

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201504010

引文格式: 史艳财, 唐健民, 柴胜丰, 等. 广西特有珍稀濒危植物小花异裂菊遗传多样性分析 [J]. 广西植物, 2017, 37(1):9-14.
SHI YC, TANG JM, CHAI SF, et al. Genetic diversity and relationship of endangered plant *Heteroplexis microcephala* assessed with ISSR polymorphisms [J]. Guihaia, 2017, 37(1):9-14.

广西特有珍稀濒危植物小花异裂菊遗传多样性分析

史艳财, 唐健民, 柴胜丰, 邹蓉, 陈宗游, 韦霄*

(广西植物功能物质研究与利用重点实验室, 广西壮族自治区广西植物研究所, 广西桂林 541006)
中国科学院

摘要: 采用 ISSR 分子标记技术, 对广西特有珍稀濒危植物小花异裂菊 6 个野生种群的遗传多样性进行了研究。结果表明: 10 条引物对 141 个个体共检测到 96 个位点, 其中 29 个位点具有多态性, 多态位点百分率 (PPB) 为 30.21%。在物种水平上, 小花异裂菊 PPB 为 30.21%, Nei's 基因多样性指数 (H) 为 0.105 4, Shannon's 信息指数 (I) 为 0.154 6。在种群水平上, PPB 为 9%~19%, H 为 0.021 2~0.051 3, I 为 0.033 9~0.080 5。基于 Nei's 遗传多样性分析所得出的种群间基因分化系数 G_{st} = 0.690 5, 表明种群内的遗传变异为 30.95%, 种群间的遗传变异为 69.05%, 小花异裂菊的遗传变异主要存在于种群间。AMOVA 分析结果与前面结果相符。小花异裂菊种群间的基因流 (N_m) 为 0.224 2。从遗传距离看, 杨堤和兴坪种群的遗传距离最小, 为 0.039 8, 白沙和阳朔之间的遗传距离最大, 为 0.160 9。在 UPGMA 聚类图中, 6 个种群可分为两组, 阳朔和高田为一组, 普益、白沙、兴坪、杨堤聚为一组。研究认为小花异裂菊的自交亲和的繁育系统和分布区域的片段化可能是导致种群遗传多样性较低和种群间高遗传分化的主要原因。该研究结果为该物种种质资源的保护提供了科学依据。

关键词: 小花异裂菊, ISSR, 遗传多样性, 遗传分化

中图分类号: Q311 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2017)01-0009-06

Genetic diversity and relationship of endangered plant *Heteroplexis microcephala* assessed with ISSR polymorphisms

SHI Yan-Cai, TANG Jian-Min, CHAI Sheng-Feng, ZOU Rong,
CHEN Zong-You, WEI Xiao*

(Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, Guangxi, China)

Abstract: *Heteroplexis microcephala* is an endangered plant only found in karst limestone regions in the Yangshuo County of Guangxi Zhuang Autonomous Region in China. In the present study, ISSR markers were used to evaluate the genetic variation within and among wild populations that were sampled from Guangxi with a goal to collect basic genetic information for its conservation. Leaf samples of 141 individuals were collected from six counties. Based on 10 ISSR primers, 96

收稿日期: 2016-04-07 修回日期: 2016-06-03

基金项目: 广西自然科学基金(2013GXNSFBA019054, 2014GXNSFAA118093); 广西植物研究所基本业务费项目(桂植业 12011) [Supported by the Natural Science Foundation of Guangxi(2013GXNSFBA019054, 2014GXNSFAA118093); Fundamental Research Fund of Guangxi Institute of Botany (12011)].

作者简介: 史艳财(1984-), 男, 山西孝义人, 硕士, 助理研究员, 主要从事植物濒危机制和药用植物研究, (E-mail) shiyancaianan@163.com.

*通信作者: 韦霄, 博士, 研究员, 研究方向为保护生物学, (E-mail) weixiao@gxib.cn.

clear and reproducible DNA fragments were generated. The percentage of polymorphic bands (*PPB*) was 30.21%, Nei's gene diversity (*H*) was 0.105 4, Shannon information index (*I*) was 0.154 6 at the species level, and *PPB* among population ranged from 9% to 19%, *H* ranged from 0.021 2 to 0.051 3, *I* ranged from 0.033 9 to 0.080 5. High levels of genetic differentiation among the populations ($G_{st}=0.690 5$) were detected on the basis of results from POPGENE, which indicated that 69.05% of the genetic variability was distributed among populations, and only 30.95% of the variation existed within populations. Molecular variance was also examined using AMOVA based on RAPD banding patterns. The variance component found within populations was 27.28%, and a variance of 72.72% was found among populations. Gene flow (*N_m*) among the population was 0.224 2 indicating that there was a low migration rate between populations. The highest genetic distance based on Nei's genetic genetic distance for all population pairs was 0.160 9 between populations BS and YS, while the lowest was 0.039 8 between XP and YD. UPGMA analysis was performed based on genetic similarity (Jaccard coefficient). Six populations were clustered into two main groups, one containing populations YS and GT, and the other containing PY, BS, XP and YD. The high genetic variance among populations and the low genetic diversity within population could be attributed to the breeding system of part self-compatibility and the limited gene flow among populations of *H. microcephala*.

Key words: *Heteroplexis microcephala*, ISSR, genetic diversity, genetic relationship

异裂菊属(*Heteroplexis* Chang)为广西稀有的特有属,1937年作为一个单种属发表(陈艺林,1985)。该属5个种全部为中国特有种:异裂菊(*H. svernonioides*)、小花异裂菊(*H. microcephala*)、绢叶异裂菊(*H. sericophylla*)、凹脉异裂菊(*H. impressinervia*)和柳州异裂菊(*H. incana*) (陈艺林,1985;梁健英,1994;覃海宁和刘演,2010)。小花异裂菊地理分布范围十分狭小,仅分布于广西阳朔县石灰岩石山山顶的狭小区域,种群个体数量很少。近年来,由于自然生态环境和植被遭受破坏,该种的野生植株正在逐年减少。小花异裂菊对于研究菊科某些类群的分类及其演化具有重要的科学价值,已被列为国家二级保护植物(付立国,1992)。

小花异裂菊一般不能形成大的群落,只分布在石山上部的小片区域,形成局部片段群落,这种片段化分布极有可能会对小花异裂菊的遗传多样性及其进化潜能造成影响。近年来,小花异裂菊的研究只有核型(张国莉和龚洵,2002)、化学成分(樊晓娜等,2010)、异地保护适应性(黄仕训等,2002)、ISSR分析条件优化(史艳财等,2012)等少数几个方面,对于其分子水平的研究尚未见报道。通过物种的遗传多样性及其遗传结构的分析可以加深对该植物进化历史和适应机制的认识,并可为该植物的保护提供科学的指导。对于不同群落类型小花异裂菊种群的遗传多样性变化规律的研究将可深入了解其适应进化及其濒危机制。ISSR集SSR和RAPD技术的优点于一身,实验操作快速、简单,费用低,可检测到的遗传多态性高,是Zietkiewicz & Rafalskia (1994)

提出的一种分子标记技术。目前,ISSR已广泛应用于植物系统演化、分类以及遗传多样性等研究(莫文娟等,2013)。本文采用ISSR技术从DNA水平分析了小花异裂菊种群的遗传多样性和遗传结构,以阐明小花异裂菊对环境的适应机制及其进化潜力,为有效保护小花异裂菊的遗传资源提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

2012年在广西桂林市阳朔县选择6个小花异裂菊种群采集样品,每个种群采集15~40个生长健壮、无病虫害植株的幼嫩叶片,植株之间至少间隔5m。选取每个植株嫩叶3~5片,装于放有硅胶的封口袋中干燥保存(柴胜丰等,2014)。6个种群的地理位置分布见表1。

1.2 基因组DNA提取与聚合酶链式反应(PCR)扩增

植物总DNA采用改良后的CTAB法提取。用1%琼脂糖凝胶电泳法和紫外分光光度计分别检验DNA质量和浓度,置于-20℃冰箱中保存。ISSR-PCR反应体系为25μL的体系中含dNTP 0.20mmol·L⁻¹,Mg²⁺ 1.5mmol·L⁻¹,TaqDNA聚合酶1.5U,模板DNA 50ng,引物0.8μmol·L⁻¹,10×Buffer 2.5μL。最后确定的PCR扩增程序为94℃预变性5min;40个循环;94℃变性40s;53℃退火45s;72℃延伸1.5min;72℃延伸7min,4℃保存。取5μL PCR扩增产物用1.5%的琼脂糖凝胶电泳1~2h,然后用0.5μg·mL⁻¹的EB液染色20min,置于UVP

表 1 小花异裂菊种群的地理位置和取样数
Table 1 Location and samples of *H. microcephala*

种群代号 Population code	地点 Geographic Localition	纬度/经度 Latitude/Longitude	海拔 Altitude (m)	样品数 Sample size
XP	阳朔县兴坪镇 Xingping Town, Yangshuo County	24°42'33" N 110°25'37" E	415	28
PY	阳朔县普益镇 Puyi Town, Yangshuo County	24°42'31" N 110°32'29" E	348	29
YS	阳朔县阳朔镇 Yangshuo Town, Yangshuo County	24°46'22" N 110°29'02" E	430	27
GT	阳朔县高田镇 Gaotian Town, Yangshuo County	24°46'41" N 110°29'06" E	160	15
BS	阳朔县白沙镇 Baisha Town, Yangshuo County	24°48'57" N 110°24'06" E	226	27
YD	阳朔县杨堤镇 Yangdi Town, Yangshuo County	24°59'31" N 110°24'32" E	172	15

表 2 筛选出的 ISSR 引物序列及标记位点
Table 2 Sequences of 10 primers successfully used in the ISSR analysis

引物 Primer	引物序列(5'-3') Sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	多态位点 比率 Proportion of polymorphic bands scored (%)
808	Ag AgAgAgAgAgAgAgC	54.59	22.22
834	Ag AgAgAgAgAgAgAgYT	53.88	30
835	Ag AgAgAgAgAgAgAgYC	56.16	36.3
841	g Ag AgAgAgAgAgAg AYC	56.16	55.55
853	TC TCTCTCTCTC TCRT	53.88	36.36
855	AC ACACACACAC ACYT	53.88	11.11
887	DVDTCTCTCTCTCTC	52.98	18.18
807	Ag AgAgAgAgAgAgAgT	52.18	20
840	gAgAgAgAgAgAgAgAYT	53.88	57.14
848	CA CACACACACACARg	56.16	22.22

R=(A,G); Y=(C,T).

凝胶成像系统中拍照。

1.3 引物筛选

扩增引物采用加拿大哥伦比亚大学(UBC)公

布的第 9 套 100 条 ISSR 引物序列,序列在上海生物工程公司合成。从 6 个种群中各选取 1 个个体进行引物扩增筛选。用 10 条扩增条带清楚、重复性好的引物(表 2)用于所有个体的扩增。

1.4 数据处理与统计分析

按照电泳图谱中同一位置上 DNA 条带有或无赋值,无带(隐性)记为“0”有带(显性)记为“1”。多态位点百分率(*PPB*)、有效等位基因数(*Ne*)、观测等位基因数(*Na*)、Shannon's 信息指数(*I*)、Nei's 基因多样性(*H*)群体总基因多样性(*Ht*)、各群体之间的遗传分化指数(*Gst*)和 Nei's 遗传距离利用 POPGENE 3.2 软件和 NTSYSpc-2.1 软件计算(张杰等,2012)。

采用 DCFA1.1 软件计算欧式距离平方和,用 WINAMOVA1.55 软件进行分子方差分析,计算种群内、种群间的变异方差分布。小花异裂菊种群间的遗传关系聚类分析基于 Nei's 遗传距离,利用 NTSYS pc2.1 软件的非加权配对算数平均法(UPGMA)计算(卜静等,2012)。

2 结果与分析

2.1 小花异裂菊的遗传多样性

10 条引物对小花异裂菊 6 个种群 141 个个体共扩增出 96 条条带,其中 29 条多态带,多态位点比率为(*PPB*) 30.91%。10 条引物扩增总带数 1~10 不等,平均扩增带数为 2.9。在物种水平上,小花异裂菊 *PPB* 为 30.21%,Nei's 基因多样性(*H*)为 0.105 4,Shannon's 信息指数(*I*)为 0.154 6;在种群水平上,*PPB* 的变化范围为 9~19%,平均为 13.33%,*H* 的变化范围为 0.021 2~0.051 3,平均为 0.032 5;*I* 变化范围为 0.033 9~0.080 5,平均为 0.052 2。观测等位基因数为 1.090 0~1.190 0,有效等位基因数为 1.034 1~1.082 3。种群 YS 的多态位点百分率、等位基因数、观测等位基因数、有效 Nei's 基因多样性以及 Shannon's 信息指数均高于其他种群,BS 种群最低。

2.2 小花异裂菊种群的遗传结构

小花异裂菊总的基因多样性(*Ht*)为 0.105 0,种群内基因多样性(*Hs*)为 0.032 5,种群间的基因多样性(*Dst*)为 0.072 5,基因分化系数(*Gst*)为 0.690 5,总的遗传变异中有 69.05%来自于种群间,种群内的遗传变异占 30.95%,说明小花异裂菊的遗传变异主

表 3 小花异裂菊种群的遗传多样性

Table 3 Genetic diversity within populations of *H. microcephala*

种群代号 Population code	多态位点 百分率 (PPB)	观测等位 基因数 (N_a)	有效等位 基因数 (N_e)	Nei's 基因 多样性 指数 (H)	Shannon's 信息指数 (I)
YS	19.00	1.1900	1.0341	0.0265	0.0494
GT	18	1.1800	1.0823	0.0513	0.0805
PY	11	1.1100	1.0376	0.0251	0.0408
BS	9	1.0900	1.0348	0.0212	0.0339
XP	10	1.1000	1.0526	0.0308	0.0468
YD	13	1.1300	1.0662	0.0401	0.0620
种群平均值 Mean	13.33	1.1333	1.0512	0.0325	0.0522
物种平均值 Species level	30.21	1.2700	1.1855	0.1054	0.1546

表 4 小花异裂菊种群多样性 Nei's 分析

Table 4 Genetic variability within populations of *H. microcephala* revealed by ISSR

	总基因 多样性 (H_t)	种群内基 因多样性 (H_s)	种群间基 因多样性 (D_{st})	基因分化 系数 (G_{st})	基因流 (N_m)
平均 Mean	0.105 0	0.032 5	0.072 5	0.690 5	0.224 2
标准差 Standard Deviation	0.032 9	0.005 2			

表 5 小花异裂菊种群间和种群内分子变异的 AMOVA 分析

Table 5 Analysis of molecular variance (AMOVA) within and among populations

变异来源 Source of variation	自由度 df	总方差 Sum of squares	平均 方差 MS	变异组分 Variance compon- ents	总变异 百分比 Percentage of variation	P 值 P value
种群间 Among populations	5	497.002 9	99.401	4.218 3	72.72%	<0.001
种群内 Within population	135	213.663 7	1.583	1.582 6	27.28%	<0.001

要来自于种群间。AMOVA 分析结果与前面结果相符,在总的遗传变异中,27.28%的变异发生在种群内,72.72%的变异发生在种群间,说明遗传变异主

要发生在种群间。小花种群间的基因流 (N_m) 为 0.224 2。

2.3 小花异裂菊种群间的遗传一致度和遗传距离

从遗传距离看, YD 和 XP 的遗传距离最小, 为 0.039 8, BS 和 YS 之间的遗传距离最大, 为 0.160 9。从遗传一致度看, YD 和 XP 的遗传一致度最高, 为 0.961 0, BS 和 YS 的遗传一致度最低, 为 0.851 4, 两者表现规律基本一致。在 UPGMA 聚类图中, 6 个种群可分为两组, YS 和 GT 为一组, PY、BS、XP、YD 聚为一组。

表 6 小花异裂菊种群的遗传距离(对角线下方)和遗传一致度(对角线上方)

Table 6 Genetic identities (above diagonal) and Nei's genetic distance (below diagonal) between populations of *H. microcephala*

种群 Population	YS	GT	PY	BS	XP	YD
YS	* * * *	0.946 0	0.857 7	0.851 4	0.881 5	0.904 0
GT	0.055 5	* * * *	0.892 1	0.875 8	0.918 6	0.938 4
PY	0.153 5	0.114 2	* * * *	0.940 8	0.915 1	0.915 6
BS	0.160 9	0.132 6	0.061 1	* * * *	0.918 0	0.937 3
XP	0.126 2	0.084 9	0.088 7	0.085 5	* * * *	0.961 0
YD	0.101 0	0.063 5	0.088 1	0.064 7	0.039 8	* * * *

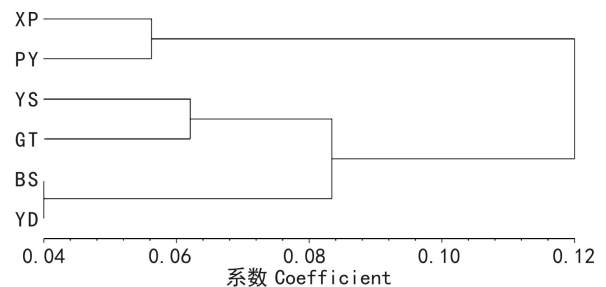


图 1 小花异裂菊 6 个种群 Nei's 遗传距离 UPGMA 聚类
Fig. 1 Dendrogram obtained based on Nei's genetic distance among the six wild populations of *H. microcephala*

3 讨论

3.1 小花异裂菊的遗传多样性

许多研究结果证明稀有、特有或分布区很狭窄的物种其遗传多样性水平都相应偏低(李昂和葛颂, 2002), 但也有些却能保持较高水平的遗传多样

性(Richter et al, 1994)。采用 ISSR 技术得到的小花异裂菊 6 个野生种群物种水平的 PPB 、 H 、 I 的值分别为 30.21%、0.105 4、0.154 6, 小花异裂菊种群内的遗传多样性 $PPB = 13.33\%$, $H_s = 0.032 5$, $H = 0.032 5$, $I = 0.052 2$, 种群间遗传分化程度 $G_{st} = 0.690 5$, 多样性指数均较低, 低于种子风媒植物($H_s = 0.261$, $G_{st} = 0.23$)、异花传粉植物($H_s = 0.260$, $G_{st} = 0.23$)和长命植物($H_s = 0.242$, $G_{st} = 0.23$)的平均水平(Ge et al, 2003)以及 Nybom & Bartishji(2000)基于 RAPD、AFLP、ISSR 等显性标记所统计的 107 个物种总结得出的平均遗传多样性($PPB = 71.02\%$), 表明其种群水平和物种水平上遗传多样性都较低。以往研究结果表明, 繁育系统、分布范围、生活型、分类地位、种子散播机制在种群水平上对遗传变异的影响呈下降趋势(Hamrick et al, 1989), 繁育系统可同时影响种群和物种水平上的遗传变异。一般来说, 分布范围广、寿命长、风媒授粉、异交为主、结实性高且存在于演替末期群落中的物种具有较高的遗传变异(Korron, 1987)。小花异裂菊分布在广西阳朔县, 其分布范围的地理跨度较小, 主要分布于石灰岩石山上部向阳的狭小范围内, 无论是光照、湿度、温度、土壤量等都相差不大, 造成各局域生境因子的较小差异。此外, 小花异裂菊的繁育系统为异交、部分自交亲和在长期进化过程自交程度随着种群的减小而呈加剧趋势。因此, 生境片段化和自交繁育系统可能是使得小花异裂菊在物种水平上具有较低水平的遗传多样性的主要原因。

3.2 小花异裂菊种群的遗传分化

小花异裂菊种群间基因分化系数 G_{st} 为 0.690 5, 总的遗传变异中有 69.05% 来自于种群间, 表明种群间发生了较大程度的遗传分化。Wright(1965)提出可根据种群每代迁移数(N_m)的大小来判断种群间遗传分化的主要原因。根据基因流估算值的大小, 分为高、中、低三个水平(Govindardju et al, 1988)。种群间的基因分化与基因流 N_m 的数值呈负相关, 大的基因流可以阻止种群之间的遗传分化。小花异裂 6 个种群的基因流仅为 0.224 2, 远小于 1, 基因流呈低水平。

一般来说木本植物基因流的大小主要决定于花粉流或种子流(Ennos, 1994)。据观测, 小花异裂菊的繁育系统为异交、部分自交亲和、需传粉者。小花异裂菊开花期山顶温度可以高达 40 °C 左右且持续时间长, 光照强烈, 白天和夜晚的风速都相对较高。

在强风和高温作用下柱头表面干燥和花蜜蒸发速度加快, 花粉对传粉者的吸引力降低, 使传粉者的活动减少。气象因素的变化还会影响访花者的种类和数量。这些因素使小花异裂菊具有不稳定的传粉环境。小花异裂菊各种群呈片段化分布, 花粉难以通过风媒或传粉者在水平地理、垂直距离都较远的种群间进行有效的传播, 不同种群间相互传粉受精几率愈来愈小, 不利于种群之间、分布区域之间的基因交流。小花异裂菊种群的植株数量一般在 10~50 之间, 其中只有部分开花, 昆虫随机的访花方式极易引起同株异花授粉, 从而导致自交。小花异裂菊自然分布十分狭窄, 种群规模很小, 长期的自交在一定程度上导致种群遗传多样性降低。

野外调查发现小花异裂菊虽然结实率很高, 但种子萌发率极低。其次小花异裂菊幼苗分布地多位于植被的底层, 光照度低, 弱光导致幼苗生长异常, 生存能力降低, 种群的更新能力较差。以上因素造成小花异裂菊种群个体数量日益缩小。50 个个体为维持足够等位基因丰度的最小有效种群的个体数, 500 个个体才能保证维持种群内数量性状的遗传变异和种群对不断变化的环境的适应能力。我们在野外调查发现, 小花异裂菊绝大多数种群中的个体在 3~100 之间, 远远低于可维持种群遗传多样性的有效规模。种群个体数量的不断减小必然导致小花异裂菊遗传多样性的丧失(Franke et al, 1995)。

一般来说, 植物的多样性中心可能是该物种的起源中心(Vavilov, 1930), 因此 YS 种群可能是小花异裂菊的部分起源中心。YS 位于 6 个种群的中间位置, 与其他种群有相对较大的基因流交流, 基因重组的空间和机会更大, 更易扩大种群的遗传多样性水平。UPGMA 聚类结果显示, YS 和 GT, BS 和 YD, XP 和 PY 亲缘关系相对较近, 来自于相近地理生态型的种群可以聚于一类, 呈现出一定的地域性分布规律。这可能是产期自然选择使个体中发生的不定向变异演变为群体遗传结构的定向变异(张怀山等, 2014), 再加上长期的自交等因素, 导致同一地区的大部分个体基因型趋于相似的结果。

3.3 保护措施

建议采取以下措施对小花异裂菊资源进行保护:(1)制止乱砍滥伐, 保护的生态不被破坏。(2)提高基因杂合度。小花异裂菊受威胁最主要的内在因素是其有性繁殖能力低, 种群复壮最主要的途径

就是提高有性繁殖能力。因此,保存现有小花异裂菊种群面积或者人工促进种群内与种群间的传粉,增加后代的基因杂合度,可在很大程度上达到复壮种群的目的。(3)小花异裂菊种子萌发率和幼苗成活率都极低,在以后的研究中需加强对小花异裂菊种子育苗和管理技术的研究。

参考文献:

- BU J, WANG DM, LI DW, et al, 2012. ISSR analysis on diversity and genetic relationship in germplasm resources of wild *Polygonatum odoratum* from different habitats [J]. Chin Trad Herb Drugs, 43(9): 1824-1828. [卜静, 王冬梅, 李登武, 等, 2012. 不同产地野生玉竹种质资源多样性与亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 43(9): 1824-1828.]
- CHAI SF, ZHUANG XY, ZOU R, et al, 2014. Genetic diversity analysis of endangered plant *Camellia pupipetala* detected by ISSR [J]. Acta Bot Boreal-Occidental Sin, 34(1): 93-98. [柴胜丰, 庄雪影, 邹蓉, 等, 2014. 濒危植物毛瓣金花茶遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 西北植物学报, 34(1): 93-98.]
- CHEN YL, 1985. An endemic and endangered genus *Heteroplexis* Chang from Guangxi [J]. Guihaia, 5(4): 337-343. [陈艺林, 1985. 广西特有和濒危的异裂菊属 [J]. 广西植物, 5(4): 337-343.]
- ENNOS RA, 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant population [J]. Heredity, 72: 250-259.
- FAN XN, LIN S, ZHU CG, et al, 2010. Terpenoids of *Heteroplexis microcephala* and their bioactivities [J]. China J Chin Mat Med, 35(3): 315-322. [樊晓娜, 林生, 朱承根, 等, 2010. 小花异裂菊中的萜类成分及其活性 [J]. 中国中药杂志, 35(3): 315-322.]
- FRANKE OH, B ROWN AHD, BURDOU JJ, 1995. The conservation of plant biodiversity [M]. Cambridge MA: Cambridge University Press.
- FU LG, 1992. Chinese plant red book [M]. Beijing: Science Press. [付立国, 1992. 中国红皮书——稀有濒危植物 [M]. 北京: 科学出版社.]
- GE YQ, QIU YX, DING BY, et al, 2003. An ISSR analysis on population genetic diversity of the relict plant *Ginkgo biloba* [J]. Biodivers Sci, 11(4): 276-287.
- GOVINDARDJU DR, 1988. Relationship between dispersal ability and levels of gene flow in plants [J]. Oikos, 52: 31-35.
- HAMRICK JL, GODT MJW, 1989. Allozyme diversity in plant species [M]// BROWN ADH, CLEGG MT, KAHLER AL, et al. Plant population genetics, breeding and genetic resources. Sunderland: Sinauer Press.
- HUANG SX, LUO WH, TANG WX, et al, 2002. Study on the adaptability of the rare and threatened limestone plants ex-situ conservation [J]. Guihaia, 22(02): 136-139. [黄仕训, 骆文华, 唐文秀, 等, 2002. 石山稀有濒危植物迁地保护适应性研究 [J]. 广西植物, 22(02): 136-139.]
- KORRON JD, 1987. A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility: geographically restricted and widespread plant congeners [J]. Ecology, 1(1): 47-58.
- LI A, GE S, 2002. Advances in plant conservation genetics [J]. Biodivers Sci, 10(1): 61-71. [李昂, 葛颂, 2002. 植物保护遗传学研究进展 [J]. 生物多样性, 10(1): 61-71.]
- LIANG JY, 1994. Two new species of *Heteroplexis* Chang (*Compositae*) [J]. Guihaia, 14(02): 126-129. [梁健英, 1994. 异裂菊属两新种 [J]. 广西植物, 14(02): 126-129.]
- MO WJ, FU JM, QIAO J, et al, 2013. ISSR study on genetic relationship of genus *Paulownia* [J]. Sci Silv Sin, 49(1): 61-67. [莫文娟, 傅建敏, 乔杰, 等, 2013. 泡桐属植物亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. 林业科学, 49(1): 61-67.]
- NYBOM H, BARTICH IV, 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD marks in plants perspectives in plant ecology [J]. Evol Syst, 3(2): 93-114.
- QIN HN, LIU Y, 2010. A checklist of vascular plants of Guangxi [M]. Beijing: Science Press. [覃海宁, 刘演, 2010. 广西植物名录 [M]. 北京: 科学出版社.]
- RICHTER TS, SOLTIS PS, SOLTIS DE, 1994. Genetic variation within and among population of the narrow endemic *Delphinium viridescens* [J]. Am J Bot, 81: 1070-1076.
- SHI YC, ZOU R, LUO WH, et al, 2012. Establishment and optimization of the ISSR reaction system for *Heteroplexis sericophylla* Y. L. Chen [J]. Seed, 31(9): 34-37. [史艳财, 邹蓉, 骆文华, 等, 2012. 广西特有植物小花异裂菊 ISSR-PCR 反应体系的建立 [J]. 种子, 31(9): 34-37.]
- VAVILOV NI, 1930. Wild progenitors of the fruit trees of *Turkistan* and the *Caucasus* and the problem of the origin of fruit trees [M]. London: Proc 6th Int Hort Cong.
- WRIGHT, 1965. The interpretation of population structure by F statistics with special regard to system of mating [J]. Evolution, 19: 395-420.
- ZIETKIEWICZ E, RAFALSKIA L, 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 20: 176-183.
- ZHANG GL, GUO X, 2002. The karyotype analysis of *Anemoclema glaucifolium* and *Heteroplexis microcephala* both endemic to China [J]. Acta Bot Yunnan, 24(6): 765-768. [张国莉, 龚洵, 2002. 中国特有罂粟莲花和小花异裂菊的核型分析 [J]. 云南植物研究, 24(6): 765-768.]
- ZHANG HS, XIA ZR, LI MF, et al, 2014. Genetic diversity of *Pennisetum longissimum* var. *intermedium* germplasm resources using ISSR markers [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 34(2): 256-264. [张怀山, 夏增润, 栗孟飞, 等, 2014. 中型狼尾草种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 西北植物学报, 34(2): 256-264.]
- ZHANG J, WANG J, LI HY, et al, 2012. Genetic diversity of different eco-geographical populations in endangered plant *Prunus mongolica* by ISSR Markers [J]. Acta Ecol Sin, 32(14): 4443-4452. [张杰, 王佳, 李浩宇, 等, 2012. 濒危植物蒙古扁桃不同地理种群遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 生态学报, 32(14): 4443-4452.]