

# 菰 (*Zizania latifolia*) ISSR 反应体系的建立及优化

吴国林<sup>1,2,3</sup>, 王惠梅<sup>3</sup>, 黄奇娜<sup>3</sup>, 奉保华<sup>3</sup>, 江绍琳<sup>1</sup>, 吴建利<sup>3</sup>, 黄长干<sup>1</sup>, 江绍玫<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>江西农业大学, 南昌 330045; <sup>2</sup>江西财经大学, 南昌 330045; <sup>3</sup>中国水稻研究所, 杭州 310006)

**摘要:** 菰是一种稻族野生资源, 水生或沼生, 在我国有着广泛的分布。野生菰群体不仅是一种重要的育种基因资源, 同时还有着巨大的生态作用。为建立适宜于菰的 ISSR 反应体系, 以菰 DNA 基因组为模板对 ISSR 反应体系中的主要影响因子进行优化。采用单因素变量法在 12 个不同梯度水平上设计正交试验针对体系中 dNTPs 浓度、Mg<sup>2+</sup> 浓度、Taq 聚合酶浓度、引物浓度、模板 DNA 浓度及引物退火温度等 6 个因子进行优化, 确定了在 20 μL ISSR 反应体系中各组分的最适因素水平分别为: 3.0 mmol Mg<sup>2+</sup> (10 × Buffer), 0.5 mmol dNTPs, 1.0 μmol 引物浓度、0.24 U/μL Taq 聚合酶、1.5 ng/μL DNA 模板以及 55 °C 退火温度。应用该优化体系对 80 个菰材料进行扩增, 证实了该体系的适用性和稳定性, 为菰遗传资源的鉴定、评价与利用提供了技术支持。

**关键词:** 菰; ISSR; 居群

## Establishment and Optimization of an ISSR Reaction System for the Wild-rice *Zizania latifolia* Griseb (Turcz)

WU Guo-lin<sup>1,2,3</sup>, WANG Hui-mei<sup>3</sup>, HUANG Qi-na<sup>3</sup>, FENG Bao-hua<sup>3</sup>,  
JIANG Shao-lin<sup>1</sup>, WU Jian-li<sup>3</sup>, HUANG Chang-gan<sup>1</sup>, JIANG Shao-mei<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045; <sup>2</sup> Jiangxi Financial University, Nanchang 330045;

<sup>3</sup> China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006)

**Abstract:** Wild rice *Zizania latifolia* Griseb (Turcz), an aquatic/wetland genus, is a member of tribe Oryzaceae widely distributed across China. *Z. latifolia* is not only an important genetic resource for crop improvement but also contributes significantly to the ecosystem. However, studies on *Z. latifolia* have been slow because of the lack of methodology and knowledge in all aspects. In this work, we first tried to develop and establish an optimized ISSR-PCR reaction system for genotyping of *Z. latifolia* using the single factor variable method in which 6 factors (dNTPs, Mg<sup>2+</sup>, Taq polymerase, primer, template DNA and primer annealing temperature) at 12 different concentrations or gradients were tested. We finally set up an optimized 20 μL reaction system as follows: 0.5 mmol dNTPs, 3.0 mmol Mg<sup>2+</sup> (10 × Buffer), 0.24 U/μL Taq polymerase, 1.0 μmol primer, 1.5 ng/μL DNA template and annealing temperature at 55 °C. The optimized ISSR system was successfully applied in the amplification of 80 *Z. latifolia* individual samples, thus, the adaptability and stability of the system were testified.

**Key words:** *Zizania latifolia*; ISSR; population

菰 [*Zizania latifolia* Griseb (Turcz)] (n = 17) 为 菰亚族菰属 (*Zizania* Linnaeus)<sup>[1-3]</sup>。全世界的菰属包括 4 个种, 其中美

收稿日期: 2014-01-07 修回日期: 2014-02-10 网络出版日期: 2014-10-13

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20141013.2025.009.html>

基金项目: 国家自然科学基金(31160271); 江西省科技支撑项目(20133BBF6005)

第一作者从事水稻品种资源研究。E-mail: zg\_pandora@163.com

通信作者: 江绍玫, 从事水稻分子遗传研究。E-mail: shmjiang111@aliyun.com

黄长干, 从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: windhcg@163.com

洲菰有 3 个种:水生菰(*Z. aquatic*)<sup>[4]</sup>、沼生菰(*Z. palustris*)<sup>[5]</sup>、流水菰(*Z. texana*)<sup>[5]</sup>,广泛分布于加拿大南部至墨西哥湾一带的浅湖、河流和沼泽中,特别是美国和加拿大 5 大湖区广泛生长着北美菰<sup>[6]</sup>。亚洲菰有 1 个种:菰(*Z. latifolia*),主要生长分布于亚洲东部和南部<sup>[7-8]</sup>。在我国,菰主要分布于华东和华南地区,其中大部分生长在长江中下游流域的各支流、湖泊、沼泽等湿地地区<sup>[9]</sup>。近年来受人类活动的影响,湿地环境大面积减少,造成菰的生存空间日益减小,再加上人们为了生产劳动而有意地定向去除菰的自然生长,使得我国的菰种质资源日益减少,尤其是对野生菰资源的破坏较为严重,所以对我菰种质资源的研究与保护迫在眉睫。

ISSR(inter simple sequence repeat)分子标记是一种以微卫星序列(SSR)为引物,进行多位点 PCR 扩增 2 个序列相同但方向相反 SSR 之间的一段 DNA 序列的技术<sup>[10]</sup>。ISSR 技术简易、快捷、成本低廉,同时兼备 AFLP(扩增酶切片多态性)、SSR(简单重复序列)和 RAPD(DNA 随机扩增多态性)等分子标记的优点。ISSR 标记以其高多态性,产物信息丰富已被广泛应用于种质收集、物种遗传多样性分析、图谱构建、基因定位等研究<sup>[11-13]</sup>。目前,由加拿大英属哥伦比亚大学开发的一套(共 100 条)ISSR 引物使用最为广泛。大量的研究证明,这套引物广泛应用于真核生物,尤其是在高等植物领域的应用上颇为突出。但在应用 ISSR 技术时,由于每个引物并不适合于所有物种,不同引物要求的反应条件也不相同,且目前尚未见 ISSR 技术在菰领域的研究与应用,因此对引物的筛选和条件的优化是非常必要的<sup>[14]</sup>。

本试验以菰基因组 DNA 为模板建立菰种质资源的 ISSR 反应体系,对后续研究我国菰的种质资源的分布、收集与保存、菰的遗传多样性及菰野生基因库的合理开发利用具有重要意义。同时也为 ISSR 分子标记技术在菰种质资源的研究与应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2013 年 4 月赴江西省鄱阳湖流域周围 10 个县,在距离湖区约 1~8 km 范围内,采取 30 个野生菰居群的 80 个个体样本(表 1),单株割莖后连根种植于中国水稻研究所富阳试验基地网室内,待其长出新叶后取新鲜叶片于 -80 °C 冰箱保存备用。

所用引物由加拿大哥伦比亚大学公布的 ISSR 引物序列,由上海桑尼(Sunny)生物科技有限公司

合成。本试验选用引物编号为 Z9:(AG)<sub>8</sub>G。*Taq* DNA Polymerase、10 × *Taq* Buffer、dNTPs 购自北京鼎国昌盛生物科技有限责任公司。

### 1.2 菰基因组 DNA 的提取

参照奉保华<sup>[15]</sup>水稻 DNA 简易抽提法提取菰叶片基因组 DNA,所得 DNA 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测质量和浓度后,用 ddH<sub>2</sub>O 稀释至终浓度为 20 ng/μL, -80 °C 保存备用。

### 1.3 PCR 扩增

ISSR 基本扩增体系为 20 μL,各组分母液包括 10 × *Taq* Buffer(含 20 mmol Mg<sup>2+</sup>),2 mmol dNTPs,2 U/μL *Taq* DNA Polymerase,20 ng/μL DNA,10 μmol 引物。PCR 反应的优化包括体系中各成分的最优浓度和引物的最佳退火温度。试验采用单因素变量法,每个因素的水平设计如表 2。引物退火温度梯度设置在最低 45 °C 至最高 57 °C 范围内(根据引物的 T<sub>m</sub> 值确定退火温度范围),中间各温度梯度值由北京东胜生物公司生产的东胜龙 PCR 仪自动生成,共有 12 个温度梯度:45.0 °C、45.6 °C、46.4 °C、47.6 °C、49.2 °C、50.7 °C、51.9 °C、53.3 °C、54.8 °C、55.8 °C、56.5 °C、57.0 °C。

PCR 反应参数:94 °C 预变性 3 min,35 个循环扩增(94 °C 变性 45 s,退火温度按梯度设置,45 s,72 °C 延伸 90 s),72 °C 延伸 7 min,4 °C 保存。扩增产物加入 3 μL 2 × Loading Buffer 混匀后用含有核酸染料 ExRed 的 1.0% 琼脂糖凝胶在 5 V/cm 条件下电泳分离 1.0 h,电泳结束后在紫外凝胶成像系统(BIO-RED)下观察并拍照记录。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同退火温度对 ISSR 引物扩增的影响

进行 ISSR-PCR 扩增首要解决的就是引物退火温度的确定,以保证其他因素优化结果的可靠性、有效性和稳定性。引物 Z9 在 45.0~57.0 °C 温度范围内扩增结果表明,在 45.0~45.6 °C 范围内扩增背景模糊,条带较弱,说明较低的退火温度易使引物与模板发生错配,非特异性条带增多。反之,较高的退火温度会导致扩增条带的减少和扩增量的减少,在 56.5~57.0 °C 范围内扩增条带明显减弱,所以此引物的退火温度范围在 46.4~55.8 °C 之间,考虑到反应的特异性和扩增条带信息量的双重因素,在 54.8~55.8 °C 范围内效果最佳(图 1)。最终,选择 55.0 °C 作为此引物的最佳退火温度,其他因素的优化在此退火温度条件下筛选。

表 1 鄱阳湖流域 30 个菰居群的地理分布

Table 1 Geographical distribution of 30 *Z. latifolia* populations in Poyang Lake basin

居群编号 Population No.	县 County	镇(乡) Town	村 Village	纬度(N) Latitude	经度(E) Longitude	海拔(m) Altitude
1	南昌	泾口乡	山头村	28°38'03.54"	116°16'23.54"	15
2	南昌	泾口乡	东湖村	28°38'40.00"	116°14'58.14"	15
3	南昌	南新乡	乡政府驻地	28°47'52.90"	116°04'14.30"	17
4	进贤	三阳集乡	孟后村	28°35'24.50"	116°16'27.47"	27
5	进贤	三里乡	六圩村	28°38'05.45"	116°19'30.44"	27
6	进贤	三里乡	池尾村	28°41'34.98"	116°24'14.17"	22
7	余干	瑞洪镇	镇驻地	28°44'09.90"	116°24'37.16"	16
8	余干	三塘乡	下潭村	28°44'45.37"	116°34'08.70"	13
9	余干	石口镇	石口村	28°49'49.45"	116°38'02.59"	15
10	鄱阳	双港镇	尧山村	29°03'24.00"	116°35'42.12"	18
11	鄱阳	双港镇	乐亭村	29°07'01.51"	116°34'29.06"	14
12	鄱阳	白沙洲乡	车门村	29°09'38.89"	116°37'50.18"	23
13	都昌	西源乡	茭塘村	29°13'17.33"	116°16'59.99"	23
14	都昌	三叉港镇	镇驻地	29°16'38.40"	116°23'55.34"	38
15	都昌	大树乡	大树下	29°16'32.74"	116°16'05.38"	27
16	都昌	多宝乡	老爷庙	29°22'34.24"	116°03'43.30"	15
17	湖口	高垄乡	乡政府驻地	29°34'32.44"	116°04'38.40"	36
18	星子	蓼花镇	胜利村	29°21'36.36"	116°00'10.00"	42
19	星子	蓼南乡	樟树曹村	29°19'12.30"	115°59'22.30"	22
20	星子	蛟塘乡	畈上村	29°18'37.45"	115°55'28.70"	25
21	共青城	苏家垱乡	膏良周村	29°15'13.22"	115°51'37.70"	30
22	共青城	富华大道	富华大道	29°14'30.50"	115°48'59.41"	27
23	共青城	江益镇	罗家村	29°12'30.66"	115°46'49.78"	38
24	永修	恒丰镇	牛头山	29°08'00.64"	115°51'40.44"	18
25	永修	九和乡	杨柳村	29°03'24.43"	115°49'35.04"	17
26	永修	马口镇	陈新村	28°57'20.41"	115°46'10.15"	17
27	新建	大塘坪乡	大塘村	28°59'28.29"	115°54'28.71"	24
28	新建	铁河乡	乡镇政府驻地	29°01'38.92"	115°58'30.30"	15
29	新建	昌邑乡	镇政府驻地	29°01'01.00"	116°03'46.90"	20
30	新建	联圩乡	下万村	28°50'50.00"	116°01'36.45"	17

表 2 菰 ISSR-PCR 体系优化时各因素的处理水平

Table 2 *Z. latifolia* ISSR-PCR optimization based on 12 different levels

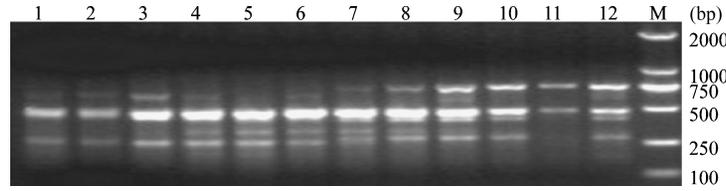
水平 Levels	10 × <i>Taq</i> Buffer	dNTPs (mmol)	<i>Taq</i> DNA Polymerase (U/μL)	DNA (ng/μL)	引物 (μmol)
1	0.5	0.1	0.04	0.2	0.1
2	1.0	0.2	0.08	0.4	0.2
3	1.5	0.3	0.12	0.6	0.3
4	2.0	0.4	0.16	0.8	0.4
5	2.5	0.5	0.20	1.0	0.5
6	3.0	0.6	0.24	1.2	0.6
7	3.5	0.7	0.28	1.4	0.7
8	4.0	0.8	0.32	1.6	0.8
9	4.5	0.9	0.36	1.8	0.9
10	5.0	1.0	0.40	2.0	1.0
11	5.5	1.1	0.44	2.2	1.1
12	6.0	1.2	0.48	2.4	1.2

## 2.2 dNTPs 浓度对 PCR 扩增的影响

dNTP 是 ISSR-PCR 扩增反应体系中的主要成分,其含量直接影响到扩增产物的稳定性和特异性,其浓度过低会影响扩增的效率及扩增产物的准确性,过高则易导致碱基的错配和非特异性条带的产生。在本试验菰 ISSR-PCR 扩增中,设计了 12 个不同浓度水平的 dNTP,结果表明,dNTP 浓度在 0.3 mmol 以下时条带背景较浅,扩增结果模糊;但在 0.8 mmol 以上浓度时扩增量逐渐减少,非特异性条带增多;浓度在 0.4 ~ 0.6 mmol 时扩增条带清晰,杂带相对较少(图 2)。最后,选择 0.5 mmol 的 dNTP 浓度作为菰 ISSR-PCR 反应体系的最佳浓度。

## 2.3 Mg<sup>2+</sup> 浓度的影响

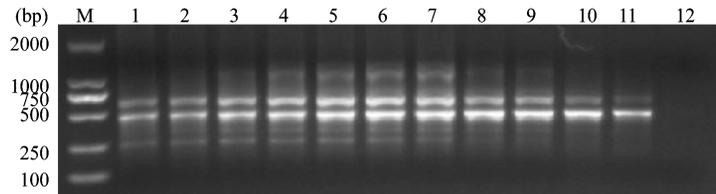
Mg<sup>2+</sup> 在 PCR 反应中是 *Taq* DNA 聚合酶的激活剂,且与 dNTP、DNA 模板及引物相结合,从而影响引



Lane 1-12:45.0 °C, 45.6 °C, 46.4 °C, 47.6 °C, 49.2 °C, 50.7 °C, 51.9 °C, 53.3 °C, 54.8 °C, 55.8 °C, 56.5 °C and 57.0 °C, respectively, M: DNA ladder

图1 引物 Z9 在不同退火温度下 ISSR-PCR 扩增结果

Fig.1 Effects of annealing temperature on ISSR-PCR amplification using primer Z9



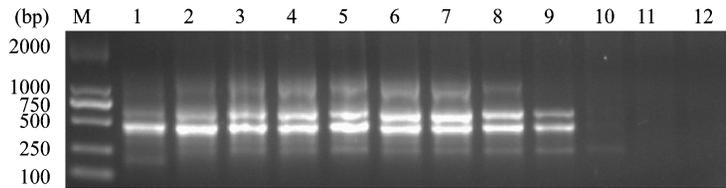
Lane 1-12:0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1 and 1.2 mmol, respectively, M: DNA Ladder

图2 不同 dNTPs 浓度对 ISSR-PCR 扩增反应的影响

Fig.2 Effects of dNTPs concentrations on ISSR-PCR amplification

物与模板结合的效率及扩增的特异性。本试验使用的  $10 \times Taq$  Buffer 内含浓度为 20 mmol 的  $Mg^{2+}$ , 所以本试验通过改变体系中  $10 \times Taq$  Buffer 的用量来确定  $Mg^{2+}$  的最佳反应浓度: 当浓度小于 1.5 mmol 时扩增条

带不稳定, 扩增量较少; 当浓度大于 4.0 mmol 时, 扩增条带减弱, 浓度达到 5.0 mmol 以上时基本扩增不出条带, 因此认为  $Mg^{2+}$  最适浓度范围在 2.0 ~ 3.5 mmol, 本试验选择浓度为 3.0 mmol (图 3)。



Lane 1-12:0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, and 6.0 mmol, respectively, M: DNA ladder

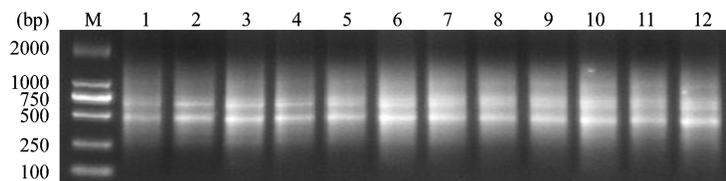
图3 不同  $Mg^{2+}$  浓度对 ISSR-PCR 扩增体系的影响

Fig.3 Effects of  $Mg^{2+}$  concentrations on ISSR-PCR amplification

#### 2.4 $Taq$ 聚合酶浓度

$Taq$  酶在 PCR 扩增反应中是最关键因素, 浓度过低会导致扩增产物量少甚至无法进行有效的 PCR 扩增; 而过高的浓度不仅是经济上的浪费, 且

易扩增出假阳性的条带和高亮拖尾的弥散产物。在菰的 ISSR 反应体系中  $Taq$  聚合酶的最适浓度在 0.24 U/ $\mu$ L 时扩增产物稳定清晰, 在低于此浓度时扩增结果模糊, 条带不稳定, 杂带较多 (图 4)。



Lane 1-12:0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.20, 0.24, 0.28, 0.32, 0.36, 0.40, 0.44, and 0.48 U/ $\mu$ L, respectively, M: DNA ladder

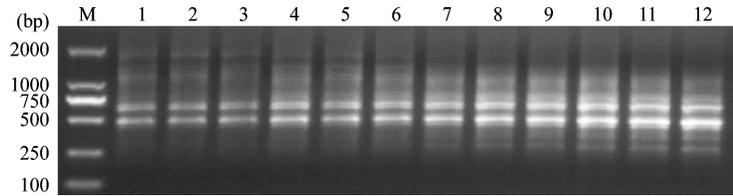
图4 不同  $Taq$  聚合酶浓度对 ISSR-PCR 扩增体系的影响

Fig.4 Effects of concentrations of  $Taq$  DNA polymerase on ISSR-PCR amplification

#### 2.5 引物浓度的影响

在 PCR 反应过程中, 过高的引物浓度会产生引物二聚体, 对试验结果产生干扰。所以在设计引物浓度梯度时应保持较低水平的引物浓度, 本试验设计的引物浓度在 0.1 ~ 1.2  $\mu$ mol。试验结果表明, 引

物浓度在小于 0.7  $\mu$ mol 时扩增条带暗淡模糊; 而浓度大于 1.0  $\mu$ mol 时条带开始弥散, 故认为引物最佳浓度范围在 0.8 ~ 1.0  $\mu$ mol, 本试验选取引物浓度为 1.0  $\mu$ mol (图 5)。



Lane 1-12: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1 and 1.2 μmol, respectively, M: DNA ladder

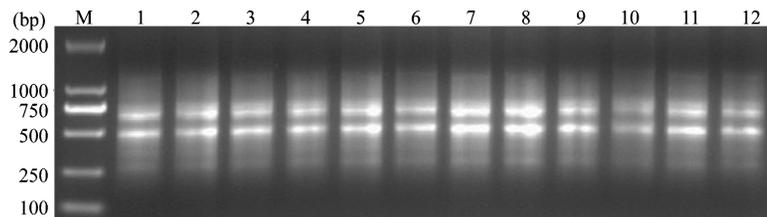
图5 不同引物浓度对 ISSR-PCR 扩增体系的影响

Fig. 5 Effects of primer concentrations on ISSR-PCR amplification

### 2.6 模板 DNA 的含量

由图 6 可见,试验设计的 12 个水平的模板 DNA 浓度扩增结果的条带数和清晰度基本一致,说明菰

ISSR-PCR 反应体系对模板 DNA 的浓度要求不是很敏感,但从结果看出浓度在 1.4 ~ 1.6 ng/μL 时扩增效率较其他要好,故本试验选择的浓度为 1.5 ng/μL。



Lane 1-12: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0, 2.2 and 2.4 ng/μL, respectively, M: DNA ladder

图6 模板 DNA 浓度 ISSR-PCR 扩增体系的影响

Fig. 6 Effects of template DNA concentrations on ISSR-PCR amplification

### 2.7 优化体系的验证

为了确定反应体系各成分的优化结果,本试验根据综合以上各成分确定的优化结果对来自江西省鄱阳湖流域 30 个居群的 80 个菰样本进行 ISSR-PCR 扩增,优化后的各组分参数如下: 0.5 mmol dNTPs, 10 × Taq Buffer (含 20 mmol Mg<sup>2+</sup>) 浓度为 3.0 mmol, Taq DNA 聚合酶浓度为 0.24 U/μL、引物

浓度 1.0 μmol、模板 DNA 浓度为 1.0 ng/μL, 选择引物 Z9 的退火温度为 55.0 °C。PCR 扩增结果显示,引物 Z9 对 80 个菰样本有较好的扩增效率,共扩增出 9 条多态性条带,扩增条带稳定、分辨率高,能较好的反应出各个体之间的多态性关系(图 7),由此说明此优化体系可以适用于以后的菰 ISSR-PCR 扩增检测。

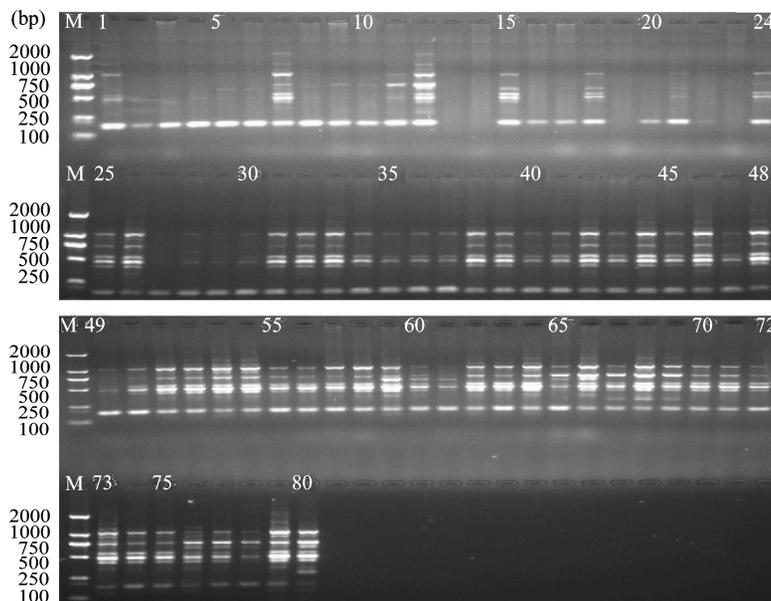


图7 引物 Z9 对 80 个菰个体的 ISSR-PCR 扩增结果

Fig. 7 ISSR-PCR amplification of 80 *Zizania latifolia* individuals using primer Z9

### 3 讨论

ISSR 技术现已广泛应用于植物遗传多样性研究、物种亲缘关系分析、种质资源的保存、遗传图谱构建和基因定位等方面,但不同物种其反应体系也各不相同<sup>[16-19]</sup>。为了获得清晰、重复性好的 ISSR 扩增结果,需要对 ISSR-PCR 扩增体系各成分进行比较、优化,包括引物退火温度、引物浓度、dNTPs 浓度、Mg<sup>2+</sup> 浓度、Taq 聚合酶浓度和模板 DNA 浓度,以便确定一个最适宜的扩增条件<sup>[20]</sup>。

从本试验对菰的 ISSR-PCR 扩增体系的优化可以得出,除了模板 DNA 以外,其他各成分的不同浓度对 PCR 扩增结果都有明显的影响。其中引物的退火温度是进行 ISSR-PCR 扩增的首要关键因素,过低的退火温度不仅会导致扩增效率低、背景模糊,而且容易产生非特异性的扩增,过高的退火温度则会导致扩增条带数目的减少,甚至得不到扩增条带;dNTPs 的浓度对反应体系的影响较为敏感,浓度过低和过高时均会影响扩增效率,过低时体系中游离的碱基不足以供应 PCR 反应的需求,过高时会降低 Taq 聚合酶的活性;试验中当 Mg<sup>2+</sup> 的浓度小于 1.5 mmol 时,扩增效率低,结果不稳定,当 Mg<sup>2+</sup> 浓度大于 4.5 mmol 时,得不到扩增条带,可能是因为 Buffer 缓冲液中的其他成分对 Taq 聚合酶活性的抑制。本试验结果显示 Taq 聚合酶浓度过低造成扩增量的不足,过高出现了非特异性扩增;由于试验中引物起始浓度设置较低,因此当达到设计的最大值时,没有产生二聚体和非特异性条带,不过低浓度扩增出的产物明显较少。另引物长时间保存于 4 °C 条件下可能发生降解而影响扩增效率。

本试验优化菰的 ISSR-PCR 扩增体系的最终结果为:在 20 μL 总反应体积内各成分的终浓度分别为:Mg<sup>2+</sup> (10 × Buffer) 3.0 mmol, dNTPs 0.5 mmol、引物 1.0 μmol、Taq 聚合酶 0.24 U/μL、DNA 模板 1.5 ng/μL, ddH<sub>2</sub>O 补齐反应体系。本反应体系的建立为菰遗传资源的鉴定、评价与利用提供了技术支撑。

### 参考文献

- [1] 沈玮玮. 菰抗病候选基因筛选及其转基因水稻白叶枯病抗性分析[D]. 南昌:江西师范大学,2010
- [2] Li J H. Flora of China [J]. Harvard Papers in Bot,2007,13(2): 301-302
- [3] 陈守良,徐克学. 菰属 *Zizania*. L. 植物的分支分类研究 [J]. 植物研究,1994(4):385-393
- [4] Boland W, Burk C J. Some effects of acidic growing conditions on three emergent macrophytes: *Zizania aquatica*, *Leersia oryzoides* and *Peltandra virginica* [J]. Environ Pollut, 1992, 76(3): 211-217
- [5] Horne F R, Kahn A. Water loss and viability in *Zizania* (*Poaceae*) seeds during short-term desiccation [J]. Am J Bot, 2000, 87(11):1707-1711
- [6] Hayes P M, Stucker R E, Wandrey G G. The domestication of American wildrice [J]. Econ Bot, 1989, 43(2):203-214
- [7] Xu X W, Ke W D, Yu X P, et al. A preliminary study on population genetic structure and phylogeography of the wild and cultivated *Zizania latifolia* (*Poaceae*) based on Adh1a sequences [J]. Theor Appl Genet, 2008, 116(6):835-843
- [8] Chen Y Y, Chu H J, Liu H, et al. Abundant genetic diversity of the wild rice *Zizania latifolia* in central China revealed by microsatellites [J]. Ann Appl Biol, 2012, 161(2):192-201
- [9] Guo H B, Li S M, Peng J, et al. *Zizania latifolia turcz.* cultivated in China [J]. Genet Resour Crop Ev, 2007, 54(6):1211-1217
- [10] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20(2):176-183
- [11] 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(6):123-129
- [12] 孙洪,程静,詹克慧,等. ISSR 标记技术及其在作物遗传育种中的应用 [J]. 分子植物育种, 2005, 3(1):123-127
- [13] 蒋彩虹,王元英,孙玉合. SSR 和 ISSR 标记技术应用进展 [J]. 中国烟草科学, 2007, 28(2):1-5
- [14] 余艳,陈海山,葛学军. 简单重复序列区间 (ISSR) 引物反应条件优化与筛选 [J]. 热带亚热带植物学报, 2003, 11(1):15-19
- [15] 奉保华. 水稻淡褐斑叶突变体 lbs11 的鉴定、遗传分析与基因定位[D]. 北京:中国农业科学院,2012
- [16] Wang Z Y, Liao L, Yuan X J, et al. Genetic diversity analysis of *Cynodon dactylon* (*bermudagrass*) accessions and cultivars from different countries based on ISSR and SSR markers [J]. Biochem Syst Ecol, 2013, 46:108-115
- [17] Ding G, Zhang D Z, Yu Y Q, et al. Population genetic diversity and divergence of the halobiotic herb *Limonium sinense* estimated by AFLP and ISSR and implications for conservation [J]. Plant Syst Evol, 2013, 299(1):131-138
- [18] Manohar S H, Murthy H N, Ravishankar K V. Genetic diversity in a collection of *Cucumis sativus* L. Assessed by RAPD and ISSR markers [J]. J Plant Biochem Biol, 2013, 22(2):241-244
- [19] Asadiar L S, Rahmani F, Siami A. Assessment of genetic diversity in the Russian olive (*Elaeagnus angustifolia*) based on ISSR genetic markers [J]. Rev Ciênc Agron, 2013, 44(2):310-316
- [20] 张志红,谈凤笑,何航航,等. 红树植物海漆 ISSR 条件的优化 [J]. 中山大学学报:自然科学版, 2004, 43(2):63-66