

兰花蕉的遗传多样性研究

李荣, 唐源江, 廖景平*

(中国科学院华南植物园, 广州 510650)

摘要:采用简单重复序列区间 (ISSR, Inter-Simple Sequence Repeat) 分子标记技术, 对采自广东省的濒危植物兰花蕉 (*Orchidantha chinensis* T. L. Wu) 的 7 个居群 137 个个体进行遗传变异分析。用 10 个 ISSR 引物共扩增出清晰谱带 101 条, 其中 58 条具有多态性, 总多态位点百分率为 57.43%。居群水平相对较低, 多态位点百分率在 6.93%~35.64% 之间, 平均为 18.24%。经 POPGENE1.31 数据处理, 结果表明: 在物种水平上 Nei 基因多样性为 0.1254 ± 0.1686 ; Shannon 信息指数为 0.2000 ± 0.2429 ; Nei 基因分化系数为 0.5481, 表明 54.81% 的遗传变异分布在居群间, 45.19% 的遗传变异分布在居群内。物种居群间的遗传一致度在 0.8855~0.9511 之间。我们认为红花潭是其最适合生境, 建议在此建立自然保护区; 鉴于兰花蕉居群间出现了一定程度的分化, 为最大限度地保护兰花蕉的遗传多样性, 建议在自然居群间进行相互移栽, 以提高群体间的基因交流。

关键词: 兰花蕉; ISSR; 遗传多样性; 遗传结构

中图分类号: Q16

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2005)03-0253-06

Study on Genetic Diversity of *Orchidantha chinensis* (Labiaceae)

LI Rong, TANG Yuan-jiang, LIAO Jing-ping*

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

Abstract: Inter-simple sequence repeats (ISSR) marker was used to analyze the genetic diversity and differentiation of 137 individuals within and among 7 populations of *Orchidantha chinensis*, an endangered species, in Guangdong Province. Ten ISSR primers generated 101 bands, of which 58 (57.43%) were polymorphic. ISSR diversity within the population was lower than that among the populations (at species level: $P=57.43\%$, $H=0.1254$, $I=0.2000$; at population level: $P=18.24\%$, $H=0.057$, $I=0.0876$). Based on Nei's G_{ST} value calculated by POPGENE1.31, gene diversity within populations was 0.1254 ± 0.1686 , Shannon information index was 0.2000 ± 0.2429 . Variation coefficient among populations was 0.5481, and that within population was 0.4519. The ranger of gentic identity among populations was from 0.8855 to 0.9511. Based on the gene diversity information available for *Orchidantha*, two management strategies are proposed. A conservation area is suggested to be established in Honghuatan (HHT) where is considered to be an optimal habitat for *O. chinensis* growth. And because of the differentiation among the populations, cross transplantation is suggested in order to enhance the gene flow among the populations. By this means, the genetic diversity resources of the species could be preserved to the greatest extent.

Key words: *Orchidantha*; ISSR; Genetic diversity; Genetic structure

兰花蕉 (*Orchidantha chinensis* T. L. Wu) 隶属于兰花蕉科 (Labiaceae) 兰花蕉属 (*Orchidantha* N. E. Brown), 全球有 16 种, 1 变种^[1-9]。兰花蕉是热带东南亚特有类群, 为单属科。主要分布在加里曼岛、

马来西亚、中印半岛及我国南部。在我国兰花蕉科有 2 种 1 变种^[7], 即兰花蕉 (*O. chinensis*) 及其变种长萼兰花蕉 (*O. chinensis* var. *longisepala*)、海南兰花蕉 (*O. insularis* T. L. Wu), 均是我国特有种。兰花蕉

收稿日期: 2004-11-29 接受日期: 2005-03-02

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (40332021); 自然科学基金 (39870087, 30370099); 广东省科技计划项目 (2002C20131, 2004B20901008) 资助

* 通讯作者 Corresponding author

现已列为国家三级保护植物^[10]。然而,迄今为止对兰花蕉的研究,主要集中在孢粉学^[11]、胚胎学^[12]、解剖学^[13,14]、分类学^[4,15]、细胞学^[16,17]和生殖生物学^[12]等方面,有关遗传多样性方面的研究未见报道。

物种的遗传多样性是长期进化的产物,也是其生存和发展的前提,对稀有濒危植物遗传多样性和遗传结构进行研究,是探讨其适应性、生存力的基础,也是分析导致其濒危机理的基础^[18]。遗传多样性的研究方法主要有蛋白质(酶)电泳、限制性内切酶酶切片长度多态性分子标记技术(RFLP)、基于PCR技术的分子标记(如RAPD和ISSR)及DNA序列分析等。简单重复序列区间(Inter-Simple Sequence Repeat, ISSR)扩增,是目前较常用的方法之一。ISSR分子标记技术具有DNA样品用量少、操作简单、实验成本低、重复性好等优点,能为我们提供有关基因组的丰富信息,现已广泛用于品种鉴定、遗传作图、基因定位、遗传多样性、进化及分子生态学研究。本研究采用ISSR分子标记技术研究兰花蕉的遗传变异,以阐明其遗传多样性水平和遗传结构,探讨种群遗传多样性水平与环境因子之间的相关性,为兰花蕉的遗传多样性保护提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

材料采自6个野生居群和1个栽培居群,野生居群分别来自广东信宜和阳春,其中采自信宜的有花楼顶居群、采自阳春的有码头湾、红花潭、八甲、圭冈、勾髻岭居群,栽培居群来自华南植物园姜园。居群中每个体材料都取自不同的植株,并且对破坏严重、个体较少的居群(如信宜居群)采取了完全采样策略。采样时采摘兰花蕉的嫩叶,置于变色硅胶中干燥保存。材料来源和采样数见表1。

1.2 基因组DNA提取与PCR扩增

采用改良的CTAB法^[19]提取兰花蕉叶片基因组DNA。ISSR扩增反应条件经过比较和优化确定为20 μl的PCR反应液,内含:20 ng模板DNA,10 mmol/L Tris-HCL (pH=9.0),1.5 U Taq酶,2.0 mmol/L MgCl₂,0.1 mmol/L dNTPs,200 nmol/L引物,2%甲酰胺。

PCR反应在PTC-200(M Research)PCR仪上进行,ISSR-PCR反应程序为:94℃预变性5 min后,94℃变性45 s,51.5℃复性45 s,72℃延伸1.5 min,35个循环,72℃延伸7 min。

PCR扩增产物在1.5%的琼脂糖凝胶上电泳分离,以北京天为时代有限公司的100 bp DNA ladder(100-1 500 bp)为分子标记,溴化乙锭(EB)染色。DNA片段通过计算机凝胶成像系统(Labworks Software Version 3.0;UVP,Upland,CA91786,USA)观察、记录。

1.3 实验设计

用加拿大哥伦比亚大学(UBC)提供序列,上海生工公司合成的ISSR引物,7个居群中各选取2个模板DNA,在20 μl反应体系中进行扩增筛选。从100个引物中筛选出10个扩增条带较多、信号强、背景清晰的引物,用于全部7个居群DNA样品的扩增。

1.4 数据统计与分析

电泳图谱中每一条带视为一个分子标记(marker),并代表一个引物的结构位点。按凝胶同一位置上DNA带的有无进行统计,有带的记为“1”,无带的记为“0”。形成0/1矩阵图输入计算机,采用POPGENE Version 1.31软件^[20]计算出兰花蕉各个居群的多态位点百分率(P)、Nei基因多样性指数(H)、Shannon信息指数(I)、基因分化系数

表1 材料来源和采样数

Table 1 Localities and number of samples of *O. chinensis*

居群 Population	产地 Locality	采样数 Sampling number	经度 Longitude	纬度 Latitude	海拔 Altitude (m)
码头湾 Matouwan (MTW)	广东阳春 Yangchun, Guangdong	20	111° 29'	21° 53'	442
红花潭 Honghuatan (HHT)	广东阳春 Yangchun, Guangdong	22	111° 31'	21° 54'	280
八甲 Bajia (BJ)	广东阳春 Yangchun, Guangdong	21	111° 25'	21° 52'	640
圭冈 Guigang (GG)	广东阳春 Yangchun, Guangdong	22	111° 39'	22° 24'	290
勾髻岭 Goujiling (GJL)	广东阳春 Yangchun, Guangdong	18	111° 36'	22° 11'	751
花楼顶 Hualouding (HLD)	广东信宜 Xinyi, Guangdong	14	111° 32'	22° 23'	752
栽培种 Cultivated population (CP)	华南植物园 South China Botanical Garden	20	113° 21'	23° 21'	49

(G_{ST})、居群间基因多样性(H_i)、居群内基因多样性(H_s)及 Nei 遗传一致度和遗传距离; 聚类分析采用非加权配对算术平均法(Unweighted pair-group method, arithmetic average, UPGMA)。

2 结果和分析

2.1 兰花蕉的遗传多样性

从 100 个引物中筛选出 10 个 ISSR 引物 (808, 811, 834, 840, 836, 841, 844, 888, 889, 890), 对 7 个居群的 137 个 DNA 样品进行 PCR 扩增。其中引物 841 对码头湾群体的 16 株 DNA 样品扩增结果见图 1。10 个引物扩增出的条带数目从 3 到 15 不等, 条带片段大小在 450–1 600 bp 之间, 共扩增出了 101 条带, 其中多态性的条带 58 个, 占 57.43%。在居群水平上, Nei 基因多样性 $H=0.057$, Shannon 信息指数 $I=0.0865$ 。在物种水平上, Nei 基因多样性 $H=$

0.1254, Shannon 信息指数 $I=0.2000$, 居群多态位点百分比率在 6.93%–35.64% 之间, 多态位点百分比率最低为八甲居群(6.93%), 最高为红花潭居群(35.64%)。Nei 基因多样性和 Shannon 信息指数的大小与居群多态位点百分率的大小趋势一致(表 2)。华南植物园栽培居群(CP)的遗传多样性为 0.0583, Shannon 信息指数为 0.0878, 栽培居群的遗传多样性水平相对总遗传多样性水平较低。

2.2 兰花蕉的遗传分化

根据居群内基因多样性(H_s)、居群间的分化(D_{ST})和居群间遗传差异在总的遗传差异中所占比例(G_{ST})(表 3)可知: 总基因多样性 $H_t=0.1254$ 大于居群内基因多样性 ($H_s=0.0509$), 表明遗传变异主要存在于居群间; 基因流 $N_m=0.4123$, 基因分化系数 $G_{ST}=0.5481$, 表明居群间有一定的遗传变异, 占总变异的 54.81%。

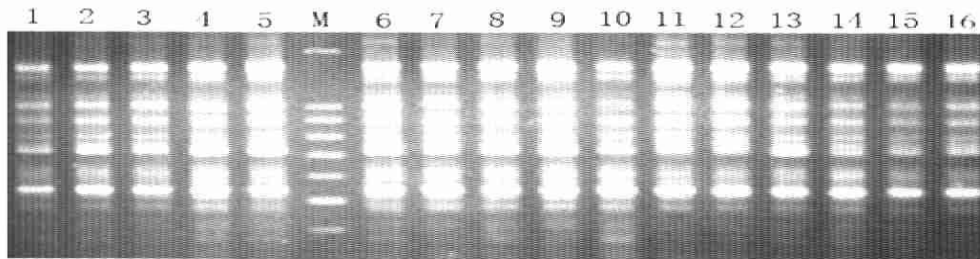


图 1 引物 841 扩增码头湾 (MTW) 兰花蕉居群 16 株基因组的 ISSR 电泳图

Fig.1 ISSR profiles of 16 individuals from the MTW population of *O. chinensis* with primer 841

M=Marker; 1–16: 码头湾居群 16 株 DNA 样品电泳图 Profiles of 16 individuals from the MTW population

表 2 兰花蕉居群间的遗传变异

Table 2 The genetic variation statistics among populations of *O. chinensis*

居群 Population	观察等位基因数 Number of alleles observed	有效等位基因数 Effective number of alleles	期望杂合度 Expected heterozygosity	Shannon 信息指数 Shannon's information index	多态位点百分率 % of polymorphic loci
BJ	1.0693±0.2552	1.0290±0.1271	0.0189±0.0766	0.0302±0.1176	6.93
GG	1.1980±0.4005	1.1044±0.2564	0.0623±0.1420	0.0949±0.2080	19.80
GJL	1.1089±0.3131	1.0507±0.1801	0.0314±0.1011	0.0491±0.1541	10.89
HHT	1.3564±0.4813	1.1480±0.2803	0.0915±0.1571	0.1434±0.2309	35.64
HLD	1.2367±0.4278	1.1431±0.2940	0.0835±0.1647	0.1244±0.2392	23.76
MTW	1.1287±0.3366	1.0933±0.2604	0.0521±0.1417	0.0757±0.2033	12.87
CP	1.1782±0.3846	1.0995±0.2564	0.0583±0.1410	0.0878±0.2054	17.82
平均 Average	1.1823	1.0949	0.057	0.0876	18.24
总群体 All loci	1.5743±0.4969	1.2019±0.3110	0.1254±0.1686	0.2000±0.2429	57.43

BJ、GG、GJL、HHT、HLD、MTW、CP 见表 1。For abbreviations see Table 1.

表 3 兰花蕉居群内基因多样性

Table 3 Gene diversity within *O. chinensis* populations

	总基因多样性 Total gene diversity	居群内基因多样性 Gene diversity within population	基因分化系数 Differentiation coefficient in population	基因流 Gene flow
平均 Mean	0.1254	0.0569	0.5481	0.4123
标准差 Standard deviation	0.0289	0.0075		

表 4 兰花蕉居群间 Nei 遗传一致度 (右上角) 和遗传距离 (左下角)

Table 4 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among *O. chinensis* population

Pop ID	MTW	HHT	BJ	GG	GJL	HLD	CP
MTW	****	0.9103	0.9232	0.9207	0.9131	0.9100	0.9340
HHT	0.0940	****	0.9054	0.9047	0.8911	0.9215	0.8921
BJ	0.0799	0.0994	****	0.9049	0.9024	0.9179	0.8855
GG	0.0826	0.1001	0.1000	****	0.9379	0.9216	0.9206
GJL	0.0909	0.1153	0.1027	0.0642	****	0.9511	0.9223
HLD	0.0943	0.0818	0.0857	0.0816	0.0502	****	0.9233
CP	0.0682	0.1142	0.1216	0.0827	0.0809	0.0799	****

2.3 遗传距离和聚类分析

为了进一步分析群体间的遗传分化程度,计算了 Nei 遗传一致度和遗传距离^[21]。兰花蕉各群体间遗传一致度和遗传距离见表 4。遗传一致度为 0.8855–0.9511,遗传距离为 0.0502–0.1216,花楼顶 (HLD) 和栽培居群 (CP) 间的遗传一致度最高,勾髻岭 (GJL) 和栽培居群 (CP) 间的遗传一致度最低,说明兰花蕉居群间存在一定的遗传变异。根据 Nei 遗传距离将所有居群进行 UPGMA 聚类,所构建的群体遗传关系聚类图见图 2。

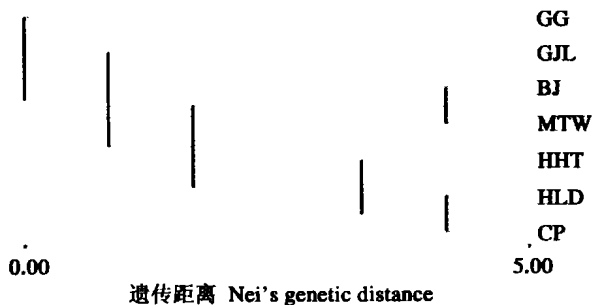


图 2 兰花蕉居群间 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类

Fig. 2 UPGMA dendrogram of seven populations of *O. chinensis* based on Nei's genetic distance

3 讨论

尽管目前兰花蕉分布范围和个体数目有限,但是从实验结果来看,在 7 个居群间的多态位点百分率 $P=57.43\%$, Nei 遗传多样性 $H=12.54\%$, Shannon 信息指数 $I=20\%$, 比居群内的都要高 ($P=18.24\%$, $H=5.7\%$, $I=8.76\%$)。这些显示出居群间相对较高的遗传多样性水平,而居群内遗传多样性水平相对较低,可能是 ISSR 分子标记技术较等位酶、RFLP、RAPD 技术可检测到更多的基因位点,发现更加丰富的遗传信息^[22-25]。采用 ISSR 分子标记技术, Jian 等^[26]研究银叶树 (*Heritiera littoralis*) 总的遗传多样

性为 0.2327,多态位点百分率为 83.19%;葛永奇等^[27]研究银杏 (*Ginkgo biloba*) 总的遗传多样性为 0.2408,多态位点百分率为 70.45%;Ge 等^[28]研究果角木 (*Cerriops tagal*) 总的遗传多样性为 0.016,多态位点百分率为 8.96%。而兰花蕉总的遗传多样性为 0.1254,多态位点百分率为 57.43%。可见,从兰花蕉的遗传多样性来看,在种的水平上,遗传多样性保持着中度水平。

遗传结构是通过物种居群内和居群间的遗传分化来体现的,基因流的大小也可以反映居群遗传结构的大小,一般来说,基因流大的物种,种群间遗传分化小,大的基因流可以阻止居群间的遗传分化^[29];反之,居群间的遗传分化大^[30]。自然界的居群往往不是处于理想状态,其居群遗传结构受到多种生物学、生态学过程的影响,如繁育系统、分布范围、种子传播机制等^[31]。兰花蕉为多年生草本植物,能正常开花,但是成熟种子很少,种子常常在幼年时期就已经脱落了^[32],主要通过根状茎进行营养繁殖。因而造成了兰花蕉居群间较低的基因流动,这可能是导致兰花蕉居群分化的因素之一。再则, Slatkin^[33]认为 $N_m < 1$,表明居群间差异显著,基因流不足以抵制居群内因遗传漂变而引起的居群分化,本研究中兰花蕉 $N_m=0.4123$,说明基因流不足可能是兰花蕉居群间遗传结构分化的主要原因之一。此外,遗传漂变可使小居群内遗传多样性降低,小种群间遗传分化增大^[34],这与我们在野外调查中所观察到的兰花蕉居群空间分布格局呈聚集型,种群规模小的事实相吻合,因此,遗传漂变也是影响兰花蕉遗传分化的重要因素。

Harmrick^[35]认为异交传粉植物的遗传分化系数平均为 0.20,而自交物种为 0.51。Kumar 和 Rogstao^[29]研究了 *Quercus gambelii* 及其同属其他植物,认为异交植物居群基因流大,种群间的遗传分化小。Bussell^[35]用 RAPD 方法分析 35 种植物的遗传分化

系数, 发现 29 个异交物种的平均遗传分化系数为 0.193, 另外 6 个自交物种为 0.625。本研究中, 兰花蕉在物种水平上遗传分化系数 $G_{ST}=0.5481$, 与自交植物的平均值非常接近。

采自华南植物园的栽培居群 (CP) 遗传多样性为 0.0583, 多态位点百分率为 17.82%, 相对兰花蕉总遗传多样性(0.1254)和多态位点百分率(57.43%)而言, 遗传多样性显著较低, 这说明华南植物园栽培居群的来源较为单一, 同时也提示我们在建立保护区时, 应尽量扩大不同居群的来源, 以最大限度地增加其遗传多样性。

遗传多样性信息是保护濒危植物的先决条件, 它有助于制定合理的保护策略, 采取高效的保护措施。保护濒危物种的关键是保护其现有居群, 进行就地保护时应选择群体遗传多样性程度较高、适宜居群生长和更新的集中分布区建立自然保护区。就兰花蕉而言, 红花潭居群具有最高的遗传变异, 应作为优先考虑的重点保护单元。在没有远交衰退的情况下, 鉴于兰花蕉不同居群间出现了一定程度的遗传分化, 为最大限度地保护其遗传多样性, 建议对不同自然居群内的个体进行相互移栽和采种育苗移栽, 以提高居群间的基因交流。此外, 根据该物种居群内遗传多样性较低, 而居群间遗传多样性较高的特点, 如果进行易地保护, 则应考虑对同一居群内的取样可以相应减少, 而把重点放在对尽可能多的居群的取样上。

致谢 中国科学院华南植物园葛学军研究员、郝刚研究员、王小兰副研究员以及韦萧副研究员对实验设计提出了宝贵意见; 在野外采集中得到阳春市林业局、信宜市林业局以及中国科学院华南植物园邓云飞副研究员的大力帮助; 李忠超协助处理数据, 特此谢忱。

参考文献

- [1] Larsen K. New species of *Veratrum* and *Orchidantha* from Thailand and Laos [J]. *Syst Biol*, 1961, 50:926-944.
- [2] Larsen K. A new species of *Orchidantha* (Lowiaceae) from Vietnam [J]. *Adansonia*, 1973, 2:481-482.
- [3] Larsen K. A new species of *Orchidantha* (Lowiaceae) from Borneo [J]. *Nord J Bot*, 1993, 13:285-288.
- [4] Wu T L(吴德邻). Lowiaceae new to the flora of China [J]. *Acta Phytotax Sin(植物分类学报)*, 1964, 9(4):335-343.(in Chinese)
- [5] Holttum R E. The genus *Orchidantha* (Lowiaceae) [J]. *Gard Bull Singap*, 1970, 25:239-246.
- [6] Nagamasu H, Sakai S. *Orchidantha inouei* (Lowiaceae), a new species from Borneo [J]. *Nord J Bot*, 1999, 19:149-152.
- [7] Wu T L, Larsen K. *Flora of China* [M]. Beijing: Science Press, St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2000. 24-319.
- [8] Pedersen L B. Four new species of *Orchidantha* (Lowiaceae) from Sabah [J]. *Nord J Bot*, 2001, 21:121-128.
- [9] Jenjittikul T, Larsen K. *Orchidantha foetide* (Lowiaceae), a new species from Thailand [J]. *Nord J Bot*, 2002, 22:405-408.
- [10] 傅立国. 中国珍稀濒危植物 [M]. 上海: 上海教育出版社, 1989. 234.
- [11] Long H (龙活), Wen Y Q (温颖群). Pollen morphology of Lowiaceae from China [J]. *J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报)*, 1997, 5(3):6-9. (in Chinese)
- [12] Wen Y Q(温颖群), Liao J P(廖景平). Embryological study on *Orchidantha chinensis* [J]. *J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报)*, 2001, 9:301-305.(in Chinese)
- [13] Wen Y Q(温颖群), Liao J P(廖景平), Wu Q G(吴七根). Anatomy and histochemistry of the seeds of *Orchidantha chinensis* T. L. Wu [J]. *Guihaia(广西植物)*, 1997, 17(3):235-241.(in Chinese)
- [14] Liao J P(廖景平), Wen Y Q(温颖群), Wu Q G(吴七根). Study on vascular system anatomy of the flowers of *Orchidantha chinensis* T. L. Wu [J]. *J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报)*, 1998, 6(4):275-282.(in Chinese)
- [15] Wu T L(吴德邻). *Flora Reipublicae Popularis Sinicae Tomus 16(2)* [M]. Beijing: Science Press, 1981. 19-21.(in Chinese)
- [16] Laser K. Chromosome cytology and relationship of the Lowiaceae [J]. *Natl Hist Bull Siam Soc*, 1996, 21:21-24.
- [17] Song J J(宋娟娟), Tang Y J(唐源江), Liao J P(廖景平), et al. Chromosome numbers of *Orchidantha* (Lowiaceae) [J]. *Acta Bot Yunnan(云南植物研究)*, 2003, 25(5):609-612.(in Chinese)
- [18] Spiess E B. *Genes in Population* [M]. 2nd ed, New York: John Wiley & Sons, 1989. 773-774.
- [19] Dolye 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.
- [20] Yeh F C, Yang R-C, Boyle T. POPGENE. Microsoft Windows - Based Freeware for Population Genetic Analysis. Release 1.31 [M]. Edmonton: University of Alberta, 1999.
- [21] Nei M. Genetic distance between populations [J]. *Amer Natl*, 1972, 106:282-292.
- [22] Godwin I D, Aitken E A B, Smith L W. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18:1524-1528.
- [23] Nagoaka T, Ogihara Y. Applicability of inter simple sequence repeat polymorphism in wheat for wheat foe use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 94:597-602.
- [24] Qian W(钱韦), Ge S(葛颂), Hong D Y(洪德元). Assessment of genetic variation of *Oryza granulata* detected by RAPDs and ISSRs [J]. *Acta Bot Sin(植物学报)*, 2000, 42(7):741-750.(in Chinese)
- [25] Du J K(杜金昆), Yao Y Y(姚颖银), Ni Z F(倪中福), et al. Genetic diversity revealed by ISSR molecular marker in common wheat, spelt, *Compactum* and progeny of recurrent selection [J]. *Acta Genet Sin(遗传学报)*, 2002, 29(5):445-452.(in Chinese)
- [26] Jian S G, Shi S H, Zhong Y, et al. Genetic diversity among south

- China *Heritiera littoralis* detected by Inter-simple sequence repeats (ISSR) analysis [J]. *Genet Mol Biol*, 2002, 13(4):272-276.
- [27] Ge Y Q(葛永奇), Qiu Y X(邱英雄), Ding B Y(丁炳扬), et al. An ISSR analysis on population genetic diversity of relict plant *Ginkgo biloba* [J]. *Biodiv Sci (生物多样性)*, 2003, 11(4):276-287. (in Chinese)
- [28] Ge X J, Sun M. Population genetic structure of *Ceriops tagal* (Rhizophoraceae) in Thailand and China [J]. *Wetland Ecol Manag*, 2001, 9:203-209.
- [29] Kumar A, Rogstad S H. A hierarchical analysis of microsatellite DNA diversity in Gambel oak (*Quercus gambelii* Nutt., Fagaceae) [J]. *Mol Ecol*, 1998, 7:859-869.
- [30] Rowe G. Phylogeography of the matterjack toad *Bufo cala mitta* in Britain: genetic differentiation of native and translocated population [J]. *Mol Ecol*, 1998, 7:751-760.
- [31] 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, Mass: Sinauer Associates, 1990. 43-63.
- [32] Wu Z F(吴忠发). Additional description of *Orchidantha chinensis* T. L. Wu [J]. *Guihaia (广西植物)*, 1991, 11(3):229-230. (in Chinese)
- [33] Slatkin M. Gene flow in natural populations [J]. *Ann Rev Ecol Syst*, 1985, 16:393-430.
- [34] Chen L Z(陈灵芝), Ma K P(马克平). *Science about Biological Diversity: Principle and Practice* [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2001. 103. (in Chinese)
- [35] Bussell J D. The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity among populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae) [J]. *Mol Ecol*, 1999, 8:775-789.