



MASTER DEGREE THESIS, 2011

UNIVERSITY CODE: 10269

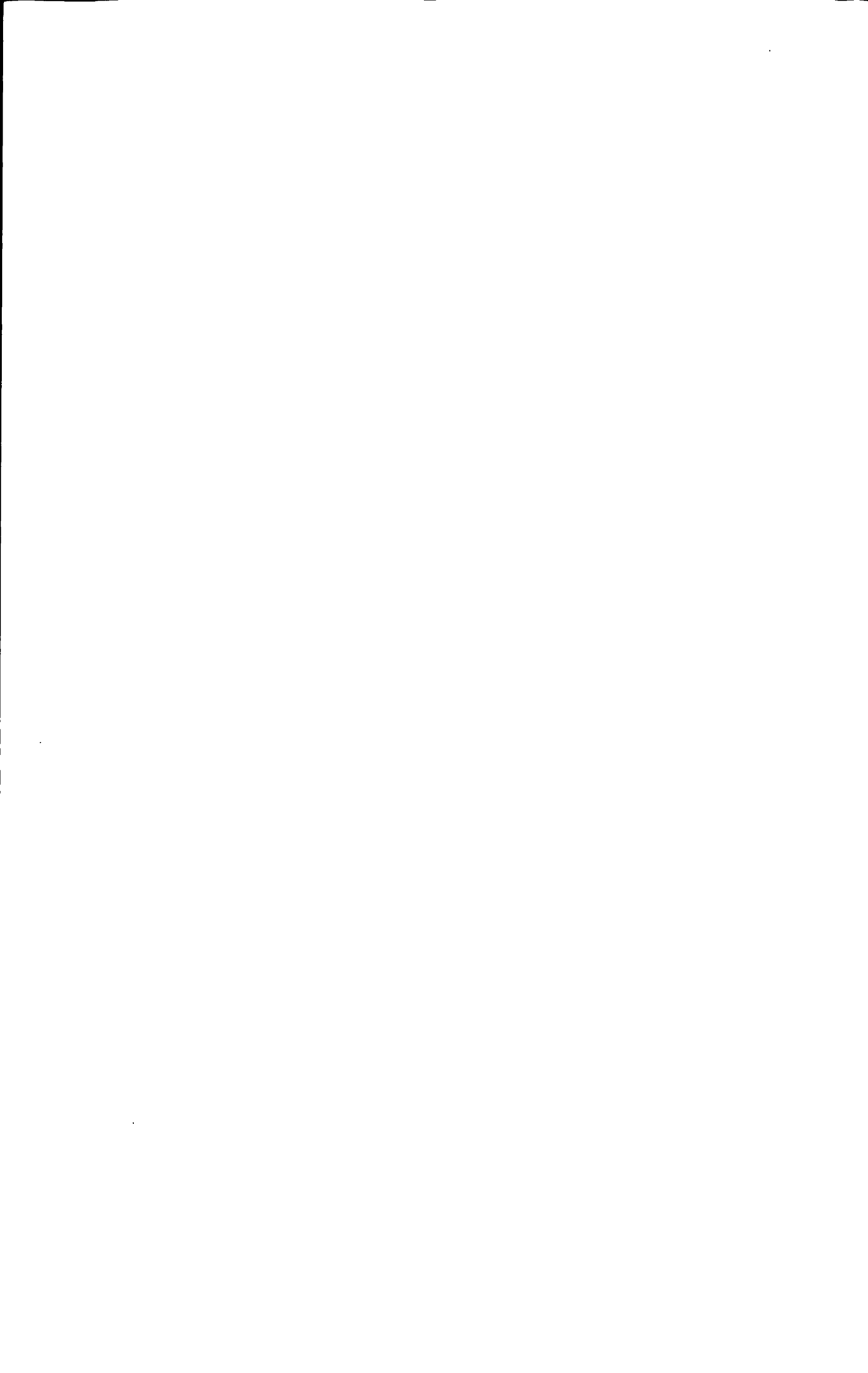
STUDENT NUMBER: 51081300012

EAST CHINA NORMAL UNIVERSITY

Molecular Systematics of *Wightia*

DEPARTMENT: School of Life Science
MAJOR: Botany
RESERCH AREA: Resource Botany
SUPERVISOR: Associate Prof. Hongqing Li
GRADUATE STUDENT: Guoli Liu

May, 2011



华东师范大学学位论文原创性声明

郑重声明：本人呈交的学位论文《美丽桐属的分子系统学研究》，是在华东师范大学攻读硕士/博士(请勾选)学位期间，在导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确说明并表示谢意。

作者签名：刘国明

日期：2011年6月2日

华东师范大学学位论文著作权使用声明

《美丽桐属的分子系统学研究》系本人在华东师范大学攻读学位期间在导师指导下完成的硕士/博士(请勾选)学位论文，本论文的研究成果归华东师范大学所有。本人同意华东师范大学根据相关规定保留和使用此学位论文，并向主管部门和相关机构如国家图书馆、中信所和“知网”送交学位论文的印刷版和电子版；允许学位论文进入华东师范大学图书馆及数据库被查阅、借阅；同意学校将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于(请勾选)

() 1. 经华东师范大学相关部门审查核定的“内部”或“涉密”学位论文*，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

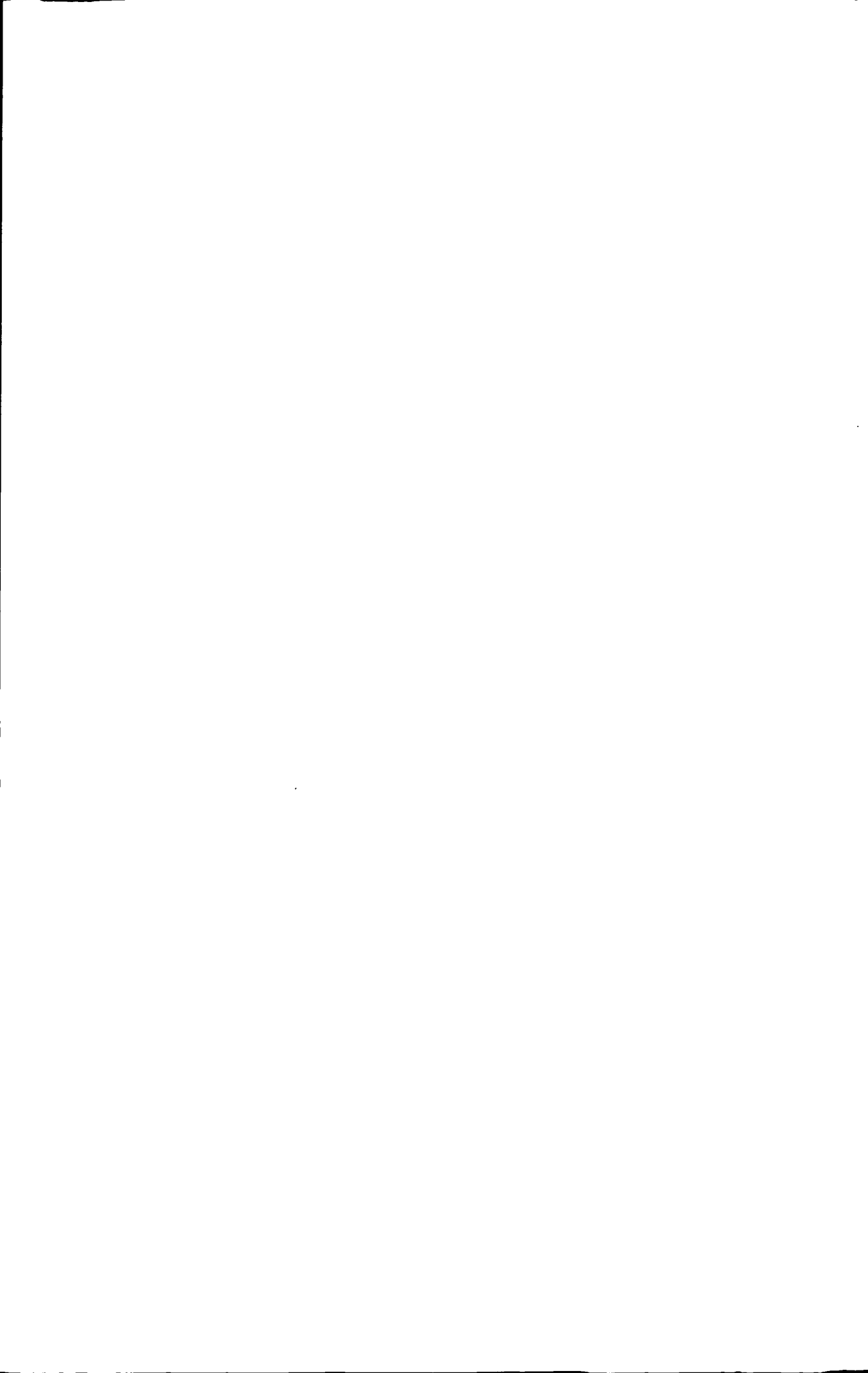
() 2. 不保密，适用上述授权。

导师签名：李国明

本人签名：刘国明

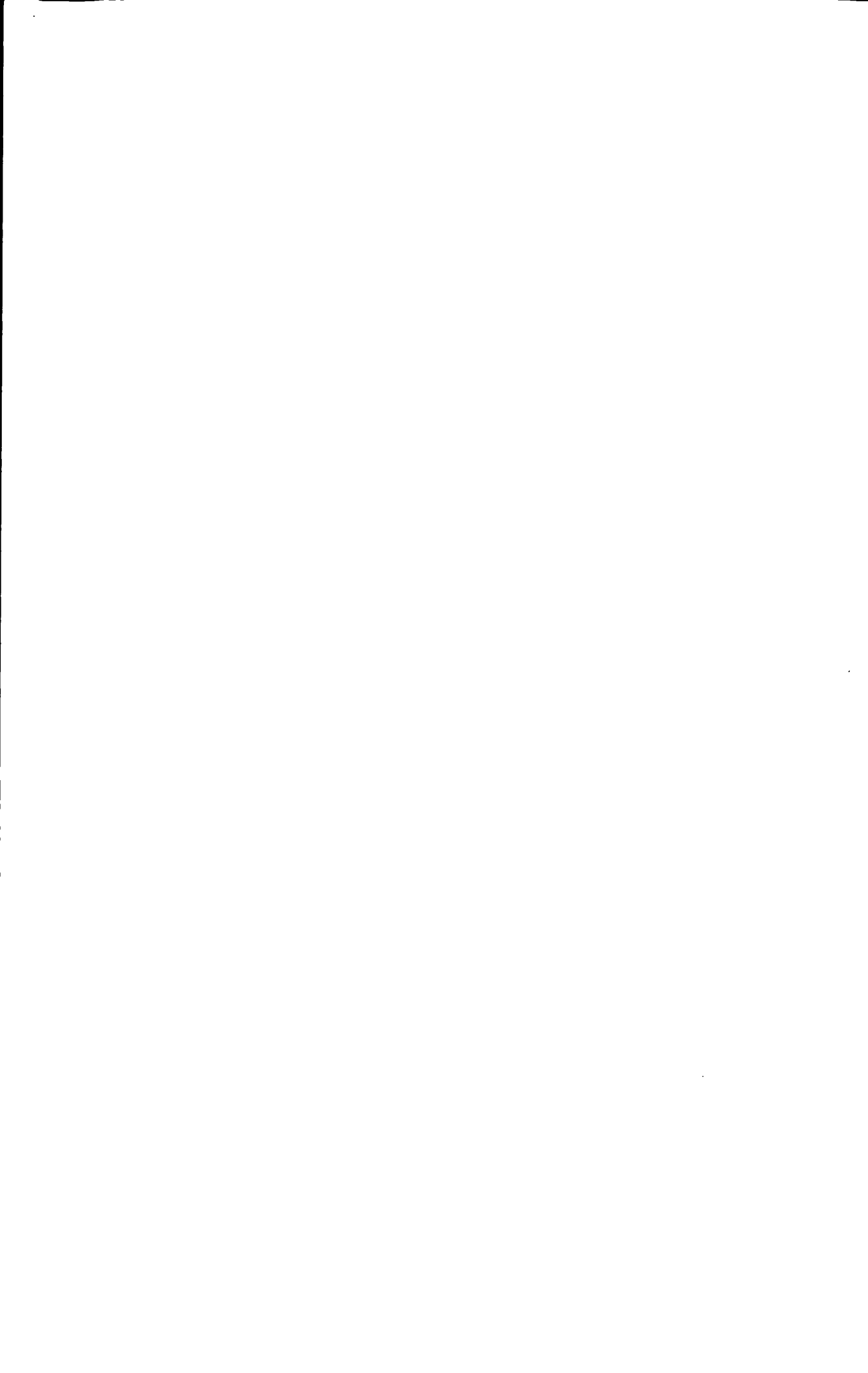
2011年6月2日

* “涉密”学位论文应是已经华东师范大学学位评定委员会办公室或保密委员会审定过的学位论文(需附获批的《华东师范大学研究生申请学位论文“涉密”审批表》方为有效)，未经上述部门审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权)。



刘国丽硕士学位论文答辩委员会成员名单

姓名	职称	单位	备注
陈小勇	教授	华东师范大学资源与环境科学学院	主席
王幼芳	教授	华东师范大学生命科学学院	
朱瑞良	教授	华东师范大学生命科学学院	

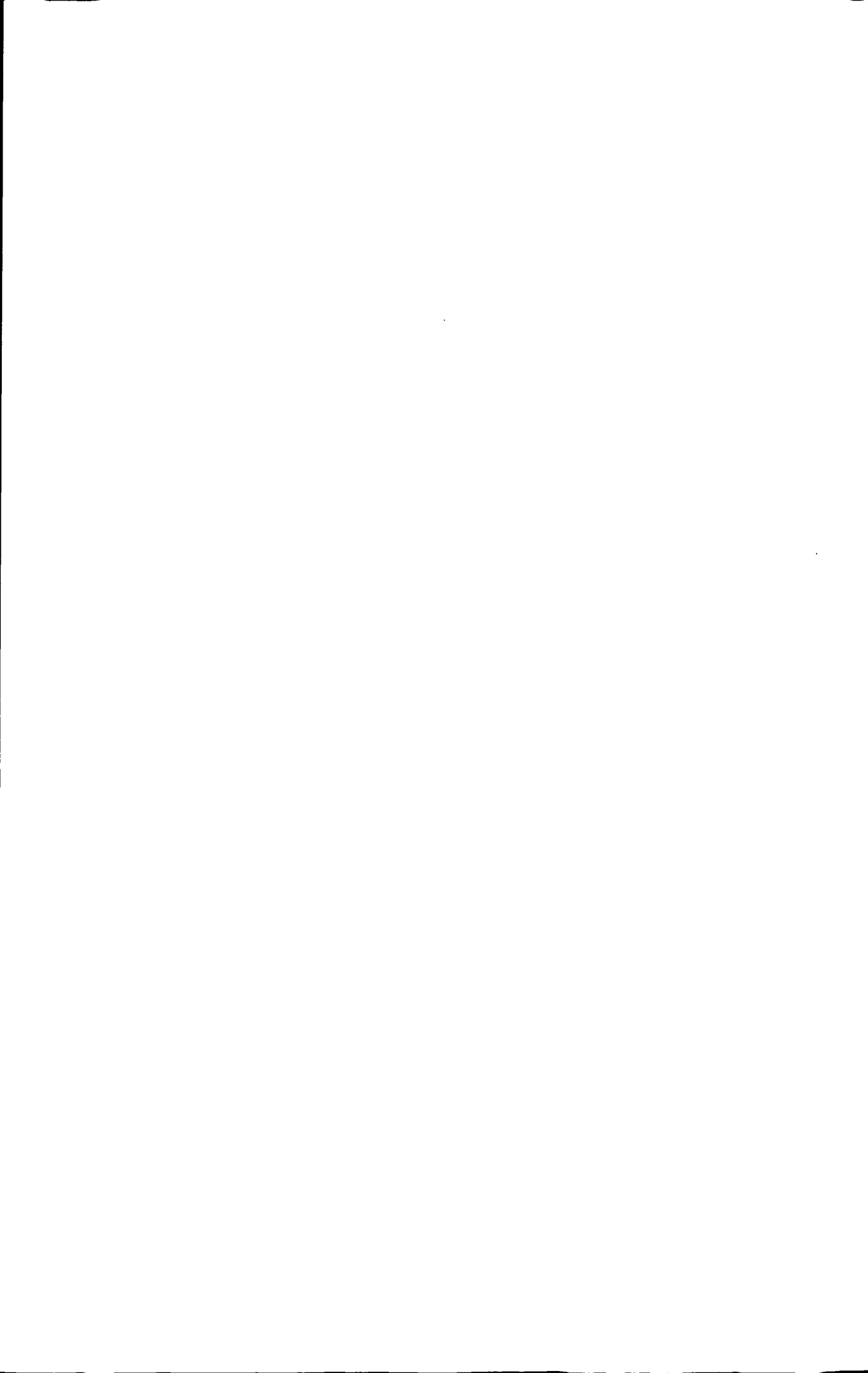


摘要

美丽桐属 (*Wightia*) 有两种, 分布范围较小。我国仅一种, 分布于云南中部及南部, 生长于海拔 2500 米以下的林中或田边。历史上, 对美丽桐属的归科问题始终没有定论, 它与来江藤属 (*Brandisia*)、泡桐属 (*Paulownia*) 一起在广义玄参科 (*Scrophulariaceae s.l.*) 和紫葳科 (*Bignoniaceae*) 之间移动, 从形态学方面已无法确定美丽桐属的归科问题。以往的分子系统学研究从未对美丽桐属进行取样, 因而该属在唇形目 (APG III) 的分子系统树上的位置亦未能确定。为研究美丽桐属在唇形目内的系统位置, 本文从分子系统学角度出发, 采用叶绿体基因组 *rbcL*、*ndhF*、*rps16*、*trnL-F* 序列和核基因组 ITS 序列共 5 个片段, 运用最大似然法 (maximum likelihood method, ML) 对美丽桐属在唇形目内的系统位置进行研究。

在对美丽桐属与唇形目中近缘科的系统发育关系研究中, 采用 *rbcL* 和 *ndhF* 两个片段, 对唇形目内 18 个科进行了系统发育分析 (其中 9 属 15 片段为本研究完成)。系统分析结果显示美丽桐属明显不属于木犀科 (*Oleaceae*)、香茜草科 (*Carlemanniaceae*)、密穗草科 (*Stilbaceae*) 和狭义玄参科 (*Scrophulariaceae s.s.*), 而与广义列当科 (*Orobanchaceae s.l.*)、透骨草科 (*Phrymaceae*) 和泡桐属亲缘关系较近。形态上认为美丽桐属与紫葳科或玄参科接近, 但是分子证据并不支持这种观点。

在确定美丽桐属系统地位的研究中, 采用 *rps16*、*trnL-F* 和 ITS 三个片段, 对美丽桐属及其近缘科广义列当科, 泡桐科 (*Paulowniaceae*), 透骨草科等共 48 个属进行了系统树的构建 (其中 11 属 26 片段为本研究完成)。结果显示: (1) 美丽桐属处于广义列当科分支中 (支持率 93%), 并与黑草属 (*Buchnera*) 和独脚金属 (*Striga*) 以 100% 支持率聚成一支, 认为美丽桐属极有可能属于广义列当科; 来江藤属与美丽桐属形态上的相似性并没有得到叶绿体基因的分子证据支持; 方茎草属 (*Leptorhabdos*)、翅茎草属 (*Pterygiella*)、芯芭属 (*Cymbaria*)、鹿茸草属 (*Monochasma*)、阴行草属 (*Siphonostegia*) 五个半寄生属与广义列当科其他属聚成单系支, 表明这五属属于广义列当科, 其中方茎草属和翅茎草属为首次取样; 自养属钟萼草属 (*Lindenbergia*) 依旧聚在广义列当科分支外围, 表明寄生性为单系起源; (2) 美丽桐属与透骨草亚科 (*Phrymoideae*) 关系相对较近而与泡桐科关系较远。叶绿体片段单独和联合构建的系统树中, 美丽桐属与透骨草亚科聚成一支, 虽支持



率偏低,但仍表明两者关系相对较近;而泡桐属与美丽桐属在所有的系统树中均没有聚成单系支,表明美丽桐属与泡桐属(科)关系相对较远,两者可能有不同的祖先;(3)唇形目内各科关系需要进一步分析。在以往的研究中,处于唇形目分支基部的类群有相对较为明晰的系统进化关系,但是对于核心科的进化关系一直没有足够的证据支持。本文在探究美丽桐属的系统地位时也出现系统树分辨率较差和不同基因树结果矛盾的问题,或需要新的基因或分析方法来确定各科系统进化关系。

关键词:美丽桐属;唇形目;核基因;叶绿体基因;系统发育



Abstract

There are two species in *Wightia* and one of which in China. The distribution of this genus is concentrated in a small range. In China it only distributes in the central-south of Yunnan Province and is found in forests of valleys or in fields at elevation of 2500m below. Historically, several genera, including *Wightia*, *Paulownia* and *Brandisia*, have been taxonomically problematic, and have been transferred repeatedly between Bignoniaceae and Scrophulariaceae. The lack of molecular study of *Wightia* blurred its position in Lamiales (APG III), and couldn't clarify the family which it belongs to. Mainly from the view of molecular systematics, this paper chose *rbcL*, *ndhF*, *rps16*, *trnL-F* genes of chloroplast genome and ITS sequences of nuclear genome, adopted maximum likelihood method, and designed to resolve the systematic problems of *Wightia*.

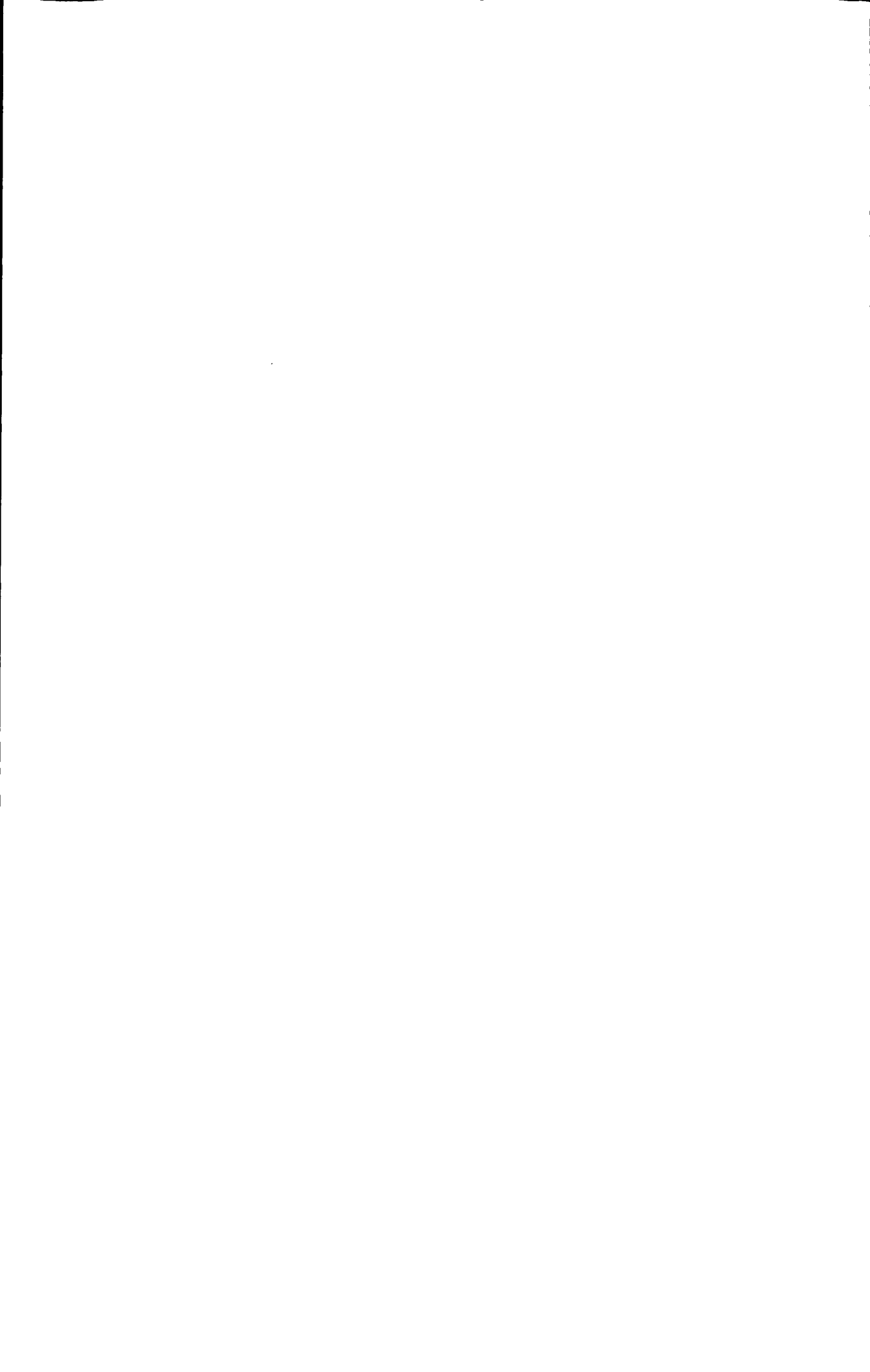
For the study of the phylogeny of *Wightia* related families, *rbcL* and *ndhF* were selected and 18 families in Lamiales were performed, of which, 15 sequences of 9 genera were obtained in this study. The results show that *Wightia* obviously did not belong to Oleaceae, Carlemanniaceae, Stilbaceae or Scrophulariaceae s.s.. It probably has close relationships with Orobanchaceae s.l., Paulowniaceae and Phrymaceae, and located on the more evolutionary position in Lamiales. Morphologically *Wightia* may be close to Scrophulariaceae or Bignoniaceae, but this has not been supported by molecular analyses.

For the study of the phylogenetic position of *Wightia*, *rps16*, *trnL-F* and ITS were selected and phylogenetic analysis on 48 genera of *Wightia* allied families such as Orobanchaceae s.l., Paulowniaceae and Phrymaceae were performed (including 26 sequences of 11 genera obtained in this study). The results show that: (1) *Wightia* is likely to belong to Orobanchaceae s.l.. *Wightia* formed a monophyletic clade with all the known genera of Orobanchaceae s.l. (bootstrap=93%), and constituted a smaller clade with *Bunchnera* and *Striga* (bootstrap=100%). The genus *Brandisia*, morphologically very closely related to *Wightia*, has not been supported by molecular analyses. Phylogenetic trees also showed that semiparasitic genera *Leptorhabdos*, *Pterygiella*, *Cymbaria*, *Monochasma* and *Siphonostegia* belonged to Orobanchaceae s.l.. Hereby, the



first two genera were first sampled in Lamiales researches. Nonparasitic genus *Lindenbergia* still formed the first branch of Oroanchaceae s.l., which indicated that parasitism shared a single origin. (2) *Wightia* has relatively close relationship with Phrymoideae (Phrymaceae) but farther with *Paulownia* (Paulowniaceae). The results of chloroplast genes showed that *Wightia* formed a clade with Phrymoideae but bootstrap was low. Genus *Paulownia* never formed a clade with *Wightia*. This result indicates that *Paulownia* (Paulowniaceae) was distinct from the genus *Wightia* to some degrees, they might have different ancestors. (3) There had been little progress about relationships among core families of Lamiales; nearly all of the phylogenetic trees lacked enough bootstrap support. The similar problem also exists in this study. It means that we might need more genes and methods for understanding the relationships among core families in Lamiales.

Keywords: *Wightia*; Lamiales; Nuclear gene; Chloroplast gene; Phylogeny

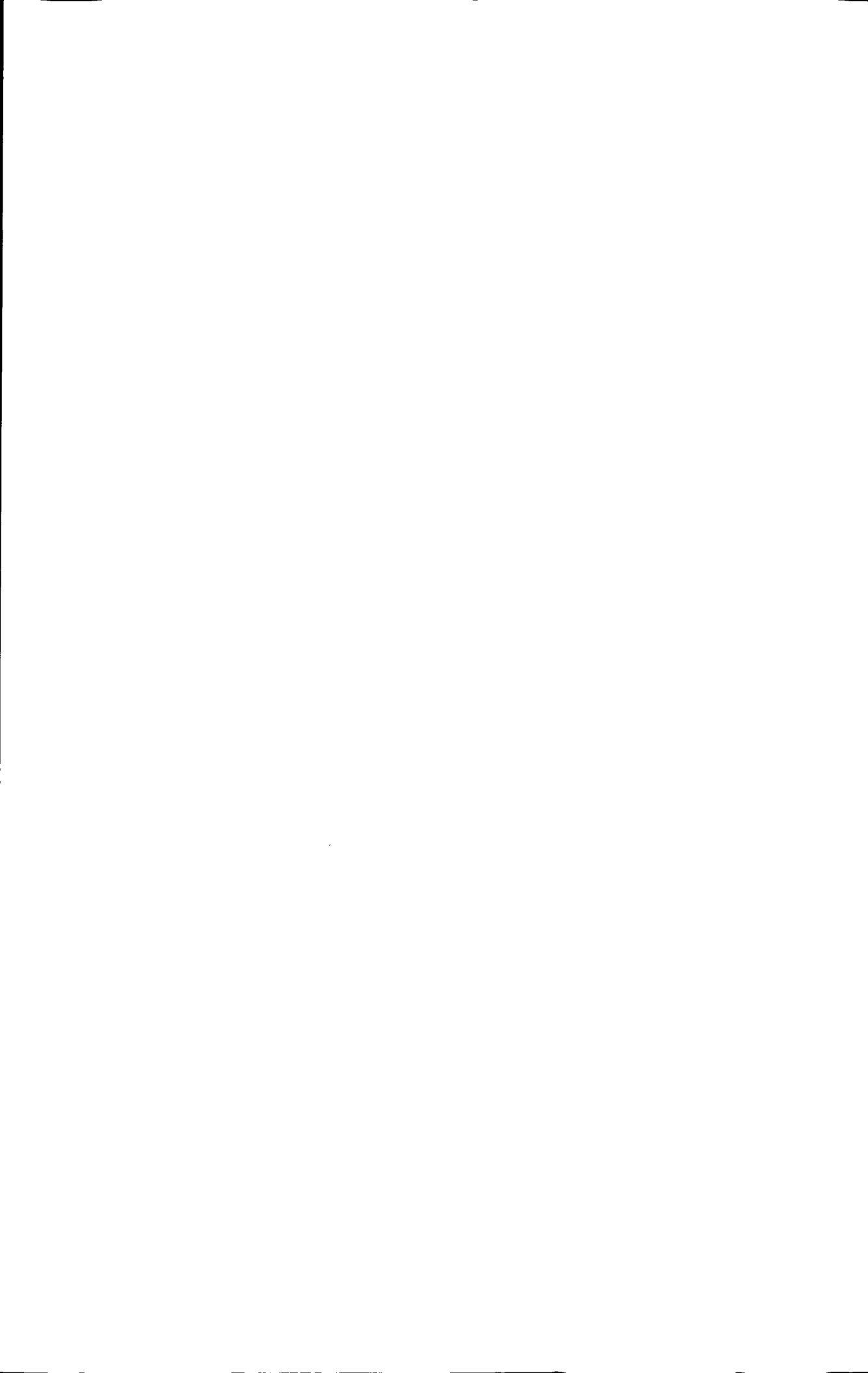


目录

前言.....	1
第一章 文献综述.....	3
1.1 唇形目分子系统学研究进展.....	3
1.1.1 唇形目简介 (APG III).....	3
1.1.2 广义玄参科拆分及相关科的重组.....	3
1.1.3 唇形目其他科的变动.....	6
1.1.4 唇形目系统发育研究常用分子标记.....	6
1.2 美丽桐属研究综述.....	9
1.2.1 美丽桐属简介.....	9
1.2.2 美丽桐属研究历史.....	9
1.2.3 美丽桐属和假定近缘属的分类关系和存在问题.....	11
第二章 美丽桐属的近缘科检测.....	13
2.1 实验材料和实验方法.....	13
2.1.1 实验材料.....	13
2.1.2 实验方法.....	13
2.1.3 序列编辑及比对.....	15
2.1.4 数据特征分析.....	16
2.2 结果和分析.....	17
2.2.1 测序结果.....	17
2.2.2 序列的特点.....	17
2.2.3 数据分析.....	17
2.2.4 系统发育结果分析.....	18
2.3 结论和讨论.....	32
2.3.1 美丽桐属不属于 <i>Oleaceae</i> 、 <i>Carlemanniaceae</i> 、 <i>Stilbaceae</i> 和 <i>Scrophulariaceae</i>	32
2.3.2 美丽桐属与 <i>Orobanchaceae</i> 、 <i>Paulowniaceae</i> 、 <i>Phrymaceae</i> 等亲缘关系相 对较近.....	32



第三章 美丽桐属的系统学地位分析.....	35
3.1 实验材料与实验方法.....	35
3.1.1 实验材料.....	35
3.1.2 实验方法.....	36
3.2 结果和分析.....	37
3.2.1 测序结果.....	37
3.2.2 序列特点.....	37
3.2.3 数据分析.....	38
3.2.4 系统发育分析.....	38
3.3 结论与讨论.....	46
3.3.1 美丽桐属极可能属于 <i>Orobanchaceae</i> s.l.	47
3.3.2 美丽桐属与 <i>Phrymoideae</i> 亲缘关系较近	47
3.3.3 唇形目部分科间的系统发育关系尚待进一步分析.....	48
全文小结.....	50
附录 I	51
附录 II	65
附录 III.....	71
参考文献.....	72
致谢.....	78



前言

美丽桐属 (*Wightia* Wall.) 由 Wallish 在 1831 年建立, 为了纪念英国植物学家 Robert Wight 而命名。该属共有形态特征十分相似的两种: *W. speciosissima* (D. Don) Merr. 和 *W. borneensis* Hook. f., 分布范围为中国西南部、印度、缅甸、尼泊尔。我国仅有美丽桐 *W. speciosissima* 1 种, 产于云南省中南部。

历史上对美丽桐属植物的研究大都集中在形态学和孢粉学上。对美丽桐属形态上最详细的描述是 van Steenis (1949) 对美丽桐属植物标本及采集地进行的研究, 他总结前人对美丽桐属的研究认为该属植物有 2 种及 1 亚种: *W. speciosissima* (D. Don) Merr., *W. borneensis* Hook. f. 及 *W. borneensis* Hook. f. subsp. *ottolanderi* (Koord.) Steen.。

从形态上看, 美丽桐属由于种子无胚乳和叶腋有腺穴而归入紫葳科, 但是如果忽略这些和紫葳科相近的特征, 美丽桐属应属于玄参科。对于美丽桐属的近缘属, Bentham (1876) 认为美丽桐属与来江藤属、泡桐属有较近的亲缘关系。

孢粉学研究上, 韦仲新 (1989) 的研究表明, 美丽桐属和来江藤属、毛地黄属、泡桐属、玄参属的花粉无论从形状、大小等级和萌发沟数目上都与传统的玄参科一致。

数量分类研究上, 梁作栢 (1995) 对泡桐属和美丽桐属等相关属的形态特征进行数量关系研究表明美丽桐属与来江藤属植物聚在一起属于玄参科。

近年来随着分子系统学的发展, 植物学家也开始借助于分子手段来解决形态上难以确定的分类问题。1998 年 APG 系统的建立, 整个被子植物基于分子资料建立起来的系统相比传统分类系统有了很大的变化。广义玄参科 (形态分类) 被拆分, 许多类群归在不同的科内 (dePamphilis, 1995; dePamphilis *et al.*, 1997; Nickrent *et al.*, 1998; Wolfe & dePamphilis, 1998; Young & dePamphilis, 2000, 2005; Olmstead *et al.*, 2001; Wolfe *et al.*, 2005; Bennett & Mathews, 2006; Park *et al.*, 2008; Albanch *et al.*, 2009; Xia *et al.*, 2009)。原本认为与玄参科有密切关联的美丽桐属的地位变得更加不清楚, 与传统分类上认为的近缘属 (来江藤属和泡桐属) 的关系也变得不确定。至今美丽桐属的地位仍然悬而未决, 而与其相关的分子研究均未涉及该属。

在此背景下, 对美丽桐属及其它相关科 (属) 进行全面的分子系统学研究, 探讨美丽桐属的系统位置, 了解其近缘类群, 对于完善整个唇形目的构建及加深对相

属的亲缘关系的了解有重要的意义。

为此,本研究设计采用叶绿体编码基因 *rbcL* 和 *ndhF*、叶绿体非编码基因 *trnL-F* 基因间区和 *rps16* 内含子、核基因组核糖体内转录基因间区 ITS 共 5 个片段分别及合并对美丽桐属在唇形目内的系统位置及其与近缘科属的系统发育关系进行研究。

第一章 文献综述

1.1 唇形目分子系统学研究进展

1.1.1 唇形目简介 (APG III)

1998年12月, 由Bremer等29位植物学家组成的被子植物系统发育小组 (APG) 提出“一个被子植物目的分类系统”, 从1998年开始, 根据近年来研究者所作的工作几经修改, 到2009年已有两次修改。与传统的被子植物分类系统不同点在于, APG系统是基于分子资料建立起来的新分类系统。该系统在目以上没有采取传统的分类方式, 例如门和纲, 而是采用“分支”。对于分类不明确的属或科可以独立成一分支。与传统分类的“目”不同, APG系统认为“目”是单系类群。划分“目”的界限首先是考虑单系原则, 其次还要依据其他方面的证据 (例如解剖、生化及发育性状等)。该系统最初建立时有462个科和40个假定的单系的“目”, 还有些非正式的单系族。2003年将其修订为45个目和457个科 (APGII, 2003)。2009年进一步修订为59个目和413个科 (APGIII, 2009), 并在此基础上又发表了两篇关联文章, 其中一篇文章中作者接受Lewis和McCourt在2004年的观点, 将有胚植物作为Equisitopsida纲, 被子植物作为Magnoliidae亚纲, 被子植物亚纲下分成16个超目 (suporder)、59个目 (Chase & Reveal, 2009)。该系统到目前为止大的框架已基本形成, 仍缺一些详细的工作来细化这个分类系统。

传统的分类系统中 (Cronquist system) 唇形目的范围仅局限于唇形 (Lamiaceae) 紫草科 (Boraginaceae)、马鞭草科 (Verbenaceae) 及Lennoaceae 4科, 而基于分子系统学研究的APG系统中, 唇形目的范围要比传统的分类系统更为广泛, 包括爵床科 (Acanthaceae)、紫葳科 (Bignoniaceae)、苦苣苔科 (Gesneriaceae)、唇形科 (Lamiaceae)、狸藻科 (Lentibulariaceae)、木犀科 (Oleaceae)、列当科 (Orobanchaceae)、胡麻科 (Pedaliaceae)、泡桐科 (Paulowniaceae)、透骨草科 (Phrymaceae)、车前科 (Plantaginaceae)、玄参科 (Scrophulariaceae)、母草科 (Linderniaceae)、Thomandersiaceae等23个类群 (APG III, 2009)。唇形目所包含类群扩大范围的同时, 许多相关科特别是玄参科的范围也有大幅度的调整。

1.1.2 广义玄参科拆分及相关科的重组

在 Cronquist 被子植物分类系统中, 玄参科约含 200 属, 3000 多种, 全球广布。

该科特征通常为草本, 具花冠, 常为二唇形, 子房 2 室、胚珠多数, 但是玄参科中也存在与其他科共有的特征, 例如泡桐属为木本、毛蕊花属具 5 枚花冠裂片且近辐射对称。相对于玄参科, 其他科则均能找到各自独特的特征, 例如紫葳科属内全为无胚乳具翅种子、列当科为失去光合作用的全寄生植物、唇形科和马鞭草科的胚珠明显减少、车前科植物为风媒植物 (Olmstead *et al.*, 1995; Tank *et al.*, 2006)。Juan 等 (2000) 利用果实和种子的性状对产于西班牙的广义玄参科 19 属 (分属 8 个族) 进行了研究, 结果表明 Scrophulariaceae s.l. 在亚科及族水平上存在明显分化, 为多系起源类群。Olmstead 和 Reeves (1995) 利用叶绿体基因 *rbcL* 和 *ndhF* 对广义玄参科进行研究, 结果表明该科并非单系起源, 与此同时 dePamphilis 等 (1997) 利用叶绿体基因 *rps2* 研究半寄生和全寄生植物的系统发育关系发现, 原本属于玄参科的具半寄生特性的属与狭义列当科 (Orobanchaceae s.s.) 聚在一起。这两个独立的研究打破了传统玄参科的界限, 从分子角度阐明了玄参科是多系起源的可能性 (Tank *et al.*, 2006)。

Olmstead 和 Reeves (1995) 利用叶绿体基因 *rbcL* 和 *ndhF* 对广义唇形目 (Lamiales s.l.) 中包括外类群在内的 32 个种进行研究, 发现广义玄参科 (Scrophulariaceae s.l.) 被分为两大支, 一支为 'Scroph I', 包括 *Verbascum*、*Celsia*、*Selago*、*Scrophulara*、*Buddleja* 和 *Nicodemia*。第二支包括 *Antirrhinum*、*Digitalis*、*Vernica*、*Veronicaceae*、*Callitrichaceae* 和 *Hippuridaceae*。随后对第二支所包含的类群进行更大范围的取样, 运用核基因 ITS、叶绿体基因 *trnL-F*、*rps16*、*matK-trnK* 内含子研究, 结果发现 *Digitalis* 代表类群和 *Plantago* 聚在一起, 并与 *Antirrhineae*、*Gratiolaeae*、*Cheloneae*、*Angelonieae*、*Angelonieae* 四个族及 *Globulariaceae*、*Callitrichaceae* 和 *Hippuridaceae* 三个小科聚在一起, 组成新的 *Veronicaceae* (Albach *et al.*, 2005)。*Schlegelia* 和 *Paulownia* 则没有足够的证据属于哪个科 (Olmstead & Reeves, 1995), 后续的研究表明这两个属不属于紫葳科 (Spangler & Olmstead, 1999) 而是各自成为独立的科 (Beardsley & Olmstead, 2002; Olmstead *et al.*, 2009; Schäferhoff *et al.*, 2010)。

DePamphilis 等 (1997) 利用叶绿体编码基因 *rps2*, Wolfe 和 dePamphilis (1998) 利用叶绿体基因 *rbcL*, Young 等 (1999) 应用叶绿体基因 *matK* 和 *rps2*, Bennett 和 Mathews (2006) 应用核基因 *phyA* 对寄生和半寄生植物研究表明: 狭义列当科

(Orobanchaceae.s.s.) 与广义玄参科 (Scrophulariaceae s.l.) 中半寄生植物构成一个单系类群, 形成了除 Olmstead 和 Reeves (1995) 的两大分支以外的第三分支, 建议第三分支称为广义列当科(Orobanchaceae s.l.) (Young *et al.*, 1999)。列当科的范围也从仅包括全寄生植物扩大到包括广义玄参科中半寄生类群、列当科 (orobanchaceae s.s.) 和自养属钟萼草属 (*Lindenbergia*) (dePamphilis, 1995; dePamphilis *et al.*, 1997; Nickrent *et al.*, 1998; Wolfe & dePamphilis, 1998; Young & dePamphilis, 2000, 2005; Olmstead *et al.*, 2001; Wolfe *et al.*, 2005; Bennett & Mathews, 2006; Park *et al.*, 2008; Albanch *et al.*, 2009; Xia *et al.*, 2009)。而最近关于地黄属和崖白菜属的系统学研究认为, 地黄属和崖白菜属构成独立的一支, 与广义列当科构成姊妹群关系, 并认为地黄属和崖白菜属可归于列当科或者独立成科 (Albanch *et al.*, 2009; Xia *et al.*, 2009)。从种子形态方面来看, 列当科与地黄属和崖白菜属都有蜂窝状种皮 (Xia *et al.*, 2009), 也进一步印证了它们之间的亲缘关系。

Olmstead 等 (2001) 应用叶绿体基因 *rbcL*、*ndhF* 和 *rps2* 三个基因对广义玄参科中 24 个族和唇形目其他 15 个科进行系统关系研究。相比起 Olmstead 和 Reeves (1995), 这次的取样范围更广, 将广义玄参科划分为至少五个单系群, Olmstead 等 (2001) 认为的 Scrophulariaceae s.s. 和 Veroniaceae 分支与 Olmstead 和 Reeves (1995) 中的两个分支对应。Globulariaceae 中的 Selagineae 和 Myoporaceae 属于 Scrophulariaceae s.s. 分支, Globulariaceae 其余类群包括在 Veronicaceae 里。第三分支为广义的列当科, 包括全寄生和半寄生植物以及一个自养属钟萼草属。第四分支为 Calceolariaceae, Olmstead 等 (2001) 认为 *Jovellana* 和 *calceolaria* 是不同于玄参科的一支谱系, 应从玄参科中分离出来, 提升为 Calceolariaceae, 并提议将 *Porodittia* 作为 Calceolariaceae 的一个属, 但是随后的研究 (Andersson, 2006) 证明 *Porodittia* 是嵌套在 *Calceolaria* 中的。Oxelmann 等 (2005) 将 Stilbaceae 各属纳入研究, 支持 *Halleria* 和 Stilbaceae s.s 组成新的 Stilbaceae, 将其扩展为 11 个属。而 *Mimulus* 却与唇形科、泡桐属和列当科聚在一起, 不属于上述任何分支。

Beardsley 和 Olmstead (2002) 运用叶绿体基因 *trnL-F* 和核基因 ITS、ETS 将 *Mimuleae* 和跟其有密切关系的科进行研究, 结果表明澳大利亚属 *Glossostigma* 和 *Peplidium* 与 *Phryma* 聚在一起, 称为透骨草亚科; *Mazus* 和 *Lancea* 两个属聚成一支成为通泉草亚科。这两个亚科一起作为透骨草科, 但聚在一起的支持率并不高,

Mimulus 在内的透骨草科作为第六支。Albanch 等 (2009) 和 Xia 等 (2009) 分别独立对亚洲属地黄属和崖白菜属及相关属的系统关系研究, 其中也涉及到通泉草属 (*Mazus*) 和肉果草属 (*Lancea*), 认为这两个属不应该包括在透骨草科内, 而应该与透骨草亚科并列, 并有作者建议将其提升到科的等级。这种处理是否合理还需要更详细的取样研究才能够确定。而对于透骨草科整个科内属的划分和它与唇形目各科的关系依旧不清晰, 需要更多的证据支持 (Schäferhoff *et al.*, 2010)。

Beardsley 和 Olmstead (2002) 研究中表明 *Lindernieae* 不属于新的 *Veronicaceae* (Olmstead & Reeves, 1995), 应该从 *Gratiroleae* 移出。Rahmanzadeh 等 (2005) 扩大取样范围将属于广义玄参科的 *Lindernieae* 族的类群提升为科等级, 为母草科 (*Linderniaceae*), 成第七分支 (Rahmanzadeh *et al.*, 2005; Schäferhoff *et al.*, 2010)。在 Rahmanzadeh *et al.* (2005) 的研究中认为 *Gratiroleae* 是与 *Veronicaceae* 不同的分支, 将其提升为科的等级为 *Gratiolaceae*, 而在 Olmstead 等 (2001) 的研究中是将 *Gratiroleae* 归到 *Veronicaceae* 里。随后更详尽的研究 (Albach *et al.*, 2005; Oxelman *et al.*, 2005; Schäferhoff *et al.*, 2010) 仍支持 *Gratiroleae* 归到 *Veronicaceae* 里。

至此, 玄参科类群的重新定位基本完成, 除部分类群仍在玄参科内, 其余类群则被分散在车前科、列当科里; 而有些属则独立成科, 例如泡桐科, 母草科, 蒲包花科等。

1.1.3 唇形目其他科的变动

Wortley 等 (2007) 研究 *Thomandersia* 的标本并比较 DNA 序列发现该属与 *Schlegeliaceae* 成姊妹群, 形成明显不属于爵床科的分支。他认为传统上将该属分到爵床科并不恰当, 应作为 *Thomandersiaceae* 从爵床科中分离出来, 但仍处于唇形目。

Albach (2001) 利用 18S rDNA, *rbcL*, *ndhF* 和 *atpB* 基因研究菊分支 (*Asterids*) 内各科关系, 结果显示 I 类真菊分支包括 *Lamiales*, *Boraginaceae*, *Solanales*, 和 *Gentianales*。第一次提出紫草科与唇形目为姊妹群, 但支持率不高, 因此原本在传统分类系统 (Cronquist 分类系统) 中属于唇形目的紫草科暂时没有证据能否归入唇形目, 但作为唇形目的姊妹群归入 *Limiids* 里 (Albach, 2001; APG III, 2009)。

1.1.4 唇形目系统发育研究常用分子标记

从以上的研究我们可以看出, 对唇形目及目内各科的研究集中在利用叶绿体基因 *rbcL*, *ndhF*, *rps2*, *rps16*, *atpB*, *trnK*, *matK*, *trnL-F* 和核基因 *phyA*, *ITS*,

ETS, 18S rDNA 进行单个或合并基因数据集进行系统发育研究。

目前对于植物系统发育关系研究,应用基因片段主要集中在叶绿体基因、核基因,线粒体基因由于其进化比较缓慢,应用较少。植物叶绿体基因主要由单拷贝序列构成,为单亲遗传(一般为母系遗传),与核基因组相比,该基因组没有基因重组问题(Gamer *et al.*, 1998)、不易受网状进化的影响、构建分子系统树相对容易,且叶绿体 DNA 容易提取、扩增引物通用等优点,使其在系统发育研究中得到广泛应用。

叶绿体基因含系统发育价值的很多,*rbcL* 基因是常用解决科级及远缘属系统关系的叶绿体基因,其中最重要的文章是基于 1993 年 Chase 利用 *rbcL* 基因序列对整个种子植物进行的系统发育重建,它是种子植物系统发育研究的一个里程碑(Chase *et al.*, 1993; 汪小全和洪德元, 1997)。*rbcL* 还广泛应用于许多分类群的系统发育研究中,从科内(eg: Xiang *et al.*, 1993; Olstead & Reeves, 1995; Fay & Chase, 1996; Morton *et al.*, 1997; Richardson *et al.*, 2000; Schwarzbach & Ricklefs, 2000) 到显花植物主要谱系间(Olmstead *et al.*, 1992)及整个蕨类(Hasebe *et al.*, 1995) 都有涉及。

除了 *rbcL* 基因外,更多的叶绿体基因(如 *matK*, *ndhF*) 等被运用于不同的科、目甚至整个被子植物的系统发育研究中。*matK* 基因进化速率大约是 *rbcL* 的 2-3 倍,*ndhF* 基因核苷酸替换速率约 *rbcL* 的 2 倍,在某些类群里可以更好地解决系统发育关系(石开明等, 2002; 田欣和李德铎, 2002)。Kim 和 Jansen (1995) 研究菊科内 *ndhF* 基因的进化且利用 *ndhF* 基因构建菊科的主要分支,研究表明在菊科内比起 *rbcL*, *ndhF* 更有利于解决菊科的系统关系。在唇形目的研究中也较常用到 *ndhF* 基因, Olmstead 和 Reeves (1995) 利用叶绿体基因 *rbcL* 和 *ndhF* 对广义玄参科进行研究解决了玄参科多系起源的问题。

叶绿体中非编码区基因由于不受进化压力的影响,进化速率较快,可以解决科内属间的亲缘关系。较常运用的是 *trnL-F*、*rps16* 内含子。Richardson 等 (2000) 对 Rhamnaceae 内族的分类研究中,选取科内及近缘科代表属进行系统发育研究发现:相比 *rbcL* 基因, *trnL-F* 非编码区能更好地解决问题。Downie 等 (1999) 运用 *rps16* 内含子对南美 Apioideae 中 13 个内类群及两个外类群进行系统发育研究,较好地解决了各亚族范围界定和相互间系统关系。Wallander 和 Albert (2000) 利用 *trnL-F* 和 *rps16* 内含子将木犀科 25 个属 76 个种进行研究,很好地解决了木犀科属间关系。

Oxelman 等 (2005) 利用 *ndhF*、*trnL-F* 和 *rps16* 大范围取样更好地证实了玄参科的多系起源问题。

核基因 ITS 用来检测属内和关系较近的属间关系十分有价值。在众多的分子片段中 ITS 也是常用的分子标记之一 (Baldwin, 1995; Alvarez & Wendl, 2003)。由于关系密切的物种间 ITS 长度接近, 而序列有一定程度的变异, 因此, 该片段特别适合于属、组级的系统发育和分类研究。Samuel 等 (1998) 和 Manos (1999) 分别对柞属用核糖体 rDNA 的 ITS 序列为标记, 进行系统进化关系研究, 发现利用各自获得的 ITS 基因构建的系统树结果并不相同, Mayol 和 Rossello (2001) 对两个研究所获得的 ITS 基因长度、GC 含量、应用 MFOLD 软件构建的 RNA 的二级结构的热力学稳定性进行分析, 发现 ITS 存在假基因, 如果得到的基因是含假基因的序列即没有功能的平行进化的同源基因片段, 那么得出的系统关系有时候并不准确 (马长乐和周浙昆, 2006)。假基因的存在使得相应的系统进化分析就会因同一物种中多样化的序列类型而无法构建出可靠的进化树 (Bailey *et al.*, 2003)。随着分子系统学研究的发展, 研究者将自己研究所获得的分子片段提交到 genbank 中可以供其他研究者参考, 从而有效的避免这种情况的发生。

最初对于唇形目的研究选取的片段主要集中在较为保守的序列 (eg: Olmstead *et al.*, 1995; Olmstead, 2000; Olmstead *et al.*, 2001), 随着研究的深入发现利用进化速率较快的叶绿体内含子有更好的效果。对于内含子的研究证实, 内含子除了解决较低分类阶元对于解决远缘科间关系也表现出很有价值的系统发育信息 (eg: Borsch, 2003; Worberg *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2006)。Oxelman 等 (2005) 利用 *rbcL*、*ndhF* 和 *rps16* 研究广义玄参科系统发育关系, 比 Olmstead 和 Reeves (1995) 利用 *rbcL* 和 *ndhF* 有更好的分辨率。闫坤 (2008) 利用 *rbcL*、*ndhF* 和 *rps16* 单独和联合基因片段研究地黄属和崖白菜属的系统关系发现联合进化速率较快的基因内含子 (*rps16*) 能更好地解决两属与相关属乃至相关科的系统发育关系。最近 Schäferhoff 等 (2010) 利用叶绿体内含子 *trnK/matK*, *trnL-F* 和 *rps16* 对唇形目各科进行系统发育研究, 不仅第一次解决了唇形科和马鞭草科之间的系统关系, 而且较好地解决了唇形目内各科系统关系。他认为之前的研究利用叶绿体基因 *rbcL* 和 *ndhF* 基因解决科内或者唇形目内各科的关系的分辨率不高, 比起进化比较保守的叶绿体基因, 叶绿体中进化速率较快的内含子基因能更好地解决唇形目系统发育关系, 尽管支持率偏低, 但是

也为解决唇形目关系的研究提供了更有利的基因片段和手段。

1.2 美丽桐属研究综述

1.2.1 美丽桐属简介

美丽桐属 (*Wightia* Wall.) 由 Wallish 建立于 1830 年, 是为了纪念东印度植物图谱作者 Robert Wight (1796-1872) 来命名的 (Maheshwari, 1961)。该属植物可长成乔木, 或为半附生的假藤本, 或为寄生的灌木, 小枝有髓。叶对生, 革质, 全缘, 多少有星毛, 有时下面脉腋中有杯状腺体。花集合为侧生的聚伞圆锥花序或总状花序, 每一小聚伞花序有花 3-9 朵; 花萼钟形, 质厚, 不规则 3-4 裂或几近截头; 花冠具向前弯曲的花冠管, 花冠呈二唇形, 上唇直立, 2 裂, 下唇 3 裂, 伸展; 雄蕊二强, 着生于近花冠管基部, 有毛, 上部伸出花冠之外, 花药基着, 矩圆状戟形, 基部 2 裂, 药室并行, 顶端多少汇合; 无退化雄蕊; 花柱伸长, 顶端内曲, 柱头不明显, 子房 2 室, 各具多数胚珠, 具盾形的胎座。蒴果卵圆形至披针形, 2 裂, 裂瓣边缘强裂内卷, 自生有胎座的中轴脱离; 种子多数, 条形, 外种皮薄而透明, 膨大为环绕无缺的狭翅 (钟补求, 1979), 种子无胚乳 (van Steenis, 1949)。

该属植物分布范围为我国西南部、印度、缅甸、尼泊尔。可作庭园观赏树及行道树 (钟补求, 1979)。

我国仅分布一种, 为美丽桐 (*W. speciosissima* (D. Don) Merr.), 别名崖梧桐、石牡丹, 分布于云南中部及南部, 生长于海拔 2500 米以下的林中或田边 (尹文清和陶定德, 1979)。本属植物可作观赏花木, 根可作药用, 味微辛, 治跌打骨折、风湿关节炎、胃痛、月经不调、体虚 (中华本草编委会, 1999)。

1.2.2 美丽桐属研究历史

1.2.2.1 美丽桐属内种类

美丽桐属植物由于叶形、被毛情况、花萼花冠比例变化较大, 甚至同一标本也不尽相同, 因此对于属内有几种, 历史上对其的研究也是存有争议 (van Steenis, 1949)。Don (1825) 将美丽桐作为 *Gmelina speciosissima* D. Don 发表, Wallich 于 1821 年在尼泊尔采集到美丽桐属标本, 并于 1830 年将其命名为 *Wightia gigantea* Wall. (Wallich, 1830)。随后还陆续出现了多个名称, 如 *W. borneensis* (Hooker, 1883)、*W. otolanderi* (Koorders, 1912)、*W. aplinii*, *W. lacei* (Craib, 1913) 和 *W. elliptica*

(Merrill, 1938) 等。van Steenis (1949) 利用美丽桐属标本和实地考察, 对其花、果实、叶片形态及被毛情况、植株生态型、地理分布五个方面进行详细研究后, 将前人对美丽桐属植物 6 个名称进行合并和剔除, 认为美丽桐属仅有 2 个种, 分别为 *W. speciosissima* (D. Don) Merr., *W. borneensis* Hook. f. 和 1 个亚种 *W. borneensis* Hook. f. subsp. *ottolanderi* (Koord.) Steen.; 其它名称 *Gmelina speciosissima*、*W. gigantea*、*W. aplinii*、*W. lacei* 及 *W. elliptica* 均为美丽桐 *W. speciosissima* 的异名。中国植物志亦认为该属仅 2 个种 (钟补求, 1979)。

1.2.2.2 美丽桐属生态型

据中国植物志记载, 美丽桐属生态型有乔木, 灌木, 附生藤本, 表明美丽桐属植物能适应不同的生活环境。van Steenis (1949) 对美丽桐属植物标本采集地的研究发现, 美丽桐属的生态型似乎随着环境的变化有所不同: 在阴暗的森林里是附生植物, 到贫瘠的环境中变成陆生灌木, 中间过渡类型为半附生植物, 半附生的美丽桐属植物长出粗的类似于茎的根, 像假藤本; 在阳光充足、潮湿且空旷的地方可以长成高大的乔木。

在热带雨林中, 美丽桐属植物一旦有机会也会成为先锋植物, 如自然的或人为因素使植被遭到破坏。在贫瘠的环境美丽桐属会提前开花、产生大量发芽力强的种子, 以抵御不良环境。这些情况表明, 美丽桐属植物在其它热带雨林植物面前并无优势, 但是它却可以抗衡不良的环境 (van Steenis, 1949)。

在研究美丽桐属生活型的同时, 植物学家在美丽桐标本上发现有蚂蚁存在。起初认为是属于“与蚁共生”, 但是随后发现蚂蚁穴的位置不固定, 且会破坏美丽桐的新芽, 这与共生的特点不相符。这个现象表明并非与蚁共生, 蚂蚁存在可能只是受美丽桐叶片腺体的吸引所致 (van Steenis, 1949)。

1.2.2.3 美丽桐属归科问题

美丽桐属植物最早的标本采集于 1802-1819 年间, 存于 Horsfield 标本馆 (van Steenis, 1949)。该属由 Wallich 建立于 1830 年并被置于紫葳科 Bignoniaceae, 但是他认为美丽桐属除部分特征与紫葳科相似外, 其他特征均与紫葳科明显不同。Bentham 和 Hooker (1880) 将其放进玄参科金鱼草族 Cheloneae 里, 后来许多植物学家也认同这种处理。1920 年 Pennell 认为应该将泡桐属上升为泡桐族, 包括泡桐属和美丽桐属, 将其放在金鱼草亚科里, 这种处理方式得到 van Steenis, Gleason,

Willis, Hu 的认可,但是也受到 Campbell, Li 和 Lawrence 的反对 (Mahshwari, 1961)。Hallier 认为美丽桐属与泡桐属为关系比较密切的属,应该同属于相同的科,这样的话那么对于种子是否有胚乳就不是一个关键的特征;但是如果将两者均放入紫葳科的话,由于泡桐属和美丽桐属的蒴果开裂方式不同,美丽桐属被划到 Bignoniaceae 而泡桐属放进 Tecomaceae,这两个属就会属于不同的族。近年来许多分子研究也证实泡桐属不属于紫葳科 (Spangker & Olmstead, 1999; Olmstead, 2009)。许多人认为依据经典植物分类原则 (Bentham & Hooker 的植物属志, Engler & Prantl 的 Die naturlichen pflanzenfamilien) 应该将美丽桐属移入玄参科 (Hooker, 1883, 1884; Gamble, 1896; Prain, 1906; Brandis, 1907; Craib, 1913; Ridley, 1923; Cowan & Cowan, 1929; Merrill, 1934, 1938; Kanjilal, 1939; Bor, 1953; Willis, 1955),但是由于美丽桐属的乔木或假藤本习性、叶表面存在蜜腺、种子有翅和无胚乳等特征又适于划入紫葳科。但是无论美丽桐属归入玄参科还是紫葳科,美丽桐属都处于孤立的地位,因此目前从形态上去定义美丽桐属植物的归科问题仍是悬而不决的。

国内的研究者对美丽桐属的归科问题也有不同的观点:在中国植物志中,美丽桐属是放在玄参科内,而在云南植物志中则放在紫葳科中。云南植物志最主要的观点是认为美丽桐属叶背近脉腋处密生腺穴,习性为乔木,蒴果室间开裂,与胎座轴分离,种子周围具翅,应将其移入紫葳科中。

由于不同植物分类学家对于不同科的同一种性状重视程度不同,对分科的标准也是五花八门,加上美丽桐属存在许多祖征,使得美丽桐属连同泡桐属、来江藤属一直属于有问题的属,在玄参科和紫葳科之间移动。

1.2.3 美丽桐属和假定近缘属的分类关系和存在问题

从形态分类和地理分布区域来看,美丽桐属由于其大型叶、乔木及分布区域特点与泡桐属关系非常密切 (van Steenis, 1949),而其半附生的特性又与来江藤属等玄参科中的半寄生植物联系起来。

韦仲新 (1989) 年对美丽桐属及相关花粉形态研究表明美丽桐属和来江藤属、毛地黄属、泡桐属、玄参属的花粉无论从形状、大小等级和萌发沟数目上都支持它们归入传统的玄参科。梁作楠 (1995) 年对泡桐属和美丽桐属等相关属的 29 个形态特征进行数量关系研究表明美丽桐属与来江藤属植物聚在一起属于玄参科。随着广义玄参科的拆分,毛地黄属已归为车前科 (Olmstead *et al.*, 1995; Olmstead *et al.*,

2001; Albach *et al.*, 2005; Albach *et al.*, 2009; Xia *et al.*, 2009); 泡桐属则从玄参科分离独立成属或为泡桐科 (Spangler & Olmstead, 1999; Olmstead *et al.*, 2001; Bremer *et al.*, 2002; Oxelman *et al.*, 2005; Albach *et al.*, 2009; Xia *et al.*, 2009)。Rebernig 等 (2007) 对广义玄参科种子基座 (seed pedestal) 类型的研究, 认为泡桐属存在独特的种子基座类型, 支持将泡桐属提升为泡桐科的观点。而对于来江藤属研究表明, 来江藤属处于列当科所在分支里 (Oxelman *et al.*, 2005; Benntt & Mathews, 2006; 闫坤, 2008; Albach *et al.*, 2009)。Bentham (1876) 认为来江藤属与泡桐属和美丽桐属有较近的亲缘关系, 但是分子证据并不支持来江藤属与泡桐属近缘这一结论, 而美丽桐属尚无分子取样研究。

由于形态解剖学特性在不同科内交叉呈现的事实, 只是依据传统的形态分类标准来确定美丽桐属的地位, 变得越来越不现实。我们需要结合分子方面的证据来确定美丽桐属的系统位置。美丽桐属与泡桐属和来江藤属有何关联, 属于紫葳科还是玄参科, 或者是否属于泡桐科, 还是属于广义列当科, 抑或是跟钟萼草属、地黄属和崖白菜属一起作为列当科的姊妹群, 抑或与唇形目 (APG III) 其它科有更近的亲缘关系, 需要分子证据来检测。

第二章 美丽桐属的近缘科检测

2.1 实验材料和实验方法

2.1.1 实验材料

2.1.1.1 美丽桐属科级系统位置分析内类群选择

本文研究内类群的选择均为唇形目 (APGIII, 2009) 科属, 主要依据下列原则进行选择: (1) 尽量选取与美丽桐属有密切关系的科, 例如: 紫葳科 (Bignoniaceae), 玄参科 (Scrophulariaceae), 列当科 (Orobanchaceae) 等; (2) 在 genbank 中搜索选定属 *ndhF* 和 *rbcL* 的序列信息, 如无则选取近缘属序列信息较齐的属代替; (3) 如所选属较重要, 则采取实验材料进行测序补充, 实验材料标本信息见表 2-1, 其余取自 genbank 的物种信息列于附表 1。

表 2-1 材料来源及相关信息

Table 2-1 Information of experimental material

标本名称	采集号	采集时间	采集地点	采集人
松蒿 <i>Phtheirospermum japonicum</i>	Lihq200902	2009.07.27	吉林抚松	李宏庆
翅茎草 <i>Pterygiella duclouxii</i>	PB-09	2009.	云南屏边	董丽娜等
方茎草 <i>Leptorhabdos parviflora</i>	Lihq2006867	2006.9.	新疆乌鲁木齐	李宏庆
马先蒿 <i>Pedicularis foliosa</i>	Lihq200979	2009.09.20	广东乳源	李宏庆
岭南来江藤 <i>Brandisia swinglei</i>	Lihq200963	2009.09.20	广东乳源	李宏庆
美丽桐 <i>Wightia speciosissima</i>	Lihq2008164	2008.07.23	云南景东	李宏庆
	Lihq2009448	2009.12.31		
小米草 <i>Euphrasia stricta</i>	Lihq200946	2009.08.28	西藏波密	李宏庆
肉果草 <i>lancea tibetica</i>	Lihq200913	2009.08.15	西藏亚东	李宏庆
绵毛鹿茸草 <i>Monochasma savatieri</i>	Lihq200961	2009.09.07	江苏宜兴	李宏庆, 刘国丽
透骨草 <i>Phryma leptostachya</i>	2010040	2010.04.20	浙江临安	葛斌杰, 王双

2.1.1.2 美丽桐属科级系统位置分析外类群选择

依据外类群选择原则, 选取与唇形目亲缘关系较近且在处于较原始位置的类群。美丽桐属近缘科检测的外类选择是在唇形目 (APGIII, 2009) 内选择, Olmstead 等 (2000) 和 Bremer 等 (2002) 对 Asterids 的系统发育分析表明, Gentianales (龙胆目) 与唇形目亲缘关系最近且符合外类群选取原则。因此本文外类群选取均在龙胆目中, 其中夹竹桃科选取长春花属 (*Vinca*) 和茜草科选取咖啡属 (*Coffea*) 和 *Scyphiphora*。

2.1.2 实验方法

2.1.2.1 材料总 DNA 的提取

实验材料为所选植物的嫩叶或用硅胶干燥的叶片，DNA 提取法为改进的尿素法，步骤如下：

- (1) 取 0.05 克硅胶干燥材料叶片或 0.5 克新鲜植物叶片放入研钵中，加入适量 PVP 和石英砂，研磨成粉末状。
- (2) 然后加入 400 μl Lysis Buffer 快速研磨后装入 2 ml 离心管内，再用 400 μl Buffer 冲洗研钵，一并转入离心管内。
- (3) 加入 600 μl 酚-氯仿 (1:1) 混合液，充分摇匀 30 sec，使蛋白质变性。12000 rpm 离心 10 min，取上清液。
- (4) 重复步骤 3。
- (5) 加入上述步骤上清液体积 2 倍的无水乙醇和 1/2 体积的 5 mol/L 的 NaCl，混匀后 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱沉淀 1 h。
- (6) 12000 rpm 离心 10 min，将上清液去除，沉淀溶于 200 μl TE 加入 600 μl 异丙醇上下颠倒混匀 (确保沉淀完全溶解)，加入 50 μl 3 mol/L 的 NaAC，放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱沉淀 0.5 h (新鲜植物可省略沉淀时间)。
- (7) 12000 rpm 离心 5 min，去除上清液，沉淀溶于 400 μl TE，加入 1 ml 无水乙醇和 40 μl 3 mol/L 的 NaAC，混匀放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱沉淀 0.5 h 后 12000 rpm 离心 5 min (新鲜植物可省略沉淀时间)。
- (8) 去上清，用 800 μl 70%乙醇洗涤 1-2 次 DNA 沉淀，离心，去上清。
- (9) 室温干燥，沉淀溶于 50 无菌水中，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。
- (10) 1%琼脂糖电泳检测 DNA 质量。

2.1.2.2 所选基因片段扩增测序

叶绿体基因 *ndhF* 长度约为 2300bp，*rbcL* 片段为 1400bp。为了扩增需要，将 *ndhF* 基因分为四段扩增，*rbcL* 分为两段，每段分别加以扩增测序，各基因扩增及测序引物见表 2-2

以上基因的扩增体系为：2.5 μl MgCl_2 (终浓度 2.5 mM)，2.5 μl 10 \times Buffer，2 μl dNTP (终浓度 0.2 mM)，0.5 μl Taq 酶 (以上药品均购自天根生物科技有限公司 北京)，上下引物各 1.5 μl (终浓度 0.3 mM)，1 μl 模板，最后用三蒸水补足到 25 μl 。

PCR 扩增程序为：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min，94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min，45 $^{\circ}\text{C}$ ~50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 sec，

72℃延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后 72℃延伸 7 min。

PCR 反应在 TP600 PCR 仪 (宝生物工程有限公司 大连) 上进行。

PCR 产物在 1%的琼脂糖凝胶上电泳 0.5 h (1×TAE) 分离后割胶回收, 使用 DNA 树脂回收试剂盒 (天根生物科技有限公司 北京) 纯化后, 由英骏 (Invitrogen) 生物公司用 ABI 3730 或 377 自动测序仪 (Applied Biosystems 美国) 测序。

表 2-2 扩增及测序引物序列名称、序列和参考文献

Table 2-2 The names, sequences and references of primers used in amplification and sequencing

基因片段	引物名称	方向	引物及测序序列	参考文献
ndhF1	ndhF-(-47)	正向	AGGTAAGATCCGGTGAATCGGAAAC	Kornhall <i>et al.</i> 2001
	ndhF-40*	Forward	TTCCACTTCCAGTTCCTATGTTAATA	
	ndhF-925R	反向	GG*	
ndhF2		Reverse	CCTCTCTTAATGTCTTTTTGAGCAAG	Bremer <i>et al.</i> 2002 Kornhall <i>et al.</i> 2001
	ndhF-4F (590)	正向	AGCT	
	ndhF-1350R	反向	TTGGATAACGGGGAGTTTCGAATTT	
ndhF3		Reverse	GTAATAGATCCGAAACATATAAAA	Kornhall <i>et al.</i> 2001 Kornhall <i>et al.</i> 2001
	ndhF-1200	正向	AGGTACACTTCTCTTTGCGGTATTC	
	ndhF-2065R	反向	C	
ndhF4		Reverse	CCAACYCCATTYGTAATTCATCAA	Kornhall <i>et al.</i> 2001 Kornhall <i>et al.</i> 2001
	ndhF-1811	正向	CAGTCAGTATAGCTTATTTAGGAAT	
	ndhF-(+606R)	反向	ACCAAGTTCAATGTTAGCGAGATTAG	
rbcL1		Reverse	TC	Bremer <i>et al.</i> 2002
	rbcL-5'F	正向	ATGTCACCACAAACAGAAACTAAAG	
	rbcL-Z895R	反向	C	
rbcL2		Reverse	ACCATGATTCTTCTGCCTATCAATAA	Bremer <i>et al.</i> 2002
	rbcL-Z674F	正向	C TGC	
	rbcL-3'R	反向	TTTATAAATCACAAGCCGAAACTGG	
		Reverse	TG AAATC	
		Reverse	CTTTTAGTAAAAGATTGGGCCGAG	

2.1.3 序列编辑及比对

测序序列用 DNASTar 软件中的 Seqman 软件进行比对后确定各序列碱基。从 genbank 中下载的序列和测序序列利用 MEGA 3.1 进行比对, 由于测序 5' 端和 3' 端信号较差, 测序结果不可靠, 而且从 genbank 中下载的不同物种同一基因

片段序列长度不一致, 首尾有~50bp 碱基不能比对, 将其舍弃后部分序列仍有缺失则用 n 补齐。比对结果进行手工调整, 避免出现比对错位。序列保存为*.meg 格式后转换为*.nex 格式, 可用于后续的系统分析检测和系统发育树构建。

2.1.4 数据特征分析

数据在进行系统发育之前要先进行检测, 来确定是否具有系统发育信息常用的分析方法包括以下四个方面:

2.1.4.1 序列特征分析

首先是利用 MEGA 3.0 来计算碱基含量、变异位点和信息位点。

2.1.4.2 g1 值检验

g1 值(Hillis & Huelsenbech, 1992) 检验目的是为了检测数据是否含有较强的系统发育信息。如果 $g1 < 0$, 表明数据集含有较强的对系统发育分析有价值的信息, 即树长的分布检验成非正态分布。g1 值一般为随机抽取 10000 棵树进行运算。

2.1.4.3 PTP 检验

PTP 检验 (Faith *et al.*, 1991) 是序列随机突变排列概率检验, 一般需要进行 1000 次重复, 通过构建简约树比较随机数据与原始数据的简约树的树长, 从而确定原始数据中是否存在有价值系统发育信息。

2.1.4.4 同质性检验

系统发育分析中除了单片段分析之外, 还可以联合各片段进行分析。合并分析是否可行, 需经过同质性检测方法来检验不同数据集所含的系统发育信息是否冲突。通常以 $P < 0.05$ 作为差异显著的标准, 如果 $P > 0.05$ 时说明两数据集差异不显著, 可以合并处理。

Sullivan (1996) 对不同数据集合并研究时认为以 0.05 作为差异显著的标准过于严格。随后 Cunningham (1997) 在合并分析过程中发现当 $P > 0.01$ 时, 不同数据集合并分析会提高 (至少不会降低) 系统发育分析的准确性, 但当 $P < 0.001$ 时, 合并分析会影响分析的准确性 (栾云霞, 2004)。

2.1.5 系统发育分析方法

本研究应用 PAUP 4.0b8 (Swofford, 2001), Garli 软件包 (<http://www.zo.utexas.edu/faculty/antisense/garli/Garli.html>), 软件选用最大似然法

(maximum likelihood, ML)对各数据集构建系统发育树。首先用 Modeltest 3.06 (Posada & Crandall, 1998) 软件进行似然率检验 (likelihood ratio test)。利用软件 MrMTgui 将数据集和程序提供的 56 种核苷酸替代模型拟和, 根据 Hierarchical Likelihood Ratio Tests (hLRTs) 选出最佳模型和参数。根据选出的最佳模型, 利用最大似然法构建系统树。Bootstrap 检验重复 1000 次以确定拓扑结构的可靠性。用于系统发育分析的核苷酸位点均做等权 (equally weighted) 对待, 并做无序特征 (unordered character) 处理, 比对后产生的空位 (gaps) 处理为缺失 (missing data)。

2.2 结果和分析

2.2.1 测序结果

用表 2-2 中所列的各片段的扩增引物, 结合改进的 PCR 条件, 获得了 9 个种的 *rbcL*、*ndhF* 共 15 条基因序列。*rbcL* 序列有美丽桐、翅茎草、方茎草、蒙古芯芭、绵毛鹿茸草、腺毛阴行草、岭南来江藤、松蒿和兰考泡桐; *ndhF* 序列有美丽桐、翅茎草、松蒿、蒙古芯芭、绵毛鹿茸草和腺毛阴行草 (除美丽桐外其余物种仅获得 *ndhF* 基因部分序列)。相关序列的 genbank 序列号暂缺。

2.2.2 序列的特点

152 个样本的 *rbcL* 序列比对后长度为 1486bp, 其中变异位点 600 个, 包含信息位点 353 个, 占总位点数的 23.8%。113 个样本的 *ndhF* 序列比对后长度为 2198bp, 包含变异位点 1236 个, 信息位点 837 个, 占比对总位点数的 38.1%。92 个样本的 *rbcL* 和 *ndhF* 的结合序列比对后长度为 3524bp, 其中变异位点 1607 个, 信息位点 1025 个, 占总位点数的 29.1% (表 2-3)。

表 2-3 各数据集的序列特征

Table 2-3 The characteristics of the sequences in each dataset

序列 Sequences	比对后的序列长度(bp) Aligned sequence length (bp)	变异位点数目(%) Numbers of variable sites (%)	信息位点数目(%) Number of informative sites (%)	GC 含量(%) GC(%)
<i>rbcL</i>	1486	600(40.4)	353(23.8)	43.8
<i>ndhF</i>	2198	1236(56.2)	837(38.1)	33.0
<i>rbcL+ndhF</i>	3524	1607(45.6)	1025(29.1)	37.3

通过比较,在这三个数据集中,两个基因片段的联合序列所包含的信息位点数目最多,*ndhF*的单个片段数据集的信息位点百分率最高(38.1%),远大于*rbcL*单序列数据集的信息位点数,表明在用单个基因片段进行系统发育分析时,*ndhF*要比*rbcL*更有利。

2.2.3 数据分析

对*rbcL*单序列数据集的统计分析结果为: $g1=-0.599950 < 0$, 1000 棵随机树的树长分布频率图示为非正态分布, $PTP=0.01 < 0.05$ 。

对*ndhF*单序列数据集的统计分析结果为: $g1=-0.566157 < 0$, 1000 棵随机树的树长分布频率图示为非正态分布, $PTP=0.01 < 0.05$ 。

对*rbcL*+*ndhF*联合序列数据集的统计结果显示: $g1=-0.615627 < 0$, 1000 棵随机树的树长分布频率图示为非正态分布, $PTP=0.01 < 0.05$ 。同质性检验 $P=0.001$, 可以进行合并分析。

2.2.4 系统发育结果分析

2.2.4.1 基于*rbcL*序列数据集构建的 ML 树

*rbcL*数据集的最佳核苷酸替代模型为 SYM+I+G ($-\ln L=14240.5176$)。

从图 2-1, 2-1a ML 树示意图和 2-1b *Wightia* 所在分支图可以看出基于*rbcL*单序列数据集构建的 ML 树存在较多的梳状结构, 拓扑结构分支状况不是很好, 但是可以看出 *Wightia* 明显位于包括唇形科、紫葳科、玄参科、列当科、透骨草科、车前科、苦苣苔科、爵床科、*Martyniaceae* 和蒲包花科等类群内, 并有 80% 的支持率, 其中红色方框为 *Wightia* 所在的位置。从图 2-1a ML 树示意图及 2-1b *Wightia* 所在分支图来看, *rbcL* 的系统分析结果表明美丽桐属属于唇形目, 其中木犀科和 *Carlemanniaceae* 与美丽桐所在分支以 59% 的支持率分开, 进一步的分支则不是很理想, 没有清晰的拓扑结构, 各类群的系统发育关系不明。这也表明 *rbcL* 单基因进化相对较慢, 没有提供足够的发育信息, 不能说明美丽桐属的系统地位, 也未能解决唇形目内各科系统关系。

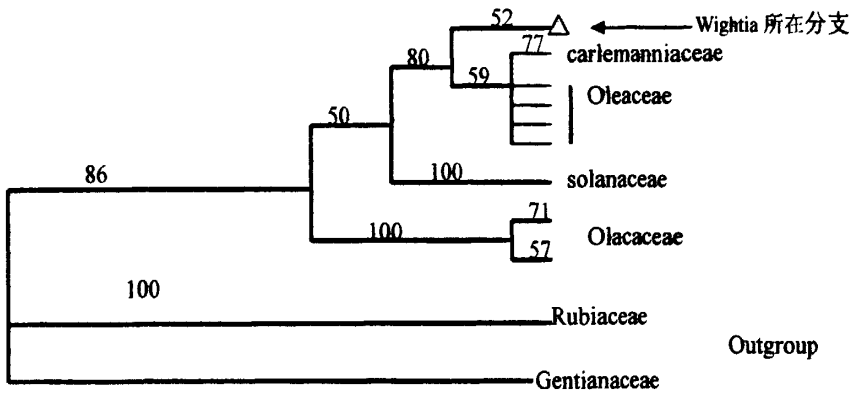
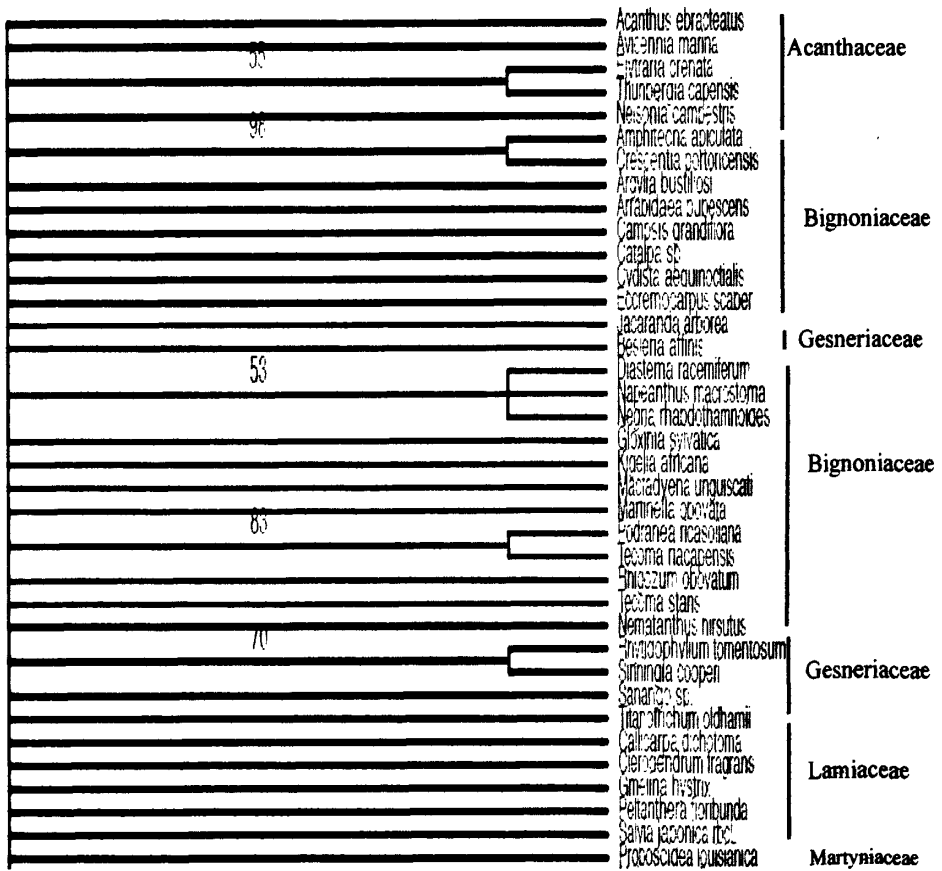


图 2-1a *rbcL* 数据集构建的 ML 树示意图 (数字表示靴带支持率, <50 未显示)

Fig.2-1a Simplification of the ML tree on the *rbcL* dataset. Numbers above the branches indicate bootstrap percentages. The branch about *Wigtia* is indicated by △



(接下页图)

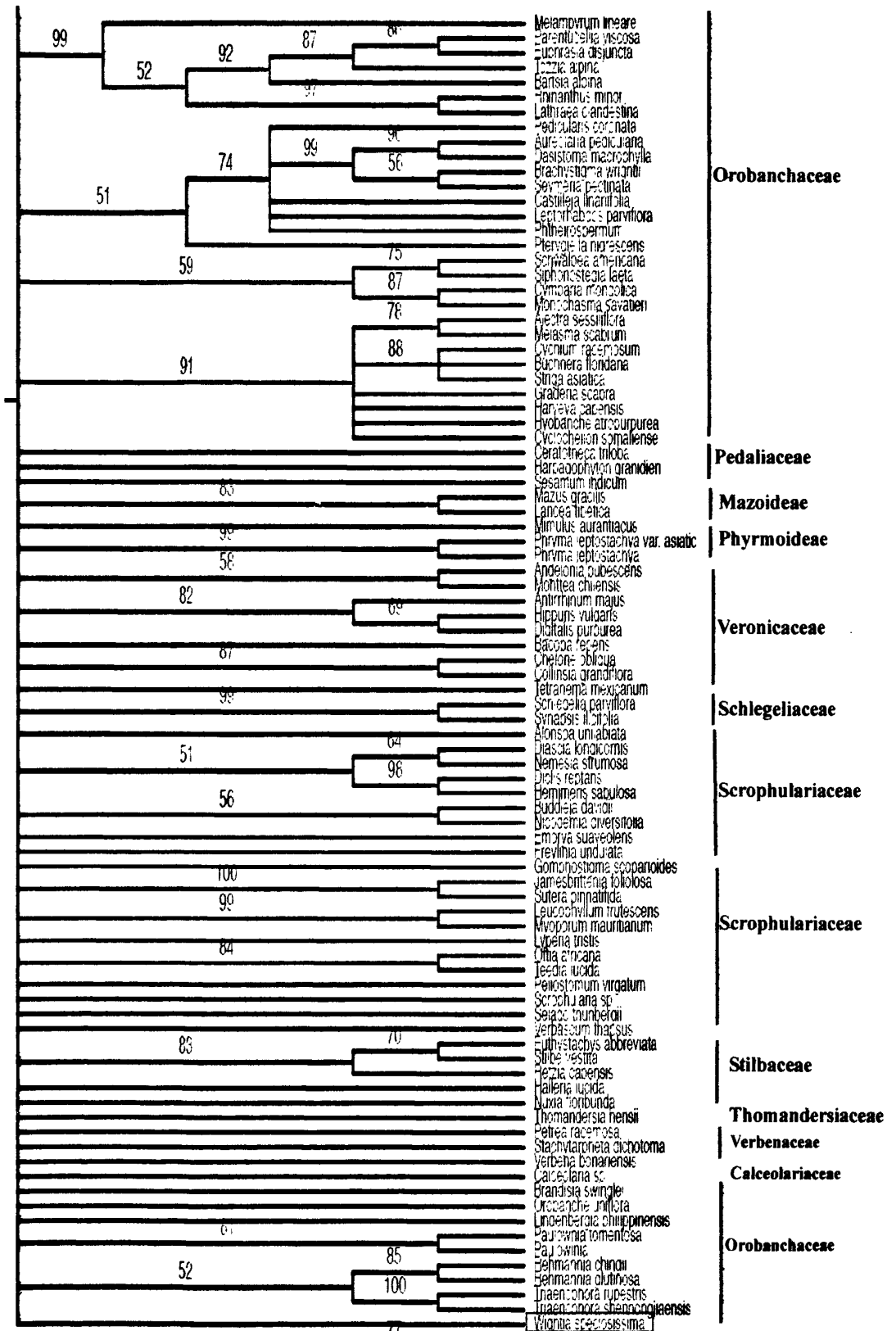


图 2-1b *Wightia* 所在分支截图 (续上页) (数字表示靴带支持率, <50 未显示)

Fig. 2-1b The branch about *Wightia* of the ML tree based on the *rbcL* dataset. Number above the branches indicate bootstrap percentages (≥ 50)

2.2.4.2 基于 *ndhF* 序列数据集构建的 ML 树

ndhF 数据集的最佳核苷酸代替模型为 GTR+I+G (-lnL=31487.5449)。

基于 *ndhF* 单序列数据集构建的 ML 较 *rbcL* 拓扑结构较清晰, 各类群拓扑结构比较清晰, 且支持率较高 (图 2-2)。A 支为 *Wightia* 所在的分支, *Wightia* 与列当科、透骨草亚科、泡桐科构成姊妹群, 支持率为 62%。列当科所在分支为 78% 支持率构成单系分支, 泡桐科位于列当科所在的分支外围, 支持率为 59%。B 支中 A 支与 2 个类群构成姊妹群, 支持率为 53% (图 2-2a), 其中唇形科所在的分支为 100% 的支持率; 通泉草亚科与美丽桐属构成姊妹群, 但是支持率不超过 50%。C 支 (图 2-2b) 中有 8 个类群与 B 支形成姊妹群, 其中 4 个类群有较高的支持率, 分别是 Acanthaceae (85%)、Bignoniaceae (90%)、Pedaliaceae (100%) 和 Schlegeliaceae (98%); 而 Verbenaceae 所在的分支支持率较低为 53%, Martyniaceae 和 Thomandersiaceae 代表类群的支持率均未超过 50%。D 支 (2-2c) 中有两个类群与 C 支形成姊妹群, 支持率为 68%。这两个分支是 Scrophulariaceae (89%) 和 Stilbaceae (94%)。E 支 (2-2d) 中有 4 个类群与 D 支成姊妹群, 支持率为 100%。4 个类群所属科为 Veronicaceae、Calceolariaceae、Gesneriaceae 和 *Peltanthera*, 其中 Calceolariaceae 与 Gesneriaceae 和 *Peltanthera* 聚在一起, 支持率为 90%; Veronicaceae 类群则没有聚成一支, *Bacopa*、*Collinsia* 与其他 Veronicaceae 类群呈姊妹群关系。F 支中仅有一支, 与 E 支构成稳定的姊妹群。这支为木犀科和 Carlemanniaceae 以 100% 支持率构成一支; 木犀科类群以 88% 支持率聚成一单系支。

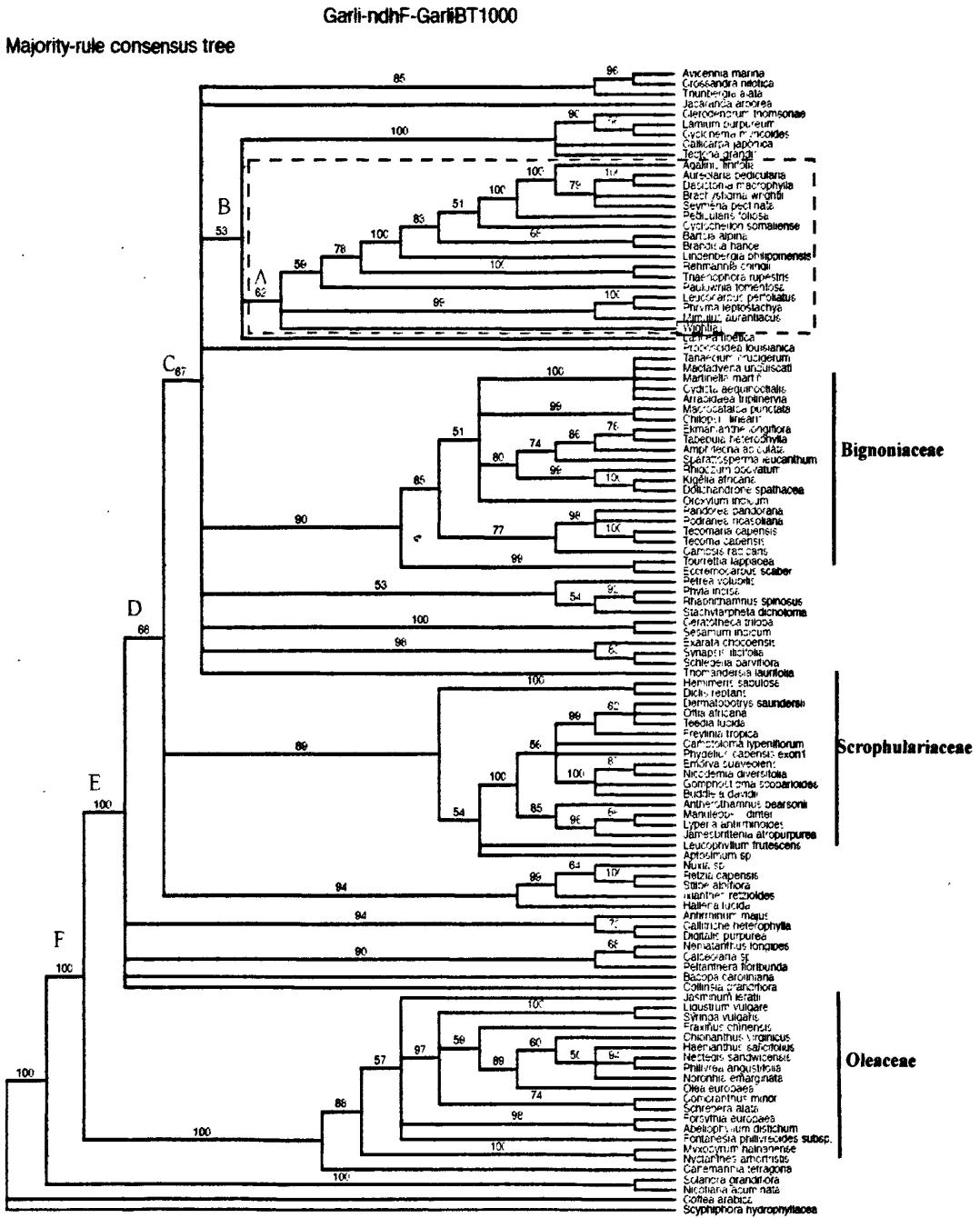


图 2-2 基于 *ndhF* 合并数据集构建的 ML 树 (数字表示靴带支持率, <50 未显示)

Fig.2-2 The ML tree based on the *ndhF* dataset. Numbers above the branches indicate bootstrap percentages (≥ 50)

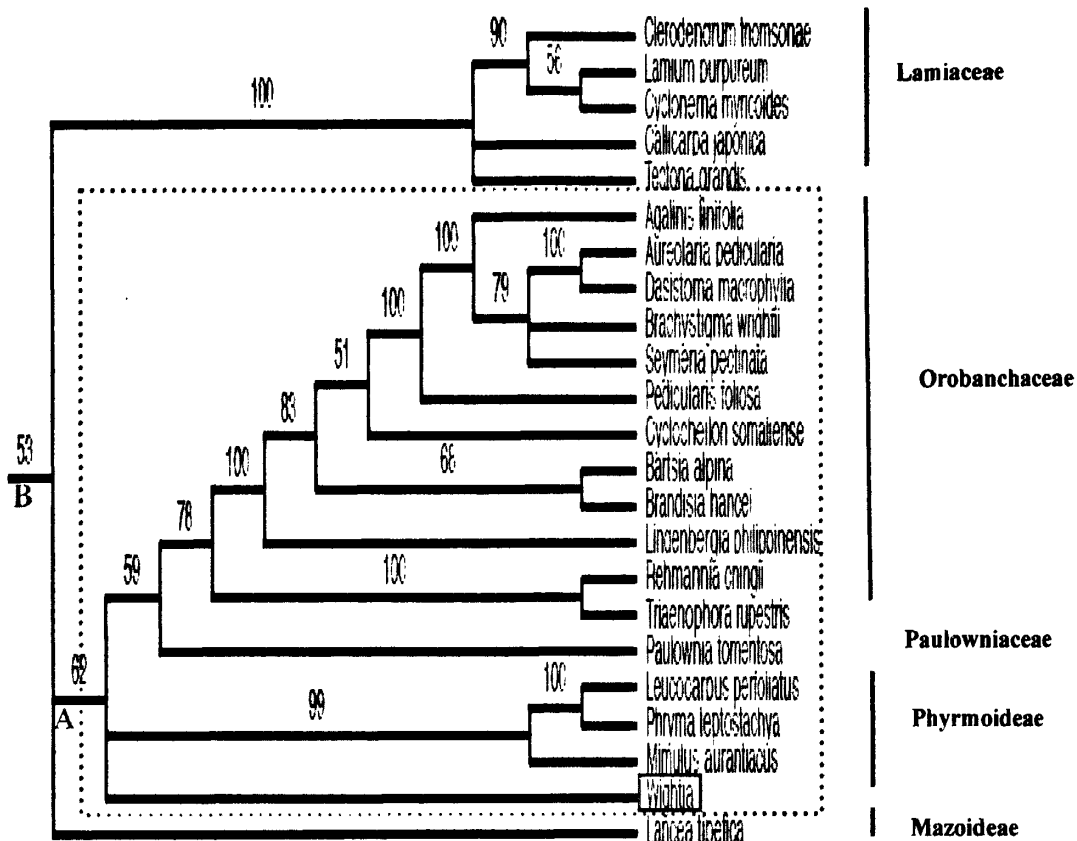


图 2-2a A 支和 B 支 (数字表示靴带支持率, <50 未显示)

Fig. 2-2a Branch A and branch B of the ML tree based on the *ndhF* dataset. Number above the branches indicate bootstrap percentages (≥ 50).

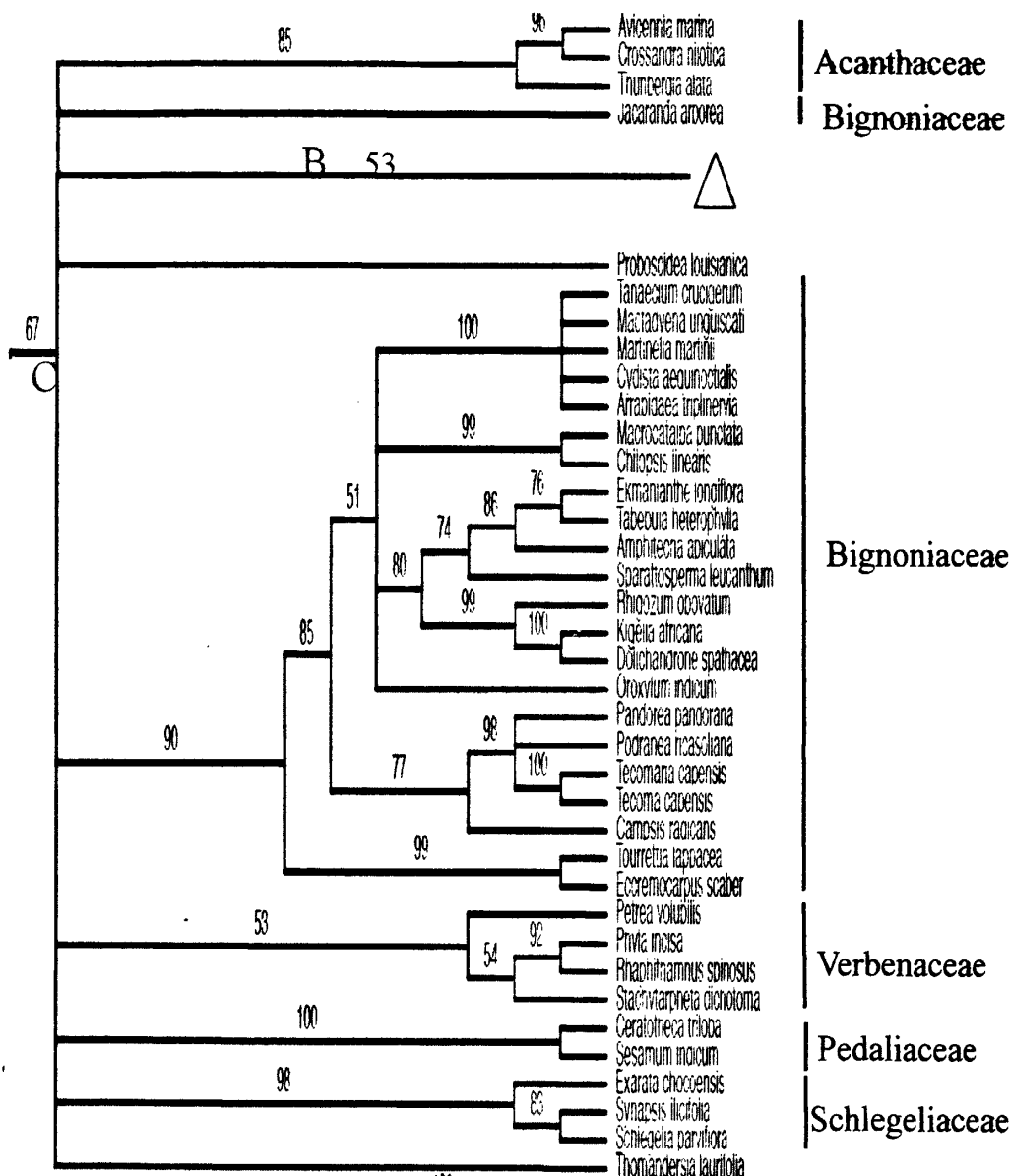


图 2-2b C 支 (△代表 B 分支类群, 数字表示靴带支持率, <50 未显示)

Fig.2-2b Branch C of the ML tree based on the *ndhF* dataset. Branch B is indicated by △

Numbers above the branches indicate bootstrap percentage (≥ 50)

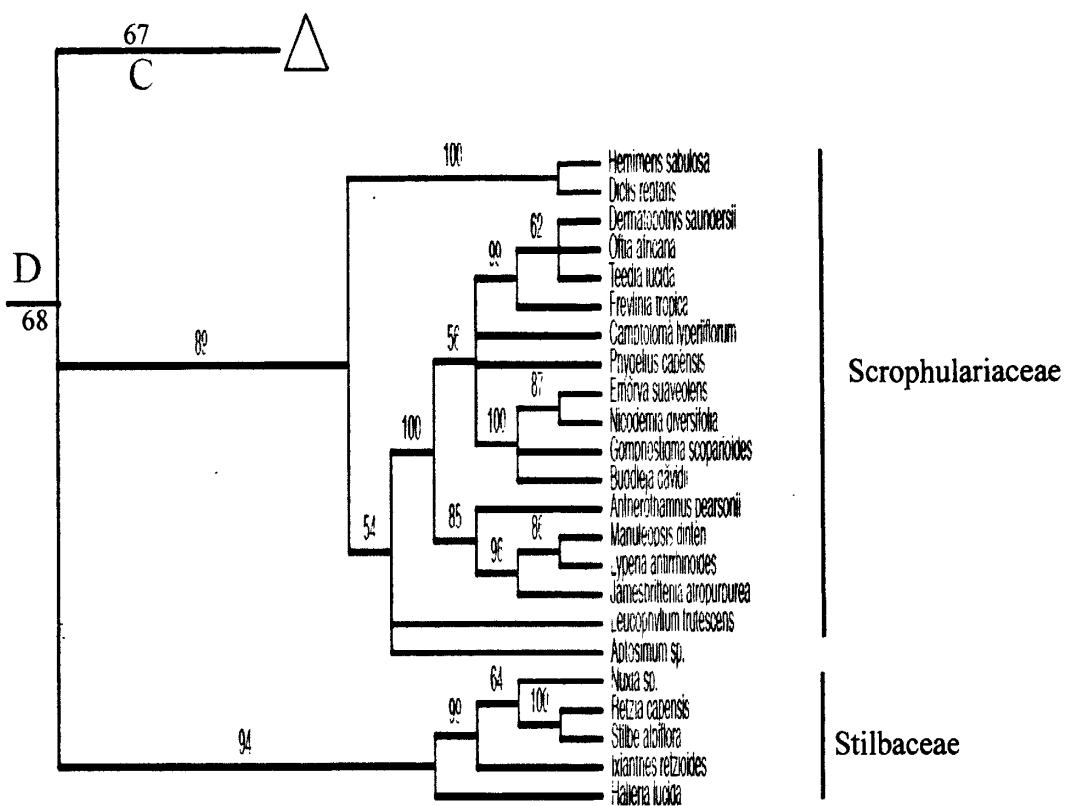


图 2-2c D 支 (△ 代表 C 分支类群, 数字代表靴带支持率, <50 未显示)

Fig. 2-2c Branch D of the ML tree based on the *ndhF* dataset. Branch C is indicated by △ .

Numbers above the branches indicate bootstrap percentage (≥ 50)

2.2.4.3 基于 *rbcL* 和 *ndhF* 联合数据集构建的 ML 树

该数据集的最佳核苷酸替代模型为 TVM+I+G (-lnL=37487.3984)。

合并数据比单序列的属相对减少,由 *rbcL* 和 *ndhF* 基因合并数据集构建 ML 树拓扑结构更加清晰,支持率也明显增高(图 2-3)。拓扑结构基本与图 2-2 大致相同,唇形目所在分支拓扑结构明显分为两大支,均为 100%的支持率。A 支为木犀科和 Carlemanniaceae 所在的分支,木犀科类群为 86%支持率。B 支为包括列当科(Orobanchaceae s.l.)、泡桐科、紫葳科、爵床科、玄参科、唇形科、透骨草亚科、通泉草亚科、马鞭草科、车前科、Schlegeliaceae、Stilbaceae、Calceolariaceae、Gesneriaceae 和 *Peltanthera*。各分支具有很高的分辨率。美丽桐属在 C 分支内,支持率较低为 64%。C 分支(图 2-3a)进一步分支,该分支上所包含的类群有列当科、泡桐科、紫葳科、透骨草亚科、通泉草亚科、唇形科、马鞭草科、爵床科、Martyniaceae、Thomandersiaceae、胡麻科和 Schlegeliaceae。C 分支(图 2-3a)上有四个支持率较高的分支,分别命名为 D 支、E 支、F 支和 G 支,列当科(D 支)所属的分支以 88%支持率聚在一起,泡桐科则以 62%的支持率与列当科所在的分支呈姊妹群。E 支为紫葳科类群(除 *Jacaranda* 外)构成一支,支持率为 98%。F 支为爵床科类群,支持率为 88%。*Mazus* 和 *Lancea* 聚成一支支持率为 100%。G 支为唇形科类群,支持率为 100%。透骨草亚科类群聚成一支,支持率为 99%。马鞭草科、Thomandersiaceae、胡麻科类群的支持率则不高,不到 50%。与 C 支并列的还有 6 个分支,包括玄参科(77%)、Stilbaceae(92%)、Calceolariaceae、Gesneriaceae、*Peltanthera* 和车前科类群。Calceolariaceae 和 Gesneriaceae 聚呈一支与 *Peltanthera* 以 87%支持率聚在一起。车前科类群以姊妹群的形式并列,支持率偏低,不足 50%。

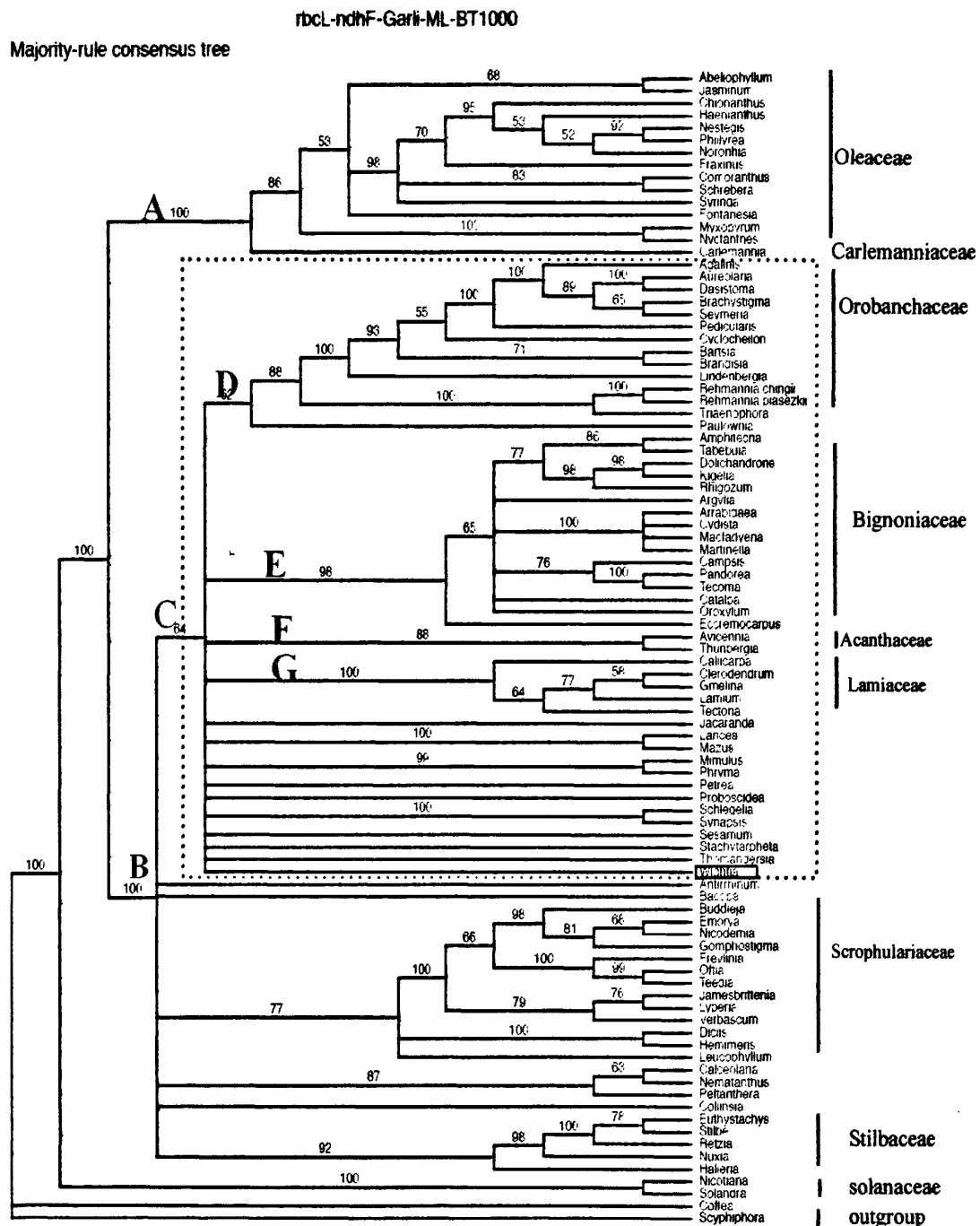


图 2-3 基于 *rbcL+ndhF* 合并数据集构建的 ML 树 (数字表示靴带支持率, <50 未显示)

Fig.2-3 The ML tree based on the *rbcL+ndhF* combined dataset. Numbers above the branches indicate bootstrap percentages (≥ 50)

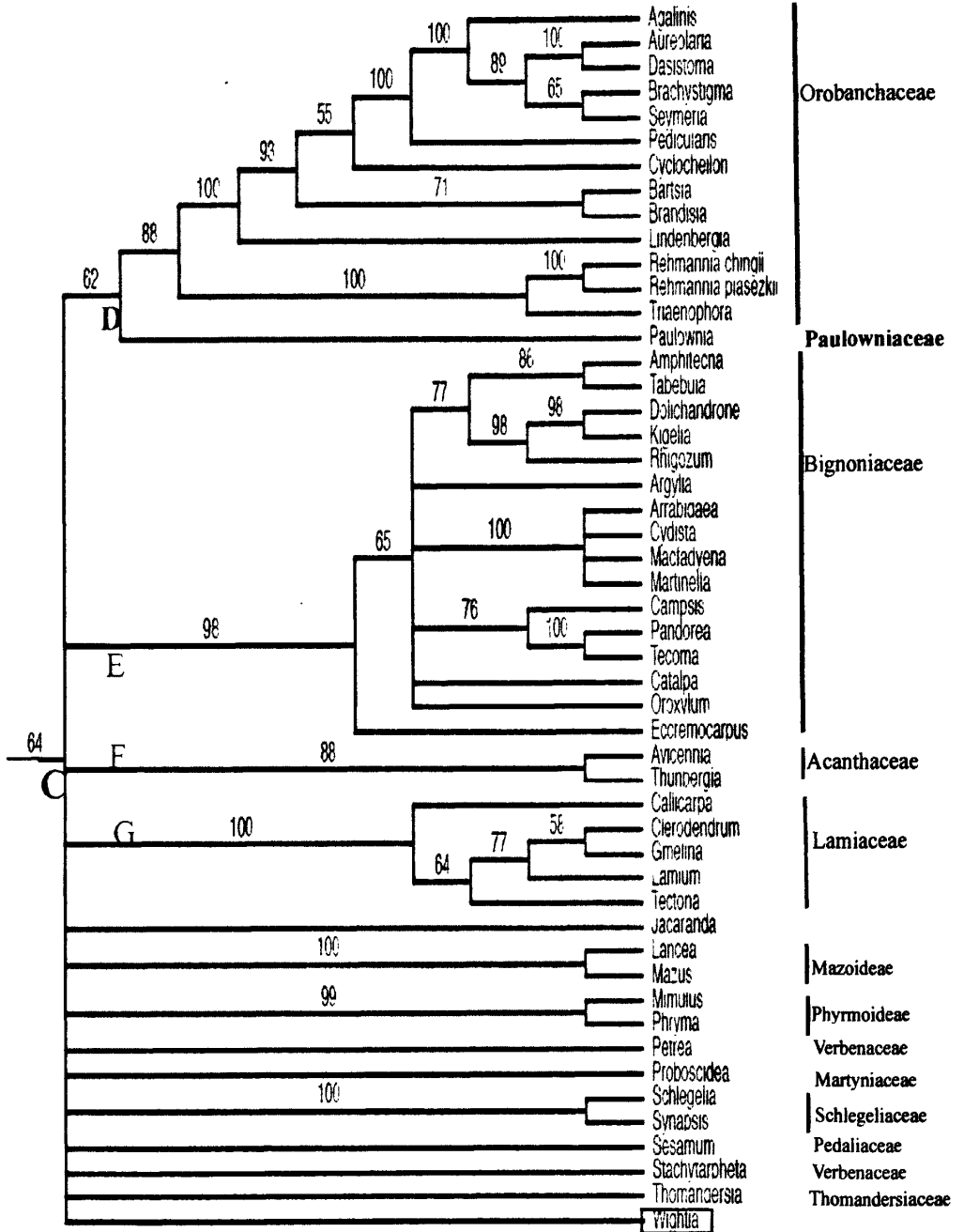


图 2-3a *Wightia* 所在分支 (数字表示靴带支持率, <50 未显示)

Fig. 2-3a The banch included *Wightia* of The ML tree based on the *rbcL+ndhF* combined dataset. Numbers above the branches indicate bootstrap percentages (≥ 50)

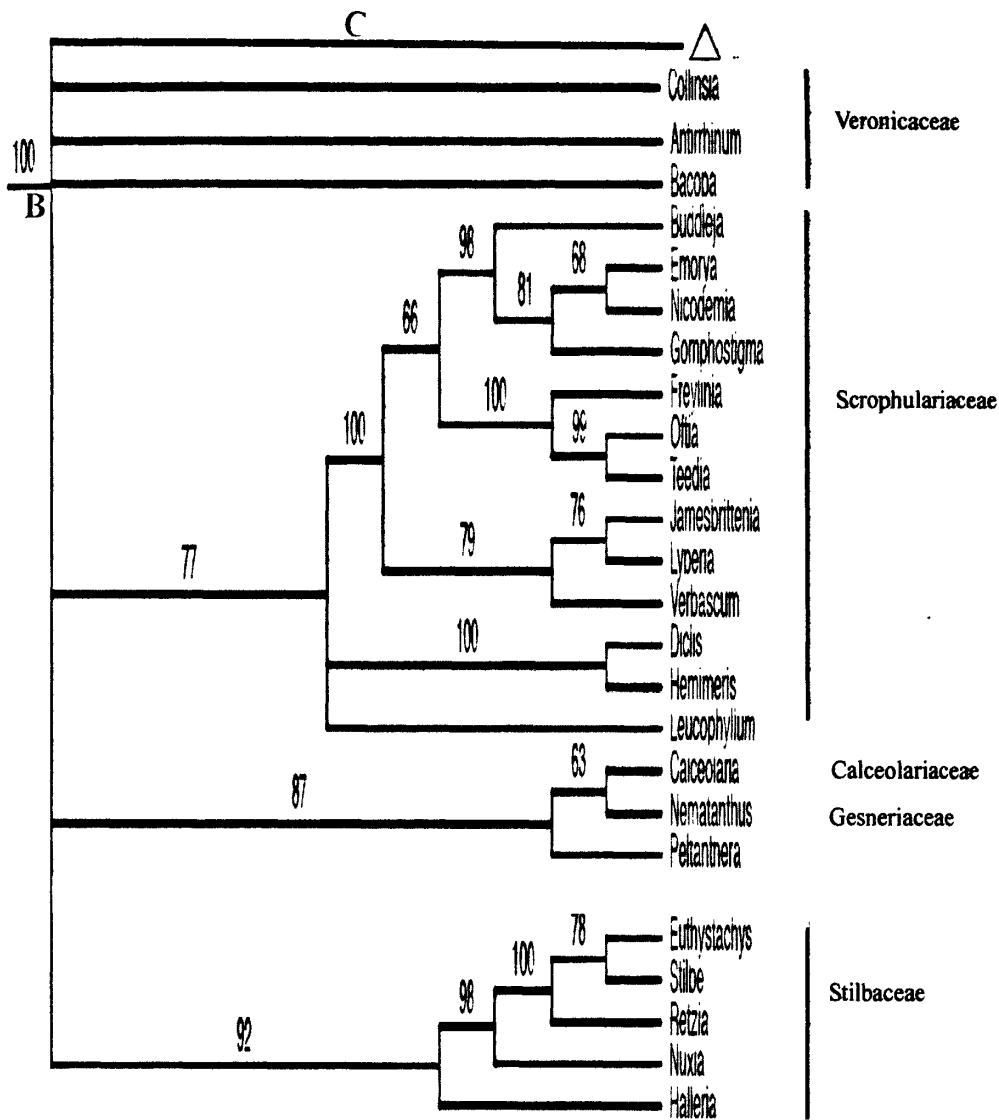


图 2-3b B 分支, △ 代表 C 分支类群 (数字表示靴带支持率, <50 的未显示。)

Fig.2-3b The ML tree based on the *rbcL*+*ndhF* combined dataset. Branch C are indicated by △. Numbers above the branches indicate bootstrap percentages (≥ 50)

2.3 结论和讨论

2.3.1 美丽桐属不属于 Oleaceae、Carlemanniaceae、Stilbaceae 和 Scrophulariaceae

叶绿体保守基因 *rbcL* 和 *ndhF* 对于构建远缘科及非单系科的系统关系有一定的价值, Olmstead & Reeves (1995) 利用 *rbcL* 和 *ndhF* 基因, 超过 3500bp 基因构建系统发育树表明玄参科属于多系起源, 且玄参科 (Scrophulariaceae s.l.) 科内类群可能是属于不同的科。

Oleaceae 和 Carlemanniaceae 以 100% 支持率处于唇形目基部, 与美丽桐属距离较远, 为该目中最原始的类群, 与 Bremer 等 (2002) 的研究结果一致。其次分化形成 Calceolariaceae、Gesneriaceae、Veronicaceae、Stilbaceae、Scrophulariaceae。联合基因树并没有显示出这五个科的进化顺序, 这表明对于唇形目各科系统关系的研究仅靠保守基因 *rbcL* 和 *ndhF* 基因分析还不够。由于所选部分属中 *ndhF* 基因扩增测序较为困难, 因此未与更多的基因进行联合分析。

在 *rbcL* 和 *ndhF* 基因构建的 ML 树中, *Calceolaria* (Calceolariaceae) 与 *Namatantus* (Gesneriaceae) 始终以较高的支持率聚成一支, 与广义玄参科中已被分割出的其他分支分开 (Olmstead *et al.*, 2001; Rahmzadeh *et al.*, 2005)。玄参科 (Scrophulariaceae s.s.) 和 Stilbaceae 各自所选类群以较高的支持率聚在一起, 与美丽桐属不在同一分支上。

不管是 *ndhF* 单基因还是 *rbcL* 和 *ndhF* 联合得到的结果, 与美丽桐属始终未与木犀科、Carlemanniaceae、Stilbaceae 或 Scrophulariaceae 在内的任一类群在同一分支上。因此美丽桐属不可能属于 Scrophulariaceae 和 Stilbaceae, 更不可能属于木犀科和 Carlemanniaceae, 而是处于更为进化的地位。

2.3.2 美丽桐属与 Orobanchaceae、Paulowniaceae、Phrymoideae 等亲缘关系相对较近

从 *ndhF* 和 *rbcL* 单独和联合基因结果表明: 美丽桐属与列当科、透骨草亚科、通泉草亚科、泡桐科、紫葳科、马鞭草科、唇形科、胡麻科、爵床科、Schlegeliaceae、Thomandersiaceae、Martyniaceae 类群聚在一起。

其中唇形科、Schlegeliaceae、和爵床科类群各自均以较高的支持率聚在一起。而紫葳科除 *Jacaranda* 外为单系类群, 各属均聚在一起, 支持率高达 90%。这与 Olmstead 等 (2009) 研究的结果一致, 认为 *Jacaranca* 位于紫葳科基部位置。这表明美丽桐属与这几个科关系较远。美丽桐属处于同一分支的还有马鞭草科、胡

麻科、Thomandersiaceae、Martyniaceae, 但支持率低, 不超过 50%。根据 Schäferhoff 等 (2010) 研究结果认为与美丽桐属有关联的科分为两大支见图 2-4, 基本可以排除美丽桐属与紫葳科、爵床科、马鞭草科、胡麻科、Schlegeliaceae、Thomandersiaceae、Martyniaceae 的近缘关系, 但是图中 ML 树的靴带支持率不高, 因此在进一步的研究还是尽量选取这些科的类群, 但不作为主要考虑的范围。

自 dePamphilis 等 (1997)、Wolfe 和 dePamphilis (1998)、Bennett 和 Mathews (2006) 对列当科进行研究, 确定狭义列当科和广义玄参科中半寄生类群和自养属钟萼草属构成一支, 为广义列当科, 后续研究结果 (eg: Albach *et al.*, 2009; Xia *et al.*, 2009) 大致与此相似。

Tank 等 (2006) 研究表明, 透骨草科与泡桐科、列当科呈姊妹群的关系。而 Albach 等 (2009) 的研究结果也显示这三者间存在最为接近的亲缘关系 (图 2-5), 本文中 *ndhF* 基因构建的 ML 树中, 美丽桐属与广义列当科和泡桐科分支, 透骨草亚科分支成姊妹群关系, 可以推断美丽桐属与透骨草亚科和泡桐科也有较近的亲缘关系。

因此可以初步推测, 美丽桐属属于以广义列当科为主, 泡桐科和透骨草亚科所在的分支附近。形态学上认为美丽桐属属于玄参科或者紫葳科的说法并没有得到分子系统学的支持。

由于较为保守的基因不能很好的解决这个问题, 具体的系统定位需要进化速率更快的基因片段来解决。

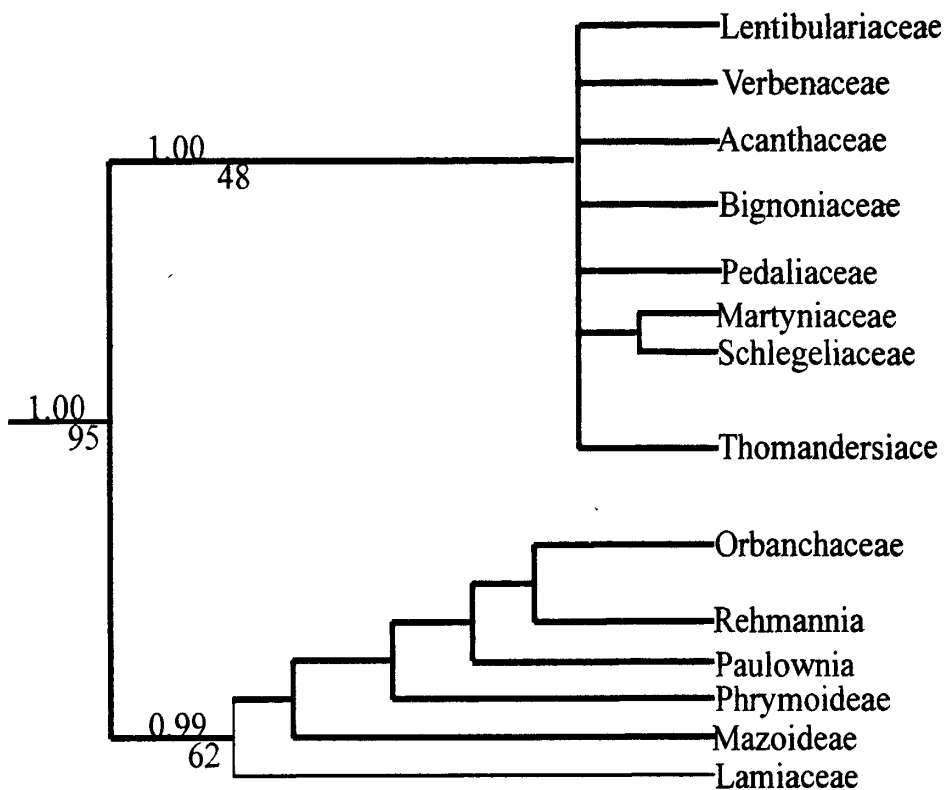


图 2-4 根据 Schäferhoff 等 (2010) 研究结果所绘简图, 分支上方数字为贝叶斯后验概率, 下方数字为 ML 靴带支持率

Fig. 2-4 Summary of the phylogenetic relationship within clade containing Higher core Lamiales based on results by Schäferhoff *et al.* (2010). Bayesian posterior probabilities are above the branches; bootstrap percentages are below the branches

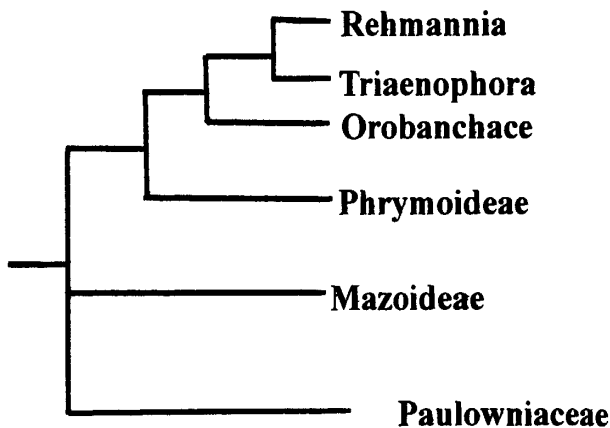


图 2-5 根据闫坤 (2008) 和 Albach 等 (2009) 研究综合所绘简化图

Fig. 2-5 Summary of phylogenetic relationships based on the results by Yan (2008) and Albach *et al.* (2009)

第三章 美丽桐属的系统学地位分析

在第二章中, 采用叶绿体编码基因 *ndhF*、*rbcL* 独立及联合对美丽桐属在唇形目近缘科的检测中发现, 美丽桐属与列当科、泡桐科、透骨草科有较近的亲缘关系。为了进一步分析美丽桐属与近缘科属的系统发育关系, 在本章中采用适合于较低分类阶元系统发育分析的基因, 叶绿体基因 *trnL-F* 基因间区、*rps16* 及核基因组 ITS 序列对美丽桐属的系统发育关系进行分析。

3.1 实验材料与实验方法

3.1.1 实验材料

3.1.1.1 美丽桐属与近缘属系统发育分析中内类群的选择

本研究选取内类群主要集中在唇形目列当科(Orobanchaceae s.l.)、泡桐科和透骨草科内。首先是从 genbank 中搜集这三个科中全部属的 ITS、*trnL-F*、*rps16* 三个基因片段序列信息, 尽量选取三个片段均齐全的属。或者尽量选取含 *rps16* 和 *trnL-F* 的属, 对于重要属或信息缺少的属则收集材料测序。属内物种尽量选取代表物种, 如代表物种信息缺乏又暂时无法取得材料的则用属内其他物种的序列信息。所选用的内类群共计 46 属, 相关信息见附录 II。依据第二章的分子结果及 genbank 中相关类群三个片段(ITS、*trnL-F*、*rps16*)搜集结果, 补充实验材料信息见表 3-1。

表 3-1 实验材料来源及相关信息

Table 3-1 Information of experimental material

标本名称	标本号	采集时间	采集地点	采集人
松蒿 <i>Phtheirospermum japonicum</i>	Lihq200902	2009.07.27	吉林抚松	李宏庆
翅茎草 <i>Pterygiella duclouxii</i>	PB-09	2009	云南屏边	董丽娜等
岭南来江藤 <i>Brandisia swinglei</i>	Lihq200963	2009.09.20	广东乳源	李宏庆
美丽桐 <i>Wightia speciosissima</i>	Lihq2008164	2008.07.23	云南景东	李宏庆
	Lihq2009448	2009.12.31		
绵毛鹿茸草 <i>Monochasma savatieri</i>	Lihq200961	2009.9.7	江苏宜兴	李宏庆, 刘国丽
腺毛阴行草 <i>Siphonostegia laeta</i>	2010042	2010.5.11	浙江淳安	王幼芳, 王莹莹
蒙古苘芭 <i>Cymbaria mongolica</i>	2010043	2010.6.7	山西忻州	刘国丽, 熊申展
圆苞山罗花 <i>Melampyrum lineare</i>	TQ00270	2010.7.31	江西茨坪	王正伟, 葛斌杰
独脚金 <i>Striga asiatica</i>	Lihq2009330	2009.11.29	广西抚绥县	李宏庆
方茎草 <i>Leptorhabdos parviflora</i>	Lihq2006867	2006.9.	新疆乌鲁木齐	李宏庆
兰考泡桐 <i>Paulownia elongata</i>	KK01	2010.4.	上海市	刘国丽

3.1.1.2 美丽桐属与近缘属系统分析外类群的选择

在第二章中构建的唇形目中各类群间系统发育树中显示 *Digitalis* 和 *Calceolaria* 是唇形目中较为原始的类群，且两者在 genbank 中的序列信息较全，所以本研究选用 *Digitalis* 和 *Calceolaria* 作为联合外类群。*Digitalis* 和 *Calceolaria* 各片段的 genbank 序列号及凭证标本信息见附录 II。

3.1.2 实验方法

3.1.2.1 总 DNA 的提取

同第二章

3.1.2.2 选取基因片段的扩增及测序

PCR 扩增反应程序如下：94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 1 min, 45℃~50℃ 退火 45 sec, 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环，最后 72℃ 延伸 7 min。扩增引物见表 3-2

表 3-2 扩增及测序引物的名称、序列和参考文献

Table 3-2 The names, sequences and references of primers used in amplification and sequencing

基因片段	引物名称	方向	引物及测序序列	参考文献
<i>rps16</i>	<i>rps16-F</i>	正向 Forward	GTGGTAGAAAGCAACGTGCGACTT	Oxelman <i>et al.</i> 1997
	<i>rps16-R</i>	反向 Reverse	TCGGGATCGAACATCAATTGCAAC	
<i>trnL-F</i>	<i>trnL-Fc</i>	正向 Forward	CGAAATCGGTAGACGCTACG	Taberlet <i>et al.</i> 1991
	<i>trnL-Ff</i>	反向 Reverse	ATTTGAACCTGGTGACACGAG	
ITS	ITS-1	正向 Forward	CGTAACAAGGTTTCCGTAGG	White <i>et al.</i> 1990
	ITS-2	反向 Reverse	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

ITS 序列 PCR 扩增的反应体系为：1.5 μl MgCl₂, 2.5 μl 10×buffer, 0.5 μl dNTP, 0.5 μl Taq 酶 (以上药品均购自天根生物科技有限公司, 北京), 上下游引物各 0.5 μl, 1 μl 模板(约 5 ng), 最后用三蒸水补足到 25 μl。采用引物 ITS1 (5'-CGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATC-3') (White *et al.*, 1990), 按程序 (94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 50℃ 45S, 72℃ 1 min, 30 次循环; 72℃ 5 min) 进行 PCR 扩增。

trnL-F 序列 PCR 扩增的反应体系为：2.5 μl MgCl₂, 2.5 μl 10×buffer, 2 μl

dNTP, 0.5 μ l Taq 酶 (以上药品均购自天根生物科技有限公司, 北京), 上下游引物各 1.5 μ l, 1 μ l 模板 (约 5ng), 最后用三蒸水补足到 25 μ l。采用通用引物 c (5'-CGAAATCGGTGACGCTACG-3') 和引物 f (5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3') (Taberlet *et al.*, 1991), 按程序 (94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45S, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 90S, 30 次循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min) 进行 PCR 扩增。

rps16 序列 PCR 扩增的反应体系为: 2.5 μ l MgCl₂, 2.5 μ l 10 \times buffer, 2 μ l dNTP, 0.5 μ l Taq 酶 (以上药品均购自天根生物科技有限公司 北京), 上下游引物各 1.5 μ l, 1 μ l 模板 (约 5 ng), 最后用三蒸水补足到 25 μ l。

PCR 反应在 TP600 PCR 仪 (宝生物工程有限公司 大连) 上进行。

PCR 产物在 1%的琼脂糖凝胶上电泳 (1 \times TAE) 分离后割胶回收, 使用 DNA 树脂回收试剂盒 (天根生物科技有限公司 北京) 纯化后, 由英骏生物公司用 ABI 3730 或 377 自动测序仪 (Applied Biosystems 美国) 测序, 测序引物和 PCR 扩增引物相同。所有样品均经过双向测序, 有疑问的序列经过重复测定, 以确保碱基序列的准确性。

以上各基因片段的正反测序结果经人工核对后, 利用 DNASTar 软件依据双向测序结果最终得到各片段准确的正向序列。

3.1.2.3 序列编辑及比对

有关序列比对、数据统计及系统发育分析方法同第二章。

3.2 结果和分析

3.2.1 测序结果

用表 3-2 中所列的各片段的扩增引物, 结合改进的 PCR 条件, 获得了个 11 种共计 26 条基因序列。详见表 3-1, 相关序列的 genebank 序列号暂缺。

3.2.2 序列特点

48 个物种的 ITS 序列比对后长度为 738bp, 其中变异位点 514bp, 信息位点 399 个, 占总比对长度的 54.1%。48 个物种的 *trnL-F* 序列比对后的长度为 1132bp, 含变异位点 579 个, 其中信息位点 328 个, 占总位点数目的 29.0% (表 3-3)。

48 个物种的 *rps16* 序列比对后长度为 1110bp, 含变异位点 593 个, 其中信息位点 323 个, 占总位点数目的 29.1%。48 个样本的 *rps16*、*trnL-F* 和 ITS 三个序列结合后比对长度为 2980bp, 具 1686 个变异位点, 信息位点为 1050 个, 占总比对长度的 35.2% (表 3-3)。

表 3-3 各数据集的序列特征
Table 3-3 The characteristics of the sequences in each dataset

序列 sequences	比对后的序列长度(bp) aligned sequence length (bp)	变异位点数目(%) Number of variable sites(%)	信息位点数目(%) Number of informative sites(%)	GC 含量(%) percent of GC(%)
ITS	738	514(69.6)	399(54.1)	62
<i>trnL-F</i>	1132	579(51.1)	328(29.0)	34.1
<i>rps16</i>	1110	593(53.4)	323(29.1)	34.4
<i>trnL-F+rps16</i>	2268	1214(53.5)	650(28.7)	34.9
<i>rps16+trnL-F+ITS</i>	2980	1686(56.6)	1050(35.2)	46.5

在四个数据集中, 由于 ITS 是进化速度最快的序列, 其所包含的信息位点丰富, 占总比对长度百分比最大, 为 54.1%。*trnL-F* 序列与之相比, 进化速率稍慢, 所提供信息位点较少, 占总比对位点百分比也较低, 为 29.1%。而 *rps16* 跟 *trnL-F* 的相关参数变化不大。对于结合序列而言, 虽然信息位点占总比对位点比例降低, 但所含的总信息位点的数目最多。

3.2.3 数据分析

对 ITS 单序列数据集的统计分析结果为: $g1=-0.476277<0$, 1000 棵随机树的树长分布频率图示为非正态分布, $PTP=0.01<0.05$ 。

对 *trnL-F* 单序列数据集的统计结果显示: $g1=-0.446993<0$, 1000 棵随机树的树长分布频率图示为非正态分布, $PTP=0.01<0.05$ 。

对 *rps16* 单序列数据集的统计结果显示: $g1=-0.443640<0$, 1000 棵随机树的树长分布频率图示为非正态分布, $PTP=0.01<0.05$ 。

对 *trnL-F+rps16* 合并数据集的统计分析结果显示: $g1=-0.517693<0$, 1000 棵随机树的树长分布频率图示为非正态分布, $PTP=0.01<0.05$ 。同质性检验后得 $P=0.001$, 说明三个片段差异不显著, 可以合并处理。

对 *rps16+trnL-F+ITS* 合并数据集的统计分析结果显示: $g1=-0.471737<0$, 10000 棵随机树的树长分布频率图示为非正态分布。PTP 检验后得 $P=0.01<0.05$ 。同质性检验后得 $P=0.001$, 说明三个片段差异不显著, 可以合并处理。

3.2.4 系统发育分析

3.2.4.1 基于 ITS 单序列数据集的系统发育分析

对 ITS 单序列数据集用最大似然法构建 ML 树 (见图 3-1)。

最大似然法中该数据集的最佳核苷酸替代模型为 GTR+I+G(-lnL=13238.8311)

基于 ITS 构建的 ML 树中, 拓扑结构较为清晰, 分辨率较高。列当科 (*Orobanchaceae* s.l.) 所在的分支(分支 A) 获得了 81% 的靴带支持率, 美丽桐属处在该分支内部, 显然与列当科构成了一个单系。

在该分支中, 还包含了 *Cymbaria*、*Monochasma*、*Siphonostegia*, 这 3 属在列当科分支内部, 属于广义列当科。

Leptorhabdos、*Pterygiella* 两属均为首次取样, 与列当科聚在同一支, 也属于广义列当科范畴。

Stilbaceae、*Scrophulariaceae*、*Pedaliaceae*、*Mazoideae*、*Phrymoideae*、*Bignoniaceae* 类群构成并列姊妹群, 并没有更进一步的分支, 其中 *Stilbaceae*、*Scrophulariaceae* 和 *Phrymoideae* 三个 (亚) 科的类群各自没有聚成一支, 分辨率较差。

Lamium (*Lamiaceae*) 和 *Stachytarpheta* (*Verbenaceae*) 聚成一支, 支持率为 94%。

来江藤属在形态学上与美丽桐属关系较近, 但是由于来江藤属的 ITS 取得较为困难, 未列入。

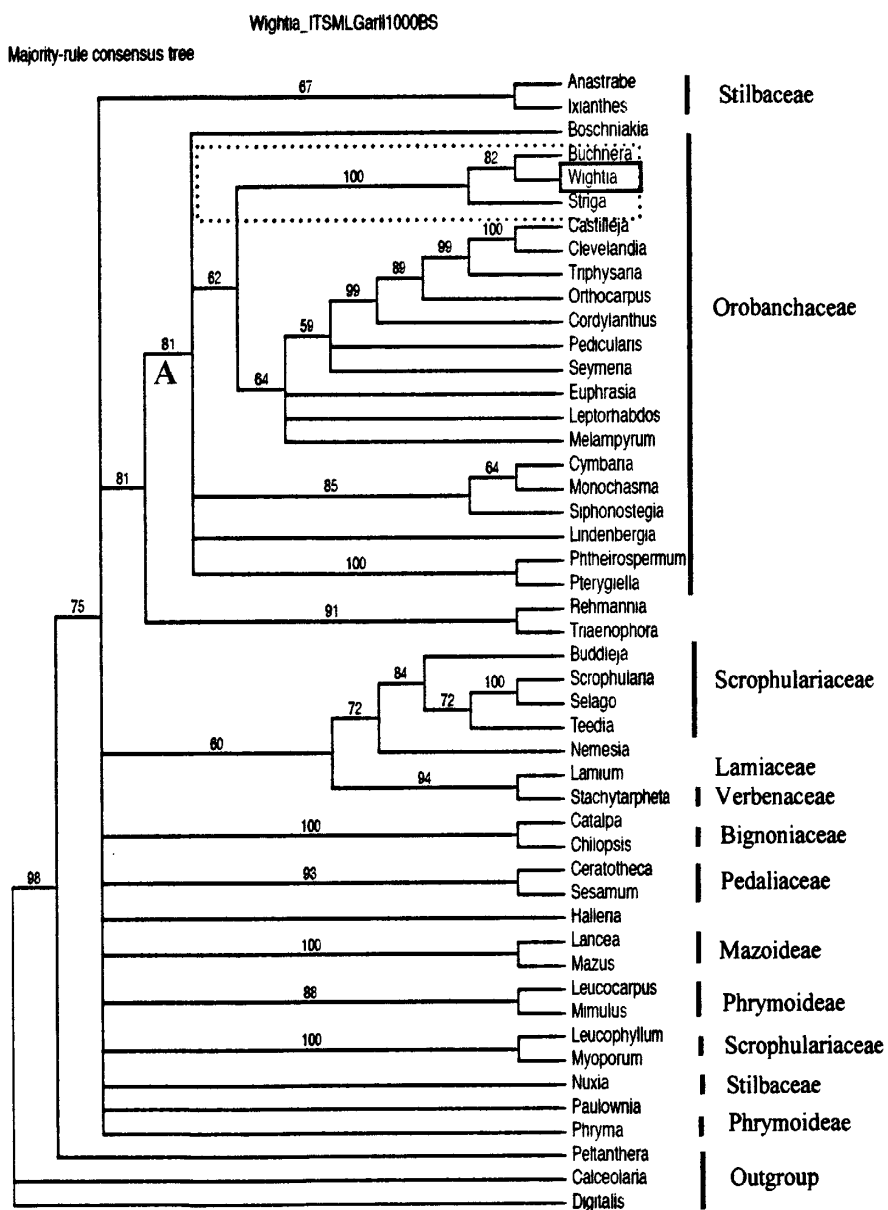


图 3-1 基于 ITS 数据集构建的 ML 树 (数字表示靴带支持率, <50 未显示)

Fig. 3-1 The ML tree based on the ITS dataset. Numbers above the Branches indicate bootstrap percentage (≥ 50).

3.2.4.2 基于 *trnL-F* 单序列数据集的系统发育分析

对 *trnL-F* 单序列数据集用最大似然法构建 ML 树 (如图 3-2)。

最大似然法中该数据集的最佳核苷酸替代模型为 TVM+I+G (-lnL=8603.0264)。

基于 *trnL-F* 基因构建的 ML 树, 拓扑结构较 ITS 树形结构较为清晰, 但支持率稍低。

美丽桐属与透骨草亚科聚在一起, 支持率偏低, 为 62%。

广义列当科一支仍聚在一起, 支持率为 83%。其中小米草属和山罗花属以 100% 支持率聚成一支与 *Lindenbergia* 与剩余列当科类群成为并列姊妹群。半寄生属与自养属 *Lindenbergia* 间的亲缘关系依旧不够清晰。地黄属和崖白菜属并没有与广义列当科聚成一支, 而是与其他类群并列成为列当科所在分支的姊妹群。

Stilbaceae 类群以 94% 的支持率聚在一起, *Scrophulariaceae* 类群以 55% 支持率聚成一支, 但支持率相对较低; *Bignoniaceae*、*Pedaliaceae* 和 *Mazoideae* 各类群则以 100% 的支持率各自聚成一支, 各科之间依然没有进一步的分支, 各科系统进化关系不明。

跟 ITS 拓扑结构不同, *Lamium* (*Lamiaceae*) 和 *Stachytarpheta* (*Verbenaceae*) 并没聚成一支, 而是并列成姊妹群。

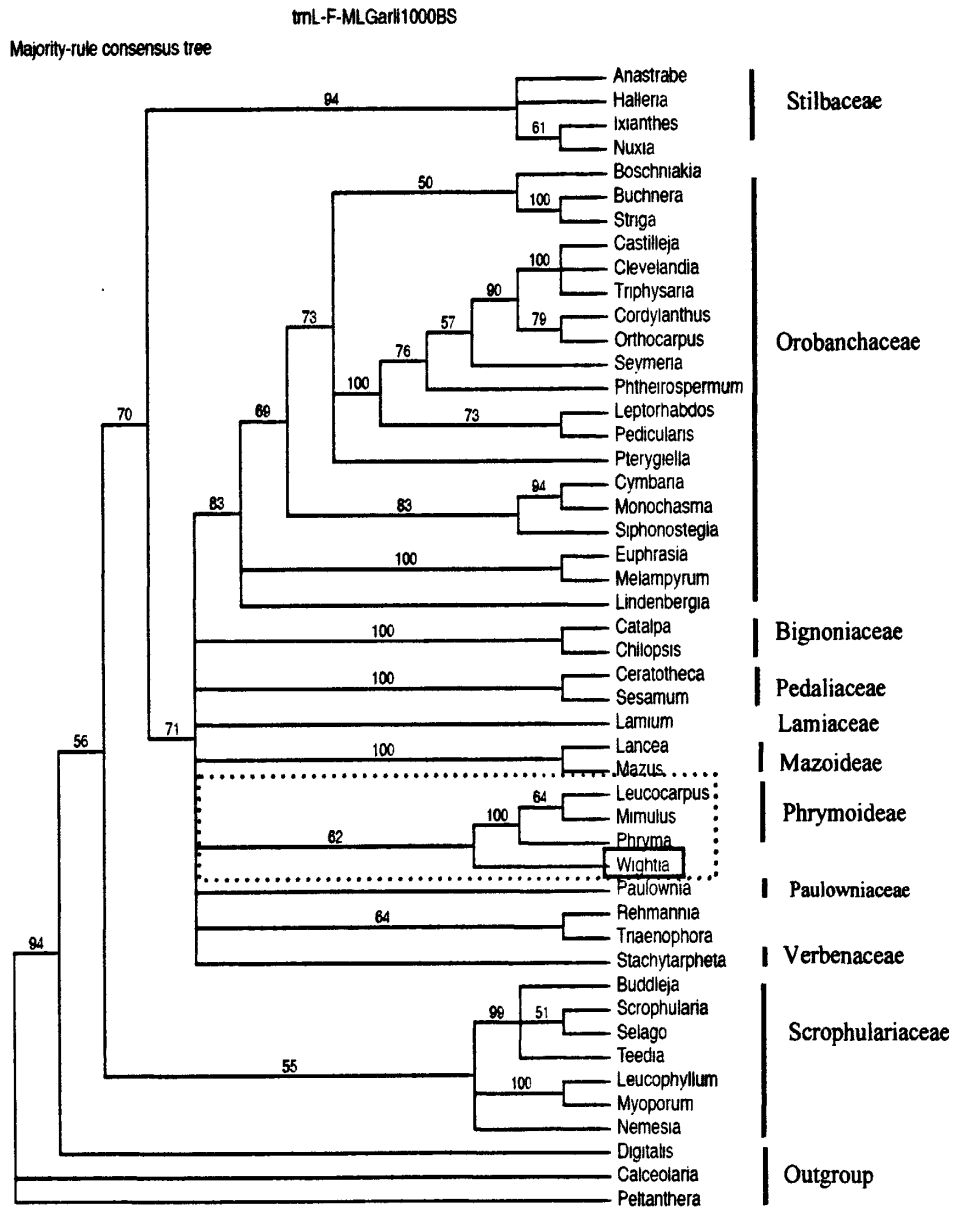


图 3-2 基于 *trnL-F* 数据集构建的 ML 树 (数字表示靴带支持率, <50 未显示)

Fig. 3-2 The ML tree based on the *trnL-F* dataset. Numbers above the branches indicate bootstrap percentages (≥ 50).

3.2.4.3 基于 *rps16* 序列所构建的系统树

rps16 片段所构建的 ML 树中, 除外类群位于基部外, 美丽桐位于所有近缘科所在的分支。各科之间为并列的分支, 与近缘科的关系没有很好的拓扑结构, 各类群系统进化关系不明, 因此本文中未予列出。

3.2.4.4 基于 *trnL-F+rps16* 联合序列数据集的系统发育分析

对 *trnL-F+rps16* 单序列数据集用最大似然法构建 ML 树 (见图 3-3)。

最大似然法中该数据集的最佳核苷酸替代模型为 TVM+I+G(-lnL=18219.3379)

基于 *trnL-F+rps16* 基因构建的 ML 树, 拓扑结构比 *trnL-F* 片段的拓扑结构更为清晰。

美丽桐属与透骨草 (亚) 科聚在一起, 支持率仅为 54%, 其中透骨草亚科所选类群以 100%支持率聚在一起。它们所在分支与列当科所在分支及泡桐科所在分支并列。

广义列当科一支以 99%支持率聚在一起, 半寄生属 *Cymbaria*、*Monochasma*、*Siphonostegia*、*Leptorhabdos*、*Pterygiella* 与全寄生属聚成单系支。*Lindenbergia* 为寄生及半寄生类群所构成的分支的姊妹群。地黄属和崖白菜属以 100%聚成一支, 与列当科聚在一起的支持率为 61%。

Stilbaceae 类群以 54%的支持率聚在一起, *Scrophulariaceae* 类群以 84%支持率聚成一支;*Bignoniaceae*、*Pedaliaceae* 和 *Mazoideae* 各类群则以 100%的支持率各自聚成一支, 与广义列当科及美丽桐属、地黄属等所构成成分支成姊妹群关系。

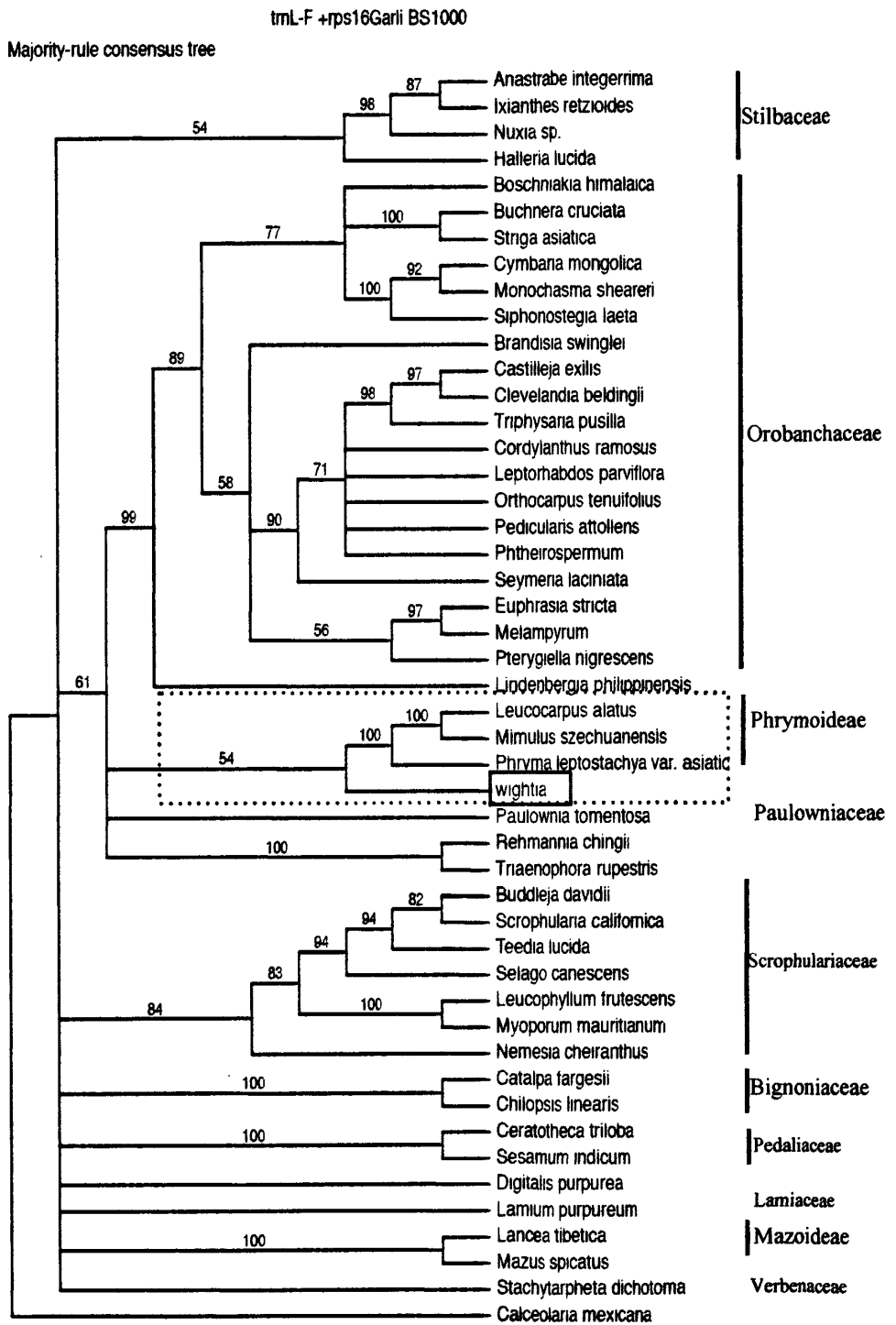


图 3-3 基于 *trnL-F+rps16* 合并数据集构建的 ML 树 (数字表示靴带支持率, <50 未显示)
 Fig. 3-3 The ML tree based on *trnL-F+rps16* combined dataset. Numbers above the Branches indicate bootstrap percentages (≥ 50)

3.2.4.5 基于 ITS+trnL-F+rps16 联合序列数据集的系统发育分析

最大似然法中该数据集的最佳核苷酸替代模型为 GTR+I+G(-lnL=31741.3965)。

相比与其他片段所构建的树, ITS+trnL-F+rps16 联合序列构建的 ML 树拓扑结构很清晰。除玄参科类群没有完全聚成一支外, 其他各科均聚成一支。

美丽桐属聚在列当科内部, 与黑草属 (*Bungrea*)、独脚金属 (*Striga*) 以 100% 的支持率聚在一起, 与 ITS 片段单独构建的系统树一致。

自养属 *Lindenbergia* 与 *Cymbaria*、*Monochasma*、*Siphonostegia*、*Leptorhabdos*、*Pterygiella* 半寄生属的系统关系得到较高的支持, *Lindenbergia* 仍为剩余列当科类群一支的姊妹群, 比 trnL-F+rps16 支持率稍低, 为 93%。

地黄属和崖白菜属与广义列当科成姊妹群关系, 支持率为 100%。

Stilbaceae 类群以 98% 的支持率聚在一起, Scrophulariaceae 部分类群以 83% 支持率聚成一支, *Leucophyllum* 和 *Myoprum* 聚成一支, 支持率为 100%, 与除外类群外的剩余分支分开, 但剩余分支聚成一支的支持率较低, 仅为 54%。Bignoniaceae、Phrymoideae、Pedaliaceae 和 Mazoideae 各类群则以 100% 的支持率各自聚成一支, 与广义列当科及美丽桐属、地黄属等所构成分支成并列姊妹群。

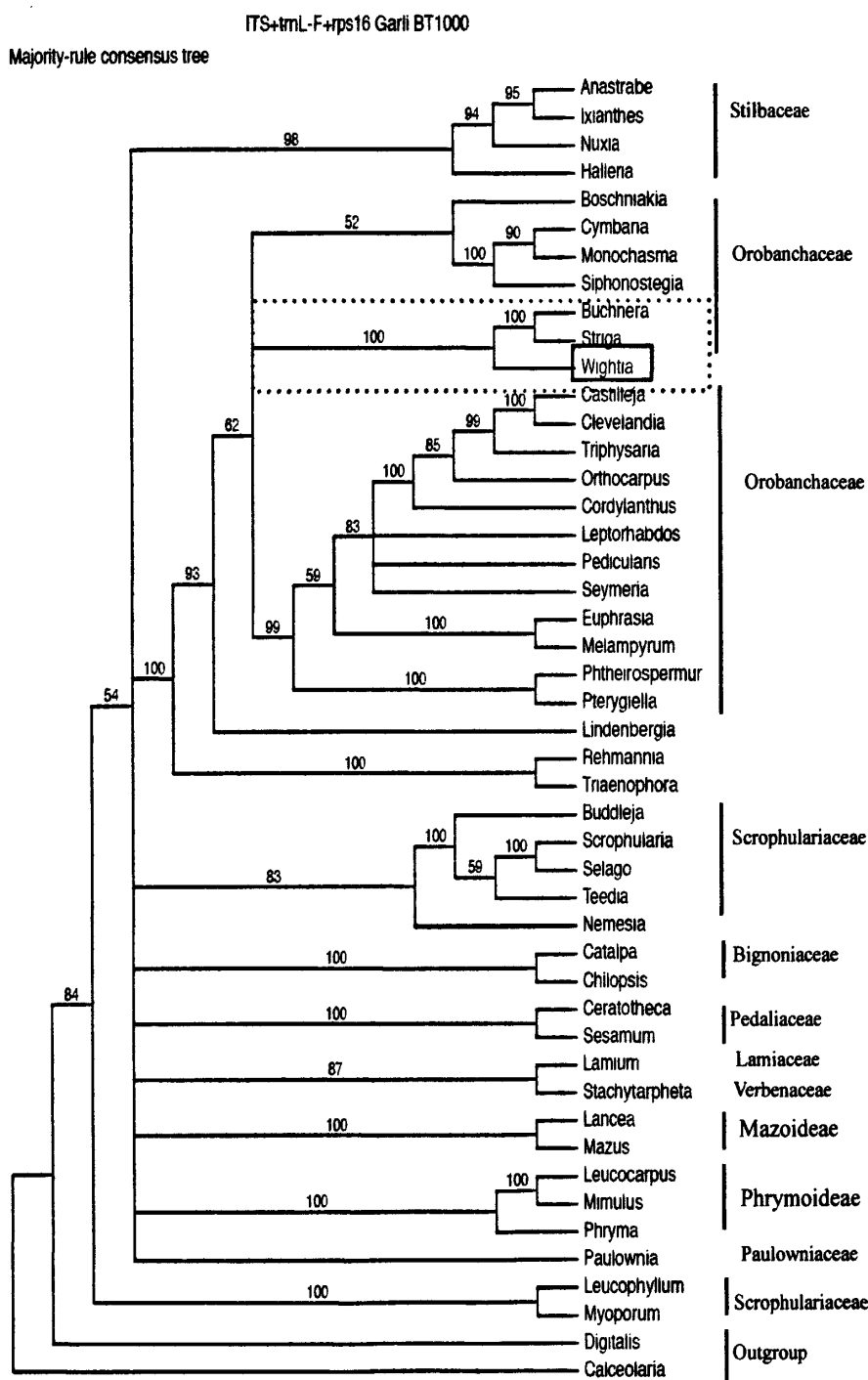


图 3-4 基于 ITS+rps16+trnL-F 合并数据集构建的 ML 树 (数字表示靴带支持率, <50 未显示)

Fig. 3-4 The ML tree based on the ITS+rps16+trnL-F combined dataset. Numbers above the branches indicate bootstrap percentages (≥ 50).

3.3 结论与讨论

3.3.1 美丽桐属极可能属于 *Orobanchaceae* s.l.

尽管 *trnL-F* 和 *trnL-F+rps16* 合并数据集构建的 ML 树中, 美丽桐属与透骨草亚科聚成一支 (靴带支持率分别为 62% 和 54%), 未与列当科聚成一支, 但仍位于列当科附近。利用 ITS 和 ITS+rps16+*trnL-F* 分别的构建的 ML 树中, 美丽桐则均处于广义列当科内部, 与 *Buchnera* 和 *Striga* 以较高的支持率 (均为 100%) 聚成一支, 它们与列当科剩余类群共同构成单系支, 支持率分别为 81% 和 93%。显然, 美丽桐属极有可能属于广义列当科。

美丽桐属与来江藤属在形态上比较接近, 虽然来自叶绿体的分子证据并未显示两者之间有很近的亲缘关系 (如图 2-3a, 3-3), 但是根据以往研究 (eg: Oxelman *et al.*, 2005; Bennett & Mathews, 2006) 及本研究结果认为来江藤属属于列当科无疑。至于两者在科内关系如何, 由于我们尚未得到可靠的来江藤属的 ITS 序列, 因此对于两者的亲缘关系还需要进一步研究。

本研究中, 将原属于玄参科的半寄生属 *Leptorhabdos*、*Pterygiella*、*Cymbaria*、*Monochasma*、*Siphonostegia* 进行研究表明, 这 5 个属均属于广义列当科, 与 Bennett & Mathews (2006) 利用核基因 *phyA* 研究结果一致, 其中 *Leptorhabdos* 和 *Pterygiella* 为本研究首次取样研究。即使增加了更多的半寄生属, 自养属 *Lindenbergia* 仍单独处于列当科分支外围, 成为列当科其他所选类群的姊妹群, 表明寄生性是单系起源, 同 Young 等 (1999) 年研究结果一致。

3.3.2 美丽桐属与 *Phrymoideae* 亲缘关系较近

在 ITS 和 ITS+rps16+*trnL-F* 分别的构建的系统树中, 美丽桐属所属的广义列当科与透骨草科 (*Phrymaceae*)、泡桐科 (*Paulowniaceae*) 成姊妹群关系。但在 *trnL-F* 和 *trnL-F+rps16* 所构建的 ML 树 (图 3-2 和 3-3) 显示, 美丽桐属与透骨草亚科 (*Phrymoideae*) 聚成一支, 虽然靴带支持率较低 (分别为 62% 和 54%), 也表明美丽桐属与透骨草亚科亲缘关系相对较近。

通泉草亚科和泡桐科显示为列当科的并列姊妹群, 这表明美丽桐属与通泉草亚科和泡桐科亲缘关系较远。Beardsley 和 Olmstead (2002) 基于来自分子数据的证据和科内类群间存在的一些诸如花萼管状带齿、蒴果室背开裂和柱头两片状等共源性状, 将 *Phrymoideae* 和 *Mazoideae* 两个亚科归入到 *Phrymaceae* 中, 但是两者间的

姐妹群关系在后续更多的基于 cpDNA 序列及更广泛取样的研究中并未得到支持 (Oxelman *et al.*, 2005)。闫坤 (2008) 也认为应将 *Mazus* 和 *Lancea* 从 Phrymaceae 中分离出来。本研究中, 透骨草亚科与通泉草亚科依旧并列, 仍与列当科、泡桐科成为姊妹群, 支持将 *Mazus* 和 *Lancea* 从 Phrymaceae 中移出。

在形态学和地理分布范围上, 泡桐属与美丽桐属有较大的相似性 (van Steenis, 1949), 但是这种相似并没有得到分子数据的支持。本研究的各基因构建的系统树中, 美丽桐属与泡桐属均不构成单系, 说明与泡桐科相对较远, 二者可能具有各自不同的祖先。

3.3.3 唇形目部分科间的系统发育关系尚待进一步分析

唇形目 (APGIII) 有 23 个类群超过 2300 个种, 成为被子植物最大的目之一, 遍布全世界 (Schäferhoff *et al.*, 2010)。随着研究的不断深入, 研究办法不断变化从单基因分析到联合基因分析。目前研究者开始选择进化速率较快的基因片段进行分子系统学研究, 但是有些结果与传统的分类系统大相径庭 (eg: Marx *et al.*, 2010), 各科间分子进化关系始终没有足够的支持证实系统进化关系 (eg: Olmstead *et al.*, 1993; Olmstead *et al.*, 2000; Bremer *et al.*, 2002)。

以泡桐科 (泡桐属) 与唇形目各科系统关系研究为例, 以往的研究所涉及泡桐属 (科), 它与各科的关系都不清晰。Olmstead 和 Reeves (1995) 研究结果表明 *Paulownia* 不属于玄参科也不属于紫葳科。Bremer 等 (2002) 研究显示泡桐属 (科) 与 *Phryma* (Phrymoideae)、Orobanchaceae 聚成一支, 支持率为 90%。而同年 Beardsley 和 Olmstead (2002) 在研究透骨草科时也选取了 *Paulownia*, 结果显示 *Paulownia* 在透骨草科外围, 系统地位依旧不清晰。Xia 等 (2009) 研究中涉及到泡桐属 (科) 显示 *Paulownia* 在由核基因 ITS 构建的系统树中与透骨草亚科成姊妹群, 而在叶绿体基因构建的系统树中与地黄属崖白菜属、列当科成姊妹群。本研究中泡桐属也始终没有显示出与其他科更进一步的亲缘关系, 仍处于不确定的系统地位。

就分子进化本身而言, 除处于唇形目分支基部的科有较好的分支外, 核心部分科的系统关系仍为并系姊妹群。Schäferhoff 等 (2010) 利用叶绿体中进化速率较快的内含子片段将唇形目核心科分成两大支 (如图 2-4), 虽然贝叶斯后验概率均为 1.00, 但是 ML 支持率仅为 48% 和 62%, 不足以证实这两大支的关系。本研究在寻求美丽桐属的科级地位时亦遇到系统树的分支分辨率低、不同基因片段所得系统树

差异较大等问题。

目前用于研究唇形目各科系统关系所用的基因不能很好地解决科间的系统进化关系，因此期待更多的基因联合分析、发掘新的基因、或新的分析手段来解决唇形目各科间的系统关系。

全文小结

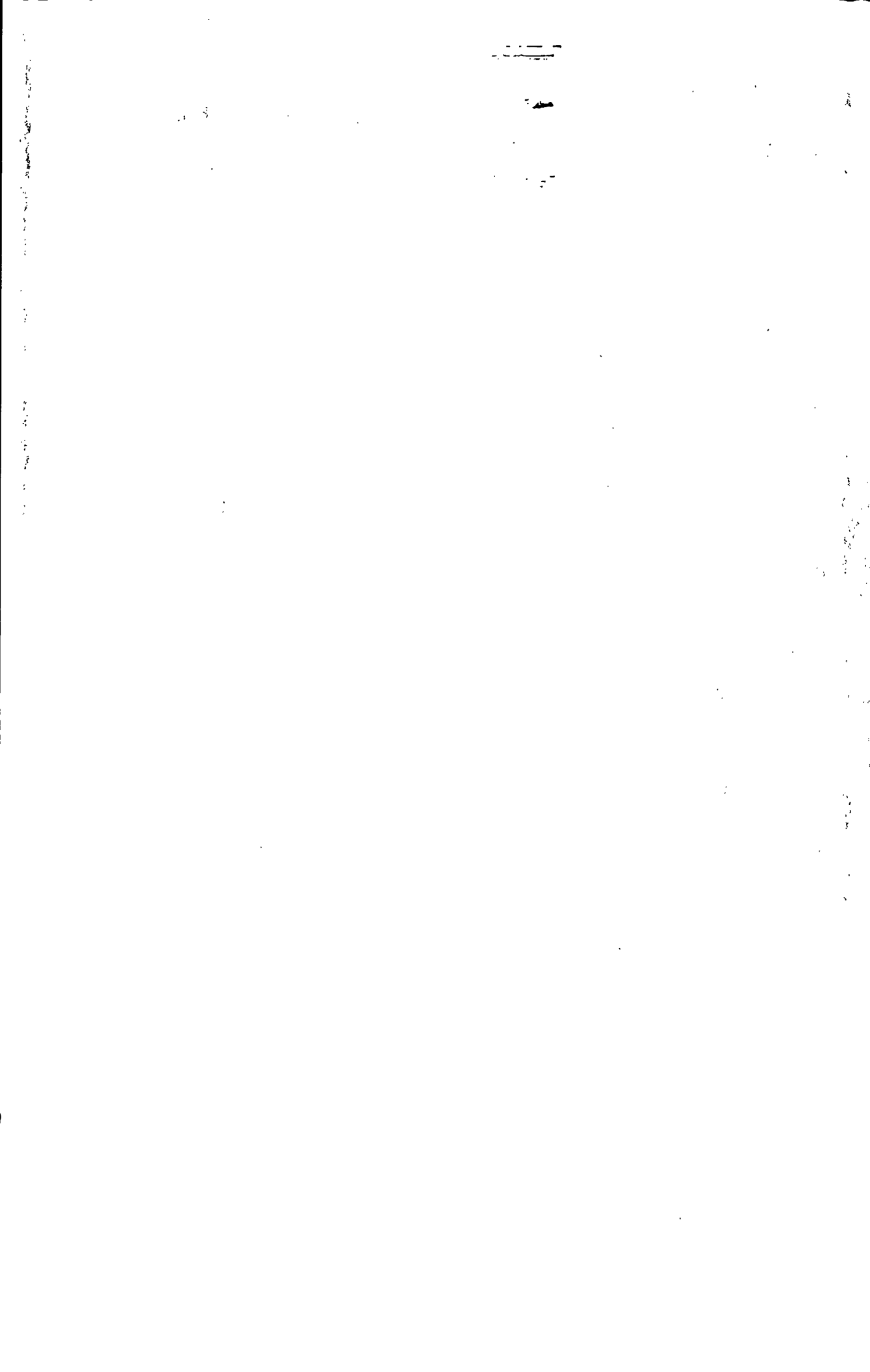
本文从分子系统学视角出发,采用叶绿体编码基因 *rbcL* 和 *ndhF*、叶绿体非编码基因 *trnL-F* 基因间区和 *rps16* 内含子、核基因组核糖体内转录基因间区 ITS 共 5 个片段,分别及合并应用最大似然法对美丽桐属在唇形目内的系统位置及其与近缘科属的系统发育关系进行了研究,得到以下结论:

1、美丽桐属极有可能属于广义列当科,与透骨草亚科相对较近而与泡桐科关系较远。系统发育树结果显示美丽桐属处于广义列当科内部,以较高的支持率(100%)与 *Buchnera* 和 *Striga* 聚成一支。而叶绿体片段单独和联合分析结果显示美丽桐属与透骨草亚科聚成一支,虽支持率偏低(62%和 54%),但显然与美丽桐属亲缘关系相对较近。泡桐科与美丽桐属始终未处于同一分支内,与美丽桐属关系较远,因此泡桐科与美丽桐属可能有不同的祖先。形态学上认为来江藤属与美丽桐属关系较近,由于未获得该属的 ITS 序列,在本研究中并没有足够的证据验证它们的关系,还需要进一步的研究。

2、唇形目部分科间系统进化关系需要进一步分析。唇形目内各科的系统进化关系始终未有足够的分子证据支持。无论是核基因和叶绿体基因的联合研究还是单纯的叶绿体基因联合研究,唇形目各科的系统进化关系都不甚明了。同时唇形目中有些科内的亲缘关系也存在问题,可能需要更大范围的取样或选用其他基因和手段来解决这个棘手的问题。

附录 I 用于美丽桐属近缘科检测的各基因片段 genbank 序列号及凭证标本信息

Family	Species name with author	DNA Source/voucher	rbcL	ndhF
Acanthaceae	<i>Acanthus ebracteatus</i> Vahl.	Shi S <i>et al.</i> (2003)	AY289682	
	<i>Avicennia marina</i> (Forstk.) Vierh	Shi S <i>et al.</i> (2005)	AY289681	
	<i>Clerodendrum thomsonae</i> Balf	Bremer B <i>et al.</i> (2002)		AJ429116
	<i>Crossandra nilotica</i> Oliv.	Huang M <i>et al.</i> (2002)		AY115887
	<i>Elytraria crenata</i> Vahl.	Scotland RW <i>et al.</i> (1995)		CNU12656
	<i>Nelsonia campestris</i> R. Br.	Olmstead RG <i>et al.</i> (2001)	AF188127	
	<i>Thunbergia capensis</i> Sedges	Albert VA <i>et al.</i> (1992)	L01935	
		Forest F (2007)	AM234783	
		Scotland RW <i>et al.</i> (1995)		TAU12667
	Apocynaceae	<i>Vinca minor</i> L.	Sennblad B & Bremer B (2001)	AJ419768
Bignoniaceae	<i>Amphitecna apiculata</i> AH R.	Spangler RE & Olmstead RG (1999)	AF102640	AF102624
	<i>Argyia bustillosii</i> Phil.	Olmstead RG <i>et al.</i> (2009)	FJ870007	
	<i>Arrabidaea pubescens</i> L.	Spangler RE & Olmstead RG (1998)	AF102641	
	<i>Arrabidaea triplinervia</i> (Mart. ex DC.) Baill. ex Bur.	Lohmann LG (2006)		DQ222564



<i>Campsis grandiflora</i> (Thunb.) K. Schum.	Xiang QY <i>et al.</i> (1999)	AF190429	
<i>Campsis radicans</i> (L.) Seem.	Xiang QY <i>et al.</i> (1999)	AF190428	AF130144
<i>Catalpa</i> sp.	Olmstead RG <i>et al.</i> (1992)	L11679	
<i>Chilopsis linearis</i> (cv.) Sweet	Olmstead RG <i>et al.</i> (2009)		FJ887856
<i>Crescentia portoricensis</i> Britton	Spangler RE & Olmstead RG (1999)	AF102643	
<i>Cydista aequinoctialis</i> L.	Spangler RE & Olmstead RG (1999)	AF102645	
	Lohmann LG (2006)		DQ222577
<i>Dolichandrone spathacea</i> (L. f.) K. Sch.	Olmstead RG <i>et al.</i> (2009)		FJ887859
<i>Eccremocarpus scaber</i> Ruiz et Pav.	Spangler RE & Olmstead RG (1999)	AF102646	AF102630
<i>Ekmanianthe longiflora</i> (Griseb.) Urb.	Grose SO & Olmstead RG (2007)		EF105008
<i>Exarata chocoensis</i> AH Gentry	Olmstead RG <i>et al.</i> (2001)		AF123691
<i>Jacaranda arborea</i> Urb.	Olmstead RG <i>et al.</i> (2009)	FJ870008	FJ887866
<i>Kigelia africana</i> (Lam.) Benth.	Spangler RE & Olmstead RG (1999)	AF102648	AF102632
<i>Macfadyena unguis-cati</i> L.	Spangler RE & Olmstead RG (1999)	AF102649	
	Lohmann LG (2006)		DQ222595
<i>Macrocatalpa punctata</i> (Griseb.) Britton	Olmstead RG <i>et al.</i> (2009)		FJ887868
<i>Martinella martinii</i> (DC.) Baill.	Lohmann LG (2006)		DQ222606



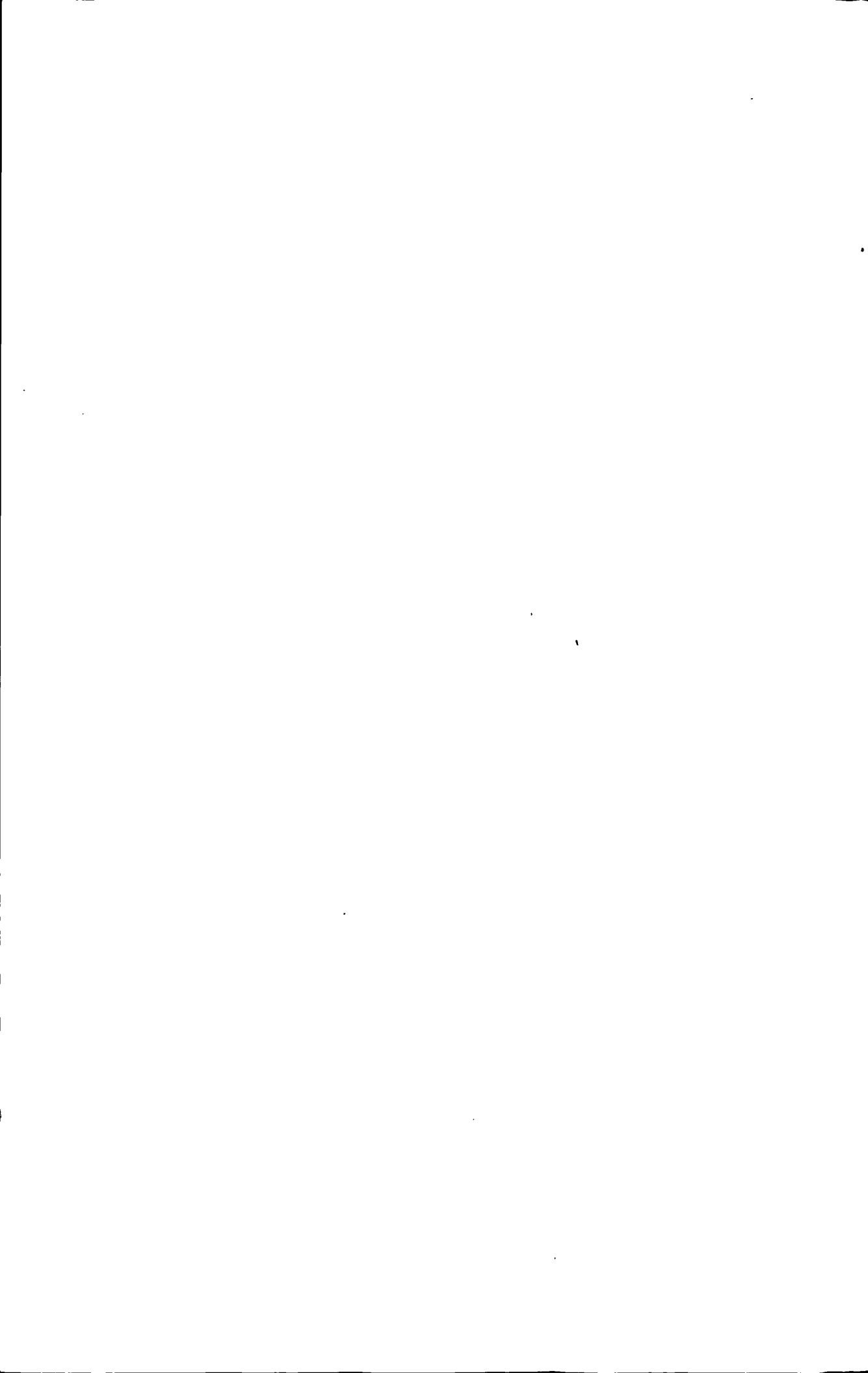
<i>Martinella obovata</i> Bureau et K. Schum	Olmstead RG & Reeves PA (1995)	L36444	
<i>Oroxylum indicum</i> (L.) Vent	Spangler RE & Olmstead RG (1998)	AF102651	AF102635
<i>Pandorea pandorana</i> (Andrews) Steenis	Grose SO & Olmstead RG (2007)		EF105016
<i>Podranea ricasoliana</i> Sprague	Spangler RE & Olmstead RG (1999)	AF102653	
<i>Rhigozum obovatum</i> Burch	Lohmann LG (2006)		DQ222628
	Forest F <i>et al.</i> (2006)	AM234922	
<i>Sparattosperma leucanthum</i> (Vell.) K.Schum.	Grose SO & Olmstead RG (2007)		EF105020
<i>Tabebuia heterophylla</i> (DC.) Britton	Grose SO & Olmstead RG (2007)		EF105022
<i>Tanaecium crucigerum</i> Seem.	Olmstead RG & Reeves PA (1995)		L36416
<i>Tecoma capensis</i> (Thunb.) Lindl.	Lohmann LG (2006)		DQ222640
<i>Tecoma stans</i> L.	Lohmann LG (2006)		DQ222642
<i>Tecomaria capensis</i> Thunb.	Spangler RE & Olmstead RG (1999)	AF102655	
<i>Tourrettia lappacea</i> (L'Her) Willd.	Olmstead RG <i>et al.</i> (2009)		FJ887874
<i>Calceolaria</i> sp.	Olmstead RG <i>et al.</i> (2009)		FJ887876
<i>Carlemannia tetragona</i> Hook. f.	Olmstead RG <i>et al.</i> (2001)	AF123669	AF123679
<i>Silvianthus bracteatus</i> Hook.f.	Lee HL <i>et al.</i> (2007)	DQ673316	DQ673290
	Lee HL <i>et al.</i> (2007)	DQ673315	



Gesneriaceae	<i>Bestleria affinis</i> C. V. Morton	Smith JF (1999)	AF170226	
	<i>Cyclonema myricoides</i> (Hochst.) Vatke	Wagstaff SJ <i>et al.</i> (1997)		CMU78687
	<i>Diastema racemiferum</i> Benth.	Smith JF (1999)	AF170230	
	<i>Gloxinia sylvatica</i> (K.) Wiehler	Smith JF (1999)	AF170235	
	<i>Napeanthus costaricensis</i> Wiehler	Smith JF <i>et al.</i> (1996)		NCU62198
	<i>Napeanthus macrostoma</i> L.	Smith JF (2000)	AF170239	
	<i>Negria rhabdanthoides</i> F. Mueller	Smith JF (1999)	AF170240	
	<i>Nematanthus hirsutus</i> (Mart.) Wiehler	Olmstead RG & Reeves PA (1995)	L36446	
	<i>Nematanthus longipes</i> L.	Olmstead RG <i>et al.</i> (2000)		AF130157
	<i>Rhytidophyllum tomentosum</i> (L.) Mart. ex G. Don.	Smith JF (1999)	AF170245	
	<i>Sanango</i> sp.	Oxelman B <i>et al.</i> (1997)	AJ001763	
	<i>Sinningia cooperi</i> (Paxt.) Wiehler	Smith JF (1999)	AF170248	
	<i>Titanotrichum oldhamii</i> Soler.	Soltis PS <i>et al.</i> (1999)	AF206829	
Lamiaceae	<i>Callicarpa dichotoma</i> (Lour.) K. Koch,	Olmstead RG <i>et al.</i> (1993)	L14393	
	<i>Callicarpa japonica</i> Thunb.	Olmstead RG <i>et al.</i> (2000)		AF130148
	<i>Clerodendrum fragrans</i> (Vent.) Willd.	Shi S <i>et al.</i> (2005)	AY289684	
	<i>Dermatobotrys saundersii</i> Bolus.	Oxelman B <i>et al.</i> (2003)		AJ617592



	<i>Gmelina hystrix</i> Schult. ex Kurz	Wagstaff SJ & Olmstead RG (1997)	GHU28873	
	<i>Lamium purpureum</i> L.	Wagstaff SJ <i>et al.</i> (1997)		LPU78694
	<i>Salvia japonica</i> Thunb.	Sudarmo & Okada H (2008)	AB266224	
	<i>Tectona grandis</i> Linn. f.	Sudarmo & Okada H (2008)	AB295063	
	<i>Proboscidea louisianica</i> (Mill.) Thell.	Oxelman B <i>et al.</i> (1997)		AF027284
Martyniaceae		Albert VA <i>et al.</i> (1998)	L01946	
	<i>Abeliophyllum distichum</i> Nakai	Olmstead RG <i>et al.</i> (2001)		AF123690
Oleaceae		Lee HL <i>et al.</i> (2007)	DQ673292	DQ673262
	<i>Chionanthus virginicus</i> L.	Lee HL <i>et al.</i> (2006)	DQ673309	DQ673283
	<i>Comoranthus minor</i> H. Perrier	Lee HL <i>et al.</i> (2006)	DQ673313	DQ673287
	<i>Fontanestia phillyreoides</i> subsp. <i>phillyreoides</i>			
	Labill	Lee HL <i>et al.</i> (2006)	DQ673293	DQ673263
	<i>Forestiera angustifolia</i> Torr.	Chen S <i>et al.</i> (2010)	GQ436541	
	<i>Forsythia europaea</i> Degen et Bald.	Lee HL <i>et al.</i> (2007)		DQ673264
	<i>Fraxinus chinensis</i> Roxb.	Ferreira R <i>et al.</i> (2009)	FJ862055	
		Lee HL <i>et al.</i> (2007)		DQ673275
	<i>Haenianthus salicifolius</i> Grised.	Lee HL <i>et al.</i> (2007)	DQ673308	DQ673282



<i>Jasminum leratii</i> Schltr.	Lee HL <i>et al.</i> (2007)		DQ673271
<i>Jasminum suavisissimum</i> Lindl.	Albert VA <i>et al.</i> (1992)	L01929	
<i>Ligustrum vulgare</i> L.	Olmstead RG <i>et al.</i> (2000)		AF130164
<i>Maburea trinervis</i> Maas	Malecot VR & Nickrent DL (2008)	DQ790165	
<i>Minquartia guianensis</i> Aubl.	Malecot VR & Nickrent DL (2008)	DQ790148	
<i>Myxopyrum hainanense</i> Chia	Lee HL <i>et al.</i> (2007)	DQ673294	DQ673265
<i>Nestegis sandwicensis</i> A. Gray	Lee HL <i>et al.</i> (2007)	DQ673305	DQ673279
<i>Noronhia emarginata</i> (Lam.) Thouars	Lee HL <i>et al.</i> (2007)	DQ673307	DQ673281
<i>Nyctanthes arborescens</i> L.	Lee HL <i>et al.</i> (2007)	DQ673295	
<i>Olea europaea</i> L.	Olmstead RG <i>et al.</i> (2000)		AF130161
<i>Ongokea gore</i> Engler	Kim KJ <i>et al.</i> (2000)		AF130163
<i>Phillyrea angustifolia</i> L.	Malecot VR & Nickrent DL (2008)	DQ790140	
<i>Phillyrea angustifolia</i> L.	Ferreira R <i>et al.</i> (2009)	FJ862063	
<i>Schrebera alata</i> (Hochst.) Welw.	Lee HL <i>et al.</i> (2007)		DQ673286
<i>Strombosia pustulata</i> Oliv.	Lee HL <i>et al.</i> (2007)	DQ673300	DQ673274
<i>Syringa vulgaris</i> L.	Malecot VR & Nickrent DL (2008)	DQ790158	
	Lee HL <i>et al.</i> (2007)	DQ673303	DQ673277

Orobanchaceae	<i>Agalinis limifolia</i> (Nuttall) Britton	Neel MC & Cummings MP (2004)	AY563929
	<i>Alectra sessiliflora</i> (Vahl) O. Ktze	Wolfe AD & dePamphilis CW(1998)	AF026820
	<i>Aureolaria pedicularia</i> (L.) Raf.	Neel MC & Cummings MP (2004)	AY563940
	<i>Bartsia alpina</i> L.	Olmstead RG <i>et al.</i> (2001)	AF190903
	<i>Brachystigma wrighitii</i> (A. Gray) Pennell	Neel MC & Cummings MP (2004)	AY563942
	<i>Brandisia hancei</i> Hook.f.	Oxelman B <i>et al.</i> (2005)	AJ619577
	<i>Brandisia swinglei</i> Merr.	Lihq 200963	XXXXXX
	<i>Buchnera floridana</i> Gand.	Wolfe AD & dePamphilis CW(1998)	AF026822
	<i>Castilleja linariifolia</i> Benth.	Wolfe AD & dePamphilis CW(1998)	AF026823
	<i>Ceratotheca triloba</i> E.Mey.ex Benth.	Wortley AH <i>et al.</i> (2005)	AY919277
	<i>Clevelandia beldingii</i> (Greene) Greene.	Bremer B <i>et al.</i> (2002)	AJ429117
	<i>Cymbaria mongolica</i> Maxim.	2010043	XXXXXX
	<i>Cyclocheilon somaliense</i> Oliv.	Wagstaff SJ & Olmstead RG (1997)	CSU28871
	<i>Cycnium racemosum</i> Benth.	Randle CP & Wolfe AD (2005)	DQ017783
	<i>Dasistoma macrophylla</i> (Nutt.) Raf.	Neel MC & Cummings MP (2004)	AY563947
	<i>Euphrasia disjuncta</i> Fernald & Wiegand	Young ND & dePamphilis CW(2005)	AY849863
	<i>Euphrasia stricta</i> D. Wolff ex JF Lehm.	Young ND & dePamphilis CW(2005)	AY849863



<i>Graderia scabra</i> Benth.	Forest F <i>et al.</i> (2006)	AM235043	
<i>Harpogophyton granidieri</i> Baill.	Albert VA <i>et al.</i> (1992)	L01923	
<i>Harveya capensis</i> Hook.	Wolfe AD & dePamphilis CW (1998)	AF026829	
<i>Hyobanche atropurpurea</i> Bolus	Wolfe AD & Randle CP (2001)	AF245023	
<i>Lathraea clandestina</i> L.	Wolfe AD & dePamphilis CW (1998)	AF026833	
<i>Leptorhabdos parviflora</i> (Benth.) Benth.	Lihq2006867	XXXXXX	XXXXXX
<i>Lindenbergia philippinensis</i> Benth.	Olmstead RG <i>et al.</i> (2001)	AF123664	AF123686
<i>Melampyrum lineare</i> Dres.	Wolfe AD & dePamphilis CW (1998)	AF026834	
<i>Melasma scabrum</i> Berg.	Olmstead RG <i>et al.</i> (1999)	AF190904	
<i>Orobanche uniflora</i> L.	Park JM & Schneeweiss GM (2004)	AY582180	
<i>Parentucellia viscosa</i> (L.) Caruel.	Young ND & dePamphilis CW(2005)	AY849865	
<i>Pedicularis coronata</i> (Corda) Kleb.	Soltis PS <i>et al.</i> (1999)	AF206803	
<i>Pedicularis foliosa</i> L.	Olmstead RG <i>et al.</i> (2001)		AF123689
<i>Phtheirospermum japonicum</i> (Thunb.) Kanitz	Lihq200902	XXXXXX	XXXXXX
<i>Pterygiella duclouxii</i> Franch.	PB-09	XXXXXX	XXXXXX
<i>Rhinanthus minor</i> L.	Dolphin KP <i>et al.</i> (2003)	AY395558	
<i>Schwalbea americana</i> L.	Young ND & dePamphilis CW(2005)	AY849866	

	<i>Seymeria pectinata</i> Pursh	Wolfe AD & dePamphilis CW (1998)	AF026837	
	<i>Siphonostegia laeta</i> S. Moore	2010042	XXXXXX	XXXXXX
	<i>Siriga asiatica</i> (L.) O. Ktze.	Wolfe AD & dePamphilis CW (1997)	AF026838	
	<i>Tozzia alpina</i> L.	Wolfe AD & dePamphilis CW (1997)	AF026843	
Paulowniaceae	<i>Paulownia tomentosa</i> (Tlittmb.) Steud.	Olmstead RG & Reeves PA (1995)	L36447	L36406
Pedaliaceae	<i>Ceratolheca triloba</i> E. Mey. ex Bernh.	Wortley AH <i>et al.</i> (2007)	AY919277	AY919281
	<i>Sexamum indicum</i> L.	Olmstead RG & Reeves PA (1995)	L14408	L36413
Phrymaceae	<i>Lancea tibetica</i> Hook. f. et Thoms.	Xia Z. <i>et al.</i> (2008)	FJ172727	
	<i>Leucocarpus perfoliatus</i> (Kunth) Benth.	Oxelman, B. <i>et al.</i> (2005)		AJ617599
	<i>Mazus stachydifolius</i> (Turez.) Maxim	Oxelman, B. <i>et al.</i> (2005)		AJ617600
	<i>Mimulus aurantiacus</i> Curtis	Yan K & Li HQ (2008)	EU348860	
	<i>Phryma leptostachya</i> L.	Wolfe AD & dePamphilis CW (1998)	AF026835	
	<i>Phryma leptostachya</i> var. <i>asiatica</i> Hara	Olmstead RG <i>et al.</i> (2001)		AF188186
Veronicaceae	<i>Angelonia pubescens</i> Benth.	Wagstaff SJ & Olmstead RG (1997)	PLU28881	
		Xiang QY <i>et al.</i> (1999)	AF190439	
		Oxelman B <i>et al.</i> (2005)		AJ617586
		Olmstead RG <i>et al.</i> (2001)	AF123672	

	<i>Antirrhinum majus</i> L.	Moore MJ <i>et al.</i> (2010)	GQ997015	
Veronicaceae	<i>Bacopa caroliniana</i> (Walter) BL Rob.	Olmstead RG & Reeves PA (1995)		L36392
	<i>Bacopa repens</i> (Swartz) Wettstein	Olmstead RG <i>et al.</i> (2001)		AF123677
	<i>Callitriche heterophylla</i> Pursh	Fritsch PW <i>et al.</i> (2007)	EF467905	
	<i>Camptoloma lyperiiflorum</i> (Vatke) Hilliard	Reeves PA & Olmstead RG		L47329
	<i>Chelone obliqua</i> L.	Kornhall P <i>et al.</i> (2001)		AJ401401
	<i>Collinsia grandiflora</i> Lindl.	Wolfe AD & dePamphilis CW (1998)	AF026824	
	<i>Digitalis purpurea</i> L.	Wolfe AD & dePamphilis CW (1998)	AF026825	
		Delavault PM (1995)	X83720	
		Olmstead RG <i>et al.</i> (2000)		AF130150
		Albach DC & Chase MW (2004)		FJ887860
Rubiaceae	<i>Exarata chocoensis</i> AH Gentry	Olmstead RG & Reeves PA (1995)	L36443	
	<i>Hippuris vulgaris</i> L.	Renner SS & Schaefer H (2009)	FJ911661	
	<i>Monttea chilensis</i> Gay.	Olmstead RG <i>et al.</i> (2001)	AF236128	
	<i>Tetranema mexicanum</i> Benth.	Nalapalli SP <i>et al.</i> (2006)	EF044213	
	<i>Coffea arabica</i> L.	Bremer B <i>et al.</i> (1999)		AJ236290
	<i>Scyphiphora hydrophyllacea</i> Gaertn.	Mouly A <i>et al.</i> (2009)	EU817432	



Schlegeliaceae	<i>Schlegelia parviflora</i> (Oerst.) Monachino	Bremer B <i>et al.</i> (1999)	AJ236311
Schlegeliaceae	<i>Synopsis ilicifolia</i> Griseb.	Olmstead RG & Reeves PA (1995)	L36448
Scrophulariaceae	<i>Alonsoa unilabiata</i> (Linn. f.) Steudel	Wortley AH <i>et al.</i> (2005)	AY919278
	<i>Antherothamnus pearsonii</i> N.E. Br.	Wolfe AD & dePamphilis CW (1998)	AF026821
	<i>Aptosimum</i> sp.	Kornhall P <i>et al.</i> (2001)	AJ401392
	<i>Buddleja davidii</i> Franch	Olmstead RG <i>et al.</i> (2001)	AF123676
	<i>Diascia longicornis</i> (Thunb.) Druce	Oxelman B <i>et al.</i> (1997)	AJ001757
	<i>Diclis reptans</i> Benth.	Olmstead RG & Reeves PA (1995)	L36394
	<i>Emorya suaveolens</i> Torrey	Forest F <i>et al.</i> (2007)	AM235134
	<i>Freylinia tropica</i> S. Moore	Forest F <i>et al.</i> (2007)	AM235135
	<i>Freylinia undulata</i> Benth.	Oxelman B <i>et al.</i> (1997)	AJ001759
	<i>Gomphostigma scoparioides</i> Turcz.	Olmstead RG <i>et al.</i> (2009)	AF027278
	<i>Halleria lucida</i> L.	Kornhall P <i>et al.</i> (2001)	AJ401402
	<i>Hemimeris sabulosa</i> L.	Forest F <i>et al.</i> (2007)	AM235137
		Oxelman B <i>et al.</i> (1997)	AJ001760
		Wolfe AD & dePamphilis CW (1998)	AF026828
		Olmstead RG <i>et al.</i> (1999)	AF123688

	<i>Jamesbrittenia atropurpurea</i> (Benth.) Hilliard	Kornhall PE & Bremer B (2003)		AJ550570
	<i>Jamesbrittenia foliolosa</i> (Benth.) Hilliard	Forest F (2007)	AM235139	
Scrophulariaceae	<i>Leucophyllum frutescens</i> (Berl.)IMJohnst	Olmstead RG <i>et al.</i> (1999)	AF123665	AF123685
	<i>Lyperia antirrhinoides</i> (L.f.) Hilliard,	Kornhall P <i>et al.</i> (2001)		AJ401405
	<i>Lyperia tristis</i> (L.f.) Benth.	Forest F <i>et al.</i> (2007)	AM235140	
	<i>Manuleopsis Dinteri</i> Thell.	Kornhall P <i>et al.</i> (2001)		AJ401410
	<i>Myoporum mauritianum</i> A. DC.	Lee HL <i>et al.</i> (2007)	DQ673294	
	<i>Nemesia floribunda</i> Lehm.	Olmstead RG <i>et al.</i> (1999)	AF123663	
	<i>Nemesia strumosa</i> Benth.	Lee HL <i>et al.</i> (2007)	DQ673305	
	<i>Nicodemia diversifolia</i> (Vahl) Tenore	Olmstead RG <i>et al.</i> (1999)	L14413	
	<i>Ofsia africana</i> Bocq.ex Baill.	Olmstead RG & Reeves PA (1995)		L36405
	<i>Ofsia africana</i> Bocq.ex Baill.	Lee HL <i>et al.</i> (2007)	AM235143	
	<i>Peltostomum virgatum</i> E.Mey.ex Benth.	Oxelman B <i>et al.</i> (2005)		AJ617606
	<i>Phygellus capensis</i> E. Meyer ex Benth.	Lee HL <i>et al.</i> (2007)	AM235144	
	<i>Scrophularia ningpoensis</i> Hemsl.	Oxelman B <i>et al.</i> (2005)		AJ617608
	<i>Sutera pinnatifida</i> Kuntze	Chen SL <i>et al.</i> (2010)	GQ436721	
		Lee HL <i>et al.</i> (2007)	AM235149	

	<i>Teedia lucida</i> (Aiton) Rudolphi	Lee HL <i>et al.</i> (2007)	AM235150	
	<i>Triphysaria pusilla</i> (Benth.) Chuang et Heckard	Oxelman B <i>et al.</i> (2005)		AJ617582
	<i>Verbascum thapsus</i> L.	Olmstead RG & Reeves PA (1995)	L36452	
Solanaceae	<i>Nicotiana tomentosiformis</i> Goodsp.	Yukawa M <i>et al.</i> (2005)	NC007602	
	<i>Nicotiana acuminata</i> (Graham) Hook.	Olmstead RG & Reeves PA (1995)	NAU08923	
	<i>Solantra grandiflora</i> Swartz	Olmstead RG & Reeves PA (1995)	SGU08620	EU580947
Stilbaceae	<i>Euthystachys abbreviate</i> (E. Mey.) A. DC.	Bremer B <i>et al.</i> (1994)	Z29671	
	<i>Halleria lucida</i> L.	Wolfe AD & dePamphilis CW (1998)	AF026828	AF188185
	<i>Ixianthes retzioides</i> Benth.	Olmstead RG <i>et al.</i> (2001)		AJ617598
	<i>Nuxia floribunda</i> Benth.	Oxelman B <i>et al.</i> (2005)		
	<i>Nuxia</i> sp.	Lee HL <i>et al.</i> (2007)	AM235156	
	<i>Retzia capensis</i> Thunb.	Oxelman B <i>et al.</i> (1997)		AF027280
	<i>Stilbe albiflora</i> E. Mey.	Bremer B <i>et al.</i> (1994)	Z29669	
	<i>Stilbe vestita</i> Berg.	Oxelman B <i>et al.</i> (1997)		AF027289
	<i>Thomandersia hensii</i> De Wild. et Th. Dur.	Oxelman B <i>et al.</i> (1997)		AF027287
Thomandersiaceae		Bremer B (1996)	Z68827	
		Wortley AH <i>et al.</i> (2005)	A Y919279	



	<i>Thomandersia laurifolia</i> (T. Anders ex Benth.) Baill.	Wortley AH <i>et al.</i> (2005)	AY919285
Verbenaceae	<i>Petrea racemosa</i> Kunth	Wagstaff SJ & Olmstead RG (1997).	PRU28879
Verbenaceae	<i>Petrea volubilis</i> L.	Olmstead RG <i>et al.</i> (2009)	FJ887872
	<i>Phyla incisa</i> Small	Olmstead RG <i>et al.</i> (2000)	AF130153
	<i>Verbena bonariensis</i> L.	Olmstead RG <i>et al.</i> (1993)	L14412
	<i>Rhaphithamnus spinosus</i> (Juss.) Mold.	Olmstead RG & Reeves PA (1995)	L36409
	<i>Stachytarpheta dichotoma</i> (R. and P.) Vahl	Wagstaff SJ & Olmstead RG (1995)	SDU32161
Lamiales incertae sedis	<i>Peltanthera floribunda</i> Benth.	Olmstead RG & Reeves PA (1995)	L36414
	<i>Rehmannia chingii</i> L.	Oxelman B <i>et al.</i> (1997)	AJ001762
	<i>Triacnophora rupestris</i> (Hemsl.) Soler.	Yan K & Li HQ (2008)	EF544598
	<i>Triacnophora shennongjiaensis</i> X.D. Li, Y.Y. Zan & J.Q. Li	Yan K & Li HQ (2008)	EF544599
	<i>Wightia speciosissima</i> (D. Don) Merr.	Xia Z <i>et al.</i> (2008)	FJ172732
		Lihq2008164/Lihq2009448	XXXXXX

注: XXXXX 表示 Genbank 号暂缺



附录 II 用于美丽桐属的系统学地位分析的各基因片段 genbank 序列号及凭证标本信息

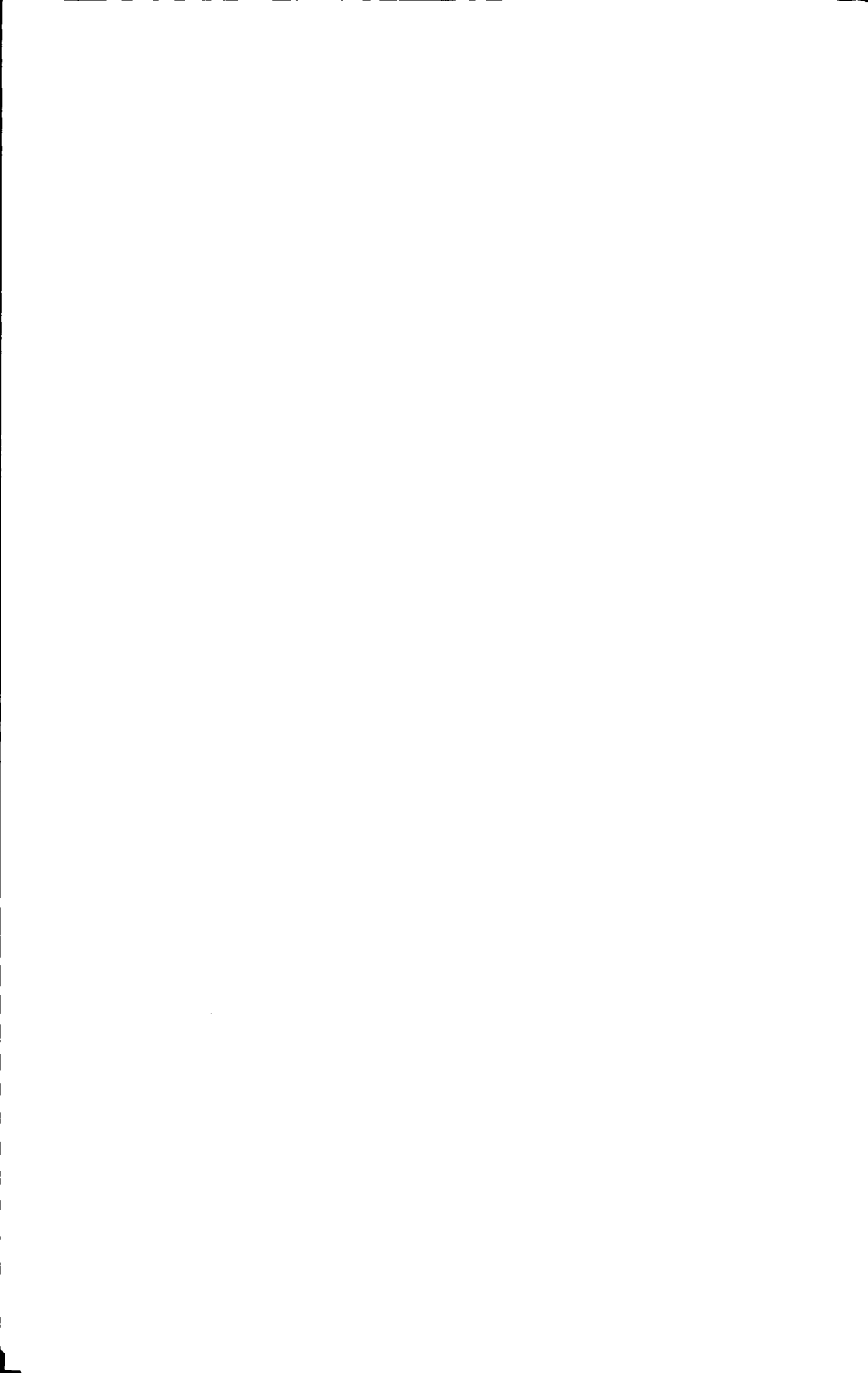
Family	Species name with author	DNA Source/voucher	rps16	trnL-F	ITS
Bignoniaceae	<i>Catalpa</i> sp.	Olmstead RG <i>et al.</i> (1992)	DQ532491	DQ532488	
	<i>Catalpa fargesii</i> Bur.	Li J (2003)			AY486301
	<i>Chilopsis linearis</i> (Cav.) Sweet	Nie ZL <i>et al.</i> (2006)	DQ532492	DQ532489	
Calceolariaceae		Gutierrez R Jr & Freeman CE (2002)			AY178657
	<i>Calceolaria arachnoidea</i> Graham	Wang CN <i>et al.</i> (2004)		AY423126	
	<i>Calceolaria mexicana</i> Benth.	Oxelman B (2005)	AJ609202		
	<i>Calceolaria rivularis</i> Kranzl.	Andersson S (2006)			AJ579440
Lamiaceae	<i>Lamium purpureum</i> L.	Oxelman B <i>et al.</i> (2005)	AJ609175		
		Ferri G <i>et al.</i> (2009)		FJ490793	
Orobanchaceae		Sudarmono & Okada H (2006)			AB266244
	<i>Boschniakia himalaica</i> Hook. f. et Thomson	Yan K & Li HQ (2008)	EU366156	EU366157	
		Wolfe AD <i>et al.</i> (2005)			AY911212
	<i>Brandisia swinglei</i> Merr.	Lihq200963	XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX
	<i>Buchnera cruciata</i> Ham.	Yan K & Li HQ (2008)	EU366155	EU366154	
	Wolfe AD <i>et al.</i> (2005)			AY911216	



Orobanchaceae	<i>Cordylanthus ramosus</i> Nutt.	Tank DC & Olmstead RG (2008)	EF103803	EF103881	EF103725
	<i>Clevelandia beldingii</i> (Greene) Greene.	Tank DC & Olmstead RG (2008)	EF103818	EF103896	EF103740
	<i>Castilleja exilis</i> A. Nels.	Tank DC & Olmstead RG (2008)	EF103785	EF103863	
	<i>Castilleja integrifolia</i> L. f.	Tank DC & Olmstead RG (2008)			EF103716
	<i>Cymbaria mongolica</i> Maxim.	2010043	XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX
	<i>Euphrasia stricta</i> D. Wolff ex JF Lehm.	Gussarova G <i>et al.</i> (2008)		EU040320	EU029952
		Schaeferhoff B <i>et al.</i> (2010)	FN794093		
	<i>Leptorhabdos parviflora</i> (Benth.) Benth.	Lihq2006867	XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX
	<i>Lindenbergia philippinensis</i> Benth.	Oxelman B (2005)	AJ609169	AJ608586	
	<i>Melampyrum lineare</i> Dres.	Jobson RW & Albert VA (2002)		AF482608	
		TQ00270	XXXXXX		
	<i>Melampyrum sylvaticum</i> L.	Tesitel J (2008)			EU624134
	<i>Monochasma savatieri</i> Franch.	Lihq200961	XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX
	<i>Orthocarpus tenuifolius</i> (Pursh) Benth.	Tank DC & Olmstead RG (2008)	EF103812	EF103890	EF103734
	<i>Pedicularis attollens</i> A. Gray	Tank DC & Olmstead RG (2008)	EF103821	EF103899	EF103743
	<i>Phleurospermum japonicum</i> (Thunb.) Kanitz	Lihq200902	XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX
	<i>Pterygiella duclouxii</i> Franch.	PB-09	XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX



<i>Seymeria laciniata</i> (M. Martens & Galeotti)						
Standl.	Tank DC & Olmstead RG (2008)	EF103820	EF103898	EF103742		
<i>Siphonostegia laeta</i> S.	2010042	XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX		
<i>Striga asiatica</i> (Linn.) O. Kuntze	Lihq2009330	XXXXXX	XXXXXX			
<i>Striga gesnerioides</i> (Willd.) Vatke.	Magembe EM & Kim DJ (2007)			EU140575		
<i>Triphysaria pusilla</i> (Benth.) Chuang et Heckard	Tank DC & Olmstead RG (2008)	EF103816	EF103894	EF103738		
<i>Paulownia elongata</i> S. Y. Hu	KK01		XXXXXX	XXXXXX		
<i>Paulownia tomentosa</i> (Tlittmb.) Steud.	Oxelman B <i>et al.</i> (2005)	AJ609153	AJ608578			
<i>Ceratotheca triloba</i> E. Mey. ex Bernh.	Beardsley PM & Olmstead RG (2002)			AF478941		
	Jobson RW & Albert VA (2002)	AF482534	AF482611			
	Gutierrez R Jr. & Freeman CE (2002)			AY178649		
<i>Sesamum indicum</i> L.	Oxelman B <i>et al.</i> (2005)	AJ609226				
	Beardsley PM & Olmstead RG (2002)		AF479010	AF478946		
<i>Leucocarpus perfoliatus</i> (Kunth) Benth.	Beardsley PM (2004)		AY57554	AY575453		
<i>Leucocarpus alatus</i> D. Don	Oxelman B (2005)	AJ609173				
<i>Mazus gracilis</i> Hemsl. ex Forbes & Hemsl.	Xia Z <i>et al.</i> (2008)	FJ172701	FJ172687	FJ172738		
<i>Mimulus aurantiacus</i> Curtis	Oxelman B <i>et al.</i> (2005)	AJ609163				



		Beardsley PM & Olmstead RG (2002)	AF478982	AF478917
	<i>Phryma leptostachya</i> var. <i>asiatica</i> H. Hara	Nie ZL <i>et al.</i> (2006)	DQ532486	DQ533808
Veronicaceae	<i>Digitalis purpurea</i> L.	Guebitz T <i>et al.</i> (2003)	AY316711	
		Wolfe AD <i>et al.</i> (2005)		AY911261
		Albach DC & Meudt H (2005)	AY492203	
Scrophulariaceae	<i>Buddleja davidii</i> Franch	Oxelman, B. <i>et al.</i> (2005)	AJ609204	AJ609204
		Schwarzbach AE & McDade LA (2002)		AF363671
	<i>Buddleja marrubiiifolia</i> Benth.			
Scrophulariaceae	<i>Leucophyllum frutescens</i> (Berl.) JM Johnston	Oxelman B <i>et al.</i> (2005)	AJ609172	
		Wallick KP <i>et al.</i> (2001)	AF380873	
	<i>Leucophyllum minus</i> A. Gray	Gutierrez R Jr. & Freeman CE (2002)		AY180904
	<i>Nemesia cheiranthus</i> E. Mey. ex Benth.	Oxelman B <i>et al.</i> (2005)	AJ609160	
	<i>Nemesia floribunda</i> Lehm.	Wallick KP <i>et al.</i> (2001)	AF380874	
	<i>Nemesia diffusa</i> Benth.	Datson PM & Murray BG (2006)		DQ222396
	<i>Scrophularia californica</i> Cham. & Schldl.	Oxelman B <i>et al.</i> (2005)	AJ609224	
	<i>Scrophularia ningpoensis</i> Hemsl.	Chen S <i>et al.</i> (2005)	AY695886	
		Xu H <i>et al.</i> (2008)		EU592022

	<i>Selago thumbergii</i> Choisy	Oxelman B <i>et al.</i> (2005)	AJ609225	
	<i>Selago myrtifolia</i> Rehb.	Kornhall PE & Bremer B (2003)	AJ586086	AJ584829
	<i>Teedia lucida</i> (Aiton) Rudolphi	Oxelman B <i>et al.</i> (2005)	AJ609127	
		Wallick KP <i>et al.</i> (2001)	AF380870	
		Wolfe AD <i>et al.</i> (2002)		AF375148
Stilbaceae	<i>Anastrabe integerrima</i> (Benth.) E.	Oxelman B <i>et al.</i> (2005)	AJ609216	
	<i>Halleria lucida</i> L.	Kornhall PE (2003)	AJ621104	AJ616314
		Wolfe AD & dePamphilis CW (1998)		AF375149
		Oxelman B <i>et al.</i> (2005)	AJ609181	
		Kornhall PE (2003)	AJ621109	
	<i>Ixianthes retzioides</i> Benth.	Oxelman B <i>et al.</i> (2005)	AJ609222	
		Kornhall PE (2003)	AJ621111	AJ616323
	<i>Nuxia</i> sp.	Oxelman B. <i>et al.</i> (2005)	AJ609157	
	<i>Nuxia congesta</i> R. Br.	Wallick KP <i>et al.</i> (2001)	AF380877	
	<i>Nuxia oppositifolia</i> (Hochst.) Benth.	Kornhall PE (2003)		AJ616328
Verbenaceae	<i>Stachytarpheta dichotoma</i> (R. and P.) Vahl	Wallander E & Albert VA (2000)	AJ299259	AJ299260
	<i>Stachytarpheta cayennensis</i> (L. Rich) Vahl	Freeman CE Jr. (2005)		DQ070736

Lamiaceae	<i>Peltanthera floribunda</i> Benth.	Clark JL <i>et al.</i> (2009)	GQ166789	GQ119585
		Oxelman B <i>et al.</i> (2005)	AJ609151	
	<i>Rehmannia chingii</i> L.	Yan K & Lihq (2008)	DQ856488	DQ069313
	<i>Triacnophora shennongjiaensis</i> X.D. Li, Y.Y.			
	Zan et J.Q. Li	Xia Z <i>et al.</i> (2009)	FJ172704	FJ172741
	<i>Triacnophora rupestris</i> (Hemsl.) Soler.	Yan K & Lihq (2008)	EF522183	EF522182
	<i>Wightia speciosissima</i> (D. Don) Merr.	Lihq2008164/Lihq2009448	XXXXXX	XXXXXX

注: XXXXXX 表示 Genbank 号暂缺

附录 III 攻读硕士学位期间发表论文情况

李宏庆, 刘国丽. 地黄属 (*Rehmannia*) 的一个新异名. 广西植物 (待发表)

1-

参考文献

- Albach DC, Soltis DE, Oxelman B. 2005. Piecing together the 'new' Veronicaceae. *American Journal of Botany* 92: 297-315.
- Albach DC, Soltis PS, Soltis DE, Olmstead RG. 2001. Phylogenetic analysis of asterids based on sequences of four genes. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 88: 163-212.
- Albach DC, Yan K, Jensen SR, Li HQ. 2009. Phylogenetic placement of *Trienophora* (formerly Scrophulariaceae) within some implications for the phylogeny of Lamiales. *Taxon* 58 (3): 749-756.
- Alvarez I, Wendel JF. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 417-434.
- Andersson S. 2006. On the phylogeny of the genus *Calceolaria* (Calceolariaceae) as inferred from ITS and plastid *matK* sequence. *Taxon* 55: 125-137.
- APG. 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Botanical Garden* 85: 531-553.
- APG II. 2003. An update of the Angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APGII. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 399-436.
- APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APGIII. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105-121.
- Bailey CD, Carr TG, Harris SA, Hughes CE. 2003. Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy and pseudogenes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 435-455.
- Baldwin BG, Sanderson JM, Poter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS, Donoghue MJ. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247-277.
- Ballard JW, Olsen GJ, Faith DP, Odgers WA, Rowell DM, Atkinson PW. 1992. Evidence from 12S ribosomal RNA sequence that onychophorans are modified arthropods. *Science* 258: 1345-1348.
- Beardsley PM, Olmstead RG. 2002. Redefining Phrymaceae: the placement of *Mimulus*, tribe Mimuleae and *Phryma*. *American Journal of Botany* 89: 1093-1102.

- Bennett J, Mathews S. 2006. Phylogeny of the parasitic plant family Orobanchaceae inferred from phytochrome A. *American Journal of Botany* 93 (7): 1039-1051.
- Bentham G. 1876. Scrophulariaceae. In Bentham and Hooker [eds.]. *Genera plantarum* 2: 913-980.
- Borsch T, Hilu KW, Quandt D, Wilde V, Neinhuis C, Barthlott W. 2003. Non-coding plastid *trnT-trnF* sequences reveal a well resolved phylogeny of basal angiosperms. *Journal of Evolutionary Biology* 16: 558-576.
- Bremer B, Bremer K, Heidari N, Erixon P, Olmstead RG, Anderberg AA, Källersjö M, Barkhordarian E. 2002. Phylogenetics of asterids based on 3 coding and 3 non-coding chloroplast DNA markers and the utility of noncoding DNA at higher taxonomic levels. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 24: 274-301.
- Chase MW, Reveal JL. 2009. A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 122-127.
- Chase MW, Soltis DE, Olmstead RG, Morgan D, Les DH, Mishler BD, Duvall MR, Price RA, Hills HG, Oiu YL, Kron KA, Retting JH, Conti E, Palmer JD, Manhart JR, Systsma KJ, Karol KG, Clark WD, Hedrenén M, Gaut BS, Jansen RK, King KJ, Wimpee CF, Smith JF, Furnier GR, Strauss SH, Xiang QY, Plunkett GM, Soltis PS, Swensen SM, Williams SS, Gadek PA, Quinn CJ, Eguiarte LE, Golenberg E, Learn GH Jr, Graham SW, Barrett SCH, Dayanandan S, Albert VA. 1993. A Phylogenetics of Seed Plants: An Analysis of Nucleotide Sequences from the Plastid Gene *rbcl*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80 (3): 528-580.
- Craib WG. 1913. *Decades Kewensis*. *Bulletin of Miscellaneous Information Kew* 1913 (1): 44.
- Craib WG. 1913. *Decades Kewensis*. *Bulletin of Miscellaneous Information Kew* 1913 (1): 114.
- DePamphilis CW, Young ND, Wolfe AD. 1997. Evolution of plastid gene *rps2* in a lineage of hemiparasitic and holoparasitic plants: many losses of photosynthesis and complex patterns of rate variation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 7367-7372.
- Downie SR, Downie DS. 1999. Phylogenetic analysis of chloroplast *rps16* intron sequences reveals relationships within the woody southern African Apiaceae subfamily Apioideae. *Canadian Journal of Botany* 77: 1120-1135.
- Faith DP, Cranston PS. 1991. Could a cladogram this short have arisen by chance alone? : on permutation tests for cladistic structure. *Cladistics* 7:1-28.

- Fay MF, Chase MW. 1996. Resurrection of Themidaceae for the *Brodiea* alliance, and recircumscription of Alliaceae, Amaryllidaceae and Agapanthoideae. *Taxon* 45: 441-451.
- Haston E, Richardson EJ, Stevens PF, Chase WM, Harris DJ. 2009. The Linear Angiosperm Phylogeny Group (LAPG) III: a linear sequence of the families in APGHI. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161:128-131.
- Hooker JD. 1883. *Icones Plantarum* 3 (15):35, t.1444.
- Koorders SH. 1912. *Exkursionsflora von Java* 3:172.
- Maheshwari JK. 1961. The Genus *Wightia* Wall.in India with a discussion on its systematic position. *Bulletin of the Botanical Survey of India* 3 (1): 31-35.
- Manos PS, Doyel JJ, Nixon KC. 1999. Phylogeny, biogeography, and processes of molecular differentiation in *Quercus* Subgenus *Quercus* (Fagaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12 (3): 333 -349.
- Marx HE, Leary ON, Yuan YW, LU-Ierving P, Tank, D C, M ú lgura M E, Olmstead RG. 2010. A Molecular Phylogeny and Classification of Verbenaceae. *American Journal of Botany* 97 (10): 1-17.
- Merrill ED. 1938. New or noteworthy Indo-Chinese plant. *Journal of the Arnold Arboretum* 19 (1): 66-67.
- Morton CM, Mori SA, Prance GT, Karol KG, Chase MW. 1997. Phylogenetic relationships of lecythidaceae: a cladistic analysis using *rbcL* sequence and morphological data. *American Journal of Botany* 84 (4): 530-540.
- Müller KF, Borsch T, Hilu KW. 2006. Phylogenetic utility of rapidly evolving DNA at high taxonomical levels: Contrasting *matK*, *trnT-F*, and *rbcL* in basal angiosperms. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 99-117.
- Olmstead RG, Depamphilis CW, Wolfe A. 2001. Disintegration of the Scrophulariaceae. *American Journal of Botany* 88 (2): 348-361.
- Olmstead RG, Bremer B, Scott KM, Palmer JD. 1993. A parsimony analysis of the Asteridae s.l. based on *rbcL* sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80: 700-722.
- Olmstead RG, Kim KJ, Jansen RK, Wagstaff SJ. 2000. The phylogeny of the Asteridae sensu lato based on *ndhF* sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 176-193.
- Olmstead RG, Michaels HJ, Scott KM. 1992. Monophyly of the asteridae and identification of

- their major lineages inferred from DNA sequences of *rbcl*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 79: 249-265.
- Olmstead RG, Reeves PA. 1995. Evidence for the polyphyly of the Scrophulariaceae based on chloroplast *rbcl* and chloroplast *ndhF* gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 16: 96-112.
- Olmstead RG, Zjhra ML, Lohmann LG, Grose SO, Eckert AJ. 2009. A molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae. *American Journal of Botany* 96(9): 1731-1743.
- Oxelman B, Backlund M, Bremer B. 1999. Relationships of Buddlejaceae s.l. investigated using parsimony jackknife and branch support analysis of chloroplast *ndhF* and *rbcl* sequence data. *Systematic Botany* 24: 164-182.
- Oxelman B, Kornhall P, Olmstead RG, Bremer B. 2005. Further disintegration of the Scrophulariaceae. *Taxon* 54: 411-425.
- Rahmanzadeh R, Müller KF, Fischer E, Bartels D, Borsch T. 2005. Linderniaceae and Gratiolaceae (Lamiales) are further lineages distinct from Scrophulariaceae. *Plant Biology* 7: 67-78.
- Rebernig CA, Anton W. 2007. Diversity, development and systematic significance of seed pedestals in Scrophulariaceae (s.l.). *Botanische Jahrbücher* 127(2): 130-150 (18).
- Richardson JE, Fay MF, Cronk QB, Bowman D, Chase MW. 2000. A phylogenetic analysis rhamnaceae using *rbcl* and *trnL-F* plastid DNA sequences. *American Journal of Botany* 87: 1309-1324.
- Samuel R, Bachmair A, Jobst J, Ehrendorfer F. 1998. ITS sequences from nuclear rDNA suggest phylogenetic relationships between Euro-Mediterranean, East Asiatic and North American taxa of *Quercus* (Fagaceae). *Plant Systematics and Evolution* 211: 129-139.
- Schäferhoff B, Fleischmann A, Fischer E, Albach DC, Borsch T, Heub G, Müller K F. 2010. Towards resolving Lamiales relationships: insights from rapidly evolving chloroplast sequences. *Evolutionary Biology* 10: 352-374.
- Schwarzbach AE, Ricklefs RE. 2000. Systematic affinities of Rhizophoraceae and Anisophylleaceae, and intergeneric relationships within Rhizophoraceae, based on chloroplast DNA, nuclear ribosomal DNA, and morphology. *American Journal of Botany* 87: 547-564.



- Spangler RE, Olmstead RG. 1999. Phylogenetic analysis of Bignoniaceae based on the cpDNA gene sequences *rbcl* and *ndhF*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 86:33-46.
- Swofford DL. 2001. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and Other Methods). Version 4.0 b8. Sinauer Associates, Sunderland, M A.
- VAN Steenis CGGJ. 1949. Notes on the genus *Wightia* (Scrophulariaceae). *Bulletin of the Botanical Garden Buitenzorg ser III* 182: 213-227.
- Waffander E, Albert VA. 2000. Phylogenetic and classification of Oleaceae based on *rps16* and *trnL-F* sequence data. *American Journal of Botany* 87(12): 1827-1841.
- Wallich N. 1830. *Plantae Asiaticae Rariores* 1: 71, t.81.
- Wolfe AD, dePamphilis CW. 1998. The effect of relaxed functional constraints on the photosynthetic gene *rbcl* in photosynthetic and nonphotosynthetic parasitic plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15: 1243-1258.
- Worberg A, Quandt D, Barniske A, Löhne C, Hilu KW, Borsch T. 2007. Phylogeny of basal eudicots: Insights from non-coding and rapidly evolving DNA. *Organisms Diversity & Evolution* 7:55-77.
- Wortley AH, Harris DJ, Scotland RW. 2007. On the taxonomy and phylogenetic position of *Thomandersia*. *Systematic Botany* 32(2): 415-444.
- Xia Z, Wang YZ, Smith JF. 2009. Familial placement and relations of *Rehmannia* and *Triaenophora* (Scrophulariaceae s.l.) inferred from five gene regions. *American Journal of Botany* 96(2): 519-530.
- Xiang QY, Crawford DJ, Wolfe AD. 1998. Origin and biogeography of *Aesculus* L. (Hippocastanaceae): A molecular phylogenetic perspective. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80: 723-734.
- Young ND, Steiner KE, dePamphilis CW. 1999. The evolution of parasitism in Scrophulariaceae /Orobanchaceae: plastid gene sequences refute an evolutionary transition series. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 86: 876-893.
- 梁作楠, 陈志远. 1995. 泡桐与其近缘属亲缘关系的探讨. *华中农业大学学报* 14(5): 493-495.
- 栾云霞. 2004. 通过核糖体 RNA 基因序列分析讨论低等六足动物的系统发生. 中国科学院博士研究生学位论文.
- 马长乐, 周浙昆. 2006. ITS 假基因对栎属系统学研究的影响及其对分子系统学研究的启示.



- 云南植物研究 28(2): 127-132.
- 石开明, 彭昌操, 彭振坤, 罗正荣. 2002. DNA 序列在植物系统进化研究中的应用. 湖北名族学院学报 (自然科学版) 20(4): 5-10.
- 田欣, 李德铎. 2002. DNA 序列在植物系统学研究中的应用. 云南植物研究 24(2): 172-184.
- 汪小全, 洪德元. 1997. 植物分子系统学近五年的研究进展概况. 植物分类学报 35(5): 465-480.
- 韦仲新. 1989. 岩梧桐属的花粉形态及其分类学意义. 云南植物研究 11(1): 65-70.
- 闫坤. 2008. 地黄属、崖白菜属与唇形目 (sensu APG II) 近缘科属的系统发育关系研究. 华东师范大学硕士学位论文.
- 尹文清, 陶德定. 1979. 云南植物志 2: 701-703. 北京: 科学出版社.
- 于生龙等. 1999. 中华本草. 7: 415-416. 上海: 上海科技出版社.
- 中国科学院植物研究所. 1979. 中国植物志 67 (2): 44-46. 北京: 科学出版社.



致谢

时光飞逝，转眼间我在华东师范大学的硕士学习生活即将划上句号。回顾这三年来的点点滴滴，老师们耐心的指导与教诲、朋友与亲人们的理解与真诚帮助给予了我莫大的鼓舞与动力，在此表达我个人最诚挚的感谢。

首先，我要对我的导师李宏庆老师表达无尽的感激。三年前报考华师大时，是李老师把我这样一个实验动手能力较差及毫无分类学基础的学生招至名下，给了我继续学习的机会。李老师对我的学业倾注了大量心血，从论文选题、野外材料的采集、实验设计到论文的写作，每个环节都包含着他的汗水。李老师严谨的治学态度、对学生亲切和蔼、言传身教等，无一不给我留下了深刻的印象，令人钦佩。每次李老师都热情耐心的与我讨论有关学术等方面的问题，正是在这些交流中，我学会了用科学的态度去主动思考和解决问题，同时也明白了许多做人的道理，使我受益匪浅。

感谢帮我采集材料的王幼芳老师、王莹莹、葛斌杰、熊申展、王双、辰山植物园王正伟，为我论文工作的开展提供重要的帮助，感谢昆明植物所刘杰和董丽娜提供实验材料。

感谢王幼芳老师、田怀珍老师、瞿伟菁老师、李小方老师、孙越老师、朱瑞良老师、许玲老师、程夏芳老师、王健老师给予我的生活上和实验过程中的帮助。

感谢昆明植物所刘成，中国科学院博士张彩飞、李瑞成协助查阅文献。

还要感谢给我莫大帮助的师姐、师兄、师弟师妹们。师兄吴冬师姐黄姝博在我最初入校的时候给予我生活上和学术上莫大的帮助；师姐闫坤和黄姝博耐心地将她所掌握的实验技能与技巧教授给我。感谢叶文师姐、左勤师姐和刘倩师姐教会了我很多实验技能和数据处理的各种方法，并为我提供较为便利的实验条件，也感谢资环学院的李媛媛老师和陈艳师姐耐心指导；感谢师弟王双、师妹陈纪云、董全英、桂萍、胡超、熊申展的支持，特别感谢熊申展师妹同我去山西采集标本，感谢当地给予我热情帮助的刘郁艳和段长虹老师。

同时也要感谢挚友邓新杰、李姣、王莹莹、张晓青在生活中和学术问题讨论中曾给予的帮助。和谐友好的氛围使我在繁忙的研究学习中得到了很好的放松与调节。

感谢B1116所有成员在我生活和实验工作中给予的便利。

感谢亲人在生活中给我关爱与帮助，没有你们的关心和支持就不会有我一点一滴的进步！

最后，我要向所有帮助我、支持我的人衷心的说一声：谢谢！

