水杉子遗居群 AFLP 遗传变异的空间分布

李作洲¹ 龚俊杰¹ 王 瑛² 黄宏文^{1*}

1 (中国科学院武汉植物研究所 ,武汉植物园 , 武汉 430074)

2 (Department of Plant Breeding , Cornell University , Ithaca , NY14853 , USA)

摘要 : 本研究采用空间自相关分析方法对水杉(*Metasequoia glyptostroboides*)子遗居群 AFLP 遗传变异的空间结构进行了研究 ,以探讨水杉子遗居群遗传变异的分布特征及其形成机制。根据 6 对 AFLP 选择性引物扩增的 46 个多态性位点 ,选择了其表型频率在 25% ~ 75 % 的 27 个 AFLP 标记 ,运用等样本频率方法和等地理距离间隔方法分别对 39 株和 37 株原生母树进行了空间自相关系数 Moran's *I* 值计算。结果表明 :水杉子遗居群缺乏空间结构 ,绝大多数 AFLP 位点变异为随机分布的空间模式 ,但也有少数位点存在显著性随机相关 ,在 4 ~ 8 km 地理距离间隔显示负相关 ,说明该间隔可能是水杉子遗居群的部分基因交流的有效屏障。水杉原生母树分布存在 12 ~ 28 km 的明显距离间隔阻挡 ,说明人类从迁入该区域起就影响着水杉子遗居群的原始生境 ,导致其生境片段化、景观破碎 ,进而形成岛屿状分布格局 ,并引起了水杉残留居群的随机遗传漂变。根据本研究结果 ,结合水杉子遗居群较低的遗传多样性 ,分析探讨了水杉子遗居群濒危的机理 ,并提出了相应的保育策略 ,为水杉的有效保育提供了科学依据。

关键词 : 空间自相关 ,保护遗传学 ,子遗植物 ,遗传结构 ,水杉

中图分类号 :Q16 , Q34

文献标识码 :A

文章编号 :1005 - 0094(2003)04 - 0265 - 11

Spatial structure of AFLP genetic diversity of remnant populations of *Metasequoia glyptostroboides* (Taxodiaceae)

LI Zuo-Zhou¹ , GONG Jun-Jie¹ , WANG Ying² , HUANG Hong-Wen^{1*}

1 Wuhan Botanical Garden , Wuhan Institute of Botany , Chinese Academy of Sciences , Wuhan 430074

2 Department of Plant Breeding , Cornell University , Ithaca , NY14853 , USA

Abstract : The Tertiary relic species , *Metasequoia glyptostroboides* , is naturally distributed in a narrowly restricted area bordering Hubei , Hunan Provinces and Chongqing City in central China. The genetic background of its overall genetic diversity and population structure is prerequisite for formulating an efficient conservation program and effective practice in management of remnant populations. The spatial structure of gene frequencies of *M. glyptostroboides* remnant populations in its original habitat was investigated using AFLP markers followed by spatial autocorrelation analysis. A total of 39 individuals were sampled from remnant populations and subjected to spatial autocorrelation analysis in two approaches of equal gene frequency correlograms with five classes and equal distance interval correlograms with ten classes , respectively. Of 46 polymorphic bands generated by six selective primer-pairs , 27 polymorphic bands with frequencies ranging from 25% to 75% were then used to calculate Moran's *I* spatial autocorrelation coefficient. The result revealed a lack of spatial structure of genetic variation existing in the remnant population of *M. glyptostroboides* , indicating that genetic variations of the most polymorphic loci were randomly distributed , strongly supported by insignificant Moran's *I* coefficients. However , lump , depression or double cline structures of the genetic variation were found in a few AFLP markers with significant Mo-

基金项目 :国家重点基础研究发展规划项目(G2000046806)和中科院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-SW-104)

收稿日期 :2003 - 03 - 10 ;接受日期 :2003 - 06 - 16

作者简介 :李作洲 ,男 ,1967 年出生 ,在职博士研究生 ,助理研究员 ,主要从事植物保育遗传研究。

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail : hongwen@ public. wh. hb. cn

ran's I in several distance classes. The distance interval 4–8 km is probably a sufficient barrier to gene flow, as evidenced by Moran's I coefficients showing negative correlations within this distance class. In addition, remnant individuals were not absent in distance classes from 12 to 28 km, suggesting that the habitat of the remnant populations had been disturbed since humans moved in and subsequent agricultural activities occurred. Apparently, habitat fragmentation resulted in an island distribution and genetic drift had occurred even before *M. glyptostrobooides* was rediscovered in 1941. Based on the results of the present study combined with the lower genetic diversity previously detected in the remnant populations, possible mechanisms causing the endangerment of *M. glyptostrobooides* are discussed and a conservation strategy for *M. glyptostrobooides* remnant populations is proposed. The results provide valuable information for formulating future *in situ* and *ex situ* conservation programs of this relic species.

Key words: spatial autocorrelation, conservation genetics, relic plant, genetic structure, *Metasequoia glyptostrobooides*

水杉(*Metasequoia glyptostrobooides*)是20世纪40年代发现于我国的“活化石”植物,为杉科(Taxodiaceae)化石植物属——水杉属(*Metasequoia*)的子遗种,仅自然子遗分布于重庆(原四川省东部)、湖北、湖南三省市交界的狭窄区域(Hu, 1948; Chaney, 1948; Hu, 1980; 汪国权, 1999)。它的发现,曾引起世界上植物学家和古植物学家的广泛关注(Merrill, 1948; Chu & Cooper, 1950; Chaney, 1951; Gressitt, 1953)。水杉起源于第三纪前,在第三纪有着广域分布(胡先骕, 1954; 于永福, 1995),但在第四纪冰期后成为仅狭域分布的子遗植物。水杉自从1941年被发现以来,经人工繁殖和引种,又得以重新广泛分布全球(Satoh, 1999; Kuser, 1999)。水杉,特别是其子遗的居群在研究地质变迁、地理变化、气候演变、古植物区系演替及杉科植物系统发育等方面具有重要的地位和作用(Chaney, 1951; 于永福, 1995; 刘艳菊等, 1996; 李承森等, 2001),有着极其重要的学术意义和科学研究价值。然而,自然环境的恶化及人类活动的影响,使其自然子遗居群受到严重的威胁,水杉及其子遗居群的有效保育已成为当务之急。

物种的成功保育,在于保育物种的基因库,保育其最大的遗传多样性,以提供物种应对环境变迁的持续进化潜力(Eriksson *et al.*, 1995)。虽然植物学家已对水杉作了大量的研究和保护繁育工作(郑万钧, 曲仲湘, 1949; Bartholomew *et al.*, 1983; 刘艳菊等, 1996; Li, 1999),但早期的研究工作很少从保育遗传角度研究该物种完整的遗传基础及其相关的分布规律,只是近几年才开始有少量研究涉及水杉的

遗传基础(张文英, 李明鹤, 1994a, b; Kuser *et al.*, 1997; 李春香等, 1999; Leng *et al.*, 2001; 李晓东, 2003),但有效信息量仍显不足,要制定更为科学的保育策略仍然需要深入的研究。

居群遗传结构及其影响因子是制定物种有效保育策略和措施的依据(Lande, 1988; Leberg, 1990; Hamrick *et al.*, 1991)。居群内和居群间遗传变异的空间分布是居群遗传结构的一个重要特征,与物种繁育机制、花粉和种子的散播方式紧密相关,也反映其生态适应进化、生境变迁与自然选择效应(Levin & Kerster, 1974; Sokal *et al.*, 1989; 李作洲等, 2002)。遗传变异空间自相关分析已成为保育遗传研究的重要工具(Sokal & Oden, 1978a, 1978b; Epperson & Allard, 1989; Recus *et al.*, 1999)。但国内对该方法的应用较少(李昂等, 2002; 李作洲等, 2002),至今还未见其用于水杉研究的报道。

本研究采用空间自相关分析,对水杉原始子遗居群内原生母树 AFLP 遗传变异的空间分布特征进行了研究,其目的在于进一步了解水杉子遗残留居群的遗传结构特征,探讨影响水杉子遗残留居群遗传结构的因素,为阐明其残留居群濒危的机制奠定基础,并为进一步完善水杉的保育策略及制订有效保育措施提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料来源

植物材料采自水杉原始子遗居群(湖北利川水杉坝,共涉及小河、兴国、桂花、钟岭4个亚居群和谋道孤树点)和子遗散生点的原生母树,树龄均在53

图 1 水杉残留居群原生母树的个体位置图
XH = 小河亚居群 ;XG = 兴国亚居群 ;GH = 桂花亚居群 ;ZL = 钟岭亚居群 ;MD = 谋道水杉孤树点 ;SZ = 重庆石柱黄水散生点 ;LS = 湖南龙山洛塔散生点
Fig. 1 Spatial distribution of 39 trees in remnant population of *M. glyptostrobooides*
XH = Xiaohé subpopulation ;XG = Xingguó subpopulation ;GH = Guihuā subpopulation ;ZL = Zhongling subpopulation ;MD = Moudao isolated tree ;SZ = Huangshui isolated tree , Shizhu , Chongqing , LS = Luota isolated tree , Longshan , Hunan Province

年以上 ,胸径在 75 cm 以上^①。各亚居群随机取样 18 ~ 30 株 ,同时测量其地理坐标。由于采用冬季扦插枝条上萌发的幼叶提取 DNA ,在部分样品可以获得较高质量的 DNA 模板用于 AFLP 分析。本次研究随机选取共 39 个个体用于遗传变异空间结构分析 ,其中 37 个植株为子遗残留居群内随机取样 ,2 个来自散生点 (重庆石柱、湖南龙山) ,植株分布位置见图 1。

1.2 DNA 提取和 AFLP 分析

取扦插萌发的幼叶 0.20 g ,放入液氮中迅速研

成粉末 ,按 Rogers & Bendich (1985) 的 CTAB 改良法提取植物基因组总 DNA。按 Ausubel *et al.* (1987) 的方法 ,采用 RNase A 消化除去 RNA。模板 DNA 的质量和浓度采用紫外分光核酸测定仪 (GENEQUANT , Eppendorf , Germany) 测定 ,并应用 1 % 的琼脂糖凝胶电泳检测确认 (λ /Hind III marker)。模板用于 AFLP 分析时稀释为 100 ng/ μ L。

AFLP 分析按 Vos *et al.* (1995) 报道的方法略加

①李建华. 1986. 中国特产的水杉群落. 华中农业大学硕士学位论文

修改,采用 AFLP™ Analysis System I/AFLP Starter Primer Kit(Gibco BRL Grand Island , NY)分析系统及试剂盒分析 (1)取 250 ng 模板 DNA 于 12.5 μL 的酶切消化反应体系(含 1 μL *EcoR* I /*Mse* I 和 2.5 μL 5 × 的反应缓冲液)中 ,37℃ 酶切消化 2.5 h ,1% 的琼脂糖凝胶电泳检测酶切效果 (2)DNA 片段接头(表 1)的连接反应体系总体积为 25 μL(12 μL 接头连接反应液 ,12.5 μL 酶切 DNA 和 0.5 μL T4 DNA Ligase) ,轻轻混匀后 ,于 20℃(± 2℃)下进行连接反应至少 2 h 或过夜。用 TE 缓冲液将连接混合液稀释 5 倍 (3)预扩增在 25.5 μL 总体积的反应体系(含 2.5 μL 经连接后稀释的模板 DNA ,1.4 μL *EcoR* I + A 引物 ,6 μL *Mse* I + C 引物 ,2.5 μL 10 × PCR buffer 和 0.1 μL 5U/ μL 的 Taq DNA 聚合酶)中进行 94℃ 30 s ,56℃ 60 s ,70℃ 60 s 共 20 个循环。用 TE 缓冲液稀释 25 倍后作为选择性扩增的模板 (4)选择性扩增引物对采用 *EcoR* I + A 加 2 或 3 选择性碱基和 *Mse* I + C 加 2 或 3 选择性碱基组成 ,共选用 6 对组合(表 1) ;采用[γ-³³P]ATP 在 25 μL(for 100 selective amplification reactions)反应体系(9 μL *EcoR* I 引物、6.5 μL dH₂O、2.5 μL 10 × kinase buffer、5 μL [γ-³³P] ATP (2000 Ci/mmol)、2 μL T4 kinase)标记 *EcoR* I 引物 5'端 ,37℃ 温浴反应 1 h ,70℃ 温浴 10 min 终止酶反应 ,选择性扩增采用 10 μL 反应体系(0.25 μL 标记过的 *EcoR*I 选择性引物、2.25 μL 含 dNTPs 的 *Mse* I 选择性引物、1 μL 含 Mg²⁺ 的 10 × PCR buffer、0.25 U Taq DNA 聚合酶、3.95 μL dH₂O) 94℃ 30 s、65℃ 30 s、72℃ 60 s 一次循环 ;然后每循环 1 次其退火温度降低 0.7℃ ,执行 12 个循环 ,在 94℃ 30 s、56℃ 30 s、72℃ 60 s 下执行 23 个循环后 ,终止反应 (5)加入等体积(10 μl)的变性剂(98% 甲酰胺 ,0.03% 溴酚蓝和二甲苯氰) ,于 94℃ 变性 3 min ,采用 6% 的变性聚丙烯凝胶 ,1 × TBE 缓冲液 ,70 W 恒功率电泳 3 h。将凝胶转移到 Whatman 3 MM 滤纸上 ,真空干燥。放上 X 光胶片放置 1 ~ 2 天放射自显影。30 bp ~ 330 bp 范围、间隔 10 bp AFLP DNA ladder (Invitrogen) 用于判读扩增片段。

将每对引物在所有样品扩增出的每一条 DNA 谱带作为一个位点 ,参照标准 Ladder(Invitrogen) ,按引物对号-DNA 片段长度及其是否多态记录位点 ,样品有带则记为 1 ,无带则记为 0 ,构建居群二态

表 1 水杉子遗居群 AFLP 遗传分析的接头和引物序列
Table 1 Adaptors and primer sequences of AFLP analysis used for evaluation of genetic diversity in *M. glyptostroboides* remnant populations

接头或引物 Adaptor and primer	序列 Sequence
<i>EcoR</i> I adaptor	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CTGACGCATGGTTAA-5'
<i>Mse</i> I adaptor	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5'
预扩增引物 Pre-amplification primer	
<i>EcoR</i> I + A	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'
<i>Mse</i> I + C	5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'
选择性扩增引物组合 Selective amplification primer combinations	
E-AAG/M-CAT	
E-ACG/M-CAA	
E-ACGT/M-CAT	
E-ACGC/M-CACC	
E-ACGC/M-CATG	
E-ACGT/M-CACC	

数据矩阵 ,并进行了遗传多样性检测和主成分分析 (Huang *et al.* , 2002)。本研究进一步对其进行空间自相关分析。

1.3 空间自相关分析

空间自相关分析是一种统计方法 ,用来检测与量化在多个标定点中取值上变异的空间依赖性 ,通过检测一个位置上的变异是否依赖于邻近位置的变异 ,来判断该变异是否存在空间自相关性 ,即是否存在空间结构(Sokal & Oden , 1978a , 1978b ;李昂等 , 2002)。首先将取样点标定在图上 ,每个取样点对应一个或多个变量。变量的性质可以分为绝对型变异(如表型或基因型)、等型变异(如植物密度等级)、连续型变异(如数量性状及基因频率等)3 种类型。

我们将 AFLP 变异看作绝对型变异进行处理。在多态位点中选取带谱表型频率在 25% ~ 75% 的位点 ,根据 Sokal (1978a)的计算方法 ,使用 Saap 4.3 软件(Warternberg , 1989) ,采用等频率距离等级 (5 个等级)相关和等间隔地理距离等级(10 个等级)相关 2 种方法计算不同距离等级下的 Moran's I 空间自相关系数和其期望值。在等间隔方法中 ,距离梯度的设置按个体间的平均距离设置。水杉子遗残留居群的取样点见图 1。

2 结果与分析

2.1 水杉子遗居群的 AFLP 分析结果

在水杉 AFLP 分析中,运用了 6 对引物组合(表 1)对水杉子遗居群的 39 株原生母树样本进行了选择性扩增,共获得清晰可靠的 DNA 谱带 169 条,其中多态性带 46 条,多态位点比率为 27.22%,片段长度为 80 bp ~ 330 bp (图 2)。水杉 AFLP 遗传多样性分析显示:水杉子遗居群的遗传多样性水平较低,亚居群间遗传一致度高(数据未列)。进一步的主成分分析(PCA)结果揭示,第一到第五主成分各自阐明了水杉遗传变异的 18.65%、13.53%、11.56%、9.36%、8.35%,但各主成分不能将各亚居群的个体明显分开,说明水杉子遗残留居群原先可能是连续居群(Huang *et al.*, 2002)。

2.2 水杉子遗母树的 AFLP 遗传变异的空间分布

在空间自相关分析中,当检测的样本足够多时, I 的期望值($E_{(I)} = -1/(n-1)$, n = 样点数)接近 0。当 I 值显著大于其期望值时,说明两点存在相似关系;而 I 值显著小于其期望值时,说明两点存在不相似关系。通过统计学检验来判断上述的相似与不相似是否由于随机过程造成的,从而分析其空间结构(Sokal & Oden, 1978a, 1978b)。

在水杉的 46 个 AFLP 多态位点中,选取了 27 个谱带频率在 25% ~ 75% 之间的位点,依本次 AFLP 分析的全部 39 棵母树样本间的距离,按等样对频率划分 5 个距离等级(其上限:3、5、7、9、122 km)。在计算出的 135 个 Moran's I 值中,仅有 13 个(9.6%)达到 0.05 显著水平($E_{(I)} = -0.026$) (表 2)。没有一个距离等级的显著性 I 值比例达到 20%(表 3),各距离等级组 I 值平均值为 -0.02 或 -0.03(表 2),表明水杉子遗居群缺乏空间结构,绝大多数 AFLP 位点变异为随机分布的空间模式。但也有少数位点表现为斑块模式、衰退模式或双向渐变模式。在第二距离组、第三距离组或第五距离组,少数位点具显著 I 值,且主要分布在二、三距离等级,多为负值,说明在 3 ~ 5 或 5 ~ 7 km 的范围内水杉母树个体间在部分位点变异存在差异。其中,位点 E-ACG/M-CAA-127 和 E-ACGC/M-CACC-230 分别在 3 ~ 5 km 和 5 ~ 7 km 距离等级为显著的负相关,在远距离等级显著性正相关的,相邻等级间 Moran's I 值正负交替,说明在这两距离等级内的个

图 2 水杉 AFLP 指纹图谱(引物组合 E-ACG/M-CAA) 标记为 AFLP DNA Ladder (Invitrogen) 30 bp ~ 330 bp, 间隔 10 bp。
Fig. 2 The AFLP fingerprint of *M. glyptostroboides* (primer combination E-ACG/M-CAA). The AFLP DNA Ladder (Invitrogen) ranging 30 bp to 330 bp in the length of 10 bp increments was used.

表 2 水杉残留居群 5 个距离等级下 Moran's I 值及其显著性(等频率)

Table 2 Spatial autocorrelation coefficients (Moran's I) for five distance classes in remnant population of *M. glyptostroboides* (equal frequency correlograms)

位点 Locus	距离等级 Distance class (km)					累积可能性 Cumulative probability
	3	5	7	9	122	
E-AAG/M-CAT-290	-0.08	-0.01	-0.05	0.06	-0.05	0.525
E-ACG/M-CAA-315	-0.09	0.14 **	-0.05	-0.05	-0.08	0.027 *
E-ACG/M-CAA-270	-0.10	-0.03	0.07	-0.10	0.04	0.341
E-ACG/M-CAA-173	-0.04	-0.07	0.08	-0.11	0.02	0.286
E-ACG/M-CAA-157	-0.04	-0.16 *	0.12 *	-0.05	-0.01	0.076
E-ACG/M-CAA-138	0.06	-0.10	-0.01	-0.09	0.02	0.543
E-ACG/M-CAA-130	-0.07	0.02	-0.05	-0.01	-0.03	1.000
E-ACG/M-CAA-127	0.05	-0.17 **	0.02	-0.08	0.07 *	0.047
E-ACGT/M-CAT-398	0.03	-0.06	0.05	-0.10	-0.05	0.734
E-ACGT/M-CAT-242	-0.02	0.03	-0.17 *	-0.02	0.02	0.152
E-ACGT/M-CAT-235	-0.05	-0.06	0.02	-0.05	0.00	1.000
E-ACGT/M-CAT-194	-0.12	0.04	-0.05	0.00	-0.02	0.625
E-ACGC/M-CACC-340	-0.11	0.03	-0.03	-0.00	-0.03	0.624
E-ACGC/M-CACC-230	0.06	-0.00	-0.23 **	-0.05	0.06 *	0.028 *
E-ACGC/M-CATG-259	-0.09	-0.08	0.02	0.05	-0.04	0.647
E-ACGC/M-CATG-255	0.02	-0.13 *	-0.01	0.02	-0.03	0.238
E-ACGC/M-CATG-205	-0.06	0.07	-0.13	-0.04	0.02	0.312
E-ACGC/M-CATG-175	0.05	-0.19 **	0.08	-0.05	-0.02	0.035 *
E-ACGC/M-CATG-163	-0.03	0.07	-0.09	-0.04	-0.04	0.391
E-ACGC/M-CATG-147	-0.03	0.01	-0.04	-0.03	-0.03	1.000
E-ACGC/M-CATG-134	-0.06	0.06	-0.13	0.01	-0.02	0.364
E-ACGC/M-CATG-124	-0.02	-0.06	-0.01	-0.01	-0.05	0.000
E-ACGT/M-CACC-332	-0.10	0.05	-0.13	0.02	0.02	0.395
E-ACGT/M-CACC-255	0.07	-0.12	0.00	0.02	-0.12 *	0.128
E-ACGT/M-CACC-181	-0.09	0.03	-0.04	-0.02	-0.02	0.912
E-ACGT/M-CACC-120	0.04	0.03	-0.19 **	0.02	-0.04	0.048 *
E-ACGT/M-CACC-87	-0.07	0.05	-0.01	-0.01	-0.14 *	0.052
Average	-0.03	-0.02	-0.03	-0.03	-0.02	—
Maximum	0.07	0.14	0.12	0.06	0.07	—
Minimum	-0.12	-0.19	-0.23	-0.11	-0.14	—

注:每距离等级含 148 个样对,第 5 等级含 149 个样对
Note: There are 148 tree pairs in each distance class, but 149 in the fifth distance class
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $E_{(I)} = -0.026$

表 3 水杉残留居群各距离等级中表现出显著相关的位点数(等频率)

Table 3 Number of loci showing significant correlation in each distance class for remnant population of *M. glyptostroboides* (equal frequency correlograms)

	距离等级 Distance class (km)				
	3	5	7	9	122
显著正相关的位点数 No. of loci which showed significantly positive correlation	0	1	1	0	2
显著负相关的位点数 No. of loci which showed significantly negative correlation	0	4	3	0	2
显著相关的位点总数 Total of loci which showed significantly correlation	0	5	4	0	4
呈现显著相关性的位点所占比例(%) The percentage of loci which showed significant correlation (%)	0	18.5	14.8	0	14.8

体在位点 E-ACG/M-CAA-127 或位点 E-ACGC/M-CACC-230 变异分别不相似;而在远距离范围虽然相似,但程度不大,呈现斑块模式。而位点 E-ACGT/M-CACC-255 和 E-ACGT/M-CACC-87 在远距离范围表现负相关的显著性 Moran's *I* 值(表 2),说明这两位点在远距离范围个体间有分化,在近距离范围则为随机分布,为衰退模式。位点 E-ACG/M-CAA-157 表现有点特殊,其 Moran's *I* 在 3~5 km 等级为显著的负相关,而在 5~7 km 等级为显著的正相关(表 2),说明 3~5 km 范围内的个体在该位点变异不相似,而相距 5~7 km 内的个体在该位点的变异又相似,呈现近距离范围的双向渐变模式。斑块模式说明,对于种子繁殖的水杉原始子遗居群存在景观破碎,其生境早已片段化,衰退模式或双向渐变模式,则说明微生境差异对水杉的遗传变异有一定的影响,同时也说明水杉的花粉交流和种子传播被限制在一定距离范围内。

从其地理距离分组等级上限看,前四个等级的间隔仅 2 km,而第四等级与第五等级间的地理间隔达 113 km,这种散生孤树距离会对其分析造成影响。为了排除其影响,我们去掉湖南龙山、重庆石柱的散生母株,对湖北利川的子遗居群按等距离间隔分 10 个距离等级(间隔为 4 km)计算 Moran's *I* 值。其中,位于中间的 4 个连续距离等级(12 km~28 km)均没有样本分布,表明生境的片段化已明显地造成了水杉自然分布的景观破碎,子遗居群已成岛屿分布。在剩余的 6 个等级中,得到的 162 个 Moran's *I* 值(表 4),但只有 20 个(12.3%)达 0.05 显著水平($E_{(1)} = -0.028$)(表 4),没有一个距离等级的显著性 *I* 值比例达到 25%(表 5),又表明其变异缺乏空间结构,为随机分布,也进一步说明子遗居群最初应是一个连续的大居群。除了第一距离等级组和无样本分布的组外,其他距离等级组均有个别或少数位点具显著 Moran's *I* 值,正负值比例相近,负值个数略多;具有显著 Moran's *I* 值的位点,其 Moran's *I* 值在相邻等级呈正负交替分布(表 4),说明景观破碎、岛屿分布引起的随机遗传漂变,可能在水杉发现以前就作用于水杉子遗居群的遗传分化,少数位点变异呈现斑块状。4~8 km 距离等级的显著性 Moran's *I* 值全为负相关(表 5),其他非显著性 Moran's *I* 值也大多为负值(表 4),表明相距 4~8 km 原生母树不相似,说明此地理间隔可能为水杉基因

流动的有效屏障,与等样对频率分析反映出 3~5 km 或 5~7 km 为部分位点变异的转折间隔的规律一致。两种分析方法的少部分显著性 Moran's *I* 值在位点上的分布略有差异,可能是两种分析方法划分的距离等级间隔的差异引起的,但两种方法反映的总趋势是一致的。等距离间隔分析中,远距离等级的显著性 Moran's *I* 值的个数略高于近距离等级的个数,可能是由于远距离等级分布的样对树不足,取样偏差所引起的。

3 讨 论

3.1 水杉子遗居群的遗传结构

保育生物学的核心在于保护、管理生物资源多样性,特别是生态系统水平的物种多样性和物种水平的遗传多样性,以防止生物多样性的丢失(Lande 1988; Leberg, 1990; Bodkin *et al.*, 1999)。物种遗传多样性和遗传结构的基本信息对物种的有效保育尤为重要(Frankel, 1983; Godt & Hamrick, 2001)。

在空间自相关分析中,如果某一等位基因的频率过高或过低,它所提供的有效信息将很少。为了避免不必要的计算,同时保证数据具有足够的统计学意义,在水杉子遗居群 AFLP 变异空间自相关分析中,我们只选用了等位基因频率在 25%~75%者。为了客观地反映其空间分布格局,避免分析方法的影响,我们分析时采用了等频率和等间隔两种方法划分地理距离等级,综合评价其空间结构,结果两者基本一致。

水杉子遗居群空间自相关分析结果表明:显著性相关 Moran's *I* 值比率在等频率分析中仅 9.6%(表 2),在等间隔分析中也只有 12.3%(表 4),说明水杉遗传变异在子遗居群内基本呈随机分布的空间模式。在显著性相关 Moran's *I* 值中负值多(等频率)(表 3)或较多(等间隔)(表 5),说明在少数位点存在随机漂变,个别位点表现双向渐变、衰退或斑块模式。将两种方法得出的结果相比较,个别位点的显著性有细微的差异,如 E-ACG/M-CAA-138、E-ACGT/M-CACC-332 等,可能是因为划分的地理距离等级范围的差异,但总体格局却是一致的。在等频率划分的 5 个地理距离等级中,第四距离组与第五距离组的间隔很大,暗示存在着生境破碎,而在等间隔划分的 10 个距离等级中,中间的 4 个连续等级均无样对分布,进一步说明水杉子遗居群的原始生

表 4 水杉子遗居群 10 个距离等级下 Moran's I 值及其显著性(等距离间隔)
Table 4 Spatial autocorrelation coefficients (Moran's I) for 10 distance class in remnant population of *M. glyptostroboides* (equal interval correlograms)

位点 Locus	距离等级及样对数 Distance class (km) and No. of tree pairs										累积可能性 Cumulative probability
	4	8	12	16	20	24	28	32	35	39	
	241	290	99	0	0	0	0	11	11	14	
E-AAG/M-CAT-290	-0.02	-0.05	0.01	—	—	—	—	-0.13	-0.65 *	0.36 *	0.159
E-ACG/M-CAA-315	0.02	-0.06	-0.04	—	—	—	—	-0.25	-0.25	0.32 *	0.496
E-ACG/M-CAA-270	-0.06	-0.01	-0.03	—	—	—	—	-0.09	0.16	-0.09	1.000
E-ACG/M-CAA-173	-0.06	-0.01	0.02	—	—	—	—	-0.08	0.22	-0.28	1.000
E-ACG/M-CAA-157	-0.11	0.02	0.02	—	—	—	—	-0.50 *	0.26	0.07	0.317
E-ACG/M-CAA-138	-0.02	-0.06	0.06	—	—	—	—	-0.58 *	0.47 *	-0.01	0.151
E-ACG/M-CAA-130	-0.02	-0.02	-0.04	—	—	—	—	0.12	-0.72 **	0.32 *	0.032 *
E-ACG/M-CAA-127	-0.04	-0.11 *	0.25 **	—	—	—	—	0.08	0.31	-0.36	0.003 **
E-ACGT/M-CAT-398	-0.01	0.01	-0.20 *	—	—	—	—	-0.32	0.09	0.15	0.243
E-ACGT/M-CAT-242	0.02	-0.06	-0.04	—	—	—	—	-0.03	0.46 *	-0.44 *	0.300
E-ACGT/M-CAT-235	-0.07	-0.03	0.06	—	—	—	—	0.03	-0.11	0.02	1.000
E-ACGT/M-CAT-194	-0.06	-0.01	-0.01	—	—	—	—	-0.45	0.10	0.15	0.559
E-ACGC/M-CACC-340	-0.06	-0.00	-0.03	—	—	—	—	-0.01	0.10	-0.09	1.000
E-ACGC/M-CACC-230	0.06	-0.15 **	0.06	—	—	—	—	-0.32	0.76 **	-0.35	0.031 *
E-ACGC/M-CATG-259	-0.09	0.01	-0.01	—	—	—	—	0.01	0.01	-0.04	1.000
E-ACGC/M-CATG-255	-0.04	-0.01	-0.04	—	—	—	—	0.03	0.21	-0.27	1.000
E-ACGC/M-CATG-205	-0.09	0.01	-0.00	—	—	—	—	-0.24	0.01	0.07	1.000
E-ACGC/M-CATG-175	-0.03	-0.03	-0.02	—	—	—	—	-0.18	-0.18	0.25	1.000
E-ACGC/M-CATG-163	-0.02	-0.02	-0.09	—	—	—	—	-0.21	-0.08	0.22	1.000
E-ACGC/M-CATG-147	-0.05	-0.01	-0.03	—	—	—	—	-0.08	-0.08	0.11	1.000
E-ACGC/M-CATG-134	-0.05	-0.05	0.08	—	—	—	—	0.35	-0.23	-0.19	0.691
E-ACGC/M-CATG-124	-0.06	0.02	-0.08	—	—	—	—	0.35	-0.02	-0.38	0.560
E-ACGT/M-CACC-332	-0.03	-0.09	0.14 *	—	—	—	—	-0.13	0.46 *	-0.38 *	0.155
E-ACGT/M-CACC-255	-0.00	-0.03	-0.08	—	—	—	—	-0.64 *	-0.02	0.29	0.113
E-ACGT/M-CACC-181	-0.04	-0.02	-0.02	—	—	—	—	0.20	-0.22	-0.02	1.000
E-ACGT/M-CACC-120	0.05	-0.10 *	-0.01	—	—	—	—	0.08	0.31	-0.36	0.455
E-ACGT/M-CACC-87	-0.02	-0.01	-0.09	—	—	—	—	0.27	0.01	-0.27	1.000
Average	-0.03	-0.03	-0.01	—	—	—	—	-0.10	0.05	-0.04	—
Maximum	0.06	0.02	0.25	—	—	—	—	0.35	0.76	0.36	—
Minimum	-0.11	-0.15	-0.20	—	—	—	—	-0.64	-0.72	-0.44	—

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $E(I) = -0.028$

表 5 水杉残留居群各距离等级中表现出显著相关的位点数(等距离间隔)
Table 5 Number of loci which showed significant correlation in each distance class for remnant populations of *M. glyptostroboides* (equal interval correlograms)

	距离等级 Distance class (km)									
	4	8	12	16	20	24	28	32	35	39
显著正相关的位点数 No. of loci which showed significantly positive correlation	0	0	2	—	—	—	—	0	4	3
显著负相关的位点数 No. of loci which showed significantly negative correlation	0	3	1	—	—	—	—	3	2	2
显著相关的位点总数 Total number of loci which showed significant correlation	0	3	3	—	—	—	—	3	6	5
呈现显著相关性的位点所占比例(%) The percentage of loci which showed significant correlation (%)	0	11.1	11.1	—	—	—	—	11.1	22.2	18.5

境是片段化的,原生母树呈岛屿分布。也就是说自从人们迁入水杉原始生境地时,就开始了对水杉子遗居群的破坏:农田开垦争夺其生境,建造木制房屋、家具及寿木等大量砍伐林木则造成植株大幅度灭绝(郑万钧,曲仲湘,1949;Chu & Cooper,1950;Gressitt,1953),从而造成了水杉子遗居群遗传结构的改变。

水杉遗传变异随机分布的空间模式,与其风媒传粉、种子风力散播、自交结实发芽率衰退(Kuser,1983)等繁育特性是相一致的。根据水杉 AFLP 遗传变异在 4~8 km 的地理间隔个体间表现出不相似,变异出现转折的现象,可能说明水杉在风媒传粉或风力散种的过程中,花粉或种子借风力散播的有效地理阻隔为 4~8 km。少数位点在不同距离等级中无规律地相关,反映出人类活动对其生境的干扰破坏(郑万钧,曲仲湘,1949;Chu & Cooper,1950;Gressitt,1953),人们对水杉原生树的采伐及其母树的死亡,造成个别位点或等位基因的随机漂变。虽然自从水杉发现以来,水杉的保护受到了重视,但人类活动对水杉子遗居群的影响从未间断,水杉的生境进一步恶化,其子遗群落有灭绝的危险(Hu,1980;Bartholomew *et al.*,1983;李建华,班继德,1989;文甲举等 2001;王希群,郭保香 2002)。

3.2 致濒原因及保育策略

一般认为,遗传基础贫乏的居群在随机事件中有高度局部绝灭的风险(Godt *et al.*,1997;Ledig *et al.*,2002),当然有许多限制地生长于冰川庇护地的稀有物种,即使其生境已片段化且产生居群隔离,仍然长期地生活于特定的局部生境中(Godt & Hamrick,2001)。“活化石”植物水杉的子遗居群虽然具有较低的遗传多样性(李晓东等,2003;Huang *et al.*,2002),在躲避过冰期后仍能长期生存,得益于其良好的生境及其个体的长寿命。但其遗传基础的贫乏和近交效应的作用导致其种子萌发能力的逐渐衰退,并依赖于适宜的萌发条件(廖绍忠,周万良,1989)。在生境未遭破坏,萌发条件具备时,尚能自然更新,实现种群演替。但随着人类活动的加强,农业用地的增多,使其自然更新生境丧失(郑万钧,曲仲湘,1949;Chu & Cooper,1950;Hu,1980;Bartholomew *et al.*,1983;李建华,班继德,1989)。且林木的大量采伐造成水杉母树数量衰减,增强了近交效应,使得子遗居群处于灭绝的边缘。水杉子

遗居群目前遗传变异的空间格局是其佐证。

自从水杉发现以来,植物学家和众多政府组织就开始保护这一“活化石”植物,并开展了人工繁殖栽培,使水杉重新散布世界各地(Satoh,1999)。仅从保存的角度讲,取得了极大的成就,但是一个物种的保育成功与否,在于是否保全了其物种基因库,以便能够维持足够的遗传变异来应对生态环境及气候的变化,并具有广泛的生态适应能力。

根据本研究结果,结合水杉保育现状,完善的水杉保育策略的制定至少应考虑如下几点:1)应继续加强子遗居群原始群落的保护,并恢复其自然更新的生境。建议将目前的水杉保护站点结合周边地区升级为省级重点或者国家级自然保护区,退耕归还水杉赖以生存更新的生境;减少原生母树人工采种的强度,给水杉自然更新留以种源;2)改造现有水杉种子园,大幅度增加遗传背景差异大的母树个体,减少同一遗传背景克隆个体的繁殖,防止人工引种水杉群体的遗传均质化。其取样策略,应根据水杉遗传多样性主要分布在居群内的背景、各亚居群间的遗传结构(张文英,李明鹤,1994b;李晓东等,2003),及其绝大部分遗传变异随机分布而个别位点或等位基因随机漂变岛屿式分布的空间模式,可以以某一亚居群为主体(如小河或桂花)随机取样,并兼顾其他亚居群,对间隔 4~7 km 的个体应特别关注;3)在水杉引种栽培时,应以建立居群的方式进行,并采用多母树来源的混合种子繁育种苗,建立群落时应培育针阔混交群落。若条件许可,可以考虑在不同的生境建立可自然更新或人工辅助更新的居群,提供自然微突变遗传变异积累的必要生态环境,增加水杉总体遗传多样性。此外,物种的保育除了主要保育丰富的遗传基础外,还应保育不同生态位的生态适应性(Mattner *et al.*,2002)。地理及微生境差异可能产生遗传分化(Godt & Hamrick,1996),因而还应注意位于特殊环境的个体和散生个体的典型取样,如水杉球果大小数量性状变异(Li,1999;汪国权,1999),湖南龙山散生孤树的叶表皮显微特征的变异(Leng *et al.*,2001;Yang,1999)。并且以珍稀古树的形式就地加强保护散生母树。

本研究中,因用于空间自相关分析的样本数偏少,所揭示的遗传变异空间模式可能有一定的偏差,但对于原生母树逐渐减少的水杉子遗居群来说,本

研究仍然为水杉的保育策略的制定和实施提供了一定的科学依据,奠定了初步基础,对水杉的保育有一定的指导意义。为了更有效地保育“活化石”水杉,还有待于进一步研究水杉子遗居群的遗传变异背景,并对目前人工引种栽培居群进行遗传变异评价。同时,应对现有原生母树建立遗传背景指纹标记,以更好地保护利用原生母树种质资源。

参考文献

Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. and Stuhl K. 1987. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, New York.

Bartholomew B., Boufford D. E. and Spongberg S. A. 1983. *Metasequoia glyptostroboides*—Its present status in Central China. *Journal of the Arnold Arboretum*, **64**: 105 – 128.

Bodkin J. L., Ballachey B. E., Cronin M. A. and Scribner K. T. 1999. Population demographics and genetic diversity in remnant and translocated populations of sea otters. *Conservation Biology*, **13** (6): 1378 – 1385.

Chaney R. W. 1948. Redwoods in China. *Natural History Magazine*, **47**: 440 – 444.

Chaney R. W. 1951. A revision of fossil *Sequoia* and *Taxodium* in western North America based on the recent discovery of *Metasequoia*. *Transactions of the American Philosophical Society*, **40** (3): 171 – 263.

Cheng W-C (郑万钧) and Chú C-H (曲仲湘). 1949. Ecological study of the motherland of *Metasequoia*. *Scientific American* (科学), Science Society, China, **31** (3): 73 – 80. (in Chinese)

Chu K. L. and Cooper W. S. 1950. An ecological reconnaissance in the native home of *Metasequoia glyptostroboides*. *Ecology*, **31**(2): 260 – 278.

Epperson B. K. and Allard R. W. 1989. Spatial autocorrelation analysis of the distribution of genotypes within populations of lodgepole pine. *Genetics*, **121**: 369 – 377.

Eriksson G., Namkoong G. and Robert J. 1995. Dynamic conservation of forest tree gene resource. *Forest Genetic Resources*, **23**: 2 – 5.

Frankel O. H. 1983. The place of management in conservation. In: Schonewald-Cox C. M., Chambers S. M., MacBryde B. and Thomas L. (eds.), *Genetics and Conservation: A Reference for Managing Wild Animal and Plant Populations*. Biology Conservation Series, 1 – 14.

Godt M. J. W. and Hamrick J. L. 1996. Genetic structure of two endangered pitcher plants, *Sarracenia jonesii* and *Sarracenia oreophila* (Sarraceniaceae). *American Journal of Botany*, **83** (8): 1016 – 1023.

Godt M. J. W. and Hamrick J. L. 2001. Genetic diversity in rare southeastern plants. *Natural Areas Journal*, **21** (1): 61 – 70.

Godt M. J. W., Walker J. and Hamrick J. L. 1997. Genetic

diversity in the endangered lily *Harperocallis flava* and a close relative, *Tofieldia racemosa*. *Conservation Biology*, **11** (2): 361 – 366.

Gressitt L. J. 1953. The California Academy—Lingnan down redwood expedition. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, **28**(2): 25 – 58.

Hamrick J. L., Godt M. J. W., Murawski D. A. and Loveless M. D. 1991. Correlations between species traits and allozyme diversity : implications for conservation biology. In: Falk D. A. and Holsinger K. E. (eds.), *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press, New York, NY, 75 – 86.

Hu H-H (胡先骕). 1954. *Metasequoia glyptostroboides*, *Glyptostrobus pensilis* and *Ginkgo biloba*. *Chinese Bulletin of Biology* (生物学通报), **3**(12): 12 – 15. (in Chinese)

Hu H. H. 1948. How *Metasequoia*, the “living fossil”, was discovered in China. *Journal of the New York Botanical Garden*, **49**(585): 201 – 207.

Hu S. Y. 1980. The *Metasequoia* flora and its phylogeographic significance. *Journal of the Arnold Arboretum*, **61**: 41 – 94.

Huang H., Li J., Li X., Deng Q., Cai Q., He Z. and Gong J. 2002. Genetic diversity and structure of remnant populations in the original habitat of *M. glyptostroboides*. Programme and Abstracts of the First International *Metasequoia* Symposium, Wuhan, China, August 4 – 7, 2002.

Kuser J. E. 1983. Inbreeding depression in *Metasequoia*. *Journal of the Arnold Arboretum*, **64**: 475 – 482.

Kuser J. E. 1999. *Metasequoia glyptostroboides*: fifty years of growth in North America. *Arnoldia*, **58**(4)-**59**(1): 76 – 79.

Kuser J. E., Sheely D. L. and Hendricks D. R. 1997. Genetic variation in two *ex situ* collections of the rare *Metasequoia glyptostroboides* (Cupressaceae). *Silvae Genetica*, **46** (5): 258 – 264.

Lande R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science*, **241**: 1455 – 1460.

Leberg P. L. 1990. Genetic considerations in the design of introduction programs. *Transactions of the North American Wildlife and Natural Resource Conference*, **55**: 609 – 619.

Ledig F. T., Hodgskiss P. D and Jacob-Cervantes V. 2002. Genetic diversity, mating system, and conservation of a Mexican subalpine relict, *Picea mexicana* Martinez. *Conservation Genetics*, **3**: 113 – 122.

Leng Q., Yang H., Yang Q. and Zhou J. P. 2001. Variation of cuticle micromorphology of *Metasequoia glyptostroboides* (Taxodiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **136** (2): 207 – 219.

Levin D. and Kerster H. W. 1974. Gene flow in seed plants. *Evolutionary Biology*, **7**: 139 – 220.

Li A (李昂), Luo Y-B (罗毅波) and Ge S (葛颂). 2002. Spatial autocorrelation study of population genetic structure of two orchid species. *Biodiversity Science* (生物多样性), **10** (3): 249 – 257. (in Chinese)

Li C-S (李承森), Wang Y-F (王宇飞) and Sun Q-G (孙启

高). 2001. Climate analysis of endemic species —a novel method for quantitative analysis of global climate change since Tertiary. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **43** (2): 217 – 220. (in Chinese)

Li C-X (李春香), Yang Q. (杨群), Zhou J-P (周建平), Fan S-H (范深厚) and Yang H. (杨洪). 1999. RAPD analysis of genetic diversity in the natural population of *Metasequoia glyptostroboides*, Central China. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni* (Natural science) [中山大学学报(自然科学版)], **38** (1): 59 – 63. (in Chinese)

Li J-H (李建华) and Ban J-D (班继德). 1989. The water fir communities endemic to China. *Journal of Henan Normal University (Natural science version)* [河南师范大学学报(自然科学版)], **4**: 49 – 55. (in Chinese)

Li J. 1999. *Metasequoia*: an overview of its phylogeny, reproductive biology, and ecotypic variation. *Arnoldia*, **58** (4) – **59** (1): 54 – 59.

Li X-D (李晓东), Huang H-W (黄宏文) and Li J-Q (李建强). 2003. Genetic diversity of the relict plant *Metasequoia glyptostroboides*. *Biodiversity Science* (生物多样性), **11** (2): 100 – 108.

Li Z-Z (李作洲), Lang P. (郎萍) and Huang H-W (黄宏文). 2002. Spatial structure of allozyme frequencies in *Castanea mollissima* Bl. *Journal of Wuhan Botanical Research* (武汉植物学研究), **20** (3): 165 – 170. (in Chinese)

Liao S-Z (廖绍忠) and Zhou W-L (周万良). 1989. Seed germination experiment of *Metasequoia glyptostroboides*. *Sichuan Forestry Science and Technology* (四川林业科技), **10** (1): 71 – 74. (in Chinese)

Liu Y-J (刘艳菊), Li C-S (李承森) and Wang Y-F (王宇飞). 1996. Review on genus *Metasequoia*. *Chinese Bulletin of Botany* (植物学通报), **13** (3): 15 – 22. (in Chinese)

Mattner J., Zawko G., Rossetto M., Krauss S. L., Dixon K. W. and Sivasithamparam K. 2002. Conservation genetics and implications for restoration of *Hemigenia exilis* (Lamiaceae), a serpentine endemic from Western Australia. *Biological Conservation*, **107**: 37 – 45.

Merrill E. D. 1948. *Metasequoia*, another “living fossil”. *Arnoldia*, **8** (1): 1 – 8.

Recusch T. B. H., Hukriede W., Stam W. and Ollsen J. L. 1999. Differentiating between clonal growth and limited gene flow using spatial autocorrelation of microsatellites. *Heredity*, **83**: 120 – 126.

Rogers S. O. and Bendich A. J. 1985. Extraction of DNA from milligram amount of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology*, **5**: 69 – 76.

Satoh K. 1999. *Metasequoia* travels the globe. *Arnoldia*, **58**(4) – **59**(1): 72 – 75.

Sokal R. R., Jacquez G. M. and Wooten M. 1989. Spatial autocorrelation analysis of migration and selection. *Genetics*, **121**: 845 – 855.

Sokal R. R. and Oden N. L. 1978a. Spatial autocorrelation in biology. 1. Methodology. *Biological Journal of the Linnean Society*, **10**: 199 – 228.

Sokal R. R. and Oden N. L. 1978b. Spatial autocorrelation in biology. 2. Some biological implications and four applications of evolutionary and ecological interest. *Biological Journal of the Linnean Society*, **10**: 229 – 249.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J. and Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, **23**: 4407 – 4414.

Wang X-Q (王希群) and Guo B-X (郭保香). 2002. Suggestion on the protection and the study of *Metasequoia glyptostroboides*. *Forestry Science and Technology of Hubei Province* (湖北林业科技), **119**: 27 – 29. (in Chinese)

Wang G-Q (汪国权). 1999. *Rediscovery and Research of Metasequoia glyptostroboides* (水杉的发现与研究). Jiangxi High Education Press, Nanchang, China. (in Chinese)

Warternberg D. 1989. SAAP 4. 3. — *A Spatial Autocorrelation Analysis Program*. Exeter Software, Setauket, NY, USA.

Wen J-J (文甲举), Wu B (吴彬), Li Y-L (李易禄) and Fan S-H (范深厚). 2001. The status and problems on protecting the original trees of *Metasequoia glyptostroboides*. *Forest Science and Technology* (林业科技通讯), **42** (3): 30 – 31. (in Chinese)

Yang H. 1999. From fossils to molecules: the *Metasequoia* tale continues. *Arnoldia*, **58**(4) – **59**(1): 60 – 71.

Yu Y-F (于永福). 1995. Origin, evolution and distribution of the Taxodiaceae. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报), **33** (4): 352 – 389. (in Chinese)

Zhang W-Y (张文英) and Li M-H (李明鹤). 1994a. A study on genetic variation of isozyme in *Metasequoia glyptostroboides*. *Journal of South China Agricultural University* (华南农业大学学报), **15** (2): 118 – 123. (in Chinese)

Zhang W-Y (张文英) and Li M-H (李明鹤). 1994b. An analysis of the population genetic structure of *Metasequoia glyptostroboides* by isozyme technique. *Journal of South China Agriculture University* (华南农业大学学报), **15** (3): 129 – 135. (in Chinese)

(责任编辑：时意专)