

珍稀濒危植物卵叶羌活自然群体遗传变异的地理分布研究

董鹏斌, 王 宁, 房敏峰, 何 颖, 刘鸿宴, 王久霞, 梁如韵, 景湘婷, 拓佩佩, 李忠虎*

西北大学生命科学学院 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 陕西 西安 710069

摘要: **目的** 检测珍稀濒危药用植物卵叶羌活自然群体遗传变异的地理分布式样和结构。**方法** 利用二代简化基因组测序技术开发卵叶羌活的微卫星分子标记 (SSR) 引物, 并对覆盖卵叶羌活整个自然地理分布范围的群体样品进行遗传多态性分析。**结果** 通过基因组 *de novo* 组装共获得了 780 条含 SSR 位点的基因片段序列; 筛选出 10 对具有较高多态性的 SSR 标记引物, 对卵叶羌活整个自然地理分布区的 6 个群体共 105 个样品进行遗传变异分析, 发现每条引物的等位基因数 (N_o) 在 1~6 (平均值为 3.530); 每个群体的平均观测杂合度范围在 0.305~0.457, 说明卵叶羌活具有中到高度水平的遗传变异。基于 Bayesian 的群体结构分析表明, 卵叶羌活的 6 个地理群体可以分为 2 个大的遗传分组, 两组之间存在着一定程度的基因交流或遗传渐渗。**结论** 二代高通量简化基因组测序技术极大丰富了珍稀濒危植物卵叶羌活的 SSR 数据库, 其自然群体遗传变异式样可能与该物种较长的进化历史以及不同地理群体之间长距离的花粉扩散有关。

关键词: 卵叶羌活; 多态性; 遗传变异; 群体结构; 微卫星标记

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)10-2461-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.10.029

Geographic distribution of genetic variation of natural populations in an endangered and rarely herb *Notopterygium forbesii* var. *oviforme*

DONG Peng-bin, WANG Ning, FANG Min-feng, HE Ying, LIU Hong-yan, WANG Jiu-xia, LIANG Ru-yun, JING Xiang-ting, TUO Pei-pei, LI Zhong-hu

Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China of Ministry of Education, College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China

Abstract: Objective In order to determine the geographic distribution of genetic variation and structure of natural populations in an endangered and rarely medicinal herb *Notopterygium forbesii* var. *oviforme*. **Methods** The primers of polymorphic microsatellite molecular markers of *N. forbesii* var. *oviforme* were firstly developed using the next generation reduced-representation sequencing technology. Then, the genetic polymorphisms of the whole geographical distributional population samples of *N. forbesii* var. *oviforme* were investigated based on the polymorphic SSRs. **Results** A total of 780 SSR-containing DNA sequences were obtained by genome *De novo* assembly. Ten pairs of polymorphic SSR primers were developed and used to analyze the genetic variability of 105 individuals from six natural populations that covered the entire geographical distributions of *N. forbesii* var. *oviforme*. The results showed that the number of observed alleles (N_o) per locus varied between 1 and 6 (mean = 3.530). The mean observed heterozygosity (H_o) per population ranged from 0.305 to 0.457. These finds suggested that *N. forbesii* var. *oviforme* had the moderate to high level of genetic variability. Bayesian clustering analyses demonstrated that the six natural populations of *N. forbesii* var. *oviforme* have formed two clear genetic lineages. The gene flow and/or genetic introgression have occurred between these two groups. **Conclusion** The next generation reduced-representation sequencing technology largely enriched SSRs database of *N. forbesii* var. *oviforme*. The geographic distribution patterns of genetic variations of *N. forbesii* var. *oviforme* may be related to the long evolutionary history of species and pollen dispersal of long distance among different natural populations.

Key words: *Notopterygium forbesii* de Boiss. var. *oviforme* (Shan) H. T. Chang; polymorphism; genetic variation; population structure; microsatellite marker

收稿日期: 2018-08-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41101058); 2018 年中医药公共卫生服务补助资金第四次全国中药资源普查项目 (财社 2018-43 号); 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室开放基金项目 (ZSK2018006, ZSK2017007, ZSK2019008)

作者简介: 董鹏斌, 硕士研究生, 主要从事植物资源学与系统进化研究。Tel: (029)88302411 E-mail: 13891099457@163.com

*通信作者 李忠虎, 教授, 主要从事植物基因组学与系统进化研究。Tel: (029)88302411 E-mail: lizhonghu@nwu.edu.cn

卵叶羌活 *Notopterygium forbesii* de Boiss. var. *oviforme* (Shan) H. T. Chang, 隶属于伞形科 (Apiaceae) 羌活属, 是我国秦岭及其邻近地区分布的一种特有多年生草本药用植物, 该物种自然状态下主要生长在海拔 1 400~3 200 m 的高山林缘、湿地以及高山草甸等环境^[1-2]。作为我国民间常用的一种重要药用植物, 该物种的干燥根主要用来治疗风湿痹痛、风寒感冒、头痛以及肩背酸痛等症状, 具有重要的药用价值和经济价值^[2-4]。然而, 该物种自然条件下的种子萌发力较弱、常常发育不完全, 加上其植株自然更新周期长, 导致难以驯化栽培。目前, 卵叶羌活的药材来源主要依赖于野生资源采挖^[3]。近年来, 随着该物种自然栖息地生境的破坏和人类对野生药材资源的过度采挖, 卵叶羌活的自然群体数量急剧减少, 已被《中国野生药材资源保护管理条例》列为三级保护植物, 《中国生物多样性红色名录》和《中国物种红色名录》也均将其收录为濒危植物。因此, 目前急需对物种的野生自然群体资源进行科学管理和保护^[2-3]。

植物遗传多样性以及遗传变异的地理分布 (结构) 是保护生物学的核心内容。一般来说, 植物遗传变异的大小与其未来命运和进化潜力密切相关: 遗传多样性高的物种或群体, 更容易抵御外界快速变化的环境, 从而更能适应不良环境的选择压力, 具有更高的进化潜力。而具有低遗传多样性水平的物种或自然群体, 其抵御外界自然环境的能力就会越低, 有时甚至会趋向灭绝^[5-6]。近年来, 基于二代高通量测序技术开发微卫星分子标记并应用于药用植物遗传多样性和群体结构的研究已广泛报道。例如, Jia 等^[7]通过测序羌活属 2 个药用植物宽叶羌活和羌活的转录组序列, 并通过直系同源基因比较分析开发了 17 条能在 2 个物种中同时成功扩增的 SSR 引物, 对其进行了遗传变异和群体结构分析。He 等^[8]利用简化基因组测序技术开发了卵叶羌活的 SSR 引物, 但并未对该物种自然群体遗传变异的分布式样以及格局成因进行详细研究。

此外, 近年来关于药用植物卵叶羌活及其近缘种的研究主要集中在物种生物学特性、DNA 条形码鉴定以及叶绿体基因组进化等方面^[9-10]。孙稚颖等^[11]发现 ITS 序列可以作为有效鉴别羌活药材的 DNA 条形码, 为此药材的鉴别和临床应用提供了科学的方法; 杨路存等^[12-13]对羌活以及宽叶羌活的遗传结构和遗传多样性进行了研究, 结果发现基于 cpDNA 片

段, 羌活的遗传多样性水平低于宽叶羌活, 并且二者的遗传变异都主要存在于群体间; Jia 等^[7]对羌活和宽叶羌活进行了比较转录组分析, 发现了调节羌活和宽叶羌活的物质以及能量代谢过程中不同的转录因子, 并且发现羌活和宽叶羌活的物种分化以及适应性进化与高海拔地区极为复杂的生态环境和气候变化显著相关。Yang 等^[10]使用完整的叶绿体基因组对羌活属 4 个物种羌活、宽叶羌活、卵叶羌活以及澜沧羌活进行了分析, 结果表明在这些羌活属物种中, 叶绿体基因组在基因顺序、基因内容、基因内含子数目以及 GC 含量上都高度保守。Shahzad 等^[14]基于 3 个母系遗传的叶绿体片段和 1 个核基因 ITS 片段对羌活属药用植物进行了系统地理学和物种分化分析, 发现羌活、宽叶羌活、卵叶羌活以及澜沧羌活形成了一个具有较高支持率的单系分支, 宽叶羌活和卵叶羌活具有较近的亲缘关系。

然而, 迄今为止, 关于卵叶羌活自然群体遗传变异的地理分布式样和群体结构鲜有研究, 该物种自然群体的保护策略和管理单元仍未划定。基于此, 本实验基于二代高通量测序的简化基因组分析技术开发多态性的微卫星分子标记, 并对卵叶羌活整个自然地理分布区的样品进行群体遗传结构及其格局成因研究, 以期对物种的合理利用和科学保护提供策略和建议。

1 材料

通过查阅中国各标本馆、秦岭植物志以及相关研究文献资料, 对卵叶羌活这一我国特有药用植物天然分布产地记录有一定了解。对覆盖物种自然地理分布的样品进行群体遗传学采样, 每个地区或每个采样地为 1 个群体, 每个群体采集 15~20 个体的成熟健康叶片, 群体内个体与个体之间至少间隔 50 m。采样时详细记录每个采样群体中心的经纬度、海拔、土壤性质等信息。具体见表 1。将新鲜幼嫩叶片放入自封袋中, 用硅胶快速干燥保存。

2 方法

2.1 DNA 提取、Illumina 二代测序以及引物设计

对所采集的卵叶羌活健康叶片样品, 采用 CTAB 法提取 DNA^[15], 并利用琼脂糖凝胶电泳进行 DNA 浓度和质量的检测。之后, 选取一个质量较高的 DNA 样品, 进行 Illumina Hiseq 2000 (Illumina 公司, 美国) 二代高通量测序实验。对得到的测序数据进行质控后 (主要是去除低质量序列和一些接头污染序列), 使用 CLC Genomics Workbench 7.5

表 1 卵叶羌活自然群体采样信息

Table 1 Information of geographic distributions of collected samples of *Notopterygium forbesii* var. *oviforme*

编号	群体代码	采样地	个体数	经度 (E)	纬度 (N)	海拔/m
1	LP	陕西陇县关山牧场松涛岭	18	106.527 9°	34.712 5°	2 158
2	LJ	陕西省洋峪口分水岭	17	108.805 4°	33.832 1°	2 350
3	LA	陕西省太白山大殿	18	107.701 8°	34.059 2°	3 196
4	LT	甘肃省华亭县关山	18	106.403 5°	35.157 7°	2 112
5	LF	甘肃省甘谷县	16	105.185 3°	34.575 6°	2 238
6	LC	陕西陇县新集川乡铁马河村	18	106.673 6°	35.068 1°	2 572

软件进行序列片段的 *De novo* 拼接组装和注释。然后利用 SciRoKo ver3.1 软件^[16]提取含有微卫星重复序列的基因片段, 使用用于单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复类型的默认参数(至少分别重复 15、7、5、4、4 和 4 次)进行搜集。对检索到含有微卫星片段的 Contig 序列, 用 Primer Premier ver7.0 软件^[17]设计引物。

2.2 PCR 扩增和 SSR 基因分型

对上述得到的 SSR 引物, 随机选取 100 对送往生物公司进行合成(上海生工生物工程有限公司), 合成后的引物干粉在室温下离心 10 min 后, 加入相应体积的 ddH₂O 稀释至 100 μmol/L。随机挑选卵叶羌活每个群体的 3 个个体, 共 18 个个体进行引物的初筛实验。具体的反应体系为 10 μL PCR 管中包含: ddH₂O 3.4 μL, mix 5 μL (含有 DNA tap 聚合酶, dNTP, Mg²⁺等), 正、反引物各 0.3 μL (10 pmol/μL), 模板 DNA 1 μL (50 ng/μL)。反应体系混合均匀后, 在 PCR 仪上首先 94 °C 条件下预变性 5 min, 接着 32 次循环, 包括: 94 °C 变性 40 s; 复性 46~55 °C (具体退火温度根据不同引物的最适温度调整) 45 s; 然后 72 °C 延伸 1 min; 最后在 72 °C 条件下终延伸 7 min。PCR 产物首先由 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 然后利用 8% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离。对于筛选出的卵叶羌活多态性引物, 对所有采样个体进行 PCR 扩增和基因分型检测。并利用 Quantity One (Bio-Rad, Hercules, California, 美国) 软件, 并以 pBR322 DNA/MspI 作为 DNA 相对分子质量标记来确定所有 SSR 片段的等位基因大小。

2.3 数据分析

使用 GenAlEx 6.501 软件^[18]检测每个 SSR 基因位点的等位基因数 (N_a)、观察杂合度 (H_o) 和期

望杂合度 (H_e), 以及是否符合 Hardy-Weinberg 平衡 (HWE) 和连锁不平衡 (LD)。然后使用贝叶斯分析软件 STRUCTURE 2.3^[19]来进一步检测各个群体之间的遗传关系。为了准确推断卵叶羌活遗传变异的地理结构和分化模式, 估算每一个族群 (K) 的似然率, 取 K 的范围为 1~6, 在计算时选用混合模型 (admixture model), 并允许组间等位基因频率具有相关性, Burn-in 值设置为 100 000, 取样迭代次数为 200 000, 每个 K 值重复计算 20 次。然后使用 Structure Harvester^[20]分析聚类结果, 得到最佳 K 值分组。最后使用软件 Distruct v.1.1^[21]进行统计和做图。

3 结果与分析

3.1 简化基因组测序和 *de novo* 组装

通过二代高通量简化基因组测序共获得了卵叶羌活 23.5 Mb 的清洁序列 (clean reads), 进一步利用 CLC Genomics Workbench 7.5 软件进行 *de novo* 重头组装, 产生了 17 900 条 Contig 片段。对这些片段进行去冗余处理, 并且去掉总核苷酸数目小于 200 bp 的 DNA 序列片段。然后利用 SciRoKo ver3.1 软件提取含有微卫星重复序列的基因片段, 共搜集到了 780 条序列。然后用 Primer Premier ver 7.0 软件对这些片段进行正、反向引物的设计。

3.2 卵叶羌活群体遗传多样性

选取 100 条合成的 SSR 引物, 对卵叶羌活的 DNA 样品进行预筛选实验。发现其中有 30 条引物能在不同群体的 18 个个体中成功扩增, 并显示了清晰的电泳主条带。然后利用这些引物对所有采样个体进行 PCR 扩增和基因分型实验。部分引物的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果如图 1 所示, 结果显示有 10 对引物展示出了明显的条带多态性 (表 2)。

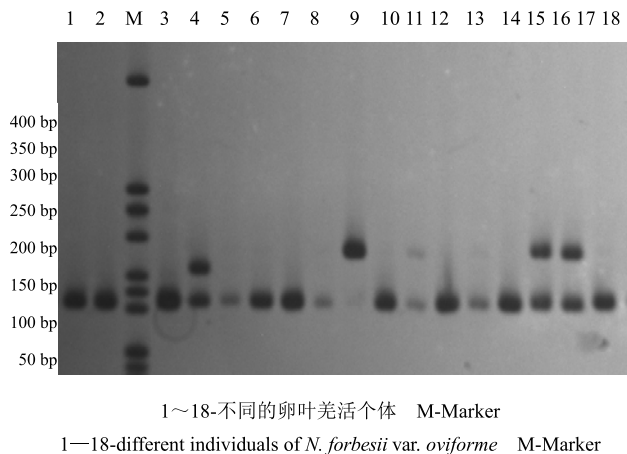


图 1 引物 No215 在部分卵叶羌活个体中的聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR amplification products of primer No215 in *N. forbesii* var. *oviforme*

经检测分析, 这些 SSR 位点引物在不同的群体中都符合 Hardy-Weinberg 平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) 和连锁不平衡 (LD) ($P > 0.05$)。

每个 SSR 位点的群体遗传多样性分析发现, 卵叶羌活的 N_e 在 1~6 变化, 平均每个位点为 3.53; N_e 在 1~4.167 变化; H_o 在 0.063~0.938, 表明卵叶羌活在不同的位点上具有中到高度水平的遗传多态性。

卵叶羌活 6 个自然地理群体的遗传多样性参数分析发现, 每个群体的 N_e 在 2.076~2.342 变化; 而每个群体的平均 H_o 在 0.305~0.457, 说明卵叶羌活不同地理群体具有不同的遗传变异水平; 同时, 不同的基因座位上也展现出了差异化的多态性变异。

表 2 卵叶羌活 10 条多态性的引物信息

Table 2 Ten pairs of SSR primers information in *N. forbesii* var. *oviforme*

引物编号	引物信息 (5'→3')	重复单元	退火温度/℃	等位基因大小/bp
No13913	F: TGATTCCAATGAAATAGATGTT R: CCACATCCTAAAGTTCTCTAAT	(ATGG) ₆	48	196~218
No215	F: CCCATGAGATTGTAATTTA R: GAAGAAGCAGACAGGAAAG	(TGA) ₆	48	192~217
No4493	F: ATTCAAAGAGAAGTGGAGAT R: ACCAAGTTTAAGGAGGAGAG	(TAG) ₆	51	143~176
No820	F: AAGCCAACATTCCAGTGATT R: TTCCCATAACTTTTTCCAA	(AAG) ₅	50	242~275
No9700	F: GAGACACAAGGTGGTAGTT R: GATGGCTTTGATTGAGAGA	(TGA) ₇	52	242~268
No4904	F: TTTCAAACATATCGACCTTTT R: CACAGGAGACGATTTAGGA	(TACA) ₄	50	162~189
No2778	F: CGAGAATAGATGTAGGGCTG R: GAAAACCTGTGGCAAGTAAT	(AGA) ₇	51	302~330
No2297	F: TGAACATACCAAAACAGACG R: AATCAACAAGGACAAGGAGA	(TCT) ₅	53	232~256
No14639	F: TCTCTTTCATTCTTG TAGCCAT R: ATCGGGGAGATGATAATAGTAG	(TTC) ₆	54	250~285
No2529	F: GATGGTGGTAGTGCCGAAAG R: GACCATTATACACTTATCGCCA	(GTAT) ₄	56	250~276

3.3 卵叶羌活群体遗传结构

利用 STRUCTURE 软件对卵叶羌活的所有取样群体进行微卫星标记的基因分型和群体聚类 (图 2) 分析得出, 最佳分组值 (K) 为 2。当 $K=2$ 时,

卵叶羌活的陕西陇县松涛岭 (LP) 群体、陕西洋裕口 (LJ) 群体和陕西太白山 (LA) 群体聚为一个大的遗传分组, 说明这 3 个群体之间具有较近的遗传亲缘关系; 而甘肃关山 (LT)、甘肃甘谷 (LF) 以

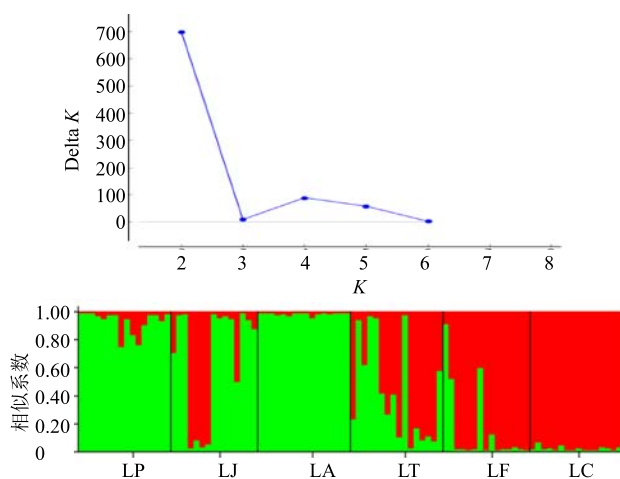


图 2 卵叶羌活样品群体遗传结构聚类图

Fig. 2 Genetic structure of natural populations in *N. forbesii* var. *oviforme* samples

及陕西陇县铁马河村 (LC) 的 3 个群体则聚为另外一个遗传分组。同时发现, 2 个大的遗传分组之间存在着一定程度的基因交流或遗传渐渗, 尤其是陕西洋裕口群体中有大量来自另外一个分组的遗传变异。

此外, 每个 SSR 位点的群体分化分析发现, 不同的基因座位上具有不同的遗传分化系数 (F_{ST}), 其具体的 F_{ST} 为 $-0.883 \sim 0.845$, 说明位于不同遗传位点上的 SSR 标记对于不同的群体分化具有差异的贡献。

4 讨论

遗传多样性是物种自然群体在长期进化过程中所形成的历史产物, 其大小和水平决定了物种的进化潜力和抵御外界不良环境因素的能力。物种遗传多样性水平越高, 代表其适应环境变化的能力越强, 越容易抵抗环境的变化而存活下来^[5-6]。本研究在珍稀濒危植物卵叶羌活的自然群体中检测到了中到高度水平的遗传多态性, 其不同地理群体的平均有效等位基因数目在 $2.076 \sim 2.342$; 而每个群体的平均 H_o 在 $0.305 \sim 0.457$ 。将其多态性水平与其他分布在秦岭地区的多年生草本物种和一些灌木、藤本植物相比, 发现它们均具有较高的遗传多样性水平。如徐敏等^[22]采用 9 对 SSR 引物对秦岭地区的华中五味子进行遗传多样性分析, 结果表明其多态性比率为 86.88%, 具有较高水平的遗传变异性; 赵冰等^[23]利用 AFLP 分子标记技术, 对秦岭地区 7 个秀雅杜鹃野生群体的遗传多样性水平进行研究, 结果表明其多态位点比率为 83.1%, POPGENE 分析

表明, 秀雅杜鹃在物种水平和群体水平上都具有较高的遗传多样性。这些物种在秦岭地区拥有较高的遗传多态性可能与该区域是一个生物多样性的交汇地区和过渡地带有关, 区域内异质复杂的生态环境可能促使了不同群体的适应性进化以及多样性的增高。

此外, 物种自然群体的地理分布 (群体结构) 可能受到基因流、海拔高度、温度、气候等其他因素的影响, 并且主要通过群体间和群体内的遗传分化来展现^[5-6]。对卵叶羌活整个自然地理分布范围内的 6 个群体进行 Bayesian 聚类分析发现, 该物种能够明显分为 2 个大的遗传分组, 这 2 个分组可以作为 2 个进化单元用于物种的生物多样性管理和保护。然而, 2 组之间存在一定程度的基因流和遗传渐渗, 可能与物种长期的进化历史以及不同地理区域群体间的长距离花粉流扩散相关。同时, 群体分化分析也发现, 不同地理群体间存在一定程度的基因分化, 这可能与该物种一般生长在高山林下、林缘或灌丛中, 造成其特殊的生长生态环境及地理位置, 因此向外扩散的能力有限, 导致其群体间的基因交流受阻, 从而加大了分化^[2-3,7]。另外, 过去的秦岭山脉隆升以及气候变化导致物种栖息地生境的片段化, 引起遗传漂变, 进一步阻碍了卵叶羌活种内不同群体间的基因交流, 致使群体间发生了遗传分化, 导致了卵叶羌活现今明显分为两组的遗传分化模式。

同时, 野外调查研究发现, 卵叶羌活的野生环境正受到前所未有的破坏, 包括生态丧失、破碎化、土壤退化、土地利用模式改变和环境变化等^[1-3,10]。如果现状不能得到改变, 卵叶羌活野生资源不但难以实现可持续利用, 而且还将遭毁灭性破坏。所以依据遗传结构分析, 明显地划分出了 2 个大的遗传保护单元, 可以为生物多样性的进一步保护和合理利用提供理论依据。

参考文献

- [1] 单人骅, 余孟兰. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [2] 王幼平, 溥发鼎, 王萍莉, 等. 中国特有属——羌活属的系统分类研究 [J]. 云南植物研究, 1996, 18(4): 424-430.
- [3] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1976.
- [4] 江纪武. 药用植物辞典 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 2005.

- [5] Booy G, Hendriks R J J, Smulders M J M, *et al.* Genetic diversity and the survival of populations [J]. *Plant Biol*, 2000, 2(4): 379-395.
- [6] Hamrick J L, Blanton H M, Hamrick K J. Genetic structure of geographically marginal populations of ponderosa pine [J]. *Am J Bot*, 2010, 76(11): 1559-1568.
- [7] Jia Y, Liu M L, Yue M, *et al.* Comparative transcriptome analysis reveals adaptive evolution of *Notopterygium incisum* and *Notopterygium franchetii*, two high-alpine herbal species endemic to China [J]. *Molecules*, 2017, 22(7): 1158-1165.
- [8] He Y, Zhao Z, Shi Y Y, *et al.* Novel microsatellite markers for *Notopterygium oviforme* (Apiaceae), an endangered endemic herb to China [J]. *Ann Bot Fennici*, 2017, 54 (4/6): 423-427.
- [9] 孙 辉, 蒋舜媛, 周 毅, 等. 药用植物羌活现状及其民族植物学调查 [J]. 世界科技研究与发展, 2004, (6): 42-44.
- [10] Yang J, Yue M, Niu C, *et al.* Comparative analysis of the complete chloroplast genome of four endangered herbals of *Notopterygium* [J]. *Genes*, 2017, 8(4): 124.
- [11] 孙稚颖, 陈士林, 姚 辉, 等. 基于 ITS2 序列的羌活及其混伪品的 DNA 条形码鉴定 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 568-571.
- [12] 杨路存, 刘何春, 周学丽, 等. 羌活不同地理种群 cpDNA trnT-trnL 多态性分析 [J]. 中草药, 2015, 46(22): 3390-3395.
- [13] 杨路存, 周国英, 聂学敏. 濒危植物宽叶羌活天然居群 cpDNA 非编码区多态性分析 [J]. 西北植物学报, 2013, 33(8): 1535-1543.
- [14] Shahzad K, Jia Y, Chen F L, *et al.* Effects of mountain uplift and climatic oscillations on phylogeography and species divergence in four endangered *Notopterygium* herbs [J]. *Frontiers Plant Sci*, 2017, 8: 1929-1934.
- [15] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15.
- [16] Kofler R, Schlötterer C, Lelley T. SciRoKo: A new tool for whole genome microsatellite search and investigation [J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(13): 1683-1685.
- [17] Clarke K R, Gorley R N. PRIMER v7: User Manual/Tutorial, PRIMER-E [D]. Plymouth: University of Gdańsk, 2015.
- [18] Peakall R, Smouse P E. GenAlEx 6. 5: Genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research-an update [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(19): 2537-2539.
- [19] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study [J]. *Mol Ecol*, 2005, 14(8): 2611-2620.
- [20] Earl D A. Structure harvester: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method [J]. *Conser Genet Resour*, 2012, 4(2): 359-361.
- [21] Rosenberg N A. Distruct: A program for the graphical display of population structure [J]. *Mol Ecol Resour*, 2004, 4(1): 137-138.
- [22] 徐 敏, 吴 生, 刘小霞, 等. 秦岭地区华中五味子 SSR 遗传多样性分析 [J]. 中药材, 2013, 36(8): 1215-1218.
- [23] 赵 冰, 徐 曼, 司国臣, 等. 秦岭秀雅杜鹃野生种群遗传多样性和遗传分化的 AFLP 分析 [J]. 应用生态学报, 2012, 23(11): 2983-2990.