

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2017.20171

杨鹏, 舒建锋, 蔡莎莎, 赵财. 贵州不同产地薤白 *nrDNA* ITS 序列分析及亲缘关系研究[J]. 植物科学学报, 2017, 35(2): 171-176Yang P, Shu JF, Cai SS, Zhao C. *nrDNA* ITS sequence analysis and genetic relationship of *Allium macrostemon* from different geographical regions in Guizhou[J]. *Plant Science Journal*, 2017, 35(2): 171-176

贵州不同产地薤白 *nrDNA* ITS 序列分析及亲缘关系研究

杨 鹏, 舒建锋, 蔡莎莎, 赵 财*

(贵州大学生命科学学院, 贵阳 550025)

摘 要: 采用 PCR 直接测序法, 对产自贵州 11 个不同地区的薤白 (*Allium macrostemon* Bunge) 18 个样品进行核糖体 DNA ITS 序列测定, 并结合 GenBank 中下载的来自四川汶川、陕西汉中以及韩国的薤白 ITS 序列进行对比分析。结果显示, 贵州不同产地的薤白 ITS 序列长度为 534 ~ 537 bp, 其中 G + C 含量为 50.5%~51.1%, 平均含量为 50.9%, 有 16 个变异位点, 包括 T-C、T-G、A-G 间的转换以及 T-A、G-C 间的颠换。以单花韭 (*Allium monanthum* Maxim.) 为外类群, 结合 GenBank 中下载葱属部分植物序列, 基于贝叶斯法和最大简约法构建系统聚类树的结果显示, 葱属部分植物可分为 4 支, 其中薤白聚为一支并支持薤白作为一个单系类群, 而不同产地的薤白又可分为 4 小支, 其中来自贵阳清镇、六盘水平寨、安顺平坝、黔西南兴仁、铜仁思南的薤白亲缘关系较近, 表明基于 *nrDNA* ITS 序列能鉴别不同产地薤白的亲缘关系。

关键词: 薤白; ITS 序列; 亲缘关系

中图分类号: Q949.71+8.23

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2017)02-0171-06

nrDNA ITS sequence analysis and genetic relationship of *Allium macrostemon* from different geographical regions in Guizhou

Yang Peng, Shu Jian-Feng, Cai Sha-Sha, Zhao Cai*

(College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: *Allium macrostemon* Bunge from 18 different habitats in 11 areas of Guizhou Province were taken as study materials. Their *nrDNA* ITS sequences were compared and analyzed, combined with ITS sequences from Wenchuan in Sichuan, Hanzhong in Shaanxi, China and Korea downloaded from GenBank. Results showed that the lengths of *A. macrostemon* Bunge sequences from the different areas in Guizhou ranged from 534 bp to 537 bp and the G + C content ranged from 50.5% to 51.1%, with an average content of 50.9% and 16 variable sites, including conversion between T-C, T-G, and A-G. Based on the sequences of *A. monanthum* Maxim. and other *Allium* species from GenBank, the plants could be divided into four groups using Bayesian and maximum parsimony methods, with *A. macrostemon* Bunge polys found on one branch and *A. macrostemon* Bunge considered to be a monophyletic group. The *A. macrostemon* Bunge from different areas could be divided into four branches and the phylogenetic relationships of *A. macrostemon* Bunge from Qingzhen in Guiyang, Pingzhai in Liupanshui, Pingba in Anshun, Xingren in southwest Guizhou, and Sinan in Tongren were found to be very close, indicating that the phylogenetic relationships of *A.*

收稿日期: 2016-06-30, 退修日期: 2016-09-01。

基金项目: 贵州大学博士基金项目(201354); 贵州省烟草专卖局项目(201401); 贵州省科技厅基金项目(20142064)。

This work was supported by grants from the Doctoral Foundation of Guizhou University (201354), Tobacco Monopoly Bureau of Guizhou Province (201401), and Foundation of Guizhou Provincial Science and Technology Committee (20142064)。

作者简介: 杨鹏(1991-), 男, 土家族, 硕士研究生, 研究方向为植物生物技术与次生代谢(E-mail: 894734163@qq.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: zhao cai_11@163.com)。

macrostemon Bunge from different habitats could be identified through *nrDNA* ITS sequences.

Key words: *Allium macrostemon* Bunge; ITS sequence; Relationship

薤白 (*Allium macrostemon* Bunge) 属百合科 (Liliaceae) 葱属 (*Allium*) 植物, 又名小根蒜、山蒜、苦蒜、野葱等, 鳞茎近球状, 粗 0.7 ~ 1.5 cm, 基部常具小鳞茎, 可用作蔬菜食用, 亦是一种传统中药材, 具有抗菌消炎、抗血小板聚集、抗氧化、降血脂、抗动脉硬化、抗肿瘤等作用。除新疆、青海外, 全国各省区均有分布。薤白生于海拔 1500 m 以下的山坡、丘陵、山谷或草地上, 极少数生长于海拔 3000 m 的山坡^[1]。

有关葱属植物种间亲缘关系及系统分类的研究一直存在争议, 例如: Li 等^[2]以核糖体 ITS 序列及 *rps16* 序列对葱属植物系统发育的研究表明, 薤白与 *Allium eremoprasum* Vved. 的亲缘关系最近; Hirschegger 等^[3]基于 ITS 序列对葱属植物的系统发育研究表明, 薤白与 *Allium oleraceum* L. 的亲缘关系最近; Choi 等^[4]基于 ITS 和 *trnL-F* 序列对葱属 (*Allium*) 取样研究表明, 薤白与 *Allium caeruleum* Pall. 的亲缘关系较近; Nguyen 等^[5]对葱属植物的 ITS 和 ETS 序列进行建树研究表明, 薤白与 *Allium melananytherum* L. 和 *Allium flavum* var. *minus* L. 的亲缘关系较近。可见薤白的系统位置及其亲缘关系复杂, 还需进一步研究和探讨。

核糖体 DNA (*nrDNA*) 内部转录间隔区 (Internal transcribed spacer, ITS) 序列具有碱基变异位点多、保守性好等特点。因此被广泛用于植物属与种间的系统关系以及种与种间的亲缘关系的研究^[6-8]。黄德青等^[9]利用 *nrDNA* ITS 和 *cpDNA trnL-F* 基因分析了薤白的系统分类地位, 认为薤白可能代表一个新的类群。王洁等^[10]利用不同产地厚朴的 *nrDNA* ITS 序列分析了其亲缘关系, 证明 *nrDNA* ITS 序列可作为厚朴不同产地亲缘关系鉴定的手段。林珊等^[11]利用 *nrDNA* ITS 序列对不同产地莲进行对比分析, 为莲 (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) 的分子鉴别提供了理论依据。贵州作为云贵高原的主要地区, 气候宜人, 野生薤白资源丰富, 为了研究贵州不同地区的薤白的亲缘关系, 本研究对贵州 11 个不同产地薤白 18 个样品的 *nrDNA* ITS 序列进行测定和分析, 从分子水平上比较不同产地薤白的差异, 旨在探讨薤白不同产地亲

缘关系及其变异, 为葱属植物系统学研究提供资料。

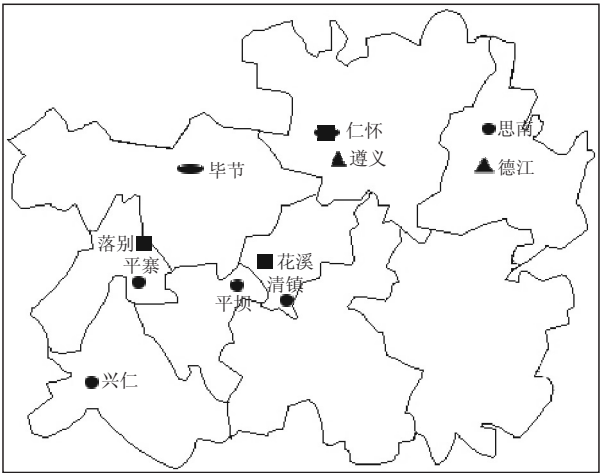
1 材料与方法

1.1 供试材料

用于薤白 (*Allium macrostemon* Bunge) ITS 序列分析的 18 组样品来自贵州 7 个地区的 11 个不同产地(表 1、图 1), 各样品均采集 1 ~ 2 株薤白的新鲜叶片作为材料, 采集后立即用硅胶干燥、备用。供试葱属植物中, 来自四川汶川 (SCWC, GU566613)、陕西汉中 (SXHZ, JF975842) 和韩国 (Korea, GQ412213) 的薤白, 以及部分葱属植物序列均来自 GenBank(表 2)。

表 1 供试薤白样品的采集地信息
Table 1 Location information of collected *Allium macrostemon*

样品编号 Sample code	采集地 Collection locality	样品编号 Sample code	采集地 Collection locality
GYQZ	贵州省贵阳市清镇市	ZYRH-2	贵州省遵义市仁怀市
GYHX	贵州省贵阳市花溪区	BJS-1	贵州省毕节市
LPSLB-1	贵州省六盘水市落别乡	BJS-2	贵州省毕节市
LPSLB-2	贵州省六盘水市落别乡	ZYZYX	贵州省遵义市遵义县
LPSpz	贵州省六盘水市牛场乡平寨村	TRDJ-1	贵州省铜仁市德江县
ASPB	贵州省安顺市平坝县	TRDJ-2	贵州省铜仁市德江县
QXNXR-1	贵州省黔西南兴仁县	TRSN-1	贵州省铜仁市思南县
QXNXR-2	贵州省黔西南兴仁县	TRSN-2	贵州省铜仁市思南县
ZYRH-1	贵州省遵义市仁怀市	TRSN-3	贵州省铜仁市思南县



图中相同的标记图形为贝叶斯树上的同一分支。
The same marked shape is the same branch of a Bayesian tree.

图 1 供试材料薤白于贵州 11 个产地的地理分布
Fig. 1 Geographical distribution of test materials from 11 different habitats in Guizhou Province

表 2 供试葱属部分植物的 GenBank 序列信息
Table 2 GenBank sequence information of *Allium* species

物种 Species	GenBank 序列号 GenBank accession No	物种 Species	GenBank 序列号 GenBank accession No
镰叶韭 <i>Allium carolinianum</i> DC.	GQ181097	蒜 <i>Allium sativum</i> L.	AF037621
藠头 <i>Allium chinense</i> G. Don	AJ411848	类北葱 <i>Allium schoenoprasoides</i> Regel	AJ412728
黄花葱 <i>Allium condensatum</i> Turcz.	GQ181098	辉韭 <i>Allium strictum</i> Schrader	GU566621
黄花葱 <i>Allium condensatum</i> Turcz.	HQ690573	唐古韭 <i>Allium tanguticum</i> Regel	GQ181089
真籽韭 <i>Allium eusperma</i> Airy-Shaw	GQ181067	西疆韭 <i>Allium teretifolium</i> Regel	AJ411886
葱 <i>Allium fistulosum</i> L.	AJ411918	合被韭 <i>Allium tubiflorum</i> Rendle	GU566622
北韭 <i>Allium lineare</i> L.	GQ181103	单花韭 <i>Allium monanthum</i> Maxim.	AJ412745
长梗韭 <i>Allium neriniflorum</i> (Herb.) G. Don	AJ411913	薤白 <i>Allium macrostemon</i> Bunge	GU566613
宽苞韭 <i>Allium platyspathum</i> Schrenk	AJ411878	薤白 <i>Allium macrostemon</i> Bunge	JF975842
韭葱 <i>Allium porrum</i> L.	AY427543	薤白 <i>Allium macrostemon</i> Bunge	GQ412213

1.2 DNA 提取、扩增及测序

植物总 DNA 采用北京 Tiangen 公司新型植物基因组 DNA 试剂盒提取。ITS 序列扩增引物参照 Wendel^[12] 等设计的通用引物：P₁：5'-GGAAGTA-AAAGTCGTAACAAGG-3'；P₂：5'-TCCTCCTCC-GCTTATTGATATGC-3'。引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。PCR 扩增试剂采用 Tiangen 公司的 2 × Taq PCR MasterMix，PCR 扩增具体程序为：94℃ 预变性 4 min；94℃ 变性 1 min；53.6℃退火 45 s；72℃延伸 1 min，共 36 个循环，最后 72℃延伸 7 min，4℃保存。双向测序由上海立菲生物技术有限公司完成。

1.3 数据分析

采用 DNASTar 软件对正反向序列拼接并手工矫正错误碱基，用 MEGA 5.0 软件对拼接后的序列进行比对并构建矩阵，再采用贝叶斯法 (BI) 和最大简约法 (MP) 建树分析。MP 树使用 PAUP 4.10 软件分析，最大简约分析采用启发式搜索，序列矩阵中所有的碱基同等加权，并作为无序性状，空位采用缺失处理，系统树上各分支的相对支持率采用 bootstrap 进行 1000 次重复取样检验。贝叶斯分析采用 MrBayes 3.2.1 软件运算，用 jmodeltest 2.1.7 软件检测并选择最优碱基替代模型 (CTR + I + G)，插入缺失使用二维模型处理，设置批处理运行代数 为 2000000 代，每 1000 代保留 1 棵树，用 Tracer 查看各项参数 ESS 值，当各项统计参数的 ESS 值均大于 200 时，表明参数已收敛，一致树各分支可信度评估用后验概率表示。用 TreeGraph 2.0 软件查看 BI 树和 MP 树并编辑调整。

2 结果与分析

2.1 nrDNA ITS 序列长度及变异位点

贵州不同产地薤白 *nrDNA* ITS 序列全长为 534 ~ 537 bp(表 3)，其中 G + C 含量为 50.5% ~ 51.1%，平均含量为 50.9%，包含 16 个变异位点(表 4)，其中在 33、140、335 和 480 位点处出现了 T-C 转换，118、393、466、499 位点处出现了 T-A 颠换，143、347 位点处出现了 T-G 转换，155、476 位点处出现了 G-C 颠换，343、394、452、492 位点处出现了 A-G 转换，序列中没有发现 A-C 转换。由此可见，不同产地薤白 ITS 序列表现出一定的差异性。

2.2 不同产地薤白的系统发育及亲缘关系分析

以百合科葱属植物的单花韭 (*Allium monanthum* Maxim.) 为外类群，基于不同产地薤白和部分薤白近缘种 ITS 序列构建贝叶斯系统发育树(图 2)和最大简约树(图 3)，这两种方法均显示，

表 3 贵州不同产地薤白的 *nrDNA* ITS 序列长度及 GC 含量
Table 3 ITS sequence lengths and GC content of *A. macrostemon* from different locations

样品编号 Sample code	G + C	长度 (bp) Length	样品编号 Sample code	G + C	长度 (bp) Length
GYQZ	50.8%	535	ZYRH-2	51.0%	535
GYHX	50.8%	535	ZYZYX	50.8%	535
LPSLB-1	51.0%	535	BJS-1	51.0%	535
LPSLB-2	50.8%	535	BJS-2	50.8%	535
LSPSZ	50.8%	535	TRDJ-1	50.5%	537
ASPB	50.8%	535	TRDJ-2	50.7%	535
QXNXR-1	50.8%	535	TRSN-1	51.0%	535
QXNXR-2	50.8%	535	TRSN-2	51.0%	535
ZYRH-1	50.7%	535	TRSN-3	51.1%	534

表 4 贵州不同产地薤白的 *nrDNA* ITS 序列的变异位点信息
Table 4 Variation of *A. macrostemon* ITS sequences from different locations

样品编号 Sample code	变异位点 Variation site															
	33	118	140	143	155	335	343	347	393	394	452	466	476	480	492	499
GYQZ	T	T	C	T	C	C	G	G	T	G	A	T	C	T	A	T
GYHX	.	A	A	.	A	.	.	A	G	.	G	A
LPSLB-1	A	.	.	.	G	A	G	.	G	A
LPSLB-2	A	.	A	.	G	A	G	.	.	A
LPSPZ	A
ASPB	A
QXNXR-1	A
QXNXR-2	A
ZYRH-1	.	.	T	G	.	.	A	T	A	A	G	A	G	.	G	A
ZYRH-2	A	.	A	.	G	A	.	.	G	A
ZYZYX	T	A	G	A
BJS-1	.	.	.	G	.	T	A	.	A	.	G	A	G	.	G	A
BJS-2	.	.	.	G	.	T	A	T	A	.	G	A	.	.	G	A
TRDJ-1	G	T	A	G	A
TRDJ-2	T	A	G	A
TRSN-1	C	A
TRSN-2	C	A
TRSN-3	C

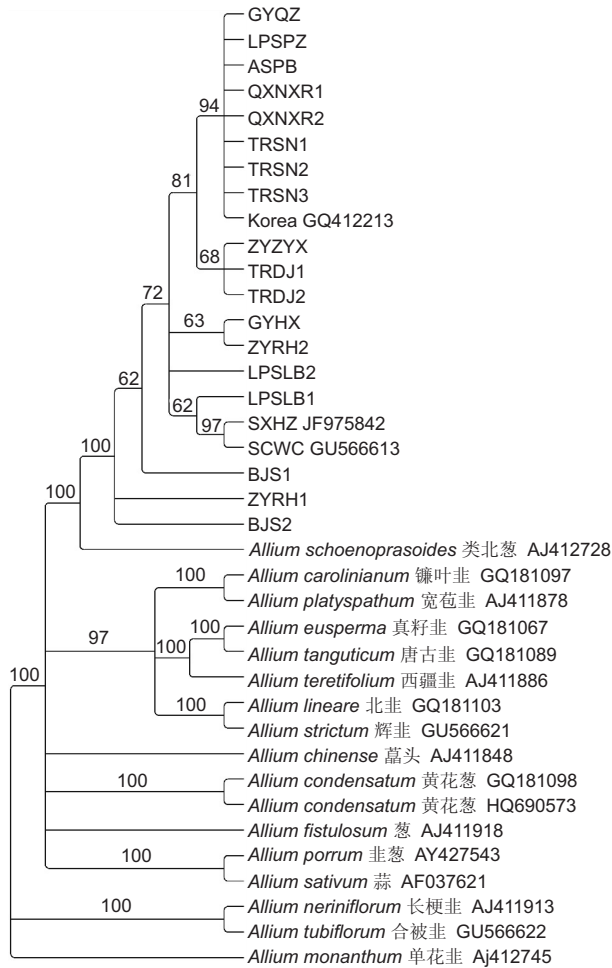


图 2 不同产地薤白及葱属部分植物的 ITS 序列 BI 树
Fig. 2 Bayesian tree of *A. macrostemon* ITS sequences from different locations

葱属部分植物可分为 4 支，其中，不同产区的薤白单独聚为一支，韭葱 (*A. porrum* L.) 和蒜 (*A. sativum* L.) 单独聚为一支，长梗韭 (*A. neriniflorum* (Herb.) G. Don) 和合被韭 (*A. tubiflorum* Rendle) 单独聚为一支，剩余部分聚为一支。不同产地的薤白又可以分为 4 支，贝叶斯法和最大简约法均支持贵阳清镇 (GYQZ)、六盘水平寨 (LPSPZ)、安顺平坝 (ASPB)、黔西南兴仁 (QXNXR)、铜仁思南 (TRSN) 以及韩国 (Korea, GQ412213) 的薤白聚为一支，支持率分别为 94% 和 74%；这 2 种方法均支持来自遵义市遵义县 (ZYZYX) 和铜仁德江 (TRDJ) 的薤白聚为一支，支持率分别为 68% 和 52%，来自四川汶川 (SCWC, GU566613) 和陕西汉中 (SXHZ, JF975842) 的薤白聚为一支，支持率分别为 97% 和 64%。这 2 种分析方法均显示类北葱 (*A. schoenoprasoides* Regel) 与薤白为一并系，且支持率均为 100%，表明类北葱与薤白的亲缘关系最近，说明基于薤白的 ITS 序列能显示部分不同产地的亲缘关系，并能将薤白与其它近缘葱属植物明显区分，支持将薤白作为一个独立的单系群。

3 讨论

3.1 ITS 序列特征

ITS 序列是位于 rDNA 编码基因 18 S、5.8 S 和

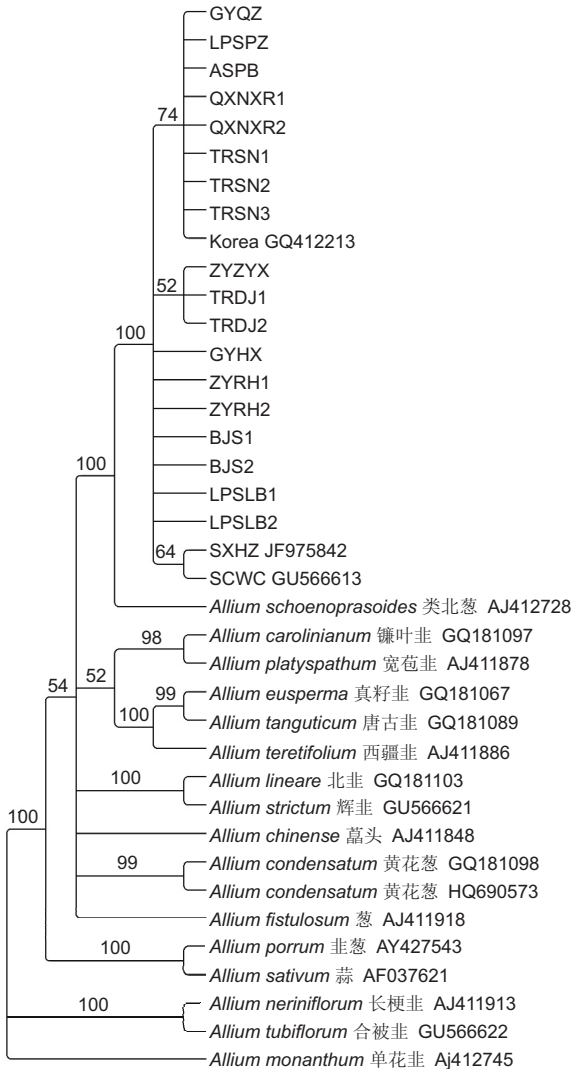


图 3 不同产地薤白及葱属部分植物的 ITS 序列 MP 树
Fig. 3 Maximum Parsimony tree of *A. macrostemon* ITS sequences from different locations

28 S 之间的小基因片段。ITS 序列分析技术自诞生以来被广泛应用于植物资源鉴定及亲缘关系的研究中^[13-15]。本研究结果表明，不同产地的薤白 ITS 序列长度为 524 ~ 525 bp，这与黄德青等^[9]的研究结果大致相同，且出现了多种变异信息位点，如 T-C、T-G、A-G 之间的转换以及 T-A、G-C 间的颠换，极大地方便了碱基序列多态信息的判读，多数被检测的薤白样本 ITS 序列相对于其它产区薤白具有丰富的碱基变异，并且大部分变异碱基可作为其识别特征^[10]。例如来自遵义仁怀 (ZYRH-1) 的部分薤白有 11 个变异位点，其中 4 个可作为识别特征，可见 *nrDNA* ITS 序列分析对于不同产地薤白的鉴定具有一定指导意义，可用于对其分类鉴

定研究。

3.2 供试薤白的产地区别与系统发育的关系

nrDNA ITS 在不同的物种间和同一物种的不同地域间都存在差异，所以 ITS 序列被广泛应用于植物属、种间以及种内系统学研究^[16, 17]。本研究基于 ITS 序列对来自贵州 7 个市 11 个地区的薤白进行了研究，结果表明来自铜仁思南、贵阳清镇、六盘水平寨、安顺平坝、黔西南兴仁以及韩国的薤白亲缘关系较近；来自遵义市遵义县和铜仁德江薤白的亲缘关系较近，结合供试薤白的地理位置来看 (图 1)，亲缘关系较近的薤白其地理位置也较近，这一点与蒋玲艳等^[18]对中国不同地区绞股蓝 ITS 序列的分析结果一致。基于 ITS 序列具有明显的同步进化、较高的分辨率以及碱基的替代速率基本稳定等特点，一定程度上能克服非同源的障碍，且基于 ITS 序列构建的系统分支树能够反映植物的系统发育及亲缘关系^[19]。从本研究贝叶斯分析结果来看，来自遵义仁怀的一部分薤白与毕节的薤白亲缘关系较近，来自遵义仁怀的另一部分与贵阳花溪的薤白亲缘关系较近；而最大简约法分析结果则支持来自贵阳花溪、遵义仁怀、毕节市以及六盘水落别地区的薤白亲缘关系较近。总体来看，遵义仁怀和毕节的薤白的亲缘关系较近，关于同一地区的薤白间有出现很远亲缘关系的现象，可能与薤白引种栽培而导致基因渐渗或不完全谱系筛选等因素有关^[20-22]，具体原因还需要扩大采样地域进一步研究。

参考文献：

[1] 吴征镒, 洪德元. 中国植物志: 第 14 卷[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 265-266.
Wu ZM, Hong DY. Flora Reipublicae Popularis Sinicae: Vol. 53[M]. Beijing: Science Press, 2005: 265-266.

[2] Li QQ, Zhou SD, He XJ, Yu Y, Zhang YC, Wei XQ. Phylogeny and biogeography of *Allium* (Amaryllidaceae: Alliaceae) based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast *rps16* sequences, focusing on the inclusion of species endemic to China[J]. *Ann Bot*, 2010, 106(5): 709-733.

[3] Hirschegger P, Jakse J, Trontelj P, Bohanec B. Origins of *Allium ampeloprasum* horticultural groups and a molecular phylogeny of the section *Allium* (*Allium*: Alliaceae) [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2010, 54(2): 488-497.

[4] Choi HJ, Giussani LM, Jang CG, Oh BU, Cota-Sánchez J. Systematics of disjunct northeastern Asian and northern North American *Allium* (Amaryllidaceae) [J]. *Botanique*,

- 2012, 90(6): 491–508.
- [5] Nguyen NH, Driscoll HE, Specht CD. A molecular phylogeny of the wild onions (*Allium*; Alliaceae) with a focus on the western North American center of diversity [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2008, 47(3): 1157–1172.
- [6] Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS, Donoghue MJ. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny [J]. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 1995, 82(2): 247–277.
- [7] Hsiao C, Chatterton NL, Asay KH, Jensen KB. Phylogenetic relationship of 10 grass species: An assessment of phylogenetic utility of the internal transcribed spacer region in nuclear ribosomal DNA in monocots [J]. *Genome*, 1994, 37(1): 112–120.
- [8] Baldwin BG. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from Compositae [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 1992, 1(1): 3–16.
- [9] 黄德青, 李琴琴, 周颂东, 何兴金. 基于 nrDNA ITS 和 cpDNA trnL-F 序列探讨薤白的系统地位 [J]. 植物分类与资源学报, 2015, 37(5): 537–545.
Huang DQ, Li QQ, Zhou SD, He XJ. Systematic position of *Allium macrostemon* based on nrDNAITS and cpDNA trnL-F sequence data [J]. *Plant Diversity and Resources*, 2015, 37(5): 537–545.
- [10] 王洁, 杨旭, 杨志玲. 不同产区厚朴 nrDNA ITS 序列分析及亲缘关系鉴定 [J]. 广西植物, 2013, 33(1): 35–41.
Wang J, Yang X, Yang ZL. nrDNA ITS sequences analysis and genetic relationship identification of *Magnolia officinalis* from different geographical regions [J]. *Guihaia*, 2013, 33(1): 35–41.
- [11] 林珊, 郑伟文, 吴锦忠, 周莉娟, 宋亚娜. 不同来源莲 rDNA ITS 的 PCR 扩增、克隆及序列分析 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(8): 671–675.
Lin S, Zeng WW, Wu JZ, Zhou LJ, Song YN. PCR, clone and sequence analysis of rDNA ITS of *Nelumbo nucifera* from different geographical origins in China [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2007, 32(8): 671–675.
- [12] Wendel JF, Schnabel A, Seelanan T. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(1): 280–284.
- [13] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1596–1599.
- [14] 曾明, 马雅军, 郑水庆, 许景峰, 邸晓辉. 中药葛根及其近缘种的 rDNA-ITS 序列分析 [J]. 中国药学杂志, 2003, 38(3): 13–15.
Zeng M, Ma YJ, Zheng SQ, Xu JF, Di XH. Studies on ribosomal DNA sequence analyses of *Radix Puerariae* and its sibling species [J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2003, 38(3): 13–15.
- [15] Wang C, Zhang H, Qian ZQ. Genetic differentiation in endangered *Gynostemma penta phyllum* (Thunb.) Makino based on ISSR polymorphism and its implications for conservation [J]. *Biochem Systemat Ecol*, 2008, 36(9): 699–705.
- [16] Yuan YM, Kupfer P, Doyle JJ. Infrageneric phylogeny of the genus *Gentiana* inferred from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers of the nuclear ribosomal DNA [J]. *Am J Bot*, 1996, 83: 641–652.
- [17] Zhang L, Zhang YL, Wei YM, Liu SG, Zhou YH. The genetic diversity and similarities among *Keng yilia* species based on random amplified microsatellite polymorphism (RAMP) [J]. *Genet Resour Crop Ev*, 200, 52(52): 1011–1017.
- [18] 蒋玲艳, 郭志刚, 王翀, 赵桂仿. 中国不同地区绞股蓝 ITS 序列分析 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1123–1127.
Jiang LY, Guo ZG, Wang C, Zhao GF. ITS Sequence analysis of *Gynostemma pentaphyllum* from different habitats in China [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2009, 40(7): 1123–1127.
- [19] 张文驹, 瞿礼嘉, 高巍. 用 ITS 序列确定小麦 B 基因组的可能供体间的关系 [J]. 植物分类学报, 1999, 37(5): 417–424.
Zhang WJ, Qu LJ, Gao W. The phylogenetic relationships among the possible donors of B-genome of common wheat based on internal transcribed spacer (ITS) sequences [J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 1999, 37(5): 417–424.
- [20] 于海彬, 张懿铨. 青藏高原及其周边地区高山植物谱系地理学研究进展 [J]. 西北植物学报, 2013, 33(6): 1268–1278.
Yu HB, Zhang YL. Advance in phylogeography of alpine plants in the Tibetan and adjacent regions [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica* 2013, 33(6): 1268–1278.
- [21] Dover GA. Concerted evolution, molecular drive and natural selection [J]. *Curr Biol*, 1994, 4(12): 1165.
- [22] Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF. Documentation of reticulate evolution in *Paeonia* using ITS sequences of nuclear rDNA: Implication for biogeography and concerted evolution [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(15): 6813–6817.