



濒危羊躑躅子代幼苗遗传多样性的 SSR 分析

董丽敏, 戴亮芳, 白李唯丹, 刘梦露, 谢建坤, 罗向东*

(江西师范大学 生命科学院, 南昌 330022)

摘要: 利用本课题组此前开发的 20 对多态性较高的羊躑躅 SSR 引物, 分析来自 3 个省份的 4 个羊躑躅野生幼苗自然居群(共 64 个株系)的遗传多样性和遗传结构, 以期对羊躑躅保护提供科学依据。结果显示: (1) 20 对 SSR 引物共扩增出 314 个等位基因, 每个 SSR 位点的平均等位基因数为 15.700, 多态信息含量 PIC 和有效等位基因数 N_e 的均值分别为 0.850 和 4.457。 (2) 羊躑躅幼苗自然居群的基因多样性指数 H 和 Shannon 多样性指数 I 的均值分别为 0.717 和 1.557, 其中江西金溪(JX)居群的遗传多样性最丰富, 浙江磐安(PA)的最低。 (3) 基于无限等位基因模型(IAM)分析发现, 羊躑躅幼苗种群的基因流 N_m 和遗传分化系数 F_{st} 分别为 1.372 和 0.155; AMOVA 分析表明, 羊躑躅幼苗种群的 86.0% 变异发生于居群内, 仅有 14% 变异发生在居群间。 (4) 遗传距离法聚类 NJ 分析和 Structure 分析结果基本一致, 分别聚为 3 大类和 4 大类。综合比较分析发现, 羊躑躅幼苗种群中的各个遗传多样性相关的指标参数均低于成年自然居群, 表明生境片段化已对羊躑躅的生存构成了极大的威胁。

关键词: 野生羊躑躅幼苗; SSR; 遗传结构; 濒危植物

中图分类号: Q346⁺.5; Q789

文献标志码: A

Genetic Diversity of Wild Seedlings of Endangered *Rhododendron molle* G. Don by SSR

DONG Limin, DAI Liangfang, BAI Liweidan, LIU Menglu, XIE Jiankun, LUO Xiangdong*

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

Abstract: The genetic diversity and genetic structure of 4 wild seedling populations of *Rhododendron molle* (64 individuals) from 3 provinces were analyzed with 20 pairs of polymorphic simple sequence repeat (SSR) primers developed by our group. We aim to provide some theoretical basis for the conservation of *R. molle*. The results showed: (1) 314 alleles were amplified by 20 pairs of SSR primers, the average number of alleles of each SSR site was 15.700, and the mean values of polymorphic information content (PIC) and the effective alleles number (N_e) were 0.850 and 4.457, respectively. (2) The mean value of the genetic diversity index (H) and Shannon diversity index (I) of the seedling population of *R. molle* were 0.717 and 1.557, respectively. The genetic diversity of Jinxi (Jiangxi Province) population exhibits great level of variability, whereas the population of Panan (Zhejiang Province) exhibits the lowest level of variability. (3) Based on the analysis of the infinite allele model (IAM), it was found that the gene flow (N_m) and the genetic differentiation coefficient (F_{st}) of the seedling population of *R. molle* (F_{st}) were 1.372 and 0.155, respectively. AMOVA analysis showed that the probability of variation of the seedling population of *R. molle* mainly occurred in the middle population (86.0%), and the inter-population varia-

收稿日期: 2019-01-10; 修改稿收到日期: 2019-03-20

基金项目: 国家自然科学基金(31360147, 31660384); 江西省自然科学基金(20151BAB204008, 20171BAB204021)

作者简介: 董丽敏(1994—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事植物分子生物学研究工作。E-mail: 1462744569@qq.com

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

tion was only 14%; (4) The results of neighbor joining (NJ) analysis and structure classification were basically similar, which are divided into 3 and 4 groups, respectively. Comprehensive comparative analysis found that the index parameters related to the genetic diversity of the seedling population of *R. molle* were all lower than the natural population of adults, which indicated that the fragmentation of habitat had posed a great threat to the survival of *R. molle*.

Key words: wild seedlings of *R. molle*; SSR; genetic structure; endangered plants

羊躑躅(*Rhododendron molle* G. Don)又名闹羊花、黄杜鹃、八厘麻等,是中国杜鹃花科羊躑躅亚属中唯一的原生种^[1]。它既是一种重要观赏植物,也是一种被列入中国药典的药用植物,具有巨大的观赏价值、经济价值和药用价值^[2-4]。20 世纪 80 年代以前,羊躑躅在中国华中及华南地区分布广泛,在云南、贵州等地也有少量分布^[5]。然而,由于全球气候和环境的变化、羊躑躅生境的破坏、人类的肆意采挖及羊躑躅自身繁殖率低等原因,羊躑躅原本连续、广泛分布的格局被打断,造成不同程度的生境片段化,多地已形成残遗分布的格局,羊躑躅野生居群规模锐减,有些原有的分布点甚至已找不到羊躑躅的踪迹^[6]。因此,野生羊躑躅处于濒临灭绝的边缘,研究和保护羊躑躅具有重要的理论和现实意义。

前人的研究表明,物种保护的首要任务是保护该物种的遗传多样性,而遗传多样性的分析与评价对物种资源的保护与利用具有重要的科学意义和指导价值^[7-10]。它能揭示物种对环境的适应能力以及在面对环境变化时的持续进化的潜在能力,可作为保护和评价稀有濒危植物的一个指标,其相关研究结果可为取样方案的制定和优先保护种群的选择提供有效的依据^[7]。我们此前分析中国 6 个省份 8 个羊躑躅自然居群中 193 个成年羊躑躅个体的遗传多样性和遗传结构发现,成年羊躑躅残余居群的生境虽已片段化,但由于羊躑躅为多年生、寿命较长的植物,并且其生境片段化的时间还不长,各羊躑躅成年居群的遗传多样性仍比较高^[5]。然而,目前有关羊躑躅生境片段化对羊躑躅野生幼苗的遗传多样性及遗传结构有何影响还不清楚,而探明野生羊躑躅野

生幼苗的遗传多样性及遗传结构对更好地保护羊躑躅具有十分重要的意义。为此,本研究利用前期开发的 20 对多态性丰富的羊躑躅 SSR 引物,分析来自 3 个省份的 4 个羊躑躅野生幼苗自然居群(共 64 个株系)的遗传结构和遗传多样性,探明种群间的亲缘关系,以期野生羊躑躅的资源保护提供科学的依据。

1 材料和方法

1.1 羊躑躅野生幼苗样本的选取和采集

参照程马龙等^[5]的方法对羊躑躅野生幼苗样本进行采集。4 个羊躑躅野生幼苗自然居群样本分别来源于江西省金溪县和永修县、浙江省磐安县、湖北省京山县,取样时间为 2016 和 2017 年 4~5 月份,共采集 64 个样本。取样植株的苗龄小于 2 年,取样时保证每个样品个体之间的间隔距离至少为 10 m,记录取样点的地理位置信息,羊躑躅野生幼苗居群取样信息见表 1。

1.2 基因组 DNA 提取与 SSR 分析

参照刘梦露等^[11]的方法提取野生羊躑躅野生幼苗的基因组 DNA。DNA 样品的浓度和纯度经紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳法检测合格后用于 SSR 分析。PCR 扩增的 SSR 引物为本课题组前期开发的 20 对多态性较高的羊躑躅 SSR 引物^[11]。PCR 扩增体系和反应条件参照此前方法进行^[5]。扩增产物用 10% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离检测,150 V 恒压电泳 90 min。凝胶银染染色和拍照参照此前方法进行^[5]。

1.3 数据处理

参照程马龙等^[5]的方法,以 20 bp DNA Marker

表 1 羊躑躅野生幼苗居群取样信息

Table 1 The information of sampling sites of wild seedling populations of *R. molle*

居群样品采集点(代号) Samples location(code)	数量 No. of sample	经度和纬度 Longitude (E) and latitude (N)	海拔 Altitude/m
江西省抚州市金溪县 Jinxi, Jiangxi province (JX)	24	116°45'E, 28°02'N	83~125
江西省九江市永修县 Yongxiu, Jiangxi province (YX)	16	115°43'E, 29°08'N	19~58
湖北省荆门市京山县 Jingshan, Hubei province (JS)	12	112°44'E, 30°53'N	78~177
浙江省金华市磐安县 Panan, Zhejiang province (PA)	12	120°37'E, 28°33'N	513~905

为标准,估计并记录各条带的分子量,得到羊躑躅野生幼苗自然居群的 SSR 表型数据。利用 POP-GENE 和 GenALEx6.1 软件分别计算羊躑躅幼苗种群的 Nei's 多样性指数(H)、Shannon 指数(I)、基因流(N_m)、遗传分化系数(F_{st})、地理距离、居群内和居群间遗传分化水平^[12-13];用 PowerMarker V3.25 分析其多态性信息量指数(PIC)、遗传一致度(genetic identity, GI)和遗传距离(genetic distance, GD);用 Structure 2.3.4 和 Neighbor joining (NJ)算法软件分别分析群体结构、计算最佳群体组数 K 值,构建聚类图^[12, 14]。

2 结果与分析

2.1 羊躑躅野生幼苗的 SSR 分析

采用课题组前期开发的 20 对羊躑躅多态性 SSR 引物,对野生羊躑躅野生幼苗的 4 个自然居群共 64 个个体进行 SSR 分析,结果发现,本研究所选引物扩增条带清晰,共扩增出 314 个等位基因,扩增

片段的长度为 115~250 bp。每个位点的等位基因数分布不均,差异明显,最高为 25 个(HD39),最低为 8 个(HD109),均值为 15.70(表 2)。20 个 SSR 位点的多态性信息含量(PIC)均较高(0.716~0.942),平均值为 0.850,表明本研究所用的 20 对 SSR 引物均为多态性丰富的位点,同时也说明羊躑躅野生幼苗的遗传背景比较复杂。

2.2 羊躑躅野生幼苗自然居群的遗传多样性分析

羊躑躅野生幼苗的遗传多样性分析结果(表 2 和表 3)表明,4 个羊躑躅野生幼苗自然居群的等位基因数和有效等位基因数均差距较大,分布不均,浙江磐安(PA)的 N_a 最低为 4.100,江西省金溪(JX)的 N_a 最高为 8.900;而 N_e 均值则为 4.457(具体数值在 2.946~5.469 之间),其中江西省永修县(YX)自然居群的最高(5.469),浙江省磐安县(PA)自然居群的最低,只有 2.946,表明浙江磐安的野生幼苗自然居群受到了更大的选择压力。

基于 Nei's 基因多样性分析结果发现,本研究的

表 2 20 个多态性 SSR 位点在羊躑躅野生幼苗中的遗传多样性特征

位点 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)
HD24	11	0.699	0.160	1.310	0.837
HD25	17	0.823	0.098	2.303	0.912
HD26	12	0.608	0.201	0.991	0.716
HD34	23	0.804	0.123	1.783	0.907
HD35	14	0.694	0.190	1.069	0.860
HD37	15	0.782	0.106	2.104	0.858
HD39	25	0.824	0.126	1.742	0.942
HD43	16	0.756	0.083	2.766	0.816
HD55	16	0.623	0.242	0.782	0.833
HD62	16	0.748	0.138	1.557	0.886
HD63	19	0.831	0.077	2.988	0.910
HD64	16	0.729	0.137	1.579	0.839
HD74	21	0.744	0.170	1.220	0.897
HD80	16	0.673	0.198	1.014	0.863
HD83	11	0.594	0.196	1.026	0.789
HD88	14	0.663	0.187	1.087	0.842
HD97	15	0.681	0.209	0.948	0.854
HD100	15	0.819	0.067	3.501	0.872
HD103	14	0.658	0.207	0.957	0.840
HD109	8	0.592	0.201	0.996	0.726
均值 Mean	15.700	0.717	0.155	1.372	0.850

4 个野生羊蹄躅幼苗居群的遗传变异存在一定差异;4 个居群的遗传多样性指数 H 的变化范围为 0.586~0.780,均值为 0.717,其中磐安(PA)的最低 0.586,金溪(JX)的最高 0.780,京山(JS)和永修(YX)的次之,分别为 0.728 和 0.775。进一步分析发现,4 个羊蹄躅幼苗居群 Shannon 指数 I 均值为 1.557,范围为 1.109~1.798,排列顺序与遗传多样性指数基本一致。综上可知,江西省金溪县(JX)地区羊蹄躅野生幼苗居群的遗传变异相对更丰富,江西省永修县野生幼苗居群(YX)、湖北省京山县(JS)次之,浙江省磐安县(PA)居群的最低。另外 4 个野生幼苗居群的固定指数为 0.352~0.454,均值为 0.411,表明各居群均表现杂合子不足,居群内部存在一定程度的近交。

2.3 羊蹄躅野生幼苗群体的遗传结构分析

2.3.1 野生幼苗群体间的遗传分化与变异 根据羊蹄躅野生幼苗的不同来源划分群体,对其 20 个 SSR 位点分析发现,不同位点在幼苗居群间的遗传分化明显,遗传分化系数最高的位点为 0.242(HD55),最低为 0.067(HD100),平均值为 0.155(表 2)。这与群体的遗传多样分析和 AMOVA 结果相吻合(表 4)。羊蹄躅野生幼苗自然群体的遗传变异的 86% 主要发生在居群内,居群间变异只有 14.00%,达到极显著水平($P<0.001$)。羊蹄躅野生

幼苗居群基因流(N_m)在 0.782~3.501 范围内变化,均值为 1.372(表 2),这说明羊蹄躅野生幼苗自然居群间在过去某个时间可能存在一定程度的基因交流,但这同时又削弱了由于遗传漂变而导致群体间的遗传分化。

根据 Nei's 方法计算了羊蹄躅 4 个居群间的遗传距离和遗传一致度。结果(表 5,图 1)发现,浙江省磐安县(PA)和湖北省京山县(JS)2 个居群间的遗传距离最远,为 1.431;说明这 2 个居群亲缘关系相对较远。而永修和(YX)和金溪县(JX)两居群间的遗传一致性最高(0.478)且遗传距离最近(0.738),说明它们之间亲缘关系较近。基于 Mantel 检测分析可知,野生羊蹄躅幼苗各群体间的遗传距离与地理距离的相关性比较小($r=-0.110$, $P=0.020$)。

表 5 4 个羊蹄躅野生幼苗群体间的遗传距离

Table 5 The Nei's genetic distance among the four seedling groups of *R. molle*

居群 Population	江西金溪 JX	江西永修 YX	湖北京山 JS	浙江磐安 PA
江西金溪 JX	—	0.478	0.441	0.428
江西永修 YX	0.738	—	0.433	0.398
湖北京山 JS	0.819	0.838	—	0.239
浙江磐安 PA	0.848	0.921	1.431	—

表 3 4 个不同地区来源的羊蹄躅野生幼苗群体的遗传多样性

Table 3 The genetic diversity of the four seedling groups 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)
江西金溪 JX	8.900	5.058	1.798	0.780	0.422
江西永修 YX	8.150	5.469	1.777	0.775	0.454
湖北京山 JS	6.350	4.355	1.544	0.728	0.352
浙江磐安 PA	4.100	2.946	1.109	0.586	0.415
平均 Mean	6.875	4.457	1.557	0.717	0.411

注:居群代号同表 1,下同

Note: The population code is shown in Table 1 and the following is the same

表 4 4 个来源不同的羊蹄躅野生幼苗群体的分子方差分析

Table 4 AMOVA analysis of the four seedling groups of *R. molle*

变异来源 Variance source	自由度 Df	平方和 SS	方差分量 Variance component	占总变异百分率 Percentage of variation/%	显著性检测 Significant test *
种群间 Among populations	3	241.400	0.683	14.00	$P<0.001$
种群内 Within population	56	1 354.167	4.869	86.00	$P<0.001$
总计 Total	59	159.567	5.552	100.00	

注: * P 为比观测值变异大的概率

Note: * P values mean the probabilities of extreme variation bigger than the observed values

2.3.2 Structure 分析 基于 SSR 分子标记数据对羊蹄躑 4 个野生幼苗自然居群进行群体结构分析,根据 Evanno 等^[12]的方法,用 ΔK 来确定 K 值,当 $K=4$ 时, ΔK 取得最大值(图 2)。Structure 分析结果与 NJ 聚类分析得出的结果相同(图 1 和图 3),即表明羊蹄躑野生幼苗的 4 个自然居群可分成 4 组(图 3,用 4 种不同颜色表示),江西省金溪县(JX)居群为一组,浙江省磐安县(PA)的野生幼苗居群为一组,江西省永修县的羊蹄躑幼苗居群(YX)和湖北省京山县的羊蹄躑幼苗居群(JS)分别为一组。通过 AMOVA 分析可知,羊蹄躑野生幼苗居群的 Φ_{st} (组间平均分化系数)为 0.055($P<0.001$),组间遗传变异为 14.00%(表 4)。这些分析结果表明羊蹄躑各

居群出现了一定的遗传分化,同时也再次证明羊蹄躑野生幼苗自然居群的组间变异远远小于组内变异。

3 讨 论

一般来说,物种的遗传多样性与进化潜力之间具有显著的相关性。物种的遗传多样性越高,它的进化潜力就越大,对环境适应能力越强;反之,则对环境的适应能力越弱甚至可能灭绝^[15]。因此,研究和揭示物种自然居群的遗传多样性和遗传结构对科学有效地保护该物种具有重要的指导意义^[7]。此前利用 SSR 分子标记,分析了 8 个羊蹄躑成年自然居群的遗传多样和遗传结构,发现成年羊蹄躑的残余自然居群仍有较高的遗传多样性,但多个残余居群几乎找不到野生幼苗,仅在 4 个残余居群中发现了一些羊蹄躑幼苗供本文研究^[5]。表明环境的破坏及生境片段化已对羊蹄躑的生存构成了极大的威胁。

为了更好地保护羊蹄躑残余居群及其幼苗群体,本研究利用课题组前期开发的 20 对 SSR 引物,分析羊蹄躑生境片段化对羊蹄躑后代的遗传多样性及生存有何影响。本研究发现,羊蹄躑幼苗自然居群中的遗传多样性还比较高,其基因多样性指数 H 和 Shannon 多样性指数 I 的平均值分别为 0.717 和 1.557。但与羊蹄躑成年居群相比,其多个遗传多样性相关的指标参数均有所下降,成年居群的 H 和 I 分别为 0.777 和 1.768, N_e 和 PIC 的均值分别为 5.425 和 0.900^[5]。这一方面可能是羊蹄躑中国一个原生种,原有的分布范围很广,在长时间的进化演变过程中积累了比较丰富的遗传变异,但近些年来其生态和生境发生了很大的变化,加之人类过度砍伐挖掘、毁林开荒和自然灾害等原因,羊蹄躑的分布

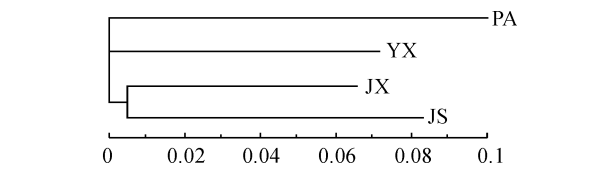


图 1 羊蹄躑野生幼苗群体间 NJ 聚类分析
Fig. 1 NJ analysis on the wild filial generation of *R. molle* by PowerMarker

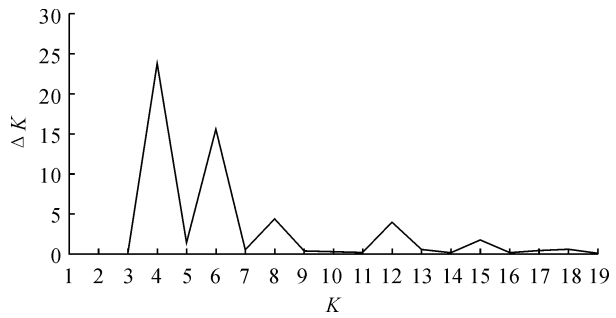


图 2 基于 ΔK 确定最佳群类数 K
Fig. 2 The rational K value of group number was estimated by ΔK



蓝色、绿色、黄色和红色分别代表金溪(JX)、永修(YX)、京山(JS)、磐安(PA)居群,相同颜色为同一类群
图 3 Structure 分析 4 个羊蹄躑野生幼苗群体的遗传结构图($K=4$)
Blue, green, yellow and red represent Jinxi, Yongxiu, Jingshan, and Pan'an populations, respectively.
The same color indicates the same population

Fig. 3 The map of genetic structure analysis of the four seedling populations of *R. molle* ($K=4$)

已经呈现破碎化和片断化的格局,但由于经历时间还比较短,遗传多样性在成年植株及幼苗中均未完全丧失,因此仍具较高的多样性。另一方面,由于羊躑躅的生境不断片断化,使其原本广泛连续的分布被打断,使物种的适应能力下降,一些居群甚至完全消失,剩余的羊躑躅残余居群内近交率不断提高,引起有些等位基因的消失,继而导致其遗传多样性不断降低。例如,我们在金溪、永修及邵东等地调查发现,生长于低海拔丘陵山坡下的羊躑躅,由于当地毁林开荒及经济开发,羊躑躅的生境遭到严重破坏,甚至完全被毁灭^[5]。因此,我们只在 4 个居群中采集到一些幼苗进行遗传多样性分析。目前,羊躑躅生境“岛屿化”的趋势日益严峻,各残余居群的固定指数均比较大(均值为 0.411)。这将导致羊躑躅幼苗的生存能力和适应能力不断减弱,加上遗传漂变和近交衰退的作用,最终可能会导致该物种的后代发生瓶颈效应^[6,16]。类似现象在中国野生山杏(*Armeniaca sibirica*)^[17]、山茱萸(*Cornus officinalis*)^[18]等物种中均有报道。

前人的研究认为, F_{st} 值处于 0~0.05 之间的群体,各亚群间不存在分化;如果 F_{st} 值为 0.05~0.15,则为中度分化;若 F_{st} 值在 0.15~0.25 之间,则被认为是高度分化^[19]。本研究结果表明,羊躑躅幼苗种群间分化系数高于成年羊躑躅种群,表明羊躑躅幼苗种群存在比较大的遗传分化。但 AMOVA 和 Structure 分析发现,羊躑躅幼苗种群的变异仍主要发生在居群内,占 86%。这可能是由于羊躑躅片断化时间不长,居群间存在一定的基因流,从而削弱了因遗传漂变引起的居群间分化程度,其中花粉和种子的扩散可能是基因流的两种主要形式^[20]。Slatkin 认为当 $N_m > 1$ 时,基因流可以抵消居群间

因遗传变异引起的遗传分化^[21]。以上结果表明,羊躑躅居群的生境片断化打破了羊躑躅原有连续分布的格局,加剧了羊躑躅幼苗种群的遗传分化。因此,保护好羊躑躅的原有生境,避免羊躑躅生境的“岛屿化”具有十分重要的意义。另外,野外调查发现,各羊躑躅残余自然居群的生境、种群数量及海拔等存在较大差异,其保护最好以就地保护为主。目前,湖北京山县太子山(JS)和浙江磐安大盘山(PA)位于国家自然保护区,保护比较有保障。但是,这 2 个居群的遗传多样性较低,随之对环境的适应性也会减弱,导致种群内个体存活率降低,无法在短时间内增加种群规模,丰富其遗传多样性。江西金溪(JX)和永修(YX)居群的遗传多样水平最高,对环境的适应性较好,生存能力更高;另外这 2 个居群也出现了明显遗传分化,因此这 2 个居群是今后保护的重点。此外,江西金溪(JX)和永修(YX)居群的幼苗也比较多,表明其对生境变化的适应能力也相对更强,有利于在短时间内恢复其种群规模,使遗传变异损失度最小化。然而,这 2 个居群所处的生境人类活动频繁,工业化、城镇化及毁林开荒等已严重破坏了其生境,造成生境断裂,形成一些小的种群。若能及时加以保护,便能保持其遗传多样性。具体保护措施:首先应将保护其生境放在首位,限制人类的活动,禁止滥砍乱伐,防治人类活动对羊躑躅自然居群造成进一步的破坏;其次要加强羊躑躅不同世代间的交流,增加遗传多样性和其对环境的适应能力。鉴于羊躑躅野生幼苗及成年植株的种群数量较少,生境破坏较严重,加之其自然繁育能力很弱,对部分残余居群应加以抢救性的迁地保护,或利用植物组织培养技术进行繁殖、保存并进行回归引种,进而有效地保护野生羊躑躅的遗传多样性。

参考文献:

[1] 马强,房鑫,李俊,等.羊躑躅的化学成分研究[J].中草药,2018,**49**(5): 1 013-1 018.
MA Q, FANG X, LI J, et al. Chemical constituents from fruits of *Rhododendron molle* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2018,**49**(5): 1 013-1 018.

[2] URESHINO K, MIYAJIMA I, AKABANE M. Effectiveness of three-way crossing for the breeding of yellow-flowered evergreen azalea[J]. *Euphytica*, 1998,**104**(2): 113-118.

[3] 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.

[4] CHENG X G, 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* (Basel, Switzerland), 2011, **16** (4): 3179-3196.

[5] 程马龙,戴亮芳,罗向东,等.濒危羊躑躅自然居群的遗传多样性和遗传结构分析[J].西北植物学报,2016,**36** (4): 674-680.

CHENG M L, DAI L F, LUO X D, et al. Genetic diversity

and genetic structure analysis on natural populations of endangered *Rhododendron molle* G. Don[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2016, **36**(4): 674-680.

[6] WANG S J, LIN S, ZHU C G, *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.

[7] CIRES E, SAMAIN M S, GOETGHEBEUR P, *et al.* Genetic structure in peripheral Western European populations of the endangered species *Cochlearia pyrenaica* (Brassicaceae) [J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2011, **297**(1-2): 75-85.

[8] KOHN M H, MURPHY W J, OSTRANDER E A, *et al.* Genomics and conservation genetics[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2006, **21**(11): 629-637.

[9] 贺俊英, 杨美青. 国内有关遗传多样性分析在濒危植物保护遗传学中的应用进展[J]. 内蒙古师范大学学报(自然科学汉文版), 2008, **37**(5): 650-655.

HE J Y, YANG M Q. The utilization of genetic diversity analysis in conservation genetics of Chinese endangered plants[J]. *Journal of Inner Mongolia Normal University* (Natural Science Edition), 2008, **37**(5): 650-655.

[10] WUYUN T N, AMO H, XU J S, *et al.* Population structure and conservation strategies for wild *Pyrus ussuriensis* Maxim. in China[J]. *PLoS One*, 2015, **10**(8): e0133686.

[11] 刘梦露, 戴亮芳, 程马龙, 等. 濒危植物羊躑躅全基因组 SSR 标记开发与鉴定研究[J]. 西北植物学报, 2018, **38**(5): 850-857.

LIU M L, DAI L F, CHENG M L, *et al.* Genome-wide identification of SSR markers in endangered species *Rhododendron molle* G. Don[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2018, **38**(5): 850-857.

[12] 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**(8): 2 611-2 620.

[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**(1): 288-295.

[14] PRITCHARD J K, STEPHENS M, DONNELLY P. Inference of population structure using multilocus genotype data [J]. *Genetics*, 2000, **155**(2): 945-959.

[15] 包文泉, 乌云塔娜, 王 淋, 等. 内蒙古西伯利亚杏群体遗传多样性和遗传结构分析[J]. 西北植物学报, 2016, **36**(11): 2 182-2 191.

BAO W Q, WU Y T N, WANG L, *et al.* Genetic diversity and population genetic structure of Siberian apricot in Inner Mongolia[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2016, **36**(11): 2 182-2 191.

[16] YAO X, ZHANG J, YE Q, *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* (Stuttgart, Germany), 2011, **13**(2): 401-410.

[17] WANG Z, KANG M, LIU H B, *et al.* High-level genetic diversity and complex population structure of Siberian apricot (*Prunus sibirica* L.) in China as revealed by nuclear SSR markers[J]. *PLoS One*, 2014, **9**(2): e87381.

[18] HADZIABDIC D, WANG X W, WADL P A, *et al.* Genetic diversity of flowering dogwood in the great smoky mountains national park[J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2012, **8**(4): 855-871.

[19] CURNOW R N, WRIGHT S. Evolution and the genetics of populations, volume 4: Variability within and among natural populations. [J]. *Biometrics*, 1979, **35**(1): 359.

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

[21] 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): 1 656-1 662.

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): 1 656-1 662.

(编辑:宋亚珍)