

枸杞 ISSR 反应体系的优化与应用

段丽君^{1,2}, 曹有龙², 周 军³

(1 孝感学院 生命科学技术学院, 湖北 孝感 432000; 2 宁夏农林科学院 枸杞工程技术研究中心, 宁夏 银川 750002;
3 西南林学院 资源学院, 云南 昆明 650224)

[摘 要] **【目的】**探索枸杞遗传变异与亲缘关系分析的新方法,为枸杞的种质遗传多样性分析和杂交育种提供了初步理论依据。**【方法】**以枸杞为试材,对 ISSR-PCR 反应中各主要影响因子进行优化筛选,确立枸杞 ISSR-PCR 的最佳反应体系;并利用该优化体系,对枸杞的 8 个品种(系)和 5 个花药培养再生植株进行种质遗传多样性分析。**【结果】**枸杞 ISSR-PCR 的最佳反应体系为:每 25 μL 反应体系中含 $10\times\text{Buffer}$ 2.5 μL , 40 ng 模板 DNA, 2.0 mmol/L Mg^{2+} , 0.1 mmol/L dNTPs, 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 引物, 1 U *Taq* DNA 聚合酶; 15 个引物在 13 份枸杞种质中共扩增出 80 个条带,其中多态性条带有 61 条,多态位点比率为 76.3%; 13 份供试材料可分为 2 类:一类群含有宁杞 1 号及其花培植株、宁杞 2 号及其花培植株、小麻叶、宁杞 3 号及其花培植株、06-16 及其花培植株;另一类群含有 04-03-32 及其花培植株、04-03-29、北方。从聚类结果来看,宁杞 2 号、宁杞 3 号、04-03-32 经花药培养所得到的再生植株与母株相比,在 DNA 水平上发生了一定程度变异。**【结论】**建立的 ISSR-PCR 优化反应体系可用于枸杞遗传多样性和基因组研究。

[关键词] 枸杞; ISSR; 体系优化; 遗传多样性

[中图分类号] S567.23

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)12-0133-06

Optimization of ISSR reaction system and its preliminary application in wolfberry (*Lycium barbarum* L.)

DUAN Li-jun^{1,2}, CAO You-long², ZHOU Jun³

(1 College of Life Science and Technology, Xiaogan University, Xiaogan, Hubei 432000, China; 2 Ningxia Wolfberry Engineering and Technology Research Center, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan, Ningxia 750002, China; 3 School of Resource Management, Southwest Forestry College, Kunming, Yunnan 650224, China)

Abstract: **【Objective】** The study was conducted to obtain analysis means of wolfberry in genetic variation and relationship. **【Method】** The optimal ISSR-PCR reaction system in wolfberry was established by studying main influential factors. It was used to assess the germplasm genetic diversity among 13 individuals of wolfberry, including eight cultivars and five regeneration plantlets by anther culture. **【Result】** The optimal PCR system for ISSR analysis was as follows: $10\times\text{Buffer}$ 2.5 μL , 40 ng template DNA, 2.0 mmol/L Mg^{2+} , 0.1 mmol/L dNTPs, 0.6 $\mu\text{mol/L}$ Primer and 1 U *Taq* DNA Polymerase in 25 μL reaction volume. 80 total bands were amplified from 13 wolfberry with 15 ISSR primers, among which 61 were polymorphic bands. The polymorphic percentage was 76.3%. In dendrograms, they could be divided into two groups: one group containing 9 individuals such as Ningqi No. 1, Huapei No. 1, Ningqi No. 2, Huapei No. 2, Xiaomaye, Ningqi No. 3, Huapei No. 3, Gouqi 06-16, Huapei 06-16; the other consisting of 4 ones such as Gouqi 04-03-32, Huapei 04-03-32, Gouqi 04-03-29, Beifang. It indicated that Huapei No. 2, Huapei No. 3 and Huapei 04-03-32 were detected the DNA-level variations. **【Conclusion】** The results obtained can be used for

* [收稿日期] 2009-04-07

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30760127)

[作者简介] 段丽君(1982—),女,湖北黄冈人,硕士,主要从事枸杞生物技术研究。E-mail:dlj121@tom.com

[通信作者] 曹有龙(1963—),男,宁夏中宁人,研究员,博士,主要从事枸杞生物技术研究。

wolfberry genetics and genome research and give the theoretical basis for the breeding of wolfberry.

Key words: *Lycium barbarum* L.; ISSR; reaction system; genetic diversity

ISSR 是由 Zietkiewicz 等^[1]于 1994 年提出的一种基于 PCR 分子标记技术的新技术,它利用 15~24 个碱基的重复锚定引物扩增 SSR 之间的片段,具有操作简单、重复性好、稳定性高、多态性丰富等优点^[2],是一种非常具有发展前途的 DNA 指纹技术^[3]。目前,该技术在水稻、杏、烟草、辣椒、长茄等多种作物的 DNA 指纹图谱构建、真伪鉴定、遗传多样性与亲缘关系鉴定等方面得到应用^[4-8]。在枸杞遗传育种中,魏玉清等^[9]、Chen 等^[10]应用 RAPD 分子标记技术对不同地区和市场上的枸杞进行了研究;石志刚等^[11]用 nrDNA ITS 序列分析了 18 份宁夏枸杞资源的遗传多样性,但利用 ISSR 分子标记技术研究枸杞尚未见报道。

枸杞(*Lycium barbarum* L.)属茄科,是多年生落叶灌木,俗成枸杞子,其营养丰富,既是名贵的中草药,又是良好的滋补品^[12]。枸杞新品种选育是提高现有品种产量、品质的关键技术措施。但是常规枸杞育种周期长,后代分离大,育种效率低。采用花药育种可以加速育种材料的纯合、缩短育种年限、提高选择效果。然而,通过花药培养和小孢子培养获得的再生植株并不一定是单倍体植株,特别是花药培养中存在药壁、药隔、花丝等体细胞的干扰,其倍性存在复杂性。本研究对枸杞 ISSR 反应体系中的各个主要影响因子进行了优化筛选,确立了枸杞 ISSR-PCR 的最佳反应体系,并利用该优化体系对 13 份枸杞种质材料进行了遗传多样性分析,以期对枸杞亲本选配和品种合理布局提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料 宁杞 1 号、宁杞 2 号、宁杞 3 号、北方、小麻叶、04-03-29、04-03-32、06-16 等 8 个枸杞品种(系),由宁夏枸杞工程技术研究中心种质资源圃提供,花培宁杞 1 号、花培宁杞 2 号、花培宁杞 3 号、花培 04-03-32、花培 06-16 等 5 个枸杞再生植株通过花药培养获得。

1.1.2 试剂与仪器 试剂:10×PCR Buffer、*Taq* DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 、dNTPs、DNA Ladder 等,均购自上海生工生物工程技术有限公司,为 Sigma 公司产品;研究用的 ISSR Primers 全部由上海生工生物工程技术有限公司合成。

主要仪器:Alpha Innotech 凝胶成像系统,PTC-200 型 PCR 仪,DYY-12 型水平电泳设备(北京六一),TU-1900 紫外可见分光光度仪。

1.2 方 法

1.2.1 枸杞 DNA 的提取 采用 Paterson 等^[13]的方法,并进行了部分修改优化。从枸杞实生苗与花药培养再生植株叶片中提取基因组 DNA,融于 $0.1\times TE$,并稀释到 $20\text{ ng}/\mu\text{L}$,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

1.2.2 ISSR-PCR 反应 以宁杞 1 号为试材,设置不同的模板 DNA、*Taq* DNA 聚合酶用量,以及不同的 Mg^{2+} 、引物和 dNTPs 浓度及退火温度梯度组合试验,依次对 ISSR 反应体系中的各主要影响因子进行筛选优化。设定 PCR 的基本反应体系为:总体积 $25\text{ }\mu\text{L}$,其中含 $10\times\text{Buffer } 2.5\text{ }\mu\text{L}$,模板 DNA 20 ng ,引物浓度 $0.6\text{ }\mu\text{mol/L}$,dNTPs 0.2 mmol/L ,*Taq* DNA 聚合酶 1 U , Mg^{2+} 1.5 mmol/L ,以重蒸馏水补充至 $25\text{ }\mu\text{L}$ 。ISSR-PCR 扩增程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s , $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 90 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s ,41 个循环;最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min ,降温至 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 终止反应。

PCR 扩增产物在 15 g/L 的琼脂糖凝胶上电泳分离($1\times\text{TAE}$ 系统),EB 染色后,使用 Alpha Innotech(Inc,USA)凝胶成像系统观察并拍照。

1.2.3 引物筛选 利用优化的 PCR 反应体系,从 50 个 ISSR 引物中筛选出 15 个扩增带型清晰、重复性好的引物。运用这些引物对 13 个枸杞品种(系)及再生植株样品进行扩增。

1.2.4 数据统计与分析 在相同迁移位置,有带记为 1,无带记为 0,扩增失败或缺失记为 9,以此为标准统计 ISSR 扩增产物,并建立数据库。利用 DPSv8.01 分析软件中的 Nei's 方法和 UPGMA 进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 模板 DNA 的提取与检测

本试验提取的枸杞 DNA 呈白色絮状沉淀,电泳结果显示 DNA 完整,无明显降解(图 1)。用紫外分光光度计测定 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值为 $1.3\sim 1.8$,说明提取的 DNA 纯度较好,可以用于 ISSR 分析。



图 1 13 个枸杞样品的总 DNA 电泳检测图谱

Fig. 1 Genomic DNA electrophoresis patterns of Wolfberry samples

2.2 ISSR 反应体系的优化

2.2.1 模板 DNA 用量对 ISSR-PCR 反应的影响

本研究设置了 1,5,10,20,30,40,50,60,70 和 80 ng 10 个模板 DNA 用量梯度。从图 2 可以看出,随着模板 DNA 用量的增加,有些扩增条带亮度略有增加;模板 DNA 用量为 1 ng 时,扩增产物得率低,扩增条带弱;模版 DNA 用量为 5~40 ng 时,均扩增出相同的带型,其中以 40 ng 的扩增条带最清晰;模板 DNA 用量为 50~80 ng 时,扩增条带反而减少。因此,在正式 ISSR-PCR 试验时,每 25 μ L 的反应体

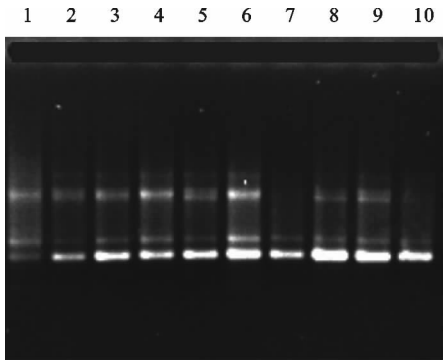


图 2 模板 DNA 用量对枸杞 ISSR-PCR 扩增结果的影响

1. 1 ng; 2. 5 ng; 3. 10 ng; 4. 20 ng; 5. 30 ng; 6. 40 ng; 7. 50 ng; 8. 60 ng; 9. 70 ng; 10. 80 ng

Fig. 2 Influence of DNA on ISSR-PCR in *Lycium barbarum* L.

2.2.3 *Taq* DNA 聚合酶用量对 ISSR-PCR 反应的影响 本研究设置了 0.5,0.75,1.0,1.25,1.5,1.75,2.0 和 2.5 U 8 个 *Taq* DNA 聚合酶用量梯度。从图 4 可以看出,不同 *Taq* DNA 聚合酶用量的扩增效果差异较小,其中当 *Taq* DNA 聚合酶用量在 1.0~1.75 U 时带型清晰;*Taq* DNA 聚合酶用量为 0.5 和 0.75 U 时不能扩增出完整的带,扩增产物得率低,扩增的条带弱;*Taq* DNA 聚合酶用量为 2.0 和 2.5 U 时扩增条带较弱且背景模糊。从经济的角度考虑,*Taq* DNA 聚合酶用量以 1.0 U 为宜。

2.2.4 dNTPs 浓度对 ISSR-PCR 反应的影响 dNTPs 是 PCR 反应的原料之一,本研究设置了 50,100,150,200,250,300,350 和 400 μ mol/L 8 个

系中模板 DNA 用量定为 40 ng。

2.2.2 Mg^{2+} 浓度对 ISSR-PCR 反应的影响

Mg^{2+} 通过调节 *Taq* DNA 聚合酶的活性影响 PCR 扩增^[5]。将 Mg^{2+} 浓度设为 1.0,1.5,2.0,2.5,3.0,3.5,4.0 和 4.5 mmol/L 8 个处理,结果(图 3)显示, Mg^{2+} 浓度的变化对 ISSR 带的数量影响不大,但对条带的强弱影响较大。随着 Mg^{2+} 浓度的增高,扩增的特异性减弱,扩增条带亮度略有下降,且条带背景模糊、不稳定。相比而言, Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L 时条带清晰,背景较干净,为最适浓度。

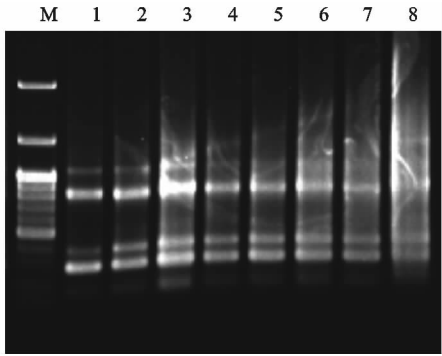


图 3 Mg^{2+} 浓度对枸杞 ISSR-PCR 扩增结果的影响

1. 1.0 mmol/L; 2. 1.5 mmol/L; 3. 2.0 mmol/L; 4. 2.5 mmol/L; 5. 3.0 mmol/L; 6. 3.5 mmol/L; 7. 4.0 mmol/L; 8. 4.5 mmol/L; M. Marker DL2000

Fig. 3 Influence of Mg^{2+} on ISSR-PCR in *Lycium barbarum* L.

dNTPs 浓度梯度。从图 5 可以看出,dNTPs 浓度为 50 μ mol/L 时不能扩增出完整的条带,扩增产物得率低,扩增的条带弱;dNTPs 浓度在 100~400 μ mol/L 时均能扩增出清晰稳定的条带。从经济的角度考虑,dNTPs 以 100 μ mol/L 为最适浓度。

2.2.5 引物浓度对 ISSR-PCR 反应的影响 本研究设置了 0.1,0.2,0.4,0.6,0.8 和 1.0 μ mol/L 6 个引物浓度梯度。从图 6 可以看出,引物浓度为 0.1 μ mol/L 时扩增的条带弱;引物浓度为 0.4 和 0.6 μ mol/L 时扩增的条带最清晰;引物浓度为 0.8 和 1.0 μ mol/L 时产生非特异性扩增产物,背景模糊。因此,本研究中引物浓度选 0.6 μ mol/L 为最适浓度。

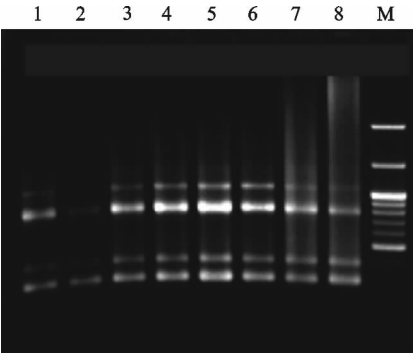


图 4 *Taq* DNA 聚合酶用量对枸杞 ISSR-PCR 扩增结果的影响
1. 0.5 U; 2. 0.75 U; 3. 1.0 U; 4. 1.25 U; 5. 1.5 U;
6. 1.75 U; 7. 2.0 U; 8. 2.5 U; M. Marker DL 2 000

Fig. 4 Influence of *Taq* polymerase on ISSR-PCR in *Lycium barbarum* L.

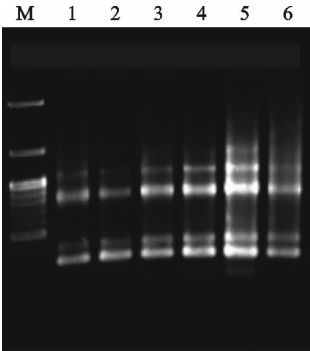


图 6 引物浓度对枸杞 ISSR-PCR 扩增结果的影响
1. 0.1 μmol/L; 2. 0.2 μmol/L; 3. 0.4 μmol/L;
4. 0.6 μmol/L; 5. 0.8 μmol/L; 6. 1.0 μmol/L;
M. Marker DL 2 000

Fig. 6 Influence of primer on ISSR-PCR in *Lycium barbarum* L.

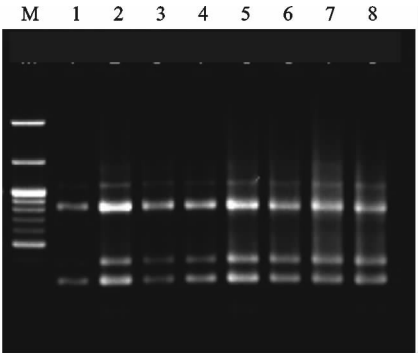


图 5 dNTPs 浓度对枸杞 ISSR-PCR 扩增结果的影响
1. 50 μmol/L; 2. 100 μmol/L; 3. 150 μmol/L;
4. 200 μmol/L; 5. 250 μmol/L; 6. 300 μmol/L;
7. 350 μmol/L; 8. 400 μmol/L; M. Marker DL 2 000

Fig. 5 Influence of dNTPs on ISSR-PCR in *Lycium barbarum* L.

2.2.6 退火温度对 ISSR-PCR 反应的影响 引物退火温度设置为 48~60 ℃,中间温度由 PTC-200 型 PCR 仪自动生成,共 10 个温度梯度,以引物 UBC886 为例。从图 7 可以看出,当退火温度为 48.0~53.1 ℃时,某些条带的亮度减弱且模糊,一些大的片段扩增缺失;当退火温度为 55.2 和 56.9 ℃时,扩增的条带数目多、带型清晰、亮度适当;当退火温度高于 56.9 ℃后,扩增的条带数目减少,最适温度定为 55.2 ℃。

2.3 13 份枸杞种质材料的 ISSR 谱带及其多样性分析

15 个引物在 13 份枸杞种质中共扩增出了 80 个 ISSR 标记位点,平均每条引物扩增出 5.3 个位点,其中有 61 个多态位点,多态位点比率为 76.3% (表 1)。每条引物的扩增位点数为 3~8 个,扩增所得的 DNA 片段长度在 200~3 000 bp。

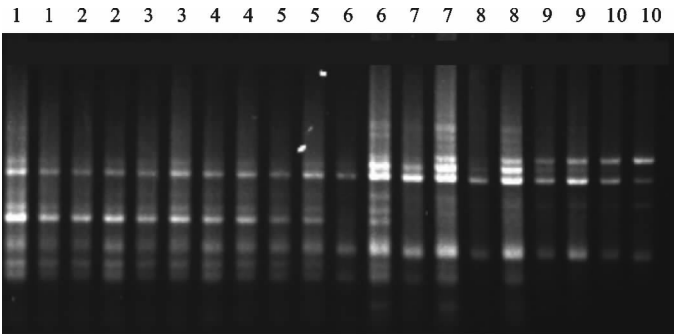


图 7 退火温度对枸杞 ISSR-PCR 扩增结果的影响
1. 48.0 ℃; 2. 48.3 ℃; 3. 49.1 ℃; 4. 50.0 ℃; 5. 51.4 ℃; 6. 53.1 ℃; 7. 55.2 ℃; 8. 56.9 ℃; 9. 58.2 ℃; 10. 59.1 ℃

Fig. 7 Influence of annealing temperature on ISSR-PCR in *Lycium barbarum* L.

表 1 枸杞 ISSR 引物及其扩增产物多态性水平

Table 1 Nucleotides sequence of ISSR Primers and their polymorphism of bands						
引物 Primer	序列 Sequence	<i>T_m</i> /℃	<i>T_a</i> /℃	总条带数 Number of total bands	多态性条带数 Number of polymorphic bands	多态位点比率/% Percentage of polymorphic bands
UBC811	(GA) ₈ C	52	53.1	8	7	87.5
UBC815	(CT) ₈ G	52	53.1	5	4	80
UBC823	(TC) ₈ C	52	53.1	5	3	60
UBC825	(AC) ₈ T	50	51.4	4	2	50
UBC834	(AG) ₈ YT	54	55.2	3	2	66.7
UBC840	(GA) ₈ YT	54	55.2	3	1	33.3
UBC844	(CT) ₈ RC	56	58.2	3	1	33.3
UBC845	(CT) ₈ RG	56	59.1	5	5	100
UBC853	(TC) ₈ RT	54	55.2	6	5	83.3
UBC857	(AC) ₈ YG	56	58.2	7	6	85.7
UBC873	(GACA) ₄	48	49.1	7	6	85.7
UBC878	(GGAT) ₄	48	49.1	5	4	80
UBC879	CTTCA) ₃	42	48	6	5	83.3
UBC886	VDV(TC) ₇	54	55.2	8	6	75
UBC890	VHV(GT) ₇	54	55.2	5	4	80
平均 Average		52.1	53.9	5.3	4.1	76.3

注: *T_m*. 引物熔解温度, *T_a*. 引物退火温度。Note: *T_m*. Melting temperature; *T_a*. Annealing temperature

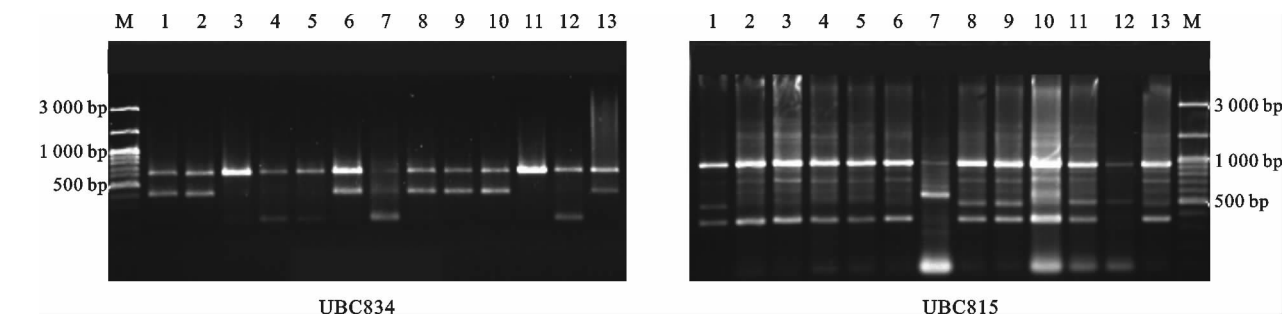


图 8 13 份枸杞种质材料分别以 UBC815 和 UBC834 为引物的 ISSR 扩增结果

1. 宁杞 1 号;2. 宁杞 2 号;3. 宁杞 3 号;4. 04-03-32;5. 04-03-29;6. 06-16;7. 北方;8. 小麻叶;9. 花培宁杞 1 号;
10. 花培宁杞 2 号;11. 花培宁杞 3 号;12. 花培 04-03-32;13. 花培 06-16;M. Marker(3 kb DNA Ladder)

Fig. 8 ISSR amplified products of primer UBC815 and UBC834 of the 13 *Lycium barbarum* L.

1. Ningqi No. 1;2. Ningqi No. 2;3. Ningqi No. 3;4. Gouqi 04-03-32;5. Gouqi 04-03-29;6. Gouqi 06-16;7. Beifang;8. Xiaomaye;
9. Huapei No. 1;10. Huapei No. 2;11. Huapei No. 3;12. Huapei 04-03-32;13. Huapei 06-16;M. Marker(3 kb DNA Ladder)

2. 4 13 份枸杞种质材料的遗传距离与 ISSR 聚类分析

分析

基于扩增产物数据库,用 DPSv8. 01 的 UPG-MA 法对 13 份枸杞种质材料进行聚类分析。从 ISSR 标记的聚类树(图 9)可以看出,13 份供试材料可以明显划分为 2 个类群:一类群含有宁杞 1 号及其花培植株、宁杞 2 号及其花培植株、小麻叶、宁杞 3 号及其花培植株、06-16 及其花培植株;另一类群含有 04-03-32 及其花培植株、04-03-29 和北方。从聚类结果来看,宁杞 1 号、宁杞 2 号、宁杞 3 号、小麻叶、06-16 亲缘关系较近;北方枸杞变种与 04-03-29,04-03-32 亲缘关系较近。04-03-29、04-03-32 的母本都是宁杞 1 号,父本都是北方变种,杂种一代与其父本亲缘关系较近,与母本亲缘关系相距较远。宁杞 2 号、宁杞 3 号、04-03-32 经花药培养所得到的再生植株与母株相

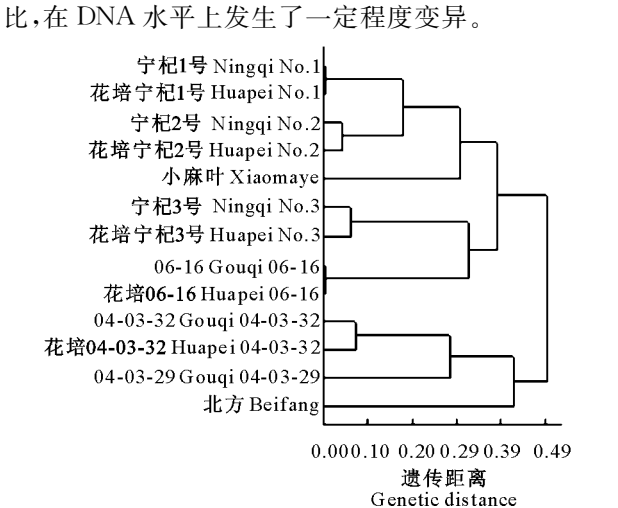


图 9 13 份枸杞种质材料的 ISSR 聚类图

Fig. 9 Dendrogram of the 13 *Lycium barbarum* L. based on the result of ISSR data

3 讨 论

ISSR 扩增反应混合物的各组分(包括模板 DNA 用量与纯度,引物、 Mg^{2+} 和 dNTPs 的浓度, *Taq* DNA 聚合酶用量等)以及 PCR 反应中的退火温度等,都会影响 DNA 扩增,从而影响扩增产物的可靠性和稳定性。因此,本研究对各影响因子进行优化,筛选出了枸杞最适宜的 ISSR 反应条件。模板用量是制约扩增产物得率及特异性的一个重要因子,模板用量过低,扩增效率低,过高则会导致非特异性扩增。本研究对模板 DNA 进行了 2 次纯化,纯度较高,5~40 ng 用量均可得到较好的扩增结果。*Taq* DNA 聚合酶是 PCR 反应的催化剂^[14]。*Taq* DNA 聚合酶用量过多不仅增加试验成本,而且极易产生非特异性扩增产物;过少则会导致产物的合成效率下降,因此应选择合适的 *Taq* DNA 聚合酶用量。本试验在 25 μ L 反应体系中选用 1.0 U 的 *Taq* DNA 聚合酶,结果获得了稳定清晰的谱带。 Mg^{2+} 浓度是影响 ISSR-PCR 结果的一个重要因素,其不仅影响 *Taq* DNA 聚合酶的活性,还能与反应液中的 dNTPs、模板 DNA 及引物结合,影响引物与模板的结合效率、模板与产物的解链温度以及产物的特异性和引物二聚体的形成^[15]。本研究得到的 Mg^{2+} 适合浓度为 2.0 mmol/L。dNTPs 是 ISSR-PCR 反应的原料,dNTPs 浓度过高会导致 PCR 错配,从而出现非特异性扩增;浓度过低又会影响合成效率,甚至会因过早消耗而使产物单链化,影响扩增效率^[8]。本试验中 dNTPs 浓度对扩增结果影响不大。引物浓度太低,影响合成效率;过高易引起错配和产生非特异性扩增,而且可增加引物之间形成二聚体的机会。引物退火温度明显影响扩增谱带式样,温度过低或过高都会产生非特异性条带,影响目的条带的清晰度。

[参考文献]

- [1] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats(SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20(2): 176-183.
- [2] 李进波, 江良荣, 李春海. 水稻光温敏核不育系的 ISSR 和 SSR 遗传分析比较 [J]. *分子植物育种*, 2003, 1(1): 42-47.
Li J B, Jiang L R, Li C H. Comparisons of genetic analysis based on ISSR and SSR in PGMS and TGMS rice lines [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2003, 1(1): 42-47. (in Chinese)
- [3] 周延清, 景建洲, 李振勇, 等. 利用 RAPD 和 ISSR 分子标记分析地黄种质遗传多样性 [J]. *遗传*, 2004, 26(6): 922-928.
- [4] Zhou Y Q, Jing J Z, Li Z Y, et al. Assessment of genetic diversity of *Rehmannia glutinosa* germplasm detected by RAPDs and ISSRs [J]. *Hereditas*, 2004, 26(6): 922-928. (in Chinese)
- [4] 黄光文, 陈觉梁, 王伟成, 等. 运用 ISSR 标记鉴别水稻品种的初步研究 [J]. *杂交水稻*, 2006, 21(3): 64-67.
Huang G W, Chen J L, Wang W C, et al. Preliminary studies on using ISSR marker to differentiate rice varieties [J]. *Hybrid Rice*, 2006, 21(3): 64-67. (in Chinese)
- [5] 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.
Liu W S, Feng C J, Yang J M, et al. Optimization of ISSR reaction system and construction of cultivar fingerprint in apricot [J]. *Journal of Fruit Science*, 2005, 22(6): 626-629. (in Chinese)
- [6] 祁建民, 王 涛, 陈顺辉, 等. 部分烟草种质遗传多样性与亲缘关系的 ISSR 标记分析 [J]. *作物学报*, 2006, 32(3): 373-378.
Qi J M, Wang T, Chen S H, et al. Genetic diversity and genetic relatives analysis of tobacco germplasm based on inter-simple sequence repeat (ISSR) [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2006, 32(3): 373-378. (in Chinese)
- [7] 陈学军, 程志芳, 陈劲枫, 等. 辣椒种质遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 及其表型数据分析 [J]. *西北植物学报*, 2007, 27(4): 662-670.
Chen X J, Cheng Z F, Chen J F, et al. Genetic diversity of pepper germplasm with RAPD, ISSR and phenotypic data [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2007, 27(4): 662-670. (in Chinese)
- [8] 毛伟海, 杜黎明, 包崇来, 等. 我国南方长茄种质资源的 ISSR 标记分析 [J]. *园艺学报*, 2006, 33(5): 1109-1112.
Mao W H, Du L M, Bao C L, et al. Genetic diversity and genetic relatives analysis of southern long-eggplant germplasm based on inter-simple sequence repeat (ISSR) [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2006, 33(5): 1109-1112. (in Chinese)
- [9] 魏玉清, 许 兴, 王 璞. 不同地区主要栽培宁夏枸杞品种的 RAPD 分析 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2007, 35(1): 91-95.
Wei Y Q, Xu X, Wang P. RAPD analysis of *Lycium barbarum* L. cultivated in diferent areas of Ningxia [J]. *Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed*, 2007, 35(1): 91-95. (in Chinese)
- [10] Chen K T, Chang C H, Huang H, et al. RAPD analysis of *Lycium barbarum* medicine in Taiwan market [J]. *Bot Bull Acad Sin*, 2000, 41: 11-14.
- [11] 石志刚, 安 巍, 焦恩宁, 等. 基于 nrDNA ITS 序列的 18 份宁夏枸杞资源的遗传多样性 [J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(24): 10379-10380.
Shi Z G, An W, Jiao E N, et al. Genetic Polymorphism of 18 *Lycium barbarum* resources based on nrDNA ITS sequences [J]. *Journal of Anhui Agri Sci*, 2008, 36(24): 10379-10380. (in Chinese)