

# 云南穗花杉的遗传多样性研究

王德莲, 李忠超, 葛学军\*

(中国科学院华南植物园, 广州 510650)

**摘要:** 采用随机扩增多态 DNA (RAPD) 方法对云南穗花杉 (*Amentotaxus yunnanensis*) 4 个居群和台湾穗花杉 (*Amentotaxus formosana*) 1 个居群共 104 个个体进行了遗传多样性分析。9 个随机引物共扩增出清晰谱带 143 条。云南穗花杉在物种水平上遗传多样性较高(多态位点百分率  $P$  为 79.0%, 基因多样性指数  $H_e$  为 0.2718), 但云南穗花杉和台湾穗花杉居群内遗传多样性均较低 ( $P$  为 18.0%、6.9%;  $H_e$  为 0.0688、0.0198)。云南穗花杉居群间遗传分化强烈 (AMOVA,  $G_{ST}$  和 Shannon 多样性指数分别为 0.7611, 0.7503 和 0.7526)。据推测, 第四纪冰川引起的瓶颈效应, 小规模居群引起的遗传漂变及幼苗成活率低等因素都加剧了居群间的遗传分化。建议对所研究的云南穗花杉全部居群予以保护, 特别是对云南西畴和贵州兴义市七舍两个具有相对较高遗传多样性的居群应该优先建立就地保护点, 以达到最大限度保存云南穗花杉遗传多样性的目的。

**关键词:** 云南穗花杉; 遗传多样性; RAPD

中图分类号: Q16

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2005)02-0143-06

## Genetic Diversity of the Relict Plant *Amentotaxus yunnanensis*

WANG De-lian, LI Zhong-chao, GE Xue-jun\*

(South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

**Abstract:** *Amentotaxus yunnanensis* Li (Taxaceae) is a rare and relict species with limited distribution. RAPD markers were used to determine the genetic variation within and among 4 populations of *A. yunnanensis* and one population of *A. formosana*. Although high level of genetic diversity was found in *A. yunnanensis* at the species level (Percentage of polymorphic loci: 79.0%, Nei's genetic diversity: 0.2718), there existed much lower genetic variation within populations (Percentage of polymorphic loci: 18.0% and 6.9%; Nei's genetic diversity: 0.0688 and 0.0198, for *A. yunnanensis* and *A. formosana*, respectively). A high degree of differentiation among populations was detected in *A. yunnanensis* (0.7611, 0.7503 and 0.7526 for AMOVA, Nei's coefficient of differentiation ( $G_{ST}$ ) and Shannon information index, respectively). It is suggested that the historical factors, including severe bottleneck and subsequent genetic drift during Quaternary glaciations and fragmentation in postglaciation, small population size and low seedling establishment would have contributed to such a population genetic structure in *A. yunnanensis*. Based on these results, strategies are proposed for the genetic conservation and management of *A. yunnanensis*.

**Key words:** *Amentotaxus yunnanensis*; Genetic diversity; RAPD

遗传多样性是指地球上所有生物携带的遗传信息的总和, 是一切多样性的基础和最重要的成分, 是生物进化的本质<sup>[1]</sup>。近年来的研究表明, 遗传多样性的丧失将对物种生存带来不利影响<sup>[2]</sup>。对濒危植物遗传多样性研究不仅能了解物种的进化历

史以及导致物种稀有或濒危的机制, 而且关系到能否采取科学有效的措施来保护濒危物种, 是保护生物学研究的核心之一<sup>[3]</sup>。

目前, 用于遗传多样性研究的分子标记主要有等位酶、随机扩增多态 DNA (RAPD)、简单重复序

收稿日期: 2004-06-02 接受日期: 2004-10-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30170070) 资助

\* 通讯作者 Corresponding author

列 (SSR)、简单重复序列区间 (ISSR) 和扩增长度片段多态 (AFLP) 等技术。其中 RAPD 技术由于其具有简便、快速、经济、DNA 用量少、多态性好等特点已经广泛应用于遗传多样性检测、基因定位、品系鉴定、医学诊断、遗传图谱构建和系统学研究等诸多领域<sup>[9]</sup>。最近研究表明, RAPD 和 AFLP 一样, 可以作为可靠的分子标记使用<sup>[9]</sup>。

云南穗花杉 (*Amentotaxus yunnanensis* Li) 分布于云南和贵州的部分地区, 越南北部也有分布, 是国家二级保护植物<sup>[6]</sup>。台湾穗花杉 (*A. formosana* Li) 仅见于台湾南部, 生于海拔 850–1 000 m 的山地林中, 为国家一级保护植物<sup>[7]</sup>。目前对云南穗花杉的研究仅限于形态学、分类学和生态学方面。Wang 等<sup>[8]</sup>曾对台湾穗花杉的遗传多样性做过等位酶和 RAPD 分析, 为了深入了解云南穗花杉遗传结构及其形成的原因, 本研究选取了一个台湾穗花杉居群作为对照, 采用 RAPD 方法对云南穗花杉 4 个居群和台湾穗花杉 1 个居群遗传多样性进行分析, 检测云南穗花杉居群的遗传结构, 为有效保护云南穗花杉提供科学的取样策略。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料采集

云南穗花杉材料取自云南麻栗坡, 西畴和贵州兴义市七舍, 安龙县石盘共 4 个天然居群。台湾穗花杉材料取自台湾浸水营 1 个居群。根据居群大小, 每个居群各取 20–21 株个体的新鲜叶片, 分别用硅胶进行快速干燥固定带回实验室于室温下保存备用。5 个居群的地理位置和取样个体数详见表 1。

表 1 云南穗花杉和台湾穗花杉居群的地理位置和取样个体数  
Table 1 Localities and number of samples from *A. yunnanensis* and *A. formosana* populations

地点 Localities	居群 Population	海拔 Altitude (m)	经度 (E) Longitude	纬度 (N) Latitude	取样数 Number of samples
贵州安龙县 Anlong, Guizhou	Anlong	1400	105°30'	25°10'	21
贵州兴义市 Xingyi, Guizhou	Xingyi	1950	104°45'	24°50'	21
云南麻栗坡 Malipo, Yunnan	Malipo	1300	104°58'	23°16'	21
云南西畴 Xichou, Yunnan	Xichou	1400	105°01'	23°28'	21
台湾浸水营 Chinshuiying, Taiwan	Taiwan	2000	120°20'	22°50'	20

### 1.2 DNA 的制备和 PCR 扩增

采用 CTAB 法<sup>[9]</sup>提取基因组 DNA, 通过 1% 的琼脂糖电泳检测 DNA 质量, -20℃ 保存备用。从上海生工 RAPD 引物中筛选出 9 个能获得清晰条带且反应稳定的引物 (S26, S29, S30, S32, S37, S39, S106, S140, S186) 用于 5 个居群的 PCR 扩增。每个 RAPD-PCR 反应体系为 20 μL, 其中包括 20 ng 的模板 DNA, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0), 50 mmol/L KCl, 0.1% Triton X-100, 2.7 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mmol/L dNTPs, 2% formamide, 200 nmol/L primer 及 1.5 U Taq 酶。每个引物均设一个空白对照反应以排除系统误差。反应在 PTC-100 型 PCR 反应仪上进行。反应程序为首先 94℃ 预变性 4 min, 接着进行以下 45 个循环: 94℃ 15 s, 35–38℃ 45 s, 72℃ 75 s; 最后 72℃ 延伸 7 min。反应产物在含溴化乙锭 (ethidium bromide, 0.1 μg ml<sup>-1</sup>) 的 1.5% 琼脂糖凝胶中, 以 0.5× TBE 为电泳缓冲液电泳分离, 最后用紫外成像系统 LabWorks Software Version 3.0 (UVP, Upland, CA 91786, USA) 成像, 用 100 bp 的 DNA ladder 作为分子量标准。

### 1.3 数据分析

同一位点的产物按扩增有 (1) 无 (0) 记录电泳带谱, 形成 RAPD 表型数据矩阵用于进一步分析。采用 POPGENE v1.31 软件<sup>[10]</sup>计算多态位点百分率 (P)、Nei's 居群水平基因多样性指数 (H<sub>e</sub>)、Nei's 物种水平基因多样性指数 (H<sub>T</sub>)、遗传分化系数 (G<sub>ST</sub>)、Nei's 遗传距离 (D) 及遗传一致度 (I<sup>[11]</sup>)。用 NTSYSpc 2.0<sup>[12]</sup>中的 SHAN 程序对两种穗花杉的遗传距离进行 UPGMA 聚类。由于 ISSR 为显性分子标记, 因此我们也计算了 Shannon's 多样性指数 ( $H_o = -\sum p_i \log p_i$ )。H<sub>o</sub> 分别在居群水平 (H<sub>pop</sub>) 和物种水平 (H<sub>sp</sub>) 上计算, 居群间分化采用 (H<sub>sp</sub> - H<sub>pop</sub>) / H<sub>sp</sub> 估计。采用 AMOVApre1.0<sup>[13]</sup>和 AMOVA1.55 软件<sup>[14]</sup>分析遗传变异在居群间及种间的分布情况, 同时用 Mantel test<sup>[15]</sup>检测云南穗花杉 4 个居群的空间距离和遗传距离之间的相关性。

## 2 结果

### 2.1 遗传多样性

9 个 RAPD 引物共扩增出清晰谱带 143 条, 两个种共有的有 71 条谱带 (47.33%)。云南穗花杉 4 个居群扩增出 138 条谱带, 多态谱带 113 条, 台湾穗花杉扩增出 83 条谱带, 多态谱带为 10 条 (表 2)。

表 2 RAPD 引物序列及其扩增情况  
Table 2 Sequences of RAPD primer and description of amplification

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence	总位点数 Total number of loci	多态位点数 No. of polymorphic loci	云南穗花杉 <i>A. yunnanensis</i>		台湾穗花杉 <i>A. formosana</i>	
				单态位点 Monomorphic loci	多态位点 Polymorphic loci	单态位点 Monomorphic loci	多态位点 Polymorphic loci
S26	GGTCCCTGAC	17	15	3	13	8	1
S29	GGGTAACGCC	15	11	3	12	7	1
S30	GTGATCGCAG	18	12	6	12	8	1
S32	TCGGCGATAG	23	22	2	19	10	1
S37	GACCGCTTGT	10	9	1	9	8	0
S39	CAAACGTCGG	16	14	2	13	7	4
S106	ACGCATCGCA	10	9	3	7	7	0
S140	GGTCTAGAGG	18	17	2	12	10	0
S186	GATACCTCGG	16	14	3	16	8	2

云南穗花杉 4 个居群中, 单个居群的多态位点百分率(P) 为 16.8%–18.9%, 平均为 18.0%; Nei's 基因多样性指数(He)为 0.0593–0.0724, 平均 0.075; Shannon 多样性指数(Hpop)值为 0.0892–0.1064, 平均为 0.1006。以兴义市七舍和西畴两个居群具有最高的遗传变异(P: 18.9%, 18.9%; He: 0.0716, 0.0724; Hpop: 0.1061, 0.1064)(表 3)。物种水平上, 多态位点百分率(P)为 79.0%, 基因多样性指数(H<sub>T</sub>)为 0.2718, Shannon 多样性指数(H<sub>sp</sub>)为 0.4066。与云南穗花杉 4 个居群相比, 台湾穗花杉居群遗传多样性最低, 多态位点百分率仅为 6.9%; 物种多态位点百分率为 12.0%。

2.2 遗传结构

AMOVA 分析表明, 云南穗花杉和台湾穗花杉种间的遗传分化很小, 两个种种间区别引起的变异

只占 0.21%, 而种内居群间和居群内变异却分别占 82.27%和 17.53%。在云南穗花杉内, 大部分遗传变异存在于居群间而非居群内(居群间: 76.11%)(表 4)。Nei's 遗传分化系数(G<sub>ST</sub>)和 Shannon 多样性指数(分别为 0.7503 和 0.7526)均验证了在云南穗花杉内存在极大的遗传分化。

云南穗花杉 4 个居群中, 遗传距离从 0.2266 到 0.4203, 平均为 0.347。西畴和安龙之间的遗传距离最高(D = 0.4203), 兴义市七舍和麻栗坡之间的遗传距离最低(D = 0.2266)。四个居群间的遗传一致度(I)为 0.6569–0.7973, 平均为 0.708 (表 5)。Mantel test 检测表明, 遗传距离和空间距离不显著相关(r = 0.775, p < 0.05)。根据遗传距离进行的 UPGMA 聚类分析显示(图 1), 云南穗花杉 4 个居群聚在一起, 和台湾穗花杉分为对应的 2 组。

表 3 居群内的遗传多样性  
Table 3 Genetic variability within populations *A. yunnanensis*

物种 Species	居群 Population	He	Hpop	P (%)
云南穗花杉 <i>A. yunnanensis</i>	Anlong	0.0682	0.1005	17.5
	Xingyi	0.0716	0.1061	18.9
	Malipo	0.0593	0.0892	16.8
	Xichou	0.0724	0.1064	18.9
	平均 Mean	0.0688	0.1006	18.0
物种水平 Species level		H <sub>T</sub> : 0.2718	H <sub>sp</sub> : 0.4066	79.0
		G <sub>ST</sub> : 0.7503	(H <sub>sp</sub> -Hpop)/H <sub>sp</sub> : 0.7526	
台湾穗花杉 <i>A. formosana</i>	Taiwan	0.0198	0.0299	6.9

He: 居群水平基因多样性指数 Nei's gene diversity index at population level; H<sub>T</sub>: 物种水平基因多样性指数 Nei's gene diversity index at species level; G<sub>ST</sub>: Nei's 基因分化系数 Nei's coefficient of gene differentiation; Hpop: 居群内 Shannon 多样性指数 Shannon information index within population level; Hsp: 物种水平 Shannon 多样性指数 Shannon information index at species level.

表 4 分子方差 (AMOVA) 分析  
Table 4 Analysis of molecular variance (AMOVA)

变异来源 Source of variation	自由度 d.f.	方差和 Sum of squares	均方 Mean squares	变异组分 Variance component	总变异百分率 % total variance	显著值 p-value
<i>A. yunnanensis</i> vs. <i>A. formosana</i> 种间 Among taxa	1	490.9786	490.979	0.05819	0.21	< 0.001
种内居群间 Among populations within taxa	3	1452.9186	484.306	23.10619	82.27	< 0.001
	居群内 Within populations	99	487.3143	4.922	4.92237	17.53
<i>A. yunnanensis</i> 居群间 Among populations	3	1192.44	397.48	18.65	76.11	< 0.001
	居群内 Within populations	80	468.38	5.86	5.85	23.89

表 5 云南穗花杉和台湾穗花杉的遗传一致度 (对角线上) 和遗传距离 (对角线下)

Table 5 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among populations of *A. yunnanensis* and *A. formosana*

居群 Population	Xingyi	Anlong	Malipo	Xichou	Taiwan
Xingyi	****	0.7318	0.7973	0.6989	0.5675
Anlong	0.3123	****	0.6856	0.6569	0.5193
Malipo	0.2266	0.3774	****	0.6789	0.5717
Xichou	0.3583	0.4203	0.3873	****	0.6106
Taiwan	0.5666	0.6553	0.5591	0.4933	****

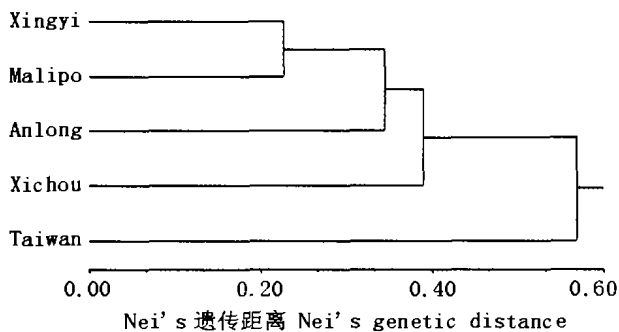


图 1 云南穗花杉和台湾穗花杉居群间 Nei's 遗传距离 UPGMA 聚类图

Fig. 1 UPGMA dendrogram based on Nei's genetic distance

### 3 讨论

#### 3.1 遗传多样性

目前用 RAPD 研究裸子植物遗传多样性的资料比较多, 但是不同物种之间遗传多样性差异较大。李晓东等<sup>[16]</sup>对水杉的 RAPD 分析显示各居群多态位点百分率差异显著 (10.53%–33.33%); 汪小全等<sup>[17]</sup>对银杉的分析表明各居群多态位点百分率为 32%; 而葛永奇等<sup>[18]</sup>的分析显示银杏的遗传多样性水平较高 (P: 68%)。Hamrick & Godt<sup>[19]</sup>根据等位酶研究结果总结了 55 种裸子植物的遗传多样性, 显

示这些裸子植物的多态位点百分率 (P) 平均为 70.9%。本研究中云南穗花杉虽然在物种水平上遗传多样性不低 (P: 79.0%), 但是在居群水平上, 多态位点百分率 (P) 仅为 18.0%, 台湾穗花杉更低。Wang 等<sup>[8]</sup>对台湾穗花杉 Tawu 和 Tsatsayalai 两个居群共 45 个个体的研究显示, 它们的多态位点百分率为 20.87%。在本研究中, 台湾穗花杉浸水营居群的多态位点百分率也只有 12.0%。这种差别可能一方面是研究的居群不同, 另一方面可能使用的引物不同造成的。可见, 台湾穗花杉遗传多样性偏低。

物种的遗传多样性和其分布范围有很大关系, 与广布种相比, 狭域分布种容易受到遗传漂变的作用从而遗传多样性通常较低<sup>[19]</sup>。云南穗花杉分布狭窄, 仅分布于云南和贵州的少数地区, 且居群规模小, 容易受到遗传漂变的作用, 降低居群的遗传多样性水平。此外, 物种的遗传多样性还受物种进化过程中历史事件的影响。据化石记载, 穗花杉属 (*Amentotaxus*) 自晚白垩纪以来曾广泛分布于北美<sup>[20]</sup>和欧洲<sup>[21]</sup>的中纬度地区, 第四纪冰川使得穗花杉属的分布区急剧缩小, 大量的穗花杉属植物因为不能抵御冰川的作用而灭绝, 因此现代自然分布区大为缩小, 并且呈零星分布<sup>[22]</sup>。最终保存下来的居群代表保存了原始穗花杉属的部分基因型。有可能在这个进化历史过程中云南穗花杉经历了严重的瓶颈效应, 导致遗传多样性大大降低。

生活史特征被认为是影响遗传多样性水平和分化的主要因素<sup>[19]</sup>。长寿命、远交、风媒传粉的裸子植物居群间的遗传分化应该较低<sup>[23]</sup>。然而, 越来越多的研究显示, 一些具有此特点的裸子植物具有较高的居群间遗传分化<sup>[24]</sup>。云南穗花杉的遗传分化在 75% 左右, 表明云南穗花杉居群间的分化十分强烈。云南穗花杉的  $G_{ST}$  值明显高于其它具有相似生态特征的木本植物 (热带分布树种  $G_{ST}$ : 0.119; 异交风媒树种  $G_{ST}$ : 0.077; 重力传播种子树种  $G_{ST}$ : 0.131)<sup>[23]</sup>。

本研究结果表明,尽管在种的水平上,云南穗花杉有较高的遗传多样性,但是这种多样性分布在各个居群间,每个居群的遗传变异都很少。

植物群体的遗传变异水平和群体遗传结构是其进化历史、分布范围、繁育方式、种子散布机制等各种不同因素综合作用的结果<sup>[25]</sup>。在影响物种遗传结构的各个生活史特征中,物种的繁育系统对其遗传多样性高低和结构影响较大。尽管云南穗花杉为风媒传粉、雌雄异株植物,但是由于居群规模小,一方面易于引起遗传漂变,另一方面容易导致后代的自交,从而导致遗传多样性的降低和遗传分化的加剧<sup>[26]</sup>。另外,基因流的强弱对居群分化具有重要影响。在植物中,花粉和种子的扩散和传播是基因流的两种最主要形式。云南穗花杉种子较大,不利于传播,而且易被动物取食;种子发芽率低,幼苗成活率低,这些因素都会限制居群间的基因交流,加剧居群间的遗传分化。

云南穗花杉和台湾穗花杉的区别仅在于前者叶较宽,雄球花通常四穗以上集生,较台湾穗花杉长5-10 cm<sup>[27]</sup>。近来有学者认为它们应该属于1个种<sup>[28]</sup>。在本研究的5个居群中,遗传变异主要存在于居群之间,云南穗花杉和台湾穗花杉之间的遗传差异很小,但是台湾居群又可以和大陆居群通过聚类分析分开,因此我们支持周其兴<sup>[28]</sup>将它们合并为一个种,并将云南穗花杉和台湾穗花杉分别作为种下的不同变种的处理。

### 3.2 保护策略

物种的遗传多样性水平和遗传结构与其适应性和进化潜力密切相关,故检测物种的遗传变异水平和空间结构关系到物种保护和复壮的策略和措施的制定<sup>[29]</sup>。尤其是针对稀有和濒危的物种以及受人类直接干扰和破坏的物种,在缺乏基本的遗传学信息的情况下很难制定科学合理的保护和抢救措施。在对物种实施保护计划的过程中,就地保护地点的选择和迁地保护的采样策略都需要遗传学资料作为基础<sup>[30]</sup>。云南穗花杉的居群规模都较小,且居群间存在着较大的遗传分化,因此每个居群都应该得到保护。考虑到云南西畴和贵州兴义市七舍两个居群具有最高的遗传多样性,因此建议首先对这两个居群进行就地保护。在迁地保护时,鉴于居群间分化较大,应该从所有居群进行采集样本,尽可能多地保存遗传资源。

**致谢** 贵州省黔东南州林科所邓朝义, 吴迎福,

昆明植物研究所龚洵,台湾成功大学蒋镇宇等协助进行野外采集,在此表示衷心感谢。

### 参考文献

- [1] 祖元刚, 张文辉, 阎秀峰, 等. 濒危植物裂叶沙参的保护生物学研究 [M]. 北京: 科学出版社, 1999. 4.
- [2] Saccheri R, Angelis G D, Corbo R M. Effect of the breeding system on the genetic structure in three *Cephalanthera* spp. (Orchidaceae) [J]. *Plant Syst Evol*, 1991, 176:53-61.
- [3] Zhang D Y (张大勇), Jiang X H (姜新华). Progress in studies of genetic diversity and conservation biology of endangered plant species [J]. *Biodiver Sci* (生物多样性), 1999, 7(1):31-37. (in Chinese)
- [4] Jang Z F (姜自锋), Lin L Q (林乃铨), Xu M (徐梅). A review on some technical problems in RAPD application [J]. *J Fujian Agri For Univ* (福建农林大学学报), 2002, 31(3):356-360. (in Chinese)
- [5] Kjølnner S, Sæstad S M, Taberlet P, et al. Amplified fragment length polymorphism versus random amplified polymorphic DNA markers: clonal diversity in *Saxifraga cernua* [J]. *Mol Ecol*, 2004, 13:81-86.
- [6] 傅立国. 中国植物红皮书(第一册) [M]. 北京: 科学出版社, 1992. 134-136.
- [7] Wei H T (魏宏图), Deng M B (邓懋彬), Jin N C (金念慈), et al. Quantitative microcomputerization on grading of rare and endangered plants in China [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1993, 35 (suppl.):111-118. (in Chinese)
- [8] Wang C T, Wang W Y, Chiang C H, et al. Low genetic variation in *Amentotaxus formosana* Li revealed by isozyme analysis and random amplified polymorphic DNA markers [J]. *Heredity*, 1996, 77:388-395.
- [9] Doyle J. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation [A]. In: Hewitt G M, Johnston A. *Molecular Techniques in Taxonomy* [M]. Germany, Berlin: Springer, 1991. 283-293.
- [10] Yeh F C, Yang R, Boyle T. POPGENE. Microsoft Windows-based Freeware for Population Genetic Analysis. Release 1.31 [M]. Edmonton: University of Alberta, 1999.
- [11] Nei M. Genetic distance between populations [J]. *Amer Natl*, 1972, 106:283-292.
- [12] Rohlf F J. NTSYS-pc 2.0 Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Exeter Software [CP/DK]. New York, 1998.
- [13] Miller M P. AMOVA-PREP 1.01: A program for the preparation of AMOVA input files from dominant markers raw data [CP/DK]. Computer software distributed by author, 1998.
- [14] Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondria DNA restriction sites [J]. *Genetics*, 1992, 131:479-491.
- [15] Miller M P. Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA), Version 1.3 [CP/DK]. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Arizona, USA, 1997.
- [16] Li X D (李晓东), Huang H W (黄宏文), Li J Q (李建强). Genetic diversity of the relict plant *Metasequoia glyptostroboides* [J].

- Biodiver Sci (生物多样性), 2003, 11(2):100-108. (in Chinese)
- [17] Wang X Q(汪小全), Zou Y P(邹喻平), Zhang D M(张大明). Genetic diversity analysis by RAPD in *Cathaya argyrophylla* Chun et Kuang [J]. Sci China (Ser C) (中国科学 C 辑), 1996, 26(5): 436-441. (in Chinese)
- [18] Ge Y Q(葛永奇). Study on the genetic diversity of the relict plant *Ginkgo biloba* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2003. 1-70. (in Chinese)
- [19] Hamrick J L, Godt M J W. Allozyme diversity in plant species [A]. In: Brow A H D, Clegg M T, Kahier A L, et al. Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources [M]. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1989. 43-63.
- [20] Royer D L, Hickey L J, Wing S L. Ecological conservatism in the "living fossil" *Ginkgo* [J]. Paleobiol, 2003, 29:84-104.
- [21] Ferguson DK, Jähnichen H, Alvin KL. *Amentotaxus* Pilger from the European Tertiary [J]. Feddes Repert, 1979, 89 (7-8): 379-410.
- [22] Ying TS(应俊生), Li LQ(李良千). Ecological distribution of endemic genera of taxales and conifers in China and neighbouring area in relation to phytogeographical significance [J]. Acta Phytotax Sin (植物分类学报), 1981, 19(4):408-415. (in Chinese)
- [23] Hamrick J L, Godt M J W, Sherman-Broyles S L, et al. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species [J]. New For, 1992, 6:95-124.
- [24] Szmidt A E, Wang X R, Changtragoon S. Contrasting patterns of genetic diversity in two tropical pines: *Pinus kesya* (Royle ex Gordon) and *P. merkusii* (Jungh et De Vriese) [J]. Theor Appl Genet, 1996, 92:436-441.
- [25] Hamrick J L, Godt M J W, Murawski D A, et al. Correlations between species traits and allozyme diversity implications for conservation biology [A]. In: Falk D A, Holsinger K E. Genetics and Conservation of Rare Plants [M]. New York: Oxford University Press, 1991. 75-86.
- [26] Ellstrand N C, Elam D R. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation [J]. Ann Rev Ecol Syst, 1993, 24:217-242.
- [27] Zheng W J(郑万均). *Sylva Sinica* Vol. 1 [M]. Beijing: China Forestry Press, 1983. 393-349.
- [28] Zhou Q X(周其兴). Studies on systematics of Taxaceae [D]. Kunming: Kunming Institute of Botany, 2001. 1-133. (in Chinese)
- [29] 葛颂, 洪德元. 遗传多样性及其检测方法 [A]. 钱迎倩, 马克平. 生物多样性研究的原理与方法 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994. 123-140.
- [30] Falk D A, Holsinger K E. Genetics and Conservation of Rare Plants [M]. New York: Oxford University Press, 1991.