

## 均匀设计优化棉花 ISSR-PCR 反应体系

朱岩芳<sup>1</sup>, 祝水金<sup>1</sup>, 王洋<sup>1</sup>, 李永平<sup>2</sup>, 马文广<sup>2</sup>, 胡晋<sup>1\*</sup>

(1. 浙江大学农业与生物技术学院种子科学中心, 杭州 310029; 2. 中国烟草育种研究(南方)中心, 云南 玉溪 653100)

**摘要:** 为探索适宜棉花的 ISSR-PCR 反应体系, 采用两轮均匀设计试验, 对 ISSR-PCR 反应体系中  $Mg^{2+}$ 、dNTPs、模板 DNA、引物、Taq DNA 聚合酶的浓度或用量进行优化。结果表明, 棉花 20  $\mu\text{L}$  的 ISSR 反应体系的最佳组分包括 2  $\mu\text{L}$  10 $\times$ PCR Buffer、0.5 U Taq DNA 聚合酶、40 ng 模板 DNA、0.25  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTPs、0.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  引物和 2.0  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $Mg^{2+}$ 。利用 8 个棉花品种和三条不同引物验证该反应体系, 结果表明, 该反应体系的稳定性和重复性较好。

**关键词:** 棉花; ISSR; 体系优化; 均匀设计

中图分类号: S562.035.3 文献标识码: A

文章编号: 1002-7807(2010)03-0202-07

## The Optimization of ISSR-PCR System of Cotton by Uniform Design

ZHU Yan-fang<sup>1</sup>, ZHU Shui-jin<sup>1</sup>, WANG Yang<sup>1</sup>, LI Yong-ping<sup>2</sup>, MA Wen-guang<sup>2</sup>, HU Jin<sup>1\*</sup>

(1. Seed Science Center of Agriculture and Biotechnology College, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 2. Southern Center of China Tobacco Breeding Research, Yuxi, Yunnan 653100, China)

**Abstract:** In present study, ISSR-PCR reaction conditions on *Gossypium* spp. were optimized. The factors which affect ISSR results of *Gossypium* spp. were investigated by uniform designs of two times. The results showed that 0.5 U Taq polymerase, 40 ng template DNA, 0.25  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTPs, 0.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  primer and 2.0  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $Mg^{2+}$  in 20  $\mu\text{L}$  ISSR reaction system might be the best combination. To validate the ISSR-PCR reaction system above, eight cultivars of *Gossypium* and three ISSR primers were employed in the research. It is indicated that the ISSR reaction system would be more productive and repeatable

**Key words:** cotton; ISSR; system optimization; uniform design

ISSR 是由加拿大蒙特利尔大学 Zietkiewicz 等<sup>[1]</sup>于 1994 年创建的一种分子标记技术, 其基本原理就是在 SSR 的 3' 或 5' 端锚定 1~4 个碱基作引物, 对两侧具有反向排列 SSR 的一段序列进行扩增, 而不是扩增 SSR 本身。ISSR 分子标记技术兼具 SSR、RAPD、RFLP、AFLP 等分子标记的优点, 与 SSR 相比, ISSR 因不需要预先获知序列信息而使成本降低, 且多态性更丰富; 与 RAPD 相比, ISSR 重复性高, 稳定性好, 同时具备 RAPD 的简便、易操作等特点; 与 RFLP、AFLP 相比, ISSR 更快捷、成本较低、DNA 用量小、安全性较高<sup>[2]</sup>。目前, ISSR 标记技术在种质资源收集和鉴定、遗传多样性和亲缘关系分析、基因定位、遗传

图谱构建及分子标记辅助选择等研究中已有广泛的应用。但有关标准化、高效的棉花 ISSR-PCR 反应体系及其优化方法的研究尚未见报道。本研究将利用均匀设计的试验方法, 建立并优化适合棉花 DNA 指纹图谱构建的高效稳定的 ISSR-PCR 反应体系, 为 ISSR 分子标记技术在棉花上更广泛应用打下基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 试验材料。**参试材料共 8 份(表 1), 取自浙江大学华家池校区农场试验田。

**1.1.2 试剂。**ISSR 引物参照加拿大哥伦比亚大学

收稿日期: 2010-01-30 作者简介: 朱岩芳(1983-), 女, 在读博士生, [zhuyanfang2008@126.com](mailto:zhuyanfang2008@126.com); \* 通讯作者

基金项目: 浙江省重大科技专项(优先主题)(2008C12005-1)、农业部转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX08005-005)、云南省科技厅项目(2009EB073)和云南省烟草公司项目(09YN008)资助。

(UBC)公布的第 9 套 ISSR 引物(编号 801-900)序列,由上海生工生物工程有限公司合成。参试引物名称及序列见表 2,用 ddH<sub>2</sub>O 溶解并稀释到 10 μmol·L<sup>-1</sup> 备用。PCR 反应试剂、10×PCR Buffer、Mg<sup>2+</sup>、dNTPs、Taq DNA 聚合酶购于上海生工生物工程有限公司,DL2000 DNA Marker (TaKaRa) 购于宝生物工程(大连)有限公司, GelRed (in water)购于杭州荧光泰生物技术有限

公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 棉花基因组 DNA 提取与检测。**DNA 提取参照 Paterson 等<sup>[3]</sup>的方法并加以改良,所提取的基因组 DNA 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测质量,用 BIO-RAD GenePulserXcellTotal 型核酸蛋白仪检测 DNA 样品质量和浓度,稀释至 20 mg·L<sup>-1</sup>,于 -20℃ 保存备用。

表 1 参试棉花材料名称与来源

Table 1 Cotton cultivars and their sources

编号	名称	来源	编号	名称	来源
1	皖棉 17 号	中国	5	M5-2	墨西哥
2	浙肖棉 1 号	中国	6	BPA68	乌干达
3	邢台 68-71	中国	7	Loxmi	印度
4	萨马尔 -72	法国	8	MJ-7	巴基斯坦

**1.2.2 ISSR-PCR 反应体系的优化设计。**试验采用两轮均匀设计。第一轮均匀设计针对影响 ISSR-PCR 反应的 5 个因素 (Mg<sup>2+</sup>、dNTPs、模板 DNA、引物、Taq DNA 聚合酶),各设 5 个水平,各因素及水平见表 3。选用 U<sub>25</sub>(5<sup>5</sup>)均匀设计表<sup>[4]</sup>(表 4),共有 25 个处理组合,表 4 中编号即为第一轮均匀设计中 25 个处理组合的编号,依照表 4 安排第一轮均匀设计试验。对第一轮均匀设计结果进行分析,初步筛选出扩增谱带丰富、清晰易辨且稳定可靠的处理组合,并以此作为第二轮均匀设计的依据。第二轮均匀设计的各因素及水平见表 5。选用 U<sub>12</sub>(3<sup>4</sup>)均匀设计表<sup>[5]</sup>(表 6),共有 12 个处理组合,表 6 中编号即为均匀设计中 12 个处

表 2 参试引物名称与序列

Table 2 Primer sequences used in the study

引物名	序列
UBC807	AGAGAGAGAGAGAGAGT
UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC
UBC815	CTCTCTCTCTCTCTG

理组合的编号,依照表 6 安排第二轮均匀设计试验。均匀设计试验以皖棉 17 号为模板,采用通用性较好的 UBC811 引物完成。试验重复 2 次。所有 PCR 扩增反应在 Eppendorf Mastercycler Gradient 梯度 PCR 仪上完成。ISSR-PCR 反应程序为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min,退火(不同引物各有特定的退火温度)1 min,72℃ 延伸 90 s,40 个循环;72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存。扩增结束后,每管产物加入 5 μL 6× 上样缓冲液(0.25% 溴酚蓝,30% 甘油),混匀后取 8 μL 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶(GelRed 染色)在 0.5×TBE 中电泳,130 V 电泳 1 h,于 GIS-1000 凝胶图像处理系统(上海天能科技有限公司)上检测并拍照。

表 3 第一轮均匀设计反应体系各因素及水平

Table 3 Factors and their levels in reaction system by the first uniform design

水平	因素				
	Mg <sup>2+</sup> /(mmol·L <sup>-1</sup> )	dNTPs/(mmol·L <sup>-1</sup> )	模板 DNA/ng	Primer/(μmol·L <sup>-1</sup> )	Taq 酶/U
1	1.0	0.10	20	0.1	0.5
2	1.5	0.15	40	0.2	1.0
3	2.0	0.20	60	0.3	1.5
4	2.5	0.25	80	0.4	2.0
5	3.0	0.30	100	0.5	2.5

表 4 ISSR-PCR 第一轮均匀设计方案

Table 4 The first ISSR-PCR uniform design scheme

处理编号	Mg <sup>2+</sup> /(mmol·L <sup>-1</sup> )	dNTPs/(mmol·L <sup>-1</sup> )	模板 DNA/ng	Primer/(μmol·L <sup>-1</sup> )	Taq 酶 /U
1	1(1.0)	3(0.20)	1(20)	2(0.2)	1(0.5)
2	3(2.0)	4(0.25)	2(40)	5(0.5)	1(0.5)
3	4(2.5)	2(0.15)	3(60)	1(0.1)	1(0.5)
4	2(1.5)	5(0.30)	4(80)	3(0.3)	1(0.5)
5	5(3.0)	1(0.10)	5(100)	4(0.4)	1(0.5)
6	5(3.0)	4(0.25)	1(20)	3(0.3)	2(1.0)
7	2(1.5)	1(0.10)	2(40)	1(0.1)	2(1.0)
8	3(2.0)	3(0.20)	3(60)	4(0.4)	2(1.0)
9	1(1.0)	2(0.15)	4(80)	5(0.5)	2(1.0)
10	4(2.5)	5(0.30)	5(100)	2(0.2)	2(1.0)
11	2(1.5)	2(0.15)	1(20)	4(0.4)	3(1.5)
12	4(2.5)	3(0.20)	2(40)	3(0.3)	3(1.5)
13	5(3.0)	5(0.30)	3(60)	5(0.5)	3(1.5)
14	3(2.0)	1(0.10)	4(80)	2(0.2)	3(1.5)
15	1(1.0)	4(0.25)	5(100)	1(0.1)	3(1.5)
16	4(2.5)	1(0.10)	1(20)	5(0.5)	4(2.0)
17	1(1.0)	5(0.30)	2(40)	4(0.4)	4(2.0)
18	2(1.5)	4(0.25)	3(60)	2(0.2)	4(2.0)
19	5(3.0)	3(0.20)	4(80)	1(0.1)	4(2.0)
20	3(2.0)	2(0.15)	5(100)	3(0.3)	4(2.0)
21	3(2.0)	5(0.30)	1(20)	1(0.1)	5(2.5)
22	5(3.0)	2(0.15)	2(40)	2(0.2)	5(2.5)
23	1(1.0)	1(0.1)	3(60)	3(0.3)	5(2.5)
24	4(2.5)	4(0.25)	4(80)	4(0.4)	5(2.5)
25	2(1.5)	3(0.2)	5(100)	5(0.5)	5(2.5)

表 5 第二轮均匀设计反应体系各因素及水平

Table 5 Factors and their levels in reaction system by the second uniform design

水平	因素			
	Mg <sup>2+</sup> /(mmol·L <sup>-1</sup> )	dNTPs/(mmol·L <sup>-1</sup> )	Primer/(μmol·L <sup>-1</sup> )	Taq 酶 /U
1	1.5	0.15	0.4	0.5
2	2.0	0.20	0.5	1.0
3	2.5	0.25	0.6	1.5

表 6 ISSR-PCR 第二轮均匀设计方案

Table 6 The second ISSR-PCR uniform design scheme

处理编号	Mg <sup>2+</sup> /(mmol·L <sup>-1</sup> )	dNTPs/(mmol·L <sup>-1</sup> )	Primer/(μmol·L <sup>-1</sup> )	Taq 酶 /U
2-1	2(2.0)	1(0.15)	2(0.5)	3(1.5)
2-2	3(2.5)	3(0.25)	1(0.4)	2(1.0)
2-3	1(1.5)	1(0.15)	2(0.5)	1(0.5)
2-4	1(1.5)	3(0.25)	2(0.5)	1(0.5)
2-5	3(2.5)	2(0.20)	2(0.5)	3(1.5)
2-6	1(1.5)	2(0.20)	1(0.4)	3(1.5)
2-7	3(2.5)	1(0.15)	1(0.4)	2(1.0)
2-8	2(2.0)	3(0.25)	3(0.6)	3(1.5)
2-9	1(1.5)	3(0.25)	3(0.6)	2(1.0)
2-10	3(2.5)	2(0.20)	3(0.6)	1(0.5)
2-11	2(2.0)	2(0.20)	1(0.4)	1(0.5)
2-12	2(2.0)	1(0.15)	3(0.6)	2(1.0)

**1.2.3 退火温度梯度试验。**利用所得最佳因素水平组合的 ISSR-PCR 反应体系,采用退火温度梯度试验,逐一确定每个引物的最佳退火温度。在梯度 PCR 扩增仪上设置 40~60℃温度梯度,自动生成 39.9℃、40.4℃、41.7℃、43.5℃、45.8℃、48.4℃、51.1℃、53.8℃、56.2℃、58.1℃、59.5℃、60.1℃共 12 个温度,根据不同引物的理论退火温度选择其中 4 个温度作温度梯度 PCR,以确定各个引物的最适退火温度。PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。



1:皖棉 17 号;2:浙肖棉 1 号;3:邢台 68-71;4:萨马尔 -72;5:M5-2;6:BPA68;7:Loxmi;8:MJ-7。

图 1 棉花叶片 DNA 电泳检测结果

Fig. 1 DNA electrophoresis of cotton leaf

## 2.2 均匀设计优化 ISSR-PCR 反应体系

第一轮均匀设计 ISSR-PCR 反应体系的扩增结果如图 2。在 25 个不同处理组合中,由于 5 个因素( $Mg^{2+}$ 、dNTPs、模板 DNA、引物、Taq 酶)浓度或用量的组成不同,扩增效果表现出明显差异。从两次重复的结果来看,2、5、6、8、9 号处理组合均能扩增出清晰条带,扩增结果相对较好。其中,2 号和 9 号处理的扩增条带最多且清晰、稳定,重复性好,但 9 号处理组合扩增的大片段条带略弱,5、6、8 号处理扩增小片段较好,而大的片段条带出现拖尾或弥散现象。4 号处理扩增条带清晰、稳定,但条带相对较弱且不够丰富。3、7、19、21 号处理只扩增出大片段,且 19、21 号处理出现弥散

**1.2.4 体系稳定性的检测。**采用筛选出的 PCR 扩增体系的最佳组合,用引物 UBC807、UBC811 和 UBC815 对 8 个棉花品种进行扩增,以验证所得优化体系的可靠性和稳定性。

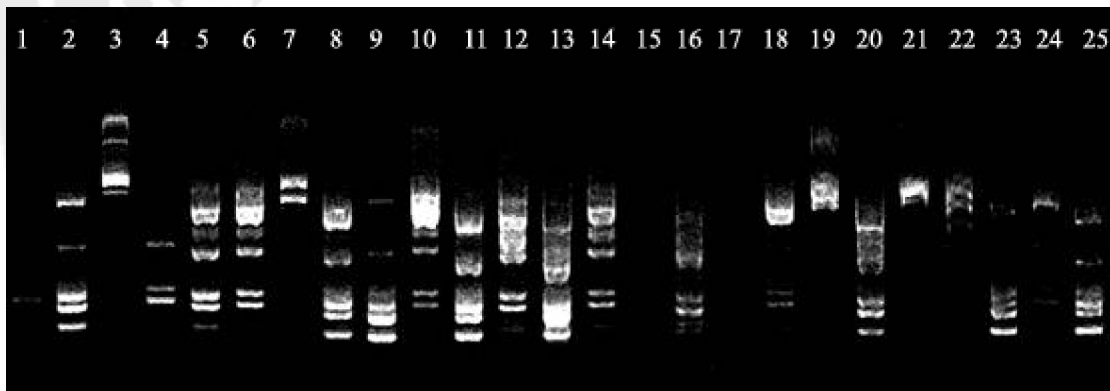
## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 质量检测

0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 1,电泳条带清晰,无降解,表明所提 DNA 质量较高,完整性较好,可以用作后续 ISSR-PCR 反应的模板。

现象。1、24 号处理扩增条带少且非常微弱,15、17 号无扩增产物,10、11、12、13、14、16、18、20、22、23、25 号处理有严重的拖尾或弥散现象。综合比较 2、4、5、6、8、9 号处理扩增的谱带效果,第一轮均匀设计试验的结果以 2 号处理组合为最佳,即 20  $\mu$ L 反应体系中  $Mg^{2+}$  浓度 2.0  $mmol \cdot L^{-1}$ 、dNTPs 浓度 0.25  $mmol \cdot L^{-1}$ 、模板 DNA 40 ng、引物浓度 0.5  $\mu mol \cdot L^{-1}$ 、Taq DNA 聚合酶 0.5 U。

为获得理想的棉花 ISSR-PCR 反应体系,在 2 号和 9 号处理组合对应的因素及水平的基础上,进行第二轮均匀设计试验。第一轮均匀设计试验结果分析显示,模板 DNA 用量对扩增效果影响不大,所以第二轮试验中 DNA 用量选用 40

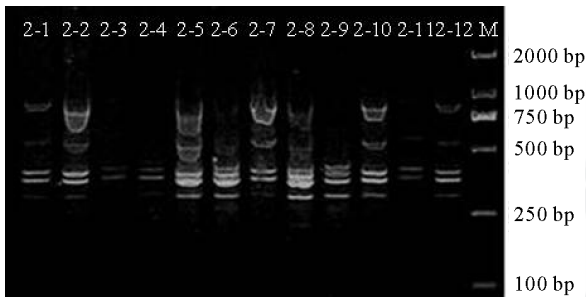


1~25:表 4 的处理编号。

图 2 ISSR-PCR 反应组分均匀设计试验电泳结果

Fig. 2 The electrophoresis results of ISSR-PCR reaction components by uniform design

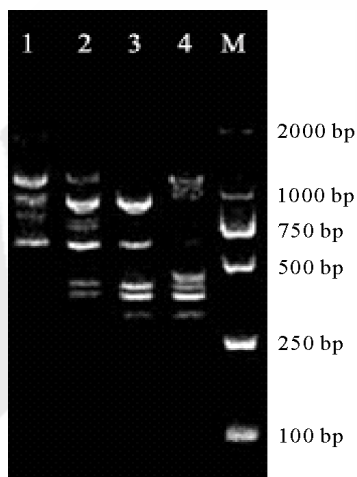
ng。第二轮均匀设计 ISSR-PCR 反应体系的扩增结果如图 3。在 12 个不同处理组合中,2-3、2-4、2-9、2-11 号处理组合扩增谱带较弱且不够丰富,2-2、2-5、2-6、2-7、2-8 号处理组合谱带有拖尾或弥散现象,2-1、2-10、2-12 号处理组合条带清晰稳定,强弱较均匀,易分辨,是比较理想的反应体系组合。2-1、2-12 与 2 号处理组合相比,dNTPs 的浓度降低,但 *Taq* DNA 聚合酶的用量增大,2-10 号处理组合与 2 号处理组合相比, $Mg^{2+}$  与引物用量提高,dNTPs 用量降低。综合比较 2 号、2-1 号、2-10 号、2-12 号处理组合,从扩增效果和经济性双重因素考虑,本试验选择 2 号处理组合作为棉花 ISSR-PCR 的最佳反应体系。



2-1~2-12;表 6 的处理编号。

图 3 第二轮均匀设计电泳结果

Fig.3 The electrophoresis results of ISSR-PCR by the second uniform design



M;DL2000;1~4: 退火温度分别为 45.8℃,48.4℃,51.1℃,53.8℃。

图 4 引物 UBC811 不同退火温度的电泳图

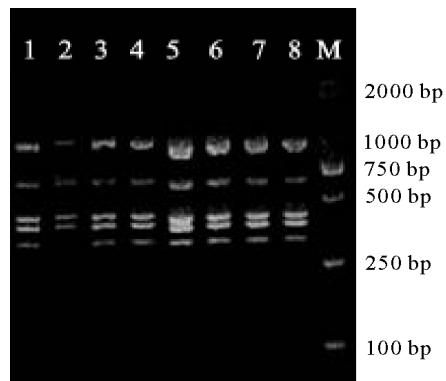
Fig.4 Electrophoretogram of UBC811 at different annealing temperature

### 2.3 退火温度对 PCR 扩增的影响

退火温度的高低直接影响到引物与模板 DNA 的特异性结合<sup>[6]</sup>,退火温度不同,扩增谱带的带型和清晰程度也不同。选择 45.8℃,48.4℃,51.1℃,53.8℃ 4 个温度做引物 UBC811 的温度梯度 PCR,结果如图 4 所示。试验结果表明,引物 UBC811 在 51.1℃退火时扩增条带最清晰、稳定,在低温(45.8℃和 48.4℃)退火下,部分条带不够稳定,重复性较差,而在高温退火(53.8℃)下,稳定而清晰的条带数减少,试验确定引物 UBC811 的最佳退火温度为 51.1℃。

### 2.4 ISSR-PCR 反应体系稳定性检测

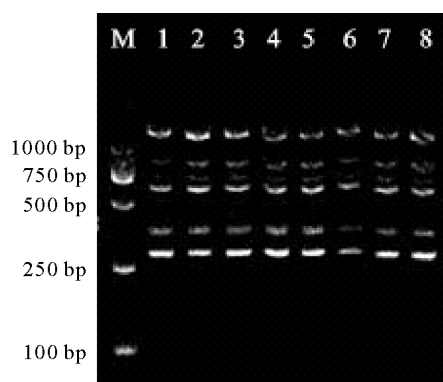
采用优化所得的 ISSR-PCR 最佳反应体系,用引物 UBC811 对 8 个不同棉花材料(表 1)进行 PCR 扩增,检测结果如图 5。此外,为验证该体系对不同引物的适用性,用 UBC807 和 UBC815 对 8 个棉花材料进行扩增,结果如图 6 和图 7 所示,扩增条带清晰、稳定。采用该反应体系,以表 1 中所示的 8 个棉花材料作模板,对 100 条 ISSR 引物(UBC801~UBC900)进行扩增,筛选到扩增条带清晰易辨、重复性好的 43 条用于后续棉花材料 ISSR 的指纹图谱构建。试验结果表明,优化所得的最佳反应体系不仅适用于不同的棉花材料,也适用于不同的 ISSR 引物,该反应体系具有较好的稳定性和重复性。



M;DL2000;1~8:表 1 的棉花品种编号。

图 5 UBC811 用优化的反应体系对 8 个棉花品种的扩增结果

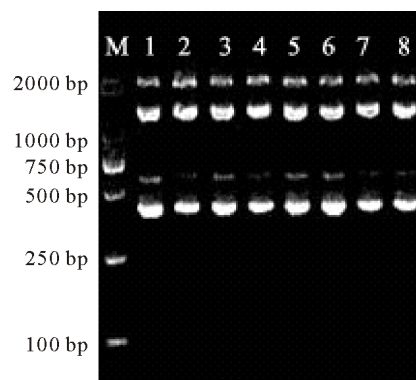
Fig.5 Amplification result of UBC811 on 8 cotton cultivars with optimized reaction system



M: DL2000; 1~8: 表 1 的棉花品种编号。

图 6 UBC807 用优化的反应体系对 8 个棉花品种的扩增结果

Fig.6 Amplification result of UBC807 on 8 cotton cultivars with optimized reaction system



M: DL2000; 1~8: 表 1 的棉花品种编号。

图 7 UBC815 用优化的反应体系对 8 个棉花品种的扩增结果

Fig.7 Amplification result of UBC815 on 8 cotton cultivars with optimized reaction system

### 3 讨论

PCR 反应体系优化大多采用单因素试验和正交设计试验,而有关均匀设计的报道相对较少。单因素试验须对反应体系中各个因素的最佳水平分别进行摸索,需要进行多次单因素梯度试验,过程繁琐,且不能兼顾到反应体系中各因素间的互作。与正交设计“均匀分布,整齐可比”的特点不同,均匀设计只考虑试验点在试验范围内的均匀分散,使试验更具均匀性和代表性,可以大大减少试验次数,提高试验效率,越来越广泛地应用于多因素、多水平的试验设计。均匀设计已经成功应用于喜盐鸢尾 ISSR<sup>[5]</sup>及澳洲坚果 SRAP<sup>[7]</sup>PCR 反应体系的优化。为了获得稳定可靠和重复性好的 ISSR 扩增谱带,提高试验的准确性,需要对不同试验条件下的 PCR 反应体系进行优化。本试验通过两轮均匀设计试验,对比得出较稳定的适合棉花 ISSR-PCR 的反应体系,即 20  $\mu\text{L}$  反应体系中  $\text{Mg}^{2+}$  浓度  $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、dNTPs 浓度  $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、模板 DNA 40 ng、引物浓度  $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、Taq DNA 聚合酶 0.5 U。

ISSR-PCR 反应的扩增效果是反应体系中各因素综合作用的结果。Taq DNA 聚合酶用量是影响 PCR 反应的重要因素,它直接影响多态性的检出率和扩增结果的重复性及忠实性<sup>[7]</sup>。Taq DNA 聚合酶量过高会导致 PCR 反应特异性下降,易出现拖尾现象,同时提高成本,过低则会导致合成

速率降低,产物合成效率低。 $\text{Mg}^{2+}$  对 ISSR-PCR 扩增的特异性和产量有显著的影响。 $\text{Mg}^{2+}$  浓度决定 Taq DNA 聚合酶的活性,浓度过低时,酶活性显著降低,浓度过高则容易导致非特异性扩增。dNTPs 是 PCR 反应的原料,浓度过低影响扩增效率,浓度高将与 Taq DNA 聚合酶竞争  $\text{Mg}^{2+}$ ,影响游离  $\text{Mg}^{2+}$  的浓度,降低 Taq DNA 聚合酶的活性<sup>[8]</sup>。反应体系中 Taq DNA 聚合酶、 $\text{Mg}^{2+}$ 、dNTPs 三者合理的浓度组合是 PCR 反应成功的关键。引物浓度也是影响 ISSR-PCR 反应的重要因素,浓度太低不能进行有效的扩增,浓度太高易形成引物二聚体,导致谱带不稳定且清晰度下降。模板 20~100 ng 的 DNA 用量对 PCR 结果影响不大,最佳的 DNA 模板用量取决于研究的物种及模板 DNA 纯度。

在 ISSR-PCR 反应中,退火温度是 ISSR-PCR 能否扩增出理想谱带最为关键的因素之一<sup>[9]</sup>。不同 ISSR 引物退火温度不同,同一引物对不同物种扩增时的退火温度也不同。退火温度过低,易造成非特异性扩增,温度过高,引物与模板的结合性差,产量和特异性降低。在允许的范围内,选择较高的退火温度可提高 ISSR-PCR 反应的特异性。

本研究优化建立的棉花 ISSR-PCR 反应体系已被成功地应用于棉花材料 ISSR 指纹图谱的初步构建,希望能为棉花种质资源的鉴定、遗传多样性分析、指纹图谱的构建及基因定位等研究提供一定的借鉴。

## 参考文献:

- [1] ZIETKIEWICZ E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.
- [2] 朴红梅,李万良,穆楠,等. ISSR 标记的研究与应用[J]. *吉林农业科学*, 2007, 32(5): 28-30.  
PIAO Hong-mei, Li Wan-liang, Mu Nan, et al. Research on ISSR markers and their application[J]. *Journal of Jilin Agricultural Sciences*, 2007, 32(5): 28-30.
- [3] PATERSON A H, Brubaker C L, Wendel J F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1993, 11(2): 122-127.
- [4] 方开泰,马长兴. 正交与均匀试验设计[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 242.  
FANG Kai-tai, Ma Chang-xing. *Orthogonal and uniformity experiment design*[M]. Beijing, Science Press, 2001: 242.
- [5] 杜欣,董玉芝,陈虹. 均匀设计优化喜盐鸢尾 ISSR-PCR 体系[J]. *新疆农业科学*, 2008, 45(3): 386-392.  
DU Xin, Dong Yu-zhi, Chen Hong. Optimization of ISSR-PCR system of *Iris halophila* by uniform design[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2008, 45(3): 386-392.
- [6] TSUMURA Y, Ohba K, Strauss S H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 92: 40-45.
- [7] 郭凌飞,邹明宏,杜丽清,等. 均匀设计优化澳洲坚果 SRAP 反应体系[J]. *果树学报*, 2008, 25(2): 250-253.  
GUO Ling-fei, Zou Ming-hong, Du Li-qing, et al. Optimization of the sequence-related amplified polymorphism (SRAP) reaction system for macadamia by uniform design[J]. *Journal of Fruit Science*, 2008, 25(2): 250-253.
- [8] 陈浩东,李育强,洪亚辉. 棉花 SSR-PCR 反应体系的优化[J]. *分子植物育种*, 2007, 5(6S): 182-186.  
CHEN Hao-dong, Li Yu-qiang, Hong Ya-hui. The optimization of SSR-PCR system of cotton[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2007, 5(6S): 182-186.
- [9] 汪结明,项艳,吴大强,等. 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.  
WANG Jie-ming, Xiang Yan, Wu Da-qiang, et al. Establishment of an ISSR reaction system for poplar and optimization using orthogonal design[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2007, 21(5): 470-473. ●