

• 药材与资源 •

羌活不同地理种群 cpDNA *trnT-trnL* 多态性分析

杨路存^{1,2}, 刘何春^{1,3}, 周学丽⁴, 徐文华^{1,2}, 周国英^{1,2*}

1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008

2. 中国科学院藏药研究重点实验室, 青海 西宁 810008

3. 中国科学院大学, 北京 100049

4. 青海省铁卜加草原改良试验站, 青海 共和 813000

摘要: 目的 对 245 份不同产地羌活 *Notopterygium incisum* 样品的遗传多样性和遗传结构进行研究。方法 采用叶绿体 cpDNA *trnT-trnL* 直接测序的方法和邻接法(NJ)对 245 份羌活样品进行遗传多样性和遗传结构分析。结果 物种水平上单倍型多样性(*Hd*) 指数为 0.873, 核苷酸多样性(*Pi*) 指数为 0.004 07; 种群水平上 *Hd* 介于 0~0.900, *Pi* 指数介于 0~0.054 4, 与同属的宽叶羌活 *Notopterygium franchetii* 相比, 遗传多样性水平居中; 分子方差分析表明, 羌活大部分遗传变异(77.55%)发生在居群间, 居群间的基因流($N_m=0.145$)较低, 群体间变异是羌活的主要变异来源; NJ 树表明, 受试的 31 个野生种群可分为 2 大种群。结论 羌活的遗传多样性处于中等水平, 居群间遗传分化较大。

关键词: 羌活; cpDNA *trnT-trnL*; 遗传多样性; 遗传结构; 种群

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)22-3390-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.22.018

Polymorphism analysis of endangered *Notopterygium incisum* and endemic species based on cpDNA *trnT-trnL* sequences

YANG Lu-cun^{1,2}, LIU He-chun^{1,3}, ZHOU Xue-li⁴, XU Wen-hua^{1,2}, ZHOU Guo-ying^{1,2}

1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China

2. Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China

3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

4. Tiebujia Grassland Improvement Experiment Station, Gonghe 813000, China

Abstract: Objective To analyze the genetic diversity and genetic structure of 245 plant samples in *Notopterygium incisum* from different regions. **Methods** Genetic diversity and genetic structure of 245 samples of *N. incisum* were studied using chloroplast cpDNA *trnT-trnL* direct sequencing method and Neighbor-joining (NJ) method. **Results** Haplotype diversity (*Hd*) and nucleotide diversity (*Pi*) at the species level were 0.873 and 0.004 07, respectively. At the population level, *Hd* ranged with 0.000—0.900, and *Pi* ranged with 0.000—0.054 4. It indicated that *N. incisum* had a moderate level of genetic diversity than *N. franchetii* plants of the genus *Notopterygium* Boiss. Molecular variance analysis (AMOVA) indicated that high genetic differentiation (77.55%) existed among populations, and gene flow was low ($N_m = 0.145$) among populations. Based on the NJ tree, the 31 wild populations tested were clustered into two groups. **Conclusion** *N. incisum* has the midium cpDNA diversity and higher population genetic differentiation.

Key words: *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang; cpDNA *trnT-trnL*; genetic diversity; genetic structure; population

遗传多样性是生物种内表现在从 DNA 分子到形态特征各个层次上可遗传所有变异的总称, 是濒危植物保护生物学的核心之一。一个种群遗传多样性越丰富, 对环境的适应能力就越强, 越容易

扩展其分布范围和开拓新的环境。可见物种或种群进化潜力和适应环境的能力取决于遗传多样性的大小。对濒危物种遗传多样性和群体遗传结构的研究是揭示其适应潜力的基础, 为进一步探讨濒危物种

收稿日期: 2015-04-21

基金项目: 青海省青年基金项目: 珍稀濒危药用植物羌活的濒危机制研究(2013-Z-942Q)

作者简介: 杨路存(1981—), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事药用植物分子生态学研究。E-mail: yanglucun@nwpb.cas.cn

*通信作者 周国英, 博士, 研究员, 主要从事青藏高原药用植物资源与植被恢复的研究工作。E-mail: zhouguy@nwpb.cas.cn

的濒危机制和制定相应的保护措施提供科学依据^[1]。

羌活 *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang 是我国特有的羌活属的多年生草本植物^[2-3]，与同属的宽叶羌活 *N. franchetii* H. de Boiss. 同为药材羌活的基原植物，以根茎及根入药^[4]，主要分布在四川、青海、甘肃等省的高寒山区^[5-6]。羌活是中、藏、羌医药体系中常用药材，主要含挥发油和香豆素类成分；具散寒祛风、除湿止痛之功效，用于风寒感冒头痛、风湿麻痹、肩背酸痛等症^[7]。现代药理研究表明其对心脑血管疾病也有确切疗效。目前，用羌活的中（藏）成药有 200 余种，用药需求量非常大。羌活多生长于海拔较高的地方，垂直分布范围在海拔 1 700~5 000 m，其种子发育期较短，成熟度低，种群更新困难^[6]。此外，由于资源短缺使得羌活药材价格逐渐攀升，使羌活遭受掠夺性采挖，该药用植物的生境片段化严重，生物多样性丧失以及资源利用的无序性和破坏性造成其野生资源濒临灭绝，1987 年即被国务院颁布的《中国野生药材资源保护管理条例》列为 III 级保护物种，2005 年又载入《中国物种红色名录》^[8]。目前，羌活植物化学^[9-10]、药理^[11]、地理分布^[12]、分类学^[2-3]、环境土壤学^[13]、核型和驯化栽培^[14-15]等方面的研究比较多，但从 DNA 分子水平上对羌活群体遗传结构、遗传分化及多样性等方面的研究较少^[16]，唐学芳等^[17]用 RAPD 标记研究了四川西部 4 个居群 33 株羌活的遗传分化，但由于其样品数量有限还不能反映羌活群体遗传状况全貌，需要更多的分子生物学标记研究结果给以补充。

由于叶绿体 DNA (cpDNA) *trnT-trnL* 间隔区属于 cpDNA 非编码区，在植物中具有稳定性，经常被用来分析植物的种群遗传变异和系统地理学问题。另外，技术上选择 DNA 测序的方法还可以避免在利用限制片段长度多态性 (RFLP) 和基于 PCR 的指纹图谱法时经常遇到的长度同塑性 (length homoplasy) 问题，从而提高估算种群遗传结构和基因流的分辨率^[18]。本研究利用 cpDNA 为分子标记，对羌活 31 个种群的遗传多样性和遗传结构进行分析，旨在了解羌活现存种群的遗传变异水平，阐述种群遗传信息对物种保护的重要意义，为保护植物遗传资源提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验选取的 31 个居群为 2014 年 6 月至 9 月

分别采自青海、四川和甘肃 3 省区，基本包括了我国羌活主要产区 (表 1)。采样时每个居群选取成年植株 4~17 株，根据随机取样原则，取样的羌活株距在 50 m 以上。野外采集新鲜、完整的植物幼嫩叶片，置于盛有硅胶的塑胶袋中干燥保存。供试材料由中国科学院西北高原生物研究所周国英研究员鉴定为羌活 *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang，凭证标本存放于中国科学院西北高原生物研究所。

1.2 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。通过测定紫外光吸收值来确定 DNA 浓度和纯度。利用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 完整性。

1.2.2 PCR 扩增与 DNA 测序 对 cpDNA 的 *trnT-trnL* 片段进行扩增，使用通用引物 *trnT*: 5'-CATTACAAATGCGATGCTCT-3' 和 *trnL*: 5'-TCTACCGATTTCCGCATATC-3'；扩增反应在 Eppendorf Mastercycler Gradient PCR 仪上进行，反应体系为 25 μ L，内含 25 mmol/L MgCl₂ 2 μ L、2.5 mmol/L dNTPs 2 μ L、10 μ mol/L 引物各 0.6 μ L、25 ng 模板、10 \times 缓冲液 2.5 μ L 和 1 U Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa)。扩增程序为：95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min，94 $^{\circ}$ C 变性 30 s，53 $^{\circ}$ C 退火 45 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 45 s，共 5 个循环，每个循环退火温度降 1 $^{\circ}$ C；94 $^{\circ}$ C 预变性 30 s，48 $^{\circ}$ C 退火 45 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 45 s，共 30 个循环；72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min，16 $^{\circ}$ C 保温。将 PCR 扩增产物经电泳检测纯化后由上海美吉生物医药科技有限公司测序。

1.3 数据分析

用 Clustal X 软件进行序列对位排列，并加以手工适当校正。在所有序列校对正确后，用 DnaSP4.0 程序统计 cpDNA 单倍型，计算各居群的核苷酸多样性 (P_i)、单倍型多样性 (H_d)、居群间基因流值 (N_m)。居群内和居群间的基因流用每代雌性个体迁移数 (F_{ST}) 估计，该值可由公式 $F_{ST} = 1/(1+2 N_m)$ 求出，其中 N 是有效居群大小雌性数目， m 是雌性迁移率。选用 Arlequin 软件进行分子方差分析 (AMOVA)，计算居群内、居群间的变异方差分布。用 MEGA4.1 软件进行核苷酸组成分析，采用 Kitamura-2-Parameter distance 双参数模型 (Kimura, 1980) 计算遗传距离，并用邻接 (Neighbour-Joining, NJ) 法，通过 1 000 次重复获得的自展检验 (bootstrap) 数值标记在分支上。

表 1 31 个羌活居群的经度、纬度、海拔及 Hd 和 Pi Table 1 Longitude, latitude, altitude, cpDNA Hd , and Pi averaged across loci of 31 *N. incisum* populations

居群编号	居群	纬度	经度	海拔/m	样本数	Hd	Pi
Q1	青海乐都	36°42.172'	102°23.540'	2 935	8	0.464	0.035 000
Q2	青海互助	36°55.614'	102°22.505'	2 735	7	0	0
Q3	青海门源	37°22.352'	102°0.819'	3 216	10	0	0
Q4	青海祁连	38°7.357'	100°11.542'	3 337	7	0.286	0.000 353
Q5	青海兴海	35°50.889'	99°355.540'	3 635	6	0	0
Q6	青海河南	34°35.958'	101°16.862'	3 525	9	0.417	0.001 370
Q7	青海玛沁	34°36.397'	100°12.904'	4 012	7	0	0
Q8	青海班玛	32°44.374'	100°46.057'	3 600	4	0.500	0.008 190
Q9	青海久治	33°22.069'	101°19.120'	4 013	10	0	0
Q10	青海达日	33°45.349'	99°33.707'	4 012	8	0	0
Q11	青海玉树	33°2.882'	96°51.258'	4 002	4	0.833	0.024 000
Q12	青海称多	33°8.019'	97°27.944'	4 401	17	0.228	0.000 437
Q13	青海囊谦	32°15.517'	96°55.072'	3 668	8	0	0
G2	甘肃民乐	38°5.480'	100°55.682'	3 408	12	0.455	0.001 030
G3	甘肃山丹	34°37.371'	101°26.413'	2 765	10	0	0
G4	甘肃榆中	35°43.819'	104°1.817'	2 958	10	0.511	0.050 600
G5	甘肃合作	35°13.512'	103°4.558'	3 164	7	0	0
G6	甘肃卓尼	34°35.910'	103°5.052'	3 025	6	0	0
G7	甘肃临潭	34°54.291'	103°41.403'	2 946	4	0	0
G8	甘肃玛曲	34°6.031'	101°53.329'	3 683	4	0.500	0.006 130
G9	甘肃碌曲	34°32.617'	102°31.825'	3 683	8	0.464	0.039 000
S1	四川若尔盖	33°18.639'	103°13.639'	3 757	4	0.000	0
S2	四川红原	32°25.875'	102°37.618'	3 963	5	0.900	0.033 100
S3	四川阿坝	32°55.346'	101°34.190'	3 493	8	0.250	0.001 470
S4	四川马尔康	31°47.110'	102°13.079'	3 693	4	0.667	0.054 400
S5	四川金川	31°27.889'	101°47.973'	3 808	15	0.533	0.038 900
S6	四川道孚	31°0.495'	101°0.440'	3 846	7	0.714	0.028 700
S7	四川甘孜	31°31.170'	99°58.579'	3 886	13	0.641	0.025 200
S8	四川炉霍	31°36.030'	100°42.474'	3 445	9	0.222	0.006 420
S9	四川丹巴	30°38.237'	101°38.108''	3 844	7	0	0
S10	四川小金	31°31.399	102°22.572'	3 654	7	0.286	0.000 720
合计					245	0.873	0.004 070

2 结果与分析

2.1 序列变异

对羌活 31 自然居群 245 个个体的 cpDNA *trnT-trnT* 基因间片段进行了测序和比对。序列长度在 753~847 bp, 排序后长 915 bp。合并相同的序列共得到 38 个单倍型 (H1~H38), 单倍型序列注册于 GenBank 数据库中。通过统计这一片段所有个体的序列发现, 碱基 A 与 T 在整个序列中

所占比例为 72.72%, 这与大多数叶绿体 DNA 基因间区碱基组成成分相符^[19-20]。

2.2 遗传多样性

种群遗传多样性参数统计表明 (表 1), 在物种水平上, 羌活 $Hd=0.873$, $Pi=0.004 07$; 在居群水平上 Hd 的变化范围为 0~0.900, Pi 变化范围为 0~0.054 4; 其中四川红原居群的 Hd 最高 (0.900), 四川马尔康居群的 Pi 最高 (0.054 4), 而青海互助居

群、青海门源居群、青海兴海居群、青海玛沁居群、青海久治居群、青海达日居群、青海囊谦居群、甘肃山丹居群、甘肃合作居群、甘肃卓尼居群、甘肃临潭居群、四川若尔盖居群、四川丹巴居群这些居群中的每一个居群都是由相同的序列组成，因此其 H_d 和 P_i 都最低。

2.3 居群的遗传结构

基于羌活 cpDNA *trnT-trnL* 非编码区序列变异的 AMOVA 分析表明，羌活大部分的遗传变异发生在居群间 (77.55%)，只有 22.45% 的遗传变异发生在居群内，居群间的遗传分化大于居群内的分化，说明群体间变异是羌活的主要变异来源。由 F_{ST} 估算的居群间的 N_m 为 0.145，表明羌活各居群间的基因流较低。

2.4 居群间的系统发育关系

根据不同单倍型之间的遗传距离，以伞形科 (Umbelliferae) 的 *Rhodosciadium argutum* (Wall. ex Hook.) Ching (登录号 JQ304919) 为外类群，构建羌活 38 个不同单倍型的 NJ 分子系统树 (图 1)，NJ 树上各分支上的数字代表 1 000 次 Bootstrap 统计分析后对该支的支持百分比 (即置信度)。NJ 树聚为 3 大分支：Q9、Q10、Q11、Q12、Q13、G5、G6、G7、S2、S3、S4、S5、S6、S7、S8、S9 聚为一支，而 Q1、Q2、Q3、Q4、Q5、Q6、Q7、G2、G3、G4、G8、G9、S1、S6、S9 聚为另一支，外类群的为第 3 支。由图 1 可见，S1 居群 (四川若尔盖) 与同一个地理区域的群体 (S2~S10) 并未聚成一支，且 S6、S9 等多个居群由于单倍型的共享在聚类时出现交叉重叠。

3 讨论

3.1 羌活的遗传多样性

普遍认为稀有的或分布区狭窄的物种遗传多样性水平偏低^[21-23]，但近年来也有研究报道显示有些特有种、狭域种甚至濒危种也能保持较高水平的遗传多样性^[24-25]。本实验通过对濒危植物羌活 31 个自然居群的叶绿体 DNA (cpDNA) *trnT-trnL* 分析得到其物种水平的 H_d 、 P_i 分别为 0.873 和 0.004 07，表明羌活物种水平上的遗传多样性相对较高。与同属的宽叶羌活^[26]相比，其物种水平的遗传多样性稍低于宽叶羌活 ($H_d=0.750\ 3$, $P_i=0.007\ 111$)。但其遗传多样性又略高于其他濒危物种^[27-29]，说明羌活的遗传多样性处于中等水平。

遗传变异水平受多方面因素影响，诸如生活型、繁殖方式、基因流、遗传漂变及自然选择和人为干

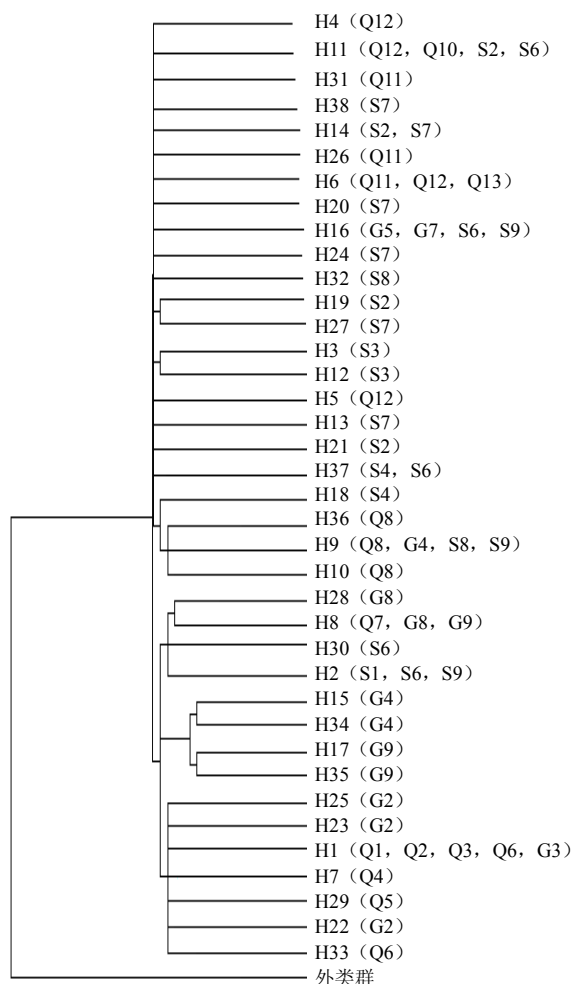


图 1 羌活 cpDNA *trnT-trnL* 单倍型 NJ 树

Fig. 1 NJ tree based on cpDNA *trnT-trnL* haplotypes of *N. incisum*

扰等。羌活的遗传多样性处于中等水平，可能与生境的严重片段化以及本身的生长特性有关。羌活是多年生草本，其分布范围相对较广，属异花授粉植物，有利于维持较高的遗传多样性水平。但是近几年来，由于资源短缺使得羌活药材价格逐渐攀升，使羌活遭受掠夺性采挖，羌活在人为的破坏中经历了严重的瓶颈效应，居群的大量减少及各居群间相互孤立，个体数量稀少的居群内容易发生近交，增加纯合度，造成居群内的遗传多样性的减少。虽然珍稀濒危物种一般表现出低水平的遗传变异，但遗传变异水平的高低并不一定与濒危相关，濒危的结果之一是遗传多样性水平下降，低水平的遗传多样性使物种更加濒危。羌活在遗传多样性上没有表现出濒危特性，需要加强其生物学特点、生殖生态、传粉生态等方面的研究，以便揭示濒危的机制。

3.2 羌活的遗传结构

一个物种或群体的进化潜力，在很大程度上取

决于它的居群遗传结构^[30]。而物种的遗传结构是指该物种遗传多样性在种群内和种群间的分布,即遗传分化。一般情况下,对于濒危物种来说,居群间的遗传变异相对较大,分化明显,如中国疣粒野生稻^[31]、银杉^[32]、宽叶羌活^[26]、独一味^[33]等。本研究中 AMOVA 数据表明羌活的遗传变异主要分布在居群间(77.55%),也显示了相似的结果。植物种群遗传结构一般解释为交配系统、种子传播方式、生活史、分布区大小等因素综合作用的结果。与 Nybom^[34]对 116 种植物种群遗传分化系数统计分析的平均值比较,羌活野生种群遗传分化系数(0.775 5)高于自交系统植物(0.65),这与羌活异花授粉的特征不符,可能是与青藏高原独特的地形和气候有关。在青藏高原内部千山万壑、峡谷纵横,而羌活主要分布于青藏高原的高山林缘下和灌丛中,青藏高原独特而复杂的地形通过阻断种子或花粉的传播来阻止居群间的交流,居群间有限的 N_m (0.145)进一步证明了这一点。因此,青藏高原地区的地理格局可能导致了羌活居群的隔离,加大了居群间的遗传分化。对大钟花 *Megacodon stylophorus* (C. B. Clarke) H. Smith^[35]、大花红景天 *Rhodiola crenulata* (Hook. f. & Thomson) H. Ohba^[36]、独一味 *Lamiophlomis rotata* (Benth. ex Hook. f.) Kudo^[32] 青藏高原植物居群的遗传多样性及遗传分化研究也表明,分布地区内复杂的地理条件,往往是导致居群隔离,促进居群间遗传分化的原因。此外,作为传统的藏药,近年来的人为过度采挖,加上人类活动对自然生境的破坏,导致羌活生境的破碎化,阻断了居群间的基因交流,进一步加剧了居群的遗传分化。

3.3 羌活的保护

探讨物种濒危机制是当前生物多样性研究的热点之一,也是保护生物学的核心工作。本研究表明,尽管羌活物种和种群都维持中等水平的遗传变异,但由于残存的羌活野生种群很小、片段化分布、种群内个体散生等种群特征,会产生遗传漂变和近交衰退的遗传后果,将可能导致遗传多样性降低、有害等位基因积累和适合度降低,最终使物种面临更高的灭绝风险,因此,开展羌活遗传资源保护工作迫在眉睫。基于本研究结果,羌活物种水平上具较中等的遗传多样性,且主要存在于居群间,居群分化明显,提出以下 4 点保护策略:(1)保护好其赖以生存的生境;(2)保护尽可能多的居群和个体;

(3)可以在 9 月中下旬人工采集部分成熟种子撒播到其他居群中,以便加强居群间的基因流动;(4)在迁地保护采样过程中,在各个居群内可以少取样,但要在尽可能多的居群中取样,以便提高栽培居群的遗传多样性。

本研究是基于叶绿体 DNA (cpDNA) *trnT-trnL* 序列来研究羌活种群遗传多样性与遗传结构,以期探讨其濒危机制。虽然叶绿体基因能反映基因多态性及基因流动大小等种群遗传学参数,也能反映羌活种群叶绿体的变异模式,但由于单基因片段所能反映的遗传多样性有限,因此,建议进一步开展多基因联合和核基因组 ISSR、RAPD、AFLP 等标记来检测羌活的遗传多样性和遗传结构,并结合生殖生态学、生殖解剖学研究,以期获得更多、更可靠的羌活种群遗传多样性及其濒危信息,为科学制定羌活遗传资源保护策略提供更全面的理论依据。

参考文献

- [1] Hamrick J L, Godt M J M, Murawski K A. *Correlations between species traits and Allozyme Diversity implications for Conservation Biology* [M]. New York: Oxford University Press, 1991.
- [2] 溥发鼎, 王萍莉, 郑中华, 等. 重订羌活属的分类 [J]. 植物分类学报, 2000, 38(5): 430-436.
- [3] 王幼平, 溥发鼎, 王萍莉, 等. 中国特有属——羌活属的系统分类研究 [J]. 云南植物研究, 1996, 18(4): 424.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [5] 吴征镒. 论中国植物区系的分区问题 [J]. 云南植物研究, 1979, 1(1): 1-22.
- [6] 周毅, 蒋舜媛, 马小军, 等. 羌活资源危机和保护 [J]. 中草药, 2003, 34(10): 12-14.
- [7] 徐惠波, 孙晓波. 羌活挥发油的药理作用研究 [J]. 中草药, 1991, 22(1): 28-30.
- [8] 汪松, 解焱. 中国物种红色名录 (第 1 卷) [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004.
- [9] 刘卫根, 王亮生, 徐文华, 等. 不同商品等级羌活中有机酸和香豆素类化合物的测定 [J]. 中成药, 2012, 34(11): 2181-2186.
- [10] 刘卫根, 王亮生, 周国英, 等. 羌活不同部位有机酸和香豆素类化合物含量的比较研究 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(11): 1950-1956.
- [11] 张明发, 沈雅琴. 羌活药理学研究 [J]. 药学服务, 2008(5): 28-30.
- [12] 马玉林, 李建民, 马莉, 等. 药用植物羌活的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(24): 13092-13093.
- [13] 蒋舜媛, 孙辉, 黄雪菊, 等. 羌活和宽叶羌活的环境土壤学研究 [J]. 中草药, 2005, 36(6): 917-921.

- [14] 董生健. 野生羌活驯化栽培技术 [J]. 农业科技与信息, 2010(1): 38-39.
- [15] 方子森, 陈小莉, 张恩和. 野生羌活的生态环境与驯化栽培 [J]. 中草药, 2004, 35(9): 1071-1073.
- [16] 孙稚颖, 陈士林, 姚 辉, 等. 基于 ITS2 序列的羌活及其混伪品的 DNA 条形码鉴定 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 568-571.
- [17] 唐学芳, 蒋舜媛, 孙 辉, 等. 川产羌活种质遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 中草药, 2008, 39(9): 1387-1392.
- [18] Chiang T Y, Chiang Y C, Chen Y J, *et al.* Phylogeography of *Kandelia candel* in East Asiatic mangroves based on nucleotide variation of chloroplast and mitochondrial DNAs [J]. *Mol Ecol*, 2001, 10(11): 2697-2710.
- [19] Kokita T and Nohara K. Chloroplast DNA phylogeography of *Rhodiola alsia* (Crassulaceae) in the Qinghai-Tibet Plateau [J]. *Botany-Botanique*, 2009, 87(11): 1077-1088.
- [20] Zheng W, Wang L Y, Meng L H, *et al.* Genetic variation in the endangered *Anisodus tanguticus* (Solanaceae), an alpine perennial endemic to the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *Genetica*, 2008, 132(2): 123-129.
- [21] 李 昂, 葛 颂. 植物保护遗传学研究进展 [J]. 生物多样性, 2002, 10(1): 61-71.
- [22] Richter T S, Soltis P S and Soltis D E. Genetic-variation within and among populations of the narrow endemic, *delphinium-viridescens* (Ranunculaceae) [J]. *Am J Bot*, 1994, 81(8): 1070-1076.
- [23] 苏志龙, 殷寿华, 吴成军, 等. 濒危物种山红树居群遗传结构的 RAPD 分析 [J]. 云南植物研究, 2005, 27(2): 181-186.
- [24] 张颖娟, 王玉山. 濒危灌木长叶红砂遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 生态学杂志, 2008, 27(2): 167-171.
- [25] 张永明, 金 洪, 马万里, 等. 濒危植物绵刺 8 个种群遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. 生态学报, 2009, 29(5): 2688-2692.
- [26] 杨路存, 周国英, 聂学敏. 濒危植物宽叶羌活天然居群 cpDNA 非编码区多态性分析 [J]. 西北植物学报, 2013, 33(8): 1535-1543.
- [27] Tan B, Liu K, Yue X L, *et al.* Chloroplast DNA variation and phylogeographic patterns in the Chinese endemic marsh herb *Sagittaria potamogetifolia* [J]. *Aquatic Bot*, 2008, 89: 372-378.
- [28] Huang J, Wang W, Peng C, Chiang T. Phylogeography and conservation genetics of *Hygrophila pogonocalyx* (Acanthaceae) based on atp B-rbcL noncoding spacer cpDNA [J]. *J Plant Res*, 2005, 118: 1-11.
- [29] Ribeiro R A, Lemos J P, Ramos A C S, *et al.* Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest [J]. *Heredity*, 2011, 106: 46-57.
- [30] Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L, *et al.* *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources* [M]. Sunderland: Sinauer Associates Press, 1990.
- [31] 钱 韦, 葛 颂, 洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性 [J]. 植物学报, 2000, 42(7): 741-750.
- [32] 汪小全, 邹喻莘, 张大明, 等. 银杉遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 中国科学 (C 辑), 1996, 26(5): 436-441.
- [33] Liu J M, Wang L, Geng Y P, *et al.* Genetic diversity and population structure of *Lamiophlomis rotata* (Lamiaceae), an endemic species of Qinghai-Tibet Plateau [J]. *Genetica*, 2006, 128(1/3): 385-394.
- [34] Nybom H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants [J]. *Mol Ecol*, 2004, 13(5): 1143-1155.
- [35] Ge X J, Zhang L B, Yuan Y M, *et al.* Strong genetic differentiation of the East-Himalayan *Megacodon stylophorus* (Gentianaceae) detected by inter-Simple sequence repeats (ISSR) [J]. *Biodi Cons*, 2005, 14(4): 849-861.
- [36] Lei Y D, Gao H, Tsering T, *et al.* Determination of genetic variation in *Rhodiola crenulata* from the Hengduan Mountains Region, China using inter-simple sequence repeats [J]. *Genet Mol Biol*, 2006, 29(2): 339-344.