

利用 AFLP 分子标记探讨蜡梅种质资源的遗传多样性

赵 冰 ,张启翔*

(北京林业大学园林学院 国家花卉工程技术研究中心,北京 100083)

摘要 利用 AFLP 分子标记技术,对中国蜡梅种质资源 7 个野生种群的遗传多样性进行了研究。利用筛选出的 3 对引物,共扩增出 253 条谱带,其中 218 条多态带,多态位点占 86.17%。种群间的基因分化系数为 0.2906,说明蜡梅基因多样性主要存在于种群内,种群总的 Nei's 基因多样性指数为 0.2933,Shannon 信息多态性指数为 0.4487。蜡梅总的遗传多样性水平较高。蜡梅不同种群遗传多样性水平差异较大,种群多态位点百分率在 65.44%~87.16% 之间,Nei's 基因多样性指数为 0.1653~0.4012,Shannon 信息多态性指数为 0.3132~0.5603。神农架种群(SN)和保康种群(BK)的遗传多样性水平较高。用 NTSYS2.01 版软件对样品进行 UPGMA 聚类分析,结果 7 个种群并没有按地理距离进行聚类。最后提出要对各蜡梅野生群体采取相应的迁地和就地保护措施。

关键词 蜡梅 种质资源 遗传多样性 AFLP 标记

文章编号:1000-0933(2007)11-4452-08 中图分类号:Q948 文献标识码:A

Genetic diversity of germplasm resources of *Chimonanthus praecox* (L.) Link based on AFLP marker

ZHAO Bing ZHANG Qi-Xiang*

School of Landscape Architecture, Beijing Forestry University the Flower Engineering and Technological Research Center of China, Beijing 100083, China
Acta Ecologica Sinica 2007 27 (11) 4452 ~ 4459.

Abstract: Levels of genetic diversity within and among seven wild populations of *Chimonanthus praecox* were analyzed using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. 253 bands were amplified by three informative and reliable primers screened, of which 218 (86.17%) were polymorphic. Genetic differentiation coefficient among populations was 0.2906, which indicated genetic differentiation mainly occurred within populations. The level of genetic diversity of *Ch. praecox* was relatively high in terms of Nei's gene diversity index (0.2933) and Shannon's information index (0.4487). Genetic diversity difference among populations was relatively high based on the percentage of polymorphic loci (PPL) ranged from 65.44% to 87.16%, Nei's gene diversity index ranged from 0.1653 to 0.4012, and Shannon's information index ranged from 0.3132 to 0.5603. The genetic diversity levels of population Shennongjia (SN) and Baokang (BK) were higher than other populations investigated. UPGMA cluster analysis was performed based on Nei and Li genetic similarity with soft NTSYS2.01, however, the clades formed including seven populations differed from cluster by geographic distance. Finally ex situ and in situ conservation of wild *Ch. Praecox* populations were suggested.

基金项目 国家“十五”攻关资助项目(2004BA525B11)

收稿日期 2007-04-09;修订日期 2007-09-06

作者简介 赵冰(1980~),女,河南漯河人,博士生,主要从事观赏植物种质资源研究。E-mail:bingbing2003915@163.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail:zqx@bjfu.edu.cn

致谢 感谢中国科学院植物研究所王亮生研究员对本文写作的帮助。

Foundation item The project was financially supported by Fifteen Tackle Key Problem Foundation of China (No. 2004BA525B11)

Received date 2007-04-09; **Accepted date** 2007-09-06

Biography ZHAO Bing, Ph. D., mainly engaged in germplasm resources of ornamental plants. E-mail:bingbing2003915@163.com

Key Words : *Chimonanthus praecox* ;germplasm resources ;genetic diversity ;AFLP marker

蜡梅科的种类很少,在植物界只是一个古老的小家族,其下包括美国蜡梅属 (*Calycanthus*),夏蜡梅属 (*Sinocalycanthus*)和蜡梅属 (*Chimonanthus*),而蜡梅属系蜡梅科中的主要者,其全部之种均原产中国,蜡梅 (*Chimonanthus praecox* (L.) Link)则指蜡梅科蜡梅属下的一种落叶乔灌木植物,在我国已有 1000 多年的栽培历史,是我国特产的传统名花和特用经济林树种,现已广泛应用于我国的园林绿化中。由于该植物是第四纪冰川末期波及而幸存的子遗植物,因此在研究植物区系分布方面也有一定的价值。中国蜡梅属植物主要分布于我国的 13 个省,其水平分布很广,但由于人为的原因,导致野生资源遭受严重破坏,原天然分布区已十分狭窄,野生蜡梅资源数量急剧减少,同时其品种资源也正遭受严重的流失。因此,尽快对其加强保护使其能可持续利用已成为急需解决的问题。

综合各种文献可以看出,目前国内外对蜡梅的研究主要集中在蜡梅科植物的归属、生物学特性、野生群落的结构及分布的调查、种属一级的分类、繁殖栽培及其应用、盆景和切花保鲜等方面,并且都取得了一定的成果^[1,2]。而对蜡梅种内遗传变异的研究则很少,采用 AFLP 分子标记技术对蜡梅种质资源的遗传多样性和种群遗传结构进行的研究目前尚无报道。目前很多学者利用 AFLP 分子标记的手段来探讨植物的遗传多样性,如蒙古栎^[3]、紫茎泽兰^[4]等,因此本研究在全面调查蜡梅种质资源分布区域的基础上,也采用 AFLP 分子标记技术来研究并揭示中国蜡梅种质资源在种群内和种群间的遗传变异规律,其主要目的是探讨其种群遗传多样性水平和遗传结构,为科学合理地保护和利用现有的中国蜡梅种质资源提供理论依据和技术支持,同时为构建中国蜡梅种质资源的核心种质打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料的采集

在蜡梅自然分布区内选择有代表性的 7 个种群,基本包括了该树种的整个分布区,且能反映出分布区的特点。各采样种群的相对位置见图 1,地理生态因子状况见表 1。在选定的种群内随机选择 30 株个体采样,株间距离在 30m 以上,海拔上至少相差 5m,以避免采种株间的亲缘关系。取其幼嫩或成熟叶片放于 5 倍于其体积的硅胶中,干燥后室温保存备用。

表 1 蜡梅采样种群原产地的地理、生态因子及分布情况

Table 1 Geographical and ecological factors and distribution scales of collection locations of samples of wintersweet

种群编号 Population number	种群名称 Population name	北纬 Latitude	东经 Longitude	海拔 Altitude (m)	年均温 Mean anaaual temperature ($^{\circ}\text{C}$)	年降水量 annual precipitation (mm)
LA	浙江临安	119 $^{\circ}$ 37'	30 $^{\circ}$ 08'	211 ~ 311 (282)	15.8	1426.4
BK	湖北保康	111 $^{\circ}$ 15'	32 $^{\circ}$ 00'	208 ~ 436 (252)	16.8	1131.9
YC	湖北宜昌	111 $^{\circ}$ 03'	30 $^{\circ}$ 39'	112 ~ 561 (262)	16.8	1164
SN	湖北神农架	111 $^{\circ}$ 49' ~ 111 $^{\circ}$ 50'	31 $^{\circ}$ 44' ~ 31 $^{\circ}$ 45'	572 ~ 761 (680)	12.2	933.7
JS	湖南吉首	99 $^{\circ}$ 34'	28 $^{\circ}$ 20'	456 ~ 465 (461)	16 ~ 17	1200 ~ 1600
HX	贵州花溪	116 $^{\circ}$ 39'	26 $^{\circ}$ 26'	985 ~ 1176 (1111)	13.5	1190
WX	重庆巫溪	99 $^{\circ}$ 36' ~ 99 $^{\circ}$ 37'	31 $^{\circ}$ 39'	814 ~ 909 (865)	14.8	950

1.2 基因组 DNA 的提取

采用改良的 CTAB 法^[5]提取基因组 DNA。

1.3 AFLP 实验

AFLP 试验引物的选择和体系的筛选方法详见《蜡梅 AFLP 分子标记技术体系的建立》一文^[6]

1.3.1 酶切与连接

本实验参照 Vos 等^[7]的方法略有修改,首先采用 NEB (New England BioLabs)公司提供的两种限制性内切

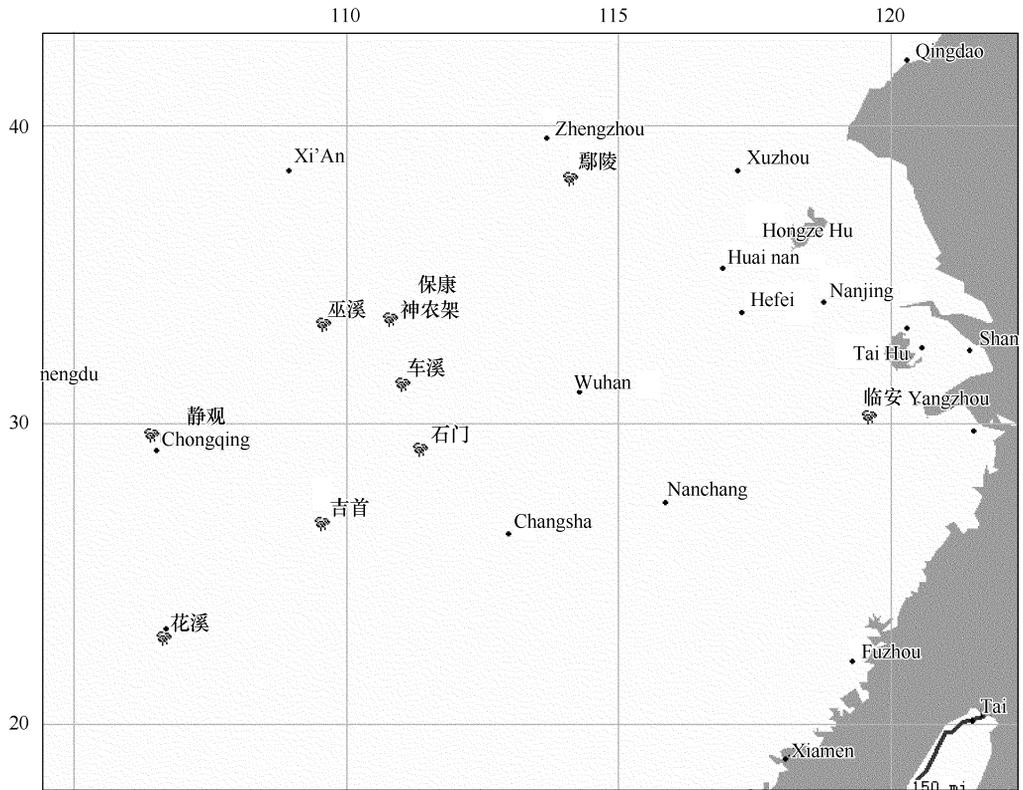


图1 蜡梅样品采集地点示意图

Fig. 1 Collection locations of samples of Wintersweet

酶 MseI 和 EcoRI 对基因组总 DNA 进行双酶切, 然后用 T4DNA 连接酶, 将 MseI 和 EcoRI 接头与酶切片断连接起来。酶切连接一步完成, 在 PCR 仪上 37℃ 反应 3h。构建成预扩增模板 DNA,

1.3.2 PCR 扩增

连接产物用预扩增引物进行预扩增, 预扩增的反应体系为 20 μ l 体系中含有酶切连接后模板 5.0 μ l, 50 ng/ μ l Eco-primer 0.6 μ l, 50 ng/ μ l Mse-primer 0.6 μ l, 10 mmol/l dNTPs 0.4 μ l, Mg^{2+} (25mmol/l) 1.2 μ l, 10 \times PCR buffer 2.0 μ l, 5units μ l Taq-polymerase 0.2 μ l。预扩增 PCR 反应程序 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 60 s, 共 24 个循环。取 10 μ l 预扩增产物, 用 0.1 \times TE 溶液稀释 10 倍, 置于 -20℃ 冰箱内保存, 作为下一步选择性扩增反应应用工作液。

预扩增产物稀释 10 倍后, 进行选择性的扩增。从 164 对引物中筛选出十对带型分布均匀、多态性高且分辨能力强的引物, 分别为: M23E46, M24E46, M25E46, M23E47, M24E47, M41E47, M41E94, M64E94, M64E66 和 M24E75, 进行正式选择性扩增。本实验所需接头和引物均由北京三博生物技术有限公司合成。

选择性扩增反应 20 μ l 体系中含有预扩 10 倍稀释后模板 5.0 μ l, Mse-primer (50ng/ μ l) 1.0 μ l, Eco-primer (50ng/ μ l) 1.0 μ l, 10 mmol/L dNTPs 0.4 μ l, Mg^{2+} (25mmol/L) 1.2 μ l, 10 \times PCR buffer 2.0 μ l, 5units μ l Taq-polymerase 0.2 μ l。选择性扩增 PCR 反应程序 94℃ 变性 30 s; 65~56℃ 退火 30 s, 每个循环降低 0.7℃; 72℃ 延伸 60 s, 共 12 个循环。然后 94℃ 变性 30 s; 56℃ 退火 30 s; 72℃ 延伸 60 s, 共 24 个循环。所有 PCR 扩增反应均在北京北方华粤行贸易有限责任公司生产的 Biometra T1/T1⁺ PCR 仪上进行。

1.3.3 PCR 产物检测

PCR 反应结束后在 20 μ l 反应体系中加入 5 μ l 加样缓冲液, 95℃ 8 分钟后迅速将 PCR 管放冰上进行变性, 然后置于 -20℃ 冰箱用于电泳检测。本实验采用聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染的方法进行检测。银染后的板晾干后在 X 线胶片观察灯下观察数带。所使用的电泳仪为北京六一仪器厂生产的 DXY-12 型电脑三恒多用

电泳仪,电泳槽为北京六一仪器厂生产的高压电泳槽。

1.4 数据分析

对扩增产物的电泳结果采用“0~1”系统记录谱带位置,观察电泳图谱中同一位置上 DNA 带的有无,有记为 1,无记为零,形成 0/1 矩阵图输入计算机。应用 POPGENE1.31^[8]软件在假定种群处于 Hardy-Weinberg 平衡状态下,对全部种群和各个种群 1987)计算以下遗传多样性各参数:多态带数 (AP)、多态位点百分率 (PPL)、观测等位基因数 (na)、有效等位基因数 (ne)、Nei's (1973)基因多样性指数 (H)、Shannon 信息指数 (I)、Nei's (1973)遗传距离 (D)和遗传一致度 (I')根据 Nei's 遗传距离,利用 NTSYS-pc 2.1^[9]软件对种群进行非加权算术平均聚类分析。并应用 Nei (1973)基因多度法计算遗传分化度即种群间的遗传分化系数 (Gst),其关系式为 $Gst = Dst/H_t$,其中 H_t 为种群总基因多样性、 H_s 为种群内基因多样性。用 AMOVA version 1.55^[10]软件进行分子方差分析,计算反映种群遗传结构及变化的平方和、均方、方差分量以及遗传距离 ϕ_{ST} 。

2 结果

2.1 AFLP 扩增片段的多态性

从选择出的 10 对分辨能力强,多态位点高的引物中选出 3 对,分别对 7 个种群 210 个个体进行扩增,共获得 253 条带(平均每条引物产生 84.33 条带),其中 218 条带是多态的,多态位点百分率为 86.17% (图 2 表 2)。

表 2 10 对 AFLP 选择性扩增引物产生的条带多态性

Table 2 Polymorphism of AFLP bands obtained by selective amplification based on the ten primers pairs

引物序号 Primer code	选择碱基 Selective nucl.	扩增位点 Amplification locus	多态性位点 Polymorphism locus	多态性位点比例 (%) Polymorphism locus proportion
24~46	TC-CAA	87	74	85.3
41~94	AGG-TTT	82	69	83.7
23~47	TA-CAA	84	75	89.5
平均 Average		84.33	72.67	86.17

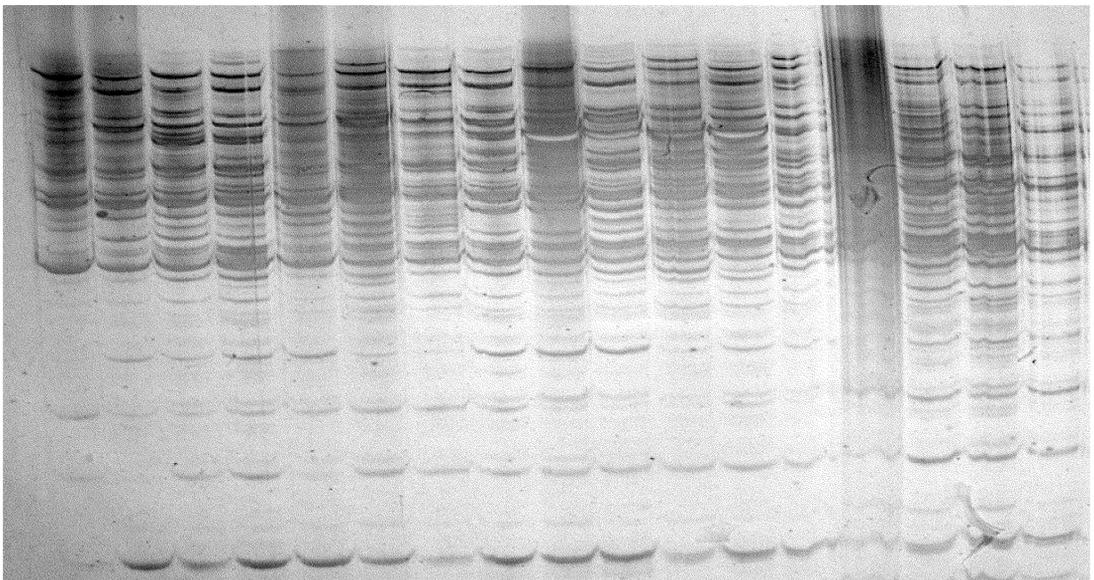


图 2 供试样品的 AFLP 扩增谱带 (M-TA/E-CAA)

Fig. 2 AFLP fingerprinting patterns of samples using primer combination M-TA/E-CAA

2.2 种群遗传多样性水平和遗传分化程度分析

有效等位基因数 (ne)、Shannon 信息指数 (I)、多态位点百分率 (P)是度量遗传多样性水平的常用指标。

从表 3 可以看出,在 7 个蜡梅种群中,神农架种群的 P 最高,吉首种群的 P 最低,7 个种群所检测的多态位点的丰富程度按照从大到小的排序依次为:神农架种群 > 保康种群 > 宜昌种群 > 花溪种群 > 巫溪种群 > 临安种群 > 吉首种群。7 个种群的 Shannon 信息指数 (I) 和 Nei 基因多样性指数 (H) 揭示的种群间遗传变异规律一致,均是神农架种群最高,吉首种群最低。

蜡梅种级水平的 Shannon 信息指数 I 为 0.6325,种群内的平均为 0.4487,则种群间遗传多样性和种群内的遗传多样性分别占总遗传多样性的 28.85% 和 71.15%,种群内遗传多样性大于种群间遗传多样性。蜡梅种级水平 H_i 为 0.4122,种群内平均 H_s 为 0.2933,种群间的遗传分化指数 G_{ST} 为 0.2906,即种群间的遗传变异占总变异的 29.06%。由此可见,Nei 基因多样性指数和 Shannon 信息指数的 AFLP 统计结果,都显示出蜡梅遗传多样性主要存在于种群内。

对蜡梅种级水平的 AFLP 检测表明,观测等位基因数 (n_a) 为 1.8831,多态带百分率 (PPL) 占 92.03%,Shannon 信息指数 (I) 为 0.6325。在蜡梅种群水平上,上述指标要低得多, n_a 、 PPL 、 I 的范围分别为:1.6544 ~ 1.8716,65.44% ~ 87.16%,0.3132 ~ 0.5603 (表 3)。

种群遗传变异的 AMOVA 分析表明,种群间差异极显著 ($P < 0.001$)。研究种群的遗传多样性主要分布在种群内,占变化成分的 83.59%,而只有 16.41% 分布在不同种群间 (表 4)。此结果与用 Nei 基因多样性指数和 Shannon 信息指数进行分析的结果是一致的。

表 3 蜡梅各种群的遗传多样性水平

Table 3 Genetic diversity among populations of *Chimonanthus praecox*

种群 Population	样本 大小 N	多态带数 AP	多态带 百分率 $PPL\%$	观测等位 基因数 n_a	有效等位 基因数 n_e	Nei's (1973) 基因多样性 H	Shannon 信息指数 I
浙江临安 LA	30	176	69.78	1.6978 (0.4803)	1.4839 (0.3301)	0.2019 (0.1884)	0.3844 (0.2115)
湖北保康 BK	30	213	84.37	1.8437 (0.3122)	1.5002 (0.3177)	0.3833 (0.1345)	0.5218 (0.2139)
湖北宜昌 YC	30	205	81.29	1.8129 (0.4333)	1.5137 (0.3203)	0.3425 (0.1744)	0.4966 (0.2409)
湖北神农架 SN	30	220	87.16	1.8716 (0.3029)	1.5603 (0.3266)	0.4012 (0.1155)	0.5603 (0.2182)
湖南吉首 JS	30	165	65.44	1.6544 (0.4105)	1.2375 (0.2252)	0.1653 (0.1377)	0.3132 (0.2205)
贵州花溪 HX	30	196	77.69	1.7769 (0.4741)	1.4474 (0.3471)	0.2374 (0.1383)	0.4013 (0.2524)
重庆巫溪 WX	30	188	74.38	1.7438 (0.4325)	1.5127 (0.4319)	0.3217 (0.1266)	0.4635 (0.2014)
种群水平 Population level	30	195	77.16	1.7716	1.4651	0.2933	0.4487
物种水平 Species level	210	232	92.03	1.8831	1.6347	0.4122	0.6325

* 观测等位基因数 (n_a) Observed number of alleles; 有效等位基因数 (n_e) Effective number of alleles [Kimura and Crow (1964)]; Nei's (1973) 基因多样性 (H) Nei's (1973) gene diversity; Shannon 信息指数 (I) Shannon's Information index [Lewontin (1972)]; 多态带百分率 (PPL) Percentage of polymorphic loci

表 4 种群间和种群内分子变异的方差分析

Table 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) within and among 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	遗传距离 Φ_{ST}	P
种群间 Among populations	6	3.7855	0.6309	0.0637	16.41	0.042	<0.001
种群内 Within population	204	24.3212	0.1192	0.3245	83.59		

2.3 种群间遗传关系的 UPGMA 聚类分析

为了进一步分析种群之间的遗传分化程度,利用 POPGEN 计算了 Nei's 遗传距离 (D)和遗传一致度 (I),从表 5 可以看出 D 值的变化范围为 0.1377~0.6321, I 值的变化范围为 0.5196~0.8544,宜昌和花溪的 D 值最高,宜昌和巫溪的 D 值最低。用 NTSYS-pc 2.1 对 7 个种群进行 UPGMA 聚类分析的结果见图 3。

表 5 Nei's 遗传一致度 (I) (右上角)和遗传距离 (D) (左下角)

Table 5 Nei's genetic identity (I) (above diagonal) and genetic distance (D) (below diagonal)

种群 Population	保康	临安	宜昌	神农架	吉首	巫溪	花溪
保康	0	0.7689	0.6734	0.7577	0.8154	0.7236	0.7346
临安	0.2434	0	0.8055	0.7568	0.8296	0.8544	0.6902
宜昌	0.4012	0.1872	0	0.6167	0.8001	0.8438	0.5196
神农架	0.2633	0.2697	0.4361	0	0.7878	0.7276	0.8557
吉首	0.1881	0.1755	0.2008	0.2295	0	0.8307	0.7074
巫溪	0.3079	0.1382	0.1377	0.3033	0.1678	0	0.7332
花溪	0.3101	0.3466	0.6321	0.1472	0.3144	0.2807	0

3 结论和讨论

蜡梅为中国特有种,主要分布于我国的中部地区,其分布区地形复杂,气候和土壤条件差异很大,通过长期的地理隔离和自然选择,使得蜡梅种内产生了极其丰富的变异,由于表型变异是遗传型和环境因子共同作用的结果,因此丰富的表型变异必然蕴藏着一定的遗传变异,因此本文利用 AFLP 分子标记技术对蜡梅野生资源的遗传变异进行研究。从蜡梅种群 AFLP 检测结果看,用 3 对 AFLP 引物共扩增出 253 条多态带(平均每条引物产生 84.33 条带),其中 218 条带是多态的,多态位点百分率为 86.17%。反映蜡梅遗传多样性的 3 个指标分别为:多态带百分率 $P=92.03$,平均 Shannon 信息指数 (I)为 0.4487,平均 Nei 遗传多样性 (H)为 0.2933。和同科不同属的夏蜡梅 (H 和 P 分别为 0.257 和 64.7%)相比^[11],具有较高的遗传多样性。种群间的遗传分化指数 G_{ST} 为 0.2906,即种群间的遗传变异占总变异的 29.06%,表明蜡梅不同种群间有一定的基因交流,但不同种群间地域上跨越了几个省区,地理隔离大,从而使种群间出现一定程度的遗传分化。Nei 的遗传一致度、遗传距离分析结果与分子方差分析 (AMOVA)得出的研究结果一致,均是种群内遗传变异大于种群间遗传变异。这与同科不同属的夏蜡梅的研究结果一样,夏蜡梅有 71.6% 的变异存在于居群内,其余 28.4% 的变异存在于居群间^[11],表明夏蜡梅的居群间也出现了一定程度的分化。

本研究根据遗传距离对 7 个种群进行 UPGMA 聚类,自然种群间的遗传距离和地理距离并没有显著的相关性,如湖北的神农架种群和贵州的花溪种群聚在了一起。而且所得聚类结果与形态分析的聚类结果存在一定程度的差异,这可能是由于许多形态学性状因受环境的影响而呈现出连续性变异或高度的可塑性。而 AFLP 分析是直接从 DNA 分子水平上检测碱基序列的变化,从而揭示出覆盖整个基因组的多态性信息,从而使二者的聚类结果呈现出一定的差异性。这一点则不同于林业树种蒙古栎,根据文献^[3]知,蒙古栎自然群体间的遗传距离有随地理距离跨度增加而递增的趋势,而这种规律性则对于制定种质资源保护时的群体样本策

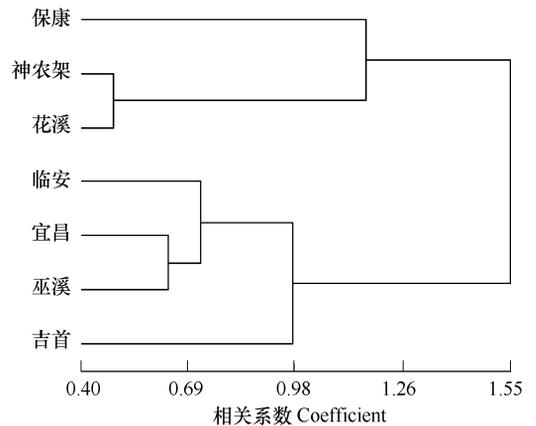


图 3 蜡梅种群间 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类图

Fig. 3 UPGMA dendrogram for 11 *Chimonanthus praecox* populations based on Nei's genetic distance

略是很有利的。

调查发现,在原产地,蜡梅群落的分布区域无一例外的为一些深切的“V”形峡谷,溪谷地势较低,水热条件良好,这种特殊的溪谷地貌,形成了一个封闭性强、人为活动较小、植被保存较好的特殊生境,为蜡梅的生长发育及繁衍创造了十分有利的条件。但是目前由于生境丧失、生境破坏以及大量砍伐森林、挖掘野生苗木、开山采矿等对蜡梅生存造成严重威胁。因此进一步的就地保护与迁地保护实验对于蜡梅的保护尤为重要。另外蜡梅自身的生殖生物学特性也造成该物种的日渐减少。蜡梅天然更新的主要方式是种子繁殖和萌蘖。由于蜡梅是虫媒异交植物,依靠蜜蜂、蝇类等昆虫传粉^[1],相对风媒传粉具有很大的局限性。同时,蜡梅的瘦果为果托所包被,果实成熟后依靠重力散播种子,因此其后代向外传播的距离相当有限。加之人为的采收和动物的破坏,蜡梅更难天然更新。由此可见,蜡梅自身繁殖系统的特点也限制了其后代远距离扩散的能力,在生境遭到破坏和栖地片段化后,种群间的基因交流变得更加困难,引起种群的分化,种群内也因本身的遗传基础狭窄而失去进化的潜力。

了解物种遗传变异的空间分布格局对于制定科学的保护策略有重要作用。蜡梅种群内遗传多样性较高,种群间遗传多样性偏低。从 AFLP 分子标记谱带来看,每个种群间除了具有共有带外,还有一些特异带,说明每个种群均有一定程度的特异性,必须对这 7 个种群实施就地保护策略,这样才能保存最大的遗传多样性。由于神农架种群和保康种群的遗传变异较大,在保护时应充分予以重视,同时也不能忽略其它种群中特有基因和稀有基因的价值。

蜡梅 7 个种群的遗传分化较大,表明该种对环境适应性较强,因而可制定迁地保护策略。通过迁地试验,发现和重建它的适宜生境。本实验也开展了这项工作,在国家花卉工程中心小汤山基地对蜡梅进行了人工栽培实验,无论是播种苗还是移栽苗,生长状况都十分良好。由此可见,蜡梅风土适应力比较强,迁地保护是切实可行的。同时须注意,迁地保护首要的是种群的建立,其采样策略同就地保护,即要尽量保护较多的种群。因此,蜡梅种群就地保护的最根本措施就是保护蜡梅赖以生存的生态系统,将之作为一个整体加以保护,这才是长期有效的方法。目前,湖北保康和宜昌种群、湖南吉首种群、贵州花溪种群都已经建立了自然保护区,这对蜡梅的就地保护起到了积极作用。但湖北神农架种群和浙江临安种群的蜡梅资源破坏较为严重,希望也能尽早加入到被保护的行列中来。

References :

- [1] Zhao T B. *Chimonanthus praecox* in China. Zhengzhou :Henan Science and Technology Press ,1987.
- [2] Zhang R H , Liu H E. *Chimonanthus praecox* in the World. Beijing :Chinese Science and Technology Press ,1998.
- [3] Li W Y , Gu W C , Zhou S L. AFLP analysis on genetic diversity of *Quercus Mongolica* populations , *Scientia Silvae Sinicae* , 2003 , 39 (5) 29 - 36.
- [4] Duan H , Qiang S , Su X H , *et al.* Genetic diversity of *Eupatorium adenophorum* determined by AFLP marker. *Acta Ecologica Sinica* , 2005 , 25 (8) 2109 - 2114.
- [5] Doyle J J , Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* , 1987 , 19 , 11 - 15.
- [6] Zhao B , Zhang Q X. The Establishment of AFLP M olecule Labeling Technique System of the Wintersweet Cultivars. *Journal of Wuhan Botanical Research* , 2007 , 25 (1) 93 - 97
- [7] Vos Hogers R , Bleeker M , Reijmans M , Vande Lee D , Homes M , Frijters A , Pot J , Peleman J , Kuiper M , Zabeau M. AFLT : a technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* , 1995 , 23 (21) : 4407 - 4414.
- [8] Yeh F C , Yang R C , Boyle T , Ye Z H , Mao J X. POPGENE , the User Friendly Shareware for population Genetic Analysis. *Molecular Biology and Biotechnology Centre. University of Alberta . Edmonton , Canada* , 1997.

- [9] Rohlf F. J. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.1. Exeter Software, Setauket, New York, 2000.
- [10] Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 1992, 131: 479—491.
- [11] Fan C. C. Analysis of genetic variability in natural population of *Calycanthus chinensis* with RAPID markers. The Master Paper of Huangzhong Agricultural University 2004.
- [12] Zhou L. H. The Study of Pollination Biology in *Chimonanthus praecox*. The Master Paper of Nanjing Agricultural University 2004.

参考文献：

- [1] 赵天榜. 中国蜡梅. 郑州: 河南科学技术出版社, 1987.
- [2] 张若蕙, 刘洪涛. 世界蜡梅. 北京: 中国科学技术出版社, 1998.
- [3] 李文英, 顾万春, 周世良. 蒙古栎天然种群遗传多样性的 AFLP 分析. *林业科学* 2003, 39 (5): 29~36.
- [4] 段惠, 强胜, 苏秀红, 等. 用 AFLP 技术分析紫茎泽兰的遗传多样性. *生态学报* 2005, 25 (8): 2109~2114.
- [6] 赵冰, 张启翔. 蜡梅 AFLP 分子标记技术体系的建立. *武汉植物学研究* 2007, 25 (1): 93~97.
- [11] 范楚川. 利用 RAPD 标记分析夏蜡梅自然居群的遗传变异. 华中农业大学硕士论文, 2001.
- [12] 周莉花. 蜡梅的传粉生物学研究. 南京农业大学硕士论文, 2004.