



论文

基于芸香科的植物通用 DNA 条形码研究

罗焜^{①②}, 陈士林^{①*}, 陈科力^②, 宋经元^①, 姚辉^①, 马新业^①, 朱英杰^③, 庞晓慧^①, 余华^①, 李西文^{①④}, 刘震^②

① 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193;

② 湖北中医学院药学院, 武汉 430061;

③ 西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031;

④ 清华大学化学系, 北京 100084

* 联系人, E-mail: slchen@implad.ac.cn

收稿日期: 2009-12-12; 接受日期: 2010-01-15

国家国际科技合作项目(批准号: 2007DFA30990)和卫生部卫生行业科研专项基金(批准号: 200802043)资助项目

摘要 植物 DNA 条形码研究是近 10 年来进展最迅速的学科之一, 其通用序列的筛选一直是该领域研究的热点问题. 2009 年, 生命条形码联盟植物工作组推荐 *rbcL*+*matK* 组成复合序列作为植物通用条形码, 但其研究对象中近缘属、种较少, 且物种水平鉴定成功率仅为 72%, 所以仍在进行验证和新序列的研究工作. 本研究选取 nrDNA ITS2 序列, 利用其具有 II 级结构的特性、通过不同物种类型模型判定全长, 将其和目前热点候选序列(*matK*, *rbcL*, *psbA-trnH*, *rpoC1*, *ycf5*)及 nrDNA ITS 序列针对芸香科 72 属 192 种 300 个样本进行比较, 试图在同一科属下更多近缘种存在时, 真实判定候选序列的鉴定能力. 结果表明, 自行设计引物的 ITS2 序列具有较好的 PCR 扩增和测序成功率, 在所考察的候选序列中具有最大的种间变异和较小的种内变异, 且两者存在极显著差异, 同时物种鉴定成功率最高, 各评价指标均优于其他候选序列. 证实 ITS2 序列在单一科属内的“高效性”, 故推荐其作为植物 DNA 条形码通用序列之一.

关键词

DNA 条形码

ITS2

芸香科

鉴定

DNA 条形码(DNA barcoding)由加拿大动物学家 Hebert 等人^[1]首次提出, 即通过使用一段标准 DNA 片段, 对物种进行快速、准确地鉴定, 是近年来发展最迅速的学科之一. Gregory^[2]认为, DNA 条形码的研究将会是全球性的“大科学计划”. Miller^[3]以“DNA 条形码与分类学的文艺复兴”为题发表文章, 认为 DNA 条形码技术将对分类学产生革命性的影响. 2003 年, Hebert 等人^[4]对动物界中共 11 个门 13320 个物种的 *CO1*(cytochrome c oxidase subunit 1)基因序列进行分析, 发现该序列种间变异能较好地地区分除刺胞动物

门以外的物种. 随后的研究中^[5~7], *CO1* 基因被公认为动物界中标准的 DNA 条形码基因. 植物由于在进化历程中容易发生杂交、网状进化等事件, 而且同一基因在不同类群的进化速率可能不同, 导致植物条形码的研究比动物要复杂得多^[8,9]. 近几年提出了一些植物 DNA 条形码候选序列及其组合^[10~12], 但尚未达成一致意见. 2009 年, 生命条形码联盟植物工作组(the plant working group of the consortium for the barcode of life, CBOL)^[13]分析了 550 个物种 907 个样品后, 推荐以 *rbcL*+*matK* 组成的复合序列作为整个植

物界的 DNA 条形码序列, 但其在物种水平的鉴定成功率仅为 72%. Chen 等人^[14]挑选 7 条序列, 分析超过 6000 个样本后, 发现 nrDNA ITS2 序列在各评价指标上优于包括 *rbcL*, *matK* 在内的其他 6 条序列, 且物种水平的鉴定成功率达 92.7%.

理想的条形码序列应具备在大量科属间的“通用性”, 同时应具备在单一科属内大量近缘物种鉴别时的“准确性和高效性”. 尽管已有学者在近缘属、种中开展植物条形码的研究工作^[15~18], 但在被考察序列受关注程度、样本的数目、取样密度及代表性、候选序列的评价指标等方面存在一定局限性.

芸香科植物在世界上有 180 属, 1300~1600 种. 中国有 28 属, 150 种(包括引进栽培种). 该科植物具有较大的经济价值, 其中花椒属(*Zanthoxylum*)、柑橘属(*Citrus*)、黄檗属(*Phellodendron*)、吴茱萸属(*Evodia*) 植物是重要的中草药资源; 柑橘属植物是著名的香料原料; 枳属(*Poncirus*)、金橘属(*Fortunella*)、柑橘属等植物是优良的水果资源; 九里香属(*Murraya*)、酒饼簕属(*Atalantia*)、柑橘属植物是良好的庭院绿化植物. 随着社会的发展, 已有不同行业的科学研究和生产活动针对芸香科植物展开. 正确的物种鉴定是植物研究的基础. 传统的植物鉴定方法依赖于经验丰富的分类学专家通过形态学特征来识别, 但形态特征不能很好解决近缘物种相似性的问题, 又易受地理环境、生物群落等诸多因素的影响. 同时, 形态分类在一定程度上需要依赖分类人员的主观判断能力, 从而影响其鉴定的准确性. 随着分子生物学和信息技术的发展, DNA 分子鉴定技术已被广泛地应用于各个实践领域. 其中 DNA 条形码技术具有不受个体形态特征限制、不受个体发育阶段影响、从基因水平上客观区分物种、操作方法相对简便等特点而引起广泛关注(<http://phe.rockefeller.edu/barcode/>). 因此, 选取芸香科开展植物通用 DNA 条形码序列研究, 旨在大量近缘属、种存在时, 比较各候选序列的优缺点, 试图寻找到适合的条形码序列.

1 材料与方法

1.1 材料

研究材料涉及芸香科 72 属 192 种共 300 个样本. 实验实地采集 9 属 19 种共 32 个样本的属种名称, 采集地点及 GenBank 登录号信息见附表 1(详见网络版).

样本经中国医学科学院药用植物研究所林余霖副研究员鉴定, 凭证标本和数字影像信息保存于中国医学科学院药用植物研究所标本馆. 从 GenBank 数据库(数据下载日期为 2009 年 7 月 5 号)获得芸香科 70 属 182 种 268 条序列, 具体属种情况及登录号等信息见附表 2(详见网络版). 研究材料中 ≥ 2 个物种数的属有 29 个, ≥ 5 个物种数的属有 10 个; ≥ 2 个样本数的物种有 49 个, ≥ 5 个样本数的物种有 8 个. 其中包含枳属、黄檗属、柑橘属、吴茱萸属、金橘属等芸香科经济类植物(药材、果树、香料、木材)的代表属, 涵盖中国境内芸香科 70% 以上的属.

1.2 方法

(1) 样品 DNA 的提取、PCR 扩增和测序. 选取硅胶干燥的植物叶片约 10 mg, 用 DNA 提取研磨仪(Retsch MM400, Germany)研磨 1 min(1800 r/min)后, 使用植物 DNA 提取试剂盒(Tiangen Biotech Co., China)提取总 DNA. 扩增 ITS2 序列正向引物: 5'-GCGATACTTGGTGTGAAT-3', 反向: 5'-GACGCTTC TCCAGACTACAAT-3'. PCR 反应体积 25 μ L, 体系包含 $MgCl_2$ 2 μ L(25 mmol/L), dNTP 2 μ L(2.5 mmol/L), PCR 缓冲液 2.5 μ L(10 $\times$), 引物各 1.0 μ L(2.5 μ mol/L) (Sangon Co., China), 聚合酶 1.0 U(Biocolour BioScience&Technology Co., China), 总 DNA 1 μ L(约 30 ng). 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C, 变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s(进行 40 个循环); 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 其余各序列的 PCR 反应条件、通用引物及扩增程序参考文献[14~16]. PCR 扩增产物经纯化后, 使用 ABI 3730XL 测序仪(Applied Biosystems Co., USA)进行双向测序.

(2) 数据处理方法. 测序后所得峰图采用 Codon Code Aligner V 2.06(CodonCode Co., USA)校对拼接, 去除低质量序列及引物区, 利用 ClustalX V2.0(Higgins D.G.)进行多序列比对并查错. ITS2 序列依照 Keller 等人^[19]的方法处理, *psbA-trnH* 序列根据 GenBank 上的注释处理, 其余序列采用 CodonCode Aligner 处理, 剔除不确定碱基数目大于 10 个和长度小于 100 bp 的序列.

实验材料采用 PCR 扩增效率和测序成功率评价各候选序列的扩增情况. 利用 Kress 等人^[8]和 Song 等人^[15]的方法(适合小样本量的比较), 比较不同条形码序列在种间、种内变异的大小, 结合网上数据并改进

Meyer 和 Paulay^[20]的方法(适合大样本量的比较), 扩大样本量以确认上述结果的正确性. 通过 Wilcoxon 检验^[14], 比较在相同样本量下两两序列种间、种内变异的大小. 使用 TAXON DNA 软件^[21]分析序列种内、种间变异并作 barcoding gap 图. 通过 Wilcoxon 检验, 考察单一序列种间、种内变异的 barcoding gap 显著性. 最后采用 Ross 等人^[22]报道的比对法(BLAST 1)和最小距离法(nearest distance)计算各序列的鉴定成功率.

2 结果

2.1 PCR 扩增效率和测序成功率

通过比较 7 条候选序列的 PCR 扩增效率、测序成功率和序列获得率(有效序列比例)(图 1), 发现 *psbA-trnH* 序列扩增效率最高, ITS2 序列其次, ITS 序列最低. 而测序成功率 ITS 最高, 其次是 *rbcL* 序列, *matK* 序列测序成功率最低. 因 ITS 和 *matK* 序列获得率过低, 故未将其纳入后续数据分析.

2.2 单一序列种内、种间变异分析和各序列的长度考察

分析单一序列种内、种内变异情况, 结果表明(表 1 和 2): ITS2 序列种间变异最大, *psbA-trnH* 序列次之, 且两者的种间变异程度明显大于其他 3 个候选序列.

rbcL, *ycf5*, *rpoC1* 序列种间变异逐个递减. ITS2 种内变异最大, *psbA-trnH* 次之, 而 *rbcL*, *rpoC1* 和 *ycf5* 序列种内不存在变异. 序列长度考察发现, *rbcL* 序列最长, *rpoC1* 其次, *psbA-trnH* 和 *ycf5* 序列长度相当, ITS2 最短. 同时 ITS2 和 *psbA-trnH* 序列长度在种间、种内均存在差异, 且 *psbA-trnH* 序列长度差异大于 ITS2 序列, 另外 3 条序列种间、种内长度无变化.

为验证实验结果的正确性, 将实验数据和 GenBank 数据库内芸香科数据结合, 在更大样本量下验证所得结论. 结果表明: ITS2, *psbA-trnH* 序列种间变异明显大于其他 3 个候选序列, 这与表 1 和 4 结论相符, 且二者种间变异最小值远大于其种内变异的极大值, 其余 3 条候选序列的种间最小变异与种内最大变异间差异不明显(表 3).

2.3 不同序列种间、种内变异的比较

利用 Wilcoxon 检验分析各序列种间、种内变异的差异情况. 结果表明: 在种间变异上 ITS2 序列的变异性大于其他序列, 其次是 *psbA-trnH* 序列. *rbcL*, *ycf5*, *rpoC1* 序列种间变异不明显. 种内变异方面 ITS2 序列大于 *psbA-trnH* 和 *rpoC1* 序列, 其余各序列间没有差异(表 4 和 5). 此结论与单一序列变异情况结论相符. 由于 Wilcoxon 检验针对的是两两比对序列间的共有序列, 但各序列数据的不对称性造成部

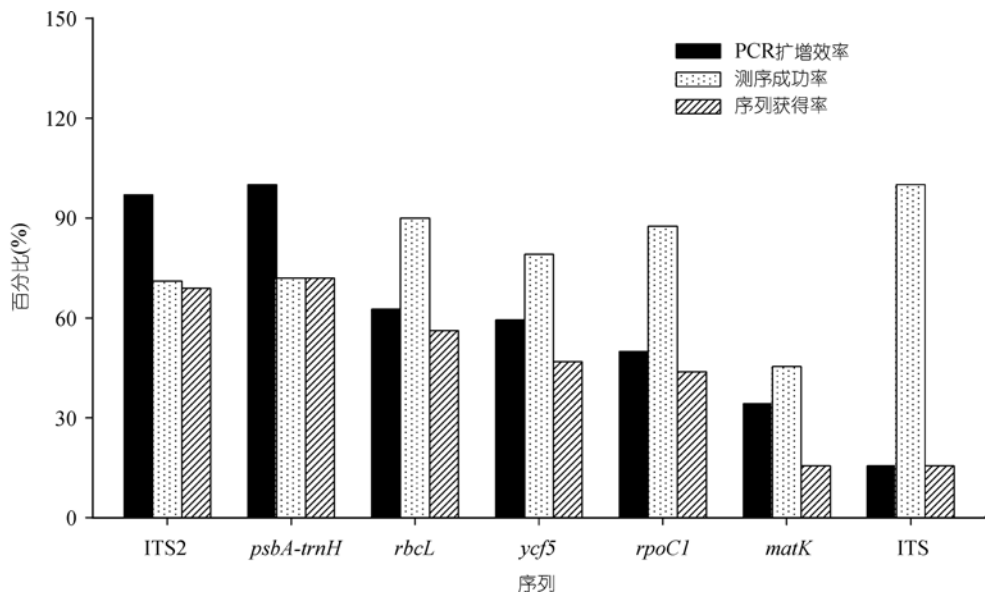


图 1 7 条序列 PCR 扩增效率、测序成功率和序列获得率

PCR 扩增时出现清晰明亮条带即判定 PCR 成功; 测序后获得高质量的序列即判定为测序成功

表 1 实验数据 5 条序列种间变异情况 ^{a)}

属名 (属内物种数)	ITS2 长度(bp)(获得序列数目)/ 变异率(%) (平均值)	<i>psbA-trnH</i> 长度(bp)(获得序列数目)/ 变异率(%) (平均值)	<i>rbcL</i> 长度(bp)(获得序列数目)/ 变异率(%) (平均值)	<i>rpoC1</i> 长度(bp)(获得序列数目)/ 变异率(%) (平均值)	<i>ycf5</i> 长度(bp)(获得序列数目)/ 变异率(%) (平均值)
<i>Citrus</i> (7 spp.)	231(7)/0.00,3.09,0.00,5.00,2.65, 5.00,0.00,3.09,5.00,2.65,5.00, 3.09,5.00,2.65,5.00,1.75,1.31, 0.87,0.39,1.75,1.31(2.60)	424~434(6)/0.23,0.23,4.90,4.90, 4.90,0.00,4.63,4.63,4.63,4.63,4.63, 4.63,0.00,0.00,0.00(2.86)	703(5)/0.00,0.57,0.57,0.00, 0.57,0.57,0.00,0.00,0.57, 0.57(0.34)	487(5)/0.00,0.21,0.21,0.00, 0.21,0.21,0.00,0.00,0.21, 0.21, (0.13)	376(3)/0.53,0.53,0.00 (0.35)
<i>Evodia</i> (2 spp.)	223(1)/-	448(1)/ -	703(2)/1.73(1.73)	487(1)/-	376(1)/-
<i>Phellodendron</i> (2 spp.)	226(1)/-	419~422(2)/1.93(1.93)	703(2)/0.00(0.00)	487(2)/0.00(0.00)	376(2)/0.00(0.00)
<i>Zanthoxylum</i> (3 spp.)	224~225(2)/13.44(13.44)	446(2)/0.45(0.45)	703(2)/1.0(1.0)	487(2)/0.20(0.20)	376(2)/2.43(2.43)
<i>Clausena</i> (1 spp.)	(0)/-	447(1)/ -/-	703(1)/-	(0)/-	376(1)/-
<i>Dictamnus</i> (1 spp.)	222(1)/-	373(1)/-	(0)/-	(0)/-	(0)/-
<i>Glycosmis</i> (1 spp.)	221(1)/-	(0)/-	703(1)/-	(0)/-	376(1)/
<i>Murraya</i> (1 spp.)	222(1)/-	473(1)/-	703(1)/-	487(1)/-	376(1)/
<i>Poncirus</i> (1 spp.)	236(1)/-	447(1)/-	703(1)/-	(0)/-	376(1)/
全体平均变异(%)	3.54	2.51	0.55	0.12	0.84
长度(bp)	221~236	373~447	703	487	376

a) -: 示无数据显示

表 2 实验数据 5 条序列种内变异情况 ^{a)}

物种名 (样本个数)	ITS2 长度(bp)/(序列数目)/ 变异率(%) (平均值)	<i>psbA-trnH</i> 长度(bp)/(序列数目)/ 变异率(%) (平均值)	<i>rbcL</i> 长度(bp)/(序列数目)/ 变异率(%) (平均值)	<i>rpoC1</i> 长度(bp)/(序列数目)/ 变异率(%) (平均值)	<i>ycf5</i> 长度(bp)/(序列数目)/ 变异率(%) (平均值)
<i>Citrus grandis</i> (6)	231(3)/0.43,1.32,0.87(0.87)	433(5)/0.24,0.00,0.46,0.24,0.24, 0.00,0.00,0.46,0.70,0.46(0.28)	703(0)/-	487(3)/0.00(0.00)	376(1)/-
<i>Citrus grandis</i> var. <i>tomentosa</i> (2)	231(2)/0.87(0.87)	433(2)/0.46(0.46)	703(1)/-	487(0)/-	376(1)/-
<i>Citrus medica</i> (3)	231(2)/0.00(0.00)	424(2)/0.00(0.00)	703(2)/0.00(0.00)	487(1)/-	376(1)/-
<i>Evodia rutaecarpa</i> (2)	223(1)/-	448(1)/-	703(1)/-	487(1)/-	376(0)/-
<i>Murraya exotica</i> (5)	222(4)/0.00(0.00)	473(3)/0.85,0.43,0.42(0.57)	703(3)/0.00(0.00)	487(2)/0.00	376(4)/0.00(0.00)
全体平均变异(%)	0.40	0.34	0.00	0.00	0.00
长度(bp)	221~231	424~473	703	487	376

a) -: 示无数据显示

分结果的缺失. 如实验中没有一个物种 2 个或以上样本同时具备 *rbcL* 和 *rpoC1* 序列, 故两者的种内 Wilcoxon 检验无法进行, 其值空缺. 同样原因空缺的还有 *ycf5* 和 *rpoC1* 序列的种内 Wilcoxon 检验结果.

2.4 不同序列 barcoding gap 分析

使用 TAXON DNA 软件分析各候选序列, 并做

barcoding gap 图(图 2). 从不同序列种间、种内变异的分布图看出, 5 条候选序列的 barcoding gap 均不明显, 但 ITS2 和 *psbA-trnH* 序列种内变异和种间变异重合较少; 种间与种内变异分布呈两边分开的趋势. 而 *rbcL*, *rpoC1*, *ycf5* 序列的种间变异偏小, 种间变异整体向种内变异方向倾斜.

因 5 个序列的 barcoding gap 不明显, 采取

表 3 5 个序列的种间种内差异

	ITS2	<i>psbA-trnH</i>	<i>rbcL</i>	<i>rpoC1</i>	<i>ycf5</i>
种间变异	0.0422±0.0468	0.0402±0.0510	0.0069±0.0051	0.0016±0.0017	0.0099±0.0128
平均种间变异	0.0844±0.0768	0.0656±0.0987	0.0090±0.0068	0.0024±0.0027	0.0099±0.0128
种间最小变异	0.0553±0.0832	0.0489±0.1030	0.0073±0.0081	0.0021±0.0029	0.0099±0.0128
种内变异	0.0123±0.0104	0.0029±0.0028	0.0028±0.0051	0.0000±0.0000	0.0000±0.0000
平均种内变异	0.0115±0.0157	0.0023±0.0028	0.0042±0.0061	0.0000±0.0000	0.0000±0.0000
种内最大变异	0.0172±0.0180	0.0045±0.0051	0.0043±0.0061	0.0000±0.0000	0.0000±0.0000

表 4 两两序列种间差异的 Wilcoxon 检验

W+	W-	种间变异相关性, <i>n</i> , <i>P</i> 值	结果
ITS2	<i>rbcL</i>	$W+ = 28.0, W- = 0, n = 7, P \leq 0.0176$	ITS2> <i>rbcL</i>
ITS2	<i>rpoC1</i>	$W+ = 55.0, W- = 0, n = 10, P \leq 0.0049$	ITS2> <i>rpoC1</i>
ITS2	<i>ycf5</i>	$W+ = 1.0, W- = 0, n = 1, P \leq 0.3173$	ITS2= <i>ycf5</i>
<i>psbA-trnH</i>	ITS2	$W+ = 27.0, W- = 379.0, n = 28, P \leq 6.1193 \times 10^{-15}$	<i>psbA-trnH</i> <ITS2
<i>psbA-trnH</i>	<i>rbcL</i>	$W+ = 66.0, W- = 0, n = 11, P \leq 0.0033$	<i>psbA-trnH</i> > <i>rbcL</i>
<i>psbA-trnH</i>	<i>rpoC1</i>	$W+ = 28.0, W- = 0, n = 7, P \leq 0.0180$	<i>psbA-trnH</i> > <i>rpoC1</i>
<i>psbA-trnH</i>	<i>ycf5</i>	$W+ = 3.0, W- = 0, n = 2, P \leq 0.1797$	<i>psbA-trnH</i> = <i>ycf5</i>
<i>rbcL</i>	<i>ycf5</i>	$W+ = 1.0, W- = 0, n = 1, P \leq 0.3173$	<i>rbcL</i> = <i>ycf5</i>
<i>rbcL</i>	<i>rpoC1</i>	$W+ = 3.0, W- = 0, n = 2, P \leq 0.1572$	<i>rbcL</i> = <i>ycf5</i>
<i>ycf5</i>	<i>rpoC1</i>	$W+ = 0.0, W- = 3.0, n = 2, P \leq 0.1797$	<i>ycf5</i> = <i>rpoC1</i>

表 5 两两序列种内差异的 Wilcoxon 检验^{a)}

W+	W-	种内变异相关性, <i>n</i> , <i>P</i> 值	结果
ITS2	<i>rbcL</i>	$W+ = 4.0, W- = 2.0, n = 3, P \leq 0.5930$	ITS2= <i>rbcL</i>
ITS2	<i>rpoC1</i>	$W+ = 15.0, W- = 0, n = 5, P \leq 0.0422$	ITS2> <i>rpoC1</i>
ITS2	<i>ycf5</i>	$W+ = 1.0, W- = 9.0, n = 4, P \leq 0.1305$	ITS2= <i>ycf5</i>
<i>psbA-trnH</i>	ITS2	$W+ = 25.0, W- = 111.0, n = 16, P \leq 0.0260$	<i>psbA-trnH</i> <ITS2
<i>psbA-trnH</i>	<i>rbcL</i>	$W+ = 6.0, W- = 0, n = 3, P \leq 0.1088$	<i>psbA-trnH</i> = <i>rbcL</i>
<i>psbA-trnH</i>	<i>rpoC1</i>	$W+ = 10.0, W- = 0, n = 4, P \leq 0.0679$	<i>psbA-trnH</i> = <i>rpoC1</i>
<i>psbA-trnH</i>	<i>ycf5</i>	$W+ = 1.0, W- = 5.0, n = 3, P \leq 0.2850$	<i>psbA-trnH</i> = <i>ycf5</i>
<i>rbcL</i>	<i>rpoC1</i>	—	—
<i>rbcL</i>	<i>ycf5</i>	$W+ = 0, W- = 3.0, n = 2, P \leq 0.1305$	<i>rbcL</i> = <i>ycf5</i>
<i>ycf5</i>	<i>rpoC1</i>	—	—

a) —: 示无数据显示

Wilcoxon 检验考察单一序列种间、种内变异是否存在显著性差异. 结果表明, ITS2 和 *psbA-trnH* 序列种间变异和种内变异之间有极显著差异, 且 ITS2 序列两者间差异更显著, *rbcL* 和 *rpoC1* 序列种间变异和种内变异之间有显著差异, 而 *ycf5* 序列种间变异和种内变异之间差异不明显. 此结论验证了前面各序列种间、种内变异差异的计算结果.

2.5 候选序列的鉴定效率评估

实验中采用比对法和最小距离法同时评估各序列的鉴定效率. 结果表明, 通过比对法分析, 发现在属水平上 ITS2 和 *psbA-trnH* 序列鉴定成功率最高, 达到 100%, 其次为 *rbcL*, *ycf5*, *rpoC1* 序列(表 6). 在物种水平上, ITS2 序列鉴定成功率最高, 其次是 *psbA-trnH* 序列. 通过最小距离法也得到同样的结论, 但各

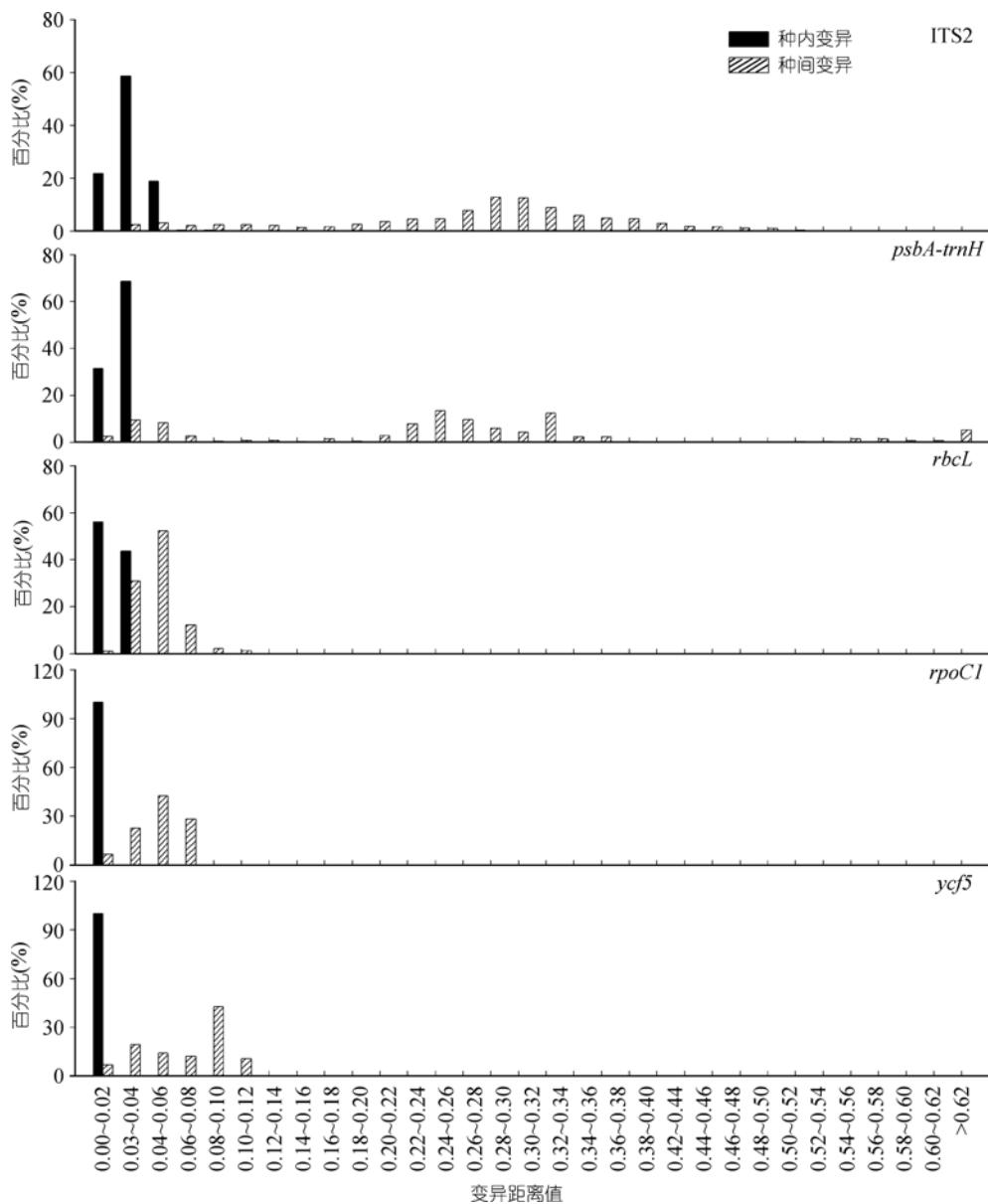


图 2 5 个候选序列的 barcoding gap

候选序列的鉴定成功率较比对法低。

3 讨论

3.1 芸香科候选序列的筛选

DNA 条形码的核心工作之一是寻找适合的条形码序列。与线粒体 *CO1* 基因在动物条形码研究中的优异表现相比, 植物 DNA 条形码研究进展相对缓慢。由于植物线粒体基因组进化速率较慢, 因此条形码序列主要在叶绿体和核基因上进行选择, 被提议的候选序列主要有叶绿体编码区 *rbcL*, *rpoC1*, *ycf5*, *matK* 和非编码区 *psbA-trnH* 序列, 及核基因 ITS 序列等。ITS 序列最早被 Kress 等人^[8]作为植物条形码候选序列提出, 由于 ITS, ITS1 种间变异高于 ITS2, 研究者则更关注前 2 条序列^[8,11], 但随着研究的深入, 越来越多的研究发现, ITS 和 ITS1 序列在一些类群中扩增并不成功^[10,14,23,24]。2007 年, 第 2 届国际条形码会上 ITS 序列甚至被排除出植物条形码候选序列^[12]。但是在系统发育和物种鉴定研究中, ITS2 序列以其特有的优势引起人们的关注^[19,25,26]。

首先, 利用自行设计引物扩增出的 ITS2 序列长度只有 450 bp 左右, 无论在新鲜或降解组织中都较容易扩增和测序, 具有很高的应用价值; 其次, ITS2

序列可根据不同物种类型基于隐马尔可夫模型的 HMM 注释方法^[19]去除两端 5.8 S 和 26 S 区段, 获得标准 ITS2 间隔区序列, 使后续数据处理更准确可靠, 这也是目前其他候选条形码序列不具备的优势。Chen 等人已利用超过 6600 个植物样本证明, ITS2 作为条形码序列具有良好的通用性^[14]。在此背景下, 本文针对芸香科 72 属 192 个物种 300 个样本、纳入目前条形码研究中的热点候选序列进行比较, 发现 ITS2 序列具有良好的 PCR 效率和测序成功率, 在所考察的候选序列中具有最大的种间变异和较小的种内变异, 且两者存在极显著差异, 同时物种鉴定成功率最高, 各评价指标均优于其他候选序列。

CBOL 在最新的研究中推荐 *rbcL*+*matK* 作为植物条形码序列^[13]。*rbcL* 序列在 GenBank 中有大量的数据, 并具有通用、易扩增、易比对的优点, 但是其变异主要存在于物种以上水平, 物种水平通常变异不够大^[11,16]。而 *matK* 片段相对于其他编码区片段进化速率较快, 但其引物在不同物种间通用性差别较大^[10,14]。本文将这 2 条序列纳入分析, 发现 *matK* 序列扩增成功率过低无法进行后续数据分析, *rbcL* 序列在属的水平鉴定效率达到 97.1%, 在种的水平为 76.5%, 但其鉴定效率不及 ITS2 序列。

另外, 由于 *psbA-trnH* 片段是进化速率最快的叶

表 6 比对法和最小距离法分析 5 条候选序列的鉴定效率^{a)}

序列	鉴定方法	物种数	鉴定成功率(%)		鉴定错误率(%)		模糊鉴定率(%)	
			物种水平	属水平	物种水平	属水平	物种水平	属水平
ITS2	比对法	197	89.3	100	0	0	10.7	0
	最小距离法	197	77.7	100	0	0	22.3	0
<i>psbA-trnH</i>	比对法	65	83.1	100	0	0	16.9	0
	最小距离法	65	75.4	97.0	0	0	24.6	3.0
<i>rbcL</i>	比对法	67	77.6	97.0	0	0	22.4	3.0
	最小距离法	67	74.6	97.0	0	0	25.4	3.0
<i>rpoC1</i>	比对法	20	40.0	100	0	0	60.0	0
	最小距离法	20	40.0	100	0	0	60.0	0
<i>ycf5</i>	比对法	14	78.6	85.7	0	0	21.4	14.3
	最小距离法	14	78.6	85.7	0	0	21.4	14.3

a) “比对法”中“鉴定成功”指通过碱基相似性搜索后, 研究对象与相同物种材料具有最高相似性的情况; “鉴定模糊”指通过碱基相似性搜索后, 研究对象同时与相同物种材料和不同物种材料具有最高相似性的情况; “鉴定失败”指通过碱基相似性搜索后, 研究对象与不同物种材料具有最高相似性, 而与相同物种材料相似性反而更低的情况。 “最小距离法”中“鉴定成功”指进行多序列比对并利用 PAUP4b10 计算 K-2-P 距离后, 研究对象与同种材料间距离值最小的情况; “鉴定模糊”指计算 K-2-P 距离后, 研究对象同时与相同物种材料和不同物种材料距离值最小的情况; “鉴定失败”指计算 K-2-P 距离后, 研究对象与不同物种材料距离值最小, 而与相同物种材料距离值更大的情况

绿体间隔区之一, 而且其两端存在约 75 bp 的保守序列, 可用于设计通用引物^[27]. 后经 Kress 等人^[8,11], Yao^[28]等人验证发现其通用性较好, 扩增成功率较高, 而在条形码研究中重点推荐. 本研究发现, *psbA-trnH* 序列在属的水平鉴定成功率达到 100%, 种的水平达 83.8%, 并且种间、种内变异存在显著性差异, 虽然其鉴定效率较 ITS2 序列低, 但可视为潜在的植物条形码序列. *ycf5* 序列在涉及的样本数较少(20 个样本)的情况下, 显示出在种和属的水平有较高的鉴定效率, 但也是唯一一种间、种内变异没有显著性差异的候选序列, 是否能真的反映其鉴定能力, 还有待进一步研究. *rpoC1* 在先前的研究中被认为其引物通用性好, 扩增成功率高, 但进化较慢, 鉴别能力较低. 本实验中, *rpoC1* 序列在样本数较少的情况下, 鉴定成功率仍然偏低(物种水平鉴定成功率为 40%), 与前人的结论相符.

3.2 考察序列鉴定成功率方法

尽管 CBOL 推荐复合序列(*rbcL*+*matK*)作为植物条形码序列, 但使用复合序列需要有足够对齐的实验数据, 导致实验费用增大. 所以本实验只考虑单一序列的可行性, 并采取比对法和最小距离法同时评价各序列的鉴定效率, 力求客观反映各序列的鉴定能力. 比对法是将样本的 DNA 序列与全体序列进行碱基比对, 按碱基差异进行排名, 具有运行速度快精度高的特点. 最小距离法是比较样本 DNA 序列与全体序列的 K-2-P 距离, 此方法基于全局比对, 量化单个序列的差异数值, 速度较慢, 同时对于缺失位点和变异位点等价处理, 易造成数据结果与真实情况的轻微差异, 这也是两种验证结果数值不一致的原因.

在评价鉴定效率过程中, 会考察每一条序列存在或不存在时, 整体数据会如何发生改变. 当数据异常时, 将可疑序列与 GenBank 数据库内数据进行比对, 以排除“假阳性”数据的干扰. 与多数研究一致, 在实验中对“种间变异”定义其实是属内不同物种之间的变异情况, 并没有打破属的界限, 使用上述“种间”范围的界定得到的计算结果可能比实际情况要小. Lahaye 等人^[16]的研究也得出相同的结论, 所以在今后的实验中, 会采取一些新的评价鉴定成功率的方法, 如 PCI(probability of correct identification)^[29], 避免人为因素干扰实验结果.

3.3 未鉴定成功样本的探讨

本文采用 ITS2 序列作为 DNA 条形码鉴定芸香科植物, 但在供试样本中, 仍有 21 个样本无法鉴定, 其中有 18 个样本属于柑橘属. 自 1753 年林奈确立柑橘属以来, 尽管它的系统分类比其他任何果树都更受重视, 但有关该属的分类, 特别是种的划分一直存在很大分歧^[30~32]. 原因一方面是柑橘植物本身容易发生芽变, 种属间易杂交且杂种可育, 体细胞突变率高, 无融合生殖占优势, 并且该属植物人工栽培历史悠久, 类型繁多, 形态复杂. 另一方面则是研究者主观上对柑橘演化过程的想法不同, 因而采用和建立的标准不同. 本文中 18 个未鉴定成功的柑橘属物种主要为宽皮柑橘类、甜橙类和杂柑类的部分种或品种. 这些种主要是通过芽变选育的, 芽变是一种体细胞变异, 芽变系与母本之间的遗传组成绝大部分是相同的, 甚至某些芽变系只发生了单核苷酸突变, 因此利用部分遗传特征信息的条形码技术很难将它们区分开来, 此结果与 Francois 等人^[33]的研究相符. 该结果也揭示了这些种具有较近的亲缘关系, 其中有些种也可能被不适当地划分, 同时说明清晰、准确的物种界定对 DNA 条形码分类具有重要影响. 对于这些近缘和近期分化的物种, 可能需要采用其他更多的分子标记(如 SNP, SSR 等)方法来解决, 而不局限于单一条形码序列.

尽管还存在争议, 但 DNA 条形码已经在动物中得到广泛应用, 在植物中的研究也正在迅速开展, 这将有助于非分类学专业工作者对物种进行快速、准确地鉴定. DNA 条形码不能取代传统的分类学, 但作为数字信息的 DNA 序列, 其准确性、丰富性以及独一无二的可重复性将使该技术成为分类学家有用的工具^[13,34,35]. 本研究为 DNA 条形码技术在植物中的应用进行了新的探索, 同时也为植物的分子分类鉴定和亲缘关系研究提供了新的方法和思路. 研究中由于采样条件的限制, 有些物种缺乏重复个体, 一些属内关系最近的姊妹种没有能纳入分析. 同时还有一些问题有待进一步研究, 如如何直接从干燥的药材中提取 DNA 并避免真菌的污染; 采用 2 条或多条复合序列能否在植物鉴定成功率达到或接近 100%等. 相信随着材料数的增加和研究的进一步深入, 能够提供更多有效的信息和可靠的方法.

致谢 感谢中国医学科学院药用植物研究所林余霖副研究员对样本进行物种鉴定, 赵娜在实验过程中提供帮助.

参考文献

- 1 Hebert P D, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 2003, 270: 313—321
- 2 Gregory T R. DNA barcoding does not compete with taxonomy. *Nature*, 2005, 434: 1067
- 3 Miller S E. DNA barcoding and the renaissance of taxonomy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 4775—4776
- 4 Hebert P D, Ratnasingham S, deWaard J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc Biol Sci Ser B*, 2003, 270: S96—S99
- 5 Vences M, Thomas M, Bonett R M, et al. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2005, 360: 1859—1868
- 6 Janzen D H, Hajibabaei M, Burns J M, et al. Wedding biodiversity inventory of a large and complex Lepidoptera fauna with DNA barcoding. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2005, 360: 1835—1845
- 7 Ward R D, Zemlak T S, Innes B H, et al. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2005, 360: 1847—1857
- 8 Kress W J, Wurdack K J, Zimmer E A, et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 8369—8374
- 9 Newmaster S G, Fazekas A J, Ragupathy S. DNA barcoding in land plants: evaluation of *rbcL* in a multigene tiered approach. *Can J Bot*, 2006, 84: 335—341
- 10 Chase M W, Cowan R S, Hollingsworth P M, et al. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon*, 2007, 56: 295—299
- 11 Kress W J, Erickson D L. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE*, 2007, 2: e508
- 12 Pennisi E. Wanted: a barcode for plants. *Science*, 2007, 318: 190—191
- 13 CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 12794—12797
- 14 Chen S L, Yao H, Han J P, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE*, 2010, 5: e8613
- 15 Song J Y, Yao H, Li Y, et al. Authentication of the family Polygonaceae in Chinese pharmacopoeia by DNA barcoding technique. *J Ethnopharmacol*, 2009, 124: 434—439
- 16 Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, et al. DNA barcoding the floras of biodiversity hot spots. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 2923—2928
- 17 Sass C, Little D P, Stevenson D W, et al. DNA barcoding in the Cycadales: testing the potential of proposed barcoding markers for species identification of Cycads. *PLoS ONE*, 2007, 2: e1154
- 18 朱英杰, 陈士林, 姚辉, 等. 重楼属药用植物 DNA 条形码鉴定研究. *药学报*, 2010, 45: 376—385
- 19 Keller A, Schleicher T, Schultz J, et al. 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation. *Gene*, 2009, 430: 50—57
- 20 Meyer C P, Paulay G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biol*, 2005, 3: e422
- 21 Slabbinck B, Dawyndt P, Martens M, et al. Taxon gap: a visualization tool for intra-and inter-species variation among individual biomarkers. *Bioinformatics*, 2008, 24: 866—867
- 22 Ross H A, Murugan S, Li W L. Testing the reliability of genetic methods of species identification via simulation. *Syst Biol*, 2008, 57: 216—230
- 23 Chase M W, Salamin N, Wilkinson M, et al. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2005, 360: 1889—1895
- 24 Gonzalez M A, Baraloto C, Engel J, et al. Identification of amazonian trees with DNA barcodes. *PLoS ONE*, 2009, 4: e7483

- 25 Müller T, Philippi N, Dandekar T, et al. Distinguishing species. RNA, 2007, 13: 1469—1472
- 26 Miao M, Warren A, Song W, et al. Analysis of the internal transcribed spacer 2(ITS2) region of scuticociliates and related taxa(Ciliophora: Oligohymenophorea) to infer their evolution and phylogeny. Protist, 2008, 159: 519—533
- 27 Shaw J, Lickey E B, Beck J T, et al. The tortoise and the hare. II. Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. Am J Bot, 2005, 92: 142—166
- 28 Yao H, Song J Y, Ma X Y, et al. Identification of *Dendrobium* species by a candidate DNA barcode sequence: the chloroplast *psbA-trnH* intergenic region. Planta Med, 2009, 75: 667—669
- 29 Erickson D L, Spouge J, Resch A, et al. DNA barcoding in land plants: developing standards to quantify and maximize success. Taxon, 2008, 57: 1304—1316
- 30 Walter R, Herbert J W, Leon D B. The Citrus industry(Vol I). California: University of California Press, 1967. 190—430
- 31 Tanaka T. Taxonomic problem of *Citrus* fruits in the Orient. Bull Univ Osaka Pref Ser B, 1969, 21: 133—138
- 32 曾勉. 对柑橘分类的认识体会和整理意见. 中国果树, 1960, (2): 31—37
- 33 Francois L, Frederic L, Joseph M B, et al. DNA amplified fingerprinting, a useful tool for determination of genetic origin and diversity analysis in *Citrus*. Hort Sci, 1995, 30: 1063—1067
- 34 陈士林, 宋经元, 姚辉, 等. 药用植物 DNA 条形码鉴定策略及关键技术分析. 中国天然药物, 2009, 7: 322—327
- 35 宁淑萍, 颜海飞, 郝刚, 等. 植物 DNA 条形码研究进展. 生物多样性, 2008, 16: 417—425

附表 1 The collection sites and GenBank accession of collected samples of the Rutaceae family

Species	Collection sites	ITS2	<i>psbA-trnH</i>	<i>rbcL</i>	<i>matk</i>	<i>rpoC1</i>	<i>ycf5</i>	ITS
<i>Citrus grandis</i>	Nanning	GQ434825	GQ435442			GQ436255	GQ435827	
<i>Citrus grandis</i>	Beijing	GQ434826	GQ435443			GQ436256		
<i>Citrus grandis</i>	Beijing	GQ434827	GQ435444			GQ436257		
<i>Citrus grandis</i>	Nanning		GQ435445					
<i>Citrus grandis</i>	Huazhou		GQ435446					
<i>Citrus grandis</i> var. <i>tomentosa</i>	Nanning	GQ434817	GQ435433		GQ434283		GQ435822	
<i>Citrus grandis</i> var. <i>tomentosa</i>	Beijing	GQ434818	GQ435434	GQ436734				
<i>Citrus limonum</i>	Xishuangbanna	GQ434832	GQ435450	GQ436744				FJ980439
<i>Citrus medica</i>	Xishuangbanna	GQ434836		GQ436749			GQ435836	FJ980440
<i>Citrus medica</i>	Putian	GQ434837	GQ435453			GQ436263		
<i>Citrus medica</i>	Xinglong		GQ435454	GQ436750				
<i>Citrus medica</i> var. <i>sarcodactylis</i>	Bozhou	GQ434821	GQ435437			GQ436251		
<i>Citrus reticulata</i>	Putian	GQ434822	GQ435438	GQ436736		GQ436252		
<i>Citrus sinensis</i>	Beijing	GQ434833		GQ436746		GQ436261		
<i>Clausena excavata</i>	Huazhou			GQ436740			GQ435828	
<i>Dictamnus dasycarpus</i>	Qinling	GQ434819	GQ435435					
<i>Evodia lepta</i>	Putian			GQ436745				
<i>Evodia rutaecarpa</i>	Chengdu	GQ434834		GQ436747	GQ434286	GQ436262	GQ435834	
<i>Evodia rutaecarpa</i>	Chongqing		GQ435451					
<i>Glycosmis pentaphylla</i>	Xishuangbanna	GQ434835	GQ435452	GQ436748			GQ435835	
<i>Murraya exotica</i>	Nanning	GQ434828	GQ435447			GQ436258	GQ435829	
<i>Murraya exotica</i>	Beijing	GQ434829		GQ436741	GQ434284	GQ436259	GQ435830	
<i>Murraya exotica</i>	Chengdu		GQ435448	GQ436742				
<i>Murraya exotica</i>	Xinglong	GQ434830					GQ435831	
<i>Murraya exotica</i>	Nanning	GQ434831	GQ435449	GQ436743	GQ434285		GQ435832	FJ980438
<i>Phellodendron amurense</i>	Beijing		GQ435440	GQ436738		GQ436253	GQ435825	
<i>Phellodendron chinense</i>	Beijing	GQ434820	GQ435436	GQ436735		GQ436250	GQ435823	
<i>Poncirus trifoliata</i>	Chengdu	GQ434823	GQ435439	GQ436737			GQ435824	
<i>Zanthoxylum armatum</i>	Xishuangbanna	GQ434838	GQ435455	GQ436751				
<i>Zanthoxylum bungeanum</i>	Beijing	GQ434824	GQ435441	GQ436739		GQ436254	GQ435826	
<i>Zanthoxylum nitidum</i>	Xishuangbanna						GQ435833	
<i>Zanthoxylum nitidum</i>	Nanning					GQ436260		

附表 2 The Species of Rutaceae family downloaded from GenBank

Species	ITS2	psbA-trnH	rbcL	rpoC1
<i>Acmadenia obtusata</i>		AM500886		
<i>Acmadenia rupicola</i>			AM235114	
<i>Acmadenia teretifolia</i>		AM500887		
<i>Acmadenia trigona</i>		AM500888		
<i>Acronychia acidula</i>			U38862	
<i>Acronychia baeuerlenii</i>	AY588596			
<i>Acronychia imperforata</i>	AY588597			
<i>Acronychia oblongifolia</i>	AY588598			
<i>Acronychia oblongifolia</i>	EU493185			
<i>Acronychia oblongifolia</i>		EU493204		
<i>Acronychia pauciflora</i>	AY588593			
<i>Acronychia pubescens</i>	AY588594			
<i>Acronychia suberosa</i>	AY588595			
<i>Acronychia wilcoxiana</i>	AY588592			
<i>Adenandra brachyphylla</i>		AM500889		
<i>Adenandra rotundifolia</i>		AM500890		
<i>Adenandra uniflora</i>			AF066803	
<i>Adenandra villosa</i>		AM500891		
<i>Aegle marmelos</i>	FJ434169			
<i>Aegle marmelos</i>			AF066811	
<i>Afraegle paniculata</i>	FJ434170			
<i>Agathosma adenandriiflora</i>		AM500892		
<i>Agathosma bathii</i>		AM500893		
<i>Agathosma bifida</i>		AM500894		
<i>Agathosma capensis</i>		AM500895		
<i>Agathosma namaquensis</i>		AM500896		
<i>Agathosma ovata</i>			AM235115	
<i>Asterolasia asteriscophora</i>	AY631937			
<i>Asterolasia muricata</i>	AY631936			
<i>Asterolasia nivea</i>	AY631939			
<i>Asterolasia pallida</i> subsp. <i>hyalina</i>	AY631934			
<i>Asterolasia pallida</i> subsp. <i>pallida</i>	AY631935			
<i>Asterolasia phebaloides</i>	AY631938			
<i>Asterolasia squamuligera</i>	AY631940			
<i>Atalantia ceylanica</i>	FJ434159			
<i>Atalantia ceylanica</i>			AF066812	
<i>Atalantia monophylla</i>	AB456047			
<i>Balsamocitrus dawei</i>	FJ434166			
<i>Bergera koenigii</i>	FJ434147			
<i>Boronia heterophylla</i>		AM500897		
<i>Calodendrum capense</i>		AM500898		
<i>Calodendrum capense</i>			AF066805	
<i>Casimiroa edulis</i>			AF066808	
<i>Casimiroa edulis</i>			EU042975	

续附表 2

Species	ITS2	<i>psbA-trnH</i>	<i>rbcL</i>	<i>rpoC1</i>
<i>Choisya mollis</i>			AF066800	
<i>Chorilaena quercifolia</i>	AY631915			
<i>Chorilaena quercifolia</i>			AF066810	
<i>Citropsis gilletiana</i>	FJ434171			
<i>Citrus amblycarpa</i>	AB456105			
<i>Citrus aurantiifolia</i>	AB456054			
<i>Citrus aurantiifolia</i>	AB456118			
<i>Citrus aurantium</i>	AB456074			
<i>Citrus aurantium</i>				GQ248907
<i>Citrus bergamia</i>	AB456056			
<i>Citrus hassaku</i>	AB456121			
<i>Citrus hassaku</i>	AB456122			
<i>Citrus hystrix</i>	AB456053			
<i>Citrus junos</i>	AB456112			
<i>Citrus junos</i>	AB456113			
<i>Citrus junos</i>	AB456114			
<i>Citrus macroptera</i>	AB456052			
<i>Citrus maxima</i>	AM398229			
<i>Citrus maxima</i>	FJ980437			
<i>Citrus medica</i>	AM260544			
<i>Citrus medica</i> var. <i>sarcodactylis</i>	AM260543			
<i>Citrus montana</i>	AB456057			
<i>Citrus natsudaikai</i>	AB456119			
<i>Citrus neoaurantium</i>	AB456078			
<i>Citrus nobilis</i>	AB456087			
<i>Citrus paradisi</i>			AJ238407	
<i>Citrus reticulata</i>	AB456091			
<i>Citrus reticulata</i>	AB456092			
<i>Citrus reticulata</i>	AB456115			
<i>Citrus reticulata</i>	AM398230			
<i>Citrus sinensis</i>	AB456079			
<i>Citrus sinensis</i>	AB456120			
<i>Citrus sinensis</i>	AB456127			
<i>Citrus sinensis</i>		DQ864733	DQ864733	DQ864733
<i>Citrus sinensis</i>		NC_008334	NC_008334	
<i>Citrus sinensis</i> var. <i>brasiliensis</i>	AB456080			
<i>Citrus sinensis</i> var. <i>brasiliensis</i>	AB456081			
<i>Citrus sinensis</i> var. <i>brasiliensis</i>	AB456111			
<i>Citrus sudachi</i>	AB456086			
<i>Citrus sunki</i>	AB456102			
<i>Citrus tachibana</i>	AB456095			
<i>Citrus tachibana</i>	AB456096			
<i>Citrus tachibana</i>	AB456097			
<i>Citrus tumida</i>	AB456104			

续附表 2

Species	ITS2	<i>psbA-trnH</i>	<i>rbcL</i>	<i>rpoC1</i>
<i>Citrus unshiu</i>	AB456088			
<i>Citrus unshiu</i>	AB456089			
<i>Citrus unshiu</i>	AB456117			
<i>Clausena anisata</i>		AM500899		
<i>Clausena anisata</i>			AM235116	
<i>Clausena excavata</i>	FJ434152			
<i>Clausena excavata</i>			AF066813	
<i>Clymenia polyandra</i>	FJ434162			
<i>Cneorum pulverulentum</i>			AF206752	
<i>Cneorum pulverulentum</i>			U38858	
<i>Cneorum tricocon</i>			EU042977	
<i>Coleonema juniperinum</i>		AM500900		
<i>Coleonema pulchellum</i>			L12567	
<i>Coleonema pulchrum</i>		AM500901		
<i>Correa pulchella</i>			AF066816	
<i>Crowea exalata</i>	AY631903			
<i>Dictyoloma vandellianum</i>			AF066823	
<i>Diosma hirsuta</i>		AM500902		
<i>Diosma oppositifolia</i>		AM500903		
<i>Diosma sabulosa</i>		AM500904		
<i>Diosma sabulosa</i>			AM235117	
<i>Diosma subulata</i>		AM500905		
<i>Diplolaena dampieri</i>			AF066807	
<i>Drummondia hassellii</i>	AY631904			
<i>Empleurum unicusulare</i>		AM500906		
<i>Empleurum unicusulare</i>			AM235118	
<i>Eremocitrus glauca</i>	AB456049			
<i>Eremocitrus glauca</i>	FJ434161			
<i>Eremocitrus glauca</i>			AF066819	
<i>Eriostemon brevifolius</i>			AF156883	
<i>Euchaetis albertiniana</i>			AM235119	
<i>Euchaetis glabra</i>		AM500907		
<i>Euchaetis glomerata</i>		AM500908		
<i>Euodia pubifolia</i>	EU493186			
<i>Feroniella lucida</i>	AB456046			
<i>Feroniella oblata</i>	FJ434168			
<i>Flindersia australis</i>			U38861	
<i>Fortunella japonica</i>	AB456051			
<i>Fortunella japonica</i>	AB456108			
<i>Fortunella japonica</i>	AB456110			
<i>Fortunella japonica</i>			AF066799	
<i>Fortunella polyandra</i>	FJ434160			
<i>Glycosmis pentaphylla</i>			AF066820	

续附表 2

Species	ITS2	<i>psbA-trnH</i>	<i>rbcL</i>	<i>rpoC1</i>
<i>Haplophyllum bastetanum</i>	AY484576			
<i>Haplophyllum blanchei</i>	AY484571			
<i>Haplophyllum broussonetianum</i>				EU531658
<i>Haplophyllum coronatum</i>	AY484573			
<i>Haplophyllum linifolium</i>	AY484572			
<i>Haplophyllum rosmarinifolium</i>	AY484574			
<i>Haplophyllum suaveolens</i>	AY484575			
<i>Leionema carruthersii</i>	AY631917			
<i>Leionema diosmeum</i>	AY631920			
<i>Leionema ellipticum</i>	AY631916			
<i>Leionema equestre</i>	AY631922			
<i>Leionema lamprophyllum</i>	AY631918			
<i>Leionema phylicifolium</i>	AY631919			
<i>Leionema ralstonii</i>	AY631921			
<i>Lunasia amara</i>			AF066814	
<i>Macrostylis ramulosa</i>		AM500909		
<i>Macrostylis ramulosa</i>			AM235120	
<i>Macrostylis squarrosa</i>		AM500910		
<i>Macrostylis villosa</i>		AM500911		
<i>Melicope clusiifolia</i>	EU493178			
<i>Melicope clusiifolia</i>		EU493197		
<i>Melicope degeneri</i>	EU493179			
<i>Melicope elleryana</i>	EU493184			
<i>Melicope elliptica</i>	EU493180			
<i>Melicope hivaoaensis</i>	EU493173			
<i>Melicope inopinata</i>	EU493176			
<i>Melicope inopinata</i>		EU493195		
<i>Melicope knudsenii</i>	EU493168			
<i>Melicope knudsenii</i>		EU493187		
<i>Melicope lucida</i>	EU493177			
<i>Melicope lucida</i>		EU493196		
<i>Melicope nukuhivensis</i>	EU493175			
<i>Melicope ovalis</i>	EU493169			
<i>Melicope paniculata</i>	EU493171			
<i>Melicope polybotrya</i>	EU493183			
<i>Melicope polybotrya</i>		EU493202		
<i>Melicope puberula</i>	EU493172			
<i>Melicope quadrangularis</i>	EU493170			
<i>Melicope quadrangularis</i>		EU493189		
<i>Melicope revoluta</i>	EU493174			
<i>Melicope revoluta</i>		EU493193		
<i>Melicope simplex</i>	DQ499137			
<i>Melicope ternata</i>			AF116271	
<i>Merrillia caloxylon</i>	FJ434149			

续附表 2

Species	ITS2	<i>psbA-trnH</i>	<i>rbcL</i>	<i>rpoC1</i>
<i>Microcitrus australasica</i>	AB457061			
<i>Microcybe multiflora</i>	AY631932			
<i>Microcybe pauciflora</i>	AY631933			
<i>Micromelum minutum</i>	FJ434148			
<i>Muiriantha hassellii</i>	AY631911			
<i>Murraya koenigii</i>	AJ879084			
<i>Murraya koenigii</i>	FN292997			
<i>Murraya koenigii</i>	FN292998			
<i>Murraya koenigii</i>	FN292999			
<i>Murraya koenigii</i>	FN293000			
<i>Murraya koenigii</i>	FN293001			
<i>Murraya paniculata</i>	AB456044			
<i>Murraya paniculata</i>	AJ879085			
<i>Murraya paniculata</i>	FN293002			
<i>Murraya paniculata</i>	FN293003			
<i>Murraya paniculata</i>	FN293004			
<i>Murraya paniculata</i>	FN293005			
<i>Murraya paniculata</i>	FN293006			
<i>Murraya paniculata</i>			U38860	
<i>Nematolepis elliptica</i>	AY631906			
<i>Nematolepis frondosa</i>	AY631907			
<i>Nematolepis phebalioides</i>	AY631910			
<i>Nematolepis rhytidophylla</i>	AY631905			
<i>Nematolepis squamea</i> subsp. <i>coriacea</i>	AY631909			
<i>Nematolepis squamea</i> subsp. <i>squamea</i>	AY631908			
<i>Pamburus missionis</i>	FJ434155			
<i>Phebalium ambiguum</i>	AY631931			
<i>Phebalium canaliculatum</i>	AY631924			
<i>Phebalium clavatum</i>	AY631923			
<i>Phebalium elegans</i>	AY631925			
<i>Phebalium festivum</i>	AY631928			
<i>Phebalium filifolium</i>	AY631930			
<i>Phebalium glandulosum</i>	AY631926			
<i>Phebalium squamulosum</i> subsp. <i>ozothamnoides</i>	AY631927			
<i>Phebalium tuberculosum</i>	AY631929			
<i>Phellodendron amurense</i>			AF066804	
<i>Phellodendron amurense</i>			EU266075	
<i>Phyllosma capensis</i>		AM500912		
<i>Pilocarpus pennatifolius</i>			AF066809	
<i>Platydesma rostrata</i>	EU493181			
<i>Platydesma rostrata</i>		EU493200		
<i>Platydesma spathulata</i>	EU493182			
<i>Platydesma spathulata</i>		EU493201		
<i>Pleiospermium alatum</i>			AF066821	
<i>Pleiospermium latialatum</i>	FJ434157			
<i>Poncirus trifoliata</i>	AB456050			

续附表 2

Species	ITS2	psbA-trnH	rbcL	rpoC1
<i>Poncirus trifoliata</i>	FJ606752			
<i>Poncirus trifoliata</i>			AJ235806	
<i>Rhadinothamnus anceps</i>	AY631914			
<i>Rhadinothamnus euphemiae</i>	AY631912			
<i>Rhadinothamnus rudis</i>	AY631913			
<i>Ruta angustifolia</i>				EU531646
<i>Ruta chalepensis</i>				EU531645
<i>Ruta graveolens</i>	EU591989			
<i>Ruta graveolens</i>	FJ434146			
<i>Ruta graveolens</i>			AY128251	
<i>Ruta graveolens</i>			U39281	
<i>Ruta montana</i>	AY484577			
<i>Sarcomelicope simplicifolia</i>			AF066817	
<i>Severinia buxifolia</i>	AB456048			
<i>Severinia buxifolia</i>	FJ434156			
<i>Severinia buxifolia</i>			AF066806	
<i>Sheilanthra pubens</i>		AM500913		
<i>Skimmia anquetilia</i>			AF066818	
<i>Spathelia excelsa</i>			AF066798	
<i>Staphylea trifolia</i>			AJ238406	
<i>Swinglea glutinosa</i>	AB456045			
<i>Swinglea glutinosa</i>	FJ434165			
<i>Tetradium ruticarpum</i>	DQ499601			
<i>Tetradium ruticarpum</i>	EF432817			
<i>Tetradium ruticarpum</i>	EF432818			
<i>Tetradium ruticarpum</i>	EU663533			
<i>Tetradium ruticarpum</i>	EU663534			
<i>Tetradium ruticarpum</i>	EU663535			
<i>Tetradium ruticarpum</i>	EU663536			
<i>Tetradium ruticarpum</i>	EU663537			
<i>Tetradium ruticarpum</i>	EU663538			
<i>Tetradium ruticarpum</i>	EU663539			
<i>Tetradium ruticarpum</i>	EU663540			
<i>Tetradium ruticarpum</i>	EU663541			
<i>Tetradium ruticarpum</i>	EU663542			
<i>Tetradium ruticarpum</i>	EU663543			
<i>Tetradium ruticarpum</i>	EU663545			
<i>Tetradium ruticarpum</i>	EU663546			
<i>Triphasia trifolia</i>	FJ434172			
<i>Vepris lanceolata</i>		AM500914		
<i>Wenzelia dolichophylla</i>	FJ434150			
<i>Zanthoxylum bungeanum</i>	DQ016542			
<i>Zanthoxylum bungeanum</i>	DQ016543			
<i>Zanthoxylum bungeanum</i>	DQ016544			
<i>Zanthoxylum capense</i>		AM500915		
<i>Zanthoxylum monophyllum</i>			U39282	
<i>Zanthoxylum piperitum</i>			AB445491	