

悬钩子属植物 rDNA ITS 序列的克隆与分析

蒋明¹, 李嵘嵘², 管铭¹, 李金枝¹

1. 台州学院生命科学学院, 浙江 椒江 318000

2. 台州学院医药化工学院, 浙江 椒江 318000

摘要: 目的 通过测定和分析 15 种悬钩子属 *Rubus* L. 药用植物的 rDNA ITS 序列, 为分子鉴定和遗传多样性研究奠定基础。方法 以叶片基因组 DNA 和通用引物为材料, 用 PCR 法克隆 rDNA ITS 全长, 并利用生物信息学软件对序列进行分析。结果 15 种悬钩子属植物 ITS1、ITS2 和 5.8 S 的序列长度分别为 255~258、208~211 和 164 bp; ITS1 和 ITS2 序列有变异位点 138 个, 其中信息位点 41 个, 序列存在较多的颠换、转换和缺失现象; 5.8 S 序列较为保守, 仅含 4 个变异位点, 没有发现信息位点; 15 种悬钩子属植物的遗传距离为 0.139 0~0.008 1, 灰毛泡和锈毛莓的遗传距离最小。结论 获得了 15 种悬钩子属药用植物的 rDNA ITS 序列, 为分子鉴定和遗传多样性研究奠定了基础。

关键词: 悬钩子属; rDNA; ITS; 分子克隆; 序列分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)15-2143-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.15.021

Cloning and analysis of rDNA ITS sequences from plants in *Rubus* L.

JIANG Ming¹, LI Rong-rong², GUAN Ming¹, LI Jin-zhi¹

1. College of Life Science, Taizhou University, Jiaojiang 318000, China

2. College of Pharmaceutical and Chemical Engineering, Taizhou University, Jiaojiang 318000, China

Abstract: Objective To provide the evidences for molecular identification as well as genetic diversity studies, sequencing and comparison of rDNA ITS sequences from 15 plants in *Rubus* L. were performed. **Methods** Full length rDNA ITS sequences were isolated from leaf genomic DNA by PCR method with universal primers, and these sequences was analyzed using bioinformatic softwares. **Results** The length of ITS1, ITS2, and 5.8 S sequences for the 15 plants in *Rubus* L. were 255—258, 208—211, and 164 bp, respectively. Total 138 variable sites were found in ITS1 and ITS2 sequences with 41 parsimony information ones, and some transitions, transversions, and deletions were observed. The 5.8 S sequences were more conserved and there were only four variable sites with no parsimony information ones. The genetic distance of the 15 plants in *Rubus* L. ranged from 0.139 0 to 0.008 1, and the smallest genetic distance was observed between *R. irenaeus* and *R. reflexus*. **Conclusion** The rDNA ITS sequences of the 15 plants in *Rubus* L. are obtained, which would provide the evidences for molecular identification and genetic diversity studies.

Key words: *Rubus* L.; rDNA; ITS; molecular cloning; sequence analysis

悬钩子属 *Rubus* L. 是蔷薇科 (Rosaceae) 蔷薇亚科 (Rosoidae) 的一个大属, 全世界有 700 余种, 主要产于北半球温带地区, 我国约有 200 种^[1]。悬钩子属植物中的一些种类具有观赏、食用、工业用和药用价值, 该属植物作为药用已有 2 000 多年的历史^[2]。木莓 *Rubus swinhoei* Hance、寒莓 *R. buergeri* Miq.、高粱泡 *R. lambertianus* Ser. 和空心泡 *R. rosaefolius* Smith 等分布广泛、方便易得, 它们都是民间常用的药用植物^[3-5]。如木莓根中含有木莓酸、胡萝卜苷、乌苏酸和蔷薇酸等成分, 具有凉

血止血、活血调经和收敛解毒的功效^[6-7]; 而寒莓全株含蔷薇酸和寒莓酸甲酯等化合物, 具有清热解毒与活血止痛的功效^[8]。近年来, 研究人员在悬钩子植物资源调查^[4-5]、化学成分^[7-8]、花粉形态^[9]、核型研究^[10]和修订补遗^[11-12]等方面进行了大量研究, 并取得了一定的成果。

悬钩子属植物种类繁多, 性状变异大, 常存在无融合生殖类型, 有时依据外部形态很难区分, 制成药材后更难区别^[1]。随着分子生物学技术的发展, 分子标记技术在悬钩子属植物的遗传多样性、亲缘

收稿日期: 2013-04-09

作者简介: 蒋明 (1973—), 男, 浙江嵊州人, 博士, 副教授, 研究方向为植物发育生物学及其分子调控。E-mail: jiangming1973@139.com

网络出版时间: 2013-07-05 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130705.1538.008.html>

关系鉴定和物种鉴定等方面得到了应用,包括简单重复序列间多态性(inter-simple sequence repeat, ISSR)、随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)、简单序列重复标记(simple sequence repeats, SSR)和内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)等^[13-18]。这些分子标记各有优缺点,其中 ITS 具有操作简单、信息位点丰富和特异性高等优点,在药用植物研究中得到了广泛应用。本研究以 15 种悬钩子属药用植物为材料,利用 PCR 法克隆各自

的 ITS 序列,经测序后用生物信息学软件进行分析,为分子鉴定和遗传多样性研究提供参考。

1 材料与仪器

1.1 材料

15 种悬钩子属植物分别采自浙江省的庆元、黄岩、遂昌、苍南、天台和临海等地,采集地点、经纬度和海拔等信息见表 1,由台州学院高级实验师陈彤鉴定。采集无病虫害、完整的新鲜叶片,放在变色硅胶中干燥,带回实验室后先用自来水冲洗,然后用无菌 ddH₂O 冲洗,晾干后置于-80 °C 的低温冰箱中保存备用。

表 1 15 种悬钩子属植物来源
Table 1 Sources of 15 plants in *Rubus* L.

编号	植物名称	采集地	经度	纬度	海拔 / m
1	周毛悬钩子 <i>Rubus amphidasys</i>	庆元百山祖	27°37'	119°06'	378
2	寒莓 <i>R. buergeri</i>	黄岩划岩山	28°41'	121°08'	312
3	尾叶悬钩子 <i>R. caudifolius</i>	庆元百山祖	27°43'	119°12'	1 300
4	山莓 <i>R. corchorifolius</i>	临海括苍山	28°49'	120°58'	389
5	插田泡 <i>R. coreanus</i>	天台华顶山	29°15'	121°05'	843
6	白叶莓 <i>R. innominatus</i>	遂昌九龙山	28°41'	118°53'	386
7	灰毛泡 <i>R. irenaeus</i>	庆元百山祖	27°30'	118°59'	437
8	高粱泡 <i>R. lambertianus</i>	临海云峰山	28°50'	121°05'	146
9	茅莓 <i>R. parvifolius</i>	黄岩划岩山	28°41'	121°08'	356
10	梨叶悬钩子 <i>R. pirifolius</i>	苍南鹤顶山	27°19'	120°27'	423
11	锈毛莓 <i>R. reflexus</i>	天台华顶山	29°15'	121°05'	697
12	空心泡 <i>R. rosifolius</i>	临海云峰山	28°50'	121°06'	86
13	棕红悬钩子 <i>R. rufus</i>	庆元百山祖	27°31'	119°03'	651
14	木莓 <i>R. swinhoei</i>	遂昌九龙山	28°40'	118°54'	248
15	光滑悬钩子 <i>R. tsangii</i>	遂昌九龙山	28°39'	118°54'	288

1.2 仪器

BIO-RAD C1000 型 PCR 仪; BIO-RAD Gel Doc XR 凝胶成像系统; SANYO MDF-382E (CN) 型超低温冰箱; BECKMAN Allegra 64R 高速冷冻离心机; 北京六一 DYY-12 型电泳仪。

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取

称取约 0.2 g 叶片,置于 1.5 mL 离心管的底部,经液氮冷冻后研磨成粉末用于 DNA 的提取, DNA 的制备采用 SDS 法^[19]。

2.2 ITS 序列的克隆、转化和测序

以 5'-TATGCTTAAAYTCAGCGGGT-3' 和 5'-AACAAAGGTTTCCGTAGGTGA-3' 为上、下游引物,分别以各悬钩子属植物的基因组 DNA 为模板进行

PCR 扩增。每个 PCR 反应体系中,加入 2 μL 10×PCR 缓冲液(含 20 mmol/L Mg²⁺), 0.45 μL dNTPs (上海生工生物工程公司), 0.45 μL Taq DNA 聚合酶(北京鼎国有限公司), 各 0.5 μL 上、下游引物(0.25 μmol/L), 30 ng DNA 模板,最后加 ddH₂O 至 20 μL。反应在伯乐 C1000 型 PCR 仪上进行,扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 40 s, 53.5 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 75 s, 33 个循环后于 72 °C 最后延伸 10 min。

2.3 PCR 产物的回收、连接和测序

PCR 产物经电泳后在紫外灯下用洁净刀片割取含目的条带的胶块,然后用 DNA 凝胶回收试剂盒(北京鼎国)回收、纯化目的片段,操作根据其提供的说明书进行。各取 2.5 μL 回收产物,与 p-GEM T-easy 载体(Promega)连接,室温放置 1 h

后用热击法将连接产物转化入 DH5 α 感受态细胞 (北京鼎国), 经平板培养、蓝白斑筛选、液体培养和 PCR 验证, 各取 3 个阳性克隆用于测序。

2.4 序列分析

多序列比对采用 ClustalX 1.81 软件^[20]; Excel 的 LEN 和 SUBSTITUTE 函数用于计算 GC 值; 遗传距离计算用 MEGA 3.1 软件^[21]; 系统发育树构建采用 PAUP 4.0 软件^[22], 建树用 MP 法 (maximum parsimony, 最大简约法), 经 1 000 次自举检测。

3 结果与分析

3.1 ITS 序列的克隆

利用通用引物对, 以基因组 DNA 为模板, 克隆到 15 种悬钩子属植物的 ITS 全长序列 (表 2)。结果表明, 15 种植物的 ITS 全长范围为 627~631 bp, 光滑悬钩子的 ITS 序列最长, 尾叶悬钩子次之, 为 630 bp, 棕红悬钩子、茅莓、白叶莓和插田泡的

ITS 序列最短; 15 种悬钩子属植物的 5.8 S 序列长度一致, 均为 164 bp, 说明该序列的长度比较保守; 光滑悬钩子的 ITS1 最长, 为 258 bp, 空心泡次之, 为 256 bp, 其余均为 255 bp; ITS2 的序列长度变异较大, 尾叶悬钩子的 ITS2 最长, 为 211 bp, 周毛悬钩子和锈毛莓次之, 为 210 bp, 而空心泡、插田泡、白叶莓、茅莓和棕红悬钩子的 ITS2 序列最短, 均为 208 bp。

15 种悬钩子属植物的 5.8 S、ITS1 和 ITS2 的 GC 值也有一定的差异, 5.8 S 序列中, 山莓和插田泡的 GC 值最小, 均为 54.3%, 其余 13 种的 GC 值均为 54.9%; ITS1 的 GC 值为 52.7%~58.4%, 插田泡的 GC 值最大, 尾叶悬钩子、灰毛泡、高粱泡、梨叶悬钩子和棕红悬钩子次之, 为 56.1%, 光滑悬钩子的 GC 值最小; ITS2 的 GC 值为 52.2%~60.6%, 插田泡的 GC 值最大, 尾叶悬钩子次之, 为 58.8%, 光滑悬钩子的 GC 值最小 (表 2)。

表 2 悬钩子属植物 ITS 序列长度及 GC 值
Table 2 ITS sequence full length and GC contents of plants in *Rubus* L.

编号	ITS 全长 / bp	5.8 S		ITS1		ITS2	
		长度 / bp	GC 值 / %	长度 / bp	GC 值 / %	长度 / bp	GC 值 / %
1	629	164	54.9	255	55.3	210	55.7
2	628	164	54.9	255	55.7	209	57.9
3	630	164	54.9	255	56.1	211	58.8
4	628	164	54.3	255	53.3	209	55.0
5	627	164	54.3	255	58.4	208	60.6
6	627	164	54.9	255	54.5	208	57.2
7	628	164	54.9	255	56.1	209	56.9
8	628	164	54.9	255	56.1	209	57.4
9	627	164	54.9	255	54.1	208	56.7
10	628	164	54.9	255	56.1	209	56.5
11	629	164	54.9	255	55.3	210	57.1
12	628	164	54.9	256	55.1	208	52.4
13	627	164	54.9	255	56.1	208	56.3
14	628	164	54.9	255	55.7	209	57.9
15	631	164	54.9	258	52.7	209	52.2

3.2 5.8 S 序列的比较分析

15 种悬钩子属植物的 5.8 S 序列经 ClustalX 软件比对后的结果见图 1, 结果表明, 除寒莓、山莓和插田泡外, 其余 12 种植物的 5.8 S 序列完全一致。插田泡 5.8 S 序列的 22 位碱基为 A, 150 位为 T, 而其余植物在这 2 个位点上的碱基分别为 T 和 G; 山莓 5.8 S 序列的 124 位碱基为 A, 而其余 14 种为 G; 寒莓 131 位为 A, 其他 14 种均为 T。5.8 S 序列

有保守位点 (conserved site) 160 个、变异位点 (variable site) 4 个, 而信息位点 (parsim-info site) 为 0 个。

3.3 ITS1 和 ITS2 序列的比较分析

与 5.8 S 相比, ITS1 序列的变异较为丰富, 存在多次缺失/插入、转换和颠换现象 (图 2)。除光滑悬钩子外, 47~49 位均存在 1 或 3 个碱基的缺失/插入现象, 其中, 空心泡有 1 个碱基的缺失/

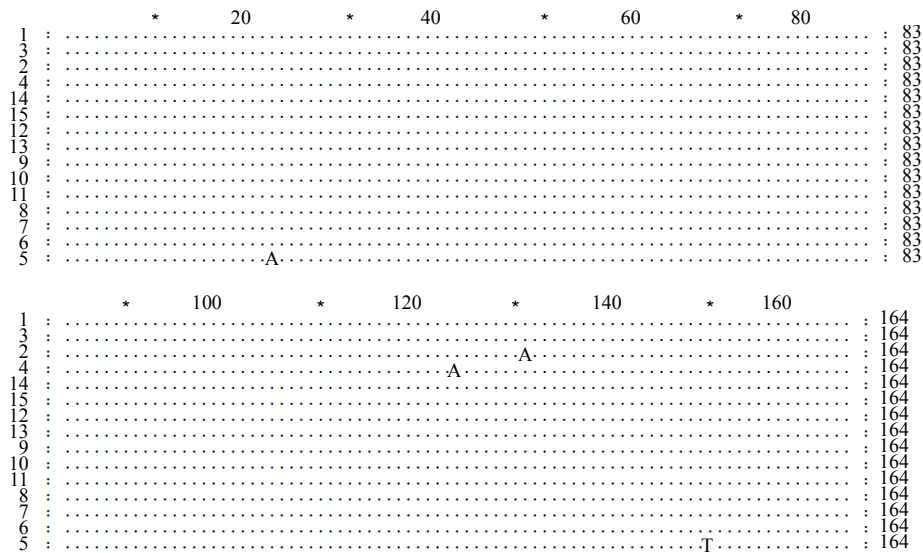


图 1 15 种悬钩子属植物 5.8 S 序列的比对

Fig. 1 Comparison on 5.8 S sequences of 15 plants in *Rubus* L.

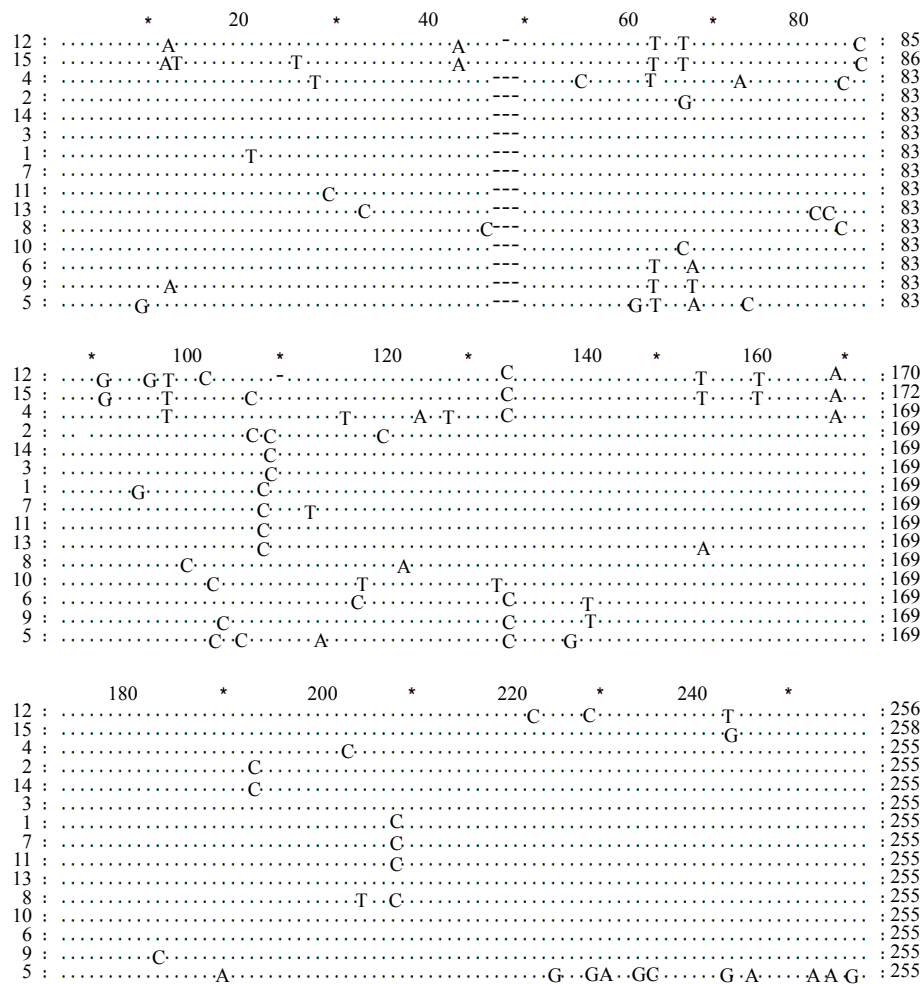


图 2 15 种悬钩子属植物 ITS1 序列的比对

Fig. 2 Comparison on ITS1 sequences of 15 plants in *Rubus* L.

插入。ITS1 序列共有 189 个保守位点, 占总位点数的 73.5%; 变异位点 68 个, 占 26.4%, 其中信息位点 20 个, 占总位点数的 7.8%。与 ITS1 类似, ITS2 的变异也十分丰富, 存在多次缺失/插入、转换和颠换事件(图 3)。15~17 位存在缺失/插入现象, 除尾叶悬钩子外,

其余 ITS2 在这些位点发生 1~3 次缺失/插入事件; 在序列的 106 位, 也有缺失/插入现象, 棕红悬钩子在该位点缺少 1 个碱基。15 种悬钩子属植物的 ITS 序列具 140 个保守位点, 占 66.4%; 存在 70 个变异位点, 占 33.2%, 其中信息位点 21 个, 占 10.0%。

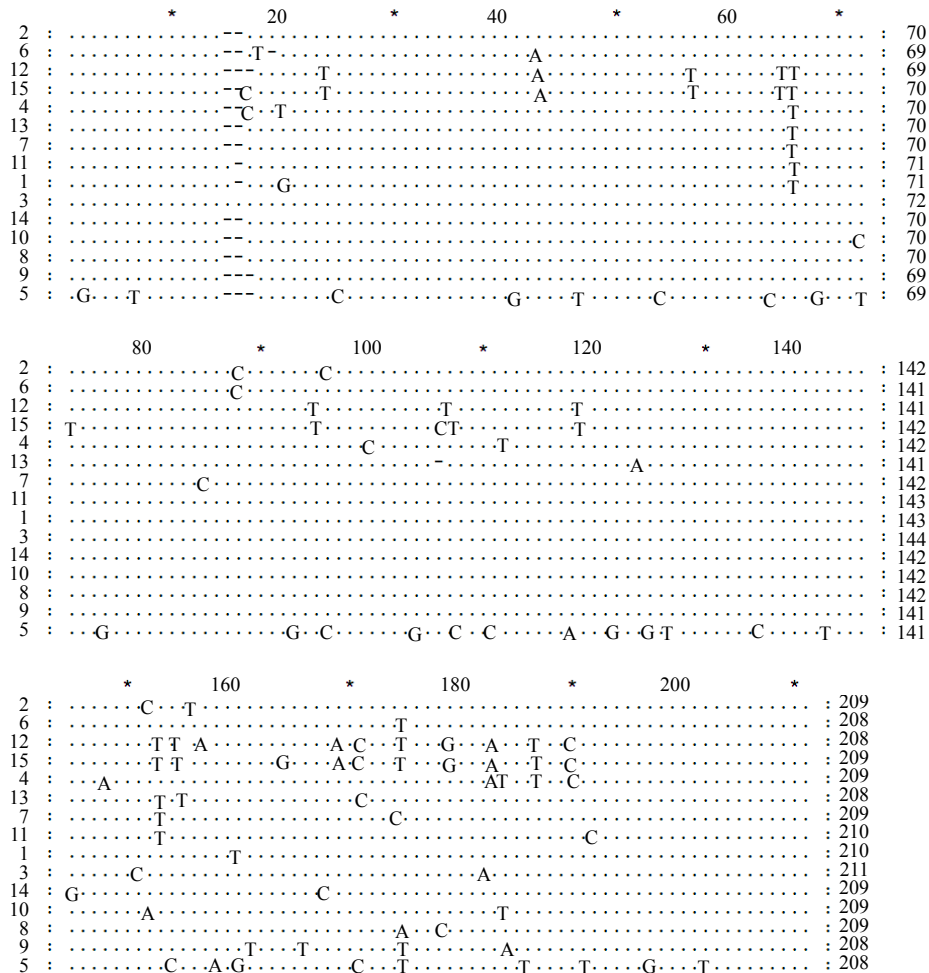


图 3 15 种悬钩子属植物 ITS2 序列的比对

Fig. 3 Comparison on ITS2 sequences of 15 plants in *Rubus L.*

3.4 进化分析

利用 MEGA 软件计算 15 种悬钩子属植物 ITS 序列的遗传距离, 结果见表 3。结果表明, 15 种植物 ITS 序列的遗传距离为 0.139 0~0.008 1, 平均遗传距离为 0.046。插田泡和光滑悬钩子的遗传距离最大, 插田泡和空心泡次之, 为 0.137 0, 灰毛泡和锈毛莓的遗传距离最小。利用 PAUP 4.0 软件构建发育树, 建树方法采用 MP 法, 经 1 000 次自举检测(图 4)。从进化树上看, 插田泡、白叶莓和茅莓聚为 1 组, 山莓、空心泡和光滑悬钩子聚为 1 组, 寒莓、尾叶悬钩子、梨叶悬钩子和木莓聚为 1 组, 高粱泡

与前面三组聚于同 1 分支; 灰毛泡、锈毛莓和棕红悬钩子聚为 1 组; 而周毛悬钩子单独处于 1 个分支。

4 讨论

已有多分子标记技术应用于悬钩子属植物亲缘关系、遗传多样性和分子鉴定的研究, Marulanda 等^[15]应用 AFLP 和 SSR 技术研究了 *R. glaucus*、*R. adenotrichos*、*R. bogotensis*、*R. robustus*、空心泡和 *R. urticifolius* 的遗传多样性, 推测有性生殖在维持遗传变异中起着重要作用。和志娇等^[13]利用 ISSR 技术对滇西北悬钩子属植物的亲缘关系进行了鉴定, 将 39 种材料分为空心莓组、木莓组、刺毛莓组、

表 3 15 种悬钩子属植物的遗传距离
Table 3 Genetic distances of 15 plants in *Rubus* L.

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2	0.029 4													
3	0.017 9	0.019 5												
4	0.044 7	0.055 0	0.041 3											
5	0.102 9	0.106 6	0.095 6	0.123 4										
6	0.026 1	0.029 4	0.019 5	0.044 7	0.092 0									
7	0.014 6	0.029 4	0.016 2	0.044 7	0.102 9	0.026 1								
8	0.022 8	0.031 1	0.017 9	0.046 4	0.102 9	0.026 1	0.021 1							
9	0.031 1	0.036 1	0.022 8	0.046 3	0.097 5	0.017 9	0.029 4	0.029 4						
10	0.024 5	0.024 4	0.016 2	0.044 7	0.097 4	0.026 1	0.022 8	0.024 5	0.027 8					
11	0.012 9	0.027 8	0.014 6	0.043 0	0.101 1	0.024 5	0.008 1	0.019 5	0.027 8	0.021 1				
12	0.067 9	0.074 8	0.062 5	0.067 8	0.137 0	0.058 9	0.062 3	0.069 6	0.062 3	0.067 7	0.060 6			
13	0.022 9	0.034 5	0.021 2	0.049 9	0.104 7	0.031 2	0.017 8	0.029 5	0.034 5	0.027 8	0.016 2	0.058 8		
14	0.019 5	0.019 5	0.008 1	0.043	0.097 4	0.021 1	0.017 8	0.019 5	0.024 4	0.017 8	0.016 2	0.064 3	0.022 8	
15	0.067 9	0.071 2	0.062 5	0.067 8	0.139 0	0.058 9	0.062 3	0.069 6	0.062 3	0.067 7	0.060 6	0.016 2	0.058 8	0.064 3

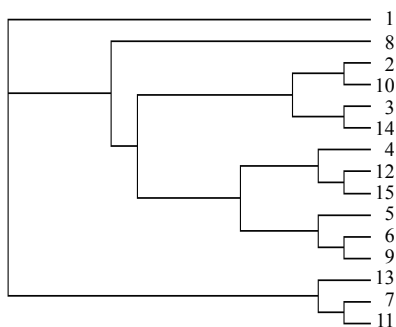


图 4 基于 MP 法构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree constructed using MP method

矮生莓组和葡萄莓组 5 大类，研究结果与形态学分类基本一致。贾静波等^[23]采用 RAPD 标记技术对 13 个黑莓、树莓品种及 5 个野生悬钩子植物的 26 个居群进行了遗传多样性研究，共扩增出条带 131 条，其中多态性条带 118 条，表明悬钩子属植物物种和品种间存在丰富的遗传多样性，聚类分析的结果与传统分类基本吻合。

ITS 区由 ITS1、5.8 S 和 ITS2 组成，5.8 S 的序列长度十分保守，在被子植物中，该序列的长度通常为 163~164 bp，在进化过程中所受的选择压力较大，产生的变异较小；而 ITS1 和 ITS2 在进化中所受的压力较小，可产生丰富的变异和信息位点，加之方法简单、重复性高和费用低廉，已被广泛应用于科内、近缘属间和属内种间物种的分子鉴定与系统发育研究^[24]。本研究中，15 种悬钩子属植物的

ITS1 为 255~258 bp，ITS2 为 208~211 bp，而 5.8 S 的序列长度均为 164 bp，虽然 5.8 S 序列的长度十分保守，但在碱基组成上存在一定的差异，寒莓、山莓和插田泡 5.8 S 的个别位点存在转换和颠换现象。ITS1 和 ITS2 的长度及碱基组成变异较 5.8 S 大，存在较多的缺失/插入、转换和颠换现象，信息位点丰富，这些位点可用于区分 15 种悬钩子属植物。

山莓、插田泡、白叶莓、茅莓、空心泡和光滑悬钩子属于空心莓组，周毛悬钩子属于刺毛莓组，而其余 8 种属木莓组。系统发育分析的结果表明，周毛悬钩子单独处于 1 个分支；空心莓组的 6 种植物位于同一进化枝上，它们与木莓组的寒莓、尾叶悬钩子、梨叶悬钩子和木莓遗传距离较小，共同处于较大分支上，但与高粱泡的距离相对较远。但是，同为木莓组的灰毛泡、锈毛莓和棕红悬钩子，它们在系统发育树上单独成组，这可能是变异信息增加导致误差变大所致^[25]。

本研究以 15 种悬钩子属植物为材料，分别克隆到各自的 ITS 序列，结果表明 ITS 序列的信息位点丰富，可用于区分这些植物，为分子鉴定和遗传多样性研究奠定了基础。

参考文献

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 37 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1985.
[2] 顾 姻, 王传永, 於 虹, 等. 中国丰富的悬钩子属

- 种质资源 [J]. 吉林农业大学学报, 2009, 31(5): 492-496.
- [3] 李维林, 贺善安, 顾 娟. 中国悬钩子属植物的利用价值概述 [J]. 武汉植物学研究, 2000, 18(3): 237-243.
- [4] 陈炳华, 刘剑秋. 福建省悬钩子属药用植物资源 [J]. 中草药, 2001, 32(6): 551-554.
- [5] 和加卫, 唐开学, 杨静全, 等. 云南省悬钩子属药用植物资源研究 [J]. 中草药, 2005, 36(7): 1078-1081.
- [6] 张惠源. 中国中药资源志要 [M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [7] 赵卫权, 丁立生, 王明奎. 木莓根部化学成分的研究 [J]. 中草药, 2001, 32(10): 874-876.
- [8] 邓 焯, 彭树林, 张晓璐, 等. 寒莓中三萜成分的研究 [J]. 植物学报, 2001, 43(6): 644-646.
- [9] 李维林, 贺善安, 顾 娟, 等. 中国悬钩子属花粉形态观察 [J]. 植物分类学报, 2001, 39(3): 234-247.
- [10] 王小蓉, 汤浩茹, 段 娟, 等. 中国悬钩子属空心莓组与木莓组 28 种和变种的核型比较研究 [J]. 植物分类学报, 2008, 46(4): 505-515.
- [11] 张书东. 国产悬钩子属绢毛亚组新资料 [J]. 植物科学学报, 2012, 30(3): 301-304.
- [12] 王焕冲, 和兆荣, 孙 航. 两种悬钩子属植物在中国的重新发现 [J]. 广西植物, 2012, 32(3): 315-317.
- [13] 和志娇, 和加卫, 程在全, 等. 滇西北部分悬钩子属植物亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. 西北植物学报, 2011, 20(11): 164-169.
- [14] 李维林, 吴文龙, 闫连飞, 等. 悬钩子属植物的 RAPD 分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2008, 17(3): 18-22.
- [15] Marulanda M L, López A M, Aguilar S B. Genetic diversity of wild and cultivated *Rubus* species in Colombia using AFLP and SSR markers [J]. *Crop Breeding Appl Biotechnol*, 2007, 7: 242-252.
- [16] Alice L A. Evolutionary relationships in *Rubus* (Rosaceae) based on molecular data [J]. *Acta Horticulturae*, 2002, 585: 79-83.
- [17] Alice L A, Campbell C S. Phylogeny of *Rubus* (Rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences [J]. *Am J Bot*, 1999, 86: 81-97.
- [18] Stafne E T, Clark J R, Pelto M C, et al. Discrimination of *Rubus* cultivars using RAPD markers pedigree analysis [J]. *Acta Horticulturae*, 2003, 626: 119-124.
- [19] Dellaporta S, Wood J, Hicks J B. A plant DNA miniprep: version II [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1983, 1: 19-21.
- [20] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [21] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Brief Bioinform*, 2004, 5: 150-163.
- [22] Swofford D L. *PAPU: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods)* [M]. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.
- [23] 贾静波, 李维林, 吴文龙, 等. 悬钩子属植物的 RAPD 分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2008, 17(3): 18-22.
- [24] Baldwin B G, Sanderson M J, Porter J M, et al. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny [J]. *Ann Missouri Bot Garden*, 1995, 82: 247-277.
- [25] 徐田军, 刘楚吾, 刘 丽, 等. 基因间隔序列 (ITS) 在水产动物种质鉴定和遗传多样性分析中的应用 [J]. 湛江海洋大学学报, 2006, 26(1): 84-88.