

中华水韭遗传多样性的 RAPD 分析

陈进明 王晶苑 刘星 张彦文 王青锋*

(武汉大学生命科学学院植物系统学与进化生物学研究室, 武汉 430072)

摘要:采用 RAPD 方法对珍稀濒危植物中华水韭(*Isoetes sinensis*) 4 个自然居群的 48 个样品进行了 DNA 多态性分析。从 60 个随机引物中筛选出 14 个有效引物,共产生 124 条 DNA 片段,其中 72 条为多态性条带,总的多态位点百分率(PPB)为 58.06%。各居群间多态位点百分率差异显著(0.81% - 12.90%)。AMOVA 分析结果表明 4 个居群间基因分化系数 $\Phi_{st} = 0.5894$,即遗传变异中有相当一部分来源于群体间(58.94%)。日益缩小的种群规模而导致的居群内近交和遗传漂变的发生以及居群间有限的基因交流可能是中华水韭目前遗传结构的主要成因。鉴于目前中华水韭居群内个体数偏少、遗传多样性较低的现状,建议对其进行就地保护并保护尽可能多的生境,对不同自然居群内的个体进行植株相互移栽和育苗移栽,以提高不同居群间的基因交流,尽可能地保护中华水韭的遗传多样性。

关键词:遗传结构, *Isoetes*, 分子变异, 珍稀濒危植物, 保护

中图分类号: Q16 文献标识码: A 文章编号: 1005-0094(2004)03-0348-06

RAPD analysis for genetic diversity of *Isoetes sinensis*

CHEN Jin-Ming, WANG Jing-Yuan, LIU Xing, ZHANG Yan-Wen, WANG Qing-Feng*

Laboratory of Plant Systematics and Evolutionary Biology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072

Abstract: Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers were used to measure genetic diversity of 48 individuals from four natural populations of *Isoetes sinensis*, a rare and endangered plant in China. A total of 124 DNA fragments were scored from 14 RAPD primers, of which 58.06% were polymorphic. A low level of genetic diversity within populations was detected, with PPB (percentage of polymorphic bands) values ranging from 0.81% to 12.90%. An Analysis of Molecular Variance (AMOVA) was used to apportion the variation within and among populations. Results indicated that most of the variation (58.9%) resided among populations and a small amount of variation (41.1%) represented differences within populations. Inbreeding is likely the factor that results in the low level of genetic diversity within the populations. Genetic drift and limited gene flow might also have enhanced genetic differentiation among the populations. In view of the ecological and genetic information available for *I. sinensis*, we suggest establishing as many *in situ* conservation spots as possible and cross transplanting plants or seedlings mutually among populations in order to enhance gene flow. By this means, the genetic diversity resources of *I. sinensis* can be preserved to the greatest extent.

Key words: genetic structure, *Isoetes*, AMOVA, rare and endangered plant, conservation

中华水韭(*Isoetes sinensis*)又名华水韭,隶属于水韭科(Isoetaceae)的子遗属——水韭属(*Isoetes*),具异型孢子(heterospore),为多年生沉水植物。在我国,中华水韭主要分布于长江流域中下游地区和钱塘江流域。中华水韭作为东亚特有的小型叶蕨类植物之一,对研究蕨类的系统演化和东亚植物区系

具有重要价值。近年来,中华水韭分布范围逐渐缩小,种群日益减少,目前仅在浙江、安徽两省发现 4 个中华水韭自然居群。中华水韭在我国濒临灭绝,已被列为国家一级重点保护野生植物(郝日明等, 2000;于永福,1999)。因此,很有必要开展中华水韭濒危机制的研究。

目前,国内一些学者对中华水韭的研究主要集中在形态学、细胞学、生理学及生态学等方面(何子灿等,2002;刘星等,2002,2003;庞新安等,2003;Pang *et al.*,2003;Wen *et al.*,2003)。庞新安等(2003)通过对中国水韭属 3 种植物的地理分布和生境特征进行分析,认为适生生境逐渐丧失和破碎化以及由此带来的杂草竞争正威胁着水韭属植物的生存,并有可能导致现存水韭种群的灭绝。濒危植物的遗传学研究是揭示濒危机制的一个重要方面,对濒危植物遗传多样性的研究不仅能了解物种的进化历史以及濒危机制,而且关系到能否采取科学有效的措施来保护濒危物种(Hamrick *et al.*,1991)。到目前为止,对中华水韭遗传多样性的研究不多。陈媛媛等(2003)报道了基于等位酶方法进行的中华水韭的遗传多样性分析,虽然初步揭示了中华水韭的遗传多样性水平及其成因,但由于等位酶本身是编码区,受环境选择压影响较大,不易发生变异,他们认为有必要改进实验方法,选择其他分子标记进行中华水韭居群的遗传结构和遗传变异研究。

Williams 等(1990)以及 Welsh 和 McClelland (1990)建立了 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 标记技术,该技术自 20 世纪 90 年代以来在系统学和遗传多样性研究中得到了广泛应用(钱韦等,2000;Fu *et al.*,2003)。本文选择 RAPD 标记从整个基因组的角度对中华水韭基因组进行随机扩增多态性分析,以期揭示中华水韭自然群体的遗传结构和遗传多样性水平,为中华水韭濒危机制的研究及合理保护措施的制定提供有益的资料和建议。

1 材料与方法

1.1 材料

检测材料于 2003 年 5 - 7 月分别采自浙江建

德、浙江松阳和安徽休宁自然居群。由于中华水韭种群规模均较小,本研究共采集了 4 个居群共 48 个植株的幼叶样品,样品用硅胶干燥。样品的采集地自然条件和样品所在地的地理位置、生境及样品数见表 1。

1.2 DNA 提取

参试材料 DNA 的提取采用改良的 CTAB 法(Doyle & Doyle,1987)。

1.3 引物和 PCR 扩增

引物购自上海 Genebase 公司,为十聚体寡核苷酸随机引物。PCR 试剂购自武汉天源生物公司。本实验共筛选了 60 个引物,依据扩增结果,对比可重复性、多态性后,确定了扩增效果良好的 14 个引物,其序列列表 2。

反应体系(25 μL)含有 15.5 μL 双蒸水,2.5 μL (2.5 mmol/L) dNTPs,2.5 μL 10 \times PCR buffer (含 10 mmol/L Tris-HCl,1.5 mmol/L MgCl_2 和 50 mmol/L KCl) 0.5 μL (2 U/ μL) Taq Polymerase,1 μL 引物(25 pmol),3 μL 模板(20 ng/ μL)。PCR 反应在 PTC-100TM 扩增仪上进行,反应参数为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min,接 45 个循环,每个循环为 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,34 $^{\circ}\text{C}$ 复性 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。反应产物在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。在 1.5% 的琼脂糖凝胶上,70 V 稳压电泳,溴化乙锭处理后置于紫外光灯下检测,用凝胶成像系统拍照,将图像存入计算机待分析。以 200 bp Marker (200 bp DNA Ladder, Tian Yuan Biotech. Co. Ltd.) 作为标准分子量对照。

1.4 统计分析

电泳图谱中的每条 DNA 谱带作为 1 个单位,如果有带(包括弱带)则定为“1”,没有带则定为“0”。采用 POPGENE 1.31 版软件(Francis & Yang,1999)对全部群体和各单个群体分别计算了多态

表 1 中华水韭样品的采集地及采样数

Table 1 Location and sample size of four *Isoetes sinensis* populations

居群 Population	采集地 Location	生境 Habitat	采样数 Sample size
JD	浙江建德 Jiande, Zhejiang	淡水潮间带沿岸 Freshwater intertidal zone	16
XN	安徽休宁 Xiuning, Anhui	弃耕沼泽地 Marsh in abandoned field	16
SY-1	浙江松阳 Songyang, Zhejiang	山沟沼泽地 Valley marsh	8
SY-2	浙江松阳 Songyang, Zhejiang	山沟沼泽地 Valley marsh	8

表 2 14 个有效引物名称、碱基序列及这些引物在中华水韭材料中的扩增结果
Table 2 Name of primers, sequences and amplifications of 14 effective primers

引物名称 Primer	序列 (5'-3') Sequence	DNA 条带数 No. of bands scored	多态性条带数 No. of polymorphic bands
P-A-10	GGGGGATTA	5	1
P-A-12	CCTGGGTCCA	7	3
P-A-13	CCTGGGTGGA	5	3
P-A-14	CCTGGGTTC	15	13
P-A-19	GCCCGTTTA	12	5
P-B-03	CTCCCTGAGC	13	7
P-B-08	TTCCCGGAGC	10	6
P-B-09	TTCCGGGTGC	6	2
P-B-17	GAGGGCGAGC	6	1
P-C-01	GCGGCTGGAG	9	5
P-C-09	TGTACGTGAC	5	2
P-C-10	TAGCCCGCTT	11	9
P-C-15	TTCCGCGGGC	8	4
P-C-19	ATFGGGCGAT	12	11

位点百分率(PPB)以及居群间的 Nei's 遗传距离;同时采用 WINAMOVA 1.55 软件(Excoffier, 1993)对中华水韭居群内和居群间的分子变异进行分析。

2 结果与分析

2.1 居群和物种水平的遗传多样性

从 60 个随机引物中筛选出 14 个引物进行扩增,共得到 124 条带,其中 72 条表现出多态性,占总带数的 58.06%,平均每个引物扩增的 DNA 带数为 8.9 条(图 1 表 2)。扩增位点分子量在 200-2000 bp 之间。中华水韭居群多态位点百分率(PPB)在 0.81%-12.90% 之间,多态位点百分率最低的是浙江松阳 SY-1 居群,为 0.81%;多态位点百分率最高的是安徽省休宁居群(XN)为 12.90%(图 2 表 3)。

表 3 中华水韭自然居群的遗传多样性分析
Table 3 Statistical analysis of genetic diversity in natural populations of *Isoetes sinensis*

居群 Population	多态位点百分率 PPB (%)
JD	4.03
XN	12.90
SY-1	0.81
SY-2	2.42
物种水平 Species level	58.06

PPB = Percentage of polymorphic bands

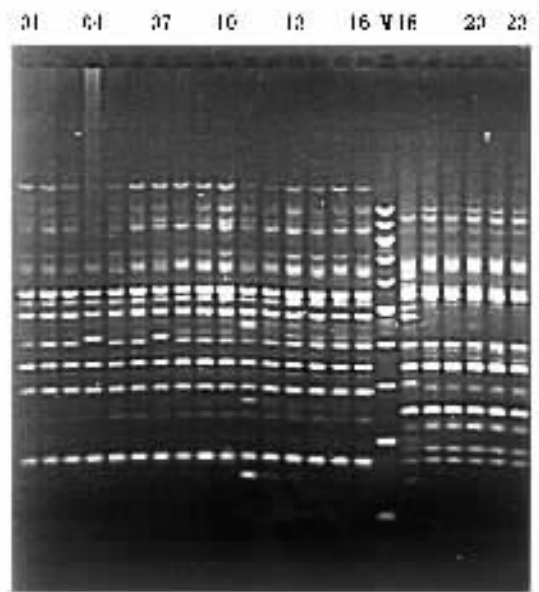


图 1 引物 P-C-10 扩增的中华水韭建德居群(JD X 泳道 01-16)和休宁居群(XN X 泳道 18-23)基因组的 RAPD 电泳图。M:200 bp DNA Ladder(Tian Yuan Biotech. Co., Ltd.)

Fig. 1 RAPD bands of *Isoetes sinensis* amplified with primer P-C-10. Lane 01-16: JD population; 18-23: XN population; M: 200 bp DNA Ladder(Tian Yuan Biotech. Co., Ltd.)

2.2 居群间的遗传关系

基于 Nei's 遗传距离对各个居群的遗传距离分析结果表明:浙江松阳两居群 SY-1 与 SY-2 之间的

表 4 中华水韭居群间和居群内分子变异的 AMOVA 分析结果

Table 4 The AMOVA analysis of genetic variances within and among populations of *Isoetes sinensis*

变异来源 Source of variation	自由度 <i>d. f.</i>	总方差 <i>SSD</i>	平均方差 <i>MSD</i>	变异组分 Variance component	总变异百分率 Total variance (%)	<i>P</i> <i>P</i> -value
居群间 Among population	3	13.94	4.65	0.38	58.94%	<0.001
居群内 Within population	44	11.63	0.26	0.26	41.06%	<0.001

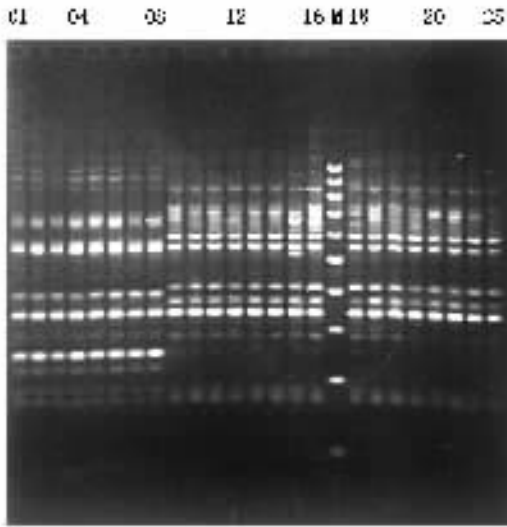


图 2 引物 P-A-14 扩增中华水韭休宁居群 (XN) (泳道 01 - 08)、松阳 SY-2 居群 (泳道 09 - 16) 和松阳 SY-1 居群 (泳道 18 - 25) 基因组的 RAPD 电泳图。M : 200 bp DNA Ladder (Tian Yuan Biotech. Co., Ltd.)

Fig. 2 RAPD bands of *Isoetes sinensis* amplified with P-A-14. 01 - 08 : XN population ; 09 - 16 : SY-2 population ; 18 - 25 : SY-1 population ; M : 200 bp DNA Ladder (Tian Yuan Biotech. Co., Ltd.)

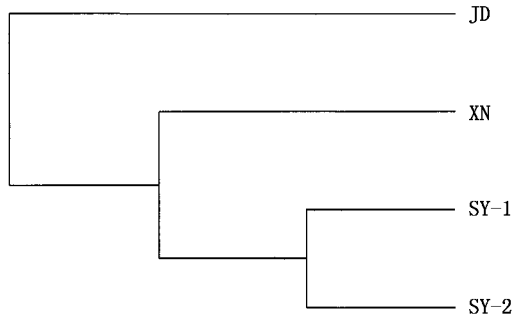


图 3 中华水韭居群间 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类图

Fig. 3 UPGMA dendrogram for populations of *Isoetes sinensis* based on Nei's genetic distance

遗传距离最小 ($D = 0.0096$) 浙江建德居群 (JD) 与安徽休宁居群 (XN) 之间的遗传距离最大 ($D =$

0.3576) (图 3)。

2.3 居群间遗传分化程度的分析

AMOVA 对中华水韭 4 个自然居群的分析结果表明,居群间基因分化系数 $\Phi_{st} = 0.5894$,即总的变异中有 58.94% 的变异存在于居群间,居群内的遗传变异占总遗传变异的 41.06%,居群间和居群内变异均极显著 ($P < 0.001$) (表 4)。

3 讨论

3.1 中华水韭的遗传多样性

RAPD 分析和等位酶标记都被广泛地用来研究濒危物种的遗传多样性,然而,由于等位酶基因不易发生变异,采用等位酶标记很可能揭示出偏少的多态位点,而 RAPD-PCR 扩增的区域为整个基因组,其中基因组非编码区的变异速度较快,因此用 RAPD-PCR 检测的遗传多样性往往比等位酶高 (Esselman *et al.*, 1999)。陈媛媛等 (2003) 对中华水韭迁地保护居群 72 个样品进行了等位酶研究,认为中华水韭等位酶水平上的遗传多样性较低。本实验从群体遗传学角度对中华水韭自然居群的遗传变异进行了 RAPD 分析,结果表明中华水韭物种水平的 PPB 为 58.06%,要高于其他濒危植物:例如 *Cathaya argyrophylla* 的 PPB 为 32% (汪小全等, 1996), *Lactoris fernandeziana* 为 24.5% (Brauner *et al.*, 1992), 水杉为 38.6% (李晓东等, 2003), 因此,中华水韭遗传多样性处于较高水平,说明中华水韭能适应当前的环境。然而,就某一特定居群而言,中华水韭的 PPB 却非常低 (0.81% - 12.90%)。这与对水韭属其他物种遗传多样性研究的结果相一致,如 *Isoetes karstenii* 和 *I. palmeri* (Small & Hickey, 1997) 以及高寒水韭 (*I. hypsophila*) (陈进明等,未发表数据) 的 PPB 在物种水平上较高 (> 50%),而在居群内部 PPB 却较低 (< 35%)。水韭属植物适应生长于贫营养环境中,如季节性浅池塘和酸性软水贫营养湖泊。然而,近年来,中华水韭栖息地的生

境特征发生了明显变化。人类活动如水产养殖、水稻耕作、旅游开发以及工业废水和生活污水的排放等均可引起水体碱化、硬化和富营养化以及底质碱化等,使中华水韭逐渐丧失了适生生境;另外,其他物种的入侵也导致中华水韭居群规模迅速减小(庞新安等 2003;Wen *et al.*, 2003)。野外调查发现浙江松阳居群(SY-1)只剩下 10 株左右,安徽休宁居群也不足 100 株。在中国,水韭属植物均处于濒危状态。野外调查发现,中国特有种云贵水韭(*I. yunguiensis*)仅存 1 个居群且个体数不足 50 株;中国特有种高寒水韭只有 6 个较小居群且零星分布;台湾水韭(*I. taiwanensis*)仅在我国台湾省存在 1 个居群。较小的居群规模很可能导致水韭属植物居群内个体间近交的发生,从而使居群内部的遗传多样性降低。当然,由于取样困难,本研究的取样数目偏少,这在一定程度上也会影响对中华水韭遗传多样性的评价。

3.2 中华水韭居群遗传分化

目前,对水韭属遗传分化的研究较少。Small 和 Hickey (1997) 采用等位酶标记对 *I. karstenii* 和 *I. palmeri* 的遗传变异水平及模式进行了研究;陈进明等(未发表数据)采用 RAPD 和 ISSR 标记对中国特有种高寒水韭进行了遗传变异研究。以上研究结果均表明居群间的遗传分化强于居群内部的遗传分化,作者认为有限的基因流以及日益缩小的种群规模而导致的遗传漂变等可能是这种遗传分化模式形成的原因。本实验的 4 个中华水韭自然居群间基因分化系数 $\Phi_{st} = 0.5894$,表明总的变异中有 58.94% 存在于居群间,居群内的遗传变异占总遗传变异的 41.06%。中华水韭采用孢子繁殖方式,孢子的传播一般要在水域相通条件下进行(孟繁松, 1998)。经调查发现,除松阳两居群距离较近外,中华水韭各居群之间呈间断的“岛屿”状分布。这种特殊的地理分布可能限制了种内居群间的随机交配,阻碍了居群间基因的流动,从而导致居群间基因多样性增大,使居群间遗传分化愈来愈明显,遗传距离愈来愈远。松阳的两个居群 SY-1 和 SY-2 具有较高的遗传相似性($I = 0.9906$),这两个居群生境之间的距离较近,位于同一座山两侧的山沟沼泽地。这两个居群间很可能存在一定程度上的基因交流,SY-1 群体也可能是 SY-2 群体的后裔群体或相反。另外,较小的居群规模很可能导致居群内遗传漂变的发生,从

而使得居群间分化加剧。

3.3 濒危原因及保护建议

中华水韭各居群内遗传多样性的丧失可能是物种濒危的后果,而不是导致濒危的原因。中华水韭的地理分布区相对狭小,种群之间相对隔离,种群内个体数偏少以及在特殊的生境中其生存力、竞争力不强,因此在自然群落中处于竞争劣势,人为或自然因素导致的生境改变,很可能造成中华水韭的种群衰退或消亡(庞新安等 2003)。对生物多样性最大的威胁是生境的丧失,保护生物多样性最关键的手段是保护生境(蒋志刚等, 1997; Ehrlich, 1988)。根据中华水韭物种水平上的遗传多样性较高而居群水平的遗传多样性较低以及中华水韭分布较为零散等特点,对中华水韭的保护应以就地保护为主,并且应该保护尽可能多的生境。由于中华水韭不同居群出现了一定程度的遗传分化,建议对不同自然居群内的个体进行植株相互移栽和育苗移栽,以提高不同居群间的基因交流,达到保护较高水平的遗传多样性的目的。

致谢:中国科学院植物研究所葛颂研究员以及本室杨春锋博士对初稿提出了宝贵意见,夏婧博士在实验过程中给予了帮助,特致谢忱。

参考文献

- Brauner, S., Crawford, D. J. and Stuessy, T. F. 1992. Ribosomal DNA and RAPD variation in the rare plant family Lactoridaceae. *American Journal of Botany*, **79**: 1436 - 1439.
- Chen, Y. Y. (陈媛媛), Ye, Q. G. (叶其刚) and Huang, H. W. (黄宏文). 2003. Preliminary study on allozyme analysis for *Isoetes sinensis* Palmer. *Journal of Wuhan Botanical Research* (武汉植物学研究), **21**: 91 - 94. (in Chinese with English abstract)
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material. *Phytochemical Bulletin*, **19**: 11 - 15.
- Ehrlich, P. R. 1988. The loss of diversity: causes and consequences. In: Wilson, E. O. and Peter, F. M. (eds.), *Biodiversity*. National Academy Press, Washington D. C., 21 - 27.
- Esselman, E. J., Li, J. Q., Crawford, D., Winduss, J. L. and Wolfe, A. D. 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative

- results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology*, **8**: 443 – 451.
- Excoffier, L. 1993. *Analysis of Molecular Variance (AMOVA) Version 1.55*. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Francis, C. Y. and Yang, R. C. 1999. *POPGENE Version 1.31*.
- Fu, C. X., Qiu, Y. X. and Kong, H. H. 2003. RAPD analysis for genetic diversity in *Changium smyrnioides* (Apiaceae), an endangered plant. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, **44**: 13 – 18.
- Hamrick, J. L., Godt, M. J. W., Murawski, K. 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, 75 – 86.
- Hao, R. M. (郝日明), Huang, Z. Y. (黄致远), Liu, X. J. (刘兴剑), Wang, Z. L. (王中磊), Xu, H. Q. (徐惠强) and Yao, Z. G. (姚志刚). 2000. The natural distribution and characteristics of the rare and endangered plants in Jiangsu, China. *Chinese Biodiversity (生物多样性)*, **8**: 153 – 162. (in Chinese with English abstract)
- He, Z. C. (何子灿), Cai, Q. (蔡清), Liu, H. T. (刘宏涛), Li, J. Q. (李建强) and Huang, H. W. (黄宏文). 2002. Chromosome number of *Isoetes sinensis* Palmer, a rare and endangered pteridophyte plant. *Journal of Wuhan Botanical Research (武汉植物学研究)*, **20**: 241 – 242. (in Chinese with English abstract)
- Jiang, Z. G. (蒋志刚), Ma, K. P. (马克平) and Han, X. G. (韩兴国). 1997. *Conservation Biology (保护生物学)*. Zhejiang Science and Technology Press, Hangzhou. (in Chinese)
- Liu, X. (刘星), Pang, X. A. (庞新安) and Wang, Q. F. (王青锋). 2003. Character and variation of chemical properties of the water in the natural habitats of three species of *Isoetes* in China. *Acta Phytocologica Sinica (植物生态学报)*, **27**: 510 – 515. (in Chinese with English abstract)
- Liu, X. (刘星), Wang, Y. (王勇), Wang, Q. F. (王青锋) and Guo, Y. H. (郭友好). 2002. Chromosome numbers of the Chinese *Isoetes* and their taxonomical significance. *Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报)*, **40**: 351 – 356. (in Chinese with English abstract)
- Li, X. D. (李晓东), Huang, H. W. (黄宏文) and Li, J. Q. (李建强). 2003. Genetic diversity of the relic plant *Metasequoia glyptostroboides*. *Biodiversity Science (生物多样性)*, **11**: 100 – 108. (in Chinese with English abstract)
- Meng, F. S. (孟繁松). 1998. Studies on *Annalepis* from Middle Triassic along the Yangtze River and its bearing on the origin of *Isoetes*. *Acta Botanica Sinica (植物学报)*, **40**: 768 – 774. (in Chinese with English abstract)
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**: 583 – 590.
- Pang, X. A. (庞新安), Liu, X. (刘星), Liu, H. (刘虹), Wu, C. (吴翠), Wang, J. Y. (王晶苑), Yang, S. X. (杨书香) and Wang, Q. F. (王青锋). 2003. The geographic distribution and habitat of the *Isoetes* plants in China. *Biodiversity Science (生物多样性)*, **11**: 288 – 294. (in Chinese with English abstract)
- Pang, X. A., Wang, Q. F., Gituru, W. R., Liu, H., Yang, X. L. and Liu, X. 2003. A preliminary study of crassulacean acid metabolism (CAM) in the endangered aquatic quillwort *Isoetes sinensis* Palmer in China. *Journal of Wuhan University (Natural Sciences)*, **8**: 445 – 448.
- Qian, W. (钱伟), Ge, S. (葛颂) and Hong, D. Y. (洪德元). 2000. Assessment of genetic variation of *Oryza granulata* detected by RAPDs and ISSRs. *Acta Botanica Sinica (植物学报)*, **42**: 741 – 750. (in Chinese with English abstract)
- Small, R. and Hickey, R. J. 1997. Levels and patterns of genetic variation in *Isoetes karstenii* with observations on *I. palmeri*. *American Fern Journal*, **87**: 104 – 115.
- Wang, X. Q. (汪小全), Zou, Y. P. (邹喻苹), Zhang, D. M. (张大明), Hong, D. Y. (洪德元) and Liu, Z. Y. (刘正宇). 1996. Genetic diversity analysis by RAPD in *Cathaya argyrophylla*. *Science in China (中国科学)*, **26**: 436 – 441. (in Chinese)
- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, **8**: 7213 – 7218.
- Wen, M. Z., Pang, X. A., Wang, Q. F. and Taylor, W. C. 2003. Relationships between the water chemistry and distribution of the endangered aquatic quillwort *Isoetes sinensis* Palmer in China. *Journal of Freshwater Ecology*, **18**: 361 – 367.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R. and Livak, K. J. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18**: 6531 – 6535.
- Yu, Y. F. (于永福). 1999. A milestone of wild plant conservation in China. *Plants (植物杂志)*, (5): 3 – 11. (in Chinese)