以 ISSR DNA 標誌用於苦瓜遺傳變異及品種鑑定之研究[1]

黃佳興[2] 王啓正[2] 全中和[3]

摘 要

爲了進行苦瓜品種的分子鑑定，本研究使用 27 個 ISSR 分子標誌對 38 個苦瓜品種（系）進行遺傳分析，共產生 247 個條帶，其中 115 個具多型性，平均每個引子提供 4.25 個多型性條帶，各引子產生多型性條帶數目從 0 至 9 皆有，分子量範圍從 150 至 2700 bp，品種（系）間最低和最高的遺傳相似性分別是 0.508 和 0.969。群集分析結果顯示野生種和經濟栽培品種的遺傳相似性最低，而經濟栽培種間的相似度最高。另外，針對本研究收集的 18 個台灣栽培種及東南亞栽培種之後代進行品種鑑定發現只需 6 個 ISSR 引子即可有效的區分這 18 個品種（系），表示 ISSR 分子標誌可有效且方便的運用在苦瓜品種鑑定上，在苦瓜的遺傳相似性研究中發現台灣的野生種苦瓜比本國及東南亞的栽培種在親遺傳相似度上較小，這可作爲苦瓜育種工作上的參考。

（關鍵詞：苦瓜、品種鑑定、簡單序列重複區間）

1.行政院農業委員會花蓮區農業改良場研究報告第 219 號。

2.行政院農業委員會花蓮區農業改良場作物改良課助理研究員。

3.行政院農業委員會花蓮區農業改良場作物改良課副研究員。

前 言

苦瓜（bitter gourd）又名錦荔枝、癩葡萄、癩瓜等；學名爲*Momordica charantia* L.爲葫蘆科一年生蔓性草本作物，原產於亞洲熱帶地區，主要栽培於亞洲的日本、中國、菲律賓、馬來西亞、印尼等國家（劉及李，1995）。台灣地區苦瓜年栽培面積接近2000公頃，栽培歷史悠久，品種以大白苦瓜爲主，綠皮大苦瓜居次，台灣原有野生種苦瓜在東部及中南部的平原至低海拔山區的田野間或荒郊野外很常見，果實小，一般在30公克以內，果形多爲短橢圓形、紡錘形及圓形，果色大多是綠色至深綠色，因此台灣野生苦瓜種原似乎與栽培種有所差異。

國際間目前新品種鑑別的主要方法仍是利用植物性狀加以區別，但若是發生侵權案件時，除了植物性狀外，如果能有分子層次的証據加以輔佐相信會更具有的公信力，且分子層次的方法目前雖然有部份的限制，但卻有較傳統方法更爲快速和無需栽培進行調查的優點。目前廣泛利用在品種和親源鑑定的分子標誌技術包括 RAPD（Random Amplification of Polymorphic DNA）、ISSR（Inter Simple Sequence Repeats）、AFLP（Amplified Fragment Length Polymorphism）及 SSR（Simple Sequence Repeats）（林，2005），每一種技術皆有其優點及其限制，但對苦瓜基因體的研究仍然極少，所以只能以不需太多遺傳資訊又便利的 RAPD 及 ISSR 爲主，其中 RAPD 最爲簡單，引子的長度 10 個核苷酸，設計容易，但再現性較低，而 ISSR 因引子多爲 16-22 個核苷酸略微改善了 RAPD 再現性較低的問題（Pasqualone *et al.* 2001），且 ISSR 更是一個簡便、低成本且有效的方法，適合用於大量樣品之研究（Fang and Roose，1997）。

ISSR 技術就是利用植物基因組存在許多具有明顯多型性表現之簡單重複序列，又稱微衛星序列（microsatellite），不同種或品種間亦具有明顯的多型性表現（Akkaya *et al.*，1992），此方法以簡單序列重複的 3'或 5'端加上一至三個寡核苷酸爲引子，進行 PCR 反應，可擴增出含基因組上 SSR 區域鄰近之片段，且具有高度的多型性，可用於鑑別物種。1995 年開始便有研究人員利用 ISSR 進行作物親緣和品種鑑定，且自 2004 年之後原本較常使用的 RAPD 技術的研究已相對較少，多以其他多種技術爲主，尤以 ISSR 爲重要，例如棉花（Liu and Wendel，2001）、茶樹（Mondal，2002）、橄欖（Terzopoulos *et al.*，2005）、甘蔗（Srivastava and Gupta，2008）、茄子（Isshiki *et al.*，2008），草莓（Hussein *et al.*，2008）、稻米（Reddy *et al.*，2009）及莎草（Denduangboripant *et al.*，2010）均利用 ISSR 技術進行遺傳歧異度和品種鑑定之研究。行政院農業委員會花蓮區農業改良場從 1998 年開始進行苦瓜品種的改良，利用野生種苦瓜爲育種材料，至 2009 年以來已育成苦瓜花蓮 1 號、花蓮 2 號、花蓮 3 號、花蓮 4 號及許多優良自交系及雜交一代新品系（全，2007），因此本研究希望利用所收集之台灣及東南亞之苦瓜品種（系），建立苦瓜品種 ISSR 分子標誌之資料庫，以作爲新品種鑑定及育種之參考資料。

材料與方法

一、試驗材料

採用苦瓜品種(系)共計 38 個，包含苦瓜品種花蓮 1 號、花蓮 2 號、花蓮 3 號、花蓮 4 號及其親本，另以目前市售的苦瓜品種小月、高月、華綠等經濟栽培品種作爲對照（表一），進行 DNA 指紋分析與品種（系）間遺傳相似度之評估。

二、DNA 萃取

每品種（系）選 3 株爲樣本，採取嫩葉 80-120 mg，以液態氮磨碎後利用 GeneMark Plant Genomic DNA Purification Kit 進行 DNA 萃取，萃取得之 DNA 以 IMPLEM nanophotometer 光電比色計測定 OD_{260}/OD_{280} 之比值，並以 OD_{260} 值計算 DNA 濃度，分別稀釋成濃度爲 20 ng / l，以進行 ISSR 分子標誌分析。

三、ISSR 分子標誌分析

ISSR 分析用之引子取自 UBC SSR primer oligonucleotide set 100/9（John Hobbs, NAPs Unit, University of British Columbia, Vanconver, V6T123, Canada），共計 80 條，PCR 反應體積爲 20 l，內含 1Unit *Taq* DNA 聚合酶（Invitrogen）、1X PCR buffer、1.5mM $MgCl_2$、0.2mM dNTP、0.8mM 引子及 40ng DNA 模板，PCR 儀器爲 96-Well GeneAmp PCR System 9700（Applied Biosystems），溫度設定爲 94℃ 5 分鐘，再進行 42 次的 94℃ 30 秒，53-57℃ 40 秒，72℃ 1 分 50 秒，最後進行 72℃ 7 分鐘，將反應後之產物以電泳進行分析。

四、DNA 電泳分析

經 ISSR 引子分析之 PCR 反應產物 20μl 加入 4μl 的 6 X DNA loading dye，以 2% agarose 膠體，0.5X TBE（45 mM Tris–HCl, pH 8.3, 45 mM boric acid, 1 mM EDTA）的電泳緩衝液進行 DNA 電泳，電泳槽爲 BIO-RAD sub Cell（G7），電壓 110V，電泳時間約 90-100 分鐘，結束後置於 0.5 mg/ml 的 EtBr（溶於 0.5X TBE buffer）中染色 20 分鐘，並以清水退染約 10 分鐘，再置於紫外燈箱中，檢視膠體上 DNA 多型性片段，並利用 Gel catcher1200 影像系統照相，以進行 DNA 條帶之分析。

五、PCR 產物之群集分析

選擇 ISSR 反應中較明顯的條帶，以 1 代表存在，0 代表缺乏，利用 NT-SYS 2.0(Exeter Software, NY, USA; Rohlf, 1998）軟體中的 SIMQUAL 程式估計各品種（系）間的 Dice's 相似性係數，計算方式爲 F=2Nab/Na+Nb，Nab 代表品系 A 和 B 共有的條帶，Na 和 Nb 分別代表樣品 A 和 B 的片段(Nei and Li，1979），並利用 SAHN 程式以 UPGMA（unweighted pair group method with arithmetic average）法進行群集分析及繪製樹狀圖。

表一、ISSR 分析用之苦瓜材料

Table 1. Bitter gourd accessions used in ISSR-based diversity analysis.

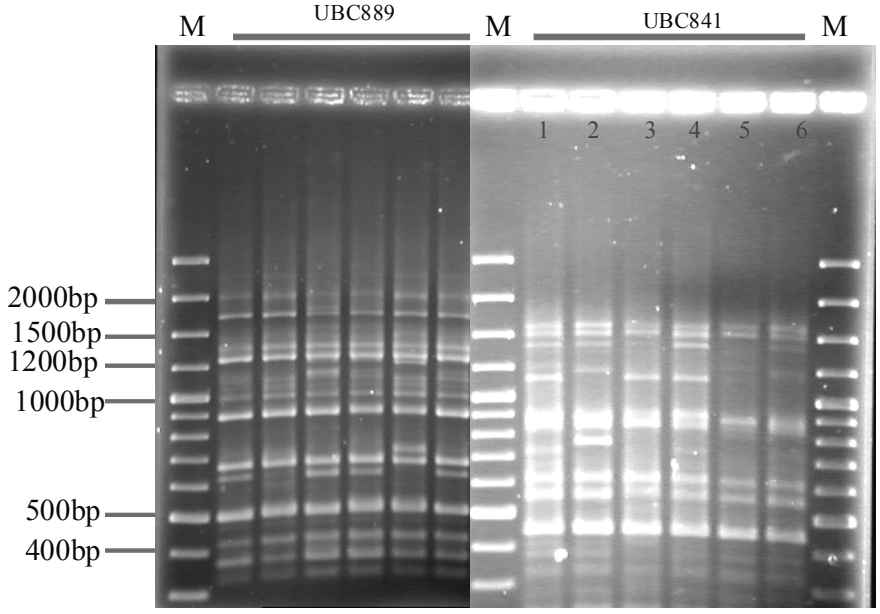
Accession	Population type and origin
HM	Gau Yue（cultivar）
MH	Yue Hua（cultivar）
HG	Hua Liu（cultivar）
WAP	Bai Ping Guo（cultivar）
TP	Tsuei Fei（cultivar）
PT	Bi Tsuei（cultivar）
GAP	Ching Ping Guo（cultivar）
SM	Shaiu Yue（cultivar）
Hu-No1	Hualien No 1
Hu-No2	Hualien No 2
Hu-No3	Hualien No 3
Hu-No4	Hualien No 4
HMP90114	Breeding line（from Philippines cultivar）
HMA94128	Breeding line（from Malaysia cultivar）
HMT537	Breeding line（from Thailand cultivar）
HMJ167	Breeding line（from Ryukyu Islands cultivar）
HMI5173	Breeding line（from India cultivar）
HMV2362	Breeding line（from Vietnam cultivar）
HMS135	Breeding line（inbred）
HM3158	Breeding line（inbred）
HM4181	Breeding line（inbred）
HM421965	Breeding line（inbred）
WB5523	Breeding line（F1）
WB5581	Breeding line（F1）
HM3155	Breeding line（inbred）
HM4	Breeding line（inbred）
HMK8923	Breeding line（inbred）
WB5281	Breeding line（F1）
WB2318	Breeding line（F1）
HM37263	Breeding line（inbred）
HM37265	Breeding line（inbred）
HMU224	Breeding line（inbred）
WM	Wild species（collected from Yue Mei）
WP	Wild species（collected from Bei Pu）
WTS	Wild species（collected from Chi Shani）
WTT	Wild species（collected from Ji Chi）
WS	Wild species（collected from Shin Se）
WK	Wild species（collected from Guang Fu）

結果與討論

一、苦瓜品種（系）ISSR 分子標誌親緣分析

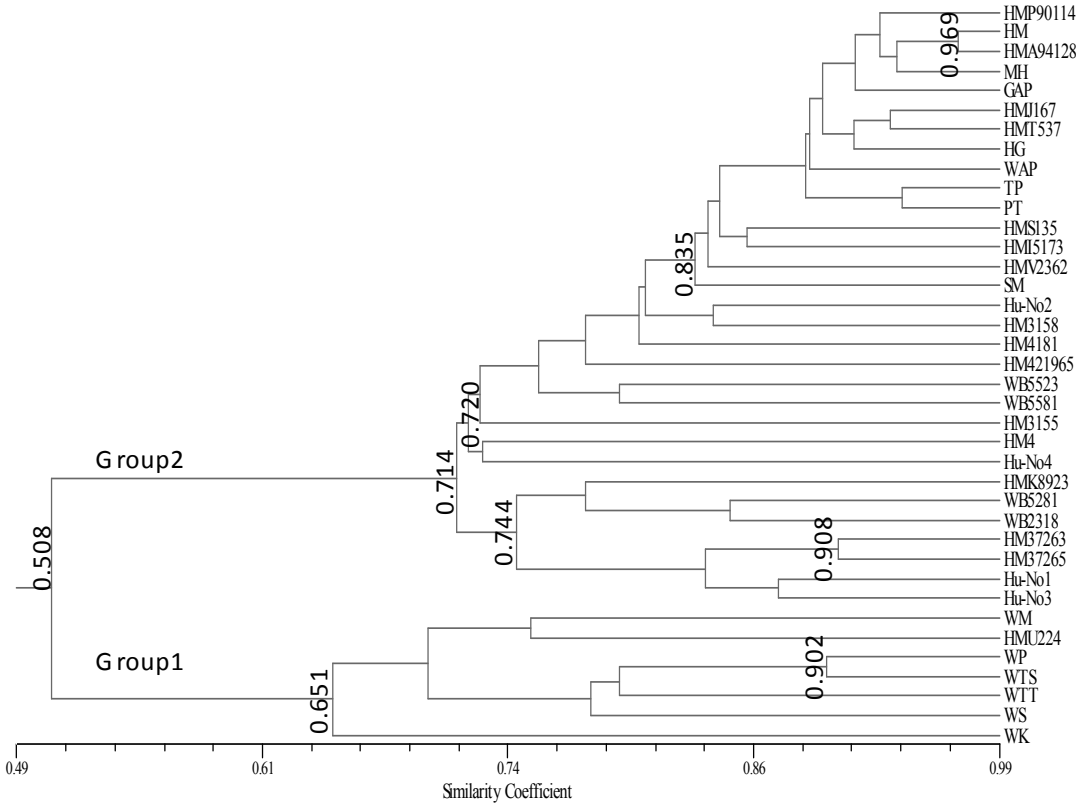
80 個 ISSR 引子其中具明顯多型性的有 27 個 ISSR 引子，共產生 247 個較明顯的條帶，平均每一引子可產生 9.19 個條帶，條帶數爲 0 到 15 個，如 UBC839 和 UBC801 產生的條帶數爲 0（資料未發表），以 UBC889 和 UBC841 產生的條帶數最多，分別爲 15 和 13 個（圖一）。其中 115 個具多型性，平均每一引子可產生 4.26 個多型性條帶，多型性比例爲 47%（表二），條帶長度介於 150~2000 bp 之間，由群集分析可知各品種（系）間遺傳相似性係數從 0.508 至 0.969，可將 38 個苦瓜品種（系）劃分成兩大群，兩大群之間遺傳相似度爲 0.508（圖二），第一群共 7 個品種（系），包含了本研究收集的所有野生種及地方種苦瓜，如 WM、WP、WTS、WTT、WS 及 WK 等，第二群共 31 個品種（系），則包含了花蓮場育成的新品種及國內與國外的經濟栽培品種及育種用之親本材料，各品種（系）間遺傳相似性係數從 0.714 至 0.969，以 HMA94128 和 HM 這兩個品種（系）遺傳組成最爲接近，遺傳相似性係數達 0.969，而第二大群中國內外的經濟栽培品種間遺傳組成最接近，遺傳相似度爲 0.835 至 0.969，代表各國的經濟栽培品種在 ISSR DNA 分子標誌層次差異性極小。

從 ISSR 引子分析的親緣關係樹狀圖的結果看來，經濟栽培品種和野生種位於兩端，而新品種苦瓜花蓮 1、2、3 及 4 號介於兩者之間，可見 ISSR 引子產生之分子標誌可有效用於區分商業品種和野生種，而台灣的野生品種間以 WP、WTS 遺傳相似性係數最高 0.902，而 WM 和 WK 之間最僅爲 0.651，顯示國內各地的野生種間遺傳相似度上存在相當的變異；而台灣的野生種苦瓜比本國及東南亞的栽培種在相似度較小，在未來可作爲苦瓜育種的參考。



圖一、不同品種苦瓜以 ISSR 引子 UBC889 及 UBC841 擴增結果

Fig. 1.Amplification profiles of 6 cultivars(lines)of bitter gourd by using ISSR primers UBC889 and UBC841. M: Gene100 DNA ladder.
1:WB5281. 2:WB2318. 3:HM37263. 4:Hu-No1. 5:Hu-No2. 6:Hu-No3.



圖二、苦瓜品種（系）以 Dice's coefficient 爲基礎進行群集分析之遺傳相似性分析樹狀圖

Fig. 2.Genetic similarity relationships based on Dice's coefficient of similarity cluster analysis of bitter gourd（*Momordica charantia* L.）.

本研究結果顯示，以兩個核苷酸序列重複（di-nucleotide motif）的引子進行 PCR 反應可產生較多的條帶，與 Wang 等人(1994)年的研究相符合，但表二的結果發現雖然引子同樣是兩個核苷酸序列重複，但不同的核苷酸組成多型性條帶數差異極大，本研究中有 7 條 AG 或 GA、12 條 AC 或 CA、3 條 TC 或 CT 及 5 條 GT 或 TG 重複的的引子產生的條帶具多型性，Nagaoka 等人（1997）研究小麥時 AG 和 AC 的多型性引子數皆爲 9 個，也比 CT 和 TG 的多型性引子數 6 個較多，與本研究結果相符，表示在不同作物中以 di-nucleotide motif 所構成的引子在應用上會呈現一致的結果。AG、AC、TC 及 GT 組成引子平均產生的多型性條帶在本研究中則介於 3.6~5 之間，差異並不明顯（表二）。從本結果發現當引子的重複序列其中一個核苷酸是 G 或 C 而另一個是 A 或 T 時，所產生的條帶最多，如果兩個核苷酸都是 GC 或 AT 時，產生的條帶就較少，尤其是由 AT 組成的 di-nucleotide motif 幾乎都沒有條帶產生（資料未發表），這可能是因爲引子鍊合溫度決定於引子序列的（G+C）百分比，當（G+C）百分比低時，引子鍊合溫度便跟著降低，也就造成引子無法鍊合，因此建議未來可直接省略單純 AT 重複組成的引子，以減少不必要的工作。

Behera 等人（2008a, 2008b）收集 38 個來自印度的苦瓜品種，利用 15 個 ISSR 引子可獲得 125 個條

帶，有 94 個爲多型性條帶，多型性條帶的比率爲 74.7%，而本試驗所收集的 38 個苦瓜品種，可利用 27 個引子獲得 247 個條帶，有 115 條爲多型性條帶，多型性條帶的比率爲 46.6%（表二）。二個實驗中皆有使用的引子包括 UBC809、UBC825、UBC840、UBC841、UBC848、UBC880、UBC888、UBC889 及 UBC890，Behera 等人（2008b）在這 9 個引子可獲得 77 個條帶，其中 51 個具多型性，而本實驗中可獲得 83 個條帶，其中只有 37 個具多型性，而其中 UBC841 引子在 Behera 等人（2008b）的實驗中所有的條帶都不具多型性，但在本實驗中則具有 9 個多型性的條帶，或許是所收集的品種來源不同所致。而由本實驗結果顯示兩個主要的群落（group）親緣相似係數爲 0.508，而 Behera 等人（2008b）的結果爲 0.57，顯示兩實驗間收集的苦瓜種源遺傳歧異度相距不大。

表二、27條ISSR引子分析38個苦瓜品種（系）之結果

Table 2. The result of 27 ISSR primers used for analyzing 38 cultivars（lines）of bitter gourd.

Primer	Sequence[Y]	TNB[X]	NPB（AVB）[Z]	PB（%）	Product Size（bp）
UBC 809	（AG）$_8$G	9	4	44	400-1200
UBC 834	（AG）$_8$YT	9	5	56	300-1500
UBC 836	（AG）$_8$YA	12	5	42	150-1000
UBC 835	（AG）$_8$YC	7	1	14	200-1500
UBC 810	（GA）$_8$T	11	5	45	200-1500
UBC 840	（GA）$_8$YT	9	2	22	300-2000
UBC 841	（GA）$_8$YC	13	9	69	200-1800
	GA+AG	70	31（4.4）	44.3	
UBC 818	（CA）$_8$G	6	3	50	400-1500
UBC 846	（CA）$_8$RT	7	4	57	600-2000
UBC 847	（CA）$_8$RC	7	2	29	500-1500
UBC 848	（CA）$_8$RG	8	4	50	300-1500
UBC 888	BDB（CA）$_8$	8	4	50	400-2000
UBC 816	（CA）$_8$T	6	4	67	500-1600
UBC 889	DBD（AC）$_8$	15	7	47	300-2000
UBC 826	（AC）$_8$C	9	3	33	300-2000
UBC 825	（AC）$_8$T	9	4	44	400-2000
UBC 855	（AC）$_8$YT	12	6	50	300-2000
UBC 827	（AC）$_8$G	10	7	70	300-2000
UBC 856	（AC）$_8$YA	12	3	25	400-1800
	AC+CA	109	51（4.2）	46.8	
UBC 822	（TC）$_8$A	8	6	75	400-2000
UBC 844	（CT）$_8$RC	13	6	43	300-2500
UBC 814	（CT）$_8$A	11	3	27	400-1500
	CT+TC	32	15（5）	46.9	
UBC 851	（GT）$_8$YG	7	4	57	500-1400
UBC 890	VHV（GT）$_8$	12	3	25	400-1600
UBC 828	（TG）$_8$A	4	2	50	600-1200
UBC 830	（TG）$_8$G	7	6	86	400-200
UBC 860	（TG）$_8$RA	6	3	50	400-1700
	TG+GT	36	18（3.6）	50	
Total		247	115	46.6	

[Z]NPB：Number of polymorphic bands. AVB：Average of polymorphic bands.

[Y]Y:（C,T）;R:（A,G）;B:（C,G,T）;D:（A,G,T）;V（A,C,G）;H（A,C,T）

[X]TNB: Total number of bands

苦瓜的品種或親緣鑑定以 Behera（2008a, 2008b）研究最多，其中使用了 RAPD、ISSR 及 AFLP 技術，雖然在他們的研究以 AFLP 分析結果的區別性較高，但 RAPD 和 ISSR 也具有鑑別力。在本研究則是選擇 ISSR 的方式，因爲 ISSR 雖然較之 AFLP 的區別性差，但其再現性還是優於 RAPD，且較 AFLP 便利。

在 Behera 等人（2008b）印度苦瓜的親緣研究中，以 RAPD 和 ISSR 的遺傳相似性樹狀圖最爲接近，但 AFLP 圖譜有相當大的差異，而 RAPD 和 ISSR 兩種方法顯示大部份印度的苦瓜品種遺傳相似係數皆在 0.7 以上，分析本研究收集的 38 個品種（系）中 HMI5173 也是源自印度的栽培種，其他東南亞包含印度、馬來西亞、菲律賓、越南、泰國及琉球的經濟栽培種之後代純化品系及台灣的栽培種小月、高月、月華、白蘋果、青蘋果、華綠、碧翠及翠妃，可發現其在親緣關係圖上這些品種（系）聚集在一起，且遺傳相似度也在 0.835 以上（圖二），代表東南亞各國的地方種及栽培種遺傳相似性極高，且與第一群在本研究中收集之台灣的野生種遺傳相似性較低，這也代表台灣的原生苦瓜在育種上是一非常重要的種源，具有相當大的遺傳歧異度，可育出更多樣化的苦瓜品種。

二、台灣及東南亞栽培種選拔後代苦瓜品種鑑定分析

品種鑑定選擇台灣的栽培品種和東南亞栽培種的後代純化品系共 18 個品種（系），利用 ISSR 引子產生的條帶進行分析，由表三的結果可知 UBC816、UBC844、UBC846 及 UBC855 中任何一個引子皆可產生小月（SM）的專一性圖譜，共計有包含花蓮 1、2、3 及 4 號在內的 16 個品種（系）可經由一個特定引子產生的專一性的圖譜加以鑑定，而高月（HM）和 HMJ167 這 2 個品種（系）則同時需要兩個以上的 ISSR 引子方可鑑別，HM 在使用兩個引子鑑別時，只能利用 UBC827+UBC855，HMJ167 在使用兩個引子鑑別時，則有 10 種組合能加以鑑別；在品種（系）專一性條帶的部份，包含 SM（UBC846）、PT（UBC841）、WAP（UBC809）、Hu-No1（UBC827）、Hu-No3（UBC836 和 UBC41）、Hu-No4（UBC822、UBC825 和 UBC827）、HMT537（UBC841）、HMT5173（UBC844）、HMV2362（UBC855）共計 9 個品種（系）可經由單一引子產生的專一性條帶加以鑑別，其中以 UBC844 及 UBC855 這兩這條引子的鑑別力最好，可由其電泳圖譜產生的 6 個多型性條帶有效的鑑別 5 個品種，而 UBC841 產生 9 個多型性條帶是最多，雖然只能同時鑑別 4 個品種，但所產生的條帶中有 3 個分別爲 PT、Hu-No3 及 HMT537 的專一性的條帶，或許未來可經由專一性條帶的序列設計品種專一性的引子，從本結果可知只需利用 UBC809、UBC827、UBC841、UBC855 這 4 個引子加上 UBC818 或 UBC825 及 UBC826 或 UBC851 共計 6 個 ISSR 引子即可有效鑑定這 18 個品種系，在本結果也顯示引子所產生的多型性條帶數愈多，在品種鑑定的鑑別力上就愈佳。

表三、鑑別苦瓜栽培品種（系）的 ISSR 引子

Table 3. ISSR primer used in bitter gourd variety identification.

Cultivar/line	PNI[Z]	Primer code[Y]
SM	1	UBC816、UBC844、UBC846*、UBC855
PT	1	UBC830、UBC841*
TP	1	UBC830、UBC855
HM	2	UBC827+UBC855
MH	1	UBC827
HG	1	UBC827
WAP	1	UBC809*、UBC834、UBC836
GAP	1	UBC826、UBC851
Hu-No1	1	UBC822 、 UBC826 、 UBC827* 、 UBC836 、 UBC841 、 UBC844 、 UBC851、UBC854、UBC856、UBC888
Hu-No2	1	UBC827、UBC836、UBC854、UBC856、 UBC889
Hu-No3	1	UBC814、UBC822、UBC830、UBC836*、UBC841*、UBC844、UBC856
Hu-No4	1	UBC822* ； UBC825* ； UBC827* 、 UBC844 、 UBC846 、 UBC848 、 UBC855、UBC856
HMT537	1	UBC841*、UBC848
HMI5173	1	UBC809、UBC814、UBC816、UBC844*、UBC888
HMV2362	1	UBC848、UBC851、UBC855*
HMP90114	1	UBC818、UBC825
HMA94128	1	U BC809、UBC855
HMJ167	2	UBC830+UBC814 、 UBC830+UBC841 、 UBC830+UBC848 、 UBC830+UBC888 、 UBC830+UBC844 、 UBC830+UBC855 、 UBC827+UBC844 、 UBC841+UBC822 、 UBC827+UBC841 、 UBC822+UBC844

[Z] PNI：Primers need for bitter gourd identification

[Y]*：Variety specific band produced by the primer.

結　論

目前全球各國單純使用分子標誌作爲品種鑑定的依據並不多，但分子標誌用在品種鑑定有其便利性，因爲不論在任何生長時期，甚至是採收後的果實都可抽取 DNA 進行鑑定，但目前仍有許多部分尚未解決，例如當分子標誌產生的相似度在多少以上時爲相同的品種，多少以上時又是衍生品種，以及用條帶區分時，多少條帶以上的差異才具有鑑別力，這些都尚待研究人員努力建立一個統一標準的平台；在國內包含西瓜、甘藷及山木麻黃的研究也都使用 ISSR 進行相關親緣及品種鑑定的研究(何等人 2004；王等人 2005；簡等人 2009）；從本研究的結果可發現利用 ISSR 可做爲苦瓜親源及品種鑑定的一個良好工具，也希望本研究結果可供苦瓜育種人員做爲育種工作時的參考。

參考文獻

1.王昭月、張有明、沈百奎、王毓華、劉邦基 2005 利用 RAPD 與 ISSR 分子標誌鑑定西瓜品種 台灣農業研究 54：257~269。

2.全中和 2007 藥食兩用的東方蔬菜-苦瓜 科學發展 48：10~13。

3.何坤益、楊政川、鄧書麟、陳財輝 2004 應用 ISSR 解析山木麻黃國際種原之遺傳變異與種原關係 台灣林業科學 19（1）:79-88。

4.林順福 2005 作物品種之 DNA 鑑定技術 二十一世紀農業發展與新興科技應用研討會 P25-35。

5.劉政道、李碩朋 1995 苦瓜 台灣農家要覽 增修訂再版 農作篇（二）p.399-404 豐年社編印。

6.簡靖華、賴永昌、陳一心、林順福 2009 台灣甘藷品種之 ISSR DNA 標誌變異研究 台灣農學會報 10（4）：255-271。

7.Akkaya, M. S., A. A. Bhagwat, and P. B. Cregan. 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean genet. Genetics 132:1131-1139.

8.Behera, T. K., A. B. Gaikward, A. K. Singh and J. E. Staub. 2008a. Relative efficiency of DNA markers（RAPD, ISSR and AFLP）in detecting genetic diversity of bitter gourd（Momordica charantia *L.*）. J. Sci. Food Agric. 88:733-737.

9.Behera, T. K., A. K. Singh and J. E. Staub. 2008b. Comparative analysis of genetic diversity in Indian bitter gourd(Momordica charantia *L.*)using RAPD and ISSR markers for developing crop improvement strategies. Sci. Hortic. 115: 209-217.

10.Denduangboripant, J., S. Setaphan, W. Suwanprasart and S. Panha. 2010. Determination of local tobacco cultivars using ISSR molecular marker. Chiang Mai J. Sci. 37（2）:293-303.

11.Fang, D. Q. and M. L. Roose. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. Theor. Appl. Genet. 95:408-417.

12.Hussein, T. S., A. A. Tawfik and M. A. Khalifa. 2008. Molecular identification and genetic relationships of six strawberry varieties using ISSR markers. Int. J. Agri. Biol., 10: 677–680.

13.Isshiki, S. N. Iwata and M. R. Md. Khan. 2008. ISSR variations in eggplant（*Solanum melongena* L.）and related *Solanum* species. Sci. Hortic. 117（3）:186-190.

14.Liu, B. and J. F. Wendel. 2001. Inter simple sequence repeat（ISSR）polymorphisms as a genetic marker system in cotton. Molecular Ecology Notes 1:205-208.

15.Mondal, T. K. 2002. Assessment of genetic diversity of tea(Camellia sinensis(*L.)O. Kuntze*)by inter simple sequence repeat polymerase chain reaction. Euphytica 128:307-315.

16.Nagaoka T. and Y. Ogihara. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 94:597-602.

17.Nei, M. and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Soc. U. S. A. 76:5269-5273.

18.Pasqualone, A., F. Caponio, and A. Blanco. 2001. Inter simple sequence repeat DNA markers for identification of drupes from different Olea europea *L*. cultivars. Eur. Food Res. Technol. 213:240-243.

19.Reddy, S. C., A. P. Babu, B. P. M. Swamy, K. Kaladhar and N. Sarla. 2009. ISSR markers based on GA and AG repeats reveal genetic relationship among rice varieties tolerant to drought, flood, or salinity. J. Zhejiang Univ. Sci. 10（2）:133–141.

20.Srivastava, S., and P.S .Gupta. 2008. Inter simple sequence repeat profile as a genetic marker system in sugarcane. Sugar Tech Springer 10（1）: 48-52.19.

21.Terzopoulos, P. J., B. Kolano, P. J. Kaltsikes, and I. Metzidakis. 2005. Identification of *Olea europaea* L. cultivars using inter-simple sequence repeat markers. Sci. Hortic. 105:45-51.

22.Wang, Z., J. L. Weber, G. Zhong, and S. D. Tanksley. 1994. Survey of plant short random DNA repeats. Theor. Appl. Genet. 88:1-6.