

濒危羊躑躅自然居群的遗传多样性和遗传结构分析

程马龙, 戴亮芳, 罗向东*, 刘梦露, 周毅, 程彦秋, 谢建坤

(江西师范大学 生命科学院, 南昌 330022)

摘要: 利用 12 对微卫星(SSR)分子标记对涉及 6 省 8 个羊躑躅自然居群 193 个体的遗传多样性和遗传结构进行分析, 探讨羊躑躅遗传多样性水平与分化程度的可能原因, 为羊躑躅的保护提供科学依据。结果显示: (1) 12 对 SSR 引物共扩出 260 个等位基因, 每个位点的平均等位基因数为 21.667, 平均有效等位基因数(N_e)为 5.425, 平均多态信息含量(PIC)为 0.900; 物种水平的 Shannon 多样性指数(I)为 1.768, 基因多样性指数(H)为 0.777。 (2) 江西金溪(JX)的羊躑躅居群的遗传变异最丰富, 福建政和(ZH)的遗传多样性水平最低。 (3) 基于无限等位基因模型(IAM)的遗传分化系数(F_{st})为 0.142, 基因流(N_m)为 1.522; AMOVA 分析显示羊躑躅居群内变异(87.71%)大于居群间变异(12.29%)。 (4) 遗传距离法聚类 NJ 分析和 Structure 分析均表明, 8 个自然群体被分为三大类群; Mantel 检测发现, 羊躑躅遗传距离与地理距离无显著相关性。研究表明, 羊躑躅最好以就地保护为主, 应优先保护江西金溪(JX)居群, 同时增加对福建政和(ZH)和湖北京山(JS)居群的保护权重。讨论了羊躑躅较高遗传多样性和中等程度分化的可能原因。

关键词: 羊躑躅; SSR; 遗传多样性; 濒危植物保护

中图分类号: Q346. +5

文献标志码: A

Genetic Diversity and Genetic Structure Analysis on Natural Populations of Endangered *Rhododendron molle* G. Don

CHENG Malong, DAI Liangfang, LUO Xiangdong*, LIU Menglu, ZHOU Yi,

CHENG Yanqiu, XIE Jiankun

(College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China)

Abstract: In the present study, 12 pairs of simple sequence repeat (SSR) primers were used to evaluate genetic diversity and genetic structure of *Rhododendron molle* G. Don in eight populations from six provinces. The results showed that: (1) A total of 260 alleles with an average 21.667 alleles per locus were amplified from 193 individuals. Average values of number of effective alleles (N_e) and polymorphism information content (PIC) were 5.425 and 0.900, respectively. This species has higher genetic diversity and gene flow among different populations. For *R. molle*, the Shannon's information index (I) and Nei's gene diversity (H) were 1.768 and 0.777, respectively. (2) Comprehensive analysis suggested that Jinxi (Jiangxi Province) population exhibits great level of variability, whereas the population of Zhenghe (Fujian Province) exhibits the lowest level of variability. (3) The genetic differentiation coefficient (F_{st}) based on infinite allele model (IAM) was 0.142 and the gene flow (N_m) was 1.522, respectively. Analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that the genetic variation mainly occurred within populations (accounted for 87.71%), more than inter-populations (accounted for 12.29%). (4) The results of neighbor joining (NJ) analysis based on genetic distance and structure analysis showed that eight populations were clustered into three groups. The mantel test showed there was no significant correlation between genetic distance and ge-

收稿日期: 2016-01-02; 修改稿收到日期: 2016-03-09

基金项目: 国家自然科学基金(31360147, 31260255); 江西省自然科学基金(20151BAB204008)

作者简介: 程马龙(1990—), 男, 在读硕士研究生, 主要从事植物生态与分子生物学研究。E-mail: 422281228@qq.com

* 通信作者: 罗向东, 博士, 教授, 主要从事植物遗传与分子生物学研究。E-mail: xdluolf@163.com

ographical distance in *R. molle*. Our results indicated the priority should be given to *in situ* conservation, natural populations in Jinxi, Zhenghe, and Jingshan (Hubei Province) deserve prior conservation. The possible formation of the high level genetic diversity and the moderate differentiation of *R. molle* were also discussed.

Key words: *Rhododendron molle* G. Don; SSR; genetic diversity; conservation of endangered plant

羊躑躅 (*R. molle*), 又名黄杜鹃、闹羊花等, 是中国杜鹃花科羊躑躅亚属中仅有的 1 个原生种^[1], 具有较高的观赏价值, 是杜鹃花色品种改良的重要资源^[2-3]。此外, 羊躑躅全株器官均含有多种活性成分, 具有重要的药用价值, 其提取物可治疗温疟、慢性肾小球肾炎、高血压和类风湿等病^[4-5]; 对血吸虫和作物害虫也具有非常好的灭杀效果^[6]。

20 世纪 80 年代以前, 羊躑躅遍及华中、华南, 尤其在江苏、浙江、安徽、江西和湖北等省比较多见, 西南地区也有少量分布。但由于人们多年来的滥挖乱采及生境的破坏, 羊躑躅的生殖环节受到严重影响, 羊躑躅野外分布的地区和种群数量急剧减少, 栖息地已呈“岛屿化”, 有些省份野外已难见其踪影, 羊躑躅濒于灭绝的风险日益加剧, 亟待加以保护^[7]。

遗传多样性分析是评价和保护稀有濒危物种的重要指标, 能够反映一个物种适应环境的能力和对环境变迁持续进化的潜力和效应, 它能为确定濒危植物优先保护种群和制定有效的取样策略提供重要依据^[8]。简单重复序列 (Simple sequence repeat, SSR), 广泛存在于真核基因组中, 具有共显性、高度重复性、高度丰富性等优点, 是研究群体遗传多样性的理想工具^[9-10]。为了揭示濒危羊躑躅自然居群遗传多样性和遗传结构特征, 利用课题组前期开发的 12 对羊躑躅微卫星 (SSR) 标记分析其自然居群的遗传多样性和遗传结构, 研究结果可为羊躑躅野生资源保护和可持续利用策略的制定提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料采集

实验材料采集于 2014 和 2015 年的 4 月中旬至

5 月上旬, 样品采自江西省金溪县、鄱阳县、永修县, 福建省政和县, 安徽省金寨县, 湖南省邵东县, 湖北省京山县, 浙江省磐安县, 共 8 个居群, 合计 193 份个体样品, 每个个体样品间隔至少 10 m, 采集好的样品用冰袋盒保存带回实验室, 液氮速冻后, 放入-80℃冰箱保存。利用 GIS 数据采集器记录各采样点地理经纬度, 各居群的基本情况见表 1。

1.2 DNA 提取和 PCR 扩增

参照王军等^[11]方法提取羊躑躅幼叶基因组 DNA。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 样品的浓度和纯度, -20℃下保存备用。15 μL 的 PCR 扩增体系包括 7.5 μL 2×Taq PCR green mix (北京鼎国昌盛生物技术有限公司提供), 上下游 SSR 引物 (表 2) 各 1.0 μL, ddH₂O 4 μL, 基因组 DNA 1.5 μL。反应条件为: 94℃预变性 3 min; 94℃变性 45 s, 55℃ (部分引物 56℃) 退火 45 s, 72℃复性 1 min, 35 个循环; 72℃延伸 7 min, 最后 4℃保存。扩增产物以 20 bp DNA ladder 作为分子量标记, 在 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 缓冲液为 1×TBE (pH 8.3)。150 V 恒压电泳 90 min, 银染色^[12], 在灯箱上拍照。

1.3 数据统计与分析

根据分子量大小估计一对等位基因, 记录条带的碱基数大小 (例如, 分子量大小为 120 bp 的纯合条带可记为 120/120; 分子量为 120 bp 和 126 bp 的杂合条带记为 120/126), 条带缺失记为“0/0”, 得到 SSR 表型数据。首先, 利用 GenALEx 6.1 软件^[13]计算各遗传多样性指数; 利用 POPGENE 计算 Nei’s 多样性指数 (*H*)、遗传分化系数 (*F_s*) 及基因流 (*N_m*)^[14]; 其次, 利用 GenALEx 6.1 软件中的分子

表 1 羊躑躅居群采样基本数据
Table 1 Detailed sample information of *R. molle* populations

居群来源 Populations location	样本数 Sample size	经纬度 Longitude and latitude	海拔 Altitude/m
安徽金寨 Jinzhai, Anhui (JZ)	21	115°47'E, 31°11'N	506~706
浙江磐安 Pan'an, Zhejiang (PA)	24	120°27'E, 28°52'N	514~906
江西永修 Yongxiu, Jiangxi (YX)	21	115°43'E, 29°08'N	16~39
湖北京山 Jingshan, Hubei (JS)	22	112°50'E, 30°59'N	80~164
江西金溪 Jinxi, Jiangxi (JX)	30	116°45'E, 27°50'N	84~100
湖南邵东 Shaodong, Hu'nan (SD)	33	111°50'E, 27°04'N	209~321
江西鄱阳 Poyang, Jiangxi (PY)	24	116°57'E, 29°16'N	67~104
福建政和 Zhenghe, Fujian (ZH)	18	119°05'E, 27°16'N	993~1176

方差(AMOVA)功能进一步分析遗传变异在羊蹄躑居群间、居群内的遗传分化水平;随后采用 Power-Marker V3.25 软件对各位点分析多态性信息量(PIC)指数,计算遗传距离(D)和遗传一致度(GI);运用 Neighbor joining(NJ)算法构建聚类图,并利用 GenALEx 6.1 计算地理距离,经 Mantel 检测,分析其与遗传距离的相关性。最后采用 STRUCTURE 2.3.4 软件分析群体结构^[15],估计最佳群体组数 K , K 取 1~13,10 次重复,采用 Structure Harvester 计算 ΔK 值作为最佳 K 值衡量标准^[16]。

2 结果与分析

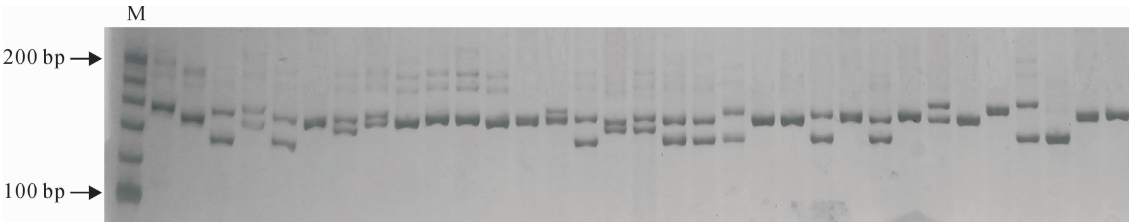
2.1 羊蹄躑 SSR 位点多态性

本研究利用 12 个多态性引物对羊蹄躑 8 个自然居群共 193 个个体进行 SSR 分析,总共扩出 260 个等位基因,平均每个位点等位基因数为 21.667,扩增片段长度在 90~182 bp 之间。本研究所用的 12 对 SSR 引物多态性较好,扩增条带清晰,如图 1 中引物 HD88 对邵东群体扩增结果所示。分析表

明,不同位点扩增出的等位基因数差异较大,其中位点变异最少的是 HD83,为 14 个,最多的是 HD34、HD39 和 HD64,均为 26 个(表 2)。12 个位点的多态性信息含量(PIC)在 0.790~0.941,平均值为 0.900,显示羊蹄躑遗传背景的复杂性。各位点的遗传分化系数 F_{st} 值差异也较明显,处于 0.067~0.251,平均值为 0.142,表明居群内变异大于居群间变异。

2.2 羊蹄躑自然居群的遗传多样性

遗传多样性分析结果显示(表 3),8 个羊蹄躑自然居群中的有效等位基因数为 4.087~6.905,平均为 5.425,其中最高为金溪(JX)居群,政和(ZH)居群最低。Nei's 基因多样性指数(H)变化范围为 0.706~0.820,平均值为 0.777,8 个居群的遗传变异(Nei's 基因多样性)排序由低到高依次为政和(ZH)<京山(JS)<永修(YX)<鄱阳(PY)<金寨(JZ)<磐安(PA)<邵东(SD)<金溪(JX)。Shannon 指数(I)平均值为 1.768(1.493~2.009),其遗传多样性排序顺序与 Nei's 基因指数(H)的结果基



M. 20 bp DNA ladder

图 1 引物 HD88 对邵东居群扩增结果

Fig. 1 Amplification products of Shaodong population by HD88

表 2 羊蹄躑 12 个 SSR 位点遗传多样性

Table 2 Genetic diversity of 12 SSR loci in *R. molle*

SSR 位点 SSR locus	等位基因数 Number of alleles (N_a)	基因多样性指数 Gene diversity index (H)	遗传分化系数 Coefficient of gene differentiation (F_{st})	基因流 Gene flow (N_m)	多态信息量 Polymorphism information content (PIC)
HD25	21	0.924	0.067	3.479	0.922
HD26	17	0.883	0.223	0.873	0.877
HD34	26	0.935	0.112	1.975	0.939
HD35	24	0.929	0.095	2.379	0.925
HD37	15	0.812	0.162	1.295	0.790
HD39	26	0.942	0.146	1.450	0.941
HD43	25	0.926	0.172	1.201	0.925
HD55	23	0.919	0.163	1.287	0.917
HD64	26	0.932	0.076	3.040	0.932
HD80	21	0.889	0.251	0.745	0.881
HD83	14	0.864	0.150	1.420	0.853
HD88	22	0.906	0.090	2.537	0.901
平均 Mean	21.667	0.905	0.142	1.522	0.900

本一致(表 3)。综合各遗传多样性参数的分析结果表明,金溪(JX)地区羊蹄躅群体内蕴含较丰富的遗传变异,邵东(SD)、磐安(PA)次之,金寨(JZ)、鄱阳(PY)、永修(YX)、京山(JS)4 个地区居群遗传多样性水平居中,政和(ZH)居群遗传多样性水平最低。

2.3 羊蹄躅自然居群的遗传结构特征

2.3.1 羊蹄躅自然居群的 AMOVA 分析 羊蹄躅 8 个自然居群遗传分化水平的分子方差分析结果表明(表 4),羊蹄躅群体的变异大部分存在于居群内(87.71%),居群间的遗传变异为 12.29% ($P < 0.001$)。该结果与由 Nei's 指数计算的群体间分化系数($F_{st}=0.142$)检测的结果一致。同时,羊蹄躅居群平均基因流 N_m 为 1.522(表 2),表明羊蹄躅居群间可能通过杂交或基因渗透产生一定程度的基因交流,从而削弱了因遗传漂变引起的居群间分化程度。

2.3.2 羊蹄躅居群间遗传距离与 NJ 聚类分析 遗传距离(D)和遗传一致度(GI)分析表明(表 5),羊蹄躅各居群 Nei's 遗传距离及遗传一致度的平均

值分别为 0.142 6 和 0.866 2,表明各居群亲缘关系比较近。浙江磐安(PA)与湖南邵东(SD)居群遗传一致度最大,为 0.905 4,同时遗传距离最小,为 0.099 4。江西永修(YX)与福建政和(ZH)居群一致度最小,为 0.805 5,两者间遗传距离最大,为 0.216 3。经 Mantel 检测发现,羊蹄躅各居群间的遗传距离与地理距离无显著相关($r=-0.164, P=0.248$)。

不同羊蹄躅居群所构建的 NJ 聚类结果(图 2)表明,8 个居群主要分为 3 个类群,永修(YX)、京山(JS)居群为 I 类,金寨(JZ)、金溪(JX)、政和(ZH)和鄱阳(PY)居群聚为 II 类,磐安(PA)与邵东(SD)2 个居群间遗传距离最小,关系最密切,聚为 III 类。

2.3.3 羊蹄躅自然居群的 Structure 分析 基于贝叶斯算法的 Structure 结果显示,羊蹄躅各居群出现了一定的遗传分化(图 3)。△ K 最大值所对应的 K 值为 3,表明羊蹄躅自然居群 Structure 分析的最适 K 值为 3。Structure 分析结果显示,羊蹄躅 8 个居群可分成 3 大组,分别用 3 种颜色来表示(图 4),可

表 3 羊蹄躅自然居群的遗传多样性
Table 3 Genetic diversity of natural populations of *R. molle*

居群 Population	等位基因数 Number of alleles (N_a)	有效等位基因数 Effective number of alleles (N_e)	Shannon 指数 Shannon index (I)	基因多样性指数 Gene diversity index (H)	固定指数 Fixation index (F)
JZ	7.58	5.061	1.724	0.783	0.415
PA	9.00	6.010	1.893	0.805	0.420
YX	8.83	5.581	1.791	0.770	0.402
JS	7.25	4.720	1.634	0.754	0.330
JX	10.58	6.905	2.009	0.820	0.367
SD	9.25	6.029	1.871	0.806	0.551
PY	7.83	5.004	1.728	0.771	0.449
ZH	6.48	4.087	1.493	0.706	0.188
平均 Mean	8.35	5.425	1.768	0.777	0.390

注:居群代号同表 1;下同。
Note:Population codes are same as table 1;The same as below.

表 4 羊蹄躅遗传分化水平的方差分析(AMOVA)
Table 4 AMOVA of the genetic differentiation level in *R. molle*

变异来源 Source of variance	自由度 df	方差和 Sum of squares	平均方差 Mean of squares	变异组分 Variance component	变异百分率 Percentage of variation/%	P^*
居群间 Among populations	7	278.334	39.762	0.683	12.29	<0.001
居群内 Within populations	185	1 823.511	9.738	4.869	87.71	<0.001
总计 Total	192	2 101.845		5.552	100.00	
组间 Among groups	2	175.104	87.552	1.153	6.86	<0.001
组内 Within groups	190	2 973.585	15.650	15.650	93.14	<0.001
总计 Total	192	3 148.689		16.803	100.00	

注: * P 值表示比观测值变异大的概率,这个概率是通过把居群中的样本经过 1 000 次随机排列改变计算得到的。
Note: * P values are the probabilities of having a more extreme variance component than the observed values alone. Probabilities were calculated by 1 000 random permutations of individuals across populations.

表 5 Nei's 遗传距离(下三角)与遗传一致度(上三角)
Table 5 Nei's genetic distance (below diagonal) and genetic identity (above diagonal)

居群 Population	JZ	PA	YX	JS	JX	SD	PY	ZH
JZ	—	0.884 7	0.834 1	0.857 2	0.904 1	0.888 6	0.870 3	0.867 1
PA	0.122 5	—	0.860 8	0.871 3	0.896 9	0.905 4	0.868 5	0.852 1
YX	0.181 4	0.149 9	—	0.844 2	0.874 7	0.855 9	0.860 6	0.805 5
JS	0.154 1	0.137 8	0.169 4	—	0.870 0	0.871 8	0.859 3	0.817 3
JX	0.100 8	0.108 8	0.133 9	0.139 3	—	0.893 7	0.852 9	0.852 9
SD	0.118 1	0.099 4	0.155 6	0.137 2	0.112 4	—	0.883 8	0.864 7
PY	0.138 9	0.141 0	0.150 1	0.151 6	0.121 0	0.123 5	—	0.885 8
ZH	0.142 6	0.160 0	0.216 3	0.201 8	0.159 1	0.145 4	0.121 3	—

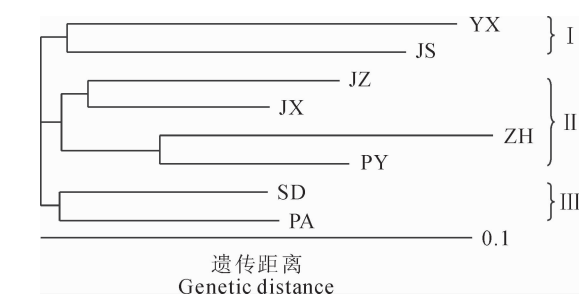


图 2 羊蹄躑群体间 NJ 聚类分析

Fig. 2 NJ analysis on 8 populations of *R. molle* by PowerMarker

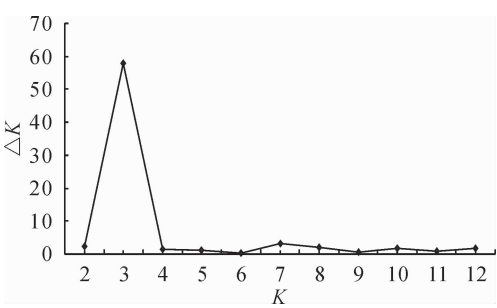
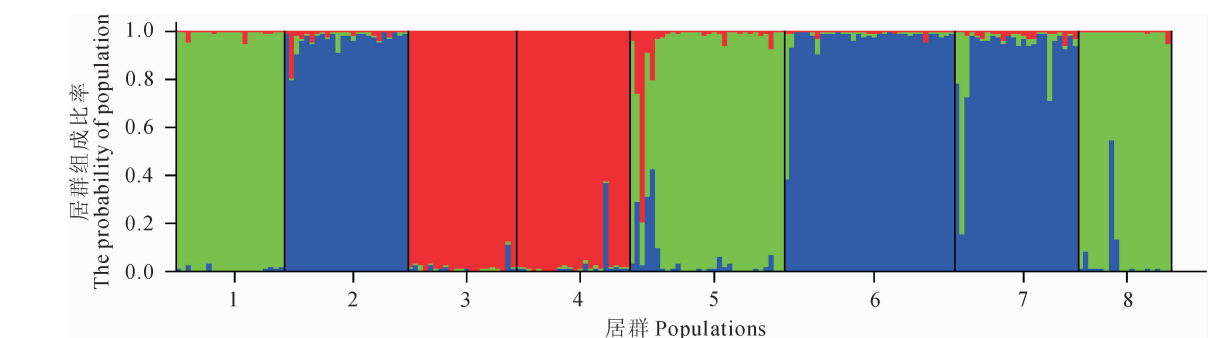


图 3 利用 ΔK 对群体结构进行分析

Fig. 3 The group structure analysis on basing ΔK



1~8 分别为 JZ、PA、YX、JS、JX、SD、PY 和 ZH 居群;相同的颜色代表一个类群。

图 4 用 Structure 推导的 8 个羊蹄躑居群遗传结构($K=3$)

The number 1 to 8 represented Jinzhai, Panan, Yongxiu, Jingshan, Jinxi, Shadong, Poyang and Zhenghe population. The same color indicates the same population

Fig. 4 Estimated genetic structure for $K=3$ obtained with the STRUCTURE program for 8 populations of *R. molle*

以看出,金寨(JZ)、金溪(JX)、政和(ZH)居群聚为一组,磐安(PA)、邵东(SD)、鄱阳(PY)居群聚为一组,永修(YX)、京山(JS)为一组。进一步比较分析发现,Structure 分析结果与基于遗传距离法的 NJ 聚类结果基本一致,即除鄱阳(PY)居群外,其余 7 个居群的聚类结果完全一致。进一步对 8 居群分为 3 组进行 AMOVA 分析发现,羊蹄躑组间遗传变异为 6.86%(表 4),组间平均分化系数 Φ_{st} 为 0.069 ($P<0.001$),再次说明羊蹄躑自然居群组内变异大

于组间变异。

3 讨 论

遗传多样性是物种长期生存和保持进化潜力的物质基础,是生物多样性保护的重要组成部分。一般而言,特有种、濒危种的遗传多样性水平较低^[17],但也有些能保持较高水平的遗传多样性^[18]。羊蹄躑是中国羊蹄躑亚属中仅有的一个原生种,由于其药用价值和园艺观赏价值,人为滥挖造成生境破坏,

分布逐渐呈现片断化,最终导致羊躑躅成为濒危种^[19]。本研究中,12 对 SSR 标记分析显示羊躑躅具有较高的遗传多样性($PIC=0.900,I=1.768,H=0.777$),高于此前利用 ISSR 标记分析江西羊躑躅的遗传多样性^[20]($I=0.5007,H=0.3342$)以及同属的美容杜鹃^[21]($I=0.4972,H=0.3386$),稍低于 SSR 标记分析的 66 个杜鹃品种遗传多样性^[22]($PIC=0.838,I=2.2293$),究其原因,一方面可能研究的自然居群大小及生态类型不同所致;另一方面可能是羊躑躅为多年生、寿命较长植物,原本分布范围较为广泛,长期的居群演化和延续已使其沉积较多遗传变异,只是后期过度采挖及其生境遭破坏出现片断化,但片断化时间不长,遗传多样性处在散失阶段。

片断化生境对种群的遗传结构和遗传多样性水平产生很大影响。一般而言,生境片断化降低有效居群大小,造成物种适应环境能力下降,同时也可能会因为遗传漂变和近交衰退而使居群间产生遗传分化,进而降低该种群的生存能力,由此在后代产生遗传瓶颈^[23]。我们的研究显示,羊躑躅种群间分化系数 F_{st} 为 0.142,属中等程度分化^[24],且遗传变异主要存在于居群内。AMOVA 分析也表明羊躑躅群体变异中 87.71% 发生于居群内,居群间遗传变异仅为 12.29%,基于 Structure 分析分为三组后的 AMOVA 分析也揭示居群内遗传变异大于居群间遗传变异。上述指标表明,羊躑躅经历居群片断化之后居群内呈中等程度的分化,究其原因可能是居群间还存在一定程度基因流。Slatkin^[25]认为当 $N_m > 1$ 时,基因流可以抵消居群间因遗传变异引起的居群分化,本研究中羊躑躅居群间 N_m 为 1.522,表明影响羊躑躅 8 个居群遗传结构的主要因素可能是

基因流,而花粉和种子的扩散是植物基因流主要两种形式^[26]。根据杜鹃花科花粉具粘性和种子细小具有膜翅特征^[22],推测虫媒和风媒是较远距离传播基因流的主要方式。

此外,分布区气候因子、生境多样性及人工栽培等因素,均对遗传多样性及遗传结构变异模式产生较大影响^[27]。我们野外实地调查发现,羊躑躅主要分布在海拔 20~1200 m 的山脊或沿路山坡,各省羊躑躅居群所处生境有很大不同。邵东(SD)、政和(ZH)及江西 3 个居群属于非保护区内居群,多处于已垦荒的丘陵,多与里白科、杜鹃科等灌木伴生,人类开垦、砍伐挖掘等因素干扰比较明显,致使羊躑躅居群数量锐减,剩下的多以零散分布为主。京山(JS)、金寨(JZ)、磐安(PA)3 个居群处在森林自然保护区,多与杉科、松科等乔木伴生,自然居群生境破坏较少,但也遭到了不同程度人为因素的破坏。因此对羊躑躅野生居群的保护亟需重视。本研究的 Structure 分析和 NJ 聚类分析均表明,8 个居群可以分为三大类,均显示永修(YX)、京山(JS)聚为一组,磐安(PA)、邵东(SD)聚为一组,金寨(JZ)、金溪(JX)、政和(ZH)居群聚为一组,表明各自然居群的遗传多样性与地理距离无直接相关性。由于该物种的海拔分布、生境和种群数量各不相同,羊躑躅的保护最好以就地保护为主。金溪(JX)的遗传多样性水平比较高,应优先保护;但由于政和(ZH)和京山(JS)居群均有一定数量的野生幼苗,应增加保护权重。另外,迁地保护、植物组织培养之后人工栽培也是保存野生羊躑躅的遗传多样性有效途径,而具体取样策略还待进一步对幼苗遗传多样性进行分析之后制定。

参考文献:

[1] 张长芹. 杜鹃花[M]. 北京:中国建筑工业出版社,2003.

[2] 张长芹,罗吉凤. 杜鹃花新品种‘金躑躅’和‘紫艳’[J]. 园艺学报,2002,29(5):502-502.

ZHANG C Q, LUO J F. New *Rhododendron* varieties—‘Jinzhihu’ and ‘Ziyan’ [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2002, 29(5):502-502.

[3] URESHINO K, MIYAJIMAL I, AKABANE M. Effectiveness of three-way crossing for the breeding of yellow-flowered evergreen azalea[J]. *Euphytica*, 1998, 104:113-118.

[4] LIU Z L, GOH S H, HO S H. Screening of Chinese medicinal

herbs for bioactivity against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst) [J]. *Journal of Stored Products Research*, 2007, 43(3):290-296.

[5] CHENG X A, XIE J J, HU M Y, et al. Induction of intracellular Ca^{2+} and pH changes in Sf9 insect cells by rhodojaponin - III, a natural botanic insecticide isolated from *Rhododendron molle* [J]. *Molecules*, 2011, 16(4):3 179-3 196.

[6] 蔡 雄,赵红梅. 羊躑躅提取物对日本血吸虫虫卵肉芽肿影响[J]. 中兽医医药杂志, 2012, 3:50-52.

CAI X, ZHAO H M. Influence of *Rhododendron molle* extraction on egg granuloma caused by *Schistosoma japonicum* [J]. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 2012, 3:

50-52.

[7] WANG S, LIN S, ZHU C, *et al.* Highly acylated diterpenoids with a new 3,4-secograyanane skeleton from the flower buds of *Rhododendron molle* [J]. *Organic Letters*, 2010, **12**(7): 1 560-1 563.

[8] EDUARDOV C, MARIE-STÉPHANIE S, PAUL G, *et al.* Genetic structure in peripheral Western European populations of the endangered species *Cochlearia pyrenaica* (Brassicaceae) [J]. *Plant Systematics & Evolution*, 2011, 297: 75-85.

[9] SUTAPA D, GIRIRAJ K, BIKRAM P S, *et al.* Development of genic-SSR markers by deep transcriptome sequencing in pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh][J]. *BMC Plant Biology*, 2011, 11: 17-17.

[10] TAN C C, WU Y Q, CHARLES M T, *et al.* Development of simple sequence repeat markers for bermudagrass from its expressed sequence tag sequences and preexisting sorghum SSR markers[J]. *Mol. Breeding*, 2012, 29: 23-30.

[11] 王 军, 杨传平, 刘桂丰. 木本植物基因组 DNA 提取及鉴定[J]. *植物研究*, 2006, **26**(5): 589-594.

WANG J, YANG C P, LIU G F. Extraction of genomic DNA from woody plants and its identification[J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2006, **26**(5): 589-594.

[12] 高 东, 杜 飞, 朱有勇. 低背景、高分辨率 PAGE 简易银染法[J]. *遗传*, 2009, **31**(6): 668-673.

GAO D, DU F, ZHU Y Y. Low-background and high-resolution contracted silver-stained method in polyacrylamide gels electrophoresis[J]. *Hereditas*, 2009, **31**(6): 668-673.

[13] PEAKALL R, SMOUSE P E. GENALEX 6, genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2006, 6: 288-295.

[14] YEH F C, YANG R C. Boyle T. POPGENE VERSION 1. 31, Microsoft window-based freeware for population genetic analysis[M]. Edmonton, University of Alberta, Canada, 1999.

[15] PRITCHARD J K, STEPHENS M, DONNELLY P. Inference of population structure using multilocus genotype data[J]. *Genetics*, 2000, 155: 945-959.

[16] EVANNO G, REGNAUT S, GOUDET J. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure; a simulation study[J]. *Molecular Ecology*, 2005, 14: 2 611-2 620.

[17] HAMRICK J L, GODT M J W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society in London, Series B*, 1996, 351: 1 291-1 298.

[18] RICHTER T S, SOLTIS P S, SOLTIS D E. Bottleneck-induced dissolution of self-incompatibility and inbreeding consequences in *Asterfurfatus* (Asteraceae) [J]. *American Journal of Botany*, 1994, 94: 965-971.

[19] 罗向东, 戴亮芳, 罗建林, 等. 濒危黄杜鹃的离体快速繁殖体系研究[J]. *西北植物学报*, 2010, **30**(4): 645-651.

LUO X D, DAI L F, LUO J L, *et al.* *In vitro* micropropagation of the endangered *Rhododendron molle* G. Don [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*, 2010, **30**(4): 645-651.

[20] 周 毅. 中国特有植物羊躑躅遗传多样性的 ISSR 分析[D]. 南昌: 江西师范大学, 2007.

[21] 赵 冰, 郑茜子, 李厚华. 秦岭山区美容杜鹃 5 个野生种群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. *广西植物*, 2015, **35**(5): 761-767.

ZHAO B, ZHENG X Z, LI H H. Genetic diversity of five wild populations of *Rhododendron calophytum* in Qinling, China by ISSR analysis [J]. *Guihaia*, 2015, **35**(5): 761-767.

[22] 周 泓. 杜鹃花品种资源多样性研究及品种分类体系构建[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.

[23] YAO X H, ZHANG J J, YE Q G, *et al.* Fine-scale spatial genetic structure and gene flow in a small, fragmented population of *Sinojackia rehderiana* (Styracaceae), an endangered tree species endemic to China [J]. *Plant Biology*, 2011, **13**(2): 401-410.

[24] WRIGHT S. Evolution and the genetics of populations, vol 4, variability within and among natural populations [M]. Chicago, University of Chicago Press, 1978.

[25] SLATKIN M. Estimating levels of gene flow in natural populations [J]. *Genetics*, 1981, **99**(2): 323-335.

[26] 李海生, 陈桂珠. 海南岛红树植物海桑遗传多样性的 ISSR 分析[J]. *生态学报*, 2004, **24**(8): 1 657-1 663.

LI H S, CHEN G Z. Genetic diversity of mangrove plant *Sonneratia caseolaris* in Hainan Island based on ISSR analysis [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, **24**(8): 1 657-1 663.

[27] 易能君, 施季森, 王明麻. 林木群体遗传多样性和多位点遗传结构[J]. *生物多样性*, 1996, **4**(3): 153-159.

YI N J, SHI J S, WANG M X. Genetic diversity and multilocus structure in forest trees [J]. *Chinese Biodiversity*, 1996, **4**(3): 153-159.

(编辑: 宋亚珍)