

研究报告

Research Report

水葫芦苗 ISSR-PCR 体系的优化与引物筛选

王建科^{1,2} 李毅¹ 胡延萍¹ 石琳^{1,2} 王钧^{1,2} 王莉^{1*}

1 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁, 810008; 2 中国科学院大学, 北京, 100049

* 通讯作者, wangli@nwipb.cas.cn

摘要 以改良 CTAB 法提取水葫芦苗基因组 DNA 为模板, 利用正交设计试验对影响 ISSR-PCR 反应体系的 5 个因素(*Taq* DNA 聚合酶, dNTP, 引物, 模板及 Mg^{2+})进行了优化筛选。经极差分析和方差分析, 最终建立了水葫芦苗 ISSR-PCR 的最佳反应体系。结果表明, 总体积 20 μ L 的反应体系中各因素浓度分别为: *Taq* DNA 聚合酶 0.025 U/ μ L、 Mg^{2+} 1.5 mmol/L、dNTP 1.0 mmol/L、引物 0.5 μ mol/L、模板 DNA 1.5 ng/ μ L。通过筛选得到 10 条扩增条带清晰的 ISSR 引物, 并通过梯度 PCR 确定了各引物的最适退火温度。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 40 次。

关键词 水葫芦苗, ISSR-PCR, 正交设计, 体系优化

Optimization of ISSR-PCR Reaction System and Primer Screening of *Halerpestes cymbalaris*

Wang Jianke^{1,2} Li Yi¹ Hu Yanping¹ Shi Lin^{1,2} Wang Jun^{1,2} Wang Li^{1*}

1 Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, 810008; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049

* Corresponding author, wangli@nwipb.cas.cn

DOI: 10.13271/j.mpb.015.003145

Abstract The genome DNA of *Halerpestes cymbalaris* was extracted by the improved CTAB method. The orthogonal design method was used to the ISSR-PCR system of *H. cymbalaris* at four levels of five factors (the concentration of *Taq* DNA polymerase, dNTPs, primer, template DNA and magnesium ion). The results were analyzed using the range analysis and variance analysis. A suitable system of the ISSR-PCR reaction of *H. cymbalaris* was established which contained 0.025 U/ μ L *Taq* polymerase, 1.5 mmol/L magnesium ion, 1.0 mmol/L dNTPs, 0.5 μ mol/L primer and 1.5 ng/ μ L template DNA in total 20 μ L reaction. Ten ISSR primers with clear bands were selected. And the annealing temperature of each primer was determined by the gradient PCR. On these bases, the optimum cycles were determined. The optimum cycles were 40 times.

Keywords *Halerpestes cymbalaris*, ISSR-PCR, Orthogonal design, System optimization

水葫芦苗(*Halerpestes cymbalaris*)为毛茛科碱毛茛属多年生草本植物,多生长于海拔 2 200~3 900 m 的林下、林缘湿地、河漫滩、河边、沼泽草甸和阴坡的潮湿地中,分布于青海、西藏、甘肃、四川、陕西、河北、内蒙古、新疆、山东、黑龙江、吉林、辽宁等省区(王文采等, 1980)。水葫芦苗全草可以入药,具有利水消肿,祛风除湿等功效,是一种重要的湿地经济植物(郭

本兆等, 1987, 青海经济植物志, pp.169-170)水葫芦苗的生长状况可为湿地健康诊断提供依据(周华坤等, 2004)。目前,对水葫芦苗的研究较少,国内的报道中仅涉及其生长特性及形态学等方面的研究,而在分子生物学水平上对水葫芦苗的研究国内外未见报道。ISSR (inter-simple sequence repeats)是一种微卫星基础上的 DNA 分子标记技术,该技术主要扩增 2 个

基金项目 本研究由青海省科技计划项目(2014-NK-A4-2-1)和国家自然科学基金项目(31300269)共同资助

引用格式: Wang J.K., Li Y., Hu Y.P., Shi L., Wang J., and Wang L., 2017, Optimization of ISSR-PCR reaction system and primer screening of *Halerpestes cymbalaris*, Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding), 15(8): 3145-3152 (王建科, 李毅, 胡延萍, 石琳, 王钧, 王莉, 2017, 水葫芦苗 ISSR-PCR 体系的优化与引物筛选, 分子植物育种, 15(8): 3145-3152)

距离较近的 SSR 间的序列, 现已广泛用于植物的分类学鉴定、基因定位、遗传图谱构建和遗传多样性分析等方面(杨晶和张广臣, 2013)。本研究利用正交设计方法对水葫芦苗 ISSR-PCR 体系中 5 个因子进行了优化, 以建立最优的 ISSR-PCR 扩增反应体系, 并通过优化建立适合水葫芦苗 ISSR-PCR 的最佳反应程序, 筛选得到扩增特异性较高的 ISSR 引物, 为进一步利用 ISSR 法对水葫芦苗遗传多样性研究提供理论基础。

1 结果与分析

1.1 水葫芦苗基因组 DNA 提取

获得的基因组 DNA 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 1), 条带清晰无拖尾, 说明用改良 CTAB 法提取的 DNA 完整性较好。

用 NanoDrop 2000c 微量分光光度计测得 DNA 溶液浓度在 200 ng/ μ L 左右, OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.8~2.0 之间, 说明 DNA 样品杂质较少, 可以用于后期的 ISSR-PCR 扩增反应。

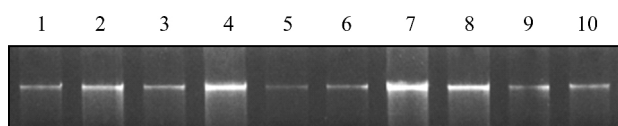


图 1 水葫芦苗基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳

注: 1~10 分别为不同水葫芦苗个体

Figure 1 Electrophoresis on agarose gel of genomic DNA in *Halerpestes cymbalis*

Note: Lanes 1~10 represent the individuals of *Halerpestes cymbalis*

1.2 ISSR-PCR 正交试验结果分析

ISSR-PCR 正交试验(图 2), 不同处理结果之间有明显差异, 对其进行评分后, 选择最佳体系。依据评分结果计算每因素同水平下的评分之和 T 及每因素同水平下的评分的平均值 A_i , 对每一因素不同水平间进行极差分析(表 1)。极差 R 的大小表示该因素对结果的影响程度。R 值越大, 该因素的影响越显著, 反之亦然。各因素极差值依次为: dNTP>引物>Taq DNA 聚合酶>模板 DNA>Mg²⁺, 所以在本试验中对扩增条带特异性影响最大的因素是 dNTP。对正交试验结果进行方差分析(表 2), 结果表明, dNTP 浓度对应的 F 值($p<0.05$)最大, 说明其对体系的影响作用最强; 其他因素对反应体系的影响依次为: 引物>Taq DNA 聚合酶>模板 DNA 浓度>Mg²⁺ 浓度, 但后 4 个因素对反应体系的影响均未达到显著水平。

M1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 M2

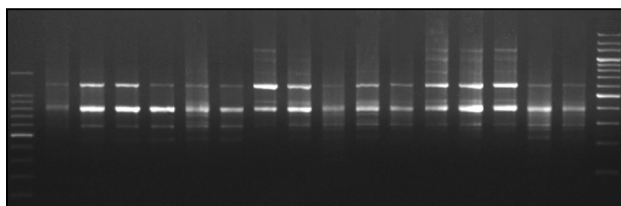


图 2 ISSR-PCR 正交试验电泳(引物为 UBC825)

注: M1: 100 bp molecular ladder; M2: 200 bp molecular ladder; 1~16: 处理序号(表 4)

Figure 2 Electrophoresis for ISSR-PCR orthogonal design (UBC-825 primer)

Note: M1: 100 bp molecular ladder; M2: 200 bp molecular ladder; 1~16: Numbers are showed (Table 4)

经过方差分析可知, 只有 dNTP 这一因素对扩增结果的影响达到了显著水平, 所以依据极差分析平均值 A_i 的大小选择每一因素的最佳水平, 最大平均值所对应的水平即为该因素的最佳水平。

由关系波动曲线可知(图 3), Taq DNA 聚合酶对扩增结果的影响不明显, 但是, 当 Taq 酶量过高时会使电泳条带背景过深, 不利于分析, 所以 Taq 酶在 0.025 U/ μ L 时体系反应效果最佳, 因此选择 0.025 U/ μ L 水平为最佳反应水平。从关系曲线的波动幅度可知, 随着镁离子浓度的增加扩增效果呈下降趋势, 选择最大平均值对应的水平作为最佳反应水平, 所以在本试验反应体系中 Mg²⁺ 的最佳反应水平为 1.5 mmol/L。dNTP 在 0.5 mmol/L、0.75 mmol/L、1.0 mmol/L 3 个水平之间差异显著, 1.0 mmol/L 和 1.25 mmol/L 之间差异不显著。当 dNTP 浓度在 0.5~1.0 mmol/L 时, 结果呈上升趋势, 当浓度继续增大时逐步下降。所以选择 dNTP 的最佳浓度为 1.0 mmol/L。

引物在四水平之间差异均不显著, 但从关系曲线可以看出当引物浓度增大时扩增效果会增强, 但引物浓度太大会导致非特异性扩增增加, 且扩增条带模糊, 所以选择最适引物浓度为 0.5 μ mol/L。

模板 DNA 在各水平之间差异不显著, 随着浓度增加扩增效果降低, 在 1.5 ng/ μ L 和 2.0 ng/ μ L 条件下扩增结果差别不大, 所以选择 2.0 ng/ μ L 为模板 DNA 的最佳量。所以在本实验 ISSR-PCR 最佳反应体系中, 各因素浓度分别为: Taq DNA 聚合酶 0.025 U/ μ L, Mg²⁺ 1.5 mmol/L, dNTP 0.1 mmol/L, 引物 0.5 μ mol/L, 模板 DNA 1.5 ng/ μ L。

1.3 引物筛选及最适退火温度

在最佳反应体系基础上, 分别使用 100 条引物 (UBC801~UBC900) 对水葫芦苗样本进行扩增, 从中

表 1 水葫芦苗正交试验极差分析

Table 1 Range analysis of orthogonal design of *Halerpestes cymbalaris*

参数 Parameter	Taq 酶 Taq polymerase	镁离子 Mg ²⁺	dNTPs	引物 Primer	模板 DNA Template DNA
T1	362.670 0	322.330 0	272.270 0	344.170 0	324.330 0
T2	304.670 0	309.660 0	250.170 0	275.670 0	323.600 0
T3	284.500 0	306.670 0	368.670 0	267.260 0	288.500 0
T4	289.930 0	303.110 0	350.660 0	54.670 0	305.340 0
A1	30.222 5	26.860 8	22.689 2	28.680 8	27.027 5
A2	25.389 2	25.805 0	20.847 5	22.972 5	26.966 7
A3	23.708 3	25.555 8	30.722 5	22.271 7	24.041 7
A4	24.160 8	25.259 2	29.221 7	29.555 8	25.445 0
R	6.514 2	1.601 7	9.875 0	7.284 2	2.985 8

注: T1~T4: 每一因素同一水平下的总和; A1~A4: 每一因素同一水平下的平均值; R: 极差

Note: T1~T4: Sum of every factor under the same level; A1~A4: Mean of every factor under the same level; R: Range

表 2 水葫芦苗 ISSR 各因素方差分析

Table 2 Analysis of variance for factors of ISSR in *Halerpestes cymbalaris*

变异来源 Source	平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F 值 F value	p 值 p value
Taq 酶 Taq polymerase	321.234 122 90	3	107.078 041 000	1.401 5	0.260 3
Mg ²⁺	17.493 522 92	3	5.831 174 306	0.076 3	0.972 3
dNTPs	841.483 589 60	3	280.494 529 900	3.671 4	0.022 2
引物 Primer	513.955 922 90	3	171.318 641 000	2.242 4	0.102 4
模板 DNA Template DNA	72.790 900 00	3	24.263 600 000	0.317 6	0.812 6
误差 Error	2 444.825 600 00	32	76.400 800 000		

选出扩增条带清晰,多态性丰富的 10 条引物用于后续水葫芦苗遗传多样性分析,引物编号及序列(表 3)。

退火温度影响水葫芦苗 ISSR-PCR 的扩增结果(图 4)。以引物 UBC873 和 UBC887 为例,当退火温度较低时,扩增条带较多但条带模糊,背景较深,扩增特异性不好;当温度较高时,条带较弱,扩增效率不高,当退火温度在 51.8℃ 时,两条引物的扩增条带清晰,结果多态性较好,所以这两条引物最适退火温度都为 51.8℃。其他引物最适退火温度(表 3)。

1.4 循环次数筛选以及最佳反应体系验证

以 UBC825 为引物,以筛选到的体系进行扩增,扩增循环次数分别设置为 25×、30×、35×、40×、45×、对水葫芦苗 DNA 进行扩增,由于在 35×~45× 循环之间扩增结果差别不明显,继续以 36×、38×、40×、42×、44× 循环次数进行细筛(图 5),在 40 次循环时扩增结

表 3 筛选到的引物序列及其最适退火温度

Table 3 Sequences and annealing temperature of each selected primer

引物 Primer	序列(5'-3') Sequences (5'-3')	最适退火温度(℃) Annealing temperature (°C)
808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	53.8
810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	50.2
811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	55.5
825	ACACACACACACACT	52.2
826	ACACACACACACACC	56.8
853	TCTCTCTCTCTCTCRT	54.5
864	ATGATGATGATGATGATG	49.4
873	GACAGACAGACAGACA	51.8
887	DVDTCTCTCTCTCTC	51.8
891	HVHTGTGTGTGTGTGTG	50.4

注: D=(A,G,T); H=(A, G, T); R=(A,G); V=(A,C,G)

Note: D=(A,G,T); H=(A, G, T); R=(A,G); V=(A,C,G)

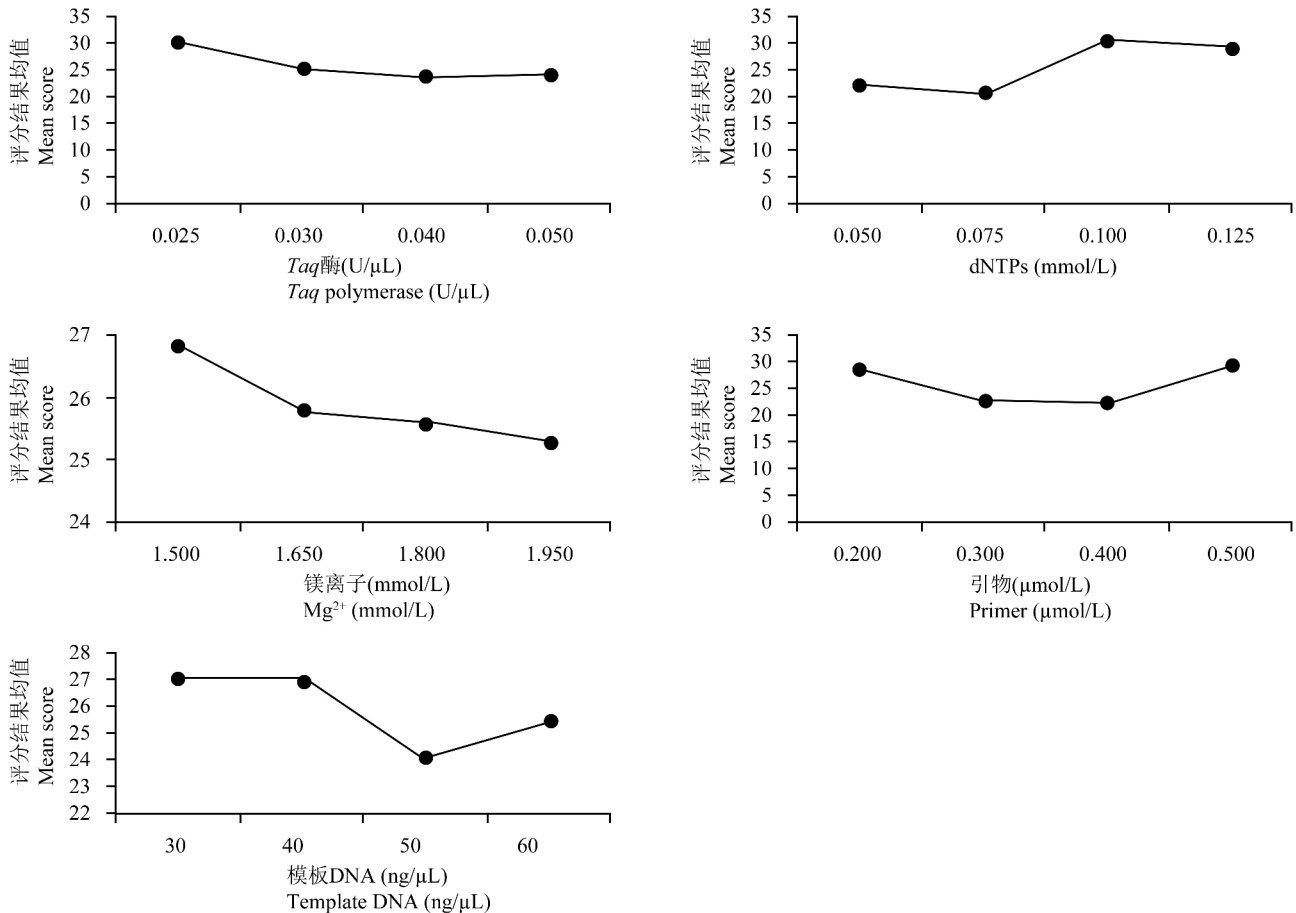


图3 水葫芦苗 ISSR-PCR 各因素浓度与评分结果均值的关系曲线

Figure 3 Curve between concentration and the mean value of factors for *Halerpestes cymbalaris*

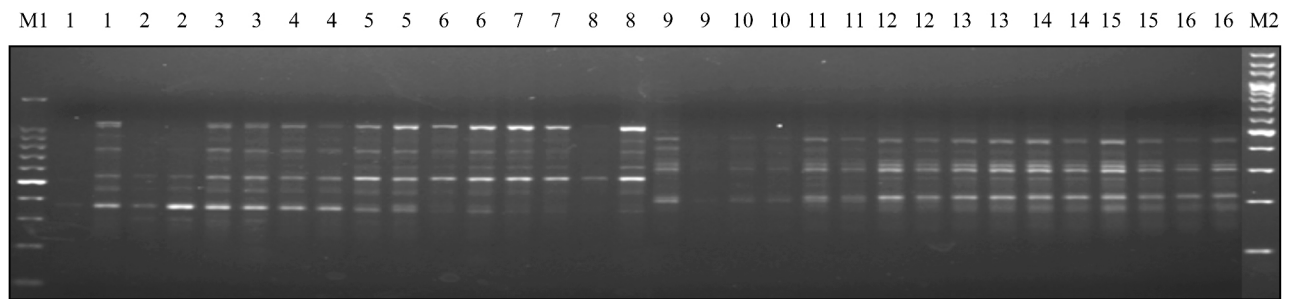


图4 UBC873 和 UBC887 退火温度试验

注: M1: 100 bp molecular ladder; M2: 200 bp molecular ladder; 1~8: UBC873; 9~16: UBC887

Figure 4 The annealing temperature test of UBC873 and UBC 887

Note: M1: 100 bp molecular ladder; M2: 200 bp molecular ladder; 1~8: UBC873; 9~16: UBC887

果最好,条带清晰,背景较浅,作为最佳循环次数。随机选取2个引物以最佳反应体系对水葫芦苗不同样本进行ISSR-PCR扩增(图6),扩增条带清晰,多态性丰富,说明筛选到的最优体系稳定,重复性好,可以用于后续试验。

2 讨论

ISSR 是一种显性遗传标记,由于其操作简单,多

态性较好及成本低等优点,已被广泛用于药用植物遗传多样性分析及遗传图谱建立等方面的研究(Qi et al., 2015)。目前关于ISSR-PCR反应体系优化方面的报道多采用单因素试验优化选择(罗海燕和陈业渊, 2007; 刘欢等, 2010; 李瑞等, 2012),过程复杂,且并未考虑到各因素之间的交互作用,这可能使得最终结果与最佳反应体系之间存在差异。本试验用正交设计法对水葫芦苗ISSR-PCR体系进行了优化,结果

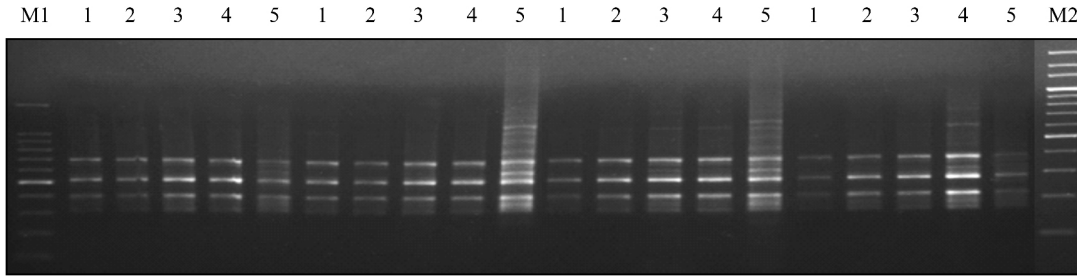


图 5 ISSR-PCR 循环次数筛选(引物为 UBC825)

注: M1: 100 bp molecular ladder; M2: 200 bp molecular ladder; 1: 36; 2: 38; 3: 40; 4: 42; 5: 44

Figure 5 Cycle times for ISSR-PCR (UBC825 primer)

Note: M1: 100 bp molecular ladder; M2: 200 bp molecular ladder; 1: 36; 2: 38; 3: 40; 4: 42; 5: 44

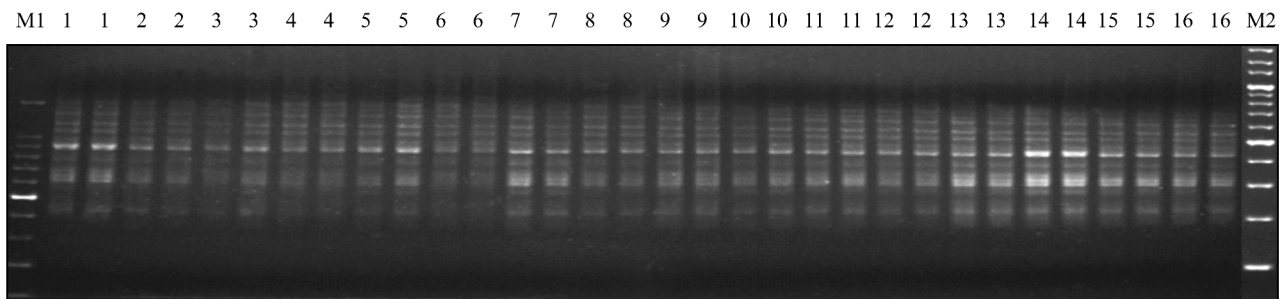


图 6 引物 UBC887 对水葫芦苗不同个体 ISSR-PCR 的扩增

注: M1: 100 bp molecular ladder; M2: 200 bp molecular ladder; 1~16: 不同的水葫芦苗个体

Figure 6 Amplification of ISSR-PCR in different individuals of *Eichhornia crassipes* seedlings by primer UBC887

Note: M1: 100 bp molecular ladder; M2: 200 bp molecular ladder; 1~16: The individuals of *Halerpestes cymbalaris*

证明,不同的正交体系组合对水葫芦苗 ISSR-PCR 扩增结果具有较大影响。极差分析和方差分析结果皆显示体系中不同 dNTP 浓度对水葫芦苗 ISSR-PCR 扩增结果具有显著影响,为主要因素。这与华扁穗草 ISSR-PCR 体系的优化的研究结果一致(包蕊等, 2014)。体系中 Mg^{2+} 浓度会影响 *Taq* DNA 聚合酶的活性,而 *Taq* 酶对扩增结果的特异性和扩增速率有较大影响,引物浓度直接影响扩增产量和错配概率,所以对每种因素选择合适的浓度对扩增结果具有很大的影响,而模板 DNA 量的许可范围较大,在不同水平上对扩增产物的多态性影响不显著,只影响扩增产量(Xing et al., 2015)。在本研究中,4 个因素对扩增结果的影响大小依次为:dNTP>引物>*Taq* DNA 聚合酶>模板 DNA> Mg^{2+} ,这与穆立蕾等(2006)对紫椴的研究结果一致。其中 dNTP 浓度对扩增结果有显著影响,而模板 DNA 对扩增结果的影响并不显著,这与廖丽和郭巧生等(2009)对夏枯草 ISSR-PCR 体系的研究结果一致。 Mg^{2+} 浓度、*Taq* DNA 聚合酶量及引物浓度这 3 个因素对水葫芦苗 ISSR-PCR 扩增结果的影响并不显著,这与紫云英及果梅等植物(桂腾琴等, 2009; 孙清信等, 2012) 中的研究结果不同,这可能是由于物种差异造成的。

循环次数决定着 ISSR-PCR 的扩增效率,循环次数过多会使非特异性产物增加,降低 ISSR-PCR 扩增特异性,循环次数过少,则会导致扩增产量降低。在本研究中对扩增程序中的循环次数进行了优化,证明不同的循环次数对扩增结果有明显影响,筛选得到最佳循环次数为 40 次,从而建立了扩增程序。

退火温度也是影响水葫芦苗 ISSR-PCR 扩增结果的重要因素,较低的退火温度可以提高扩增反应的敏感性,但扩增特异性较差,较高的退火温度可以提高扩增特异性,但扩增效率较差,所以选择合适的退火温度就尤为重要。本试验梯度 PCR 结果显示不同引物的最适退火温度不同,同一引物在不同物种中的退火温度可能不同,为了保证实验的可靠性,应该对所用引物的退火温度进行逐一筛选。

本研究利用五因素四水平正交试验方法,对影响水葫芦苗 ISSR-PCR 扩增反应的 5 个因素进行了优化筛选,并通过极差分析和方差分析,对实验结果进行了统计学对比分析,最终得到水葫芦苗 ISSR-PCR 的最佳反应体系,即 20 μ L 反应体系中,各因素浓度分别为:*Taq* DNA 聚合酶 0.025 U/ μ L, Mg^{2+} 1.5 mmol/L, dNTP 0.1 mmol/L,引物 0.5 μ mol/L,模板 DNA 1.5 ng/ μ L。通过优化筛选得到水葫芦苗 ISSR-

PCR 反应的最佳循环次数为 40 次。从 100 条引物中筛选到条带清晰稳定的 10 条 ISSR 引物,并确定了各条引物的最适退火温度。通过对不同水葫芦苗 DNA 样本进行扩增,证明筛选得到的扩增体系和程序的稳定可靠,可用于后续水葫芦苗 ISSR-PCR 扩增和遗传多样性分析方面的研究。

3 材料与方 法

3.1 试验材料

水葫芦苗样品于 2012 年 8 月 21 日采自青海省大通县黑泉水库(37°14'39.9"N/101°27'36.1"E),用硅胶快速干燥后置于 -20℃ 冰箱中保存备用。

ISSR 通用引物使用加拿大哥伦比亚大学(University of British Columbia)提供的序列,由上海生物工程技术服务有限公司合成。*Taq* DNA 聚合酶, dNTP, DNA Ladder 均购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司。

3.2 水葫芦苗基因组 DNA 提取

水葫芦苗总 DNA 提取采用改良 CTAB 法(Pan et al., 2006),以 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度,利用 NanoDrop 2000c 微量紫外分光光度计测定其浓度。

3.3 ISSR-PCR 反应体系的优化

用 $L^{16}(4^5)$ 正交试验设计方法对 ISSR-PCR 扩增的 5 个因素 (*Taq* DNA 聚合酶, dNTP, 模板 DNA, 引物及 Mg^{2+})进行了优化筛选(表 4)。共 16 个处理,每个处理 3 个技术重复,实验重复三次。以 UBC825 (5'-A CACACACACACACT-3')为引物,反应体系总体积为 20 μ L,扩增程序为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 20 s、53℃ 复性 60 s、72℃ 延伸 80 s,37 个循环,72℃ 延伸 6 min 及 4℃ 保存(胡延萍等,2010)。在 1 \times TAE 电泳缓冲液、4 V/cm 电压条件下,用 1.2% 琼脂糖凝胶(含 0.5 ng/mL EB),以 10 μ L 上样量对水葫芦苗 PCR 产物电泳检测,ChemiDoc™ MP 凝胶成像系统(Bio-Rad, USA)观察电泳结果。

对 16 个处理进行评定,按照亮度、清晰度、条带数以及重复性对条带进行打分,亮度、清晰度和重复性 3 个评分点最高等级为 10 分,最低为 0 分;条带数评分时,每条带 1 分。每个处理计算总分,三次技术重复求均值,作为一个处理的评分结果。对评分结果用 DPS 7.05 统计软件进行分析。

3.4 ISSR-PCR 循环次数筛选

在最佳反应体系基础上,以筛选的引物进行 PCR 扩增,设置不同循环次数(25 \times , 30 \times , 35 \times , 40 \times , 45 \times)进行初步筛选,在相似结果的循环之间设置小梯度进

表 4 水葫芦苗五因素四水平正交试验设计

Table 4 Orthogonal design of $L_{16}(4^5)$ for *Halerpestes cymbalaris*

编号 No.	<i>Taq</i> DNA 聚合酶(U/ μ L) <i>Taq</i> polymerase (U/ μ L)	镁离子(mmol/L) Mg^{2+} (mmol/L)	dNTP (mmol/L)	引物(μ mol/L) Primer (μ mol/L)	模板 DNA (ng/ μ L) Template DNA (ng/ μ L)
1	0.025	1.50	0.050	0.2	1.5
2	0.025	1.65	0.075	0.3	2.0
3	0.025	1.80	0.100	0.4	2.5
4	0.025	1.95	0.125	0.5	3.0
5	0.030	1.50	0.075	0.4	3.0
6	0.030	1.65	0.050	0.5	2.5
7	0.030	1.80	0.125	0.2	2.0
8	0.030	1.95	0.100	0.3	1.5
9	0.040	1.50	0.100	0.5	2.0
10	0.040	1.65	0.125	0.4	1.5
11	0.040	1.80	0.050	0.3	3.0
12	0.040	1.95	0.075	0.2	2.5
13	0.050	1.50	0.125	0.3	2.5
14	0.050	1.65	0.100	0.2	3.0
15	0.050	1.80	0.075	0.5	1.5
16	0.050	1.95	0.050	0.4	2.0

行细筛,扩增产物用 1.2%琼脂糖凝胶检测,选择扩增条带特异性最好的循环次数。

3.5 ISSR-PCR 引物筛选及退火温度试验

以最优体系对水葫芦苗 DNA 进行扩增,从 UBC801~UBC900 100 条引物中筛选出扩增结果多态性与稳定性较好的引物,并对筛选出的引物进行退火温度试验,筛选出各个引物的最佳退火温度。以 UBC873 和 UBC887 为例,以梯度 PCR 模式,在每个引物 T_m 值上下浮动 $3^{\circ}\text{C}\sim 5^{\circ}\text{C}$ 的范围设置 8 个梯度 (49°C , 49.5°C , 50.4°C , 51.8°C , 53.5°C , 54.8°C , 55.6°C , 56°C) 温度梯度由仪器随机生成,扩增程序如正交设计试验程序。

3.6 ISSR-PCR 反应体系验证

用 UBC891 (5'-AGTACGAGTTGTGTGTGTGTGTGTG-3')引物对水葫芦苗不同个体进行 ISSR-PCR 扩增,对筛选出的最优体系进行稳定性检验。

作者贡献

王建科是本研究的试验设计和试验研究的执行人,并负责数据分析和论文撰写;李毅、胡延萍、石琳和王钧参与实验材料的收集及前处理等工作;王莉是本研究的通讯作者,主要负责试验方案的构思、论文修改及最后审阅。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由青海省科技计划项目(2014-NK-A4-2-1)和国家自然科学基金项目(31300269)共同资助。

参考文献

- Bao R., Hu Y.P., Wang L., Xu R.H., and Li Y., 2014, Optimization of ISSR-PCR and primer screening for *Blysmus sinocompressus*, *Zhongguo Caodi Xuebao* (Chinese Journal of Grassland), 36(6): 46-52 (包蕊, 胡延萍, 王莉, 旭荣花, 李毅, 2014, 华扁穗草 ISSR-PCR 反应体系优化及引物筛选, *中国草地学报*, 36(6): 46-52)
- Gui T.Q., Sun M., Qiao A.M., and Wang X.Y., 2009, Optimization of an ISSR reaction system of Japanese apricot (*Prunus mume*) based on orthogonal design, *Guoshu Xuebao* (Journal of Fruit Science), 26(1): 108-112 (桂腾琴, 孙敏, 乔爱民, 王心燕, 2009, 正交设计优化果梅 ISSR 反应体系, *果树学报*, 26(1): 108-112)
- Hu Y.P., Xie X.L., Wang L., Yang J., and Li Y., 2010, Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction conditions for

- Rheum tanguticum*, *Guangxi Zhiwu* (Guihaia), 30(1): 112-116 (胡延萍, 谢小龙, 王莉, 杨建, 李毅, 2010, 唐古特大黄 ISSR-PCR 反应条件的优化, *广西植物*, 30(1): 112-116)
- Li R., Chen S.Y., Ning D.L., Li Y.J., and Mao Y.L., 2012, Optimization of ISSR-PCR reaction system and primer selection for *Olea euyopaea*, *Anhui Nongye Kexue* (Journal of Anhui Agricultural Sciences), 40(10): 5797-5799 (李瑞, 陈少瑜, 宁德鲁, 李勇杰, 毛云玲, 2012, 油橄榄 ISSR-PCR 反应体系优化与引物筛选, *安徽农业科学*, 40(10): 5797-5799)
- Liao L., and Guo Q.S., 2009, Establishment of ISSR marker technology and optimization of its system in *Prunella vulgaris*, *Zhongcaoyao* (Chinese Traditional and Herbal Drugs), 40(7): 1131-1135 (廖丽, 郭巧生, 2009, 夏枯草 ISSR 分子标记技术的建立与体系优化, *中草药*, 40(7): 1131-1135)
- Liu H., Mu P., Zhao G.Q. and Sun L.K., 2010, Preliminary establishment and optimization of ISSR reaction system for Oat, *Zhongguo Caodi Xuebao* (Chinese Journal of Grassland), 32(4): 80-85 (刘欢, 慕平, 赵桂琴, 孙丽坤, 2010, 燕麦 ISSR 反应体系的建立与优化, *中国草地学报*, 32(4): 80-85)
- Luo H.Y., and Chen Y.Y., 2007, Optimization and application of ISSR reaction system in wild Lychee (*Litchi chinensis* Sonnerat), *Redai Nongye Kexue* (Chinese Journal of Tropical Agriculture), 27(1): 19-24 (罗海燕, 陈业渊, 2007, 海南野生荔枝 ISSR 反应体系优化及应用, *热带农业科学*, 27(1): 19-24)
- Mu L.Q., Liu Y.N., Feng F.J., and Yang G.T., 2006, Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction system for *Tilia amurensis*, *Linye Kexue* (Scientia Silvae Sinicae), 42(6): 26-31 (穆立蔷, 刘赢男, 冯富娟, 杨国婷, 2006, 紫椴 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化, *林业科学*, 42(6): 26-31)
- Pan H., Yang C.P., Wei Z.G. and Jiang J., 2006, DNA extraction of birch leaves by improved CTAB method and optimization of its ISSR system, *Journal of Forestry Research*, 17(4): 298-300
- Qi S.S., Fan Y., Gong Z.N., Yan S.Z., Zhao B.T., and Chen S.L., 2015, Genetic diversity of *Shiraia bambusicola* from East China assessed using ISSR markers, *Biochemical Systematics and Ecology*, 59: 7
- Sun Q.X., Chen J., and Lin X.J., 2012, Optimization of ISSR's primer and PCR reaction system for *Astragalus sinicus* L., *Zhiwu Yichuan Ziyuan Xuebao* (Journal of Plant Genetic Resources), 13(5): 870-878 (孙清信, 陈坚, 林新坚, 2012, 紫云英 ISSR 引物的筛选及 PCR 反应体系的优化, *植物遗传资源学报*, 13(5): 870-878)
- Wang W.C., Liu L., Wang S.X., Zhang M.L., Ding Z.Z., Lin P.P. and Fang M.Y., eds., 1980, *Flora of China*, Science Press, Beijing, China, pp.335-336 (王文采, 刘亮, 王蜀秀, 张美玲, 丁志遵, 凌萃萃, 方明渊, 编著, 1980, *中国植物志*, 科学出版社, 中国, 北京, pp.335-336)

- Xing C., Tian Y., Guan F., and Meng F.J., 2015, Evaluation of genetic diversity in *Amygdalus mira* (Koehne) Ricker using SSR and ISSR markers, *Plant Syst. Evol.*, 301: 1055-1064
- Yang J. and Zhang G.C., 2013, Optimization of ISSR-PCR reaction system and its verification in common bean, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (*Molecular Plant Breeding*), 11(4): 6111-6616 (杨晶, 张广臣, 2013, 菜豆 ISSR-PCR 体系的优化与验证, *分子植物育种*, 11(4): 6111-6616)
- Zhou H.K., Zhou L., Zhao X.Q., Liu W., Li Y.N., and Zhao L., 2004, Study of growing characteristics of *Halerpestes cymbalaris*, *Xibei Zhiwu Xuebao* (*Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*), 24(10): 1798-1804 (周华坤, 周立, 赵新全, 刘伟, 李英年, 赵亮, 2004, 水葫芦苗(*Halerpestes cymbalaris*)的生长特征研究, *西北植物学报*, 24(10): 1798-1804)

《分子植物育种》征稿启事

《分子植物育种》是由国家科技部批准,国家新闻出版署核准的刊物。本刊“立足国内,面向国际”,是一份为转基因育种、分子标记辅助育种及常规育种服务的国际化科学杂志。围绕水稻、小麦、玉米、油菜、大豆、棉麻、薯类、果树、蔬菜、花卉、茶叶、林草等,刊登分子遗传育种理论、分子育种方法、分子育种研究动态以及优良种质培育等方面的科学论文应用成果。从2003年创刊以来,已被美国化学文摘(CA)、英国《国际农业与生物科学研究文摘》(CABI)、中国科学引文数据库(CSCD)、中国期刊全文数据库(CJFD)、中文科技期刊数据库、中国核心期刊(遴选)数据库、中国生物学文摘和中国生物学数据库(CBA)等多家中外文献数据库收录。本刊是北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》之核心期刊、中国科学技术信息研究所的中国科技论文统计源期刊之核心期刊,是中国科学院文献情报中心的中国科学引文数据库(CSCD)核心库来源期刊。

特向您征集研究论文和研究报告:

研究论文:反映我国植物分子生物学和分子育种领域在基础理论、应用研究和高新技术开发方面的、在国内公开出版的刊物上尚未发表过的原始研究报告。论文篇幅要求在8个印刷页面以上,相当某些国际刊物的 Full length paper。

研究报告:以简要的形式发表的原始研究报告。论文篇幅要求在5~8个印刷页面左右。

欢迎登录在线投稿系统网址 <http://www.molplantbreed.org>。也可以通过投稿邮箱 mpb@molplantbreed.org, mpb@hibio.org 或 molplantbreed@126.com 来稿。