

# 薇菜 SSR 分子标记的开发及遗传多样性初步探讨

赵杰<sup>1</sup>, 王玢琪<sup>1</sup>, 贾晓<sup>1</sup>, 童益琴<sup>1</sup>, 何义发<sup>2\*</sup>, 葛台明<sup>1\*</sup>

(1. 中国地质大学(武汉)湿地演化与生态恢复湖北省重点实验室, 武汉 430074;

2. 湖北民族学院林学园艺学院, 湖北恩施 445000)

**摘要:** 利用改良 FIASCO 法(Fast Isolation by AFLP Sequences COnaining repeats)开发出的 9 对多态性 SSR 引物评价了薇菜(*Osmunda japonica* Thunb.)2 个野生居群(庐山和恩施)、1 个栽培居群(恩施)的遗传多样性和遗传分化水平。结果显示, 9 个 SSR 标记在 3 个薇菜居群中共检测到 47 个等位基因, 每个 SSR 位点的平均等位基因数为 5.222 个, 观测杂合度和期望杂合度分别为 0.000 ~ 0.944 和 0.577 ~ 0.834, 香农指数为 0.962 ~ 1.860, 表明各 SSR 位点多态性较高; 各居群的平均期望杂合度均大于平均观测杂合度且种内近交系数均为正值, 说明 3 个薇菜居群中都存在非随机交配现象; 对各居群的相关遗传多样性参数分析表明, 恩施野生居群遗传多样性最高, 而其栽培居群最低; 庐山野生居群与恩施野生居群间遗传分化系数为 0.092, 说明两地野生薇菜居群的遗传分化程度较低, AMOVA 分析也表明遗传变异主要存在于野生居群内部。

**关键词:** 薇菜; 遗传多样性; SSR; FIASCO

中图分类号: Q75

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2015)06-0801-07

## Development of SSR Markers to Assess Genetic Diversity in *Osmunda japonica* Thunb.

ZHAO Jie<sup>1</sup>, WANG Bin-Qi<sup>1</sup>, JIA Xiao<sup>1</sup>, TONG Yi-Qin<sup>1</sup>, HE Yi-Fa<sup>2\*</sup>, GE Tai-Ming<sup>1\*</sup>

(1. Hubei Key Laboratory of Wetland Evolution and Ecological Restoration, China University of Geosciences, Wuhan 430074, China; 2. School of Forestry and Horticulture, Hubei University for Nationalities, Enshi, Hubei 445000, China)

**Abstract:** Nine SSR markers developed by a modified FIASCO (Fast Isolation by AFLP Sequences COnaining repeats) method were used to analyze the genetic diversity and differentiation of three *Osmunda japonica* Thunb. populations, including two wild populations from Lushan and Enshi and one cultured population from Enshi. A total of 47 alleles were detected in the three populations, with a mean  $N_A$  (number of alleles) of 5.222. The observed heterozygosity and expected heterozygosity were 0.000 – 0.944 and 0.577 – 0.834, respectively. The Shannon index ranged from 0.962 to 1.860. Results suggested that the microsatellite loci were highly polymorphic. For each population, the average expected heterozygosity was higher than that of the observed heterozygosity, and the population inbreeding polymorphism coefficient was positive, indicating the existence of non-random mating. For the three populations, the wild population from Enshi harbored the most abundant genetic diversity, while the cultured population had the lowest. Low levels of genetic differentiation were found between the two wild populations ( $F_{ST} = 0.092$ ), which was supported by AMOVA analysis.

**Key words:** *Osmunda japonica* Thunb.; Genetic diversity; Simple sequence repeat; Fast Isolation by AFLP Sequences COnaining repeats

收稿日期: 2015-05-29, 退修日期: 2015-07-10。

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(40930210)。

作者简介: 赵杰(1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物学(E-mail: zj1989890616@126. com)。

\* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: hbmyhf@163. com; getm@263. net)。

紫萁 (*Osmunda japonica* Thunb.) 为紫萁科紫萁属多年生草本蕨类植物, 主要分布于我国长江流域以南各省区, 尤以武陵山区分布较多。由于紫萁嫩叶具有较高的营养价值和一定的药用价值, 且富含维生素、氨基酸和人体新陈代谢必需的多种微量元素<sup>[1]</sup>, 加工成山野菜被人们广泛食用, 称为薇菜。随着日本、韩国等国家对其大量进口, 薇菜的研究和开发利用也愈受关注<sup>[2]</sup>。人工栽培的薇菜繁殖系数较低<sup>[3]</sup>, 目前其主要来源是野生资源, 然而自然环境下, 薇菜的配子体生长周期长且需要水湿环境, 自然更新的速度无法满足市场需求<sup>[4]</sup>; 此外, 由于不合理的开发利用, 野生薇菜无法完成其正常的生活周期, 致使我国薇菜野生资源面临枯竭的风险, 应尽快采取措施对薇菜野生居群进行保护。朱英东<sup>[5]</sup>研究提出, 薇菜野生资源的恢复策略为先通过有性繁殖(孢子繁殖)产生大量幼苗, 再将幼苗移栽至适宜的野生环境, 但由于物种的遗传多样性直接关系到其生存及发展<sup>[6]</sup>, 因此实施薇菜野生资源恢复措施前应充分了解其居群遗传多样性现状。近年来, 关于薇菜的研究主要集中在营养成分和经济价值等方面<sup>[1,7-9]</sup>, 目前尚未见薇菜 SSR 分子标记的开发及其遗传多样性研究的报道。

SSR (Simple Sequence Repeat) 分子标记以其共显性的遗传方式<sup>[10]</sup>和高度变异性<sup>[11]</sup>等特点被广泛用于居群遗传多样性分析、种质资源鉴定和遗传图谱构建<sup>[12,13]</sup>。为了分析不同地区薇菜居群的遗传多样性, 需开发具有较高多态性的 SSR 分子标记, 本文拟采用改良的 FIASCO (Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing repeats)<sup>[14]</sup> 技术开发薇菜的 SSR 分子标记, 并评估庐山和恩施的 3 个薇菜居群的遗传多样性, 以期为薇菜资源的保护和可持续发展提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

对江西庐山和湖北恩施的 2 个野生居群以及栽培于湖北民族学院内的一个人工薇菜居群(由恩施薇菜野生居群的孢子繁育而来)进行随机采样, 且每居群选择 30 株个体采集幼嫩叶片(表 1), 放入

置有碎冰(低温保存)的保温箱中带回实验室, 并于-80°C 保存、备用。

表 1 供试薇菜样品  
Table 1 Samples of *Osmunda japonica* used in the study

居群编号 Population codes	来源 Location	个体数目 No. of individuals	特征 Characteristics
居群 1 Population 1	庐山 Lushan (29°34'21" N, 115°58'24" E)	30	野生 Wild
居群 2 Population 2	恩施 Enshi (30°16'13" N, 109°28'30" E)	30	野生 Wild
居群 3 Population 3	恩施 Enshi (30°29'52" N, 109°49'49" E)	30	栽培 Cultivated

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 薇菜基因组 DNA 的提取

采用 CTAB 法<sup>[15]</sup>并结合异丙醇沉淀提取薇菜叶片(约 0.5 g)基因组 DNA; 利用 Thermo Scientific NanoDrop 2000/2000C 分光光度计测定提取 DNA 的浓度和纯度, 再通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性。DNA 样品于-20°C 保存、备用。

### 1.2.2 SSR 分子标记的开发

随机选取一份薇菜个体的基因组 DNA, 采用改良的 FIASCO 法<sup>[14,16]</sup>分离其 SSR 序列, 主要实验步骤包括: ①基因组 DNA 的酶切和连接反应同时进行。反应体系为 20 μL, 包含 250 ng 薇菜基因组 DNA、0.4 U *Cvi*QI 限制性内切酶(NEB)、1.0 μmol/L *Cvi*QI 接头(5'-TAGTCAGGACTCAT-3'/5'-GACGATGAGTCCTGAC-3')、20 mg/μL BSA、0.5 mmol/L ATP、0.12 U T4 DNA 连接酶(Pro-mega)和 1 × *Cvi*QI Buffer3(NEB), 25°C 条件下温育 16 h; ②反应结束后, 将连接产物稀释 10 倍, 并用含 PIG-tail 的 *Cvi*QI-N 引物对连接产物进行单引物 PCR 扩增, 然后向扩增产物中加入 0.25 μmol/L 生物素标记的(GATA)<sub>6</sub>、(AAAG)<sub>6</sub>、(GAT)<sub>8</sub> 探针进行杂交, 杂交条件为: 94°C 变性 1 min, 探针退火 1 min, 72°C 保温 1 min; ③目的片段用链霉亲和素包被的磁珠富集<sup>[17]</sup>后进行第二次 PCR 扩

增, 扩增产物经纯化后转入 TOP10 感受态细胞, 30℃恒温培养 16 h 后挑选阳性克隆子送往武汉擎科创新生物科技有限公司进行测序。通过 SSRHunter 1.3 软件<sup>[18]</sup>查找 SSR 序列, 并用 Primer Premier 5.0 软件 (<http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/>) 设计 SSR 序列的特异性引物(由生工生物工程(上海)股份有限公司合成)。

### 1.2.3 位点多态性的检测

经扩增条件优化并确定设计的 42 对 SSR 引物的最适退火温度后, 对随机选取的 20 份薇菜个体基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 筛选可稳定扩增的多态性 SSR 标记。PCR 扩增体系为 10 μL, 包含 1×PCR buffer (北京百泰克生物技术有限公司)、2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.2 mmol/L dNTP、0.2 μmol/L 的上下游引物、0.25 U Taq DNA 聚合酶(北京百泰克生物技术有限公司)、约 200 ng 模板 DNA; PCR 反应程序为: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 1 min, 49℃~61℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 共 30 个循环; 最后 72℃延伸 10 min。所有 PCR 产物经 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后银染<sup>[19]</sup>。

### 1.2.4 数据分析

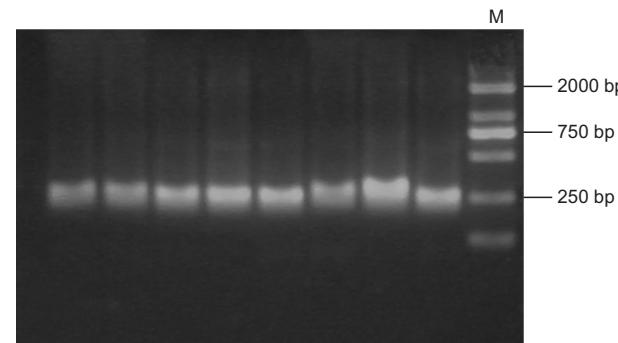
依据 DNA Marker (20 bp 或 50 bp DNA Ladder Marker, TaKaRa) 判读各 SSR 位点等位基因的扩增片段长度, 若存在某等位基因则记为 1, 反之记为 0, 并用 Excel 软件将基因型数据转化为 0/1 数据矩阵; 利用 MICRO-CHECKER 2.2.3 软件检测分型错误<sup>[20]</sup>后, 使用 POPGENE 1.31 统计分析软件<sup>[21]</sup>对数据进行分析, 分别计算 3 个居群的等位基因数(number of alleles,  $N_A$ )、有效等位基因数(effective number of alleles,  $N_E$ )、观测杂合度(observed heterozygosity,  $H_o$ )、期望杂合度(expected heterozygosity,  $H_e$ ) 和香农指数(Shannon index,  $I$ ) 等遗传多样性参数, 以及居群内近交系数(inbreeding population polymorphism coefficient,  $F_{IS}$ )、居群总近交系数(total inbreeding coefficient,  $F_{IT}$ )、居群间遗传分化系数(genetic differentiation coefficient,  $F_{ST}$ ) 和基因流(gene flow,  $Nm = 0.25(1 - F_{ST}) / F_{ST}$ <sup>[22,23]</sup>); 利用 Arlequin 3.5 软件<sup>[24]</sup>对居群进行分子方差分析(AMOVA)。

## 2 结果与分析

### 2.1 SSR 多态性引物的筛选

对随机挑取的 200 个克隆进行测序, 共有 153 条序列含有目标 SSR 序列, 阳性率为 76.5%, 表明本研究采用改良的 FIASCO 法开发薇菜基因组 SSR 标记的效率非常高。

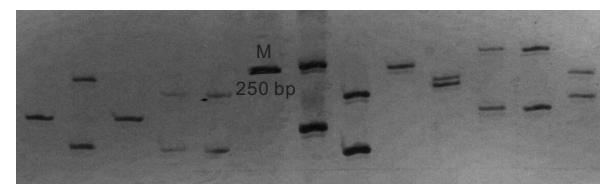
根据引物设计的主要原则<sup>[25]</sup>, 我们共设计了 42 对薇菜 SSR 特异性引物, 并对 20 份薇菜个体基因组 DNA 进行了 PCR 扩增, 结果显示有 10 对引物可稳定扩增(图 1), 其中 9 对具有多态性(图 2, 表 2), 可用于薇菜居群的遗传多样性分析。



M: DL2000 marker.

图 1 SSR 位点 OJT42 的琼脂糖凝胶电泳检测

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis result of SSR locus OJT42



M: 50 bp DNA ladder marker.

图 2 SSR 位点 OJT30 的聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 2 Polyacrylamide gel electrophoresis result of SSR locus OJT30

### 2.2 薇菜居群的遗传多样性分析

采用 MICRO-CHECKER 2.2.3 软件对 SSR 扩增片段的分型检测表明, 未发现由无效等位基因(null alleles)、影子带(stutters)等引起的错误。9 个微卫星位点在 3 个薇菜居群中扩增的遗传多样性参数(表 3)显示, 共检测到 47 个等位基因, 其平均等位基因数为 5.222, 平均有效等位基因数为 3.822; 观测杂合度和期望杂合度分别为 0.000~

表 2 薇菜 SSR 分子标记  
Table 2 SSR markers for *Osmunda japonica*

位点 Locus	序列号 GenBank accession No.	重复单元 Repeat motif	引物序列(5'-3') Primer sequence	目标片段大小 Expected fragment size (bp)	退火温度 Annealing temperature (℃)
OJT6	KC924747	(CAT) <sub>11</sub>	F: GGGTCCCCAAATGTGCTC R: CGGAATCCCCACGATGTAGT	176	51
OJT7	KC924748	(CAT) <sub>18</sub>	F: GGGTCCCCAAATGTGCTC R: CGGAATCCCCACGATGTAGT	191	55
OJT15	KC924749	(TCTT) <sub>9</sub> (GT) <sub>10</sub>	F: TCCAGAGACAAATGATGACACC R: TCCACCCAACCTCACTAAAGAAC	227	59
OJT30	KC924750	(AAAG) <sub>5</sub> (AG) <sub>5</sub>	F: CTCTGGAATCTCTGGTAG R: CCGCTTTGGTCTTTG	219	61
OJT31	KC924751	(TC) <sub>12</sub> (AC) <sub>10</sub>	F: TATTCAACCAGGCTCAACTC R: CTCCATCTCTCCCTCTCAC	120	52
OJT32	KC924752	(TC) <sub>9</sub> (CA) <sub>11</sub>	F: GGGATTAATGACTCCTCTAC R: TTTCTGATTGTGCCTGCT	220	55
OJT33	KC924753	(TG) <sub>14</sub>	F: AGCCTCCAGCACCTCAT R: GGTCTACACCCCTCTCCATC	122	53
OJT40	KC961957	(CTT) <sub>9</sub>	F: AACCAACGAGAGGAGGA R: CACGACGATGTAAAACGAC	262	49
OJT42	KC924755	(TC) <sub>22</sub> (TCTA) <sub>6</sub>	F: AGACTCTGCCTGTTCG R: GATTCTTCTGCTATGTTCCCTC	239	51

表 3 薇菜居群的遗传多样性参数  
Table 3 Population genetics parameters of SSR loci

位点 Locus	等位基 因数 $N_A$	有效等位 基因数 $N_E$	观测杂 合度 $H_O$	期望杂 合度 $H_E$	香农 指数 $I$
OJT6	4	2.404	0.000	0.587	0.991
OJT7	5	4.221	0.083	0.768	1.507
OJT15	4	2.343	0.095	0.577	0.962
OJT30	8	5.829	0.012	0.834	1.860
OJT31	4	3.031	0.125	0.675	1.205
OJT32	4	3.235	0.063	0.696	1.244
OJT33	5	4.435	0.250	0.780	1.540
OJT40	6	4.616	0.944	0.789	1.632
OJT42	7	4.287	0.195	0.772	1.635
Mean	5.222	3.822	0.196	0.720	1.397

Notes:  $N_A$ , Number of alleles;  $N_E$ , Effective number of alleles;  $H_O$ , observed heterozygosity;  $H_E$ , expected heterozygosity;  $I$ , Shannon index. Same below.

0.944 和 0.577 ~ 0.834, 均值分别为 0.196 和 0.720; 香农指数范围为 0.962 ~ 1.860, 均值为 1.397, 表明各 SSR 位点均具有多态性, 可用于薇菜居群的遗传多样性分析等研究。

在 3 个居群中(表 4), 恩施野生薇菜居群(居群 2)的平均有效等位基因数(3.305)和平均期望杂合度(0.666)最高, 但其居群平均近交系数最低(0.592); 庐山野生薇菜居群(居群 1)的平均有效等位基因数(3.129)和平均期望杂合度(0.663)次之; 恩施栽培居群(居群 3)的相关参数均值都较低, 说明恩施薇菜野生居群的遗传多样性最高, 而恩施薇菜栽培居群遗传多样性最低。3 个薇菜居群中, 期望杂合度均值都大于观测杂合度均值, 表明 3 个群体中均存在非随机交配现象。

表 4 3 个薇菜居群的遗传多样性参数  
Table 4 Genetic diversity for the three *Osmunda japonica* populations

居群 Population	平均有效 等位基因数 Average of $N_E$	平均观测 杂合度 Average of $H_O$	平均期望 杂合度 Average of $H_E$	居群内近 交系数 Average of $F_{IS}$
居群 1 Population 1	3.129	0.120	0.663	0.815
居群 2 Population 2	3.305	0.272	0.666	0.592
居群 3 Population 3	3.064	0.198	0.618	0.673

## 2.3 薇菜居群间遗传分化分析

由表5可见, 居群1(庐山野生居群)与居群2(恩施野生居群)间、居群2与居群3(恩施栽培居群)间的居群总近交系数分别为0.770和0.658, 说明庐山与恩施野生薇菜居群、恩施野生与栽培薇菜居群间均存在近交现象。居群1与居群2的平

表5 薇菜居群遗传分化分析

Table 5 Genetic differentiation analysis of *Osmunda japonica* populations

居群 Populations	居群内近 交系数 $F_{IS}$	居群总近 交系数 $F_{IT}$	遗传分 化系数 $F_{ST}$	基因流 $Nm$
庐山与恩施野生居群 Wild populations from Lushan and Enshi	0.746	0.770	0.092	2.468
恩施野生与栽培居群 Wild and cultivated populations from Enshi	0.630	0.658	0.075	3.086

Notes:  $F_{IS}$ , Inbreeding population polymorphism coefficient;  $F_{IT}$ , Total inbreeding coefficient;  $F_{ST}$ , Genetic differentiation coefficient;  $Nm$ , gene flow.

均遗传分化系数( $F_{ST}$ )为0.092, 属于中等分化( $0.05 < F_{ST} < 0.15$ )<sup>[26]</sup>, 说明仅有9.2%的遗传变异存在于居群之间, 90.8%的变异存在于居群内部, 表明庐山与恩施的野生薇菜居群存在一定程度的遗传分化, 但遗传分化程度较低; 恩施薇菜野生居群与栽培居群之间的遗传分化水平也较低( $F_{ST}$ 均值为0.075); 居群1与居群2、居群2与居群3间的基因流均值( $Nm$ )分别为2.468和3.086, 说明庐山与恩施薇菜野生居群间、恩施薇菜野生居群与栽培居群间的历史基因交流频繁。

对居群1与居群2、居群2与居群3之间的遗

传变异进行的AMOVA分析(表6)表明, 庐山与恩施薇菜野生居群的12.10%遗传变异存在于居群间, 87.90%存在于居群内, 说明遗传变异主要来自于居群内部; 恩施薇菜野生与栽培居群的遗传变异也主要来源于居群内部。

## 3 讨论

### 3.1 薇菜居群的遗传多样性分析

SSR分子标记具有多态性高、重复性好以及呈共显性遗传等优点, 已被广泛应用于蕨类植物的遗传学研究中<sup>[27]</sup>。李磊等<sup>[16]</sup>利用改良的FIASCO法开发了9个蜈蚣草(*Pteris vittata*)SSR分子标记, 且各位点的平均等位基因数为4.556个, 香农指数值为0.500~1.146(均值0.783)。Woodhead等<sup>[28]</sup>开发了10个蹄盖蕨属*Athyrium distentifolium*的EST-SSR多态性分子标记, 且各位点的平均等位基因数为4.800个。本研究开发的9个薇菜SSR分子标记在3个居群中共检测到47个等位基因, 各位点的平均等位基因数为5.222个, 香农指数范围为0.962~1.860(均值1.397), 均高于李磊等<sup>[16]</sup>、Woodhead等<sup>[28]</sup>开发的SSR标记, 表明这9对SSR分子标记具有较好的多态性, 可应用于薇菜分子遗传学方面的研究。

利用开发的9个SSR分子标记对庐山薇菜野生居群、恩施薇菜野生居群和恩施薇菜栽培居群进行的遗传多样性评价表明, 2个薇菜野生居群的期望杂合度均明显高于观测杂合度, 说明杂合子缺失, 这可能是由于群体内的非随机交配导致的。在蕨类植物世代交替过程中, 因配子体对水环境的要

表6 薇菜居群分子方差分析

Table 6 Analysis of molecular variance (AMOVA) for *Osmunda japonica* populations

变异来源 Source of variation	自由度 d.f.	离差平方和 Sum of squares deviation	方差分量 Variance components	方差分量比率(%) Percentage of variation	显著性 P
庐山与恩施野生居群 Wild populations from Lushan and Enshi					
居群间 Between populations	1	58.067	1.558	12.10	< 0.001
居群内 Within population	58	656.600	11.321	87.90	< 0.001
恩施野生与栽培居群 Wild and cultivated populations from Enshi					
居群间 Between populations	1	66.100	1.809	13.25	< 0.001
居群内 Within population	58	686.933	11.844	86.75	< 0.001

求较高，多通过自体受精的方式产生孢子体，从而导致了蕨类植物群体近交程度较高，群体中杂合子比例偏低<sup>[27]</sup>。本研究中，居群内近交系数均为正值，证实了非随机交配现象的存在，同样这也在蜈蚣草群体多样性分析中得到了验证<sup>[16]</sup>。

与庐山和恩施的2个野生居群相比，恩施薇菜栽培居群遗传多样性较低，这可能是由于人工栽培过程对薇菜进行了性状选择所导致的，因此我们应采取适当的措施，在更大范围内采集野生种质，以丰富和恢复栽培群体的遗传基础，避免人工驯化的过程中发生种质退化。

### 3.2 不同薇菜居群遗传分化分析

本研究中的2个薇菜野生居群之间的遗传分化较小，*F*-统计量的分析显示两居群间的遗传分化系数为0.092，AMOVA分析结果也表明12.10%的遗传变异存在于居群间。此外，*F*-统计量和AMOVA分析均显示，恩施的薇菜野生居群与栽培居群间的遗传分化较小，这可能是由于栽培居群的来源是野生居群所导致。

虽然地理隔离是造成居群遗传分化的重要因素，但蕨类植物以孢子繁殖，并借助空气进行传播，虽促进了不同居群间的基因交流<sup>[27,29]</sup>，同时也可能是导致不同居群间遗传分化较小的原因。居群间遗传分化较小的现象在蕨类植物中较为常见，如荷叶铁线蕨(*Adiantum reniforme* var. *sinense*)<sup>[30]</sup>、广西蜈蚣蕨(*Pteris vittata*)<sup>[31]</sup>、华中铁角蕨(*Asplenium sarelii*)<sup>[32]</sup>和披针莲座蕨(*Angiopteris caudatiformis*)<sup>[33]</sup>等，其中对荷叶铁线蕨自然居群的遗传多样性研究发现，98.51%的遗传变异存在于居群内部，居群间的遗传分化程度较低。

### 参考文献：

- [1] 王谋强, 励启腾. 薇菜干的营养品质分析[J]. 植物资源与环境学报, 2006, 4(2): 63-64.
- [2] 何义发. 经济蕨类植物紫萁的研究进展与展望[J]. 湖北农业科学, 2002 (6): 101-103.
- [3] 梁运江, 李伟, 王维娜, 鲁宇菡, 何忠. 薇菜的生物学特性及人工繁殖[J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2010, 11(2): 183-185.
- [4] 罗世家. 影响薇菜生长的主要环境因子分析[J]. 湖北民族学院学报: 自然科学版, 2001, 19(4): 8-
- [5] 朱英东. 薇菜野生资源恢复方法[J]. 蔬菜, 2014, (11): 50-51.
- [6] Milligan BG, Leebensmack J, Strand AE. Conservation genetics-beyond the maintenance of marker diversity[J]. *Mol Ecol*, 1994, 3(4): 423-435.
- [7] 张学义, 赵凤臣, 吴洪军, 张静, 安文和. 薇菜加工各阶段的营养成份分析[J]. 中国林副特产, 2000, (4): 6-7.
- [8] 张钟, 史竹兰. 三种薇菜产品营养成分的分析与比较[J]. 中国林副特产, 2007 (1): 1-4.
- [9] 田瑞, 程超, 汪兴平. 野生与栽培薇菜的营养成分分析与评价[J]. 食品科学, 2011, 32(23): 297-300.
- [10] Powell W, Machray GC, Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats[J]. *Trends Plant Sci*, 1996, 1(7): 215-222.
- [11] Selkoe KA, Toonen RJ. Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers[J]. *Ecol Lett*, 2006, 9(5): 615-629.
- [12] Yao XH, Ye QG, Kang M, Huang HW. Microsatellite analysis reveals interpopulation differentiation and gene flow in the endangered tree *Changiosytrax dolichocarpa* (Styracaceae) with fragmented distribution in central China[J]. *New Phytol*, 2007, 176 (2): 472-480.
- [13] Xu JJ, Lin Y, Zhu ZD. Development and applications of SSR markers in plant pathogens[J]. *Plant Prot*, 2008, 34(1): 14-21.
- [14] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: A review [J]. *Mol Ecol*, 2002, 11(1): 1-16.
- [15] Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues[J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19(1): 11-15.
- [16] 李磊, 敖日格乐, 王玢琪, 葛台明. 改良FIASCO方法筛选砷超富集植物蜈蚣草SSR分子标记[J]. 植物科学学报, 2014, 32(4): 413-420.
- [17] Tong YQ, Zhao J, Tao F, Li JH, Ge TM. Isolation and characterization of 16 highly polymorphic tetranucleotide microsatellite DNA markers in *Paa spinosa*[J]. *Biochem Syst Ecol*, 2014, 57: 257-261.
- [18] Li Q, Wan JM. SSRhunter: Development of a local

- searching software for SSR sites [ J ]. *Hereditas (Beijing)*, 2005, 27(5): 808–810.
- [19] Bassam BJ, Gresshoff PM. Silver staining DNA in polyacrylamide gels [ J ]. *Nat Protoc*, 2007, 2(11): 2649–2654.
- [20] Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. Micro-checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data [ J ]. *Mol Ecol Notes*, 2004, 4(3): 535–538.
- [21] Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ, Ye ZH, Mao JX. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis [ M ]. Edmonton: Molecular and Biotechnology Center, University of Alberta, 1997: 1–25.
- [22] 张鹏飞, 张福花, 张茹, 刘亚令, 王志广. 山西省榛属植物居群的 SSR 遗传多样性研究 [ J ]. 植物科学学报, 2014, 32(2): 131–138.
- [23] Slatkin M, Barton NH. A comparison of 3 indirect methods for estimating average levels of gene flow [ J ]. *Evolution*, 1989, 43(7): 1349–1368.
- [24] Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows [ J ]. *Mol Ecol Resour*, 2010, 10(3): 564–567.
- [25] 邱道寿, 郑希龙, 蔡时可, 郑锦荣, 罗焕明, 张蕾, 邓瑞云, 李武, 刘晓津. 石斛 SSR 标记的开发及可转移性分析 [ J ]. 植物科学学报, 2013, 31(5): 500–509.
- [26] Wright S. Evolution and the genetics of population [ M ]. Chicago: The University of Chicago Press, 1978: 205.
- [27] 周媛, 高磊, 汪志伟, 王艇. 分子标记技术在蕨类植物遗传多样性研究中的应用 [ J ]. 武汉植物学研究, 2009, 27(6): 667–673.
- [28] Woodhead M, Russell J, Squirrell J, Hollingsworth M, Cardle L, Ramsay L, Gibby M, Powell W. Development of EST-SSRs from the alpine lady-fern, *Athyrium distentifolium* [ J ]. *Mol Ecol Notes*, 2003, 3(2): 287–290.
- [29] Soltis PS, Soltis DE. Genetic-variation within and among populations of ferns [ J ]. *Am Fern J*, 1990, 80(4): 161–172.
- [30] 潘丽芹, 季华, 陈龙清. 荷叶铁线蕨自然居群的遗传多样性研究 [ J ]. 生物多样性, 2005, 13(2): 122–129.
- [31] 周厚高, 谢义林, 黎桦, 周琼, 张西丽, 王中仁, 周世良. 广西石灰岩地区蜈蚣蕨居群的遗传多样性研究 [ J ]. 广西植物, 2002, 22(1): 67–70.
- [32] 王可青, 王中仁, 张方. 二倍体华中铁角蕨 *Asplenium sarelii* Hook. 的等位酶遗传变异 [ J ]. 遗传学报, 1998, 25(5): 454–463.
- [33] 王玲, 和兆荣. 基于 ISSR 的披针莲座蕨居群遗传多样性分析 [ J ]. 云南大学学报: 自然科学版, 2008, 30(S2): 398–402.

(责任编辑: 刘艳玲)