

濒危植物夏蜡梅遗传分化研究

谈 探^{1,2}, 金则新^{2*}, 李钧敏², 张文标²

(1. 北京林业大学 自然保护区学院, 北京 100083; 2. 台州学院 生态研究所, 浙江 临海 317000)

摘 要:为阐明小尺度范围内濒危物种夏蜡梅种群的遗传分化,保护和恢复夏蜡梅种质资源,采用 ISSR 分子标记技术,对浙江省临安市清凉峰镇的 5 个夏蜡梅种群的遗传结构进行分析。12 个引物对夏蜡梅 5 个种群 100 个个体进行扩增,共得到 171 个位点,其中多态位点 98 个,总多态位点百分率(P)为 57.31%,平均为 25.03%。夏蜡梅总 Shannon 指数(I)为 0.268 9,平均为 0.148 8;总 Nei 指数(h)为 0.174 5,平均为 0.102 8。 P 、 I 、 h 均表明夏蜡梅总体水平的遗传多样性较高,而种群水平的遗传多样性较低。AMOVA 分子变异分析结果显示,47.01%的变异存在于种群间,52.99%的变异存在于种群内;种群内与种群间的遗传分化均很明显。夏蜡梅种群间基因流较低,为 0.717 3,显示夏蜡梅种群间的基因流动部分受阻。5 个种群的平均遗传距离为 0.105 1,根据种群间的遗传距离进行 UPGMA 聚类,结果为生境相似的种群聚在一起。夏蜡梅种群间较高水平的遗传分化主要是本身的生物学特性以及对微生境适应的结果。

关键词:夏蜡梅; ISSR; 遗传多样性; 遗传分化

中图分类号:S685.99 文献标识码:A 文章编号:1001-7461(2008)02-0077-06

Genetic Differentiation of *Calycanthus chinensis* an Endangered Plant

TAN Tan^{1,2}, JIN Ze-xin^{2*}, LI Jun-min², ZHANG Wen-biao²

(1. College of Natural Conservation, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

2. Institute of Ecology, Taizhou University, Linhai, Zhejiang 317000, China)

Abstract: Genetic structures of 5 *Calycanthus chinensis* populations, located Qingliangfeng in Lin'an city Zhejiang Province, were analyzed by Using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) molecular marker technique, to reveal genetic differentiation of *S. chinensis* fine scale, and to provide a theoretical basis for protecting and restoring its germplasm resources. Using 12 primers, 98 polymorphic loci from total 171 loci were detected in 100 individuals from 5 populations and the overall percentage of polymorphic loci (P) was 57.31% with an average of 25.03%. Total Shannon's information index (I) and Nei's gene diversity (h) of *S. chinensis* was the total value of 0.268 9, 0.174 5 with an average of 0.148 8, 0.102 8 respectively. The results of P , I and h indicated that genetic diversity at species level was relatively high, but at relatively low at population level. Analysis of molecular variation (AMOVA) suggested the variation was 47.01% among populations and 52.99% within population. Therefore, genetic differentiation within population and among populations were significant. The gene flow among populations was as low as 0.717 3 indicating that part of gene flow was blocked. The mean genetic distance of 5 *S. chinensis* populations was 0.105 1. Based on genetic distance, the clustered result for 5 *S. chinensis* populations by unweighted pair group method arithmetic average (UPGMA) suggested the populations in the similar habitat were clustered together. So genetic differentiation among *S. chinensis* populations was induced by its biological characteris-

② 收稿日期:2007-07-02 修回日期:2007-09-06

基金项目:浙江省自然科学基金项目(Y504220)。

作者简介:谈探(1982-),女,辽宁锦州人,硕士研究生,主要从事生物多样性保护及利用研究。E-mail: tantan110882@163.com。

* 通讯作者:金则新(1960-),男,浙江临海人,教授,硕士生导师,主要从事植物生态学研究。E-mail: jzx@tzc.edu.cn。

tic and the adaptability for different microhabitat.

Key words: *Calycanthus chinensis*; ISSR; genetic diversity; genetic differentiation

夏蜡梅(*Calycanthus chinensis*)为蜡梅科(*Calycanthaceae*)的落叶灌木,第三纪孑遗物种,夏蜡梅属的唯一代表^[1]。仅分布于浙江临安市西部和浙江天台县龙溪乡的狭小范围内^[2],资源极少,为国家2级保护的珍稀濒危植物。由于植被的砍伐及原始生境的破坏,夏蜡梅的生存繁衍受到严重威胁^[1],因此,迫切需要对其濒危机制进行探讨。其中,遗传多样性研究是探讨物种濒危机制的一个重要方面。Li等^[3]和金则新等^[4]分别采用RAPD和ISSR标记对分布在浙江临安和天台10个夏蜡梅自然种群的遗传结构进行分析,发现物种水平的遗传多样性较高,种群水平的遗传多样性较低,种群间遗传分化程度高。遗传分化在种群内或种群间都可以发生,在不同尺度即不同空间均会发生^[5]。因此,本研究采用ISSR(inter simple seuquence repeat,简单重复序列区间)^[6]分子标记技术对模式标本产地浙江临安大明山村附近的5个夏蜡梅种群遗传结构进行分析,旨在了解夏蜡梅在小尺度范围内的遗传分化水平和

遗传结构特征以及不同生境对夏蜡梅遗传分化的影响,为科学保护和恢复夏蜡梅种质资源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

在浙江省临安市清凉峰镇大明山村附近,根据不同群落类型设置5个夏蜡梅样地,其中西坑涧设置4个样地,白水设置1个样地,白水(Pop3)和西坑涧(Pop5)样地相距约7 km,Pop2和Pop5样地相距约50 m,Pop5和Pop1样地相距约30 m,Pop1和Pop4样地相距约3 km,各样地的基本情况见表1。在每个样地中随机选取20棵成年植株,每棵植株相隔30 m以上。取植株的幼嫩叶片置于保鲜袋中,封口,放入样品储藏箱中(箱中有冰袋维持冷藏条件),带回实验室,−70℃低温冰箱保存,用于DNA提取。

1.2 研究方法

表1 5个夏蜡梅样地的基本概况
Table 1 Basic condition of five *S. chinensis* populations' plots

种群	群落类型	地点	海拔/m	坡向	概况
Pop1	常绿阔叶林	西坑涧	585	NE55°	主要伴生树种为木荷(<i>Schima superba</i>)、石楠(<i>Photinia serrulata</i>)、青冈栎(<i>Cyclobalanopsis glauca</i>)等,夏蜡梅位于林下。
Pop2	灌丛	西坑涧	540	NE90°	人工干扰后的次生灌丛,夏蜡梅位于灌丛的冠层,光照充足。
Pop3	常绿、落叶阔叶混交林	白水	555	NW30°	主要伴生树种为青冈栎(<i>C. glauca</i>)、木荷(<i>S. superba</i>)、青钱柳(<i>Cyclocarya paliurus</i>)等,夏蜡梅位于林缘等地。
Pop4	常绿阔叶林	西坑涧	854	NW8°	主要伴生树种为木荷(<i>S. superba</i>)、甜槠(<i>Castanopsis eyrei</i>)、东南石栎(<i>Lithocarpus harlandii</i>)等,夏蜡梅位于林下。
Pop5	櫟木林	西坑涧	578	NE50°	人工櫟木(<i>Sassafras tsumu</i>)林,夏蜡梅位于林下。

1.2.1 DNA提取与定量 采用改进的SDS法^[7]提取夏蜡梅基因组总DNA。提取出的DNA经0.8%琼脂糖凝胶电泳分析,GIS凝胶成像分析系统(上海天能科技服务公司)拍照定量,并稀释成终浓度为20 ng/μL,−20℃保存,用于ISSR扩增分析。

1.2.2 ISSR扩增及产物鉴定 ISSR引物采用加拿大哥伦比亚大学(University of British Columbia,Set No. 9, No. 801-900)提供的序列,由

上海生物工程公司合成。扩增反应在P×2梯度热循环仪(美国,Thermo公司)中进行。扩增反应体系和扩增程序参见文献^[8]进行,从100个引物中筛选出12个扩增条带清晰,不弥散,稳定和重复性好的引物用于所有种群ISSR扩增分析,同时确定这些引物各自合适的退火温度(表2)。扩增产物在1.6%的琼脂糖凝胶(含0.5 μg/mL溴化乙锭)中电泳,电泳缓冲液为0.5×TBE,用λDNA/EcoR I + HindⅢ标准分子量参照物作分子量标记,用GIS凝

胶成像分析系统拍照保存。

表 2 用于夏蜡梅 ISSR 扩增分析的 12 个引物序列
Table 2 Sequence of 12 primers used in ISSR analysis of *S. chinensis*

引物	序列	引物	序列
UBC811	(GA) ₈ C	UBC866	(CTC) ₆
UBC812	(GA) ₈ A	UBC873	(GACA) ₄
UBC826	(AC) ₈ C	UBC886	VDV(CT) ₇
UBC840	(GA) ₈ YT	UBC888	BDB(CA) ₇
UBC842	(GA) ₈ YG	UBC890	VHV(GT) ₇
UBC855	(AC) ₈ YT	UBC891	HVH(TG) ₇

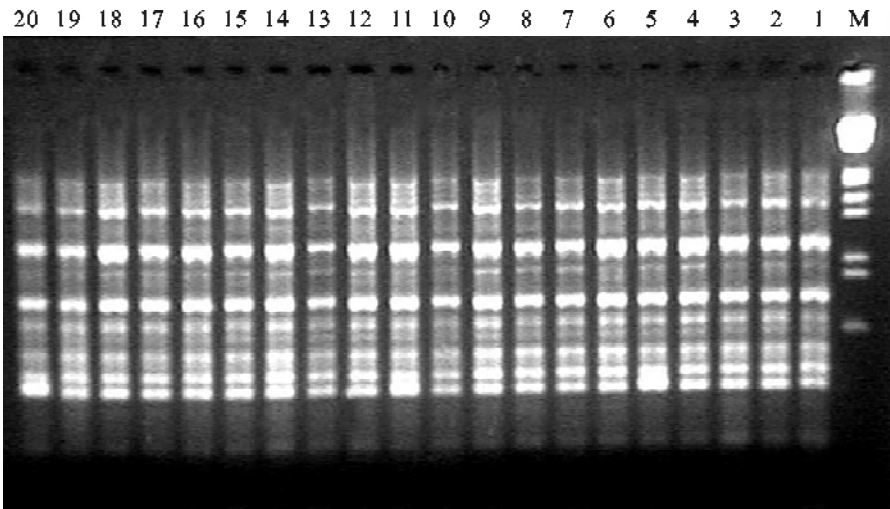
1.2.3 数据统计与分析 对照反应产物在凝胶上的对应位置,有带记为“1”,无带记为“0”,得到 ISSR 分析的原始数据矩阵。采用 POPGEN32 软件^[9]计算多态位点百分率(P)、Shannon 信息指数(I)和 Nei 指数(h)用来估算基因多样性。采用 DCFA 1.1 软件^[10]计算欧氏距离平方和,建立遗传距离矩阵,并利用 WINAMOVA 1.5 软件^[11]进行分子方差分析 (analysis of molecular variance, AMOVA),计算种群内、种群间的变异方差分布。另外,根据基因频率矩阵,利用 POPGEN32 软件计算了总种群基因多样度(H_t),各种群基因多样度(H_s)、遗传分化系数(G_{st})和基因流(N_m)。利用 Shannon 信息指数

计算基于各引物扩增条带在种群(H_{pop})和物种水平的表型多样性(H_{sp}),分别根据 (H_{pop}/H_{sp}) 和 $(H_{sp}-H_{pop})/H_{sp}$ 计算种群内和种群间变异所占的比例。为分析种群间的遗传关系,计算 Nei^[12] 无偏差遗传距离和遗传相似度。根据种群间的遗传距离,采用算术平均数的非加权成组配对法 (unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA) 对各种群进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 夏蜡梅种群 ISSR 扩增条带的多态性

利用筛选出的 12 个 ISSR 引物对 5 个夏蜡梅种群共 100 个个体的 DNA 样品进行分析,每个引物均能扩增出清晰可重复的条带,图 1 所示为 Pop1 的 ISSR 扩增结果(引物 UBC812)。12 个引物共扩增出 171 条条带,分子量在 200~2 000 bp 范围内,平均每个引物扩增出 14.25 条条带,其中 98 条条带具有多态性,比率为 57.31%,5 个夏蜡梅种群总体的多态位点百分率(P)较高。而各种群的 P 在 15.79%~27.56% 之间,平均为 25.03%,可见,5 个种群总遗传多样性较高,种群遗传多样性处于较低水平。其高低顺序为 Pop3>Pop2>Pop5>Pop4>Pop1(表 3)。



1-20: 个体 1-20; M: λ DNA/EcoR I + Hind III 标准分子量参照物

图 1 夏蜡梅 Pop1 的 ISSR 扩增结果(引物 UBC812)

Fig. 1 ISSR amplification results of Pop1 of *S. chinensis* (with primer UBC812)

2.2 夏蜡梅种群的遗传多样性

夏蜡梅各种群的 Shannon 信息多样性指数(I)的变化范围为 0.091 0~0.195 8,平均为 0.148 8,总体水平为 0.268 9;各种群的 Nei 基因多样性指数(h)大小在 0.062 7~0.134 7 之间,平均为 0.102

8,总体基因多样性为 0.174 5(表 3)。 I 、 h 均显示夏蜡梅各种群的遗传多样性水平较低,而总体遗传多样性却处于较高水平。用 I 、 h 计算的各种群遗传多样性大小顺序都是 Pop3>Pop2>Pop5>Pop4>Pop1,这与 P 的结果排序一致。

表 3 夏蜡梅种群内的遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of <i>S. chinensis</i> population					
种群编号	样本数	多态位 点数	多态位点 百分率/%	Shannon 指数(<i>I</i>)	Nei 指数(<i>h</i>)
Pop1	20	27	15.79	0.091 0	0.062 7
Pop2	20	48	28.07	0.667 0	0.114 4
Pop3	20	58	33.92	0.195 8	0.134 7
Pop4	20	40	23.39	0.142 5	0.990 0
Pop5	20	41	23.98	0.148 0	0.103 4
总体	100	98	57.31	0.268 9	0.174 5
(SD)				(0.266 2)	(0.184 1)

注:SD 为标准误差

2.3 夏蜡梅种群的遗传分化

夏蜡梅 5 个种群 AMOVA 分子变异分析结果显示,在总遗传变异中,47.01%的变异存在于种群间,52.99%的变异存在于种群内,种群间和种群内

均存在极显著的遗传分化($\Phi_{st}=0.470, P<0.001$) (表 4)。 Φ_{st} 相当于分化指数,Bus^[13] 认为分化指数介于 0~0.05 之间说明种群间分化很弱,0.05~0.15 之间表示中等分化,0.15~0.25 之间表示分化大,大于 0.25 表明分化极大,本研究结果为 0.470,说明种群之间有明显的遗传分化。

此外,如表 5 所示,由 *I* 计算的总遗传多样性中,种群内遗传多样性占 55.34%,种群间遗传多样性占 44.66%。由 *h* 计算的种群间基因分化系数(G_{st})为 0.410 7,即有 41.07%的遗传变异存在于种群间,而种群内遗传变异为 58.93%。这些指数均说明夏蜡梅大部分变异存在于种群内,但近半数的遗传变异存在于种群间,种群间与种群内的遗传分化均极显著。由 G_{st} 计算的种群间基因流(N_m)为 0.714 3,其值较低,表明部分基因流动受阻。

表 4 5 个夏蜡梅种群 100 个个体的 AMOVA 分析

Table 4 AMOVA analysis of 100 individuals in five <i>S. chinensis</i> populations							
变异来源	自由度	总方差	平均方差	变异组分	变异百分率 /%	Phist Φ_{st}	显著度检测 (<i>P</i> 值)
种群间	4	500.020	125.005	5.916 7	47.01	0.470	<0.001
种群内	95	633.700	6.671	6.670 5	52.99		<0.001

表 5 5 个夏蜡梅种群的 Shannon 信息指数与 Nei 基因多样性指数

Table 5 Shannon's and Nei's diversity index among 5 <i>S. chinensis</i> populations			
Shannon 信息指数(<i>I</i>)		Nei 指数(<i>h</i>)	
种群内遗传多样性 $H_{pop}(SD)$	0.148 8(0.263 0)	种群内基因多样性 $H_s(SD)$	0.102 8(0.014 2)
种群总的遗传多样性 $H_{sp}(SD)$	0.268 9(0.266 2)	种群总的基因多样性 $H_t(SD)$	0.174 5(0.184 1)
种群内遗传多样性比率 H_{pop}/H_{sp}	0.553 4	种群内基因多样性比率 H_s/H_t	0.589 1
种群间遗传多样性比率 $(H_{sp}-H_{pop})/H_{sp}$	0.446 6	遗传分化系数 G_{st}	0.410 7
		基因流 N_m	0.717 3

注:SD 为标准误差

2.4 夏蜡梅种群间遗传相似度、遗传距离及聚类分析

种群间遗传相似度能够在一定程度上反映种群间的遗传分化和 DNA 差异^[5]。夏蜡梅 5 个种群间遗传相似度最大值为 0.915 8(Pop3 与 Pop5),最小值为 0.879 8(Pop2 与 Pop3),平均为 0.904 5。遗传距离最大值为 0.128 0(Pop2 与 Pop3),最小值为 0.088 0(Pop3 与 Pop5),平均为 0.105 1(表 6)。根据夏蜡梅 5 个种群间遗传距离,采用 UPGMA 法对 5 个种群进行聚类分析(图 2)。结果显示,Pop3 与 Pop5 首先聚在一起;然后是 Pop1 与 Pop4;最后它

们再与 Pop2 聚在一起。

表 6 5 个夏蜡梅种群间的遗传相似度和遗传距离

Table 6 Genetic identity and genetic distance among five <i>S. chinensis</i> populations					
种群	Pop1	Pop2	Pop3	Pop4	Pop5
Pop1		0.884 0	0.884 4	0.910 3	0.902 2
Pop2	0.123 3		0.879 8	0.902 1	0.914 8
Pop3	0.122 9	0.128 0		0.895 3	0.915 8
Pop4	0.094 0	0.103 1	0.110 6		0.914 4
Pop5	0.102 9	0.089 1	0.088 0	0.089 5	

注:对角线上方为 Nei 遗传相似度,对角线下方为遗传距离。

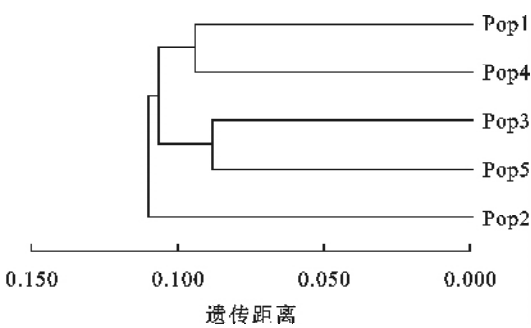


图 2 5 个夏蜡梅种群间的遗传距离聚类分析

Fig. 2 Dengrogram produced by POPGENE software for five populations of *S. chinensis*

3 结论与讨论

植物的遗传分化普遍存在于大尺度的种群间,但现有的一些研究表明,一些物种在小尺度范围内种群间也存在显著的遗传分化,如华山新麦草^[14](*Psathyrostachys huashanica*)种群的 G_{st} 为 0.326 3;大血藤^[15](*Sargentodoxa cuneata*)种群的 G_{st} 为 0.540 6;七子花^[16](*Hepatocodium miconioides*)种群的 G_{st} 为 0.654 6。本研究采用 ISSR 分子标记技术对大明山 5 个夏蜡梅种群的遗传结构进行分析,结果显示其总的遗传多样性较高($P=57.31\%$, $I=0.268\ 9$, $h=0.174\ 5$),而种群水平的遗传多样性较低($P=25.03\%$, $I=0.148\ 8$, $h=0.102\ 8$)。AMOVA 分子变异方差分析显示,夏蜡梅种群间遗传变异较大,47.01%的变异存在于种群间,52.99%的变异存在于种群内;此外,用 I/h 计算的种群内与种群间遗传变异的分布结果与 AMOVA 分析结果相似, G_{st} 为 0.410 7,表明夏蜡梅各种群间出现显著的遗传分化。

影响种群遗传分化的因素很多,其中基因流是影响种群遗传分化的重要因素之一^[17]。通常情况下,具有较低水平基因流的物种比具较高水平基因流的物种有更高的遗传分化。在植物中花粉的扩散和种子的传播是基因流的 2 种主要形式。夏蜡梅花为虫媒花,但其花在形态上并不高度适应虫媒,且其传粉媒介大多是一些飞行能力有限或无飞行能力的小型昆虫,因此,相对于风媒传粉有很大的局限性^[4];此外,由于人类活动干扰和原有植被破坏所导致的生境片断化,夏蜡梅局限于互不相连的小区域内,形成若干个成岛状分布的小种群,这将进一步限制花粉在夏蜡梅种群间的扩散。因为,当种群内植物数量少,密度低时,将不足以维持较多的传粉者,

而导致传粉者数量减少,活动强度降低或发生不利于传粉的变化^[18]。同时,夏蜡梅的种子为果托所包被,果实成熟后依靠重力散播,其后代向外扩散的能力相当有限;加上人为采收和动物噬食,影响了夏蜡梅种群的天然更新^[4]。另外,植物物种的繁育系统也是影响种群遗传分化的重要因素^[17],夏蜡梅的繁育系统是以异交为主,自交亲和的混合交配系统^[3],一定程度上的近交也将限制基因在种群间的流动。Wright^[19]认为,种群间基因流大于 1,则能发生均质化作用;反之若小于 1,则表明基因流成为遗传分化的主要原因。5 个夏蜡梅种群间的基因流(N_m)为 0.717 3,小于 1,表明小尺度上夏蜡梅的基因流不足以阻止种群间的遗传分化。

通过对 5 个夏蜡梅种群的 UPGMA 聚类分析可知:Pop3 与 Pop5 遗传相似度最大,首先聚在一起;其次是 Pop1 与 Pop4;最后该 4 个种群再与 Pop2 聚在一起。Pop5 与 Pop3 分别位于不同的山坡上,地理距离远,而遗传距离最小;Pop1 与 Pop5 相距最近,仅 30 m,而遗传距离并非最小。这可能与微生境的异质性有关,Pop3 位于常绿落叶阔叶混交林的林缘,该样地人为砍伐较严重,尤其是高大乔木被砍伐后,林分较低矮,夏蜡梅位于群落的近冠层处,部分遮荫,光照条件较适宜;Pop5 位于人工檫木林林下,物种单一,林内植株较稀疏,群落的透光率大,与 Pop3 的光照条件较一致,其遗传相似度也最高;Pop1 与 Pop4 虽然海拔高度不同,但群落类型均为常绿阔叶林,人为干扰少,植被相对于其他样地保存最好,林内郁闭度高,夏蜡梅位于常绿阔叶林林下,光照并不充足,这 2 个样地的生境条件相对一致;Pop2 位于人工砍伐后的次生灌丛冠层,光照充足,在 5 个样地中单独成为一类。由此可见,不同基因型的个体在不同微生境上的适合度相异,导致具有相同基因型的个集聚在较适宜的微生境上,从而产生遗传分化。此外,夏蜡梅种群由于生境破碎化,使夏蜡梅的分布互不相连,种群之间产生隔离,并且种群变小,增加遗传漂变和近交作用,导致遗传多样性的丧失,使种群之间产生遗传分化。因此,微生境的异质性、种群隔离和遗传漂变均可能导致种群间的遗传分化。

种群之间的遗传分化越大,将要求更多的种群得到保护,以维持丰富的遗传变异,进一步确保物种的生存^[20];以上分析表明,夏蜡梅总的遗传多样性水平较高,种群的遗传多样性水平较低,种群间的遗

传分化明显。因此,对夏蜡梅进行保护时,首先,就地建立保护小区,保护夏蜡梅的适生生境。其次,通过人工授粉、人工播种、人工移植等方法,加强种群之间的基因交流,提高夏蜡梅的的遗传多样性和对环境的适应能力。第三,实施迁地保护时,应从各种群中选取足够的样本,保存更多的遗传多样性。

参考文献:

[1] 徐耀良,张若蕙,周骋. 夏蜡梅的群落学研究[J]. 浙江林学院学报,1997,14(4):355-362.

[2] 周世良,叶文国. 夏蜡梅的遗传多样性及其保护[J]. 生物多样性,2002,10(1):1-6.

[3] LI J M, JIN Z X. High genetic differentiation revealed by RAPD analysis of narrowly endemic *Sinocalycanthus chinensis* Cheng et S. Y. Chang, an endangered species of China [J]. Bi-
ochemical Systematics and Ecology, 2006, 34(10): 725-735.

[4] 金则新,李钧敏. 珍稀濒危植物夏蜡梅遗传多样性 ISSR 分析 [J]. 应用生态学报,2007,18(2):247-253.

[5] 刘惠芬,高玉葆,阮维斌,等. 内蒙古中东部不同草原地带羊草种群遗传分化[J]. 生态学报,2004,24 (10):2 157-2 164.

[6] ZIETKIEWICZ E, RRAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat(SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20: 176-183.

[7] 李钧敏,柯世省,金则新. 濒危植物七子花 DNA 的提取及分析 [J]. 广西植物,2002,22(6):499-502.

[8] 金则新,李钧敏. 濒危植物夏蜡梅 ISSR 扩增条件的优化[J]. 植物研究,2007,27(1):68-72.

[9] YE H F C, BOYLE T J B. Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits[J]. Belgian J. Botany, 1997, 129(1):157.

[10] 张富明,葛颂. 群体遗传学研究中的数据处理方法(I):RAPD 数据的 AMOVA 分析[J]. 生物多样性,2002,10(4):438-444.

[11] EXCIFFUER L, SMOUSE P, QUATTRO J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data[J]. Genetics, 1992, 131(2): 479-491.

[12] NEI M. Genetic distance between populations[J]. American Naturalist, 1972,106;283-292.

[13] BUSO G S C, RANGEL P H, Ferreira M E. Analysis of genetic variability of south American wild rice population (*Oryzaglumaepatula*) with isozymesand RAPDmarkers[J]. Molecular Ecology, 1987, 7(1):107-117.

[14] 王丽,杨娟,郭晶,等. 用 RAPD 检测华山新麦草自然居群的遗传结构和居群分化[J]. 生态学报,2005,25(4): 719-726.

[15] 李钧敏,金则新,钟章成. 不同海拔高度大血藤群体遗传多样性的 RAPD 分析及其与环境因子的相关性 [J]. 生态学报,2004,24(3):567-573.

[16] 金则新,李钧敏. 浙江天台山不同海拔高度七子花种群遗传多样性及其与环境因子的相关性分析[J]. 浙江大学学报:理学版,2005,32(4):452-458.

[17] 陈小勇. 生境片段化对植物种群遗传结构的影响及植物遗传多样性保护[J]. 生态学报,2000,20(5):884-892.

[18] LAMONT B B, KLINKHAMER P G L, WITKOWSKI E T F. Population fragmentation may reduce fertility to zero in *Banksia goodie*-a demonstration of the Allee effect[J]. Oecologia, 1993, 94(3): 446-450.

[19] WRIGHT S. Evolution in mendelian population[J]. Genetics, 1931, 16: 97-159.

[20] NEEL M C, ELLSTRAND N C. Conservation of genetic diversity in the endangered plant *Eriogonum ovalifolium* var. *vineum* (Polygonaceae) [J]. Conservation Genetics, 2003, 4 (3): 337-352.