

文章编号:1673-5021(2014)06-0046-07

# 华扁穗草 ISSR-PCR 反应体系优化及引物筛选

包蕊<sup>1</sup>, 胡延萍<sup>1</sup>, 王莉<sup>1</sup>, 旭荣花<sup>2</sup>, 李毅<sup>1,\*</sup>

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008; 2. 海西州科学技术局, 青海 德令哈 817000)

**摘要:**利用正交试验设计方法,对影响华扁穗草 ISSR-PCR 反应中  $Mg^{2+}$ 、Taq DNA 聚合酶、dNTP、引物和 DNA 模板等 5 个因素进行优化筛选,以期建立最佳反应条件。同时,筛选扩增条带清晰稳定的 ISSR 引物,经退火温度试验得到各个引物的最佳退火温度。结果表明:华扁穗草 20 $\mu$ l ISSR-PCR 最佳反应体系包括 1.80 mmol/L  $Mg^{2+}$ 、0.80 U Taq DNA 聚合酶、0.100 mmol/L dNTP、0.6 $\mu$ mol/L 引物和 20ng DNA 模板;筛选出扩增条带清晰稳定的 10 条引物。体系验证和引物筛选试验表明,其在华扁穗草不同个体中能够扩增出条带清晰、稳定性好的条带,可用于后续华扁穗草遗传多样性分析,为华扁穗草野生资源保护和优良牧草种质资源选育提供理论依据。

**关键词:**华扁穗草;ISSR-PCR;反应体系;正交试验设计;引物筛选

中图分类号:S548 文献标识码:A

华扁穗草 (*Blysmus sinocompressus* Tang et Wang) 为莎草科扁穗草属多年生草本,生长于海拔 1000~4200 m 的溪边、河边、河滩潮湿处和沼泽地上,分布于内蒙古、山西、河北、陕西、甘肃、青海、云南、四川、西藏等省区<sup>[1~2]</sup>。华扁穗草是中生或中湿生植物群落的优势种和建群种之一,由于过度放牧在若尔盖高原、甘南玛曲县等地区已成为濒危物种<sup>[3~4]</sup>,保护华扁穗草野生资源和选育优良种质牧草迫在眉睫。目前,对华扁穗草的研究相对较少,仅涉及生长特征、形态解剖学与其在湿地植物群落中的功能与作用等研究,而在分子生物学水平用 ISSR 分子标记对华扁穗草的研究尚未见报道。ISSR 是一种基于 PCR 的分子标记,现已广泛应用于牧草遗传分析、基因定位、遗传作图等方面<sup>[5~9]</sup>。本研究采用正交设计方法对华扁穗草 ISSR-PCR 反应体系中的各个因子进行优化,以建立华扁穗草 ISSR-PCR 最佳反应体系,为进一步利用 ISSR 分子标记进行华扁穗草种质资源遗传多样性研究和优良牧草资源保护提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料

样品于 2013 年 8 月采自青海省海北州祁连山下大坂口(37°18'53.8"N,101°48'59.4"E),经中国科学院西北高原生物研究所卢学峰研究员鉴定为华扁穗草,每个植株材料采集嫩叶,置于塑料自封袋中,加入硅胶促其快速干燥,带回实验室于 -20℃ 冰箱保存备用。凭证标本保存于中国科学院西北高原生物研究所青藏高原生物标本馆(采集号 2013082205)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 华扁穗草基因组总 DNA 提取

华扁穗草总 DNA 提取使用 Doyle<sup>[10]</sup> 改进的 CTAB 法,1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度, NanoDrop 2000c 微量紫外分光光度计测定 DNA 浓度。

#### 1.2.2 优化 ISSR-PCR 反应体系

用  $L_{16}(4^5)$  正交试验设计方法对 Taq DNA 聚合酶、 $Mg^{2+}$ 、引物浓度、dNTP 浓度和模板 DNA 设计 5 因素 4 水平试验(表 1)。共 16 个处理,每个处理 2 个重复。选择 UBC807(5'-AGAGAGAGAGAGAGAGT-3') 引物。反应体系总体积为 20 $\mu$ l,PCR 仪型号为 PTC-221(MJ Research, Bio-Rad)。扩增程序由 94℃ 预变性 5 min,38 个循环 94℃ 变性 20 s,50℃ 复性 60 s,72℃ 延伸 80 s,72℃ 延伸 6 min 及 4℃ forever 组成。

在 1×TAE 电泳缓冲液、电压 4V/cm 的条件下,取 10 $\mu$ l PCR 扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶(含 0.5 $\mu$ g/mL EB)中电泳,ChemiDoc™ MP 凝胶成像系统(Bio-Rad, USA)拍照记录电泳情况。

经直观分析将 16 个处理划分为 16 等级,条带丰富、清晰、背景低的记 16 分,最差的记 1 分。分数越高,表示特异性越强,该条件下的扩增效果好。对

\* 通讯作者, E-mail: liyi@nwipb.cas.cn

收稿日期:2014-04-16;修回日期:2014-08-27

基金项目:国家科技支撑计划项目(2012BAC08B04);国家自然科学基金项目(31200245);2011 年中国科学院“西部之光”人才培养计划“西部博士资助”项目

作者简介:包蕊(1991-),女,青海湟中人,主要从事资源植物遗传多样性研究, E-mail: 1070074485@qq.com.

评分情况用 DPS 7.05 统计软件进行方差分析<sup>[11]</sup>。

表 1 华扁穗草五因素四水平正交设计

Table 1 Orthogonal design of  $L_{16}(4^5)$  for *Blysmus sinocompressus*

编号 Number	因素 Factors				评分结果 Score results		
	镁离子 $Mg^{2+}$ (mmol/L)	Taq DNA 聚合酶 Taq DNA polymerase (U/20 $\mu$ L)	脱氧核糖核 苷三磷酸 dNTP (mmol/L)	引物 Primer ( $\mu$ mol/L)	模板 DNA Template DNA (ng)	重复 1 Repeat 1	重复 2 Repeat 2
1	0.9	0.4	0.075	0.3	20	1	4
2	0.9	0.6	0.100	0.4	30	6	5
3	0.9	0.8	0.125	0.5	40	10	8
4	0.9	1.0	0.150	0.6	50	4	7
5	1.2	0.4	0.100	0.5	50	9	9
6	1.2	0.6	0.075	0.6	40	3	2
7	1.2	0.8	0.150	0.3	30	11	11
8	1.2	1.0	0.125	0.4	20	8	10
9	1.5	0.4	0.125	0.6	30	13	6
10	1.5	0.6	0.150	0.5	20	15	15
11	1.5	0.8	0.075	0.4	50	2	1
12	1.5	1.0	0.100	0.3	40	7	12
13	1.8	0.4	0.150	0.4	40	12	14
14	1.8	0.6	0.125	0.3	50	14	13
15	1.8	0.8	0.100	0.6	20	16	16
16	1.8	1.0	0.075	0.5	30	5	3

### 1.2.3 ISSR-PCR 退火温度试验

在最佳反应体系基础上进行退火温度实验,筛选各个引物的最佳退火即复性温度。以 UBC818(5'-CAC ACA CAC ACA CAC AG-3',  $T_m=52^\circ\text{C}$ )为例,采用梯度 PCR 模式,在其  $T_m$  值上下浮动 4~6 $^\circ\text{C}$  的情况下设置 12 个梯度(48.00、48.30、48.90、49.70、50.80、52.30、54.00、55.40、56.50、57.30、57.80 和 58.00 $^\circ\text{C}$ ),扩增程序与前文正交设计程序一致。

### 1.2.4 反应体系稳定性试验及引物筛选

用 UBC818 引物对华扁穗草不同个体进行 ISSR-PCR 扩增,对筛选出的最佳体系进行稳定性检

测和引物筛选。

## 2 结果与分析

### 2.1 华扁穗草 DNA 提取结果

从华扁穗草 DNA 琼脂糖凝胶电泳图(图 1)可以看出,在 23 kb 处有一条清晰的主条带,说明所提 DNA 基因组完整性好,无明显降解现象。另外,NanoDrop 2000c 微量紫外分光光度计对华扁穗草 DNA 进行浓度检测,其浓度在 149~592.3 ng/ $\mu\text{L}$  之间。总之,所得 DNA 纯度较高,能够满足后续 ISSR-PCR 分析的要求。



图 1 华扁穗草基因组 DNA 电泳图(M:  $\mu$ DNA/HindIII 标准分子量参照物)

Fig. 1 Electrophoresis of genomic DNA of *Blysmus sinocompressus* (M:  $\mu$ DNA/HindIII molecular ladder)

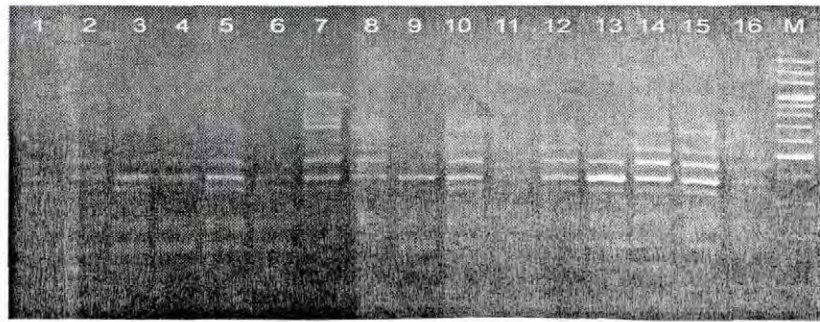
### 2.2 ISSR-PCR 正交试验数据统计

ISSR-PCR 正交试验电泳凝胶成像结果见图 2,其中组合 15 所得条带清晰且稳定性好。16 个处理两次重复的评分结果见表 1。

根据评分计算每一因素同一水平下的得分之和 T 与每一因素同一水平下的平均值 X,统计分析同

一因素不同水平间平均值的极差 R 见表 2。

极差 R 值代表该因素对扩增结果的影响程度,R 越大影响越显著,反之越小。由表 2 可知,各因素浓度的变化对华扁穗草扩增情况的影响由大到小依次为 dNTP、 $Mg^{2+}$ 、模板 DNA、Taq DNA 聚合酶和引物。



1~16 为处理组合编号(见表 1) M: 200 bp 标准分子量参照物  
1~16; Numbers are shown in Table 1. M: 200 bp molecular ladder

图 2 ISSR-PCR 正交试验电泳结果(引物为 UBC807)

Fig. 2 Results of electrophoresis for ISSR-PCR orthogonal design (UBC807 Primer)

表 2 华扁穗草直观分析结果

Table 2 Results of intuitive analysis for *Blymus sinocompressus*

计算结果 Calculation results	镁离子 Mg <sup>2+</sup>	TaqDNA 聚合酶 TaqDNA polymerase	脱氧核糖核苷三磷酸 dNTP	引物 Primer	模板 DNA Template DNA
T1	45	68	21	73	85
T2	63	73	80	58	60
T3	71	75	82	74	68
T4	93	56	89	67	59
X1	5.625	8.500	2.625	9.125	10.625
X2	7.875	9.125	10.000	7.250	7.500
X3	8.875	9.375	10.250	9.250	8.500
X4	11.625	7.000	11.125	8.375	7.375
R	6.000	2.375	8.500	2.000	3.250

注: T1-T4 为每一因素同一水平下的总和; X1-X4 为每一因素同一水平下的平均值; R 为极差。

Note: T1-T4, Sum of every factor under the same level; X1-X4, Mean of every factor under the same level; R, Range.

由平均值 X 得出每一因素的最佳浓度, 即: 该因素的最佳浓度是最大 X 对应的水平。因此, Taq DNA 聚合酶以水平 3、Mg<sup>2+</sup> 水平 4、dNTP 水平 4、引物水平 3 和 DNA 水平 1 较好。即影响华扁穗草 ISSR-PCR 正交试验设计 5 个因素的最佳水平为: 1.80 mmol/L Mg<sup>2+</sup>、0.80 U Taq DNA 聚合酶、0.15 mmol/L dNTP、0.5 μmol/L 引物和 20 ng DNA。尽管各个因素的最佳组合在正交表中没有出现, 但最接近扩增效果最好的处理 15。

为判断各个因素对华扁穗草扩增结果的影响是否显著, 对评分结果进行方差分析(表 3)。由 F 值大小可知, dNTP > Mg<sup>2+</sup> > DNA > Taq DNA 聚合酶 > 引物, 与极差分析结果完全一致。其中, Taq DNA 聚合酶和引物对试验结果的影响不显著, 模板 DNA 的影响达到了显著水平(P < 0.05), dNTP 和 Mg<sup>2+</sup> 的影响达到了极显著水平(P < 0.01)。所以, 还应对 Mg<sup>2+</sup>、dNTP 和模板 DNA 这 3 个因素进行水平间的 Duncan 多重比较(表 4), 以确定每个因素最适宜的水平。

极差分析(表 2)和方差分析(表 3)均表明, dNTP 不但影响华扁穗草 ISSR-PCR 反应的试验结

表 3 华扁穗草 ISSR 各因素方差分析

Table 3 Analysis of variance for factors of ISSR in

*Blymus sinocompressus*

变异来源 Source	平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F 值 F value	P 值 P value
Mg <sup>2+</sup>	148.5000	3	49.5000	14.1429	0.0001**
Taq DNA polymerase	27.2500	3	9.0833	2.5952	0.0885
dNTP	373.7500	3	124.5833	35.5952	0.0001**
Primer	20.2500	3	6.7500	1.9286	0.1657
DNA	54.2500	3	18.0833	5.1667	0.0109*
Error	56.0000	16	3.5000		

注: \*\* 表示 0.01 水平差异极显著; \* 代表 0.05 水平差异显著。

Note: \*\* Extremely remarkable difference at 0.01 level; \* Remarkable difference at 0.05 level.

果, 而且是所有因素中影响最明显的。dNTP 是 PCR 反应的重要原料, 当浓度过低时扩增效率低, 过高则会产生错误掺入和非特异性扩增。从图 2 可以看出, 当 dNTP 浓度在 0.075 mmol/L 时扩增出的条带数目少且亮度低; 而在浓度高于 0.100 mmol/L 时扩增出的条带增多, 且开始逐渐清晰明亮。从多重比较的结果看, 水平 1 与水平 2、水平 3、水平 4 差异显著, 水平 2、水平 3、水平 4 三者间差

表 4 华扁穗草 ISSR-PCR 因素水平间 Duncan 比较  
Table 4 Duncan comparison of factors at different levels of ISSR-PCR in *Blymus sinocompressus*

镁离子 Mg <sup>2+</sup> (mmol/L)	脱氧核糖核 苷三磷酸 dNTP (mmol/L)		模板 DNA Template DNA (ng)		
	均值 Average	均值 Average	均值 Average	均值 Average	均值 Average
1.8	11.6250a	0.150	11.1250a	20	10.6250a
1.5	8.8750b	0.125	10.2500a	40	8.5000b
1.2	7.8750b	0.100	10.0000a	30	7.5000b
0.9	5.6250c	0.075	2.6250b	50	7.3750b

注:在 0.05 水平上,不同字母表示处理间差异显著,相同字母差异不显著。

Note: Data with different letters differ significantly while with the same letter not significantly at  $P < 0.05$  level.

异均不显著。从经济的角度考虑,选择水平 2 (0.100mmol/L)为 dNTP 最佳浓度。

Mg<sup>2+</sup>对华扁穗草 ISSR-PCR 反应的影响仅次于 dNTP。Mg<sup>2+</sup>一方面影响 Taq DNA 聚合酶活性,另一方面还能与反应液中的模板、引物及 dNTP 结合,对引物与模板的结合、模板与 PCR 产物的变性温度以及扩增产物的特异性有影响。当 Mg<sup>2+</sup>浓度过低时,会显著降低酶的活性而使扩增片段的含量少,如 Mg<sup>2+</sup>浓度为 0.9 mmol/L 时,扩增出的片段亮度低;当 Mg<sup>2+</sup>浓度在 1.2~1.5 mmol/L 时,扩增出的片段逐渐变亮;当 Mg<sup>2+</sup>浓度为 1.8 mmol/L 时,扩增出的条带清晰且亮度适中。由表 4 可知,Mg<sup>2+</sup>浓度水平 1 与水平 2、水平 3、水平 4 差异显著,且水平 4 与水平 2、水平 3 差异显著,水平 2 与水平 3 差异不显著。因此,选择水平 4 为最佳 Mg<sup>2+</sup>浓度,即 1.8 mmol/L。

当模板 DNA 的浓度大于等于 20ng 时,均能扩增出条带。模板 DNA 浓度在水平 1 和水平 2、水平 3、水平 4 之间差异显著,而水平 2 和水平 3、水平 4 之间两

两差异不显著。从图 2 可以看出,模板 DNA 大于 20ng 后条带数目和清晰度并没有明显差异,由于模板浓度的增加可能会增加反应中抑制的成分,因此在 ISSR-PCR 反应中应尽可能降低模板的使用量。综合分析选择水平 1 为最佳模板 DNA 浓度,即 20ng。

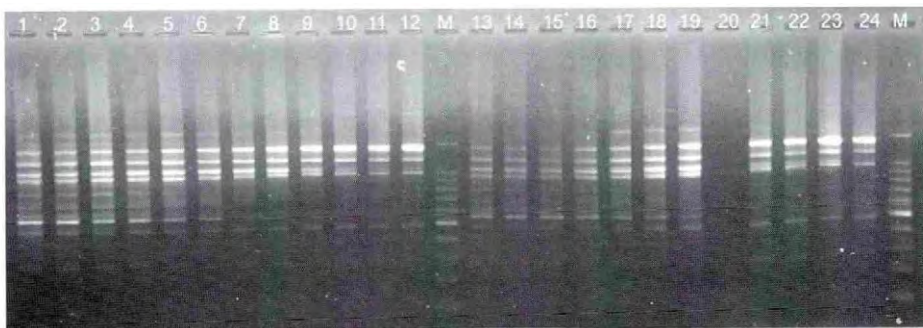
Taq DNA 聚合酶是 PCR 扩增反应的重要因素。在本试验设计中,参考以往我们实验室人员对其他植物 ISSR 分子标记体系优化的经验,Taq DNA 聚合酶的量一般在 0.5~0.6 U<sup>[12~13]</sup>,我们设置 Taq DNA 聚合酶量为 0.4~1.0 U,设计的水平范围较小,所以对正交试验结果影响不显著。由图 2 可知,Taq DNA 聚合酶的用量过大时(1.0 U)扩增的特异性减少,扩增产物的电泳呈弥散状。从保证扩增反应的结果和酶量充足综合考虑,确定水平 3 为 Taq DNA 聚合酶最佳水平。

极差和方差分析表明,本次试验中引物对体系的影响最小。由图 2 可知,引物浓度变化对 ISSR 条带的数量影响不大,只是对其强弱有一定的作用,确定引物的最优浓度为水平 3(0.5 μmol/L)。

综合以上直观分析和方差分析结果,本试验各个因素(Mg<sup>2+</sup>、Taq DNA 聚合酶、dNTP、引物和 DNA 模板浓度)的最佳水平组合是 4、3、2、3、1,但该组合并未出现在正交设计的处理中,与扩增结果最好的处理 15 最接近。所以,本试验以接近最佳组合的处理 15 为正式试验的反应体系,即 20 μl 反应体系中包括 1.80mmol/L Mg<sup>2+</sup>、0.80 U Taq DNA 聚合酶、0.100 mmol/L dNTP、0.6 μmol/L 引物和 20 ng DNA 模板。

### 2.3 退火温度对 ISSR-PCR 扩增的影响

引物 UBC818 退火温度试验结果如图 3。从图 3



1~12 泳道的退火温度分别为 48.00、48.30、48.90、49.70、50.80、52.30、54.00、55.40、56.50、57.30、57.80、58.00℃;

13~24 是 1~12 的重复; M 为 100 bp 标准分子量参照物

Lanes 1~12 represents the annealing temperature of 48.00, 48.30, 48.90, 49.70, 50.80, 52.30, 54.00, 55.40, 56.50, 57.30, 57.80, 58.00℃ respectively. Lanes 13~14 are repeat of lanes 1-12. M is 100 bp molecular marker

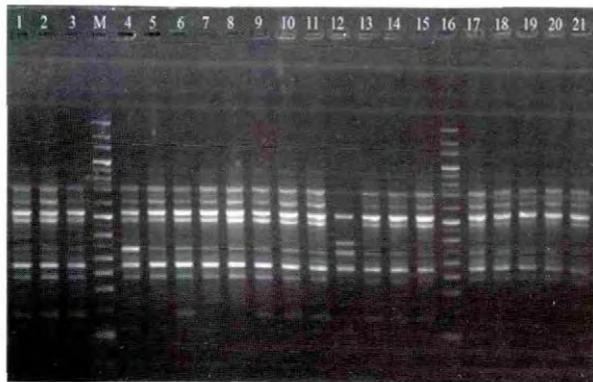
图 3 UBC818 退火温度实验

Fig. 3 The annealing temperature of UBC818

可以看出,退火温度显著影响华扁穗草 ISSR 扩增条带。当退火温度低于 50.80℃时,扩增特异性差,产生的杂带多,如 500~1000 bp 的片段模糊,重复性差,背景深。随着复性温度的升高,扩增特异性变强,非特异性带减少,背景变低。当退火温度大于 52.30℃,引物与模板结合效率差,所得条带减少且弱。复性温度为 52.30℃,扩增条带清晰、丰富且稳定,所以 52.30℃是 UBC818 引物的最佳复性温度。

#### 2.4 ISSR 最优体系验证和筛选到的引物

引物 UBC818 对华扁穗草不同个体进行 ISSR-PCR 扩增,均能扩增出清晰、稳定性好的条带(图 4)。由扩增结果可知,优化确定的 ISSR-PCR 体系是稳定可靠的。在最佳反应条件基础上,最终选出谱带清晰、稳定且多态性丰富的 10 条引物,通过退火温度梯度试验确定各个引物的最佳退火温度见表 5。



M 为 200 bp 和 100 bp 标准分子量参照物

M represents 200 bp and 100 bp molecular marker

图 4 引物 UBC818 对华扁穗草不同个体 ISSR-PCR 扩增的结果

Fig. 4 The application results of *Blisymus sinocompressus* by UBC818

表 5 筛选出的引物序列和退火温度

Table 5 Selected primers sequences and annealing temperature of each primer

引物 Primer	序列 Sequences (5'→3')	退火温度 Annealing temperature (°C)
807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	52.0
808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	54.3
817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	50.8
818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	52.3
822	TCT CTC TCT CTC TCT CA	48.3
834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	55.4
836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	58.0
857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	50.0
864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG	48.0
899	CAT GGT GTT GGT CAT TGT TCC A	50.0

注:Y = (C, T)。Note:Y=(C, T)。

### 3 讨论

ISSR 分子标记是近年来发展起来的一种非常有前途的新型技术,其实验结果因反应体系和物种的差异而不同<sup>[12~15]</sup>。本试验结果证明,不同的正交体系组合对华扁穗草 ISSR 扩增结果影响较大。在本研究中,极差分析和方差分析结果均表明,dNTP 是影响华扁穗草 ISSR-PCR 反应的最主要的因素,这与廖丽<sup>[16]</sup>对夏枯草 ISSR-PCR 体系优化的研究结果一致。Mg<sup>2+</sup> 浓度也是影响华扁穗草 ISSR-PCR 的重要因素,Taq DNA 聚合酶是 Mg<sup>2+</sup> 依赖性酶,对 Mg<sup>2+</sup> 浓度较敏感,选择适量 Mg<sup>2+</sup> 对 PCR 反应至关重要。模板作为 PCR 扩增的对象,在保证其质量的前提下,ISSR 对其要求并不严格。一般而言,DNA 浓度在一定范围内对扩增条带的多少无影响,但对得到的条带产量有影响,模板 DNA 浓度越高条带越亮,扩增产量越多<sup>[16]</sup>。Taq DNA 聚合酶和引物浓度对华扁穗草 ISSR-PCR 反应的影响均不显著,这与本研究中正交试验设计的因素和水平有关。Taq DNA 聚合酶是 PCR 扩增反应的重要因素,但在本试验设计中因 Taq DNA 聚合酶设置的水平范围较小,所以对正交结果影响不显著。此外,在试验过程中,为了确保 ISSR-PCR 的重复性,建议使用同一厂家同一批次的 Taq DNA 酶。一般 PCR 反应中引物的终浓度为 0.2~1.0 μmol/L,在此范围内 PCR 产物量基本相同<sup>[14]</sup>,本研究也证实了这一点,华扁穗草引物浓度水平在 0.3~0.6 μmol/L 之间,各水平间所得结果差异不大。

退火温度是影响华扁穗草 ISSR-PCR 的又一重要因素,华扁穗草不同引物的退火温度不一样。退火温度严重影响引物是否与模板特异的结合,退火温度低,错配的几率高,条带的特异性差且背景深;而提高退火温度虽可提高配对的准确性,但引物与模板结合效果差,所得扩增条带较少。因此,为获得稳定可靠的实验结果,对不同的 ISSR 引物需根据其熔点逐一筛选,确定其最适退火温度。

### 4 结论

本研究采用 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>) 正交试验方法,优化筛选华扁穗草 ISSR-PCR 反应的主要因素,并通过直观分析和正交极差分析对比,确定了适合华扁穗草 ISSR-PCR 的最佳反应体系:即 20 μl 反应体系中包括 1.80 mmol/L Mg<sup>2+</sup>、0.80 U Taq DNA 聚合酶、

0.100mmol/L dNTP、0.6 $\mu$ mol/L 引物和 20ng DNA 模板。同时,筛选出扩增条带清晰、稳定的 10 条引物,并确定了各引物的最佳退火温度。对华扁穗草不同个体扩增的结果表明,该反应体系稳定可靠,可用于后续华扁穗草 ISSR 遗传多样性分析。

#### 参考文献 (References):

- [1] 唐进,汪发缙. 中国植物志(第 11 卷)[M]. 北京:科学出版社,1961:41,224.  
Tang Jin, Wang Fazuan. Flora of China (Vol. 11) [M]. Beijing: Science Press, 1961: 41, 224.
- [2] 刘尚武. 青海植物志(第 4 卷)[M]. 西宁:青海人民出版社,1996:193.  
Liu Shangwu. Flora of Qinghai (Vol. 4)[M]. Xining: Qinghai People's Publishing House. 1996: 193.
- [3] 何池全,赵魁义,赵志春. 若尔盖高原湿地草场退化成因分析及其保护利用[J]. 中国草地,2000,6:11-16.  
He Chiquan, Zhao Kuiyi, Zhao Zhichun. Wetlands pasture mechanism and its sustainable utilization countermeasure in Roige Plateau [J]. Grassland of China, 2000, 6: 11-16.
- [4] 岳东霞,李文龙,李自珍. 甘南高寒湿地草地放牧系统管理的 AHP 决策分析及生态恢复对策[J]. 西北植物学报,2004,24(2):248-253.  
Yue Dongxia, Li Wenlong, Li Zizhen. Analysis of AHP strategic decision for grazing management system and ecological restoration in the alpine wetland at Gannan in Gansu [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2004, 24(2): 248-253.
- [5] Liu W S, Dong M, Song Z P, et al. Genetic diversity pattern of *Stipa purpurea* populations in the hinterland of Qinghai-Tibet Plateau [J]. Annals of Applied Biology, 2009, 154(1): 57-65.
- [6] Chen S Y, Ma X, Zhang X Q, et al. Genetic variation and geographical divergence in *Elymus nutans* Griseb. (Poaceae; Triticeae) from west China [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2009, 37(6): 716-722.
- [7] 刘曙娜. 苜蓿遗传图谱的构建和重要农艺性状的基因定位[D]. 呼和浩特:内蒙古大学,2012.  
Liu Shuna. Genetic mapping and gene localization of main agronomic characters of alfalfa [D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2012.
- [8] 郭郁频,任永霞,张颖超,等. 早熟禾种质资源 ISSR 遗传多样性分析[J]. 中国草地学报,2014,36(3):28-34,46.  
Guo Yupin, Ren Yongxia, Zhang Yingchao, et al. Genetic diversity analysis of bluegrass germplasm resources by ISSR markers [J]. Chinese Journal of Grassland, 2014, 36(3): 28-34, 46.
- [9] 张颖娟,王斯琴花. 不同苜蓿种质材料的 ISSR 分析及遗传多样性研究[J]. 中国草地学报,2014,36(3):35-39.  
Zhang Yingjuan, Wang Siqinhua. ISSR analysis and genetic diversity research of different alfalfa materials [J]. Chinese Journal of Grassland, 2014, 36(3): 35-39.
- [10] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Focus, 1987, 12: 13-15.
- [11] 唐启义,冯明光. DPS 数据处理系统-实验设计、统计分析及模型优化[M]. 北京:科学出版社,2006.  
Tang Qiyi, Feng Mingguang. DPS data processing system-experimental design, statistical analysis and modeling [M]. Beijing: Science Press, 2006.
- [12] 胡延萍,谢小龙,王莉,等. 唐古特大黄 ISSR-PCR 反应条件的优化[J]. 广西植物,2010,30(1):112-116.  
Hu Yanping, Xie Xiaolong, Wang Li, et al. Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction conditions for *Rheum tanguticum* [J]. Guihaia, 2010, 30(1): 112-116.
- [13] 彭秉玉,胡延萍,巩爱岐,等. 杂交油菜 ISSR-PCR 反应体系的建立和优化[J]. 植物研究,2010,30(5):576-581.  
Peng Bingyu, Hu Yanping, Gong Aiqi, et al. Establishment and optimization of ISSR-PCR system for hybrid rapeseed [J]. Bulletin of Botanical Research, 2010, 30(5): 576-581.
- [14] 俞靓,井赵斌,魏琳,等. 本氏针茅 ISSR-PCR 反应体系的建立及引物筛选[J]. 中国草地学报,2012,34(1):77-83.  
Yu Jing, Jing Zhaobin, Wei Lin, et al. Establishment and optimization of the ISSR-PCR reaction system in *Stipa bungeana* Trin. [J]. Chinese Journal of Grassland, 2012, 34(1): 77-83.
- [15] 李钰莹,董宽虎,王若梦,等. 白羊草 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 中国草地学报,2012,34(4):15-20.  
Li Yuying, Dong Kuanhu, Wang Ruomeng, et al. Establishment and optimization of the ISSR-PCR system for *Bothriochloa ischaemum* [J]. Chinese Journal of Grassland, 2012, 34(4): 15-20.
- [16] 廖丽,郭巧生. 夏枯草 ISSR 分子标记技术的建立与体系优化[J]. 中草药,2012,40(7):1131-1135.  
Liao Li, Guo Qiaosheng. Establishment of ISSR marker technology and optimization of its system in *Prunella vulgaris* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2012, 40(7): 1131-1135.

## Optimization of ISSR-PCR System and Primer Screening for *Blysmus sinocompressus*

BAO Rui<sup>1</sup>, HU Yan-ping<sup>1</sup>, WANG Li<sup>1</sup>, XU Rong-hua<sup>2</sup>, LI Yi<sup>1</sup>

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, the Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China;  
2. Haixi Prefecture Science and Technology Bureau, Delingha 817000, China)

**Abstract:** To optimize the ISSR-PCR system for *Blysmus sinocompressus*, an orthogonal design was selected at four levels of five factors ( $Mg^{2+}$ , Taq DNA polymerase, dNTP, primer and DNA template). Then, based on the optimal ISSR-PCR amplification system, ISSR primers with clear bands and the annealing temperatures were selected. As a result, the optimal PCR mixture (20 $\mu$ L) contained 1.80 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.80 U Taq DNA polymerase, 0.100 mmol/L dNTP, 0.6mol/L primer and 20 ng template DNA. Ten primers were screened with clear and consistent bands. With the optimal system of ISSR-PCR and primer screening, clear and steady bands were obtained in different individuals of *Blysmus sinocompressus*. The establishment of ISSR-PCR system could favor the genetic diversity of *Blysmus sinocompressus* pasture germplasm with molecular marker techniques. It was useful for the conservation of wild resource of *Blysmus sinocompressus* and excellent forage germplasm breeding.

**Key words:** *Blysmus sinocompressus*; ISSR-PCR; Reaction system; Orthogonal design; Primer screening