

濒危植物绵刺 8 个种群遗传多样性的 AFLP 分析

张永明¹, 金 洪², 马万里^{1,3,*}, 李景环¹

(1. 内蒙师范大学生命科学与技术学院, 内蒙古 呼和浩特 010022; 2. 内蒙古农业大学生态环境学院, 内蒙古 呼和浩特 010019;
3. 国家林业局林产工业规划设计院, 北京 100714)

摘要: 利用 8 对 AFLP 引物对我国绵刺的 8 个种群 240 份材料的基因组 DNA 进行扩增, 得到大小在 65 ~ 530bp 之间的 397 条清晰显带, 其中 296 (74.56%) 条呈多态性, 平均每对 AFLP 引物得到 37 条多态性带; 用 PopGen32 软件将 AFLP 多态性数据进行分析, 不同种群的 Nei's 基因多样性指数和 Shannon 信息指数变化范围分别在 0.0845 ~ 0.1779 和 0.1280 ~ 0.2377 之间, 其中遗传多样性最高为上沙窝种群, 最低为银根种群, 可将上沙窝种群作为种质遗传中心之一进行保护。绵刺遗传变异有 68.31% 存在种群内, 31.69% 种群之间, 说明变异主要存在于种群内部。8 个种群的平均遗传距离为 0.1341, 按 UPGMA 进行聚类分析, 结果表明绵刺种群具有明显的地域相关性和遗传类型趋同性, 说明不同的种群可能有共同的起源, 随机遗传漂变不是影响绵刺种群遗传多样性的主要过程。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, 最大限度地保护绵刺的遗传多样性, 为进一步地系统演化研究奠定基础。

关键词: 绵刺; 种群; 遗传多样性; AFLP

文章编号: 1000-0933(2009)05-2686-08 中图分类号: Q16, Q948, X176 文献标识码: A

Eight populations genetic diversity analysis of endangered species *Potaninia mongolica* Maxim. based on AFLP markers

ZHANG Yong-Ming¹, JIN Hong², MA Wan-Li^{1,3,*}, LI Jing-Huan¹

1 College of Life Science and Technology in Inner Mongolia Normal University, Hohhot, Inner Mongolia 010022, China

2 College of Ecology and Environment in Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010019, China

3 Planning and Design Academy of Forestry Products Industry State Forestry Administration, Beijing 100714, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(5): 2686 ~ 2693.

Abstract: Genomic DNA of 240 plant samples from eight populations of *Potaninia mongolica* Maxim. in China was amplified with 8 pairs of primer to evaluate the population genetic diversity of this endangered species by using amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis. 397 clear bands from 65 to 530bp were available for analysis and 296 (74.56%) of them were polymorphic. So it amplified 37 polymorphic bands for each pair of AFLP primer. PopGen32 data processing software gave out that Nei's gene diversity index ranged from 0.0845 to 0.1779 and Shannon's information index ranged from 0.1280 to 0.2377 for the 8 populations, among them the highest population genetic diversity level was in Shangshawo which will be one of the germplasm centers and the lowest of it was in Yingen. The analysis of variance showed that the variance between populations was 31.69% and the main variance was 68.31% within populations, the UPGMA cluster analysis showed that the mean genetic distance among the 8 populations was 0.1341. the UPGMA cluster analysis results also revealed that the population genetic diversity of *P. mongolica* Maxim was closely related to its distribution area and had high genetic similarity between the populations. This conclusion implied that population of *P. mongolica* Maxim. had same origin and genetic drift was of no importance for its diversity. The research suggest that the best way for ex situ conservation was collecting sufficient individual plant from as many populations as possible and bring the full effort to keep

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30560030); 内蒙古师范大学自然科学基金资助项目(QN06039)

收稿日期: 2008-01-27; 修订日期: 2008-08-15

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wanlima518@126.com

the genetic diversity of it, because this is the basis for the study of systematic evolvement of *P. mongolica* Maxim.

Key Words: *Potania mongolica* Maxim. ;population;genetic diversity;AFLP

绵刺(*Potania mongolica* Maxim.)是蔷薇科古地中海孑遗植物,为单属、种小灌木,属国家二级保护植物,绵刺分布区均属于干旱荒漠区内山前冲积、洪积沙砾质戈壁与走廊绿州的相逢线地区,垂直分布范围在海拔1000~1800m之间^[1]。目前仅分布在亚洲中部的西鄂尔多斯高原极为有限的狭小区域,在中国绵刺的分布范围为最西端在甘肃玉门市西南部的昌马河(97°E),最东在鄂尔多斯高原西北部乌加庙一带(107°30'E),最南端到甘肃景泰上沙窝(37°30'N)^[2],最北端在中蒙边界附近银根一带(41°52'N)。绵刺不仅具有性繁殖方式,同时还具有由劈根和天然压条等营养繁殖构成的无性繁殖方式^[3],虽然能够很好的适应恶劣的环境,但长期以来,受不同因素的影响,其分布范围和种群数量明显减少。目前对绵刺的研究主要集中在生物学特性^[4],生理抗性^[5,6],生殖生态学特性^[1,7~11]等方面的研究。绵刺虽然能够很好的适应恶劣的环境,但其分布区的面积在逐渐缩小,而且绵刺群落中的生物多样性也在不断的降低,造成这种局面的根本原因尚未找到。目前我国十分重视对荒漠植物种质资源保护和开发利用,研究的内容以基础理论为前提开始向微观的分子水平方向转移,利用分子标记的方法对绵刺种群遗传多样性进行研究,将对绵刺种群的保护和种质资源的保存利用具有很重要的理论价值和指导依据。

AFLP(amplified fragment length polymorphism)即扩增片段长度多态性,是由荷兰 Keygen 公司的 Zabeau 和 Vos 等人发明的一种分子标记^[12,13]。AFLP 自问世以来被广泛应用于遗传多样性研究中,如紫茎泽兰^[14]、腊梅^[15]。一个种群遗传多样性越丰富,对环境的适应能力就越强,越容易扩展其分布范围和开拓新的环境。可见物种或种群进化潜力和适应环境的能力取决于遗传多样性的多少。遗传多样性的研究尤其为分析物种珍稀或濒危的原因和进化潜力提供重要资料,对物种保护具有指导意义^[16]。利用 AFLP 分子标记的方法对不同地理分布区域的珍稀濒危物种绵刺种群遗传结构进行分析研究,探索绵刺种群遗传背景、进化过程及致濒原因,为建立和保护绵刺“种质中心”提供可靠的依据及对策。

1 材料和方法

1.1 材料收集

在国内绵刺分布范围内选取具有代表性的8个种群(图1、表1),每个种群采集30单株,根据随机取样原则,取样的绵刺株距在30m以上,每株采集约5g叶片和幼嫩枝稍。将所采集的材料装入盛有硅胶的封口袋

表1 绵刺种群采集地及生境特点
Table 1 Localities and habitats of populations of *P. mongolica* Maxim.

种群编号 Population number	种群名称 Population name	样本数 Sample size	生境 Habitats	东经 Longitude	北纬 Latitude	海拔 Altitude(m)
YG	阿拉善盟银根 Yingen, Alashan	30	沙砾质荒漠 Grit desert	105°31′	41°06′	1218
XLGL	阿拉善盟锡林高勒 Xilingaole, Alashan	30	沙砾质荒漠 Grit desert	105°36′	39.08°05′	1242
BYNRC	阿拉善盟巴彦诺日公 Bayannuorigong, Alashan	30	砾石质山间谷地 Gravel valley	104°79′	40°18′	1032
GQRC	鄂托克旗公其日嘎 Gongqiriga, Etooke	30	覆沙戈壁 Gobi with sand-covered	107°17′	39°45′	1459
HHC	乌海黄河村 Huanghecun, Wuhai	30	沙砾质冲积扇 Grit alluvion	106°78′	39°68′	1068
LC	高台县罗城 Luo Cheng, Gaitai	30	沙砾质冲积扇 Grit alluvion	99°82′	39°38′	1456
SSW	景泰县上沙窝 Shangshawo, Jingtai	30	覆沙戈壁 Gobi with sand-covered	104°04′	37°30′	1610
HSG	民勤红砂岗 Hongshagang, Minqin	30	沙砾质冲积扇 Grit alluvion	103°08′	38°62′	1463

进行迅速干燥,将干燥的材料带回实验室于 -80°C 下保存以供提取 DNA 使用。

1.2 DNA 提取与检测

DNA 提取采用改进的十六烷基三甲基溴化胺 (CTAB) 法^[17]。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 实验

1.3.1 酶切与连接

实验参照 Vos 等^[13] 的方法略作修改,酶切连接一步完成。反应体系为:50pmol/ μl *EcoR* I 1.0 μl , 50pmol/ μl *Mse* I 1.0 μl , 10 $\times$ BSA 0.5 μl , 3U/ μl T4 DNA Ligase 0.5 μl , 10U/ μl *Mse* I adapter 0.3 μl , 10U/ μl *EcoR* I adapter 0.3 μl , 200ng/ μl DNA 2.0 μl , 加水至 20 μl , 37°C 恒温消化连接 8h (实验中所用的酶均由 New England Bio Labs 公司生产)

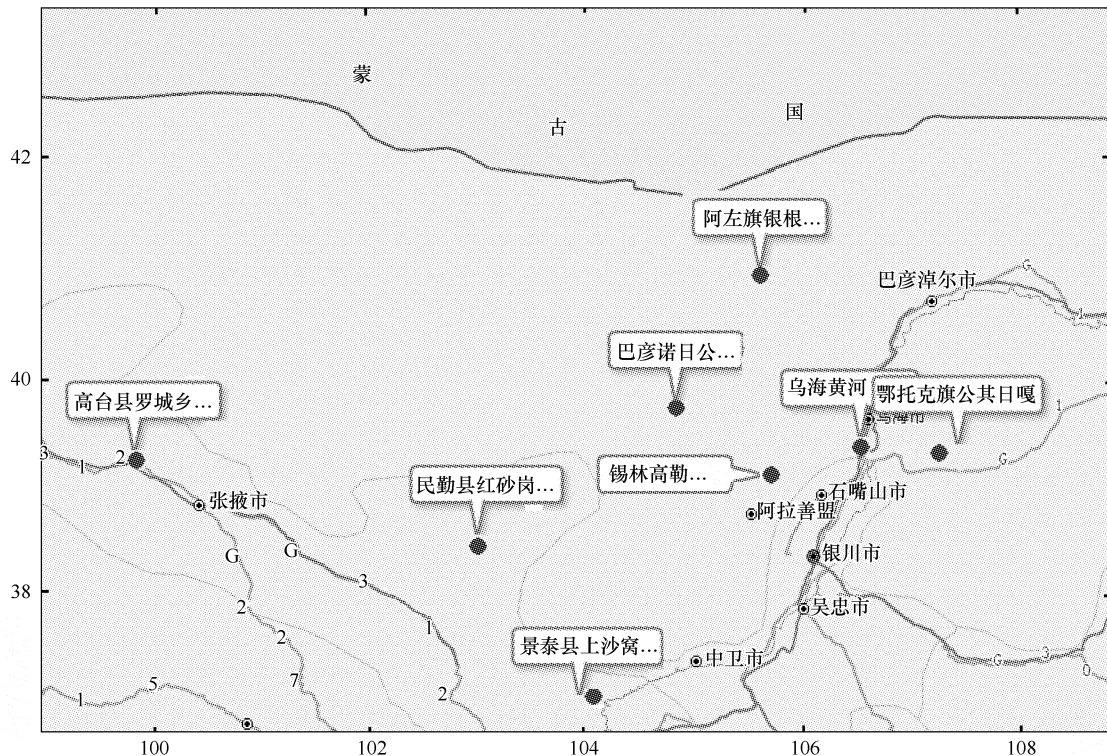


图1 绵刺自然种群采集地分布图

Fig. 1 Natural populations of *P. mongolica* Maxim in this study

1.3.2 PCR 预扩增

将酶切连接产物进行预扩增^[18],预扩增反应体系为: 50ng/ μl *EcoI* primer 0.6 μl , 50 ng/ μl *MseI* primer 0.6 μl , 25 mmol/l dNTPs 0.18 μl , 25mmol/l Mg^{2+} 1.2 μl , 10 $\times$ PCR buffer 2.0 μl , 5U/ μl Taq DNA polymerase 0.12 μl , 酶切连接后模板 4.0 μl 。预扩增 PCR 反应程序: 94°C 变性 30s, 56°C 退火 30s, 72°C 延伸 60s, 共 30 个循环; 72°C 延伸 3min。预扩增产物用 0.1 $\times$ TE 溶液稀释 20 倍,置于 -20°C 冰箱内保存,作为选择性扩增反应的模板。

1.3.3 引物筛选与选择性扩增

稀释后的预扩增进行选择性扩增^[19]。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个体的基因组 DNA 预扩产物进行选择性扩增。选择性扩增反应体系为: 50ng/ μl *EcoI* primer 0.8 μl , 50 ng/ μl *MseI* primer 0.8 μl , 25 mmol/l dNTPs 0.2 μl , 25mmol/l Mg^{2+} 1.3 μl , 10 $\times$ PCR buffer 2.0 μl , 5U/ μl Taq DNA polymerase 0.12 μl , 预扩增产物 4.0 μl 。选择性扩增 PCR 反应程序: 94°C 变性 30s,

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 28 个循环。所有 PCR 扩增反应均在美国生产的 (ABI) 9700 型 PCR 扩增仪上进行。

1.3.4 PCR 产物检测

选择性扩增产物加入加样缓冲液, 经 95℃ 变性 5min 后, 用 6% 的尿素变性聚丙烯酰胺凝胶 85W 恒功率电泳 3h 进行分离, 然后银染的方法进行检测。银染后的凝胶晾干后在 X 线胶片观察灯下观察数带并拍照记录。

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^[20,21] 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)、变异分量比率 (PVC)、Nei's 遗传距离 (D) 和遗传一致度 (I), 根据 Nei's 遗传距离, 利用 NTSYS-pc 2.1 软件对种群进行 UPGMA 分析^[22], 生成聚类图。

2 结果与分析

2.1 AFLP 扩增片段的多态性

从 64 对引物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 8 对引物对 8 个种群的 240 个个体进行扩增, 共检测到大小在 65 ~ 530bp 之间的 397 个 DNA 片段, 其中多态性片段 296 个, 每个引物组合平均检测到多态性片段 37 条, 平均多态性比率为 74.56% (表 2), 表明 8 种引物组合具有较强的检测绵刺种群间遗传变异的能力。多态性比率超过 80% 的引物组合有 E44/M44、E34/M60、E44/M63, 其中 E44/M44 检测到的多态性最高, 多态性比率为 85.5% (图 2)。

表 2 不同引物组合在绵刺种群中的多态位点比率及 DNA 扩增片段大小

Table 2 The ratio of polymorphic loci of every primer and the length of DNA fragment amplified in *P. mongolica* Maxim.

引物组合 Primer combination	选择性碱基序列 Selective base sequence	DNA 片段 (bp) DNA fragment	总带数 Whole fragment	多态带数 Polymorphic fragment	多态性比率 (%) Percentage of polymorphic fragment
E34/M60	AAT/CTC	65-495	53	43	81.4
E63/M31	GAA/AAA	88-385	30	18	60.0
E44/M44	ATC/ATC	75-440	76	65	85.5
E33/M44	AAG/ATC	105-530	43	31	72.1
E34/M31	AAT/AAA	85-525	57	41	71.9
E65/M46	GAG/ATT	68-485	39	25	64.1
E60/M63	CTC/GAA	82-490	35	21	60.0
E44/M63	ATC/GAA	80-428	64	52	81.3
平均 Average		65-530	49.63	37	74.56

2.2 绵刺种群的基因多样性

多态位点百分率、Nei 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, 在 8 个绵刺种群中, 多态位点百分率最高为上沙窝种群 87.91%, 最低为银根种群 61.96%。种群水平上的多态位点百分率为 76.07%, 物种水平上的多态位点百分率为 90.68%。Nei's 基因多样性指数和 Shannon 信息指数的变化范围分别在 0.0845 ~ 0.1779 和 0.1280 ~ 0.2377 之间。

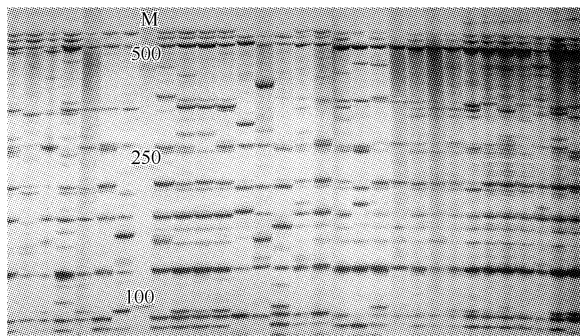


图 2 供试样品的 AFLP 扩增谱带 (E44/M44)

Fig. 2 AFLP fingerprinting patterns of samples using primer combination E44/M44

表 3 绵刺各种群的遗传多样性水平

Table 3 Genetic diversity among populations of *P. mongolica* Maxim.

种群 Population	样本大小 <i>N</i>	多态带数 <i>AP</i>	多态带百分率 <i>PPL</i> (%)	Nei's 基因多样性 <i>H</i>	Shannon 信息指数 <i>I</i>	变异分量比率 <i>PVC</i> (%)
银根 YG	30	262	61.96	0.0845	0.1280	—
上沙窝 SSW	30	349	87.91	0.1779	0.2377	—
公其日嘎 GQRG	30	329	82.87	0.1090	0.1692	—
罗城 LC	30	304	76.57	0.1181	0.1854	—
黄河村 HHC	30	262	65.99	0.1144	0.1734	—
锡林高勒 XLGL	30	274	69.02	0.1088	0.1654	—
巴彦诺日公 BYNRG	30	342	86.15	0.1145	0.1793	—
红砂岗 HSG	30	297	74.81	0.1101	0.1733	—
种群间 Populations level	30	302	76.07	0.1093	0.1708	31.69
种群内水平 Iner-population level	240	360	90.68	0.1805	0.2585	68.31

* 样本大小(*N*) Sample Number; 多态带数(*AP*) Polymorphic Fragment; 多态带百分率(*PPL*) Percentage of polymorphic Fragment; Nei's 基因多样性(*H*) Nei's gene diversity; Shannon 信息指数(*I*) Shannon's Information index; 变异分量比率(*PVC*) Percentage of Variance Component

绵刺种群水平和物种水平的 Nei's 基因多样性指数分别为 0.1093 和 0.1805, 说明绵刺种群内遗传多样性大于种群间遗传多样性; 绵刺种群间的 Shannon 信息指数是 0.1708, 种群内为 0.2585, 也说明绵刺遗传多样性主要存在于种群内部。由此可见, 这两种指数揭示了绵刺遗传变异规律的一致性, 而且最高为上沙窝种群($H=0.1779$; $I=0.2377$), 最低为银根种群($H=0.0845$; $I=0.1280$)。通过计算可知, 绵刺遗传变异有 68.31% 存在种群内, 31.69% 存在种群之间。

2.3 绵刺种群关系与聚类分析

利用 POPGEN32 软件计算了 Nei's 遗传距离(*D*)和遗传一致度(*I*), 作为进一步评价绵刺种群之间的遗传分化程度地依据。由表 4 可以看出, 各种群间的遗传距离范围在 0.0687~0.2019 之间, 其中高台县罗城种群和民勤红砂岗种群之间的遗传距离最小, 为 0.0687, 高台县罗城种群和阿拉善盟巴彦诺日公种群之间的遗传距离最大, 为 0.2019。遗传一致度变化范围为 0.8149~0.9325。

依据 Nei's 遗传距离, 采用 UPGMA 法对 8 个种群进行聚类分析结果如图 3 所示。罗城种群与红砂岗种群先到聚合到一起, 再与上沙窝种群聚合为 A 组群, 显示具有很近的亲缘关系; 黄河村种群、锡林高勒种群、银根种群与公其日嘎种群遗传差异较小聚合到一起成为 B 组群, 巴彦诺日公种群单独成为 C 组群。其中 B 组群与 C 组群遗传距离较近, 而 B、C 组群与 A 组群遗传距离远一些, 聚类结果表明空间距离分布较近的种群能够优先聚到一起, 表现出一定的地域相关性, 这可能与种群的起源有密切关系。

表 4 种群间的 Nei's 遗传相似度(右上角)和遗传距离(左下角)

Table 4 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) between Populations

种群 Population	银根 YG	上沙窝 SSW	公其日嘎 GQRG	罗城 LC	巴彦诺日公 BYNRG	锡林高勒 XLGL	黄河村 HHC	红砂岗 HSG
银根 YG	—	0.8827	0.8973	0.8726	0.8769	0.9105	0.9233	0.8726
上沙窝 SSW	0.1298	—	0.8801	0.8972	0.8634	0.8912	0.8756	0.8895
公其日嘎 GQRG	0.1223	0.1356	—	0.8511	0.8307	0.8854	0.8817	0.8648
罗城 LC	0.1338	0.1155	0.1689	—	0.8146	0.8721	0.8742	0.9325
巴彦诺日公 BYNRG	0.1329	0.1420	0.1897	0.2019	—	0.8663	0.8697	0.8426
锡林高勒 XLGL	0.1086	0.1201	0.1380	0.1358	0.1397	—	0.9213	0.8673
黄河村 HHC	0.0918	0.1223	0.1159	0.1276	0.1302	0.0809	—	0.8543
红砂岗 HSG	0.1310	0.1173	0.1434	0.0687	0.1627	0.1425	0.1509	—

3 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^[23]。绵刺种群的遗传结构是其在长期的演化过程中形成的,并与生活历史特征有密切的联系,它一方面反映了绵刺种群的进化历史,另一方面又决定了绵刺在未来发展中的适应潜力。多态位点比率和遗传多样性指数是衡量种群遗传多样性的重要指标。本研究利用 8 对 AFLP 引物对 8 个种群的绵刺基因组 DNA 进行扩增,得到的 397 条清晰显带,其中 296 (74.56%) 条呈多态性,平均每对 AFLP 引物得到 49.63 条带;8 个种群的 Nei 遗传距离平均为 0.1341,种群间的遗传变异分量为 0.3169,即种群间的遗传变异占总变异的 31.69%,表

明绵刺种群间由于地理隔离,使得种群间出现一定程度的遗传分化,同时不同种群间存在一定的基因交流,且地理隔离较小的种群间基因交流更加频繁。但是在实地调查中绵刺种群内的实生苗不是很多,种群的更新主要以无性繁殖为主,造成种群内分化较大的原因可能与绵刺有效的有性繁殖系统有关。对于自交种来说,总的遗传变异中,有 51% 的变异存在于种群之间,而异交种只有 12% 存在于种群之间,因此,自交率高的种群其遗传分化明显高于自交率低的种群^[24]。而绵刺种群间存在的变异为 31.69%,鉴于两者之间,说明绵刺在有性繁殖时可能属于混交系统物种,这种可能性有待于进一步去验证。如果绵刺是混交系统物种,那么对自然选择的进化反应要比异交物种慢许多^[25]。

利用 Nei's 基因多样性指数和 Shannon 指数估测绵刺种群变异情况基本一致,均显示种群内变异大于种群间变异。遗传相似度和遗传距离从一程度上衡量了种群间遗传差异程度。本研究发现,在 8 个绵刺种群中罗城和巴彦诺日公这两个种群之间的遗传距离最大,为 0.2019,而且巴彦诺日公种群与其他种群之间的遗传距离均较大,平均为 0.1570,造成这种结果的原因,一种解释是巴彦诺日公种群与其他种群之间的基因交流很小,另一种解释可能是在生境选择的压力下,绵刺长期进化过程中,该种群基因组 DNA 的变化使其在遗传上与其他种群产生了较大的差异。8 个种群中多样性指数最高的上沙窝种群,在生态调查结果中,上沙窝种群面积较大,数量特征指标也明显优于其他种群,综合考虑,可将上沙窝种群作为绵刺种质中心之一来保护。

根据遗传距离对 8 个种群的聚类分析表明,种群间的遗传距离和地理距离有显著的相关性,生长于相似生态条件或地理隔离较小的绵刺种群具有优先聚类的趋势,如景泰县上沙窝、高台县罗城和民勤县红砂岗种群聚到一起,这 3 个种群都在甘肃省范围内,无大的地理隔离障碍,且多样性指数均较高,这说明绵刺种群遗传多样性表现出十分明显的地域相关性和遗传类型趋同性,同时说明距离较近的种群可能起源于相同的自然群体。但总的来说,种群间的遗传差异不是很大,这与其它子遗植物的研究结果有所不同,子遗植物桫欏种群遗传结构的一个特点是种内遗传多样性水平极低,其原因是片段化的种群在遗传漂变和缺乏有效基因流的情况下致使种群内的遗传变异降低,种群间的遗传分化增加^[26]。这种现象在子遗植物中并不罕见,应用 RAPD 分析鳞茎虎耳草(*Saxifraga cernua*)的子遗种群,无论是种群内还是同地区的种群间都检测不到遗传变异的存在^[27]。而对于绵刺种群来说,随机遗传漂变不是影响其种群遗传多样性的主要过程。

对于保护绵刺来说,由于绵刺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,最大限度地保护绵刺的遗传多样性,为今后进一步研究绵刺的系统演化奠定基础。

References:

- [1] Ma Q L, Wang J H, Jin H X, Wu C R, Zhang C M. Biological and ecological characteristic of the national secondary protection species-Potania

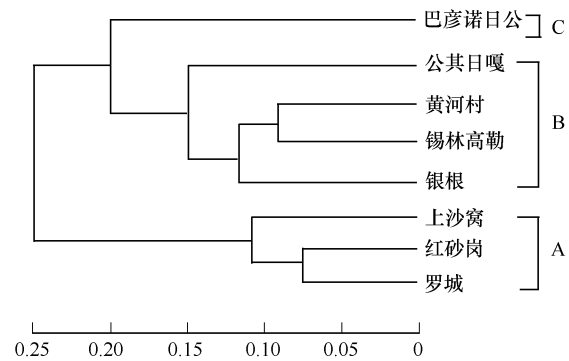


图3 绵刺各种群间 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类图

Fig.3 UPGMA dendrogram for 8 *P. mongolica* Maxim. populations based on Nei's genetic distance

- mongolica* Maxim. Bulletin of Botanical Research, 2003, 23(1): 106—111.
- [2] Zhao Y Z. The area and floristic geographic element of *Potania*. Acta Bot Boreal -Occident Sin, 2002, 22(1): 43—45.
- [3] Gao R H, Jin H, Zhang W, *et al.* Patterns of clone growth in a rare and endangered plant *Potania mongolica* Maxim. Journal of Arid Land Resources and Environment, 2001, 15(4): 92—96.
- [4] Liu G H, He X, Tian J, Zhao P Y. The biological characters and protection of *Potania mongolica* Maxim Acta Bot. Boreal-Occident Sin, 2000, 20(1): 123—128.
- [5] Liu G H, He X, Wu L Z. Study on the adaptation and protection of *Potania mongolica* Maxim. -the national priority Protective Plant. Journal of Inner Mongolia Forestry College, 1997, 19(4): 20—24.
- [6] Wang J H, Wu C R, Zhang C M, Ma Q L. Studies on eco-physiological characteristics of endangered plant *Potania mongolica* Maxim. Journal of Desert Research, 2000, 24(4): 397—403.
- [7] Patterns of Clone Growth in a Rare and Endangered Plant *Potania mongolica* Maxim. Journal of Arid Land Resources and Environment, 2001, 15(4): 92—96.
- [8] Wang Y C, Qin X C, Yang C. Study on microsporogenesis and development of male gametophyte in *Potania mongolica* Maxim. Acta Scientiarum Naturalium University NeiMongol, 2001, 32(4): 453—456.
- [9] Jin H, Gao R H, Zhuang G H, Xie J R. Structure of clone growth of a rare and endangered plant *Potania mongolica* Maxim. in Alashan desert, Inner Mongolia. Journal of BeiJing Forestry University, 2003, 25(2): 24—27.
- [10] Zhang Y M, Jin H, Gao R H, Li G L. Soil seed bank characteristics and dynamics of the rare and endangered species *Potania mongolica* Maxim. Acta Agrest Sinica, 2005, 13(1): 5—8.
- [11] Yongming Zhang, Hong Jin, Runhong Gao, Shengli Wang. Allelopathic effects of the extracts from several plants on *Potania mongolica* Maxim. Grassland of China, 2005, 27(3): 44—48
- [12] Zabeau M, Vos P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application 92402629. 7 (Publication No. 0534858A1). European Patent Office, Paris, 1993.
- [13] Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. A new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res, 1995, 23(21): 4407—4414.
- [14] Duan H, Qiang S, Su X H, *et al.* Genetic diversity of *Eupatorium adenophorum* determined by AFLP marker. Acta Ecologica Sinica, 2005, 25(8): 2109—2114.
- [15] Zhao B, Zhang Q X. Genetic diversity of germplasm resources of *Chimonanthus praecox* (L.) Link based on AFLP marker. Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(11): 4452—4459.
- [16] Greef J M, Deuter M, Jung C, Schoondelmaier J. Genetic diversity of *European Miscanthus* species revealed by AFLP fingerprinting. Genetic Resources and Crop Evolution, 1997, 44: 2, 185—195.
- [17] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 1987, 19, 11—15.
- [18] Zong X X, D Vaughan, A Kaga, N Tomooka, Wang X W, Guan J P, Wang S M. Genetic Diversity in *Vigna angularis* Revealed by AFLP Analysis. Acta Agronomica Sinica, 2003, 29(4): 562—568.
- [19] Xu R Q, Tomooka N, Vaughan D A, *et al.* AFLP markers for characterizing the azuki bean complex. Crop Sci, 2000, 40(3): 808—815.
- [20] Nei M. Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia Univ. Press, 1987.
- [21] Yeh F C, Yang R C, Boyle T, Ye Z H, Mao J X. POPGENE, The user friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre. University of Alberta. Edmonton, Canada, 1997.
- [22] Rohlf F J. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2.1. Exeter Software, Setauket, New York, 2000.
- [23] Arise J C, Hamrick J L. Conservation genetics, case histories from nature. Chapman & Hall. New York, 1996. 189—190.
- [24] Zhang DY, Jang X H. Mating system evolution, resource allocation and genetic diversity in plants. Acta Phytoecologica Sinica, 2001, 25(2): 130—143.
- [25] Shaw R G, Byers D L, Shaw F H. Genetic components of variation in *Nemophila menziesii* undergoing inbreeding: morphology and flowering time. Genetics, 1998, 150: 1649—1661.
- [26] Wang T, Su Y J, Li X Y, Zheng B, Chen G P, Wang B S. RAPD analysis of the genetic variation within populations of a relict tree fern, *Alsophila spinulosa* (Cyatheaceae). Acta Ecologica Sinica, 2003, 23(6): 1201—1205.
- [27] Bauert M R, Kalin M, Baltisberger M, *et al.* No genetic variation detected within isolated relict populations of *Saxifraga cernua* in the Alps using

RAPD markers. *Mol Ecol*, 1998, 7: 1519—1527.

参考文献:

- [1] 马全林,王继和,金红喜,吴春荣,张吨明. 国家二级保护植物绵刺的生物、生态学特征. *植物研究*, 2003,23(1): 106~111.
- [2] 赵一之. 绵刺属的分布区及其区系地理成分. *西北植物学报*, 2002,22(1):43~45.
- [3] 高润宏,金洪,张巍,等. 阿拉善荒漠特有珍稀濒危植物绵刺克隆生长构型研究. *干旱区资源与环境*, 2001,15(4): 92~96.
- [4] 刘果厚,贺晓,田靖,赵培英. 绵刺生物学特性及其保护. *西北植物学报*,2000,20(1):123~128.
- [5] 刘果厚,贺晓,吴丽芝. 国家重点保护植物绵刺的适应性及其保护的研究. *内蒙古林学院学报*,1997,19(4):20~25.
- [6] 王继和,吴春荣,张吨明,马全林. 甘肃荒漠区濒危植物绵刺生理生态学特性的研究. *中国沙漠*,2000,20(4):397~403.
- [7] 高润宏,金洪,张巍. 阿拉善荒漠特有珍稀濒危植物绵刺克隆生长构型研究. *干旱区资源与环境*,2001,15(4):92~96.
- [8] 王迎春,秦晓春,杨持. 绵刺小孢子发育和雄性配子体形成研究. *内蒙古大学学报*,2001,32(4):453~456.
- [9] 金洪,高润宏,庄光辉,谢君仁. 阿拉善荒漠绵刺克隆生长格局研究. *北京林业大学学报*,2003,25(2): 24~27.
- [10] 张永明,金洪,高润宏,李国龙. 绵刺土壤种子库特征及动态. *草地学报*,2005,13(1): 5~8.
- [11] 张永明,金洪,高润宏,王胜利. 几种植物对濒危物种绵刺他感作用的研究. *中国草地*,2005,27(3): 32~38.
- [14] 段惠,强胜,苏秀红,等. 用 AFLP 技术分析紫茎泽兰的遗传多样性. *生态学报*,2005,25(8): 2109~2114.
- [15] 赵冰,张启翔. 利用 AFLP 分子标记探讨蜡梅种质资源的遗传多样性. *生态学报*,2007, 27(11): 4452~4459.
- [18] 宗绪晓, D Vaughan, A Kaga, 等. AFLP 分析小豆种内遗传多样性. *作物学报*,2003,29(4): 562~568.
- [24] 张大勇,姜新华. 植物交配系统的进化、资源分配对策与遗传多样性. *植物生态学报*, 2001, 25(2): 130~143.
- [26] 王艇,苏应娟,李雪雁,郑博,陈国培,王伯荪. 孑遗植物桫欏种群遗传变异的 RAPD 分析. *生态学报*,2003,23(6): 1201~1205.