

濒危植物毛瓣金花茶遗传多样性的 ISSR 分析

柴胜丰^{1,2}, 庄雪影², 邹蓉¹, 陈宗游¹, 蒋运生¹, 韦霄^{1*}

(1 广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西桂林 541006; 2 华南农业大学 林学院, 广州 510642)

摘要: 采用 ISSR 分子标记对毛瓣金花茶 6 个自然居群的遗传多样性进行了分析。利用 11 个引物对 150 个个体进行了扩增, 共扩增出 92 条条带, 其中多态性条带 74 条。毛瓣金花茶在物种水平和居群水平都表现出相对较高的遗传多样性, 在物种水平上, 多态位点百分率 (PPB) 为 80.43%, Nei's 基因多样性指数 (h) 为 0.245 1, Shannon 多样性指数 (I) 为 0.377 6; 在居群水平上, PPB 为 58.70%~66.30%, h 为 0.199 7~0.229 3, I 为 0.300 9~0.343 8。Nei's 遗传多样性分析和 AMOVA 分析表明, 毛瓣金花茶的遗传变异主要存在于居群内, 居群间的遗传分化程度较低 ($G_{st}=0.126 6$, $\Phi_{st}=11.37\%$), 基因流 (N_m) 为 3.448 0。Mantel 检测表明, 居群间的遗传距离和地理距离之间存在显著的相关关系 ($r=0.755 1$, $P<0.05$)。研究认为, 毛瓣金花茶较高的遗传多样性和较低的遗传分化可能与其异交型繁育系统和鸟类传粉有关。

关键词: 濒危植物; 毛瓣金花茶; 遗传多样性; ISSR

中图分类号: Q346⁺.5; Q789

文献标志码: A

Genetic Diversity Analysis of Endangered Plant *Camellia pubipetala* Detected by ISSR

CHAI Shengfeng^{1,2}, ZHUANG Xueying², ZOU Rong¹,

CHEN Zongyou¹, JIANG Yunsheng¹, WEI Xiao^{1*}

(1 Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin, Guangxi 541006, China; 2 College of Forestry, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: ISSR markers were used to analyze the genetic diversity and genetic structure of 6 natural populations of *Camellia pubipetala*. Eleven primers were used to amplify DNA samples from 150 individuals, and a total of 92 loci were detected. The genetic diversity of *C. pubipetala* is relatively high both at the species level and population level. At the species level, the percentage of polymorphic bands (PPB) is 80.43%, Nei's gene diversity (h) is 0.245 1, Shannon information index (I) is 0.377 6. At the population level, PPB range from 58.70%~66.30%, h range from 0.199 7~0.229 3, I range from 0.300 9~0.343 8. A low level of genetic differentiation among populations was detected based on Nei's genetic diversity analysis ($G_{st}=0.126 6$) and analysis of molecular variance ($\Phi_{st}=11.37\%$). Gene flow (N_m) among the populations is high (3.448 0). A mantel test showed there was a significantly correlation between genetic and geographic distance among the populations studied ($r=0.755 1$, $P<0.05$). Relatively high genetic diversity within the population and the low population differentiation of *C. pubipetala* might be related to its out-crossing mating system and bird pollination.

Key words: endangered plant; *Camellia pubipetala*; genetic diversity; ISSR

收稿日期: 2013-10-20; 修改稿收到日期: 2013-11-22

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划 (桂科重 1355001-5-4); 广西自然科学基金 (2012GXNSFAA053067); 国家自然科学基金 (31160137); 广西科技成果转化和应用项目 (桂科攻 11233013-15); 广西培养新世纪学术和技术带头人专项资金

作者简介: 柴胜丰 (1980—), 男, 博士, 主要从事植物保护生物学研究。E-mail: sfchai@163.com

* 通信作者: 韦霄, 研究员, 主要从事保护生物学和药用植物栽培研究。E-mail: weixiao@gxib.cn

毛瓣金花茶(*Camellia pubipetala*)系山茶科山茶属(*Camellia*)金花茶组(Theaceae, *Camellia*, Sect. *Chrysantha* Chang)常绿灌木或小乔木,为广西石灰岩特有珍稀濒危植物。其花瓣、花丝、花柱和子房均密被柔毛,具有极高的观赏价值^[1]。毛瓣金花茶是培育黄色茶花新品种的优良种质资源,具有重要的科研价值^[2]。在毛瓣金花茶、金花茶(*C. petelotii*)、显脉金花茶(*C. euphlebia*)等 8 种金花茶中,毛瓣金花茶的制茶适宜性最好^[3];毛瓣金花茶还可作为一种天然的食品抗氧化剂或用于保健食品的生产^[4],具有潜在的开发利用价值。毛瓣金花茶分布区极为狭窄,仅分布在广西西南部隆安和大新两县的局部生境,生于海拔 120~430 m 的北热带石灰岩季雨林。由于人类对其生境的破坏和对资源的过度采挖,其栖息地面积逐渐缩小,野外居群数量锐减,大部分居群呈衰退趋势,资源濒于灭绝。目前该物种已列入《广西极小种群野生植物名录》、《广西第一批重点保护野生植物名录》、《中国珍稀濒危保护植物名录》、《中国物种红色名录》和《IUCN 物种红色名录》。目前对于毛瓣金花茶的研究主要集中在染色体、花粉和叶片形态结构^[5-7]、种群结构特征^[8]、光合特性^[9]、繁殖技术^[10-11]等方面,而对于毛瓣金花茶濒危机理的研究并不多,缺乏其濒危原因的足够了解,因而难以制定出切实可行的保护策略。

物种的遗传多样性是维持其繁殖活力和适应环境变化的基础,又是其它一切多样性的基础和最重要的部分,濒危植物的遗传学研究是揭示濒危机制的一个重要方面^[12]。对濒危植物遗传多样性的研究不仅能了解物种的进化历史以及濒危机制,而且关系到能否采取科学有效的措施来保护濒危物种^[13]。ISSR(inter-simple sequence repeats)即简单重复间隔序列标记方法,具有操作简单、快速、高效、可重复性等优点,在珍稀濒危植物遗传多样性研究中被广泛应用并获得了成功^[14-16]。本研究拟采用

ISSR 分子标记技术对毛瓣金花茶 6 个自然居群进行了分析,旨在揭示毛瓣金花茶自然居群的遗传结构和遗传多样性水平,为其濒危原因的揭示及保护措施的制定提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验材料分别采自广西隆安县屏山乡、乔建镇和大新县福隆乡的 6 个居群,覆盖了毛瓣金花茶的整个分布区域,其地理位置、采样数等详见表 1。对于个体数量较少的居群,如陇连(LL)和内斗(ND)居群,采集居群内所有个体,其它居群则采样时植株的距离尽量达到 5 m 以上。共采集 150 株毛瓣金花茶植株幼嫩叶片,用变色硅胶进行快速干燥,置于密封袋中带回,室温下保存备用。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 的提取 植物基因组总 DNA 提取采用改良的 CTAB 方法^[17],用紫外分光核酸测定仪(BioPhotometer, Eppendorf, Germany)测定模版 DNA 浓度,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,将 DNA 浓度稀释到 20 ng/ μ L, -20 °C 保存备用。

1.2.2 ISSR 的扩增与检测 ISSR 引物选用加拿大哥伦比亚大学公布的序列(University of British Columbia, Set No. 9, No. 801~900),由上海生工生物工程有限公司合成,从 100 个 ISSR 引物中筛选出 11 个扩增条带清晰、反应稳定的引物用于全部 150 份 DNA 样品的扩增(表 2)。采用 20 μ L 反应体系,其中包括:1 $\times$ Buffer、1.5 mmol/L MgCl₂、0.2 mmol/L dNTP、0.5 μ mol/L 引物、1 U Taq 酶、20 ng 模版 DNA。扩增程序为:94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 49 °C~53 °C 退火 45 s(因引物而异,表 2), 72 °C 延伸 1.5 min, 进行 40 个循环,最后 72 °C 延伸 7 min。扩增产物在 1.6% 琼脂糖凝胶上电泳分离,溴化乙锭(EB, 0.1 μ g $\cdot$ mL⁻¹)染色显带,

表 1 毛瓣金花茶居群的地理位置和取样数

Table 1 Geographical location and sample number of *C. pubipetala* populations

居群编码 Population code	地点 Site	纬度/经度 Latitude/longitude	海拔 Altitude /m	取样数 Sample number	居群大小 Population size
LZ	隆安县屏山乡陇召屯 Longzhao in Pingshan Town, Long'an Country	23°00'03"; 107°34'46"	373	28	180
LL	隆安县屏山乡陇连屯 Longlian in Pingshan Town, Long'an Country	22°58'50"; 107°36'55"	302	25	25
DA	隆安县乔建镇底隘屯 Di'ai in Qiaojian Town, Long'an Country	22°58'35"; 107°38'47"	130	26	50
LT	隆安县乔建镇龙土屯 Longtu in Qiaojian Town, Long'an Country	22°57'52"; 107°39'16"	260	25	35
ND	大新县福隆乡内斗屯 Neidou in Fulong Town, Daxin Country	22°59'12"; 107°27'39"	421	20	20
TS	大新县福隆乡驮塞屯 Tuosai in Fulong Town, Daxin Country	22°59'09"; 107°29'31"	303	26	120

通过 UVP 凝胶成像系统成像、观察、记录。

1.2.3 数据统计与分析 ISSR 为显性标记,电泳图谱中的每一条带均视为一个分子标记,并代表一个引物的结合位点。按照凝胶同一位置上 DNA 带的有无进行统计,有带的记为 1,无带的记为 0,构成表型数据矩阵。用 POPGENE 1.32 软件^[18]对全部群体进行遗传参数分析。分别计算了多态位点百分率(*PPB*)、等位基因数(n_a)、有效等位基因数(n_e)、Nei's 基因多样性指数(h) (Nei, 1973)、Shannon 多样性指数(I)、Nei's 遗传距离(D)和遗传一致度(I),根据总的基因多样性(H_t)和居群内基因多样性(H_s),计算基因分化系数(G_{st})^[19]和基因流 $[N_m = (1/G_{st} - 1)/4]$ ^[20]。采用 DCFA 1.1 软件计算欧氏距离平方和,建立遗传距离矩阵,并用 WINAMOVA

表 2 各个引物序列、退火温度、
扩增位点数与多态位点数

Table 2 Primer sequences, annealing temperature, number of loci and number of polymorphic loci

引物编号 Primer code	引物序列 Primer sequence (5'→3')	退火温度 Annealing temperature /℃	统计位点数 No. of loci	多态位点数 No. of polymorphic loci
817	(CA) ₈ A	53	9	7
818	(CA) ₈ G	49	9	8
827	(AC) ₈ G	52	10	8
830	(TG) ₈ G	52	6	5
836	(AG) ₈ YA	52	9	4
841	(GA) ₈ YC	50	8	6
844	(CT) ₈ RC	52	9	9
846	(CA) ₈ RT	52	8	8
850	(GT) ₈ YC	52	7	6
853	(TC) ₈ RT	49	7	6
856	(AC) ₈ YA	52	10	7

Note: R=(A, G); Y=(C, T).

表 3 毛瓣金花茶居群的遗传多样性

Table 3 Genetic diversity within populations of *C. pubipetala*

居群 Population	n_a	n_e	h	I	<i>PPB</i> /%
LZ	1.587 0	1.334 6	0.199 7	0.300 9	58.70
LL	1.641 3	1.354 1	0.210 3	0.317 5	64.13
DA	1.663 0	1.388 0	0.228 4	0.342 5	66.30
LT	1.608 7	1.330 1	0.196 7	0.298 8	60.87
ND	1.630 4	1.379 7	0.222 1	0.332 1	63.04
TS	1.663 0	1.388 2	0.229 3	0.343 8	66.30
平均 Mean	1.632 2	1.362 5	0.214 4	0.322 6	63.22
物种水平 Species level	1.804 3	1.395 9	0.245 1	0.377 6	80.43

注: n_a . 等位基因数; n_e . 有效等位基因数; h . Nei's 基因多样性指数; I . Shannon 多样性指数; *PPB*. 多态位点百分率。

Note: n_a . Observed number of alleles per locus; n_e . Effective number of alleles per locus; h . Expected heterozygosity; I . Shannon's information index; *PPB*. Percentage of polymorphic bands.

1.55 软件进行分子方差分析,计算居群内、居群间的变异方差分布。根据 Nei's 遗传距离,用 NTSYSpc 2.02^[21]对各居群进行聚类分析,确定各居群间的相互关系。采用 TFPGA 软件^[22]进行 Mantel test 分析,检测 6 个居群之间的遗传距离与地理距离之间的关系。

2 结果与分析

2.1 毛瓣金花茶的遗传多样性

11 个引物对毛瓣金花茶 6 个居群 150 个个体共扩增出 92 条带,其中 74 条多态带。由表 2 可以看出,11 个引物扩增总带数 6 到 10 不等,平均扩增条带数为 8.4。在物种水平上,毛瓣金花茶 *PPB* 为 80.43%, h 为 0.245 1, I 为 0.377 6;在居群水平上, *PPB* 的变化范围为 58.70%~66.30%,平均为 63.22%, h 的变化范围为 0.199 7~0.229 3,平均为 0.214 4, I 的变化范围为 0.300 9~0.343 8,平均为 0.322 6(表 3)。各居群遗传多样性水平相对较高,且差异并不大,各居群的 *PPB* 与居群个体数量的相关性分析显示,两者并不存在显著的相关关系($r=-0.272, P=0.601$)。表明遗传多样性与居群内个体数量无关,人类对某些居群的破坏(LL 和 NT)并未引起其遗传多样性的降低。

2.2 毛瓣金花茶居群的遗传结构

毛瓣金花茶总的基因多样性(H_t)为 0.245 6,居群内的基因多样性(H_s)为 0.214 5,居群间 G_{st} 为 0.126 6,表明有 12.66%的遗传变异存在于居群间,87.34%的变异存在于居群内(表 4)。AMOVA 分析结果显示,居群间遗传分化系数(Φ_{st})为 11.37%,在总的遗传变异中,11.37%的变异发生在居群间,88.63%的变异发生在居群内(表 5)。说明遗传变

异主要存在于居群内,居群间的遗传分化较小。居群间的基因流(N_m)为 3.448 0,表明毛瓣金花茶居群间的基因流较高。

2.3 居群间的遗传距离和遗传一致度

由表 6 可以看出,6 个居群平均遗传一致度(I)为 0.952 6,平均遗传距离(D)为 0.048 9。其中陇连居群(LL)和底隘居群(DA)遗传一致度最大(0.964 3),遗传距离最小(0.036 4);龙土居群(LT)

表 4 毛瓣金花茶居群基因多样性 Nei's 分析

Table 4 Nei's analysis of gene diversity in *C. pubipetala* populations

	平均 Mean	标准差 Standard deviation
总基因多样性 H_t	0.245 6	0.029 7
居群内基因多样性 H_s	0.214 5	0.023 2
基因分化系数 G_{st}	0.126 6	
基因流 N_m	3.448 0	

表 5 毛瓣金花茶居群内和居群间分子变异的 AMOVA 分析

Table 5 Analysis of molecular variance (AMOVA) for populations of *C. pubipetala*

变异来源 Source of variation	自由度 df	总方差 Sum of squares	平均方差 MS	变异组分 Variance component	总变异百分比 Percentage of variation/%	P 值 P value
居群间 Among populations	5	218.04	43.61	1.33	11.37	<0.001
居群内 Within population	144	1 494.92	10.38	10.38	88.63	<0.001

表 6 毛瓣金花茶 6 个居群的遗传一致度(对角线上方)和遗传距离(对角线下方)

Table 6 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) between populations of *C. pubipetala*

居群 Population	LZ	LL	DA	LT	ND	TS
LZ		0.954	0.950 9	0.95	0.954 9	0.957 9
LL	0.047 1		0.964 3	0.961 6	0.951 9	0.952 0
DA	0.050 4	0.036 4		0.961 2	0.945	0.950 3
LT	0.051 3	0.039 2	0.039 6		0.943 9	0.938 3
ND	0.046 2	0.049 3	0.056 5	0.057 8		0.952 3
TS	0.043 0	0.049 2	0.051 0	0.067 3	0.048 9	

和驮塞居群(TS)居群遗传一致度最小(0.938 3),遗传距离最大(0.067 3)。在 UPGMA 聚类图中,6 个居群可分为 2 类(图 1),LL、DA 和 LT 等 3 个居群聚为一类,ND、TS 和 LZ 聚为一类。经 Mantel 检测,居群间的遗传距离和地理距离之间存在显著的正相关关系($r=0.755\ 1, P<0.05$)。

3 讨 论

3.1 毛瓣金花茶的遗传多样性和遗传分化

通常认为特有种、濒危种和狭域种的遗传多样性水平较低^[23-24]。但是也有研究报道表明有些特有种、狭域种甚至濒危种也能保持较高水平的遗传多样性^[25-27]。毛瓣金花茶仅分布在面积不到 100 km² 广西西南部隆安和大新两县的交界处,但却具有较高的遗传多样性($PPB=80.43\%$, $h=0.277\ 6, I=0.410\ 0$),与已有研究报道的山茶属其它物种相比,如油茶(*C. oleifera*)^[28]、茶(*C. sinensis*)^[29]、山茶(*C. japonica*)^[30]的 PPB 分别为 95.11%、91.22% 和 90.00%,金花茶(*C. petelotii*)^[31]、显脉金花茶(*C. euphlebia*)^[32]和杜鹃红山茶(*C. changii* Ye)^[33]的 PPB 分别为 63.22%、55.38% 和 55.29%,毛瓣

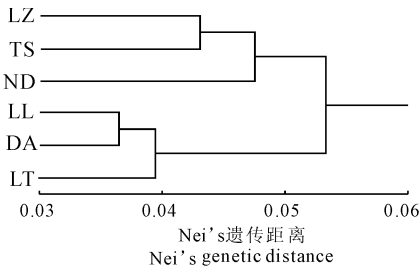


图 1 毛瓣金花茶 6 个居群 Nei's 遗传距离 UPGMA 聚类
居群代码同表 1

Fig. 1 Dendrogram of UPGMA cluster analysis based on Nei's (1972) genetic distances between 6 populations of *C. pubipetala*
Population codes are given in Table 1

金花茶的遗传多样性低于油茶、山茶等广布种,但高于金花茶、杜鹃红山茶等濒危种。与同样利用 ISSR 技术对其他特有或濒危狭域分布的物种相比,如华木莲^[34]、五针白皮松^[35]、天目木兰^[36]等,毛瓣金花茶的遗传多样性水平也处于较高水平。毛瓣金花茶虽然分布区极为狭窄,但遗传多样性仍保持在较高水平,这可能与其进化历史有关,濒危植物并不一定表现出低的遗传多样性^[37-38]。

毛瓣金花茶在居群水平上亦表现出较高的遗传多样性,各居群的遗传多样性 PPB 为 $58.70\% \sim 66.30\%$, h 为 $0.1997 \sim 0.2293$, I 为 $0.3009 \sim 0.3438$ 。居群间基因分化系数(G_{st})为 0.1266 ,表明只有 12.66% 的遗传变异存在于居群间,AMOVA 分析结果($\Phi_{st} = 11.37\%$)进一步证实了居群间遗传分化程度较低。Hamrick 等^[13]的研究表明,生活型、分布范围等 8 个因素对居群遗传变异水平有明显的影响,而影响居群遗传结构的最重要因素是繁育系统方式和基因交流的程度。毛瓣金花茶居群水平较高的遗传多样性和居群间较低的遗传分化可能与其异交型繁育系统和鸟类传粉有关。毛瓣金花茶为异交物种,有着极高的自交不亲和性(未发表资料),这样的繁育系统有利于维持居群较高的遗传多样性,同时促进居群内基因交流,减少遗传漂变的发生。毛瓣金花茶的主要传粉者为叉尾太阳鸟(*Aethopyga christinae*)(未发表资料),其传粉距离较远,毛瓣金花茶分布范围十分狭窄,个别居群间的地理距离不足 1 km ,这样的传粉模式可以有效促进居群间的基因交流,防止遗传分化的产生。Slatkin^[39]和 Hamrick 等^[13]认为:若 $N_m > 1$, N_m 就足以抵制遗传漂变的作用,同时也可以防止发生居群间的分化;若 $N_m < 1$,则遗传漂变可导致居群间明显的遗传分化。本研究中, N_m 为 3.4480 ,表明毛瓣金花茶居群间有较高的基因流,这可有效防止居群间的遗传分化。

根据居群间的遗传距离,6 个毛瓣金花茶居群可分为两类,LL、DA 和 LT 居群聚为一类,ND、TS 和 LZ 聚为一类。这与各居群间的地理距离有一定关系,即地理上相近的居群遗传相似度高。Mantel 分析也表明毛瓣金花茶居群间的遗传距离和地理距离之间存在显著正相关关系($r = 0.7551$, $P < 0.05$)。这可能与毛瓣金花茶依靠鸟类传粉有关,地理距离相近的居群,传粉鸟类在居群间的传粉可能更多,基因交流更频繁,居群间的遗传相似度更大。这与濒危

植物延龄草^[40]、永瓣藤^[41]的研究结果类似。

近年来,野外毛瓣金花茶人为挖取、采盗现象极为严重,除龙虎山保护区核心区内毛瓣金花茶破坏较轻外,其余大部分居群都受到极为严重的破坏,居群个体数量进一步缩小,许多居群个体数量可能不足 20 株,居群个体数量的进一步减少无疑将加剧遗传漂变和近交的影响,导致遗传变异的下降,同时增加了随机灾难性事故导致居群灭绝的概率。

3.2 毛瓣金花茶的保育策略

毛瓣金花茶虽然具有较高的遗传多样性,但其分布范围和居群数量相对于其他濒危物种仍非常有限,如果不能有效维持居群大小和自然更新,同样可能引起居群的退化甚至灭绝,使物种的濒危程度加剧。笔者认为应采取以下保育策略:(1)加强就地保护。毛瓣金花茶野生居群数量少,目前仅分布在隆安和大新两县交界处不到 100 km^2 范围内,已发现的居群数量为 10 个左右,且已有数个居群野外灭绝。因此,对现有每一个居群的保护都相当重要,任何一个居群的丧失都将导致遗传变异的流失。目前已建立的广西龙虎山自然保护区,是毛瓣金花茶保护的一个重要机构,保护区核心区内的保护相对较好,但在保护区外,仍有数个居群,尤其是分布于大新的居群还未得到保护,因此,有必要建立保护小区,把保护任务具体落实到乡、村,责任到户。(2)积极实施迁地保护。目前,广西已有广西植物研究所、南宁市金花茶公园、广西防城金花茶国家级自然保护区、广西林科院等单位对其进行了迁地保护,但保存的成年植株数量大都不足 10 株,且大多通过扦插繁殖而来,还不足以保存其遗传多样性。结合毛瓣金花茶居群分化程度较小的特点,可在少数居群内取尽可能多的样品(种子或采枝扦插),保证该物种绝大部分的遗传多样性得到保存。(3)进行引种回归。毛瓣金花茶居群个体数量少,且结实率低,居群自然更新能力很弱,有必要野外采集种子进行人工繁育,长成幼树后回迁到其野生居群中。

参考文献:

- [1] 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, 1998: 112—113.
- [2] TAO Y(陶 源), DENG CH Z(邓朝佐). A primary report on the result of cross breeding of *Camellia pubipetala* and *Camellia polyodonta*[J]. *Journal of Beijing Forestry University*(北京林业大学学报), 1994, **16**(3): 112—114(in Chinese).
- [3] LIANG J(梁 机), YANG ZH D(杨振德), LU T L(卢天玲), et al. Evaluation on tea-process fitness of eight yellow *Camellia* based on tea polyphenols and amino acids[J]. *Guangxi Sciences*(广西科学), 1999, **6**(1): 72—74(in Chinese).
- [4] WEI X(韦 霄), HUANG X X(黄兴贤), JIANG Y SH(蒋运生), et al. Comparison of antioxidative activities of extracts from three yellow *Camellia*[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*(中国中药杂志), 2011, **36**(5): 639—641(in Chinese).
- [5] CAO H J(曹慧娟), LI T Q(李天庆). The cytological studies of chromosome of certain *Camellia* species[J]. *Journal of Beijing Forestry University*(北京林业大学学报), 1986, **2**: 35—41(in Chinese).

- [6] XIE Y Q(谢永泉), LIANG SH Y(梁盛业). The pollen morphology of Sect. *Chrysanth* Chang plants[J]. *Guangxi Forest Science and Technology*(广西林业科学), 1991, **20**(2): 65—70(in Chinese).
- [7] WANG R X(王任翔), LIANG SH Y(梁盛业), LI J R(李洁荣), *et al.* The leaf epidermis of Sect. *Chrysanth* Chang plants studied by scanning electron microscope[J]. *Guangxi Forest Science and Technology*(广西林业科学), 2003, **32**(11): 12—16(in Chinese).
- [8] DAI Y(戴月), XUE Y G(薛跃规). Population structure of *Camellia pubipetala* in two different habitats[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*(安徽农业科学), 2011, **39**(25): 15 603—15 607(in Chinese).
- [9] CHAI SH F(柴胜丰), ZHUANG X Y(庄雪影), WEI X(韦霄), *et al.* Effects of light intensity on photosynthesis and physiological characteristics in seedlings of *Camellia pubipetala*[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*(西北植物学报), 2013, **33**(3): 547—554(in Chinese).
- [10] CHAI SH F(柴胜丰), SHI Y C(史艳财), CHEN Z Y(陈宗游), *et al.* Study on cutting propagation of the endangered plant *Camellia pubipetala*[J]. *Seed*(种子), 2012, **31**(6): 118—121(in Chinese).
- [11] TANG W X(唐文秀), HUANG SH X(黄仕训), WANG Y(王燕), *et al.* Study on air layering propagation of six yellow *Camellia*[J]. *Guangxi Horticulturae*(广西园艺), 2008, **19**(3): 45—46(in Chinese).
- [12] SPIESS E B. Genes in population(2nd)[M]. New York: John Wiley & Sons, 1989: 787—792.
- [13] HAMRICK J L, GODT M J W. Allozyme diversity in plant species[M]//BROWN A H D, CLEGG M T, KAHLER A L, WEIR B S. Plant population genetics, breeding and genetic resources. Sunderland, Massachusetts: Sinauer, 1989: 43—263.
- [14] CAO P J, YAO Q F, DING B Y, *et al.* Genetic diversity of *Sinojackia dolichocarpa* (Styracaceae), a species endangered and endemic to China, detected by inter-simple sequence repeat (ISSR)[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2006, **34**: 231—239.
- [15] HUANG Y, ZHANG C Q, LI D Z. Low genetic diversity and high genetic differentiation in the critically endangered *Omphalogramma souliei* (Primulaceae): implications for its conservation[J]. *Acta phytotaxonomica Sinica*, 2009, **47**: 103—109.
- [16] JEONG J H, KIM E H, GUO W H, *et al.* Genetic diversity and structure of the endangered species *Megaleranthus saniculiifolia* in Korea as revealed by allozyme and ISSR markers[J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2010, **289**: 67—76.
- [17] DOYLE J, DOYLE J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue[J]. *American Journal of Botany*, 1987, **75**: 1 238.
- [18] YEH F C, YANG R C, BOYLE T B J, *et al.* POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis(Ver. 1. 32)[M]. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada, 1997.
- [19] NEI M. Analysis of gene diversity in subdivided populations[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1973, **70**(12): 3 321—3 323.
- [20] MCDERMOTT J M, MCDONALD B A. Gene flow in plant pathosystems[J]. *Annual Reviews Phytopathology*, 1993, **31**: 353—373.
- [21] ROHLF F J. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2. 02. Exeter Software, Setauket, New York, 1998.
- [22] MILLER M P. Tools for Population Genetic Analysis (TEPGA) Version 1. 3. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Arizona, USA, 1997.
- [23] FALK D A, HOLSINGER K E. Genetics and conservation of rare plants[M]. Oxford University Press, New York, 1991.
- [24] LI A(李昂), GE S(葛颂). Advances in plant conservation genetics[J]. *Biodiversity Science*(生物多样性), 2002, **10**(1): 61—71(in Chinese).
- [25] GE S, ZHANG D M, WANG H Q, *et al.* Allozyme variation in *Ophiopogon xylorrhizus*, an extreme endemic species of Yunnan, China[J]. *Conservation Biology*, 1997, **11**: 562—565.
- [26] KANG U, CHANG C S, KIM Y S. Genetic structure and conservation considerations of rare endemic *Abeliophyllum distichum* Nakai (Oleaceae) in Korea[J]. *Journal of Plant Research*, 2000, **113**: 127—138.
- [27] XUE D W, GE X J, HAO G, *et al.* High genetic diversity in a rare, narrowly endemic primrose species: *Primula interjacens* by ISSR analysis[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2004, **46**(10): 1 163—1 169.
- [28] HUANG Y F(黄芳芳), CHEN X M(陈锡沐), ZHUANG X Y(庄雪影), *et al.* Analysis of genetic diversity in *Camellia oleifera* germplasms[J]. *Scientia Silvae Sinicae*(林业科学), 2006, **42**(4): 38—43(in Chinese).
- [29] NING J(宁静), LI J Q(李健权), DONG L J(董丽娟), *et al.* Genetic diversity and relationship of tea germplasm resources “Huangjinchai” (*Camellia sinensis*) revealed by ISSR markers[J]. *Journal of Tea Science*(茶叶科学), 2010, **30**(2): 149—156(in Chinese).
- [30] LIN L(林立), HU ZH Y(胡仲义), LI J Y(李纪元), *et al.* Analysis on genetic diversity of ten insular populations of *Camellia japonica* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*(园艺学报), 2012, **39**(8): 1 531—1 538(in Chinese).
- [31] WEI X, CAO H L, JIANG Y S, *et al.* Population genetic structure of *Camellia nitidissima* (Theaceae) and conservation implications[J]. *Botanical Studies*, 2008, **49**: 147—153.
- [32] WEI X, WEI J Q, CAO H L, *et al.* Genetic diversity and differentiation of *Camellia euphlebia* (Theaceae) in Guangxi, China[J]. *Annual Botany Fennici*, 2005, **42**: 365—370.
- [33] LUO X Y(罗晓莹), ZHUANG X Y(庄雪影), YANG Y SH(杨跃生). Genetic diversity of *Camellia changii* Ye(Theaceae) using ISSR markers[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*(热带亚热带植物学报), 2007, **15**(2): 93—100(in Chinese).
- [34] ZHANG ZH Y(张志勇), LI D ZH(李德铎). Conservation genetics of an extremely endangered pine, *Pinus squamata* [J]. *Acta Botanica Yunnanica*(云南植物研究), 2003, **25**(5): 544—550(in Chinese).
- [35] LIAO W H(廖文芳), XIA N H(夏念和), DENG Y F(邓云飞), *et al.* Study on genetic diversity of *Manglietia decidua* (Magnoliaceae) [J]. *Acta Botanica Yunnanica*(云南植物研究), 2004, **26**(1): 58—64(in Chinese).
- [36] WANG Z Y(王祖良), DING L X(丁丽霞), ZHAO M SH(赵明水), *et al.* Genetic diversity of *Ostrya rehderiana* revealed by RAPD markers[J]. *Journal of Zhejiang Forestry College*(浙江林学院学报), 2008, **25**(3): 304—308(in Chinese).
- [37] FEYISSA T, NYBOM H, BARTISH I V, *et al.* Analysis of genetic diversity in the endangered tropical tree species *Hagenia abyssinica* using ISSR markers[J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2007, **54**: 947—958.
- [38] RAHIMMALEK M, BAHREININEJAD B, *et al.* Genetic variability and geographic differentiation in *Thymus daenensis* subsp. *daenensis*, an endangered medicinal plant, as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) markers[J]. *Biochemical Genetics*, 2009, **47**: 831—842.
- [39] SLATKIN M. Gene flow and the geographic structure of natural populations[J]. *Science*, 1987, **236**: 787—792.
- [40] LI Q(李群), XIAO M(肖猛), GUO L(郭亮), *et al.* Genetic diversity of the rare and endangered plant *Trillium tschonoskii* in Sichuan Province[J]. *Journal of Beijing Forestry University*(北京林业大学学报), 2005, **27**(4): 1—6(in Chinese).
- [41] XIE G W(谢国文), PENG X Y(彭晓瑜), ZHENG Y L(郑燕玲), *et al.* Genetic diversity of endangered plant *Monimopetalum chinense* in China detected by ISSR analysis[J]. *Scientia Silvae Sinicae*(林业科学研究), 2007, **43**(8): 48—53(in Chinese).