

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.05.001

王群,李同建,韩兴杰,等. 基于低拷贝核基因 *GBBSI* 的禺毛茛复合体系统进化研究[J]. 广西植物,2014,34(5):575—581Wang Q, Li TJ, Han XJ, et al. Phylogenetic analysis of *Ranunculus cantoniensis* complex based on low-copy nuclear gene *GBBSI*[J]. *Guihaia*, 2014, 34(5):575—581

# 基于低拷贝核基因 *GBBSI* 的禺毛茛复合体系统进化研究

王 群, 李同建, 韩兴杰, 廖 亮, 徐玲玲\*

(九江学院 药学与生命科学学院, 江西 九江 332000)

**摘 要:** 禺毛茛多倍体复合体及其近缘种系统进化关系复杂, 杂交与多倍化现象同时存在。该复合体内高倍性植物的形成及扩散过程仍需进一步研究。首次克隆了毛茛属植物低拷贝核基因颗粒结合型淀粉合成酶 I (*GBBSI*) 基因, 并利用其构建禺毛茛多倍体复合体及其近缘种的系统进化树和网状进化关系, 进而证明其适合于研究毛茛属植物种下系统发育研究。结果表明: 匍枝毛茛与多倍体复合体关系密切, 参与了该多倍体复合体的起源和进化; 禺毛茛起源于茴茴蒜和卷喙毛茛, 扬子毛茛起源于茴茴蒜和匍枝毛茛; 在该类群中茴茴蒜是个关键种, 它在多倍体复合体中可能起着枢纽基因组的重要作用。

**关键词:** 禺毛茛; 多倍体复合体; 系统进化; *GBBSI*; 枢纽基因组

**中图分类号:** Q949.746    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1000-3142(2014)05-0575-07

## Phylogenetic analysis of *Ranunculus cantoniensis* complex based on low-copy nuclear gene *GBBSI*

WANG Qun, LI Tong-Jian, HAN Xing-Jie, LIAO Liang, XU Ling-Ling\*

(School of Pharmacy and Life Sciences, Jiujiang University, Jiujiang 33200, China)

**Abstract:** Evolutionary relationship of *Ranunculus cantoniensis* polyploid complex and its allied species was complicated, and hybridization and polyploidization occurred simultaneously in this complex. It was necessary to explore the speciation and dispersal processes of high-ploid taxa. First cloned partial sequence of *GBBSI* gene, then phylogenetic tree and network were constructed using the introns of *GBBSI* gene, and proved that the introns of *GBBSI* gene were suited to study phylogenetic relationship of *Ranunculus*. The results showed that *R. repens* closely associated with polyploid complex, participating in the origin and evolution of polyploid complex; *R. cantoniensis* originated from hybridization of *R. chinensis* and *R. sileriifolius* var. *sileriifolius*, *R. sieboldii* originated from hybridization of *R. chinensis* and *R. repens*, *R. repens* might originated from hybridization of *R. chinensis* and *R. sileriifolius* var. *dolicathus*; *R. chinensis* was a key species in this complex, which may play an important role as a pivotal genome.

**Key words:** *Ranunculus cantoniensis*; polyploid complex; phylogeny; *GBBSI*; pivotal genome

禺毛茛 (*Ranunculus cantoniensis*, 4x) 及其近缘种作为一个多倍体复合体由 Tamura (1978) 提出, 由 Okada (1984, 1989) 通过人工合成四倍体杂种的

方法推测禺毛茛由茴茴蒜 (*R. chinensis*, 2x) 和卷喙毛茛 (*R. sileriifolius* var. *sileriifolius*, 2x) 杂交而成。廖亮等 (1995) 通过孢粉学、同工酶、细胞学和分

收稿日期: 2013-10-27    修回日期: 2013-12-10

基金项目: 国家自然科学基金 (31260044, 31460046); 江西省自然科学基金 (2009GZN0080)。

作者简介: 王群 (1990-), 男, 江西高安人, 主要研究方向为植物分子系统学, (E-mail) 15270265054@163.com。

\*通讯作者: 徐玲玲, 教授, 研究方向为植物分子生物学, (E-mail) 13907021710@163.com。

子系统学的方法证明这禺毛茛可能由茴茴蒜和卷喙毛茛和棱喙毛茛(*R. trigonus*, 2x)通过两次杂交形成,褐鞘毛茛(*R. vaginatus*, 5x)可能由扬子毛茛(*R. sieboldii*, 6x 和 8x)和铺散毛茛(*R. diffusus*, 4x)杂交形成,并重新定义了禺毛茛多倍体复合体,认为该复合体及其近缘种包括了禺毛茛、茴茴蒜、卷喙毛茛、棱喙毛茛、长花毛茛(*R. silerifolius* var. *dolicathus*, 2x)、扬子毛茛、褐鞘毛茛、铺散毛茛;同时还指出禺毛茛复合体及其近缘种的进化关系复杂,同时存在多倍化与杂交现象形成复杂的网状结构(廖亮等, 1995, 1996, 2008; Xu *et al.*, 2013)。虽然以上研究使得该复合体及其近缘种的系统发育关系逐渐清晰,但高倍性类群如何形成和复合体的形成及扩散过程等仍然未知。

杂交和异源多倍化类群中保存着来自双亲的等位基因,可以通过双亲遗传的等位基因追溯以上类群的形成及进化过程(刘志鹏等, 2007)。在研究植物的系统演化时,使用较多的 DNA 片段为 cpDNA 序列和 nrDNA 序列。但 cpDNA 在大多数植物中是母性遗传,只能提供母系进化背景(Corriveau *et al.*, 1988)。在 nrDNA 中以转录间隔区 ITS 序列应用最为广泛,该基因进化速率较快能够应用于属下甚至个体间的系统发育研究(Yang *et al.*, 2007)。但由于该基因存在一致性进化现象,无法完全展现杂种个体的双亲遗传特征,使得该基因在研究杂交和异源多倍化类群的系统发育时受到限制(Zheng *et al.*, 2008)。低或单拷贝核基因较少受到重组影响,可较长时间保存双亲的等位基因,并且其内含子区域进化速率较快,具有丰富的系统发育信息,是研究杂交和异源多倍化类群系统发育关系的良好工具(Oh *et al.*, 2003; 刘志鹏等, 2007)。颗粒结合型淀粉合成酶 I 基因(Granule-bound starch synthase I, *GBSSI*)是常用的低拷贝核基因,*GBSSI* 基因外显子和内含子的进化速率不一致,内含子为非编码序列,受到的选择压力较小,更容易积累变异,其在蔷薇科和茄科植物系统发育中得到广泛使用(张兴伟等, 2008; Peralta *et al.*, 2001)。鉴于低拷贝核基因在杂交和异源多倍化类群系统进化研究中的优势,本研究利用低拷贝基因序列设计兼并引物,开发适用于禺毛茛多倍体及其近缘种的低拷贝核基因标记,以便对该复合体进行系统发育分析,更深入地探讨该复合体及近缘种的系统发育关系,了解多倍体类群的形成及进化过程。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验材料采集地和凭证标本号见表 1,凭证标本保存于九江学院药学与生命科学学院标本室(JJTU)。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 采用改良的 CTAB 法(Lodhi *et al.*, 1994)提取实验材料的基因组 DNA。

1.2.2 *GBSSI* 基因扩增 根据 *GBSSI* 序列,在保守区设计简并引物扩增禺毛茛 *GBSSI* 基因,获取一段初始序列。运用高效快速的 FPNI-PCR (Fusion primer and nested integrated PCR) 法扩增以获取该序列的侧翼序列(Wang *et al.*, 2011)。

1.2.3 内含子序列扩增 从已克隆到的 *GBSSI* 基因中选取部分内含子序列,在其两端的外显子序列上设计一对引物,用于扩增其它种中相对应的内含子。该引物序列为 *GBSSI*-F: 5'-TCTTCCAAT-TCTGCTTGTCGG-3', *GBSSI*-R: 5'-CTAAGG-TAGCAAGGGAGAACAACAG-3'。在 PCR 管中建立 10  $\mu$ L 反应体系,并依次加入下列组分: 10  $\times$  PCR Buffer 1  $\mu$ L, 25 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 0.6  $\mu$ L, 10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> dNTPs 0.1  $\mu$ L, 0.5 U Taq DNA 聚合酶,基因组 DNA 约 20 ng, 10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 正反向引物各 0.2  $\mu$ L, 灭菌双蒸水补齐体积。PCR 反应程序为 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.4 PCR 产物回收、克隆及测序 PCR 的产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳后,在紫外成像分析系统中完成切胶。使用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海 Sangon 生物工程公司)回收。将回收的片段连接到 pMD18-T 载体(大连 TaKaRa 生物公司)上。连接产物转化至大肠杆菌感受态细胞,经过 Amp 抗性筛选和菌落 PCR 筛选后,每个类群至少选取 20 个阳性克隆送 Sangon 公司测序。

1.2.5 数据处理及系统发育分析策略 测序数据载入 Geneious 4.8 软件(Http://www.geneious.com),去除引物和载体序列后,采用 Clustal W (Thompson *et al.*, 1994)进行序列比对。比对结果用 MEGA 5.1 (Tamura *et al.*, 2011)计算其核苷酸变异位点及简约信息位点的个数。选用贝叶斯法 (Bayesian inference, BI) 构建系统树 (Huelsenbeck

*et al.*, 2001)。使用 MrModeltest2.2 检验 24 种核苷酸替代模型对 *GBBSI* 数据集的拟合度, 评判出 *GBBSI* 基因进化的最优模型为 HKY+I+G。MrBayes 软件批处理方式“begin mrbayes;”开始, 中间行以“;”结尾, 以“end;”结束。运用 Splits Tree (Klopper *et al.*, 2008) 进行 Network 分析。将数

据导入软件后采用 Median-Joining(MJ)方法(Bandelt *et al.*, 1999)。该方法将在检测序列的所有位点后, 赋予这些位“0”或“1”两种状态, 并转化为由二态特性组成的矩阵, 进而构建出禺毛茛多倍体复合体及其近缘种的无根中间连接网(median-Joining network)。

表 1 实验材料

Table 1 The origin of materials

分类群 Taxon	采集地 Origin	标本凭证 Voucher	克隆 Clone	登录号 GenBank accession
茴香蒜 <i>Ranunculus chinensis</i> (2x)	云南普洱 Puer, Yunnan	L. Liao1050910	H-1, H-10 至 H-16 H-2 至 H-9	KF240886 至 KF240893 KF240894 至 KF240901
卷喙毛茛 <i>R. sileriifolius</i> var. <i>sileriifolius</i> (2x)	云南普洱 Puer, Yunnan	L. Liao1051074	J-1, J-10 至 J-16 J-2 至 J-9	KF240922 至 KF240929 KF240930 至 KF240937
长花毛茛 <i>R. sileriifolius</i> var. <i>dolicathus</i> (2x)	云南普洱 Puer, Yunnan	L. Liao1051013	C-1, C-10 至 C-15 C-2 至 C-9	KF240871 至 KF240877 KF240878 至 KF240885
棱喙毛茛 <i>R. trigonus</i> (2x)	云南普洱 Puer, Yunnan	L. Liao1051047	L-1, L-10 至 L-16 L-2 至 L-9	KF240938 至 KF240945 KF240946 至 KF240953
禺毛茛 <i>R. cantoniensis</i> (4x)	江西九江 Jiujiang, Jiangxi	L. Liao1210131	Y-1, Y-10 至 Y-17 Y-2 至 Y-9	KF240983 至 KF240991 KF240992 至 KF240999
铺散毛茛 <i>R. diffusus</i> (4x)	云南昆明 Kunming, Yunnan	L. Liao050514	PS-1, PS-10 至 PS-14 PS-2 至 PS-9	KF240954 至 KF240959 KF240960 至 KF240967
匍枝毛茛 <i>R. repens</i> (4x)	云南丽江 Lijiang, Yunnan	L. Liao1072514	PZ-1, PZ-10 至 PZ-15 PZ-2 至 PZ-9	KF240968 至 KF240974 KF240975 至 KF240982
褐鞘毛茛 <i>R. vaginatus</i> (5x)	贵州六盘水 Liupanshui, Guizhou	L. Liao050518	HQ-1, HQ-10 至 HQ-19 HQ-2, HQ-20 HQ-3 至 HQ-9	KF240902 至 KF240912 KF240913 至 KF240914 KF240915 至 KF240921
扬子毛茛 <i>R. sieboldii</i> (6x)	贵州六盘水 Liupanshui, Guizhou	L. Liao050516	YZ-1, YZ-10 至 YZ-19 YZ-2, YZ-20 至 YZ-23 YZ-3 至 YZ-9	KF241000 至 KF241010 KF241011 至 KF241015 KF241016 至 KF241022

## 2 结果与分析

### 2.1 禺毛茛 *GBBSI* 序列

在保守区设计的简并引物扩增得到一条 299 bp 的片段。利用 FPNI-PCR 步移法获取了此序列上游 918 bp 和下游 1 379 bp 两段序列。拼接后序列长度为 2 465 bp。经 BLAST 检索序列数据库比对表明, 它与红茛苕 (*Viburnum erubescens*) *GBBSI* 基因核苷酸序列的相似性为 72.7%, 与美国梧桐 (*Platanus occidentalis*) *GBBSI* 基因核苷酸序列的相似性为 71.0%。

### 2.2 *GBBSI* 部分内含子序列

共克隆了禺毛茛复合体及其近缘种 9 个类群的 152 条序列。种间的内含子长度差异较小, 除了棱喙毛茛和扬子毛茛的少数序列为 487 bp 以外, 其余序列长度均在 501~506 bp 之间, 比对后的长度为 512 bp。种间的内含子核苷酸突变较大, 512 bp 中有 127 个核苷酸变异位点, 其中 70 个为简约信息位点。

### 2.3 系统发育分析

基于 *GBBSI* 基因内含子序列构建的系统发生树显示, 所有序列主要分为 9 个聚类簇(图 1)。长花毛茛、铺散毛茛、扬子毛茛和匍枝毛茛构成聚类簇 I, 其中扬子毛茛和匍枝毛茛聚为一支, 长花毛茛和铺散毛茛聚为一支; 聚类簇 II 由褐鞘毛茛、铺散毛茛和卷喙毛茛组成; 聚类簇 III 由扬子毛茛、棱喙毛茛、铺散毛茛和褐鞘毛茛构成; 匍枝毛茛、扬子毛茛和禺毛茛构成聚类 IV; 聚类簇 V 中包括铺散毛茛、褐鞘毛茛、茴香蒜、禺毛茛、扬子毛茛和匍枝毛茛等 6 个类群; 聚类簇 VI 和 VII 均只有长花毛茛; 聚类簇 VIII、IX 分别由棱喙毛茛和卷喙毛茛的拷贝单独构成。

### 2.4 网状进化关系

复合体及其近缘种的网状进化图(图 2)与 BI 树一致性较高。152 条内含子序列共有 99 个基因型。这个网状结构主要由 11 个分支组成。来自茴香蒜、禺毛茛、扬子毛茛和匍枝毛茛的 15 个序列基因型完全一致, 并聚于分支 1, 来自铺散毛茛和褐鞘毛茛的序列与以上基因型同源性较高, 也聚于分支 1; 部分来自卷喙毛茛和禺毛茛的序列聚于分支 2,

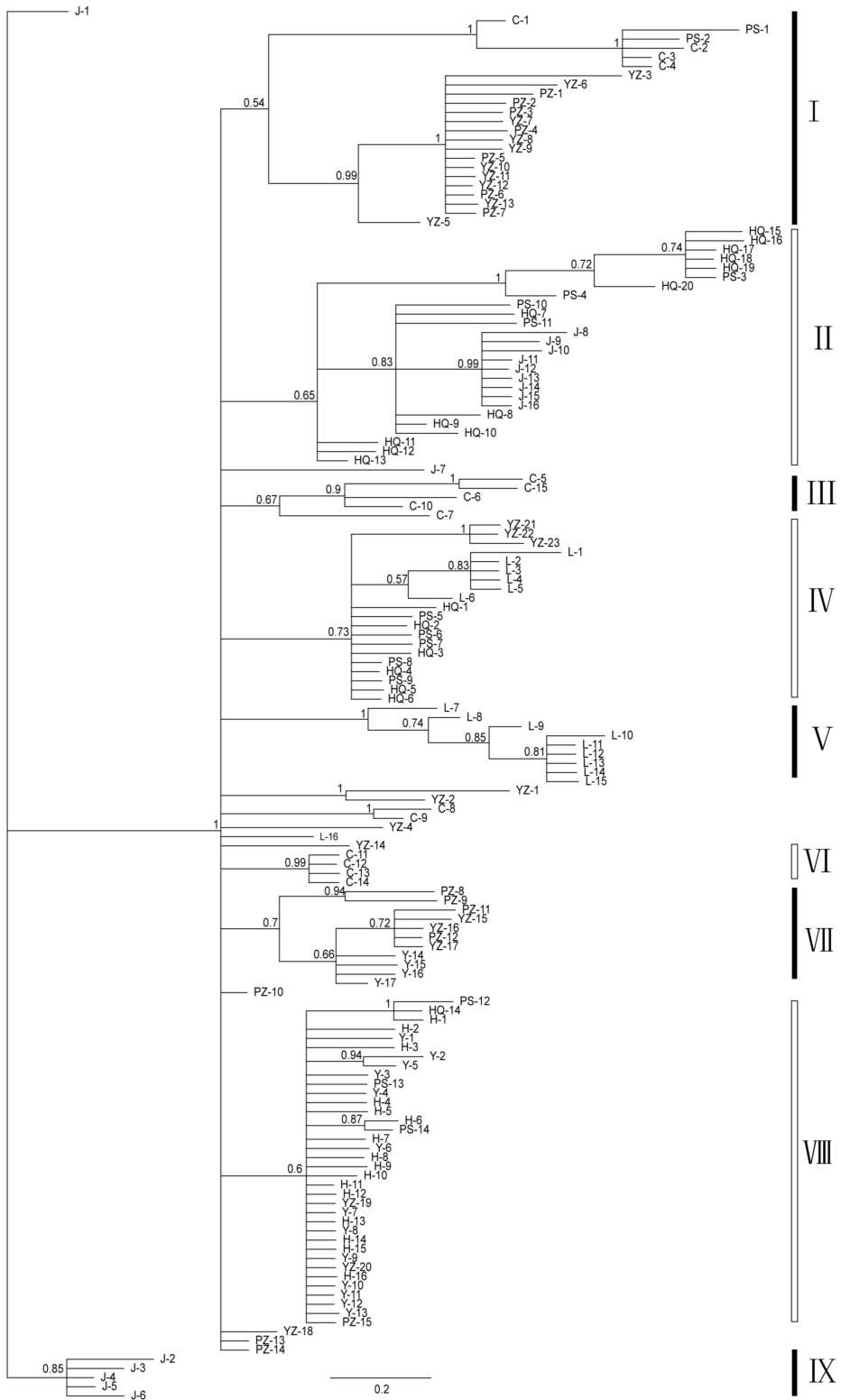


图 1 禺毛茛多倍体复合体及其近缘种的 BI 系统树 C. 长花毛茛; H. 苗苗蒜; J. 卷喙毛茛; L. 棱喙毛茛; Y. 禺毛茛; HQ. 褐鞘毛茛; PS. 铺散毛茛; PZ. 匍枝毛茛; YZ. 扬子毛茛。下同。

Fig. 1 Phylogenetic tree using bayesian inference from *Ranunculus cantonensis* polyloid complex and its allied species C. *R. sileriifolius* var. *dolicathus*; H. *R. chinensis*; J. *R. sileriifolius* var. *sileriifolius*; L. *R. trigonus*; Y. *R. cantoniensis*; HQ. *R. vaginatus*; PS. *R. diffuses*; PZ. *R. repens*; YZ. *R. sieboldii*. The same below.

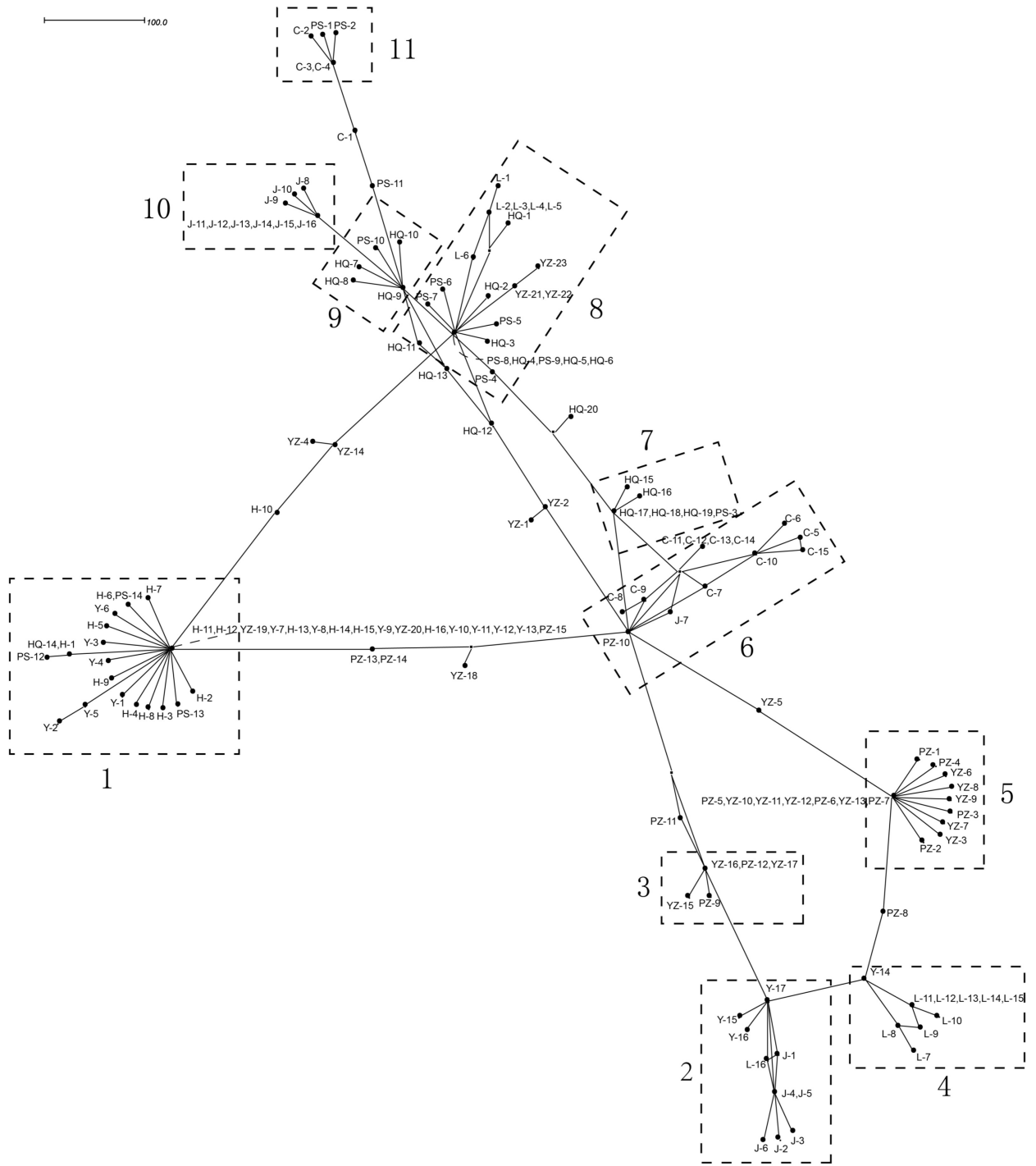


图 2 禺毛茛多倍体复合体及其近缘种的网状关系

Fig. 2 Network relationship from *Ranunculus cantonensis* polyploid complex and its allied species

而来自卷喙毛茛的另一部分序列形成分支 10；分支 3 和分支 5 均仅包括来自匍枝毛茛和扬子毛茛的序列，其中，在分支 3 中匍枝毛茛的 1 个序列和扬子毛茛的 2 个序列完全相同，在分支 5 中匍枝毛茛的 3 个序列和扬子毛茛的 4 个序列完全相同；部分来自

棱喙毛茛的序列与 1 个来自禺毛茛的序列聚于分支 4，另有部分来自棱喙毛茛的序列聚在分支 8；长花毛茛聚集在分支 6 和分支 11；在分支 8 上，来自铺散毛茛和褐鞘毛茛的 5 个序列完全相同，剩余的序列与扬子毛茛相似；褐鞘毛茛的 4 个序列与铺散毛

苋的1个序列相似,构成分支9。

### 3 讨论与结论

贝叶斯法不仅保留了最大似然法的基本原理,而且引进了马尔科夫链的蒙特卡洛法,能在较短时间内处理大型的数据集和复杂模型,提高分辨率(陈士超等,2007)。然而,系统进化树只能表示分歧进化的物种形成模式,无法表示杂交物种形成模式。所以,利用系统树很难研究杂交和异源多倍化类群的系统发育,而网状进化结构能更好地替代简单的分支过程(Makarenkov *et al.*, 2004)。相比BI树而言,网状结构能表示基因的横向转移,在分析整个系统时分辨率更高。因此,本研究结合两者的优点对该复合体及其近缘种的系统发育进行讨论。

#### 3.1 GBSSI 基因的变异特点

在多数植物类群研究中,单拷贝或低拷贝核基因能提供更多的信息位点,具有更强的优势(Sang *et al.*, 2002)。本研究选取了GBSSI基因内含子序列,512 bp中有70个为简约信息位点,进化速率为13.7%,进化速度适中,适合于研究毛茛属种下系统进化关系,因而该基因可以用来重建禹毛茛多倍体及其近缘种的系统发育。

#### 3.2 匍枝毛茛与复合体亲缘关系较近

匍枝毛茛为多年生草本植物,簇生有多数粗长须根,茎下部匍匐于地面,在节处生有根并且分枝,叶为三出复叶,宽卵圆形叶片。扬子毛茛为多年生草本植物,须根簇生,茎铺散,节下部偃地生根,在节处多分枝,叶为三出复叶,圆肾形至宽卵形叶片(王文采等,1980)。这两个物种在形态上有较多的相似之处,暗示它们可能有较近的亲缘关系。本研究发现部分匍枝毛茛和扬子毛茛的GBSSI克隆序列完全相同(图2分支1,分支3和分支5),表明匍枝毛茛和扬子毛茛亲缘关系非常近。前期研究认为该复合体由8个物种构成,匍枝毛茛并未加入该复合体(Xu *et al.*, 2013)。以上结果显示匍枝毛茛与该复合体关系密切,可能参与了该复合体的起源与进化。

#### 3.3 复合体中多倍体的起源

种间杂交和基因组复制在植物进化过程导致两个亲本的核基因位点整合到后代基因组中,进而表现为个体中存在两个不同的等位基因(Ekrt *et al.*, 2010)。部分扬子毛茛的GBSSI克隆与茴茴蒜有相同的基因型(图2分支1),而另外一部分扬子毛

茛的GBSSI克隆与匍枝毛茛的序列相同或相似(图2分支1,分支3和分支5),说明扬子毛茛中存在两个不同的等位基因,分别与匍枝毛茛和茴茴蒜有较近的亲缘关系。扬子毛茛(6x)很可能由茴茴蒜(2x)和匍枝毛茛(4x)杂交并加倍形成。在染色体组方面匍枝毛茛的贡献比茴茴蒜大,Osborn(2003)认为在异源多倍体中基因表达的机制之一是基因的剂量效应,印证了扬子毛茛在形态学上与匍枝毛茛更为相似,而并非茴茴蒜。

禹毛茛有四种核型,这种种内核型多型性是由于卷喙毛茛核型多型性所致(廖亮等,1995)。禹毛茛的一部分基因型和茴茴蒜的基因型聚在一支(图2分支1),禹毛茛的另外一部分基因型和卷喙毛茛的基因型聚在一支(图2分支2),而仅有1个基因型与多个棱喙毛茛的基因型聚在一支(图2分支4),表明茴茴蒜、卷喙毛茛和棱喙毛茛三个二倍体参与了禹毛茛四倍体复合体的形成,实验结果与ITS序列分析和荧光原位杂交(Xu *et al.*, 2013)的研究结果一致,即证实了禹毛茛的亲本是茴茴蒜、卷喙毛茛和棱喙毛茛。

多倍体铺散毛茛和褐鞘毛茛中均有二倍体卷喙毛茛,棱喙毛茛和茴茴蒜的基因拷贝(图1聚类簇II,聚类簇IV和聚类簇VIII)。一方面说明铺散毛茛与褐鞘毛茛的亲缘关系较近;另一方面说明二倍体的这类基因拷贝作为直系同源拷贝遗传给后来形成的物种,并对物种的进化有重要贡献(Sonnhammer *et al.*, 2002)。

#### 3.4 茴茴蒜在多倍体进化中的作用

复合体及其近缘种中的多倍体均有茴茴蒜的基因组。Stebbins(1971)提出,一些二倍体植物能提供共同的基因组与其它物种基因组杂交组合形成多倍体植物,这个基因组称为枢纽基因组。Zohary(1962)指出,多个多倍体共享一个相同的基因组,最有可能起源于相同的二倍体物种。在该复合体中,茴茴蒜直接参与了禹毛茛和扬子毛茛的形成,还可能参与了铺散毛茛和褐鞘毛茛的形成,因此茴茴蒜是该复合体起源和进化的关键种,起着枢纽基因组的重要作用。

低拷贝核基因GBSSI在重建禹毛茛多倍体复合体及其近缘种的系统发育时,分辨率比较高,该基因在异源多倍体中同时含有双亲的遗传信息,能够利用该基因推断多倍体的起源和多倍体复合体网状进化关系,适合于多倍体复合体的系统进化研究。

## 参考文献:

- Bandelt HJ, Peter F, Arne R. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies [J]. *Mol Biol Evol*, **16**(1):37-48
- Chen SC(陈士超), Yang H(杨红), Li S(李珊), et al. 2007. Bayesian inference and its application in the molecular phylogeny of Liliales(贝叶斯推论及其在百合目分子系统学中的应用) [J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), **29**(2):161-166
- Corriveau JL, Coleman AW. 1988. Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species [J]. *Am J Bot*, **75**(10):1443-1458
- Ekrt L, Holubová R, Trávníček P, et al. 2010. Species boundaries and frequency of hybridization in the *Dryopteris carthusiana* (Dryopteridaceae) complex: a taxonomic puzzle resolved using genome size data [J]. *Am J Bot*, **97**(7):1208-1219
- Huelsenbeck JP, Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees [J]. *Bioinformatics*, **17**(8):754-755
- Klopper TH, Huson DH. 2008. Drawing explicit phylogenetic networks and their integration into splits tree [J]. *BMC Evol Biol*, **8**(1):22
- Liao L(廖亮), Xu LL(徐玲玲), Chen Y(陈晔), et al. 1995. Study of karyotypes of *Ranunculus cantoniensis* polyploidy complex and its allied species(禺毛茛多倍体复合体及其近缘种核型研究) [J]. *Acta Phytotaxon Sin*(植物分类学报), **33**(3):230-239
- Liao L, Xu LL, Zhang DM, et al. 2008. Multiple hybridization origin of *Ranunculus cantoniensis* (4x): evidence from trnL-F and ITS sequences and fluorescent in situ hybridization (FISH) [J]. *Plant Syst Evol*, **276**(1):31-37
- Liu ZP(刘志鹏), Wang NF(王能飞), Zhao AY(赵爱云), et al. 2007. The evolution and expression of low-copy nuclear genes in allopolyploid plants(低拷贝核基因在异源多倍体植物中的进化与表达) [J]. *Hereditas*(遗传), **29**(2):163-171
- Lodhi MA, Ye GN, Weeden NF, et al. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species [J]. *Plant Mol Biol Rep*, **12**(1):6-13
- Makarenkov V, Legendre P. 2004. From a phylogenetic tree to a reticulated network [J]. *J Comput Biol*, **11**(1):195-212
- Oh SH, Potter D. 2003. Phylogenetic utility of the second intron of *LEAFY* in *Neillia* and *Stephanandra* (Rosaceae) and implications for the origin of *Stephanandra* [J]. *Mol Phyl Evol*, **29**(2):203-215
- Okada H. 1984. Polyphyletic allopolyploid origin of *Ranunculus cantoniensis* (4x) from *R. sileriifolius* (2x) × *R. chinensis* (2x) [J]. *Plant Syst Evol*, **148**(1):89-102
- Okada H. 1989. Cytogenetical changes of offsprings from the induced tetraploid hybrid between *Ranunculus sileriifolius* (2n=16) and *R. chinensis* (2n=16) (Ranunculaceae) [J]. *Plant Syst Evol*, **167**(3):129-136
- Osborn TC, Pires JC, Birchler JA, et al. 2003. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids [J]. *Trends Genet*, **19**(3):141-147
- Peralta IE, Spooner DM. 2001. Granule-bound starch synthase (*GBSSI*) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*) [J]. *Am J Bot*, **88**(10):1888-1902
- Sang T. 2002. Utility of low-copy nuclear gene sequences in plant phylogenetics [J]. *Crit Rev Biochem Mol*, **37**(3):121-147
- Sonnhammer ELL, Koonin EV. 2002. Orthology, paralogy and proposed classification for paralog subtypes [J]. *Trends Genet*, **18**(12):619-620
- Stebbins GL. 1971. Chromosomal evolution in higher plants [M]. Edward Arnold, London; Barrington EJW:147-154
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, **28**(10):2731-2739
- Tamura M. 1978. *Ranunculus cantoniensis* group in Japan [J]. *J Geobot*, **26**:34-40
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. *Nucl Acids Res*, **22**(22):4673-4680
- Wang WT(王文采), Liu L(刘亮). 1980. *Ranunculus* (毛茛属) [M]//Wu ZY(吴征镒). Flora of China(中国植物志). Beijing(北京): Science Press(科学出版社), **28**:255-331
- Wang Z, Ye S, Li J, et al. 2011. Fusion primer and nested integrated PCR (FPNI-PCR): a new high-efficiency strategy for rapid chromosome walking or flanking sequence cloning [J]. *BMC Biotechnology*, **11**(1):109
- Xu LL, Li TJ, Liao L, et al. 2013. Reticulate evolution in *Ranunculus cantoniensis* polyploidy complex and its allied species [J]. *Plant Syst Evol*, **299**(3):603-610
- Yu Y, Degnan JH, Nakhleh L. 2012. The probability of a gene tree topology within a phylogenetic network with applications to hybridization detection [J]. *PLOS Gen*, **8**(4):e1002660
- Yang ZY, Chao Z, Huo KK, et al. 2007. ITS sequence analysis used for molecular identification of the *Bupleurum* species from northwestern China [J]. *Phytomedicine*, **14**(6):416-423
- Zhang XW(张兴伟), Wang ZH(王志德), Liu YH(刘艳华), et al. 2008. IP marker and its application strategy in molecular breeding of tobacco(内含子多态性标记及其在烟草分子育种上的应用) [J]. *J Anhui Agric*(安徽农业科学), **36**(8):3147-3159
- Zheng X, Cai D, Yao L, et al. 2008. Non-concerted ITS evolution, early origin and phylogenetic utility of ITS pseudogenes in *Pyrus* [J]. *Mol Phyl Evol*, **48**(3):892-903
- Zohary D, Feldman M. 1962. Hybridization between amphidiploids and the evolution of polyploids in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group [J]. *Evolution*, **16**(1):44-61