

## 研究报告

### A Letter

## 不同生态型冬瓜种质资源的 ITS 序列变异分析

江彪<sup>✉</sup>, 刘文睿<sup>✉</sup>, 谢大森<sup>✉</sup>, 何晓明<sup>✉</sup>, 彭庆务<sup>✉</sup>, 赵芹<sup>✉</sup>

广东省农业科学院蔬菜研究所, 广州, 510640

✉ 通讯作者: xiedasen@126.com ✉ 作者

分子植物育种, 2012 年, 第 10 卷, 第 35 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0035

收稿日期: 2012 年 06 月 12 日

接受日期: 2012 年 06 月 15 日

发表日期: 2012 年 06 月 29 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放获取论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

江彪等, 2012, 不同生态型冬瓜种质资源的 ITS 序列变异分析, 分子植物育种(online) Vol.10 No.35 pp.1252-1258 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0035)

引用格式(英文):

Jiang et al., 2012, Genetic Variation of the Different Ecotype Wax Guard Germplasms (*Benincasa hispida*) Based on ITS Sequences, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.35 pp.1252-1258 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0035)

**摘要** 以不同生态类型的 41 份冬瓜种质资源为材料, 对其核糖体 DNA 的内部转录间隔区(internal transcribed spacers, ITS) 进行 PCR 扩增, 并将目的片段回收测序, 获得 ITS 序列信息, 并用于探讨冬瓜种质资源的系统进化关系。分析结果显示, 这些冬瓜材料的 ITS 序列长度变异较小, 且长度变异仅发生在 ITS1 区。以西瓜为外类群, 将 ITS1 和 ITS2 序列作为一个共同的数据矩阵进行系统发育树构建, 所有材料主要分在两个分支上。这些结果表明, 不同生态型的冬瓜资源的 ITS 序列没有明显变异, 序列非常保守。冬瓜种质资源有着非常相近的遗传背景, 其形态学差异可能主要由环境因素造成的。

**关键词** 冬瓜; 种质资源; ITS; 遗传变异

## Genetic Variation of the Different Ecotype Wax Guard Germplasms (*Benincasa hispida*) Based on ITS Sequences

Jiang Biao<sup>✉</sup>, Liu Wenri<sup>✉</sup>, Xie Dasen<sup>✉</sup>, He Xiaoming<sup>✉</sup>, Peng Qingwu<sup>✉</sup>, Zhao Qin<sup>✉</sup>

Vegetable Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, 510640

✉ Corresponding author, gaodong521@yahoo.com.cn; ✉ Authors

**Abstract** Forty-one different ecotype germplasms of Wax Guards (*Benincasa hispida*) were employed as experimental materials to amplify the ribosomal DNA internal transcribed spacer region (ITS). The target fragments were recovered and sequenced to generate the ITS information as well as to analyze the phylogenetic relationships among the tested *Benincasa hispida* germplasms. The results showed that the length variation of the ITS sequences are very small that only occur in the ITS1 region. Using watermelon (*Citrullus lanatus*) as outgroup, the phylogenetic tree was constructed by using common data matrix of ITS1 and ITS2 sequences, all tested materials were grouped into two major clades. The results suggested that the variation of ITS sequences among the different ecotype germplasms of wax guards (*Benincasa hispida*) should have no significant difference, which indicated that the sequences be very conservative. Therefore, we might conclude that the germplasms of wax guards (*Benincasa hispida*) share very similar genetic background, and the morphological differences might be mainly caused by environmental effects.

**Keywords** Wax guard; *Benincasa hispida*; ITS; Phylogenetics

### 研究背景

核糖体内转录间隔区(internal transcribed spacers, ITS)是位于核糖体 18S、5.8S 和 26S 之间转录间隔区的 DNA 片段, 被 5.8S 分割成 2 段。由于其进化速率较快、稳定性好、测序方便等特定, 已成为研究植物分类和亲缘关系的重要工具(Bellarosa et al., 2005; Kress et al., 2005)。陈少风等(2007)利用 ITS 序列探讨莠属及其近缘植物的系统发育关系。张利等(2007)基于 ITS 序列分析仲彬草属植物的亲缘关

系, 发现形态相似、地理分布一致的物种有聚在一起的倾向, 表现出较近的亲缘关系。为了探讨亚洲瓠瓜的地理分化, 周先治等(2011)利用 ITS 序列研究发现, 源自日本的瓠瓜品种与源自中国和泰国的品种存在明显的地理分化现象。

冬瓜(*Benincasa hispida* Cogn.)属于葫芦科(*Cucurbitaceae*)冬瓜属的一年生蔓性植物, 起源于中国南部和印度, 广泛分布于亚洲的热带、亚热带和温带地区, 是全国性重要蔬菜。冬瓜种质资源丰富,

在熟性、瓜形、瓜色、蜡粉、种子形态等方面具有丰富的多态性。对于该属植物系统分类研究, 张建军等(2009)根据熟性、果实大小、果形以及 RAPD 分子标记对 100 份冬瓜种质资源进行了分类。宋世威等(2010)利用 RAPD 标记对 41 份冬瓜和节瓜种质资源进行了遗传多样性分析。目前, 国内外尚无关于冬瓜的 ITS 序列的研究报道。

本研究以冬瓜的 41 个种质为材料, 通过 ITS 序列来分析冬瓜不同生态种质间的 ITS 遗传关系, 为探讨其系统进化关系提供遗传信息。

## 1 结果与分析

### 1.1 冬瓜的 ITS 序列分析

本研究共测定了 41 个冬瓜种质资源的 ITS 序列。由于所有供试材料的 5.8S rDNA 的长度均为 163 bp, 仅有个别碱基的替换, 显示出高度的保守性, 故不作进一步分析。冬瓜材料的 ITS (ITS1+ITS2) 长度及 GC 含量列于表 1。从表中可以看出, 41 个冬瓜材料 ITS 序列长度变异不大(仅相差 3 bp), 且长度变异仅发生在 ITS1 区(218 bp~221 bp)。供试冬瓜材料内 ITS1 区 GC 含量变化范围为 59.36%~60.09%, ITS2 区为 63.36%~64.22%。当空位作为缺失处理时, ITS 全长 466 bp, 共有 55 个变异位点, 其中信息位点 5 个, 占变异位点的 9.1%, 仅占全长的 1.1%。

### 1.2 冬瓜 ITS 序列遗传距离及系统树构建

根据 Kimura-2 参数遗传距离模型, MEGA 5.05 软件分析遗传距离, 发现不同材料之间 ITS 的距离在 0.000~0.016 之间。有些亲缘关系较近的材料, 如 20 (海南文昌长筒冬瓜)和 21 (江苏海安六叶头冬瓜), 因其 ITS 序列完全一致, 故其遗传距离为零。

根据测序结果, 以西瓜为外类群, 采用邻接法和最大简约法对冬瓜属材料的 ITS 序列(ITS1+ITS2)构建系统进化树。系统进化树分支上的数字为靴带(bootstrap)重复 1 000 次抽样检验得出的分支支持率。从图 1 可以看出, 所有冬瓜种质资源主要分在两个分支上。BQ98、B184、B214、B259、B264、P4 以及来自云南的部分原始种 BN17、BN31、BN32、BN36、BN37 为一支, 其余材料为另一支, 分支支持率均为 100%, 各分支都有很高的支持率, 说明系统树上各组的系统关系可信度较高。邻接树和最大简约树的拓扑结构基本一致(图略)。

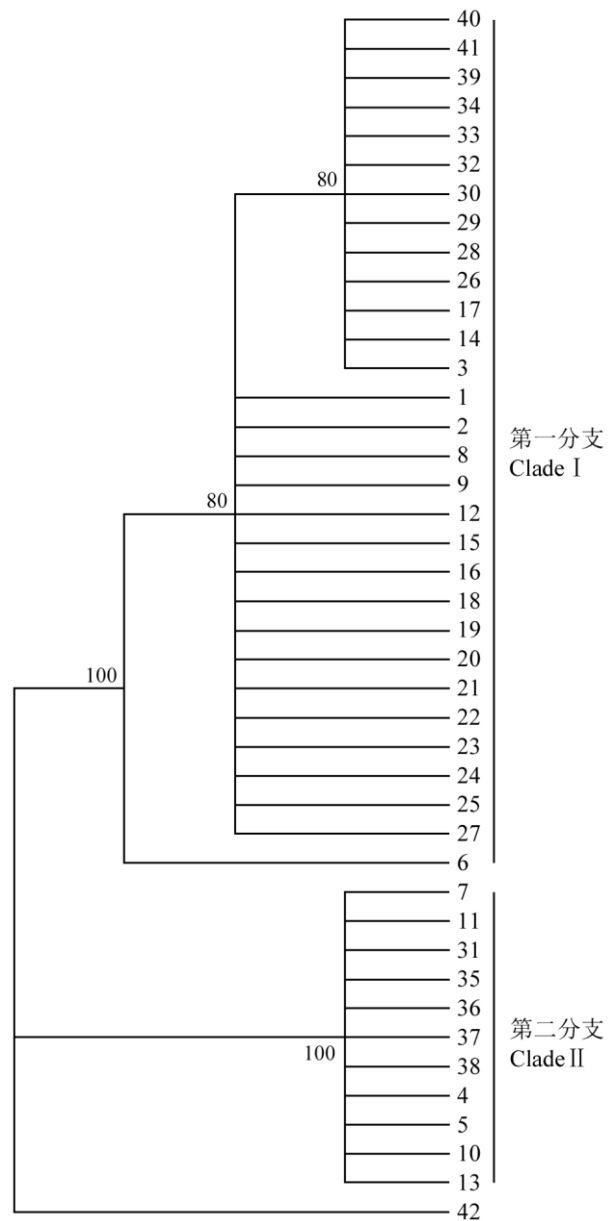


图 1 邻接法构建的系统进化树

注: 分支上面的数值代表 1 000 次重复的自展支持率

Figure 1 The phylogenetic tree constructed by the Neighbor-joining method

Note: Numbers above branches are bootstrap value (%) with 1 000 replicates

## 2 讨论

我国冬瓜种质资源丰富, 主要有一个种和一个变种, 在长期的进化过程中, 为了适应不同的生态环境而形成遗传分化明显的地理生态类群。冬瓜不同生态类群种质在形态学上表现出极大的差异, 目前已用于冬瓜种质资源的分类研究(张建军等, 2009)。然而, 形态学分类目前却没有分子系统发育

证据的支持。

近年来, 利用 ITS 序列研究植物的亲缘关系和

系统分类已成为焦点, 已在许多植物上得到广泛应用(史全良等, 2001; 张露等, 2002; 高玉梅等, 2009)。

表 1 各材料 ITS (包括 ITS1 和 ITS2)长度和 GC%含量

Table 1 Sequence sizes and GC content of ITS (ITS1+ITS2) in the tested Wax guards (*Benincasa hispida*)

编号 Code	ITS1		ITS2		ITS (ITS1+ITS2)	
	长度 Length	GC%	长度 Length	GC%	长度 Length	GC%
1	219	59.36	232	63.79	451	61.64
2	219	59.36	232	63.79	451	61.64
3	219	59.82	232	63.79	451	61.86
4	218	59.63	232	63.36	450	61.56
5	218	60.09	232	63.79	450	62.00
6	221	59.73	232	63.79	453	61.81
7	218	59.63	232	63.79	450	61.78
8	219	59.36	232	63.79	451	61.64
9	219	59.36	232	63.79	451	61.64
10	218	59.63	232	63.36	450	61.56
11	218	59.63	232	63.79	450	61.78
12	219	59.36	232	63.79	451	61.64
13	218	59.63	232	63.36	450	61.64
14	219	59.82	232	63.79	451	61.86
15	219	59.36	232	63.79	451	61.64
16	219	58.90	232	63.79	451	61.42
17	219	59.82	232	63.79	451	61.86
18	219	59.36	232	63.79	451	61.64
19	219	59.36	232	63.79	451	61.64
20	219	59.36	232	63.79	451	61.64
21	219	59.36	232	63.79	451	61.64
22	219	59.36	232	63.79	451	61.64
23	219	59.36	232	63.79	451	61.64
24	219	59.36	232	63.79	451	61.64
25	219	59.36	232	63.79	451	61.64
26	219	59.82	232	63.79	451	61.86
27	219	59.36	232	63.79	451	61.64
28	219	59.82	232	63.79	451	61.86
29	219	59.82	232	63.79	451	61.86
30	219	59.82	232	63.79	451	61.86
31	218	59.63	232	63.79	450	61.78
32	219	59.82	232	64.22	451	62.08
33	219	59.82	232	63.79	451	61.86
34	219	59.82	232	63.79	451	61.86
35	218	59.63	232	63.36	450	61.56
36	218	59.63	232	63.79	450	61.78
37	218	59.63	232	63.79	450	61.78
38	218	59.63	232	63.36	450	61.56
39	219	59.82	232	63.79	451	61.86
40	219	59.82	232	63.79	451	61.86
41	219	59.82	232	63.79	451	61.86
42	217	60.37	237	63.29	454	61.89

表 2 本实验所用材料

Table 2 The materials used in this study

编号 Code	名称 Name	产地 Origin	GenBank 登录号 GenBank accession
1	英德黑皮 Yinde black	广东英德 Yinde, Guangdong	JX073041
2	连州冬瓜 Lianzhou wax gourd	广东连州 Lianzhou, Guangdong	JX073042
3	台山黑皮 Taishan black	广东台山 Taishan, Guangdong	JX073043
4	四倍体冬瓜 Tetraploid wax gourd	本单位创新材料 Innovative material by our institute	JX073044
5	佛山黑皮 Foshan black	广东佛山 Foshan, Guangdong	JX073045
6	佛山黑皮 Foshan black	广东佛山 Foshan, Guangdong	JX073046
7	香芋冬瓜 Xiangyu wax gourd	中国台湾 Taiwan, China	JX073047
8	双边籽冬瓜 Shuangbianzi wax gourd	广东韶关 Shaoguan, Guangdong	JX073048
9	一串铃 Yichuanling	北京 Beijing	JX073049
10	耐热冬瓜 Hot tolerance wax gourd	本单位创新材料 Innovative material by our institute	JX073050
11	扬子洲冬瓜 Yangzizhou wax gourd	江西南昌 Nanchang, Jiangxi	JX073051
12	绿肉节瓜 Lvrou Chieh-qua	广东鹤山 Heshan, Guangdong	JX073052
13	英德粉皮 Yinde fenpi	广东英德 Yinde, Guangdong	JX073053
14	遂溪粉皮 Suixi fenpi	广东遂溪 Suixi, Guangdong	JX073054
15	遂溪粉皮 Suixi fenpi	广东遂溪 Suixi, Guangdong	JX073055
16	白粉大冬瓜 baifen wax gourd	安徽六安 Lu'an, Anhui	JX073056
17	特早五叶子 Tezaowuyezi	四川成都 Chengdu, Sichuan	JX073057
18	一窝蜂冬瓜 Yiwofeng wax gourd	江苏南京 Nanjing, Jiangsu	JX073058
19	百色大冬瓜 Baise large wax gourd	广西百色 Baise, Guangxi	JX073059
20	文昌长筒冬瓜 Wenchang changtong wax gourd	海南文昌 Wenchang, Hainan	JX073060
21	六叶头冬瓜 Liuyetou wax gourd	江苏海安 Haian, Jiangsu	JX073061
22	旺苞冬瓜 Wangbao wax gourd	四川成都 Chengdu, Sichuan	JX073062
23	青皮冬瓜 Qingpi wax gourd	江苏南通 Nantong, Jiangsu	JX073063
24	明溪下洋冬瓜 Mingxixiyang wax gourd	福建明溪 Mingxi, Fujian	JX073064

续表 1

Continued table 1

25	猪肚冬瓜 Zhudu wax gourd	广西百色 Baise, Guangxi	JX073065
26	青皮冬瓜 Qingpi wax gourd	广西玉林 Yulin, Guangxi	JX073066
27	马群冬瓜 Maqun wax gourd	江苏南京 Nanjing, Jiangsu	JX073067
28	香冬瓜 Xiang wax gourd	云南昆明 Kunming, Yunnan	JX073068
29	小型冬瓜 Small wax gourd	云南昆明 Kunming, Yunnan	JX073069
30	云南地方种 Yunnan local species	云南西双版纳 Xishuangbanna, Yunnan	JX073070
31	香冬瓜 Xiang wax gourd	云南景洪 Jinghong, Yunnan	JX073071
32	云南地方种 Yunnan local species	云南景洪 Jinghong, Yunnan	JX073072
33	香冬瓜 Xiang wax gourd	云南勐海勐遮 Menghaimengzhe, Yunnan	JX073073
34	绿肉冬瓜 Lvrou wax gourd	云南勐海勐遮 Menghaimengzhe, Yunnan	JX073074
35	云南地方种 Yunnan local species	云南大勐龙勐宋 Damenglongmengsong, Yunnan	JX073075
36	云南地方种 Yunnan local species	云南大勐龙勐宋 Damenglongmengsong, Yunnan	JX073076
37	绿肉冬瓜 Lvrou wax gourd	云南东风农场 Dongfengnongchang, Yunnan	JX073077
38	香冬瓜 Xiang wax gourd	云南东风农场 Dongfengnongchang, Yunnan	JX073078
39	云南地方种 Yunnan local species	云南东风农场 Dongfengnongchang, Yunnan	JX073079
40	糯米香味冬瓜 Nuomixiangwei wax gourd	云南司土老寨 Situlaozhai, Yunnan	JX073080
41	香冬瓜 Xiang wax gourd	云南 Yunnan	JX073081
42	西瓜 <i>Citrullus lanatus</i>		FJ915098

本研究利用 ITS 序列研究冬瓜属种质资源的系统进化关系, 结果发现这些资源主要分为两个分支, 且不同生态类群种质资源之间, 其 ITS 序列无明显分化, 序列非常保守。该结果表明冬瓜属种质资源虽然经历了长期的自然选择和人工选择, 不同来源的种质资源间的 ITS 序列仍然没有明显的遗传分化。类似结果在其他作物上也有相关报道, 张露等(2002)研究新疆石竹属 8 个野生种的 ITS 序列时发现, ITS 序列在石竹属内相当保守。高玉梅等(2009)以不同地理来源的白菜类作物为材料, 发现其 ITS 序列无明显变异, 序列非常保守。

在冬瓜资源研究中, 不同地方的冬瓜品种在同一地方、同一条件下种植的田间表现与其在原产地表现出一定的差异。不同生态类群冬瓜资源有着非常相近的遗传背景, 其形态学差异可能主要由环境因素造成的。由于 ITS 序列在部分种类中的分辨率较低, 要理清冬瓜属下类群间的亲缘关系, 需要结合更多的分子序列和形态性状作进一步研究。

### 3 材料与方法

#### 3.1 材料

共选用冬瓜材料 41 份, 均取自广东省农业科



学院蔬菜研究所, 具体编号及来源见表 2。

### 3.2 DNA 提取

取刚展开的幼嫩叶片, 采用 CTAB 法(谢大森等, 2010)提取基因组 DNA。

### 3.3 ITS 序列的 PCR 扩增

ITS 全序列(包括 ITS1, 5.8S rRNA, ITS2)采用双引物扩增。两引物分别为: 5'-CCTTATCATTTAGAGGAAGGAG-3' (Stanford et al., 2000); 5'-TCCTC-CGCTTATTGATATGC-3' (White et al., 1990)。PCR 扩增反应总体积为 20  $\mu$ L, 反应体系为: 20 ng DNA 模板, 50 ng 正反向引物, 2.5 mmol/L 的 dNTPs, 2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2  $\mu$ L 10 $\times$ PCR buffer 和 1 U Taq DNA 聚合酶(TaKaRa)。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。

### 3.4 目的片段回收及测序

利用琼脂糖凝胶上检测 PCR 产物, 目的片段切下后用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(康为世纪)回收。回收产物经纯化后连接于 pMD19-T 载体(TaKaRa)上, 随后加入含有大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞的 1.5 mL 离心管中, 37 $^{\circ}$ C 静置培养过夜后, 挑取单克隆, 并在 LB 液体培养基(含有 100 mg/L 氨苄青霉素)中振荡过夜。利用菌液 PCR 方法鉴定阳性克隆。测序由上海英俊生物技术有限公司完成。

### 3.5 序列分析

分析 ITS 测序结果, 确定 ITS1、ITS2 和 5.8S rRNA 区, 所得序列采用 Clustal X 1.83 进行排序, 用 Bio XM 2.6 进行 GC 含量分析, 碱基替换的同质性检测用 MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011)进行。利用 MEGA 5.05 软件构建邻接树(Neighbor-joining tree)和最大简约树(Maximum parsimony tree), 以自展法(bootstrap)进行检测, 共循环 1 000 次。西瓜(*Citrullus lanatus*)与冬瓜同属葫芦科, 且亲缘关系较近(Kocyan et al., 2007), 因此选该种为外根群进行分析(登录号为 FJ915098)。由于 ITS1 和 ITS2 的变异都很小, 因此聚类分析时把 ITS1 和 ITS2 结合在一起计算。

### 作者贡献

谢大森和江彪是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 江彪和刘文睿完成数据分析, 论文初稿的写作; 何晓明参与实验结果分析和论文的修改; 彭庆务和赵芹提供实验材

料。全体作者都阅读并同意最终的文本。

### 致谢

感谢现代农业产业技术体系建设专项(CARS-25-G-36), 广东省科技计划项目(2011A020201002), 广州市科技计划项目(20110000003)给予本试验的经费支持。

### 参考文献

- Bellarosa R., Simeone M.C., Papini A., and Schirone B., 2005, Utility of ITS sequence data for phylogenetic reconstruction of Italian *Quercus* spp., *Mol. Phylogenet. Evol.*, 34(2): 355-370 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2004.10.014> PMID:15619447
- Chen S.F., Dong S.S., Wu W., Shi S.H., and Zhou P.H., 2007, Phylogenetics of *Triarrhena* and related genera based on ITS sequence data, *Wuhan Zhiwuxue Yanjiu (Journal of Wuhan Botanical Research)*, 25(3): 239-244 (陈少凤, 董穗穗, 吴伟, 施苏华, 周朴华, 2007, 基于 ITS 序列探讨荻属及其近缘植物的系统发育关系, *武汉植物学研究*, 25(3): 239-244)
- Gao Y.M., Zhang S.J., Zhang S.F., Li F., Wang X.W., Wu J., and Sun R.F., 2009, ITS analysis of *Brassica rapa*, *Zhongguo Shucai (China Vegetables)*, 24: 13-18 (高玉梅, 张淑江, 章时蕃, 李菲, 王晓武, 武剑, 孙日飞, 2009, 白菜类作物 ITS 序列分析, *中国蔬菜*, 24: 13-18)
- Kocyan A., Zhang L.B., Schaefer H., and Renner S.S., 2007, A multi-locus chloroplast phylogeny for the Cucurbitaceae and its implications for character evolution and classification, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 44(2): 553-577 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2006.12.022> PMID:17321763
- Kress W.J., Liu A.Z., Newman M., and Li Q.J., 2005, The molecular phylogeny of *Alpinia* (Zingiberaceae): a complex and polyphyletic genus of gingers, *Am. J. Bot.*, 92(1): 167-178 <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.92.1.167> PMID:21652395
- Shi Q.L., Zhuge Q., Huang M.R., and Wang M.X., 2001, Phylogenetic relationship of *Populus* sections by ITS sequence analysis, *Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Sinica)*, 43(3): 323-325 (史全良, 诸葛强, 黄敏仁, 王明麻, 2001, 用 ITS 序列研究杨属各组之间的系统发育关系, *植物学报*, 43(3): 323-325)
- Song S.W., Li Z., Liu H.C., Sun G.W., and Chen R.Y., 2010, RAPD analysis of genetic diversity of wax gourd and Chieh-qua germplasm, *Zhongguo Shucai (China Vegetables)*, 22: 47-53 (宋世威, 李珍, 刘厚诚, 孙光闻, 陈日远, 2010, 冬瓜和节瓜种质资源遗传多样性的 RAPD 分析, *中国蔬菜*, 22: 47-53)
- Stanford A.M., Harden R., and Parks C.R., 2000, Phylogeny and biogeography of *Juglans* (Juglandaceae) based on

- matK* and ITS sequence data, *Am. J. Bot.*, 87(6): 872-882  
<http://dx.doi.org/10.2307/2656895> PMID:10860918
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S., 2011, MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Mol. Biol. Evol.*, 28(10): 2731-2739 <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121> PMID:21546353
- White T.J., Burns T., Lee S., and Taylor J., 1990, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M., Gelfand D., Sninsky J., and White T.(eds.), *PCR protocols: a guide to methods and application*, Academic Press, San Diego, pp.315-322
- Xie D.S., He X.M., Peng Q.W., and Zhao Q., 2010, Studies on DNA extraction methods from winter gourd, *Zhongguo Shucai (China Vegetables)*, 2: 38-41 (谢大森, 何晓明, 彭庆务, 赵芹, 2010, 冬瓜 DNA 提取方法的研究, *中国蔬菜*, 2: 38-41)
- Zhang J.J., Liu S.G., Yu M.Q., and Ao Q.Y., 2009, Research on wax gourd agronomic characters and genetic diversity, *Sichuan Daxue Xuebao (Journal of Sichuan University (Natural Science Edition))*, 46(6): 1855-1861 (张建军, 刘世贵, 余懋群, 敖清艳, 2009, 100 份中国冬瓜种质资源农艺性状与遗传多样性研究, *四川大学学报(自然科学版)*, 46(6): 1855-1861)
- Zhang L., Cai Y.M., Zhuge Q., Zou H.Y., and Huang M.R., 2002, Sequence of the ITS region of nuclear ribosomal DNA (nrDNA) in Xinjiang wild *Dianthus* and its phylogenetic relationship, *Yichuan Xuebao (Acta Genetica Sinica)*, 29(6): 549-554 (张露, 蔡友铭, 诸葛强, 邹惠渝, 黄敏仁, 2002, 新疆石竹属野生种核糖体 DNA 的 ITS 序列与亲缘关系, *遗传学报*, 29(6): 549-554)
- Zhang L., Zhou Y.H., Ding C.B., Yang R.W., and Fan X., 2007, The phylogenetic relationships of *Kengyilia* species based on evidences from ITS sequences, *Xibei Zhiwu Xuebao (Acta Botanical Boreali-Occidentalia Sinica)*, 27(3): 490-496 (张利, 周永红, 丁春邦, 杨瑞武, 凡星, 2007, 基于 ITS 序列分析仲彬草属植物的亲缘关系, *西北植物学报*, 27(3): 490-496)
- Zhou X.Z., Chen Y., Chen S., Wu Y.F., and Zhao Y.J., 2011, Studiesy on geographic divergence of *Lagenaria siceraria* spp. *asiatica* based on 5.8S rDNA and ITS sequence data, *Zhongguo Shucai (China Vegetables)*, 6: 49-53 (周先治, 陈阳, 陈晟, 吴宇芬, 赵依杰, 2011, 基于 5.8S rDNA 和 ITS 序列探讨亚洲瓠瓜的地理分化, *中国蔬菜*, 6: 49-53)