

金钱槭属植物的遗传多样性与保护策略

柏国清¹, 杨娟², 李忠虎³, 赵桂仿^{3*}

(1 陕西省西安植物园/陕西省植物研究所, 西安 710061; 2 西安交通大学 环境与疾病相关基因教育部重点实验室 生物医学研究实验中心/医学院遗传学与分子生物学系, 西安 710061; 3 西北大学 生命科学学院 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 西安 710069)

摘要: 金钱槭属包括 2 个种: 金钱槭(*Dipteronia sinensis* Oliv.) 和云南金钱槭(*Dipteronia dyeriana* Henry), 均为珍稀濒危植物, 主要分布于中国的中部和南部。该研究应用 18 种随机扩增多态性 DNA(RAPD) 引物、8 对扩增片段长度多态性(AFLP)引物和 10 种多态性叶绿体微卫星基因(cpSSR)引物, 获得金钱槭和云南金钱槭的遗传多样性与种群结构的相关信息。结果表明, 在物种水平上, 由 RAPD(金钱槭: $H=0.386\ 4$, $H_{sh}=0.556\ 3$; 云南金钱槭: $H=0.304\ 7$, $H_{sh}=0.445\ 0$) 和 AFLP(金钱槭: $H=0.331\ 9$, $H_{sh}=0.488\ 0$; 云南金钱槭: $H=0.304\ 7$, $H_{sh}=0.445\ 0$) 2 个核标记的遗传多样性具有可比性, 而 cpSSR 标记(金钱槭 $H_e=0.603\ 2$, 云南金钱槭 $H_e=0.671\ 1$) 的遗传多样性高于 AFLP 和 RAPD 标记的遗传多样性, 遗传分化系数(G_{ST}) 也显示出相似的结果, 由此揭示 2 个种均拥有相对较高的遗传多样性和遗传分化。研究认为, 人类活动破坏植物栖息地是造成 2 种物种处于濒危状态的主要原因; 从长远来看, 保护 2 种金钱槭属植物的主要策略是保护植物栖息地, 同时应加强扩大种群规模以维持现有遗传变异水平。

关键词: 金钱槭属; 遗传多样性; RAPD; AFLP; cpSSR; 保护策略

中图分类号: Q346⁺.5; Q789

文献标志码: A

Genetic Diversity and Implications for Conservation of *Dipteronia* Olive.

BAI Guoqing¹, YANG Juan², LI Zhonghu³, ZHAO Guifang^{3*}

(1 Xi'an Botanical Garden of Shaanxi Province/Institute of Botany of Shaanxi Province, Xi'an 710061, China; 2 Department of Genetics and Molecular Biology, Medical School of Xi'an Jiaotong University/Key Laboratory of Environment and Disease-related Gene, Ministry of Education, Xi'an 710061, China; 3 Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: The genus *Dipteronia* Oliv. endemic to central and southern China consists of two species, *D. sinensis* Oliv. and *D. dyeriana* Henry, both of them are rare and endangered. In this study, a combination of 18 random amplified polymorphic DNA(RAPD) markers, 8 pair of amplified-fragment length polymorphism(AFLP) primers and 10 polymorphic chloroplast microsatellite loci(cpSSR) were used to access the genetic diversity and population structure of species *D. sinensis* and *D. dyeriana*. At the species level, the genetic diversity estimated by the two nuclear markers RAPD(*D. sinensis*: $H=0.386\ 4$, $H_{sh}=0.556\ 3$ and *D. dyeriana*: $H=0.304\ 7$, $H_{sh}=0.445\ 0$) and AFLP(*D. sinensis*: $H=0.331\ 9$, $H_{sh}=0.488\ 0$ and *D. dyeriana*: $H=0.304\ 7$, $H_{sh}=0.445\ 0$) were comparable, while that of cpSSR($H_e=0.603\ 2$ of *D. sinensis* and $H_e=0.671\ 1$ of *D. dyeriana*) were much higher than that of both AFLP and RAPD, and the gene differentiation coefficient(G_{ST}) displayed a similar trend. The resulting values indicated that the three marker types estimated a relative high genetic diversity and genetic differentiation within both species. For the implica-

收稿日期: 2014-04-22; 修改稿收到日期: 2014-08-07

基金项目: 国家自然科学基金(30270154); 西北大学长江学者奖励计划和创新研究团队(PCSIRT); 陕西省教育厅专项基金(2007JK412); 西北大学优秀博士论文资助项目(07YYB05)

作者简介: 柏国清(1983—), 男, 硕士, 研究实习员, 主要从事系统与进化植物学研究。E-mail: guoqingbai913@gmail.com

* 通信作者: 赵桂仿, 教授, 主要从事植物系统进化与分子生态研究。E-mail: gzfzhao@nwu.edu.cn

tion of conservation, we believe that the habitat destruction by human activities is among the key factors responsible for both species' endangered status. Therefore, in the long term, the strategy for conservation of the two *Dipteronia* species is the protection of its habitat. In addition, increasing small population size to maintain existing levels of genetic variation should be taken into consideration.

Key words: *Dipteronia* Oliv.; genetic diversity; RAPD; AFLP; cpSSR; conservation strategy

中国特有属金钱槭属(*Dipteronia* Oliv.)包括金钱槭(*D. sinensis* Oliv.)和云南金钱槭(*D. dyeriana* Henry)2个种。2个种均为二倍体($2n=18$),生长于海拔1 000~2 400 m的山涧^[1],分布于中国中部和南部的落叶阔叶林中。2个种均为珍稀濒危物种,居群小而分散,个体数量有限,因此被列为中国珍稀濒危保护植物。

保护遗传学的主要目的是量化、保护或恢复濒危物种的进化潜能^[2]。遗传多样性为物种提供了适应不断变化的生存环境、抵抗病虫害、避免近亲交配所带来的负面影响的潜能^[3-6]。濒危物种遗传多样性的保存是保护规划的主要目标,由于长期的物种生存依赖于居群内和居群间的遗传变异的维护,以适应由环境变化所带来的新的选择压力^[7]。评估遗传多样性、理解多样性的构成方式是设计适合物种保护策略的先决条件^[8]。通常基于形态学性状估计的遗传变异有受环境和遗传因素影响的缺点,因此可能无法提供准确的测量数据^[9]。随着分子标记技术的使用,从非特异性物种引物获得的聚合酶链反应(PCR)衍生标记开始大范围流行起来,此种标记无需请求获取目标物种的序列信息。多数野生植物物种没有或很少有分子遗传学方面的研究,因此这些方法特别适合^[10]。

RAPD(随机扩增多态性DNA)^[11]是目前最常用的植物遗传多样性评估方法。后来发展起来的AFLP(扩增片段长度多态性)^[12]以多重聚合酶链反应为基础,可以产生更多的多态性基因位点^[13],目前已成功应用于多种濒危植物遗传多样性研究^[14-16]。

对植物物种进行综合分析,需要对细胞核、叶绿体和线粒体基因组进行评估。由于遗传的单性生殖模式,与细胞核等位基因相比,植物叶绿体和线粒体基因组均表现出了不同的遗传分化模式^[9]。相比细胞核基因组,叶绿体基因组保存率高且突变率更低。近期研究显示,叶绿体微卫星(cpSSR)基因的突变率比叶绿体基因组的替换率高,且通常也高于细胞核基因组序列,细胞核微卫星(SSR)除外^[17]。

到目前为止,多数有关金钱槭属的研究焦点在形态发育与分类学方面^[18-21]。有必要在多种标记基础上对金钱槭属的遗传多样性进行评估,探索造成

其濒临灭绝的原因并提出相关保护建议。目前已有关于在RAPD和AFLP基础上探索金钱槭属2个物种遗传多样性的报道^[22-23]。因此,本研究通过综合使用cpSSR和细胞核RAPD与AFLP标记,评估金钱槭属植物的遗传多样性水平及其在居群中的分布,探讨致濒的遗传学原因,为该属植物的有效保护和保护策略的制定提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 植物材料

本研究所用17个金钱槭居群样本来自中国陕西、河南、甘肃、四川、重庆、河北、湖南和贵州等8个省份,并从云南省采集4个云南金钱槭居群样本(表1)。采样策略是尽可能涵盖该物种整个生长分布范围(2次采样地点至少间隔10 m),每个用于研究的居群个体数量为5~15个。收集幼叶,放入装有硅胶的塑料袋干燥保存于-80℃的冰箱备用。

1.2 遗传分析

使用改良的CTAB法从干叶中提取DNA^[24-25]。

RAPD研究中应用18对清晰可辨识多态性带的随机引物。引物序列及程序引自Li等^[22]。用于AFLP研究的8个引物组合(包括P-GAA/M-CAA、P-GAA/M-CAC、P-GAA/M-CAG、P-GAG/M-CAA、P-GAG/M-CAA、P-GAG/M-CAC、P-GAG/M-CTG和P-GAG/M-CTT)是从32个*Pst* I+3/*Mse* I+3引物组合中筛选而来,优化的扩增程序引自Yang等^[25]。本项研究所使用的10对cpSSR引物(cpSSR-6、cpSSR-7、cpSSR-13、cpSSR-15、cpSSR-16、cpSSR-17、cpSSR-18、cpSSR-19、cpSSR-21、cpSSR-22)的选择基于Chung和Staub提供的高水平种内及种间多态性,并根据该文献提供的程序扩增基因组序列^[26]。

1.3 数据分析

RAPD和AFLP为显性标记,使用Genescan分析软件收集数据并分析(PE应用生物系统)。条带存在记为1,不存在记为0,然后创建二进制矩阵。使用Nei's遗传多样性指数(H)、Shannon多样性指数(H_{sh})对种内和居群内的遗传多样性进行评估,并使用Popgen32软件对居群间的Nei遗传分化系数(G_{ST})进行预估^[27]。

表 1 金钱槭属 21 个居群的地理位置
Table 1 Geographical locations of the 21 *Dipteronia* Oliv. populations

居群编码 Population code	地点 Site	纬度/经度 Latitude/longitude	海拔 Altitude/m
TBS	陕西太白山 Taibai Mountain, Shaanxi	33°25'N/107°46'E	1 154
TJS	陕西铁甲树 Tiejiashu Mountain, Shaanxi	33°52'N/107°48'E	1 603
BMG	陕西白马沟 Baima Valley, Shaanxi	33°34'N/107°48'E	1 346
NX	陕西宁西 Ningxi forest centre, Shaanxi	33°45'N/108°20'E	1 616
XLS	甘肃小陇山 Xiaolong Mountain, Gansu	34°21'N/106°00'E	1 526
CDZ	四川川洞子 Chuandongzi, Sichuan	30°28'N/102°42'E	1 468
LDG	四川陇东沟 Longdonggou, Sichuan	30°29'N/102°45'E	1 950
JZX	重庆箭竹乡 Jianzhu, Chongqing	32°03'N/108°43'E	1 479
ZPH	湖南纸棚河 Zhipeng River, Hu'nan	30°02'N/110°32'E	1 388
HPS	湖南壶瓶山 Huping Mountain, Hu'nan	30°01'N/110°31'E	1 500
JCS	湖北九冲山 Jiuchong Mountain, Hubei	31°24'N/110°35'E	870
WJG	湖北万家沟 Wanjia Valley, Hubei	31°24'N/110°33'E	811
LMH	湖北龙门河 Longmen River, Hubei	31°19'N/110°29'E	1 297
ZCG	河北猪槽沟 Zhucao Valley, Hubei	31°05'N/110°55'E	1 735
QTW	湖北青潭湾 Qingtan Gulf, Hubei	31°03'N/110°55'E	1 685
SRS	河南石人山 Shiren Mountain, He'nan	33°43'N/112°16'E	1 138
YJ	贵州印江 Yinjiang, Guizhou	27°59'N/108°42'E	1 098
WSH	云南文山 Wenshan, Yunnan	23°37'N/104°24'E	2 217
MZ	云南蒙自 Mengzi, Yunnan	23°24'N/103°23'E	1 902
PB	云南屏边 Pingbian, Yunnan	23°01'N/103°52'E	2 019
HLT	云南黑龙潭 Heilongtan, Yunnan	25°02'N/102°54'E	1 923

SSR 标记为共显性标记,而叶绿体仅具有一条双链线形 DNA,本研究中的扩增产物电泳谱带仅为 1 条。根据条带的迁移率,将每个位点的等位基因(1 对引物对应 1 个位点;其扩增产物片段大小相同,则没有多态性;若分子量大小不同,则视为等位基因),每个位点上分子量最小的等位基因,将其记为 1,根据分子量大小分别记做 1、2、3、…(分子量从小到大)。将每个个体的 10 对引物所检测的数据串到一起,组成原始数据。通过无偏差单倍型多样性(H_e)计算遗传变异: $H_e = [\frac{n}{n-1}(1 - \sum_{i=1}^m P_i^2)]$
式中: n 指分析个体总数, P 为 i th 单倍型相对频率, m 为种群内探测到的单倍型数量。所有类型的标记被用来估测两个种所有居群间的遗传分化程度参数 $G_{ST}^{[28]}$ 。

2 结果与分析

2.1 RAPD、AFLP 和 cpSSR 估算的遗传多样性
通过 RAPD 分析发现,18 个随机引物在 16 个金钱槭居群中共扩增了 128 条带,其中 119 条具有多态性;4 个云南金钱槭居群扩增了 103 条带,其中 84 条具有多态性。金钱槭的遗传多样性为 $H =$

0.386 4, $H_{sh} = 0.556 3$, 云南金钱槭的遗传多样性为 $H = 0.304 7$, $H_{sh} = 0.445 0$ 。金钱槭 16 个居群(不包含 YJ 居群)的平均遗传多样性为 $H = 0.214 9$, $H_{sh} = 0.319 9$, 而 4 个云南金钱槭种群的平均遗传多样性为 $H = 0.159 3$, $H_{sh} = 0.233 2$ (表 2)。
通过 8 对 Pst I + 3/ Mse I + 3 选择性引物组合,共计从 21 个金钱槭属居群(17 个金钱槭居群和 4 个云南金钱槭居群)中获得了 324 条 AFLP 带谱(表 2)。金钱槭和云南金钱槭居群间的 Nei's 遗传多样性指数(H)和 Shannon 多样性指数(H_{sh})显示类似趋势。金钱槭和云南金钱槭的 H 范围分别为 0.040 3(YJ)~0.302 4(ZCG)和 0.160 7(MZ)~0.242 2(PB),而它们的 H_{sh} 分别为 0.060 5~0.435 1 和 0.233 3~0.349 4。金钱槭的遗传多样性($H = 0.331 9$, $H_{sh} = 0.488 0$)高于云南金钱槭($H = 0.304 7$, $H_{sh} = 0.445 0$),该结果与 RAPD 结果一致。
10 条 cpSSR 引物扩增产物中共检测出 39 个等位基因位点,每个基因位点有 2~6 个等位基因。每个个体 10 条 cpSSR 引物扩增产物组合共检测到 49 种不同的单倍型(表 2),其中金钱槭 39 个,云南金钱槭 10 个,个别居群的单倍型比例非常高(91.8%)。2 个物种间均无共享单倍型。除居群 HPS 仅有 1 个单

表 2 金钱槭属 21 居群分析结果

Table 2 The results analysis of the 21 *Dipteronia* Oliv. populations

分类群 Taxa	居群 Population	RAPD		AFLP		cpSSR	
		H_e	H_{sh}	H_e	H_{sh}	N	H_e
金钱槭 <i>D. sinensis</i>	1 TBS	0.169 8	0.257 7	0.164 3	0.240 0	3	0.639 7
	2 BMG	0.246 6	0.353 7	0.152 0	0.221 3	5	0.846 2
	3 TJS	0.208 4	0.305 0	0.117 8	0.169 4	2	0.666 7
	4 NX	0.176 7	0.255 9	0.198 1	0.290 7	2	0.666 7
	5 XLS	0.223 7	0.336 9	0.205 1	0.294 1	3	0.714 3
	6 CDZ	0.193 1	0.288 8	0.277 8	0.410 4	2	0.527 5
	7 LDG	0.199 0	0.294 7	0.233 5	0.340 7	2	0.327 3
	8 JZX	0.188 3	0.280 7	0.252 8	0.366 2	2	0.600 0
	9 ZPH	0.196 5	0.298 2	0.225 3	0.328 2	4	0.802 2
	10 HPS	0.175 8	0.269 6	0.101 6	0.147 1	1	0.000 0
	11 JCS	0.226 1	0.337 2	0.199 9	0.290 0	2	0.533 3
	12 LMH	0.249 0	0.363 1	0.277 4	0.396 2	2	0.571 4
	13 WJG	0.214 2	0.323 6	0.242 0	0.348 3	2	0.500 0
	14 YJ	—	—	0.040 3	0.060 5	2	0.600 0
	15 ZCG	0.249 6	0.377 8	0.302 4	0.435 1	4	0.782 1
	16 QTW	0.228 6	0.347 2	0.281 2	0.412 1	4	0.790 5
	17 SRS	0.292 2	0.428 9	0.281 3	0.405 1	3	0.685 7
	均值 Mean(Pop)	0.214 9	0.319 9	0.208 9	0.303 3	2.647	0.603 2
	总和 Species total	0.386 4	0.556 3	0.331 9	0.488 0	39	0.967 6
云南金钱槭 <i>D. dyeriana</i>	18 WSH	0.184 9	0.271 3	0.227 7	0.331 6	3	0.712 1
	19 MZ	0.156 8	0.231 5	0.160 7	0.233 3	2	0.666 7
	20 PB	0.124 1	0.182 2	0.242 2	0.349 4	3	0.750 0
	21 HLT	0.171 5	0.247 6	0.187 0	0.282 2	2	0.555 6
	均值 Mean(Pop)	0.159 3	0.233 2	0.204 4	0.299 1	2.5	0.671 1
	总和 Species total	0.277 9	0.419 1	0.304 7	0.445 0	10	0.914 4

注: N , 单倍型的数目(在样品中检测到的单倍型); H_e , 无偏差单倍型多样性; H_{sh} , 香农多样性指数。
Note: N , The number of haplotypes(haplotypes detected in the sample); H_e , The unbiased haplotypic diversity; H_{sh} , The Shannon's diversity index.

表 3 金钱槭和云南金钱槭居群间的遗传分化统计

Table 3 Genetic differentiation statistics among populations of species *D. sinensis* and *D. dyeriana*

群 Taxa	G_{ST}		
	RAPD	AFLP	cpSSR
金钱槭 <i>D. sinensis</i>	0.447 0	0.367 8	0.812 0
云南金钱槭 <i>D. dyeriana</i>	0.426 7	0.326 6	0.706 7

注: G_{ST} , 遗传分化系数。
Note: G_{ST} , Genetic differentiation coefficient.

倍型 h19 外,其他各居群均显示出至少存在 2 个特有单倍型。17 个金钱槭居群的平均遗传变异(H_e)为 0.603 2,4 个云南金钱槭居群 H_e 为 0.671 1。通过 17 个金钱槭居群计算 cpSSR 总变异率为 0.967 6,4 个云南金钱槭居群 cpSSR 总变异率为 0.914 4。

2.2 居群间的遗传分化

金钱槭属 2 个种内居群间 Nei 遗传变化系数(G_{ST})均表现出金钱槭高于云南金钱槭相似趋势(表 3)。其中,RAPD 检测结果分别为 0.447 0 和 0.426 7,AFLP 检测结果分别为 0.367 8 和 0.326 6;cpSSR

则分别为 0.812 0 和 0.706 7,明显高于 RAPD 和 AFLP 检测值(表 3)。

3 讨 论

3.1 金钱槭属的遗传多样性

比较 3 种类型分子标记研究结果,金钱槭属 2 个物种遗传多样性均较高。AFLP 和 RAPD 的结果具有可比性,而 cpSSR 标记检测到的物种内遗传多样性、物种水平和平均物种内遗传多样性均高于 RAPD 和 AFLP 分析,类似结果在其他研究中也报道^[17,29-30]。这可能是由分子标记的性质决定其研究结果,已知微卫星在居群内有高的可变性^[31]。

检测到这 2 种珍稀濒危物种均拥有相对较高的遗传多样性并不出人意料。先前的研究显示,珍稀濒危物种能够保存较高的遗传多样性^[32-34]。Wang 等^[35]发现,中国一级珍稀濒危植物华山新麦草(*Psa-thyrostachys huashanica*)的遗传多样性较高($H_e=0.396 5$, $H_{sh}=0.557 9$)。物种遗传多样性的保存受到多种因素的影响,例如物种的生物学特性、生态条

件、进化过程以及历史事件。有多种因素可以导致金钱槭属植物拥有相对较高的遗传多样性。首先,化石显示该属物种曾于第三纪存在于中国和北美^[1],而目前仅分布于中国中部和南部地区,并表现出片段化或集合种群结构。第四纪冰川期是造成该属物种在北美灭绝的主要原因,因为在冰川期,北美北部的大部分地区都被大陆冰盖所覆盖^[36-37]。在第四纪冰川期,中国这些地区仅发现了山地冰川,且该地区未受大陆冰盖的影响。冰川活动仅限于局部地区,因此形成了许多分散的避难所^[38]。许多第三纪孑遗植物如金钱槭属植物可以在中国中部和南部的避难所内生存,由于冰川作用,其分布已呈现片段化。其次,根据本研究中的 cpSSR 数据(居群高度特异的单倍型)推测,当前的金钱槭属植物代表从不同避难所遗留下来的孑遗植物,其种群及个体拥有大量的遗传信息。第三,孑遗植物金钱槭属物种经历了很长时间的进化。金钱槭属植物个体寿命长,拥有世代交替和风媒传粉的繁殖系统^[22],它保留了多种基因以适应不同的选择压力,并在长期的进化过程中累积了相对较高的遗传性变异。

3.2 居群间的遗传分化

RAPD 和 AFLP 测得的金钱槭和云南金钱槭居群间遗传分化系数具有可比性,且这 2 个系数均高于双子叶植物 G_{ST} 的平均值($G_{ST} = 0.273$)^[39]。因此,本研究结果揭示出 2 个种的居群间存在极高的遗传分化。相比细胞核基因组(RAPD 和 AFLP 标记),金钱槭和云南金钱槭的叶绿体基因组居群分化更高。最可能的解释是,与大部分被子植物相同,金钱槭属的叶绿体基因组为母系遗传^[40]。

3.3 关于金钱槭属植物保护的建议

为物种提供有效的保护需要同时考虑生态因素与遗传因素^[41]。从物种保护角度讲,金钱槭和云南金钱槭显示出能鼓舞人心的较高遗传多样性。生态因素可能是导致这两种植物濒临灭绝的主要原因。

从居群水平来讲,栖息地片段化、环境恶化和对原生植物种群过度砍伐造成的压力导致了植物密度及数量的降低、健康度下降,孤立化程度增加,最终可能导致物种灭绝^[42]。在实地调查中,Li 等^[43]观察到金钱槭和云南金钱槭的栖息地已受到不同程度的破坏,个体均存在灭绝的危险。由于生长较慢,目前已很少能够见到这 2 个物种的高大个体。因此,目前该物种已不属于人们出于经济原因而砍伐的树种。但由于其多数生长于山谷中或森林边缘,当地居民常将其用作柴火,动物会踩踏或食用或由于当地道路建设而遭到破坏。此外,Su 等^[44]发现,农田开垦范围扩大也成为威胁云南金钱槭生存的主要原因。该行为对其栖息地造成了深刻改变,并对其地上部分和地下根系部分造成了破坏。因此,人类活动破坏植物栖息地是造成金钱槭和云南金钱槭处于濒危状态的主要原因。从长远的角度来看,保护金钱槭属的 2 种植物,尤其是云南金钱槭种群的主要战略为保护植物栖息地。

Barrett 等^[45]指出,保护计划的目标之一是保护珍稀濒危物种的现有遗传多样性水平。种群规模越小,其生存时间将越长,从而也将失去更多的遗传多样性。因此,金钱槭和云南金钱槭的未来管理目标即是促进小种群中个体数量的增加。

参考文献:

- [1] MCCLAIN A M, MANCHESTER S R. Dipteronia(Sapindaceae) from the Tertiary of North America and implications for the phylogeographic history of the Aceroidae[J]. *American Journal of Botany*, 2001, **88**(7): 1 316—1 325.
- [2] STORFER A. Quantitative genetics: a promising approach for the assessment of genetic variation in endangered species[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 1996, **11**(8): 343—348.
- [3] NEWTON A C, BAKER P, et al. The mahogany shoot borer: prospects for control[J]. *Forest Ecology and Management*, 1993, **57**(1): 301—328.
- [4] NEWTON A C, LEAKEY R R B, MESEN J F. Genetic variation in mahoganies: its importance, capture and utilization[J]. *Biodiversity & Conservation*, 1993, **2**(2): 114—126.
- [5] NEWTON A C, ALLNUTT T R, GILLIES A C M, et al. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 1999, **14**(4): 140—145.
- [6] BAWA K S, DAYANANDAN S. Global climate change and tropical forest genetic resources[M]. Netherlands: Springer, 1998: 333—345.
- [7] BARRETTARRETT S C H, KOHN J R, FALK D A, et al. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation[J]. *Genetics and Conservation of Rare Plants*, 1991: 3—30.
- [8] FAKL, DONALD A, KENT E, HOLINGER, et al. Genetics and Conservation of Rare Plants[M]. New York: Oxford University Press, 1991.
- [9] BASU A, GHOSH M, MEYER R, et al. Analysis of genetic diversity in cultivated jute determined by means of SSR markers and AFLP profiling[J]. *Crop Science*, 2004, **44**(2): 678—685.
- [10] NYBOM H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants[J]. *Molecular Ecology*, 2004, **13**(5): 1 143—1 155.

- [11] WILLIAMS J G K, KUBELIK A R, LIVAK K J, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, **18**(22): 6 531—6 535.
- [12] VOS P, HOGERS R, *et al.* AFLP: a new technique for DNA finger printing[J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, **23**(21): 4 407—4 414.
- [13] POWELL W, MORGANTE M, ANDRE C, *et al.* The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR(microsatellite) markers for germ-plasm analysis[J]. *Molecular Breeding*, 1996, **2**(3): 225—238.
- [14] TRAVIS S E, MASCHINSKI J, KEIM P. An analysis of genetic variation in *Astragalus cremnophylax* var. *cremnophylax*, a critically endangered plant, using AFLP markers[J]. *Molecular Ecology*, 1996, **5**(6): 735—745.
- [15] DRUMMOND R S M, KEELING D J, RICHARDSON T E, *et al.* Genetic analysis and conservation of 31 surviving individuals of a rare New Zealand tree, *Metrosideros bartlettii* (Myrtaceae)[J]. *Molecular Ecology*, 2000, **9**(8): 1 149—1 157.
- [16] SCHMIDT K, JENSEN K. Genetic structure and AFLP variation of remnant populations in the rare plant *Pedicularis palustris* (Scrophulariaceae) and its relation to population size and reproductive components[J]. *American Journal of Botany*, 2000, **87**(5): 678—689.
- [17] RIBEIRO M M, MARIETTE S, *et al.* Comparison of genetic diversity estimates within and among populations of maritime pine using chloroplast simple-sequence repeat and amplified fragment length polymorphism data[J]. *Molecular Ecology*, 2002, **11**(5): 869—877.
- [18] ZHAO X G(赵先贵), XIAO L(肖 玲), MAO F CH(毛富春), Pollen morphology of Aceraceae[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 1998, **18**: 252—255(in Chinese).
- [19] TIAN X(田 欣), JIN Q J(金巧军), LI D ZH(李德铎), Pollen morphology of Aceraceae and its systematic implication[J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), 2001, **23**(4): 457—465(in Chinese).
- [20] QI Y ZH(祁云枝), DU Y J(杜勇军), LI L M(李莲梅), The rare and endangered plants of Shaanxi Province for ex situ conservation in Xi'an Botanical Garden[J]. *Journal of Northwest Forestry University* (西北林学院学报), 2001, **16**(1): 33—36(in Chinese).
- [21] LI SH(李 珊), CAI Y L(蔡宇良), XU L(徐 丽), *et al.* Morphological differentiation of samaras and seeds of *Dipteronia dyeriana*, Aceraceae[J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), 2003, **25**(5): 589—595(in Chinese).
- [22] LI SH(李 珊), QIAN Z Q(钱增强), CAI Y L(蔡宇良), *et al.* A comparative study on the genetic diversity of *Dipteronia sinensis* and *Dipteronia dyeriana* [J]. *Acta Phytocologica Sinica* (植物生态学报), 2005, **29**(5): 785—792(in Chinese).
- [23] YANG J, QIAN Z Q, LIU Z L, *et al.* Genetic diversity and geographical differentiation of *Dipteronia* Oliv. (Aceraceae) endemic to China as revealed by AFLP analysis[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2007, **35**(9): 593—599.
- [24] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 370—375.
- [25] YANG J(杨 娟), LI SH(李 珊), CAO D W(曹东伟), *et al.* Construction and analysis of the AFLP reaction system of *Dipteronia* Oliv. [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2005, **25**(11): 2 173—2 177(in Chinese).
- [26] CHUNG S M, STAUB J E. The development and evaluation of consensus chloroplast primer pairs that possess highly variable sequence regions in a diverse array of plant taxa[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, **107**(4): 757—767.
- [27] YEH F C, YANG R C. PopGen computer program(ver. 1. 31) microsoft windows based freeware for population genetic analysis[J]. 2000.
- [28] NEI M. Molecular Evolutionary Genetics[M]. New York: Columbia University Press, 1987.
- [29] COART E, VEKEMANS X, *et al.* Genetic variation in the endangered wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) in Belgium as revealed by amplified fragment length polymorphism and microsatellite markers[J]. *Molecular Ecology*, 2003, **12**(4): 845—857.
- [30] PARDUCCI L, SZMIDT A E, MADAGHIELE A, *et al.* Genetic variation at chloroplast microsatellites (cpSSRs) in *Abies nebrodensis* (Lojac.) Mattei and three neighboring *Abies* species[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, **102**(5): 733—740.
- [31] LEFORT F, ECHT C, STREIFF R, *et al.* Microsatellite sequences: a new generation of molecular markers for forest genetics[J]. *Forest Genetics*, 1999, **6**(1): 15—20.
- [32] SWENSEN S M, ALLAN G J, HOWE M, *et al.* Genetic analysis of the endangered island endemic *Malacothamnus fasciculatus* (Nutt.) Greene var. *nesioticus* (Rob.) Kearn. (Malvaceae)[J]. *Conservation Biology*, 1995, **9**(2): 404—415.
- [33] ZHANG Y X(张云香), HU H Y(胡灏禹), HE X J(何兴金). Genetic diversity of *Urophysa rockii*, an endangered and rare species, detected by ISSR[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2013, **33**(6): 1 098—1 105(in Chinese).
- [34] HUANG J(黄 骥), CHEN ZH(陈 浙), LI J(李 菁), *et al.* Genetic diversity of *Huperzia serrata* (Huperziaceae) in Wuling Mountains area detected by AFLP[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2014, **34**(1): 83—92(in Chinese).
- [35] WANG L, GUO J, ZHAO G F. Genetic diversity of the endangered and endemic species *Psathyrostachys huashanica* natural populations using simple sequence repeats(SSRs) markers[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2006, **34**(4): 310—318.
- [36] 刘东生. 第四纪环境[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 14—38.
- [37] 夏正楷. 第四纪环境科学[M]. 北京: 北京大学出版社, 1997: 105—118.
- [38] AREA M. The Metasequoia flora and its phytogeographic significance[J]. *Journal of the Arnold Arboretum*, 1980, **61**: 41—94.
- [39] 钱迎倩, 马克平. 生物多样性研究的原理与方法[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1997: 122—140.
- [40] HARRIS S A, INGRAM R. Chloroplast DNA and biosystematics: the effects of intraspecific diversity and plastid transmission[J]. *Taxon*, 1991, **40**(3): 393—412.
- [41] PROBER S M, TOMPKINS C, MORAN G F, *et al.* The conservation genetics of *Eucalyptus paliformis* L. Johnson et Blaxell and *E. parvifolia* Cambage, two rare species from south-eastern Australia[J]. *Australian Journal of Botany*, 1990, **38**(1): 79—95.
- [42] CRUSE-SANDERS J M, HAMRICK J L. Genetic diversity in harvested and protected populations of wild American ginseng, *Panax quinquefolius* L. (Araliaceae)[J]. *American Journal of Botany*, 2004, **91**(4): 540—548.
- [43] 李 珊. 金钱槭属植物保护遗传学与分子亲缘地理学研究[D]. 西安: 西北大学, 2004.
- [44] SU W H(苏文华), ZHANG G F(张光飞), OUYANG ZH Q(欧阳志勤). Community characteristics and conservation strategies of a rare species, *Dipteronia dyeriana* (Aceraceae)[J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), 2006, **28**(1): 54—58(in Chinese).
- [45] BARRETT S C H, KOHN J R, FALK D A, *et al.* Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation[J]. *Genetics and Conservation of Rare Plants*, 1991: 3—30.