



濒危物种珊瑚菜遗传多样性的 ISSR 分析

王爱兰¹,王贵琳¹,李维卫^{2*}

(1 鲁东大学 生命科学学院,山东烟台 264025;2 鲁东大学 学报编辑部,山东烟台 264025)

摘要:该研究采用 ISSR 分子标记对中国 10 个居群的 241 个珊瑚菜样本进行了遗传多样性分析。结果显示:8 条引物共检测到 76 条清晰谱带,其中多样性条带 64 条;POPGENE 分析显示,其物种水平多样性条带百分率(PPB)为 84.21%,有效等位基因数(N_e)为 1.562 8,Shannon 多样性指数(I^*)为 0.866 3,Nei's 遗传多样性指数(h^*)为 0.342 5,居群间的遗传分化系数(G_{ST})为 0.205,基因流(N_m)为 1.939 1,表明野生珊瑚菜具有较高的遗传多样性,且大部分遗传多样性存在于居群内;AMOVA 分析显示,珊瑚菜居群间遗传分化水平(F_{ST})为 0.259 1,也表明珊瑚菜居群内变异大于居群间变异。研究认为,珊瑚菜的濒危原因主要来源于野生生态环境的破坏,应当加强种质资源的保护。

关键词:珊瑚菜;ISSR;遗传多样性;基因流

中图分类号:Q789;Q949.763.3 文献标志码:A

Genetic Diversity of *Glehnia littoralis* Populations Revealed by ISSR Molecular Markers

WANG Ailan¹, WANG Guilin¹, LI Weiwei^{2*}

(1 School of Life and Sciences, Ludong University, Yantai, Shandong 264025, China; 2 Ludong University Journal, Ludong University, Yantai, Shandong 264025, China)

Abstract: In order to formulate conservation strategies of this species, We assessed the genetic diversity of *G. littoralis* with total 241 samples of 10 populations using molecular marker ISSR analysis. The result revealed that high levels of genetic variations occurred within and among populations ($PPB=84.21\%$, $N_e=1.562 8$, $I^*=0.866 3$, $h^*=0.342 5$). The genetic differentiation coefficient (G_{ST}) among populations was 0.205. Analysis of molecular variance (AMOVA) demonstrated that 25.91% of genetic diversity was found among populations, 74.09% of genetic diversity was found within populations. The value of gene flow (N_m) was 1.939 1. It is indicated that the endangered status of this species is probably due to destruction of habitats of the wild populations, rather than a loss of the genetic diversity.

Key words: *Glehnia littoralis*; ISSR; genetic diversity; gene flow

珊瑚菜(*Glehnia littoralis*)属于伞形科(Apiaceae)珊瑚菜属(*Glehnia*)多年生二倍体($2n=22$),草本药用植物,其繁殖方式为有性生殖,传粉媒介以虫媒和风媒(非自花授粉)为主^[1]。珊瑚菜属仅有珊瑚菜一个种,主要分布在 2 个区域:其一是东亚珊瑚

菜分布区,主要分布在东亚地区的中国、韩国、朝鲜、日本等 4 个国家海岸线的沙滩;其二是北美珊瑚菜分布区,主要分布在美国近海沙滩。中国境内主要分布在辽宁、山东、江苏、浙江、台湾、福建、广东和海南省沿海海岸^[2]。珊瑚菜主要生长在原始海滩的沙

收稿日期:2015-03-04;修改稿收到日期:2015-06-04

基金项目:山东省自然科学基金(ZR2010CM056)

作者简介:王爱兰(1978—),女,博士,讲师,主要从事分子生态学方面的研究。E-mail:alww05@126.com

* 通信作者:李维卫,硕士,讲师,主要从事植物学方面的研究。E-mail:lwwal@163.com

地里,特殊的沙土生境导致其根系非常发达,且根部膨大形成根状茎,从而使其成为海岸固沙的良好经济品种。此外,珊瑚菜的膨大根茎被称作北沙参,是一种传统的中药材,对免疫类疾病具有良好的疗效,在中国已经有 600 多年的使用历史^[3]。

由于珊瑚菜具有重要的药用价值、种质资源价值、经济及生态价值,在过去的几十年里,野生珊瑚菜居群不仅受到来自生境退化甚至丧失的巨大压力,也受到滥采滥挖的严重威胁,居群面积不断缩小,居群数量迅速降低,对居群的繁衍和遗传多样性的维持造成困难,已被列为国家Ⅱ级濒危保护物种^[4],又被称做植物界的大熊猫。

植物遗传多样性评估是研究濒危物种保护机制的重要手段。虽然珊瑚菜属物种已濒临灭绝,但是其种群遗传多样性的相关研究却不多见,仅见利用等位酶标记和 SRAP 分子标记的相关研究报告^[5-7],对其遗传结构及其保护方面的研究还不够深入。

简单重复序列间多态性标记 (inter-simple sequence repeat, ISSR) 为显性遗传标记,由于其结合了 RAPD 和 SSR 的优点,可以揭示出更多的多态性,且被证明具有较好稳定性、可重复性、通用性和价格低廉的特点,现已广泛应用于遗传多样性和遗传结构、系统进化和遗传资源评价等方面^[8-11]。为了进一步深入研究珊瑚菜的遗传多样性,本研究采用 ISSR 分子标记对中国 10 个野生珊瑚菜居群的遗传变异进行分析,揭示其遗传多样性水平和遗传结构。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究选取中国境内分布的 10 个居群,共 241

个珊瑚菜样本,均为野外随机采集的珊瑚菜幼嫩叶片,利用硅胶干燥保存,具体样本编号与取样地基本信息见表 1。

1.2 实验方法

1.2.1 引物筛选与 PCR 扩增 本实验采用改进的 CTAB 法^[12] 提取珊瑚菜基因组 DNA,用 1.0% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测,根据条带亮度和有无拖尾情况,粗略估计该样品 DNA 提取的质量和浓度。将检测合格的 DNA(浓度比较大的 DNA 用超纯水稀释至约 20 ng/μL),置于 -20℃ 冰箱中备用。

根据加拿大 British Columbia 大学公布的引物序列^[13],从中选取了 30 对进行合成(北京华大基因)。在所有 DNA 样本扫描之前,首先从珊瑚菜 10 个居群中随机抽取少部分 DNA 样品,进行引物多态性和稳定性的前期检测,从中筛选出稳定性好且条带清晰的 8 个引物,用于群体的扩增。PCR 反应体系为 15 μL,其中含 1.5 μL 10×Taq Buffer,0.5 mmol/L dNTPs,0~1.5 mmol/L Mg²⁺,5 μmol/L ISSR 引物,1 U Taq 酶,约 30 ng 模板 DNA。反应程序为 94 ℃ 预变性 4 min,94 ℃ 变性 50 s,50~55 ℃ 复性 50 s,72 ℃ 延伸 75 s,进行 38 个循环;然后 72 ℃ 延伸 8 min。

1.2.2 数据统计与分析 按照清晰易辨、重复、稳定的原则对扩增条带进行统计,同一位置有条带的记为“1”、没有条带的记为“0”,以此形成 0,1 二元数据矩阵。利用 POPGENE1.32 软件分析计算多样性条带百分率(PPB)、Shannon 多样性指数(I^*)、Nei's 多样性指数(h^*)、遗传分化系数(G_{ST})等^[14];利用 ARLEQUIN 软件中的 AMOVA 功能分析居群的遗传分化水平(F_{ST})^[15];采用 NTSYS 软件对居群进行 UPGMA 聚类分析;采用 TFPGA 进行

表 1 用于实验的珊瑚菜材料及其来源

Table 1 Profiles of sampling population

居群 Population	采样地点 Locality	样本数 Sample No.	经度 Longitude(E)	纬度 Latitude(N)
SDHY	山东海阳 Haiyang, Shandong	29	121°15'	36°41'24"
HBQHD	河北秦皇岛 Qinhuangdao, Hebei	25	119°18'	39°37'12"
LNCH I	辽宁长海 I Changhai I, Liaoning	27	122°19'12"	39°10'12"
LNCH II	辽宁长海 II Changhai II, Liaoning	39	122°40'12"	39°15'36"
LNWFD	辽宁瓦房店 Wafangdian, Liaoning	25	121°31'48"	39°41'24"
LNZH	辽宁庄河 Zhuanghe, Liaoning	26	122°57'35"	39°31'12"
LNBYQ	辽宁鲅鱼圈 Bayuquan, Liaoning	5	122°4'12"	40°12'36"
LNXC	辽宁兴城 Xingcheng, Liaoning	12	120°48'36"	40°30'36"
ZJZS	浙江舟山 Zhoushan, Zhejiang	25	122°24'36"	29°52'48"
SDRZ	山东日照 Rizhao, Shandong	28	119°34'48"	35°26'24"

Mantel 检测,测定地理分布范围与遗传距离的相关关系^[16]。

2 结果与分析

2.1 珊瑚菜遗传多样性分析

利用 8 个 ISSR 引物对来自 10 个居群的 241 个样品进行扩增,共得到 76 条清晰的谱带(部分结果见图 1),其中多样性条带 64 条,占总扩增条带的 84.21%(表 2)。通过 POPGENE 软件分析,得到不同分布区珊瑚菜居群的平均遗传多样性水平,PPB 为 84.21%, N_e 为 1.562 8, I^* 为 0.866 3, h^* 为 0.342 5。根据 I^* 、 h^* 以及有效等位基因数,可知珊瑚菜 10 个自然居群的遗传多样性大小依次为:山东海阳>山东日照>辽宁长海Ⅱ>辽宁瓦房店>河北秦皇岛>辽宁长海Ⅰ>浙江舟山>辽宁兴城>辽宁庄河>辽宁鲅鱼圈。其中,山东海阳(SDHY)居群的遗传多样性水平最高($N_e=1.444$ 1, $I^*=0.882$ 5, $h^*=0.279$ 5);辽宁鲅鱼圈(LNBYQ)居群的遗传多样性水平最低($N_e=1.260$ 7, $I^*=0.373$ 4, $h^*=0.154$ 2)。

2.2 珊瑚菜居群间遗传变异分析

AMOVA 分析显示,珊瑚菜各居群间遗传分化

不明显,居群间遗传分化水平(F_{ST})为 0.259 1,即居群内的遗传分化水平为 0.740 9,表明居群内遗传变异高于居群间的遗传变异,且变异达到极显著水平($P<0.001$)。POPGENE 分析结果表明,居群间平均遗传分化系数(G_{ST})为 0.205 0,表明 79.5% 的基因变异存在于居群内。由此可见,AMOVA 和 POPGENE 的分析结果是一致的。居群间基因流水平(N_m)为 1.939 1,大于 1,表明居群间有一定的基因交流。

2.3 珊瑚菜居群间的遗传距离及遗传一致度分析

根据 POPGENE 计算的 Nei's^[17]无偏离遗传一致度和遗传距离结果(表 3)可知,珊瑚菜 10 个居群间的遗传距离介于 0.032 5~0.242 之间,山东海阳(SDHY)居群与辽宁鲅鱼圈(LNBYQ)居群的遗传距离最大,为 0.242;辽宁长海Ⅰ(LNCHI)居群与辽宁瓦房店(LNWFD)居群遗传距离最小,为 0.032 5。10 个居群的遗传一致度介于 0.785 1~0.968 0 之间,辽宁瓦房店(LNWFD)居群与辽宁长海Ⅰ(LNCHI)居群之间的遗传一致度最大,为 0.968 0,说明这 2 个居群的遗传分化最小。辽宁鲅鱼圈(LNBYQ)居群与山东海阳(SDHY)居群的遗传一致度最小,为 0.785 1,说明这 2 个居群的遗传分化相对

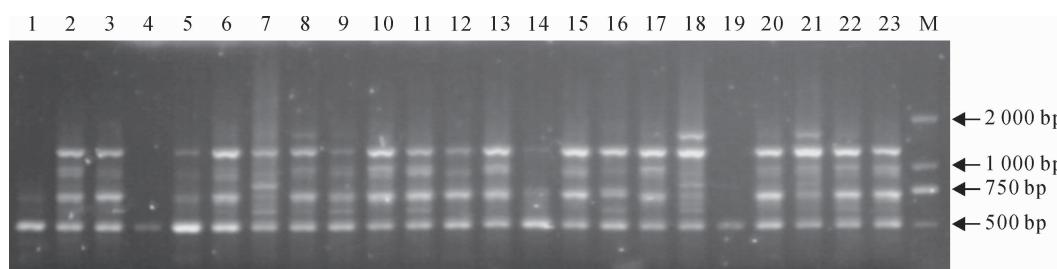


图 1 引物 ISSR834 对珊瑚菜种群的部分扩增结果

M:DL2000 marker;1~16:ZJZS 居群材料;17~23:SDRZ 居群材料

Fig. 1 ISSR bands of *G. littoralis* amplified by 834 ISSR primer

M:DL2000 marker;1~16:Samples of ZJZS population;17~23:Samples of SDRZ population

表 2 8 条引物序列及扩增结果

Table 2 8 ISSR primers and their polymorphisms of amplified bands

引物名称 Primer code	引物序列 Sequence (5'→3')	退火温度 Annealing temperature/°C	扩增带数 No. of bands	多态性带 No. of polymorphic bands	多态性百分率 Percentage of polymorphic bands/%
809	(AG)8G	52	17	14	82.35
810	(GA)8T	50	5	4	80.00
814	(CT)8A	50	9	8	88.89
824	(TC)8G	50	6	5	83.33
825	(AC)8T	50	12	10	83.33
834	(AG)8YT	52	14	13	92.86
844	(CT)8RC	50	6	5	83.33
853	(TC)8RT	50	7	5	71.43
总计 Total			76	64	84.21

表3 珊瑚菜居群间的遗传一致度(对角线以上)和遗传距离(对角线以下)
Table 3 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) of *G. littoralis*

居群 Population	SDHY	HBQHD	LNCH I	LNCH II	LNWFD	LNZH	LNBYQ	LNXC	ZJZS	SDRZ
SDHY	* * * *	0.9544	0.9134	0.9363	0.9044	0.8881	0.7851	0.8537	0.8584	0.8803
HBQHD	0.0467	* * * *	0.9315	0.9642	0.8735	0.8971	0.8068	0.9125	0.8687	0.918
LNCH I	0.0906	0.071	* * * *	0.9509	0.968	0.9599	0.8965	0.9195	0.9245	0.9303
LNCH II	0.0658	0.0365	0.0504	* * * *	0.9128	0.9492	0.8703	0.9137	0.9052	0.9565
LNWFD	0.1004	0.1353	0.0325	0.0912	* * * *	0.9447	0.8824	0.9001	0.9029	0.9119
LNZH	0.1187	0.1086	0.041	0.0521	0.0569	* * * *	0.8864	0.9225	0.8545	0.9178
LNBYQ	0.242	0.2146	0.1092	0.1389	0.1251	0.1206	* * * *	0.8983	0.9051	0.9114
LNXC	0.1582	0.0916	0.0839	0.0902	0.1053	0.0806	0.1073	* * * *	0.8604	0.9301
ZJZS	0.1527	0.1408	0.0786	0.0996	0.1021	0.1573	0.0997	0.1503	* * * *	0.9377
SDRZ	0.1274	0.0856	0.0723	0.0445	0.0922	0.0858	0.0928	0.0725	0.0644	* * * *

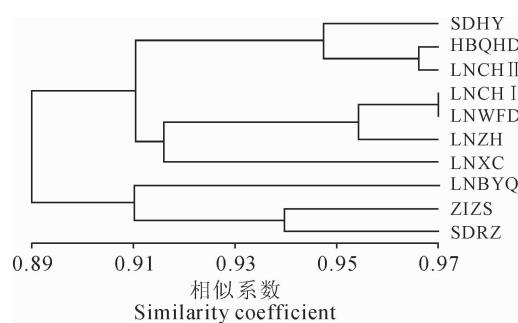


图2 珊瑚菜10个居群基于Nei's遗传距离的UPGMA聚类结果

Fig. 2 Cluster dendrogram based on Nei's genetic distance of 10 *G. littoralis* populations

来说最高。总体来说,10个居群的遗传一致度都在0.78以上,说明所有居群之间的遗传分化整体比较低,这也印证了本研究2.2所分析的遗传变异主要存在于居群内而非居群间。利用Mantel检测分析了珊瑚菜10个居群遗传距离与地理距离的相关性,结果表明居群间遗传距离与地理距离不存在显著的相关性($r=-0.133\ 6, P>0.05$)。

2.4 聚类分析

UPGMA聚类分析结果(图2)表明,珊瑚菜居群主要分为两大分支,其中山东海阳、河北秦皇岛、辽宁长海II,辽宁长海I、辽宁瓦房店、辽宁庄河、辽宁兴城聚为一支,该支又细分为2个小分支:山东海阳、河北秦皇岛、辽宁长海II为一个小分支,辽宁长海I、辽宁瓦房店、辽宁庄河、辽宁兴城为一个小分支;辽宁鲅鱼圈、浙江舟山、山东日照聚为一支。总体来看,居群间的亲缘关系与地理分布并不完全一致,地理距离相对更远的居群间(如浙江舟山和辽宁庄河)有着较远的亲缘关系,同时也发现,分布在辽

宁的5个珊瑚菜居群,聚在不同的分支,没有表现出更近的亲缘关系。

3 讨论

本研究首次采用ISSR分子标记法,针对国内采集的10个珊瑚菜野生居群进行了遗传多样性分析,结果表明,所选取的8对引物所产生的条带数量多、相对稳定、图像清晰、多态性高(都在70%以上),说明ISSR分子标记对研究珊瑚菜的遗传多样性是可行的。

3.1 珊瑚菜遗传多样性水平

居群是进化的基本单元,而遗传多样性是居群生存和进化的基础,它受多种因素影响,包括繁殖体系、生物学特性、生态环境因素、人类活动、演化史、种子散播机制等等^[18-19],物种的遗传多样性越高,其环境适应能力就越强,这一点对于濒危物种尤为重要^[20]。本研究采用的8对引物共得到76条清晰的谱带,其中多样性条带64条,多样性条带百分率为84.21%,居群水平Shannon多样性指数为0.8663,Nei's多样性指数为0.3425,这些数据都说明了珊瑚菜野生居群具有较高的遗传多样性。造成遗传多样性高的原因可能与珊瑚菜的繁育系统、生境分布有一定关系,珊瑚菜属于异交授粉的植株,其生境被海洋和陆地间隔成块状分布,使其个体在较小的分布区域进行杂交授粉,从而导致居群内个体间基因交流频繁,形成了较高的物种多样性。

3.2 影响珊瑚菜遗传结构的主要因素

遗传结构是指遗传多样性在居群内和居群间的分布,是一个物种最基本的特征之一,受生境片断化、居群分离、繁育系统、基因流等多因素的影响,本

研究结果验证了这一说法。POPGENE 分析结果表明,珊瑚菜居群平均遗传分化系数为 0.205 0,表明 79.5% 基因变异存在于居群内;AMOVA 分析显示,珊瑚菜居群间遗传分化水平为 0.259 1,居群内的遗传分化水平为 0.740 9;两组数据结果一致,均表明居群内遗传变异高于居群间的遗传变异。这可能与其复杂的繁育系统和片段化生境有关。珊瑚菜属于多年生草本植物,其生殖方式是有性生殖,主要传粉方式是虫媒和风媒,传粉昆虫为熊蜂^[6];其种子传播途径主要是风和水,繁殖体系较复杂;其地理分布主要是不连续的岛屿,及被海洋隔离的陆地沙滩,花粉和种子的传播范围受到一定限制,由此,其居群内的基因交流较高,遗传变异水平较高;居群间的基因交流较低,也就具有较低的遗传分化水平。

影响居群遗传结构的因素除繁育系统外,基因流也是一个重要因素。在群体遗传学理论中,以基因流的临界点为判别标准,不管居群大小,只要基因流大于或等于 1 时,就可以防止由遗传漂变引起的居群间遗传分化^[21]。本研究中,珊瑚菜的基因流为 1.939 1,说明珊瑚菜居群间有一定的基因交流,足以抵消遗传漂变带来的影响,也说明珊瑚菜居群具有较强的适应能力。

3.3 遗传结构与地理分布的关系

UPGMA 聚类分析显示所有 10 个居群分为两个大支,其中一支由浙江舟山、山东日照和辽宁鲅鱼圈分布的居群组成,浙江舟山和山东日照的居群显示有较近的遗传关系,这与宋春凤等^[7]的研究结果基本一致;辽宁鲅鱼圈居群没有归入辽宁其它居群的可能原因是,该处已开发为旅游海滩,原始生境遭到严重破坏,分布材料濒临绝迹,仅在此分布区发现 5 株样品,全部采集参与分析,由于样品较少,可能导致检测结果有所偏离;另外一个大支,由山东海阳、河北秦皇岛分布的居群和辽宁地区分布的 5 个

居群组成,这 7 个居群又聚成 2 个小支,其中山东海阳、河北秦皇岛居群和辽宁长海分布的一个居群聚在一起,显示较近的遗传关系,而剩余 4 个辽宁地区分布的居群单独聚为一个小支。从聚类分析结果来看,居群间的亲缘关系与地理分布并不完全一致,既表现在地理距离相距较远的居群有更远的亲缘关系(如浙江舟山和辽宁庄河等居群),又被发现同一分布区的珊瑚菜居群聚在不同的分支(如辽宁分布的 5 个居群),如果排除采样问题的偏差,可以推测长距离范围内珊瑚菜可能会受生境片断化的效应影响,受到生境选择的压力,距离越远遗传差异越大,而小范围内珊瑚菜的遗传变异与地理分布则没有呈现明显的相关性,即在一定空间尺度内珊瑚菜居群间的遗传距离与地理距离关系不大,表明差异不大的地理距离在珊瑚菜的遗传分化中可能并非是主导因素,其遗传分化的因素可能主要与珊瑚菜的繁育系统有关。本研究利用 Mantel 检测的结果也说明地域分布与遗传距离不存在显著的相关性,如需深入探讨该问题,增加取材范围和更多的分子标记分析是必要的。

3.4 保护珊瑚菜居群的措施

濒危物种保护主要目标就是维持物种的遗传多样性水平。本研究表明,珊瑚菜自身具有较强的适应能力和遗传多样性水平,其濒临灭绝的原因除了其特殊的狭域生境^[22]外,还应主要归咎于外界其他因素,例如人类的过度采挖和海岸带过度开发等对生境造成的毁灭性的破坏。珊瑚菜种质资源的保护是非常必要也是非常有意义的,应从以下几方面着手:1)加强原始生境的保护;2)严禁野生珊瑚菜品种的采挖;3)考虑到珊瑚菜的居群内具有较高的遗传多样性水平,选择较大的居群进行就地或异地建立种质资源库也是保护该物种的一个重要举措。

参考文献:

- [1] MATHIAS M E. Studies in the Umbelliferae. I[J]. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 1928, **15**(1): 91—109.
- [2] 单人骅,余孟兰. 中国植物志(第 55 卷第 3 分册)[M]. 北京:科学出版社,1992, **55**(3): 77—79.
- [3] YOON T, CHEON M S, LEE A Y, et al. Anti-inflammatory activity of methylene chloride fraction from *Glehnia littoralis* extract via suppression of NF- κ B and mitogen-activated protein kinase activity[J]. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2010, **112**(1): 46—55.
- [4] 傅立国. 中国植物红皮书·珍稀濒危植物(一)[M]. 北京:科学出版社,1992:698.
- [5] HUI H(惠 红), LIU Q X(刘启新), LIU M H(刘梦华). Allozyme variation and genetic diversity of *Glehnia littoralis* populations at the middle of seaboard in China[J]. *Journal of Plant Resources and Environment*(植物资源与环境学报), 2001, **10**(3): 1—6(in Chinese).
- [6] HUH M, CHOI J, HUH H, et al. Genetic diversity and population structure of *Glehnia littoralis* (Umbelliferae) in Korea[J]. *Korean J,*

- Oriental Physiology & Pathology, 2003, **17**(6): 1 519—1 523.
- [7] SONG CH F(宋春凤), LIU Q X(刘启新), ZHOU Y F(周义峰), et al. Genetic diversity analysis of *Glehnia littoralis* (Apiaceae) revealed by SRAP[J]. *Guizhou Botany*(广西植物), 2014, **34**(1): 15—18(in Chinese).
- [8] WU A D(吴安迪), HUANG X L(黄小龙), HUANG D Y(黄东益). Genetic diversity analysis of *Misanthus floridulus* by using ISSR marker[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*(中国农学通报), 2011, **27**(24): 93—97(in Chinese).
- [9] WEI L(魏磊), BAI SH R L(白沙如拉), PANG L(庞磊), et al. Genetic diversity and population structure of *Helianthemum ordosicum* (Cistaceae) in west Ordos national nature reserve revealed by ISSR markers[J]. *Journal of Inner Mongolia Agriculture University*(内蒙古农业大学学报), 2014, **35**(1): 30—36(in Chinese).
- [10] WOLFE A D, RANDLE C P. Relationships within and among species of the holoparasitic genus *Hyobanche* (Orobanchaceae) inferred from ISSR banding patterns and nucleotide sequences[J]. *Systematic Botany*, 2001, **26**(1): 120—130.
- [11] MORT M E, CRAWFORD D J, SANTOS-GUERRA A, et al. Relationships among the Macaronesian members of *Tolpis* (Asteraceae: Lactuceae) based upon analyses of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers[J]. *Taxon*, 2003, **52**(3): 511—518.
- [12] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material[J]. *Phytochemical Bulletin*, 1987, **19**(1): 11—15.
- [13] QIAN W, GE S, HONG D Y. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, **102**(2/3): 440—449.
- [14] YEH F C, YAND R C, BOYLE T J B, et al. POPGENE, the user-friendly Shareware for population genetic analysis (Ver. 1.32)[M]. Edmonton: University of Alberta Press, 2000: 1—28.
- [15] SCHNEIDER S, ROESSLI D, EXCOFFIER L. Arlequin Ver. 2.0: a software for population genetics data analysis[M]. Geneva: University of Geneva Press, 2000: 90—97.
- [16] MILLER M P. Tools for population genetic analysis (TFPGA) version1. 3: a windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data, computer software distributed by author[M]. Flagstaff: Northern Arizona University Press, 1997: 1—29.
- [17] NEI M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. *Genetics*, 1978, **89**(3): 583—590.
- [18] HAMRICK J L, GODT M J W. Allozyme Diversity in Plant Species [C]// BROWN A H D, CLEGG M T, KAHLER A C, et al. *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources*. Sunderland: Sinauer Associates Inc, 1990: 43—63.
- [19] LIU Y F(刘义飞), HUANG H W(黄宏文). Gene flow dynamics and related adaptive evolution in plant populations[J]. *Chinese Bulletin of Botany*(植物学报), 2009, **44**(3): 351—362(in Chinese).
- [20] FRANKHAM R, BALLON J D, BRISCOE D A. *Introduction to Conservation Genetics* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2002: 1—618.
- [21] WRIGHT S. Evolution in Mendelian population [J]. *Genetics*, 1931, **16**(1): 97—159.
- [22] HUI H(惠红), LIU Q X(刘启新), LIU M H(刘梦华). Effects of different soil media on the growth and development of endangered plant *Glehnia littoralis*[J]. *Journal of Plant Resources and Environment*(植物资源与环境学报), 2003, **12**(3): 25—30(in Chinese).

(编辑:宋亚珍)