



天女木兰遗传多样性微卫星标记的研究

王金玲¹, 王瑞俭¹, 杜凤国^{1*}, 孙广仁¹, 邹奎², 王仲晖², 张树平³

(1 北华大学 林学院 吉林吉林 132013; 2 辽宁省凤凰山自然保护区管理处 辽宁凤城 118100; 3 河北省秦皇岛市海滨林场 河北秦皇岛 066000)

摘要:以中国 7 个省份 9 个天女木兰种群为研究对象, 采用微卫星技术(SSR)探讨天女木兰分子遗传多样性。结果显示: (1) 9 个天女木兰种群间存在较低的遗传多样性, 种群平均 Nei 基因多样性指数(H) 0.098 5, 平均 Shannon 信息指数(I) 0.146 8; 种群间基因流为 0.597 9 (<1), 处于很低的水平。(2) 天女木兰不同种群在长期进化过程中发生了一定的遗传分化, 9 个天女木兰种群的遗传距离为 0.068 8~0.214 2, 遗传相似度介于 0.82~0.93 之间。(3) 聚类分析结果显示, 9 个天女木兰种群在进化上形成 2 个主要分枝, 贵州麻江种群为一支, 其他地区的种群为另一支, 其中贵州麻江的天女木兰生存状况较差。(4) 天女木兰的遗传多样性与种群分布的经度呈正相关。研究表明, 天女木兰种群间的遗传多样性低, 缺乏基因交流, 可能是导致其濒危的主要遗传学机制。

关键词: 天女木兰; 微卫星技术; 遗传多样性; 遗传分化

中图分类号: Q789; S718.46; **文献标志码:** A

Genetic Diversity of *Magnolia sieboldii* Assessed with SSR Markers

WANG Jinling¹, WANG Ruijian¹, DU Fengguo^{1*}, SUN Guangren¹,
ZOU Kui², WANG Zhonghui², ZHANG Shuping³

(1 Provincial key Laboratory of Forestry and Ecological Environment, Forestry College of Beihua University, Jilin, Jilin 132013, China; 2 Administrative office of Fenghuang Mountain Natural Reserve, Fengcheng, Liaoning 118100, China; 3 Haibin Forest Farm, Qin huangdao, Hebei 066000, China)

Abstract: The genetic diversity of *Magnolia sieboldii* was assessed with simple sequence repeat (SSR, also known as microsatellite) DNA marker technique among 9 populations in seven provinces of China. The results indicated that: (1) A lower genetic diversity of 0.098 5 for the average Nei gene diversity (H), 0.146 8 for the average Shannon information index (I), and 0.597 9 for gene flow (<1 , again relatively low) among the 9 populations. (2) Certain genetic differentiation has occurred over long-term evolution, with genetic distance ranging from 0.068 8 to 0.214 2 and genetic similarity from 0.82 to 0.93. (3) The clustering analysis suggested that the 9 populations have evolved into two main branches, one with the Majiang population in Guizhou Province and the other with the rest of the populations. Comparatively, the Majiang population was in poor conditions. (4) The genetic diversity of *M. sieboldii* was positively related to population longitude. Our results suggest that the low genetic diversity and gene flow among *M. sieboldii* populations are probably the main genetic mechanisms of the species becoming endangered.

Key words: *Magnolia sieboldii* K. Koch; SSR; genetic diversity; genetic differentiation

天女木兰 (*Magnolia sieboldii* K. Koch) 又名 天女花、小花木兰和山牡丹, 为木兰科 (Magnoliace-

收稿日期: 2016-11-02; 修改稿收到日期: 2017-01-16

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项 (201004095)

作者简介: 王金玲 (1985—), 女, 硕士, 实验师, 主要从事野生植物保护与利用的研究。E-mail: wjlhdx@qq.com

* 通信作者: 杜凤国, 博士, 教授, 主要从事野生植物保护与利用的研究。E-mail: dfg4656@qq.com

ae) 木兰属(*Magnolia* L.) 的落叶小乔木。天女木兰在《中国植物红皮书》中被列为国家重点保护的珍稀濒危植物,也是吉林省一级保护植物。分布于辽宁凤凰山、长白山脉和黄山等地,是木兰科在中国分布最北界及最抗寒的一个物种,其花、果、叶不仅具有很高的观赏作用,而且均可提取高级香料,具有很高的经济价值^[1-2]。现天女木兰种群数量在不断减少,生长状况变差,处于濒危状态。作者在贵州省麻江县采样地调查的天女木兰种群规模很小,且生长状况不好,如果不加以保护,该分布地将消失。目前对于天女木兰濒危机制的研究主要是利用分子生物学手段(如 RAPD、SSR、AFLP 及 SNP 等)分析其遗传多样性。SSR 技术具有 DNA 用量较少、操作简单、反应的速度较快、结果重复性较好等,现已广泛应用于遗传多样性的研究,如甘蔗^[3],籽用西瓜^[4]等,其中对木兰科一些植物的遗传多样性研究有鹅掌楸^[5]、巴东木莲^[6]、华木莲^[7]等。但对天女木兰的遗传多样性研究只有日本学者 Kikuchi 等^[8]关于日本天女木兰(*Magnolia sieboldii* ssp. *japonica*)的相关研究,在国内尚未见报道。在天女木兰采样调查过程中发现种群数量很少,而且生长状况较差。分析认为,天女木兰的间断性分布,各种群之间缺乏基因交流,导致遗传多样性水平降低,生殖和生存能力下降,产生近交衰退,可能是导致其濒危的重要因素,但还缺乏直接的试验证实。本研究应用微卫星技术,从分子水平研究天女木兰遗传多样性,为阐明天女木兰濒危的遗传学机制提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

根据天女木兰在中国间断性分布的特点及分布地管理人员的确认,选取 7 个省的 9 个自然分布地

作为采集地(表 1),分别是吉林省通化,辽宁省凤凰山、白石砬,河北省祖山,安徽省黄山,浙江省清凉峰,贵州省麻江、雷公山,广西省猫儿山。2012 年 10 月采集新鲜且生长健康的成熟叶片,硅胶干燥。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 由于个别分布地天女木兰植株较少,每个分布地随机选 20 株天女木兰,分别采集叶片样本,用 Axyprep 植物基因组 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。

1.2.2 SSR 引物设计及筛选 从天女木兰同科属植物的 SSR 研究文献^[9-10]中选择 44 对参考引物(表 2),合成各引物序列,上海英骏生物技术有限公司合成。

每个采集地随机选取 4 个样本,分别与所有引物进行 PCR 扩增。扩增结果通过非变性聚丙烯凝胶电泳筛选,选取条带清晰且种群间差异性较大的引物作为后续 SSR 分析的引物。

1.2.3 天女木兰 SSR 片段的扩增 以每个采集地的 20 个样本 DNA 为模板,分别与筛选出的所有引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系如下(20 μ L 体系):2 \times Taq mix 10 μ L,Template (DNA) 0.5 μ L,正反向引物各 1 μ L,去离子水 8.5 μ L。

优化后的 PCR 反应程序如下:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,48 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,10 个循环(每循环增加 0.5 $^{\circ}$ C);94 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,53 $^{\circ}$ C 变性 30 s,72 $^{\circ}$ C 退火 2 min,25 个循环。扩增产物用非变性聚丙烯凝胶电泳分离,经银染显色,并在凝胶成像仪中扫描成图像。

1.2.4 数据分析 将非变性聚丙烯酰胺电泳所得图像用 TotalLab Quant 软件进行处理识别。采用人工读带的方式进行统计,有带记为 1,无带记为 0。利用 POPGENE 1.32 软件计算多态位点百分率(P)、

表 1 天女木兰采样信息
Table 1 Sampling of *M. sieboldii*

编号 Code	种群 Population	个体数 Individual	经度 Longitude(E)	纬度 Latitude(N)	海拔 Altitude/m
1	石湖 Shihu	20	126°33′	43°20′	1 000~1 150
2	白石砬 Baishila	20	124°48′	40°56′	600~930
3	凤凰山 Fenghuang Mountain	20	124°04′	40°24′	400~550
4	祖山 Zu Mountain	20	119°24′	40°07′	1 100~1 300
5	清凉峰 Qingliang peak	20	118°53′	30°06′	1 400~1 550
6	黄山 Huang Mountain	20	118°09′	30°08′	1 600~1 700
7	麻江 Majiang	20	107°20′	26°24′	1 600~1 700
8	雷公山 Leigong Mountain	20	108°12′	26°23′	2 000~2 170
9	猫儿山 Maoer Mountain	20	110°24′	25°51′	2 000~2 100

表 2 SSR 引物序列

Table 2 The sequences of primers in the SSR experiment

名称 Name	序列 Sequence(5'→3')	核心重复 Core repeat	退火温度 Ta	长度 Size/bp
M6D1	ACTGGAGCAGTGCCTGGATA TCGCAACTGCGTGTTCAT	(CT) ₄₃	54.2	187
M6D8	CGAGTGGCATTTCGGTAATA GAACCTGGCGCACCGTAGTC	(CT) ₃ C(CT) ₁₀	54.1	170
stm0184	GCCAAATTCAACTCTTACCT TGGGGTGTACAACTAATTATC	(GA) ₁₈	60	209~255
stm0191	TTCAATGGTGGAGTTCTAGT CACTACCCAAACCTAATCTAAA	(GA) ₁₇	60	257~278
stm0200	GCAAGCTACCAGGTTACTC AGCCATCTGATGTTTGTGATAC	(CT) ₁₃ (TC) ₁₁	60	167~211
stm0218	CCACCACCACTGCCGAATCT TCGCCTCAAAATGTCATTGGA	(ACC) ₄ (AG) ₂₈	58	236~270
stm0225	CCACTGTTAGGGCTCATATT CGGATAATTAGGAGTCTAC	(CT) ₁₂	55	408~459
stm0231	AAATTGTTGTTTCGGATGAT GTGAAGGGCCTTTATCTG	(TC) ₂₈	50	148~177
stm0246	AAGCAAAGCCTCCTAGGTC TCTACGCCTAACAGGTCTGTC	(GA) ₃₃	58	193~230
stm0349	TTGTCCATGAAGTGTGTA GATCCAGGATTATTACCAGTC	(GA) ₁₄ (GA) ₈	55	104~159

Shannon 信息指数(I)^[11]和 Nei 基因多样性指数(H)^[12],估算基因多样性;并计算总基因多样性(H_t)^[12]、各种群内的平均基因多样性(H_s)、遗传分化系数(G_{st})、种群间基因流动系数(N_m)^[13],分析遗传分化程度;计算 Nei 无偏差遗传距离(D)^[14]和遗传相似度(I),利用 NTSYS-pc 软件,根据 Nei 遗传相似性系数采用算术平均数的非加权成组配对法(UPGMA)对天女木兰的 9 个种群进行聚类分析,分析种群间的亲缘关系。利用 SPSS11.5 软件分析种群地理位置及地理距离与遗传参数相关性。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物筛选

根据非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结果,选择条带清晰且种群间有差异的引物(图 1)。共筛选出 10 对引物用于天女木兰 SSR 分析:M6D1, M6D8, stm0184, stm0191, stm0200, stm0218, stm0225, stm0231, stm0246 和 stm0349。

2.2 遗传多样性分析

利用 POPGENE 1.32 软件对 9 个天女木兰种群遗传多样性进行分析(表 3)。9 个种群的平均多态性比率中,石湖种群最高,达到 39.71%;麻江种群最低,为 6.86%。9 个种群的 Nei 基因多样性指数(H)和 Shannon 信息指数(I)表现一定的相关性,最高是石湖种群,分别为 0.144 6,0.215 5;麻江的 2

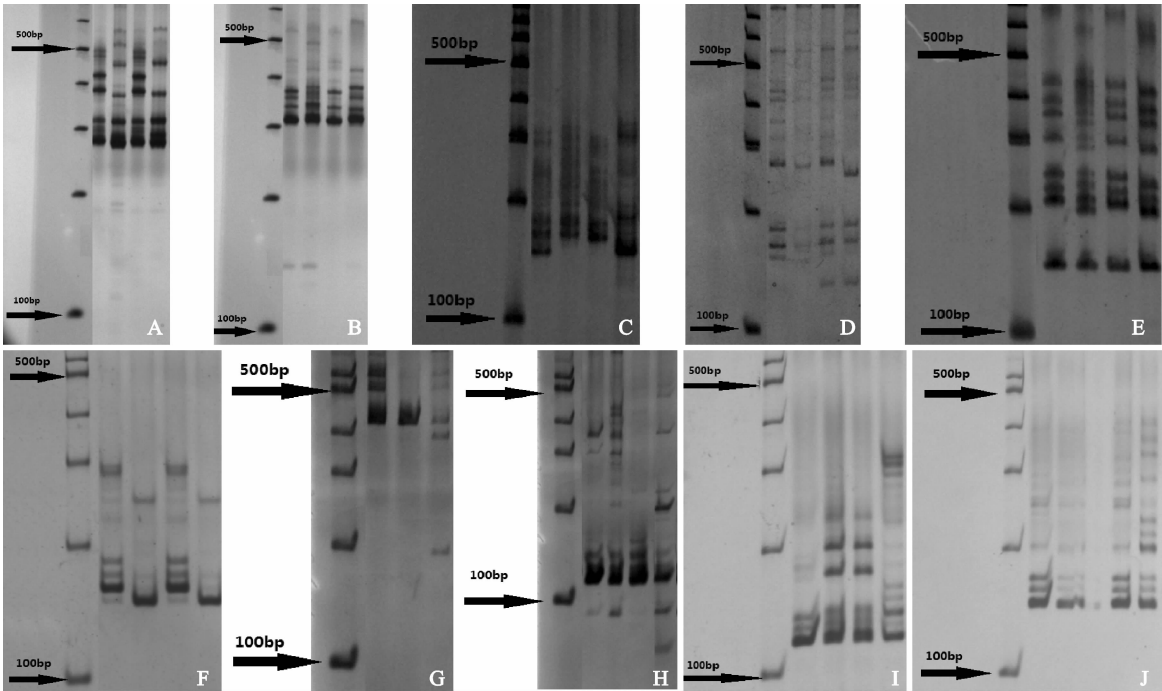
个指数最低,分别为 0.027 8、0.040 7。天女木兰种群的平均多态性比率(P)为 27.19%,平均 Nei's 指数(H)为 0.098 5。Hamrick 等^[15]在 220 个属 662 个种的林木中总结的物种遗传多样性平均水平($P=64.7\%$, $H=0.57$)。相比之下,天女木兰的多态性比率(P)和 Nei's 指数(H)均较低,说明天女木兰种群的遗传多样性较低。理论上,遗传多样性较低的种群,其适应环境的能力较弱,具有较差的生存能力,种群的规模也会不断减小。分析结果与采样地的种群实际状况一致,Nei 基因多样性指数和 Shannon 信息指数高的石湖、祖山、黄山等天女木兰种群规模较大,且生长健康;而两种指数低的贵州麻江种群(麻江林业局考察的分布点)天女木兰数量少,长势较差,细弱,部分枯萎等,有的甚至只有 1 枝(图 2)。

2.3 遗传分化的分析

天女木兰的遗传分化情况(表 4)表明,9 个天女木兰种群的总基因多样性(H_t)为 0.187 4;种群内基因多样性(H_s)为 0.098 3;种群间遗传分化系数为 0.479 6,即 47.96%的变异来自 9 个天女木兰种群间。Hamrick 等^[16-18]认为基因流 $N_m \geq 10.0$ 为非常高,基因流 $N_m < 1.0$ 为很低。天女木兰种群的平均基因流为 0.5979(<1)说明天女木兰的基因流水平很低,种群间的基因交流有限。

2.4 遗传距离和遗传相似度分析

通过 POPGENE 1.32 软件分析天女木兰遗传



A~J 分别为引物 M6D1、M6D8、stm0184、stm0191、stm0200、stm0218、stm0225、stm0231、stm0246 和 stm0349

图 1 部分 SSR 扩增产物的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳图

A—J is primer M6D1, M6D8, stm0184, stm0191, stm0200, stm0218, stm0225, stm0231, stm0246 and stm0349

Fig.1 The polyacrylamide gel electrophoresis of the part of SSR amplification

表 3 9 个天女木兰种群的遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of 9 *M. sieboldii* populations

种群编号 Population No.	多态性带数 Number of polymorphic bands	多态性比率 Percentage of polymorphic fragments(P) / %	Nei's 基因多样性指数 Nei's gene diversity(H)	Shannon 信息指数 Shannon's information index(I)
1	10.3	39.71	0.144 6	0.215 5
2	9.4	32.19	0.119 4	0.177 1
3	7.6	24.97	0.089 3	0.132 6
4	7.8	25.97	0.090 0	0.135 2
5	7.3	27.40	0.099 2	0.148 2
6	9.7	34.56	0.126 6	0.188 2
7	3.4	6.86	0.027 8	0.040 7
8	6.7	23.09	0.089 9	0.132 8
9	8.7	29.99	0.100 1	0.150 4
均值 Mean	7.88	27.19	0.098 5	0.146 8

距离(表 5),9 个种群的遗传距离范围是 0.068 8~0.214 2,平均遗传距离为 0.117 2。在 9 个天女木兰种群中,通化石湖与浙江清凉峰的遗传距离最小,为 0.068 8,种群规模相近,个体生长健康,长势相似;贵州麻江与河北祖山遗传距离最大,为 0.214 2,两种群规模相差较大,麻江种群数量少,且枝条细弱,与长势好的祖山天女木兰种群差异明显。麻江的天女木兰种群与其他种群间遗传距离均较远(与雷公山遗传距离最近,也达 0.147 8),说明在长期进化过程中麻江与其他地区的天女木兰产生了一定遗

传分化,结合麻江地区天女木兰种群状况分析认为,麻江的天女木兰是极度濒危的天女木兰种群,应重点加以保护。

9 个种群遗传相似度 UPGMA 聚类分析结果(图 3)表明,当 $\lambda=0.89$ 时,可将 9 个种群分为 2 分支:麻江为一支,其他种群(石湖、清凉峰、猫儿山、凤凰山、雷公山、白石砬、祖山和黄山)为另一支。产生这一分歧的原因可能是麻江地区天女木兰样本数较少(整个种群仅 20 株样本),也可能是该地区与其他种群的遗传基因确有差异[其种群多样性更低(表

3),与其他种群遗传距离较远(表 5)]。

2.5 遗传参数与地理位置的相关性分析

将种群的经纬度地理距离分别与种群的 Nei 基因多样性指数、Shannon 信息指数、遗传距离及遗传相似度进行相关性分析,结果(表 6)显示,Nei 基因

多样性指数和 Shannon 信息指数与种群所处经度的 Pearson 相关性系数分别为 0. 679、0. 678, $P=0. 045(P<0. 05)$,说明经度与 Nei's 基因多样性指数和 Shannon 信息指数均呈显著正相关;经度与遗传距离和遗传相似度显著性不明显($P>0. 05$)。纬度



A. 麻江植株, B. 祖山植株

图 2 不同植株的生长状态

A. Majiang population, B. Zu mountain population

Fig. 2 The growth of different plants

表 4 9 个天女木兰种群之间的遗传分化

Table 4 Genetic differentiation of the 9 *M. sieboldii*

引物 Primer	总基因多样性 Total gene diversity	种群内基因多样性 Gene diversity within population	遗传分化系数 Coefficient of genetic differentiation	基因流 Gene flow
M6D1	0. 236 4	0. 142 6	0. 397 0	0. 759 5
M6D8	0. 239 1	0. 150 3	0. 371 3	0. 846 6
stm0184	0. 179 3	0. 085 1	0. 525 6	0. 451 3
stm0191	0. 152 5	0. 076 1	0. 501 0	0. 498 1
stm0200	0. 226 8	0. 151 8	0. 330 8	1. 011 6
stm0218	0. 148 7	0. 093 5	0. 370 8	0. 848 5
stm0225	0. 142 3	0. 053 8	0. 621 8	0. 304 2
stm0231	0. 191 2	0. 091 9	0. 519 4	0. 462 7
stm0246	0. 233 5	0. 071 9	0. 692 2	0. 222 3
stm0349	0. 124 0	0. 066 3	0. 465 7	0. 573 7
均值 Mean	0. 187 4	0. 098 3	0. 479 6	0. 597 9

表 5 9 个天女木兰种群的遗传距离及遗传相似度

Table 5 Nei's genetic distance and genetic identity of 9 *M. sieboldii*

种群 Population	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	* * *	0. 908 8	0. 919 4	0. 910 3	0. 933 9	0. 892 0	0. 847 6	0. 916 1	0. 914 3
2	0. 097 3	* * *	0. 918 2	0. 885 4	0. 912 4	0. 889 0	0. 837 2	0. 899 6	0. 903 3
3	0. 084 9	0. 086 1	* * *	0. 903 7	0. 923 3	0. 902 7	0. 852 9	0. 924 4	0. 904 4
4	0. 095 1	0. 122 7	0. 103 3	* * *	0. 915 6	0. 871 8	0. 823 4	0. 885 3	0. 908 5
5	0. 068 8	0. 092 7	0. 080 4	0. 089 4	* * *	0. 905 8	0. 841 1	0. 922 8	0. 926 9
6	0. 116 2	0. 119 9	0. 104 5	0. 143 8	0. 100 3	* * *	0. 853 5	0. 914 2	0. 883 1
7	0. 171 6	0. 185 8	0. 165 0	0. 214 2	0. 182 8	0. 160 5	* * *	0. 867 0	0. 825 9
8	0. 088 9	0. 107 0	0. 079 4	0. 125 8	0. 081 8	0. 090 8	0. 147 8	* * *	0. 899 6
9	0. 090 4	0. 102 1	0. 101 6	0. 097 9	0. 078 0	0. 129 9	0. 205 1	0. 109 2	* * *

注: * 上三角为遗传相似度,下三角为遗传距离

Note: Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal)

表 6 种群地理位置及距离与各遗传参数的相关性分析结果

Table 6 Correlation analysis of population's geography and geographical distance with Genetic parameters

遗传参数 Genetic parameter	经度 Longitude		纬度 Latitude		地理距离 Geographical distance	
	Pearson 相关系数	P	Pearson 相关系数	P	Pearson 相关系数	P
Nei's 基因多样性指数 Nei's gene diversity(<i>H</i>)	0.679	0.045	0.493	0.177	0.579	0.102
Shannon 信息指数 Shannon's information index(<i>I</i>)	0.678	0.045	0.493	0.177	0.578	0.103
遗传距离 Genetic distance	0.624	0.073	0.546	0.129	0.584	0.098
遗传相似度 Nei's genetic identity	−0.619	0.075	−0.548	0.126	−0.585	0.098

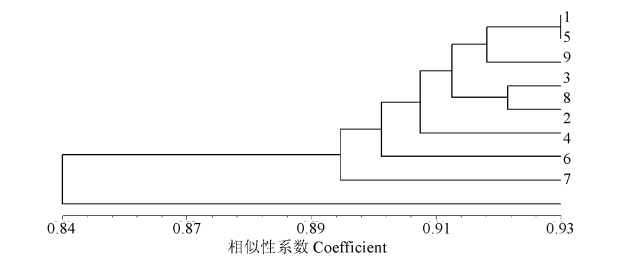


图 3 基于遗传相似度的天女木兰种群聚类图

Fig. 3 The UPGMA of *Magnolia sieboldii* populations based on Nei's genetic identity

与 4 个遗传参数显著性不明显($P>0.05$)。而且,各遗传参数与种群地理距离的,显著性也不明显($P>0.05$)。另外,从种群的聚类分析结果(图 3)也可以看出,遗传相似度与地理距离显著性不明显。

3 讨 论

天女木兰的观赏价值及经济价值较高,但在全国的分布逐步减少,人类行为的参与也加快了其种群的缩减。因此,了解其濒危的分子遗传学机制是有必要的。本文采用 SSR 技术对天女木兰的遗传多样性进行分析,研究其遗传分化及基因交流情况,为阐明天女木兰濒危的分子遗传机制提供实验依据。本实验筛选出 10 对适于天女木兰的 SSR 引物,并对中国 9 个天女木兰种群的遗传多样性进行分析。研究结果显示,天女木兰的遗传多样性明显低于木兰科其他物种。如 Nei's 基因多样性指数(0.098 5)及 Shannon 信息指数(0.146 8)远低于 21 种木兰科植物的平均值(0.38、0.56)^[19],且低于木兰属的武当木兰(0.128 4、0.198 8)^[20]等。Kikuchi 等^[8]采用微卫星技术对日本天女木兰的遗传多样性进行了研究,得到了与本实验相同的结论:天女木兰种群具有较低的遗传多样性。Frankham 等^[21]认为,遗传多样性较低的种群,其适应环境的能力较弱,具有较差的生存能力。天女木兰种群的遗传多

样性较低,种群的适应能力较低,种群的规模也会不断减小,不利于天女木兰的保护。

Frankham 等^[21]认为小种群比大种群的遗传多样性低,更易灭绝,适应环境的能力低。在调查过程中,发现贵州省麻江地区天女木兰种群数量较少,植株的个体性状也较差,每个植株枝条较少,有的甚至一根枝条,且枝条纤细。本研究结果也证实该地区的天女木兰种群遗传多样性更低,适应环境的能力差,固应将该地区天女木兰列为极度濒危种群。相对来说,其他地区天女木兰种群数量较多,个体性状较好,适应环境的能力也较强,属于较优势种群。

天女木兰目前在分类学上仍为单一种,其岛屿状分布使各种群间相对独立,种群间的遗传分化状况尚未见报道。对中国 7 个省 9 个分布地的天女木兰种群 SSR 分析结果显示,种群之间遗传距离最小的 0.068 8,遗传距离最大为 0.214 2。Nei^[14]认为地理种群之间的遗传距离为 0.00~0.05,亚种间的遗传距离约为 0.05 或更大。按照这一标准,9 个天女木兰种群分别属 9 个亚种。但由于测定遗传距离的方法、样本来源及实验误差等因素,亚种界定的标准也不可能完全相同。综上,天女木兰是否应该形成亚种,以及形成哪些亚种等问题尚需其他分类学方法加以佐证。

种群的遗传多样性和地理位置之间的关系,一直在植物种群遗传变异研究被广泛关注。一些学者认为二者有相关性^[22-23],也有学者认为二者没有相关性^[24]。本研究结果表明,经度与天女木兰的 Nei's 基因多样性指数和 Shannon 信息指数存在一定相关性,纬度与各遗传参数、经度与遗传距离和遗传相似度的显著性不明显。说明经度可能对天女木兰种群遗传多样性产生一定作用,并与其他生态因子共同影响种群的遗传变异。分析结果还表明,天女木兰地理距离与其遗传参数间显著性不明显。

从目前天女木兰分布的现状和其濒危的状态来看,采取一定的措施,加大种群间的基因交流,提高天女木兰的遗传多样性。迁地保育是一种较适合提高其遗传多样性的措施。天女木兰种群的片段化分布可能是导致其种群之间缺乏交流的主要原因。增加种群间的基因交流可能提高其遗传多样性。选择适合天女木兰生长的环境,将遗传距离较远的两个天女木兰种群种植于此,增加两种群基因交流机会,形成一个人工的种群,可以丰富其遗传多样性。

参考文献:

[1] 杜凤国,王柏青. 森林植物学[M]. 长春: 吉林大学出版社, 2008;360-361.

[2] 杜凤国,王 欢,刘春强,等. 天女木兰研究现状及保育对策[J]. 西北师范大学学报,2006,**42**(6):68-71.

DU F G, WANG H, LIU C Q, *et al.* The research situation and conservation strategies of *Magnolia sieboldii* K Koch[J]. *Journal of Northwest Normal University*, 2006,**42**(6):68-71.

[3] 刘洪博,范源洪,陆 鑫,等. 29 份云南甘蔗创新种质的 SSR 遗传多样性分析和指纹图谱构建[J]. 西北植物学报,2015,**35**(12):2 414-2 421.

LIU H B, FAN Y H, LU X, *et al.* Genetic diversity and construction of fingerprint of 29 Yunnan germplasms of sugarcane innovation by SSR [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*, 2015,**35**(12):2 414-2 421.

[4] 石 磊,王 萍,杨 静,等. 籽用西瓜种质资源 SSR 分析及初级核心种质库构建[J]. 西北植物学报,2016,**36**(6):1 125-1 134.

SHI L, WANG P, YANG J, *et al.* Genetic diversity analysis and construction of seed watermelon core germplasm resource by SSR [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*, 2016,**36**(6):1 125-1 134.

[5] 张红莲,李火根,胥 猛,等. 鹅掌楸属种及杂种的 SSR 分子鉴定[J]. 林业科学,2010,(1):36-39.

ZHANG H L, LI H G, XU M, *et al.* Identification of *Liriodendron tulipifera*, *Liriodendron chinense* and Hybrid *Liriodendron* using species-specific SSR markers[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2010,(1):36-39.

[6] 邢 冲,姚小洪,等. 巴东木莲核基因组微卫星位点分离的初步研究[J]. 武汉植物学研究, 2010,**8**(1):76-80.

XING C, YAO X H, *et al.* Preliminary studies on the isolation of Microsatellite Loci of *Manglietia patungensis* (Magnoliaceae) [J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2010,**8**(1):76-80.

[7] 熊 敏,王 静,张志荣,等. 濒危植物华木莲核基因组微卫星引物开发研究[J]. 植物分类与资源学报,2011,**33**(5):535-539.

XIONG M, WANG J, ZHANG Z R, *et al.* The development of nuclear microsatellite markers for an endangered plant, *Sinomanglietia glauca* (Magnoliaceae) [J]. *Plant Diversity and Resources*, 2011,**33**(5):535-539.

[8] KIKUCHI S, ISAGI Y. Microsatellite genetic variation in small and isolated populations of *Magnolia sieboldii* ssp. *japonica*[J]. *Heredity*, 2002,88:313-321.

[9] SETSUKO S, UENO S, *et al.* Development of Microsatellite markers in *Magnolia stellata* (Magnoliaceae), athreatened Japanese tree[J]. *Conservation Genetics*, 2005, 6:317-320.

[10] ISAGIY, KANAZASHI T, *et al.* Polymorphic microsatellite

综合 SSR 研究结果,天女木兰种群的遗传多样性较低,基因流水平低,从遗传学上证实了之前推测天女木兰濒危机制的正确性。分析发现经度与 Nei's 基因多样性指数和 Shannon 信息指数呈正相关。同时,我们建议对天女木兰种群采取如下保育策略:将长势良好的天女木兰种群引栽到与其遗传距离较远的天女木兰种群中,促进基因交流,增强天女木兰种群的遗传多样性,从而提高其生存及种群恢复能力。

DNA markers for *Magnolia obovata* Thunb. and their utility in related species[J]. *Molecular Ecology*, 1999, 8: 685-702.

[11] LEWONTIN R. Testing the theory of natural selection[J]. *Nature*, 1972,236:181-182.

[12] NEI M. Analysis of gene diversity in subdivided populations [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973,70: 3321-3323.

[13] MCDEROTT JM, MCDONALD BA. Gene flow in plant pathosystems[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1993, 31:353-373.

[14] NEI M. Molecular Evolutionary Genetics[M]. New York: Columbia University Press, 1987;1- 511.

[15] HAMRICK J L, GODT M J W, SHERMAN-BROYLES S L. Factors influencing levels of genetic diversity in wood plant species[J]. *New Forest*, 1992,6: 95-124.

[16] HAMRICK J L. Gene Flow and Distribution of Genetic Variation in Plant Populations[M]. New York: Academic Press, 1987;53-67.

[17] GOVINDARAJU D R. A note on the relationship between outcrossing rate and gene flow in plants[J]. *Heredity*, 1988, 61:401-404.

[18] GOVINDARAJU D R. Gene flow, spatial patterns and seed-collection zones[J]. *Forest Ecology and Management*, 1989, **35**(3-4):291-302.

[19] 李 剑. 21 种木兰科常绿植物的遗传多样性分析[D]. 郑州: 河南农业大学,2013.

[20] 杨 梅. 武当木兰地理变异及遗传多样性的研究[D]. 陕西杨陵:西北农林科技大学,2014.

[21] 法兰克汉,巴卢,布里斯科. 保育遗传学导论[M]. 黄宏文,康明译. 北京:科学出版社,2005;201-213.

[22] WILLIAMS J H, ARNOLD M L. Sources of genetic structure in the woody perennial *Betula occidentals*[J]. *International Journal of Plant Sciences*, 2001, **162**(5):1 097-1 109.

[23] 严学兵,郭玉霞,等. 影响波碱草属植物遗传分化和亲缘关系的地理因素分析[J]. 植物资源与环境学报,2006,15(4):17-24.

YAN X B, GUO Y X, *et al.* Analysis of geographical conditions affected on genetic variation and relationship among populations of *Elymus*[J]. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2006,**15**(4):17-24.

[24] HAMRICK JL, GODT MJW. Allozyme diversity in plant species[M]// Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS,. Plant population genetics, breeding, and genetic resources. Sunderland, MA: Sinauer Associates,1990;43-63.