

濒危植物猪血木人工繁殖幼苗的遗传多样性及对种群复壮的启示

申仕康¹, 刘丽娜², 王跃华^{1*}, 吴富勤¹, 赖建华¹

(1. 云南大学 生命科学学院 植物科学研究所, 昆明 650091; 2. 云南农业大学 园林园艺学院, 昆明 650201)

摘要: 猪血木为山茶科特有的单型属珍稀濒危植物, 目前仅在广东省阳春市八甲镇有分布, 且种群数量不足 200 株, 为给濒危植物猪血木的种群成功回归自然和种群复壮提供科学依据, 采用 AFLP 分子技术, 对 7 个种源人工繁殖的猪血木幼苗遗传多样性进行研究。结果表明: 6 对引物共检测到位点数为 115 个, 其中多态位点数为 68 个, 多态位点所占比率为 59.13%, 观察等位基因数 (N_a) 为 1.5826、有效等位基因数 (N_e) 为 1.3813、 $N_{ei}'s$ 基因多样性 (H) 为 0.2215、Shannon 多样性指数 (I) 为 0.3280。UPGMA 聚类将 7 个种源的幼苗划分为 3 支, 不同种源间幼苗的遗传距离与种源地理距离存在显著相关性 ($P < 0.05$)。说明不同种源人工繁殖猪血木幼苗仍保持较高的遗传多样性。建议采集不同种源种子进行人工繁殖和人工种群构建, 促进物种的种群复壮。

关键词: 濒危植物; 猪血木; 遗传多样性; AFLP; 种群复壮

中图分类号: Q948.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2012)05-0644-06

* Genetic diversity of artificially propagation seedlings of a critically endangered plant *Euryodendron excelsum* and its significance for population recovery

SHEN Shi-Kang¹, LIU Li-Na², WANG Yue-Hua^{1*},
WU Fu-Qin¹, LAI Jian-Hua¹

(1. Plant Science Institute, School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China; 2. School of Horticulture and Landscape, Yunnan Agriculture University, Kunming 650201, China)

Abstract: *Euryodendron excelsum*, which is endemic to China, is an endangered plant from the monotypic genus *Euryodendron* in the family Theaceae. The species is restricted to one remnant population with less than 200 individuals in Bajia region of Yangchun County, Guangdong Province. It is listed as a second class endangered plant for state protection in China. In the present study, genetic diversity of 7 provenances of *E. excelsum* artificially propagation seedlings was investigated by Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). We recorded a total of 115 amplified bands using 6 pairs of AFLP primers, 68 of which ($PPB=59.13\%$) were polymorphic. The observed number of alleles (N_a) and effective number of alleles (N_e) were 1.5826 and 1.3813, respectively. The average values of $N_{ei}'s$ genetic diversity index (H) and Shannon polymorphism information index (I) were 0.2215 and 0.3280, respectively. *E. excelsum* artificially propagation seedlings from 7 provenances were clustered into three groups by UPGMA dendrogram, which was significantly correlated with the geographic distribution of the materials. The results of present

* 收稿日期: 2012-04-10 修回日期: 2012-07-09

基金项目: 国家自然科学基金(31070306); 云南大学植物科学研究所青年教师基金(ZW201004)[Supported by National Natural Science Foundation of China(31070306); Young Teacher Research fund of Plant Science Institute School of Life Sciences, Yunnan University(ZW201004)]

作者简介: 申仕康(1982-), 男, 湖南邵东人, 博士, 从事生物多样性保护和恢复生态学研究, (E-mail) ssk168@yahoo.com.cn.

* 通讯作者: 王跃华, 教授, 从事保护生物学研究, (E-mail) wangyh58212@126.com.

study indicated that *E. excelsum* artificially propagation seedlings from 7 provenances had a relatively high level of genetic diversity. We suggest the future population recovery of this endangered plant could collect seeds and seedling propagation from the above 7 provenances to keep the genetic diversity. This study would provide a profound basis for the population recovery of *E. excelsum*.

Key words: endangered plant; *Euryodendron excelsum*; genetic diversity; AFLP; population recovery

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,对稀有和濒危物种遗传多样性研究,是揭示其进化历史和适应潜力的基础,并进一步探讨物种的濒危机制,制定科学的保护和种群恢复措施提供依据(Hedrick & Kalinowski, 2000)。保护生物学的关键问题就是保护物种,具体地说就是保护物种的遗传多样性或进化潜力(康明等, 2005)。种内遗传多样性或变异越丰富,物种对环境变化的适应能力就越强,其进化的潜力也就越大,这不仅有助于保护物种和整个生态系统的多样性,还可以减慢由于适应或进化所导致的灭绝过程(Frankham 等, 2002; Ellis 等, 2006)。故无论是从进化的角度还是从保护生物学的角度,物种遗传多样性的研究对揭示物种的进化历史和潜能,以及进一步探讨其濒危机制具有重要意义,并能为濒危物种保护措施的制定提供重要依据(McKay 等, 2005)。同时,对于受胁迫的濒危物种而言,基于种群遗传多样性的种群恢复策略是物种人工种群构建、迁地保护和种群成功回归自然的主要途径(康明等, 2005; 韦霄等, 2005; Sinclair & Hobbs, 2008)。

猪血木(*Euryodendron excelsum*)是中国特有的山茶科单型属猪血木属的珍稀濒危植物,现仅分布于广东省阳春县八甲镇地区,且仅残存一个居群,种群数量不足 200 株,同时,由于受当地高强度人为干扰的影响,猪血木残存种群被隔离成斑块状分布且种群自然更新存在瓶颈效应,因此,该物种已经处于极度濒危状态,其被列为国家二级重点保护野生植物,并被国际自然保护与联盟(IUCN)收录为极危种(Critically endangered)(IUCN, 2010)。前期研究表明:猪血木自然种群仍然保留较高的遗传多样性,这为猪血木种群的就地保护方案制定提供了依据(Wang 等, 2006; 罗晓莹等, 2005; 王博轶, 2009),导致物种濒危的主要原因是外界高强度人为干扰对生境及植株个体的破坏(Shen 等, 2009)。然而,对于因外界因素致濒的物种来说,种群的重建与迁移被认为是拯救该物种的极为有效的方法(Armstrong & Seddon, 2008; Primack 和马克平, 2009),因此,在猪血木人工种群构建和迁地保护过程中,如

何选择合适的遗传结构?如何配置幼年个体的遗传多样性?从而保证猪血木人工种群对环境因子的长期适应性及其进化潜能,则是该物种种群成功回归自然和实现其种群有效保育的关键问题。鉴于此,本文通过对不同种源(即不同斑块种子)下种子采集、人工繁育幼苗,采用扩增片段长度多态性(Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)分子标记技术检测猪血木人工繁殖幼苗的遗传多样性,从而为猪血木人工种群构建、迁地保护及其种群成功回归自然提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

猪血木种子于 2008 年 1 月采集于八甲镇的冲田、木力、中田、竹根富、石角、解塘和澄洞 7 个有结实成年植株的斑块。各斑块植株分布现状及生境特征详见 Shen 等(2009)。种子采集后于 2008 年 3 月份在云南大学洋浦校区温室进行种子萌发和幼苗培育试验,不同种源幼苗采用日常温室管理进行育苗,待幼苗生长 12 个月后,采集不同种源幼苗的叶片进行 DNA 提取和不同种源幼苗的 AFLP 遗传多样性分析。

1.2 试验方法

1.2.1 材料总 DNA 提取 实验采用改良的 CTAB 法(Doyle JJ & Doyle JL, 1987)进行基因组 DNA 提取,提取后的 DNA 用 0.5% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测纯度, -20 °C 下保存备用。

1.2.2 AFLP 实验 试验流程主要采用 Vos 等(1995)的方法略作改动。包括酶切、连接、预扩增和选择性扩增及凝胶电泳、银染等步骤。酶切采用 20 μL 反应体系: ddH₂O 11 μL , 10 \times buffer 2 μL , MseI 和 EcoRI 各 1 μL , Genomic DNA 5 μL , 反应程序为 37 °C, 2.5 h; 65 °C, 15 min; 16 °C, 终止。酶切后,在酶切体系中加入接头连接反应体系, EcoRI 和 Mse I 接头的上下游接头序列见表 1, 连接反应体系为 ddH₂O 5 μL , 10 \times buffer 2 μL , MseI 和 EcoRI 接头各 1 μL , T4 DNA Ligase 1 μL , Genomic DNA 5

μL , Digested DNA $10 \mu\text{L}$, 反应程序为: $16 \text{ }^\circ\text{C}$, 10 h ; $72 \text{ }^\circ\text{C}$, 10 min 。预扩增和选择性扩增引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成, 具体序列见表 1, 预扩增采用 $25 \mu\text{L}$ 的反应体系: 模板 DNA $2 \mu\text{L}$, $10 \times \text{buffer}$ $2.5 \mu\text{L}$, MgCl_2 $2 \mu\text{L}$, MseI $2 \mu\text{L}$, EcoRI $2 \mu\text{L}$, dNTP $1 \mu\text{L}$, Taq 酶 $1 \mu\text{L}$, ddH_2O $12.5 \mu\text{L}$, PCR 反应程序为: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 40 min ; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min , $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min , $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min ; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min ; 运行 35 个循环, 终止。预扩增产物于 0.5% 琼脂糖凝胶上检测, 然后将预扩增产物稀释并在 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 下保存作为

选择性扩增模板。选择性扩增引物参照文献(邹喻苹等, 2001)提供的 64 对引物组合, 从中选择 6 对条带清晰的引物组合将进行 AFLP 分析(表 1), 反应体系为: $10 \times \text{buffer}$ $2.5 \mu\text{L}$; MgCl_2 $2 \mu\text{L}$; MseI $2 \mu\text{L}$; EcoRI $2 \mu\text{L}$; dNTP $1 \mu\text{L}$; Taq 酶 $1 \mu\text{L}$; ddH_2O $13.5 \mu\text{L}$; 模板 DNA(稀释 5 倍后的溶液) $1 \mu\text{L}$, PCR 反应程序则为: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 4 min ; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min , $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min , $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min 运行 35 个循环, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min ; $16 \text{ }^\circ\text{C}$ 终止。选择性产物进行 5% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染, 并进行照相。

表 1 猪血木幼苗 AFLP 实验接头和扩增引物序列

Table 1 The sequence of adapters and primers of amplification in AFLP technique of *E. excelsum* seedlings

接头和引物 Adapters and primers	序列 Sequence	
接头 Adapters	Mse I-1	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
	Mse I-2	3'-TACTCAGGACTCAT-5'
	EcoRI-1	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
	EcoRI-2	3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'
预扩增引物 Primers of pre-amplification	EcoRI+1	5'-GACTGCGTACCAATTC-3'
	Mse I+1	5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'
选择性扩增引物 Primers of selective amplification	E-CAA	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAA-3'
	E-CCA	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CCA-3'
	M-AGA	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AGA-3'
	M-ATA	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ATA-3'
	M-AGC	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AGC-3'
	M-ACT	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACT-3'
	M-ACG	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACG-3'
	M-ACC	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACC-3'

1.2.3 数据收集和统计分析 根据所照照片的图谱记录条带。针对某一条带而言, 有记为“1”, 无记为“0”, 只记载清晰易辨的扩增带, 将 6 对选择扩增引物产生的 DNA 扩增带数据输入到数据矩阵, 得到了 0、1 数据表。运用 DCFA 1.1(Zhang, 2002)对得到的 AFLP 数据进行处理后, 运用 POPGENE 1.32(Yeh 等, 1997)进行遗传多样性分析, 计算得到以下遗传多样性参数: 多态位点百分率 PPB , 平均等位基因数 N_a (average number of alleles per loci), 有效等位基因数 N_e (effective number of alleles per loci)(Kimura and Crow, 1964), $Nei's$ 基因多样性指数 h (gene diversity)(Nei, 1973), Shannon 信息指数 I (Shannon Information Index)(Lewontin, 1972); 利用 NTSYS 2.1(Rolf, 2000)中的 Genetic distance 程序, 采用 $Nei72$ 方法(Nei, 1972), 计算样品间的遗传距离, 运用 TPGA 1.3(Miller, 1997)检测不同种源间遗传距离和地理距离的相关性。根据 $Nei's$ 遗传距离运用 NTSYS 2.1 中的 UPGMA

(Nei 等, 2000)进行聚类分析。同时运用 SPSS 13.0 软件来分析各种遗传指标之间的相关性。

2 结果与分析

2.1 不同种源幼苗的遗传多样性

用 6 对引物对不同种源人工繁育猪血木幼苗的基因组 DNA 的 AFLP 分析显示, 每个引物检测到的位点数为 $15 \sim 25$ 个之间, 6 对引物共检测到位点数为 115 个, 平均每对引物检测到 19.17 个位点, 试验所选择的 6 对引物均能检测到多态位点。总共检测到的多态位点数为 68 个, 多态位点所占比率为 59.13% (表 2)。

根据所有引物检测的数据得到的观察等位基因数为 1.5826 ± 0.4953 、有效等位基因数为 1.3813 ± 0.3789 、 $Nei's$ 基因多样性为 0.2215 ± 0.2034 、Shannon 多样性指数为 0.3280 ± 0.2919 , 各引物所检测的多态位点比率及遗传多样性指数见表 2, 采

用 SPSS13.0 软件进行多态位点比率 PPB 、观察基因等位数、有效等位基因数、 $Nei's$ 基因多样性和

Shannon 多样性指数 5 项指标进行相关性分析,结果显示两两参数之间有显著的相关性($P < 0.05$)。

表 2 不同种源猪血木幼苗的基因多样性

Table 2 Gene diversity of propagation seedlings from different provenance of *E. excelsum*

引物组合 Primer pairs	多态位点比率 PPB (%)	观察等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	$Nei's$ 基因多样性 H	Shannon 指数 I
E-CAA+M-ATA	53.33	1.5333±0.5264	1.4516±0.4669	0.2395±0.2399	0.3404±0.3366
E-CAA+M-AGA	47.37	1.4737±0.5130	1.2305±0.2807	0.1504±0.1727	0.2339±0.2618
E-CCA+M-AGC	58.82	1.5294±0.5145	1.3324±0.3693	0.1969±0.2042	0.2935±0.2963
E-CCA+M-ACT	62.50	1.6250±0.5000	1.4361±0.3925	0.2500±0.2118	0.3563±0.3032
E-CCA+M-ACG	69.57	1.6957±0.4705	1.4391±0.3848	0.2555±0.1974	0.3810±0.2788
E-CCA+M-ACC	60.00	1.6000±0.5000	1.3986±0.3799	0.2318±0.2064	0.3424±0.2967
Total	59.13	1.5826±0.4953	1.3813±0.3789	0.2215±0.2034	0.3280±0.2919

表 3 猪血木 7 个种源幼苗的遗传距离(对角线下方)和遗传一致度(对角线上方)

Table 3 $Nei's$ genetic distance (below diagonal) and genetic identity (above diagonal) of artificial propagation seedlings from seven seed resources of *E. excelsum*

种源 Seeds source	冲田 Chongtian	木力 Muli	中田 Zhongtian	澄洞 Chengdong	石角 Shijiao	解塘 Jietang	竹根富 Zhugenfu
冲田 Chongtian	****	0.7304	0.6783	0.7565	0.7478	0.7043	0.7739
木力 Muli	0.3141	****	0.6870	0.7826	0.7565	0.7652	0.7652
中田 Zhongtian	0.3882	0.3755	****	0.6783	0.6696	0.6609	0.6261
澄洞 Chengdong	0.2790	0.2451	0.3882	****	0.8000	0.8435	0.7391
石角 Shijiao	0.2906	0.2790	0.4011	0.2231	****	0.8522	0.8174
解塘 Jietang	0.3505	0.2676	0.4142	0.1702	0.1600	****	0.7391
竹根富 Zhugenfu	0.2563	0.2676	0.4683	0.3023	0.2016	0.3023	****

2.2 不同种源幼苗的遗传距离和聚类分析

用 POPGENE 算出 7 个不同种源人工繁殖的猪血木幼苗之间的遗传距离,其变化范围介于 0.1600~0.4683 之间(表 3),其中澄洞和石角之间的遗传距离最小,只有 0.1600,经 UPGMA 聚类后聚在一起。而竹根富和中田之间的遗传距离最大,为 0.4683,在 UPGMA 聚类图中亦相隔很远,UPGMA 聚类分析中,冲田和竹根富聚成一支,木力、澄洞、石角和解塘聚成一支,而中田则单独为一支(表 3,图 1)。采用 Mantle 检测,不同种源间幼苗的遗传距离与种源地理距离存在显著相关性($P < 0.05$),这与 SPSS13.0 检测种源间幼苗的遗传距离与种源地理距离存在显著正相关性($r=0.958, P=0.012$)的结果一致。

3 结论与讨论

3.1 不同种源人工繁殖幼苗遗传多样性

物种的遗传多样性是生命进化和适应的基础,种内遗传多样性越高,物种对环境变化的适应能力就越强,通常认为特有物种、濒危种和狭域种具有较

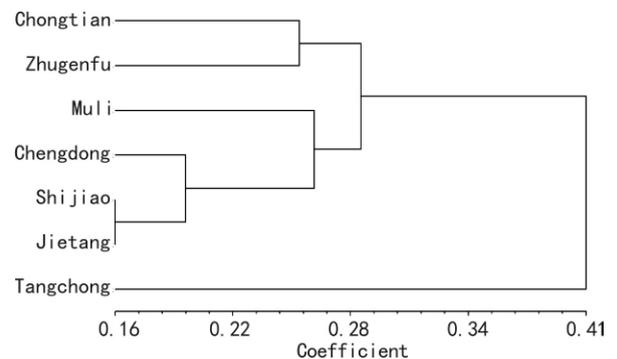


图 1 基于 $Nei's$ 遗传距离猪血木幼苗的 UPGMA 聚类图
Fig. 1 UPGMA tree of artificial propagation seedlings from seven seed resources of *Euryodendron excelsum* based on $Nei's$ genetic distance

低的遗传多样性(Frankham 等,2002),但是对大量的濒危植物遗传多样性检测亦发现,许多濒危或稀有物种亦具有较高的遗传多样性,而也有一些广布物种的遗传多样性则很低(Kang 等,2000)。

猪血木为山茶科单型属,且仅局限分布于八甲地区,种群数量稀少,属于狭域分布的地方特有濒危物种,Wang 等(2006)和罗晓莹等(2005)分别采用 RAPD 分子标记检测猪血木自然居群的遗传多样性

发现,其多态位点所占比率 *PPB* 和 *Nei's* 基因多样性 *H* 分别为 51.80% 和 0.1821、60.90% 和 0.1993, 这比 Hamrik & Godt(1989)对 165 属 449 个种的植物等位酶研究得出植物多态位点百分率平均为 50% 的结论要高;王博轶(2009)通过扩大样本数量,采用 AFLP 分子标记亦检测到猪血木自然居群 *PPB* 和 *H* 分别为 63.13% 和 0.1526,表明猪血木自然种群仍然保留较高的遗传多样性;在本研究中,猪血木人工繁殖幼苗的 *PPB* 和 *H* 分别为 59.13% 和 0.2215,表明猪血木在子代中仍然保留较丰富的遗传多样性和较高的进化潜力,但是二者在 *Nei's* 基因多样性 *H* 的不一致性可能是由于取样和选择性引物差异所导致的(邹喻苹等,2001;Frankham 等,2002)。与山茶科其它植物相比,猪血木种群遗传多样性高于稀有种杜鹃红山茶(*Camellia changii*, 38.83%),低于稀有种金花茶(*C. nitidissima*, 72.50%)、圆子荷(*Apterosperma obovate*, 80.26%)和广布种川鄂连蕊茶(*C. rosthomiana*, 76.00%) (Tang 等,2006;罗晓莹等,2005)。

张德全等(2008)通过对 235 篇文献关于 314 种植物遗传多样性参数统计分析表明,RAPD 和 AFLP 分子标记的参数相关性较大,具有较好的可比性,在本研究中,基于 AFLP 对猪血木幼苗遗传多样性得出的结果与罗晓莹等(2005)和 Wang 等(2006)基于 RAPD 的结果存在一定的差异,其可能是由于分子标记和取样的差异所造成。一般认为,AFLP 比 RAPD 能够检测出更多的位点,覆盖了基因组中更多的片段,而在对濒危物种遗传多样性研究取样过程中,样本覆盖面积占整个群体面积的比例越大,对遗传参数引起的偏差可能越小(Frankham 等,2002)。此外,本研究与王博轶(2009)采用 AFLP 分子标记,分别对自然居群和人工繁殖幼苗的研究结果亦存在一定的差异,其可能是由于取样和扩增引物的差异所导致,同时,猪血木为两性花,异花授粉,本研究人工繁殖幼苗为种子繁殖苗,故亲本和子代个体在遗传结构上的变异亦可能导致自然居群与人工繁殖幼苗在遗传参数上的差异。

Hamrick & Loveless(1989)认为:物种丰富的遗传多样性是与其生活史特征和生态特性密切相关的,猪血木自然种群和人工繁育幼苗具有较高遗传多样性的原因可能为:(1)猪血木在八甲镇曾成片分布,其种群数量急剧减少是由于近几十年的人为干扰所致,故对于猪血木这种高大的乔木物种而言,物

种可能在种群数量衰减的一段时间内仍然会保留较高的遗传多样性;(2)猪血木自然种群仍然保持较高的遗传多样性,而本实验所检测的材料仅为自然居群中成年个体的第一代幼年个体,依然反应出自然居群中成年个体的遗传水平;(3)猪血木种子为以鸟类散布为主,通过动物传播种子的物种可增加物种之间的基因交流,有利于保持物种的遗传变异和突变;(4)猪血木为两性花,其具有较高的授粉率,属异花传粉植物,主要依赖昆虫进行传粉,这也是猪血木人工繁育幼苗具有较高的遗传多样性的原因之一。

3.2 幼苗遗传多样对种群保护与复壮的启示

目前猪血木仍保留较高的遗传多样性,就种群本身遗传变异而言,其对生存环境仍具有较好的适应性,但通过野外种群生态学调查和分析发现,猪血木主要分布于高强度人为干扰的村庄附近,外界干扰导致种群生境破碎化且自然更新困难,从而严重影响种群的正常生存和繁衍,故对该物种的保护既要加强现有植株的就地保护,同时也要积极开展物种的人工繁殖和种群回归自然研究与实践(罗晓莹等,2005)。一般认为,种群能否成功回归自然取决于 3 个方面:(1)适宜物种种群恢复和回归自然的生境;(2)种群不同生长阶段的统计学信息如存活率、繁殖力和种群活力;(3)在前两条都满足的基础上,物种的遗传多样性则是决定物种能否适应环境变化、维持变异潜能及其长期生存繁衍的关键因素,故在濒危物种的种群恢复和回归自然中,选择合适的生境条件和保持物种的遗传多样性对物种保育具有重要应用价值(Sinclair & Hobbs, 2008; Bischoff 等,2010)。猪血木种群数量稀少,但成年植株开花结实正常,且结实量大(申仕康等,2008b)。

建议通过采集不同种源种子进行幼苗人工繁殖,进行猪血木人工种群恢复和迁地保护,扩大种群数量。同时通过对现有居群生境质量和生态因子的调查,探明物种生存繁衍过程对生境条件的需求,选择合适的生境条件进行人工居群构建和种群回归自然研究,对猪血木人工繁育幼苗的遗传多样性分析表明,猪血木幼苗仍然保留较大的遗传多样性,故可以通过采集不同斑块的猪血木种子进行人工繁育,保证种群回归过程中的遗传多样性与遗传变异。但是,如何基于遗传差异最大化来配置不同种源猪血木幼苗的数量及式样,从而成功实现物种的复壮和种群回归自然仍然有待进一步研究。

致谢 云南大学 2006 级生物技术专业本科生

韩振伟、卢孟孟和唐明勇等参与了相关试验,特此致谢!

参考文献:

- Primack RB, 马克平. 2009. 保护生物学简明教程[M]. 北京:高等教育出版社:1—257
- 王博轶. 2009. 濒危植物猪血木的保护生物学研究[D]. 昆明:云南大学
- 国家林业局. 1999. 国家重点保护野生植物名录(第1批)
- 邹喻苹, 葛颀, 王晓东. 2001. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京:科学出版社, 108—121
- Armstrong DP, Seddon PJ. 2008. Directions in reintroduction biology[J]. *Trends Ecol Evol*, **23**:20—25
- Bischoff A, Steinger T, Müller-Schärer H. 2010. The importance of plant provenance and genotypic diversity of seed material used for ecological restoration[J]. *Restor Ecol*, **18**:837—844
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochem Bull*, **19**:11—15
- Ellis JR, Pashley CH, Burke JM, et al. 2006. High genetic diversity in a rare and endangered sunflower as compared to a common congener[J]. *Mol Ecol*, **15**:2 345—2 355
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2002. Introduction to Conservation Genetics[M], New York: Cambridge University Press:21—640
- Hamrick JL, Godt MJW. 1989. Allozyme Diversity in Plant Species[M]//Brown HD, Clegg MT, Kahler AL(eds). Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources, Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts:43—46
- Hamrick JL, Loveless MD. 1989. The Genetic Structure of Tropical Tree Populations: Associations with Reproductive Biology [M]//Bock JH, Linhart YB(eds). Plant Evolutionary Ecology. Westview Press:131—146
- Hedrick PW, Kalinowski ST. 2000. Inbreeding depression in conservation biology[J]. *Annu Rev Ecol Systemat*, **31**:139—162
- IUCN. 2010. The IUCN red list of threatened species. <http://www.iucnredlist.org>
- Kang M(康明), Ye QG(叶其刚), Huang HW(黄宏文). 2005. Genetic risks in plant *ex situ* conservation(植物迁地保护中的遗传风险)[J]. *Hereditas(遗传)*, **27**(1):160—166
- Kang U, Chang CS, Kim YS. 2000. Genetic structure and conservation considerations of rare endemic *Abeliophyllum distichum* Nakai (Oleaceae) in Korea[J]. *J Plant Res*, **113**:127—138
- Kimura M, Crow JF. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population[J]. *Genetics*, **49**:725—738
- Lewontin RC. 1972. The apportionment of human diversity[J]. *Evol Biol*, **6**:381—398
- Luo XY(罗晓莹), Tang GD(唐光大), Xu H(许涵), et al. 2005. Genetic diversity of three endemic and endangered species of the family Theaceae in Guangdong, China(山茶科3种中国特有濒危植物的遗传多样性研究)[J]. *Biodivers Sci(生物多样性)*, **13**(2):112—121
- McKay JK, Christian CE, Harrison S, et al. 2005. “How local is local?”—A review of practical and conceptual issues in the genetics of restoration[J]. *Restor Ecol*, **13**:432—440
- Miller MP. 1997. Tools for population genetic analysis(TFPGA), version 1.3; a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations[J]. *Am Nat*, **106**:283—292
- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **70**:3 321—3 323
- Nei M, Kumar S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics [M]. New York: Oxford University Press:87
- Rolf JF. 2000. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2.1. Exeter Software, New York: Setauket
- Shen SK(申仕康), Hu XL(胡晓立), Wang YH(王跃华). 2008. Ornithochory *Euryodendron excelsum* and its significance in conservation biology(鸟类对猪血木种子的散步及其在保护中的意义)[J]. *Guihaia(广西植物)*, **28**(5):650—654
- Shen SK, Wang Y, Ma HY, et al. 2009. Distribution, stand characteristics and habitat of a critically endangered plant *Euryodendron excelsum*: implications to conservation[J]. *Plant Spec Biol*, **24**(2):133—138
- Sinclair EA, Hobbs RJ. 2008. Sample size effects on estimates of population genetic structure: implications for ecological restoration[J]. *Restor Ecol*, **17**:837—844
- Tang SQ, Bin XY, Wang L, et al. 2006. Genetic diversity and population structure of yellow *Camellia* (*C. nitidissima*) in China as revealed by RAPD and AFLP markers[J]. *Biochem Genet*, **44**:444—456
- Wang T, Su YJ, Ye HG, et al. 2006. Genetic differentiation and conservation of 14 surviving individuals of *Euryodendron excelsum* endemic to China[J]. *Front Biol Chin*, **1**:68—70
- Wei X(韦霄), Wei JQ(韦记青), Jiang SY(蒋水元), et al. 2005. Genetic diversity evaluation of *ex-situ* populations of *Camellia nitidissima* (迁地保护的金花茶遗传多样性评价)[J]. *Guihaia(广西植物)*, **25**(3):215—218
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. *Nucleic Acids Res*, **23**:4 407—4 414
- Yeh FC, Yang RC, Boyle TB, et al. 1997. POPGENE, the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis[M]. Canada: University of Alberta, Molecular Biology and Biotechnology Centre
- Zhang DQ(张德全), Yang YP(杨永平). 2008. A statistical and comparative analysis of genetic detected by different molecular markers(几种常见分子标记遗传多样性参数的统计分析)[J]. *Acta Bot Yunan(云南植物研究)*, **30**(2):159—167
- Zhang FM. 2002. DCFA 1.1, A Program Companion with AMOVA to Compute the Matrix of Distance[M]. Beijing: Laboratory of Systematics and Evolutionary Botany, Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences