

## 江浙莼菜遗传多样性和遗传结构的 ISSR 分析\*

张光富<sup>1,2</sup>, 高邦权<sup>1</sup>

(1: 南京师范大学生命科学学院, 南京 210046)

(2: 中国科学院南京地质古生物研究所, 现代古生物学和地层学国家重点实验室, 南京 210008)

**摘要:** 利用 ISSR 标记对分布于江苏和浙江的濒危水生植物莼菜(*Brasenia schreberi* J. F. Gmelin)的遗传多样性和遗传结构进行研究. 从 77 个引物中筛选出 12 个引物用于研究, 共扩增出 101 条扩增带, 其中多态性条带 16 条, 占 15.84%, 平均每个引物扩增的条带数为 8.4 条. 结果表明: 莼菜的遗传多样性水平较低(种水平的遗传多样性  $H_t$  为 0.0395, Shannon's 信息指数  $H_s$  为 0.0630; 种群水平的遗传多样性  $H_t$ 、 $H_s$  分别为 0.0391、0.0335). 大部分遗传变异存在于种群内(85.79%), 种群间的基因流为 3.0199. 营养繁殖、生境丧失与片断化以及人工引种等人为干扰对莼菜的遗传多样性和遗传结构产生重要影响.

**关键词:** 莼菜; 遗传多样性; 遗传结构; ISSR

## Analysis on genetic diversity and genetic structure of *Brasenia schreberi* in Jiangsu and Zhejiang Provinces revealed by ISSR Markers

ZHANG Guangfu<sup>1,2</sup> & GAO Bangquan<sup>1</sup>

(1: *School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, P.R.China*)

(2: *State Key Laboratory of Palaeobiology and Stratigraphy, Nanjing Institute of Geology and Palaeontology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, P.R.China*)

**Abstract:** In order to investigate the level of genetic diversity of the endangered species *Brasenia schreberi*, three populations from Jiangsu and Zhejiang Provinces were sampled and analyzed using inter-simple sequence repeats (ISSR) markers. A total of fifty-four individuals were sampled. Twelve filtered from 77 ISSR primers gave rise to 101 discernible DAN fragments of which 16 were polymorphic (15.84%). The average number of DNA bands amplified by each primer was 8.4. The Nei's genetic and Shannon's information indexes were 0.0395 and 0.0630 respectively at species level, 0.0391 and 0.0335 respectively at population level. Based on Nei's  $G_{st}$  value and Shannon's index, it showed that most of genetic diversity (85.79%) was within populations, and that gene flow ( $Nm$ ) was 3.0199. It was concluded that vegetative propagation, habitat loss and fragment, introducing plants, and human disturbances may play a significant negative role on genetic diversity and genetic structure of *Brasenia schreberi*.

**Keywords:** *Brasenia schreberi* J. F. Gmelin; genetic diversity; genetic structure; ISSR

莼菜(*Brasenia schreberi* J. F. Gmelin)为莼菜科(Cabombaceae)多年生水生草本<sup>[1]</sup>. 由于其幼嫩茎叶富含胶质, 可作汤羹, 莼菜为珍贵的水生蔬菜. 它含有酸性多糖、蛋白质、氨基酸和维生素等化学成分, 有抗肿瘤、抗溃疡、抗菌消炎和促进免疫等生物活性, 还具有医疗和保健功效, 是重要的野生经济植物. 1999 年它被我国林业部和农业部列为国家 I 级重点保护野生植物.

据文献记载, 莼菜在我国分布于江苏、浙江、安徽、江西、湖南、四川、云南和台湾等省份<sup>[1-3]</sup>, 其中江苏和浙江是莼菜的主产区之一. 由于莼菜主要分布于浅水湖泊、池塘, 其生境隔离现象突出. 近年来随着人类活动的加剧, 莼菜的分布面积急剧减少<sup>[4]</sup>. 根据实地调查, 在江苏的宝应湖、太湖和浙江杭州的西湖等地均未见到莼菜的野生种群, 仅发现部分半自然种群.

\* 江苏省教育厅项目(04KJD180105)和现代古生物学和地层学国家重点实验室(中国科学院南京地质古生物研究所) (083111) 联合资助. 2008-01-10 收稿; 2008-04-20 收修改稿. 张光富, 男, 博士, 副教授; E-mail: zhangguangfu@njnu.edu.cn.

由于 ISSR 标记有较高的退火温度, 且引物较长, 实验的可重复性和稳定性都较可靠; 同时能扩增出比 RAPD 更多的条带, 因而可检测到更多的基因位点, 发现更加丰富的遗传信息. 与 SSR 标记相比, 采用 ISSR 标记可以不必预先知道基因组序列信息, 因而大大节约了实验的前期准备工作<sup>[5]</sup>. 因此, ISSR 标记在珍稀濒危植物研究中已经有广泛的运用<sup>[6-7]</sup>. 对莼菜的重金属污染<sup>[8]</sup>、花粉发育<sup>[9]</sup>、分类位置<sup>[10]</sup>、群落多样性<sup>[4]</sup>等已有不少研究, 但是关于莼菜的遗传多样性及不同种群间的遗传分化等研究尚未见报道. 而遗传多样性是物种长期进化的结果, 通常认为物种的进化潜力和抵御外界不良环境的能力在很大程度上取决于遗传多样性的大小. 因此本文采用 ISSR 标记研究江浙莼菜种群的遗传多样性和遗传结构, 为莼菜的生物多样性保护及其开发利用提供科学的依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

研究材料采自江苏苏州东山镇和浙江杭州转塘镇. 根据两地莼菜的分布面积和种群数量, 分别对东山镇的 2 个和转塘镇的 1 个莼菜种群随机取样, 共采集 54 个个体(表 1). 采集莼菜幼嫩的叶片于冰上存放. 莼菜幼叶背面富含多种营养成份的胶质粘液, 运回实验室将其洗净并用蒸馏水冲涮, 等叶片表面水分自然晾干后, 按个体对叶片分装, 进行植物基因组 DNA 提取前集中存放于-80℃的冰箱内保存.

表 1 莼菜取样种群的基本情况

Tab.1 The general situation of *Brasenia schreberi* sampling populations

种群编号	地点	经度	纬度	采样数
SZ_a	苏州东山镇	120°24'E	31°2'N	14
SZ_b	苏州东山镇	120°24'E	31°2'N	20
HZ	杭州转塘镇	120°03'E	30°11'N	20

### 1.2 植物基因组 DNA 的提取

莼菜幼叶富含多糖及蛋白质, 采用改良的 CTAB 法提取莼菜基因组总 DNA<sup>[11]</sup>, 用分光光度法测其含量. 提取过程中加入 β-巯基乙醇、PVP 和 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 等物质, 提高基因组 DNA 纯度, 并避免褐化现象<sup>[12]</sup>.

### 1.3 ISSR 反应体系的建立及反应条件的优化

对购自南京生兴生物技术有限公司的 77 个引物进行筛选, 从中选取扩增条带清晰、重复性较好的 12 个引物(表 2)用于 PCR 扩增. 扩增反应在 MJR 系列 PCR 扩增仪上进行. 优化后的 20μl 反应体系含 2μl

表 2 筛选的引物及其对应的退火温度

Tab.2 Selected primers and their corresponding annealing temperature

引物编号	序列	退火温度(℃)	记录的带数
ISSR-3	(AC) <sub>8</sub> TT	52	9
ISSR-5	(AC) <sub>8</sub> TG	52	8
ISSR-10	(GAA) <sub>6</sub>	50	7
ISSR-23	(AC) <sub>8</sub> TA	52	8
ISSR-28	(TG) <sub>8</sub> CC	54	7
ISSR-35	(AG) <sub>8</sub> TA	52	8
ISSR-47	(AC) <sub>8</sub> GT	54	7
ISSR-63	(AG) <sub>8</sub> CT	52	9
ISSR-65	(AG) <sub>8</sub> CC	52	8
ISSR-66	(TC) <sub>8</sub> CG	52	10
ISSR-71	(TC) <sub>8</sub> GG	52	10
ISSR-74	(ACTG) <sub>4</sub>	48	10

10×buffer、1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.2mmol/L dNTPs、0.3μmol/L primer、1U Taq DNA 聚合酶和 20ng 模板 DNA. PCR 扩增反应程序为: 94℃ 预变性 5min, 之后进行 37 个循环, 每个循环包括 94℃ 变性 30s, 48–54℃ 退火 45s, 72℃ 延伸 1.5min, 最后于 72℃ 延伸 7min. 将扩增产物置于 4℃ 冰箱保存.

#### 1.4 PCR 产物鉴定

将 PCR 扩增产物在用 1×TAE 配制的含有 EB 的 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳分离. 以 DNA Marker(100–2000bp)作为相对分子质量标准. 在 5V/cm 的电压下电泳 40min. 电泳结束后在紫外检测仪上观察记录扩增产物的泳带, 并在凝胶成像系统中保存图像(图 1).

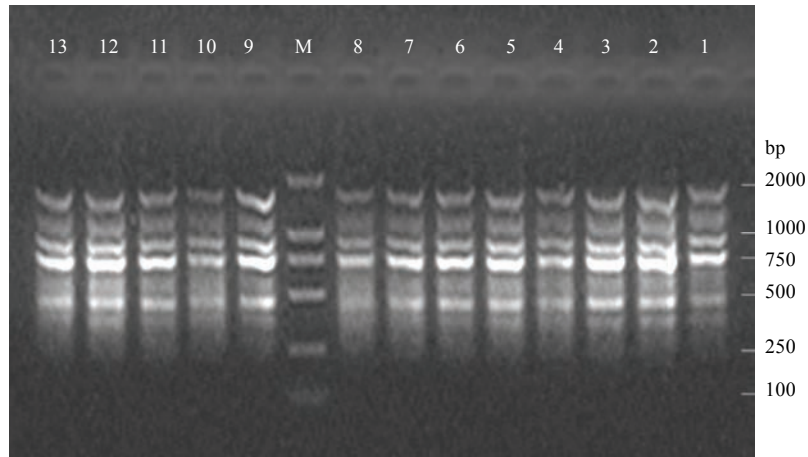


图 1 引物 10 在菹菜种群上的扩增谱带(个体 1–3、4–8、9–13 分别为苏州东山镇 A、苏州东山镇 B 和杭州转塘镇菹菜种群的个体; M 为 DNA 分子量标记 DL2000)

Fig.1 Amplified bands of primer 10 on *Brasenia schreberi* populations

#### 1.5 数据统计与处理

在琼脂糖凝胶电泳图谱上同一 ISSR 位点上有电泳带记为 1, 无电泳带的记为 0, 作 0, 1 矩阵输入计算机. 应用 POPGENE 1.32 程序进行数据处理<sup>[13]</sup>, 假定种群在这些 ISSR 标记位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态, 统计下列参数: (1)多态位点百分率(PPB); (2)平均每个位点的观察等位基因数( $N_a$ ); (3)平均每个位点的有效等位基因数( $N_e$ ); (4)Nei's 基因多样性( $H_e$ ); (5)Shannon 信息指数( $H_o$ ); (6)Nei's 总基因多样性( $H_t$ )和种群内的基因多样性( $H_s$ ); (7)基因分化系数( $G_{st}$ )和基因流( $Nm$ ); (8)Nei's 遗传距离( $D$ )和遗传一致度( $I$ ). 使用软件 MEGA 3.1, 采用非加权配对算术平均法(UPGMA)对种群间和种群内个体间的 Nei's 遗传距离进行聚类分析<sup>[14]</sup>.

## 2 结果与分析

### 2.1 菹菜种群的遗传多样性

POPGENE 分析各种群的遗传多样性指数分别如表 3 和表 4.

筛选出的 12 个引物在 3 个菹菜种群 54 个个体的基因组 DNA 中共检测到 101 条扩增带, 每个引物扩增的条带数为 7–10 条, 平均每个引物扩增的条带数为 8.4 条, 扩增的条带大小在 250–2000bp 之间(图 1). 101 条扩增带中, 共有条带 85 条, 多态性条带 16 条, 多态位点百分率(PPB)为 15.84%.

种群内的多态位点百分率在 8.91%–13.86% 之间, 平均为 10.89%. Nei's 基因多样性在 0.0282–0.0476 之间, 平均为 0.0335; Shannon's 信息指数反应的遗传多样性比 Nei's 基因多样性高, 在 0.0436–0.0718 之间, 平均为 0.0518. 多态位点百分率、Nei's 基因多样性和 Shannon's 信息指数在 3 个种群中都表现出同样的趋势, 即 SZ\_b>HZ>SZ\_a(表 3).

表 3 基于 ISSR 检测的莼菜遗传多样性指数<sup>1)</sup>  
Tab.3 Data of genetic diversity of *Brasenia schreberi* populations revealed by ISSR

种群	<i>Ao</i>	<i>Ae</i>	<i>He</i>	<i>Ho</i>	<i>PPB</i> (%)
SZ_a	1.0891 (0.2863)*	1.0444 (0.1590)	0.0282 (0.0958)	0.0436 (0.1449)	8.91
SZ_b	1.1386 (0.3473)	1.0800 (0.2275)	0.0476 (0.1281)	0.0718 (0.1883)	13.86
HZ	1.0990 (0.3002)	1.0378 (0.1426)	0.0248 (0.0864)	0.0399 (0.1323)	9.90
种群水平	1.1089 (0.0262)	1.0541 (0.0227)	0.0335 (0.0123)	0.0518 (0.0174)	10.89
物种水平	1.1584 (0.3670)	1.0604 (0.1760)	0.0395 (0.1075)	0.0630 (0.1639)	15.84

1) 观测等位基因数 *Ao*; 有效等位基因数 *Ae*; Nei's 基因多样性 *He*; Shannon's 信息指数 *Ho*; 多态性位点百分率 *PPB*; \*标准差.

## 2.2 莼菜的遗传分化

POPGENE 分析的莼菜种群间的遗传分化表明, 莼菜所有种群 Nei's 总基因多样性(*Ht*)为 0.0391±0.0114, 种群内基因多样性(*Hs*)为 0.0335±0.0082. 根据 Nei's 总基因多样性(*Ht*)和种群内基因多样性(*Hs*)估测种群间遗传分化系数(*Gst*)为 0.1421, 即莼菜的遗传多样性大部分(85.79%)存在于种群内, 只有 14.21%存在于种群间.

Wright 认为, 当  $Nm > 1$  时, 基因流就可以防止遗传漂变引起的居群间的遗传分化. 而莼菜的基因流  $Nm$  为 3.0199, 远大于 1, 据此可以推测其尚未受到小种群遗传漂变的严重影响. 高等植物种群内和种群间的基因流主要借助于花粉、种子、植株个体以及其他携带有种群遗传物质的物体而进行, 其中花粉扩散是自然植物种群最主要的基因流, 种群内基因流强度因物种而异, 同时与种群密度、开花、物候的时间变异及繁育系统有关<sup>[15]</sup>. 本文研究的莼菜分布于苏州东山镇和杭州转塘镇, 尽管分属不同省份, 但是两地相距并不远. 根据野外调查和了解, 上世纪后期杭州西湖等地尚有莼菜分布, 因此两地莼菜种群间隔时间可能不长. 从莼菜在世界上的地理分布看, 欧洲也仅于第四纪冰川中莼菜才绝灭<sup>[16]</sup>. 由于受到市场需求的影响, 两地莼菜种群的种植面积急剧波动. 因此, 可能由于莼菜种群间隔历史不长、生境高度相似, 以及人为引种等因素, 导致莼菜种群间存在着较高的基因流. 这表明半自然植物种群的遗传分化, 不仅受到其本身生物学特性的影响, 而且与人为的影响关系密切.

种群间的遗传距离(*D*)和遗传一致度(*I*)矩阵见表 4. 种群 SZ\_a 与种群 HZ 的遗传距离为 0.0067, 种群 HZ 与种群 SZ\_b 的遗传距离为 0.0071, 种群 SZ\_a 与种群 SZ\_b 的遗传距离为 0.0122, 表明种群间的遗传距离都很低. 遗传一致度值的变化范围为 0.9879–0.9934, 所有群体间的平均一致度达 0.9914, 这与 Nei 的遗传分化指数 *Gst* 值较低相吻合.

表 4 莼菜种群间的遗传一致度(右上角)和遗传距离(左下角)  
Tab.4 Nei's genetic identity and genetic distance among *Brasenia schreberi* populations

种群	SZ_a	HZ	SZ_b
SZ_a	***	0.9934	0.9879
HZ	0.0067	***	0.9930
SZ_b	0.0122	0.0071	***

根据 Nei's 遗传距离将 3 个种群进行 UPGMA 聚类(图 2), 聚类结果为 SZ\_b 种群和 HZ 种群首先在距离 0.00335 处聚在一起, 然后在距离 0.00483 处再与 SZ\_a 聚为一起. 利用 POPGENE 计算 3 个种群共

54 个个体间的遗传距离, 并根据个体间的遗传距离用 UPGMA 法聚类(图 3), 发现同一个种群的个体并非单独聚为一类.

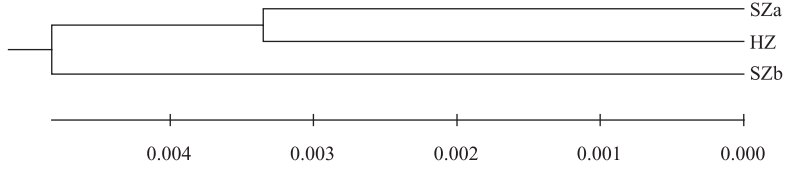


图 2 基于 Nei's 遗传距离构建的 3 个菹菜种群 UPGMA 聚类

Fig.2 UPGMA dendrogram based on Nei's genetic distance for three populations of *Brasenia schreberi*

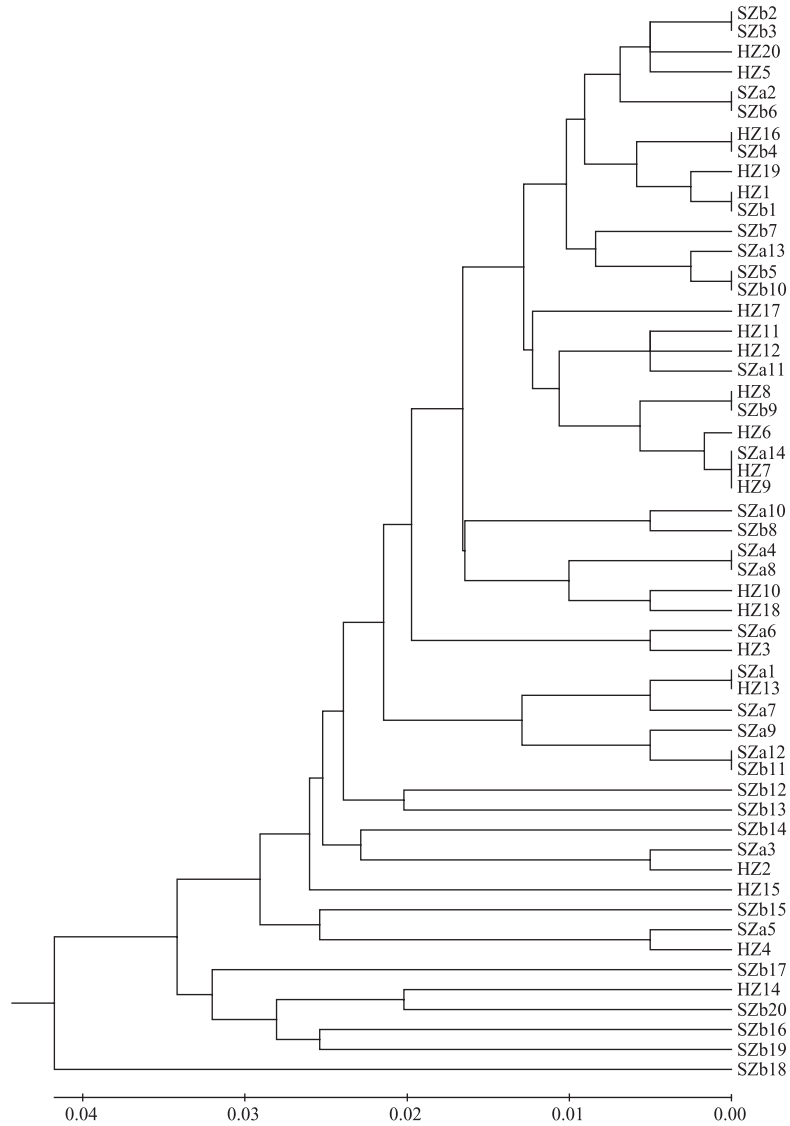


图 3 基于菹菜 3 种群 54 个体间 Nei's 遗传距离建立的 UPGMA 聚类图

Fig.3 UPGMA dendrogram based on Nei's genetic distance for 54 individuals of *Brasenia schreberi*

### 3 讨论

#### 3.1 莼菜的遗传多样性

近年来对珍稀濒危植物的遗传多样性研究已经有大量的报道<sup>[6,17]</sup>, 但对水生植物的遗传多样性研究相对较少<sup>[18]</sup>. 本文通过对浙江、江苏3个半自然种群的ISSR分析, 首次报道了莼菜种群的遗传多样性. 研究结果显示, 莼菜的遗传多样性水平较低, 其多态性位点百分率仅为15.84%, 低于珍稀濒危植物水蕨(*Ceratopteris thalictroides*)(为65.19%)<sup>[19]</sup>和小慈姑(*Sagittaria potamogetifolia*)(为16.67%–38.89%)<sup>[20]</sup>; 莼菜的 Nei's 基因多样性为0.0395, Shannon's 信息指数为0.0630, 也低于竹叶眼子菜(*Potamogeton malaianus*)(分别为0.2471、0.3736)<sup>[21]</sup>. 莼菜的遗传多样性较低, 其原因可能如下: (1)该种长期栽培, 每年4–10月采收其幼嫩的茎叶, 因此较少开花结果, 有性生殖程度低. 种群主要依赖地下匍匐茎和水中茎等营养繁殖进行更新. (2)近年来在江苏、安徽和浙江的淡水水域广泛调查莼菜, 但是在江苏的宝应湖、太湖和浙江杭州的西湖及安徽等地均未见到野生种群. 莼菜在云南省的分布也有减少的趋势, 曾有莼菜分布的思茅地区现已难觅踪迹, 仅在腾冲的北海有自然分布(云南大学胡志浩教授面告). 本文研究的仅为江浙两地的3个半自然种群, 其中浙江省的莼菜种群仅采自杭州转塘镇, 在该省的采样地点偏少; 而根据对江苏莼菜的实际调查, 本文的太湖莼菜的2个种群均采自东山镇. 因此, 莼菜的长期人工栽培与采样种群的偏少可能是导致莼菜遗传多样性极低的重要原因. 据文献记载, 莼菜曾有叶背面为紫色和绿色的不同类型. 调查过程中据太湖地区农民介绍, 该区在20世纪七八十年代两者均有, 但本文的所有野外调查只见到叶背为紫色的莼菜. 因此, 太湖地区的莼菜遗传多样性很可能已经减少, 应该切实加强对该种的保护和研究. 此外, 莼菜在我国也分布于湖北、四川、黑龙江等地<sup>[4]</sup>. 为更好地保护濒危植物莼菜, 应该进一步扩大研究区域范围, 获得对莼菜遗传多样性和遗传结构更加全面的了解, 并选择遗传多样性高的种群就地保护. 此外, 为了全面揭示该种的遗传变异, 取样应该包括日本、朝鲜、美国、印度、澳大利亚等国外的分布地<sup>[8]</sup>.

#### 3.2 莼菜的遗传结构

莼菜3个种群的遗传分化很小, 其 Nei's 基因分化系数  $G_{st}$  仅为0.1421, 种群间的遗传一致度高达0.9941. 这可能与下列因素有关: 莼菜为多年生水生草本, 而水环境相对稳定. 东山镇和转塘镇虽分属两省, 但两者直线距离不超过150km, 气候条件较为相似. 而东山镇的两个种群, 生境明显彼此隔离. 值得注意的是, 这54个体依据 Nei's 遗传距离建立的UPGMA聚类图(图3)表明, 并非同一个种群的个体聚在一起, 不同种群的个体之间存在一定程度的混杂. 这可能与莼菜的反复引种及人工管理有关. 在调查中了解, 莼菜的种植面积随出口量及国内需求的波动而增减, 种群大小的大幅波动使得莼菜经历频繁的瓶颈效应, 且莼菜在生长季节里需人工去除池塘中的杂草. 郑芳等利用ISSR等分子标记对不同水系的河蟹(*Eriocheir japonica*)遗传检测时, 也发现因频繁引种、盲目放流等人类活动而存在个体混杂的现象<sup>[22]</sup>.

莼菜的较低遗传多样性和遗传分化, 与其交配系统、生活史特性和人为干扰等关系密切. Nybom指出, 不同交配类型的物种, 其种群的  $G_{st}$  存在显著差异<sup>[23]</sup>. 莼菜的  $G_{st}$ (0.1421)较为接近于混交(mixed mating)类型, 而与自交(selfing mating)( $G_{st}$ 为0.59)和远交(outcrossing mating)( $G_{st}$ 为0.22)相差较大. 莼菜花期主要为5–7月, 开花分为2个阶段: (1)雌花期: 雌蕊伸长, 但雄蕊尚未伸长和成熟, 此时花药尚未裂开; (2)雄花期: 雄蕊的花丝伸长, 花药也已成熟开裂. 但整个花期(单朵花)的过程约3d, 然后果实在水中成熟<sup>①</sup>. 有研究认为莼菜的传粉是异花授粉, 且主要借助风力, 但传播的距离很短(约1–2m), 因此主要是以邻近的花朵进行授粉. 此外也发现有少数昆虫为莼菜传粉<sup>①</sup>. 但研究区域内的莼菜栽培存在较大的盲目性, 缺乏相关的技术指导, 不断引种、人为除草和生长季节里持续采收等人为干扰可能是导致莼菜的遗传多样性降低的重要原因.

此外, 莼菜作为重要的水生经济植物, 要求生长于水质洁净的浅水环境, 以及富含有机质的淤泥中<sup>[24]</sup>. 但莼菜不耐污染, 在杭州转塘镇对莼菜采样时发现水体中有食虫植物南方狸藻(*Utricularia australis*), 后者对水质要求严格. 而太湖地区存在较为严重的水华现象<sup>[25–26]</sup>, 这对莼菜的生存构成极大的威胁. 在当

① [Http://ccw.eces.ilc.edu.tw/scweb/STU/sp\\_detail.asp?sp\\_id=601](http://ccw.eces.ilc.edu.tw/scweb/STU/sp_detail.asp?sp_id=601)

前的人为栽培过程中, 其生境隔离、生境丧失与种群大小急剧变动都将影响莼菜的遗传变异. 因此, 为了有效保护莼菜的遗传多样性, 首先要加强对我国莼菜野生种群的调查; 从长远的观点看, 最适合的策略是保护其生境.

致谢: 在太湖东山莼菜采样期间承蒙常福辰高级实验师和解凯彬副教授的大力协助, 室内实验得到张双全教授和孙红英教授的帮助, 李建宏教授、陈崇顺副教授和陆长梅副教授对论文提出宝贵意见, 在此深表谢意.

#### 4 参考文献

- [1] Wu ZY, Raven PH. Flora of China (Vol. 6). Beijing: Science Press, 2001: 119-120.
- [2] 安徽植物志协作组. 安徽植物志(第二卷). 北京: 中国展望出版社, 1987: 367.
- [3] 江苏省植物研究所. 江苏植物志(下册). 南京: 江苏科学技术出版社, 1982: 155.
- [4] 高邦权, 张光富, 陈会艳. 不同生境下莼菜群落的物种多样性. 应用生态学报, 2007, 18(2): 283-287.
- [5] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用. 遗传, 2002, 24(5): 613-616.
- [6] Tao Xia, ShiLong Chen, ShengYun Chen *et al.* ISSR analysis of genetic diversity of the Qinghai-Tibet Plateau endemic *Rhodiola chrysanthemifolia* (Crassulaceae). *Biochem Syst & Ecol*, 2007, 35(4): 209-214.
- [7] 薛建华, 卓丽环, 周世良. 黑龙江野生莲遗传多样性及其地理式样. 科学通报, 2006, 51(4): 299-308.
- [8] 陆长梅, 施国新, 吴国荣等. Hg、Cd 对莼菜冬芽茎叶、叶绿素含量及活性氧清除系统的影响. 湖泊科学, 1999, 11(4): 322-327.
- [9] Taylor ML, Osborn JM. Pollen ontogeny in *Brasenia* (Cabombaceae, Nymphaeales). *Am J Bot*, 2006, 93(3): 344-356.
- [10] Podoplelova Y, Ryzhakov G. Phylogenetic analysis of the order Nymphaeales based on the nucleotide sequences of the chloroplast ITS2-4 region. *Plant Sci*, 2005, 169: 606-611.
- [11] Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15.
- [12] 李宗菊, 熊 丽, 桂 敏等. 非洲菊基因组 DNA 提取及 ISSR-PCR 扩增模板浓度优化. 云南植物研究, 2004, 26(4): 439-444.
- [13] Yeh FC, Yang QY, Boyle T. POPGENE. Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. Release 1.32. University of Alberta, Edmonton, 1997.
- [14] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5: 150-163.
- [15] 珊 丹, 赵萌莉, 韩 冰等. 不同放牧压力下大针茅种群的遗传多样性. 生态学报, 2006, 26(10): 3175-3183.
- [16] 吴征镒, 路安民, 汤彦承等. 中国被子植物科属综论. 北京: 科学出版社, 2003: 89-95.
- [17] Zhang XiaoPing, Li XiaoHong, Qiu YingXiong. Genetic diversity of the endangered species *Kirengeshoma palmata* (Saxifragaceae) in China. *Biochem Syst & Ecol*, 2006, 34(1): 38-47.
- [18] Chen JinMing, Liu Xing, Wang JingYuan *et al.* Genetic variation within the endangered quillwort *Isoetes hypsophila* (Isoetaceae) in China as evidenced by ISSR analysis. *Aquat Bot*, 2005, 82: 89-98.
- [19] 董元火, 王青锋. 水蕨的生境及其遗传多样性分析. 武汉大学学报(理学版), 2007, 53(2): 224-230.
- [20] 陈锦华, 孙爱珍, 汪小凡. 小慈姑的遗传多样性和居群分化. 水生生物学报, 2006, 30(5): 570-577.
- [21] 陈媛媛, 栗 琪, 吴文颖等. 竹叶眼子菜居群遗传多样性和克隆结构. 应用生态学报, 2006, 17(11): 2034-2040.
- [22] 郑 芳, 吕秀玲, 孙红英等. ISSR 标记在河蟹种质检测中的运用. 中国水产科学, 2007, 14(1): 46-51.
- [23] Nybom H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol Ecol*, 2004, 13: 1143-1155.
- [24] 沈 珉, 黄炳元. 太湖莼菜无公害栽培技术. 中国蔬菜, 2006, (9): 50-51.
- [25] 杨清心. 太湖水华成因及控制途径初探. 湖泊科学, 1996, 8(1): 67-74.
- [26] 秦伯强, 王小冬, 汤祥明等. 太湖富营养化与蓝藻水华引起的饮用水危机——原因与对策. 地球科学进展, 2007, 22(9): 896-906.