

## 地石榴 ISSR 扩增体系优化及应用\*

侯香莲<sup>1,2</sup> 杨大荣<sup>1</sup> 曹永强<sup>1,2</sup> 柳青<sup>1,2</sup> 彭艳琼<sup>1</sup>

(1. 中国科学院 西双版纳植物园 中国科学院 热带森林生态学重点实验室 云南 昆明 650223;  
2. 中国科学院 研究生院 北京 100039)

**摘要:** 以地石榴为材料, 通过单因素试验, 对 ISSR-PCR 反应体系中各种影响因子, 如引物浓度、dNTPs 浓度、 $Mg^{2+}$  浓度、*Taq* DNA 聚合酶用量、模板 DNA 浓度、退火温度等进行了优化和筛选, 建立了适合地石榴的 ISSR-PCR 反应体系: 20  $\mu$ L 体系中, 10  $\times$  buffer 2.0  $\mu$ L, 引物 0.50  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, dNTPs 0.15 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>,  $Mg^{2+}$  1.2 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, *Taq* DNA 酶 1.25 U, 模板 DNA 25 ng. 确定了适宜的退火温度为 52  $^{\circ}$ C. 利用该优化后的体系从 60 条 ISSR 引物中筛选出了 12 条, 随机选取 2 条对 10 份分布于不同地区的地石榴标本基因组 DNA 进行扩增, 证实了该体系稳定可靠, 可用于进一步分析地石榴居群遗传多样性.

**关键词:** 地石榴; ISSR-PCR 反应体系; 优化

**中图分类号:** Q 949.737.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-7971(2011)S1-0310-07

地石榴(*Ficus tikoua*)是多年生常绿藤本植物, 属桑科(Moraceae)榕属(*Ficus*), 俗称地果, 又称地枇杷<sup>[1]</sup>. 最早记载于《滇南本草》用于风寒湿痹、肝胆湿热、泄泻痢疾, 是民族习惯用药, 临床应用已有较长的历史. 地石榴植物资源丰富, 分布广泛, 在我国云南、四川、广西、贵州、湖南、湖北及陕西南部等地均有分布. 它对环境有很强的适应性<sup>[2]</sup>, 常生长在路边、地头, 特别在喀斯特地貌石漠化区域能形成致密的草坪地被, 是水土保持的优良植物.

目前, 针对地石榴的研究仅仅集中在地石榴的应用于草坪的优势<sup>[2-3]</sup>、栽培技术<sup>[4]</sup>、药用价值<sup>[5]</sup>以及生理<sup>[6]</sup>等几个方面. 这些研究从内容来看只是对其现有的生物性状进行初步的筛选, 而没有把性状的鉴定与控制性状的基因以及基因的传递和变异规律的研究结合起来. 此外, 有关地石榴遗传多样性的研究国内外还未见报道, 了解地石榴的遗传多样性, 可以为将来地石榴种质资源的开发和利用以及培育具有自主知识产权的国产草坪新品系(种)提供重要的理论依据.

ISSR(inter-simple sequences repeats)即简单

序列重复区间标记法, 是由 Zietkiewicz 等 1994<sup>[7]</sup>年提出的一种 DNA 标记技术, 该技术检测的是 2 个相近 SSR 之间的一段短 DNA 序列上的多态性. 在 SSR 的 3' 端或 5' 端加锚 1~4 个嘌呤或嘧啶碱基, 并以此作为引物, 通常为 16~18 个碱基序列, 对两侧具有反向排列的 SSR 之间的一段 DNA 序列进行扩增, 然后进行电泳、染色. 根据谱带的有无及相对位置, 来分析不同样品间 ISSR 标记的多态性. 由于 ISSR 引物碱基数量多, 退火温度高, 可重复性好, 非特异性扩增少, 真核生物富含 SSR 序列且变异最快, 故 ISSR 扩增出的条带多且多态性要比 RAPD, SSR, RFLP 等更加丰富. ISSR 为显性标记, 符合孟德尔遗传规律, 并且无需克隆、制备探针、分子杂交等工作, 具有简便迅速、高效、实验成本低等优点. 因此, ISSR 技术现已在遗传多样性<sup>[8]</sup>、亲缘关系分析<sup>[9]</sup>、遗传作图<sup>[10]</sup>、品种鉴定<sup>[11]</sup>、进化<sup>[12]</sup>等研究方面被广泛应用. ISSR 被认为是研究种群遗传多样性的一种非常有效的分子标记手段<sup>[13-17]</sup>. 但不同物种 ISSR-PCR 扩增的最适反应条件需要摸索<sup>[18]</sup>. 该实验目的是优化地石

\* 收稿日期: 2011-03-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30970403, 30970439).

作者简介: 侯香莲(1983-), 女, 山东人, 硕士生, 主要从事榕树分子生物学研究.

通讯作者: 杨大荣(1954-), 男, 云南人, 研究员, 主要从事进化生态学研究, E-mail: yangdr@xtbg.ac.cn.

榴 ISSR 反应体系,以期建立重复性好、结果稳定的地石榴 ISSR-PCR 反应体系,为进一步进行地石榴的遗传多样性研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 反应体系的优化是以 2010 年

1 月采自云南维西的地石榴标本基因组 DNA 为模板进行的,利用 10 份分布于不同地区的地石榴标本(表 1)验证 ISSR 技术在地石榴遗传多样性研究应用中的有效性.用硅胶干燥法保存样品,采 5~10 g 新嫩地石榴叶子放到自封袋中,加入样品质量 10 倍的硅胶,摇动袋子使硅胶与叶子充分接触,干燥的材料在常温下保存.

表 1 10 份地石榴标本采集信息  
Tab. 1 The collection information of ten *Ficus tikoua* samples

| 样品编号 | 产地           | 纬度/(°) | 经度/(°) | 海拔/m  |
|------|--------------|--------|--------|-------|
| 1    | 云南大理州洱源县     | 26.11  | 99.99  | 2 099 |
| 2    | 云南迪庆州维西白济迅村  | 27.44  | 99.06  | 1 690 |
| 3    | 云南大理州鹤庆县     | 26.31  | 100.18 | 2 183 |
| 4    | 云南怒江州云龙县     | 25.99  | 99.14  | 1 314 |
| 5    | 云南玉溪市新平县     | 24.07  | 101.99 | 1 675 |
| 6    | 云南怒江州贡山县     | 27.67  | 98.73  | 1 418 |
| 7    | 云南迪庆州维西巴迪洛义村 | 26.90  | 98.97  | 1 829 |
| 8    | 云南楚雄州禄丰恐龙谷   | 24.97  | 102.07 | 1 571 |
| 9    | 云南昆明宜良县      | 24.83  | 103.11 | 1 638 |
| 10   | 贵州兴义坡脚       | 24.95  | 105.47 | 851   |

1.1.2 主要试剂 10 × *Taq* Buffer ( $Mg^{2+}$  25 mmol · L<sup>-1</sup>), 15 mmol · L<sup>-1</sup> dNTPs, 5 U μL<sup>-1</sup> *Taq* DNA polymerase 为宝生物(TaKaRa)公司产品, DNA Marker 为分子量标准,荧光染料 Goldview Nucleic Acid Stain 购自百泰克公司.引物是加拿大哥伦比亚大学设计的 ISSR 引物序列,由上海生工合成.

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 使用改良的 3 × CTAB 法<sup>[19]</sup>提取叶片总 DNA,通过紫外检测和琼脂糖凝胶电泳检测其质量和浓度,将部分稀释成 20 ng · μL<sup>-1</sup>置于 -20 °C 冰箱保存备用,其余放至 -80 °C 保存.

1.2.2 ISSR 反应体系的优化 为了确定最佳的地石榴 ISSR-PCR 扩增条件,参照侯思名等<sup>[20]</sup>的 ISSR 反应条件以及预试验的结果,初步设定各因

素的水平: ISSR-PCR 反应体积为 20 μL, 10 × buffer 2.0 μL,引物浓度 0.5 μmol · L<sup>-1</sup>, dNTPs 0.2 mmol · L<sup>-1</sup>,  $Mg^{2+}$  2.0 mmol · L<sup>-1</sup>, *Taq* DNA 酶 1.5 U,模板 DNA 60 ng.实验采用单因素试验对影响扩增的 6 个影响因素(引物浓度、dNTPs 浓度、 $Mg^{2+}$  浓度、*Taq* DNA 聚合酶用量、模板 DNA 浓度、退火温度)逐个进行 6~12 个水平梯度的对比试验,各梯度水平见表 2.前一个试验结果作为下一个试验的条件之一.每个影响因素的试验分别重复 4 次( $N=4$ ),使结果基本一致,否则改变梯度水平,继续重复试验,直到结果基本一致.

1.2.3 引物筛选 用建立的 ISSR-PCR 反应体系,从合成的 60 条 ISSR 单引物中筛选出 12 条引物用于地石榴材料的 ISSR 扩增,筛选出的引物序列见表 3.

表 2 ISSR-PCR 体系优化的因素及水平

Tab. 2 Factors and levels used for optimizing ISSR-PCR reaction system

| 反应因素                                                  | 浓度梯度(终浓度) |      |      |      |      |      |      |      |    |    |    |    |
|-------------------------------------------------------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|----|----|----|----|
|                                                       | 1         | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9  | 10 | 11 | 12 |
| $c(\text{引物})/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$    | 0.10      | 0.20 | 0.30 | 0.40 | 0.50 | 0.60 | 0.70 |      |    |    |    |    |
| $c(\text{dNTPs})/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$   | 0.05      | 0.10 | 0.15 | 0.20 | 0.25 | 0.3  | 0.35 | 0.40 |    |    |    |    |
| $c(\text{Mg}^{2+})/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$ | 0.60      | 0.90 | 1.20 | 1.50 | 1.80 | 2.10 |      |      |    |    |    |    |
| <i>Taq</i> DNA 酶/U                                    | 0.25      | 0.50 | 0.75 | 1.00 | 1.25 | 1.50 | 1.75 |      |    |    |    |    |
| 模板 DNA 质量/ng                                          | 5         | 10   | 15   | 20   | 25   | 40   | 60   | 100  |    |    |    |    |
| 退火温度/℃                                                | 48        | 49   | 50   | 51   | 52   | 53   | 54   | 55   | 56 | 57 | 58 | 59 |

表 3 本实验筛选出的 ISSR 引物序列

Tab. 3 The prime sequences screened in this study

| 引物编号 | 碱基序列(5'-3')        |
|------|--------------------|
| 3    | GAGAGAGAGAGAGAT    |
| 4    | GAGAGAGAGAGAGAC    |
| 7    | CTCTCTCTCTCTCTG    |
| 44   | BDBTCCTCCTCCTCCTCC |
| 52   | AGAGAGAGAGAGAGATC  |
| 60   | ACACACACACACACST   |
| 61   | CTCCTCCTCCTCCTC    |
| 87   | CTCTCTCTCTCTCTTG   |
| 88   | CTCTCTCTCTCTCTAC   |
| 89   | TCCTCCTCCTCCTCCAG  |
| 90   | AGCAGCAGCAGCGT     |
| 91   | CACCACCACGC        |

B = (G, T, C); D = (G, A, T); S = (G, C)

PCR 反应程序是: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 52℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 80 s, 共 40 个循环; 72℃ 完全延伸 10 min. PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上检测, gold-view 染色, 紫外分析仪下观察、拍照.

## 2 结果与分析

**2.1 退火温度对 ISSR 扩增的影响** 退火温度与引物序列有关, 由于不同的引物有不同的 GC 百分含量, 所以每种引物的适宜退火温度会有所不同. 本实验通过 PCR 仪自动生成 48~59℃ 之间的 12 个温度梯度, 图 1 是引物 89(以下优化体系的实验均使用该引物) 在不同退火温度下扩增的电泳图. 从图中可以看出, 当退火温度低于 50℃ 时, 弱带较

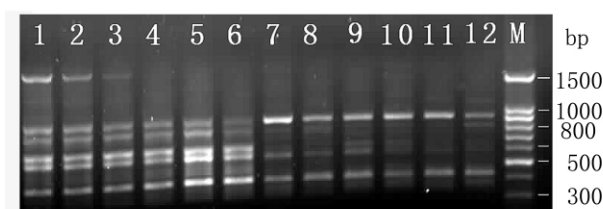
多, 结果不稳定; 而当温度高于 54℃ 时, 扩增片段明显减少, 所以此引物的反应温度范围应该是在 50~54℃ 之间, 以 52℃ 时条带最清晰明亮, 多态性好 ( $N=4$ ), 所以选择 52℃ (泳道 5) 作为最佳退火温度, 以期待获得较为稳定的扩增结果.

**2.2 引物浓度对 ISSR 扩增的影响** 引物浓度会对 PCR 的带型产生明显的影响, 浓度过低不能扩增, 浓度过高会引起模板与引物的错配, PCR 反应特异性降低, 且形成引物二聚体. 从图 2 可以看出, 引物浓度在  $0.50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 能得到清晰且稳定的条带 (泳道 5); 当浓度低于或高于这个浓度时, 条带减少且模糊 ( $N=4$ ). 因此, 实验中采用  $0.50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的引物浓度为宜.

**2.3 dNTPs 浓度对 ISSR 扩增的影响** dNTPs 是 PCR 反应的原料, 浓度过低会导致扩增产量低, 而过高会产生错误掺入. 从图 3 可以看出, 地石榴 IS-SR-PCR 反应体系中 dNTPs 的浓度为  $0.15 \sim 0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  之间时效果最好 (泳道 3, 4), 低于  $0.15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  或高于  $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  都会使扩增带减弱或消失 ( $N=4$ ), 因此, 采用  $0.15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs 为宜.

**2.4  $\text{Mg}^{2+}$  浓度对 ISSR 扩增的影响** 作为酶的辅助因子,  $\text{Mg}^{2+}$  浓度能影响 *Taq* DNA 聚合酶的活性,  $\text{Mg}^{2+}$  浓度过高容易生成非特异产物,  $\text{Mg}^{2+}$  浓度过低, 会使扩增带减少. 从图 4 可以确定  $1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  是反应的最适宜浓度 (泳道 4,  $N=4$ ).

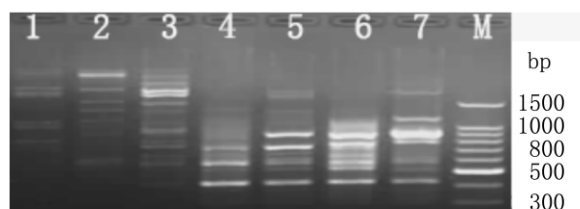
**2.5 *Taq* DNA 聚合酶对 ISSR 扩增的影响** 从图 5 可以看出 *Taq* DNA 聚合酶用量为 1.25 U 能扩增出较理想的条带, 而低于或高于 1.25 U 时, 扩增条带减弱或模糊不清 (泳道 5,  $N=4$ ).



M: 100 bp Marker; 1 ~ 12 的退火温度分别为 48 , 49 , 50 , 51 , 52 , 53 , 54 , 55 , 56 , 57 , 58 , 59 °C

图 1 退火温度对 ISSR 扩增的影响

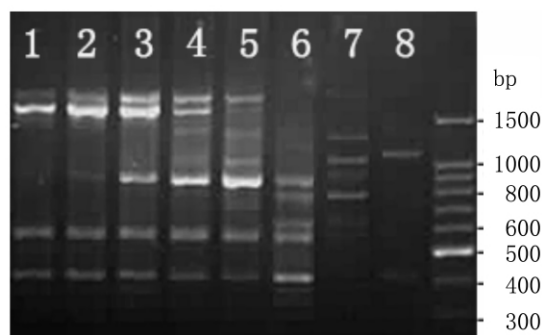
Fig. 1 Effect of annealing temperature on ISSR - PCR reaction ( M: 100 bp Marker; 1—12 for annealing temperature at 48 , 49 , 50 , 51 , 52 , 53 , 54 , 55 , 56 , 57 , 58 , 59 °C , respectively)



M: 100 bp Marker; 1 ~ 7 的引物浓度分别为 0.10 , 0.20 , 0.30 , 0.40 , 0.50 , 0.60 , 0.70  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图 2 引物浓度对 ISSR 扩增的影响

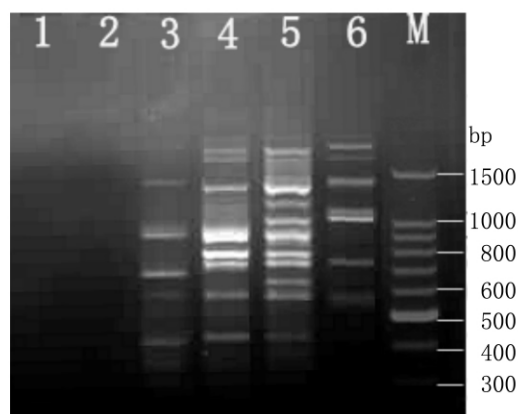
Fig. 2 Effects of primer concentration on ISSR - PCR reaction ( M: 100 bp Marker; 1—7 for primer concentration of 0.10 , 0.20 , 0.30 , 0.40 , 0.50 , 0.60 and 0.70  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )



M: 100 bp Marker; 1 ~ 8 的 dNTPs 浓度分别为 0.05 , 0.10 , 0.15 , 0.20 , 0.25 , 0.30 , 0.35 , 0.40  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

图 3 dNTPs 浓度对 ISSR 扩增的影响

Fig. 3 Effects of dNTPs on ISSR - PCR reaction ( M: 100 bp Marker; 1—8 for dNTPs concentration of 0.05 , 0.10 , 0.15 , 0.20 , 0.25 , 0.30 , 0.35 and 0.40  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )



M: 100 bp Marker; 1 ~ 6 的  $\text{Mg}^{2+}$  浓度分别为 0.60 , 0.90 , 1.20 , 1.50 , 1.80 , 2.10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

图 4  $\text{Mg}^{2+}$  浓度对 ISSR 扩增的影响

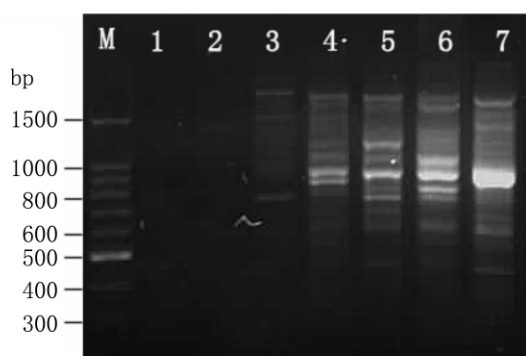
Fig. 4 Effects of  $\text{Mg}^{2+}$  concentration on ISSR reaction ( M: 100 bp Marker; 1—6 for  $\text{Mg}^{2+}$  concentration of 0.6 , 0.90 , 1.20 , 1.50 , 1.80 and 2.10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

**2.6 模板用量对 ISSR 扩增的影响** DNA 模板的用量是制约扩增产物得率及特异性的一个重要因子,模板用量过少,分子碰撞的机率低,偶然性大,没有扩增产物或扩增不稳定;模板用量过多,又会相应增加非特异性产物的扩增。由图 6 可见,在 20  $\mu\text{L}$  体系中加入 5 ~ 100 ng 的 DNA 模板均能够扩增出稳定的条带,本实验采用 25 ng 的 DNA 模板用量 (泳道 5,  $N=4$ )。

综上所述,本实验得到地石榴 ISSR - PCR 反应的最适宜体系: 20  $\mu\text{L}$  体系中,  $10 \times \text{buffer}$  2.0  $\mu\text{L}$ , 引物 0.50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , dNTPs 0.15  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  1.2  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , *Taq* DNA 酶 1.25 U, 模板 DNA 25 ng, 无菌超纯水补充至 20  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程

序是: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 40 个循环; 72 °C 完全延伸 10 min。

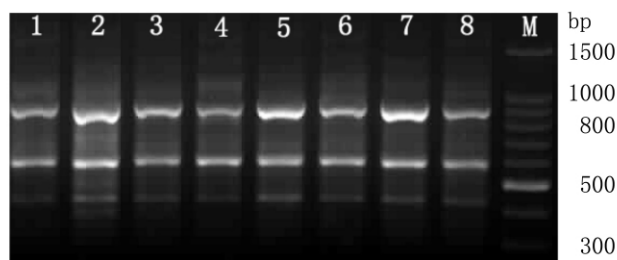
**2.7 引物筛选** 本试验采用以上确立的体系,从 60 条 ISSR 引物中筛选出了 12 条重复性好、特异性高的引物。从 12 条筛选出的引物中随机挑选编号为 87 和 89 两个引物对 10 份地石榴标本 DNA 进行扩增应用,以检测优化确立的地石榴 ISSR - PCR 反应体系的效果。结果如图 7 和图 8 所示,两个引物对 10 份地石榴标本基因组 DNA 进行 PCR 扩增,都能扩增出清晰、重复性好、多态性高的片段,表明优化确立的 ISSR 反应体系稳定可靠,可用于地石榴遗传多样性及亲缘关系分析等研究。



M: 100 bp Marker; 1~7 的 *Taq* DNA 聚合酶用量分别为 0.25  $\mu$ l, 0.5  $\mu$ l, 0.75  $\mu$ l, 1.0  $\mu$ l, 1.25  $\mu$ l, 1.5  $\mu$ l, 1.75  $\mu$ l

图 5 *Taq* DNA 聚合酶用量对 ISSR 扩增的影响

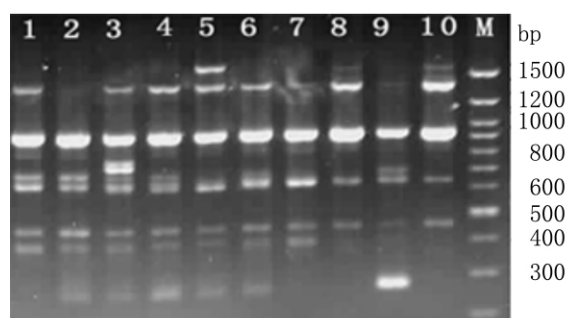
Fig. 5 Effects of *Taq* DNA polymerase dosage on ISSR reaction (M: 100 bp Marker; 1—7 for *Taq* DNA polymerase dosage of 0.25  $\mu$ l, 0.5  $\mu$ l, 0.75  $\mu$ l, 1.0  $\mu$ l, 1.25  $\mu$ l, 1.5  $\mu$ l and 1.75  $\mu$ l)



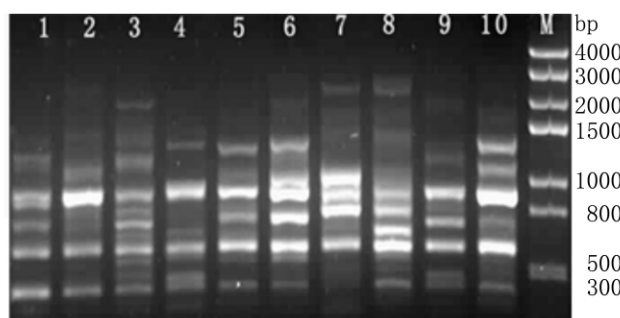
M: 100 bp Marker; 1~8 的模板质量分别为 5, 10, 15, 20, 25, 40, 60, 100 ng

图 6 模板用量对 ISSR 扩增的影响

Fig. 6 Effects of template DNA concentration on ISSR - PCR reaction (M: 100 bp Marker; 1—8 for template DNA concentration of 5, 10, 15, 20, 25, 40, 60, 100 ng, respectively)



A



B

M: 分子量标准; 1~10 为引物 87、89 分别对 10 份地石榴标本基因组 DNA 扩增结果

图 7 A、B 分别为引物 87、89 对 10 份地石榴标本基因组 DNA 的扩增结果

Fig. 7 The result of ISSR amplification of primer 87 (A) and primer 89 (B) with ten *Ficus tikoua* samples respectively (M: DNA Marker; 1—10 for the result of ISSR amplification with ten *Ficus tikoua* samples respectively)

### 3 讨论

由于 ISSR 分子标记技术是基于 PCR 的一种标记方法,其扩增效果易受退火温度、模板质量、引物浓度、 $Mg^{2+}$  浓度、dNTPs 浓度和 *Taq* DNA 酶等条件的影响,所以对其反应条件进行优化显得十分重要。在实验中发现引物的退火温度和 *Taq* DNA 酶对 ISSR - PCR 起着重要的作用,当退火温度偏低时,条带模糊;温度偏高时,片段减少。所以,在正式实验前,必须通过预实验确定引物的退火温度。在筛选引物时,如不清楚引物的退火温度,可以先确定一个统一的退火温度(本实验设置 52  $^{\circ}C$  为引物的退火温度),这样可以节省实验的时间,提高实验效率。*Taq* DNA 酶用量太多不仅增加实验的成

本,而且容易产生非特异性产物,用量太少则会使酶过早地消耗完,产物合成效率低<sup>[21]</sup>。由于不同厂家的酶活性不同,因此在实验中要始终采用相同的酶,才能保持实验的可靠性。本实验一直采用的都是宝生物(TaKaRa)公司产品。另外,很多实验都证明在一定范围内模板质量对扩增带影响不明显<sup>[22-23]</sup>。本实验中,设定的 8 个梯度的 DNA 用量扩增出来的条带数量和清晰度差异不算大,这说明地石榴 ISSR 反应体系对模板 DNA 的用量不太敏感。其它因素如引物浓度、dNTPs 浓度、 $Mg^{2+}$  浓度对 ISSR - PCR 扩增的影响也相对较小。

通过对引物浓度、dNTPs 浓度、 $Mg^{2+}$  浓度、*Taq* DNA 聚合酶用量、模板 DNA 用量等影响 ISSR - PCR 反应参数的研究,建立了地石榴 ISSR 反应的

适宜条件: 20  $\mu\text{L}$  体系中, 10  $\times$  buffer 2.0  $\mu\text{L}$ , 引物 0.50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , dNTPs 0.15  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  1.2  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , Taq DNA 酶 1.25 U, 模板 DNA 25 ng, 无菌超纯水补充至 20  $\mu\text{L}$ . PCR 反应程序是: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 52  $^{\circ}\text{C}$  退火 45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 90 s, 共 40 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  完全延伸 10 min.

本实验利用优化后的体系对 60 条 ISSR 引物进行筛选, 共得到 12 条重复性好、特异性高的引物, 并分别对 10 份地石榴标本进行扩增, 结果显示优化确立的 ISSR 反应体系稳定可靠, 可用于地石榴居群遗传多样性及亲缘关系等研究.

致谢: 感谢本组徐磊、张凤萍、李宗波在标本采集过程中提供的帮助. 本研究对于凝胶电泳结果的拍摄和处理是在版纳植物园分子遗传和育种研究组实验室完成的, 在此对实验室的各位老师和同学表示感谢.

### 参考文献:

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴 [M]. 北京: 科学出版社, 1972.
- [2] 解玮佳, 李兆光, 李燕, 等. 地被新秀——地石榴 [J]. 西南园艺, 2006, 34: 57.
- [3] 窦剑, 周双云, 许再富. 滇南热带 3 种乡土地被植物的坪用研究初报 [J]. 草业科学, 2006, 8: 93-96.
- [4] 杨志明, 张复军, 薛泽梅, 等. 地石榴扦插繁殖技术研究 [J]. 林业调查规划, 2006, 34: 76-77.
- [5] 汤秀梅, 王京昆, 刘波, 等. 民族药地板藤的质量标准进行研究 [J]. 云南中医中药杂志, 2009, 30 (11): 47-49.
- [6] LIU C C, LIU Y G, GUO K, et al. Exploitation of patchy soil water resources by the clonal vine *Ficus tikoua* in karst habitats of southwestern China [J]. Acta Physiol Plant, 2011, 33: 93-102.
- [7] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LAHND A D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20: 176-183.
- [8] 王玲, 和兆荣. 基于 ISSR 的披针莲座蕨居群遗传多样性分析 [J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2008, 30 (S2): 398-402.
- [9] GUI T Q, QIAO A M, SUN M, et al. ISSR analysis of genetic relationship of germplasm resource in *Prunus sibirica* et *Prunus*. [J]. Agricultural Science & Technology, 2009, 10(5): 92-95.
- [10] 马红勃, 祁建民, 李延坤, 等. 烟草 SRAP 和 ISSR 分子遗传连锁图谱构建 [J]. 作物学报, 2008, 34(11): 1958-1963.
- [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.
- [12] LIU A H, WANG J B. Genomic evolution of *Brassica* allopolyploids revealed by ISSR marker [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2006, 53: 603-611.
- [13] PROVAN J, PROWELL W, WAUGH R. Analysis of cultivated potato (*Solanum tuberosum*) using inter-microsatellite amplification [J]. Genome, 1996, 39: 767-779.
- [14] TANI N, TOMARU N, TSUMURA Y, et al. Genetic structure within a Japanese stone pine (*Pinus pumila* Regel) population on Mt. Aino-dake in Central Honshu, Japan [J]. Journal of Plant Research, 1998, 111: 7-15.
- [15] HUANG J C, SUN M. Genetic diversity and relationship of sweetpotato and its wild relatives in *Ipomoea* series *Batatas* (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 100: 1050-1060.
- [16] HERRERA R, CARESL V, WILKINSON M J, et al. Characterisation of genetic variation between *Vitis vinifera* cultivars from central Chile using RAPD and Inter Simple Sequence Repeat markers [J]. Euphytica, 2002, 124: 139-145.
- [17] TIAN C J, LEI Y D, SHI S H, et al. Genetic diversity of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) Populations in northeastern and northwestern China as revealed by ISSR markers [J]. New forests, 2004, 27: 229-237.
- [18] 李汝玉. 简单重复序列 (SSR) 及其在农作物研究中的应用 [J]. 山东农业科学, 1999, (4): 45-49.
- [19] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue [J]. Physiochemical Bulletin, 1987, 19: 11-15.
- [20] 侯思名, 段继强, 梁雪妮, 等. 苎麻细胞质雄性不育系与保持系线粒体 DNA 的 ISSR 检测 [J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(8): 705-707.
- [21] 罗海燕, 陈业渊. 海南野生荔枝 ISSR 反应体系优化及应用 [J]. 热带农业科学, 2007, 27(1): 19-24.
- [22] 祁建民, 周东新, 吴为人, 等. RAPD 和 ISSR 标记检测黄麻属遗传多样性的比较研究 [J]. 中国农业科学, 2004, 37(12): 2006-2011.
- [23] 钱韦, 葛颂, 洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性 [J]. 植物学报, 2000, 42(7): 741-750.

## Optimization and application of ISSR reaction system in *Ficus tikoua*

HOU Xiang-lan<sup>1,2</sup>, YANG Da-rong<sup>1</sup>, CAO Yong-qiang<sup>1,2</sup>, LIU Qing<sup>1,2</sup>, PENG Yan-qiong<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Tropical Forest Ecology, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden,

Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;

2. Graduate School of the Chinese Academy Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract:** The main factors of ISSR – PCR reaction such as primer concentration, dNTPs concentration,  $Mg^{2+}$  concentration, *Taq* DNA polymerase dosage, DNA templates concentration and annealing temperature were optimized using single factor experiment based on *Ficus tikoua*. ISSR system for *Ficus tikoua* was established that is each 20ul amplification reaction consisted of 10 × buffer 2.0  $\mu$ L, 0.5  $\mu$ mol · L<sup>-1</sup> primer, 0.15 mmol · L<sup>-1</sup> dNTPs, 1.2 mmol · L<sup>-1</sup>  $Mg^{2+}$ , 1.25 U *Taq* DNA polymerase and 25 ng DNA template. The optimized annealing temperature is 52 °C. Then 12 primers were selected from 60 ISSR primers by using the optimized system and 10 accessions of *Ficus tikoua* were amplified. Results show that this system is reliable and safe which set up a basis for the study of genetic diversity analysis in *Ficus tikoua*.

**Key words:** *Ficus tikoua*; ISSR – PCR reaction system; optimization