

栲树微卫星分子标记的开发

付丹丹^{1,2}, 王 静³, 刘义飞³, 黄宏文^{1,3*}

(1. 中国科学院武汉植物园, 武汉 430074; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049;

3. 中国科学院华南植物园植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广州 510650)

摘要: 采用基因组 DNA 富集法 FIASCO 对我国典型常绿阔叶林建群种栲树(*Castanopsis fargesii* Franch.)进行了微卫星分子标记的开发。从栲树基因组中分离和筛选了 15 个微卫星位点, 并对江西九连山栲树自然分布居群的遗传多样性进行了分析。结果表明, 栲树具有较高水平的遗传多样性, 每个位点在 28 株栲树个体上的平均等位基因数(A)为 6.7 (4~8 个), 平均观察杂合度(H_o)为 0.690 (0.250~1.000), 平均预期杂合度(H_e)为 0.698 (0.293~0.867)。每个位点的第一排除概率值 $P_r(E_{x1})$ 为 0.043~0.527, 位点综合值为 0.9972。单个位点的第二排除概率 $P_r(E_{x2})$ 为 0.159~0.694, 位点综合值为 0.9999。这些微卫星标记可为研究栲树的遗传多样性及居群遗传结构提供有效的遗传工具。

关键词: 常绿阔叶林; 栲树; 微卫星; 遗传多样性

中国分类号: Q75

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2010)05-0541-06

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2010.05.011

Isolation of Microsatellite Markers for *Castanopsis fargesii* (Fagaceae)

FU Dan-dan^{1,2}, WANG Jing³, LIU Yi-fei³, HUANG Hong-wen^{1,3*}

(1. Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China; 2. Graduate University of Chinese

Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable

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

Abstract: Fifteen polymorphic microsatellite loci were developed and characterized for *Castanopsis fargesii* Franch. (Fagaceae), a dominant species in typical broad-leaved evergreen forest of China. The development of microsatellite loci was conducted using the fast isolation by AFLP of sequences containing repeats protocol (FIASCO). Fifteen microsatellite primers (SSR) were used to examine the genetic diversity of a natural population of *C. fargesii* in Jiulianshan Nature Reserve, Jiangxi Province. The number of alleles varied from four to eight, with a mean value of 6.7 alleles per locus. The mean observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e) were 0.690 and 0.698, ranging from 0.250 to 1.000 and 0.293 to 0.867, respectively. The first estimate of paternity exclusion probability $P_r(E_{x1})$ varied from 0.043 to 0.527 for individual loci and 0.9972 for the combined loci, when the offspring was sampled but the mother is not. The second estimate, $P_r(E_{x2})$, ranged from 0.159 to 0.694 for individual loci and 0.9999 for the combined loci, when both the mother and the offspring were sampled. It indicated that these loci could provide a powerful tool for investigating genetic diversity and population genetic structure of *C. fargesii*.

Key words: Evergreen broad-leaved forest; *Castanopsis fargesii*; Microsatellite; Genetic diversity

收稿日期: 2010-04-06

接受日期: 2010-04-26

基金项目: 中国科学院创新方向项目(KSCX2-YW-N-061); 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室青年基金项目(200918); 中国科学院华南植物园博士启动基金项目(200907)资助

作者简介: 付丹丹(1984~), 硕士研究生, 研究方向为植物保育遗传学, email: dandanfu@scbg.ac.cn

* 通讯作者 Corresponding author, email: huanghw@mail.scbg.ac.cn

常绿阔叶林是亚热带地区的地带性植被,也是亚热带森林生态系统的主要组成部分。我国亚热带常绿阔叶林分布广、面积大,类型复杂多样,是全球常绿阔叶林的主体^[1],在维持区域生态环境、保护生物多样性和维持可持续发展等方面有重要作用。我国亚热带常绿阔叶林蕴藏着非常丰富的生物资源,是世界上生物多样性最为丰富的地区之一^[2]。我国最近确认的 10 个生物多样性热点生态区域,有 7 个位于亚热带常绿阔叶林地区^[3]。

壳斗科(Fagaceae)植物全世界约有 1000 种,是北半球热带、亚热带和温带森林的主要树种,在北半球森林生态系统中起着举足轻重的作用^[4-5]。栲属(*Castanopsis*)植物是我国常绿阔叶林的主要组成树种,具有重要的经济与生态价值^[6]。栲树(*Castanopsis fargesii*)是我国亚热带常绿阔叶林的建群种,广泛分布于我国长江以南各地,其分布范围大致可分为台湾及东南和南部沿海类型;湖北西部、四川及贵州西北部类型;广西西部、广东西南部及贵州南部类型;云南东南部类型等^[7]。

微卫星 DNA(microsatellite DNA)又称简单重复序列(simple sequence repeats, SSR)或短串联重复序列(short tandem repeats, STR),广泛分布于真核生物的基因组中^[8]。微卫星是指以少数几个核苷酸(1~6 个)为单位多次串联重复的简单序列,重复次数 5~50 不等,以双核苷酸重复最为常见^[9]。微卫星(SSR)分子标记因其存在的普遍性、多态性信息丰富、遗传共显性、较好的稳定性和重复性,且易于检测等优点,被认为是重要的分子标记,目前已广泛应用于品种鉴定、遗传连锁图谱的构建、分子辅助育种和居群遗传学等方面^[10-12]。微卫星引物具有较强的物种保守性和专一性,因此一定程度上需要对每个物种设计特异的 SSR 引物。Ueno 等从 *Castanopsis sieboldii* var. *sieboldii* 上开发了 16 对 EST-SSR^[13]。但还未见从栲树上开发 SSR 引物的报道,本研究采用改良的基因组 DNA 富集法(Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing Repeats, FIASCO)^[14]对栲树的微卫星位点进行首次分离,旨在为评价栲树居群遗传多样性和遗传结构提供技术支持,为栲树植物资源的保护和管理提供可靠的分子标记。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本研究选取位于江西九连山国家级自然保护

区内的栲树(*Castanopsis fargesii*)居群(24°31'N, 114°27'E)设置样地,样地面积约为 0.5 hm²。该样地海拔 569 m,乔冠层以栲树为优势种,还有大果马蹄荷(*Exbucklandia tonkinensis*)、猴头杜鹃(*Rhododendron simiarum*)、丝线吊芙蓉(*R. westlandii*)等。对样地内栲树的所有成株进行取样,用高精度 GPS 和电子测距仪对成株进行精确定位,并记录每株植株的胸径和株高。样地内共有栲树成株 28 株,每株采集新鲜叶片 5 g,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。

1.2 DNA 提取和微卫星标记开发

采用改进的 CTAB 法^[15]从叶片中提取总栲树基因组 DNA,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳对 DNA 质量进行检测。采用改良的基因组 DNA 富集法(FIASCO)^[14]对栲树进行微卫星分子标记的开发。

选择高质量的栲树 DNA 样本,稀释至 50 ng μL⁻¹,用 3 U *Mse* I (BioLabs)进行消化,取 15 μL 消化产物在 1 U T4 DNA 连接酶(Takara)的作用下与 *Mse*I AFLP 接头(5'-TACTCAGGACTCAT-3', 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3')相连接,反应体系为 30 μL。

将消化-连接混合液稀释 10 倍,用 AFLP 接头专一的引物(5'-GATGAGTCCTGAGTAAN-3', 即 *Mse*I-N)直接进行扩增,反应体系为 20 μL: *Mse*I-N 120 ng μL⁻¹, dNTPs 200 μmol/L, MgCl₂ 1.5 mmol/L, 1 U *Taq* DNA 聚合酶(Fermentas)和 5 μL 稀释的消化-连接产物。PCR 扩增反应程序如下:94℃ 30 s, 53℃ 1 min, 72℃ 1 min, 18 个循环。取 20 μL 扩增产物(片段大小 200~1000 bp)与 0.15 μmol/L 的 5'-生物素化的探针(AC)₁₅、(GA)₁₅或(AAG)₈在 250 μL 杂交液(含 SSC 4.2 × 和 SDS 0.07%)中混合,95℃ 变性 5 min,然后将混合物在 48℃ 下退火杂交 2 h。杂交产物用 300 μL Streptavidin MagneSphere® 磁珠(Promega)进行选择性地富集。将富集的 DNA 片段用 *Mse*I-N 引物按上述程序扩增 35 个循环。PCR 产物使用 E.Z.N.A® 琼脂糖凝胶回收试剂盒(Omega)进行纯化,将纯化后的片段连接到 pMD 18-T 质粒载体(Takara)上,按产品说明书将连接产物转化到 *E. coli* 菌株(JM109, Promega)中。在含有氨苄、X-gal 和 IPTG 的 Luria-Bertani 琼脂培养基平板上用蓝/白斑法筛选重组克隆。使用 M13 正、反向引物对含插入片段的阳性克隆进行扩增,并用琼脂糖凝胶电泳进行检测,选择 DNA 片段差异较大

的阳性单克隆进行测序(上海英骏生物技术有限公司)。

对于合成后的引物,我们选择地理分布较远的 8 个样本进行了引物多态性检测。随后,采用所开发的 SSR 引物对栲树所有取样样本进行 PCR 分析。PCR 扩增反应总体系为 10 μL: 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.4), 50 mmol/L (NH₄)₂ SO₄, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTPs, 0.25 μmol/L 引物, 40 ng 基因组 DNA 和 1 U *Taq* DNA 聚合酶(Fermentas)。PCR 扩增反应在 PTC-200 的 PCR 仪上进行,程序

为:95℃预变性 10 min,然后 95℃ 1 min,52 ~ 59℃ 1.5 min,72℃ 1.5 min,35 个循环,最后于 72℃ 延伸 7 min,每对引物的退火温度详见表 1。扩增产物在 6%的变性聚丙烯酰胺胶上电泳,电泳缓冲液为 1 × TBE 缓冲液。电泳在 Sequi-Gen GT System (BIORAD, USA)电泳仪上进行,功率恒定为 55 W,电泳时间约 1.5 ~ 2.0 h。然后进行银染染色。使用 25 bp DNA ladder Markers (Promega)确定等位基因大小。

表 1 栲树 15 对微卫星引物的特征
Table 1 15 novel microsatellite primers in *C. fargesii*

引物 Primer	重复单元 Repeat motif	序列 Sequence (5' ~ 3')	大小 Size(bp)	Ta (℃)	A	H _E	H _O	F _{IS}	P _r (E _{x1})	P _r (E _{x2})
CFA04 GU012005	(AAG) ₁₁	F: GCAATTGCCCAATTATGTCC R: CGTCCACGTCAATAGCCTTT	174 ~ 202	56	7	0.739	0.643	0.1321	0.326	0.505
CFA12 GU012006	(AGA) ₁₁	F: GTCGAAAGGCAAGGGTAAGT R: CCGTGGGATTCTCTACCAAA	232 ~ 246	56	5	0.605	0.786	-0.3055	0.185	0.314
CFA13 GU012007	(TTC) ₁₂	F: CAAGAACCAACACCCCACTT R: GGATCACAGTTTGGGGAGA	146 ~ 176	56	8	0.812	0.857	-0.0571	0.432	0.609
CFA17 GU012008	(GA) ₉ GT (AGA) ₁₀	F: TGACAGCCACCACTCACAAT R: TCACACAAC TCTCTTTCCCTTC	216 ~ 236	56	8	0.734	0.857	-0.1718	0.333	0.518
CFA22 GU012009	(AG) ₆ ..(AG) ₅	F: CACTAGCAAACCAGCCAACA R: GCGTAGGGCCACAAATGATA	144 ~ 156	52	5	0.512	0.429	0.166	0.138	0.297
CFA25 GU012010	(GTT) ₇	F: CCAAGCATGGTTGTTGCTTA R: TACCATTTGCAGAAGCGAAA	224 ~ 240	58	7	0.738	0.607	0.1804	0.339	0.525
CFA26 GU012011	(AAC) ₇	F: GAGCGGTGTGGTATTCGTTT R: GATTGGCACGATGGACTACA	206 ~ 230	58	8	0.706	0.704	0.003	0.296	0.475
CFA31 GU012012	(GA) ₁₉	F: CTGCCTGCCACATCAGAGT R: CGCAAGGCAGATTGATGTTA	184 ~ 200	59	8	0.867	1	-0.1579*	0.527	0.694
CFA35 GU012013	(AG) ₁₈	F: TGGGCATCTGTGTGAAGAAA R: AATCCATTGGACCTGCTTTG	208 ~ 226	56	8	0.792	0.464	0.4429*	0.407	0.587
CFA45 GU012014	(AG) ₁₅	F: CCACCGATCTAAGGCAGAGA R: TGAGCGATGGAAATTGAGTG	236 ~ 246	56	6	0.788	0.593	0.2657	0.381	0.559
CFA46 GU012015	(TC) ₁₇	F: TGCAGGGTAATCGGTTTAGG R: GCAAATTGTGGCTGCTGATA	234 ~ 262	58	8	0.826	0.958	-0.1578*	0.453	0.629
CFA57 GU012016	(TCT) ₂₃	F: GCCCTTTCTCCTGTTCAAGG R: AGGAAGAGAGGGAGGAGCAG	174 ~ 202	56	8	0.788	0.815	-0.0344	0.396	0.576
CFA61 GU012017	(AC) ₁₁ (AT) ₇	F: ATCTCGTCCTTGTTGTCA R: CAACCTTTGCAATCGTCCTT	180 ~ 200	56	5	0.293	0.25	0.1486	0.043	0.159
CFA63 GU012018	(TC) ₉	F: CAAAAGGGTCGCAATCAATC R: CGCCAAATGTTTCATCTTTGA	246 ~ 262	58	5	0.543	0.429	0.2136	0.154	0.308
CFA71 GU012019	(AC) ₉ ..(AG) ₆	F: CAAGCTCTTTGGGAATGGAA R: GGCACAATCCCTCCAAAAT	180 ~ 190	54	4	0.723	0.964	-0.3425*	0.284	0.454
平均 Mean					6.7	0.698	0.69	0.0217	0.9972	0.9999

Ta:退火温度 Annealing temperature;*A*:等位基因数 Number of alleles per locus;*H_E*:预期杂合度 Expected heterozygosity;*H_O*:观察杂合度 Observed heterozygosity;*F_{IS}*:近交系数 Inbreeding coefficient;* 表示经统计检验校正后显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 Denotes significant deviations from HWE (adjusted *P* value = 0.000476);*Pr*:排除概率 Exclusion probabilities.

1.3 统计分析

采用 GENEPOP version 3.4 软件^[16]估算微卫星位点的标准居群遗传参数,包括总的等位基因数(A)、预期杂合度(H_E)、观察杂合度(H_O)、近交系数(F_{IS})、等位基因连锁不平衡(LD)和哈迪-温伯格不平衡(HWE)。同时采用 CERVUS 3.0^[17]计算排除概率(P_r)。

2 结果

共挑取 143 个克隆,其中 89 个(62%)DNA 序列含有简单重复序列(simple sequence repeats),用 Primer3.0^[18]设计引物 78 对,其中 15 对引物(表 1)能扩增出较清晰的多态性谱带(图 1)。每对引物在栲树上扩增得到的等位基因数(A)为 4~8 个,平均为 6.7 个,片段大小为 144~262 bp。观察杂合度(H_O)和预期杂合度(H_E)分别为 0.250~1.000 和 0.293~0.867。Hardy-Weinberg (HWE)检验表明 4 对引物(CFA31, CFA35, CFA46 和 CFA71)显著偏离了哈迪-温伯格平衡(adjusted P value = 0.000476)。第一排除概率 $[P_r(E_{x1})]$ (只有后代而无母本样本的情况),单个位点为 0.043~0.527,位点综合值为 0.9972。第二排除概率 $[P_r(E_{x2})]$ (母本和后代样本都具备的情况),单个位点为 0.159~0.694,位点综合值为 0.9999,表明这些微卫星引物非常适合于亲本分析。

3 讨论

3.1 栲树的 SSR 遗传多样性

遗传多样性是一个物种生存、发展和进化的基石^[19]。Hamrick 等对植物居群遗传结构与植物生活史特性和生态环境因子之间的关系进行了研究,结果表明,繁育系统、分布范围和生活习性是影响植物居群遗传变异水平的主要因素^[20-22]。遗传变

异最高的植物类群通常是那些寿命长、地理分布范围广、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^[23]。

本研究所开发的 15 对微卫星引物表现出高度的多态性,同时具有较高的亲本排除率,因此这些位点可较好地用于栲树的居群遗传学、交配系统和基因流等方面的研究。同时,SSR 检测结果表明我国典型常绿阔叶林栲树居群的遗传多样性水平较高。Blakesley 等^[24]用 5 对微卫星分子标记对台湾北部 3 个 *C. acuminatissima* 群体遗传多样性进行研究,平均预期杂合度 H_E 为 0.716,与本研究(栲树 H_E 为 0.698)相当。栲树具有较高的遗传多样性,与其亲缘关系较近的壳斗科植物相似。王英等^[25]用 9 对微卫星引物检测了栗属植物茅栗(*Castanea sequinii*)的遗传多样性,结果表明茅栗的遗传多样性水平较高($A = 9.78$, $H_O = 0.625$, $H_E = 0.778$)。Streiff 等^[26]用微卫星标记对壳斗科植物无梗花栎(*Quercus petraea*)和夏栎(*Q. robur*)进行分析,结果表明它们的遗传多样性较高($A = 8.5$, $H_O = 0.70 \sim 0.80$, $H_E = 0.79 \sim 0.94$)。栲树较高的遗传多样性,可能与其为多年生长寿命植物、广域分布、雌雄同株且风媒异花授粉的繁育特性有关。

3.2 遗传多样性保护

虽然我国常绿阔叶林资源丰富,但由于人类活动的长期破坏,保护较完整的常绿阔叶林已非常有限^[27]。目前我国常绿阔叶林面积已不足我国亚热带地区面积的 5%^[28]。遗传多样性的研究是遗传资源保存的重要前提条件,有效的保存策略只有在对物种遗传多样性充分了解的基础上才能实现。

本研究结果表明,在典型亚热带常绿阔叶林内,栲树这个古老的森林树种,其遗传多样性仍保持一定水平,这为其遗传种质资源的保护提供了一

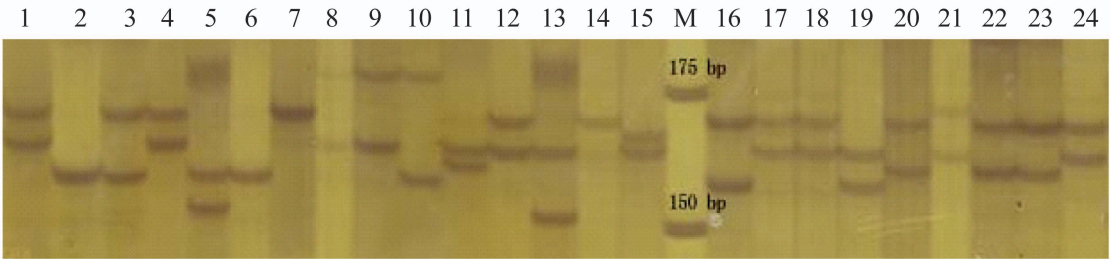


图 1 引物 CFA13 在栲树居群扩增的多态性谱带

Fig. 1 Microsatellite polymorphism in *C. fargesii* population with primer CFA13

M: Marker; 1~24: 栲树植株 *C. fargesii* adult individuals.

定的育种群体。

目前,有关我国亚热带常绿阔叶林的生态学、生物学和群落学特征的相关研究还不够深入,对于其遗传种质资源的现状更是缺乏有效的评估。因此,采用分子标记对典型常绿阔叶林的关键物种进行居群遗传方面的研究,可以为我国常绿阔叶林相关的生物资源保护和合理的开发利用提供科学依据。

致谢 感谢江西九连山国家级自然保护区管理局工作人员对野外采样的无私协助,特别感谢本实验室康明研究员和孙晔副研究员从课题设计到论文修改给予的悉心指导,感谢郭勇、陈磊等老师在课题完成过程中给予的实验指导和建议。

参考文献

[1] Song Y C(宋永昌), Chen X Y(陈小勇), Wang X H(王希华). Studies on evergreen broad-leaved forests of China: A retrospect and prospect [J]. J E China Norm Univ (Nat Sci) (华东师范大学学报:自然科学版), 2005(1): 1–7.(in Chinese)

[2] Zhang P, Shao G, Zhao G, et al. China’s forest policy for the 21st century [J]. Science, 2000, 288: 2135–2136.

[3] Tang Z Y, Wang Z H, Zheng C Y, et al. Biodiversity in China’s mountains [J]. Front Ecol Environ, 2006, 4: 347–352.

[4] Zhou Z K(周浙昆). Fossils of the Fagaceae and their implications in systematics and biogeography [J]. Acta Phytotaxon Sin(植物分类学报), 1999, 37: 369–385.(in Chinese)

[5] Kremer A, Casasoli M, Barreneche T, et al. Fagaceae trees [M]// Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants Vol. 7. Berlin: Springer Verlag, 2007: 161–187.

[6] Ye W H(叶万辉), Lian J Y(), Cao H L(曹洪麟). Geographical distribution and substitution of *Castanopsis* plants in China [C]// Advances in Biodiversity Conservation and Research in China: Proceedings of the Fifth National Symposium on the Conservation and Sustainable use of Biodiversity in China. Beijing: China Meteorological Press, 2004: 281–287.(in Chinese)

[7] Huang C C(黄成就), Chang Y T(张永田), Hsu Y C(徐永椿), et al. Fagaceae [M]// Chun W Y(陈焕镛), Huang C C(黄成就). Flora Reipublicae Popularis Sinicae Tomus 22. Beijing: Science Press, 1998: 19–79.(in Chinese)

[8] Tautz D, Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes [J]. Nucl Acids Res, 1984, 12: 4127–4138.

[9] Powell W, Morgante M, Andre C, et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis [J]. Mol Breed, 1996, 2: 225–238.

[10] Steinkellner H, Lexer C, Turetschek E, et al. Conservation of (GA)n microsatellite loci between *Quercus* species [J]. Mol Ecol, 1997, 6: 1189–1194.

[11] Barreneche T, Bodenes C, Lexer C, et al. A genetic linkage map of

Quercus robur L. (Pedunculate oak) based on RAPD, SCAR, microsatellite, minisatellite, isozyme, and 5S rDNA markers [J]. Theor Appl Genet, 1998, 97: 1090–1103.

[12] Selkoe K A, Toonen R J. Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers [J]. Ecol Lett, 2006, 9: 615–629.

[13] Ueno S, Aoki K, Tsumura Y. Generation of expressed sequence tags and development of microsatellite markers for *Castanopsis sieboldii* var. *sieboldii* (Fagaceae) [J]. Ann For Sci, 2009, 66: 509–529.

[14] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellites isolation: A review [J]. Mol Ecol, 2002, 11: 1–16.

[15] Doyle J. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation [M]// Hewitt G M, Johnston A. Molecular Techniques in Taxonomy. Berlin: Springer, 1991: 283–293.

[16] Raymond M, Rousset F. GENEPOP (Version 3.4): Population genetics software for exact tests and ecumenicism [J]. J Hered, 1995, 86: 248–249.

[17] Kalinowski S T, Taper M L, Marshall T C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment [J]. Mol Ecol, 2007, 16: 1099–1106.

[18] Rozen S, Skaletsky H J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers [M]// Krawetz S, Misener S. Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2000: 365–386.

[19] 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.

[20] Hamrick J L, Godt M J W. Allozyme diversity in plant species [M]// Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L, et al. Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources. Sunderland, Massachusetts: Sinauer, 1989: 43–63.

[21] 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.

[22] 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.

[23] Ge S(葛颂), Hong D Y(洪德元). Biosystematic studies on *Adenophora potaninii* Korsh. complex (Campanulaceae) IV. Allozyme variation and differentiation [J]. Acta Phytotaxon Sin(植物分类学报), 1998, 36: 481–489.(in Chinese)

[24] Blakesley D, Pakkad G, James C, et al. Genetic diversity of *Castanopsis acuminatissima* (Bl.) A. DC. in northern Thailand and the selection of seed trees for forest restoration [J]. New For, 2004, 27: 89–100.

[25] Wang Y(王英), Kang M(康明), Huang H W(黄宏文). Subpopulation genetic structure in a panmictic population as revealed by molecular markers: A case study of *Castanea sequinii* using SSR markers [J]. J Plant Ecol(植物生态学报), 2006, 30(1):

147–156.(in Chinese)

[26] Streiff R, Labbe T, Bacilieri R, et al. Within-population genetic structure in *Quercus robur* L. & *Quercus petraea* (Matt.) Leibl. assessed with isozymes and microsatellites [J]. Mol Ecol, 1998, 7: 317–328.

[27] Wang X P (王献溥), Jiang G M (蒋高明). The study of classification and geographical distribution of evergreen broadleaved forest in Guangxi [J]. J Wuhan Bot Res(武汉植物学研究), 2000, 18(5): 195–205.(in Chinese)

[28] Chen L Z(陈灵芝), Chen W L(陈伟烈). Study of Degraded Ecosystems in China [M]. Beijing: China Science and Technology Press, 1995: 61–93.(in Chinese)