

基于叶绿体四个 DNA 片段联合分析探讨山茶属 长柄山茶组、金花茶组和超长柄茶组的 系统位置与亲缘关系*

方伟, 杨俊波, 杨世雄, 李德铎**

(中国科学院昆明植物研究所生物多样性与生物地理学重点实验室, 云南昆明 650204)

摘要: 为探讨山茶属茶亚属 (*Camellia* subgen. *Thea*) 中长柄山茶组 (sect. *Longipedicellata*)、金花茶组 (sect. *Chrysantha*) 和超长柄茶组 (sect. *Longissima*) 的系统位置和亲缘关系, 本研究选取了该属 4 个亚属 11 组 28 个种及 2 个外类群的材料, 对这些材料的叶绿体 4 个 DNA 片段 (*rpl* 16、*psbA-trnH*、*trnL-F* 和 *rpl* 32-*trnL*) 进行了测序, 运用邻接法 (neighbor-joining)、最大简约法 (maximum-parsimony) 和贝叶斯推断 (Bayesian inference) 对获得的序列进行了联合矩阵分析, 并构建基因树。基因树的拓扑结构显示: 1) 金花茶组包括 3 个平行的支系, 并且长柄山茶组的模式种长柄山茶 (*Camellia longipedicellata*) 嵌于其中一个支系, 因而金花茶组可能是一个并系或多系类群; 2) 长柄山茶与越南分布的金花茶组种类在分子系统树上构成一个单系支, 暗示了长柄山茶组和金花茶组之间可能具有紧密的亲缘关系; 3) 超长柄茶组不是一个单系类群, 该组的河口超长柄茶 (*C. hekouensis*) 位于系统树的基部, 与山茶属其余种构成姐妹群。由于缺乏更广泛取样的分析, 超长柄茶在山茶属中的系统位置仍然不明确, 超长柄茶组与长柄山茶组的亲缘关系问题也没有得到解决。

关键词: 山茶属; 长柄山茶组; 金花茶组; 超长柄茶组; 系统学关系; 叶绿体 DNA 序列

中图分类号: Q 949, Q 75

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700(2010) 01-001-13

Phylogeny of *Camellia* sects. *Longipedicellata*, *Chrysantha* and *Longissima* (Theaceae) Based on Sequence Data of Four Chloroplast DNA Loci

FANG Wei, YANG Jun-Bo, YANG Shi-Xiong, LI De-Zhu**

(Key Laboratory of Biodiversity and Biogeography, Kunming Institute of Botany,
Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: We focused on the systematic positions and relationships of three sections of *Camellia* subgen. *Thea* of Theaceae, i. e., sect. *Longipedicellata*, sect. *Chrysantha* (golden camellias) and sect. *Longissima* by using four chloroplast DNA regions (*rpl* 16, *psbA-trnH*, *trnL-F* & *rpl* 32-*trnL*). We sampled 28 species representing four subgenus, 11 sections in *Camellia* and two outgroups. Combined analyses of chloroplast DNA sequence data sets are performed with the neighbor-joining, maximum-parsimony and Bayesian inference methods, and the gene trees are constructed. The topologies of gene trees revealed that: 1) sect. *Chrysantha* is paraphyletic or polyphyletic, containing three parallel lineages and *Camellia longipedicellata* (type of sect. *Longipedicellata*) nested inside; 2) all four species from Vietnam, together with *C. longipedi-*

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (编号: 30870169)

** Author for correspondence; E-mail: dzl@mail.kib.ac.cn

收稿日期: 2009-06-16, 2009-12-23 接受发表

作者简介: 方伟 (1981-) 男, 硕士, 主要从事植物系统发育与分子进化研究。

cellata, forming a well-supported monophyletic clade, which implies the close relationship between sect. *Longipedicellata* and sect. *Chrysantha*; and 3) sect. *Longissima* is not monophyletic because *C. hekouensis* is the sister to the rest of *Camellia* species. The systematic position of *C. longissima* and the relationship between sect. *Longissima* and sect. *Longipedicellata* are unsolved.

Key words: *Camellia*; sect. *Longipedicellata*; sect. *Chrysantha*; sect. *Longissima*; Phylogenetic relationships; Chloroplast DNA sequences

张宏达于 1979 年建立金花茶组 *Camellia* sect. *Chrysantha* H. T. Chang, 后于 1981 年建立长柄山茶组 *C. sect. Longipedicellata* H. T. Chang 和超长柄茶组 *C. sect. Longissima* H. T. Chang; 3 个组均隶属于山茶属茶亚属 *Camellia* subgen. *Thea* H. T. Chang (张宏达, 1979, 1981)。长柄山茶组和超长柄茶组的种类较少, 分别只包括 2 个种和 3 个种; 而金花茶组种类较多, 共有 18 个种 (张宏达, 1996; 张宏达和任善湘, 1998)。3 个组的地理分布基本一致, 绝大多数种类集中分布于越南北部, 以及我国的广西、贵州西南部和云南东南部的低海拔地区。

Sealy 系统 (Sealy, 1958)、张宏达系统 (张宏达, 1981, 1996; 张宏达和任善湘, 1998; Chang and Bartholomew, 1984) 和闵天禄系统 (闵天禄和张文驹, 1996; 闵天禄, 1999, 2000; Ming and Bartholomew, 2007) 是目前 3 个主要的山茶属形态分类系统 (表 1)。这三个分类系统对于长柄山茶组、金花茶组和超长柄茶组的处置意见并不一致。Sealy (1958) 系统并未设立这 3 个组, 黄花茶 *Camellia flava* (Pitard) Sealy、显脉金花茶 *C. euphlebica* Merr. ex Sealy 隶属于古茶组 sect. *Archecamellia* Sealy, 中越山茶 *C. indochinensis* Merr. 隶属于连蕊茶组 *C. sect. Theopsis* Cohen Stuart。张宏达 (1981) 将 *C. flava* 和 *C. euphlebica* 移入金花茶组, 将 *C. indochinensis* 移入长柄山茶组; 在其系统中, 长柄山茶组与金花茶组的亲缘关系最为密切, 而超长柄茶组则与茶组 *C. sect. Thea* (L.) Dyer 系统关系接近 (张宏达, 1981; 叶创兴和许兆然, 1992; 叶创兴, 1993; 叶创兴和张宏达, 1997)。闵天禄和张文驹 (1993) 认为金花茶组应并入古茶组, 这与 Sealy (1958) 的处理相符合, 但在 *C. indochinensis* 的系统位置问题上, 作者则认为该种应归入古茶组。此外, 闵天禄 (1999,

2000) 主张将超长柄茶组并入长柄山茶组, 并认为长柄山茶组与茶组亲缘很近, 两者虽与古茶组 (包含金花茶组) 均有联系, 但古茶组可能较为原始。

由于对山茶属系统演化规律的认识差异, 不同学者对于属下类群的分类学处理一直存在较大的争议。尽管在山茶属内一些亚属或组被先后建立 (Sealy, 1958; 张宏达, 1979, 1981, 1982, 1996; 闵天禄, 1994, 1999, 2000), 甚至一些类群被提升至属级 (Hallier, 1921; Nakai, 1940; 胡先骕, 1956, 1957 a, b; Hu, 1956), 但这些分类学处理往往难以得到其它学者的一致认可。学者之间意见的分歧, 甚至冲突, 在一定程度上也造成了该属分类系统的混乱。本研究所涉及到的 3 个组, 长柄山茶组、金花茶组和超长柄茶组, 它们的系统位置及亲缘关系问题即是其中的一个分歧焦点。

目前利用 DNA 测序以及分子标记等分子生物学手段进行植物分子系统学研究已经十分普遍。分子数据是独立于形态学性状的数据, 易于获取和分析, 且排除了人为主观的因素, 能有效的弥补形态分类学研究的不足。在山茶属的分子系统学研究方面, Xiao and Parks (2002) 最先运用核基因 RPB 2 (Nuclear RNA polymerase II, RNA 合成酶 II 基因) 对山茶属展开了较为全面的分子系统分析。属下的分子系统学研究也有所开展, 但研究主要关注于有重要经济价值的类群, 如茶组 (陈亮等, 2002; 陈亮, 2002; 李渊博, 2007), 红山茶组 (邓白罗等, 2006; 倪穗, 2007; 田敏等, 2008), 金花茶组 (唐绍清等, 1998; 施苏华等, 1998; 唐绍清等, 2004a, b; 谭晓风等, 2005; 方伟, 2008) 等, 其余组的相关研究则十分欠缺。

目前山茶属仍然缺乏一个较为坚实的分子系统框架, 主要原因可能在于山茶属种类繁多, 且

表1 山茶属三个主要分类系统

Table 1 Three main classifications of the genus *Camellia*

J. R. Sealy (1958) 系统	张宏达 (1981, 1996, 张宏达和任善湘, 1998) 系统	闵天禄 (1999, 2000) 系统
J. R. Sealy (1958)	H. T. Chang (1981, 1996, H. T. Chang and S. X. Ren, 1998)	T. L. Ming (1999, 2000)
01. sect. <i>Archecamellia</i> Sealy	I. Subgen. Protocamellia	III. Subgen. Thea
02. sect. <i>Stereocarpus</i> (Pierre) Sealy	01. sect. <i>Archecamellia</i> Sealy	13. sect. <i>Corallina</i> Sealy
03. sect. <i>Theopsis</i> Cohen Stuart	02. sect. <i>Stereocarpus</i> (Pierre) Sealy	14. sect. <i>Brachyandra</i> Chang
04. sect. <i>Camelliopsis</i> (Pierre) Sealy	03. sect. <i>Protocamellia</i> Chang	15. sect. <i>Longipedicellata</i> Chang
05. sect. <i>Piquetia</i> (Pierre) Sealy	04. sect. <i>Pleurocarpus</i> Chang	16. sect. <i>Chrysantha</i> Chang
06. sect. <i>Thea</i> (L.) Dyer	05. sect. <i>Piquetia</i> (Pierre) Sealy	17. sect. <i>Calpandria</i> (Bl.) Cohen Stuart
07. sect. <i>Corallina</i> Sealy	II. Subgen. Camellia	18. sect. <i>Thea</i> (L.) Dyer
08. sect. <i>Calpandria</i> (Bl.) Cohen Stuart	06. sect. <i>Oleifera</i> Chang	19. sect. <i>Longissima</i> Chang
09. sect. <i>Pseudocamellia</i> Sealy	07. sect. <i>Furfuracea</i> Chang	20. sect. <i>Glaberrima</i> Chang
10. sect. <i>Heterogenea</i> Sealy	08. sect. <i>Paracamellia</i> Sealy	IV. Subgen. Metacamellia
11. sect. <i>Camellia</i> (L.) Dyer	09. sect. <i>Pseudocamellia</i> Sealy	21. sect. <i>Theopsis</i> Cohen Stuart
12. sect. <i>Paracamellia</i> Sealy	10. sect. <i>Tuberculata</i> Chang	22. sect. <i>Camelliopsis</i> (Pierre) Sealy
	11. sect. <i>Luteoflora</i> Chang	
	12. sect. <i>Camellia</i> (L.) Dyer	
		I. Subgen. Thea
		01. sect. <i>Piquetia</i> (Pierre) Sealy
		02. sect. <i>Archecamellia</i> Sealy
		03. sect. <i>Cylindrica</i> Ming
		04. sect. <i>Thea</i> (L.) Dyer
		05. sect. <i>Longipedicellata</i> Chang
		06. sect. <i>Corallina</i> Sealy
		07. sect. <i>Theopsis</i> Cohen Stuart
		08. sect. <i>Camelliopsis</i> (Pierre) Sealy
		II. Subgen. Camellia
		09. sect. <i>Heterogenea</i> Sealy
		10. sect. <i>Stereocarpus</i> (Pierre) Sealy
		11. sect. <i>Tuberculata</i> Chang
		12. sect. <i>Camellia</i> (L.) Dyer
		13. sect. <i>Paracamellia</i> Sealy
		14. sect. <i>Calpandria</i> (Bl.) Cohen Stuart

系统演化关系复杂。但在另一方面，缺乏合适的 DNA 片段用于分析也在很大程度上影响了对该属的分子系统学研究。

核基因组庞大而复杂，拥有许多具有丰富变异的 DNA 片段（如某些基因的内含子区），在低阶元类群的分子系统学研究中应用广泛。但在山茶属的研究中，核基因的应用需要十分谨慎。山茶属不仅是一个杂交频繁的类群，染色体多倍化现象也十分普遍（Kondo, 1977a, b, c, 1978; Parks, 1990）；在应用核基因进行该属的系统分析时，由于核基因双亲遗传的特性，种间的杂交和多倍化很容易造成对系统发育关系的误读。

rDNA ITS（核糖体转录间隔区）无疑是植物分子系统研究中最普遍使用的核基因。然而，ITS 在山茶属中直接测序较为困难，这可能与该属 ITS 区序列 GC 含量较高（唐绍清等, 2004a），种类的杂交和多倍化现象，以及 ITS 一致性进化是否完全等因素有关（杨俊波等, 2006b）。这些因素在一定程度上限制了 ITS 在山茶属中的应用。

低拷贝核基因（Low-Copy Nuclear Gene）在系统学中的应用正变得越来越普遍（Sang, 2002; Small 等, 2004; Hughes 等, 2006）。但由

于存在选择性的基因沉默或丢失而产生基因复制（Wendel and Doyle, 1998），核基因通常不止一个拷贝，而适于分子系统学研究的单拷贝核基因往往又难于获得。在研究过程中，确定所使用核基因的拷贝数量，来源及性质，对于进一步的系统分析至关重要。不同拷贝的序列可能来自于直系同源基因（orthologous gene），或是旁系同源基因（paralogous gene），但仅直系同源基因具有系统学价值（Sonnhammer and Koonin, 2002; Walter, 2007）。在山茶属内，由于种间的杂交和染色体的多倍化所导致的复杂的基因进化背景也将增加系统分析的难度。目前已报道应用于山茶属的低拷贝核基因仅有两个：*RPB 2* 和 *GBSSI*（即 *waxy*）基因。Xiao and Parks (2002) 应用 *RPB 2* 基因进行了山茶属的分子系统研究，但对于 *RPB 2* 基因在山茶属内的遗传性质并没有论述，同时由于受到基因树的分辨率和分支支持率方面的限制，该研究对山茶属系统发育的解读能力有限。*GBSSI* 基因在植物系统研究中的应用较为广泛（Mason-Gamer 等, 1998; Evans 等, 2000; Mason-Gamer, 2001; Peralta and Spooner, 2001; Evans and Campbell, 2002; Smedmark 等, 2003; Winkworth and Dono-

ghue, 2004; Guo and Li, 2004; Yang 等, 2008)。在山茶属内, *GBSSI* 基因是单拷贝基因, 并且具有较高的序列变异率, 因而有重要的应用价值 (杨俊波等, 2006b)。目前有关 *GBSSI* 基因在山茶属的应用研究, 我们正在开展之中。

植物叶绿体基因组 (cp DNA) 为单亲遗传, 其 DNA 片段容易扩增和测序, 因而被广泛的应用于分子系统学研究。但叶绿体基因组序列相对保守, 进化速率较慢, 在属下类群的系统学研究中应用有限。尽管如此, 对于象山茶属这样, 系统发育关系复杂、核基因的应用有难度的一些类群, 进行叶绿体 DNA 片段有效筛选, 适当增加用于研究分析的叶绿体 DNA 片段数目, 仍然不失为一个直接可行的方法。基于上述原因, 本研究筛选了 4 个进化速率较快的叶绿体片段 (*rpl 16* 内含子、*psbA-trnH* 基因间区、*trnL-F* 基因间区和 *rpl 32-trnL* 基因间区) 用于山茶属分子系统树的构建, 据此探讨该属的 3 个近缘类群, 长柄山茶组、金花茶组和超长柄茶组的系统位置、分类学范围以及相互间的亲缘关系等系统学问题。

1 材料与方 法

1.1 材 料

本研究主要依据张宏达和任善湘 (1998) 的山茶属系统进行取样, 共选取山茶属 28 个种作为内类群; 它们分别来自于山茶属的 4 个亚属 11 个组。长柄山茶组拥有 2 个种: *C. indochinensis* 和 *C. longipedicellata* (Hu) H. T. Chang et D. Fang, 本研究只具有该组模式种 *C. longipedicellata* 的取样。金花茶组的取样来自五室系 *ser. Flavae* (*C. flava*) 和金花茶系 *ser. Chrysanthae*, 共 13 个种; 其中 9 种产自我国广西, 另 4 种则分布于越南, *C. nitidissima* 是该组的模式种。茶组的取样分别为 *C. sinensis* (L.) O. Ktze. (茶系 *ser. Sinenses*), *C. kwangsiensis* H. T. Chang (五室茶系 *ser. Quinquelocularis*) 和 *C. gymnogyna* H. T. Chang (秃房茶系 *ser. Gymnogynae*) 3 个种, *C. sinensis* 是该组的模式种。在超长柄茶组的 3 个种中, 取样包括 *C. longissima* H. T. Chang et S. Y. Liang (本组模式种) 和 *C. hekouensis* C. J. Wang et G. S. Fan 两种。本研究所涉及的另外 7 个组, 每组分别有 1~2 种的取样 (表 2)。依据近年来山茶科系统学的研究成果 (杨世雄和闵天禄, 1995; Prince and Parks, 2001; 杨俊波等, 2006a), 核果茶属 *Pyrenaria* Bl. 和石笔木属 *Tutcheria* Dunn 在演化上与山茶属具有较近的亲缘关系, 因而选

取长核果茶 *Pyrenaria oblongicarpa* H. T. Chang 和石笔木 *Tutcheria spectabilis* Dunn 做为本研究的外类群。

实验用分子样品为新鲜或经硅胶快速干燥的叶片, 大多采自于各植物园及科研单位的栽培植株。本研究对上述 30 种植物的分子样品进行了叶绿体四个 DNA 片段 (*rpl 16*、*psbA-trnH*、*trnL-F* 和 *rpl 32-trnL*) 的序列测定。所有凭证标本均存放于中国科学院昆明植物研究所标本馆 (KUN), 材料来源、凭证标本号及 GeneBank 登录号见表 2。

1.2 实验方法

总 DNA 提取采用改良的 CTAB 法 (Doyle and Doyle, 1987)。PCR 扩增反应在 PERKIN ELMER (PE) 9600 或 9700 型 PCR 仪上进行。*rpl 16* (Jordan 等, 1996), *psbA-trnH* (Sang 等, 1997; Tate and Simpson, 2003), *trnL-F* (Taberlet 等, 1991) 和 *rpl 32-trnL* (Shaw 等, 2007) 4 个 DNA 片段扩增反应程序均采用: 97°C 预变性 4 min, 94°C 变性 1 min, 52°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min。32 个循环后, 72°C 延伸 10 min, 根据具体情况而略有变动。扩增反应采用 25 μ l 的反应体系, 包括 10 \times buffer, 0.2 U 的 Taq 聚合酶, 2.5 mmol \cdot L⁻¹ 的 MgCl₂, 250 μ M 的 dNTPs, 正反向引物浓度各为 0.2 μ mol \cdot L⁻¹, 以及约 50 ng 的模板 DNA。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测合格后, 用美国华舜公司的纯化试剂盒纯化以备测序反应之用。

扩增引物同时作为测序引物, 利用正反向引物分别对两条链测序, 反应依据双脱氧链终止法 (Sanger 等, 1977)。测序反应在 PE9600 或 PE9700 PCR 仪上进行, 采用 5 μ l 的反应体系, 包括: 1 μ l 的测序 mix (PE 公司的 Bigdye v3.1 测序试剂盒), 0.5 μ l 的测序引物, 1 μ l 的 PCR 纯化产物和 2.5 μ l 的双蒸水。反应程序为: 95°C 预变性 4 min; 96°C 变性 10 s, 50°C 退火 5 s, 60°C 延伸 4 min, 共 33 个循环。反应产物经 95% 乙醇+乙酸钠沉淀, 之后用 70% 乙醇、无水乙醇洗涤, 干燥后加入 20 μ l 的双蒸水充分溶解, 经 95°C 变性 4 min 后上样, 在 ABI3700 型自动测序仪上进行检测。

序列编辑和拼接应用 Lasergene v7.1 软件中的 SeqMan (DNASTAR Inc., Madison, Wisconsin, USA; Burland, 2000) 完成。叶绿体 4 个 DNA 序列数据进行单独及联合序列矩阵构建; 利用 Clustal X 1.83 (Thompson 等, 1997) 对矩阵进行自动排序, 并进行必要的人工排序调整。应用 Modeltest3.7 (Posada and Crandall, 1998) 对序列矩阵进行模型选择, 获得最适核苷酸替代模型为 TVM+I 和相关参数估值。对序列进行联合分析, 分别采用邻接法 (neighbor-joining, NJ)、最大简约法 (maximum parsimony, MP) 以及贝叶斯推断 (Bayesian inference, BI) 构建相应的基因树 (NJ 树、MP 树和 BI 树)。

邻接法分析在 MEGA 4.0 (Tamura 等, 2007) 软件上进行; 分析采用 Kimura 两参数模型 (Kimura, 1980), 空位 (Gap) 和缺失 (Missing data) 采用配对状态删除 (Pairwise Deletion)。最大简约分析在 PAUP * 4.0b10 (Swofford, 2002) 中运行, 联合矩阵中的空位作为缺失处理, 并对空位进行“01”编码 (Simmons and Ochoterena, 2000), 然后加入序列矩阵参与分析; 所有性状状态做等权无序处理。采用启发式搜索 (Heuristic search) 1000 次抽样, TBR 枝长交换, 每步保留 10 棵树, 获取严格一致树。邻接法和最大简约法均采用自展分析 (Bootstrap analysis), 1000 次抽样, 根据抽样自展值 (Bootstrap value, BS) 评估分支的可靠性。应用 Mr-Bayes 3.1 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) 软件进行贝叶斯分析; 分析采用马尔可夫链的蒙特卡罗模拟算法 (Markov Chain Monte Carlo process, MCMC), 并根据 Modeltest 3.7 的模型选择结果进行相关参数的设置; 以随机树作为起始树, 共运行 1000 000 代, 每 100 代进行 1 次抽样。摒弃前 1000 次老化样本 (burn-in samples), 用剩余样本构建一致树并计算各分支的后验概率 (Posterior probability value, PP)。

2 结果

本研究获得山茶属及其外类群 30 份样品的叶绿体 4 个 DNA 片段 (*rpl 16*、*psbA-trnH*、*trnL-F* 和 *rpl 32-trnL*) 共 120 条序列的数据, 并对这些序列的单独及联合矩阵进行了相关的数据信息统计, 统计分析的结果见表 3。

运用贝叶斯推断、最大简约法和邻接法进行系统树的构建 (图 1, 2)。对系统树的拓扑结构进行分析, 结果表明:

1) 整个山茶属构成一个单系, 其中 *C. hekouensis* 与山茶属其余种 (Clade A) 构成

姐妹群。Clade A 在相应 BI 树的后验概率值 (PP)、MP 树和 NJ 树的自展值 (MP-BS/NJ-BS) 分别为 1.00, 73 和 79。

2) 在 Clade A 内, BI 树、MP 树和 NJ 树均形成 3 个基本一致的分支: Clade I, II, III (图 1, 2)。Clade I 和 Clade II 均由国产金花茶种类组成; Clade III 不仅包含越南分布的金花茶种类, 同时 *C. longipedicellata* 也嵌入其中。3 个分支均得到较好的支持, Clade I, II, III 相应的后验概率值 (PP) 和抽样自展值 (MP-BS/NJ-BS) 分别为 1.00/85/88, 1.00/98/97 和 1.00/75/-。这 3 个分支互为平行支, 之间的系统关系仍不明确。

Clade I: *C. flavida*、*C. chrysanthoides* 和 *C. micrantha* 3 个种又构成一个较弱支持 (PP = 1.00, MP-BS = 64, NJ-BS = 62) 的分支, 而 *C. pubipetala*、*C. impressinervis*、*C. limonia* 和 *C. parvipetala* 4 个种各为单支, 未形成进一步分支。

Clade II: 由 *C. nitidissima*、*C. euphlebia* 和 *C. tunghinensis* 3 个种组成。

Clade III: 包括 *C. crassiphylla*、*C. tamdaoensis*、*C. murauchii*、*C. flava* 以及 *C. longipedicellata* 5 个种。Clade III 的分支关系在 BI 树、MP 树和 NJ 树中表现出一定的差异。在 BI 树中, 5 个种各为互相平行的单支。在 MP 树中, *C. crassiphylla* 与 *C. murauchii* 在 Clade III 内部形成一个弱的分支 (MP-BS = 57), 其它 3 个种仍然各为单支。在 NJ 树中, Clade III 并未得到支持, 而是 *C. tamdaoensis*、*C. murauchii*、*C. flava* 以及 *C. longipedicellata* 这 4 个种组成的分支, 得到

表3 叶绿体四个片段 (*rpl 16*, *psb A-trn H*, *trn L-F* & *rpl 32-trn L*) 单独及联合矩阵的统计数据

Table 3 Statistical data of separate and combined datasets of four plastid regions (*rpl 16*, *psb A-trn H*, *trn L-F* & *rpl 32-trn L*)

DNA 片段 DNA Region	排列长度 Aligned length	简约位点数目 (所占比例) Parsimony-informative sites (percentage of aligned length)		变异位点数目 (所占比例) Variable sites (percentage of aligned length)		插入/缺失 Indels
		excl. gaps (%)		incl. gaps (%)		
		excl. gaps (%)	incl. gaps (%)	excl. gaps (%)	incl. gaps (%)	
<i>rpl 16</i>	919	16 (1.7)	28 (3.0)	36 (3.9)	53 (5.8)	8
<i>psb A-trn H</i>	478	13 (2.7)	22 (4.6)	21 (4.4)	43 (9.0)	6
<i>trn L-F</i>	898	2 (-)	8 (0.9)	15 (1.7)	38 (4.2)	8
<i>rpl 32-trn L</i>	1012	8 (0.8)	21 (2.1)	38 (3.8)	134 (13.2)	17
Combined	3307	39 (1.2)	79 (2.4)	110 (3.3)	268 (8.1)	39

“-” 指忽略不计

“-” indicating neglected

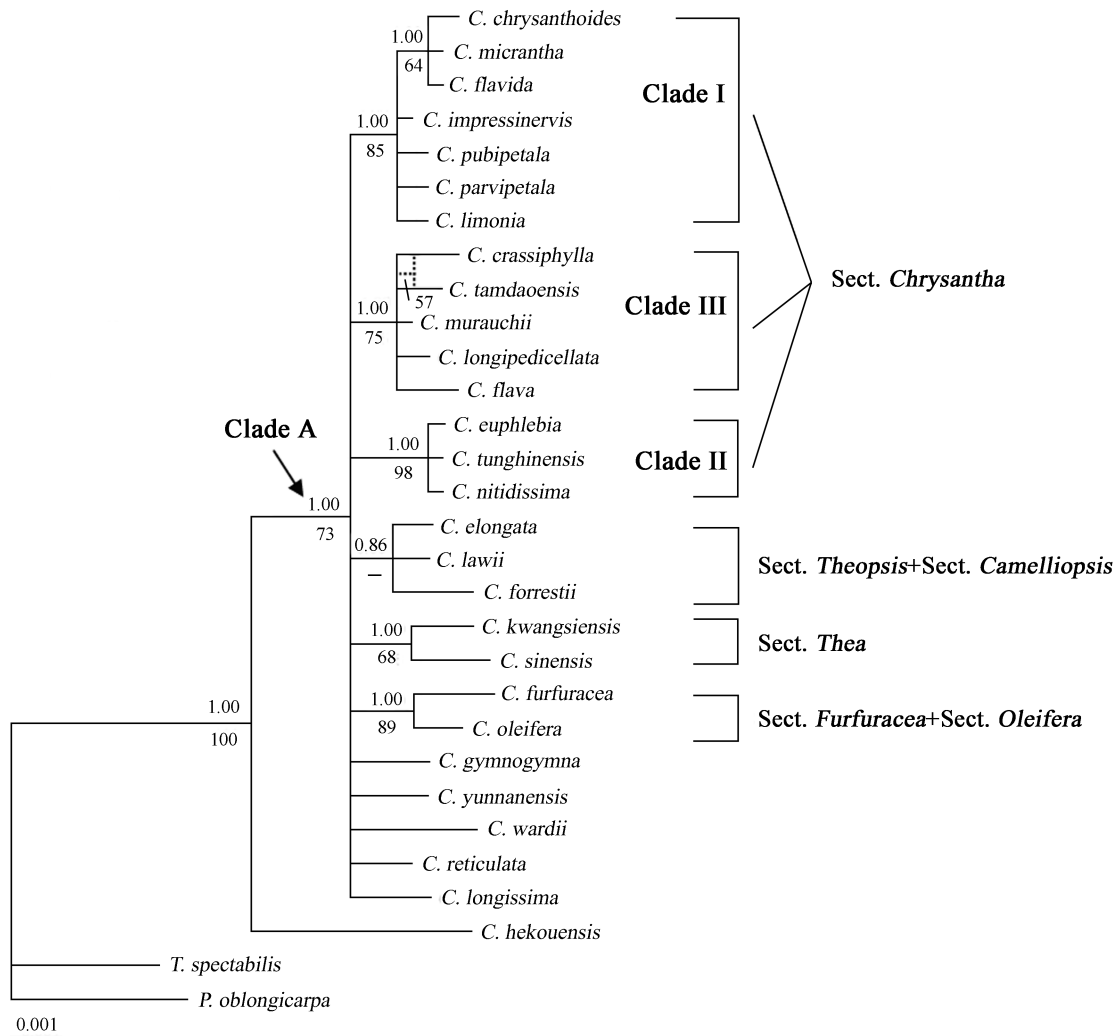


图 1 叶绿体联合分析获得的山茶属系统树

分支上的数字为贝叶斯推断（最适模型为 TVM+I）获得的后验概率值；分支下的数字为最大简约分析（树长 123 步，CI=0.911，RI=0.845，RC=0.769）获得的抽样自展值。BI 树和 MP 树的分支差异用虚线或分支下方的“—”来表示

Fig. 1 Phylogenetic tree based on combined datasets of cpDNA sequences for *Camellia*

Numbers above branches show posterior probabilities from the Bayesian inference under TVM+I model of DNA substitution evolution.

Numbers below branches are bootstrap values from the maximum-parsimony analysis (Tree Length=123, CI=0.911,

RI=0.845, RC=0.769). MP resolution incongruent with BI clades as indicated with broken lines or a hyphen (—) below branches

较好的支持 (NJ-BS=80)。在这 4 个种的分支内部，*C. longipedicellata* 与 *C. murauchii* 组成末端分支 (NJ-BS=84)，由内向外依次与 *C. tamdaoensis* (NJ-BS=76)、*C. flava* 构成姐妹群。

3) 在 Clade A 内，茶组的两个种 *C. sinensis* 和 *C. kwangsiensis* 构成一支，得到较好的支持 (PP=1.00, MP-BS=68, NJ-BS=89)；*C. gymnogymna* 的系统位置则不确定。*C. furfuracea*

(糙果茶组) 和 *C. oleifera* (油茶组) 形成一个得到良好支持 (PP=1.00, MP-BS=89, NJ-BS=81) 的分支；在 NJ 树中，该分支还与 *C. longissima* 形成姐妹群，但支持率很弱 (NJ-BS=54)。在 BI 树中，*C. elongata*、*C. forrestii* 和 *C. lawii* 构成分支，但其后验概率值 PP 仅为 0.86。*C. reticulata* (红山茶组)、*C. yunnanensis* (实果茶组) 和 *C. wardii* (离蕊茶组) 3 个种的系统位置不确定。

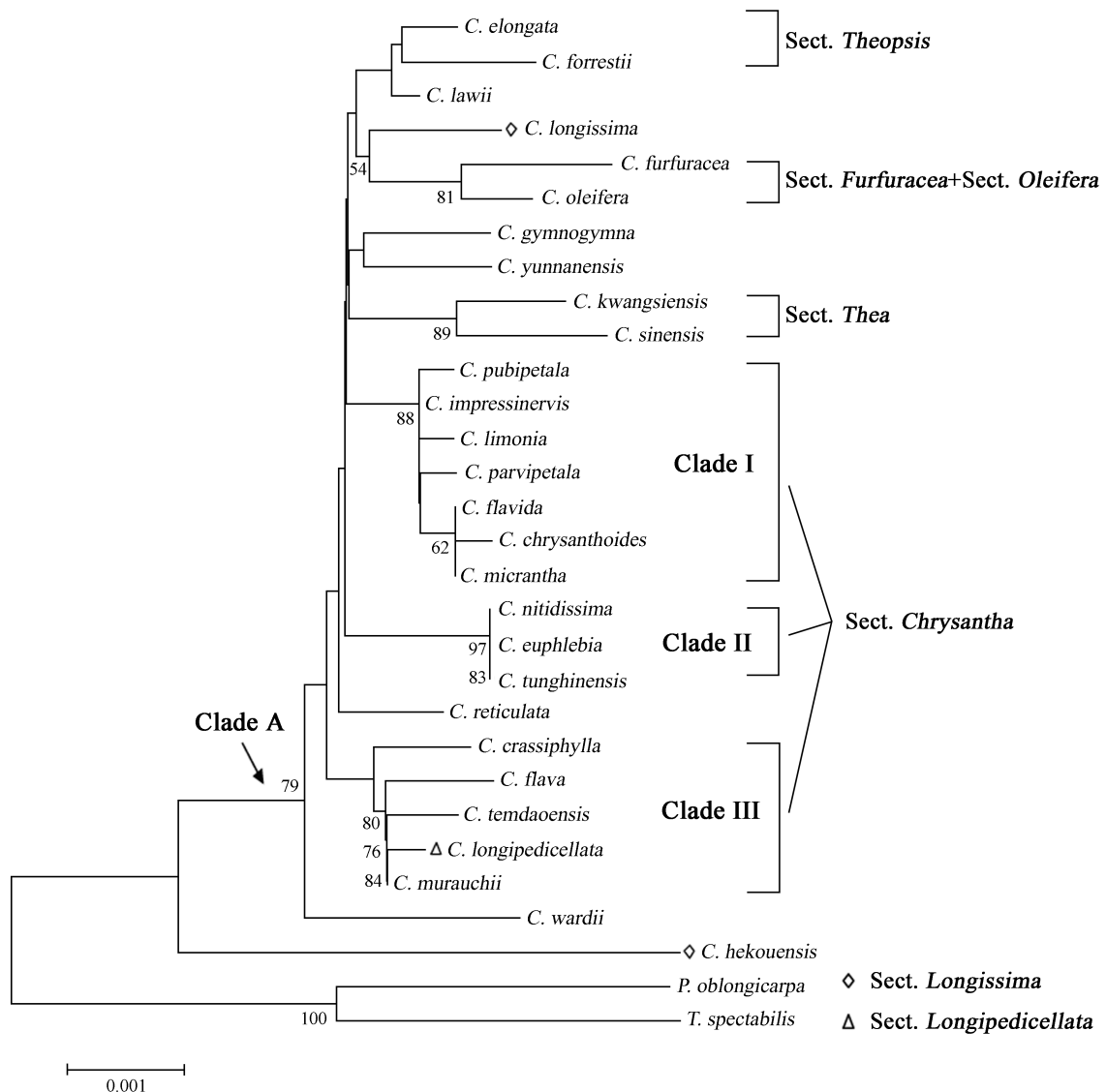


图 2 叶绿体联合分析获得的山茶属邻接树 (高于 50% 的自展值在分支上显示)

Fig. 2 Neighbor-joining tree based on combined datasets of cpDNA sequences for *Camellia*, showing bootstrap values over 50%

3 讨论

在本研究中, 尽管筛选出 4 个进化速率较快的叶绿体 DNA 片段进行联合分析, 但其总体的位点突变率为 3.3%, 简约信息位点所占比例仅为 1.2% (均不包括空位) (表 3), 信息量仍然十分有限。在系统树的拓扑结构 (图 1, 2) 上, 系统树出现大量多歧分支, 并且一些分支的支持率也不高, 难以清晰的反映山茶属的组间关系。不过通过对系统树的详细分析, 我们仍然可以得到一些较有价值的结论。

金花茶组在山茶属中的系统地位一直存在较

大的争议, 但观点的分歧主要集中在金花茶组是否应归并入古茶组的问题上 (张文驹, 1992; 闵天禄和张文驹, 1993; 张宏达和叶创兴, 1993; 叶创兴, 1993; 张宏达, 1996; 闵天禄, 2000)。在金花茶组内, 不同种间的形态特征十分相似, 除个别种存在分歧外, 不同学者均承认金花茶组成员之间的近缘关系, 这也得到了部分分子数据的支持 (唐绍清等, 1998; 施苏华等, 1998; 唐绍清等, 2004a, b; Xiao and Parks, 2002)。然而不同于前人的研究结果, 在本研究中, 系统树的拓扑结构显示: 张宏达的金花茶组包括三个平行

的支系 (Clade I, II, III), 长柄山茶组的 *C. longipedicellata* 嵌于 Clade III 中, 与越南分布的金花茶组种类在分子系统树上构成一个单系支 (图 1, 2)。这表明金花茶组不是一个单系, 而可能是并系或多系类群。

在系统树中, 金花茶组所表现出的分支关系目前尚缺乏相应形态学的依据, 但却明显具有地理分布上的启示意义。越南北部地区分布的金花茶种类自成一支 (Clade III), 而国产的金花茶种类分为两个支系 Clade I 和 Clade II, 它们在地理分布上大体以我国广西的十万大山为界, Clade II 的三个种主要分布于十万大山东南面的广西防城地区, Clade I 的种类则分布于十万大山西北面的广西龙州、宁明、扶绥和平果等县。这在一定程度上支持了叶创兴和许兆然 (1992) 有关金花茶组地理分化路线的推断。但由于这三个支系的系统位置及相互关系仍然不明确, 金花茶组的分类学范围和地理演化规律等问题仍然有待于进一步的研究。

由于 *C. longipedicellata* 与越南分布的金花茶组成员聚成一支, 长柄茶组和金花茶组的密切关系得到了分子数据的部分证实。实际上, 在基于形态学的研究中, 叶创兴和许兆然 (1992) 认为金花茶组和长柄山茶组除了花的颜色不同外, 其余特征均与之接近; 这两组各自独立仅仅是为了突出它们 (在花色上) 的区别。*C. longipedicellata* 仅分布于我国广西中部至西北部 (模式产地在广西中部的忻城县), 与分布于越南北部地区的金花茶种类存在明显的地理隔离。它们之间紧密的亲缘关系可能与长柄茶组的另一个种 *C. indochinensis* (分布于越南北部及我国广西、贵州及云南) 有密切关联。一直以来, *C. indochinensis* 的系统位置 (参见本文前言) 和分类学范畴都颇具争议, 甚至在地理分布上也存在疑问 (闵天禄和张文驹, 1993)。闵天禄和张文驹 (1993) 将 *C. indochinensis* 移至今茶组 (包含金花茶组) 中, 并将 *C. limonia* 和 *C. parvipetala* 等金花茶种类并入该种, *C. tunghinensis* 作为该种的变种处理。对于这些分类学处理, 张宏达 (1996) 均予以否认。本研究的系统树拓扑结构显示 *C. limonia* 和 *C. parvipetala* 两个种与 *C. tunghinensis* 分别落

入 Clade I 和 Clade II 中。这一结果也并不支持闵天禄和张文驹 (1993) 对这三种的分类学处理。由于本研究缺乏 *C. indochinensis* 的取样, 仅依据 *C. longipedicellata* 在系统树中所反映的分支关系, 我们还难以深入地探讨整个长柄山茶组的系统地位, 以及与金花茶组的系统关系。

系统树的拓扑结构表明: 超长柄茶组明显不是一个单系。闵天禄将超长柄茶组并入长柄山茶组中, 这一观点也并没有得到分子证据的支持。*C. hekouensis* 与整个山茶属其余种互为姐妹群, 暗示了它在山茶属中所处的原始地位, 而这与现行的张宏达系统和闵天禄系统的系统发育关系均明显不符。因此, *C. hekouensis* 在山茶属的系统发育过程中, 可能具有重要的系统地位。从系统树的拓扑结构来看, *C. longissima* 与 *C. hekouensis* 并无联系, 与茶组的系统关系也不明确, 但却似乎表现出与糙果茶组和油茶组的某些联系, 在 NJ 树上三者形成弱的分支 (图 3)。

在本研究中, 茶组的 3 个种, *C. sinensis* 和 *C. kwangsiensis* 构成一个紧密的分支, 但 *C. gymnogyna* 在系统树上的位置并不确定, 茶组并未构成单系。糙果茶组和油茶组各有一个种的取样, 分别为 *C. furfuracea* 和 *C. oleifera*, 均为所在组的模式种。系统树的拓扑结构反映出两个种之间的紧密联系, 得到了 BI 树、MP 树和 NJ 树的一致支持。这也与张宏达系统中糙果茶组和油茶组的系统关系较为相符。连蕊茶组和毛蕊茶组的近缘关系得到不同学者的一致认可 (张宏达, 1981; 闵天禄, 2000), 这在系统树中也有所显示。

本研究针对山茶属三个组的系统地位和亲缘关系进行了相应的分子系统学探讨, 但研究的结果与形态分类系统的认识之间仍然存在明显的差异。一方面, 这可能是由于研究的取样所限, 以及叶绿体片段本身在进化速率上的局限性, 分子系统树难以反映属下类群之间全面深入的联系, 可能存在系统关系分析上的偏差。另一方面, 目前研究者对于该类群的形态性状演化尚未达成一致的认识, 基于形态性状分析的经典分类系统也有待完善。因此, 为进一步探讨山茶属的系统学问题, 我们在扩大取样范围和筛选更合适的

DNA 片段的同时, 加强形态学研究与分子系统学研究的结合是非常必要的。

致谢 感谢中国西南野生生物种质资源库分子生物学实验中心的工作人员在实验过程中给予的帮助!

〔参 考 文 献〕

- 闵天禄, 2000. 世界山茶属的研究 [M]. 昆明: 云南科技出版社
- 张宏达, 任善湘, 1998. 中国植物志 (第 49 卷 第 3 分册) [M]. 北京: 科学出版社
- Chang HT (张宏达), 1979. *Chrysantha*, a section of golden camellias from Cataysian flora [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni* (中山大学学报 (自然科学版)), **18** (3): 69—74
- Chang HT (张宏达), 1981. A taxonomy of the genus *Camellia* [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni* (中山大学学报 (自然科学版)), Monographic Series **1**: 1—180
- Chang HT (张宏达), Zeng FA (曾范安), 1982. *Luteoflora*, A new section of *Camellia* [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni* (中山大学学报 (自然科学版)), **21** (3): 72—73
- Chang HT (张宏达), Ye CX (叶创兴), 1993. Diagnosis on the systematic development of Theaceae II. The systematic characters of golden Camellia-*C. nitidissima* Chi [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni* (中山大学学报 (自然科学版)), **32** (3): 118—120
- Chang HT (张宏达), 1996. Diagnosis on the systematic development of Theaceae I. A review on the sect. *Chrysantha* and *Archechamellia* of the genus *Camellia* [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni* (中山大学学报 (自然科学版)), **35** (1): 77—83
- Chang HT, Bartholomew B, 1984. *Camellias* [M]. Oregon: Timber Press
- Chen L (陈亮), Yamaguchi S, Wang PS (王平盛) *et al.*, 2002. Genetic polymorphism and molecular phylogeny analysis of section *Thea* based on RAPD markers [J]. *Journal of Tea Science* (茶叶科学), **22** (1): 19—24
- Chen L (陈亮), 2002. Studies on Molecular Systematics of sect. *Thea* (L.) Dyer-Genetic Polymorphism and Classification [D] (PhD Thesis). Hangzhou: Zhejiang University
- Deng BL (邓白罗), Tan XF (谭晓风), Qi LL (漆龙霖) *et al.*, 2006. RAPD analysis and taxonomy of sect. *Camellia* species in *Camellia* [J]. *Scientia Silvae Sinicae* (林业科学), **42** (5): 36—41
- Doyle JJ, Doyle JL, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochemical Bulletin*, **19**: 11—15
- Evans RC, Alice LA, Campbell CS *et al.*, 2000. The granule-bound starch synthase (GBSSI) gene in the Rosaceae: multiple loci and phylogenetic utility [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **17**: 388—400
- Evans RC, Campbell CS, 2002. The origin of the apple sub-family (Maloideae; Rosaceae) is clarified by DNA sequence data from duplicate GBSSI genes [J]. *American Journal of Botany*, **89**: 1478—1484
- Fang W (方伟), 2008. Molecular Systematics of *Camellia* sect. *Archechamellia* Sealy and sect. *Chrysantha* H. T. Chang (Theaceae) MS Thesis [D]. Kunming: Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences
- Guo ZH, Li DZ, 2004. Phylogenetics of the Thamnocalamus group and its allies (Gramineae; Bambusoideae) inference from the sequences of GBSSI gene and ITS spacer [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **30**: 1—12
- Hallier H, 1921. Beiträge zur Kenntnis der Linaceae, 24. Die Bonnetieen [J]. *Beihefte zum Botanischen Centralblatt*, **39**: 156—162
- Hughes CE, Eastwood RJ, Bailey CD, 2006. From famine to feast? Selecting nuclear DNA sequence loci for plant species-level phylogeny reconstruction [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society, B. Biological Sciences*, **361**: 211—225
- Hu HH, 1956. *Yunnanea*, a new genus of Theaceae from Yunnan, China [J]. *The Rhododendron and Camellia Yearbook*, **11**: 105—107
- Hu HH (胡先骕), 1956. *Sinopyrenaria* and *Yunnanea*, two new genera of Theaceae from Yunnan, China [J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报), **5** (4): 279—286
- Hu HH (胡先骕), 1957a. *Kailosocarpus* and *Parapiquetia*, new genera of Theaceae in Yunnan [J]. *Scientia* (科学通报), **1957**: 170
- Hu HH (胡先骕), 1957b. *Glyptocarpa*, a new genus of Theaceae [J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报), **10** (1): 25—26
- Jorden WC, Courtney MW, Neigel JE, 1996. Low levels of intraspecific genetic variation at a rapidly evolving chloroplast DNA locus in North American duckweeds (Lemnaceae) [J]. *American Journal of Botany*, **83**: 430—439
- Kimura M, 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences [J]. *Journal of Molecular Evolution*, **16**: 111—120
- Kondo K, 1977a. Chromosome numbers in the *Camellia* [J]. *Biotropica*, **9** (23): 86—94
- Kondo K, 1977b. Cytological studies in cultivated species of China I: Diploid species and their hybrids [J]. *Japanese Journal of Breeding*, **27**: 28—38
- Kondo K, 1977c. Cytological studies in cultivated species of Chi-

- na II: Hexaploid species and their hybrids [J]. *Japanese Journal of Breeding*, 333—344
- Kondo K, 1978. Cytological studies in cultivated species of China III: Tetraploid species and hybrids between diploid species and hexaploid species [J]. *Japanese Journal of Breeding*, **27**: 28—38
- Li YB (李渊博), 2007. Preliminary Study on Molecular Systematics of *Camellia* Sect. *Thea* (L.) Dyer [D] (MS Thesis). Beijing: Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences
- Mason-Gamer RJ, Weil CF, Kellog EA, 1998. Granule-bound starch synthase: structure, function, and phylogenetic utility [J]. *Molecular Biology and Evolution*, **15**: 1658—1673
- Mason-Gamer RJ, 2001. Origin of the North American *Elymus* (Poaceae: Triticeae) allotetraploids based on granule-bound starch synthase gene sequences [J]. *Systematic Botany*, **26**: 757—768
- Ming TL (闵天禄), Zhang WJ (张文驹), 1993. On taxonomic problems of sect. *Archeamellia* Sealy and sect. *Chrysantha* in the genus *Camellia* [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **15** (1): 1—15
- Ming TL (闵天禄), 1994. Sect. *Cylindrica*, one new section of genus *Camellia* (Theaceae) [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **16** (4): 343—344
- Ming TL (闵天禄), Zhang WJ (张文驹), 1996. The evolution and distribution of genus *Camellia* [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **18** (1): 1—13
- Ming TL (闵天禄), 1999. A systematic synopsis of the genus *Camellia* [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **21** (2): 149—159
- Ming TL, Bartholomew B, 2007. Flora of China [M]. Vol. 12. Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press
- Nakai T, 1940. A new classification of the Sino-Japanese genera and species which belong to the tribe Camellieae (II) [J]. *Journal of Japanese Botany*, **16**: 691—708
- Ni S (倪穗), 2007. Research on Phylogenesis of sect. *Camellia* in the Genus *Camellia* [D] (PhD Thesis). Nanjing: Nanjing Forestry University
- Parks R, 1990. Cross-compatibility studies in the genus *Camellia* [J]. *International Camellia Journal*, **10**: 37—54
- Peralta I, Spooner DM, 2001. Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*) [J]. *American Journal of Botany*, **88**: 1888—1902
- Posada D, Crandall KA, 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution [J]. *Bioinformatics*, **14** (9): 817—818
- Prince LM, Parks C, 2001. Phylogenetic relationships of Theaceae inferred from chloroplast DNA sequence data [J]. *American Journal of Botany*, **88** (12): 2309—2320
- Ronquist F, Huelsenbeck JP, 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. *Bioinformatics*, **19**: 1572—1574
- Sanger E, Nicklen S, Coulson AR, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **74**: 5463—5467
- Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF, 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae) [J]. *American Journal of Botany*, **84**: 1120—1136
- Sang T, 2002. Utility of low-copy nuclear gene sequences in plant phylogenetics [J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **37** (3): 121—147
- Sealy JR, 1958. A Revision of the Genus *Camellia* [M]. London: The Royal Horticultural Society
- Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, et al., 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III [J]. *American Journal of Botany*, **94**: 275—288
- Shi SH (施苏华), Tang SQ (唐绍清), Chen YQ (陈月琴) et al., 1998. Phylogenetic relationships among eleven yellow-flowered *Camellia* species based on random amplified polymorphic DNA [J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报), **36** (4): 317—322
- Simmons AM, Ochoterena H, 2000. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses [J]. *Systematic Botany*, **49**: 369—381
- Small RL, Cronn RC, Wendel JF, 2004. Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants [J]. *Australian Systematic Botany*, **17**: 145—170
- Smedmark JEE, Eriksson T, Evans RC et al., 2003. Ancient allopolyploid speciation in Geinae (Rosaceae): evidence from nuclear granule-bound starch synthase (GBSSI) gene sequences [J]. *Systematic Botany*, **52**: 374—385
- Sonnhammer ELL, Koonin EV, 2002. Orthology, paralogy and proposed classification for paralog subtypes [J]. *Trends in Genetics*, **18** (12): 619—620
- Swofford DL, 2002. PAUP* 4.0b10: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods), beta version [CP]. Sunderland: Sinauer Associates, Inc
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G et al., 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA [J]. *Plant Molecular Biology*, **19**: 11—15
- Tamura K, Dudley J, Nei M et al., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, **24**: 1596—1599
- Tan XF (谭晓风), Qi LL (漆龙霖), He J (贺晶) et al., 2005. Molecular classification of Section *Oleifera* Chang and Section *Chrysantha* Chang of *Camellia* L. [J]. *Journal of Central South*

- Forestry University* (中南林学院学报), **25** (4): 32—34
- Tang SQ (唐绍清), Shi SH (施苏华), Chen YQ (陈月琴) *et al.*, 1998. Phylogenetic relationship of *Camellia nitidissima* Chi and its allied species based on random amplified polymorphic DNA [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni* (中山大学学报 (自然科学版)), **37** (4): 28—32
- Tang SQ (唐绍清), Shi SH (施苏华), Zhong Y (钟杨) *et al.*, 2004a. Phylogenetic relationships of golden camellias (sect. *Chrysanth*, *Camellia*) in China: evidence from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA [J]. *Guihaia* (广西植物), **24** (6): 488—492
- Tang SQ (唐绍清), Du LF (杜林方), Wang Y (王燕), 2004b. AFLP analysis of ser. *Chrysanth* Chang (*Camellia*, sect. *Chrysanth*) [J]. *Journal of Wuhan Botanical Research* (武汉植物学研究), **22** (1): 44—48
- Tate JA, Simpson BB, 2003. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploidy species [J]. *Systematic Botany*, **28**: 723—737
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F *et al.*, 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, **24**: 4876—4882
- Tian M (田敏), Li JY (李纪元), Ni S (倪穗) *et al.*, 2008. Phylogenetic study on section *Camellia* based on ITS sequences data [J]. *Acta Horticulture Sinica* (园艺学报), **35** (11): 1685—1688
- Walter SJ, Campbell CS, Kellogg EA *et al.*, 2007. Plant Systematics: A Phylogenetic Approach [M]. 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associate, Inc
- Wendel JF, Doyle JJ, 1998. Phylogenetic Incongruence: Window into Genome History and Molecular Evolution [A]. In: Soltis DE, Soltis PS, Doyle JJ, eds. *Molecular Systematics of Plants II: DNA sequencing* [M]. Norwell: Kluwer Academic Publishers
- Winkworth RC, Donoghue MJ, 2004. *Viburnum* phylogeny: evidence from the duplicated nuclear gene GBSSI [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **33**: 109—126
- Xiao TJ, Parks CR, 2002. Molecular Analysis of Genus *Camellia* [R]. American Camellia Society: American Camellia Yearbook, 52—58
- Yang HQ, Yang JB, Peng ZH *et al.*, 2008. A molecular phylogenetic and fruit evolutionary analysis of the major groups of the paleotropical woody bamboos (Gramineae: Bambusoideae) based on nuclear ITS, GBSSI gene and plastid trnL-F DNA sequences [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **48**: 809—824
- Yang JB (杨俊波), Yang SX (杨世雄), Li DZ (李德铎) *et al.*, 2006a. Phylogenetic relationships of Theaceae inferred from mitochondrial *matR* gene sequence data [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **28** (1): 29—36
- Yang JB (杨俊波), Li HT (李洪涛), Yang SX (杨世雄) *et al.*, 2006b. The application of four DNA sequences to studying molecular phylogeny of *Camellia* (Theaceae) [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **28** (2): 108—114
- Yang SX (杨世雄), Ming TL (闵天禄), 1995. Studies on the systematic position of genera *Pyrenaria*, *Tutcheria* and *Parapyrenaria* of family Theaceae [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **17** (2): 192—196
- Ye CX (叶创兴), Xu ZR (许兆然), 1992. A taxonomy of *Camellia* sect. *Chrysanth* Chang [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni* (中山大学学报 (自然科学版)), **31** (4): 68—77
- Ye CX (叶创兴), 1993. Diagnosis on the systematic development of Theaceae III. A review of *Camellia* Sect. *Chrysanth* Chang and evolution of genus *Camellia* [J]. *Guihaia* (广西植物), **13** (4): 306—310
- Ye CX (叶创兴), Chang HT (张宏达), 1997. Diagnosis on the systematic development of Theaceae IX. Primitive characters and evolutionary trends of the genus *Camellia* [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni* (中山大学学报 (自然科学版)), **36** (3): 76—81
- Zhang WJ (张文驹), 1992. A Systematic Study on Sect. *Archecamellia* Sealy of the Genus *Camellia* [D] (MS Thesis). Kunming: Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences