

四照花亚属的 nrDNA ITS 致同进化不完全

胡兆锋¹, 向秋云², 黄宏文^{1*}

(1. 中国科学院华南植物园, 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广州 510650; 2. 北卡罗来纳州立大学植物生物学系, NC27695, USA)

摘要: 四照花亚属(*Cornus* subg. *Syncarpea*)隶属于山茱萸科山茱萸属(*Cornus*), 我国该亚属共有 5 种 8 亚种。为探讨四照花亚属 nrDNA ITS 序列的致同进化不完全现象及假基因产生的可能原因, 分析了该亚属 4 种(每种 1~2 个居群)共 21 个个体的 nrDNA ITS 序列。结果表明, 这些类群的 nrDNA ITS 存在多态性, 通过分析这些 nrDNA ITS 克隆序列的 G + C 含量、5.8S 保守基序和二级结构最小自由能, 推测其可能存在假基因。系统发育研究结果显示所有 nrDNA ITS 序列分成 5 个分支, 同一个体的不同拷贝被分别置于两个甚至多个分支中, 且不同分支显示了不同种间关系。四照花亚属物种个体内部存在 nrDNA ITS 不完全致同进化, 可能归咎于不完全的世系分选(incomplete lineage sorting)、种间杂交或多倍化等进化事件, 从而导致基因组内 nrITS 区序列出现多态性, 同时也导致难以通过外部形态来划分亚属内种间界限。

关键词: 四照花亚属; nrDNA ITS; 致同进化不完全进化; 假基因

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2013.01.004

Incomplete Concerted Evolution of nrDNA ITS in *Cornus* subg. *Syncarpea* (Cornaceae)

HU Zhao-feng¹, XIANG Qiu-yun (Jenny)², HUANG Hong-wen^{1*}

(1. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. Department of Plant Biology, North Carolina State University, Raleigh, NC 27695, USA)

Abstract: The subgenus *Syncarpea*, which belongs to genus of *Cornus* (Cornaceae), includes five species and eight subspecies in China. nrDNA ITS sequences of 21 individuals from 4 species, with 1 to 2 populations for each species, in the subgenus were amplified and used to test the existence of incomplete concerted evolution and pseudogenes. Intra-genomic polymorphism was detected in the internal transcribed spacer (including ITS1, 5.8S and ITS2) regions of these species. The analyses of G + C content, 5.8S conserved motifs and minimum free energy of 5.8S secondary structures suggested that there were putative pseudogenes of nrDNA in these species. Phylogenetic analyses of the sequences resulted in five clades with variants from the same accession commonly being placed in two or more clades and species were grouped differently among clades. These results demonstrated the existence of incomplete concerted evolution of ITS within individuals of *Syncarpea*, which could be explained by incomplete lineage sorting, possible hybridization or polyploidy and resulted in the polymorphism of ITS and the difficulty in morphology-based species delineation in the subgenus.

Key words: *Cornus* subg. *Syncarpea*; nrDNA ITS; Incomplete concerted evolution; Pseudogenes

收稿日期: 2012-05-08 接受日期: 2012-06-11

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-YW-Z-1024)资助

作者简介: 胡兆锋(1985~), 男, 硕士研究生, 从事四照花亚属的系统发育研究。E-mail: zfh543@126.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: huanghw@mail.scbg.ac.cn

四照花亚属[*Cornus* subg. *Syncarpea* (Nakai) Q. Y. Xiang]隶属于山茱萸科(Cornaceae)山茱萸属(*Cornus* L.),东亚分布类群,中国是其分布中心^[1]。该亚属种间的分类和系统发育关系一直没有得到彻底解决^[2],尤其在基于形态学数据进行分类的过程中,由于对性状加权的不同,该亚属被分为4~14种^[1,3]。向秋云^[1]根据形态性状的研究,将四照花亚属原来的19种处理成4种12亚种及3变种;基于对前人研究及对标本的深入分析,胡文光等^[4]将四照花亚属提升为四照花属,并将该属分成10种;最近,向秋云等^[3]基于分子系统发育学和形态学的研究,最终将四照花亚属分成4种8亚种。

向秋云等^[2]利用nrDNA ITS和叶绿体*matK*对整个山茱萸属的物种系统发育关系的研究中,四照花亚属各物种系统发育关系没有得到有效的解决,物种系统发育位置比较混乱,香港四照花(*C. hongkongensis*)各亚种和四照花(*C. kousa*)各亚种与其它物种之间存在交叉,且亚种系统发育关系自展值都不高。此外,没有该亚属系统发育研究的报道。

由于变异速率较快且不同拷贝之间存在致同进化,nrDNA ITS已经被广泛应用于近缘物种的系统进化研究中^[5]。虽然在系统发育分析中存在一定的问题,但许多研究利用ITS区域致同进化不完全现象发现了其它常用分子片段不能检测到的进化过程^[6]。通常,nrDNA(包括ITS)基因家族在致同进化的作用下,拷贝之间序列均一化程度很高,几乎没有差异^[7]。然而近年来,许多研究表明ITS在植物基因组内存在着较高的多样性,暗示其存在致同进化不完全现象。比如,在裸子植物松科(Pinaceae)^[8]和买麻藤属(*Gnetum*)^[9]中,nrDNA ITS基因组内的多样性不仅仅表现在碱基替换上,其长度变异也非常明显,超过100 bp。被子植物基因组内nrDNA ITS致同进化不完全的现象可能不如裸子植物常见,但在不同类群中也有报道,例如栎属(*Quercus*)^[10]和梨属(*Pyrus*)^[11]等类群中也发现致同进化不完全现象和假基因。nrDNA假基因在系统发育研究中的作用颇受争议^[7,11-14]。因此,在利用nrDNA ITS序列进行系统发育研究之前首先要判断该序列是否存在假基因及假基因的类型。

基因组内nrDNA ITS区致同进化不完全的产生既有物种进化和生活史方面的原因,如多倍化^[15]、世代周期长和杂交^[16]等,也有核仁组织者

(NOR)在基因组中的数目和位置等原因,基因组内NOR数目较多或位于非同源染色体上都会减缓甚至阻止致同进化^[12]。

在利用ITS和cpDNA序列进行山茱萸属系统发育关系的研究^[2]中,一些物种的ITS区的PCR扩增产物直接测序结果出现多态性,碱基不可读。本研究从四照花亚属基因组内nrDNA ITS序列多态性入手,分析了四照花亚属nrDNA ITS致同进化不完全现象和nrDNA假基因的存在及产生原因。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究选取尖叶四照花(*Cornus elliptica*)、香港四照花(*C. hongkongensis*)、多脉四照花(*C. multinervosa*)和四照花(*C. kousa*)4种植物6个居群共21个个体进行分析,每个居群的凭证标本均保存在中国科学院华南植物园标本馆(IBSC),样本具体标本号和地理位置见表1。样本均采自物种的典型分布区。每个个体采集幼嫩叶片,硅胶干燥保存。另外,从GenBank数据库下载到已发表该属植物nrDNA ITS序列12条(序列编号见表1)。

1.2 DNA提取、PCR扩增及克隆

样本的总DNA提取采用改良的CTAB法^[17],nrDNA ITS片段的扩增采用引物ITS-5m^[18]和ITS-4^[19],扩增反应(PCR)体系总体积为25 μ L,包括60 ng DNA模板,引物ITS-5m和ITS-4各0.2 μ mol L⁻¹, MgSO₄ 2 mmol L⁻¹, 1 \times *Pfu* 缓冲液,dNTPs 0.2 mmol L⁻¹, *Pfu* DNA聚合酶(Fermentas) 1.25 U。反应程序为:95 $^{\circ}$ C预变性5 min;95 $^{\circ}$ C变性30 s, 58 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸90 s, 37个循环;最终72 $^{\circ}$ C延伸10 min。为了便于PCR产物能够与T载体连接,PCR结束后,加2.5 U普通*Taq* DNA聚合酶延伸10 min,加A接头。

PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳后,切下目的片段并用Axygen凝胶回收试剂盒回收、纯化产物与pMD19-T Vector (TaKaRa)载体连接,然后转化DH5 α 感受态细胞。纯化和克隆按试剂盒说明书操作。菌液送奥科鼎盛生物公司采用Sanger法测序。测序结果经人工核对后,提交GenBank。测序结果序列号与样本之间的对应关系见表1。

表 1 四照花亚属样本和相应 nrDNA ITS 序列信息

Table 1 Samples and nrDNA ITS sequence information of *Cornus* subg. *Syncarpea*

物种 Species	编号 No.	采集地 Location	凭证标本 Voucher	GenBank 序列号 GenBank Acc. No.
尖叶四照花 <i>C. elliptica</i>		江西井冈山	胡兆锋 Z F Hu 748210, IBSC	
	JX-1-1	Jinggangshan, Jiangxi,	Acc. 1 clone 1	JQ909996
	JX-1-2		Acc. 1 clone 2	JQ909997
	JX-2-1		Acc. 2 clone 1	JQ909998
JX-2-2		Acc. 2 clone 2	JQ909999	
尖叶四照花 <i>C. elliptica</i>		湖北恩施	胡兆锋 Z F Hu 748209, IBSC	
		Enshi, Hubei		
	HB-3-1		Acc. 3 clone 1	JQ910000
	HB-3-2		Acc. 3 clone 2	JQ910001
	HB-4-1		Acc. 4 clone 1	JQ910003
	HB-4-2		Acc. 4 clone 2	JQ910004
	HB-4-3		Acc. 4 clone 3	JQ910005
	HB-4-4		Acc. 4 clone 4	JQ910006
香港四照花 <i>C. hongkongensis</i>	FJ-1-1	福建武夷山	胡兆锋 Z F Hu 748206, IBSC	
		Wuyishan, Fujian	Acc. 1 clone 1	JQ910009
香港四照花 <i>C. hongkongensis</i>		广东	胡兆锋 Z F Hu 748207, IBSC	
		Guangdong		
	GD-2-1		Acc. 2 clone 1	JQ910011
	GD-3-1		Acc. 3 clone 1	JQ910012
	GD-3-2		Acc. 3 clone 2	JQ910013
	GD-3-3		Acc. 3 clone 3	JQ910014
	GD-3-4		Acc. 3 clone 4	JQ910015
	GD-3-5		Acc. 3 clone 5	JQ910018
	GD-4-1		Acc. 4 clone 1	JQ910019
	GD-4-2		Acc. 4 clone 2	JQ910020
	GD-4-3		Acc. 4 clone 3	JQ910021
	GD-4-4		Acc. 4 clone 4	JQ910022
	GD-4-5		Acc. 4 clone 5	JQ910023
	GD-5-1		Acc. 5 clone 1	JQ910024
	GD-5-2		Acc. 5 clone 2	JQ910025
	GD-6-1		Acc. 6 clone 1	JQ910026
多脉四照花 <i>C. multinervosa</i>	SC-1-1	四川峨眉山	向秋云 Q Y Xiang 02-115, NCSC	
		Emeishan, Sichuan	Acc. 1 clone 1	JQ918684
四照花 <i>C. kousa</i>		陕西眉县	向秋云 Q Y Xiang 10-24, NCSC	
		Meixian, Shaanxi		
	SX-1-1		Acc. 1 clone 1	JQ910028
	SX-2-1		Acc. 2 clone 1	JQ918685
	SX-2-2		Acc. 2 clone 2	JQ910029
	SX-3-1		Acc. 3 clone 1	JQ910030
	SX-3-2		Acc. 3 clone 2	JQ910031
	SX-4-1		Acc. 4 clone 1	JQ910032
	SX-4-2		Acc. 4 clone 2	JQ910033
	SX-4-3		Acc. 4 clone 3	JQ910034
	SX-5-1		Acc. 5 clone 1	JQ910035
	SX-6-1		Acc. 6 clone 1	JQ910036
	SX-7-1		Acc. 7 clone 1	JQ910037
	SX-8-1		Acc. 8 clone 1	JQ910038
	SX-8-2		Acc. 8 clone 2	JQ910039
	SX-8-3		Acc. 8 clone 3	JQ910040
	SX-9-1		Acc. 9 clone 1	JQ910041
	SX-9-2		Acc. 9 clone 2	JQ910042
SX-10-1		Acc. 10 clone 1	JQ910043	
SX-10-2		Acc. 10 clone 2	JQ910044	

续表(Continued)

物种 Species	编号 No.	采集地 Location	凭证标本 Voucher	GenBank 序列号 GenBank Acc. No.
香港四照花 <i>C. hongkongensis</i>	SC-7-dl		Xiang et al. 2006	DQ340548.1
	YN-8-dl		Xiang et al. 2006	DQ340552.1
头状四照花 <i>C. capitata</i>	YN-1-dl		Xiang et al. 2006	DQ340540.1
	YN-2-dl		Xiang et al. 2005	AY530915.1
四照花 <i>C. kousa</i>	HB-11-dl		Xiang et al. 2006	DQ340555.1
	HB-12-dl		Xiang et al. 2006	DQ340554.1
多脉四照花 <i>C. multinervosa</i>	SC-dl		Xiang et al. 2006	DQ340556.1
外类群 Outgroup				
大花四照花 <i>C. florida</i>	dl		Xiang et al. 2006	DQ340535.1
长圆叶柞木 <i>C. oblonga</i>	dl		Xiang et al. 2006	DQ340530.1
山茱萸 <i>C. officinalis</i>	1-dl		Xu et al. 2008	EU591992.1
	2-dl		Chen and Pan 2006	DQ683358.1
	3-dl		Xiang et al. 2005	AY530921.1

dl: 从 GenBank 上下载的序列; Acc. 1 clone 1: 第 1 个个体的第 1 个克隆。

dl: Sequence downloaded from GenBank; Acc. 1 clone 1: The first clone from the first individual.

1.3 序列处理

ITS1、5.8S、ITS2 区域的边界确定参照其它已有的序列^[2,20];利用 CLUSTAL X^[21]对所有序列进行对位排列;并用 BioEdit 5.0.6^[22]对序列进行人工校正。为了初步确定四照花亚属基因组内是否存 ITS 假基因,进行了以下分析^[23]: (1) 计算 ITS1、5.8S 的 G + C 含量^[11,24],以及序列之间的平均遗传距离;(2) 检测是否存在种子植物 5.8S 特有的 3 个保守基序。motif1: GAATTGCAGAATCC、motif2: TTTGAAY-GCA 和 motif3: CGATGAAGAACGYAGC^[25], 并检测保守基序中碱基的变化;(3) 利用网络在线版 Mfold 3.1 (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/rna/form1.cgi>)统计 5.8S 二级结构最小自由能 (ΔG 在 37 °C)^[26]。在 R2.10.1 软件中作 ITS1 G + C 含量与 ITS2 G + C 含量以及 5.8S G + C 含量与 5.8S 二级结构最小自由能变化关系图。

1.4 系统发育关系重建

由于假基因在系统发育研究中的应用还存在很多争议,本研究利用以上初步分析得到的可能的 nrDNA ITS 假基因以外的克隆序列,选取大花四照花(*C. florida*)、山茱萸亚属(*Cornus* subg. *Cornus*)的山茱萸(*C. officinalis*)和长圆叶柞木亚属(*Cornus* subg. *Yinquania*)的长圆叶柞木(*C. oblonga*)为外类群,采用最大简约法(maximum parsimony, MP)、最大似然法(maximum likelihood, ML)和贝叶斯法(Bayesian inference, BI)构建 ITS1 序列和种间系统发育关系。由于 GenBank 中四照花亚属及相关外

类群只有部分 ITS2 序列数据(0 ~ 79 bp),在本研究中 ITS2 没有用于系统发育分析。用 PAUP*4.0b10 软件^[27]构建 MP 树和 ML 树,对 MP 树和 ML 树分别进行 1000 次和 100 次拟重复抽样的 bootstrap 分析,检验各节点的置信度;ML 树根据 Modeltest 3.7^[28]估算数据最佳模型为 TrNef + G。然后利用这个进化模型(TrNef + G)和 Mrbayes-3.1.2^[29]软件构建系统发育树。贝叶斯法构建系统发育树时采用如下设置: MCMC (Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo)算法,以随机树为起始树,迭代运行 2000000 次,每 100 代取样 1 次,舍弃开始的 5000 个样本作为老化样本(burn-in samples)。

2 结果

2.1 nrDNA ITS基因组内多样性

序列组成分析结果显示,四照花亚属中 ITS1-5.8S-ITS2 序列总长度为 608 ~ 659 bp, G + C 含量为 51% ~ 66%。四照花基因组内不同克隆序列间的 ITS1-5.8S-ITS2 存在 51 bp 的长度差异,其中 ITS1 序列长度变异达到 40 bp;尖叶四照花基因组内 ITS1-5.8S-ITS2 序列的 G + C 含量变化最大,为 52% ~ 64%,序列长度为 637 ~ 650 bp。香港四照花基因组内 ITS1-5.8S-ITS2 序列长度和 G + C 含量变化介于四照花和尖叶四照花之间,基因组内长度变异最大为 638 ~ 647 bp, G + C 含量变化最大为 58% ~ 65%。

统发育树。

系统发育分析结果表明四照花亚属 ITS 克隆序列可分成五支(图 3)。分支 1 包含四照花亚属全部物种的代表序列,而其它分支均仅包含该亚属部分物种。分支 1 中,同一物种的克隆序列都聚在一起,四照花与尖叶四照花系统发育关系较近,且后验概率(PP)较高(0.97);四照花与多脉四照花聚成一个小分支,但后验概率较低;头状四照花单独形成一个分支,后验概率很高(1.00)。分支 2 包含 3 个物种,同一物种的克隆序列没有完全聚在一起,香港四照花和尖叶四照花克隆序列之间存在部分

交叉。分支 4 中,四照花的 4 条克隆序列与尖叶四照花的 1 条克隆序列是姊妹关系。分支 5 仅包含 2 条香港四照花克隆序列和 1 条四照花克隆序列。

在系统发育树上,除香港四照花第 3 号个体(*C. hongkongensis* GD-3)的不同克隆序列被分别置于分支 1、分支 2 和分支 5 外,其它物种相同个体的不同克隆序列都被置于 1 个或两个分支中。

进一步分析表明,分支 1 和分支 2 中的 ITS1、ITS2 和 5.8S rDNA 等 3 个片段平均 G + C 含量均高于分支 4 和分支 5 (表 3),推测后两个分支包含的序列可能还是假基因序列。

表 3 4 个分支上不同 ITS 片段的平均 G + C 含量(%)

Table 3 Average G + C content (%) of ITS1, 5.8S and ITS2 of five clades

	ITS1	ITS2	5.8S
Clade 1	67.22	66.89	54.58
Clade 2	66.81	65.94	53.36
Clade 4	56.25	56.5	47.23
Clade 5	61.05	60.89	51.40

4 讨论

4.1 nrDNA ITS 基因组内多样性与致同进化不完全

序列组成成分分析结果发现,四照花亚属各物种个体基因组内部不仅存在 GC 含量上的变化,不同克隆序列之间长度也存在变异。这些结果说明在四照花亚属中个体基因组内部 nrDNA ITS 存在致同进化不完全现象。与一些裸子植物相比^[8-9],四照花亚属植物基因组内部 ITS 序列变化相对较小。这可能是由于裸子植物世代周期长,多倍化现象普遍以及 NOR 数目较多且位于非同源染色体上;而属于被子植物的四照花亚属植物,多倍化现象很少, NOR 数目不多,一般为 1~2 个,因此后者基因组内 ITS 序列致同进化的程度相对较高。

本研究显示四照花亚属植物基因组内存在多种 ITS 变异类型(如香港四照花第 3 个个体检测到有 3 种类型),但同一个体的不同克隆序列大都被置于两个不同的分支,且位于相同分支的这些序列之间相似度非常高,只存在少数碱基的差别。我们推测这些个体内部相似序列的变异可能是 PCR 或测序过程中的错误引起的,但本研究用于 PCR 反应的 DNA 聚合酶为 Pfu DNA 聚合酶,其出错率为 1.3×10^{-6} ^[30](即 100 万个碱基对可能出现 1.3 个错

配),因此 PCR 过程中出现错误的可能性不大。另外,本研究还在基因库上对所有克隆序列进行序列相似性比较也没有发现其它生物 nrDNA ITS 序列的污染。因此,本研究中检测到的植物个体内部的 ITS 相似序列的变异可能是基因组内串联重复序列之间的近期分化、物种之间的杂交或植物基因组多倍化引起的。

种间系统发育关系分析结果表明,得到的克隆序列之间的系统发育关系与伞房属(*Corymbia*)、桉树(*Eucalyptus* sp.)^[6]和梨属^[11]的研究结果相似,不同物种相同类型的 nrDNA ITS 序列之间的关系比同一物种基因组内不同类型的 nrDNA ITS 之间的关系更近。这说明基因组内不同类型的 nrDNA ITS 经历了不同的进化过程,可能位于非同源染色体上,或来源于种间杂交。该类种群间没有完全生殖隔离的报道,种间过渡类型普遍。虽然采样居群中没有发现不同物种同域分布的情况,但由于世代周期长,一次与邻近居群偶然的种间杂交可能就会引起基因组内长期存在多样性。

4.2 四照花亚属 nrDNA 假基因

由于假基因的判断标准很多^[11,23-25],本研究选取通过核苷酸序列判断假基因最常用的方法,

ITS1、ITS2、5.8S rDNA G + C 含量^[31]和 5.8S rDNA 二级结构最小自由能以及 5.8S rDNA 保守基序,同时结合克隆序列的系统发育位置做进一步分析。但最可靠的还是与 5.8S rDNA 相应的 mRNA 序列进行比较^[31],但由于没有保存提取 RNA 相应的实验材料,因此要得到更加可靠的证据还需要以后的深入研究。克隆序列的系统发育结果研究表明,在整个四照花亚属中可能至少存在两种类型的假基因。

与梨属^[11]的报道相似,四照花亚属 nrDNA ITS 序列系统发育关系分析结果表明,假基因与功能序列在基因树上各自独立形成分支,这说明其假基因起源于亚属物种形成之前并且已经难以与功能序列之间进行遗传交换了。深入研究表明这样的假基因类型有些能够准确的反应物种之间的进化关系。但是由于在本研究中不是所有物种都检测到这两种假基因,要利用这些 nrDNA 假基因进行种间系统发育分析还需要对每个个体做更多的克隆测序,以增加检测到的假基因的数量。而且这两种类型的假基因哪种更加适合进行种间系统发育分析,还是两种都可以用于四照花亚属种间系统发育关系分析还需要做进一步研究。

四照花亚属种间形态分类一直存在争议,由于种间形态变异的复杂性以及不同学者对性状权重不同使得该亚属物种的分类和系统发育关系还不明晰。本研究通过 nrDNA ITS 序列的深入分析,发现了该亚属致同进化不完全现象和假基因的存在,这一发现有助于解释向秋云等通过少数 ITS 序列难以解决物种系统发育关系的问题。通过本研究,我们推测四照花亚属可能存在自然杂交或多倍化现象,最终导致该亚属物种基因组内 nrDNA ITS 区序列存在多态性,从而也使得物种之间形态上的界限变模糊。但这种观点还需要更多 DNA 序列等分子数据的证明。

参考文献

- [1] Xiang Q Y. System and synopsis of *Cornus* subgen. *Synarpea* (Nakai) Q. Y. Xiang (Cornaceae) [J]. Bull Bot Res, 1987, 7(2): 33–52.
向秋云. 楝木属四照花亚属的系统和总览 [J]. 植物研究, 1987, 7(2): 33–52.
- [2] Xiang Q Y, Thomas D T, Zhang W H, et al. Species level phylogeny of the genus *Cornus* (Cornaceae) based on molecular and morphological evidence implications for taxonomy and Tertiary intercontinental migration [J]. Taxon, 2006, 55(1): 9–30.
- [3] Xiang Q Y, David E B. Flora of China, Vol. 14 [M]. Beijing: Science Press, St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2005: 206–221.
- [4] Hu W G. Flora Reipublicae Popularis Sinicae, Tomus 56 [M]. Beijing: Science Press, 1990: 88–104.
胡文光. 中国植物志 第56卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1990: 88–104.
- [5] Volkov R A, Kozeretska I A, Kyryachenko S S, et al. Molecular evolution and variability of ITS1-ITS2 in populations of *Deschampsia antarctica* from two regions of the maritime Antarctic [J]. Polar Sci, 2010, 4(3): 469–478.
- [6] Ochieng J W, Henry R J, Baverstock P R, et al. Nuclear ribosomal pseudogenes resolve a corroborated monophyly of the eucalypt genus *Corymbia* despite misleading hypotheses at functional ITS paralogs [J]. Mol Phylogenet Evol, 2007, 44(2): 752–764.
- [7] Xiao L Q, Zhu H. Intra-genomic polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) regions of *Cycas revoluta*: Evidence of incomplete concerted evolution [J]. Biodiv Sci, 2009, 17(5): 476–481.
肖龙骞, 朱华. 苏铁nrDNA ITS区的序列多态性: 不完全致同进化的证据 [J]. 生物多样性, 2009, 17(5): 476–481.
- [8] Kan X Z, Wang S S, Ding X, Wang X Q. Structural evolution of nrDNA ITS in Pinaceae and its phylogenetic implications [J]. Mol Phylogenet Evol, 2007, 44(2): 765–777.
- [9] Won H, Renner S S. The internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA in the gymnosperm *Gnetum* [J]. Mol Phylogenet Evol, 2005, 36(3), 581–597.
- [10] Mayol M, Rosselló J A. Why nuclear ribosomal DNA spacers (ITS) tell different stories in *Quercus* [J]. Mol Phylogenet Evol, 2001, 19(2): 167–176.
- [11] Zheng X Y, Cai D Y, Yao L H, et al. Non-concerted ITS evolution, early origin and phylogenetic utility of ITS pseudogenes in *Pyrus* [J]. Mol Phylogenet Evol, 2008, 48(3): 892–903.
- [12] Álvarez I, Wendel J F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference [J]. Mol Phylogenet Evol, 2003, 29(3): 417–434.
- [13] Razafimandimbison S G, Kellogg E A, Bremer B. Recent origin and phylogenetic utility of divergent ITS putative pseudogenes: A case study from Naucleaeae (Rubiaceae) [J]. Syst Biol, 2004, 53(2): 177–192.
- [14] Felsenstein J. Case in which parsimony and compatibility methods will be positively misleading [J]. Syst Zool, 1978, 27(4): 401–410.
- [15] Suh Y, Thien L B, Zimmer E A. Nucleotide sequences of the internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene in *Canella winterana* (Magnoliales: Canellaceae) [J]. Nucl Acid Res, 1992,

- 20(22): 6101–6102.
- [16] Muir G, Fleming C C, Schlotterer C. Three divergen rDNA clusters predate the species divergence in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L. [J]. *Mol Biol Evol*, 2001, 18(2): 112–119.
- [17] Xiang Q Y, Crawford D J, Wolfe A D, et al. Origin and biogeography of *Aesculus* L. (Hippocastanaceae): A molecular phylogenetic perspective [J]. *Evolution*, 1998, 52(4): 988–997.
- [18] Sang T, Crawford D J, Stuessy T F. Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: Implications for biogeography and concerted evolution [J]. *PNAS*, 1995, 92(15): 6813–6817.
- [19] Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. PCR protocols: A Guide to Methods and Applications [M]. San Diego, Calif.: Academic Press, Inc., 1990: 315–322.
- [20] Hanssen F, Wischniewski N, Moreth U, et al. Molecular identification of *Fitzroya cupressoides*, *Sequoia sempervirens*, and *Thuja plicata* wood using taxon-specific rDNA-ITS primers [J]. *IAWA J*, 2011, 32(2): 273–284.
- [21] 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]. *Nucl Acid Res*, 1997, 25(24): 4876–4882.
- [22] Hall T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. *Nucl Acid Symp Ser*, 1999, 41(41): 95–98.
- [23] Bailey C D, Carr T G, Harris S A, et al. Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2003, 29(3): 435–455.
- [24] Yokota Y, Kawata T, Iida Y, et al. Nucleotide sequences of the 5.8S rRNA gene and internal transcribed spacer regions in carrot and broad bean ribosomal DNA [J]. *J Mol Evol*, 1989, 29(4): 294–301.
- [25] Harpke D, Peterson A. 5.8S motifs for the identification of pseudogenetic ITS regions [J]. *Botany*, 2008, 86(3): 300–305.
- [26] Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction [J]. *Nucl Acid Res*, 2003, 31(13): 3406–3415.
- [27] Swofford D L. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) 4.0 Beta [M]. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.
- [28] Posada D, Buckley T R. Model selection and model averaging in phylogenetics: Advantages of akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests [J]. *Syst Biol*, 2004, 53(5): 793–808.
- [29] Ronquis F, Huelsenbeck J P. Mrbayes3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(12): 1572–1574.
- [30] Cline J, Braman J C, Hogrefe H H. PCR fidelity of *pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases [J]. *Nucl Acids Res*, 1996, 24(18): 3546–3551.
- [31] Xiao L Q, Möller M, Zhu H. High nrDNA ITS polymorphism in the ancient extant seed plant *Cycas*: Incomplete concerted evolution and the origin of pseudogenes [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2010, 55(1): 168–177.