

三叶悬钩子自然居群遗传多样性的 ISSR 分析

和志娇^{1,2}, 和加卫^{1,*}, 程在全², 杨正松¹, 杨洪涛¹, 和文佳¹

(¹ 云南省农业科学院高山经济植物研究所, 云南丽江 674100; ² 云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 昆明 650223)

摘要: 利用 ISSR 分子标记对云南特有植物三叶悬钩子 (*Rubus delavayi* Fanch.) 的 12 个居群共 248 个个体进行了遗传多样性分析。结果表明: 16 个 ISSR 引物共扩增到 199 个位点, 其中 185 个是多态性位点, 占 92.96%。三叶悬钩子居群具有很高的遗传多样性水平, 在物种水平上平均每个位点的多态位点百分率 (*PPB*) 为 97.99%, 有效等位基因数 (A_e) 为 1.427, Nei's 遗传多样性 (H) 为 0.267, Shannon's 多态信息指数 (I) 为 0.417; 在居群水平上 *PPB* 为 62.10%, A_e 为 1.289, H 为 0.177, I 为 0.275。居群间基因分化系数 G_{st} = 0.3351, 与 AMOVA 分析的居群间遗传变异量占总量的 33.03% 相近, 说明三叶悬钩子居群间存在一定程度的遗传分化。居群间遗传分化占总遗传变异的 33.51%, 居群内的遗传变异为 66.49%, 基因流 (N_m) 为 0.9923。通过 Mantel 检测, 居群间的遗传距离与地理距离不存在相关性。UMPGA 聚类分析和二维主成分分析 (PCA) 结果一致。导致居群内高遗传变异水平原因主要是有限的基因流, 而居群间较低的遗传多样性水平可能与生态破坏和生物入侵有关。

关键词: 三叶悬钩子; ISSR; 遗传多样性; 遗传分化

中图分类号: S 663.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 11-2142-09

Genetic Diversity in the Natural Populations of *Rubus delavayi* Demonstrated by Inter-simple Sequence Repeats

HE Zhi-jiao^{1,2}, HE Jia-wei^{1,*}, CHENG Zai-quan², YANG Zheng-song¹, YANG Hong-tao¹, and HE Wen-jia¹

(¹ Institute of Alpine Economic Plant, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Lijiang, Yunnan 674100, China;

² Research Institute of Biotechnology & Genetic Germplasm, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China)

Abstract: Genetic diversity of 248 individuals from 12 natural populations of *Rubus delavayi* Fanch., which are specific but endangered species in Yunnan, was assessed using ISSR markers. The results showed that 199 amplified bands were got in PCR when sixteen primers were used. Among those bands, 185 (92.96% of the total bands) were polymorphic. A high level of genetic diversity was showed in these populations. At species level, percentage of polymorphic loci (*PPB*) was 97.99%, effective number of alleles (A_e) was 1.427, Nei's gene diversity (H) was 0.267, and Shannon's information index (I) was 0.417. At population level, *PPB* was 62.10%, A_e was 1.289, H was 0.177, I was 0.275. The level of genetic differentiation between populations was lower than that within populations. The coefficient of gene

收稿日期: 2012-06-01; 修回日期: 2012-08-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30860035)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: hejw4522@163.com)

differentiation (G_{st}) between the populations was 0.3351. And the gene differentiation contributed to 33.51% of the total genetic variations between the populations and to 66.49% within the populations. The total gene flow (N_m) was 0.9923. There was no significant correlation between genetic and geographic distances among population ($r = 0.0286$, $P = 0.5240$) in the Mantel test. The result of UPGMA clustering analysis was basically similar to that of the principle coordinate analysis (PCA). The high genetic variation level within populations could be caused mainly by the significant genetic variation inside a population together with the limited gene flow ($N_m = 0.9923$) between populations. While the lower genetic diversity among the populations could be caused by severely destroyed and biological invasion of *Eupatorium adenophorum* Spreng.

Key word: *Rubus delavayi*; ISSR; genetic diversity; genetic differentiation

三叶悬钩子 (*Rubus delavayi* Fanch.) 为蔷薇科 (Rosaceae) 悬钩子属 (*Rubus* L.) 空心莓组 (Section *Idaeobatus* Focke) 直立矮小灌木, 花白色, 果橙红色, 具有食用、药用和观赏价值 (俞德浚 等, 1985)。三叶悬钩子为云南特有种, 也是中国特有种, 分布在云南丽江、大理、怒江、昆明、玉溪等, 生于海拔 1 600 ~ 3 000 m 常绿阔叶林或常绿落叶阔混交林下 (和加卫 等, 2008)。目前由于山地开垦、环境破坏和外来植物入侵, 三叶悬钩子的野生资源遭到不同程度的破坏, 生境片段化较为严重, 加之三叶悬钩子是通过形成吸枝 (吸芽) 繁殖, 发育比较缓慢, 有些地区分布的三叶悬钩子已经逐渐走向濒危和灭绝。

物种的遗传多样性既是维持其繁殖活力和适应环境变化的基础, 也是其它一切多样性的基础和最重要的部分, 而居群的遗传多样性水平在相当程度上制约其对环境的适应能力, 从而可预测这个居群的发展趋势。同时遗传多样性的研究能为植物育种和遗传改良提供理论指导 (Spiess, 1989; 潘莹和赵桂仿, 1998)。

ISSR (inter-simple sequence repeats) 分子标记具有快捷、灵敏、稳定性好、多态性高等优点, 现已经被广泛应用于植物遗传多样性的研究 (Jin et al., 2010; Patcharin et al., 2011; 宋常美 等, 2011; 宋杨 等, 2011), 也应用于悬钩子属植物的遗传多样性和遗传分化的研究 (Hong et al., 2003; Samir, 2007; Anne et al., 2011)。

目前有关对三叶悬钩子的研究较少, 仅见到繁殖生物学方面的报道 (陈曦 等, 2007), 而有关三叶悬钩子的遗传多样性研究尚未见报道。本研究中采用 ISSR 分子标记对三叶悬钩子的 12 个自然居群的遗传多样性进行了分析, 目的在于揭示其遗传多样性水平及遗传结构, 为三叶悬钩子资源的有效保护和合理利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

于 2007 年 6 月对云南怒江、丽江、玉溪、昆明等地进行三叶悬钩子资源调查及样品采集 (表 1)。选取 12 个居群, 每个居群选 3 ~ 5 个调查点, 分别相距 30 km 以上。用全球定位系统 (GPS) 记录各居群的经纬度信息。

每个调查点随机选取 3 ~ 5 个植株, 每株分别采集树冠外围一年生健康幼嫩叶片。所采集样品用硅胶干燥剂干燥, 并及时提取 DNA, 保存于 -20 °C 备用。

表 1 三叶悬钩子 12 个居群的采样情况
Table 1 The 12 populations of *Rubus delavayi* Fanch. sampled

居群 Population	经纬度 Locality	海拔/ m Altitude	生境 Habitat
碧江 Bijiang	98°92'E, 26°55'N	2 400	路边, 包谷地边, 云南松林下 Roadside, corn field boundry, under <i>Pinus yunnanensis</i> forest
贵峰 Guifeng	100°17'E, 26°46'N	2 427	云南松林下 Under <i>Pinus yunnanensis</i> forest
金沙江河谷 Jinshajiang Hegu	99°58'E, 27°26'N	1 980	云南松林下, 黄背栎灌木丛中 Under <i>Pinus yunnanensis</i> forest and the <i>Quercus pannosa</i> and in shrubs
白汉场 Baihanchang	100°22'E, 26°96'N	1 990	云南松林下, 灌木丛中 Under <i>Pinus yunnanensis</i> forest, in shrubs
新主植物园 Xinzhu Botanical Garden	99°98'E, 26°82'N	2 256	云南松林下, 灌木丛中 Under <i>Pinus yunnanensis</i> forest, in shrubs
美翁中山 Meixizhongshan	100°04'E, 25°71'N	2 600	云南松林下, 灌木丛中 Under <i>Pinus yunnanensis</i> forest, in shrubs
碧江知子罗 Bijiang Zhiziluo	98°93'E, 26°41'N	2 400	云南松林下, 灌木丛中 Under <i>Pinus yunnanensis</i> forest, in shrubs
福贡古泉 Fugong Guquan	98°84'E, 26°86'N	1 700	云南松林下, 灌木丛中 Under <i>Pinus yunnanensis</i> forest, in shrubs
昆明西山 Kunming Xishang	102°63'E, 24°96'N	2 150	云南松林下, 针叶林与阔叶林中 Under <i>Pinus yunnanensis</i> forest, coniferous and broad leaf forests
江川白石岩 Jiangchuan Baishiyang	102°71'E, 24°25'N	2 050	云南松林下, 灌木丛中 Under <i>Pinus yunnanensis</i> forest, in shrubs
昆明宜良 Kunming Yiliang	103°18'E, 24°87'N	1 860	云南松林下, 灌木丛中 Under <i>Pinus yunnanensis</i> forest, in shrubs
大理黄坪 Dali Huangping	100°45'E, 26°07'N	2 500	云南松林下 Under <i>Pinus yunnanensis</i> forest

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 的提取

采用 CTAB 法 (Doyle & Doyle, 1990) 提取总 DNA。用 SmartSpec™3000 核酸蛋白仪测定 DNA 的浓度并稀释至 25 ng · μL⁻¹ 用于扩增反应。

1.2.2 ISSR 引物的筛选和 PCR 扩增

引物根据加拿大哥伦比亚大学 (UBC) 公布的第 9 套 ISSR 引物序列 (<http://www.michaelsmith.ubc.ca/services/NAPS/Primer-Sets/Primers.pdf>), 由上海生工生物公司合成。每个居群选取 2 个模板, 在 10 μL 反应体系中进行引物筛选及可重复性试验。经过比较和优化确定最适的 ISSR 反应条件为: PCR 反应体积 10 μL, 其中包括模板 DNA 溶液 (25 ng · μL⁻¹) 6.95 μL, 10 × Buffer (Mg⁺²) 1.05 μL, dNTP (2.5 μmol · L⁻¹) 0.8 μL, 引物 (12.5 μmol · L⁻¹) 0.1 μL, *Taq* 聚合酶 (5 U · μL⁻¹) 0.1 μL, 加 ddH₂O, 一滴石蜡油覆盖。反应热循环程序为: 首先 94 °C 预变性 4 min, 然后进入循环, 每个循环为 94 °C 变性 30 s, 48 ~ 52 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 90 s, 共 40 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 冷却取出。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶在 1 × TAE 缓冲液 (pH 8.0) 中电泳分离, 以 Marker DL2000 为分子量标准, 溴化乙锭 (EB, 0.5 μg · mL⁻¹) 染色后在凝胶成像系统 GDS-7501 (UVP 公司) 上扫描与分析, 所有的扩增反应重复 1 次。

1.2.3 数据统计与分析

在 ISSR-PCR 扩增结果电泳图谱中, 扩增出的清晰稳定、重复性好的每条 DNA 带谱作为与引物的一个结合位点, 视为有效的分子标记 (Clark, 1998), 根据电泳图谱中 DNA 条带的有无, 将 ISSR 扩增结果转化为二元数据 (有带的量化为 1, 无带的量化为 0), 构建二元数据矩阵。遗传多样性参数: 多态位点百分比 (PPB), 每个位点的观察等位基因数 (A_o), 有效等位基因数 (A_e), Nei's 的遗传多样性 (H), Shannon's 多态信息指数 (I), 居群遗传分化系数 (G_{st}) 与基因流 (N_m)。Nei's 遗传距离用 POPGENE 1.31 (Yeh et al., 1999) 软件进行分析。用 NTSYSpc 2.1 (Rohlf, 2002) 进

行 UPGMA 聚类分析和主成分分析 (principal coordinates analysis, PCA)。用 ARLEQUIN 2.000 (Schneider et al., 2000) 进行居群遗传结构的分子方差 AMOVA (Excoffier et al., 1992) 分析。应用 TFPGA (Miller, 1997) 软件对自然居群间地理距离与遗传距离之间的相关性进行 Mantel 检验 (Mantel, 1976)。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

从 100 条 ISSR 引物中选出 16 个扩增条带清晰、反应稳定、重复性好的引物, 对 12 个居群 248 个个体基因组进行了 PCR 扩增, 共扩增到 199 个位点, 平均每个引物 12.44 个条带, 其中多态性位点有 185 个, 占 92.96% (表 2)。其中贵峰居群和大理黄坪居群用引物 846 的扩增图谱如图 1 所示。

表 2 各个引物序列、扩增位点数与多态位点数
Table 2 Primer sequences, number of loci and number of polymorphic loci

引物 Primer	序列 (5'→3') Sequence (5'→3')	退火温度/℃ Annealing temperature	统计位点数 Number of loci	多态位点数 Number of polymorphic loci
807	(AG) ₈ T	52	14	14
811	(GA) ₈ C	50	13	12
814	(CT) ₈ A	52	13	13
825	(AC) ₈ T	52	12	12
826	(AC) ₈ C	52	13	12
827	(AC) ₈ G	52	12	11
834	(AG) ₈ YT	52	12	12
835	(AG) ₈ YC	52	15	14
844	(CT) ₈ RC	52	9	8
846	(CA) ₈ RT	52	15	14
848	(CA) ₈ RG	52	13	12
856	(AC) ₈ YA	52	9	6
864	(ATG) ₆	52	10	8
873	(GACA) ₄	48	14	14
880	(GGAGA) ₃	50	14	13
890	VHV (GT) ₇	52	11	10

R = A/G, Y = C/T, H = A/C/T, V = A/C/G.

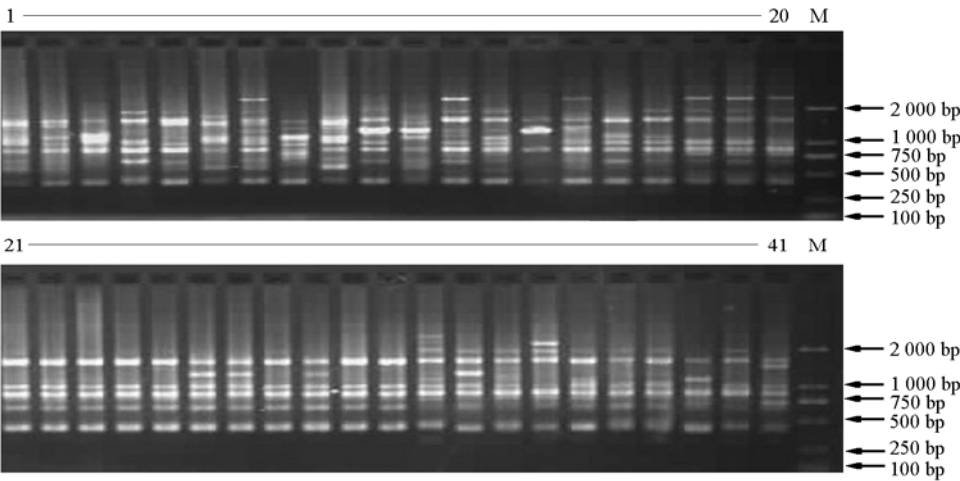


图 1 引物 846 对贵峰居群 (1 ~ 21) 和大理黄坪 (22 ~ 41) 居群样本 PCR 扩增后电泳图谱
Fig. 1 ISSR amplification products generated by primer ISSR 846 from samples of population Guifeng (1 - 21) and Dali Huangping (22 - 41)

2.2 居群遗传多样性分析

12 个居群 248 个个体的遗传多样性分析（表 3）表明：物种水平的遗传多样性相对较高，多态位点百分比（PPB）达 97.99%，Nei’s 遗传多样性（ H ）为 0.267，Shannon’s 多态信息指数（ I ）为 0.417；居群水平略低，居群平均多态位点百分比为 62.10%，平均有效等位基因数（ A_e ）为 1.289，平均 Nei’s 遗传多样性（ H ）为 0.177，Shannon’s 多态信息指数（ I ）为 0.275。

从多态位点百分比（PPB）看，各自然居群间相差比较大，贵峰最高（PPB = 81.91%），碧江最低（PPB = 34.17%）。从其他指数看，贵峰的遗传多样性相对最高，金沙江河谷次之，而昆明宜良和大理黄坪相当，碧江最低。

表 3 ISSR 分析的三叶悬钩子的遗传多样性
Table 3 Genetic variability of *Rubus delavayi* Fanch. detected by ISSR

居群 Population	样本数 Number of Individuals (N)	有效等位基因数 Mean observed number of alleles (A_e)	Nei 基因多样性 Nei’s genetic diversity (H)	Shannon 信息指数 Shannon’s Index of diversity (I)	多态位点百分/% 率Percentage of polymorphic loci (PPB)
碧江 Bijiang	21	1.173	0.104	0.159	34.17
贵峰 Guifeng	21	1.383	0.231	0.359	81.91
金沙江河谷 Jinshajiang Hegu	23	1.377	0.224	0.339	70.35
白汉场 Baihanchang	20	1.324	0.196	0.301	65.33
新主植物园 Xinzhu Botanical Garden	25	1.242	0.146	0.226	51.76
美禽中山 Meixizhongshan	24	1.310	0.190	0.294	64.82
碧江知子罗 Bijiang Zhiziluo	23	1.319	0.197	0.307	70.85
福贡古泉 Fugong Guquan	21	1.294	0.186	0.295	69.85
昆明西山 Kunming Xishang	24	1.283	0.180	0.287	71.86
江川白石岩 Jiangchuan Baishiyan	13	1.323	0.200	0.307	65.33
昆明宜良 Kunming Yiliang	12	1.240	0.147	0.227	49.25
大理黄坪 Dali Huangping	21	1.204	0.126	0.198	49.75
居群水平平均 Mean at population level	21	1.289	0.177	0.275	62.10
物种水平 Total at species level	248	1.427	0.267	0.417	97.99

2.3 三叶悬钩子遗传分化与基因流

三叶悬钩子居群间存在一定程度的遗传分化。12 个自然居群的基因分化系数（ $G_{st} = 0.3351$ ，表 4）与 AMOVA 分析的结果（ $F_{st} = 0.3303$ ，表 5）基本一致，即居群间遗传变异量约占总遗传变异量的 33.03%，而居群内遗传变异量占总变异量的 66.99%，说明三叶悬钩子的遗传多样性主要分布在居群内，居群间的遗传分化也达到了显著性水平（ $P < 0.001$ ）。

基于 T 值估算基因流公式， $N_m = 0.5 (1 - G_{ST}) / G_{ST}$ (McDermott & McDonald, 1993; Yeh et al., 1999)，所计算的居群间基因流 N_m 为 0.9923（表 4），说明三叶悬钩子居群间存在着一定的基因流。

表 4 三叶悬钩子居群的基因多样性 Nei’s 分析
Table 4 Nei’s genetic diversity in populations of *Rubus delavayi* Fanch.

项目 Item	居群总基因多样性 Total gene diversity (H_t)	居群内基因多样性 Gene diversity within population (H_s)	居群间遗传分化指数 The coefficient if gene differentiation (G_{st})	居群每代迁移数 Estimate if gene flow from G_s (N_m)
平均 Mean	0.2668	0.1774	0.3351	0.9923
标准差 Standard deviation	0.0230	0.0092		

表 5 三叶悬钩子居群间的 AMOVA 分析
Table 5 AMOVA analysis of twelve natural populations of *Rubus delavayi* Fanch.

变异来源 Source of variation	自由度 <i>df</i>	离差平方和 Sum of squared Deviations (SSD)	方差分量 Variance component	方差分量比率/% Percentage of variation	固定指数 Fixation index (F_{ST})	<i>P</i>
居群间 Mongpopulations	11	855.2126	10.469	33.03	0.3303	< 0.001
居群内 Within population	236	1 750.8084	21.250	66.99	-	< 0.001
总和 Total	247	2 606.0210	31.710	100.00	-	-

2.4 聚类分析

为了进一步揭示居群分化趋势和亲缘关系,依据 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类分析结果(图 2),三叶悬钩子居群可以明显分为 5 个组:碧江居群、新主植物园居群、昆明宜良居群和大理黄坪居群各成为一个组以外,其他居群都聚为一个组。

基于居群间的遗传距离和地理距离的 Mantel 检测表明,三叶悬钩子居群的遗传距离和地理距离之间并不存在显著相关性($r = 0.0286$, $P = 0.5240$),表明三叶悬钩子居群遗传分化不太符合 Wright 的地理距离分化模式(Wright, 1943)。

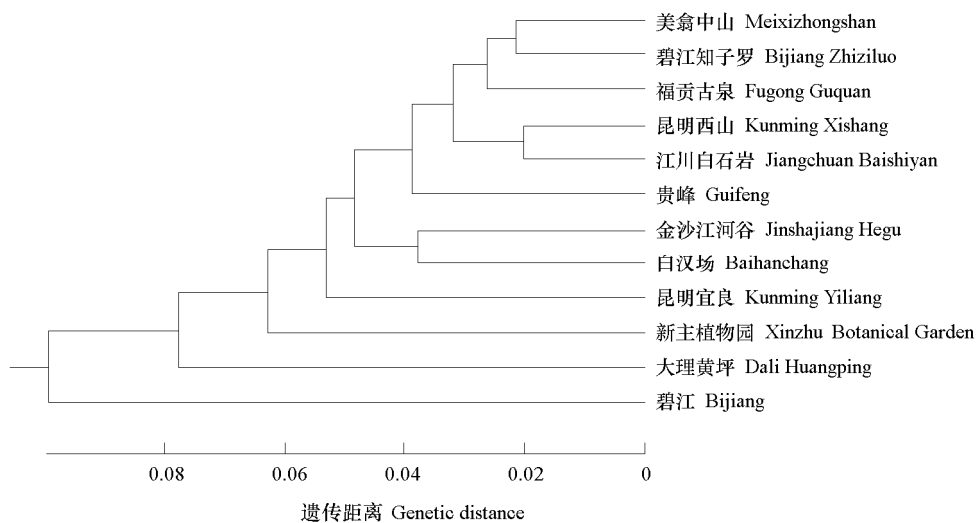


图 2 三叶悬钩子 12 个居群的 UPGMA 聚类图
Fig. 2 A dendrogram of 12 *Rubus delavayi* Fanch. populations based on Nei's genetic distance using UPGMA clustering analysis

2.5 三叶悬钩子居群的 PCA 分析

主成分分析结果与聚类分析结果(图 3)基本相似,贵峰居群的部分个体、昆明宜良居群的部分个体、大理黄坪居群、碧江与其他居群在二维空间图中分布明显分离。说明它们之间的亲缘关系较远;其余各居群亲缘关系较近,个体之间存在不同程度交叉聚集,特别是昆明西山居群和江川白石岩居群、美翁中山居群和碧江知子罗居群、金沙江河谷居群和白汉场居群聚集程度更高,明显高于其他居群。这说明,三叶悬钩子居群的遗传变异主要来自于居群内,居群的地理距离与遗传距离不存在相关性。

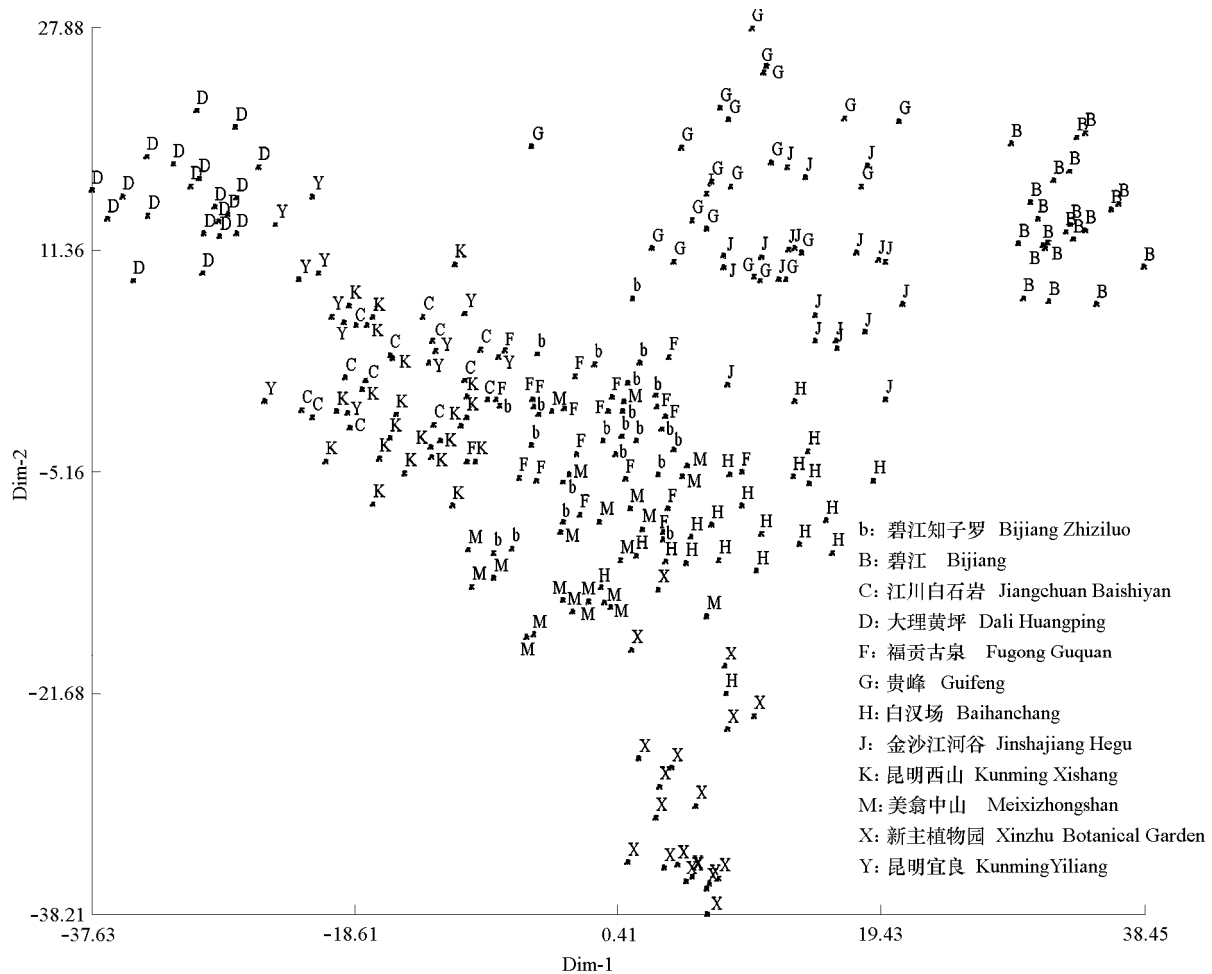


图3 三叶悬钩子 ISSR-PCR 扩增产物的二维 PCA 分析图

Fig. 3 Two-dimension principle correspondence analysis of *Rubus delavayi* Fanch. based on ISSR-PCR amplified products

3 讨论

3.1 三叶悬钩子居群的遗传多样性

用筛选到的 16 对 ISSR 引物对三叶悬钩子居群进行 PCR 扩增, 所有样品均能扩增出清晰、重复性好的有效片段, 扩增出的位点数为 9~15 条不等, 平均每个引物扩增出 12.44 条 DNA 片段。相对于 RAPD 标记 (Korpelainen, 1999), 使用共显性标记研究三叶悬钩子居群遗传多样性和遗传结构方面具有大的优势 (Jia, 1996; Samir, 2007)。

12 个三叶悬钩子居群间的遗传多样性水平存在较大的差异, 以贵峰的遗传多样性相对最高 ($PPB = 81.91\%$), 碧江居群最低 (34.17%)。ISSR 引物 Shannon's 多样性指数的变化范围为 0.159~0.359, Shannon's 信息指数平均为 0.275。综合分析比较各参数, 平均有效等位基因数和 I 值的变化趋于一致, 平均有效等位基因变异数值大的 ISSR 位点其 I 值也大, 能够真实反映群体遗传多样性。三叶悬钩子居群水平的遗传多样性 ($H = 0.177$) 明显低于 Nybom (Nybom, 2004) 基于 RAPD、AFLP、ISSR 等显性标记所统计的多种植物居群水平遗传多样性的平均值 ($H = 0.22$ 或 0.23), 仅高于一年生 ($H = 0.13$) 或自交物种 ($H = 0.12$) RAPD 检测的居群遗传多样性的平均值 (Nybom & Bartish,

2000), 揭示出三叶悬钩子居群内部遗传多样性的明显不足。相对而言, 三叶悬钩子在物种水平上还保持着较高的遗传多样性 ($PPB = 97.99\%$, $H = 0.267$)。这一研究结果将为育种工作者引种扩大三叶悬钩子基因资源提供科学依据。

由于遭受森林资源的破坏、不合理的开垦和生物入侵, 使三叶悬钩子原有的生境受到了严重破坏, 生存和繁衍受到很大威胁, 导致其居群遗传多样性的迅速丧失。三叶悬钩子各居群的遗传多样性水平存在很大的差异 (H 值变化范围为 $0.104 \sim 0.231$)。贵峰居群的遗传多样性较高 ($H = 0.231$), 而碧江、昆明宜良和大理黄坪居群的遗传多样性都相对较低, 原因是紫茎泽兰 (*Eupatorium adenophorum* Spreng.) 入侵, 尤其是昆明宜良和江川居群仅有有限的居群个体数量, 加上人为的生态破坏, 已经接近濒危。除生物入侵和人为破坏使居群数量逐渐缩小外, 其濒危机制有待进一步深入研究。

3.2 三叶悬钩子居群间的遗传分化

三叶悬钩子居群的 G_{ST} 的值为 0.3351 , 表明 $1/3$ 的遗传变异存在于居群之间, 这一较高水平的遗传分化与其居群间基因流过小有关。所得分析结果与 AMOVA 结论一致, AMOVA 分子变异分析显示, 三叶悬钩子居群的遗传分化系数 F_{ST} 分别为 0.3303 , 说明三叶悬钩子的遗传多样性或遗传变异主要分布于物种内部。Wright (1965) 提出可根据居群每代迁移数 (N_m) 的大小来判断居群间基因流状况与分化程度: 当 $N_m < 1$, 则遗传漂变可能导致居群间的分化, 表明基因流成为居群间遗传分化的主要原因。低的基因流导致物种居群间的分化加大。三叶悬钩子居群的基因流为 0.9923 , 说明在物种水平上基因流被限制, 各个居群间的交流小, 群体间虽存在一定程度的基因交流, 但不足以抵制居群内遗传漂变而引起的居群分化。

Cozzolino 等 (2003) 研究表明, 高山或河道的物理隔离对生物居群间的遗传分化有一定的影响。然而, 基于居群地理距离和遗传距离的 Mantel 检测表明, 三叶悬钩子居群遗传分化不太符合 Wright (1943) 的地理距离分化模式。说明除随机遗传漂变与地理隔离外, 其遗传分化可能还与各地区的人为破坏程度等因素有关。野外考察三叶悬钩子的生境, 发现其直接暴露于高频繁的人为活动压力下, 并且有紫茎泽兰的生物入侵, 使得有些地方的居群数量逐渐缩小, 甚至趋于濒临灭绝, 如昆明宜良、江川白石岩和碧江。另外, 三叶悬钩子通过形成吸枝 (吸芽) 繁殖, 发育缓慢, 属开花与果实发育同步类型 (陈曦 等, 2007), 使得与其他自然居群基因交流比较少, 这些是产生分化的直接原因。从本研究的结果来看, 贵峰居群的遗传多样性较高, 是保护和利用的重点, 但是三叶悬钩子居群间有一定的遗传分化, 基因流低, 因此也要注意其它居群的保护和利用。建议加强就地或迁地保护, 尽快建立相应的保护区, 保护生态环境, 以促进居群的天然更新和繁衍。

References

- Anne F L, Irwin N F, Dennis F W, Melissa K M. 2011. Genetic diversity in the invasive *Rubus phoenicolasius* as compared to the native *Rubus argutus* using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Biological Invasions*, 13 (8): 1735 - 1738.
- Clark M S. 1998. *Plant molecular biology: A laboratory manual*. Beijing: China Higher Education Press: 3 - 11.
- Cozzolino S, Cafasso D, Pellegrino G. 2003. Fine-scale phylogeographical analysis of Mediterranean *Anacamptis palustris* (Orchidaceae) populations based on chloroplast minisatellite and microsatellite variation. *Molecular Ecology*, 12: 2783 - 2792.
- Chen Xi, Zhang Mei-fang, Chen Su-mei. 2007. The biological observation to the three *Rubus* L. species. *Shanxi Fruits*, (6): 4 - 5. (in Chinese)
- 陈曦, 张梅芳, 陈素梅. 2007. 三种悬钩子的生物学特性观察. *山西果树*, (6): 4 - 5.
- Doyle J J, Doyle J L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13 - 15.
- Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondria DNA restriction sites. *Genetics*, 131: 479 - 491.

- He Jia-wei, Yang Zheng-song, Tang Kai-xue, Li Yan, Yang Yan-lin, Wang Chao-wen, Yang Hong-tao. 2008. Plant resources of genus *Rubus* in Northwest Yunnan. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (7): 951 – 958. (in Chinese)
- 和加卫, 杨正松, 唐开学, 李 燕, 杨燕林, 王朝文, 杨洪涛. 2008. 滇西北悬钩子属植物资源的调查. *园艺学报*, 35 (7): 951 – 958.
- Hong Y P, Kim M J, Hong K N. 2003. Genetic diversity in natural populations of two geographic isolates of Korean black raspberry. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78 (3): 350 – 354.
- Jin Z, Peng J, Nan L, Jin F W, Liu Z Y, Qin S. 2010. Analysis of genetic variation within and among *Ulva pertusa* (Ulvaceae, Chlorophyta) populations using ISSR markers. *Chinese Science Bulletin*, 55: 705 – 711.
- Jia J Z. 1996. Molecular germplasm diagnostics and molecular marker assisted breeding. *Scientia Agricultura Sinica*, 29 (4): 1 – 10.
- Korpelainen H. 1999. Clonal structure of *Rubus chamaemorus* populations: Comparison of different molecular methods. *Plant Ecol*, 143 (1): 123 – 128.
- Miller M P. 1997. Tools for population genetic analysis (TFPGA), Version 1.3. Arizona: Department of Biological Sciences, Northern Arizona University.
- Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209 – 220.
- McDermott J M, McDonald B A. 1993. Gene flow in pathosystems. *Annual Review of Phytopathology*, 31: 353 – 373.
- Nybom H, Bartish I. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 3: 93 – 114.
- Nybom H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13: 1143 – 1155.
- Patcharin T, Puntaree T, Yaowanart H, Peerasak S. 2011. Genetic diversity among jatrophas and jatrophas-related species based on ISSR markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29: 252 – 264.
- Pan Ying, Zhao Gui-fang. 1998. Estimation of genetic diversity at molecular level. *Acta Botany Boreal-Occident Sinica*, 18 (4): 645 – 653. (in Chinese)
- 潘 莹, 赵桂仿. 1998. 分子水平的遗传多样性及其测定方法. *西北植物学报*, 18 (4): 645 – 653.
- Rohlf F. 2002. NTSYS-pc Version 2.1. Numerical taxonomy system and multivariate analysis system. New York: Setauket, Exeter Software.
- Samir C D. 2007. Inter-simple sequence repeat (ISSR) -PCR analysis to assess genetic diversity in a collection of wild cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) clones. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 82 (5): 727 – 732.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L. 2000. ARLEQUIN: A software for population genetic data analysis, version 2.0. Geneva: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva.
- Song Chang-mei, Wen Xiao-peng, Yang Er-tai. 2011. Cherry germplasm from Guizhou Province analyzed by ISSR markers. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (8): 1531 – 1538. (in Chinese)
- 宋常美, 文晓鹏, 杨尔泰. 2011. 贵州樱桃种质资源的 ISSR 分析. *园艺学报*, 38 (8): 1531 – 1538.
- Song Yang, Zhang Chun-yu, Zhang Zhi-dong, Wen Jing-hui, Li Ya-dong, Wu Lin, Liu Hai-guang. 2011. Genetic relationship of blackcurrant cultivars revealed by ISSR markers. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (9): 1747 – 1752. (in Chinese)
- 宋 杨, 张春雨, 张志东, 温景辉, 李亚东, 吴 林, 刘海广. 2011. 黑穗醋栗品种亲缘关系的 ISSR 分析. *园艺学报*, 38 (9): 1747 – 1752.
- Spiess E B. 1989. *Genes in population*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons: 787 – 792.
- Wright S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*, 28: 114 – 138.
- Wright S. 1965. The interpretation of population structure by F statistics with special regard to system of mating. *Evolution*, 19: 395 – 420.
- Yu De-jun, Lu Ling-di, Gu Cui-zhi, Guan Ke-jian, Li Chao-luan. 1985. China flora. Vol.37. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 俞德浚, 陆玲娣, 谷粹芝, 关克俭, 李朝銮. 1985. 中国植物志. 第 37 卷. 北京: 科学出版社.
- Yeh F C, Yang R C, Boyle T. 1999. POPGENE Version 1.31, Microsoft windows-based freeware for population genetic analysis. Edmonton: University of Alberta.