

勃氏甜龙竹 6 个云南地理种群的 ISSR 多样性分析

阮桢媛^{1,2} 杨汉奇² 田 波³ 杨宇明¹ 孙茂盛¹

(1 西南林学院资源学院 2 中国林业科学研究院资源昆虫研究所 3 中国科学院西双版纳热带植物园)

摘要:为了保护云南分布的勃氏甜龙竹种质资源,应用 ISSR 标记对勃氏甜龙竹 6 个云南代表性地理种群的遗传多样性和变异进行了研究。从 80 个引物中筛选出 7 个用于正式扩增,在调查的 6 个种群共 84 个样丛中检测到 73 个多态位点。研究结果表明:1) 云南分布的勃氏甜龙竹遗传多样性较高,在种群水平上,平均多态位点百分率 PPB = 13.38%,有效等位标记数 $N_e = 1.0906$,平均 Nei's 等位标记多样性指数 $H = 0.0507$,平均 Shannon 信息指数 $I = 0.0742$;在物种水平上,PPB = 96.05%, $N_e = 1.5304$, $H = 0.3130$, $I = 0.4714$ 。2) 种群间遗传分化水平高,种群间的遗传分化系数(G_{st})为 0.8427。3) Mantel 检测结果显示种群间遗传距离和地理距离之间没有显著的正相关性($r = 0.0244$, $P = 0.5740$)。推断人类活动的干扰、生境的片段化以及结实率低的生物学特性是导致勃氏甜龙竹种群稀少的主要因素。考虑到云南分布的勃氏甜龙竹遗传多样性和种群间遗传分化水平较高,但种群的个体数量较少,因此应该对勃氏甜龙竹所有种群以及个体实施及时的就地保护,在迁地保护时应在各种群内大量采样。

关键词: 勃氏甜龙竹;地理种群;遗传多样性;遗传分化;ISSR

中图分类号: S795;S718.46 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2010)02-0046-06

RUAN Zhen-yuan^{1,2}; YANG Han-qi²; TIAN Bo³; YANG Yu-ming¹; SUN Mao-sheng¹. **Genetic diversity analysis based on ISSR among six populations of *Dendrocalamus brandisii* in Yunnan Province, China.** *Journal of Beijing Forestry University* (2010)32(2) 46-51 [Ch, 25 ref.]

1 College of Resources, Southwest Forestry University, Kunming, 650224, P. R. China;

2 Research Institute of Resource Insects, Chinese Academy of Forestry, Kunming, 650224, P. R. China;

3 Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming, 650223, P. R. China.

In order to protect native germplasm resources of *Dendrocalamus brandisii* in Yunnan Province, China, inter-simple sequence repeat (ISSR) markers were used to assess the genetic diversity and differentiation among 84 clumps from six representative populations of *D. brandisii* in Yunnan. Seven informative and reliable primers were selected from 80 pre-screened primers and 73 ISSR polymorphic loci were obtained. ISSR markers revealed high genetic diversity among the populations of *D. brandisii*. At the population level, the percentage of polymorphic loci (PPB) was 13.38%, the effective number of alleles (N_e) 1.0906, the average Nei's (1972) gene diversity (H) index was 0.0507 and the average Shannon information index (I) 0.0742. At the species level, the corresponding values were 96.05% (PPB), 1.5304 (N_e), 0.3130 (H) and 0.4714 (I). A high level of genetic differentiation among populations was detected based on Nei's genetic diversity (84.27%). There was no correlation between genetic and geographic distance among populations. The effect of human activities, forest fragmentation and low fruiting rates may play prominent roles in the current declining state of *D. brandisii*. Given this

收稿日期: 2009-02-09

基金项目: 国际竹藤网络中心基本科研业务费专项资金项目 (06/07-D37)、"十一五"国家科技支撑计划项目 (2006BAD19B0301)、云南省科技厅联合支持国家科技项目 (2007GA014)、云南省竹藤科学创新团队项目。

第一作者: 阮桢媛。主要研究方向: 植物保护生物学。电话: 0871-3863190 Email: edith0727@126.com 地址: 650224 云南省昆明市白龙寺西南林学院资源学院。

责任作者: 杨汉奇, 博士, 副研究员。主要研究方向: 植物学、竹类种质资源保护和利用。电话: 0871-3862834 Email: yanghanqim@yahoo.com.cn 地址: 650224 云南省昆明市白龙寺中国林科院资源昆虫研究所

本刊网址: <http://www.bjfujournal.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

high genetic diversity and differentiation among the populations of *D. brandisii* in Yunnan , we suggest that all trees from all populations be protected for *in situ* conservation and enough samples be collected from all populations for *ex situ* conservation.

Key words *Dendrocalamus brandisii*; geographical population; genetic diversity; genetic differentiation; ISSR

勃氏甜龙竹(*Dendrocalamus brandisii*)主要分布于亚洲热带和南亚热带的缅甸、老挝、越南、泰国北部和我国云南省,其秆材和竹笋常用于建筑材料、竹纸浆以及笋制食品生产,是一种用途广泛、经济价值极高的大型丛生竹种^[1]。勃氏甜龙竹在云南主要分布于滇中、滇南和滇西南海拔 600 ~ 2 000 m 的河谷坡地;适生环境为年均温度 ≥ 16℃ , ≥ 10℃ 活动积温 ≥ 5 500℃ ,极端最低温 - 4℃ ,无霜期 300 d 以上且无重霜;年均降雨量 900 ~ 2 000 mm ,年均相对湿度 70%;尤以土层深厚、湿润肥沃的红壤、砂壤土地区长势最好^[2]。勃氏甜龙竹在自然条件下有性繁殖能力极弱,多为零星开花,在云南分布区内还未见结实的报道^[3],天然更新非常缓慢;同时由于日益强烈的人类活动干扰导致生境不断恶化,勃氏甜龙竹现存的天然种群十分稀少,亟需对其种质资源和天然种群进行保护。

ISSR(inter-simple sequence repeat)即简单重复间隔序列标记方法技术是近年来在简单序列重复(simple sequence repeat, SSR)技术上发展起来的一种新的分子标记技术^[4]。与 AFLP、RFLP、RAPD、SSR 等分子标记技术相比,ISSR 技术可以揭示更多的多态性,但比 SSR 技术简单,并且具有较高的稳定性和重复性,已经在遗传图谱构建^[5]、遗传多样性分析^[6-7]、种质资源鉴定^[8]等方面广泛应用。在近年竹子遗传多样性研究中多运用 RAPD 和 SSR 技术^[9-12],而 ISSR 技术的应用还少见报道,最近 Lin 等^[13]利用 ISSR 技术发现毛竹(*Phyllostachys pubescens*) 10 个栽培变型间具有很高的遗传相似性。本文旨在通过 ISSR 技术分析勃氏甜龙竹云南地理种群的遗传多样性及种群间的遗传分化,分析天然种群严重萎缩的原因,探讨种质资源保护措施。

1 材料与方法

1.1 材料

取样尽量覆盖勃氏甜龙竹在云南的整个分布范围,通过在其分布区广泛实地调查,我们选择了当地起源且人为干扰少的、代表了该竹种在云南竹类植物地理分布区划^[14]中 4 个分布区类型的 6 个近天然种群进行取样。每个种群根据竹丛的分布情况随机采样,每丛至少相距 50 m,根据种群大小,按照约 80% 的样品采集率各取样 8 ~ 20 丛,样品的采集地

点及编号见表 1 和图 1。所取样品为样丛的幼嫩竹叶,在野外迅速用硅胶干燥保存。

表 1 用于 ISSR 分析的 6 个勃氏甜龙竹种群
Tab. 1 Populations of *D. brandisii* for ISSR analyses

采集地	种群 编号	海拔/ m	纬度	经度	样本 数
金平县铜厂乡勐谢村	JP	1 672	22°49'37"N	103°01'40"E	8
新平县老厂乡竹园村	XP	1 206	24°08'24"N	101°38'43"E	20
石屏县大桥乡冲门口村	SP	1 452	23°44'31"N	102°26'43"E	20
宁洱县宁洱镇老王寨村	NE	1 363	23°05'15"N	101°02'10"E	20
西盟县勐梭镇上寨村	XM	1 080	22°37'58"N	99°37'20"E	8
沧源县芒卡镇芒岗村	CY	702	23°29'15"N	98°54'32"E	8

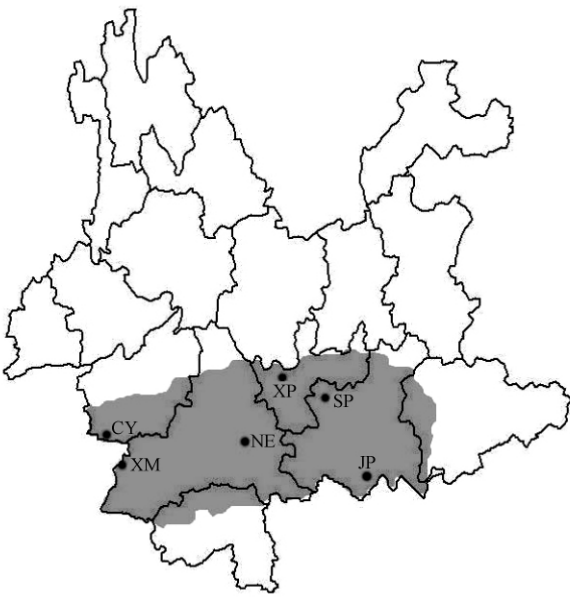


图 1 勃氏甜龙竹在云南的分布区(阴影部分)及 6 个种群的取样地点分布图
Fig. 1 Distribution of *D. brandisii* in Yunnan (shaded in the figure) and sampling locations of the six populations
注:种群编号同表 1。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

采集生长良好、无病虫害感染的幼嫩竹叶并用硅胶保存,参照 CTAB 法^[15]分别提取各样丛总 DNA,在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳 30 ~ 40 min。DNA 浓度和纯度用分光光度计检测,波长 260 ~ 280 nm,OD 值在 1.8 ~ 1.9 之间,表明所提的 DNA 纯度高,可用于 ISSR 扩增反应。所提取的 DNA 放于 - 20℃ 冰箱中保存。

1.2.2 引物筛选与 PCR 扩增反应

所用引物系列为加拿大哥伦比亚大学 UBC 公司公布的第 9 套 ISSR 引物序列 (http://www.biotech.ubc.ca/services/NAPS/Primer_Sets/Primers.pdf) ,由上海生工合成。引物筛选时每个种群随机挑选 2 个模板在 25 μ L 的反应体系中进行 重复 3 次。

PCR 反应在 ABI Verity 梯度 PCR 仪上进行。25 μ L 反应体系包括: 10 $\times$ Buffer (100 mmol/L Tris-HCl ,pH =8.8;500 mmol/L KCl) 2.5 μ L ,5 U/ μ L 的 Taq DNA 聚合酶(Fermentas)0.5 μ L ,25 mmol/L 的 MgCl₂ 1.8 μ L ,10 mmol/L 的 dNTPs (TAKARA ,宝生物工程(大连)有限公司)2.5 μ L ,10 μ mol/L 的引物(上海生工生物工程有限公司)1.5 μ L ,DMSO 0.5 μ L ,50 ng/ μ L 的模板 DNA 0.7 μ L ,以及 ddH₂O 15 μ L。

扩增程序:94 $^{\circ}$ C 5 min ,1 个循环;94 $^{\circ}$ C 45 s ,53~55 $^{\circ}$ C (温度依引物不同而改变)1 min ,72 $^{\circ}$ C 2 min ,40 个循环;72 $^{\circ}$ C 7 min ,1 个循环。

1.2.3 PCR 产物的凝胶电泳

PCR 扩增产物在 1.6% 的琼脂糖凝胶上电泳 (0.5 $\times$ TBE ,5V/cm) 分离 ,以 100 bp DNA Ladder Marker (100~3 000 bp) (Fermentas) 作标记估算扩增片断大小 ,溴化乙锭(EB) 染色后在凝胶成像系统 (UPV) 上成像 观察并记录 每个样本重复测定 2 次。

1.2.4 数据分析

电泳图谱中每一扩增条带代表引物的一对结合位点且视为有效的分子标记。同一引物的扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性 ,依据 ISSR 标记判读电泳图谱中扩增产物的有无及其分子量大小 ,将电泳图谱中清晰的条带记作“1” ,否则记作“0” ,建立 0/1 数据矩阵。种群遗传参数的统

计基于每个标记条带具有 2 个等位标记位点(1 和 0)的假设^[16-17]。应用 POPGENE 1.32^[18] 软件计算多态性位点百分率 (PPB)、Nei's 等位标记多样性指数 (H)、Shannon 多态性信息指数 (I)、总的等位标记多样性 (H_t)、种群内等位标记多样性 (H_s)、等位标记分化系数 (G_{st})、基因流 (N_m)、Nei's 遗传距离;应用 NTSYS-PC V2.11C 软件用 UPGMA 方法进行聚类分析;应用 TFPGA1.3 软件进行种群间遗传距离和地理距离的 Mantel 相关性检测。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果

用 CTAB 法提取的 6 个种群的勃氏甜龙竹 DNA 纯度较好 ,DNA 片段大小较一致。利用 UV2550 紫外分光光度计检测提取的总 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值为 1.8~2.0 ;0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测结果显示 DNA 条带清晰 ,无降解和 RNA 污染 ,适合于 ISSR 标记分析。

2.2 引物筛选结果

从 80 个引物中选取 7 个扩增条带清晰、重复性好的引物(表 2)用于全部样品的 PCR 扩增、全部 6 个种群样本分析 ,部分引物的扩增结果如图 2、3。

表 2 优选的 ISSR 引物序号、序列和扩增条带数		
Tab.2 ISSR primers and number of amplified bands		
引物序号	序列 (5'-3')	条带数
807	(AG) ₈ T	21
810	(GA) ₈ T	24
836	(AT) ₈ YA	27
840	(GA) ₈ YT	14
850	(GT) ₈ YC	20
855	(AC) ₈ YT	12
857	(AC) ₈ YG	17

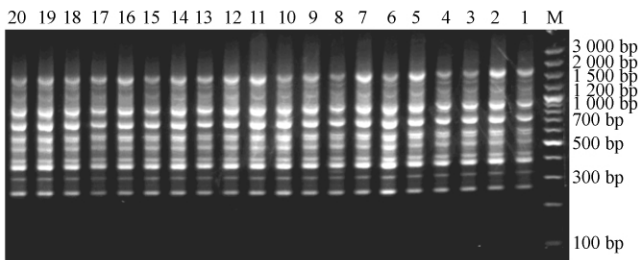


图 2 引物 810 对勃氏甜龙竹 XP 种群样品的扩增样式

Fig.2 ISSR bands of Xinping population of *D. brandisii* amplified with primer 810

2.3 遗传多样性和遗传分化分析

在检测到的所有清晰且重复性好的 76 个有效位点中有 73 个多态位点。分析结果表明:在物种水平上 ,勃氏甜龙竹具有较高的多态位点百分率 (PPB = 96.05%)、平均每个位点的有效等位标记数 $N_e = 1.530 4 \pm 0.328 3$,Nei's 等位标记多样性

指数 $H = 0.313 0 \pm 0.161 0$,Shannon 信息指数 $I = 0.471 4 \pm 0.210 2$ (表 3)。在种群水平上 ,各个种群的平均多态位点百分率 (PPB) 差异较大 (1.32%~35.53%) ,平均值为 13.38% ,平均每个位点的有效等位标记数 (N_e) 为 $1.090 6 \pm 0.216 8$,平均 Nei's 等位标记多样性指数 (H) 为 $0.050 7 \pm$

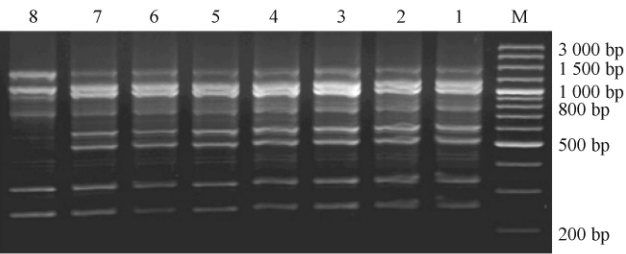


图 3 引物 840 对勃氏甜龙竹 CY 种群样品的扩增样式

Fig.3 ISSR bands of Cangyuan population of *D. brandisii* amplified with primer 840

表 3 勃氏甜龙竹 6 个种群的遗传多样性						
Tab.3 Genetic variation in six populations of <i>D. brandisii</i>						
种群编号	等位标记观察值 N_a	有效等位标记数 N_e	Nei's 等位标记多样性 H	Shannon 信息指数 I	多态位点百分率 PPB/%	
XM	1. 039 5 ± 0. 196 0	1. 031 5 ± 0. 156 9	0. 017 5 ± 0. 086 9	0. 025 1 ± 0. 124 5	3. 95	
JP	1. 144 7 ± 0. 354 2	1. 110 5 ± 0. 279 8	0. 061 5 ± 0. 153 2	0. 088 8 ± 0. 219 7	14. 47	
XP	1. 184 2 ± 0. 390 2	1. 126 5 ± 0. 292 3	0. 071 4 ± 0. 160 4	0. 104 3 ± 0. 230 8	18. 42	
NE	1. 065 8 ± 0. 249 6	1. 044 3 ± 0. 190 6	0. 024 2 ± 0. 101 5	0. 035 2 ± 0. 144 5	6. 58	
SP	1. 013 2 ± 0. 114 7	1. 001 4 ± 0. 012 4	0. 001 3 ± 0. 011 2	0. 002 7 ± 0. 023 2	1. 32	
CY	1. 355 3 ± 0. 481 8	1. 229 1 ± 0. 369 0	0. 128 1 ± 0. 197 4	0. 188 8 ± 0. 280 1	35. 53	
物种水平	1. 960 5 ± 0. 196 0	1. 530 4 ± 0. 328 3	0. 313 0 ± 0. 161 0	0. 471 4 ± 0. 210 2	96. 05	
种群水平	1. 133 8 ± 0. 297 8	1. 090 6 ± 0. 216 8	0. 050 7 ± 0. 118 4	0. 074 2 ± 0. 170 4	13. 38	

用 POPGENE 计算出的遗传变异分析结果(表 4)表明,勃氏甜龙竹种群间存在着较高的遗传分化。6 个云南种群总遗传多样性 $H_t=0.280\ 0$,其中种群内遗传多样性 $H_s=0.038\ 2$ 种群间的平均等位标记多样度($D_{st}=H_t-H_s$)为 0.241 8。Nei 的等位标记分化系数 $G_{st}=0.842\ 7$,表明有 84.27% 的遗传变异存在于种群间,种群内的遗传变异为 15.73% 种群间的遗传分化明显大于种群内的遗传分化。种群间的基因流(N_m)为 0.093 3,基因流小。

表 4 勃氏甜龙竹 6 个种群等位标记多样性 Nei's 分析				
Tab.4 Nei's (1972) genetic diversity in six populations of <i>D. brandisii</i>				
	总等位标记多样性 H_t	种群内等位标记多样性 H_s	等位标记分化系数 G_{st}	基因流 N_m
平均	0.280 0	0.038 2	0.842 7	0.093 3
标准差	0.027 8	0.003 2		

2.4 遗传距离与聚类分析

本研究中 6 个勃氏甜龙竹种群之间的遗传距离为 0.048 4~0.697 6,大部分在 0.4~0.7 之间,石屏种群和沧源种群的遗传距离最远,为 0.697 6,西盟种群和金平种群的遗传距离最近,为 0.048 4;值得注意的是,沧源种群与另外 5 个种群的遗传距离都大于 0.55,显示它们之间产生了相当大的遗传分化(表 5)。根据 Nei's 遗传距离进行 UPGMA 聚类分析显示 6 个勃氏甜龙竹种群聚成一支(图 4)。种群间遗传距离和地理距离的相关性检测显示,地理距离和遗传距离不存在显著的正相关关系($r=$

0.118 4,平均 Shannon 信息指数(I)为 0.074 2 ± 0.170 4(表 3)。

Shannon 信息指数显示各种群的遗传变异依次为沧源(CY) > 新平(XP) > 金平(JP) > 宁洱(NE) > 西盟(XM) > 石屏(SP)(表 3),与 PPB 值分析的结果一致。各种群间的遗传多样性差别较大:其中沧源种群(CY)的遗传多样性水平最高(PPB = 35.53% $N_e=1.229\ 1$ $H=0.128\ 1$ $I=0.188\ 8$);石屏种群(SP)的遗传多样性水平最低(PPB = 1.32% , $N_e=1.001\ 4$ $H=0.001\ 3$ $I=0.002\ 7$)(表 3)。

0.024 4, $P=0.574\ 0$)(表 5)。

表 5 勃氏甜龙竹 6 个种群遗传距离(对角线下方)以及遗传距离和地理距离相关性的 Mantel 检验						
Tab.5 Genetic distance (below diagonal) and Mantel test (above diagonal) for six populations of <i>D. brandisii</i>						
种群编号	XM	JP	XP	NE	SP	CY
XM		375	280	186	319	133
JP	0.048 4		243	213	130	466
XP	0.089 9	0.122 6		120	114	302
NE	0.413 9	0.437 1	0.293 3		134	255
SP	0.568 1	0.516 9	0.443 6	0.643 6		380
CY	0.591 6	0.578 7	0.555 1	0.638 1	0.697 6	

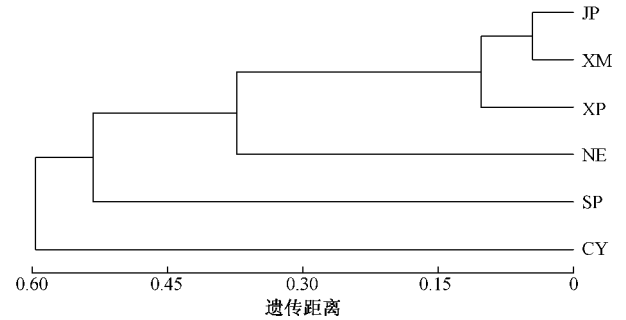


图 4 勃氏甜龙竹 6 个种群 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类图

Fig.4 UPGMA dendrogram for six populations of *D. brandisii* based on Nei's genetic distance

3 结论与讨论

勃氏甜龙竹在云南虽然仅分布于热带和南亚热带区域,却具有很高水平的遗传多样性(在种群水平上,PPB = 13.38% $N_e=1.090\ 6$ $H=0.050\ 7$ $I=$

0.074 2; 在物种水平上, $PPB = 96.05\%$ 、 $N_e = 1.530 4$ 、 $H = 0.313 0$ 、 $I = 0.471 4$)。尽管木本竹子的起源和演化还没有可靠的化石资料, 吴征镒等^[19]推测竹子起源于第三纪劳亚古陆的热带地区, 而该地区自第三纪以来没有遭受大的地质灾害的影响, 气候温暖湿润, 为勃氏甜龙竹等热带竹子的生长繁衍提供了优越的条件。因此, 我们推测勃氏甜龙竹拥有一个广泛连续分布且具有丰富遗传基础的祖先, 其祖先丰富的总体遗传多样性一直保留在现存的勃氏甜龙竹种群中。本研究中宁洱、西盟和石屏种群的遗传多样性较低 (PPB 为 $1.32\% \sim 6.58\%$), 可能是因为 3 个种群由于人为干扰的日益频繁, 生境恶化状况加剧, 使得各种群的个体数目过小, 在预定的取样间距下可采集的样本数少, 影响了样本抽样的结果。

Nybom^[20]总结了 158 份 RAPD、27 份 AFLP、13 份 ISSR 等多项植物遗传多样性研究结果, 得出的 G_{st} 平均值分别 0.27、0.21 和 0.34。与 Nybom 所得出的平均值相比, 勃氏甜龙竹云南 6 个种群呈现出了种群间遗传分化大的特点 ($G_{st} = 0.842 7$)。云南分布的勃氏甜龙竹具有较高水平的群体分化可能原因: 随着人类活动的日益频繁, 生境的片段化不断加剧, 形成了一些不连续分布的种群, 使得各种群的个体数目和分布范围变小。另一方面, 木本竹子具有特殊的繁殖生物学特性: 1) 竹类植物具有独特的开花习性, 即一个生命周期只开一次花, 开花周期长达几十年甚至上百年, 一株开花后同一个种同一起来的所有克隆植株均陆续开花, 开花后绝大多数植株将死亡; 2) 在传粉生物学方面, 竹子为风媒传粉植物, 但在野外多为零星开花, 其花粉的传播也是有限的, 而且大部分竹子花粉存在大量败育现象^[21]。虽然勃氏甜龙竹繁育系统的研究尚未见报道, 但云南分布区内的勃氏甜龙竹在自然条件下有性繁殖能力极弱, 多为零星开花且不结实^[3], 使得其不能实现种子的传播, 影响了基因流的形成, 导致其种群间个体迁移率小、基因流小 ($N_m = 0.093 3$)。现代越来越多的研究证明, 基因流强弱对于群体遗传分化具有重要影响^[22], Wright^[23]指出, 如果 $N_m < 1$, 则很容易发生遗传漂变, 并可以导致居群间明显的遗传分化, 因此遗传漂变可能是影响勃氏甜龙竹种群间遗传分化的重要因素之一。

尽管勃氏甜龙竹在云南的分布可细划为 4 个地理分布区^[14], 但本文 Mantel 检测结果显示勃氏甜龙竹种群间遗传距离和地理距离之间同样没有显著的正相关性 ($r = 0.024 4$, $P = 0.574 0$), 这一点也可以从勃氏甜龙竹取样种群分布图和 UPGMA 聚类图看

出。地理距离较远的金平 (JP) 和西盟 (XM) 种群间的遗传距离最近; 而地理距离最近的沧源 (CY) 和西盟 (XM) 种群间的遗传距离在 6 个取样种群间处于较高的水平。因此, 地理隔离对勃氏甜龙竹种群遗传分化没有显著影响。

我们推测勃氏甜龙竹天然种群不断萎缩的主要原因是原生境片段化且地理隔离和人类干扰加剧的结果。人类活动导致森林片段化, 勃氏甜龙竹生境恶化甚至丧失, 可能使原来广泛连续分布的高水平遗传多样性的大种群片段化分布退化为地理隔离、范围狭小的各个小种群; 栖息地的变小造成种群内个体数量减少, 再加上木本竹子开花周期长、花粉败育率高、结实率低的生物学特性, 可能进而导致基因流水平下降和遗传漂变, 从而使得勃氏甜龙竹种群间的遗传分化加大。作为云南地区重要的经济竹种以及推广栽培优先发展的竹种, 保护好勃氏甜龙竹的种质资源对于云南竹产业的发展具有重要的现实意义。参照其他物种保护遗传学结果^[24-25], 我们提出以下保护建议: 1) 针对勃氏甜龙竹总体遗传多样性水平高, 但种群数量和各种群个体数量都较少的现状, 对现存所有种群的所有个体实施有效地就地保护, 尤其是遗传多样性最高的沧源种群和遗传多样性水平较低但个体数量较少的西盟等种群, 应该得到林业部门的特别重视; 2) 由于各种群间存在高水平的遗传分化, 因此有必要采用不同种群间进行混合繁殖和相互移植的方法, 以提高其遗传多样性水平。

参 考 文 献

- [1] 耿伯介, 王正平. 中国植物志: 第 9 卷第 1 分册 [M]. 北京: 科学出版社, 1996: 189-190.
- [2] 杨宇明, 辉朝茂. 优质笋用竹产业化开发 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1998: 98-103.
- [3] 杜凡, 薛嘉榕, 杨宇明, 等. 15 年来云南竹子的开花现象及其类型的研究 [J]. 林业科学, 2000, 36(6): 57-68.
- [4] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)—anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.
- [5] BORNET B, BRANCHARD D. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2001, 19: 209-215.
- [6] LUAN S, CHIANG T Y, GONG X. High genetic diversity vs. low genetic differentiation in *Nouelia insignis* (Asteraceae), a narrowly distributed and endemic species in China, revealed by ISSR fingerprinting [J]. *Annals of Botany*, 2006, 98 (3): 583-589.
- [7] 金则新, 李钧敏, 李增鸿. 浙江仙居长叶榧自然种群遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 北京林业大学学报, 2007, 29(1): 53-59.

[8] ESCANDON A S , ZELENER N , DE LA TORRE M P , *et al.* Molecular identification of new varieties of *Nierembergia linariaefolia* (Graham) , a native Argentinean ornamental plant [J]. *Journal of Applied Genetics* , 2007 , 48 (2) : 115–123.

[9] 李鹏 杜凡 普晓兰 ,等. 巨龙竹种下不同变异类型的 RAPD 分析 [J]. *云南植物研究* , 2004 , 26 (3) : 290–296.

[10] DAS M , BHATTACHARYA S , PAL A. Generation and characterization of SCARs by cloning and sequencing of RAPD products: A strategy for species-specific marker development in bamboo [J]. *Annals of Botany* , 2005 , 95 (5) : 835–841.

[11] NAYAK S , ROUT G R. Isolation and characterization of micro satellites in *Bambusa arundinacea* and cross species amplification in other bamboos [J]. *African Journal of Biotechnology* , 2005 , 4 (2) : 151–156.

[12] BHATTACHARYA S , DAS M , BAR R , *et al.* Morphological and molecular characterization of *Bambusa tulda* with a note on flowering [J]. *Annals of Botany* , 2006 , 98 (3) : 529–535.

[13] LIN X C , RUAN X S , LOU Y F , *et al.* Genetic similarity among cultivars of *Phyllostachys pubescens* [J]. *Plant Systematics and Evolution* , 2009 , 277 (1) : 67–73.

[14] 杨宇明 辉朝茂 薛嘉榕 ,等. 云南竹类植物地理分布区划研究 [J]. *竹子研究汇刊* , 1999 , 18 (2) : 19–28.

[15] DOYLE J J , DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material [J]. *Phytochemistry Bulletin* , 1987 , 19 : 11–15.

[16] WILIAMS 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) : 6531–6535.

[17] 钱韦 葛颂. 群体遗传结构研究中显性标记数据分析方法初探 [J]. *遗传学报* , 2001 , 28 (3) : 244–255.

[18] YEH F C , YANG R C , BOYLE T. *et al.* *Microsoft windows-based freeware for population genetic analysis* [M]. Edmonton , Canada: Molecular Biology and Biotechnology Center , University of Alberta , 1999.

[19] 吴征镒 路安民 汤彦承 ,等. 中国被子植物科属综论 [M]. 北京: 科学出版社 2003 : 325–328.

[20] NYBOM H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plant [J]. *Molecular Ecology* , 2004 , 13 : 1143–1155.

[21] 张文燕 马乃训 陈红星. 竹类花粉形态及萌发试验 [J]. *林业科学研究* , 1989 , 2 (1) : 67–70.

[22] HARTL D L , CLARK A G. *Principle of population genetics* [M]. Sunderland , Massachusetts: Sinauer Associates , 1997.

[23] WRIGHT S. The genetic structure of populations [J]. *Annals of Eugenics* , 1951 , 15 : 323–354.

[24] LI Q M , XU Z F , HE T H. *Ex situ* conservation of endangered *Vatica guangxiensis* (Dipterocarpaceae) in China [J]. *Biological Conservation* , 2002 , 106 : 151–156.

[25] 陈俊秋 慈秀芹 李巧明 ,等. 樟科濒危植物思茅木姜子遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. *生物多样性* , 2006 , 14 (5) : 410–420.

(责任编辑 董晓燕)