

云南南部不同种源地小桐子遗传多样性的 ISSR 分析^{*}

向振勇^{1,2,3}, 宋松泉², 王桂娟², 陈茂盛², 杨成源², 龙春林^{1**}

(1 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204; 2 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 勐腊 666303;

3 云南农业大学园林园艺学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 应用 ISSR 分子标记方法对采自云南的 8 个居群的小桐子 (*Jatropha curcas*) 共 158 个个体进行遗传多样性分析。8 个 ISSR 引物共扩增到了 67 个位点, 其中 61 个是多态性位点。分析结果表明: (1) 云南小桐子的遗传多样性水平很高。在物种水平上, 平均每个位点的多态位点百分率 $PPB = 91.04\%$, 有效等位基因数 $N_e = 1.5244$, Nei's 基因多样性指数 $H_e = 0.3070$, Shannon 多样性信息指数 $H_o = 0.4618$; 在居群水平上, $PPB = 55.04\%$, $N_e = 1.3826$, $H_e = 0.2171$, Shannon 多样性信息指数 $H_o = 0.3178$ 。(2) 居群间的遗传分化低于居群内的遗传分化。基于 Nei's 遗传多样性分析得出的居群间遗传多样性分化系数 $G_s = 0.2944$ 。AMOVA 分析显示: 云南小桐子的遗传变异主要存在于居群内, 占总变异的 63.50%, 居群间的遗传变异占 36.50%。(3) 居群间的地理距离及遗传一致度并不存在相关性。鉴于以上指标, 我们推测云南小桐子可能来自不同的地区。

关键词: 小桐子; 遗传变异; ISSR

中图分类号: Q 75

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700 (2007) 06-619-06

Genetic Diversity of *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) Collected from Southern Yunnan, Detected by Inter-simple Sequence Repeat (ISSR)^{*}

XIANG Zhen-Yong^{1,2,3}, SONG Song-Quan², WANG Gui-Juan²,
CHEN Mao-Sheng², YANG Cheng-Yuan², LONG Chun-Lin^{1**}

(1 Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China;

2 Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla 666303, China;

3 College of Landscape and Horticulture, Yunnan Agriculture University, Kunming 650201, China)

Abstract: The genetic diversity of 158 individuals from eight semi-wild populations from Yunnan Province was estimated using ISSR method (8 primers). The results revealed an extraordinarily high level of genetic diversity (at species level, percentage of polymorphic loci $PPB = 91.04\%$, effective number of alleles $N_e = 1.5244$, Nei's (1973) gene diversity $H_e = 0.3070$, and Shannon's information index $H_o = 0.4618$; at population level, $PPB = 55.04\%$, $N_e = 1.3826$, Nei's (1973) gene diversity $H_e = 0.2171$, and Shannon's information index $H_o = 0.3178$). The level of genetic differentiation between populations is lower than that among populations. The low level of genetic differentiation among populations was detected, based on Nei's genetic diversity analysis (29.44%), and AMOVA (36.50%). There is no associations between geographical distance and genetic identity. We suggest that *Jatropha curcas* of Yunnan Province might not be introduced from the same place.

Key words: *Jatropha curcas*; ISSR; Genetic variation; Physic nut

* 基金项目: 国家科技基础条件平台 (2004DKA30430, 2005DKA210006)、云南省自然科学基金 (2005C0053M) 资助项目

** 通讯作者: Author for corresponding; E-mail: long@mail.kib.ac.cn

收稿日期: 2007-04-12, 2007-07-11 接受发表

作者简介: 向振勇 (1981-), 男, 硕士研究生, 主要从事能源植物分子生理学研究。

小桐子 (*Jatropha curcas* L.), 属大戟科 (Euphorbiaceae), 膏桐属 (*Jatropha*) 植物。起源于墨西哥及中美洲, 现在拉丁美洲、亚洲及非洲的许多国家均有分布。它是一个耐干旱的物种, 在热带地区以绿篱的方式被广泛栽培, 其种子对人类和动物具有毒性。小桐子是多倍体, 其染色体数为 22 (Heller, 1996)。

小桐子在引种到我国的 100 年里, 已经在其适生区发展成野生或半野生状态, 主要分布于我国的云南、四川、贵州、广西、广东及台湾等地区。小桐子种仁的最高含油量约为 60%, 超过油菜及大豆等常见的油料作物; 从小桐子中提取的生物柴油可适用于各种柴油发动机, 其在闪点、凝固点、含硫量、一氧化碳排放量、颗粒值等关键技术指标上均优于国内零号柴油, 因此小桐子是一种优良的生物柴油原料。目前, 在小桐子的遗传多样性研究方面未见报道。

SSR (inter-simple sequence repeat) 分子标记是一种简单重复序列区间扩增多态性分子标记, 具有 DNA 样品用量少、操作简单、快速灵敏和实验成本低等优点, 而且实验重复性好、信息量大且多态性高, 因而是一种非常理想的检测物种内遗传变异的分子标记, 现已被广泛应用于遗传多样性分析和居群生物学的研究 (陈俊秋等, 2006; 杨淑达等, 2005; 张萍等, 2006)、种质资源鉴定 (周晔等, 2006; 邓传良等, 2006), 以及物种的系统分类学比较 (Huang and Sun, 2000; Joshi 等, 2000) 等方面, 同时也成为构建遗传图谱的有力工具 (Kojima 等, 1998)。

本文采用 ISSR 分子标记对产于云南南部 8 个居群的遗传多样性进行了研究, 旨在阐明其遗

传多样性水平和遗传结构等。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料来自于云南省的保山、西双版纳、德宏、玉溪、文山、红河、临沧、普洱等地 (图 1), 共计 8 个居群 158 个样本。实验时所用的材料均在中国科学院西双版纳热带植物园进行过迁地保存。采样过程中, 对于个体数大于 20 株的居群按照均匀分布、随机取样的原则进行采样, 而对于个体少于此数的居群进行全部个体采样, 采样时所用叶片均为新鲜幼叶。各个居群的具体位置和采样个体数详见表 1 和图 1。



图 1 8 个云南小桐子居群的取样分布图 (居群代号同表 1)

Fig. 1 Locations of the eight sampled *Jatropha curcas* populations. Population codes are the same as those in Table 1.

表 1 用于 ISSR 分析的 8 个小桐子居群信息

Table 1 Population information of *Jatropha curcas* for ISSR analyses

居群编号 Population code	分布地 Locality	居群大小 Population size	采样数 Sample size	海拔 Altitude (m)	纬度 Latitude	经度 Longitude
保山 BS	隆阳, 腾冲, 昌宁	20	20	780~ 1800	24°08' ~ 25°51'	98°25' ~ 100°02'
西双版纳 XSNB	勐仑, 勐腊, 勐醒	20	20	380~ 800	21°10' ~ 21°41'	99°55' ~ 101°25'
德宏 DH	梁河, 潞西, 陇川	20	20	870~ 1400	23°50' ~ 25°10'	97°31' ~ 98°43'
玉溪 YX	新平	19	19	1600	23°19' ~ 24°53'	101°16' ~ 103°9'
文山 WS	广南, 富宁, 麻栗坡	20	20	700	22°40' ~ 24°48'	103°35' ~ 106°12'
红河 HH	元阳, 绿春, 金平	25	22	380~ 1100	23°30' ~ 23°59'	103°04' ~ 103°43'
临沧 LC	双江, 耿马, 镇康, 临翔	17	17	900~ 1200	21°8' ~ 29°15'	97°31' ~ 106°11'
普洱 PR	上允坝, 小墨江, 忠爱桥	21	20	800~ 1400	22°51' ~ 23°59'	101°8' ~ 102°34'

1.2 基因组 DNA 提取

采用了改良后的 CTAB 法提取基因组 DNA, 在 0.8% 的琼脂糖胶中电泳 30~40 min, 用紫外分光光度计 (Beckman DU800) 检测其质量及浓度后放入 -20℃ 冰箱里储存备用。

1.3 引物筛选与 PCR 扩增

所用引物系列为加拿大哥伦比亚大学 UBC 公司公布的第 9 套 ISSR 引物序列 (http://www.michaelsmith.ubc.ca/services/NAPS/Primer_Sets/), 由上海生工合成。引物筛选时每个居群随机挑选 2 个模版在 20 μl 的反应体系中进行扩增筛选, 从前 60 个引物中选取 8 个扩增条带清晰、重复性好的引物 (表 2) 用于全部 8 个居群样本分析。

表 2 用于小桐子居群扩增的 ISSR 引物

Table 2 ISSR primers used for generating ISSR markers from *Jatropha curcas* populations

引物 Primer	系列 (5'~3') Sequence	退火温度 (℃) Annealing temperature
836	(Ag) ₈ YA	48
840	(gA) ₈ YT	47
846	(CA) ₈ RT	44
849	(gT) ₈ YA	51
852	(TC) ₈ RA	45
856	(AC) ₈ YA	55
858	(Tg) ₈ RT	54
860	(Tg) ₈ RA	44

PCR 扩增反应在 Bio-Rad PCR 仪上进行, 经过比较与优化确定最佳的 ISSR 扩增条件为 20 μl 反应体系, 内含 2 × buffer, 2.0 mmol/L MgCl₂, 250 μmol/L dNTPs, 0.5 μmol/L 引物, 1 U Taq DNA 聚合酶, 25 ng 模板 DNA。

PCR 扩增程序: 95℃ 预变性 7 min; 95℃ 变性 45 s, (44~55)℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min (35 个循环); 72℃ 延伸 7 min。

PCR 扩增产物在 1.8% 的琼脂糖凝胶上电泳 (0.5 × TBE, 5 V/cm) 分离, 以 DNA Maker DL2000 (100~3 000 bp) (博大生物工程有限公司) 为分子标记, 溴化乙锭 (EB) 染色显带。DNA 片段通过凝胶成像系统 (UPV) 观察记录。

1.4 数据统计分析

按照电泳图谱中同一位置上 DNA 带的有无进行统计, 有带的记为“1”, 无带的记为“0”。记录清晰、稳定且长度在 300~1 300 bp 范围内的扩增带, 形成 0/1 矩阵图输入计算机。应用 POPGENE1.31 (Yeh 等, 1999) 软件在假定种群处于 Hardy-Weinberg 平衡状态下, 对全部居群和各单个居群分别进行遗传参数分析, 分别计算了多态位点百分率 (PPB)、观测等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、Nei's (1973) 基因多样性指数 (H_e)、Shannon's 信息指数 (H_o)、群体总基因多样性 (H_t)、群

体内基因多样性 (H_s)、群体间的遗传分化系数 (G_{ST})、Nei's (1978) 遗传距离 (D) 和遗传一致度 (I), 并据此用 UPGMA 方法进行聚类, 分析各群体之间的遗传关系。运用 DCFA1.1 (张富民和葛颂, 2001) 对 ISSR 表型数据矩阵进行计算, 得到表型间的距离系数, 组成 WINAMOVA 所需要的距离系数 (δ^2) 矩阵文件, 即距离文件 (dis) 然后采用 WINAMOVA 软件 (Excoffier, 1993) 对居群间和居群内的遗传变异进行分子变异分析 (AMOVA)。

2 结果

2.1 物种和居群水平的遗传多样性

八条引物共检测到 67 个位点, 其中 61 个位点是多态性位点。在物种水平上, 云南小桐子具有很高的多态位点百分率 $PPB = 91.04\%$ (表 3)、平均每个位点的有效等位基因数 $N_e = (1.5244 \pm 0.3482)$ 、Nei's 基因多样性指数 $H_e = (0.3070 \pm 0.1673)$ 、Shannon 信息指数 $H_o = (0.4618 \pm 0.2208)$ (表 4)。在居群水平上, 各居群的多态位点百分率差异大 (43.28~67.16%) (表 3), 平均值为 55.04%, 平均每个位点的有效等位基因数 $N_e = 1.3826$ 、Nei's 基因多样性指数 $H_e = 0.2171$ 、Shannon 信息指数 $H_o = 0.3178$ (表 4)。

表 3 云南小桐子各居群的多态位点百分率 (PPB) 统计 (居群代号同表 1)

Table 3 The PPB values of all *Jatropha curcas* population
Population codes are the same as those of Table 1

居群编号 Population code	采样数 (株) Sampled size	多态位点数 No of polymorphic loci	多态位点百分率 PPB (%)
保山 BS	20	29	43.28
西双版纳 XSBN	20	45	67.16
德宏 DH	20	37	55.22
玉溪 YX	19	32	47.76
文山 WS	20	43	64.18
红河 HH	22	37	55.22
临沧 LC	17	41	61.19
普洱 PR	20	31	46.27
平均 Mean	19.75	36.63	55.04
物种水平 At species level	158	61	91.04

Shannon 信息多样性指数显示了各居群的遗传变异由高到低依次为西双版纳 (XSBN) > 文山 (WS) > 临沧 (LC) > 红河 (HH) > 德宏 (DH) > 玉溪 (YX) > 普洱 (PR) > 保山 (BS) (表 4), 与 PPB 值分析的结果一致。各居群间均

表 4 小桐子居群的遗传多样性

Table 4 Genetic diversity of *Jatropha curcas* population. Population codes are the same as those of Table 1

居群 Population	等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	Nei's 基因多样性 H_e	Shannon 信息指数 H_o
保山 BS	1.4328±0.4992	1.2875±0.3790	0.1644±0.2051	0.2422±0.2944
西双版纳 XSBN	1.6716±0.4732	1.4894±0.3985	0.2744±0.2082	0.3992±0.2946
德宏 DH	1.5522±0.5010	1.3670±0.3991	0.2079±0.2125	0.3057±0.3017
玉溪 YX	1.4776±0.5033	1.3278±0.3840	0.1880±0.2087	0.2762±0.3003
文山 WS	1.6418±0.4831	1.4844±0.3994	0.2705±0.2127	0.3912±0.3026
红河 HH	1.5522±0.5010	1.3774±0.4051	0.2125±0.2143	0.3115±0.3040
临沧 LC	1.6119±0.4910	1.4221±0.3794	0.2425±0.2087	0.3547±0.2996
普洱 PR	1.4627±0.5024	1.3049±0.3734	0.1768±0.2039	0.2614±0.2944
平均 Mean	1.5504	1.3826	0.2171	0.3178
物种水平 At species level	1.9104±0.2877	1.5244±0.3482	0.3070±0.1673	0.4618±0.2208

N_a , Observed number of alleles; N_e , effective number of alleles; H_e , Nei's (1973) gene diversity; H_o , Shannon's information index (mean, H_{pop} ; At species level, H_{sp}).

表 5 小桐子居群基因多样性 Nei's 分析

Table 5 Nei's (1987) analysis of gene diversity in *Jatropha curcas* populations

	总基因多样性 H_t	居群内基因多样性 H_s	基因分化系数 G_{st}	基因流 N_m
平均 Mean	0.3077	0.2171	0.2944	1.1986
标准差 Standard deviation	0.0278	0.0151		

H_t , total gene diversity; H_s , gene diversity within populations; G_{st} , coefficient of gene differentiation; N_m , gene flow, ($N_m = 0.5(1 - G_{st})/G_{st}$)

表 6 小桐子的 AMOVA 分析

Table 6 Analysis of molecular variance (AMOVA) for *Jatropha curcas*

谱系结构 Source of variance	方差总和 SSD	平均方差 MSD	变异组分 Variance component	变异百分率 (%) Percentage of total variance	P*
居群间 Variance among populations	498.6386	71.234	3.3167	36.50	< 0.001
居群内 Variance within populations	865.5956	5.771	5.7706	63.50	< 0.001

P 值表示比观察值的变异大的概率, 这个概率是通过把居群中的样本经过 1000 次随机排列改变计算得到的。SSD, Sum of squared deviation; MSD, Mean of squared deviation. * P-values are the probabilities of having a more extreme variance component than the observed values alone. Probabilities were calculated by 1 000 random permutations of individuals across populations.

有遗传多样性差异。其中西双版纳居群的遗传多样性水平最高 ($PPB = 67.16$, $N_e = 1.4894$, $H_e = 0.2744$, $H_o = 0.3992$), 保山 (BS) 居群的遗传多样性水平最低 ($PPB = 43.28$, $N_e = 1.2875$, $H_e = 0.1644$, $H_o = 0.2422$) (表 3, 4)。

2.2 居群遗传分化程度的比较分析

用 POPGENE 计算出的遗传变异分析结果 (表 5) 表明: 小桐子各居群间存在着一定的遗传分化。8 个自然居群总的遗传多样性 $H_t = 0.3077$, 其中居群内遗传多样性 $H_s = 0.2171$, 居群间的基因多样性 ($D_{st} = H_t - H_s$) 为 0.0906, Nei 基因分化系数 $G_{st} = 0.2944$, 表明有 29.44%

的遗传变异存在于居群间, 有 70.56% 的遗传变异存在于居群内, 居群内的遗传分化大于居群间的分化。居群间基因流 ($N_m = 0.5(1 - G_{st})/G_{st}$) 为 1.1986。

用 WINAMOVA 进行基于欧式距离平方的遗传变异巢式方差分析结果也显示小桐子的遗传变异主要存在于居群内, 占总的遗传变异的 63.50%, 居群间的遗传变异占 36.50% ($P < 0.001$) (表 6)。

虽然用两种方法分析的结果在数值上有差异, 但所揭示的小桐子居群的遗传分化趋势是一致的, 都表明了遗传变异主要存在于居群内, 居群内的遗传分化大于居群间的遗传分化。

表 7 小桐子 8 个居群间的 *Nei's* (1978) 遗传一致度 (*I*) (对角线上方) 和遗传距离 (*D*) (对角线下方)

Table 7 *Nei's* genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal)

	保山 BS	西双版纳 SXBN	德宏 DH	玉溪 YX	文山 WS	红河 HH	临沧 LC	普洱 PR
保山 BS	****	0.9426	0.7824	0.8506	0.8282	0.8361	0.7913	0.8484
西双版纳 SXBN	0.0591	****	0.8610	0.9016	0.9077	0.9274	0.8888	0.8985
德宏 DH	0.2454	0.1496	****	0.9157	0.8948	0.8541	0.8297	0.8312
玉溪 YX	0.1618	0.1036	0.0881	****	0.9262	0.9159	0.8662	0.8716
文山 WS	0.1885	0.0968	0.1111	0.0767	****	0.9155	0.8859	0.8212
红河 HH	0.1790	0.0754	0.1577	0.0878	0.0883	****	0.9319	0.8884
临沧 LC	0.2341	0.1179	0.1867	0.1437	0.1212	0.0706	****	0.8988
普洱 PR	0.1645	0.1071	0.1849	0.1374	0.1969	0.1183	0.1067	****

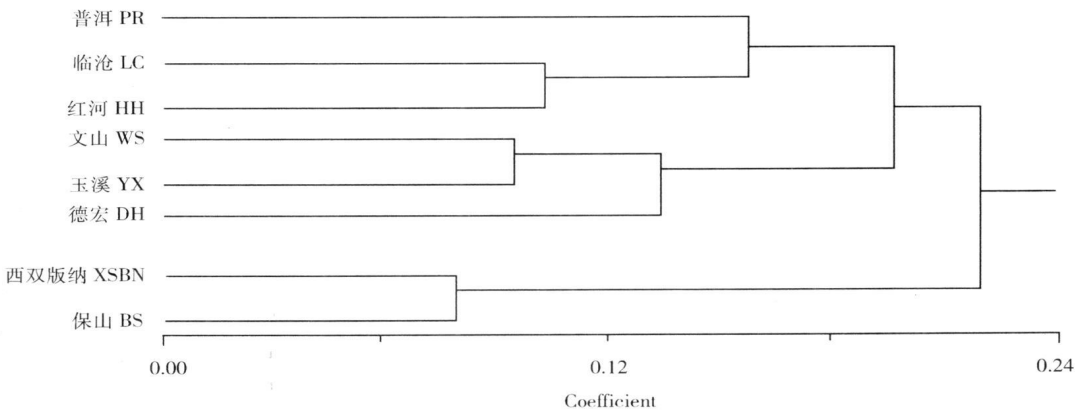


图 2 小桐子居群的 *Nei's* (1978) 遗传距离的 UPGMA 聚类图 (居群代号同表 1)

Fig. 2 UPGMA dendrogram of *Jatropa carcas* populations based on *Nei's* (1978) genetic distance.

Population codes are the same as those in Table 1.

2.3 居群间遗传距离和遗传一致度

用 POPGENE 计算出了小桐子 8 个居群两两居群间的 *Nei's* 遗传一致度 (*I*), 其范围为 0.7824~ 0.9426, 遗传距离 (*D*) 的范围从 0.0591~ 0.2454 (表 7)。其中保山、西双版纳之间的遗传一致度最高 (0.9426), 遗传距离最近 (0.0591), 同时在 UPGMA 聚类图中, 也聚在了一起; 保山与临沧的遗传一致度最低 (*I* = 0.7824), 遗传距离最远 (*D* = 0.2454) 在 UPGMA 聚类图中, 各自的距离最远 (图 2)。

3 讨论

Hamrick 等 (1992) 曾总结了 662 种植物的遗传多样性和遗传分化所得出的平均值为: *PPB* = 51.3%, *N_a* = 1.97, *H_e* = 0.150, *G_{st}* = 0.228; 而其中分布区较为广泛的物种的遗传多样性和遗传分化所得出的平均值为: *PPB* = 67.8%, *N_a* =

2.11, *H_e* = 0.257, *G_{st}* = 0.033; 云南小桐子 8 个半野生居群的遗传多样性水平参数分别为 *PPB* = 91.04%, *N_a* = 1.9104, *H_e* = 0.3070, *G_{st}* = 0.2944。与 Hamrick 等所得出的平均值相比, 小桐子的多态位点百分率 (*PPB*), 基因多样性指数 (*H_e*) 及遗传分化参数 (*G_{st}*) 均明显偏高, 说明小桐子具有较高的遗传多样性, 且居群间的遗传多样性亦较高。这一结果以宽分布区的种趋向于具有更高的遗传多样性水平 (Karron, 1987; Hamrick and Godt, 1990) 是相符的。小桐子居群间遗传多样性较高, 可能是由于小桐子长期生长的地理区域的环境各不相同, 其在各居群内发生的变异被逐渐保留下来所致。

根据 POPGENE 1.31 及 WINAMOVA 两种软件的分析结果均表明: 小桐子的遗传变异主要存在于居群内 (70.56%, 63.50%), 居群内的遗传变异大于居群间的遗传变异。这可能是由于云南

特殊的地理环境, 气候因素等造成, 因为即便在同一居群中, 海拔、降雨量等因素都会对其遗传变异产生影响。在研究中我们就发现西双版纳半野生状态的小桐子在叶片上具有光滑及两种不同形式的褶皱现象。

从图2聚类中, 可以看出小桐子在遗传一致度方面大致可以分为两大支, 即普洱、临沧、红河、文山、玉溪、德宏为一大支; 西双版纳、保山为一大支。结合图1可以看出, 在普洱到德宏这一支中, 其几个地区在地理位置上均相连在一起。而在聚类时又聚在一起, 遗传一致度高。于是推测这几个地区的小桐子可能是从同一地区引种进入的, 也有可能是相互引种形成, 但它们的遗传一致度并不完全相同, 产生这样的现象, 我们估计可能是由于云南特殊的地理位置, 复杂的山川、河流以及各个地区气候的差异导致了各个地区的小桐子产生了不同的变异, 在引种进入的100年里所出现的差异; 而从图2可以看出西双版纳与保山两个地区的小桐子聚为一支, 但从图1可知, 这两个地区并不相邻。它们与上一支的遗传一致度差别较大, 我们估计这一支的起源可能与普洱-德宏一支的起源不同, 同时, 这两个地区的起源又较为相似。但西双版纳地区的遗传多样性较高, 保山地区的遗传多样性较低, 而两个地区小桐子的遗传一致度又较相近, 我们怀疑保山地区的小桐子是由西双版纳引种过去的, 同时其变异的程度较小。

〔参 考 文 献〕

- Chen JQ (陈俊秋), Ci XQ (慈秀芹), Li QM (李巧明) *et al.* 2006. Genetic diversity of *Litsea szemaois*, an endangered species endemic to China, detected by inter-simple sequence repeat (ISSR) [J]. *Biodivers Sci* (生物多样性), **14** (5): 410—420
- Deng CL (邓传良), Zhou J (周坚), Lu LD (卢龙斗) *et al.* 2006. Study on germplasm resources of *Lycoris longituba* (Amaryllidaceae) by RAPD and ISSR [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **28** (3): 300—304
- Excoffier L. 1993. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) Version 1.55 [R]. Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva
- Hanrick JL, Godt MJW. 1990. Allozyme Diversity in Plant Species [A]. In: Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL *et al.* eds. *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources* [M]. Sunderland: Sinauer, MA, 43—63
- Heller, Joachim. 1996. *Physic Nut. Jatropha curcas L.*, 1996. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 1. [M]. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, 6—13
- Huang JC, Sun M. 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationships of sweet potato and its wild relatives in *Ipomoea* series *Butatas* (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA [J]. *Theoret Appl Genet*, **100**: 1050—1060
- Joshi SP, Gupta VS, Aggarwal RK *et al.* 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza* [J]. *Theoret Appl Genet*, **100**: 1311—1320
- Karrin JD. 1987. A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners [J]. *Evolut Ecol*, **1**: 47—58
- Kojima T, Nagaoka T, Noda K. 1998. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers [J]. *Theoret Appl Genet*, **96**: 37—45
- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations [J]. *Proceed Natl Academy Sci, USA*, **70**: 3321—3323
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, **89**: 583—590
- Yang SD (杨淑达), Shi SH (施苏华), Gong X (龚洵) *et al.* 2005. Genetic diversity of *Paeonia delavayi* as revealed by ISSR [J]. *Biodivers Sci* (生物多样性), **13** (2): 105—111
- Yeh FC, Yang RC. 1999. POPGENE Version 1.31, Microsoft Windows-based Freeware for Population Genetic Analysis. University of Alberta and Tim Boyle, Centre for International Forestry Research
- Zhang FM (张富民), Ge S (葛颂). 2002. Data analysis in population genetics. I. Analysis of RAPD data with AMOVA [J]. *Biodivers Sci* (生物多样性), **10** (4): 438—444
- Zhang P (张萍), Dong YZ (董玉芝), Wei Y (魏岩) *et al.* 2006. Analysis of genetic diversity of *Haloxylon persicum* (Chenopodiaceae) in Xinjiang by ISSR [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **28** (4): 359—362
- Zhou Y (周晔), Wang RL (王润玲), Tang C (唐铖) *et al.* 2006. Identification of *Polygonatum sibiricum* and *P. cirrhifolium* by ISSR [J]. *J Tianjin Med Univ* (天津医科大学学报), **12** (2): 178—180