维普资讯 http://www.cqvip.com

云 南 植 物 研 究 2008，30（1）：69～75
Acta Botanica Yunnanica

# 黄花杓兰云南中甸居群遗传结构及克隆多样性的分析*

蔡凝枫[1,2]，严 宁[1]，胡 虹[1**]，刘 涛[3]
（1 中国科学院昆明植物研究所，云南 昆明 650204；2 中国科学院研究生院，北京 100049；
3 云南农业大学农学与生物技术学院，云南 昆明 650201）

**摘要**：采用 AFLP 分子标记方法对云南中甸的 6 个黄花杓兰（*Cypripedium flavum*）居群进行了遗传多样性水平、遗传结构及克隆多样性研究，其中两个居群用样方取样法分析其克隆空间结构。POPGENE 软件分析结果表明：两组引物共产生 104 个位点，其中 86 个为多态位点，多态位点百分率为 82.69%。黄花杓兰具有丰富的遗传变异（物种水平上，$H_e=0.2884$，$H_o=0.4312$；居群水平上，P=64.59%，$H_e=0.2449$，$H_o=0.3606$），黄花杓兰居群的遗传分化不大（$G_{st}=0.154$），居群间基因交流较为频繁（$N_m=2.7460$）。居群的克隆多样性水平高（$D=0.9638-0.9960$，G/N=0.83-0.96），同一克隆的分株相邻，克隆生长延伸范围狭窄。黄花杓兰居群之所以保持较高水平的遗传多样性，可能与其既能通过实生幼苗增加基因的杂合度，又能通过无性分株把杂合体固定下来有关。

**关键词**：黄花杓兰；遗传多样性；遗传结构；克隆；AFLP
**中图分类号**：Q 75 **文献标识码**：A **文章编号**：0253-2700（2008）01-069-07

# Genetic Structure and Clonal Diversity of *Cypripedium flavum* (Orchidaceae) Populations from South-West China

CAI Ning-Feng[1,2], YAN Ning[1], HU Hong[1**], LIU Tao[3]
(1 *Kunming Institute of Botany*, *Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650204, China;
2 *Graduate University of Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100049, China;
3 *College of Agronomy and Biotechnology*, *Yunnan Agricultural University*, Kunming 650201, China)

**Abstract**: Six populations of *Cypripedium flavum* were studied on their genetic diversity, genetic structure, and clonal diversity in Zhongdian County, Yunnan Province (South-west China). Using POPGENE software, 86 polymorphic loci was obtained using two AFLP primer combinations, and the proportion of polymorphic loci was 82.69%. A relatively high level of genetic diversity was revealed: $H_e=0.2884$, $H_o=0.4312$ (at species level); P=64.59%, $H_e=0.2449$, $H_o=0.3606$ (at population level). Genetic differentiation among populations was not high ($G_{st}=0.154$). A relatively high level of gene flow was obtained among populations. Clonal diversity of populations was high ($D=0.9638-0.9960$, G/N=0.83-0.96), and ramets of same genotype were adjacent. *C. flavum* was found with high level of genetic diversity. This may be explained by gene heterozygosity increasing by seedling recruitment and maintaining by clonal reproduction.

**Key words**: *Cypripedium flavum*; Genetic diversity; Genetic structure; Clonality; Amplified fragment length polymorphism (AFLP)

兰科植物多为珍稀濒危植物，全世界所有野生兰科植物均被列入《野生动植物濒危物种国际贸易公约》的保护范围，占该公约应保护植物的 90% 以上，是植物保护中的“旗舰”类群（flag

* 基金项目：国家自然科学基金项目（30470182），中国科学院知识创新工程重要方向项目（KSCX2-YW-Z-033）
** 通讯作者：Author for correspondence；E-mail：huhong@mail.kib.ac.cn
收稿日期：2007-04-24，2007-11-05 接受发表
作者简介：蔡凝枫（1981-）女，硕士，主要从事生理生态学研究。E-mail：cainingfeng@mail.kib.ac.cn

维普资讯 http://www.cqvip.com



group)(罗毅波等，2003)。杓兰属(*Cypripedium*)植物主要分布于北半球，全属约47个种和3个变种，我国有35个种，其中27个种为特有种(Cribb and Sandison，1998；陈心启和刘仲健，2004)。由于人类对杓兰野生环境的破坏和对杓兰的过渡采挖，使得杓兰的种群数量急剧下降，迫切需要对杓兰的野生植物资源进行保护。

黄花杓兰(*Cypripedium flavum*)属兰科(Orchidacaea)杓兰属植物，为我国特有种，分布于云南西北部、西藏东南部、四川、甘肃南部和湖北西部的高海拔地区，是一种典型的多年生高山草本植物。花型独特，花色鲜艳，极具观赏价值。在野外观察到的黄花杓兰不仅能结实，还能通过根状茎上的休眠芽发育成株，具有有性繁殖和无性繁殖两种繁殖方式。中甸县地处横断山区，是野生杓兰的分布中心和分化中心(郎楷永，1990)。整个横断山区有17种杓兰，但杓兰分布范围狭窄，对生境要求严格致使某些种类数量稀少，已处于濒危状态。黄花杓兰在中甸的种群数量较大，因此选择黄花杓兰为材料来研究其居群的遗传结构、遗传多样性、克隆多样性及克隆空间结构，为制定杓兰的保护策略提供依据。

种群维持取决于进化潜力，也就是需要一定的遗传差异。因此，一般认为濒危物种比广布种的遗传多样性水平低。但近年来，许多研究发现濒危植物相对分布广的植物具有较高水平遗传差异(Gitzendanner and Soltis，2000)。有关兰花种群遗传结构方面的文献不多，大多是关于兰花种群遗传结构并指出居群的遗传多样性水平低(Brzosko and Wróblewska，2003a；Chung等，2006；Gustafsson and Sjögren-Gulve，2002)。但也有人发现高水平的遗传多样性(Borba等，2001)。关于杓兰属兰花遗传结构和遗传多样性的报道也很少，基本都采用等位酶标记(Case等，1998；Chung and Chung，1999；Brzosko等，2002a，b)；对兰科植物克隆多样性分析的研究尚不多见(Case等，1998；Chung and Chung，1999；Brzosko等，2002a，b)。

本研究采用AFLP分子标记技术对云南省中甸县分布的黄花杓兰居群进行了研究，探讨其居群遗传多样性水平，遗传结构，克隆多样性水平和克隆空间结构，旨在为杓兰的物种保护提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

遗传多样性及遗传结构的研究材料：采自云南中甸的6个居群(图1，表1)，共121个个体。黄花杓兰植株

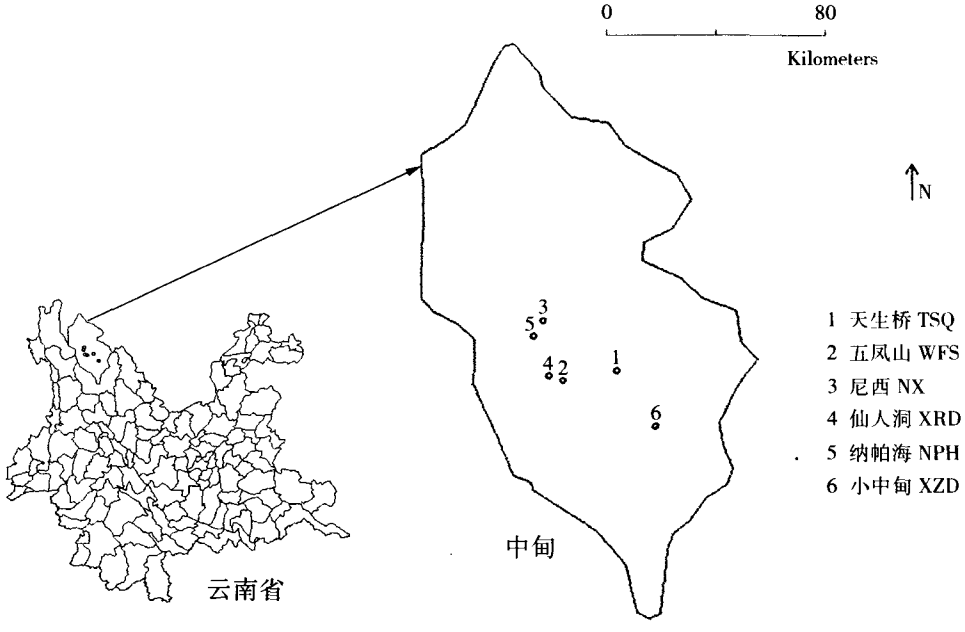


图1 黄花杓兰居群的分布

Fig. 1 Distribution of *Cypripedium flavum* Populations

维普资讯 http://www.cqvip.com



**表 1　黄花杓兰取样居群分布的生境、海拔、经纬度及采样数**

Table 1　Habitat, altitude, longitude, latitude, and sample size of *Cypripedium flavum* populations

| 编号 No. | 居群产地 Locality of populaiton | 样品数 No. of samples | 海拔 Altitude (m) | 经度（东经） Longitude | 纬度（北纬） Latitude | 生境 Habitat |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 天生桥（TSQ） | 23 | 3460 | 99°50′ | 27°48′ | 东北坡，灌木林下 |
| 2 | 五凤山（WFS） | 14 | 3240 | 99°39′ | 27°46′ | 西北坡，灌木林下 |
| 3 | 尼西（NX） | 25 | 3180 | 99°35′ | 27°58′ | 西北坡，杨树林下 |
| 4 | 仙人洞（XRD） | 24 | 3460 | 99°36′ | 27°47′ | 西北坡，灌木林下 |
| 5 | 纳帕海（NPH） | 20 | 3260 | 99°33′ | 27°55′ | 山谷，云杉林疏林下 |
| 6 | 小中甸（XZD） | 15 | 3360 | 99°58′ | 27°37′ | 西北坡，云冷杉林下 |

往往多株聚集生长一起，斑块状分布，因此以斑块为单位采集。斑块内采集 2～5 株，斑块间距离不小于 5 m。由于天生桥居群的黄花杓兰分布较分散，斑块状分布不明显，因此该居群采用随机取样法，株距不小于 5 m。

克隆多样性研究材料：在天生桥和五凤山两个居群中分别选择 10 m×16 m 样方取样，在每格 1 m×1 m 的正方形的 4 个顶点取样，分别采集样品 94 个和 44 个，共 138 个个体。

采集成熟植株的叶片，并用硅胶干燥。

### 1.2　DNA 提取及 AFLP 反应与电泳

1.2.1　总 DNA 的提取　用 TaKaRa 生物技术公司生产的基因组 DNA 通用提取试剂盒提取 DNA，并用 1.5% 的琼脂糖凝胶检测 DNA 的质和量。

1.2.2　AFLP 反应与电泳　基因组总 DNA 用 EcoRI（NEB）和 MseI（NEB）37℃双酶切 3 h，65℃灭活酶 20 min，然后进行连接反应，使酶切片断与接头连接。AFLP 反应依据 Vos 等（1995）的两步扩增方法并略作修改。预扩增引物和选择性扩增引物序列见表 2。用于 PCR 反应的 Taq 聚合酶购买自 TaKaRa 公司。

**表 2　引物和接头序列**

Table 2　Primer and adapter sequences

| 引物 Primer | 接头 Adapter |
|---|---|
| 预扩增引物 | EcoRI 接头 EcoRI adapter |
| MseI + C　5′-GAIGAGTCCTGAGTAAC-3′ | 5′-CTCGTAGACTGCGTACC-3′ |
| EcoRI + A 5′-GACTGCGTACCAATTCA-3′ | 3′-CATCTGACGCATGG-5′ |
| 选择性扩增引物 | MseI 接头 MseI adapter |
| EcoRI-ACG/MseI-CTA | 5′-GACGATGAGTCCTGAG-3′ |
| EcoRI-ACG/MseI-CTG | 3′-TACTCAGGACTC-5′ |

预扩增程序为：94℃变性 3 min；94℃ 30 s，56℃ 30 s，72℃ 60 s，循环 30 次；72℃延伸 5 min；4℃终止。选择性扩增程序为；94℃变性 3 min；94℃ 30 s，65℃ 30 s（每个循环降低 0.7℃），72℃ 60 s，循环 13 次；94℃ 30 s，56℃ 30 s，72℃ 60 s，循环 27 次；72℃ 5 min；4℃终止。

选择性扩增产物 94℃变性后进行变性聚丙烯酰胺凝胶（6%）电泳，最后银染显影检测。

### 1.3　数据处理

扩增条带采用人工读带，模糊带及弱带不计，用“1”或“0”表示条带的有或无，产生二态数据矩阵。数据用 POPGENE 1.31（Yeh 等，1999）软件计算得到：平均每个位点测定到的等位基因数（Ao），平均每个位点的等位基因的有效数目（Ae），多态位点百分率（P（%）），Shannon 表型多样性指数（$H_o$），Nei 的基因多样性指数（$H_e$），遗传分化指数（Nei），$G_{st}$ 和居群每代迁移数（$N_m$）。

个体间的相似度用相似系数计算（Lynch，1988，1990）：

$S_{xy} = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$

其中，$n_x$ 和 $n_y$ 指 x 和 y 个体的 AFLP 条带数，$n_{xy}$ 为 x 和 y 共有的条带数。只计算多态位点。

克隆多样性的计算方法有两种：（1）G/N：G 为基株数，N 为样品数；（2）Simpson 多样性指数（$D$）：$D = 1 - [n_i (n_i - 1)] / N (N - 1)$，其中 $n_i$ 为基因型 $i$ 的样品数，$N$ 为总的样品数（Pielou，1969）。

## 2　结果

### 2.1　不同居群 AFLP 产物的多态性

两对引物组合共产生 104 个位点，86 个多态位点，多态百分率为 82.69%。两对引物组合的多态位点数不同，ACG/CTA 产生多态位点 48（85.71%），ACG/CTT 产生多态位点 38（79.17%）。不同居群的多态位点百分率从 59.62% 到 68.27% 不等。

### 2.2　遗传多样性水平和居群分化程度

在物种水平上，等位基因的有效数目、Shannon 表型多样性指数和 Nei 的基因多样性系数分别为 1.4961、0.4312、0.2884。其中，Nei 的基因多样性系数最高的居群是小中甸（$H_e$ = 0.2618），最低的是仙人洞居群（$H_e$ = 0.2237）。黄花杓兰总的遗传变异量 $H_t$ 为 0.2895，其中居群内遗传变异量 $H_s$ 为 0.2449，表明黄花杓兰居群的遗传变异主要存在于居群内部，各居群间的遗传分化系数 $G_{st}$ 为 0.154。居群间每代迁移数 $N_m$ 为 2.7460（表 3）。

### 2.3　克隆多样性及克隆结构

为了估算 AFLP 反应的可重复性，选择一个

维普资讯 http://www.cqvip.com



**表3 黄花杓兰遗传多样性与居群遗传结构**

Table 3 The genetic diversity of *Cypripedium flavum* and genetic structure of its population

| Population | $A_o$ | $A_e$ | $H_e$ | $H_o$ | P (%) | $H_t$ | $H_s$ | $G_{st}$ | $N_m$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TSQ | 1.6827 | 1.4591 | 0.2610 | 0.3838 | 68.27 | | | | |
| WFS | 1.6346 | 1.3988 | 0.2296 | 0.3406 | 63.46 | | | | |
| NX | 1.6827 | 1.4542 | 0.2582 | 0.3796 | 68.27 | | | | |
| XRD | 1.6154 | 1.3816 | 0.2237 | 0.3328 | 61.54 | | | | |
| NPH | 1.5962 | 1.4211 | 0.2353 | 0.3429 | 59.62 | | | | |
| XZD | 1.6635 | 1.4592 | 0.2618 | 0.3838 | 66.35 | | | | |
| Mean | 1.6459 | 1.4290 | 0.2449 | 0.3606 | 64.59 | | | | |
| Total | 1.8269 | 1.4961 | 0.2884 | 0.4312 | 82.69 | 0.2895 | 0.2449 | 0.1540 | 2.7460 |

$A_o$, observed number of alleles; $A_e$, effective number of alleles; $H_e$, Nei's (1973) gene diversity; $H_o$, Shannon's Information index [Lewontin (1972)]; P, the percentage of polymorphic loci; $H_t$, gene diversity of specie; $H_s$, gene diversity within populations; $G_{st}$, coefficient of gene differentiation; $N_m$, gene flow

样品重复提取了10次DNA，用三对引物组合EcoRI-AGC/MseI-CTG，EcoRI-ACG/MseI-CTA，EcoRI-ACG/MseI-CTG，检测其一致度，计算方法参照Arens（1998）等的方法。结果两个样品之间最大的差异度为6.8%，因此个体间相似度达到或高于93%则判定两个个体为同一克隆体。

G/N变幅为0.83～0.96，仙人洞和尼西两个居群检测到的克隆分株较多；克隆多样性指数D的变幅为0.9638～0.9960，各居群之间相差不大，仙人洞居群最低（表4）。检测到的克隆分株都为同一斑块内的相邻个体。

天生桥和五凤山居群的克隆空间结构如图2所示，同一个克隆的分株距离邻近，两个居群共检测出九个克隆系，其余都为基因型不同的个体。

**表4 黄花杓兰居群的克隆多样性**

Table 4 Clonal diversity of *Cypripedium flavum* populations

| Population | N | G | G/N | D |
|---|---|---|---|---|
| TSQ | 23 | 22 | 0.96 | 0.9960 |
| WFS | 14 | 13 | 0.93 | 0.9890 |
| NX | 25 | 21 | 0.84 | 0.9867 |
| XRD | 24 | 20 | 0.83 | 0.9638 |
| NPH | 20 | 19 | 0.95 | 0.9947 |
| XZD | 15 | 14 | 0.93 | 0.9905 |

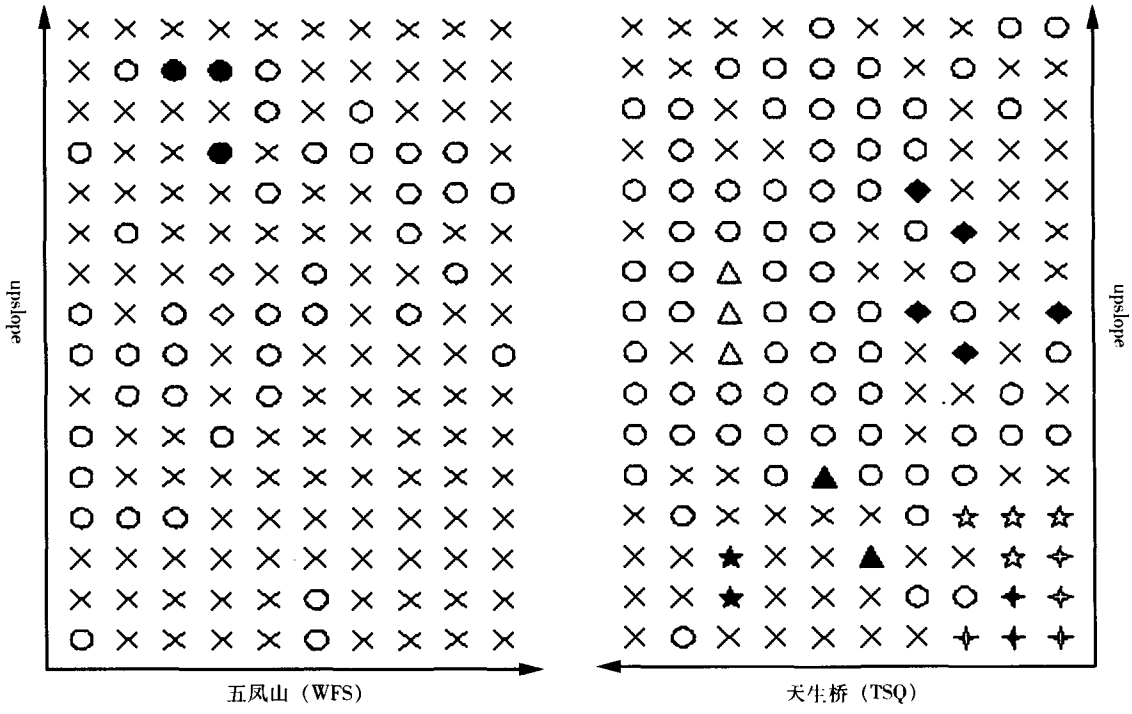


图2 五凤山和天生桥居群的克隆空间结构，相同形状颜色的基因型相同，○ 无色圈基因型各不同，X 为该点无样品

Fig. 2 Map showing the spatial distribution of *Cypripedium flavum* clones at the sampling site. Each colour of different shapes corresponds to a single genotype, while colourless, ○ correspondes to different genotype, X corresponds to no samples

维普资讯 http://www.cqvip.com



## 3 讨论

### 3.1 居群的遗传多样性及遗传结构

黄花杓兰居群的遗传多样性水平较高（P = 82.69%，$H_e$ = 0.2884，$H_o$ = 0.4312），有关杓兰属兰花的居群遗传多样性的报道多为等位酶标记，如：杓兰 *C. calceolus*（P = 45.5%，$H_e$ = 0.184，$H_o$ = 0.156，Brzosko 等，2002a），*C. caleolus* 以及变种（$H_e$ = 0.180 - 0.274，Case，1993），*C. reginae*（P = 18%，$H_e$ = 0.037；Case，1994），*C. acaule*（P = 5.3 - 15.4%，$H_o$ = 0.0016 - 0.023；Bornbush 等，1994），*C. kentuckiense*（P = 25%，$H_o$ = 0.045，$H_e$ = 0.050，Case 等，1998），以及 *C. parviflorum* var. *parviflorum* populations（P = 35.2%，A = 1.4；Wallace and Case，2000）的结果都比黄花杓兰的遗传多样性水平低，而 *C. parviflorum* var. *pubescens* 和 *C. parviflorum* var. *makasin* 美国居群具有高水平的多态性（P = 81.8%），以及高的期望杂合度（$H_e$ = 0.22 - 0.29，Wallace and Case，2000），*C. parviflorum* var. *pubescens*（P = 83.3%，A = 2.83，$H_o$ = 0.166，$H_e$ = 0.198，Case 等，1998），其结果与黄花杓兰相当。短命的多年生植物，分布广的植物，演替阶段处于晚期的植物，或具有有性和无性两种繁殖方式的植物具有最高的遗传多样性（Loveless and Hamrick，1984）。近年来人类对黄花杓兰野生环境的破坏及过渡采挖，使得黄花杓兰的种群数量急剧下降；但黄花杓兰分布较广，又具有远交交配系统，且能依靠根茎休眠芽进行无性繁殖固定并维持有性繁殖的基因多样性，使得黄花杓兰居群仍然保持较高水平的遗传多样性。

Nei 的基因多样性系数最高的居群是小中甸（$H_e$ = 0.2618），其次是天生桥（$H_e$ = 0.2610），最低的是仙人洞居群（$H_e$ = 0.2237）。小中甸的种群数量不大，但斑块分布较分散，15 个个体中只有两个个体是同一克隆系；而仙人洞种群的个体分布较密集，克隆鉴定结果表明在一个斑块内的五个样品都为一个克隆系的分株，表明该采样点克隆繁殖比例较高，种群密度大发生近交的可能性也大，因此遗传多样性水平最低；天生桥的种群数量最大，因此遗传多样性也比较高。

Forrest 等（2004）总结了文献中兰科植物的 $G_{st}$（$F_{st}$）的变幅为 0.012 - 0.924，平均 $G_{st}$ 值为 0.187，指出虽然兰科植物具有种子极小如尘埃等生物学共性，同时又是一个庞大的千差万别的科系，具有不同的繁殖策略、分布范围和分布方式，因此表现出居群的遗传分化差异也非常大；Hamrick and Godt（1989）总结出长寿多年生草本植物 $G_{st}$ = 0.213，动物远交植物 $G_{st}$ = 0.197；Bussell（1999）总结了 35 个物种的 RAPD 结果，发现 29 个远交物种的居群间变异在总遗传变异中平均占 19.3%（$G_{st}$ = 0.193）；6 个近交物种的平均 $G_{st}$ 为 0.625。黄花杓兰（$G_{st}$ = 0.154）居群间遗传分化低于同类植物的平均水平，且远远低于近交物种的 $G_{st}$ 值，证明黄花杓兰是以远交为主的虫媒花，居群间的遗传分化不是很大，仅有 15.4% 的差异来自居群间。

影响居群间遗传结构的因素很多，如繁育系统、分布范围、花粉和种子传播机制等。当居群间每代迁移数 $N_m > 1$ 时，基因流就可以防止由于遗传漂变引起的居群之间的遗传分化（Slatkin，1987），黄花杓兰是典型的虫媒花，异花授粉，居群间每代迁移数 $N_m$ 达到 2.7460，表明黄花杓兰居群间基因交流较为频繁，可能与其虫媒授粉有关。兰科植物的种子很小，随风飘散，具有长距离散布的能力，很多研究证实种子流是较为有效的基因流（Squirrell 等，2001；Cozzolino 等，2003；Trapnell and Hamrick，2004），但是 Chung 等（2005）研究了一种地生兰 *Orchis cyclochila* 的种群空间遗传结构，发现高水平的遗传多样性以及低的种群间差异（$F_{st}$ = 0.030），空间自相关分析表明许多种子落在母株附近。除此以外，各居群间相隔不远也是居群间遗传分化不大的原因之一。

### 3.2 克隆多样性及克隆系的空间分布

长期以来，普遍认为克隆繁殖会导致种群内基因型变异和遗传变异的下降；一些研究验证了这种看法，发现克隆植物种群的遗传多样性水平较低（Ayres and Ryan，1999；王可青等，1999；Chung，1995；Bornbusch 等，1994）；但也有一些研究发现种群具有较高的遗传多样性（Mayes 等，1998；Brzosko 等，2002a，b；Jover 等，2003；葛颂等，1999）。

野外观察和组织培养（Yan 等，2005）都证

维普资讯 http://www.cqvip.com



明黄花杓兰具有克隆繁殖能力，通过AFLP分子标记也检测出克隆分株，证实克隆生长的存在，但发现的克隆分株并不多。与同类型的兰科植物相比，黄花杓兰各居群的克隆多样性非常高（$D=0.9638-0.9960$，$G/N=0.83-0.96$），如Brzosko and Wróblewska（2003b）采用等位酶方法检测*Cephalanthera rubra*的401个样品分株，只有14个基因型，克隆多样性很低（$G/N=0.068$，$D=0.664$）；也有文献中研究了杓兰*C. calceolus*的3个岛屿居群获得了较高的克隆多样性水平（Brzosko等，2002b）。

黄花杓兰的平均根茎节长度为1.34 cm，根茎的年增长量有限，也就决定了基株要通过克隆生长扩张其分布范围很难。本研究发现基株都为局部基因型，只存在于一个居群，且同一克隆的分株相邻，多为一个斑块内的个体，表明克隆生长延伸范围狭窄。总之，尽管不清楚黄花杓兰有性繁殖和无性繁殖之间的确切比例，但可以推断克隆生长并不占主导地位；许多学者认为即使幼苗补充很少，也可能维持甚至增加当地的遗传多样性水平（Soane and Watkinson，1979；Stehlik and Holderegger，2000）；黄花杓兰居群之所以保持较高水平的遗传多样性，可能与其既能通过实生幼苗增加基因的杂合度，又能通过无性分株把杂合体固定下来有关。

### 3.3 黄花杓兰的保护

本研究结果表明，黄花杓兰的遗传多样性水平较高，居群间遗传分化不大，因此推测黄花杓兰资源遭受严重破坏的主要原因是人类干扰，如公路修建，旅游开发，放牧压力，过度采挖等，对黄花杓兰的生态环境造成很大的破坏，种群数量急剧下降。因此，原生地生态保护及进行人工繁育是较为合适的保护策略。

**致谢** 胡运乾老师在整个实验和论文写作中给予帮助；黄家林、李树云老师在样品采集中给予帮助。

## 〔参 考 文 献〕

Arens P, Coops H, Jansen J *et al.*, 1998. Molecular genetic analysis of black poplar (*Populus nigra* L.) along Dutch rivers [J]. *Mol Ecol*, **7**: 11—18

Ayres DR, Ryan FJ, 1999. Genetic diversity and structure of the narrow endemic *Wyethia reticulata* and its congener *W. bolanderi* (Asteraceae) using RAPD and allozyme techniques [J]. *Amer J Bot*, **86**: 344—353

Borba EL, Felix JM, Solferini VN *et al.*, 2001. Fly-pollinated *Pleurothallis* (orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers [J]. *Amer J Bot*, **88**: 419—428

Bornbusch AH, Swender LA, Hoogerwerf DL, 1994. Genetic variation in Massachusetts populations of *Cypripedium arietinum* R. Brown in Ait. and *C. acaule* Ait. (Orchidaceae) [J]. *Rhodora*, **888**: 354—369

Brzosko E, Ratkiewicz M, Wróblewska A, 2002a. Allozyme differentiation and genetic structure of Lady's slipper island populations (*Cypripedium calceolus*) in north-east Poland [J]. *Bot J Linn Soc*, **138**: 433—440

Brzosko E, Wróblewska A, Ratkiewicz M, 2002b. Spatial genetic structure and clonal diversity of island populations of Lady's slipper (*Cypripedium calceolus*) from the Biebrza National Park (northeast Poland) [J]. *Mol Ecol*, **11**: 2499—2509

Brzosko E, Wróblewska A, 2003a. Low allozymic variation in two island populations of *Listera ovata* (Orchidaceae) from NE Poland [J]. *Ann Bot Fennici*, **40**: 309—315

Brzosko E, Wróblewska A, 2003b. Genetic variation and clonal diversity in island *Cephalanthera rubra* populations from the Biebrza National Park, Poland [J]. *Bot J Linn Soc*, **143**: 99—108

Bussell JD, 1999. The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae) [J]. *Mol Ecol*, **8**: 775—789

Case MA, 1993. High levels of allozyme variation within *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) and low levels of divergence among its varieties [J]. *Syst Bot*, **18**: 663—677

Case MA, 1994. Extensive variation in the levels of genetic diversity and degree of relatedness among five species of *Cypripedium* (Orchidaceae) [J]. *Amer J Bot*, **81**: 175—184

Case MA, Mlodozeniec HT, Wallace LE *et al.*, 1998. Conservation genetics and taxonomic status of the rare Kentucky lady's slipper: *Cypripedium kentuckiense* (Orchidaceae) [J]. *Amer J Bot*, **85**: 1779—1786

Chen XQ (陈心启), Liu ZJ (刘仲健), 2004. A new species and a new variety of *Cypripedium* (Orchidaceae) from China [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **26** (4): 382—38

Chung MG, 1995. Low levels of genetic diversity within populations of *Hosta clausa* (Liliaceae) [J]. *Plant Species Biol*, **9**: 177—182

Chung MY, Chung MG, 1999. Allozyme diversity and population structure in Korean populations of *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae) [J]. *J Plant Res*, **112**: 139—144

Chung MY, Nason JD, Chung MG, 2005. Spatial genetic structure in population of the terrestrial orchid *Orchis cyclochila* (Orchidaceae) [J]. *Plant Syst Evol*, **254**: 209—219

Chung MY, Park CW, Chung MG, 2006. Extremely low levels of allozyme variation in southern Korean populations of the two rare and endangered lithophytic or epiphytic *Bulbophyllum drymoglossum* and

维普资讯 http://www.cqvip.com



*Sarcanthus scolopendrifolius* (Orchidaceae): implications for conservation. Biodivers Conserv (Online) [J]. Springer, Netherlands

Cozzolino S, Cafasso D, Pellegrino G *et al.*, 2003. Fine-scale phylogeographical analysis of Mediterranean *Anacamptis palustris* (Orchidaceae) populations based on chloroplast minisatellite and microsatellite variation [J]. *Mol Ecol*, **12**: 2783—2792

Cribb P, Sandison MS, 1998. A preliminary assessment of the conservation status of *Cypripedium* species in the wild [J]. *Bot J Linn Soc*, **126**: 183—190

Forrest AD, Hollingsworth ML, Hollingsworth PM *et al.*, 2004. Population genetic structure in European populations of *Spiranthes romanzoffiana* set in the context of other genetic studies on orchids [J]. *Heredity*, **92**: 218—227

Ge S (葛颂), Wang KQ (王可青), Dong M (董鸣), 1999. Genetic diversity and clonal structure of *Hedysarum laeve* in Mo Us sandland [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), **41** (3): 301—306

Gitzendanner MA, Soltis S, 2000. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners [J]. *Amer J Bot*, **87**: 783—792

Gustafsson S, Sjögren-Gulve P, 2002. Genetic diversity in the rare orchid, *Gymnadenia odoratissima* and a comparison with the more common congener, *G. conopsea* [J]. *Conserv Genet*, **3**: 225—234

Hamrick JL, Godt MJW, 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]. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 43—63

Jover MA, Castillo-Agudo LD, Garcia-Carrascosa M *et al.*, 2003. Random amplified polymorphic DNA assessment of diversity in western Mediterranean populations of the seagrass *Posidonia oceanica* [J]. *Amer J Bot*, **90**: 364—369

Lang KY (郎楷永), 1990. Notes on the orchid flora in the Hengduan Mountain region, China [J]. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), **28** (5): 356—371

Loveless MD, Hamrick JL, 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations [J]. *Ann Rev Ecol Syst*, **15**: 65—95

Luo YB (罗毅波), Jia JS (贾建生), Wang CL (王春玲), 2003. A general review of the conservation status of Chinese orchids [J]. *Biodiversity Science* (生物多样性), **11** (1): 70—77

Lynch M, 1988. Estimation of relatedness by DNA fingerprinting [J]. *Mol Biol Evol*, **5**: 584—599

Lynch M, 1990. The similarity index and DNA fingerprinting [J]. *Mol Biol Evol*, **7**: 478—484

Mayes SG, McGinley AM, Werth CR, 1998. Clonal population structure and genetic variation in sand-shinnery oak, *Quercus haveardii* (Fagaceae) [J]. *Amer J Bot*, **85**: 1609—1617

Pielou EC ed., 1969. An introduction to mathematical ecology [M]. Wiley, New York

Slatkin M, 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations [J]. *Science*, **236**: 787—792

Soane ID, Watkinson AR, 1979. Clonal variation in populations of *Ranunculus repens* [J]. *New Phytol*, **82**: 557—573

Squirrell J, Hollingsworth PM, Bateman RM *et al.*, 2001. Partitioning and diversity of nuclear and organelle markers in native and introduced populations of *Epipactis helleborine* (Orchidaceae) [J]. *Amer J Bot*, **88**: 1409—1418

Stehlik I, Holderegger R, 2000. Spatial genetic structure and clonal diversity of *Anemone nemorosa* in late successional deciduous woodlands of Central Europe [J]. *J Ecol*, **88**: 424—435

Trapnell DW, Hamrick JL, 2004. Partitioning nuclear and chloroplast variation at multiple spatial scales in the neotropical epiphytic orchid, *Laelia rubescens* [J]. *Mol Ecol*, **13**: 2655—2666

Vos P, Hogers R, Bleeker M *et al.*, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Res*, **23**: 4407—4414

Wallace LE, Case MA, 2000. Contrasting allozyme diversity between northern and southern populations of *Cypripedium parviflorum* (Orchidaceae): implications for *Pleistocene refugia* and taxonomic boundaries [J]. *Syst Bot*, **25**: 281—296

Wang KQ (王可青), Ge S.(葛颂), Dong M (董鸣), 1999. Allozyme variance and clonal diversity in the rhizomatous grass *Psammochloa villosa* (Gramineae) [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), **41** (5): 537—540

Yan N, Hu H, Huang JL *et al.*, 2005. Micropropagation of *Cypripedium flavum* through multiple shoots of seedlings derived from mature seeds [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **84**: 113—117

Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ, 1999. POPGENE Version 1.31, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. University of Alberta and Centre for International Forestry Research