



基于 ISSR 的硬叶兜兰居群遗传多样性研究

李宗艳¹, 管名媛¹, 李 静¹, 李名扬^{2*}

(1 西南林业大学 园林学院, 昆明 650224; 2 西南大学 园艺园林学院, 重庆 400715)

摘 要: 利用 ISSR 标记对 7 个硬叶兜兰居群 160 个体扩增, 10 对引物共扩增出 101 个条带, 其中多态性条带 97 个, 种水平上的多态性条带比率(PPB)达 96.02%, 香依指数(I)为 0.488 9, Nei's 基因多样性指数(H)为 0.332 4。居群水平的遗传参数, 多态性条带比率(PPB)为 33.51%, 香依指数(I)为 0.194 3, Nei's 基因多样性指数(H)为 0.133 2。总的遗传多样性(H_T)为 0.323 9, 个体遗传多样性(H_s)达到 0.133 2。AMOVA 结果揭示居群间遗传分化大, 居群间基因流 N_m 为 0.349 2。居群间的 Nei's 遗传距离 0.148 1~0.4385。基于 UPGMA 聚类, 在遗传距离为 0.327 时, 7 个居群聚为两支, 第一支由古林箐和马固、田坝、夹寒箐和杨柳井居群组成, 第二支由斗咀和小坝子居群组成, 聚类关系反映居群间遗传分化与地理距离无显著相关性。

关键词: 硬叶兜兰; 遗传多样性; 遗传分化; 遗传距离; 亲缘关系

中图分类号: Q746⁺.5

文献标志码: A

Genetic Diversity of *Paphiopedilum micranthum* Detected by ISSR Data

LI Zongyan¹, GUAN Mingyuan¹, LI Jing¹, LI Mingyang^{2*}

(1 Landscape and Architecture Faculty, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China; 2 Horticulture and Landscape College, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: *Paphiopedilum micranthum* has the high ornamental value known as slipper orchids, which was restrictedly distributed in karst limestone areas of southeast Yunnan, southwest Guizhou, northern and western Guianxi Province. This study focused on the genetic diversity of 7 populations from Southeast Yunnan detected by ISSR markers. 101 bands were generated from 160 individuals by 10 primers, among which 97 bands belonged to polymorphic and each primer amplified 10.1 bands. There was a higher genetic diversity index at species level (PPB=96.02%; I =0.488 9; H =0.332 4), but a lower genetic diversity index at population level (PPB=33.51%; I =0.194 3; H =0.133 2). Total gene diversity reached 0.323 9 and gene diversity within populations attained to 0.133 2. Nei's genetic differentiation among populations (G_{st}) was 0.148 1–0.438 5. Gene flow (N_m) was 0.349 2. These indicated that there was a higher population differentiation among populations. Based on the UPGMA cluster dendrogram, the seven populations were classified into two groups at genetic distance of 0.327. First group included Gulinqing, Magu, Tianba, Jiahanqing and Yangliujing; Second group was made up by Douzui and Xiaobazi populations. The cluster result indicated that there was no significant correlation between genetic distance and geographical distance.

Key words: *Paphiopedilum micranthum*; genetic diversity; genetic differentiation; genetic distance; blood relationship

收稿日期: 2016-04-21; 修改稿收到日期: 2016-06-13

基金项目: 云南省高校优势特色生态学重点学科建设项目(05000511311); 云南省优势特色重点学科生物学一级学科建设项目(50097501)

作者简介: 李宗艳(1974—), 女, 博士, 副教授, 从事濒危植物保护研究。E-mail: lizyan74@sina.com

* 通信作者: 李名扬, 男, 博士, 教授, 从事植物分子生物学研究。E-mail: limy@swu.edu.cn

硬叶兜兰 (*Paphiopedilum micranthum*) 分布于云南东南、贵州西南和北部、广西西部的亚热带石灰岩山区^[1-2],因其具有较高的观赏价值,自 20 世纪 80 年代发现以来,种质资源大量被采挖,被 CITES 列为一级保护植物,禁止贸易。

作为珍稀花卉,当前主要开展了硬叶兜兰繁殖、传粉生物学、育种和遗传多样性等研究^[3-9]。硬叶兜兰主要依靠蜂类和食蚜蝇传粉^[3],自然状态下,硬叶兜兰结实率和萌发率较低,人工授粉后种子萌发率最大可达 32.4%^[4];因其具有较高的观赏特性,硬叶兜兰参与许多园艺栽培品种的杂交,如著名的魔鬼灯笼 *P. magic* Lantern(硬叶兜兰 × 德氏兜兰)^[5];硬叶兜兰植株形态多样,花器官变异较大,如花色、花瓣、中萼和合萼的分化系数较其它器官高^[6];李昂等^[7]分析 4 个硬叶兜兰居群遗传多样性,结果表明:其物种水平的遗传多样性高于居群水平,有 20.3% 的遗传多样性来自于居群间的分化,居群间遗传分化水平高于 7 个云南居群的 SRAP 数据的结果^[8];进一步的空间自相关研究表明:硬叶兜兰群体中遗传变异在空间上的分布呈斑块状,在短距离内表现出显著的正相关,在较大距离内表现出显著的负相关^[9]。

ISSR(inter simple sequence repeat) 称为简单重复序列区间扩增多态 DNA,实验操作简单快速^[10],自创建以来,在居群遗传多样性和遗传结构分析中显示了突出的优势^[11-13]。滇东南的石灰岩地区极可能是兜兰的起源中心和演化中心,亦是国内硬叶兜兰采集压力最大的区域,采用 ISSR 技术对该地区居群遗传多样性进行分析,为其保护提供理论依据具有现实意义。

1 材料和方法

1.1 材料收集

本研究材料采集选择文山、马关和麻栗坡 3 县 7 个居群,每居群按随机采样原则,为避免无性克隆个体,每个单株取样距离在 2 m 以上,7 个居群共 160 个样本(表 2),置于保温箱中带回实验室于一 70 ℃超低温冰箱保存。

1.2 引物筛选和 PCR 扩增

采用改良的 1.5×CTAB 法提取硬叶兜兰基因组总 DNA,DNA 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测后,稀释为 30 ng/μL 在一 20 ℃保存备用。

实验选用的 ISSR 引物是由加拿大哥伦比亚大学(UBC)开发设计的 77 个引物,从中选取 10 对能

稳定扩增、产生条带清晰丰富、多态性较好的引物组合进行遗传多样性的分析。优化的 PCR 扩增反应体系为:2.0 mmol/L MgCl₂、dNTPs 0.40 mmol/L、模板质量浓度为 5.0 ng/μL、1.25 U/20μL TaqDNA 聚合酶、引物质量浓度 0.35 μmol/L。IS-SR-PCR 扩增程序为:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 45 s,48~52 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 90 s,35 个循环,72 ℃延伸 10 min,4 ℃保存。扩增产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 数据处理

条带统计时将具有相同迁移率的扩增片段,按照 0/1 编码,应用 POPGENE 1.32 软件^[14,15]进行多态位点百分率(PPB)、观测等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、Nei's 基因多样性指数(H)、Shannon 信息指数(I)、群体总的遗传多样性(H_T)、群体内基因多样性(H_s)、群体间的遗传分化系数(G_{st})、Nei's 遗传距离(D)和基因流(N_m)计算。根据 Nei's 遗传距离,利用 NTSYS-pc1.21^[16]软件对居群进行 UPGMA 居群间亲缘关系分析。分子遗传变异的方差分析(AMOVA)用 GenALEX 软件计算^[17]。

2 结果与分析

2.1 引物筛选结果

采用优化的 ISSR-PCR 扩增反应体系,对 77 个 ISSR 引物扩增有产物的有 42 个,从中筛选出 10 个扩增稳定性较高、多态性较好和条带清晰的引物进行居群遗传多样性分析(表 1)。引物扩增条带最多

表 1 不同引物的扩增效果
Table 1 Amplified results of the different primers

引物序号 Primer code	序列 Sequence (5'→3')	扩增条带 No. of bands	多态性条带 No. of polymorphic bands	多态性百分率 Percentage of polymorphic bands/%
UBC814	(CT) ₈ A	9	9	100
UBC825	(AC) ₈ T	10	9	90
UBC831	(AT) ₈ YA	8	7	87.5
UBC834	(AG) ₈ YT	10	10	100
UBC848	(CA) ₈ RG	10	9	90.0
UBC855	(AC) ₈ YT	12	12	100
UBC856	(AC) ₈ YA	12	12	100
UBC862	(AGC) ₅	10	10	100
UBC840	(GA) ₈ YT	12	12	100
UBC849	(GT) ₈ YA	8	7	87.5
总计 Total		101	97	96.04

表 2 基于 ISSR 数据的硬叶兜兰 7 个居群的遗传多样性指数

Table 2 Genetic diversity indices of seven geographical populations of *P. micranthum*

居群 Population	样本数 Sample	观测等位 基因数 N_a	有效等位 基因数 N_e	Nei's 基因 多样性指数 H	Shannon's 指数 I	多态性 百分率 $PPB/\%$
马关马固 MGMG	22	1.3663	1.2539	0.1428	0.2094	36.63
马关夹寒箐 MGJHQ	19	1.287 1	1.180 1	0.102 0	0.151 6	28.71
马关古林箐 MGGLQ	25	1.405 9	1.268 2	0.151 9	0.224 1	40.59
文山斗咀 WSDZ	22	1.316 8	1.238 3	0.133 2	0.192 8	31.68
文山杨柳井 WSYLJ	19	1.287 1	1.226 7	0.122 0	0.175 0	28.71
文山小坝子 WSXBZ	21	1.346 5	1.255 6	0.143 0	0.207 8	34.65
麻栗坡田坝 MLPTB	32	1.336 6	1.247 4	0.137 4	0.199 6	33.66
居群 Population		1.335 2	1.238 6	0.133 2	0.194 3	33.51
物种 Species	160	1.960 4	1.552 9	0.324 4	0.488 9	96.04

注: N_a . 观测等位基因数; N_e . 有效等位基因数; H . Nei's 基因多度; I . Shannon's 指数; PPB . 多态性百分率

Note: N_a . Observed number of alleles; N_e . Effective number of alleles; H . Nei gene diversity; I . Shannon's information index; PPB . The percentage of polymorphic bands

表 3 硬叶兜兰 7 个居群的 Nei's 遗传一致度(对角线上方)和遗传距离(对角线下方)

Table 3 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance(below diagonal) of *P. micranthum*

居群 Population	马关古林箐 MGGLQ	马关夹寒箐 MGJHQ	马关马固 MGMG	文山斗咀 WSDZ	文山杨柳井 WSYLJ	文山小坝子 WSXBZ	麻栗坡田坝 MLPTB
马关古林箐 MGGLQ	* * * *	0.677 8	0.804 6	0.746 0	0.707 2	0.676 8	0.704 5
马关夹寒箐 MGJHQ	0.388 9	* * * *	0.775 8	0.727 9	0.862 3	0.719 9	0.784 5
马关马固 MGMG	0.217 4	0.253 9	* * * *	0.784 3	0.745 2	0.687 6	0.734 3
文山斗咀 WSDZ	0.293 1	0.317 6	0.242 9	* * * *	0.740 0	0.797 0	0.784 7
文山杨柳井 WSYLJ	0.346 4	0.148 1	0.294 0	0.301 2	* * * *	0.645 0	0.794 5
文山小坝子 WSXBZ	0.390 3	0.328 7	0.374 6	0.226 9	0.438 5	* * * *	0.708 0
麻栗坡田坝 MLPTB	0.350 3	0.242 7	0.308 9	0.242 4	0.230 1	0.345 3	* * * *

为 12 条,为引物 855、856 和 840,多数引物扩增条带为 8~10 条,有 6 个引物扩增多态百分率达 100%。

2.2 硬叶兜兰的遗传多样性

10 个引物共扩增出 101 个条带(表 2),其中多态性条带 97 个,多态条带比率达 96.04%,每个引物平均扩增产生 10.1 个条带。古林箐和马固居群多态性百分率较高,分别为 40.59%和 36.63%,夹寒箐和杨柳井居群的多态性百分率最小,仅有 28.71%。7 个居群的有效等位基因数(N_e) 在 1.180 1~1.268 2 之间;Nei's 基因多度(H)变幅为 0.102 0~0.151 9,Shannon 指数(I)值在 0.151 6~0.224 1。小坝子和田坝居群的遗传多样性相差不大,夹寒箐居群内的遗传多样性较低($PPB=28.71\%$; $H=0.102 0$; $I=0.151 6$)。古林箐居群的遗传多样性水平最高,Shannon 指数(I) 为 0.224 1。在居群水平的 Shannon 指数和 Nei's 基因多度为 0.194 3 和 0.133 2,在物种水平的分别为

0.488 9 和 0.324 4。总的遗传多样性(H_T) 为 0.323 9,居群内的遗传多样性(H_s)为 0.133 2。

2.3 居群间遗传距离与亲缘关系

依据显示的居群间的 Nei's 遗传距离(表 3),近距离居群的小坝子和杨柳井间的遗传距离最大,为 0.438 5,而夹寒箐和杨柳井居群间有最小遗传距离,为 0.148 1,7 个居群间平均遗传距离为 0.299 2。基于 UPGMA 聚类(图 1),在遗传距离达 0.327 时,7 个居群聚为两支,第一支由两个分支组成,第一分支由古林箐和马固居群组成,第二分支由田坝、夹寒箐和杨柳井居群组成,第二支由斗咀和小坝子居群组成,结果证实了居群间遗传距离与地理距离无显著相关性。

2.4 硬叶兜兰居群间的遗传分化

群体间遗传分化系数是衡量遗传多样性的变异来源的指标^[18],遗传分化的高低表明居群间的变异和分化水平^[19-20]。 G_{st} 、 $PhiPT$ 是不同软件计算

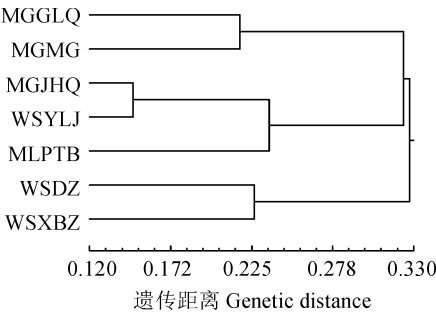


图 1 硬叶兜兰 7 个居群的亲缘关系聚类
Fig. 1 Dendrogram analysis showing relationships among seven populations

的遗传分化指数。

首先, 7 个居群间的遗传分化系数 (G_{st}) 达 0.588 8, 揭示了居群间存在较高的遗传分化水平。AMOVA 揭示有 39.60% 的分子遗传变异来源于居群间, 这一结果稍高于黄家林等报道的结果^[21], 小于与 G_{st} 的分化水平, 与 Φ_{iPT} 值近相同。而居群间平均基因流 (N_m) 仅为 0.349 2。

其次, 同一地区间居群的遗传分化系数 (Φ_{iPT}) 相差较大, 文山小坝子与斗咀间的 Φ_{iPT} 值为 0.304, 斗咀与杨柳井的为 0.430, 小坝子与杨柳井间的遗传分化系数达 0.492, 平均遗传分化系数达 0.409; 而马关马固和古林箐仅为 0.319, 古林箐与夹寒箐的 Φ_{iPT} 为 0.472, 马固与夹寒箐之间为 0.381。田坝居群与其余 6 个居群间 Φ_{iPT} 值在 0.338~0.413 之间, 与斗咀分化最小, 与古林箐最大。7 个居群两两间遗传分化最小的为杨柳井和夹寒箐, 达 0.278; 最大的为杨柳井和小坝子, 达 0.492。7 个居群间平均 Φ_{iPT} 值为 0.392。居群间 Φ_{iPT} 值反映出的遗传分化程度与 Nei's 距离关系是一致的。尽管杨柳井和斗咀居群为近缘居群, 但居群两两间的平均遗传分化系数却较高, 说明相同地区近距离居群间亦存在较高的遗传分化, 反映了居群间遗传分化水平与地理距离无明显相关性。

3 讨论

3.1 硬叶兜兰居群的遗传多样性

一般认为, 广布种都比窄布种具有较高的遗传多样性, 濒危植物有较低的遗传多样性, 遗传多样性越低的植物越濒危^[22-23]。但越来越多的研究表明, 濒危植物也有很高的遗传多样性。采用 ISSR 技术对珊瑚菜 (*Glehnia littoralis*)、毛瓣金花茶 (*Camel-*

lia pubipetala) 濒危种遗传多样性水平的检测显示, 在种和居群水平都保持较高的遗传多样性, 居群间遗传分化也不高^[24-25]。

采用 ISSR 技术检测兰科濒危种的研究表明, 流苏石斛 (*Dendrobium fimbriatum*) 在种水平的遗传多样性不低, 但居群水平的遗传多样性较低^[26]。本项目对 7 个硬叶兜兰居群的 ISSR 检测结果表现出物种水平的遗传多样性较高 ($PPB=96.04\%$, $H=0.324\ 4$, $I=0.488\ 9$), 居群水平的遗传多样性均高于上述种 ($PPB=33.51\%$, $H=0.133\ 2$, $I=0.194\ 3$)。物种总的遗传多样性 (H_T) 为 0.323 9, 居群内的遗传多样性仅为 0.133 2。此结论与 SRAP 数据和李昂的初步检测结论是一致的^[8-9], 即硬叶兜兰种水平遗传多样性远高于居群水平, 但与黄家林等报道的较高水平的居群遗传多样性 ($PPB=80.28\%$, $H=0.284\ 7$, $I=0.423\ 6$) 结果有较大出入^[21]。

珍稀濒危物的遗传多样性与很多因素有关, 如从祖先广布种的物种中分化而来、分布范围、生境条件、繁育系统等。Hamrick^[22] 认为居群遗传变异大小的主要影响因素依次为繁育系统、分布范围和生活型, 广布、异交和靠动物传播种子的物种往往具有较高的遗传多样性。硬叶兜兰能保持种较高水平的遗传多样性与其异交、长命草本、种子传播特性、分布生境的多样密切相关。

3.2 硬叶兜兰居群的遗传分化

一般认为, Φ_{iPT} 分化指数若在 0~0.05 之间说明居群间分化很弱, 若在 0.05~0.15 之间说明居群间存在中等程度分化, 若在 0.15~0.25 之间说明居群间分化大, 若 Φ_{iPT} 大于 0.25 表明居群间分化极大^[27]。7 个硬叶兜兰居群的分化指数 (Φ_{iPT}) 平均水平达 0.392, 充分说明硬叶兜兰居群间分化大, 与 AMOVA 结果近相同, 低于基于 Nei's 指数的 G_{st} (0.588 8), 接近于相同地区铁皮石斛居群间 G_{st} (0.563 7), 远高于硬叶兜兰在云贵桂交界区的 G_{st} 水平^[21]。基于硬叶兜兰的 ISSR 分子标记, 利用不同的分析方法 (Φ_{iPT} , AMOVA) 所得的遗传分化值基本一致。研究表明: 异交类群的平均基因遗传分化系数 G_{st} 为 0.23, 混交类群 G_{st} 为 0.19, 自交类群 G_{st} 为 0.59^[28]。硬叶兜兰属于异花传粉植物, 居群间的遗传分化显著。

物种的繁育系统是影响居群水平上的遗传分化水平的重要因素, Avise^[29] 认为由弱飞行能力的动物授粉和靠种子迁移的植物居群之间的遗传分化显

著。硬叶兜兰主要由蜂类传粉^[3],其飞行距离有限,主要是进行居群内开花植株之间的授粉,造成遗传变异主要来源于居群内,而居群间的花粉流是非常有限的;再者,由于硬叶兜兰种子萌发特性具有强烈的生境选择特点,易导致物种地理间断性分布,造成居群间的地理距离较远。一般认为,地理隔离会引起近交,而近交繁殖方式将引起近交衰退和降低群体间的遗传多样性,同样也会降低群体间基因交流,加剧群体间的分化^[30-32]。居群遗传学研究中,基因流根据 N_m 的大小划分为高(≥ 1.0)、中($0.250 \sim 0.99$)、低($0.0 \sim 0.249$)三个等级水平^[33]。若按此标准划分,此次研究的硬叶兜兰居群间基因流处于低水平,仅为 0.349 2,相同的 ISSR 技术揭示的云南、贵州和广西交界区域的硬叶兜兰的基因流也仅有 0.7201^[21]。一般而言,在选择作用不明显时,只要有很少量的基因流便可有效地阻止群体分化^[34],可判断基因流不是造成硬叶兜兰居群间遗传分化显

著的主要因素。

有越来越多的研究证明,遗传变异主要是由选择、突变、基因流和遗传漂变等产生,而空间距离并不一定产生遗传变异^[35]。彼此相距很近的群体即使存在频繁的基因流动,强有力的选择作用也能使得群体间产生遗传上的变异和分化。

有学者^[35]认为遗传距离与地理距离之间缺乏显著相关性意味着遗传漂变在种群间的分化中起着不可忽视的作用。在人为干扰严重的硬叶兜兰居群中,居群个体主要依赖无性克隆产生,导致居群中有效个体数量下降形成小居群,则更易加大发生遗传漂变的机率;此次供试斗咀、小坝子和杨柳井居群为小居群,大概也增加了居群间的遗传分化。再者,在人为干扰小的居群中,开花植株少和个体数量减少,易造成居群内花粉流水平下降和结实率降低,居群内遗传多样性水平下降和遗传变异变小,而居群间的种子流有限则也加剧居群间的遗传分化。

参考文献:

[1] 陈心启,吉占和. 中国兰花全书[M]. 北京:中国林业出版社, 2000: 123-124.

[2] CRIBB P, LUO Y B, SIU G. . *Paphiopedilum micranthum* North-east Guizhou, a significant range extension[J]. *Orchid Review*, 2002, 43: 40-43.

[3] BANZIGER H. Studies on the natural pollination of three species of wild lady slipper orchids (*Paphiopedilum*) in Southeast Asia[C]// PRIDGEON A. Proceedings of the 14th World Orchid Conference. HMSO, Edinburgh, UK, 1994: 201-202.

[4] 陈之林,叶秀彝,梁承邺,等. 杏黄兜兰和硬叶兜兰的种子试管培养[J]. 园艺学报, 2004, **31**(4): 540-542.

CHEN Z L, YE X L, LIANG C Y, *et al.* Seed germination *in vitro* of *Paphiopedilum armeniacum* and *P. micranthum*[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2004, **31**(4): 540-542.

[5] 曾宋君,田瑞雪,陈之林,等. 兜兰属植物杂交育种研究进展[J]. 热带亚热带植物学报, 2010, **18**(2): 459-468.

ZENG S J, TIAN R X, CHEN Z L, *et al.* Research progress on cross breeding of *Paphipedilum*[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2010, **18**(2): 459-468.

[6] 李宗艳,李名扬. 硬叶兜兰居群表型变异研究[J]. 植物遗传资源学报, 2015, **16**(4): 765-771.

LI Z Y, LI M Y. Study on phenotypic variation of *Paphiopedilum micranthum* population[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2015, **16**(4): 765-771.

[7] LI A, LUO Y B, GE S. A preliminary study on conservation genetics of an endangered orchid (*Paphiopedilum micranthus*) from southwestern China[J]. *Biochemical Genetics*, 2002, 40: 195-201.

[8] 李宗艳,李 静,曾万标,等. 滇东南硬叶兜兰核心种质区群体遗传结构研究[J]. 植物遗传资源学报, 2013, **14**(3): 407-413.

LI Z Y, LI J, ZENG W B, *et al.* Genetic structure of *Paphiopedilum micranthum* populations from core distribution in Southeast Yunnan[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2013, **14**(3): 407-413.

[9] 李 昂,罗毅波,葛 颂. 采用空间自相关分析研究两种兰科植物的群体遗传结构[J]. 生物多样性, 2002, **10**(3): 249-254.

LI A, LUO Y B, GE S. Spatial autocorrelation study of population genetic structure of two orchid species[J]. *Biodiversity Science*, 2002, **10**(3): 249-254.

[10] ZIETKIEWICZ E, FAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, 1994, **20**(2): 176-183.

[11] 钱 韦,葛 颂,洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性[J]. 植物学报, 2000, **42**(7): 741-750.

QIAN W, GE S, HONG D Y. Assessment of genetic variation of *Oryza granulate* detected by RAPDs and ISSRs[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2000, **42**(7): 741-750.

[12] 杨淑达,施苏华,龚 洵,等. 滇牡丹遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 生物多样性, 2005, **13**(2): 105-111.

YANG S D, SHI S H, GONG X. *et al.* Genetic diversity of *Paeonia delavayias* revealed by ISSRs[J]. *Biodiversity Science*, 2005, **13**(2): 105-111.

[13] 金则新,李钧敏,李增鸿. 浙江仙居长叶榧自然居群遗传多

样性的 ISSR 分析[J]. 北京林业大学学报, 2007, **29**(1):53-59.

JIN Z X, LI J M, LI Z H. ISSR analysis of the genetic diversity of *Torreya jactii* Chun natural populations in Xianju County, Zhejiang Province[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2007, **29**(1):53-59.

[14] NEI M. Genetic distance between populations[J]. *American Naturalist*, 1972, **106**(949):283-292.

[15] NEI M. Analysis of gene diversity in subdivided populations [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1973, **70**(12):3 321-3 323.

[16] PEAKALL R, SMOUSE P E. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2006, **6**(1):288-295.

[17] ROHLF F J. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System[M]. New York: Applied Biostatistics Incorporated, 1988:24-32.

[18] FISCHER M, HUSI R, PRATI D, *et al.* RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae)[J]. *American Journal of Botany*, 2000, **87**(8):1 128-1 137.

[19] GROOM M J, MEFFE G K, CARROLL C R. Principles of Conservation Biology[M]. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Incorporated, 2005:85-97.

[20] HARTL D L, CLARK A G. Principles of Population Genetics[M]. Sunderland, Massachusetts: Sinauer associates Incorporated, 1997:67-69.

[21] 黄家林,李树云,胡 虹. 珍稀濒危植物硬叶兜兰的遗传多样性及遗传结构研究[J]. 植物分类与资源学报, 2014, **36**(2): 209-218.

HUANG J L, LI S Y, HU H. ISSR and SRAP markers reveal genetic diversity and population structure of an endangered slipper orchid, *Paphiopedilum micranthum* (Orchidaceae)[J]. *Plant Diversity and Resources*, 2014, **36**(2): 209-218.

[22] HAMRICK J L. Plant population genetics and evolution[J]. *American Journal of Botany*, 1982, **69**(10):1 685-1 693.

[23] 洪德元,葛 颂,张大明,等. 植物濒危机制研究的原理和方法[M]. 北京:中国科学技术出版社, 1995:125-133.

[24] 王爱兰,王贵琳,李维卫. 濒危物种珊瑚菜遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 西北植物学报, 2015, **35**(5): 1 541-1 546.

WANG A L, WANG G L, LI W W. Genetic diversity of *Glehnia littoralis* populations revealed by ISSR molecular markers[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2015, **35**(5):1 541-1 546.

[25] 柴胜丰,庄雪影,邹 蓉,等. 濒危植物毛瓣金花茶遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 西北植物学报, 2014, **34**(1): 93-98.

CHAI S F, ZHUANG X Y, ZOU R, *et al.* Genetic diversity analysis of endangered plant *Camellia pubipetala* detected by ISSR [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2014, **34**(1): 93-98.

[26] 马佳梅,殷寿华. 西双版纳地区流苏石斛遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 云南植物研究, 2009, **31**(1): 35-41.

MA J M, YIN S H. Genetic diversity of *Dendrobium fimbriatum* (Orchidaceae), an endangered species, detected by inter-simple sequence repeat (ISSR)[J]. *Acta Botanica Yunnanica*, 2009, **31**(1): 35-41.

[27] BUSO G S, RANGEL P H, FERREIRA M E. Analysis of genetic variability of South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers [J]. *Molecular Ecology*, 1998, **7**(1):107-117.

[28] NYBOM H, BARTISH I V. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants[J]. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematic*, 2000, **3**(2):93-114.

[29] AVISE J C. Molecular Markers, Natural History and Evolution[M]. New York: Chapman & Hall, 1994:125.

[30] HAMRICK J L. Gene Flow and Distribution of Genetic Variation in Plant Populations [M]. New York: Academes Press, 1987:87-103.

[31] BROWN A. Genetic Characterization of Plant Mating Systems. Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources[M]. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Incorporated, 1990:145-162.

[32] URBANSKA K M. Differentiation Patterns in Higher Plants [M]. New York: Academes Press, 1987:57-76.

[33] GOVINDARAJU D R. Relationship between dispersal ability and levels of gene flow in plants[J]. *Oikos*, 1988, **52**(1):31-35.

[34] FISCHER M. Species loss after habitat fragmentation[J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 2000, **15**(10):396-404.

[35] FISCHER M, MATTHIES D. RAPD variation in relation to population size and plant fitness in the rare *Gentianella germanica* (Gentianaceae) [J]. *American Journal of Botany*, 1998, **85**(6): 811-819.

(编辑:宋亚珍)