

基于 SRAP 分子标记技术研究浙江产细叶石仙桃的遗传多样性

朱欣, 蒋晓颖, 金魏佳, 吕奕, 何佳, 范灵希, 高松, 蒋明*

台州学院生命科学学院, 浙江椒江 318000

摘要: 目的 以药用植物细叶石仙桃为材料, 利用 SRAP 分子标记技术进行遗传多样性研究, 为进一步开展该物种的保护奠定基础。方法 从 81 对 SRAP 引物组合中, 共筛选出 7 对用于 SRAP-PCR, 对浙江省境内 5 个自然居群的 68 份细叶石仙桃进行了遗传多样性分析。结果 共获得 197 个电泳谱带, 其中多态性条带为 190 条, 每对引物平均提供 27.29 个标记信息, 平均有效等位基因数目 (N_e) 为 1.238 1。在物种水平上, 多态位点百分率 (PPB) 为 96.45%, Nei's 基因多样性指数 (H) 为 0.188 2, Shannon's 信息指数 (I) 为 0.312 5; 在居群水平上, PPB 为 30.46%~46.19%, 平均为 40%, H 为 0.089 1~0.155 9, 平均 0.120 8, I 为 0.138 7~0.234 9, 平均 0.186 4; 5 个居群的基因分化系数 (G_{st}) 为 35.81%, 基因流 (N_m) 为 0.896 3。UPGMA 聚类结果表明, 68 份样品可分成 5 组, 同一居群的细叶石仙桃聚于同一分支。结论 细叶石仙桃具有较高的遗传多样性水平, 居群间也存在一定的遗传分化和基因交流, 但大部分遗传变异存在于居群内。

关键词: 珍稀植物; 细叶石仙桃; SRAP; 遗传多样性; 药用植物

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)13-3116-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.13.024

Genetic diversity analysis of *Pholidota cantonensis* in Zhejiang based on SRAP molecular marker technique

ZHU Xin, JIANG Xiao-ying, JIN Wei-jia, LV Yi, HE Jia, FAN Ling-xi, GAO Song, JIANG Ming

College of Life Science, Taizhou University, Jiaojiang 318000, China

Abstract: Objective To study the genetic diversity of medicinal plant *Pholidota cantonensis* Rolfe. by SRAP molecular marker technique, and to lay foundations for the protection of this species. **Methods** Seven pairs of primers were screened from 81 SRAP primer pairs, and used for SRAP-PCR; The genetic diversity of 68 *P. cantonensis* materials from five natural populations in Zhejiang Province was applied to analyze. **Results** Totally 197 reproducible bands were obtained, and 190 bands of which were polymorphic bands. Each primer pairs contributed 27.29 band on average, and the effective number of allele (N_e) was 1.238 1. At the species level, the percentage of polymorphic bands (PPB) was 96.45%, and the Nei's genetic diversity (H) and the Shannon's information index (I) were 0.188 2 and 0.312 5, respectively. At the population level, the PPB ranged from 30.46% to 46.19% with an average PPB of 40%, their H and I were 0.089 1—0.155 9 and 0.138 7—0.234 9, with average levels from 0.120 8 to 0.186 4, respectively. The coefficient of gene differentiation (G_{st}) for five populations was 35.81%, and the gene flow (N_m) was 0.896 3. The Unweighted Pair Group Method with Arithmetic (UPGMA) mean clustering results indicated that 68 samples were divided into five groups, and *P. cantonensis* plants from the same population were clustered into the same clade. **Conclusion** *P. cantonensis* showed a high level of genetic diversity, and its genetic differentiation as well as gene flow were found among the five populations; However, but the genetic differentiation happened mainly within each population.

Key words: rare plant; *Pholidota cantonensis* Rolfe.; SRAP; genetic diversity; medicinal plant

兰科 (Orchidaceae) 植物历史悠久, 种类繁多, 是单子叶植物中的第一大科。石仙桃属 *Pholidota* Lindl. ex Hook. 是兰科的一个重要类群, 含毛兰素、毛兰菲和苯丙素等多种药用成分, 是一类重要的中

草药^[1]。细叶石仙桃 *P. cantonensis* Rolfe. 是石仙桃属植物的一个重要物种, 生长于海拔 200~850 m 的林缘灌丛或岩石上, 主要产自浙江、江西、福建、台湾、湖南、广东和广西等地^[2]。细叶石仙桃为国

收稿日期: 2017-12-13

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目 (201610350007)

作者简介: 朱欣 (1995—), 女, 浙江嘉兴人, 本科生, 研究方向为药用植物分子生物学。

*通信作者 蒋明 (1973—), 男, 浙江嵊州人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为植物逆境生物学及其分子调控。

E-mail: jiangming1973@139.com

家濒危 II 级保护物种, 已列入《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES) 的保护范围^[3]。细叶石仙桃株型优美、花型奇特、果实玲珑可爱, 可用做观赏植物; 植株全草和假鳞茎可入药, 具有清热凉血、滋阴润肺和消肿止痛等药用功效^[4-5]。近年来, 由于细叶石仙桃的药用价值被逐渐认识, 观赏价值也不断受到重视, 人们的过度采挖导致资源遭到严重破坏; 加之对生存环境的要求较为严苛, 使用细叶石仙桃的资源逐渐减少, 对该物种的保护已迫在眉睫^[6]。

DNA 分子标记技术建立于 20 世纪 80 年代, 是广泛应用于遗传多样性研究的新型技术^[7]。相关序列扩增多态性 (sequence-related amplified polymorphism, SRAP) 由 Li 等^[8]于 2001 年开发, 是以 PCR 为基础的一种分子标记技术, 具有重复性好、稳定性高、操作简便和高共显性等优点^[9]。SRAP 利用基因外显子中 GC 含量丰富而启动子和内含子中 AT 含量丰富的特点设计引物, 对开放阅读框 (open reading frames, ORFs) 进行扩增, 以得到不同长度的谱带^[10]。SRAP 标记技术已广泛应用于遗传多样性分析、遗传图谱的构建、重要性状基因标记和比较基因组学等多方面的研究^[11-14]。近年来, 科研人员利用 SRAP 技术对一些珍稀或濒危植物进行了遗传多样性研究, 并提出了相应的保护措施^[15-16]。目前, SRAP 分子标记在细叶石仙桃遗传多样性中的研究未见报道, 本实验利用 SRAP 标记技术对细叶石仙桃开展遗传多样性研究, 为该物种的保护和可持续利用奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

细叶石仙桃采自白岩山 (BY)、天打岩 (TDY)、雁荡山 (YD)、九峰山 (JF) 和划岩山 (HY), 共 68 个样品, 各样品的位置信息如表 1 所示。各样品的距离均在 50 m 以上, 采集幼嫩叶片带回实验室, 用无菌水冲洗后擦干, 保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱用于 DNA 的提取。

1.2 仪器

伯乐 C1000 型 PCR 仪 (Bio-Rad 公司, 美国); 伯乐 Gel Doc XR⁺ 凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司, 美国); DYY-12 型电泳仪和电泳槽 (北京市六一仪器厂); SANYO MDF-382E 型超低温冰箱 (SANYO 公司, 日本); 艾本德 Eppendorf 移液枪 (Eppendorf 公司, 德国); BECKMAN Allegra 64R 高速冷冻离心机 (Beckman Coulter, 美国)。

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取和检测

取细叶石仙桃的幼嫩叶片, 置于研钵中, 加入液氮快速研磨至粉末状, 用新型植物基因组 DNA 快速提取试剂盒 (北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司) 提取基因组总 DNA。使用 DYY-12 型电泳仪, 用 1.0% 琼脂糖凝胶 (含溴化乙锭) 电泳检测后备用。

2.2 SRAP-PCR 扩增

SRAP-PCR 的反应总体积为 20 μL : 2 μL 10 \times Buffer (含 20 mmol/L Mg^{2+})、0.5 μL 10 mmol/L dNTPs、上/下游引物 (20 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL 、0.5 μL DNA 模板 (约 30 ng)、0.4 U Taq DNA 聚合酶, 加 ddH₂O 至终体积。SRAP-PCR 的反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 35 $^{\circ}\text{C}$ 复性 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 5 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像系统拍照记录。

2.3 SRAP 数据处理及分析

根据 SRAP-PCR 电泳结果, 以 100 bp Ladder III 为标准相对分子质量进行条带统计, 有条带时赋值为“1”, 无条带时赋值为“0”, 构建 0/1 矩阵图; 利用 POPGENE version 1.32 软件对条带统计数据进行分析, 计算多态性位点百分率 (PPB)、Nei's 基因多样性指数 (H)、Shannon's 指数 (I)、居群间基因流 (N_m) 和基因分化系数 (G_{st}) 等相关数据信息^[17]; 运用 NTSYS-PC 2.1 软件进行聚类分析, 构建不同居群细叶石仙桃的系统发育树。

3 结果与分析

3.1 SRAP-PCR 结果

从 81 对通用引物中筛选得到 7 对引物, 组合分别是 ME-1/em-4、ME-2/em-6、ME-3/em-7、ME-5/em-2、ME-5/em-5、ME-6/em-7 和 ME-9/em-5, 利用这些引物可获得清晰、多态性好和重复性高的电泳条带 (表 2)。细叶石仙桃 SRAP-PCR 扩增的结果表明, 68 个样品共检测到 197 个特异性条带, 其中多态性条带 190 个, PPB 为 96.45%, 平均每对引物扩增得到 27.29 个条带 (图 1)。不同的引物组合检测到的位点数差距较大, 其中 ME-3/em-7 组合的多态性位点最多, 有 34 个; 位点数最少的是 ME-2/em-6 组合, 仅有 18 个。

3.2 聚类分析

根据 SRAP 扩增结果, 利用 NTSYS-PC (Version 2.1)

表 1 样品的位置信息

Table 1 Location information of samples

样点编号	经度 (E)	纬度 (N)	海拔/m	样点编号	经度 (E)	纬度 (N)	海拔/m
BY-1	121°30'31.85"	28°49'9.57"	179	YD-5	121°4'33.79"	28°21'45.74"	284
BY-2	121°30'26.63"	28°49'3.86"	238	YD-6	121°4'36.37"	28°21'43.86"	241
BY-3	121°30'19.00"	28°49'4.00"	261	YD-7	121°4'34.94"	28°21'42.78"	220
BY-4	121°30'21.17"	28°49'1.59"	288	YD-8	121°4'17.92"	28°21'15.20"	360
BY-5	121°30'25.86"	28°49'0.55"	308	YD-9	121°4'11.03"	28°21'14.66"	324
BY-6	121°30'21.47"	28°49'0.03"	309	YD-10	121°4'12.04"	28°21'20.35"	247
BY-7	121°30'14.66"	28°48'51.37"	347	YD-11	121°4'1.69"	28°21'14.82"	299
BY-8	121°30'9.95"	28°48'42.70"	193	YD-12	121°3'45.94"	28°20'57.75"	398
BY-9	121°30'16.48"	28°48'44.89"	284	YD-13	121°3'39.68"	28°20'56.80"	324
BY-10	121°30'7.00"	28°48'43.00"	221	JF-1	121°16'28.80"	28°38'8.19"	294
BY-11	121°30'20.12"	28°49'3.15"	267	JF-2	121°16'27.12"	28°38'8.00"	285
BY-12	121°30'21.00"	28°49'5.00"	255	JF-3	121°16'25.25"	28°38'10.11"	261
TDY-1	121°17'52.51"	28°37'23.70"	115	JF-4	121°16'56.00"	28°38'15.00"	150
TDY-2	121°17'52.95"	28°37'21.43"	127	JF-5	121°16'53.72"	28°38'13.27"	154
TDY-3	121°17'52.65"	28°37'18.81"	163	JF-6	121°16'51.00"	28°38'13.00"	152
TDY-4	121°17'50.27"	28°37'22.33"	170	JF-7	121°16'51.39"	28°38'16.13"	180
TDY-5	121°17'49.65"	28°37'18.10"	237	JF-8	121°16'47.14"	28°38'14.64"	170
TDY-6	121°17'45.62"	28°37'22.34"	220	JF-9	121°16'46.16"	28°38'17.92"	220
TDY-7	121°17'42.93"	28°37'21.01"	266	JF-10	121°16'38.41"	28°38'20.29"	140
TDY-8	121°17'44.68"	28°37'18.78"	297	JF-11	121°16'36.40"	28°38'22.35"	145
TDY-9	121°17'46.09"	28°37'16.73"	296	HY-1	121°8'41.20"	28°41'42.80"	329
TDY-10	121°17'45.66"	28°37'25.70"	176	HY-2	121°8'42.05"	28°41'38.80"	300
TDY-11	121°17'44.13"	28°37'26.10"	193	HY-3	121°8'38.61"	28°41'35.03"	268
TDY-12	121°17'42.54"	28°37'25.23"	211	HY-4	121°8'45.11"	28°41'38.07"	324
TDY-13	121°17'42.57"	28°37'24.31"	238	HY-5	121°8'50.73"	28°41'38.38"	394
TDY-14	121°17'43.43"	28°37'22.72"	248	HY-6	121°8'51.58"	28°41'35.35"	395
TDY-15	121°17'39.52"	28°37'22.85"	261	HY-7	121°8'42.39"	28°41'29.64"	335
TDY-16	121°17'39.85"	28°37'24.16"	248	HY-8	121°8'33.77"	28°41'25.69"	257
TDY-17	121°17'38.93"	28°37'28.19"	206	HY-9	121°8'45.58"	28°41'18.90"	167
TDY-18	121°17'35.06"	28°37'27.55"	230	HY-10	121°8'45.29"	28°41'24.15"	260
YD-1	121°4'16.38"	28°21'40.45"	296	HY-11	121°8'55.30"	28°41'22.65"	311
YD-2	121°4'24.66"	28°21'40.60"	214	HY-12	121°9'12.63"	28°41'16.52"	455
YD-3	121°4'26.34"	28°21'41.84"	208	HY-13	121°9'04.70"	28°41'16.52"	307
YD-4	121°4'29.96"	28°21'41.66"	195	HY-14	121°8'53.18"	28°41'08.92"	237

表 2 SRAP 引物序列

Table 2 Primer sequences for SRAP

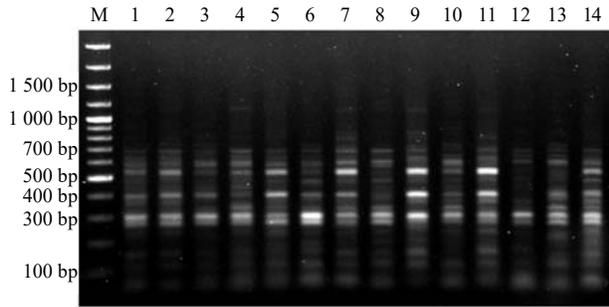
引物组合	ME 引物序列 (5'-3')	em 引物序列 (5'-3')
ME-1/em-4	TGAGTCCAAACCGGATA	GACTGCGTACGAATTTGA
ME-2/em-6	TGAGTCCAAACCGGAGC	GACTGCGTACGAATTGCA
ME-3/em-7	TGAGTCCAAACCGGAAT	GACTGCGTACGAATTATG
ME-5/em-2	TGAGTCCAAACCGGAAG	GACTGCGTACGAATTTGC
ME-5/em-5	TGAGTCCAAACCGGAAG	TGAGTCCAAACCGGAAG
ME-6/em-7	TGAGTCCAAACCGGTAG	GACTGCGTACGAATTATG
ME-9/em-5	TGAGTCCAAACCGGTCA	GACTGCGTACGAATTAAC

软件处理数据,对细叶石仙桃材料进行聚类分析(图 2)。68 个样品细叶石仙桃的相似系数介于 0.82~0.97。在遗传相似系数为 0.82 时,可分为 2 大类群,其中 BY、TDY、YD 和 JF 聚为一组, HY 单独聚为一组;在相似系数为 0.853 时,可分为 5 大类群, BY、TDY、YD、HY 和 JF 5 个不同居群单独聚为一组。相同地域来源的细叶石仙桃聚在一组,说明

同一居群的细叶石仙桃遗传相似性高,亲缘关系近;不同地理来源的细叶石仙桃在遗传多样性上存在一定差异,其中 HY 的细叶石仙桃与其他居群样品之间的遗传距离最远,差异最大; BY 和 YD 细叶石仙桃的遗传距离最小,仅为 0.005,亲缘关系最近。

3.3 遗传多样性分析

利用 POPGENE 1.32 软件对细叶石仙桃进行遗传



M-Marker 1~14-HY 14 个样品的细叶石仙桃 SRAP-PCR 结果
M-Marker 1—14-SRAP-PCR results of 14 *P. cantonensis* samples

图 1 引物 ME-5/em-2 对 HY 样品的 SRAP-PCR 结果
Fig. 1 SRAP-PCR results of HY samples using ME-5/em-2 primers

多样性分析, 结果表明, 细叶石仙桃的平均有效等位基因数目 (N_e) 为 1.238 1。在物种水平上, 细叶石仙桃的 PPB 为 96.45%, H 为 0.188 2, I 为 0.312 5; 居群水平上, PPB 在 30.46%~46.19%, 平均为 40%, H 为 0.089 1~0.155 9, 平均 0.120 8, I 为 0.138 7~0.234 9, 平均值 0.186 4。细叶石仙桃 5 个居群的 G_{st} 大小为 35.81%, N_m 为 0.896 3, 表明居群间存在一定的遗传分化和基因流动, 居群间的基因分化度为 35.81%, 居群内为 64.19%, 遗传分化主要存在于居群内。

4 讨论

近年来的研究表明, 即使是特有种、狭域种或濒危种, 也保持着较高的遗传多样性^[15,18-19]。例如蕨类植物金毛狗 *Cibotium barometz* (L.) J. Sm. 和太行菊 *Opisthopappus taihangensis* (Ling) Shih 均为珍稀濒危植物, 金毛狗的 PPB 为 85.98%, H 为 0.229 6, I 为 0.358 6, 在物种水平上具有较高的遗传多样性^[20]; 太行菊的 PPB 为 81.11%, H 为 0.205 9, I 为 0.325 6, 也显示出很高的遗传多样性^[15]。Nybom 等^[21]基于 RAPD、AFLP 和 ISSR 等显性分子标记, 对 107 个物种进行了多年的研究, 得到了其平均遗传多样性 (PPB 为 71.02%)。细叶石仙桃的 PPB 为 96.45%, 远高于 71.02%, 表明细叶石仙桃具有较高的遗传多样性。而珍稀濒危植物小花异裂菊 *Heteroplexis microcephala* Y. L. Chen 的 H 为 0.105 4, I 为 0.154 6, 遗传多样性相对较低^[22]。细叶石仙桃的 H 为 0.188 2, I 为 0.312 5, 2 个指数均大于小花异裂菊, 也表明细叶石仙桃在物种水平上的遗传变异较高。在居群水平上, 细叶石仙桃的 PPB 在 30.46%~46.19%, 从高到低依次为 HY>YD>TDY>JF>BY; H 在 0.089 1~0.155 9, 平均

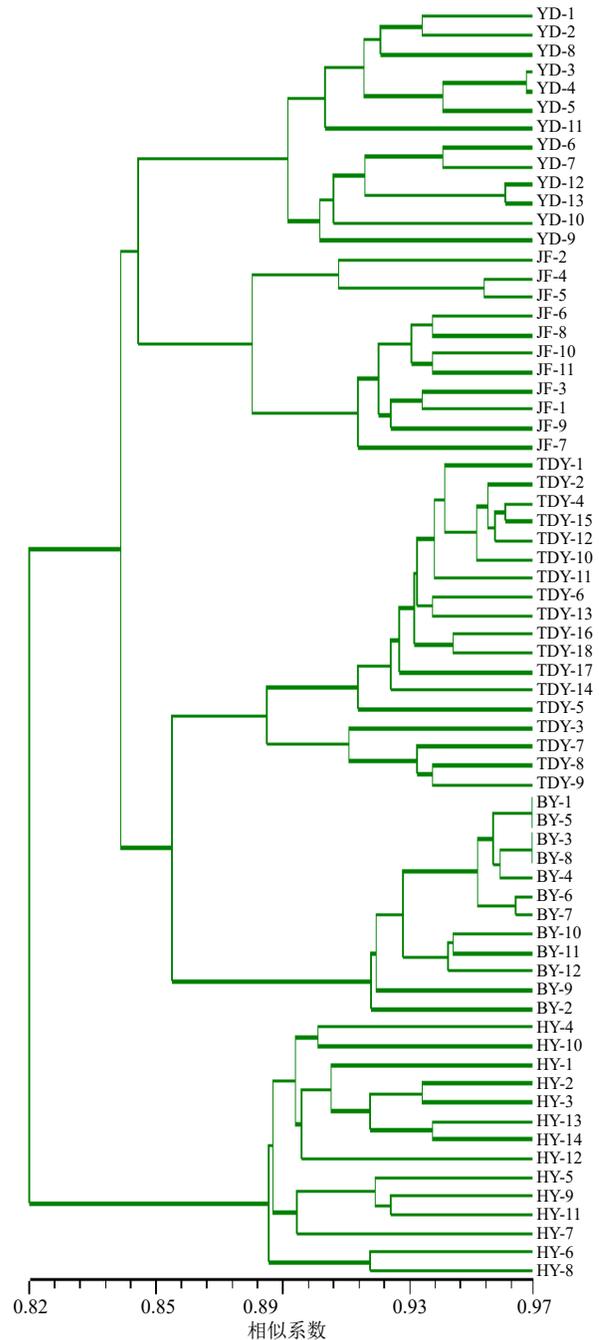


图 2 68 个样品细叶石仙桃的 UPGMA 聚类图
Fig. 2 Dendrogram of 68 *P. cantonensis* accessions generated by UPGMA

为 0.120 8; I 在 0.138 7~0.234 9, 平均为 0.186 4, H 和 I 显示各居群的遗传变异大小顺序与 PPB 结果完全一致。5 个居群中, HY 的遗传多样性水平最高 (PPB=46.19%, H =0.155 9, I =0.234 9), 而 BY 的遗传多样性水平最低 (PPB=30.46%, H =0.089 1, I =0.138 7)。UPGMA 聚类结果表明, 68 份细叶石仙桃种质资源可分为 5 组, 来自同一居群

的样品聚于同一分支,说明细叶石仙桃遗传相似性与地理距离之间具有较明显的相关性。按照地理距离聚类的趋势,相同地域采集的物种遗传相似性高,亲缘关系较近,在系统发育树上聚在一起^[23]。

物种的繁育系统、分布范围、自然选择和基因流等因素均影响种群的遗传结构,其中基因流对群体遗传分化具有重要影响^[24]。基因流可以阻止居群间的遗传变异,防止种群的分化,这与遗传漂变的作用相互拮抗^[25-26]。基于 Nei's 遗传多样性分析得出的细叶石仙桃种群间 G_{st} 为 0.358 1,表明遗传变异中有 35.81%来自于居群间,居群间具有一定的遗传分化。Wright^[27]和 Slatkin^[28]研究认为,当居群间的 N_m 大于 1,可防止由遗传漂变引起的群体间遗传分化;若小于 1,基因流则成为居群间遗传分化的主要原因。Hansson^[29]对 124 种植物进行统计研究,发现 51%的 N_m 小于 1,基因流小于 0.5 的物种占 35%。多数物种的基因流系数较低,遗传漂变在植物种群分化中的影响较大,导致遗传变异的减少^[30]。细叶石仙桃 5 个居群间的 $N_m=0.896 3$,限制的基因流可能是导致居群间遗传分化较高的主要原因,也说明基因流对居群间的遗传分化有重要影响^[31]。居群间存在着一定的基因交流,因此初步认为基因流不是细叶石仙桃濒危的原因。

物种的遗传多样性及其居群的遗传结构分析,可以为珍稀濒危物种保护价值的评估以及保护策略的制定提供非常重要的信息^[32]。由于细叶石仙桃具有较高的药用价值,人们对其采挖现象日益严重^[33];再加上细叶石仙桃对生境的要求较高,由旅游开发和道路修建对生境造成了一定的破坏,导致细叶石仙桃数量越来越少,而种群个体数量的减少必然会导致遗传多样性的改变^[34]。本研究中,细叶石仙桃具有较高的遗传多样性和较高的基因流,推测生境遭受破坏或过度采挖等因素是造成该物种数量稀少的原因。建议采取以下措施对细叶石仙桃进行保护:(1)大力宣传保护生态环境和物种多样性的重要性,做好就地保护,杜绝过度采挖行为;(2)建立珍稀植物的种质资源保护基地,实施人工抚育,恢复种群规模;(3)提高基因杂合度,通过人工授粉提高其有性繁殖的比例,有效增加后代的基因杂合度;(4)采用组织培养技术,减少对野生细叶石仙桃资源的依赖。本研究运用 SRAP 分子标记技术,对细叶石仙桃开展了遗传多样性研究,为该物种的保护和可持续利用奠定了基础。

参考文献

- [1] 董发武. 鼓槌石斛和云南石仙桃的化学成分及生物活性研究 [D]. 合肥: 安徽大学, 2012.
- [2] 林杰, 郑宏钧, 黄京芳. 石斛混淆品—细叶石仙桃的生药鉴定 [J]. 中药材, 1998, 21(7): 340-342.
- [3] 黄暖爱. GIS在重点兰科植物地理分布格局与保护现状评价中的应用 [D]. 海口: 海南大学, 2008.
- [4] 易绮斐, 邢福武, 陈红锋, 等. 我国石仙桃属植物的分布和开发利用 [J]. 华南农业大学学报, 2004, 25(3): 94-97.
- [5] 张小佳, 李旭梅, 曾建红. 细叶石仙桃的性状和显微鉴别研究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(8): 1909-1911.
- [6] Pimm S L, Russell G R, Gittleman J L, et al. The future of biodiversity [J]. *Science*, 1995, 269(5222): 347-350.
- [7] 李林, 董敦义, 丁雨龙. 竹类分子系统学中的 DNA 标记 [J]. 林业工程学报, 2009, 23(1): 10-15.
- [8] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. *Theoret Appl Genet*, 2001, 103(2/3): 455-461.
- [9] 任羽, 王得元, 张银东. 相关序列扩增多态性 (SRAP) 一种新的分子标记技术 [J]. 中国农学通报, 2004, 20(6): 11-13.
- [10] Poczai P, Varga I, Laos M, et al. Advances in plant gene-targeted and functional markers: A review [J]. *Plant Methods*, 2013, 9(1): 6.
- [11] 徐操, 赵宝华. SRAP 分子标记的研究进展及其应用 [J]. 生命科学仪器, 2009, 7(4): 24-27.
- [12] 李媛媛, 沈金雄, 王同华, 等. 利用 SRAP、SSR 和 AFLP 标记构建甘蓝型油菜遗传连锁图谱 [J]. 中国农业科学, 2007, 40(6): 1118-1126.
- [13] Ferriol M, Picó B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers [J]. *Theoret Appl Genet*, 2003, 107(2): 271-282.
- [14] Li G, Gao M, Yang B, et al. Gene for gene alignment between the *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping [J]. *Theoret Appl Genet*, 2003, 107(1): 168-180.
- [15] 张安世, 司清亮, 刘莹, 等. 珍稀濒危植物太行菊遗传多样性的 SRAP 分析 [J]. 分子植物育种, 2014, 12(3): 517-524.
- [16] 白坚, 胡旭, 周淑婷, 等. 47 个建兰品种的 SRAP 遗传多样性分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(3): 376-380.
- [17] Goulart F M, Ribeiro S P, Lovato M B. Genetic, morphological and spatial characterization of two

- populations of *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae), in different successional stages [J]. *Brazil Arch Biol Technol*, 2005, 48(2): 275-284.
- [18] 黄久香, 庄雪影. 观光木种群遗传多样性研究 [J]. 植物生态学报, 2002, 26(4): 413-419.
- [19] 陈俊秋, 慈秀芹, 李巧明, 等. 樟科濒危植物思茅木姜子遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 生物多样性, 2006, 14(5): 410-420.
- [20] 由永飞, 邓洪平. 珍稀濒危植物金毛狗的 SRAP 分析 [J]. 西北植物学报, 2012, 32(4): 688-692.
- [21] Nybom H, Bartish I V. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants [J]. *Perspect Plant Ecol Evol Syst*, 2000, 3(2): 93-114.
- [22] 史艳财, 唐健民, 柴胜丰, 等. 广西特有珍稀濒危植物小花异裂菊遗传多样性分析 [J]. 广西植物, 2017, 37(1): 9-14.
- [23] 王宇. 东北地区胡桃楸遗传多样性 SRAP 研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2007.
- [24] 文亚峰, 韩文军, 吴顺. 植物遗传多样性及其影响因素 [J]. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(12): 80-87.
- [25] Lenormand T, Guillemaud T, Bourgeuet D, et al. Evaluating gene flow using selected markers: A case study [J]. *Genetics*, 1998, 149(3): 1383-1392.
- [26] Whitlock M C, McCauley D E. Indirect measures of gene flow and migration: F_{ST} not equal to $1/(4Nm+1)$ [J]. *Heredity*, 1999, 82(2): 117-125.
- [27] Wright S. Evolution in Mendelian populations [J]. *Bull Mathemat Biol*, 1990, 52(1): 241-295.
- [28] Slatkin M. Estimating levels of gene flow in natural populations [J]. *Genetics*, 1981, 99(2): 323-335.
- [29] Hansson L. *Ecological Principles of Nature Conservation* [M]. London & New York: Elsevier Applied Science, 1992.
- [30] 陈小勇. 植物的基因流及其在濒危植物保护中的作用 [J]. 生物多样性, 1996, 4(2): 97-102.
- [31] 孙坤, 王瑞雪, 陈纹, 等. 山西五台山不同海拔中国沙棘居群的遗传变异 [J]. 西北师范大学学报: 自然科学版, 2013, 49(2): 75-79.
- [32] Avise J C, Hamrick J L. *Conservation Genetic: Case Histories from Nature* [M]. London: Chapman & Hall, 1996.
- [33] 李建晨, 冯丽, 野原稔弘. 细叶石仙桃的化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(14): 1691-1693.
- [34] Frankel O H, Brown A H D, Burdon J J. *The Conservation of Plant Biodiversity* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

(上接第 3115 页)

- [8] 张建清, 苏雪, 吴琼, 等. 药用植物党参的 RAPD 分析 [J]. 中药材, 2006, 29(5): 417-420.
- [9] 苏强, 杨静, 王哲, 等. 党参 DNA-AFLP 分析体系建立及条件优化 [J]. 药物生物技术, 2010, 17(4): 326-330.
- [10] 张延红, 高素芳. 党参 ISSR-PCR 反应体系的建立 [J]. 中国现代中药, 2014, 16(7): 551-555.
- [11] 陈大霞, 彭锐, 李隆云, 等. 利用 SRAP 和 ISSR 标记分析川党参的遗传多样性 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(3): 255-259.
- [12] 赵莎, 辛天怡, 侯典云, 等. 党参药材及其混伪品的 ITS/ITS2 条形码鉴定研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2013, 15(3): 421-428.
- [13] 李忠虎, 刘晓东, 王小琦, 等. 党参微卫星引物筛选及群体遗传多样性研究 [J]. 中草药, 2013, 44(2): 210-214.
- [14] 王东, 曹玲亚, 高建平. 党参转录组中 SSR 位点信息分析 [J]. 中草药, 2014, 45(16): 2390-2394.
- [15] 王炜勇, 俞少华, 张飞, 等. 近缘属 SSR 标记引物在光萼荷属植物中的通用性 [J]. 分子植物育种, 2013, 11(4): 583-587.
- [16] Li Y C, Korol A B, Fahima T, et al. Microsatellites within genes: Structure, function, and evolution [J]. *Mol Biol Evol*, 2004, 21: 991-1007.
- [17] 黄立飞, 房伯平, 陈景益, 等. 甘薯 EST 资源的 SSR 信息分析 [J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(1): 23-27.
- [18] 赵美琼, 宋燕, 范静华, 等. 玉米 EST 序列中微卫星的频率和分布 [J]. 云南农业大学学报, 2008, 23(5): 585-589.
- [19] 崔娜, 邱杨, 李锡香, 等. 萝卜 EST 资源的 SSR 信息分析及 EST-SSRs 标记开发 [J]. 园艺学报, 2012, 39(7): 1303-1312.