

## · 药材与资源 ·

基于叶绿体 DNA *trnL* 内含子序列变异的远志谱系地理学研究韩雪婷, 房敏峰<sup>#</sup>, 李忠虎, 杨 佳, 冯 力, 赵桂仿<sup>\*</sup>

西北大学生命科学学院, 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 陕西 西安 710069

**摘要:** 目的 研究我国自然地理分布范围内远志 *Polygala tenuifolia* 的分子谱系地理情况, 揭示其地理分布格局的形成原因, 推测该物种潜在的冰期避难所及冰期后的迁移扩散路线。方法 使用叶绿体非编码片段 (*trnL* 内含子序列) 对远志在我国自然地理分布区内的 39 个居群 308 个个体的遗传变异分布模式进行检测。结果 共发现 26 个多态性位点, 得到 12 种叶绿体单倍型。单倍型系统发育分析显示远志自然居群可划分为南、北 2 个地理组群: 北方 (包括中国东北、中部、西北地区) 组群和南方组群, 南北组群没有共享单倍型。居群遗传结构分析表明 2 个地理组群之间遗传分化较大 ( $G_{st}=0.783$ ,  $P<0.001$ ), 物种水平遗传多样性较高 ( $H_t=0.755$ ), 北方组群不存在明显的谱系地理结构。结论 第四纪冰期时远志在中国北方和南方地区存在多个避难所; 冰期后或间冰期, 北方地区发生了明显的居群扩张事件; 南、北组群的分化可能是由于长期的地理隔离所致。

**关键词:** 远志; 谱系地理学; 冰期避难所; 扩张; 居群结构

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)22-3311-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.22.018

## Phylogeography of *Polygala tenuifolia* inferred from chloroplast DNA *trnL* intron sequence variation

HAN Xue-ting, FANG Min-feng, LI Zhong-hu, YANG Jia, FENG Li, ZHAO Gui-fang

Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China

**Abstract: Objective** To study the molecular phylogeography of natural populations of *Polygala tenuifolia* (Polygalaceae) in China, reveal the forming reasons of geographic distribution pattern of extant populations, and further determine the potential glacial refuges and colonization/migration routines of *P. tenuifolia* during the postglacial or interglacial periods. **Methods** We investigated the distribution patterns of genetic variation of 308 individuals from 39 natural populations of *P. tenuifolia* in China based on one chloroplast DNA fragment (cpDNA *trnL* intron). **Results** A total of 26 polymorphic sites were identified and 12 cpDNA haplotypes were recovered. Phylogenetic analysis of cpDNA haplotypes suggested that the natural populations of *P. tenuifolia* could be divided into two different groups: northern part (including populations of northeast, center, and northwest of China) and southern part. There were no shared cpDNA haplotypes between the two groups. And the population genetic analysis suggested that the high level of genetic differentiation ( $G_{st} = 0.783$ ,  $P < 0.001$ ) between the two groups, the high level of the genetic diversity were found ( $H_t = 0.755$ ) at the species level. No significant phylogeographic structure was detected in the North group. **Conclusion** The present studies revealed that the multiple glacial refuges of *P. tenuifolia* are identified in the northern and southern parts of China during the Quaternary periods. And northern populations have occurred the expansion events during the post-glacial or interglacial periods. The genetic divergence between the north and south groups of natural populations of *P. tenuifolia* may be caused by the long term geographic isolation.

**Key words:** *Polygala tenuifolia* Willd.; phylogeography; glacial refuges; expansion; population structure

全球气候变化, 尤其是第四纪冰期与间冰期气候反复波动, 影响了全球特别是北半球动植物的地理分布和居群遗传结构<sup>[1]</sup>。近年来, 通过追踪物种

自然地理居群遗传变异的时空分布来阐述植物响应对过去气候波动的分子谱系地理学研究获得了长足的发展<sup>[2-4]</sup>。研究结果表明, 冰期产生的历史气候波动

收稿日期: 2014-02-19

基金项目: 陕西省教育厅科学研究项目 (2013jk0808, 2013jk0713)

作者简介: 韩雪婷 (1987—), 女, 甘肃定西人, 硕士, 主要从事分子资源植物学方面的研究。Tel: 18392017922 E-mail: tshan2011@126.com

\*通信作者 赵桂仿 Tel: (029)88305207 E-mail: gfzhao@nwu.edu.cn

<sup>#</sup> 共同第一作者

对分布于我国植物的遗传结构产生了很大影响<sup>[5-6]</sup>。根据古孢粉学和化石证据对中国植被的重建研究发现,在距今 18 000~20 000 年前的末次盛冰期时,中国北方的草原和荒漠植被一直延伸到了今天的东南部海岸线附近<sup>[7]</sup>,而另外一些学者研究认为在末次盛冰期时中国北方地区存在有多个独立的植物冰期避难所,冰期后发生了局域性的居群扩张<sup>[8]</sup>。然而,这些研究主要集中在北方和南方地区多年生木本植物物种的居群历史动态方面,对于该地理分布范围内的草本植物物种研究较少。

叶绿体 DNA (cpDNA) 在大部分被子植物中为母系遗传,最大限度地保留了植物长期进化的历史遗传痕迹,这使得 cpDNA 非常适合于植物谱系地理历史研究。近年来,利用叶绿体 DNA 非编码区序列研究植物物种的群体遗传结构和谱系地理历史已经取得了一系列研究成果<sup>[9-11]</sup>。这些研究结果表明:在末次盛冰期 (LGM) 来临时,植物迁移到低海拔环境相对稳定的避难所地区得以幸存,而在间冰期或冰期过后,这些物种居群以避难所为中心重新向外回迁或扩散。

远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 是我国一种重要的多年生草本药用植物,隶属于远志科 (Polygalaceae) 远志属 *Polygala* Subgen, 具有祛痰安神、益智、消肿止痛等功效<sup>[12]</sup>。目前,对该物种的研究主要集中在化学成分、药理功能和部分取样居群的遗传多样性等方面<sup>[13-14]</sup>。该物种在我国的自然地理分布范围较广,这为研究草本植物在中国北方是否存在冰期避难所以及冰期后的迁移/扩散路线等问题提供了良好的研究系统。本研究通过检测我国自然地理分布范围内的 31 个远志自然居群的 308 个个体的叶绿体 DNA 序列变异模式,进一步进行该物种分子谱系地理历史研究,以期揭示远志现今地理分布格局的形成原因,推测远志潜在的冰期避难所及冰期后可能的迁移/扩散路线。

## 1 材料

对分布于我国范围内的远志自然地理居群进行采样,共收集到 31 个居群共 308 个个体的样品。野外采取嫩叶,用硅胶快速干燥并带回西北大学进化植物学实验室保存。具体采样信息及编号见表 1。样品由西北大学生命科学学院房敏峰教授和李佳硕士采集并鉴定为远志 *Polygala tenuifolia* Willd.。

## 2 材料

### 2.1 DNA 提取、PCR 扩增和测序

用小型植物基因组 DNA 提取试剂盒 (天根生

化科技有限公司) 从干燥叶片中提取远志总 DNA。叶绿体 *trnL* intron 扩增引物来自 Taberlet 的文献报道<sup>[15]</sup>。此外,本课题组选择跟远志同属物种卵叶远志 *Polygala sibirica* Willd. 和瓜子金 *Polygala japonica* Houtt. 作为外类群。

PCR 反应在 PTC-200 (MJ Research, 美国) 热循环仪上来进行。20  $\mu$ L PCR 反应体系包括 10  $\mu$ L 2 $\times$  Taq PCR Mix (西安润德生物技术有限公司), DNA 模板 2  $\mu$ L, 引物 0.3  $\mu$ L, 加 ddH<sub>2</sub>O 补至 20  $\mu$ L。反应程序: 94  $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 35 个循环; 94  $^{\circ}$ C 加热变性 40 s; 61.7  $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min; 然后在 72  $^{\circ}$ C 终延伸 10 min, 最终 PCR 产物于 4  $^{\circ}$ C 保存。

PCR 扩增产物首先在 1.2% 琼脂糖凝胶上检测,用溴化乙锭染色,在紫外灯下观察并拍照查看有无扩增产物,然后将 PCR 产物送到上海生工生物有限公司进行测序 (ABI 3730xl 遗传分析仪)。

### 2.2 数据处理

测序原始序列用 BioEdit 7.0.9 软件<sup>[16]</sup>编辑后进行序列比对,不准确位点通过原始序列图谱在 MEGA 5.0 软件<sup>[17]</sup>中进行适当手工校正。用 DnaSP 5.0<sup>[18]</sup>对 cpDNA 单倍型进行统计并计算每个居群单倍型多态性 ( $H_d$ ) 和核苷酸多态性 ( $P_i$ )<sup>[19]</sup>。用失配分布分析来检测居群历史动态变化情况<sup>[20]</sup>,群体扩张或增长时,失配分布呈现为单峰分布,反之,出现双峰或多峰,则处于动态平衡。用 Tajima's D 检验<sup>[21]</sup>、Fu and Li's D<sup>\*</sup><sup>[22]</sup>、Fu and Li's F<sup>\*</sup> 检验以及 Fu's F<sub>S</sub><sup>[23]</sup>进行中性检验。

远志居群总的遗传多样性 ( $H_t$ ) 和居群内平均遗传多样性 ( $H_s$ ), 居群间遗传分化系数 ( $G_{st}$ ) 以及基因流系数 ( $N_{st}$ ) 值用软件 PERMUT 进行 1 000 次置换检验计算。同时比较  $G_{st}$  和  $N_{st}$ , 如果  $N_{st}$  值显著大于  $G_{st}$  ( $P < 0.05$ ), 说明亲缘关系相近的单倍型更可能发生在相同的居群中,表明存在谱系地理结构<sup>[24]</sup>。利用 NETWORK 4.2.0 软件<sup>[25]</sup>构建叶绿体单倍型网状关系图。组间、组内居群间和居群内的遗传差异分析用 ARLEQUIN 3.0 软件包<sup>[26]</sup>中的分子变异分析 (AMOVA) 进行检测。利用 MEGA 5.0 软件<sup>[15]</sup>中的最大简约法进行单倍型的系统发育分析,通过 1 000 次重复自展分析 (Bootstrap) 推断出节点的置信度。

## 3 结果与分析

### 3.1 单倍型变异及其分布

对远志所有个体测序结果进行比对以及人工矫

表 1 31 个远志居群的地理位置及样本大小

Table 1 Sample sizes (N) and locations of 31 populations of *P. tenuifolia*

居群代号	采样地点	纬度 (N) / (°)	经度 (E) / (°)	海拔 / m	样本数量
GSLZ	甘肃兰州	36.03	103.82	1 833.0	10
GSLX	甘肃陇西	35.09	104.44	1 833.0	10
HBLY	河北涞源	39.34	114.58	957.2	9
HBTX	河北唐县	38.78	114.98	121.0	10
HBWC	河北围场	41.95	117.77	1 004.0	10
HNHX	河南辉县	35.45	113.81	100.0	10
HNLS	河南卢氏	34.08	111.07	674.5	10
HBFX	湖北房县	32.57	110.70	153.7	10
JSXZ	江苏徐州	34.17	117.08	106.1	10
JXGC	江西广昌	26.91	116.21	109.9	10
LNBP	辽宁北票	41.62	121.00	166.6	10
LNJZ	辽宁锦州	41.20	121.10	108.0	10
NMBT	内蒙包头	40.63	109.84	1 452.0	10
NMCF	内蒙赤峰	42.26	118.95	569.0	10
NMHS	内蒙呼市	40.84	111.74	1 734.0	9
NXYI	宁夏盐池	37.76	107.14	1 565.0	10
NXYU	宁夏银川	38.71	105.99	1 601.0	10
QHXH	青海循化	35.83	102.69	2 011.0	10
SDFX	山东费县	32.17	117.88	248.9	10
SXPS	山西平顺	36.19	113.43	1 134.0	10
SXPY	山西平遥	37.21	112.27	826.2	10
SXWT	山西五台	38.83	113.41	1 101.0	10
SXXJ	山西新绛	35.49	111.07	564.8	10
SXYC	山西运城	34.85	110.57	604.7	10
SXHY	陕西合阳	35.14	110.29	575.3	10
SXSM	陕西神木	38.82	110.50	1 053.0	10
SXYX	陕西耀县	35.19	108.84	1 250.0	10
SXWN	陕西渭南	34.48	109.50	352.0	10
SXYH	陕西延川	36.86	110.20	790.1	10
SCMX	四川茂县	31.68	103.84	1 568.0	10
ZJKH	浙江开化	29.01	118.39	108.8	10

正, 结果显示 *trnL* 内含子间隔区对齐后总长度为 545 bp, 包含 26 个变异位点, 其中 8 个简约信息位点, 具体变异位点如表 2 所示。分析得到总单倍型多态性和总核苷酸多态性分别是  $H_d=0.183$  和  $P_i=0.001 54$ , 总共得到的 12 种单倍型见表 3。大多数居群含有单倍型 H1 和 H2, 而且所占频率较高。这 2 种单倍型主要分布于中国北部、西北和中部的居群中。此外, H2 在东北居群中也有分布。H9、H10、H11、H12 为南部居群的特有单倍型。H4、H6、H7、H8 分布范围有限, H7、H8 仅分布于陕西耀县的居群中, H6 仅在陕西合阳居群中有分布, H5 仅在辽宁 2 个居群中分布,

而 H4 仅在河南辉县居群中存在。

### 3.2 单倍型系统发育关系

基于叶绿体单倍型最大简约型的系统发育分析显示, 远志的叶绿体单倍型构成一个单系分支, 而且具有较高的支持率。在最大简约树 (MP 树) 中 (图 1), cpDNA 单倍型基本上可以分为 2 个不同的地理族群, 一个在中国北方 (包括中部、西北、华北、东北的居群), 另一个在中国东南部地区, 这与 Network 网状结构关系 (图 2) 基本一致。单倍型 H1 和 H2 位于网络连接图的中央位置, 而且分布频率较高, 范围较广, 推测可能是古老的祖先单倍型。

表 2 远志 cpDNA *trnL* 内含子确定的 12 种单倍型间的变异

Table 2 Variable sites of aligned sequences of cpDNA fragment *trnL* intron of 12 haplotypes of *P. tenuifolia*

cpDNA 单倍型	内含子 / bp																									
	22	72	94	109	144	320	321	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	365	398	413	430	468
H1	A	T	A	A	C	-	-	A	T	A	A	A	T	-	-	-	-	-	-	-	-	C	A	A	T	-
H2	A	T	A	A	C	-	-	A	T	A	A	A	T	A	A	A	T	-	-	-	-	C	A	A	T	-
H3	A	T	A	A	C	-	-	A	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	A	A	T	-
H4	A	T	A	A	T	-	-	A	T	A	A	A	T	-	-	-	-	-	-	-	-	C	A	A	T	-
H5	A	T	A	A	C	-	-	A	T	A	A	A	T	A	A	A	T	A	A	A	T	C	A	A	T	-
H6	A	T	A	A	C	-	-	A	T	A	A	A	T	A	A	A	T	-	-	-	-	C	A	A	T	A
H7	-	T	A	A	C	-	-	A	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	A	A	T	-
H8	A	T	A	A	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	A	A	T	-
H9	A	G	G	T	C	-	-	A	T	A	A	A	T	-	-	-	-	-	-	-	-	A	C	A	G	-
H10	A	G	G	T	C	-	-	A	T	A	A	A	T	-	-	-	-	-	-	-	-	A	C	T	G	-
H11	A	G	G	T	C	-	-	A	T	A	A	A	T	-	-	-	-	-	-	-	-	A	C	A	T	-
H12	A	G	G	T	C	T	A	A	T	A	A	A	T	A	A	A	T	-	-	-	-	A	C	A	G	-

表 3 12 种单倍型在 31 个居群中的分布以及各居群的遗传多样性

Table 3 Genetic diversity and distributions of 12 haplotypes from 31 populations of *P. tenuifolia*

居群	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	<i>n</i>	<i>N</i>	$P_i$	$H_d$
GSLZ	9		1										10	2	0.000 38	0.2
GSLX		10											10	1	0	0
HBLY	8	2											10	2	0.000 67	0.355 56
HBTX	10												10	1	0	0
HBWC		10											10	1	0	0
HNHX				10									10	1	0	0
HNLS	10												10	1	0	0
HBFX	10												10	1	0	0
JSXZ		10											10	1	0	0
JXGC									2		4	4	10	3	0.003	0.711 11
LNBP					10								10	1	0	0
LNJZ					10								10	1	0	0
NMBT		10											10	1	0	0
NMCF		10											10	1	0	0
NMHS		10											10	1	0	0
NXYI	8	2											8	2	0.000 067	0.355 56
NXYU	10												10	1	0	0
QHXH			10										10	1	0	0
SDFX		10											10	1	0	0
SXPS		10											10	1	0	0
SXPY	10												10	1	0	0
SXWT	5	5											10	2	0.001 04	0.555 56
SXXJ	6	4											10	2	0.001	0.533 33
SXYC		6	4										10	2	0.002	0.533 33
SXHY		9				1							10	2	0.000 38	0.2
SXSM	10												10	1	0	0
SXYX			8				1	1					10	3	0.000 75	0.377 78
SXWN			9										9	1	0	0
SXYH		10											10	1	0	0
SCMX	10												10	1	0	0
ZJKH									4	6			10	2	0.001	0.533 33

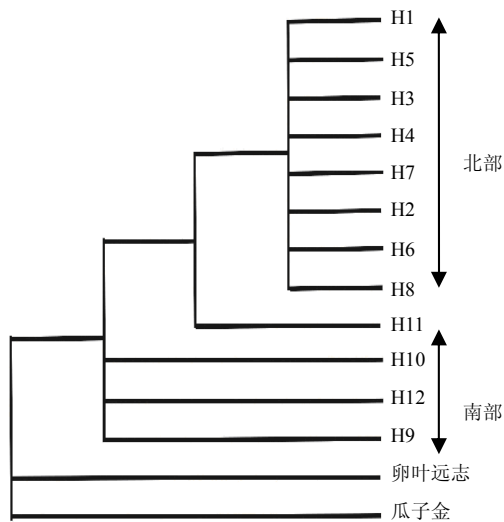


图 1 远志 12 种叶绿体 *trnL* 内含子单倍型的 MP 树  
Fig. 1 MP tree of chloroplast *trnL* intron in 12 haplotypes of *P. tenuifolia*

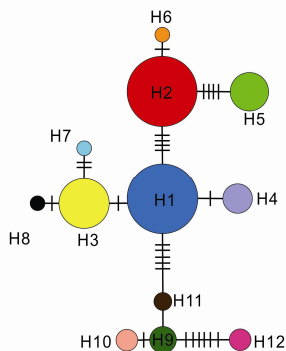


图 2 *trnL* 内含子的单倍型网状关系  
Fig. 2 Networks of 12 chloroplast haplotypes of *trnL* intron region

### 3.3 居群遗传结构和谱系地理历史

基于采样居群的地理区域和单倍型的组成将所有的居群划分为北部组（中西部、华北、东北）和南部组。AMOVA 分析显示中国北部和南部组间存在明显的遗传分化（59.95%， $P < 0.001$ ）。组内居群间的分化为 37.77%（ $P < 0.001$ ），而居群内的分化较小（6.28%， $P < 0.001$ ），居群内基因流较低（ $N_m = 0.06$ ），居群间遗传分化明显（ $F_{st} = 0.8197$ ）。

Permut 分析显示居群间遗传分化较大，物种水平上遗传多样性较高，总的  $N_{st}$ （0.717）小于  $G_{st}$ （0.783），表明没有明显的谱系地理结构。北部组  $N_{st}$ （0.889）大于  $G_{st}$ （0.856），表明北部组也没有明显谱系地理结构。失配分布分析结果显示北部组

为单峰，推测可能发生了快速的居群扩张事件。同样，北部组  $F_{st}$  值为负数也与扩张的结论一致。

## 4 讨论

### 4.1 群体遗传结构和分化

基于叶绿体 DNA *trnL* 内含子间隔区序列的系统发育分析显示，我国远志自然地理居群可以分为明显的 2 大谱系分支，遗传变异显著（59.95%， $P < 0.001$ ）。北部组包括单倍型 H1~H8，其中 H1 和 H2 存在于大多数居群中。南部组包含 4 个单倍型 H11、H9、H10、H12，南北 2 组之间不存在共享的单倍型。分子变异分析（AMOVA）和 Permut 分析结果也显示远志居群间的遗传分化水平较高（ $G_{st} = 0.783$ ）。远志自然居群中，物种水平上存在较高的遗传多样性（ $H_t = 0.783$ ），推测可能是由于其明显的群体结构所致；居群内遗传多样性水平较低（ $H_s = 0.164$ ）。造成我国南、北方远志自然居群遗传分化的主要原因可能是由于存在地理隔离屏障，以及种子传播距离有限和基因流水平较低等原因所致。一般来说，母系遗传的叶绿体 DNA 通过种子传播，传播距离较短。结果显示远志居群间的  $N_m$  为 0.06，基因流较小。推测远志种子长距离传播能力有限，加之有长江等河流以及其他的地理隔离因素（如山脉、沟谷等），所有这些都阻碍了远志南、北居群之间的基因交流，导致了明显的遗传分化。

### 4.2 冰期避难所及居群动态历史

基于叶绿体 DNA *trnL* 内含子间隔区，本实验在远志自然分布区总共鉴定得出 12 种单倍型，单倍型网状结构显示单倍型 H1、H2 位于网络图的中央位置，可能是古老单倍型。居群 GSLZ 地理上属于西北地区，它除了包含高分布频率的古老单倍型 H1，还包括西北居群的代表单倍型 H3，且此区域遗传多样性较高，故推测居群 GSLZ 是远志在冰期时的一个避难所。远志在秦岭西部存在可能的冰期避难所的假设与栎属植物研究发现的植物冰期避难所位置相似<sup>[25]</sup>。此外，位于中国东北部的居群 LNJZ 和 LNBP 只固定单倍型 H5，在北方其他居群中也没有发现该单倍型的存在，因此推测居群 LNJZ 和居群 LNBP 所在区域可能是远志冰期时一个避难所，这与对蒙古栎和辽东栎的研究中发现的在末次盛冰期沿着长白山的东北中部有避难所的结果类似<sup>[27]</sup>。居群 SXYX 和 SXHY 中，不仅含有特有单倍型 H7、H8、H6、H3，而且还包括广布单倍型 H2，这些居群的单倍型多样性较高，因此，推测这些区域可能也是

远志的冰期避难所。冰期过后单倍型 H2 向西、向北、向南进行扩散。单倍型 H9、H10、H11、H12 仅出现在南部的居群 ZJKH 和 JXGC 中, 南方居群中的特有单倍型在系统发育树中处于基部位置, 暗示了其早期的起源和分化, 表明这些居群在南部稳定的避难所中有着长期的进化历史。这些居群经过长期的适应性进化, 或者由于早期的奠基者效应或是进化过程中的瓶颈效应, 再加上与北部居群的长时期的地理隔离, 造成现今南北地区远志叶绿体单倍型显著的差异。

综上, 基于 cpDNA *trnL* 内含子序列对远志自然居群谱系地理研究结果表明, 该物种在冰期时在中国北方和南方都存在避难所。冰期过后, 北部区域明显地发生了居群扩张事件。南、北部组群的分化可能由于河流、山脉等形成的长期的地理隔离所致。

#### 参考文献

- [1] Abbott R J, Smith L C, Milne R I, *et al.* Molecular analysis of plant migration and refugia in the Arctic [J]. *Science*, 2000, 289(5483): 1343-1346.
- [2] Falchi A, Paolini J, Desjoberg J M, *et al.* Phylogeography of *Cistus creticus* L. on Corsica and Sardinia inferred by the TRNL-F and RPL32-TRNL sequences of cpDNA [J]. *Mol Phylo Evol*, 2009, 52(2): 538-543.
- [3] Abbott R J, Smith L C, Milne R I, *et al.* Molecular analysis of plant migration and refugia in the Arctic [J]. *Science*, 2000, 289(5483): 1343-1346.
- [4] Hewitt G M. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2004, 359(1442): 183-195.
- [5] Liu J Q, Sun Y S, Ge X J, *et al.* Phylogeographic studies of plants in China: advances in the past and directions in the future [J]. *J System Evol*, 2012, 50(4): 267-275.
- [6] Li Z, Zou J, Mao K, *et al.* Population genetic evidence for complex evolutionary histories of four high altitude juniper species in the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *Evolution*, 2012, 66(3): 831-845.
- [7] Winkler M G, Wang P K. *The Late-Quaternary Vegetation and Climate of China, Global Climates Since the Last Glacial Maximum* [M]. Minneapolis: University of Minnesota Press, 1993.
- [8] Qian H, Ricklefs R E. Large-scale processes and the Asian bias in species diversity of temperate plants [J]. *Nature*, 2000, 407(6801): 180-182.
- [9] Hewitt G. The genetic legacy of the Quaternary ice ages [J]. *Nature*, 2000, 405(6789): 907-913.
- [10] Tian X, Luo J, Wang A, *et al.* On the origin of the woody buckwheat *Fagopyrum tibeticum* (*Parapteropyrum tibeticum*) in the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *Mol Phylo Evol*, 2011, 61(2): 515-520.
- [11] 郑丹书, 张君毅, 郭巧生. 半夏及近缘种叶绿体非编码区序列分析 [J]. *中草药*, 2013, 44(7): 881-886.
- [12] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [13] 李佳, 房敏峰, 周天华, 等. 主产区远志种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. *中草药*, 2010, 41(11): 1881-1885.
- [14] Fang M F, Li J, Zhou T H, *et al.* Genetic diversity in natural populations of the medicinal herb *Polygala tenuifolia* Willd. and its implications for conservation [J]. *Bioch System Ecol*, 2012, 44: 400-406.
- [15] Taberlet P, Gielly L, Pautou G, *et al.* Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA [J]. *Plant mol Biol*, 1991, 17(5): 1105-1109.
- [16] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program on Windows 95/98/NT [J]. *Nucl Acids Symp Ser*, 1999, 41: 95-98.
- [17] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4. 0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [18] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451-1452.
- [19] Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics* [M]. New York: Columbia University Press, 1987.
- [20] Rogers A R, Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences [J]. *Mol Biol Evol*, 1992, 9(3): 552-569.
- [21] Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism [J]. *Genetics* 1989, 123: 585-595.
- [22] Fu Y X, Li W H. Statistical tests of neutrality of mutations [J]. *Genetics*, 1993, 133(3): 693-709.
- [23] Fu Y X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection [J]. *Genetics*, 1997, 147(2): 915-925.
- [24] Pons O, Petit R J. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles [J]. *Genetics*, 1996, 144(3): 1237-1245.
- [25] Bandelt H J, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies [J]. *Mol Biol Evol*, 1999, 16(1): 37-48.
- [26] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3. 0): an integrated software package for population genetics data analysis [J]. *Evol Bioinform Online*, 2005, 1: 47.
- [27] Zeng Y F, Liao W J, Petit R J, *et al.* Geographic variation in the structure of oak hybrid zones provides insights into the dynamics of speciation [J]. *Mol Ecol*, 2011, 20(23): 4995-5011.