

中国硬叶兜兰主要分布区居群表型多样性分析

程浩¹, 徐玉凤², 王文晓², 朱俊², 贾瑞冬^{1,*}, 杨树华¹, 赵鑫¹,
葛红^{1,*}

(¹ 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 国家花卉改良中心, 北京 100081; ² 河南农业大学林学院, 郑州 450002)

摘要: 研究基于硬叶兜兰 (*Paphiopedilum micranthum*) 表型变异, 通过相关性、主成分以及聚类分析, 对 9 个硬叶兜兰野生居群的 22 个表型性状指标进行了调查研究, 探究硬叶兜兰居群间及居群内表型多样性, 为硬叶兜兰资源的进一步保护和利用奠定基础。结果表明: 硬叶兜兰在居群间具有丰富的表型多样性, 居群内变异较少。平均表型分化系数 (V_{st}) 为 64%, 居群间表型分化高于居群内表型分化。22 个性状的平均变异系数 (CV) 范围为 9.52%~31.48%, 9 个居群平均变异系数为 14.55%~18.51%, 在表型间差异显著, 在居群间差异不显著。主成分分析表明, 花纵径等花部性状和株高等营养性状是硬叶兜兰变异的主要因素。Pearson 相关性分析表明, 株高、中萼片长和花瓣长与大部分性状都呈现显著正相关; 冠幅、叶片数等营养性状与海拔存在显著正相关性, 而花横径、花纵径等生殖性状与海拔存在显著或极显著负相关性。聚类分析结果表明, 9 个居群可以聚类为 3 个类群, 和硬叶兜兰地理分布距离一致。

关键词: 硬叶兜兰; 居群; 表型多样性; 资源保护

中图分类号: S 682.31

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2020) 06-1098-13

Phenotypic Diversity of *Paphiopedilum micranthum* Populations from Main Distribution Areas in China

CHENG Hao¹, XU Yufeng², WANG Wenxiao², ZHU Jun², JIA Ruidong^{1,*}, YANG Shuhua¹, ZHAO Xin¹,
and GE Hong^{1,*}

(¹ National Flowers Improvement Center of China, Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ² College of Forestry, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: This study was designed to characterize the phenotypic diversity of *Paphiopedilum micranthum*, with the aim of creating a foundation for the further protection and use of *Paphiopedilum* germplasm resource. Analysis of 22 morphological characteristics among 9 natural populations was performed through statistical analysis methods including correlation, principal component and cluster analysis. The results showed that there were significant differences in most phenotypic traits among populations but few differences within populations. The mean phenotypic differentiation coefficient (V_{st}) was 64%, and the variation among populations was higher than that within populations. The average coefficient of variation (CV) was 9.52% – 31.48% among 22 traits and 14.55% – 18.51% among nine

收稿日期: 2020-01-15; **修回日期:** 2020-04-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31301810); 国家公益 (农业) 行业科研专项 (201203071); 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: jiaruidong@caas.cn, gehong@caas.cn)

populations. The variation coefficients varied dramatically among phenotypic traits. Principal component analysis (PCA) revealed that traits including vertical diameter of flower and plant height were responsible for the diversity of *P. micranthum*. Pearson correlation analysis showed plant height, length of dorsal sepal and length of petal displayed significant positive correlation with the majority of traits. Vegetative characteristics, such as canopy diameter and leaf number, were positively correlated with altitude, whereas reproductive characteristics, such as diameter and vertical diameter of flower, were negatively correlated with altitude. According to the cluster analysis, the nine *P. micranthum* populations were divided into three groups, which is consistent with their geographic distributions.

Keywords: *Paphiopedilum micranthum*; population; phenotypic diversity; resource conservation

硬叶兜兰 (*Paphiopedilum micranthum* T. Tang et F. T. Wang) 为兰科 (Orchidaceae) 兜兰属植物, 花形奇特, 具有极高的观赏价值, 被《华盛顿公约》列为 I 级珍稀濒危物种 (罗毅波 等, 2003a; 龙波和龙春林, 2006), 主要分布在中国云南东南部 (麻栗坡、西畴、文山)、广西西南部、贵州南部和西南部 (荔波、兴义), 生长于海拔 1 000 ~ 1 700 m 的石灰岩山坡草丛或石壁缝隙或积土处, 越南也有分布。由于过度采挖、走私出境以及生境破坏等原因, 近几年来野生硬叶兜兰的数量急剧减少 (田凡 等, 2012)。硬叶兜兰的研究大多集中在组培快繁 (丁长春 等, 2011; 周艳 等, 2013)、菌根真菌 (Li et al., 2010; 田凡 等, 2012, 2017)、遗传多样性 (李宗艳 等, 2013, 2016; 黄家林 等, 2014; Xu et al., 2018) 等方面。

表型多样性是遗传基础与环境多样性的综合体现, 其差异在一定程度上反映遗传的异质性, 研究居群在其分布区内各种环境下的表型变异, 是生物多样性与生物系统学的重要内容 (Li et al., 2002)。地理、地形因子造成的环境异质性可导致居群表型的变异, 这种变异具有适应和进化上的意义 (曾杰 等, 2005)。居群多样性可为适应多变的环境提供选择, 不同类型的环境有不同的居群 (Kussell & Leibler, 2005)。通过有效的采样、合理的数学统计, 对遗传上较稳定的、不易受环境影响的性状进行分析, 可以揭示群体的遗传规律、变异大小。利用表型性状差异研究群体的遗传多样性具有简便、快速和节省费用等优点 (明军和顾万春, 2006), 已在宽刺蔷薇 (杨树华 等, 2013; 向贵生 等, 2018)、牡丹 (张晓骁 等, 2017)、鱼腥草 (李爱民 等, 2018)、大白花杜鹃 (李叶芳 等, 2019)、独花兰 (孙海芹 等, 2005)、杓兰属 (张毓 等, 2013) 等植物上应用。在兜兰居群表型多样性研究中, 周妍慧等 (2016) 对云南地区杏黄兜兰的 3 个野生居群进行叶片和花器官等 19 个性状的表型多样性分析, 发现分布于云南省怒江流域的居群表现出较高水平的表型多样性, 而且居群间多样性较居群内更为丰富。李宗艳和李名扬 (2015) 对滇东南核心分布地区 7 个硬叶兜兰居群 113 个个体的 18 个表型数量性状进行分析, 7 个居群可以分为两大类, 性状变异贡献最大的为花器官, 18 个表型性状平均分化系数为 22.02%, 居群内的表型分化明显大于居群间。这些研究为探究中国硬叶兜兰主要分布区的居群表型多样性提供了方法学参考。

尽管如此, 由于硬叶兜兰野生居群数量较少, 生长周期长, 野外开花率较低, 居群多样性研究报道较少, 且性状在地理间隔、数量等方面有局限性。本研究中选择经纬度跨度大、海拔差异大、覆盖了中国硬叶兜兰主要分布区的 9 个野生居群的 270 株硬叶兜兰进行盛花期包括株高、冠幅、叶片数等 19 个表型性状指标的调查, 以了解硬叶兜兰在表型水平上的变异程度, 揭示居群遗传因素与环境互作的复杂性及其适应环境压力的程度, 为濒危物种硬叶兜兰的保护策略制定和资源可持续利用等提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 居群选择与材料采集

对云南省文山市 3 个居群（珠琳镇、西洒镇、坡脚镇）、贵州省兴义市 3 个居群（泥凼镇、则戎乡、万峰湖镇）、贵州省铜仁市 1 个居群（龙泉乡）、广西河池市木论保护区 2 个居群（下寨乡、木论乡）等共 9 个野生硬叶兜兰居群进行调查（表 1）。参照周妍慧等（2016）报道的采样方法，考虑居群生长环境的险峻及开花个体数量的稀少，从每个居群随机选择 10 个约 1 m² 样方，测量样方里生长正常、无明显病虫害的 3 株开花植株的表型，即每个居群获得 30 株开花硬叶兜兰的表型数据。样方水平间距设定为 5 m 以上，居群地理位置采用 GPS 定位。

表 1 野生硬叶兜兰 9 个居群的地理位置和生境
Table 1 The geographical location and habitat of 9 populations of *Paphiopedilum micranthum*

生境 Habitat	坡向 Slope	海拔/m Altitude	样品采集点 Sample locality	居群名 Name of population name
石灰岩山坡草丛 Limestone hillside with grass	东北坡 Northeast	1 560	云南文山市珠琳镇 Zhulin Town, Wenshan City, Yunnan	WZL
		1 553	云南文山市西洒镇 Xisa Town, Wenshan City, Yunnan	WXS
		1 570	云南文山市坡脚镇 Pojiao Town, Wenshan City, Yunnan	WPJ
灌木丛，石灰岩碎石 Shrub and limestone rubble	北坡 North	750	贵州兴义市泥凼镇 Nidang Town, Xingyi City, Guizhou	XND
		1 176	贵州兴义市则戎乡 Zerong Township, Xingyi City, Guizhou	XZR
		1 242	贵州兴义市万峰湖镇 Wanfenghu Town, Xingyi City, Guizhou	XWF
石灰岩山坡草丛 Limestone hillside with grass	北坡 North	640	贵州铜仁市龙泉乡 Longquan Township, Tongren City, Guizhou	TLQ
		290	广西河池市下寨乡 Xiazhai Township, Hechi City, Guangxi	HXZ
		315	广西河池市木论乡 Mulun Township, Hechi City, Guangxi	HML

1.2 表型性状的选取及测定方法

野外测量并记录盛花期下硬叶兜兰具有代表性、遗传相对稳定的表型性状，包括株高、冠幅、最大叶长、最大叶宽、叶片数、花茎高、花横径、花纵径、唇瓣横径、唇瓣纵径、中萼片长、中萼片宽、合萼片长、合萼片宽、退化雄蕊横径、退化雄蕊纵径、子房长、花瓣长、花瓣宽共 19 个性状指标。株高、冠幅、最大叶长、花茎高采用钢尺测量，其他指标采用游标卡尺测量，精度为 0.01 cm。此外，计算 3 个相对性状指标：最大叶长/最大叶宽、花横径/花纵径、唇瓣横径/唇瓣纵径。

1.3 表型多样性参数及统计分析

巢式方差分析、方差分量、主成分分析、Pearson 相关性分析由 SAS 9.4 进行；表型分化系数、表型变异系数由 Excel 计算。群体巢式方差分析的线性模型为： $Y_{ijk} = \mu + S_i + T_{(i)j} + e_{(ij)k}$ ，式中 Y_{ijk} 为第 i 个居群第 j 个单株第 k 个观测值， μ 为总均值， S_i 为居群效应（固定）， $T_{(i)j}$ 为居群内单株效应（随机）， $e_{(ij)k}$ 为试验误差（郝蕾 等，2017）。表型分化系数计算公式为： $V_{st} (\%) = [(\delta_{ts}^2) / (\delta_{ts}^2 + \delta_s^2)] \times 100$ ，其中 δ_{ts}^2 为居群间方差分量， δ_s^2 为居群内方差分量， V_{st} 为表型分化系数（葛

颂 等, 1988)。表型变异系数 $CV(\%) = \sigma/\mu \times 100$, σ 为标准差, μ 为平均值。采用 SAS 9.4 的 Cluster 程序离差平方和法 (WAR), 对标准化 (STD) 后的数据进行聚类分析 (颜亭玉和杜晓林, 2009)。

2 结果与分析

2.1 硬叶兜兰天然居群的表型分化

利用巢氏设计方差分析得到的方差分量及其百分比分量组成比, 探究居群的分化程度。如表 2 所示, 硬叶兜兰居群间的方差分量百分比均值 (16.18%) 大于居群内 (7.58%), 反映了居群之间的分化程度高于居群内分化程度。用居群间的方差分量占遗传总变异 (居群间及居群内方差分量之和) 的百分比表示居群间的表型分化系数 V_{st} (李文英和顾万春, 2005)。从 V_{st} 的大小看, 硬叶兜兰 9 个居群里, 最大叶长/最大叶宽、合萼片长、中萼片长这 3 类性状在居群间分化最大; 株高、花茎高、花瓣宽、退化雄蕊横径在居群间变异小于居群内; 中萼片宽的表型分化系数为 0, 说明它在不同居群间不存在分化差异。平均表型分化系数为 64%, 反映了硬叶兜兰表型变异在居群间贡献率为 64%, 居群内贡献率为 36%, 居群间变异是硬叶兜兰表型性状变异的主要来源。

表 2 硬叶兜兰居群表型性状的方差分量与居群间表型分化系数
Table 2 Variance component and phenotype differentiation coefficient of morphological traits among and within populations

表型性状 Phenotypic trait	方差分量 Variance component			方差分量百分比/% Percentage of variance portion		$V_{st}/\%$
	居群间 Among populations	居群内 Within populations	机误 Error	居群间 Among populations	居群内 Within populations	
株高/cm Plant height (PH)	0.95	1.11	11.12	7.18	8.40	46
冠幅/cm Canopy diameter (CD)	1.91	1.74	10.86	13.20	11.99	52
最大叶长/cm Length of maximum leaf (LWL)	0.97	0.20	4.05	18.51	3.86	83
最大叶宽 Width of maximum leaf (MWL)	0.01	0.01	0.25	3.16	4.61	50
最大叶长/最大叶宽 LWL/MWL	0.11	0	1.18	8.72	0	100
叶片数 Leaf number (LN)	0.21	0.08	0.77	19.79	7.73	72
花茎高/cm Scape height (SH)	0.55	0.80	6.35	7.13	10.44	41
花横径/cm Diameter of flower (DF)	0.15	0.01	0.68	17.81	1.39	94
花纵径/cm Vertical diameter of flower (VF)	0.14	0.08	1.01	11.08	6.43	64
花横径/花纵径 DF/VF	0.0020	0.0004	0.01	16.93	2.48	83
唇瓣横径/cm Diameter of lip (DL)	0.20	0.03	0.30	37.75	4.89	87
唇瓣纵径/cm Vertical diameter of lip (VL)	0.06	0.06	0.46	10.29	10.78	50
唇瓣横径/唇瓣纵径 DL/VL	0.01	0.01	0.01	31.56	11.30	50
合萼片长/cm Length of synsepal (LS)	0.02	0	0.09	20.10	0	100
合萼片宽/cm Width of synsepal (WS)	0.01	0.01	0.08	9.55	7.76	50
中萼片长/cm Length of dorsal sepal (LDS)	0.01	0	0.11	8.05	0	100
中萼片宽/cm Width of dorsal sepal (WDS)	0	0.002	0.09	0	2.67	0
退化雄蕊横径/cm Diameter of false stamen (DFS)	0.01	0.03	0.03	10.11	38.86	25
退化雄蕊纵径/cm Vertical diameter of false stamen (VFS)	0.11	0.01	0.05	65.05	3.54	92
子房长/cm Length of ovary (LO)	0.10	0.09	0.45	15.56	14.50	53
花瓣长/cm Length of petal (LP)	0.03	0.01	0.09	21.42	6.48	75
花瓣宽/cm Width of petal (WP)	0.005	0.01	0.15	2.93	8.63	33
平均值 Mean	0.25	0.20	1.74	16.18	7.58	64

2.2 硬叶兜兰表型性状在居群间和居群内的差异

9 个居群的 22 个表型性状的均值、标准误差、居群间和居群内的 F 值（表 3）由巢式方差分析得到。

表 3 硬叶兜兰 9 个居群表型性状的巢式方差分析

Table 3 Nested variation analysis of phenotypic traits of nine populations in *Paphiopedilum micranthum*

表型性状 Phenotypic trait	居群 Population				
	WZL	WXS	WPJ	XND	XZR
PH	24.31 ± 2.93 bc	21.35 ± 4.36 d	23.82 ± 2.88 c	25.46 ± 3.34 a	23.91 ± 3.14 bc
CD	18.52 ± 3.61 a	14.37 ± 2.67 e	15.64 ± 4.28 c	16.28 ± 4.26 b	18.25 ± 3.66 a
LWL	10.92 ± 2.09 a	7.80 ± 1.74 e	8.82 ± 2.21 d	9.89 ± 2.28 b	10.94 ± 2.01 a
MWL	2.75 ± 0.44 a	2.32 ± 0.28 e	2.46 ± 0.34 cd	2.57 ± 1.18 b	2.47 ± 0.26 cd
LWL/MWL	4.15 ± 1.70 b	3.38 ± 0.77 e	3.66 ± 1.11 d	4.17 ± 1.20 b	4.45 ± 0.83 a
LN	4.33 ± 0.84 de	5.10 ± 1.21 b	5.30 ± 0.99 a	4.57 ± 0.90 c	5.10 ± 1.21 b
SH	17.31 ± 2.52 a	14.10 ± 3.10 e	14.93 ± 2.28 d	16.41 ± 2.34 b	15.67 ± 2.85 c
DF	5.39 ± 1.00 e	6.05 ± 0.70 b	5.87 ± 0.62 cd	5.76 ± 0.78 d	5.98 ± 0.62 bc
VF	7.18 ± 0.98 d	7.73 ± 1.07 b	7.85 ± 0.83 ab	7.54 ± 1.36 c	6.77 ± 1.28 e
DF/VF	0.75 ± 0.12 d	0.79 ± 0.11 c	0.75 ± 0.07 d	0.78 ± 0.14 c	0.91 ± 0.18 a
DL	4.42 ± 0.52 d	4.15 ± 0.42 e	5.14 ± 0.52 b	4.11 ± 0.67 e	4.26 ± 0.82 e
VL	5.64 ± 0.67 e	5.89 ± 0.62 c	5.67 ± 0.64 de	5.61 ± 0.67 e	5.82 ± 0.73 c
DL/VL	0.8 ± 0.19 b	0.71 ± 0.07 e	0.92 ± 0.14 a	0.74 ± 0.12 c	0.73 ± 0.08 cd
LS	2.46 ± 0.2 c	2.28 ± 0.24 d	2.45 ± 0.39 c	2.44 ± 0.28 c	2.29 ± 0.28 d
WS	1.87 ± 0.31 b	1.75 ± 0.32 e	1.76 ± 0.26 de	1.79 ± 0.34 de	1.61 ± 0.23 e
LDS	2.87 ± 0.25 bc	2.64 ± 0.31 e	2.77 ± 0.28 de	2.86 ± 0.38 c	2.83 ± 0.23 cd
WDS	2.37 ± 0.32 a	2.20 ± 0.31 cd	2.25 ± 0.25 bc	2.28 ± 0.26 b	2.25 ± 0.27 b
DFS	0.75 ± 0.40 c	0.88 ± 0.28 a	0.59 ± 0.12 e	0.82 ± 0.29 b	0.55 ± 0.13 e
VFS	1.35 ± 0.17 d	1.31 ± 0.13 de	1.66 ± 0.15 c	1.64 ± 0.30 c	1.32 ± 0.14 d
LO	4.16 ± 0.84 e	4.47 ± 0.84 de	4.54 ± 0.50 cd	4.40 ± 0.60 e	4.63 ± 0.58 c
LP	3.29 ± 0.29 c	3.15 ± 0.27 e	3.26 ± 0.27 cde	3.01 ± 0.29 e	3.22 ± 0.21 e
WP	3.39 ± 0.34 bc	3.23 ± 0.34 e	3.42 ± 0.32 ab	3.33 ± 0.36 cd	3.15 ± 0.36 e

表型性状 Phenotypic trait	居群 Population				居群间 F 值 F among population	居群内 F 值 F within population
	XWF	TLQ	HXZ	HML		
PH	23.86 ± 2.83 c	25.35 ± 3.47 a	23.83 ± 4.57 c	24.49 ± 3.38 b	2.97*	1.30
CD	16.88 ± 3.12 b	15.10 ± 3.64 bcd	14.92 ± 3.43 de	14.39 ± 2.75 e	4.57**	1.48*
LWL	9.47 ± 2.46 c	8.76 ± 2.22 d	8.81 ± 1.81 d	8.78 ± 1.53 d	7.23**	1.15
MWL	2.43 ± 0.28 d	2.44 ± 0.31 d	2.69 ± 0.35 a	2.53 ± 0.46 bc	1.89	1.15
LWL/MWL	3.91 ± 1.04 c	3.66 ± 1.07 d	3.30 ± 0.70 e	3.58 ± 0.94 d	4.01**	0.95
LN	4.47 ± 0.57 cd	4.23 ± 0.94 e	4.10 ± 0.66 e	3.90 ± 0.71 e	7.21**	1.32
SH	15.52 ± 2.18 c	15.65 ± 2.50 c	15.43 ± 3.40 c	14.94 ± 2.57 d	2.88**	1.88*
DF	6.50 ± 0.78 a	6.52 ± 1.00 a	6.52 ± 1.01 a	6.55 ± 0.84 a	7.29**	1.05
VF	7.24 ± 1.02 d	7.86 ± 0.92 ab	7.91 ± 1.00 a	8.03 ± 0.78 a	4.26**	1.23
DF/VF	0.91 ± 0.13 a	0.83 ± 0.09 b	0.83 ± 0.10 b	0.82 ± 0.10 b	6.77**	1.09
DL	4.31 ± 0.41 e	5.47 ± 0.62 a	4.57 ± 0.63 c	4.64 ± 0.42 c	16.73**	1.26
VL	6.10 ± 0.65 b	6.10 ± 0.60 b	5.78 ± 1.00 cd	6.50 ± 0.82 a	3.77**	1.41*
DL/VL	0.71 ± 0.07 de	0.90 ± 0.08 a	0.81 ± 0.12 b	0.72 ± 0.09 cde	11.40**	1.59**
LS	2.26 ± 0.26 d	2.72 ± 0.36 a	2.63 ± 0.38 b	2.60 ± 0.32 b	8.73**	0.98
WS	1.68 ± 0.27 f	1.99 ± 0.23 a	1.85 ± 0.38 bc	1.80 ± 0.26 cd	3.70**	1.28
LDS	2.76 ± 0.34 e	2.92 ± 0.41 ab	2.64 ± 0.33 e	2.97 ± 0.43 a	3.84**	0.92
WDS	2.27 ± 0.30 b	2.24 ± 0.26 bc	2.18 ± 0.32 d	2.25 ± 0.38 bc	0.93	1.08
DFS	0.67 ± 0.32 de	0.69 ± 0.17 de	0.71 ± 0.15 cd	0.66 ± 0.17 e	2.81**	3.28**
VFS	1.27 ± 0.19 e	1.67 ± 0.19 c	1.96 ± 0.41 b	2.23 ± 0.31 a	47.43**	1.34
LO	4.33 ± 0.69 e	5.29 ± 0.84 a	4.59 ± 0.92 cd	5.02 ± 0.67 b	5.12**	1.62**
LP	3.23 ± 0.34 de	3.66 ± 0.40 a	3.28 ± 0.43 cd	3.40 ± 0.31 b	8.02**	1.27
WP	3.22 ± 0.36 e	3.48 ± 0.28 a	3.25 ± 0.42 e	3.30 ± 0.68 de	1.77	1.29

注：居群名同表 1；性状缩写词同表 2；表中数据为平均数 ± 标准差；**表示极显著差异 ($P < 0.01$)，*表示显著差异 ($P < 0.05$)；字母相同者为相互间差异不显著。下同。

Note: The population name is seen in Table 1 while the abbreviations of phenotypic traits in Table 2. Data are shown as the mean ± S.E.; ** means significance at the 0.01 level while * means significance at the 0.05 level; The same letters mean no significant difference. The same below.

冠幅、最大叶宽、花茎高和中萼片宽的最大值均出现在文山市珠琳镇居群 (WZL), 并且最大叶长在 9 个居群中排第二, 株高排第三, 这些性状除了中萼片宽, 都属于营养器官, 说明这个居群的营养生长比较旺盛。唇瓣横径、合萼片长、合萼片宽、子房长、花瓣长和花瓣宽等大多数性状的最大值集中在铜仁市龙泉乡居群 (TLQ), 花横径、唇瓣纵径、合萼片长和中萼片长在此居群中排第二, 花纵径和退化雄蕊纵径排第三, 说明这个居群花器官较大, 观赏价值较高。

由 F 值检验可知, 在居群间, 冠幅、最大叶长、叶片数、花茎高、花横径、花纵径等 18 个性状存在极显著差异 ($P < 0.01$), 株高存在显著差异 ($P < 0.05$), 最大叶宽、中萼片宽、花瓣宽没有显著差异; 在居群内, 唇瓣横径/唇瓣纵径、退化雄蕊横径、子房长存在极显著差异, 冠幅、花茎高、唇瓣纵径差异显著, 其他没有显著差异。唇瓣横径/唇瓣纵径、退化雄蕊横径、子房长在居群间及居群内均存在极显著差异 ($P < 0.01$), 而最大叶宽、中萼片宽、花瓣宽在居群间和居群内都没有显著差异。可见, 硬叶兜兰的表型性状在居群间存在丰富的多样性, 在居群内差异较少。

居群间 F 值最大值的性状为退化雄蕊纵径 (47.43), 最小值的性状为中萼片宽 (0.93)。居群内不同性状的 F 值差异较小, F 值最大值的是退化雄蕊横径 (3.28), 最小值是中萼片长 (0.92)。

2.3 硬叶兜兰表型性状的变异系数分析

变异系数 (CV) 反映了表型性状的离散程度。对硬叶兜兰的表型性状进行变异系数分析 (表 4), 表型性状在不同居群间和不同性状间离散程度不同。性状平均变异系数在 9.52% ~ 31.48% 间。退化雄蕊横径平均变异系数最大, 为 31.48%, 表明该性状特征在居群内部变异最大; 花瓣长平均变异系数在居群内为 9.52%, 变异幅度最小, 稳定性最高。冠幅、最大叶长、最大叶宽、最大叶长/最大叶宽、叶片数和花茎高等营养性状在居群内有较高的变异系数, 分别为 21.81%、21.91%、17.09%、

表 4 硬叶兜兰 9 个居群的表型性状变异系数 (CV)
Table 4 Variation coefficient of phenotype traits of nine populations in *Paphiopedilum Micranthum* %

表型性状 Phenotypic trait	居群 Population									平均 Average
	WZL	WXS	WPJ	XND	XZR	XWF	TLQ	HXZ	HML	
PH	12.05	20.41	12.10	13.12	13.12	11.90	13.70	19.18	13.80	14.38 fg
CD	19.51	18.55	27.33	26.15	20.08	18.49	24.09	22.96	19.12	21.81 c
LWL	19.16	22.29	25.00	23.08	18.38	25.93	25.40	20.51	17.48	21.91 c
MWL	16.07	11.95	13.71	46.00	10.56	11.59	12.64	13.04	18.22	17.09 e
LWL/MWL	41.02	22.77	30.25	28.91	18.67	26.46	29.19	21.35	26.12	27.19 b
LN	19.48	23.79	18.64	19.66	23.79	12.79	22.09	16.14	18.26	19.40 d
SH	14.53	22.01	15.23	14.28	18.15	14.07	15.97	22.05	17.18	17.05 e
DF	18.62	11.64	10.60	13.57	10.31	11.99	15.32	15.48	12.82	13.37 ghi
VF	13.63	13.83	10.58	18.07	18.85	14.02	11.72	12.61	9.77	13.68 gh
DF/VF	16.49	14.31	9.33	17.65	19.61	14.53	10.84	12.63	11.84	14.14 g
DL	11.71	10.04	10.08	16.39	19.16	9.45	11.34	13.85	9.05	12.34 hij
VL	11.90	10.50	11.35	12.01	12.57	10.64	9.76	17.37	12.67	12.09 ij
DL/VL	23.65	9.47	15.08	15.70	11.64	9.64	8.52	15.38	11.96	13.45 ghi
LS	7.94	10.29	15.91	11.26	12.37	11.42	13.11	14.54	12.20	12.12 ij
WS	16.39	18.18	14.93	18.98	14.34	15.97	11.56	20.40	14.38	16.13 e
LDS	8.78	11.84	10.11	13.15	8.20	12.15	13.88	12.46	14.35	11.66 j
WDS	13.59	14.27	11.00	11.19	12.04	13.10	11.82	14.59	16.73	13.15 hij
DFS	52.73	32.17	21.04	35.68	22.63	47.60	24.47	21.68	25.35	31.48 a
VFS	12.45	10.04	9.27	18.4	10.57	15.15	11.40	20.96	13.83	13.56 ghi
LO	20.10	18.67	10.92	13.71	12.43	15.86	15.89	20.14	13.35	15.67 ef
LP	8.73	8.49	8.42	9.62	6.54	10.66	11.05	12.97	9.24	9.52 k
WP	10.15	10.41	9.29	10.73	11.47	11.25	8.19	13.07	20.49	11.67 j
平均 Average	17.67 a	15.72 a	14.55 a	18.51 a	14.79 a	15.67 a	15.09 a	16.97 a	15.37 a	

27.19%、19.40%和 17.05%。生殖性状除退化雄蕊横径外，其他性状变异幅度较小：花横径 13.37%、花纵径 13.68%、花横径/花纵径 14.14%、唇瓣横径 12.34%、唇瓣纵径 12.09%、唇瓣横径/唇瓣纵径 13.45%、合萼片长 12.12%、合萼片宽 16.13%、中萼片长 11.66%、中萼片宽 13.15%、退化雄蕊纵径 13.56%、子房长 15.67%、花瓣长 9.52%、花瓣宽 11.67%。

对 22 个性状的变异系数在居群间进行差异性检验，结果显示不存在显著差异，居群之间的表型变异的离散程度变化不大；以 9 个居群的变异系数进行不同性状间差异性检验，结果显示变异系数在表型性状间存在显著差异，说明表型性状之间的变异程度存在显著差别，体现了不同表型性状对环境适应能力的不同。

2.4 硬叶兜兰表型性状的主成分分析

对硬叶兜兰的 22 个表型性状进行主成分分析，结果如表 5 所示。前 4 个主成分累计贡献率为 86.3%，性状特征值均大于 1。第 1、2、3、4 主成分贡献率分别为 35.85%、25.41%、14.91%、10.13%。第 1 主成分贡献率最高，其中花纵径、合萼片长载荷度最高；第 2 主成分中载荷度最大的是株高、花茎高；第 3 主成分载荷度最高的为花横径/花纵径、唇瓣纵径；第 4 主成分载荷度最高的是叶片数、唇瓣横径/唇瓣纵径。第 1、3 主成分主要反映了花部性状，第 2 主成分反映了营养性状，第 4 主成分主要反映了营养性状和花部性状。综合主成分分析结果，花纵径、合萼片长、花横径/花纵径、唇瓣纵径、唇瓣横径/唇瓣纵径等花部器官，以及株高、花茎高、叶片数等营养器官是硬叶兜兰表型变异的主要因素。

表 5 硬叶兜兰不同居群表型性状的主成分分析
Table 5 The PCA of phenotypic traits in different populations of *Paphiopedilum micranthum*

表型性状 Phenotypic trait	主成分 Principal component			
	1	2	3	4
PH	0.066	<u>0.344</u>	0.157	- 0.061
CD	- 0.288	0.211	0.108	0.102
LWL	- 0.254	0.260	0.155	- 0.013
MWL	- 0.039	0.281	- 0.105	- 0.333
LWL/MWL	- 0.269	0.200	0.185	0.088
LN	- 0.171	- 0.167	- 0.150	<u>0.463</u>
SH	- 0.150	<u>0.361</u>	- 0.021	- 0.150
DF	0.239	- 0.158	0.300	- 0.086
VF	<u>0.315</u>	- 0.063	- 0.189	- 0.102
DF/VF	- 0.059	- 0.125	<u>0.477</u>	0.016
DL	0.263	0.153	0.004	0.372
VL	0.196	- 0.083	<u>0.358</u>	- 0.137
DL/VL	0.169	0.192	- 0.192	<u>0.407</u>
LS	<u>0.291</u>	0.209	- 0.022	- 0.096
WS	0.241	0.220	- 0.194	- 0.082
LDS	0.060	0.293	0.239	- 0.017
WDS	- 0.176	0.309	- 0.030	- 0.037
DFS	- 0.006	- 0.089	- 0.340	- 0.347
VFS	0.265	0.055	0.051	- 0.252
LO	0.287	0.030	0.236	0.128
LP	0.254	0.149	0.180	0.185
WP	0.180	0.272	- 0.227	0.194
特征值 Eigenvalue	7.887	5.590	3.280	2.228
贡献率/% Contribution proportion	35.850	25.410	14.910	10.130
累积贡献率/% Cumulative proportion	35.850	61.260	76.170	86.300

2.5 硬叶兜兰表型性状的相关性分析

22 个表型性状的相关性分析结果表明, 株高与冠幅、最大叶长、最大叶宽、最大叶长/最大叶宽、花茎高、花横径、唇瓣横径、唇瓣纵径、合萼片宽、中萼片长、中萼片宽、退化雄蕊纵径、子房长、花瓣长和花瓣宽等 15 个性状极显著正相关; 其中株高与花茎高的相关系数最大, 为 0.852^{**}。合萼片宽与株高、最大叶宽、花横径和花纵径等 15 个其他性状显著或极显著正相关。中萼片长与株高、最大叶长、最大叶宽、花茎高、花横径和花纵径等 15 个其他性状存在显著或极显著正相关。花瓣长与株高、花茎高、花横径、花纵径、唇瓣横径、唇瓣纵径、唇瓣横径/唇瓣纵径、合萼片长、合萼片宽、中萼片长、中萼片宽、退化雄蕊纵径、子房长和花瓣宽等 14 个其他性状存在显著或极显著正相关。退化雄蕊纵径与冠幅、最大叶长、最大叶长/最大叶宽、叶片数存在显著或极显著负相关, 与株高、花横径、花纵径、唇瓣横径、唇瓣纵径、合萼片长、合萼片宽、中萼片长、子房长、花瓣长和花瓣宽呈极显著正相关。这表明营养生长与前期生殖生长正相关。

对表型性状与海拔、经纬度等环境因子进行相关性分析 (表 6), 冠幅、叶片数与海拔呈极显著正相关, 花横径、花纵径、唇瓣纵径、合萼片长、退化雄蕊纵径、子房长、花瓣长与海拔呈极显著负相关, 株高、合萼片宽与海拔呈显著负相关; 子房长、花瓣长与纬度呈显著正相关性, 合萼片长与纬度呈极显著正相关; 退化雄蕊纵径、子房长、花瓣长与经度呈显著正相关, 叶片数与经度呈显著负相关。

表 6 硬叶兜兰部分表型性状与环境因子的 Pearson 相关分析
Table 6 Pearson correlation analysis between phenotypic traits and environmental factors in *Paphiopedilum micranthum*

表型性状 Phenotypic trait	环境因子 Environmental factor		
	海拔 Altitude	纬度 Latitude	经度 Longitude
PH	- 0.157 [*]	0.590	0.328
CD	0.181 ^{**}	- 0.158	- 0.552
LN	0.345 ^{**}	- 0.546	- 0.776 [*]
DF	- 0.287 ^{**}	0.575	0.774
VF	- 0.173 ^{**}	0.147	0.575
VL	- 0.168 ^{**}	0.426	0.617
LS	- 0.322 ^{**}	0.609	0.813 ^{**}
WS	- 0.127 ^{**}	0.538	0.566
VFS	- 0.644 ^{**}	0.241	0.749 [*]
LO	- 0.254 ^{**}	0.746 [*]	0.767 [*]
LP	- 0.160 ^{**}	0.718 [*]	0.690 [*]

2.6 硬叶兜兰表型性状的聚类分析

对硬叶兜兰的 22 个表型性状数据标准化后进行聚类分析 (图 1)。当 R^2 为 0.17 时可将 9 个居群分为 3 类。贵州铜仁市龙泉乡居群 (TLQ)、广西河池市下寨乡居群 (HXZ)、广西河池市木论乡居群 (HML) 归为第 I 类, 云南文山市西洒镇居群 (WXS)、云南文山市坡脚镇居群 (WPJ) 聚于第 II 类, 云南文山市珠琳镇居群 (WZL)、贵州兴义市泥函镇居群 (XND)、贵州兴义市则戎乡居群 (XZR)、贵州兴义市万峰湖镇居群 (XWF) 聚为第 III 类。

9 个居群大致依照地理分布距离聚类, 表明环境异质性下存在居群表型差异。第 I 类包含的 3 个居群位于东部大致处于同一经度位置, 其中 HXZ 和 HML 居群邻近; 第 II 类包含的 2 个居群 WPJ 和 WXS 位于云南东南部; 第 III 类包含的 4 个居群位于云南、广西、贵州交界处, 地理位置邻近。

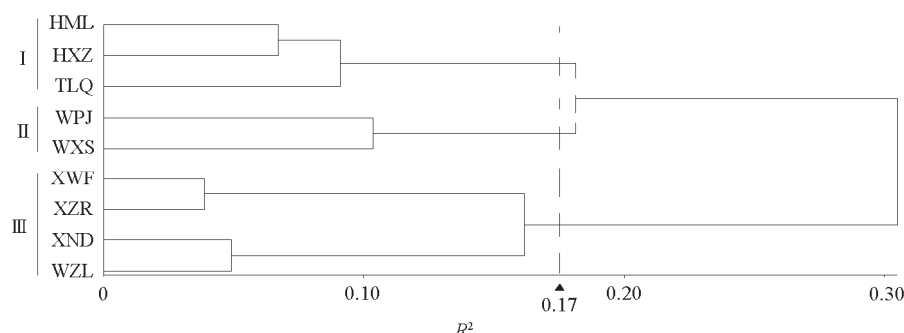


图1 硬叶兜兰 9 个居群表型聚类图

Fig. 1 Dendrogram of nine populations of *Paphiopedilum micranthum*

3 讨论

硬叶兜兰是兜兰属中分布最靠北的一个种，也是分布比较广的一个种，在中国云南、贵州和广西等西南地区的喀斯特熔岩丘陵地带广泛分布。不同居群的硬叶兜兰，因为地理位置不同、海拔不同或者生长环境不同，形态差异明显。尽管形态性状变异的基础比较复杂，但在某种程度上能够反映遗传变异的大小，更重要的是，形态变异往往具有适应性意义（葛颂 等，1997；周艳 等，2013）。

巢式方差分析结果显示，云贵桂地区 9 个硬叶兜兰居群的所有表型性状在居群间存在显著或极显著差异，在居群内差异较小。其中唇瓣性状在居群间和居群内均存在差异，表型变异较大。硬叶兜兰传粉通道（唇瓣）的大小决定了熊蜂为其主要传粉者，兜状唇瓣能欺骗熊蜂进入唇瓣，熊蜂携带花粉后，到另外一朵花上完成传粉（史军，2008）。不同大小的唇瓣可适应不同大小个体的熊蜂，保证传粉完成。本研究，22 个表型分化系数中萼片宽为 0，其他的在 25%~100% 间，均值为 64%。硬叶兜兰的分化系数高于杏黄兜兰的 53.02%（周妍慧 等，2016），这可能是因为，杏黄兜兰是窄域分布种，而且只有 3 个居群的数据；结果也明显高于滇东南硬叶兜兰的 22.02%（李宗艳和李名扬等，2015），主要是因为本研究中选取的居群范围更广，特别是广西河池两个居群和贵州铜仁一个居群，经度和纬度跨度大，海拔差异也较大。这反映了地理和生殖隔离可以导致居群间性状差异比居群内差异大，而居群间差异是硬叶兜兰表型变异的主要来源。

不同表型性状对环境适应能力存在差别，在居群内也存在相当或差异的变异类型（丹曲 等，2015）。9 个居群 22 个性状的变异系数在 9.52%~31.48% 之间，略高于杏黄兜兰的 9.68~26.36%（周妍慧 等，2016）。其中，退化雄蕊横径的变异系数最大，最大叶长/最大叶宽次之，与巢式方差分析结果相符，也说明退化雄蕊横径变异幅度大，多样性很高，可能与其授粉策略相关。花瓣长的变异系数最小，表明该性状比较稳定。从进化角度看，由于环境对植物器官的可塑性存在差异，变异系数与适应环境的能力相关性不大，性状变异的贡献对物种功能的进化可能更有实质意义（李宗艳和李名扬，2015）。通过主成分分析发现，表征株高和花大小的花纵径、唇瓣纵径是硬叶兜兰性状变异的主要来源。在野外生境中，硬叶兜兰与草丛及灌木丛伴生，株高影响了感受的光面积大小和光合作用强度，与植物生长发育相关；花纵径、唇瓣纵径等则对吸引昆虫产生影响，与物种繁殖相关。

孙海芹等（2005）对独花兰（*Changnienia amoena*）的形态变异研究发现营养器官各性状之间、花部性状之间均存在较高的相关性，各性状在维持花空间结构的稳定性方面具有协调一致的适应。

本研究中, 对硬叶兜兰的表型性状进行相关性分析, 株高跟大部分营养性状和花部性状呈正相关, 可以反映植株的健壮状况, 株高较大的硬叶兜兰, 营养生长与生殖生长情况大多较好。合萼片宽和中萼片长也跟多数营养性状和花部性状呈正相关。花瓣长跟大部分花部性状呈正相关, 基本可以反映花性状特征。退化雄蕊纵径和大部分营养性状呈负相关, 跟大多数花部性状呈正相关。今后测定表型性状时, 株高、合萼片宽、中萼片长和花瓣长等性状可作为代表性状。该相关性分析结果与杏黄兜兰相似, 杏黄兜兰株高与多数营养器官和花部器官呈显著正相关(周妍慧 等, 2016)。这可能是因为植株高、冠幅大、叶片大的营养生长较好的兜兰有更多的营养供给花, 使得花部各器官体型较大。

索默等(2016)对野生莲瓣兰(*Cymbidium tortisepalum*)的表型性状与海拔因子研究发现, 海拔高度不仅影响野生莲瓣兰株型, 而且对莲瓣兰花部特征影响也较大。本研究中也发现, 硬叶兜兰形态对海拔高度变化较敏感, 冠幅、叶片数等性状与海拔显著正相关, 而株高、花横径、花纵径等生殖性状与海拔显著或极显著负相关。这表明海拔影响表型性状, 高海拔地区, 硬叶兜兰叶片数较多、冠幅较大、植株变矮, 花部器官较小。海拔梯度造成的温度、水分和土壤肥力等环境异质性可能会极大地影响到植物的生长, 从而导致山地植物生理生态适应性发生变化(潘红丽 等, 2009)。高海拔地区光照相对充足, 光合作用相对较强, 但是夜温低、昼夜温差大, 导致植株矮化, 叶片数多, 冠幅较大, 花部器官较小。

9个硬叶兜兰居群依其性状分为3类, 大致与它们的地理距离、海拔高度和经度相关。居群WZL、XND、XZR、XWF位于云南和贵州交界处, 地理距离近, 大致处于同一经度, 生境大部分分布在海拔1 000 m。WXS、WPJ居群处于云南东南部, 海拔相对较高, 在1 500 m以上, 实地调查发现气温相对高于云贵交界处, 湿度相对较低, 生境出现差异, 居群特征独特, 单独聚于一类。TLQ、HXZ、HML等3个居群聚为一支, TLQ居群与另两居群位置稍远, 基本处于同一经度, 海拔最低, 都在700 m以下。聚类分析结果反映了不同环境压力下居群存在表型多样性。

中国是兜兰属植物的主要产地, 开展野生居群遗传多样性调查对于深入了解资源现状、合理有效保护和利用这些濒危植物有重要意义(Lu et al., 2019)。兰科植物具有非常特殊的花部结构, 适应虫媒传粉, 开展形态学尤其是花形态研究对兰科植物尤其重要(Cribb, 2001)。我国硬叶兜兰主要分布区的9个硬叶兜兰居群表现了高度的表型多样性, 居群间多样性高于居群内。这9个居群地理跨度大, 海拔差异大。在地理隔离的居群间, 花的大小、形态的多样性常和传粉媒介的选择相关(Herrera, 2004)。居群间花瓣、退化雄蕊性状差异可能与授粉等生殖行为相关。从分析结果可以看出, 硬叶兜兰居群内和居群间都具有较高的遗传多样性。作者在调查过程中发现, 人迹罕至的地方, 其硬叶兜兰居群面积较大, 植株数量多, 生长状况良好, 无濒危的迹象。在20世纪八、九十年代, 硬叶兜兰被大量采挖、走私出口, 绝大多数居群遭受了人为的采集破坏(罗毅波 等, 2003b)。2015—2019年野外资源调查中发现, 其野生种群仍然遭受人为破坏, 例如公路修建、植株盗挖等。硬叶兜兰已被列为国家一级保护植物, 以保护其免受人为破坏。

依据研究结果, 提出硬叶兜兰种质资源收集和保护的策略。硬叶兜兰居群间和居群内都具有丰富的表型多样性, 居群间略高, 因此应该尽可能地保护较多的居群数量, 并且在一个居群里保护好一定数量的植株, 从而保护好居群完整性。聚类分析结果表明, 居群WZL、XND、XZR、XWF遗传关系较近, 居群WXS和WPJ遗传关系较近, 居群TLQ、HXZ和HML遗传关系较近, 建议对中国硬叶兜兰主要分布区具有代表性的居群XND、WPJ和TLQ的野生硬叶兜兰进行重点保护。居群XND是一个较大的居群, 居群内植株数量大, 生长状况好, 距离城镇较远; 居群WPJ位于滇东南

硬叶兜兰核心分布区, 离其他居群远, 纬度最低; 居群 TLQ 是个特殊的居群, 纬度最高, 居群离其他所有居群都非常远, 而且破坏最严重。兰科植物对环境依赖较强, 建立保护点就地保护是最好的保护方法。在此基础上应该收集更多居群样品, 建立资源圃(库), 进行迁地保护。还应该加大濒危物种保护的宣传力度, 制定细致完善的法律法规, 加大对违法采挖行为的惩罚执行力度。此外, 可建立以产业化促进物种保护和可持续利用的新模式, 平衡野生植物的保护与开发的关系(刘虹 等, 2013)。

在调查中还发现, 不同居群的硬叶兜兰, 花瓣、唇瓣和萼片的花色及上面斑纹的分布都有不同, 有的差异非常明显, 比如广西的两个居群中, 唇瓣完全是白色, 而其他居群唇瓣口呈粉红色。在后期研究中, 应该调查花色、斑纹等更多的性状, 并结合 SSR 等分子手段, 开展分子水平的遗传多样性研究, 解析遗传变异特点, 为硬叶兜兰的物种保护提供参考依据。

References

- Cribb P. 2001. Orchidaceae// Pridgeon A M, Cribb P, Chase M W. Genera *Orchidacearum*. Oxford: Oxford University Press.
- Dan Qu, Fang Jiang-ping, Guo Qi-qiang, Zhang Yan-fu. 2015. Advances in phenotypic diversity of herbal dicotyledons. Agriculture of Jilin, (16): 62 – 64. (in Chinese)
- 丹 曲, 方江平, 郭其强, 张艳福. 2015. 草本双子叶植物表型多样性研究进展. 吉林农业, (16): 62 – 64.
- Ding Chang-chun, Li Lei, Xia Nian-he. 2011. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling cultivation of *Paphiopedilum micranthum* T. Tang & F. T. Wang. Northern Horticulture, (5): 115 – 117. (in Chinese)
- 丁长春, 李 蕾, 夏念和. 2011. 硬叶兜兰的无菌播种和试管成苗. 北方园艺, (5): 115 – 117.
- Ge Song, Wang Ming-xiu, Chen Yue-wu. 1988. An analysis of population genetic structure of masson pine by isozyme technique. Scientia Silvae Sinicae, 24 (4): 399 – 409. (in Chinese)
- 葛 颂, 王明麻, 陈岳武. 1988. 用同工酶研究马尾松群体的遗传结构. 林业科学, 24 (4): 399 – 409.
- Ge Song, Wang Hai-qun, Zhang Can-ming, Hong De-yuan. 1997. Genetic diversity and population differentiation of *Cathaya argyrophylla* in BAMIN Mountain. Acta Botanica Sinica, 39 (3): 266 – 271. (in Chinese)
- 葛 颂, 王海群, 张灿明, 洪德元. 1997. 八面山银杉林的遗传多样性和群体分化. 植物学报, 39 (3): 266 – 271.
- Hao Lei, Zhang Guo-sheng, Mu Xi-yun, Han Sheng-li, Wang Ying, Ning Rui-xie, Bai Yu-rong, Zhang Lei. 2017. Phenotypic diversity of *Salix psammophila* populations in germplasm resources. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 37 (5): 1012 – 1021. (in Chinese)
- 郝 蕾, 张国盛, 穆喜云, 韩胜利, 王 颖, 宁瑞些, 白玉荣, 张 磊. 2017. 北沙柳种质资源居群表型多样性. 西北植物学报, 37 (5): 1012 – 1021.
- Herrera J. 2004. Flower size variation in *rosmarinus officinalis*: individuals, populations and habitats. Annals of Botany, 95 (3): 431 – 437.
- Huang Jia-lin, Li Shu-yun, Hu Hong. 2014. ISSR and SRAP markers reveal genetic diversity and population structure of an endangered slipper orchid, *Paphiopedilum micranthum* (Orchidaceae). Plant Diversity, 36 (2): 209 – 218. (in Chinese)
- 黄家林, 李树云, 胡 虹. 2014. 珍稀濒危植物硬叶兜兰的遗传多样性及遗传结构研究. 植物分类与资源学报, 36 (2): 209 – 218.
- Kussell E, Leibler S. 2005. Phenotypic diversity, population growth, and information in fluctuating environments. Science, 309 (5743): 2075 – 2078.
- Li A, Luo Y B, Ge S. 2002. Note: a preliminary study on conservation genetics of an endangered orchid (*Paphiopedilum micranthum*) from southwestern China. Biochemical Genetics, 40 (5 – 6): 195 – 201.
- Li Ai-min, Lü Min-li, Zhou Chun-ming. 2018. Phenotypic diversity analysis of leaf traits in cultivated *Houttuynia cordata* Thunb. populations from Hunan Province. Plant Science Journal, 36 (1): 73 – 85. (in Chinese)
- 李爱民, 吕敏丽, 周春鸣. 2018. 同质园栽培下的湖南鱼腥草居群叶表型性状多样性分析. 植物科学学报, 36 (1): 73 – 85.
- Li Wen-ying, Gu Wan-chun. 2005. Study on phenotypic diversity of natural population in *Quercus mongolica*. Scientia Silvae Sinicae, 41 (1): 49 – 56. (in Chinese)

- 李文英, 顾万春. 2005. 蒙古栎天然群体表型多样性研究. 林业科学, 41 (1): 49 - 56.
- Li Y, Zhu L.Y, Li S Y, Hong H. 2010. Mycorrhizal specificity, preference, and plasticity of six slipper orchids from south western China. Mycorrhiza, 20 (8): 559 - 568.
- Li Ye-fang, Ma Shi-yu, Song Jie, Guan Wen-ling. 2019. Phenotypic diversity of three natural populations of *Rhododendron decorum*. Northern Horticulture, (1): 121 - 126. (in Chinese)
- 李叶芳, 马诗雨, 宋 杰, 关文灵. 2019. 大白花杜鹃三个天然居群的表型多样性分析. 北方园艺, (1): 121 - 126.
- Li Zong-yan, Li Jing, Ceng Wang-biao, Li Ming-yang. 2013. Genetic structure of *Paphiopedilum micranthum* populations from core distribution in southeast Yunnan. Journal of Plant Genetic Resources, 14 (3): 407 - 413. (in Chinese)
- 李宗艳, 李 静, 曾万标, 李名扬. 2013. 滇东南硬叶兜兰核心种质区群体遗传结构. 植物遗传资源学报, 14 (3): 407 - 413.
- Li Zong-yan, Li Ming-yang. 2015. Study on phenotypic variation of *Paphiopedilum micranthum* population. Journal of Plant Genetic Resources, 16 (4): 765 - 771. (in Chinese)
- 李宗艳, 李名扬. 2015. 硬叶兜兰居群表型变异研究. 植物遗传资源学报, 16 (4): 765 - 771.
- Li Zong-yan, Guan Ming-yuan, Li Jing, Li Ming-yang. 2016. Genetic diversity of *Paphiopedilum micranthum* detected by ISSR data. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 36 (7): 1351 - 1356. (in Chinese)
- 李宗艳, 管名媛, 李 静, 李名扬. 2016. 基于 ISSR 的硬叶兜兰居群遗传多样性研究. 西北植物学报, 36 (7): 1351 - 1356.
- Liu Hong, Luo Yi-bo, Liu Zhong-jian. 2013. Using guided commercialized cultivation models to promote species conservation and sustainable utilization: an example from the Chinese medicinal orchids. Biodiversity Science, 21 (1): 132 - 135. (in Chinese)
- 刘 虹, 罗毅波, 刘仲健. 2013. 以产业化促进物种保护和可持续利用的新模式: 以兰花为例. 生物多样性, 21 (1): 132 - 135.
- Long Bo, Long Chun-lin. 2006. Amazing *Paphiopedilum* and its research status. Chinese Journal of Nature, 28 (6): 341 - 344. (in Chinese)
- 龙 波, 龙春林. 2006. 兜兰属植物及其研究现状. 自然杂志, 28 (6): 341 - 344.
- Lu H C, Liu Z J, Lan S R. 2019. Genome sequencing reveals the role of MADS-box gene families in the floral morphology evolution of orchids. Horticultural Plant Journal, 5 (6): 247 - 254.
- Luo Yi-bo, Jia Jian-sheng, Wang Chun-ling. 2003a. A general review of the conservation status of Chinese orchids. Biodiversity Science, 11 (1): 70 - 77. (in Chinese)
- 罗毅波, 贾建生, 王春玲. 2003a. 中国兰科植物保育的现状和展望. 生物多样性, 11 (1): 70 - 77.
- Luo Yi-bo, Jia Jian-sheng, Wang Chun-ling. 2003b. Conservation strategy and potential advantages of the Chinese *Paphiopedilum*. Biodiversity Science, 11 (6): 491 - 498. (in Chinese)
- 罗毅波, 贾建生, 王春玲. 2003b. 初论中国兜兰属植物的保护策略及其潜在资源优势. 生物多样性, 11 (6): 491 - 498.
- Ming Jun, Gu Wan-chun. 2006. Phenotypic variation of *Syringa oblata* Lindl. Forest Research, 19 (2): 199 - 204. (in Chinese)
- 明 军, 顾万春. 2006. 紫丁香表型多样性研究. 林业科学研究, 19 (2): 199 - 204.
- Pan Hong-li, Li Mai-he, Cai Xiao-hu, Wu Jie, Du Zhong, Liu Xing-liang. 2009. Responses of growth and ecophysiology of plants to altitude. Ecology and Environment, 18 (2): 722 - 730. (in Chinese)
- 潘红丽, 李迈和, 蔡小虎, 吴 杰, 杜 忠, 刘兴良. 2009. 海拔梯度上的植物生长与生理生态特性. 生态环境学报, 18 (2): 722 - 730.
- Shi Jun. 2008. Pollination ecology of *Paphiopedilum* Pfitz. in China [Ph. D. Dissertation]. Beijing: Institute of Botany, Chinese Academy of Science. (in Chinese)
- 史 军. 2008. 中国兜兰属植物的传粉生态学研究[博士论文]. 北京: 中国科学院植物研究所.
- Suo Mo, Bi Yu-fen, Wang Hong-ze, Tang Min, Ye Guang. 2016. Relationship between morphology and elevation in native *Cymbidium tortisepalum* in Yunnan Province, China. Acta Ecologica Sinica, 36 (19): 6170 - 6177. (in Chinese)
- 索 默, 毕玉芬, 王鸿泽, 唐 敏, 叶 广. 2016. 云南野生莲瓣兰形态分异与海拔的关系. 生态学报, 36 (19): 6170 - 6177.
- Sun Hai-qin, Li Ang, Ban Wei, Zheng Xiao-ming, Ge Song. 2005. Morphological variation and its adaptive significance for *Changnienia amoena*, an endangered orchid. Biodiversity Science, 13 (5): 376 - 386. (in Chinese)
- 孙海芹, 李 昂, 班 玮, 郑晓明, 葛 颂. 2005. 濒危植物独花兰的形态变异及其适应意义. 生物多样性, 13 (5): 376 - 386.
- Tian Fan, Liao Xiao-feng, Wang Lian-hui, Zhu Guo-sheng, Gui Yang, Bai Xin-xiang. 2017. Classification and identification of mycorrhizal fungi of

- Paphiopedilum micranthum*. Northern Horticulture, (24): 116 - 122. (in Chinese)
- 田 凡, 廖小锋, 王莲辉, 朱国胜, 桂 阳, 白新祥. 2017. 硬叶兜兰菌根真菌的分类鉴定. 北方园艺, (24): 116 - 122.
- Tian Fan, Zhu Guo-sheng, Gui Yang, Bai Xin-xiang. 2012. Study on isolation and culture characteristics of *Paphiopedilum micranthum* mycorrhizal fungi. Northern Horticulture, (7): 61 - 64. (in Chinese)
- 田 凡, 朱国胜, 桂 阳, 白新祥. 2012. 硬叶兜兰菌根真菌的分离及培养特性研究. 北方园艺, (7): 61 - 64.
- Xiang Gui-sheng, Wang Qi-gang, Jian Hong-ying, Yan Hui-jun, Li Shu-fa, Zhang Hao, Qiu Xian-qin. 2018. Phenotypic diversity of natural populations of *Rosa soulieana* in Yunnan. Journal of Yunnan University (Natural Science Edition), 40 (4): 786 - 794. (in Chinese)
- 向贵生, 王其刚, 蹇洪英, 晏慧君, 李树发, 张 颢, 邱显钦. 2018. 云南川滇蔷薇天然居群表型多样性分析. 云南大学学报 (自然科学版), 40 (4): 786 - 794.
- Xu Y F, Jia R D, Zhou Y H, Cheng H, Zhao X, Ge H. 2018. Development and characterization of polymorphic EST-SSR markers for *Paphiopedilum henryanum* (Orchidaceae). Applications in Plant Sciences, 6 (5): 1 - 6.
- Yan Ting-yu, Du Xiao-lin. 2009. Application of cluster analysis from SAS system in the process of agricultural research and statistics analysis. Journal of Beijing University of Agriculture, 24 (1): 73 - 75. (in Chinese)
- 颜亭玉, 杜晓林. 2009. SAS 聚类分析过程在农业试验统计分析中的应用. 北京农学院学报, 24 (1): 73 - 75.
- Yang Shu-hua, Guo Ning, Ge Wei-ya, Yang Shuang, Liu Xin-yan, Jia Rui-dong, Ge Hong. 2013. Phenotypic diversity of *Rosa platyacantha* populations in eastern Tianshan Mountains of Xinjiang. Journal of Plant Genetic Resources, 14 (3): 455 - 461. (in Chinese)
- 杨树华, 郭 宁, 葛维亚, 杨 爽, 刘新艳, 贾瑞冬, 葛 红. 2013. 新疆东天山地区宽刺蔷薇居群表型多样性分析. 植物遗传资源学报, 14 (3): 455 - 461.
- Zeng Jie, Zheng Hai-shui, Gan Si-ming, Bai Jia-yu. 2005. Phenotypic variation in natural populations of *Betula alnoides* in Guangxi, China. Scientia Silvae Sinicae, 41 (2): 59 - 65. (in Chinese)
- 曾 杰, 郑海水, 甘四明, 白嘉雨. 2005. 广西西南桦天然居群的表型变异. 林业科学, 41 (2): 59 - 65.
- Zhang Xiaoxiao, Song Chao, Zhang Yanlong, Niu Lixin, Zhang Qingyu, Xie Lihang. 2017. Phenotypic diversity of *Paeonia rockii* populations in Qinling and Ziwuling Mountain areas. Acta Horticulturae Sinica, 44 (1): 139 - 150. (in Chinese)
- 张晓晓, 宋 超, 张延龙, 牛立新, 张庆雨, 谢力行. 2017. 秦岭与子午岭地区紫斑牡丹居群表型多样性研究. 园艺学报, 44 (1): 139 - 150.
- Zhang Yu, Wang Miao-miao, Zhang Xue, Zhao Shi-wei. 2013. The study on numerical taxonomy of *Cypripedium* in north and northeast China. Acta Horticulturae Sinica, 40 (5): 933 - 942. (in Chinese)
- 张 毓, 王苗苗, 张 雪, 赵世伟. 2013. 中国华北和东北地区杓兰属植物的数量分类研究. 园艺学报, 40 (5): 933 - 942.
- Zhou Yan, Zhou Hong-ying, Zhu Li, Zhou Qing. 2013. Aseptic germination and rapid propagation of *Paphiopedilum micranthum* Tang. Guizhou Science, 31 (5): 79 - 82. (in Chinese)
- 周 艳, 周洪英, 朱 立, 周 庆. 2013. 硬叶兜兰的无菌播种和离体快速繁殖. 贵州科学, 31 (5): 79 - 82.
- Zhou Yan-hui, Jia Rui-dong, Yang Shu-hua, Zhao Xin, Ge Hong, Luo Wen-mei, Zhao Xin-mei, Sang Yi-heng. 2016. Phenotypic diversity of *Paphiopedilum armeniacum* populations. Acta Horticulturae Sinica, 43 (7): 1337 - 1347. (in Chinese)
- 周妍慧, 贾瑞冬, 杨树华, 赵 鑫, 葛 红, 罗文美, 赵新梅, 桑益恒. 2016. 杏黄兜兰居群表型多样性分析. 园艺学报, 43 (7): 1337 - 1347.