

# 丹参 ISSR-PCR 反应体系的建立与正交优化

李 嵘, 王喆之

( 陕西师范大学 生命科学学院, 西安 710062 )

**摘 要:** 利用正交试验设计的方法, 从引物浓度、*Taq* DNA 聚合酶浓度、 $Mg^{2+}$  浓度、dNTP 浓度 4 种因素 3 个水平, 对丹参 ISSR-PCR 反应体系进行优化分析, 并在此基础上对模板 DNA 浓度、PCR 反应过程中的退火温度进行梯度检测。结果表明: 20  $\mu$ L ISSR-PCR 反应体系中各因素的最佳浓度为  $1 \times$  PCR buffer、200  $\mu$ mol/L dNTP、1.0  $\mu$ mol/L 引物、1.5 mmol/L  $Mg^{2+}$  和 1 U *Taq* DNA 聚合酶, 最佳模板 DNA 浓度为 20~60 ng, 引物 UBC 835 的最佳退火温度为 51.7  $^{\circ}$ C。

**关键词:** 丹参; ISSR-PCR; 反应体系; 正交优化

**中图分类号:** Q943.2    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1000-3142(2008)05-0599-05

## Establishment and orthogonal optimization of ISSR-PCR amplification system in *Salvia miltiorrhiza*

LI Rong, WANG Zhe-Zhi

( College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China )

**Abstract:** In this paper, the orthogonal design was used to optimize the ISSR-PCR amplification system of *Salvia miltiorrhiza* in four factors (the concentration of dNTP, Primers,  $Mg^{2+}$  and *Taq* DNA polymerase) at three levels respectively. Then, based on the optimal ISSR-PCR amplification system, the concentration of template DNA and annealing temperature were proposed by gradient PCR. The results showed that: a suitable ISSR-PCR amplification system of *S. miltiorrhiza* was established. In a total volume of 20  $\mu$ L ISSR-PCR amplification system, it contains  $1 \times$  PCR buffer, 200  $\mu$ mol/L dNTP, 1.0  $\mu$ mol/L primer, 1.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 1 U *Taq* DNA polymerase and 20~60 ng template DNA. The optimal annealing temperature for primer UBC 835 is 51.7  $^{\circ}$ C.

**Key words:** *Salvia miltiorrhiza*; ISSR-PCR; amplification system; orthogonal optimization

丹参(*Salvia miltiorrhiza*)属唇形科(Lamiaceae)鼠尾草属(*Salvia*),为多年生草本植物,生于海拔 100~1 300 m 的山沟、溪边及林中阴湿处,主要分布于我国的安徽、河北、河南、湖北、湖南、江苏、陕西、山东、山西、浙江及日本(Li & Hedge, 1994)。其干燥根及根茎入药,味苦,微寒,有祛瘀止痛,活血通经,清心除烦的作用,主要用于月经不调,经闭痛经,胸腹刺痛,热痹疼痛,疮疡肿痛,心烦不眠,肝脾肿大,心绞痛等(国家药典委员会,2005)。

简单重复序列间区(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,由 Zietkiewicz 等(1994)提出。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

收稿日期: 2007-04-17    修回日期: 2007-07-28

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2004BA721A35)[Supported by Key Technologies Research and Development Program of State Tenth Five-Year Plan Project(2004BA721A35)]

作者简介: 李嵘,男,主要从事植物分子生物学研究,(E-mail)lirong@snnu.edu.cn.

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(Dirlewanger 等,1998;Blair 等,1999;Esselman 等,1999;Gilbert 等,1999;杜道林等,2001),因此,ISSR 标记技术已广泛应用于遗传连锁图谱的构建、基因定位、种质资源鉴定、植物分类、进化和遗传多样性等研究中(Kantety 等,1995;Nagaoka & Ogihara,1997;Ratnaparkhe 等,1998;Prevost & Wilkinson,1999;Dávila 等,1999;Arcade 等,2000;Joshi 等,2000;Ammiraju 等,2001;Casasoli 等,2001)。

进行 ISSR 分子标记时,首先应对反应体系进行优化,筛选出最佳反应条件。若以单因子试验进行筛选,难免顾此失彼,忽略各因子间的互作效应,而正交试验设计具有均衡分散、综合可比、伸缩性强、效应明显、易于了解各因素之间的内在规律,从而快速找到最优水平组合的特点(盖钧益,2000)。鉴于此,本文在参考经典 PCR 反应条件的同时,利用正交试验设计的思路,从引物浓度、*Taq* DNA 聚合酶浓度、 $Mg^{2+}$  浓度、dNTP 浓度 4 种因素 3 个水平,对丹参 ISSR-PCR 反应体系进行优化分析,并在此基础上对模板 DNA 浓度、PCR 反应过程中的退火温度进行梯度检测分析,旨在建立适合丹参 ISSR-PCR 的最佳反应体系,为后期丹参遗传连锁图谱的构建、基因定位、种质资源的优选、种群遗传结构与分化等研究奠定一定的基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试材料为丹参(*Salvia miltiorrhiza*)3 年生实生苗嫩叶,2006 年 3 月 25 日采自陕西师范大学丹参种质资源圃,该种苗于 2005 年 4 月从陕西安康引种。

### 1.2 试剂

实验所用 *Taq* DNA 聚合酶、dNTP、DNA marker (DL2000)均购自 TaKaRa(宝)生物工程(大连)有限公司。ISSR 引物采用加拿大哥伦比亚大学(University of British Columbia,UBC)所设计的引物,由上海生物工程技术有限公司合成。所使用的引物序列如下(5' → 3'): UBC 807: (AG)<sub>8</sub>T; UBC 811: (GA)<sub>8</sub>G; UBC 835: (AG)<sub>8</sub>YC; UBC 836: (AT)<sub>8</sub>YA; UBC 842: (GA)<sub>8</sub>YG, Y 代表 G 和 C。

### 1.3 基因组总 DNA 的提取

采用改良的 CTAB 微量法提取基因组总 DNA (邹喻苹等,2001;周延清,2005),用 0.8% 的琼脂糖电泳检测 DNA 质量, DNA 的纯度和浓度用美国 Thermo Electron Corporation 公司生产的 Unicam UV 300 紫外分光光度计测定,并将 DNA 浓度稀释至 20 ng/ $\mu$ L。

### 1.4 ISSR-PCR 反应体系正交试验设计与 PCR 扩增

采用  $L_9(3^4)$  正交试验设计,对 dNTP 浓度、引物浓度、 $Mg^{2+}$  浓度、*Taq* DNA 聚合酶浓度进行 4 因素 3 水平筛选,方案如表 1、2。

表 1 ISSR-PCR 反应体系的因素与水平  
Table 1 Factors and levels of ISSR-PCR amplification system

因素 Factors	水平(体系终浓度) Levels (Final concentration)		
	1	2	3
dNTP ( $\mu$ mol/L)	150	200	250
Primers ( $\mu$ mol/L)	0.25	0.50	1.0
$Mg^{2+}$ (mmol/L)	1.5	2.0	2.5
<i>Taq</i> DNA polymerase (U/20 $\mu$ L)	0.5	1.0	2.0

表 2 ISSR-PCR 反应体系的正交试验设计  
Table 2  $L_9(3^4)$  orthogonal design of factors and levels of ISSR-PCR amplification system

处理组合 Treatment	dNTP ( $\mu$ mol/L)	Primers ( $\mu$ mol/L)	$Mg^{2+}$ (mmol/L)	<i>Taq</i> DNA polymerase (U/20 $\mu$ L)
1	150	0.25	1.5	0.5
2	150	0.50	2.0	1.0
3	150	1.0	2.5	2.0
4	200	0.25	2.0	2.0
5	200	0.50	2.5	0.5
6	200	1.0	1.5	1.0
7	250	0.25	2.5	1.0
8	250	0.50	1.5	2.0
9	250	1.0	2.0	0.5

根据表 1、2 配制总体积为 20  $\mu$ L 的 PCR 反应体系,除表中变化因素外,每管中还含有 1 $\times$  PCR buffer 和 40 ng 模板 DNA,引物选用 UBC835,每处理设 2 次重复。PCR 扩增反应在美国 Bio-Rad 公司生产的 MyCycler<sup>TM</sup> Thermal Cycler 580BR 4255 型仪上进行,预扩增程序:94  $^{\circ}$ C 预变性 10 min;94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,52  $^{\circ}$ C 退火 60 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 60 s,循环 35 次;72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4  $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物用 1.3% 琼脂糖凝胶(含 EB 0.5  $\mu$ g/mL)于 4 V/cm 电压下电泳 2 h,电泳结果用美国 Media Cybernetics 公司生产的 UVP GDS-

8000 凝胶成像系统拍照分析。

### 1.5 ISSR-PCR 反应体系中模板 DNA 浓度的优化

根据正交试验结果选出最佳反应体系组合后, 再对模板 DNA 浓度进行梯度试验, 优化筛选合适的模板 DNA 浓度。20  $\mu\text{L}$  反应体系中模板 DNA 设 10、20、40、60、80、100、120 ng 七个处理, 每个处理设 2 次重复, 其它反应程序和体系组合均与正交试验设计中最佳反应体系相同。

### 1.6 ISSR-PCR 反应体系中退火温度的优化

在上述试验确定的最佳反应体系基础之上, 对退火温度进行梯度试验, 优化筛选最佳退火温度。在 PCR 梯度扩增仪上设置最小退火温度为 48  $^{\circ}\text{C}$ , 最大为 58  $^{\circ}\text{C}$ , PCR 仪自动形成 8 个梯度, 即 48、48.7、49.9、51.7、54.1、56、57.2、58  $^{\circ}\text{C}$ , 每个梯度设 2 次重复, 其它反应程序和体系组合均与试验确定的最佳反应体系相同。

### 1.7 ISSR-PCR 反应体系的稳定性检测

选择另外 4 个 ISSR 引物 UBC807、UBC811、UBC836、UBC842 对优化确定的丹参 ISSR-PCR 反应体系的稳定性进行检测, 每个引物设 2 次重复。

## 2 结果和分析

### 2.1 ISSR-PCR 反应体系的正交优化

参照何正文等(1998)的方法, 对 PCR 扩增结果依据谱带的强弱和杂带的多少进行直观分析。由图 1 看出, 不同处理间, 由于 dNTP、引物、 $\text{Mg}^{2+}$  和 *Taq* DNA 聚合酶的浓度不同, 其扩增结果存在明显差异。组合 1 的扩增效果最差, 谱带弱且多态性低, 其原因可能是反应体系中 dNTP 浓度和引物浓度较低所致。组合 3 与 8 扩增谱带较强, 但多态性较低, 究其原因, 组合 3 可能是反应体系中 dNTP 浓度过低, 反应不完全, 扩增产率较低; 组合 8 可能是反应体系中 dNTP 浓度较高, 对  $\text{Mg}^{2+}$  产生抑制作用, 从而影响 *Taq* DNA 聚合酶的活性, 导致反应不充分。组合 2、5、9 扩增谱带的多态性较高, 但谱带较弱, 致使条带无法区分, 其原因, 组合 2 可能是反应体系中 dNTP 浓度过低, 反应不完全, 导致 PCR 扩增量不足; 组合 5 可能是反应体系中  $\text{Mg}^{2+}$  浓度过高, 非特异性扩增产物增加, 导致 PCR 扩增结果受背景噪音干扰; 组合 9 可能是受反应体系中 *Taq* DNA 聚合酶浓度较低和 dNTP 浓度较高的双重影响, 过高的 dNTP 浓度抑制了  $\text{Mg}^{2+}$  的作用, 减弱 *Taq* DNA 聚

合酶的活性, 这就使本身 *Taq* DNA 聚合酶浓度较低的反应体系更加无法充分完成反应, 导致扩增产物大为减少。组合 4、6、7 扩增谱带清晰, 且多态性高, 但组合 4、7 有严重的 Smear 现象发生, 其原因是组合 4、7 反应体系中的引物浓度较低, 其与模板 DNA 结合位点少, 导致 PCR 扩增产量下降。最佳组合应选择特异性谱带清晰、谱带多态性高, 且谱带稳定的组合, 故本实验选择组合 6 为最佳组合, 即 20  $\mu\text{L}$  ISSR-PCR 反应体系中含  $1 \times$  PCR buffer、200  $\mu\text{mol/L}$  dNTP、1.0  $\mu\text{mol/L}$  引物、1.5 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$  和 1 U *Taq* DNA 聚合酶。

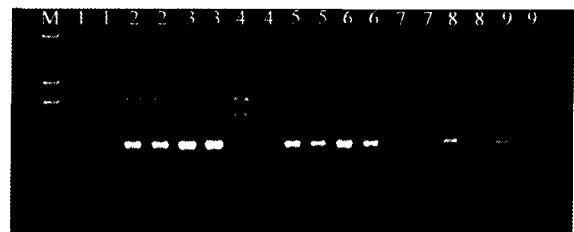


图 1 正交试验设计 ISSR-PCR 反应体系的扩增结果

Fig. 1 The results of ISSR-PCR amplification system according to orthogonal design

1-9: 表 2 的处理组合编号; M: DNA maker DL2000, 下同; 引物: UBC835。

### 2.2 不同模板 DNA 浓度对 ISSR-PCR 反应体系的影响

根据正交试验结果选择组合 6 对模板 DNA 浓度进行梯度筛选。由图 2 看出, 由于模板 DNA 浓度不同, 其扩增结果也存在一定的差异。在 20  $\mu\text{L}$  ISSR-PCR 反应体系中, 模板 DNA 浓度由 10~120 ng 虽均能扩增出谱带, 但模板 DNA 浓度为 10 ng 时, 由于浓度过低, 造成扩增谱带的缺失, 模板 DNA 浓度为 80、100、120 ng 时, 由于浓度过高, 引起非特异性扩增, 导致背景呈弥散状, 难以区分谱带。模板 DNA 浓度为 20、40、60 ng 时, 谱带清晰、多态性高, 且较稳定。因此, 本实验确定 20  $\mu\text{L}$  ISSR-PCR 反应体系中, 最佳模板 DNA 浓度为 20~60 ng。

### 2.3 不同退火温度对 ISSR-PCR 反应体系的影响

根据正交试验和模板 DNA 浓度的筛选结果, 选择组合 6 (模板 DNA 浓度为 40 ng) 对引物 UBC 835 的退火温度进行梯度筛选。由图 3 看出, 由于退火温度不同, 其扩增结果也存在明显的差异。在 20  $\mu\text{L}$  ISSR-PCR 反应体系中, 退火温度由 48  $^{\circ}\text{C}$  升到 58  $^{\circ}\text{C}$  虽均能扩增出谱带, 但退火温度为 48~49.9  $^{\circ}\text{C}$  时, 由于退火温度过低, 特异性较差, 除主带

外,杂带多,背景模糊;随着退火温度升高(54.1~58℃),引物与模板的特异性增强,但多态性偏低,且谱带亮度越趋减弱。退火温度为51.7℃时,谱带主带清晰、杂带少,且多态性较高,因此,本实验确定引物UBC 835的最佳退火温度为51.7℃。

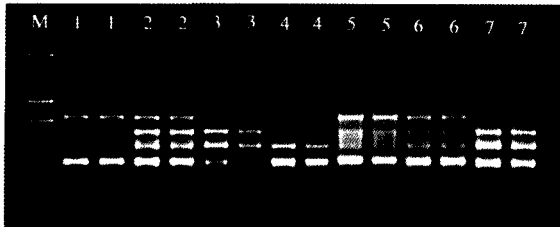


图2 ISSR-PCR反应体系中不同模板DNA浓度的扩增结果

Fig. 2 The results of ISSR-PCR amplification system with different concentrations of DNA template

1:10 ng; 2:20 ng; 3:40 ng; 4:60 ng; 5:80 ng;  
6:100 ng; 7:120 ng; 引物:UBC835。

#### 2.4 ISSR-PCR反应体系的稳定性检测

根据正交试验和模板DNA浓度的筛选结果,选择另外4个ISSR引物UBC 807、UBC 811、UBC 836、UBC 842对优化确定的丹参ISSR-PCR反应体系(正交试验设计组合6,模板DNA浓度为40 ng)的稳定性进行检测(图4)。由图4看出,所选4个ISSR引物均能扩增出清晰明朗、多态性高、重复性好的谱带,表明优化确立的丹参ISSR-PCR反应体系是稳定可靠的。

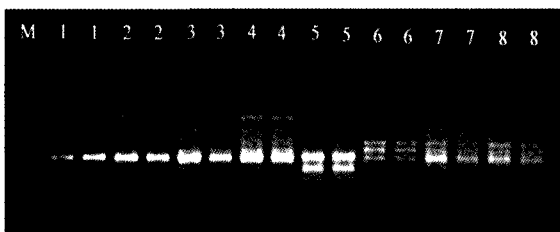


图3 ISSR-PCR反应体系中不同退火温度的扩增结果

Fig. 3 The results of ISSR-PCR amplification system with different annealing temperature

1:48℃; 2:48.7℃; 3:49.9℃; 4:51.7℃; 5:54.1℃;  
6:56℃; 7:57.2℃; 8:58℃; 引物:UBC835。

### 3 讨论

由于ISSR分子标记技术是基于PCR的一种分子标记技术,其扩增结果受模板DNA浓度、引物浓度、*Taq* DNA聚合酶浓度、 $Mg^{2+}$ 浓度、dNTP浓

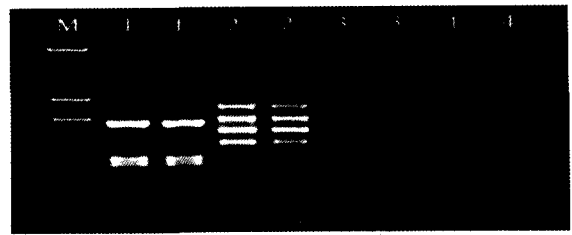


图4 ISSR-PCR反应体系中不同引物的扩增结果

Fig. 4 The results of ISSR-PCR amplification system with different primers

1:UBC807; 2:UBC811; 3:UBC836; 4:UBC842。

度等多种因素的综合影响。本研究的结果也表明,采用不同的反应体系组合及不同的反应程序,其扩增结果差异很大。

*Taq* DNA聚合酶的浓度是影响ISSR-PCR扩增结果的重要因素。酶浓度过高,不仅增加实验成本,而且易引起非特异性扩增,导致背景弥散;酶浓度过低,则无扩增产物或产物不稳定,其常用浓度为1~2.5 U(Bruno & Rhonda, 1993)。此外,*Taq* DNA聚合酶是 $Mg^{2+}$ 依赖性酶,在ISSR-PCR反应体系中, $Mg^{2+}$ 浓度也极为重要,浓度过高,容易生成非特异性扩增产物,使背景噪音加强,浓度过低,扩增效率下降,甚至不能扩增出谱带,适宜的 $Mg^{2+}$ 浓度为0.5~2.5 mmol/L(张青林等,2004)。但 $Mg^{2+}$ 最终反应浓度还会受体系中其它成分,尤其是dNTP的影响,因为dNTP分子中的磷酸基团能定量地与 $Mg^{2+}$ 结合,使实际参加反应的 $Mg^{2+}$ 浓度下降,对 $Mg^{2+}$ 产生抑制作用(李文表等,2006)。dNTP是靶序列扩增的原料,浓度过高易引起非特异性扩增,过低则不足以完成设定的循环数就终止反应,导致PCR扩增产量不足,不利于结果的检测,常用dNTP浓度为200  $\mu$ mol/L(郑景生等,2003)。引物浓度也是影响ISSR-PCR扩增结果的一个重要因素,浓度过高,易引起碱基错配和产生非特异性扩增,还易形成引物二聚体,浓度过低,其与模板DNA结合位点减少,扩增产物下降,并有可能出现Smear现象(冯富娟等,2004)。本研究中,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,对dNTP浓度、引物浓度、 $Mg^{2+}$ 浓度、*Taq* DNA聚合酶浓度进行4因素3水平筛选,确定组合6为最佳组合,即20  $\mu$ L ISSR-PCR反应体系中含1 $\times$  PCR buffer、200  $\mu$ mol/L dNTP、1.0  $\mu$ mol/L引物、1.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ 和1 U *Taq* DNA聚合酶。

模板DNA浓度对ISSR-PCR扩增结果也有一定的影响,浓度太高,非特异性扩增加强,电泳图谱

背景弥散模糊,浓度过低,扩增出的谱带亮度较弱,抑或无扩增产物。但总的来说,模板 DNA 浓度的适宜范围较宽,在此适宜范围内,不同的模板 DNA 浓度不会对 ISSR-PCR 扩增结果造成明显的影响(王彦华等,2004)。本研究的结果表明,20  $\mu$ L ISSR-PCR 反应体系中,最佳模板 DNA 浓度为 20~60 ng。

本研究利用正交试验设计具有均衡分散、综合可比、伸缩性强、效应明显的特点(盖钧益,2000),对影响 ISSR-PCR 反应体系的主要因素进行优化筛选分析,快速选出了最佳实验组合,避免了单因素试验结果的不足。由此看来,对受多因素综合影响的 ISSR-PCR 反应体系来说,正交试验设计在了解各因素之间的内在规律,从而为快速找到最优水平组合的实验体系方面,是一种值得借鉴的方法。

### 参考文献:

- 邹喻萃,葛颂,王晓东. 2001. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京:科学出版社:13-17
- 周延清. 2005. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京:化学工业出版社:9-47
- 国家药典委员会. 2005. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社:52-53
- 盖钧益. 2000. 试验统计方法[M]. 北京:中国农业出版社:286-287
- Ammiraju JSS, Dholakia BB, Santra DK, et al. 2001. Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat[J]. *Theoretical Appl Genet*, **102** (5):726-732
- Arcade A, Anselin F, Faivre RP, et al. 2000. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch[J]. *Theoretical Appl Genet*, **100** (2):299-307
- Blair MW, Panaud O, McCouch SR. 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa*) [J]. *Theoretical Appl Genet*, **98** (5):780-792
- Bruno WSS, Rhonda JH. 1993. High output genetic mapping of polyploids using PCR-generated markers[J]. *Theoretical Appl Genet*, **86** (1):105-112
- Casasoli M, Mattioni C, Cherubini M, et al. 2001. A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa*) based on RAPD, ISSR and isozyme markers[J]. *Theoretical Appl Genet*, **102** (8):1190-1199
- Dávila A, Loarce Y, Ferrer E. 1999. Molecular characterization and genetic mapping of random amplified microsatellite polymorphism in barley[J]. *Theoretical Appl Genet*, **98** (2):265-273
- Dirlewanger E, Pronier V, Parvery C, et al. 1998. Genetic linkage map of peach (*Prunus persica*) using morphological and molecular markers[J]. *Theoretical Appl Genet*, **97** (5-6):888-895
- Du DL (杜道林), Su J (苏杰), Zhou P (周鹏), et al. 2001. Preliminary studies on the application of RAPD in *Musa* (香蕉 RAPD 分析初步研究) [J]. *Guihaia* (广西植物), **21** (3):243-246
- Esselman EJ, Jianqiang L, Crawford DJ, et al. 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers [J]. *Mol Ecol*, **8** (3):443-451
- Feng FJ (冯富娟), Wang FY (王凤友), Liu T (刘彤). 2004. The influence factors of the ISSR-PCR experiment system on *Pinus koraiensis* (红松 ISSR-PCR 实验系统影响因素) [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), **21** (3):326-331
- Gilbert JE, Lewis RV, Wilkinson MJ, et al. 1999. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections [J]. *Theoretical Appl Genet*, **98** (6-7):1125-1131
- He ZW (何正文), Liu YS (刘运生), Chen LH (陈立华), et al. 1998. Orthogonal design-direct analysis for PCR optimization (正交设计直观分析法优化 PCR 条件) [J]. *Bull Hunan Med Univ* (湖南医科大学学报), **23** (4):403-404
- Joshi SP, Gupta VS, Aggarwal RK, et al. 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza* [J]. *Theoretical Appl Genet*, **100** (8):1311-1320
- Kantety RV, Zeng XP, Bennetzen JL, et al. 1995. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays*) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification [J]. *Mol Breed*, **1** (4):365-373
- Li WB (李文表), Zhou XY (周先叶), Li Y (李勇), et al. 2006. Discussion on the ISSR reaction condition of *Trachycarpus fortunei* (棕榈 ISSR 反应条件的筛选与优化) [J]. *Guihaia* (广西植物), **26** (2):204-208
- Li XW, Hedge IC. 1994. *Salvia* [A]. In: Wu ZY, Peter HR (eds). *Flora of China* [M]. Beijing: Science Press and St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, **17**:212
- Nagaoka T, Ogihara Y. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers [J]. *Theoretical Appl Genet*, **94** (5):597-602
- Prevost A, Wilkinson MJ. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars [J]. *Theoretical Appl Genet*, **98** (1):107-112
- Ratnaparkhe MB, Santra DK, Tullu A, et al. 1998. Inheritance of inter-simple-sequence-repeat polymorphisms and linkage with a fusarium wilt resistance gene in chickpea [J]. *Theoretical Appl Genet*, **96** (3-4):348-353
- 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 Boreali-Occident Sin* (西北植物学报), **24** (5):899-902
- Zhang QL (张青林), Luo ZR (罗正荣). 2004. ISSR technology and its applications in fruit trees (ISSR 及其在果树上的应用) [J]. *J Fruit Sci* (果树学报), **21** (1):54-58
- Zheng JS (郑景生), Lü B (吕蓓). 2003. PCR technique and its practical methods (PCR 技术及实用方法) [J]. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), **1** (3):381-394
- Zietkiewicz E, Rafalske A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, **20** (2):176-183