

基于 cpDNA *rps16* 序列分析兰考泡桐与 白花泡桐和毛泡桐的遗传关系

莫文娟^{1,2}, 李少峰^{1*}, 邱乾栋³, 孙长忠¹, 汤志敏¹, 乔杰²
杜红岩², 傅建敏^{2**}

(1. 中国林业科学研究院华北林业实验中心, 北京 102300; 2. 中国林业科学研究院经济林研究开发中心, 河南 郑州 450003;
3. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要:【目的】通过测序法分析兰考泡桐与白花泡桐和毛泡桐在叶绿体 *rps16* 序列上的遗传差异, 旨在分析三者之间在叶绿体基因上的变化特点和规律, 探讨其种间的遗传关系。【方法】选取兰考泡桐、白花泡桐和毛泡桐各 15 个样本, 对其提取的 DNA 用 PCR 扩增获得特异片段, 并将其纯化与测序。利用软件 Clustal X 2.0 对所得序列进行排序; 运行 MEGA 4 软件, 进行多序列比对, 分析其序列特征, 并计算出 K2P 遗传距离。【结果】(1) 对获得的 *rps16* 序列进行测定分析, 得兰考泡桐序列长度分别为 932~933 bp; 白花泡桐序列长度为 932 bp; 毛泡桐序列长度分别为 916~918 bp。对所得 *rps16* 序列进行排序后的长度为 938 bp, 平均 GC 含量为 34.31%。3 个种所代表的个体之间共有 10 个变异位点, 占整个序列长度的 1.07%。其中有 9 个变异位点属于碱基插入或缺失类型, 占变异位点总数的 90%, 占整个序列长度的 0.96%。有 1 个变异位点属于碱基替换类型, 占整个变异位点总数的 10%, 占整个序列长度的 0.11%。(2) 整个 *rps16* 片段的序列共有 10 个变异位点, 其中兰考泡桐与白花泡桐在总的变异位点上, 具有一致的碱基位点 9 个, 占总变异的 90%。而兰考泡桐与毛泡桐相比, 没有相同的碱基。【结论】根据三种泡桐的 *rps16* 序列的序列特征和变异位点的分析, 表明在叶绿体遗传方面, 兰考泡桐具有与白花泡桐更多相似的遗传物质, 其亲缘关系较近。综上所述, 推测兰考泡桐与白花泡桐可能来自同一母系遗传。

关键词: 兰考泡桐; 白花泡桐; 毛泡桐; *rps16*

中图分类号: S792.43

文献标识码: A

Genetic Relationships among *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* and *Paulownia tomentosa* Based on cpDNA *rps16* Region Sequences

MO Wen-juan^{1,2}, LI Shao-feng¹, QIU Qian-dong³, SUN Chang-zhong¹, TANG Zhi-min¹,
QIAO Jie², DU Hong-yan², FU Jian-min²

(1. Forestry Experiment Center of North China, Chinese Academy of Forestry, Beijing 102300, China; 2. Non-timber Forestry Research & Development Center, Chinese Academy of Forestry, Zhengzhou 450003, He'nan, China; 3. College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forest University, Beijing 100083, China)

Abstract: [Objective] To explore the change of chloroplast genetic characteristics and laws of *Paulownia elongata*, *P. fortunei* and *P. tomentosa* and to discuss the genetic relationship among the three species. [Method] The genetic differences of the Chloroplast DNA *rps16* region sequences of *P. elongata*, *P. fortunei* and *P. tomentosa* were ana-

收稿日期: 2015-05-23

基金项目: 十二五科技支撑“抗逆生态树种泡桐新品种选育技术研究”(2012BAD01B0602)。

作者简介: 莫文娟(1985—), 女, 博士, 植物遗传育种研究方向。E-mail: mwj862004@163.com。

* 共同第一作者: 李少峰(1981—), 男, 主要从事林木遗传育种研究。E-mail: lishao2009@163.com。

** 通讯作者: 傅建敏, 女, 副研究员, 主要从事经济林育种与栽培研究。E-mail: fjm371@163.com。

本研究部分实验在中国林业科学研究院重点开放实验室完成, 在此感谢。

lyzed by using sequencing method. The DNAs were extracted from each 15 individuals of *P. elongata*, *P. fortunei* and *P. tomentosa*, then were amplified with PCR to obtain specific fragment which were purified and sequenced. Quick sort were completed by the software Clustal X 2.0, multiple sequence were aligned by using software MEGA 4, and then the characteristics and the K2P genetic distance of the alignment sequence were also calculated. [Result] (1). The sequence lengths of rps16 region from *P. elongata* were measured by 916 ~ 933 bp; those from *P. fortunei* was calculated by 932 bp; and those from *P. tomentosa* were 916 ~ 918 bp after aligned. The length of rps16 sequence was 938 bp after aligned by the software Clustal X 2.0, and the average GC content was 34.31%. The amount of total variable loci detected from the aligned sequences was 10, accounting for 1.07% of the entire length of the sequence. The amount of variable loci (insertion-deletion site) was 9, accounting for 90% of the total variable loci, for 0.96% of the entire sequence. The amount of variable loci (substitution site) was 1, accounting for 10% of the total variable loci, for 0.11% of the entire sequence. (2). Total 10 variable loci were detected from the aligned sequences, of which 9 (90%) sites were same between *P. elongata* and *P. fortunei*, while there was no same base between *P. elongata* and *P. tomentosa*. [Conclusion] According to the analysis on sequence characteristics and mutation sites of rps16 sequences from the three species of Genus Paulownia, in chloroplast genetic aspects, the results illustrated that there were much more similar plastid inheritances between *P. elongata* and *P. fortunei* than between *P. elongata* and *P. tomentosa*; indicating closer relationships between *P. elongata* and *P. fortunei*. From the above, *P. elongata* and *P. fortunei* could be inferred from the same maternal lineage.

Keywords: *Paulownia elongata*; *Paulownia fortunei*; *Paulownia tomentosa*; rps16

兰考泡桐(*Paulownia elongata* S. Y. Hu)、白花泡桐(*Paulownia fortunei* (Seem.) Hemsl)和毛泡桐(*Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud)为玄参科(Scrophulariaceae)泡桐属(*Paulownia*)的落叶乔木,是重要的速生用材和绿化型典型代表树种之一。兰考泡桐集中分布于以黄、淮、海平原为代表的黄河流域;白花泡桐分布长江流域以南各省、市,是南方泡桐种类的代表树种;毛泡桐分布从长江中下游一直到泡桐分布区的北界,其重点分布区为大别山和神农架及其周边地区,是北方泡桐种类的代表种。毛泡桐抗旱耐寒、适应能力强、木材材质致密,是优良的家具用材^[1-4]。由于泡桐种间生殖隔离不强,存在非常普遍的种间混交、渐渗现象^[5-6],使得泡桐杂交种的单倍型来源非常丰富,兰考泡桐是泡桐天然杂交种的代表中之一^[7]。根据竺肇华的观点^[7]认为兰考泡桐可能是毛泡桐与白花泡桐的杂交种。从地理分布上看,毛泡桐与白花泡桐有重叠区。兰考泡桐又是高度不育。熊金桥^[8]总结有多种证据反复证实兰考泡桐作为毛泡桐和白花泡桐的杂交种。卢龙斗^[9]通过RAPD标记研究泡桐属的7个种,其中的结果之一是白花泡桐与兰考泡桐间遗传相似系数为0.723,说明白花泡桐对兰考泡桐形成提供的遗传份额比较大。这些在分子水平的数据支持了竺肇华的观点,证明在泡桐属植物演化过程中兰考泡桐

可能是毛泡桐与白花泡桐发生的种间杂交。马浩^[10]等对泡桐属15个植物的cpDNA进行RFLP的分析结果认为兰考泡桐是白花泡桐与毛泡桐的杂交种,且兰考泡桐含白花泡桐的遗传成分较大,所以将其归入白花泡桐组内。莫文娟^[11]等利用ISSR分析得出兰考泡桐与毛泡桐聚在一组,表明兰考泡桐与毛泡桐的亲缘关系近,对于毛泡桐是兰考泡桐的亲本之一这一观点,在核DNA水平上提供一定的理论基础支持。

在林木的分子鉴定技术的研究领域里,根据检测方法,目前可分为两大类:DNA多态性分析和DNA测序。两者相比,最明显的区别:前者是对DNA变异的间接比较,而后者是直接比较^[12-14]。DNA测序法通过PCR扩增目的基因,直接测序获得序列,通过比较分析所有的样品而检测出序列差异,确定有意义的特定位点,进而达到识别样本的目的^[13]。目前在植物方面进行DNA测序的基因有cpDNA *rbcL*、*rps16*、*trnL-F*等与nrDNA *ITS*、*ETS*等,研究者针对植物中要解决的科间、属间、种间及种内居群间的遗传差异和变异问题,会参考相关文献和前人研究来选择合适的基因片段,进行序列测定与分析^[15]。这种方法快速、可靠而准确地反映出研究对象间的碱基差异,进而分析它们间的遗传变异与遗传关系,且不受生长季节的限制。张金梅^[16]研究组

展开了对芍药科芍药属遗传关系的研究,他们通过叶绿体 DNA 基因,注释了该属牡丹组的种种关系,探讨了牡丹组的系统进化和位置变动。侯鑫^[17]等分析小叶、中间和柠条锦鸡儿的 *trnL-F* 序列特征;对齐排序为 1 053 bp,87 个变异位点中含有 54 个信息位点。并探讨分析其种间关系,结果显示中间锦鸡儿与小叶的序列完全一致,而与柠条存在明显差异。内含子如 *rps16*, *rpl16*, *rpoC1* 等,因它们功能上的限制较少,比编码区表现出更快的进化速率(约为 10 倍),可为各种分类类群的系统发育提供大量的信息,较多用于低分类类群间的研究。*rps16* 基因编码核糖体蛋白 S16,位于植物 cpDNA 大单拷贝区,可用于属间、种间的亲缘关系分析^[15]。目前 Wallander、Baker、Robbrecht^[18-20]等利用 *rps16* 对木樨科、棕榈科、流苏子属、丁香属的植物进行分类遗传学的研究,并探讨它们之间的进化问题、分类问题。

本文尝试采用 *rps16* 基因对兰考泡桐,白花泡桐和毛泡桐进行 cpDNA 序列分析,旨在探讨兰考泡桐与白花泡桐和毛泡桐在叶绿体基因上的变化特点和规律,分析其间的遗传关系。

1 材料与方法

1.1 植物材料

实验材料采自江西九江共青城的泡桐基因库(所有材料经河南农业大学兼国家林业局泡桐研究中心特聘专家李荣幸教授鉴定),选取兰考泡桐、白花泡桐和毛泡桐各 15 个样本(见表 1)。采集新鲜嫩叶,用 70% 乙醇清洗表面,用无菌去离子水冲洗干净,存放至 -70°C 超低温冰箱保存待用。

表 1 供试材料

种	来源
兰考泡桐 (<i>P. elongata</i>)	江西共青城
白花泡桐 (<i>P. fortunei</i>)	江西共青城
毛泡桐 (<i>P. tomentosa</i>)	河南郑州市

1.2 DNA 分析

采用天根试剂盒提取泡桐叶片中的基因组 DNA,纯化 DNA 后,经琼脂糖电泳及紫外分光光度法检测 DNA 浓度与纯度,稀释为 $25\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, -20°C 保存备用。

引物的正向序列:“5'-GTGGTAGAAAG-CAACGTGCGACTT-3'”,反向序列:“5'-TCGG-GATCGAACATCAATTGCAAC-3'”^[16]。进行 PCR 扩增,20 μL 体系^[21-22]:1 \times buffer、25 ng 模板 DNA、

$\text{Mg}^{2+} 1.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、dNTPs 0.20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、引物各 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、1 U Taq DNA 聚合酶,5 μL PCR 增强剂。降落 PCR 反应程序:96 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;96 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,每个循环降温退火温度 1 $^{\circ}\text{C}$,72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,10 个循环;96 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,25 个循环;然后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。通过 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测其扩增产物,将扩增成功的 PCR 产物(特异性好的单一条带)进行纯化后,送中美泰和生物技术(北京)有限公司进行双向测序。进行两次或以上的重复检测,以克服因为材料混淆、PCR 错配和测序失误等带来的实验误差。扩增本研究的实验材料,第二次重复均得到与第一次完全相同的序列结果。

收到测序公司返回的序列文件后,按照以下步骤进行序列分析:1. 用 Sequencher 4.5 Demo 软件检查序列峰图的有效性,以测序信号清晰,峰图无重叠者为佳。2. 借助 Chromas 2.0 软件编辑序列文件,去除两端信号不佳的部分,将信号清晰的部分转换成 Fasta 格式。3. 用 ClustalX 2.0 软件^[23]进行序列比对,生成序列比对文件。4. *rps16* 区序列的边界根据 GenBank 中的近缘种序列作为参考,利用 MEGA 4 软件^[24]进行多序列比对,并计算 K2P 距离。5. 利用 CodonCode Aligner V 2.06 (CodonCode Co., USA) 软件分析统计序列的变异位点。

2 结果与分析

泡桐部分序列峰图(图 1),反映了序列的测序质量。对获得的 *rps16* 序列进行测定分析,得兰考泡桐序列长度分别为 932 ~ 933 bp;白花泡桐序列长度为 932 bp;毛泡桐序列长度分别为 916 ~ 918 bp。对所得 *rps16* 序列进行排序后的长度为 938 bp,平均 GC 含量为 34.31%。

从表 2 和表 3 中可以看出:兰考泡桐有两种序列:兰考泡桐(1)为代表的序列长度为 932 bp,兰考泡桐(2)为代表的序列长度为 933 bp;二者之间的区别在于兰考泡桐(2)为代表的序列在第 871 位点上有 1 个碱基 G 的插入(兰考泡桐的种内变异位点)见表 2。白花泡桐的所有个体拥有一致的序列长度为 932 bp。毛泡桐的个体有两种序列:毛泡桐(1)为代表的序列长度为 916 bp,毛泡桐(2)为代表的序列长度为 918 bp;二者之间的区别在第 727、728 位点上有碱基插入或缺失的(A \rightarrow -、G \rightarrow -)见表 2。在 716 位点有碱基替换(G \rightarrow A)见(表 3)。

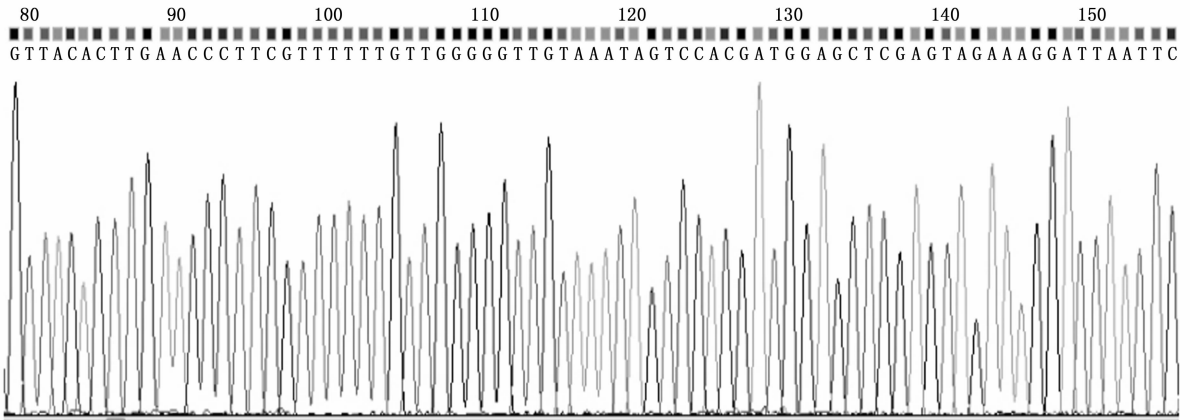


图 1 泡桐 *rps16* 序列的部分峰图

在整个 *rps16* 序列中,718 ~ 724 bp 连续 7 个位点的碱基是 A 见(表 2),测序结果中出现这种多 A 结构,不适合作为信息位点用于属内种间遗传关系的分析,本研究将不考虑上述位点。所以 3 个种所代表的个体之间共有 10 个变异位点(同一位点上所有样品的碱基类型不完全相同),占整个序列长度的

1.07%。其中有 9 个变异位点属于碱基插入或缺失类型(表 1),占变异位点总数的 90%,占整个序列长度的 0.96%。有 1 个变异位点属于碱基替换类型(表 2),占整个变异位点总数的 10%,占整个序列长度的 0.11%。

表 2 *rps16* 区变异位点(插入或缺失)及碱基类型

种	位点编号及碱基类型																
	265	266	267	268	269	717	718	719	720	721	722	723	724	727	728	871	
白花泡桐(<i>P. fortunei</i>)	A	T	A	T	C	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	-
兰考泡桐(<i>P. elongata</i>)(1)	A	T	A	T	C	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	-
兰考泡桐(<i>P. elongata</i>)(2)	A	T	A	T	C	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	G
毛泡桐(<i>P. tomentosa</i>)(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
毛泡桐(<i>P. tomentosa</i>)(2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	G	-

注:括号里的数字表示序列的类型,如兰考泡桐(1)表示兰考泡桐序列的第一种类型。“-”代表 gap

表 3 *rps16* 变异位点(碱基替换)及碱基类型

种	位点编号及碱基类型
	716
白花泡桐(<i>P. fortunei</i>)	A
兰考泡桐(<i>P. elongata</i>)(1)	A
兰考泡桐(<i>P. elongata</i>)(2)	A
毛泡桐(<i>P. tomentosa</i>)(1)	G
毛泡桐(<i>P. tomentosa</i>)(2)	A

注:括号里的数字表示序列的类型,如兰考泡桐(1)表示兰考泡桐序列的第一种类型。“-”代表 gap

综合表 2 和表 3 的结果,在 10 个变异位点中,兰考泡桐与白花泡桐在总的变异位点上,其中 9 个位点(占 90%)上具有一致的碱基;而与毛泡桐的在总的变异位点上,没有相同的碱基。

3 讨论

本研究所选择的叶绿体 *rps16*,其位于 cp DNA 大单拷贝区,编码核糖体蛋白 16S 小亚基基因。其

内含子功能上限制较少,具有解决属间系统发育的能力^[25]。而本研究中的泡桐的 *rps16* 序列的变异位点不多,说明 *rps16* 在泡桐属中的进化速率一般,单独进行系统学研究价值不大,这个与前人^[15]的结论和观点一致。泡桐属植物的 GC 含量较低,平均为 34.31%,说明泡桐属 *rps16* 序列的 A + T 含量较高,大于 60%。

叶绿体基因顾名思义为绿色植物所特有的细胞质基因,在被子植物中的遗传方式属于细胞质遗传中的单亲母系遗传方式^[26-27],是一种有别于核基因的遗传方式^[28]。本研究通过 cp DNA 序列分析发现,兰考泡桐与白花泡桐的 *rps16* 序列具有 94.12% 的相同变异碱基,与毛泡桐的 *rps16* 序列没有相同变异位点,说明兰考泡桐的 *rps16* 序列更接近白花泡桐,因而可以推测两者具有更多相似的叶绿体遗传物质,可能来自同一母系遗传,这与马浩^[10]的结论

和观点一致。

在前辈的研究发现中,熊金桥^[8]总结有多种证据反复证实兰考泡桐作为毛泡桐和白花泡桐的杂交种。胡惠蓉的叶表皮毛状体研究^[29]及其扫描电镜观察^[30]均证实了一点:兰考泡桐叶子表皮毛状体特征与毛泡桐一致,而下表皮则介于毛泡桐和白花泡桐之间,说明此杂交种更接近毛泡桐。泡桐属花药表皮毛状体研究^[29]对兰考泡桐花药表皮毛和气孔形状的研究发现:兰考泡桐花药表皮毛的多少介于白花泡桐与毛泡桐之间,而气孔形状则表现出与毛泡桐特有的椭圆形一致,为兰考泡桐的亲本是白花泡桐和毛泡桐提供了新的佐证。梁作楠^[31]等对泡桐属 8 种植物 GAT、AMYL、ADH、MDH 同工酶分析,表明兰考泡桐的亲本均为白花泡桐和毛泡桐。马浩^[10]等的 cp DNA RFLP 的分类结果认为兰考泡桐是白花泡桐与毛泡桐的杂交种,且其含白花泡桐的遗传成分较大,所以将其归入白花泡桐组内。说明考泡桐与白花泡桐具有更多相似的叶绿体遗传物质,这在叶绿体 DNA 方面为其两者的遗传关系提供有利的分子证据。

虽然兰考泡桐与白花泡桐和毛泡桐在核 DNA 方面有过种间关系的探讨研究,但利用核 DNA 验证兰考泡桐是白花泡桐和毛泡桐的杂交种这还是一个需要探索的领域。推测毛泡桐可能是兰考泡桐的父本,还需要核基因组水平和叶绿体基因组水平上的证据。

4 结论

根据三种泡桐的 *rps16* 序列的序列特征和变异位点的分析,表明在叶绿体遗传方面,兰考泡桐具有与白花泡桐更多相似的遗传物质,其亲缘关系较近。综上所述,推测兰考泡桐与白花泡桐可能来自同一母系遗传。

参考文献:

[1] 李芳东, 乔杰, 王保平, 等. 中国泡桐属种质资源图谱[M]. 北京:中国林业出版社, 2013:2-12.

[2] 邱乾栋, 莫文娟, 王楠, 等. 白花泡桐材色优良单株的选择[J]. 林业科学研究. 2014, 27(2): 277-283.

[3] 王楠, 李芳东, 莫文娟, 等. 杂交泡桐“毛白33”与其回交一代的光合特性比较[J]. 东北林业大学学报, 2015, 43(6): 51-56.

[4] 王楠, 李芳东, 马跃, 等. 泡桐优良无性系“TF33”干材表型性状杂种优势研究[J]. 林业科学研究, 2015, 28(3): 402-408.

[5] Schwarzbach A E, Donovan L A, Rieseberg L H. Transgressive character expression in a hybrid sunflower species [J]. American Journal of Botany, 2001, 88(2): 270-277.

[6] Rauscher J T, Doyle J J, Brown A H D. Internal transcribed spacer repeat - specific primers and the analysis of hybridization in the *Glycine tomentella* (Leguminosae) polyploid complex[J]. Molecular Ecology, 2002, 11(12): 2691-2702.

[7] 竺肇华. 泡桐属植物的分布中心及区系成分的探讨[J]. 林业科学, 1981, 19(3): 271-280.

[8] 熊金桥, 陈志远. 泡桐属的数量分类研究[J]. 植物研究, 1992, 12(2): 185-188.

[9] 卢龙斗, 谢龙旭, 杜启艳. 泡桐属七种植物的 RAPD 分析[J]. 广西植物, 2001, 21(4): 335-338.

[10] 马浩, 张冬梅, 李荣幸, 等. 泡桐属植物种类的 RFLP 分析[J]. 植物研究, 2001, 21(1): 136-139.

[11] 莫文娟, 傅建敏, 乔杰, 等. 泡桐属植物亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 林业科学, 2013, 49(1): 61-67.

[12] 高婷. 利用 DNA 条形码技术鉴定药用双子叶植物[D]. 中国协和医科大学, 2010.

[13] 任保青, 陈之端. 植物 DNA 条形码技术[J]. 植物学报, 2010, 45(1): 1-12.

[14] 杨燕, 费改顺, 贾正平, 等. 半夏人工栽培技术及分子标记技术研究新进展[J]. 中药材, 2010(2): 312-317.

[15] 陈仁芳, 张泽, 唐洲, 等. 桑属 *ITS*、*TrnL-F*、*rps16* 序列与进化分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44(8): 1553-1561.

[16] 张金梅, 王建秀, 夏涛, 等. 基于系统发育分析的 DNA 条形码技术在澄清芍药属牡丹组物种问题中的应用[J]. 中国科学: C 辑, 2008, 38(12): 1166-1176.

[17] 侯鑫, 刘俊娥, 赵一之, 等. 基于 *ITS* 序列和 *trnL-F* 序列探讨小叶锦鸡儿, 中间锦鸡儿和柠条锦鸡儿的种间关系[J]. 植物分类学报, 2006, 44(2): 126-134.

[18] Wallander E, Albert V A. Phylogeny and classification of Oleaceae based on *rps16* and *trnL-F* sequence data[J]. American Journal of Botany, 2000, 87(12): 1827-1841.

[19] Baker W J, Hedderson T A, Dransfield J. Molecular phylogenetics of subfamily Calamoideae (Palmae) based on nrDNA *ITS* and cpDNA *rps16* intron sequence data[J]. Molecular phylogenetics and evolution, 2000, 14(2): 195-217.

[20] Robbrecht E, Manen J F. The major evolutionary lineages of the coffee family (Rubiaceae, angiosperms). Combined analysis (nrDNA and cpDNA) to infer the position of *Coptosapelta* and *Luculia*, and super tree construction based on *rbcL*, *rps16*, *trnL-trnF* and *atpB-rbcL* data. A new classification in two subfamilies, Cinchonoideae and Rubioideae [J]. Systematics and Geography of Plants, 2006: 85-145.

[21] 李芳东, 袁德义, 莫文娟, 等. 白花泡桐种源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中南林业科技大学学报, 2011, 31(7): 1-7.

[22] 莫文娟, 袁德义, 李芳东, 等. 白花泡桐种源的遗传多样性和遗传分化研究[J]. 植物研究, 2011, 31(5): 585-591.

[23] 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 research,

- 1997, 25(24): 4876 - 4882.
- [24] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24:1596 - 1599.
- [25] Vinnersten A, Reeves G. Phylogenetic relationships within Colchicaceae[J]. American Journal of Botany, 2003, 90(10): 1455 - 1462.
- [26] 袁长春, 何雪宝, 袁秋梅, 等. 绿绒蒿自然杂交种及其亲本 cp-DNA *trnL-trnF* 基因的遗传学分析[J]. 云南植物研究, 2007, 29(1): 103 - 108.
- [27] 宋育红, 张君诚, 张杭颖. 长柄石杉不同地理居群叶绿体 DNA *trnL-trnF* 序列变异与聚类分析[J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(003): 443 - 448.
- [28] Qi W, Yang H, Xue Y, *et al.* Inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA in Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) [J]. Acta Botanica Sinica, 1998, 41(7): 695 - 699.
- [29] 李宗然. 泡桐研究进展[M]. 北京: 中国林业出版社, 1995: 226 - 230.
- [30] 胡惠蓉, 陈志远. 泡桐属叶表皮毛状体扫描电镜观察[J]. 华中农业大学学报, 1996, 15(2): 190 - 193
- [31] 梁作楠. 泡桐属植物 CAT、AWYI、ADH 同工酶研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 1996.

(责任编辑:张 研)