

基于 ITS 序列探讨荻属及其近缘植物的系统发育关系

陈少风^{1,3}, 董穗穗², 吴 伟², 施苏华², 周朴华^{1*}

(1. 湖南农业大学生物科学技术学院, 长沙 410128; 2. 中山大学生命科学院, 广州 510275;

3. 南昌大学生命科学学院, 南昌 330031)

摘 要: 荻属是禾本科的一个小属, 其分类地位存在争议。通过测定和从 GenBank 中提取荻属 *Triarrhena* 及其近缘植物的 ITS 序列, 以芦苇 *Phragmites australis* 为外类群, 采用 MP(maximum parsimony) 和 NJ(neighbor-joining) 分析方法进行了系统发育分析, 这两种方法得到的系统发育树基本相同。荻属和芒属 *Miscanthus* 的种类形成一个单系类群; 河八王 *Narenga porphyrocoma* 与芒属和荻属的植物聚在一起并构成姐妹群; 白茅 *Imperata cylindrica* 与斑茅 *Saccharum arundinaceum* 聚成一小支并构成姐妹群, 白茅与荻属的关系较远; 荻属植物归并到芒属更为合理, 不支持将荻属置入白茅属或另立一属的观点。斑茅与白茅、河八王及蔗茅 *Erianthus fulvus* 系统发育关系较近, 而与滇蔗茅 *E. rockii* 及甘蔗属的竹蔗 *Saccharum sinense*、甘蔗 *S. officinarum*、细秆甘蔗 *S. barberi* 和甜根子草 *S. spontaneum* 的关系较远。甘蔗属、河八王属及蔗茅属关系复杂, 还需要进一步研究。

关键词: 荻属; ITS; 系统发育

中图分类号: Q949.71+4.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2007)03-0239-06

Phylogenetics of *Triarrhena* and Related Genera Based on ITS Sequence Data

CHEN Shao-Feng^{1,3}, DONG Sui-Sui², WU Wei², SHI Su-Hua², ZHOU Pu-Hua^{1*}

(1. School of Bioscience and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China; 3. School of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract: *Triarrhena* is a small-sized genus of Gramineae with only two species, which occurs in eastern Asia, particularly in China, but its taxonomic treatment has been a controversial matter. It was treated as an independent genus, or a species under *Miscanthus* or *Imperata*. This study is to assess the phylogeny of *Triarrhena* and its related genera in Saccharinae (Gramineae) based on internal transcribed spacer (ITS) and the 5.8s coding region of the nuclear ribosomal DNA. Maximum parsimony (MP) and neighbor-joining (NJ) methods were employed to analyze the data sets with *Phragmites australis* as outgroup. The phylogenetic trees based on the data set show that the genus *Miscanthus* (including *Triarrhena*) formed a monophyletic group. *Narenga porphyrocoma* was strongly supported to be the sister group of a subclade comprising *Miscanthus* and *Triarrhena*. *Imperata cylindrica* and *Saccharum arundinaceum* were sister group and formed a subclade, indicating their close affinity. The present authors suggest that *Triarrhena* should be merged with *Miscanthus*. The results of phylogenetic analysis also indicate that *Saccharum arundinaceum* has a closed relationship with *Imperata*, followed by *Narenga* and *Miscanthus*. However it is the most distant to the other species of *Saccharum*. Since the genera of *Saccharum*, *Narenga* and *Erianthus* are shown to be polyphyletic, further studies on their phylogenetic relationships are still needed.

Key words: *Triarrhena*; ITS; Phylogeny

荻属 *Triarrhena* 是禾本科黍亚科须芒草族甘蔗亚族中一个小属^[1]。荻属的分类学问题在学术界存在争议, 荻曾置于白茅属 *Imperata*、芒属 *Miscanthus* 或独立为一属^[2-6]。刘亮^{1), [1]}在对禾本科植物资源研究及编写中国植物志时, 把荻从芒属中分出,

另立荻属, 其依据是荻小穗无芒, 具发达根状茎区别于芒属, 荻又以大型圆锥花序, 雄蕊 3 枚而不同于白茅属。刘亮认为荻 *T. sacchariflorus* (Maxim.) Nakai 分布于我国北纬 30° 以北的东北、华北至日本, 而分布于长江中下游荻的材料是特产于我国的新种, 定

收稿日期: 2006-12-04, 修回日期: 2007-01-16。

作者简介: 陈少风 (1958 -), 女, 在职博士研究生, 主要从事植物系统学的研究。

* 通讯作者 (Author for correspondence)。

1) Liu L. Plant Resources of Gramineae II. 1989, 10 - 11. Unpublished manuscript.

名为南荻(*T. lutarioriparia* L. Liu), 荻属为东亚的特有属之一。陈守良和 Renvoize^[6,7]把南荻作为芒属的一个新种 *M. lutarioriparius* Liu ex S. L. Chen & Renvoize 正式发表, 而且在《Flora of China》中也是将荻和南荻归并在芒属中。

荻属的近缘植物有芒属、白茅属、甘蔗属 *Saccharum*、蔗茅属 *Erianthus* 和河八王属 *Narenga* 等, 这些属的植物分类地位较为复杂, 它们之间的系统发育关系并不明确。有人主张甘蔗属包括蔗茅属和河八王属, 也有人把蔗茅属和河八王属从甘蔗属分出来^[1,4,7,8]。有学者把斑茅 *Saccharum arundinaceum* 放在甘蔗属 *Saccharum* 或把它归入蔗茅属 *Erianthus*, 也有些学者提出应将其单立为一属^[1,9-11]。

关于禾本科甘蔗亚族属种间的系统发育关系的讨论主要是基于形态、细胞及生理生化水平的研究, 而根据 DNA 序列分析的也有一些报道, 已经报道的主要有 ITS、*rbcl* 和 *trnL-F*。*rbcl* 和 *trnL-F* 基因在

甘蔗亚族属种间的变异极低, 难以用于系统发育研究^[12,13]。ITS 序列在研究属内种间和较近的属间关系时都表现出较高的趋异率与信息位点百分率, 为类群内部的系统发育重建提供了较好的支持^[14-17], 特别是在禾本科甘蔗亚族植物属种间的研究中已提供了较有意义的信息^[18,19]。本文通过对作者测定的和从 GenBank 中检索到的甘蔗亚族 7 属 14 种 27 个材料及外类群芦苇(*Phragmites australis*)的 ITS 序列的分析, 来探讨荻属的系统演化关系, 同时为荻属及其近缘植物的分类和资源的开发利用提供系统学资料。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究 11 个材料来自野外用硅胶快速干燥的新鲜叶片, 其余的及外类群序列来自 GenBank, 所有用于分析的材料见表 1。

表 1 实验材料及其来源
Table 1 The origin of material used in this study

编号 No.	物种名称 Species	采集地/凭证标本 Locality/Voucher	GenBank 检索号 Accession number
01	五节芒 <i>Miscanthus floridulus</i>	Nanchang Jiangxi, Chen 0416	EF211948
02	五节芒 <i>Miscanthus floridulus</i>	Tonggu Jiangxi, Chen 0418	EF211949
03	五节芒 <i>Miscanthus floridulus</i>	Yunnan	AF345214
04	芒 <i>Miscanthus sinensis</i>	Tonggu Jiangxi, Chen 0425	EF211950
05	芒 <i>Miscanthus sinensis</i>	Nanchang Jiangxi, Chen 0417	EF211951
06	芒 <i>Miscanthus sinensis</i>	Cultivated in U. K.	AF019822
07	突节荻 <i>Triarrhena lutarioriparia</i> var. <i>elevationodis</i>	Yuanjiang Hunan, Chen 0301	EF211952
08	突节荻 <i>Triarrhena lutarioriparia</i> var. <i>elevationodis</i>	Hanshou Hunan, Chen 0302	EF211953
09	南荻 <i>Triarrhena lutarioriparia</i> var. <i>lutarioriparia</i>	Hanshou Hunan, Chen 0311	EF211954
10	南荻 <i>Triarrhena lutarioriparia</i> var. <i>lutarioriparia</i>	Yuanjiang Hunan, Chen 0312	EF211955
11	荻 <i>Triarrhena sacchariflora</i>	Cultivated in U. K.	AY116282
12	荻 <i>Triarrhena sacchariflora</i>	Cultivated in U. K.	AJ426564
13	斑茅 <i>Saccharum arundinaceum</i>	Nanchang Jiangxi, Chen 0422	EF211956
14	斑茅 <i>Saccharum arundinaceum</i>	Yunnan	AF345202
15	斑茅 <i>Saccharum arundinaceum</i>	Guizhou	AF345207
16	甘蔗 <i>Saccharum officinarum</i>	Yunnan	AF345231
17	甜根子草 <i>Saccharum spontaneum</i>	Yunnan	AF345245
18	细秆甘蔗 <i>Saccharum barberi</i>	Yunnan	AF331657
19	竹蔗 <i>Saccharum sinense</i>	Yunnan	AF345242
20	白茅 <i>Imperata cylindrica</i>	Yunnan	AF345653
21	白茅 <i>Imperata cylindrica</i>	Taiwan	AF092512
22	滇蔗茅 <i>Erianthus rockii</i>	Yunnan	AF345219
23	滇蔗茅 <i>Erianthus rockii</i>	Sichuan	AF345220
24	蔗茅 <i>Erianthus fulvus</i>	Yunnan	AF345216
25	蔗茅 <i>Erianthus fulvus</i>	Yunnan	AF345217
26	河八王 <i>Narenga porphyrocoma</i>	Pengze Jiangxi, Chen 0445	EF211957
27	柔枝莠竹 <i>Microstegium vimineum</i>	Guanshan Jiangxi, Chen 0430	EF211958
28	芦苇 <i>Phragmites australis</i> *	Unknown	AF019810

* Outgroup.

1.2 实验方法

1.2.1 植物总 DNA 的提取

参照改进的 CTAB 法^[20]提取总 DNA。

1.2.2 PCR 扩增及纯化

实验中使用引物 ITS4 (5' → 3') TCCTCCGCT-TATTGATATGC, ITS5 (5' → 3') GGAAGTAAAAGT-CGTAACAAGG对目的片段进行扩增和测序, PCR 扩增反应在 MJ Research 公司的 PTC-200 PCR 仪上进行,反应总体积为 20 μL,扩增条件:94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 1 min,50℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,35 个循环。扩增得到核糖体 DNA 的 ITS 片段(包括 ITS1, 5.8S rDNA 和 ITS2)。PCR 产物用 QIAGEN 公司的 PCR 纯化试剂盒进行纯化,然后采用 Ugene 的凝胶回收试剂盒回收。

1.2.3 序列测定

测序反应在 MJ Research 公司的 PTC-200 PCR 仪上进行,反应程序为:96℃ 变性 10 s,50℃ 退火 10 s,60℃ 延伸 4 min,40 个循环,反应总体积为 10 μL。用 Bigdye 循环测序试剂盒在 ABI 公司(美国应用生物系统公司)ABI 3730 全自动测序仪上进行正、反链双向测序。

1.2.4 序列分析和分子系统发育树的构建

本文测定的序列和从 GenBank 获得的序列采用 DNASTAR 软件包(DNASTAR Inc., 1995)进行校正和多重序列比对后,空位(gap)作为缺失处理。本研究选择芦苇属芦苇(*Phragmites australis*)为外类群,芦苇属于芦竹亚科 Arundinoideae 或黍亚科 Panicoideae 须芒草超族 Andropogonatae (荻及其近缘植物亦属于黍亚科须芒草超族),芦苇在形态上与荻及其近缘植物有相似性,但又是较为原始的类群^[21-23]。本文采用两种方法对序列进行分析,分别是最大简约法(maximum parsimony, MP)和邻接法(neighbor-joining, NJ)对 ITS 序列进行独立的系统发育分析。MP 和 NJ 法采用 MEGA2b3 软件进行分析,使用其中的 Kimura 2-Parameter Distance^[24],参数转换成遗传距离值后用 NJ 法和 MP 法构树;同时,进行 1000 次自展法检验,以评价各分支的可靠性。

2 结果与讨论

所研究的荻属及其近缘植物的 G + C 含量在 ITS-1 区的变化范围为 61.8% ~ 67.5%,在 ITS-2 区为 66.1% ~ 73.3%,序列长度范围为 540 ~ 557 bp,序列对排后的长度为 565 bp,变异位点数目 144,信息位点数目 77,ITS1 长度范围为 204 ~ 208 bp,变异位

点为 82 个,信息位点为 42 个,排序后长度为 224 bp。ITS2 长度范围为 172 ~ 176 bp,变异位点为 54 个,信息位点为 31 个,排序后长度为 164 bp,在所有类群中 5.8S rDNA 序列很保守,长度均为 163 bp。荻属及其近缘植物的 ITS 区序列(ITS1 + ITS2)在各属种间的变异程度较高,且各属种均有特定的变异位点或信息位点。如:芒属和荻属分别在 34、52、82 bp 和 413 bp 处均存在特有的变异位点,分别为“A”、“A”、“T”、“A”,而其他属在此处的位点分别为“C”、“G”、“G”、“T”或“G”;斑茅在 82、117、207 bp 和 548 bp 处存在特有的变异位点为“A”、“G”、“G”和“G”;甘蔗属斑茅 *S. arundinaceum*、竹蔗 *S. sinense*、甘蔗 *S. officinarum*、细秆甘蔗 *S. barber* 和甜根子草 *S. spontaneum*,蔗茅属蔗茅 *E. fulvus*、滇蔗茅 *E. rockii* 及白茅属 *Imperata* 的白茅 *I. cylindrica* 420 bp 和 421 bp 处存在 2 个缺失位点等,这些为荻属及其近缘属种的系统发育和分类学的研究提供了重要的分子信息。

为了更准确地说明问题,我们采用 MP 和 NJ 法,在自展百分比分析中,经过 1000 次重复抽样计算,获得的最大简约树的一致性指数(CI)为 0.833333、保持指数(RI) 0.878571、重复尺度一致性指数 0.732143。用邻接法经过 1000 次重复抽样计算,同样获得 50% 多数原则一致树(图 1)。

ITS 系统树表明,实验所研究的甘蔗亚族芒属和荻属的种类形成一个单系类群(monophyletic group),这一结果得到了 82% (NJ) 和 100% (MP) 的自展数据值的支持(图 1,图 2),两属之间的 ITS 序列只相差 3 个 bp。在这个类群中,芒属 *Miscanthus* 聚为次一级的分支,具有 100% (MP) 和 79% (NJ) 的支持率,荻属 *Triarrhena* 也聚为次一级的分支,具有 82% (NJ) 和 89% (MP) 的支持率;芒属中的芒与五节芒的形态特征差异较明显,但 ITS 碱基分异却较小。陈守良、刘亮等^[1-6]划分荻和南荻两个种所依据的形态差异是前者的秆高为 50 ~ 250 cm,秆直径 3.5 ~ 10 mm,总状花序数 5 ~ 20,花药长 2.5 ~ 3 mm,而后者秆高为 300 ~ 700 cm,秆直径 10 ~ 20 mm,总状花序数 20 ~ 40,花药长 1.5 ~ 2 mm。荻和南荻的划分也并未得到 ITS 序列分析的有力支持。ITS 序列分析的结果还表明白茅 *I. cylindrica* 与斑茅 *S. arundinaceum* 聚在一起并构成姐妹群,获得了 79% (NJ) 和 100% (MP) 的自展数据支持率,说明这两者之间亲缘关系较近;白茅属 *Imperata* 与荻属 *Triarrhena* 的关系较远,芒属和荻属的

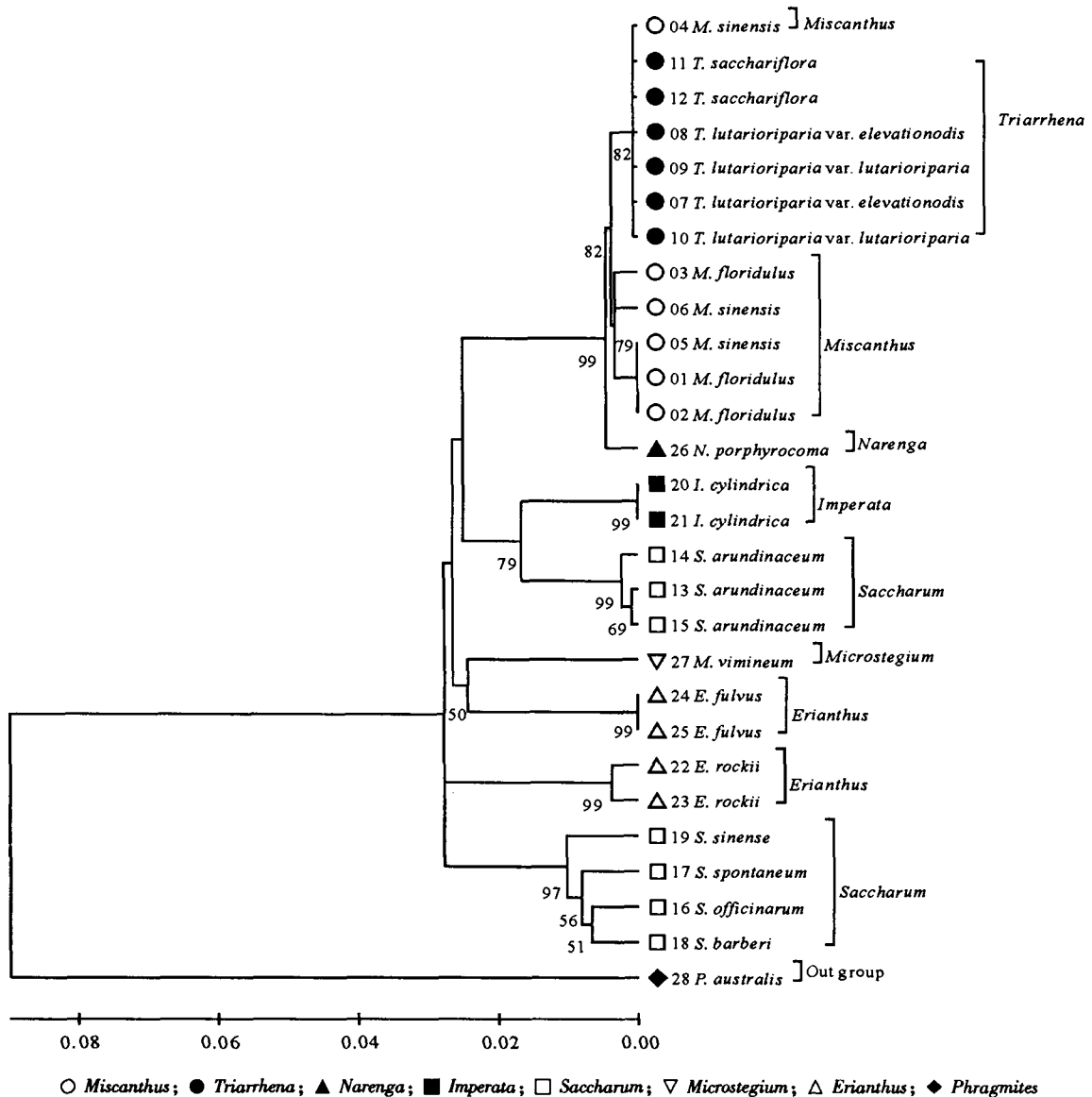


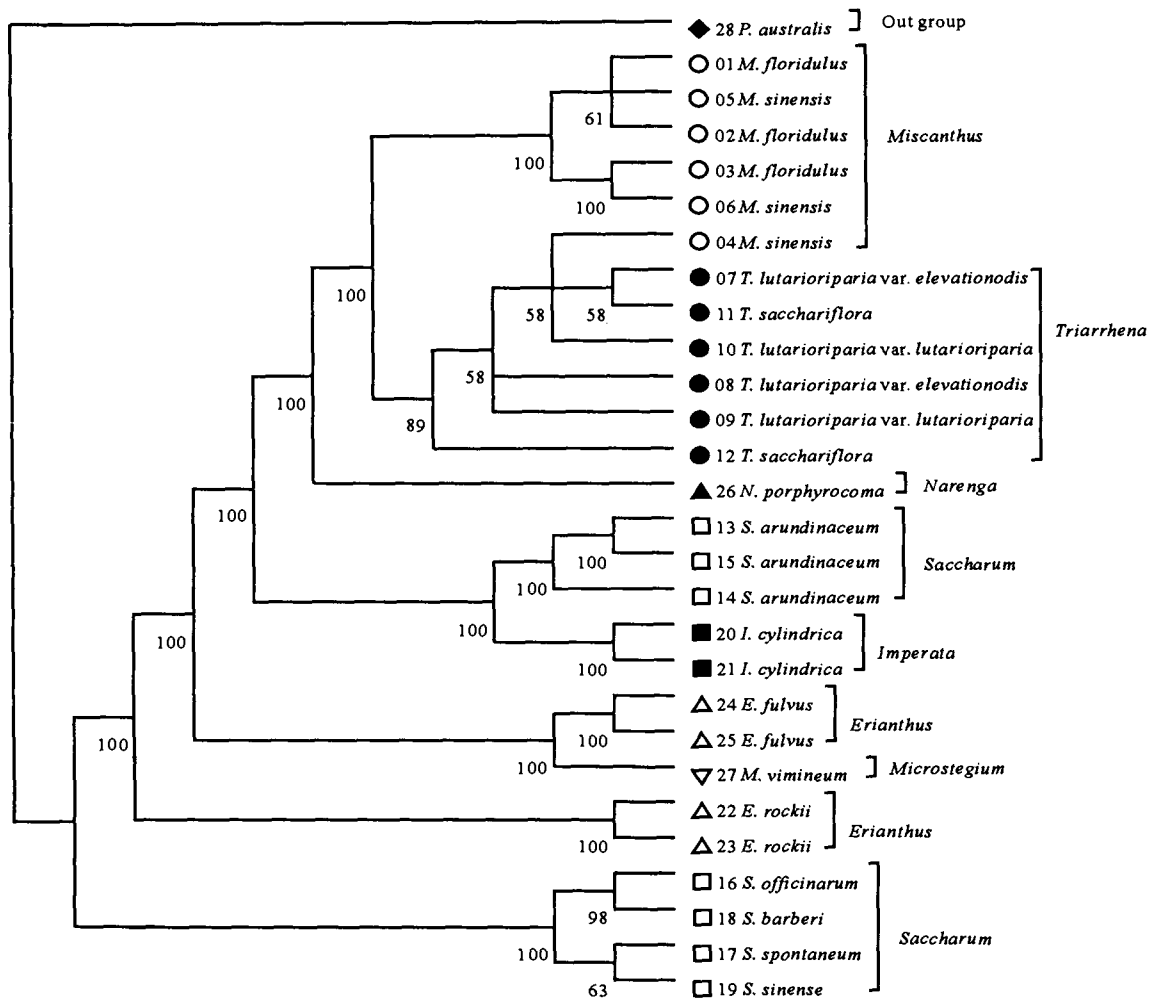
图 1 以芦苇 (*Phragmites australis*) 为外类群, 基于荻属及其近缘属种的 ITS 区序列共建的 NJ 树 (分支上的数字是 1000 次自展的数据支持率)

Fig. 1 The Neighbor-Joining tree based on *Triarrhena* and related species of ITS sequences analysis with *P. australis* as outgroup (Numbers above the branches are bootstrap values (%) of 1000 replications)

染色体基数都为 $x = 19$, 而白茅属 *Imperata* 的染色体基数为 $x = 10$ ^[25]。因此, 本研究认为荻属 *Triarrhena* 归并到芒属 *Miscanthus* 更为合理, 不支持荻置于白茅属 *Imperata* 或另立一属的观点。

甘蔗属 *Saccharum*、蔗茅属 *Erianthus* 和河八王属 *Narenga* 植物形态相近, 是亲缘关系很近的一群, 三个属的界限不清楚, 蔗茅属 *Erianthus* 和河八王属 *Narenga* 有归在甘蔗属 *Saccharum* 的, 也有独立为属的, 在野生情况下这些植物能互相杂交, 可能组成一个复合体, Mukherjee 称之为“甘蔗属 *Saccharum* 复合体”, 这些植物是甘蔗育种的好材料, 同时, 也是分

类上混乱的部分^[26]。国外甘蔗界学者认为斑茅是蔗茅属的一个种 *E. arundinaceus*^[19, 27], 国内, 根据 1997 年出版的中国植物志, 斑茅则被归在甘蔗属中 *S. arundinaceum*。陈严平等^[28]通过甘蔗属及近缘属 8 种植物叶片下表皮的解剖研究发现, 斑茅的叶下表皮肋区无刺细胞, 肋区和肋间区都有大量的栓细胞, 与甘蔗属的甘蔗、甜根子草和蔗茅属的蔗茅均有明显差别, 认为把斑茅从甘蔗属中划出是比较合理的。张云武等^[13]对甘蔗属及其近缘属种的部分 *rbcl* 基因片段 (1137 bp) 进行了测序比较, 认为斑茅不应列入甘蔗属或蔗茅属, 而应独立为一属。陈辉



○ *Miscanthus*; ● *Triarrhena*; ▲ *Narenga*; ■ *Imperata*; □ *Saccharum*; ▽ *Microstegium*; △ *Erianthus*; ◆ *Phragmites*

图2 以芦苇(*Phragmites australis*)为外类群,基于荻属及其近缘属种的 ITS 区序列建立的 MP 树
(数字代表各分支的自展 1000 次的支持率)

Fig. 2 The single most parsimonious tree of *Triarrhena* and related species based on ITS regions (length 531, $CI = 0.833333$, $RI = 0.878571$). Gaps were treated as missing data. Values above braches are bootstrap supports (%) for the clades

等^[19]对甘蔗属及其近缘属种的 ITS 序列分析认为斑茅不属于甘蔗属 *Saccharum*。蔡青等^[29]用 AFLP 分子标记技术,对“甘蔗属复合体”的材料研究认为斑茅应列入蔗茅属。本文的 ITS 序列分析结果也显示:甘蔗属的竹蔗 *S. sinense*、甘蔗 *S. officinarum*、细秆甘蔗 *S. barberi* 和甜根子草 *S. spontaneum* 的 4 个种聚为一个分支,获得 97% (NJ) 和 100% (MP) 的有力支持;而来源于 3 个不同产地的斑茅 *S. arundinaceum* 聚在一起,然后与白茅构成为姐妹群,斑茅 *S. arundinaceum* 与河八王属河八王 *N. porphyrocoma* 及蔗茅属蔗茅 *E. fulvus* 也较近,有着较为亲近的系统发育关系,但斑茅与蔗茅属滇蔗茅及甘蔗属其它 4 个种的亲缘关系较远。甘蔗属、河八王属及蔗茅属

关系复杂,其系统关系是一个很值得深入探讨的问题,需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Chen S L (陈守良), Liu L (刘亮), Sun B X (孙必兴). *Flora Reipublicae Popularis Sinicae Tomous [M].* Beijing: Science Press, 1997. 10 (2): 4 - 55 (in Chinese).
- [2] Benth G. Notes on Gramineae [J]. *J Linn Soc Bot*, 1881, 19: 14 - 135.
- [3] Hackel E. Gramineae [A]. In: Engler A. Prantle K eds. *Die Natürlichen Pflanzenfamilien II (2) [M].* Leipzig: Verlag von Wilhelm Engelmann, 1887. 1 - 97.
- [4] Geng Y L (耿以礼). *Flora Illustralis Plantarum Primarum Sinarum (Gramineae) [M].* Beijing: Science Press, 1959. 748 - 784 (in Chinese).

- [5] 谢成章,张友德,徐冠军. 荻和芦的生物学[M]. 北京:科学出版社,1993. 14-20.
- [6] Chen S L (陈守良), Renvoize S A. A new species and a new combination of *Miscanthus* (Poaceae) from China[J]. *Kew Bulletin*, 2005, **60**(4): 605-607.
- [7] Chen S L (陈守良), Renvoize S A. In: Wu Z Y, Raven P H, Hong D Y eds. *Flora of China* (Vol. 22) [M]. Beijing: Science Press and St Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2006. 581-583.
- [8] Clayton W D, Renvoize S A. Genera *Graminum*: Grasses of the world[J]. *Kew Bull*, 1986, Addit. Ser. **13**: 328-338.
- [9] Heinz K J. Report of the Standing Committee on Germplasm and Breeding[A]. In: Proc of the XVII Congress of the ISSCT[C]. Philippines, 1980. LIV-LVI.
- [10] Liao Z Z (廖兆周), Tang M D (唐明德), Jin Y F (金玉峰). Peroxidase isozymes of *Saccharum*, *Arundinaceum* and their hybrids[J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1988, **30**: 214-219 (in Chinese).
- [11] Daniels J, Roach B T. A taxonomic listing of *Saccharum* related genera[J]. *Sugar Cane*, 1997, Spring Suppl: 16-22.
- [12] Hodkinson T R, Renvoize S A, Ni Chonghaile G, Stapleton C, Chase M W. A comparison of ITS nuclear rDNA sequence data and AFLP markers for phylogenetic studies in *Phyllostachys* (Bambusoideae, Poaceae) [J]. *J Plant Res*, 2000, **113**: 259-269.
- [13] Zhang Y W (张云武), Long H S (龙火生), Fang Y H (范源洪), Yao Y G (姚永刚), Cai Q (蔡青), Zhang Y P (张亚平). Sequence variation of *rbcL* gene and evolution of *Saccharum* and related species [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 2002, **24**(1): 29-36 (in Chinese).
- [14] Baldwin B G. Nuclear ribosomal DNA phylogenetics of the *Tareeds* (Madiinae: Asteraceae) [J]. *Amer J Bot*, 1991, **78**: 165-166.
- [15] Baldwin B G. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae [J]. *Mol Phylogent Evol*, 1992(1): 3-16.
- [16] Shi S H (施苏华), Huang Y L (黄椰林), Zhang Q (章群), Jin H (金虹), Tan F X (谈凤笑), Zhang H D (张宏达). Analysis of ITS sequences of nuclear ribosomal DNA from *Tetrathyrum* (Hamamelidaceae) and the related genera and the phylogenetic significance [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 1999, **21**: 87-95 (in Chinese).
- [17] Hong Y P (洪亚平), Chen Z D (陈之端), Lu A M (路安民). Phylogeny of the tribe Menispermaceae (Menispermaceae) reconstructed by ITS sequence data [J]. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), 2001, **39**(2): 97-104 (in Chinese).
- [18] Hodkinson T R, Chase M W, Takahashi C, Leitch I J, Bennett M D, Renvoize S A. The use of DNA sequencing (ITS and *trnL-F*), AFLP and fluorescent *in-situ* hybridisation to study allopolyploid *Miscanthus* (Poaceae) [J]. *Am J Bot*, 2002, **89**: 279-286.
- [19] Chen H (陈辉), Fan Y H (范源洪), Xian Yu J G (向余劲攻), Cai Q (蔡青), Zhang Y P (张亚平). Phylogenetic relationships of *Saccharum* and related species inferred from sequence analysis of the nrDNA ITS region [J]. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2003, **29**(3): 379-385 (in Chinese).
- [20] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material [J]. *Phytochem Bull*, 1987, **19**: 11-15.
- [21] Cai L B (蔡联炳), Guo Y P (郭延平). Studies on constituent cells of leaf epidermis systematics and phylogenetic path of the family Poaceae [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), 1995, **15**(4): 323-335 (in Chinese).
- [22] Cai L B (蔡联炳), Guo Y P (郭延平). Studies on constituent cells of leaf epidermis systematics and phylogenetic path of the family Poaceae [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), 1996, **16**(1): 65-72 (in Chinese).
- [23] Han J G (韩建国), Fan F C (樊奋成), Li F (李枫). Origin, evolution and distribution of the Graminae [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 1996, **13**(1): 9-13 (in Chinese).
- [24] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, Nei M. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis [J]. Version 2.1. *Bioinformatics*, 2001, **17**: 1244-1245.
- [25] Adati S, Shiotani I. The cytotoxonomy of the genus *Miscanthus* and its phylogenetic status [J]. *Bull Fac Agric Mie Univ*, 1962, **25**: 1-14.
- [26] Mukherjee S K. Origin and distribution of *Saccharum* [J]. *Bot Gaz*, 1957, **119**: 55-61.
- [27] Zhou Y H (周耀辉). Study on the position of arundinaceae [J]. *Sugar Cane* (甘蔗糖业), 1989, **6**: 4-6 (in Chinese).
- [28] Chen Y P (陈严平), Li R C (李荣春), Li X (李信), Zhang Y H (张跃华), Yang S Q (杨世清), He L L (何丽莲). Study on the anatomic structure of leaf hypodermis of *Saccharum* and its related plants [J]. *J Yunnan Agr Univ* (云南农业大学学报) 2000, **15**(2): 93-96 (in Chinese).
- [29] Cai Q (蔡青), Fan Y H (范源洪), Aitken K. Assessment of the phylogenetic relationships within the "*Saccharum* Complex" using AFLP markers [J]. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2005, **31**(15): 551-559 (in Chinese).