

# 山东实生板栗居群遗传多样性 ISSR 分析 Study on the Genetic Diversity of Natural Chestnut of Shandong by ISSR

艾呈祥, 张力思, 魏海蓉, 金松南, 苑克俊, 刘庆忠\*

AI Cheng-Xiang, ZHANG Li-Si, WEI Hai-Rong, JIN Song-Nan, YUAN Ke-Jun and LIU Qing-Zhong\*

山东省果树研究所, 山东省果树生物技术育种重点实验室, 泰安 271000

Shandong Institute of Pomology, Key Laboratory for Fruit Biotechnology Breeding of Shandong, Tai'an 271000, China

**摘 要** 采用 ISSR 分子标记技术对山东省内的 10 个板栗居群共 279 个个体的遗传多样性水平及居群遗传结构进行了研究。10 个引物共检测到 116 个位点, 其中 101 个位点为多态位点, 占 87.07%。POPGENE 分析结果表明, 板栗具有丰富的遗传变异(在物种水平上,  $H_e = 0.2697$ ,  $H_0 = 0.3999$ ; 在居群水平上,  $PPL = 64.58$ ,  $H_e = 0.2004$ ,  $H_0 = 0.3010$ )。Nei's 遗传多样性分析和 AMOVA 分析表明, 各居群间产生了一定程度的遗传分化( $G_{ST} = 0.2414$ ,  $F_{ST} = 0.2224$ )。居群间一定程度的遗传分化可能是由于生境破坏和基因流的障碍( $N_m = 0.8743$ )引起。UPGMA 聚类分析可知, 临沭、莒南、郯城和费县 4 个居群优先聚成一支, 而莱阳居群单独聚为一支。

**关键词** 实生板栗, 资源, 居群遗传结构, ISSR

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)04-0628-06

**Abstract** The genetic diversity of 279 individuals from 10 populations in Shandong Province was investigated using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. As a result, 116 bands were amplified by 10 informative and reliable primers, of which 101 were polymorphic loci. A relatively high level of genetic diversity was revealed:  $PPL = 87.07$ ,  $H_e = 0.2697$ ,  $H_0 = 0.3999$  (at the species level);  $PPL = 64.58$ ,  $H_e = 0.2004$ ,  $H_0 = 0.3010$  (at the population level). A higher level of genetic differentiation was detected among populations with Nei's  $G_{ST}$  analysis and the analysis of molecular variance (AMOVA;  $G_{ST} = 0.2414$ ,  $F_{ST} = 0.2224$ ). Habitat fragmentation and gene flow may result in genetic differentiation. UPGMA cluster analysis indicated that the four populations from Linshu, Junan, Tancheng and Feixian grouped together, whereas Laiyang populations clustered in an isolated clade. The results showed that a mixed mating system was possibly the main factor influencing the genetic structure of this species. These results, combined with other information about *Castanea mollissima*, may provide a valuable basis for proposing conservation strategies.

**Key words** natural chestnut, resource, population genetic structure, ISSR

板栗 (*Castanea mollissima* BI) 为山毛榉科 (Fagaceae) 植物。我国板栗资源丰富, 可分为华北、长江流域、西南、东南、西北与东北 6 个品种群<sup>[1]</sup>。全国约有 300 个栽培品种, 但作商业化栽培的品种

Received: December 18, 2006; Accepted: February 1, 2007.

This work was supported by the National Basic Science Research Project of China (No. 2004DKA30390-20 and 2005DKA21002-20) and the Youth Foundation of Shandong Academy of Agricultural Sciences (No. 2005YQ013).

\* Corresponding author. Tel: +86-538-8266663; E-mail: qzliu@sdiip.cn

科技部科技基础平台项目 (No. 2004DKA30390-20 2005DKA21002-20) 和山东省农业科学院青年基金资助项目 (No. 2005YQ013)

约为 50 个。我国丰富的地方栽培品种为商业化主栽品种的进一步改良,提供了丰富遗传资源多样性的基础。目前山东省生产上应用的优良品种均为实生选优而成,选种以高产、优质、耐贮、抗逆和抗病虫为目标,山东泰安、五莲、莒南居群高产、优质资源较为丰富,蒙阴、平邑、费县居群耐贮、抗逆、抗病虫资源较为丰富。山东独特的地理气候,形成了一定资源优势,在栗属植物新品种选育及改良上具有很大潜力,但长期以来,由于对我国丰富的栗属资源重视不够,加上多年来在资源利用上的不正确导向,以少数几个“优良品种”大量进行改接换种,改造野生、实生板栗林,以至于大量破坏野生资源,在利益的驱动下,人们对板栗资源的过度开采,使板栗的自然生境和资源遭到了严重的破坏<sup>[2,3]</sup>。

山东地区位于华北腹地,处于中国植物区系的核心部分,南北渗透,是中国具有东亚特色的生物多样性最丰富的地区之一。山东省板栗资源极为丰富,因此也成为实生板栗资源遭受破坏的重灾区,对其加强保护使其能可持续利用迫在眉睫<sup>[3,4]</sup>。近年来,人们逐渐认识到保护山毛榉科植物的重要意义,并开展了初步的保护生物学研究和对山毛榉科一些重要物种的保护工作,但大多数保护活动仍然是在缺乏基本的生物学研究尤其是保护遗传学研究的情况下进行的,很难制定科学合理的保护和抢救措

施<sup>[2,5]</sup>。

ISSR(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。ISSR 技术对果树进行遗传多样性研究已有较多报道<sup>[6-9]</sup>,而采用 ISSR 技术对果树的遗传多样性和居群结构遗传结构进行的研究目前尚少有报道。本研究采用 ISSR 分子标记技术对山东省分布的实生板栗居群进行了研究,探讨其居群遗传多样性水平和遗传结构,为科学合理地保护和利用现有的板栗资源提供理论依据和技术支持。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

材料采集于山东的泰安、郯城、五莲、费县、莱阳、日照、平邑、莒南、蒙阴和临沭,共计 10 个居群,279 个样本。调查过程中,对于个体数大于 25 株的居群就按照均匀分布、随机取样的原则进行采样,而对于个体数少于此数的居群进行全部个体采样。采集新鲜幼叶,记录各居群的取样地、海拔、经纬度(表 1),所有样品在国家果树种质泰安板栗圃进行迁地保存。

表 1 山东 10 个板栗居群概况

Table 1 Summary of 10 *Castanea mollissima* populations in Shandong

Population	Sample collection place	Altitude/m	North latitude	East longitude	Sample size
泰安 Tai'an	黄前、下港 Huangqian and Xiangang	550 ~ 650	117°13' 6'	36°18' 6'	20
郯城 Tancheng	高峰头、红花、马头、胜利 Gaofengtou, Honghua, Matou and Shengli	300 ~ 500	118°35' 22', 17', 11'	34°61' 37', 26', 14'	31
五莲 Wulian	许孟、汪湖、于里、高泽 Xumeng, Wanghu, Yuli and Gaoze	450 ~ 600	119°2' 12', 25', 36'	35°74' 61', 50', 39'	32
费县 Feixian	马头崖、南张庄、大田庄、水连峪 Matouya, Nanzhangzhuang, Datianzhuang and Shuilianyu	500 ~ 700	117°97' 83', 76', 57'	35°26' 21', 17', 15'	29
莱阳 Laiyang	穴坊、照旺庄、沐浴店、河洛 Xufang, Zhaowangzhuang, Muyudian and Heluo	100 ~ 200	120°71' 62', 53', 41'	36°97' 72', 84', 60'	21
日照 Rizhao	三庄、黄墩 Sanzhuang and Huangdun	50 ~ 150	119°46' 40'	5°42' 37'	19
平邑 Pingyi	卞桥、白彦 Bianqiao and Baiyan	400 ~ 550	117°63' 37'	35°49' 30'	35
莒南 Junan	洙边、涝坡、板泉 Zhubian, Laopo and Banquan	350 ~ 500	118°83' 72', 50'	35°17' 21', 15'	33
蒙阴 Mengyin	垛庄、岱固、百花峪 Duozhuang, Daigu and Baihuayu	700 ~ 900	117°95' 82', 69'	35°7' 14', 22'	32
临沭 Linshu	青云、白旄、大兴 Qingyun, Baimao and Daxing	100 ~ 400	118°73' 52', 39'	34°89' 70', 56'	27

### 1.2 DNA 的提取

采用改良的 CTAB 法<sup>[10]</sup>提取板栗叶片的基因组 DNA,用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测其质量,并在紫外分光光度计下检测其质量,最后稀释到 20ng/ $\mu$ L,放入 -20℃ 冰箱里储存备用。

### 1.3 引物筛选及 PCR 扩增

所用引物参照加拿大哥伦比亚大学 UBC 公司公布的第 9 套引物序列([Http://www.biotech.ubc.ca/services/naps/primers/Primers.pdf](http://www.biotech.ubc.ca/services/naps/primers/Primers.pdf)),由北京赛百盛基因公司合成。每个居群各取 2 个 DNA 模板在 25 $\mu$ L 的反应体系中进行筛选,从 69 个引物中选取了 10 条

扩增条带清晰、重复性好的引物(表2)用于全部10个居群样本分析。

PCR扩增反应在ABI 9700 PCR仪上进行,经过比较和优化确定最佳的ISSR扩增条件为 $25\mu\text{L}$ 的反应体系,含有 $10\times$  PCR buffer  $2.5\mu\text{L}$ ,  $2.5\text{mmol/L}$  dNTPs  $2.0\mu\text{L}$ ,  $\text{MgCl}_2$  ( $2.5\text{mmol/L}$ )  $2.0\mu\text{L}$ ,  $0.5\text{U}$  Taq DNA聚合酶  $0.3\mu\text{mol/L}$  引物  $50\text{ng}$  模板DNA。PCR扩增程序为 $94^\circ\text{C}$ 预变性3min,然后 $94^\circ\text{C}$ 变性45s,  $48\sim 56^\circ\text{C}$ 退火(退火温度随引物而定,见表2)45s,  $72^\circ\text{C}$ 延伸2min,共32个循环,最后 $72^\circ\text{C}$ 延伸5min。

PCR扩增产物用 $1.0\times$  TBE配制的1.5%琼脂糖凝胶电泳分离,在150V电压下电泳1h,电泳结束后在凝胶成像系统(Alpha Innotech)中观察、记录、保存图像。

表2 对板栗10个居群279个个体进行扩增的ISSR引物  
Table 2 ISSR primers used for generating ISSR markers from 279 individuals of 10 *Castanea mollissima* populations

Primer	Sequence (5'→3')	Annealing temperature/ $^\circ\text{C}$	No. of bands scored	No. of polymorphic bands
811	(GA) <sub>8</sub> C	51.8	10	9
814	(CT) <sub>8</sub> A	54.0	8	7
815	(CT) <sub>8</sub> G	48.6	14	14
819	(GT) <sub>8</sub> A	53.4	11	10
823	(TC) <sub>8</sub> C	51.0	9	6
830	(TG) <sub>8</sub> G	51.0	11	9
834	(AG) <sub>8</sub> YT	55.6	16	13
841	(GA) <sub>8</sub> YC	48.2	10	8
845	(CT) <sub>8</sub> RG	52.4	13	13
868	(GAA) <sub>8</sub>	52.9	14	12

Y=(C,T),R=(A,G)

#### 1.4 数据统计分析

将ISSR琼脂糖凝胶电泳图谱记录后进行人工读带,以DNA Marker DL2000作为相对分子量标准,由同一引物扩增的电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性,属于同一位点的产物<sup>[11]</sup>。

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”,仅

记录清晰、稳定且长度在300~2000bp范围内的扩增带,形成0/1矩阵图输入计算机。应用POPGENE 1.31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(PPL)、观测等位基因数( $A_0$ )、有效等位基因数( $A_e$ )、Nei's (1973)遗传多样性指数( $H_e$ )<sup>[12]</sup>、Shannon信息指数( $H_0$ )、群体总遗传多样性( $H_t$ )、群体内遗传多样性( $H_s$ )、群体间遗传分化系数( $G_{ST}$ )、Nei's遗传距离( $D$ )和遗传一致度( $I$ )。根据Nei's遗传距离,利用NTSYS-pc 2.1软件对居群进行UPGMA聚类分析。采用AREQUIN 2.0软件对居群间和居群内的遗传变异进行分子变异分析。利用TFPGA软件对Nei's无偏差预期杂合度( $h$ )<sup>[13]</sup>和Wright的基因分化系数( $\varphi_{ST}$ )<sup>[14]</sup>进行了统计计算;居群间的基因流通过公式 $N_m = (1 - F_{ST})/4F_{ST}$ 间接推算。

## 2 结果与分析

### 2.1 居群间ISSR的多态性

对69个ISSR引物进行了筛选,其中10条引物(表2)能扩增出条带清晰、重复性和稳定性好且多态性条带相对较多,10条引物共检测到116个位点(每条引物产生8~16个位点),其中101个位点是多态的,每个引物扩增出的DNA片段大小主要集中在300~2000bp之间(图1),以上数据表明山东实生板栗居群在分子水平具有丰富的多态性。

### 2.2 物种和群体水平的遗传多样性

在物种水平上,多态位点百分率为88.14%,Nei's遗传多样性指数( $H_e$ )为0.2697,Shannon信息指数( $H_0$ )为0.3999。居群水平上的多态位点百分率在43.56%~76.63%之间,平均为64.58%,最高的是蒙阴居群,最低的是泰安居群。居群的Nei's遗传多样性指数在0.1347~0.2438之间,平均为

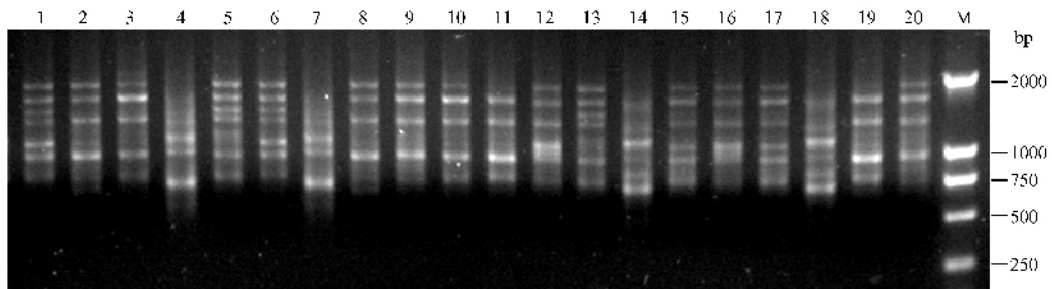


图1 ISSR引物835对泰安居群扩增的谱带

0.2004 Shannon 信息指数在 0.2219 ~ 0.3618 之间, 平均为 0.3010, Nei's 遗传多样性指数和 Shannon 信

息指数两者大小与居群多态位点百分率的大小趋势基本一致(表 3)。

表 3 板栗居群的遗传多样性  
Table 3 Genetic diversity of *Castanea mollissima* populations

Population	Observed number of alleles/ $A_e$	Effective number of alleles/ $A_e$	Nei's gene diversity/ $H_0$	Shannon's information index/ $H_0$	Percentage of polymorphic loci (PPL) %
泰安 Tai'an	1.4949	1.2551	0.1455	0.2219	43.56
郯城 Tancheng	1.6221	1.4519	0.2010	0.3046	68.18
五莲 Wulian	1.6113	1.5105	0.1942	0.3293	61.10
费县 Feixian	1.6259	1.5411	0.2134	0.2919	67.22
莱阳 Laiyang	1.5017	1.2640	0.1347	0.2311	54.24
日照 Rizhao	1.5244	1.2442	0.1756	0.2514	59.47
平邑 Pingyi	1.6352	1.5316	0.2349	0.3366	70.15
莒南 Junan	1.7316	1.5774	0.2438	0.3618	73.08
蒙阴 Mengyin	1.7526	1.5883	0.2391	0.3540	76.63
临沭 Linshu	1.6528	1.5495	0.2215	0.3275	72.19
Population level	1.6153	1.4151	0.2004	0.3010	64.58
Species level	1.8425	1.4829	0.2697	0.3999	88.14

### 2.3 居群间遗传分化程度的比较分析

POPGENE 分析结果表明,居群间遗传分化系数( $G_{ST}$ )为 0.2414,表明居群间具有一定水平的遗传分化。AMOVA 分析结果进一步表明了类似的情况(表 4)居群间的遗传变异占总遗传变异的 22.24% ( $P < 0.001$ )。另外,用 TFGA 计算 Wright 的基因分化系数  $\varphi_{ST} = 0.2178$ ,此结果与用 POPGENE、AMOVA 进行分析的结果相一致。根据公式  $N_m = (1 - F_{ST}) / 4F_{ST}$  计算居群间基因流  $N_m = 0.8743$ 。

表 4 居群间和居群内分子变异的 AMOVA 分析结果

Table 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) within and among populations

Source of variation	df	Variance component	Percentage of total variance/%	$P^*$
Among populations	9	4.10352	22.24	< 0.001
Within population	240	14.89655	77.76	< 0.001
Total	249	19.00007		

\*  $P$ -values are the probabilities of having a more extreme variance component than the observed values alone. Probabilities were calculated by 1000 random permutations of individuals across populations.

### 2.4 聚类分析

根据 Nei's 遗传距离( $D$ )和遗传一致度( $I$ ),用 NTSYS-pc 2.1 软件对 10 个居群进行 UPGMA 聚类分析的结果见图 2。从图中可以看出五莲居群和日照居群的遗传距离最近,首先聚在一起,临沭、莒南、郯城和费县 4 个居群在与其他居群相聚之前优先聚为一支,而莱阳居群与其他各居群的遗传距离均较大,最后才与其他居群聚类。为研究距离对板栗遗传结构的影响,我们对各居群间的地理距离和遗传距离进行了 Mantel 检验,结果表明,居群间的地理距离

和遗传距离之间没有显著相关性( $r = 0.3229$ ,  $P = 0.5441$ )。

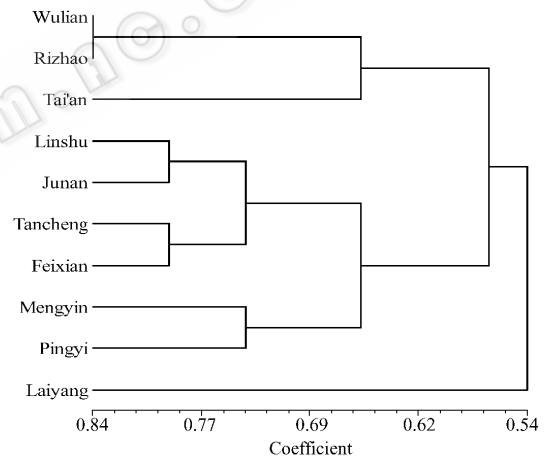


图 2 居群间 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrogram for 10 *Castanea mollissima* populations based on Nei's genetic distance

## 3 讨论

### 3.1 板栗居群的遗传多样性

前人利用同工酶<sup>[3,45]</sup>、RAPD<sup>[15]</sup>、SSR<sup>[4]</sup>等技术,分析板栗品种,表明分子标记在一定程度上能够反映品种的地理分布特点。利用同工酶对我国主栽的板栗品种进行遗传多样性分析,发现山东、江苏板栗品种群具有较高的遗传多样性,这些地区共有的特点就是板栗生产量大,品种资源丰富。山东板栗品种群遗传多样性较高是因为山东板栗栽培历史悠久,过去长期采用实生繁殖,群体庞大,单株性状复杂多样<sup>[3,4]</sup>。其次,品种类型变异较大,该品种群中大

量为实生单株人工选优产物,归根结底是性状各异的天然杂种<sup>[16]</sup>,还有极少数人工杂种<sup>[17]</sup>造成了其遗传多样性。Hamrick 等<sup>[18]</sup>曾报道植物在物种水平上的遗传多样性( $H_e$ )为 0.150,而本研究的 10 个自然居群除了莱阳(0.1347)和泰安(0.1455)居群外,其他居群的遗传多样性均高于植物的自然水平,这可能与板栗多年生、风媒异花授粉树种且分布区域广泛有密切关系。

山东实生板栗居群间的生境差异较大,海拔从 50~1500m,随着海拔的升高,气候、植被、土壤等也呈现明显的垂直变化,因而造成 10 个居群间的遗传多样性水平也存在较大差异。莒南、蒙阴和平邑居群遗传多样性最高,临沭、费县、郯城和五莲居群的遗传多样性次之,而日照、泰安和莱阳居群遗传多样性最低。日照、泰安和莱阳居群反应了遗传多样性的 3 个指标( $PPL$ ,  $H_e$ ,  $I$ )的值仅为莒南、蒙阴和平邑居群的 65% 左右。根据我们的调查,莒南、蒙阴和平邑居群的个体数量较多,莱阳、日照和泰安居群的个体数量最少。表明 ISSR 分子标记检测到的板栗居群遗传多样性水平与居群的大小相关,较大的居群趋向于具有更高的遗传多样性水平。

Hamrick 和 Godt 的研究表明,居群的地理分布和遗传多样性分布没有直接的相关性<sup>[19]</sup>。经过 Mantel 检测,本研究结果表明居群间的地理距离和遗传距离之间没有显著相关性( $r = 0.3229$ ,  $P = 0.5441$ )。比较山东实生板栗居群概况和 UPGMA 聚类图(图 2),我们不难看出其地理与遗传距离并没有呈现出显著的相关性,五莲居群和日照居群的遗传距离最近,首先聚在一起,实际上日照与五莲相距一百多公里而与莒南相距仅五十多公里,这反映了遗传距离和地理距离之间不呈显著相关。

### 3.2 板栗居群的遗传分化

板栗在居群间的遗传变异较大,居群间遗传分化系数( $G_{ST}$ )为 0.2414。已有的研究表明,植物居群的遗传结构反映了种的长期进化史(分布区转移、生境化片断和居群特化)、突变、遗传漂变、交配系统、基因流和选择等不同过程的相互作用<sup>[20]</sup>。研究中发现,板栗居群间遗传变异的产生主要与居群间的基因交流受到限制有关。所研究的 10 个板栗居群之间的地理距离较远,可能影响到了居群间的基因交流。板栗居群间的遗传距离与地理距离呈正相关关系,但相关性不显著,说明地理隔离影响其居群间的基因交流。Wright 指出<sup>[21]</sup>,如果  $N_m < 1$  则遗传漂

变可以导致居群间明显的遗传分化。因此,基因流受阻和遗传漂变是导致板栗居群间产生遗传分化的原因之一。

### 3.3 板栗资源的保护

物种的遗传多样性水平在一定程度上体现着这个物种适应环境的能力,制约着物种适应性进化水平,同时物种的遗传多样性水平可以为其现状和保护价值的评估提供非常重要的信息<sup>[22]</sup>。虽然没有被国家列为重点保护植物,但中国板栗是一种世界上分布广泛的重要园艺作物,具有较高的经济价值。它不仅是世界上食用栗品种改良的重要遗传资源,而且在板栗起源与进化研究中发挥了重要作用,对于世界板栗资源保护和利用方面具有重要意义,是抗病、抗虫育种的重要种质资源。从本研究结果来看,莒南、蒙阴和平邑居群遗传多样性最高,是保护和利用的重点,同时,板栗居群间产生了较大的遗传变异,遗传变异的分布有一定的地域性,因此也要注意其他地区板栗的保护和利用。保护和挽救宝贵的栗属野生资源,停止以损失野生资源为代价的板栗栽培品种高接野板栗的野生栗改造法,充分挖掘当地资源优势,开展多种选育方法的品种改良,成为栗属植物资源保护、发展和可持续利用的当务之急。

### REFERENCES (参考文献)

- [1] Liu L (柳鏊), Cai JH (蔡剑华), Zhang YH (张宇和). Chestnut. Beijing: Science Press (科学出版社), 1988.
- [2] Huang HW (黄宏文). Review of current research of the world *Castanea* species and importance of germplasm conservation of China native *Castanea* species. *Journal of Wuhan Botanical Research* (武汉植物学研究), 1998, 16(2): 171-176.
- [3] Bao ZX (暴朝霞), Huang HW (黄宏文). Analysis of genetic diversity and genetic relationships of Chinese chestnut. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报) 2002, 29(1): 13-19.
- [4] Ai CX (艾呈祥), Yu XM (余贤美), Zhang LS (张力思), et al. A study of genetic diversity of *C. mollissima* in Shandong. *Journal of Fruit Science* (果树学报) 2006, 23(5): 681-684.
- [5] Li A (李昂), Ge S (葛颂). Advances in plant conservation genetics. *Biodiversity Science* (生物多样性) 2002, 10(1): 61-71.
- [6] Regner F, Stadlbauer A, Eisenbeld C. Molecular markers for genotyping grapevine and for identifying clones of traditional varieties. *Acta Horticulturae* 2001, 546: 331-341.
- [7] Monte CL, Goulao L, Oliveira C. ISSR analysis of cultivars of pear and suitability of molecular markers for clone discrimination. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 2001, 126: 517-522.
- [8] Potter D, Gao FY, Aiello G, et al. Intersimple sequence repeat markers of fingerprinting and determining genetic relationships of walnut (*Juglans regia*) cultivars. *Journal of the American Society*

- for Horticultural Science 2002, **127**: 75 - 81.
- [ 9 ] Wu ZL(吴子龙), Fang LY(方连玉), Wang J(王军), et al. Analysis of genetic relationship of 15 vitis germplasm resources by ISSR markers. *Journal of Fruit Science*(果树学报), 2006, **23**(4): 605 - 608.
- [ 10 ] Ai CX(艾呈祥), Yu XM(余贤美), Liu QZ(刘庆忠), et al. Extraction and RAPD and SSR analysis of genomic DNA in *Catanea* plants. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*(西北植物学报) 2006, **26**(3): 624 - 627.
- [ 11 ] Yang SD(杨淑达), Shi SH(施苏华), Gong X(龚询), et al. Genetic diversity of *Paeonia delavayi* as revealed by ISSR. *Biodiversity Science*(生物多样性) 2005, **13**: 105 - 111.
- [ 12 ] Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 1973, **70**: 3321 - 3323.
- [ 13 ] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, **89**: 583 - 590.
- [ 14 ] Weir BS, Cockerham CC. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 1984, **38**: 1358 - 1370.
- [ 15 ] Casasoli M, Mattioni C, Cherubini M, et al. A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR and isozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, **102**: 1190 - 1199.
- [ 16 ] Ma YK(马元考), Wang YZ(王云尊), Xu CB(许传宝). A new chestnut cultivar—'Yimeng short choots'. *China Fruits*(中国果树), 1998, **15**(1): 35 - 36.
- [ 17 ] Ming GD(明桂东), Zhang YY(张玉英). An excellent new chestnut 'Huafeng'. *China Fruits*(中国果树), 1995, **12**(3): 1 - 2.
- [ 18 ] Hamrick JL. Isozyme and analysis of genetic structure in plant population. In: Solits DE, Solits PS, eds. *Isozymes in Plants Biology*. Portland, Ore: Dioscorides Press, 1989, pp. 87 - 105.
- [ 19 ] Hamrick JL, Godt MJW. Allozyme diversity in plant species. In: *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources*. Sunderland: 1990, pp. 43 - 63.
- [ 20 ] Schaal BA, Hayworth DA, Olsen KM, et al. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology*, 1998, **7**: 465 - 474.
- [ 21 ] Wright S. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 1951, **15**: 323 - 354.
- [ 22 ] Hogbin PM, Perkal R. Evaluation of the contribution of genetic research to the management of the endangered plant *Zieria prostrate*. *Conservation Biology*, 1999, **13**: 514 - 522.