

鸡爪槭种下分类群的 DNA 条形码筛选

高 健^{1,2}, 孟婉姮^{1,2}, 杜 芳^{1,2}, 李俊清^{1,2*}

(1. 北京林业大学林学院, 北京 100083; 2. 北京林业大学省部共建森林培育与保护教育部重点实验室, 北京 100083)

摘 要: 槭属鸡爪槭 (*Acer palmatum* Thunb.) 是北温带广泛分布的一类园艺观赏树种, 由于频繁的种内杂交渐渗导致其种下分类群的形态性状特征趋同, 致使传统的形态学分类难以准确鉴定, 新兴的 DNA 条形码技术为快速、准确的鉴定鸡爪槭种下分类群提供了新的思路。本研究采用 5 个叶绿体 DNA 片段 (*rpl16*、*psbA-trnH*、*trnL-trnF*、*rbcL*、*matK*) 和核基因组 ITS 片段, 运用 PWG-distance 和 Tree-Building 两种方法对鸡爪槭的 8 个分类群共 32 个个体进行 DNA 条形码分析。结果显示, 单个叶绿体基因组片段 (分辨率为 0%~25%) 或核 rDNA ITS 片段 (12.5%) 的分辨率较低, 不同组合的叶绿体 DNA 片段 (0%~62.5%)、叶绿体片段与核 rDNA ITS 片段 (12.5%~50%) 的分辨率则相对较高。其中, *rpl16* + *psbA-trnH* + *trnL-trnF* 片段组合的分辨率最高 (62.5%), 较为符合 DNA 条形码快速、准确鉴定的要求, 因此建议将其作为鸡爪槭种下分类群鉴定的 DNA 条形码。

关键词: 鸡爪槭; DNA 条形码; 叶绿体 DNA 片段; 核基因组 ITS 片段; 物种分辨率

中图分类号: Q949.755.3

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2015)06-0734-10

DNA Barcoding of *Acer palmatum* (Aceraceae)

GAO Jian^{1,2}, MENG Wan-Heng^{1,2}, DU Fang^{1,2}, LI Jun-Qing^{1,2*}

(1. College of Forestry of Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. The Key Laboratory for Silviculture and Conservation of Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: *Acer palmatum* Thunb. (Aceraceae) is an important garden ornamental tree species in northern temperate regions. It is relatively difficult to classify by traditional methods due to frequent intraspecific hybridization and introgression. However, the emergence and development of DNA barcoding methods has provided an alternative approach to this issue. In this study, five candidate DNA noncoding regions (*rpl16*, *psbA-trnH*, *trnL-trnF*, *rbcL* and *matK*) from the chloroplast genome and internal transcribed spacer (ITS) region from the nuclear genome were used to distinguish eight taxa of *A. palmatum*. The identification efficiency estimated by PWG-distance and Tree-Building methods showed that single chloroplast DNA fragment (0% – 25%) or ITS fragment (12.5%) always showed low levels of species discrimination, while the combination of chloroplast DNA fragments (0% – 62.5%) and chloroplast DNA fragments plus ITS fragments (12.5% – 50%) had higher resolution for identifying *A. palmatum*. The highest discrimination rate of *rpl16* + *psbA-trnH* + *trnL-trnF* reached 62.5%. Thus, we concluded that *rpl16* + *psbA-trnH* + *trnL-trnF* could be considered as a potential barcode for taxa identification in *A. palmatum*.

Key words: *Acer palmatum*; DNA barcoding; Chloroplast DNA fragment; nrDNA ITS region; Discrimination rate

收稿日期: 2015-06-29, 退修日期: 2015-07-27。

基金项目: 北京市科技新星 (Z151100000315056); 国家环境保护公益性行业科研专项 (201509042)。

作者简介: 高健 (1990–), 男, 博士研究生, 研究方向为生物多样性 (E-mail: gaojian5688@163.com)。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: lijq@bjfu.edu.cn)。

槭属(*Acer*)鸡爪槭(*Acer palmatum* Thunb.)原产于日本,是广泛栽培于中国、日本及北美等北温带地区的重要森林树种,并因其错落的树形、变化的叶形等极具生态、经济及观赏价值^[1]。鸡爪槭种下分类群主要有:鸡爪槭(原变种)(*A. palmatum* subsp. *palmatum*)、小鸡爪槭(*A. palmatum* var. *thunbergii*)、细叶鸡爪槭(俗称羽毛槭, *A. palmatum* var. *dissectum*)、紫红鸡爪槭(俗称红枫, *A. palmatum* f. *atropurpureum*)以及种类繁多的栽培品种等^[2]。鸡爪槭种下划分目前主要参考传统形态分类学依据,如叶形与叶态、翅果大小及两翅间角度等。其中,小鸡爪槭与鸡爪槭(原变种)的主要形态区别为:叶较小且较深7裂,叶边缘重锯齿较锐尖,翅较小,小坚果呈卵圆形等。然而,这些形态差异的不显著有时会导致野外采集时难以辨别,并且鸡爪槭种间杂交频繁,形态性状特征趋同严重,也加大了鉴定难度。因此,鉴于形态学分类的局限性,需借助DNA条形码技术对具有重要园林、园艺及观赏价值的鸡爪槭种下分类群进行区分,这在理论与实践上都具有重要意义。

近年来,DNA条形码技术的兴起、成熟与应用为解决鸡爪槭种下分类群的划分与鉴定提供了可参考的新思路^[3-6]。DNA条形码技术由加拿大动物学家Hebert在2003年首次提出,即利用标准化的、较短的DNA序列对物种进行快速、准确的鉴定^[7]。与传统分类运用表型鉴定不同,DNA条形码鉴定技术不受个体形态特征限制和物种发育阶段影响,并可快速、准确的进行物种识别。在动物基因组片段的条形码鉴定方面,线粒体COI(细胞色素c氧化酶亚基I)基因具有良好的DNA条形码通用性,并在鉴定鱼类^[8-10]、鸟类^[11-13]、两栖类^[14,15]、鹿类^[16]、蝶类^[17]、蝇类^[18]等物种中取得了良好的效果。而在植物不同种类的条形码鉴定中,通用性较高的基因组片段目前还较为缺乏,但已有的相关研究成果为DNA条形码的筛选提供了参考。例如,Kress和Erickson^[19]提出采用叶绿体DNA片段组合*rbcl* + *psbA-trnH*对陆生植物进行鉴定;生物条形码联盟植物工作组(CBOL Plant Working Group)则推荐叶绿体DNA *rbcl* + *matK*片段组合作为陆生植物

的鉴定条形码^[20];中国植物条形码研究团队(China Plant BOL Group)认为叶绿体DNA片段*psbA-trnH*与核基因组ITS片段组合对于大多数被子植物的鉴定有较高的通用性^[21]。此外,还有一些叶绿体片段如*rpoB*和*rpoC1*^[22,23]、*rpl16*^[24]、*trnS-trnG*^[25]、*trnL-trnF*^[26]、*rps4*^[27]、*ycf1*^[28]等也陆续被用于条形码研究,且取得了较好的效果。

叶绿体DNA片段与核基因组ITS片段在多数植物鉴别中有较高的分辨率,但由于基因组片段在植物中的通用性相对较低,故为了筛选出适合鸡爪槭种下分类群的候选或标准条形码,本研究拟以3个常用的叶绿体DNA片段(*psbA-trnH*、*rbcl*、*matK*)、2个候选叶绿体DNA片段(*rpl16*、*trnL-trnF*)和核基因组ITS片段快速、准确地识别鸡爪槭种下8个分类群,以期筛选出适合鸡爪槭种下鉴定的DNA条形码片段或片段组合,为鸡爪槭种下分类群的快速、准确鉴定,以及鸡爪槭植物资源合理开发利用与保护、定向育种等提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究以鸡爪槭种下8个分类群的32株个体为材料(表1),每个分类群至少选取2株个体并采集其幼嫩叶片,分别放入置有变色硅胶的取样袋中干燥、备用。同时,压制鸡爪槭种下8个分类群的凭证标本并存放于北京林业大学林学院。

1.2 DNA提取、聚合酶链式反应(PCR)及测序

每份样品取约0.2 g干燥叶片,采用植物基因组DNA小型提取试剂盒(Plant Genomic DNA kit)提取基因组DNA。叶绿体基因组片段*psbA-trnH*、*rbcl*、*matK*、*rpl16*、*trnL-trnF*和核rDNA ITS片段的PCR扩增均在Labnet MultiGene™ 96-well Gradient Thermal Cycler上完成。PCR反应体系为20 μL,主要包含10~30 ng DNA模板、50 mmol/L Tris-HCl、1.5 mmol/L MgCl₂、1 mmol/L dNTPs、正反引物各0.3 μL(表2)、0.2 U *Taq* DNA聚合酶(博尔纳德股份有限公司,台湾)。PCR反应程序为:94℃预变性3 min;94℃变性30 s,52℃~58℃退火30 s,72℃延伸60 s,共30个循环;最后72℃延伸10 min。PCR扩增产物经1%琼脂糖

表 1 材料来源
Table 1 Origins of *Acer palmatum* material

分类群 Taxon	采集地点 Locality	样本编号 Code
细叶鸡爪槭 <i>Acer palmatum</i> var. <i>dissectum</i>	上海辰山 Chenshan, Shanghai	J2_1
	江苏栖霞山 Qixiashan, Jiangsu	JSNJxxs_06_001
	江苏紫金山 Zijinshan, Jiangsu	m002b
	上海辰山 Chenshan, Shanghai	i003c
	山东泰安 Taian, Shandong	n001i
紫红鸡爪槭 <i>A. palmatum</i> f. <i>atropurpureum</i>	江苏栖霞山 Qixiashan, Jiangsu	JSNJxxs_03_001
	江苏紫金山 Zijinshan, Jiangsu	JSNJzwy_01_019
	江苏徐州 Xuzhou, Jiangsu	JSXZzwy_01_035
	江西庐山 Lushan, Jiangxi	JXLS_06_002
	浙江西湖 Xihu, Zhejiang	ZJHZxh_03_001
	广西兴宁 Xingning, Guangxi	I010a
	广西青秀山 Qingxiushan, Guangxi	k005a
鸡爪槭(原变种) <i>A. palmatum</i> subsp. <i>palmatum</i>	湖北磨山 Moshan, Hubei	HBWHzwy_04_001
	河南白云山 Baiyunshan, Henan	HNbys_04_002
	江苏栖霞山 Qixiashan, Jiangsu	JSNJxxs_01_012
	江苏紫金山 Zijinshan, Jiangsu	JSNJzwy_02_016
	江西庐山 Lushan, Jiangxi	JXLS_05_001
	陕西杨凌 Yangling, Shanxi	SXXYnwafu_02_009
	浙江西湖 Xihu, Zhejiang	ZJHZzwy_07_002
	北京香山 Xiangshan, Beijing	b015
	上海辰山 Chenshan, Shanghai	i003e
	湖北十堰 Shiyan, Hubei	y002
小鸡爪槭 <i>A. palmatum</i> var. <i>thunbergii</i>	上海辰山 Chenshan, Shanghai	i003a
	广西兴宁 Xingning, Guangxi	I010b
‘红镜’鸡爪槭 <i>A. palmatum</i> ‘Beni Kagami’	上海辰山 Chenshan, Shanghai	x002p
	上海辰山 Chenshan, Shanghai	x002j
‘猩猩’鸡爪槭 <i>A. palmatum</i> ‘Shojo’	上海辰山 Chenshan, Shanghai	J5_1
	上海辰山 Chenshan, Shanghai	J13_1
‘青龙’鸡爪槭 <i>A. palmatum</i> ‘Seiryu’	上海辰山 Chenshan, Shanghai	J22_1
	上海辰山 Chenshan, Shanghai	x002o
‘深红细叶’鸡爪槭 <i>A. palmatum</i> ‘Ornatum’	四川茂县 Maoxian, Sichuan	u002
	山东泰安 Taian, Shandong	n001b

表 2 利用 PCR 扩增基因组片段的引物信息
Table 2 Primer pairs used for PCR amplification and sequencing of DNA regions

基因组片段 DNA regions	引物序列(5' – 3') Primer sequences	引物来源 Reference
<i>trnL-trnF</i>	<i>trnL</i> : CGAAATCGGTAGACGCTACG	Taberlet <i>et al.</i> ^[32]
	<i>trnF</i> : ATTTGAACCTGGTGACACGAG	Taberlet <i>et al.</i> ^[32]
<i>rpl16</i>	F: GCTATGCTTAGTGTGTGACTCGTTG	Jordan <i>et al.</i> ^[33]
	R: CTTCTCTATGTTGTTTACG	Asmussen ^[34]
<i>psbA-trnH</i>	<i>psbA</i> : GTTATGCATGAACGTAATGCTC	Sang <i>et al.</i> ^[35]
	<i>trnH</i> : CGCGCATGGTGGATTACAAATCC	Tate <i>et al.</i> ^[36]
<i>rbcL</i>	1F: ATGTCACCACAAACAGAAAC	Fay <i>et al.</i> ^[37]
	724R: TCGCATGTACCTGCAGTAGC	Olmstead <i>et al.</i> ^[38]
<i>matK</i>	3F_KIM: CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG	Hilu <i>et al.</i> ^[39]
	1R_KIM: ACCCAGTCCATCTGGAAATCCTTGGTTC	Hilu <i>et al.</i> ^[39]
ITS	ITS5: GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG	Baum <i>et al.</i> ^[40]
	ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC	Baum <i>et al.</i> ^[40]

凝胶电泳检测后，送往北京生工生物工程股份有限公司并在 ABI3730XL 遗传分析仪上进行测序。

1.3 数据分析

利用 Bioedit 7.1.11 软件对获得的基因组片段序列进行整理、拼接以及校正^[29]；使用 DNAsp 5.10.01 软件^[30]对各个序列进行插入缺失(indels)以及单核苷酸多态性(SNPs)统计。将经手工矫正后的各基因组片段的完整序列提交至 GenBank，其登录号为 KT160029~KT160168。将 5 个叶绿体基因组片段(*rpl16*、*psbA-trnH*、*trnL-trnF*、*rbcL*、*matK*)和核基因组 ITS 片段分别以单独、两两以及多重组合(63 种)构建矩阵，并以此来评估在单基因组片段或多基因组片段组合的情况下 DNA 条形码对槭属鸡爪槭种下分类群的鉴定能力。利用 MEGA 6.0 软件^[31]对 5 个叶绿体基因组片段和核基因组 ITS 片段的 Kimura-2-parameter distance (K2P)遗传距离进行计算分析，并构建单个以及多个基因组片段组合的邻接树(neighbor-joining tree)；运用两种不同的方法，即 plant working group 距离法(PWG-distance)和 NJ 系统聚类树法(Tree-Building)，对基因组片段的鉴定能力进行评估。生物条形码联盟植物工作组推荐使用的 PWG 距离法(单独计算每个物种的遗传距离)认为，当种间最小遗传距离大于种内最大遗传距离时，方可表明物种鉴定成功；而利用 Tree-Building 方法评估时，只有同一个分类群的不同个体在构建的 NJ 系统树上形成单系分支方可认为分类群鉴定成功。

2 结果与分析

2.1 各基因组片段的序列信息

对 5 个叶绿体 DNA 片段和核基因组 ITS 片段

的序列长度、变异位点、插入缺失数等的分析结果(表 3)显示，各 DNA 片段的测序成功率均为 100%；叶绿体 DNA 片段总长度为 3754 bp，核基因组 ITS 片段为 694 bp。在 5 个叶绿体片段中，*matK* 序列的变异位点最多，为 61 个(54 个 SNPs，7 个 indels)，占其片段总长度的 7.48%；*trnL-trnF* 序列的变异位点为 49 个(40 个 SNPs，9 个 indels)，占其片段总长度的 5.46%；*psbA-trnH* 序列的变异位点为 40 个(33 个 SNPs，7 个 indels)，占其片段总长度的 8.87%；*rpl16* 序列的变异位点为 17 个(11 个 SNPs，6 个 indels)，占其片段总长度的 1.81%；*rbcL* 序列的变异位点最少，为 6 个(4 个 SNPs，2 个 indels)。核 rDNA ITS 片段的变异位点为 61 个(51 个 SNPs，10 个 indels)。

2.2 单个及多个 DNA 片段的分辨率

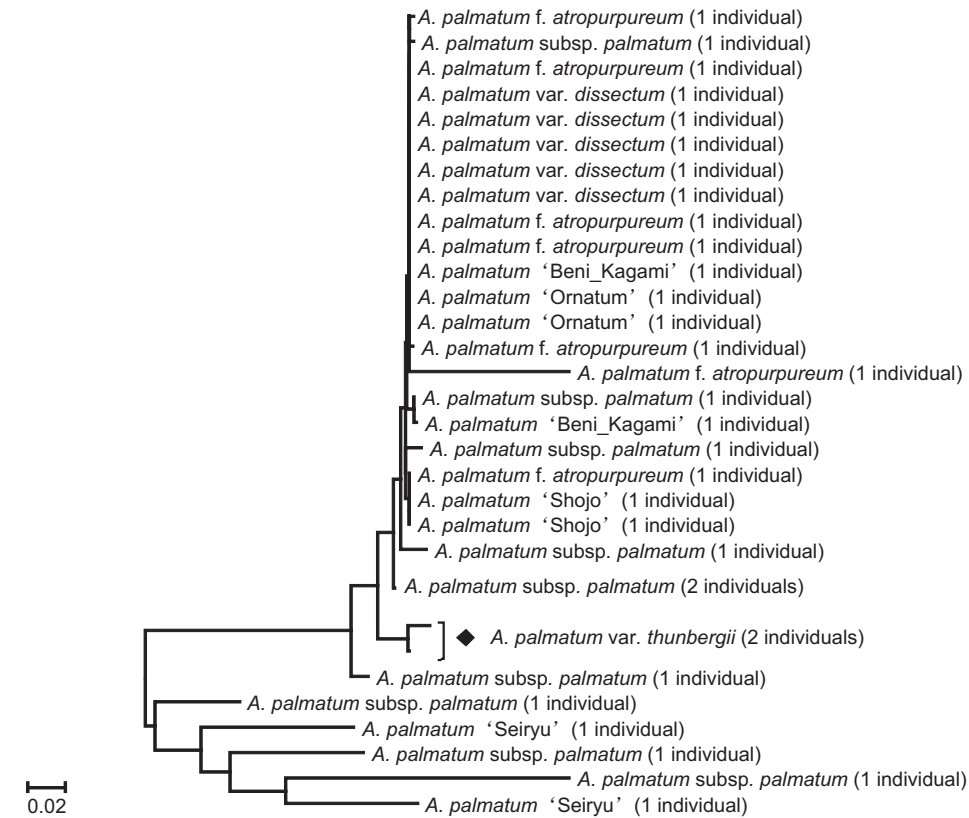
采用 PWG-distance 和 Tree-Building 两种方法比较了单个 DNA 片段和多个 DNA 片段组合对鸡爪槭种下 8 个分类群的分辨率(图 1)，结果显示，单个叶绿体 DNA 片段 *trnL-trnF*、*psbA-trnH*、*rpl16*、*rbcL*、*matK* 的分辨率分别为 25%、12.5%、0%、0%、0%，核基因组 ITS 片段的分辨率为 12.5%。在叶绿体 DNA 片段的不同组合分析中，2 个片段组合的分辨率为 0%~37.5%，其中生物条形码联盟植物工作组推荐的 *matK* + *rbcL* 组合的分辨率为 0%；3 个片段组合的分辨率为 0%~62.5%，其中 *rpl16* + *psbA-trnH* + *trnL-trnF* 组合的分辨率最高(62.5%)，能鉴定出 8 个分类群中的 5 个；4 个、5 个片段组合的分辨率为 12.5%~62.5%，表明组合片段虽增加，但对鸡爪槭种下 8 个分类群的分辨率没有提高。在叶绿体 DNA 片段与核基因组 ITS 片段联合构建的组合片段分析中，所有片段组合的分辨率介于 12.5%~50% 之间，与相对应的单

表 3 用于条形码分类的 DNA 片段长度、变异位点、分辨率和遗传距离

Table 3 Sequence length, variation sites of each DNA region, discrimination rate and genetic distance for DNA barcoding

基因组片段 DNA regions	比对长度 Aligned length (bp)	SNPs 位点数 No. of SNPs	插入缺失数 No. of indels	变异位点 No. of variation sites	PWG 法分辨率 Discrimination rate of PWG	NJ 法分辨率 Discrimination rate of NJ	分类群间遗传距离* Inter-taxon distance	分类群内遗传距离* Intra-taxon distance
<i>trnL-trnF</i>	897	40	9	49 (5.46%)	25%	25%	0~0.0298	0~0.0298
<i>rpl16</i>	935	11	6	17 (1.81%)	0%	0%	0~0.0189	0~0.0125
<i>psbA-trnH</i>	451	33	7	40 (8.87%)	12.5%	12.5%	0~0.0785	0~0.0690
<i>rbcL</i>	655	4	2	6 (0.01%)	0%	0%	0~0.0061	0~0.0046
<i>matK</i>	816	54	7	61 (7.48%)	0%	0%	0~0.0467	0~0.0400
ITS	694	51	10	61 (8.8%)	12.5%	12.5%	0~0.4169	0~0.3766

Note: PWG, Plant Working Group; NJ, Neighbor-joining. * mean K2P distance.



菱形表示利用 Tree-building 方法被成功鉴定的分类群。下同。
Taxa with solid rhombi were successfully delimited using the tree-building method. Same below.

图 2 基于核基因组 ITS 片段构建的鸡爪槭种下分类群的 NJ 系统发育树

Fig. 2 Neighbor-joining phylogenetic tree of *Acer palmatum* based on internal transcribed spacer region

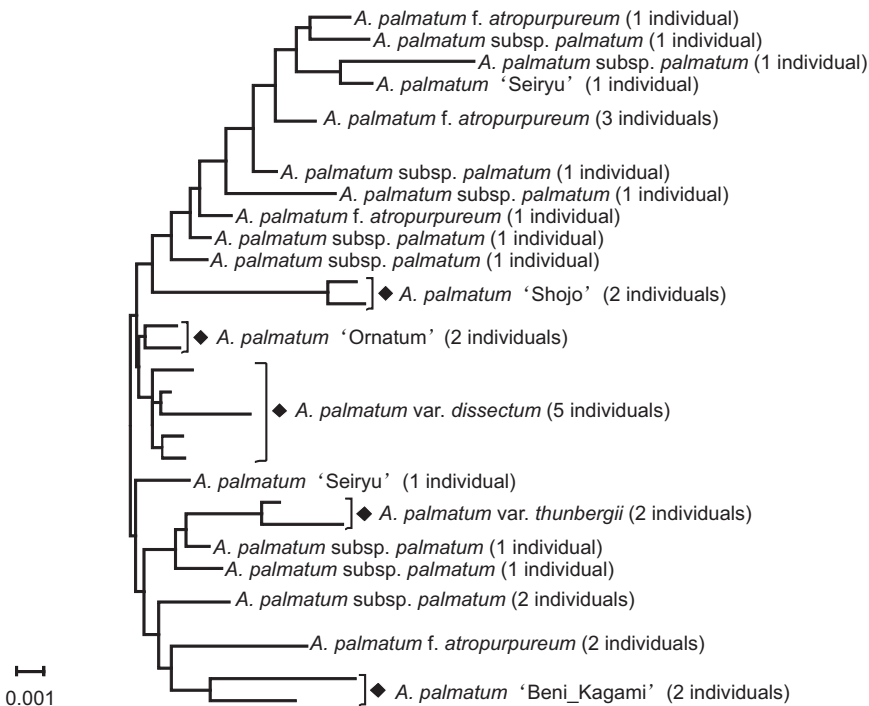


图 3 基于 *rpl16* + *psbA-trnH* + *trnL-trnF* 片段组合构建的鸡爪槭种下分类群 NJ 系统发育树

Fig. 3 Neighbor-joining phylogenetic tree of *Acer palmatum* based on combination of *rpl16*, *psbA-trnH* and *trnL-trnF* DNA regions

度最短(451 bp), 但变异位点率最高(8.87%); *trnL-trnF* 的变异位点数较多, 在单个 DNA 片段的分辨率中最高(表 3), 表现出良好的鉴定能力; *rpl16* 片段作为族群遗传研究中常用的 DNA 片段^[24], 却在鸡爪槭种下分类群鉴定中效果一般; *rbcL* 的变异位点可能主要存在于种以上的分类群中^[19,41,42], 其在鸡爪槭种下分类群鉴定中变异位点率仅为 0.01%。采用 5 个叶绿体 DNA 片段进行组合鉴别时, 对鸡爪槭种下分类群的分辨率仅为 37.5%(低于 3 个或 4 个 cpDNA 片段的部分组合), 这可能是本研究采用的 5 个叶绿体基因组片段中, 存在进化速率较慢且其序列中无效变异位点居多的片段, 导致组合片段的数量增加但鉴定能力下降的现象^[42], 此结果也曾在莎草科^[50]、蔓藓科^[51]等研究中报道。

3.2.2 多个叶绿体 DNA 片段与核基因组 ITS 片段组合

核基因组和叶绿体基因组具有不同的遗传模式, 即核基因是双亲遗传、叶绿体基因为母系遗传。依据不同的遗传方式, 可以追踪植物不同的进化历史, 阐明植物的进化过程, 其中进化速率较快的核基因组比叶绿体基因组会携带更多的遗传信

息^[52-54]。目前选择多种基因组片段组合, 尤其是不同遗传背景来源的基因组片段组合并构建系统发育矩阵, 是进行 DNA 条形码鉴定尝试较多的方法之一^[25,55]。

在核基因组片段的选取上, ITS 区一直是选用的热点片段之一^[21,56], 尤其与叶绿体基因组片段组合可显著提升物种分辨率^[26,57-59]。而在本研究中, 多个叶绿体 DNA 片段与核基因组 ITS 片段组合的分辨率为 12.5%~50%, 其中 *rpl16* + *psbA-trnH* + *trnL-trnF* + ITS (图 4) 与 *rbcL* + *rpl16* + *psbA-trnH* + *trnL-trnF* + ITS 分辨率均为 50%, 即加入核 rDNA ITS 片段并未使分辨率增加。ITS 片段虽在植物种下分类群中的序列变异较大^[49], 且在许多植物中的鉴定效率较高^[21], 但对于世代周期较长且种内分类群杂交、渐渗较为频繁的鸡爪槭来讲, 核 rDNA ITS 片段可能有一定的局限性(不是很好的 DNA 条形码选择), 故建议开发其他适于鸡爪槭种下分类群鉴定的核基因组片段。

本研究中未能被准确鉴定的分类群主要有鸡爪槭(原变种)与紫红鸡爪槭(俗称红枫)。这 2 个分类群对环境适应性较强, 其被应用于园林、园艺景观的频率也较高, 致使两者的分布与应用范围较为

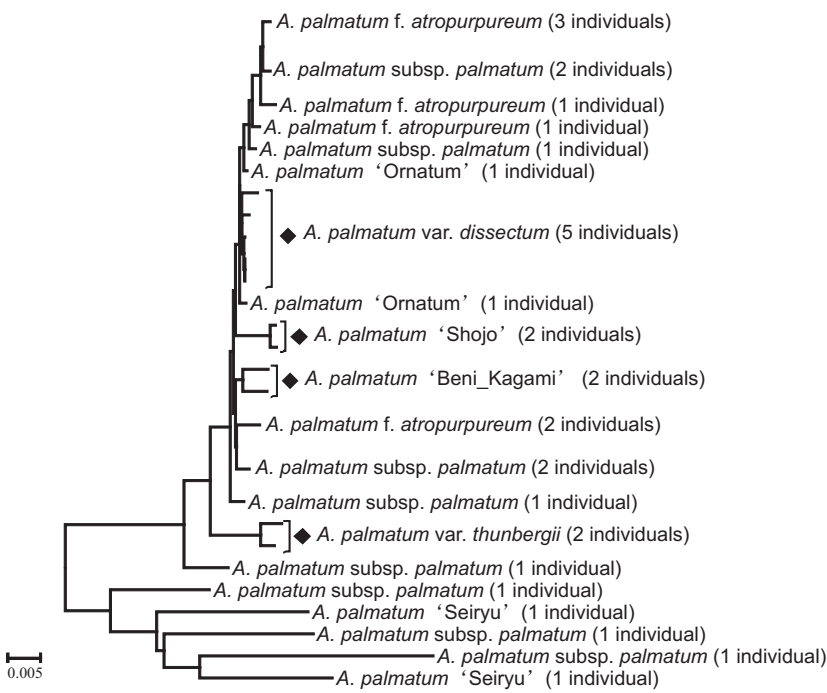


图 4 基于 *rpl16* + *psbA-trnH* + *trnL-trnF* + ITS 片段组合构建的鸡爪槭种下分类群 NJ 系统发育树
Fig. 4 Neighbor-joining phylogenetic tree of *Acer palmatum* based on combination of chloroplast (*rpl16*, *psbA-trnH* and *trnL-trnF*) regions and nrDNA ITS

广泛,从而使相同分类群中不同个体可能因区域性适应而累积各自独有的突变,这也许是鸡爪槭(原变种)与紫红鸡爪槭未被准确鉴定的原因。

本研究结果虽未实现对全部材料的准确识别和鉴定,但 *rpl16* + *psbA-trnH* + *trnL-trnF* 片段组合以其相对较高的分辨率而被优先考虑作为鉴定鸡爪槭种下分类群的DNA条形码。该条形码的筛选也可为槭属植物遗传多样性分析方面提供参考,并为完善木本植物DNA条形码技术研发奠定基础。

致谢: 感谢台湾师范大学廖培钧副教授、黄秉宏博士对论文初稿的修改;感谢北京林业大学林学院分子生态学实验室侯盟博士、鲁四海博士在数据处理上的帮助。

参考文献:

- [1] 吕运舟, 黄利斌, 何旭东, 窦全琴. 鸡爪槭园艺品种分类及栽培研究综述[J]. 江苏林业科技, 2014, 41(5): 41-45.
- [2] 方文培. 中国植物志: 第46卷[M]. 北京: 科学出版社, 1981: 129.
- [3] Schindel DE, Miller SE. DNA barcoding a useful tool for taxonomists[J]. *Nature*, 2005, 435(7038): 17.
- [4] Hollingsworth PM, Graham SW, Little DP. Choosing and using a plant DNA barcode[J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19254.
- [5] 高连明. DNA条形码在生物多样性编目与评价中的应用[J]. 生物多样性, 2015, 23(3): 286-287.
- [6] 马克平. DNA条形码: 从物种到生物群区[J]. 生物多样性, 2015, 23(3): 279-280.
- [7] Hebert PD, Ratnasingham S, Dewaard JR. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270(Suppl 1): 96-99.
- [8] Ward RD, Hanner R, Hebert PD. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL[J]. *J Fish Biol*, 2009, 74(2): 329-356.
- [9] 彭居俐, 王绪祯, 王丁, 何舜平. 基于线粒体 *COI* 基因序列的DNA条形码在鲤科鲃属鱼类物种鉴定中的应用[J]. 水生生物学报, 2009, 33(2): 271-276.
- [10] 柳淑芳, 陈亮亮, 戴芳群, 庄志猛. 基于线粒体 *COI* 基因的DNA条形码在石首鱼科(Sciaenidae)鱼类系统分类中的应用[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(2): 223-232.
- [11] Hebert PD, Stoeckle MY, Zemlak TS, Francis CM. Identification of birds through DNA barcodes[J]. *PLoS Biol*, 2004, 2(10): e312.
- [12] Kerr KCR, Stoeckle MY, Dove CJ, Weigt LA, Francis CM, Hebert PDN. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds[J]. *Mol Ecol Notes*, 2007, 7(4): 535-543.
- [13] 梁刚, 张卫, 雷富民, 尹祚华, 黄原, 李天宪. 雀形目15种鸟类 *Col* 与 *Cytb* 基因序列的比较[J]. 动物分类学报, 2007, 32(3): 613-620.
- [14] Vences M, Thomas M, Bonett RM, Vieites DR. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges[J]. *Philos T Roy Soc B*, 2005, 360(1462): 1859-1868.
- [15] Smith MA, Poyarkov NA, Hebert PD. *COI* DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge[J]. *Mol Ecol Resour*, 2008, 8(2): 235-246.
- [16] 张蓉, 刘春生, 黄璐琦, 王学勇, 崔光红, 董栗. 鹿茸饮片的DNA条形码鉴别研究[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(4): 263-266.
- [17] 诸立新, 吴孝兵, 晏鹏. 基于 *COI* 基因部分序列对尾凤蝶属(鳞翅目, 凤蝶科)四种蝴蝶分子系统关系及相关问题的探讨[J]. 动物分类学报, 2006, 31(1): 25-30.
- [18] 陈庆, 白洁, 刘力, 林红斌, 唐晖, 赵伟, 周红章, 严江伟, 刘雅诚, 胡松年. 北京地区7种常见嗜尸性蝇类的 *COI* 基因序列分析及DNA条形码的建立[J]. 昆虫学报, 2009, 52(2): 202-209.
- [19] Kress WJ, Erickson DL. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcl* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region[J]. *PLoS One*, 2007, 2(6): e508.
- [20] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(31): 12794-12797.
- [21] Li DZ, Gao LM, Li HT, Wang H, Ge XJ, Liu JQ, Chen ZD, Zhou SL, Chen SL, Yang JB, Fu CX, Zeng CX, Yan HF, Zhu YJ, Sun YS, Chen SY, Zhao L, Wang K, Yang T, Duan GW. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(49): 19641-19646.
- [22] 于杰, 闫化学, 鲁振华, 周志钦. 基于柑橘及其近缘属植物DNA条形码的叶绿体编码序列筛选[J]. 中国农业科学, 2011, 44(2): 341-348.
- [23] Chase MW, Cowan RS, Hollingsworth PM, Cassio

- VDB, Madri Án S, Petersen G, Seberg O, Rg-sensen TJ, Cameron KM, Carine M. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants[J]. *Taxon*, 2007, 56(2): 295–299.
- [24] 姚领爱, 胡之璧, 郑志仁, 周吉燕, 王莉莉, 化海霞, 黎万奎. 铁皮石斛种质资源研究中的 DNA 条形码初探[J]. 上海农业学报, 2012(1): 49–54.
- [25] 邹嘉宾, 王茜, 李丽丽, 刘建全. 结合叶绿体和核 DNA 序列变异可提高云杉属物种的分子鉴别率[J]. 植物分类与资源学报, 2013, 35(3): 375–385.
- [26] 程芳婷, 李忠虎, 刘春艳, 原超, 李雪童, 刘占林. 地黄属植物的 DNA 条形码研究[J]. 植物科学学报, 2015, 33(1): 25–32.
- [27] 李丹丹, 郭水良, 于晶, 李莎, 曹同. 基于 4 个叶绿体基因识别蕁藓属(*Macromitrium*)植物的可行性研究[J]. 植物科学学报, 2013, 31(1): 23–33.
- [28] Dong WP, Xu C, Li CH, Sun JH, Zuo YJ, Shi S, Cheng T, Guo JJ, Zhou SL. *ycf1*, the most promising plastid DNA barcode of land plants[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8348.
- [29] Hall TA. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. *Nucl Acids Sympos Series*, 1999, 41: 95–98.
- [30] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451–1452.
- [31] Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(12): 2725–2729.
- [32] Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA[J]. *Plant Mol Biol*, 1991, 17(5): 1105–1109.
- [33] Jordan WC, Courtney MW, Neigel JE. Low levels of intraspecific genetic variation at a rapidly evolving chloroplast DNA locus in North American duckweeds (*Lemnaceae*)[J]. *Am J Bot*, 1996, 83(4): 430–439.
- [34] Asmussen CB. Toward a chloroplast DNA phylogeny of the tribe Geonomeae (*Palmae*)[J]. *Mem New York Bot Gard*, 1999, 83: 121–129.
- [35] Sang T, Crawford D, Stuessy T. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (*Paeoniaceae*)[J]. *Am J Bot*, 1997, 84(9): 1120–1136.
- [36] Tate JA, Simpson BB. Paraphyly of *Tarasa* (*Malvaceae*) and diverse origins of the polyploid species[J]. *Syst Bot*, 2003, 28(4): 723–737.
- [37] Fay MF, Swensen SM, Chase MW. Taxonomic affinities of *Medusagyne oppositifolia* (*Medusagynaceae*)[J]. *Kew Bullet*, 1997, 52(1): 11–120.
- [38] Olmstead RG, Michaels HJ, Scott KM, Palmers JD. Monophyly of the Asteridae and identification of their major lineages inferred from DNA sequences of *rbcL*[J]. *Ann Mo Bot Gard*, 1992, 79(2): 249–265.
- [39] Hilu KW, Borsch T, Müller K, Soltis DE, Soltis PS, Savolainen V, Chase MW, Powell MP, Alice LA, Evans R, Sauquet H, Neinhuis C, Slot TA, Rohwer JG, Campbell CS, Chatrou LW. Angiosperm phylogeny based on *matK* sequence information[J]. *Am J Bot*, 2003, 90(12): 1758–1776.
- [40] Baum DA, Small RL, Wendel JF. Biogeography and floral evolution of baobabs (*Adansonia*, *Bombacaceae*) as inferred from multiple data sets[J]. *Syst Biol*, 1998, 47(2): 181–207.
- [41] Fazekas AJ, Burgess KS, Kesanakurti PR, Graham SW, Newmaster SG, Husband BC, Percy DM, Hajibabaei M, Barrett SC. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well[J]. *PLoS One*, 2008, 3(7): e2802.
- [42] Lahaye R, Van DBM, Bogarin D, Warner J, Pupulin F, Gigot G, Maurin O, Duthoit S, Barraclough TG, Savolainen V. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(8): 2923–2928.
- [43] 陈士林, 姚辉, 韩建萍, 辛天怡, 庞晓慧, 石林春, 罗焜, 宋经元, 侯典云, 石上梅, 钱忠直. 中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 54–61.
- [44] 王晓玥, 陈晓辰, 廖保生, 王丽丽, 韩建萍. 基于 DNA 条形码鉴定豆蔻类中药材[J]. 中国现代中药, 2014, 16(11): 888–894.
- [45] Skepner AP, Krane DE. RAPD reveals genetic similarity of *Acer saccharum* and *Acer nigrum*[J]. *Heredity*, 1997, 80(4): 422–428.
- [46] Pfosser MF, Guzy-Wróbelska J, Sun BY, Stuessy TF, Sugawara T, Fuji N. The origin of species of *Acer* (*Sapindaceae*) endemic to Ullung Island, Korea[J]. *Syst Bot*, 2002, 27(2): 351–367.
- [47] 张毅, 刘伟, 李桂祥. 世界各国的日本枫树垂枝型园

- 艺品种资源[J]. 中国农学通报, 2014, 30(10): 73–82.
- [48] Renner SS, Grimm GW, Schneeweiss GM, Stuessy TF, Ricklefs RE. Rooting and dating maples (*Acer*) with an uncorrelated-rates molecular clock: implications for North American/Asian disjunctions[J]. *Syst Biol*, 2008, 57(5): 795–808.
- [49] 宁淑萍, 颜海飞, 郝刚, 葛学军. 植物 DNA 条形码研究进展[J]. 生物多样性, 2008, 16(5): 417–425.
- [50] Starr JR, Naczi RF, Chouinard BN. Plant DNA barcodes and species resolution in sedges (*Carex*, Cyperaceae) [J]. *Mol Ecol Resour*, 2009, 9(Suppl 1): 151–163.
- [51] 赵丽嘉, 贾渝, 周世良, 杜桂森. 藓类植物 DNA 条码的初步研究——以蔓藓科部分属为例[J]. 云南植物研究, 2010, 32(3): 239–249.
- [52] Du FK, Xiao LP, Jian QL, Lascoux M, Feng SH, Petit RJ. Direction and extent of organelle DNA introgression between two spruce species in the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *New Phytol*, 2011, 192(4): 1024–1033.
- [53] Du FK, Petit RJ, Liu JQ. More introgression with less gene flow: chloroplast vs. mitochondrial DNA in the *Picea asperata* complex in China, and comparison with other Conifers [J]. *Mol Ecol*, 2009, 18(7): 1396–1407.
- [54] 杜芳, 徐放. 基因流介导的种间渐渗与物种界定[J]. 植物分类与资源学报, 2012, 34(3): 257–262.
- [55] Hollingsworth PM. Refining the DNA barcode for land plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(49): 19451–19452.
- [56] 葛颂, Schaal BA, 洪德元. 用核糖体 DNA 的 ITS 序列探讨裂叶沙参的系统位置——兼论 ITS 片段在沙参属系统学研究中的价值 [J]. 植物分类学报, 1997, 35(5): 385–395.
- [57] Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH. Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(23): 8369–8374.
- [58] Ren BQ, Xiang XG, Chen ZD. Species identification of *Alnus* (Betulaceae) using nrDNA and cpDNA genetic markers [J]. *Mol Ecol Resour*, 2010, 10(4): 594–605.
- [59] Xiang XG, Hu H, Wang W, Jin XH. DNA barcoding of the recently evolved genus *Holcoglossum* (Orchidaceae: Aeridinae): a test of DNA barcode candidates [J]. *Mol Ecol Resour*, 2011, 11(6): 1012–1021.

(责任编辑: 刘艳玲)