维普资讯 http://www.cqvip.com

云 南 植 物 研 究 2002, 24 (4): 455~462
Acta Botanica Yunnanica

应用 ITS 区序列对秋海棠属无翅组分类学问题的探讨*

向建英, 管开云**, 杨俊波
(中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

摘要: 以侧膜组 (Sect. *Coeloecentrum*) 的 *Begonia cirrosa* 和单裂组 (Sect. *Reichenheimia*) 的 *B. henryi* 为外类群, 对秋海棠属 (*Begonia* L.) 无翅组 (Sect. *Sphenanthera*) 9 种 2 变种及秋海棠组 (Sect. *Begonia*) 4 种进行了 ITS 区 (包括 5.8S rDNA) 序列的测定。发现该属的 ITS 序列较一般类群要长一些, 所测的序列长度变化范围为 648~743bp。这些序列经 Clustal X 软件排序后序列总长为 756 个位点, gap 做缺失处理时, 变异位点和信息位点分别占 26.41% 和 10.11%。运用 PAUP4.0b8 软件分析, 获得 6 棵最大简约树, 步长为 286, 一致性指数 (*CI*) 和维持性指数 (*RI*) 分别为 0.8287 和 0.7841, 利用 6 棵最简约树获取严格一致树, 并作 Bootstrap 检测。结果表明: 1. 支持将原无翅组内子房 3 室的种类移入秋海棠组, 而将子房 4 室的种保留, 成立四室组 (Sect. *Sphenanthera*); 2. 将 *B. tetragona* 作为 *B. acetosella* 的异名处理得到一定的支持; 3. *B. crassirostris* 的系统位置有待进一步的研究。

关键词: 秋海棠属; 无翅组; 四室组; ITS 区
中图分类号: Q 949, Q 945 **文献标识码**: A **文章编号**: 0253-2700(2002)04-0455-08

Studies on the Classification of *Begonia* Sect. *Sphenanthera* Based on Nuclear Ribosomal DNA ITS Sequence Data

XIANG Jian-Ying, GUAN Kai-Yun*, YANG Jun-Bo
(*Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650204, China)

Abstract: The sequences of nrDNA internal transcribed spacers (ITS) (including 5.8S rDNA) of 9 species and 2 varieties in Sect. *Sphenanthera*, 4 species in Sect. *Begonia* were examined and analyzed *B. cirrosa* (sect. *Coelocentrum*), *B. henryi* (Sect. *Reichenheimia*) as outgroup. The length of these sequences is 648-743bp, and the aligned length of ITS region is 756 position, which provides 26.41% variable sites and 10.11% phylogenetical informative sites when gaps are treated as missing. Six most parsimonious trees, with length of 286, consistency index (*CI*) of 0. 8287 and retention index (*RI*) of 0.7841 were obtained by PAUP 4.0b8 analysis. The topology of the strict consensus tree shows that: 1. transferring the species with 3-locular ovaries from Sect. *Sphenanthera* to Sect. *Begonia* was supported; and the remaining species with 4-locular ovaries should be kept in Sect. *Sphenanthera*; 2. *B. tetragona* should be synonymized with *B. acetosella*; 3. the phylogenetic position of *B. crassirostris* has not been re-

* 基金项目: 云南省自然科学基金资助项目 (87C087M); 中国科学院百人计划支持项目 1998—0054
** 通讯作者 Author for correspondence
收稿日期: 2001-08-10, 2001-10-08 接受发表
作者简介: 向建英 (1976-) 女, 云南人, 在读博士研究生, 主要从事植物保护生物学研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

solved in this study and needs to be further studied.

Key words: *Begonia* L.; Sect. *Sphenanthera*; ITS region

到目前为止，秋海棠属（*Begonia* L.）已知约有1 400多种，分属于63个组（Doorenbos等，1998）。根据目前大多数人所采取的秋海棠属内的分组分类系统（Engler等，1894），无翅组（Sect. *Sphenanthera*）与其它组最重要的区别特征在于该组的各个种具有肉质的浆果状蒴果，果无翅或具角状突起。然而，该组内的一些种由于在形态上同时也具有其它一些组的重要区别性特征而在归属上显得模棱两可。有研究（Doorenbos等，1998）指出，符合以上无翅组定义的一些种由于同时具有等翅组（Sect. *Petermannia*）或扁果组（Sect. *Platycentrum*）等其它组的某些重要特征而显得界限模糊。如该组的模式种 *B. robusta* 即与该组内其它的种存在着很大的差异：花梗直立较叶柄长，果具不等的3翅，甚至最长的翅达2 cm等。事实上，该种除了子房3室的特征外，似乎更应该置于等翅组内。近期已有一些国内外研究者对该属内一些种的归属进行了研究订正，如Tebbitt等（2000）主要依据花被片、花序及子房特征，将原归属于无翅组的 *B. axillipara*，*B. brachyptera*，*B. pseudolateralis* 转归于等翅组内。

在最近出版的《中国植物志》中，谷粹芝（1999）以子房分室和胎座裂片为主要特征，对中国秋海棠属的分组分类进行了调整。文中将原无翅组中子房3室的种移入秋海棠组（Sect. *Begonia*）内，成立无翅亚组（Subsect. *Crassirostris*）；将原该组内子房4室的种保留并改名为四室组（Sect. *Sphenanthera*）；将子房5~7室，胎座不分裂的种 *B. balansana* 独立出来，成立多室组（Sect. *Pleiothece*）。这一新的分类方法在某种程度上解决了一些种同时具有两个组的重要区别性状的问题。同时，在应用中我们发现，调整后归属于秋海棠组无翅亚组的各个种都为雌雄同株，而四室组内所包含的种为雌雄异株的种，且它们各自的花期都相对集中。然而由于原无翅组的模式种（*B. robusta*）已不在调整后的四室组内，四室组的拉丁学名应该重新命名而不应继续使用Sect. *Sphenanthera*。对于这个问题将在以后另文讨论而在此暂时继续使用。

近年来，分子生物学证据越来越多地被应用于系统学的研究。其中尤其是核糖体DNA ITS间隔区在解决属内分类系统学问题中的应用最为广泛。由于ITS序列在被子植物中长度变异较小，进化速率较快而适用于解决科内尤其是近缘属间及种间关系的研究（Baldwin，1991，1992；Cox等，1997；Kim等，1999；Lee等，1999；Shi等，1999）。

本文通过ITS序列的测定和分析拟对以下问题进行研究：（1）建立四室组，将原无翅组内子房3室的种类并入秋海棠组，成立无翅亚组的观点是否得到分子系统学的支持；（2）四室组内各个种间亲缘关系如何；（3）从分子生物学的角度讨论由形态学研究为基础提出的将四室组内的 *B. tetragona* 作为 *B. acetosella* 的异名处理是否合理。

1 材料和方法

1.1 材料来源

研究材料来源见表1。凭证标本存于中国科学院昆明植物所标本馆（KUN）。

1.2 总DNA的提取、ITS区的扩增、纯化和DNA测定

维普资讯 http://www.cqvip.com

分别取各个种新鲜叶片0.2 g左右，采用改良的CTAB法（Doyle & Doyle，1987）提取总DNA，并以1%的琼脂糖胶，1×TAE缓冲液电泳检测。

用White等（1990）描述的引物进行ITS区的扩增。聚合酶链式反应（PCR）在PERKIN ELMER 9600型PCR仪上进行。采用ITS5和ITS4一对引物扩增DNA ITS区。PCR程序为：97℃预变性4 min，此后94℃变性1 min，50℃退火1 min，72℃延伸1 min，共30个循环后，72℃ 10 min，反应体系为20 μL。扩增反应结束后以1.2%的琼脂糖胶，1×TAE的电泳缓冲液电泳检测反应产物，对于未能扩增出产物的*B. longicarpa*和*B. handelii*，调整DNA模板浓度后加入10%的DMSO重新扩增，得到扩增产物。扩增产物均经Watson公司柱式纯化试剂盒进行纯化。

测序反应依据双脱氧链终止法（Sanger等，1977）原理，在上述PCR仪上进行，反应程序为：96℃变性10 s，50℃退火5 s，60℃延伸4 min，进行30个循环，反应体系为10 μL。产物纯化后经95℃变性4 min后于ABI 310型自动测序仪进行序列测定。为保证所测序列的准确性，分别对每一个种或变种的ITS序列的正、反链进行测序并校准。

1.3 数据分析及系统树的构建

表1　材料来源

Table 1　The information of the materials and their GenBank accession numbers

Taxon	Section	Locality	Voucher	GenBank Acc.
B. ceratocarpa	?（3-locular）	Xishuangbanna	X.J.Y.01002	AF048978
B. crassirostris	as above	as above	X.J.Y.01001	AF048980
B. longicarpa	as above	as above	X.J.Y.01003	AF048985
B. acetosella	*Sphenanthera*（4-locular）	Lincang	X.J.Y.01004	AF048975
B. acetosella var. *rubropilosa*	as above	Cultivated at Kunnming Botanic Garden	X.J.Y.01005	AF048976
B. handelii	as above	Hekou	X.J.Y.01007	AF048981
B. handelii var. *rubropilosa*	as above	Cultivated at Kunnming Botanic Garden	X.J.Y.01008	AF048982
B. lancangensis	as above	as above	X.J.Y.01030	AF048984
B. prostrata	as above	Lincang	X.J.Y.01009	AF048986
B. silletensis	as above	as above	X.J.Y.01012	AF048988
B. tetragona	as above	Xishuangbanna	X.J.Y.01006	AF048989
B. alveolata	*Begonia*（3-locular）	Cultivated at Kunming Botanic Garden	X.J.Y.01014	AF048977
B. ruboides	as above	as above	X.J.Y.01013	AF048987
B. tsai	as above	as above	X.J.Y.01015	AF048990
B. wenshanensis	as above	as above	X.J.Y.01010	AF048974
B. cirrosa	*Coeloecentrum*	as above	X.J.Y.01021	AF048979
B. henryi	*Reichenheimia*	as above	X.J.Y.01022	AF048983

所得序列采用SeqEdv1.0.03（PE Applied Biosystems）及Clustal X（Thompson等，1987）进行序列校对和排序。序列排列好以后以侧膜组（Sect. *Coeloecentrum*）的*B. cirrosa*和单裂组（Sect. *Reichenheimia*）的*B. henryi*作为外类群，利用PAUP4.0b8软件（Swofford，2001）进行统计分析和分支分析，计算各类群间的核苷酸差异值及差异矫正值，最简约树采用启发式搜索（heuristic search）取严格一致树。用Bootstrap分析（1000 replications）检验系统树中各分支的支持强度。

2 结果

本文测得15种2变种的ITS区（包括5.8S rDNA）序列的长度范围为648～743bp。其

维普资讯 http://www.cqvip.com

中 ITS2 的长度范围为 246～336bp，ITS1 的长度范围为 230～242bp，所有种的 ITS2 长度均比 ITS1 的长。而 5.8S rDNA 则高度一致，均为 165bp，无碱基差异。Gap 做为缺失处理时，测序得 ITS 区全序列排序后的长度为 756 个位点，其中有 201 个变异位点，77 个为系统发育信息位点，分别占全序列的 26.41% 和 10.11%。所研究的 15 种 2 变种秋海棠的 ITS1，5.8S 和 ITS2 的长度、G+C 含量见表 2。

排列后的序列经 PAUP4.0b8 软件分析得到各类群间的绝对遗传距离和相对遗同等传距离见表 3。各个种间的相对遗传距离为 0.140～12.141%。以侧膜组（Sect. *Coeloecentrum*）的 *B. cirrosa* 和单裂组（Sect. *Reichenheimia*）的 *B. henryi* 作为外类群，用最大简约法运算得到 6 棵最简约树，采用启发式搜索（Heuristic search）获取严格一致树。所得树长度为 286 步，一致性指数（*CI*）和维持性指数（*RI*）分别为 0.8287 和 0.7841。用 Bootsrap 分析各分支的支持强度，结果见图 1。

表 2 各类群 ITS1 和 ITS2 的长度

Table 2 Lengths (bp) and G+C contents of ITS2, 5.8S and ITS1 of the taxa studied in present paper

Species (varieties)	ITS2		5.8S		ITS1	
	Length (bp)	% G+C	Length (bp)	% G+C	Length (bp)	% G+C
B. acetosella	310	59.03	165	53.33	237	59.07
B. ace var. hirtifolia	310	59.03	165	53.33	237	59.07
B. alveolata	296	59.46	165	53.33	238	61.34
B. ceratocarpa	310	61.61	165	53.33	237	62.03
B. cirrosa	336	58.63	165	53.33	242	64.05
B. crassirostris	313	57.83	165	53.33	237	57.38
B. handelii	315	59.05	165	53.33	238	59.66
B. han var. rubropilosa	316	58.23	165	53.33	238	60.08
B. henryi	246	61.38	165	53.33	237	59.07
B. lancangensis	310	59.03	165	53.33	237	58.23
B. longicarpa	310	61.94	165	53.33	230	63.48
B. prostrata	318	57.86	165	53.33	238	74.79
B. ruboides	313	60.38	165	53.33	238	63.45
B. silletensis	303	58.09	165	53.33	239	60.67
B. tetragona	310	59.03	165	53.33	237	58.65
B. tsai	312	60.26	165	53.33	238	62.18
B. wenshanensis	311	59.49	165	53.33	239	60.25

3 讨论

通过 ITS 序列分析，结合形态学研究，可以得到以下的结论。

3.1 实验结果表明，所研究的 15 个类群分为两大支，原置于无翅组内子房 3 室的 *B. ceratocarpa*，*B. longicarpa* 和秋海棠组的 *B. wenshanensis*，*B. alveolata*，*B. ruboides*，*B. tsai* 同属一分支，该分支的靴带支持强度为 86%。这一结果支持将原无翅组内子房 3 室的种移入秋海棠组的分组分类系统；而 *B. acetosella*，*B. acetosella* var. *hirtifolia*，*B. lancangensis*，*B. tetragona*，*B. handelii*，*B. handelii* var. *rubropilosa*，*B. prostrata*，*B. silletensis* 及 *B. crassirostris* 同处一支，其靴带支持强度为 83%。这一大的分支内包括了四室组的所有种和变种，它又可分为两个亚分支：第一亚分支由根茎类的 *B. handelii*，*B. handelii* var. *rubropilosa*，

维普资讯 http://www.cqvip.com

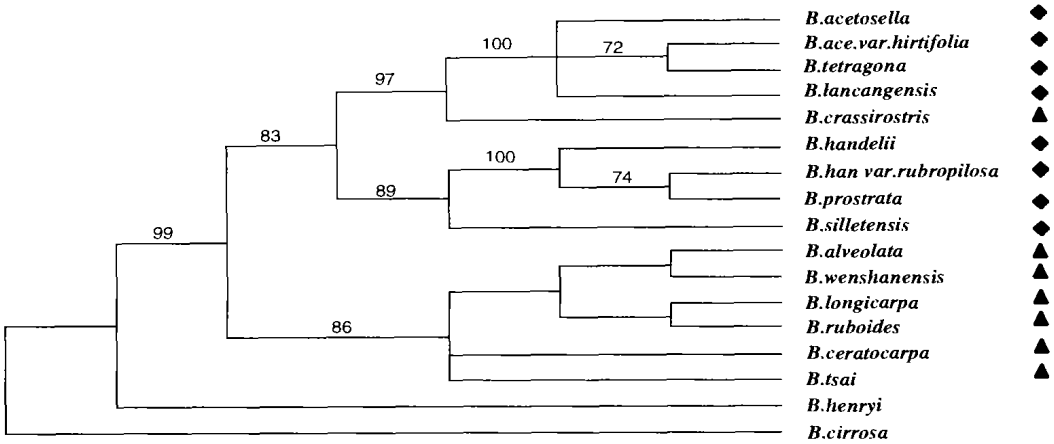

图 1　基于 ITS 区序列分析得到的严格一致树

（各分支上的数字为 1000 次重复抽样检测的 Bootstrap 值；◆：子房 4 室；▲：子房 3 室）

Fig. 1　The strict consensus of six most parsimonious trees generated from ITS sequence.

(Number above the branches are bootstrap data values (1000replicates). The tree has 286 steps, with CI = 0.8287 and RI = 0.7841; ◆: 4--locular; ▲: 3--locular.)

B. prostrata，*B. silletensis* 共同组成，其支持强度为 89%；另一亚分支则包括了具直立茎的 *B. acetosella*，*B. acetosella* var. *hirtifolia*，*B. lancangensis*，*B. tetragona* 以及 *B. crassirostris*，支持强度为 97%（图 1）。这一结果支持四室组内的各个种间有较近亲缘关系的观点，可以认为该组在分类上是一个比较自然的分类群；而且其中根茎类的种和变种间、具直立茎的种和变种间的亲缘关系分别较近。

3.2　由原始文献（Irmscher，1939），*B. tetragona* 与 *B. acetosella* 的主要区别特征有二：前者叶具重锯齿，果具明显四角突起而后者叶仅具浅而疏离的齿，果近圆形无翅。标本查阅发现，有的标本同时具有这两个种主要的区别特征而使这两个种间的界限模糊，如冯国楣 22828、武全安 9257、绿春队 1590，它们的果都具有明显的四角突起，而叶缘具浅而疏离的齿。由 *B. acetosella* var. *hirtifolia* 的模式产地（思茅）引种的个体，果实都具有明显的四角突起；临沧一居群叶具浅而疏离的齿但果具有明显的四角突起而介于 *B. acetosella* 和 *B. tetragona* 之间；版纳和思茅的居群则有与 *B. tetragona* 的原始描述（叶具重锯齿，果具四角突起）相吻合的特征。对照观察该组内的 *B. prostrata*、*B. silletensis*，它们各自都有果实具四角突起的居群以及果实圆形无四角突起的居群，且不同居群间果实的角状突起程度往往存在着明显的不同。从而认为，果实是否具四角突起这一特征在该组内并不足以成为定种的主要区别特征。由以上的研究，认为 *B. acetosella* 和 *B. tetragona* 应该为同一个种。依据命名法的优先律，该种的名称应该为 *B. acetosella*，而后者应该为该种的异名。

ITS 序列测定表明由 *B. acetosella*，*B. acetosella* var. *hirtifolia*，*B. tetragona*，*B. lancangensis* 组成的小分支支持率为 100%，其中 *B. acetosella*，*B. acetosella* var. *hirtifolia*，*B. tetragona* 间的绝对遗传距离仅有 1～6 个碱基的差别，*B. acetosella* 和 *B. tetragona* 的相对

表3 各个种间的遗传距离

Table 3 Pairwise distances between taxa in the present study

Below diagonal: Total character differences; Above diagonal: Mean character differences (adjusted for missing data)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1 *B. acetosella*			-0.0070	0.0565	0.0555	0.1058	0.0421	0.0492	0.0478	0.1196	0.0589	0.0506	0.0679	0.0471	0.0084	0.0552	0.0596	0.0140
2 *B. ace. var. hirtifolia*	5			-0.0580	0.0512	0.1072	0.0379	0.0449	0.0436	0.1180	0.0575	0.0478	0.0693	0.0457	0.0014	0.0538	0.0581	0.0126
3 *B. alveolata*	39	40			-0.0301	0.1032	0.0665	0.0562	0.0576	0.1059	0.0304	0.0631	0.0358	0.0585	0.0594	0.0315	0.0344	0.0681
4 *B. ceratocarpa*	39	36	21			-0.0971	0.0638	0.0481	0.0494	0.1019	0.0255	0.0549	0.0351	0.0502	0.0526	0.0239	0.0309	0.0612
5 *B. cirossa*	75	76	72	69			-0.1111	0.1078	0.1091	0.1158	0.1022	0.1172	0.1035	0.1068	0.1086	0.1023	0.1094	0.1157
6 *B. crassirostris*	30	27	46	45	79			-0.0533	0.0520	0.1147	0.0659	0.0561	0.0748	0.0556	0.0393	0.0636	0.0651	0.0449
7 *B. handelii*	35	32	39	34	77	38			-0.0056	0.1127	0.0486	0.0070	0.0647	0.0299	0.0464	0.0479	0.05220	0.0520
8 *B. han. var. rubropilosa*	34	31	40	35	78	37	4			-0.1113	0.0499	0.0056	0.0660	0.0312	0.0450	0.0492	0.0549	0.0506
9 *B. henryi*	75	74	66	64	74	72	71	70			-0.1022	0.1175	0.1081	0.1033	0.1196	0.1032	0.1079	0.1228
10 *B. longicarpa*	41	40	21	18	72	46	34	35	64			-0.0555	0.0298	0.0580	0.0589	0.0270	0.0327	0.0647
11 *B. prostrata*	36	34	44	39	84	40	5	4	74	39			-0.0714	0.0312	0.0492	0.0547	0.0604	0.0534
12 *B. ruboides*	48	49	25	25	74	53	46	47	68	21	51			-0.0671	0.0707	0.0336	0.0393	0.0764
13 *B. silletensis*	33	32	40	35	75	39	21	22	65	40	22	47			-0.0471	0.0528	0.0614	0.0500
14 *B. tetragona*	6	1	41	37	77	28	33	32	75	41	35	50	33			-0.0552	0.0596	0.0140
15 *B. tsai*	39	38	22	17	73	45	34	35	65	19	39	24	37	39			-0.0308	0.0609
16 *B. wenshanensis*	42	41	24	22	78	46	37	39	68	23	43	28	43	42	22			-0.0653
17 *B. lancangensis*	10	9	47	43	82	32	37	36	77	45	38	54	35	10	43	46		

维普资讯 http://www.cqvip.com

维普资讯 http://www.cqvip.com

遗传距离也仅为0.843%。陈月琴和屈良鹄（1999）使用ITS作为属种划分的分子标准，认为在被子植物中物种的ITS变异度为1.2%～10.2%，属的ITS变异度为9.6%～28.8%。结合形态学特征，ITS序列测定的结果支持我们在上文提出的将 *B. tetragona* 作为 *B. acetosella* 的异名处理的观点。

3.3 表3：3，*B. handelii*，*B. handelii* var. *rubropilosa*，*B. prostrata* 的ITS序列间绝对遗传距离仅相差4或5个碱基，相对遗传距离也仅为0.556%～0.696%。由它们组成的小分支支持率达100%，从而从遗传组成上证实了 *B. handelii* 和 *B. prostrata* 间亲缘关系极为相近。但二者在形态学上有一定差别，而且它们在地理分布上也有不同，应该为起源于一较近的共同祖先，由生境（分布）不同发生分化从而分离开来的两个分类群。

3.4 分支图中以子房分室为标准将这两大分支分开来的例外的情况是 *B. crassirostris* 的位置，这对谷粹芝（1999）提出的分类调整的合理性提出了质疑——该系统中 *B. crassirostris* 从属于秋海棠组而在分支图中，该种则显然位于四室组的亚分支内。结合 *B. crassirostris* 其它的生物学特征进行分析，该种雌花被片稳定为6，子房3室而显然不同于四室组的各个种；从分布上来看，该种的分布特殊，除云南外遍及我国的福建、广东、海南、广西、湖南、贵州，并与分布于台湾的 *B. hayatae* 极为相似。由以上的分析，虽然在分支图中该种进入了四室组的分支内，但该种在很多重要的生物学特征上明显有别于四室组的种类。因而其系统位置只有进一步结合其它方面的证据，进行深入研究才能确定它合理的分类学位置。

致谢 实验中得到了王仲朗老师、陈永燕老师、田代科老师以及分子植物地理实验室的郭振华、田欣等同学的热心帮助。

〔参 考 文 献〕

Baldwin BG, 1991. Nuclear ribosomal DNA phylogenetics of the tareeds (Madiinae: Asteraceae) [J]. *Amer J Bot*, 78 (supplement, abstract): 165—166

Baldwin BG, 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae [J]. *Mol Phylogent Evol*, **1**: 3—16

Cox AV, Pridgeon AM, Albert VA, *et al*, 1997, Phylogenetics of the slipper orchids (Cypripedium, Orchidaceae): Nuclear rDNA ITS sequences [J]. *Pl Syst Evol*, **208**: 197—223

Doyle JJ, Doyle JL, 1987. A rapid DNA isolation prodedure for small quantities of fresh leaf tissue [J].

Irmscher E, 1939. Mitt. Inst. Allg. Bot. Hamburg [M], **10**: 515—516

Engler, Prantl, 1894. Die Naturl. Pflanzenfam [M]. (ed. 1) 3, 6a: 141

Doorenbos J, Sosef MSM, de Wilde JJFE, 1998. The Sections of *Begonia* [R]. Wageningen: Agricultural University Papers, 98

Kim SC, Crawford DJ, Tadesse M, *et al*, 1990. ITS sequences and phylogenetic relationships in Bidens and Coreopsis (Asteraceae) [J]. *Systematic Botany*, **24**: 480—493

Ku Tsuechih (谷粹芝) 等, 1999. Flora Reipublicae Popularis Sinicae (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, **52** (1): 126—29

Lee BY, Downie SR, 1999. A molecular phylogeny of Apiaceae tribe Caucalideae and related taxa: inferences based on ITS sequences data [J]. *Systematic Botany*, **24**: 461—478

Tebbitt MC, James H, Dickson, 2000. Amended descriptions and Sectional assignment of some Asia begonias (Begoniaceae).

维普资讯 http://www.cqvip.com

Brittonia, **52** (1): 112—117

Sanger F, Nicklen S, Coulson SR, 1977. DNA sequencing with chain-termination inhibitors [J], Proceedings of the National Academy of Sciences USA, **74**: 5463—5467

Shi SH (施苏华), Huang YL (黄椰林), Zhang Q (章群) 等, 1999. Analysis of ITS sequences of nuclear ribosomal DNA from Tetrathyrium (Hamamelicaceae) and the related genera and the phylogenetic significance [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **21**: 87—95

Swofford DL, 2001. PAUP: phylogenetic analysis using jparsimony, Ver. 4.0b5 [M]. Sinauer, Associates, Massachusetts, USA

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak Frédéric, *et al*, 1997. The CLUSTAL - X windows interface: flexible stragegies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool [J]. *Nucleic Acid Research*. **25** (24): 4876—4882

White TJ, Bruns T, Lee S, *et al*, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T, eds., PCR protocols: A Guide to Methods and Application [M]. San Diego: Academic Press, 1990, 315—322

* *

〔上接 438 页〕

Stebbins GL, 1956. Cytogenetics and evolution of the grass family [J]. *Amer J Bot*, **43**: 890—905

Stebbins GL, 1981. Coevolution of grasses and herbivores [J]. *Ann Missouri Bot Gard*, **68**: 75—86

Tateoka T, 1957. Miscellaneous papers on the phylogeny of Poaceae (10). Proposition of a new phylogenetic system of Poaceae [J]. *J Jap Bot*, **32**: 275—287

Thomasson JR, 1987. Fossil grasses: 1820 - 186 and beyond. In Soderstrom T R, Hilu KW, Campbell CS, *et al*. (eds.), Grass Systematics and Evolution [M]. Washington D. C.: Smithsonian Institute Press, 159—167

Tzvelev NN, 1989. The system of grasses (Poaceae) and their evolution [J]. *The Bot Rev*, **55**: 141—203

Watson L, Dallwitz MJ, 1992. The Drass Genera of The World [M]. Wallingford, Oxon, England: C A B International

Zhang W, 1996. Phylogenetic and Classification of The Bamboos (Poaceae: Bambusoidea) Based on Molecular and Morphological Data [M]. Doctoral dissertation, Iowa State University, Ames

Zhang W, 2000. Phylogeny of the grass family (Poaceae) from rpl16 intron sequence data [J]. *Mol Phylogenet Evol*, **15**: 135—146

Zhang W, Clark LG, Wendel JF, 1995. ndhF sequence data and the phylogeny of the subfamily Bambusoideae (Poaceae) [J]. *Amer J Bot*, **82** (supplement): 173