

10 个山茶岛屿天然居群的遗传多样性分析

林立^{1,2}, 胡仲义², 李纪元³, 祝志勇², 倪穗^{1,*}

(¹宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315211; ²宁波城市职业技术学院, 浙江宁波 315502; ³中国林业科学院亚热带林业研究所, 浙江富阳 311400)

摘要: 采用 ISSR 分子标记对舟山群岛、长门岩岛、鹿儿岛、四国岛和五岛的 10 个山茶 (*Camellia japonica*) 居群的遗传多样性和分化程度进行分析。20 条随机引物扩增出 210 个可分析位点, 多态性百分比 (PPL) 为 90%。试验结果显示, 山茶居群水平的 Nei's 基因多样性指数为 0.2732, Shannon 信息多态性指数为 0.4003, 表明其具有较高的遗传多样性。鹿儿岛、四国岛和五岛的居群相对于舟山群岛和长门岩岛居群而言, 遗传多样性水平更高。10 个居群间遗传分化系数 $G_{st} = 0.2028$; 地理距离与遗传距离之间具有显著相关性 ($r = 0.9081$, $P < 0.05$), 表明岛屿地理隔离对山茶居群间的遗传分化具有重要影响。UPGMA 聚类显示了居群间的亲缘关系, 同岛内居群间亲缘关系更近, 长门岩岛居群与舟山群岛居群亲缘关系近于鹿儿岛、四国岛以及五岛居群间的亲缘关系。

关键词: 山茶; ISSR; 岛屿; 遗传多样性

中图分类号: S 685.14

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 08-1531–08

Analysis on Genetic Diversity of Ten Insular Populations of *Camellia japonica*

LIN Li^{1,2}, HU Zhong-yi², LI Ji-yuan³, ZHU Zhi-yong², and NI Sui^{1,*}

(¹Faculty of Marine Science, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315211, China; ²Ningbo City College of Vocational Technology, Ningbo, Zhejiang 315502, China; ³Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang, Zhejiang 311400, China)

Abstract: *Camellia japonica* is an important horticultural and economic species, mainly distributed in East Asia. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers were used to investigate the genetic diversity within and among the ten natural populations of *Camellia japonica*. A total of 210 discernible loci were obtained for all populations using 20 primers, 90% of which were polymorphic ($PPL = 90\%$). The average value of Nei's genetic diversity and Shannon information index of ten populations were 0.2732 and 0.4003, indicated that the genetic diversity of *Camellia japonica* populations was relatively high. Population in Kagoshima, Shikoku Island and Goto Island had a higher level of genetic diversity than that in Zhoushan Islands and Changmenyan Island. The value of differentiation ($G_{st} = 0.2028$) affirmed that *Camellia japonica* had high genetic differentiation among populations, and a significant correlation was found between genetic distance and geographic distance ($r = 0.9081$, $P < 0.05$). UPGMA showed that CMY population had a close relationship with Zhoushan Islands populations.

收稿日期: 2012–05–22; **修回日期:** 2012–07–19

基金项目: 浙江省科技厅重点项目 (2008C14065); 宁波市国际科技合作项目 (2010D10013); 宁波市农村科技创新创业资金项目 (2010C91026); 国家国际科技合作项目 (2011DFA30490)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: nbnisui@126.com)

Key words: *Camellia japonica*; ISSR; island; genetic diversity

遗传多样性是生物多样性的重要组成部分,影响物种长期生存与进化,已成为进化生物学和生物多样性保育研究的热点内容(Ellstre & Elam, 1993)。遗传多样性受物种繁育系统、基因流、遗传漂变和自然选择等诸多因素的影响(Schaal et al., 1998),岛屿物种因其具有地理隔离、基因流阻隔及种群规模较小等特点而成为种群遗传分化研究的模式物种(Juan et al., 2000)。通常的观点认为岛屿上的种群遗传多样性低于大陆种群,其有限的基因流、遗传漂变以及历史上可能存在的瓶颈效应被认为是主要的影响因素。岛屿种群遗传多样性的衰退可能会损害其进化潜能甚至会导致其最终灭绝。据统计,17 世纪至 20 世纪地球上灭绝的维管植物共 384 种,其中岛屿植物达 139 种,约占 36% (冷欣 等, 2006)。除了上述自然因素外,人为干扰也被认为是岛屿物种致濒的主要因子之一(Wolf & Harrison, 2001)。

山茶(*Camellia japonica*)隶属山茶科(Theaceae)山茶属(*Camellia*),为常绿灌木或小乔木(张宏达和任善湘, 1998),天然居群主要分布于中国沿海地区(浙江沿海地区、山东沿海地区和台湾岛北部)以及日本的四国、本州和相邻的一些岛屿,在朝鲜半岛南部也有分布,海拔在 0~1 000 m (高继银 等, 2005)。近年来由于人们对野生山茶资源破坏式的利用,造成了天然居群数量和规模骤减,原地保护已十分迫切。

目前,国内外对山茶天然居群的遗传多样性的研究还不多。李力等(1996)对青岛的长门岩岛、大管岛和浙江的普陀山 3 个山茶居群进行了等位酶的分析。张立(2008)对浙江的 4 个山茶天然居群进行了 ISSR 遗传多样性的分析。国外的相关研究则主要集中在 20 世纪 90 年代对日本和韩国所分布的山茶的天然居群进行的研究(Wendel & Parks, 1985; Chung & Kang, 1996; Oh et al., 1996)。

本研究中采用 ISSR 分子标记方法对中国和日本天然山茶主要分布岛屿中居群的遗传多样性和亲缘关系进行分析,以期更加全面地揭示天然山茶主要分布区域内居群的遗传多样性水平及居群间的遗传分化程度;了解不同岛屿居群之间的亲缘关系;分析岛屿地理隔离、人为因素等对其遗传结构的影响,为该物种种质资源的保护和合理利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 采样地概况与采样方法

经前期调查,以 10 个山茶岛屿天然居群(表 1)为研究对象,即舟山群岛的桃花岛居群(TH)、朱家尖岛居群(ZJ)、善财洞居群(SC)和慧济寺居群(HJ),长门岩岛居群(CMY),鹿儿岛居群(Kago),四国岛的初崎居群(Shiko-1)和足摺岬居群(Shiko-2),五岛的原生林居群(Goto-1)和防风林居群(Goto-2)。

采用间隔距离取样法(Joshi et al., 2000),每个居群采嫩叶样本 30 个,用冰袋保鲜运回实验室,洗净、干燥后立即放入 -80 °C 冷库保存。

1.2 DNA 的提取

试验采用改良的 CTAB 法(Doyle & Doyle, 1987)提取山茶基因组的 DNA,通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度,用 1 × TE 溶解后放入 -20 °C 冰箱中,保存备用。

表 1 山茶居群采样位置
Table 1 Locality of populations sampled of *Camellia japonica*

居群 Population	样本数 Number	产地 Locality	地理位置 Geographical location	海拔/m Altitude
桃花岛居群 TH	30	舟山群岛的桃花岛 Taohua Island	29°48'N, 122°18'E	12
朱家尖岛居群 ZJ	30	舟山群岛的朱家尖岛 Zhujiajian Island	29°25'N, 121°42'E	372
善财洞居群 SC	30	舟山群岛的普陀岛 Putuo Island	30°00'N, 122°24'E	288
慧济寺居群 HJ	30	舟山群岛的普陀岛 Putuo Island	30°00'N, 122°23'E	291
长门岩岛居群 CMY	30	长门岩岛 Changmenyan Island	36°10'N, 120°56'E	36
鹿儿岛居群 Kago	30	鹿儿岛 Kagoshima	31°25'N, 130°35'E	144
初崎居群 Shiko-1	30	四国岛 Shikoku Island	33°03'N, 132°58'E	120
足摺岬居群 Shiko-2	30	四国岛 Shikoku Island	32°43'N, 133°00'E	12
五岛原生林居群 Goto-1	30	五岛 Goto Island	32°40'N, 128°48'E	26
五岛防风林居群 Goto-2	30	五岛 Goto Island	32°38'N, 128°51'E	36

1.3 PCR 扩增与引物筛选

PCR 反应体系为 20 μL ，反应液中含 2 μL 10 \times Buffer 缓冲液，1.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mg^{2+} ，0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP，0.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物，1.0 U *Tag* 酶，40 ng DNA 模板，14.2 μL 无菌水。PCR 扩增程序为：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s，各温度退火 45 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min，40 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶（含 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溴化乙锭）于 5 $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 电压下电泳 90 min，电泳结果用凝胶成像系统（FR-200A）拍照并记录。

每个居群选取 2 个植株的 DNA 模板，以灭菌双蒸水为对照，从有关山茶科植物的 ISSR 研究报告中选取 60 个引物，由生工生物工程（上海）服务有限公司合成。根据预试验结果筛选出 20 个扩增带型清晰且重复性好的引物序列（表 2）。

1.4 数据处理与分析

统计条带时将电泳图谱中较清晰的条带（包括弱带）计为“1”，无带则计为“0”，转化成 0/1 二元矩阵。采用 POPGEN1.32 软件计算多态位点百分比 *PPL*（The percentage of polymorphic loci）、*Nei's* 遗传多样性（*Nei's* gene diversity, H_E ）、*Shannon's* 信息指数（*Shannon's* information index, H ）、观测等位基因数（Observed number of alleles, N_a ）、有效等位基因数（Effective number of alleles, N_e ）和遗传分化系数（ G_{st} ），基因流值（ N_m ）计算公式为： $N_m = (1 - G_{st}) / 4G_{st}$ （*Slatkin & Barton*, 1989）。利用 NTSYSpc2.10e 软件分析遗传距离矩阵，按 UPGMA（Unweighted pair group method using arithmetic averages）法进行聚类分析，构建聚类图。

利用 GenAlEx 6.41 软件（*Excoffier et al.*, 1992）对居群遗传分化进行 AMOVA 方差分析。同时，以居群为单位，采用 Mantel 检验（*Smouse & Peak*, 1986）来分析居群间遗传距离和地理距离的相关性。

2 结果与分析

2.1 山茶居群及物种水平遗传多样性

20 个引物在 10 个居群的基因组 DNA 上扩增共得到 210 条带 (ZJ 和 CMY 居群 ISSR 扩增结果见图 1), 片段长度为 100~2 000 bp, 每条引物最少得到 7 条扩增带, 最多得到 13 条扩增带, 平均每条引物得 10.5 条扩增带, 其中多态性条带为 189 条, 多态性位点百分比 (*PPL*) 为 90% (表 2)。

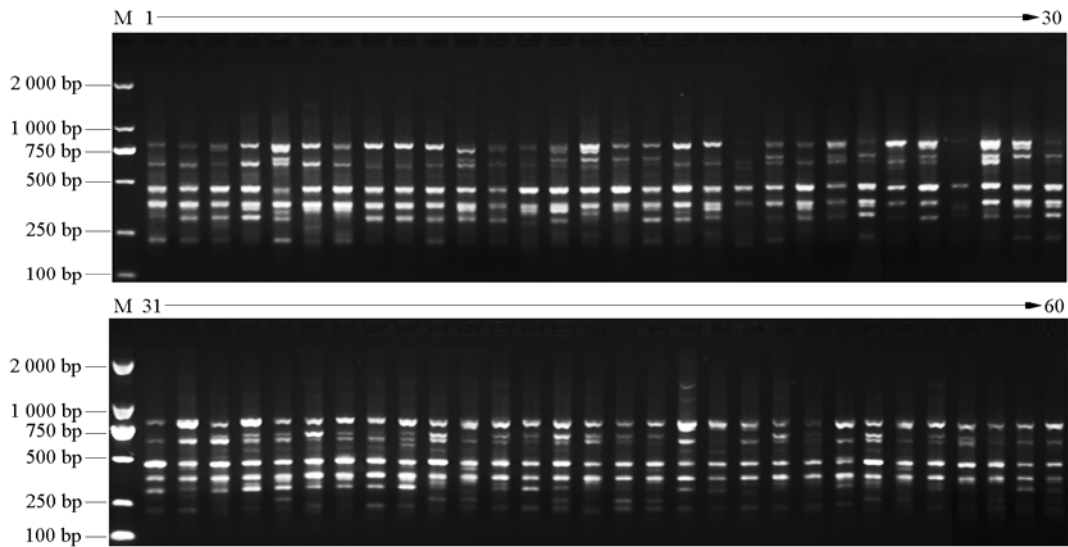


图 1 引物 UBC841 对 ZJ 居群和 CMY 居群的 ISSR 扩增结果

M: Marker; 1~30: ZJ 居群个体; 31~60: CMY 居群个体。

Fig. 1 ISSR profiles of ZJ and CMY population with primer UBC841

M: Marker; 1~30: The individuals of ZJ population; 31~60: The individuals of CMY population.

表 2 ISSR 扩增引物

Table 2 Primers used for ISSR amplification

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence	退火温度/℃ Annealing temperature	总条带数 Number of bands recorded	多态性条带 Number of polymorphic bands	<i>PPL</i> /%
UBC810	(GA) ₈ T	54.8	11	9	81.82
UBC811	(GA) ₈ C	54.8	12	11	91.67
UBC813	(CT) ₈ T	51.2	10	9	90.00
UBC818	(CA) ₈ G	51.2	9	9	100.00
UBC824	(TC) ₈ G	54.6	11	11	100.00
UBC825	(AC) ₈ T	52.2	13	11	84.62
UBC827	(AC) ₈ G	54.8	12	11	91.67
UBC834	(AG) ₈ YT	53.9	7	6	85.71
UBC835	(AG) ₈ YC	56.2	9	8	88.89
UBC836	(AG) ₈ YA	51.2	11	11	100.00
UBC841	(GA) ₈ YC	56.2	13	10	76.92
UBC843	(CT) ₈ RA	54.0	13	12	92.31
UBC848	(CA) ₈ RG	54.8	10	9	90.00
UBC853	(TC) ₈ RT	51.2	10	10	100.00
UBC856	(AC) ₈ YA	56.6	9	7	77.78
UBC866	(CTA) ₆	61.8	12	11	91.67
UBC873	(GACA) ₄	51.6	9	8	88.89
UBC880	(GGAGA) ₃	53.6	11	10	90.91
IR43	(GA) ₈ CT	52.9	10	9	90.00
IR53	(CAA) ₈ G	56.6	8	7	87.50
总和 Total			210	189	90.00

Y = (C, T), R = (A, G)。

表明山茶基因组 DNA 多态性较高。居群水平多态位点百分比 (*PPL*) 的变化范围为 66.67%~77.62% (表 3), 平均值为 72%。在 20 个引物中, 16 个为二核苷酸重复序列, 2 个为三核苷酸重复序列, 1 个为四核苷酸重复序列, 1 个为五核苷酸重复序列, 表明山茶基因组中以二核苷酸重复序列居多。

利用 PopGen1.32 计算得到 10 个山茶居群的平均有效等位基因数为 1.4850, 平均 Nei's 基因多样性指数为 0.2732, 平均 Shannon 信息指数为 0.4003 (表 3)。居群水平的多态位点百分比、有效等位基因数和 Nei's 基因多样性指数均为足摺岬居群最大, 善财洞居群最小。足摺岬山茶林保存完好, 集中分布在坡地岩山缝的腐殖土中, 山茶树干粗大, 一般干径为 10~30 cm, 最粗的达 40 cm, 一般为 3~4 m 高, 向同一方向倾斜, 呈现“风冲型”, 苍劲威武。普陀山曾分布有大量的野生山茶, 但如今数量已大不如前。据调查, 当地遭砍伐的百年以上山茶古树不计其数, 只剩下了大约 43 株分散分布的百年以上古树, 其中 400 年以上两株, 300 年以上 7 株, 幼树数量不多 (游幕贤, 2010)。

表 3 10 个山茶居群的遗传多样性参数
Table 3 Genetic diversity for ten populations of *C. japonica*

居群代号 Code	样本数 Number	N_a	N_e	H_E	H	$PPL/\%$
TH	30	1.6857 (0.4653)	1.4226 (0.3880)	0.2426 (0.2029)	0.3603 (0.2848)	68.57
ZJ	30	1.6905 (0.4634)	1.4438 (0.3908)	0.2531 (0.2039)	0.3737 (0.2868)	69.05
SC	30	1.6667 (0.4725)	1.4323 (0.3840)	0.2484 (0.2030)	0.3666 (0.2882)	66.67
HJ	30	1.6571 (0.4758)	1.4540 (0.3998)	0.2557 (0.2094)	0.3737 (0.2960)	66.71
CMY	30	1.7095 (0.4551)	1.4918 (0.3896)	0.2775 (0.2035)	0.4054 (0.2869)	70.95
Kago	30	1.7762 (0.4178)	1.5247 (0.3855)	0.2952 (0.1973)	0.4322 (0.2740)	77.62
Shiko-1	30	1.7333 (0.4433)	1.5019 (0.4069)	0.2785 (0.2086)	0.4064 (0.2895)	73.33
Shiko-2	30	1.7714 (0.4209)	1.5363 (0.3946)	0.2980 (0.2022)	0.4339 (0.2803)	77.14
Goto-1	30	1.7619 (0.4269)	1.5199 (0.3843)	0.2926 (0.1989)	0.4279 (0.2775)	76.19
Goto-2	30	1.7381 (0.4407)	1.5227 (0.3976)	0.2907 (0.2048)	0.4229 (0.2858)	73.81
平均值 Mean	30	1.7190	1.4850	0.2732	0.4003	72.00
物种水平 Species level	300	1.9000 (0.3007)	1.6084 (0.3466)	0.3427 (0.1686)	0.5024 (0.2257)	90.00

注: 括号内为标准差。

Note: The value of standard deviation in bracket.

2.2 山茶居群的遗传分化

通过 POPGEN1.32 软件计算得到 10 个居群的总基因多样性 (H_T) 为 0.3427, 居群内基因多样性 (H_S) 为 0.2732, 居群间的遗传分化系数 $G_{st} = 0.2028$, 即 20.28% 的变异存在于居群间, 山茶变异的主要原因还是发生在居群内个体间, 占总遗传变异的 79.72%。该结果与 Shannon 居群分化系数 ($S = 0.2032$) 相近。基因流 (N_m) 为 0.9834, 表明居群间基因交流受限, 遗传漂变是引起遗传分化的主要原因 (Wright, 1931)。

AMOVA 方差分析表明, 10 个居群间存在显著差异 ($P < 0.001$), 21.27% 的变异存在于居群间, 78.73% 的变异发生在居群内个体间, 与上述 POPGEN1.32 软件计算结果相近。根据居群所处地理位置将 10 个居群划分为 3 个大区域居群, 即桃花岛—朱家尖岛—普陀岛居群 (29°25'~30°00' N, 121°42'~122°24' E), 长门岩岛居群 (36°10' N, 120°56' E) 和鹿儿岛—四国岛—五岛居群 (31°25'~33°03' N, 128°48'~133°00' E), 对大区域居群进行 AMOVA 分析, 发现 19.29% 的变异发生在不同区域之间, 7.37% 的变异发生在同区域内居群之间, 主要的遗传变异还是发生在居群内个体间 (占 73.34%)。

以岛屿为分析单位, 普陀岛、四国岛以及五岛岛内居群间的遗传分化系数 G_{st} 分别为 0.0377、

0.0401 和 0.0355, 岛内居群间的遗传分化程度远低于岛屿居群间的遗传分化程度 ($G_{st} = 0.2028$), 表明岛屿隔离可能会引起山茶居群间较高的遗传分化。经 Mantel 检验, 岛屿地理距离与遗传距离 (表 4) 具有显著正相关性, 相关系数 $r = 0.9081$, $P < 0.05$, 进一步证实了岛屿地理隔离对山茶居群的遗传分化具有重要影响。

表 4 10 个居群间的 Nei's 一致度 (右上) 和 Nei's 遗传距离 (左下)
Table 4 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) for ten populations

居群 Population	TH	ZJ	SC	HJ	CMY	Kago	Shiko-1	Shiko-2	Goto-1	Goto-2
TH		12	21	22	691	811	1067	1068	722	725
ZJ	0.0369		16	17	685	809	1057	1059	718	729
SC	0.0551	0.0454		2	667	790	1047	1052	711	720
HJ	0.0624	0.0520	0.0209		666	791	1047	1053	711	721
CMY	0.1322	0.1209	0.1140	0.1117		1046	1162	1196	850	856
Kago	0.1487	0.1421	0.1476	0.1490	0.1103		272	270	207	209
Shiko-1	0.1721	0.1640	0.1720	0.1714	0.1398	0.0435		25	383	376
Shiko-2	0.1554	0.1491	0.1509	0.1522	0.1314	0.0342	0.0274		391	384
Goto-1	0.1455	0.1348	0.1302	0.1301	0.1129	0.0447	0.0451	0.0652		10
Goto-2	0.1549	0.1411	0.1435	0.1441	0.1124	0.0493	0.0476	0.0626	0.0238	

2.3 聚类分析

UPGMA 聚类结果表明同在一岛的 SC 居群和 HJ 居群之间遗传距离最近, 首先聚为一小支, 其后与地理距离较近的 TH 居群和 ZJ 居群聚为一亚支, 显示了舟山群岛的 4 个居群之间存在着较近的亲缘关系。CMY 居群与舟山群岛居群之间的地理距离较远, 亲缘关系也较远, 聚为一大支。鹿儿岛、四国岛和五岛的 5 个居群另聚为一大支, 其中两组同岛内居群之间的亲缘关系更近, 分别聚为两小支, Kago 居群和四国岛居群之间的亲缘关系近于和五岛居群之间的亲缘关系, 与三者之间地理距离的远近相对应 (图 2)。

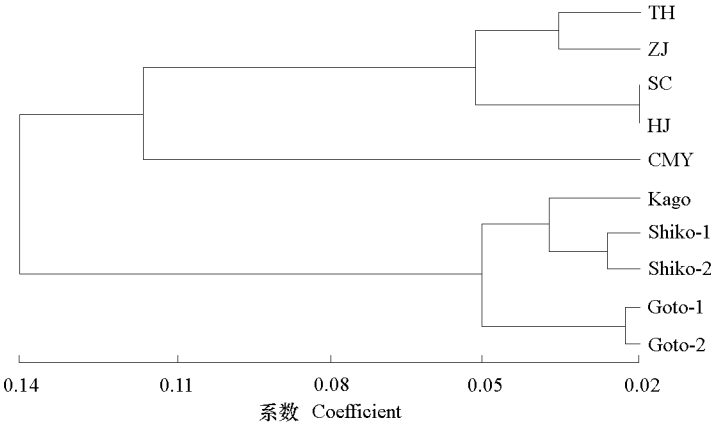


图 2 10 个山茶居群基于遗传距离的 UPGMA 聚类图
Fig. 2 UPGMA dendrogram for ten populations of *C. japonica* based on Nei's genetic distance

3 讨论

Frankham (1997) 研究发现岛屿特有植物与陆地近缘种的杂合度比值 ($H_{IS}/H_M = 0.54$) 低于非岛屿特有植物在岛屿和陆地分布所具有的杂合度比值 ($H_{IS}/H_M = 0.71$), 表明岛屿特有植物较非岛屿

特有植物遗传多样性低。ISSR 分子标记揭示了 10 个山茶居群平均水平的多态位点百分比 ($PPL = 72\%$)、居群内基因多样性 ($H_S = 0.2732$) 和 Shannon 多态性信息指数 ($H_{pop} = 0.4003$) 均高于舟山群岛特有种全缘冬青 (*Ilex integra*) 居群 ($PPL = 41.2\%$, $H_S = 0.1530$, $H_{pop} = 0.2270$) (冷欣 等, 2005), 与 Frankham (1997) 结论相符。山茶居群内基因多样性 ($H_S = 0.2732$) 也高于 Nybom (2004) 统计的基于 ISSR 位点分析物种的居群内基因多样性平均值 ($H_S = 0.2200$), 表明山茶居群 ISSR 遗传多样性较高。Hamrick 和 Godt (1990) 认为山茶居群的高遗传多样性与该物种的繁育系统有关。山茶为典型的长世代、木本两性花, 主要靠虫媒进行异花授粉, 且开红花的山茶也具备典型鸟媒植物的一些特征, 而容易取得的花蜜也吸引了很多非专性嗜蜜的鸟类 (Chung & Kang, 1996), 如暗绿绣眼鸟 (*Zosterops japonica*) (Kunitake et al., 2004), 因而山茶居群之间具有较高的花粉流 (Oh et al., 1996; Ueno et al., 1999)。山茶的种子主要是靠重力传播, 但也有研究表明许多啮齿动物也是山茶种子的传播载体, 有助于提高近距离居群间的基因交流水平 (Harue et al., 2006)。

鹿儿岛、四国岛和五岛的居群相对于舟山群岛和长门岩岛居群而言, 其遗传多样性水平更高。生境破坏、居群规模下降、基因交流受阻以及自然选择被认为是引起居群遗传多样性下降的重要原因 (Ouborg, 1999)。鹿儿岛、四国岛和五岛的山茶为当地植被类型的主要优势种之一, 居群规模较大, 生长势良好。舟山群岛和长门岩岛山茶天然居群所处岛屿的面积狭窄、生境单一、居群遗传背景相似, 受人为干扰也较为严重 (周汝伦 等, 1994; 冷欣 等, 2006), 因而居群数量和规模都较小。据浙江林业局于 1990—1992 年调查, 舟山群岛共有山茶近 30 万株。但如今大量山茶已被采挖或砍伐, 现存的多为萌芽林, 一般作为常绿阔叶林或落叶林的伴生种。人为破坏、地理隔离以及生境脆弱等因素造成了居群规模的下降, 使得居群内近交频度增加, 遗传漂变导致等位基因流失, 降低居群遗传多样性水平 (Francisco-Ortega et al., 2000)。

同岛内居群间遗传分化程度较异岛居群间遗传分化程度小, 表明岛屿隔离可能对居群的遗传分化具有重要影响 (冷欣 等, 2006)。Mantel (2003) 认为岛屿地理隔离阻碍基因交流, 其作用主要体现在影响植物的繁育系统 (Luo et al., 2007)。异岛居群间花粉和种子的传播会受海水隔离以及地理距离影响, 表现出遗传距离与地理距离之间的正相关性 ($r = 0.9081$, $P < 0.05$)。同岛内居群间则不受此因素影响, 基因交流更频繁, 居群间亲缘关系更近。

References

- Chung M G, Kang S S. 1996. Genetic variation within and among populations of *Camellia japonica* (Theaceae) in Korea. *Can J For Res*, 26: 537 - 542.
- Doyle J J, Doyle J L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytoch Bull*, 19: 11 - 15.
- Ellstre N C, Elam D R. 1993. Population genetic consequences of small population size: Implication for plant conservation. *Annual Review of Ecology Journal*, 8: 238 - 244.
- Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Applications to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479 - 491.
- Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, Kim S C, Crawford D J. 2000. Plant genetic diversity in the Canary Islands: A conservation perspective. *American Journal of Botany*, 87 (7): 909 - 919.
- Frankham R. 1997. Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity*, 78: 311 - 327.
- Gao Ji-yin, Parks C R, Du Yue-qiang. 2005. Collected species of *Camellia* - An illustrated outline. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press. (in Chinese)
- 高继银, Parks C R, 杜跃强. 2005. 山茶属植物主要原种彩色图集. 杭州: 浙江科学技术出版社.
- Hanwick J L, Godt M J W. 1990. Allozyme diversity in plant species//Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L, Weir B S. *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Massachusetts: Sinauer: 43 - 63.

- Harue A, Rikyu M, Saneyoshi U, Yamamoto S. 2006. Dispersal of *Camellia japonica* seeds by *Apodemus speciosus* revealed by maternity analysis of plants and behavioral observation of animal vectors. *Ecol Res*, 21 (5): 732 - 740.
- Joshi S P, Gupta V S, Aggarwal R K, Ranjekar P K, Brar D S. 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theor Appl Genet*, 100: 1311 - 1320.
- Juan C, Emerson B C, Oromi P, Hewitt G M. 2000. Colonization and diversification: Towards a phylogeographic synthesis for the Canary Islands. *Tree*, 15 (3): 104 - 109.
- Kunitake Y K, Hasegawa M, Miyashita T, Higuchi H. 2004. Roles of a seasonal specialist bird *Zosterops japonica* on pollen transfer and reproductive success of *Camellia japonica* in a temperate area. *Plant Species Biol*, 19: 197 - 201.
- Leng Xin, Wang Zhong-sheng, An Shu-qing. 2006. The influence of insular geographical isolation on population genetic structure of *Machilus hunbergii*. *Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition*, 30 (2): 20 - 24. (in Chinese)
- 冷 欣, 王中生, 安树青. 2006. 岛屿地理隔离对红楠居群遗传结构的影响. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 30 (2): 20 - 24.
- Leng Xin, Wang Zhong-sheng, An Shu-qing, Feng Jue, Liu Yu-hong, Wang Guo-ming. 2005. ISSR analysis of genetic diversity of *Ilex integra*, an insular endemic plant. *Biodiversity Science*, 13 (6): 546 - 554. (in Chinese)
- 冷 欣, 王中生, 安树青, 冯 珏, 刘玉虹, 王国明. 2005. 岛屿特有种全缘冬青的 ISSR 分析. *生物多样性*, 13 (6): 546 - 554.
- Li Li, Wang Ren-qing, Wang Zhong-ren, Wang Shao-ping, Li Shu-wei. 1996. The study of Naidong *Camellia* biodiversity in Qingdao (II) — Genetic diversity analysis of populations. *Biodiversity Science*, 4 (1): 1 - 6. (in Chinese)
- 李 力, 王仁卿, 王中仁, 王少萍, 李书韦. 1996. 青岛耐冬山茶的多样性 (II) ——居群的遗传多样性分析. *生物多样性*, 4 (1): 1 - 6.
- Luo Xiao-ying, Zhuang Xue-ying, Yang Yue-sheng. 2007. Genetic diversity of *Camellia changii* Ye (Theaceae) using ISSR markers. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 15 (2): 93 - 100.
- Mantel S. 2003. Landscape genetics: Combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, 18 (4): 189 - 197.
- Nybom H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13 (5): 1143 - 1155.
- Oh G S, Kang S S, Chung M G. 1996. Temporal genetic structure in *Camellia japonica* (Theaceae). *Genes Genet Syst*, 71: 9 - 13.
- Ouborg N J. 1999. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. *Journal of Ecology*, 87: 551 - 568.
- Schaal B A, Hayworth D A, Olsen K M, Rauscher J T, Smith W A. 1998. Phylogeographic studies in plants: Problems and prospects. *Molecular Ecology*, 7: 465 - 474.
- Slatkin M, Barton N H. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution*, 43: 1349 - 1368.
- Smouse P E, Peak R. 1986. Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multiocus genetic structure. *Heredity*, 82: 561 - 573.
- Ueno S, Yoshimaru H, Tomaru N, Yamamoto S. 1999. Development and characterization of microsatellite markers in *Camellia japonica* L. *Mol Ecol*, 8: 335 - 336.
- Wendel J F, Parks C R. 1985. Genetic diversity and population structure in *Camellia japonica* L. (Theaceae). *Am J Bot*, 72: 52 - 65.
- Wolf A, Harrison S P. 2001. Effects of habitat size and patch isolation on reproductive success of the Serpentine Morning Glory. *Conservation Biology*, 15: 111 - 121.
- Wright S. 1931. Evolution in Mendelian population. *Genetics*, 6: 91 - 159.
- You Mu-xian. 2010. Tracking down Chinese ancient *Camellia* trees for ten years. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press: 13. (in Chinese)
- 游慕贤. 2010. 中国茶花古树觅踪十年. 杭州: 浙江科学技术出版社: 13.
- Zhang Hong-da, Ren Shan-xiang. 1998. Flora of China (Vol. 49). Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 张宏达, 任善湘. 1998. 中国植物志: 第四十九卷第三分册. 北京: 科学出版社.
- Zhang Li. 2008. Genetic diversity of *Camellia japonica* in Zhenjiang Province. Beijing: Beijing Forestry University. (in Chinese)
- 张 立. 2008. 浙江省山茶天然居群的遗传多样性研究. 北京: 北京林业大学.
- Zhou Ru-lun, Yang Zhen, Wei Jian-gong, Dong Shu-gang. 1994. Present conditions and restoring measures of *Camellia japonica* in plant community of Changmenyan Island. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 24 (1): 72 - 78. (in Chinese)
- 周汝伦, 杨 震, 魏建功, 董树刚. 1994. 长门岩岛植物群落中的山茶现状和恢复措施. *青岛海洋大学学报*, 24 (1): 72 - 78.