

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201401041

赵冰,郑茜子,李厚华. 秦岭山区美容杜鹃五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 XZ, Li HH. Genetic diversity of five wild populations of *Rhododendron calophytum* in Qinling, China by ISSR analysis[J]. Guihaia, 2015, 35(5):761—767

秦岭山区美容杜鹃五个野生种群遗传多样性的 ISSR 分析

赵冰*, 郑茜子, 李厚华

(西北农林科技大学 风景园林艺术学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 美容杜鹃是杜鹃花科杜鹃花属常绿观花植物,也是秦岭地区的特有属,在维持当地生态平衡方面发挥着重要作用,但目前资源正在遭受严重的破坏。该文通过 ISSR 分子标记技术对秦岭地区 5 个美容杜鹃野生种群进行遗传多样性分析,了解美容杜鹃不同种群的遗传分化,从而为美容杜鹃野生种质资源保护策略的制定提供理论依据。用 8 个 ISSR 引物对 5 个天然种群的 90 个单株进行扩增,共扩增出 78 条带(平均每条引物产生 9.75 条带),其中 65 条带是多态的,多态位点占总位点的百分率为 83%。种群总的 Nei's 基因多样性指数为 0.3386,Shannon 信息多态性指数为 0.4972,表明美容杜鹃总的遗传多样性水平较高。种群多态位点百分率为 82.71%~90.25%,Shannon 信息多态性指数为 0.4161~0.5867,Nei's 基因多样性指数为 0.3044~0.4122,表明美容杜鹃不同种群遗传多样性水平差异较大。其中镇安木王种群和柞水牛背梁种群的遗传多样性水平较高。AMOVA 分析表明种群内的遗传变异(91.22%)大于种群间的遗传变异(8.78%)。UPGMA 聚类分析表明 5 个种群的遗传分化程度与地理距离没有相关性。因此建议尽可能地保护美容杜鹃所有的天然种群原生境条件,以最大限度保护其遗传变异。由于镇安和柞水种群具有较高的遗传多样性,因此建议优先对这 2 个种群实施就地保护和迁地保护。

关键词: 美容杜鹃; 种质资源; 遗传多样性; ISSR

中图分类号: Q948.15 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2015)05-0761-07

Genetic diversity of five wild populations of *Rhododendron calophytum* in Qinling, China by ISSR analysis

ZHAO Bing*, ZHENG Xi-Zi, LI Hou-Hua

(College of Landscape Architecture and Arts, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: *Rhododendron calophytum* belonged to Ericaceae family, *Rhododendron* genus. It is an endemic evergreen plant with beautiful flowers, and has high ornamental value and breeding value, which is also beneficial to maintain the stability of the ecosystem in Qinling Mountains. Recently, *R. calophytum* germplasm was endangered due to human being's excessive excavation activities. The genetic diversity of five natural populations of *R. calophytum* in Qinling Mountain was assessed using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. And 78 bands were amplified by 8 informative and reliable primers, of which 65 were polymorphic loci, the percentage of polymorphic bands was 83%. As analyzed by the software POPGENE, the genetic diversity difference among populations was high with PPL of 82.71%—90.25%, Nei's gene diversity 0.3044—0.4122 and Shannon's Information Index 0.4161—0.5867. Analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that among and within population genetic variations accounted for

收稿日期: 2014-12-19 修回日期: 2015-04-26

基金项目: 国家自然科学基金(K305021110); 陕西省自然科学基金(2012JQ3008); 陕西省林业厅项目(陕林计字[2011]70号)。

作者简介: 赵冰(1980-),女,河南驻马店人,博士,讲师,主要从事观赏植物种质资源的教学和科研工作。(E-mail)bingbing2003915@163.com。

*通讯作者

8.78% and 91.22% of the total genetic variation, respectively. UPGMA cluster analysis based on Nei and Li genetic similarity did not form clades corresponding to geographic distance. Therefore, it is suggested that all the original habitat conditions of *R. calophytum* populations should be protected as much as possible in order to protect its genetic variation. In addition, we should take some measures of in-situ and ex-situ conservation to protect *R. calophytum* populations in Zhen'an and Zhashui because these two populations have much higher genetic diversity.

Key words: *Rhododendron calophytum*; germplasm resources; genetic diversity; ISSR

美容杜鹃(*Rhododendron calophytum*)是杜鹃花科杜鹃花属常绿灌木。在秦岭山区森林生态系统中具有非常重要的生态意义,此外美容杜鹃花序硕大,形态变异丰富,花期较早,具有很高的育种价值,成为秦岭地区最具引种价值的野生杜鹃花属种质资源之一。目前,秦岭地区对美容杜鹃资源滥采滥挖的现象比较严重,美容杜鹃的生境遭到破坏,种群数量大量减少,因此急需对美容杜鹃资源进行保护。由于不同物种的遗传结构存在很大的差异,因此只有首先了解物种的群体遗传学信息,才能对该物种采取有效的保护策略。Falk *et al.*(1991)指出在对物种实施保护的过程中,遗传学资料对该物种原位保护地的选择和迁地保护策略的制定具有重要的意义。所以了解物种的遗传多样性水平和群体的遗传结构,可为物种保护策略的制定奠定重要的理论基础。

目前国内对野生美容杜鹃的研究主要集中在组织培养(罗彭等,2007)、化学成分分析(田萍等,2010)与栽培管理(李天兴等,2005;司国臣等,2012)等方面,采用简单重复序列区间扩增多态性(ISSR)分子标记技术对美容杜鹃遗传多样性和遗传分化的研究尚未见报道,而 ISSR 分子标记技术已被开始应用于对杜鹃花属植物的遗传分化分析(金则新等,2006;刘旭颖等,2010;赵芯等,2010;赵凯等,2013)以及其它观赏植物的遗传多样性分析(冯亮亮等,2011;张玉梅等,2012,杨美玲等,2012;汪琼等,2013)。因此本研究通过 ISSR 技术对秦岭地区 5 个美容杜鹃野生种群进行遗传多样性分析,了解美容杜鹃不同种群的遗传分化,从而为美容杜鹃野生种群保护策略的制定奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

在秦岭山区选择 5 个有代表性的美容杜鹃种群。各种群的地理状况和地理分布位置见表 1 和图 1。美容杜鹃的形态变异见图 2。根据种群的大小,

在 5 个种群内随机选择 10~25 株个体植株进行采样,采样时应避免采种株间的亲缘关系较近,一般株间距离在 50 m 以上,海拔相差 5 m 以上。选取幼嫩叶片,装于放有硅胶的自封袋中,尽快带回实验室放在-20 ℃冰箱中保存备用。

表 1 美容杜鹃采样种群的环境因子情况
Table 1 Environment factors of collection populations of samples of *Rhodoendro calophytum*

种群 Population	取样数量 Sample size	海拔 Altitude (m)	经度 Longitude (E)	纬度 Latitude (N)
柞水,牛背梁 Niubeiliang, Zhashui	25	2 299~2 501	108°59′	33°52′
镇安,木王 Muwang, Zhen'an	20	1 700~2 180	108°37′	33°24′
宁陕,平河梁 Pingheliang, Ningshan	18	1 650~1 822	108°29′	33°28′
佛坪,凉风垭 Liangfengya, Fuping	12	2 200~2 218	107°51′	33°41′
周至,黑河 Heihe, Zhouzhi	15	1 920~2 250	107°48′	33°53′

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采用植物基因组 DNA 试剂盒(离心柱型,DP305)提取 DNA,试剂盒由北京天根生化科技有限公司提供。用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测提取的 DNA 质量,只有点样孔无杂质,带型均匀,无拖尾的 DNA 才可以用于下一步的 PCR 扩增;另外用紫外分光光度计(Bio-RAD SmartspecMT3000)检测 DNA 浓度,PCR 使用的 DNA 浓度要稀释标定到 50 ng·μL⁻¹。最后把提取出的符合下一步 PCR 扩增的 DNA 样品储存于-20 ℃冰箱中保存备用。

1.2.2 引物筛选与 PCR 扩增 引物序列根据加拿大哥伦比亚大学 UBC 公司公布的第九套 ISSR 引物序列,所用引物均由沃尔森生物工程技术服务有限公司合成。该实验从 50 个合成引物中筛选出 8 条扩增条带清晰、扩增条带较多的引物用于美容杜鹃 5 个种群 90 个 DNA 样本的分析(表 2)。PCR 扩增反应在德国 Eppendorf 公司生产的 PCR 仪上进行,本研究采用的 Mix 反应体系为 25 μL 反应体系中

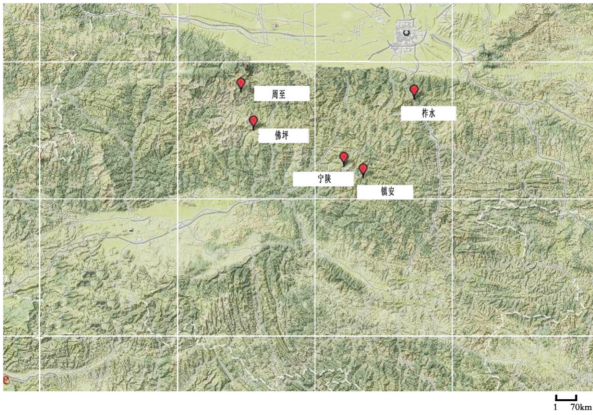


图 1 美容杜鹃样品采集地点示意图
Fig. 1 Collection locations of *Rhododendro calophytum* samples



图 2 美容杜鹃居群内丰富的形态变异
Fig. 2 Abundant flower variations of *Rhododendron calophytum* populations

2 结果与分析

2.1 引物的筛选和 ISSR 扩增片段的多态性

ISSR 分子标记技术用的是通用型引物,由于有些引物并不能对 DNA 样品进行很好的扩增,因此需要对引物进行筛选,只有那些多态性高和稳定性好的引物才能进行全部基因组的扩增。该研究用 50 个引物作为初选引物,从中筛选出了 8 个多态性高、重复性好且分辨能力强的引物(表 2)。

用选出的 8 个引物,分别对 5 个种群 90 个美容

含 1 μL 引物、1 μL DNA、12.5 μL Taq mix、10.5 μL ddH₂O。PCR 扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;然后连续进行 40 个循环(94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s);最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min,扩增产物 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.3 数据处理 采用“0/1”数据记录扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果上谱带的位置。同一分子量标准有带记为 1,无带记为 0,形成 0/1 矩阵。采用 POP-GENE 1.31(Yeh *et al.*,1999)计算各种群的遗传多样性参数。采用 AMOVA 1.55 软件进行分子方差分析。采用 NTSYS-pc2.1 (Rohlf,2000)软件对美容杜鹃种群进行非加权算术平均聚类分析。

杜鹃个体进行扩增,获得 78 条带(平均每条引物产生 9.75 条带),其中 65 条带是多态的,多态位点百分率为 83%(表 2)。从图 3 可以看出,不同引物所获得的电泳图谱带型丰富,片段大小有差异,片段数从 9~12 不等。

2.2 种群遗传多样性水平和遗传分化程度分析

多态位点百分率(PPL)、有效等位基因数(*ne*)、Shannon 信息指数(*I*)和 Nei's 基因多样性指数(*h*)是评价某一物种遗传多样性水平高低的重要指标。从表 3 可以看出,美容杜鹃 5 个种群多态位点百分率有很大的差异,其中镇安木王美容杜鹃种

表 2 对美容杜鹃 5 个种群 90 个个体进行扩增的 ISSR 引物
Table 2 ISSR primers used for generating ISSR markers from 90 individuals of five *Rhododendron calophytum* populations

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence	统计位 点数 No. of scored band	多态位 点数 No. of polymorphic band	多态位 点比率 Proportion of polymorphic loci (P, %)
811	(GA) ₈ C	12	10	83
815	(CT) ₈ G	8	7	88
835	(AG) ₈ YC	11	9	82
836	(AG) ₈ YA	9	7	78
841	(GA) ₈ YC	10	8	80
843	(CT) ₈ RA	9	8	89
844	(CT) ₈ RC	10	7	70
845	(CT) ₈ RG	9	9	100
		78	65	83

R = (A, G)

群的多态位点百分率为 90.25%，是 5 个种群中最高的；佛坪凉风垭美容杜鹃种群的多态位点百分率为 82.71%，是 5 个种群中最低的。5 个种群的多态位点百分率按从高到低的排序依次为镇安木王种群>柞水牛背梁种群>周至黑河种群>宁陕平河梁种群>佛坪凉风垭种群。5 个种群的 Nei 基因多样性指数(h)和 Shannon 信息指数(I)所揭示的美容杜鹃遗传变异规律基本一致，均是镇安木王种群最高($h = 0.412\ 2, I = 0.586\ 7$)，佛坪凉风垭种群最低($h = 0.304\ 4, I = 0.416\ 1$)。

对美容杜鹃种级水平的 ISSR 检测表明，多态带百分率占 89.06%，Shannon 信息指数为 0.520 2，Nei's 基因多样性指数为 0.360 9。在美容杜鹃种群水平上，上述指标要低得多， PPL 、 I 和 h 的分别为 86.77%，0.497 2 和 0.338 6(表 3)。说明对于美容杜鹃这个物种而言，其遗传多样性主要存在于种群内部。

对美容杜鹃 5 个种群进行分子变异方差分析(表 4)，结果表明，在秦岭 5 个美容杜鹃野生种群间存在一定程度的遗传分化。在美容杜鹃总的遗传变异中，种群内的变异是 91.22%，种群间的变异是 8.78%，说明美容杜鹃的主要变异来自于种群内。该结论与 Shannon 信息指数和 Nei's 基因多样性指数所揭示的结果是一致的。

2.3 种群间遗传分化的聚类分析

利用 POPGEN 软件计算 Nei's 遗传距离，再根据遗传距离建立美容杜鹃遗传关系聚类树状图。由图 4 可以看出，地理距离相距较远的佛坪种群和镇安种群首先聚在一起，表明这两个种群的遗传距离

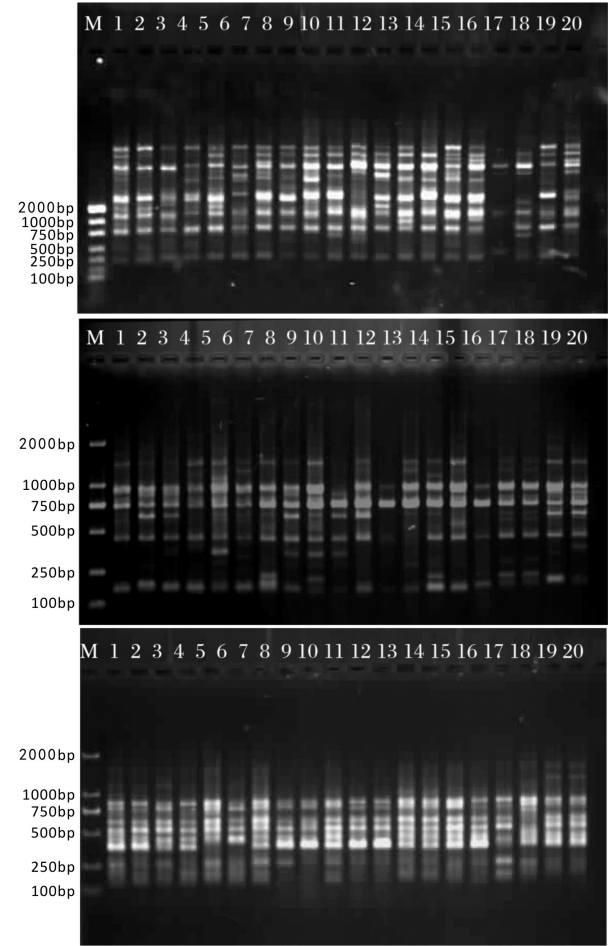


图 3 3 个引物对镇安木王地区美容杜鹃样品的 ISSR 扩增谱带 1-20. 美容杜鹃单株; A-C. 引物 811、835 和 841。
Fig. 3 AFLP fingerprinting patterns of *Rhododendron calophytum* samples in Muwang, Zhenan using three primers 1-20. *Rhododendron calophytum* plant; A-C. Primer 811, 835 and 841.

最近；镇安种群和宁陕种群的地理距离较近，但在聚类图上并没有首先聚在一起，说明 2 个种群的遗传距离较远，说明美容杜鹃种群间的遗传距离与种群间的地理距离不相关，该结论与秀雅杜鹃的研究结论一致(赵冰等，2012)。

3 讨论与结论

3.1 美容杜鹃种质资源的遗传多样性和遗传分化

遗传多样性是物种长期进化的结果，是种群生存和发展的前提。在评价种群遗传多样性的参数中，多态位点百分率、Nei 基因多样性指数和 Shannon 信息指数是衡量种群遗传多样性的主要指标。该研究利用 ISSR 技术分析表明，5 个美容杜鹃

表 3 美容杜鹃 5 个种群的遗传多样性水平

Table 3 Genetic diversity among five *Rhododendron calophytum* populations in Qinling

种群 Population	观测等位基因数 <i>na</i>	有效等位基因数 <i>ne</i>	Nei's(1973)基因 多样性 <i>h</i>	Shannon 信息 指数 <i>I</i>	多态位点百分率 <i>PPL</i> (%)
柞水,牛背梁 Niubeiliang,Zhashui	1.900 2	1.753 3	0.336 4	0.542 8	88.64
镇安,木王 Muwang,Zhen'an	1.956 4	1.825 0	0.412 2	0.586 7	90.25
宁陕,平河梁 Pingheliang,Ningshan	1.825 4	1.700 9	0.319 1	0.447 0	85.04
佛坪,凉风垭 Liangfengya,Fuping	1.796 3	1.633 4	0.304 4	0.416 1	82.71
周至,黑河 Heihe,Zhouzhi	1.871 8	1.748 0	0.320 9	0.493 5	87.22
种群水平 Population level	1.870 0	1.732 0	0.338 6	0.497 2	86.77
物种水平 Species level	1.920 1	1.804 7	0.360 9	0.520 2	89.06

Note: *na* = Observed number of alleles; *ne* = Effective number of alleles (1964); *h* = Nei's (1973) gene diversity; *I* = Shannon's Information index (1972); *PPL* = Percentage of polymorphic loci.

表 4 美容杜鹃种群分子变异的方差分析

Table 4 Variance analysis of molecular variance(AMOVA) of *Rhododendron calophytum* populations

变异来源 Source of variation	自由度 df	平方和 SS	均方 MS	方差分量 Variance component	方差分量百分率 (%) Percentage of variance component	显著性检测 <i>P</i> -value
种群间 Among populations	4	2.176 3	0.544 1	0.052 2	8.78	<0.001
种群内 Within population	89	9.452 5	0.106 2	0.287 7	91.22	

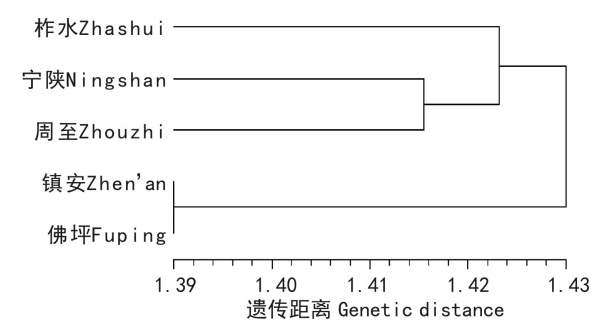


图 4 美容杜鹃 5 个种群间的 N ei 遗传距离聚类分析图

Fig. 4 Dendrogram of five *Rhododendron calophytum* populations based on Nei's genetic distance

种群的各遗传多样性参数的变化趋势一致,均是镇安木王种群最大,佛坪凉风垭种群最小。由于镇安木王美容杜鹃的分布面积远远大于佛坪凉风垭,因此推测这可能与种群的地理分布范围的大小有关。一个物种的地理分布区域较小时,近交频繁,从而使该物种遗传多样性水平偏低。如宁陕和佛坪的美容杜鹃分布面积小,单株数量少,故遗传多样性水平偏低。而对于地理分布区域比较大的种群,无论是昆虫传粉还是风媒传粉都比较困难,基因交流受阻碍,种群内产生分化,使其遗传多样性水平偏高。如镇安美容杜鹃的分布面积最大,所以其具有较高的遗传多样性水平。

本研究中,5 个美容杜鹃种群的总多态位点百

分率为 86.77%,Shannon 信息指数为 0.497 2,Nei's 基因多样性指数为 0.338 6,与同科不同属的其它植物如云锦杜鹃(金则新等,2006)(*PPL* 为 88.24%、*I* 为 0.431 7、*h* 为 0.284 8)的遗传多样性水平较接近,但远远高于鹿角杜鹃(赵芯等,2010)(*PPL* 为 64.35%、*I* 为 0.464 0、*h* 为 0.309 9)的遗传多样性,说明美容杜鹃种群具有较高的遗传多样性水平。美容杜鹃种群具有较高的遗传多样性与其本身生物学特性有关。Hamrick *et al.*(1981)指出,遗传变异比较高的植物多为寿命长、地理分布广和结实性高的物种。美容杜鹃是秦岭山区为数不多的广布种,寿命比较长,结实率很高,在林下常有大量的幼苗出现,所以表现出较高的遗传多样性。

不同物种在种群内和种群间的遗传分化差异很大。AMOVA 分子变异分析显示,美容杜鹃的遗传变异 8.78%存在于居群间,说明种群间已产生较大程度的分化。种群间遗传分化的产生主要与种群间的基因交流受到限制有关。居群间遗传分化的产生主要与居群间的基因交流受到限制有关。基因流是促使群体遗传分化的主要因素之一,在植物中,花粉、种子的扩散和传播是基因流的两种主要形式(李建辉等,2007)。调查中发现,美容杜鹃生长海拔较高,花期较早,主要集中在 3 月份,此时可供传粉的昆虫的种类和数量有限,因此多依靠风媒传粉,而由于 5 个居群间的空间距离较远,使花粉的传播受到

了很大的阻碍,限制了种内居群间的随机交配,使得基因交流变得困难,近交程度加深,因此导致种群间遗传分化的出现(Weller *et al.*, 1996)。因此,美容杜鹃由于种群隔离而产生的基因流受阻是种群间遗传分化的重要原因。

POPGENE 分析表明,美容杜鹃物种水平的多态位点百分率和 Shannon 信息指数均高于种群水平,表明美容杜鹃遗传多样性主要存在于种群内部。AMOVA 分析也表明美容杜鹃种群内的遗传变异大于种群间。Chappell *et al.* (2007) 研究发现美国 7 种落叶杜鹃花的遗传变异也主要发生在种群内。因此,从园林植物育种的观点考虑,从同一种群内部选择单株进行杂交可能会比从不同地理区域选择单株杂交得到更高的等位基因多样性。

UPGMA 聚类结果表明美容杜鹃 5 个种群间的遗传分化与它们间的地理距离不相关。而一些物种如珙桐(张玉梅等, 2012)和长叶榧(李建辉, 2006)的研究表明它们种群间的遗传分化和地理距离有一定的相关性。

3.2 美容杜鹃种质资源的保护和利用

遗传多样性是物种适应外界环境变化的进化潜力基础,遗传多样性丢失将大大降低个体的适应度和物种对环境变化的适应能力(Frankham *et al.*, 2002)。美容杜鹃物种和种群都维持较高水平遗传多样性,种群间产生较大遗传分化,表明美容杜鹃物种具有较大的进化潜力。

人类活动所导致的生境恶化甚至丧失,使原来高水平遗传多样性的大种群隔离为若干个范围狭小的小种群;小种群会导致遗传漂移,这是其它许多濒危物种的致濒因素(Eriksson *et al.*, 1995)。由于物种在生境遭到破坏和片段化后,种群间的基因交流受到阻碍而引起种群的分化,进而失去进化的潜力。据此,建议尽可能地保护美容杜鹃所有的天然种群原生境条件,禁止滥砍滥挖,以保护尽可能多的遗传变异。美容杜鹃变异丰富,观赏价值较高,抗寒抗旱性强,具有重要的育种价值。因此保护好美容杜鹃野生种质资源,对于改良现有杜鹃花的观赏特性和抗逆能力从而进行杜鹃花新品种的选育具有重要的意义。本研究的结果表明镇安和柞水美容杜鹃种群的遗传多样性水平较高,因此建议优先就地保护,同时也要采取移栽小植株、扦插或者播种的方法对其进行一定的迁地保护。建议在迁地保护时,应当从所有种群采集样本,创造种群间植株迁移、种

子和幼苗交换的条件,尽可能多地保存该物种的遗传资源。

参考文献:

- Chappell M, Robacker C, Jenkins T. 2007. Assessing the genetic diversity of seven *Rhododendron* spp. section pentanthera native to the eastern united states[J]. *Hortic Sci*, **42**(4): 970—970
- Eriksson G, Namkoong G, Robert J. 1995. Dynamic conservation of forest tree gene resources[J]. *For Genet Resour*, **23**(1): 2—5
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2002. Introduction to Conservation Genetics[M]. Cambridge: Cambridge University Press; 2—9, 96—112
- Falk DA, Holsinger KE. 1991. Genetics and Conservation of Rare plants[M]. New York: Oxford University Press
- Feng LL(冯亮亮), Tang H(唐红), Li Y(李毅), *et al.* 2011. Analysis of genetic diversity in *Reaumuria soongorica* populations in Gansu using ISSR markers(甘肃红砂不同种群遗传多样性的 ISSR 分析)[J]. *Acta Pratac Sin*(草业学报), **20**(1): 125—130
- Hamrick JL, Mitton JB, Linhart YB. 1981. Levels of genetic variation in tree influence of life history characteristics[C]// US Department of Agnculture. Isozymes of north American forest trees and forest insects. Berkeley: Genetic Technology Republic: 3 511
- Jin ZX(金则新), Li JM(李钧敏), Gu QP(顾奇萍). 2006. Genetic diversity in the natural popula tions of *Rhododendron fortune* revealed by ISSR molecular markers(云锦杜鹃自然居群遗传多样性的 ISSR 分析)[J]. *Acta Hortic Sin*(园艺学报), **33**(6): 1 263—1 267
- Lei MD(雷明德). 1999. The Vegetation of Shanxi(陕西植被)[M]. Beijing(北京): Science Press(科学出版社)
- Li TX(李天兴), Zhang C(张超). 2005. A preliminary study of cultivating technology of *Rhododendron calophytum*(美容杜鹃栽培技术初步研究)[J]. *J Sichuan For & Technol*(四川林业科技), **26**(1): 62—64
- Luo P(罗彭), Zhuang P(庄平), Bai J(白洁). 2007. Tissue culture of *Rhododendron decorum* Franch., *Rhododendron calophytum* Franch. and *Rhododendron discolor* Franch(大白杜鹃、美容杜鹃和喇叭杜鹃的组织培养)[J]. *Plant Physiol Comm*(植物生理学通讯), (2): 326—326
- Li JH(李建辉), Jin ZX(金则新), Li JM(李钧敏). 2007. Genetic diversity of endangered plant *Torreya jackii*: a study of RAPD markers(濒危植物长叶榧群体遗传多样性的 RAPD 分析)[J]. *Chin J Appl Ecol*(应用生态学报), **18**(12): 2 661—2 667
- Liu XY(刘旭颖), Shen XQ(沈向群), Zhang YH(张艳红). 2010. Genetic relationship of nine hardy *Rhododendrons* by ISSR marker(9 种耐寒杜鹃花亲缘关系 ISSR 分析)[J]. *Acta Agric Boreal-Occident Sin*(西北农业学报), **19**(7): 89—92
- Rohlf FJ. 2000. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Ver. 2.1 [M]. New York: Exeter Software, Setauket
- Si GC(司国臣), Zhang YL(张延龙), Gu X(顾欣), *et al.* 2012. Study on cutting propagation technology of Qinling wild *Rhododendron calophytum*(秦岭野生美容杜鹃扦插繁殖技术)[J]. *Northern Hortic*(北方园艺), **3**: 77—79
- Tian P(田萍), Fu XL(付先龙), Zhuang P(庄平), *et al.*

2010. The GC-MS analysis of flower essential oils of *Rhododendron calophyturn* (美容杜鹃花挥发油化学成分 GC-MS 分析) [J]. *Chin J Appl & Environ Biol* (应用与环境生物学报), **5**: 734—737
- Wang Q (汪琼), Yao QJ (姚青菊), Xu ZL (徐增莱), *et al.* 2013. Genetic diversity of four populations of *Calycanthus chinensis* based on ISSR and RAPD markers (基于 ISSR 和 RAPD 标记的 4 个夏蜡梅种群的遗传多样性研究) [J]. *Guihaia* (广西植物), **33**(1): 30—34
- Weller SG, Sakai AK, Straub C. 1996. Allozyme diversity and identity in *Schiedea* and *Alsinidendron* (Caryophyllaceae: Alsinoideae) in the Hawaiian Islands [J]. *Evolution*, **50**(1): 23—34
- Yang ML (杨美玲), Tang H (唐红). 2012. Genetic diversity of *Paeonia rockii* revealed by ISSRs (紫斑牡丹遗传多样性的 ISSR 分析) [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), **32**(4): 693—697
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T. 1999. POPGENE (Ver. 1. 31): Microsoft window-bases freeware for population genetic analysis [D]. University of Alberta and the Centre for International Forestry Research
- Zhao X (赵芯), Jin ZX (金则新), Li JH (李建辉), *et al.* 2010. Genetic diversity of *Rhododendron latoucheae* using ISSR markers (鹿角杜鹃遗传多样性的 ISSR 分析) [J]. *Jiangsu Agric Sci* (江苏农业科学), (3): 34—36
- Zhao K (赵凯), Wang DY (王德元), Zhang WJ (张文娟), *et al.* 2013. Genetic diversity of *Rhododendron shanii* based on ISSR analysis (都支杜鹃遗传多样性的 ISSR 分析) [J]. *Plant Divers & Resour* (植物分类与资源学报), **35**(5): 578—584
- Zhang YM (张玉梅), Xu GB (徐刚标), Shen XB (申响保), *et al.* 2012. Genetic diversity of *Davidia involucrata* populations detected by using ISSR markers (珙桐天然种群遗传多样性的 ISSR 标记分析) [J]. *Sci Silv Sin* (林业科学), **48**(8): 62—67

(上接第 732 页 Continue from page 732)

- 25** (2): 383—385
- Douglas CJ, Lee D. 1996. Two divergent members of a tobacco 4-coumarate: Coenzyme A ligase (4CL) gene family cDNA structure, gene inheritance and expression, and properties of recombinant proteins [J]. *Plant Physiol*, **112**(1): 193—205
- Feskens EJM, Hertog MGL, Kromhout D, *et al.* 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study [J]. *Lancet*, **342** (8 878): 1 007—1 011
- Fulda M, Heinz E, Wolter FP, *et al.* 1994. The fadD gene of *Escherichia coli* K12 is located close to rmd at 39. 6 min of the chromosomal map and is a new member of the AMP-binding protein family [J]. *Mol Gen Genet*, **242**(3): 241—249
- Gershenzon J, Pichersky E. 2002. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense [J]. *Curr Opin Plant Biol*, **5**(3): 237—243
- Gulick AM. 2009. Conformational dynamics in the Acyl-CoA synthetases, adenylation domains of non-ribosomal peptide synthetases, and firefly luciferase [J]. *ACS Chem Biol*, **4**(10): 811—827
- Hirose T, Kitabayashi H, Ujihara A, *et al.* 1995. On the genotypic differences for rutin content in tatar buckwheat, *Fagopyrum tataricum* Gaertn [J]. *Breed Sci*, **45**(2): 189—194
- Hu WJ, Kawaoka A, Tsai C, *et al.* 1998. Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate:CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**(9): 5 407—5 412
- Kajita S, Katayama Y, Omori S, *et al.* 1996. Alterations in the biosynthesis of lignin in transgenic plants with chimeric genes for 4-coumarate: Coenzyme A ligase [J]. *Plant Cell Physiol*, **37**(7): 957—965
- Treutter D. 2005. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis [J]. *Plant Biol*, **7**(6): 581—591
- Wang AH (王安虎), Xia MZ (夏明忠), Cai GZ (蔡光泽), *et al.* 2008. The origin of cultivating buckwheat and the genetic analysis of the kindred species (栽培苦荞麦的起源及其近缘种亲缘分析) [J]. *Southwest Chin J Agric Sci* (西南农业学报), **21**(2): 38—40
- Wang XQ, Wei XX. 2004. Evolution of 4-coumarate: coenzyme A ligase (4CL) gene and divergence of *Larix* (Pinaceae) [J]. *Mol Phylogenet Evol*, **31**(2): 542—553
- Zhao ZC (赵佐成), Zhou MD (周明德), Luo DZ (罗定泽), *et al.* 1998. Ethnobotanical investigation of in-situ conservation of tartary buckwheat in China (中国苦荞麦原生境保存可行性的民族植物学调查) [J]. *Chin J Appl & Environ Biol* (应用环境生物学报), **4**(4): 320—327