

茶花品种 ISSR 指纹图谱反应体系建立与优化

胡兴华, 李景剑, 王 燕, 黄仕训

(广西壮族自治区中国科学院 广西植物研究所, 广西 桂林 541006)

摘 要:以 30 个茶花品种为试材, 采用 5 因素 4 水平正交实验以及单因素优化试验方法, 研究 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、引物浓度、*Taq* DNA 聚合酶浓度和模板 DNA 浓度对 ISSR-PCR 指纹图谱条带清晰度的影响, 以进行茶花品种 ISSR-PCR 反应体系优化及引物筛选。结果表明: 茶花品种 ISSR-PCR 最适扩增条件为 25 μ L 反应体系中, Mg^{2+} 3.0 mmol/L、dNTPs 0.2 mmol/L、引物 0.3 mmol/L、*Taq* DNA 聚合酶 0.5 U、模板 DNA 80 ng 以及 52.1℃ 退火温度; 试验从 100 个 ISSR 引物中筛选出 12 个适用引物; 并对 12 个 ISSR 引物的多态性和稳定性进行了检验。

关键词:茶花品种; 分子指纹图谱; ISSR 体系优化; 引物筛选

中图分类号:S 796 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)22-0084-05

茶花 (*Camellia japonica*) 是我国著名的传统名花^[1]。其植株形态优美, 花形艳丽缤纷, 具有很高的观赏和景观生态价值, 被列为国家二级保护植物, 是园林绿化中常用的树种之一^[2]。我国是茶花的发源地, 种质资源十分丰富, 在 1 000 多年的栽培和应用历史过程中, 培育了近千个色彩丰富的茶花品种^[3]。近年来, 外国也陆续进行了茶花品种的杂交与选育, 培育了大量的新品

种, 在国际茶花协会登记的品种就高达万余个^[4]。然而, 在茶花产业的长期发展中, 经过人工选择和自然杂交的茶花发生多种性状变异, 这些变异导致茶花品种的遗传背景模糊化, 部分品种间因地域差异, 在长期的引种过程中品种记录不够全面, 同名异物、同物异名现象普遍存在, 影响了茶花的文化鉴赏、种质交流、研究推广和市场开发^[5-6]。因此, 开展对茶花品种准确的鉴定和分析十分重要。

在前期的分类鉴定工作中, 该课题组利用 SSR 指纹图谱技术对茶花品种进行了分类研究。但是由于 SSR 标记具有较强的物种特异性, 部分从山茶属植物筛选而来的引物在进行茶花品种 SSR-PCR 时出现扩增失败的现象, 这可能是因为长期的选育和杂交已导致一些茶花

第一作者简介:胡兴华(1974-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为植物资源保护利用及动植物关系。E-mail: huxh773@163.com.

责任作者:黄仕训(1966-), 男, 本科, 研究员, 研究方向为珍稀濒危植物资源保护利用。E-mail: hsx@gxib.cn.

基金项目:广西科技攻关资助项目(桂科攻 10100012-4)。

收稿日期:2014-07-21

Study on Floral Characters and Flowering Phenology in *Xanthoceras sorbifolia* Bunge

MA Fang¹, WANG Jun¹, WANG Heng², PENG Li³

(1. College Education for Nationalities, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750002; 2. Ningxia Forest Research Institute, Yinchuan, Ningxia 750004; 3. College of Life Science, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: Flower structure and flowering phenology were investigated by position observation, bagging test of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge in the Yinchuan of Ningxia. The florescence, daily development, premature drop were observed. The results indicated that flowering time of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge was between the last part of April to the earlier part of May, anthesis of individual lasted 5—7 days. Flowering time, however, was shortened to 1—2 days in high temperature and prolonged to 1—2 days in low temperature. Monoecism plant and the two kinds of flowers (fertile and infertile floret) had similar structures of floral organ during the early stage of sex differentiation. They both had stamen and pistil, anthers of fertile were not normal outward appearance, anthers of infertile were normal outward and degradation in pistil. The inflorescence of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge existed flower-drop and fruit-drop seriously. Naturally setting was low, only 1.48%.

Keywords: *Xanthoceras sorbifolia*; flower morphology; flowering; phenophase

品种出现了性状变异,仅靠现有的少数 SSR 引物并不能有效的区分数量众多的茶花品种^[7]。ISSR (Inter simple sequence repeat)是一种简单序列重复间扩增多态性的指纹图谱技术^[8],它的生物学基础仍然是基因组中存在的 SSR,具显性标记特征,呈 Mendel 式遗传,可以在不同物种间通用,是非常理想的分子标记^[9-10],已被应用于凤仙花^[11]、菊花^[12]、荷花^[13]、兰花^[14]、茉莉花^[15]等多种花卉的品种鉴定及遗传多样性分析。尽管 ISSR 有诸多优点,但是它是 PCR 扩增为基础,其反应条件易受多种因素的干扰,不同的扩增条件会产生不同的结果^[16]。因此,对 ISSR 反应体系条件进行优化,建立标准方法是非常必要的。

该研究以部分茶花品种为试验材料,将正交设计方法结合单因素试验探索茶花 ISSR 反应的最佳体系,并筛选适用于茶花品种 ISSR 指纹图谱的引物。以期将来利用该标记技术研究观赏茶花品种的遗传多样性以及构建指纹图谱提供方法参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以茶花“赤丹”、“迷摩萨”、“美国大红”、“状元红”、“白雪塔”、“佛朗哥玫瑰”、“凯蒂”、“杜鹃红山茶”、“台湾粉九曲”、“九头狮子”、“女儿红”、“福建五色茶”、“明镜”、“海绵”、“依兰贝蒂”、“花露珍”、“布鲁克斯玫瑰”、“宫粉”、“酒中花”、“四季金花茶”、“大卡特”、“黄抱”、“桂绿 1 号”、“红露珍”、“南海明珠”、“雪娇”、“红叶贝拉”、“金花茶”、“红花抱茎茶”、“皇冠”等品种为试验材料。所有材料于 2013 年采自广西植物研究所茶花种质园,摘取生长良好的植株幼嫩叶子,用硅胶干燥保存备用。所用引物参照加拿大哥伦比亚大学 UBC 公司 2006 年公布的 ISSR 引物序列,由上海生物化工公司合成,用于 ISSR-PCR 反应的 PCR buffer、Mg²⁺、dNTP、Taq DNA 聚合酶等均购自于上海生物化工公司。

1.2 试验方法

1.2.1 总 DNA 提取与检测 参照改良的 CTAB 法^[17]

提取样品总 DNA。山茶科植物中含有较多的多酚类物质,一般来说干燥保存的叶片多酚类物质已被氧化,因此该试验在 CTAB 抽提液中加入 1%PVP 分离已被氧化的多酚类。用 1%的琼脂糖电泳检测 DNA 质量,用紫外分光光度计检测 DNA 的浓度,并用 ddH₂O 将浓度调整为 30 ng/μL 于-20℃贮存备用。

1.2.2 退火温度的优化 随机抽样 1 个品种(“赤丹”)的 DNA 为试验材料。按通用 PCR 条件对 100 个 ISSR 引物进行筛选,经初步筛选得到适用引物后,选择引物 UBC854 作为此次优化试验的引物,退火温度范围设置 47~60℃,PCR 仪自动生成 8 个梯度温度,分别为 47.0、

47.8、49.6、52.1、55.2、57.8、59.3、60.0℃。

1.2.3 ISSR-PCR 正交实验 ISSR 反应采用 25 μL 的 PCR 反应体系,针对 Mg²⁺、dNTP、引物、Taq 酶和模板 DNA 5 因素 4 水平(表 1),选用 L₁₆(4⁵)正交表设计 PCR 扩增体系各成分的因素-水平正交设计试验表(表 2)。表 2 中共有 16 个处理,每个处理 2 次重复,共 32 管,按表中的数据加样,除表 1 中的因素外,每个反应管内还加 1×PCR Buffer。反应程序为:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,52℃退火 30 s,72℃延伸 2 min,循环 40 次,72℃延伸 7 min,12℃保存。反应结束后,PCR 产物用 1.2%琼脂糖凝胶电泳分离,使用 BIO-RAD 凝胶成像仪进行观察并拍照。

表 1 PCR 反应体系各因素水平

Table 1 The level of each factor for PCR reaction

因素	MgCl ₂ 浓度	dNTP 浓度	引物浓度	Taq 酶单位	DNA 浓度
Factor	/(mmol · L ⁻¹)	/(mmol · L ⁻¹)	/(μmol · L ⁻¹)	/U	/ng
水平	1.0	0.15	0.2	0.5	40
Level	2.0	0.20	0.3	1.0	80
	3.0	0.25	0.4	1.5	120
	4.0	0.30	0.5	2.0	160

表 2 PCR 反应体系正交实验设计[L₁₆(4⁵)]

Table 2 Orthogonal design for PCR [L₁₆(4⁵)]

编号	Mg ²⁺	dNTP	引物	Taq 聚合酶	模板 DNA
No.	/(mmol · L ⁻¹)	/(mmol · L ⁻¹)	/(μmol · L ⁻¹)	/U	/ng
1	1.0	0.15	0.2	0.5	40
2	1.0	0.20	0.3	1.0	80
3	1.0	0.25	0.4	1.5	120
4	1.0	0.30	0.5	2.0	160
5	2.0	0.15	0.3	1.5	160
6	2.0	0.20	0.2	2.0	120
7	2.0	0.25	0.5	0.5	80
8	2.0	0.30	0.4	1.0	40
9	3.0	0.15	0.4	2.0	80
10	3.0	0.20	0.5	1.5	40
11	3.0	0.25	0.2	1.0	160
12	3.0	0.30	0.3	0.5	120
13	4.0	0.15	0.4	0.5	120
14	4.0	0.20	0.3	1.0	160
15	4.0	0.25	0.2	2.0	40
16	4.0	0.30	0.1	1.5	80

1.2.4 单因素试验 根据正交实验结果选择扩增效果最好的组合进行单因素试验,变化单一因素,其它因素不变,每一个条件确定后作为后续研究的一个条件。每因素设置 6 个水平,Mg²⁺ 浓度分别为 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、4.5 mmol/L,dNTP 浓度分别为 0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35 mmol/L,引物浓度分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 μmol/L,Taq DNA 聚合酶浓度分别为 0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 U/25μL,模板 DNA 为 10、40、80、120、160、200 ng。每个水平设 2 次重复。利用经单因素优化后的最优体系,以从 100 个 ISSR 引物中筛选出的适用引物对 30 个茶花品种基因组 DNA 为模板进行

PCR 扩增,电泳检测该体系对不同茶花品种的适用性。

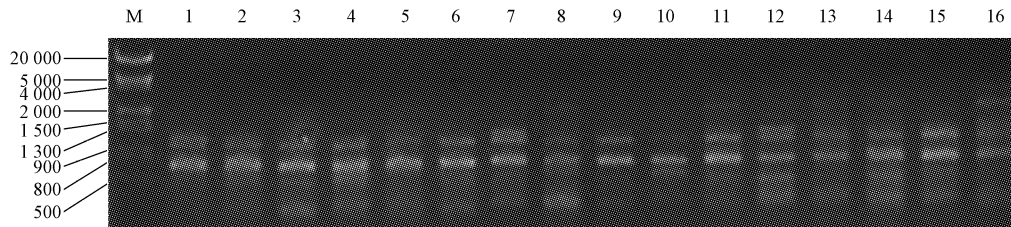
2 结果与分析

2.1 引物退火温度的优化

退火温度对 ISSR-PCR 的结果具有明显影响。引物 UBC854 在 47、47.8、49.6、52.1、55.2、57.8℃ 的退火温度下有多态片段产物出现,但是在温度过低时,条带背景模糊;温度过高时,扩增条带数目少,多态性偏低(图 2a)。退火温度为 47.8、49.6、52.1℃ 时扩增效果基本一致,为提高反应特异性,确定选用 52.1℃ 为引物 UBC854 的最佳退火温度。

2.2 正交组合体系的 PCR 扩增结果

引物 UBC854 在 52℃ 的最适退火温度下,进行不同组合体系的扩增试验。在 16 种组合中,随着 Mg^{2+} 、dNTPs、引物、*Taq* DNA 聚合酶以及模板 DNA 的组成比例改变,ISSR 的扩增结果发生较大变化。由图 1 可知,1、2、5、8、10 和 13 组合的效果较差,条带模糊不清;7、11、12、14 和 16 组合扩增出 3 条及以上的条带,主条带清晰,条带之间容易区分,相对而言,12 号组合的条带清晰度更高(图 1)。综合分析后初步确定选用 12 号组合体系进行下一步优化,即体系中含 Mg^{2+} 3.0 mmol/L, dNTP 0.3 mmol/L,引物 0.3 μ mol/L, *Taq* DNA 聚合酶 0.5 U/25 μ L,模板 DNA 120 ng。



注:编号 1~16 分别表示表 2 中 16 个处理的电泳结果,M 为 Lambda DNA/EcoRI+Hind III Marker。

Note: The serial numbers 1 to 16 show the electrophoresis results of the 16 treatments in table 2. M represent Lambda DNA/EcoRI+Hind III Marker.

图 1 茶花正交优化 ISSR-PCR 反应体系结果

Fig. 1 The optimization results of orthogonal test designed for PCR-ISSR of *Camellia japonica*

2.4 优化体系对引物筛选及 30 个茶花品种的 PCR 扩增试验

以品种“赤丹”为试样,由优化反应体系,即在 25 μ L 体系中含 Mg^{2+} 3.0 mmol/L、dNTP 0.2 mmol/L、引物 0.3 μ mol/L、*Taq* 聚合酶 0.5 U/25 μ L 和模板 DNA 80 ng,对 100 个 ISSR 引物筛选,经退火温度优化调试,可重复性试验,共筛选出 12 个扩增条带数达 6 条以上的,条带清晰、多态性强、可重复性好的引物(表 3)。为验证该试验所筛选出引物的有效性和体系的稳定性,再次用这 12 个引物对 30 个不同的茶花品种进行 ISSR-PCR 扩增,结果显示该优化体系稳定性强,图像背景干净均一,12 个引物扩增的目的条带都清晰可见,多态性条带清楚,依据图谱可以准确进行分型计算,说明该反应体系适用于茶花品种的鉴定及遗传多样性分析(图 3)。

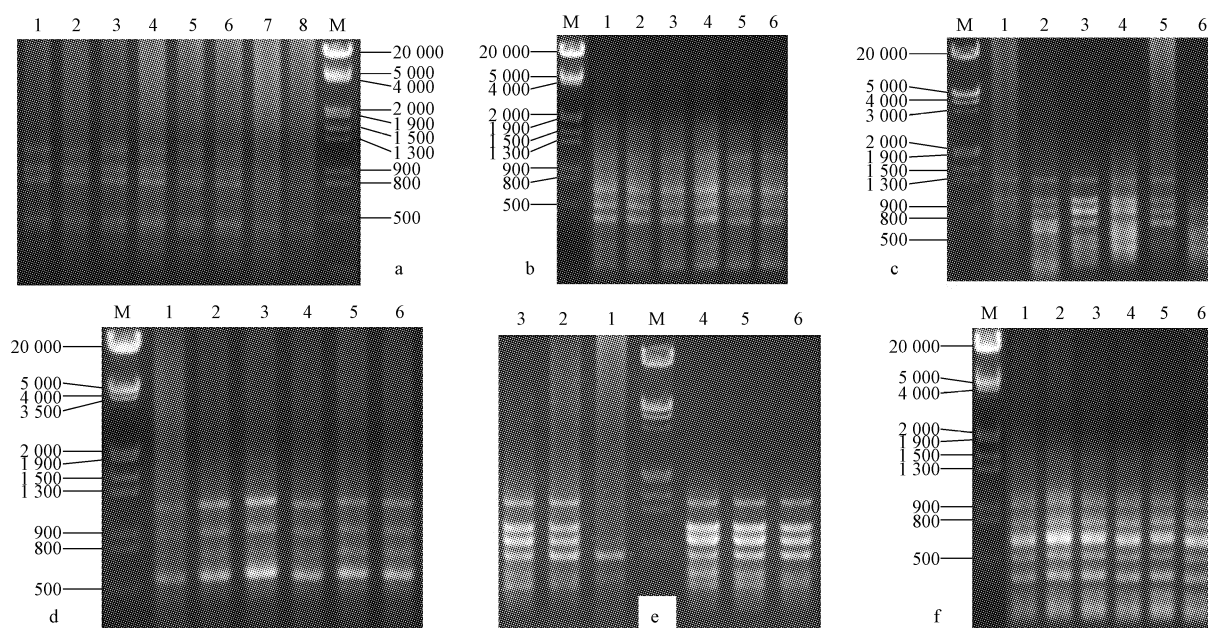
2.3 各单因素对 ISSR-PCR 扩增的影响

在正交优化的基础上,再进一步对 12 号组合进行单因素优化。由于 *Taq* DNA 聚合酶是 Mg^{2+} 依赖性酶,因此在反应体系中 Mg^{2+} 浓度十分重要。扩增条带清晰度随着 Mg^{2+} 浓度的增加呈正比例递增,但是 Mg^{2+} 浓度过高时非特异性条带增强(图 2b),为了保证较好的扩增效果,该试验中 Mg^{2+} 浓度定为 3.0 mmol/L。dNTP 作为 PCR 反应的原料,量太少会降低扩增产物量,过多会对 Mg^{2+} 产生拮抗作用,降低 Mg^{2+} 的浓度,且 dNTP 过多也会引起不必要的浪费,带谱对比显示 dNTP 浓度以 0.2 mmol/L 较为合理(图 2c)。试验采用的 6 个引物浓度梯度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 μ mol/L,综合比较认为 0.3 μ mol/L 比较适合该反应体系(图 2d)。在确定了 Mg^{2+} 、dNTP 和引物浓度之后,设置了 6 个 *Taq* 聚合酶浓度梯度,结果表明,在 25 μ L 反应体系中,加入 0.5~2.5 U 的 *Taq* 聚合酶都可以获得重复清晰的条带(图 2e),综合对比,0.5 U 为最适宜用量。模板 DNA 浓度亦是影响 PCR 扩增的重要因素,相比以上的因素,模板 DNA 适宜浓度范围较大,在试验设置的 6 个浓度梯度中,40、80、120、160、200 ng 用量的扩增图谱都较清晰,多态性较高(图 2f),考虑后续研究尚需大量的模板 DNA,在该试验中选取 80 ng 为最佳 DNA 浓度。

表 3 筛选茶花品种的 12 个引物的扩增带数及退火温度

Table 3 Bands and annealing temperature of 12 primers

引物编号 Primer No.	引物序列(5'~3') Primer sequence(5'~3')	退火温度 Annealing temperature/℃	扩增条带数 Number of bands
UBC 895	AGAGTTGGTAGCTCTTGATC	49.6	9
UBC 892	TAGATCTGATATCTGAATCCC	55.2	9
UBC 891	HVHTGTGTGTGTGTGTG	55.2	6
UBC 879	CTTCACTTCACTTCA	57.8	11
UBC 873	GACAGACAGACAGACA	52.1	9
UBC 854	TCTCTCTCTCTCTCTCRG	52.1	8
UBC 853	TCTCTCTCTCTCTCTCRT	52.1	7
UBC 845	CTCTCTCTCTCTCTCTRG	52.1	7
UBC 836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	49.6	8
UBC 835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	49.6	8
UBC 824	TCTCTCTCTCTCTCTCG	47.0	8
UBC 823	TCTCTCTCTCTCTCTCC	47.0	6

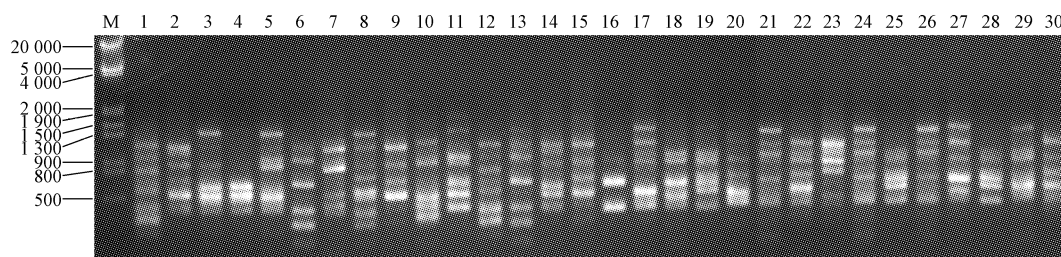


注:a,退火温度;b, Mg^{2+} 浓度;c,dNTP浓度;d,引物浓度;e, Taq DNA聚合酶浓度;f,模板DNA浓度。

Note:a,annealing temperature;b, Mg^{2+} concentration;c,dNTP concentration;d,primer concentration;e, Taq DNA polymerase concentration;f,template DNA concentration.

图2 各单因素试验对 ISSR 反应的影响

Fig. 2 The effect of each factor on ISSR amplification by single factor experimental way



注:M为 Lambda DNA/EcoRI+Hind III Marker,1~30 为 30 个茶花品种样品

Note:M represent Lambda DNA/EcoRI+Hind III Marker,the serial numbers 1 to 30 show the 30 *Camellia* cultivars,respectively.

图3 UBC824 对 30 个茶花品种的 ISSR 扩增结果

Fig. 3 ISSR amplified results of primer UBC824

3 讨论

通过对比前期的茶花品种 SSR 引物筛选试验发现^[7],虽然 SSR 标记技术能够区分物种的显性纯合基因型和杂合基因型,试验结果更加可靠,但是由于茶花品种数量众多,且不同品种之间的多次杂交等原因已导致现有的部分山茶属植物的 SSR 引物不能用于全部的茶花品种鉴定。因此,唯有通过筛选物种通用性较好的 ISSR 引物来开展茶花品种指纹图谱研究。目前 ISSR 分子标记技术广泛应用于各种植物资源的品种鉴定和遗传多样性研究,但是它是基于 PCR 反应为基础,其扩增效率和质量受反应体系中多个因素的影响,ISSR 标记在应用于不同物种的分子指纹图谱分析时,ISSR-PCR 反应体系都需要重新进行优化,以确定获得清晰图谱的

最优反应条件。PCR 反应条件优化可采用简单的单因素梯度试验和多因素正交实验 2 种方法,前者是通过单纯的单因素变化来对每个因素的最佳水平进行摸索而获得优化体系,但是该方法并不能兼顾到各因素间的交互作用;后者能够迅速获得满意的试验结果,但亦存在一定的局限性,如对试验结果本身优劣的判断依据带有主观上的成分,不能很好地估计试验误差,说明各个试验条件之间的相互作用等^[19]。此外,就遗传多样性分析而言,其结果具有一定的不稳定性,这与相关 PCR 反应的不稳定有关^[20]。

该研究将正交设计方法结合单因素优化试验应用到茶花品种 ISSR-PCR 反应系统的优化中,利用正交设计对茶花品种 ISSR-PCR 反应的 5 因素(Mg^{2+} 、dNTP、

引物、*Taq* 酶和模板 DNA) 在 4 水平上进行的优化。在正交的最优组合的条件基础上,再对各单因素进行优化,使分析结果相对以往的 PCR 反应优化更科学、完善。随后,以该优化体系对 100 个 ISSR 引物筛选,并以 30 个茶花品种为试材,对筛选的引物及该体系的稳定性进行测试。结果显示,优化的体系筛选获得了 12 个适用引物,以多个品种的基因组 DNA 为模板对这些引物进行扩增后均获得清晰的图谱,图谱质量完全达到了品种资源的鉴定和遗传多样性分析等研究的要求。这一优化体系为以后大量开展茶花品种 ISSR 指纹图谱研究提供可借鉴的价值。

参考文献

- [1] 张宏达,任善湘. 中国植物志[M]. 49 卷,3 分册. 北京:科学出版社,1998:53-91.
- [2] 高继银,陈绍山,徐碧玉. 世界名贵茶花[M]. 杭州:浙江科学技术出版社,1998.
- [3] 刘福平. 茶花育种研究现状与趋势[J]. 广西农业科学,2008,39(6):815-819.
- [4] 高继银,Clifford R P,杜月强. 山茶属植物主要原种彩色图集[M]. 杭州:浙江科学技术出版社,2005.
- [5] 王晓锋,陈根金,郑红玉,等. 基于 DNA 分子标记技术研究的 10 个特色茶花品种遗传差异分析[J]. 中国农学通报,2009,25(19):182-185.
- [6] 黄宗兴,林立,倪穗,等. 4 组形态相似川茶花品种的分子鉴别[J]. 福建林业科技,2012,39(2):79-83.
- [7] 胡兴华,王燕,邹伶俐,等. 茶花品种 SSR 指纹图谱分型技术反应体系优化[J]. 中国农学通报,2013,29(1):127-131.
- [8] Ziet K E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20:176-183.
- [9] Tsumura Y, Ohba K, Sorauss S H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*) [J]. Theor Appl Genet, 1996, 92:40-45.
- [10] Fang D Q, Roose M L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers[J]. Theor Appl Genet, 1997, 95:408-471.
- [11] 李祥军,唐文秀,黄仕训. 桂林大旗瓣凤仙花遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 广东农业科学,2013(13):142-144.
- [12] 雒新艳,王晨,戴思兰,等. 基于 ISSR 标记的大菊品种资源遗传多样性分析[J]. 中国农业科学,2013,46(11):2394-2402.
- [13] 刘艺平,李创,李娜,等. 荷花遗传多样性的 ISSR 标记分析[J]. 西北农林科技大学学报,2013,41(4):139-146.
- [14] 卢家仕,卜朝阳,吕维莉,等. 20 份兰科植物的 ISSR 遗传多样性分析[J]. 西南农业学报,2012,25(6):2252-2257.
- [15] 邱长玉,高国庆,陈伯伦,等. 茉莉花 ISSR-PCR 反应体系的建立[J]. 北方园艺,2008(2):214-217.
- [16] 谢运海,夏德安,姜静,等. 利用正交设计优化水曲柳 ISSR-PCR 反应体系[J]. 分子植物育种,2005,3(3):445-450.
- [17] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochemical Bulletin, 1987, 19:11-15.
- [19] 何桥,梁国鲁,谢江辉. 莲雾 ISSR 反应体系的优化与应用[J]. 果树学报,2005,22(2):186-189.
- [20] Dieffenbach C W, Dveksler G S. PCR primer: A Laboratory Manual [M]. Beijing: Science Press, 2002:140-141.

Reaction System Optimization and Primer Screening of ISSR Fingerprint Map for *Camellia* Cultivars

HU Xing-hua, LI Jing-jian, WANG Yan, HUANG Shi-xun

(Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin, Guangxi 541006)

Abstract: Taking 30 *Camellia* cultivars as test materials, the effects of concentrations of Mg^{2+} , dNTP, Primers, *Taq* DNA polymerase, template DNA, and the annealing temperature for primers on the ISSR-PCR molecular fingerprint map were examined by orthogonal design test and single factor modified. The results showed that the optimal ISSR-PCR conditions in the experiments were as following: in 25 μ L reaction system containing Mg^{2+} 3.0 mmol/L, dNTPs 0.2 mmol/L, primers 0.3 mmol/L, *Taq* DNA polymerase 0.5 U, template DNA 80 ng and annealing temperature 52.1°C. Base on this optimal reaction system, 100 ISSR primers were used to screen for the suitable primers with 1 cultivar samples, of which 12 ISSR primers with high resolution and multiple polymorphic bands were screened. Further amplification of 30 *Camellia japonica* cultivars using these 12 primers demonstrated that this optimized reaction system had specialties of good repeatability and stability.

Keywords: *Camellia* cultivar; molecular fingerprint map; ISSR reaction system optimizing; primer screening