

云南西双版纳地区羽叶金合欢的遗传多样性研究

高洁^{1,2} 李巧明^{1*}

1 (中国科学院西双版纳热带植物园植物系统与保护生物学实验室, 昆明 650223)

2 (中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 羽叶金合欢(*Acacia pennata*)是一种重要的经济植物。本研究使用微卫星(SSR)分子标记技术对分布于云南西双版纳地区的7个羽叶金合欢自然居群进行了遗传多样性和居群遗传结构的研究,旨在从分子水平探讨其自然居群的遗传多样性,制定科学的保护策略,为今后的持续利用提供科学依据。我们用筛选出的6对SSR引物对采自7个自然居群的124个个体进行了扩增,共检测到23个等位基因。平均观察等位基因数(N_a)为3.381,有效等位基因数(N_e)为2.460,平均期望杂合度(H_e)为0.573, Nei's多样性指数(h)为0.567。其中景洪居群具有较高的遗传多样性,曼腊居群遗传多样性相对较低。遗传分化系数 F_{ST} 仅为0.113。结果表明羽叶金合欢的自然居群具有较高的遗传多样性水平,居群间分化较小,遗传变异主要来源于居群内。羽叶金合欢为多年生植物,分布范围广泛,这可能是其具有较高水平遗传多样性的原因;同时其繁育系统可能为异交,种子可远距离传播,这些特性也可能导致其较高的遗传多样性水平和较低的居群遗传分化。我们建议在对羽叶金合欢进行迁地保护时,要在遗传多样性较高的居群内进行大量取样,同时也要对不同居群进行取样。

关键词: *Acacia pennata*, SSR, 遗传多样性, 遗传分化

Genetic diversity of natural populations of *Acacia pennata* in Xishuangbanna, Yunnan

Jie Gao^{1,2}, Qiaoming Li^{1*}

1 Laboratory of Plant Phylogenetics and Conservation Biology, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223

2 Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049

Abstract: *Acacia pennata* is an economically important plant that is used for timber and food by the local people in Xishuangbanna, Yunnan. The objectives of this study were to evaluate the genetic diversity and genetic differentiation of natural populations and present a scientific framework for the conservation and utilization of *A. pennata*. We estimated the genetic diversity and genetic structure of seven natural populations in Xishuangbanna using SSR techniques. A relatively high level of genetic diversity was detected in *A. pennata* using six polymorphic microsatellite loci. Based on six primers, 23 alleles were detected. Average (N_a) and effective (N_e) number of alleles were 3.381 and 2.460, respectively. The mean expected heterozygosity (H_e) was 0.573 and Nei's diversity index (h) was 0.567. The highest genetic diversity was found in Jinghong population, while the lowest was found in Manla population. The majority of genetic variation occurred within populations and could have resulted from low genetic differentiation ($F_{ST} = 0.113$). *Acacia pennata* is a perennial species with a wide distribution; these characteristics could account for the relatively high genetic diversity we observed. Furthermore, this species has an outcrossing breeding system and its seeds are widely dispersed, a situation amenable to high genetic diversity and low levels of genetic differentiation among populations. Therefore, we should focus on sampling more individuals from populations with higher genetic diversity and sampling different populations for *ex-situ* conservation of *A. pennata*.

Key words: *Acacia pennata*, SSR, genetic diversity, genetic differentiation

收稿日期: 2007-10-17; 接受日期: 2008-01-21

基金项目: 中国科学院方向性项目(KSCX2-YW-Z-0021); 中国科学院知识创新工程青年人才领域前沿项目

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: lqm@xtbg.ac.cn

羽叶金合欢(*Acacia pennata*)又名臭菜, 豆科金合欢属大型木质藤本植物, 分布于中国的云南、广东、福建、广西以及印度东部、中南半岛和非洲。喜温耐热, 多分布在海拔1,900 m以下的低山丘陵、村寨附近或林地边。其嫩叶、根及树皮均具有药用价值, 茎可作木材。臭菜营养丰富, 特别是蛋白质、氨基酸含量高, 风味独特, 具有较高的经济价值(许又凯等, 2004)。长期以来, 云南东南部及南部地区的红河、文山、西双版纳和广西西部等地区以及邻近的老挝、缅甸和泰国的许多民族均食用臭菜, 使其成为当地最具特色的野生木本蔬菜。近年来, 由于人类的过度采伐, 大面积的野生臭菜林已经很少见到, 只有少数的零星分布。因此对其遗传资源的研究及保护工作已十分必要。目前, 对于臭菜的研究主要包括民族植物学、扦插繁殖、人工栽培(王洁如和龙春林, 1995; 潘奇, 2004)、营养成分分析等方面(许又凯等, 2004), 关于其遗传多样性方面的研究未见报道。

由Moore等(1991)创立的SSR分子标记为中性, 呈共显性的孟德尔式遗传(Levinson & Gutman, 1987), 可检测到较多的等位基因位点。目前SSR分

子标记技术已广泛应用于水稻(杨庆文等, 2005)、大豆(赵洪锟等, 2001)、玉米(段运平等, 2006)等经济作物以及其他植物(徐小林等, 2004; 姜志磊等, 2005; 张金然等, 2006)的遗传多样性及种质资源保存的研究中。本研究利用SSR分子标记技术对分布于我国云南省西双版纳地区的7个羽叶金合欢自然居群的遗传多样性进行分析, 探讨其遗传资源保存策略, 并为今后的持续利用提供科学依据。

1 材料和方法

对云南西双版纳地区的大渡岗、大勐龙、普文、景洪、勐仑、勐腊和曼腊共7个羽叶金合欢自然居群进行了随机采样, 各个居群的位置和采样个体数详见表1。所取样品均为新鲜叶片, 在野外迅速用硅胶干燥保存。

1.1 DNA的提取

我们对Zeng等(2002)的方法做了稍许修改, 增加了1.5 mL Buffer I, 6 μ L β -巯基乙醇和材料冰浴的步骤, 洗去杂质后所得DNA质量明显提高, 杂质减少。详见高洁和李巧明(2008)。

表1 羽叶金合欢自然居群的采样数目及位置

Table 1 Locations and sample size of natural populations of *Acacia pennata*

居群代号 Population code	采样地 Origin	经纬度 Location	样本量 Sample size	生境 Habitat	伴生种 Companion species
大渡岗 DDG	景洪市大渡岗 Dadugang, Jinghong City	100.91° E 22.50° N	17	山脚、沟谷 Mountain foot, ravine forest	绒毛番龙眼 <i>Pometia tomentosa</i> 千果榄仁 <i>Terminalia myriocarpa</i>
大勐龙 DML	勐海县大勐龙 Damenglong, Menghai County	100.50° E 21.50° N	20	沟谷林 Ravine forest	番龙眼 <i>P. pinnata</i> 油朴 <i>Celtis wightii</i> 轮叶戟 <i>Lasiococca comberi</i> var. <i>pseudoverticillata</i>
普文 PW	景洪市普文 Puwen, Jinghong City	101.38° E 22.55° N	15	沟谷林 Ravine forest	毛麻楝 <i>Chukrasia tabularis</i> var. <i>velutina</i> , 油朴 <i>Celtis wightii</i>
景洪 JH	景洪市勐罕 Menghan, Jinghong City	100.78° E 21.93° N	18	沟谷林、低山 Ravine forest, hill	番龙眼 <i>P. pinnata</i> 油朴 <i>Celtis wightii</i> 轮叶戟 <i>Lasiococca comberi</i> var. <i>pseudoverticillata</i>
勐仑 MDJ	勐腊县勐仑 Menglun, Mengla County	101.25° E 21.91° N	20	石灰山、山脚 Limestone forest, mountain foot	尖叶闭花木 <i>Cleistanthus sumatranus</i> 轮叶戟 <i>Lasiococca comberi</i> var. <i>pseudoverticillata</i>
勐腊 BB	勐腊县补蚌 Bubeng, Mengla County	101.63° E 21.53° N	17	河边、沟谷林 River bank, ravine forest	云南厚壳桂 <i>Cryptocarya yunnanensis</i> 白颜树 <i>Gironniera subaequalis</i>
曼腊 ML	勐腊县曼腊 Manla, Mengla County	101.50° E 22.21° N	17	低中山坡、沟谷林 Mountain slope, ravine forest	长果木棉 <i>Bombax insigne</i> 一担柴 <i>Colona floribunda</i> 翅果刺桐 <i>Erythrina subumbrans</i>
总计 Total			124		

1.2 引物筛选与PCR扩增

随机选取2个样品, 从来源于金合欢属其他种马占相思(*A. mangium*) (Butcher, 2000)、阿拉伯金合欢(*A. nilotica* ssp. *indica*) (Wardill et al., 2004), 大叶相思(*A. auriculiformis*) (Ng et al., 2005)和短穗金合欢 (*A. brevispica* subsp. *dregeana*) (Otero-Arnaiz et al., 2005) 的82对引物中筛选出11对有扩增产物且扩增条带清晰的引物。每个居群随机选取3个样品, 再从中筛选出6对多态性较好的引物用于所有个体的研究。其中引物P4、P5来自金合欢属植物*A. mangium*, 引物P9、P11、P18来自*A. mangium*×*A. auriculiformis*, 引物P13来自*A. brevispica*。引物序列及退火温度见表2。

PCR 扩增及反应体系详见高洁和李巧明(2008)。

1.3 PCR产物检测

4 μL 扩增产物中加入4 μL 3×Loading-buffer, 94℃变性5 min后置于冰上待用。采用凝胶浓度6%的变性聚丙烯酰胺凝胶系统, 电泳仪为Bio-Red公司的Power Pac-3000, 缓冲液为1×TBE。80 W预电泳1.5 h, 然后110 W电泳2.5 h。

卸胶后用10%乙醇、1%冰乙酸固定3 min; 去离子水漂洗5–10 s; 用提前预冷的0.2%硝酸银染色5 min; 去离子水漂洗5–10 s; 最后将胶板置于3%氢氧化钠和0.1%的37%甲醛中充分摇动, 摇至所有条带都清晰可见; 去离子水漂洗两次, 然后晾干。

1.4 数据处理与分析

每对SSR引物检测一个位点, 视每条多态性带为一个等位基因, 在相同迁移率位置上有带记为1, 无带记为0。采用GenALEX软件(Peakall & Smouse, 2001)计算物种水平和居群水平的等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观察杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、Nei's基因多样性(h)、基因分化系数(F_{ST})、近交系数(F_{IS}) (Weir & Cockerham, 1994), Nei's 遗传距离和遗传一致度; 采用Li和Horvitz(1953)的方法检验等位基因频率是否偏离Hardy-Weinberg平衡。按照Wright(1951)的 F_{ST} 方法计算反映基因流强度的居群每代迁移数(N_m), 其公式为 $N_m = (1-F_{ST})/4F_{ST}$ 。在此, F_{ST} 可认为等同于 G_{ST} (Nei, 1987)。

运用DCFA 1.1(张富民和葛颂, 2002)对SSR表型数据矩阵进行计算, 得到表型间的距离系数, 组成WINAMOVA所需要的距离文件(.dis), 然后运用WINAMOVA(Excoffier, 1993)对居群间和居群内的遗传变异进行分析, 得出变异组分、变异百分率和遗传分化系数。

根据GenALEX计算得到的Nei's遗传距离和遗传一致度, 运用NTSYS-pc 2.10e软件中的UPGMA方法进行聚类, 分析各居群之间的遗传关系。

运用TFPGA 1.3(Miller, 1997)软件进行Mantel检验, 检测居群间的遗传距离和地理距离间的相关性。

表2 筛选出的用于羽叶金合欢扩增的SSR引物序列及退火温度

Table 2 Primer sequences, annealing temperature of PCR amplification for *Acacia pennata*

引物 Primer	引物序列(5'-3') Sequence	退火温度 Annealing temperature (°C)	原始编号 Original code	引物来源 Source	参考文献 References
P4	GTCGCGTACACAGACACAGT GGCGCACCTCTCTCTCTCT	50	Am367	<i>Acacia mangium</i>	Butcher et al.(2000)
P5	GGCGCAACTCTCTCTCTCTCT TTGGTCACTTAGCGCATGCC	48	Am429	<i>A. mangium</i>	Butcher et al.(2000)
P9	GAGGTAATATTTTGAATTCCTTGAAC GGTGTATACCTCTTTCCTGTGG	48	AH08	<i>A. mangium</i> <i>A. auriculiformis</i>	Ng et al.(2005)
P11	CGCAACTCCATCTGATTACTG TTATGTTGGGTTAATACGCTAACTG	46	AH18	<i>A. mangium</i> <i>A. auriculiformis</i>	Ng et al.(2005)
P13	GTGAAGGCTCTCTCTCTCTCT GGAGATGGATAGAGATGGCC	48	Ab22	<i>A. brevispica</i>	Otero-Arnaiz et al.(2005)
P18	GTCGCGTACACAGACACAGT GGCGCACCTCTCTCTCTCTCT	50	AH37	<i>A. mangium</i> <i>A. auriculiformis</i>	Ng et al.(2005)

2 结果

2.1 SSR-PCR扩增结果

6对引物在羽叶金合欢居群全部样品中均扩增出了清晰的条带,并且具有很好的重复性。所得片段在100–300 bp之间。

2.2 遗传多样性

微卫星标记在羽叶金合欢居群中检测出较高的多态性。在物种水平上,6个位点上共扩增出23个等位基因。每个位点等位基因数(N_a)为2.000–5.286,平均为3.381,有效等位基因数(N_e)为1.877–3.113,平均为2.460。Nei's基因多样性指数 $h = 0.644$,平均期望杂合度 $H_e = 0.573$,平均观察杂合度 $H_o = 0.483$ (表3)。

在居群水平上,每个位点等位基因数(N_a)为3.000–3.670,平均为3.381,有效等位基因数(N_e)为

1.920–2.809,平均为2.460。Nei's基因多样性指数 $h = 0.567$,平均期望杂合度 $H_e = 0.592$,平均观察杂合度 $H_o = 0.494$ (表4)。

Nei's基因多样性指数显示了各居群的遗传变异(表4)由高到低依次是景洪(JH)>大勐龙(DML)>勐仑(MDJ)>勐腊(BB)>大渡岗(DDG)>普文(PW)>曼腊(ML)。此结果与期望杂合度分析的结果基本一致。其中景洪居群相对于其他居群具有相对较高的遗传多样性水平($h = 0.628$, $H_e = 0.805$, $N_e = 2.809$),曼腊居群遗传多样性水平最低($h = 0.464$, $H_e = 0.464$, $N_e = 1.920$)(表4)。

2.3 居群遗传变异

基因分化系数(F_{ST})在不同位点有较大差异,变化范围为0.039–0.182,平均为0.113(表3)。即有11.3%的遗传变异存在于居群间,而88.7%存在于居群内。基因流 $N_m = 1.962$ 。用AMOVA进行的基于欧

表3 羽叶金合欢物种水平的遗传多样性与遗传分化

Table 3 Genetic diversity and genetic differentiation of *Acacia pennata* at species level

基因座 Locus	样本量 Sample size	观察等位 基因数 N_a	有效等位 基因数 N_e	Nei's基因 多样性 h	观察杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	近交系数 F_{IS}	基因分化系数 F_{ST}
P4	124	5.286	3.113	0.787	0.431	0.643	0.331	0.182
P5	124	3.714	2.705	0.739	0.460	0.610	0.246	0.175
P9	124	3.000	2.478	0.643	0.518	0.592	0.125	0.079
P11	124	2.000	1.877	0.485	0.449	0.466	0.036	0.039
P13	124	3.286	2.251	0.578	0.528	0.602	-0.140	0.086
P18	124	3.000	2.336	0.632	0.509	0.560	0.091	0.114
平均 Mean	124	3.381	2.460	0.644	0.483	0.573	0.115	0.113

N_a , Observed number of alleles; N_e , Effective number of alleles; h , Nei's gene diversity; H_o , Observed heterozygosity; H_e , Expected heterozygosity; F_{IS} , Inbreeding coefficient; F_{ST} , Differentiation coefficient.

表4 羽叶金合欢居群水平的遗传多样性与遗传分化

Table 4 Genetic diversity and genetic differentiation of *Acacia pennata* populations at population level

居群代号 Population code	样本量 Sample size	观察等位 基因数 N_a	有效等位 基因数 N_e	Nei's基因 多样性 h	观察杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	近交系数 F_{IS}
大勐龙 DML	20	3.500	2.779	0.607	0.480	0.607	0.200
勐仑 MDJ	20	3.670	2.675	0.602	0.508	0.602	0.153
景洪 JH	18	3.333	2.809	0.628	0.435	0.805	0.294
勐腊 BB	17	3.500	2.490	0.582	0.510	0.582	0.111
大渡岗 DDG	17	3.000	2.341	0.553	0.520	0.553	0.056
曼腊 ML	17	3.167	1.920	0.464	0.529	0.464	-0.150
普文 PW	15	3.500	2.207	0.530	0.478	0.531	0.108
平均 Mean	17.7	3.381	2.460	0.567	0.494	0.592	0.129

N_a , Observed number of alleles; N_e , Effective number of alleles; h , Nei's gene diversity; H_o , Observed heterozygosity; H_e , Expected heterozygosity; F_{IS} , Inbreeding coefficient. Population codes correspond to those in Table 1.

表5 羽叶金合欢7个居群间Nei's遗传一致度(I)(对角线上方)和遗传距离(D)(对角线下方)

Table 5 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among *Acacia pennata* populations

	大勐龙 DML	勐仑 MDJ	景洪 JH	勐腊 BB	大渡岗 DDG	曼腊 ML	普文 PW
大勐龙 DML	****	0.861	0.868	0.877	0.872	0.850	0.785
勐仑 MDJ	0.150	****	0.873	0.839	0.805	0.736	0.799
景洪 JH	0.141	0.135	****	0.853	0.891	0.750	0.805
勐腊 BB	0.131	0.175	0.159	****	0.742	0.838	0.654
大渡岗 DDG	0.137	0.217	0.115	0.299	****	0.654	0.857
曼腊 ML	0.163	0.307	0.288	0.177	0.425	****	0.581
普文 PW	0.242	0.224	0.216	0.424	0.154	0.542	****

居群代号同表1 Population codes correspond to those in Table 1

表6 羽叶金合欢居群的AMOVA分析

Table 6 AMOVA analysis of *Acacia pennata* populations

变异来源 Source of variance	方差总和 SSD	平均方差 MSD	变异组分 Variance component	变异百分率 Variation (%)	P*
居群间 Among populations	90.6407	15.107	0.6351	14.09	<0.001
居群内 Within populations	453.0690	3.872	3.8724	85.91	<0.001

SSD, Sum of squared deviation; MSD, Mean of squared deviation; * P-values, The probabilities of having a more extreme variance component than the observed values alone.

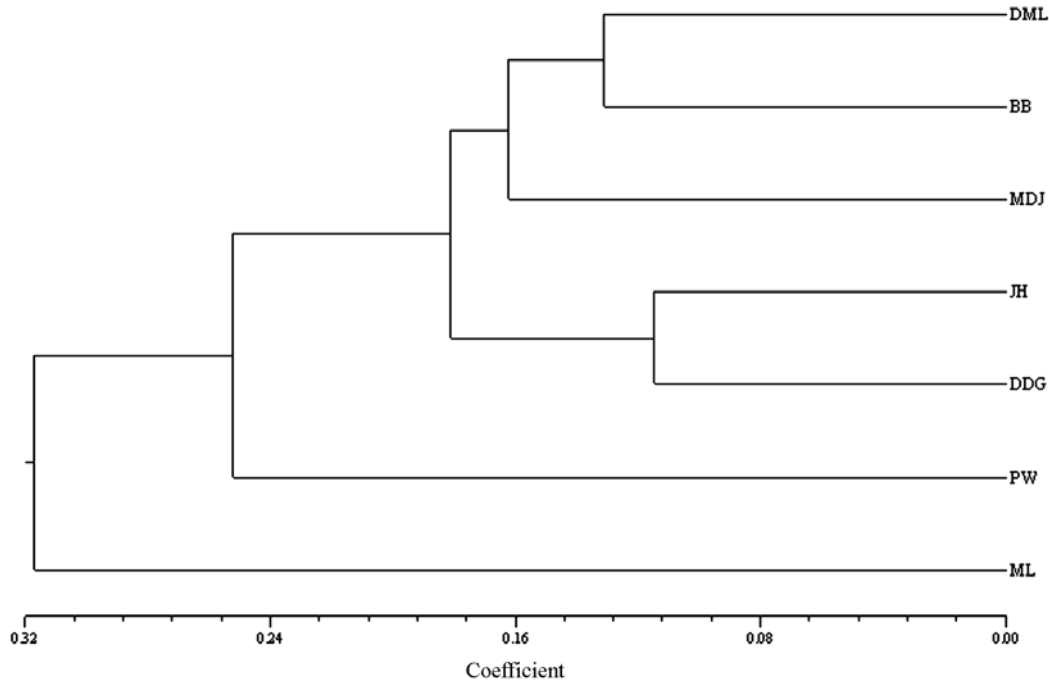


图1 基于Nei's遗传距离绘制的羽叶金合欢居群的UPGMA聚类图(居群代号见表1)

Fig. 1 UPGMA dendrogram of *Acacia pennata* populations based on Nei's genetic distance. Population codes correspond to those in Table 1.

氏距离平方的遗传变异巢式方差分析结果也显示羽叶金合欢的遗传变异主要存在于居群内, 占总变异的 85.91%, 居群间的遗传变异为 14.09%

($P < 0.001$) (表6)。每个居群的Wright's近交系数 F_{IS} 为 0.056–0.294, 平均值为 0.129(表4), 经Hardy-Weinberg统计检验, 80%位点均未偏离平衡, 表明

羽叶金合欢自然居群为随机交配居群。

2.4 居群间遗传距离与遗传一致度

用GenAlEx计算出了羽叶金合欢7个居群两两间的Nei's遗传一致度(I), 其范围为0.581–0.891; 遗传距离(D)的范围为0.115–0.542(表5)。其中大渡岗居群(DDG)和景洪居群(JH)间的遗传一致度最高($I = 0.891$), 遗传距离最近($D = 0.115$), 在UPGMA聚类图(图1)中也聚在了一起。普文居群(PW)和曼腊居群(ML)的遗传一致度最低($I = 0.581$), 遗传距离最远($D = 0.542$), 在聚类图中各自的分支距离也最远(表5, 图1)。经Mantel检测, 羽叶金合欢的遗传距离和地理距离之间没有显著的相关性($r = -0.3240$, $P = 0.8350$)。

3 讨论

微卫星侧翼序列在属内种间和亲缘关系接近的属间是相当保守的, 这一特征奠定了微卫星共用引物的理论基础。属内种间微卫星共用引物的扩增成功率比较高, 在亲缘关系较近的种间一般能够共用, 属间共用微卫星主要取决于属间亲缘关系的远近(Thelma *et al.*, 2007)。目前已有很多微卫星在属内种间共用的研究报道(Rossetto, 2001; 王丽和赵桂仿, 2005)。本研究从金合欢属其他种的82对引物中筛选出11对, 在羽叶金合欢中均有扩增产物, 并且有6对具有较好的多态性。表明金合欢属植物的SSR引物在其同属近缘种羽叶金合欢中具有一定的通用性。

Hollingsworth等(2005)用SSR标记研究了秘鲁同为豆科的植物印加豆(*Inga dulis*), 得到 $h = 0.665$ 。Madan等(2002)用RAPD研究了内盖夫沙漠金合欢属植物*Acacia raddiana*, 发现它也具有较高的遗传多样性水平。本研究用6对SSR引物揭示出羽叶金合欢居群有较高的遗传多样性。

Hamrick和Godt (1989)认为, 影响居群遗传变异大小的主要因素依次为繁育系统(33%)、分布范围(28%)和生态习性(12%), 普遍认为异交、多年生广布种具有较高的遗传多样性(Korron, 1987; Hamrick & Godt, 1990)。金合欢属的绝大多数植物都是异交, 表现出高度的自交不亲和或至少是部分的自交不亲和(Ross, 1979; Bernhardt *et al.*, 1984; Kenrick & Knox, 1989; Oballa, 1993; Morgan *et al.*, 2002; Broadhurst & Coates, 2002), 其主要的传粉者

是蜜蜂和鸟类(Graham *et al.*, 2003), 同时羽叶金合欢居群具有较高的杂合度, 因此我们推断其繁育系统也为异交; 加之羽叶金合欢为多年生植物, 且分布范围广泛。以上因素都可能是造成其遗传多样性水平较高的原因。

Hamrick和Godt (1989)统计了1968–1988年20年里报道的165属449种裸子植物和被子植物的研究结果, 认为影响居群遗传结构的最主要因素是繁育系统和基因交流程度。自交为主的物种, 平均 $G_{ST} = 0.51$, 即居群间的遗传变异占总变异的一半以上; 而异交为主的物种, $G_{ST} = 0.10$, 即90%的遗传变异发生在居群内部。本研究中羽叶金合欢的 $F_{ST} = 0.113$, AMOVA分析表明14.09%的遗传变异存在于居群间, 而85.91%的遗传变异存在于居群内, 这与其繁育系统可能是异交有关。羽叶金合欢的花粉可远距离传播; 此外, 羽叶金合欢的野生居群主要靠种子繁殖, 鸟类或啮齿类动物对种子的传播为远距离基因交流提供了可能性。这些生物学特性促进了居群之间较大的基因交流($N_m = 1.962$), 从而减小了居群间的遗传分化。

Harmrick和Godt (1990)认为, 居群的地理分布和遗传多样性分布没有直接的相关性。本研究的结果支持了上述结论。比较羽叶金合欢的居群分布(表1)和UPGMA聚类图(图1), 我们发现, 普文(PW)和曼腊(ML)居群间的地理距离最近, 在聚类图上却在两支上; 而地理距离较远的大勐龙(DML)和勐腊(BB)居群却聚在了一起。经Mantel检测, 羽叶金合欢居群间的遗传距离和地理距离之间没有显著的相关性。

云南的西双版纳地区居住着以傣、哈尼、布朗为主的13个少数民族。千百年来他们与大自然和谐相处, 发展形成了独特的土地和自然资源利用方式, 有着丰富的利用野生植物的经验和传统。在当地少数民族居民的庭园中很大一部分栽培植物都是从当地山野直接移植, 通常是野生的可食用植物, 如羽叶金合欢。然而近年来, 我们对云南西双版纳地区羽叶金合欢的自然居群考察发现大面积的野生林已经很少见到。因此对其尽早进行保护十分必要。我们为此提出以下建议: (1)针对羽叶金合欢自然居群的遗传多样性丰富, 且其遗传变异绝大部分都存在于居群内这一特性, 在进行就地保护时, 应充分重视居群内不同类型个体的保护; (2)对

遗传多样性水平最高的大勐龙(DML)居群应给予重点保护, 要防止进一步破坏; (3)还可以对一些具备育种价值的资源进行迁地保护。可以适量从遗传多样性较高的大勐龙居群中挑选一定的植株进行有效的迁地保护。考虑到遗传变异主要存在于居群内部, 应该从居群内部多挑选一些个体, 同时也要从不同的居群进行适量取样。

致谢: 本项研究的野外采样得到王洪老师的鼎力帮助; 论文的绘图工作得到甘宏协、赵金丽同学的大力帮助; 实验部分得到武汉植物园康明老师的指点和帮助; 此外无论在实验过程中, 还是数据处理阶段都得到实验室慈秀芹等各位同学的积极帮助, 谨致谢忱!

参考文献

- Bernhardt P, Kenrick J, Knox RB (1984) Pollination biology and the breeding system of *Acacia retinodes* (Leguminosae: Mimosoideae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **71**, 17–29.
- Broadhurst LM, Coates DJ (2002) Genetic diversity within and divergence between rare and geographically widespread taxa of the *Acacia acuminata* (Mimosaceae) complex. *Heredity*, **88**, 250–257.
- Butcher PA, Decroocq S, Gray Y, Moran GF (2000) Development, inheritance and cross-species amplification of microsatellite markers from *Acacia mangium*. *Theoretical and Applied Genetics*, **101**, 1282–1290.
- Duan YP (段运平), Chen WG (陈卫国), Li MS (李明顺), Li XH (李新海), Liu X (刘雪), Tian QZ (田清震), Bai L (白丽), Zhang SH (张世煌) (2006) The genetic diversity among 27 maize populations based on SSR data. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), **39**, 1102–1113. (in Chinese with English abstract)
- Excoffier L (1993) *Analysis of Molecular Variance (AMOVA)* Version 1.55. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Gao J (高洁), Li QM (李巧明) (2008) The DNA extracting and SSR primer screening of *Acacia pennata* (Leguminosae). *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **30**, 64–68. (in Chinese with English abstract)
- Graham NS, Nigel ER, Matthew P, Pat GW (2003) Pollination ecology of *Acacias* (Fabaceae, Mimosoideae). *Australian Journal of Botany*, **16**, 103–118.
- Hamrick JL, Godt MJW (1990) Allozyme diversity in plant species. In: *Plant Population Genetics, Breeding and Genetics Resources* (eds Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS), pp. 43–63. Sinauer, Sunderland, MA.
- Hollingsworth PM, Dawson IK, Goodall CWP, Richardson JE, Weber JC, Montes CS, Pennington RT (2005) Do farmers reduce genetic diversity when they domesticate tropical trees? A case study from Amazonia. *Molecular Ecology*, **14**, 497–501.
- Jiang ZL (姜志磊), Yang XM (杨欣明), Wang R (王瑞), Gao AN (高爱农), Li LH (李立会) (2005) Genetic diversity of *Roegneria thordiana* (Oliv.) Keng populations based on SSR analyses. *Journal of Plant Genetic Resources* (植物遗传资源学报), **6**, 315–318. (in Chinese with English abstract)
- Kenrick J, Knox RB (1989) Quantitative analysis of self-incompatibility in trees of seven species of *Acacia*. *Heredity*, **80**, 240–245.
- Korron JD (1987) A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners. *Ecology*, **1**, 47–58.
- Levinson G, Gutman GA (1987) Slipped strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 203–281.
- Li CC, Horvitz DG (1953) Some methods of estimating the inbreeding coefficient. *American Journal of Human Genetics*, **5**, 107–117.
- Madan KS, Golan GA, David D (2002) Population genetic structure and the conservation of isolated populations of *Acacia raddiana* in the Negev Desert. *Biological Conservation*, **108**, 119–127.
- Miller MP (1997) *Tools for Population Genetics Analysis* (TFPGA), Version 1.3. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff.
- Moore SS, Sargent LL, King TJ (1991) The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*, **10**, 654–660.
- Morgan A, Carthew SM, Sedgley M (2002) Breeding system, reproductive efficiency and weed potential of *Acacia baileyana*. *Australian Journal of Botany*, **50**, 357–364.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Ng CH, Koh SC, Lee SL, Ng KKS, Mark A, Norwati M, Wickneswari R (2005) Isolation of 15 polymorphic microsatellite loci in *Acacia* hybrid (*Acacia mangium* × *Acacia auriculiformis*). *Molecular Ecology Notes*, **5**, 572–575.
- Oballa PO (1993) *Genetic Variation Within Acacia karroo Hayne*. PhD thesis. 224pp. Oxford Forestry Institute (OFI), Oxford, UK.
- Otero-Arnaiz A, Schnabel A, Glenn TC, Schable NA, Hagen C, Ndong L (2005) Isolation and characterization of microsatellite markers in the East African tree, *Acacia brevispica* (Fabaceae: Mimosoideae). *Molecular Ecology Notes*, **5**, 366–368.
- Pan Q (潘奇) (2004) Artificial cultivation of *Acacia pennata*. *Yunnan Agriculture* (云南农业), **11**, 7. (in Chinese)
- Peakall R, Smouse PE (2001) *GenAlEx 5: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research*. Australian National University, Canberra, Australia.

- lia.
- Ross JH (1979) A conspectus of the African *Acacia* species. *Memoirs of Botanical Survey of South Africa*, **44**, 155.
- Rossetto M (2001) Sourcing of SSR markers from related plant species. In: *Plant Genotyping: The DNA Fingerprinting of Plants* (ed. Henry RJ), pp. 211–224.
- Thelma B, Clarisse PS, Gecele MP, Fernanda B, Michael FF, Christian L (2007) Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology*, **16**, 3759–3767.
- Wang L (王丽), Zhao GF (赵桂仿) (2005) Microsatellite primers shared by different plant species and genera. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica* (西北植物学报), **25**, 1540–1546. (in Chinese with English abstract)
- Wang JR (王洁如), Long CL (龙春林) (1995) Ethnobotany study of traditional edible plants of Jinuo nationality. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **17**, 161–168. (in Chinese with English abstract).
- Wardill TJ, Scott KD, Graham GC, Zalucki MP (2004) Isolation and characterization of microsatellite loci from *Acacia nilotica* ssp. *indica* (Mimosaceae). *Molecular Ecology Notes*, **4**, 361–363.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358–1370.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, **15**, 323–354.
- Xu YK (许又凯), Liu HM (刘宏茂), Dao XS (刀祥生), Xu ZY (许自艳) (2004) The study on the nutritional contents of *Acacia pennata* and its evaluation as a wild vegetable. *Guihaia* (广西植物), **24**, 12–16. (in Chinese with English abstract)
- Xu XL (徐小林), Xu LA (徐立安), Huang MR (黄敏仁), Wang ZR (王章荣) (2004) Genetic diversity of microsatellite (SSR) of natural populations of *Quercus variabilis*. *Hereditas (Beijing)* (遗传), **26**, 683–688. (in Chinese with English abstract)
- Yang QW (杨庆文), Yu LQ (余丽琴), Zhang WX (张万霞), Chen DZ (陈大洲), Shi JX (时津霞), Ren JF (任军方), Miao H (苗晗) (2005) Comparative studies on genetic diversities between *in-situ* and *ex-situ* conserved germplasm of *Oryza rufipogon*. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), **38**, 1073–1079. (in Chinese with English abstract)
- Zhang FM (张富民), Ge S (葛颂) (2002) Data analysis in population genetics. I. Analysis of RAPD data with AMOVA. *Biodiversity Science* (生物多样性), **10**, 438–444. (in Chinese with English abstract)
- Zhang JR (张金然), Shang J (尚洁), Wang QY (王秋玉) (2006) Genetic diversity among the clones of aspen hybrid detected by simple sequence repeat DNA marker. *Bulletin of Botanical Research* (植物研究), **26**, 447–451, 460. (in Chinese with English abstract)
- Zhao HK (赵洪锷), Wang YM (王玉民), Li QY (李启云), Zhang M (张明), Zhuang BC (庄炳昌) (2001) SSR analysis of wild soybean and cultivated soybean from different latitude in China. *Soybean Science* (大豆科学), **20**, 172–176. (in Chinese with English abstract)
- Zeng J, Zou YP, Bai JY, Zheng HS (2002) Preparation of total DNA from 'recalcitrant plant taxa'. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **44**, 694–697.

(责任编辑: 葛颂 责任编辑: 时意专)