

# 观叶福禄桐 ISSR-PCR 反应体系的建立及优化

张国武<sup>1</sup>, 黄涛<sup>2</sup>, 吴南生<sup>2</sup>, 张沛健<sup>1</sup>, 刘学锋<sup>1</sup>

(1. 国家林业局 桉树研究开发中心, 广东 湛江 524022; 2. 江西农业大学 园林艺术学院, 江西 南昌 330045)

**摘要:**以福禄桐叶片为试材, 采用正交实验和单因子试验, 分析模板 DNA、 $Mg^{2+}$ 、*Taq* 酶、引物和 dNTP 五个因子对福禄桐 ISSR-PCR 反应的影响。结果表明: 福禄桐 ISSR-PCR 最佳反应体系为在 25  $\mu$ L 反应体系中, 模板 DNA 为 15 ng,  $Mg^{2+}$  3.0 mmol/L, *Taq* 酶 0.5 U, 引物 0.6  $\mu$ mol/L, dNTP 0.20 mmol/L, 通过梯度 PCR 试验得到相应引物最佳退火温度为 47℃; 该试验可为福禄桐遗传多样性分析和亲缘关系等提供理论基础。

**关键词:** 福禄桐; ISSR-PCR 反应; 梯度 PCR; 退火温度

**中图分类号:** S 682.36 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2014)15-0101-05

福禄桐(*Polyscias*)属五加科福禄桐属常绿灌木或小乔木, 又名南洋参, 原产于太平洋诸岛, 株形柔和, 古朴优雅, 叶片与茎干奇特优美<sup>[1]</sup>。株高 1~3 m, 株型高大、饱满, 侧枝细长, 分支皮孔显著, 枝繁叶茂, 叶色多彩, 性喜高温多湿, 耐旱耐阴。由于其独特的魅力成为近些年来非常流行的一类观叶植物类群, 又因其名字含有“福禄”一词, 有富贵吉祥的美好寓意, 广受人们的喜爱, 主要用于庭院美化和盆栽。调查研究表明, 国外的研究主要集中在观叶福禄桐的起源、化学成分以及药理作用<sup>[2-4]</sup>; 国内则主要集中研究观叶福禄桐的栽培、繁殖和观赏价值<sup>[5-6]</sup>, 而国内外对其遗传学背景研究尚鲜见报道, 导致观叶福禄桐品种混杂、分类标准不统一、优良种质资源稀缺、制约其快速良好的发展, 目前急需对其遗传结构及遗传多样性做全面的研究。

ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) 由 Zietkiewicz 等<sup>[7]</sup>于 1994 年创建, 因其具有分布广、多态性高、技术难度低、操作简单、重复性高、成本低等优点, 是近年来应用较为广泛的分子遗传标记技术, 它来源于植物基因组中丰富的简单序列重复(SSR), 由 2~4 个随机的核苷酸锚定在微卫星序列的 3'端或 5'端, 由此组成的单引物进行重复序列间 DNA 的 PCR 扩增<sup>[8]</sup>。该试验选用羽叶福禄桐(*Polyscias fruticosa* var. *plumata* Bailey)为材料, 对 PCR 反应的主要影响因子模板 DNA、*Taq* 聚合酶、引物、 $Mg^{2+}$ 、dNTP 以及退火温度进行分析, 旨在建立福禄桐 ISSR-PCR 最佳反应体系, 为今后福禄桐种质资源遗

传多样性和亲缘关系的研究提供了分子水平的借鉴与参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试福禄桐植株采自于广东省湛江市南方国家级种苗基地, 取生长健壮、无病虫害危害幼嫩叶片-70℃冰箱保存备用。

引物参照加拿大哥伦比亚大学(UBC)<sup>[9]</sup>所设计的引物序列, 由铂尚生物技术(上海)公司合成; *Taq* DNA 聚合酶、 $Mg^{2+}$ 、dNTP、10×buffer 和 DS<sup>TM</sup> 5000Marker 购于广州东盛生物公司; PCR 仪美国 Bio-Rad(伯乐公司) C-1000, 试验于国家林业局桉树研究开发中心实验室内完成。

### 1.2 试验方法

1.2.1 福禄桐基因组 DNA 提取与检测 采用改良的 CTAB 法<sup>[10-11]</sup>提取 5 个福禄桐属植物叶片基因组 DNA, 它们分别为 C1 圆叶福禄桐(*Polyscias scutellaria* (N. L. Burman) Fosberg), C2 线叶南洋森(*Polyscias cumingiana* (C. Presl) Fernández-Villar), C3 银边福禄桐(*Polyscias guilfoylei*), C4 南洋森(*Polyscias fruticosa* (Linnaeus) Harms), C5 银边圆叶福禄桐(*Polyscias balfouriana* cv. *Marginata*); 用 1×TAE 电泳缓冲液, 在 1.5% 琼脂糖(含 EB 终浓度为 0.5  $\mu$ g/mL)凝胶中电泳, 条件为 85 V, 50 min; 凝胶成像系统下(Bio-Rad)观察并记录, 以初步检测基因组 DNA 的完整度和质量; 通过核酸检测仪(Bio-Rad 生产的 Thermo Nano Drop 2000)检测其浓度及纯度。

1.2.2 福禄桐 ISSR-PCR 反应体系和条件 试验采用  $L_{16}(4^5)$  正交设计, 对 PCR 反应中 5 个因素( $Mg^{2+}$  浓度、模板 DNA 浓度、dNTP 浓度、引物浓度、*Taq* 酶浓度)进

**第一作者简介:** 张国武(1966-), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向为森林培育。

**基金项目:** 中国林业科学院基金资助项目(CAFYBB2012005)。

**收稿日期:** 2014-01-21

行优化,选用通用引物 UBC807,每个处理 3 次重复。PCR 反应的因素水平见表 1,  $L_{16}(4^5)$  设计方案见表 2。反应体系为 25  $\mu\text{L}$ , 内含  $1\times$  buffer。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s, 52 $^{\circ}\text{C}$  退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 循环 35 次; 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min; 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。取 PCR 产物于 1.5% 琼脂糖(含 EB 终浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 凝胶中电泳(85 V, 1 h), 然后在凝胶成像系统下观察并成像记录, 参照何文正等<sup>[12]</sup>、唐辉等<sup>[13]</sup> 方法, 依据条带数、清晰度和特异性对 PCR 扩增结果进行依次打分。3 次重复分别独立统计。

表 1 ISSR-PCR 反应体系的因素水平

Table 1 Factors and levels of ISSR-PCR system

因素 Factor	水平(体系终浓度) Level(Final concentration)			
	1	2	3	4
<i>Taq</i> 酶				
<i>Taq</i> DNA polymerase/ $\text{U} \cdot (25\mu\text{L})^{-1}$	0.5	1.0	1.5	2.0
dNTP/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.15	0.20	0.25	0.30
引物 Primer/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.2	0.4	0.6	0.8
$\text{Mg}^{2+}$ / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	1.5	2.0	2.5	3.0
模板 DNA				
DNA template/ $\text{ng} \cdot (25\mu\text{L})^{-1}$	10	15	20	25

表 2 ISSR-PCR 正交实验设计( $L_{16}(4^5)$ )Table 2 Orthogonal design of ISSR-PCR system ( $L_{16}(4^5)$ )

编号 Number	模板 DNA DNA template $/\text{ng} \cdot (25\mu\text{L})^{-1}$	$\text{Mg}^{2+}$ $/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	引物 Primer $/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	<i>Taq</i> 酶 <i>Taq</i> DNA polymerase $/\text{U} \cdot (25\mu\text{L})^{-1}$	dNTP $/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
1	10	1.5	0.2	0.5	0.15
2	10	2.0	0.4	1.0	0.20
3	10	2.5	0.6	1.5	0.25
4	10	3.0	0.8	2.0	0.30
5	15	1.5	0.4	1.5	0.30
6	15	2.0	0.2	2.0	0.25
7	15	2.5	0.8	0.5	0.20
8	15	3.0	0.6	1.0	0.15
9	20	1.5	0.6	2.0	0.20
10	20	2.0	0.8	1.5	0.15
11	20	2.5	0.2	1.0	0.30
12	20	3.0	0.4	0.5	0.25
13	25	1.5	0.8	1.0	0.25
14	25	2.0	0.6	0.5	0.30
15	25	2.5	0.4	2.0	0.15
16	25	3.0	0.2	1.5	0.20

1.2.3 福祿桐 ISSR-PCR 反应单因子试验设计 据正交实验初步建立的 ISSR-PCR 反应体系, 按照一定的浓度梯度适当变化, 进行单因子( $\text{Mg}^{2+}$ 、模板 DNA、dNTP、引物、*Taq* 酶) 试验, 每个处理重复 2 次, 试验设计见表 3, 找出适合福祿桐 ISSR-PCR 反应体系。

1.2.4 引物退火温度优化试验 在正交实验和单因子试验建立的最佳反应体系基础上, 进行退火温度试验, 退火温度在 46~57 $^{\circ}\text{C}$ , 扩增仪自动生成 8 个梯度 46.0、

表 3 ISSR-PCR 单因子试验设计

Table 3 Respective factor design for ISSR-PCR

编号 No.	模板 DNA DNA template $/\text{ng} \cdot (25\mu\text{L})^{-1}$	$\text{Mg}^{2+}$ $/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	引物 Primer $/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	<i>Taq</i> 酶 <i>Taq</i> DNA polymerase $/\text{U} \cdot (25\mu\text{L})^{-1}$	dNTP $/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
1	12.5	2.5	0.8	0.5	0.2
2	15	2.5	0.8	0.5	0.2
3	17.5	2.5	0.8	0.5	0.2
4	20	2.5	0.8	0.5	0.2
5	15	2.0	0.8	0.5	0.2
6	15	2.5	0.8	0.5	0.2
7	15	3.0	0.8	0.5	0.2
8	15	3.5	0.8	0.5	0.2
9	15	2.5	0.4	0.5	0.2
10	15	2.5	0.6	0.5	0.2
11	15	2.5	0.8	0.5	0.2
12	15	2.5	1.0	0.5	0.2
13	15	2.5	0.8	0.2	0.2
14	15	2.5	0.8	0.5	0.2
15	15	2.5	0.8	0.8	0.2
16	15	2.5	0.8	1.0	0.2
17	15	2.5	0.8	0.5	0.16
18	15	2.5	0.8	0.5	0.2
19	15	2.5	0.8	0.5	0.24
20	15	2.5	0.8	0.5	0.28

46.7、48.2、50.3、53.5、55.2、56.4、57.0 $^{\circ}\text{C}$ , 筛选出该引物的最佳退火温度。

### 1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 17.0 进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组 DNA 提取与检测

该试验通过改良的 CTAB 法提取 5 种福祿桐属植物叶片基因组 DNA 进行电泳检测, 结果表明条带清晰, 无降解(图 1); 核酸检测仪测定  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  比值在 1.75~1.95 之间, 表明所提取基因组 DNA 中蛋白质和 RNA 含量较少, 纯度较高, 符合后续的试验要求。为了

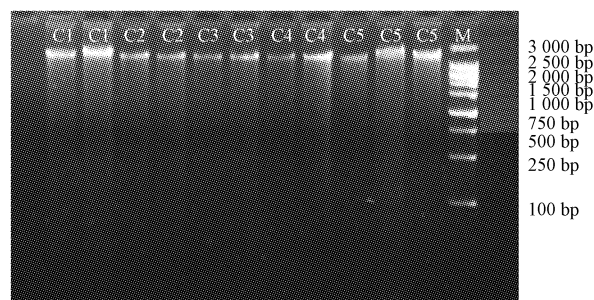


图 1 福祿桐 5 个品种 DNA 质量检测

注: C1~C5 分别代表圆叶福祿桐、线叶南洋森、银边福祿桐、南洋森、银边圆叶福祿桐。M 为 marker。

Fig. 1 Quality detection of *Polyscias* DNA template

Note: C1~C5 represent round leaf *Polyscias*, line leaf *Polyscias fruticosa*, silverside *Polyscias*, *Polyscias fruticosa*, silverside round leaf *Polyscias*, respectively. M is marker.

统一反应体系,最后根据样品测得的浓度相应地稀释成 20 ng/ $\mu$ L。

2.2 ISSR-PCR 正交设计直观分析

正交试验 PCR 电泳结果见图 2~5,16 个处理分数见表 4。

表 4 16 个处理评分

Table 4					The point table of 16 manages												
重复	组合 Combination																
Repeat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
1	5	7	10	12	4	7	14	13	2	5	12	13	10	5	5	7	
2	4	8	10	12	4	8	16	12	1	5	13	13	9	3	4	8	
3	4	8	11	11	4	7	15	11	2	6	13	13	9	5	5	8	

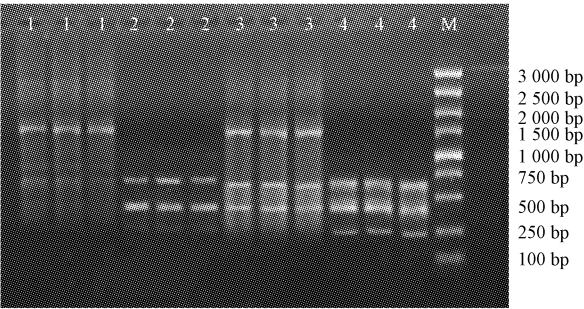


图 2 PCR 产物电泳结果

注:数字代表表 2 中的处理组合。下同。

Fig. 2 Result of PCR products electrophoresis

Note:Numbers mean the treatment combination in table 2,the same below.

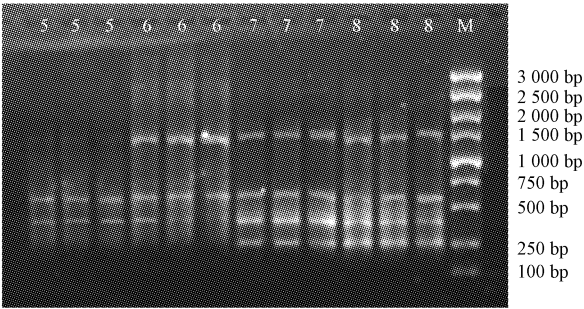


图 3 PCR 产物电泳结果

Fig. 3 Result of PCR products electrophoresis

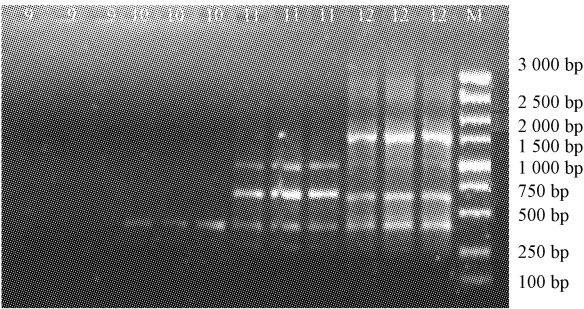


图 4 PCR 产物电泳结果

Fig. 4 Result of PCR products electrophoresis

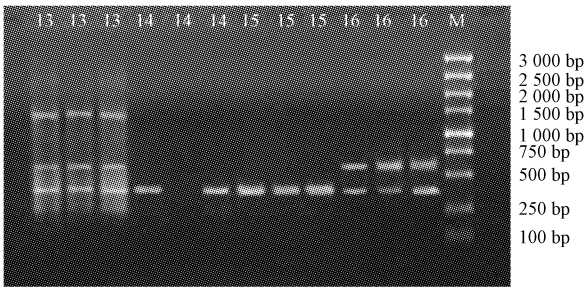


图 5 PCR 产物电泳结果

Fig. 5 Result of PCR products electrophoresis

2.3 ISSR-PCR 正交结果方差分析

由表 5 可知,由  $F$  值可知,各因素水平变化对 PCR 反应的影响大小依次为  $Mg^{2+}$ 、 $Taq$  聚合酶、Primer、dNTP、模板 DNA,各因素水平间的差异均达到显著水平,可以进行下游试验,进一步细调各因素内水平。

表 5 PCR 反应各因素间的方差分析

Table 5 Variance analysis for the factors of PCR				
变异来源	自由度	平方和	均方	$F$ 值
Source	DF	SS	MS	$F$ value
模板 DNA	3	58.729	19.576	44.746 **
DNA template	3	58.729	19.576	44.746 **
镁离子 $Mg^{2+}$	3	358.396	119.465	273.063 **
引物 Primer	3	79.063	26.354	60.238 **
$Taq$ 酶	3	134.396	44.799	102.397 **
$Taq$ DNA polymerase	3	134.396	44.799	102.397 **
dNTP	3	70.729	23.576	53.889 **
误差 Error	32	14.000	0.437	
总和 Sum	48	3933.000		

2.4 ISSR-PCR 单因素试验结果分析

2.4.1 模板浓度对 ISSR-PCR 的影响 DNA 模板浓度对 ISSR-PCR 反应影响最小,从图 6 可知,DNA 模板浓度分别为 12.5、15.0、17.5 ng/ $25\mu$ L 时条带亮度和多态性差异不大,而浓度为 20.0 ng/ $25\mu$ L 条带亮度有所减弱。因此,综合上述正交实验模板用量 15.0 ng 较为合适。

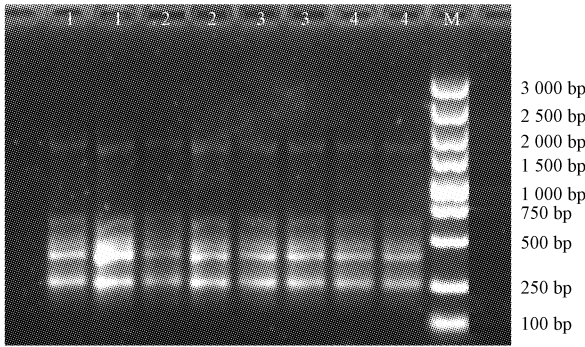


图 6 模板浓度对 PCR 反应的影响

注:1、2、3、4 分别代表 12.5、15.0、17.5、20.0 ng/ $25\mu$ L。

Fig. 6 Effect of PCR at different concentrations of template

Note:1,2,3,4 represent 12.5,15.0,17.5,20.0 ng/ $25\mu$ L.



2.4.2  $Mg^{2+}$  浓度对 ISSR-PCR 的影响  $Mg^{2+}$  浓度不仅影响酶的活性,还能与反应中的引物、模板、dNTP 结合,影响模板与引物的结合率,产生非特异性<sup>[14]</sup>。结合图 7 可知,随着  $Mg^{2+}$  浓度逐渐提高,条带亮度由暗变亮在变暗, $Mg^{2+}$  浓度在 3.0 mmol/L 条带亮度高,特异性好。因此福祿桐 ISSR-PCR 体系  $Mg^{2+}$  最佳浓度 3.0 mmol/L。

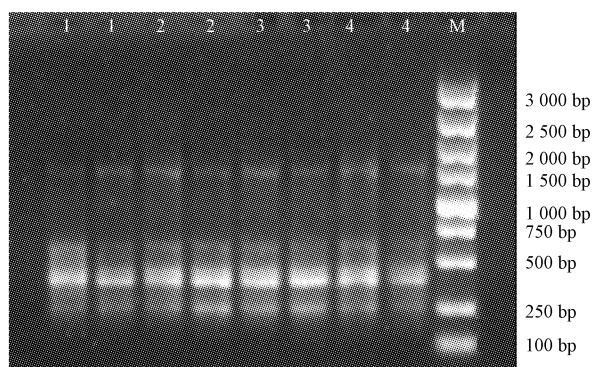


图 7  $Mg^{2+}$  浓度对 PCR 反应的影响

注:1:2.0 mmol/L;2:2.5 mmol/L;3:3.0 mmol/L;4:3.5 mmol/L。

Fig. 7 Effect of PCR at different concentrations of  $Mg^{2+}$

Note:1,2,3,4 represent 2.0,2.5,3.0,3.5 mmol/L.

2.4.3 引物浓度对 ISSR-PCR 的影响 引物浓度会影响 PCR 结果的可靠性,浓度偏高会引起错配和非特异性产物扩增,且会增加引物之间形成二聚体的概率,浓度过低则无法检测出所有 ISSR 位点<sup>[15]</sup>。由图 8 可知,随着引物浓度的升高,条带亮度有所下降并出现弥散现象,考虑到成本和综合上述正交实验引物最佳浓度为 0.6  $\mu$ mol/L。

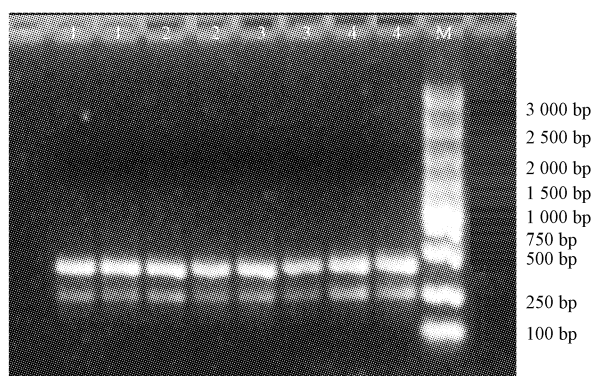


图 8 引物浓度对 PCR 反应的影响

注:1:0.4  $\mu$ mol/L;2:0.6  $\mu$ mol/L;3:0.8  $\mu$ mol/L;4:1.0  $\mu$ mol/L。

Fig. 8 Effect of PCR at different concentrations of primer

Note:1,2,3,4 represent 0.4,0.6,0.8,1.0  $\mu$ mol/L.

2.4.4  $Taq$  酶浓度对 ISSR-PCR 的影响  $Taq$  酶是影响 ISSR-PCR 反应中的一个重要因素,图 9 中  $Taq$  酶浓度为 0.2、0.5 U/25 $\mu$ L 时,条带亮度较好,多态性高;随着浓度升高至 0.8、1.0 U/25 $\mu$ L,条带多态性没有明显变

化,但亮度反而有所降低并出现弥散现象。从经济和试验效果考虑, $Taq$  酶最适宜浓度为 0.5 U/25 $\mu$ L。

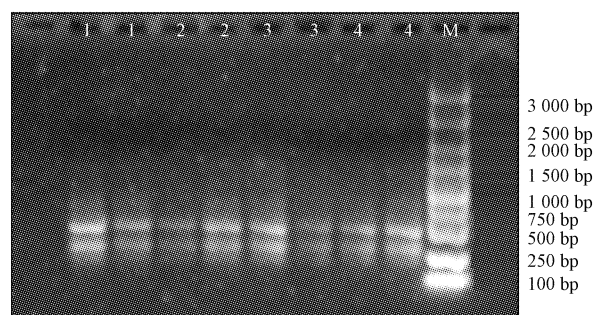


图 9  $Taq$  酶浓度对 PCR 反应的影响

注:1:0.2 U/25 $\mu$ L;2:0.5 U/25 $\mu$ L;3:0.8 U/25 $\mu$ L;4:1.0 U/25 $\mu$ L。

Fig. 9 Effect of PCR at different concentrations of

$Taq$  polymerase

Note:1,2,3,4 represent 0.2,0.5,0.8,1.0 U/25 $\mu$ L.

2.4.5 dNTP 浓度对 ISSR-PCR 的影响 dNTP 是 PCR 反应中合成新核苷酸的原料和提供能量的来源,因此 dNTP 在 PCR 反应中发挥着重要作用。由图 10 可知,dNTP 浓度为 0.16、0.28 mmol/L 时,条带较暗且出现弥散现象;而浓度为 0.20 mmol/L 条带清晰,多态性好。结合正交实验 dNTP 浓度为 0.20 mmol/L 较为合适。

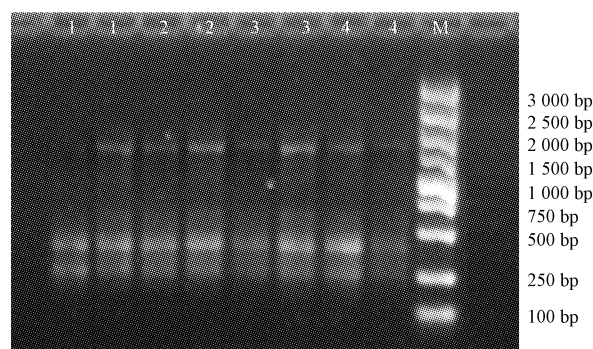


图 10 dNTP 浓度对 PCR 反应的影响

注:1:0.16 mmol/L;2:0.20 mmol/L;3:0.24 mmol/L;4:0.28 mmol/L。

Fig. 10 Effect of PCR at different concentrations of dNTP

Note:1,2,3,4 represent 0.16,0.20,0.24,0.28 mmol/L.

2.5 退火温度对 ISSR-PCR 的影响

退火温度为引物和模板 DNA 结合时候的温度参数,是影响 PCR 特异性较重要因素。由图 11 可知,退火温度逐渐升高,条带逐渐减少,亮度减弱,弥散现象严重,当退火温度在 46.7 $^{\circ}$ C,产生的条带质量最好,较为适合。

### 3 结论与讨论

试验结果表明,福祿桐 ISSR-PCR 25  $\mu$ L 反应体系中 5 个因子的最佳水平为 DNA 模板浓度为 15 ng, $Mg^{2+}$  浓度为 3.0 mmol/L,引物浓度 0.6  $\mu$ mol/L, $Taq$  酶含量 0.5 U,dNTP 浓度为 0.20 mmol/L,内含 2.5  $\mu$ L 10 $\times$ PCR buffer。反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,47 $^{\circ}$ C

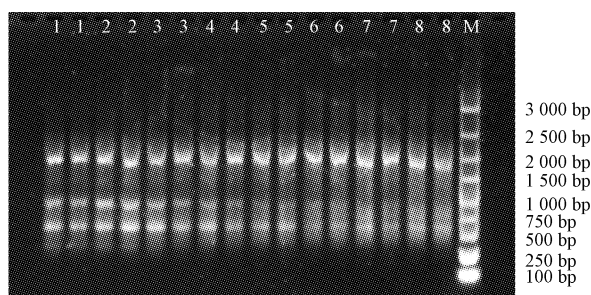


图 11 退火温度对 PCR 反应的影响

注:1~8 对应退火温度为 46.0、46.7、48.2、50.3、53.0、55.2、56.4、57.0℃。

Fig. 11 Effect of PCR at different concentrations of the annealing temperature

Note: Number 1~8 represent temperature of 46.0, 46.7, 48.2, 50.3, 53.0, 55.2, 56.4, 57.0℃.

退火 45 s, 72℃延伸 1 min, 循环 35 次; 72℃延伸 7 min; 4℃保存。

ISSR 分子标记的扩增结果受反应条件、扩增程序以及物种的不同影响<sup>[16]</sup>。试验表明,模板 DNA 用量、 $Mg^{2+}$  浓度、Primer 浓度、*Taq* 酶含量、dNTP 浓度以及退火温度对福禄桐 ISSR-PCR 反应都有不同程度的影响;其中以  $Mg^{2+}$ 、*Taq* 酶、引物影响较大,其浓度过高主带亮度有所变暗且出现弥散现象。每个引物有其相对应的退火温度,引物的退火温度对 PCR 扩增影响较大,温度过低导致不完全配对的位点得到扩增,产生部分非特异性片段,相反温度过高,则引物与模板难结合,扩增反应受抑制,扩增片段减少。

该研究结合正交实验和单因子试验对福禄桐 ISSR-PCR 反应体系进行优化,既排除了各因素之间互作对反应体系的影响,又设置了较多的水平梯度,从而较快的建立满意的试验结果,但正交设计直观分析法也存在一定的局限性,如对试验结果本身的评价带有主观成分,打分的先后次序直接影响分析结果,使影响因素最佳反

应水平的确定缺乏可靠性。此外,试验过程中易受一些人为因素、试验药品、试验器材等因素的影响,试验偶然性也比较大。因此,在试验过程中,应由固定人员操作,选择同一批试剂和器材,多次重复进行试验,以减少误差。

### 参考文献

- [1] 李克烈,王荣香,陈伟,等. 羽叶南洋参的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(2): 324-325.
- [2] Plunkett G M, Lowry P P, Burke M K. The phylogenetic status of *Polyscias* (Araliaceae) based on nuclear rDNA sequence data[J]. Annals of the Missouri Botanical Garden, 2001, 30(1): 213-230.
- [3] Mitaine-Offer A C, Taqondjou L A, Lontsi D. Constituents isolated from *Polyscias fulva* [J]. Biochemical Systematic and Ecology, 2004, 32(6): 607-610.
- [4] Vo D H, Yamamura S, Ohtani K, et al. Oleanane saponins from *Polyscias fruticosa* [J]. Phytochemistry, 1998, 47(3): 451-457.
- [5] 欧阳泉,周俊辉,陈水渐,等. 几种盆栽植物对甲醛的净化作用[J]. 北方园艺, 2012(22): 57-60.
- [6] 尹斌开,龙相斌,胡庆,等. 圆叶福禄桐组织培养繁殖技术研究[J]. 现代农业科技, 2008(20): 18-19.
- [7] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1999, 20: 176-183.
- [8] 杨兆起. 中药鉴别手册(第3册)[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 1.
- [9] 孙清信,陈坚,张辉,等. 紫云英 ISSR 引物的筛选及 PCR 反应体系的优化[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(5): 870-878.
- [10] 邹喻苹,葛颂,王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [11] Dolye J J, Dolye J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochem Bul, 1987, 9(1): 11-15.
- [12] 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.
- [13] 唐辉,陈宗游,史艳财,等. 正交设计优化地枫皮 ISSR-PCR 反应体系[J]. 中草药, 2013, 44(5): 610-615.
- [14] 王佳,梁国华,陈学好. 正交优化黄芩 ISSR 体系[J]. 分子育种, 2006, 3(4): 439-442.
- [15] 田斌,辛培尧,孙正海,等. 三七 ISSR-PCR 反应体系建立及优化[J]. 云南农业大学学报, 2013, 28(1): 96-101.
- [16] 林万明. PCR 技术操作和应用指南[M]. 北京: 人民军医出版社, 1993.

## Establishment and Optimization of ISSR-PCR Reaction System for *Polyscias*

ZHANG Guo-wu<sup>1</sup>, HUANG Tao<sup>2</sup>, WU Nan-sheng<sup>2</sup>, ZHANG Pei-jian<sup>1</sup>, LIU Xue-feng<sup>1</sup>

(1. Eucalypt Research Centre, State Forestry Administration, Zhanjiang, Guangdong 524022; 2. College of Landscape and Art, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045)

**Abstract:** Use leaves of *Polyscias* as materials, the effect of the five main reaction elements ( $Mg^{2+}$ , *Taq* DNA polymerase, dNTP, DNA template and primer) on *Polyscias* ISSR-PCR were all optimized by combining single factor experiments and orthogonal test method. The results showed that the best ISSR-PCR reaction system of *Polyscias* was 25  $\mu$ L, reaction system concentration: the DNA template 15.00 ng,  $Mg^{2+}$  3.0 mmol/L, *Taq* DNA polymerase 0.5 U, primer 0.6  $\mu$ mol/L, dNTP 0.20 mmol/L. The optimal annealing temperature of ISSR-PCR was 47℃ by gradient PCR. This system could provide theoretical foundation for carrot research on genetic diversity analysis, genetic relationship, etc.

**Key words:** *Polyscias*; ISSR-PCR reaction; gradient PCR; annealing temperature