

玉叶金花 SSR-PCR 体系的优化

郑艳^{1,2}, 胡章立¹, 陈涛^{1,2*}

(1. 深圳大学生命与海洋科学学院, 广东深圳 518060; 2. 深圳市中国科学院仙湖植物园, 广东深圳 518004)

摘要 [目的]优化玉叶金花 SSR-PCR 扩增反应体系。[方法]以红纸扇为材料,采用正交设计和单因素试验方法,从 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、引物、模板 DNA 浓度以及退火温度 4 个方面对玉叶金花 SSR-PCR 体系进行优化,并采用 4 对 SSR 引物和 4 种玉叶金花植物样品进行验证。[结果]玉叶金花 20 μ L 的 SSR-PCR 反应最优体系为 Mg^{2+} 浓度 1.50 mmol/L、dNTPs 浓度 0.150 mmol/L、引物浓度 0.45 μ mol/L、*Taq* DNA 聚合酶 2.00 U、模板 DNA 15 ng、退火温度 53.4 $^{\circ}C$ 。[结论]该反应体系的扩增条带清晰、稳定、重复性好,可用于玉叶金花的 SSR 分子标记开发、物种分子鉴定、遗传多样性分析和谱系关系构建等相关研究。

关键词 玉叶金花;正交设计;SSR 分子标记;PCR 体系优化

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)13-0098-06

Optimization of SSR-PCR System for *Mussaenda* L.

ZHENG Yan^{1,2}, HU Zhang-li¹, CHEN Tao^{1,2*} (1. College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060; 2. Shenzhen Fairy Lake Botanical Garden, CAS, Shenzhen, Guangdong 518004)

Abstract [Objective] To optimize SSR-PCR amplification reaction system for *Mussaenda* by orthogonal design. [Method] The orthogonal design and single factor test were adopted to optimize the SSR-PCR system using *M. erythrophylla* genomic DNA as template. Six factors including the concentration of Mg^{2+} , dNTPs, *Taq* DNA polymerase, primer, DNA template and annealing temperature were tested separately in this system, which was further verified by four primers and samples of four *Mussaenda* species. [Result] The optimized SSR-PCR reaction system condition was obtained in a 20 μ L system containing 1.50 mmol/L Mg^{2+} , 0.150 mmol/L dNTPs, 0.45 μ mol/L SSR primer, 2.00 U *Taq* DNA polymerase and 15 ng DNA template, and the annealing temperature 53.4 $^{\circ}C$. [Conclusion] With clear, stable and reproducible bands, the system can be used for SSR maker development, germplasm identification, genetic diversity and relationship analyses.

Key words *Mussaenda* L.; Orthogonal design; SSR molecular marker; PCR system optimization

玉叶金花属 (*Mussaenda* L.) 植物属于茜草科 (Rubiaceae) 金鸡纳亚科 (Cinchonoideae) 玉叶金花族 (Mussaendeae), 主要分布于非洲、亚洲及西南太平洋岛屿, 全世界有 130 多种, 我国玉叶金花属植物约有 28 种, 主产于西南部至东南部以及西藏和台湾^[1-3]。玉叶金花属植物一般为缠绕藤本、灌木和小乔木, 主要特征是具有扩大的花瓣状萼叶, 不开裂浆果, 具有较高的观赏价值^[4]。部分玉叶金花属植物全株可入药, 有清热解暑、去湿、止渴、活血化痰等功效, 也可作为凉茶配料, 预防感冒等, 有的种类提取物还具有抗菌和抗癌等功效^[5-6], 因此玉叶金花具有重要的开发利用价值。

简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 在真核和原核生物基因组中分布广泛。SSR 分子标记具有共显性、多态性高、易检测、操作简单等优点, 在植物的亲缘关系鉴定、遗传多样性分析、DNA 指纹图谱构建、分子标记辅助育种等方

面应用广泛^[7-10]。目前, 基于 SSR 标记技术的玉叶金花属植物的研究较少, 结果不够理想^[11-13]。笔者采用正交试验设计和单因素试验相结合, 对 SSR-PCR 反应体系中的 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、引物、模板 DNA 的浓度以及退火温度进行优化, 以期后续玉叶金花 SSR 分子标记的全面开发、遗传多样性分析和分子分类鉴定等相关研究提供参考和应用。

1 材料与方法

1.1 材料 以红纸扇、大叶玉叶金花、广东玉叶金花、墨脱玉叶金花为材料, 材料采自广东省深圳市仙湖植物园玉叶金花保育与研发基地。采集幼嫩健康的叶片用硅胶进行干燥处理, 其中红纸扇用于 SSR-PCR 体系优化试验, 验证试验采用 4 种样品 (表 1)。

表 1 供试玉叶金花材料

Table 1 Samples of *Mussaenda* L. species

| 序号 No. | 品种名称 Name of species | 拉丁名 Latin name | 凭证标本 Voucher specimen |
|-----------|-------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| 1 | 红纸扇 | <i>Mussaenda erythrophylla</i> | Chen 2016010201 |
| 2 | 大叶玉叶金花 | <i>Mussaenda macrophylla</i> | Chen 2016050903 |
| 3 | 广东玉叶金花 | <i>Mussaenda kwangtungensis</i> | Chen 2016122401 |
| 4 | 墨脱玉叶金花 | <i>Mussaenda decipiens</i> | Chen 2016101201 |

基金项目 深圳市技术创新计划技术开发项目 (CXZZ20140903154251302); 深圳市城管局科研项目 (201803)。

作者简介 郑艳 (1993—), 女, 湖南常德人, 硕士研究生, 研究方向: 植物遗传多样性与分子鉴定。* 通讯作者, 研究员, 博士, 从事资源植物研究与开发。

收稿日期 2018-02-05

1.2 主要试剂与仪器

1.2.1 主要试剂。 DL2000 DNA Marker、PCR 扩增所用的 10 \times PCR buffer、 Mg^{2+} 、dNTPs 和 *Taq* DNA 聚合酶均购于宝生物工程 (大连) 有限公司。试验所用的 SSR 引物由赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司合成, 其中引物 M8 用于正交试验及单

因素试验,引物 M2、M10 和 M11 用于体系验证试验(表 2)。

BIO-RAD T100™ Thermal Cycler、DYCP-31DN 水平电泳仪

1.2.2 主要仪器。NanoDrop 2000 超微量分光光度计、

购于北京六一仪器厂、BIO-RAD 全自动凝胶成像系统。

表 2 4 对 SSR 引物信息

Table 2 The 4 primer pairs of SSR

| 编号 Code | 引物序列(5' - 3') Primer sequence(5' - 3') | SSR 类型 SSR motif | 产物大小 Size//bp |
|------------|---|-----------------------|------------------|
| M2 | F:ATTCTCTGTCTCGATGCTTCTG R:CCCATTCAAATTAGGGTTTCTTC | (ATT) ₆ | 133 |
| M8 | F:ACTGGTTTCTGAAGCTGAATTTG R:CTATACTFCCAAGCCTTGTTTGC | (AGA) ₆ | 98 |
| M10 | F:CTTTGCCTTTTTCGTTTTTCTTTT R:TCATTGAGCTAACCAAGACGAAT | (CGC) ₆ | 151 |
| M11 | F:ATTAAGGCGAATCCTCTGAAAC R:TTCTAAGTGACTGCAAGGACTC | (ATGAGG) ₄ | 119 |

1.3 方法

1.3.1 玉叶金花基因组 DNA 提取。采用 CTAB 法提取玉叶金花基因组 DNA^[14],用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量,用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计检测 DNA 浓度,并用 TE buffer 稀释至 50 ng/L 备用。

SSR-PCR 体系中的 Mg²⁺ 浓度、dNTPs 浓度、Taq DNA 聚合酶用量、引物浓度、模板 DNA 用量进行 5 因素 4 水平的优化试验。SSR-PCR 总反应体系为 20 μL,除上述 5 个变化因素外,每个体系还包含 2 μL 10 × PCR buffer,其他用 ddH₂O 补齐,每个处理重复 3 次(表 3、4)。

1.3.2 正交试验设计。采用 L₁₆(4⁵) 正交设计,对玉叶金花

表 3 正交试验设计因素水平

Table 3 Factors and levels of orthogonal design

| 水平 Levels | Mg ²⁺ 浓度 Mg ²⁺ concentration mmol/L | dNTPs 浓度 dNTPs concentration mmol/L | Taq DNA 聚合酶用量 Taq DNA polymerase U | 引物浓度 Primer concentration μmol/L | 模板 DNA 用量 DNA template ng |
|--------------|---|---|--|--|---------------------------------|
| 1 | 1.00 | 0.10 | 0.50 | 0.30 | 20 |
| 2 | 1.50 | 0.15 | 1.00 | 0.40 | 30 |
| 3 | 2.00 | 0.20 | 1.50 | 0.50 | 40 |
| 4 | 2.50 | 0.25 | 2.00 | 0.60 | 50 |

表 4 玉叶金花 SSR-PCR 体系正交设计 L₁₆(4⁵)

Table 4 The orthogonal design L₁₆(4⁵) of SSR-PCR reaction system for *Mussaenda L.*

| 序号 No. | Mg ²⁺ 浓度 Mg ²⁺ concentration mmol/L | dNTPs 浓度 dNTPs concentration mmol/L | Taq DNA 酶用量 Taq DNA polymerase U | 引物浓度 Primer concentration μmol/L | 模板 DNA 用量 DNA template ng |
|-----------|---|---|--|--|---------------------------------|
| 1 | 1.00 | 0.10 | 0.50 | 0.30 | 20 |
| 2 | 1.00 | 0.15 | 1.00 | 0.40 | 30 |
| 3 | 1.00 | 0.20 | 1.50 | 0.50 | 40 |
| 4 | 1.00 | 0.25 | 2.00 | 0.60 | 50 |
| 5 | 1.50 | 0.10 | 1.00 | 0.50 | 50 |
| 6 | 1.50 | 0.15 | 0.50 | 0.60 | 40 |
| 7 | 1.50 | 0.20 | 2.00 | 0.30 | 30 |
| 8 | 1.50 | 0.25 | 1.50 | 0.40 | 20 |
| 9 | 2.00 | 0.10 | 1.50 | 0.60 | 30 |
| 10 | 2.00 | 0.15 | 2.00 | 0.50 | 20 |
| 11 | 2.00 | 0.20 | 0.50 | 0.40 | 50 |
| 12 | 2.00 | 0.25 | 1.00 | 0.30 | 40 |
| 13 | 2.50 | 0.10 | 2.00 | 0.40 | 40 |
| 14 | 2.50 | 0.15 | 1.50 | 0.30 | 50 |
| 15 | 2.50 | 0.20 | 1.00 | 0.60 | 20 |
| 16 | 2.50 | 0.25 | 0.50 | 0.50 | 30 |

1.3.3 单因素试验设计。利用正交试验设计中 16 组试验

的结果,选出 1 组结果最佳的浓度组合,以此为基准进行

PCR 体系单因素试验,进一步优化 SSR-PCR 体系。每个因素设置 8 个水平,每个处理重复 3 次(表 5)。

表 5 玉叶金花 SSR-PCR 单因素试验设计

Table 5 The single factor test of SSR-PCR reaction system for *Mussaenda* L.

| 序号 No. | Mg ²⁺ 浓度 Mg ²⁺ concentration mmol/L | dNTPs 浓度 dNTPs concentration mmol/L | Taq DNA 聚合酶用量 Taq DNA polymerase U | 引物浓度 Primer concentration μmol/L | 模板 DNA 用量 DNA template ng |
|-----------|---|---|--|--|---------------------------------|
| 1 | 1.00 | 0.100 | 0.50 | 0.30 | 15 |
| 2 | 1.25 | 0.125 | 0.75 | 0.35 | 20 |
| 3 | 1.50 | 0.150 | 1.00 | 0.40 | 25 |
| 4 | 1.75 | 0.175 | 1.25 | 0.45 | 30 |
| 5 | 2.00 | 0.200 | 1.50 | 0.50 | 35 |
| 6 | 2.25 | 0.225 | 1.75 | 0.55 | 40 |
| 7 | 2.50 | 0.250 | 2.00 | 0.60 | 45 |
| 8 | 2.75 | 0.275 | 2.25 | 0.65 | 50 |

1.3.4 SSR-PCR 扩增及检测。PCR 反应在 BIO-RAD T100™ Thermal Cycler 上进行,采用 Touchdown PCR 扩增程序^[15]:94℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,7 个循环且每个循环降低 1℃;之后 94℃ 变性 30 s,53℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,28 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 反应的结果用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,以 DL2000 DNA Marker 作为对照,采用 BIO-RAD 全自动凝胶成像系统观察并拍照。

1.3.5 退火温度的优化。选用以上试验所得最佳反应体系,对 SSR 引物退火温度进行筛选。设置退火温度为 48~65℃,用 BIO-RAD T100™ Thermal Cycler 自动生成 8 个退火温度:48.0、49.0、50.7、53.4、56.5、59.1、60.9、62.0℃。

1.3.6 反应体系验证。通过正交试验和单因素试验筛选出玉叶金花 SSR-PCR 最佳反应体系以及最佳退火温度,使用 4 对引物 M2、M8、M10 和 M11 对 4 个不同种的玉叶金花样品进行 PCR 扩增,重复 2 次,并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,以验证反应体系的可靠性和稳定性。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果 用 CTAB 法提取的玉叶金花基因组 DNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.81~1.91,浓度为 105~243 ng/μL,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,条带清晰,说明 DNA 完整性好,可用于 SSR-PCR 试验(图 1)。

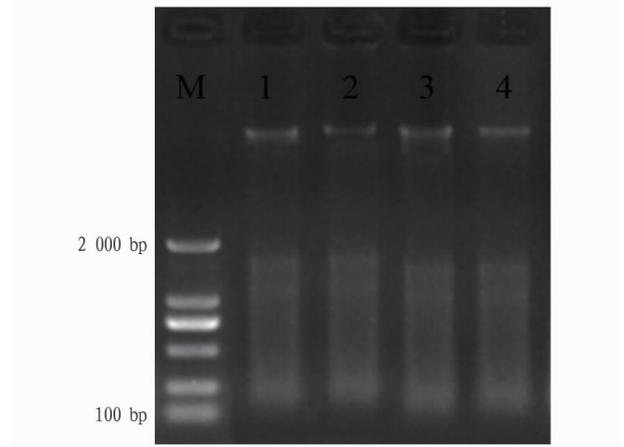
2.2 正交试验结果分析 由图 2 可知,L₁₆(4⁵) 正交设计的 16 个处理 3 次重复的结果,因 Mg²⁺、dNTPs、Taq DNA 聚合酶、引物及 DNA 浓度的不同组合,扩增效果出现了明显差异。第 2、3、4、5、6、11、12、14、16 组条带模糊,出现弥散现象,且结果不稳定;第 1 和 13 组扩增结果较稳定,但条带不清晰;第 7、8、9 和 15 组扩增条带明亮,较清晰;第 10 组条带最明亮、清晰,条带大小与理论值相符,无引物二聚体,且重复性好,亮度一致。

根据对各组合扩增结果的分析,第 10 组的各种因素组合为最佳选择,即 20 μL 反应体系中含 2.00 mmol/L Mg²⁺、0.150 mmol/L dNTPs、2.00 U Taq DNA 聚合酶、0.50 μmol/L 引物及 20 ng DNA。

2.3 单因素试验结果分析 以 SSR-PCR 正交试验结果最好的第 10 组为基准,对 Mg²⁺、dNTPs、Taq DNA 聚合酶、引物和模板 DNA 这 5 个因素进行单因素试验,图 3 为 1 次试验的

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测的结果。

2.3.1 Mg²⁺ 浓度对 SSR-PCR 反应的影响。Mg²⁺ 通过调控 Taq DNA 聚合酶的活性影响 PCR 反应。由图 3 可知,随着 Mg²⁺ 浓度的升高,PCR 产物条带的亮度呈先升高后降低的趋势,说明 Mg²⁺ 浓度过低或过高都会影响 PCR 扩增效率。第 3 组即 Mg²⁺ 浓度为 1.50 mmol/L 时,条带最为明亮,因此 Mg²⁺ 最佳浓度选用 1.50 mmol/L。



注:M 为 DL2000 DNA Marker;1~4 为 4 种玉叶金花编号
Note: M. DL2000 DNA Marker; 1-4. Four *Mussaenda* species code

图 1 玉叶金花基因组 DNA 电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis results of *Mussaenda* genome DNA

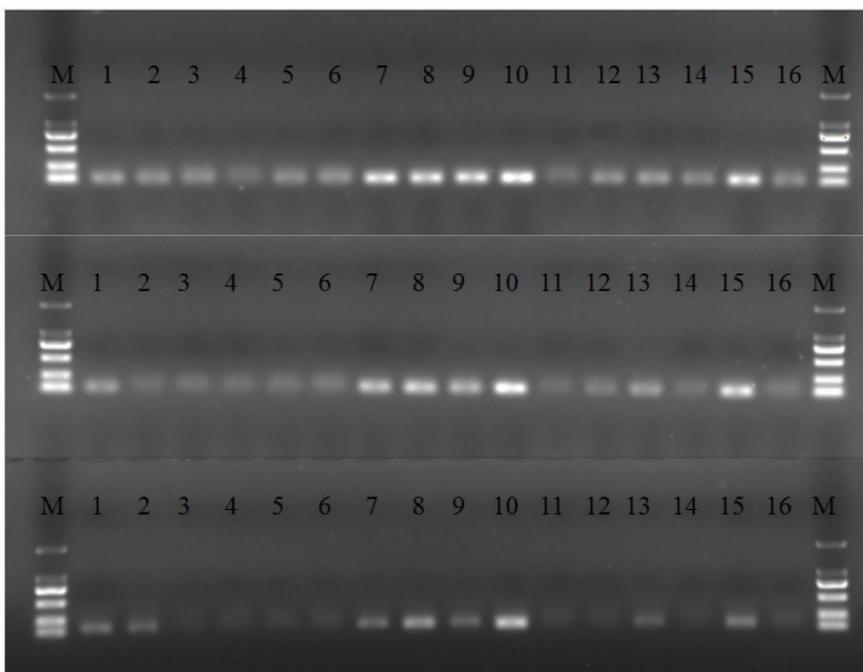
2.3.2 dNTPs 浓度对 SSR-PCR 反应的影响。dNTPs 是 PCR 反应的底物,该试验中 dNTPs 的浓度不同时,PCR 扩增结果相当,影响不大,因此选择正交试验结果中的最佳浓度 0.150 mmol/L。

2.3.3 Taq DNA 聚合酶浓度对 SSR-PCR 反应的影响。Taq DNA 聚合酶浓度低时,扩增产物浓度低,结果不理想,随着浓度的增加,扩增的条带亮度上升。由图 3 可知,当 Taq DNA 聚合酶的量低于 1.00 U 时,条带很淡,高于 1.00 U 时扩增效果较好,当 Taq DNA 聚合酶为 2.00 U 时,条带最为清晰,扩增效果最好,因此最佳选择是 2.00 U。

2.3.4 引物浓度对 SSR-PCR 反应的影响。SSR 引物浓度对 PCR 结果的影响不是很大,其中第 4、5、6、7 和 8 组条带清晰,扩增效果均很好,第 1、2、3 组相对较差,即引物浓度为 0.45~0.65 μmol/L 时,PCR 结果很好,浓度为 0.30~

0.40 μmol/L时扩增结果稍差。引物浓度过高时,容易产生非特异性扩增及引物二聚体,综合考虑到成本,选择浓度较低的第4组,即引物浓度的最佳选择为0.45 μmol/L。

2.3.5 模板 DNA 浓度对 SSR-PCR 反应的影响。由图3可知,DNA 模板对 PCR 扩增的影响较大,随着 DNA 浓度的增高,条带逐渐变淡,最低浓度 15 ng 为最佳选择。

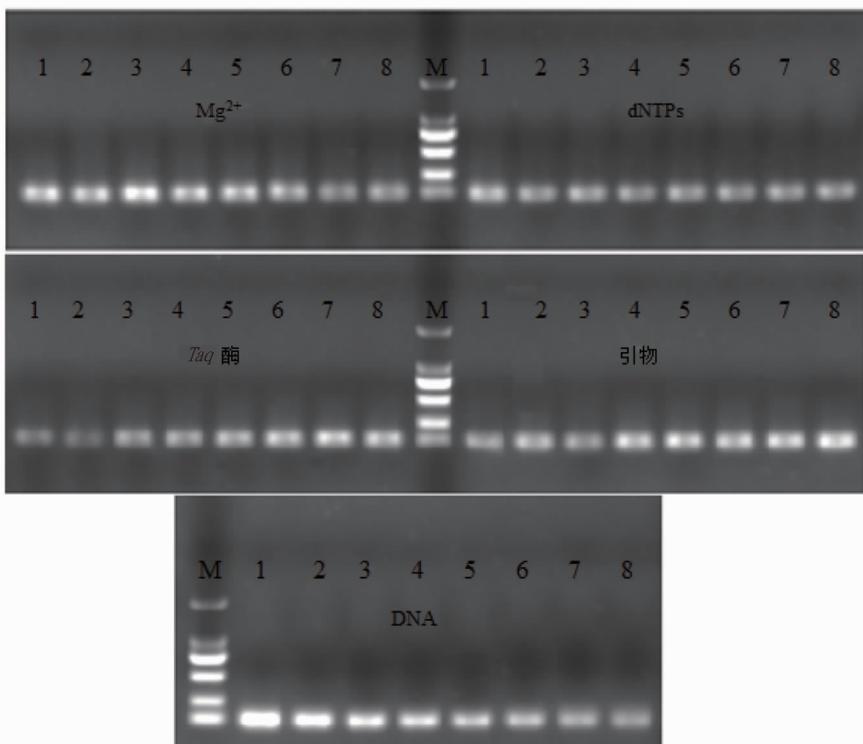


注:M 为 DL2000 DNA Marker;1~16 为组号

Note:M. DL2000 DNA Marker;1-16. The group code

图2 SSR-PCR 体系正交试验电泳结果

Fig.2 Electrophoresis results of orthogonal design of SSR-PCR reaction system



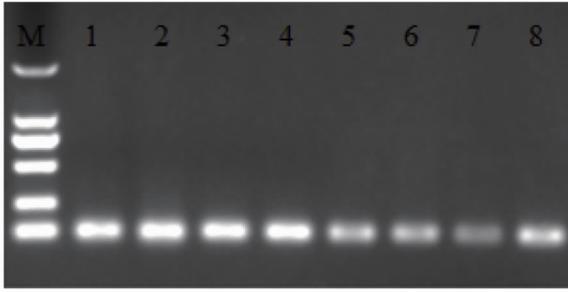
注:M 为 DL2000 DNA Marker;1~8 为因素水平

Note:M. DL2000 DNA Marker;1-8. Factor levels

图3 SSR-PCR 体系单因素试验结果

Fig.3 Electrophoresis results of single factor test of SSR-PCR reaction system

2.4 退火温度筛选结果分析 在 PCR 反应中,退火温度影响引物与模板的特异性结合。由图 4 可知,在 8 个不同退火温度下,均能扩增出目的条带。在退火温度为 48.0、49.0、50.7、53.4 °C 时,扩增结果条带明亮,清晰;当退火温度高于 53.4 °C 时,条带亮度较弱。因此在 48.0~53.4 °C 内,扩增效果较好。退火温度过高会影响 PCR 扩增的效率,而退火温度较低时,容易出现引物二聚体,所以选择 53.4 °C 为最佳退火温度。

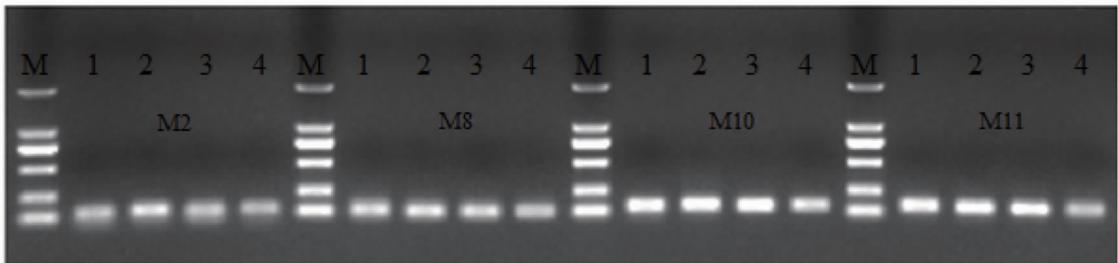


注: M 为 DL2000 DNA Marker; 1~8 退火温度分别为 48.0、49.0、50.7、53.4、56.5、59.1、60.9、62.0 °C

Note: M. DL2000 DNA Marker; 1~8. The annealing temperature 48.0, 49.0, 50.7, 53.4, 56.5, 59.1, 60.9, 62.0 °C

图 4 退火温度对 SSR-PCR 扩增的影响

Fig. 4 The impact of annealing temperature on SSR-PCR amplification



注: M 为 DL2000 DNA Marker; 1~4 为 4 种玉叶金花编号

Note: M. DL2000 DNA Marker; 1~4. Four *Mussaenda* species code

图 5 玉叶金花 SSR-PCR 体系验证试验结果

Fig. 5 Electrophoresis results of verification test of SSR-PCR reaction system for *Mussaenda* L.

SSR-PCR 反应体系中,各因素交互影响。 Mg^{2+} 能够影响 *Taq* DNA 聚合酶的活性,还会与 dNTPs 结合,产生拮抗作用^[20]。dNTPs 浓度过高,容易产生引物二聚体和非特异性扩增,还会与 Mg^{2+} 结合导致 *Taq* DNA 聚合酶的活性降低。*Taq* DNA 聚合酶浓度过低会导致活性不够,反应不充分;浓度过高不仅浪费原料,还会降低反应的特异性。引物的特异性及稳定性会影响扩增产率,引物浓度过低会导致产量下降或扩增失败,浓度过高则容易引起碱基错配,形成引物二聚体^[21-22]。

在绣球^[18]、红椿^[23]、绿豆^[24]等植物的研究中发现 Mg^{2+} 浓度对 SSR-PCR 反应的影响最大。该研究中,PCR 的效果随着 Mg^{2+} 浓度的上升呈现先上升后下降的趋势,这与众多研究结果类似,但是 Mg^{2+} 浓度的变化并未导致扩增失败,可能是由于该研究所设计的浓度梯度变化不大。在大多数研

2.5 体系验证试验结果分析 应用 SSR-PCR 正交试验和单因素试验结果所得到的最佳反应体系,选用 4 对 SSR 引物 M2、M8、M10 和 M11 对 4 种玉叶金花样品进行 PCR 扩增,1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果显示,扩增条带清晰、明亮,与预期产物大小相符,无引物二聚体,试验结果稳定,重复性好(图 5)。

综上所述,玉叶金花 SSR-PCR 的 20 μ L 最佳反应体系为 1.50 mmol/L Mg^{2+} 、0.150 mmol/L dNTPs、0.45 μ mol/L 引物、2.00 U *Taq* DNA 聚合酶、15 ng 模板 DNA、2 μ L 10 \times PCR buffer,其他用 ddH₂O 补齐,最佳退火温度为 53.4 °C。

3 讨论

SSR 标记作为一种重要的分子标记,在物种的遗传多样性分析、种群遗传结构分析、物种系统进化关系分析、遗传图谱构建、品种鉴定和分子标记辅助育种等方面具有广泛的应用^[9,16]。SSR-PCR 反应的扩增效果受诸多因素影响,探索玉叶金花 SSR 的最佳 PCR 反应体系,对 SSR 分子标记在玉叶金花属植物研究中的应用十分关键。

该研究采用正交设计和单因素试验相结合的方法对玉叶金花 SSR-PCR 反应体系进行优化,其中正交试验能够均衡各个试验因素,综合各因素之间的交互作用,以便快速找出最佳的组合。在正交试验的基础上,结合单因素试验设计,充分考虑到各因素的影响,提高了试验结果的准确性^[17-19]。

究中,PCR 反应对 DNA 模板的量要求很宽泛,认为模板 DNA 对反应影响最小^[19,24]。该研究结果显示,随着 DNA 模板浓度的提高,PCR 反应效果明显下降。这可能是由于玉叶金花材料中多糖等其他成分的含量较高,而该试验采用的 CTAB 法提取基因组 DNA,未能将杂质去除干净,琼脂糖电泳检测结果显示模板 DNA 主带明显,但浓度不高,含有杂质。在 DNA 浓度高的同时,因杂质含量较高,从而影响了 PCR 反应结果。PCR 试验对模板 DNA 含量要求不高,因此仅 15 ng 便能满足试验要求,并且效果很好。然而,玉叶金花模板 DNA 的提取及纯化方法还需要改进。退火温度影响 PCR 反应中引物与模板的特异性结合。退火温度过高会影响 PCR 扩增的效率;退火温度过低时,容易发生错配,出现引物二聚体,该试验筛选出 53.4 °C 为最佳退火温度。

该研究通过正交试验设计,结合单因素试验,建立了玉

叶金花 SSR-PCR 反应的最优反应体系:1.50 mmol/L Mg^{2+} 、0.150 mmol/L dNTPs、0.45 $\mu\text{mol/L}$ 引物、2.00 U *Taq* DNA 聚合酶、15 ng 模板 DNA、2 μL $10\times$ PCR buffer,用 ddH₂O 补齐至 20 μL ,最佳退火温度 53.4 $^{\circ}\text{C}$ 。此反应体系可用于玉叶金花属植物的 SSR 引物开发、物种分类鉴定、遗传多样性和种群遗传结构分析等方面的研究。

参考文献

- [1] DAVIS A P, GOVAERTS R, BRIDSON D M, et al. A global assessment of distribution, diversity, endemism, and taxonomic effort in the Rubiaceae [J]. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 2009, 96(1): 68-78.
- [2] ALEJANDRO G D, RAZAFIMANDIMBISON S G, LIEDE-SCHUMANN S. Polyphyly of *Mussaenda* inferred from its and trnT-F data and its implication for generic limits in Mussaendeae (Rubiaceae) [J]. *American journal of botany*, 2005, 92(3): 544-557.
- [3] CHEN T, TAYLOR C M. *Mussaenda* [M]// WU Z Y, RAVEN P H, HONG D Y, et al. *Flora of China*. Beijing and St. Louis: Science Press, & Missouri Botanical Garden Press, 2010: 231-242.
- [4] 邱少松, 邵志芳, 赵厚本, 等. 美丽的热带观花植物——粉萼花 [J]. *广东园林*, 2006, 28(4): 41-42.
- [5] 张颖, 李嘉, 姜平川. 玉叶金花化学成分研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2013, 24(3): 278-281.
- [6] 唐德智. 玉叶金花研究进展 [J]. *解放军药理学学报*, 2016, 32(2): 170-173.
- [7] 罗冉, 吴委林, 张场, 等. SSR 分子标记在作物遗传育种中的应用 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2010, 29(1): 137-143.
- [8] 张新叶, 宋丛文, 张亚东, 等. 杨树 EST-SSR 标记的开发 [J]. *林业科学*, 2009, 45(9): 53-59.
- [9] KALIA R K, RAI M K, KALIA S, et al. Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants [J]. *Euphytica*, 2011, 177(3): 309-334.
- [10] QIU L J, YANG C, TIAN B, et al. Exploiting EST databases for the devel-

- opment and characterization of EST-SSR markers in castor bean (*Ricinus communis* L.) [J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10(1): 1-10.
- [11] 王小兰, 虞文根, 周玉萍, 等. 玉叶金花 (*Mussaenda pubescens*) SSR 引物的快速开发 [J]. *广州大学学报 (自然科学版)*, 2007, 6(1): 50-52.
- [12] DUAN T T, GONG W, ZHANG D X. Development of microsatellite markers from *Mussaenda pubescens* (Rubiaceae) [J]. *American journal of botany*, 2012, 99(11): 437-439.
- [13] DUAN T T, ZHANG D X. Fourteen additional microsatellite markers for *Mussaenda pubescens* and cross-species amplification [J]. *Journal of genetics*, 2014, 93(2): 44-47.
- [14] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochemical Bull*, 1987, 19(1): 11-15.
- [15] LUO Z L, DUAN T T, YUAN S, et al. Identification of natural hybrids by SSR markers in *Mussaenda* [J]. *BioProtocol*, 2016, 6(13): 1-7.
- [16] 王玲玲, 陈东亮, 黄丛林, 等. SSR 分子标记技术在植物研究中的应用 [J]. *安徽农业科学*, 2017, 45(36): 123-126, 130.
- [17] 杨水云, 李续娥, 吴明宇, 等. 正交实验法在 PCR 反应条件优化中的应用 [J]. *生物数学学报*, 2005, 20(2): 202-206.
- [18] 贾新平, 孙晓波, 梁丽建, 等. 绣球 SSR-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. *华北农学报*, 2016, 31(4): 68-73.
- [19] YANG T T, MU L Q, WANG J. Optimizing SSR-PCR system of *Panax ginseng* by orthogonal design [J]. *Journal of forestry research*, 2007, 18(1): 31-34.
- [20] 糜亚男, 张水寒, 蔡媛, 等. 杜仲 SSR-PCR 反应体系的优化 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(2): 1-6.
- [21] 胡小利, 马庆, 包海柱, 等. 食用向日葵 SSR-PCR 反应体系的优化 [J]. *华北农学报*, 2015, 30(2): 161-165.
- [22] 周丽霞. 椰子 SSR-PCR 反应体系的优化 [J]. *江西农业学报*, 2017, 29(4): 36-39.
- [23] 湛欣, 鲁好君, 赵帅, 等. 红椿 SSR-PCR 体系建立和多态性引物筛选 [J]. *林业科学研究*, 2016, 29(4): 565-570.
- [24] 赵雅楠, 王颖, 张杰东. 绿豆 SSR-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(8): 23-26.

(上接第 64 页)

圾处理场,不再开发生态园区,保持其天然状态;黑河中游区的中段和下段控制化肥和农药的施用量,污水处理厂达标排放;黑河下游区密切注意污水处理厂污水处理状况,可考虑更换牧区开采并现状使用的汽油泵抽水为太阳能抽水。

参考文献

- [1] 刘兆鑫, 崔英山, 毛郁, 等. 成都平原浅层地下水天然防污性能评价 [J]. *四川地质学报*, 2016, 36(3): 440-443.
- [2] 崔秀凌, 李庚阳. 银川市地下水防污性能研究 [J]. *农业科学研究*, 2013, 34(3): 14-18.
- [3] 刘春华, 张光辉, 王威, 等. 区域地下水系统防污性能评价方法探讨与验证:以鲁北平原为例 [J]. *地球学报*, 2014, 35(2): 217-222.
- [4] 杨利国, 王现国, 钱建立. 洛阳盆地地下水防污性能评价 [J]. *地下水*, 2016, 38(4): 117-118.
- [5] 苗晋杰, 梁合成, 张莺, 等. 我国不同区域地质环境城市地下水防污性能分布特征分析 [J]. *安全与环境工程*, 2012, 19(2): 48-53, 65.
- [6] 蓝永超, 康尔泗, 张济世, 等. 黑河流域水资源开发利用现状存在问题分析 [J]. *干旱区资源与环境*, 2003, 17(6): 34-39.

- [7] 张光辉, 聂振龙, 王金哲, 等. 黑河流域水循环过程中地下水同位素特征及补给效应 [J]. *地球科学进展*, 2005, 20(5): 511-519.
- [8] 刘芬, 王水献, 蓝永超, 等. 黑河流域张掖盆地地表水-地下水系统同位素特征及转化关系 [J]. *南水北调与水利科技*, 2014, 12(2): 92-96.
- [9] 武选民, 史生胜, 黎志恒, 等. 西北黑河下游额济纳盆地地下水系统研究(下) [J]. *水文地质工程地质*, 2003, 29(2): 30-33.
- [10] 张光辉, 聂振龙, 刘少玉, 等. 黑河流域走廊平原地下水补给源组成及其变化 [J]. *水科学进展*, 2005, 16(5): 673-678.
- [11] 聂振龙, 陈宗宇, 申建梅, 等. 应用环境同位素方法研究黑河源区水文循环特征 [J]. *地理与地理信息科学*, 2005, 21(1): 104-108.
- [12] 阮云峰, 赵良菊, 姚治君, 等. 黑河流域地下水导电率空间特征及影响因素研究 [J]. *北京师范大学学报 (自然科学版)*, 2016, 52(3): 289-296.
- [13] 张光辉, 刘少玉, 谢悦波, 等. 西北内陆黑河流域水循环与地下水形成演化模式 [M]. 北京: 地质出版社, 2005: 14.
- [14] 钟佐桑. 地下水防污性能评价方法探讨 [J]. *地学前缘*, 2005, 12(S1): 3-13.
- [15] 蒲瑞丰, 康尔泗, 艾贤高, 等. 黑河流域农业土壤重金属人为污染的富集因子分析 [J]. *干旱区资源与环境*, 2007, 21(5): 108-111.

科技论文写作规范——缩略语

采用国际上惯用的缩略语。如名词术语 DNA(脱氧核糖核酸)、RNA(核糖核酸)、ATP(三磷酸腺苷)、ABA(脱落酸)、ADP(二磷酸腺苷)、CK(对照)、CV(变异系数)、CMS(细胞质雄性不育性)、IAA(吲哚乙酸)、LD(致死剂量)、NAR(净同化率)、PMC(花粉母细胞)、LAI(叶面积指数)、LSD(最小显著差)、RGR(相对增长率)、单位名缩略语 IRRI(国际水稻研究所)、FAO(联合国粮农组织)等。对于文中有些需要临时写成缩写的词(如表及图中由于篇幅关系以及文中经常出现的词而写起来又很长时),则可取各主要词首字母写成缩写,但需在第一次出现处写出全称,表及图中则用注解形式在下方注明,以便读者理解。