

额尔齐斯河流域银白杨克隆结构及多样性研究

郑书星^{1,2}, 张建国^{1*}, 段爱国¹, 何彩云¹, 保尔江³, 王健³

(1. 中国林业科学研究院林业研究所, 林木遗传育种国家重点实验室, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091;
2. 中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 云南 昆明 650224; 3. 阿勒泰地区林业科学研究所, 新疆 阿勒泰 836500)

摘要:新疆额尔齐斯河流域河谷的银白杨天然林呈雌雄独立斑块状分布, 为了解其成因及分布模式, 利用 SSR 分子标记技术对根据 2 种采样策略采集的银白杨样本进行了克隆结构和克隆多样性研究。结果表明: (1) 运用 12 对 SSR 引物对采自各雌雄独立斑块的所有样本进行分析, 发现所有样本单株是同 1 个无性系克隆, 斑块内只有 1 个基株, 即斑块居群是单克隆结构; (2) 整个流域不同斑块所采集的 90 个样本用 12 对 SSR 引物进行扩增分析, 共检测到 53 个基因型(克隆基株), 银白杨居群克隆多样性水平较高, Simpson 指数(D)平均为 0.983, 基因型比率 PD 平均为 0.589。银白杨以根孽方式繁殖后代, 其最初建群时由多个不同基因型克隆基株形成了较高的克隆多样性, 现存植株是克隆后代或克隆后代的后代。

关键词:银白杨; 克隆结构; 克隆多样性; SSR

中图分类号: S718 文献标识码: A

Clonal Structure and Clonal Diversity of *Populus alba* along the Erqis River

ZHENG Shu-xing^{1,2}, ZHANG Jian-guo¹, DUAN Ai-guo¹, HE Cai-yun¹, BAO Er-jiang³, WANG Jian³

(1. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Key Laboratory of Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China; 2. Research Institute of Resource Insects, Chinese Academy of Forestry, Kunming 650224, Yunnan, China; 3. Aletai Research Institute of Forestry, Aletai 836500, Xinjiang, China)

Abstract: The populations of *Populus alba* present a independently distributing pattern of male or female patch. To realize the form reason and distributing mode, we selected 12 microsatellite primers to study the clonal structure and clonal diversity of *Populus alba* base on two sampling strategy. The result showed that: (1) all swatches in a single distributing patch of male or female were a identical clone, the single patch had only one genet; (2) we differentiated 53 genotypes (genet) among the 90 plants sampled of all patches. The populations of *Populus alba* had an abundant clonal diversity and the mean Simpson's index was 0.983, and mean PD was 0.589. The progeny of *Populus alba* was reproduced by root clone. The high clonal diversity might be maintained if the populations were initially founded by multiple genets that differed genetically and the existent frond was the progeny of clonal genets.

Key words: *Populus alba*; clonal structure; clonal diversity; SSR

多数植物具有有性生殖和无性生殖 2 种繁殖方式。研究以无性繁殖为主的植物种群的克隆结构和克隆多样性, 有助于了解克隆植物种群的形成、维持和衰退机制, 以及植物定居、侵殖和演替的机理^[1]。

克隆结构是指克隆植物种群内基株和各克隆分株在空间上的分布模式, 而克隆多样性是指 1 个克隆植物种群由多少个遗传基因型不同的个体组成, 克隆多样性在很大程度上决定了克隆植物的遗传多样

收稿日期: 2009-06-09; 修回日期: 2013-03-10

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目“额尔齐斯河天然杨树种群遗传多样性研究”(201004035)

作者简介: 郑书星(1979—), 男(土家族), 助理研究员, 主要从事植物分子生态研究。

* 通讯作者: 研究员, 博士生导师。

性,同时又能指示该种群的有性繁殖程度和种群建立初期的个体数。近年来,这一方面的研究已成为克隆植物的研究热点之一,国内外的学者也取得了一定的研究成果,如对草本植物如矮慈姑(*Sagittaria pygmaea* Miq.)^[2]、鹅绒委陵菜(*Potentilla anserina* L.)^[3]、华山新麦草(*Psathyrostachys huashanica* Keng ex P. C. Kuo)^[4]、黄花杓兰(*Cypripedium flavum* Hunt et Summerh.)^[5]、珠芽蓼(*Polygonum viviparum* Linn. (*Bistorta vivipara* (L.) S. F. Gray))^[6]及乔木如欧洲山杨(*Populus tremula* L.)^[7]、美洲山杨(*P. tremuloides* L.)^[8]等的研究,但未有对银白杨(*P. alba* L.)天然林分的研究。沿额尔齐斯河流域分布的银白杨天然林分,其结构单一、林龄相近、呈雌雄独立斑块状分布,整个流域内许多独立斑块组成了1个大斑块,而若干大斑块又组成了1个种群。本研究应用SSR分子标记,对额尔齐斯河流域河谷分布的银白杨天然居群进行克隆结构及克隆多样性研究,以初步揭示银白杨的繁殖策略及斑块状分布模式的成因,为进一步揭示银白杨的克隆生长和生态适应性

提供基础资料,为这一独特的生态资源库的保存提供理论依据。

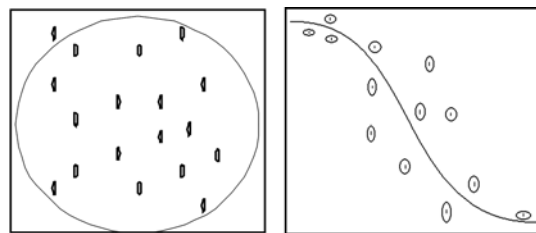
1 材料与方法

1.1 实验材料与采样策略

本研究所用的实验材料采自新疆阿尔泰地区额尔齐斯河(47°21'~48°00' N, 85°42'~87°48' E; 海拔424~500 m)(表1);运用2种采样策略(图1):(1)探明1个银白杨斑块的克隆结构,有几个基株、各有多少个分株,采集2个独立分布的雌雄斑块内的所有植株,分别编号为F(♂,32个样)、G(♀,38个样);(2)分析不同斑块间的遗传关系,在基于采样策略1的研究基础上,在每个独立分布的斑块内采1个样,沿额尔齐斯河流域在4个地点共采集90个斑块样本,斑块间隔100 m以上。第1个地点采样20个,编号为Y1-3至Y1-22;第2个地点采样20个,编号为Y2-1至Y2-20;第3个地点采样25个,编号为Y3-1至Y3-25;第4个地点采样25个,编号为Y4-1至Y4-25。

表1 银白杨天然居群SSR分析样本采集点及生境条件

居群编号	采样地点	经度(E)	纬度(N)	海拔/m	样本数/个	生境
Y1	北屯哈拉西里克	87°48'19"	47°21'50"	500	20	路边草地
Y2	北屯克孜勒哈英	87°15'33"	47°33'26"	475	20	路边草地
Y3	布尔津平原林场	87°03'26"	47°34'59"	471	25	草地
Y4	哈巴河比列兹河口	85°42'11"	48°00'03"	424	25	河滩



注:(1)采集一个独立分布斑块内的所有植株,每个点表示一个植株样本;(2)沿额尔齐斯河流域的不同斑块内采集一个样本,椭圆表示一个独立分布的斑块,黑色点表示每个斑块内采集的一个植株。

图1 银白杨采样策略

1.2 方法

本实验利用SSR分子标记技术对银白杨天然林进行克隆结构及遗传多样性分析。

1.2.1 基因组DNA提取及SSR扩增反应 采集样本的枝条于室内水培,选取萌发的幼嫩叶片,用天根生化科技(北京)有限公司的植物基因组DNA提取试剂盒提取样本的基因组DNA。

SSR扩增中的引物来自 <http://www.ornl.gov/>

sci/ipgc/ssr_resource.htm中提供的杨树SSR引物序列。共选择了已Mapped的50对引物序列,从中筛选了12对扩增条带清晰、重复性好的引物用于实验分析(表2)。

SSR扩增体系为25 μL: 50 ng基因组DNA, PCR Buffer (10 mmol · L⁻¹ of Tris-HCl (pH值8.3), 50 mmol · L⁻¹的KCl, 1.5 mmol · L⁻¹的MgCl₂), 0.2 mmol · L⁻¹ dNTP, 0.2 μmol · L⁻¹反应引物,

1 U Taq 酶 (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Japan), 用去离子水补足总体积。扩增程序设定为: 94 °C 预变性 3 min; 36 个循环(94 °C 变性 30 s, 54 ~ 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 105 s); 72 °C 延伸 10 min。扩增反应在 GeneAmp® PCR system 9700 型扩增仪上进行。扩增产物用 4% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染方法检测结果。

1.2.2 数据分析 扩增产物经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 在玻璃板上获得图谱。根据分析软件要求记录数据时, 在玻璃板同一位置, 1 个样品在该地方电泳显示有带, 就记录数据“1”; 另一样品在该地方电泳显示没有出现条带, 就记录数据“0”。多个引物扩增结果显示带型完全一致的样品, 可推测为同一个克隆系。为了解不同克隆之间的遗传关系, 用 PHYLIP 3.67e (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) 和 NTSYS 软件分析数据, 根据遗传距离做聚类分析。

为分析克隆居群的克隆结构和克隆多样性, 运用几种常用的度量指标^[9-11]:

(1) 基株数目 (G): G 即是居群中基株的总数目, 所有扩增位点基因型相同的植株可视作同一基株。

(2) 平均克隆大小 (N/G): 其数值表示平均每个基株含有的克隆分株数, N 是实验样本数。

(3) 不同基因型比率 (PD): 以 G/N 估算, N 是所分析样本数。

(4) Simpson 多样性指数 (D): D 值可表示物种的多样性和均匀度, 在本实验分析中用于度量居群内的克隆多样性。公式为:

$$D = 1 - \sum(n_i(n_i - 1)) / (N(N - 1)) \quad (1)$$

式(1)中: n_i 是第 i 个基因型的分株数, N 是样本大小。 D 值变动范围是 0 ~ 1, 0 表示种群所有样本是同一种基因型, 1 表示所有的样本都是不同的基因型。

(5) 基因型分布均匀度 Fager 指数 (E):

$$E = (D - D_{\min}) / (D_{\max} - D_{\min})$$

$$D_{\min} = ((G - 1)(2N - G)) / (N(N - 1))$$

$$D_{\max} = (N(G - 1)) / (G(N - 1)) \quad (2)$$

Fager 指数 (E) 表示居群内基因型分布的均匀度, $E=0$ 表示种群内所有个体的基因型都不同或有 1 个基因型占据绝对优势而其它基因型都只有一个个体; $E=1$ 表示种群内所有基因型都有相同的个体数。

表 2 SSR 引物序列

编号	引物名称	前引物	后引物	长度/bp	碱基	重复数/次	片段长度/bp
P6	GCPM_1063	AGTTAATTGCCGATGTTCTT	AAACAAACTCCAGCAAACAT	165	ca	16	49
P7	GCPM_1065	TGCAATCATATATTCCTCCC	ATAAAATTACTGCGTGCCAT	156	ac	9	100
P13	GCPM_114	TTAGCCATTGGATTTCATT	CATTGCACTCTCACACATTC	112	ttc	6	253
P16	GCPM_1158	ATGCACTTCCTTCCAATTA	ATCAGTTCCTTCAGCTTCAA	225	ctg	6	104
P24	GCPM_124	TTTGAGCACTTCAACTACCA	TGTCTCCCTTAGTCACCAC	198	cac	6	123
P29	GCPM_1252	AGCGTCTCAATGTTTTGTTT	TTTGCTTCAGGTTTATTTC	149	aata	4	73
P30	GCPM_1255	GAACCTTAAAACCAGAACCC	GAGCCACAGAAATACTGCTC	207	ag	23	110
P31	GCPM_1260	CACAGGAACCTGTTATCAT	CTGGCATTCTTCTAAGCTA	134	tg	11	45
P35	GCPM_1274	CCCTGATACTTGTGGACCTA	CCCGTATAATATG	195	ttat	5	77
P42	GCPM_1353	GAAAACGTATTCCTGATTCG	CAAGAATCAATGCATGTCTG	150	at	9	71
P45	GCPM_1376	TGTCAAATAGTAGCATCCCC	CCACCTTGACTTTTCTTCTG	105	at	11	110
P48	GCPM_139	ATGACATGACATGATTGGAA	CTTCTGCTGGAAGAAGAAA	227	gt	15	147

2 结果与分析

2.1 单斑块克隆结构及多样性

根据采样策略 1 采集的银白杨雌雄独立分布斑块 F、G 共 70 个样本, 利用筛选的 12 对 SSR 引物对其进行 PCR 扩增, 扩增产物经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳得到指纹图谱。

图 2 所示的是引物 GCPM_1255 对银白杨 F 斑

块 / G 斑块内的部分样本 PCR 扩增产物的电泳图谱, 从图中可看出斑块内的植株的电泳带型一致。根据电泳实验结果分析可知, 对独立斑块状分布的 F (或 G) 斑块内的所有样本进行 PCR 扩增, 12 个引物扩增产物的电泳图谱带型一致, 应具有相同的基因型; 同时根据实地调查发现, 斑块内植株林龄相近、裸露地表的根系相连, 这直观的证明了银白杨植株能通过根蘖方式来进行无性繁殖, 即在 1 个独立

分布状的斑块内所采集的所有样本单株是同 1 个无性系克隆, 斑块内只有 1 个基株, 即斑块群体是单克隆结构。

对 F/G 斑块样本, 根据 12 对 SSR 引物实验分析得到的数据用 PHYLIP 软件进行聚类分析(图 3)。由图 3 可见: F 斑块的所有样本完全聚类在一

起, 遗传相似系数为 1; G 斑块也是相同的聚类结果; 但 F 和 G 斑块样本之间还是有遗传差异的, 遗传距离为 0.020。根据采样的实地位置, 作出 F 和 G 斑块内无性系分株的位置图(图 4), 所有来自同一基株的无性系分株用相同的图形和颜色表示。

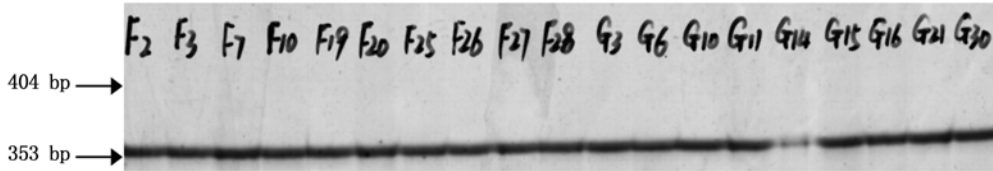


图 2 SSR 引物 GCPM_1255 扩增银白杨部分样品的电泳图(F、G 分别表示斑块内采样植株号)

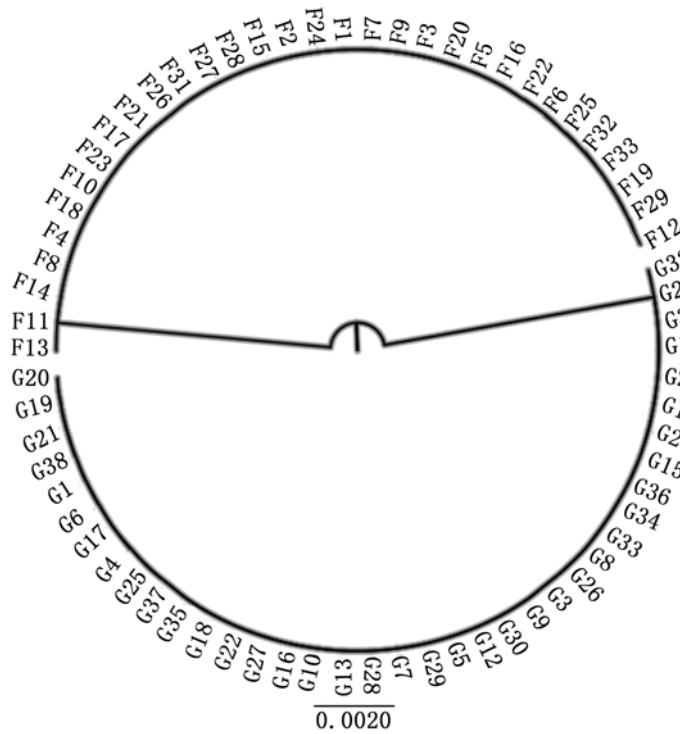


图 3 银白杨 F/G 斑块内样本 UPGMA 聚类图

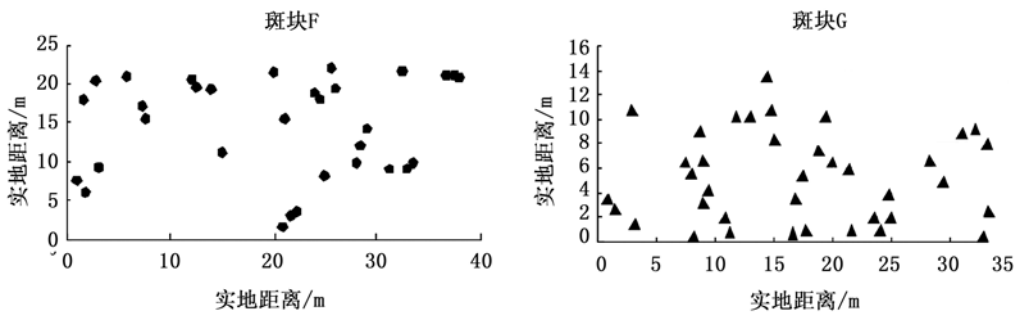


图 4 银白杨 F/G 斑块内样本位置图

2.2 银白杨居群的克隆多样性

对银白杨独立分布斑块这一小尺度的研究结果分析表明:每一个斑块的所有无性系来自1个基株;但在整个流域大尺度的角度上,不同斑块间的克隆多样性如何,需要根据采样策略(2)采集的样本进行分析。

用筛选出的12对SSR引物对沿额尔齐斯河流域4个不同地点采集的银白杨居群的90个样本进行PCR扩增。图5所显:其中的一对SSR引物“GCPM_1063”对银白杨不同居群部分样本的扩增电泳图谱,Y2-11、Y2-12、Y2-19的电泳图谱一样,表明一个居群内的不同斑块间的样本可能属于同一个克隆系;同时,也可看出不同居群的多个斑块的样本具有不同的带型,表明从不同斑块所采集的样本也具有明显的遗传多态性。

表3所示的是银白杨各居群的基株(G)、平均克隆大小(N/G)、基因型比率(PD)、 D 值等指标。统计分析表明:平均克隆大小为1.698,变幅为1.087~1.429,Y2居群最高,为1.429,而Y3居群的平均克隆大小(N/G)最低,为1.087;基因型比率(PD)为0.589,变幅是0.700~0.920;克隆多样性显示指标 D 值则表明,Y3居群最高(0.993),Y2居群最低(0.958),平均为0.983;居群Fager指数的平均值为0.947,相较于Ellstrand等^[9]对21种克隆植物的比较结果($E=0.680$),银白杨居群的这一指标值要高。表3所示:银白杨4个居群所分析的90个样本中共检测到53个基因型(克隆基株),且基因型数目在各居群中不同;这说明银白杨居群是由多基因型构成,居群间基因型多样性较高。

表3 银白杨居群的克隆多样性

种群	样本大小/个	基株/个	平均克隆大小/个	基因型比率	Simpson 多样性指数	均匀度
Y1	20	16	1.250	0.800	0.963	0.401
Y2	20	14	1.429	0.700	0.958	0.778
Y3	25	23	1.087	0.920	0.993	0.516
Y4	25	18	1.389	0.720	0.967	0.778
居群	90	53	1.698	0.589	0.983	0.947

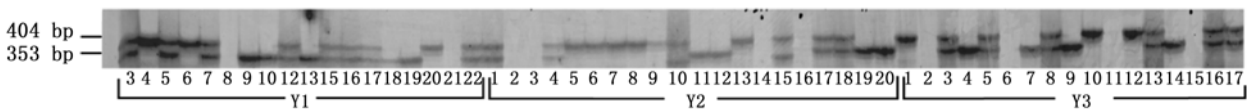


图5 SSR引物GCPM_1063扩增银白杨部分样品的电泳结果

2.3 银白杨居群的克隆结构和聚类分析

通过SSR电泳图谱和实验数据计算分析了银白杨居群的克隆分布情况。4个居群的克隆数目(基株数目)大小不同(14~23个),而从整个流域大尺度分析可知:总群体的克隆数目(基株数目)为53个,其中,18个基株具有多个无性系分株,另有35个基株只有1个无性系分株。所有由不同斑块组成的4个居群都是多克隆居群,没有发现单克隆居群(独立分布的斑块是单克隆结构)。从居群的克隆空间格局分析,相邻斑块可能属于同一克隆;但是,相距较远的斑块也具有相同的基因型,例如Y2,Y3和Y4居群的部分个体。这表明银白杨居群内的克隆结构有明显的镶嵌现象。

根据多个引物扩增的电泳图谱的带型判读,获得0/1数据矩阵;运用NTSYS软件对数据矩阵进行

处理,对银白杨居群不同实验样本(不同独立分布斑块)进行聚类分析,结果显示:同一居群的样本通常先聚为一类,再与其它居群样本聚类;但也有不同的居群样本先聚为一类。图6为银白杨Y2居群的聚类结果(其它种群聚类图略),Y2居群20个实验样本聚为14支,其中,个体1/2/3,5/6,7/8,11/12/19分别属于同一克隆,其余的个体都是1个单独的克隆,具有独有的基因型。

3 讨论

银白杨是雌雄异株植物,可产生种子来繁殖后代,但为什么雌雄株是各自形成一个个独立斑块,且每一个斑块内的植株都具有相同的基因型呢?通过对独立斑块(小尺度)的实地调查和SSR实验分析,本研究发现:每一个斑块内的植株其林龄相近,林下

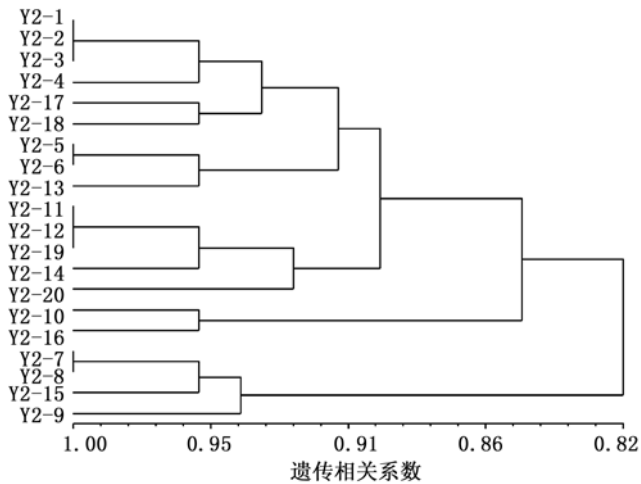


图6 银白杨 Y2 种群聚类图

没有更新的幼苗;斑块内所采集的所有样本单株是同一个无性系克隆,斑块内只有1个基株,即斑块群体是单克隆结构。分析其原因可能是:(1)排斥效应。在不同的生境条件下,银白杨占优势生态位的雌(雄)株排斥雄(雌)株。如 McLetchie 等^[12]以模型手段研究了雌雄异株克隆生物地钱局域种群的性比动态,发现在轻微和中度干扰情况下,雌性个体逐渐排斥雄性个体;而在严重干扰情况下,雄性个体逐渐排斥雌性个体。(2)克隆繁殖。杨树植株可通过根蘖方式繁殖新个体,有研究表明^[13],欧洲山杨的根系可从母株延伸至40 m的范围。在实地调查中发现,银白杨斑块内相邻的几个植株裸露在地表的根系是相连的,这直观的证明了银白杨植株能通过根蘖方式来进行无性繁殖;同时,由于人为分流额尔齐斯河水量引起流域内地下水位下降、牲畜啃食等破坏活动,使得银白杨产生的大量种子无法在合适的环境下产生实生苗。许多植物通常都具有性生殖和无性生殖2种繁殖方式,在干旱、高山等胁迫环境中生长的植物,其克隆繁殖占优势而有性生殖方式往往被限制^[14-16];这是因为克隆繁殖植物通过快速繁殖、幼苗高成活率等优势,能在短期内占据不同生境尤其是不良环境^[17],从而保证了物种的繁衍。

以往人们普遍认为克隆繁殖会导致种群内遗传变异下降^[18],但近年来的研究表明,克隆植物居群也具有较高的遗传多样性。如在对1年或多年生草本植物矮慈姑^[2]、鹅绒委陵菜^[3]、华山新麦草^[4]、黄花杓兰^[5]、珠芽蓼^[6]及乔木如欧洲山杨^[7]等的研究中发现,各种克隆植物居群具有较高的遗传多态性、度量居群内克隆多样性的 Simpson 多样性指数(D)具有较大的数值。基因型多样性 Simpson(D)指数

能反映物种居群中特定基因型的相对频率。如果取样范围内居群中每个样本的遗传基因型都不同,则相应的 D 值就高,当 D 值等于1时就表明每个个体有其独特的多位点基因型;较低的 D 值则表明在如果居群内有一些样本的遗传基因型相同,则相应的 D 值就低,那么当 D 值等于0就说明所有个体具有共同的多位点基因型。本研究中,从流域大尺度研究分析银白杨天然居群的 Simpson 指数(D)为0.983,这表明银白杨天然居群具有较高的克隆多样性。影响植物的克隆多样性的因素包括有实生苗补充、环境异质性、体细胞突变、基因流等。很低的实生苗更新足以保持一个种群的遗传多样性^[13];环境异质性则能促进植物不同基因型的固定^[19];而体细胞突变能有效补偿有性繁殖重组的缺失,以使克隆繁殖物种具有更强的环境适应性^[20]。在对额尔齐斯河流域银白杨天然居群研究分析中发现,其分布在河谷地区,没有明显的环境异质性;而由于人为活动及自然环境的影响,实生苗补充也难以发生;主要以根蘖方式克隆繁殖新的个体。那么,额河流域的银白杨天然林具有较高的克隆多样性,其原因可能是:在最初的银白杨建群过程中,由多个基因型不同的基株占据不同地点的生境,然后通过根蘖方式来繁殖后代;现在的植株是最初的基株的克隆后代或者克隆后代的后代。Jelinski 等^[8]在研究美洲山杨的结果中也提出了这样的观点。

额尔齐斯河流域河谷分布的银白杨天然林分,呈雌雄独立斑块状分布,以克隆方式繁殖后代。如果不存在突变、迁移、选择和经有性繁殖实现更新,那么随着时间的推移,种群内的克隆多样性最终会消失,直至只有一种基因型^[10]。因此,为了保存这一有价值的遗传基因资源以免其流失,应防止人为活动对现存天然林分的破坏;同时,可进行封育保存天然林分,并收集天然林的种子在适宜的地方建立种质基因资源库加以保存。

参考文献:

- [1] 阮成江,何祯祥,周长芳. 植物分子生态学[M]. 北京:化学工业出版社,2005
- [2] 陈锦华,汪小凡,吕应堂. 矮慈姑自然居群的克隆生长格局[J]. 武汉大学学报:理学版,2003,49(4):523-527
- [3] 陆建英,杨晓明,马瑞君. 青藏高原东缘鹅绒委陵菜种群克隆结构的研究[J]. 草业学报,2008,17(2):68-74
- [4] 刘占林,李珊,阎桂琴,等. 华山新麦草自然居群的遗传结构和种内遗传多态性研究[J]. 遗传学报,2001,28(8):769-777

- [5] 蔡凝枫,严 宁,胡 虹,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
- [6] 陆建英,马瑞君,孙 坤. 珠芽蓼种群克隆多样性及克隆结构的初步研究[J]. 植物生态学报, 2007, 31(4): 561-567
- [7] Marie-claire N, Andrew P, Francine T, *et al.* Clonal and spatial genetic structures of aspen (*Populus remuloide* Michx.) [J]. Molecular Ecology, 2005, 14(10): 2969-2980
- [8] Jelinski D E, Cheliak W M. Genetic diversity and spatial subdivision of *Populus tremuloides* (*Salicaceae*) in a heterogeneous landscape [J]. American Journal of Botany, 1992, 79(7): 728-736
- [9] Ellstrand N C, Roose M L. Patterns of genotypic diversity in clonal plant species [J]. American Journal of Botany, 1987, 74(1): 123-131
- [10] Parker K C, Hamrick J L. Genetic diversity and clonal structure in a columnar cactus, *Lophocereus schottii* [J]. American Journal of Botany, 1992, 79(1): 86-96
- [11] Fager E W. Diversity: a sampling study [J]. The American Nature, 1972, 106(949): 293-310
- [12] McLetchie D N, Garcia-Ramos G, Crowley P H. Local sex-ratio dynamics: a model for the dioecious liverwort *Marchantia inflexa* [J]. Evolutionary Ecology, 2001, 15(4-6): 231-254
- [13] Jobling J. Poplars for wood production and amenity [M]. London: Forestry Commission Bulletin, HMSO, 1990, 92: 1-75
- [14] Gray A. The vascular plant pioneers of primary successions: persistence and phenotypic plasticity [M]//Miles J, Walton D. Primary Succession on Land. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1993: 179-191
- [15] Stocklin J, Baumler E. Seed rain, seedling establishment and clonal growth strategies on a glacier foreland [J]. Journal of Vegetation Science, 1996, 7(1): 45-56
- [16] Klimes L, Klimesova J, Hendriks R, *et al.* Clonal plant architecture: a comparative analysis of form and function. In de Kroon H and van Groenendael J, The Ecology and Evolution of Clonal Plant [M]. Leiden: Backhuys Publishers, the Netherlands, 1997: 1-29
- [17] Barret S C H, Shore J S. Isozyme variation in colonizing plants [M]//Eds D, Soltis P. Isozymes in Plant Biology Portland, Oregon: Diosscoredes Press, 1989: 106-126
- [18] McLellan A J, Prati D, Kaltz O, *et al.* Structure and analysis of phenotypic and genetic variation in clonal plants [M]//de Kroon H, Van Groenenda J M. The Ecology and Evolution of Clonal Plants. Leiden: Backhuys Publishers, 1997
- [19] Torimaru T, Tomaru N, Nishimura N, *et al.* Clonal diversity and genetic differentiation in *Ilex leucoclada* M. patches in an old-growth beech forest [J]. Molecular Ecology, 2003, 12(4): 809-818
- [20] Lynch M, Milligan B G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers [J]. Molecular Ecology, 1994, 3(2): 91-99