



濒危植物秦岭石蝴蝶的 SCoT 遗传多样性分析

孙 旺¹, 蒋景龙^{1*}, 胡选萍¹, 李 耘², 王 琦¹, 陶小斌², 胡凤成³

(1 陕西理工大学 生物科学与工程学院, 陕西汉中 723000; 2 汉中市野生动植物保护管理站, 陕西汉中 723000; 3 略阳县苗圃, 陕西汉中 724310)

摘 要: 利用筛选到的 24 条 SCoT 引物, 分析秦岭石蝴蝶人工繁育和野生种群 60 份材料的遗传多样性和遗传结构, 为秦岭石蝴蝶的濒危机制和制定种群保护与修复策略提供理论依据。结果显示: (1) 60 份秦岭石蝴蝶供试样品的观察等位基因数平均为 1.51, 有效等位基因数平均为 1.31, Nei's 基因多样性平均为 0.230 5, Shannon 指数平均为 0.370 3, 表明供试材料种群的遗传多样性较低。 (2) 种群间的遗传距离与遗传相似系数分析结果表明, 3 个种群 60 份供试材料间的遗传相似系数为 0.955 1~0.970 5, 平均相似系数 0.963 4, 进一步表明供试材料之间的遗传相似性极高, 遗传背景较为狭窄。 (3) 秦岭石蝴蝶种群分子方差分析结果显示 15% 的变异来自于种群间, 而 85% 的变异来自于种群内部。综合分析表明, 秦岭石蝴蝶各种群内和种群之间的遗传多样性较低, 遗传背景狭窄, 这可能是秦岭石蝴蝶适应环境能力差, 从而导致其濒危的重要原因之一。

关键词: 濒危植物; 秦岭石蝴蝶; 遗传多样性; SCoT; 等位基因

中图分类号: Q789 **文献标志码:** A

Genetic Diversity Analysis of Endangered Plant *Petrocosmea qinlingensis* Based on SCoT

SUN Wang¹, JIANG Jinglong^{1*}, HU Xuanping¹, LI Yun²,
WANG Qi¹, TAO Xiaobin², HU Fengcheng³

(1 School of Biological Sciences and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi, 723000, China; 2 Hanzhong City Wildlife Conservation and Management Station, Hanzhong, Shaanxi, 723000, China; 3 Nursery of Lueyang County, Hanzhong, Shaanxi, 724310, China)

Abstract: The genetic diversity and genetic structure of *Petrocosmea qinlingensis* artificial breeding population and wild population were analyzed with 24 SCoT primers. This study is of scientific significance to analyze the endangered mechanism of the *P. qinlingensis* and to formulate population protection and restoration strategies. The results showed that: (1) the average of observed number of alleles, effective number of alleles, Nei's gene diversity and Shannon information index of 60 *P. qinlingensis* test samples were 1.51, 1.31, 0.230 5 and 0.370 3, respectively. This indicates that the genetic diversity of the test material population was low. (2) The analysis results of genetic distance and similarity coefficient among populations showed that the genetic similarity coefficient between 60 test materials of the three populations was 0.955 1 to 0.970 5, and the average similarity coefficient was 0.963 4, which further explained that the ge-

收稿日期: 2019-12-13; 修改稿收到日期: 2020-02-04

基金项目: 陕西省重点研发计划(2018NY-042); 汉中市野生动植物保护管理站秦岭石蝴蝶人工繁育及生物学研究项目(208022179); 陕西教育厅项目(18JK0139)

作者简介: 孙 旺(1994—), 男, 在读硕士研究生, 主要从事植物细胞生物学研究。E-mail: 13892696847@163.com

* 通信作者: 蒋景龙, 副教授, 主要从事植物细胞生物学研究。E-mail: jiangjinglong511@163.com

netic similarity among populations was extremely high. Therefore, the genetic background was narrow. (3) The results of molecular variance analysis of *P. qinlingensis* population showed that 15% of the variation was from among populations, and 85% of the variation was from within population. The comprehensive analysis showed that the genetic diversity of the *P. qinlingensis* was low in various groups and between populations, and the genetic background was narrow. This may also be one of the important reasons for its poor ability to adapt to the environment, leading to its endangerment.

Key words: endangered plants; *Petrocosmea qinlingensis*; genetic diversity; SCoT; alleles

秦岭石蝴蝶(*Petrocosmea qinlingensis* W. T. Wang)为苦苣苔科(Gesneriaceae)石蝴蝶属(*Petrocosmea*),多年生草本植物,具有较高的观赏价值^[1],截止目前,仅在汉中略阳县和勉县的阴湿山沟中被发现,野生数量极其稀少,在中国珍稀濒危植物信息系统中已被列为极危,属秦岭地区特有的国家二级珍稀濒危保护植物^[2]。因此,对于该物种的保护研究工作已刻不容缓。近年来针对秦岭石蝴蝶的保护和研究工作正在积极开展^[3-5],尤其是在人工繁育技术方面有所突破^[6-7],但关于秦岭石蝴蝶种群遗传多样性的研究还未见报道。

遗传结构和遗传多样性是一个物种的重要特征,遗传结构的分布与物种的繁育机制以及自然选择效应密切相关,而遗传多样性则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^[8]。因此,分析物种尤其是珍稀濒危物种的遗传多样性和遗传结构,对于生物资源的保护和合理开发利用具有重要的意义。作为石蝴蝶属分布最北缘的植物,秦岭石蝴蝶遗传多样性的研究不仅可以了解其种群遗传多样性情况,更能为进一步解释其濒危机制和演化起源提供线索。另外,遗传多样性也是检验后期野外回归成功与否的重要指标之一^[9]。

目标起始密码子多态性(start codon targeted polymorphism, SCoT)标记是基于翻译起始位点的目的基因标记技术,由 Collard 等^[10]于 2009 年在水稻中首次应用的一种新型分子标记方法,可用于遗传多样性和亲缘关系的研究。大量研究表明,基因的起始密码子的附近序列是非常保守的,具有一致性。SCoT 标记的引物正是根据 ATG 翻译起始位点侧翼保守序列来设计单引物,扩增产生偏向候选功能基因区显性多态性标记,具有操作简单、重复性好等特点^[11]。目前,SCoT 分子标记已经广泛应用于多种植物的遗传多样性分析当中。欧景莉等^[12]通过 11 条 SCoT 引物分析了 48 份杨桃(*Averrhoa carambola*)种质的遗传多样性。程虎印等^[13]利用筛选得到的 12 条 SCoT 引物对陕西产重楼属(*Paris*)6 个类群的遗传多样性和亲缘关系进行了分析。

王令等^[14]利用 22 条 SCoT 引物分析了 22 份陕南茶树(*Camellia sinensis*)地方品种的遗传多样性。在濒危植物的遗传多样性分析当中也有应用。Chhajjer 等^[15]利用 22 条 SCoT 引物分析了沙漠柚木(*Tecomella undulata*)21 个种群的遗传多样性。Bhattacharyya 等^[16]利用 SCoT 标记分析了 6 个自然居群金钗石斛(*Dendrobium nobile*)的遗传多样性。陈大霞等^[17]利用 SCoT 标记分析了 6 个桃儿七(*Sinopodophyllum emodi*)野生居群的遗传多样性。基于前期在人工种群观察到存在丰富花器官变异类型以及植株形态表型也存在差异^[5],因此本研究选取 SCoT 分子标记方法对采自略阳县、勉县以及实验室人工繁育种群秦岭石蝴蝶的遗传多样性进行分析,以期今后研究其濒危机制和制定合理的种群保护与修复策略提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

在获得陕西省林业局批准,取得《国家重点保护野生植物采集证》并在汉中市野生动植物保护管理站监督下,于 2019 年 7 月分别在略阳县野生种群(L)和勉县野生种群(M)进行采样,选取新鲜幼嫩的秦岭石蝴蝶叶片作为实验材料。人工种群叶片采自陕西理工大学秦岭石蝴蝶人工繁育室(S)。3 个居群各取幼嫩叶片材料 20 份,按照采集顺序进行编号,野生种群采样采取间隔 2.0 m 以上进行采样,实验室种群采取随机采样。采集的样品迅速放于冰盒中带回实验室并置于一 80 ℃超低温冰箱中储存备用。试验所用的 SCoT 引物参考 Collard 等^[10],部分自己设计,共 60 条 SCoT 引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成。

1.2 方法

1.2.1 秦岭石蝴蝶基因组 DNA 的提取与检测 采用改良的 CTAB 法^[18]提取秦岭石蝴蝶基因组 DNA,提取得到的产物用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的完整性,使用 NanoDrop 2 000 超微量分光光度计检测 DNA 纯度、浓度,按比例稀释

后将所有装有 DNA 的小管于-80 ℃保存备用。

1.2.2 PCR 扩增与聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

SCoT-PCR 总反应体系 20 μL,包括 DNA 模板 50 ng,2×Power Taq PCR MasterMix 10 μL(北京百泰克生物技术有限公司),SCoT 引物 100 ng,加 dd H₂O 至 20 μL。PCR 反应在 PCR 扩增仪(Hema 9 600)上按以下程序运行:94 ℃预变性 4 min,94 ℃变性 45 s,54 ℃退火 45 s,72 ℃下延伸 90 s,35 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min,4 ℃保存。

完成 PCR 后,取 3 μL PCR 产物在 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶上恒电压 150 V 电泳 4 h,电泳缓冲液为 0.5×TBE,最后用银染法进行染色显影。各溶剂浓度和体积为:银染液,0.2% AgNO₃,500 mL;显影液 1.5% NaOH,500 mL,甲醛 2 mL;终止液,0.75% Na₂CO₃,500 mL。银染程序为:去离子水漂洗 2 次,银染 25 min,去离子水漂洗 2~3 次,加入显影液在摇床上轻摇显色至适宜程度,及时加入终止液终止显色,防止背景颜色过深。显影后,用 Epson Expression 10 000XL 影像扫描仪采集图像以便进行后续数据统计分析。

1.2.3 引物的筛选 从 3 个种群中各挑选 2 个 DNA 样本,共 6 个样本,使用合成的 60 条 SCoT 引物分别进行 PCR 扩增和聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,按照银染方法进行染色显影,扫描并保存凝胶图像。从 60 条 SCoT 引物中选取扩增效率高,条带清晰,重复性好的 24 条引物对秦岭石蝴蝶 3 个种群的 60 份 DNA 样本进行聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

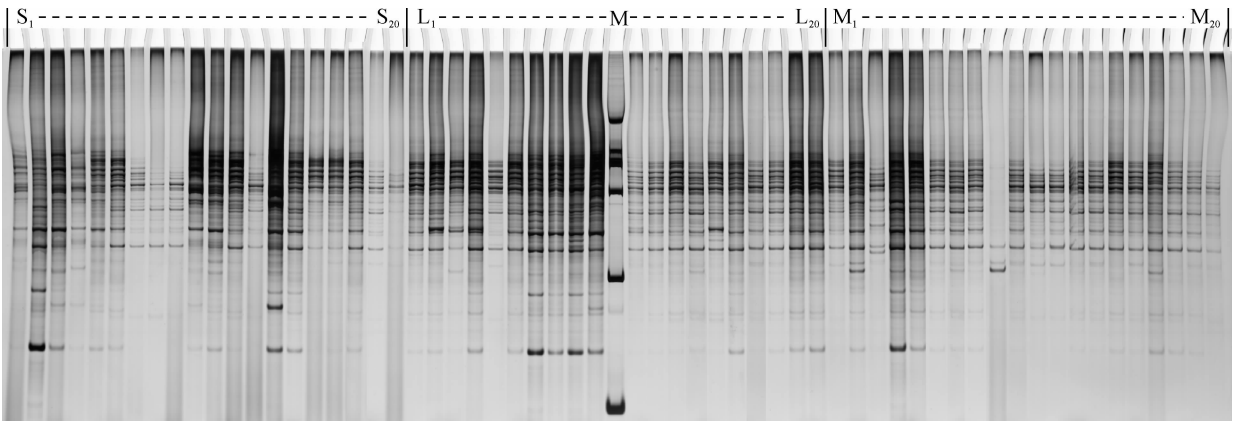
1.2.4 秦岭石蝴蝶种群遗传多样性分析 使用 Excel 2010 对电泳后的凝胶图像进行条带统计,采

用人工读带的方法将清晰可辨的电泳条带全部用于统计分析,在凝胶的相同迁移位置上,将有条带记为“1”,无条带记为“0”。使用 POPGEN Version 1.32 软件^[19],分析供试材料的多态性比例、观察等位基因数、有效等位基因数、Nei's 基因多样性、Shannon 信息指数等。应用 GenALEx 6.3 软件^[20]进行进行分子方差分析,计算居群内、居群间的变异方差分布。最后根据居群间的遗传距离,采用非加权组平均法(Unweighted pair-group method with arithmetic mean,UPGMA)使用 MEGA 5 软件^[21]对 3 个种群进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 秦岭石蝴蝶的遗传多样性

从合成的 60 条 SCoT 分子标记引物中共筛选出 24 条用于秦岭石蝴蝶的遗传多样性分析。这 24 条引物均可扩增出清晰的条带,其中引物 SCoT 31 对 3 个居群的 60 份材料的扩增结果如图 1。24 条引物共扩增出 322 条 DNA 带,每条引物扩增的条带数在 7~17 条之间,其中引物 SCoT 6 最少,仅为 7 条,SCoT 40 和 SCoT 56 扩增的条带数最多,为 17 条,平均每条引物扩增出 13.42 条带。24 条引物共产生 113 条多态性条带,其中 SCoT 34 的多态性比例最高,为 50%,而 SCoT 49 的多态性比例最低,为 15.38%,24 条引物平均多态性为 35.20%。这表明试验所用的 SCoT 引物通用性较强,可以用于秦岭石蝴蝶的遗传多样性研究。秦岭石蝴蝶供试样品的观察等位基因数介于 1.17~1.82,平均为 1.51;有效等位基因数在 1.09~1.67 之间,平均为 1.31。Nei's



M. DNA Marker; S₁~S₂₀ 表示人工繁育种群; L₁~L₂₀ 表示略阳县野生种群; M₁~M₂₀ 表示勉县野生种群

图1 SCoT 31 在供试材料中的扩增结果

M. DNA Marker; S₁—S₂₀ stand for artificial breeding population; L₁—L₂₀ indicate wild population in Lueyang County; M₁—M₂₀ indicate wild population in Mianxian County

Fig. 1 Amplification results of SCoT 31 primer

基因多样性在 0.102 8~0.296 5,平均为 0.230 5。Shannon 信息指数在 0.143 4~0.453 9 之间,平均为 0.3703(表 1)。

2.2 秦岭石蝴蝶居群间的遗传分化

AMOVA(analysis of molecular variance)分子变异分析显示,在秦岭石蝴蝶总的遗传变异中,15%

的变异发生在居群间,85%发生于居群内(表 2)。

2.3 秦岭石蝴蝶居群间的遗传距离及聚类分析

从表 3 中可以看出,3 个居群平均遗传相似度为 0.963 4,平均遗传距离为 0.036 9。其中,实验室人工种群和略阳野生群体之间的遗传距离最小,为 0.029 6;略阳野生群体和勉县野生群体之间的遗传

表 1 秦岭石蝴蝶在 24 条 SCoT 引物中的遗传多样性指数
Table 1 Genetic diversity indices of *P. qinlingensis* with 24 SCoT primers

编号 No.	序列 Primer sequence	条带数 Numbers of band	多态性 条带数 Number of band polymorphism	多态性 比例 Polymorphism rate/%	观察等 位基因 Observed number of alleles	有效等 位基因 Effective number of alleles	Nei's 基因 多样性 Nei's gene diversity	Shannon 指数 Shannon information index
SCoT 1	CAACAATGGCTACCACCA	11	4	36.36	1.64	1.22	0.265 5	0.438 9
SCoT 5	CAACAATGGCTACCACGA	9	2	22.22	1.21	1.15	0.202 9	0.346 4
SCoT 6	CAACAATGGCTACCACGC	7	3	42.86	1.28	1.19	0.199 3	0.248 5
SCoT 8	CAACAATGGCTACCACGT	14	4	28.57	1.37	1.21	0.263 4	0.453 9
SCoT 11	AAGCAATGGCTACCACCA	16	4	25.00	1.52	1.33	0.127 3	0.242 0
SCoT 19	ACCATGGCTACCACCGGC	11	5	45.45	1.69	1.39	0.126 0	0.241 5
SCoT 30	CCATGGCTACCACCGGCG	11	4	36.36	1.74	1.34	0.280 6	0.451 6
SCoT 31	CCATGGCTACCACCGCCT	16	7	43.75	1.78	1.45	0.296 5	0.437 1
SCoT 34	ACCATGGCTACCACCGCA	12	6	50.00	1.58	1.41	0.293 5	0.442 0
SCoT 37	CAACAATGGCTACCAGCG	15	7	46.67	1.34	1.19	0.231 5	0.403 4
SCoT 39	ACGACATGGCGACCAACT	14	5	35.71	1.62	1.37	0.257 8	0.441 4
SCoT 40	ACGACATGGCGACCAACC	17	5	29.41	1.17	1.09	0.258 7	0.434 9
SCoT 42	ACGACATGGCGACCATCC	16	6	37.50	1.49	1.25	0.196 8	0.246 5
SCoT 43	ACGACATGGCGACCATCA	10	3	30.00	1.41	1.26	0.131 9	0.243 9
SCoT 45	ACGACATGGCGACCACGG	12	5	41.67	1.39	1.29	0.256 6	0.428 1
SCoT 47	ACGACATGGCGACCCACG	14	5	35.71	1.55	1.32	0.285 0	0.434 2
SCoT 49	ACGACATGGCGACCCACC	13	2	15.38	1.50	1.36	0.102 8	0.143 4
SCoT 50	ACCATGGCTACCACCGCT	16	5	31.25	1.35	1.28	0.126 4	0.242 4
SCoT 52	ACCATGGCTACCACCGGA	12	4	33.33	1.44	1.29	0.274 6	0.429 8
SCoT 53	CCATGGCTACCACCGCCC	14	5	35.71	1.61	1.41	0.252 3	0.414 5
SCoT 55	CCATGGCTACCACCGGCA	16	5	31.25	1.62	1.37	0.276 9	0.415 7
SCoT 56	CCATGGCTACCACCGGCT	17	6	35.29	1.68	1.41	0.289 6	0.431 7
SCoT 57	CCATGGCTACCACCGCAA	15	7	46.67	1.82	1.67	0.273 8	0.425 0
SCoT 60	CATGGCTACCACCGGCCA	14	4	28.57	1.37	1.24	0.262 1	0.450 4
平均 Mean		13.42	4.71	35.20	1.51	1.31	0.230 5	0.370 3
合计 Total		322	113					

表 2 秦岭石蝴蝶种群内和种群间的 AMOVA 分析
Table 2 Analysis of molecular variance within and among populations of *P. qinlingensis*

变异来源 Source of variance	自由度 Degree of freedom	总方差 Sun of squares	均方差 Expected mean squares	变异组分 Variance component	百分率 Percent/%	P
种群间 Among populations	2	356.233 0	178.117 0	6.996 0	15	<0.001
种群内 Within population	57	2 177.350 0	38.199 0	38.199 0	85	<0.001

表 3 秦岭石蝴蝶种群间的遗传相似度(对角线上方)与遗传距离

Table 3 Genetic identities (above diagonal) and genetic distance between populations of <i>P. qinlingensis</i>			
种群 Population	S	L	M
S	* * *	0.970 5	0.964 6
L	0.029 6	* * *	0.955 1
M	0.035 7	0.045 5	* * *

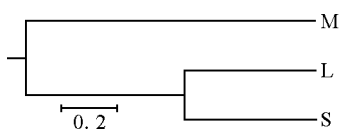
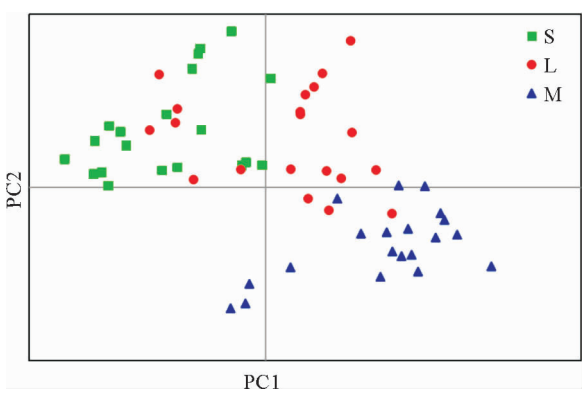


图 2 秦岭石蝴蝶 3 个种群的 Nei's 遗传距离 UPGMA 聚类进化树

Fig. 2 Dendrogram obtained based on Nei's genetic distance among the 3 populations of *P. qinlingensis*



PC1. 主坐标 1; PC2. 主坐标 2

图 3 秦岭石蝴蝶 3 个居群的主坐标分析

PC1. Principal coordinates 1; PC2. Principal coordinates 2

Fig. 3 Principal coordinates analysis of the 3 populations of *P. qinlingensis*

距离最大,为 0.045 5。根据秦岭石蝴蝶种群间的遗传距离,使用 MEGA 5 基于 UPGMA 法构建遗传进化树(图 2),从图中可以看出实验室人工种群与略阳野生群体聚为一类,而勉县野生群体单独聚为一支。这表明实验室群体与略阳野生群体在遗传距离上较为相近,而勉县野生群体与两者的遗传距离相对较远。使用 GenALEx 6.3 软件对 3 个居群 60 份样本进行主坐标分析,结果与聚类分析的结果相一致(图 3),实验室人工种群和略阳野生群体之间的有所交叉,未完全分开,而两者与勉县野生群体之间基本完全分开。造成这一结果的原因很可能是由于实验室群体最初是采自略阳的野生植株,后经大量繁殖和传代得到,因此他们在遗传背景上较为相

近。而勉县野生群体与两者之间遗传距离相对较远这与种群之间的地理距离的远近相一致。

3 讨 论

遗传多样性是物种适应环境变化和抵御病虫害的前提条件,遗传多样性水平决定了物种长期的生存能力和进化潜力^[22]。一般来说,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^[23]。因此,研究濒危物种的遗传多样性和遗传结构,对生物资源的合理开发利用和种质资源保护,具有重要的意义。普遍认为,与广泛分布种相比,稀有种或特有种以及分布范围狭窄的植物物种的遗传多样性水平一般较低^[24]。然而也有研究表明,稀有种或特有种可保持较高的遗传变异,濒危物种并不意味着遗传变异水平的下降,不同类型的濒危植物并不都表现出遗传衰退^[25]。但就秦岭石蝴蝶而言,其较低的遗传多样性水平与其稀有的野生数量和狭窄的地域分布相一致。

本研究中,从 24 条 SCoT 引物对秦岭石蝴蝶 3 个种群的扩增结果和分析结果来看,60 份秦岭石蝴蝶供试样品的观察等位基因数介于 1.17~1.82 之间,平均为 1.51;有效等位基因数在 1.09~1.67,平均为 1.31。Nei's 基因多样性在 0.102 8~0.296 5,平均为 0.230 5。Shannon 指数则介于 0.143 4~0.453 9,平均为 0.370 3,表明供试材料种群的遗传多样性不高。这可能与取样的区域范围狭窄,样本量较小有关,因为野生分布地的秦岭石蝴蝶分布范围极为狭窄,采样无法做到足够分散。同时,从种群间的遗传距离与遗传相似系数可以得出,3 个种群 60 份供试材料间的遗传相似系数为 0.955 1~0.970 5,平均相似系数 0.963 4,这也进一步说明供试材料之间的遗传相似性极高,遗传背景较为狭窄。秦岭石蝴蝶种群分子方差分析结果显示 15% 的变异来自于种群间,而 85% 的变异来自于种群内部。这很可能是由于秦岭石蝴蝶 3 个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。因为目前发现的野生秦岭石蝴蝶的分布地有两处,但从地理位置上来看,这两处野生分布地的地理距离非常接近。而前面的研究已经证实秦岭石蝴蝶的种子可育^[2],并且在本研究进行野外采样的过程中,也发现了一些极小的实生苗。因此,非常接近的居群地理位置就很可能造成授粉昆虫在两个居群间进行交叉授粉,从而产生居群间的基因流。而花

粉和种子的扩散正是产生基因流的两种主要形式^[26]。

秦岭石蝴蝶自命名以来就一直遭受灭绝的风险,但其濒危机制一直不甚清楚。杨平等^[4]于 2016 年从秦岭石蝴蝶的生态学特征角度分析了其群落特征和结构,并对其濒危机制进行了探讨,认为地质运动造成的地理分布格局是其自然分布狭窄和走向濒危的重要原因之一,另外秦岭石蝴蝶生境土壤理化性质和人为干扰和破坏也可能是其濒危的原因之一。本研究通过对其遗传多样性的分析,结果表明秦岭石蝴蝶各种群内和种群之间的遗传多样性较低,遗传背景狭窄,而这很有可能造成其环境适应力差,从而导致其处于濒危状态的重要原因之一,而这为其种群的人工恢复工作提出了挑战。此外,不同的分子标记具有不同的多态性检测范围,越来越多的遗传多样性研究趋向于使用多个分子标记共同分析物种的遗传多样性。如王梦亮等^[27]采用 RAPD 和 ISSR 分子标记对野生红景天(*Rhodiola rosea*)种间亲缘关系及种内的遗传多样性进行了分析。周娜等^[28]采用 ISSR、RAPD 与 RAMP 3 种分子标记

分析了收集到的国内外 32 份萝卜(*Raphanus sativus*)种质的亲缘关系与遗传多样性。Golkar 和 Mokhtari^[29]通过 SRAP 和 SCoT 分子标记分析了来自世界各地的 100 种红花(*Carthamus tinctorius*)的遗传多样性。因此,秦岭石蝴蝶的遗传多样性评价应该结合形态学表型或其他诸如 SSR、ISSR 等分子标记技术的结果,并在扩大样本量的基础上,进行多角度的评估,以促进对秦岭石蝴蝶种质资源的保护、种群修复以及开发利用。最后,鉴于秦岭石蝴蝶种群的遗传多样性较低,其人工保护和抢救工作已刻不容缓,在此提出以下几点具体保护措施:首先应在保护其现有生境的基础之上积极改善和修复已遭受破坏的生境,并限制人类的活动,防止人为破坏;其次应选择合适的地点,尽快开展秦岭石蝴蝶的野外回归和种群复壮工作;最后,应在提高野生秦岭石蝴蝶数量的基础之上,增加居群和不同世代之间的基因流,提高秦岭石蝴蝶的遗传多样性,增强其对抵御环境变化和病虫害的能力,最终使其实现种群规模的自我维持和扩大。

参考文献:

[1] 王文采. 中国苦苣苔科的研究(二)[J]. 植物研究, 1981, **1**(4): 35-75.
WANG W T. Notulae de Gesneriaceis sinensibus (II) [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 1981, **1**(4): 35-75.

[2] 汪 松, 解 焱. 中国物种红色名录: 第一卷 红色名录[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 405.

[3] 黎 君, 杨 妮, 周天华. 珍稀濒危植物秦岭石蝴蝶的研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2015, **34**(5): 38-40.
LI J, YANG N, ZHOU T H. Progress of rare and endangered plants *Petrocosmea qinlingensis* [J]. *Chinese Wild Plant Resources*, **34**(5): 38-40.

[4] 杨 平, 陆 婷, 邱志敬, 等. 濒危植物秦岭石蝴蝶的生态学特性及濒危原因分析[J]. 植物资源与环境学报, 2016, **25**(3): 90-95.
YANG P, LU T, QIU Z J, *et al.* Analyses on ecological characteristics and endangered reason of endangered plant *Petrocosmea qinlingensis* [J]. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2016, **25**(3): 90-95.

[5] 孙 旺, 蒋景龙, 陶小斌, 等. 秦岭石蝴蝶人工种群花器变异现象研究[J]. 西北植物学报, 2019, **39**(2): 349-358.
SUN W, JIANG J L, TAO X B, *et al.* Study on variation of floral organs in artificial *Petrocosmea qinlingensis* population [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2019, **39**(2): 349-358.

[6] 杨 平, 陆 婷, 邱志敬. 濒危植物秦岭石蝴蝶的叶插繁殖研究[J]. 北方园艺, 2016, **40**(11): 57-60.
YANG P, LU T, QIU Z J. Study on propagation of the endangered species *Petrocosmea qinlingensis* by leaf cutting [J]. *Northern Horticulture*, 2016, **40**(11): 57-60.

[7] 蒋景龙, 孙 旺, 胡选萍, 等. 珍稀濒危植物秦岭石蝴蝶的繁育研究现状[J]. 分子植物育种, 2019, **17**(09): 3 024-3 029.
JIANG J L, SUN W, HU X P, *et al.* Research status of the breeding of rare and endangered plant *Petrocosmea qinlingensis* [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, **17**(9): 3 024-3 029.

[8] SOKAL R R, JACQUEZ G M, WOOTEN M C. Spatial autocorrelation analysis of migration and selection [J]. *Genetics*, 1989, **121**(4): 845-855.

[9] 丁剑敏, 张向东, 李国梁, 等. 濒危植物居群恢复的遗传学考量[J]. 植物科学学报, 2018, **36**(3): 452-458.
DING J M, ZHANG X D, LI G L, *et al.* Genetic considerations in recovery of endangered plants [J]. *Plant Science Journal*, 2018, **36**(3): 452-458.

[10] COLLARD B C Y, MACKILL D J. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2009, **27**(1): 86-93.

[11] 熊发前, 唐荣华, 陈忠良, 等. 目标起始密码子多态性 (SCoT): 一种基于翻译起始位点的目的基因标记新技术 [J]. 分子植物育种, 2009, **7**(3): 635-638.

XIONG F Q, TANG R H, CHEN Z L, *et al.* SCoT: A novel gene targeted marker technique based on the translation start codon[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2009, **7**(3): 635-638.

[12] 欧景莉, 朱杨帆, 陈豪军, 等. 基于 SCoT 分子标记的 48 份杨桃种质遗传多样性分析[J]. 南方农业学报, 2019, **50**(8): 1 680-1 687.

OU J L, ZHU Y F, CHEN H J, *et al.* Genetic relationship analysis of 48 *Averrhoa carambola* L. germplasms based on SCoT marker[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2019, **50**(8): 1 680-1 687.

[13] 程虎印, 王 艳, 颜永刚, 等. 陕西产重楼属种质资源的 SCoT 遗传多样性分析[J]. 中草药, 2019, **50**(16): 3 917-3 922.

CHENG H Y, WANG Y, YAN Y G, *et al.* Genetic diversity analysis of germplasm resouces of *Paris* genus in Shaanxi province by SCoT molecular markers[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2019, **50**(16): 3 917-3 922.

[14] 王 令, 李 佼, 席彦军, 等. 基于 SCoT 标记的陕西茶树种质资源遗传多样性分析[J]. 西北农业学报, 2018, **27**(2): 244-252.

WANG L, LI J, XI Y J, *et al.* Analysis on genetic diversity of tea germplasm in Shaanxi based on SCoT markers[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2018, **27**(2): 244-252.

[15] CHHAJER S, JUKANTI A K, KALIA R K. Start codon targeted (SCoT) polymorphism-based genetic relationships and diversity among populations of *Tecomella undulata* (Sm.) Seem—an endangered timber tree of hot arid regions [J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2017, **13**(4): 84.

[16] BHATTACHARYYA P, KUMARIA S, KUMAR S, *et al.* Start codon targeted (SCoT) marker reveals genetic diversity of *Dendrobium nobile* Lindl., an endangered medicinal orchid species[J]. *Gene*, 2013, **529**(1): 21-26.

[17] 陈大霞, 赵纪峰, 刘 翔, 等. 濒危药用植物桃儿七野生居群遗传多样性与遗传结构的 SCoT 分析[J]. 中国中药杂志, 2013, **38**(2): 278-283.

CHEN D X, ZHAO J F, LIU X, *et al.* Genetic diversity and genetic structure of endangered wild *Sinopodophyllum emodi* by start codon targeted polymorphism [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2013, **38**(2): 278-283.

[18] DOYLE J J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochem. Bull.*, 1987, 19: 11-15.

[19] YE H F C, YANG R C, BOYLE T B, *et al.* POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis[M]. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada, 1997.

[20] PEAKALL R O D, 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.

[21] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, **28**(10): 2 731-2 739.

[22] BOOY G, HENDRIKS R J J, SMULDERS M J M, *et al.* Genetic diversity and the survival of populations[J]. *Plant Biology*, 2000, **2**(4): 379-395.

[23] 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.

[24] 李 昂, 葛 颂. 植物保护遗传学研究进展[J]. 生物多样性, 2002, **10**(1): 61-71.

LI A, GE S. Advances in plant conservation genetics[J]. *Biodiversity Science*, 2002, **10**(1): 61-71.

[25] RICHTER T S, SOLTIS P S, SOLTIS D E. Genetic variation within and among populations of the narrow endemic, *Delphinium viridescens* (Ranunculaceae) [J]. *American Journal of Botany*, 1994, **81**(8): 1 070-1 076.

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

[27] 王梦亮, 任晓琳, 崔晋龙, 等. 野生红景天的 RAPD 和 ISSR 遗传多样性分析[J]. 中草药, 2016, **47**(3): 469-473.

WANG M L, REN X L, CUI J L, *et al.* Genetic diversity of wild plants in *Rhodiola* L. with two molecular marker methods of RAPD and ISSR[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2016, **47**(3): 469-473.

[28] 周 娜, 李丹丹, 陶伟林, 等. 萝卜种质遗传多样性的 ISSR, RAPD 与 RAMP 分析[J]. 西南农业学报, 2015, **28**(2): 704-712.

ZHOU N, LI D D, TAO W L, *et al.* Genetic diversity analysis in radish (*Raphanus sativus*) germplasm with ISSR, RAPD and RAMP[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2015, **28**(2): 704-712.

[29] GOLKAR P, MOKHTARI N. Molecular diversity assessment of a world collection of safflower genotypes by SRAP and SCoT molecular markers[J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2018, **24**(6): 1 261-1 271.

(编辑:宋亚珍)