采用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 确定各成分的最佳浓度, 每个优化好了的参数直接用于下一个优化参数的反应体系中。

表 1 ISSR 反应体系优化设计

Table 1 Design of optimal ISSR reaction system

反应物	反应物浓度					
Reactant	Reactant concentration					
<i>Taq</i> DNA 聚合酶浓度 (U)	0.75	1.0	1.25	1.5	1.75	-
The concentration of <i>Taq</i> DNA polymerase (U)						
模板 DNA 浓度 (ng/ $\mu\text{L}$ )	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0	4.0
The concentration of template DNA (ng/ $\mu\text{L}$ )						
引物浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.5	0.75	1.0	1.25	1.5	2.0
The concentration of primers ( $\mu\text{mol/L}$ )						
dNTPs 浓度 (mmol/L)	0.05	0.1	0.2	0.4	0.6	-
The concentration of dNTPs (mmol/L)						
$\text{MgCl}_2$ 浓度 (mmol/L)	1.0	1.5	2.0	2.5	-	-
The concentration of $\text{MgCl}_2$ (mmol/L)						

#### 3.5 ISSR 反应体系引物筛选及检测

根据优化的 ISSR 反应体系, 选用 2 个品种对 48 条 ISSR 引物进行 PCR 扩增, 扩增产物采用 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 确定多态性较

好且条带清晰的引物, 选用其中 2 条引物对 23 个品种进行多态性扩增检测。

### 作者贡献

葛亚英、张飞是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 葛亚英、张飞完成数据分析, 论文初稿的写作; 沈晓岚、刘建新和张智参与实验设计, 试验结果分析; 王伟勇是项目的构思者, 指导实验设计; 张飞进行论文修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

### 致谢

本研究由浙江省重大科技专项(2009C12095)、杭州市种子种苗项目(20101532H06)和浙江省农科院创新能力提升项目共同资助。

### 参考文献

- Chai D.D., Chen S.X., Meng H.W., Cheng Z.H., and Li Y.L., 2008, Establishment of SRAP-PCR reaction system on cucumber, *Xibei Nongye Xuebao (Acta Agriculturae Borealioccidentalis Sinica)*, 17(3): 274-279 (柴丹丹, 陈书霞, 孟焕文, 程智慧, 李亚利, 2008, 黄瓜 SRAP-PCR 反应体系的建立, *西北农业学报*, 17(3): 274-279)
- Chen L.J., Cao S., Wang Y.K., Liu X.C., Zhang L., Ming J., Tao C.G., Li T.L., 2011, Optimization of SRAP-PCR in *Lilium*, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 9: 1173-1181 (陈丽静, 曹珊, 王玉坤, 刘烜晨, 张丽, 明军, 陶承光, 李天来, 2011, 百合 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化, *分子植物育种*, 9: 1173-1181)
- Du P., and Cui B.K., 2011, Establishment and optimization of SRAP-PCR reaction system for wild *Auricularia polytricha*, *Jiyin Zuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 30: 1165-1172 (杜萍, 崔宝凯, 2011, 野生毛木耳 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化, *基因组学与应用生物学*, 30: 1165-1172)
- Li J., Jiang C.H., Zhang Y.L., Liu Z., Zhao X.F., and Hu Y.H., 2011, Optimization and establishment of SRAP-PCR reaction system of *Camellia nitidissima*, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 9(23): 1167-1172 (李健, 蒋昌华, 张亚利, 刘焯, 赵晓峰, 胡永红, 2011, 金花茶 SRAP-PCR 反应体系的优化与确立, *分子植物育种*, 9(23): 1167-1172)
- Li P., Shi J.L., Hu Y.H., Chen C., Jiang C.H., Wang J., and Ming F., 2007, Molecular identification of *Aechmea* and relative genera in Bromeliaceae by ISSR, *Zhongzi (Seed)*, 26(11): 35-40 (李萍, 石金磊, 胡永红, 陈醇, 蒋昌华, 王佳, 明凤, 2007, 凤梨亚科光萼荷属与其近源属亲缘关系的ISSR分子鉴定, *种子*, 26(11): 35-40)
- Liu L.J., Meng Z.Q., Xing X.L., and Peng D.X., 2006, Optimization for SRAP reaction system in *Ramie*, *Fenzi*

- Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 4(5): 726-730 (刘立军, 蒙祖庆, 邢秀龙, 彭定祥, 2006, 苧麻基因组 SRAP 扩增体系的优化研究, *分子植物育种*, 4(5): 726-730.)
- Lv Y.Z., Wang L., Zhang X.W., and Guo C.Y., 2011, Optimization of ISSR Reaction system in *Carya cathayensis*, *Anhui Nongxue Tongbao (Anhui Agricultural Science Bulletin)*, 17(07): 30-31, 35 (吕岩桢, 王雷, 张兴旺, 郭传友, 2011, 山核桃 ISSR 反应体系的优化, *安徽农学通报*, 17(07): 30-31, 35)
- Miao H.B., Chen F.D., Zhao H.B., Fang W.M., and Shi L.M., 2008, Genetic diversity and construction of fingerprinting of chrysanthemum cultivars by ISSR markers, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 41(11): 3735-3740 (缪恒彬, 陈发棣, 赵宏波, 房伟民, 石丽敏, 2008, 应用 ISSR 对 25 个小菊品种进行遗传多样性分析及指纹图谱构建, *中国农业科学*, 41(11): 3735-3740)
- Murray M., and Thompson W.F., 1980, Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, *Nucleic Acids Research*, 8: 4321-4325
- Palma-Silva C., Lexer C., Paggi G.M., Barbará T., Bered F., and Bodanese-Zanettini M. H., 2009, Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species, *Heredity*, 103:503-512
- Wang W.Y., Yu Y.M., Yu S.H., Yu X.Y., and Zhao Z.J., 2011, Standardization plant technology of *Vriesea* in Zhejiang, *Zhejiang Nongye Kexue (Journal of Zhejiang Agricultural Sciences)*, 2: 283-286 (王伟勇, 郁永明, 俞少华, 俞信英, 赵张健, 2011, 浙江省丽穗凤梨标准化生产技术, *浙江农业科学*, 2: 283-286)
- Wu Z.X., Wang H.Z., Shi N.N., and Zhao Y., 2008, The genetic diversity of *Cymbidium* by ISSR, *Yichuan (Hereditas)*, 30(5): 627-632 (吴振兴, 王慧中, 施农农, 赵艳, 2008, 兰属 *Cymbidium* 植物 ISSR 遗传多样性分析, *遗传*, 30(5): 627-632)
- Zeng L., Zhao L.J., Sun J., Zhao Z.G., and Yang F., 2010, Analysis of genetic relatedness of genetic resources of *Tagetes* as revealed by ISSR, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 43(1): 215-222(曾丽, 赵梁军, 孙佳, 赵子刚, 杨帆, 2010, 万寿菊属品种资源遗传关系的 ISSR 分析, *中国农业科学*, 43(1): 215-222)
- Zhang F., Chen F.D., Fang W.M., Li F.T., and Liu P.S., 2009, Optimization and establishment of SRAP-PCR reaction system of *Dendranthema×Grandiflorum*, *Zhiwu Ziyuan Yu Huanjing Xuebao (Journal of Plant Resources and Environment)*, 18(3): 44-49 (张飞, 陈发棣, 房伟民, 李凤童, 刘浦生, 2009, 菊花 SRAP-PCR 反应体系的优化

与确立, 植物资源与环境学报, 18(3): 44-49)

Zhang Y.X., Ma Y.Z., and Zhao G.F., 2011, Establishment and optimization of ISSR technique in *Pyrus L.*, *Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 27(6): 50-53 (张玉星, 马艳芝, 赵国芳, 2011, 梨属植物 ISSR 技术体系的建立与优化, 中国农学通报, 27(6): 50-53)

Zhou Y.Q., Yang Q.X., and Zhang G.N., 2008, Bio-genetic markers and application, Chemical Industry Press, Beijing, China, pp.166-167 (周延清, 杨清香, 张改娜, 2008, 生物遗传标记与应用, 化学工业出版社, 中国, 北京, pp.166-167)

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

Zou X.Y., Zou X.F., Chen L.L., and Song L.Q., 2010, Optimization for SRAP-PCR system of peanut based on orthogonal design, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 8(4): 822-826 (邹小云, 邹晓芬, 陈伦林, 宋来强, 2010, 花生 SRAP-PCR 反应体系的正交设计优化, 分子植物育种, 8(4): 822-826)



5<sup>th</sup>Publisher是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5<sup>th</sup>Publisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>