

新变种上犹杜鹃的 ITS 分子标记证据分析

刘仁林, 曹利民, 肖红

(赣南师范学院 化学与生命科学学院, 江西 赣州 341000)

摘要: 对杜鹃花科杜鹃属的新变种上犹杜鹃进行了 ITS 分子标记分析。结果表明:(1)上犹杜鹃与原变种毛果杜鹃在系统树上没有聚合为一支;(2)上犹杜鹃 ITS 序列密码子第二位上的 G+C 含量与原变种毛果杜鹃差异明显,而且编码位上的 G+C 含量(G+Cc)也与原变种毛果杜鹃有差异;(3)上犹杜鹃与原变种毛果杜鹃的形态特征有明显的区别,并具间断性特征;(4)密码子偏向性指数 CBI 分析正好反映了上犹杜鹃处于“变种”等级阶段的特点。基于这些证据,认为上犹杜鹃处理为种以下等级“变种”比较合理。

关键词: 杜鹃属; 新变种; ITS 证据

中图分类号: Q949.772.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)05-0576-05

Analysis of the evidences of ITS from a new variety *Rhododendron seniavinii* var. *shangyounicum*

LIU Ren-Lin, CAO Li-Min, XIAO Hong

(Department of Chemistry and Life Science, Gannan Normal College, Ganzhou 341000, China)

Abstract: *Rhododendron seniavinii* var. *shangyounicum* is a new variety, which belongs to the family Ericaceae and genus *Rhododendron*. As to make classification of this new variety more true, many evidences of ITS has been studied in this paper and the results are as follows: (1) Based on the strict consensus and most parsimonious tree of ITS sequences, *Rh. seniavinii* var. *shangyounicum* has not been clustered with *Rh. seniavinii* var. *seniavinii*; (2) G+C content at second codon positions (G+C2) is more different *Rh. seniavinii* var. *shangyounicum* and *Rh. seniavinii* var. *seniavinii*, and G+C content at coding positions (G+Cc) also is different between them; (3) morphologic characters between this two taxa is clearly different by some intermittent characters; (4) Codon Bias Index CBI shows features of a new variety *Rh. seniavinii* var. *shangyounicum* which is in evolving. According to the evidences above, it is reasonable that *Rh. seniavinii* var. *shangyounicum* should be treated as a variety.

Key words: *Rhododendron*; new variety; evidences of ITS

杜鹃属 (*Rhododendron*) 是杜鹃花科 (Ericaceae) 一个种类丰富的属, 1000 余种 (David 等, 1959), 属典型的北温带分布类型 (闵天禄等, 1979)。中国杜鹃属约 542 种 (何明友等, 1999), 主要分布于我国西南地区。上犹杜鹃 (*Rhododendron seniavinii* var. *shangyounicum*) 系杜鹃花科杜鹃属植物, 主要分布在江西上犹、崇义以及湖南汝城、桂东等县, 海拔 600~1100 m, 生长于林区路边或疏林内, 它与原变

种在形态上有明显区别。为了使分类证据充分、可信、可靠, 对上犹杜鹃和毛果杜鹃原变种 (*Rh. seniavinii* var. *seniavinii*) 以及相关类群进行 ITS 分子标记实验分析。ITS 是核糖体 DNA (nrDNA) 的内转录间隔区, ITS 序列可以提供丰富的信息位点, 目前被广泛应用于植物进化与系统分析, 符合较低阶元系统分析的要求 (田欣等, 2002)。

收稿日期: 2008-05-20 修回日期: 2009-02-17

基金项目: 教育部科技基础条件平台子专题 (505002) [Supported by Basic Research and Development Plan of Education Department of China (505002)]

作者简介: 刘仁林 (1958-), 男, 江西永新人, 教授, 研究方向为植物分类学, (E-mail) lrlldongh@126.com.

1 研究方法

1.1 分子标记 ITS

1.1.1 取样 映山红亚属(subg. *Tsutsusi*)取样 8 种(含种以下等级),其它亚属的类群取样 2 个种:即云锦杜鹃(*Rhododendron fortunei*)、羊躑躅(*Rh. molle*)。所取样的器官为新叶,即展叶后 2~3 个月,立即用硅胶保存,带回实验室后迅速放入-70 °C 的超低温冰箱保存。每个种在同一地区,对映山红亚属,每个种分为海拔高、中、低三种类型,每种类型选择 1 个群落各取 3 株,其它亚属的云锦杜鹃、闹羊花每个群落取 1 株,每个种在同地区分别 3 个群落各取 1 株,混合后提取 DNA。所采标本保存在江西农业大学标本馆(JXAU)。取样主要考虑三个方面:(1)外推类群的选择:云锦杜鹃同属于杜鹃属,分布较普遍,采样方便;其次云锦杜鹃是常绿杜鹃亚属(subg. *Hymenantes*)的类群,常绿杜鹃亚属在系统发育中处于原始地位,其中云锦杜鹃亚组(subsect.

Fortunea)、耳叶杜鹃亚组(subsect. *Auriculata*)、大叶杜鹃亚组(subsect. *Grandla*)和杯毛杜鹃亚组(subsect. *Falconera*)是原始类群的直接后裔(方瑞征等,1995),因此采用云锦杜鹃作外推类群比较合适。(2)在较近缘的类群中取样:首先对毛果杜鹃原变种取样并采集标本。毛果杜鹃原变种的等模式标本(存放于中国科学院北京植物研究所)采自福建(Chamberlain 等,1990),湖南也有分布(Stevenison, 1930),因此通过等模式的查阅和研究,到福建对毛果杜鹃原变种进行采集、取样。其次,对映山红亚属的映山红组(sect. *Tsutsusi*)取样:即映山红(*Rh. simsii*)、背绒杜鹃(*Rh. hypoblematosum*)、乳源杜鹃(*Rh. rhuyuenense*)、湖南杜鹃(*Rh. hunanense*)4 个种和上犹杜鹃;对映山红亚属轮叶组(sect. *Brachycalyx*)的取样为 2 个种:满山红(*Rh. mariesii*)和华丽杜鹃(*Rh. farrerae*)。(3)适当扩大取样范围,即选择与映山红亚属较近缘的羊躑躅亚属(subg. *Pentanthera*)的羊躑躅取样;另外,映山红的取样增加了取样地点,分别在福建戴云山、江西寻邬和广东南昆山取样。共

表 1 样本来源

Table 1 Resource of materials for experiment

类群 Taxon	采集地点 Location	海拔 Elevation (m)	生境 Habitat	凭证标本 Voucher
华丽杜鹃 <i>Rh. farrerae</i>	江西寻邬县中和	310,500,800	路边灌丛	L 05015
满山红 <i>Rh. mariesii</i>	江西上犹县营盘山	980,500,1 200	路边灌丛	L 05014
云锦杜鹃 <i>Rh. fortunei</i>	广东乳源保护区	1 670,1 200,1 400	路边灌丛	L 05011
映山红 <i>Rh. simsii</i> (1)	江西寻邬县留车	360,500,800	路边灌丛	L 05016
映山红 <i>Rh. simsii</i> (2)	福建德化戴云山	560,800,1 000	路边灌丛	L 05008
映山红 <i>Rh. simsii</i> (3)	广东南昆山	490,800,1 000	路边灌丛	L 050036
背绒杜鹃 <i>Rh. hypoblematosum</i>	江西井冈山	647,800,1 000	路边灌丛	L 050020
湖南杜鹃 <i>Rh. hunanense</i>	江西齐云山保护区	1 098,600,800	山坡灌丛	L 050027
毛果杜鹃(原变种) <i>Rh. seniaivinii</i> var. <i>seniaivinii</i>	福建德化戴云山	890,500,1100	路边灌丛	L 050028
乳源杜鹃 <i>Rh. rhuyuenense</i>	江西上犹营盘山	1 030,900,800	山坡灌丛	L 050029
上犹杜鹃 <i>Rh. seniaivinii</i> var. <i>shangyounicum</i>	江西上犹营盘山	900,600,1 100	山坡灌丛	L 050034
闹羊花 <i>Rh. molle</i>	江西井冈山	580,700,800	荒山灌丛	L 050033

取 10 个种(含种以下等级)的样本(表 1)。

1.1.2 实验方法 DNA 的提取:取硅胶保存的植物叶片约 0.1 g,采用改良的 CTAB 法(Doyle JJ & Doyle JL, 1987)提取总 DNA 并测序(邹喻莘等, 2001)。具体操作方法:(1)硅胶上取出 0.5 g 干燥的组织,在液氮中迅速研磨,使成糊状或粉状,在研磨时即时加入少许抗坏血酸钠和 PVP 干粉;(2)将糊状物转入 5 mL 离心管(聚苯乙烯管,耐氯仿)后,加入 5~10 mL 65 °C 的 2×CTAB 提取介质(100 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 2% CTAB, 0.1%~2% β-巯基乙

醇),放入 65 °C 水浴保温 30~60 min,开启摇动阀维持缓慢摇动;(3)加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1),缓慢翻转离心管使内含物充分混匀后形成乳油液,在 6 000 g 离心 10 min 使分层,取出水相转入另一离心管;(4)重复第 3 步,即再用氯仿/异戊醇(24:1)抽提 1 次;(5)在两次抽提的水相中加入 2/3 体积冰冷的异丙醇,置于-20 °C 30 min 或过夜。然后在 10 000 g 离心 10 min 收集沉淀,在室温下自然风干 4~5 min;(6)将此沉淀溶于合适体积的(200 μL)0.1 TE 缓冲液(1.0 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 0.1 mmol EDTA pH8.0),加入 2~3 μL RNase A

储备液(10 mg/mL),在 37 °C 保温 1 h 以裂解 RNA;(7)保温后用等体积的氯仿/异戊醇(24:1)再抽提一次,将水相转入另一 1.5 mL 离心管,加入 1/5 体积 10 mol/L 的 NH₄(使其总浓度为 2 mol/L),然后加入两体积冰冷 95%乙醇,在 -20 °C 放置至少 30 min;(8)再 10 000 g 离心 10 min,收集沉淀;(9)加入 70%乙醇洗沉淀(10 000 g 离心 10 min)去除残留的无机离子,在室温下自然风干直至沉淀无乙醇味,如果沉淀过干则难以溶解;(10)溶入适量的(200~300 μL/g 新鲜组织)0.1TE 缓冲液,分装后放入 -20 °C 储存或放入 4 °C 冰箱待用。

PCR 扩增和测序:在 Perkin Elmer 960 型 PCR 仪上进行 PCR 扩增,引物为 White(1990)的引物,PCR 条件:97 °C 预变性 4 min,94 °C 变性 1 min,50 °C 退火 1.5 min,72 °C 延伸 2 min,30 个循环,扩增后用 Watson 公司纯化试剂盒进行纯化。依据双脱氧链终止法(Sanger 等,1977)的原理在 960 型 PCR 仪上进行测序反应,反应条件为:96 °C 变性 10 s,50 °C 退火 5 s,60 °C 延伸 4 min,30 个循环,反应体系为 5 μL,所得产物经热变性后于 ABI310 型自动测序仪上进行序列测定。完成测序后进行序列校正,然后通过互联网进入 Genbank,找出同源性最高的序列,应用 Blast 进行比对,确定 ITS1、5.8S 和 ITS2 的区间位点,并用 DNASP 进行序列特征分析。引物序列:ITS“4”(Sequence 5' to 3') TCCTCCGCT-TATTGATATGC; ITS“5”(Sequence 5' to 3') GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG;引物作用方为:ITS“5”由 18 s 与 ITS1 交界区→ITS1→5.8 s→ITS2→26 s 与 ITS2 交界区;ITS“4”由 26 s 与 ITS2 交界区→ITS2→5.8 s→ITS1→18 s 与 ITS1 交界区。序列经校正、对比等,得到如下结果。

2 结果与分析

采用 Clustalx 1.83 软件对序列进行对准排序,以云锦杜鹃为外推类群,应用 Paup 4.0b10 软件(Swofford,2001),对 10 种(包括种以下等级)的 ITS 序列进行分析。设置最大简约法和启发式搜索(Heuristic search)获得 1 个最简约树的严格一致树(图 1),并用靴带法(Bootstrap analysis,1000 replicate)分析、检验简约树中各分支的支持率。ITS 序列长度范围是 638~659 bp(表 2),5.8S 均为 164 位点。空位(gap)作缺失处理,ITS 区序列有 23 个变

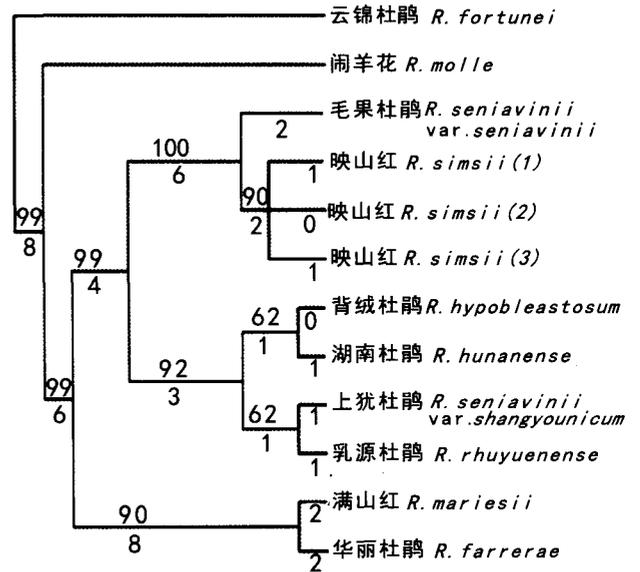


图 1 空位作缺失处理时用 Paup 软件得到的映山红亚属与其它类群 ITS 序列分析最简约树的严格一致树

Fig. 1 Strict consensus and most parsimonious tree of ITS sequences by Paup

步长为 50,分支横线上面的数值为靴带支持率,下面的数值为步长;CI=0.96,HI=0.0000,RI=0.96.

tree length=50, the number above the lines of branches are bootstrap value(%), the number below the lines of branches are steps of branches; CI=0.96, HI=0.0000, RI=0.96.

异位点,24 个系统发育的信息位点。由表 2 可知,所取样本的 5.8S 序列都为 164 个 bp,比较稳定;云锦杜鹃、闹羊花的序列较长,分别为 650 bp 和 659 bp。此外,应用 Dnasp4.10 软件(Julio 等,2006)分析各样本的 G+C 含量(表 2),其中:G+C₂为密码子第二位上的 G+C 含量;G+C_{3s}为密码子(同义密码子)第三位上的 G+C 含量;G+C_c为编码位(coding positions)上的 G+C 含量;G+C 为各样本 ITS1 与 ITS2 及 5.8s 的总 G+C 含量。CBI 为密码子偏向性指数。

2.1 最简约树的严格一致树的分析

由图 1 可知,上犹杜鹃没与毛果杜鹃原变种聚合在一起,而与乳源杜鹃聚合为一支。这说明上犹杜鹃的 ITS 基因序列与毛果杜鹃原变种有明显差异,换句话说,上犹杜鹃与毛果杜鹃原变种的差异是建立在基因序列差异的分子基础之上,因此支持把上犹杜鹃作为种以下等级“变种”处理。说明了映山红亚属的映山红组和轮叶组分别聚为两支,高连明等(2002)对映山红亚属组间关系的 ITS 分析也得到同样的结果,在形态上轮叶组的类群均以叶轮生

或对生明显区别于映山红组, 因此支持在映山红亚属中成立这两个组的形态分类处理(何明友等, 1994)。

由图 1 还可知, 上犹杜鹃没与毛果杜鹃原变种聚合在一起, 而与乳源杜鹃聚合为一支, 这与杜鹃花属中有些类群是天然杂交起源有一定的联系(闵天禄等, 1990)。由于杜鹃属植物寿命较长, 风媒异花授粉, 结实量大, 基因交流频繁, 种间杂合度较高, 据测定, 种间杂合基因多样化比率达 0.683(高连名等, 2000), 因此, 上犹杜鹃可能是天然杂交起源的类群之一。图 1 表明, 映山红这个种 3 个跨省区的样

本依然聚合在一个分支, 说明杜鹃属虽然种间杂合性较高, 但种内却保持着一定的稳定性, 原因是杜鹃属植物寿命较长、风媒异花授粉、结实量大、基因交流频繁等特点有利于种内维持低水平的群体遗传分化和高水平的种间遗传分化(高连名等, 2000)。高水平的种间遗传分化有利于物种形成, 种内低水平的群体遗传分化又是物种性状稳定、清晰可辨的基础, 因此杜鹃属的这一特点又在一定程度上反映了杜鹃属之所以种类繁多、而种间形态上依然清晰可辨的分子基础, 图 1 中映山红组和轮叶组明显地聚为两支也是杜鹃属这一规律的反映。

表 2 各样本 ITS1、ITS2、5.8S 的长度和基因分析

Table 2 Length of ITS1, ITS2, 5.8S of samples and their gene analysis

类群 Taxa	分析指标 Items of analysis							
	ITS1(bp)	ITS2(bp)	5.8S(bp)	G+C2	G+C3s	G+Cc	G+C	CBI
华丽杜鹃 <i>Rh. farrerae</i>	227	255	164	0.527	0.518	0.551	0.541	0.260
满山红 <i>Rh. mariesii</i>	225	254	164	0.527	0.518	0.553	0.543	0.270
云锦杜鹃 <i>Rh. fortunei</i>	233	253	164	0.527	0.518	0.548	0.534	0.272
映山红 <i>Rh. simsii</i> (1)	226	248	164	0.522	0.523	0.550	0.536	0.275
映山红 <i>Rh. simsii</i> (2)	226	248	164	0.522	0.528	0.552	0.538	0.285
映山红 <i>Rh. simsii</i> (3)	226	253	164	0.521	0.523	0.548	0.535	0.289
背绒杜鹃 <i>Rh. hypoblematosum</i>	226	253	164	0.529	0.523	0.554	0.540	0.271
湖南杜鹃 <i>Rh. humanense</i>	226	253	164	0.529	0.523	0.552	0.538	0.263
毛果杜鹃(原变种) <i>Rh. seniavinii</i> var. <i>seniavinii</i>	226	254	164	0.517	0.533	0.553	0.540	0.291
乳源杜鹃 <i>Rh. rhuuyenense</i>	225	253	164	0.520	0.523	0.552	0.538	0.261
上犹杜鹃 <i>Rh. seniavinii</i> var. <i>shangyounicum</i>	226	253	164	0.525	0.523	0.554	0.540	0.255
闹羊花 <i>Rh. molle</i>	235	260	164	0.531	0.522	0.552	0.544	0.280

聚为两支也是杜鹃属这一规律的反映。

2.2 基因分析

由表 2 分析可知, 同一个种不同地理区域的样本 G+C2 含量变化不大, 如表 2 中映山红(1)、映山红(2)和映山红(3)之间的 G+C2 含量差异很小。但是, 上犹杜鹃 ITS 序列密码子第 2 位上(G+C2)的 G+C 含量为 0.525, 与原变种毛果杜鹃(0.517)相差 0.008(即 0.8%), 差异明显。由于密码子第二位上的碱基替换都能表达为氨基酸取代的替换, 因而具有进化意义。由此可知, 上犹杜鹃具有明显的基因序列差异的遗传基础。这个结论在分子水平上提供了上犹杜鹃可以作为种以下等级处理的重要依据。此外, 表 2 中上犹杜鹃 ITS 序列编码位(coding positions)上的 G+C 含量(G+Cc)为 0.554, 原变种毛果杜鹃为 0.553, 二者差异达到 0.1%, 一般而言, ITS 序列编码位上的碱基替换可以引起氨基酸取代(黄原, 1998), 成为信号位点, 这又说明了上犹杜鹃作为新变种分类等级的合理性。

密码子第三位上的替换多数为同义替换, 这使序列中密码子第三位碱基组成很快趋于随机化, 从而使这一位点成为无信号位点, 因此 G+C3s 含量变化常常是引起趋同进化的原因之一, 在分类研究中应该正确识别这种趋同造成的假象。上犹杜鹃密码子第 3 位上的 G+C 含量(G+C3s)为 0.523, 12 个样本的平均值也为 0.523, 说明上犹杜鹃的趋同变异不强烈, 性状相对较稳定。

由于密码子偏向性指数 CBI 与基因表达速度呈正相关, 与核基因的进化速率呈负相关(黄原, 1998)。因此根据表 2 可知, 上犹杜鹃的 CBI 指数为 0.255, 大于原变种毛果杜鹃的 CBI(0.291), 而且是所采的 12 个样本中 CBI 指数最小的一个类群(表 2), 说明上犹杜鹃的进化速率较快, 基因表达速度较慢, 这一事实正好反映了上犹杜鹃处于“变种”等级阶段的特点, 支持把上犹杜鹃处理为种以下等级的类群。

2.3 表型形态分析

上犹杜鹃与毛果杜鹃原变种的形态特征有明显

的区别(表3),其中上犹杜鹃的花丝中部以下具白色短毛、花柱无毛是区别于原变种毛果杜鹃的间断性特征,具有明显的分类意义。上犹杜鹃主要分布于罗霄山脉中段的上犹、崇义、遂川、汝城、桂东等县,具有一定的地理分布区。因此基于形态特征分析,把

上犹杜鹃处理为种以下等级的分类群具有一定的合理性。这种形态分类的处理与前面 ITS 的分析是一致的,即图1中上犹杜鹃没有与毛果杜鹃原变种聚合在一起,反映了上犹杜鹃的分化形成具有遗传差异的分子基础,并表现出一些稳定的形态性状。

表3 上犹杜鹃与原变种毛果杜鹃的比较

Table 3 Comparison of morphologic characters between *Rh. seniavinii* var. *shangyounicum* and *Rh. seniavinii* var. *seniavinii*

类群 Taxa	花丝 Filaments	花柱 Styles	花冠裂片 Corolla	花冠筒 Tube of corolla	叶长 Length of leaves	地理分布 Geographic distribution
上犹杜鹃 <i>Rh. seniavinii</i> var. <i>shangyounicum</i>	中部以下具白色短毛	无毛	上方内向具紫红色斑点	内壁具白色短毛	2.7~8.6 cm	江西上犹、崇义
毛果杜鹃(原变种) <i>Rh. seniavinii</i> var. <i>seniavinii</i>	无毛	中部以下具毛	上方内向具紫红色斑点	外壁具白色短毛	1-6(8) cm	滇、黔、湘、赣、闽、浙

3 讨论

(1)应用 ITS 分子标记分析表明,上犹杜鹃与原变种毛果杜鹃在系统树上没有聚合为一支;基因分析也表明,上犹杜鹃 ITS 序列密码子第二位上的 G+C 含量与原变种毛果杜鹃差异明显,而且上犹杜鹃 ITS 序列编码位上的 G+C 含量也与原变种毛果杜鹃也有差异,这些结论在分子水平上提供了上犹杜鹃可以作为种以下等级处理的重要证据。此外,上犹杜鹃与原变种毛果杜鹃的形态特征有明显的区别,并具间断性特征,这与分子标记的分析结果一致。根据密码子偏向性指数 CBI 分析,上犹杜鹃的 CBI 指数大于原变种毛果杜鹃的 CBI 指数,而且是 CBI 指数最小的一个类群,说明上犹杜鹃的进化速率较快,基因表达速度较慢,这一事实正好反映了上犹杜鹃处于“变种”等级阶段的特点,充分说明把上犹杜鹃处理为种以下等级“变种”的合理性。基于上面的证据,上犹杜鹃与毛果杜鹃原变种的形态差异是奠定在基因序列差异的基础之上,因此将上犹杜鹃处理为种以下等级“变种”比较合理。

(2)ITS 分析表明:上犹杜鹃没有与毛果杜鹃原变种聚合在一起,而是与乳源杜鹃聚合为一支,这可能与杜鹃花属中有些类群是天然杂交起源有一定的联系。

(3)根据 ITS 分析,映山红这个种 3 个跨省区的样本依然聚合在一个分支以及与其它同类研究的结果一样:映山红组和轮叶组明显地聚为两支,这些事实进一步说明了杜鹃属虽然种间分化性较高,但种内却保持着一定的稳定性的特点。

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
- 黄原. 1998. 分子系统学—原理、方法及应用[M]. 北京:中国农业出版社
- 邹喻苹,葛颂,王晓东. 2001. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京:科学出版社
- Chamberlain DF, Rae SJ. 1990. A revision of *Rhododendron* IV subg. *Tsutsui*[J]. *Edinburgh J Bot*, 47(2):144-146
- David G, Leach. 1959. *Rhododendron* of the World[M]. New York, Scribners Press
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochemical Bull*, 9(1):11-15
- Fang RZ(方瑞征), Min TL(闵天禄). 1995. The floristic study on the genus *Rhododendron*(杜鹃属植物区系的研究)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), 17(4):359-379
- Gao LM(高连明), Yang JB(杨俊波), Zhang CQ(张长芹), et al. 2002. Phylogenetic relationship of subg. *Tsutsui* (*Rhododendron*) based on ITS sequences(基于 ITS 序列分析探讨杜鹃属映山红亚属的组间关系)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), 24(3):313-320
- Gao LM(高连明), Zhang CQ(张长芹), Wang ZR(王中仁). 2000. Genetic differentiation of nine species of *Rhododendron* revealed by allozyme analysis(九种杜鹃属植物的遗传分化研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 20(4):377-382
- Julio Rozas, et al. 2006. DnaSP4. 10. Universitat de Barcelona [M]. Version4. 10
- Min TL(闵天禄), Fang RZ(方瑞征). 1979. A approach to geographical distribution and origination of genus *Rhododendron*(杜鹃属的地理分布及其起源问题的探讨)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), 1(2):17-27
- Stevenson JB. 1930. The Species of *Rhododendron*[M]. London: *Rhododendron Society*, 1-120
- Swofford DL. 2001. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony[M]. Version4. 0b8. Sunderland, Sinauer Tian X(田欣), Li DZ(李德铎). 2002. Application of DNA sequences in plant phylogenetic study(DNA 序列在植物系统学研究中的应用)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), 24(2):170-184