

台湾杉 ISSR 反应体系的建立及检测

杨琴军¹ 袁继林² 付强¹ 陈龙清¹

1. 华中农业大学园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070;

2. 贵州雷公山国家级自然保护区管理局, 雷山 557100

摘要 在保持 1 U *Taq* 酶和 0.2 mmol/L dNTP 两个条件不变的情况下, 通过对模板 DNA 的浓度、引物浓度与 Mg^{2+} 浓度的筛选, 建立了台湾杉的优化 ISSR 反应体系, 即在 25 μ L 的反应体系中, 含有 40 ng 模板 DNA、1 U *Taq* 酶、0.2 mmol/L dNTP、0.4 μ mol/L 引物、1.8 mmol/L Mg^{2+} 、2.5 μ L 10 \times buffer。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C, 4 min; 94 $^{\circ}$ C, 45 s, 51~56 $^{\circ}$ C, 45 s, 72 $^{\circ}$ C, 2 min, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 7 min。利用这种优化的反应体系, 筛选出了 10 条稳定性强、清晰度高并表现出一定多态性的 ISSR 引物, 并进一步筛选出了这 10 条引物的最佳退火温度。应用这些引物对分布于湖北利川市星斗山保护区的台湾杉野生居群的 20 个样品进行了扩增, 结果表明, 利川星斗山台湾杉居群的多态位点百分率为 61.97%, Nei's 基因多样性和 Shannon's 信息指数分别为 0.136 9 和 0.216 0。

关键词 台湾杉; ISSR; PCR 条件; 反应体系; 引物筛选

中图分类号 S 791.280.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)04-0432-06

台湾杉(*Taiwania cryptomerioides* Hayata)又名秃杉, 属杉科台湾杉属, 是特产于我国的一种古老濒危的孑遗植物, 国家一级保护树种, 生长快、寿命长、材质优良, 而且四季常绿、树形优美, 是优良的用材树种、造林树种和庭园绿化树种; 台湾杉也具有较高的药用价值^[1]。由于生境破坏、自身繁育习性等原因, 台湾杉的野外居群规模越来越小, 处于濒危的边缘, 亟待保护^[2]。

国内外对台湾杉的研究主要集中在解剖学、胚胎学、细胞学、生态地理分布、群落和种群特征、引种和繁殖栽培以及组织培养等方面^[3-7], 分子水平的研究很少^[8-9]。Zietkiewicz 等^[10]提出的简单序列重复区间(inter simple sequence repeat, ISSR)DNA 标记技术, 结合了 SSR 和 RAPD 的优点, 具有引物设计简单、利用率高、稳定性好、多态性丰富, 而较之 AFLP 又具技术要求较低、操作简便快捷等优点。近年来 ISSR 已广泛应用于品种鉴定与分类^[11-12]、遗传图谱构建^[13-14]和种群的遗传结构评价及遗传多样性研究^[9, 15-18]等领域。

对于一些居群数目多、分析样本数量大而遗传背景又不清楚的濒危植物, 可优先考虑选择 ISSR

标记进行居群遗传多样性研究。本研究对影响台湾杉 PCR 反应体系的条件进行了筛选, 建立并优化台湾杉的 ISSR 反应体系, 筛选出合适的引物并检测其有效性, 为进一步开展台湾杉的保育遗传学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料采自湖北省利川市星斗山国家级自然保护区境内的台湾杉残遗分布区, 具体采样地点见杨琴军等^[19]的报道。随机选取 20 株成年大树, 取其新梢嫩叶, 置于加入了足量硅胶干燥剂的塑料袋中密封, 带回实验室后置于一 70 $^{\circ}$ C 的冰箱中保存。反应体系筛选的模板为 LC-5(随机从利川居群选取)。引物筛选时则采用来自 2 个不同地区居群的样品 LC-5 和 LS-32(随机从贵州雷公山雷山县台湾杉野生居群选取)。

1.2 试剂

所用 10 \times PCR buffer、 $MgCl_2$ 、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、购于 MBI Fermentas 公司, D3000Marker 购于上海英俊公司。引物序列由加拿大哥伦比亚大学

收稿日期: 2010-12-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(30901130)

杨琴军, 博士研究生, 讲师。研究方向: 生物多样性保护、园林植物种质资源创新及园林植物应用研究。E-mail: yangqj@mail.hzau.edu.cn
通讯作者: 陈龙清, 教授。研究方向: 园林植物种质资源保护、创新与应用。E-mail: chenlq@mail.hzau.edu.cn

UBC 公司提供,引物合成由 Invitrogen 公司完成。其他试剂购于上海国药公司,为分析纯。

1.3 DNA 提取和检测

参见文献[20]。

1.4 PCR 反应体系的优化

模板 DNA 的浓度、*Taq* 酶的用量、引物浓度、 Mg^{2+} 浓度及 dNTP 浓度等因素都会影响扩增的结

果。经过多次试验比较发现每个 PCR 反应(反应体系为 25 μ L)加 1 U *Taq* 酶和 0.2 mmol/L dNTP,扩增结果比较好。

因此,在保持这 2 个条件不变的情况下,对引物浓度、 Mg^{2+} 浓度及模板 DNA 的浓度设置三因素 2~3 个水平完全组合试验(表 1)。反应体系筛选的模板为 LC-5,引物为 (AG)₈T。

表 1 ISSR-PCR 反应体系的筛选

Table 1 The selection of the optimal ISSR-PCR reaction system

体系编号 Number of system	模板 DNA 的用量/ng Content of template DNA	引物浓度/(μ mol/L) Concentration of primer	Mg^{2+} 浓度/(mmol/L) Concentration of Mg^{2+}
体系 1 System 1	20	0.2	1.5
体系 2 System 2	20	0.2	1.8
体系 3 System 3	20	0.2	2.0
体系 4 System 4	20	0.3	1.5
体系 5 System 5	20	0.3	1.8
体系 6 System 6	20	0.3	2.0
体系 7 System 7	20	0.4	1.5
体系 8 System 8	20	0.4	1.8
体系 9 System 9	20	0.4	2.0
体系 10 System 10	40	0.2	1.5
体系 11 System 11	40	0.2	1.8
体系 12 System 12	40	0.2	2.0
体系 13 System 13	40	0.3	1.5
体系 14 System 14	40	0.3	1.8
体系 15 System 15	40	0.3	2.0
体系 16 System 16	40	0.4	1.5
体系 17 System 17	40	0.4	1.8
体系 18 System 18	40	0.4	2.0

1.5 引物筛选和最佳退火温度的确定

选取来自 2 个不同居群的样品 LC-5 和 LS-32,采用优化的反应体系、较低的退火温度 52 $^{\circ}$ C,对 ISSR 引物进行初步筛选。

由于每条引物的最佳退火温度不一样,选择 51、52、53、54、55、56 $^{\circ}$ C 等 6 个退火温度,对初步筛选出来的引物进一步进行退火温度的比较试验,以确定每个引物的最佳退火温度。选择能扩增出清晰、稳定条带的引物用于所有样品分析。

1.6 PCR 扩增程序及产物检测

扩增程序:94 $^{\circ}$ C,4 min;94 $^{\circ}$ C,45 s,51~56 $^{\circ}$ C,45 s,72 $^{\circ}$ C,2 min,40 个循环;72 $^{\circ}$ C,7 min。扩增在 PE9600 型 PCR 仪上进行。

产物检测:以 1 \times TAE 为电泳缓冲液,取 10 μ L 的扩增产物在含有 0.5%EB 的 1.8%琼脂糖凝胶上电泳 2 h 左右(5 V/cm)。采用 DNA 标准样品 Marker:100 bp DNA Ladder,分子质量范围 100~3 000 bp。电泳结束后利用 Gel-Logic 200 凝胶扫描成像系统拍照并保存。

1.7 结果统计与数据分析

PCR 产物统计:电泳图谱中的每 1 条带(DNA 片段)作为 1 个分子标记,并代表 1 个引物结合位点。根据各分子标记的迁移率及其有无计算所有位点的二元数据:显带计为“1”,无带计为“0”。强带和弱带均赋值为“1”。

基因多样性的度量:运用 POPGENE32 软件计算 Nei's 基因多样性指数 $H_e^{[21]}$ 和 Shannon 信息指数 $I^{[22]}$ 。

2 结果与分析

2.1 优化的 ISSR 反应体系

通过对上述 18 个反应体系的 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳检测,观察比较电泳图谱,确定体系 17 的扩增效果最好,即在 25 μ L 的反应体系中,含有 40 ng 模板 DNA、1 U *Taq* 酶、0.2 mmol/L dNTP、0.4 μ mol/L 引物、1.8 mmol/L Mg^{2+} 、2.5 μ L 10 \times buffer。

2.2 引物筛选和退火温度筛选

利用优化的 ISSR 反应体系,从 38 个 ISSR 引物中筛选出了 10 个引物,引物的序列及最佳的退火

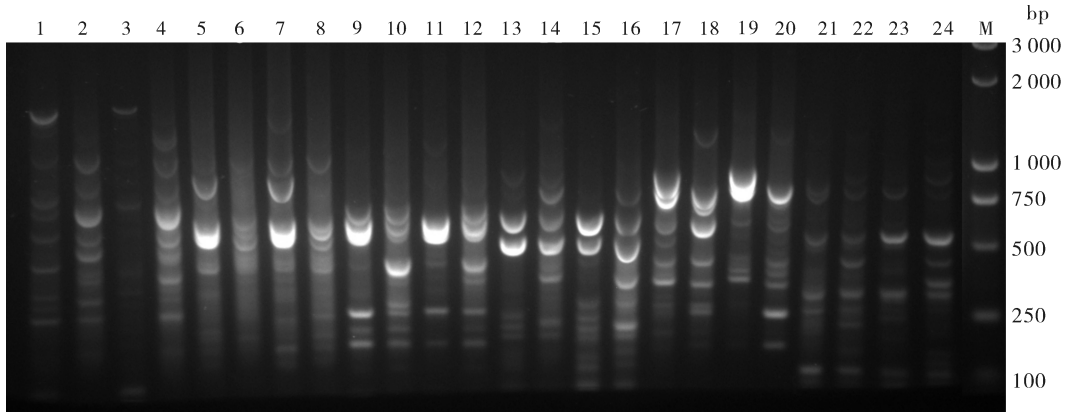
温度见表 2。重复试验表明,这 10 个引物均能够扩增出清晰、重复性好、多态性高的条带,可用于台湾杉的 ISSR 分析(图 1)。

表 2 筛选出的 10 个 ISSR 引物的序列、退火温度及多态性片断数¹⁾

Table 2 The sequence, annealing temperature and the number of polymorphic loci of selected 10 ISSR primers

引物序号 Primer	引物序列 Sequence ¹⁾	退火温度/℃ Annealing temperature	扩增总带数 No. of total bands	多态性带数 No. of polymorphic bands
ISR1	(AG) ₈ T	52	9	6
ISR3	(AG) ₈ YT	52	7	3
ISR4	(AG) ₈ C	55	3	2
ISR6	(AG) ₈ YC	52	8	7
ISR7	(AG) ₈ YA	52	8	4
ISR9	(AC) ₈ YG	53	9	7
ISR15	(GA) ₈ YC	52	11	6
ISR25	(CT) ₈ RC	52	7	5
ISR29	(CTC) ₆	52	4	3
ISR32	(TCC) ₆	52	5	1
Total			71	44

1)R=A,G; Y=C,T.



M. Marker; 1~4, 5~8, 9~12, 13~16, 17~20, 21~24 道分别为引物 ISR1, ISR4, ISR7, ISR15, ISR3, ISR6 扩增的带型; 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 道的模板 DNA 为 LC-5; 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 道的模板为 LS-32; 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17, 18, 21, 22 道的退火温度均为 52℃; 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15, 16, 19, 20, 23, 24 道的退火温度均为 55℃。

M. Marker; The bands in lane 1-4, lane 5-8, lane 9-12, lane 13-16, lane 17-20, lane 21-24 were amplified by primers ISR1, ISR4, ISR7, ISR15, ISR3 and ISR6, respectively; DNA template of LC-5 was used in lane 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23; DNA template of LS-32 was used in lane 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24; the annealing temperature of 52℃ was used in lane 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17, 18, 21, 22; the annealing temperature of 55℃ was used in lane 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15, 16, 19, 20, 23, 24.

图 1 部分 ISSR 引物的退火温度比较

Fig. 1 Comparison of results under different annealing temperature

由表 2 可知,这 10 条引物中,有 8 条为二碱基重复引物,2 条为三碱基重复引物。而 5' 端锚定的二碱基重复引物如 BDV(CA)₇、VHV(GT)₇、DBD(AC)₇、HVH(TG)₇、VBV(CA)₈、VDV(GT)₈ (B=C,G,T; D=A,G,T; H=A,C,T; V=A,C,G)等均没有扩增带,或者扩增的带谱要么呈弥散

型、要么没有多态性而被淘汰。

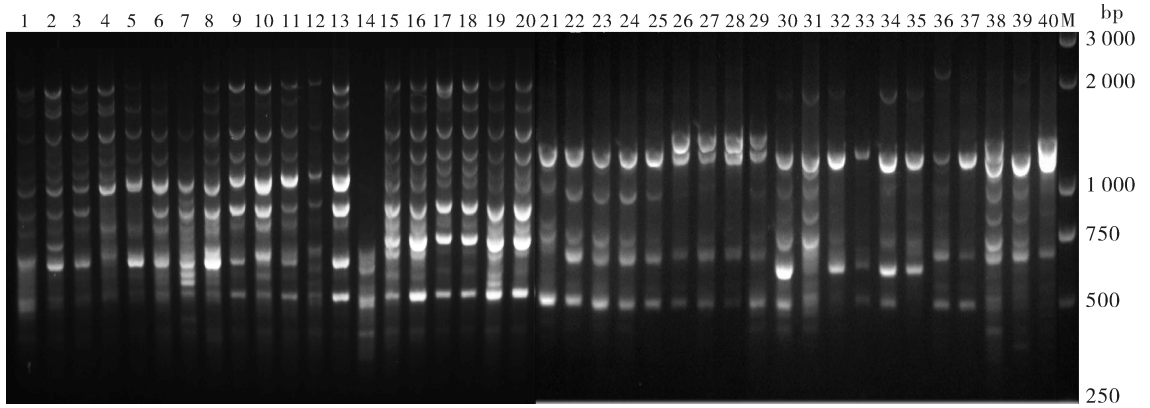
2.3 优化体系对台湾杉的扩增效果

采用优化的反应体系和筛选出的 10 条引物对采自湖北利川的野生台湾杉居群(共 20 个样品)进行了扩增,结果得到了背景清晰、多态性丰富、重复性好的 DNA 扩增片段(图 2),证明本试验建立的体

系稳定可靠,可用于台湾杉居群遗传变异的分析研究。

通过对利川居群的遗传分析得到如下结果:10条引物共扩增出71条谱带,每个引物扩增的条带数

为3~11不等(表2),扩增谱带的分子质量在250~2000 bp之间,多态性带共有44条,多态位点百分率为61.97%,Nei's基因多样性和Shannon's信息指数分别为0.1369和0.2160。



M, Marker; 1~20道和21~40道分别为引物ISR1和ISR3的扩增图谱。退火温度:52℃。M, Marker; the amplified bands in 1-20 lane and 21-40 lane using primer ISR1 and ISR3 respectively, annealing temperature:52℃.

图2 引物ISR1和ISR3对利川居群样品的扩增

Fig.2 The amplified bands of the samples from population LC using primer ISR1 and ISR3

3 讨论

本试验通过对影响PCR反应体系条件的筛选,建立并优化了台湾杉的ISSR-PCR反应体系,即在25 μL的反应体系中,含有40 ng模板DNA、1 U *Taq*酶、0.2 mmol/L dNTP、0.4 μmol/L引物、1.8 mmol/L Mg²⁺、2.5 μL 10×buffer。基于此反应体系筛选出了10条扩增效果好的引物用于台湾杉的ISSR分析。10个引物的序列中有8个为二碱基重复,并且都是3'端锚定的,2个为三碱基重复。其中,5条引物是基于(AG)重复、1条引物基于(GA)重复,扩增的多态性最高(表2),其他二碱基重复或三碱基重复的引物扩增的多态性较低。由于3'端的锚定碱基不同,即使具有相同碱基重复序列的引物,在基因组上的扩增序列也是不同的。通过对这些引物序列的分析,表明在台湾杉的基因组中,以(AG)或(GA)二碱基重复的微卫星序列最丰富、拷贝数最多、多态性最高、在个体或居群间发生的突变几率也可能最大;其次,以(AC)二碱基重复的微卫星序列的含量也比较丰富,但多态性一般。

Mehdi等^[15]在利用ISSR标记研究 *Thymus daenensis* subsp. *daenensis* 的遗传多样性时对引物选择进行了分析,结果表明,含(AG)和(AC)二碱基系列引物扩增的带更清晰,多态性带数更多,筛选出

15条引物中,二碱基系列引物有11条,三碱基重复引物只有4条,同时这15条引物中有12条属于3'端锚定的,3条为5'端锚定的,由此表明3'端锚定引物比5'端锚定引物更有效,扩增出的带更清晰;Pradeep等^[23]的研究也表明ISSR标记中3'端锚定引物比5'端锚定引物更有效;这与本研究结果一致。而Lu等^[17]在分析中国西南部青杨的遗传多样性时发现以(AC)重复的ISSR引物扩增的多态性带数最多,并推测在青杨的基因组中,(AC)重复的微卫星序列的多态性最丰富。在对小麦^[24]和马铃薯^[25]的ISSR分析中也发现(AC)重复的二碱基引物更有用。对贵州苏铁^[16]、南洋杉^[18]、水稻^[26]和枸橼^[27]的ISSR研究则发现(AG)或(GA)重复的二碱基引物扩增效果最好。

Li等^[9]用ISSR标记研究了台湾杉的遗传多样性,他所建立的台湾杉ISSR反应体系为:20 μL反应体系中,含有20 ng模板DNA、1.5 U *Taq*酶、0.1 mmol/L dNTP、0.2 μmol/L引物、2.5 mmol/L Mg²⁺、50 mmol/L KCl、2%甲酰胺等。这与本试验建立的反应体系有明显差别。Li等^[9]用此反应体系筛选出了15条引物用于台湾杉居群104个个体的扩增。其中有5条引物与本研究筛选出的引物相同;4条(AG)重复的引物和1条三碱基重复的引物,即(AG)₈T、(AG)₈C、(AG)₈YC、(AG)₈YA、

(CTC)₆,其他引物则与本试验不相同。采用本试验建立的反应体系和得到的10条引物对湖北利川星斗山野生台湾杉居群20个样本的遗传多样性进行了检测,结果得出星斗山台湾杉居群的多态位点百分率、Nei's基因多样性和Shannon's信息指数分别为61.97%、0.1369和0.2160,远高于Li等^[9]用ISSR标记对湖北利川野生台湾杉居群(22个样本)遗传多样性检测的结果。本试验得到的台湾杉星斗山居群的遗传多样性与张瑞麟^[28]、Lin等^[29]、杨琴军^[2]等对台湾杉居群遗传多样性的研究结果类似,与其他濒危裸子植物相比,利川台湾杉居群具有较高的遗传多样性。

总之,本研究建立了台湾杉的优化ISSR反应体系,筛选出了10个有效的ISSR引物,通过对10个引物序列的分析,讨论了台湾杉基因组序列的特征,并运用这些引物对湖北利川台湾杉居群进行了有效扩增。这为进一步从DNA水平上开展台湾杉的遗传多样性研究及保护、利用工作奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] KUO Y H, CHIEN S C, KUO C H. Antioxidative 7-oxodehydrodropocarpane-type trinorditerpenes from the bark of *Taiwania cryptomerioides* [J]. *Planta Medica*, 2002, 68(11): 1020-1023.
- [2] 杨琴军, 陈光富, 刘秀群, 等. 湖北星斗山台湾杉居群的遗传多样性研究[J]. *广西植物*, 2009, 29(4): 450-454.
- [3] 于永福. 杉科植物的起源、演化及其分布[J]. *植物分类学报*, 1995, 33(4): 362-389.
- [4] 于永福, 傅立国. 杉科植物的系统发育分析[J]. *植物分类学报*, 1996, 34(2): 124-141.
- [5] 胡玉熹, 林金星, 王献溥, 等. 中国特有植物台湾杉的生物学特性及其保护[J]. *生物多样性*, 1995, 3(4): 206-212.
- [6] 庞惠仙, 张光飞, 苏文华. 秃杉的组织培养及植株再生[J]. *植物生理学通讯*, 2005, 41(2): 187.
- [7] 廖凤林, 李久林, 吴士章, 等. 贵州雷公山台湾杉种群结构及空间分布格局[J]. *贵州师范大学学报: 自然科学版*, 2004, 22(2): 6-9.
- [8] 陈伯望, 洪菊生, 施行博. 杉木和秃杉群体的叶绿体微卫星分析[J]. *林业科学*, 2000, 36(3): 46-51.
- [9] LI Z C, WANG X L, GE X J. Genetic diversity of the relict plant *Taiwania cryptomerioides* Hayata (Cupressaceae) in mainland China [J]. *Slivae Genetica*, 2008, 57(4/5): 242-249.
- [10] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.
- [11] ARNAU G, LALLEMND J, BOURGOIN M. Fast and reliable strawberry cultivar identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification [J]. *Euphytica*, 2003, 129: 69-79.
- [12] ZHAO W, MIAO X, ZANG B, et al. Construction of fingerprinting and genetic diversity of mulberry cultivars in China by ISSR markers [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33(9): 851-860.
- [13] ZHANG R, XU Y, YI K, et al. A genetic linkage map for watermelon derived from recombinant inbred lines [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 2004, 129: 237-243.
- [14] LEVI J, THMAS C E, TREBITSH T, et al. An extended linkage map for watermelon based on SRAP, AFLP, SSR, ISSR, and RAPD markers [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 2006, 131: 393-402.
- [15] MEHDI R, BABAK B, MOJTABA K, et al. Genetic variability and geographic differentiation in *Thymus daenensis* subsp. *daenensis*, an endangered medicinal plant, as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) markers [J]. *Biochem Genet*, 2009, 47: 831-842.
- [16] XIAO L Q, GE X J, GONG X, et al. ISSR Variation in the endemic and endangered plant *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae). [J]. *Annals of Botany*, 2004, 94: 133-138.
- [17] LU Z, WANG Y, PENG Y, et al. Genetic diversity of *Populus cathayana* Rehd populations in southwestern China revealed by ISSR markers [J]. *Plant Sci*, 2006, 170: 407-412.
- [18] PYE M G, HENWOOD M J, GADEK P A. Differential levels of genetic diversity and divergence among populations of an ancient Australian rainforest conifer, *Araucaria cunninghamia* [J]. *Plant Syst Evol*, 2009, 277: 173-185.
- [19] 杨琴军, 徐辉, 严志国, 等. 湖北原生台湾杉 (*Taiwania cryptomerioides* Hayata) 资源及其保护 [J]. *广西植物*, 2006, 26(5): 551-556.
- [20] 陈光富, 杨琴军, 陈龙清. 濒危孑遗树种台湾杉 DNA 提取及 RAPD 反应体系的建立 [J]. *湖北农业科学*, 2008, 47(10): 1108-1110.
- [21] HOELZEL A R. *Molecular genetic analysis of population* [M]. London: IRL Press, 1992.
- [22] KING L M, SCHAAL B A. Ribosomal DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis* [J]. *Evolution*, 1989, 43: 1117-1119.
- [23] PRADEEP R M, SARLA N, SIDDIQ E A. Inter simple sequence repeat (ISSR) and its application in plant breeding [J]. *Euphytica*, 2002, 128: 9-17.
- [24] NAGAOKA T, OGIHARA Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 597-602.
- [25] MCGREGOR C E, LAMBERT C A, GREYLING M M, et al. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm [J]. *Euphytica*, 2000, 113: 135-144.
- [26] BLAIR M W, PANAUD O, MCCOUCH S R. Inter-simple se-

- quence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98:780-792.
- [27] FANG D Q, ROOSE M L, KRUEGER R R, et al. Fingerprinting trifoliolate orange germplasm accessions with isozymes, RFLPs and inter-simple sequence repeat markers[J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 95:211-219.
- [28] 张瑞麟. 台湾杉遗传多样性之研究[D]. 台湾: 国立中山大学园艺学院, 2005.
- [29] LIN T P, LU C S, CHUNG Y L, et al. Allozyme variation in 4 populations of *Taiwania cryptomerioides* in Taiwan[J]. *Silvae Genetica*, 1993, 42 (4/5):278-284.

Establishment of ISSR system for the relict plant *Taiwania cryptomerioides* Hayata

YANG Qin-jun¹ YUAN Ji-lin² FU Qiang¹ CHEN Long-qing¹

1. *Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*

2. *Administration Bureau of Leigongshan National Natural Reserve, Leishan 557100, China*

Abstract An optimal ISSR reaction system for *Taiwania cryptomerioides* was established with 25.0 μL reaction mixture made up of 40 ng genomic DNA, 0.4 $\mu\text{mol/L}$ primer, 1.8 mmol/L Mg^{2+} , 1.0 U *Taq*, 0.2 mmol/L dNTP, and 2.5 μL $10\times$ buffer. The PCR were performed as follows: 4 min at 94 $^{\circ}\text{C}$, 40 cycles of 45 s at 94 $^{\circ}\text{C}$, 45 s at 51 $^{\circ}\text{C}$ to 56 $^{\circ}\text{C}$, and 2 min at 72 $^{\circ}\text{C}$, with a final extension of 7 min at 72 $^{\circ}\text{C}$. Ten polymorphic primers were screened using this reaction system. Twenty DNA samples from the wild population of *T. cryptomerioides* distributed in Lichuan City of Hubei Province were amplified by the 10 selected primers. The percentage of polymorphic bands was 61.97%, Nei's gene diversity and Shannon's information measure were 0.1369 and 0.2160, respectively.

Key words *Taiwania cryptomerioides*; ISSR; PCR conditions; reaction system; primer screening

(责任编辑:杨锦莲)