

基于 5.8S rDNA 和 ITS 序列探讨亚洲瓠瓜的地理分化

周先治¹ 陈 阳¹ 陈 晟¹ 吴宇芬¹ 赵依杰²

(¹福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福建福州 350003; ²福州市农业科学研究所, 福建福州 350018)

摘 要: 基于 5.8S rDNA 及 ITS 序列对 23 份来自中国、泰国和日本的亚洲瓠瓜品种进行了地理分化研究。结果发现, 23 份瓠瓜材料的 ITS1+5.8S rDNA+ITS2 序列的长度在 611 ~ 627 bp 之间, G+C 含量在 54.17% ~ 63.26% 之间, 信息位点数 65 个, 占总碱基数的 11.09%; 源自日本的 2 份瓠瓜品种的序列长度短于其他 21 份瓠瓜品种, G+C 含量也明显低于其他瓠瓜品种。从 5.8S rDNA 及 ITS 序列构建的系统树可以看出, 源自日本的瓠瓜品种与源自中国和泰国的瓠瓜品种存在地理分化现象, 分属于不同的分支, 支持率达到 99%。序列间的同质性检验结果显示, 2 份源自日本的瓠瓜品种与源自中国和泰国的瓠瓜品种差异显著。

关键词: 5.8S rDNA; 亚洲瓠瓜; 内转录间隔区; 地理分化

中图分类号: S642.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-6346 (2011) 06-0049-05

Studies on Geographic Divergence of *Lagenaria siceraria* ssp. *asiatica* Based on 5.8S rDNA and ITS Sequence Data

ZHOU Xian-zhi¹, CHEN Yan¹, CHEN Sheng¹, WU Yu-fen¹, ZHAO Yi-jie²

(¹Agricultural Bio-resources Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, Fujian, China; ²Fuzhou Institute of Agricultural Sciences, Fuzhou 350018, Fujian, China)

Abstract: The geographic divergence of the *Lagenaria siceraria* ssp. *asiatica* were examined using ITS1+5.8S rDNA+ITS2 sequences data. The sequences were obtained from 23 species of *L. siceraria* ssp. *asiatica* from China, Thailand and Japan. The results showed that within *L. siceraria* ssp. *asiatica*, ITS1+5.8S rDNA+ITS2 was 611-627 bp, the G+C content of the sequences was 54.17% - 63.26%, 65 informative sites (11.09%) within *L. siceraria* ssp. *asiatica* are found in the ITS1+5.8S rDNA+ITS2 sequences. The length of the ITS1+5.8S rDNA+ITS2 sequences of 2 species from Japan is shorter than the other 21 species from China and Thailand, the G+C content of the sequences of the 2 species from Japan is lower than those from China and Thailand. Finally we constructed the strict consensus tree of 23 species of *L. siceraria* ssp. *asiatica* indicated that *L. siceraria* ssp. *asiatica* has two main prophylactic glades, one including 2 species from Japan, and the other including 20 species from China and 1 species from Thailand. The bootstrap value is 99%. Test of the homogeneity of substitution patterns revealed that the species of *L. siceraria* ssp. *asiatica* from Japan are significantly different from those from China and Thailand.

收稿日期: 2010-11-19; 接受日期: 2011-01-16

基金项目: 福建省科技厅重点项目 (200710037)

作者简介: 周先治, 助理研究员, 专业方向: 生物资源研究, E-mail: xianzhizhou@126.com

Key words: 5.8S rDNA; *Lagenaria siceraria* ssp. *asiatica*; ITS; Geographic divergence

瓠瓜 [*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.] 隶属葫芦科 (Cucurbitaceae) 葫芦属 (*Lagenaria*), 是一种雌雄同体一年生藤本植物。瓠瓜原产于非洲 (Heiser, 1973, 1979), 现在非洲和亚洲种植的瓠瓜在形态上和基因上存在明显差异, 据此分为 *L. siceraria* ssp. *siceraria* 和 *L. siceraria* ssp. *asiatica* 两个亚种 (Heiser, 1973, 1979; Decker-Walters, 1999; Decker-Walters et al., 2004)。瓠瓜是人类最早栽培的作物之一, 在世界范围内种植已有几千年历史, 早在公元前 8 000 ~ 9 000 年中国和日本就有栽培的瓠瓜 (Crawford, 1992)。

研究葫芦属植物的系统分化对于瓠瓜的引种、育种具有重要意义。由于植物核糖体内转录间隔区 ITS (Internal transcribed spacer) (18S-5.8S-26S) 承受选择压力小, 进化速率快, 是最常用作植物遗传分化研究的片段 (Baldwin et al., 1995; 林剑伟 等, 2007)。该片段已成功应用于杜鹃属 (高连明 等, 2002)、睡莲科 (刘艳玲 等, 2005)、益母草类 (杨志业 等, 2006)、杨属 (史全良 等, 2001)、桑属 (赵卫国 等, 2004) 等植物物种系统分化研究。亚洲瓠瓜 *L. siceraria* ssp. *asiatica* 的地理分化方面尚未见报道, 本试验旨在对来自中国、泰国和日本的 23 份瓠瓜栽培品种的核糖体内转录间隔区进行序列差异分析, 构建系统进化树, 研究亚洲栽培瓠瓜的地理分化, 以期丰富葫芦属植物系统分化的遗传学资料, 为瓠瓜的引种、育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

供试的 23 份瓠瓜材料包括来自我国的 20 份种质资源, 引自日本和泰国的 3 份种质资源, 均为当地生产上种植的常规品种, 具体来源及序列登录号 (www.ncbi.nlm.nih.gov) 见表 1。

1.2 叶片基因组 DNA 提取

2008 年 8 月在福州市农业科学研究所蔬菜温室播种, 4 片真叶期取单株叶片进行试验。叶片基因组 DNA 的提取参照黄玉吉等 (2009) 的方法进行。

1.3 ITS 序列的扩增与测定

ITS 全序列 (含 5.8S rRNA 基因) 采用引物 ITS5a: 5'-CCTTATCATTTAGAGGAAGGAG-3' (Stanford et al., 2000) 和引物 ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White et al., 1990) 扩增获得。PCR 反应体系体积为 50 μ L, 其中模板 DNA 100 ng, 2 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 5 μ L, 10 \times buffer 5 μ L, Taq 酶 2 U, 引物 ITS5a 和 ITS4 各 20 pmol。PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 50 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min; 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 产物经 DNA 纯化试剂盒 (杭州博日生物技术有限公司) 纯化, 由上海生工

表 1 材料来源

编号	品种名称 ¹⁾	类群	原产地	登录号
1	8号	瓠瓜 <i>L. siceraria</i>	中国北京	FJ951137
2	短柄芦 2	瓠瓜 <i>L. siceraria</i>	中国福州	FJ951139
3	本地短柄	瓠瓜 <i>L. siceraria</i>	中国福州	FJ951140
4	日本长葫	瓠瓜 <i>L. siceraria</i>	日本	FJ951142
5	青长葫	瓠瓜 <i>L. siceraria</i>	中国海南	FJ951143
6	超丰新生	瓠瓜 <i>L. siceraria</i>	中国郑州	FJ951145
7	京欣砧霸	瓠瓜 <i>L. siceraria</i>	中国北京	FJ951146
8	黄山长葫	瓠瓜 <i>L. siceraria</i>	中国福州	FJ951147
9	青圆有柄	瓠瓜 <i>L. siceraria</i>	中国福州	FJ951148
10	芦 1	瓠瓜 <i>L. siceraria</i>	中国福州	FJ951149
11	花长葫	瓠瓜 <i>L. siceraria</i>	中国福州	FJ951150
12	中引 28	瓠瓜 <i>L. siceraria</i>	中国北京	FJ951151
13	4号砧木	瓠瓜 <i>L. siceraria</i>	中国福州	FJ951152
14	7号砧木	瓠瓜 <i>L. siceraria</i>	中国福州	FJ951153
15	10号砧木	瓠瓜 <i>L. siceraria</i>	中国福州	FJ951154
16	11号砧木	瓠瓜 <i>L. siceraria</i>	中国福州	FJ951155
17	12号砧木	瓠瓜 <i>L. siceraria</i>	中国福州	FJ951156
18	16号砧木	瓠瓜 <i>L. siceraria</i>	中国福州	FJ951157
19	18号砧木	瓠瓜 <i>L. siceraria</i>	中国福州	FJ951158
20	19号砧木	瓠瓜 <i>L. siceraria</i>	泰国	FJ951159
21	中引 63	瓠瓜 <i>L. siceraria</i>	中国北京	FJ951160
22	青圆无柄	瓠瓜 <i>L. siceraria</i>	中国福州	FJ951161
23	日本长葫 3	瓠瓜 <i>L. siceraria</i>	日本	FJ951162

注: 1) 由于试验材料为嫁接砧木, 福州本地的部分种植品种并没有具体名称, 只有砧木编号。

生物工程服务有限公司测序。

1.4 序列分析

对 ITS 序列测序结果进行分析, 确定 ITS1、ITS2 和 5.8S rRNA 区, 并登陆 GenBank, 所得序列采用 DNASTar 软件进行排序和 G+C 含量分析, 碱基替换的同质性检测 (Kumar & Gadagkar, 2001) 用 MEGA4.0 (Tamura et al., 2007) 进行。利用 MEGA4.0 软件进行系统发育分析, 并以自展法 (bootstrap) 进行检测, 共循环 1 000 次, 大于 50 % 的分支支持率显示在分支上 (Felsenstein, 1985), 采用最大简约法 (Maximum parsimony) 构建严格一致树。

2 结果与分析

2.1 瓠瓜 5.8S rDNA 及 ITS 序列的差异性分析

供试瓠瓜的 5.8S rRNA 的长度均为 162 bp, 仅有个别碱基的替换, 表明葫芦属植物核糖体基因的高度保守性。23 份瓠瓜材料的 ITS1+5.8S rDNA+ITS2 序列长度在 611 ~ 627 bp 之间, G+C 含量在 54.17 % ~ 63.36 % 之间。葫芦属植物 ITS1+5.8S rDNA+ITS2 序列的信息位点数为 65 个, 占总碱基数 (去掉间隙和缺失数据的最终数据集中包含 586 个位点) 的 11.09 %, 来自日本的 2 个瓠

表 2 23 份瓠瓜材料的 ITS1+5.8S rDNA+ITS2 序列长度和 G+C 含量

编号	登陆序列号	ITS1+5.8S rDNA+ITS2		编号	登陆序列号	ITS1+5.8S rDNA+ITS2	
		长度/bp	G+C 含量/%			长度/bp	G+C 含量/%
1	FJ951137	625	63.20	13	FJ951152	626	63.26
2	FJ951139	625	63.04	14	FJ951153	626	63.26
3	FJ951140	626	63.26	15	FJ951154	626	62.68
4	FJ951142	611	54.17	16	FJ951155	626	63.10
5	FJ951143	626	63.26	17	FJ951156	625	63.20
6	FJ951145	625	63.20	18	FJ951157	621	63.12
7	FJ951146	625	63.04	19	FJ951158	621	62.96
8	FJ951147	625	63.20	20	FJ951159	625	63.04
9	FJ951148	627	63.32	21	FJ951160	621	63.12
10	FJ951149	626	61.82	22	FJ951161	621	63.12
11	FJ951150	626	63.00	23	FJ951162	616	57.79
12	FJ951151	625	63.20				

瓜品种 (FJ951142 和 FJ951162) 的序列长度分别为 611 bp 和 616 bp, 明显短于来自中国和泰国的瓠瓜品种; G+C 含量分别为 54.17 % 和 57.79 %, 低于来自中国和泰国的瓠瓜品种 (表 2)。

2.2 瓠瓜 5.8S rDNA 和 ITS 序列的系统树构建

依据测序结果, 采用最大简约法对 23 份不同来源的瓠瓜材料的 ITS1+5.8S rDNA+ITS2 序列构建严格一致树, 其步长为 145, 一致性指数 (CI) 和维持性指数 (RI) 分别为 0.833 3 和 0.864 1, 系统分支上的数字为 Bootstrap 重复 1 000 次抽样检验得出的分支支持率 (图 1)。系统发育树上的拓扑结构显示, 源自日本的 2 份瓠瓜品种在同一支上, 支持率为 99 %, 而源

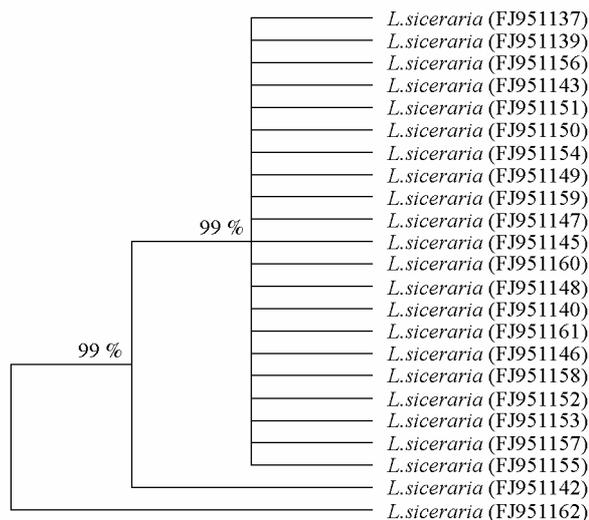


图 1 23 份瓠瓜材料 5.8S rDNA 和 ITS 序列的严格一致树

自中国和泰国的 21 份瓠瓜品种在另一分支上, 分支支持率为 99 %, 源自泰国的瓠瓜品种和源自中国的瓠瓜品种的亲缘关系较近, 源自日本的瓠瓜品种与源自中国的瓠瓜品种亲缘关系较远。经过分析, 源自日本的 2 份瓠瓜品种与源自中国和泰国的 21 份瓠瓜品种的序列替换进化概率差异显著, 差异指数在 0.413 ~ 2.887 之间 (表 3)。

表 3 23 份瓠瓜材料 ITS1+5.8S rDNA+ITS2 序列间的同质性替换检测

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1		0.000	0.000	2.751	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.051	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.913
2	1.000		0.000	2.618	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.043	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.836
3	1.000	1.000		2.887	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.056	0.000	0.000	0.000	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.998
4	0.000	0.000	0.000		2.751	2.751	2.751	2.751	2.887	2.263	2.589	2.751	2.887	2.887	2.406	2.751	2.751	2.887	2.802	2.618	2.887	2.887	0.413
5	1.000	1.000	1.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.051	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.913
6	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000		0.000	0.000	0.000	0.051	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.913
7	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000		0.000	0.000	0.044	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.918
8	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000		0.000	0.051	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.913
9	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000		0.056	0.000	0.000	0.000	0.000	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.998
10	0.053	0.086	0.062	0.000	0.053	0.061	0.098	0.063	0.066		0.026	0.051	0.056	0.056	0.031	0.044	0.051	0.056	0.041	0.046	0.056	0.056	0.621
11	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.192		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.795
12	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.057	1.000		0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.913
13	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.064	1.000	1.000		0.000	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.998
14	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.067	1.000	1.000	1.000		0.012	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.998
15	0.107	1.000	0.121	0.000	0.090	0.088	1.000	0.106	0.089	0.133	1.000	0.089	0.113	0.094		0.000	0.007	0.012	0.003	0.002	0.012	0.012	0.701
16	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.109	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.918
17	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.054	1.000	1.000	1.000	1.000	0.103	1.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.913
18	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.059	1.000	1.000	1.000	1.000	0.083	1.000	1.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.998
19	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.109	1.000	1.000	1.000	1.000	0.326	1.000	1.000	1.000		0.000	0.000	0.000	0.939
20	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.056	1.000	1.000	1.000	1.000	0.458	1.000	1.000	1.000	1.000		0.000	0.000	0.833
21	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.056	1.000	1.000	1.000	1.000	0.094	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		0.000	0.998
22	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.058	1.000	1.000	1.000	1.000	0.110	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.998
23	0.000	0.001	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 不同序列间的差异指数 (Disparity Index) 位于对角线的上方, 蒙特卡罗检验 (Monte Carlo test, 重复 1000 次) 获得的不同序列间的差异 P 值位于对角线的下方, $P < 0.05$ 表示差异显著, 灰色标记表示序列间差异显著。

3 结论与讨论

亚洲瓠瓜类群在长期迁移、演化过程中为了适应各地的生态环境形成了不同的地理生态类群, 这些生态类群间具有明显的遗传分化。由于核糖体基因组的进化速率远快于线粒体和叶绿体 (Wolfe et al., 1987), 植物核糖体内转录间隔区 (ITS) 的区分识别度高 (Sass et al., 2007), 是最常用作遗传分化研究的片段 (Baldwin et al., 1995; 林剑伟 等, 2007)。周先治等 (2010) 基于 ITS 序列研究西瓜种下分化, 发现中国西瓜和非洲西瓜存在地理分化现象。笔者采用 ITS 序列对南瓜属植物进行系统发育研究, 同样也发现存在地理分化现象 (另文发表)。本试验基于 5.8S rDNA 及 ITS 序列对来自中国、泰国和日本的 23 份亚洲瓠瓜品种进行了地理分化研究, 结果发现 ITS1+5.8S rDNA+ITS2 序列的信息位点数 65 个, 占总碱基数的 11.09 %, 具有极强的系统发育信号, 源自中国的 20 个瓠瓜品种和源自泰国的 1 个瓠瓜品种同属一个分支, 而源自日本的 2 个瓠瓜品种属于另一分支, 这 2 个品种的序列长度明显短于其他品种, G+C 含量也明显低于其他品种, 碱基替换的同质性检测显示, 源自日本的 2 个瓠瓜品种与源自中国和泰国的瓠瓜品种的替换

进化概率差异显著。23 份瓠瓜材料的遗传聚类与生态类群间地理来源的相关性, 都说明源自中国和泰国的亚洲瓠瓜品种和源自日本的亚洲瓠瓜品种的地理分化是具有遗传基础的。以上结论说明, 亚洲瓠瓜地理分化是地理生态因子导致的遗传分化, 当然作用于遗传变异的不仅限于地理生态因子, 还可能还有其他引起遗传变异的因子, 这种机制还有待进一步研究。

亚洲瓠瓜在中日两国都有悠久的种植历史, 由于人工育种选择目标和气候不同也可能导致两国种植瓠瓜的遗传差异, 这有待进一步研究。由于源自日本和泰国的亚洲瓠瓜品种只有 3 个, 仍需要扩大来自上述两国的亚洲瓠瓜品种和数量来进一步研究和佐证亚洲瓠瓜的地理分化现象。

参考文献

- 高连明, 杨俊波, 张长芹, 李德铎. 2002. 基于 ITS 序列分析探讨杜鹃属映山红亚属的组间关系. 云南植物研究, 24 (3): 313-320.
- 黄玉吉, 陈菁瑛, 苏海兰, 黄颖桢, 万学锋. 2009. 不同产区麦冬、山麦冬 rDNA-ITS 序列分析. 福建农业学报, 24 (6): 508-512.
- 林剑伟, 网友雄, 陈天生, 许莉萍, 张木清. 2007. 核糖体 DNA 的内转录间隔区序列标记在真菌分类鉴定中的应用. 生物技术通讯, 18 (2): 292-294.
- 刘艳玲, 徐立铭, 倪学明, 赵家荣. 2005. 睡莲科的系统发育: 核糖体 DNA ITS 区序列证据. 植物分类学报, 43 (1): 22-30.
- 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.
- 杨志业, 晁志, 霍克克, 吴炳义, 潘胜利. 2006. 益母草类中药原植物的核糖体内转录间隔区序列分析. 南方医科大学学报, 26 (11): 1593-1595.
- 赵卫国, 潘一乐, 张志芳. 2004. 桑属植物 ITS 序列研究与系统发育分析. 蚕业科学, 30 (1): 11-14.
- 周先治, 陈晟, 吴宇芬, 陈阳, 赵依杰. 2010. 基于 ITS 序列探讨西瓜种下分化. 中国农学通报, 26 (1): 17-21.
- Baldwin B G, Sanderson M J, Porter J, Wojciechowski M F, Campbell C S, Donoghue M J. 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.
- Crawford G W. 1992. The origins of plant domestication in East Asia//Watson P J, Cowan C W. In origins of agriculture: an international perspective. Washington D C: Smithsonian Institution Press: 7-38.
- Decker-Walters D S. 1999. Cucurbits, sanskrit and the Indo-aryans. Economic Botany, 53 (1): 98-112.
- Decker-Walters D S, Wilkins-Ellert M, Sang-min C, Staub J E. 2004. Discovery and genetic assessment of wild bottle gourd [*Lagenaria siceraria* (Mol.) Standley; Cucurbitaceae] from Zimbabwe. Economic Botany, 58 (4): 501-508.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution, 39: 783-791.
- Heiser C B. 1973. Variation in the bottle gourd//Meggers B J, Ayensu E S, Duckworth W D. In tropical forest ecosystems in Africa and South America: a comparative review. Washington D C: Smithsonian Institution Press: 121-128.
- Heiser C B. 1979. The gourd book. Oklahoma: University of Oklahoma Press.
- Kumar S, Gadagkar S R. 2001. Disparity index: a simple statistic to measure and test the homogeneity of substitution patterns between molecular sequences. Genetics, 158: 1321-1327.
- Sass C, Little D P, Stevenson D W, Specht C D. 2007. DNA barcoding in the cycadales: testing the potential of proposed barcoding markers for species identification of cycads. PloS One, 2: 154.
- Stanford A M, Harden R, Parks C R. 2000. Phylogeny and biogeography of *Juglans* (Juglandaceae) based on *matK* and ITS sequence data. American Journal of Botany, 87: 872-882.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24 (8): 1596-1599.
- White T J, Burns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics//Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J. In PCR protocols: a guide to methods and applications. New York: Academic Press: 315-322.
- Wolfe K H, Li W H, Sharp M H. 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. Proceedings of the National Academy of Sciences, 84 (24): 9054-9058.