文章编号: 1001-1498(2010)06-0850-06

运用 AFLP 技术分析筇竹种群遗传多样性

茹广欣[1], 袁金玲[2], 张 朵[1,2], 郭广平[2]

(1. 河南农业大学林学院林学系, 河南 郑州 450002; 2. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

摘要: 利用 AFLP 分子标记技术对筇竹 2 个种群的遗传多样性进行了分析, 筛选出 10 对多态性和清晰度较高的引物组合, 共获得 680 个 AFLP 位点, 其中多态性位点 662 个, 平均多态性检出率为 97.20%, 并用 PopGen32 软件对 AFLP 多态性数据进行分析, 结果表明, 供试 2 个筇竹种群均具有丰富的遗传多样性, 多态位点百分率分别为 89.86% 和 91.95%, 等位基因数分别为 1.898 6 和 1.919 5, 有效等位基因数分别为 1.585 0 和 1.568 3, 种群内遗传多样性为 0.332 1, 种群水平平均 Nei's 遗传多样性为 0.394 9, Shannon 信息指数为 0.575 4, 基因流为 2.900 9, 遗传一致度为 0.821 9, 遗传距离平均值为 0.196 1。并根据遗传距离进行了 UPGMA 聚类分析。

关键词: 筇竹; 遗传多样性; AFLP

中图分类号: S795.9 **文献标识码**: A

Analysis of Populations Genetic Diversity of *Qiongzhuea tumidinoda* Using AFLP Markers

RU Guang-xin[1], *YUAN Jin-ling*[2], *ZHANG Duo*[1,2], *GUO Guang-ping*[2]

(1. College of Forestry, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China;
2. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

Abstract: Amplified fragment length polymorphism (AFLP) was used to analyze the genetic diversity of 2 diferent populations of *Qiongzhuea tumidnoda*. Ten primer pairs with higher polymorphic were selected from *EcoRI/MseI* primers, Total of 680 loci of the *Qiongzhuea tumidnoda* genome were examined for molecular variation and 662 loci were polymorphic (97.20%). PopGen32 data processing software gave out that the rate of polymorphism were 89.86% and 91.95%; the number of alleles were 1.898 6 and 1.919 5; the effective number of alleles were 1.585 0 and 1.568 3; the average genetic identities within 6 populations was 0.332 1; the average genetic identities within the 2 populations was 0.394 9; Shannon information index was 0.575 4. The genetic differentiation coefficient among the 2 populations was 0.148 8. The gene flow among the 2 populations was 2.861 0. The average genetic identity was 0.821 9 and the average genetic distance was 0.196 1. The 2 populations were divided according to the UPGMA cluster analysis.

Key words: *Qiongzhuea tumidnoda*; genetic diversity; AFLP

筇竹(*Qiongzhuea tumidnoda* Hsueh et Yi)是我国特有的禾本科竹亚科植物, 为国务院公布的第 1 批《中国珍稀濒危保护植物目录》中仅列入的 2 个二类保护竹种之一[1]。其天然分布于我国金沙江下游的云南省昭通地区 11 个县(市)和四川省雷波、叙永、筠连、马边等县海拔 1 800～2 300 m 的高山山区, 呈纯林生长或与阔叶林混生, 总面积约 23 000 hm^2, 对我国西南高海拔地区的水土保持、生态环境维护具有重要的作用[2-4]。由于长期掠夺式的采笋伐竹, 导致筇竹种群退化。目前有关筇竹的研究较

收稿日期: 2010-05-16
基金项目: 中国林科院亚热带林业研究所基本科研业务费项目(6807); "十一五"林业科技支撑计划专题(2006BAD19B0202); 国家林业局重点项目(2006-64)
作者简介: 茹广欣(1963—), 男, 河南洛阳人, 博士生导师.

少, 主要集中在生长规律、开花结实特性、竹笋成分以及引种育苗等方面, 对于筇竹属内遗传多样性的研究未见报道, 这对该竹种的保护和利用造成了很大的困难。AFLP 标记是一种 DNA 指纹分析技术, 在树木的数量性状定位、种质资源鉴定、遗传连锁图谱构建、种群遗传结构及多样性研究、演化和亲缘关系研究等方面有着广泛的应用[5]。目前国内外关于竹类植物 AFLP 方面研究报道多集中在竹类植物属间关系及系统分类方面, Loh 等[6]运用 AFLP 技术, 对竹亚科中簕竹属(*Bambusa* Schreb.)、麻竹属(*Dendrocalamus* Nees)、巨竹属(*Gigantochloa* Kurz) 和条竹属(*Thyrsostachys* Gamble) 的 15 个竹种进行了 AFLP 分析, 并根据 AFLP 产生的特异性条带得到了不同竹种之间的亲缘关系; Marulanda 等[7] 利用 AFLP 技术分析了美国大型用材竹瓜多竹(*Guadua angustifolia* Stkiata) 及其近缘属的遗传多样性, 发现瓜多竹属(*Guadua* Kunth) 存在明显的遗传分化, 扩增出的条带表现为多态性, 近缘属中也存在较高的遗传多样性; 胖铁良等[8] 利用 AFLP 分子标记对竹类植物 6 个不同属的 35 个品种进行亲缘关系的分析, 依据 AFLP 标记的聚类结果: 以遗传距离 0.403 为分类界限, 35 个供试品种大致可以聚为两类。对于筇竹属内遗传多样性的研究还是空白, 本文利用 AFLP 分子标记对珍稀保护竹种筇竹种群遗传结构进行研究, 分析该物种珍稀或濒危的原因和进化潜力, 为建立和保护筇竹核心种质资源提供可靠的依据和对策。

1　材料与方法

1.1　实验材料

实验用材料采自浙江省富阳市中国林科院亚热带林业研究所试验苗圃两年生实生筇竹苗, 竹苗用云南省绥江县和四川省叙永县采取的两个种源的筇竹种子培育得到[4]。云南绥江县位于 103°47′E, 28°21′N, 四川叙永位于 105°16′E, 27°55′N, 试验苗圃地处 119°56′E, 30°05′N, 海拔 50 m。属中亚热带东部季风气候区, 年降水量 1 300～1 500 mm, 最热月平均气温 28.7 ℃, 最冷月平均气温 3.6 ℃, 年均气温 16.1 ℃, 年均无霜期 230 天, 年平均相对湿度 79%, 土壤为花岗岩发育的砂质山地黄壤。每个种群随机采取 32 单株, 采取当年生新鲜叶片提取 DNA 备用。

1.2　DNA 提取和检测

参照 Doyle 等经典的 CTAB 法[9] 略加改变来提取基因组 DNA 并进行纯化。具体方法: 取适量的筇竹嫩叶叶片于研钵中, 加入适量 PVP、液氮研磨成粉状, 转入 1.5 mL 离心管中, 加入 0.6 mL 65 ℃预热的 CTAB 提取缓冲液(0.1 mol·L^{-1} Tris, 0.05 mol·L^{-1} EDTA, 1.5 mol·L^{-1} NaCl, 2% CTAB), 放入 65 ℃水浴中加热 30 min, 期间不时晃动摇匀; 加入等体积的氯仿∶异戊醇(24∶1) 混合液, 混匀, 室温放置几分钟; 4℃ 10 000 r·min^{-1}离心 10 min, 取上清液转入新的 1.5 mL 的离心管中; 加入 2 倍体积的冰冷的无水乙醇, 混匀, 冷藏 2 h 或者过夜; 然后 4℃ 10 000 r·min^{-1}离心 10 min, 弃上清, 收集沉淀, 用 75% 乙醇清洗 2 次, 沉淀自然风干后溶于 100 μL 1 ×TE 中; 加入 1/2 体积的 1∶1 的酚仿, 混匀 2～3 min, 静置 2～3 min 后再混匀, 8 000～10 000 r·min^{-1}离心 5～10 min, 取上清, 加入氯仿, 8 000～10 000 r·min^{-1}离心 5 min; 取上清, 加入二倍体积的预冷的无水乙醇, 弃上清, 收集沉淀, 用 75% 乙醇清洗 2 次, 沉淀自然风干后溶于 1 ×TE 中, -20 ℃保存备用。通过测定紫外光吸收值来确定 DNA 浓度和纯度, 利用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 完整性。

1.3　AFLP 分析

1.3.1　酶切与连接　AFLP 实验过程参考胖铁良[8] 等的方法略作修改, 酶切体系为: 600 ng DNA, 10U EcoR I, 10U Mse I, 2 μL 10 ×T4 DNA 连接酶缓冲液, ddH_2O 补充至 20 μL。在 37℃ 3 h, 65℃ 10 min 的条件下进行双酶切, 然后取 10 μL 酶切溶液, 加入 10 μL 连接混合液: 1 μL 10 ×T4 DNA 连接酶缓冲液, 20 μmol·L^{-1} Mse I 接头和 EcoR I 接头各 1.25 μL, 3U T4-DNA 连接酶 0.5 μL, ddH_2O 补充至 10 μL。在 PCR 上 16 ℃ 连接 10 h。

1.3.2　预扩增　预扩增时取连接产物 5 μL, E00 和 M00(20 U·μL^{-1}) 各 0.6 μL, 10 ×PCR buffer 2 μL, 2.5 mmol·L^{-1} dNTPs 2 μL, 5U Taq 酶 0.2 μL, 用 ddH_2O 补到 20 μL。预扩增 PCR 反应程序: 94 ℃变性 2 min, 94 ℃ 变性 50 s, 55 ℃ 退火 50 s, 72 ℃延伸 60 s, 共 30 个循环; 10 ℃ 保温。

1.3.3　选择性扩增与引物筛选　参考其他竹类 AFLP 分析的文献[6-8、10-11] 中的引物组合选取部分引物, 通过预备试验, 筛选出扩增产物稳定、重复性好、多态性高且分辨能力强的引物对, 对所有供试个体的基因组 DNA 预扩产物进行选择性扩增。取 3 μL 稀释 15 倍后的预扩增产物, 20 U·μL^{-1} EcoR I 和 Mse I 选扩引物各 0.6 μL, 10 ×PCR buffer 2 μL,

2.5 mmol·L^{-1} dNTPs 2 μL, 5U Taq 酶 0.2 μL, 用 ddH_2O 补到 20 μL 进行选择性扩增。选择性扩增 PCR 程序: 94 ℃ 变性 30 s, 65 ～ 56 ℃(每次循环降低 0.7 ℃) 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 60 s, 共 13 个循环; 然后 94 ℃ 变性 30 s, 56 ℃ 退火 30 s, 72 ℃延伸 60 s, 共 20 个循环, 10 ℃保温。所有 PCR 反应均在 ABI-2720 型 PCR 扩增仪上进行。

所用 EcoR I 酶以及所用接头、引物购自上海英骏生物工程技术服务有限公司, Mse I 酶、T4 DNA Ligase 酶购自 Promega 公司。接头和引物序列详见表 1。

表 1 扩增引物名称与序列

EcoR 引物	引物序列	Mse 引物	引物序列
adaptor E1	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'	adaptor M1	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
adaptor E2	3'-CTGACGCATGGTTAA-5	adaptor M2	3'-TACTCAGGACTCAT-5'
E-AAC	5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3'	M-CAA	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3'
E-ACA	5'-GACTGCGTACCAATTCACA-3'	M-CAC	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'
E-ACG	5'-GACTGCGTACCAATTCACG-3'	M-CAG	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'
E-CTA	5'-GACTGCGTACCAATTCCTA-3'	M-CAT	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3'
		M-GCG	5'-GATGAGTCCTGAGTAAGCG-3'

1.3.4 聚丙烯酰胺电泳 选择性扩增产物用 6% 变性聚丙烯酰胺胶(厚度 0.4 mm) 和 1 ×TBE 电泳缓冲液电泳分离。电泳仪为 JY-ECP3000, 电泳槽为 JY-CX2B 型垂直电泳槽, 电泳仪和电泳槽均购自北京君意东方电泳设备有限公司。预电泳 30 min 后上样, 90 W 恒功率电泳约 2 h 后银染检测。

1.4 数据分析

对扩增产物的电泳结果采用 "1-0" 系统记录谱带, 观察电泳图谱中同一位置上 DNA 带的有无, 有带记为 "1", 无带记为 "0", 将统计结果输入计算机。应用 POPGENE32 Version 1.32 [12-13] 计算以下遗传多样性各参数: 多态带数(AP)、多态位点百分率(P)、Nei's 基因多样性指数(H)、Shannon 信息指数(I)、遗传分化系数(Gst) 和基因流(Nm)、Nei's 遗传距离(D) 和遗传一致度(I) 等, 根据 Nei's 遗传距离, 利用 NTSYS-pc 2.1 软件对种群进行 UPGMA 分析[14], 生成聚类图。

2 结果与分析

2.1 AFLP 扩增片段的多态性

从所有引物组合中筛选出扩增产物稳定、重复性好、多态性高且分辨能力强的 10 对引物组合(表 2) 对筇竹 2 个种群的个体进行扩增, 共检测到大小在 100 ～ 800bp 之间的 680 条 DNA 片段, 其中多态性片段 662 条, 每个引物组合平均检测到多态性片段 66.2 条, 平均多态性比率为 97.20%, 表明 10 对引物组合具有较强的检测筇竹种群内及种群间遗传变异的能力, 与李潞滨等[12] 结论一致。筛选出的引物组合扩增出条带的多态性比率均超过 90%, 其中 E-ACA/M-CAA 检测到的条带最多, 但是多态性却不是最高的; E-AAC/M-CAC 检测到的条带多态性最高, 多态性比率为 100% (图 1)。

表 2 不同引物组合在筇竹种群中的多态位点比率

引物组合	多态带(AP)	总带数	多态性比率/%
E-ACA/M-CAT	52	56	92.86
E-ACA/M-CAA	87	88	98.86
E-AAC/M-CAT	61	62	98.39
E-ACG/M-CAC	54	55	98.18
E-ACA/M-CAC	63	66	95.45
E-ACA/M-CAG	51	53	96.23
E-ACG/M-CAT	66	67	98.51
E-ACG/M-CAG	80	83	96.39
E-AAC/M-CAC	80	80	100.00
E-ACG/M-CAA	68	70	97.14
(平均值)	66.2	68	97.20

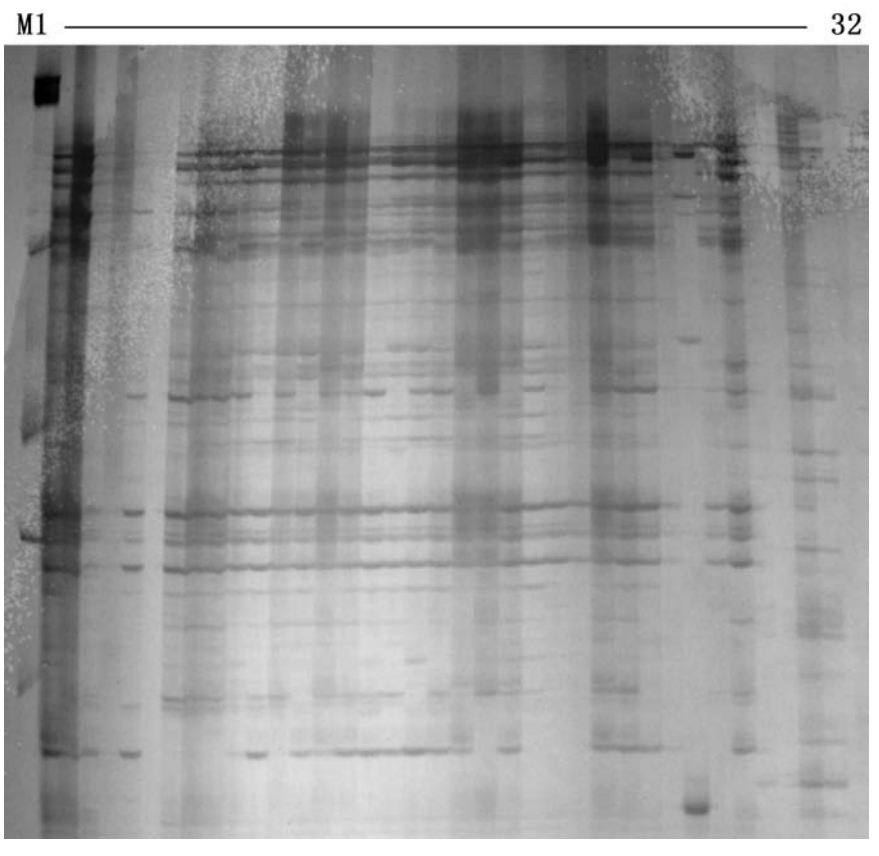


图 1 绥江样品的 AFLP 扩增谱带

2.2　筇竹的遗传多样性

多态位点百分率、Nei s 基因多样性指数、Shannon 信息指数是度量遗传多样性水平的常用指标。从表 3 可以看出, 10 对引物组合对叙永的材料扩增出的条带多态性大于绥江材料的条带多态性、两个种群的基因多样性分别为 0.333 7 和 0.331 8、Shannon 信息指数分别为 0.492 2 和 0.494 3。叙永种群的材料扩增出的条带百分率和 Shannon 信息指数均比绥江种群的条带百分率和 Shannon 信息指数大, 但是叙永种源扩增出的有效基因位点比绥江种源小, Nei s 基因多样性指数也比绥江种群小。

表 3　筇竹种群遗传多样性

种群	样本大小	多态带(AP)	多态带百分率(P)/%	*na*	*ne*	*H*	*I*
绥江	32	612	89.86	1.898 6	1.585 0	0.333 7	0.492 2
叙永	32	625	91.95	1.919 5	1.568 3	0.331 8	0.494 3
种群间	32	618.5	90.91	1.909 1	1.576 7	0.332 7	0.493 2
种水平	64	662	97.20	1.972 0	1.704 5	0.394 9	0.574 5

注: *na* = 观测等位基因数; *ne* = 有效等位基因数 [Kimura and Crow (1964)]; *H* = Nei s 基因多样性指数; *I* = Shannon s 指数。

2.3　筇竹种群遗传分化

筇竹种群总的遗传多样性指数(Ht)为 0.394 9, 种群间的遗传多样性(Dst)为 0.062 2, 种群内遗传多样性(Hs)为 0.332 7, 表明筇竹种群内遗传多样性大于种群间遗传多样性; 也说明筇竹遗传分化主要存在于种群内部。种群分化系数(Gst)为 0.157 2, 并根据 $Nm = (1 - Gst)/4Gst$, 得出筇竹种群水平上的基因流(Nm)为 2.900 9。

表 4　筇竹种群遗传分化

项目	*Ht*(总体遗传多样性)	*Hs*(种群内遗传多样性)	*Dst*(种群间遗传多样性)	*Gst*(分化率)	*Nm*(基因流)
平均值	0.394 9	0.332 7	0.062 2	0.157 1	2.900 9
标准差	0.013 2	0.014 4			

2.4　筇竹种群关系与聚类分析

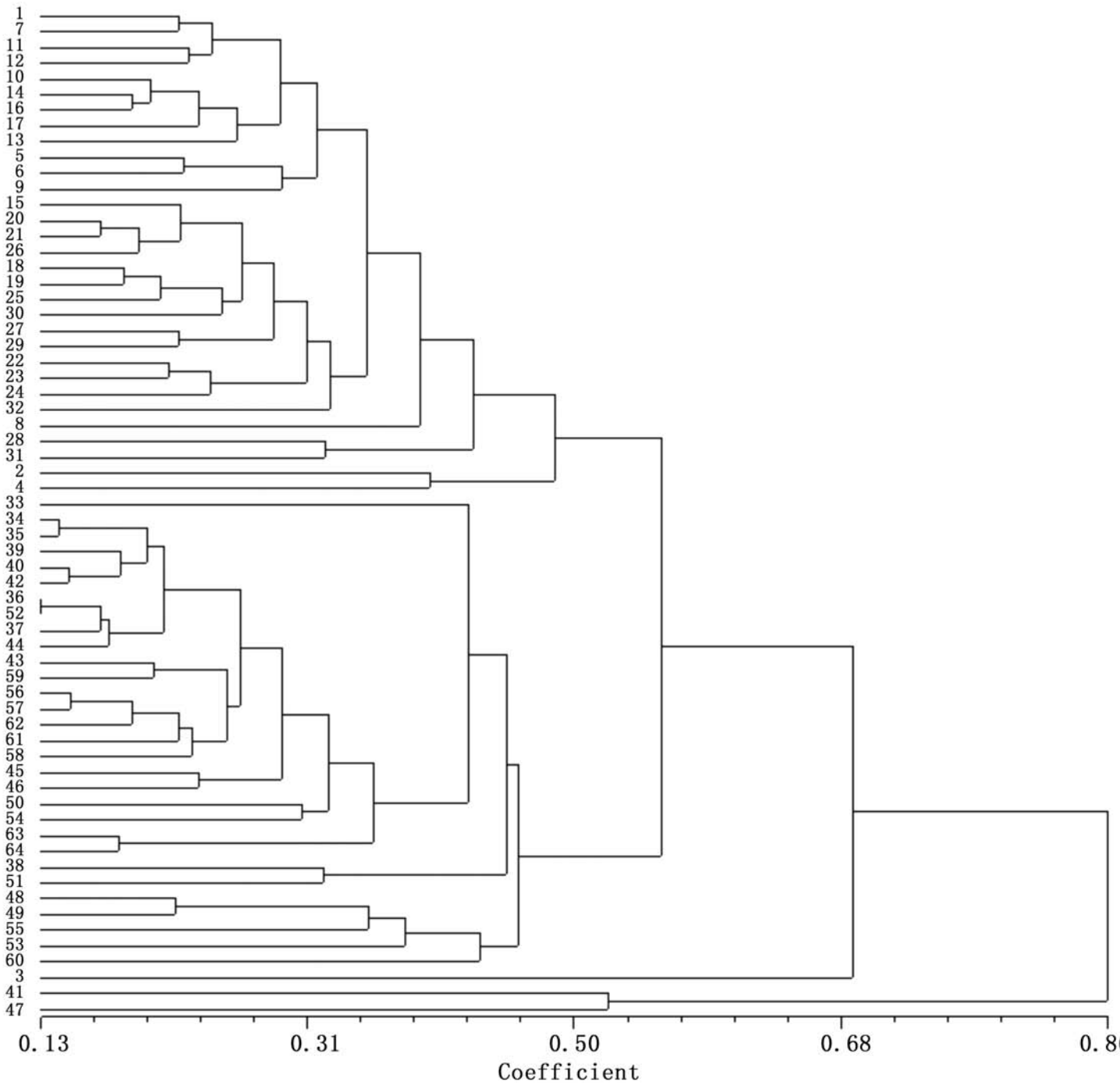
遗传距离和遗传一致度作为进一步评价筇竹种群之间的遗传分化程度的依据。本实验利用 POPGEN32 软件计算了 Nei s 遗传距离(D)为 0.196 1、遗传一致度(I) 为 0.821 9, Nei s 相似系数是用来比较种群或个体间相似程度的度量参数, 平均相似系数越高, 说明相似程度越大, 遗传背景一致性越强[15], 说明筇竹两个种群间遗传分化程度很小, 具有高度的遗传一致性。

根据 Nei s 遗传距离, 采用 UPGMA 法对筇竹种群进行聚类分析结果如图 2 所示。由聚类图看出绥江种源遗传一致性比叙永种源遗传一致性高。绥江种源中的 3 号材料、叙永种源中 41、47 号材料与该种源中其它材料遗传距离较远, 但绥江种源的遗传相似度明显高于叙永种源; 而在这 3 个材料之外, 绥江种源和叙永种源的遗传距离在 0.57 处, 明显聚为两个种群, 也说明了两个种群间存在一定的遗传差异; 并且聚类结果与计算的遗传多样性结果一致。

3　结论与讨论

一个物种的进化潜力和抵御不良环境的能力既取决于种内遗传变异的大小, 也有赖于种群的遗传结构[16]。本研究结果表明, 10 对 AFLP 引物组合对筇竹供试材料扩增出多态性位点 662 个, 每对引物平均多态性位点 66.2 个, 而且每对引物扩增出多态性条带的比率均在 90% 以上, 平均多态性条带比率为 97.20%, 说明供试的筇竹材料的基因多样性较高。胖铁良等[8] 利用 10 对 AFLP 引物组合对 35 个竹子品种扩增出 872 个位点, 多态性位点比率为 95.87%; 李潞滨等[10] 利用 10 对 AFLP 引物组合对 26 个竹子品种共扩增出 733 个多态性位点, 多态位点比率为 87.45%。与他们的研究结果相比, 本实验所选用的引物组合总扩增条带相对少一些, 但是多态性位点的比率较高。

利用 AFLP 分子标记技术对筇竹种群的遗传多样性和遗传分化进行了分析, 筇竹遗传多样性的实验结果为: 种群水平的平均多态位点百分率为 97.20%, 种群间的平均多态位点百分率为 90.91%; 种群间和种群水平的 Nei s 基因多样性指数(Hs)和 Shannon 信息指数(I)值均表明, 筇竹种群水平和种群间都有较高的遗传多样性, 但是种群水平遗传多样性要高于种群间的遗传多样性; 种群分化系数是种群间的遗传变异与总遗传变异的比值,



注:1～32 为绥江种源,33～64 为叙永种源

图 2 筇竹种群 Nei s 遗传距离的 UPGMA 聚类图

是判断遗传变异的主要来源。筇竹种群间的遗传多样性(Dst)为 0.062 2,种群分化系数(Gst)为 0.157 2,这说明由于地理隔离,筇竹种群间存在一定的遗传分化,而且筇竹种群内的变异明显大于种群间,即遗传多样性主要存在于种群内。本研究所得的筇竹种群总的遗传多样性(H = 0.394 9, I = 0.574 9)高于毛竹(*Phyllosachys edulis* H. de Lehaie)天然种群的遗传多样性(H = 0.157 8, I = 0.241 8)[17]、巨龙竹(*Dendrocalamus sinicus* Chia er J. L. Sun)种下变异类型的遗传多样性(H = 0.329 3, I = 0.487 8)[18]。Zawko 等[19]认为,濒危或者分布狭窄的物种存在较高水平的多样性,可能与该种的进化历史有关。筇竹表现出丰富的遗传多样性可能是因为在进化过程中保留了广泛的遗传基础,也可能是由于在后期的自然选择过程中产生了丰富的遗传变异。

基因流是影响种群内部和种群间遗传变异程度的重要因素[20]。还是影响植物种群的遗传组成和遗传结构的重要因子,基因流的大小同样可以反映种群遗传结构的大小,一般来说,大的基因流能够阻止种群间的遗传分化,因此基因流大的物种,种群间的遗传分化就小,而基因流小的物种,种群间的遗传分化就大。Wright[21]认为,当 $Nm > 1$ 时,说明种群间存在一定的基因流动。而本实验数据分析结果表明筇竹种群水平上的基因流(Nm)为 2.900 9 >1,说明筇竹种群间存在基因流动,种群间的遗传分化较小,这与实验所得种群间和中群内的遗传多样性以及遗传分化系数分析结果相一致。而本实验所用筇竹材料为筇竹天然林开花结实的实生苗,表明筇竹存在自然的有性繁殖现象;又因其多分布在高山山区,花粉可借助风力远距离传播,造成筇竹种群间有一定的基因交流,这也是造成筇竹种群间遗传分化小于种群内的一个重要原因。

根据 Nei s 遗传距离聚类分析可以看出,两个种

群中供试材料从总体上看能够清楚的聚类区别, 但是绥江种群的 3 号材料聚类结果和叙永种群的遗传关系更近, 可能是人为在播种或者收集实验材料时的错误, 也可能是两个种源间的基因流动或两个种源有着共同的遗传起源造成。但总的来说, 种群间的遗传差异不大。

根据本研究对筇竹两个种群的遗传多样性的分析, 表明筇竹种群内有较高的遗传多样性, 有利于保存筇竹种质资源。对于保护筇竹来说, 由于筇竹不同种群间出现了一定程度的遗传分化, 建议在迁地保护和取样时, 不仅要在每个种群中取足够多的个体, 而且要在尽可能多的种群中取样, 最大限度地保护筇竹的遗传多样性, 为今后进一步研究筇竹的系统演化奠定基础。

参考文献:

[1] 傅立国, 金鉴明. 中国植物红皮书——稀有濒危植物: 第 1 册[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 318 - 319

[2] 袁金玲, 熊登高, 胡炳堂, 等. 珍稀保护竹种筇竹笋营养成分的研究[J]. 林业科学研究, 2008, 21(6): 773 - 777

[3] 董文渊, 黄宝龙, 谢泽轩, 等. 筇竹秆花结实特性的研究[J]. 南京林业大学学报, 2001, 25 (6): 30 - 32

[4] 袁金玲, 熊登高, 金 光, 等. 珍稀保护竹种筇竹引种育苗研究[J]. 林业科学研究, 2009, 22 (2): 166 - 170

[5] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005

[6] Loh Jin Phang, Ruth Kiew, Ohm Set, *et al*. . A study of gentic variaton and relationships within the bamboo subtribe Bambnsirlae using amplified fragment length polymorphism [J]. Annals of Botany, 2000, 85: 607 - 612

[7] Marulanda M L, Marquez P, Londo O X. AFLP analysis of *Guadua angustifolia (Poaceae: Bambusoideae)* in Colombia with emphasis on the Coffee Region[J]. Bamboo Science and Culture, 2002, 16(1): 32 - 42

[8] 胖铁良, 郭晓军, 李璐滨, 等. 利用 AFLP 分子标记技术探讨部分竹类植物属间亲缘关系[J]. 植物生理与分子生物学研究, 2009, 280 - 284

[9] Doyle J J, Doyle D J. Isolation of plant DNA from fresh tissue[J]. Focus, 1990, 12: 13 - 15

[10] 李潞滨, 郭晓军, 彭镇华, 等. AFLP 引物组合数量对准确研究竹子系统关系的影响[J]. 植物学通报, 2008, 25(4): 449 - 454

[11] 卢江杰, 郑　蓉, 杨　萍, 等. 利用 AFLP 技术研究不同产地绿竹的遗传多样性[J]. 世界竹藤通讯, 2008, 6(5): 10 - 14

[12] Nei M. Molecular Population Genetics and Evolution[M]. Amsterdam and New York: North Holland, 1973

[13] Yeh F C, Yang R. POPGENE v1.31 [EB/OL]. http://www.ualberta.ca/~fyeh.

[14] Rohf F J. NTSYS—pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.1 [M]. Exeter Software, Setauket, New York: 2000

[15] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual [J]. Genetics, 1978, 89: 583 - 590

[16] Arise J C, Hamrick J L. Conservation Genetics, Case Histories from Nature[M]. Chapman& Hal1, New York: 1996: 189 - 190

[17] 魏　瑜, 毛竹等 36 种竹类植物的 RAPD 分析[D]. 福州: 福建师范大学, 2005

[18] 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

[19] Zawko G, Kranss S L, Dixon K W, *et al*. . Conservation genetics of the rare and endangered *Leueopogon obtectus*(Ericaeeae) [J]. Moleculer Ecology, 2001, 10(10): 2389 - 2396

[20] Slatkin M. Gene flow and the geographic structure of natural populations [J]. Science, 1987, 236 (4803): 787 - 792

[21] Wirght S. The genetic structure of populations[J]. Ann Eugen, 1951, 15: 323 - 354