浙 江 农 林 大 学 学 报，2018，**35**(4)：612–617
Journal of Zhejiang A&F University
doi:10.11833/j.issn.2095-0756.2018.04.005

12 个北美冬青品种的 ISSR 亲缘关系分析

王伟丽[1]，何立平[2]，余敏芬[2]，袁虎威[1]，闫道良[1]，赵　亮[1]，余有祥[3,4]，
刘　军[3,4]，赵　鹂[5]，郑炳松[1]

（1. 浙江农林大学 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室，浙江 杭州 311300；2. 宁波市林场，浙江 宁波 315440；3. 杭州北美冬青发展中心，浙江 杭州 311100；4. 杭州润土园艺科技有限公司，浙江 杭州 311100；5. 浙江广播电视大学，浙江 杭州 310030）

摘要：北美冬青 *Ilex verticillata* 作为切枝观赏和景观美化植物在中国花卉市场受到越来越多的关注。为给北美冬青新品种选育提供保障，采用简单重复序列间扩增多态性(ISSR)分子标记分析了北美冬青品种间的亲缘关系，从 12 个 ISSR 引物中筛选出 4 个多态性引物；对 12 个北美冬青品种进行了扩增，共获得 63 个条带，其中多态性条带占 90.48%，所选引物的多态性较高，可用于鉴定北美冬青品种间的相对亲缘关系；12 个北美冬青品种间的遗传相似系数为 0.54~0.87，亲缘关系相对较近；品种间的遗传相似系数聚类结果表明，各品种间存在不同程度的亲缘关系，其中 *I. verticillata* ‘Jim Dandy’和 *I. verticillata* ‘Cacapon’间亲缘关系最近。研究结果为北美冬青品种的选育奠定了理论和实践基础。图 2 表 4 参 20

关键词：林木育种学；北美冬青；ISSR 标记；分子鉴定；亲缘关系
中图分类号：S718.3　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**2095-0756(2018)04-0612-06

Phylogenetic relationships among 12 cultivars of *Ilex verticillata* based on ISSR molecular markers

WANG Weili[1], HE Liping[2], YU Minfen[2], YUAN Huwei[1], YAN Daoliang[1], ZHAO Liang[1], YU Youxiang[3,4], LIU Jun[3,4], ZHAO Li[5], ZHENG Bingsong[1]

(1. State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. Ningbo Forest Centre, Ningbo 315440, Zhejiang, China; 3. Hangzhou Ilex Development Center, Hangzhou 311100, Zhejiang, China; 4. Hangzhou Runtu Horticulture Science and Technology Co., Ltd., Hangzhou 311100, Zhejiang, China; 5. Zhejiang Radio and TV University, Hangzhou 310030, Zhejiang, China)

Abstract: As an important ornamental and landscape plant, *Ilex verticillata* has received increasing attention in flower markets of China. To foster breeding of new *I. verticillata* cultivars, genetic relationships between *I. verticillata* cultivars were analyzed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Four primers with polymorphism among *I. verticillata* cultivars were screened from 12 candidate ISSR primers. Results revealed a total of 63 bands with polymorphic bands accounting for 90.48% implying they could be used to identify relative relationships among different *I. verticillata* cultivars. The genetic similarity coefficient of the 12 *I. verticillata* cultivars varied from 0.54 to 0.87 indicating that the genetic relationships among *I. verticillata* were relatively close. Clustering of these genetic similarity coefficients showed that genetic relationships among cultivars were different with the relationship between *I. verticillata* ‘Jim Dandy’ and *I. verticillata* ‘Cacapon’ being the clos-

收稿日期：2017-08-07；修回日期：2017-11-06
基金项目：中央财政林业科技推广示范项目[2017]TS11(L20170116)；浙江省宁波市科技局科技富民项目(2015C10030)；浙江省林学一流学科(A 类)资助项目(201703)
作者简介：王伟丽，从事经济林培育与利用研究。E-mail: 823507158@qq.com。通信作者：郑炳松，教授，博士，从事植物分子生理生化等研究。E-mail: bszheng@zafu.edu.cn。赵鹂，教授，博士，从事植物生理学等研究。E-mail: 835343010@qq.com

est. This study will help lay an important theoretical and practical basis for genetic breeding of *I. verticillata*. [Ch, 2 fig. 4 tab. 20 ref.]

Key words: forest tree breeding; *Ilex verticillata*; ISSR marker; molecular identification; genetic relationship

北美冬青 *Ilex verticillata* 又名轮生冬青、美洲冬青，是冬青科 Aquifoliaceae 冬青属 *Ilex* 多年生灌木，原产美国东北部，雌雄异株，多生长在低洼地区，也可生长在较为干燥的过渡区和山地。与冬青科其他常绿树种相比，北美冬青具有秋冬落叶、果期长等特点。秋冬季节，北美冬青红果挂枝、颜色鲜亮，观赏价值极高[1]，可用于切枝观赏、居室盆栽和景观美化等。北美冬青品种选育工作在欧美国家已开展了多年，优良品种也较多[2-3]；在中国，北美冬青也得到了越来越多的关注，但品种引种工作尚处于起步阶段，仅见于浙江、山东、河南和吉林等地，育种工作更是几近空白。亲缘分析是育种中的重要工作，是保障育种质量的重要前提。分子标记是进行亲缘分析的有效工具[4]。简单重复序列间扩增多态性(inter-simple sequence repeat, ISSR)是一种以简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)作为引物，基于聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术，在多个位点上扩增 SSR 之间 DNA 片段的分子标记技术[4]，由加拿大蒙特利尔大学于 1994 年创建，具有多态性高、操作简便、成本低等特点[5]，在遗传多样性评价、亲缘分析、系统发育、图谱构建、分子辅助育种等方面具有重要应用，已成为植物种质资源遗传基础研究的重要技术[6-11]，成功应用于核桃 *Juglans regia*[12]，柽柳 *Tamarix chinensis*[13]，藺草 *Juncus effusus*[14]，红花檵木 *Loropetalum chinense* var. *rubrum*[15]，马铃薯 *Solanum tuberosum*[16]，樱花 *Cerasus yedoensis*[17]等物种的品种鉴定、种质资源收集、遗传多样性和系统进化分析中。本研究拟在前期对国内外北美冬青品种搜集、调查的基础上，以 12 个北美冬青品种为材料，利用多态性 ISSR 引物在品种间进行 PCR 扩增，构建北美冬青品种间的分子指纹图谱，鉴定品种间亲缘关系，为北美冬青新品种选育提供保障。

1　材料与方法

1.1　实验材料

以杭州润土园艺科技有限公司北美冬青基地中的 12 个北美冬青品种为鉴定材料，以落叶冬青 *Ilex decidua* 为远缘对照(ck)，12 个北美冬青品种及对照的基本信息见表 1。采集各北美冬青品种及落叶冬青的幼嫩叶片，迅速放入液氮中带回，-80 ℃超低温冰箱中保存备用。

表 1　北美冬青品种信息

Table 1　*Ilex verticillata* cultivar information

编号	品种名称	来源	表型特征
R_1	*Ilex verticillata* ‘Oosterwijk’	荷兰	灌木，叶片 8.0 cm × 4.0 cm，花期 6 月初，果红色，果径 9~12 mm
R_2	*Ilex verticillata* ‘Apollo’	美国	灌木，雄株，叶片 8.0 cm × 4.0 cm，花期 5 月底
R_3	*Ilex verticillata* ‘Red Sprite’	美国	灌木，株型紧凑，叶片 5.5 cm × 2.5 cm，花期 5 月下旬，果径 10~12 mm
R_4	*Ilex verticillata* ‘Winter Red’	美国	灌木，叶片 6.0 cm × 3.0 cm，花期 6 月初，果小而密，果径 7~9 mm
R_5	*Ilex verticillata*‘A. Gray’	美国	灌木，叶片 6.5 cm × 3.5 cm，花期 5 月中旬，果红色，果径 10~12 mm
R_6	*Ilex verticillata* ‘Winter Gold’	美国	灌木，叶片 6.0 cm × 3.0 cm，花期 6 月初，果黄色，果径 7~9 mm
R_7	*Ilex verticillata* ‘Jim Dandy’	美国	灌木，雄株，花期 5 月中旬
R_8	*Ilex verticillata* ‘Afterglow’	美国	灌木，株型紧凑，叶片 5.5 cm × 2.5 cm，花期 5 月下旬，果径 7~9 mm
R_9	*Ilex verticillata* × *serrata* ‘Sparkleberry’ (female)	美国	灌木，雄株
R_{10}	*Ilex verticillata* × *serrata* ‘Sparkleberry’ (male)	美国	灌木，叶片 5.0 cm ×2 .5 cm，花期 5 月下旬，果径 5~7 mm
R_{11}	*Ilex verticillata* ‘Cacapon’	美国	灌木，叶片 3.5 cm × 5.5 cm，色浓绿，紧凑，花期 5 月下旬，果径 7~9 mm
R_{12}	*Ilex verticillata* ‘Southern Gentleman’	美国	灌木，雄株，叶片 6.0 cm × 4.0 cm，花期 5 月下旬
ck	*Ilex decidua*	美国	乔木，叶片 5.0 cm × 2.0 cm，花期 5 月初，果径 5~7 mm

1.2　DNA 的提取及质量检测

采用植物基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司，北京)提取北美冬青基因组 DNA[5]。用

NanoDrop-1000 型分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度；用质量分数为 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量。

1.3 ISSR 引物筛选及扩增

以 12 条已报道的冬青属 ISSR 引物为候选引物[表 2，由生工生物工程(上海)有限公司合成]，以提取的各北美冬青品种基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。ISSR-PCR 扩增反应体系共 20.0 μL，包含三磷酸碱基脱氧核苷酸(dNTPs) 3.2 μL，10×缓冲液 2.0 μL，模板 DNA 1.0 μL，引物 1.0 μL，超纯水 12.6 μL，*rTaq* 酶 0.2 μL (Takara，日本)。ISSR-PCR 扩增程序：94.0 ℃预变性 4 min；94.0 ℃变性 70 s，51.3~61.0 ℃退火 50 s，72.0 ℃延伸 70 s，共 35 个循环；72.0 ℃延伸 7 min，4 ℃保存。PCR 产物用质量分数为 1.5%的琼脂糖凝胶电泳分离，电泳时间为 40 min，电泳条带在紫外凝胶成像系统中观察并拍照。

表 2 冬青属 ISSR 引物

Table 2 ISSR primers for *Ilex*

引物编号	引物序列(5′→3′)	$T_{退火}$/℃	引物编号	引物序列(5′→3′)	$T_{退火}$/℃
ZBSI-001	$(CT)_8T$	51.3	ZBSI-007	$(GA)_8YT$	51.3
ZBSI-002	$(CT)_8G$	51.3	ZBSI-008	$(CA)_8RT$	56.4
ZBSI-003	$(TC)_8G$	52.5	ZBSI-009	$(AC)_8YG$	52.5
ZBSI-004	$(AC)_8T$	52.5	ZBSI-010	$(TG)_8RA$	54.2
ZBSI-005	$(AC)_8C$	52.5	ZBSI-011	$(ATG)_5$	58.9
ZBSI-006	$(AC)_8G$	61.0	ZBSI-012	GAT CAA GC TNN NNN NAT GTG	54.2

1.4 统计分析

以 0 和 1 分别代表条带的有和无，统计各 ISSR 引物对 12 个北美冬青品种的扩增情况。用 NTSYSpc 2.10e 软件计算各品种间的遗传相似系数，得到相似系数矩阵；基于相似系数矩阵用非加权组平均法(UPGMA)进行品种间聚类分析。

2 结果与分析

2.1 12 个北美冬青品种的 ISSR 分子指纹图谱

以 12 条待测 ISSR 引物为候选引物，R_1~R_4 品种基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。经琼脂糖凝胶电泳检测，在 12 条待测引物中筛选出 4 条在各品种间具有多态性、扩增条带清晰的 ISSR 引物(ZBSI-002，ZBSI-004，ZBSI-007，ZBSI-009)，并以筛选出的多态性引物对各品种的基因组 DNA 进行 PCR 扩增，构建 DNA 指纹图谱。以 ZBSI-002 引物为例(图 1)，12 个北美冬青品种间在该引物的扩增位点上多态性较高，初步显示了品种间存在一定的遗传差异。检测引物扩增位点上的基因型分型情况可知，12 个北美冬青品种在 4 条 ISSR 引物扩增位点上共扩增出 63 个条带，其中多态性条带的比例占 90.48%，说明所选引物的多态性较高，可以用于鉴定 12 个北美冬青品种间的亲缘关系(表 3)。

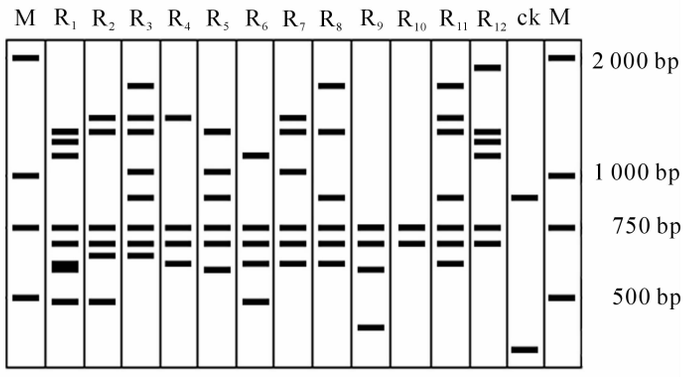

图 1 12 个北美冬青品种的 ZBSI-002 引物指纹图谱

Figure 1 Fingerprints of ISSR primer ZBSI-002 between the 12 cultivars of *Ilex verticillata*

2.2 12 个北美冬青品种的亲缘关系

12 个北美冬青品种的遗传相似系数为 0.54~0.87，仅个别低于 0.60(表 4)，说明各品种的亲缘关系较近。作为对照的落叶冬青(ck)与各北美冬青品种的遗传相似性系数为 0.44~0.68，明显低于北美冬青品种之间的遗传相似系数(表 4)，说明北美冬青和落叶冬青种间的亲缘关系低于北美冬青种内亲缘关系，与客观实际相符。

12 个北美冬青品种间的遗传相似系数聚类结果表明：北美冬青品种间存在不同程度的亲缘关系。由图 2 可知：R_6 与其他品种的亲缘关系较远，R_9 与 R_{10} 间亲缘关系较近，对比品种的信息(表 1)可知，R_9 与 R_{10} 为同一品种的雌雄株，其亲缘关系近是合理的。此外，R_7 和 R_{11} 的亲缘关系最近，甚至比 R_9 和 R_{10} 之间的亲缘关系还近，说明根据特定表型性状筛选出来的不同北美冬青品种，其在遗传水平上的差异可能并不明显。

表 3　北美冬青品种在 4 条 ISSR 引物位点上的扩增条带

Table 3　Statistics of bands amplified by 4 ISSR primers in the 12 cultivars of *Ilex verticillata*

引物编号	总条带数	多态性条带数	多态性条带比例/%
ZBSI-002	16	15	93.75
ZBSI-004	15	13	86.67
ZBSI-007	18	16	88.89
ZBSI-009	14	13	92.86
合计	63	57	90.48

表 4　北美冬青品种间在 4 条 ISSR 引物位点上的遗传相似系数

Table 4　Genetic similarity coefficients of 4 ISSR primers in *Ilex verticillata* cultivars

编号	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7	R_8	R_9	R_{10}	R_{11}	R_{12}	ck
R_1	1												
R_2	0.63	1											
R_3	0.57	0.75	1										
R_4	0.71	0.70	0.67	1									
R_5	0.60	0.62	0.78	0.70	1								
R_6	0.63	0.67	0.57	0.71	0.70	1							
R_7	0.67	0.68	0.62	0.76	0.59	0.57	1						
R_8	0.70	0.65	0.78	0.79	0.81	0.70	0.68	1					
R_9	0.63	0.62	0.59	0.76	0.65	0.70	0.78	0.68	1				
R_{10}	0.70	0.59	0.59	0.79	0.62	0.63	0.78	0.75	0.84	1			
R_{11}	0.63	0.71	0.68	0.73	0.62	0.60	0.87	0.75	0.81	0.78	1		
R_{12}	0.71	0.67	0.57	0.78	0.54	0.62	0.86	0.63	0.76	0.76	0.83	1	
ck	0.54	0.56	0.46	0.60	0.46	0.44	0.68	0.56	0.65	0.68	0.65	0.63	1

3　讨论与结论

ISSR 作为一种重要的分子标记技术，已广泛应用于种质鉴定、分子标记辅助选择、遗传多样性评价、亲缘关系分析、遗传图谱构建及基因定位等多个领域，并取得了许多重要的成果。目前，分子标记技术虽尚未应用于北美冬青，但在冬青属其他植物已有应用。付铨盛[18]采用 ISSR 分子标记技术对华南地区 5 个省份 28 个毛冬青 *Ilex pubescens* 样品进行了分析，平均相似系数为 0.769 3；UPGMA 聚类分析结果表明：在 0.34 水平上秃毛冬青 *Ilex pubescens* var. *glabra* 与毛冬青存在明显分支。钱永生等[19]利用随机扩增多态性 DNA(RAPD)和扩增片段长度多态性(AFLPs)标记技术对 10 种冬青进行了亲缘关系鉴定，发现不同种间多态率分别为 91.30%和 98.60%。冷欣等[20]运用 ISSR 分子标记技术对浙江省舟山群岛全缘冬青 *Ilex integra* 的 6 个种群共 57 个个体进行了遗传多样性分析，利用 9 条随机引物共扩增出 45 条多态性条带，多态率为 57.70%；UPGMA 聚类分析结果表明：亲缘关系较近的为普陀岛和朱家尖岛的种群，舟山岛栽培种群由桃花岛自然种群移植而来。

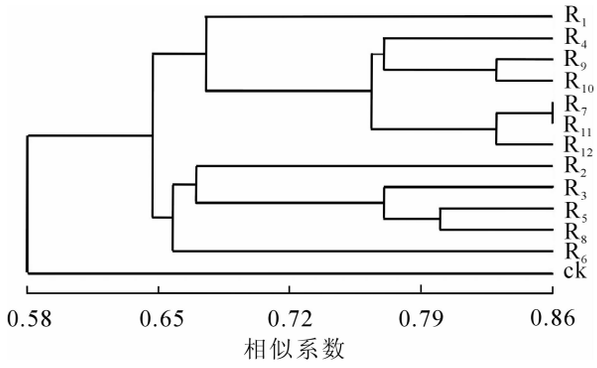

图 2　12 个北美冬青品种遗传相似系数聚类

Figure 2　Clustering of genetic similarity coefficients among 12 cultivars of *Ilex verticillata*

本研究利用 4 条 ISSR 引物对 12 个北美冬青品种间的亲缘关系进行了分析，共获得 57 条多态性片

段，多态率达 90.48%。品种间遗传相似系数为 0.54~0.87，表明各品种间的亲缘关系相对较近。品种间遗传相似系数聚类结果表明：北美冬青品种间存在不同程度的亲缘关系；尽管在形态学上非常相近，但利用 ISSR 分子标记也能明显的鉴别出各个品种间细微的 DNA 差异，说明 ISSR 分子标记在北美冬青亲缘关系的鉴定上具有可行性。

本研究对 12 个北美冬青品种间的亲缘分析结果发现：*Ilex verticillata* ‘Jim Dandy’(R_7和 *I. verticillata* ‘Cacapon’(R_{11})间亲缘关系最近，相较 *I. verticillata* × *serrata* ‘Sparkleberry’这一品种雌雄株(R_9 和 R_{10})的亲缘关系更近，这说明基于表型筛选出来的不同品种，其遗传水平上的差异可能并不大。此外，从品种表型特征与遗传学间亲缘关系上来看，*I. verticillata* ‘Afterglow’(R_8)与 *I. verticillata* ‘Red Sprite’(R_3)的株型、叶片及花期等较为相近，在遗传水平上的亲缘关系也较近；从各品种来源与遗传学亲缘关系上来看，来自荷兰的 *I. verticillata* ‘Oosterwijk’(R_1)与来自美国的其他 11 个北美冬青品种并非分成独立的 2 个类别，而是与来自美国的 5 个品种(*I. verticillata* ‘Winter Red’，*I. verticillata* × *serrata* ‘Sparkleberry’，*I. verticillata* ‘Jim Dandy’等)聚在同 1 个大类中，因此，不能仅根据植株的表型特征和来源确定各个品种间的亲缘关系。基于本研究的结果，我们建议在今后北美冬青育种过程中可参照亲缘分析结果，通过亲缘关系较远的品种间的杂交等创建新的优良种质，以保证育种群体的遗传多样性水平；同时，也可以将新的品种融入到现有育种群体中来，以扩展现有育种群体的遗传多样性基础，保证北美冬青改良的长期、可持续发展。

4 参考文献

[1] DIRR M A. *Manual of Woody Landscape Plants* [M]. 6th Ed. Ellinois: Stipes Publishing LLC, 2009: 537 – 541.

[2] 钱萍，季春峰. 美国州树研究[J]. 江西林业科技，2011(6)：26 – 27.
QIAN Ping, JI Chunfeng. Research on state trees of United States. [J]. *J Jiangxi For Sci Technol*, 2011(6): 26 – 27.

[3] BAILES C. *Hollies for Gardeners* [M]. Portland: Timber Press, 2006: 170 – 173.

[4] 赵谦，杜虹，庄东红. ISSR 分子标记及其在植物研究中的应用[J]. 分子植物育种，2007，**5**(6S)：123 – 129.
ZHAO Qian, DU Hong, ZHUANG Donghong. ISSR molecular marker and its application in plant research [J]. *Mol Plant Breed*, 2007, **5**(6S): 123 – 129.

[5] 周喜军. 冬青属植物 ISSR 分子标记及枸骨组织培养体系的建立[D]. 郑州：河南农业大学，2009.
ZHOU Xijun. *Inter-Simple Sequence Repeat Molecular Markers in Ilex and the Tissue Cculture System of Ilex cornuta Lindl ex Paxt* [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2009.

[6] REDDY M P, SARLA N, SIDDIQ E A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding [J]. *Euphytica*, 2002, **128**(1): 9 – 17.

[7] 陈良华，胡庭兴，张帆，等. 用 AFLP 技术分析四川核桃资源的遗传多样性[J]. 植物生态学报，2008，**32**(6)：1362 – 1372.
CHEN Lianghua, HU Tingxing, ZHANG Fan, *et al*. Genetic diversity of four *Juglans* populations revealed by AFLP in Sichuan Province, China [J]. *J Plant Ecol*, 2008, **32**(6): 1362 – 1372.

[8] POTTER D, GAO Fangyou, AIELLO G. Inter-simple sequence repeat markers for fingerprinting and determining genetic relationships of walnut (*Juglans regia*) cultivars [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 2002, **127**(1): 75 – 81.

[9] 王滑，郝俊民，王宝庆，等. 中国核桃 8 个天然居群遗传多样性分析[J]. 林业科学，2007，**43**(7)：120 – 124.
WANG Hua, HAO Junmin, WANG Baoqing, *et al*. SSR analysis of genetic diversity of eight natural walnut populations in China [J]. *Sci Silv Sin*, 2007, **43**(7): 120 – 124.

[10] 陈良华，胡庭兴，张帆. 核桃与铁核桃种间关系的 RAPD 鉴定[J]. 四川农业大学学报，2007，**25**(4)：513 – 516.
CHEN Lianghua, HU Tingxing, ZHANG Fan. Identification of relationship between *Juglans regia* L. and *J. sigillata* Dode by RAPD markers [J]. *J Sichuan Agric Univ*, 2007, **25**(4): 513 – 516.

[11] 陈少瑜，杨恩，张雨，等. 云南核桃品种遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 标记研究[J]. 河北林果研究，2007，**22**(1)：56 – 61.
CHEN Shaoyu, YANG En, ZHANG Yu, *et al*. Genetic diversity of *Juglans silillata* Dode varieties by RAPD and ISSR markers [J]. *Hebei J For Orchard Res*, 2007, **22**(1): 56 – 61.

[12] POLLEGIONI P, BARTOLI S, CANNATA F, *et al*. Genetic differentiation of four Italian walnut (*Juglans regia* L.) varieties by inter simple sequence repeat (ISSR) [J]. *J Genet Breed*, 2003, **57**: 231 – 240.

[13] JIANG Zhimin, CHEN Yuxia, BAO Ying. Population genetic structure of *Tamarix chinensis* in the Yellow River Delta, China [J]. *Plant Syst Evol*, 2012, **298**(1): 147 – 153.

[14] 柴晓娟，郭玮龙，陈慧，等. 蔺草种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 浙江农林大学学报，2017，**34**(3)：552 – 558.
CHAI Xiaojuan, GUO Weilong, CHEN Hui, *et al*. Genetic diversity of *Juncus effuses* germplasm by ISSR markers [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2017, **34**(3): 552 – 558.

[15] 董海燕，季孔庶，侯伯鑫，等. 基于 ISSR 标记的红花檵木品种亲缘关系分析[J]. 园艺学报，2014，**41**(2)：365 – 374.
DONG Haiyan, JI Kongshu, HOU Boxin, *et al*. Genetic relatives analysis of 41 *Loropetalum chinense* var. *rubrum* cultivars by ISSR markers [J]. *Acta Hortic Sin*, 2014, **41**(2): 365 – 374.

[16] 田大翠，朱宏波，郭建夫，等. 马铃薯遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中国马铃薯，2010，**24**(1)：1 – 5.
TIAN Dacui, ZHU Hongbo, GUO Jianfu, *et al*. Genetic diversity analysis based on potato ISSR [J]. *Chin Potato J*, 2010, **24**(1): 1 – 5.

[17] 林立，王志龙，付涛，等. 39 个樱花品种亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 植物研究，2016，**36**(2)：297 – 304.
LIN Li, WANG Zhilong, FU Tao, *et al*. Genetic relationships of 39 *Cerasus* cultivars by ISSR analysis [J]. *Bull Bot Res*, 2016, **36**(2): 297 – 304.

[18] 付铨盛. 毛冬青 ISSR 指纹图谱的建立及成分动态规律初探[D]. 广州：广州中医药大学，2016.
FU Quansheng. *Establish Fingerprint for Ilex pubescens based on ISSR PCR and Preliminary of Ingredients Cumulative* [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2016.

[19] 钱永生，王慧中，施农农，等. 10 种冬青属植物遗传多样性的 RAPD 和 AFLPs 分析[J]. 分子细胞生物学报，2008，**41**(1)：35 – 43.
QIAN Yongsheng, WANG Huizhong, SHI Nongnong, *et al*. Studies of genetic diversity among 10 species of *Ilex* based on RAPD and AFLPs [J]. *J Mol Cell Biol*, 2008, **41**(1): 35 – 43.

[20] 冷欣，王中生，安树青，等. 岛屿特有种全缘冬青遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 生物多样性，2005，**13**(6)：546 – 554.
LENG Xin, WANG Zhongsheng, AN Shuqing, *et al*. ISSR analysis of genetic diversity of *Ilex integra*, an insular endemic plant [J]. *Biodivers Sci*, 2005, **13**(6): 546 – 554.