基于叶绿体 DNA *trn*L-*trn*F 序列研究云南省绞股蓝属植物的亲缘关系

董文华，刘占林，黄兆辉，杨　佳，苏海伦，李忠虎，赵桂仿

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

摘要：通过叶绿体 DNA *trn*L-*trn*F 测序分析，研究云南省绞股蓝属（*Gynostemma* BL.）7 种（14 个居群）植物的遗传变异。结果显示：绞股蓝属植物叶绿体 DNA *trn*L-*trn*F 序列变异长度为 732～810 bp，变异主要由 2 个位置片段的插入或缺失引起，共鉴定得到 5 种单倍型。绞股蓝属植物不同居群的样品在碱基含量、信息位点的碱基位置和遗传距离等方面存在一定差异；具有相同地理分布的不同物种拥有相同的单倍型，说明其祖先物种可能存在多态性。分子变异分析表明大部分遗传变异主要存在于居群间。系统发育分析表明绞股蓝属植物的亲缘关系与地理分布具有一定的相关性，但也存在不一致现象。推测生态因素以及绞股蓝不同物种复杂的倍性变化可能是导致特定遗传结构形成的重要原因。因而，要确定不同绞股蓝物种之间的合理亲缘关系还需要结合其他方面的证据支持。

关键词：植物学；绞股蓝属植物；DNA 测序；遗传变异；物种分布；亲缘关系

中图分类号：Q941　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1674-2850(2012)03-0415-8

Phylogenetic relationships of *Gynostemma* BL. in Yunnan based on chloroplast DNA *trn*L-*trn*F sequence variation

DONG Wenhua, LIU Zhanlin, HUANG Zhaohui, YANG Jia,
SU Hailun, LI Zhonghu, ZHAO Guifang

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

Abstract: 7 species (14 populations) of *Gynostemma* BL. collected in Yunnan province were analyzed by the chloroplast DNA (cpDNA) *trn*L-*trn*F sequencing technologies. The length of cpDNA *trn*L-*trn*F sequence was varied to 732-810 bp. Insertion and/or deletion at two positions mainly caused the genetic variation among populations of *Gynostemma* BL., 5 cpDNA haplotypes were uncovered within samples of *Gynostemma* BL. Some differences of the cpDNA sequence were detected in the base contents, positions of the parsimony informative sites and genetic distance among populations of *Gynostemma* BL. from samples collected from different areas in Yunnan. The different *Gynostemma* BL. species distributed in the same areas shared the same cpDNA haplotypes. It concluded that the ancestral species of *Gynostemma* BL. may be polymorphic. Analysis of molecular variance indicated that the most of genetic variations were existed among populations. Phylogenetic analysis showed that some correlations were found between genetic relationships and geographic locations among different *Gynostemma* BL. species, whereas the discrepancies were also detected among them. It concluded that the ecological factors and the complex changes in cytotypes of *Gynostemma* BL. species might have caused the formation of specific genetic structure among populations. So other evidence is needed to be combined with for ascertaining the reasonable genetic relationships among *Gynostemma* BL. species.

Key words: botany; *Gynostemma* BL.; DNA sequencing; genetic variation; species distribution; phylogenetic relationship

基金项目：高等学校博士学科点专项科研基金（20096101110008）

作者简介：董文华（1986—），女，硕士研究生，主要研究方向：植物分子亲缘地理学

通信联系人：赵桂仿，教授，主要研究方向：系统与进化植物学. E-mail：gfzhao@nwu.edu.cn

0 引言

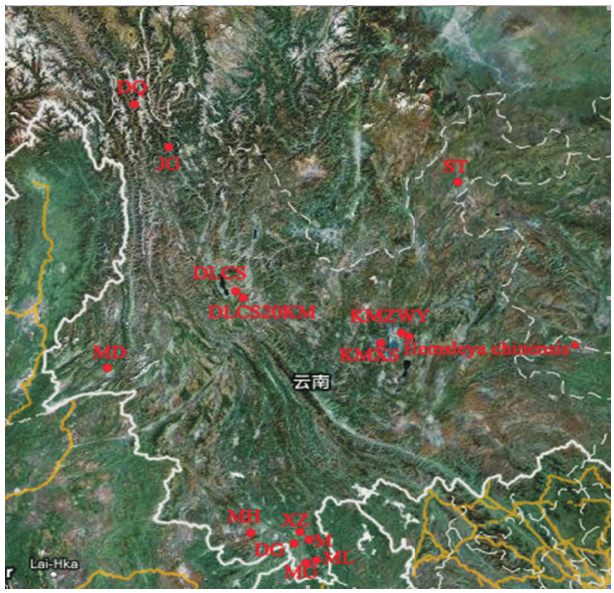
绞股蓝属（*Gynostemma* BL.）为葫芦科（Cucurbitaceae）多年生草本植物，全属共有 16 种 2 变种，在我国 17 个省区均有分布，其中 9 种 2 变种为中国特有。云南省分布的种类最多，有绞股蓝（*Gynostemma pentaphyllum*）、聚果绞股蓝（*Gynostemma aggregatum*）、小籽绞股蓝（*Gynostemma microspermum*）、大果绞股蓝（*Gynostemma burmanicum* var. *molle*）、毛果绞股蓝（*Gynostemma pentaphyllum* var. *dasycarpum*）、毛绞股蓝（*Gynostemma pubescens*）和缅甸绞股蓝（*Gynostemma burmanicum*）等，是我国传统中草药，全草入药，主要药用成分为绞股蓝皂苷[1~2]。绞股蓝属为热带亚洲分布类型，地理环境变化复杂，在其种系发生发展过程中，为适应新的环境形成了一系列的生态变异类型，属内各类群之间形态特征交叉，过渡现象严重，同时存在染色体倍型的变化[3]，为该属的分类界定带来困难。已有研究证据表明，绞股蓝属内不同种之间在蛋白质营养成分[4]，皂甙含量[5]，黄酮含量[6]等方面存在差异，同时种子微结构[7]，染色体数目和过氧化物酶同工酶谱方面也有不同[8]。因此，绞股蓝属植物分类问题的研究具有重要的理论和应用价值。

近年来，随着分子生物学的发展，DNA 测序及序列分析技术在植物种源鉴定、分类研究等方面发挥了重要作用。植物叶绿体 DNA（cpDNA）是迄今用于分子系统学和谱系地理学研究最多的一类基因，在一些非编码区域存在相对较高的核苷酸置换率[9]，从而其在种间和种内居群间都拥有较高的序列遗传变异[10]。目前，针对叶绿体基因非编码区发展了一批应用广泛的通用引物[11]。通过这些 cpDNA 序列变异的研究，不仅可以建立属内物种之间的亲缘关系[12~13]，而且还能在一些种内鉴别出多种特有单倍型（haplotype）[14]。采用 DNA 测序技术，测定了我国云南省绞股蓝属植物 7 个物种（14 个居群）共 210 个个体的叶绿体 DNA *trn*L-*trn*F 基因序列。通过序列的比对分析和系统发育研究，探讨了云南省几种绞股蓝属植物的物种分布特点和亲缘关系。

1 实验方法与数据处理

1.1 植物材料

研究所用植物材料于 2009 年 6 月至 2010 年 6 月期间采自云南省内不同地区。经过大量广泛的野外调查和采样，共收集到云南省绞股蓝属 7 个 物种 14 个居群的材料。在野外采集新鲜、完整的植物幼嫩叶片，使用盛有硅胶的塑胶袋干燥保存，每个地点随机采集 15 株不同个体，个体间的距离尽量保持在 50 m 以上。同时在每个采样点制作标本，记录样品的采样地位置海拔、经纬度等信息，标本由中国科学院昆明植物研究所陈书坤研究员与西北农林科技大学陈彦生研究员鉴定。另外，在每个采样点同时采集植物的根尖，用福尔马林－醋酸－乙醇（formalin-acetic acid-alcohol，FAA）固定液固定，带回实验室进行染色体计数（根据 SANG[15] 的方法）。经鉴定，绞股蓝属植物 14 个居群中，只有大理苍山的绞股蓝居群是八倍体（DLCS 8x），其余都是二倍体（2x），雪胆（*Hemsleya chinensis*）作为研究的外类群。研究材料来源及编号如图 1 和表 1 所示。



注：JG－聚果绞股蓝；DG－大果绞股蓝；XZ－小籽绞股蓝；MG－毛果绞股蓝；M－毛绞股蓝；MD－缅甸绞股蓝；DQ－绞股蓝德钦居群；MH－绞股蓝勐海居群；ML－绞股蓝勐腊居群；DLCS－绞股蓝大理苍山居群；DLCS20KM－绞股蓝大理苍山 20 km 处居群；KMZWY－绞股蓝昆明植物园居群；KMXS－绞股蓝昆明西山居群；ST－绞股蓝邵通居群；*Hemsleya chinensis* * －雪胆

图 1 实验材料的采样地点分布图

Fig. 1 Geographic distribution of sampled populations of *Gynostemma* BL. in Yunnan

表 1 云南省绞股蓝属植物采样信息

Tab. 1 Locality of *Gynostemma* BL. in Yunnan province

种名	倍性	采样地点	编号	个数	纬度	经度	海拔/m
聚果绞股蓝 *G. aggregatum*	2x	中甸 \ 桥头	JG	15	27°10′	100°03′	1 859
大果绞股蓝 *G. burmanicum* var. *molle*	2x	勐养-勐仑 59 km 处	DG	15	21°56′	101°15′	550
小籽绞股蓝 *G. microspermum*	2x	西双版纳 \ 勐醒	XZ	15	21°07′	100°07′	789
毛果绞股蓝 *G. pentaphyllum* var. *dasycarpum*	2x	勐腊 88 km 处	MG	15	21°09′	100°07′	657
毛绞股蓝 *G. pubescens*	2x	勐仑 \ 植物园	M	15	21°41′	101°25′	832
缅甸绞股蓝 *G. burmanicum*	2x	潞西 \ 三台乡 \ 山谷林	MD	15	24°20′	98°24′	1 193
绞股蓝 *G. pentaphyllum*	2x	德钦 \ 茨中	DQ	15	28°18′	98°53′	1 900
绞股蓝 *G. pentaphyllum*	2x	勐海往西 7 km 处 \ 勐曼	MH	15	22°00′	100°45′	830
绞股蓝 *G. pentaphyllum*	2x	勐腊 88 km 处	ML	15	21°09′	100°07′	657
绞股蓝 *G. pentaphyllum*	8x	大理 \ 苍山	DLCS	15	25°41′	109°07′	2 557
绞股蓝 *G. pentaphyllum*	2x	大理 \ 苍山 20 km 处	DLCS20KM	15	25°38′	109°09′	2 557
绞股蓝 *G. pentaphyllum*	2x	昆明植物园	KMZWY	15	25°08′	102°38′	2 000
绞股蓝 *G. pentaphyllum*	2x	昆明西山	KMXS	15	24°57′	102°39′	2 200
绞股蓝 *G. pentaphyllum*	2x	邵通黄连河	ST	15	27°31′	103°74′	1 887
雪胆 *H. chinensis* *		昆明植物园		10	25°08′	102°38′	2 000

注：居群编号为采样地点；2x，8x 分别为二倍体和八倍体；* 为外类群

1.2 DNA 提取

以硅胶快速干燥的绞股蓝属植物叶片为材料，参照改进的 2×CTAB 法[16]提取植物总 DNA，作适当修改。

1.3 PCR 扩增、纯化及扩增产物的测序

首先，利用几对叶绿体通用引物对绞股蓝属植物不同种的少量居群（每个居群选择 3 个个体）进行预扩增和测序实验，最后筛选得到了一对扩增质量高、多态性丰富的叶绿体 *trn*L-*trn*F 引物（引物序列：正向引物 CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG；反向引物 ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG）对所有样品目的片段进行测序工作。PCR 反应条件根据 LI 等[17~18]的方法改进，总体系为 50 μL，其中包括 1×PCR 缓冲液，2 mmol/L Mg^{2+}，250 μmol/L dNTPs，2 单位 *Taq* DNA 聚合酶，正反向引物各 0.8 mmol/L，以及 50～100 ng 基因组 DNA，去离子水补足体积至 50 μL. PCR 反应在 PTC-200TM thermocycler（MJ Research，美国）上进行，反应程序为：95℃预变性 4 min；95℃变性 45 s，55.0～57.5℃退火 45 s，72℃延伸 1 min，进行 35 个循环；最后 72℃延伸 7 min. 采用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果，然后利用上海生工生物工程有限公司的 DNA 纯化/回收试剂盒纯化回收 PCR 产物。最终，每个居群的材料选取 10 个个体进行双向测序。测序反应由上海生工生物工程有限公司完成，测序引物为 *trn*L-*trn*F 正反向扩增引物。

1.4 序列分析和系统发育树的构建

序列编辑用 BioEdit Sequence Aligment Editor 软件进行对位排列，编辑后根据测序原始峰图进行适当手工调整，即可得到不同的单倍型。应用 DnaSP 4.50.2 软件进行单倍型划分和对全部居群的单倍型多样性指数 H[19]、核苷酸多样性指数 π[20]值进行计算，系统发育分析采用 MEGA 4.0 中的最大简约法（maximum parsimony，MP）和邻接法（neighbour joining，NJ）进行。利用 TCS 1.2 构建 cpDNA 单倍型网络进化关系图。拓扑结构的可靠性用 1 000 次重复的自展（bootstrap）检验来完成[21]。此外，运用 Arlequin 软件包中的分子变异分析（analysis of molecular variance，AMOVA）方法对所有采样居群间的遗传分化程度进行度量[22]，固定指数 F_{st}的显著性水平，用 1 000 次的非参数置信检验来验证。

2 结果与分析

2.1 cpDNA 序列分析

研究测得云南省绞股蓝属 7 种植物 14 个居群的叶绿体 DNA *trn*L-*trn*F 序列，序列测序结果包括基

因及其间隔区间。由于存在插入/缺失，最后得到的序列长度为 732～810 bp，长度变异主要由 2 个位置片段的插入或缺失（如表 2 所示）引起。研究发现：云南大理的八倍体绞股蓝居群（DLCS 8x）不仅与其他地理距离较近的 DLCS20KM 居群，还与地理距离较远的昆明居群（KMZWY，KMXS），以及邵通居群（ST），在 79～85 位置均同时出现了 7 bp 碱基插入，在 322～330 处出现 9 bp 碱基缺失，说明这几个居群存在较近的亲缘关系。所有测定序列中鉴定到 5 个变异位点，其中简约信息位点（parsimony informative sites）2 个，单一多态性位点（single variable sites）3 个，序列 GC 含量为 34.3%.

表 2　叶绿体片段 *trn*L-*trn*F 中的变异位点

Tab. 2　Variable characters in the chloroplast DNA *trn*L-*trn*F alignments

居群	倍性	*trn*L-*trn*F
DG	2x	...GA..T———AAG..TCGG..A-TT..... TG AAAGATGTG AA.....
JG	2x	...TA..T———AAG..TCAG..AATT.....TG AAAGATGTG AA.....
XZ	2x	...GA..T———AAG..TCGG..A-TT..... TG AAAGATGTG AA.....
M	2x	...GA..T———AAG..TCGG..A-TT..... TG AAAGATGTG AA.....
MG	2x	...GA..T———AAG..TCGG..A-TT..... TG AAAGATGTG AA.....
MD	2x	...TA..T———AAG..TCAG..AAATT.... TG AAAGATGTG AA.....
DQ	2x	...TA..T———AAG..TCAG..AATT.....TG AAAGATGTG AA.....
MH	2x	...GA..T———AAG..TCGG..AATT.....TG AAAGATGTG AA.....
ML	2x	...GA..T———AAG..TCAG..AATT.....TG AAAGATGTG AA.....
DLCS	8x	...TA..T TCTAAAT AAG..TCAG..AATT.....TG———AA.....
DLCS20KM	2x	...TA..T TCTAAAT AAG..TCAG..AATT.....TG———AA.....
KMZWY	2x	...TA..T TCTAAAT AAG..TCAG..AATT.....TG———AA.....
KMXS	2x	...TA..T TCTAAAT AAG..TCAG..AATT.....TG———AA.....
ST	2x	...TA..T TCTAAAT AAG..TCAG..AATT.....TG———AA.....
H. chinensis *		...TTT TCAAAAAACAAA..TCAA..TCGA.....TT CCAATATCT AA.....

2.2　cpDNA 单倍型及遗传多样性分析

研究对 7 种绞股蓝属植物 14 个居群，共计 220 个体的叶绿体 DNA *trn*L-*trn*F 序列进行了 PCR 扩增产物的全序列双向测序，共鉴定出 5 种单倍型（如表 3 所示）。其中，单倍型 H2 和 H1 出现的频率最高，均在 5 个居群中出现，其他单倍型为各地理区域居群所特有（如图 2 所示）。单倍型多样性 H_d=0.725，核苷酸多样性 π=0.290；遗传分化系数 N_{st}=0.389(0.082) 和 G_{st}=0.362(0.054). 使用 U 统计对 G_{st}和 N_{st}做显著性分析，结果表明 N_{st}显著大于 G_{st}（P<0.05），说明绞股蓝属植物存在明显的谱系地理结构。各居群间的遗传距离如表 4 所示，其中缅甸绞股蓝与大果绞股蓝、毛绞股蓝、毛果绞股蓝、小籽绞股蓝，以及绞股蓝勐海居群之间的遗传距离最大为 0.022. 通过分子变异分析（analysis of molecular variance，AMOVA）将 14 个居群分为 2 组：一组为居群 DG，M，MG，XZ，MH，ML，MD；另一组为 DLCS20KM，DLCS，KMZWY，KMXS，DQ，ST，JG. AMOVA 分析结果表明：大部分的遗传变异主要存在于组内居群间（79.93%），而居群内的变异最低（0），如表 5 所示。另外，居群遗传分化系数 F_{st}的值为 1，说明绞股蓝属植物居群间存在较高水平的遗传分化。

表 3　各种单倍型编号

Tab. 3　Symbols of cpDNA haplotype sequence

单倍型	居群	单倍型	居群
H1	DG	H2	KMZWY
H1	M	H2	ST
H1	MG	H2	KMXS
H1	XZ	H3	ML
H1	MH	H4	JG
H2	DLCS20KM	H4	DQ
H2	DLCS	H5	MD

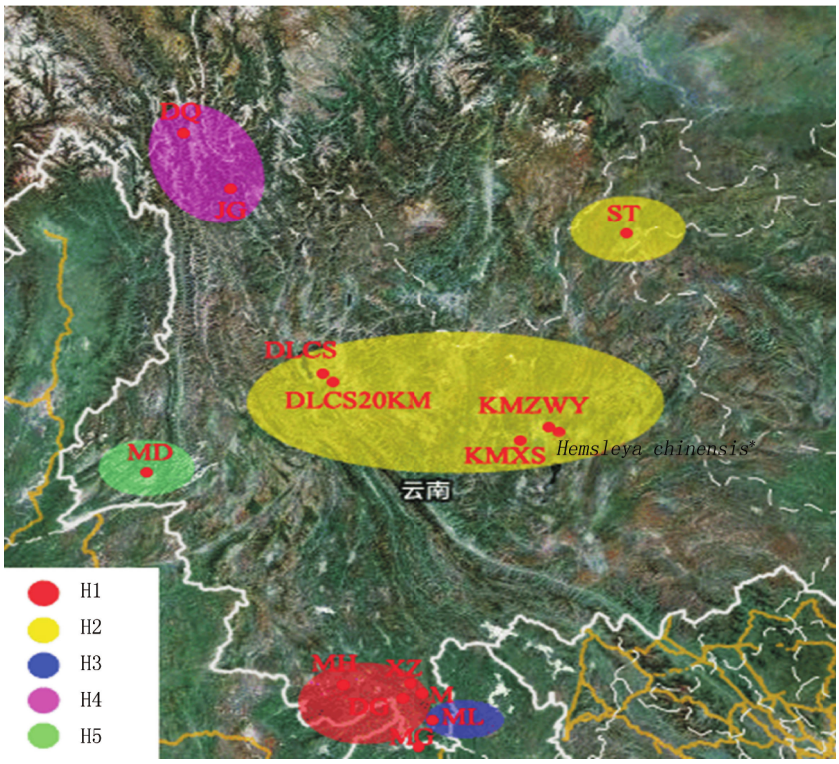


图 2 单倍型地理分布图

Fig. 2 Geographic distribution of cpDNA haplotypes

表 4 各居群之间的遗传距离

Tab. 4 Genetic distances among populations

	DG	JG	M	MG	MD	XZ	DLCS20KM	DLCS	KMZWY	MH	ML	ST	DQ	KMXS
DG														
JG	0.013													
M	0.002	0.013												
MG	0.002	0.013	0.002											
MD	0.022	0.004	0.022	0.022										
XZ	0.002	0.013	0.002	0.002	0.022									
DLCS20KM	0.013	0.002	0.013	0.013	0.004	0.013								
DLCS	0.013	0.002	0.013	0.013	0.004	0.013	0.002							
KMZWY	0.013	0.002	0.013	0.013	0.004	0.013	0.002	0.002						
MH	0.002	0.013	0.002	0.002	0.022	0.002	0.013	0.013	0.013					
ML	0.004	0.004	0.004	0.004	0.009	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004				
ST	0.013	0.002	0.013	0.013	0.004	0.013	0.002	0.002	0.002	0.013	0.004			
DQ	0.018	0.004	0.018	0.018	0.004	0.018	0.004	0.004	0.004	0.018	0.004	0.004		
KMXS	0.013	0.002	0.013	0.013	0.004	0.013	0.002	0.002	0.002	0.013	0.004	0.002	0.004	

表 5 叶绿体单倍型分子变异分析结果

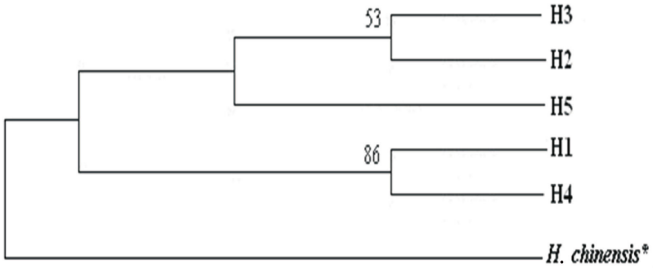
Tab. 5 AMOVA of all the individuals of chloroplast haplotypes

变异来源	自由度	平方和	变异组分	变异百分率
组间	1	199.286	3.629 25	20.07%
组内居群间	12	867.143	14.452 38	79.93%
居群内	56	0	0	0
总量	69	1 066.429	18.081 63	F_{st}=1

2.3 系统发育分析

利用 MEGA 4.0 软件构建绞股蓝属植物叶绿体 DNA *trn*L-*trn*F 序列 5 种单倍型的 NJ 树和 MP 树。

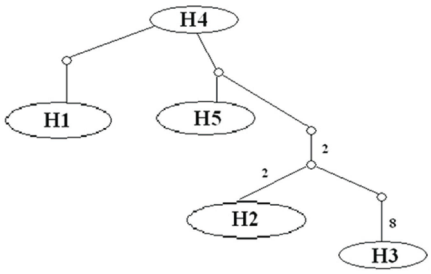
2 种方法所得到的单倍型系统发育树拓扑结构基本一致，在此只列出 MP 树的分支结构图。由图 3 可以看出：5 种单倍型划分为 3 个小分支，其中单倍型 H1 和 H4 聚为一支，H2 和 H3 聚在另一支上。根据绞股蓝属单倍型序列的变异情况，运用 TCS 1.2 软件构建单倍型网络进化关系图（如图 4 所示），由图 4 可以看出：单倍型 H4 位于网络进化关系图的中间位置，可能代表了比较原始的类型。另外，H1 与 H4 的亲缘关系比较近，这与单倍型系统发育树的结果基本一致。



注：枝上的数字为自展分析自展值（1 000 重复），＊代表外类群

图 3　MP 法构建的 5 个单倍型的系统发生树

Fig. 3　MP phylogenetic tree constructed from 5 cpDNA haplotypes



注：H1～H5 为 5 种单倍型；“0”代表了假设的共同祖先，在每个连接旁的数字代表了缺失祖先的数目；圆圈大小与单倍型频率成正比

图 4　利用 TCS1.2 构建的叶绿体单倍型网状进化关系图

Fig. 4　Network of cpDNA haplotypes H1-H5 constructed by TCS1.2

3　讨论与结论

DNA 测序技术是近年来发展的用于探讨植物种间和种内居群间遗传变异，以及近缘属间系统亲缘关系的重要分子手段[17~18]。研究运用的叶绿体 DNA 序列片段在绞股蓝属物种内显示出较高的遗传变异，从 DNA 序列分析的结果来看，不同居群样品在碱基含量、信息位点的碱基位置和遗传距离等方面存在一定差异。如 DLCS，DLCS20KM，KMZWY，KMXS 和 ST 居群在 79～85 处同时出现 7 bp 的碱基插入，在 322～330 处出现 9 bp 碱基缺失。

对绞股蓝属 7 个物种 14 个居群进行叶绿体 DNA *trn*L-*trn*F 单倍型序列系统发育分析，从分支结构树中可以看出（如图 3 所示）：虽然单倍型种类比较少，但是它们具有明显的物种分布特点，并且物种间亲缘关系与其各自地理分布基本相一致。其中，5 种绞股蓝属植物分布在云南省的最南部——西双版纳州，它们共同拥有一种单倍型 H1，表明分布距离较近的大果绞股蓝、毛绞股蓝、毛果绞股蓝、小籽绞股蓝和绞股蓝（勐海居群）的亲缘关系比较近，说明西双版纳的生态环境适合种类较多的云南绞股蓝属植物生存，也可以推测出绞股蓝属植物的祖先可能存在多态性。绞股蓝（德钦）居群和聚果绞股蓝共同拥有单倍型 H4，德钦县与中甸都位于云南省迪庆州的北部，TCS 网络图（如图 4 所示）显示单倍型 H4 位于网络核心位置，体现出原始单倍型的特征。MP 树把单倍型 H4 和单倍型 H1 聚到一起，二者所包含的居群虽然地理位置上相对比较远，但是亲缘关系比较近，这又显示了其地理分布与亲缘关系的不一致性。单倍型 H2 在 5 个采自不同地区（DLCS，DLCS20KM，KMZWY，KMXS，ST）的绞股蓝居群样品中都有发现，其中只有大理苍山居群的绞股蓝是八倍体，其他居群则均是二倍体。在绞股蓝种内，二倍体居群分布范围较广，八倍体在种的分布区内呈点块状分布，分布区较狭小[1]。通过 DNA 序列分析，在这 5 个居群序列 79～85 bp 处均出现 TCTAAAT 的插入，由于研究仅仅涉及单亲遗传的叶绿体遗传标记，由此可以推测绞股蓝八倍体的母系来源于单倍型 H2 多个居群内部。位于西双版纳州最南端的绞股蓝勐腊居群单独拥有单倍型 H3，在系统发育树上，其与单倍型 H2 聚到一起，但支持率并不是很高，显示了其地理分布与亲缘关系的不一致，推测这种部分不一致性主要是由绞股蓝种内复杂的倍性变化所导致。缅甸绞股蓝采于云南省潞西县，此居群拥有特定单倍型

H5，由于靠近缅甸，可能与缅甸绞股蓝属植物存在基因交流。

研究结果显示：在云南省绞股蓝属植物中，具有相同地理分布的不同物种可以拥有相同单倍型，不同种共享相同的单倍型说明其祖先种可能存在多态性，另外，大量的遗传变异主要存在于居群间，生态因素可能是导致特定遗传结构形成的重要原因。细胞学资料表明：绞股蓝种内有二倍体、四倍体、六倍体和八倍体四种细胞型，不同倍性的植物在形态上难以区分，但不同倍性的植物对生态环境的应对方式和居群间基因交流程度不同[23~24]。虽然研究只发现绞股蓝 DLCS 居群为八倍体，但鉴于绞股蓝属植物叶绿体 DNA *trn*L-*trn*F 遗传变异的分布情况及系统发育关系与地理分布的部分不一致性，再加上叶绿体 DNA 序列单亲遗传的特点[14]，要确定绞股蓝属不同物种之间的合理亲缘关系还需要结合其他方面的证据（例如双亲遗传的核基因分子标记），从而达到准确的分子鉴定的目的。

[参考文献] (References)

[1] 陈书坤. 绞股蓝属植物的分类系统和分布[J]. 植物分类学报，1995，33 (4)：403-410.
CHEN S K. A classificatory system and geographical distribution of the genus *Gynostemma* BL. (Cucurbitaceae)[J]. Acta Phytotaxonomica Sinica，1995，33(4)：403-410. (in Chinese)

[2] 刘敏华. 药用动植物种养加工技术 60：绞股蓝[M]. 北京：中国中医药出版社，2001.
LIU M H. Planting and processing technology of medicinal plants and animals 60：*Gynostemma*[M]. Beijing：Chinese Press of Traditional Chinese Medicine，2001. (in Chinese)

[3] 高信芬，陈书坤，顾志建，等. 绞股蓝属的染色体研究[J]. 云南植物研究，1995 ，17 (3)：312- 316.
GAO X F，CHEN S K，GU Z J，et al. A chromosomal study on the genus *Gynostemma* (Cucurbitaceae)[J]. Acta Botanica Yunnanica，1995，17(3)：312-316. (in Chinese)

[4] 李纯，孟洁. 安徽省绞股蓝资源调查及质量评价[J]. 安徽农学通报，1997，3 (3)：22-24.
LI C，MENG J. Investigation and evaluation of plant resources and quality of *Gynostemma* in Anhui province[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin，1997，3(3)：22-24. (in Chinese)

[5] 刘世彪，林如 ，胡正海. 绞股蓝属 5 种植物的茎叶结构和总皂贰含量差异[J]. 福建农林大学学报（自然科学版），2006，35 (5)：495-499.
LIU S B，LIN R，HU Z H. Comparison of stem and leaf structures and total gypenosides among 5 species of *Gynostemma*[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)，2006，35(5)：495-499. (in Chinese)

[6] 蒋伟哲，周燕文，李锦燊. 6 种广西产绞股蓝中总黄酮的含量测定[J]. 中国药房，2006，17 (1)：74-75.
JIANG W Z，ZHOU Y W，LI J S. Assaying of total flavonoids in 6 kinds of *Gynostemma* made in Guangxi[J]. China Pharmacy，2006，17(1)：74-75. (in Chinese)

[7] 孙航，陈书坤. 绞股蓝属植物种皮微结构特征及其分类学意义[J]. 云南植物研究，1998，20 (3)：59-61.
SUN H，CHEN S K. The microstructural features of seed surfaces and its taxonomic significance in the genus *Gynostemma*[J]. Acta Botanica Yunnanica，1998，20(3)：59-61. (in Chinese)

[8] 张智，谢中稳，李瑶. 安徽绞股蓝属植物资源分布及其过氧化物酶同工酶的研究[J]. 安徽农业大学学报，1993，29 (4)：372-376.
ZHANG Z，XIE Z W，LI Y. Resource distribution and peroxidase isozyme of *Gynostemma* in Anhui[J]. Journal of Anhui Agricultural University，1993，29(4)：372-376. (in Chinese)

[9] TABERLET P，GIELLY L，PAUTOU G，et al. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA[J]. Plant Molecular Biology，1991，17(5)：1105-1109.

[10] NEWTON A C，ALLNUTT A R，GILLIES A C M，et al. Molecular phylogeography，intraspecific variation and the conservation of tree species[J]. Trends in Ecology and Evolution，1999，14(4)：140-145.

[11] HAMILTON M B. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation[J]. Molecular Ecology，1999，8(3)：521-523.

[12] WANG Y J，LIU J Q. Phylogenetic analyses of Saussurea sect. Pseudoeriocoryne (Asteraceae：Cardueae) based on

chloroplast DNA trnL-F sequences[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2004, 32(11): 1009-1023.

[13] 王玉金，李小娟，郝刚，等. 点地梅属的分子系统学、生物地理学和垫状形态的趋同进化[J]. 植物分类学报，2004，42 (6)：481-499.
WANG Y J, LI X J, HAO G, et al. Molecular phylogeny and biogeography of Androsace (Primulaceae) and the convergent evolution of cushion morphology[J]. Acta Phytotaxonomica Sinica, 2004, 42(6): 481-499. (in Chinese)

[14] TREMBLAY N O, SCHOEN D J. Molecular phylogeography of *Dryas integrifolia*: glacial refugia and postglacial recolonization[J]. Molecular Ecology, 1999, 8(7): 1187-1198.

[15] SANG T. Utility of low-copy nuclear gene sequences in plant phylogenetics[J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 37(3): 121-147.

[16] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochemical Bulletin, 1987, 19(1): 11-15.

[17] LI Z H, ZHANG Q, LIU J Q, et al. The Pleistocene demography of an alpine juniper of the Qinghai-Tibetan Plateau: *tabula rasa*, cryptic refugia or something else?[J]. Journal of Biogeography, 2011, 38(1): 31-43.

[18] LI Z H, ZOU J B, MAO K S, et al. Population genetic evidence for complex evolutionary histories of four high altitude juniper species in the Qinghai-Tibetan Plateau[J]. Evolution, 2011, doi: 10.1111/j.1558-5646.2011.01466.x

[19] NEI M. Molecular evolutionary genetics[M]. New York: Columbia University Press, 1987.

[20] NEI M, LI W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, 76(10): 5269-5273.

[21] FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. Evolution, 1985, 39(4): 783-791.

[22] EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S. Arlequin (version. 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis[J]. Evolutionary Bioinformatics Online, 2005, 1: 47-50.

[23] SOLTIS D E, SOLTIS P S. Polyploidy: reccurrent formation and genome evolution[J]. Trends in Ecology and Evolution, 1999, 14(9): 348-352.

[24] SOLTIS D E, SOLTIS P S, NESS B D. Chloroplast-DNA variation and multiple origins of autopolyploidy in *Heuchera micrantha* (Saxifragaceae)[J]. Evolution, 1989, 43(3): 650-656.