

• 研究简报 •

云南干热河谷地区余甘子居群的遗传多样性研究

李巧明^{1*} 赵建立^{1,2}

1 (中国科学院西双版纳热带植物园植物系统与保护生物学实验室, 昆明 650223)

2 (中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 余甘子(*Phyllanthus emblica*)是我国西南干热河谷地带的优势植物, 也是一种重要的药用经济植物, 对其遗传多样性进行研究对生态环境的建设和恢复有着重要意义。作者采用ISSR分子标记技术对分布于云南干热河谷地区的4个余甘子居群的遗传多样性水平进行了检测。12条引物共扩增出135条清晰、重复性好的DNA条带, 其中多态性条带为115条, 多态位点百分率(PPB)为85.19%。居群间的遗传分化系数(G_{ST})为0.1222, 基因流(N_m)为1.7958。结果表明余甘子居群具有较高的遗传多样性水平, 而居群间存在较低的遗传分化, 这可能主要是由其繁育特性造成的。Mantel 检测表明地理距离和Nei's遗传距离间无相关性($r = 0.19798$, $P = 0.6513 > 0.05$)。当我们进行干热河谷地区生态恢复时, 以上结果对于确定余甘子的取样策略具有指导意义。

关键词: 药用经济植物, 遗传结构, 遗传分化, ISSR

Genetic diversity of *Phyllanthus emblica* populations in dry-hot valleys in Yunnan

Qiaoming Li^{1*}, Jianli Zhao^{1,2}

1 Laboratory of Plant Phylogenetics and Conservation Biology, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223

2 Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049

Abstract: *Phyllanthus emblica* (Euphorbiaceae) is one of the dominant species distributed in dry-hot valleys of southwestern China. Besides its function in ecology, environment and reforestation, it is also an important medicinal plant. We studied the genetic diversity in four populations of *P. emblica* sampled from dry-hot valleys of Yunnan using ISSR (inter-simple sequence repeats) markers. Based on 12 primers, 135 clear and reproducible DNA fragments were generated, of which 115 were polymorphic, accounting for 85.19%. The coefficient of genetic differentiation (G_{ST}) equaled 0.1222. Such a high level of genetic diversity and low level of population genetic differentiation might result from the breeding system of this species. There was a lack of significant association between genetic and geographical distances ($r=0.19798$, $P=0.6513>0.05$) among *P. emblica* populations. The results suggest some important recommendations about sampling methods to be used in ecological reforestation of dry-hot river valleys.

Key words: medicinal economic plant, genetic structure, genetic differentiation, ISSR

在我国西南横断山区及其东部邻近地区的几条大河流如怒江、金沙江和元江及其支流流域的河谷地段, 形成了独特的干热河谷生态类型。据估计, 干热河谷面积约有8万平方公里(许再富和邹祜梅, 1991; 金振洲和欧晓昆, 2000)。由于人类活动的破

坏, 该地区的原生性植被已残存无几, 取而代之的是次生的半稀树草丛, 许多地方已成为裸露的荒山秃岭, 生态环境和生物多样性遭到严重破坏, 水系中下游地区的生态安全受到影响。据预测, 全球气候变化将会导致我国西南干热河谷地区的面积扩

收稿日期: 2006-06-16; 接受日期: 2006-09-05

基金项目: 中科院方向性项目(KSCX2-SW-116)、中科院西部之光项目和云南省基金(2002C0018Q)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: lqm@xtbg.ac.cn

大, 气候也将变得更加干热(许再富和邹祜梅, 1991)。

我国正在实施的西部大开发战略把西部地区的生态环境保护和建设作为首要任务。虽然关于西南干热河谷地区植物群落学已开展了许多研究工作(许再富等, 1985; 金振洲等, 1995), 但以往的研究多涉及生态学方面, 对于植物在这种干热生境中的生命过程和适应机理研究得较少, 关于遗传多样性方面的研究还未见报道。

遗传多样性是生物适应多变环境的基础, 对物种的合理利用和保护有赖于了解其遗传多样性的分布、分化及影响因素 (Solbrig, 1991)。物种的进化潜力和抵御不良环境的能力, 生态系统的恢复力和稳定性都取决于遗传多样性的大小(Grant, 1991; O'Hanlon *et al.*, 2000)。当然, 生物资源的减少有过量采伐和更新不及时的原因, 但是否存在着物种遗传多样性水平较低的因素, 还有待研究。

余甘子 (*Phyllanthus emblica*) 又名橄榄(油甘子、滇橄榄), 是大戟科叶下珠属的落叶小乔木或灌木。起源于热带亚洲东南部, 从喜马拉雅山到斯里兰卡、马六甲海峡, 以及中国南部的广大地区都有分布(Morton, 1987)。分布区涵盖了 70°–122°E, 1°–29°N 的广大地域, 包括印度、尼泊尔和中国。在云南集中分布于金沙江、南盘江、元江、澜沧江和怒江等五大水系流域 (李昆和陈玉德, 1994)。

余甘子是干热河谷地区荒山绿化的先锋树种 (Pathak & Pandey, 1985; Pathak & Pathak, 2001), 对水土流失严重的干热河谷地带有明显的保水、固土作用(陈宝昌, 2004), 还可以增加土壤有机碳的含量(Pathak, 2003), 可用于生态脆弱区植被恢复和生态经济群落的重建 (姚小华和盛能荣, 1999)。余甘子果实营养价值很高, 维生素C含量仅次于刺梨, 高于猕猴桃2–4倍, 是苹果的160倍(Mustard, 1952; Amal & Raghwan, 1957; Barthakur & Arnold, 1991)。并且它的维生素C含量具有高度稳定性, 即使经过高温处理仍能大部分保留, 保存率为79.0–93.5%(王开良等, 2003)。此外, 余甘子还具有重要的药用价值, 防癌抗衰老作用显著, 是理想的保健食品(刘凤书等, 1993), 已被联合国卫生组织指定为在世界范围内推广种植的三种保健植物之一(郑元福和杨长山, 1997)。中国西南部地区尤其是干热河谷地区拥有丰富的余甘子资源, 这一地域余甘子的研究对资

源保护与开发具有重要意义(夏泉和孔杰, 1997)。

目前, 国内对余甘子多样性方面的研究主要还是局限在宏观生物学领域, 仅蔡英卿等(2003)报道过余甘子基因组RAPD反应条件优化方面的内容。Uma Shaanker和Ganeshaiah(1997)根据等位酶分析的结果提出了印度余甘子遗传资源的就地保护策略, 并提出了森林基因库(forest gene bank)的方法; 位于印度勒克瑙Lucknow的亚热带园艺研究中心(CISH)利用微卫星及其他分子标记鉴定了余甘子品种, 并申请了专利(Pathak, 2003)。

本文首次采用ISSR(inter-simple sequence repeat)分子标记技术研究云南干热河谷地区余甘子居群的遗传多样性及遗传分化程度, 主要目的在于揭示这一特殊地区余甘子居群的遗传多样性水平, 为干热河谷地区的生态恢复和经济发展提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

采样的地点主要集中在我国云南的金沙江、怒江以及元江的干热河谷地区, 包括金沙江的元谋和巧家、怒江的保山, 以及元江的元江共4个地区, 采样时尽可能涵盖每个地区的所有分布点。共采集了4个居群计220个个体 (表1, 图1)。在每个分布点, 所采个体之间至少间隔10 m, 然后对所采样本进行随机取样, 用于实验的样本数为100个, 详见表1。采集新鲜叶片, 迅速用硅胶干燥保存, 带回实验室备用。

1.2 方法

1.2.1 总DNA的提取

鉴于余甘子叶片中含有较多酚类物质和多糖, 经过反复试验, 对Zeng等(2002)的方法做了稍许修改, 选取了能获得较高质量基因组DNA, 且耗时、耗费较少的3×CTAB法。提好的DNA采用1×TBE电泳缓冲液, 用1.0%的琼脂糖凝胶电泳, 以50 ng/μL和20 ng/μL的λ DNA (TaKaRa, 宝生物工程(大连)有限公司)作为标准, 经EB染色后于凝胶成像分析系统中检测其浓度。

1.2.2 PCR扩增

PCR扩增反应在ABI 9700 PCR仪上完成, 所需的Mg²⁺、DNA聚合酶、10×Buffer均来自TaKaRa公司。引物参照哥伦比亚大学(UBC)设计的100条引物

表1 余甘子居群采样数目及位置
Table 1 Locations of *Phyllanthus emblica* populations and the number of individuals sampled

居群编号 Population code	采集数(株) Sample size	实验样品数(株) No. of samples for experiment	经度 Longitude	纬度 Latitude	海拔 Altitude (m)
元江 YJ	46	24	102°00'41"E	23°36'35"N	497
保山 NJ	44	27	98°53'08"E	24°59'32"N	808
元谋 YM	85	24	101°50'39"E	25°50'30"N	1,300
巧家 QJ	45	25	102°52'11"E	26°32'38"N	1,400

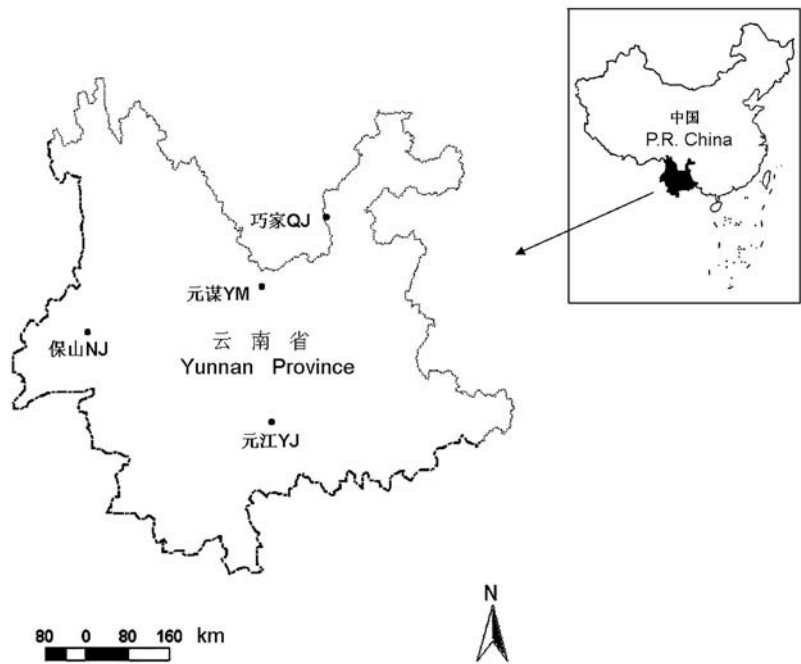


图1 余甘子居群采样地点分布图
Fig. 1 Map showing locations of sampled *Phyllanthus emblica* populations from Yunnan

序列，由上海生工生物工程有限公司合成，并根据实际情况对Mg²⁺、DNA及酶的浓度进行了优化。通过实验筛选出了12条扩增条带清晰、重复性好的引物(表2)用于居群样本分析，每次PCR做一个负对照来检测试剂是否污染。

25 μL反应体系包括：10×Buffer (10 mmol/L Tris-HCl, pH8.3; 50 mmol/L KCl) 2.5 μL; 5U/μL的*Taq* DNA聚合酶(TaKaRa) 0.2 μL; 25 mmol/L的MgCl₂ 2.0 μL; 10 mmol/L的dNTPs(TaKaRa) 2.0 μL; 15 μmol/L的引物(上海生工生物工程有限公司)1.0 μL, 10 ng/μL的模板DNA 1.0 μL, ddH₂O 16.3 μL。

扩增程序：94℃ 5 min; 94℃ 45 s, 退火 (温度视不同引物而定，见表2) 45 s, 72℃ 1.5 min, 35个循

表2 ISSR-PCR的引物序列及退火温度
Table 2 The primer sequence and annealing temperature of ISSR-PCR amplification for *Phyllanthus emblica*

UBC引物 UBC Primer	引物序列 Sequence of primer 5'-3'	退火温度 Annealing temperature (°C)
807	(AG) ₈ T	54
810	(GA) ₈ T	54
811	(GA) ₈ C	57
812	(GA) ₈ A	57
817	(CA) ₈ A	57
826	(AC) ₈ C	57
828	(TG) ₈ A	54
836	(AG) ₈ YA	54
855	(AC) ₈ YT	54
861	(ACC) ₆	59
888	BDB(CA) ₇	54
890	VHV(GT) ₇	52

Y = (C,T); B = (C,G,T); D = (A,G,T); H = (A,C,T); V = (A,C,G)

环; 72℃ 10 min。电泳时琼脂糖胶的浓度为1.5%, 缓冲液为0.5×TBE, PCR产物20 μL与6×Loading Buffer (TaKaRa) 5 μL 混匀加入点样孔, 加4 μL DL2000 DNA ladder Marker (100–2,000 bp) (TaKa-Ra), 120 V电压电泳分离3.5 h后在0.5 μg/mL EB (溴化乙锭)溶液中染色约40 min, 于凝胶成像系统 (SYNGENE)上观察记录。

1.2.3 数据统计及分析

按照相同迁移位置上有扩增带记为“1”、无带记为“0”的方法记录电泳谱带, 仅记录清晰、重复性好的扩增条带, 并将“0”、“1”数据输入Excel表格中用于下一步分析。假定居群在这些ISSR标记位点处于Hardy-Weinberg平衡状态, 应用POPGENE 1.31软件(Yeh *et al.*, 1997)统计下列参数: 多态位点百分率(*PPB*)、平均每个位点的观察等位基因数(*N_a*)、平均每个位点的有效等位基因数(*N_e*)、Nei’s基因多样性指数(*H*) (Nei, 1973)、Shannon信息指数(*I*)、总的基因多样性度(*H_t*)和居群内的基因多样性度(*H_s*)、遗传分化系数(*G_{ST}*)和基因流(*N_m*) (*N_m*=(1–*G_{ST}*)/4*G_{ST}*)、Nei’s遗传距离和遗传一致度。应用NTSYS-pc 2.10e 软件的Mantel统计学检验对种群间的地理距离和遗传距离进行相关性分析, 并做显著性检测(1,000次置换)。

2 结果

2.1 ISSR-PCR扩增结果

12条引物共扩增出135条条带, 其中有115条为

多态性条带。每个引物扩增的条带数为9–17条, 平均每个引物扩增出11.25条(表3)。扩增片断的大小在280–2,010 bp之间, 主要集中在280–1,000 bp之间。

2.2 居群内的遗传多样性

干热河谷地区余甘子居群的多态条带数为115, 多态位点百分率(*PPB*)为85.19%。各居群的*PPB*在57.78–80.74%之间, 由大到小依次为元谋居群(*YM*)>巧家居群(*QJ*)>保山居群(*NJ*)>元江居群(*YJ*), 平均值为70.56%, 低于整个干热河谷地区余甘子物种水平的平均值85.19%(表3); 居群内观测等位基因数(*N_a*)、有效等位基因数(*N_e*)、Nei’s基因多样性指数(*H*)和Shannon信息指数(*I*)由高到低依次为元谋居群(*YM*)>巧家居群(*QJ*)>保山居群(*NJ*)>元江居群(*YJ*) (表4)。

2.3 居群间的遗传分化和遗传距离

干热河谷地区4个余甘子居群总的基因多样性(*H_t*)为0.2469, 居群内的基因多样性(*H_s*)为0.2168, 居群间的遗传分化系数(*G_{ST}*)为0.1222, 从*G_{ST}*估计的基因流(*N_m*)为1.7958。表明余甘子居群间存在较小的遗传分化, 其遗传变异大部分来自于居群内部。

居群间遗传一致度的变化范围在0.9214–0.9716之间, 保山居群(*NJ*)和元谋居群(*YM*)具有最高的遗传一致度, 它们之间的遗传距离也最小(0.0288)。而元江居群(*YJ*)和保山居群(*NJ*)的遗传距离最大(表5)。根据Nei’s遗传距离进行居群间的UPGMA 聚类, 得到了各居群间遗传距离的聚类图

UBC引物 UBC primer	总条带数 Total bands	多态条带数 No. of polymorphic bands	多态位点百分率(%) Percentage of polymorphic bands <i>PPB</i>
807	13	13	100.00
810	10	10	100.00
811	9	8	88.89
812	9	7	77.78
817	12	11	91.67
826	17	13	76.47
828	14	13	92.86
836	9	9	100.00
855	9	7	77.78
861	10	3	30.00
888	10	8	80.00
890	13	13	100.00
平均 Mean	11.25	9.58	84.62
总群体 Total	135	115	85.19

表3 余甘子居群ISSR-PCR
扩增位点数统计
Table 3 The locus variation
within *Phyllanthus emblica*
populations

表4 余甘子居群的遗传多样性统计
Table 4 Genetic diversity within populations of *Phyllanthus emblica*

居群 Population	多态位点数 NPB	多态位点百分率 PPB(%)	观测等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	Nei's基因多样性指数 H	Shannon's信息 指数 I
元江 YJ	78	57.78	1.5778±0.4958	1.3313±0.3651	0.1955±0.1985	0.2936±0.2845
保山 NJ	94	69.63	1.6963±0.4616	1.3608±0.3590	0.2161±0.1900	0.3298±0.2680
元谋 YM	109	80.74	1.8074±0.3958	1.3927±0.3589	0.2351±0.1859	0.3605±0.2562
巧家 QJ	100	74.07	1.7407±0.4399	1.3631±0.3414	0.2218±0.1822	0.3413±0.2570
居群水平 Population level	95.25	70.56	1.8519±0.3566	1.4128±0.3573	0.2471±0.1822	0.3789±0.2485
物种水平 Species level	115	85.19	1.8519±0.3566	1.4128±0.3573	0.2471±0.1822	0.3789±0.2485

NPB, Number of polymorphic bands; PPB, Percentage of polymorphic bands; N_a , Observed number of alleles; N_e , Effective number of alleles; H , Nei's genetic diversity; I , Shannon's information index.

表5 余甘子居群间的遗传一致度(对角线上方)和遗传距离(对角线下方)
Table 5 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among *Phyllanthus emblica* populations

居群 Population	元江 YJ	保山 NJ	元谋 YM	巧家 QJ
元江 YJ	****	0.9214	0.9329	0.9301
保山 NJ	0.0818	****	0.9716	0.9668
元谋 YM	0.0695	0.0288	****	0.9700
巧家 QJ	0.0725	0.0337	0.0305	****

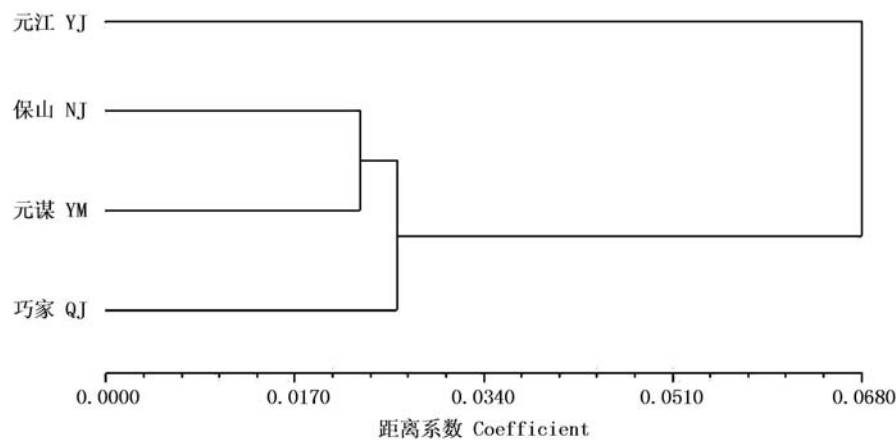


图2 余甘子居群间Nei's遗传距离的UPGMA聚类图
Fig. 2 UPGMA dendrogram of *Phyllanthus emblica* populations based on Nei's genetic distance

(图2)。由图2可见, 同属金沙江干热河谷的元谋居群(YM)和巧家居群(QJ)之间的遗传距离, 比分属于怒江干热河谷的保山居群(NJ)和金沙江干热河谷的元谋居群(YM)之间的遗传距离还要远。为了检测遗传分化与地理距离之间的相关性, 进行了遗传距离和地理距离之间的Mantel检验。结果表明余甘子居群的Nei's遗传距离与地理距离之间的相关性较小, 且显著性很低($r=0.19798$, $P=0.6513>0.05$)。

3 讨论

3.1 遗传多样性及遗传分化

基于ISSR方法检测的我国云南干热河谷地区的余甘子居群水平的遗传多样性($H=0.2471$)(表4)高于Nybom (2004)所统计的多种植物居群水平的遗传多样性(基于RAPD、AFLP、ISSR等显性标记)的平均值($H=0.22$ 或 0.23), 表明余甘子居群具有较高水平的遗传多样性。在物种水平上, 余甘子也显示了

较高的遗传多样性($PPB=85.19\%$) (表3)。有研究表明, 来自显性遗传标记(RAPD, AFLP, ISSR)的检测具有相似性, 并有直接的可比性(Nybom, 2004)。与同属另一种重要的药用植物*P. amarus* (RAPD检测的遗传变异为65%)(Jain *et al.*, 2003) 相比, 余甘子也显示了较高水平的遗传多样性。

余甘子居群间的遗传分化系数(G_{ST})为0.1222, 表明只有12.22%的遗传变异存在于居群间, 而87.78%的遗传变异存在于居群内。Bussell(1999)曾对35个物种的RAPD研究结果进行了总结, 发现29个远交物种的居群间变异在总的遗传变异中占0.9–41.3%(G_{ST}), 而6个近交物种则为44.8–66.9%。Hogbin和Peakall(1999)也总结了一些物种的RAPD分析结果, 发现异交物种的遗传变异主要分布在居群内, 而居群间的遗传变异通常只占27%以下。对比我们的研究结果, 余甘子居群间的遗传分化程度较低, 应属于异交物种范畴, 大部分遗传变异存在于居群内。

统计学检验表明, 在居群水平上影响遗传变异大小的因素依次为: 繁育系统>分布范围>生活型>分类地位>种子散播机制。

繁育系统是影响居群遗传结构的最重要的因素之一, 也同样影响到物种水平上的遗传变异。一般来说, 远交、晚期演替的物种拥有较高的居群遗传多样性水平(Hamrick & Godt, 1989; 1996; Nybom, 2004), 自交和混交物种的总体遗传变异水平低于异交物种。余甘子属雌雄同株异花植物, 具有自花传粉不相容性(Singh *et al.*, 1998; 2001; Mohammad & Ram, 1999); 而且雄花生于生长枝的末端, 雌花在雄花之上(Morton, 1987), 这决定了余甘子异花传粉的特性。余甘子传粉的媒介主要是风和蜜蜂(Bajpai, 1957; Morton, 1987; Pathak, 2003), 花粉的远距离传播为异地居群间的远距离基因交流提供了可能性。在自然状态下, 余甘子主要依靠种子繁殖, 而种子的远距离散布必须依靠一些食果动物(Prasad *et al.*, 2004), 由于食果动物的活动范围及其所携带种子数量有限, 决定了种子的散布对余甘子居群多样性的贡献极小, 其遗传变异主要来源于异株间的交叉传粉产生的基因重组(方嘉兴, 1996)。余甘子的这些繁育特性决定了它居群内高水平的遗传变异和居群间较低水平的遗传分化。

余甘子分布范围广泛。一般而言, 广布种比狭

域分布的物种具有更高的遗传多样性(Hamrick & Godt, 1996)。一般认为, 基因流 $N_m \geq 1$ 时即可防止因遗传漂变而产生的居群遗传分化(Slatkin, 1987)。余甘子居群间的基因流 $N_m=1.7958$, 足以抵制居群内遗传漂变而引起的居群分化。Hamrick和Godt(1989)的研究表明, 居群间的地理分布和遗传多样性分布没有直接的相关性。我们的研究也印证了上述结论, 地理隔离没有对余甘子居群分化造成显著影响。

此外, 关于干热环境对植物遗传多样性的影响存在不同的看法。第一种观点认为干热环境能增大遗传分化, 增加遗传多样性。虽然干热是植物生长的限制因子, 但经过长期的适应性进化, 干热环境下的植物形成了一整套抗旱机制和丰富的抗性基因(Ricardo & O'Connell, 2005)以及与环境相适应的遗传结构(O'Connell, 1995; Ceccarelli & Grando, 1996); 而且由于干热条件的胁迫, 居群内的遗传亚分化增大、遗传变异增加、多样性提高, 进化速率要高于在潮湿环境下生存的物种(Stebbins, 1952)。另一种观点则认为干热对植物遗传分化的影响呈中性(胡志昂和王洪新, 1998)。至于外界环境是否对余甘子的遗传多样性水平产生了影响, 下一步我们决定选取较湿润地区的一些居群进行对照实验, 以便更深入地探讨其对干热环境的适应机制。

综合以上因素, 余甘子高水平的遗传多样性及其居群间较低的遗传分化除了受自身繁育系统影响外, 还可能受其分布范围及其对干热环境的适应能力以及种子散布等因素的影响。

3.2 干热河谷生态恢复的启示

20世纪80年代, 人们在金沙江干热河谷地区将成片余甘子林砍伐烧毁, 有的连根锄伐, 至今很难见到林相整齐的余甘子林(代正福, 1990)。在印度, 由于放牧、滥伐及一些人为的影响, 许多地区的余甘子林正在缩减。印度已经对具有高多样性的余甘子自然居群(可作为余甘子的基因库)采取了就地保护和迁地保护措施(Pathak, 2003; Chandra *et al.*, 2004)。

我国具有极其丰富的余甘子资源, 该植物对干热河谷的生长环境已经形成了很好的适应性, 在自然生境下能在干热河谷大面积繁殖生长, 可作为干热河谷地区荒山绿化的先锋树种; 同时, 作为一种重要的药用经济植物, 它丰富的遗传多样性为我们

选育高质品种提供了空间。

作者期望通过此研究,能够引起人们对我国野生余甘子遗传资源的重视。除了对遗传多样性高的居群进行就地保护外,还可以对一些具备育种价值的资源进行筛选、分类研究,有重点地进行收集和保護。特别是在干热河谷地区进行生态恢复的时候,我们可以适量从遗传多样性水平高的余甘子居群中挑选一定的植株,来增强其对不良环境的抵抗能力。在我们的研究中,通过各种遗传多样性参数的比较,均显示了元谋居群(YM)具有最高的遗传多样性水平(表4)。我们应对元谋居群给予足够的重视。此外,考虑到遗传变异主要存在于居群内部,在干热河谷地区进行生态恢复的时候,我们应该从居群内部多挑选一些个体来进行繁殖。

致谢: 本研究在采样和实验室工作中得到了赵敏和曹文斌等同学的帮助;分布图的绘制得到了李增加同学和杨礼攀博士的热心帮助,谨致谢意!

参考文献

- Amal EKJ, Raghwan RS (1957) Physiology and vitamin C in *Emblia officinalis* Gaertn. *Proceedings of the Indian Academy of Science, Section B*, **47**, 312–314.
- Bajpai PN (1957) Blossom biology and fruit set in *Phyllanthus emblica* L. *Indian Journal of Horticulture*, **14**, 99–102.
- Barthakur NN, Arnold NP (1991) Chemical analysis of the emblic (*Phyllanthus emblica* L.) and its potential as a food source. *Scientia Horticulturae*, **47**, 99–105.
- Bussell JD (1999) The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae). *Molecular Ecology*, **8**, 775–789.
- Cai YQ (蔡英卿), Lai ZX (赖钟雄), Sang QL (桑庆亮), Guo ZX (郭志雄), Guo YQ (郭玉琼), Pan DM (潘东明) (2003) Genomic DNA extraction and optimization of RAPD analytic conditions of *Phyllanthus emblica* L. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)* (福建农林大学学报(自然科学版)), **32**, 89–92. (in Chinese with English abstract)
- Ceccarelli S, Grando S (1996) Drought as a challenge for the plant breeder. *Plant Growth Regulation*, **20**, 149–155.
- Chandra PK, Nehal AF, Uppeandra D (2004) Prioritization of medicinal plants on the basis of available knowledge, existing practices and use value status in Uttaranchal, India. *Biodiversity and Conservation*, **13**, 453–469.
- Chen BC (陈宝昌) (2004) Emblic: pioneer tree species reforesting in dry-hot river valley. *Forest Inventory and Planning* (林业调查规划), **29** (Suppl.), 289–290. (in Chinese)
- Dai ZF (代正福) (1990) Ecological effect and comprehensive utilization of emblic in Jinsha River dry-hot valley. *Tropical Crop Science and Technology* (热带作物科技), (5), 28–31. (in Chinese)
- Fang JX (方嘉兴) (1996) A primary research on wild emblic. *Economic Forest Researches* (经济林研究), **14** (Suppl.), 16–19. (in Chinese)
- Ge S (葛颂), Hong DY (洪德元) (1994) Genetic diversity and its detection. In: *Principles and Methodologies of Biodiversity Studies* (生物多样性研究的原理与方法) (eds Qian YQ (钱迎倩), Ma KP (马克平)), pp.123–140. Chinese Science and Technology Press, Beijing. (in Chinese)
- Grant V (1991) *The Evolutionary Process: A Critical Study of Evolutionary Theory*, 2nd edn. Columbia University Press, New York.
- Hamrick JL, Godt MJW (1989) Allozyme diversity in plant species. In: *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources* (eds Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS), pp. 43–63. Sinauer, Sunderland, MA.
- Hamrick JL, Godt MJW (1996) Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B*, **351**, 1291–1298.
- Hogbin PM, Peakall R (1999) Evaluation of the contribution of genetic research to the management of the endangered plant *Zieria prostrata*. *Conservation Biology*, **13**, 514–522.
- Hu ZA (胡志昂), Wang HX (王洪新) (1998) Advances in molecular ecology. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), **18**, 565–574. (in Chinese with English abstract)
- Jain N, Shasany AK, Sundaresan V, Rajkumar S, Darokar MP, Bagchi GD, Gupta AK, Kumar S, Khanuja SPS (2003) Molecular diversity in *Phyllanthus amarus* assessed through RAPD analysis. *Current Science*, **85**, 1454–1458.
- Jin ZZ (金振洲), Ou XK (欧晓昆) (2000) *The Dry-hot River Valley Vegetation of Yuanjiang River, Nuijiang River, Jinsha River, and Lancang River* (元江、怒江、金沙江、澜沧江干热河谷植被). Yunnan University Press, Yunnan Science and Technology Press, Kunming. (in Chinese)
- Jin ZZ (金振洲), Yang YP (杨永平), Tao GD (陶国达) (1995) The floristic characteristics, nature and origin of seed plant in the dry-hot river valley of SW China. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **17**, 129–143. (in Chinese with English abstract)
- Li K (李昆), Chen YD (陈玉德) (1994) A study on the groups and distribution characteristics of wild emblic in Yunnan Province. *Forest Research* (林业科学研究), **7**, 606–611. (in Chinese with English abstract)
- Liu FS (刘凤书), Hou KW (侯开卫), Li SJ (李绍家), Yang CW (杨臣武), Zhao P (赵苹) (1993) The health-protecting value of *Phyllanthus emblica* L. and its prospects for exploitation and utilization. *Journal of Natural Resources* (自然资源学报), **8**, 299–306. (in Chinese)

- nese with English abstract)
- Mohammad A, Ram S (1999) Cause of low fruit set and heavy fruit drop in Indian gooseberry (*Emblica officinalis* Gaertn). *Indian Journal of Horticulture*, **47**, 210–277.
- Morton JF (1987) Emblic. In: *Fruits of Warm Climates* (ed. Morton JF), pp. 213–217. Florida Flair Books.
- Mustard MJ (1952) Ascorbic acid content of some miscellaneous tropical and sub-tropical plants and plant products. *Food Research*, **17**, 31–35.
- Nyblom H (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, **13**, 1143–1155.
- O'Connell MA (1995) The role of drought-responsive genes in drought resistance. *AgBiotech News and Information*, **7**, 143–147.
- O'Hanlon P, Briese DT, Peakall R (2000) A review of new PCR-based genetic markers and their utility to weed ecology. *Weed Research*, **40**, 239–254.
- Pathak RK (2003) *Status Report on Genetic Resources of Indian Gooseberry—Aonla (Emblica officinalis Gaertn) in South and Southeast Asia* (eds Mal B, Rao VR, Arora RK), pp. 1–37. IPGRI Office for South Asia National Agriculture Science Centre (NASC) DPS Marg, Pusa Campus, New Delhi, India.
- Pathak RK, Pandey SD (1985) *Problems and Possibilities of Aonla (Emblica officinalis Gaertn) Cultivation in Wasteland*. Abs. pp.110. Paper presented in National Symposium in Plantation Opportunities in India, New Delhi.
- Pathak RK, Pathak S (2001) Fruit production in problematic soil. *Indian Journal of Horticulture*, **58**, 16–22.
- Prasad S, Chellam R, Krishnaswamy J, Goyal SP (2004) Frugivory of *Phyllanthus emblica* at Rajaji National Park, northwest India. *Current Science*, **87**, 1188–1190.
- Ricardo TC, O'Connell MA (2005) Genetic diversity of drought-responsive genes in populations of the desert forage *Dactylis glomerata*. *Plant Science*, **168**, 1327–1335.
- Singh HK, Srivastava AK, Dwivedi R (1998) Pollination and fruit set behaviour of aonla (*Emblica officinalis* Gaertn). *Indian Journal of Agriculture Science*, **68**, 204–205.
- Singh HK, Srivastava AK, Dwivedi R (2001) Effect of pollinizer on fruit set and fruit quality of Narendra aonla (*Emblica officinalis* Gaertn). *Indian Journal of Agriculture Science*, **71**, 65–66.
- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, **236**, 787–792.
- Solbrig OT (1991) *From Genes to Ecosystems: A Research Agenda for Biodiversity*. IUBS, Paris.
- Stebbins GL (1952) Aridity as a stimulus to plant evolution. *The American Naturalist*, **86**, 33–44.
- Uma Shaanker R, Ganeshaiah KN (1997) Mapping genetic diversity of *Phyllanthus emblica*: forest gene banks as a new approach for *in situ* conservation of genetic resources. *Current Science*, **73**, 163–168.
- Wang KL (王开良), Yao XH (姚小华), Xiong YJ (熊仪俊), Ren HD (任华东), Wang WH (王维辉) (2003) Cultivation and utilization of *Emblica officinalis* and its developing perspective. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis* (江西农业大学学报), **25**, 397–401. (in Chinese with English abstract)
- Xia Q (夏泉), Kong J (孔杰) (1997) The ethical medical study of traditional medicine emblic. *China Journal of Chinese Materia Medica* (中国中药杂志), **22**, 515–518, 525. (in Chinese)
- Xu ZF (许再富), Tao GD (陶国达), Yu PH (禹平华), Wang YL (王耀龙) (1985) An approach to the vegetational changes from Yuanjiang dry-hot valley of Yunnan in the last 500 years. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **7**, 403–412. (in Chinese)
- Xu ZF (许再富), Zou HM (邹祜梅) (1991) *The Exploitation of Resource and Economic Crops in the Dry-hot Valleys of SW China* (西南热区资源与经济作物开发研究). Science Press, Beijing. (in Chinese)
- Yao XH (姚小华), Sheng NR (盛能荣) (1999) Present status of emblic varieties in China and emphasis of selective breeding. *Economic Forest Researches* (经济林研究), **17**(1), 9–12. (in Chinese)
- Yeh EC, Yang RC, Boyle TBJ, Ye ZH, Mao JX (1997) *POP-GENE, the User-friendly Shareware for Population Genetic Analysis*. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.
- Zeng J, Zou YP, Bai JY, Zheng HS (2002) Preparation of total DNA from 'recalcitrant plant taxa'. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **44**, 694–697.
- Zheng YF (郑元福), Yang CS (杨长山) (1997) Progress in the research on the health-protection functions and utilization of emblic. *Journal of Jimei University* (集美大学学报), **2**(1), 40–44. (in Chinese with English abstract)