

## 省沽油 ISSR 引物筛选及居群遗传多样性初探

陈龙灿<sup>1</sup>, 王颖<sup>1</sup>, 王业中<sup>2</sup>, 张远海<sup>3</sup>, 束庆龙<sup>1</sup>, 王勤<sup>1</sup>, 张良富<sup>1</sup>, 曹翠萍<sup>1</sup>

(1. 安徽农业大学林学与园林学院, 合肥 230036; 2. 岳西柘井园省级自然保护区, 岳西 246600; 3. 金寨县林业局, 金寨 237321)

**摘要:** 测试和筛选出 14 条多态性较高的省沽油 ISSR 有效引物, 并对安徽省野生省沽油的遗传多样性进行初步调查分析。共扩增出 143 个多态性位点, 居群水平平均有效等位基因数  $n_e$  为 1.271, 期望杂合度  $H_e$  为 0.165, Shannon 多态性信息指数  $I$  为 0.257, 物种水平遗传多样性参数分别为  $n_e = 1.341$ ,  $H_e = 0.227$ ,  $I = 0.370$ ; 居群间遗传分化系数为  $G_{st} = 0.271$ 。初步揭示了野生省沽油的遗传多样性, 同时表明 ISSR 标记对于研究省沽油遗传多样性的适用性和可靠性, 研究结果将为进一步深入研究省沽油多居群的遗传多样性和资源保护提供帮助。

**关键词:** 省沽油; ISSR 标记; 引物筛选; 居群遗传多样性

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2014)03-0462-06

### ISSR primer selection and preliminary analysis of genetic diversity in natural populations of *Staphylea bumalda*

CHEN Longcan<sup>1</sup>, WANG Ying<sup>1</sup>, WANG Yezhong<sup>2</sup>, ZHANG Yuanhai<sup>3</sup>,  
SHU Qinglong<sup>1</sup>, WANG Qin<sup>1</sup>, ZHANG Liangfu<sup>1</sup>, CAO Cuiping<sup>1</sup>

(1. School of Forestry & Landscape Architecture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Kujingyuan Provincial Nature Reserve of Yuexi County, Yuexi 246600; 3. Forestry Bureau of Jinzhai County, Jinzhai 237321)

**Abstract:** Fourteen effective polymorphic ISSR primers were tested and selected. The genetic diversity in wild *Staphylea bumalda* of Anhui province was analysed based on the selected primers. A total of 143 polymorphic loci were amplified, showing effective number of alleles per locus ( $n_e$ ) of 1.271, expected heterozygosity ( $H_e$ ) of 0.165, and Shannon's information index ( $I$ ) of 0.257 at the population level, and  $n_e = 1.341$ ,  $H_e = 0.227$ ,  $I = 0.370$  at the species level. The genetic differentiation among populations ( $G_{st}$ ) stood at 0.271. Preliminary results revealed the genetic diversity in wild *S. bumaldas*, and indicated the applicability and reliability of ISSRs to the investigation of genetic diversity in *S. bumaldas*. The present study will provide support for further research of multi-population genetic diversity in *S. bumaldas* and conservation of its genetic resources in future.

**Key words:** *Staphylea bumalda*; ISSR markers; primer selection; genetic diversity

省沽油 (*Staphylea bumalda* DC) 是省沽油科 (Staphyleaceae) 省沽油属 (*Staphylea*) 多年生落叶灌木或小乔木, 别名水条, 因其顶生珍珠似的白色小花, 故又称为珍珠花树。其主要分布于北半球热带、亚热带和温带, 如中国、韩国、日本等国家, 在我国主要分布于华中地区的安徽、湖北、河南以及江西北部, 现多数以野生状态存活<sup>[1-2]</sup>。省沽油是我国稀有的木本油料、优良的园林绿化树种, 也具有食用和药用价值。但长期以来, 野生资源被人们过度利用, 遗传资源遭到了很大破坏并流失, 许多

重要的价值未被很好地利用起来。因此, 研究和保护现有野生省沽油的遗传多样性, 就成为当务之急。

ISSRs (Inter-simple sequence repeats), 即简单序列重复区间扩增多态性, 是一种建立在 PCR 扩增技术上的分子标记方法<sup>[3]</sup>, 其基本原理是用锚定的微卫星 (即简单序列重复 SSRs: simple sequence repeats) DNA 作为引物, 在 SSR 序列的 5'端或 3'端连接上 2~4 个随机核苷酸, 在 PCR 反应中, 锚定引物引起特定位点退火, 导致与锚定引物互补间隔的重复序列间 DNA 片段的扩增。与其他分子标

收稿日期: 2014-01-03

作者简介: 陈龙灿, 硕士研究生。

\* 通信作者: 曹翠萍, 教授。E-mail: cuipingcao@163.com

记方法(如 RFLP, RAPD, AFLP, SSR)相比, ISSRs 具有许多优点, 如 DNA 用量少、重复性好、操作简便、成本低, 不需要预先知道靶序列信息, 具有很好的稳定性和多态性, 已广泛应用于植物遗传多样性研究<sup>[4-5]</sup>、亲缘关系分析<sup>[6-7]</sup>, 以及品种鉴定等研究<sup>[8]</sup>。

国外关于省沽油的研究报道较少, 且仅见于省沽油生态和生理学的研究, 以及省沽油叶中少数化学成分的研究<sup>[9-10]</sup>。我国科研工作者在省沽油的研究方面作了较多工作, 但主要是对省沽油形态特征、生态习性和生物学特性的研究, 各器官营养成分的分析比较, 以及省沽油育苗造林技术的研究。相比之下, 对于省沽油在遗传学方面的研究和报道还较少, 王庆平等<sup>[11]</sup>对野生省沽油的根尖细胞染色体数目和结构的变异进行过初步观察, 叶欢等<sup>[12]</sup>对湖北三潭风景区野生省沽油 32 个样本的遗传多样性进行了 ISSR 分析, 李凤鸣等<sup>[13]</sup>对来自湖北、河南和

安徽的 28 个省沽油样本的遗传多样性进行了 AFLP 分析, 但有关安徽省野生省沽油遗传多样性的研究, 至今还未见报道。

本研究旨在筛选出多态性较高的省沽油 ISSR 有效引物, 并对安徽省野生省沽油的遗传多样性初步进行分析评价, 为进一步广泛研究省沽油多居群的遗传多样性和资源保护提供帮助。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验材料包括 3 个居群的 45 个野生省沽油样本, 分别采集于安徽省江淮地区的庐江县、皖南的石台县和大别山区的金寨县 3 个代表性自然分布区, 样本树木均为健康单株, 每个样本单株相距 20 m 以上。从每株样本树木采集当年生嫩叶, 分别编号, 与硅胶干燥保存于塑料袋中, 带回实验室, 放入 -70℃ 冰箱内, 实验材料及采集地信息见表 1。

表 1 实验材料及采集地信息

Table 1 Information of samples and their geographic location of *S. bumaldas*

居群名称 Pop. ID	采集地点 Sampling location	样本大小 Sample size	纬度(北纬) Latitude (N)	经度(东经) Longitude (E)	海拔高度 m Altitude
庐江 Lujiang	汤池 Tangchi	15	31°15'	117°16'	21
石台 Shitai	城郊 Chengjiao	15	30°12'	117°28'	65
金寨 Jinzhai	马鬃岭 Mazongling	15	31°20'	117°20'	550
合计 Total		45			

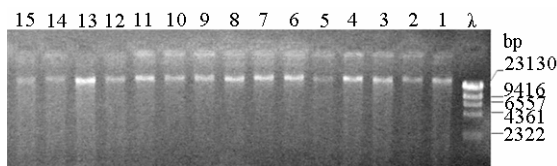


图 1 省沽油基因组 DNA

Figure 1 Genomic DNA of *S. bumalda*

## 1.2 方法

**1.2.1 DNA 提取** 采用 TIANGEN 植物基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)和细胞破碎仪(TissueLyser II, 德国)提取省沽油叶片 DNA。取 5 μL 的 DNA 产物, 与 1 μL SYBR Green I 核酸染料混合, 在 0.8% 的琼脂糖凝胶上点样, 置于 1×TAE 缓冲液中电泳, 然后在紫外灯下拍照, 省沽油基因组 DNA 电泳结果如图 1 所示。利用微量分光光度计 NanoDrop ND-1000 检测 DNA 的浓度为 75 ng·μL<sup>-1</sup>, 纯度 OD 值 (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>) 约为 1.8, 最后将基因组 DNA 放入 -22℃ 的冰箱中保存备用。

**1.2.2 ISSR-PCR 反应体系的建立** 参照杜仲 ISSR-PCR 反应体系<sup>[14]</sup>, 并对 5 个主要因素即基因组 DNA、dNTP、引物、Mg<sup>2+</sup>以及 Taq DNA 聚合酶的浓度分别进行调适, 最后得到省沽油 ISSR-PCR 最佳反应体系, 实验材料来源于庐江居群。

实验用分子量标准为 Trans2K<sup>TM</sup> Plus DNA Marker(北京全式金), 其他试剂均购自上海生工生物工程有限公司(Sangon)。选用加拿大哥伦比亚大学公布的 ISSR 引物(UBC Primer set # 9, University of British Columbia, Vancouver, Canada), 由 Sangon 公司合成。所用引物为 UBC 846。ISSR-PCR 反应体系中, 除含有上述 5 个因素外, 还需加入 2.5 μL 10×PCR 缓冲液, 最后加入超纯水(HPLC)使反应体系总体积达到 20.0 μL。扩增反应在 BIORAD PCR 仪(S1000<sup>TM</sup> Thermal Cycler)中进行。PCR 扩增程序为: 94℃ 预变性 5 min; 42 个循环 94℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 90 s; 最后, 72℃ 延伸 7 min。取 PCR 产物 5.0 μL 和 1 μL SYBR Green I 混合后, 点样在 1.5% 琼脂糖凝胶上, 置于

1×TAE 缓冲液中电泳, 然后在紫外灯下拍照。

**1.2.3 ISSR 引物筛选** 以庐江居群样本为材料, 运用已建立的 ISSR-PCR 反应体系, 对 ISSR 引物逐条进行测试, 筛选出条带清晰、多态性高且重复性好的引物, 用于分析省沽油的 ISSR 遗传多样性。

**1.2.4 ISSR 实验分析** 运用已筛选出的 ISSR 引物, 对表 1 中的野生省沽油 3 个居群样本逐一进行 ISSR-PCR 实验分析, 然后电泳分离和拍照。

**1.2.5 数据分析** 对各个居群 ISSR-PCR 产物的电泳图谱进行判读, 每个扩增位点上无条带记作“0”, 有条带记作“1”, 由此获得由“0”和“1”组成的二元式矩阵。运用软件 POPGENE version 1.31<sup>[15]</sup> 计算各遗传多样性参数, 即多态性位点数  $N$ 、多态性位点百分率  $PPL$ 、有效等位基因数  $n_e$ <sup>[16]</sup>、期望杂合度  $H_e$ <sup>[17]</sup>、Shannon 多态性信息指数  $I$ <sup>[18]</sup>、成对居群间遗传相似度和遗传距离的 Nei's 无偏估计<sup>[19]</sup> 以及居群间的遗传分化系数  $G_{st}$ <sup>[20]</sup>。运用软件 NTSYS-pc 2.0<sup>[21]</sup>, 基于 Nei's 遗传距离<sup>[19]</sup>对居群进行非加权配对算数平均法 (UPGMA, unweighted pairgroup method using arithmetic average) 聚类分析, 基于 Dice's<sup>[22]</sup>遗传相似性系数和主坐标分析法, 构建样本个体的二维分布图。

## 2 结果与分析

### 2.1 ISSR-PCR 反应体系

经调适获得省沽油的 ISSR-PCR 最佳反应体

系, 总体积为 20.0  $\mu\text{L}$ , 包括 DNA ( $5\sim 10 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) 1.0  $\mu\text{L}$ 、dNTP ( $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 0.3  $\mu\text{L}$ 、引物 ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  ( $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 2.5  $\mu\text{L}$ 、*Taq* DNA 聚合酶 ( $5 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) 0.3  $\mu\text{L}$ 、10×PCR 缓冲液 2.5  $\mu\text{L}$ 、HPLC 超纯水 12.9  $\mu\text{L}$ 。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 拍照如图 2 所示。

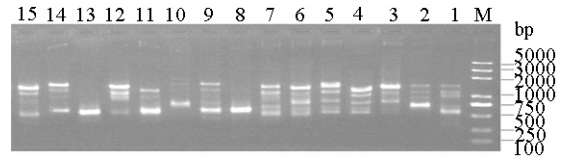


图 2 省沽油 ISSR-PCR 反应体系的琼脂糖凝胶电泳图谱 (引物 UBC 846)

Figure 2 Electrophoretic patterns of ISSR-PCR reaction system for *S. bumalda* on agarose gel using primer UBC 846

### 2.2 ISSR 引物筛选

运用已建立的省沽油 ISSR-PCR 反应体系, 从 80 条 ISSR 随机引物中筛选出条带清晰、多态性高且重复性好的引物共 14 条。以庐江县省沽油样本为材料, 部分引物的 PCR 扩增结果如图 3 所示, 可以看出省沽油样本单株间表现出明显的 ISSR 标记的多态性。

各引物的编号、序列、退火温度、本研究中的扩增位点数等详细信息见表 2。

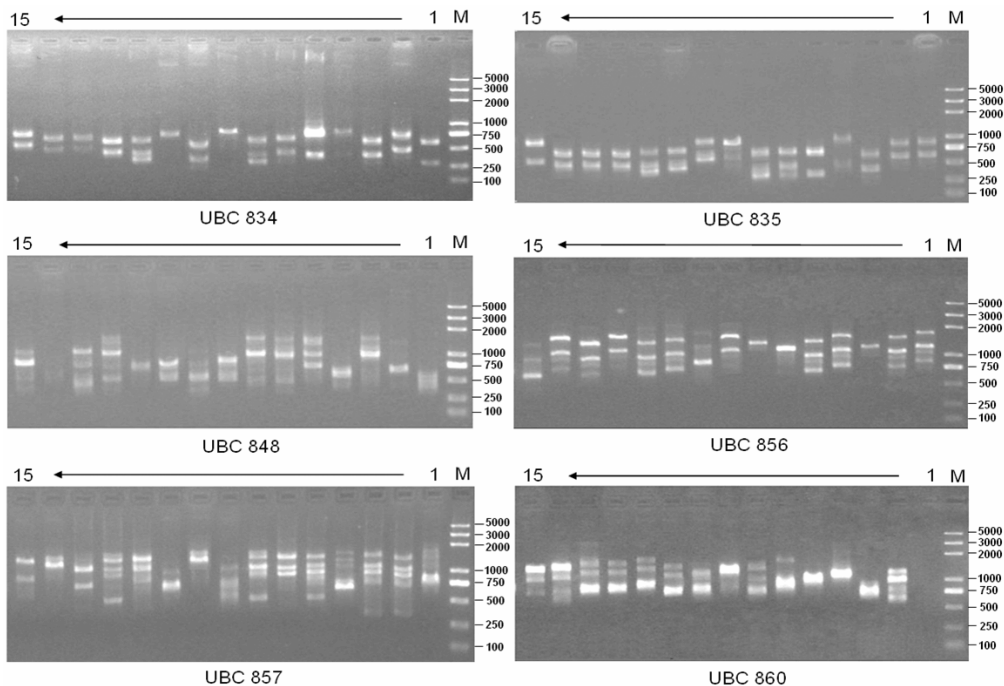


图 3 省沽油庐江居群 ISSR-PCR 部分扩增结果

Figure 3 ISSR-PCR patterns for population of *S. bumalda* from Lujiang

表 2 省沽油 14 条 ISSR 有效引物信息  
Table 2 Information of 14 selected ISSR primers for *S. bumalda*

引物编号 Primer ID	引物序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	退火温度/°C Annealing temperature	扩增位点数 No. of amplified loci	位点条带长度范围/bp Band range of loci
UBC 816	(CA) <sub>8</sub> T	54.0	10	500~1200
UBC 817	(CA) <sub>8</sub> A	54.0	5	500~925
UBC 834	(AG) <sub>8</sub> YT	54.0	10	250~1000
UBC 835	(AG) <sub>8</sub> YC	54.5	11	200~900
UBC 840	(GA) <sub>8</sub> YT	55.1	11	300~1400
UBC 846	(CA) <sub>8</sub> RT	54.2	13	250~1600
UBC 848	(CA) <sub>8</sub> RG	54.0	11	275~1600
UBC 849	(GT) <sub>8</sub> YA	54.0	7	625~1700
UBC 855	(AC) <sub>8</sub> YT	54.0	12	250~1500
UBC 856	(AC) <sub>8</sub> YA	55.3	12	550~1600
UBC 857	(AC) <sub>8</sub> YG	54.0	12	350~1600
UBC 858	(TG) <sub>8</sub> RT	54.0	9	500~1600
UBC 860	(TG) <sub>8</sub> RA	55.0	12	500~2100
UBC 869	(GTT) <sub>6</sub>	54.0	8	375~1000

注: R: A 或 T; Y: C 或 G。Note: R: A or T; Y: C or G.

表 3 省沽油居群内遗传多样性  
Table 3 Genetic diversity within population of *S. bumalda*

居群 Pop. ID	样本大小 Sample size	多态性位点数 $N$ Number of polymorphic loci	多态性位点百分率 $PPL\%$ Percentage of polymorphic loci	有效等位基因数 $n_e$ Effective number of alleles	期望杂合度 $H_e$ Nei's expected heterozygosity	Shannon 信息指数 $I$ Shannon's information index
庐江 Lujiang	15	96	67.13	1.312	0.192	0.298
石台 Shitai	15	81	56.64	1.275	0.165	0.255
金寨 Jinzhai	15	69	48.25	1.225	0.139	0.217
平均 Average	15	82	57.34	1.271	0.165	0.257
物种水平 Species level	45	143	100.00	1.341	0.227	0.370

从表 2 可以看出, 14 条引物序列不同, 退火温度略也有差别, 扩增位点数变动在 5~13 之间, 扩增位点数最少为 5 的引物为 UBC 817, 扩增位点数最多为 13 的引物为 UBC 846, 所有扩增位点的条带长度在 250~2100 bp 范围内。

### 2.3 遗传多样性

运用上述筛选出的 14 条引物, 对全部省沽油样本进行 ISSR-PCR 扩增反应, 检测和分析遗传多样性, 结果如表 3。由表 3 可知, 14 条引物共扩增出 143 个多态性谱带, 省沽油遗传多样性在居群间有明显的差异, 其中庐江居群的遗传多样性最高, 有效等位基因数  $n_e$  为 1.312, 期望杂合度  $H_e$  为 0.192, Shannon 信息指数为 0.298, 金寨居群显示出最低的遗传多样性, 有效等位基因数  $n_e$  为 1.225, 期望杂合度  $H_e$  为 0.139, Shannon 信息指数为 0.217, 石台的遗传多样性程度居中, 有效等位基因数  $n_e$  为 1.275, 期望杂合度  $H_e$  为 0.165, Shannon 信息指数

为 0.255。

### 2.4 遗传距离和聚类分析

表 4 显示省沽油成对居群间的遗传距离和遗传相似度。可以看出, 金寨与石台居群间的遗传距离最大(0.141), 庐江与石台居群间的遗传距离最小(0.083), 庐江与金寨居群间的遗传距离居中(0.107)。居群间的遗传分化系数  $G_{st}$  为 0.271。

基于居群间的 Nei's 遗传距离, 对省沽油进行 UPGMA 聚类分析, 居群间的遗传关系如图 4 所示。

表 4 省沽油各居群间的 Nei's 遗传相似度(对角线上)与遗传距离(对角线下)

居群 Pop. ID	庐江 Lujiang	石台 Shitai	金寨 Jinzhai
庐江 Lujiang	****	0.920	0.899
石台 Shitai	0.083	****	0.869
金寨 Jinzhai	0.107	0.141	****

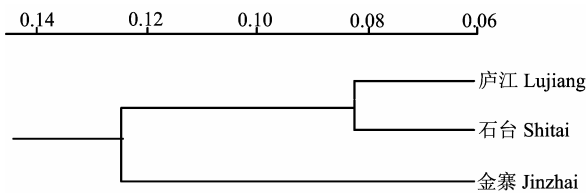


图4 基于 Nei's 遗传距离的省沽油 UPGMA 聚类图  
Figure 4 UPGMA dendrogram based on Nei's genetic distance for *S. bumalda*

由图4可看出, 庐江居群与石台居群聚为一个小组, 而金寨居群明显地与其余两个居群分离开来。

基于 Dice's 遗传相似性系数, 运用主坐标分析法, 构建样本个体的二维分布图如图5所示。

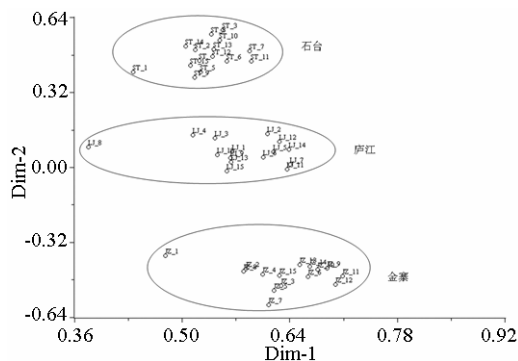


图5 基于 Dice's 遗传相似性系数的省沽油主坐标分析二维图  
Figure 5 Two-dimension plot of principal coordinate analysis based on Dice's similarity coefficient for *S. bumalda*

由图5可以看出, 样本聚类结果与图4相似。来自安徽省3个县的45个省沽油样本明显地被区分开来, 且相同种源的省沽油样本聚在一起成为一个小组, 形成了3个小组, 即石台、庐江和金寨, 样本个体间和种源间也表现出明显的遗传差异。

### 3 讨论

ISSR 标记不仅操作简便、成本低, 而且本研究中筛选出的引物, 对省沽油的遗传变异解析率高, 能明显揭示种内个体间以及种源间的遗传差异。

本研究结果显示(表3), 野生省沽油平均有效等位基因数、期望杂合度、多态性信息指数、以及种源间遗传分化系数分别为  $n_e=1.271$ ,  $H_e=0.165$ ,  $I=0.257$ ,  $G_{st}=0.271$ , 基于同样的分子标记技术, 与其它研究结果相比较, 低于湖北三潭风景区野生省沽油 32 个样本的遗传多样性<sup>[12]</sup> ( $n_e=1.432$ ,  $H_e=0.265$ ,  $I=0.412$ ); 与同为两性花的其他木本植物相比, 其遗传多样性程度低于舟山群岛中 3 个岛屿的 4 个野生山茶种群的平均值<sup>[23]</sup> ( $n_e=1.422$ ,  $H_e=0.239$ ,

$I=0.355$ ), 但遗传分化程度高于野生山茶种群( $G_{st}=0.224$ ); 也低于 9 个省区 38 个种源的野生白花泡桐的遗传多样性平均值和遗传分化系数<sup>[24]</sup> ( $n_e=1.391$ ,  $H_e=0.242$ ,  $I=0.376$ ,  $G_{st}=0.354$ )。

本研究中的样本材料来源于相隔一定距离的不同基因型, 省沽油主要是虫媒植物, 基因交流方式为异交, 一般来说, 异交植物有较高的遗传多样性。但与上述其他树种的研究结果相比, 本研究结果的各项遗传多样性参数均较低, 这可能是因为省沽油资源遭受外界干扰破坏较多, 随着群体内个体数量减少, 近交和遗传漂变逐渐增强, 导致基因流失严重, 遗传多样性减少。

从图4的聚类分析结果可以看出, 庐江种源 and 石台种源的省沽油聚在了一起, 二者遗传相似度相对较高(表4), 而金寨种源明显地分离出来, 这可能与省沽油居群的生活史有关。庐江县和石台县的气候相近, 分别属于亚热带湿润季风气候和中亚热带湿润气候, 居群所处的海拔高度差别不大, 分别为 21 和 65 m (表1), 造成居群小生境相似, 而金寨县地处大别山腹地, 属于北亚热带温暖湿润季风气候区, 具有典型的山地气候特征, 居群所处的海拔高度为 550 m, 由于各居群长期适应局域环境和不断地进化, 就形成了居群间不同程度的遗传差异。

本研究表明了 ISSR 标记技术对于研究省沽油遗传多样性的适用性和可靠性, 同时初步揭示了安徽省野生省沽油的遗传多样性和遗传分化状况。鉴于居群内遗传多样性程度较低, 居群间表现出明显的遗传差异, 每个省沽油居群都有必要保护。建议采取原地保存和异地保存两种措施保护省沽油遗传资源, 即一方面保护省沽油的各自然居群和自然生境, 使物种得以继续生存和进化, 另一方面, 通过建立种子园和收集圃等方式进行异地保护, 同时通过人工控制杂交手段增加省沽油后代的遗传多样性。总之, 本研究结果为进一步深入研究省沽油多居群的遗传多样性和资源保护奠定了重要基础。

### 参考文献:

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(2册) [M]. 北京: 科学出版社, 1983.
- [2] 警兴中, 张定成. 大别山植物志[M]. 北京: 中国林业出版社, 2006.
- [3] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome finger printing by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20: 176-183.
- [4] Liu Y F, Xing M, Zhao W, et al. Genetic diversity analysis of *Rhododendron aureum* Georgi (Ericaceae) located on

- Changbai Mountain using ISSR and RAPD markers[J]. *Plant Syst Evol*, 2012, 298: 921-930.
- [5] 龚榜初, 刘国彬. 锥栗自然居群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(4): 581-587.
- [6] Xu J T, Li A Q, Wang X F, et al. Genetic diversity and phylogenetic relationship of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) accessions evaluated by SRAP and ISSR[J]. *Biochem Syst Ecol*, 2013, 49: 94-100.
- [7] Ozturk M, Duran A, Hakki E E. Cladistic and phylogenetic analyses of the genus *Cicer* in Turkey[J]. *Plant Syst Evol*, 2013, 299: 1955-1966.
- [8] 于小玉, 喻方圆, 刘建兵, 等. ISSR 在油茶品种鉴别和遗传多样性分析中的应用[J]. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 2013, 37(1): 61-66.
- [9] Yu Q, Matsunami K, Otsuka H, et al. Staphylionosides A-K: megastigmane glucosides from the leaves of *Staphylea bumalda* DC.[J]. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53: 800-807.
- [10] Sueyoshi E, Yu Q, Matsunami K, et al. Three new olefinic acetogenin glycosides from leaves of *Staphylea bumalda* DC.[J]. *J Nat Med*, 2009, 63: 61-64.
- [11] 王庆平, 刘幼琪, 张菁, 等. 野生珍珠花 (*Staphylea bumalda* DC.) 染色体研究初报[J]. *湖北大学学报: 自然科学版*, 1998, 20(1): 97-99.
- [12] 叶欢, 李建华, 汪殿蓓, 等. 湖北三潭风景区野生省沽油遗传多样性的 ISSR 分析[J]. *福建林业科技*, 2010, 37(4): 16-20.
- [13] 李凤鸣, 张华新, 杨秀艳. 省沽油群体遗传多样性的 AFLP 分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2012, 13(1): 130-133.
- [14] 王弦云, 朱晓敏, 王勤, 等. 杜仲 ISSR-PCR 反应体系建立、引物筛选及其在遗传多样性研究上的应用[J]. *经济林研究*, 2013, 31(1): 30-34.
- [15] Yeh F C, Yang R C, Boyle T. POPGENE version 1.31. Microsoft window-based freeware for population genetic analysis[R/OL]. Department of Renewable Resources, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada, 1999. Available free at <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>
- [16] Hartl D L, Clark A G. Principles of population genetics[M]. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1989.
- [17] Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1973, 70: 3321-3323.
- [18] Lewontin R C. The apportionment of human diversity[J]. *Evol Biol*, 1972, 6: 381-398.
- [19] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. *Genetics*, 1978, 89: 583-590.
- [20] Nei M. Molecular evolutionary genetics[M]. New York: Columbia University Press, 1987.
- [21] Rohlf F J. NTSYS-pc version 2.0. Numerical taxonomy and multivariate analysis system[R]. Exeter Software, Setauket, N Y, 1998.
- [22] Dice L R. Measures of the amount of ecologic association between species[J]. *Ecology*, 1945, 26: 297-302.
- [23] 林立, 胡仲义, 王国明. 舟山群岛野生山茶种群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(4): 594-599.
- [24] 李芳东, 袁德义, 莫文娟, 等. 白花泡桐种源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. *中南林业科技大学学报*, 2011, 31(7): 1-7.