

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201609020

引文格式: 王谈笑, 郑伟, 陈菁, 等. 基于 ITS 序列分析钩苞大丁草九个居群的亲缘关系 [J]. 广西植物, 2017, 37(3):329-334

WANG TX, ZHENG W, CHEN J, et al. Genetic relationship analysis of *Gerbera delavayi* from nine populations based on ITS sequences[J]. Guihaia, 2017, 37(3):329-334

基于 ITS 序列分析钩苞大丁草九个居群的亲缘关系

王谈笑¹, 郑伟², 陈菁¹, 王炜², 徐晓丹^{3*}

(1. 昆明理工大学 现代农业工程学院, 昆明 650500; 2. 昆明理工大学 建筑与城市规划学院, 昆明 650500; 3. 昆明理工大学 艺术与传媒学院, 昆明 650500)

摘要: 该研究对我国西南地区钩苞大丁草 (*Gerbera delavayi*) 9 个居群 rDNA ITS 序列进行 PCR 的扩增和检测序列, 并以非洲菊 (*G. jamesonii*) 的 ITS 序列作为外类群, 比较了序列之间的差异, 同时分析了钩苞大丁草不同居群在地理距离与遗传距离之间的关系, 构建了 NJ 系统发育树。结果表明: (1) 钩苞大丁草 9 个居群的 ITS 序列全长介于 600~700 bp 之间, 平均长度约为 657 bp, 其中, ITS1 长度为 243~246 bp, (G+C) 含量为 45.67%~46.80% 之间, 5.8S 长度 191~193 bp, (G+C) 含量为 58.60%~58.61% 之间, ITS2 长度为 220~221 bp, (G+C) 含量为 57.00%~57.45% 之间; ITS 序列共有 22 个变异位点, ITS1 序列 (17 个)、5.8S 序列 (2 个) 以及 ITS2 序列 (3 个) 上均有变异。(2) 地理距离与遗传距离有正相关 ($r^2=0.652$), 序列间遗传分化距离为 0.001 1~0.024 3, 其中普洱居群与其他居群间遗传距离最大。(3) 钩苞大丁草 9 个居群分成三个分支, 普洱居群单独成支, 丽江和洱源居群聚为一支, 富源、武定、德昌、石林、新平和开远 6 个居群聚为一支。rDNA ITS 序列可以用于钩苞大丁草群体遗传研究的分析, 该研究结果为其保护性开发提供了参考依据。

关键词: 钩苞大丁草, ITS 序列, 居群, 遗传距离, 亲缘关系

中图分类号: Q948.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2017)03-0329-06

Genetic relationship analysis of *Gerbera delavayi* from nine populations based on ITS sequences

WANG Tan-Xiao¹, ZHENG Wei², CHEN Jing¹, WANG Wei², XU Xiao-Dan^{3*}

(1. College of Modern Agricultural Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China; 2. College of Architecture and City Planning, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China; 3. College of Art and Communication, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: Ribosomal DNA (rDNA) ITS of nine populations of *Gerbera delavayi* in Southwest China were amplified, sequenced and compared with *G. jamesonii*. The relationships of geographic distance and genetic distance of nine populations were studied. The NJ phylogenetic tree was also constructed. The results were as follows: (1) The whole length of ITS sequences of *G. delavayi* was 600–700 bp, the average length was 657 bp, the length of ITS1 was 243–246 bp, (G+C) amounted for 45.67%–46.80%, the length of 5.8S was 191–193 bp, (G+C) amounted for 58.60%–58.61%, the length of ITS2 was 220–221 bp, (G+C) amounted for 57.00%–57.45%. A total of 22 variable sites (ITS1, 7; 5.8S, 2 and ITS2, 3) were found. (2) The genetic distance had positive correlation with the geographic distance of *G. delavayi* ($r^2=0.652$). The genetic differentiation distance was 0.001 1–0.024 3, among which the genetic distance between Pu'er and other population

收稿日期: 2016-09-14 修回日期: 2016-11-21

基金项目: 国家自然科学基金(31560086) [Supported by the National Natural Science Foundation of China(31560086)].

作者简介: 王谈笑(1991-), 女, 吉林市人, 硕士研究生, 从事植物资源研究, (E-mail)418658915@qq.com.

*通信作者: 徐晓丹, 博士, 讲师, 从事植物资源研究, (E-mail)125128370@qq.com.

was the largest. (3) Nine populations were divided into three branches, in which Pu'er populations was separated as the first group. The second group contained Lijiang and Eryuan provenances. The other six populations (Fuyuan, Wuding, Dechang, Shilin, Xiping and Kaiyuan) were clustered together. RDNA ITS sequence analysis could be applied to study the population genetic of *G. delavayi*. The results provides reference for the protective development of *G. delavayi*.

Key words: *Gerbera delavayi*, ITS sequences, population, genetic distance, genetic relationship

钩苞大丁草(*Gerbera delavayi*)是菊科大丁草属植物,分布于我国云南省、四川省南部及越南北部,生长于海拔1 800~3 200 m的贫瘠草地(程用谦,1996)。钩苞大丁草干枯后的叶片具有良好的助燃性,祖先曾世代将其利用于打火取火之用,故又名“火草”、“火石花”。钩苞大丁草具有广泛的应用价值,首先,它叶背部的毛纤维可做纺织火草衣的材料(李晓岑和李云,2010),深受我国白、彝、壮、傣、纳西族等少数民族人民的喜爱,目前,火草纺织技艺已被列入云南省、四川省的非物质文化遗产。其次,钩苞大丁草的根系含有杀菌成份香豆素等,可以用于治疗肠胃疾病(徐冰钰,2014)。此外,钩苞大丁草的花有一定的观赏价值,具有作为鲜切花的潜力。近年来,火草衣的价格逐年攀升(市场价每件约为5 000元),导致钩苞大丁草鲜叶的价格也迅速上升(2014年高达500元·kg⁻¹),过度的采摘已经影响到了其正常的发育与生长,根系被用作中药材,还导致部分地区的钩苞大丁草被大量的采挖。可见,野生资源正受到多方面的威胁。然而,钩苞大丁草还未实现人工种植,因此,钩苞大丁草的保护性开发迫在眉睫。

核糖体 DNA 转录区序列(Internal transcribed spacer, ITS)进化迅速,ITS 标记技术的诞生就备受人们关注,在系统发育研究(Yamaji et al, 2007)、植物资源鉴定(Yang et al, 2007)、遗传多样性检测(Baraket et al, 2009)等研究领域发挥了重要作用。ITS 序列不仅用于被子植物种间及以上水平的系统发育研究,如菊属(赵惠恩等,2003)和兔儿风属(范香媛,2011)等,还适合种内水平的亲缘关系研究(严寒静等,2008;李喜凤等,2012;腰政懋等,2015;王洁等,2013)等。本研究对钩苞大丁草 9 个居群 rDNA ITS 序列进行了分析,探讨了钩苞大丁草不同居群间的序列变异程度及亲缘关系,为钩苞大丁草的种质资源利用和保护性开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

所用材料来自钩苞大丁草的 9 个野生居群(表

1)。其中,8 个居群分布在云南省内,1 个居群德昌居群分布于四川省南部。采样以均匀、随机的取样原则来进行,确保采样母本之间的距离在 50 m 以上。采样时,选择新鲜幼嫩的叶片,采样后用带冰保冷箱保存。带回实验室后置于超低温冰箱-80 ℃冷冻保存备用。

1.2 DNA 的提取

样本分别称 0.1 g 叶片置于研钵中,利用液氮将钩苞大丁草研磨成粉末状,然后利用 CTAB 法(Doyle JJ & Doyle JL, 1987)提取 DNA,最后放于冰箱-20 ℃保存等待备用。

1.3 扩增及纯化

获取 DNA 后,采用通用引物 ITS4 (5'-TCCTC-CGCTTATTGATATGC-3') 和 ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3') (昆明硕擎生物有限公司合成)进行 PCR 扩增,扩增如下:先 94 ℃预变性 4 min,然后进行循环,即 94 ℃变性 1 min,50 ℃退火 2 min,72 ℃延伸 2 min,30 个循环后,72 ℃延伸 10 min。PCR 反应体系总体积为 20 μL(DNA 模板 1 μL,去离子水 8.0 μL, Master Mix 10 μL,引物 1 μL)。最后,用 0.6%琼脂糖凝胶电泳检测其扩增结果,以 DNA Ladder Mix maker 作为分子量标记,电泳结果在 BIOTOP 凝胶成像仪中观察和拍照,并将扩增产物送至昆明硕擎生物有限公司进行测序。

1.4 DNA 序列分析

先将钩苞大丁草的 ITS 序列在 NCBI 中进行 Blast 对比,并通过近缘种非洲菊(*G. jamesonii*)的 ITS 序列(登录号:GU818551)确定钩苞大丁草 ITS 序列中 ITS1、ITS2 以及 5.8S rDNA 的界限;然后用 UltraEdit 软件对测序结果进行调整,转换格式,利用 ClustalX1.08 软件(王洁等,2013)进行对位排列和多重对比,并辅助人工校对,完成 9 组 DNA 序列的选择保存 FASTA 格式,用系统发育分析软件(MEGA 6 软件)和 Bootstrap 的方法进行可信度检测,调整空位不足,使用 Bottstrap1000 计算 NJ 进化树(Neighbor joining tree, NJ),完成钩苞大丁草 9 个居群系统发育树的构建,确认后在 NCBI 上登录注

表 1 钩苞大丁草 9 个居群的地理位置
Table 1 Geographical location of nine *G. delavayi* populations

局群 Population	采样点 Location	纬度 Latitude	经度 Longitude	海拔 Altitude (m)	样本数 No. of sample
WD	武定县 Wuding County	25°28'12.39" N	102°19'32.92" E	2 026	22
FY	富源县 Fuyuan County	25°50'30.84" N	103°17'18.83" E	2 468	24
LJ	丽江市 Lijiang City	26°53'59.81" N	100°10'47.33" E	2 564	23
EY	洱源县 Pu'er County	26°09'38.82" N	99°54'20.12" E	2 512	17
DC	德昌县 Dechang County	27°19'20.92" N	102°17'27.08" E	2 180	25
KY	开远市 Kaiyuan City	23°48'19.36" N	103°37'52.97" E	1 456	23
PE	普洱市 Pu'er City	22°46'20.11" N	101°00'56.81" E	1 466	24
SL	石林彝族自治县 Shilin Yi Autonomous County	24°54'31.20" N	103°20'42.31" E	1 862	22
XP	新平彝族傣族自治州 Xinping Yi and Dai Autonomous Prefecture	23°55'55.32" N	102°08'21.12" E	1 528	23

册,其登录号为 KX932426、KX932427、KX932428、KX932429、KX932430、KX932431、KX932432、KX932433、KX932434。

2 结果与分析

2.1 钩苞大丁草 rDNA ITS 序列长度及碱基频率

钩苞大丁草 9 个居群的序列长度为 600~700 bp 之间,其平均长度为 657 bp,ITS 序列鸟嘌呤 G 含量最高(28.85%),腺嘌呤 A 含量最低(20.03%),ITS1 长度为 243~246 bp,(G+C)含量为 45.67%~46.80%之间,5.8S 长度 191~193 bp,(G+C)含量为 58.60%~58.61%之间,ITS2 长度为 220~221 bp,(G+C)含量为 57.00%~57.45%之间,通过(G+C)含量看出其变化幅度小,说明钩苞大丁草 9 个居群的亲缘关系很近(Rodriguez et al,2000)。

2.2 钩苞大丁草 9 个居群的 ITS 序列变异

从图 1 分析表明,钩苞大丁草 9 个居群间的 ITS 序列共发现 22 个变异位点,变异类型包括 A-T、A-C、A-G、T-C、C-T、G-A、G-T、C-G 碱基颠换与替换等。ITS1 序列上变异较多为 17 个,占 ITS 序列长度的 6.9%,5.8S 保守区域有 2 个,ITS2 上的变异有 3 个,占 ITS 序列长度的 1.4%。可见,ITS1 序列上的信息量比 ITS2 序列上的信息量高,且 ITS1 序列中钩苞大丁草样本差异较大。

从图 1 看出,富源(FY)居群、武定(WD)居群、石林(SL)居群、德昌(DC)居群相似度在 60%以上;开

远(KY)居群、新平(XP)居群以及丽江(LJ)居群、洱源(EY)居群相似度均在 90%以上,其中新平居群在 568 位处 T 取代 G,是新平居群的特异位点,丽江居群在 148 位处 T 取代 G,是丽江居群的特异位点。但普洱(PE)居群与其他几个的差异较大,其变异位点多且多次出现碱基替换及颠换的现象,尤其在 5.8S 保守区域中还出现 2 个变异位点,明确指出普洱居群与其它居群钩苞大丁草存在较大差异。

2.3 遗传距离与地理距离的相关性分析

遗传距离是表达基因频率功能组之间的遗传变异,可以反映不同居群之间的进化关系,可以用来衡量群体之间遗传差异的大小。通过对 9 个居群遗传距离的分析,SL 居群和 XP 居群间的遗传距离最小,为 0.001 1;KY 和 PE 间的遗传距离最大,为 0.024 3;9 个野生群体的遗传距离都维持在较低水平。值得注意的是,PE 与其他 8 个群体间的遗传距离均高于其它两两群体间的遗传距离,表明 PE 与其它居群亲缘关系相对较远。

为探讨地理距离与遗传距离间的关系,采用卡方检验的方法来进行相关关系的分析。图 2 结果显示,钩苞大丁草 9 个居群间的遗传距离和地理距离为正相关关系($r^2=0.652, P=0.005$),表明地理距离对钩苞大丁草群体间的遗传距离有较大影响。

2.4 钩苞大丁草 9 个居群的系统发生树

从图 3 可以看出,外类群非洲菊单独成支,其他居群分成三支。第 I 支为位于云南省西南部的普洱(PE)居群;位于云南省西北部高原山地地区的丽江

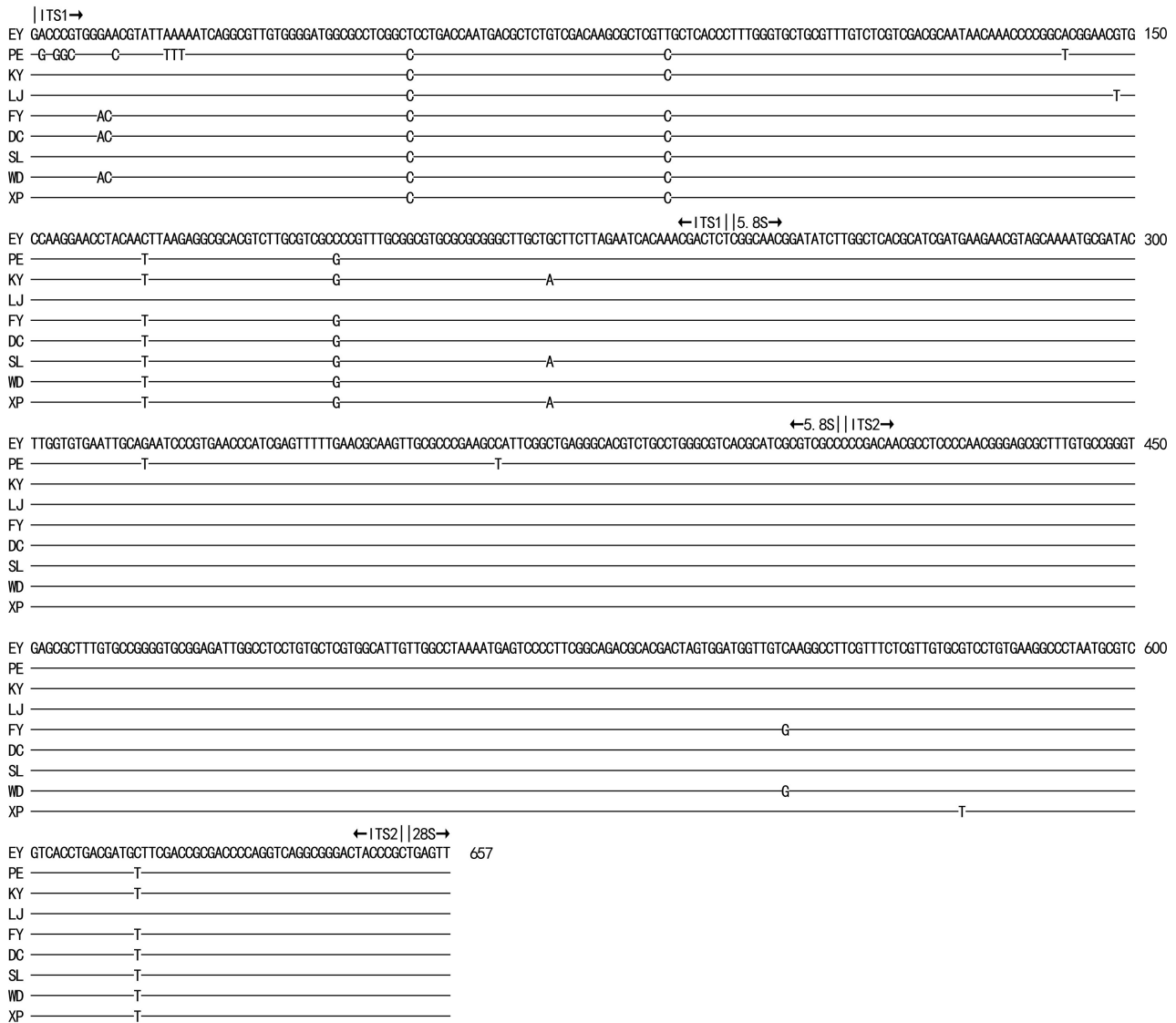


图 1 钩苞大丁草 9 个居群的 ITS 序列排列

Fig. 1 ITS sequences of nine *G. delavayi* samples

(LJ)和洱源(EY)居群聚为第Ⅱ支;滇中地区的武定(WD)、富源(FY)、德昌(DC)、石林(SL)、新平(XP)和开远(KY)六个居群聚为第Ⅲ支。NJ系统树的结果与遗传距离分析所得的结果一致,表明钩苞大丁草 rDNA ITS 序列的差异与其地理分布相关性较高,表现出一定的分子地域性差异。

3 讨论与结论

3.1 ITS 序列对不同居群钩苞大丁草的鉴别

rDNA 在不同物种间的变化丰富,由于核苷酸

序列的变化很大,可提供详尽的遗传信息(Schmidt, 2000),相对于 mtDNA(线粒体 DNA),rDNA 可以直接与通用引物进行扩增与测序(Baraket et al, 2009),因此,非常适合种以上级别的系统发育和分类研究。本文中钩苞大丁草变异位点较多(ITS1 变异位点 17 个,5.8S 变异位点 2 个,ITS2 变异位点 3 个),并且变异类型丰富包括 A-T、A-C、A-G、T-C、C-T、G-A、G-T、C-G 碱基颠换与替换等,且大部分碱基变异可作为识别特征。如普洱居群(PE)有 15 个变异位点,其中 11 个可作为识别特征,5.8S 保守区域有 2 个变异位点,说明普洱居群与其他居群存在差

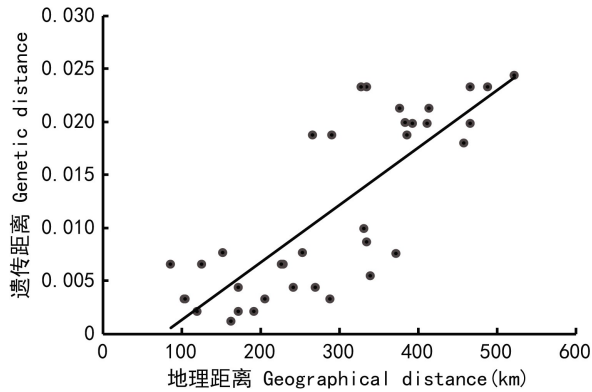


图 2 钩苞大丁草 9 个居群地理距离和遗传距离间的相关分析

Fig. 2 Correlation analysis of geographic distance and genetic distance of nine populations of *G. delavayi*

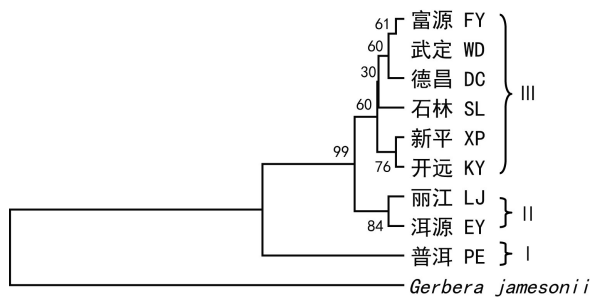


图 3 钩苞大丁草 9 个居群间 ITS 序列的系统发生树
Fig. 3 Tree of nine provenances of *G. delavayi* rDNA ITS

异;丽江居群(LJ)和新平居群(XP)分别在 148 位和 558 位有变异位点,也可作为它们的识别特征。可见,rDNA ITS 序列分析对于不同居群钩苞大丁草的鉴定具有一定的指导意义,可用于其鉴定研究。

3.2 钩苞大丁草群体结构形成的原因分析

通过 NJ 系统发育树分析发现,9 个居群钩苞大丁草被大体聚为 3 类,又通过地理距离与遗传距离分析,可以看出两者存在正相关关系,这一结论与该种的地理分布情况 (Fan et al, 2013) (张一平等, 2001) 和气候变化情况 (陈飞, 2012) 以及温度 (廖菊够等, 2013) 有着密不可分关系。本研究中,普洱居群地处亚热带季风气候区,夏季温度高,雨水多、冬季气温低,雨水少;同时,红河、哀牢山在普洱和其它居群间形成了地理阻隔 (Yuan & Zhang, 2008), 这些原因使普洱居群单独聚为一支。丽江居群和洱源

居群则处于我国西南地区的横断山脉,海拔在 2 500 m 以上,气温较低,形成了第 II 大分支。滇中地区的富源、武定、开远、石林、新平等居群和金沙江流域的德昌居群,地处亚热带大陆气候,温度常年保持在 20 ℃ 左右,温度适宜,可能有相似的昆虫进行传粉,形成了第 III 大分支。综上,钩苞大丁草的群体遗传结构形成与地理、气候条件密切相关。

3.3 野生钩苞大丁草的保护性开发策略探讨

由于钩苞大丁草野生资源逐年减少,所以对钩苞大丁草的保护性开发尤为重要。首先,对于生态环境较为稳定的居群可以进行原地保护,如丽江居群位于丽江古镇区普济寺后山,生态环境破坏较小,可以就地保护。其次,对于携带特异基因资源而居群环境受到破坏的居群 (Gao et al, 2007), 可以采取迁地保护的措施。例如普洱居群有多个 ITS 序列变异位点,可能携带一些特异基因,但其生长环境受到了一定的破坏,只有对其采取迁地保护,才能更加有效的保护这些特异的种质资源。最后,构建资源圃是资源开发利用的前提 (施朝阳等, 2013)。

本研究对钩苞大丁草进行了较为全面的调查与收集,并在昆明市构建了资源圃。在今后的工作中,一方面,可直接从资源圃中筛选优异的纤维资源、切花资源等,促进钩苞大丁草的开发利用;另一方面,可使资源圃中不同居群的钩苞大丁草通过自然交配的方式实现基因的融合,提升后代群体的遗传多样性,进而筛选更加优异的资源。

参考文献:

- BARAKET G, SADDOUD O, CHATTI K, et al, 2009. Sequence analysis of the internal transcribed spacers (ITSs) region of the nuclear ribosomal DNA (nrDNA) in fig cultivars (*Ficus carica*) [J]. *Sci Hortic*, 120(1): 34-40.
- CHENG YQ, 1996. *Flora of China* [M]. Beijing: Science Press: 89-90. [程用谦, 1996. *中国植物志* [M]. 北京: 科学出版社: 89-90.]
- CHEN F, 2012. Relationship between climate change and geographic distribution, community structure and evolution trend of *Pinus yunnanensis* [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry: 34-47. [陈飞, 2012. 气候变化与云南松分布、结构和演变趋势的研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院: 34-47.]
- DOYLE JJ, DOYLE JL, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem*, 19: 11-15.
- FAN DM, YUE PJ, NIE LZ, et al, 2013. Phylogeography of *Sophora davidii* (Leguminosae) across the Tanaka-Kaiyong Line, an important phylogeographic boundary in southwest China [J]. *Mol Ecol*, 22(16): 4270-4288.
- FAN XY, 2011. Systematics research of *Ainsliaea* DC [D]. Xinxiang: Henan Normal University: 17-25. [范香媛, 2011. 兔儿

- 凤属的系统学研究 [D]. 新乡:河南师范大学:17-25.]
- GAO LM, MOLLER M, Gibby M, et al, 2007. High variation and strong phylogeographic pattern among cpDNA haplotypes in *Taxus wallichiana* (Taxaceae) in China and north Vietnam [J]. *Mol Ecol*, 16(22):4684-4698.
- LIAO JG, KANG HM, DAI JR, et al, 2013. Effects of temperature on *Nicotiana stocktonii* during microsporogenesis [J]. *Guihaia*, 33(5):614-619. [廖菊够, 康洪梅, 代瑾然等, 2013. 温度对提托克通氏烟草雄配子体形成和发育的影响 [J]. *广西植物*, 33(5):614-619.]
- LI XC, LI Y, 2010. Minority groups fireweed textile in southwestern China [C]. *Soc Sci Yunnan*, (2):64-67. [李晓岑, 李云, 2010. 中国西南少数民族的火草布纺织 [C]. *云南社会科学*, (2):64-67.]
- LI XF, QIU TB, ZHANG HM, et al, 2012. Different species of dandelions' ITS sequences and relationship analysis [J]. *J Chin Med*, 27:84-86. [李喜凤, 邱天宝, 张红梅, 等, 2012. 不同种群蒲公英的 ITS 序列及其亲缘关系分析 [J]. *中医学报*, 27:84-86.]
- RODRIGUEZ TF, TARRIO R, AYALA FJ, 2000. Evidence for a high ancestral GC content in *Drosophila* [J]. *Mol Biol & Evol*, 17(11):1710-1717.
- SCHMIT GJ, SCHILLING EE, 2000. Phylogeny and biogeography of *Eupatium* (Asteraceae: Eupatorieae) based on nuclear ITS sequence data [J]. *Am J Bot*, 87:716-726
- SHI CY, CAI YL, LI XL, 2013. Research of garden plant community structure in Dongtan wetland park [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 29(13):214-220. [施朝阳, 蔡永立, 赵小雷, 2013. 崇明东滩湿地公园园林植物群落结构研究 [J]. *中国农学通报*, 29(13):214-220.]
- WANG J, YANG X, YANG ZL, 2013. nrDNA ITS sequences analysis and genetic relationship identification of *Magnolia officinalis* from different geographical regions [J]. *Guihaia*, 33(1):35-41. [王洁, 杨旭, 杨志玲, 2013. 不同产区厚朴 nrDNA ITS 序列分析及亲缘关系鉴定 [J]. *广西植物*, 33(1):35-41.]
- XU BY, 2014. The thin layer identification analysis of *Gerbera delabayi* [J]. *Yunnan J Trad Chin Med Mat Med*, 35(2):60-61. [徐冰钰, 2014. 钩苞大丁草薄层鉴别研究 [J]. *云南中医* 中药杂志, 35(2):60-61.]
- YAMAJI H, FUKUDA T, YOKOYAMA J, et al, 2007. Reticulate evolution and phylogeography in *Asarum* sect. *Asiasarum* (Aristolochiaceae) documented in internal transcribed spacer sequences (ITS) of nuclear ribosomal DNA [J]. *Mol Phylog Evol*, 44(2):863-884.
- YANG ZY, CHAO Z, HUO KK, et al, 2007. ITS sequence analysis used for molecular identification of the *Bup leurum* species from northwestern China [J]. *Phytomedicine*, 14(6):416-423.
- YAN HJ, FANG ZJ, YU SX, 2008. ITS sequences and phylogenetic relationships of *Fallopia multiflora* from different areas based on evidences [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 28(5):922-927. [严寒静, 房志坚, 余世孝, 2008. 不同种源何首乌的 ITS 序列分析及其亲缘关系研究 [J]. *西北植物学报*, 28(5):922-927.]
- YAO ZM, XU CY, LI L, 2015. rDNA ITS sequences and phylogenetic relationships of *Abies holophylla* from different provenances [J]. *J NE For Univ*, 43(10):6-9. [腰政懋, 徐程扬, 李乐, 2015. 不同种源辽东冷杉 rDNA ITS 序列及其亲缘关系 [J]. *东北林业大学学报*, 43(10):6-9.]
- YUAN QJ, ZHANG YZ, 2008. Chloroplast phylogeography of *Dipentodon* (Dipentodontace) in southwest China and northern [J]. *Mol Ecol*, 17(4):1054-1065.
- ZHANG YP, MA YX, LIU YH, et al, 2001. Characteristics of spatial distribution of microclimate in the gap of ever-green broad-leaved forest in the north of Ailao Mountain in Yunnan [J]. *J Beijing For Univ*, 23(4):80-83. [张一平, 马友鑫, 刘玉洪, 尹利伟, 2001. 哀牢山北部常绿阔叶林林窗小气候空间分布特征 [J]. *北京林业大学学报*, 23(4):80-83.]
- ZHAO HN, WANG XQ, CHEN JY, 2003. The origin of garden ghyrsanthemums and molecular phylogeny of *Dendranthema* in China based on nucleotide sequences of nrDNA ITS, *trnT-trnL* and *trnT-trnF* intergenic spacer regions in cpDNA [J]. *Mol Plant Breed*, 1(5/6):597-604. [赵惠恩, 汪小全, 陈俊愉, 2003. 基于核糖体 DNA 的 ITS 序列和叶绿体 *trnT-trnL* 和 *trnT-trnF* 基因间的菊花起源与中国菊属植物分析系统学研究 [J]. *分子植物育种*, 1(5/6):597-604.]

(上接第 364 页 Continue from page 364)

- YANG GP, HUANG JP, XIE YN, et al, 2013. Flora and ecological habits of wild vines in the Ailao Mountains [J]. *J NE For Univ*, 8(3):79-83. [杨国平, 黄建平, 谢有能, 等, 2013. 哀牢山野生藤本植物区系与生态习性分析 [J]. *西北林学院学报*, 8(3):79-83.]
- YAO C, WAN SW, SUN DL, et al, 2009. Ecological mechanisms of vegetation succession of coastal wetland in Yancheng Nature Reserve [J]. *Acta Ecol Sin*, 29(5):2203-2210. [姚成, 万树文, 孙东林, 等, 2009. 盐城自然保护区海滨湿地植被演替的生态机制 [J]. *生态学报*, 29(5):2203-2210.]
- YAO R, FANG Y, 2012. A preliminary study on the secondary broad-leaved forest in Nanjing Xianlin [J]. *J Anhui Agric Univ*, 39(1):72-78. [姚榕, 方彦, 2012. 南京仙林地区次生阔叶林群落的初步研究 [J]. *安徽农业大学学报*, 39(1):72-78.]
- YUAN LJ, LI CQ, CUI B, ER AL, 2007. Flora analysis of wild liane in Henan [J]. *Henan Sci*, 25(6):918-921. [袁丽洁, 李春奇, 崔波, 等, 2007. 河南省野生藤本植物区系分析 [J]. 25(6):918-921.]
- ZHANG ZY, ZHOU FX, XU GF, 2009. Application of linan in ecological restoration of side slope [J]. *Res Soil Water Cons*, 16(3):291-293. [张朝阳, 周凤霞, 许桂芳, 2009. 藤本植物在边坡生态恢复中的应用 [J]. *水土保持研究*, 16(3):291-293.]
- ZHANG YW, YANG HP, 2001. The studies on flora and ecological restures of liana in Fanjing Mountain National Nature Reserve, Guizhou, China-attach a list of liana in the Fanjing Mountain [J]. *J Wuhan Bot Res*, 19(4):269-298. [张玉武, 杨红萍, 2001. 贵州梵净山自然保护区藤本植物攀援方式及类型的研究—附梵净山藤本植物名录 [J]. *武汉植物学研究*, 19(4):269-298.]