

寒兰基因组 DNA ISSR-PCR 反应条件的优化

孙小琴, 李恩香, 贾文杰, 彭德镇, 孔令杰, 杨柏云* (南昌大学生命科学学院, 江西南昌 330031)

摘要 以改良的 CTAB 法提取的寒兰(*Cymbidium kanran* Makino)基因组 DNA 为模板, 通过单因子试验建立最适的寒兰的 ISSR-PCR 反应体系。结果表明, 适宜寒兰 ISSR-PCR 反应体系的扩增条件为: 25 μ l PCR 反应体系中, 1 \times PCR buffer, 2.0 mmol/L MgCl₂, 300 ng 模板 DNA, 200 μ mol/L dNTP, 1.40 U *Taq* DNA 聚合酶, 0.4 μ mol/L 引物。最佳扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后进行 40 个循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 复性温度根据各引物的 *Tm* 值略低 1~2 $^{\circ}$ C, 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

关键词 寒兰; ISSR-PCR 反应; 遗传多样性

中图分类号 S682.31 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)29-14044-03

Optimization of ISSR-PCR Reaction Conditions for Genomic DNA from *Cymbidium kanran* Makino

SUN Xiao-qin et al (School of Life Science, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330031)

Abstract The genomic DNA of *C. kanran* was used as template, which was extracted by improved CTAB. The suitable reaction ISSR-PCR system of *C. kanran* was established by studying the influence of the main components in the ISSR reaction system. The most suitable ISSR-PCR reaction system and amplified procedure for *C. kanran* was 25 μ l amplification reactions system which contained 1 \times PCR buffer, 2.0 mmol/L MgCl₂, 300 ng template DNA, 200 μ mol/L dNTPs, 1.40 U *Taq* DNA polymerase, 0.4 μ mol/L primer. The optimal amplified procedure was as follows: a pre-denaturing for 5 min at 94 $^{\circ}$ C, 40 cycles of denaturing for 30 s at 94 $^{\circ}$ C, annealing for 30 s at the temperature due to 1~2 $^{\circ}$ C lower than the *Tm* of different primer and extension for 50 s at 72 $^{\circ}$ C. At last, the DNA in the reactions system was extended for 7 min at 72 $^{\circ}$ C.

Key words *Cymbidium kanran*; ISSR-PCR reaction; Genetic diversity

寒兰(*Cymbidium kanran* Makino)是兰科(Orchidaceae)兰属(*Cymbidium*)多年生草本植物, 具有很高的观赏价值, 受到国内外学者的广泛关注。目前, 寒兰的研究主要集中在资源分布、栽培技术、无菌播种、快速繁殖、试管成花、脱毒防病等方面^[1-5], 而在分类研究方面, 由于兰花属间自然杂交及属内变种、品种以及自然杂交种的存在, 仅凭形态特征较难分类^[6]。对于种质资源的深入研究是观赏植物育种、引种驯化、生产优质种苗的基础, 而育种上的突破取决于关键性基因的发现和利用。在进行种质资源鉴定中, 使用 ISSR 分子标记是非常有效和常用的方法^[7-8], 利用分子标记技术对寒兰种质资源进行深入研究可为寒兰的分类提供分子水平的证据, 并为寒兰保护策略和措施的制定提供理论基础。研究拟建立重复性高, 结果清晰且稳定的 ISSR-PCR 反应体系, 为进一步从分子水平上研究寒兰的种群遗传多样性以及探索切实可行的保护策略奠定良好的实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料采集和准备 试验样品均采自江西省, 分别来自于武夷山脉、罗霄山脉、幕阜山脉、大庾岭和九连山脉(表 1)。每个居群采集 15~20 个样本。记录采集样品的经纬度、海拔和生境, 同时对每个居群采集凭证标本供研究用。DNA 样品采集通过采取少量新鲜幼嫩叶片。

1.2 基因组 DNA 提取 寒兰的基因组 DNA 均采用改良的 CTAB 法^[9-11], 主要采用微量液氮提取叶片 DNA, 方法如下: ①取 0.1 g 新鲜的寒兰叶片, 置 1.5 ml 离心管中加液氮研磨成粉末后, 转入 2 ml 离心管中, 加入 65 $^{\circ}$ C 预热的 0.8 ml 2 \times CTAB 抽提缓冲液(pH 值 8.0)、20 μ l β -巯基乙醇, 轻轻摇动使溶液分散均匀, 65 $^{\circ}$ C 水浴 50 min 左右, 水浴过程每隔 5 min 轻

轻摇匀。②取出样品冷却至室温, 加等体积的氯仿: 异戊醇(24:1), 轻轻摇匀, 12 000 r/min 离心 10 min。③吸取上层水相转入新的 1.5 ml 离心管, 再加 1 倍体积异戊醇, 摇匀后 12 000 r/min 离心 10 min。④取出上清, 加 2 倍体积 -20 $^{\circ}$ C 下保存的无水乙醇, 0.5 倍体积的 5 mol/L NaCl 混匀, 于 -20 $^{\circ}$ C 下放置 20 min。⑤勾出 DNA, 加 70% 乙醇洗涤 2 次, 用无水乙醇洗涤 1 次, 风干。⑥勾不出的于 12 000 r/min 离心 10 min, 加 70% 乙醇洗涤 2 次, 用无水乙醇洗涤 1 次, 风干。⑦用 100 μ l 0.1 \times TE 溶解 DNA, -20 $^{\circ}$ C 长期保存备用。

表 1 材料来源

Table 1 The sources of materials

编号 Code	采集地 Sampling site	所属山脉 Mountain range	数量 Sample size	海拔/m Altitude
A	宜春宜丰	幕阜山脉	20	350~760
B	赣州龙南县九连山	大庾岭和九连山脉	15	500~900
C1	吉安井冈山	罗霄山脉	15	400~500
C2	吉安安福	罗霄山脉	15	400~500
C3	赣州崇义县齐云山	罗霄山脉	15	400~500
D	抚州资溪马头山	武夷山脉	20	300~500

1.3 DNA 样品的检测 用 1.0% 琼脂糖电泳检测 DNA 质量; 用分光光度计测定其纯度和浓度, DNA 纯度以 $OD_{260\text{nm}}/OD_{280\text{nm}}$ 的比值来检测, 浓度计算法为:

$$\text{DNA 浓度}(\mu\text{g/ml}) = OD_{260\text{nm}} \times 50 \times \text{稀释倍数}$$

1.4 ISSR-PCR 条件筛选 引物参照哥伦比亚大学提供的序列(UBC 801~UBC 900), 由上海生物工程技术服务有限公司合成, 引物使用浓度为 5 μ mol/L。Taq DNA 聚合酶、dNTPs 及相应缓冲液购自上海申能博彩生物科技有限公司。该研究以 UBC 835 和 841 为引物, 设计了 4 个 Mg²⁺ 浓度: 1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L; 4 个 dNTP 浓度: 160、200、240、280 μ mol/L。以 UBC 822 和 825 为引物, 设计了 4 个 Taq DNA 聚合酶浓度: 0.75、1.00、1.25、1.40 U; 采用原浓度在 1 800 ng/ μ l DNA 模板设计 4 个梯度 50、100、200、300 ng/25 μ l。最

基金项目 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ09054)。

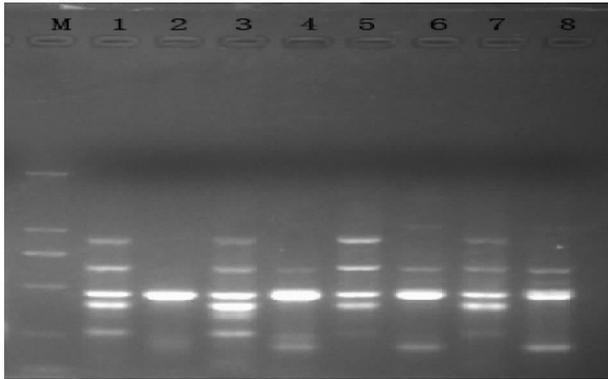
作者简介 孙小琴(1985-), 女, 江西吉安人, 硕士研究生, 研究方向: 植物分子生物学。* 通讯作者。

收稿日期 2009-06-18

后,以 UBC 823 和 824 进行了相对于该引物的 T_m 值低 1.0、1.5、2.0、3.0 °C 的退火温度筛选及循环次数为 35、40、45 次的筛选。

2 反应条件的优化结果

2.1 Mg^{2+} 浓度 由图 1 可知,引物 UBC 835 较 UBC 841 扩增效果更好,通过对 UBC 835 分析可以得出, Mg^{2+} 浓度对 PCR 试验影响不大,在浓度为 1.5 ~ 3.0 mmol/L 时均有电泳条带出现,但当浓度为 2.0 mmol/L 时,电泳条带数相对较多,而且也比较清晰。因此,整体上比较可以得出浓度在 2.0 mmol/L 时 PCR 能得到清晰稳定的条带,且无非特异性扩增,为最适合浓度。



注:1~2, Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L;3~4, Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L;5~6, Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L;7~8, Mg^{2+} 浓度为 3.0 mmol/L;其中,1,3,5,7 为 UBC 835;2,4,6,8 为 UBC 841。

Note:1~2, 1.5 mmol/L Mg^{2+} ;3~4, 2.0 mmol/L Mg^{2+} ;5~6, 2.5 mmol/L Mg^{2+} ;7~8, 3.0 mmol/L Mg^{2+} ;1,3,5,7 are primer UBC 835;2,4,6,8 are primer UBC 841.

图 1 Mg^{2+} 浓度对 ISSR 扩增的影响

Fig.1 Effect of Mg^{2+} concentration on ISSR amplification

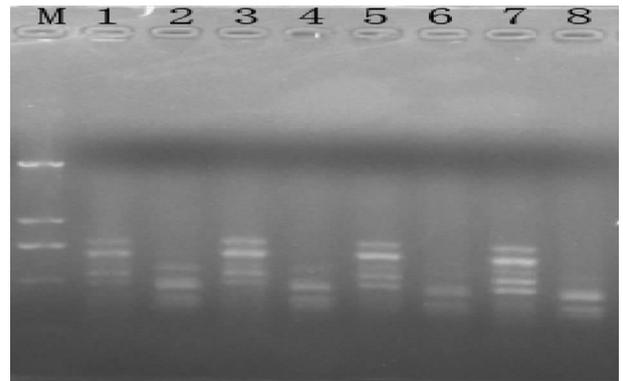
2.2 *Taq* DNA 聚合酶辅助因子浓度 由图 2 可知,引物 UBC 822 较 UBC 825 扩增效果更好。从 UBC 822 在不同 *Taq* DNA 聚合酶浓度下的扩增效果可以看出,在 1.25 ~ 1.40 U 范围内均能得到清晰的条带,背景较暗,不同浓度下的产物差异不大,浓度为 1.0 U 时条带数相对较少,综合来看在浓度为 1.40 U 时扩增效果最好。

2.3 DNA 模板浓度 由图 3 可知,模板浓度在 50 ~ 300 ng 均能得到清晰稳定的条带,基本没有非特异性扩增,产物稳定。200 ng 以下虽也能扩增出条带,但明显可以看出随浓度的降低,条带越弱。从图中 UBC 822 的扩增效果还可发现,模板浓度在 300 ng 时扩增出的条带最清晰。

2.4 dNTP 浓度 由图 4 可知,引物 UBC 835 较 UBC 841 扩增效果好,且试验所采用的 dNTP 浓度对这 2 种引物扩增的影响并不特别明显,浓度为 160 ~ 280 $\mu\text{mol/L}$ 时得到的产物基本一致,但过高或过低的浓度都使 PCR 产物较为模糊,因此,笔者选用中间的浓度(200 $\mu\text{mol/L}$)进行后续的研究,此浓度的条带清晰,带数相对较多,背景较暗。

2.5 退火温度 由图 5 可知,在原引物 T_m 值上降低 1 ~ 2 °C 的条件下效果均较好,低 3 °C 时条带不明显。

2.6 循环次数 由图 6 可知,循环 35 次带数较少,且条带不清晰,45 次循环背景太亮,40 次循环次数为最佳,此时带

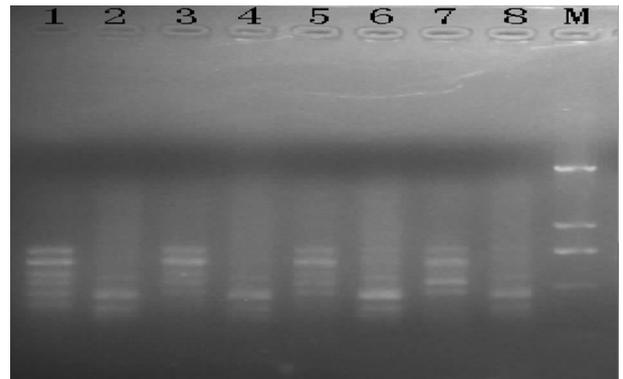


注:1~2,浓度为 0.75 U;3~4,浓度为 1.0 U;5~6,浓度为 1.25 U;7~8,浓度为 1.40 U;其中,1,3,5,7 为 UBC 822;2,4,6,8 为 UBC 825。

Note:1~2,0.75 U;3~4,1.0 U;5~6,1.25 U;7~8,1.40 U;1,3,5,7 are primer UBC 822;2,4,6,8 are primer UBC 825.

图 2 *Taq* DNA 聚合酶对 ISSR 扩增的影响

Fig.2 Effect of *Taq* DNA polymerase on ISSR amplification



注:1~2,浓度为 300 ng;3~4,浓度为 200 ng;5~6,浓度为 100 ng;7~8,浓度为 50 ng;其中,1,3,5,7 为引物 UBC 822;2,4,6,8 为引物 UBC 825。

Note:1~2,300 ng;3~4,200 ng;5~6,100 ng;7~8,50 ng;1,3,5,7 are primer UBC 822;2,4,6,8 are primer UBC 825.

图 3 DNA 浓度对 ISSR 扩增的影响

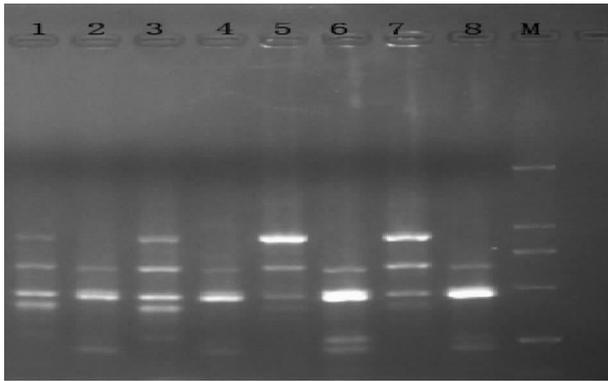
Fig.3 Effect of DNA concentration on ISSR amplification

数相对较多,背景较暗,扩增条带比较稳定。

3 结论与讨论

(1)通过对各影响因子的筛选,确定寒兰的 ISSR 较适宜的扩增条件是:25 μl PCR 反应体积中,1 \times PCR buffer,1.40 U *Taq* DNA 聚合酶,4 种 dNTPs 各 200 $\mu\text{mol/L}$,0.4 $\mu\text{mol/L}$ 引物,2.0 mmol/L $MgCl_2$,300 ng 模板 DNA。最佳扩增程序为:94 °C 预变性 5 min,然后进行 40 个循环:94 °C 变性 30 s,复性温度根据各引物的 T_m 值略低 1 ~ 2 °C,30 s,72 °C 延伸 50 s,循环结束后 72 °C 延伸 7 min,4 °C 保存。PCR 扩增在 PE 2700 PCR 仪上完成,PCR 扩增产物 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。利用所优化体系,选用 UBC 822 引物,在复性温度为 50 °C 条件下进行批量扩增。从图 7 中可以看出,优化后的反应体系是比较理想的。

(2)ISSR 最佳扩增条件在不同物种中各有不同,为了获得可靠性和重复性较高的 ISSR 条带,针对不同物种进行反应体系的优化是非常重要的。在 ISSR-PCR 反应体系中,*Taq* DNA 聚合酶起着关键的作用。酶的用量对 PCR 扩增有很大

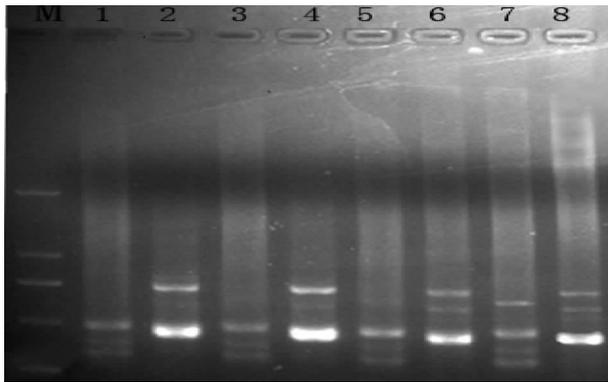


注:1~2,浓度为160 μmol/L;3~4,浓度为200 μmol/L;5~6,浓度为240 μmol/L;7~8,浓度为280 μmol/L;其中1,3,5,7为引物 UBC 835;2,4,6,8为 UBC 841。

Note:1-2, 160 μmol/L;3-4, 200 μmol/L;5-6, 240 μmol/L;7-8, 280 μmol/L; 1,3,5,7 are primer UBC 835;2,4,6,8 are primer UBC 841.

图4 dNTP浓度对ISSR扩增的影响

Fig.4 Effect of dNTP concentration on ISSR amplification



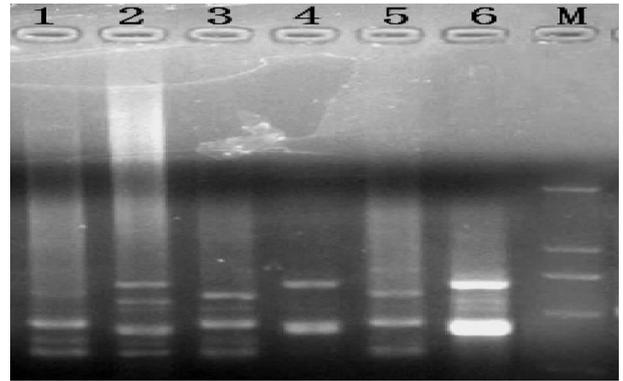
注:1~2,温度为51.4 °C;3~4,温度为52.2 °C;5~6,温度为53.7 °C;7~8,温度为53.0 °C;其中,1,3,5,7为引物 UBC 823;2,4,6,8为 UBC 825。这2种引物 T_m 值为54.59 °C。

Note:1-2, 51.4 °C, 3-4, 52.2 °C, 5-6, 53.7 °C, 7-8, 53.0 °C; 1, 3, 5, 7 are primer UBC 823; 2, 4, 6, 8 are primer UBC 824. T_m of the two primers are 54.59 °C.

图5 退火温度对ISSR扩增的影响

Fig.5 Effect of annealing temperature on ISSR amplification

影响,酶量过少会影响靶序列扩增产量,而过多则会导致非特异性的扩增,同时扩增条带的背景模糊,不易辨认。 Mg^{2+} 作为 *Taq* DNA 聚合酶的辅助因子, Mg^{2+} 浓度不仅影响 *Taq* DNA 聚合酶的活性,还能与反应液中的 dNTP、模板 DNA 及引物结合,影响引物与模板的结合效率、模板与 PCR 产物的解链温度、产物的特异性和引物二聚体的形成^[12]。在 PCR 反应中,作为模板的 DNA 所需浓度很低,在每个反应体系(25 μl)中一般在 50~300 ng,其适宜浓度范围较大。一般来说,模板过少,分子碰撞的机率低,偶然性大,影响扩增产物的稳定性;模板过多又会降低特异性扩增效率,增加非特异性产物。通常的 PCR 反应体系中,dNTP 常用的浓度的 4 种 dNTP 各 20~200 μmol/L。浓度过高可加快反应速度,同时也增加了碱基错配率和试验成本;浓度过低可导致反应速度下降,但可提高反应的特异性。循环次数是影响扩增结果的一个重要因素,循环次数少,扩增产物相应较少,循环次数



注:1~2,为40个循环;3~4,为35个循环;5~6,为45个循环。其中1,3,5为引物 UBC 823;2,4,6为引物 UBC 824。

Note:1-2, 40 cycles; 3-4, 35 cycles, 5-6, 45 cycles. 1, 3, 5 are primer UBC 823; 2, 4, 6 are primer UBC 824.

图6 循环次数对ISSR扩增的影响

Fig.6 Effect of cycle number on ISSR amplification

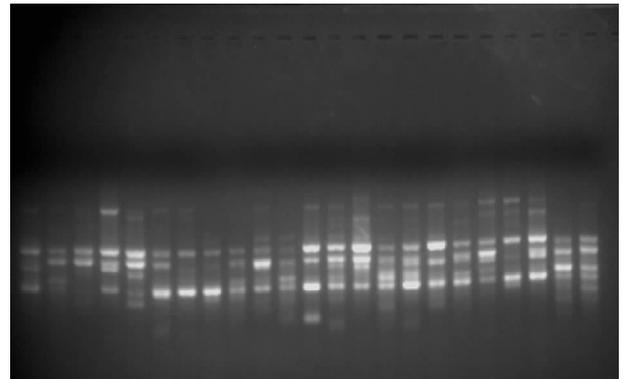


图7 引物 UBC 822 的扩增结果

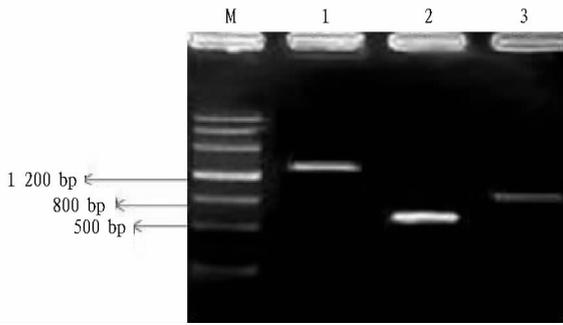
Fig.7 The amplification results with primer UBC 822

多,扩增产物就多,但是非特异性扩增也多^[14]。退火温度为引物和模板结合时候的温度参数,它是影响 PCR 特异性的较重要因素,不同的引物退火温度也不同。一般来说,较低的退火温度可提高 PCR 反应的敏感性但其特异性较差,而较高的退火温度则可提高反应的特异性但却降低了其扩增效率^[15]。

参考文献

- [1] 朱国兵,杨柏云,蔡奇英,等. 寒兰的快速繁殖技术[J]. 热带亚热带植物学报, 2006, 14(2):156-156.
- [2] 朱国兵,杨柏云,敖爱艳. 寒兰的组织培养与试管成花[J]. 植物生理学通讯,2008,44(3):513-514.
- [3] 向地英,杨晓琴,杨利平. 寒兰的种内变异[J]. 北方园艺,2007(12):160-162.
- [4] 蔡镇坤. 寒兰下山草的栽培管理[J]. 花卉园,2006(4):46.
- [5] 刘翔. 台湾省的兰花病虫害及防治[J]. 世界农业,2001(12):38-39.
- [6] 范成明,李枝林,何月秋. 兰花组织培养及分子生物学研究进展[J]. 园艺学报,2003,30(4):487-491.
- [7] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用[J]. 遗传学, 2002,24(5):613-616.
- [8] 李海生. ISSR 分子标记技术及其在植物遗传多样性分析中的应用[J]. 生物学通报, 2004, 39(2):19-20.
- [9] 陈昆松,李方,徐昌杰,等. 改良 CTAB 法用于多年生植物组织基因组 DNA 的大量提取[J]. 遗传,2004,26(4):529-531.
- [10] 陈惠云,孙志栋,茅轶俊,等. 春兰基因组 DNA 提取方法的研究[J]. 分子植物育种,2006,4(1):135-142.
- [11] 王国鼎,文晓鹏,季祥彰,等. 11 种兰属植物 DNA 的提取及 RAPD-PCR 实验体系的建立与优化[J]. 种子,2007,26(3):24-26.
- [12] 贾文杰,李恩香,杨柏云,等. 白木香基因组 DNA 的提取及 ISSR 反应条件的优化[J]. 安徽农业科学,2008,36(24):10365-10367,10370.

(下转第 14050 页)



注: M. 分子量标准 Marker III; 1. 含有目的片段 Tyr-rich HRGP 的农杆菌菌液 PCR 产物; 2. 含有目的片段 XERIC0 的农杆菌菌液 PCR 产物; 3. 含有目的片段 rd29A 的农杆菌菌液 PCR 产物。

Note: M, Marker III; 1, PCR products of *Agrobacterium* bacteria liquid with target fragment Tyr-rich HRGP; 2, PCR products of *Agrobacterium* bacteria liquid with target fragment XERIC0; 3, PCR products of *Agrobacterium* bacteria liquid with target fragment rd29A.

图6 转化农杆菌的 PCR 鉴定

Fig. 6 PCR identification of transformed *Agrobacterium*

重要原因。CaMV35S 为组成型启动子, 具有较强的启动功能, 其控制的外源基因在转基因植物的任何时空均可表达, 但外源基因在受体植物中的过量表达不但造成植物体内能量浪费, 甚至严重影响植物的生长发育, 如某些含有 35S 启动子的基因过量表达会使转基因植物产生生长缓慢、形体变小等现象^[17-19]。为解决这一问题, 人们越来越重视对特异表达启动子及诱导型启动子的研究。针对不同的目的基因, 应选用不同的启动子, 从而使靶基因在特定组织或条件下表达, 以利于转基因植物的正常生长发育^[20-21]。该试验针对抗逆基因 XERIC0 选用诱导型启动子 rd29A, 针对与改变木质素结构有关的 Tyr-rich HRGP 基因选用特异表达启动子 PAL2, 这在提高植物的抗性和材性方面具有极大的优越性。

3.2 抗性与材性的同时改良 迄今为止, 双价转基因植物表达载体的构建, 一般是关于抗虫基因或抗逆基因的构建, 有关抗性与材性基因相结合的研究较少。引入 XERIC0 抗逆基因可增强逆境条件下树种的抗逆性; Tyr-rich HRGP 基因可改变木质素的结构, 在造纸工业中利于木质素生物分解以减少其对环境的污染, 达到高抗性和优良材性同时提高的目的。该研究构建了 XERIC0 抗逆基因和改变木质素结构有关的 Tyr-rich HRGP 基因的双价转基因植物表达载体, 每个基因两端均含有各自的启动子、终止子等, 将 2 个基因串联在一起共同组建于 1 个表达载体中, 保证了基因高效表达, 同时又防止了同源重组和基因沉默的发生, 通过 1 次转化可将 2 个基因同时转入植物体内, 获得抗性和材性同时改良的转基因植株。

参考文献

[1] WHETTEN R, SEDEROFF R. Lignin biosynthesis[J]. *The Plant Cell*,

1995, 7:1001-1013.

[2] DIANE H, ROBERT S, YUNG M H, et al. Two classes of cis sequences contribute to tissue-specific expression of a PAL2 promoter in transgenic tobacco[J]. *The Plant Journal*, 1995, 7(6): 859-876.

[3] KANG Z, BUCHENAUER H. Ultrastructural and immunocytochemical investigation of pathogen development and host responses in resistant and susceptible wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2000, 57: 255-268.

[4] VANCE C P, KIRK T K, SHERWOOD R T. Lignification as a mechanism of disease resistance[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1980, 18: 259-288.

[5] 程智慧, 李玉红, 孟焕文, 等. BTH 诱导黄瓜幼苗对霜霉病的抗性 with 细胞壁 HRGP 和木质素含量的关系[J]. *中国农业科学*, 2006, 39(5): 935-940.

[6] 韦国海. 中国造纸工业污染防治的现状和对策[J]. *国际造纸*, 2002, 19(1): 44-46.

[7] 杜仰民. 造纸工业废水治理进展与评述[J]. *工业水处理*, 1997, 17(3): 1-5.

[8] BAUCHER M, BERNARD VAILHE M A, CHABBERT B, et al. Down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) and the effect on lignin composition and digestibility[J]. *Plant Mol. Biol.*, 1999, 39: 437-447.

[9] GU D, CHEN F, WHEELER J, et al. Improvement of in-rumen digestibility of alfalfa forage by genetic manipulation of lignin O-methyltransferases[J]. *Transgenic Res.*, 2001, 10: 457-464.

[10] PETRA K, ELMON S, KLAUS H, et al. Two pathogen-responsive genes in parsley encode a tyrosine-rich hydroxyproline-rich glycoprotein (hrgp) and an anionic peroxidase[J]. *Mol Gen Genet.*, 1995, 247: 444-452.

[11] LIANG H Y, FROST C J, WEI X P, et al. Improved sugar release from lignocellulosic material by introducing a tyrosine-rich cell wall peptide gene in poplar[J]. *Clean*, 2008, 36(8): 662-668.

[12] KO J H, YANG S. H, HAN K H. Upregulation of an Arabidopsis RING-H2 gene, XERIC0, confers drought tolerance through increased abscisic acid biosynthesis[J]. *The Plant Journal*, 2006, 47(3): 343-355.

[13] KOHLI A, GRIFFITHS S, PALACIAS N, et al. Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV35S promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination[J]. *Plant Journal*, 1999, 17(6): 591-601.

[14] DIANE H, ROBERT S, YUNG M H, et al. Two classes of cis sequences contribute to tissue-specific expression of a PAL2 promoter in transgenic tobacco[J]. *The Plant Journal*, 1995, 7(6): 859-876.

[15] GAIL S, CHEN F, REDDY M S S, et al. Down-regulation of hydroxycinnamoyl CoA: Shikimate hydroxycinnamoyl transferase in transgenic alfalfa affects lignification, development and forage quality[J]. *Phytochemistry*, 2007, 68: 1521-1529.

[16] LIU Q, LI J, ZHANG G Y, et al. Isolation of cDNAs encoding two distinct transcription factors binding to DRE cis-acting element involved in cold- and drought-induced expression of *Arabidopsis* rd29A Gene[J]. *Tsinghua Science and Technology*, 1999, 4(3): 256-260.

[17] HSIEH T H, LEE J T, CHANG Y Y, CHAN et al. Tomato plants ectopically expressing Arabidopsis CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress[J]. *Plant Physiol*, 2002, 130: 618-626.

[18] HSIEH T H, LEE J T, CHANG Y Y, et al. Heterology expression of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato[J]. *Plant Physiol*, 2002, 129: 1086-1094.

[19] MIE K, SETSUKO M, KAZUO S, et al. A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress inducible rd29A promoter drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer[J]. *Plant Physiol*, 2004, 45(3): 346-350.

[20] 刘强, 赵南明, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, 等. DREB 转录因子在提高植物抗逆性中的作用[J]. *科学通报*, 2000, 45(1): 11-16.

[21] 赵恢武, 陈杨坚, 胡鸾雷, 等. 干旱诱导性启动子驱动的海藻糖-6-磷酸合酶基因载体的构建及转基因烟草的耐旱性[J]. *植物学报*, 2002, 42(6): 616-619.

(上接第 14046 页)

[13] 王廷华, 景强, PIERRE DUBUS, 等. PCR 理论与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 13-20.

[14] 李恩香, 贾文杰, 杨柏云, 等. 龙牙百合 DNA 的提取及 ISSR-PCR 体系

的建立[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(34): 14907-14908.

[15] 刘晓静, 王文泉, 郭凌霄. 益智 ISSR-PCR 反应体系建立与优化[J]. *生物技术*, 2008, 18(3): 33-37.