

基于 SNP 分子标记的凹叶木兰遗传多样性初步研究

王佳媛¹, 吴传芳², 唐亚^{1*}

(1. 四川大学 建筑与环境学院, 成都 610065; 2. 四川大学 生命科学学院, 成都 610065)

摘要: 凹叶木兰是我国特有的木兰属植物, 仅分布于我国四川和云南两省相邻地区, 目前已被列入中国物种红皮书名录, 属易危物种。该研究以采自四川南部麻咪泽和美姑大风顶两个自然保护区的野生凹叶木兰为材料, 利用以 PCR 和测序为基础的 SNP 分子标记方法, 初步研究了凹叶木兰的遗传多样性。结果表明: 在扩增出的 4 条 510 bp 长的序列上, 平均在 73 bp 左右的序列长度上能够检测到一个 SNP 位点, 说明两个自然保护区内不同居群的凹叶木兰具有较高遗传多样性; 序列间相似度达 97%, 与引物所对原序列相似度达 36%, 表明该序列适宜进行凹叶木兰遗传多样性研究。研究结果为进一步开展凹叶木兰遗传多样性的研究及其保护政策的制定提供了参考。

关键词: 木兰属; 遗传多样性; 植物保护; PCR; SNP 标记

中图分类号: Q949.747.1, Q16 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2012)04-0542-06

Preliminary study on genetic diversity of *Magnolia sargentiana* (Magnoliaceae) through SNP marker

WANG Jia-Yuan¹, WU Chuan-Fang², TANG Ya^{1*}

(1. College of Environment and Architecture, Sichuan University, Chengdu 610065, China;

2. School of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: *Magnolia sargentiana* is a species endemic to China and is listed on the Red List of vulnerable species. It is only found in limited localities in Sichuan and Yunnan provinces. Using samples collected from the Mamize Provincial Nature Reserve and the Meigu Dafengding National Nature Reserve in the southern Sichuan Province, its genetic diversity was investigated with single nucleotide polymorphism (SNP) marker, based on PCR and sequencing technique. In the four sequences (510 bp lengths) that amplified with specific primers, a SNP locus was found on every 73 bp sequence on average, which suggested that the different *M. sargentiana* populations in the two nature reserves had a high level of genetic diversity; the similarity among the amplified sequences reached to 97%, and 36% of the amplified sequences was similar to the sequence used for making primers, which indicated that the sequence we selected was suitable for genetic research of *M. sargentiana*. The results would provide useful information for further conservation research and protection policy making on *M. sargentiana* or other protected species.

Key words: Magnolia; genetic diversity; plant conservation; PCR; SNP marker

生物多样性是地球上最珍贵的资源之一, 是人类社会赖以生存和发展的基本食物、药物和工业原

料的主要来源和保护生态环境的重要基础。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

* 收稿日期: 2011-12-01 修回日期: 2012-04-19

基金项目: 高等学校学科创新引智计划(B08037)[Supported by the Innovation and Introducing Intellectual Resources Project in Institute of Higher Learning(the Project 111)(B08037)]

作者简介: 王佳媛(1987-), 女, 陕西咸阳人, 在读硕士研究生, 主要从事植物、森林生态等研究, (E-mail)wjysunny@gmail.com。

* 通讯作者: 唐亚, 教授, 博士生导师, 主要从事环境生态学和植物学研究, (E-mail)tangya@scu.edu.cn。

基础, 又是其它一切多样性的基础和核心部分 (Spiess, 1989)。天然群体高水平遗传多样性的存在是群落稳定的基础, 而物种的受威胁和灭绝是以其遗传多样性的消失而产生的。如今, 在珍稀濒危物种的保护受到栖息地破坏与破碎化威胁的同时, 具有严格地理分布限制的特有的保护成为生物学家们关心的一个重要问题 (Ge 等, 2003)。因此, 针对这些特有种开展遗传多样性研究成为当务之急。凹叶木兰 (*Magnolia sargentiana*) 是木兰科 (Magnoliaceae) 木兰属 (*Magnolia*) 落叶乔木, 其天然分布主要集中于四川中部的峨眉山和二郎山、南部的小凉山以及相邻的云南东北部 (中国植物志编辑委员会, 1996), 常生长于海拔 1 400~2 500 m 的阔叶林中 (补举才, 1996), 是我国特有的一种木兰科植物。凹叶木兰有重要的药用与观赏价值; 同时, 由于木兰科植物的外部形态和内部结构具有许多原始特征, 因此, 凹叶木兰也是研究被子植物系统发育和起源的珍贵材料 (徐志豪等, 2003)。目前凹叶木兰自然居群分布范围狭窄, 居群数量少 (罗红梅, 2007), 根据 IUCN (国际自然与自然资源保护联合会) 公布的物种红皮书名录等级和标准, 凹叶木兰被列入了中国物种红皮书名录, 属于易危物种; 1987 年该种被列为四川省三级保护植物。

到目前为止, 国内外关于凹叶木兰的研究较少, 已有的研究主要包括罗红梅 (2007) 基于蜡叶标本进行的叶片解剖结构研究、茎解剖学研究及遗传多样性研究; 王静等 (2009) 在四川南部大风顶地区开展的种群生态学、保护现状及针对性保护措施的研究。仅有的遗传多样性研究为利用随机引物扩增进行的 RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA) 分析 (罗红梅, 2007)。但 RAPD 为显性标记, 难以区别纯合体和杂合体, 有时带型不稳定, 重复性差。随着人类基因组测序工作的完成, 作为第三代分子标记技术, 单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 以其分布广泛、数量众多、易于批量检测等优点显示出广阔的应用前景。目前, SNP 标记已广泛应用于基因作图、疾病相关性分析、群体遗传学及药物研究等领域 (陈冬等, 2008), 应用 SNP 标记在草本植物中的研究也在大规模的展开 (Rafalski, 2002)。近年来, SNP 研究开始应用到林木这类重要的多年生木本植物中, 并已对松 (*Pinus* spp.)、杨 (*Populus* spp.)、黄杉 (*Pseudotsuga* spp.)、云杉 (*Picea* spp.) 等 4 属 7 个树种的核苷酸

多样性特征进行了初步解析 (褚延广等, 2008)。而利用 SNP 对凹叶木兰进行遗传多样性分析的研究尚未见报道。本研究采用以 PCR 和测序为基础的 SNP 分子标记手段, 对凹叶木兰的遗传多样性进行了初步研究, 为针对该珍稀、易危植物制定保护措施提供一些基本信息。研究过程和结果可为日后进一步开展遗传多样性研究提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

研究所用的 29 个凹叶木兰个体的嫩芽样品 (表 1) 于 2007 年分别随机采自四川雷波县麻咪泽省级自然保护区 (22 个) 和美姑县美姑大风顶国家级自然保护区 (7 个)。样品采集后即置于有硅胶的密封袋中保存, 防止 DNA 降解。引物筛选所用正对照杨树叶片采自四川大学望江校园内。

表 1 DNA 测序样品信息
Table 1 Information of the samples with DNA sequenced

样品编号 No.	样品 生境 Habitat	采样地 Sampling spot	海拔 (m) Altitude	经度 (°) Longitude	纬度 (°) Latitude
1	村庄附近	大风顶	1 812	28.76344	103.17394
2	人工林	麻咪泽	2 152	28.41738	103.31731
3	原始森林	麻咪泽	2 191	28.44664	103.31580
4	放牧地	麻咪泽	2 269	28.43727	103.32569

1.2 方 法

1.2.1 基因组 DNA 提取 基因组 DNA 采用大连宝生 (TaKaRa) 公司的 Genome Universal DNA 提取试剂盒分批提取。对所提取的基因组 DNA 标号, 贮存于 -20 °C 冰箱中备用。

1.2.2 引物获取与筛选 美国加州大学戴维斯分校 (University of California, Davis) 的 Mingcheng Luo 实验室从 NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA) 的毛果杨 (*Populus trichocarpa*) uniGene 数据库中下载了毛果杨的单基因序列, 并将其与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 基因序列对比, 发现其中一段共有序列。由于毛果杨 (杨柳科) 与拟南芥 (十字花科) 为系统位置跨度很大的两种植物, 该段序列共有的现象说明了此段序列具有高度的保守性, 故推断在凹叶木兰的基因序列中也应存在该段序列。据此, Mingcheng Luo 实验室为我们的这一研究设计出 225 对引物。在本研究中, 我们随

机选取了 10 对引物(表 2),并从已提取的凹叶木兰样品基因组中随机选择一个作为模板、以杨树模板为正对照,对 10 对引物进行复选,最终选定了条带清晰、无杂带的 356 号引物(图 1)用于本实验。

20 μL 引物筛选 PCR 扩增体系为:10 \times PCR 缓冲液 2 μL (TIANGEN 公司),模板基因组 DNA 2

μL ,dNTPs 0.2 μL , MgCl_2 1.2 μL (TIANGEN 公司),双向引物各 0.2 μL ,Taq 酶 0.2 μL (TIANGEN 公司),ddH₂O 14 μL 。PCR 反应在 ALS1296 PCR 仪(Bio-Rad)上完成。扩增条件:94 $^\circ\text{C}$ 预变性 4 min;94 $^\circ\text{C}$ 变性 15 s,50 $^\circ\text{C}$ 退火 15 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 45 s,循环 40 次。

表 2 10 对引物编号及其序列

Table 2 Serial number and sequence of the ten pairs of selected primers

引物编号 Primer No.	序列 Sequence	引物编号 Primer No.	序列 Sequence
1-1	ATCAATGACTCGCCTGCTCT	356-1	CTGCGAACAATGAGAGGTGA
1-2	GCAGATCTGACACCTGGAG	356-2	TCCCTTGAGATGATGGAAG
108-1	AGGTTGATGCAGCATTCTC	367-1	CCTCTGCAGCTTTGTCATCA
108-2	GAACTTAGGCGCTTCATTCG	367-2	AAATGAATCGCTTCCTGTG
270-1	TCAACAAGTTCAGGCGACAG	453-1	CAAGAACCAAACTTGGGCAT
270-2	CTCCGAATCTCACCCGATTA	453-2	AGGTGGTCTCAATTCACGG
286-1	CTTGTGAAGCGTGTCTCAA	466-1	AGGCGACAGCCAGAATTAGA
286-2	GTCAGTCTGCCACTAAGGC	466-2	CCGTGAAGAACTCTCTTGGC
318-1	TGCTGAGGACCCTGAGAACT	552-1	AGCCTGGGAACCTTCTCATT
318-2	CCGCTAAATGTTTGGACGAT	552-2	GATCAATTGGGACCTGTGCT

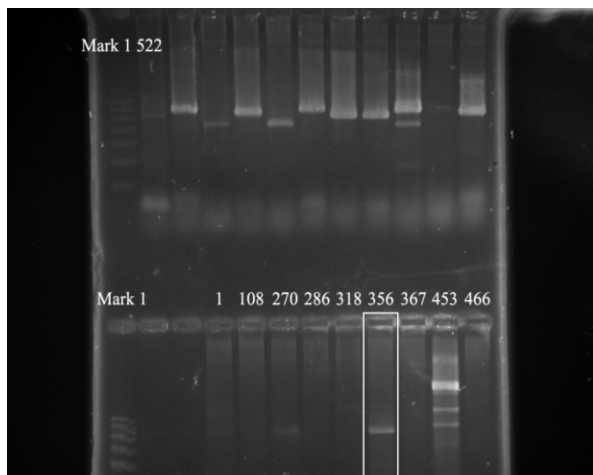


图 1 引物筛选结果

Fig. 1 Result of the selected primers

下排和上排第二条条带为以凹叶木兰为模板进行 PCR 的扩增结果;上排其余条带为正对照,即以杨树基因组 DNA 为模板进行 PCR 的扩增结果,引物顺序同凹叶木兰。

Lower strips and the second one(on the left)on the higher row are the PCR results that used *M. sargentiana* as templete;the other ones on the higher row are the results that used *Populus* sp. as templete. Primer order in the two set of results is the same.

1.2.3 PCR 扩增及目的片段回收 引物选定后,以所提取的凹叶木兰基因组 DNA 为模板,用选定的 356 号引物进行目的片段扩增。由于要对所扩增的目的片段进行测序,为避免 Taq 酶引起的碱基突变而造成测序结果不准确,本实验选用体积比为 4:1 的 Taq 酶与 Pfu 高保真酶混合酶。40 μL PCR 反

应体系包括:10 \times PCR 缓冲液 4 μL (TIANGEN 公司),基因组 DNA 模板 4 μL ,dNTPs 0.4 μL , MgCl_2 2.4 μL (TIANGEN 公司),双向引物各 0.4 μL ,Taq 酶混 Pfu 酶 0.4 μL (TIANGEN 公司),dd H₂O 28 μL 。PCR 反应在 ALS1296 PCR 仪(Bio-Rad)上完成。扩增条件:94 $^\circ\text{C}$ 预变性 4 min;94 $^\circ\text{C}$ 变性 15 s,50 $^\circ\text{C}$ 15 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 60 s,循环 40 次。PCR 扩增后,采用 Omega 胶回收试剂盒对目的片段进行回收,进而进行之后的连接、转化等步骤;对暂时不用回收的产物进行编号并贮存于-20 $^\circ\text{C}$ 冰箱。

1.2.4 连接、转化与测序 由于本实验中的 PCR 产物浓度达不到直接测序的要求,故采用传统的连接、转化、涂板、检测、再测序的方法。具体过程为:将回收的目的片段连接到 PMD 19-T 载体中(连接体系见表 3),再将连接了目的片段的载体转入感受态细胞内,置于 SOC(Super Optimal broth with Catabolic repressor)培养基中摇床培养 1 h;将菌液均匀地涂在加入氨苄(Amp)的 LB(Lysogeny broth)固体培养基上,于 37 $^\circ\text{C}$ 条件下培养 12 h;对生长状况良好的单菌落进行挑菌,最后进行菌落 PCR 检测,程序同 20 μL PCR 反应体系,模板为枪头挑取的微量菌体,ddH₂O 的加入量为 16 μL ,其余成分不变。选择菌落检测为阳性的菌液送北京三博远志生物技术有限责任公司测序。

1.2.5 分析方法 测序结果利用 NCBI 数据库中在

线序列比对软件 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 以及 EBI (European Bioinformatics Institute) 网页中在线序列比对软件 Clustalw 2 进行样本序列与引物所对毛果杨序列的同源性比对以及样本序列间相似性比对, 找出 SNP 位点。利用 DnaSP 软件计算样本核苷酸多样性指数 π , 该指数越高则遗传多样性越高。

表 3 10 μ L 连接体系
Table 3 Connection system (10 μ L)

成分 Composition	加入量 Amount (μ L)	终浓度 Concentration
DNA 片段	5.0	4.0 g/L 左右
10 \times Buffer	1.0	10.0 mol/L
PMD19-T 载体	0.2	50.0 g/L
T4 连接酶	0.2	0.2 U
ddH ₂ O	2.8	—

2 结果与分析

2.1 测序结果与毛果杨相似性比对

对 29 个样本进行测序, 最终得到 4 条有效序列 (表 1)。表 1 测序结果显示, 所测片段长度均为 512 bp, 与实验中根据毛果杨序列所设计的引物所对原始片段长度 (510 bp) 相符。BLAST 软件进行相似比对结果显示, 本实验所得凹叶木兰序列的确与毛果杨序列相似, 相似区域达 36%。利用 Clustalw 2 在线比对软件, 将引物所对毛果杨序列片段与测序序列一一进行比对, 相似度分别为 30%、29%、30% 和 29% (表 4)。4 个样品的序列与毛果杨序列的相似性一致。

表 4 相似度比对
Table 4 Comparison of the similarity

样品编号 Sample No.	与毛果杨相似度 Similarity (%)	与 1 号样比较 Comparison with sample 1	
		SNP 位点数 SNP No.	相似度 (%) Similarity
1	30	—	—
2	29	11	97.85
3	30	5	99.02
4	29	7	99.02

2.2 SNP 位点检测

运用 Clustalw 2 在线比对软件, 对测序结果进行样本间纵向比较。结果显示 (表 4), 样本间同源性很高, 相似度均在 97% 以上。1 号样本与 2、3、4 号样本间的 SNP 位点分别为: 11 个、5 个和 7 个, 即

在 512 bp 长度的序列上, SNP 位点平均至少达 7 个, 即平均每 73 bp 长度的片段上就存在一个 SNP 位点。利用 DnaSP 软件计算得出凹叶木兰样本核苷酸多样性指数 π 为 0.0178。

3 结论与讨论

3.1 对异常数据的讨论

对 29 个样本的测序结果进行处理后发现, 除 4 个序列结果正常外, 其余序列均为未插入目的片段的空载体序列。未插入目的片段的可能原因是在涂板过程中有部分没有接入载体的目的片段残留在平板上, 这些片段粘在细菌表面随细菌一起培养, 而在挑单克隆进行菌落 PCR 时, 因模板中含有这些片段, 因此出现了 PCR 假阳性的结果。为避免以上情况出现, 在测序之前除进行菌落 PCR 检测外, 还应对菌液提质粒, 以质粒为模板再进行 PCR, 同时对所提质粒进行酶切检测。本实验由于时间限制, 只进行了菌落 PCR 检测, 实验结果有局限性。但仅有的 4 个数据仍在一定程度上反应出凹叶木兰遗传多样性水平。

3.2 利用 SNP 进行凹叶木兰遗传多样性研究的可行性

由于 NCBI 数据库中木兰科植物的数据非常少, 在将得到的序列放在 NCBI 上进行同源性比对时, 仅找到 3 条毛果杨的序列与所得的序列相近, 同源性均为 36%。这一方面验证了所扩增序列的正确性, 另一方面说明该段序列在植物进化中较为保守, 在杨树、拟南芥和凹叶木兰中都存在同源的部分, 但在保守的同时又存在差异, 说明了该段序列在不同的植物进化中又有一定的变异。因此, 在日后开展凹叶木兰遗传多样性的研究时, 仍可采用该段序列。

3.3 凹叶木兰的遗传多样性及其地理原因

本研究运用在 PCR 和测序基础上的 SNP 分子标记技术对凹叶木兰的遗传多样性进行了初步分析。在 512 bp 长度的序列上, SNP 位点平均达 7 个以上, 即平均每 73 bp 长度的片段上就存在一个 SNP 位点, 核苷酸多样性指数 π 约为 0.0178。Tenaillon 等 (2001) 对玉米 1 号染色体的 21 个位点进行研究, 发现平均 104 bp 中有一个 SNP, 核苷酸多样性指数 π 为 0.0063~0.0096; 对毛果杨 (*P. trichocarpa*) 基因组序列的分析共发现 1 241 251 个 SNP 位点 (包括插入和缺失), 平均约每 1 kb DNA 存在

2.6 个 SNP,核苷酸多样性指数 π 为 0.016(Tuskan 等,2006);拟南芥(*A. thaliana*)核苷酸多样性指数 π 为 0.007(Nordborg 等,2005);水稻(*Oryza sativa*)核苷酸多样性指数 π 为 0.0035(Caicedo 等,2007);挪威云杉(*Picea abies*)核苷酸多样性指数 π 为 0.00399(Heuertz 等,2006)。综上所述认为凹叶木兰样品具有较高的遗传多样性。

凹叶木兰自然分布范围狭窄、居群数量少。基于植物同工酶的研究,Karron(1991)提出,受地理条件限制的特有植物通常由于基因漂移与受限的基因流而具有较低的遗传多样性,以此推论,凹叶木兰的遗传多样性应该较低。但本研究的结果揭示出凹叶木兰较高的遗传多样性,与 Karron(1991)的结论不同,这部分说明居群分布范围不能直接体现凹叶木兰遗传多样性的高低,同时也说明基于同工酶研究的结论并不一定具有普遍意义。

罗红梅(2007)运用 RAPD 对凹叶木兰进行的遗传多样性研究结果也揭示出该物种具有较高的遗传多样性,本研究支持了这种结果。罗红梅(2007)研究结果还表明,凹叶木兰个体间的遗传距离与这些个体所属居群间的地理分布间隔呈正相关,即两居群间隔距离越大,遗传差异越大。

与凹叶木兰类似,不少乔木树种都具有种群分布极为有限但遗传多样性较高的特征(Bartish 等,1999)。根据 Maguire 等(1997)的研究,对于具有高遗传多样性、低种群数量特征的稀有植物,形成该特征具有一系列可能因素:(1)在某些特殊情况下,种群数量明显下降,而其遗传多样性没有经过足够长时间降低至与自然状态下具有该数量大小的种群所应具有的遗传多样性高低相符的状态;(2)基因系统对于小种群条件的适应;(3)曾经连续的基因系统受到破坏,如人类干扰;(4)鸟类传粉与高异交率结合而形成的较高基因流。若基因流是相邻种群遗传结构的首要因素,通常地理位置相近的种群间的遗传相似性比地理位置间隔远的种群间高(Ge 等,2003)。结合罗红梅(2007)和本研究结果,我们推测,基因流是决定凹叶木兰种群遗传结构的主要因素。

大量同工酶研究以及日益剧增的叶绿体 DNA(cpDNA)与线粒体 DNA(mtDNA)研究结果表明,受到“避难所”保护的植物类群其后代通常具有较高的遗传多样性(Lewis 等,1995)。据考证,中生代白垩纪地质运动使得四川盆地四周隆起,大、小凉山即在此时形成,环境的变迁促使古生物物种得以繁荣

发展(刘金波等,2006)。本研究样品采样地雷波麻咪泽自然保护区,位于四川盆地西南边缘,凉山山系主峰黄毛埂东坡,金沙江下游北岸,紧邻另一采样地美姑大风顶国家自然保护区。两区地处小凉山,属亚热带湿润气候类型。由于所属地理位置的特殊性,采样地区以及周边广大区域成为第三纪或更古老生物的“避难所”和各种生物分化的摇篮(刘金波等,2006;宋昭彬等,2004)。这种特殊的地理和气候条件很可能是采样地区的凹叶木兰种群具有较高遗传多样性的主要原因。

3.4 凹叶木兰保护建议

王静等(2009)在四川南部麻咪泽和大风顶地区的调查结果显示,野生凹叶木兰居群分散且自然更新状况差的主要原因是生长环境与人为砍伐、采集花芽及树皮。本研究结果表明,凹叶木兰具有较高的遗传多样性,因此,目前遗传多样性并不是限制凹叶木兰生长的首要条件。但随着野生凹叶木兰生境因人为干扰造成破碎化程度的加剧,以基因流作为主要控制因素的居群间的遗传结构,很可能因地理位置的增大而产生较大差异,最终形成生殖屏障而阻断居群间的基因交流而导致遗传多样性下降。因此,原始生境保护、禁止人为砍伐是对凹叶木兰进行原地保护的首要任务。由于凹叶木兰不同居群间的遗传差异较大,因此在进行迁地保护时应注意尽可能多地从凹叶木兰的不同生长区引种,从而最大限度地保持其遗传多样性。

致谢 本研究所用样品由四川大学建筑与环境学院博士生王静、张立芸、乔雪和硕士李晶、张松等采集;美国加州大学戴维斯分校(University of California, Davis, USA) Mingcheng Luo 博士为本研究提供引物资料并在实验过程中给予宝贵建议;四川大学建筑与环境学院高辉副教授、生命科学学院赵梓亦博士在实验过程中给予帮助。

参考文献:

- 刘玉壶(编辑). 1996. 中国植物志(第 30 卷第 1 分册)[M]. 北京:科学出版社:127-128
- 罗红梅. 2007. 凹叶木兰茎叶解剖学及遗传多样性研究[D]. 雅安:四川农业大学
- Bartish IV, Jeppsson N, Nybom H. 1999. Population genetic structure in the dioecious pioneer plant species *Hippophae rhamnoides* investigated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers[J]. *Mol Ecol*, 8:781-802
- Bu JC(补举才). 1996. A threatened species, *Magnolia sargentiana*(渐危树种——凹叶木兰)[J]. *Plants(植物杂志)*, (1):4

- Caicedo AL, Williamson S, Hernandez RD, *et al.* 2007. Genome-wide patterns of nucleotide polymorphism in domesticated rice [J]. *Plos Genet*, **3**(9):1 745—1 756
- Chen Dong(陈冬), Wu Dengjun(吴登俊). 2008. Approaches for SNP genotyping(单核苷酸多态性检测方法的研究进展)[J]. *Biotech Bull*, **2**:94—96
- Chu YG(褚延广), Su XH(苏晓华). 2008. Research progress of single nucleotide polymorphisms in forest trees(单核苷酸多态性在林木中的研究进展)[J]. *Hereditas(遗传)*, **30**(10):1 272—1 278
- Ge XJ, Yu Y, Zhao NX. 2003. Genetic variation in the endangered Inner Mongolia endemic shrub *Tetraena mongolica* Maxim. (Zygophyllaceae)[J]. *Biol Cons*, **111**:427—434
- Heuertz M, De Paoli E, Källman T, *et al.* 2006. Multilocus patterns of nucleotide diversity, linkage disequilibrium and demographic history of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst][J]. *Genetics*, **174**(4):2 095—2 105
- Karron JD. 1991. Patterns of Genetic Variation and Breeding Systems in Rare Plants [M]//Falk DA, Holsinger KE(eds). Genetics and conservation of rare plants. New York: Oxford University Press:87—98
- Lewis PO, Crawford DJ. 1995. Pleistocene refugium endemics exhibit greater allozymic diversity than widespread congeners in the genus *Polygonella* (Polygonaceae)[J]. *Am J Bot*, **82**:141—149
- Liu JB(刘金波), Yang GJ(杨古几). 2006. The animal and plant resources and protection in Mamize Nature Reserve(麻咪泽自然保护区的动植物资源及保护)[J]. *J Sichuan Fore Sci Technol(四川林业科技)*, **27**(2):89—92
- Maguire TL, Sedgley M. 1997. Genetic diversity in *Banksia* and *Dryandra* (Proteaceae) with emphasis on *Banksia cuneata*, a rare and endangered species[J]. *Heredity*, **79**:394—401
- Nordborg M, Hu TT, Ishino Y, *et al.* 2005. The pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana* [J]. *PLoS Biol*, **3**(7):1 289—1 299
- Rafalski JA. 2002. Novel genetic mapping tools in plants: SNP and LD based approaches[J]. *Plant Sci*, **162**(3):329—333
- Song SB(宋昭彬), Zou FD(邹方东), Guo C(郭聪), *et al.* 2004. Floristic analysis on seed plants of Meigu Dafengding national nature reserve(美姑大风顶自然保护区种子植物区系分析)[J]. *Guihaia(广西植物)*, **24**(3):207—213
- Spieß EB. 1989. Genetic in Population[M]. Second edition. New York: John Wiley & Sons, 773—774
- Tenaillon MI, Sawkins MC, Long AD, *et al.* 2001. Patterns of DNA sequence polymorphism along chromosome 1 of maize (*Zea mays* ssp. *mays*)[J]. *PNAS*, **9**(16):9 161—9 166
- Tuskan GA, DiFazio S, Jansson S, *et al.* 2006. The genome of black cotton wood, *Populus trichocarpa* (Torr & Gray)[J]. *Science*, **313**(5 793):1 596—1 604
- Wang J, Tang Y, Xie ZH, *et al.* 2009. Autecology and conservation status of *Magnolia sargentiana* Rehder & Wilson (Magnoliaceae) in the Dafengding region, southern Sichuan Province, China [J]. *J Syst Evol*, **47**(6):525—534
- Xu XH(徐志豪), Zhou DG(周定国), Zhang JG(张建国). 2003. Review on the applications of the Magnoliaceous species(木兰科植物应用综述)[J]. *Ningbo Agric Sci Technol(宁波农业科技)*, (2):9—12

(上接第 535 页 Continue from page 535)

- growth regulators and silver nitrate for micropropagation of *Dianthus caryophyllus* with the aid of a response surface experimental design[J]. *In Vitro Cell Dev-Pl*, **46**:57—63
- Huang Y(黄莺), Fan YP(范燕萍), Wang WS(王文生), *et al.* 2003. The induction of callus and plantlet regeneration in *Dianthus chinensis* (石竹愈伤组织诱导及植株再生)[J]. *J S Chin Agric Univ; Nat Sci Edit(华南农业大学学报·自然科学版)*, **24**(1):50—52
- Karami O, Deljou A, Esna-Ashari M, *et al.* 2006. Effect of sucrose concentrations on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus*)[J]. *Sci Hortic*, **110**:340—344
- Karami O, Deljou A, Pour AM. 2007. Repetitive somatic embryogenesis in carnation on picloram supplemented media [J]. *J Plant Growth Regul*, **51**:33—39
- Pareek A, Kothari SL. 2003. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf cultures of ornamental species of *Dianthus*[J]. *Sci Hortic*, **98**:449—459
- Tang DT(唐定台), Xu MX(徐民新), Feng YH(冯永红). 1996. *In vitro* flowering from explants in *Dianthus chinensis* and factors influenced flower formation (石竹试管花的诱导及其影响因子的研究)[J]. *Acta Horti Sin(园艺学报)*, **23**(3):277—278
- Tsay H, Tsay HS, Drew RA. 1998. Effects of medium composition at different recultures on vitrification of carnation (*Dianthus caryophyllus*) *in vitro* shoot proliferation[J]. *Acta Horti*, **461**:243—249
- Vandelook F, Van de Moer D, Van Assche JA. 2008. Environmental signals for seed germination reflect habitat adaptations in four temperate Caryophyllaceae[J]. *Funct Ecol*, **22**(3):470—478
- William E, Finch S, Gerhard LM. 2006. Seed dormancy and the control of germination[J]. *New Phytol*, **171**(3):501—523
- Yu PN(余彭娜), Zhou QG(周启贵), Long Y(龙云), *et al.* 2009. Optimization of factors for decreasing vitrification of watermelon plantlets *in vitro* (降低西瓜试管苗玻璃化因素的优化)[J]. *J Southwest Univ; Nat Sci Edit(西南大学学报·自然科学版)*, **31**(10):35—38
- Zhang GL(张桂莲), Zhang ST(张顺堂), Tong JL(童佳丽), *et al.* 2011. Study on physiological characteristics of seed dormancy in rice (水稻种子休眠生理特性研究)[J]. *Chin Agric Sci Bull(中国农学通报)*, **27**(27):65—69