

石榴 ISSR-PCR 反应体系的正交设计优化

赵丽华^{1,2}

(1. 西昌学院 农业科学学院 四川 西昌 615013; 2. 西南大学 园艺园林学院, 重庆市花卉工程技术研究中心, 重庆 400715)

摘要: 现利用正交设计 $L_{16}(4^5)$ 探讨 DNA 模板、 Mg^{2+} 、dNTPs、引物、*Taq* DNA 聚合酶对石榴 ISSR-PCR 反应体系的影响, 首次应用加权平均法及百分制对正交实验结果进行评分, 并应用 DPS 数据处理系统进行数据分析; 同时对石榴 ISSR-PCR 最佳反应体系进行退火温度梯度试验。结果表明: 适合石榴的 ISSR-PCR 最优反应体系 (25 μ L) 为: Mg^{2+} 1.75 mmol/L、dNTPs 0.15 mmol/L、*Taq* DNA 聚合酶 1 U、引物 0.8 mmol/L、DNA 模板 20 ng; 引物 UBC 811 的最适退火温度为 51.2℃, 且最适退火温度因引物而异。

关键词: 石榴; 正交设计; ISSR; 反应体系; 优化

中图分类号: S 665.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)19-0148-05

石榴 (*Punica granatum* L.) 是落叶灌木或小乔木, 目前运用 ISSR 分子标记对石榴进行研究鲜有报道。ISSR (Inter-simple Sequence Repeat) 是一种利用在重复

序列 3' 或 5' 端加 1~4 个随机核苷酸为引物, 对基因组 DNA 进行扩增的分子标记, 具有无需预知基因组背景信息、操作简单、多态性高、重复性好、信息量大、DNA 样品用量少和成本低等优点^[1]。但 ISSR-PCR 反应体系往往受到 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、引物、DNA 模板用量以及退火温度的影响^[2], 且不同物种对反应条件的要求也存在一定的差异^[3], 为了获得多态性高、稳定可靠的试验结果, 应对这些因素进行优化, 选择适宜的退火温度。正交实验具有均衡分散、综合可比及效应明确等特性, 既减小了试验规模, 又使信息损失少, 克服了

作者简介: 赵丽华 (1972-), 女, 在读博士, 副教授, 现从事园艺植物生物技术及遗传育种研究和教学工作。E-mail: 1973zlh@163.com.

基金项目: 四川省教育厅科研基金资助项目 (08zc014); 西昌学院科研课题资助项目 (YJSA0615)。

收稿日期: 2010-06-10

[9] Cachi A M, Wunsch A. Bulk segregant analysis for the identification of molecular markers linked to self-compatibility in 'Cristobalina' sweet cherry [J]. *Acta Horticulturae* 2009, 814(1): 395-400.

[10] 王永康, 田建保, 王永勤等. 枣树品种品系的 AFLP 分析 [J]. *果树学报* 2007, 24(2): 146-150.

[11] Kichen L, Tifi-Farah N, Marmakchi M, et al. Variability, organization and identification of Tunisian apricot (*Prunus armeniaca* L.) using AFLP markers [J]. *Acta Horticulturae* 2006, 717: 251-254.

[12] 赵翀, 刘法央, 郭玉露等. AFLP 荧光标记和银染技术的比较分析 [J]. *甘肃农业大学学报*, 2007, 42(2): 125-129.

Extraction of DNA and Establishment of Fluorescent-AFLP Techniques in Leaves of Apricot

ZHANG Jun-huan, SUN Hao-yuan, YANG Li, WANG Yu-zhu

(Institute of Pology and Forestry, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100093)

Abstract: The high quality DNA required for construction of AFLP analysis system was isolated with an improved method of CTAB from young leaves of apricot. A fluorescent-AFLP reaction system was constructed for genetic analysis of apricot by optimizing DNA restriction-ligase reaction, pre-amplification and selective amplification. The clear and stable amplification patterns could be obtained from 12 pairs primer combinations with good polymorphism, which were selected from 64 pairs AFLP primer combinations. These results might provide a method based on the fluorescent-AFLP system for the further study in the field of molecular marker in cultivar identification, genetic diversity and genetic relationship in apricot.

Key words: apricot; extraction of DNA; fluorescent-AFLP

单因素试验顾此失彼、试验规模巨大的缺点,从而最快找到最优水平组合,并可分析各因素的主次顺序,为进一步试验明确方向^[4]。该研究旨在应用正交设计探讨石榴 ISSR-PCR 体系中 5 种因素对扩增结果的影响,为石榴资源进行 ISSR 分子标记提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2009 年 4 月于云南蒙自县石榴研究所石榴品种资源圃采集试验材料,陕西‘墨石榴’、山东‘红牡丹’、安徽‘水粉皮’、云南‘火炮石榴’、河南‘天红蜜’每个品种选取 30~50 片健壮、无病虫害的嫩叶,用冰壶带回实验室,置于 4℃冰箱中保存。

试验所用 ISSR 引物参照加拿大哥伦比亚大学(UBC)所设计的引物,由上海英骏公司合成。MgCl₂、Taq DNA 聚合酶、dNTPs 购自 TaKaRa 公司。Marker 为 DL 2000 为博日科技有限公司生产。乙二醇四乙酸二钠(EDTA)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、氯化钠、无水乙醇、硼砂、氯仿、异戊醇、β-巯基乙醇等试剂为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 石榴基因组 DNA 提取及检测 采用改良 CTAB

法从石榴幼叶中提取基因组 DNA,具体操作参见赵丽华^[5]等方法,并稍加改进,即在 CTAB 裂解液中加入硼砂终浓度为 0.015 mol/L,65℃水浴 1 h。0.8% (含 0.1% GV)琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度,核酸蛋白分析仪测定 DNA 含量及质量,最后稀释为 50 ng/μL 工作液,放入-20℃冰箱里备用。

1.2.2 ISSR-PCR 反应体系正交实验 根据预试验结果,以 UBC 814 为引物,对 ISSR-PCR 反应产生影响的 Mg²⁺、dNTPs、Taq DNA 聚合酶、引物、DNA 模板浓度进行五因素四水平正交实验设计(表 1),按表 1 编号加样后,每管加入 2.5 μL 的 10× PCR buffer,加 ddH₂O 补足 25 μL,在 Eppendorf PCR 仪上进行扩增,每个处理重复 1 次。参照戴正^[6]、邱长玉^[3]、林玲^[7]等 ISSR-PCR 反应程序,设定扩增程序为:94℃预变性 4 min;94℃变性 45 s,退火 1 min,72℃延伸 2 min,40 个循环;72℃延伸 10 min,4℃保存。采用 2%琼脂糖凝胶电泳(含 0.1% GV)分离 PCR 扩增产物,电压为 2 V/cm,电泳 1.5 h,用紫外与可见分析装置观察并拍照记录。采用加权平均法分别对 2 次 PCR 产物电泳图进行评分:扩增谱带数权数为 5、谱带亮度权数为 2、弥散程度权数为 2、引物二聚

表 1		ISSR-PCR 反应体系正交实验设计 L ₁₆ (4 ⁵) 及评分结果					
编号	Mg ²⁺	dNTPs	引物	DNA 模板	Taq DNA	评分	
	/mmol ° L ⁻¹	/mmol ° L ⁻¹	/μmol ° L ⁻¹	/ng	聚合酶/ U	1	2
1	1.00	0.10	0.50	5	1.00	70.60	68.3
2	1.00	0.15	0.60	10	1.50	71.42	70.17
3	1.00	0.20	0.70	20	1.75	70.92	70.13
4	1.00	0.25	0.80	40	2.00	67.60	66.90
5	1.50	0.10	0.60	20	2.00	74.20	73.74
6	1.50	0.15	0.50	40	1.75	79.02	78.62
7	1.50	0.20	0.80	5	1.50	69.42	68.30
8	1.50	0.25	0.70	10	1.00	69.24	68.28
9	1.75	0.10	0.70	40	1.50	71.94	70.88
10	1.75	0.15	0.80	20	1.00	94.00	93.02
11	1.75	0.20	0.50	10	2.00	80.52	79.99
12	1.75	0.25	0.60	5	1.75	76.92	77.01
13	2.00	0.10	0.80	10	1.75	84.70	84.32
14	2.00	0.15	0.70	5	2.00	82.52	81.97
15	2.00	0.20	0.60	40	1.00	91.02	90.90
16	2.00	0.25	0.50	20	1.50	80.38	80.26
CK	1	0.10	0.50	0	1.00	/	/

体权数为 1,各项满分为 100 分,计算各处理的得分。

1.2.3 退火温度筛选 根据正交实验结果,选取最佳组合的 PCR 体系进行温度梯度试验。根据公式 $Tm=4(G+C)+2(A+T)$ 计算引物 UBC 811 理论退火温度为 52℃,设置中心温度为 52℃,G=4, Eppendorf Mastercycler Gradient PCR 仪自动设定 12 个温度梯度为:48.1、48.2、48.6、49.3、50.2、51.2、52.3、53.4、54.5、55.3、56、56.4℃,重复 1 次温度梯度试验。反应程序、电泳检测、试验结果评分与 PCR 正交实验相同。

1.2.4 ISSR-PCR 反应体系稳定性检测 根据正交实验及温度梯度试验结果筛选出最佳体系及温度,采用不同引物对所提 5 个石榴品种 DNA 进行 ISSR-PCR 扩增,2%琼脂糖凝胶电泳(含 0.1% GV)分离 PCR 扩增产物,检测反应体系稳定性。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取

由琼脂糖凝胶电泳检测所提 DNA 结果显示(图 1),石榴基因组 DNA 略小于 23 kb,点样孔干净,DNA 主带

清晰,无弥散现象;由核酸蛋白仪检测结果显示:石榴叶片 DNA 产量在 137.12~218.33 $\mu\text{g/g}$ 之间, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值在 1.772~1.864 之间,结果表明,用改良 CTAB 法从石榴叶片中提取到了高质量、高产率的基因组 DNA。

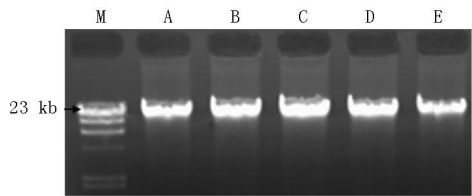


图 1 石榴基因组 DNA 电泳图

注: M 为 λ -HindIII A 为墨石榴; B 为水粉皮; C 为红牡丹; D 为火石榴; E 为天红蜜。

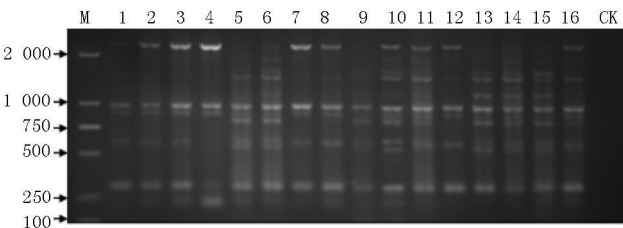


图 2 正交实验 PCR 产物电泳图(引物 UBC 814)

注 1~16 为表 1 的处理组合编号; M 为 DL2 000; CK 为对照。

2.2 ISSR-PCR 反应体系正交实验

2.2.1 各因素对 PCR 反应影响的差异 采用加权平均法对正交实验 PCR 产物电泳图(图 2)进行评分后计入表 1,从图 2 可知,16 个处理组合都有 PCR 产物,但由于 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、引物及 DNA 模板五因素的不同浓度组合,扩增效果存在着明显差异。1、2、3、4 可能是 Mg^{2+} 浓度偏低,不能激发 *Taq* DNA 聚合酶的活性,导致反应不充分,条带数较少,组合 7、8、12、16 的 Mg^{2+} 浓度虽然有一定提高,但过高的 dNTPs 浓度降低了 Mg^{2+} 的有效浓度,进而 *Taq* DNA 聚合酶的活性不能激发,导致反应不充分,条带数较少,因此这 8 个组合分值均低;组合 5、6、11 和 14 扩增出较多的谱带,但弥散程度重,可能是 *Taq* DNA 聚合酶浓度较高,反应特异性降低,出现非特异性扩增,条带虽多,但背景模糊,因此这 4 个组合分值较低;组合 9 和 13 可能是 Mg^{2+} 浓度、引物、*Taq* DNA 聚合酶浓度都相应提高,能扩增出较多谱带,但背景轻微弥散,因此这 2 个组合分值较高;组合 10 和 15 可能是 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶浓度都得以提高,且各组分比例适当,使 PCR 反应较充分,谱带数最多,但组合 15 的 Mg^{2+} 、DNA 浓度高于组合 10,引起非特异性扩增,导致背景呈轻微弥散状,因此组合 10 分值最高,其次组合 15。所有组合均无引物二聚体产生。对重复处理 PCR 电泳结果评分计入表 1,其结果与第 1 次 PCR 扩增结果高度一致性。将正交设计的 16 个处理评

分结果用 DPS 数据处理系统进行方差分析(表 2),由 *F* 值可知,各因素水平变化对 PCR 反应影响大小依次为: Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、引物和 DNA 模板,且都达到极显著水平。同时对正交实验的 16 个处理评分结果进行极差分析(表 2),*R* 值大小依次是: Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、引物浓度、DNA 模板,这与方差分析结果一致。

表 2 正交实验结果方差及极差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	显著水平	<i>R</i> 值
Mg^{2+}	1 153.6839	3	384.5613	920.9050	0.0001	15.0037
dNTPs	298.4140	3	99.4713	238.2030	0.0001	8.0187
引物	142.1046	3	47.3682	113.4321	0.0001	5.2975
DNA 模板	113.6453	3	37.8818	90.7150	0.0001	5.2012
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	257.4750	3	85.8250	205.5242	0.0001	7.8237
误差	6.6815	16	0.4176			
总和	1 972.0043	31				

2.2.2 各因素不同水平间多重比较 由于所检测的 5 个因素不同水平间的差异都达到了极显著水平,因此对每个因素的不同水平间进行多重比较(表 3)。表 3 结果显示,随着 Mg^{2+} 浓度从 1.00~1.75 mmol/L,扩增结果均值增大,增加到 2.0 mmol/L 时,反而呈下降趋势, Mg^{2+} 浓度在 1.75 mmol/L 时,均值最高,且与其它 3 个水平之间差异均达到极显著水平,随着 dNTPs 浓度从 0.10~0.15 mmol/L,扩增结果均值增大,增加到 0.20 mmol/L 时,反而呈下降趋势, dNTPs 浓度在 0.15 mmol/L 时,均值最高,且与其它 3 个水平之间的差异均达到极显著水平,随着 *Taq* DNA 聚合酶浓度从 1~1.5 U,均值具有下降趋势,1.5~1.75 U 时,均值上升,继续增加酶量,均值下降, *Taq* DNA 聚合酶浓度为 1 U 时,均值最高,且与其它 3 个水平之间的差异均达到极显著水平;引物浓度为 0.80 与 0.60 $\mu\text{mol/L}$ 之间没有显著差异,但都与另 2 个水平的差异均达到极显著水平;随着 DNA 模板浓度增大,扩增结果均值增大,当浓度为 40 ng 时,均值下降, DNA 浓度为 20 ng 时,均值最高,且与其它 3 个水平之间差异均达极显著水平。

2.3 退火温度对反应体系的影响

引物的退火温度极大地影响着 ISSR-PCR 反应结果,确定一个合适的退火温度非常必要。引物 UBC 811 温度梯度 PCR 电泳结果(图 3)显示,当退火温度为 48.1~48.6 $^{\circ}\text{C}$ 时有 8 条带,弥散程度较严重;当退火温度为 49.3~51.2 $^{\circ}\text{C}$ 时有 10 条带,亮度逐渐加强,弥散程度较轻;当退火温度为 52.3~56.4 $^{\circ}\text{C}$ 时,弥散程度最轻,但仅有 6~8 条带。采用加权平均法对各温度 PCR 产物评分,分值依次为: 68.00、73.09、73.40、84.28、86.03、87.76、82.74、74.52、71.63、70.88、70.47、70.46;重复温度梯度试验分值依次为: 64.37、71.20、71.97、80.15、82.62、83.01、79.42、70.32、68.74、67.94、67.92。2 次结果高度一致,根据评分高低,选取分值最高的 51.2 $^{\circ}\text{C}$ 为引物 UBC

811 最佳退火温度, 与计算出的理论退火温度基本一致。引物不同, 退火温度不同, 该试验对石榴 ISSR-PCR 体系中部分引物的退火温度进行了筛选(表 4)。

表 3 各因素水平间方差分析				
变异来源	水平	均值	显著水平 <i>P</i>	
			5%	1%
Mg^{2+} /mmol · L ⁻¹	1. 75	84. 5088	a	A
	2. 00	80. 5350	b	B
	1. 50	72. 6025	c	C
	1. 00	69. 5050	d	D
dNTPs /mmol · L ⁻¹	0. 15	81. 3425	a	A
	0. 20	77. 6500	b	B
	0. 10	74. 8350	c	C
	0. 25	73. 3238	d	D
引物 /μmol · L ⁻¹	0. 80	78. 5325	a	A
	0. 60	78. 1725	a	A
	0. 50	77. 2113	b	B
	0. 70	73. 2350	c	C
DNA 模板/ng	20	79. 5813	a	A
	40	77. 1100	b	B
	10	76. 0800	c	C
	5	74. 3800	d	D
<i>Taq</i> DNA 聚合酶 / U	1. 00	80. 6700	a	A
	1. 75	77. 7050	b	B
	2. 00	75. 9300	c	C
	1. 50	72. 8463	d	D

表 4 引物序列和最佳退火温度			
引物	序列 5'→3'	<i>T_m</i> 值/℃	退火温度/℃
UBC 809	(AG) ₈ G	52. 0	56. 0
UBC 811	(GA) ₈ G	52. 0	51. 2
UBC 814	(CT) ₈ A	50. 0	51. 4
UBC 818	(CA) ₈ G	52. 0	49. 7
UBC 819	(GT) ₈ A	50. 0	54. 4
UBC 821	(CA) ₈ T	50. 0	49. 3
UBC 840	(GA) ₈ YT	54. 0	55. 3
UBC 841	(AG) ₈ YC	56. 0	58. 0
UBC 845	(CT) ₈ RG	54. 0	51. 3
UBC 846	(CA) ₈ RT	52. 0	51. 7
UBC 854	(TC) ₈ RG	54. 0	50. 2
UBC 856	(AC) ₈ YA	54. 0	56. 5
UBC 868	(GAA) ₅	40. 0	38. 1
UBC 879	(CTTCA) ₃	42. 0	43. 0
UBC 899	CATGGTGGTGGTCATTGTCCA	64. 0	58. 0
UBC 900	ACTTCCACAGGTTAACACA	62. 0	54. 2

注 其中 R 为 A 或 G, Y 为 C 或 T。

2. 4 ISSR-PCR 反应体系稳定性

选用 UBC 900 引物对所提 5 个石榴品种 DNA 用优化后 ISSR-PCR 体系及 51. 2℃的退火温度进行扩增 电泳结果显示(图 4), 扩增背景没有弥散, 谱带清晰, 多样性丰富, 表明该研究建立的石榴 ISSR-PCR 反应体系稳定可靠。

3 讨论

ISSR-PCR 反应体系中的 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、引物、DNA 模板是一个有机的整体, 都会影响 PCR 产物的质和量。通过对该正交实验结果进行方差

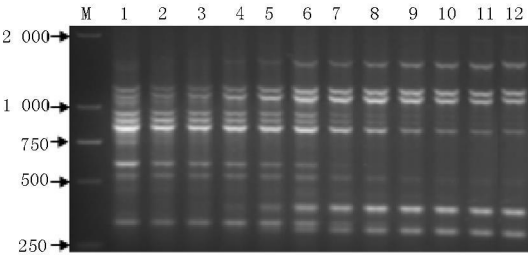


图 3 温度梯度 PCR 电泳图(UBC 811)

注 M 为 DL 2000; 1~12 退火温度依次为 48. 1、48. 2、48. 6、49. 3、50. 2、51. 2、52. 3、53. 4、54. 5、55. 3、56. 5、64℃。

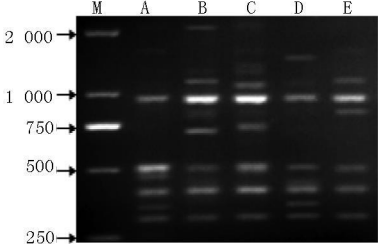


图 4 UBC 900 对 5 个石榴品种的 ISSR-PCR 扩增结果

注 M 为 DL 2000; A 为墨石榴 B 为水粉皮; C 为红牡丹; D 为火炮石榴 E 为天红蜜。

分析和极差分析, 都显示 Mg^{2+} 浓度是影响 PCR 的最重要因素 与汪结明^[8]、付燕^[9] 等研究结果一致, 因为 Mg^{2+} 是 *Taq* DNA 聚合酶的激活剂, 其有效浓度决定 *Taq* DNA 聚合酶活性强弱, 并且它还引物退火、模板与 PCR 产物的变性温度等有影响^[10]; dNTPs 浓度是影响 PCR 的次要因素, 因为 dNTPs 不仅是 PCR 的原料, 而且 dNTPs 分子中的磷酸基团能与 Mg^{2+} 结合, 使反应中的 Mg^{2+} 有效浓度下降, 进而影响 *Taq* DNA 聚合酶的活力; *Taq* DNA 聚合酶的活性与用量是关系到扩增能否正常进行的重要因子, 用量少会使扩增的条带变弱, 用量过多会产生非特异性扩增 并随着酶用量的增加甘油含量随之增加, 而抑制 PCR 反应; 引物浓度的变化实质上是改变了引物与模板配对几率, 从而影响扩增效果; DNA 模板是 PCR 反应中影响最小的因素, 但其浓度过高出现非特异性扩增, 浓度过低, 则无扩增产物或产物不稳定, 且因子内 4 个水平之间的差异达极显著, 与李宗菊^[11]、潘丽梅^[12] 等试验结果一致, 因此, DNA 模板虽然影响最小, 但也应进行浓度优化。目前很多研究者^[13-19] 都应用正交设计对 ISSR-PCR 体系进行优化, Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、引物、DNA 模板在各试验中对 ISSR-PCR 体系影响的大小有一定的差异, 这可能是由于用于试验的物种不同, 对体系中各因素的敏感程度也不同的原因。

退火温度对 ISSR-PCR 扩增产物质与量也有明显

的影响, 较低的温度在保证引物与模板结合稳定的同时, 也会产生一定的错误扩增, 较高的退火温度, 增强了引物与模板的选择性, 抑制非特异扩增, 但条带数少^[20], 因此在选择退火温度时应综合考虑 PCR 产物的条带数、谱带亮度、弥散程度、引物二聚体, 选出效果最佳的退火温度。有的引物有较宽的温度适应范围时, 应选高的温度作为退火温度。

4 结论

在该研究中, 对影响石榴 ISSR-PCR 反应的 5 个因素在 4 个水平上进行了正交实验, 克服了单因素试验顾此失彼、试验规模巨大的缺点; 并首次利用加权平均法及百分制对扩增产物进行评分, 对试验结果进行了量化, 克服直观分析的主观性, 使试验结果的分析更为客观和科学; 采用 DPS 数据处理系统分析各因素及各因素不同水平对反应结果影响的内在规律性, 筛选出石榴 ISSR-PCR 25 μ L 的最优反应体系为: Mg^{2+} 1.75 mmol/L、dNTPs 0.15 mmol/L、*Taq* DNA 聚合酶 1 U、引物 0.6 mmol/L、DNA 模板 40 ng。该研究建立的石榴 ISSR-PCR 反应体系稳定可靠, 对石榴种质资源的筛选及多样性评价具有重要的参考意义。

参考文献

- [1] 周延清. 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, 2005: 7-125.
- [2] XIE J H, YANG X H, LIN S Q. Analysis of genetic relationship among Eriobotrya Germplasm in China using ISSR markers[J]. Acta Horticulturae, 2007, 750: 203-208.
- [3] 邱长玉, 高国庆, 陈伯伦. 茉莉花 ISSR-PCR 反应体系的建立[J]. 北方园艺, 2008(2): 214-217.
- [4] 周凌瑜, 吴晨伟, 唐东芹. 利用正交设计优化小苍兰 ISSR-PCR 反应体系[J]. 植物研究, 2008, 28(4): 402-407.

- [5] 赵丽华, 王先磊. 成熟石榴叶片 DNA 提取方法研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(31): 15141-15145.
- [6] 戴正, 陈力耕, 童品璋. 香榧品种遗传变异与品种鉴定的 ISSR 分析[J]. 园艺学报, 2008, 35(8): 1125-1130.
- [7] 林玲, 汤浩茹, 刘燕. 观赏桃 ISSR-PCR 反应体系的优化[J]. 生物技术通报, 2009(12): 72-75.
- [8] 汪结明, 项艳, 吴大强. 杨树 ISSR 反应体系的建立及正交设计优化[J]. 核农学报, 2007, 21(5): 470-473.
- [9] 付燕, 罗楠, 杨岑. 枇杷属植物 ISSR 反应体系的建立和优化[J]. 果树学报, 2009, 26(2): 180-185.
- [10] Tsumura Y, Ohba K, Strauss S H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Glyptomeria japonica*) [J]. Theor Appl Genet, 1996, 92: 40-45.
- [11] 李宗菊, 熊丽, 桂敏. 非洲菊基因组 DNA 提取及 ISSR-PCR 扩增模板浓度优化[J]. 云南植物研究, 2004, 26(4): 439-444.
- [12] 潘丽梅, 朱建华, 秦献泉. 龙荔基因组 DNA 的提取及 ISSR-PCR 体系的建立与优化[J]. 西南农业学报, 2009, 22(1): 145-149.
- [13] 欧文军, 李开绵, 王文泉. 小桐子基因组 DNA 的提取及 ISSR-PCR 反应体系的优化[J]. 中国农学通报, 2008, 24(5): 409-413.
- [14] 戴正, 陈力耕, 童品璋. 香榧品种遗传变异与品种鉴定的 ISSR 分析[J]. 园艺学报, 2008, 35(8): 1125-1130.
- [15] 谢运海, 夏德安, 姜静. 利用正交设计优化曲柳 ISSR-PCR 反应体系[J]. 分子植物育种, 2005, 3(3): 445-450.
- [16] 魏鑫, 魏永祥, 王颖. 平欧杂种榛 ISSR 反应体系的优化与验证[J]. 北方园艺, 2010(4): 125-128.
- [17] 彭海, 张静, 张路帆. 对长豇豆品种 ISSR 反应体系中 4 种关键成分的优化[J]. 北方园艺, 2007(12): 186-188.
- [18] 冒维维, 马骏, 薄天岳. 正交设计优化菜薹 ISSR 反应体系研究[J]. 分子植物育种, 2006, 6(4): 137-141.
- [19] 陈露, 张雨, 陆斌. 云南三台核桃 ISSR 体系优化[J]. 北方园艺, 2010(4): 20-22.
- [20] 施维属, 潘腾飞, 钟凤林. 柑橘基因组 DNA 快速提取及 ISSR-PCR 扩增体系优化[J]. 生物技术通报, 2009(10): 109-113.

Optimization of ISSR-PCR Reaction System for Pomegranate in Orthogonal Design

ZHAO Li-hua^{1,2}

(1. Agricultural Sciences Institute, Xichang College, Xichang Sichuan 615013; 2. College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Flower Engineering Technology Research Center, Chongqing 400715)

Abstract: The optimize ISSR-PCR reaction system of pomegranate was studied, the orthogonal design $L_{16}(4^5)$ was used to optimize 5 factors *Taq* DNA polymerase, Mg^{2+} , DNA template, dNTPs and primer of ISSR-PCR amplification system for pomegranate, the weighted average method and hundred mark system are used to evaluate the results of the orthogonal scoring, the DPS data processing systems was used data analysis; And then do annealing temperature gradient test to optimize ISSR-PCR reaction system. The results showed that the best ISSR-PCR reaction system (25 μ L) for pomegranate was Mg^{2+} 1.75 mmol/L, dNTPs 0.15 mmol/L, *Taq* DNA polymerase 1 U, DNA template 20 ng and primer 0.8 mmol/L; the best annealing temperature for primer UBC 811 was 51.2 $^{\circ}C$, it was found that different primers had different annealing temperature

Key words: pomegranate; orthogonal design; ISSR; reaction system; optimization