

## 福建道地药材枇杷叶 ISSR 反应体系的建立与优化

李婷, 徐榕青\*, 林文津, 张亚敏(福建省医学科学研究院, 福建省医学测试重点实验室, 福州 350001)

**摘要:** 目的 建立适于福建产枇杷叶的 ISSR 分析的 PCR 反应体系, 筛选适宜引物, 并确定最佳退火温度。方法 改良的 CTAB 法提取嫩叶中 DNA, 通过单因子实验分别找出合适的 ISSR-PCR 反应条件, 利用梯度 PCR 确定引物最佳退火温度。结果 适于枇杷叶 ISSR 最佳的反应体系为: 总反应体积为 25  $\mu\text{L}$ , 其中模板 DNA 60 ng, Taq DNA 聚合酶 0.9 U, 引物浓度 0.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , dNTP 浓度 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 10 $\times$ Buffer(含  $\text{Mg}^{2+}$ ) 2.5  $\mu\text{L}$ , 加入灭菌去离子水至 25  $\mu\text{L}$ 。扩增程序为: 预变性 94  $^{\circ}\text{C}$  7 min, 变性 94  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 复性最佳退火温度 1 min, 延伸 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 35 个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。在 100 条引物中筛选出 14 条扩增条带清晰且条带数目较多的引物, 最佳退火温度为 48~58  $^{\circ}\text{C}$  (因引物不同而异)。结论 建立了枇杷叶 ISSR 最佳反应体系, 筛选出 14 条引物并确定了最佳退火温度, 为应用 ISSR 技术鉴定枇杷叶的种质资源和遗传多样性研究奠定了基础。

**关键词:** 枇杷叶; 简单重复间隔序列; 反应体系; 优化

中图分类号: R282.2 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2012)04-0315-05

### Establishment and Optimization of ISSR Reaction System for Eriobotryae Folium from Fujian

LI Ting, XU Rongqing\*, LIN Wenjin, ZHANG Yamin(Fujian Academy of Medical Sciences, Fujian Key Laboratory of Medical Testing, Fuzhou 350001, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish and optimize the ISSR-PCR reaction system for Eriobotryae Folium; to screen the suitable primers and determine their optimal annealing temperatures. **METHODS** Genomic DNA was extracted by CTAB method from *Eriobotrya* leaves. The main influencing elements in different levels were tested by single factor experiment. The gradient PCR was used to determine the optimal annealing temperatures of each selected primer. **RESULTS** The optimized PCR reaction system: total response volume 25  $\mu\text{L}$ , including 60 ng template DNA, DNA polymerases dosage for 0.9 U, primer eventual concentration of 0.4  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , dNTP eventual concentration was 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 10 $\times$ Buffer(including  $\text{Mg}^{2+}$ ) for 2.5  $\mu\text{L}$ , sterilization deionized water to 25  $\mu\text{L}$ . The optimal amplified procedure was as follows: after a pre-denaturing of 7 min at 94  $^{\circ}\text{C}$ , 35 cycles were performed with denaturing of 1 min at 94  $^{\circ}\text{C}$ , annealing of 1 min according to denaturing temperature of different primers, extension of 1 min at 72  $^{\circ}\text{C}$ , a final extension step of 10 min at 72  $^{\circ}\text{C}$ . Fourteen primers which showed clearer and more bands from 100 primers were selected and the optimal annealing temperatures were 48~58  $^{\circ}\text{C}$  (changed among different primers). **CONCLUSION** The stable and reproducible optimal ISSR-PCR reaction system and suitable annealing temperatures of 14 selected primers from 100 are established for Eriobotryae Folium which had laid the good foundation for ISSR analysis on studies of germplasm resources identification and genetic diversity.

**KEY WORDS:** Eriobotryae Folium; ISSR; reaction system; optimization

枇杷叶(*Eriobotryae Folium*)为蔷薇科(Rosaceae)植物枇杷 *Eriobotrya japonica*(Thunb.) Lindl.的干燥叶。枇杷叶性苦, 微寒, 归肺、胃经, 具有清肺止咳、降逆止呕的作用, 可用于肺热咳嗽、气逆喘急、胃热呕逆、烦热口渴等<sup>[1]</sup>。

枇杷叶是福建省资源储量最大的道地药材品

种, 属常用大宗中药材。枇杷品种极为丰富, 初步统计有 14 个种, 1 个新变种, 600 多个品种<sup>[2-3]</sup>。仅福建省国家级枇杷品种资源圃就收集保存了枇杷品种、品系和近缘种 215 份<sup>[4]</sup>。

枇杷品种的不断丰富发展给枇杷叶的药用品质带来了重要影响。枇杷叶 GAP 产后关键技术研

基金项目: 福建省卫生厅中医药科研课题(WZZD0902)

作者简介: 李婷, 女, 硕士生 Tel: (0591)87514999  
(0591)87514999 E-mail: 422503946@qq.com

E-mail: lt19861112@163.com

\*通信作者: 徐榕青, 男, 硕士, 研究员 Tel:

究表明, 来源于不同品种枇杷的枇杷叶, 其主要活性成分之一熊果酸含量存在较大差异, 使得枇杷叶药材质量参差不齐, 从而影响临床疗效。由于源于不同品种枇杷的枇杷叶形态特征相近, 用传统的植物形态学分类方法很难加以严格有效的区分, 因此为了加强枇杷叶药用品质控制, 需要对源于不同品种枇杷的枇杷叶从遗传分化上寻求差异, 进行分子水平上的鉴别。

简单重复间隔序列(inter simple sequence repeat, ISSR)是在简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)分子标记技术基础之上发展起来的一种基于 PCR 的新型 DNA 分子标记技术<sup>[5]</sup>, 是 1994 年加拿大蒙特利尔大学 Zietkiewicz 发现的<sup>[6]</sup>。由于 ISSR 标记技术结合了 RAPD 标记技术和 SSR 标记技术的优点, 实验操作简单、快速、高效、重复性高、稳定性好、耗资少, 在不知道 DNA 序列的情况下即可用引物进行 PCR 扩增, 其扩增产物所揭示的多态性比 RFLP、RAPD 和 SSR 更高, 并可提供多位点信息和揭示不同微卫星座位个体间变异的信息。因此, ISSR 标记技术已广泛应用于药用植物遗传图谱构建、植物分类、种质资源鉴定、遗传多样性等研究中<sup>[7-9]</sup>。

## 1 材料、仪器及试剂

### 1.1 材料

从福建省莆田市采集了枇杷叶样本, 经福建省莆田市中医药研究所林玉霖老师根据植物形态学的依据, 鉴定为不同品种的枇杷叶, 共 24 份。采集现场用冰壶保存, 实验室置低温冰箱中保存备用。考虑到 PCR 反应的高度灵敏性, 为防止外源 DNA 的污染, 每个样品先用刷子刷去叶子上的绒毛, 用常水洗 3 遍, 去离子水再清洗 3 遍后统一保存在 $-20^{\circ}\text{C}$ 的冰箱内。

ISSR 引物(100 条)参照加拿大哥伦比亚大学(UBC)提供的序列由上海生工合成; DNA 提取所用试剂购自北京拜尔迪生物技术公司, 其它 PCR 所需试剂购自上海生工。PCR 反应在 Eppendorf 的 Mastercycler 梯度 PCR 仪上进行。

### 1.2 试剂及仪器

$\beta$ -巯基乙醇、CTAB、EDTA Na<sub>2</sub>、脱氧三磷酸核苷(dNTPs)、Taq DNA 聚合酶、溴化乙锭(EB)等均来自 Sigma 公司。

PCR 扩增仪、低温高速离心机均来自 Eppendorf 公司; 电热三用水箱(金坛市江南仪器

厂); 电泳仪(北京市六一仪器厂); RNA/DNA 计数仪、凝胶成像自动分析仪均来自 Aquapro(艾科浦)公司。

## 2 方法

### 2.1 叶片总 DNA 提取与检测

采用改良的 CTAB 法分离总基因组 DNA 的提取方法, 具体方法如下: 取离心管一个,  $65^{\circ}\text{C}$  预热 CTAB 抽提液 2 mL, 随机抽取 2 个品种的枇杷叶各 0.5 g, 液氮中迅速均匀研磨, 转入上管中, 加入  $\beta$ -巯基乙醇 40  $\mu\text{L}$ , 上下振荡。 $65^{\circ}\text{C}$  水浴 1 h, 每 10 min 振荡一次。 $65^{\circ}\text{C}$  预热 CTAB/NaCl。加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1), 混匀, 除去蛋白质。平衡后离心,  $4^{\circ}\text{C}$ , 8 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 10 min。取上清到另一离心管中, 加 1/5 体积的  $65^{\circ}\text{C}$  预热的 CTAB/NaCl, 混匀。加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1), 混匀。平衡后离心,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 10 min。取上清到另一离心管中, 加入等体积的 CTAB 沉淀液, 混匀,  $65^{\circ}\text{C}$  水浴 1 h 至沉淀可见。平衡后离心,  $4^{\circ}\text{C}$ , 12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 10 min 后小心去上清。沉淀用 TE(0.5 mL)溶解。再加入等体积的酚: 氯仿/异戊醇, 平衡后离心,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 10 min。取上清到另一离心管中, 加入 2 倍的无水乙醇, 混匀,  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱中 2 h。平衡后离心,  $4^{\circ}\text{C}$ , 12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 10 min 后小心去上清。自然干燥后, 加入 50  $\mu\text{L}$  TE 溶解,  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

取 DNA 溶液 2  $\mu\text{L}$ , 经 50 倍稀释后于 RNA/DNA 计数仪测定 dSDNA 的吸光度及浓度。

### 2.2 单因子实验确定 ISSR-PCR 的最佳反应体系

以叶片基因组 DNA 为模板, 单因子考察因素为模板 DNA、引物、TaqDNA 聚合酶、dNTP 的量。随机选取一个品种的枇杷叶为样品, 将其提取出来的 DNA 溶液稀释至 50  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  作为模板, 采用引物 UBC848(CACACACACACACARG), 对影响 PCR 反应的因素进行最适条件考察。对影响扩增的主要参数设置了不同梯度处理, 反应总体积为 25  $\mu\text{L}$ , 其中 DNA 模板设 10, 20, 40, 60, 100, 200, 500 ng 7 个梯度; 引物浓度设 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  5 个浓度梯度; TaqDNA 聚合酶设置 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8 U 5 个梯度; dNTPs 设 50, 150, 200, 250, 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  6 个浓度梯度。

### 2.3 退火温度的确定

根据  $T_m$  值对设定退火温度为  $48\sim 58^{\circ}\text{C}$ , PCR

仪自动生成 8 个温度梯度: 48, 48.8, 50.1, 51.9, 54.4, 56.3, 57.5, 58 °C。每一合适条件确定后将作为后续研究的一个条件。反应程序为: 预变性 94 °C 7 min, 变性 94 °C 1 min, 复性 48~58 °C(因引物不同而异)1 min, 延伸 72 °C 1 min, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min。ISSR-PCR 产物采用 1.8% 琼脂糖凝胶电泳分离(55 V, 40 min), 紫外自动凝胶成像系统上观察并拍照记录。

### 3 结果

#### 3.1 叶片基因组 DNA 的提取

总 DNA 电泳后呈现一条迁移率很小的整齐条带, 无弥散的荧光区出现, 表明所提取的 DNA 样品纯, 无降解和 RNA 污染。取各样品的基因组 DNA 溶液 1 μL, 经 70 倍稀释后于 ND-1000 Spectrophotometer RNA/DNA 计数仪测定 dSDNA 的吸光度  $A_{260}/A_{280}$  为 1.72~1.84, 定量分析表明浓度在 997.0~1 483.5 ng·μL<sup>-1</sup>。改良的 CTAB 法提取的 DNA 质量和浓度都很高, 可以用作 ISSR-PCR 分析。

#### 3.2 模板 DNA 浓度对 ISSR-PCR 的影响

模板 DNA 的量会影响 PCR 扩增结果, 付燕等<sup>[10]</sup>认为在 ISSR 实验中 20~100 ng 的模板适合扩增, 乔燕春等<sup>[11]</sup>认为 10 ng 左右的模板比较适合 ISSR 扩增。一般认为模板量在 10~100 ng 内有最佳扩增, 且最佳模板浓度范围取决于研究类群与模板纯度。本研究从 10 ng 开始, 考察 7 个不同浓度的模板量, 在其他成分不变的情况下, 只改变模板 DNA 的量, 进行相同条件的 PCR 扩增。结果见图 1。

从结果可知, 模板量在 40~200 ng 之间时, PCR 扩增主条带基本一致, 模板量为 60 ng 时所得到的 ISSR 指纹图谱最为清晰。当模板量过高, 达到 500 ng 时, 可能由于 DNA 中含有过多的蛋白质等大分子物质, 使扩增的条带过少; 当模板量过低时, 低于 20 ng 时, 扩增结果表现为谱带弱, 可能因为模板量过少, 扩增效率低, 模板和引物不能有效配对。因此, 根据以上实验结果选择最佳的模板量为 60 ng。

#### 3.3 Taq DNA 聚合酶对 ISSR-PCR 的影响

关于 Taq DNA 聚合酶的用量, 报道出入较大, 这可能与不同厂家不同批次的 Taq DNA 聚合酶活性不同有关。根据经验, 在中药材的 ISSR-PCR 反应中, Taq DNA 聚合酶通常需要 1.0 U·(25 μL)<sup>-1</sup>

以上才能进行较好的扩增。为确定最佳酶浓度, 本实验选择了 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8 U 5 个梯度进行 PCR 扩增的考察。结果见图 2。

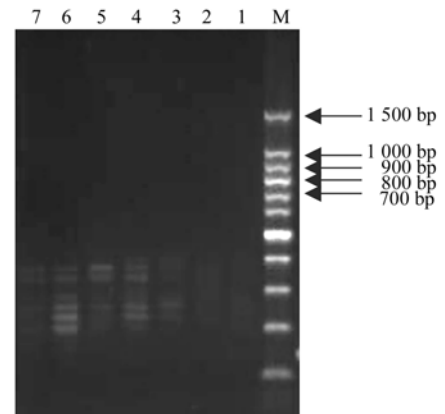


图 1 优化模板 PCR 扩增结果

DNA 用量: 1-10 ng; 2-20 ng; 3-40 ng; 4-60 ng; 5-100 ng; 6-200 ng; 7-500 ng

Fig 1 PCR products of template optimization

DNA dosage: 1-10 ng; 2-20 ng; 3-40 ng; 4-60 ng; 5-100 ng; 6-200 ng; 7-500 ng

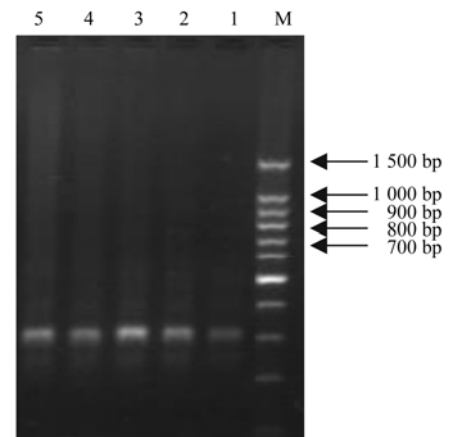


图 2 优化 Taq DNA 聚合酶 PCR 扩增结果

Taq 酶用量: 1-0.6 U; 2-0.9 U; 3-1.2 U; 4-1.5 U; 5-1.8 U

Fig 2 PCR products of Taq DNA polymerase optimization

Taq enzyme dosage: 1-0.6 U; 2-0.9 U; 3-1.2 U; 4-1.5 U; 5-1.8 U

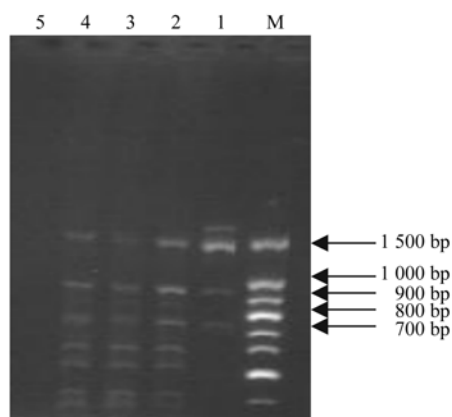
从结果可知, 当 Taq 酶的量 0.6 U 时, 合成的产物量很少, 所得 PCR 产物的条带也较少, 而 0.9, 1.2 与 1.5 U 的 Taq 酶所得产物基本相同, 1.8 U 的 Taq 酶由于浓度过高, 引起非特异性扩增, 产生的扩增条带也较多, 但是会有很多错配产生, 根据此浓度判断会得到错误的结论。所以, 在以后的实验中选择 0.9 U 为 Taq DNA 聚合酶的用量。

#### 3.4 引物浓度对 ISSR-PCR 的影响

引物是一小段单链 DNA 或 RNA, 作为 DNA 复制的起始点, 在核酸合成反应时, 作为每个多

核苷酸链进行延伸的出发点而起作用的多核苷酸链，在引物的 3'-OH 上，核苷酸以二酯链形式进行合成，因此引物的 3'-OH，必须是游离的。引物的浓度过高时，会引起错配和非特异性产物的出现，引物浓度过低时，可能得不到扩增结果。因此，结合文献报道，本实验考察了 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 及 1.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  5 个引物浓度。结果见图 3。

从结果可知，随着引物浓度的增加，非特异性产物逐渐增加，表现为条带数逐渐增多，而特异性引物的产量却在减少，表现为特异性条带亮度很弱，条带模糊。所以，本实验选择 0.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  为引物的实验浓度，这样既能够有效地防止非特异性产物的增加又能够满足 PCR 产量的需要。

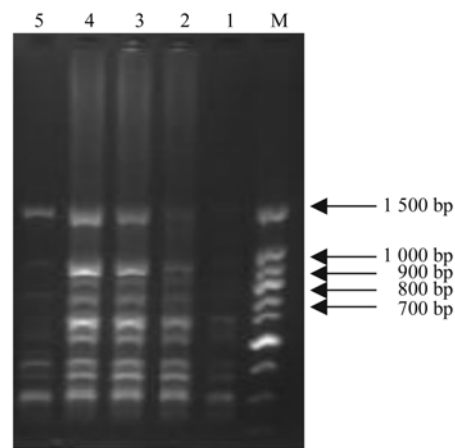


**图 3** 优化引物浓度 PCR 扩增结果  
引物浓度: 1-0.2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 2-0.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 3-0.6  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 4-0.8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 5-1.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   
**Fig 3** PCR products of primer concentration optimization  
Primer concentration: 1-0.2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 2-0.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 3-0.6  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 4-0.8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 5-1.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

### 3.5 底物(dNTPs)浓度对 ISSR-PCR 的影响

dNTPs 为 PCR 反应的合成原料，dNTP 的浓度过高可加快反应速度，但同时会增加碱基的错误掺入率和实验成本，而低浓度的 dNTP 会导致反应速度的下降，但可提高实验的精确性。本研究选择了 50, 150, 200, 250 及 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  6 个浓度进行考察。结果见图 4。

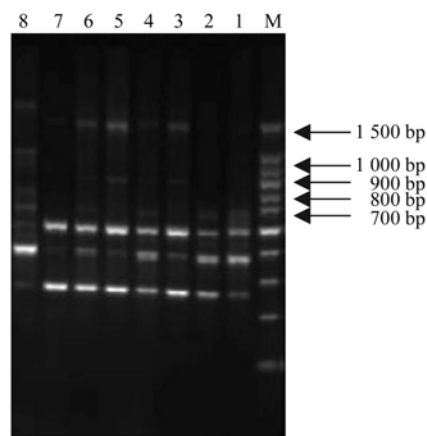
从结果可知，底物浓度为 50 和 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时，产量很少，条带比较弱；浓度为 200 和 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时，条带基本一致，说明在此浓度时 PCR 反应的特异性可以得到保证；浓度到 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时，特异性很差，条带模糊，实验成本也很大。所以，在以后的实验中选择 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  为 dNTPs 的浓度。



**图 4** 优化 dNTP 浓度 PCR 扩增结果  
dNTPs 浓度: 1-50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 2-150  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 3-200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 4-250  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 5-500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   
**Fig 4** PCR products of dNTPs concentration optimization  
dNTPs concentration: 1-50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 2-150  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 3-200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 4-250  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 5-500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

### 3.6 退火温度对 ISSR-PCR 的影响

引物的退火温度极大地影响着 ISSR 反应的进行，退火温度过低易导致非特异性扩增，重复性降低；温度过高又使条带减少，导致一些可能反应多态性的条带消失。引物不同，退火温度也不一样，因而确定合适的退火温度非常必要。本实验采用引物 UBC848，根据其  $T_m$  值由 PCR 扩增仪自动产生 8 个温度梯度：48, 48.8, 50.1, 51.9, 54.4, 56.3, 57.5, 58  $^{\circ}\text{C}$ ，选择最佳退火温度，结果见图 5。由结果可知，UBC848 的最佳退火温度是 56.3  $^{\circ}\text{C}$ 。



**图 5** 退火温度对 ISSR 的影响  
1-48  $^{\circ}\text{C}$ ; 2-48.8  $^{\circ}\text{C}$ ; 3-50.1  $^{\circ}\text{C}$ ; 4-51.9  $^{\circ}\text{C}$ ; 5-54.4  $^{\circ}\text{C}$ ; 6-56.3  $^{\circ}\text{C}$ ; 7-57.5  $^{\circ}\text{C}$ ; 8-58  $^{\circ}\text{C}$   
**Fig 5** Effect of annealing temperatures on the amplified results  
1-48  $^{\circ}\text{C}$ ; 2-48.8  $^{\circ}\text{C}$ ; 3-50.1  $^{\circ}\text{C}$ ; 4-51.9  $^{\circ}\text{C}$ ; 5-54.4  $^{\circ}\text{C}$ ; 6-56.3  $^{\circ}\text{C}$ ; 7-57.5  $^{\circ}\text{C}$ ; 8-58  $^{\circ}\text{C}$

## 4 讨论

本实验结果证明, 采用不同的反应体系会对 ISSR 扩增产生较大的影响, 从而影响 ISSR 分析的准确性, 而 ISSR 带谱的准确性与稳定性是进行遗传多样性分析的前提。为了利用这一分子标记对枇杷叶进行遗传多样性分析, 获得重复性和可靠性较高的 ISSR 带谱, 有必要对其影响因子进行筛选和优化, 确立最适宜的 ISSR 反应体系。

本研究以枇杷叶 DNA 为材料, 建立了重复性好, 分辨率高的 ISSR 反应体系, 即在 25  $\mu\text{L}$  反应体系中, 模板 DNA 的量为 60 ng, Taq DNA 聚合酶的用量为 0.9 U, 引物终浓度为 0.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , dNTP 终浓度为 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 10 $\times$ Buffer 为 2.5  $\mu\text{L}$ , 加入灭菌去离子水至 25  $\mu\text{L}$ ; 扩增程序为: 预变性 94  $^{\circ}\text{C}$  7 min, 变性 94  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 复性最佳退火温度 1 min(因引物不同, 最佳退火温度为 48~58  $^{\circ}\text{C}$ ), 延伸 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 35 个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。利用该体系, 对 100 条 ISSR 引物进行筛选, 得到了 14 条条带清晰, 多态性好的引物。

## REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版.一部) [S]. 2010: 190.
- [2] ZHANG H Z. Chinese loquat germplasm resources and common loquat origin research [J]. Acta Horticul Sin(园艺学

报), 1990, 17, (1): 5-11.

- [3] LIU Q. Loquat. Red Bayberry High-quality Production Technology Q&A(枇杷、杨梅优质生产技术) [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1998.
- [4] LIN G Y. Research and prospect of loquat germplasm resources [J]. Fujian Fruits(福建果树), 1990(4): 25-27.
- [5] ZHOU Y Q. Application of DNA Molecular Markers Technique to Plant Research(DNA 分子标记技术在植物研究中的应用) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
- [6] ZIETKIWICZ E, RAFALSKI A, ABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) -anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994(20): 176-183.
- [7] LIU R H, ZHAN X J, HUANG L Q, et al. Genetic diversity analysis of *Vitex trifolia* var. simplicifolia populations with inter-simple sequence repeats(ISSR) technique [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2010, 35(13): 1670-1672.
- [8] XU H, WANG Y Y, WEI D H, et al. ISSR analysis and identification of Radix Salviae Miltiorrhizae from different habitats [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2007, 18(6): 454-456.
- [9] LI M Y, XIE X b, ZHU H z, et al. Breeding of *Dendrobium officinale* cv. Xianhu 1 and its characteristics [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(4): 281-284.
- [10] FU Y, LUO N, YANG Q, et al. Establishment and optimization of ISSR reaction system for species of *Eriobotrya* [J]. J Fruit Sci(果树学报), 2009, 26(2): 180-185.
- [11] QIAO Y C, LIN S Q, YANG X H, et al. Optimization of ISSR-PCR analysis and its application in Germplasm of Loquat(*E.japonica* Lindl.ev) by uniform design [J]. Genom Appl Biol(基因组学与应用生物学), 2009, 28(1): 123-126.

收稿日期: 2011-06-28