

## 基于叶绿体基因序列 *rbcL-accD* 研究蕈子蕨的 分子遗传多样性和谱系地理结构

刘海瑞<sup>1, 2</sup> 高庆波<sup>1</sup> 张发起<sup>1</sup> 邢睿<sup>1</sup> 迟晓峰<sup>1</sup> 陈世龙<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院高原生物进化与适应重点实验室, 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008; 2. 中国科学院大学, 北京 100039)

**摘要** 蕈子蕨是蕈子蕨属的一种多年生草本植物, 主要分布在青藏高原东北部及邻近高山地区和日本, 为东亚特有种。本文基于叶绿体 DNA 基因间隔区 *rbcL-accD* 序列, 对蕈子蕨物种水平的序列特征、分子遗传多样性和谱系地理结构进行研究。分析结果发现该区域蕈子蕨种群的遗传变异主要来自于居群间(72.28%), 优势单倍型(H2)广泛分布, 特有单倍型分散在多个居群。居群间遗传分化系数  $N_{ST} < G_{ST}$ , 没有检测到显著谱系地理结构, 而且居群间基因流较低( $N_m = 0.096$ ), 青藏高原及其邻近地区特殊地形和生态环境造成的地理隔离或者生境异质化可能是现有单倍型分布格局形成的原因。种群动态历史分析显示蕈子蕨经历过不显著的种群选择或者扩张事件。综合分析推测蕈子蕨居群应该是在间冰期或者冰期后从不同避难所扩散形成现在的分布格局, 具体避难所还需进一步深入研究才能确认。

**关键词** 蕈子蕨; 遗传多样性; 谱系地理结构; 叶绿体基因序列

中图分类号: Q949.781.2 文献标志码: A doi: 10.7525/j.issn.1673-5102.2018.02.016

## Genetic Diversity and Phylogeographic Structure of *Triosteum pinnatifidum* based Chloroplast DNA Sequence *rbcL-accD*

LIU Hai-Rui<sup>1, 2</sup> GAO Qing-Bo<sup>1</sup> ZHANG Fa-Qi<sup>1</sup> XING Rui<sup>1</sup> CHI Xiao-Feng<sup>1</sup> CHEN Shi-Long<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008; 2. University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

**Abstract** *Triosteum pinnatifidum* is perennial herb belonging to *Triosteum* (Caprifoliaceae) with the distribution in northwest Qinghai-Tibetan Plateau and adjacent mountain regions and Japan. It's endemic species of East Asia. We studied the sequence features, genetic variation and phylogeographic structure of *T. pinnatifidum* based on chloroplast DNA intergenic region *rbcL-accD*. Analysis of molecular variance for the whole populations revealed that 72.28% of total genetic variation occurred among populations, and 27.72% within populations. Dominant haplotype H2 had wide distribution while the private haplotypes could be found in different populations. There was no phylogeographic structure ( $N_{ST} < G_{ST}$ ) and low gene flow ( $N_m = 0.096$ ), indicating the geographic isolation and variable habitat created by the special topography or ecological environment on the Qinghai-Tibetan Plateau and adjacent mountain regions may form current distribution of haplotypes. *T. pinnatifidum* experienced nonsignificant species selection or expansion. Indeed, we speculate there were different refugias for *T. pinnatifidum* during glaciations, it spread to current locations during interglaciation or postglaciation. To know the details of refuges and the migration routes, more work are needed.

基金项目: 青海省应用基础研究计划(2016-ZJ-761); 国家自然科学基金(31400322)

第一作者简介: 刘海瑞(1986—), 男, 汉族, 博士研究生, 主要从事植物分子系统地理学研究。

\* 通信作者: E-mail: slchen@nwipb.cas.cn

收稿日期: 2017-09-21

Foundation item: Project supported by "Applied Basic Research Programs of Qinghai Province" (2016-ZJ-761); National Natural Science Foundation of China (31400322)

First author introduction: LIU Hai-Rui (1986—), male doctor student, mainly engaged in the research of botany molecular phylogeography.

\* Corresponding author: E-mail: slchen@nwipb.cas.cn

Received date: 2017-09-21

in future survey.

**Key words** *Triosteum pinnatifidum*; genetic variation; phylogeographic structure; cpDNA sequence

薤子蕨 (*Triosteum pinnatifidum* Maxim.) 又名羽裂叶薤子蕨, 隶属于忍冬科 (Caprifoliaceae) 薤子蕨属 (*Triosteum*), 多年生草本, 分布于中国的河北、山西、陕西、宁夏、甘肃、青海、河南、湖北和四川以及日本, 为东亚特有种。生于海拔 1 800 ~ 2 900 m 的山坡暗针叶林下和沟边向阳处<sup>[1]</sup>。薤子蕨的根、叶、果实均可入药, 具有一定药用价值; 味苦、涩、性平; 祛风除湿, 行气活血, 消食; 主治风湿性腰腿痛, 劳伤, 跌打损伤, 月经不调, 白带, 食积等<sup>[2]</sup>。目前对薤子蕨的研究主要集中在化学成分<sup>[3-5]</sup>、形态组织学<sup>[6]</sup>方面, 应用叶绿体基因片段对其分子遗传多样性和谱系地理结构的研究尚属首次。

植物分子水平上的遗传多态性直接反映为分子标记多态性。上世纪 70 年代 RFLP 分子标记技术的问世, 开创了直接检测和利用 DNA 分子的多态性。特别是 80 年代 PCR 技术的诞生, 使得体外直接扩增 DNA 的多态性成为可能。基于这一技术发明的创新性和它在应用上的广泛性, 分子标记技术发展迅速, 目前已经发展了多种基于 DNA 多态性的分子标记技术。包括随机扩增多态性 DNA (RAPD)、限制性片断长度多态性 (RFLP)、扩增片断长度多态性 (AFLP)、简单重复序列扩增 (SSR)、简单重复序列间扩增 (ISSR) 等分子标记技术被广泛应用在系统进化、品种鉴定及品种选育、遗传图谱构建、基因定位、分子育种及杂种优势预测等生命科学的各个领域。建立在 PCR 技术基础之上, 通过比较扩增序列间差异为原理的 DNA 测序技术极大地提高了分子标记分析效率。常用的序列标记主要来自于 3 个基因组系统, 分别是核基因组 (nuclear DNA, nDNA)、线粒体基因组 (mitochondrial DNA, mtDNA) 和叶绿体基因组 (chloroplast DNA, cpDNA)。3 个基因组的大小、起源及进化机制不同, 进化速率差别也很大<sup>[7]</sup>。叶绿体 DNA (cpDNA) 多数具有单亲遗传的特性, 在植物中大多数情况下为母系遗传。拥有独立的进化路线, 从而能更准确的反应出一系列的历史事件所遗留的印记。不同的 cpDNA 片段进化速率不同: 其中, 编码区的核苷酸变异较低, 适合较高分类水平的系统发育研究; 而非编码区的变异率较高, 适用于低分类类群和种内的系统学研究。

谱系地理学 (phylogeography) 最早由 Avise 于 1987 年提出, 与传统的生物地理学相比, 谱系地理学不仅仅局限于解释现有居群的分布状况, 而是更深入的探究居群形成现有分布格局的历史成因, 阐述其进化历程, 分析区域类群在时间和空间尺度上的动态变化, 进而重建生物区系的历史<sup>[8-11]</sup>。对单个物种的谱系地理学研究, 往往关注该物种冰期避难所及在气候变化过程中物种范围的变化等进化历史问题。本研究应用 cpDNA 间隔区片段 (intergenic regions) *rbcL-accD* 作为分子标记, 研究薤子蕨物种水平上的分子遗传多样性, 并结合地理分布初步探讨其谱系地理结构及可能成因。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究所用样品于 2008 ~ 2017 年分别采自四川、青海、山西、陕西四省, 共采集 12 个居群 92 个个体, 每个居群内采集 3 ~ 15 株植株叶片, 采集的植株相距 10 m 以上, 新鲜叶片用变色硅胶快速干燥保存带回实验室进行分析。取样信息见表 1。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 基因组 DNA 的提取与检测

依据改良的 CTAB 法从硅胶干燥的叶片中提取总 DNA<sup>[12]</sup>。通过 DNA 浓度分光光度计检测 DNA 浓度和纯度。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 完整性。

#### 1.2.2 PCR 扩增与 DNA 测序

采用通用引物 “*rbcL*” (5'-TAGCTGCTGCTT-GTGAGGTATGGA-3') 和 “*accD*” (5'-AAATACTAG-GCCCACTAAAGG-3') 扩增 cpDNA *rbcL-accD* 序列。扩增反应在 Eppendorf Mastercycler pro SPCR 仪上进行, 反应体系为 25  $\mu$ L, 内含 0.6  $\mu$ L 浓度约 20 ng  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup> 的模板 DNA、2.5  $\mu$ L 10  $\times$  PCR buffer (含 Mg<sup>2+</sup>)、1.0  $\mu$ L 10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> dNTPs、各 0.5  $\mu$ L 5 pM 的双向引物、0.2  $\mu$ L (1.5 单位) *Taq* 聚合酶 (中国大连 Takara)、19.7  $\mu$ L 双蒸水。扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 35 个循环: 95 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 6 min。将 PCR 扩增产物经电泳检测后由北京三博远志生物技术有限责任公司测序。

表 1 薤子蕪居群采样信息及单倍型分布

Table 1 Sample data and haplotypes of *T. pinnatifidum*

居群编号 Code	采集地点 Sample location	凭证标本号 Voucher specimens	纬度 Latitude( N)	经度 Longitude( E)	海拔 Altitude( m)	个体数 Number	单倍型 Haplotype
P1	青海班玛 Banma ,Qinghai	Chensl-0335	N32°48'46"	E100°49'08"	3 600	9	H2( 9)
P2	四川壤塘 Rangtang ,Sichuan	Chensl-1162	N32°19'16"	E100°49'50"	3 430	7	H2( 7)
P3	四川阿坝 Aba ,Sichuan	Chensl-1178	N32°35'55"	E101°14'26"	3 090	7	H2( 7)
P4	青海互助 Huzhu ,Qinghai	Chensl-1725	N36°55'07.5"	E102°22'01.1"	2 690	12	H2( 12)
P5	青海平安 Pingan ,Qinghai	Chensl-1759	N36°20'24.0"	E101°54'58.5"	2 690	7	H2( 3) H6( 4)
P6	青海乐都 Ledu ,Qinghai	Chensl-1820	N36°41'16.9"	E102°24'09.3"	2 650	3	H2( 3)
P7	四川红原 Hongyuan ,Sichuan	Chensl1842	N31°50'15.3"	E102°41'11.4"	3 370	3	H5( 3)
P8	四川炉霍 Luhuo ,Sichuan	Chensl1890	N31°37'29.0"	E100°43'12.0"	3 470	15	H2( 15)
P9	四川若尔盖 Ruoergai ,Sichuan	Chen2012028	N33°40'50.6"	E103°27'49.1"	3 150	13	H2( 13)
P10	陕西太白山 Taibaishan ,Shaanxi	Zhang2015005	N34°00'40"	E107°48'34"	2 863	5	H3( 2) H4( 3)
P11	山西历山 Lishan ,Shanxi	Zhang2015032	N35°30'46"	E111°56'02"	1 792	4	H1( 3) H2( 1)
P12	山西交城 Jiaocheng ,Shanxi	Zhang2015051	N37°50'45"	E111°28'02"	1 823	7	H1( 7)

### 1.3 数据处理

序列用 Clustal X 软件进行排序比对<sup>[13]</sup>加以手工校对。用 MEGA 5.1 计算序列碱基 A、T、C、G 含量及转换颠换比率。运用 DnaSP 软件<sup>[14]</sup>统计变异位点和单倍型,并计算核苷酸多样性( $\pi$ )、单倍型多态性( $h$ )。歧点分布(Mismatch distribution)分析也在 Dnasp 软件中完成。Arlequin 3.11 进行分子变异分析(Analysis of Molecular Variance, AMOVA),分别得出多态性在居群间和居群内的分布情况、 $F_{ST}$  值,并根据公式  $N_m = (1 - F_{ST}) / 4F_{ST}$  求出基因流。Tajima's D 和 Fu's  $F_s$  两种无限突变位点模型的中性检验方法分析也在 Arlequin 3.11 中进行。利用 PERMUT 软件计算居群内平均遗传多样性(average gene diversity within populations  $H_s$ )、总的遗传多样性(total gene diversity  $H_T$ )、居群间遗传分化系数  $G_{ST}$  (coefficient of gene differentiation)<sup>[15]</sup> 和  $N_{ST}$  值<sup>[16]</sup>。使用 U-统计方法对  $G_{ST}$  和  $N_{ST}$  进行比较(1 000 次重复的置换检验)。利用这些计算值可以检验单倍型变异的地理分布模式,当  $N_{ST}$  明显大于  $G_{ST}$  时( $P < 0.05$ ),

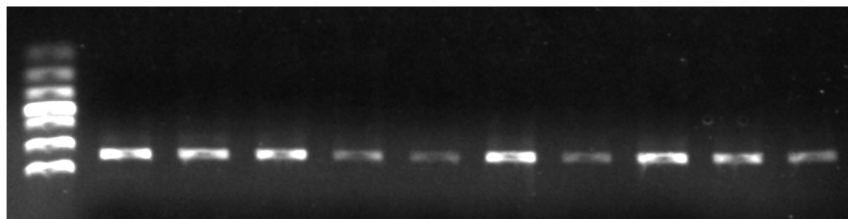
表示在同一区域亲缘关系相近的单倍型发生于同一居群中,并且存在着明显的分子系统地理学关系<sup>[17]</sup>。

以毛花忍冬(*Lonicera trichosantha*) 为外类群,应用 MrBayes3.2 软件构建贝叶斯演化树,以随机树为起始树,每隔 100 代采样一次,共运行 1 000 000 代,弃去最开始 25% 的预热树,剩余的树用来计算一致树和各分支的后验概率。在构建贝叶斯树之前先通过 MrModeltest 2.3 检测最优核苷酸替代模型(substitution model)<sup>[18]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 序列及单倍型分析

薤子蕪 cpDNA 序列 *rbcl-accD* 对位排列后长度为 757 bp, (G + C) 含量为 37.53%, 显著低于其 (A + T) 的含量。757 bp 碱基中存在 5 处变异位点,变异位点百分率为 0.66%,其中转换(transitions) 2 处(384 bp 处 A ↔ G, 438 bp 处 G ↔ A) 颠换(transversions) 3 处(404 bp 处 T ↔ A, 601 bp 处 A ↔ T, 613 bp 处 A ↔ T), 总体转换颠换比率(R) 为 0.484。

图 1 薤子蕪 *rbcl-accD* 序列扩增产物电泳图Fig. 1 Electrophoretogram of PCR production of *rbcl-accD* sequence

基于 5 处变异位点, DnaSP 共检测出 6 个单倍型(H1-H6)。单倍型 H2 出现在除 P7、P10、P12 之外的 9 个居群中, 分布最广泛; 单倍型 H3(P10, 陕西太白山)、H4(P10, 陕西太白山)、H5(P10, 四川红原)、H6(P5, 青海平安) 为特有单倍型, 分别只在一个居群中分布, 分布范围窄、出现频率低(表 1)。

## 2.2 薹子蕨 cpDNA *rbcL-accD* 序列遗传多样性及动态历史分析

薹子蕨 cpDNA *rbcL-accD* 序列 12 个居群的单倍型多样性( $H_d$ ) 范围从 0 ~ 0.600, 整体水平为 0.409 2。核苷酸多样性( $\pi$ ) 范围从 0 到 0.002 38, 整体水平为 0.000 67, P10 的单倍型多样性和核苷酸多样性最高, 分别为 0.600 和 0.002 38。AMOVA 分析显示 27.72% 的多态性来自居群内, 居群间的多态性占 72.28%, 表明薹子蕨的遗传变异主

要存在于居群间, 居群间具有较高的分化水平。

基于薹子蕨 cpDNA *rbcL-accD* 序列的 6 种单倍型用 PERMUT 软件计算结果表明, 居群内平均遗传多样性( $H_s$ ) 为 0.139, 总的遗传多样性( $H_T$ ) 为 0.597, 居群间遗传分化  $G_{ST}$  和  $N_{ST}$  分别为 0.767 和 0.764。使用 U 统计方法(1000 重复检验) 对整个分布区单倍型变异的地理分布模式进行检验, 结果为  $N_{ST} < G_{ST}$ , 这表明薹子蕨不存在显著谱系地理结构。基因流( $N_m = (1 - F_{ST}) / 4F_{ST}$ ) 依据 AMOVA 分析中的  $F_{ST}$  值计算为 0.096。

## 2.3 种群动态历史

在物种水平上对 *rbcL-accD* 序列进行失配分析, 得到单峰曲线(图 2), 符合近期扩张模型的假设, 同时中性检验值 Tajima's D 和 Fu's  $F_s$  分别为 -1.037 4 ( $P > 0.05$ )、-2.576 1 ( $P > 0.05$ ), 表明薹子蕨种群经历了不显著的种群选择或者扩张事件。

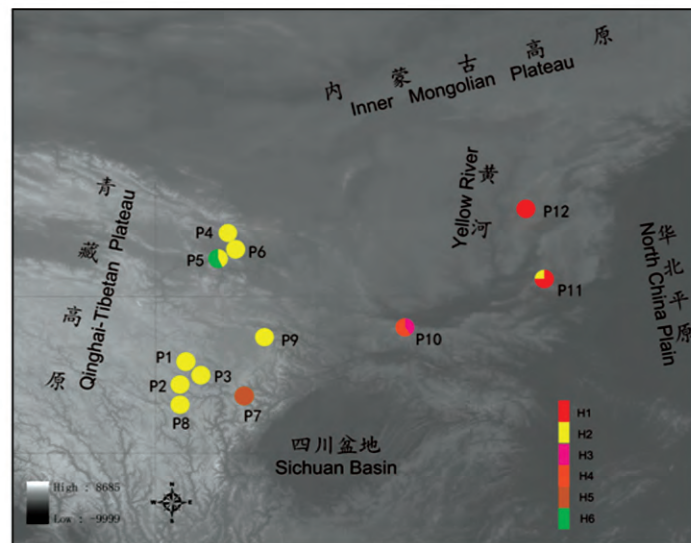


图 2 薹子蕨居群采样点及 *rbcL-accD* 序列单倍型分布图

Fig. 2 Geographic distribution of cpDNA haplotypes detected among 12 populations of *T. pinatifidum*. Pie charts show the proportions of haplotypes within each population.

## 2.4 系统发育分析

对 *rbcL-accD* 序列单倍型进行系统发育树重建得到的贝叶斯树(图 3) 显示各分支都得到了较高的后验支持率, 其中单倍型 H1 自成一支, 其余单倍型聚为一支。其中单倍型 H4、H5 又聚为小的分支, 表明虽然 H4(P10, 陕西太白山)、H5(P7, 四川红原) 分布在距离较远的不同居群, 但具有较近的亲缘关系。

## 3 讨论

近年来叶绿体基因组结构和序列信息被广泛

应用于揭示物种起源、进化演变及不同物种之间的亲缘关系和同一物种不同居群间的分化等方面<sup>[19-21]</sup>。主要原因如下: 首先, 植物基因组因其结构和功能上的差异, 进化速率也有所不同。总的来说, 核基因组进化最快, 约为叶绿体基因组的 2 倍; 线粒体基因组进化最慢, 还不到叶绿体基因组的 1/3<sup>[19]</sup>; 其次, cpDNA 为单性遗传, 有独立的进化路线, 不依赖于其它任何数据即可构建分子系统树, 可为从历史和系统发育的角度解释生物多样性提供可靠和准确的信息<sup>[22]</sup>。第三, 叶绿体基因序列编码区和非编码区序列进化速率相差较

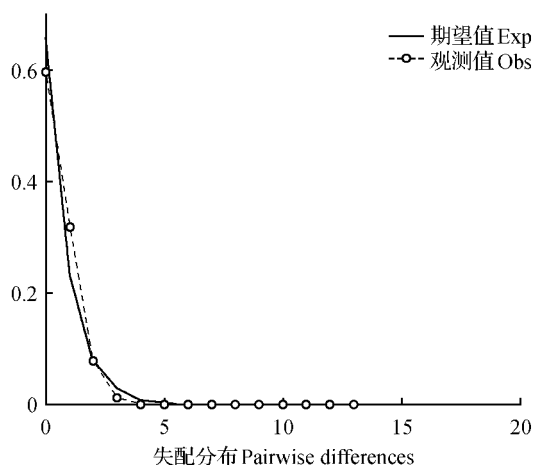


图3 薤子蕪所有个体的叶绿体基因片段 *rbcL-accD* 序列数据的歧点分布

**Fig. 3 Mismatch distribution for chloroplast DNA sequence data of *T. pinnatifidum*** Solid lines represent expected differences among sequences, whereas dashed lines are drawn from the observed differences.

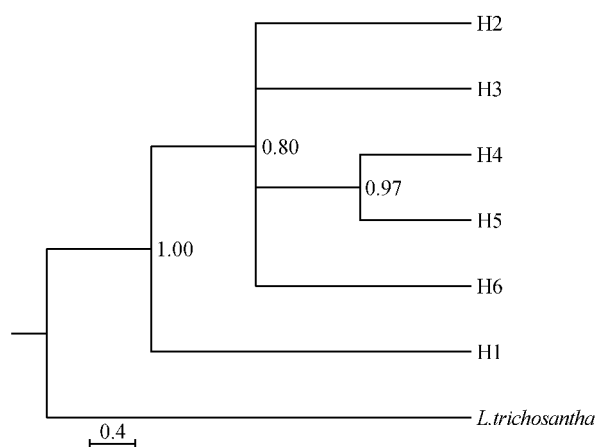


图4 叶绿体 DNA *rbcL-accD* 6 个单倍型构建贝叶斯树,分支上的数字分别表示贝叶斯后验概率(BPP)

**Fig. 4 Phylogenetic relationships inferred among the haplotypes of *T. pinnatifidum* based on the sequences of cpDNA from Bayesian inference** Posterior probabilities given at the nodes

大,可适于不同分类阶元的系统发育研究<sup>[23]</sup>。本研究中,叶绿体 DNA 基因间隔序列 *rbcL-accD* 提供了足够的位点信息,能够在一定程度上揭示薤子蕪居群间的进化关系。所以 cpDNA 序列 *rbcL-accD* 可以用于薤子蕪属植物的分子谱系地理学研究。

薤子蕪 cpDNA 序列 *rbcL-accD* 序列检测结果显示在序列的 5 处变异位点中,不存在片段的插入或者缺失,全部为点突变(表 2),这说明该地区

物种序列分化水平较低。基于 *rbcL-accD* 序列单倍型的 AMOVA 分析结果发现,基因多态性大部分来源于居群间,表现出较高的居群间遗传变异水平。叶绿体 DNA 统计数据显示被子植物的居群间的总的遗传多样性  $H_T = 0.660$ <sup>[24]</sup>,而薤子蕪的居群间总的遗传多样性 ( $H_T = 0.597$ ) 非常接近被子植物的平均值,但居群内的平均遗传多样性则较低 ( $H_S = 0.139$ )。我们认为青藏高原东北部边缘及其邻近高山地区复杂多样的地形、不同区域之间气候环境异质性为薤子蕪提供了适宜的生境,保持了该物种的遗传多样性。本研究中薤子蕪基因流  $N_m (0.096) < 1$ ,基因交流程度较低,因而居群之间的遗传变异大。所以,造成薤子蕪 cpDNA 序列 *rbcL-accD* 多样性水平低而居群间分化水平高的原因可能为以下两点:首先居群内采样数量少,致使居群没有表现出所有单倍型;其次由于地理隔离和环境因素的影响使得薤子蕪生境出现片段化,致使便于基因交流或者生境相似的居群出现相同或者关系相近的单倍型 (P1/P2/P3/P4/P5/P6 等),而基因交流被隔离或者生境差异较大的居群间表现出明显的遗传分化(如 P10/P11/P12 等)。

表 2 薤子蕪叶绿体 DNA *rbcL-accD* 片段 6 种单倍型间的序列变异位点

**Table 2 Variable sites of cpDNA haplotypes of *T. pinnatifidum***

单倍型 Haplotypes	变异位点 Variable sites					总数 Total
	384	404	438	601	613	
H1	A	A	A	A	T	10
H2	.	T	G	.	.	71
H3	.	T	.	T	.	2
H4	.	T	.	.	.	3
H5	G	T	.	.	.	3
H6	G	T	.	.	A	4

基于 cpDNA 序列进行的失配分析单峰结果符合近期扩张模型,中性检验结果 Tajima's D 和 Fu's Fs 也支持薤子蕪经历了种群选择或者扩张事件。由于该区域的薤子蕪优势单倍型(H2)分布广泛,特有单倍型(H3、H4、H5、H6)分布在距离较远的居群中,综合分析结果,我们推测薤子蕪在冰期存在多个避难所,间冰期或者冰期后从多个避难所中向外扩张。避难所的具体位置及扩散路线的确定还需要更大的样本量、更广的采样范围以及更多的基因标记才能进一步的研究推论。

## 参 考 文 献

- 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第 39 卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1988.  
Editorial Board of Flora of China. Flora of China [M]. Beijing: Science Press, 1988.
- 宋立人. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.  
Song L R. Chinese herbal medicine [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1999.
- 赵泽青, 苏艳芳, 黄雄. 蕤子蕤地上部分 1 个新的环烯醚萜 [J]. 中草药, 2016, 47(8): 1265 - 1268.  
Zhao Z Q, Su Y F, Huang X. One new iridoid from aerial parts of *Triosteum pinnatifidum* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2016, 47(8): 1265 - 1268.
- Chai X, Su Y F, Zheng Y H et al. Iridoids from the roots of *Triosteum pinnatifidum* [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2010, 38(2): 210 - 212.
- 周春东. 白果七化学成分研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.  
Zhou C D. Chemical constituents from *Triosteum pinnatifidum* Maxim [D]. Yangling: Northwest Agriculture and Forestry University, 2010.
- 曹丹, 李涛, 伍龙, 等. 蕤子蕤的形态组织学研究 [J]. 华西药理学杂志, 2014, 29(1): 56 - 58.  
Cao D, Li T, Wu L et al. Study on the morphology and histology of *Triosteum pinnatifidum* [J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014, 29(1): 56 - 58.
- Wolfe K H, Li W H, Sharp P M. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial chloroplast, and nuclear DNAs [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987, 84(24): 9054 - 9058.
- Avise J C, Arnold J, Ball R M et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics [J]. Annual Review of Ecology and Systematics, 1987, 18: 489 - 522.
- Avise J C. Phylogeography: retrospect and prospect [J]. Journal of Biogeography, 2009, 36(1): 3 - 15.
- Hewitt G M. Speciation, hybrid zones and phylogeography - or seeing genes in space and time [J]. Molecular Ecology, 2001, 10(3): 537 - 549.
- Hewitt G M. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 2004, 359(1442): 183 - 195.
- Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochemical Bulletin, 1987, 19: 11 - 15.
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F et al. The CLUST-AL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876 - 4882.
- Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. Bioinformatics Applications Note, 2009, 25(11): 1451 - 1452.
- Nei M. Molecular evolutionary genetics [M]. New York: Columbia University Press, 1987.
- Grivet D, Petit R J. Phylogeography of the common ivy (*Hedera* sp.) in Europe: genetic differentiation through space and time [J]. Molecular Ecology, 2002, 11(8): 1351 - 1362.
- Pons O, Petit R J. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles [J]. Genetics, 1996, 144(3): 1237 - 1245.
- Nylander J A A. MrModeltest v2. Program distributed by the author [R]. Norbyvägen: Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, 2004.
- 邢少辰, Clarke Jihong Liu. 叶绿体基因组研究进展 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(1): 21 - 28.  
Xing S C, Liu C J. Progress in chloroplast genome analysis [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2008, 35(1): 21 - 28.
- 段义忠, 张得钧, 高庆波, 等. 窄叶鲜卑花 (*Sibiraea angustata*) nrDNA ITS 和 cpDNA *trnL-F* 序列分子进化特点的分析 [J]. 植物研究, 2010, 30(2): 146 - 151.  
Duan Y Z, Zhang D J, Gao Q B et al. Characteristic of molecular evolution of *Sibiraea angustata* Based on nrDNA ITS and cpDNA *trnL-F* sequence analysis [J]. Bulletin of Botanical Research, 2010, 30(2): 146 - 151.
- 杨路存, 刘何春, 周学丽, 等. 羌活 (*Notopterygium incisum*) nrDNAITS 和 cpDNA *rpl20-rps12* 序列分子进化特点的分析 [J]. 植物研究, 2016, 36(2): 291 - 296.  
Yang L C, Liu H C, Zhou X L et al. Characteristic of molecular evolution of *Notopterygium incisum* Based on nrDNAITS and cpDNA *rpl20-rps12* sequence analysis [J]. Bulletin of Botanical Research, 2016, 36(2): 291 - 296.
- 曹庆芹, 甄贞, 姜洁, 等. 叶绿体 DNA 分析技术及其在栗属植物中的应用 [J]. 果树学报, 2008, 25(3): 396 - 399.  
Cao Q Q, Zhen Z, Jiang J et al. Chloroplast DNA analysis technology and its application in *Castanea* [J]. Journal of Fruit Science, 2008, 25(3): 396 - 399.
- 田欣, 李德铎. DNA 序列在植物系统学研究中的应用 [J]. 云南植物研究, 2002, 24(2): 170 - 184.  
Tian X, Li D Z. Application of DNA sequences in plant phylogenetic study [J]. Acta Botanica Yunnanica, 2002, 24(2): 170 - 184.
- Magni C R, Ducousso A, Caron H et al. Chloroplast DNA variation of *Quercus rubra* L. in North America and comparison with other Fagaceae [J]. Molecular Ecology, 2005, 14(2): 513 - 524.