

## 枣 ISSR 反应体系的建立及其指纹图谱构建

孙雯雯<sup>1</sup>, 孙俊<sup>1</sup>, 周军永<sup>2</sup>, 孙其宝<sup>2\*</sup>

(1. 安徽农业大学园艺学院, 合肥 230036; 2. 安徽省农科院园艺研究所, 合肥 230031)

**摘要:** 对影响枣 ISSR 反应的相关因子进行了研究。优化的反应体系包含: 2.5  $\mu\text{L}$  10 $\times$ buffer, 50 ng 模板 DNA, 2.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Mg}^{2+}$ , 0.3  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTPs, 0.3  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  引物, 2 U Taq DNA 聚合酶, 反应体积为 25  $\mu\text{L}$ ; 优化的 PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$  2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  2 min, 循环 35 次; 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min; 退火温度根据引物温度设定。该 ISSR 体系被用于 17 个枣栽培品种遗传图谱分析, 结果表明所构建的遗传图谱能较好地反应供试品种的遗传多样性。

**关键词:** 枣; ISSR-PCR; 遗传多样性

中图分类号: S665.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2011)06-0940-06

### Establishment of inter-simple sequence repeat (ISSR) reaction system and construction of fingerprint in *Zizyphus jujuba* genus

SUN Wen-wen<sup>1</sup>, SUN Jun<sup>1</sup>, ZHOU Jun-yong<sup>2</sup>, SUN Qi-bao<sup>2</sup>

(1 School of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2 Horticulture Research Institute, Anhui Academy of Agriculture Science, Hefei 230031)

**Abstract:** Several main factors influencing inter-simple sequence repeat (ISSR) reaction were analyzed in order to establish ISSR molecular marker system in *Zizyphus jujube* genus. The optimal system was in a reaction volume of 25  $\mu\text{L}$  including: 2.5  $\mu\text{L}$  10 $\times$ buffer, 50 ng template DNA, 2.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Mg}^{2+}$ , 0.3  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTPs, 0.3  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  primer, 2 U TaqDNA polymerase. The optimal amplification program was with the following cycling parameters: 94 $^{\circ}\text{C}$  for 2 min; 35 cycles of 94 $^{\circ}\text{C}$  for 1 min; specified annealing temperature for 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  for 2 min, final extension at 72 $^{\circ}\text{C}$  for 10 min. The optimal amplification program was used in the present study to detect the genetic diversity in 17 cultivars of Jujube.

**Key words:** Jujube; ISSR-PCR; genetic diversity

枣(*Zizyphus jujube* Mill.)为鼠李科枣植物,是原产我国的特有果树<sup>[1]</sup>。在复杂的生态条件下,长期以来演化形成了极其丰富的遗传多样性,给杂交育种、良种筛选带来了一定的困难。近年来,分子标记被证明是进行遗传多样性研究的良好方法<sup>[2-4]</sup>。简单序列重复区间(inter-simple sequence repeat, ISSR)因具有相对可靠的重复性和稳定性<sup>[5-7]</sup>,已广泛应用于柑橘、李、葡萄、梨、山楂等多种果树的品种鉴定、种质资源和遗传多样性的研究<sup>[8-10]</sup>,但是由于 ISSR 技术也是基于 PCR 的一种标记,其稳定性易

受许多因素的干扰,如  $\text{Mg}^{2+}$ 、dNTPs、引物和 Taq 酶等浓度的影响。因此,必须建立一个解决这些问题的稳定而最佳的反应体系。若仅以传统的单因素试验,难免顾此失彼,忽视其互作效应;正交设计可弥补上述的不足,它具有均衡分散和整齐可比的特点,能通过有限的试验找出最佳的组合条件,找出影响扩增的主要因素和次要因素等<sup>[11]</sup>。本研究利用正交试验设计,从  $\text{Mg}^{2+}$ 、dNTPs、引物、Taq DNA 聚合酶、模板 DNA 5 个因素 4 个水平,对枣 ISSR 反应体系进行优化。并利用优化的 ISSR 体系分析

收稿日期: 2011-06-03

基金项目: 国家科技部农业成果转化项目(2010GB2C300191),安徽省科技厅重点项目(05023118)和安徽省财政专项种子工程项目(2008-18)。

作者简介: 孙雯雯,女,硕士研究生。

\* 通讯作者: 孙其宝,男,副研究员。E-mail: anhuisqb@yahoo.com.cn

了 17 个枣栽培品种的遗传多样性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试的 17 个枣品种 (表 1) 的幼叶于 2008 年 5 月采自安徽省农科院果树试验基地。用于 ISSR-PCR 反应的  $Mg^{2+}$ 、dNTPs、引物、*Taq* DNA 聚合酶等均购自上海生物工程有限公司。

表 1 供试材料

Table 1 The materials used in the study

编号 Code	品种名 Name of variety	品种来源 Geographical origin
1	磨盘枣 Mopanzao	安徽安庆
2	龙枣 Longzao	山东果树所
3	辣椒枣 Lajiaozao	山东果树所
4	芒果冬枣 Mangguodongzao	山东果树所
5	沾化冬枣 Zhanhuadongzao	六安果树所
6	茶壶枣 Chahuzao	安徽安庆
7	繁昌长枣 Fanchangchangzao	安徽省繁昌
8	水东青枣 Shuidongqingzao	安徽宣城
9	雪枣 Xuezao	山东临沂
10	葫芦枣 Huluzao	山东
11	酸枣 Suanzao	山东
12	九月青 Jiuyueqing	安徽阜阳
13	马枣 Mazao	安徽歙县
14	团枣 Tuanzao	安徽歙县
15	木枣 Muzao	安徽歙县
16	李府贡枣 Lifugongzao	安徽合肥
17	梨枣 Lizao	安徽农业大学试验园

### 1.2 基因组 DNA 提取

**1.2.1 基因组 DNA 提取** 采用改良的 CTAB 法<sup>[12]</sup> 提取基因组 DNA, 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量, 在核酸检测仪下检测 DNA 浓度与纯度。

**1.2.2 正交试验设计方案** 选用  $L_{16}(4^5)$  正交表。正交试验设计见表 2<sup>[13-14]</sup>。用梨枣品种 DNA 为模板, 引物 z04 进行试验, 每个处理重复 2 次。各处理的总体积为 25  $\mu$ L, 每个处理均加入 2.5  $\mu$ L 10 $\times$ PCR Buffer, 不足用超纯水补足。

**1.2.3 PCR 反应条件及电泳、成像** 在美国 MJ 公司的 PTC-200 型 PCR 仪上进行扩增反应。初步反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 复性 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 36 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, EB 染色, 在 Bio Imaging System (Gene Genius) 凝胶成像系统成像。

**1.2.4 退火温度的确定** 根据正交试验结果, 选择最佳反应体系对退火温度进行梯度试验, 建立了 6 个温度 48.0 $^{\circ}$ C、50.1 $^{\circ}$ C、51.8 $^{\circ}$ C、53.9 $^{\circ}$ C、55.7 $^{\circ}$ C 和 58.0 $^{\circ}$ C。除退火温度不同外, 反应程序与正交试验设计的相同。

**1.2.5 最佳体系及其适用于遗传多样性研究的验证** 用筛选获得的最佳反应体系和反应程序, 选用 2 条引物 z15 (DBDACACACACACACAC) 和 z34 (AGAGAGAGAGAGAGAGYC) 对 17 份枣品种资源 (表 1) 进行稳定性验证。

表 2 PCR 正交试验设计表 ( $L_{16}(4^5)$ )

Table 2 Orthogonal design for PCR ( $L_{16}(4^5)$ )

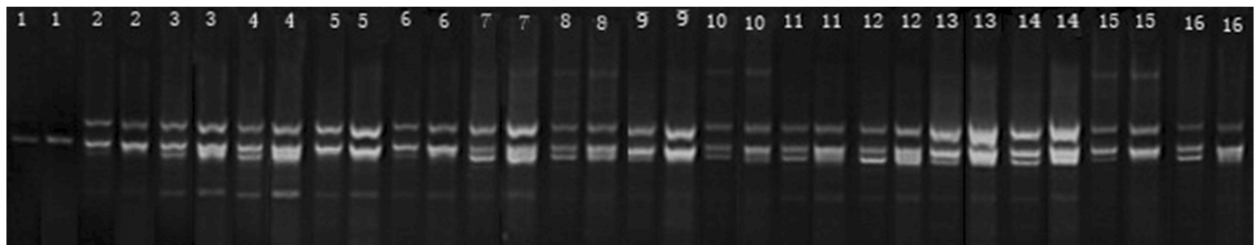
处理 Treatment	dNTPs /mmol $\cdot$ L $^{-1}$	$Mg^{2+}$ /mmol $\cdot$ L $^{-1}$	<i>Taq</i> DNA polymerase/U	模板 DNA/ng Template	引物/ $\mu$ mol $\cdot$ L $^{-1}$ Primer
1	0.1	1.5	0.5	20	0.1
2	0.1	2.0	1.0	40	0.2
3	0.1	2.5	1.5	60	0.3
4	0.1	3.0	2.0	80	0.4
5	0.2	1.5	1.0	60	0.4
6	0.2	2.0	0.5	80	0.3
7	0.2	2.5	2.0	20	0.2
8	0.2	3.0	1.5	40	0.1
9	0.3	1.5	1.5	80	0.2
10	0.3	2.0	2.0	60	0.1
11	0.3	2.5	0.5	40	0.4
12	0.3	3.0	1.0	20	0.3
13	0.4	1.5	2.0	40	0.3
14	0.4	2.0	1.5	20	0.4
15	0.4	2.5	1.0	80	0.1
16	0.4	3.0	0.5	60	0.2

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 正交设计直观分析

根据表 2 设计的 16 个处理重复进行两组 PCR 反应后, 将得到的产物分别进行电泳, 结果见图 1, 16 个组合均有谱带产生。参照何正文等<sup>[13-14]</sup>的方法, 依据谱带的强弱和杂带的多少对 PCR 扩增结果依次打分。条带数量丰富、清晰、稳定的最佳产物

记 16 分, 最差的计 1 分。2 次重复分别独立统计, 16 个处理的分数分别依次为: 1、8、10、11、2、9、12、13、3、14、16、15、4、5、7、6, 和 1、2、12、13、8、10、11、9、3、16、15、14、4、5、7、6。根据打分求出每个因素同一水平下的试验值之和  $K_i$  以及每一因素水平下的数据平均值  $k_i$ , 并求出同一因素不同水平间平均值的极差  $R$  (表 3)。



引物 z04, 1~16 处理编号同表 3, 每个处理重复 2 次  
Primer z04, Treatment No. from lane 1 to 16 is same as that in table 1, replicates for each treatment

图 1 正交试验 PCR 产物电泳结果  
Figure 1 Electrophoresis of orthogonal design PCR products

表 3 正交设计直观分析

Table 3 Intuitive analysis of orthogonal design

结果 Results	dNTPs /m mol·L <sup>-1</sup>	Mg <sup>2+</sup> /mmol·L <sup>-1</sup>	Taq DNA polymerase/U	模板 DNA/ng DNA templete	引物/ $\mu$ mol·L <sup>-1</sup> Primer
K <sub>1</sub>	22.0	43.5	32.0	37.0	25.5
K <sub>2</sub>	48.0	45.0	31.5	31.5	34.0
K <sub>3</sub>	37.0	34.5	30.0	32.0	37.5
K <sub>4</sub>	29.0	13.0	42.50	35.5	39.0
k <sub>1</sub>	5.500	10.875	8.000	9.250	6.375
k <sub>2</sub>	12.000	11.250	7.875	7.875	8.500
k <sub>3</sub>	9.250	8.625	7.500	8.000	9.375
k <sub>4</sub>	7.250	3.250	10.625	8.875	9.750
R	6.500	8.000	3.125	1.375	3.375

表 4 正交设计方差分析

Table 4 Variance analysis of orthogonal design

变异来源 Source of variation	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F value	P 值 P-value
dNTPs	187.000	3	62.333	19.179	0.000
Mg <sup>2+</sup>	326.250	3	108.750	33.462	0.000
Taq 酶 Taq DNA polymerase	49.250	3	16.417	5.051	0.002
模板 DNA DNA templete	10.750	3	3.583	1.103	0.377
引物 Primer	54.750	3	18.250	5.615	0.008
误差 Error	52.000	16	3.250		
总计 Total	2 992.000	32			
Corrected total	680.000	31			

极差  $R$  反映了影响因素对反应体系的影响,  $R$  越大, 影响越显著。由表 3 可知各因素水平的变化对 PCR 反应的影响从大到小依次为:  $Mg^{2+} >$

$dNTPs >$  引物  $>$  Taq 酶  $>$  模板 DNA。

每一因素水平下的数据平均值  $k_i$  反映了影响因素各水平对反应体系的影响情况,  $k_i$  值越大, 反应

水平越好。由表 3 可知, ISSR-PCR 反应中 5 个影响因素的最佳反应水平组合并没有在正交表中出现, 但与分值最高的 2 号组合接近, 其中 Taq、模板 DNA 和引物的用量不同。

## 2.2 正交设计方差分析

将上述处理和评分结果用 SPSS 数据处理软件进行方差分析 (表 4) 和多重比较分析 (图 2)。

方差分析  $F$  值表明, 各因素对 PCR 反应影响强弱与极差分析一致, 除模板 DNA 外, 其余的因素 (引物、 $Mg^{2+}$ 、Taq 酶、dNTPs) 各个水平对试验结果的影响达到极显著水平 ( $P < 0.01$ ), 可进一步进行因素内多重比较分析。

模板 DNA 浓度在本试验所选的 4 个水平范围内对 PCR 扩增结果的影响不显著 (表 4), 这一结论与姜静等<sup>[15]</sup>的研究相似。因此, 选用 20~80 ng 作为最佳模板质量。

多重比较分析表明, 在 25  $\mu\text{L}$  反应体系中, Taq 酶量为 0.5 U、1.0 U 与 1.5 U 水平间的差异不显著, 2.0 U 与其余 3 者组合间的差异均达到显著水平 (图 2)。从图 1 可知, Taq 酶量为 2.0 U 时 (4、7、10、13 号处理) 产生的条带比其他处理产生的条带稳定、清晰, 所以选择 2.0 U 为 Taq 酶的最佳水平。结果与极差分析一致 (表 3)。结果与刘兴菊等<sup>[16]</sup>的结论不同。

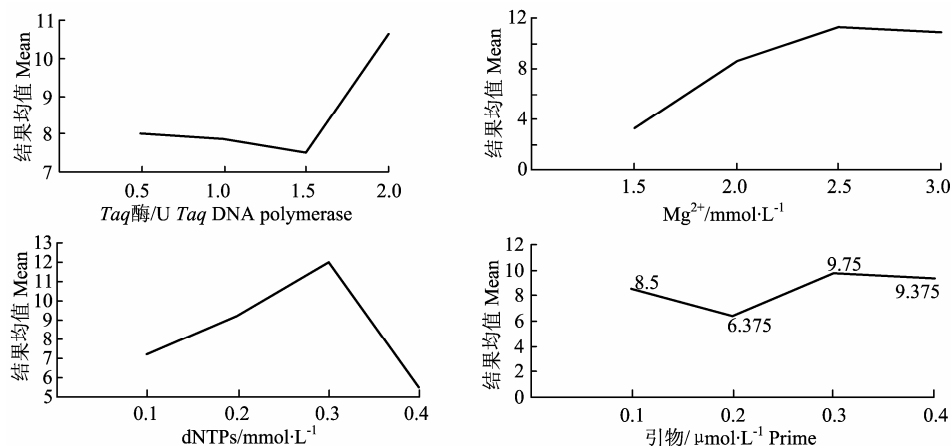
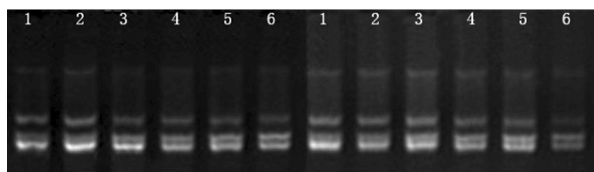


图 2 各因素与结果均值的关系

Figure 2 Relationship between the factors and the mean of result



引物 z04, 1-6 退火温度分别为: 48.0°C、50.1°C、51.8°C、53.9°C、55.7°C、58.0°C, 每个梯度 2 次重复

Primer z04, Lane 1 to 6 indication the annealing temperature 48.0°C、50.1°C、51.8°C、53.9°C、55.7°C、58.0°C, replicates for each treatment

图 3 退火温度对 ISSR 反应的影响

Figure 3 The effects of annealing temperature on ISSR reaction

$Mg^{2+}$  浓度各水平对 PCR 结果的影响最为显著,  $Mg^{2+}$  浓度在 2.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  与 3.0  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  水平的差异不显著, 但与 1.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  和 2.0  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  水平间均有显著差异 (图 2), 该试验确定  $Mg^{2+}$  最佳浓度为 2.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。与桂腾琴<sup>[17]</sup>研究的结果相似。

dNTPs 0.1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  与 0.4  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、两个水平

间表现无显著差异, 与 0.2  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、0.3  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  水平差异显著。0.3  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  与其他 3 个水平间差异显著; 在 0.2~0.3  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  水平上呈上升趋势, 但随浓度增大开始下降 (图 2)。因此, 选择 dNTP 最佳水平为 0.3  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。结果与原勤勤等<sup>[18]</sup>的结论不同。

引物在 0.3  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  与 0.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  水平间差异不显著, 但与 0.1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、0.2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  水平间差异显著 (图 2)。引物在 0.2~0.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  水平时 PCR 结果呈上升趋势, 当引物浓度为 0.3  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时 (3、6、12、13 号处理) 比引物浓度为 0.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时 (4、5、11、14 号处理) 产生的条带稳定、清晰, 说明引物浓度增加, 信号增强, 但是浓度过大实际上削弱了遗传多态性特异条带的鉴别分析, 所以本试验将 0.3  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  定为最佳的反应引物。

## 2.3 PCR 退火温度选择

PCR 反应中, 退火温度的高低直接影响到引物与模板 DNA 的特异性结合, 根据正交试验结果, 选用最佳因素水平, 建立了 6 个温度 48.0°C、

50.1℃、51.8℃、53.9℃、55.7℃和 58.0℃进行退火温度梯度试验。由图 3 可见, 6 个温度梯度的扩增条带相同, 退火温度对扩增反应影响不明显, 但 51.8℃、53.9℃和 55.7℃时扩增的条带最清晰、最稳定; 由于 ISSR 引物较长, 可适当提高退火温度以提高

扩增产物的特异性, 故引物 z04 的最佳退火温度为 56℃。因为不同 ISSR 引物的碱基组成不同, 其退火温度相差也较大, 因而在实际操作中, 应根据不同引物理论  $T_m$  值变化对退火温度进行适当调整。

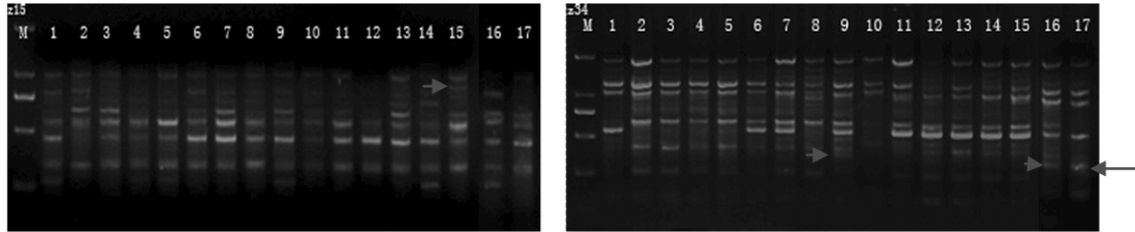


图 4 引物 z15 和 z34 在 17 份枣品种中的 ISSR 扩增结果

Figure 4 ISSR profiles generated by primers z15 and z34 of 17 cultivars of Jujube

#### 2.4 最佳反应体系及其适用于遗传多样性研究的验证

用筛选获得的最佳反应体系和反应程序, 随机选用两条引物 z15 和 z34 对 17 份枣品种资源(表 1)进行 ISSR 扩增, 结果如图 4。两条引物共扩增出 22 条谱带, 多态性条带 17 条。其中, 引物 z15 共扩增出 9 条谱带, 多态性条带 7 条, 多态性条带比率为 78%, 引物 z34 共扩增出 13 条谱带, 多态性条带 10 条, 多态性条带比率为 77%, 通过与 Marker 比较分析, 扩增条带片段大小约在 200~2 000 bp 之间。其中, 15 号品种在引物 z13 的 750~1 000 bp 之间, 9 号品种在 z34 的 200~500 bp 之间, 16 号、17 号品种在 z34 的 200~500 bp 之间均有特异性谱带。两条引物的扩增谱带清晰、多态性条带丰富, 能将 17 份枣种质区分开, 说明该反应体系和反应程序稳定、重复性好, 适合用于枣 ISSR 反应的遗传多样性研究。

### 3 小结与讨论

ISSR 引物中包含有一定长度的重复序列, 与它结合的目标序列在 DNA 复制的过程中存在滑动和不均等交换现象, 使得它们在不同品种或个体间的重复次数存在较大差异<sup>[23]</sup>, 更易于导致引物结合位点和两结合位点间的片段长度产生差异。所以要对反应体系进行优化, 建立稳定性好, 重复性高的最优体系进行 PCR 扩增。

正交设计是从复因子试验中挑选出部分有代表性的水平组合进行试验, 相对于单因素设计和完全组合设计减少了处理组合, 节省了人力和财力。它对结果的分析更科学和完善。本试验针对这几个因

素, 借助统计软件, 将正交试验设计与分析应用到 PCR 反应系统的优化中, 使分析结果更科学、完善和简便。但该方法对 PCR 扩增效果的评价带有一定的主观性等。本试验得出 *Taq* DNA 聚合酶最佳浓度为 2.0 U, 比已研究的单因素试验中确定的 *Taq* DNA 聚合酶最佳浓度都要略高, 这可能与 PCR 反应的不稳定性和正交设计采用的主观打分有关, 也与 *Taq* DNA 聚合酶的生产质量等有关。因此, 如果能对 PCR 扩增结果建立客观的评价标准, 将会更好地促进该方法的应用。

ISSR-PCR 反应对模板浓度的要求范围较宽, 本试验所设定模板浓度的 4 个水平对扩增结果无显著影响, 这与姜静等<sup>[15]</sup>等结论基本相符。为增加实验的可比性, 应尽量选择同一厂家同一批次的 *Taq* 酶。 $Mg^{2+}$  浓度对 PCR 扩增影响很大, 适宜的浓度一般为 0.5~2.5 mmol·L<sup>-1</sup>, 本研究与果梅<sup>[17]</sup>研究的结果相似, 除 *Taq* 酶量和 dNTPs 浓度稍高外,  $Mg^{2+}$ 、引物浓度相似; 而与梨<sup>[19]</sup>的 ISSR 体系相比, 除引物外,  $Mg^{2+}$ 、*Taq* 酶和 dNTPs 均比梨的高。因此, 不同植物初建 ISSR-PCR 体系时, 在参照亲缘关系较近的近缘种反应条件的同时, 先进行正交设计, 然后对不是很明确的因素再进行单因素试验, 可快速建立最佳反应体系。

赵锦等<sup>[20]</sup>应用 16 个引物进行 12 个赞皇大枣优良品系及赞新大枣的 RAPD 分析, 共扩增出 70 条 DNA 带, 其中多态性带数为 19 条, 占总数的 27.14%。智福军<sup>[21]</sup>等用 12 个引物对 5 个枣树品种进行了 RAPD 扩增, 共扩增出 34 条带, 其中共有带 14 条, 多态性带 20 条, 多态性比例为 58.82%, 每对引物扩增条带数在 1~5 之间, 平均达到 2.83 条。

李莉等<sup>[22]</sup>用 19 对 SRAP 引物组合对 26 份枣试材共扩增出 580 条 DNA 带, 其中 570 条为多态带 (占 98.28%), 平均每个引物扩增多态性带 30 条。乔勇等<sup>[3]</sup>采用 AFLP 技术, 利用 10 对引物, 对 21 个枣品种(系)的基因组 DNA 进行了分析, 共扩增出条带 531 条, 其中多态性条带 216 条, 多态性位点百分比为 40.68%。本试验用优化出的稳定体系, 采用两条引物共扩增出 22 条谱带, 多态性条带 17 条, 多态性位点百分率为 77.27%。其中, 引物 z15 共扩增出 9 条谱带, 多态性条带 7 条, 多态性条带比率为 78%, 引物 z34 共扩增出 13 条谱带, 多态性条带 10 条, 多态性条带比率为 77%, 两条引物的扩增谱带清晰、多态性条带丰富, 能将 17 份枣种质区分开。ISSR 引物的长度一般都在 15~24 bp, 反应的退火温度 52~55℃, 比 RAPD 的退火温度 36~40℃高, 因此对 PCR 反应的敏感性低于 RAPD, 其稳定性也较 RAPD 分析技术也更高。ISSR-PCR 有一套通用引物, 相比于 AFLP 和 SRAP 分子标记技术, 其实际操作简单、快捷, 在品种资源研究中有较大的应用潜力。

本试验稳定的 ISSR 反应体系可以为枣种质资源遗传多样性分析、品种鉴定、亲缘关系分析、农艺性状分子标记和枣优良新品种选育等领域提供研究平台。

## 参考文献:

- [1] 曲泽州, 王永蕙, 周吉柱. 关于枣树的起源问题(2 报)[J]. 河北农业大学学报, 1987, 10(中国枣研究专辑): 1-9.
- [2] 李守勇, 续九如, 孙浩元. 不同产地冬枣的 RAPD 分析[J]. 西北林学院学报, 2006, 21(5):89-93.
- [3] 乔勇, 赵锦, 杨海旭, 刘孟军. 21 个枣品种(系)的 AFLP 指纹分析[J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(2): 205-210.
- [4] 马庆华, 王贵禧, 梁丽松. 枣选择性扩增微卫星体系的建立及优化[J]. 中国农业科学, 2010, 43(2): 371-379.
- [5] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome finger printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplified [J]. Genomics, 1994, 20: 176-183.
- [6] Esayas A, Endashaw B, Tomas B. Inter-simple sequence repeat (ISSR) variation in forest coffee trees (*Coffea ara-bica* L.) populations from Ethiopia [J]. Genetica, 2005, 124: 213-221.
- [7] Syamkumar R S, Sasikumar B. Molecular marker based genetic diversity analysis of Curcuma species from India[J]. Scientia Horticulturae, 2007, 10: 10-16.
- [8] 代红艳, 张志宏, 周传生, 等. 山楂 ISSR 分析体系的建立和优化[J]. 果树学报, 2007, 24(3): 313-318.
- [9] 王进, 何桥, 欧毅, 等. 李种质资源 ISSR 鉴定及亲缘关系分析[J]. 果树学报, 2008, 25(2): 182-187.
- [10] 张青林, 罗正荣. ISSR 及其在果树上的应用[J]. 果树学报, 2004, 21(1):54-58.
- [11] 明道绪. 生物统计附试验设计[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2007: 286-287.
- [12] 李宗菊, 熊丽, 桂敏, 等. 非洲菊基因组 DNA 提取及 ISSR-PCR 扩增模板浓度优化[J]. 云南植物研究, 2004, 26(4): 439-444.
- [13] 何正文, 刘运生, 陈立华, 等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件[J]. 湖南医科大学学报, 1998, 23(4): 403-404.
- [14] 赵锦. 枣树品种、品系及其近缘种的 RAPD 分析[D]. 保定: 河北农业大学, 2000.
- [15] 姜静, 杨传平, 刘桂丰, 等. 桦树 ISSR-PCR 反应体系的优化[J]. 生态学杂志, 2003, 22(3): 91-93.
- [16] 刘兴菊, 汤新彩, 梁海永, 等. 枣树 ISSR 反应体系的建立及优化[J]. 西北林学院学报, 2007, 22(5): 62-65.
- [17] 桂腾琴, 孙敏, 乔爱民, 等. 正交设计优化果梅 ISSR 反应体系[J]. 果树学报, 2009, 26(1): 108-112.
- [18] 原勤勤, 文亚峰, 何钢, 等. 用正交设计法优化枣树 ISSR-PCR 反应体系[J]. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(2): 70-74.
- [19] 曾艳玲, 谭晓风, 曾晓峰. 采用正交设计方法优化梨 ISSR-PCR 反应体系[J]. 湖北农业科学, 2008, 47(11): 1235-1238.
- [20] 赵锦, 刘孟军. 赞皇大枣优良品系及赞新大枣的 RAPD 分析[J]. 林业科学, 2003, 39(3): 153-156.
- [21] 智福军, 贾彦丽, 梁海永, 等. 利用 RAPD 技术进行枣树的品种鉴定[J]. 华北农学报, 2009, 24(增刊): 110-114.
- [22] 李莉, 彭建营, 白瑞霞. 中国枣属植物亲缘关系的 SRAP 分析[J]. 中国农业科学, 2009, 42(5): 1713-1719.
- [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: 741-750.