

# 假臭草 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化

黎丽倩, 李妮亚, 刘 强\*, 王 婷, 杨 丽, 石俊菲

(热带动植物生态学省部共建教育部重点实验室 海南师范大学 生命科学院, 海南 海口 571158)

**摘 要:**采用单因子试验、L16 (4<sup>5</sup>) 正交试验设计, 以假臭草 DNA 为模板, 研究了 PCR 反应体系中的 5 种主要成分, 即 Mg<sup>2+</sup>、dNTPs、Taq 酶、引物及模板, 对假臭草 ISSR-PCR 扩增结果的影响, 并对引物退火温度进行了筛选和优化。建立了假臭草 ISSR 最佳反应体系: 在 20 μL 的反应体系中, Mg<sup>2+</sup> 为 2.0 mmol/L, 模板 DNA 用量为 60 ng, TaqDNA 聚合酶为 1.5 U, dNTPs 浓度为 0.2 mmol/L, 引物浓度为 0.3 μmol/L。假臭草 ISSR 反应体系的建立为利用该技术分析假臭草遗传多样性及探索防控措施提供良好的基础。

**关键词:**假臭草; ISSR; 反应体系; 优化

**中图分类号:**S722.33

**文献标志码:**A

**文章编号:**1001-7461(2013)02-0083-07

Establishment and Optimization of ISSR-PCR Reaction System for *Eupatorium catarium*

LI Li-qian, LI Ni-ya, LIU Qiang\*, WANG Ting, YANG Li, SHI Jun-fei

(Key Laboratory for Tropical Animal and Plant Ecology, Ministry of Education, College of Life Science,  
Hainan Normal University, Haikou, Hainan 571158, China)

**Abstract:** The effects of 5 factors (Mg<sup>2+</sup> concentration, dNTPs concentration, Taq DNA polymerase dosage, primer concentration and DNA templates concentration) on ISSR amplification were tested, and the annealing temperature was selected and optimized for establishment of a suitable ISSR-PCR reaction system of *Eupatorium catarium* through single factor test and orthogonal experiment design of L16 (4<sup>5</sup>). The results showed that the optimal ISSR-PCR reaction system (20 μL) contained 2.0 mmol/L Mg<sup>2+</sup>, 60 ng DNA template, 1.5 U Taq DNA polymerase, 200 μmol/L dNTPs and 0.3 μmol/L primer. The establishment of the ISSR-PCR reaction system could lay a favorable foundation for the analysis of the genetic diversity of *E. catarium* and for the exploration of prevention and control strategy for *E. catarium*.

**Key words:** *Eupatorium catarium*; ISSR; reaction system; optimization

假臭草又名猫腥草(*Eupatorium catarium*)或(*Praxelis clematidea* R. M. King)<sup>[1]</sup>, 自 20 世纪 80 年代首次发现于我国香港特别行政区的荒地、路边及市区的假臭草<sup>[2]</sup>, 属双子叶植物纲(Dicotyledoneae)菊目(Asterales)菊科(Compositae)泽兰属(*Eupatorium*)植物。到了 90 年代, 开始在深圳被发现, 后来陆续在广州等其他地方也被发现<sup>[3]</sup>。目前, 海南分布的主要外来入侵植物共有 91 种, 其中假臭草为最严重的入侵植物之一<sup>[4]</sup>。海南省 2004 年首次

记录假臭草<sup>[5]</sup>, 但之前可能已经生长并开始蔓延。因其特有的生态、生理特性, 如生态位宽度较大, 且与其他物种在生态位上都存在重叠<sup>[6]</sup>, 说明它的适应性极强, 致使入侵后很快便存活下来, 并在入侵地成为优势单种, 对入侵地带来了不可忽视的破坏, 引起生态多样性锐减, 农业耕地面积减少, 土壤肥力下降等问题。邓世明<sup>[7]</sup>等对假臭草的黄酮类成分进行研究, 为其入侵机制提供基础。

ISSR 又称简单重复序列区间扩增, 是近年来发

收稿日期: 2012-07-07 修回日期: 2012-10-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060095)。

作者简介: 黎丽倩, 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 恢复生态学。E-mail: 395005396@qq.com

\* 通信作者: 刘强, 男, 博士, 教授, 主要从事植物生态学研究。E-mail: hnsylq@163.com

展起来的一类新型的分子标记技术,具有无需知道任何靶标序列的微卫星背景信息、遗传多态性高、检测快速等特点<sup>[8-9]</sup>。因此,如果能将该技术用于外来入侵物种遗传多样性的研究将带来突破性的发现,对防范该物种的入侵取得重要进步。

对于假臭草 ISSR-PCR 反应体系的建立和优化研究鲜见报道,由于该方法是基于 PCR 的一种标记,其反应条件同样易受到 PCR 反应各因素的影响。为了确保假臭草 ISSR 分析结果的可靠性和重复性,本研究通过单因素试验和反应参数正交试验设计相结合的方式对假臭草 ISSR-PCR 反应体系进行优化,以期利用 ISSR 分子标记对不同地理来源假臭草的遗传多样性分析,进而为假臭草的分布、入侵路线及亲缘关系提供可靠的信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

假臭草样品采集于广东省 3 个不同的市县(鹤山市、徐闻县、阳江市)及海南省 5 个不同市县(海口、琼海、三亚、琼中、儋州)中生长的假臭草群落,每个地区又在 3 个不同的采集地点分别采集 20 个样品,及每个地区采集 60 个样。将采集到的假臭草新鲜叶片放入封口袋中,转至-20℃冰箱保存、备用。

### 1.2 方法

1.2.1 假臭草 DNA 的提取 采用 TIANGEN 公司的植物基因组提取试剂盒法从假臭草成熟叶片中提取 DNA,操作按照说明书进行。

1.2.2 ISSR-PCR 反应的单因子试验 ISSR-PCR 扩增反应体系的优化按常规采用单因素试验,共试验了 5 个因素各 8 个水平。经初步筛选以引物 UBC856(ACACACACACACACACYA)为优化试验的引物。分别对  $Mg^{2+}$ 、dNTP、Taq 酶、引物和模板 DNA 浓度等 5 个因素进行梯度试验,筛选其合适的使用浓度。在  $Mg^{2+}$  浓度试验中设 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mmol · L<sup>-1</sup> 8 个梯度; dNTP 浓度试验中设 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40 mmol · L<sup>-1</sup> 8 个梯度;Taq 酶浓度设 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 U/20 μL 8 个梯度;引物浓度设 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 μmol · L<sup>-1</sup> 8 个梯度;模板 DNA 浓度设 5、10、20、40、60、80、160、320 ng/20 μL 8 个梯度。反应程序为:94℃预变性 10 min,然后按 94℃变性 1 min,53℃退火 35 s,72℃延伸 72 s,40 次循环;72℃延伸 10 min,4℃保存<sup>[10]</sup>。

1.2.3 ISSR-PCR 反映因素水平的正交试验设计 根据单因子试验结果,初步建立假臭草 ISSR 反

应体系各主要成分的适宜浓度范围,针对影响 PCR 反应的  $Mg^{2+}$ 、dNTPs、引物、Taq 酶和模板 DNA 5 个因素,选用 L16 (4<sup>5</sup>)正交表在 4 个水平上进行试验(表 1)。PCR 反应体系总体积为 20 μL。PCR 反应程序同 1.2.2。

1.2.4 ISSR 引物的筛选与退火温度的确定 依据上述试验的最优反应体系对退火温度进行优化,采用梯度 PCR 模式,自动设定温度从 50.5~59℃,生成的温度梯度为 50.5、50.9、51.3、52.2、53.2、54.2、55.2、56.2、57.3、58.1、58.5、59.0℃。通过引物的 *T<sub>m</sub>* 值,选取了 50.9、52.2、54.2、55.2、56.2、58.1℃ 6 个较相近的温度作为引物退火温度的确定试验,PCR 扩增程序同 1.2.2。

表 1 ISSR-PCR 正交设计试验 (L16 (4<sup>5</sup>))

Table 1 L16 (4<sup>5</sup>) orthogonal design for ISSR-PCR

处理组合	因素				
	$Mg^{2+}$ /(mmol · L <sup>-1</sup> )	Taq 酶 /(U · 20μL <sup>-1</sup> )	引物 /(μmol · L <sup>-1</sup> )	模板 DNA /ng	dNTP /(mmol · L <sup>-1</sup> )
1	1.5	0.5	0.3	50	0.1
2	1.5	1.0	0.4	100	0.2
3	1.5	1.5	0.5	150	0.3
4	1.5	2.0	0.6	200	0.4
5	2.0	0.5	0.4	150	0.4
6	2.0	1.0	0.3	200	0.3
7	2.0	1.5	0.6	50	0.2
8	2.0	2.0	0.5	100	0.1
9	2.5	0.5	0.5	200	0.2
10	2.5	1.0	0.6	150	0.1
11	2.5	1.5	0.3	100	0.4
12	2.5	2.0	0.4	50	0.3
13	3.0	0.5	0.6	100	0.3
14	3.0	1.0	0.5	50	0.4
15	3.0	1.5	0.4	200	0.1
16	3.0	2.0	0.3	150	0.2

## 2 结果与分析

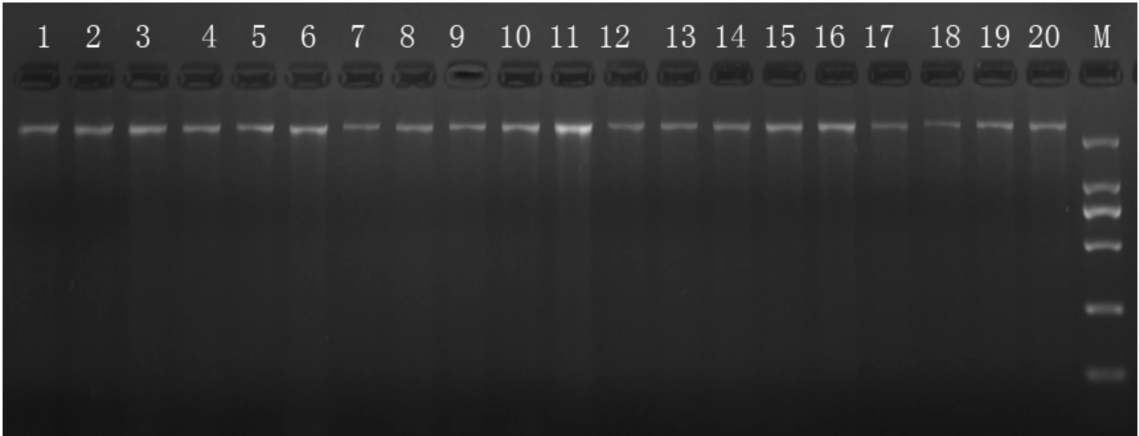
### 2.1 假臭草 DNA 提取结果

从图 1 的琼脂糖凝胶电泳图中可以看出,所提取的 20 个 DNA 样的主带都较清晰,迁移率低,排列整齐,完整性好,无明显降解现象,点样孔基本无滞留,能满足 ISSR 分析的要求。

### 2.2 ISSR-PCR 反应体系的单因素试验分析

2.2.1  $Mg^{2+}$  浓度对 ISSR 扩增的影响 本试验设立了 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mmol · L<sup>-1</sup>(由左至右) 8 个浓度梯度。扩增结果表明(图 2-A),当  $Mg^{2+}$  浓度为 0.5 mmol · L<sup>-1</sup> 时扩增谱带不明显, $Mg^{2+}$  浓度为 1.0 ~ 3.0 mmol · L<sup>-1</sup> 时都有扩增条带出现,但  $Mg^{2+}$  浓度为 1.0 mmol 时,扩增条带较弱,不清晰,当  $Mg^{2+}$  为 1.5、2.0、2.5 mmol ·

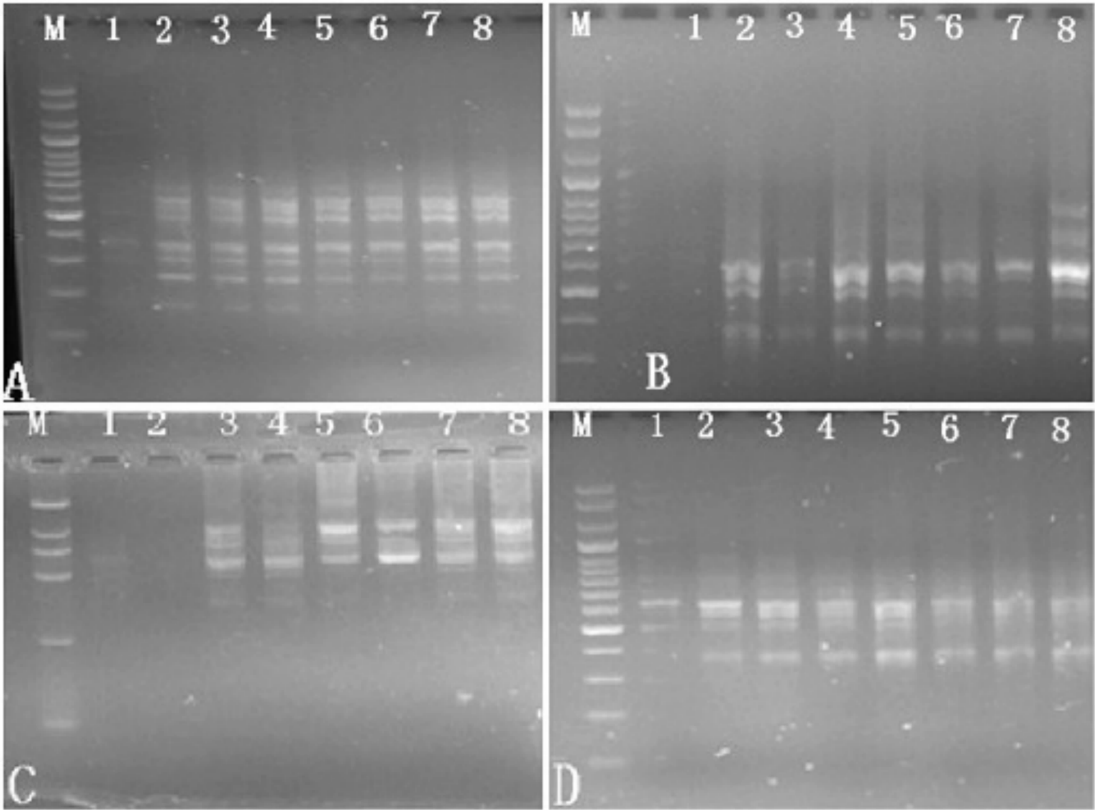
$\text{L}^{-1}$ 时扩增的谱带清晰、完全,  $\text{Mg}^{2+}$  浓度为 3.0、3.5、4.0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时有一定的弥散和拖尾现象。再比较 1.5、2.0、2.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的条带, 浓度 2.0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的  $\text{Mg}^{2+}$  的条带更清晰、完全。因此, 本试验选用  $\text{Mg}^{2+}$  浓度 2.0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为 ISSR 的扩增参数。



注:1~20 为不同样地的 DNA,M 为标准分子。

图 1 用试剂盒提取的鹤山地区 20 个样的 DNA

Fig. 1 20 samples of DNA in Heshan by extraction kit



注:A:不同  $\text{Mg}^{2+}$  浓度对假臭草 ISSR-PCR 扩增效果的影响 1-8,M. 标准分子量(表 3 同);B:不同 dNTP 浓度对假臭草 ISSR-PCR 扩增效果的影响,1-8. 从低到高的不同浓度水平;C:不同 Taq DNA 聚合酶浓度对假臭草 ISSR-PCR 扩增效果的影响;D:不同引物浓度对假臭草 ISSR-PCR 扩增效果的影响。

图 2 假臭草 ISSR-PCR 反应体系优化的 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification result of the optimization ISSR-PCR reaction system about praxelis

2.2.2 dNTP 浓度对 ISSR 扩增的影响 dNTPs 参与新链 DNA 的合成,它的大小与 ISSR-PCR 的扩增条带数及清晰度密切相关。本试验设计了 8 个 dNTPs 浓度梯度:0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、

0.30、0.35、0.40  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (由左至右),试验结果显示(图 2-B),当浓度为 0.05  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,基本没有条带出现;当浓度为 0.10、0.15  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,扩增条带较弱;当浓度为 0.20~0.25  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

时,出现的条带清晰、整齐,随着浓度的增加;当 dNTP 为  $0.30\sim0.35\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,条带开始变弱,变少;当为  $0.4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,出现了弥散现象。所以本试验 dNTP 的最适宜浓度为  $0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2.3 Taq DNA 聚合酶浓度对 ISSR-PCR 的影响

Taq 酶对扩增结果影响较大,当 Taq 酶量过低,PCR 反应的敏感性差,扩增产物少;Taq 酶量过高扩增反应的特异性降低,产生大量的弥散片断,形成很亮的背景。如(图 2-C)显示,浓度由左至右分别为 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0,3.5,4.0 U,当 Taq 酶为 0.5、1.0 U 时,条带太弱,不易辨别;当 Taq 酶为 1.5~4.0 U 时均有条带出现。但从 2.0 U 开始它们的条带都开始有弥散现象,相比较而言,在 1.5 U 时比较的清晰整齐。故本试验 Taq 酶的最适宜浓度为 1.5 U。

2.2.4 模板 DNA 量对 ISSR 扩增的影响 结果(图 3-A)显示模板用量从 5、10、20、40、60、80、160 到 320 ng,均有条带出现,出 5 ng 时条带模糊外,其他基本都较整齐,由此可知,ISSR 扩增对模板浓度不太敏感,适宜范围较宽。

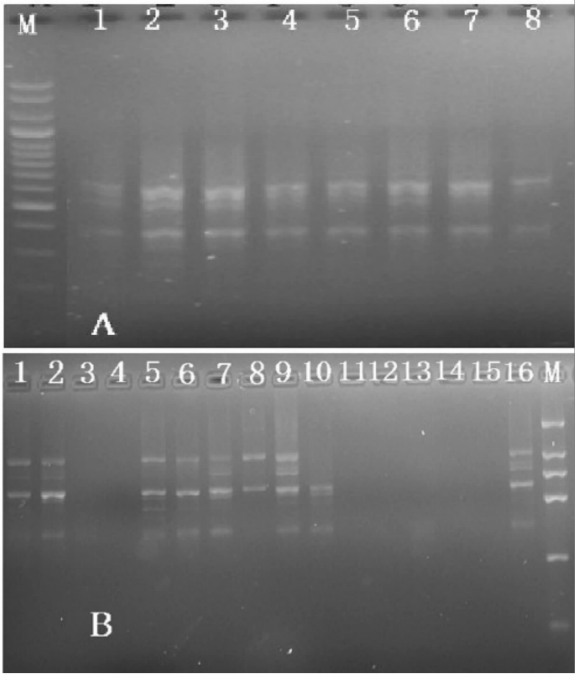
2.2.5 引物浓度对 ISSR 带的影响 如图(2-D),由左至右 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  这 8 个浓度的引物都有扩增条带出现,当浓度较低时,扩增强度弱,条带不清晰;浓度为  $0.3\sim0.4\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,条带明显;当浓度为  $0.5\sim0.8\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,虽也有条带出现,但开始逐渐变模糊,出现弥散现象。因此将本试验引物的适宜浓度确定在  $0.3\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3 PCR 正交试验设计直观分析

由于 PCR 各因子之间存在交互作用,单因素试验筛选 ISSR-PCR 各成分适宜浓度的任意组合并不一定能扩增出理想条带。本研究在单因子试验的基础上,设计  $\text{Mg}^{2+}$ 、dNTPs、引物、模板和 Taq 酶 5 因素 4 水平的正交试验建立了适合假臭草 ISSR 分子标记的反应体系(表 1)。根据正交试验 L16 ( $4^5$ ) 表,进行了正交反应体系的优化(图 3-B),L16 ( $4^5$ ) 正交试验结果显示不同引物 ISSR-PCR 各成分适宜浓度组合存在一定的差异,仔细比较这 16 条泳道。可以直观看出第 7 条泳道出现的条带数较多、清晰、整齐。且该泳道组合与单因素试验的结果也吻合。为此选用第 7 个组合确定为最佳反应体系:在 20  $\mu\text{L}$  的反应体系中,  $\text{Mg}^{2+}$   $2.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,模板 DNA 用量为 60 ng, Taq 酶为 1.5 U, dNTPs 浓度为 200  $\mu\text{mol/L}$ ,引物浓度为  $0.3\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.4 引物筛选结果及退火温度的确定

退火温度明显影响扩增谱带式样。它不仅与引



注:图 3-A:不同浓度模板 DNA 量对 ISSR 扩增的影响,图 3-B:正交试验 PCR 产物电泳结果,1-16. 不同处理组合,M. 标准分子。

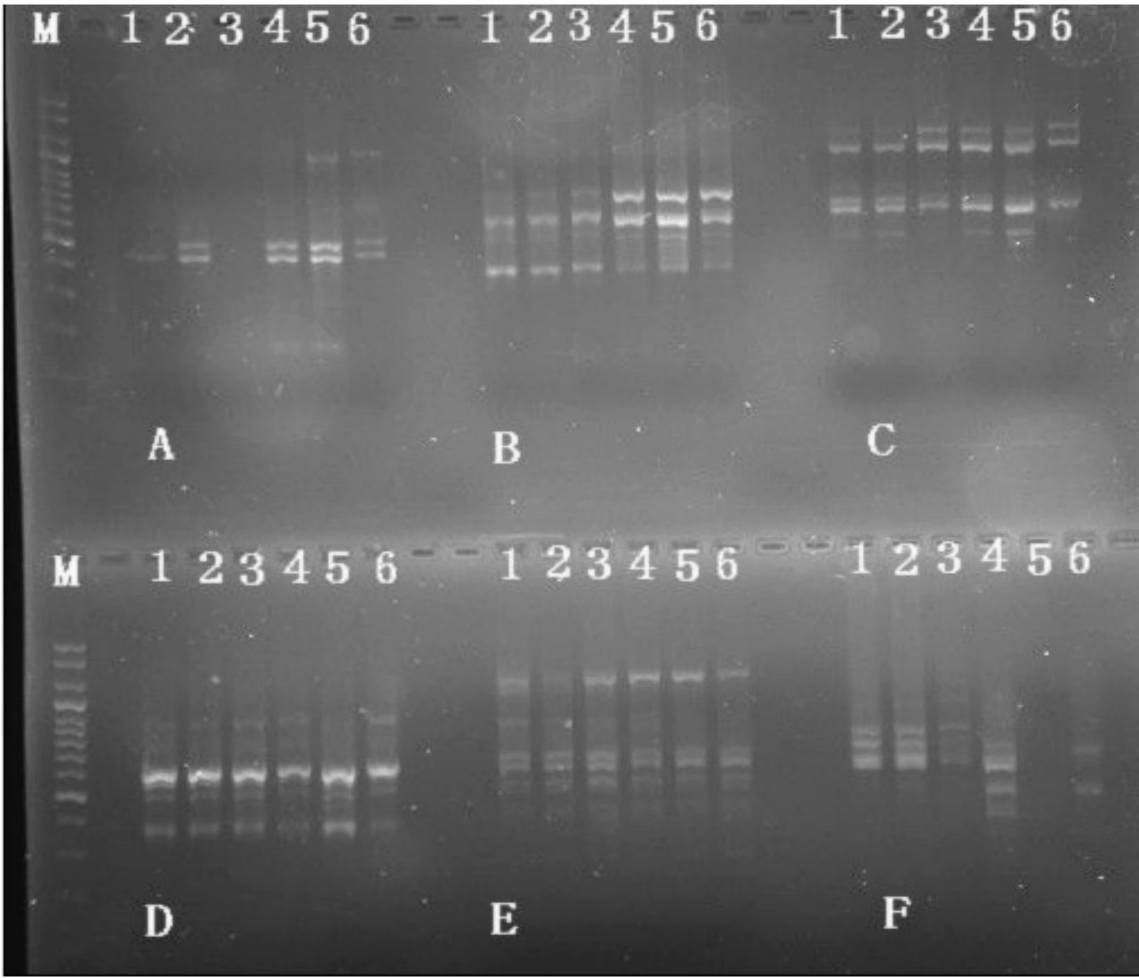
图 3 假臭草 ISSR-PCR 反应体系建立和优化的 PCR 扩增结果

Fig. 3 PCR amplification result of the establishment and optimization of ISSR-PCR

物序列有关,而且还与物种的序列有密切关系。本研究采用优化后的反应体系为试验条件,对委托上海生物工程技术服务有限公司合成的 60 条引物同时进行退火温度优化和有效引物筛选。6 个退火温度下 PCR 扩增的结果见图 4,从图中可以看出,退火温度对假臭草 ISSR-PCR 反应的影响很大。以引物 UBC-856 为例:当退火温度为  $50.9\sim54.2^{\circ}\text{C}$  时,产生的条带较为清晰、一致,当退火温度为  $55.2\sim58.1^{\circ}\text{C}$  时,条带虽清晰,但不稳定,相比较而言,当退火温度为  $54.2^{\circ}\text{C}$  时,条带数较多且清晰,所以引物 UBC-856 的最佳退火温度为  $54.2^{\circ}\text{C}$ 。又如引物 UBC-881:当退火温度为  $50.9\sim56.2^{\circ}\text{C}$  时,产生的条带数逐渐增多但是条带模糊,当退火温度为  $58.1^{\circ}\text{C}$  时,条带数明显减少,而当退火温度为  $56.2^{\circ}\text{C}$  时条带数较为清晰且条带数最多。因此,UBC-881 的最佳退火温度为  $56.2^{\circ}\text{C}$ 。再如引物 UBC-844(图略),由于无条带扩增出来,故 UBC-844 不是假臭草的有效引物。

2.5 ISSR-PCR 反应体系稳定性的检测

根据上述假臭草 ISSR-PCR 反应体系建立和优化的试验结果,采用最佳反应体系,对徐闻样区假臭草的 60 个样本进行 PCR 扩增(图 5),可以看出均



注:泳道 1~6 分别表示 6 个不同的退火温度:50.9、52.2、54.2、55.2、56.2、58.1℃,M:标准分子,  
A~F 分别代表引物 UBC810、UBC817、UBC881、UBC856、UBC855、UBC847。

图 4 引物筛选结果及退火温度

Fig. 4 The primer selection and the annealing temperature

能扩增出较清晰的条带且稳定性很好,表明通过优化试验筛选出的反应体系稳定和重复性好,适合于假臭草 ISSR-PCR 反应。

3 讨论

3.1 ISSR 反应体系中几个主要成分对 PCR 反应稳定性的影响

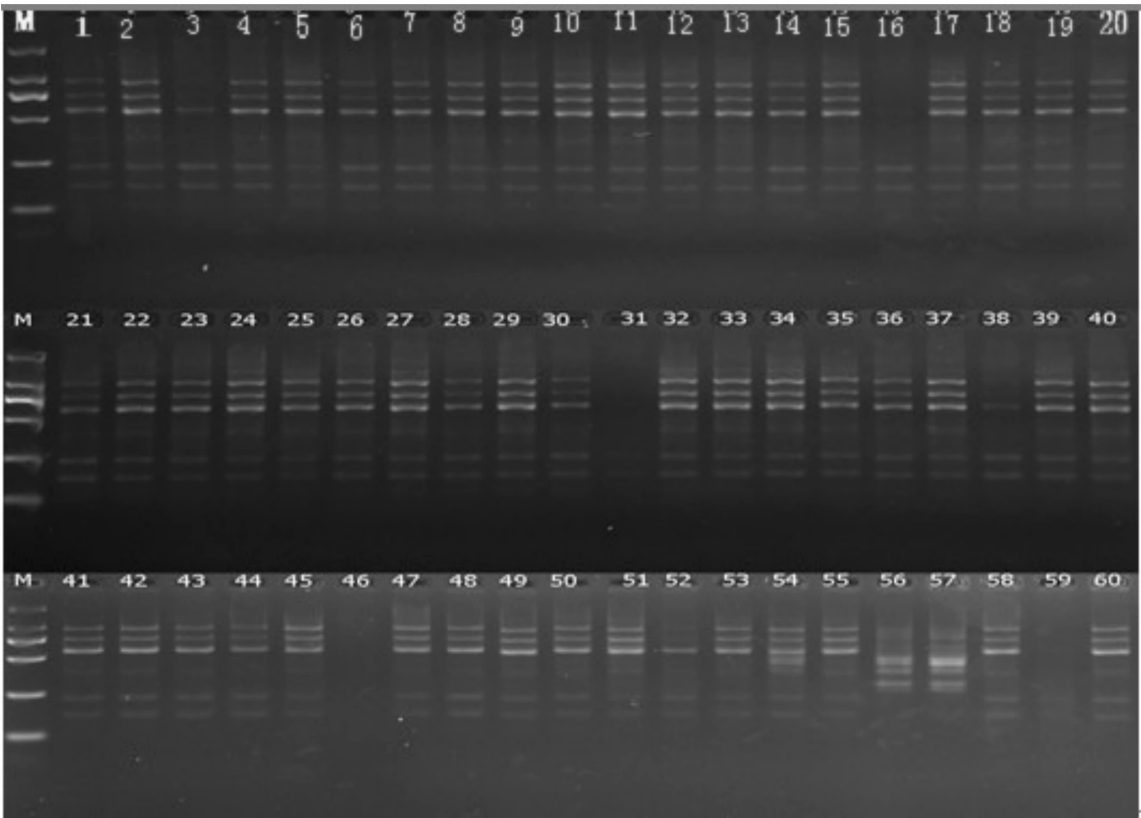
本研究以假臭草 DNA 为模板,采用了单因子试验和正交试验 2 种方法对 ISSR-PCR 反应体系进行优化。这 2 种方法的试验结果都显示 PCR 产物的质量和生成都主要受这一反应体系中  $Mg^{2+}$  浓度、dNTPs、Taq 酶、假臭草 DNA 模板和引物这 5 个主要因子及其浓度的影响。

$Mg^{2+}$  浓度对 PCR 扩增的特异性和产量有显著影响, $Mg^{2+}$  浓度过高,容易产生非特异性扩增,而过低会降低扩增率,甚至不出现扩增条带。 $Mg^{2+}$  还能跟反应液中的模板 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<sup>[11]</sup>。不同引物和模板的最适  $Mg^{2+}$  浓度都不同,对于假臭草 ISSR 反应体系  $Mg^{2+}$  浓度在  $1.5 \sim 2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  这一范围扩增效果比较好。本研究得到的  $Mg^{2+}$  优化浓度为  $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  也证实了这一点。

dNTPs 作为 PCR 反应的原料,量太少会影响扩增反应的稳定性,使扩增不完全,量太多可能出现非特性扩增,本研究初步确定 dNTPs 的最适宜浓度为  $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Taq 酶用量是影响 PCR 反应的重要因子,酶量过多不仅增加试验成本,而且会导致非特异性扩增产物的增加,反之酶量过低则会引起 PCR 扩增量的不足,本试验 Taq 酶用量确定为 1.5 U。

从单因子的试验中可以看出模板 DNA 的量对扩增影响不是很大,ISSR 扩增对模板的范围较宽。引物与模板 DNA 结合的程度和结合量是影响 PCR 扩增产率和稳定性的主要因子,引物浓度过低会影响 PCR 扩增的稳定性,使得扩增不完全,浓度过高则会产生非特异性扩增,本试验将引物的适宜浓度



注:1~60 为徐闻地区 60 个模板扩增结果,M:标准分子

图 5 引物 UBC891 对徐闻地区假臭草的扩增结果

Fig. 5 Effect of primer UBC891 on ISSR amplification in Xuwen

确定为 0.3  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.2 单因子试验与正交试验的优化比较

目前常用于 ISSR 试验条件优化的方法有 2 种,即单因子优化和正交试验优化。正交试验优化设计具有均衡分散、综合可比及可伸可缩、效应明确的特性,可了解各因素之间的内在规律,较快地找到最佳的水平组合<sup>[12]</sup>。但正交试验不能很好地估计试验误差,对结果的评价带有一定的主观成分,使各因素最佳反应水平缺乏可靠性。大多数研究在设计正交试验因子水平时,是参考其他类似物种 ISSR-PCR 反应体系的报道<sup>[13-14]</sup>。为获得理想的试验体系,试验者一般会多次调整因子浓度水平致使正交试验变得繁琐。采用单因子 PCR 优化设计对各个影响因素逐一进行研究,对最佳水平的确定更直观,但单因子试验不能兼顾各成分之间的交互作用<sup>[15]</sup>,因此单因素试验筛选 ISSR-PCR 各成分适宜浓度的任意组合并不一定能扩增出理想条带。本研究先是利用单因子试验建立假臭草 ISSR-PCR 反应体系中主要成分的适宜浓度范围,再设计正交试验确立最适 ISSR-PCR 反应体系。

3.3 ISSR 在部分入侵植物遗传多样性分析中的应用

ISSR 标记符合孟德尔遗传规律,具有良好的遗

传稳定性和多态性;遗传多态性高<sup>[16]</sup>。因此,ISSR 分子标记在研究物种的遗传多样性和遗传结构等方面已经获得了广泛的应用<sup>[8-9]</sup>。W. H. Ye<sup>[17]</sup>等运用 ISSR 技术对中国 27 个飞机草(*Chromolaena odorata*)种群的遗传结构研究表明,所有种群的遗传变异都很低,多态位点比率为 0 %~7.69%,平均 2.35%。在不同地域和生境广布的假臭草种群可能有具较高的遗传多样性,通过遗传分化机制适应多变的生境。Wang<sup>[10]</sup>等采用 ISSR 标记技术对华南 28 个薇甘菊(*Mikaina micrantha* 为假臭草的同科植物)种群的遗传结构进行分析,发现无性繁殖是主导的繁殖方式,种群遗传结构未受到无性繁殖的影响。从试验结果可以看出,利用优化后的假臭草 ISSR-PCR 反应体系,对广州徐闻地区 3 种生境假臭草的 60 个样本进行 PCR 扩增,获得了较好的结果(图 5),为下一步进行假臭草遗传多样性和遗传结构分析提供试验基础。

4 结论

根据本试验的结果,最终筛选出了假臭草 IS- SR-PCR 的最佳的稳定的反应体系,即在 20  $\mu\text{L}$  的反应体系中, $\text{Mg}^{2+}$  为 2.0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,模板 DNA

用量为 60 ng,Taq 酶为 1.5 U,dNTPs 浓度为 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,引物浓度为 0.3  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  扩增程序: 94℃预变性 10 min,然后按 94℃变性 1 min,50.9 ~56.2℃退火 35 s,72℃延伸 72 s,40 次循环;72℃延伸 10 min,4℃保存。通过反应体系稳定性检测表明,本试验建立的假臭草 ISSR-PCR 反应体系稳定可靠,该研究为进一步利用 ISSR 分子标记技术进行假臭草遗传多样性分析奠定了基础。

参考文献:

[1] WATERHOUSE B M. Know your enemy; recent records of potentially serious weeds in northern Australia, Papua New Guinea and Papua( Indonesia) [J]. Telopea, 2003, 10 (1) : 477-485.

[2] 吴世捷,高力行. 不受欢迎的生物多样性:香港的外来植物物种 [J]. 生物多样性,2002,10 (1):109 -118.

WU S J,GAO L X. The bad biodiversity;alien plant species in Hong Kong[J]. Chinese Biodiversity,2002,10 (1):109-118.

[3] 李振宇,解焱. 中国外来入侵种[M]. 北京:中国林业出版社, 2002:166.

LI Z Y,JIE Y. Invasive Alien Species in China[M]. Beijing: China Forestry Press,2002:164 .

[4] 安锋,阚丽艳,谢贵水,等. 海南外来植物入侵的现状与对策 [J]. 西北林学院学报,2007,22(5):193-197.

AN F,KAN L Y,XIE G S,*et al.* Alien Invasion Plants in Hainan Island and Contral Countermeasures[J]. Journal of Northwest Forestry University,2007,22(5):193-197. (in Chinese)

[5] 秦新生,严岳鸿,陈红锋,等. 海南植物增补(Ⅷ) [J]. 华南农业大学学报:自然科学版,2004,25(1):122 -123.

QIN X S,YAN Y H,CHEN H F,*et al.* Some new recorded plants in Hainan Island(Ⅷ) [J]. Journal of South China Agricultural University: Nat. Sci. Edi. , 2004, 25(1):122-123. (in Chinese)

[6] 陈伟,兰国玉,安锋,等. 海南外来杂草——假臭草群落生态位特征研究[J]. 西北林学院学报,2007,22(2):24-27.

CHEN W,LAN G Y,AN F,*et al.* Niche characteristics of *Eupatorium catarium* Community in Hainan[J]. Journal of Northwest Forestry University,2007,22(2):24-27. (in Chinese)

[7] 邓世明,杨先会,王宁,等. 外来入侵植物假臭草的黄酮类成分研究[J]. 西北植物学报,2009,29(12):2548-2550.

DENG S M,YANG X H,WANG N,*et al.* Identification of flavonoids in alien invasive plant *Eupatorium catarium*[J]. Acta Bot. Boreal;Occident. Sin. 2009,29(12):2548-2550. (in Chinese)

[8] 陈珂,陈国娟. ISSR 技术及其在植物遗传多样性研究中的应用 [J]. 安徽农学通报,2009,15(16):28-29.

CHENG K,CHENG G J. ISSR and Application in the Research of plant genetic diversity [J]. Anhui Agri. Sci. Bull, 2009,15(16):28-29. (in Chinese)

[9] 梁晓剑,张鹏,王永雄. ISSR 技术在草业上应用的研究进展 [J]. 现代农业科学,2008,3(3):9-10.

LIANG X J,ZHANG P,YU Y X,*et al.* Research development on the application of ISSR technology in grass industry[J]. Modern Agricultural Sciences,2008,3(3):9-10.

[10] WANG T,SU Y J,CHEN G P. Population genetic variation and structure of the invasive weed *Mikania micrantha* in southern China; consequences of rapid range expansion [J]. Journal of Heredity,2008,99(1):22-33.

[11] 陈大霞,李隆云,李泉森,等. 仙茅属植物 SRAP-PCR 反应体系的优化[J]. 分子植物育种,2007,5(6):191-195.

CHEN D X,LI L Y,LI Q S,*et al.* Optimization of SRAP-PCR System for *Curculigo* L. plant[J]. Molecular Plant Breeding, 2007,5(6):191-195. (in Chinese)

[12] 盖钧镒. 试验统计方法[M]. 北京:中国农业出版社,2003.

[13] 周凌瑜,吴晨炜,唐东芹,等. 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.

ZHOU L Y,WU C W,TANG D Q,*et al.* Optimization for ISSR-PCR system of *Freesia refracta Klatt* through orthogonal design[J]. Bulletin of Botanical Research, 2008, 28(4):402-407. (in Chinese)

[14] 李嵘,王喆之. 丹参 ISSR-PCR 反应体系的建立与正交优化 [J]. 广西植物,2008,28(5):599-603.

LI R,WANG Z Z. Establishment and orthogonal optimization of ISSR-PCR amplification system in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Guihaia, 2008,28(5):599-603.

[15] 李鹏,汪阳东,陈益存,等. 油桐 ISSR-PCR 最佳反应体系的建立[J]. 林业科学研究,2008,21(2):194-199.

LI P,WANG Y D,LI Y C,*et al.* Establishment of optimum ISSR-PCR reaction system in Tung Oil Tree[J]. Forest Research,2008,21(2):194-199. (in Chinese)

[16] 朴红梅,李万良,穆南,等. ISSR 标记的研究与应用[J]. 吉林农业科学,2007,32(5):28-30.

PU H M,LI W L,MU N,*et al.* Research and application of ISSR[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences,2007,32(5):28-30.

[17] YE W H,MU H P,CAO H L,*et al.* Genetic structure of the invasive *Chromolaena odorata* in China[J]. Weed Res. ,2004, 44 (2):129-135.