

中国特有单种属血水草的微卫星分子标记开发与评价

王静¹, 胡菀^{1,2}, 阳亿¹, 肖昆¹, 范邓妹^{1*}, 张志勇¹

(1. 江西农业大学亚热带生物多样性实验室, 南昌 330045; 2. 江西农业大学林学院, 南昌 330045)

摘要: 血水草 (*Eomecon chionantha* Hance) 是中国亚热带地区特有的单种属植物。本研究采用 (AG)₁₅、(AC)₁₅ 两种生物素探针及磁珠富集法从血水草基因组中开发并筛选出 13 个微卫星位点, 且在该物种中能进行稳定的 PCR 扩增并表现出多态性。利用筛选出的 13 个 SSR 多态性标记对血水草 4 个野生居群 24 个个体进行 PCR 扩增, 结果显示每个微卫星位点的等位基因数为 2 ~ 7 个, 观测杂合度 (H_o) 和期望杂合度 (H_e) 分别为 0.125 ~ 0.792 和 0.299 ~ 0.691。说明这些 SSR 标记可用于血水草遗传多样性的后续研究, 并揭示该物种地理分布格局形成的原因, 有助于保护和利用中国亚热带地区的血水草野生资源。

关键词: 血水草; 罂粟科; 微卫星; 磁珠富集法; 遗传多样性

中图分类号: Q75

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2015)06-0855-06

Isolation and Characterization of Microsatellite Markers for *Eomecon chionantha*, a Monotypic Species Endemic to China

WANG Jing¹, HU Wan^{1,2}, YANG Yi¹, XIAO Kun¹, FAN Deng-Mei^{1*}, ZHANG Zhi-Yong¹

(1. Laboratory of Subtropical Biodiversity, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;

2. College of Forestry, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: *Eomecon chionantha* is a monotypic species endemic to subtropical China. In this study, 13 polymorphic microsatellite loci were developed from the genome of *E. chionantha* by magnetic bead enrichment, with biotin-labelled (AG)₁₅ and (AC)₁₅ probes. These loci were successfully amplified and displayed polymorphism. The polymorphism of each locus was screened among 24 individuals from four wild populations. Results showed that the number of alleles per locus varied from two to seven, and the observed and expected heterozygosity ranged from 0.125 to 0.792 and from 0.299 to 0.691, respectively. These SSR markers will provide tools for future studies on the genetic diversity of *E. chionantha* populations to help clarify current geographical distribution, and contribute to the conservation and utilization of wild resources of *E. chionantha* in subtropical China.

Key words: *Eomecon chionantha*; Papaveraceae; Microsatellite markers; Magnetic bead enrichment; Genetic diversity

血水草 (*Eomecon chionantha* Hance) 为罂粟科 (Papaveraceae) 血水草属多年生草本植物, 是我国特有的单种属植物^[1], 广泛分布在中国亚热带东部湿润的常绿阔叶林区。血水草具匍匐根茎, 叶心形且全部基生, 花葶细长、直立, 花朵较大、

白色^[1], 常成片生长于阴暗潮湿环境中, 可作为地被观赏植物应用于公园或保护区的水缘造景。此外, 血水草植株内含有丰富的生物碱, 具有抗菌、抑菌和灭螺的功能, 是一种开发生态型绿色药物的优良野生植物^[2]。血水草的适生生境对水分条件

收稿日期: 2015-06-17, 退修日期: 2015-07-18。

基金项目: 国家自然科学基金(31160043, 31160082); 国家科技支撑计划项目(2012BAC11B02)。

作者简介: 王静(1975-), 女, 硕士, 研究方向为系统与进化植物学(E-mail: wjmn_31456@163.com)。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: dmf.625@163.com)。

的要求较高，再加上长期的人为采挖和移栽，导致现存的野生血水草的生境片段化现象非常严重(张志勇野外调查资料)，其野生种群正呈现逐步缩小的趋势^[3]。因此，采用合适的分子标记对现有血水草野生居群的遗传多样性和遗传结构进行评价，可深入探讨血水草形成目前分布格局的原因，为制定相应的保护措施提供依据。

植物谱系地理学和群体遗传学研究中最常用的分子标记虽是叶绿体基因组片段，但因被子植物叶绿体基因组为母系遗传，其只能反映种子流，无法反映花粉流^[4]。近年来，直接获取单拷贝或低拷贝核基因序列已成为主要趋势^[5]，但从杂合子中获得等位基因序列通常需要克隆测序，导致实验时间长且花费较高。微卫星分子标记(simple sequence repeat, SSR)是根据已知微卫星位点(1~6个核苷酸串联重复序列)两侧的DNA序列来设计特异性引物，并经PCR扩增和电泳检测位点长度多态性^[6]。由于具有多态性

高、共显性、重复性好、容易筛选和分析等诸多优点，SSR标记是目前遗传多样性和遗传结构研究中的首选标记之一^[7,8]。随着荧光毛细管电泳技术在微卫星扩增和检测中的应用，微卫星标记的开发更加高效和廉价。本研究拟开发血水草的微卫星分子标记，并利用中国亚热带地区4个血水草居群对这些SSR标记进行筛选和初步检测，以期获得适于血水草遗传多样性和遗传结构研究的微卫星分子标记。

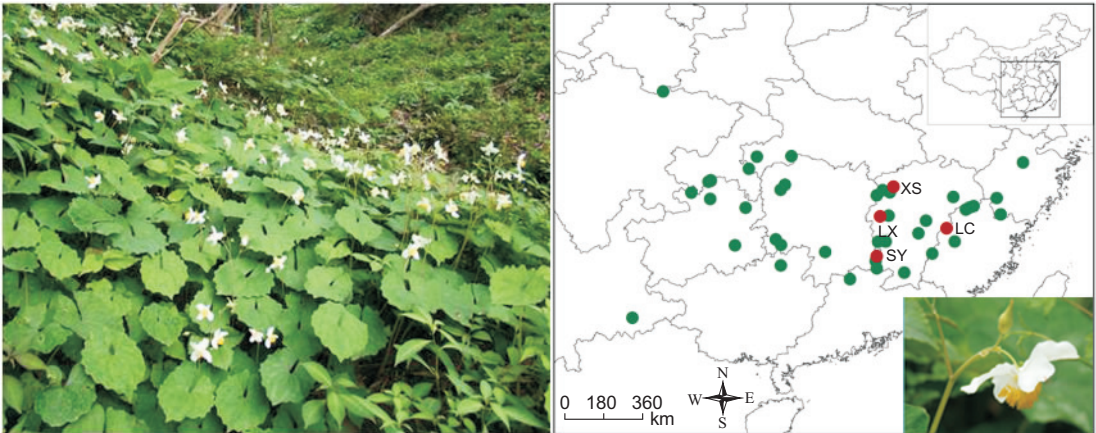
1 材料与方法

1.1 实验材料

4个血水草野生居群材料分别来自江西省黎川县、芦溪县、上犹县和修水县(表1,图1)，采集新鲜、健康的幼嫩叶片放入置有变色硅胶的采样袋中迅速干燥，带回实验室后于-20℃冰箱中保存、备用。4个血水草野生居群的采集凭证标本保存于江西农业大学亚热带生物多样性实验室(JXAU)。

表 1 四个血水草野生居群的采样信息
Table 1 Sampling information for each population of *Eomecon chionantha*

居群编号 Population codes	采集地点 Location	样品数 Sample No.	纬度 Latitude	经度 Longitude	海拔 Altitude (m)	标本号 Voucher No.
LC	江西省黎川县 Lichuan, Jiangxi	6	27°04'10"	116°55'57"	682	JXAU35286
LX	江西省芦溪县 Luxi, Jiangxi	6	27°33'41'	114°11'36"	525	JXAU35294
SY	江西省上犹县 Shangyou, Jiangxi	6	25°55'03"	114°03'03"	852	JXAU35307
XS	江西省修水县 Xiushui, Jiangxi	6	28°47'14"	114°44'20"	651	JXAU35254



右图中红色圆点代表本研究血水草居群的采集地点。
Red dots in the right figure represent the population sites sampled in this study.

图 1 血水草生境及其地理分布图
Fig. 1 Habitat and geographical range of *Eomecon chionantha*

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取

采用改良的 CTAB 法^[9]提取血水草干燥叶片的基因组 DNA, 并置于-20℃冰箱保存、备用。

1.2.2 微卫星富集文库的构建与克隆筛选

利用 FIASCO (Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing Repeats) 方法^[10]构建血水草基因组微卫星富集文库, 其实验操作流程如下:

(1) 基因组 DNA 酶切与接头连接。采用内切酶 Mse I (10 U/μL, MBI, Fermentas, Lithuania) 在 37℃ 条件下酶切 DNA 3 h, 然后置于 65℃ 10 min 对内切酶进行灭活处理; 酶切反应体系为 25 μL, 包括 2.5 μL NEB2、0.25 μL BSA、0.25 μL Mse I 内切酶、10 μL DNA (50 ng/μL)、17.25 μL 灭菌双蒸水。经电泳检测后, 挑选 DNA 片段为 200 ~ 800 bp 的酶切产物与接头连接, Mse I 接头序列分别为 F: 5'-TACTCAGGACTCAT-3' 和 R: 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'。连接反应体系为 30 μL, 包括 0.4 μL T4 DNA Ligase (5 U/μL)、正反接头各 3 μL、3 μL T4 Buffer、15 μL 酶切后的 DNA、8.6 μL 灭菌双蒸水, 37℃ 连接 2 h; 连接完成后, 置于 65℃ 10 min 对连接酶进行灭活处理。

(2) 连接产物预扩增。将连接产物稀释 10 倍后, 取出 5 μL 作为模板, 并利用 Mse I-N 引物 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAN-3' 和 5'-TTACTCAGGACTCATCN-3') 进行 PCR 扩增; 然后使用上海生工 SanPrep 柱式 PCR 产物回收试剂盒对扩增产物进行纯化。PCR 反应程序为: 95℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 53℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 26 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。

(3) 生物素探针杂交与磁珠富集。以 (AG)₁₅ 和 (AC)₁₅ 为生物素探针, 95℃ 变性 5 min, 48℃ 杂交 2 h。250 μL 杂交体系中包括 30 μL DNA、52.5 μL 20 × SSC、1.75 μL 10% SDS、1.5 μL 100 pmol/L 生物素探针、164.25 μL 双蒸水。采用 Promega MagneSphere 磁珠对微卫星片段进行富集: 将已与生物素探针杂交的 DNA 和制备的磁珠悬浮液混匀, 室温放置 30 min; 在磁场中吸附磁珠并吸取上清; 非严格洗涤分别采用 600 mL 和 800 mL TEN1000 (10 mmol/L Tris-HCL + 1 mmol/L EDTA + 1 mol/L

NaCl, pH 7.5) 在室温下顺次冲洗磁珠 1 ~ 2 次, 每次 3 ~ 5 min, 严格洗涤则采用 500 μL 洗脱液 (10 μL 20 × SSC + 10 μL 10% SDS + 980 μL 双蒸水) 在 42℃ 条件下冲洗磁珠 3 次, 每次 5 min; 加入 50 μL TE, 95℃ 变性 5 min, 使目的片段从杂交复合物上解离下来, 磁珠吸附并收集上清液, 同时配置 50 μL 变性液 (12 μL 10 mol/L NaOH + 11.52 μL HAc + 26.48 μL TE) 加入到磁珠中再一次变性, 磁珠吸附后收集上清液。取富集回收杂交产物 5 μL, 以 Mse I-N 为简并引物进行 PCR 扩增, 然后利用上海生工 SanPrep 柱式 PCR 产物回收试剂盒进行纯化。

(4) 克隆筛选与测序。采用 pLB 零背景快速克隆试剂盒 (Tiangen) 对已纯化的 PCR 产物进行克隆筛选。将 PCR 产物与 pZeroBack/blunt 载体连接并转入大肠杆菌感受态细胞中, 挑取培养皿中的白色菌斑, 经液体培养基培养后, 用引物 (AG)₁₀ 或 (AC)₁₀ 和载体引物 (5'-CGACTCAC-TATAGGGAGAGCGGC-3' 和 5'-AAGAACATCG-ATTTTCCATGGCAG-3') 进行 PCR 扩增, 筛选出含有微卫星 DNA 序列的阳性克隆, 并送至上海生物工程有限公司测序。

1.2.3 微卫星引物设计

采用 Tandem Repeats Finder 软件对获得的 DNA 片段序列进行微卫星分析^[11]; 然后用 Oligo 7.0 软件^[12]在微卫星两翼设计引物。SSR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.4 引物检测

在血水草的 4 个野生居群中分别随机选取 1 份 DNA 样品, 并利用合成的微卫星引物对其进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 10 μL, 主要包括 20 ~ 50 ng 模板 DNA、0.5 μmol/L 正、反向引物、5 μL 2 × Taq PCR MasterMix (Tiangen; 含 0.1 U/μL Taq DNA polymerase、0.5 mmol/L dNTP、20 mmol/L Tris-HCl [pH 8.3]、100 mmol/L KCl、3 mmol/L MgCl₂)。PCR 反应程序为: 95℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 45 s, 45 ~ 60℃ (每对引物退火温度不同) 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 32 ~ 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min。采用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶对 PCR 扩增产物进行电泳检测,

其中对能够成功扩增的引物进一步优化其最佳反应条件。

1.2.5 多态性引物筛选与分析

选择能够成功扩增的引物对 4 个血水草野生居群共 24 个个体(表 1)进行 PCR 扩增,以期从中筛选出谱带清晰、扩增稳定性好、多态性高的 SSR 引物。PCR 产物经 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,并根据每个个体产生的条带位置确定其基因型,再利用 GenAlEx V.6.3 软件^[13]进行居群遗传多样性分析,计算每个多态性位点的等位基因数(number of allele, N_A)、观测杂合度(observed heterozygosity, H_O)和期望杂合度(expected heterozygosity, H_E)。

2 结果与分析

从富集的微卫星文库中挑选 253 个阳性克隆

进行测序,然后对获得的 DNA 片段序列比对,发现有 227 条序列(90%)含有非同源微卫星片段,其中 203 条(89.4%)含 AG 重复,24 条(10.6%)含 AC 重复。去除重复序列和长度较短的序列,以微卫星重复单元位于中部的序列共设计了 162 对特异性引物¹⁾,然后从中挑选 82 对 SSR 引物进行合成。

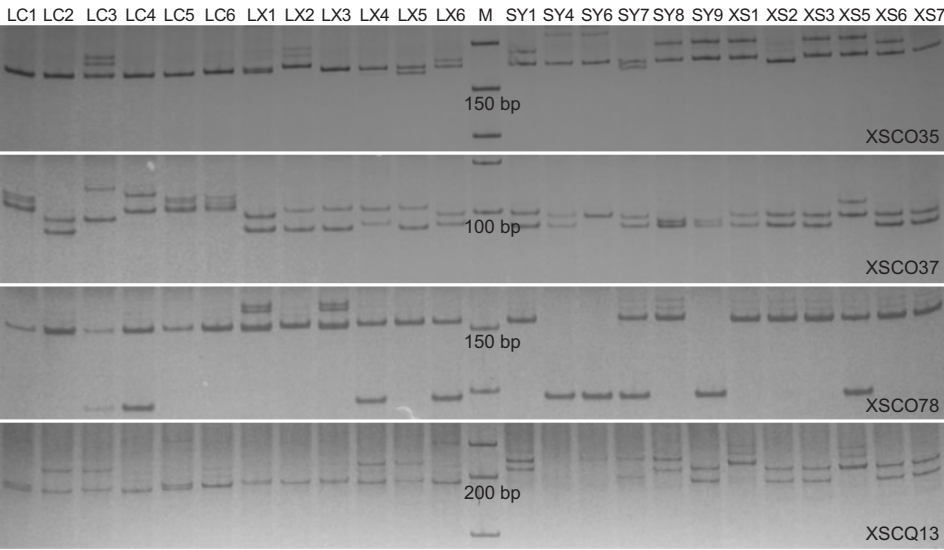
用 4 个血水草样本对合成的 82 对 SSR 引物进行初步检测发现,有 52 对引物能扩增出与预期片段大小相同或相近的 DNA 条带。然后,利用初步筛选的 52 对 SSR 引物对 24 个血水草野生居群样品进行 PCR 扩增,结果显示有 33 对引物扩增条带清晰且稳定性较好,但其中 12 对引物没有检测到微卫星多态性,8 对引物呈现非特异性扩增,因此共成功选择出适于血水草野生居群遗传多样性分析的 13 对多态性较高的 SSR 引物(表 2,图 2)。

表 2 血水草 13 对微卫星引物的特征分析
Table 2 Characteristics of 13 microsatellite primers in *Eomecon chionantha*

位点 Locus	引物序列 (5'-3') Primer sequences	重复单元 Repeat motif	退火温度 T _m (℃)	片段大小 Allele size (bp)	等位 基因数 N_A	观测 杂合度 H_O	期望 杂合度 H_E	序列号 GenBank accession No.
XSCO11	F: GCTCGGCTTCGTTGTCGT R: GTGGCGCTGACGTGGCAA	(CT) ₁₆	50.5	186	4	0.583	0.455	KP892731
XSCO35	F: TTATTAGTGGGTGAAGGC R: ACGGTACGGAATGAAAGT	(TC) ₁₈	48	177	6	0.458	0.438	KP892732
XSCO37	F: AGTTTCACATAATCGGC R: GGTCAGGATTGGGGTAA	(TC) ₁₀	46	119	6	0.792	0.639	KP892733
XSCO78	F: TGAACTCGCACCTCTACAAC R: CTGAGTAAGGGGAAGTTGCG	(CT) ₁₀	57	155	2	0.250	0.299	KP892734
XSCV42	F: CTGAGTAAGGAAGGAAAG R: CACATAACTGGAGCGATAAC	(GA) ₈	51.5	131	4	0.125	0.375	KP892738
XSCQ13	F: GATTAGAGGGAGGCAAGAGA R: GCCCTACTGAATGCTTGT	(GA) ₁₂	60	199	7	0.625	0.653	KP892735
XSCQ25	F: TGAGCGGATTAGGATAAGG R: CGATACTACTCCGCCAT	(TC) ₈	53.4	218	4	0.417	0.556	KP892736
XSCQ60	F: ACAGCATTGAGGTTTAGCA R: ATGCTTCGTGGTCTGATCC	(GA) ₉	44.7	218	4	0.333	0.333	KP892737
XSCV35	F: TGAGTAAGGCAGAGACCACA R: ATCTATTCTCCCAACCGTC	(AG) ₁₁	60	104	6	0.292	0.691	KR781500
XSCV51	F: TAACAACAGGGAGAGCAGAA R: GCCTGCTTCAAATCATCTAT	(GA) ₈	56.7	172	5	0.583	0.576	KR781501
XSCV54	F: TGACAAATGGATAGGGATGC R: AGTTACAGGGAGAGCCGAAG	(AG) ₁₂	51	221	6	0.292	0.552	KR781502
XSCQ62	F: ATCACAAACCCTAACCCCT R: AGAACACACAAGCACCAC	(CT) ₅ ...(CT) ₅	52.5	243	5	0.550	0.509	KR781498
XSCS7	F: CAGGATTTTTAGGAAGCAAG R: AATGACATACACGGATACAC	(GT) ₁₁ (GA) ₁₀	54	118	5	0.342	0.518	KR781499

注: N_A , 等位基因数; H_O , 观测杂合度; H_E , 期望杂合度。
Notes: N_A , Number of alleles; H_O , Observed heterozygosity; H_E , Expected heterozygosity.

1) 设计的 162 对血水草 SSR 特异性引物, 如需查阅请与作者邮件联系。



M: DNA maker.

图 2 部分微卫星位点的聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 2 Amplified profiles of several microsatellite loci on 8% non-denaturant polyacrylamide gel

利用 13 对多态引物对 4 个血水草野生居群 24 个个体进行遗传多样性分析(表 2)，共检测到 64 个等位基因，每个 SSR 位点的等位基因数 (N_A) 为 2 ~ 7 个，平均等位基因数 5 个；观测杂合度(H_O) 为 0.125 ~ 0.792 (均值 0.434)，期望杂合度(H_E) 为 0.299 ~ 0.691 (均值 0.507)。

3 讨论

本研究通过 FIASCO 方法成功构建了血水草基因组微卫星富集文库，并且得到微卫星阳性克隆的比率很高，重复率也较低，进一步从 253 个阳性克隆中筛选出 227 条富含微卫星的序列，效率高达 90%。FIASCO 相对于传统的富集基因组文库方法更为高效，但其仍需进行酶切、建库、富集、克隆、筛选等一系列较为繁琐的实验步骤^[10]，因此近年来采用高通量测序技术在植物中开发微卫星标记的报道^[14,15] 越来越多。高通量测序具有快捷、高效等优点，但其实验成本仍较高，更适合于大规模微卫星引物的开发。在进行居群遗传多样性分析时，需要的微卫星位点数量较少，目前 FIASCO 应是一种高效且更加经济的微卫星标记开发方法；随着大批快速 DNA 连接、克隆等试剂盒的出现，FIASCO 的实验方法也将更加快捷、简便。

本研究获得的微卫星序列中，AG 重复类型所占比列高于 AC 重复类型，这与前人报道的植物

SSR 中的优势重复碱基类型一致^[16]。一般来讲，序列内碱基重复次数越高，核心序列越长，微卫星多态性越好^[17,18]。我们从设计的 162 对特异性 SSR 引物中挑选出 82 对进行合成和筛选，这 82 对引物的微卫星序列内碱基重复次数均 > 8，有利于筛选出多态性信息含量高且适于血水草居群遗传多样性分析的微卫星位点。

利用筛选出的 13 对多态性 SSR 引物对血水草 4 个野生居群的 24 个个体进行遗传多样性检测发现，每个 SSR 位点的平均等位基因数 (N_A) 为 5 个，平均观测杂合度(H_O) 为 0.434，平均期望杂合度(H_E) 为 0.507，这与罂粟科其他物种如多刺绿绒蒿 ($H_O = 0.442$, $H_E = 0.458$ ^[19])、虞美人 ($H_E = 0.547$ ^[20]) 的遗传多样性参数相近。血水草为典型的异花授粉多年生草本植物^[21]，其地理分布范围广，并且为集体开花模式，对气候和环境变化的生殖适应性强^[22]，这些特性均有利于血水草遗传变异的积累；同时，血水草作为第三纪孑遗物种，在长期进化中也积累了大量的遗传变异。此外，笔者所在课题组基于叶绿体和核基因组片段序列分析发现，血水草的遗传多样性较高(未发表数据)，表明血水草资源减少的主要原因很可能是人类活动的影响，如大量采挖和生境破坏。当然，由于本研究中的样本数量太少，血水草野生居群的遗

传多样性水平评估还需针对中国亚热带地区范围内系统取样。综上分析,本研究开发的 SSR 多态性标记可用于血水草遗传多样性的后续研究,进一步揭示该物种地理分布格局形成的原因,有助于保护和利用中国亚热带地区血水草的野生种质资源。

致谢:感谢江西农业大学农学院李波和雷抒情老师在样品采集中给予帮助;感谢呼慧丽、袁琳和胡妍月同学在实验中给予帮助。

参考文献:

- [1] Zhang ML, Su ZY, Lidén M, Grey-Wilson C. *Papaveraceae*[M]// Wu ZY, Raven PH eds. *Flora of China*. Beijing and St. Louis: Science Press and Missouri Botanical Garden Press, 2010: 85–93.
- [2] 刘铭, 田大伦. 血水草生态解剖学特征及其药理功能研究进展[J]. *生态学报*, 2009, 29(3): 1525–1534.
- [3] 胡雪华, 陈香, 肖宜安, 廖信军, 鞠建文, 郭永久. 中国特有植物血水草 RAPD 反应体系的优化[J]. *植物研究*, 2011, 31(1): 89–94.
- [4] Petit RJ, Duminil J, Fineschi S, Hampe A, Salvini D, Vendramin GG. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations[J]. *Mol Ecol*, 2005, 14(3): 689–701.
- [5] Gao J, Wang BS, Mao JF, Ingvarsson P, Zeng QY, Wang XR. Demography and speciation history of the homoploid hybrid pine *Pinus densata* on the Tibetan Plateau[J]. *Mol Ecol*, 2012, 21: 481–4827.
- [6] Lagdgerantz U, Ellegren H, Andersson L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates[J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(5): 1111–1115.
- [7] Powell W, Machray GC, Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats[J]. *Trends Plant Sci*, 1996, 1(7): 215–222.
- [8] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [9] Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19(1): 11–15.
- [10] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review[J]. *Mol Ecol*, 2002, 11(1): 1–16.
- [11] Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences[J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27: 573–580.
- [12] Rychlik W. OLIGO 7 primer analysis software[M]//Yuryev A ed. *Methods in Molecular Biology*. Totowa: Humana Press Inc., 2007: 35–59.
- [13] Peakall ROD, Smouse PE. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research[J]. *Mol Ecol Notes*, 2006, 6(1): 288–295.
- [14] Malausa T, Gilles A, Meglécz E, Blanquart H, Duthoy S, Costedoat C, Dubut V, Pech N, Castagnone-Sereno P, Délye C, Feau N, Frey P, Gauthier P, Guillemaud T, Hazard L, Corre VL, Lung-Escarmant B, MalÉ PJG, Ferreira S, Martin JF. High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries[J]. *Mol Ecol Res*, 2011, 11(4): 638–644.
- [15] Zalapa JE, Cuevas H, Zhu HY, Steffan S, Senalik D, Zeldin E, McCown B, Harbut R, Simon P. Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences[J]. *Am J Bot*, 2012, 99(2): 193–208.
- [16] Morgante M, Olivieri AM. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics[J]. *Plant J*, 1993, 3(1): 175–182.
- [17] Wierdle M, Dominska M, Petes TD. Microsatellite instability in yeast: dependence on the length of the microsatellite[J]. *Genetics*, 1997, 146(3): 769–779.
- [18] Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited[J]. *Genetics*, 1993, 133(3): 737–749.
- [19] Zhao Y, Zhang SB, Yang J, Zhang L. Characterization of 13 microsatellite loci developed from *Meconopsis horridula*[J]. *Genet Mol Biol*, 2010, 33(3): 539–541.
- [20] Kati V, Corre VL, Michel S, Jaffrelo L, Poncet C, Délye C. Isolation and characterization of 11 polymorphic microsatellite markers in *Papaver rhoeas* L. (corn poppy), a major annual plant species from cultivated areas[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(1): 470–479.
- [21] 陈香, 胡雪华, 廖信军, 肖宜安, 鞠建文, 郭永久. 井冈山血水草种群遗传多样性的 RAPD 分析[J]. *植物研究*, 2011, 31(2): 199–205.
- [22] 陈香, 胡雪华, 陆耀东. 中国特有植物血水草开花物候与生殖特性[J]. *生态学杂志*, 2011, 30(9): 1915–1920.

(责任编辑: 刘艳玲)