

# 喜马拉雅 - 横断山区钟花报春居群 遗传多样性及遗传分化

王凤英, 葛学军, 郝刚\*, 胡启明

(中国科学院华南植物园, 广州 510650)

**摘要:**应用简单序列重复区间(ISSR, Inter-simple sequence repeat)分子标记,对喜马拉雅-横断山区钟花报春(*Primula sikkimensis*)进行居群遗传分析。用10个ISSR引物对13个居群的254个个体进行扩增,共检出91条扩增片段,全部为多态带,总的多态位点百分率为100%。Shannon多样性指数( $H_0$ )从0.2293到0.4016,居群水平上平均值( $H_{POP}$ )为0.3211,物种水平上( $H_{SP}$ )为0.5576。利用分子方差(AMOVA)软件分析,其结果为:在总的遗传变异中,有50.28%的遗传变异属于居群之间;用POPGENE计算出的遗传分化系数 $G_{ST}=0.4127$ ,即居群间的分化变异占居群总遗传变异的41.27%,比AMOVA分析所得的结果偏低。居群间遗传距离变化范围从0.0780到0.4748,遗传一致度(I)的变化范围从0.6220到0.9250。居群间的基因流 $N_m=0.7114$ ,相对低的基因流可能是维持钟花报春居群遗传分化的原因。这表明,喜马拉雅-横断山区钟花报春的13个居群具有很高的遗传多样性,并且居群间的分化也很大。

**关键词:**喜马拉雅-横断山区;报春花科;钟花报春;遗传多样性;遗传分化

中图分类号:Q16

文献标识码:A

文章编号:1005-3395(2005)02-0149-05

## Genetic Diversity and Differentiation in *Primula sikkimensis* (Primulaceae) in Himalayan-Hengduan Mountains

WANG Feng-ying, GE Xue-jun, HAO Gang\*, HU Qi-ming

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

**Abstract:** Population genetic structure of *Primula sikkimensis* distributed in Himalayan-Hengduan Mountains was studied using Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Ten ISSR primers were used to amplify 254 individuals of 13 populations, which successfully detected 91 loci, all of which being polymorphic. The Shannon diversity index ( $H_0$ ) ranged from 0.2293 to 0.4016, with an average of 0.3211 at the population level ( $H_{POP}$ ) and 0.5576 at the species level ( $H_{SP}$ ). Moreover, the AMOVA analysis showed that 50.28% of the total genetic diversity was among populations; the index ( $G_{ST}=0.4127$ ) based on POPGENE indicated that 41.27% of molecular variation was among populations, which was lower than that in the result of AMOVA. The variation of genetic distance ranged from 0.0780 to 0.4748, genetic identity from 0.6220 to 0.9250. In addition, the gene flow among population was low ( $N_m=0.7114$ ); relatively lower gene flow might be one of important factors influencing the genetic structure of the species. The present analysis reveals that 13 populations of *P. sikkimensis* in Himalayan-Hengduan Mountains have high genetic diversity and high genetic differentiation.

**Key words:** Himalayan-Hengduan Mountains; Primulaceae; *Primula sikkimensis*; Genetic diversity; Genetic differentiation

收稿日期:2004-07-13 接受日期:2004-10-09

基金项目:国家自然科学基金(30370100,30470125);广东省自然科学基金(31255);中国科学院知识创新工程重要方向性项目(kscxz-sw-101A)资助

\* 通讯作者 Corresponding author

东喜马拉雅及横断山地区是全球 25 个、北半球仅有的两个生物多样性研究热点之一的中国中南热点的核心区域<sup>[1,2]</sup>,也是欧亚大陆很多植物的发源地和避难所。这一地区因其复杂的地质历史和多样化的生境及气候条件,蕴育出丰富的物种多样性和特有成分,是研究物种分化和物种形成机制的理想地区。

报春花属 (*Primula*) 在喜马拉雅 - 横断山地区的分化是种子植物在此地区急剧辐射演化的一个典型例子。报春花属共有 500 余种,我国约有 300 种,西藏东南部至云南、四川西部(亦即东喜马拉雅 - 横断山地区)是该属植物的现代分布中心和多样化中心<sup>[3]</sup>。

钟花报春 (*P. sikkimensis* Hook.) 隶属于报春花属钟花报春组,多年生草本,在我国产于四川西部、云南西北部和西藏,生长于林缘湿地、沼泽草甸和水沟边,海拔 3 200–4 400 m 处。在尼泊尔、锡金、不丹亦有分布<sup>[4]</sup>。

喜马拉雅 - 横断山地区具有丰富的物种多样性和特有成分是早已认同的事实,以分子生物学的手段来探讨本地区植物类群自第四纪以来的物种分化、适应性进化和物种迁移路线的研究也逐渐开展<sup>[5-8]</sup>。本文利用简单序列重复区间 (ISSR, inter-simple sequence repeat) 分子标记来检测喜马拉雅 - 横断山地区钟花报春的遗传多样性和遗传结构,探讨其在居群水平上的遗传分化式样,为研究本地区的物种分化和物种形成积累资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

以居群为单位采集生长于喜马拉雅 - 横断山区的钟花报春。共采集到 13 个居群,每个居群各取大约 20 株个体的新鲜叶片,分别用变色硅胶进行快速干燥,置于密封袋中带回实验室,于室温下保存。材料来源见表 1。

### 1.2 总 DNA 的提取、PCR 扩增和数据分析

采用改进的 CTAB 法<sup>[9]</sup>从叶片中提取总 DNA,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

从 100 个 ISSR 引物中筛选出 10 个能获得清晰条带的引物,引物及序列见表 2。PCR 反应体系 20  $\mu$ l,  $Mg^{2+}$  浓度为 2.5 mmol/L。PCR 扩增反应在 PTC-100 或 PTC-200 的 PCR 仪上进行。扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后进行 35 个循环:94 $^{\circ}$ C 30 s, 49–51 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

反应产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳检测。

ISSR 是显性标记,同一引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性。属于同一位点的产物按扩增阳性 (1) 和扩增阴性 (0) 记录电泳图谱,形成 ISSR 表型数据矩阵。为衡量 ISSR 水平上的遗传变异程度,利用 POPGENE v.1.31 软件<sup>[10]</sup>,计算多态位点百分数 (PPB)、Shannon 多样性指数 ( $H_o$ )、在物种水平上的遗传多样性 ( $H_{sp}$ )、在居群水平上的遗传多样性 ( $H_{pop}$ )、居群间遗传分化系数 ( $G_{ST}$ )、居群间遗传一致性 (I) 及基因流 (Nm)。另外采

表 1 材料来源及居群内遗传变异

Table 1 Sample location of *Primula sikkimensis* and genetic variation within populations

居群编号 Population No.	采集地点 Location	凭证标本 Voucher	居群采样数量 Sample number	经度 Longitude (E)	纬度 Latitude (N)	$H_o$	P (%)
1	四川泸定 Luding, Sichuan	Hao 456	16	102 $^{\circ}$ 17'	29 $^{\circ}$ 51'	0.2700	46.15
2	四川康定 Kangding, Sichuan	Hao 462	19	101 $^{\circ}$ 58'	30 $^{\circ}$ 02'	0.3564	58.24
3	四川雅江 Yajiang, Sichuan	Hao 464	19	101 $^{\circ}$ 02'	30 $^{\circ}$ 02'	0.3507	60.44
4	四川卧龙 Wolong, Sichuan	Hao 481	20	103 $^{\circ}$ 09'	31 $^{\circ}$ 03'	0.3317	56.04
5	云南中甸 Zhongdian, Yunnan	Hao 497	20	100 $^{\circ}$ 03'	27 $^{\circ}$ 54'	0.3635	64.84
6	云南中甸 Zhongdian, Yunnan	Hao 499	20	99 $^{\circ}$ 47'	28 $^{\circ}$ 30'	0.2898	47.25
7	四川乡城 Xiangcheng, Sichuan	Hao 504	20	99 $^{\circ}$ 50'	28 $^{\circ}$ 57'	0.3281	53.85
8	四川稻城 Daocheng, Sichuan	Hao 508	20	100 $^{\circ}$ 22'	28 $^{\circ}$ 35'	0.3043	53.85
9	云南德钦 Deqin, Yunnan	Hao 509	20	98 $^{\circ}$ 57'	28 $^{\circ}$ 26'	0.3474	58.24
10	西藏林芝 Linzhi, Tibet	Ge & Yuan 2003T-6	20	94 $^{\circ}$ 43'	29 $^{\circ}$ 55'	0.3399	56.04
11	西藏左贡 Zuogong, Tibet	Ge & Yuan 2003T-7	20	97 $^{\circ}$ 53'	29 $^{\circ}$ 41'	0.4016	67.03
12	西藏芒康 Mangkang, Tibet	Ge & Yuan 2003T-5	20	98 $^{\circ}$ 38'	29 $^{\circ}$ 41'	0.2615	46.15
13	西藏芒康 Mangkang, Tibet	Ge & Yuan 2003T-5a	20	98 $^{\circ}$ 32'	29 $^{\circ}$ 28'	0.2293	39.56

$H_o$ : Shannon 多样性指数 Shannon's information index;

P: 多态位点百分率 Percentage of polymorphic loci

用 AMOVA 1.55 软件<sup>[11]</sup>分析遗传变异在居群间的分布情况。用 Mantel test<sup>[12]</sup>检测居群之间的遗传距离与地理距离之间的关系。

表 2 钟花报春的 ISSR 引物序列  
Table 2 Primers used in ISSR for *Primula sikkimensis*

引物名称 Prime name	序列 Sequence 5'-3'
808	(AG) <sub>8</sub> C
811	(GA) <sub>8</sub> C
814	(CT) <sub>8</sub> A
827	(AC) <sub>8</sub> G
834	(AG) <sub>8</sub> YT
835	(AG) <sub>8</sub> YC
840	(GA) <sub>8</sub> YT
857	(AC) <sub>8</sub> YG
888	BDB(CA) <sub>7</sub>
889	DBD(AC) <sub>7</sub>

## 2 结果

10 个引物在 254 个个体中共扩增出 91 条带, 平均每个引物扩增出 9.1 条带, 扩增片段长度为 280-1 400 bp。91 条带均为多态性条带, 多态位点百分数 (PPB) 为 100%。单个居群的多态带百分率从 39.56% 到 67.03%, 平均为 54.44%。Shannon 多样性

指数 ( $H_o$ ) 从 0.2293 到 0.4016 (表 1), 居群水平上平均值 ( $H_{POP}$ ) 为 0.3211, 物种水平上 ( $H_{SP}$ ) 为 0.5576。

用 POPGENE 计算出的居群间遗传分化系数  $G_{ST} = 0.4127$ , 表明在总的遗传多样性中, 有 41.27% 的变异来自于居群之间。居群之间每一代的基因流 ( $N_m$ ) 为 0.7114, 这表明居群之间的基因流水平较低。

利用 AMOVA 软件分析, 表明在总的遗传变异中, 有 50.28% 的遗传变异发生在居群之间, 49.72% 的遗传变异位于居群内 (表 3)。

表 4 显示了钟花报春各居群地理距离和遗传距离之间的关系。Mantel test 结果显示居群之间的遗传距离与地理距离之间呈正相关 ( $r = 0.5906, p = 0.0109$ )。根据钟花报春各个居群之间的遗传距离进行聚类 (图 1)。13 个居群明显分为 2 类, 一类为采自西藏的 4 个居群, 另一类为采自四川和云南的 9 个居群。

## 3 讨论

### 3.1 遗传多样性

遗传多样性是一个物种生存、发展和进化的基础<sup>[13]</sup>。Hamrick 等曾多次对植物居群遗传结构与植物生活史特性和生态因子之间的关系进行综合研究, 结果表明, 繁育系统、分布范围和习性<sup>[14-16]</sup>是影

表 3 分子方差分析结果  
Table 3 Analysis of molecular variance

变异来源 Source of variation	自由度 d.f.	方差和 Sum of squares	平均方差 Mean squares	变异组分 Variance component	总变异百分率 % total variance	p-value
居群间 Among populations	12	2127.94	177.33	8.64	50.28	< 0.001
居群内 Within populations	241	4187.07	8.54	8.54	49.72	< 0.001

表 4 钟花报春居群间的遗传距离及地理距离表 (对角线上为地理距离, 下为遗传距离)

Table 4 Pairwise Phist distance estimates and geographical distances between *Primula sikkimensis* populations based on ISSR fingerprinting (Geographical distance in kilometers above diagonal and genetic distance below diagonal)

居群* Population	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	****	37	122	157	307	285	257	233	360	729	425	353	365
2	0.3270	****	90	160	302	272	239	224	342	698	395	324	337
3	0.3010	0.2334	****	232	256	209	167	174	269	608	306	235	249
4	0.4594	0.3637	0.2874	****	461	431	395	384	499	817	527	459	477
5	0.4924	0.3856	0.3461	0.3381	****	72	119	82	123	565	289	241	228
6	0.6019	0.4711	0.4977	0.5264	0.5372	****	50	58	82	516	227	173	162
7	0.5478	0.4548	0.3993	0.4644	0.4655	0.3537	****	66	103	507	206	142	139
8	0.5423	0.3997	0.4181	0.4239	0.4706	0.4183	0.2871	****	139	567	270	208	203
9	0.4817	0.4237	0.3667	0.4299	0.4415	0.3559	0.3661	0.3956	****	443	173	142	122
10	0.5982	0.5648	0.5359	0.5495	0.5458	0.5906	0.5414	0.5454	0.5458	****	306	379	372
11	0.6022	0.5304	0.5380	0.5502	0.5486	0.5585	0.5430	0.5599	0.5423	0.5077	****	72	67
12	0.6080	0.5211	0.5486	0.5776	0.5450	0.5693	0.5718	0.5545	0.5029	0.5964	0.4991	****	26
13	0.6150	0.5358	0.5022	0.5995	0.5815	0.5990	0.5376	0.5502	0.5067	0.6098	0.5514	0.4908	****

\*居群编号见表 1 For population numbers see Table 1.

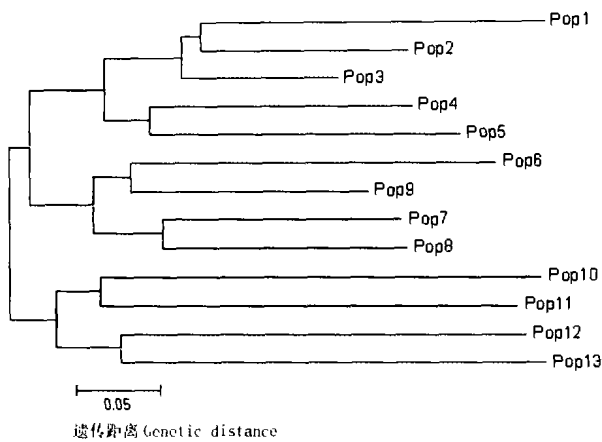


图 1 钟花报春 13 个居群的聚类图

Fig. 1 Neighbor-joining tree of 13 populations of *Primula sikkimensis* Hook.

居群编号见表 1 For population numbers see Table 1.

响植物居群遗传变异大小的主要因素。遗传变异最高的植物类群是那些寿命长、地理分布广、异交为主、风媒授粉、结实性高且存在于演替末期群落中的物种<sup>[17]</sup>。

植物的遗传多样性与物种的地理分布范围有着很强的关联性<sup>[14]</sup>。自然分布范围大的物种通常包含较多的遗传多样性<sup>[18]</sup>。已有研究表明,报春花属中的一些广布种,如鄂报春 (*P. obconica* Hance)、卵叶报春 (*P. ovlifolia* Franch.) 及 *P. elatior* Hill 具有较高的遗传多样性<sup>[19-21]</sup>。钟花报春为多年生草本植物,广泛分布在喜马拉雅-横断山区。钟花报春物种水平上的多态位点比率为 100%,居群水平平均为 54.44%,具有很高的遗传多样性,符合分布范围广遗传多样性就较高这一预测。但是,在报春花属其它植物的遗传多样性研究中也发现了与地理分布范围没有关联的情况,如景东报春 (*P. interjacens* Chen)。虽然景东报春分布范围非常小,但是遗传多样性比较高<sup>[8]</sup>,可能与其两型花结构有关。远交植物通常比自交植物具有较高的遗传多样性。Weller 等人研究 *Schiedea* 属和 *Alsinidendron* 属的 29 种植物的遗传多样性,发现异型花植物的遗传多样性显著高于自花授粉植物<sup>[22]</sup>。因为同一类型的花之间通常自交不育,而只能通过昆虫来实现不同类型花之间的授粉。钟花报春较高的遗传多样性也可能与其具有两型花结构(长花柱花或者短花柱花),进行异交有一定的关系。

Shannon 多样性指数 ( $H_0$ ) 同时也反映了遗传多样性的水平,在钟花报春,  $H_0=0.2293-0.4016$ ,  $H_{POP}=0.3211$ ,  $H_{SP}=0.5576$ , 这些指数接近于报春花属

中的景东报春 ( $H_0: 0.3242-0.3763$ ,  $H_{POP}: 0.3459$ ,  $H_{SP}: 0.4618$ )<sup>[8]</sup>, 高于卵叶报春 ( $H_0: 0.112-0.147$ ,  $H_{POP}: 0.134$ ,  $H_{SP}: 0.313$ )<sup>[20]</sup> 和鄂报春 ( $H_0: 0.045-0.309$ ,  $H_{POP}: 0.222$ ,  $H_{SP}: 0.435$ )<sup>[20]</sup>。因此,钟花报春相对于同属中的其他物种来说具有较高的遗传多样性。

钟花报春虽然遗传多样性较高,但是各个居群多态带百分率变化较大,从 39.56% 到 67.03%, 平均为 54.44%。其中居群 11 最高,为 67.03%;居群 13 最低,为 39.56%。居群遗传多样性水平可能与居群所处的生境具有一定的相关性。

### 3.2 遗传结构

用 POPGENE 计算出的居群间遗传分化系数  $G_{ST}=0.4127$ , 表明在总的遗传多样性中,有 41.27% 的变异来自于居群之间,而 58.73% 的变异则来自居群内,说明居群间遗传分化相当高。交配系统是影响植物遗传结构的最重要因素之一。钟花报春具有异型花结构,是典型的异花授粉植物。其交配系统应该促进居群间基因交流,增加有效居群大小,并且减少基因漂变带来的影响<sup>[14]</sup>。Hamrick 和 Godt 统计了 1968 年到 1988 年 20 年里报道的 165 属 449 种种子植物遗传多样性研究结果,发现自交为主的种类遗传分化平均为 0.51,而异交为主的物种平均为 0.10<sup>[23]</sup>。报春花属的其他一些植物,如鄂报春 (*P. obconica*) ( $G_{ST}=0.5197$ )、卵叶报春 (*P. ovlifolia*) ( $G_{ST}=0.5737$ )、景东报春 (*P. interjacens*) ( $G_{ST}=0.2613$ ), 遗传分化也很高;而报春花属的另一些植物居群间遗传分化很低,如在 *P. elatior* 中只有 4%<sup>[21]</sup>,在黄花九龙草 (*P. veris*) 中也只有 3.9%<sup>[24]</sup>。然而本研究中,钟花报春居群间的遗传分化达到 0.4127,与其异交交配系统完全不同。

虽然异交一般使居群间的遗传分化下降,但同种植物各个居群空间上的隔离、突变、环境因子造成的选择差异、随机遗传漂变、基因流的隔离等都能导致居群遗传结构的空间异质性,从而促进居群的分化<sup>[21]</sup>。本研究所选用的居群均采自喜马拉雅-横断山区,本地区地理位置特殊,地势相差很大,地形复杂,气候多变,生境多样化,具复杂的垂直带和纵向的平行峡谷,导致居群隔离,促进居群间大的遗传分化<sup>[22]</sup>。

影响居群遗传结构的因素除繁育系统外,基因流也是一个重要因素。高水平、稳定的基因流可以防止居群间的遗传分化,使居群趋向于一致<sup>[25]</sup>。钟花报春为生长在亚高山草甸和疏林下的低矮草本,所处

的生境复杂,居群之间相距较远,种子缺乏特殊的传播机制,花粉和种子的有效传播距离可能小于居群间的地理距离,使得居群内基因交流频繁,而居群间难以进行基因交流,基因流较低( $Nm = 0.7114$ ),造成居群间出现较明显的遗传分化( $G_{ST} = 0.4127$ )。

### 3.3 遗传距离

在钟花报春居群的聚类树中(图1),四川乡城和稻城这两个居群亲缘关系最近,先聚合在一起,由于地理位置接近,气候类型相似,基因交流的可能性较大,保持着较小的遗传距离;而西藏采的4个居群与其他的遗传距离较远,可能是地理距离较远,生境差异较大,基因交流的可能性相对较小,因而在进化中形成了较大的遗传距离。

### 参考文献

- [1] Myers N, Mittermeyer R A, Mittermeyer C G, et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities [J]. *Nature*, 2000, 403:853–858.
- [2] Sechrest W, Brooks T M, da Fonseca G A B, et al. Hotspots and the conservation of evolutionary history [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 87:7024–7029.
- [3] Hu Q M (胡启明). On the geographical distribution of the Primulaceae [J]. *J Trop Subtrop Bot (热带亚热带植物学报)*, 1994, 2: 1–14. (in Chinese)
- [4] Hu Q M (胡启明). *Flora Reipublicae Popularis Sinicae Tomus 59 (2)* [M]. Beijing: Science Press, 1990. 136–138. (in Chinese)
- [5] Sun H (孙航). Tethys retreat, Himalayas and Hengduanshan Mountains uplift and its significance on the Sino-Himalaya elements and alpine flora origin and development [J]. *Acta Bot Yunnan (云南植物研究)*, 2002, 24:273–288. (in Chinese)
- [6] Sun H (孙航). Evolution of arctic-tertiary flora in Himalayan-Hengduan Mountains [J]. *Acta Bot Yunnan (云南植物研究)*, 2002, 24: 671–688. (in Chinese)
- [7] Ge X J (葛学军), Zhang L B (张林彬), Yuan Y M (袁永明), et al. Strong genetic differentiation of the East-Himalayan *Megacodon stylophorus* (Gentianaceae) detected by Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) [J]. *Biodiver Conserv*, 2004. (in press)
- [8] Xue D W, Ge X J, Hao G, et al. High genetic diversity in a rare, narrowly endemic primrose species: *Primula interjacens* (Primulaceae) by ISSR analysis [J]. *Acta Bot Sin*, 2004, 46:1163–1169.
- [9] Doyle J. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation[A]. In: Hewitt G M, Johnston A. *Molecular Techniques in Taxonomy* [M]. Berlin: Springer, 1991. 283–293.
- [10] Yeh F C, Yang R, Boyle T. POPGENE. Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis [CP/DK]. Release 1.31 University of Alberta, Edmonton, 1999.
- [11] 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.
- [12] Miller M P. Tools for Population Genetic Analysis, Version 1.3, Department of Biological Sciences [CP/DK]. Northern Arizona University, Flagstaff, 1997.
- [13] Barrett B A, Kidwell K K. AFLP-based genetic diversity assessment among wheat cultivars from the Pacific Northwest [J]. *Crop Sci*, 1998, 38:1261–1271.
- [14] Hamrick J L, Godt M J W. Allozyme diversity in plant species [A]. In: Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L, et al. *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources* [M]. Sunderland, Massachusetts: Sinauer, 1989. 43–63.
- [15] Hamrick J L, Linhart Y B. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plant [J]. *Ann Rev Ecol Syst*, 1979, 10:173–200.
- [16] Hamrick J L, Godt M J W, Sherman-Broyles S L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species [J]. *New For*, 1992, 6:95–124.
- [17] Ge S (葛颂), Hong D Y (洪德元). Biosystematic studies on *Adenophora Cpotaninii* Korsh. complex (Campanulaceae) IV. Allozyme variation and differentiation [J]. *Acta Phytotax Sin (植物分类学报)*, 1998, 36:481–489. (in Chinese)
- [18] WRIGHT S. The genetic structure of populations [J]. *Ann Engen*, 1951, 15:323–354.
- [19] Nan P (南蓬), Shi S H (施苏华), Peng S L (彭少麟), et al. Genetic diversity of *Primula obconica* from central and southwest China as revealed by ISSR markers [J]. *Ann Bot*, 2003, 91:329–333.
- [20] Nan P (南蓬). Analyses of essential oil composition and genetic diversity of *Primula obconica* and *Primula ovalifolia* population in China [D]. Guangzhou: South China Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, 2002. (in Chinese)
- [21] Jacquemyn H, Honnay O, Galbusera P, et al. Genetic structure of the forest herb *Primula elatior* in a changing landscape [J]. *Mol Ecol*, 2004, 13:211–219.
- [22] Weller S G, Sakai A K, Straub C. Allozyme diversity and identity in *Schiedea* and *Alsiniidendron* (Caryophyllaceae: Alsinoideae) in the Hawaiian Islands [J]. *Evolution*, 1996, 50:22–34.
- [23] Hamric J L, Godt M J W. Allozyme diversity in plant species [A]. In: Brown A D H, Clegg M T, Kahler A L, et al. *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources* [M]. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associatea Inc, 1990. 43–63.
- [24] Antrobus S, Lack A J. Genetics of colonizing and established populations of *Primula veris* [J]. *Heredity*, 1993, 71:252–258.
- [25] Zhang J (张娟), Yin L K (尹林克), Zhang D Y (张道远). RAPD analysis of genetic diversity in natural populations of *Tamarix hispida* [J]. *Acta Bot Yunnan (云南植物研究)*, 2003, 25:557–562. (in Chinese)
- [26] Zhang R Z (张荣祖), Zheng D (郑度), Yang Q Y (杨勤业), et al. *Physical Geography of Hengduan Mountains* [M]. Beijing: Science Press, 1997. (in Chinese)
- [27] Zou Y P (邹喻苹), Ge S (葛颂), Wang X D (王晓东). *Molecular Marker in Systematic and Evolutionary Botany* [M]. Beijing: Science Press, 2001. (in Chinese)