

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.05.006

王运华,李楠,陈庭,等. 种间转移扩增筛选仙湖苏铁微卫星位点及其遗传多样性研究[J]. 广西植物,2014,34(5):608-613

Wang YH, Li N, Chen T, et al. Screening of microsatellite loci by cross-species amplification and their use in *Cycas fairylakea* (Cycadaceae)[J]. *Guihaia*, 2014, 34(5): 608-613

种间转移扩增筛选仙湖苏铁微卫星位点及其遗传多样性研究

王运华, 李楠, 陈庭, 邓焕祥

(深圳市中国科学院仙湖植物园 深圳市南亚热带植物多样性重点实验室, 广东 深圳 518004)

摘要: 运用刺叶苏铁、葫芦苏铁、海南苏铁的 SSR 引物, 在仙湖苏铁中进行种间转移扩增, 筛选得到 7 对引物能扩增出清晰的特异带, 其中 3 对引物的扩增产物具有多态性。为验证微卫星的真实性, 扩增产物切胶回收后克隆测序。结果表明: 重复单元的数目变化是扩增片段长度多态性的主要来源。运用筛选出的 3 对 SSR 标记对 4 个仙湖苏铁野生种群进行遗传结构研究, 等位基因数从 2~5, 杂合度从 0.000~0.667, 期望杂合度为 0.000~0.610。种群两两遗传分化系数从 0~0.382。总体上仙湖苏铁遗传多样性水平低, 而种群间遗传分化显著。STRUCTURE 分析结果表明, 4 个野生种群可被分配到 3 个假想的遗传簇。BOTTLENECK 分析结果表明种群近期没有遭遇瓶颈效应。

关键词: 仙湖苏铁; 微卫星; 种间转移扩增; 遗传多样性

中图分类号: Q949.62 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2014)05-0608-06

Screening of microsatellite loci by cross-species amplification and their use in *Cycas fairylakea* (Cycadaceae)

WANG Yun-Hua, LI Nan, CHEN Ting, DENG Huan-Xiang

(Shenzhen Key Laboratory of Southern Subtropical Plant Diversity, Fairylake Botanical Garden, Shenzhen & Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518004, China)

Abstract: Simple sequence repeat (SSR) markers developed from *Cycas rumphii*, *C. changjiangensis* and *C. hainanensis* were cross-species amplified in genomic leaf DNA of *C. fairylakea*. The positive PCR productions were cloned and sequenced. Seven loci consistently yielded the predicted size ranges. Of these loci, three were polymorphic and confirmed as simple sequence repeat (SSR) loci in *C. fairylakea*. They were utilized to investigate the genetic diversity among four wild populations of *C. fairylakea*. The number of alleles per locus ranged from 2 to 5, and the observed and expected heterozygosities varied from 0.000 to 0.667 and from 0.000 to 0.610, respectively. Pairwise F_{st} varied from 0 to 0.382. In the whole, *C. fairylakea* has low levels of genetic variation within populations and high variation across populations. The STRUCTURE analysis indicated that the four *C. fairylakea* populations could be subdivided into three different hypothetical genetic clusters (K). The BOTTLENECK results suggested that no populations had faced recent significant bottleneck.

Key words: *Cycas fairylakea*; microsatellite; cross-species amplification; genetic diversity

收稿日期: 2013-10-15 出版日期: 2014-08-25

基金项目: 国家林业局“珍稀濒危物种野外救护与繁育”财政专项(2010); 深圳市仙湖植物园基金(2012)。

作者简介: 王运华(1976-), 男, 湖北仙桃人, 助理研究员, 从事植物多样性研究, (E-mail) 76wasir@163.com。

苏铁类植物是现存最古老的种子植物,全世界现存苏铁类植物有 3 科(苏铁科、蕨叶铁科与泽米科)11 属约 300 种(Norstog *et al.*, 1997),星散分布于热带与亚热带地区。我国仅有苏铁属分布,共有 23 种(陈家瑞等, 2011),全部列入国家重点保护野生植物名录。仙湖苏铁(*Cycas fairylakea*)是国家一级濒危保护植物,目前仅在我国广东省和福建省发现有自然分布,个体数在 4 000 株以下。除广东省深圳市的两个种群外,其余种群野生个体总数均不足 20 株(王定跃, 1996; 简曙光等, 2005a)。

微卫星分子标记(也称简单重复序列, Simple Sequence Repeat, SSR)具有分布广泛、多样性高、共显性、可转移性等特点,已被广泛用于物种的遗传多样性研究(Powell *et al.*, 1996)。目前,在刺叶苏铁(*Cycas rumphii*)(Cibrián-Jaramillo *et al.*, 2008)、葫芦苏铁(*C. changjiangensis*)(Li *et al.*, 2009)和海南苏铁(*C. hainanensis*)(Zhang *et al.*, 2009)等多种苏铁中已成功开发了 SSR 分子标记。SSR 引物在亲缘关系较近的不同物种间具有一定通用性,将这些已成功开发的 SSR 分子标记运用到同属的仙湖苏铁中,可充分利用现有资源、减少引物开发成本。本文采用种间引物转移扩增方法,从亲缘物种的 SSR 引物中筛选仙湖苏铁微卫星位点,并运用其进行种群遗传结构研究,以期对仙湖苏铁种群恢复和保护策略的制定提供遗传多样性方面的参考。

1 材料与方 法

1.1 材料

从广东省的梅林水库(ML)、塘朗山(TLS)、曲江县罗坑水库(LK)和福建省马坑(MK)4 个仙湖苏铁自然种群中采集 115 份个体植株的新鲜叶片。梅林水库的样品包括 34 份 1~2 年生幼苗,其余样品均为成年个体植株且均匀分布在种群中,每个个体采集 3~5 个羽片,用硅胶干燥保存。

1.2 DNA 提取与引物筛选

用 CTAB 法提取叶片总 DNA(Doyle, 1991)。选取 4 个仙湖苏铁 DNA 样品(来自 4 个不同的野生种群),用刺叶苏铁(Cibrián-Jaramillo *et al.*, 2008)、葫芦苏铁(Li *et al.*, 2009)和海南苏铁(Zhang *et al.*, 2009)的 SSR 引物序列,在仙湖苏铁中进行种间转移 PCR 扩增。引物由上海生工合成,引物序列来自引用文献。PCR 反应体系为 20 μ L,

含有 30 ng DNA, 2.0 μ L 10 \times buffer(含 20 mmol \cdot L⁻¹ Mg²⁺), 1.0 μ L(10 mmol \cdot L⁻¹) dNTP, 上下游引物各 2.0 μ L(2.0 μ mol \cdot L⁻¹), 1.0 μ L(2U) Taq 酶(Takara), ddH₂O 补齐。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 随后 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 45~60 $^{\circ}$ C 退火 30 s(退火温度因引物而定), 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 循环 35 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增产物在 3% 的琼脂糖凝胶上进行电泳, 紫外灯下检测。对于成功扩增出目的条带的样品, 在 8% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 采用快速银染法检测。

1.3 SSR 分型与真实性验证

对于成功扩增的 SSR 引物, 用 6-FAM(羧基荧光素)荧光标记 SSR 引物(上海生工), 在 115 份仙湖苏铁 DNA 样品中进行 PCR 扩增, 反应体系和程序采用上文的方案, PCR 扩增产物用 ABI 3730XL 进行毛细管检测分型(华大基因), 分型结果运用 GeneMarker v1.90(SoftGenetics LLC)软件分析。

为了验证 SSR 位点的真实性, 将 PCR 扩增产物进行 TA 克隆并测序分析, 各位点扩增的不同大小片段至少选取一个进行克隆测序。PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶在 1 \times TAE 缓冲液中电泳后, 用切胶纯化试剂盒纯化(北京天根), 将纯化后的片段连接到 Pmd19-T 载体系统中(Takara), 随机挑选 2~3 个克隆, 用质粒小抽试剂盒纯化(Takara)。纯化后的质粒用 M13 通用引物(M13RV: CAG-GAAACAGCTATGAC, M13M4: GTTTTC-CCAGTCACGAC)进行 PCR 鉴定, 用 ABI 3710 自动测序仪双向测序(上海立菲生物)。DNA 序列运用 Bio Edit 7.0 软件的 ClustalX 进行人工比对。

1.4 数据分析

1.4.1 遗传多样性指数 用 GenAlEx v6 软件计算每个种群各位点的等位基因数目(N_a)、杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e), 以及固定系数(F), 并检测哈温平衡(Peakall *et al.*, 2006)。

1.4.2 种群遗传结构 采用 GenAlEx v6 软件计算 pairwise F_{st} , 得出群体两两之间的遗传分化系数。假定有 K 个(未知)遗传群体, 样本个体被随机指派到群体中, 如果某些个体的基因型显示他们是混合的情况, 而且他们甚至加入到两个或多个群体中, 通过对不同 K 值下概率的对数值进行比较, 即可确定最佳的 K 值。用这种方法可以解释现有群体结构, 识别独特的遗传群体, 将个体指派到群体中, 鉴定迁移者和混合的个体。采用 STRUCTURE 2.3.4 软

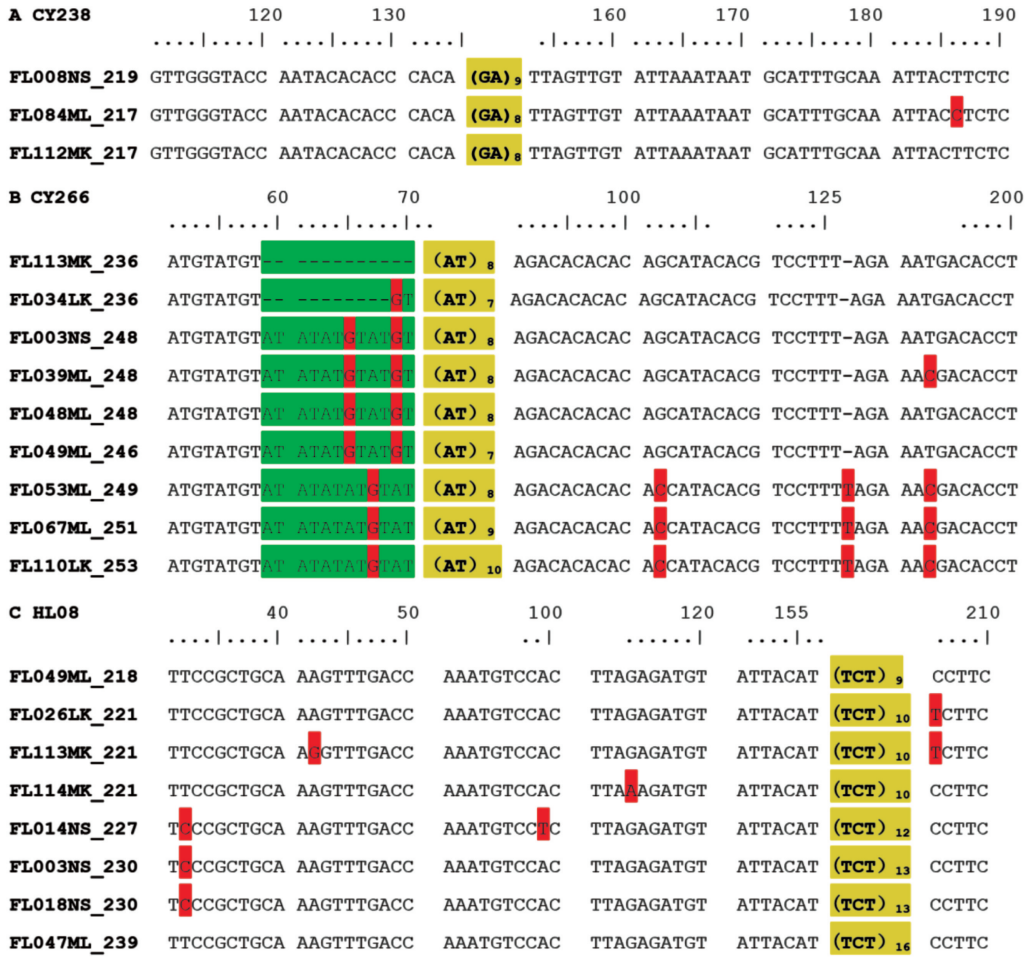


图 1 微卫星位点 CY238(A)、CY266(B)、HL08(C)的 DNA 序列比对 第一行数字表示一致序列的碱基位点。黄色标示区域为微卫星的重复区,括号内的核酸为重复单元,下标为重复数。红色标示处为单个的碱基突变,绿色标示区域为存在插入或缺失的位点。

Fig. 1 Alignment of a subset of DNA fragments at simple sequence repeat(SSR) loci CY238(A),CY266(B) and HL08(C) Numbers in the top line indicate positions relative to the consensus sequences. Bold nucleotides in brackets indicate SSR motifs and their number of repeats. Dashes indicate gaps,highlighted nucleotides in red mark mutations from one base to another,green box indicate groups of insertion or deletions.

表 1 仙湖苏铁中筛选的微卫星位点

Table 1 Characteristics of microsatellite loci in *Cycas fairylakea*

微卫星位点 Locus	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	重复单元 Repeat motif	退火温度 T (°C)	等位基因大小 Allele range	等位基因数 Na
CY238	F: TGCCCATGATTTTGGTTTT R: AAATTTGCTGATTCGGCTTC	(GA) _n	55~53	217~219	2
CY266	F: AAATGCTTTGATGTTCCAAA R: ATGCAATGCTCAACAAGCTG	(AT) _n	56~54	236~253	5
HL08	F: AAAACATTCCTTGCCTGT R: GGAGCCTGTTGAAGAGCTA	(TCT) _n	55~53	218~239	5

件推算种群的遗传结构。设定 K 值从 2~7,参数设为 100 000 burn-in steps 和 100 000 MCMC simulation steps,其它参数选择默认设置。

在经历了瓶颈的种群中,有效种群大小下降,根据种群内等位基因频率推算得来的期望杂合度也会

相应减少,但等位基因数的降低比杂合度更快,从而使得杂合度比期望杂合度大,即杂合子过量,反之为杂合子不足。采用 BOTTLENECK 1.2.02 测试群体中最近是否遭遇瓶颈效应。选择适合 SSR 位点的 SMM(Stepwise Mutation Model)和 TPM(Two-

Phase Model) 两种突变模型进行分析, 结果采用 Wilcoxon 和 SIGN 两种方法进行显著性检测。

2 结果与分析

筛选 7 对能清晰扩增出目的大小的特异性条带引物。分别来自葫芦苏铁的 HL08、海南苏铁的 Ch05、刺叶苏铁 CY238、CY240、CY266、CY270、CY284。其中引物 CY238、CY266、HL08 在仙湖苏铁 115 个样品 DNA 中扩增出多态性条带, 大小在 217~253 bp 之间, 另外 4 对引物只呈现单态性(表 1)。对 3 个多态性位点的各类等位基因的测序结果证实了 GA, AT, TCT 简单重复序列的存在, 同时还得到了 SSR 位点的侧翼序列以及存在的单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)和插入缺失(Indel)位点, 但重复单元的数目变化是扩增片段长度多态性的主要来源(图 1)。结果表明新筛选的 3 个多态性 SSR 位点可用于仙湖苏铁遗传多样性研究。

115 个样品在 CY238、CY266、HL08 位点上的等位基因数分别为 2、5、5, 杂合度从 0.000~0.667, 期望杂合度为 0.000~0.610。4 个野生种群中梅林(ML)、塘朗山(TLS)的多样性最高, 包含平均等位基因个数分别为 3.667 和 3.333。罗坑(LK)和马坑(MK)种群多样性最低, 平均等位基因个数均为 1.667。4 个种群中 3 个位点的哈温平衡检测结果表明, CY238 位点因缺乏杂合度而偏离哈温平衡, LK 种群的 HL08 和 CY266 位点因杂合度过剩而偏离哈温平衡。偏离哈温平衡说明种群内存在非随机交配现象。固定系数说明 ML($F=0.268$)、TLS($F=0.133$)两种群存在中等至较高水平的近亲繁殖, LK 和 MK 种群过度杂合。遗传多样性分析结果见表 2。

种群两两间遗传分化系数, 即 Pairwise F_{st} 的大小从 0~0.382 之间。结果说明仙湖苏铁种群之间已显著分化, 即使是地理距离相对较近的 ML 和 TLS 种群也有显著的遗传分化。ML 与 TLS 种群间遗传分化相对最小($F_{st}=0.199$, $P=0.010$), 而与 LK 和 MK 种群的分化大, 遗传分化系数分别为 0.382($P=0.010$)和 0.361($P=0.010$), TLS 种群与 LK 和 MK 种群也有显著分化, 遗传分化系数分别为 0.238($P=0.010$)和 0.208($P=0.010$)。LK 和 MK 种群间的遗传分化系数为 0($P=0.320$), $P>0.05$ 结果不显著(表 3)。

表 2 仙湖苏铁四个野生种群的遗传多样性分析
Table 2 Genetic diversity within populations of *Cycas fairylakea* using the 3 newly developed polymorphic microsatellite markers

种群 Population	微卫星 位点 Locus	样本数 N	等位 基因数 Na	杂合度 H_o	期望 杂合度 H_e	固定系数 F
梅林 ML	HL08	75	5.000	0.533	0.610	0.126
	CY266	75	4.000	0.653	0.550	-0.189
	* CY238	75	2.000	0.067	0.494	0.865
	Mean	75.000	3.667	0.418	0.551	0.268
	SE	0.000	0.882	0.179	0.034	0.312
塘朗山 TLS	HL08	20	4.000	0.600	0.580	-0.034
	CY266	20	4.000	0.650	0.554	-0.174
	* CY238	20	2.000	0.100	0.255	0.608
	Mean	20.000	3.333	0.450	0.463	0.133
	SE	0.000	0.667	0.176	0.104	0.241
罗坑 LK	* HL08	14	2.000	1.000	0.500	-1.000
	* CY266	14	2.000	1.000	0.500	-1.000
	* CY238	14	1.000	0.000	0.000	Monomorphic
	Mean	14.000	1.667	0.667	0.333	-1.000
	SE	0.000	0.333	0.333	0.167	0.000
马坑 MK	HL08	6	2.000	1.000	0.500	-1.000
	CY266	6	2.000	1.000	0.500	-1.000
	* CY238	6	1.000	0.000	0.000	Monomorphic
	Mean	6.000	1.667	0.667	0.333	-1.000
	SE	0.000	0.333	0.333	0.167	0.000
总计 Total	Mean	28.750	2.583	0.550	0.420	-0.280
	SE	8.189	0.379	0.119	0.062	0.202

注: * 显著偏离哈温平衡($P<0.01$); SE. 标准误差。

Note: * Significant departure from Hardy-Weinberg Equilibrium($P<0.01$); SE. standard error.

表 3 种群间 F_{st} 的两两比对

Table 3 Pairwise population F_{st} values

	梅林 ML	塘朗山 TLS	罗坑 LK	马坑 MK
梅林 ML	0.000	0.010	0.010	0.010
塘朗山 TLS	0.199	0.000	0.010	0.010
罗坑 LK	0.382	0.238	0.000	0.320
马坑 MK	0.361	0.208	0.000	0.000

F_{st} 值位于对角线下方, 相应的置信度 (P 值) 在对角线上方。

F_{st} Values below diagonal. Probability values based on 99 permutations are shown above diagonal.

STRUCTURE 分析结果表明, 4 个仙湖苏铁野生种群可被分配到 3 个假想的遗传簇(K)。从 K 值概率折线图可看到, 当 $K=3$ 时, 概率的对数值($\ln P$) 达到最大值(图 2)。4 个自然种群的 115 个样本按照一定的概率被指派到 3 个遗传簇中, ML 种群大部分被指派到 1 簇($Q=0.54$), TLS 种群大部分被指派到 2 簇($Q=0.531$), LK、MK 种群被指派到 3 簇($Q=0.97$)(表 4)。

利用 BOTTLENECK 软件, 在两个演化模式(SMM 与 TPM)下进行分析, 结果显示在 Wilcoxon's sign rank 和 SIGN 检验下, ML、TLS、LK3 个种群均未出现显著的杂合过度与杂合不足, 说明 3

个种群近期没有遭遇瓶颈效应。MK 种群因样本数少于 10, 未做 BOTTLENECK 检测。

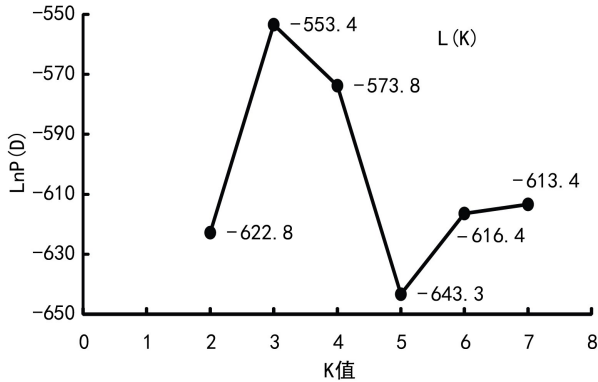


图 2 STRUCTURE 软件分析的 K 值 (K=2~7) 概率 (LnP) 折线图

Fig. 2 Log-likelihood probability LnP (D) of the number of inferred clusters (K) as a function of K using STRUCTURE, for K=2 to 7

表 4 4 个仙湖苏铁野生种群分配到 3 个假想的遗传簇的关联样本概率 (Q)

Table 4 Estimated membership probabilities (Q) of 4 populations into 3 hypothetical clusters

种群 Pop	假想的遗传簇 Given Inferred clusters			个体数 No. of individuals
	1	2	3	
ML	0.547	0.401	0.052	75
TLS	0.12	0.531	0.349	20
LK	0.01	0.02	0.97	14
MK	0.01	0.02	0.97	6

注: 每个种群的概率最高值用粗体标示。

Note: The highest value of membership probability (Q) of each population is in bold.

3 讨论与结论

3.1 苏铁 SSR 引物在种间转移扩增的可行性

Cibrián-Jaramillo 等 (2008, 2010) 从刺叶苏铁中开发 SSR 引物, 部分引物在 *C. micronesica*, *C. curranii*, *C. edentata*, 海南苏铁和 *C. wadei* 等多种苏铁中成功扩增出目的条带, 并从中筛选到 14 对通用性好的 SSR 引物, 对关岛上的 *C. micronesica* 开展遗传多样性研究, 阐明 24 个野生种群间的遗传连通性。Yang 等 (2008) 在德保苏铁 (*C. debaoensis*) 中开发的 SSR 引物大多在同属的其它 4 种苏铁 (*C. micholitzii*, *C. multipinnata*, *C. guizhouensis*, *C. hongheensis*) 中成功扩增。Ju 等 (2011) 在台东苏铁 (*C. taitungensis*) 中开发的 SSR 引物大多也

在苏铁 (*C. revoluta*) 和德保苏铁中成功扩增。这些结果表明, 利用 DNA 的保守性及同源性筛选合适的 SSR 标记, 将苏铁属植物中已知的 SSR 标记直接运用到同属不同物种中, 继而进行相关遗传多样性研究是可行的。需要注意的是, 运用 SSR 标记进行遗传多样性研究, 是建立在简单重复序列突变基础上的。在种间转移扩增中出现的阳性扩增产物, 必须检验真实性, 确认其多态性来源于微卫星的突变。扩增的假阳性条带不适合进行建立在微卫星突变基础上的遗传研究 (Liu *et al.*, 2007)。

3.2 仙湖苏铁的遗传多样性与遗传分化

仙湖苏铁野生种群具有中等及以上水平的近亲繁殖, 种群内多样性低, 种群间的遗传分化显著。这一结果与其他苏铁类植物多样性研究类似。如贵州苏铁 (肖龙骞等, 2003)、德保苏铁 (Xie *et al.*, 2005) (Yang *et al.*, 2008)、台东苏铁 (Ju *et al.*, 2011)、篦齿苏铁 (Yang *et al.*, 1996)、苏铁 (Kyoda *et al.*, 2010) 等。主要原因在于: 小种群导致了遗传漂变和近亲繁殖。目前发现的仙湖苏铁野生种群中, 除塘朗山、梅林两个种群外, 其余种群个体均在 20 株以下 (简曙光等, 2005a); 种子散布和传粉机制使基因交流受阻。苏铁植物主要依靠一、两种昆虫进行虫媒传粉, 种子一般较大, 主要依靠重力和啮齿类动物散布, 基因流的有效距离为 2~7 km (Huang *et al.*, 2004), 再加上仙湖苏铁种群分布区域狭窄, 呈间断不连续的岛屿状 (简曙光等, 2005a), 种群间的基因交流十分有限。生境特点和土壤条件的差异也是种群产生遗传分化的动力。塘朗山、梅林种群位于稀疏常绿阔叶林下, 郁闭度适中, 环境潮湿, 枯枝落叶层厚 (汪殿蓓等, 2003)。罗坑种群位于稀疏针叶林下, 郁闭度较小, 土壤为砖红性红壤, 落叶层薄 (简曙光等, 2005b)。这种差异使得种群为适应各自的生境而形成较大的遗传分化。

3.3 保护策略

由于人为因素带来的生境改变和采挖, 以及自身遗传因素的影响, 仙湖苏铁个体少、生长状态差, 已处于濒危状态, 除梅林种群有开花植株和一年生小苗外, 其它种群已严重老化, 鲜见有性繁殖 (简曙光等, 2005a), 对其制定科学的保护措施十分紧迫。遗传多样性水平是一个物种或种群对环境的适应和进化能力的反映。保护生物学的主要目的之一就是保护生物的遗传多样性 (Ge *et al.*, 2003)。遗传分化分析表明仙湖苏铁种群间已发生了显著的分化,

种群间的遗传多样性很高,除了保护多样性较高的种群之外,也要对那些多样性相对低的种群实施保护(肖龙骞等,2003),应尽可能地保护更多的种群。在就地保护的基础上,要努力提高种群的遗传多样性,可以开展种群间的人工授粉和移苗等措施,促进基因交流,从而提高物种的遗传多样性。

参考文献:

- Chen JR(陈家瑞), Yang Y(杨勇), Li N(李楠). 2011. A taxonomic revision of *Cycas* L. in China(中国苏铁属分类学修订)[C]//Shenzhen(深圳): Abstracts of the 9th international conference on Cycad biology(第九届国际苏铁生物学大会论文摘要集): 18
- Cibrián-Jaramillo A, Marler TE, Desalle R, et al. 2008. Development of EST-microsatellites from the cycad *Cycas rumphii*, and their use in the recently endangered *Cycas micronesica*[J]. *Conserv Genet*, **9**: 1 051—1 054
- Cibrián-Jaramillo A, Daly AC, Brenner E, et al. 2010. When North and South don't mix: genetic connectivity of a recently endangered oceanic cycad, *Cycas micronesica*, in Guam using EST-microsatellites[J]. *Mol Ecol*, **19**(12): 2 364—2 379
- Doyle J. 1991. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation[C]//Hewitt G M, Johnston A. Molecular Techniques in Taxonomy. Berlin: Springer: 283—293
- Huang S, Hsieh HT, Fang K, et al. 2004. Patterns of genetic variation and demography of *Cycas taitungensis* in Taiwan[J]. *Bot Rev*, **70**: 86—92
- Jian SG(简曙光), Liu N(刘念), Gao ZZ(高泽正), et al. 2005a. Biological characteristics of wild *Cycas fairylakea* population in Guangdong Province(广东省野生仙湖苏铁居群生物学特性研究)[J]. *Acta Univ Sunyatseni: Sci Nat Edit*(中山大学学报·自然科学版), **44**(6): 97—100
- Jian SG(简曙光), Wei Q(韦强), Gao ZZ(高泽正), et al. 2005b. Characteristics and conservation of wild population of *Cycas fairylakea* newly found in Qujiang of Guangdong province(广东省曲江县野生仙湖苏铁新种群及其保护)[J]. *Guihaia*(广西

植物), **25**(2): 97—101

- Ju LP, Kuo CC, Chao YS, et al. 2011. Microsatellite primers in the native perennial cycad *Cycas taitungensis* (Cycadaceae)[J]. *Amer J Bot*, **98**: e84—e86
- Kyoda S, Setoguchi H. 2010. Phylogeography of *Cycas revoluta* Thunb.(Cycadaceae) on the Ryukyu islands: very low genetic diversity and geographical structure[J]. *Plant Syst Evol*, **288**: 177—189
- Li L, Wang ZF, Jian SG, et al. 2009. Isolation and characterization of microsatellite loci in endangered *Cycas changjiangensis* (Cycadaceae)[J]. *Conserv Genet*, **10**: 793—795
- Liu BQ(刘必谦), Zeng QG(曾庆国), Wang YJ(王亚军), et al. 2007. The cross species amplification and validation of EST-SSR loci in *Porphyra haitanensis* (条斑紫菜 EST-SSR 引物种间转移扩增真实性研究)[J]. *Acta Hydrobiol Sin*(水生生物学报), **31**(2): 149—154
- Norstog KJ, Nicholls TJ. 1997. The biology of the cycads[M]. Ithaca: Cornell University Press
- Peakall R, Smouse PE. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research[J]. *Mol Ecol Note*, **6**: 288—295
- Powell W, Morgante M, Andre C, et al. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis[J]. *Mol Breed*, **2**: 119—122
- Wang DY(王定跃). 1996. Taxonomy of *Cycas* in China(中国苏铁属的分类研究[M]//Cycads of China(中国苏铁). Guangzhou(广州): Guangdong Science and Technology Press(广东科技出版社): 19—142
- Xie JG, Jian SG, Liu N. 2005. Genetic variation in the endemic plant *Cycas debaoensis* on the basis of ISSR analysis[J]. *Aust J Bot*, **53**: 141—146
- Yang Y, Li Y, Li LF, et al. 2008. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Cycas debaoensis* Y. C. Zhong et C. J. Chen(Cycadaceae)[J]. *Mol Ecol Resour*, **8**: 913—915
- Zhang M, Wang ZF, Jian SG, et al. 2009. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Cycas hainanensis* C. J. Chen(Cycadaceae)[J]. *Conserv Genet*, **10**: 1 175—1 176
- drought-resistance of *Acacia auriculaeformis*(大叶相思抗旱性生理指标主成分分析)[J]. *J Zhejiang For Sci & Technol*(浙江林业科技), **25**(6): 15—19
- Zhu JP(朱建平), Ying RF(殷瑞飞). 2007. The Statistical & Application by SPSS(SPSS在统计分析中的应用)[M]. Beijing(北京): Tsinghua University Press(清华大学出版社)
- Zou TC(邹天才), Lou YL(娄义龙). 1996. Biochemical characteristics of 8 species from wild *Camellia*(山茶属 8 种野生资源的生化特性研究)[J]. *Acta Horti Sin*(园艺学报), **23**(2): 179—183
- Zou TC(邹天才). 2001. Guizhou Endemic and Rare Spermatophyte(贵州特有及稀有种子植物)[M]. Guiyang(贵阳): Guizhou Science and Technology Publishing House(贵州科技出版社)

(上接第 699 页 Continue from page 699)

育出版社)

- Wang ML(王满莲), Wei Xiao(韦霄), Kong DX(孔德鑫), et al. 2014. Effects of drought stress and rehydration on physiological characteristics of *Ardisia corymbifera* var. *tuberifera* seedlings(干旱胁迫与复水对块根紫金牛生理特性的影响)[J]. *Guihaia*(广西植物), **34**(1): 105—110
- Xia JG(夏建国), Li TX(李廷轩), Deng LJ(邓良基), et al. 2000. The application of the principal component analysis method in quality evaluation of cultivated land(主成分分析法在耕地质量评价中的应用)[J]. *SW Chin J Agric Sci*(西南农业学报), **13**(2): 51—55
- Zhang WH(张卫华), Zhang FQ(张方秋), Zhang SG(张守攻), et al. 2005. Analysis on major physiological components for