

网络出版时间:2014-07-30 16:13

DOI: 10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.09.012

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.09.012.html>

长白山区不同花色杓兰属植物 遗传多样性的 ISSR 分析

孙叶迎^a, 陈丽飞^b, 刘树英^a, 刘昕^a, 曹岩^a, 刘洪章^a

(吉林农业大学 a 生命科学学院, b 园艺学院, 吉林 长春 130118)

【摘要】【目的】分析长白山地区不同花色杓兰属植物的遗传多样性。【方法】采用 ISSR 分子标记技术,对长白山区 8 个花色 11 个杓兰属植物个体的遗传多样性进行分析,用 Popgen32 软件分析 Nei's 基因多样性和 Shannon 信息指数,采用 UPGMA 法进行聚类分析。【结果】筛选出 11 条 ISSR 引物,共扩增出 94 条条带,其中多态性条带 86 条,多态基因位点比例为 91.5%,平均有效等位基因数为 1.418 2,平均 Nei's 基因多样性为 0.250 0,平均 Shannon 信息指数为 0.369 7,样品间的遗传距离为 0.010 5~0.969 7。【结论】长白山区杓兰属植物具有较丰富的遗传多样性,聚类结果与形态学分类结果基本一致。

【关键词】 长白山区;杓兰属;简单重复序列区间;遗传多样性

【中图分类号】 S682.31

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2014)09-0137-07

ISSR analysis for genetic diversity of *Cypripedium* in Changbai Mountain area

SUN Ye-ying^a, CHEN Li-fei^b, LIU Shu-ying^a,

LIU Xin^a, CAO Yan^a, LIU Hong-zhang^a

(a College of Life Science, b College of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China)

Abstract: 【Objective】The objective of this article was to analyze the genetic diversity of *Cypripedium* plants with different colors. 【Method】The genetic diversity of 11 *Cypripedium* individuals belonging to 8 color types in Changbai Mountain area was analyzed using ISSR marker. Nei's genetic diversity index and Shannon information index were calculated using Popgen 32 software. Cluster analysis was also conducted using UPGMA. 【Result】Eleven primers were selected and applied for PCR amplification. A total of 94 bands were produced and 86 of them were polymorphic with the PPB of 91.5%. The average effective number of alleles, Nei's gene diversity and Shannon information index were 1.418 2, 0.250 0, and 0.369 7, respectively. The distance between 11 individuals was 0.010 5—0.969 7. 【Conclusion】*Cypripedium* plants in Changbai Mountain area had comparatively great genetic diversity. Clustering analysis results were generally consistent with morphological taxonomy results.

Key words: Changbai Mountain; *Cypripedium*; ISSR; genetic diversity

杓兰属(*Cypripedium*)是兰科的一个属,多年生草本植物^[1]。杓兰属植物最显著的特征是其花唇

〔收稿日期〕 2013-06-28

〔基金项目〕 农业部野生植物资源调查项目(2012Z32);吉林省科技厅项目(20100254)

〔作者简介〕 孙叶迎(1988—),女,吉林舒兰人,在读硕士,主要从事分子生物学研究。E-mail:sunyeying3928@163.com

〔通信作者〕 刘洪章(1957—),男,吉林长春人,教授,博士生导师,主要从事果树种质资源学、经济作物资源与生物技术研究。E-mail:lhz999@126.com

瓣特化成兜状,因此,有人称之为“大口袋花”。杓兰属植物低垂的花瓣酷似拖鞋,生活在终年云雾缭绕、遍地野花的高山上,也被称为“仙女的拖鞋”,西方人美其名曰“lady's slipper”,即拖鞋兰^[2]。此属植物花形奇特,颜色艳丽,株型优雅多姿,观赏价值极高,深受园艺学家们的喜爱,并将收集杓兰属植物作为目标^[3]。杓兰属的地理分布式样较杓兰亚科中其他 4 个属复杂^[1,4]。50 余种杓兰属植物广泛分布在北半球温带和亚热带山地,东亚和北美为主要的分布中心^[1,5]。我国杓兰属植物种类繁多,资源丰富,被称作杓兰资源多样性中心^[6-7]。据《中国植物志》记载,中国有杓兰属植物 32 种及 1 个变种,近年来报道或正式命名的新品种有 4 个^[8-11],共 36 种,1 个变种,其中 21 种及 1 变种是我国的特有种。据《东北植物检索表》记载,东北地区分布的杓兰属植物有大花杓兰、斑花杓兰、杓兰和黄铃杓兰 4 个种及大白花杓兰 1 个变型^[12]。长白山地区除了上述杓兰属植物外还有东北杓兰、山西杓兰,但在长白山地区,甚至东北地区均未见黄铃杓兰的模式标本植物^[13]。目前,杓兰属植物由于遭破坏性采挖加之其繁育困难,造成其种群数量下降,已处于严重濒危状态^[14],被列入《野生动植物濒危物种国际贸易公约》的保护范围^[1,15-16]。种群内遗传多样性的丢失会导致物种对环境变化的适应性降低,增加了灭绝的危险,所以,对于幸存的濒危物种而言,研究其遗传多样性,对濒危物种的管理保护及遗传多样性的评定至关重要^[3,17-18]。

表 1 供试杓兰属植物材料的概况

Table 1 General information of tested *Cypripedium* plants

编号 Number	种名 Species	萼片颜色 Sepals color	编号 Number	种名 Species	萼片颜色 Sepals color
B ₁	大花杓兰 <i>Cypripedium macranthum</i> Sw.	浅粉红色 Baby pink	B ₇	杓兰 <i>Cypripedium calceolus</i> L.	栗色 Maroon
B ₂	大白花杓兰 <i>Cypripedium macranthum</i> Sw.	白色 White	B ₈	杓兰变型 Forma of <i>Cypripedium</i>	紫红色 Purple
B ₃	大花杓兰 <i>Cypripedium macranthum</i> Sw.	深粉红色 Radiance	B ₉	山西杓兰 <i>Cypripedium shanxiense</i> . S. C. Chen	褐色 Brown
B ₄	东北杓兰 <i>Cypripedium</i> × <i>ventricosum</i> Sw.	粉白色 Pink-white	B ₁₀	东北杓兰 <i>Cypripedium</i> × <i>ventricosum</i> Sw.	紫红色 Purple
B ₅	杓兰 <i>Cypripedium calceolus</i> L.	紫红色 Purple	B ₁₁	山西杓兰 <i>Cypripedium shanxiense</i> . S. C. Chen	褐色 Brown
B ₆	大花杓兰 <i>Cypripedium macranthum</i> Sw.	粉红色 Pink			

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取及质量检测 采用 CTAB 法^[20-21]提取 4 种植物 11 个个体的基因组 DNA,并用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 质量,凝胶成像系统(UVP GelDoc-ItTM 型)照相,保存。再用 Bi-Photometre (EPENDOR 公司)

ISSR(Inter simple sequence repeats)又称简单重复序列区间,是由 Zietkiewicz 等^[19]创建的新型分子标记技术。它是在 SSR 分子标记的基础上建立起来的,与 SSR 分子标记相比无需知道 DNA 序列的信息;重复性好,克服了 RAPD 分子标记不稳定的缺点。在真核生物中,微卫星 DNA 分布广泛,且变异速度快,利用 ISSR 引物对微卫星 DNA 序列进行扩增,能够快速检测出差异位点,因此 ISSR 标记在植物遗传育种研究中得到广泛应用。但在杓兰属植物的研究中尚未见报道。

本试验采用 ISSR 分子标记技术对长白山区不同花色的杓兰属植物进行研究探讨,对其遗传多样性以及亲缘关系进行分析,全面掌握长白山区现有杓兰属种质资源的遗传多样性,减少育种工作中亲本选择的盲目性,提高育种效率,以期更好地对濒危物种进行保护。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料采自于长白山区,分别为大花杓兰(*Cypripedium macranthum* Sw.)、东北杓兰(*Cypripedium* × *ventricosum* Sw.)、杓兰(*Cypripedium calceolus* L.)、山西杓兰(*Cypripedium shanxiense* S. C. Chen)4 个种,以萼片颜色区分,共 8 个颜色 11 个个体,具体如表 1 所示。于 2012-06 采集各种植物新鲜叶片置于冰盒中带回,于 -80 °C 低温冰箱保存。

核酸检测仪测定 OD_{260}/OD_{280} 及 OD_{260}/OD_{230} ,检测 DNA 样品的纯度与浓度。

1.2.2 ISSR-PCR 扩增与电泳 试验用哥伦比亚大学报道的植物通用的 ISSR 引物和相关文献报道的引物^[22-23],均由北京三博远志生物技术有限责任公司合成,共 37 个。从中筛选扩增条带清晰、多态

性高、重现性好的引物,参考不同引物的退火温度,采用梯度 PCR 确定每个引物的退火温度。扩增反应在 PCR(德国 Eppendorf Mastercycler personal) 扩增仪上进行。ISSR 反应体系 25 μL : 1.5 μL DNA 模板(20 ng/ μL), 1.5 μL 引物(10 $\mu\text{mol/L}$), 2 μL dNTP (2.5 mmol/L, 宝生物工程(大连)有限公司), 2.5 μL 10 \times PCR buffer, 0.15 μL Taq DNA 聚合酶(5 U/ μL , 宝生物工程(大连)有限公司); 17.35 μL ddH₂O。PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min; 55~57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 15 min 终止反应。所得产物用 60 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳(1 \times TBE)检测, 560 V 电压电泳 1 h, 再用体积分数 10% 醋酸溶液固定 30 min, 银染 10 min, 强碱显影直至条带清晰, 照相, 观察扩增结果。所有试验均重复 2 次。

1.3 数据统计与分析

用聚丙烯酰胺凝胶对扩增产物进行分离后, 对电泳图进行人工读带。其中每条带视为 1 个分子标记^[21], 即 1 个引物的结合位点, 以 250 bp DNA lad-

der 为标准, 对重复性好的条带进行统计, 无论强弱有则记为 1, 无则记为 0, 模糊不清的条带也记为 0。将数据输入数据矩阵, 使用 NTSYS-pc 软件对不同花色杓兰属植物之间的相似系数进行分析, 采用 UPGMA 法分析样品间的遗传关系, 进行聚类分析。用 Popgene32 软件^[24] 分析观测的等位基因数(na)、有效等位基因数(ne)、Nei's 基因多样性(He)、Shannon 信息指数(Ho)和遗传距离。

2 结果与分析

2.1 ISSR-PCR 引物筛选及扩增

随机选取 3 份供试材料作为模板进行扩增, 结果显示, 在 37 个引物中筛选出 14 个条带清晰、具有差异的引物; 再用这 14 个引物分别对 11 份材料进行复筛, 最终确定扩增效果较好的 11 个引物(表 2)。引物 UBC835 对 11 个个体的 DNA 扩增结果见图 1。经统计 11 个引物共扩增出 94 条条带, 平均每个引物获得 8.5 条条带, 其中多态性条带为 86 条, 多态基因位点比例为 91.5%(表 2)。

表 2 对 11 份杓兰属植物材料扩增效果好的 ISSR 引物序列及多态性分析

Table 2 Sequences of ISSR primers and polymorphic analysis

引物 Primer	序列 Sequence	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Annealing temp.	扩增条带数 Nb	多态条带数 Npb	多态基因位点比例 % Ratio
UBC811	(GA) ₈ C	56	4	3	75.0
UBC826	(AC) ₈ C	57	7	6	85.7
UBC827	(AC) ₈ G	58	8	8	100.0
UBC834	(AG) ₈ YT	55	15	15	100.0
UBC835	(AG) ₈ YC	57	13	11	84.6
UBC836	(AG) ₈ YA	57	5	4	80.0
UBC840	(GA) ₈ YT	57	9	9	100.0
UBC841	(GA) ₈ YC	55	8	8	100.0
UBC844	(CT) ₈ RG	56	9	9	100.0
UBC855	(AC) ₈ YT	57	9	8	88.9
UBC856	(AC) ₈ YA	57	7	5	71.4
总计 Total	—	—	94	86	91.5

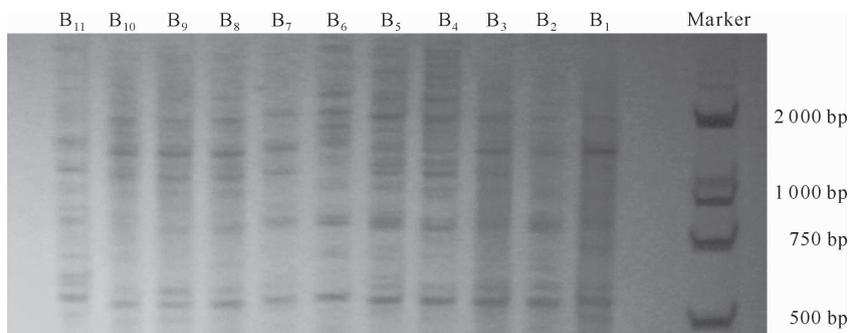


图 1 引物 UBC835 对 11 份杓兰属植物材料的 ISSR-PCR 扩增结果

Fig. 1 ISSR-PCR amplification of 11 *Cypripedium* plants by primer UBC835

2.2 杓兰属植物的 ISSR 特异性标记

图 2、3 分别为引物 UBC844、UBC856 对 11 份杓兰属植物材料基因组 DNA 的扩增结果。本研究中,11 条引物共产生了 9 条特异性条带,具有特

性条带的植物样品见表 3。由表 3 可以看出,深粉色大花杓兰 B₃ 和栗色的杓兰 B₇ 特异性标记最多,各有 3 条;紫红色杓兰 B₅、粉红色大花杓兰 B₆、紫红色东北杓兰 B₁₀ 各有 1 条特异性条带。

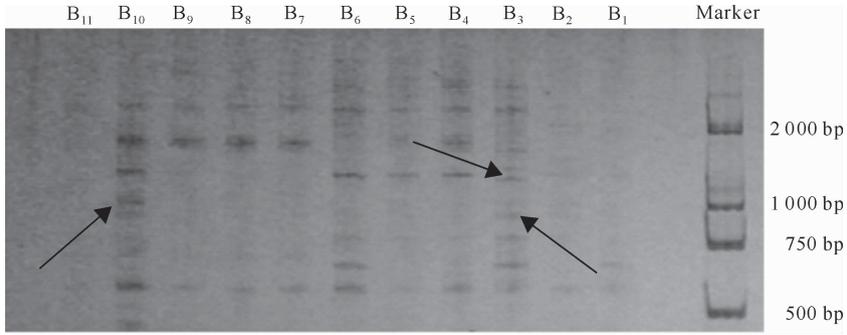


图 2 引物 UBC844 对 11 份杓兰属植物材料的 ISSR-PCR 扩增结果
箭头所示为特异性条带,下图同

Fig. 2 ISSR-PCR amplification of 11 *Cypripedium* plants by primer UBC844
Arrows indicated the specific bands,the same below

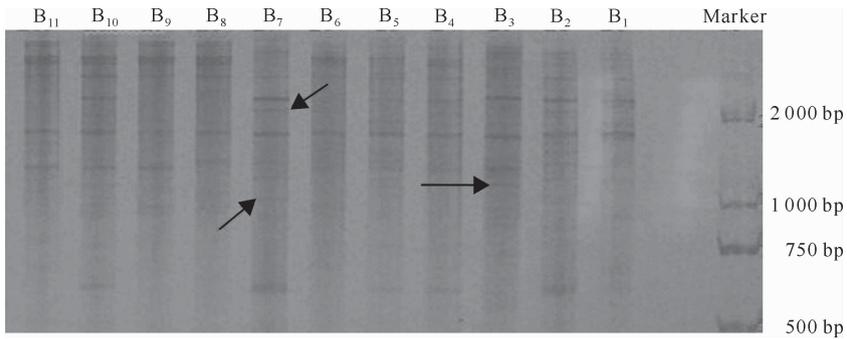


图 3 引物 UBC856 对 11 份杓兰属植物材料的 ISSR-PCR 扩增结果

Fig. 3 ISSR-PCR amplification of 11 *Cypripedium* plants by primer UBC856

表 3 杓兰属植物的 ISSR 特异性标记样品

Table 3 Specific markers for *Cypripedium* samples

样品编号 Sample code	种名 Species	萼片颜色 Sepals color	特异性标记 Specific marker
B ₃	大花杓兰 <i>Cypripedium macranthum</i> Sw.	深粉红色 Radiance	UBC844 15 000 bp,900 bp;UBC856 1 200 bp
B ₅	杓兰 <i>Cypripedium calceolus</i> L.	紫红色 Purple	UBC840 2 000 bp
B ₆	大花杓兰 <i>Cypripedium acranthum</i> Sw.	粉红色 Pink	UBC855 2 000 bp
B ₇	杓兰 <i>Cypripedium calceolus</i> L.	栗色 Maroon	UBC834 500 bp;UBC856 2 000 bp,1 000 bp
B ₁₀	东北杓兰 <i>Cypripedium</i> × <i>ventricosum</i> Sw.	紫红色 Purple	UBC844 1 000 bp

2.3 杓兰属植物的遗传多样性

表 4 显示,11 份材料的平均有效等位基因数为 1.418 2,平均 Nei's 基因多样性为 0.250 0,平均 Shannon 信息指数为 0.369 7。其中 Nei's 基因多

样性最大值为 0.500 0,最小值为 0.000 0;Shannon 信息指数最大值为 0.693 1,最小值为 0.000 0,可见,各位点遗传多样性程度存在较大差别。

表 4 不同花色杓兰属植物材料的遗传多样性

Table 4 Genetic diversity of *Cypripedium* plants with different colors

样品 Sample code	样本大小 Sample size	观测的等位基因数 <i>na</i>	有效等位基因数 <i>ne</i>	Nei's 基因多样性 <i>He</i>	Shannon 信息指数 <i>Ho</i>
B ₁	4	1.000 0	1.000 0	0.000 0	0.000 0
B ₂	4	2.000 0	1.600 0	0.375 0	0.562 3
B ₃	4	1.000 0	1.000 0	0.000 0	0.000 0

续表 4 Continued table 4

样品 Sample code	样本大小 Sample size	观测的等位基因数 <i>na</i>	有效等位基因数 <i>ne</i>	Nei's 基因多样性 <i>He</i>	Shannon 信息指数 <i>Ho</i>
B ₁	4	2.000 0	1.600 0	0.375 0	0.562 3
B ₅	4	2.000 0	1.600 0	0.375 0	0.562 3
B ₆	4	1.000 0	1.000 0	0.000 0	0.000 0
B ₇	4	1.000 0	1.000 0	0.000 0	0.000 0
B ₈	4	2.000 0	1.600 0	0.375 0	0.562 3
B ₉	4	2.000 0	1.600 0	0.375 0	0.562 3
B ₁₀	4	2.000 0	2.000 0	0.500 0	0.693 1
B ₁₁	4	2.000 0	1.600 0	0.375 0	0.562 3
平均值 Mean	4	1.636 4	1.418 2	0.250 0	0.369 7

2.4 杓兰属植物的遗传距离和相似系数

11 份材料的遗传距离和遗传相似系数见表 5。表 5 显示,样本间的遗传距离为 0.010 5~0.969 7,其中 B₄ 大花杓兰(浅粉红色)与 B₆ 东北杓兰(粉白

色)之间的遗传距离最小,为 0.010 5;B₄ 大花杓兰(浅粉红色)与 B₅ 杓兰(紫红色)及 B₉ 山西杓兰(褐色)与 B₁₀ 东北杓兰(紫红色)的遗传距离均最大,为 0.969 7。

表 5 不同花色杓兰属植物的遗传距离(对角线以下)和相似系数(对角线以上)

Table 5 Nei's genetic distance (above diagonal) and identity (below diagonal) of *Cypripedium* plants with different colors

编号 Code	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅	B ₆	B ₇	B ₈	B ₉	B ₁₀	B ₁₁
B ₁	* * * *	0.840 6	0.977 3	0.715 2	0.897 9	0.447 7	0.841 7	0.269 1	0.758 9	0.628 6	0.422 4
B ₂	0.159 4	* * * *	0.633 4	0.664 7	0.664 7	0.341 6	0.210 2	0.438 2	0.823 5	0.604 4	0.686 3
B ₃	0.022 7	0.366 6	* * * *	0.491 9	0.253 7	0.741 9	0.742 3	0.232 7	0.292 1	0.893 9	0.712 7
B ₄	0.284 7	0.335 3	0.508 6	* * * *	0.030 3	0.989 6	0.491 0	0.696 6	0.961 9	0.441 2	0.202 1
B ₅	0.102 1	0.335 3	0.746 3	0.969 7	* * * *	0.048 7	0.663 6	0.752 2	0.048 7	0.637 4	0.483 3
B ₆	0.552 3	0.658 4	0.258 1	0.010 5	0.951 3	* * * *	0.125 5	0.728 7	0.731 3	0.607 3	0.884 0
B ₇	0.158 3	0.789 8	0.257 7	0.529 1	0.336 4	0.874 7	* * * *	0.211 8	0.339 8	0.814 6	0.365 5
B ₈	0.730 9	0.562 0	0.767 3	0.303 4	0.247 8	0.271 3	0.789 8	* * * *	0.524 8	0.705 6	0.434 6
B ₉	0.241 1	0.176 4	0.707 9	0.038 1	0.951 3	0.268 7	0.660 2	0.475 2	* * * *	0.030 1	0.922 4
B ₁₀	0.371 4	0.395 9	0.106 1	0.558 8	0.362 6	0.392 7	0.185 4	0.294 4	0.969 7	* * * *	0.785 1
B ₁₁	0.577 6	0.313 7	0.287 3	0.797 9	0.516 7	0.116 0	0.634 5	0.565 4	0.077 6	0.215 1	* * * *

2.5 杓兰属植物的聚类分析

图 5 为 8 个不同花色 11 个杓兰属植物个体的 ISSR 聚类图。在相似系数为 0.62 时,将 11 个材料分为 2 类,4 种颜色的大花杓兰分为一类,另一类为 2 种花色的杓兰、东北杓兰、山西杓兰以及紫红色杓

兰变型。相似系数为 0.66 时,将第 1 类中的粉红色大花杓兰单分为一组;第 2 类中分为 2 组:2 种花色的杓兰与 2 种花色的东北杓兰分为一组,2 种花色山西杓兰与杓兰变型分为一组。

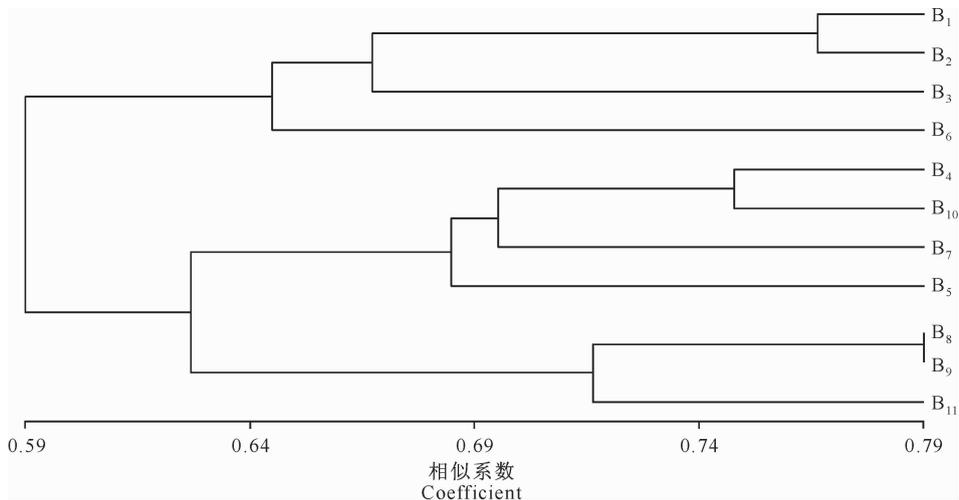


图 4 11 个杓兰属植物的聚类分析结果

Fig. 4 UPGMA dendrogram of 11 *Cypripedium* plants

3 讨论

3.1 杓兰属植物的遗传多样性

本研究结果表明,长白山区杓兰属植物的多态基因位点比例为 91.5%,平均 Nei's 基因多样性 (H_e) 为 0.250 0,平均 Shannon 信息指数 (H_o) 为 0.369 7,表现出较高的遗传多样性。Takeshi 等^[3] 对日本礼文岛濒危大花杓兰的遗传多样性研究结果表明,礼文岛的大花杓兰具有较高的遗传多样性,多态基因位点比例为 62%,观测的等位基因数为 1.85,有效等位基因数为 1.28,Nei's 基因多样性为 0.187,Shannon 信息指数为 0.163,较长白山区杓兰属植物遗传多样性低;Brzosko 等^[25] 研究表明,*C. calceolus* 的遗传多样性(多态基因位点比例为 46%,观测的等位基因数为 1.73,Nei's 基因多样性为 0.156,Shannon 信息指数为 0.184) 也比长白山区杓兰属植物低。而蔡凝枫等^[26] 采用 RAPD 标记对云南中甸黄花杓兰的遗传多样性进行研究,发现其多态基因位点比例为 82.69%,Nei's 基因多样性为 0.288 4,Shannon 信息指数为 0.431 2;Michael 等^[27] 发现,欧洲西北部杓兰的多态基因位点比例为 82.5%,观测的等位基因数为 1.278,Nei's 基因多样性为 0.40~0.53。可见以上地区杓兰属植物均较长白山区杓兰属植物的遗传多样性高。推断野生杓兰属资源遭到破坏的主要原因是人类的滥采滥挖,对其进行保护可从以下 2 点入手:1) 建立自然保护区,加强对其生境的保护,禁止滥采滥挖,尤其是商业性质的采集;2) 生境破坏严重的地区可以进行迁地保护。

3.2 杓兰属植物的聚类分析

杓兰属植物隶属于兰科杓兰属,与其他兰科植物一样,都是单子叶植物,杂交范围宽,种间甚至属间都能杂交。兰科植物多适应虫媒传粉,花部特征都表现出高度适应和特化,在自然杂交中变异性大,种间种类很多,种的界限不清楚,一般多依照形态学分类。本研究采用 ISSR 分子标记方法,对长白山区 8 种不同花色 11 个杓兰属植物个体进行了分类,结果显示,分子标记的分类结果与形态学的分类结果存在一定程度的一致性,大白花杓兰 B_2 是大花杓兰的一个变型,其花唇瓣与萼片颜色都为纯白色。由聚类结果可知,大白花杓兰与浅粉红色的大花杓兰 B_1 关系更近,在聚类图上处于同一分支,这与形态学分类结果一致;而东北杓兰是杓兰与大花杓兰的天然杂交种,花型在形态上更接近于大花杓兰,但

却与杓兰聚为一类,由此可见,东北杓兰与杓兰的关系更为密切。杓兰变型 (B_8) 植物中,其每株植株上具有 2 朵花,萼片颜色为紫红色,花唇瓣颜色为黄色,具有褐色斑点,颜色与杓兰相似;此外,其上面花朵的下萼片浅裂,下面花朵的下萼片深裂,与山西杓兰相似,可见 B_8 是介于杓兰与山西杓兰之间的一个变型,但在有关的文献中并无记载,是一个新类型,本研究将其暂定为杓兰变型,聚类结果显示其与山西杓兰聚为一类,可见其与山西杓兰的亲缘关系更近一些,是山西杓兰的一个变型。

[参考文献]

- [1] Cribb P. The genus *Cypripedium* [M]. Portland: Time Press, 1997: 126.
- [2] 解玮佳,李兆光,李燕,等. 三江并流区域野生杓兰属植物资源初报 [J]. 中国野生植物资源, 2005, 4(2): 28-30.
Xie W J, Li Z G, Li Y, et al. A preliminary report on the resources of wild genus *Cypripedium* in the three parallel rivers region [J]. Chinese Wild Plant Resources, 2005, 4(2): 28-30. (in Chinese)
- [3] Takeshi Izawa, Takayuki Kawahara, Hideki Takahashi. Genetic diversity of an endangered plant, *Cypripedium macranthos* var. *rebenense* (Orchidaceae): Background genetic research for future conservation [J]. Conserv Genet, 2007, 8: 1369-1376.
- [4] Van der Pijl L, Donson C H. Orchid flowers: Their pollination and evolution [M]. Coral Gables: Miami FL University of Miami Press, 1966.
- [5] Averyanov L V. The genus *Cypripedium* (Orchidaceae) in Russia [J]. Lindleyana, 2000, 15: 197-221.
- [6] 张佐双. 植物园研究 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2006.
Zhang Z S. Botanical studies [M]. Beijing: China Forestry Publishing, 2006. (in Chinese)
- [7] Cribb P, Sandison M S. A preliminary assessment of the conservation status of *Cypripeditan* species in the wild [J]. Botanical Journal of the Linnean Society, 1998, 126: 183-190.
- [8] 陈心启, 邹家林. 云南杓兰属一新种 [J]. 植物分类学报, 1991, 29(1): 86-88.
Chen X Q, Wu J L. A new species of *Cypripedium* from Yunnan [J]. Journal of Systematics and Evolution, 1991, 29(1): 86-88. (in Chinese)
- [9] 陈心启, 刘仲健. 中国兰科杓兰属一新种及一新变种 [J]. 云南植物研究, 2004, 26(4): 382-384.
Chen X Q, Liu Z J. A new species and new variety of *Cypripedium* (Orchidaceae) [J]. Acta Botanica Yunnanica, 2004, 26(4): 382-384. (in Chinese)
- [10] 陈心启, 刘仲健. 杓兰属(兰科)中一个国产种类的新等级 [J]. 武汉植物学研究, 2005, 23(3): 233-234.
Chen X Q, Liu Z J. New status for a Chinese Taxon of *Cypripedium* (Orchidaceae) [J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 2005, 23(3): 233-234. (in Chinese)

- [11] 李纪红. 杓兰属和杓兰亚科生物地理学研究简况 [J]. 郑州师范教育, 2012, 1(4): 42-45.
Li J H. Overview on the research of *Cypripedium* and *Cypripedioideae* in biogeography [J]. Journal of Zhengzhou Normal Education, 2012, 1(4): 42-45. (in Chinese)
- [12] 傅沛云, 李冀云. 东北植物检索表 [M]. 北京: 科学出版社, 1995: 895.
Fu P Y, Li J Y. Northeast plant retrieve table [M]. Beijing: Science Press, 1995: 895. (in Chinese)
- [13] 朗楷永, 陈心启, 朱光华. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 35.
Lang K Y, Chen X Q, Zhu G H. Flora of China [M]. Beijing: Science Press, 1999: 35. (in Chinese)
- [14] 张 毓, 赵世伟. 中国大花杓兰的濒危机制及保育对策 [J]. 中国植物园, 2009, 11(24): 34-41.
Zhang Y, Zhao S W. The study on endangered mechanism and conservation strategy of *Cypripedium macranthos* in China [J]. Chinese Botanical Garden, 2009, 11(24): 34-41. (in Chinese)
- [15] 李志清, 潘晓茹, 汤 君, 等. 长白山区大花杓兰资源调查及生物学特征研究 [J]. 林业实用技术, 2010(6): 54-55.
Li Z Q, Pan X R, Tang J, et al. Survey the resources of *Cypripedium macranthum* and research on biological characteristics in Changbai Mountain [J]. Practical Forestry Technology, 2010(6): 54-55. (in Chinese)
- [16] 罗毅波, 贾建生, 王春玲. 中国兰科植物保育的现状和展望 [J]. 生物多样性, 2003, 11(1): 70-77.
Luo Y B, Jia J S, Wang C L. A general review of Chinese Orchids [J]. Biodiversity Science, 2003, 11(1): 70-77. (in Chinese)
- [17] 张业栋. 基于 ITS 和 trnH-psbA 对川西南杓兰的分子系统学研究 [D]. 成都: 四川农业大学, 2012.
Zhang Y D. Study on phylogenetic relationships of *Cypripedium* in west of Sichuan based on ITS and trnH-psbA [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2012. (in Chinese)
- [18] Sushma V, Rana T S. Genetic diversity within and among the wild populations of *Murraya koenigii* (L.) Spreng., as revealed by ISSR analysis [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2011, 39: 139-144.
- [19] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR): Anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20: 176-183.
- [20] 朱田田, 杜 毅, 侯 嘉, 等. 不同花色铁棒锤基因组 DNA 提取及遗传差异分析 [J]. 山西农业科学, 2012, 40(4): 316-318.
Zhu T T, Du T, Hou J, et al. Genomic DNA extraction and diversity analysis for types of *Aconitum pendulum* Busch [J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2012, 40(4): 316-318. (in Chinese)
- [21] Clark M S. 植物分子生物学实验手册 [M]. 顾红雅, 瞿礼嘉, 译. 北京: 高等教育出版社, 1998: 3-11.
Clark M S. Plant molecular biology lab manual [M]. Gu H Y, Qu L Y, translation. Beijing: Higher Education Press, 1998: 3-11. (in Chinese)
- [22] 赵 谦, 庄东红, 杜 虹, 等. ISSR 在蝴蝶兰亲缘关系分析中的初步应用 [J]. 汕头大学学报, 2007, 22(4): 65-70.
Zhao Q, Zhuang D H, Du H, et al. Preliminary application of ISSR molecular marker in the genetic relationship analysis of phalaenopsis cultivar/strains [J]. Journal of Shantou University, 2007, 22(4): 65-70. (in Chinese)
- [23] 高 丽, 杨 波. 湖北野生春兰资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 生物多样性, 2006, 14(3): 250-257.
Gao L, Yang B. Genetic diversity of wild *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae) populations from Hubei based on ISSR analysis [J]. Biodiversity Science, 2006, 14(3): 250-257. (in Chinese)
- [24] Yeh F C, Boyle T J B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits [J]. Belgian J Bot, 1997: 129-157.
- [25] Brzosko E, Ratkiewicz M, Wroblewska A. Allozyme differentiation and genetic structure of the Lady's slipper (*Cypripedium calceolus*) island populations in northeast Poland [J]. Bot J Linn Soc, 2002, 138: 433-440.
- [26] 蔡凝枫, 严 宁, 刘 涛, 等. 黄花杓兰云南中甸居群遗传结构及克隆多样性的分析 [J]. 云南植物研究, 2008, 30(1): 69-75.
Cai N F, Yan N, Liu T, et al. Genetic structure and clonal diversity of *Cypripedium flavum* (Orchidaceae) populations from south-west China [J]. Acta Botanica Yunnanica, 2008, 30(1): 69-75. (in Chinese)
- [27] Michael F, Ruth, Peter Cook, et al. Genetic diversity in *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) with a focus on north-western Europe, as revealed by plastid DNA length polymorphisms [J]. Annals of Botany, 2009, 104(3): 517-525.