

# 古樟 ISSR 扩增条件的优化

黄 萌<sup>1,2</sup>, 陈尚钊<sup>1,2</sup>, 杨光耀<sup>1,2</sup>, 王宗德<sup>1,2</sup>, 季春峰<sup>1,2</sup>

(1. 江西农业大学 园林与艺术学院, 江西 南昌 330045; 2. 江西农业大学, 江西省竹子种质与利用重点实验室, 江西 南昌 330045)

**摘 要:**采用改良 CTAB 法提取古樟叶片基因组 DNA。利用单因素试验设计, 对反应体系中退火温度、模板 DNA 含量、 $Mg^{2+}$  浓度、dNTP 浓度、引物浓度、*Taq* DNA 聚合酶用量、去离子甲酰胺等 7 种因素不同梯度对扩增结果的影响进行了比较分析。结果表明: 古樟 ISSR-PCR 最佳反应体系为, 在 20  $\mu$ L PCR 反应体积中, 含 50 ng DNA 模板, 2.5 mmol/L  $MgCl_2$ , 0.20 mmol/L dNTPS, 1 U *Taq* DNA 聚合酶, 0.5  $\mu$ mol/L 引物浓度, 2% 去离子甲酰胺。该反应体系的建立为今后利用 ISSR 分子技术对古樟的遗传多样性分析提供了技术支撑。

**关键词:**古樟; ISSR; 反应条件; 优化

**中图分类号:**S 792.23 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)07-0116-05

樟 [*Cinnamomum camphora* (L.) Presl] 隶属于樟科 (Lauraceae), 是中国的珍贵树种之一, 木材材质优良, 根、干、枝、叶可提取樟脑、樟油; 种子可榨油; 树形优美, 也常供观赏<sup>[1]</sup>。江西是樟的现代分布中心地区之一, 各地保留有大面积古樟群以及全国少见的古樟树。据记载, 自汉时开始, 江西即有古樟分布, 目前保存古樟林有 300 余处<sup>[2]</sup>。樟树遗传多样性研究已有不少报道, 但研究材料几乎都为新近培育的栽培种, 针对古樟的遗传多样性研究还十分有限, 其分子层面研究还鲜见报道<sup>[3-6]</sup>。

ISSR 是由 Zietkiewicz 等<sup>[7]</sup> 创建的一种扩增简单重复序列区间多态性的标记。该技术较好结合了 RAPD 和 SSR 的优点, 稳定性和多态性好, DNA 用量少, 试验操作简单、快速、成本低廉等特点使得该技术目前已被广泛应用于作物遗传育种、植物品种鉴定、遗传图谱构建、基因定位以及遗传多样性等研究<sup>[8-16]</sup>。为了提高 ISSR 分析结果的可靠性和重复性的目的, 对 ISSR-PCR 反应体系进行优化试验是极其必要的<sup>[17]</sup>。该研究对古樟 ISSR 反应体系进行优化筛选, 并在此基础上对模板 DNA 浓度、PCR 反应程序中的退火温度进行了比较分析, 旨在建立稳定的反应体系, 为古樟优良种质遗传鉴定奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

2009 年 10 月至 2012 年 7 月, 在江西省安义、安福、瑞金、铅山、婺源 5 个县(市)共调查了 151 株古樟, 采集古樟的无病虫害的幼嫩叶片装入自封袋中, 并装入硅胶干燥, -20℃ 冰箱保存备用。

GS-15-IM-6 台式高速冷冻离心机 (Backman 公司), 旋涡混合器 (江苏康健公司), 电子分析天平 (上海上平仪器有限公司), 小型高速离心机 (SORVALL), PTC System 2700 温度梯度 PCR 仪 (Bio-Rad 公司), DYY-6B 型稳压稳流电泳仪, DYY 系列水平电泳槽 (北京六一厂), 紫外凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司), 超纯水仪 (台湾艾柯公司), 制冰机 (宁波格兰特有限公司), 高压灭菌锅 (上海医用核子仪器公司), 微波炉 (广东美的电器制造公司), 超微量分光光度计 (日本岛津公司), 恒温水浴锅 (上海医疗仪器厂), 微量移液枪 (Eppendorf, Germany)。Marker、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶等试剂均是上海生工生物工程公司的产品, 试验所用的 ISSR 引物采用的序列是由加拿大哥伦比亚大学设计的, 上海生工生物工程公司合成。

### 1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的制备与定量 采用改进的 CTAB 法, 参考张国防等方法<sup>[18]</sup> 并在此基础上稍加改进提取 DNA。得到的 DNA 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析, 检测其完整性。

1.2.2 ISSR 原初扩增条件及 PCR 扩增程序 PCR 扩增 ISSR 基本反应体系为 20  $\mu$ L, 其中含 50 ng DNA 模板, 2.5 mmol/L  $MgCl_2$ , 0.25 mmol/L dNTPS, 1 U *Taq* DNA 聚合酶, 0.5  $\mu$ mol/L 引物浓度, 2% 去离子甲酰胺,

**第一作者简介:**黄萌(1989-), 女, 在读硕士, 研究方向为植物系统与演化。E-mail: mengmeng8910@126.com.

**责任作者:**季春峰(1977-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事植物分类与植物资源等研究工作。E-mail: cfjee2004@163.com.

**基金项目:**国家林业公益性行业科研专项资助项目(201004073)。

**收稿日期:**2012-12-19

11.6  $\mu\text{L}$  的无菌水。试验采用单因子设计法,每个因子重复 2 次,其中不同因子的梯度设置如表 1。PCR 扩增程序为:94℃预变性 5 min;94℃变性 45 s,特定温度退火 90 s,72℃延伸 90 s,38 个循环;72℃延伸 7 min,4℃保存。PCR 扩增反应在由 Bio-Rad 公司生产的 PTC System 2700 温度梯度 PCR 仪中进行。取 10  $\mu\text{L}$  的 PCR 扩增产物(加 2  $\mu\text{L}$  溴酚蓝)在 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳(含 0.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EB),其中电压为 108 V,电泳 100 min,电泳结束后,在 Bio-Rad 凝胶成像系统下进行照相保存并观察分析。

1.2.3 PCR 扩增条件的优化 对 ISSR 反应中退火温度、DNA、 $\text{Mg}^{2+}$ 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶等几个关键因子的用量设置了梯度试验,也对去离子甲酰胺的用量对 ISSR 产物的影响做了优化试验,反应中各因子的梯度设计见表 1。

表 1 古樟 ISSR-PCR 反应条件优化

Table 1 Design of ISSR-PCR reaction condition for ancient camphor-trees

影响因素	试验梯度
退火温度/℃	48~60
DNA 模板用量/ng	15、30、50、80、100、120、160、200
$\text{Mg}^{2+}$ 浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0
dNTPs 浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35
<i>Taq</i> 酶用量/U	0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0
引物用量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.10、0.25、0.50、0.75、1.0、1.5
去离子甲酰胺/%	0、1、2、3、4、5

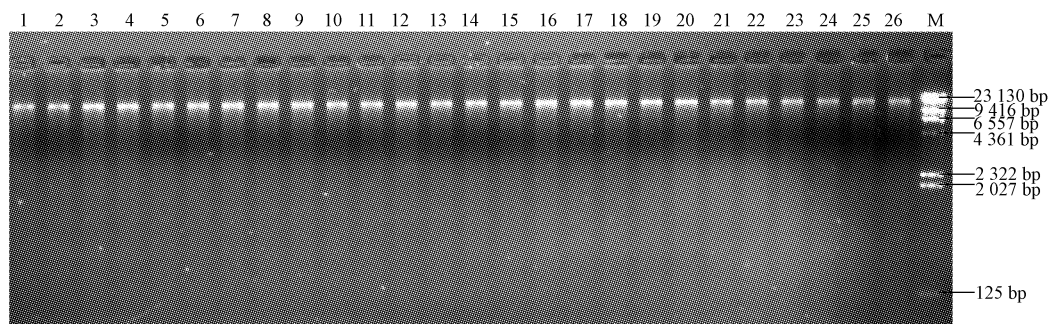


图 1 古樟基因组 DNA 电泳检测图

注:1~26 为不同的古樟的 DNA 样品;M 为  $\lambda\text{DNA}/\text{HindIII}$  Marker。

Fig. 1 The gel-electrophoresis detection chart of genomic DNA of ancient camphor-trees

Note:1~26 are different DNA samples of ancient camphor-trees;M is  $\lambda\text{DNA}/\text{HindIII}$  Marker.

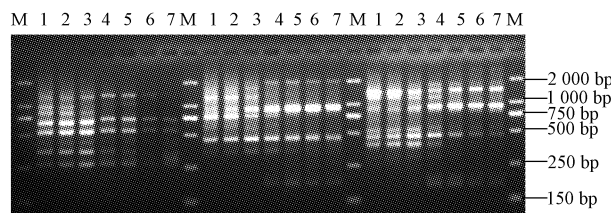


图 2 不同退火温度对 ISSR 扩增反应结果的影响

注:从左至右引物分别为 UBC811、UBC856、UBC835,温度均为 48~60℃ 每 2℃ 为 1 个梯度;即 1~7 对应的温度为 48、50、52、54、56、58、60℃;M 为 2 000 bp DNA marker。

Fig. 2 Effect of different annealing temperature on ISSR-PCR amplification

Note: The primer is UBC811, UBC856, UBC835 respectively from left to right; the temperature is 48~60℃ and gradient is 2℃, that is, the temperature from 1 to 7 is 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60℃; M is 2 000 bp DNA marker.

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 的提取

从图 1 可以看出,有 1 条整齐、无弥散的条带出现,且加样孔较清晰,表明所提取的 DNA 样品较纯,基本没有多糖、蛋白质等杂质,无降解和 RNA 污染。DNA 样品在岛津超微量分光光度计下测出  $\text{OD}_{260}$ 、 $\text{OD}_{280}$ 、 $\text{OD}_{230}$ 、 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  等值,且  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  的值均在 1.80~2.00 之间,说明样品较纯,经过检验均符合后续 PCR 的要求。

### 2.2 不同退火温度对 ISSR 扩增结果的影响

ISSR 扩增反应中,退火温度非常重要,不同的引物有不同的退火温度,根据引物退火温度计算公式  $T_m = 4 \times (C+G) + 2 \times (A+T)^{[19]}$ 。得到引物 UBC811 的退火温度为 52℃,UBC856 的退火温度为 50℃,UBC835 的退火温度为 52℃。以此温度为基础,在其上下以 2℃ 为 1 个梯度,共设置 7 个温度梯度进行优化试验。图 2 表明,48℃ 背景比较模糊,条带不清晰。不同物种对于同一引物的最适退火温度可能不同,但是较低的退火情况下易引起引物与模板之间的错配现象,产生非特异性扩增条带;退火温度过高又会抑制引物和模板的有效结合<sup>[20]</sup>。引物 UBC811 在 50℃ 条带最多且最亮,UBC856 及 UBC835 则在 52℃ 处的条带最为清晰且丰富。综合各因素,引物只有在适宜的退火温度范围内才可以获得稳定性好、多态性高、条带丰富的扩增产物。由此看来,这 3 条引物的退火分别选择 50、52、52℃。



### 2.3 不同 DNA 模板用量对 ISSR 扩增结果的影响

DNA 模板浓度对 ISSR-PCR 扩增条带的数量和清晰度有较大影响,模板含量太低,扩增效率比较低,模板含量太高,非特异性扩增产物也会增加。对模板用量该试验共设计了 8 个梯度进行优化。图 3 表明,当模板含量为 15~200 ng 均能扩增,而模板以 50 ng 最为稳定;当模板含量为 15~30 ng 时,扩增产物谱带不够清晰,信号较弱;当模板含量为 50~150 ng 时,扩增条带基本一致,无明显变化,但是出于成本考虑,模板 DNA 用量选择 50 ng 为宜。

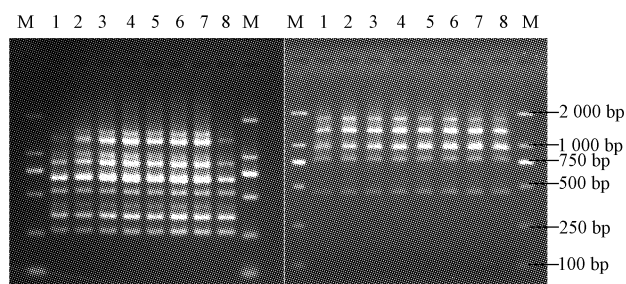


图 3 不同 DNA 用量对 ISSR 扩增反应结果的影响

注:左右引物分别为 UBC811、UBC856;M 为 2 000 bp DNA marker, 1~8 分别为 15、30、50、80、100、120、150、200 ng DNA,图 4~8 同。

Fig. 3 Effect of different dosages of template on ISSR-PCR amplification

Note: The left primer is UBC811 and the right primer is UBC856; M is 2 000 bp DNA marker, 1~8 is 15, 30, 50, 80, 100, 120, 150, 200 ng DNA. The same as Fig. 4~Fig. 8.

### 2.4 不同 $Mg^{2+}$ 浓度对 ISSR 扩增结果的影响

ISSR-PCR 反应中,选择合适的  $Mg^{2+}$  浓度对 PCR 反应结果有很大的影响极其重要。 $Mg^{2+}$  浓度是影响结果的一个重要变量,它可以通过影响 *Taq* DNA 聚合酶的活性,还能与 dNTPs、引物以及模板结合,对 PCR 扩增结果造成影响<sup>[19]</sup>。试验中选择合适的  $Mg^{2+}$  浓度对反应结果的最佳化极其重要。由图 4 可知,不同  $Mg^{2+}$  浓度对扩增条带的数量和强弱影响较大,当  $Mg^{2+}$  浓度为 2.5 mmol/L 时,条带清晰可见,且条带数量最多;而浓度过低时,扩增效率很低,浓度为 0.5 和 1.0 mmol/L 时没有扩增产物;当  $Mg^{2+}$  浓度为 3.0 mmol/L 时,背景开始模糊。综上所述,

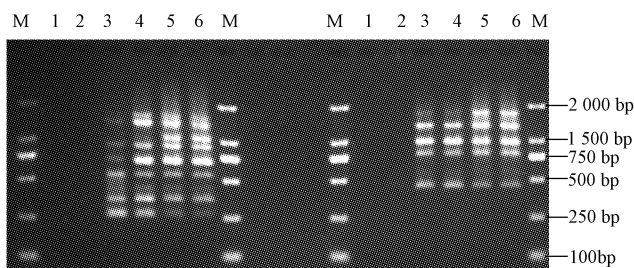


图 4 不同  $Mg^{2+}$  浓度对 ISSR 扩增反应结果的影响

注:1~6 分别为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ 。

Fig. 4 Effect of different concentrations of  $Mg^{2+}$  on ISSR-PCR amplification

Note: 1~6 is 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ .

$Mg^{2+}$  浓度选择 2.5 mmol/L 较为适宜。

### 2.5 不同 dNTPs 浓度对 ISSR 扩增反应结果的影响

dNTPs 的量对扩增产物的量及效率有着直接的影响。当 dNTPs 浓度过低时,会影响产物的合成;当 dNTPs 浓度过高时,则会抑制 *Taq* DNA 聚合酶的活性,使得扩增条带减少或者不扩增。图 5 显示,当 dNTPs 的浓度为 0.10 mmol/L 时,扩增不足,条带较少。当 dNTPs 的浓度为 0.15 mmol/L 时,虽然条带数目较多,但是背景较模糊,扩增效率不够高。当 dNTPs 的浓度为 0.20 mmol/L 时,扩增条带清晰且数量较多。dNTPs 的浓度为 0.25~0.35 mmol/L 时,开始呈现条带数目减少同时亮度变弱的趋势。综合考虑,dNTPs 的浓度选择 0.20 mmol/L 较好。

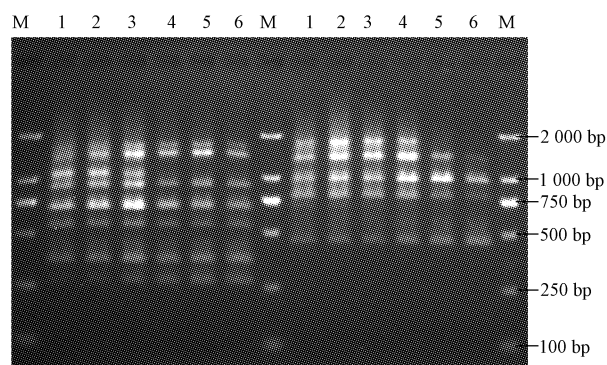


图 5 不同 dNTPs 浓度对 ISSR 扩增反应结果的影响

注:1~6 分别为 0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35 mmol/L dNTPs。

Fig. 5 Effect of different concentrations of dNTPs on ISSR-PCR amplification

Note: 1~6 is 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35 mmol/L dNTPs.

### 2.6 不同引物浓度对 ISSR 扩增反应结果的影响

引物浓度能较大程度地影响反应结果。当引物浓度太低时,不扩增或者扩增产物很少,背景不清晰;引物浓度过高,容易产生错配现象和非特异性扩增,得出的结果不可靠。图 6 表明,当引物浓度为 0.50  $\mu$ mol/L 时,扩增谱带丰富且清晰。0.75  $\mu$ mol/L 及以上时,扩增条带背景模糊,且有弥散现象。当引物浓度低于 0.50  $\mu$ mol/L 时,扩增条带较少,且条带也比较模糊。因此该试验中选择 0.50  $\mu$ mol/L 为最佳引物浓度。

### 2.7 不同 *Taq* DNA 聚合酶用量对 ISSR 扩增反应结果的影响

*Taq* DNA 聚合酶用量是 PCR 反应中一个至关重要的影响因子。用量过低,扩增产物条带弱或者扩增不出来;当用量太高,除了不经济,且会引起错配现象产生非特异性扩增,该试验中对 *Taq* DNA 聚合酶用量共设置了 6 个梯度,图 7 显示,当酶用量为 1.0 U 时,条带丰富且清晰度高;当酶用量为 0.5 U 时,虽然能够扩增出条带,但是不够清晰稳定。酶用量为 1.5、2.0、2.5、3.0 U 时,扩增谱带数量与 1 U 时基本一致,亮度上有所变化,综合成本等因素考虑,*Taq* DNA 聚合酶用量选择 1.0 U 时较为适宜。

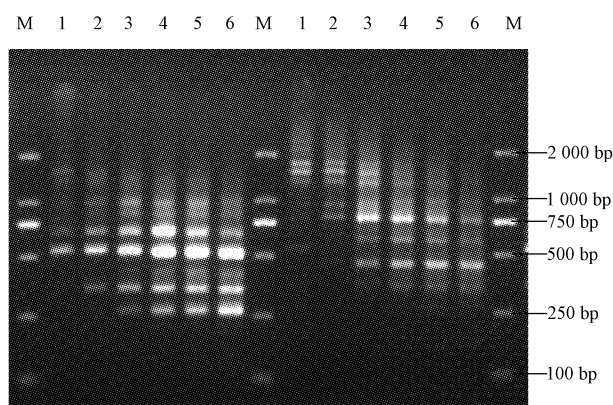


图6 不同引物浓度对 ISSR 扩增反应结果的影响

注:1~6 分别为 0.10,0.25,0.50,0.75,1.00,1.50  $\mu\text{mol/L}$  dNTPs。

Fig.6 Effect of different concentrations of primer on  
ISSR-PCR amplification

Note:1~6 is 0.10,0.25,0.50,0.75 1.00 1.50  $\mu\text{mol/L}$  dNTPs.

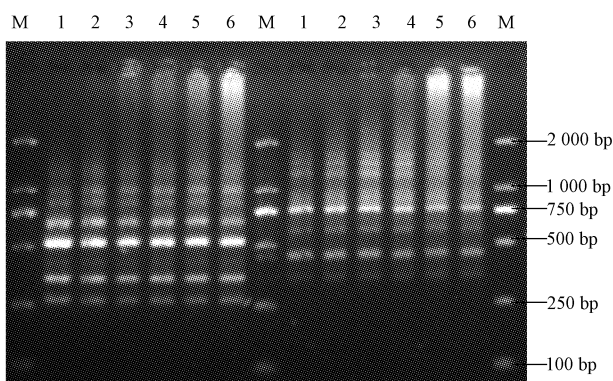


图7 不同 *Taq* DNA 聚合酶用量对 ISSR 扩增反应结果的影响

注:1~6 分别为 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 U *Taq* DNA 聚合酶。

Fig.7 Effect of different dosages of *Taq* DNA polymerase on  
ISSR-PCR amplification

Note:1~6 is 0.5,1.0,1.5 2.0,2.5,3.0 U *Taq* DNA polymerase.

## 2.8 去离子甲酰胺的有无对 ISSR 扩增反应结果的影响 在 ISSR-PCR 反应中,重复序列与目标序列的结合

在 DNA 复制过程中存在着一定的滑动和不均等交换现象,常常会导致扩增条带背景模糊<sup>[21]</sup>。在反应体系中加入少量的去离子甲酰胺(2%)能使条带更清晰,背景颜色变弱<sup>[22]</sup>。该试验中对是否加去离子甲酰胺以及加的量做了一个优化。图8表明,加入一定量的去离子甲酰胺能够使得条带清晰程度增高,但加入量达到3%时,条带数目减少了,加入2%的量条带数量丰富且条带清晰程度最高,加入1%能起到一定效果,但是条带背景还是比较模糊。因此,该试验中加入2%的去离子甲酰胺最为适宜。

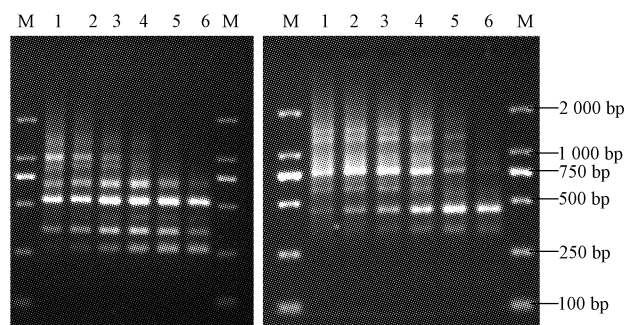


图8 不同去离子甲酰胺量对 ISSR 扩增反应结果的影响

注:1~6 分别为 0%,1%,2%,3%,4%,5% 的去离子甲酰胺。

Fig.8 Effect of formamide on ISSR-PCR amplification

Note:1~6 is 0%,1%,2%,3%,4%,5% formamide.

## 2.9 ISSR 优化反应体系的确立及应用

综合以上试验结果,确定在反应体积为 20  $\mu\text{L}$  古樟 ISSR-PCR 中,最佳的反应体系为:在 20  $\mu\text{L}$  PCR 反应体积中,含 50 ng DNA 模板,2.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 0.20 mmol/L dNTPS,1.0 U *Taq* DNA 聚合酶,0.5  $\mu\text{mol/L}$  引物浓度,2%去离子甲酰胺。依照优化后的反应体系,在 100 条 ISSR 引物中筛选出 15 条对古樟扩增条带清晰度高重复性好、且条带较为丰富的引物。图9为 UBC835 对安义群体的扩增图谱,获得了较多且清晰的 ISSR 谱带。

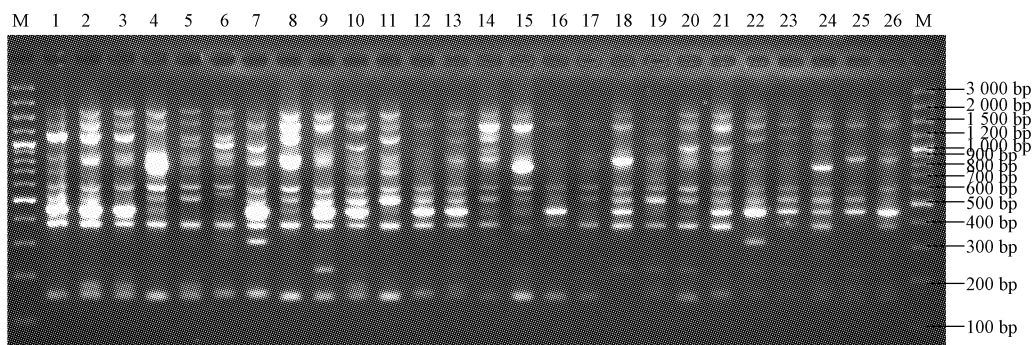


图9 优化后反应体系对安义群体古樟的扩增结果

注:引物为 UBC835 对安义群体古樟扩增情况;M 为 100 bp Ladder。

Fig.9 PCR result to Anyi county ancient camphor-trees with optimized reaction system

Note:The primer is UBC835;M is 100bp Ladder.



### 3 讨论

为了保持试验的一致性,所有试验均用一台 PCR 仪上进行。为了保证试验的重复性,试验所用的试剂也均购自同一厂家。而对于反应扩增程序,参考有关文献,该试验结果表明,退火温度对 ISSR 扩增谱带的影响极其显著,退火温度不同,产生的错配程度也不同。对每个初筛后的引物进行复筛后,再对其中的每个引物进行了退火的优化,获得了较好的扩增效果。用优化后的反应体系,经反复试验,能够获得重复性高、稳定的 ISSR 扩增结果,说明该体系确实可行。

#### 参考文献

- [1] 中国树木志编辑委员会. 中国树木志(第一卷)[M]. 北京:中国林业出版社,1983:735-749.
- [2] 李明志. 江西古树[M]. 南昌:江西人民出版社,1998:61-68.
- [3] 邢建宏,刘希华,陈存及,等. 樟树几种生化类型及近缘种的 RAPD 分析[J]. 三明学院学报,2007,24(4):433-437.
- [4] 邢建宏,陈存及,张国防. 樟树 ISSR-PCR 反应体系优化研究[J]. 福建林业科技,2006,33(3):96-98.
- [5] 邢建宏,陈存及,张国防,等. 樟树几种化学类型及近缘种的 ISSR 分析[J]. 福建林业科技,2008,35(4):101-104.
- [6] 宋爱云,陈辉,董林水. RAPD 分子标记在鉴定香樟优选株和普通株中的应用[J]. 应用与环境生物学报,2009,9(3):263-265.
- [7] Zietkiewicz E, Rafalak I A, Labud A, et al. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomic, 1994, 20(2):176-183.
- [8] Iruela M, Rubio J, Cubero J I, et al. Phylogenetic analysis in genus Cicer and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers[J]. Theor Appl Genet, 2002, 104:643-651.
- [9] Debnath S C. Inter-simple sequence repeat (ISSR)-PCR analysis to assess genetic diversity in a collection of wild cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) clones[J]. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2007, 82(5):727-732.

- [10] Li A, Ge S. Genetic variation and clonal diversity of *Psammochloa villosa* (Poaceae) detected by ISSR markers[J]. Ann Bot, 2001, 87:585-590.
- [11] Esselman E J, Li J Q, Crawford D J, et al. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers[J]. Mol Ecol, 1999, 8:443-451.
- [12] Ammiraju J S S, Dholakia B B, Santra D K, et al. Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat[J]. Theor Appl Genet, 2001, 102:726-732.
- [13] Hao G, Lee D H, Lee J S, et al. A study of taxonomical relationships among species of Korean *Allium* sect. *Sacculiferum* (Alliaceae) and related species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers[J]. Bot Bull Acad Sin, 2002, 43:63-68.
- [14] Prevost A, Wilkinson M J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars[J]. Theor Appl Genet, 1999, 98:107-112.
- [15] Borner B, Branchard M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2001, 19:209-215.
- [16] 王国霞, 曹福亮, 方炎明. 古银杏雄株的 ISSR 遗传多样性分析[J]. 北京林业大学学报, 2010, 32(2):39-45.
- [17] 金则新, 李均敏. 濒危植物夏腊梅扩增条件的优化[J]. 植物研究, 2007, 27(1):69-72.
- [18] 张国防, 陈存及, 邢建宏. 樟树干叶 DNA 提取方法的研究[J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(1):111-114.
- [19] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 2 版. 北京:中国协和医科大学出版社, 1999:458-463.
- [20] 温强, 叶金山, 雷小林, 等. 油茶 ISSR 反应体系建立及优化[J]. 中南林学院学报, 2006, 26(6):22-26.
- [21] 钱韦, 葛颂, 洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性[J]. 植物学报, 2000, 42(7):741-750.
- [22] Joshi S P, Gupta V S, Aggarwal R K, et al. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*[J]. Theor Appl Genet, 2000, 100:1311-1320.

## Optimization of ISSR Amplification Conditions in Ancient Camphor-trees

HUANG Meng<sup>1,2</sup>, CHEN Shang-xing<sup>1,2</sup>, YANG Guang-yao<sup>1,2</sup>, WANG Zong-de<sup>1,2</sup>, JI Chun-feng<sup>1,2</sup>

(1. College of Landscape and Art, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045; 2. Jiangxi Provincial Key Laboratory for Bamboo Germplasm Resources and Applications, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045)

**Abstract:** The genomic DNA of ancient camphor-trees was extracted from leaves by improved CTAB method. With the design of single factor experiment method, the influences of seven factors including  $Mg^{2+}$ , dNTP, DNA content in the template, *Taq* DNA polymerase, amounts of primer, deionized formamide, and annealing temperature on PCR amplification were analyzed. The results showed that the best ISSR-PCR reaction system of ancient camphor-trees was as follows: 50 ng DNA template, 2.5 mmol/L  $MgCl_2$ , 0.20 mmol/L dNTPS, 1.0 U *Taq* polymerase, 0.5  $\mu$ mol/L primer and 2% formamide deionized in 20  $\mu$ L reaction volume. The results would lay a technology foundation for further study of the genetic diversity of ancient camphor-trees with ISSR molecular marking.

**Key words:** ancient camphor-trees; ISSR; reaction condition; optimization