

莲瓣兰 DALP 遗传多样性研究

贾琳¹, 史云东^{1*}, 虞泓², 骆扬², 李永谊²

(1. 玉溪师范学院 资源与环境学院, 云南 玉溪 653100; 2. 云南大学 生命科学学院 生态遗传学实验室, 昆明 650091)

摘要: 采用 DALP(Direct amplification of length polymorphism)检测莲瓣兰 5 个居群的遗传结构。5 个引物组合共检测到 103 个多态位点。和其它具有相似生活史(多年生草本、以动物为媒介的杂交、种子随风散布)的物种相比,莲瓣兰原变种水平($PPB=88.18\%$, $A=1.8818$, $A_e=1.4880$, $H=0.2911$, $I=0.4412$)和物种水平($PPB=93.64\%$, $A=1.9364$, $A_e=1.5262$, $H=0.3129$, $I=0.4732$)均具有较高的遗传多样性;各居群间($G_s=0.3292$)存在较大的遗传分化。基因流的估计值($N_m=1.0186$)表明莲瓣兰物种水平上各居群间每代有 1.0186 个移居个体。地理隔离和选择压力可能是造成莲瓣兰居群间基因流动受到限制的原因。在这些研究的基础上,探讨了野生莲瓣兰资源的保护问题。

关键词: 莲瓣兰; DALP; 遗传多样性; 遗传分化; 保护

中图分类号: Q948 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2012)06-0822-06

Genetic diversity of *Cymbidium tortisepalum* by DALP

JIA Lin¹, SHI Yun-Dong^{1*}, YU Hong², LUO Yang², LI Yong-Yi²

(1. College of Nature Resources and Environment, Yuxi Normal University, Yuxi 653100, China; 2. Laboratory of Ecological Genetics, College of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: DALP was applied to evaluate genetic variation and structure of 5 populations of *Cymbidium tortisepalum*. The results were as follows: 103 DALP polymorphic loci were detected in four populations using 5 random primers. Compared with other long lived herbaceous perennials, animal pollinated outcrossing species and wind dispersal seeds, the total genetic diversity of *C. tortisepalum* was relatively high both at the subspecies($PPB=88.18\%$, $A=1.8818$, $A_e=1.4880$, $H=0.2911$, $I=0.4412$) and species levels($PPB=93.64\%$, $A=1.9364$, $A_e=1.5262$, $H=0.3129$, $I=0.4732$); and there was much genetic differentiation among population($G_s=0.3292$). An indirect estimate of the number of migrants per generation($N_m=1.0186$) suggested about 1.0186 migrants in every generation. The isolation from parent population and the selective pressure might be the causes leading to the restriction of gene flow. Based on these results, the conservation strategies of this species were developed.

Key words: *Cymbidium tortisepalum*; DALP; genetic variation; genetic differentiation; conservation

莲瓣兰(*Cymbidium tortisepalum*), 又名萼草兰, 是兰科(Orchidaceae)兰属(*Cymbidium*)下一个独立的种, 其包括原变种莲瓣兰和变种春剑(*C. tortisepalum* var. *longibracteatum*)。莲瓣兰分布范围狭窄, 仅在中国台湾、云南西北部、四川西南部有分

布。在云南主要分布于金沙江、澜沧江、怒江三江流域, $98^\circ\sim 101^\circ\text{E}$, $24^\circ\sim 28.4^\circ\text{N}$ (刘仲健等, 2006; 陈心启等, 2011)。莲瓣兰形态变化多样, 奇花和线艺品种有较高的观赏价值和经济价值, 使之成为云南最具代表性的兰花种类之一。

收稿日期: 2012-03-19 修回日期: 2012-08-26

基金项目: 云南大学省级生物技术人才培养基地项目; 云南大学植物学博士点基金[Supported by the Base Project of Biotechnology Talents of Yunnan University; the Fund of Botany Doctoral Subject of Yunnan University]

作者简介: 贾琳(1980-), 女, 云南玉溪人, 博士研究生, 讲师, 主要从事植物生态遗传学的研究, (E-mail)jl@yxnu.net.

通讯作者(Author for correspondence, E-mail: sydong2011@126.com)

目前莲瓣兰研究主要集中于分类地位的探究(Liu 等,2009;陈心启等,2011)、人工驯化栽培、种间杂交育种(李海峰等,2009,2012)、种子萌发特性(庞惠仙等,2010)及野生资源的保护利用(维饶箐等,2008)。作为一种形态变化丰富的观赏植物(陈于敏等,2005),从分子水平对其居群遗传多样性进行研究还鲜有报到。直接扩增片段长度多态性(Direct amplification of length polymorphisms, DALP)是 1998 年由法国科学家 E. Desmarais, I. Lanneluc 和 J. Lagnel 发展起来的一种检测 DNA 多态性的新方法。该方法采用双引物对未知序列的基因组 DNA 进行扩增,选择性引物采用 M13 测序

引物核心序列(-40USP),并在 3'端加上 2~4 个选择性碱基,反向引物采用 M13 反向测序引物,每对引物组合都能产生一个特殊的多带的图谱(Desmarais 等,1998)。研究表明,DALP 适用于快速筛选遗传多态性和等位位点变异。该技术与 RFLP、RAPD 相比,具有在一次实验中同时检测出大量扩增片段的优点;与 AFLP 相比,DALP 具有操作简单、扩增片段可直接测序的优点。本研究选取 5 个莲瓣兰居群,采用 DALP 技术对其遗传多样性进行研究,并结合已有繁育系统研究结果,共同分析莲瓣兰居群的遗传结构,为制定合理的保护策略提供遗传背景资料。

表 1 材料来源与生境
Table 1 Habitats and location of materials

编号 Code	种类 Taxon	来源 Location	样品数 Sample No.	海拔 Altitude (m)	生长环境 Habitat
EA	莲瓣兰	大理云龙	10	1 500	松栎林和灌木混交林下,背阴坡
EB	莲瓣兰	保山施甸	10	1 500	松栎林和灌木混交林下,背阴坡
EC	莲瓣兰	香格里拉维西	10	2 500	松栎林和灌木混交林下,背阴坡
ED	莲瓣兰	怒江福贡	10	2 000	松栎林和灌木混交林下,背阴坡
EE	春剑	贵州兴隆	10	1 500	松栎林和灌木混交林下,背阴坡

表 2 本研究中 DALP 引物组序号与序列
Table 2 Sequences of the primer groups used in the present study

引物 Primer	名字 Name	序列 Sequence (5'-3')
选择性引物 Selective primer	DALP221(P1)	GTTTCCCAGTCACGACGC
	DALP231(P2)	GTTTCCCAGTCACGACAGC
	DALP233(P3)	GTTTCCCAGTCACGACACG
	DALP235(P4)	GTTTCCCAGTCACGACCAC
	DALP244(P5)	GTTTCCCAGTCACGACCTGA
反向引物 Reverse primer	DALPR1(Pr)	5'-TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'

1 材料与方 法

1.1 研究材料

实验材料来自云南沁兰园艺公司引种基地(表 1)。每一个实生植株,剪取一片新鲜幼嫩叶片,放置于干净的纸袋中,保存于 4℃待用。材料来源见表 1。

1.2 方 法

1.2.1 总 DNA 提取 本文采用改良后的 CTAB 法(Dolye JJ & Dolye JL,1987)提取基因组 DNA,每株选取 0.3~0.5 g 新鲜叶片。总 DNA 用含 0.5 μg/mL 溴化乙锭(Ethidium Bromide,EB)的 1%的琼脂糖凝胶(agarose gel)电泳检测,用 20、40、60、100 ng 的 λDNA 作为标定标准。模板 DNA 工作浓度平衡为 20 ng/μL。

1.2.2 反应体系和扩增程序的优化 20 μL 反应体系:模板 DNA 3 μL(60 ng),25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μL,10×Buffer(酶配套)2 μL,2.5 mmol/L dNTP Mixture(上海生工分装)2 μL,0.5 U/μl Taq 酶(上海生工分装)3.5 μL,5 pmol/L 选择性引物(上海生工合成)1 μL,5 pmol/L 反向引物(上海生工合成)3 μL,灭菌超纯水 4 μL。扩增程序:使用 PE9700 扩增仪(美国 PE 公司)。94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,50℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,共 40 个循环。最后,72℃延伸 10 min 完成整个 PCR 扩增。

1.2.3 引物筛选 从 5 个居群中各取出 1 份 DNA 样品进行预备实验,从 22 组引物组合中选出 5 组能获得清晰条带,反应稳定的随机引物组合:PrP1、PrP2、PrP3、PrP4、PrP5(引物名称序列见表 2)。

1.2.4 DALP 扩增及检测 使用上述优化体系和引

物组合扩增所有的 50 个样品。扩增产物用含 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EB 的 1% 琼脂糖凝胶电泳,电泳缓冲液为 $1 \times \text{TBE}$ 。电泳结果采用 Kodak Image Station 440CF 凝胶成像系统,初步检测扩增效果,再进行聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染。

1.2.5 聚丙烯酰胺电泳 取 5% 非变性聚丙烯酰胺胶(丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺=29:1)40 mL,用真空泵抽气 20 min。加入 256 μL 过硫酸胺($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$)和 17.6 μL TEMED(N,N,N,N',四甲基乙二胺),开始制胶。上样量 5 μL (样品:6

$\times$ 上样缓冲液=5:1),电泳条件:Dyy-Z 型垂直电泳仪,电压 800V,电泳时间 2.5 h。

1.2.6 DALP 银染 本实验采用快速银染法:①固定液(10%乙酸)洗脱直至溴酚兰颜色褪去,用蒸馏水洗 3 次,每次不少于 2min。②染色液(0.1%的硝酸银,染色前加入 0.4%的甲醛)染色 40 min;蒸馏水洗 2 s 立即拿出。③在显影液(3.0%碳酸钠,显影前加入 0.4%甲醛,0.02%硫代硫酸钠)中显影至条带清晰。④固定液(10%乙酸)固定 5 min,蒸馏水洗 10 min。

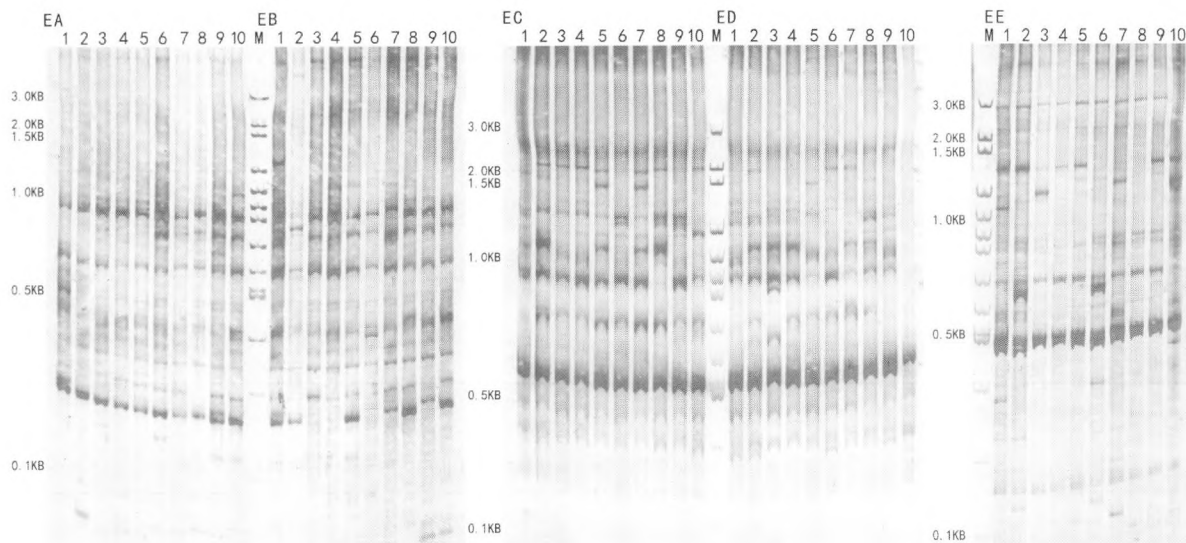


图 1 DALP 引物组合对莲瓣兰 EA、EB、EC、ED、EE 居群扩增的 DNA 指纹图谱

Fig. 1 DNA fingerprints of 5 populations of *Cymbidium tortisepalum* by using DALP primer group

1.2.7 数据统计分析 电泳图谱中根据分子量标准对照反应产物在胶上的位置,估计扩增产物及其分子量。有带记为(1),无带记为(0),形成 0/1 矩阵图输入计算机。采用 POPGENE 软件计算出各居群的 Nei's 基因多样性指数(H)、Shannon's 多态性信息指数(I)、多态位点百分率(PPB)、基因分化系数(G_s)、居群内基因多样性(H_s)、居群间基因多样性(H_t)、Nei's 遗传距离(D)和遗传一致度(I);同时结合 treeview 软件对得到的遗传距离矩阵进行非加权配对算术平均法(UPGMA)聚类分析,构建聚类图。

2 结果与分析

2.1 遗传多样性

莲瓣兰 5 个居群,5 组 DALP 引物扩增得到 110 条清晰条带,其中 103 条为多态条带,平均每个

引物扩增多态条带数为 20.6。从表 3 看出,莲瓣兰原变种各居群的遗传多样性水平差异不大,其中保山(SD)居群的 PPB 值(66.36)、Shannon's 指数(0.3659)和 Nei's 基因多样性指数(0.2039)均为最高;大理(YL)居群的 PPB 值(60.00)、Shannon's 指数(0.3074)和 Nei's 基因多样性指数(0.2241)较低。然而,变种春剑的兴隆居群(XL)的 PPB 值(42.73)、Shannon's 指数(0.2345)和 Nei's 基因多样性指数(0.1577)均远低于莲瓣兰原变种的各居群。

莲瓣兰居群水平的多态位点比率 64.4%,物种水平的多态位点比率 93.64%;居群水平的 Nei's 基因多样性指数为 0.2098,物种水平的 Nei's 基因多样性指数为 0.3129;居群水平的 Shannon's 指数为 0.3131,物种水平的 Shannon's 指数为 0.4732。

2.2 遗传分化

莲瓣兰物种水平总基因多样性(H_t)为 0.3128,居群内基因多样性(H_s)为 0.2098,基因分化系数

表 3 莲瓣兰各居群的遗传变异
Table 3 Genetic variation of five populations of *C. tortisepalum*

居群 Population	总位点数 Total No. of loci	多态位点数 No. of polymorp- hic loci	多态位点 百分比 PPB	等位基因 数 A	有效等位 基因数 Ae	Nei's 基因 多样性 H	Shannon's 指数 I
大理云龙(YL)	110	66	60.00	1.6000	1.3452	0.2039	0.3074
保山施甸(SD)	110	73	66.36	1.6636	1.4281	0.2469	0.3659
迪庆维西(WX)	110	67	60.91	1.6091	1.3939	0.2263	0.3348
怒江福贡(FG)	110	69	62.73	1.6273	1.3603	0.2142	0.3230
春剑兴隆(EE)	110	47	42.73	1.4273	1.2699	0.1577	0.2345
平均值 Average value	110	64.4	58.55	1.5855	1.3595	0.2098	0.3131
物种 Species	110	103	93.64	1.9364	1.5262	0.3129	0.4732

PPB=The percentage of polymorphic loci; A:allele number; Ae:effective allele number; H=Nei's gene diversity; I=Shannon's information index.

G_s 为 0.3292。这表明莲瓣兰物种的遗传变异有 32.92% 来自居群间,67.08% 来自居群内。而莲瓣兰原变种水平上,则有 23.38% 的遗传变异存在于居群间,76.62% 的遗传变异存在于居群内。

表 4 不同居群间的遗传分化分析
Table 4 Analysis of genetic differentiation among populations in *C. tortisepalum*

居群 Population	总基因多 样性 H_t	居群内基因 多样性 H_s	基因分化 系数 G_s	基因流 N_m
莲瓣原变种	0.2908	0.2228	0.2338	1.6384
标准差 SD	0.0278	0.0186		
莲瓣兰	0.3128	0.2098	0.3292	1.0186
标准差 SD	0.0237	0.0142		

H_t =Total gene diversity; H_s =Gene diversity within population;
 G_s =The coefficient of gene differentiation;SD=Standard deviation;
 N_m =Estimate of gene flow from G_s or G_{cs}

表 5 莲瓣兰各居群的遗传一致度以及遗传距离
Table 5 Nei's genetic identity and genetic distance among populations of *C. tortisepalum*

	EA	EB	EC	ED	EE
EA	* * * *	0.9228	0.8489	0.8530	0.7626
EB	0.0803	* * * *	0.8790	0.8907	0.7880
EC	0.1639	0.1290	* * * *	0.9074	0.7522
ED	0.1590	0.1158	0.0972	* * * *	0.7822
EE	0.2710	0.2383	0.2847	0.2457	* * * *

Nei's genetic identity(遗传一致度)(above line) and genetic distance(遗传距离)(below line)

根据基因分化系数 G_s 计算出每代居群的移居者数量 N_m 。在物种水平, N_m 为 1.0186;原变种水平上, N_m 为 1.6384。

2.3 遗传关系

表 5 列出 5 居群的遗传一致度(Nei's genetic identity)以及遗传距离(genetic distance)。大理云龙居群(EA)与保山施甸居群(EB)之间遗传距离最小为 0.0803,香格里拉维西居群(EC)与春剑的贵州

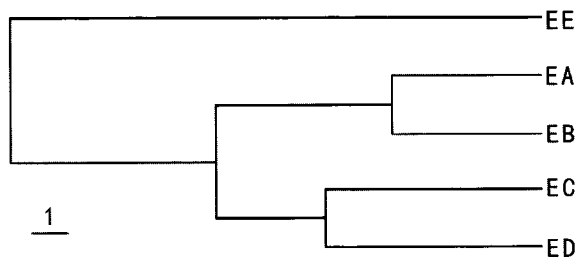


图 2 莲瓣兰 5 居群 UPGMA 聚类图
Fig. 2 Dendrogram of 5 populations of *C. tortisepalum* by UPGMA

兴隆居群(EE)之间遗传距离最大为 0.2847。各居群的 UPGMA 聚类分析见图 2。

3 结论与讨论

3.1 莲瓣兰居群遗传结构及进化因素的探讨

与其它具有相似生活史特征(多年生草本、以动物为媒介的杂交、地区分布)的物种相比($PPB=49\%$, $A=1.89$, $H=0.131$)(Hamrick 等,1989),莲瓣兰居群水平($PPB=58.55\%$, $A=1.5855$, $A_e=1.3595$, $H=0.2098$, $I=0.3131$)和物种水平($PPB=93.64\%$, $A=1.9364$, $A_e=1.5262$, $H=0.3129$, $I=0.4732$)均具有较高的遗传多样性,莲瓣兰在长期的进化过程中形成了丰富的遗传多样性和进化潜力。

物种的繁育系统、遗传变异水平、进化历史、自然选择和基因流的强弱等进化因素共同作用,使物种形成了不同的居群遗传结构(Hamrick,1989)。交配系统是影响居群遗传结构最关键的生物学因素之一,因为交配系统不仅决定居群未来世代的基因型频率,而且还影响到植物居群的有效大小和基因流等其它进化因素(Barrett 等,1990)。莲瓣兰是多年生草本植物,在野外可以通过有性或无性方式进

行繁殖。有性繁殖依靠昆虫传粉,开花多而结果少。授粉试验表明:莲瓣兰自体授精结实率为1%,人工授粉的自交结实率为96%,人工杂交结实率为90%(贾琳等,2006)。莲瓣兰虽然自交亲和,但要依靠传粉媒介,其主要的交配方式是杂交。

在植物中,花粉的扩散和种子的传播是基因流的两种最主要的形式(Hamrick,1987)。莲瓣兰花粉的传播距离取决于传粉媒介,而昆虫的飞行距离是有限的。但莲瓣兰微小的种子却可以借助风力远距离散布,是莲瓣兰基因流的主要形式。莲瓣兰物种的遗传分化系数 G_s 为 0.3292,高于以动物为媒介的杂交物种($G_s=0.197$)和依靠风力散布种子的物种($G_s=0.14$)(Hamrick等,1989),也高于其近缘种春兰($G_s=0.098$)(Chung等,1999)。这表明虽然莲瓣兰的种子可以借助风力散布,但是居群间的基因流动仍然受到一定因素限制。遗传漂变、奠基者效应、地理隔离和选择压力都是导致居群遗传分化原因。通过 G_s 估算出莲瓣兰原变种水平上各居群间基因流 $N_m=1.6384$,居群的每一代个体中,有1.6个遗传个体,略高于其它以动物为媒介的杂交物种($N_m=1.15$)(Hamrick,1987)。 $N_m>1$,基因流可以阻止遗传漂变导致的中性等位基因的固定(Raijmann等,1994)。在这些居群中,遗传漂变不是影响居群结构的主要因素(Slatkin,1987)。

然而,兰花种子典型的散布距离为5~10 km(Rasmussen,1995),而莲瓣兰分布的三江并流地区又多高山河谷,山脊的阻挡和隔离可能成为限制基因流的因素之一。另外,即使居群之间存在不断的基因流,但强有力的选择也能使彼此相距很近的居群保持遗传上的差别(Bradshaw,1984)。莲瓣兰的保山施甸居群的平均海拔为1500 m,气候温暖湿润;而维西居群的平均海拔为2500 m,气候寒冷。这种较大的环境差异产生的选择压力也可能成为导致居群分化的因素。

综上所述,杂交和种子随风散布使得莲瓣兰居群间产生基因流动,但是横断山区高山河谷的阻挡和地理隔离限制了基因流动,而不同的生态环境则选择了不同的基因型和表型,并固定了这种差异。因此,杂交、种子散布机制和地理隔离、选择压力互为制约因素。一方面,杂交和种子散布机制倾向于不断消除居群间的遗传差异,避免居群间出现分化;另一方面,地理隔离和选择压力则导致居群的分化。而正是这两方面因素的制衡作用共同构建了莲瓣兰

居群的遗传变异式样。

需要注意的是,多年生植物,由于较长的世代和不同世代的重叠,其遗传多样性的丧失速度将会减缓。而一年生植物则会对影响遗传多样性的因素做出更快的回应(Ouborg等,1999)。因此存在这样的可能性:由于这种多年生的习性,莲瓣兰从遭受严重破坏至本研究取样期间,经历的世代很少,以至于现阶段并没有检测到遗传多样性的降低。将来,莲瓣兰的基因库可能会对这些过度采集和生境破坏事件做出延迟的回应。

3.2 保护策略

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,全球范围内的生境退化和丧失加上人为破坏是导致大量兰花变为稀有、濒危以致灭绝的主要原因(IUCN/SSC Orchid Specialist Group,1996)。而对于莲瓣兰,最主要的原因就是过度采集。虽然莲瓣兰在物种和居群水平上都具有较高的遗传多样性,但过度采集和生境破坏使得莲瓣兰居群的个体数量急剧减少,这可能导致遗传衰退,从而影响物种的长期生存和适应能力。对一个遗传多样性主要存在于居群之内的物种和一个遗传多样性主要分布于居群间的物种应采用完全不同的取样策略和保护方法(邹喻苹等,2001)。根据取样的原则 $0.99=1-(G_{ST})n$ (n 为取样居群数)(Ceska等,1997),为维持莲瓣兰物种99%的遗传多样性,则至少要选取3个居群进行保护。莲瓣兰在云南主要分布在三江并流区域,而该地区现已被列为世界自然遗产。将莲瓣兰的保护和三江并流地区多个自然保护区的保护工作相结合,将莲瓣兰列为该保护区的重点保护植物。这样既保护了莲瓣兰的生境,也防止了滥采滥挖。

莲瓣兰是云南兰花产业中的重要种类之一。许多花卉公司和个人对莲瓣兰进行大量收购和种植。这被认为是一种变相的迁地保护。但是,在这种人工栽培条件下,莲瓣兰只有一种繁殖方式,即分株繁殖。而长期的无性繁殖,没有居群内和居群间的基因流动,将会导致物种多样性减少,环境适应能力降低,进化潜能衰退和抵抗病虫害的能力下降。因此这并不是一种真正意义上的迁地保护。此外,建立莲瓣兰的人工繁殖体系,通过杂交选育特异品种,通过组织培养大量优良品种,是对其保护策略的重要补充。但是莲瓣兰生长周期长,种子萌发率很低,仍

是该技术发展的主要限制因素。

参考文献:

- 刘仲健, 陈心启, 茹正忠, 等. 2006. 中国兰属植物[M]. 北京: 科学出版社: 206—208
- 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 2001. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社: 140—149
- 陈心启. 2011. 国兰及其品种全书[M]. 北京: 林业出版社: 173—203
- Barrett SCH, Eckert CG. 1990. Variation, Evolutionary Trends in Plants[M]. London: Academic Press: 229—254
- Bradshaw AD. 1984. Ecological Significance of Genetic Variation Between Population[M]//Dirzo R, Sarukhan J(eds). Perspectives on Plant Population Ecology. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA: 213—228
- Chung MY, Chung MG. 1999. Allozyme diversity and population structure in Korean populations of *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae)[J]. *J Plant Res*, **112**: 139—144
- Ceska JA, Affolter JM, Hamrick JL. 1997. Developing a sampling strategy for *Baptisia arachnifera* based on allozyme diversity[J]. *Conserv Biol*, **11**: 133—139
- Chen YM(陈于敏), Wang JJ(王建军). 2005. *Cymbidium lianpan* Tang et Wang, a rare resource of *Cymbidium* mainly distributed in West of Yunnan(滇西特有的珍稀兰属资源—莲瓣兰)[J]. *J Yunnan Agric Univ*(云南农业大学学报), **20**(5): 746—748
- Dolye JJ, Dolye JL. 1987. A Rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue[J]. *Phytochem Bull*, **19**: 11—15
- Desmarais EI, Laneluc J, Lagnel. 1998. Direct amplification of length polymorphism(DALP), or how to get and characterize new genetic markers in many species[J]. *Nucleic Acids Res*, **26**: 1458—1465
- Hamrick JL. 1987. Gene Flow, Distribution of Genetic Variation in Allozyme Frequencies in Plant Populations[M]//Urbanska K(ed). Differentiation Patterns in Higher Plants. New York: Academic Press: 288—287
- Hamrick JL, Godt MJW 1989. Allozyme Diversity in Plant Species [M]//Brown AHH, Kehler AI, Weir BS(eds). Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc. : 321—335
- Hamrick JL. 1989. Isozymes, Analysis of Genetic structure of plant populations[M]//Soltis D, Soltis P(eds). Isozymes in Plant Biology. Washington: Dioscorides Press: 110—113
- IUCN/SSC Orchid Specialist Group. 1996. Orchid Plan[R]. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge. ds-Status Survey and Conservation Act: 121—122
- Jia L(贾琳), Shi YD(史云东), Yu H(虞泓). 2006. Study of breeding of *Cymbidium tortiliseplum* (莲瓣兰繁育方式研究)[J]. *J Yuzi Teach Coll*(玉溪师范学院学报), **12**: 84—87
- Liu ZJ, Chen SC, Cribb PJ, et al. 2009. Flora of China(Orchidaceae)[M]. Beijing/St. Louis: Science Press/Missouri Bot. Gard. Press: 260—270
- Li HF(李海峰), Zhao ZL(赵志莲), Liu GM(刘光明), et al. 2009. Study on effects of different transplantation medium on test-tube plantlet of *Cymbidium tortiliseplum* (不同移栽基质对莲瓣兰试管苗影响的研究)[J]. *J Anhui Agri Sci*(安徽农业科学), **37**(21): 9950—9951
- Li HF(李海峰), Yang XB(杨兴彪), Cheng QQ(程清泉). 2012. Study on transplant of tissue culture test-tube plantlet of rare endangered plant *Cymbidium tortiliseplum* (珍稀濒危莲瓣兰组织培养试管苗移栽的研究)[J]. *Northern Hortic* (北方园艺), **5**: 96—98
- Ouborg NJY, Piquot JMV, Groenenda V. 1999. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants[J]. *J Ecol*, **87**: 551—568
- Pang HX(庞惠仙), Yang HM(杨红明), Ma J(马骏), et al. 2010. Seed germination characteristics of *Cymbidium goeringii*, *C. goeringii* var. *goeringii*, *C. tortiliseplum* and *C. goeringii* var. *longibracteatum* (春兰、豆瓣兰、莲瓣兰和春剑 4 种国兰种子萌发特性研究初报)[J]. *J West Chin Fore Sci*(西部林业科学), **29**(3): 56—60
- Rajimann LEL, Leeuwen NCV, Kersten R, et al. 1994. Genetic variation and outcrossing rate in relation to population size in *Gentiana pneumonanthe*[J]. *Conserv Biol*, **8**: 1014—1026
- Rasmussen HN. 1995. Terrestrial Orchids from Seed to Mycotrophic Plant[M]. Cambridge: Cambridge University Press
- Slatkin M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations[J]. *Science*, **236**: 787—792
- Wei RQ(维饶箐), Wang JL(王金亮), Guo SR(郭树荣). 2008. Study of habit variation of wild *Cymbidium tortiliseplum* (野生莲瓣兰生境变化研究初探)[J]. *Chin Wild Plant Res*(中国野生植物资源), **27**(4): 17—19

作者: [贾琳](#), [史云东](#), [虞泓](#), [骆扬](#), [李永谊](#), [JIA Lin](#), [SHI Yun-Dong](#), [YU Hong](#), [LUO Yang](#), [LI Yong-Yi](#)

作者单位: [贾琳, 史云东, JIA Lin, SHI Yun-Dong](#)(玉溪师范学院资源与环境学院, 云南玉溪, 653100), [虞泓, 骆扬, 李永谊, YU Hong, LUO Yang, LI Yong-Yi](#)(云南大学生命科学学院生态遗传学实验室, 昆明, 650091)

刊名: [广西植物](#) **ISTIC** **PKU**

英文刊名: [Guihaia](#)

年, 卷(期): 2012, 32(6)

被引用次数: 4次

参考文献(24条)

1. [刘仲健;陈心启;茹正忠](#) [中国兰属植物](#) 2006
2. [邹喻苹;葛颂;王晓东](#) [系统与进化植物学中的分子标记](#) 2001
3. [陈心启](#) [国兰及其品种全书](#) 2011
4. [Barrett SCH;Eckert CG](#) [Variation, Evolutionary Trends in Plants](#) 1990
5. [Bradshaw AD](#) [Ecological Significance of Genetic Variation Between Population](#) 1984
6. [Chung MY;Chung MG](#) [Allozyme diversity and population structure in Korean populations of Cymbidium goeringii \(Orchidaceae\)](#) 1999
7. [Ceska JA;Affolter JM;Hamrick JL](#) [Developing a sampling strategy for Baptisia arachnifera based on allozyme diversity](#) 1997
8. [陈于敏, 王建军](#) [滇西特有的珍稀兰属资源—莲瓣兰](#)[期刊论文]-[云南农业大学学报](#) 2005(5)
9. [Dolye JJ;Dolye JL A](#) [Rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue](#) 1987
10. [Desmarais EI;Laneluc J;Lagnel](#) [Direct amplification of length polymorphism\(DALP\), or how to get and characterize new genetic markers in many species](#) 1998
11. [Hamrick JL](#) [Gene Flow, Distribution of Genetic Variation in Allozyme Frequencies in Plant Populations](#) 1987
12. [Hamrick JL;Godt MJW](#) [Allozyme Diversity in Plant Species](#) 1989
13. [Hamrick JL](#) [Isozymes, Analysis of Genetic structure of plant populations](#) 1989
14. [IUCN/SSC Orchid Specialist Group](#) [Orchiion Plan](#) 1996
15. [贾琳, 史云东, 虞泓, 周元清](#) [莲瓣兰繁育方式研究](#)[期刊论文]-[玉溪师范学院学报](#) 2006(12)
16. [Liu ZJ;Chen SC;Cribb PJ](#) [Flora of China\(Orchidaceae\)](#) 2009
17. [李海峰, 赵志莲, 刘光明](#) [不同移栽基质对莲瓣兰试管苗影响的研究](#)[期刊论文]-[安徽农业科学](#) 2009(21)
18. [李海峰, 杨兴彪, 程清泉](#) [珍稀濒危莲瓣兰组织培养试管苗移栽的研究](#)[期刊论文]-[北方园艺](#) 2012(5)
19. [Ouborg NJY;Piquot JMV;Groenenda V](#) [Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants](#) 1999
20. [庞惠仙, 杨红明, 马骏, 刘英杰, 沈应柏](#) [春兰、豆瓣兰、莲瓣兰和春剑4种国兰种子萌发特性研究初报](#)[期刊论文]-[西部林业科学](#) 2010(3)
21. [Raijmann LEL;Leeuwen NCV;Kersten R](#) [Genetic variation and outcrossing rate in relation to population size in Gentiana pneurnonanthe](#) 1994
22. [Rasmussen HN](#) [Terrestrial Orchids from Seed to Mycotrophic Plant](#) 1995
23. [Slatkin M](#) [Gene flow and the geographic structure of natural populations](#) 1987
24. [饶箐, 王金亮, 郭树荣](#) [维西野生莲瓣兰生境变化研究初探](#)[期刊论文]-[中国野生植物资源](#) 2008(4)

引证文献(4条)

1. [黄永艺, 唐敏, 叶广, 张青华](#) [花期调控技术在莲瓣兰产业化中的应用](#)[期刊论文]-[北方园艺](#) 2015(08)
2. [黄永艺, 唐敏, 张志荣, 李枝林, 毕玉芬](#) [云南莲瓣兰主栽品种SSR指纹图谱的构建和遗传差异分析](#)[期刊论文]-[热带亚热带植物学](#)

报 2015 (03)

3. 黄永艺, 唐敏, 张志荣, 李枝林, 毕玉芬 云南莲瓣兰主栽品种SSR指纹图谱的构建和遗传差异分析 [期刊论文] - 热带亚热带植物学

报 2015 (03)

4. 魏霜, 袁俊杰, 程文杰, 林利平, 李小健, 鄯杰平, 黄锦炎, 刘碧琳, 刘晓莹 兰花的分子标记研究进展 [期刊论文] - 检验检疫学刊

2014 (02)

引用本文格式: 贾琳. 史云东. 虞泓. 骆扬. 李永谊. JIA Lin. SHI Yun-Dong. YU Hong. LUO Yang. LI Yong-Yi 莲瓣兰DALP遗传多样性研究 [期刊论文] - 广西植物 2012 (6)