

## 大王马先蒿云南五个居群遗传变异研究\*

李文丽, 高连明, 王红\*\*, 李德铎

(中国科学院昆明植物研究所生物多样性与生物地理学实验室, 云南昆明 650204)

**摘要:** 采用随机扩增多态 DNA (RAPD) 分子标记方法, 对大王马先蒿 (*Pedicularis rex* L.) 分布在云南中甸、丽江、大理、武定和昆明的 5 个居群 (其中中甸居群有 3 个亚居群) 的遗传多样性和遗传结构进行了研究。结果表明, 大王马先蒿居群具有较高的遗传多样性, 多态位点百分率  $P$ 、Shannon 表型多样性指数  $I$  和 Nei 的基因多样性指数  $h$  分别为 82.0%、0.361 和 0.240, 遗传多样性水平与居群的地理分布范围相关; 大王马先蒿居群间的遗传变异较高, 遗传变异主要发生在居群之间, 而不是居群内部; 居群间遗传分化系数  $G_{st}$  为 0.747, 遗传分化明显, 居群间基因交流较少。居群间的遗传距离与居群间的相对地理距离具有一定的相关性。对云南西北部中甸居群的 3 个亚居群的遗传多样性分析表明, 居群的遗传多样性水平与海拔高度有一定的相关性。居群间遗传变异较高可能是由于大王马先蒿为短命多年生植物, 繁育系统为混交型, 且自交占较大比例等原因造成的。

**关键词:** 大王马先蒿; 居群; 遗传变异; 地理分布; 云南

**中图分类号:** Q 943      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0253-2700(2005)03-0253-08

## Genetic Variation on Five Populations of *Pedicularis rex* (Scrophulariaceae) in Yunnan

LI Wen-Li, GAO Lian-Ming, WANG Hong\*\*, LI De-Zhu

(Laboratory of Biodiversity and Plant Biogeography, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

**Abstract:** Genetic variation of five populations (one of which with three subpopulations) of *Pedicularis rex* L. in Yunnan were examined by using 14 random amplified polymorphic DNA (RAPD) primers. The results showed that the overall genetic variability of *P. rex* was high. The percentage of polymorphic loci ( $P$ ) was 82.0%, i.e., 132 polymorphic loci out of a total of 161 loci. The Shannon's Index ( $I$ ) and the Nei's Index ( $h$ ) were 0.361 and 0.240, respectively. Genetic diversity among the populations was higher than that within a population. The genetic variability occurred mainly among the populations. The genetic variation was related to the geographic distribution of the populations, i.e. distant population having larger genetic divergence. The populations of Zhongdian and Lijiang in northwestern Yunnan in high altitude had greater

\* 基金项目: 国家科技部重要野生植物种质资源收集保存的标准化及共享试点项目资助 (Supported by a national program for R & D Infrastructure and Facility Development, 2004DKA30430)

\*\* 通讯作者: To whom correspondence should be addressed. E-mail: wanghong@mail.kib.ac.cn

收稿日期: 2004-11-09, 2005-03-14 接受发表

作者简介: 李文丽 (1978-) 女, 理学硕士, 主要从事植物系统与进化研究。现在美国 Georgia University 攻读博士学位。

levels of genetic diversity than that of central Yunnan. According to Nei's  $G_{st}$  (0.747) calculated, the gene differentiation among the populations was conspicuous, indicating low gene flow among the populations. A separate analysis of the three subpopulations of *P. rex* from Zhongdian county, northwestern Yunnan revealed that higher genetic diversity was found in high-altituded subpopulations. It was suggested that *P. rex*, being a short-lived perennial species with mixed breeding system, could be mainly self-pollinated.

**Key words:** *Pedicularis rex*; Population; Genetic variation; Geographical distribution; Yunnan

大王马先蒿 (*Pedicularis rex* L.) 属于斗叶马先蒿群 (*Pedicularis cyathophora* group) (钟补求, 1963), 该类群有 7 种、4 亚种、1 变种, 为喜马拉雅特有, 集中分布在横断山地区。因独特的叶柄基部特征和囊括了整个属的全部花冠类型, 使其成为研究马先蒿属系统发育和进化的关键类群。

大王马先蒿为多年生草本, 高 10~90 cm, 茎直立, 有棱角和条纹, 多分枝, 叶片羽状全裂或深裂, 长 3.5~12 cm, 宽 1~4 cm。裂片线状长圆形至长圆形, 叶常 4 枚轮生, 叶柄膨大而与同轮者结合为斗状, 斗高达 5~15 mm。生长在 2 500~4 300 m 的空旷山坡草地与稀疏针叶林中。在斗叶马先蒿群中大王马先蒿分布最广, 自我国四川西南部, 云南东北部、中部和西北部至缅甸北部与印度的阿萨姆均有分布。花冠无喙具齿, 被认为是该属内较原始的类群 (王红, 1998)。随生境和海拔不同, 其结合成斗状的每轮叶子数目从 4~7 枚不等; 花冠颜色全黄、下唇具棕色条纹或花冠红色, 蔡杰等 (2003) 曾对其花器官发生作过详细研究。由于大王马先蒿形态特征变化较大, 对不同居群在不同地理分布式样中的遗传变异的研究具有重要意义。

DNA 指纹标记方法在植物居群研究方面具有广泛的应用, 例如对居群内和居群间的遗传变异进行检测, 繁育系统的分析, 生态地理变异的研究等 (Weising 等, 1995)。随机扩增多态性 DNA (RAPD) 是 20 世纪 90 年代出现的一种分子标记, 由于 RAPD 具有多态性高、无需活材料、能实现全基因组无偏取样和无组织特异性等优点, RAPD 在构建遗传图谱和濒危植物遗传多样性检测中得到广泛应用, 它体现出来的遗传分化水平比较接近实际情况 (Williams 等, 1990)。

在马先蒿属中, 利用分子标记对物种居群遗传变异的研究比较匮乏, Fujii 等 (1997) 曾检测了 *Pedicularis chamissonis* 不同居群内 cpDNA 非编码区的遗传多样性, 认为 *P. chamissonis* 是在多次冰河时期从阿留申群岛逐渐向日本群岛迁移。

本文采用 RAPD 分子标记对大王马先蒿在云南西北部和中部不同海拔分布的 5 个野生自然居群的遗传多样性状况和遗传结构的变异式样进行了分析和评估, 并对分布在云南西北部中甸居群的 3 个亚居群的遗传结构进行了分析, 试图对大王马先蒿遗传变异式样与地理分布的关系, 以及影响居群间遗传分化的主要因素进行初步研究, 为进一步探讨大王马先蒿的物种形成和分化提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

野外采集的大王马先蒿新鲜叶片, 用变色硅胶快速干燥保存。所采集的 5 个野生居群分布在云南中部和西北部 (图 1), 每个居群随机采集 18~20 个不同个体 (其中中甸居群包括 3 个亚居群)。材料来源

及凭证标本见表 1, 所有凭证标本均存于中国科学院昆明植物研究所标本馆 (KUN)。

表 1 实验材料和凭证标本

Table 1 Material and Voucher specimen

居群 (亚居群) Population (Subpopulation)	个体数量 No. of individuals	海拔 (米) Altitude (m)	采集地点 Locality	凭证标本 Voucher specimen
1. 中甸 Zhongdian	20			
翁水亚居群	6	4060	翁水至大雪山垭口	Li and Yang 064
尼西那当村亚居群	7	3760	尼西那当村后山	Li and Yang 050
那帕海至尼西那亚居群	7	3450	那帕海至尼西路边	Li and Yang 083
2. 丽江 Lijiang	18	2600	丽江雪松村	Li Wen-li 012
3. 大理 Dali	16	2780	大理苍山	Li Wen-li 723
4. 武定 Wuding	19	2200	武定关山	YL 130
5. 昆明 Kunming	20	1980	昆明小哨	Li Wen-li 128

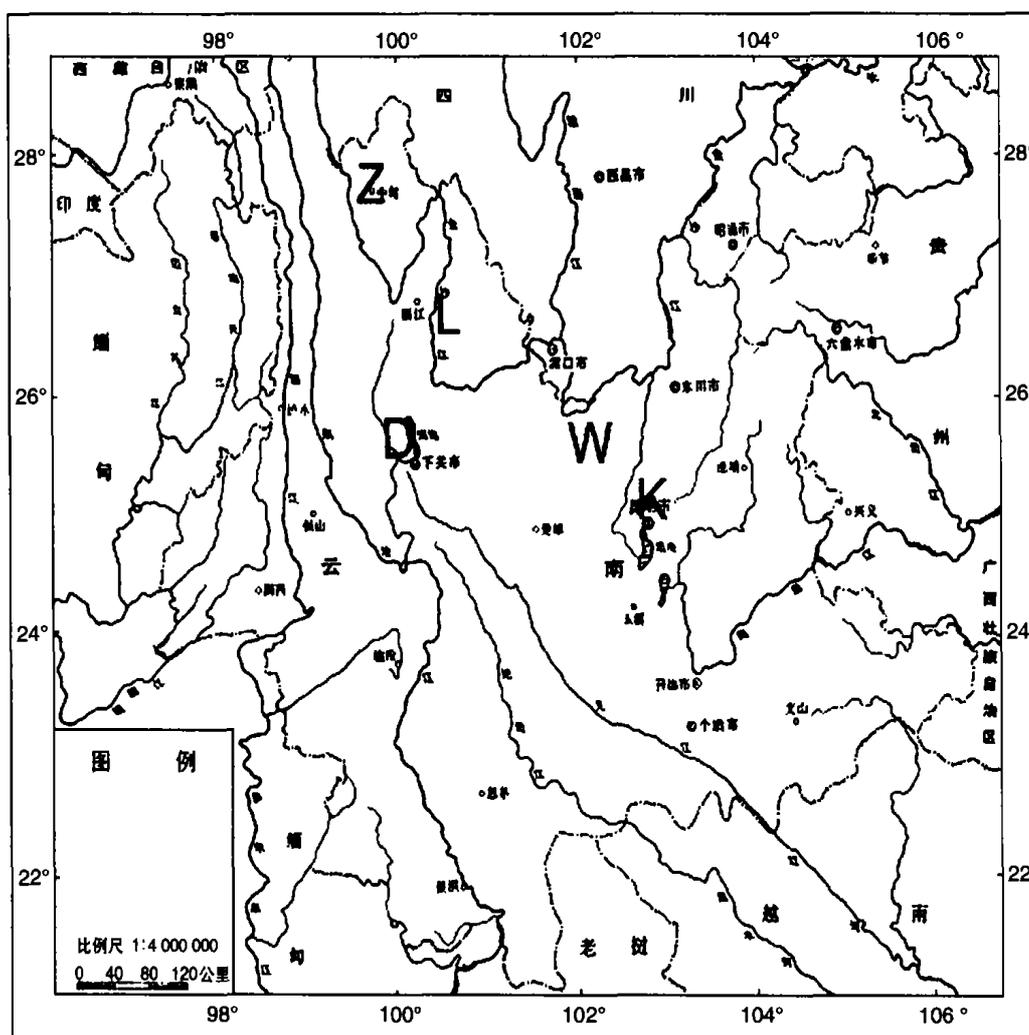


图 1 大王马先蒿 5 个居群在云南的分布 (Z: 中甸; L: 丽江; D: 大理; W: 武定; K: 昆明)

Fig. 1 The locations of *P. rex* populations in Yunnan province (Z: Zhongdian; L: Lijiang; D: Dali; W: Wuding; K: Kunming)

## 1.2 实验方法

1.2.1 总 DNA 提取 采用 CTAB 法 (Doyle and Doyle, 1987), 并作适当的改进。总 DNA 用 RNA 酶 A 进行纯化, 之后用紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 的光密度值 (OD 值), 再根据 Ausubel 等 (1995) 的

方法确定总 DNA 的浓度和质量,用于 PCR 反应的总 DNA 浓度稀释为 50 ng/ $\mu$ l。

1.2.2 PCR 扩增 扩增反应在 Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600 上进行,反应体积为 20  $\mu$ l,其成分为: 2 ng DNA 模板, 2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5  $\mu$ mol/L dNTP, 10  $\times$  PCR buffer, 2.5  $\mu$ mol/L 引物 (Operon 公司引物序列) 2 U Tag DNA 聚合酶。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 4 min 预变性, 94 $^{\circ}$ C 15 s, 36 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 40 次重复,最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 4 min。

1.2.3 PCR 产物的鉴定 用浓度为 1% 的琼脂糖电泳 (TAE 系统), EB 染色,以 Gene Ruler<sup>TM</sup> 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas 公司) 作为相对分子量标准 (Maker),在 Gel Doc 2000 型 (BIORAD 公司) 图像分析仪上观察并照相。

1.2.4 数据处理与分析 统计扩增产物较为稳定的 14 个引物在 97 个样品中的扩增情况,在电泳图谱上同一 RAPD 位点上有电泳带的记为 1,无电泳带的记为 0,对 RAPD 图谱进行 0, 1 编码。将 0, 1 矩阵输入 POPGENE 软件进行分析。表征遗传多样性和居群遗传结构的参数包括平均每个位点测定到的等位基因数 ( $n_a$ , Observed number of alleles), 平均每个位点的等位基因有效数目 ( $n_e$ , Effective number of alleles, Kimura and Crow, 1964), 多态位点百分率 ( $P$ , Percentage of polymorphic loci), Shannon 表型多样性指数  $I$  (Lewontin, 1972), Nei (1973) 的基因多样性指数 ( $H$ ), Nei (1973) 的遗传分化指数 ( $G_{st}$ ) 和居群每代迁移数 ( $N_m$ , Estimate of gene flow from  $G_{st}$ , Slatkin and Borton, 1989)。

## 2 实验结果

### 2.1 RAPD 引物的筛选

在大王马先蒿 5 个居群中,每个居群任意选取一个个体,然后将它们的总 DNA 混合,利用混合总 DNA 对 124 个引物进行了筛选,从中筛选出扩增条带清晰,重复性好的 14 个引物,用这些引物对 5 个居群的所有个体进行了 PCR 扩增,并对扩增结果进行统计分析。

### 2.2 PCR 扩增结果

14 个引物扩增得到的 DNA 条带共 161 条,每个引物产生 4~20 条带,平均每个引物可以检测到 11.5 条,长度在 150~2 000 bp 之间,其中 132 条为多态带,占总条带的 82.0%,多态性很高 (表 2)。14 个引物的扩增条带多态带比率在 58.3%~92.9% 之间。

表 2 用于遗传多样性检测的寡核苷酸引物序列及其检测的位点数

Table 2 The sequences of 14 random oligo-nucleotide primers and the number of amplified loci

引物 Primer	序列 Sequence	条带数 No. of Loci	多态带数 No. of poly- morphic loci	多态带 比率 $P(\%)$	引物 Primer	序列 Sequence	条带数 No. of Loci	多态带数 No. of poly- morphic loci	多态带 比率 $P(\%)$
OPC-7	GTCCCGACGA	12	7	58.3	OPM-17	TCAGTCCGGG	8	6	75.0
OPC-13	AAGCCTCGTC	8	6	75.0	OPS-2	CCTCTGACTG	19	17	89.5
OPJ-11	ACTCCTGCGA	9	7	77.8	OPS-7	TCCGATGCTG	8	6	75.0
OPJ-15	TGTAGCAGGG	20	19	95.0	OPS-11	AGTCGGGTGG	14	13	92.9
OPJ-20	AAGCGGCCTC	13	11	84.6	OPV-2	AGTCACTCCC	9	7	77.8
OPM-7	CCGTGACTCA	8	6	75.0	OPV-3	CTCCCTGCAA	16	13	81.2
OPM-15	GACCTACCAC	13	11	84.6	OPV-20	CAGCATGGTC	4	3	75.0

### 2.3 云南大王马先蒿 5 个居群的遗传多样性与遗传结构

大王马先蒿居群表征遗传多样性和遗传结构参数如表 3 所示,中甸居群和丽江居群的遗传多样性较高,Nei 的遗传多样性指数和多态位点百分率分别为 0.093, 38.5% 和 0.085, 32.3%;武定居群和昆明居群的遗传多样性次之,Nei 的遗传多样性指数和多态位点百分

率分别为 0.056, 21.1% 和 0.040, 14.3%; 而大理居群的遗传多样性最低, Nei 的遗传多样性指数和多态位点百分率仅为 0.029 和 16.8%。在研究的 5 个居群中, 平均每个位点的等位基因的有效数目  $ne$ 、多态位点百分率  $P$ 、Shannon 表型多样性指数  $I$  和 Nei 的基因多样性指数  $h$  分别为 1.414、82.0%、0.361 和 0.240 (表 3)。整个大王马先蒿居群的遗传多样性 ( $Ht$ ) 为 0.239, 每个居群的平均遗传多样性 ( $Hs$ ) 为 0.066, 居群间的遗传分化系数 ( $Gst$ ) 为 0.747; 居群间每代迁移数  $Nm$  为 0.169 (表 3), 表明遗传变异主要存在于居群之间, 而居群内的遗传变异则较低。

表 3 云南大王马先蒿遗传多样性与居群遗传结构

Table 3 The genetic diversity and structure of *P. rex* in Yunnan

Parameter	$na$	$ne$	$h$	$I$	$P$ (%)	$Ht$	$Hs$	$Gst$	$Nm$
武定居群	1.211	1.093	0.056	0.087	21.1				
昆明居群	1.143	1.063	0.040	0.062	14.3				
中甸居群	1.385	1.144	0.093	0.149	38.5				
丽江居群	1.323	1.134	0.085	0.133	32.3				
大理居群	1.168	1.041	0.029	0.050	16.8				
大王马先蒿居群	1.820	1.414	0.240	0.361	82.0	0.239	0.061	0.747	0.169

\* $na$  = Observed number of alleles;  $ne$  = Effective number of alleles [Kimura and Crow (1964)];  $h$  = Nei's (1973) gene diversity;  $I$  = Shannon's Information index (Lewontin, 1972);  $P$  = The percentage of polymorphic loci;  $Nm$  = Estimate of gene flow from  $Gst$  (Slatkin and Barton, 1989)

表 4 根据 Nei 氏系数算出的居群遗传相似性 (对角线上方) 和遗传距离矩阵 (对角线下方)

Table 4 Nei's unbiased measures of genetic identity (above diagonal) and distance (below diagonal)

Pop ID	1	2	3	4	5
武定居群	****	0.8922	0.6776	0.7551	0.7331
昆明居群	0.1140	****	0.6815	0.7664	0.7344
中甸居群	0.3892	0.3835	****	0.8184	0.7091
丽江居群	0.2809	0.2660	0.2004	****	0.8684
大理居群	0.3105	0.3087	0.3438	0.1411	****

从表 4 可以看出: 武定居群和昆明居群间的遗传相似性最高, 为 0.892, 大理居群和丽江居群之间的遗传相似性次之, 为 0.868; 武定居群与中甸居群间的遗传相似性最小, 为 0.678, 略大于昆明居群与中甸居群间的 0.682。由此可见, 大王马先蒿各居群间的遗传相似性与居群间的相对地理距离相关, 而遗传距离正好相反。

基于 P 距离法得到的大王马先蒿各居群关系的 UPGMA 树形图中 (图 2), 昆明居群与武定居群构成一支, 中甸居群与丽江居群 + 大理居群构成一支, 每个居群各自聚为一小分支, 表明居群间的遗传距离与居群间的相对地理距离呈一定的相关性。

#### 2.4 大王马先蒿中甸居群的遗传多样性和遗传结构

中甸居群与另外 4 个居群比较时, 其多态位点百分率  $P$ 、Shannon 表型多样性指数  $I$  和 Nei 的基因多样性指数  $h$  均高于其他居群 (表 3)。在中甸居群内, 3 个亚居群之间的 Nei 的遗传多样性指数 ( $h$ ), Shannon 表型多样性指数 ( $I$ ) 和多态位点百分率 ( $P$ ) 等指数差别不大, 分别为 0.058 ~ 0.074, 0.088 ~ 0.112 和 17.3% ~ 22.3%, 表明各亚居群内的遗传多样性较低 (表 5)。

大王马先蒿中甸居群的遗传变异量  $Ht$  为 0.107, 各亚居群间的平均遗传变异量  $Hs$  为 0.066, 亚居群间的遗传分化系数  $Gst$  为 0.387, 虽然大王马先蒿中甸居群的遗传变异量不大 ( $Ht = 0.107$ ), 但遗传变异主要发生在亚居群间, 而不是亚居群的内部 ( $Hs = 0.066$ ) (表 5)。

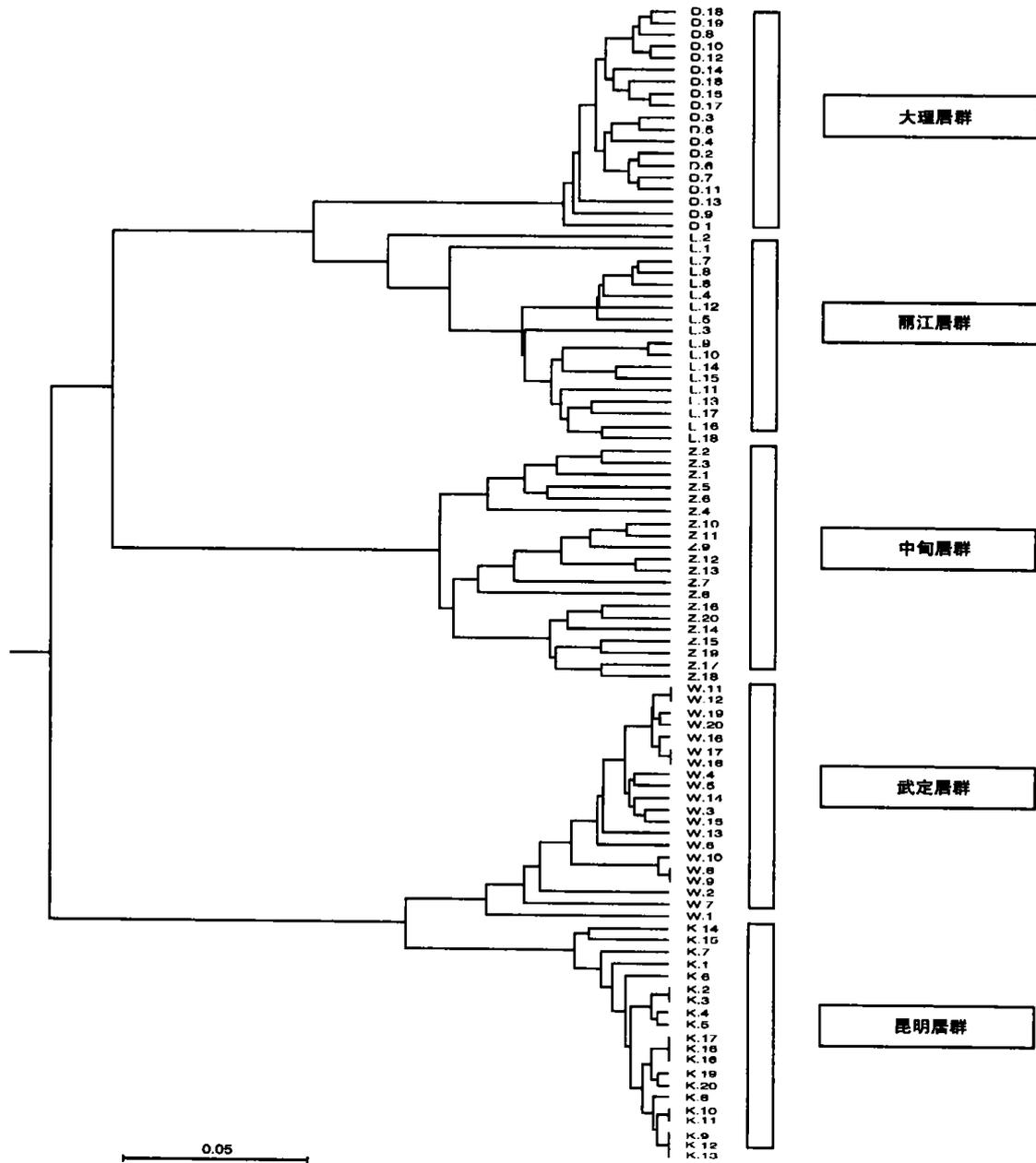


图 2 基于 P 距离计算出的大王马先蒿个体间亲缘关系 UPGMA 聚类树形图

Fig. 2 UPGMA dendrogram of *P. rex* individuals based on the P-distance

表 5 大王马先蒿中甸居群的遗传多样性和遗传结构

Table 5 The genetic diversity and structure of *P. rex* at Zhongdian

居群 (亚居群) Population (Subpopulation)	<i>na</i>	<i>ne</i>	<i>h</i>	<i>I</i>	<i>P</i> (%)	<i>Ht</i>	<i>Hs</i>	<i>Gst</i>	<i>Nm</i>
翁水亚居群	1.223	1.126	0.074	0.112	22.3				
尼西那当村亚居群	1.223	1.106	0.065	0.101	22.3				
那帕海至尼亚居群	1.172	1.102	0.058	0.088	17.3				
中甸大王马先蒿居群	1.453	1.165	0.107	0.172	45.3	0.107	0.066	0.387	0.793

\**na* = Observed number of alleles; *ne* = Effective number of alleles [Kimura and Crow (1964)]; *h* = Nei's (1973) gene diversity; *I* = Shannon's Information index (Lewontin, 1972); *P* = The percentage of polymorphic loci; *Nm* = Estimate of gene flow from *Gst* (Slatkin and Barton, 1989)

### 3 分析与讨论

#### 3.1 云南大王马先蒿的遗传多样性与遗传结构

云南大王马先蒿居群具有较高的遗传多样性, 其多态位点百分率  $P$  为 82.0%, Nei 的基因多样性指数  $h$  为 0.240, Shannon 表型多样性指数  $I$  为 0.361。大王马先蒿 5 个居群 Nei 的遗传多样性指数由高到低分别为: 中甸居群  $h = 0.093 >$  丽江居群  $h = 0.085 >$  武定居群  $h = 0.056 >$  昆明居群  $h = 0.040 >$  大理居群  $h = 0.029$ , 表明云南大王马先蒿 5 个居群间的遗传多样性存在较大差异。其中中甸居群的遗传多样性是大理居群遗传多样性的 3.2 倍, 可能由于中甸居群分布的地理范围比大理居群的地理分布范围大有关, 类似结果也得到 Hilde and Lgor (2000) 的支持。

影响居群间基因交流的因素很多, 如生活型、分布范围、繁育系统、种子扩散方式和演替阶段等 (Hamrick, 1989; Hilde and Lgor, 2000)。大王马先蒿总的遗传变异量  $H_t$  为 0.239, 居群内的平均变异量  $H_s$  为 0.061, 表明大王马先蒿大部分遗传变异存在于居群间, 而居群内的遗传变异则相对较少。居群间的遗传分化系数  $G_{st}$  较高, 为 0.747, 表明居群间存在明显的遗传变异, 居群间基因交流较低。对 RAPD 标记分析表明, 寿命长、异交、演替阶段晚期类群在居群内保持高的遗传变异, 而一年生 (或短命多年生)、自交和演替阶段早期类群在居群间保持高的遗传变异 (Hilde and Lgor, 2000)。本研究表明大王马先蒿在居群间存在明显的遗传分化, 遗传分化系数  $G_{st}$  高达 0.747, 而居群内遗传变异则较低, 其平均遗传变异量  $H_s$  仅为 0.061, 可能与大王马先蒿为短命多年生植物有关。Hilde and Lgor (2000) 通过对 RAPD 标记研究的统计表明, 自交类群的遗传分化系数  $G_{st} = 0.59$  ( $\Phi_{st} = 0.70$ ), 异交类群的遗传分化系数  $G_{st} = 0.23$  ( $\Phi_{st} = 0.28$ )。王红 (1998) 对大王马先蒿的传粉生物学和繁育生物学研究表明, 它是由昆虫传粉的异交型植物, 但本文中大王马先蒿居群间较高的遗传分化系数 ( $G_{st} = 0.747$ ), 可能暗示大王马先蒿并非严格的异交类群。有证据表明一些北极地区的马先蒿有自花授粉现象 (Williams and Batzli, 1982; Eriksen 等, 1993), 据此我们认为大王马先蒿很可能为混交型植物, 并且自交占很大比例, 这可能也是导致大王马先蒿居群间存在明显遗传分化的主要原因, 另外与传粉昆虫自身的活动范围和生活习性也有一定关系。

有研究表明遗传距离 (或遗传相似性) 与地理分布有一定的相关性 (Hamrick and Godt, 1989; Schmidt and Jensen, 2000)。中甸居群与昆明居群的相对距离最远, 它们的遗传距离也最大, 为 0.385, 略小于中甸居群与武定居群的 0.389; 武定居群和昆明居群的遗传距离最小为 0.114, 它们之间的相对距离也最小。基于 P 距离法得到的大王马先蒿各居群关系的 UPGMA 树形图中 (图 2), 昆明居群与武定居群构成一支, 中甸居群与丽江居群 + 大理居群构成一支, 每个居群各自聚为一小分支。由此可见, 各居群所处地理位置的相对距离与云南大王马先蒿居群间的遗传距离有一定的相关性, 这可能与居群间的地理隔离、种子传播方式和传粉昆虫的活动规律等因素有关。

#### 3.2 大王马先蒿中甸居群的遗传结构

在大王马先蒿中甸居群中, 包括 3 个地理上有一定隔离的亚居群: 翁水亚居群、尼西那当村亚居群和那帕海至尼西亚居群。该居群的地理分布范围较广, 这可能是其多态位点百分率  $P$ 、Shannon 表型多样性指数  $I$  和 Nei 的基因多样性指数  $H$  均大于其它居群的主要

原因。在居群内, 3个亚居群间的多态位点百分率  $P$ 、Shannon 表型多样性指数  $I$  和 Nei 的基因多样性指数  $h$  差别很小, 分别为 0.058~0.074, 0.088~0.112 和 17.3%~22.3%, 表明各亚居群内的遗传多样性较低。海拔较高的翁水亚居群各项指数最高, 而海拔较低的那帕海至尼西亚亚居群各项指标最低 (表 5), 各亚居群的遗传多样性随海拔高度的降低而逐渐降低, 与各亚居群的海拔高度具有一定的相关性。

整个中甸居群的遗传变异量  $H_t$  为 0.107, 各亚居群的平均遗传变异量  $H_s$  为 0.066, 说明居群内的遗传变异大部分发生在各亚居群之间, 而不是亚居群内部, 可能中甸居群的较高海拔和极端的气候, 影响了传粉昆虫的活动范围和传粉效率。从各亚居群间的遗传分化系数  $G_{st}$  为 0.387 来看, 各亚居群间存在一定的遗传分化, 从而证明了大王马先蒿可能是混交型植物, 并且自交占很大比例的推测。

致谢 本实验室的张志勇博士和陈永燕博士在实验设计和数据分析中给予许多帮助; 杨雪女士参与野外工作; 杨世雄博士提供部分实验材料。

### 〔参 考 文 献〕

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, *et al*, 1995. Short Protocols in Molecular Biology [M]. 3th. ed. Indianapolis: John Wiley & Sons, Inc
- Cai J (蔡杰), Liang HX (梁汉兴), Wang H (王红), 2003. Floral organogenesis of *Pedicularis* (Orobanchaceae) with erostate corolla [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 25 (6): 671—679
- Doyle JJ, Doyle JL, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 19: 11—15
- Eriken B, Molau U, Svensson M, 1993. Reproductive strategies in two arctic *Pedicularis* species (Scrophulariaceae) [J]. *Ecography*, 16: 154—166
- Fujii N, Ueda K, Watano Y, *et al*, 1997. Intraspecific sequence variation of chloroplast DNA in *Pedicularis chamissonis* (Scrophulariaceae) and geographic structuring of the Japanese "Alpine" plants [J]. *Plant Res*, 110: 195—207
- Hamrick JL, Godt MI, 1989. Allozyme diversity in plant species [A]. In: Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL *et al.*, (eds.): Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources [M]. Sunderland, M A: Sinaur, Associate, Inc., 43—46
- Hilde N, Lgor VB, 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants [J]. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 3 (2): 93—114
- Kimura M, Crow JF, 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population [J]. *Genetics*, 49: 725—738
- Lewontin RC, 1972. Apportionment of human diversity [J]. *Evol Biol*, 6: 381—398
- Nei M, 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 10: 3321—3323
- Schmidt K, Jensen K, 2000. Genetic structure and AFLP variation of remnant populations in the rare plant *Pedicularis palustris* (Scrophulariaceae) and its relation to population size and reproductive components [J]. *Amer J Bot*, 87 (5): 678—689
- Slatkin M, Barton NH, 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow [J]. *Evolution*, 85: 733—752
- Taoong PC (钟补求), 1963. *Pedicularis*, Scrophulariaceae (Pars II) [A]. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press
- Wang H (王红), 1998. The pollination syndrome of *Pedicularis rex* (Scrophulariaceae) and its biogeographic significance [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 40 (9): 781—785
- Weising K, Nybom H, Wolff K, *et al*, 1995. DNA Fingerprinting in Plants and Fungi [M]. Boca Raton, FL: CRC Press
- Williams JB, Batzli GO, 1982. Pollination and dispersion of five species of Lousewort (*Pedicularis*) near Atkasook, U. S. A [J]. *Arctic and Alpine Research*, 14: 59—74
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, *et al*, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531—6535