

# 金线莲 ISSR-PCR 反应体系建立

唐军荣<sup>1</sup>, 谭辛夷<sup>2</sup>, 孙正海<sup>2</sup>, 辛培尧<sup>1</sup>

(1. 西南林业大学 国家林业局西南地区生物多样性保育重点实验室, 云南 昆明 650224; 2. 西南林业大学 园林学院, 云南 昆明 650224)

**摘要:**利用正交设计  $L_{16}(4^5)$  对金线莲 ISSR-PCR 反应体系的 5 因素(模板 DNA、*Taq* 酶、引物、 $Mg^{2+}$  和 dNTP)在 4 个水平上进行优化试验, 采用直观分析法获得影响因素最佳反应水平。结果表明:最终建立的金线莲 ISSR-PCR 的最佳反应体系为, 在 25  $\mu$ L 的反应体系中, DNA 模板为 40 ng、*Taq* 酶为 1.60 U、引物浓度为 0.80 mmol/L、dNTP 浓度为 0.96 mmol/L、 $Mg^{2+}$  浓度为 2.40 mmol/L。该反应体系的建立为金线莲种质资源分类、遗传多样性分析提供了更客观可靠的方法。

**关键词:**金线莲; ISSR-PCR; 正交设计

**中图分类号:**Q 949.71<sup>+</sup>8.43 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)18-0118-05

金线莲(*Anoectochilus roxburghii*)属兰科(Orchidaceae)开唇兰属(*Anoectochilus*)多年生草本植物, 别名金蚕、金线兰、金线虎头蕉等, 产于浙江、江西、福建、湖南、广东、海南、广西、四川、云南、西藏东南部<sup>[1]</sup>。金线莲作为名贵珍稀的中药材, 性平、味甘, 有药用植物之王的盛誉, 在民间素有“金草”、“神药”、“乌人参”等美称, 常用于治疗小儿惊风高热、糖尿病、高血压、肝炎、肾炎等<sup>[2-3]</sup>。在金线莲的销售过程中, 往往把开唇兰属的植物统称为金线莲, 作为中药材销售, 这与中药材规范化标准化生产相差甚远, 也会给消费者带来潜在的风险, 因此很有必要借助分子手段对金线莲各品种间进行准确分类和定位。

ISSR(Inter simple sequence repeat, 简单序列重复区间)分子标记技术是 Zietkiewicz 等<sup>[4]</sup>于 1994 年提出的一种新型分子标记技术, 用于检测 SSR 间 DNA 序列差异。该标记具有模板需求量少, 操作简单, 成本低, 多态性丰富, 重复性好且稳定等优点<sup>[5]</sup>。在物种起源与进化<sup>[6]</sup>、遗传图谱构建<sup>[7]</sup>、物种间的亲缘关系和遗传多样性<sup>[8-11]</sup>、种质资源鉴定<sup>[12-13]</sup>等方面得到广泛应用。由于 ISSR 技术是基于 PCR 的一种标记方法, 其大多为显性标记, 所以其反应条件易受退火温度、模板浓度及纯度、引物、 $Mg^{2+}$  浓度和 *Taq* 酶含量等条件的影响。为了确保该类型试

验的可靠性和重复性, 仍有必要针对具体试验进行反应体系的优化。该研究采用正交实验的方法对影响金线莲 ISSR-PCR 反应的 DNA 模板、引物、 $Mg^{2+}$ 、dNTP、*Taq* 酶 5 个因素在 4 个水平上进行试验和筛选, 以建立金线莲 ISSR-PCR 优化体系, 并且探究体系中 5 个因素与试验结果的关系, 为进一步研究它的种质资源和遗传多样性等奠定基础, 进而为金线莲的品种鉴定、多样性评价、亲缘关系等提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料采用金线莲组培苗, 由西南林业大学保育重点实验室下的组培室提供。

### 1.2 试验方法

1.2.1 基因组总 DNA 提取及检测 采用改良 CTAB 法提取金线莲基因组 DNA, DNA 经 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳分析, 用美国 SYNGENE 公司生产的 Gbox-hr-e-m 型凝胶成像系统观察结果, 选取检测结果好的 DNA 作为该试验的模板。

1.2.2 ISSR-PCR 反应引物筛选 试验的引物从哥伦比亚大学公布的 ISSR 反应体系引物序列中随机选择, 采用 ISSR-PCR 体系进行筛选。随机选择的引物分别是 801、804、812、818、825、831、836、838、848、853、860(表 1)。电泳结果用凝胶成像系统拍照, 根据扩增结果选出适合金线莲进行 ISSR-PCR 反应的引物。

1.2.3 金线莲 ISSR-PCR 反应正交实验设计 采用 25  $\mu$ L ISSR-PCR 体系进行试验, 以与 ISSR-PCR 体系相关的 DNA 模板、引物、 $Mg^{2+}$ 、dNTP、*Taq* 酶设计 5 因素 4 水平正交实验, 共 16 个不同处理。每个处理 3 次重复, 正交实验因素和水平见表 2。完成后用凝胶成像系统照

**第一作者简介:**唐军荣(1982-), 男, 广西全州人, 硕士, 讲师, 现主要从事药用植物繁育等研究工作。E-mail: tjrzy@163.com.

**责任作者:**孙正海(1978-), 男, 山东昌邑人, 博士, 副教授, 现主要从事植物种质资源评价和采后保鲜及生物技术辅助育种等研究工作。E-mail: sunzhenghai1978@163.com.

**基金项目:**云南省教育厅科学研究基金资助项目(2013Y123)。

**收稿日期:**2014-04-24

相,记录结果,并对 PCR 扩增产物进行评分,选出金线莲最适的 ISSR-PCR 反应体系。根据何正文等<sup>[14]</sup>的正交设计直观分析方法,以 Marker 为参照根据带的多少和亮度给每个处理进行打分,带数为 4 以上=10 分,3=8 分,2=6 分,1=4 分,0=2 分;亮度最亮=10 分,很亮=8 分,较亮=6 分,微亮=4,不亮=2 分;3 次重复分别独立统计。

表 1 供试引物

Table 1 The primers used in the study

编号 No.	引物代号 Primer code	序列 Sequences
1	801	ATA TAT ATA TAT ATA TT
2	804	TAT ATA TAT ATA TAT AA
3	812	GAG AGA GAG AGA GAG AA
4	831	ATA TAT ATA TAT ATA TYA
5	825	ACA CAC ACA CAC ACA CT
6	818	CAC ACA CAC ACA CAC AG
7	836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA
8	848	CAC ACA CAC ACA CAC ARG
9	853	TCT CTC TCT CTC TCTCCT
10	838	TAT ATA TAT ATA TAT ARC
11	860	TGT GTG TGT GTG TGT GRA

表 2 金线莲 ISSR-PCR 反应体系的正交实验设计

Table 2 Orthogonal design for ISSR-PCR reaction of

*Anoectochilus roxburghii*

水平 Level	DNA /(ng· (25 $\mu$ L) <sup>-1</sup> )	引物 /(mmol· L <sup>-1</sup> )	Taq /(ng· (25 $\mu$ L) <sup>-1</sup> )	dNTP /(mmol· L <sup>-1</sup> )	Mg <sup>2+</sup> /(mmol· L <sup>-1</sup> )
1	40.00	0.48	0.40	0.40	1.76
2	40.00	0.64	1.00	0.68	2.08
3	40.00	0.80	1.60	0.96	2.40
4	40.00	0.96	2.20	1.24	2.72
5	60.00	0.64	0.40	0.96	2.72
6	60.00	0.48	1.00	1.24	2.40
7	60.00	0.96	1.60	0.40	2.08
8	60.00	0.80	2.20	0.68	1.76
9	80.00	0.80	0.40	1.24	2.08
10	80.00	0.96	1.00	0.96	1.76
11	80.00	0.48	1.60	0.68	2.72
12	80.00	0.64	2.20	0.40	2.40
13	100.00	0.96	0.40	0.68	2.40
14	100.00	0.80	1.00	0.40	2.72
15	100.00	0.64	1.60	1.24	1.76
16	100.00	0.48	2.20	0.96	2.08

## 2 结果与分析

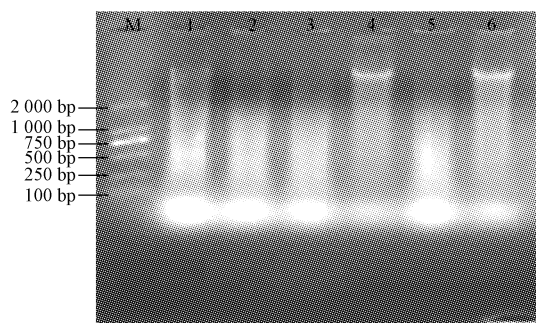
### 2.1 金线莲基因组总 DNA 检测

由图 1 可知,DNA 纯度检测电泳图中共有 7 条泳道,其中,泳道 4、6 条带较亮、较清晰,泳道 1 现象微弱,泳道 2、3、5 几乎没有亮带。由此可以判断,4、6 泳道的 DNA 可以进行 ISSR-PCR 反应,而其它条带杂质含量过高,不适用于 ISSR-PCR 反应。

### 2.2 金线莲引物筛选

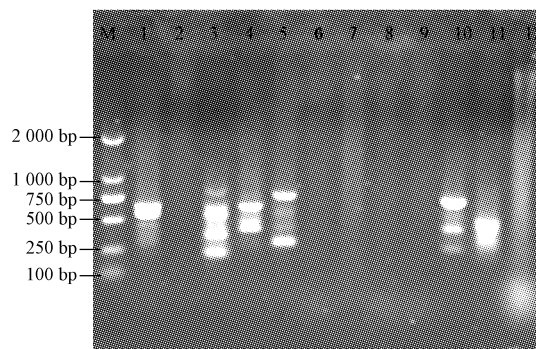
由图 2 可知,在成像系统下观察到金线莲 ISSR-

PCR 反应体系引物筛选的电泳结果,可观察到 13 个泳道。11 个引物中共有 6 个引物扩增出亮带,其中 3、4、5、10 号泳道的亮带层次分明,3 号泳道的亮带最清晰、丰富。查看记录后,确认 3 号泳道对应的引物是 836,所以选取引物 836 作为金线莲 ISSR-PCR 优化体系引物。



注:M 为 100 bp DNA Marker,下同。1、2、3、4、5、6 为金线莲 DNA。

图 1 金线莲 DNA 检测电泳结果

Fig. 1 Eletrophoresis of *Anoectochilus roxburghii* DNA

注:1~11 号泳道分别为随机选取的 11 个引物,12 为 DNA 模板。

图 2 金线莲 11 个引物 ISSR-PCR 反应结果

Fig. 2 ISSR-PCR reaction of *Anoectochilus roxburghii* by 11 primers

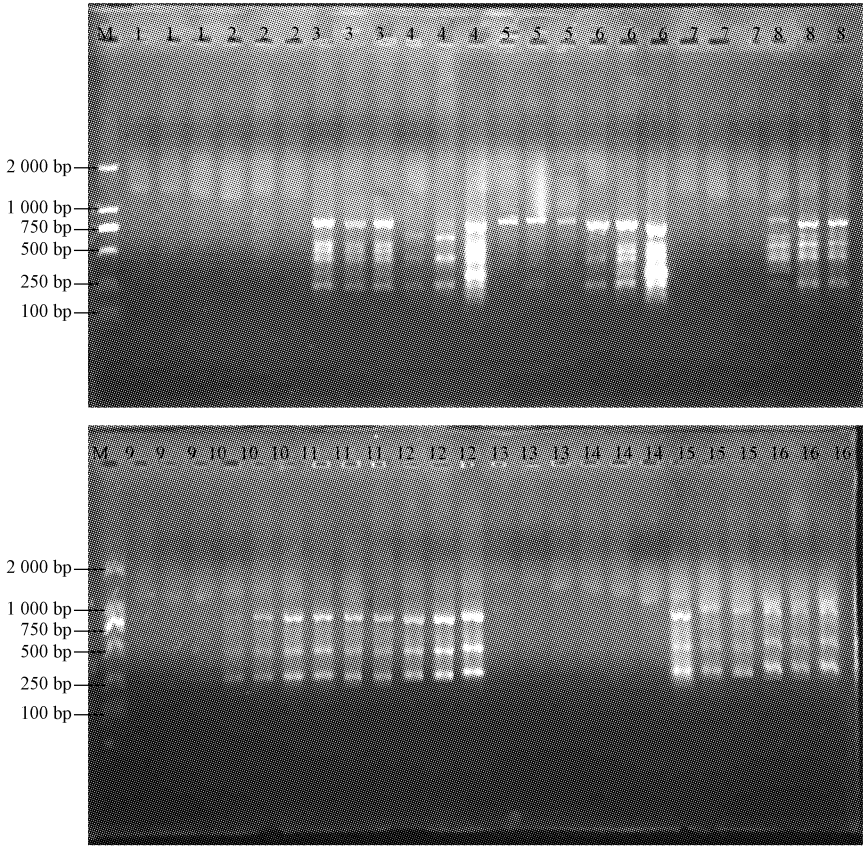
### 2.3 ISSR-PCR 产物电泳结果评分

在琼脂凝胶成像系统下观察电泳后的 ISSR-PCR 反应产物。由图 3 可知,琼脂胶上有 50 条泳道,除第 1 泳道 Marker 外有 30 个泳道能扩出条带,分别是泳道 3、4、5、6、8、10、11、12、15、16。从 3 次重复的结果来看,各个处理组合的反应都具有较高的一致性。依处理次序得到的 3 次分数分别记为:4,4,20,12,12,14,4,16,4,12,14,14,4,4,16,12;4,4,16,16,16,18,4,18,4,12,14,16,4,4,16,12;以及 4,4,18,20,10,18,4,18,4,14,14,16,4,4,16,12。将上述处理和评分结果采用统计软件 SPSS 17.0 进行方差分析,从表 3 可以看出,16 个处理间的结果存在显著差异。从 3 次平均得分来看,可以得出第 3 组的得分最高,得分第 2 的是第 8 组处理,第 3 的是第 6 组处理;第 4、5、11、12 组亮度较好,但是条带的多态性不如 3、6、8 组;第 15 组处理虽然多态性较好,



但是亮度不够。其它有条带的处理,无论从条带的多态性还是亮度来说,都比不上 3、6、8 组处理。结合方差分析可知 3、6、8 组的处理较好,其中第 3 组处理时得分最高,为该试验的 ISSR 最优反应组合。最优体系总

共为 25  $\mu\text{L}$ ,其中各因素的浓度 DNA 40  $\text{ng}/25\mu\text{L}$ 、引物 0.80  $\text{mmol}/\text{L}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  2.40  $\text{mmol}/\text{L}$ 、dNTP 0.96  $\text{mmol}/\text{L}$ 、*Taq* 酶 1.60  $\text{U}/25\mu\text{L}$ 。



注:处理编号同表 2。

图 3 金线莲 DNA 正交实验 ISSR-PCR 产物电泳图

Fig. 3 Experimental result of orthogonal design for ISSR-PCR reaction of *Anoectochilus roxburghii*

表 3 PCR 反应结果方差分析

Table 3 Variance analysis for the results of PCR reaction

变异来源 Variation origin	自由度 df	离差平方和 Sum of squares	均方 Mean square	F	Sig.
组间 Between groups	15	1 498.333	99.889	41.333	0.000
组内 Within groups	32	77.333	2.417		
总计 Total	47	1 575.667			

2.4 各因素对 ISSR-PCR 反应结果影响 表 2 和打分结果求得不同因子对 ISSR-PCR 反应影响分  
为分析不同因素对杜鹃 ISSR-PCR 反应影响,据 值,整理成表 4。

表 4 金线莲 ISSR-PCR 正交实验 5 个因子评分

Table 4 Mark on 5 factors for orthogonal design for ISSR-PCR reaction of *Anoectochilus roxburghii*

$\text{Mg}^{2+}$ 浓度 Concentration of $\text{Mg}^{2+}$ $/(\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})$	平均评分 Average score	dNTP 浓度 Concentration of dNTP $/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	平均评分 Average score	引物浓度 Concentration of primer $/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	平均评分 Average score	<i>Taq</i> 酶浓度 Concentration of <i>Taq</i> enzyme/ $(\text{U} \cdot (25\mu\text{L})^{-1})$	平均评分 Average score	DNA 浓度 Concentration of DNA $/(\text{ng} \cdot (25\mu\text{L})^{-1})$	平均评分 Average score
1.76	12.00	0.40	20.50	0.48	35.00	0.40	18.50	40.00	31.50
2.08	18.00	0.68	29.50	0.64	36.00	1.00	28.00	60.00	38.00
2.40	40.50	0.96	32.00	0.80	32.50	1.60	39.00	80.00	34.50
2.72	36.00	1.24	39.50	0.96	27.50	2.20	45.50	100.00	27.00

2.4.1  $Mg^{2+}$  浓度的影响 当  $Mg^{2+}$  浓度为 1.76~2.40 mmol/L 时,均值随浓度的增加而上升;而当  $Mg^{2+}$  2.40~2.72 mmol/L 时,均值随浓度增加而下降。可知,  $Mg^{2+}$  浓度过低,  $Mg^{2+}$  作用效率低, PCR 产物多样性不高;浓度度过高,容易产生非特异性弥散带。

2.4.2 dNTP 浓度的影响 当 dNTP 浓度为 0.40~1.24 mmol/L 时,均值随浓度的增加而显著上升,当浓度为 1.24 mmol/L 时均值达到最大值,此时的扩增效果最好,因此 1.24 mmol/L 为金线莲 ISSR-PCR 较适的浓度。

2.4.3 引物浓度的影响 当引物浓度为 0.48~0.64 mmol/L 时,均值随浓度的增加差异不大;当引物浓度为 0.64~0.96 mmol/L 时,均值随浓度的增加而下降。表明浓度过低会使扩增不完全,过高也会影响结果。试验时应适量加入,以免造成浪费。

2.4.4 *Taq* 酶浓度的影响 当 *Taq* 酶浓度为 0.40~2.20 U/25 $\mu$ L 时,均值随 *Taq* 酶浓度的增加而上升明显,当浓度为 2.20 U/25 $\mu$ L 时达到最大值。可知,酶浓度在 0.40~2.20 U/25 $\mu$ L 区间内,ISSR-PCR 的反应效果随着 *Taq* 酶浓度的升高而变好。

2.4.5 模板 DNA 浓度的影响 当模板 DNA 浓度为 40~60 ng/25 $\mu$ L 时,均值随浓度的增加而上升,当浓度为 60 ng/25 $\mu$ L 时达到最高值;当浓度为 60~100 ng/25 $\mu$ L 时,均值随浓度增加而下降。DNA 是扩增反应物,过低的 DNA 直接影响产物的数量和质量,影响试验效果。

### 3 讨论

该研究以金线莲 DNA 为模板,对 ISSR-PCR 反应体系及反应参数进行了调整和优化,该试验从 60 种引物中随机选取了 11 种引物,其中引物 836 在扩增后的电泳结果中呈现出最清晰、最丰富的亮带。并通过正交实验最终筛选出适合金线莲进行 ISSR 标记的 PCR 反应体系:DNA 模板为 40 ng/25 $\mu$ L、*Taq* 酶为 1.60 U/25 $\mu$ L、引物浓度为 0.80 mmol/L、dNTP 浓度为 0.96 mmol/L、 $Mg^{2+}$  浓度为 2.40 mmol/L。其结果与张福生等<sup>[15]</sup>对台湾金线莲建立的 ISSR-PCR 试验结果不同,主要可能是由于同属而不同种的原因所致。

ISSR-PCR 反应体系中,PCR 产物的生成和质量受模板 DNA 用量、 $Mg^{2+}$  浓度、引物浓度、*Taq* 酶用量、dNTP 浓度,以及退火温度等诸多因素的影响<sup>[16-17]</sup>。DNA 的提取质量是 PCR 成败与否的首要因素,而 ISSR-PCR 结果的可靠性和稳定性则与 PCR 的反应条件有很大关系。采用正交设计直观分析法,能够迅速获得满意

的试验结果,但该方法也存在一定的局限性,如对试验结果打分的先后次序对结果有一定影响,使影响因素最佳反应水平的确定缺乏可靠性<sup>[18]</sup>。因此,在 ISSR-PCR 反应体系的建立过程中,可以采用正交实验和单因子试验相结合的方法进行因素确定,特别是对扩增效果影响较大的因素的优化,有利于获得清晰、可重复、易统计的条带,从而保证筛选出的 ISSR-PCR 反应体系重复性好,结果的稳定可靠性。

### 参考文献

- [1] 郎楷永,陈心启,罗毅波,等. 中国植物志[M]. 17 卷. 北京:科学出版社,1999:220.
- [2] 郑纯,黄以钟,季莲芳. 金钱莲文献考证、原植物及商品调查[J]. 中草药,1996,27(3):269.
- [3] 林宗铿. 名贵药材“金线莲”[J]. 福建热作科技,2003,28(2):45-46.
- [4] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat(SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics,1994,20(2):176-183.
- [5] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用[J]. 遗传,2002,24(5):613-616.
- [6] 龚汉雨,刘爱华,王建波. 山羊草属异源多倍体植物基因组进化的 ISSR 分析[J]. 植物分类学报,2006,44(3):286-294.
- [7] 刘威生,冯晨静,杨建民,等. 杏 ISSR 反应体系的优化和指纹图谱的构建[J]. 果树学报,2005,22(6):626-629.
- [8] 杜金昆,姚颖垠,倪中福,等. 普通小麦、斯卑尔脱小麦、密穗小麦和轮回选择后代材料 ISSR 分子标记遗传差异研究[J]. 遗传学报,2002,29(5):445-452.
- [9] 牟海飞,林贵美,邹瑜,等. 利用 ISSR 分子标记分析香蕉品种的遗传多样性[J]. 西南农业学报,2010,23(4):1206-1210.
- [10] 何予卿,张宇,孙梅,等. 利用 ISSR 分子标记研究栽培稻和野生稻亲缘关系[J]. 农业生物技术学报,2001,9(2):123-127.
- [11] 葛永奇,邱英雄,丁炳扬,等. 牙遗植物银杏群体遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 生物多样性,2003,11(4):276-287.
- [12] 沈颖,徐程,万小凤,等. ISSR-PCR 在石斛种间鉴别中的应用[J]. 中草药,2005,36(3):423-427.
- [13] 张介驰,马庆芳,张丕奇,等. 用 ISSR 分子标记鉴别东北地区黑木耳生产菌株的研究[J]. 菌物学报,2007,26(4):534-538.
- [14] 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.
- [15] 张福生,郭顺星. 金线莲 ISSR 反应体系的建立与优化[J]. 中草药,2011,42(1):137-142.
- [16] 黄帆,王明玖,何丽君,等. 高加索三叶草 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 内蒙古农业大学学报,2012,33(4):103-107.
- [17] 庞赫,郭太君,胡志军,等. 大花君子兰 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 吉林农业大学学报,2010,32(2):167-171,176.
- [18] 穆立蕾,刘赢男,冯富娟,等. 紫椴 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 林业科学,2006,42(6):26-31.

## Establishment of ISSR-PCR Reaction System for *Anoectochilus roxburghii*

TANG Jun-rong<sup>1</sup>, TAN Xin-yi<sup>2</sup>, SUN Zheng-hai<sup>2</sup>, XIN Pei-yao<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Biodiversity Conservation in Southwest China, State Forestry Administration, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224; 2. School of Horticulture and Gardening, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224)

# 棕肉桂酸-4-羟化酶基因及其启动子克隆与表达分析

王玉珍<sup>1,2</sup>, 陈桂信<sup>1,2</sup>, 赵利<sup>1,2</sup>, 吕恃衡<sup>1</sup>, 潘东明<sup>1,2</sup>, 姜翠翠<sup>3</sup>

(1. 福建农林大学 园艺学院, 福建 福州 350002; 2. 福建农林大学 园艺产品贮运保鲜研究所, 福建 福州 350002;

3. 福建省农业科学院 果树研究所, 福建 福州 350013)

**摘要:**以不同发育时期的棕果实为试材,采用两步法逆转录与抑制 PCR 技术相结合的方法构建均一化全长 cDNA 文库,筛选出一条编码肉桂酸-4-羟化酶的全长 cDNA(命名为 *PsC4H*);采用 APA-Walking 技术,分离获得该基因的启动子序列;采用实时荧光定量 PCR 技术,检测该基因在棕果实不同发育时期的表达动态。结果表明:*PsC4H* 基因全长为 1 772 bp, ORF(Open Reading Frame)为 1 515 bp, 编码 504 个氨基酸, 相对分子量为 145 719.6, 等电点为 4.94, 经序列同源性分析发现, *PsC4H* 氨基酸序列与李属果树高度同源;经 PlantCare 软件预测, 棕 *PsC4H* 基因的启动子除具有 TATA/CAAT-box 外, 还含有 G-box、HSE 等特异作用元件;实时荧光定量结果显示, *PsC4H* 在棕果实整个生长发育过程中呈下调-上调的表达趋势, 其中在成熟果中表达量最高。

**关键词:**棕;肉桂酸-4-羟化酶;启动子;实时荧光定量 PCR

**中图分类号:**Q 943.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)18-0122-06

苯丙烷代谢途径是从莽草酸途径衍生的植物特有次生代谢途径,是植物最重要的次生代谢途径之一。苯丙烷代谢途径包括木质素合成途径、黄酮类物质合成途径和原花青素特异合成途径,可以产生多种具有重要生理功能的多酚类次生物质。苯丙氨酸解氨酶(PAL)和肉桂酸-4-羟化酶(C4H)分别催化苯丙烷代谢途径中的第 1 步和第 2 步反应。C4H 的底物和产物包括反式肉桂酸和  $p$ -香豆酸都受到苯丙烷代谢途径中 PAL 和其它酶的调控。PAL 和 C4H 这 2 种酶通常以协同方式表达,但是协同机理还不确定。

C4H 是细胞色素 P450(CYP450)单加氧酶超家族的一员,它是第一个被鉴定的植物 CYP450 单加氧酶,也是第一个既被克隆、又确定了功能的植物 CYP450 酶<sup>[1-3]</sup>。植物受到辐射、机械损伤、诱导子诱导和真菌感染等刺激时, C4H 活性及基因表达发生变化,使其在苯丙烷代谢途径中扮演着不同的角色<sup>[4]</sup>。目前,多种植物编码合成肉桂酸-4-羟化酶的基因已被克隆,如拟南芥<sup>[5-7]</sup>、大豆<sup>[8]</sup>、杨树<sup>[9-11]</sup>、油菜<sup>[12]</sup>、杏、李<sup>[13]</sup>、柑橘<sup>[14]</sup>等。

该研究从已构建好的含不同发育时期的棕果实均一化 cDNA 文库中筛选得到一个 C4H 全长基因,对该基因进行生物信息学分析及启动子克隆,了解棕果实 C4H 基因的结构与功能,这对从分子水平上探讨棕苯丙烷类次生代谢途径具有重要意义;采用荧光定量 PCR 技术,分析 *PsC4H* 基因在棕果实不同发育时期的表达模式,以期为进一步研究该基因的表达调控机理、改变表达活性奠定工作基础。

**第一作者简介:**王玉珍(1988-),女,硕士研究生,研究方向为果树生物技术。E-mail:wyzenabcde@163.com.

**责任作者:**陈桂信(1967-),男,博士,副教授,研究方向为分子生物学与生物技术。E-mail:guixinchen@126.com.

**收稿日期:**2014-04-25

**Abstract:** The orthogonal design was used to optimize ISSR-PCR amplification system on *Anoectochilus roxburghii* in four levels of five factors (DNA template, *Taq* DNA polymerase, primer,  $Mg^{2+}$ , and dNTP) respectively. The results showed that a suitable ISSR-PCR reaction system was established, namely 25  $\mu$ L reaction system containing 40 ng DNA template, 1.60 U *Taq* DNA polymerase, 0.80 mmol/L primer, 0.96 mmol/L dNTP, 2.40 mmol/L  $Mg^{2+}$ . In conclusion, this established ISSR-PCR reaction system provide an available and reliable method for genetic diversity analysis and germplasm classification of *Anoectochilus roxburghii*.

**Keywords:** *Anoectochilus roxburghii*; ISSR-PCR; orthogonal design