

紫乌头复合体 nrDNA 的 ITS 序列与系统发育分析

¹张富民 ¹葛颂* ²陈文俐

¹(中国科学院植物研究所系统与进化植物学重点实验室 北京 100093)

²(中国科学院植物研究所 北京 100093)

Phylogeny of the *Aconitum delavayi* complex (Ranunculaceae) based on evidence from nuclear ribosomal ITS sequences

¹ZHANG Fu-Min ¹GE Song* ²CHEN Wen-Li

¹(Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

²Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract Internal transcribed spacer (ITS) sequences of nuclear ribosomal DNA (nr DNA) were used to investigate the phylogeny of the *Aconitum delavayi* complex that was found mainly in Hengduan Mountains, SW China. Based on maximum parsimony and neighbor-joining analyses, we reconstructed the phylogenetic relationships of 27 taxa of *Aconitum* including 8 taxa of the *A. delavayi* complex. The two methods generated similar ITS trees, which showed that ser. *Volubilia* could not be a monophyletic group and that ser. *Stylosa* could hardly be distinguished from ser. *Ambigua*. Such results indicate that the present serial delimitation of the subgenus *Aconitum* made by Wang in Flora Reipublicae Popularis Sinicae is problematic. The close phylogenetic relationships among some species endemic to the Hengduan Mountains in NW Yunnan may be attributed to the recent speciation events of *Aconitum* species in this area. The *Aconitum delavayi* complex that mainly occurs in the Hengduan Mountains is separated into three clades in the ITS trees, implying that the complex is not a natural lineage in terms of genetic relationships. Of the three clades, the one including *A. episcopale* is quite distinct from the clade consisting of *A. delavayi*, *A. tuguanense*, *A. stapfianum* and *A. vilmorinianum*, although they are all mainly distributed in NW Yunnan and there is a high degree of morphological similarity among them. Another clade includes *A. campylorhynchum* and *A. sungpanense* from NW Sichuan, NE Chongqing and Shaanxi. Consequently, the *A. delavayi* complex is not a monophyletic group and may have originated from three different lineages.

Key words *Aconitum*, *A. delavayi* complex, Hengduan Mountains, nuclear ribosomal ITS sequences, phylogeny.

摘要 对乌头属 *Aconitum* L. 27 个类群的 nrDNA ITS 序列进行了简约法与邻接法分析,两种方法得到的系统发育树基本一致。乌头亚属 subgen. *Aconitum* 的蔓乌头系 ser. *Volubilia* 不是一个单系类群,显柱乌头系 ser. *Stylosa* 与兴安乌头系 ser. *Ambigua* 各自作为单系类群也没有得到支持。特产于云南西北部横断山区的一些种之间存在非常近的系统发育关系,说明这些种可能是近期物种形成的产物。紫乌头 *A. delavayi* 复合体的不同类群在系统发育树上位于不同的分支中。含西南乌头 *A. episcopale* 的分支最为独特,处于系统发育树靠近基部的位罝。松潘乌头 *A. sungpanense* 与弯喙乌头 *A. campylorhynchum* 组成一个分支;另一个分支含土官村乌头 *A. tuguanense*、紫乌头 *A. delavayi*、玉龙乌头 *A. stapfianum* 与黄草

2003-01-21 收稿,2003-04-04 收修改稿。

基金项目:国家自然科学基金(30070057)和中国科学院 KSCXZ-SW-101A 项目支持(Supported by the National Natural Science Foundation of China(Grant No. 30070057) and the Chinese Academy of Sciences(KSCXZ-SW-101A))

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: <gesong@ns. ibcas. ac. cn > .)

乌头 *A. vilmorinianum*。上述结果表明,紫乌头 *A. delavayi* 复合体不是一个单系类群,可能经历了 3 次不同的起源。

关键词 乌头属;紫乌头复合体;横断山区;nrDNA ITS 序列;系统发育

乌头属 *Aconitum* L. 是毛茛科中的大属,全世界约 400 种,分布于欧亚和北美大陆的温带地区(王文采,1979;Kadota,1987)。根据地下部分的特征,该属植物被划分为 3 个亚属(王文采,1979;Tamura,1990),即牛扁亚属 subgen. *Lycocotnum* Peterm., 乌头亚属 subgen. *Aconitum* 和露蕊乌头亚属 subgen. *Gymnaconitum* (Stapf) Rapaics。乌头亚属中乌头组在我国有 11 个系,其中的蔓乌头系 ser. *Volubilia* 为藤本类型,分布于东亚,绝大多数特产于我国(王文采,1979)。在该系中,包括黄草乌 *A. vilmorinianum* Kom、紫乌头 *A. delavayi* Franch., 西南乌头 *A. episcopale* Lévl., 弯喙乌头 *A. campylorrhynchum* Hand.-Mazz., 土官村乌头 *A. tuguanconense* Q. E. Yang, 玉龙乌头 *A. stapfianum* Hand.-Mazz. 和松潘乌头 *A. sungpanense* Hand.-Mazz. 在内的 7 个二倍体种主要分布于横断山区,均为叶全裂的藤本类型,形态非常相近,部分种之间存在中间类型,呈现极为复杂的水平替代和分布区重叠(杨亲二,1999)。这些种可能组成一个复合体,本文称之为紫乌头 *A. delavayi* 复合体,是分类学中很难处理的类群。这种形态性状上的重叠和地理上的替代可能也是导致乌头亚属中系的划分不太自然的主要原因(杨亲二,1999)。

乌头属最重要的分布和分化中心为我国西南部的横断山区,据记载有 104 种、37 变种(李良干,1988,1993),并且大多数为该地区特有种。一般认为横断山区丰富的特有植物多为新近起源的类群,即新特有和替代现象十分明显,植物区系较为年轻(应俊生,张玉龙,1994)。因此,乌头属物种,尤其是主要分布于横断山区的物种,在分类上的困难可能和该地区特殊的地质历史和植物物种形成方式有关(Wu,1988)。

由于 nrDNA 的 ITS 区域具较多的碱基变异信息,在长度上具较好的保守性,因而近十几年来被广泛地用于植物属间与种间系统关系的研究(Baldwin et al.,1995)。虽然 nrDNA 的 ITS 区属于具串联结构与高拷贝数的 nrDNA 多基因家族,但由于该基因家族经历了快速的一致性进化(concerted evolution)(Li & Graur,1991;Baldwin,1992)而且这种一致性进化既发生在同一位点内也发生在不同位点间(Hillis et al.,1991),从而能够被有效地用于近缘类群的系统发育关系研究(Sang et al.,1995;Soltis et al.,1996;葛颂等,1997;Francisco-Ortega et al.,2002 等)。Kita 和 It(2000)利用 ITS 序列对产于东亚的乌头亚属一些二倍体种与四倍体种进行了系统发育分析。Utelli 等(2000)为了解释产于欧洲的黄花牛扁 *A. lycocotnum* 复合体的系统关系,测定了产于欧洲与高加索山脉的所有牛扁亚属的种与产于欧洲的乌头亚属的种的 nrDNA ITS 序列及 cpDNA 的 *psbA-trnH* 序列,并运用简约性方法,进行了系统发育分析。这两项研究显示,ITS 序列数据均为乌头属植物系统发育关系研究提供了有意义的信息。

本文试图通过利用 nrDNA 的 ITS 序列对乌头属紫乌头复合体及其近缘的蔓乌头系 ser. *Volubilia*、显柱乌头系 ser. *Stylosa* 与兴安乌头系 ser. *Ambigua* 植物进行系统发育分析,研究该复合体的起源以及与近缘类群的系统发育关系,同时对蔓乌头系、显柱乌头系与兴安乌头系划分的合理性进行探讨。

1 材料和方法

1.1 材料来源

本研究共涉及 27 个类群。其中 5 个欧洲乌头属植物的 ITS 序列从 GenBank 下载 2 个蔓乌头系 ser. *Volublia* 的叶片材料采自标本。乌头亚属 25 个类群为 蔓乌头系 13 个类群,包括紫乌头 *A. delawayi* 复合体 9 个类群,显柱乌头系 ser. *Stylosa* 4 个种,兴安乌头系 ser. *Ambigua* 2 个种;乌头系 ser. *Inflata*、短柄乌头系 ser. *Brachypoda*、保山乌头系 ser. *Bullatifolia* 各一种,欧洲 3 种。牛扁亚属 2 个种。除从 GenBank 下载的序列及采自标本的叶片外,其余材料均为保存于硅胶中的干燥叶片。所有用于分析的材料见表 1。

1.2 总 DNA 提取

对采自标本的叶片与硅胶干燥的叶片均使用修改的 Doyle 和 Doyle (1987) 的方法提取总 DNA。

1.3 扩增与测序

使用引物 ITS5、ITS4 (White et al., 1990) 扩增全长 ITS (包括 5.8S) 区域。PCR 反应体系为 25 μ L, 内含 $MgCl_2$ (2 mmol/L), dNTP (0.2 mmol/L), 引物 ITS5、ITS4 (0.2 μ mol/L), 聚合酶 0.75 单位、总 DNA 约 10 ng。扩增程序为: 循环 1 70 $^{\circ}$ C 4 min, 循环 2 94 $^{\circ}$ C 1 min \rightarrow 52 $^{\circ}$ C 20 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 50 s 2 个循环, 循环 3 94 $^{\circ}$ C 20 s \rightarrow 52 $^{\circ}$ C 20 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 50 s 34–38 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 4 min。PCR 产物经用 Pharmacia 系统纯化后, 直接用于测序反应。每个材料的 ITS 序列均用 ITS5 与 ITS4 两个引物分别进行测序反应, 以进行正反链测序。测序反应体系为 10 μ L, 其中 BigDyeMix 1.5 μ L, 引物 1 μ L (5 μ mol/L), 模板 1–2 μ L (约 20 ng 左右)。测序反应程序为 94 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 8 s, 60 $^{\circ}$ C 4.5 min, 25 个循环。序列测定工作在 PE 公司的 ABI Prism 377 DNA 自动测序仪上完成。

1.4 序列分析

序列经用互补链校对后, 参照 GenBank 上 Utelli 等 (2000) 与 Kita 和 Ito (2000) 的序列, 确定非编码的 ITS-1 与 ITS-2 的边界。序列排列 (alignment) 用 Clustal X (Thompson et al., 1997) 初排, 进一步用人工核对排列。对排好的序列, 所有碱基状态以无序 (unorder) 对待, 组成计算矩阵。用运行于 Macintosh 上的 PAUP 4.04b4a (Swofford, 1999) 的简约法 (parsimony) 与邻接法 (neighbor-joining) (Saitou & Nei, 1987) 构建 ITS 树, 进行系统发育分析。在简约法分析中, 所有的空位 (gap) 作缺失 (missing) 处理。

选择牛扁亚属的两个种作为简约法分析中的外类群。这是因为在乌头属 3 个亚属中, 牛扁亚属核型较原始, 形态上与乌头亚属更相似 (李良千, 1988; 杨亲二等, 1994)。用 TBR 分支交换 (Branch swapping) 与随机类群附加 1000 次, 进行完全启发式 (Heuristic) 搜索。为进一步检验搜索到的简约树中各分支的支持度, 用完全的启发式 (Heuristic) 搜索进行 3000 次自展 (bootstrap) 计算。在邻接法分析中, 采用 Kimura 2-参数距离, 构建 ITS 的邻接树, 并进行 1000 次自展计算。

表 1 用于 nrDNA ITS 序列研究的乌头属类群及 GenBank 检索号

Table 1 Taxa of *Aconitum* in this study and their GenBank accession numbers

Subgen. <i>Aconitum</i>	分类群 ¹⁾²⁾ Taxon	采集地 Locality	凭证标本 Voucher	GenBank 检索号 Accession number
(1) ser. <i>Volubilia</i>	<i>A. episcopale</i> Lévl.	云南丽江 Lijiang, Yunnan	孔宏智 (H. Z. Kong) 99034	AY189794
	<i>A. delavayi</i> Franch.	云南大理 Dali, Yunnan	张富民 (F. M. Zhang) 00-017	AY189785
	<i>A. stapfianum</i> Hand.-Mazz.	云南大理 Dali, Yunnan	张富民 (F. M. Zhang) 00-018	AY189786
	<i>A. tuguanuncunense</i> Q. E. Yang	云南中甸 Zhongdian, Yunnan	张富民 (F. M. Zhang) 00-008	AY189782
	<i>A. campylorrhynchum</i> Hand.-Mazz.	四川红原 Hongyuan, Sichuan	张富民 (F. M. Zhang) 00-025	AY189797
	<i>A. sungpanense</i> var. <i>leucanthum</i> W. T. Wang	重庆城口 Chengkou, Chongqing	PE 0917416	AY189796
	<i>A. sungpanense</i> Hand.-Mazz.	陕西佛坪 Foping, Shaanxi	孔宏智 (H. Z. Kong) k1001	AY189795
	<i>A. vilmorinianum</i> Kom	云南昆明 Kunming, Yunnan	张富民 (F. M. Zhang) 00-023	AY189787
	<i>A. cannabifolium</i> Franch. ex Finet et Gagnep.	安徽潜山 Qianshan, Anhui	PE 1391652	AY189801
	<i>A. hemsleyanum</i> Pritz.	云南大理 Dali, Yunnan	孔宏智 (H. Z. Kong) 99039	AY189793
	<i>A. contortum</i> Finet et Gagnep.	云南大理 Dali, Yunnan	张富民 (F. M. Zhang) 00-019	AY189788
	<i>A. volubile</i> Pall.	吉林长白山 Changbaishan, Jilin	葛颂 (S. Ge) GS004	AY189802
	<i>A. tsaii</i> W. T. Wang	云南福贡 Fugong, Yunnan	张富民 (F. M. Zhang) 00-014	AY189784
(2) ser. <i>Stylosa</i>	<i>A. forrestii</i> Stapf	云南丽江 Lijiang, Yunnan	张富民 (F. M. Zhang) 00-009	AY189783
	<i>A. transectum</i> Diels	云南丽江 Lijiang, Yunnan	张富民 (F. M. Zhang) 00-011	AY189791
	<i>A. georgei</i> Comber	云南丽江 Lijiang, Yunnan	张富民 (F. M. Zhang) 00-012	AY189792
	<i>A. bulleyanum</i> Diels	云南鹤庆 Heqing, Yunnan	张富民 (F. M. Zhang) 00-016	AY189798
(3) ser. <i>Ambigua</i>	<i>A. piepunense</i> Hand.-Mazz.	云南中甸 Zhongdian, Yunnan	张富民 (F. M. Zhang) 00-001	AY189800
	<i>A. fengii</i> W. T. Wang	云南中甸 Zhongdian, Yunnan	张富民 (F. M. Zhang) 00-003	AY189799
(4) ser. <i>Inflata</i>	<i>A. monanthum</i> Nakai	吉林长白山 Changbaishan, Jilin	葛颂 (S. Ge) GS008	AY189803
(5) ser. <i>Brachypoda</i>	<i>A. brachypodum</i> Diels	云南丽江 Lijiang, Yunnan	张富民 (F. M. Zhang) 00-007	AY189789
(6) ser. <i>Bullatifolia</i>	<i>A. nagarum</i> Stapf	云南福贡 Fugong, Yunnan	张富民 (F. M. Zhang) 00-015	AY189790
Unknown	<i>A. variegatum</i> L.	欧洲 Europe	GenBank	AF216549
Unknown	<i>A. napellus</i> L.	欧洲 Europe	GenBank	AF216544
Unknown	<i>A. anthora</i> L.	欧洲 Europe	GenBank	AF216547
Subgen. <i>Lycotunum</i>	<i>A. lycotunum</i> L.	欧洲 Europe	GenBank	AF216537
	<i>A. septentrionale</i> Koelle	欧洲 Europe	GenBank	AF216555

1) 乌头亚属系的划分采用王文采(1979)的系统。The serial division of subgenus *Aconitum* follows Wang's system(1979).2) 黑体印刷的分类群属于紫乌头 *A. delavayi* 复合体。The taxa printed in bold belong to the *A. delavayi* complex.

2 观察结果

ITS 区域(包括 ITS-1 和 5.8S ITS-2)的长度在本研究的材料中变化很小,最长 631 bp,最短 627 bp。具体序列的情况见表 2。ITS-1 区域的长度变化大于 ITS-2 区域。排好的 ITS 区域全长 634 bp。其中,519 个位点碱基一致,44 个变异的碱基位点无简约性信息,信息位点为 71 个。

表 2 27 个乌头属植物类群的 nrDNA ITS 与 5.8S 区域的序列分析

Table 2 Sequence analyses on nrDNA ITS and 5.8S regions of 27 taxa of *Aconitum*

	ITS-1		5.8S		ITS-2	
	长度 Length	GC 含量 %(G + C)	长度 Length	GC 含量 %(G + C)	长度 Length	GC 含量 %(G + C)
最长 Maximum	251	62.6	164	45.7	216	64.8
最短 Minimum	247	59.4	164	45.7	214	62.1
平均 Mean	249.60	61.34	164	45.7	215.64	63.67
标准差 Standard error	0.796	0.720	0	0	0.581	0.719

简约法分析中,共发现 9 个同等最简约树,树长均为 151,一致性指数(CI)为 0.828,保持性指数(RI)为 0.840。这 9 个树的严格一致树见图 1。

从自展的检验结果看,虽然总的来说各分支(clade)的支持度不算高,但在严格一致树上,本研究涉及的几个系均不是单系类群。蔓乌头系的近裔性在简约树上没有得到体现。该系藤本类乌头出现在不同的分支里,从较基部到较顶部的分支里都有该系的类群。显柱乌头系与兴安乌头系的划分也没有得到支持,这两个系的类群出现在同一分支里,但各自都没有显示出各系独自的近裔特征。在自展支持度较高(81%)的分支 A 中(图 1)包含来自蔓乌头系、显柱乌头系以及兴安乌头系的类群。并且在此分支中,除了黄草乌主要采自横断山区边缘的昆明外,其余全部产于云南西北部的横断山区,且基本为本地区特有种。

由分支图还可见,紫乌头 *A. delavayi* 复合体分散在 3 个不同的分支中,其中西南乌头最为独特,处于系统发育树基部位置;四川红原的弯喙乌头、陕西佛坪松潘乌头与重庆城口的白花松潘乌头 *A. sungpanense* var. *leucanthum* 处于同一分支,其余的处于分支 A 中(见图 1)。

邻接法分析的结果与简约性分析类似(图 2),各分支自展支持度略高于简约树,蔓乌头系同样分散在不同的分支里,而显柱乌头系与兴安乌头系的类群虽仍处在同一较大的分支中,但这两个系的类群不仅未独自形成分支,而且相互或与部分蔓乌头系的类群交错在一起。在邻接树上,分枝 A 的情况与简约树类似。邻接树上的紫乌头复合体类群仍然分散在三个不同的分支中,但紫乌头与玉龙乌头的姐妹群关系得到很高的支持。

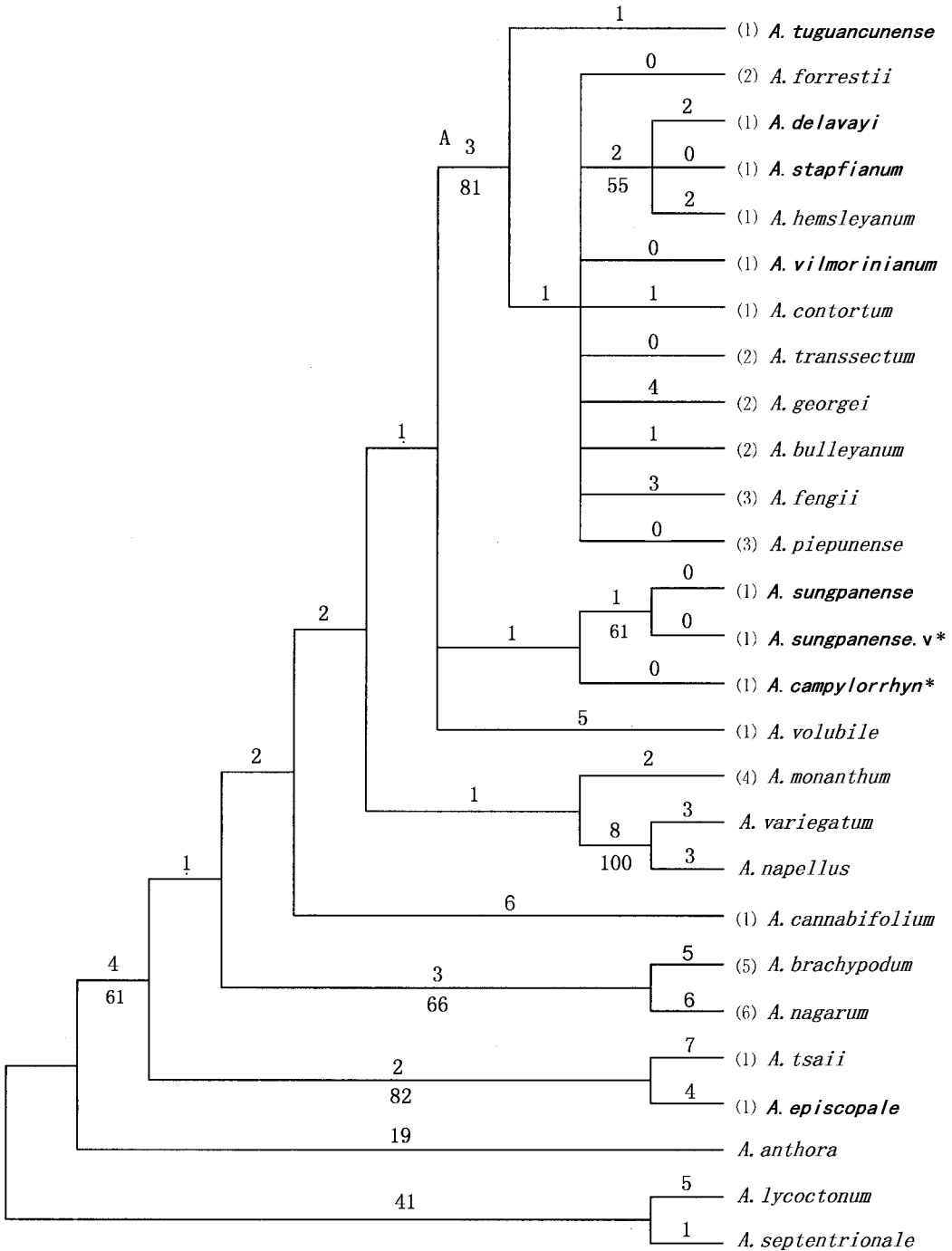


图 1 ITS 序列数据 9 个同等最简约树的严格性一致树(分支下的数字为自展百分比,分支上的数字为分支长度)

Fig. 1. The strict consensus tree generated from nine equally-parsimonious trees found by a heuristic search based on the nrDNA ITS sequences. Numerals above branches indicate the number of nucleotide changes supporting each branch. Numerals immediately below indicate the percentage of times that the branch was recovered in 3000 bootstrap replicates. (1) ser. *Volubilia*, including the *A. delavayi* complex printed in bold. (2) ser. *Stylosa*. (3) ser. *Ambigua*. (4) ser. *Inflata*. (5) ser. *Brachypoda*. (6) ser. *Bullatifolia*. * *A. sungpanense*. v = *A. sungpanense* var. *leucanthum*, *A. campylorrhyn* = *A. campylorrhynchum*.

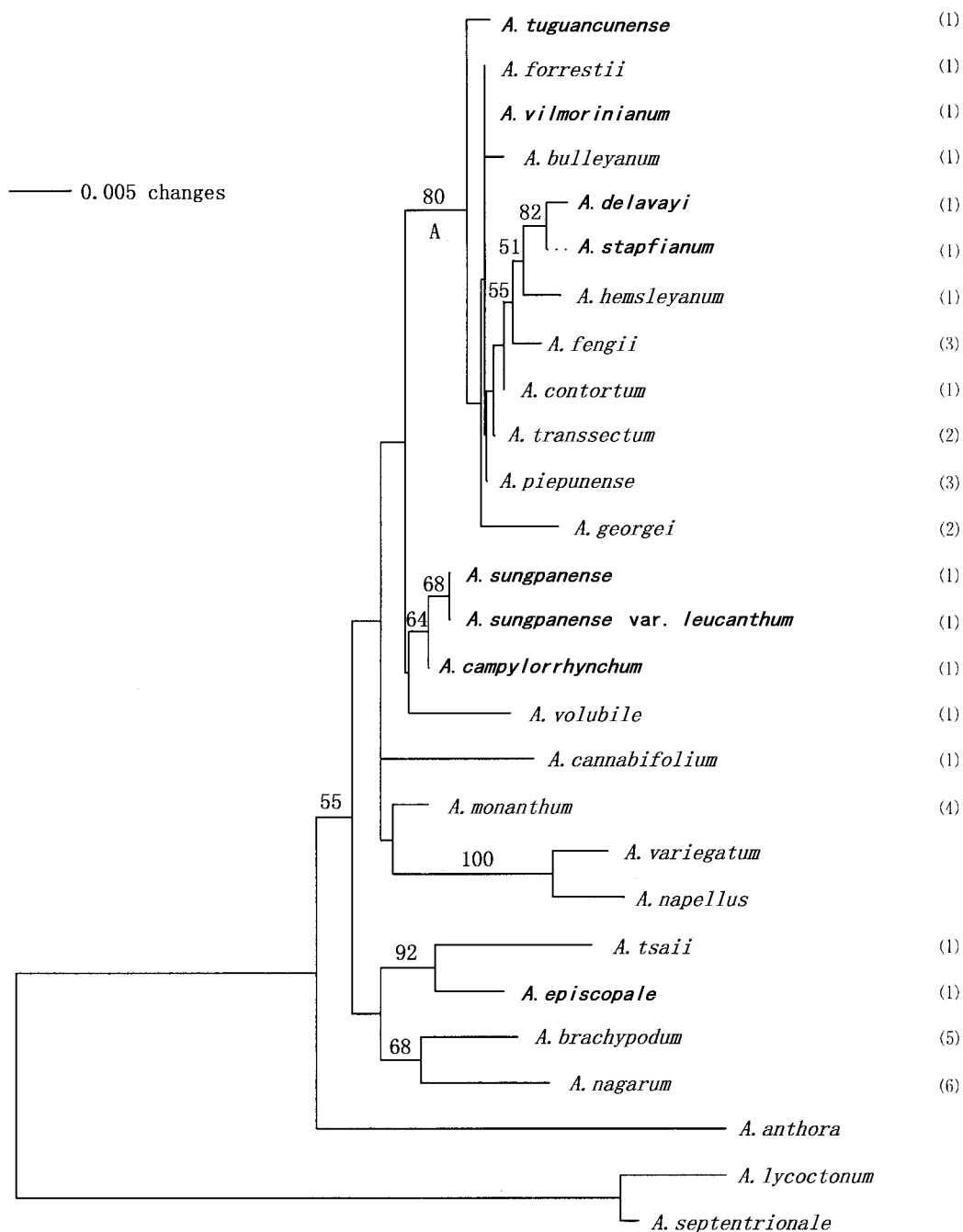


图2 根据 ITS 序列数据用 Kimura 2-参数距离计算出的邻接树(分支上的数字为自展百分比)

Fig. 2. The neighbor-joining tree using Kimura's two-parameter distances based on the nrDNA ITS sequences. Numerals on the branches indicate percentage support in 1000 bootstrap replicates. (1) ser. *Volubilia*, including the *A. delavayi* complex printed in bold. (2) ser. *Stylosa*. (3) ser. *Ambigua*. (4) ser. *Inflata*. (5) ser. *Brachypoda*. (6) ser. *Bullatifolia*.

3 讨论

从 Kita 和 Ito (2000) 与 Utelli 等 (2000) 及本研究的结果来看,就研究乌头属种一级的系统发育关系而言,*nrDNA* ITS 的分辨率不高。但针对本研究的问题,*nrDNA* ITS 的结果清楚表明,蔓乌头系 *ser. Volubilia* 不是一个单系类群。显柱乌头系 *ser. Stylosa* 与兴安乌头系 *ser. Ambigua* 的单系起源也没有得到支持。ITS 序列的简约性分析,基本没有提供主要分布于横断山区的显柱乌头系 *ser. Stylosa* 与兴安乌头系 *ser. Ambigua* 的系统发育信息,而且在邻接树上,显柱乌头系 *ser. Stylosa*、兴安乌头系 *ser. Ambigua* 与蔓乌头系 *ser. Volubilia* 的部分类群交错在一起。以上说明乌头亚属中系的划分是有问题的,并且杨亲二 (1999) 根据对一些藤本类群的研究也认为乌头亚属内系的划分可能不太自然。

有证据表明,类群分化的时间与分子序列的趋异存在广泛的联系 (Baldwin, 1992; Utelli et al., 2000)。事实上,如果分子序列的趋异完全是在祖先种被基因流阻隔成不同的后裔后通过突变产生的,则可推测出祖先种分裂或后裔种开始积累遗传趋异的时间 (Baldwin, 1992)。本研究分支图中多歧结构分支 A 中的类群,分属 3 个不同的系,形态差别明显,几乎完全特产于云南西北部的横断山区。考虑到横断山区特殊的伴随青藏高原隆起而高度变化的环境,及青藏高原较短的抬升历史 (张荣祖等, 1997), 可以推测分支 A 中的类群很可能是近期物种形成 (recent speciation) 的结果,其形态上的明显差异很可能是对环境急剧变化的一种适应,但这些类群起源时间较晚,从而没有积累足够的 ITS 序列突变。

紫乌头 *A. delavayi* 复合体也不是一个单系类群,可能有 3 个不同的起源。其中,西南乌头 *A. episcopale* 尤显突出,与本复合体其他的类群之间系统关系较远。它与紫乌头 *A. delavayi* 之间形态上的相似,可能是趋同进化造成的 (Zhang et al., 2003)。除了西南乌头 *A. episcopale* 外,紫乌头 *A. delavayi* 复合体明显地处在两个与地理分布相关的分支内,一个处于云南西北部的横断山区核心地区,一个处于四川北部及横断山区边缘地区。

研究结果同时还显示,横断山区分布的乌头亚属植物既出现在简约树的顶部,如分支 A,也出现在基部,如由 *A. episcopale* 与 *A. tsaii* 组成的分支。这从一定程度上支持中国-喜马拉雅植物亚区不仅是乌头属植物原始类群的保存中心,而且是活跃的分化中心的观点 (李良千, 1988)。

致谢 杨亲二教授对本研究材料的鉴定、结果与讨论和论文的修改都给予了帮助,孔宏智博士帮助采集部分研究材料,罗艳博士提出许多宝贵建议,特此表示衷心感谢。

参 考 文 献

- Baldwin B G, Sanderson M J, Porter J M, 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.
- Baldwin B G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1: 3 - 16.
- Doyle J J, Doyle J L. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 9: 11 - 15.
- Francisco-Ortega J, Fuertes-Aguilar J, Kim S-C, Santos-Guerra A, Crawford D J, Jansen R K. 2002. Phylogeny of

- the macaronesian endemic *Crambe* section *Dendrocrambe* (Brassicaceae) based on internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany* 89: 1984 – 1990.
- Ge S (葛颂), Schaal B A, Hong D-Y (洪德元). 1997. A revelation of the status of *A. lobophylla* based on ITS sequence, with reference to the utility of ITS sequence in *Adenophora*. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报) 35: 385 – 395.
- Hillis D M, Moritz C, Porter C A, Baker R J. 1991. Evidence for biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA. *Science* 251: 308 – 310.
- Kadota Y. 1987. A revision of *Aconitum* subgenus *Aconitum* (Ranunculaceae) of East Asia. Utsunomiya: Sanwa Shoyaku Company, Ltd.
- Kita Y, Ito M. 2000. Nuclear ribosomal ITS sequences and phylogeny in East Asian *Aconitum* subgenus *Aconitum* (Ranunculaceae), with special reference to extensive polymorphism in individual plants. *Plant Systematics and Evolution* 225: 1 – 13.
- Li L-Q (李良千). 1988. On distributional features of the genus *Aconitum* in Sino-Himalayan flora. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报) 26: 189 – 204.
- Li L-Q (李良千). 1993. *Aconitum*. In: Wang W-T (王文采) ed. *Vascular Plants in Hengduan Mountains*. Beijing: Science Press. 447 – 474.
- Li W H, Graur D. 1991. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406 – 425.
- Sang T, Crawford D J, Stuessy T F. 1995. Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: Implications for biogeography and concerted evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 6813 – 6817.
- Soltis D E, Johnson L A, Looney C. 1996. Discordance between ITS and chloroplast topologies in the *Boykinia* group (Saxifragaceae). *Systematic Botany* 21: 169 – 185.
- Swofford D L. 1999. PAUP*. *Phylogenetic analysis using parsimony* (*, and other methods). Version 4. Sunderland: Sinauer Associates.
- Tamura M. 1990. A new classification of the family Ranunculaceae 1. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 41: 93 – 101.
- Thompson J D, Gibson T J, Plewinak F, Jeanmougin F, Higgins D G. 1997. The Clustal-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876 – 4882.
- Utelli A B, Roy B A, Baltisberger M. 2000. Molecular and morphological analyses of European *Aconitum* species (Ranunculaceae). *Plant Systematics and Evolution* 224: 195 – 212.
- Wang W-T (王文采). 1979. *Aconitum* L. In: *Flora Reipublicae Popularis Sinicae*. Beijing: Science Press. 27: 113 – 362.
- White T J, Bruns T, Lee S, Taylor J W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press. 315 – 322.
- Wu Z Y. 1988. Hengduan Mountain flora and her significance. *The Journal of Japanese Botany* 63: 297 – 311.
- Yang Q-E (杨亲二), Gu Z-J (顾志建), Wu Z-Y (吴征镒). 1994. A karyomorphological study in *Aconitum* subgenus *Lycototum* (Ranunculaceae) from Yunnan. *Acta Botanica Yunnannica* (云南植物研究) 16: 61 – 74.
- Yang Q-E (杨亲二). 1999. Taxonomic notes on some species of *Aconitum* L. (Ranunculaceae) from Yunnan, China. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报) 37: 545 – 590.
- Ying T-S (应俊生), Zhang Y-L (张玉龙). 1994. *The Endemic Genera of Seed Plants of China* (中国种子植物特有属). Beijing: Science Press.
- Zhang F-M, Kong H-Z, Ge S. 2003. Allozyme divergence among populations from the *Aconitum delavayi* complex (Ranunculaceae) in the Hengduan Mountains. *Biochemical Genetics* 41: 47 – 55.
- Zhang R-Z (张荣祖), Zheng D (郑度), Yang Q-Y (杨勤业), Liu Y-H (刘燕华). 1997. *Physical Geography of Hengduan Mountains* (横断山区自然地理). Beijing: Science Press.