

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201405042

刁松锋,邵文豪,姜景民,等. 多用途树种无患子 ISSR-PCR 体系建立与检测[J]. 广西植物, 2015, 35(6):899—904

Diao SF, Shao WH, Jiang JM, et al. Detection and establishment of ISSR-PCR system for multipurpose tree species *Sapindus mukorossi* [J]. Guihaia, 2015, 35(6):899—904

多用途树种无患子 ISSR-PCR 体系建立与检测

刁松锋^{1,2}, 邵文豪¹, 姜景民^{1*}, 栾启福¹

(1. 中国林业科学研究院 亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; 2. 中国林业科学研究院 经济林研究中心, 郑州 450003)

摘要: 无患子(*Sapindus mukorossi*)是我国长江以南地区传统的重要绿化树种,其果皮富含皂苷,种仁富含油脂,为新型木本油料树种之一。为了获得基于 KOD FX 高保真 DNA 聚合酶试剂盒的无患子 ISSR-PCR 的最佳反应体系,该文采用正交优化设计相结合的方法,研究了引物浓度、dNTPs 浓度、KOD FX 酶、模板 DNA 浓度和 Mg^{2+} 浓度对无患子 ISSR-PCR 反应体系的影响,并在此基础上对退火温度进一步优化,最终确立了适合无患子的 ISSR-PCR 反应的最佳体系和程序,即 20 μ L PCR 反应体系中,引物 0.5 μ mol $\cdot$ L⁻¹、dNTPs 0.05 mmol $\cdot$ L⁻¹、KOD FX 酶 0.06 U $\cdot$ μ L⁻¹、模板 DNA 浓度 1.0 ng $\cdot$ μ L⁻¹和 Mg^{2+} 1.0 mmol $\cdot$ L⁻¹。当以 UBC841 为引物时,PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 48.6 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 35 个循环, 68 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。这一优化的 ISSR-PCR 反应体系的建立,为无患子种质资源的遗传多样性、亲缘关系及遗传结构研究、种质创新与分子辅助育种等奠定了良好的基础。

关键词: 无患子; ISSR; PCR 反应体系; 正交设计

中图分类号: S718.46, Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2015)06-0899-06

Detection and establishment of ISSR-PCR system for multipurpose tree species *Sapindus mukorossi*

DIAO Song-Feng^{1,2}, SHAO Wen-Hao¹, JIANG Jing-Min^{1*}, LUAN Qi-Fu¹

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, China; 2. No-timber Forestry Research and Development Center, Chinese Academy of Forestry, Zhengzhou 450003, China)

Abstract: *Sapindus mukorossi* is a traditional and important virescencetree species in the south part of China with rich saponins in peel and rich oil in seed. This tree species is one of the newly-developed woody oil species that were approved by the State Forestry Administration of China. For optimizing ISSR-PCR reaction system of *S. mukorossi*, based on KOD FX High-fidelity DNA Polymerase Kit, orthogonal design experiments were conducted. The main factors affecting ISSR-PCR amplification, such as suitable concentration of primer, dNTPs, KOD FX DNA polymerase, DNA template and 2 $\times$ PCR buffer for KOD FX were studied. Furthermore, the annealing temperature was optimized on the base of the above tests. An ideally ISSR-PCR reaction system was established, namely 25 μ L reaction system containing primer 0.5 μ mol $\cdot$ L⁻¹, dNTPs 0.05 mmol $\cdot$ L⁻¹, KOD FX DNA polymerase 0.06 U $\cdot$ μ L⁻¹, DNA template 1.0 ng $\cdot$ μ L⁻¹ and Mg^{2+} 1.0 mmol $\cdot$ L⁻¹. The optimal PCR amplification program was: The profile of ISSR-PCR was an initial denaturation step for 2 min 94 $^{\circ}$ C, followed by 35 cycles of 30 s at 98 $^{\circ}$ C for denaturation, 30 s at 48.6 $^{\circ}$ C for annealing, 90 s at 68 $^{\circ}$ C for extension, finally extension at 68 $^{\circ}$ C for 7 min and holding the samples at 4 $^{\circ}$ C. This optimized ISSR-PCR reaction system would provide the basis for the analysis of genetic diversity, genetic

收稿日期: 2014-07-21 修回日期: 2014-10-11

基金项目: 国家林业公益性科研专项(201404104, 200804032); 浙江省重大科技专项重点农业项目(2011C12015)。

作者简介: 刁松锋(1989-),男,安徽亳州人,硕士,主要从事林木遗传育种研究, (E-mail) stanfordiao@yeah.net。

*通讯作者: 姜景民,博士,研究员,从事林木遗传育种和种质资源研究, (E-mail) zzyjiang@yeah.net。

structure, germplasm innovation and molecular assisted selection in *S. mukorossi*.

Key words: *Sapindus mukorossi*; ISSR; PCR reaction system; orthogonal design experiments

无患子(*Sapindus mukorossi*)也称为肥皂树、菩提树,是无患子科(Sapindaceae)无患子属(*Sapindus*)落叶乔木,广泛分布在亚洲、中南美洲、北美洲南部、太平洋岛屿的暖温带和热带低山丘陵及石灰岩地区,中国分布于秦岭—淮河以南低山丘陵地区,欧洲也有分布(中国植物志编委会,1998; Chhetri *et al.*, 2008)。无患子皂苷在果皮中含量可达 11.5 % (Pandey, 2008),易降解,无有害物质残留,对环境无污染,是一种优良的天然表面活性剂,具有良好的起泡性和去污能力,是天然的环境友好型洗涤剂(Ghagi *et al.*, 2011)。无患子皂苷具有抗病毒、降血压等药理作用(Ibrahim *et al.*, 2008; Verma *et al.*, 2012)。无患子种仁含油率达 42.7% (黄素梅等,2009),不饱和脂肪酸含量达 86.63%,为重要的生物质能源树种(Sun *et al.*, 2012)。目前,国内外学者对无患子的多在苗木繁育与优树选择(林文荣,2007;刁松锋等,2014a)、表型及经济性状变异(邵文豪等,2012,2013;刁松锋等,2014b,c)、光合生理(孟德悦等,2013;刁松锋等,2014d)、医药病理(Ibrahim *et al.*, 2008; Verma *et al.*, 2012)和化学成分及其提取工艺(黄素梅等,2009;魏凤玉等,2010)等领域,对于一些天然分布的无患子群体,人们对其遗传背景知之甚少。目前有彭珠清等(2014)对无患子 SARP-PCR 反应体系进行研究;洪莉等(2013)采用 SARP 技术对无患子种质资源多样性及亲缘关系进行分析;刘宝等(2014)也采用 SARP 技术对不同地理种源无患子的分子多态性进行分析,但对无患子 ISSR-PCR 反应体系的研究尚未见有报道。总体来看,目前对我国无患子种质资源和天然群体遗传多样性的系统研究还很匮乏,这严重限制了它的推广应用。因此,如何提高无患子的资源利用率,挖掘有价值的种质资源材料已成为无患子产业发展亟待解决的重要问题。

1994 年,加拿大蒙特利尔大学 Zietkiewicz 教授建立了 ISSR(inter-simple sequence repeats)分子标记技术,与 RFLP 和 RAPD 技术相比有更高的重复性和稳定性(Zietkiewicz *et al.*, 1994)。另一方面,ISSR 分子标技术具有操作简单快捷 DNA 用量少技术要求低成本低等特点,引物设计无需知道基因组序列,只要目标区域的长度在可扩增范围内,就能

扩增出微卫星重复间的 DNA 片段。因此,当前 ISSR 分子标记技术广泛用于遗传多样性分析(沈庆庆等,2013)、遗传作图(Bornet *et al.*, 2001)、亲缘关系(梅洛银等,2013)和种质资源研究(陈虎等,2012)等领域,但是 ISSR 技术也存在缺陷,稳定性易受到引物浓度、dNTPs、模板 DNA 量、酶以及引物退火温度等条件的影响,扩增出来的条带随机性较大。因此,在利用 ISSR 技术进行遗传性分析时,为保证结果的清晰可靠和准确,必须对反应体系进行优化。因此,本研究采用正交试验设计对以上几个因素进行筛选,初步建立了一套适用于无患子的 ISSR-PCR 反应体系,为研究无患子遗传多样性、种质创新与分子辅助育种奠定良好的基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

所用材料来自无患子天然分布区的 11 个省区的 18 个自然保护区的野生资源,采样时选择包含 5 株以上成年个体的种群进行采样,单株之间的距离在 50 m 以上,共采集 272 株个体的当年生嫩叶。采集的叶片放入盛有硅胶的密封袋中带回实验室,放入-70 °C 冰箱中保存。

1.2 主要试剂与仪器

所用试剂为 Buffer A (100 mmol · L⁻¹ Tris-HCl pH 9.5、1 mmol · L⁻¹ KCl 和 10 mmol · L⁻¹ EDTA)、琼脂糖、DNA marker(天根 D2000)、6 × DNA Loading Buffer(天根)、UniRed Nucleic Acid Stain(天根)、1 × TBE(pH 8.3)和 KOD FX 高保真 DNA 聚合酶试剂盒(由天根生化科技杭州有限公司提供),该试剂盒包含 2 × PCR buffer for KOD FX (含 2.0 mmol · L⁻¹ Mg²⁺,以下简称 Mg²⁺)、2.0 mmol · L⁻¹ dNTPs 和 1.0 U · μL⁻¹ KOD FX 酶(以下简称 KOD FX)。

主要仪器:琼脂糖凝胶电泳仪(Takara-TP-600)、台式高速冷冻离心机(Neofuge 15R)、Nano-Drop 2000 紫外分光光度计(Thermo Fisher 公司生产)、Takapa PCR Thermal Cycler Dice PCR 仪(TP600)、FR-980A 全自动紫外与可见光凝胶成像系统装置(复日科技公司)。

1.3 基因组总 DNA 提取与检测

DNA 提取按照新型 KOD FX 试剂盒的说明进行,即取无患子叶片约 3 mm 小块,添加 Buffer A 100 μL ,充分振荡后放入 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,离心机 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 4 min,取上清液置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。利用紫外分光光度计检测 DNA 完整性、浓度及纯度和 1.5 % 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,120 V 电泳 30 min 后,通过 FR-980A 生物电泳图像分析系统观察拍照。

1.4 PCR 正交试验设计

采用正交设计 $L_{16}(4^5)$,针对本实验中 ISSR-PCR 反应体系的 5 个因素(引物、dNTPs、KOD FX、模板 DNA 和 Mg^{2+})分别进行 4 个水平筛选(表 1),25 μL 无患子 ISSR-PCR 各个反应体系的成分组成及正交试验设计见表 2。本实验采用加拿大英属哥伦比亚大学报道的 UBC841 号(GAG AGA GAG AGA GAG AYC)引物,该引物是本课题组通过大量预实验从 100 条引物中筛选出的 36 条可以扩增出较亮条带的引物之一。正交表中的每个处理分别重复 3 次。

表 1 正交试验因素表
Table 1 Orthogonal factors and levels

因素 Factor	水平 Level			
	1	2	3	4
引物 Primer ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.3	0.4	0.5	0.6
dNTPs ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.2	0.3	0.4	0.5
KOD FX ($\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	0.02	0.04	0.06	0.08
模板 DNA Template DNA ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	1.0	2.0	3.0	4.0
Mg^{2+} ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.4	0.6	0.80	1.0

1.5 PCR 扩增、电泳以及凝胶成像

按照 KOD FX 试剂盒说明书要求,PCR 预扩增的反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min,98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,51.2 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min,40 个循环,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。将 PCR 扩增产物用 1 $\times$ TBE 配制的 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离,120 V 的恒流电压电泳 30 min。电泳结束把凝胶放入 FR-980A 生物电泳图像分析系统观察拍照并统计条带。

1.6 退火温度的优化

在筛选出的最优反应体系的基础上进行退火温度的梯度优化筛选试验。温度梯度设置为 46.0 $^{\circ}\text{C}$ 、47.0 $^{\circ}\text{C}$ 、48.0 $^{\circ}\text{C}$ 、49.0 $^{\circ}\text{C}$ 、50.0 $^{\circ}\text{C}$ 、51.0 $^{\circ}\text{C}$ 和 52.0 $^{\circ}\text{C}$ 。每个温度梯度进行 3 次重复,其他条件不变。

数据处理利用 Excel 2010 软件和 SAS 8.2 软件

完成,利用 Sigmaplot 10.0 软件作图。

表 2 ISSR-PCR 反应正交设计 $L_{16}(4^5)$

Table 2 $L_{16}(4^5)$ orthogonal design for the factors and levels of ISSR-PCR reaction

处理 Processing	引物 Primer ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	dNTPs ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	KOD FX ($\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	模板 DNA Template DNA ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	Mg^{2+} ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
1	0.3	0.2	0.02	1.0	0.4
2	0.3	0.3	0.04	2.0	0.6
3	0.3	0.4	0.06	3.0	0.8
4	0.3	0.5	0.08	4.0	1.0
5	0.4	0.2	0.04	3.0	1.0
6	0.4	0.3	0.02	4.0	0.8
7	0.4	0.4	0.08	1.0	0.6
8	0.4	0.5	0.06	2.0	0.4
9	0.5	0.2	0.06	4.0	0.6
10	0.5	0.3	0.08	3.0	0.4
11	0.5	0.4	0.02	2.0	1.0
12	0.5	0.5	0.04	1.0	0.8
13	0.6	0.2	0.08	2.0	0.8
14	0.6	0.3	0.06	1.0	1.0
15	0.6	0.4	0.04	4.0	0.4
16	0.6	0.5	0.02	3.0	0.6

2 结果与分析

2.1 ISSR-PCR 反应体系正交试验的直观分析

对 16 个处理 3 次重复的 48 个样品的条带依据凝胶条带的强弱和杂带多少进行打分,其中条带数量多、清晰度高满分为 10 分,依次后推,最低分值为 1 分。根据打分情况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 k_i ,并求同一因素不同水平间平均值的极差 R (表 3)。 R 反映了各因素对反应体系的影响,极差越大表明其对反应体系的影响就越大。由表 3 可以看出,引物对无患子 PCR 反应体系影响最大,KOD FX 次之; Mg^{2+} 最小,模板 DNA 则较小。 K_i 反映了每个因素不同水平对反应体系的影响程度, k_i 值越大则说明这个水平在该因素中表现最好。因此,根据表 3 可知,引物、KOD FX 和 Mg^{2+} 在第 3 水平最优,dNTPs 和模板 DNA 分别在第 4 水平和第 1 水平最优。

2.2 PCR 正交试验的方差分析

对 5 个因素进行方差分析,结果如表 4。由表 4 可以发现,引物、KOD FX 和 dNTPs 对 PCR 反应体系的影响达到极显著水平($P<0.01$),模板 DNA 对反应体系的影响则为显著水平($P<0.05$),而 Mg^{2+}

对体系的影响不显著。这与正交试验的直观分析结果是一致的。

表 3 16 组正交设计直观分析

Table 3 16 sets of orthogonal design intuitive analysis

处理 Processing	引物 Primer ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	dNTPs ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	KOD FX ($\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	模板 DNA Template DNA ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	Mg^{2+} ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
K1	19.3	22.1	28.3	33.6	16.2
K2	28.6	26.8	30.9	29.7	22.8
K3	35.4	32.7	37.4	26.3	27.4
K4	31.2	36.5	34.2	21.6	23.5
k1	2.4	2.7	4.7	8.9	2.1
k2	2.9	3.3	7.3	7.5	2.5
k3	13.2	5.5	10.8	6.8	4.7
k4	3.7	8.5	9.2	4.4	3.2
R	10.8	5.8	6.1	4.5	2.6

表 4 正交设计方差分析

Table 4 Variance analysis of orthogonal design

变异来源 Variation source	平方和 (SS) Square sum	自由度 (DF) Degree of freedom	均方 (MS) Mean square	F 值 F value
引物 Primer	89.62	3	29.87	11.85 * *
dNTPs	38.09	3	12.70	5.04 * *
KOD FX	51.76	3	17.25	6.85 * *
模板 DNA Template DNA	20.84	3	6.95	2.76 *
Mg^{2+}	9.57	3	3.19	1.27
误差 Error	7.55	3	2.52	
总计 Total	217.43	15		

注：* 表示在 0.05 水平差异显著；* * 表示在 0.01 水平差异显著。
Note: * and * * Differences are significant at the 0.05 and 0.01.

2.3 几个不同水平的因素对 PCR 反应体系的影响

从图 1 可以看出,5 个不同因素在 I~IV 水平下对 PCR 扩增的影响不同,其中引物浓度、KOD FX、 Mg^{2+} 的 PCR 扩增 DNA 条带数呈现单峰曲线变化,并且都在第 III 水平下,即分别为 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.06 \text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 和 $1.0 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,扩增出的 DNA 条带数最多;PCR 扩增 DNA 条带数随着 dNTPs 浓度在 I~IV 水平增加时而呈上升趋势,且在第 IV 水平($0.05 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 扩增条带数达到最多;而模板 DNA 浓度(DNA)处于下时 PCR 扩增出的 DNA 条带数则随着模板 DNA 浓度的增加而减少。

对退火温度梯度进行优化筛选时发现,在 48°C 和 49°C 时,PCR 扩增的 DNA 的条带较多,而且具有比较清晰的背景。继续以 48.2°C 、 48.4°C 、 48.6°C 和 48.8°C 为温度梯度进行优化,结果表明 PCR 扩增的 DNA 条带在 48.6°C 表现最优。采用

优化好的体系,即 $25 \mu\text{L}$ 体系中各组分的含量分别为 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ primer、 $0.5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs、 $0.06 \text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ KOD FX、 $1.0 \text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 模板 DNA 浓度和 $1.0 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Mg}^{2+}$ 。

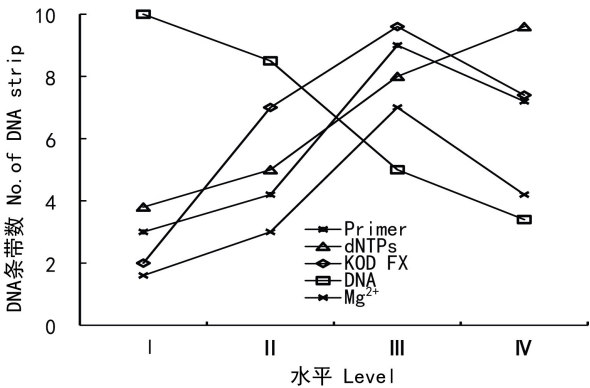


图 1 不同因素水平对 ISSR-PCR 的影响

Fig. 1 Influence of different factor levels of ISSR-PCR

2.4 无患子的 ISSR-PCR 扩增检测

采用已优化的 ISSR-PCR 体系,从中筛选出 24 条引物均能用于对无患子扩增反应,其中 UBC808、UBC818、UBC824、UBC830、UBC836、UBC840、UBC841、UBC848、UBC855、UBC860、UBC880、UBC881 和 UBC891 具有较好的效果。随机选出 UBC818 和 UBC841 用于不同种源的无患子样本试验,结果如图 2,表明该体系具有良好的效果,可以用于无患子遗传多样性、亲缘关系及遗传改良研究。

3 讨论与结论

ISSR-PCR 反应体系优化常用的试验设计方法可分为单因素试验和正交试验。

胡翠萍等(2010)对唐古特大黄(*Rheum tanguticum*)ISSR 反应体系中各影响因素分别设置单因素梯度试验,建立了适合唐古特大黄的 ISSR-PCR 最佳反应体系;罗成等(2010)通过单因素试验,确立华中五味子(*Schisandra chinensis*) ISSR 最佳反应条件。而正交试验设计具有高效、经济布点均衡、试验次数少、结果直观等优点(王彦华等,2004)。目前该方法也已在枇杷(*Eriobotrya* spp.)(梅洛银等,2012)、龙眼(*Dimocarpus longan*)(陈虎等,2012)和荔枝(*Broussonetia papyrifera*)(沈庆庆等,2013)等经济林树种的 ISSR 体系优化中采用。

由于 ISSR-PCR 反应体系受许多因素的影响,

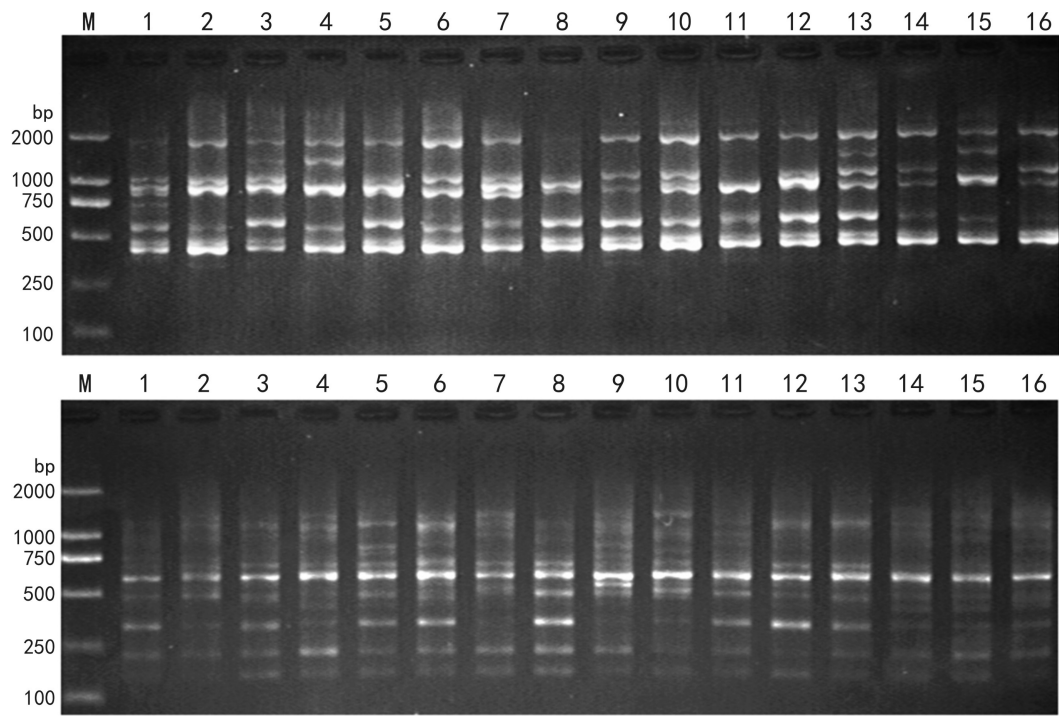


图 2 引物 UBC818 对江西上犹(上)和引物 UBC841 对浙江富阳(下)部分个体的扩增图

Fig. 2 Amplification of primer UBC818 in Shangyou (above) and UBC841 in Fuyang (below) population

为了获得重复性和可靠性较高的 ISSR 谱带,提高分析的准确性,有必要对各种影响因子,诸如引物、dNTPs、模板 DNA、反应聚合酶(本实验采用 KOD FX 高效反应酶)及退火温度等进行优化筛选,获得最适宜的 ISSR 反应体系和程序。本研究结果表明无患子 ISSR-PCR 最优体系是在 25 μL 体系中各组分的含量分别为引物 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、dNTPs 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、KOD FX 0.06 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、模板 DNA 浓度 1.0 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 和 Mg^{2+} 1.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。与彭珠清等(2014)优化的无患子 SRAP-PCR 反应体系所需 50 ng 模板 DNA 和洪莉等(2013)采用的 ISSR-PCR 反应体系所需 60 ng 模板 DNA 相比,本反应体系仅需较少的模板 DNA,说明 KOD FX 高保真 DNA 聚合酶具有明显的高效性。在前人的研究报告中,体系中各组分的不同含量对 PCR 的影响程度不同。周凌瑜等(2008)研究认为引物浓度会对 PCR 的条带数、带行产生明显的影响,浓度太高产生新的位点,且易形成引物二聚体的几率大增。孙清信等(2012)对紫云英(*Astragalus sinicus*)的研究表明模板 DNA 浓度对 ISSR-PCR 反应体系影响不大,而廖声熙等(2013)对构树的研究认为模板 DNA 浓度对反应体系的影响具有显著性,这与本研究具有

相似的研究结论。前人的研究表明 Taq 酶对 PCR 体系的影响具有极显著性(廖声熙等,2013),本研究采用新型的 KOD FX 酶在实验中对 PCR 体系的影响也具有极显著作用。本研究是基于 UBC841 这一条引物对体系进行优化的,在后续的实验中会增加引物的筛选范围,进而增加以 KOD FX 高保真 DNA 聚合酶试剂盒为基础的无患子 ISSR-PCR 反应体系的通用性。

参考文献：

Bornet B, Branchard M. 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome finger printing[J]. *Plant Mol Biol Rep*, **19**(3): 209—215
Chen H(陈虎), He XH(何新华), Huang GX(黄桂香), et al. 2012. Comparison and analysis of SCoT and ISSR markers for genetic diversity of longan (不同龙眼资源遗传多样性的 SCoT 和 ISSR 比较分析)[J]. *Guihaia*(广西植物), **32**(4): 536—541
Chhetri AB, Tango MS, Budge SM, et al. 2008. Non-edible plant oils as new sources for biodiesel production[J]. *Intern J Mol Sci*, **9**(2): 169—180
Diao SF(刁松锋), Shao WH(邵文豪), Dong RX(董汝湘), et al. 2014d. Diurnal variation of photosynthesis and relationship with the eco-physiological factors of *Sapindus mukorossi* (无患子光合作用日变化及其与生理生态因子的关系)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), **34**(4): 828—834
Diao SF(刁松锋), Shao WH(邵文豪), Jiang JM(姜景民), et al. 2014b. Phenotypic diversity in natural populations of *Sap-*

- indus mukorossi* based on fruit and seed traits(基于种实性状的无患子天然群体表型多样性研究)[J]. *Acta Ecol Sin* (生态学报), **34**(6): 1 451—1 460
- Diao SF(刁松锋), Shao WH(邵文豪), Jiang JM(姜景民), *et al.* 2014c. Study on variation in phenotypic traits of fruit and seed of *Sapindus mukorossi* in seedling plantation(无患子实生群体种实表型性状变异研究)[J]. *J Northwest A & F Univ: Nat Sci Ed* (西北农林科技大学学报·自然科学版), **42**(5): 75—83
- Diao SF(刁松锋), Shao WH(邵文豪), Jiang JM(姜景民), *et al.* 2014a. Superior individual selection of *Sapindus mukorossi* based on fruit and seed traits (基于种实性状的无患子优良单株选择)[J]. *J Northeast For Univ* (东北林业大学学报), **42**(4): 6—10
- Flora of China Editorial(《中国植物志》编辑委员会). 1998. Flora of China(中国植物志第 47 卷第 1 分册)[M]. Beijing(北京): Science Press(科学出版社), **47**: 14—15
- Ghagi R, Satpute SK, Chopade BA, *et al.* 2011. Study of functional properties of *Sapindus mukorossi* as a potential bio-surfactant[J]. *Ind J Sci Technol*, **4**(5): 530—533
- Hong L(洪莉), Bai ME(柏明娥), Zhang JZ(张加正), *et al.* 2013. Genetic diversity and genetic relationship of germplasm resources of *Sapindus mukorossi* by ZSSR and SPARP(无患子种质资源多样性与亲缘关系的 ISSR 和 SRAP 分析)[J]. *Zhejiang Agric Sci*(浙江农业科学), (5): 566—568
- Hu YP(胡延萍), Xie XL(谢小龙), Wan L(王莉), *et al.* 2010. Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction conditions for *Rheum tanguticum*(唐古特大黄 ISSR-PCR 反应条件的优化)[J]. *Guihaia*(广西植物), **30**(1): 112—112
- Huang SM(黄素梅), Wang JW(王敬文), Jiang JM(姜景民), *et al.* 2009. Fatty acid composition analysis of *Sapindus mukorossi* Gaertn. seed oil(无患子籽油脂脂肪酸成分分析)[J]. *Chin Oils Fats* (中国油脂), **34**(12): 74—76
- Ibrahim M, Khaja MN, Aara A, *et al.* 2008. Hepatoprotective activity of *Sapindus mukorossi* and *Rheum emodi* extracts: in vitro and in vivo studies[J]. *World J Gastroenterol*, **14**(16): 2 566—2 561
- Liao SX(廖声熙), Cui K(崔凯), Zhang P(张鹏), *et al.* 2013. Establishment and optimization of ISSR reaction system of *Broussonetia papyrifera*(构树 ISSR 反应体系的优化与建立)[J]. *For Res* (林业科学研究), **26**(1): 076—080
- Lin WR(林文荣). 2007. Study on cutting propagation test of *Sapindus mukorossi* (无患子扦插繁殖试验研究)[J]. *Mod Hortic* (现代园艺), (7): 9—10
- Liu B(刘宝), Fan HH(范辉华), Peng ZQ(彭珠清), *et al.* 2014. Molecular polymorphic analysis with geographic provenances of *Sapindus mukorossi* (不同地理种源无患子的分子多态性分析)[J]. *J Zhejiang A & F Univ*(浙江农林大学学报), **31**(1): 151—155
- Luo C(罗成), Xiong YT(熊宇婷), Gu W(顾蔚), *et al.* 2010. Optimization of ISSR-PCR reaction system and primers screening in *Schisandra sphenanthera* (华中五味子 ISSR-PCR 反应体系优化及引物筛选)[J]. *Bull Bot Res* (植物研究), (5): 588—593
- Mei LY(梅洛银), Liao MA(廖明安), Ren YJ(任雅君), *et al.* 2013. Relationship identification of a loquat variant based on Inter-Simple Sequence Repeat(ISSR)(基于 ISSR 分子标记的枇杷材料亲缘关系分析)[J]. *Guihaia*(广西植物), **33**(6): 740—744
- Meng DY(孟德悦), Wu HY(吴海勇), Liu GB(刘光斌), *et al.* 2013. Variance analysis on net photosynthetic rate and transpiration rate of *Spindus mukorossi* from different provenances(不同种源无患子光合与蒸腾速率差异分析)[J]. *Non-wood For Res*(经济林研究), **31**(2): 48—53
- Pandey G. 1998. Dravyaguna Vijnana, VI. Varanasi[M]. India: Krishnadas Academy: 191—196
- Peng ZQ(彭珠清), Fan HH(范辉华), Liu B(刘宝), *et al.* 2014. Optimization of SARP-PCR in *Sapindus mukorossi* (无患子 SRAP-PCR 反应体系的优化)[J]. *J Zhejiang A & F Univ*(浙江农林大学学报), **31**(2): 322—328
- Shao WH(邵文豪), Diao SF(刁松锋), Jiang JM(姜景民), *et al.* 2012. Geographic variation of saponins contents in *Sapindus mukorossi* peels from different habitats (不同产地无患子果皮皂苷含量的地理变异研究)[J]. *Bull Bot Res* (植物研究), **32**(5): 627—631
- Shao WH(邵文豪), Diao SF(刁松锋), Jiang JM(姜景民), *et al.* 2013. Study on geographic variation of morphology and economic character of fruit and seed of *Sapindus mukorossi* (无患子种实形态及经济性状的地理变异)[J]. *For Res* (林业科学研究), **26**(5): 603—608
- Shen QQ(沈庆庆), Zhu JH(朱建华), Peng HX(彭宏祥), *et al.* 2013. Genetic diversity of early-maturing seedling litchi resources in southwest Guangxi by ISSR(桂西南早熟荔枝实生资源遗传多样性的 ISSR 分析)[J]. *Guihaia*(广西植物), **33**(2): 225—228
- Sun QX(孙清信), Chen J(陈坚), Zhang H(张辉), *et al.* 2012. Optimization of ISSR's primer and PCR reaction system for *Astragalus sinicus* L. (紫云英 ISSR 引物的筛选及 PCR 反应体系的优化)[J]. *J Plant Gen Res*(植物遗传资源学报), **13**(5): 870—878
- Sun SD, Ke X, Cui L, *et al.* 2011. Enzymatic epoxidation of *Sapindus mukorossi* seed oil by perstearic acid optimized using response surface methodology[J]. *Ind Crops Prod*, **33**(3): 676—682
- Verma N, Amresh G, Sahu PK, *et al.* 2012. Antihyperglycemic activity, antihyperlipidemic activity, haematological effects and histopathological analysis of *Sapindus mukorossi* Gaerten fruits in streptozotocin induced diabetic rats[J]. *Asian Paci J Trop Med*, **5**(7): 518—522
- Wang YH(王彦华), Hou XL(侯喜林), Xu MY(徐明宇). 2004. Study on optimization for ISSR reaction system in *Brassica campestris* ssp. *chinensis* using orthogonal design(正交设计优化不结球白菜 ISSR 反应体系研究)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), **24**(5): 899—902
- Wei FY(魏凤玉), Fang C(方春). 2010. Enzyme-assisted aqueous extraction of *Sapindus saponins*(酶法提取无患子皂苷的工艺研究)[J]. *Appl Chem Ind* (应用化工), **39**(8): 1 149—1 151
- Zhou LY(周凌瑜), Wu CW(吴晨炜), Tang DQ(唐东芹), *et al.* 2008. Optimization for ISSR-PCR system of *Freesia refracta* Klatt through orthogonal design(利用正交设计优化小苍兰 ISSR-PCR 反应体系)[J]. *Bull Bot Res* (植物研究), **28**(4): 402—407
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, **20**(2): 176—183