

华顶杜鹃 ISSR 反应体系的优化 及亲缘关系的初步分析

颜士辉, 郑蔚虹*, 丁炳扬

(温州大学 生命与环境科学学院, 浙江 温州 325027)

摘要: 以华顶杜鹃为材料, 利用单因素试验确立适合华顶杜鹃 ISSR-PCR 的优化反应体系: 在 25 μL 反应体系中, Mg^{2+} 1.5 或 2.0 mmol/L, dNTPs 0.3 mmol/L, 引物 0.40 $\mu\text{mol/L}$, Taq DNA 聚合酶 IU, 模板 DNA 40 ng; 分析 ISSR-PCR 反应体系中 Mg^{2+} 、dNTP、引物、模板 DNA、Taq DNA 聚合酶浓度及退火温度对 ISSR-PCR 反应的影响。PCR 扩增程序: 预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s; 退火 (T_m+2) $^{\circ}\text{C}$ (根据引物不同设定) 75 s; 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min; 40 个循环; 继续延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 1.5% 琼脂糖电泳分离 PCR 产物。并以优化好的体系初步分析华顶杜鹃及 5 个近缘种 (茶绒杜鹃、*Rhododendron mayebrae*、*Rh. sataense*、南平杜鹃和映山红) 的亲缘关系, 6 个种明显地聚为 2 大类: A 类含有映山红、南平杜鹃; B 类含有茶绒杜鹃、*Rh. sataense*、*Rh. mayebrae* 与华顶杜鹃, 为明确华顶杜鹃的系统地位提供可借鉴的依据。

关键词: 华顶杜鹃; ISSR; 优化; 亲缘关系

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2012)05-0593-06

Optimization of ISSR reaction conditions and analysis of phylogenetic relationship for *Rhododendron huadingense*

YAN Shi-Hui, ZHENG Wei-Hong*, DING Bing-Yang

(School of Life and Environmental Sciences, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China)

Abstract: Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) is a good molecular marker for revealing genetic diversity, and the reaction system differed in different species. In order to study the genetic diversity of *Rhododendron huadingense*, a protocol of reproducible ISSR was established and phylogenetic relationship was analyzed. The main factors influencing ISSR-PCR including the concentration of Mg^{2+} , dNTP, primer, template DNA, Taq polymerase, and annealing temperature, PCR cycles were investigated. The optimal reaction conditions were as follow in 25 μL reaction system: 1 \times buffer, Mg^{2+} 1.5 or 2.0 mmol/L, dNTP 0.3 mmol/L, primer 0.40 $\mu\text{mol/L}$, Taq polymerase IU, template DNA 40 ng. The optimal amplification program was: 3 min initial denaturation step (94 $^{\circ}\text{C}$), followed by 40 cycles of 45 s (94 $^{\circ}\text{C}$), 75 s [(T_m+2) $^{\circ}\text{C}$, according to different primer], and 1.5 min (72 $^{\circ}\text{C}$). The reactions were completed by a final extension step of 10 min (72 $^{\circ}\text{C}$). The PCR products were analyzed by electrophoresis using a 1.5% agarose gel. According to cluster analysis, the populations of 6 species were classified into two large groups, the populations of *Rh. simsii* and *Rh. nanpingense* were divided into one group, and the populations of *Rh. rufulum*, *Rh. sataense*, *Rh. mayebrae* and *Rh. huadingense* were divided into another group. These results would supplement the information for pro-

* 收稿日期: 2012-04-10 修回日期: 2012-07-12

基金项目: 国家自然科学基金 (30370106); 温州大学课题 (2005L013) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370106); Foundation of Wenzhou University (2005L013)]

作者简介: 颜士辉 (1983-), 男, 浙江建德人, 硕士, 遗传学专业。

* 通讯作者: 郑蔚虹, 女, 副教授, 研究方向为分子生态学, (E-mail) zwh@wzu.edu.cn。

tection and utilization of *Rh. huadingense* and also provide further data for the study of genetic variation and species differentiation of *Rh. huadingense*.

Key words: *Rhododendron huadingense*; ISSR; optimization; phylogenetic relationship

简单序列重复区间扩增(Inter-Simple Sequence Repeat, ISSR)是 Zietkiewicz 等(1994)在 SSR(Simple Sequence Repeat)基础上创建的基于 PCR 扩增的一种新型分子标记技术。其基本原理是根据真核生物基因组中广泛存在的 SSR 设计单一引物(通常为 15~24 个碱基序列),在 SSR 的 5' 或 3' 末端加锚 1~4 个碱基,然后以此为引物对那些两侧具有反向排列 SSR 且长度合适的一段基因组 DNA 序列进行 PCR 扩增。ISSR 分子标记技术具有 RAPD 的操作简单和 SSR 的多态性好的优点,然而它的重复性比 RAPD 高,在引物设计上比 SSR 技术简单得多,不需预先知道 DNA 序列即可用引物对其进行扩增(Fang & Roose, 1997);同时该技术可揭示的多态性比 RFLP、RAPD、SSR 高,而成本比 AFLP 低(Kojima 等,1998;Gupta 等,1994)。目前已广泛用于植物品种鉴定、遗传作图、基因定位、遗传多样性、生物进化及分子生态学等研究中(邹喻莘,2001)。

华顶杜鹃 (*Rhododendron huadingense*) 是

1990 年报道的新种,至今仍仅知局限分布于浙江省天台县华顶山,其分布范围狭窄,植株稀少,在《浙江植物志》中已被列入珍稀濒危植物名单中加以保护(章绍尧等,1993)。该种果实与种子形态特殊,花艳丽,具较高观赏价值,在研究杜鹃花科系统分类学方面有一定的学术意义(曾汉元,2002)。该种发现时置于映山红亚属(subgen. *Tsutsusi*) 轮叶杜鹃组(sect. *Brachycalyx*),主要根据落叶灌木,叶聚生于枝条顶端,雄蕊 10 枚等特征。但是其叶片及叶缘具毛,嫩叶干时黑绿色,老叶干时黄绿色。花序具花 2~4 朵等,又与落叶杜鹃亚属(subgen. *Pentanthera*) 相似。其果实卵球形,花梗具腺毛,子房和果实无毛,种子特大,表皮细胞突起等特征,与两个组的成员都有很大区别(丁炳扬等,1989)。因此它的系统地位值得进一步研究。本文运用 ISSR 技术揭示华顶杜鹃在杜鹃花属中的分类地位及其与近缘种的亲缘关系,从而为确立华顶杜鹃是一个新种提供分子生物学上的依据。

表 1 6 种杜鹃花属的样品
Table 1 6 spices of the *Rhododendron*

样品 Sample	采集地点 Locality	采集人 Collector	标本号 Voucher code
映山红 <i>Rhododendron simsii</i>	浙江台州华顶	纪律, 缪肖玢	001(1)
华顶杜鹃 <i>Rh. huadingense</i>	浙江台州华顶	纪律, 缪肖玢	006(4)
南平杜鹃 <i>Rh. nanpingense</i>	福建三明	丁炳扬, 张红双	8122
茶绒杜鹃 <i>Rh. rufulum</i>	福建三明	丁炳扬, 张红双	8121
日本 2 号 <i>Rh. mayebarae</i>	日本宫崎	金孝锋	1434
日本 4 号 <i>Rh. sataense</i>	日本宫崎	金孝锋	1446

1 材料和方法

1.1 材料

供试的 6 种杜鹃花属分别来自天台华顶山,福建三明,日本,详见表 1。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 DNA 提取参考 Doyle (1991) 的 CTAB 法,并加以改进。

1.2.2 PCR 扩增反应 根据紫外分光光度仪测得的 DNA 浓度,将 DNA 稀释至浓度为 20 ng/ μ L,供 PCR 反应使用。利用单因素试验确立了适合华顶杜鹃 ISSR-PCR 的优化的反应体系:25 μ L 反应体系中进行,

其中含 40 ng 左右的基因组 DNA 模板,1 \times PCR Buffer,2.0 mmol/L MgCl₂,0.3 mmol/L dNTP,0.4 μ mol/L ISSR 引物, TaqDNA 聚合酶 1.0 U,加 ddH₂O 至 25 μ L。PCR 反应程序:预变性 94 $^{\circ}$ C 3 min,变性 94 $^{\circ}$ C 0.45 min,退火温度依引物而定 1.15 min,延伸 72 $^{\circ}$ C 1.5 min,循环 40 次,继续延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min,反应结束后在 4 $^{\circ}$ C 保存。反应在 Whatman Biometra 的 Tpersonal PCR 仪上进行(Doyle,1991)。

1.2.3 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 后的扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳分离检测,电泳缓冲液采用 0.5 \times TBE,溴酚蓝:样品为 1:5 混匀后,点样 10 μ L,电泳总电压 80 v,1.5~2 h 完成。电泳后的胶板在溴化乙锭(EB)池中染色 20 min,取出放入凝

胶成像系统中照相记录结果。

1.2.4 数据处理 用凝胶成像系统(UVP)对基因组 DNA 的 PCR 扩增产物电泳图谱进行记录,通过 DL4000DNA Marker,标注各条带(扩增产物)的分子量,导出 Excel 表格。无条带的记为 0,有条带的记为 1,形成 0/1 矩阵图并输入计算机,根据所得 0/1 矩阵图,利用 POPGENE32 软件中 dominant(显性)2 diploid(二倍体),计算多态位点百分率(PPL)、Nei's 基因多样性指数(H)、Shannon's 多态性信息指数(I)、基因分化系数(Gst)、基因多样性(Ht)、种群内基因多样性(Hs)、Nei's(1978)遗传一致度和遗传距离(D),并根据 Nei 的遗传一致度和遗传距离最后形成一个树型的 UPGMA 聚类图。

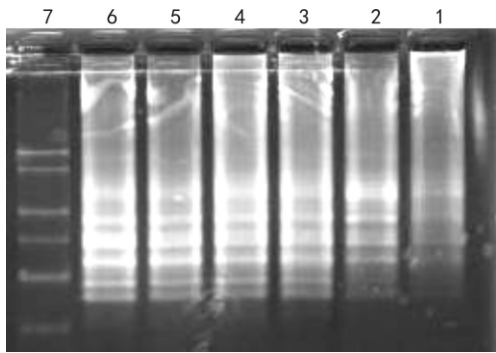


图 1 模板 DNA 浓度对 ISSR 扩增反应的影响
Fig.1 Effects of template DNA concentration on ISSR amplification

1,2,3,4,5,6. 分别代表模板 DNA 浓度 10、20、30、40、50、60 ng; 7. 代表 M, DL2000 marker。

2 结果与分析

2.1 ISSR-PCR 反应体系的优化

2.1.1 DNA 模板 本试验设定了 6 个 DNA 模板梯度(10、20、30、40、50、60 ng),实验结果表明,DNA 模板量对 PCR 扩增无明显的影响,在 10、20 ng 的情况下条带比较模糊,是因为 DNA 的含量不够,使其不能完成整个 PCR 循环,而在 30~60 ng 范围都得到较好的扩增结果(图 1)。

2.1.2 Mg^{2+} 浓度 Mg^{2+} 浓度的改变对 PCR 扩增产生明显的影响。 Mg^{2+} 浓度为 0.5,1.0 mmol/L 时主带少,且弱,稳定性较差。随着浓度的增加,特异性结合增强,扩增条带越来越清晰,在 1.5~2.0 mmol/L 之间均能获得清晰稳定的条带,但在 2.5 mmol/L 的时候,扩增条带亮度减弱(图 2)。

2.1.3 dNTPs 浓度 dNTPs 浓度的改变对 PCR 扩增的亮度影响较小,0.05~0.10 时,扩增条带不清晰;以 0.15~0.20 mmol/L 为宜;但在 0.25~0.3 mmol/L 之间,随着浓度的增加,某些特异性扩增带亮度变弱,但条带还是比较清晰的(图 3)。

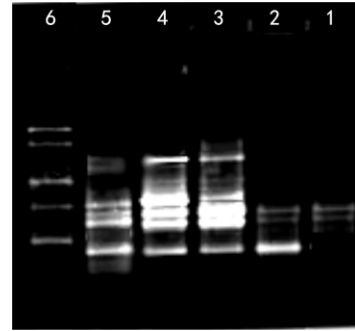


图 2 Mg^{2+} 浓度对 ISSR 扩增反应的影响
Fig.2 Effects of Mg^{2+} concentration on ISSR amplification

1,2,3,4,5. 分别代表 Mg^{2+} 浓度 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L; 6. 代表 M, DL2000 marker。

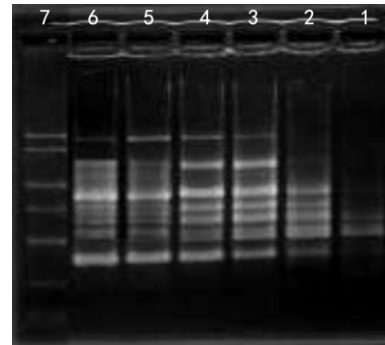


图 3 dNTPs 浓度对 ISSR 扩增反应的影响
Fig.3 Effects of dNTPs concentration on ISSR amplification

1,2,3,4,5,6. 分别代表 dNTPs 浓度 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 mmol/L; 7. 代表 M, DL2000 marker。

2.1.4 Taq 聚合酶浓度 在 25 μ L 反应体系中,选用 5 个 Taq 聚合酶浓度,分别为 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 U,均有扩增产物。在 0.25 U 时,扩增条带不够清晰,且条带很少;在 1.0~1.5 U 时,扩增条带清晰,信息量大;当酶溶度在 2.0 U 时,非特异性扩增条带增多。从经济的角度考虑,以 1.0 U 为好(图 4)。

2.1.5 引物浓度 引物浓度对华顶杜鹃 ISSR 扩增结果影响较大,在引物浓度为 0.20~0.30 μ mol/L 时扩增条带不清晰;在 0.40 μ mol/L 时扩增条带较好;但在 0.50~0.60 μ mol/L 时,出现了非特异性的扩增(图 5)。

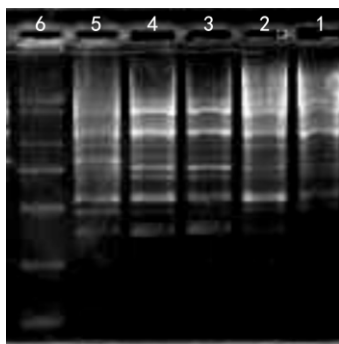


图 4 Taq 聚合酶浓度对 ISSR 扩增反应的影响
Fig. 4 Effects of Taq DNA Polymerase concentration on ISSR amplification.

1, 2, 3, 4, 5. 分别代表 Taq 聚合酶浓度 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0U; 6. 代表 M, DL2000 marker。

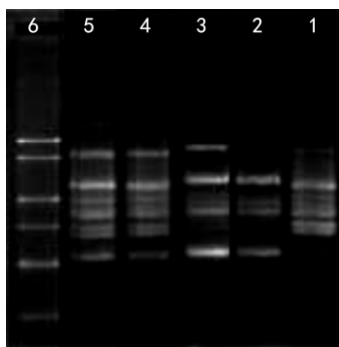


图 5 引物浓度对 ISSR 扩增反应的影响
Fig. 5 Effects of primer concentration on ISSR amplification

1, 2, 3, 4, 5 分别代表引物浓度 0.20、0.30、0.40、0.50、0.60 $\mu\text{mol/L}$; 6. 代表 M, DL2000 marker。

2.1.6 退火温度 不同退火温度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响见图 6 所示。从图中可以看出,退火温度在 47~50 $^{\circ}\text{C}$ 之间,扩增条带清晰度不高;而在 51~54 $^{\circ}\text{C}$ 得到了较好的扩增。在温度 55~57 $^{\circ}\text{C}$,扩增条带特异性增强且条带多为短片段,多态性条带减少,因而信息量减少。通过 ISSR-PCR 条件的优化建立适合华顶杜鹃的 PCR 反应体系:1 \times PCRBuffer, dNTPs 0.30 mmol/L, 引物 0.40 $\mu\text{mol/L}$, MgCl_2 2.0 mmol/L, 模板 DNA 40 ng, Taq DNA 聚合酶 1 U, 超纯水加至 25 μL 。

2.2 ISSR 反应程序及 ISSR 引物筛选

扩增程序:预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min \rightarrow 39 个循环:(变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s \rightarrow 退火(根据各个引物来定)1 min 15 s \rightarrow 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 30 s) \rightarrow 继续延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min \rightarrow 保存 4 $^{\circ}\text{C}$ 0 s。在优化的体系中,以茶绒杜鹃、*Rhodo-*

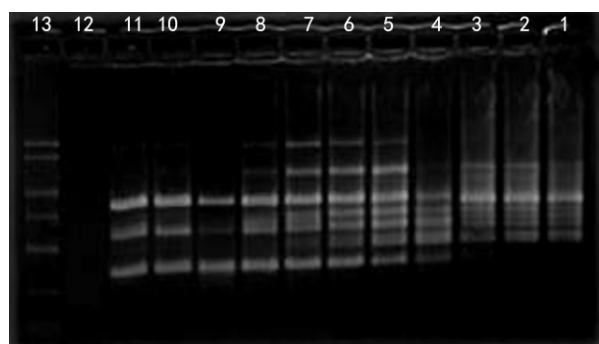


图 6 退火温度对 ISSR 扩增反应的影响
Fig. 6 Effects of annealing temperature concentration on ISSR amplification

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11. 分别代表退火温度 47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57 $^{\circ}\text{C}$; 12. 代表对照; 13. 代表 M, DL2000 marker。

dendron mayebrae, *Rh. sataense*、南平杜鹃、华顶杜鹃、映山红的基因组 DNA 为模板,筛选出多态性较理想的引物。然后对扩增清晰、多态明显的条带进行了统计分析。所用引物的编号及序列见表 3

表 3 引物序列编号及引物序列
Table 3 List of ISSR primers and their sequence in this study

引物序号 No. of primer	引物序列 Sequence of primer	特征数 No. of traits
ISSR-1	(AC) ₈ YT	6
ISSR-2	(CA) ₆ RY	6
ISSR-3	(CA) ₆ RG	10
ISSR-4	(CTC) ₄ RC	8
ISSR-5	BDB(ACA) ₆	5
ISSR-6	BBB(GAAA) ₃ GAA	8
ISSR-7	(CAC) ₄ RC	6

2.3 华顶杜鹃分类地位初步分析

ISSR 位点是指 ISSR 引物在基因组中一定条件下扩增出随机的 DNA 片段,本身不具任何功能意义。ISSR 所揭示的遗传变异是核苷酸碱基变化的结果,引物结合位点的改变或扩增范围内的突变(插入或缺少)都会使扩增产物改变,表现为 ISSR 片段的有或无。对于显性标记而言,这是等位基因典型的分布方式,不能区分纯合(AA)与杂合(Aa)基因型,是 ISSR 标记的主要缺陷,在种群遗传研究中无法评估等位基因频率(Ratnaparkhe 等,1998)。

同一引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性,在电泳带谱中同一位点上出现条带的个体按扩增阳性(1)记录,该位点上没出现条带的则按扩增阴性(0)记录,形成(0,1)排列的 ISSR 表

型数据矩阵,用于进一步分析(张如莲等,2006)。如图 7 所示,本文数据分析依据所筛选的 ISSR 引物产生的 ISSR 标记进行。将这些标记利用 NTSYSpc2.1 软件进行分析,建立遗传距离矩阵(张文静等,2005)。在此基础上,按非加权算术平均数聚类法(UPGMA)建立遗传关系聚类图(Kantety 等,1995)。

从图 7 可以看出,6 个种明显地聚为 2 大类:A、B 类。A 类含有映山红、南平杜鹃;B 类含有茶绒杜鹃、日本 4 号、日本 2 号与华顶杜鹃,而茶绒杜鹃、日本 4 号、日本 2 号之间有较多遗传相似性,说明这几个种之间的亲缘关系较接近。从遗传相似性和遗传距离也可以得出同样的结论(张春平等,2009),华顶杜鹃相对亲缘关系较远。

3 结论与讨论

3.1 退火温度的确定

退火温度不仅与引物序列有关,还与物种 DNA 的序列有密切关系,因此在进行 ISSR 扩增优化之前

确定引物的退火温度非常重要(Hogbin & Peakall, 1999)。先根据原初的 PCR 反应条件进行引物的初筛,选择能看到清晰条带的引物进行退火温度的确定。从图 6 看出,退火温度对 ISSR-PCR 的影响非常

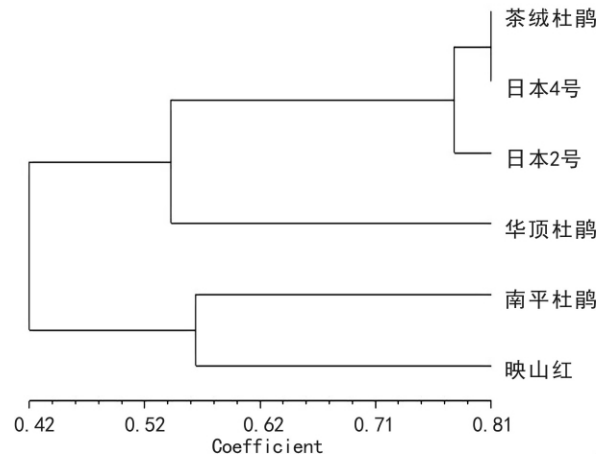


图 7 6 种杜鹃花的 ISSR 标记聚类图(UPGMA)

Fig. 7 Dendrogram of genetic relationships among 6 species of the genus *Rhododendron*

表 4 6 个种的遗传相似性

Table 4 Heredity similarity of 6 spices

	茶绒杜鹃 <i>Rh. rufulum</i>	日本 4 号 <i>Rh. sataense</i>	日本 2 号 <i>Rh. mayebrae</i>	南平杜鹃 <i>Rh. nanpingense</i>	华顶杜鹃 <i>Rh. huadingense</i>	映山红 <i>Rh. simsii</i>
茶绒杜鹃 <i>Rh. rufulum</i>	1.0000000					
日本 4 号 <i>Rh. sataense</i>	0.8125000	1.0000000				
日本 2 号 <i>Rh. mayebrae</i>	0.8125000	0.7500000	1.0000000			
南平杜鹃 <i>Rh. nanpingense</i>	0.4375000	0.6250000	0.5000000	1.0000000		
华顶杜鹃 <i>Rh. huadingense</i>	0.5000000	0.5625000	0.5625000	0.3120000	1.0000000	
映山红 <i>Rh. simsii</i>	0.2500000	0.4375000	0.3125000	0.5625000	0.5000000	1.0000000

明显,其结果的影响可分为 3 组:从 47~50 °C 较低的退火温度为第一组,非特异条带数较多,和较高的退火温度相比有较大片段,从 51~54 °C 为第二组,扩增条带清晰,亮度较大,在此温度范围内,随着温度的增加,条带亮度略有减弱;从 55~57 °C 较高的退火温度为第 3 组,扩增大片段的条带数目明显减少;所以,在 ISSR-PCR 扩增中,退火温度非常重要,我们可根据公式计算引物的退火温度,对于具相似退火温度的引物采用 52 °C 进行筛选,选择清晰、不弥散的引物进行下一步研究,对于退火温度差距较大的,则进一步采用梯度 PCR 进行退火温度筛选。

3.2 Mg²⁺ 浓度对 ISSR 扩增的影响

Mg²⁺ 浓度对 Taq DNA 聚合酶的活性、退火温度和产物的特异性都有影响。在华顶杜鹃 ISSR-

PCR 扩增中,Mg²⁺ 浓度的变化对 ISSR 条带的数量和强弱影响较大(图 2)。在一定的浓度范围内,随着 Mg²⁺ 浓度的增高,扩增的特异性加强,扩增条带增加,Mg²⁺ 浓度为 0.5、1.0 mmol/L 时主带少,且弱,稳定性较差,随着浓度的增加,特异性结合增强,扩增条带越来越清晰,在 1.5~2.0 mmol/L 之间均能获得清晰稳定的条带,但在 2.5 mmol/L 时,非特异性扩增条带增多。因此,确定 Mg²⁺ 浓度以 2.0 mmol/L 较为适宜。

3.3 Taq 酶用量对 ISSR 扩增的影响

Taq 酶的用量也对实验结果影响较大,酶用量过高不仅增加成本,还会造成非特异性的扩增产物,过低则会使酶过早地消耗完,产物合成效率低。在 25 μL 反应体系中设定的 5 个 Taq 聚合酶浓度(0.25,0.5,1.0,1.5,2.0 U)均有清晰的扩增产物。

在 0.25 U 时,扩增条带不够清晰,且条带很少;在 0.5~1.5 U 时,这些扩增条带都比较清晰,酶用量在 1.0,1.5 U 扩增结果较好,扩增条带最清晰,信息量大;当酶用量在 2.0 U 时,非特异性扩增条带增多。从经济的角度考虑,以 1.0 U 为好。

值得注意的是,不同厂家甚至同一厂家不同批次的试剂,其活力都存在着差异。为减少实验误差,应尽量使用同一厂家生产的同一批次的试剂,另仪器使用,不同样品的试验也要注意同样的问题(胡延萍等,2010)。

3.4 亲缘关系的初步分析

按杜鹃系统发育与进化理论,常绿杜鹃亚属为最原始的杜鹃类群,在适应古地史和古气候的变迁过程中,演化出两个分支:一支分化成全体密被(腺体状)鳞片的高山类群或热带附生类群—适应于旱、寒生环境的有鳞杜鹃;另一支演变为(无鳞)多少被毛的半常绿或落叶的温带和亚热带林下类群—适应于温暖湿润气候的马银花、落叶杜鹃、映山红等亚属的杜鹃。

从形态学上看,映山红、南平杜鹃、茶绒杜鹃都是属于映山红亚属中的映山红组,日本 4 号是映山红组的现已合并于轮叶杜鹃,日本 2 号是轮叶杜鹃组的现已合并于丁香杜鹃和满山红,而华顶杜鹃是属于轮叶杜鹃组(*sect. Brachycalyx*),现认为应归入落叶杜鹃(羊躑躅)亚属 *subgen Pentanthera* 的 *Sciadorhodon* 组(丁炳扬等,2009)。

从 ISSR 分析所获得的遗传相似性和 UPGMA 聚类树状图看,映山红与南平杜鹃相似聚成一分枝,而茶绒杜鹃、日本 4 号、日本 2 号与华顶杜鹃聚成另一分枝。从形态学和分子生物学两个角度上区别这 6 个种,除茶绒杜鹃外,其它 5 个种基本是一致的。结果表明,华顶杜鹃不同于其它 5 个种,从而为确立华顶杜鹃是一个新种提供可借鉴的依据,由于仅用 7 个引物对 6 个种的杜鹃花属植物进行分析,所以对华顶杜鹃的亲缘关系仅做初步分析。

参考文献:

丁炳扬,金孝锋. 2009. 杜鹃花属映山红亚属的分类研究[M]. 北京:科学出版社:67
 邹喻苹. 2001. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京:科学出版社:36—41
 章绍尧,丁炳扬. 1993. 浙江植物志(总论卷)[M]. 杭州:浙江科学技术出版社
 Ding BY(丁炳扬),Fang YY(方云亿). 1989. A study on *Rhodo-*

dendron from Zhejiang(浙江杜鹃花属植物的研究)[J]. *J Hangzhou Univ; Nat Sci Edi*(杭州大学学报·自然科学版), **16**(2):194—200
 Doyle JJ. 1991. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation[C]//Hewitt GM, Johnston A. *Molecular Techniques in Taxonomy*. Berlin; Springer:283—293
 Fang DQ, Roose ML. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers[J]. *Theor Appl Genet*, **95**(3):408—417
 Gupta M, Chyi YS, Romere-Severaon J, et al. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats[J]. *Theor Appl Genet*, **89**(7—8):998—1 006
 Hogbin PM, Peakall R. 1999. Evaluation of the contribution of genetic research to the management of the endangered plant *Zieria prostrate*[J]. *Conserv Biol*, **13**:514—522
 Hu YP(胡延萍), Xie XL(谢小龙), Wang L(王莉), et al. 2010. Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction conditions for *Rheum tanguticum*(唐古特大黄 ISSR-PCR 反应条件的优化)[J]. *Guihaia*(广西植物), **30**(1):112—116
 Kantety RV, Zeng XP, Bennetzen JL, et al. 1995. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays*) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification[J]. *Mol Breed*, **1**:365—373
 Kojima T, Nagaoka T, Noda K, et al. 1998. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers[J]. *Theor Appl Genet*, **96**(1):37—45
 Ratnaparkhe MB, Tekeoglu M, Muehlbauer FJ. 1998. Inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters[J]. *Theor Appl Genet*, **97**(4):515—519
 Zeng HY(曾汉元). 2002. A study on the population structure and distribution pattern of the endangered and rare plant *Rhododendron huadingense*(珍稀濒危植物华顶杜鹃种群结构与分布格局的研究)[J]. *J Huaihua Univ*(怀化学院学报), **21**(2):1 671—1 743
 Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, **20**(2):176—183
 Zhang CP(张春平), He P(何平), Hu SJ(胡世俊), et al. 2009. Establishment and optimization of ISSR reaction system for endangered plant *Coptis omeiensis*(濒危植物峨眉黄连 ISSR 反应体系的建立与优化)[J]. *Guihaia*(广西植物), **29**(1):39—43
 Zhang RL(张如莲), Fu XX(傅小霞), Hong CX(洪彩香), et al. 2006. ISSR analysis of genetic diversity on 30 varieties of banana (30 个香蕉品种遗传多样性的 ISSR 分析)[J]. *Chin Agric Sci Bull*(中国农业学通报), **22**(3):376—380
 Zhang WJ(张文静), Yu YH(余育和), Shen YF(沈钰芬). 2005. Genetic relationship of five ciliate strains inferred from ISSR analysis(五株纤毛虫遗传关系的 ISSR 分析)[J]. *Acta Hydrobiol Sin*(水生生物学报), **29**(6):35—40