

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201912030

张余, 龚洵, 冯秀彦. 利用 DNA 片段测序方法探究枳属和富民枳的分类地位 [J]. 广西植物, 2021, 41(1): 114–122.
ZHANG Y, GONG X, FENG XY. Phylogenetic position of *Poncirus* and *Poncirus polyandra* by DNA sequencing [J]. Guihaia, 2021, 41(1): 114–122.



利用 DNA 片段测序方法探究枳属和富民枳的分类地位

张 余¹, 龚 洵², 冯秀彦^{2*}

(1. 云南农业大学 园林园艺学院, 昆明 650000; 2. 中国科学院昆明植物研究所 资源植物与生物技术所级重点实验室, 昆明 650201)

摘 要: 富民枳(*Poncirus polyandra*)属于芸香科(Rutaceae)枳属(*Poncirus* Raf.)。自发表以来,分类地位一直备受争议,其中在 *Flora of China* 中认为富民枳为柑橘杂交种(*Poncirus polyandra*),把枳属归并于柑橘属(*Citrus*)。该研究选取枳属的富民枳、枳(*Poncirus trifoliata*)及柑橘属下 8 个种共 10 个种 47 个个体作为研究材料,以九里香(*Murraya exotica*)为外类群,利用 3 个叶绿体片段(*trnL-trnF*、*trnS-trnG*、*rbcL*)、ITS 片段和 1 个单拷贝核基因(*Chr5*)数据构建系统发育树,探究枳属和富民枳的分类地位。结果表明:基于 3 个叶绿体片段数据构建的最大似然树(ML)和贝叶斯树(BI)的拓扑结构基本一致,10 个物种聚为两大分支,即柑橘属的 8 个物种聚为一大分支,富民枳和枳聚为另一大分支。其中,富民枳所有个体聚为一小单系分支,枳的所有个体聚为一小单系分支,支持枳属和富民枳独立存在。2 个核 DNA 片段数据结果显示,枳属的两个种与柑橘属的 8 个物种聚在一个大分支里,无法确立枳属的单系地位,但富民枳的 9 个个体聚在一起,暗示富民枳在遗传上是一个独立的类群。综上研究认为,无论是叶绿体 DNA 数据还是核 DNA 数据均支持富民枳是一个独立的物种,但核 DNA 数据不支持枳属成立。

关键词: 枳属, 富民枳, 柑橘属, 系统发育, 分类地位

中图分类号: Q949;S666.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2021)01-0114-09

Phylogenetic position of *Poncirus* and *Poncirus polyandra* by DNA sequencing

ZHANG Yu¹, GONG Xun², FENG Xiuyan^{2*}

(1. College of Horticulture and Landscape, Yunnan Agricultural University, Kunming 650000, China; 2. Key Laboratory of Economic Plants and Biotechnology, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China)

Abstract: *Poncirus polyandra* belongs to the genus *Poncirus* Raf. of Rutaceae. Since it was published, its taxonomic status has always been controversial. In *Flora of China*, *P. polyandra* was regarded as a *Citrus* hybrid (*Poncirus polyandra*), and the genus *Poncirus* was included in the genus *Citrus*. In this study, we used three chloroplast DNA fragments (*trnL-trnF*, *trnS-trnG*, *rbcL*), ITS and one single copy nuclear genes (*Chr5*) to construct phylogenetic trees to explore the taxonomic status of the genus *Poncirus* and *P. polyandra*. We sampled a total of 47 individuals from ten

收稿日期: 2020-03-12

基金项目: 国家科技部基础资源调查专项(2017FY100100) [Supported by the Science and Technology Basic Resources Investigation Program of China (2017FY100100)]。

作者简介: 张余(1992-), 硕士研究生, 主要从事种子资源研究与分类研究, (E-mail) 525952488@qq.com。

*通信作者: 冯秀彦, 博士, 助理研究员, 主要从事物种濒危机制与群体遗传学研究, (E-mail) fengxiuyan@mail.kib.ac.cn。

species, including *P. polyandra* and *P. trifoliata* of the genus *Poncirus* as well as eight other species of the genus *Citrus* by using *Murraya exotica* was used as the outgroup. The results were as follows: The maximum likelihood trees (ML) and Bayesian inference trees (BI) constructed by all data were basically identical in topological structure. The cpDNA results showed that all species were clustered into two clades: eight species of *Citrus* were clustered into one major clade, and *P. polyandra* and *P. trifoliata* were clustered into another major clade. Meanwhile, all individuals of *P. polyandra* and *P. trifoliata* were grouped into a monophyletic subclade respectively, supporting the independence of *Poncirus* and *P. polyandra* could exist independently; However, the results of two nuclear DNA fragments showed that two species of *Poncirus* and the eight species of *Citrus* clustered into a large clade, indicating that the genus *Poncirus* cannot be recognized independently. Moreover, nine individuals of *P. polyandra* were monophyletic, suggesting that *P. polyandra* was a genetically independent lineage. In summary, both chloroplast DNA data and nuclear DNA data supported that *P. polyandra* was an independent taxa, but nuclear DNA data from our study did not support the independence of *Poncirus*.

Key words: *Poncirus* Raf, *Poncirus polyandra*, *Citrus*, phylogeny, phylogenetic position

枳属(*Poncirus* Raf.), 又名枸橘属, 属下植物有枳(*Poncirus trifoliata*) 和富民枳(*P. polyandra*) 两个种(方德秋, 1993), 原产于我国, 是芸香科(Rutaceae) 柑橘亚科下的一属, 区别于柑橘、金柑等属, 主要分布于长江中游两岸各省及淮河流域一带, 分布范围较柑橘属更广。该属在我国传统医药上使用很早, 早在李时珍《本草纲目》中有记载。近代中医学研究发现, 其药用作用主要是因为存在一种枳苷的物质(胡源祥等, 2017a, b)。在生产上, 枳属植物是一种优秀的柑橘矮化砧, 抗逆性强。枳属的划分一直与枳的系统分类位置有密切关系, 枳属的研究曾历经三个阶段: (1) 枳属的不认可阶段, 在公元 1178 年韩彦直《橘录》被称作枸橘, 1763 年分类学家林奈把枳归类于柑橘属; (2) 枳属认可阶段, 认为枳属区别于柑橘属(Tomimatsu, 1968; Tomimatsu & Hashimoto, 1968); (3) 枳属的分类存在争议, 2008 年 *Flora of China* 修订版中把枳属归类到柑橘属(Zhang, 2008), 但有些学者认为枳属区别于柑橘属, 并且是一种优秀的种质资源(Heo et al. 2018; George & Lapointe, 2019)。

富民枳属于芸香科(Rutaceae) 枳属, 是丁素琴等(1984) 发表的一个新种, 它是国家二级保护植物, 分布于云南富民县的特有种。富民枳是常绿小乔木, 区别于枳的形态特征(武晓晓等, 2018), 分类地位备受争议, 作为枳属的一个新种得到了叶片同工酶证据(Fang, 1993)、SSR 标记的高纯合率(Pang et al., 2003) 及核型分析(刘利勤等, 2007) 的

支持, 但郭天池等(1996) 认为富民枳是一个天然枳橙类型。在当地富民枳常作为药用植物使用, 是一种珍贵的药用资源, 可以抑制新生血管形成, 降低肿瘤细胞表达(胡源祥等, 2017c)。由于人为因素的影响、原生地的过度放牧以及作为常绿观赏植物的大量挖掘, 富民枳已经野外灭绝(邢定生, 2008), 于 2009 年被列入云南极小种群拯救计划五个物种之一。但是富民枳的分类地位仍然没有得到解决, 2008 年 *Flora of China* 修订版中认为富民枳是柑橘属的一个杂交种(*Poncirus* × *polyandra*) (Zhang, 2008), 而张珊珊等(2018) 把富民枳作为一个独立的种并进行了遗传多样性的研究。

在形态界定物种存在争议的情况下, 可借助分子手段解决。目前, 已发展起一系列的 DNA 分子标记, 如 SSR (Simple Sequence Repeats, 简单重复序列)、ISSR (Inter Simple Sequence Repeat, 简单重复序列间多态性)、SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism, 序列相关扩增多态性) 等被用来研究富民枳与其近缘属植物间的亲缘关系(庞小明等, 2003; 张连峰, 2006; 刘通, 2014)。然而, DNA 分子片段直接测序技术在国内很多植物研究上均有报道(李映志, 2006), 常见的有叶绿体 DNA (cpDNA) 片段(李小孟, 2010) 和核基因(nDNA)。因为旁系同源的存在, 核基因报道较少, 但 nDNA 作为植物遗传物质最重要的载体, 且具双亲遗传特性方面优点, 是一种理想的 DNA 分子标记, 常用于种属分类关系的探究(成彩霞等,

2018)。本研究利用母系遗传的 cpDNA 和双亲遗传的 nDNA 直接测序的方法,以期探究枳属和富民枳的分类地位。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究共采集枳属和柑橘属植物的 47 份分子材料,其中包括 9 份栽培于中国科学院昆明植物研究所的富民枳新鲜植物叶片材料,这 9 株富民枳于 1992 年从富民枳的原生地富民县大营镇老青山冬瓜岭引种(102.49465 E,25.22583 N,海拔 2 180 m);8 份枳的新鲜植物叶片材料,其中 2 份来自中国科学院昆明植物研究所;3 份红河大翼橙低温冷藏植物叶片材料(中国科学院昆明植物研究所资源室龚洵课题组);6 份枳橙的新鲜植物叶片材料;4 份柚新鲜植物叶片材料;6 份柑橘新鲜植物叶片材料;3 份香橼新鲜植物叶片材料;3 份金柑新鲜植物叶片材料;2 份箭叶橙新鲜植物叶片材料和 3 份宜昌橙新鲜植物叶片材料。另外采集 1 份九里香(*Murraya exotica*)新鲜植物叶片材料作为本研究的外类群。采集的新鲜叶片立即放入硅胶干燥,将干燥好的叶片在-20 ℃冰箱保存备用。植物材料采集信息见表 1。

1.2 方法

采用改良的 CTAB 法从植物材料中提取总 DNA (Doyle, 1991)。通过查阅文献,从常用于植物系统学、群体遗传学和保护生物学等的 DNA 分子片段中进行筛选,共筛选到 3 个 cpDNA 片段和 2 个 nDNA 片段(唐政, 2014; 杨晓明, 2017),其引物信息见表 2。对于目的条带清晰,特异性好的 PCR 扩增产物,送昆明硕擎生物有限公司进行双向测序以保证测序的准确性,测序使用与扩增相同的引物,测序序列已上传到 NCBI,接受号为 MN585512-MN585655 和 MN638942-MN639037。

1.3 数据分析

DNA 分子片段经过测序后,利用 SEQMAN (Swindell & Plasterer, 1997) 软件进行序列的编辑和拼接。然后将拼接好的序列用 BioEdit ver. 7.0.4.1 (Hall, 1999) 进行序列的比对和手工校对。

对于 3 个叶绿体 DNA 分子片段,利用 PAUP ver. 4.0b10 (Swofford, 2003) 软件进行序列联合合并进行同质性检验,若 $P>0.05$ 则说明片段的一致性良好,可以用于联合分析。因为 2 个核基因(ITS 和 *chr5*)外显子片段都存在双峰的个体,且一致性检验 $P<0.05$,因此,未将核基因进行联合分析。

表 1 本研究材料的采集信息
Table 1 Sampling information of leaf tissues in this study

物种名称 Species	采集位置(样品数目) Sample sites (sample numbers)
富民枳 <i>Poncirus polyandra</i>	中国科学院昆明植物研究所(9) Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences (9)
枳 <i>P. trifoliata</i>	中国科学院昆明植物研究所,四川达州市(8) Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences and dazhou city, Sichuan Province (8)
红河大翼橙 <i>Citrus hongheensis</i>	云南省红河州(3) Honghe, Yunnan Province (3)
枳橙 <i>Citrus × insitorum</i>	中国农业科学院柑橘研究所(6) Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (6)
柚 <i>C. maxima</i>	中国农业科学院柑橘研究所(4) Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (4)
柑橘 <i>C. reticulata</i>	中国农业科学院柑橘研究所(6) Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (6)
香橼 <i>C. medica</i>	中国农业科学院柑橘研究所(3) Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (3)
金柑 <i>C. japonica</i>	中国农业科学院柑橘研究所(3) Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (3)
箭叶橙 <i>C. hystrix</i>	中国农业科学院柑橘研究所(2) Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (2)
宜昌橙 <i>C. cavaleriei</i>	中国农业科学院柑橘研究所(3) Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (3)
九里香 <i>Murraya exotica</i>	中国科学院西双版纳植物园(1) Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences (1)

以芸香科九里香做为外类群,采用最大似然法(maximum likelihood, ML)和贝叶斯法(Bayesian inference, BI)构建系统发育树以进行枳属和富民枳的分类地位研究。ML 分析所需模型及树的构建均在软件 MEGA ver. 5 (Tamra et al., 2011) 中执行,树的构建选用 Nearest-Neighbor-Interchange (NNI) 搜索方法,支持率的估计采用 1 000 次重复

表 2 引物序列信息
Table 2 Information of primers

引物名称 Primer name	引物序列 Sequence of primer	片段长度 Size (bp)	退火温度 Annealing temperature (℃)
<i>trnL-trnF</i>	F: CGAAATCGGTAGACGCACG R: ATTGAACTGGTGACACGAG	948	57
<i>trnS-trnG</i>	F: GAACGAATCACACTTTTACCAC R: GCCGCTTTAGTCCACTCAGC	806	59
<i>rbcL</i>	F: ATGTCACCACAAACAGAACTAAAGCAAGT R: CTTCACAAAGCAGCAGCTAGTTCAGGACTCC	1 266	55
ITS	F: ACGAATTCATGCTCCGGTGAAGTGTTCC R: TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC	756	65
<i>Chr5</i>	F: CGAGCAGCTTTCTCCCACT R: CCCCTCCAGGAATACCACT	780	55~58

抽样的靴带分析。BI 分析所需最佳碱基替代模型在软件 Jmodeltest ver. 2.3.1 (Darriba et al., 2012) 中计算, BI 分析在软件 MrBayes ver. 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) 中进行, 每一个马尔可夫链从一个随机的树开始, 运行 10⁶ 个循环, 每 100 次循环取样一次, 支持率选用后验概率 (Posterior Probability, PP), 利用软件 Figtree 读取最终的树文件。

2 结果与分析

2.1 叶绿体联合片段分析

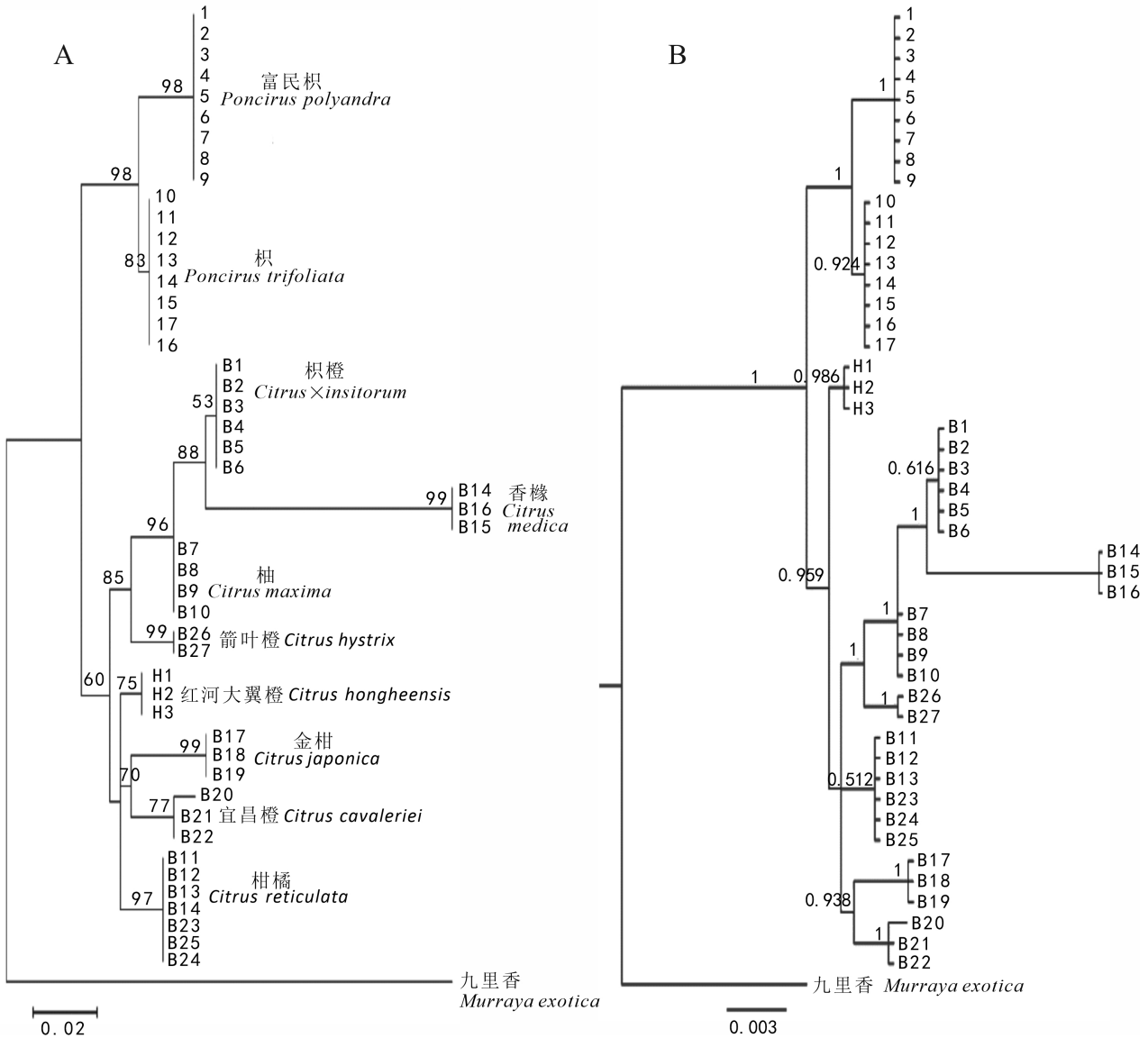
所研究的叶绿体片段长度在类群间和个体间均一致, *trnL-trnF* 的长度为 948 bp, 共检测到 16 个多态位点, 包括 11 个位点变异和 5 个插入/缺失; *trnS-trnG* 的长度为 806 bp, 共检测到 44 个多态位点, 包括 40 个位点变异和 4 个插入/缺失; *rbcL* 的长度为 1 266 bp, 共检测到 18 个多态位点, 包括 9 个位点变异和 9 个插入/缺失。将 3 个片段进行同质性检验并联合, 一致长度为 3 020 bp。

基于最大似然法和贝叶斯法构建系统发育树如图 1 所示, 构建最大似然树选用最佳模型为 T92 模型, 贝叶斯分析选用 TPMluf-Nei 模型, 最大似然树和贝叶斯树分支上方的数字分别代表靴带值 (Bootstrap value, BS) 和后验概率 (PP)。两种推导法构建系统树的拓扑结构比较一致, 内类群的所有物种聚成两大支且得到了较高的支持率, 其中柑橘属的 8 个物种聚为一大分支 (BS = 60; PP = 0.959),

枳属的富民枳和枳聚为另一大分支 (BS = 98; PP = 1), 枳属与柑橘属的类群并没有交叉, 二者均是单系。其中在枳属的这一分支里, 富民枳的所有个体聚为一小单系分支, 枳的所有个体聚为另一小单系分支, 均得到了高支持率 (BB = 98, 83; PP = 1, 0.924)。在柑橘属的分支里, 每个物种的所有个体都聚为一个小的单系分支, 并不存在交叉。但两种方法在对柑橘属物种的系统发育关系的处理上存在稍许差别, 如红河大翼橙的系统位置不同, 最大似然树显示红河大翼橙位于分支内部位置, 而贝叶斯树显示红河大翼橙最早分化出来。两种树均显示枳橙和香橼聚为一支, 随后又与柚聚在一起, 说明它们的亲缘关系较近; 金柑和宜昌橙聚在一支, 说明二者具有较近的亲缘关系。

2.2 ITS 片段分析

ITS 片段经过整理剪切的一致长度为 756 bp, 共检测到 66 个多态位点, 包括 63 个位点变异和 3 个插入/缺失。构建最大似然树选取 HKY+G+I 为最佳模型, 贝叶斯分析选用 TIM3+G 模型。基于 ITS 联合片段构建的最大似然树和贝叶斯树见图 2, ML 树和 BI 树的拓扑结构并不一致, 但两种树的结果均显示富民枳和枳聚为一支 (BS = 54; PP = 0.982), 嵌套在柑橘属的分支里, 但富民枳和枳与柑橘属的其他物种并没有交叉。ML 树所得到的聚类关系支持率均较低, 结果显示柑橘最先分化出来, 然后是红河大翼橙、金柑、香橼和宜昌橙, 而四者呈并系关系 (BS < 50); 柚和枳橙聚为一支, 然



分支上方的数字代表靴带值(A)和后验概率(B)。下同。

Numbers on each branch indicate the bootstrap value (BS) (A) and the posterior probability (PP) (B). The same below.

图 1 基于最大似然法(A)和贝叶斯法(B)利用 3 个叶绿体联合片段构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogeny trees constructed by three combined chloroplast fragments based on maximum likelihood (ML) (A) and Bayesian inference (BI) (B) methods

后二者又与箭叶橙聚在一起 (BS=56)。BI 树所得到的聚类关系支持率均较高,结果显示所有物种聚为三大支 (PP=1),箭叶橙为一分支;富民枳、枳、红河大翼橙、柑橘、香橼、金柑和宜昌橙聚为一大分支 (PP=0.994),其中富民枳与枳聚为一小单系分支 (PP=0.982),另外 5 个柑橘属植物聚为另一小单系分支,但它们呈并系关系 (PP=0.986);

枳橙与柚聚为另一大分支 (PP=0.522)。

2.3 单拷贝核基因 *Chr5* 分析

Chr5 片段比对剪切后一致性长度为 780 bp,共检测到 39 个多态位点,全为位点变异,构建的系统发育树见图 3,其中 ML 树构建选择 TM93+I 模型,BI 树的构建模型为 TIM1。基于 *Chr5* 片段构建的 ML 树和 BI 树的拓扑结构是一致的,结果见图 3。

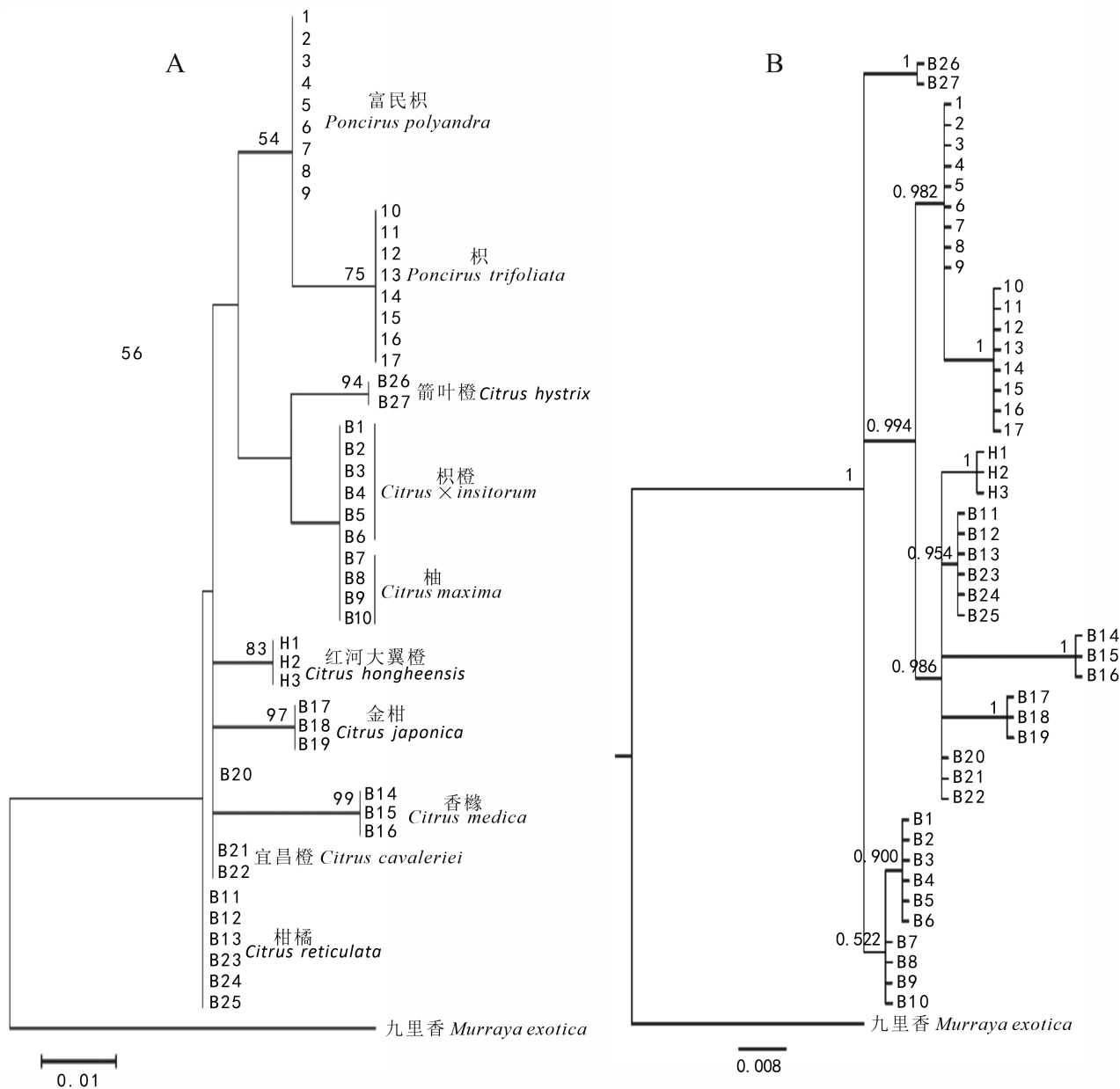


图 2 基于最大似然法 (A) 和贝叶斯法 (B) 利用 ITS 片段构建的系统发育树
Fig. 2 Phylogeny trees constructed by ITS fragments based on maximum likelihood (ML) (A)
and Bayesian inference (BI) (B) methods

与 ITS 数据结果相似,富民枳和枳聚为一支嵌套在柑橘属植物的分支里,但二者与柑橘属的其他物种并没有交叉,ML 树的支持率较低,BI 树的支持率较高。系统树结果显示红河大翼橙最先分化出来 (BS<50; PP = 1), 然后是宜昌橙 (BS = 65; PP = 0.862), 随后枳橙、柚、香橼、柑橘、箭叶橙和金柑聚为一支 (BS=62; PP=0.516), 最后与富民枳和枳的分支聚为一大分支 (BS=62; PP=0.993)。

3 讨论与结论

3.1 枳属的分类地位

本研究以“枳属”单独存在为基础,选择枳属的两个种和柑橘属的 8 个种为研究对象,利用 3 个 cpDNA 片段、ITS 和 1 个核基因对枳属的系统发育进行研究。cpDNA 的数据结果均一致支持枳属为



图 3 基于最大似然法 (A) 和贝叶斯法 (B) 利用核基因 *chr5* 构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogeny trees constructed by nuclear gene *Chr5* based on maximum likelihood (ML) (A) and Bayesian inference (BI) (B) methods

一单系,与柑橘属的物种并无交叉,说明两属之间无基因交流。本研究结果和武晓晓等(2018)、杨晓明(2017)及 Wu et al.(2018)的研究结果一致,枳属能够作为一个独立的属,而不应将其归并到柑橘属中。但 3 个叶绿体联合片段的 ML 树和 BI 树显示柑橘属物种的系统发育关系是不一致的,如红河大翼橙的系统位置不同,ML 树显示红河大翼橙位于分支内部位置,而 BI 树显示红河大翼橙

是最早分化出来的物种。这可能是由于 3 个叶绿体 DNA 分子片段信息位点不足,基于不同的方法推断出来的结果存在冲突。

与 cpDNA 的研究结果不同的是 ITS 和 *Chr5* 的数据结果显示枳属并不能与柑橘属分开,而是嵌套在柑橘属的分支里,说明两个核 DNA 的数据并不支持枳属能够单独成属,而应归并在柑橘属里,这与 2008 年 *Flora of China* 修订版(Zhang, 2008)中对枳

属的处理是一致的,但与 Wu et al. (2018) 基于基因组数据的研究结果不一致。另外,这 2 个核 DNA 数据显示柑橘属 8 个物种的关系也不一致,比如红河大翼橙,在 ITS 构建的系统树上处于内部分支里,而在 *Chr5* 构建的系统树上显示最早分化出来。不同核 DNA 分子片段数据揭示的结果不一致,可能是由于核基因的不完全谱系分选造成的,亦或它们受到的选择压力和进化速率不一致造成的。另外,在核基因中往往存在重组现象,可能对物种系统发育关系也会存在影响。

本研究中,不同类型的 DNA 分子片段数据在对枳属和柑橘属物种的系统发育关系解决上存在差异,cpDNA 数据支持枳属能够独立成属,而核 DNA 数据显示枳属嵌套在柑橘属里不能单独成属。因为质体基因是母系遗传的,而核基因是双亲遗传的,质体基因所拥有的 N_e 是核基因的 $1/4$, N_e 可以影响一个物种单倍型成为单系的速度 (Moore, 1995)。因此,基于 1 个质体基因物种的单倍型成为单系所需的时间是基于 1 个核基因所需时间的 $1/4$,即质体基因能更快地体现出一个物种的单倍型成为单系。可能在解决属的分类地位时,叶绿体数据也能尽早体现出来。所以在本研究中,叶绿体数据能够解决枳属的分类地位,而两个核 DNA 则不行。另外,根据 Moore 的观点,在 1 个质体基因能 95% 成功地解决一个物种是单系时,就需要用 16 或者 40 个核基因才能达到如此成功率。所以,想要解决一个属或者物种的分类地位就需要采用更多的核基因,这也可能造成本研究中较少的核基因不能解决枳属的分类地位。另外,叶绿体片段数据与核基因数据结果存在差异,也可能暗示枳属杂交起源,这需要采用更多的核基因数据或从组学水平上进行深入探究。

3.2 富民枳的分类地位

序列位点差异直观反映各个研究材料之间基因层次上的差异性,这种研究方式是直观有效的,这种方法在很多植物领域都有利用。本研究通过具有母系遗传特性的 3 个叶绿体片段和具有双亲遗传特性的核基因片段 ITS 和 *Chr5* 数据来研究富民枳的分类地位以及它与枳、红河大翼橙、枳橙、柚、柑橘、香橼、金柑、箭叶橙这些种的系统发育关

系。基于 ML 法和 BI 法构建系统发育树,所有数据结果均显示富民枳的 9 个个体聚在一起,并未与其他任何物种有交叉,支持富民枳是一个遗传上相对独立的类群,而不支持 *Flora of China* 将其作为柑橘属的一个杂交种的分类处理。因此,富民枳不是一个柑橘杂交种,而是为一个独立“好种”,且与前人研究结果一致 (吴兴恩等, 2006; 龚桂芝等, 2008)。本研究结果表明,虽然核 DNA 数据并不支持枳属的成立,但是,无论叶绿体 DNA 数据还是核 DNA 数据均支持富民枳是一个独立的物种,是一种优质的种质资源 (张珊珊等, 2018),具有重要的保护价值。

参考文献:

- CHENG CX, SU X, GAO T, et al., 2018. nrDNA ITS sequence analysis of *Grayia spinosa* (Chenopodiaceae) from different regions in the Western United States [J]. *Guihaia*, 38(5): 617-625. [成彩霞, 苏雪, 高婷, 等, 2018. 美国西部不同地区 *Grayia spinosa* 核 DNA ITS 序列分析 [J]. *广西植物*, 38(5): 617-625.]
- DARRIBA D, TABOADA GL, DOALLO R, et al., 2012. Model test 2: more models, new heuristics and parallel computing [J]. *Nat Methods*, 9(8): 772-772.
- DING SQ, ZHANG XN, BAO ZR, et al., 1984. A new species of *Poncirus* from China [J]. *Acta Bot Yunnan*, 6(3): 292-293. [丁素琴, 张显努, 暴卓然, 等, 1984. 中国枳属一新种 [J]. *云南植物研究*, 6(3): 292-293.]
- DOYLE J, 1991. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation [M]//HEWITT GM, JOHNSON A (eds.). *Molecular techniques in taxonomy*. Berlin: Springer: 101-115.
- FANG DQ, 1993. Intra and intergeneric relationships of *Poncirus polyandra*: investigation by leaf isozymes [J]. *J Wuhan Bot Res*, 11(1): 34-40. [方德秋, 1993. 富民枳的分类地位及其在进化中的作用研究——叶片同工酶证据 [J]. *武汉植物学研究*, 11(1): 34-40.]
- GEORGE J, LAPOINTE SL, 2019. Host-plant resistance associated with *Poncirus trifoliata* influence oviposition, development and adult emergence of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) [J]. *Pest Mang Sci*, 75(1): 279-285.
- GONG GZ, HONG QB, PENG ZC, et al., 2008. Genetic diversity of *Poncirus* and its phylogenetic relationships with relatives as revealed by nuclear and chloroplast SSR [J]. *Acta Horti Sin*, 35(12): 1742-1750. [龚桂芝, 洪棋斌, 彭祝春, 等, 2008. 枳属种质遗传多样性及其与近缘属植物亲缘关系的 SSR 和 cpSSR 分析 [J]. *园艺学报*, 35(12): 1742-1750.]
- GUO TC, CHEN QY, YE YM, 1996. *Poncirus trifoliata* germplasm resources [M]. *South China Fruit*, (3): 8-

10. [郭天池, 陈全友, 叶荫民, 1996. 枳的种质资源 [M]. 中国南方果树, (3): 8-10.]
- HALL TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. Nucl Acids Symposium Ser, 41(41): 95-98.
- HEO Y, CHO Y, JU KS, et al., 2018. Antiviral activity of *Poncirus trifoliata* seed extract against oseltamivir-resistant influenza virus[J]. J Microbiol, 56(8): 586-592.
- HU YX, SONG YP, TAN SS, et al., 2017a. Extraction process of Poncirin in Fructus *Ponciri trifoliata* [J]. J Jinggangshan Univ (Nat Sci Ed), 38(2): 83-86. [胡源祥, 宋玉鹏, 谭舒舒, 等, 2017a. 绿衣枳壳中枳属苷的提取工艺研究 [J]. 井冈山大学学报(自然科学版), 38(2): 83-86.]
- HU YX, CHEN HF, SONG YP, et al., 2017b. Determination of flavonoids in Fructus *Ponciri trifoliatae* and Fructus *Aurantii* by HPLC [J]. J Pharm Anal, 37(12): 2162-2166. [胡源祥, 陈海芳, 宋玉鹏, 等, 2017b. HPLC 法测定酸橙枳壳和枸橘枳壳中黄酮苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 37(12): 2162-2166.]
- HU YX, ZHU HQ, TAN SS, et al., 2017c. Isolation and purification of Poncirin from Fructus *Ponciri trifoliatae* by multi-solvent partition [J]. J Jinggangshan Univ (Nat Sci Ed), 38(5): 85-88. [胡源祥, 朱海强, 谭舒舒, 等, 2017c. 多溶剂萃取法分离制备绿衣枳壳中枳属苷 [J]. 井冈山大学学报(自然科学版), 38(5): 85-88.]
- LI YZ, 2006. Genetic diversity and phylogeny of *Citrus reticulata* Blanco [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. [李映志, 2006. 宽皮柑橘 (*Citrus reticulata* Blanco) 的遗传多样性及系统发育研究 [D]. 武汉: 华中农业大学.]
- LI XM, 2010. Molecular phylogeny of the true citrus fruit trees group (Aurantioideae, Rutaceae) and the origin of cultivated *Citrus* [D]. Chongqing: Southwestern University. [李小孟, 2010. 柑橘及其近缘属植物的分子进化与栽培柑橘的起源研究 [D]. 重庆: 西南大学.]
- LIU LQ, YANG J, GU ZJ, 2007. Karyomorphology and taxonomic position of *Poncirus polyandra* (Rutaceae) [J]. Acta Bot Yunnan, 29(2): 198-200. [刘利勤, 杨静, 顾志建, 2007. 富民枳的核型与分类位置探讨 [J]. 云南植物研究, 29(2): 198-200.]
- LIU T, 2014. Genetic diversity analysis of Guangxi *Citrus* germplasm using SSR and SPAP [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. [刘通, 2014. 应用 SSR 和 SRAP 技术研究广西柑橘资源遗传多态性 [D]. 武汉: 华中农业大学.]
- MOORE WS, 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees [J]. Evolution, 49(4): 718-726.
- PANG XM, HU CG, DENG X, 2003. Phylogenetic relationships among *Citrus* and its relatives as revealed by SSR markers [J]. J Genet, 30(1): 81-87. [庞晓明, 胡春根, 邓秀, 2003. 用 SSR 标记研究柑橘属及其近缘属植物的亲缘关系 [J]. 遗传学报, 30(1): 81-87.]
- RONQUIST F, HUELSENBECK JP, 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. Bioinformatics, 19(12): 1572-1574.
- SWINDELL SR, PLASTERER TN, 1997. SEQMAN [M]//SWINDELL SR (ed.). Sequence data analysis guidebook. Vol. 70. New York: Humana Press: 75-89.
- SWOFFORD DL, 2003. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, Version 4.0 b10 [J]. Sunderland: Sinauer Associates: 33-39.
- TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Mol Biol Evol, 28(10): 2731-2739.
- TANG Z, 2014. The polymorphism of *Citrus* and its relatives based on single-copy nuclear gene (SCNGs) DNA sequences [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. [唐政, 2014. 基于单拷贝核基因 (SCNGs) DNA 序列的柑橘多样性研究 [D]. 武汉: 华中农业大学.]
- TOMMIMATSU T, 1968. Studies on the chemical components of Rutaceae plants. I. Components of the root of *Poncirus trifoliata* Rafinesque (1) [J]. Yakugaku Zasshi-J Pharm Soc J, 88(5): 643-645.
- TOMMIMATSU T, HASHIMOTO M, 1968. Studies on the chemical components of Rutaceae plants. II. Components of the root of *Poncirus trifoliata* Rafinesque (2) [J]. Yakugaku Zasshi-J Pharm Soc J, 88(10).
- WU GA, TEROL J, IBANEZ V, et al., 2018. Genomics of the origin and evolution of Citrus [J]. Nature, 554(7692): 311.
- WU XE, FAN MT, GONG X, et al. 2006. The ISSR analysis of 22 *Citrus* resources [J]. J Yunnan Agric Univ, (1): 36-41. [吴兴恩, 范晖天, 龚洵, 等, 2006. 22 份柑桔资源的 ISSR 分析 [J]. 云南农业大学学报, (1): 36-41.]
- WU XX, TANG Y, DENG CL, et al., 2018. Observation of citrus pollen morphology by scanning electron microscopy [J]. J Fruit Sci, 35(7): 794-801. [武晓晓, 唐艳, 邓崇岭, 等, 2018. 柑橘不同种属花粉形态观察 [J]. 果树学报, 35(7): 794-801.]
- XING DS, 2008-10-21. Carry out investigation on wild plants and alien invasive organisms [N]. Yuxi Daily, (005). [邢定生, 2008-10-21. 开展野生植物及外来入侵生物调查 [N]. 玉溪日报, (005).]
- YANG XM, 2017. The phylogenomic of Aurantioideae and phylogeography of wild citron (*Citrus medic*) and ichang papeda (*Citrus ichangensis*) [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. [杨晓明, 2017. 柑橘亚科植物系统发育基因组学及野生枸橼、宜昌橙谱系地理学研究 [D]. 武汉: 华中农业大学.]
- ZHANG DX, 2008. Flora of China [M]. Beijing: Beijing Science Press, 11(7): 90-96.
- ZHANG LF, 2006. Phylogenetic relationships among *Fortunella* Swingle and its relatives as revealed by ISSR and SSR markers [D]. Chongqing: Southwestern University. [张连峰, 2006. 金柑属 (*Fortunella* Swingle) 及其近缘属植物的 ISSR 及 SSR 分析 [D]. 重庆: 西南大学.]
- ZHANG SS, GAN YH, YANG WZ, et al., 2018. Genetic diversity of *Poncirus polyandra* resources [J]. J West Chin For Sci, 47(4): 14-20. [张珊珊, 甘云浩, 杨文忠, 等, 2018. 富民枳种质资源的 SSR 遗传多样性研究 [J]. 西部林业科学, 47(4): 14-20.]