

# 我国西南部喀斯特森林特有濒危树种掌叶木新的微卫星分子标记的开发

贺瑞坤<sup>1,2</sup>, 王静<sup>1</sup>, 黄宏文<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院华南植物园, 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广州 510650; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:**采用基因组 DNA 富集文库法 FIASCO(Fast isolation by AFLP of sequences containing repeats)从掌叶木(*Handeliidendron bodinieri*)基因组中分离和筛选了 10 个新的微卫星位点, 进而对掌叶木茂兰自然分布居群的遗传多样性进行了分析。结果表明, 每个位点在 30 株掌叶木个体上的平均等位基因数( $A$ )为 3.53(3~5 个), 平均观察杂合度( $H_o$ )为 0.650(0.267~0.900), 平均预期杂合度( $H_e$ )为 0.494(0.224~0.652)。每个位点的第一排除概率值  $P_r(Ex_1)$  为 0.029~0.240, 位点综合值为 0.7496。单个位点的第二排除概率  $P_r(Ex_2)$  为 0.123~0.419, 位点综合值为 0.9517。这些信息预示着这些微卫星标记可以为研究喀斯特特有濒危树种掌叶木的基因流及居群遗传结构提供有效的遗传工具。

**关键词:**喀斯特森林; 掌叶木; 微卫星; 遗传多样性

中图分类号: Q943.3

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2011)06-0493-06

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2011.06.001

## Isolation of Novel Microsatellite Loci for *Handeliidendron bodinieri* (Sapindaceae), An Endangered Tree Endemic to Karst Forest in Southwestern China

HE Rui-kun<sup>1,2</sup>, WANG Jing<sup>1</sup>, HUANG Hong-wen<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** Ten novel polymorphic microsatellite loci were developed and characterized for *Handeliidendron bodinieri* according to a modified genomic DNA enrichment protocol of FIASCO (Fast isolation by AFLP of sequences containing repeat). These SSR (simple sequence repeat) loci were used to examine genetic diversity of *H. bodinieri* in Maolan karst forests, Guizhou Province. The results showed that each locus displayed between 3 and 5 alleles. The observed heterozygosity ranged from 0.267 to 0.900 and expected heterozygosity varied between 0.224 and 0.652. The combined probabilities of paternity exclusion over all loci were 0.7496 for  $P_r(Ex_1)$  and 0.9517 for  $P_r(Ex_2)$ , respectively. It suggested that these loci could provide a powerful tool in investigating the patterns of gene flow and population structure in natural populations of *H. bodinieri*.

**Key words:** Karst forests; *Handeliidendron bodinieri*; Microsatellite; Genetic diversity

中国西南部喀斯特山区位于世界三大连片喀斯特发育区之一的东亚片区中心, 面积约  $5.4 \times$

$10^5 \text{ km}^2$ <sup>[1]</sup>, 是世界上最大的喀斯特连续带<sup>[2]</sup>。喀斯特地貌因其独特的生态学特性, 使得喀斯特森林具

收稿日期: 2011-04-07

接受日期: 2011-04-22

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31000148)资助

作者简介: 贺瑞坤(1983~), 博士研究生, 研究方向为植物保育遗传学, email: herukun@scib.ac.cn

\* 通讯作者 Corresponding author, email: huanghw@mail.scbg.ac.cn

有异乎寻常的鲜明特征,特有成分多,是我国植物特有种分布中心之一,也是我国生物多样性保护的热点区域之一。该地区目前已知有高等植物 4287 种<sup>[3]</sup>,其中 28% 是喀斯特特有植物<sup>[4]</sup>。但是,原始喀斯特森林已受到砍伐、放牧、开垦和火烧等人类活动的严重破坏<sup>[5]</sup>,中国西南喀斯特森林中绝大部分物种面临生境退化的威胁。由于种群数量减少、密度下降,以及个体和种群间不断加剧的生境隔离,越来越多的物种成为稀有或濒危物种,急需保护<sup>[5]</sup>。

掌叶木(*Handeliidendron bodinieri*)隶属于无患子科(Sapindaceae)掌叶木属,是我国西南喀斯特森林特有的濒危物种,主要分布在贵州南部和广西西北部海拔 500~900 m 的石灰岩山地<sup>[6]</sup>。它的木材坚硬,是建筑及制作家具的优良材料,种子可榨油,具有一定经济价值,是重要的经济植物<sup>[7]</sup>。前期对掌叶木现有本底资源的野外调查表明,由于砍伐、放牧、开垦和火烧等人为干扰,掌叶木被破坏程度极为严重,多为片断化的小居群,居群个体数量少,密度极低(0.08~0.19 ind. hm<sup>-2</sup>,个人调查)。掌叶木在自然状态下种子败育率极高,种子萌发率低(仅为 1%),幼苗死亡率高,自然更新困难,已陷于濒临灭绝的境地<sup>[8]</sup>。对掌叶木的研究大多集中在形态学、细胞学、生态学及分子系统学等方面<sup>[9]</sup>,对掌叶木的就地及异地引种保护研究也取得一定进展<sup>[10]</sup>。然而,有关掌叶木野生居群的保育遗传学研究至今未见报道。由于缺乏详细的遗传背景知识,前期对掌叶木的保护不可避免地存在一定的盲目性,甚至可能造成潜在的遗传风险<sup>[11]</sup>。因此了解喀斯特森林中特有濒危物种的遗传多样性程度,可为制定喀斯特生境中其它类似特有濒危物种的保育措施提供理论依据。

微卫星 DNA(microsatellite DNA)又称简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)或短串联重复序列(short tandem repeat, STR),广泛分布于真核生物的基因组中<sup>[12]</sup>。微卫星是指以少数几个核苷酸(1~6 个)为单位多次串联重复的简单序列,重复次数(5~50)不等,以双核苷酸重复最为常见<sup>[13]</sup>。微卫星分子标记因其存在的普遍性、数量多、分布均匀、多态性信息丰富、遗传共显性、具有较好的稳定性和重复性,且易于检测(具自动化分析的潜力)等优点,被认为是重要的分子标记,目前已广泛应用于品种鉴定、遗传连锁图谱的构建、分子辅助育种和居群遗传学研究<sup>[14-16]</sup>等。微卫星引物具有较强的物种保

守性和专一性,因此每个物种需要设计特异的 SSR 引物。近年来发展了很多简易、高效的微卫星开发技术,使得开发大量微卫星引物成为可能。本研究采用改良的基因组 DNA 富集法(Fast isolation by AFLP of sequences containing repeat, FIASCO)<sup>[17]</sup>对掌叶木的微卫星位点进行了首次分离和筛选,旨在为评价掌叶木自然居群遗传多样性和遗传结构提供技术支持,为掌叶木植物资源及喀斯特特有濒危物种的保护和管理提供可靠的分子标记。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

本研究地点位于贵州省荔波县茂兰国家级自然保护区内(25°19'N, 107°59'E)。该保护区是典型的亚热带喀斯特森林,物种丰富度极高,特有现象显著。在自然保护区内对掌叶木(*Handeliidendron bodinieri*)自然分布居群采用高精度 GPS (eTrex Venture)对成株进行精确定位,并详细记录每个个体的胸径和株高。共有成株掌叶木 30 株,每株采集新鲜叶片 5 g,置于装有硅胶的密封塑料袋中快速干燥,以备 DNA 提取。

### 1.2 DNA 提取和微卫星标记开发

采用改良的 2% CTAB 法<sup>[18]</sup>提取总基因组 DNA。取约 0.5 g 叶片在液氮中迅速研磨成粉末,立即转入预冷的 1.5 mL 离心管中;迅速加入 1.0 mL 65°C 预热的 CTAB 提取缓冲液(2.5% CTAB, 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris-HCl,使用前加入 200  $\mu$ L  $\beta$ -巯基乙醇)快速混匀,于 65°C 恒温水浴 40~60 min,每隔 10 min 颠倒轻摇一次;取出冷却至室温后,15300  $\times$  g 离心 8 min,取上清液,加入等体积的苯酚/氯仿/异戊醇(25/24/1, V/V/V),缓慢翻转离心管使之混匀成乳浊液,15300  $\times$  g 离心 8 min;取上清液,加入等体积的氯仿/异戊醇(24/1, V/V),缓慢翻转离心管使之混匀成乳浊液,15300  $\times$  g 离心 8 min;取上清液,加入等体积的氯仿/异戊醇(24/1, V/V),缓慢翻转离心管使之混匀成乳浊液,15300  $\times$  g 离心 8 min;取上清液,加入 2.5 倍体积的冷冻的无水乙醇和 1/10 体积的醋酸钠,置于 -20°C 下 30 min;于 10200  $\times$  g 下离心 5 min,弃上清液,加入 75% 乙醇 700  $\mu$ L,室温下漂洗 1 h;于 10200  $\times$  g 下离心 5 min,弃上清液,加入 75% 乙醇 700  $\mu$ L,室温下漂洗 1 h;然后在 10200  $\times$  g 下离心 5 min,弃上清液,室温下晾干。最后加入 50~100  $\mu$ L TE (0.1 mol/L)溶解过

夜;再加入1/100体积的Rnase A,37℃水浴1 h,消化除去RNA。

使用紫外分光核酸测定仪(GENEQUANT, Eppendorf, Germany)测定模板DNA浓度。所有样品DNA的 $OD_{260}/OD_{280}$ 值均在1.8左右,质量较好。模板DNA质量用1%的琼脂糖凝胶电泳( $\lambda/Hind$  III marker)检测,电泳缓冲液为 $1 \times TAE$  (40 mmol/L Tris-base, 20 mmol/L EDTA, 用醋酸调节pH至7.2),  $3 \mu\text{L}$ 模板DNA与 $1 \mu\text{L}$ 上样缓冲液( $10 \times TAE$ , 50%琼脂糖, 0.25%溴酚蓝)混合,在 $3 \text{ V cm}^{-1}$  (120 V)下恒压电泳20 min (BioRAD 3000Xi电泳仪, USA; DYY-III电泳槽, 北京六一科仪), 用 $0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$  EB (ethidium bromide)染色30 min, 用凝胶成像系统(UVC-303, UVP Inc.)观察并照相。样品的DNA都显示出比较清晰的一条亮带。

所得掌叶木DNA样本总数为30个。微卫星引物开发程序如下:采用改良的基因组DNA富集法FIASCO<sup>[17]</sup>进行微卫星标记的分离。将250 ng基因组DNA用3 U *Mse*I (BioLabs)进行消化,反应体系为25  $\mu\text{L}$ ;然后将15  $\mu\text{L}$ 消化产物在1 U的T4 DNA连接酶(Takara)的作用下与*Mse*I AFLP接头(5'-TACTCAGGACTCAT-3'; 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3')相连接,反应体系为30  $\mu\text{L}$ 。将消化-连接混合液稀释10倍并使用AFLP接头专一的引物(5'-GATGAGTCCTGAGTAAAN-3', 即*Mse*I-N)直接进行扩增,反应体系为20  $\mu\text{L}$ :包含*Mse*I-N 120 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , dNTPs 200  $\mu\text{mol/L}$ ,  $\text{MgCl}_2$  1.5 mmol/L, 1 U *Taq* DNA聚合酶(Fermentas)和5  $\mu\text{L}$ 稀释的消化-连接产物。PCR扩增反应程序为:94℃ 30 s, 53℃ 1 min, 72℃ 1 min, 18个循环。

取20  $\mu\text{L}$ 扩增产物(片段大小为200~1000 bp)与0.15  $\mu\text{mol/L}$ 的5'-生物素化的探针( $\text{AC}$ )<sub>15</sub>、( $\text{GA}$ )<sub>15</sub>或( $\text{AAG}$ )<sub>8</sub>在250  $\mu\text{L}$ 杂交液中含SSC 4.2  $\times$ 和SDS 0.07%混合,95℃变性5 min。然后将混合物在48℃下退火杂交2 h。杂交产物用300  $\mu\text{L}$  Streptavidin MagneSphere<sup>®</sup>磁珠(Promega)进行选择性地富集。磁珠-探针-DNA复合物用磁性分离架分离获得。室温下,用500  $\mu\text{L}$  TEN1000 (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mol/L NaCl, pH 7.5)进行3次非严格洗涤后,用500  $\mu\text{L}$ 严格洗液(SSC 0.2  $\times$ 和0.1% SDS)洗3次。加入50  $\mu\text{L}$  TE (Tris-HCl 10 mmol/L, EDTA 1.0 mmol/L, pH 8.0), 95℃水浴5 min 变性,富集的DNA片段即可从复合物中洗脱下来。

将得到的DNA片段用*Mse*I-N引物按上述程序扩增35个循环。PCR产物使用E.Z.N.A<sup>®</sup>琼脂糖凝胶回收试剂盒(Omega)进行纯化。将纯化后的片段连接到pMD 18-T质粒载体(Takara)上,并按照产品说明书将连接产物转化到*E. coli*菌株(JM109, Promega)中。在含有氨苄、X-gal和IPTG的Luria-Bertani琼脂培养基平板上用蓝/白斑法筛选重组克隆。使用M13正向和反向引物对含插入片段的阳性克隆进行扩增,并用琼脂糖凝胶电泳进行检测。随后,用所开发的SSR引物对掌叶木所有取样样本进行PCR分析。PCR扩增反应总体体系为10  $\mu\text{L}$ , 包括10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.4), 50 mmol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 15 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mmol/L dNTPs, 引物0.25  $\mu\text{mol/L}$ , 40 ng基因组DNA和1 U的*Taq* DNA聚合酶(Fermentas)。PCR扩增反应在PTC-200的PCR仪上进行。扩增程序包括:94℃变性5 min;然后94℃ 45 s, 52℃~62℃(依引物而不同,表1) 50 s、72℃ 1.5 min,共35次循环;最后72℃延伸8 min。扩增产物在6%的变性聚丙烯酰胺胶上电泳,电泳缓冲液为 $1 \times TBE$ 缓冲液。电泳在Sequi-Gen GTSYSTEM (BIORAD, USA)电泳仪上进行,功率恒定为55 W,电泳时间约1.5~2.0 h,然后进行银染染色。使用25 bp DNA ladder Markers (Promega)确定等位基因大小。

### 1.3 统计分析

采用FSTAT 2.9.3.2软件<sup>[19]</sup>计算各居群的遗传多样性参数,包括每位点的平均等位基因数( $A$ )、等位基因丰富度( $A_R$ )、预期杂合度( $H_0$ )、观察杂合度( $H_E$ )以及近交系数( $F_{IS}$ )。用GENEPOP version 3.3软件<sup>[20]</sup>检测各居群是否偏离哈迪-温伯格平衡。同时采用CERVUS 3.0软件<sup>[21]</sup>计算排除概率( $P_i$ )。

## 2 结果

共挑取183个克隆,其中142个(78%)DNA序列含有简单重复序列(simple sequence repeat),用Primer 3.0<sup>[22]</sup>设计引物78对,共获得10对呈多态性扩增的微卫星位点。引物序列及遗传学参数特征见表1。每对引物对掌叶木扩增得到的等位基因数( $A$ )为3~5个,平均3.5个。观察杂合度( $H_0$ )和预期杂合度( $H_E$ )分别为0.267~0.900和0.224~0.652。Hardy-Weinberg (HWE)检验表明所有10个位点均未显著偏离哈迪-温伯格平衡(表2)。第一排除概率估计

[ $P_r(\text{Ex}_1)$ ] (当只有后代而无母本样本的情况), 单个位点为 0.029 ~ 0.240, 位点综合值为 0.7496。第二排除概率 [ $P_r(\text{Ex}_2)$ ] (当母本和后代样本都具备的情

况), 单个位点为 0.123 ~ 0.419, 位点综合值为 0.9517, 表明这些微卫星引物非常适合于亲本分析(图 1)。

表 1 掌叶木 10 对微卫星引物的基本特征

Table 1 Characterization of 10 pair microsatellite primers in *Handeliodendron bodinieri*

引物 Primer	序列 Sequence (5' ~ 3')	重复单元 Repeat motif	大小 Size (bp)	退火温度 Annealing temperature (°C)	GenBank 登录号 GenBank accession No.
ZYM57	F: CCGCCATAATCTCTCTCCAC R: CACTCCTACCAATTCGCCATT	(CT) <sub>10</sub>	233 ~ 241	52	JF895988
ZYM125	F: CCTCGACGTCACCGTCTAAT R: AGACAGGGAGAAAAGCGATCA	(CT) <sub>9</sub> , (CT) <sub>5</sub>	170 ~ 175	62	JF895989
ZYM152	F: TGGTCTCTCTTTCGACGCTTT R: ACGCACGATGAGATGAGATG	(TC) <sub>7</sub> , (TCGC) <sub>5</sub>	224 ~ 243	56	JF895990
ZYM216	F: TCTGTTTTCCACCGCTCTCT R: TGAAGGAAGCAGTCGAGGTT	(CT) <sub>10</sub>	149 ~ 153	58	JF895991
ZYM223	F: GCTTTTTTCGTTTCCAAGTTC R: CGAGGAAGACCAAGCAAAAAG	(CT) <sub>9</sub>	171 ~ 178	56	JF895992
ZYM224	F: ATTATAAAAAGCCGGCAAGG R: AAGCGCCAAAATCCTCTTCTT	(CA) <sub>8</sub>	262 ~ 267	56	JF895993
ZYM245	F: GAAGAGGAGCACCCGATTG R: CTTTTGGTGTGTTGGGTTGG	(AAC) <sub>5</sub>	129 ~ 131	56	JF895994
ZYM246	F: ACTGATCCAGGGTTCGTGTC R: ACGCTAGGGTTGAAAAGCAA	(AC) <sub>7</sub>	232 ~ 238	60	JF895995
ZYM270	F: GACTGGCTGGCACATCATAA R: ATCGTTATCGGAGCATCGAC	(GA) <sub>11</sub>	150 ~ 157	62	JF895996
ZYM304	F: AAAATGGCCAAACGAAAACAG R: GAAATGCCGACCTCCAATAA	(TG) <sub>9</sub> , (AG) <sub>9</sub>	175 ~ 180	60	JF895997

表 2 掌叶木 10 对引物的遗传多样性

Table 2 Genetic diversity of 10 pair microsatellite primers in *Handeliodendron bodinieri*

引物 Primer	$A$	$H_E$	$H_O$	$F_{IS}$	$P_r(\text{Ex}_1)$	$P_r(\text{Ex}_2)$
ZYM57	5	0.652	0.767	-0.1055	0.240	0.419
ZYM125	3	0.549	0.767	-0.2073	0.146	0.283
ZYM152	5	0.502	0.633	-0.1647	0.130	0.284
ZYM216	3	0.569	0.900	-0.2435	0.156	0.262
ZYM223	4	0.427	0.533	-0.1429	0.089	0.213
ZYM224	3	0.244	0.267	-0.0643	0.029	0.123
ZYM245	3	0.515	0.733	-0.1902	0.128	0.233
ZYM246	3	0.508	0.667	-0.1772	0.125	0.265
ZYM270	3	0.564	0.800	-0.2158	0.154	0.294
ZYM304	3	0.406	0.433	-0.0146	0.080	0.200

$A$ : 等位基因数;  $H_E$ : 预期杂合度;  $H_O$ : 观测杂合度;  $F_{IS}$ : 近交系数;  $P_r$ : 排除概率。

$A$ : Number of alleles per locus;  $H_E$ : Expected heterozygosity;  $H_O$ : Observed heterozygosity;  $F_{IS}$ : Inbreeding coefficient;  $P_r$ : Exclusion probability.

## 3 讨论

### 3.1 掌叶木的 SSR 遗传多样性

近年来, 自然居群维持一定的遗传多样性以确

保物种持续生存、维持适合度及进化潜力的观点已得到普遍认可<sup>[23]</sup>。平均而言, 利用微卫星对植物的研究表明, 每个位点的等位基因数约为 10.0, 期望杂合度约为 0.61<sup>[24]</sup>。与此相比, 本研究结果表明, 掌

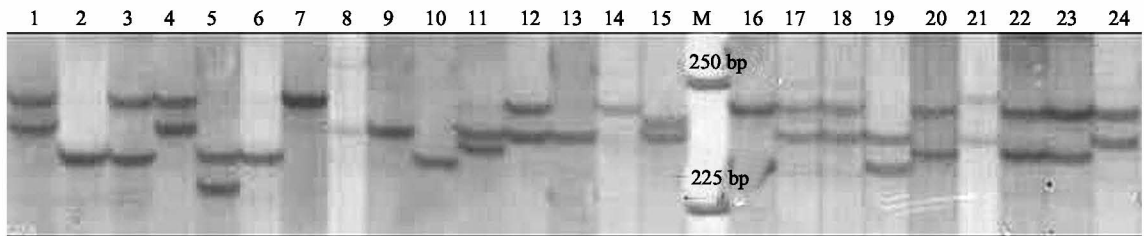


图1 引物 ZYM57 在掌叶木自然居群扩增的多态性谱带。M: 25 bp DNA ladder Marker; 1~24: 掌叶木个体。

Fig. 1 Microsatellite polymorphism in *Handeliidendron bodinieri* nature population with primer ZYM57. M: 25 bp DNA ladder Marker; 1-24: *H. bodinieri* individuals.

叶木的遗传多样性相对较低( $A = 3 \sim 5$ , 平均为 3.5;  $H_E = 0.224 \sim 0.652$ , 平均为 0.494)。与同样隶属于无患子科但广泛分布的近缘物种伞花木(*Eurycorymbus cavaleriei*)相比( $A = 3.0 \sim 7.0$ , 平均为 4.9;  $H_E = 0.431 \sim 0.787$ , 平均为 0.622)<sup>[25]</sup>, 掌叶木的遗传多样性水平较低。但另一方面, 掌叶木的遗传多样性水平与其他稀有濒危树种的研究结果相似<sup>[26-29]</sup>。此外, 尽管极低的分布密度和明显的空间隔离, 掌叶木的遗传多样性水平相当于甚至高于很多其它高/或中密度森林树种的遗传多样性水平(如 *Aucoumea klaineana* 的  $H_E = 0.38 \sim 0.55$ <sup>[30]</sup>; *Distemonanthus benthamianus* 的  $H_E = 0.470 \sim 0.567$ <sup>[29]</sup>), 暗示着极端恶劣的喀斯特生境及人为干扰并没有严重地削弱掌叶木的遗传变异。

遗传杂合度可以反映进化适应性, 在居群适应环境变化中发挥关键性作用。本研究未发现自交现象, 说明掌叶木成功的维持了异交机制。多位点分析结果显示自交系数  $F_{IS}$  值显著为负, 表明喀斯特生境中掌叶木存在杂合子过剩现象。本研究中掌叶木的杂合度( $H = 0.494$ )明显大于异交、多年生木本的平均值( $H = 0.283$ )<sup>[31]</sup>。因此, 尽管居群密度极低, 并且喀斯特森林存在空间隔离, 但近亲繁殖在掌叶木自然居群中发生的频率非常低。在其他物种的研究中, 也同样发现了杂合子过剩的现象(如 *Carapa procera*<sup>[32]</sup>、*Dioon edule*<sup>[33]</sup>、*Prunus avium*<sup>[34]</sup>)。一般来说, 导致杂合子过剩的原因主要有繁殖种群个体数量少、超显性、对纯合子的逐步选择及负选型交配<sup>[34-35]</sup>。但是由于缺乏掌叶木交配式样和生殖适合度方面的信息, 我们尚不能确定是何种因素造成杂合子过量, 还需进一步的研究。

### 3.2 遗传多样性保护

中国南方喀斯特森林蕴含着丰富的植物多样性, 在该地区发现了许多特有属, 是世界物种多样

性保护中心之一。对该地区进行研究, 分析喀斯特森林树种遗传变异有助于我们更好地了解过去喀斯特生境景观条件的变化。遗传多样性的研究是遗传资源保存的重要前提条件, 有效的保存策略只有在对物种遗传多样性充分了解的基础上才可以实现。据我们的了解, 鲜有关于亚热带喀斯特生境内特有濒危树种遗传学研究的报道。利用微卫星分子标记, 本研究结果显示生境片断化和人为干扰并没有严重侵蚀掌叶木遗传多样性水平或加剧近交, 这为其遗传种质资源的保护提供了一定的育种群体, 为中国南方喀斯特森林典型濒危树种掌叶木的保育遗传研究提供了新的思路和重要的居群遗传信息。

**致谢** 感谢贵州茂兰国家级自然保护区管理局工作人员对野外采样的无私帮助, 特别感谢本实验室康明研究员在课题设计方面给予的悉心指导和帮助, 感谢郭勇、刘义飞等老师在课题完成过程中给予的实验指导和帮助。

### 参考文献

- [1] Cai YL(蔡玉龙). Preliminary research on ecological reconstruction in karst mountain poverty areas of southwest China [J]. *Adv Earth Sci(地球科学进展)*, 1996, 11(6): 602-606.(in Chinese)
- [2] Sweeting M M. Reflection on the development of karst geomorphology in Europe and a comparison with its development in China [J]. *Geomorphology*, 1993, 37(3): 127-138.
- [3] Xu Z R(许兆然). Studies of the limestone forest in China [J]. *Guihaia(广西植物)*, 1993(Suppl. IV): 5-54.(in Chinese)
- [4] Zhu H(朱华). The karst ecosystem of southern China and its biodiversity [J]. *Trop For(热带林业)*, 2007, 35(Suppl): 44-47.(in Chinese)
- [5] Su W C(苏维词). Rare and endangered plants in Guizhou karst regions with the consideration of their conservation [J]. *Resour Environ Yangtze Basin(长江流域资源与环境)*, 2002, 11(2): 111-116.(in Chinese)
- [6] Fu L G(傅立国), Jin J M(金黎明). *China Plant Red Data Book: Rare and Endangered Plants* [M]. Beijing: Science Press, 1992: 590-591.(in Chinese)



- [7] Editorial Committee of the Oil Plants in China(中国油脂植物编委会). The Oil Plants in China [M]. Beijing: Science Press, 1987: 334-335.(in Chinese)
- [8] Xiong Z B(熊志斌), Ran J C(冉景丞), Tan C J(谭成江), et al. The seed ecological characteristics of endangered *Handeliidendron bodinierei* [J]. Acta Ecol Sin(生态学报), 2003, 23(4): 820-825.(in Chinese)
- [9] Cao L M(曹丽敏). Advances in studies on the rare and endemic plant *Handeliidendron bodinierei* (Sapindaceae) [J]. J Anhui Agri Sci(安徽农业科学), 2009, 37(3): 1043-1045.(in Chinese)
- [10] Zhang Z L(张著林), Lin C H(林昌虎). Study on the introduction and preservation of *Handeliidendron bodinierei* (Lévl.) Rehd Wei in allopatry [J]. Guizhou Sci(贵州科学), 2006, 24(4): 45-48.(in Chinese)
- [11] Hufford K M, Mazer S J. Plant ecotypes: Genetic differentiation in the age of ecological restoration [J]. Trends Ecol Evol, 2003, 18(3): 147-155.
- [12] Tautz D, Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of Eukaryotic genomes [J]. Nucl Acids Res, 1984, 12(10): 4127-4138.
- [13] Powell W, Morgante M, Andre C, et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for gemplasm analysis [J]. Mol Breed, 1996, 2(3): 225-238.
- [14] Steinkellner H, Lexer C, Turetschek E, et al. Conservation of (GA)<sub>n</sub> microsatellite loci between *Quercus* species [J]. Mol Ecol, 1997, 6(12): 1189-1194.
- [15] Barreneche T, Bodenes C, Lexer C, et al. A genetic linkage map of *Quercus robur* L. (Pedunculate oak) based on RAPD, SCAR, microsatellite, minisatellite, isozyme, and 5S rDNA markers [J]. Theor Appl Genet, 1998, 97(7): 1090-1103.
- [16] Selkoe K A, Toonen R J. Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers [J]. Ecol Lett, 2006, 9(5): 615-629.
- [17] Zane L, Bargelloni L, Patamello T. Strategies for microsatellites isolation: A review [J]. Mol Ecol, 2002, 11(1): 1-16.
- [18] Doyle J. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation [M]// Hewitt G M, Johnston A. Molecular Techniques in Taxonomy. Berlin: Springer, 1991: 283-293.
- [19] Goudet J. Fstat version 1.2: A computer program to calculate F-statistics [J]. J Hered, 1995, 86(6): 485-486.
- [20] Raymond M, Rousset F. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism [J]. J Hered, 1995, 86(3): 248-249.
- [21] Kalinowski S T, Taper M L, Marshall T C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment [J]. Mol Ecol, 2007, 16(5): 1099-1106.
- [22] Rozen S, Skaletsky H J. Primer 3.0 on the WWW for general users and for biologist programmers [M]// Krawetz S, Misener S. Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2000: 365-386.
- [23] Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A. Introduction to Conservation Genetics [M]. UK: Cambridge University Press, 2002: 31-45.
- [24] Nybom H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants [J]. Mol Ecol, 2004, 13(5): 1143-1155.
- [25] Wang J, Ye Q G, Kang M, et al. Novel polymorphic microsatellite loci and patterns of pollen-mediated gene flow in an ex situ population of *Eurycorymbus cavaleriei* (Sapindaceae) as revealed by categorical paternity analysis [J]. Conserv Genet, 2008, 9(3): 559-567.
- [26] Myriam G, Irène T B. Genetic structure of the endangered perennial plant *Eryngium alpinum* (Apiaceae) in an alpine valley [J]. Biol J Linn Soc, 2008, 93(4): 667-677.
- [27] Wang R, Ai B, Gao B Q, et al. Spatial genetic structure and restricted gene flow in a functionally dioecious fig, *Ficus pumila* L. var. *pumila* (Moraceae) [J]. Popul Ecol, 2009, 51(2): 307-315.
- [28] Hans J, Isabel R R, Olivier H. Evidence for demographic bottlenecks and limited gene flow leading to low genetic diversity in a rare thistle [J]. Conserv Genet, 2010, 11(5): 1979-1987.
- [29] Debout G D G, Doucet J L, Hardy O J. Population history and gene dispersal inferred from spatial genetic structure of a Central African timber tree, *Distemonanthus benthamianus* (Caesalpinioideae) [J]. Heredity, 2011, 106(1): 88-99.
- [30] Born C, Hardy O J, Chevalier M H, et al. Small-scale spatial genetic structure in the central African rainforest tree species *Aucoumea klaineana*: A stepwise approach to infer the impact of limited gene dispersal, population history and habitat fragmentation [J]. Mol Ecol, 2008, 17(8): 2041-2050.
- [31] Hamrick J L. Response of forest trees to global environmental changes [J]. For Ecol Manag, 2004, 197(1): 323-335.
- [32] Doligez A, Joly H. Genetic diversity and spatial structure within a natural strand of a tropical forest tree species, *Carapa procera* (Meliaceae), in French Guiana [J]. Heredity, 1997, 79(1): 72-82.
- [33] Gonzalez-Astorga J, Vovides A P, Ferrer M M, et al. Population genetics of *Dioon edule* Lindl. (Zamiaceae, Cycadales): Biogeographical and evolutionary implications [J]. Biol J Linn Soc, 2003, 80(3): 457-467.
- [34] Stoeckel S, Grange J, Fernandez-Manjares J F, et al. Heterozygote excess in a self-incompatible and partially clonal forest tree species: *Prunus avium* L. [J]. Mol Ecol, 2006, 15(8): 2109-2118.
- [35] Rasmussen K K, Kollmann J. Low genetic diversity in small peripheral populations of a rare European tree (*Sorbus torminalis*) dominated by clonal reproduction [J]. Conserv Genet, 2008, 9(6): 1533-1539.