

# 叶绿体 DNA 片段的 RFLP 分析在黄精族系统学研究中的应用\*

<sup>1</sup>吴世安 <sup>1</sup>吕海亮 <sup>1</sup>杨继\*\* <sup>1</sup>饶广远 <sup>1</sup>尤瑞麟 <sup>2</sup>葛颂 <sup>3</sup>钟扬

<sup>1</sup>(北京大学生命科学学院 北京 100871)

<sup>2</sup>(中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放研究实验室 北京 100093)

<sup>3</sup>(中国科学院武汉植物研究所 武汉 430074)

## Molecular systematic studies on the tribe Polygonateae (s.l.) in China based on RFLPs data of PCR-amplified chloroplast DNA fragments

<sup>1</sup>WU Shi-An <sup>1</sup>LÜ Hai-Liang <sup>1</sup>YANG Ji\*\* <sup>1</sup>RAO Guang-Yuan <sup>1</sup>YOU Rui-Lin

<sup>2</sup>GE Song <sup>3</sup>ZHONG Yang

<sup>1</sup>(College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)

<sup>2</sup>(Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093)

<sup>3</sup>(Wuhan Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074)

**Abstract** Phylogenetic relationships in the tribe Polygonateae s.l. of Liliaceae were investigated with an RFLP analysis of two PCR-amplified chloroplast genome DNA fragments. One fragment is the transfer RNA gene for lysine (*trnK* gene) including the maturase-encoding gene *matK*, and the other is the *rpl16* gene which codes for a chloroplast ribosomal protein in large subunit. The *trnK* gene is ca. 2600 bp in length in all the taxa, but the *rpl16* gene ranges from ca. 1140 bp to ca. 1320 bp in length among different genera and in *Polygonatum*. The results suggested that the tribe Polygonateae s. str. consisting of *Polygonatum*, *Disporopsis*, *Smilacina* and *Maianthemum* is closely related to *Convallaria* in Convallarieae, and supported the earlier results that *Streptopus* and *Disporum* should be removed out from the tribe Polygonateae s.l.. The results also showed that *Polygonatum* formed a clad with *Disporopsis*, while *Smilacina* lumped with *Maianthemum* in the tribe Polygonateae s. str.. In addition, the present study supports the view that *S. ginfoshanicum* should be transferred from *Smilacina* to *Polygonatum*.

**Key words** *Polygonatum*; Systematics; RFLP; *trnK* gene; *rpl16* gene

**摘要** 对广义百合科黄精族 6 属 23 种及铃兰族 1 属 1 种的叶绿体基因组 *trnK* 和 *rpl16* 两个基因片段进行了 PCR-RFLP 分析, 结果表明: *trnK* 基因的 PCR 产物在各类群间几乎不存在长度变异, 均约 2600 bp, 而 *rpl16* 基因则在各属之间及黄精属内表现出长度变异, 变异范围在 1140~1320 bp 之间; 限制性酶切位点的同源性分析显示, 黄精属、竹根七属、鹿药属和舞鹤草属构成的狭义黄精族与铃兰族中的铃兰属有较近的亲缘关系, 并支持将扭柄花属和万寿竹属从广义百合科黄精族中分出的观点; 在狭义黄精族内, 黄精属与竹根七属聚成一支, 鹿药属与舞鹤草属聚成另一支, 为探讨族内属间的系统演化关系提供了分子生物学方面的证据。另外, 本研究结果支持将金佛山黄精从鹿药属转隶至黄精属的观点。

**关键词** 黄精族; 系统学; RFLP; *trnK* 基因; *rpl16* 基因

\* 国家自然科学基金资助项目(39500011)。

\*\* 通讯联系人。Author for correspondence  
1999-02-01 收稿, 1999-10-11 收修改稿。

黄精族 Polygonateae 隶属于广义百合科 Liliaceae。该族自 Bentham & Hooker(1883)建立以来,对族的范围及其系统位置,不同的学者有不同的观点(表 1),并且在属间界限以及属的范围等问题上也存在一定的分歧。比如,鹿药属 *Smilacina* 与舞鹤草属 *Maianthemum* 的分与合一直存在争论,LaFrankie(1986) 和李恒(1990)等人赞成将鹿药属与舞鹤草属合二为一;而 Krause(1930)、Hutchinson(1973)、Dahlgren *et al.* (1985)等则坚持认为它们应作为独立的属。再如,我国特有种金佛山黄精在外部形态上兼有鹿药属和黄精属植物的特征(汪发纘 唐进 1983,1978),因而其归属问题亦需进行深入研究。此外,黄精族所包含的有些属,属下分类也存在很多困难,黄精属 *Polygonatum* 尤其如此。可以说,至今没有一个广泛令人接受的分类系统(Jeffrey 1980, 汤彦承 1978)。

从现有资料看,仅仅依据形态学、解剖学、孢粉学、胚胎学以及细胞学等方面的资料已不能很好地解决黄精族系统学研究中存在的问题,因此,人们试图从分子水平去探索解决问题的可能性。Shinwari *et al.* (1994)通过叶绿体 *rbcL* 基因的序列分析对 Krause (1930)黄精族及其近缘类群进行了系统发育重建,结果显示:Krause(1930)的黄精族并不是一个单系类群,依据 *rbcL* 基因序列建立的分支树显示黄精族中各类群的分支式样与 Dahlgren *et al.* (1985)系统中有关类群的排列方式非常接近。这应该说是分子生物学资料与形态学资料在黄精族系统学研究中的很好结合。但我们未发现更多的分子方面的资料在黄精族系统学研究中的应用。

表 1 黄精族的范围及系统位置  
Table 1 Previous systematic arrangements of tribe Polygonateae

Bentham & Hooker 1883 <sup>a</sup>	Engler 1889 <sup>b</sup>	Krause 1930	Hutchinson 1973 <sup>c</sup>	Dahlgren <i>et al.</i> 1985 <sup>d</sup>	Takhtajan 1987
Liliaceae	Liliaceae	Liliaceae	Liliaceae	Asparagales	Asparagales
Polygonateae	Asparagoideae	Asparagoideae	Polygonateae	Convallariaceae	Convallariaceae
<i>Polygonatum</i>	Polygonateae	Polygonateae	<i>Drymophila</i>	Polygonateae	Polygonateae
<i>Streptopus</i>	<i>Clintonia</i>	<i>Clintonia</i>	<i>Streptopus</i>	<i>Streptopus</i>	<i>Disporum</i>
<i>Drymophila</i>	<i>Smilacina</i>	<i>Tovaria</i>	<i>Polygonatum</i>	<i>Polygonatum</i>	<i>Prosartes</i>
<i>Smilacina</i>	<i>Maianthemum</i>	<i>Maianthemum</i>	<i>Disporopsis</i>	<i>Maianthemum</i>	<i>Streptopus</i>
<i>Maianthemum</i>	<i>Disporum</i>	<i>Disporum</i>	<i>Maianthemum</i>	Luzuriagaceae	<i>Clintonia</i>
Uvulariaceae	<i>Streptopus</i>	<i>Streptopus</i>	<i>Smilacina</i>	<i>Luzuriaga</i>	<i>Drymophila</i>
<i>Schelhammera</i>	<i>Disporopsis</i>	<i>Drymophila</i>	<i>Oligobotrya</i>	...	<i>Polygonatum</i>
...	<i>Polygonatum</i>	<i>Polygonatum</i>	<i>Disporum</i>	<i>Drymophila</i>	<i>Disporopsis</i>
<i>Disporum</i>		<i>Oligobotrya</i>	<i>Clintonia</i>	Liliales	<i>Maianthemum</i>
Medeoleae		<i>Disporopsis</i>		Uvulariaceae	<i>Smilacina</i>
<i>Clintonia</i>				Uvulariaceae	
<i>Scoliopus</i>				<i>Disporum</i>	
<i>Medeola</i>				<i>Prosartes</i>	
<i>Trillium</i>	<i>Drymophila</i>			<i>Clintonia</i>	
<i>Paris</i>	(not referred here)			<i>Streptopus</i>	
				...	

a. In Bentham and Hooker's system, Liliaceae was divided into 3 series and 20 tribes, and Polygonateae and Convallariae were placed in a same series with other four tribes.

b. Engler treated 11 subfamilies and 31 tribes under Liliaceae. In his system, Polygonateae, Convallariae and Parideae formed the subfamily Asparagoideae.

c. Hutchinson made a considerable change to Engler's Liliaceae system, but no great change to the range of Polygonateae.

d. Dahlgren *et al.* placed Convallariaceae in Asparagales and Uvulariaceae in Liliales. In his system, Convallariaceae included four tribes: Polygonateae, Convallariaceae, Aspidistreae and Ophiopogoneae. Conran (1987) and Conover (1991) followed Dahlgren *et al.* (1985), but Conran created a new tribe Maianthemeae for *Smilacina* and *Maianthemum*.

DNA 序列分析是检测遗传物质变异的最直接的方法,对于揭示植物系统与进化的分子规律有着不可替代的作用,但从功能基因序列分析中得到的数据可能存在非独立性,这种非独立性会导致在系统发育分析时无意中对进化事件的加权(Olmstead *et al.* 1994)。Kellogg & Juliano (1997) 也指出, *rbcL* 基因的不同位置碱基替代率可能会有很大的差异,氨基酸限于功能上的束缚以及密码子不同位置变异的偏差均会极大地增强平行演化事件的可能性(汪小全等 1997)。RFLP 分析同序列分析比较起来,尽管其对各分类群 DNA 变异的比较是间接的,但同时 RFLP 也有其独到之处。限制性内切酶位点在所研究的 DNA 片段上近于随机取样,性状独立性假设的可能性更大。Kim *et al.* (1992) 将从同一组分类群内得到的限制性位点数据与序列数据进行比较,发现 DNA 序列性状比限制性位点性状显示出更高比率的同塑性(homoplasy),其中部分原因就可能是因为序列数据矩阵中非独立性状较多。

在高等植物中,叶绿体基因组相对比较保守,而且它既不象核基因组那样有较多的重复序列,也不象线粒体基因组那样重排事件频繁发生,因而被广泛用于植物分子系统学的研究中。但叶绿体基因组不同区域的进化速率是不同的(Morton *et al.* 1993, Wolfe *et al.* 1987),这种变化不但存在于基因之间,亦存在于同一基因的不同功能域内,如编码区和非编码区之间(Wolfe *et al.* 1987)。因此,选择不同(包括不同类型)的基因,从多个相对独立的事件去进行系统学研究是必要的。本文着重采用 PCR 技术扩增叶绿体基因组的特异片段 *trnK* 基因和 *rpl16* 基因,通过 RFLP 分析手段对黄精族进行进一步的研究。

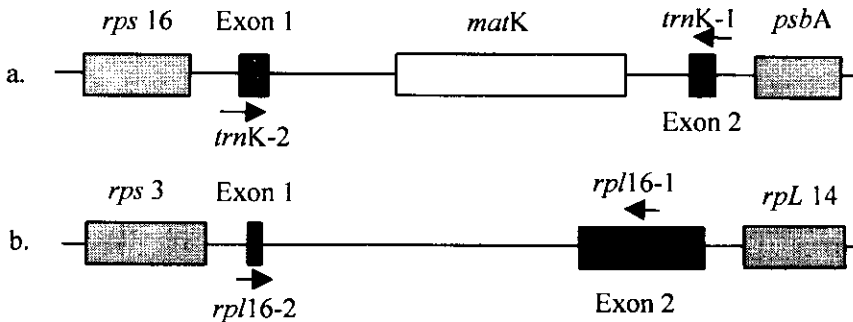


图1 烟草叶绿体 *trnK* 基因和 *rpl16* 基因结构示意图

Fig. 1 Chloroplast DNA regions used for amplification a. Map of *trnK* gene including *matK*; b. Map of *rpl16* gene. Boxed areas represent coding regions. Arrows indicate the approximate position and direction of the primers used in this study.

*trnK* 基因属于断裂基因,在两个短的外显子之间有一个相当长的内含子,其中包含一段长 1500 bp 左右的 *orfK* (open reading frame K) 序列,又名 *matK* (图 1)。*matK* 编码一种成熟酶(maturase),参与 RNA 转录体中 II 型内含子的剪切。*trnK* 基因在系统学研究中的价值已被许多学者的工作所证实(Liston *et al.* 1995, Wolfe *et al.* 1993)。并且 Johnson & Soltis (1995) 对 *trnK* 基因的 *matK* 片段和 *rbcL* 基因的序列进行了比较,发现两者有很大差别。*matK* 片段序列的变异较为均一,这在客观上增强了系统发育重建的可靠性。*rpl16* 基因的结构与 *trnK* 基因类似,同为断裂基因(图 1),其在系统学研究中的应用价值亦已证实(Jordan *et al.* 1996, Wolfe *et al.* 1987)。在本次研究过程中,我们对隶属于 Krause (1930)

系统中黄精族及其近缘类群的 24 种植物(表 2)的 *trnK* 基因和 *rpl16* 基因进行了 PCR-RFLP 分析,以期了解以下方面:(a) Krause(1930)黄精族的界限及其与近缘类群的关系;(b)黄精族内各属间的系统演化关系;(c)依据形态性状建立的黄精属属下分类系统是否为 PCR-RFLP 证据所支持;(d)金佛山黄精的系统位置。

表 2 材料来源  
Table 2 The origin of materials

属名 Genus	种名 Species	缩写 Abbreviation	产地 Locality	采集人 Collector
黄精属 <i>Polygonatum</i>	玉竹 <i>P. odoratum</i>	ODO	陕西宁陕 Shaanxi	吴世安 Wu S-A
	春水玉竹 <i>P. simizui</i>	SIZ	河南鸡公山 Henan	汪劲武 Wang J-W
	热叶黄精 <i>P. macropodium</i>	MAC	北京金山 Beijing	吴世安 Wu S-A
	小玉竹 <i>P. humile</i>	HUM	河北雾灵山 Hebei	汪劲武 Wu S-A
	多花黄精 <i>P. cyrtoneura</i>	CYR	陕西化龙山 Shaanxi	吴世安 Wu S-A
	长梗黄精 <i>P. filipes</i>	FIL	安徽黄山 Anhui	汪劲武 Wang J-W
	节根黄精 <i>P. nodosum</i>	NOD	四川金佛山 Sichuan	刘正宇 Liu Z-Y
	二苞黄精 <i>P. involucreatum</i>	INV	北京小龙门 Beijing	吴世安 Wu S-A
	卷叶黄精 <i>P. cirrhifolium</i>	CIR	四川金佛山 Sichuan	吕海亮 Lü H-L
	黄精 <i>P. sibiricum</i>	SIB	四川南坪 Sichuan	汪劲武 Wang J-W
	康定玉竹 <i>P. prattii</i>	PRA	云南大理 Yunnan	吕海亮 Lü H-L
	点花黄精 <i>P. punctatum</i>	PUN	云南昆明 Yunnan	吕海亮 Lü H-L
	金佛山黄精 <i>P. ginfoshanicum</i>	GIN	四川金佛山 Sichuan	刘正宇 Liu Z-Y
	竹根七属 <i>Disporopsis</i>	长叶竹根七 <i>D. longifolia</i>	LON	云南屏边 Yunnan
散斑竹根七 <i>D. aspera</i>		ASP	四川金佛山 Sichuan	吕海亮 Lü H-L
深裂竹根七 <i>D. pernyi</i>		PER	四川南川 Sichuan	吕海亮 Lü H-L
竹根七 <i>D. fuscopicta</i>		FUS	四川金佛山 Sichuan	吕海亮 Lü H-L
金佛山竹根七 <i>D. jinfushanensis</i>		JIN	四川金佛山 Sichuan	吕海亮 Lü H-L
鹿药属 <i>Smilacina</i>	鹿药 <i>S. japonica</i>	JAP	北京小龙门 Beijing	吴世安 Wu S-A
舞鹤草属 <i>Maianthemum</i>	舞鹤草 <i>M. bifolium</i>	BIF	河北雾灵山 Hebei	汪劲武 Wang J-W
万寿竹属 <i>Disporum</i>	万寿竹 <i>D. cantoniense</i>	CAN	陕西化龙山 Shaanxi	饶广远 Rao G-Y
	大花万寿竹 <i>D. megalaranthum</i>	MEG	四川金佛山 Sichuan	吕海亮 Lü H-L
扭柄花属 <i>Streptopus</i>	腋花扭柄花 <i>S. simplex</i>	SIM	云南中甸 Yunnan	吕海亮 Lü H-L
铃兰属 <i>Convallaria</i>	铃兰 <i>C. majalis</i>	MAJ	北京小龙门 Beijing	饶广远 Rao G-Y

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料来源

本研究所用实验材料均取于温室栽培的活体植株,来源见表 2。由于材料限制,本文未就七筋姑属 *Clintonia* 和 *Drymophia* 进行研究。

### 1.2 总 DNA 提取与纯化

总 DNA 的提取依照 Doyle & Doyle(1987)的 CTAB 法略加简化进行。具体步骤为:取鲜叶片 1 g 左右,用液氮充分研磨,转入 1.5 ml 的 Eppendorf 离心管中,加入预热至 60℃ 的 2×CTAB 提取液 700 μl(其中含 0.3%β-巯基乙醇,100 μg/ml RNaseA,40 μg/ml 蛋白酶 K),混匀,60℃ 水浴中 30 min,37℃ 30 min,加入氯仿:异戊醇(24:1)混合液 700 μl,轻轻摇匀,12 000 rpm 离心 5 min,回收上层水相,加入 2/3 体积预冷异丙醇-20℃ 30 min,然后 10 000 rpm 离心 5 min,弃上清,用 70% 乙醇洗涤 1~2 次,风干后用适量双蒸水重悬 DNA。经酚、酚:氯仿(1:1),氯仿:异戊醇(24:1)各纯化一次,用无水乙醇沉淀 DNA,再重悬于双蒸水中,定量后 4℃ 备用。

### 1.3 聚合酶链式反应(PCR)

*trnK* 基因的扩增采用引物对 *trnK*-1 和 *trnK*-2。*trnK*-1 在烟草叶绿体基因组 1828~1847 bp 位置,其碱基序列为 5'-AACCCGGAAGTACTAGTCGGATG-3'; *trnK*-2 在 4406~4387 bp 位置,其碱基序列为 5'-GGTTGCTAACTCAACGGTAG-3'。*rpl16* 基因的扩增采用引物对 *rpl16*-1 和 *rpl16*-2。*rpl16*-1 在烟草叶绿体基因组 83874~83893 bp 位置,其碱基序列为 5'-CGTACCCATATTTTCCACC-3'。*rpl16*-2 在 85096~85077 bp 位置,碱基序列为 5'-GC-TATGCTTACTGTGTGACT-3'。两个基因的扩增程序相同:94℃ 3 min→94℃ 1 min,52℃ 1 min,72℃ 2.5 min,35 个循环→72℃ 8 min。扩增反应在 PE 公司 9600 型 PCR 仪上完成,反应体积为 100 μl。反应体系中各成分如下:50 mmol/L Tris-HCl(pH8.3),25 μg/ml BSA,2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,dATP,dTTP,dCTP 和 dGTP 各 200 μmol/L(Promega 产品),TaqDNA 聚合酶(中国农业大学产品)3U/100 μl,相应的引物对各 0.1 μmol/L,总 DNA 模板 50~100 ng。PCR 结束后,取 5 μl 反应液电泳检查。

### 1.4 限制性内切酶消化

本实验选用了 *Alu* I、*Ava* II、*Bam*HI、*Bst*BI、*Bst*NI、*Cla* I、*Dde* I、*Dra* I、*Eco*RI、*Eco*RV、*Hae*III、*Hha* I、*Hinc*II、*Hind*III、*Hinf* I、*Hpa* II、*Kpn* I、*Rsa* I、*Sau*3AI、*Ssp* I、*Sst* I、*Taq* I、*Xba* I、*Xho* I、*Xmn* I 共 25 种酶对 *trnK* 基因进行酶解。其中,*Kpn* I、*Sst* I、*Xba* I、*Xho* I 4 种酶没有切点。对 *rpl16* 基因选用了上述除 *Cla* I、*Kpn* I 外的其余 23 种酶酶解。其中 *Ava* II、*Bam*HI、*Bst*BI、*Eco*RI、*Eco*RV、*Hha* I、*Hinc*II、*Hind*III、*Xho* I 没有切点。当酶切位点难于确定时还采用了双酶切组合。酶解反应体积为 20 μl,内含 5 μl PCR 产物,5 单位限制性内切酶,2 μl 相应的限制性内切酶缓冲液,在每种酶要求的适当温度下消化 3 h。

### 1.5 琼脂糖凝胶电泳

配制 1.5% 的琼脂糖平板凝胶(含 EB),在 1×TBE 缓冲液中电泳,电压为 3~4V/cm,手提式紫外灯检查带型分散良好后,在 FOTODYNE 型透射紫外仪上观察、照相(图 2)。

### 1.6 数据分析

数据矩阵是根据限制性位点在不同分类群的 PCR 扩增产物上存在与否以及长度的变异而产生的。所有性状均处理为二态性状。分支分析使用 PAUP 3.1.1(Swofford 1993)软件完成。对限制性位点数据采取 Wagner 简约分析,选择 MULPARS,TBR branch swapping 和 SIMPLE,用启发式搜索方法(heuristic search methods)寻找最简约树(most parsimonious trees)。当分析结果出现多个步长相同的简约树时,分析严格一致树,计算其一致性指数

(CI)和维持性指数(RI)。为了进一步判断简约树中各分支的可信度,本文采用 bootstrap 检验方法(重复 500 次)。

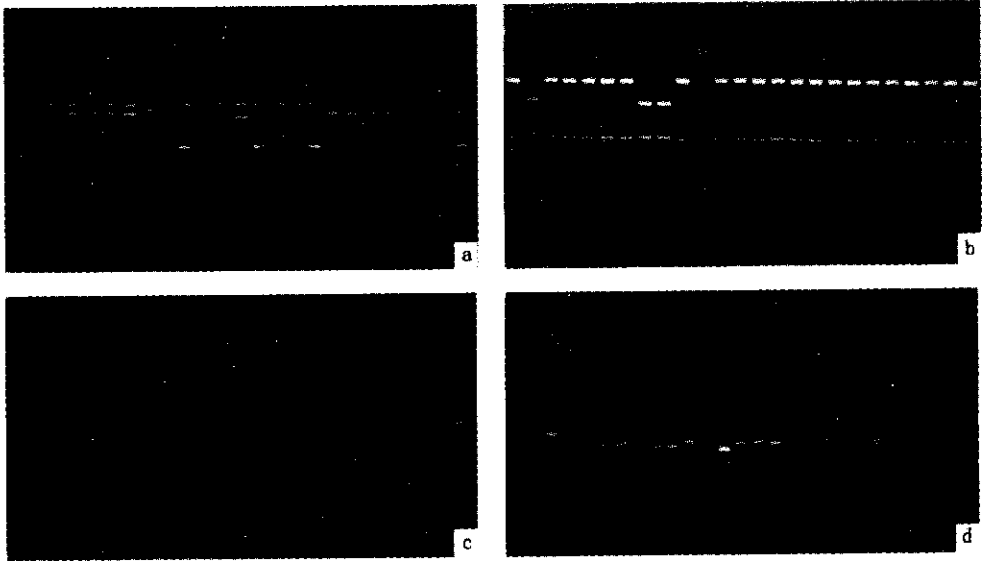


图 2 黄精族及其近缘铃兰族植物叶绿体基因组 *trnK* 和 *rpl16* 基因的部分限制性内切酶切图谱

Fig. 2 Partial restriction enzymes digested the PCR-amplified cpDNA fragments of *trnK* gene or *rpl16* gene in Polygonateae and the allied tribe Convallarieae. 2a Dde I digested *trnK* gene; 2b Hpa II digested *trnK* gene; 2c Dde I digested *rpl16* gene; 2d Hae III digested *rpl16* gene. 1. MAJ; 2. SIM; 3. ASP; 4. FUS; 5. LON; 6. PER; 7. JIN; 8. MEG; 9. CAN; 10. BIF; 11. 100 bp DNA ladder; 12. JAP; 13. GIN; 14. PRA; 15. PUN; 16. SIB; 17. CIR; 18. INV; 19. NOD; 20. FIL; 21. CYR; 22. HUM; 23. MAC; 24. SIZ; 25. ODO. No. of lanes from left to right(1~25) on each map. Abbr. of species name are listed in table 2.

## 2 实验结果

### 2.1 PCR 产物长度变异

引物对 *trnK*-1 和 *trnK*-2 在本文所有类群中均扩增了一个约 2600 bp 的产物,类群间几乎没有长度变异。引物对 *rpl16*-1 和 *rpl16*-2 所扩增的产物在各类群间存在长度变异:扭柄花属约 1320 bp,万寿竹属约 1140 bp,鹿药属约 1170 bp,舞鹤草属约 1260 bp,竹根七属约 1240 bp,铃兰属约 1230 bp。上述 6 属植物的 *rpl16* 基因在本文所选用的材料中不存在属内种间变异,而黄精属内种间则出现细微的变化,*P. cyrtoneuma* 与 *P. macropodium* 约为 1220 bp,*P. prattii* 和 *P. simizui* 约为 1250 bp,其余黄精属种约 1240 bp。

### 2.2 PCR 产物限制性位点变异

本文用 25 种酶消化 *trnK* 基因,其中 4 种酶没有位点,另外两种酶 *Hinf* I 和 *Sau3A* I 因消化 *trnK* 基因后片段太多,在进行限制性位点排定时未计算在内。因此,19 种酶共得到 98 个位点,其线性排列顺序与大致位置见表 3。98 个位点总共对应碱基 472 bp,约占 *trnK* 基因扩增产物的 18.2%。在 *trnK* 基因中只有 6 个位点在所有类群中为不变位点,其余 92 个是可变的(表 3)。23 种酶消化 *rpl16* 基因后,9 种酶无位点,*Hinf* I 消化后因片段太多未作分析之用,其余 13 种酶共得到 47 个位点,43 个是可变的(表 3)。位点的线性排列次序和大致位置见表 3。47 个位点对应碱基 218 bp,占 *rpl16* 基因 PCR 产物的 16.5%~19.1%。







性状	酶	序列	位置 <sup>b</sup>	分布 (distribution) <sup>a</sup>																											
				Character	Enzyme	Sequences	position	ODO	SIZ	MAC	RUM	CYR	FIL	NOD	INV	SIB	CIR	FUN	PRA	GIN	JAP	BIF	LON	ASP	PER	FUS	JIN	MAJ	SIM	CAN	MEG
92	<i>DraI</i>	<b>TTTAAA</b>	2480	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
93	<i>DraI</i>	<b>TTTAAA</b>	40	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
94	<i>AluI</i>	AGCT	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
95	<i>AvaII</i>	6c(A/T)CC	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Sau3AI</i>	GTAC	170	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
96	<i>DraI</i>	<b>TTTAAA</b>	240	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
97	<i>DdeI</i>	CTNAG	320	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
98	<i>SspI</i>	AATATT	360	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
99	<i>SspI</i>	AATATT	380	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	<i>DdeI</i>	CTNAG	410	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
101	<i>DdeI</i>	CTNAG	430	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
102	<i>DdeI</i>	CTNAG	460	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
103	<i>HaeIII</i>	GGCC	470	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
104	<i>TaqI</i>	AGCT	490	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
105	<i>TaqI</i>	TCGA	530	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
106	<i>XmnI</i>	GAAT <sup>b</sup> TC	530	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
107	<i>AluI</i>	AGCT	540	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
108	<i>SspI</i>	<b>AATATT</b>	660	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
109	<i>TaqI</i>	TCGA	610	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
110	<i>SspI</i>	AATATT	640	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
111	<i>DdeI</i>	<b>CTNAG</b>	670	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
112	<i>Sau3AI</i>	GTAC	690	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
113	<i>HaeIII</i>	GGCC	700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
114	<i>SspI</i>	AATATT	720	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
115	<i>SsII</i>	GAGCTC	720	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
116	<i>SspI</i>	AATATT	750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
117	<i>XbaI</i>	TCTAGA	760	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
118	<i>AluI</i>	AGCT	780	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
119	<i>BstNI</i>	CC(A/T)GG	780	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
120	<i>TaqI</i>	TCGA	780	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
121	<i>SspI</i>	AATATT	840	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
122	<i>AluI</i>	AGCT	860	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
123	<i>TaqI</i>	<b>TCGA</b>	860	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
124	<i>AluI</i>	AGCT	890	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
125	<i>DdeI</i>	CTNAG	900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
126	<i>RsaI</i>	GTAC	920	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
127	<i>XmnI</i>	GAAT <sup>b</sup> TC	940	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
128	<i>TaqI</i>	TCGA	950	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
129	<i>DdeI</i>	CTNAG	980	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>HpaII</i>	CCGG	990	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
130	<i>TaqI</i>	TCGA	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
131	<i>XmnI</i>	GAAT <sup>b</sup> TC	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
132	<i>SspI</i>	AATATT	1020	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
133	<i>TaqI</i>	TCGA	1040	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
134	<i>TaqI</i>	TCGA	1090	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Sau3AI</i>	GATC	1150	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
135	<i>AluI</i>	AGCT	1170	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

a 1-92 of characters on *trnK* gene, 93-135 on *rpl16*. Boldfaces represent the variable characters among *Polygonatum*, *Maianthemum*, *Saricacina* and *Convallaria*. A Only variable restriction sites used in cladistic analyses are numbered. b The approximate positions on PCR products of *trnK* gene and *rpl16* gene. c "1" and "0" indicate presence and absence of therestriction sites respectively. Abbreviation of species listed in table 2.

在 *rpl16* 基因中因涉及到长度变异,使得酶切片段的大小略有不同(图 2),但位点未发生变化时仍作不变性状处理。

对两个基因的位点进行简单的分析之后发现绝大多数可变位点存在于两组类群之间。黄精属、竹根七属、鹿药属、舞鹤草属(本文称其为狭义黄精族)和铃兰属构成一组,扭柄花属与万寿竹属构成另一组。在前组中, *trnK* 基因和 *rpl16* 基因的 75 个酶切位点中,只有 23 个是可变的。而狭义黄精族与扭柄花属之间 108 个位点中 92 个是可变的,与万寿竹属之间 120 个位点中有 101 个位点可变,扭柄花属和万寿竹属之间的 99 个位点中变异位点为 79 个(表 3)。这反映了狭义黄精族与扭柄花属和万寿竹属以及扭柄花属与万寿竹属之间限制性酶切位点的同源性程度较低。本文以 *trnK* 基因和 *rpl16* 基因所有 145 个酶切位点构建一个数据合矩阵(表 3),分别以铃兰属、扭柄花属、万寿竹属为外类群对狭义黄精族进行分支分析,再以扭柄花属和万寿竹属为复合外类群对合矩阵进行运算,其中仅可变位点用于分析。

### 2.3 分析结果

运用 PAUP 3.1.1 软件以铃兰为外类群进行分支分析时得到 11 个步长为 30 的最简约树,计算严格一致树(图 3a),其一致性指数(CI) = 0.688,维持性指数(RI) = 0.833。以扭柄花属或万寿竹属为外类群运算后构建的严格一致树与图 3a 的结构完全一致。以扭柄花属和万寿竹属为复合外类群运算后得到 106 个步长为 151 的最简约树,其严格一致树(图 3b)的一致性指数(CI) = 0.888,维持性指数(RI) = 0.912。一致树各支的置信度用 bootstrap 分析进行检验(共进行 500 次循环)。

## 3 讨论

### 3.1 黄精族的范围以及与万寿竹属和扭柄花属的关系

自 Bentham & Hooker (1883) 建立黄精族以来,尽管黄精族的范围和系统位置在大多数系统(Takhtajian 1987, Hutchinson 1973, Krause 1930, Engler 1889)中不尽一致(表 1),但均包括了黄精属 *Polygonatum*、竹根七属 *Disporopsis*、鹿药属 *Smilacina*、舞鹤草属 *Maianthemum*、扭柄花属 *Streptopus*、万寿竹属 *Disporum*、七筋姑属 *Clintonia* 和 *Drymophila* (Engler 系统中未提及)。通过对单子叶植物 90 多个性状的比较研究及对单子叶植物系统发育的探讨,Dahlgren *et al.* (1985) 提出了一个单子叶植物的新系统。在这个系统中,黄精族隶属于百合超目 Superorder Liliiflorae,天门冬目 Asparagales,铃兰科 Convallariaceae。此系统中黄精族的范围已大大缩小,仅包括黄精属、鹿药属和舞鹤草属。而万寿竹属、扭柄花属与七筋姑属因缺乏草酸钙针晶、无隔膜蜜腺以及在胚囊形成过程中不产生周缘细胞等特征被从黄精族中移出,划归于百合目的 Uvulariaceae 科中。*Drymophila* 是一个仅包括 2 个种的小属,分布于澳大利亚东南部,该属花柱三裂,且宿存于成熟果实上,这一特征不仅在黄精族,即使在整个铃兰科中也很独特。Dahlgren *et al.* (1985) 根据叶基部扭曲等特征将其放在分布于南半球的 Luzuriagaceae 中,这一转隶得到了 Conran (1987) 的支持。Shnvari *et al.* (1994) 通过 *rbcL* 基因的 DNA 序列分析,对 Krause (1930) 黄精族及其近缘类群进行了系统发育的重建。结果发现:黄精属、竹根七属、鹿药属、舞鹤草属和铃兰属 *Convallaria* 构成一单系类群;七筋姑属、扭柄花属、油点草属 *Tricyrtis* 和 *Prosartes* 构成一单系类群;万寿竹属

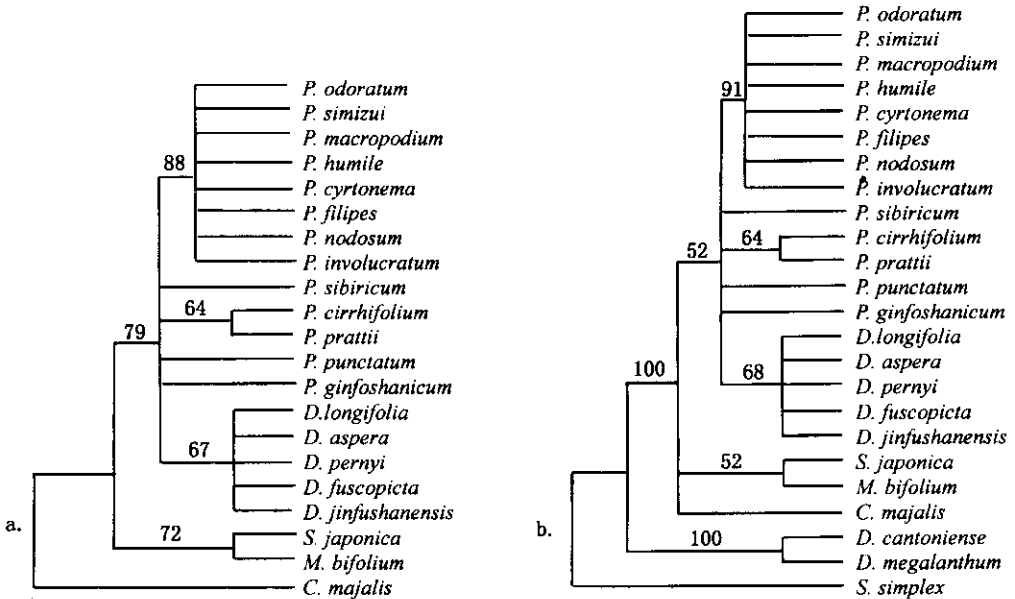


图 3 基于 *trnK* 基因和 *rpl16* 基因限制性位点构建的严格一致树(大于 50% 的 bootstrap 置信值标示于树上)

图 3a 中 *C. majalis* 为外类群,图 3b 中 *S. simplex*, *D. cantoniense* 和 *D. megalanthum* 为复合外类群。

Fig. 3 Strict consensus trees based on restriction sites of *trnK* gene and *rpl16* gene (bootstrap values above 50% are shown in the trees) *C. majalis* was used as out-group in Fig. 3a, and *S. simplex*, *D. cantoniense* and *D. megalanthum* were used as complex out-group in Fig. 3b.

和 *Uvularia* 构成另一单系类群。这与 Dahlgren *et al.* (1985) 的观点基本一致。本文的研究结果表明:在 *trnK* 和 *rpl16* 基因酶切位点上,狭义黄精族与扭柄花属的同源性为 14.8%,与万寿竹属的同源性为 15.8%,而与铃兰属的同源性则达 69.3% (表 3),反映出将扭柄花属和万寿竹属从黄精族中移出有其合理性。至于万寿竹属和扭柄花属从黄精族分出后是否应像 Dahlgren *et al.* (1985) 处理的那样,和七筋姑属一起置于 *Uvulariaceae* 中,值得进一步研究。

### 3.2 鹿药属与舞鹤草属的关系

鹿药属自 Desontaines 1807 年建立以来,与舞鹤草属的分与合一直是植物系统学家争论的问题,但本世纪的大多数植物系统学家均采用了分的观点(表 1)。LaFrankie (1986) 对舞鹤草属和鹿药属的历史由来进行了比较全面的回顾,并根据地上茎的分枝、花序的着生位置、花药的着生方式、蜜腺及染色体核型等特征的相似性将两者予以合并。随后,我国学者李恒(1990)沿用了这种观点。Shinwari *et al.* (1994) 通过 *rbcL* 基因 DNA 序列的比较研究后,他认为将两属合并似乎是合理的,但同时也承认仅以此而得出定论尚为时过早。本文在分析了 *rpl16* 基因和 *trnK* 基因后发现, *rpl16* 基因的 PCR 产物的长度在两属之间存在非常明显的差异: *rpl16* 基因扩增片段在舞鹤草属中约长 1260 bp,而在鹿药属中则为 1170 bp,两者相差达 90 bp。两属植物在由限制性酶切位点构建的分支图上却能较好地聚成一支(图 3),这似乎与 *rpl16* 基因扩增产物的长度变异相悖,但 bootstrap 重抽样分析的支持率(72% 或 52%) 不高,据此将两者合并是不适当的。由此看来,无论是从形态学还是分子生物学来看,舞鹤草属和鹿药属具有最近的共同祖先看来是毫无疑问的。但本文的

研究结果支持将这二属分开处理的观点,因为在两属之间 *rpl16* 基因的长度变异是明显的(尽管这种差异也存在黄精属内种间,但通常在 30 bp 以内),且两者在花基数上的差别(舞鹤草属为二基数,鹿药属为三基数)也是稳定的。

### 3.3 黄精属与竹根七属的关系

竹根七属 *Disporopsis* 是东亚特有属,约 5 种,我国均有分布。本文对竹根七属植物全部 5 种进行了研究。说明竹根七属是一个十分自然的类群。

它们在 *trnK* 基因和 *rpl16* 基因上,无论是限制性酶切位点还是扩增产物长度的变异均表现出高度的一致性(图 2, 图 3)。从分支图上可以看出,竹根七属与黄精属有着密切的系统演化关系,特别是与金佛山黄精 *P. ginfoshanicum*、点花黄精 *P. punctatum* 等的关系尤其密切(图 3)。根据限制性酶切位点作类群间距离分析时,发现竹根七属与点花黄精等的距离(0.033)甚至比黄精属某些种间的距离还小,如点花黄精与热河黄精 *P. macropodium* 间的距离为 0.054。两属植物在分支图上反映出的系统关系和它们在外形形态上的相似性是一致的,如茎不分枝、花序腋生、花被合生成筒状、柱头头状等特征为两属所共有。同时,竹根七属花粉的外壁纹饰(Rao *et al.* 1994)及其叶表皮与种皮的特征(吕海亮等 1999)在黄精属内均能找到其对应的类型。

核型特征的高度相似性(Gu *et al.* 1990)也说明了这一点。在对 5 种竹根七属植物中的 4 种(金佛山竹根七 *Disporopsis jinfushanensis* 除外)的核型进行广泛调查研究后发现它们在其较广阔的分布区内染色体数均为  $2n = 40$ (洪德元等 1990, Gu *et al.* 1990)。该属植物除具副花冠这一特化性状外,与黄精属在形态上有高度相似性,据此,洪德元等(1990)认为该属植物的染色体基数为  $x = 20$ ,是一个古多倍体,很可能是由黄精属中  $2n = 20$  的某一类群经由多倍化演化而来的。本文的实验结果及对金佛山竹根七核型的调查( $2n = 40$ ,待发表)支持这一观点。

### 3.4 金佛山黄精的系统位置

*Polygonatum ginfoshanicum* (Wang *et Tang*) Wang *et Tang* 是汪发缙和唐进(1978)根据熊济华和周子林采自四川金佛山的 90841 号标本最先在鹿药属下建立起来的,命名为金佛山鹿药 *Smilacina ginfoshanica*,其突出的特点是植株具顶生花序。后来汪发缙和唐进等(1983)又将其转隶于黄精属,成立金佛山黄精这一分类组合,其理由是:“当时所见标本甚少,植株仅具一顶生花序,故暂置 *Smilacina* 中。现在看到标本较多,发现本种某些标本除顶生花序外,还具一侧生花序,又考虑到它的花被合生情况及顶端外面具乳头状毛,子房每室具 4 胚珠等特征,归隶于黄精属较合适。”本文 *trnK* 基因和 *rpl16* 基因的分子生物学资料完全支持上述分类处理(图 3)。另外,金佛山黄精叶表皮特征与鹿药属明显不同而与黄精属某些种如 *P. punctatum* 相近(吕海亮等 2000),亦支持这一改隶组合。

### 3.5 黄精属内的种间关系

黄精属 *Polygonatum* Miller 是北温带分布的一个类群,主要分布于东亚,尤其是中国。据统计,我国黄精属植物的种类约占世界种类的 75%,类型繁多,变异复杂,且有许多特有种,如 *P. megaphyllum*, *P. macropodium*, *P. franchetii*, *P. filipes* 等等。显然,我国是黄精属植物的分化与分布中心(Jeffrey 1980)。

黄精属的分类是一个十分困难的问题(Jeffrey 1980)。各类群间性状交叉,地理分布

区重叠,新类群和变异型不断发现(汤彦承 1978),预示着黄精属仍处在比较活跃的分化阶段,这给分类学工作带来了不少困难。该属自 Miller(1754)建立以后,Jeffrey(1982)、汤彦承(1978)、Abramova(1975)和 Baker(1875)等对其进行过系统学研究。Baker(1875)根据叶序将黄精属分为 3 个组,即互生叶组 sect. *Alternifolia*、轮生叶组 sect. *Verticillata* 和对生叶组 sect. *Oppositifolia*。汤彦承(1978)根据苞片的大小与质地、叶序类型、花被筒长度、花被形状、花药的长短以及子房的形状等特征,将国产黄精属植物分为 8 个系。有关黄精属植物的细胞学工作亦已有大量报道(杨继等 1992, 洪德元等 1990, 汪劲武等 1987, Therman 1953 等等),但大多数是零散的、缺乏系统性的工作。Tamura(1993)根据染色体基数与花丝的微形态特征将本属分为 2 个组:sect. *Polygonatum* 和 sect. *Verticillata*,前者相当于 Baker(1875)的互生叶组,包括了汤彦承(1978)的苞叶系、互叶系和短筒系;后者相当于 Baker(1875)的轮生叶组与对生叶组,包括汤彦承(1978)的独花系、点花系、对叶系、滇黄精系和轮叶系。Tamura *et al.* (1997)对黄精属 17 种及一变种的 *trnK* 基因进行了 PCR-RFLP 分析,结果支持 Tamura(1993)将黄精属分成两组的观点。本文扩大取材范围,对黄精属植物 *trnK* 基因和 *rpl16* 基因进行 PCR-RFLP 分析的结果表明,互生叶种类组成一单系,且 bootstrap 支持率在 85% 以上,而轮生叶和对生叶种类为多系关系,不构成一个单系(图 3),因而黄精属能否明确划分为互生叶类和轮生叶类两个自然类群有待进一步深入研究。

### 参 考 文 献

- Abramova L I, 1975. On the taxonomical structure of the genus *Polygonatum* Miller. Bot Zhurn, 60(4): 490 ~ 497
- Baker J D, 1875. Revision of the genera and species of Asparagaceae. J Linn Soc Bot, 14: 508 ~ 632
- Benthams G, Hooker J D, 1883. Genera Plantarum. Vol III. London: Reeve. 3:748 ~ 837
- Conover M V, 1991. Epidermal patterns of the reticulate-veined Liliiflorae and their parallel veined allies. Bot J Linn Soc, 107: 295 ~ 312
- Conran J C, 1987. A phenetic study of the relationships of *Drymophila* R. Br. within the reticulate-veined Liliiflorae. Austral J Bot, 35: 283 ~ 300
- Dahlgren R M T, Clifford H T, Yeo P F, 1985. The Families of Monocotyledons, Structure, Evolution, and Taxonomy. London: Academic Press. 107 ~ 255
- Doyle J, Doyle J L, 1987. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. Phytochem Bull, 19: 11 ~ 15
- Engler A, 1889. Liliaceae. In: Engler A, Prantl K, Die Natürlichen Pflanzenfamilien. II. Leipzig: Verlag von Wilhelm Engelmann. 10 ~ 91
- Gu Zh-J, Yang Q-E, Kondo K, 1990. A karyomorphological study on *Disporopsis* Hance in China. La Kromosomo II, 57: 1916 ~ 1925
- Hong D-Y(洪德元), Zhu X-Y(朱相云), 1990. Report on karyotypes of 6 species in 4 genera of Polygonateae from China. Acta Phytotax Sin(植物分类学报), 28(3): 185 ~ 198
- Hutchinson J, 1973. The Families of Flowering Plants, Arranged According to a New System Based on Their Probable Phylogeny. Vol II. Monocotyledons. 3rd ed. Oxford: Clarendon Press
- Jeffrey C, 1980. The genus *Polygonatum* (Liliaceae) in Eastern Asia. Kew Bull, 34(3): 435 ~ 471
- Jeffrey C, 1982. Further note on Eastern Asian *Polygonatum* (Liliaceae). Kew Bull, 37(2): 335 ~ 339
- Johnson L A, Soltis D E, 1995. Phylogenetic inference in Saxifragaceae sensu stricto and *Gilia* (Polemoniaceae) using *matK* sequences. Ann Miss Bot Gard, 82: 149 ~ 175
- Jordan W C, Courtney M W, Neigel J E, 1996. Low levels of intraspecific genetic variation at a rapidly evolving chloroplast DNA locus in North American duckweeds (Lemnaceae). Amer J Bot, 83(4): 430 ~ 439
- Kellogg E A, Juliano N D, 1997. The structure and function of Rubisco and their implications for systematic studies.

- Amer J Bot, 84(3): 413 ~ 428
- Kim K J, Jensen R K, Wallace R S *et al.*, 1992. Phylogenetic implications of *rbcL* sequence variation in the Asteraceae. *Ann Miss Bot Gard*, 79: 428 ~ 445
- Krause K, 1930. Liliaceae. In: Engler A, Prantl K, Die Natürlichen Pflanzenfamilien. 2 Auflage 15a Band. Leipzig: Verlag von Wilhelm Engelmann. 227 ~ 386
- LaFrankie J V, 1986. Transfer of the species of *Smilacina* to *Maianthemum* (Liliaceae). *Taxon*, 35: 584 ~ 589
- Li H (李恒), 1990. Infrageneric system of the genus *Maianthemum*. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), Suppl. III. 1 ~ 12
- Liston A, Kadereit J W, 1995. Chloroplast DNA evidence for introgression and long distance dispersal in the desert annual *Senecio flavus* (Asteraceae). *Pl Syst Evol*, 197: 33 ~ 41
- Lü H-L(吕海亮), Wu S-A(吴世安), Yang J(杨继) *et al.*, 2000. Systematic study on the trib. Polygonateae(Liliaceae s. l.) with the evidence from leaf abaxial epidermis and seed coat. *Acta Phytotax Sin*(植物分类学报), 38(1): 30 ~ 42
- Morton B T, Clegg M T, 1993. A chloroplast DNA mutational hotspot and gene conversion in a noncoding region near *rbcL* in the grass family. *Current Genetics*, 24: 357 ~ 365
- Olmstead R G, Palmer J D, 1994. Chloroplast DNA systematics: A review of methods and data analysis. *Amer J Bot*, 81(9): 1205 ~ 1224
- Rao G-Y, Pan K-Y, 1994. Pollen morphology of the Polygonateae and its systematic significance. *Cathaya*, 6: 75 ~ 91
- Shinwari Z K, Kato H, Terauchi R *et al.*, 1994. Phylogenetic relationships among genera in the Liliaceae-Asparagoideae-Polygonatae s.l. inferred from *rbcL* gene sequence data. *Pl Syst Evol*, 182:263 ~ 277
- Swofford D L, 1993. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony. Version 3.1.1. Champaign, Illinois: Illinois Natural History Survey
- Takhtajan A, 1987. *Systema Magnoliophytorum*. Leninopli: Officina editoria《Nauka》. 287 ~ 309
- Tamura M N, 1993. Biosystematic studies on the genus *Polygonatum* (Liliaceae) III. Morphology of staminal filaments and karyology of eleven Eurasian species. *Bot Jahrb Syst*, 115(1): 1 ~ 26
- Tamura M N, Schwarzbach A E, Kruse S *et al.*, 1997. Biosystematic studies on the genus *Polygonatum* (Convallariaceae) IV. Molecular phylogenetic analysis based on restriction site mapping of the chloroplast gene *trnK*. *Feddes Repert*, 108(3 ~ 4): 159 ~ 168
- Tang Y-C(汤彦承), 1978. *Polygonatum* Mill. In: Wang F-T(汪发绩), Tang T(唐进) eds. *Fl Reip Popul Sin*. Beijing: Science Press. 15: 52 ~ 80
- Therman E, 1953. Chromosomal evolution in the genus *Polygonatum*. *Hereditas*, 39: 277 ~ 288
- Wang F-T(汪发绩), Tang T(唐进), 1978. *Fl Reip Popul Sin*. Beijing: Science Press. 15: 24 ~ 86
- Wang F-T(汪发绩), Tang T(唐进), Liang S-Y(梁松筠), 1983. Notes on Chinese Liliaceae XI. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 15(3): 261 ~ 263
- Wang J-W(汪劲武), Li M-X(李懋学), Li L-X(李丽霞), 1987. Studies on the cytotaxonomy of *Polygonatum* I. Karyotypes and evolution of eight species of *Polygonatum* in China. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), 5(1): 1 ~ 10
- Wang X-Q(汪小全), Hong D-Y(洪德元), 1997. Progress in molecular systematics of plants in recent five years. *Acta Phytotax Sin*(植物分类学报), 35(5): 465 ~ 480
- Wolfe A D, Elisens W J, Watson L E *et al.*, 1993. A phylogenetic and biogeographic analysis of the North American Cheloneae (Scrophulariaceae): evidence from chloroplast PCR-product restriction site variation. *Amer J Bot*, 80 (suppl): 183 ~ 184
- Wolfe K H, Li W H, Sharp P M, 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proc Nat Aca Sci USA*, 84: 9054 ~ 9058
- Yang J(杨继), Wang J-W(汪劲武), Li M-X(李懋学), 1992. Cytotaxonomic studies on the genus *Polygonatum* III. Chromosome numbers and karyotypes of 6 species from China. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究), 10(3): 201 ~ 206