

猕猴桃自然居群SSR遗传变异的空间自相关分析

刘亚令^{1,2} 李作洲² 张鹏飞³ 姜正旺² 黄宏文^{1,2*}

1 (华中农业大学园林学院, 武汉 430074)

2 (中国科学院武汉植物园, 武汉 430074)

3 (信阳农业高等专科学校园林艺术系, 河南信阳 464000)

摘要: 本研究采用空间自相关分析方法对同域分布的中华猕猴桃(*Actinidia chinensis*)和美味猕猴桃(*A. deliciosa*)自然居群SSR遗传变异的空间结构进行了研究, 以探讨猕猴桃自然居群遗传变异的分布特征。选用的9对SSR引物在两物种中共扩增出104个等位基因。选择频率在20–80%的SSR等位基因, 运用等样本对频率方法分别对同域分布的中华猕猴桃和美味猕猴桃各1个居群及其中华/美味猕猴桃复合居群进行了空间自相关系数Moran's *I*值计算。结果表明: 中华猕猴桃和美味猕猴桃的遗传变异在居群内均存在着一定程度的空间结构, 尽管近半数或半数以上的等位基因在居群内表现为随机分布的空间模式, 但也有相当比例(29.6–48.0%)的等位基因在种内居群中和复合居群中(河南西峡51.0%, 陕西商南44.7%)呈现渐变、衰退、双向衰退或侵扰模式。而且其居群内遗传变异的空间分布规律, 不论是在种内还是复合居群中都基本一致: 相距在100 m以内, 特别是30 m范围内的个体间的等位基因表现出显著性的正相关, 但随着地理距离的增大逐渐显示出负相关, 说明猕猴桃属植物的有效传粉距离可能在100 m左右, 种子散播主要集中在30 m的近距离内。猕猴桃自然居群遗传变异的空间结构是其传粉和种子散播等生物学特性与生境共同作用的结果, 其中种子近距离的散播、花粉传播的有限距离及人为干扰是最主要的因素。本研究结果揭示了这两个近缘物种居群遗传变异的空间分布特征及相互关系, 有助于进一步探讨猕猴桃属植物的遗传变异、居群扩散及其地理系统发育进化等方面的规律, 并为制定相应的保育策略和措施提供基础数据和科学依据。

关键词: *Actinidia chinensis*, *Actinidia deliciosa*, 空间遗传结构, 微卫星, Moran's *I* 指数

Spatial genetic structure in natural populations of two closely related *Actinidia* species (Actinidiaceae) as revealed by SSR analysis

Yaling Liu^{1,2}, Zuozhou Li², Pengfei Zhang³, Zhengwang Jiang², Hongwen Huang^{1,2*}

1 College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430074

2 Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074

3 Department of Horticulture and Forestry, Xinyang Agricultural College, Xinyang, Henan 464000

Abstract: The spatial structure of genetic variation is an important part of evolutionary and ecological genetic processes in natural populations of plants, and may provide deep insights into the conservation of species. In this paper, the spatial distribution patterns of genetic variation of two closely related sympatric species, *Actinidia chinensis* and *A. deliciosa*, were investigated using SSR markers. A total of 104 alleles was scored by nine pairs of SSR primers in two natural populations, and the alleles with frequency ranging from 20% to 80% were chosen and then used to calculate Moran's *I* spatial autocorrelation coefficients for the two individual species or the species complex (*A. chinensis/A. deliciosa*) based on equal numbers of paired samples. Over half of the alleles were found to have a random distribution pattern within populations, while a large proportion of alleles occurred as cline, depression, double depression or intrusion patterns (29.6–48.0% within populations of each individual species, 51.0–44.7% for the two species complex, in Xixia of Henan and Shangnan of Shaanxi populations, respectively). This suggests that a moderate spatial structure of genetic variation occurred within the natural populations of the two species. Moreover, a similar spatial distribution pattern of genetic variation was

收稿日期: 2006-03-20; 接受日期: 2006-07-15

基金项目: 中国科学院武汉植物园创新主任基金(05035117)和中国科学院知识创新方向性项目(KSCX2-SW-320 和 KSCX2-SW-104)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: hongwen@public.wh.hb.cn

found within the two populations of each individual species and in the species complex at the two sampled locations. The results showed that allelic variation for individual plants within 100 m (and especially within 30 m) distance had significant positive correlation, but changed into a negative correlation with increasing distance, which may imply that the distances for pollen dispersal is about 100 m, and seed dispersal might be restricted to within 30 m. The different spatial structures of genetic variation of *Actinidia* natural populations were influenced by a combination of the biological characteristic of pollination, seed dispersal, and natural habitat. The restricted seed and pollen dispersal, and intervention of human activities were the main factors influencing the spatial pattern. The results should be of importance for further understanding of population genetic structure, population spreading and phylogeography in *Actinidia*, and provide baseline data for the conservation and management of these species, especially for sampling strategies for *ex situ* conservation.

Key words: *Actinidia chinensis*, *A. deliciosa*, spatial genetic structure, microsatellite, Moran's *I* index

猕猴桃原产于我国,为多年生雌雄异株落叶藤本植物,隶属猕猴桃科猕猴桃属(*Actinidia*)。全世界现有猕猴桃属植物66种,约118个分类单位(变种、变型)(黄宏文等,2000)。广泛分布于热带赤道0°至北温带50°N的亚洲东部区域,除4个种分布于我国的周边地区外,其余62个种均原产我国,而且多数种集中分布于我国的秦岭以南、横断山以东的地域(梁畴芬,1984;崔致学,1993)。该属众多物种果实富含维生素C,味道甜美,倍受人们喜爱。其中最为著名的是中华猕猴桃(*Actinidia chinensis*)和美味猕猴桃(*A. deliciosa*),已从中选育出众多的品种用于商业化栽培。由于这两个物种为遗传近缘种,有高度的遗传相似性,在猕猴桃属植物的种系亲缘关系处理中通常合并为中华/美味猕猴桃物种复合体(Huang & Ferguson, 2006)。自1904年新西兰从我国湖北宜昌引种、驯化栽培猕猴桃以来,猕猴桃迅速地成为世界各地竞相发展的新兴果树产业。现全球栽培面积达12万hm²、年产量达130多万吨(黄宏文,2005)。

然而,猕猴桃产业的发展面临两个问题:一是品种单一、栽培品种的遗传基础狭窄,这势必给该产业带来潜在的危机(Huang & Ferguson, 2003)。二是随着人口的迅速膨胀和经济活动的不断加剧,大面积森林被砍伐,野生猕猴桃的原始生境不断萎缩和消失,种质资源严重流失。目前已处在濒危状态的该属物种已达19种(武显维等,1995;张忠慧等,1999,2003)。因此,猕猴桃植物资源的有效保育成为了人们关注问题之一。

物种的科学、有效的保育措施的制定,应建立在对物种的自然居群遗传结构、遗传变异空间分布格局等遗传基础以及相关环境因子作用规律有着

充分了解的基础上(Falk & Holsinger, 1991; Dunham *et al.*, 1999)。居群内和居群间遗传变异的空间分布是居群遗传结构的重要特征之一,与物种繁育机制、花粉和种子的散播方式紧密相关,也反映其生态适应进化、生境变迁与自然选择效应(Epperson & Allard, 1989; Shapcott, 1995)。近十年来植物居群遗传变异的空间自相关分析已成为保育遗传学研究的重要工具(Sokal & Oden, 1978a, b; Epperson & Allard, 1989; Reusch *et al.*, 1999; Escudero *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2003; Ng *et al.*, 2004),但在我国的相关研究起步较晚(何田华等,1999;陈小勇,2001;张冬梅等,2001),所涉及的物种较少,不过近年来也正在逐步增加(李昂等,2002;李作洲等,2002,2003;闫伯前等,2003;何敬胜等,2005;王瑛等,2006)。

目前,世界上主要猕猴桃生产国已纷纷建立了种质资源圃,收集保存猕猴桃种质资源,我国也建立了以武汉植物园猕猴桃种子资源圃为主的资源圃体系(张忠慧等,1999;黄宏文等,2000)。但有关猕猴桃属植物保育遗传学方面的研究相对缺乏(胡忠荣等,2003;王圣梅等,2003;张忠慧等,2003),远远不能满足猕猴桃种质资源的综合保育要求。Huang (2003)提出应从核质基因组完整性方面开展猕猴桃资源的综合保育,但目前国内外的相关研究主要集中在资源圃的种质遗传基础与背景的评价(Atkinson *et al.*, 1997; Testolin *et al.*, 1995, 1997)、猕猴桃属植物的分子系统学研究(Huang *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002; Chat *et al.*, 2004)以及栽培品种(株系)的遗传多样性检测与分子指纹鉴定等(Zhen *et al.*, 2004)。对于猕猴桃野生居群的研究极少,仅栗琪等(2004)运用SSR标记对中华/美味猕猴桃的少数自然

居群开展了遗传多样性的初步研究, 在自然居群的空间遗传结构方面未见涉及。

中华猕猴桃和美味猕猴桃野生居群分布于秦岭淮河以南的广大地区, 中华猕猴桃自然分布略为偏东或偏向中低海拔, 而美味猕猴桃自然分布偏西或偏向中高海拔, 但在地域上和海拔上均存在重叠分布。由于环境的日益恶化和人类干扰的加重, 这两个猕猴桃属中最重要的经济栽培物种正面临着日益严重的生境消失和野生资源丧失。以中华猕猴桃和美味猕猴桃为代表开展猕猴桃属植物的保育遗传学, 特别是居群遗传变异空间结构方面的研究, 不仅可以为这两个物种以及整个猕猴桃属植物的种质资源保育提供参考, 同时还可以为新的种质发掘或品种遗传改良提供基础数据。本文运用SSR遗传标记针对我国猕猴桃典型分布的代表性自然居群, 采用空间自相关分析方法对中华猕猴桃和美味猕猴桃两物种的居群空间结构进行分析, 目的在于探讨其居群间、居群内等位基因频率的空间分布模式; 揭示这两个近缘物种同域分布的遗传结构特征及其相互关系, 为制定有效的保育措施和保育策略提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

材料于2004年10–11月采自河南西峡县和陕西商南县中华猕猴桃和美味猕猴桃的集中分布区域。在河南西峡县境内一个自然同域分布区共取样91

个植株, 其中中华猕猴桃为52株, 美味猕猴桃为39株; 在陕西商南县境内一个自然同域分布区共取样77个植株, 其中中华猕猴桃为37株, 美味猕猴桃为40株。每植株取其休眠枝。所有采样株均经GPS(Garmin eTrex Vista)定位, 用以上材料作小格局的居群遗传空间结构分析。取样点分布如图1所示。

1.2 DNA提取

所采猕猴桃枝条在实验室进行水培, 使其发芽, 选取适量幼叶, 按Rogers和Bendich (1985) 改良CTAB法提取植物总DNA, 按Ausubel等(1987)的方法, 采用Rnase A 消化除去RNA。模板DNA的质量和浓度采用紫外分光核酸测定仪(GENEQUANT, Eppendorf, Germany)测定, 并应用1%琼脂糖凝胶电泳检测模板DNA的浓度和质量(λ /Hind III marker), 模板用于微卫星分析时稀释为50 ng/ μ L。

1.3 PCR扩增及产物检测

按Huang等 (1998) 等报道的微卫星位点, 选取其中多态性好的23对引物 (由上海博亚生物技术公司合成) 进行筛选预实验, 挑选出9对稳定性好、多态性高的SSR引物用于正式实验。扩增反应在Master Gradient (Eppendorf, Germany)PCR仪上进行, 反应程序按Huang等(1998)报道的反应条件及步骤进行。扩增产物采用6%的变性聚丙烯酰胺凝胶 (6% acrylamide / bisacrylamide 19:1, 7 mol/L urea in TBE, pH 8.3) 电泳分离和银染检测。在PCR 产物中加入3/4倍体积的变性剂 (98%甲酰胺, 10 mmol/L

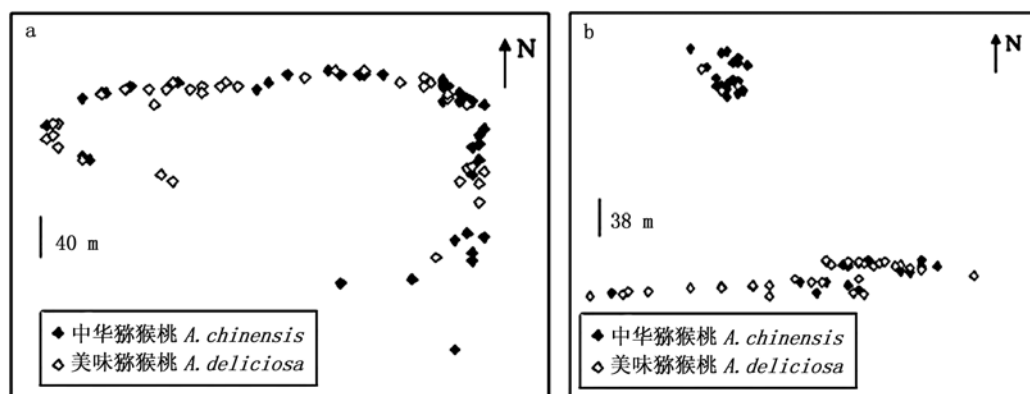


图1 两物种猕猴桃自然居群个体分布图(a: 河南西峡; b: 陕西商南)

Fig. 1 Spatial distribution of sampled individuals from *Actinidia chinensis* and *A. deliciosa* populations. Xixia, Henan region (a); Shangnan, Shaanxi region (b).

EDTA, 0.25%溴酚蓝, 0.25%二甲苯腈), 在95℃下变性15 min。在Sequei-Gen GT System (BIORAD) 电泳仪上进行预电泳和正式电泳。银染程序参照Sanguinetti等(1994)报道的方法, 略做改动。凝胶在室温下自然干燥。

1.4 数据的判读与空间自相关分析

中华猕猴桃有二倍体和四倍体两种倍性, 美味猕猴桃为六倍体(黄宏文等, 2000)。实验采用的9对SSR引物均为单一位点, 尽管可以检测出各个等位基因, 并可区分杂合体和纯合体, 但对于多倍体却难以准确判读其基因型, 因此本研究将引物扩增的等位基因作为“1”或“0”赋值, 构建二态数据矩阵, 对其进行空间自相关分析。

空间自相关分析是一种用来检测与量化从多个标定点中取值变异的空间依赖性的方法, 它通过检测一个位置上的变异是否依赖于邻近位置的变异, 来判断该变异是否存在空间自相关性, 即是否存在空间结构(Sokal & Oden, 1978a, b; Epperson, 1990a; 何田华等, 1999)。在此, 我们将SSR等位基因变异看作绝对型变异(如表型或基因型)进行处理。在空间自相关分析中, 如果某一等位基因的频率过高或过低, 则该位点在空间自相关分析中提供的有效信息将很少(Geburek, 1993)。为了保证数据具有足够的统计学意义, 在每一个被分析居群中, 我们统一选取了表型频率在20–80%范围内的等位基因, 根据Sokal和Oden(1978a)的方法, 使用SAAP4.3软件(Warternberg, 1989), 依据等样对频率原则划分了10个距离等级, 尽量使每个距离等级内的样对数均匀分布。分别对中华猕猴桃和美味猕猴桃居群及其两物种复合居群进行空间自相关系数Moran's I 值和期望值($I_{\text{expected}} = -1/(n-1)$, n =样点数)的计算。

在空间自相关分析中, 当 I 值显著大于 I 的期望值(即 I 值为正值, 且显著)时, 说明两点存在相似关系; 而当 I 值显著小于 I 的期望值(即 I 值为负值, 且显著)时, 说明两点不存在相似关系(Sokal & Oden, 1978a; 何田华等, 1999)。通过统计学检验来判定上述的相似和不相似是否是由于随机过程造成的, 进而分析居群在两个不同分布尺度上的空间结构(Sokal & Oden, 1978a, b; McCauley *et al.*, 1996)。

2 结果

2.1 两猕猴桃物种在各居群内SSR分析结果

采用9对引物对中华猕猴桃和美味猕猴桃在两个区域中的168株样本进行PCR扩增, 共检测出104个清晰可靠的等位基因, 平均每个位点的等位基因为11.56个。除引物UDK96-013在陕西区域的两物种中被扩增出单一的两个等位基因外, 其他引物在各个居群都表现出较高的多态性(表1)。根据多态信息指数(PIC)公式(Weir, 1996; Rongwen *et al.*, 1995)计算各位点在各居群物种的PIC值。

$$PIC = 1 - \sum_{j=1}^n f_{ij}^2$$

f_{ij} 为 i 位点第 j 个等位基因的表型频率。在多倍体中, PIC常被用来代替预期杂合度(H_e)近似地估测遗传多样性水平。中华猕猴桃居群PIC值平均达0.812, 美味猕猴桃居群PIC值平均达0.831(数据未列), 表明这两种猕猴桃均具有极高的遗传多样性, 其中美味猕猴桃的多样性又略高于中华猕猴桃。

2.2 河南西峡猕猴桃居群遗传变异的空间分布

对于河南西峡(HX)中华猕猴桃居群, 用于空间自相关分析的38个等位基因所得到的380个Moran's I 值中(表2), 有145个(22.4%)达到显著($P < 0.05$)或极显著水平($P < 0.01$)相关($E_{ij} = -0.020$); 其中累计达显著相关水平的等位基因有14个(36.8%)(数据未列), 表明多数等位基因的变化不存在明显的空间结构, 为随机分布模式或称百纳被模式(crazy quilt)(Sokal & Oden, 1978b)。从显著性相关Moran's I 值在各地地理距离等级中的分布看, 在近距离等级内(第1–3距离等级, 30–69 m), 达显著水平的Moran's I 值均为正值; 随着距离等级的增加, 达显著正相关的Moran's I 值的个数逐渐减少, 显著负相关的Moran's I 值的个数逐渐增多, 而且从第4距离等级(89 m)到第5距离等级(117 m)成为明显的变化拐点, 说明在100 m范围内的个体存在相似关系(表2), 尽管最远距离等级中又出现少数正显著相关的Moran's I 值, 但基于平均Moran's I 值的空间模式图依然反映出渐变(cline)模式(图2a)。平均Moran's I 值在第1距离等级(30 m)达到显著正相关, 进一步表明相距30 m以内的个体更为相似。

表1 2个猕猴桃近缘种微卫星遗传分析的9对引物、退火温度及等位基因数
Table 1 Nine pairs of primers and annealing temperature used in the microsatellite analysis of two closely related species in *Actinidia chinensis* and *A. deliciosa*

位点 Locus	引物序列 Primer sequence (5'→3')	重复类型 Repeat motif	退火温度 Annealing temperature (°C)	等位基因数 Number of alleles	
				河南西峡 HX population 中华/美味 <i>A. chinensis</i> / <i>A. deliciosa</i>	陕西商南 SS population 中华/美味 <i>A. chinensis</i> / <i>A. deliciosa</i>
UDK96-001	5'GAATCGCGTAATGATTGATGG 5' GTTCCCACTCTGCAAAAAGC	(AC)10(TC)16	55	17/20	20/25
UDK96-009	5'CACTCACATGCCTTTACACACA 5' AAGAGGCCACCAAAACCTT	(AC)8	55	16/8	12/11
UDK96-013	5' ACGTGACTTGGTTTTGAAGG 5' CACTCCGATCAGCTCTCCTC	(AC)15	55	12/11	2/2
UDK96-019	5' ATACACTGAAGCGCCGC 5' AAGCAGCCATGTCGATACG	(AG)11(AC)12	55	17/20	22/19
UDK96-028	5' TCCCCACACAACAACCTCTC 5' CAGATGACCTGCACGTGC	(AG)19	55	9/7	8/9
UDK96-039	5' GGTTTGATCGGTCTTCGAAA 5' ATAAATGTGTGCCAGTGCGA	(AC)10	55	12/12	8/12
UDK97-404	5' CGGCATTTTCTTTTAAATGACC 5' TTGCCTTGCTCTTGTTTCATG	(TC)20	57	16/11	13/12
UDK97-408	5' GTGCTCTCCGTCCATGTAT 5' CGTCCTCTCTTCGCCATTTA	(AG)21	56	16/16	11/15
UDK97-420	5' GAGCGTAGAATGTGGCGG 5' CATTTGAAATGAGTCAAGCTGC	(AG)17	57	15/15	14/15

从具显著性相关Moran's *I* 值的各等位基因看, 各等位基因变化的空间模式不尽一致, 其中等位基因UDK96-028-113、UDK96-039-153表现为渐变模式, 即在第1-6 距离等级(30-142 m)内的Moran's *I* 值多为显著性正值, 随着距离的增加而逐渐表现为负值, 呈现为有规律的从显著正相关到显著负相关逐渐变化; 而等位基因UDK96-009-167表现为双向渐变模式(double cline), 即在第1-6 距离等级的Moran's *I* 值由极显著的正相关逐步变为极显著的负相关, 随后又逐步上升到第10距离等级的显著正相关。其他大多数具显著性Moran's *I* 值的等位基因则以UDK97-408-111或UDK97-408-85为代表呈现为衰退(depression)或双向衰退模式(double depression), 即在第1距离等级或第2距离等级 (47 m) 内的Moran's *I* 值为显著正相关, 随后迅速下降, 继而上升再下降, 呈现为循环式的下降曲线, 只是后者的循环振幅更大些; 相对于UDK97-408-85为代表的典型双向衰退模式而言, UDK96-019-151、UDK97-420-130两等位基因略有不同, 在第9 距离等级前表现为双向衰退模式, 但在第10距离等级迅速上升达到显著水平的正相关(数据未列)。此外还

有部分等位基因如UDK97-408-101, 其Moran's *I* 值在绝大多数距离等级内差异不显著, 且高低正负交错, 仅在单个距离等级达到显著水平, 表现为侵扰模式(intrusion)。

同中华猕猴桃居群相比, 美味猕猴桃居群的遗传变异空间结构相对更为明显。在由50个等位基因分析所得到的500个Moran's *I* 值中(表2), 有144个(28.8%)达到显著($P<0.05$)或极显著($P<0.001$)相关水平($E_{ij}=-0.026$), 其中累计达显著或极显著水平的等位基因有24个(48.0%), 即近一半的等位基因具有明显的空间结构。同中华猕猴桃居群的距离等级变化模式相似, 只是明显变化的拐点在第5距离等级(104 m)到第6距离等级间(134 m)。对于具显著性相关Moran's *I* 值的各等位基因而言, 除了其具明显空间结构的等位基因比例高于中华猕猴桃居群外, 依然表现为渐变、双向渐变、衰退、双向衰退或侵扰等模式类型(图 2b)。其中等位基因UDK96-001-233、UDK96-028-117、UDK97-404-141呈典型的渐变模式, 等位基因UDK97-404-135为双向渐变模式, 其他大多数等位基因依然呈衰退或双向衰退模式(数据未列), 其代表等位基因分别为

表2 在同域分布的两猕猴桃物种各距离等级中表现出显著相关的等位基因数(等频率间隔)
Table 2 Number of alleles showing significant correlation in each distance class for two sympatric *Actinidia* species (equal frequency correlograms)

	中华猕猴桃距离等级 Distance class of <i>A. chinensis</i> (m)																			
	河南西峡 Xixia, Henan										陕西商南 Shangnan, Shaanxi									
	30	47	69	89	117	142	165	182	209	286	34	53	83	125	685	744	792	830	878	992
显著正相关的等位基因数 No. of alleles showing significant positive correlation	10	11	6	6	1	1	0	1	2	3	8	5	2	4	1	2	1	0	1	1
显著负相关的等位基因数 No. of alleles showing significant negative correlation	0	0	0	1	4	8	6	8	10	7	1	1	1	2	6	3	2	4	3	1
呈现显著相关性的等位基因所占比例 Percentage of alleles showing significant correlation (%)	26.3	28.9	15.8	18.4	13.2	23.7	15.8	23.7	31.6	26.3	33.3	22.2	11.1	22.2	25.9	18.5	11.1	14.8	14.8	7.4

	美味猕猴桃距离等级 Distance class of <i>A. deliciosa</i> (m)																			
	河南西峡 Xixia, Henan										陕西商南 Shangnan, Shaanxi									
	27	52	70	83	104	134	156	174	201	231	30	46	66	83	97	119	138	181	766	927
显著正相关的等位基因数 No. of alleles showing significant positive correlation	21	16	12	6	8	0	0	2	1	8	17	3	4	4	5	2	4	2	1	7
显著负相关的等位基因数 No. of alleles showing significant negative correlation	0	0	0	7	4	9	11	17	15	17	0	3	2	3	2	9	4	7	10	7
呈现显著相关性的等位基因所占比例 Percentage of alleles which showed significant correlation (%)	42.0	32.0	24.0	26.0	24.0	18.0	22.0	38.0	32.0	50.0	40.5	14.3	14.3	16.7	16.7	26.2	19.0	21.4	26.2	33.3

	中华/美味物种复合体距离等级 Distance class of <i>A. chinensis</i> / <i>A. deliciosa</i> complex (m)																			
	河南西峡 Xixia, Henan										陕西商南 Shangnan, Shaanxi									
	30	52	72	89	117	143	164	183	207	286	34	58	82	111	145	705	767	817	871	1004
显著正相关的等位基因数 No. of alleles showing significant positive correlation	23	9	11	12	7	1	1	4	4	4	13	4	5	5	9	0	2	2	1	1
显著负相关的等位基因数 No. of alleles showing significant negative correlation	0	0	6	1	2	7	16	12	17	19	2	1	3	5	2	8	5	5	9	10
呈现显著相关性的等位基因所占比例 Percentage of alleles showing significant correlation (%)	46.9	18.4	34.7	26.5	18.4	16.3	34.7	32.7	42.9	46.9	39.5	13.2	21.1	26.3	28.9	21.1	18.4	18.4	21.1	28.9

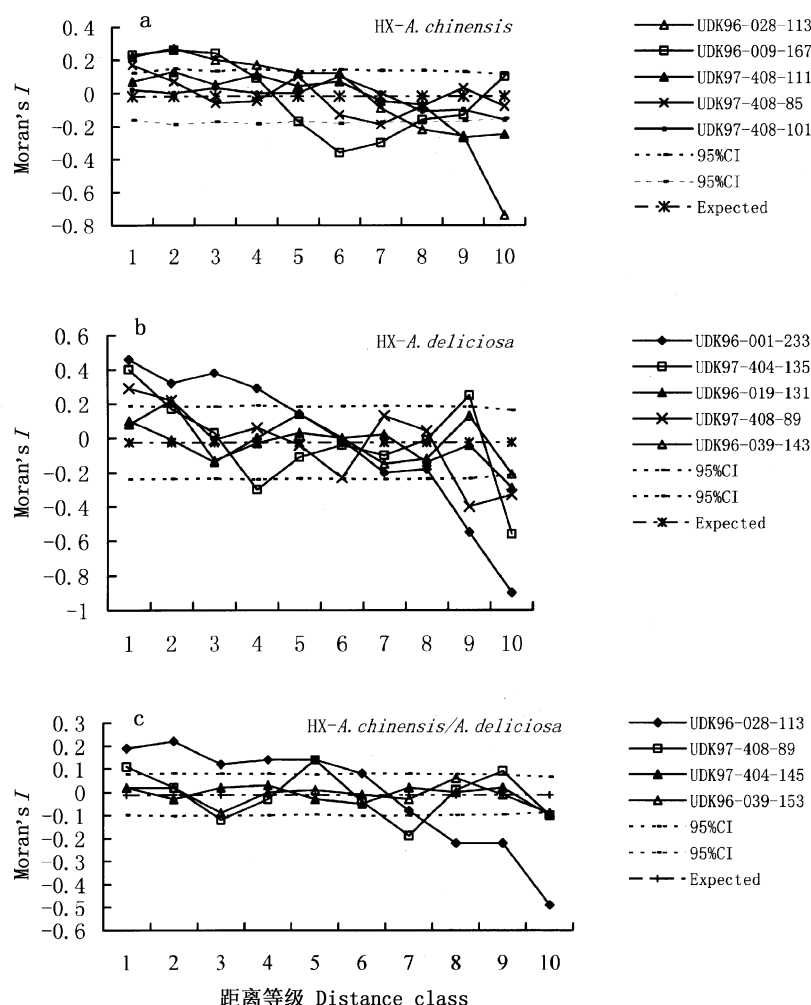


图2 依据微卫星等位基因在10个距离等级上的Moran' I 平均值和代表性等位基因Moran' I 值得出的自相关图(95%置信区间)。(a)河南西峡-中华猕猴桃居群;(b)河南西峡-美味猕猴桃居群;(c)河南西峡-中华/美味猕猴桃复合居群。
Fig. 2 Correlogram using mean value of Moran' I of all microsatellite alleles and typical alleles in 10 distance intervals (95% confidence interval). *A. chinensis* population from Xixia, Henan (a); *A. deliciosa* population from Xixia, Henan (b); *A. chinensis/A. deliciosa* complex population from Xixia, Henan (c).

UDK96-019-131和UDK97-408-89, 此外还有少数等位基因, 如UDK96-039-143、UDK96-013-133等呈现侵扰模式(数据未列)。

中华猕猴桃和美味猕猴桃具有高度的亲缘关系, 曾被作为一个物种看待, 在猕猴桃属植物的种系亲缘关系处理中通常合并为中华/美味猕猴桃物种复合体。而且在本实验中两居群为同域分布, 花期较为一致, 所检测到的共有等位基因达62.3%(数据未列), 两物种间具有一定的基因交流。将两物种作为复合居群分析可能有助于揭示该自然居群猕

猴桃的遗传变异的空间结构规律。在本区域复合居群中用于分析的49个等位基因所得到的490个Moran's I 值, 有156个(31.8%)达到显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)水平($E_{(I)} = -0.011$), 其中累计达显著水平的等位基因有25个(51.0%)(数据未列), 揭示出复合居群中多数等位基因的遗传变异呈现较明显的空间结构。在第1距离等级(30 m)内具有显著性Moran's I 值达46.9%, 且均为正值, 尽管第2距离等级(52 m)等级显著性Moran's I 值的数目大幅减少, 但均为正值。随着距离等级的增加, 正显著性Moran's

I 值的比例逐渐降低,而负显著性Moran's I 值的比例逐步上升,第5距离等级(117 m)与第6距离等级(143 m)间依然是明显变化的拐点(表2),与平均Moran's I 值模式图所反映的结果相一致,并体现出总体的衰退模式(图2c)。

对于各等位基因而言,绝大多数与两物种分开分析时所体现的模式相一致或相近,但在中华猕猴桃居群或美味猕猴桃居群中呈现渐变模式的等位基因大多转化为衰退或双向衰退模式,仅UDK96-028-113呈现渐变模式(数据未列)。也有少数在单一物种居群分析中呈现空间结构的等位基因,在合并分析中失去明显的空间结构,如UDK97-404-139、UDK97-404-143、UDK97-404-145等在美味猕猴桃居群中为衰退或双向衰退模式,且在近距离等级中具有显著或极显著水平的正Moran's I 值,只因其在中华猕猴桃居群相应的近距离等级中具有负的Moran's I 值(但不显著),使得其在合并分析相应距离等级中的Moran's I 值不再显著,体现出随机模式或侵扰模式(数据未列)。但等位基因UDK96-039-153的变化却较为特殊,分别在中华猕猴桃居群和美味猕猴桃居群的近距离等级中具有极显著的正相关Moran's I 值,在远距离等级具有显著或极显著的负Moran's I 值,但合并分析时多数距离等级的Moran's I 值均在0值附近波动,仅在第3和第10距离等级达到负显著相关,体现出侵扰模式。

2.3 陕西南猕猴桃居群遗传变异的空间分布

在陕西南猕猴桃居群的SSR分析中,中华猕猴桃居群中选用27个等位基因所得到的270个Moran's I 值中,仅有49个(18.1%)达到显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)相关水平($E_{(I)}=-0.028$)。其中累计达显著水平的等位基因仅8个(29.6%)(数据未列),各距离等级中显著性相关Moran's I 值的变化趋势同河南西峡区域相一致,明显变化的拐点也是第4距离等级(125 m),但第4距离等级与第5距离等级(685 m)间的距离跨度大(表2),说明本区域中华猕猴桃居群遗传变异的空间结构虽然较弱,但也表明其分布不连续。基于平均Moran's I 值模式图呈现出弱衰退模式(图3a)。在具显著性Moran's I 值的等位基因中,UDK97-420-130在第1、4距离等级显著正相关,在第2、5距离等级极显著负相关,总体上正负交错呈现为斑块分布模式(patch),UDK97-404-141呈现双

向渐变模式,绝大多数等位基因如同UDK96-001-273一样呈双向衰退模式,此外还有少数等位基因,如UDK97-408-103仅在个别距离等级达到显著呈现侵扰模式。

对于美味猕猴桃物种,选用了42个等位基因用于分析,结果得到的420个Moran's I 值中有96个(22.9%)达到显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)相关水平($E_{(I)}=-0.026$),其中累计达显著水平的等位基因有17个(40.5%),表明该区域中美味猕猴桃居群遗传变异的空间遗传结构较中华猕猴桃居群明显。从各距离等级正负显著性相关的Moran's I 值的分布看,第1距离等级(30 m)内所有显著性Moran's I 值为正相关,占所分析等位基因的40.5%,随着距离等级的增加,正显著Moran's I 值的减少和负显著Moran's I 值的增加呈现一种循环波动的变化,但总趋势依然是正显著Moran's I 值减少,负显著Moran's I 值增加,主要变化拐点也还是在第5距离等级(97 m)和第6距离等级(119 m)间(表2),表明美味猕猴桃居群遗传变异空间结构变化依然在30 m和100 m左右的这两个拐点上,与基于平均Moran's I 值模式图所揭示的弱衰退模式相一致。

对比河南西峡美味猕猴桃居群各距离等级显著Moran's I 值数目的渐变和本居群的波动衰退变化,揭示出美味猕猴桃两居群的遗传变异空间结构存在一定的区别。在29个具显著性Moran's I 值的等位基因中,有近半数的等位基因似UDK96-001-269(图3b)呈现双向衰退模式,剩余半数的等位基因似UDK96-039-149呈现侵扰模式(数据未列),仅等位基因UDK97-404-139为近似的渐变模式。

在本区域中华/美味猕猴桃物种复合居群中,用于分析的38个等位基因所得到的380个Moran's I 值中(表2),有92个(24.2%)达到显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)相关水平($E_{(I)}=-0.013$)(数据未列),其中累计达显著水平的等位基因有19个(44.7%)。各距离等级中显著性Moran's I 值的数目变化与美味猕猴桃居群的趋势相同,平均Moran's I 值模式图也呈现弱衰退模式。拥有多个显著性Moran's I 值的等位基因多数如同UDK96-028-137(图3c)一样呈现双向衰退模式(数据未列),仅UDK96-039-143呈现为渐变模式;而仅在一个距离等级中具有显著性的等位基因多呈现为侵扰模式,如UDK97-408-105。

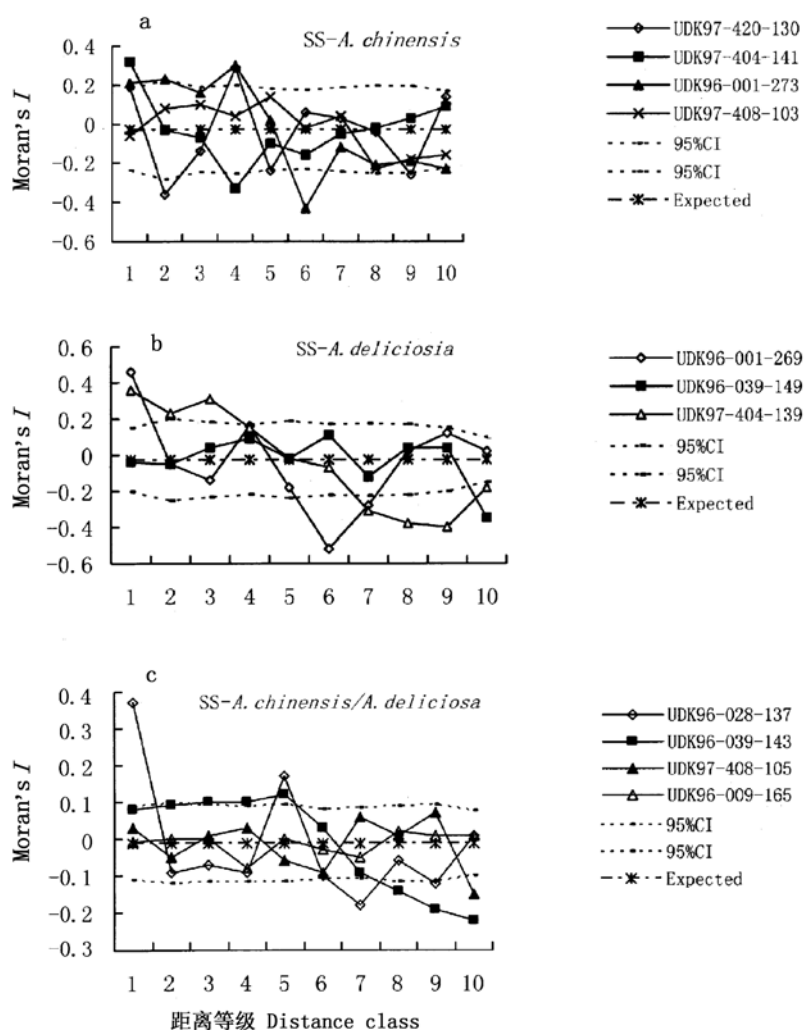


图3 依据微卫星等位基因在10个距离等级上的Moran's I 平均值和代表性等位基因Moran's I 值得出的自相关图(95%置信区间)。(a)陕西商南-中华猕猴桃居群;(b)陕西商南-美味猕猴桃居群;(c)陕西商南-中华/美味猕猴桃复合居群
Fig. 3 Correlogram using mean value of Moran's I of all microsatellite alleles and typical alleles in 10 distance intervals (95% confidence interval). *A. chinensis* population from Shangnan, Shaanxi (a); *A. deliciosa* population from Shangnan, Shaanxi (b); *A. chinensis/A. deliciosa* complex population from Shangnan, Shaanxi (c).

比较两物种单独分析与复合分析中各等位基因的模式变化, 依然体现河南西峡复合居群的规律, 即复合分析中大多数等位基因的变化模式与两物种居群分开分析时的模式相近, 但也有少数在单一物种居群中呈现空间结构的等位基因如UDK96-009-165、UDK96-019-149、UDK97-404-149等在复合分析中转变为随机的百纳被模式或侵扰模式(数据未列)。

3 讨论

Wright's F -统计量(F_{ST}) (Wright, 1978)、遗传分化度 G_{ST} (Nei, 1987) 等参数在一定程度上可以提供物种居群间遗传结构的信息, 但对于深入了解亚居群或邻近个体之间遗传变异的空间分布, 有效信息仍显不足(Dewey & Heywood, 1988; 何田华等, 1999)。而空间自相关分析作为一种有效的工具, 在

居群遗传研究领域有着越来越广泛的应用(Sokal & Oden, 1978a; Epperson & Chung, 2001; Chung *et al.*, 2004), 空间自相关分析既能提供更详细的空间分布信息, 并且不用做居群结构尺度大小的预先假设(Dewey & Heywood, 1988)。

物种遗传变异的空间分布格局往往与物种的繁育系统、种子散布方式等生殖生物学特性以及居群生境有着密切联系(Ellstrand & Elam, 1993; Loiselle *et al.*, 1995; Chung *et al.*, 2000; Marquardt & Epperson, 2004)。其中, 植物繁育机制和花粉、种子的散播决定着植物居群内或居群间等位基因频率或基因型的初始空间分布, 花粉和种子等繁殖体的有限散布导致遗传变异呈斑块状分布, 使居群内遗传变异出现一定空间结构的非随机分布, 从而导致个体间的空间自相关性随距离的增加而降低(Epperson, 1990b; Kelly, 2004)。研究现实居群遗传变异的空间结构也可以揭示已发生的花粉、种子散播和繁育机制等方面的一些规律, 遗传变异的空间结构分析也常用来推断如突变、迁移、选择和距离隔离等微进化因子的作用(Hamrick & Allard, 1972; Allard *et al.*, 1977; Sokal & Oden, 1978b; Epperson, 1990b, 1993; Reusch *et al.*, 1999; 何田华等, 1999)。本研究通过对于中华猕猴桃和美味猕猴桃两物种(物种内)居群的空间自相关分析表明, 尽管中华猕猴桃居群内多数等位基因、美味猕猴桃居群内半数以上等位基因的遗传变异的空间分布格局呈随机分布, 但也揭示出两种猕猴桃在两居群内存在程度不同的弱空间结构, 分别约有29.6–48.0%的等位基因呈现衰退、双向衰退或渐变等空间分布模式, 还有部分等位基因在总体上呈现随机分布状态, 而在个别距离等级偏离随机分布的侵扰模式。

虽然河南西峡和陕西商南区域中样本分布存在较明显的区别(图1), 但不论是在各物种居群独立分析中还是在复合分析中, 都揭示出相同的规律: 即相距100 m左右以内的大多数个体呈现或多或少的相似性, 而相距30 m以内的个体更为相似(图2、3), 而且具有空间结构的等位基因大多表现为衰退或双向衰退模式, 其次表现为侵扰模式。猕猴桃植物居群内的这种空间遗传结构可能正是由猕猴桃属植物的繁殖生物学特性所决定并受着居群环境的影响。

两猕猴桃物种在两居群内所呈现的遗传变异

空间结构的共性, 不仅表明其空间结构与猕猴桃植物雌雄异株、虫媒为主风媒辅助传粉、果实重力带动种子散播或动物取食传播的繁殖生物学特性(崔致学, 1993)相一致, 而且进一步揭示出猕猴桃花粉、种子散播的有效距离范围的一些规律: 相距100 m左右的猕猴桃植株在遗传变异上的或多或少相似, 而此距离范围以外的植株遗传变异则越来越不相似, 说明猕猴桃的有效传粉距离可能主要集中在100 m左右的范围内; 也就是说, 猕猴桃传粉昆虫可能多在相距100 m范围以内的邻近植株间活动, 或者风媒传粉在此距离范围更有效。

相距30 m左右的植株间的遗传变异更为相似, 说明除了近距离传粉外, 种子依靠果实重力近距离散播对猕猴桃居群遗传变异的空间分布格局的形成也有着重要影响。此外, 猕猴桃遗传变异的空间分布格局以双向衰退为主体, 同时存在较多的侵扰模式, 可能与雄株在居群中初始分布有关, 当然也不排除居群微生境影响或人为活动的干扰作用。

尽管中华猕猴桃与美味猕猴桃遗传变异的空间结构模式相一致, 但两者空间结构的强弱程度存在区别。无论是在河南西峡区域还是在陕西商南区域, 美味猕猴桃居群的显著性Moran's I 值的比例都略高于中华猕猴桃居群, 从各距离等级累计显著性等位基因看, 美味猕猴桃居群的累计显著性等位基因的比例也明显高于中华猕猴桃居群, 说明美味猕猴桃的遗传变异空间结构比中华猕猴桃更明显。这可能是由于美味猕猴桃的倍性($2n=6x$)高于中华猕猴桃($2n=2x, 4x$)的原因。植物倍性越高, 其个体所能容纳的等位基因就越多, 不仅使其维持的遗传多样性水平相应较高(栗琪等, 2004; Ng *et al.*, 2004; Zhen *et al.*, 2004), 而且可能更易于体现出空间遗传变异结构。中华猕猴桃和美味猕猴桃为同一近缘物种复合体的两个成员, 其亲缘关系极近(Huang *et al.*, 2002; Zhen *et al.*, 2004), 曾被作为中华猕猴桃种下的两个变种(梁畴芬, 1975; 梁畴芬和Ferguson, 1984), 虽然两者倍性存在差异 (Atkinson *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1997), 但存在较广区域的同域分布, 花期也相近。在两者并存的居群中, 相互间可能通过杂交或基因渗透产生较高基因交流($N_m \approx 11.2$, 未发表数据), 影响其遗传变异的空间结构。本研究中复合居群空间自相关分析的结果可能揭示了这一点, 如中华/美味猕猴桃复合居群遗传变

异的空间结构要强于两物种各自居群, 具空间结构的等位基因的比例相对较高。另外, 因部分等位基因在复合居群中表型频率发生改变, 进而影响到 Moran's I 值在各距离等级中的改变, 使其空间分布模式发生细微变化, 如等位基因 UDK96-039-153 (河南西峡)、UDK96-009-165 (陕西商南) 等。

总体而言, 复合居群的空间遗传变异的分布规律和各物种居群是相一致的, 在近距离范围内 (第 1-5 距离等级) Moran's I 值显著性正相关比例数占多数 (表 2、3), 说明相距较近的两物种间个体的遗传变异也较相似, 可能是两物种间存在频繁基因交流的结果。

除了物种的繁育系统、种子散布方式等生殖生物学特性影响其空间遗传变异结构或分布外, 居群生境的不同也可能在一定程度上改变其遗传变异的空间分布 (Ellstrand & Elam, 1993; Loiselle *et al.*, 1995; Chung *et al.*, 2000; Marquardt & Epperson, 2004)。对于本研究中的两区域, 河南西峡的 Moran's I 值显著性高于陕西商南。而且随着距离等级的增加, 河南西峡区域中具显著负相关的等位基因数呈现逐渐增加的趋势 (表 2), 同时多数等位基因的 Moran's I 值随距离等级增加而减少 (数据未列), 渐变、衰退或双向衰退模式为主体 (图 2); 但陕西商南区域远距离等级显著性负相关等位基因数为波动变化 (表 2), 相当一部分等位基因 Moran's I 值在远距离等级上下波动 (数据未列), 使其遗传变异多以双向衰退、侵扰模式为主体。导致这种空间结构差异的原因可能是因为:

(1) 生境的异质性可能影响其传粉或种子散播进而改变其空间结构。河南西峡猕猴桃居群分布于 U 型山谷两侧山坡上部半环形的连续狭长区域, 山坡下部坡度较陡且很少见有猕猴桃分布 (图 1a), 造成猕猴桃邻近个体间连续, 远距离个体间隔离的分布格局, 使其传粉和种子散播形成随距离的近似线性梯度变化, 则在居群内遗传变异分布上体现出以渐变、衰退或双向衰退模式为主体的空间结构 (图 1a、图 2)。陕西商南猕猴桃居群位于同一山坡, 但中间被人工林分隔为两个亚居群, 其中一个亚居群为方形区域, 而另一亚居群为长带状分布 (图 1b、图 3)。依据植物遗传分化的距离隔离模式 (Slatkin, 1993; Nason *et al.*, 2002; Moyle, 2006), 其种子的近距离散播及花粉的传播应主要集中于各亚居群内,

形成亚居群内的渐变、衰退或双向衰退模式和亚居群间的斑块模式。虽然本研究结果所揭示的亚居群空间结构与理论模式相一致 (近距离等级), 但在长距离等级并不是非常明显的负显著相关, 而是一种波动变化 (表 2, 图 3), 可能是受其长带型亚居群两端个体间距大于亚居群间距的影响以及人为活动干扰的结果。

(2) 人类活动的强弱与方式不同可能对居群遗传变异的空间结构带来不同的影响。本研究中的两居群都存在不同程度的人类活动, 河南西峡区域主要受园艺生产活动的影响较大, 果实的采摘可能造成种子的远距离散播, 附近的栽培居群与相近自然居群个体间的基因渗透, 使自然居群的空间遗传结构发生改变, 如少数等位基因所呈现的侵扰模式 (图 2)。在陕西商南区域, 我们看到在悬崖峭壁或攀缘在高大林木上的猕猴桃有着较大的树龄, 说明这里曾经有过大量的野生猕猴桃生存, 应为连续居群。但人为活动的破坏, 如开垦农田或营造人工林, 导致猕猴桃个体数量减少, 有效居群规模降低, 形成隔离的亚居群结构。这样, 亚居群间存在着历史基因流的积累, 可能导致亚居群间的一些个体共享部分等位基因, 使远距离等级存在少部分显著正相关 Moran's I 值 (表 2, 图 3), 该居群中出现较多等位基因空间分布侵扰模式 (图 3), 体现出人类活动有时可能对植物居群遗传变异空间结构带来较大的影响。

空间自相关分析极大地拓展了遗传学在保护生物学研究中的应用范围, 是将居群遗传学理论、种群统计学方法与景观生态学研究相结合的重要一环 (Manel *et al.*, 2003)。本研究结果表明中华猕猴桃和美味猕猴桃两个物种的遗传多样性较高, 且在各个居群中均呈现出一定的空间分布结构, 尽管生境差异或人为活动的干扰造成其部分等位基因空间分布模式略有不同, 但两物种分界不明显, 基因交流频繁, 各居群总体空间分布结构趋势基本一致。即无论在单一物种还是复合物种划分研究中, 相距 30 m 左右个体遗传变异极相似, 在 100 m 以内也或多或少存在着相似性, 因此我们在进行迁地保护和取样策略制定时, 应多采取相距 100 m 以上的个体, 适当采取 30 m 和 100 m 之间的个体, 以最大可能地保存其最多的遗传多样性。生境的差异与人类活动干扰有时会严重影响自然居群遗传变异结

构或降低遗传多样性,因而制定就地保护策略时,不同生境的居群应兼顾考虑,限制人为活动是必要的措施。

本研究结果不仅揭示出了猕猴桃植物居群遗传结构及其种子散播、花粉流等方面的规律,而且还揭示出生境异质性和人类活动对植物自然居群空间结构有着重要影响。这有助于进一步探讨猕猴桃属植物的遗传变异、物种扩散及其地理系统发育进化等方面的规律,同时也为猕猴桃属植物综合保育策略的制定和保育措施的实施提供了基础数据和科学依据。

致谢: 河南省西峡县林业局朱鸿云先生及陕西省商南县章仁海先生等在采样过程中提供的热心帮助,本实验室暴朝霞博士参与了野外调查采样,康明博士对实验给予了相关指导,在此一并感谢。

参考文献

- Allard RW, Kahler AL, Clegg MT (1977) Measuring selection in natural populations. Springer-Verlag, New York.
- Atkinson RG, Cipriani G, Whittaker DJ, Gardner RC (1997) The allopolyploid origin of kiwifruit, *Actinidia deliciosa* (Actinidiaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **205**, 111–124.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Stuhl K (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York.
- Chat J, Jauregui B, Petit RJ, Nadot S (2004) Reticulate evolution in kiwifruit (*Actinidia*, Actinidiaceae) identified by comparing their maternal and paternal phylogenies. *American Journal of Botany*, **91**, 736–747.
- Chen XY(陈小勇) (2001) Spatial autocorrelation of genetic structure in a population of *Cyclobalanopsis glauca* in Huangshan, Anhui. *Acta Phytocologica Sinica* (植物生态学报), **25**, 29–34. (in Chinese with English abstract)
- Chung MG, Chung JM, Chung MY, Epperson BK (2000) Spatial genetic distribution of allozyme polymorphisms following clonal and sexual reproduction in populations of *Rhus javanica* (Anacardiaceae). *Heredity*, **84**, 178–185.
- Chung MY, Nason JD, Chung MG (2004) Spatial genetic structure in populations of the terrestrial orchid *Cephalanthera longibracteata* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, **91**, 52–57.
- Cui ZX (崔致学) (1993) *Actinidia in China*(中国猕猴桃), pp.6–14. Shandong Science and Technology Press, Jinan. (in Chinese)
- Dewey SE, Heywood JS (1988) Spatial genetic structure in a population of *Psychotria nervosa*. I. Distribution of genotypes. *Evolution*, **42**, 834–838.
- Dunham J, Peacock M, Tracy CR, Nielsen J, Vinyard G (1999) Assessing extinction risk: integrating genetic information. *Conservation Ecology*, **3**, 2.
- Ellstrand NC, Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **24**, 217–242.
- Epperson BK (1990a) Spatial patterns of genetic variation within plant populations. In: *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources* (eds Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS), pp. 229–253. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA.
- Epperson BK (1990b) Spatial autocorrelation of genotypes under directional selection. *Genetics*, **124**, 757–771.
- Epperson BK (1993) Recent advances in correlation studies of spatial patterns of genetic variation. *Evolutionary Biology*, **27**, 95–155.
- Epperson BK, Allard RW (1989) Spatial autocorrelation analysis of the distribution of genotypes within populations of lodgepole pine. *Genetics*, **121**, 369–377.
- Epperson BK, Chung MG (2001) Spatial genetic structure of allozyme polymorphisms within populations of *Pinus strobes* (Pinaceae). *American Journal of Botany*, **88**, 1006–1010.
- Escudero A, Iriondo JM, Torres ME (2003) Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. *Biological Conservation*, **113**, 351–365.
- Falk DA, Holsinger KE (1991) *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press, Oxford.
- Geburek T (1993) Are genes randomly distributed over space in mature populations of sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.)? *Annals of Botany*, **71**, 217–222.
- Hamrick JL, Allard RW (1972) Microgeographical variation in allozyme frequencies in *Avena barbata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **69**, 2100–2104.
- He JS (何敬胜), Li ZZ (李作洲), Huang HW (黄宏文) (2005) Spatial autocorrelation of allozyme genetic variation of the endangered *Manglietia patungensis* (Magnoliaceae). *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **27**, 171–180. (in Chinese with English abstract)
- He TH (何田华), Yang J (杨继), Rao GY (饶广远) (1999) Spatial autocorrelation analysis of plant population genetic variation. *Chinese Bulletin of Botany* (植物学通报), **16**, 636–641. (in Chinese with English abstract)
- Hu ZR (胡忠荣), Yuan Y (袁媛), Yi SW (易芍文), Gao ZQ (高正清) (2003) Germplasm resources and main distribution of wild Chinese gooseberry in Yunnan Province. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences* (西南农业学报), **16**, 47–52. (in Chinese with English abstract)
- Huang HW (2003) Integration both nuclear and cytoplasmic genetic information into a high genomic coverage conservation approach for *Actinidia*. *Acta Horticulturae*, **610**, 87–93.
- Huang HW (黄宏文) (2005) One hundred years revelation and thinking on development of Chinese's kiwifruit cultivars

- in 21st century. In: *Advances in Actinidia Research*. III (猕猴桃研究进展III)(ed. Huang HW (黄宏文)), pp. i-ii. Science Press, Beijing. (in Chinese)
- Huang HW (黄宏文), Gong JJ (龚俊杰), Wang SM (王圣梅), He ZC (何子灿), Zhang ZH (张忠慧), Li JQ (李建强) (2000) Genetic diversity in the genus *Actinidia*. *Chinese Biodiversity* (生物多样性), **8**, 1-12. (in Chinese with English abstract)
- Huang HW, Dene F, Wang ZZ, Jiang ZW, Huang RH, Wang SM (1997) Isozyme inheritance and variation in *Actinidia*. *Heredity*, **78**, 328-336.
- Huang HW, Ferguson AR (2003) Kiwifruit (*Actinidia chinensis* and *A. deliciosa*) plantings and production in China, 2002. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, **31**, 197-202.
- Huang HW, Ferguson AR (2006) Genetic resources of kiwifruit: domestication and breeding. *Horticultural Reviews*, **33**, 1-121.
- Huang HW, Li ZZ, Li JQ, Kubisiak TL, Layne DR (2002) Phylogenetic relationships in *Actinidia* as revealed by RAPD analysis. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **127**, 759-766.
- Huang WG, Cipriani G, Morgante M, Testolin R (1998) Microsatellite DNA in *Actinidia chinensis*: isolation, characterization, and homology in related species. *Theoretical and Applied Genetics*, **97**, 1269-1278.
- Kelly BA, Hardy OJ, Bouvet JM (2004) Temporal and spatial genetic structure in *Vitellaria paradoxa* (shea tree) in an agroforestry system in southern Mali. *Molecular Ecology*, **13**, 1231-1240.
- Li A (李昂), Luo YB (罗毅波), Ge S (葛颂) (2002) Spatial autocorrelation study of population genetic structure of two orchid species. *Biodiversity Science* (生物多样性), **10**, 249-257. (in Chinese with English abstract)
- Li JQ, Huang HW, Sang T (2002) Molecular phylogeny and infrageneric classification of *Actinidia* (Actinidiaceae). *Systematic Botany*, **27**, 408-415.
- Li Q (栗琪), Li ZZ (李作洲), Huang HW (黄宏文) (2004) Preliminary study on SSR analysis in natural populations of *Actinidia*. *Journal of Wuhan Botanical Research* (武汉植物学研究), **22**, 175-178. (in Chinese with English abstract)
- Li ZZ (李作洲), Gong JJ (龚俊杰), Wang Y (王瑛), Huang HW (黄宏文) (2003) Spatial structure of AFLP genetic diversity of remnant populations of *Metasequoia glyptostroboides* (Taxodiaceae). *Biodiversity Science* (生物多样性), **11**, 265-275. (in Chinese with English abstract)
- Li ZZ (李作洲), Lang P (郎萍), Huang HW (黄宏文) (2002) Spatial structure of allozyme frequencies in *Castaenea mollissima* Bl. *Journal of Wuhan Botanical Research* (武汉植物学研究), **20**, 165-170. (in Chinese with English abstract)
- Liang CF (梁畴芬) (1975) The taxonomic of *Actinidia*. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报), **13**, 32-35. (in Chinese)
- Liang CF (梁畴芬) (1984) *Actinidia*. In: *Flora Republicae Popularis Sinicae* (中国植物志) Tomus 49(2), (eds, Feng KM), pp. 195-268, Science Press, Beijing. (in Chinese)
- Liang CF (梁畴芬), Ferguson AR (1984) Revision of intraspecific taxa of *Actinidia chinensis* Planch. *Guihaia* (广西植物), **4**, 181-182. (in Chinese with English abstract)
- Loiselle BA, Sork VL, Nason J, Grnham C (1995) Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*, **82**, 1420-1425.
- Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, **18**, 189-197.
- Marquardt PE, Epperson BK (2004) Spatial and population genetic structure of microsatellites in white pine. *Molecular Ecology*, **13**, 3305-3315.
- McCauley DE, Stevens JE, Peroni PA, Raveill JA (1996) The spatial distribution of chloroplast DNA and allozyme polymorphisms within a population of *Silene alba* (Caryophyllaceae). *American Journal of Botany*, **83**, 727-731.
- Moyle LC (2006) Correlates of genetic differentiation and isolation by distance in 17 congeneric *Silene* species. *Molecular Ecology*, **15**, 1067-1081.
- Nason JD, Hamrick JL, Fleming TH (2002) Historical vicariance and postglacial colonization effects on the evolution of genetic structure in *Lophocereus*, a Sonoran Desert columnar cactus. *Evolution*, **56**, 2214-2226.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Ng KKS, Lee SL, Koh CL (2004) Spatial structure and genetic diversity of two tropical tree species with contrasting breeding systems and different ploidy levels. *Molecular Ecology*, **13**, 657-669.
- Reusch TBH, Hukriede W, Stam W, Olsen JL (1999) Differentiating between clonal growth and limited gene flow using spatial autocorrelation of microsatellites. *Heredity*, **83**, 120-126.
- Rogers SO, Bendich AJ (1985) Extraction of DNA from milligram amount of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology*, **5**, 69-76.
- Rongwen J, Akkaya MS, Bhagwat AA, Lavi U, Cregan PB (1995) The use of microsatellite DNA marker for soybean genotype identification. *Theoretical and Applied Genetics*, **90**, 43-48.
- Sanguinetti CJ, Neto ED, Simpson AJG (1994) Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, **17**, 915-919.
- Shapcott A (1995) The spatial genetic structure in natural populations of the Australian temperate rainforest tree *Atherosperma moschatum* (Labill.) (Monimiaceae). *Heredity*, **74**, 28-38.

- Slatkin M (1993) Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution*, **47**, 264–279.
- Sokal RR, Oden NL (1978a) Spatial autocorrelation in biology. 1. Methodology. *Biological Journal of the Linnean Society*, **10**, 199–228.
- Sokal RR, Oden NL (1978b) Spatial autocorrelation in biology. 2. Some biological implications and four applications of evolutionary and ecological interest. *Biological Journal of the Linnean Society*, **10**, 229–249.
- Testolin R, Cipriani G (1997) Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in the genus *Actinidia*. *Theoretical and Applied Genetics*, **94**, 897–903.
- Testolin R, Cipriani G, Costa G (1995) Sex segregation ratio and gender expression in the genus *Actinidia*. *Sexual Plant Reproduction*, **8**, 129–132.
- Torres E, Iriondo JM, Esduder A, Perez C (2003) Analysis of within-population spatial genetic structure in *Antirrhinum microphyllum* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany*, **90**, 1688–1695.
- Wang SM (王圣梅), Huang HW (黄宏文), Zhang ZH (张忠慧) Jiang ZW (姜正旺) (2003) The conservation and utilization of the genetic resources of the genus *Actinidia*. In: *Advances in Actinidia Research* (II) (猕猴桃研究进展II) (ed. Huang HW(黄宏文)), pp. 270–274. Science Press, Beijing. (in Chinese with English abstract)
- Wang Y (王瑛), Kang M (康明), Huang HW (黄宏文) (2006) Subpopulation genetic structure in a panmictic population as revealed by molecular markers: a case study of *Castanea sequinii* using SSR markers. *Journal of Plant Ecology*(植物生态学报), **30**, 147–156. (in Chinese with English abstract)
- Warternberg D (1989) SAAP 4.3. —A *Spatial Autocorrelation Analysis Program*. Exeter Software, Setauket, New York.
- Weir BS (1996) *Genetic Data Analysis*. II, 2nd edn. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA.
- Wright S (1978) *Evolution and the Genetics of Populations*. Vol 4, *Variability Within and Among Natural Populations*. University of Chicago Press, Chicago.
- Wu XW (武显维), Kang N (康宁), Huang RH (黄仁煌), Wang SM (王圣梅) (1995) *Actinidia* germplasm conservation selection and breeding. *Journal of Wuhan Botanical Research* (武汉植物学研究), **13**, 263–268. (in Chinese with English abstract)
- Yan BQ (闫伯前), Qin L (秦岭), Li ZZ (李作洲), Huang HW(黄宏文) (2003) Spatial autocorrelation of population genetic structure of *Cryphonectria parasitica* in China. *Journal of Wuhan Botanical Research* (武汉植物学研究), **21**, 238–244. (in Chinese with English abstract)
- Zhang DM (张冬梅), Shen XH (沈熙环) He TH (何田华) (2001) A paternity analysis of seeds from different clones in a *Pinus tabulaeformis* Carr. seed orchard. *Acta Phytocologica Sinica* (植物生态学报), **25**, 166–174. (in Chinese with English abstract)
- Zhang ZH (张忠慧), Wang L (王莉), Huang HW (黄宏文), Jiang ZW (姜正旺), Peng FS (彭辅松) (2003) Germplasm investigation and protective strategy of the genus *Actinidia* in south foot of the peak of Shennongjia Mountains. In: *Advances in Actinidia Research* (II) (猕猴桃研究进展 II)(ed. Huang HW (黄宏文)), pp.280–284. Science Press, Beijing. (in Chinese with English abstract)
- Zhang ZH (张忠慧), Wang SM (王圣梅), Huang HW (黄宏文) (1999) Current situation of endangered *Actinidia* species and countermeasure on *ex situ* conservation. *China Fruits*(中国果树), **2**, 49–50. (in Chinese with English abstract)
- Zhen YQ, Li ZZ, Huang HW (2004) Molecular characterization of kiwifruit (*Actinidia*) cultivars and selections using SSR markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **129**, 374–382.

(责任编辑: 葛颂 责任编辑: 时意专)