

珍稀濒危植物安徽羽叶报春遗传多样性的 RAPD 分析*

彭艳秋¹, 邵剑文^{1,2}, 张小平^{1,2}, 张中信¹, 朱国萍^{1,2**}

(1 安徽师范大学生命科学学院生物大分子进化重点实验室, 安徽 芜湖 241000;

2 生物环境与生态安全安徽省高校重点实验室, 安徽 芜湖 241000)

摘要: 利用 RAPD 分子标记对安徽特有濒危物种安徽羽叶报春 (*Primula merrilliana*) 6 个自然居群的 134 个个体的遗传多样性进行了研究。从 100 个随机引物中筛选出 12 个 RAPD 引物, 扩增共得到 158 条带, 其中 129 个多态性位点 (*PPL*)。POPGENE 分析显示安徽羽叶报春具有较丰富的遗传变异 ($PPL = 81.65\%$, $H_e = 0.2515$, $H_o = 0.3849$)。Nei's 基因多样性指数计算的居群间遗传分化系数 ($G_{ST} = 0.5511$) 与 Shannon 信息指数 (54.48%) 基本一致。生境的片段化和基因流障碍可能是导致居群间遗传分化显著的主要原因。针对安徽羽叶报春的居群遗传变异提出了相应的保护措施: 保护好自然生境和现有的居群及个体; 加强居群间的基因流动; 在迁地保护过程中, 在尽可能多的居群中采样, 以提高栽培居群的遗传多样性。

关键词: 安徽羽叶报春; RAPD; 遗传多样性; 遗传分化

中图分类号: Q 16

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700(2007)05-549-05

Genetic Diversity of the Endangered and Endemic Species, *Primula merrilliana* (Primulaceae), Revealed by RAPD Analysis

PENG Yan-Qiu¹, SHAO Jian-Wen^{1,2}, ZHANG Xiao-Ping^{1,2},
ZHANG Zhong-Xin¹, ZHU Guo-Ping^{1,2**}

(1 The Key Laboratory of Bio-Macromolecular Evolution, College of Life Science, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China;

2 Anhui Key Laboratory of Biotic Environment and Ecological Security, Wuhu 241000, China)

Abstract: Genetic diversity of 134 individuals from 6 natural populations of *Primula merrilliana*, an endangered and endemic species in Anhui province, was assessed using RAPD markers. A total of 158 amplified bands were evaluated from 12 informative and reliable primers screened from 100 RAPD primers, and 129 bands were polymorphic loci (*PPL*). Analysis with POPGENE showed a high proportion of genetic variation ($PPL = 81.65\%$, $H_e = 0.2515$, $H_o = 0.3849$) for *Primula merrilliana*. Analyzed by Nei's gene diversity index, the coefficient of the genetic differentiation (G_{ST}) was 0.5511, which was consistent with Shannon information index (54.48%). The main factors responsible for the high degree of genetic differentiation among populations may result from habitat fragmentation and barriers of gene flow. The pattern of genetic variation provides important data and valuable information for the conservation strategies of *Primula merrilliana*, such as protecting their natural habitats and existing populations and individuals, improving the gene flow among populations, and sampling within more populations during ex situ conservation.

Key words: *Primula merrilliana* Schltr.; RAPD; Genetic diversity; Genetic differentiation

安徽羽叶报春 (*Primula merrilliana* Schltr.) 隶属于报春花科 (Primulaceae) 报春花属 (*Primula*),

* 基金项目: 教育部科学技术研究重点项目 (206066); 安徽省优秀青年科技基金 (06043089); 安徽省引进海外留学人才基金 (2005Z032); 安徽省教育厅自然科学研究重点项目 (2006KJ061A) 资助

** 通讯联系人 Author for correspondence; E-mail: gpz1996@yahoo.com

收稿日期: 2006-12-13, 2007-04-23 接受发表

作者简介: 彭艳秋 (1983-) 女, 在读硕士研究生, 主要从事植物分子系统学与保护生物学的研究。

现仅零星分布于安徽皖南山区 (陈封怀和胡启明, 1990; 钱啸虎等, 1991)。该植物为二年生草本, 每年 1 月底陆续绽放, 花期可延至 5 月中旬, 具有较高的园艺开发价值 (张小平和陈明林, 2003)。安徽羽叶报春生长在海拔 50 ~ 1 100 m 的落叶阔叶林下或林缘的沟谷或岩壁上, 由于人类活动的影响, 其野生种质资源急剧减少, 分布区日益缩小, 且大多数居群处于人类活动较多的路边或垦地边 (陈明林和张小平, 2002)。据调查, 安徽羽叶报春现仅在黄山桃花峰、黄山区 (太平县)、石台县、歙县等地发现有少量分布 (陈明林和张小平, 2002), 已被将要出版的《中国植物红皮书》第二卷收录 (http://bd.brim.ac.cn/copy_of159_226_89_44/consult/chenys/Search_Form.asp), 其野生种群亟待保护。然而, 目前对安徽羽叶报春的研究主要集中在形态学和资源调查等方面 (陈明林和张小平, 2002; 张小平和陈明林, 2003), 至今未见有从分子角度分析遗传变异和遗传分化等居群遗传学方面的研究, 因此保护措施也比较盲目。

RAPD 分子标记技术由 William 等 (1990) 和 Welsh and Mc (1990) 各自独立发明, 已被广泛应用到植物遗传和其他领域的研究中, 具有操作简单、快速、成本较低等诸多优点 (周延清, 2005)。本文采用 RAPD 标记技术来揭示安徽羽叶报春的遗传特征, 分析其遗传多样性和居群遗传结构, 从而为合理保护与利用该植物资源提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

材料采自安徽省石台县的六都乡和蓬莱洞景区, 休宁县的齐云山景区, 黄山区的郭村乡、谭家桥镇, 黄山温泉景区的桃花峰 (图 1), 共计 6 个居群, 134 个样本。取样过程中, 对于个体数大于 30 株的居群按照均匀分布、随机取

样的原则进行采样, 而对于个体数少于 30 株的居群对全部较大个体进行采样。野外采集新鲜叶片, 迅速放入硅胶中干燥, 保存。用 GPS 记录各居群的海拔、经纬度 (表 1)。



图 1 安徽羽叶报春的取样分布图

Fig. 1 Map showing locations of the 6 sampled populations of *Primula merrilliana* Schltr. in Anhui

1.2 基因组 DNA 提取

采用 CTAB 法 (Doyle, 1991) 提取基因组 DNA, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其质量, 并在紫外分光光度计 (UV-2102C) 下检测其浓度, 最后稀释标定到 10 ng/ μ L, -20 °C 冰箱保存备用。

1.3 引物筛选与 PCR 扩增

所用引物参照加拿大哥伦比亚大学 UBC 公司公布的 701 - 800 号 RAPD 引物序列 (<http://www.biotech.ubc.ca/services/naps/primers/Primers.pdf>), 由上海生物工程技术有限公司合成。每个居群各选取 2 个 DNA 模板在 15 μ L 的反应体系中进行扩增筛选, 从 100 个引物中筛选出条带清晰、重复性好的 12 个扩增引物 (表 2) 用于全部样本分析。

PCR 扩增反应在美国 Bio-Rad 热循环仪上进行, 参照相关文献 (陈明林和张小平, 2003), 经过比较和优化确定最佳的 RAPD 扩增条件为 15 μ L 的反应体系, 内含 1.5 μ L 10 \times buffer, 1 μ L 引物, 2 μ L 模板 DNA, 0.2 mmol/L dNTP, 2 mmol/L MgCl₂, 0.75 U *Taq* 酶, 用双蒸水补充到 15 μ L, 加 10 μ L 石蜡油并加盖。(上述试剂均购于上海申

表 1 调查材料来源和名称

Table 1 Sources and names of the materials investigated

种群 Population	采样数 Sampling number	产地 Locality	地理位置 Geographical location	海拔高度 Altitude (m)
六都 (LD)	22	石台县六都乡荒田边 Wild field of Liudu town, Shitai county	30°19.274 N, 117°50.598 E	171
蓬莱洞 (PLD)	24	石台县蓬莱洞景区 Scenic spots of Penglaidong, Shitai county	30°14.076 N, 117°02.512 E	99
齐云山 (QYS)	28	休宁县齐云山山脚 Qiyun mountain, Xiuning county	29°48.908 N, 118°02.273 E	165
郭村 (GC)	17	太平县郭村乡, 岩自村 Yanzi village, Guocun town, Xiuning county	30°07.385 N, 117°56.741 E	255
桃花峰 (THF)	21	黄山温泉景区, 桃花峰 Taohua peak, Scenic spots of Hotspring, Huangshan	30°06.088 N, 118°09.830 E	712
谭家桥 (TJQ)	22	屯溪市, 黄山区, 谭家桥 Tanjiaqiao, Huangshan region, Tunxi city	30°06.167 N, 118°10.106 E	303

表 2 RAPD 分析用的 12 个随机引物序列

Table 2 Sequences of 12 random primers used in RAPD analysis

引物 Primers	序列 Sequences (5'3')	总扩增条带 Total amplified bands	多态性条带 Polymorphic bands	多态性比率 Polymorphism (%)
711	CCCTCTCCCT	12	10	83.33
714	GGGTGGGTGT	17	14	82.35
729	CCCAACCCAC	13	11	84.62
732	CACCCACCAC	13	10	76.92
733	GGGAAGGGAG	13	10	76.92
743	CCACCCACAC	13	10	76.92
744	CCACCCACCA	15	13	86.67
749	GGGAGGAGAG	13	9	69.23
756	CCCTCCTCCT	14	12	85.71
764	CTCTCCTCCC	9	8	88.89
776	CTTCCCTCCT	17	14	82.35
780	CCTCTCCTC	9	8	88.89

能博彩生物科技有限公司)

PCR 扩增程序为 94 预变性 5 min, 之后进行 45 个循环: 94 预变性 1 min, 42 退火 45 s, 72 延伸 1 min 30 s。循环结束后 72 延伸 15 min。

1.4 产物检测

DNA 扩增产物在 $1 \times$ TBE 缓冲液中用 1.5% 琼脂糖 (购于上海申能博彩生物科技有限公司) 电泳分离, 以 DL2000 作 DNA Marker, 经溴化乙锭染色后, 在美国 Bio-Rad 公司的凝胶成像系统下观察并照相, 记录扩增结果。

1.5 数据处理

按照电泳图谱中同一位置上 DNA 带的有无进行统计, 有带的记为“1”, 无带的记为“0”, 仅记录清晰、稳定且长度在 300 ~ 1100 bp 范围内的扩增带, 形成 0 1 矩阵图输入计算机。应用 POPGENE 1.31 (Yeh 等, 1999) 软件对全部居群和各个单一居群分别进行遗传参数分析, 分别计算了多态位点百分率 (PPL)、观察等位基因数 (A_o)、有效等位基因数 (A_e)、Nei s (Nei, 1973) 基因多样性指数 (H_e)、Shannon 信息指数 (H_o)、总基因多样性 (H_t)、居群内基因多样性 (H_s)、群体间的遗传分化系数 (G_{ST})、

Nei s (Nei, 1978) 遗传距离 (D) 和遗传一致度 (I)。

2 结果

2.1 遗传多样性

12 个随机引物对安徽羽叶报春 134 个个体 DNA 的 RAPD 分析如图 2, 共扩增到 158 条带 (每个引物产生 9 ~ 17 个条带, 平均约 13 个条带), 其中有 129 个多态性位点。在物种水平上, 多态位点百分率为 81.65%, Nei s 基因多样性指数 (H_e) 为 0.2515, Shannon 信息指数 (H_o) 为 0.3849。居群水平上的多态位点百分率在 34.81% ~ 52.53% 之间, 平均为 41.98%, 最高为齐云山 (QYS) 居群 (52.53%), 最低的是蓬莱洞 (PLD) 居群 (34.81%)。居群内的 Nei s 基因多样性指数在 0.0971 ~ 0.1353 之间, 平均为 0.1124, Shannon 信息指数在 0.1521 ~ 0.2123 之间, 平均为 0.1752 (表 3)。

2.2 遗传结构与基因流

POPGENE 分析结果表明, 居群间的遗传分化较大 ($G_{ST} = 0.5511$), 基因流小 ($Nm = 0.4072$)。各居群间的遗传距离 (D) 在 0.0890 ~ 0.3448 之间, 平均为 0.2107; 遗传一致度 (I) 在 0.6841 ~ 0.9149 之间, 平均为 0.8138 (表 4)。

3 讨论

一般认为, 分布区狭窄的濒危物种多样性水平相对较低 (Karron, 1991; Hamrick and Godt, 1996), 异花传粉植物的主要遗传变异存在于居群内部, 居群间的差异相对较小 (Xue 等, 2004; Zhang 等, 2006)。而本文的研究结果表明, 安徽羽叶报春虽仅局限分布在面积不到 700 km² 的安

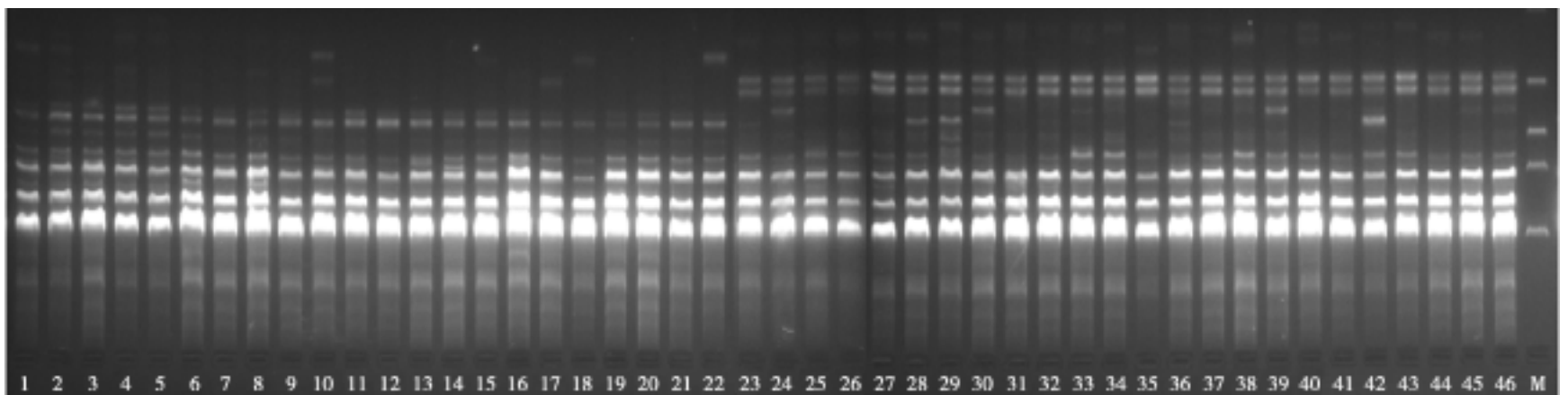


图 2 LD 居群、PLD 居群的 733 引物扩增结果

1 ~ 22: LD 居群; 23 ~ 46: PLD 居群; M: DNA 梯度分子量 DL2000

Fig. 2 Amplification with primer 733 in LD and PLD population

1-22, LD population; 23-46, PLD population; M, DNA ladder molecular weight marker DL2000

表 3 安徽羽叶报春居群的遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of *Primula merrilliana* Populations

居群 Population	观测等位基因数 (A_o)	有效等位基因数 (A_e)	Nei s 基因多样性指数 (H_e)	Shannon 信息指数 (H_o)	多态位点百分率 (PPL)
六都 (LD)	1.3861 (0.4884)	1.1606 (0.2999)	0.0971 (0.1628)	0.1521 (0.2358)	38.61
蓬莱洞 (PLD)	1.3481 (0.4779)	1.1741 (0.3131)	0.1035 (0.1709)	0.1584 (0.2479)	34.81
齐云山 (QYS)	1.5253 (0.5009)	1.2198 (0.3191)	0.1353 (0.1750)	0.2123 (0.2527)	52.53
郭村 (GC)	1.4367 (0.4976)	1.1739 (0.2824)	0.1107 (0.1590)	0.1766 (0.2348)	43.67
桃花峰 (THF)	1.3671 (0.4835)	1.1682 (0.3036)	0.1010 (0.1681)	0.1558 (0.2438)	36.71
谭家桥 (TJQ)	1.4557 (0.4996)	1.2119 (0.3307)	0.1268 (0.1792)	0.1958 (0.2578)	45.57
居群水平 (mean)	1.4198 (0.0660)	1.1848 (0.0247)	0.1124 (0.0157)	0.1752 (0.0245)	41.98
物种水平	1.8165 (0.3883)	1.4132 (0.3351)	0.2515 (0.1765)	0.3849 (0.2456)	81.65

A_o , observed number of alleles; A_e , effective number of alleles; H_e , Nei s gene diversity index; H_o , Shannon s information index; PPL , percentage of polymorphic loci .

表 4 安徽羽叶报春居群间的遗传一致度和遗传距离

Table 4 Genetic identity and genetic distance among 6 populations of *Primula merrilliana* Schltr .

pop ID	LD	PLD	QYS	GC	THF	TJQ
LD	****	0.7178	0.8887	0.8227	0.8479	0.8351
PLD	0.3316	****	0.7315	0.6841	0.7084	0.7092
QYS	0.1180	0.3127	****	0.8730	0.8801	0.8723
GC	0.1952	0.3797	0.1359	****	0.8608	0.8601
THF	0.1650	0.3448	0.1277	0.1499	****	0.9149
TJQ	0.1802	0.3436	0.1367	0.1508	0.0890	****

对角线上方为 Nei s 遗传一致度, 对角线下方为遗传距离

Nei s genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) .

徽皖南山区, 但却具有较高的遗传多样性。在检测的 158 个位点中, 只有 29 个位点是共有的, 多态性位点比率达 81.65%, 远远高于一般的分布区狭窄的物种, 如四合木 (*Tetraena mongolica* Maxim.) 为 48.1% (Ge 等, 2003), 明党参 (*Changium smyrnioides* Wolff.) 为 32.58% (Qiu 等, 2004), 疣粒野生稻 (*Oryza granulata* Nees et Arn. ex Watt.) 为 23% (Wu 等, 2004)。与本属的广布种卵叶报春 (*Primula ovalifolia* Franch.) (Nan 等, 2002) 和鄂报春 (*Primula obconica* Hance.) (Nan 等, 2003) 相似。Nei s 基因多样性指数估计的安徽羽叶报春居群间的遗传分化系数为 $G_{ST} = 0.5511$, 与根据 Shannon 信息指数估计的值 54.48% 相似, 两者共同表明安徽羽叶报春居群间的遗传分化明显。

影响物种的遗传多样性和居群间遗传分化的因素很多, 如种群历史、繁育系统、基因突变、遗传漂变、基因流以及自然选择等 (Schaal 等, 1998)。安徽羽叶报春遗传多样性主要存在于居群间的原因可能为: (1) 生境的片断化。我们观察发现安徽羽叶报春对生境要求非常苛刻, 营养

阶段需要在阴湿的环境中生长, 而在生殖阶段时, 需有较好光照条件才能有效地吸引传粉昆虫, 完成有性生殖。因此, 它们多分布于落叶阔叶林下或林边的沟谷岩壁上。由于频繁的人类活动的影响, 大量的阔叶林被砍伐, 安徽羽叶报春适宜的生存环境被破坏或被分割成相互隔离的若干岛屿状小生境, 导致它们的有效种群变小; (2) 基因流受阻。 Nm 为 0.4072, 表明居群间的基因交流已严重受阻。植物居群间的基因流是借助于花粉、种子、植株个体以及其携带遗传物质的物体为媒介进行的, 其中花粉和种子的扩散是植物自然种群中主要的基因流 (李海生和陈桂珠, 2004)。对于安徽羽叶报春来说, 种子散布能力很弱, 绝大多数种子主要是依靠重力作用散落在母株附近, 另外, 它虽具二型花柱, 为典型的异花虫媒传粉植物, 但实验表明它也能进行自花传粉。鉴于安徽羽叶报春居群间的遗传分化系数为 $G_{ST} = 0.5511$, 远远高于远交物种的 $G_{ST} = 0.190$, 而接近于自花授粉的植物 ($G_{ST} = 0.59$) (Nybom and Bartish, 2000), 说明在自然居群中, 安徽羽叶报春的繁育系统可能自交占有很大的比例, 这进一步降低了居群间的基因交流; (3) 遗传漂变。Slatkin (1985) 认为, 当 $Nm < 1$ 时, 基因流就不足以抵制居群内因遗传漂变而引起的居群分化。而安徽羽叶报春的 Nm 仅为 0.4072, 因此遗传漂变也可能是引起居群间较大遗传分化的因素之一。

安徽羽叶报春居群水平的遗传多样性略低于本属的狭域种景东报春 (*Primula interjacens* Chen) (Xue, 2004) 和广布种鄂报春 (*Primula obconica* Hance.) (Nan 等, 2003) 的居群水平的遗传多样性, 近交衰退和遗传漂变可能是导致安徽羽叶报

春居群水平的遗传多样性较同属其它植物小的主要原因 (Nybom and Bartish, 2000)。进一步分析发现, 安徽羽叶报春居群水平的遗传多样性与生境关系明显, 生长在路边、人干扰较大的 QYS 居群遗传多样性较高, 而林下居群, 如 LD、PLD 和 THF 的遗传多样性相对较低, 具体原因还有待于进一步研究。

物种的遗传多样性及其居群的遗传结构分析, 可以为珍稀濒危物种保护价值的评估以及保护策略的制定提供非常重要的信息 (Hamrick and Godt, 1996)。针对安徽羽叶报春物种水平上具较高的遗传多样性, 且主要存在于居群间, 居群分化明显, 我们提出以下几点保护策略: 第一, 保护好其赖以生存的生境。安徽羽叶报春对生境的要求较高, 要对其现有的生境进行保护, 防止人为因素的进一步破坏。第二, 保护尽可能多的居群和个体。第三, 可以在 5 月中下旬, 人工采集部分成熟种子撒播到其它居群中, 以便加强居群间的基因流动。第四, 在迁地保护采样过程中, 在各个居群内可以少取样, 但要在尽可能多的居群中取样, 以便提高栽培居群的遗传多样性。

致谢 植物基因组 DNA 的提取工作是在浙江大学植物系统与进化重点实验室完成的, 实验过程得到了浙江大学生命科学学院邱英雄博士和李恩香博士的帮助。

【参 考 文 献】

- 陈封怀, 胡启明, 1990. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 57
- 周延清, 2005. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 79—95
- 钱啸虎, 郭新弧, 王学文等, 1991. 安徽植物志 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 33—55
- Chen ML (陈明林), Zhang XP (张小平), 2002. A study on the ecological features of *Primula merrilliana*, a rare and endangered plant species [J]. *J Anhui Norm Univ (Nat Sci)* (安徽师范大学学报 (自然科学版)), **25** (4): 371—374
- Chen ML (陈明林), Zhang XP (张小平), 2003. Studies on optimization of concentration of compositions in RAPD experiment of *Primula merrilliana* [J]. *J Anhui Norm Univ (Nat Sci)* (安徽师范大学学报 (自然科学版)), **26** (3): 264—267
- Doyle J, 1991. DNA protocols for plants—CTAB total DNA isolation [A]. In Hewitt GM, Johnston A (eds.), *Molecular Techniques in Taxonomy* [M]. Berlin: Springer, 283—293
- Ge XJ, Yu Y, Zhao NX *et al*. 2003. Genetic variation in the endangered Inner Mongolia endemic shrub *Tetraena mongolica* Maxim. (Zygophyllaceae) [J]. *Biol Conserv*, **111**: 427—434
- Hamrick JL, Godt MJW, 1996. Conservation genetics of endemic plant species [A]. In: Avise JC, Hamrick JL eds, *Conservation Genetics* [M]. New York: Case Histories from Nature Chapman and Hall, 281—304
- Karron JD, 1991. Patterns of genetic variation and breeding systems in rare plant species [A]. In: Falk DA, Holsinger KE eds, *Genetic and Conservation of Rare Plants* [M]. New York: Oxford University Press
- Li HS (李海生), Chen GZ (陈桂珠), 2004. Genetic diversity of mangrove plant *Sonneratia caseolaris* in Hainan Island based on ISSR analysis [J]. *Acta Ecol Sin* (生态学报), **24** (8): 1657—1663
- Nan P, Peng SL, Ren H *et al*. 2002. Genetic diversity of *Primula ovalifolia* from central and southwest China based on ISSR markers [J]. *J Gen Mol Biol*, **13**: 119—123
- Nan P, Shi SH, Peng SL *et al*. 2003. Genetic diversity in *Primula obconica* (Primulaceae) from central and southwest China as revealed by ISSR markers [J]. *Ann Bot*, **91**: 329—333
- Nei M, 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **70**: 3321—3323
- Nei M, 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, **89**: 583—590
- Nybom H, Bartish IV, 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants [J]. *Perspect Plant Ecol Evol Syst*, **3**: 93—114
- Qiu YX, Hong DY, Fu CX *et al*. 2004. Genetic variation in the endangered and endemic species *Changium smyrnioides* (Apiaceae) [J]. *Biochem Syst Ecol*, **32**: 583—596
- Schaal BA, Hayworth DA, Olsen KM *et al*. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects [J]. *Mol Ecol*, **7**: 465—474
- Slatkin M, 1985. Gene flow in natural populations [J]. *Annu Rev Ecol Syst*, **16**: 393—430
- Welsh J, Mc CM, 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids Res*, **18** (24): 7213—7218
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ *et al*. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Res*, **18** (22): 6531—6535
- Wu CJ, Cheng ZQ, Huang XQ *et al*. 2004. Genetic diversity among and within populations of *Oryza granulata* from Yunnan of China revealed by RAPD and ISSR markers: implication for conservation for the endangered species [J]. *Plant Sci*, **167**: 35—42
- Xue DW, Ge XJ, Hao G *et al*. 2004. High genetic diversity in a rare, narrowly endemic primrose species: *Primula interjacens* by ISSR analysis [J]. *Act Bot Sci*, **46**: 1163—1169
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T, 1999. POPGENE. Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. Release 1.31 [M]. Edmonton: University of Alberta
- Zhang XP (张小平), Cheng ML (陈明林), 2003. A study of genetic diversity of *Primula merrilliana* and *P. cicutariifolia* with assessing new ornamental resources [J]. *J Plant Res Environ* (植物资源与环境学报), **12** (3): 1—5
- Zhang XP, Li XH, Qiu YX, 2006. Genetic diversity of the endangered species *Kirengeshoma palmata* (Saxifragaceae) in China [J]. *Biochem Syst Ecol*, **34**: 38—47