

基于 ITS 序列分析探讨杜鹃属映山红亚属的组间关系*

高连明, 杨俊波, 张长芹, 李德铎**

(中国科学院昆明植物研究所生物多样性和生物地理开放实验室, 云南 昆明 650204)

摘要: 以叶状苞亚属的叶状苞杜鹃为外类群, 对杜鹃属映山红亚属 (subg. *Tsutsusi*) 2 组 12 种杜鹃和羊躑躅亚属 (subg. *Pentanthera*) 3 组 4 种杜鹃的 ITS 区 (包括 5.8S rDNA) 的序列进行了系统学分析。3 个亚属的 ITS 区序列长度范围为 642 - 645 bp, 排序后 ITS 区的序列长度为 653 个位点, gap 做缺失处理时, 变异位点和信息位点分别占 6.58% 和 3.68%。运用 PAUP4.0 软件分析, 获得 15 个最简约树, 步长为 75, 一致性指数 (CI) 和维持性指数 (RI) 值分别为 0.9333 和 0.9515, 利用 15 个最简约树获取严格一致树, 结果表明: 1) 映山红亚属为一单系类群, 其内部支持率为 81%; 2) 不支持将 *R. tashiroi* 独立成假映山红组, 也不支持将 *R. tashiroi* 并入映山红组, 而支持将 *R. tashiroi* 并入轮生叶组中的观点; 3) 支持将 *R. tsusioiophyllum* 并入映山红组中的观点; 4) 大字杜鹃的系统位置还需进一步的研究。

关键词: 杜鹃属; ITS; 系统发育**中图分类号:** Q 75, Q 949 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253 - 2700(2002)03 - 0313 - 08Phylogenetic Relationship of Subgenus *Tsutsusi* (*Rhododendron*)
Based on ITS Sequences

GAO Lian-Ming, YANG Jun-Bo, ZHANG Chang-Qin, LI De-Zhu**

(Laboratory of Plant Biodiversity and Biogeography, 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 12 species representing 2 sections of Subg. *Tsutsusi* and 4 species representing 3 sections of Subg. *Pentanthera* of *Rhododendron*, were analyzed to reconstruct the phylogeny of Subg. *Tsutsusi* and Subg. *Pentanthera* using parsimony methods and *R. redowskianum* Maxim of subg. *Therorhodion* as outgroup. The size of ITS region within the three subgenera ranges from 642 to 645bp. The aligned length is 653 positions, which provide 6.58% variable sites and 3.68% phylogenetical informative sites when gaps are treated as missing. 15 most parsimonious trees, with a length of 75 steps, consistency index (CI) of 0.9333 and retention index (RI) of 0.9515, were obtained. The topology of the strict consensus tree shows that: 1) Subg. *Tsutsusi* is a monophyletic group, the bootstrap value is 81%; 2) *R. tashiroi* is neither a member of

* 基金项目: 国家杰出青年科学基金 NSFC39725001 和中国科学院百人计划 1998 - 0054, 云南省自然科学基金 (98C090M)

** 通讯作者 Whom for correspondence

收稿日期: 2001 - 07 - 12, 2001 - 10 - 11 接受发表

作者简介: 高连明 (1972 -) 男, 在读博士研究生, 主要从事植物系统学和植物地理学研究。

Sect. *Tsusiopsis* nor that of Sect. *Tsutsusi*, *R. tashiroi* should be a member of Sect. *Brachycalyx*; 3) *R. tsusiophyllum* is a member of Sect. *Tsutsusi*; 4) the phylogenetic position of *R. schlippenbachii* is not resolved in this study and needs further research.

Key words: *Rhododendron*; Internal transcribed spacers (ITS); Phylogeny

杜鹃属映山红亚属约有 97 种, 映山红组约有 80 种, 轮生叶组约有 15 种, 主要分布在我国长江以南各省区和日本及朝鲜半岛, 我国约有 72 种 (Chamberlain & Rae, 1990; 何明友等, 1994)。不同分类学者对该亚属的分组及一些种的系统位置存在争议, Sleumer (1949, 1980) 将该亚属分为 3 个组, 即映山红组 (Sect. *Tsutsusi*)、轮生叶组 (Sect. *Brachycalyx*) 和假映山红组 (Sect. *Tsusiopsis*), 其中假映山红组仅有 *R. tashiroi* 一种。Chamberlain & Rae (1990) 在对该亚属修订时, 将单型属 *Tsusiophyllum* 归并到映山红组, 即 *R. tsusiophyllum*, 将 *R. tashiroi* 也归并到映山红组, 映山红亚属仅含映山红组和轮生叶组两个组。而 Yamazaki (1996) 在对产于日本、台湾和韩国的杜鹃属植物修订时, 却将 *R. tashiroi* 置于轮生叶组。Philipson & Philipson (1982) 和 Judd and Kron (1995) 将 Sleumer 系统中轮生叶组中的大字杜鹃 (*R. schlippenbachii*) 转移到羊躑躅亚属下的 Sect. *Sciadorhodion* 中。本研究选取叶状苞亚属的叶状苞杜鹃做为外类群, 因为叶状苞亚属是杜鹃属其它亚属的姐妹群, 已在近年来的形态学和分子系统学研究中得到很好的支持 (Kron & Judd, 1990; Kron, 1997; Kurashige 等, 1998; Kron 等, 1999)。

核糖体 DNA 中的内转录间隔区 (ITS) 序列由于可以提供较丰富的信息位点, 已被广泛用于研究被子植物属内, 近缘属间, 乃至科内的系统发育和分类问题 (Baldwin 等, 1995; 汪小全等, 1998; 王建波等, 1999; 洪亚平等, 2001; 史全良等, 2001)。ITS 分析在杜鹃花科内也得到了很好的应用 (Kron & King, 1996)。拟通过对 17 种杜鹃花的 ITS 序列分析, 从分子角度探讨映山红亚属内组间的系统学关系, 并对 *R. tsusiophyllum*, *R. tashiroi* 和 *R. schlippenbachii* 3 种杜鹃花的系统位置进行了讨论, 试图为该亚属的系统学研究和分类问题提供更多的证据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本文对 *R. tashiroi* 和 *R. redowskianum* 两种杜鹃进行了 ITS 区全序列的测定, 另外 15 种杜鹃花的 ITS 区序列从 Genbank 获得, 序列号和实验材料见表 1。

1.2 总 DNA 的提取、PCR 扩增和 DNA 测序

取硅胶干燥的各种植物叶片 0.1 g 左右, 采用改良的 CTAB 法 (Doyle 等, 1987) 提取总 DNA。聚合酶链式反应 (PCR) 在 PERKIN ELMER 9600 型 PCR 仪上进行, 用 White 等 (1990) 的引物进行 ITS 区的扩增。PCR 程序为: 97℃ 预变性 4 min, 94℃ 变性 1 min, 50℃ 退火 1.5 min, 72℃ 延伸 2 min, 30 个循环; 扩增产物用 Watson 公司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: 94℃ 变性 10 s, 50℃ 退火 5 s, 60℃ 延伸 4 min, 30 个循环, 反应体系为 5:1。产物纯化后经热变性于 ABB10 型自动测序仪进行序列测定。为保证测序的准确性, 对 ITS 序列正、反链进行测定并加以校准。

表 1 材料来源

Table 1 The information of the materials base on the systematic of *Rhododendron* of Chamberlain *et al.* (1996)

Species	Subgenus	Section	Voucher	Genbank Acc. No.
<i>R. kusurazumi</i> Makino.	Tsutsusi	Tsutsusi	From Genbank	X96805
<i>R. kaempferi</i> Planch.	Tsutsusi	Tsutsusi	From Genbank	X96804
<i>R. breviperulatum</i> Hayata	Tsutsusi	Tsutsusi	From Genbank	AF285853
<i>R. lasiocalyx</i> Hayata	Tsutsusi	Tsutsusi	From Genbank	AF285845
<i>R. oldhamii</i> Maxim	Tsutsusi	Tsutsusi	From Genbank	AF285843
<i>R. longiperulatum</i> Hayata	Tsutsusi	Tsutsusi	From Genbank	AF285847
<i>R. simsii</i> Planch.	Tsutsusi	Tsutsusi	From Genbank	AF285848
<i>R. tsusiophyllum</i> Sugim.	Tsutsusi	Tsutsusi	From Genbank	X97428
<i>R. tashiroi</i> Maxim	Tsutsusi	Tsutsusi	RBGE19931410	AF393417
<i>R. mariesii</i> Hemsl. & Wils.	Tsutsusi	Brachycalyx	From Genbank	AF285844
<i>R. reticulatum</i> D. Don ex G. Don	Tsutsusi	Brachycalyx	From Genbank	X96808
<i>R. wadatum</i> Makino	Tsutsusi	Brachycalyx	From Genbank	X96807
<i>R. luteum</i> Sweet	Pentanthera	Pentanthera	From Genbank	X96814
<i>R. molle</i> (Bl.) G. Don	Pentanthera	Pentanthera	From Genbank	X97425
<i>R. cuspidense</i> (L.) Torr.	Pentanthera	Rhodora	From Genbank	X96811
<i>R. schlippenbachii</i> Maxim	Pentanthera	Scandorhodon	From Genbank	X96810
<i>R. redoubtanum</i> Maxim	Therorhodon		L. M. Gao 20046	AF393418

1.3 序列分析及系统树的构建

本文测定的序列和从 Genbank 获得的序列经 DNASTAR 软件排序后, 以叶状苞杜鹃为外类群, 用 PAUP4.0 软件进行系统发育分析。最大简约树采用启发式搜索 (Heuristic search), 获取严格一致树。用 Bootstrap 分析 (1000 replications) 检验简约树中各分支的内部支持率。

2 实验结果

本文测得 2 种杜鹃花的 ITS 区序列和从 Genbank 获得的 15 种杜鹃花的 ITS 区序列的长度范围为 642 - 645bp。Gap 做为缺失处理时, ITS 区全序列排序后的长度为 653 位点, 其中有 43 个变异位点, 24 个为系统发育的信息位点, 分别占 6.58% 和 3.68%; ITS1 的长度范围为 253 - 256bp, 排序后长度为 261 位点, 变异位点占 9.96%, 信息位点占 4.60%; ITS2 的长度范围为 225 - 226bp, 排序后长度为 228 位点, 变异位点占 7.46%, 信息位点占 5.26%; 5.8S rDNA 长度均为 164bp, 无碱基差异。17 种杜鹃花 ITS1 和 ITS2 的长度和 G + C 含量见表 2。

排列后的序列经 PAUP4.0 软件分析得到的 17 种杜鹃花间的相对遗传距离和绝对遗传距离见表 3。3 个亚属间的相对遗传距离为 3.286% ~ 5.00%, 杜鹃属内种间的相对遗传距离为 0.156% ~ 5.00%, 映山红亚属内种间的相对遗传距离为 0.156% ~ 2.804%。

以叶状苞杜鹃为外类群, 用最大简约法 (启发式搜索) 获得 15 个最大简约树, 树长为 75 步, 一致性指数 (CI) 和维持性指数 (RI) 值分别为 0.9333 和 0.9515, 利用 15 个最简约树获取严格一致树。Bootstrap 分析获得各分支的支持强度, 结果见图 1。映山红亚属聚为一支, 形成一单系类群, 其靴带支持率为 81%, 在映山红组内, *R. tsusiophyllum* 与本组其它种类聚为一支, 具有 100% 的内部支持率; *R. tashiroi* 则与轮生叶组聚为一支, 支持强度为 79%。大字杜鹃形成映山红亚属的姐妹群, 内部支持率为 75%。羊躑躅亚属的 Sect. *Pentanthera* 和 Sect. *Rodora* 聚为一支, 靴带支持率为 98%, Sect. *Rodora* 的内部支持率为 86%。

表 2 各类群的 ITS1 和 ITS2 的长度和 G+C 含量

Table 2 The size and G+C content of ITS1 and ITS2 of the ten species of *Rhododendron* used in present study

Species	ITS-1		ITS-2	
	Size (bp)	G+C (%)	Size (bp)	G+C (%)
<i>R. kiusianum</i> Makino	253	51.38	226	58.41
<i>R. oldhamii</i> Maxim.	253	51.38	226	58.41
<i>R. kaempferi</i> Planch.	253	51.38	226	58.41
<i>R. simsii</i> Planch.	253	51.38	226	58.41
<i>R. breviperulatum</i> Hayata	253	51.38	226	58.85
<i>R. longiperulatum</i> Hayata	253	51.38	226	58.85
<i>R. lasiophyllum</i> Hayata	253	50.99	226	58.85
<i>R. tsusiophyllum</i> Sugim	255	51.37	226	57.52
<i>R. tashiroi</i> Maxim	254	52.36	225	58.22
<i>R. mariesii</i> Herndl. & Wils.	254	52.36	225	56.89
<i>R. wadanum</i> Makino	254	52.76	225	58.22
<i>R. reticulatum</i> D. Don ex G. Don	254	52.76	225	58.22
<i>R. luteum</i> Sweet	253	52.17	226	57.96
<i>R. molle</i> (Bl.) G. Don	255	52.94	226	57.96
<i>R. canadense</i> (L.) Torr.	253	51.78	225	56.89
<i>R. schlippenbachii</i> Maxim	254	50.79	225	56.00
<i>R. redowskianum</i> Maxim	256	52.34	225	58.22

3 讨论

3.1 映山红亚属组间的系统关系

本文的 ITS 分析表明, 映山红亚属是一个单系类群, 其内部支持率为 81%, 这一结果同样得到叶绿体 *matK* 基因序列分析的支持 (Kurashige 等, 1998)。Sleumer (1949, 1980) 根据常绿或落叶、叶在枝顶假轮生或散生, 单型叶或二型叶以及毛被等特征, 将该亚属分为 3 个组, 即映山红组、轮生叶组和假映山红组。假映山红组则介于映山红组和轮生叶组之间, 如: 叶常绿, 被扁平糙伏毛等为映山红组的特征; 单型叶, 叶在枝顶轮生等性状为轮生叶组的特征。

Chamberlain and Rae (1990) 对映山红亚属修订时, 强调了小枝被扁平糙伏毛, 叶常绿等性状, 将单型组假映山红组中的 *R. tashiroi* 归并到映山红组, 映山红亚属分为轮生叶组和映山红组两个组。本文 ITS 序列分析的结果支持将映山红亚属分为两个组的观点。由图 1 可知, 在映山红亚属内聚为两个分支, 一支为映山红组, 靴带支持率为 100%; 另一支包括轮生叶组和 *R. tashiroi* (Sleumer 分类系统中的假映山红组), 内部支持率为 79%, *R. tashiroi* 并没有形成单独的分支, 不支持将 *R. tashiroi* 独立成假映山红组的观点。这一结果与 Kurashige 等 (1998) 基于 *matK* 的序列的分析结果一致。Sleumer 将本亚属分为 3 个组的观点未能得到支持。

3.2 *R. tsusiophyllum* 和 *R. tashiroi* 的系统位置

R. tsusiophyllum 由于花药顶端垂直开裂, 子房 3 室等特征, 一直被分类学家认为是一个独立的属 *Tsusiophyllum* (Stevens, 1971; Judd & Kron, 1990; Yamazaki, 1996)。Chamberlain and Rae (1990) 根据本种具有扁平糙伏毛, 花芽与叶芽出自同一顶芽等共同特征, 将 *R. tsusiophyllum* 归并到映山红亚属映山红组内。由图 1 可知, 映山红组的种类聚为一支, 内部支持率为 90%, *R. tsusiophyllum* 与映山红组形成姐妹群, 靴带支持率为 100%, 强烈

表 3 类群间的遗传距离
Table 3 Pairwise distances between taxa used in the present study

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1 <i>R. haenkei</i>	-	0.00311	0.00622	0.00622	0.00467	0.00467	0.00622	0.01244	0.02181	0.02804	0.02336	0.02336	0.03432	0.03432	0.03583	0.04361	0.05000
2 <i>R. kusistanum</i>		-	0.00311	0.00311	0.00156	0.00156	0.00311	0.00933	0.01869	0.02492	0.02025	0.02025	0.03120	0.03120	0.03271	0.04050	0.04688
3 <i>R. oldhamii</i>			-	0.00311	0.00156	0.00467	0.00311	0.01244	0.02181	0.02804	0.02336	0.02336	0.03432	0.03432	0.03583	0.04361	0.04688
4 <i>R. lasiocalyx</i>				-	0.00156	0.00467	0.00311	0.00933	0.01869	0.02492	0.02025	0.02025	0.03120	0.03120	0.03271	0.04050	0.04375
5 <i>R. longiperilatum</i>					-	0.00311	0.00156	0.01089	0.02025	0.02648	0.02181	0.02181	0.03276	0.03276	0.03427	0.04206	0.04531
6 <i>R. simsii</i>						-	0.00467	0.01089	0.02025	0.02648	0.02181	0.02181	0.03276	0.03276	0.03427	0.04206	0.04844
7 <i>R. breviperculatum</i>							-	0.01244	0.02181	0.02804	0.02336	0.02336	0.03432	0.03432	0.03583	0.04361	0.04688
8 <i>R. tsusisophyllum</i>								-	0.02022	0.02644	0.02177	0.02177	0.03120	0.03120	0.03271	0.04050	0.04531
9 <i>R. ussuri</i>									-	0.00622	0.00156	0.00156	0.02496	0.02496	0.02336	0.03115	0.03750
10 <i>R. mariesii</i>										-	0.00778	0.00778	0.02808	0.02496	0.02648	0.03427	0.04062
11 <i>R. ussuriense</i>											-	0.00311	0.02652	0.02340	0.02492	0.03271	0.03906
12 <i>R. reticulatum</i>												-	0.02340	0.02028	0.02181	0.02960	0.03594
13 <i>R. schlippenbachii</i>													-	0.02496	0.02648	0.03432	0.03906
14 <i>R. luteum</i>														-	0.00311	0.01560	0.03286
15 <i>R. molle</i>															-	0.01713	0.03438
16 <i>R. curvibrise</i>																-	0.04219
17 <i>R. redoukianum</i>																	-

Below diagonal: Total character differences; Above diagonal: Mean character differences

下面为绝对遗传距离;上面为相对遗传距离

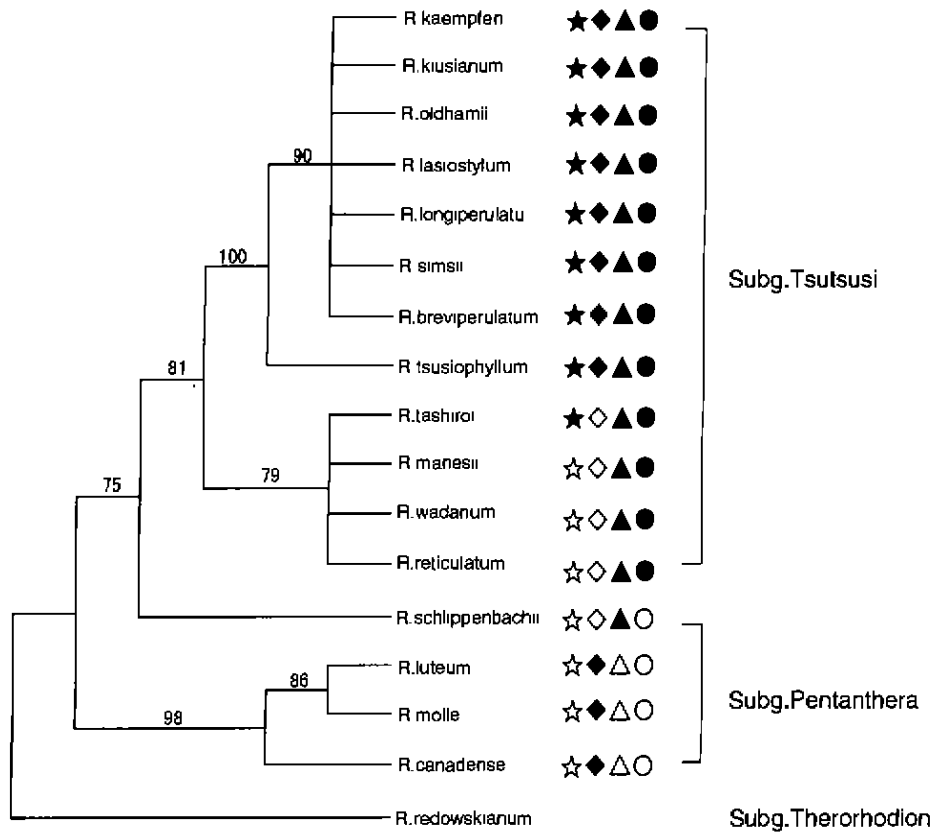


图 1 以叶状苞杜鹃为外类群, 基于 ITS 区序列分析得到的 15 个最简约树的严格一致树。

Fig. 1 the strict consensus of 15 most parsimony trees base on ITS sequences. Length = 75; CI = 0.9333; RI = 0.9515; Bootstrap values (%) above branches by 1000 replicate. ★ evergreen; ☆ deciduous; ◆ scattered leaf, ◇ pseudo-whorl leaf; ▲ mixed bud; △ terminal bud; ● glandular hairs on ovary; ○ glandular hairs on ovary

支持将 *R. tsusiophyllum* 归并到映山红组的观点, 这一观点同样得到 matK 基因序列分析的支持 (Kron, 1997; Kurashige 等, 1998)。从 ITS 长度和 G + C 含量看, *R. tsusiophyllum* 与映山红组的其它种类相比, ITS1 虽多 2 个碱基, 但 G + C 含量却非常一致, ITS2 的长度相同, 均为 226bp, G + C 含量也较一致 (表 2), 也支持将 *R. tsusiophyllum* 归并到映山红组。*R. tsusiophyllum* 的花药垂直开裂和子房 3 室可能与杜鹃属的花药顶孔开裂, 子房 5 室可能为同源异形现象。

R. tashiroi 的系统位置一直存在争议, Sleumer (1980) 认为 *R. tashiroi* 具有映山红组和轮生叶组的某些特征, 建立了假映山红组。Chamberlain and Rae (1990), Chamberlain 等 (1996) 强调了叶常绿, 具扁平糙伏毛等特征, 将该种归并到映山红组内; 而 Yamazaki (1996) 根据 (2-) 3 叶轮生枝顶, 菱形叶, 叶被长柔毛等特征将 *R. tashiroi* 放到轮生叶组内。从严格一致树可见, *R. tashiroi* 与轮生叶组聚为一支, 其内部支持率为 79%, 支持将 *R. tashiroi* 归并到轮生叶组中, 而不支持将该种并入映山红组中。从 ITS 长度和 G + C

含量看, *R. tashiroi* 的 ITS1 和 ITS2 的长度和轮生叶组中的 3 个种相同, 且 G + C 含量也非常一致, 而与映山红组的 ITS 长度和 G + C 含量不同, 也支持了 Yamazaki 等 (1996) 将 *R. tashiroi* 并入轮生叶组中的观点。

3.3 大字杜鹃的系统位置

大字杜鹃分布在我国东北、朝鲜和俄罗斯远东地区, 由于它兼有映山红亚属轮生叶组和羊躑躅亚属的某些特征, 其系统位置一直存在争议。Sleumer (1949; 1980) 根据叶在枝顶假轮生, 叶芽和花芽出自同一花芽等特征, 将该种放入轮生叶组; Judd and Kron (1995) 则强调了子房被腺体毛, 5 叶假轮生枝顶, 不含棉花苷 (gossypetin) 等特征将大字杜鹃转移到羊躑躅亚属 Sect. *Sciadorhodion* 中。从 ITS 长度看, 大字杜鹃与轮生叶组中的 3 种杜鹃的 ITS1 和 ITS2 的长度相同, 但 G + C 含量有一定的差异。由图 1 可见, 大字杜鹃形成映山红亚属的姐妹群, 支持率为 75%, 而没有与轮生叶组聚为一支, 不支持将该种放到轮生叶组中的观点。然而大字杜鹃也没有与羊躑躅亚属的两个组聚为一支, 也不支持将该种归并到羊躑躅亚属的观点。从本文的结果看, 大字杜鹃与映山红亚属可能有较近的亲缘关系, 但该种又具羊躑躅亚属的某些特征, 提示了映山红亚属与羊躑躅亚属之间的某些联系。通过对本文结果的分析认为, 大字杜鹃可能是较为孤立的类群, 对于大字杜鹃的系统位置在本文中未能得到很好地解决, 还需要结合更多的证据, 做进一步的研究。

致谢 英国爱丁堡皇家植物园的 David Paterson, Tony Garn 和 P. Ashby, 中科院沈阳应用生态研究所树木园陈玮副研究员提供部分实验材料; 中国科学院昆明植物所方瑞征教授在完成本文的过程中给予指导和帮助; 本实验室的陈永燕、田欣、郭振华等在分子实验中给予支持和帮助。

[参 考 文 献]

- 何明友, 方明渊, 胡文光等, 1994. 中国植物志第 57 卷 (第 2 分册) [M]. 北京: 科学出版社
- Baldwin BG, Sanderon MJ, Potrer JM, et al. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny [J]. *Ann Missouri Bot Gard*, **82**: 247—277
- Chamberlain DF, Rae SJ. 1990. A revision of *Rhododendron* IV [J]. *Edin J Bot*, **47**: 89—200
- Chamberlain DF, Hyau R, Argent G, et al. 1996. The Genus *Rhododendron*, Its Classification and Synonymy [M]. Edinburgh: Roy Bot Gard Edinburgh
- Doyle J, Doyle J. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochemical Bulletin*, **19**: 11—15
- Hong YP (洪亚平), Chen ZD (陈之端), Lu AM (路安民), 2001. Phylogeny of the tribe Merispermaceae (Merispermaceae) reconstructed by ITS sequence data [J]. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **39** (2): 97—104
- Judd WS, Kron KA. 1995. A revision of *Rhododendron* VI. Subgenus *Pentstemon* (sections *Sciadorhodion*, *Rhodora* and *Viscidula*) [J]. *Edin J Bot*, **52**: 1—54
- Kron KA, Judd WS. Phylogenetic relationships within the *Rhodoreae* (Ericaceae) with specific comments on the placement of *Ladum* [J]. *Syst Bot*, **15** (1): 57—68
- Kron KA et al. 1999. Phylogenetic relationships of *epacrids* and *vaccinioids* (Ericaceae s. l.) based on *matK* sequence data [J]. *Plant Syst Evol*, **218**: 55—65
- Kron KA. 1997. Phylogenetic relationships of *Rhododendroideae* (Ericaceae) [J]. *Amer J Bot*, **84** (7): 973—980
- Kron KA, Judd WS, Gray DM. 1999. Phylogenetic analyses of *Andromedeae* (Ericaceae subfam. *Vaccinioidae*) [J]. *Amer J of*

- Bot*, **86** (9): 1290—1300
- Kron KA, King JM. 1996. Cladistic relationships of *Almia*, *Leiophyllum*, and *Loiseleuria* (Phyllocladaceae, Ericaceae) based on *rbcL* and nrITS data [J]. *Systematic Botany*, **21** (1): 17—29
- Kurashige Y, Mine M, Kobayashi N, et al. 1998. Investigation of relationships in the genus *Rhododendron* (Ericaceae) based on *matK* sequences [J]. *J Jpn Bot*, **73**: 143—154
- Philipson MN, Philipson WR. 1982. A preliminary synopsis of the genus *Rhododendron* III [J]. *Notes RBG Edinb*, **40** (1): 225—227
- 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 QL (史全良), Zhuge Q (诸葛强), Huang MR (黄敏仁) et al. 2001. Phylogenetic relationship of *Populus* sections by ITS sequence analysis [J]. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **43** (3): 323—325
- Sleumer H. 1949. Ein system der gattung *Rhododendron* L. [J]. *Bot Jahrb Syst*, **74**: 511—553
- Sleumer H. 1980. Past and present taxonomic systems of *Rhododendron*. Based on macromorphological characters. In: Lutey JL, O'Brien ME (eds.), *Contributions Toward a Classification of Rhododendron* [M]. New York: New York Bot Gard. 19—26
- Stevens PF. 1971. A classification of the Ericaceae: subfamilies and tribes [J]. *Bot J Linn Soc*, **64**: 1—53
- Wang JB (王建波), Zhang WJ (张文驹), Chen JK (陈家宽). 1999. Application of ITS sequences of nuclear rDNA in phylogenetic and evolutionary studies of angiosperms [J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报), **37** (4): 407—416
- Wang XQ (汪小全), Deng ZR (邓峥嵘), Hong DY (洪德元). 1998. The systematic position of *Beesia*: Evidence from ITS (nrDNA) sequence analysis [J]. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **36** (5): 403—410
- White TJ, Bruns T, Lee S, et al. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky, et al., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Application* [M]. San Diego, California: Academic Press, 315—322
- Yamazaki T. 1996. A Revision of the Genus *Rhododendron* in Japan, Taiwan, Korea and Sakhalin [M]. Tokyo: Tsurura Laboratory