

## 血皮槭叶绿体 DNA 非编码区差异序列筛选和分析

叶学敏, 于雪丹, 付其迪, 郑勇奇, 张川红\*

(中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091)

**摘要:** [目的] 筛选出高变异率的叶绿体 DNA 序列, 以进行血皮槭天然群体的谱系地理学研究。[方法] 以血皮槭 16 个天然群体为试材, 对叶绿体基因组 20 个非编码区序列进行测序研究, 并利用筛选出的高变异率 cpDNA 序列初步分析了其遗传变异。[结果] 序列比对和系统发育分析结果显示血皮槭 cpDNA 种内变异非常低, 9 个 cpDNA 序列检测到不同程度的变异位点, 其中只有 4 个序列 *psbJ-petA*、*ndhF-rpl32*、*trnD-trnT* 和 *trnH-psbA* 表现出较高的变异水平。[结论] 筛选出的 4 个高变异率 cpDNA 序列, 可以在分子水平上研究血皮槭种内的系统发育、遗传变异和种群历史动态, 为进一步研究濒危种血皮槭的分子谱系地理学奠定基础。

**关键词:** 血皮槭; cpDNA; 序列筛选; 序列比对; 系统发育分析

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2017)04-0674-05

### Differential Analysis of Non-coding Chloroplast DNA Sequences in *Acer griseum*

YE Xue-min, YU Xue-dan, FU Qi-di, ZHENG Yong-qi, ZHANG Chuan-hong

(Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry; Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China)

**Abstract:** [Objective] By screen highly variable cpDNA sequences to study the phylogeography of *Acer griseum*. [Method] Twenty non-coding cpDNA sequences were sequenced. The genetic variation of sixteen natural populations in *A. griseum* was preliminarily analyzed with the selected highly variable sequences. [Result] Sequences alignment and phylogenetic analysis showed that the intraspecific variation of cpDNA in *A. griseum* was very low. Different variation were detected in some loci of nine cpDNA sequences and a relative high level of variation displayed in four sequences *psbJ-petA*, *ndhF-rpl32*, *trnD-trnT* and *trnH-psbA*. [Conclusion] The four selected highly variable cpDNA sequences could be used to study the phylogeny and genetic variation and clarify the history of population dynamics of *A. griseum*. These sequences will lay a foundation for future phylogeographic study in *A. griseum*.

**Keywords:** *Acer griseum*; cpDNA; sequences screening; sequences alignment; phylogenetic analysis

血皮槭 (*Acer griseum* (Franch.) Pax) 为中国特有种, 具有极高的观赏价值。1993 年, 血皮槭获得英国皇家园艺学会园艺奖, 成为国内外著名的景观树种<sup>[1]</sup>。除观赏价值外, 血皮槭的许多价值尚待开发和利用, 例如木材坚硬, 可作为良好的建筑材料; 木

材纹理精美可制作乐器及工艺品。但是, 这个极具开发价值的树种正濒临灭绝, 急需保护。血皮槭的分布范围仅限于我国中部地区海拔 800~2 000 m 的山地, 分布区严重片段化, 天然群体数量非常小, 表现出濒危物种的典型特征<sup>[2]</sup>。根据世界自然保护

收稿日期: 2016-11-03

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (CAFYBB2016MA001)。

作者简介: 叶学敏 (1991—), 男, 在读硕士, 主要从事植物谱系地理研究。E-mail: 330584119@qq.com。

\* 通讯作者: 张川红 (1970—), 女, 博士, 副研究员, 主要从事林木种质资源研究。E-mail: zhangch@caf.ac.cn。

联盟(IUCN)的标准,血皮槭在《中国物种红色目录》中已被列为濒危树种(EN A2c)<sup>[3]</sup>。

植物叶绿体基因组 DNA(Chloroplast DNA, cpDNA)的研究为珍稀濒危物种制定合理有效的保护策略提供了重要的理论依据。通常,叶绿体非编码区的碱基替换率较高,为中性突变,不受自然选择等其它因素的影响,是研究植物谱系地理、分子系统发育和群体遗传学重要的工具,近年来被成功用于种间或种内变异水平的研究<sup>[4]</sup>。例如,利用 cpDNA 序列对濒危植物南方红豆杉(*Taxus wallichiana* var. *mairei* (Lemée & H. Léveillé) L. K. Fu & Nan Li), 日本红枫(*Acer pycnanthum* K. Koch), 瘦椒树(*Tapiscia sinensis* Oliv.), 青钱柳(*Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk.), 珙桐(*Davidia involucrata* Baill.), 金钱槭(*Dipteronia sinensis* Oliv.)等植物<sup>[5-10]</sup>开展了谱系地理学研究。近年来,对于濒危植物血皮槭的研究主要集中在 SSR 引物开发、天然群体遗传变异和谱系

地理学初步研究等方面<sup>[11-13]</sup>,其中王佳慧利用 rps16 序列对血皮槭谱系地理学进行初步探讨取得进展。但是一个序列并不能全面反映血皮槭的谱系地理结构,本研究利用 20 个通用 cpDNA 序列,以血皮槭 16 个天然群体的 16 株个体为材料,筛选适宜于血皮槭种内研究的高变异率 cpDNA 非编码区序列,为进一步研究濒危种血皮槭的分子谱系地理学奠定基础,对于制定血皮槭合理的保护策略具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料来源于本课题组野外调查的 16 个血皮槭天然群体(表 1),每个群体随机选取 1 株个体为试材。新鲜叶片经硅胶充分干燥后,置于 -80℃ 冰箱保存备用。

表 1 血皮槭各采样群体的地理位置

Table 1 The geographical location of the sampled populations of *A. griseum*

群体 Population	代码 Code	纬度/N Latitude	经度/E Longitude	海拔/m Altitude	群体 Population	代码 Code	纬度/N Latitude	经度/E Longitude	海拔/m Altitude
重庆巫溪	WX	31°28'17"	109°50'59"	1280	湖北兴山	XS	31°19'18"	110°29'08"	1 450
重庆城口	CHK	32°08'20"	108°34'45"	1127	湖北五峰	WF	30°10'20"	110°35'20"	1 496
陕西太白山	TBS	34°04'49"	107°42'48"	1668	湖北神农架	SNJ	31°27'41"	110°23'26"	1 272
陕西华山	HS	34°28'15"	110°04'14"	1989	河南西峡	TPZ	33°39'27"	110°37'23"	837
山西阳城	YC	35°16'18"	112°26'28"	800	河南嵩县	SX	34°13'60"	111°50'48"	941
湖南张家界	ZJJ	29°03'09"	110°28'38"	1440	河南内乡	NX	33°29'38"	111°55'42"	1 234
湖南沅陵	YL	28°53'39"	110°24'46"	561	河南栾川	LC	33°44'28"	111°37'50"	1 031
湖南壶瓶山	HPS	30°02'20"	110°31'23"	1640	甘肃天水	TS	34°14'10"	105°58'33"	1 390

### 1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取与检测 取干燥叶片 30 mg,采用 DNA 提取试剂盒 DP305 (Tiangen Biotech Co., China) 提取血皮槭叶片总 DNA。采用 0.8% 的琼脂糖凝胶进行电泳, G-box 凝胶成像仪 (Chemix XX6, Syngene) 拍照检测 DNA 的质量,酶标仪 (Spectra Max i3) 检测 DNA 纯度和浓度。DNA 浓度稀释到 50 ng · μL<sup>-1</sup>,放于 -20℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 cpDNA 通用引物筛选及测序 从参考文献<sup>[14-17]</sup>挑选了 20 对适合种内水平的 cpDNA 非编码通用引物,由上海美吉生物医药科技有限公司合成(表 2)。为对 20 对通用引物进行初步筛选,随机挑选 2 个样品进行 PCR 反应。反应体系 20 μL,包括模板 DNA 50 ng, 2 × Buffer Master Mix 10 μL, 10 μmol · L<sup>-1</sup> F-primer 0.4 μL, 10 μmol · L<sup>-1</sup> R-primer 0.4 μL,其余 ddH<sub>2</sub>O 补齐。NdhF-rpl32, psbJ-petA 序

列的 PCR 程序:80℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 1 min, 50℃ 退火 1 min, 0.3℃ · s<sup>-1</sup> 升温到 65℃, 65℃ 延伸 4 min, 30 个循环;65℃ 延伸 5 min。其他序列的 PCR 程序:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 30 个循环;72℃ 延伸 10 min。PCR 产物采用 1% 琼脂糖凝胶检测,筛选出条带清晰单一的引物;然后利用初筛合格的引物对所有样品进行 PCR 扩增,选择条带清晰明亮、无非特异性扩增的 PCR 扩增产物,送到上海美吉生物医药科技有限公司纯化,然后采用 ABI 3730xl DNA analyzer 进行测序。

1.2.3 cpDNA 序列编辑和分析 根据原始峰图,使用 Contig Express 软件 (Informax Inc., North Bethesda, MD, USA) 对 cpDNA 测序结果进行峰图检查及拼接,手工校对。然后,采用 BioEdit v7.0.5.2 软件<sup>[18]</sup>分别对 cpDNA 序列进行比对和手工调整;利用 MEGA

表2 20对cpDNA通用引物序列

Table 2 Twenty pairs of the cpDNA universal primer sequence

编号 Code	序列名称 Sequence name	引物信息(5' - 3') Primer details	编号 Code	序列名称 Sequence name	引物信息(5' - 3') Primer details
1	trnH-psbA	F:CGCGCATGGTGGATTACAATCC R:GTTATGCATGAACGTAATGCTC	11	rpl16	F:GCTATGCTTAGTGTGTGACTCGTTG R:CCCTTCATTCTTCCTCTATGTTG
2	psbJ-petA	F:ATAGCTACTGTARCYGGTATT R:AACARTTYGARAAGGTTCAATT	12	rpl32-trnL	F:CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT R:CAGTCCAA AA A ACGTACTTC
3	ndhF-rpl32	F:CCAATATCCCTT YTTTTCCAA R:GAAAGGTATKATCCAYGMATATT	13	rpoB-trnC	F:CACCCRGATTYGAAGTGGGG R:CKACAA AAYCCYTCRAATTG
4	trnD-trnT	F:ACCAATTGAAC TACAATCCC R:CTACCACTGAGTAAAAAGGG	14	rps16-trnK	F:AAAGTGGGTTTTATGATCC R:TTAAAAGCCGAGTACTCTACC
5	atpB-rbcL	F:GTGAAAACCCCGGACGAGAAGTAGT R:ACTTGCCTTACTTTCTGTTGTGGTGA	15	rpl20-rps18	F:CTTCGTCGTTTGTGGATTAC R:AGTCGATTTATTAGTGAGCA
6	trnS-trnG	F:AGATAGGGATTGCAACCCTCGGT R:GTAGCGGAATCGAACC CGCATC	16	psbD-trnT	F:CTCCGTARCCAGTCAATCCATA R:CCCTTTAACTCAGTGGTAG
7	ndhF	F:GATTTGATTTTCCCCTTATC R:TCCATAGCATCAGGTAACC	17	psbM-trnD	F:AGCAATAAATGCRAGAATTTACTTCCAT R:GGGATTGTAGYCAATTGGT
8	trnL-trnF	F:CGAAATCGGTAGACGCTACG R:ATTTGAACTGGTGACACGAG	18	trnV-ndhC	F:GTCTACGGTTCGARTCCGTA R:TATTATTAGAAATGYCCARAA AATATCATATTC
9	petB-petD	F:CTATCGTCCRACCGTTACWGAGGCT R:CAAAYGGATAYGCAGGTTACCC	19	psbB-psbH	F:TCCAAAAANKGGAGATCCAAC R:TCAAAYRGTYTGTGTAGCCAT
10	trnS-trnFM	F:GAGAGAGAGGATTGCAACC R:CATAACCTTGAGGTCACGGG	20	rps12-rpl20	F:ATTAGAAAANRCAAGACAGCCAAT R:CGYYAYCGAGCTATATATCC

v5.0<sup>[19]</sup>计算信息位点。cpDNA序列的变异位点,都是潜在的信息位点(PICs),包括核苷酸的替换、倒置、插入和缺失<sup>[11]</sup>。利用MEGA v5.0进行聚类分析,采用邻接法(Neighbor joining)构建系统发育树,自展检验(bootstrap)通过1000次重复获得。为获得血皮槭潜在信息位点(PICs)和变异率(V),引入公式:

$$PICs = I + S + R \quad (1)$$

$$V = \frac{PICs}{A} \quad (2)$$

式(1)、(2)中:I表示序列插入和缺失数,S表示序列核苷酸替换数,R表示序列倒置数,A表示序列比对后长度。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA提取与PCR扩增

酶标仪检测提取的DNA纯度和浓度都较高。 $OD_{260}/OD_{280}$ 为1.606~1.992,DNA浓度为42.8~154.2 ng· $\mu\text{L}^{-1}$ ,符合PCR反应所需的要求。电泳结果显示DNA条带清晰,满足后续试验要求。

### 2.2 序列分析

所有20对cpDNA通用引物都能扩增出目的片段。其中9个cpDNA序列(表2编号1-9)检测到不同程度的变异位点(表3),序列(表2编号5-9)只检测到一个位点的变异(数据省略)。其余11个

cpDNA序列(表2编号10-20)未能检测到变异位点。

表3 4个cpDNA序列在血皮槭群体中的变异位点分布

Table 3 Variation sites of 4 cpDNA sequences in the populations of *A. griseum*

序列 Sequence	<i>psbJ-petA</i>		<i>ndhF-rpl32</i>				<i>trnD-trnT</i>		<i>trnH-psbA</i>			
群体名称 Population name	2	4	5	4	6	7	7	4	5	2	2	2
	1	9	4	1	2	3	3	5	3	8	9	9
	9	7	3	9	6	6	7	2	9	9	0	3
重庆巫溪(WX)	C	T	-	G	-	A	A	-	T	-	-	-
重庆城口(CHK)	A	-	-	G	-	A	-	-	T	A	-	☆
陕西太白山(TBS)	A	-	-	G	-	A	-	-	T	A	-	-
陕西华山(HS)	A	-	-	G	-	A	-	-	C	A	-	-
山西阳城(YC)	A	-	-	G	-	A	-	-	C	A	-	-
湖南张家界(ZJJ)	A	-	-	G	△	A	-	-	T	-	-	-
湖南沅陵(YL)	A	-	-	G	△	A	-	-	T	A	-	-
湖南壶瓶山(HPS)	A	-	-	G	△	A	-	-	T	A	-	-
湖北兴山(XS)	A	-	-	G	-	A	-	-	T	A	A	-
湖北五峰(WF)	A	-	-	G	△	A	-	-	T	A	-	-
湖北神农架(SNJ)	C	T	-	G	-	A	A	-	T	A	-	-
河南西峡(TPZ)	A	-	-	G	-	A	-	-	T	-	-	-
河南嵩县(SX)	A	-	A	G	-	A	-	-	T	A	-	-
河南内乡(NX)	A	-	-	C	-	A	-	◇	C	A	-	-
河南栾川(LC)	A	-	A	G	-	A	-	-	C	A	A	-
甘肃天水(TS)	A	-	-	G	-	-	-	-	T	A	-	-
测序长度(bp)	867			876				620		450		
比对长度(bp)	563			746				574		395		

注:“△”:TAAC TCCGAAATACAAAAAGAGAGAGATAGAAAAGGTATC ACAA;“◇”:TTCTTTCAGT;“☆”:TAATAAA;“-”:缺失

Note:“△”:TAAC TCCGAAATACAAAAAGAGAGAGATAGAAAAGGTA TCACAAA;“◇”:TTCTTTCAGT;“☆”:TAATAAA;“-”:deletion.

对9个序列的PICs值和变异率(图1)进行比较,筛选出4个变异丰富的cpDNA序列,按照PICs

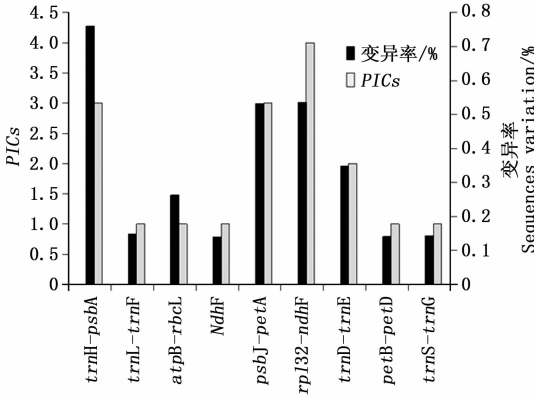


图1 血皮槭 cpDNA 非编码区序列的 PICs 值和变异率  
Fig.1 PICs values and sequence variation of Non-coding cpDNA sequences in *A. griseum*

值由高到低依次为 *ndhF-rpl32*, *psbJ-petA*, *trnH-psbA*, *trnD-trnT*, 变异率由高到低依次为 *trnH-psbA*, *ndhF-rpl32*, *psbJ-petA*, *trnD-trnT*。

血皮槭 cpDNA 非编码区序列的种内变异 (PICs 值) 与其他木本植物相比很低 (见表 4)。*rps12-rpl20* 和 *rpl32-trnL* 序列在血皮槭中表现无变异,而在伞花木<sup>[20]</sup> (*Eurycorymbus cavaleriei* (Le' vl.) Rehd. et Hand. -Mazz.) 群体和珙桐<sup>[9]</sup> (*D. involucrata*) 群体检测到不同程度的变异; *trnH-psbA*, *atpB-rbcL*, *ndhF-rpl32* 和 *psbJ-petA* 序列在血皮槭中的 PICs 值与其他木本植物如色木槭<sup>[21]</sup> (*Acer mono Maxim.*)、红枫<sup>[22]</sup> (*Acer rubrum L.*)、美洲糖槭<sup>[23]</sup> (*Acer saccharum Marsh.*) 和观光木<sup>[24]</sup> (*Michelia odora*) 相比很低。

表 4 各树种不同 cpDNA 序列 PICs 值比较

Table 4 PICs values comparison of different cpDNA sequences in different tree species

序列 sequence	PICs 值 PICs value						
	血皮槭 <i>A. griseum</i>	伞花木 <i>E. cavaleriei</i>	珙桐 <i>D. involucrata</i>	色木槭 <i>A. mono</i>	观光木 <i>M. odora</i>	日本红枫 <i>A. rubrum</i>	美洲糖槭 <i>A. saccharum</i>
<i>rps12-rpl20</i>	0(0)	2(1)	-	-	-	-	-
<i>rpl32-trnL</i>	0(0)	-	13(11)	-	-	-	-
<i>trnH-psbA</i>	3(0)	-	-	20(14)	5(4)	-	-
<i>atpB-rbcL</i>	1(1)	-	-	-	-	8(2)	-
<i>ndhF-rpl32</i>	4(1)	-	-	-	-	-	27(15)
<i>psbJ-petA</i>	3(1)	-	-	-	-	-	20(12)
群体数量	16	18	24	63	21	115	16
个体数量	16	170	231	1236	161	258	233

注:括号内的数字为核苷酸替换数

Note: The number in parentheses represents the number of nucleotide substitutions

### 2.3 系统发育树构建

基于 4 个序列 *ndhF-rpl32*, *psbJ-petA*, *trnH-psbA* 和 *trnD-trnT* 的比对结果,构建了血皮槭群体的系统发育树(图 2)。此系统发育树显示,16 个群体明显分为两大支,SNJ、WX、ZJJ、TPZ、TS、TBS、YL、WF、CHK、HPS、SX、XS 群体聚为一支,LC、YC、HS、NX 群体聚为一支。SNJ、WX 群体和 NX 群体分别从两大支单独分离出来。位于大巴山脉东部的重庆巫溪(WX)和湖北神农架(SNJ)同聚为一支,位于秦岭山脉东部的河南栾川(LC)和内乡(NX)、山西阳城(YC)和陕西华山(HS)群体聚为一支。

### 3 讨论

与其他一些木本植物相比,血皮槭种内变异率较低。血皮槭的种内变异率较低的原因可能与只选用了较少的 16 个样品用于 cpDNA 序列筛选有关,在植物的谱系地理学研究中,天然群体的数量非常重要,样本数量越多越能全面反映其遗传变异情况;也可能与血皮槭及天然群体分布范围窄且呈片段化

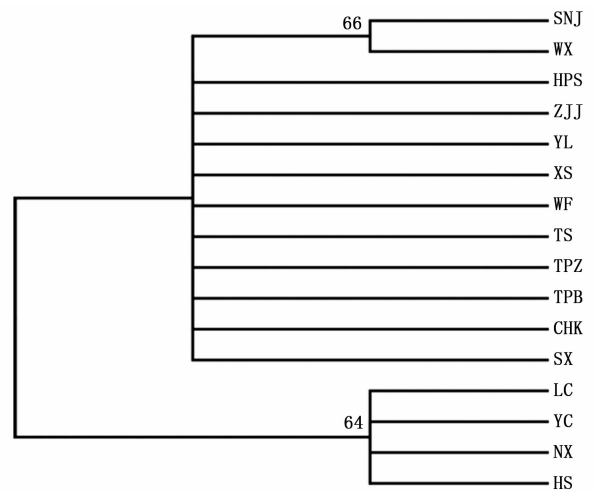


图 2 血皮槭基于 4 个 cpDNA 片段的 NJ 系统发育树 (群体的代码见表 1)

Fig.2 NJ phylogenetic tree based on 4 cpDNA sequences of *A. griseum*(population codes are shown in Table 1)

分布的特点有关,一般来说,广域分布的物种比狭域分布的物种拥有更丰富的遗传变异。例如广域分布

的槭属植物如色木槭和糖槭的 cpDNA 序列变异率比狭域分布的日本红枫和血皮槭高很多。

通过构建系统发育树分析,16 个群体明显分为两大支,而且两个分支内群体间地理距离较近,推测这两个分支的群体经历了长期的地理隔离,与其它群体之间缺乏有效的基因流。ZJJ、TPZ、TS、TBS、YL、WF、CHK、HPS、SX 和 XS 群体位于秦岭山脉、大巴山脉和武陵山脉,此区域位于华中地区的中心,独特的地形和复杂的气候是众多动植物的避难所,为物种的分化和地理隔离提供先决条件。此外,叶绿体基因流是通过种子进行母系传播,基于血皮槭翅果种子传播距离有限、空种率高和种子难以萌发等特性,加之恶劣生境的影响,限制了种子的传播,阻断了基因流,从而使血皮槭在区域内分化和地理隔离成为可能。

## 4 结论

本研究通过对 20 个血皮槭叶绿体 DNA 非编码区差异序列进行筛选,共筛选出 4 个多态性较好的序列 (*psbJ-petA*、*ndhF-rpl32*、*trnD-trnT* 和 *trnH-psbA*)。利用筛选得到的 4 个 cpDNA 序列对血皮槭 16 个群体进行系统发育分析,结果显示 16 个群体应分为两大类。本研究筛选获得的 4 个 cpDNA 序列在血皮槭种群内拥有相对丰富的变异,是研究种内变异良好的分子标记,可以进一步用于血皮槭系统发育、遗传变异和谱系地理学研究。

## 参考文献:

- [1] 何晓燕,包志毅. 英国引种家威尔逊引种中国园林植物种质资源及其影响 [J]. 浙江林业科技, 2005, 25(3): 56-61.
- [2] Gibbs D, Chen Y. The Red List of Maples [M]. Botanic Gardens Conservation International, 2009: 17.
- [3] 汪松,解焱. 中国物种红色目录. 第一卷. 红色目录 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004.
- [4] Shaw J, Shafer H L, Leonard O R, et al. Chloroplast DNA sequence utility for the lowest phylogenetic and phylogeographic inferences in angiosperms: The tortoise and the hare IV [J]. American Journal of Botany, 2014, 101(11): 1987-2004.
- [5] 张雪梅,李德铎,高连明. 南方红豆杉谱系地理学研究 [J]. 西北植物学报, 2012, 32(10): 1983-1989.
- [6] Saeki I, Murakami N. Chloroplast DNA phylogeography of the endangered Japanese red maple (*Acer pycnanthum*): the spatial configuration of wetlands shapes genetic diversity [J]. Diversity & Distributions, 2009, 15(6): 917-927.
- [7] Zhang J, Li Z, Fritsch P W, et al. Phylogeography and genetic structure of a Tertiary relict tree species, *Tapiscia sinensis* (Tapisciaceae): Implications for conservation [J]. Annals of Botany, 2015, 116(5): 727-737.
- [8] Kou Y X, Cheng S M, Tian S, et al. The antiquity of *Cyclocarya paliurus* (Juglandaceae) provides new insights into the evolution of relict plants in subtropical China since the late Early Miocene [J]. Journal Of Biogeography, 2016, 43: 351-360.
- [9] Ma Q, Du Y, Chen N, et al. Phylogeography of *Davidia involucreata* (Davidiaceae) Inferred from cpDNA Haplotypes and nSSR Data [J]. Systematic Botany, 2015, 40(3): 796-810
- [10] 柏国清. 金钱槭属植物谱系地理学研究 [D]. 西安: 西北大学, 2010.
- [11] Sun S, Yu X D, Zheng Y Q, et al. Isolation and characterization of twenty-seven polymorphic microsatellite loci in endangered Chinese paperbark maple, *Acer griseum*, (Dicotyledoneae: Aceraceae) [J]. Biochemical Systematics & Ecology, 2014, 56(56): 99-103.
- [12] 孙圣. 基于 SSR 标记的血皮槭天然群体遗传变异研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2014.
- [13] 王佳慧. 特有濒危种血皮槭天然群体生长状况及分子谱系地理初步研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2015.
- [14] Shaw J, Lickey E B, Schilling E E, et al. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III [J]. American Journal of Botany, 2007, 94(3): 275-288.
- [15] Shaw J, Lickey E B, Beck J T, et al. The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis [J]. American Journal of Botany, 2005, 92: 142-166.
- [16] Wakasugi T, Tsudzuki J, Ito S, et al. A physical map and clone bank of the black pine (*Pinus thunbergii*) chloroplast genome [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1994, 12(12): 227-241.
- [17] Golenberg E M, Clegg M T, Durbin M L. Evolution of a noncoding region of the chloroplast genome [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1993, 2(1): 52-64.
- [18] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. In Nucleic acids symposium series, 1999, 41: 95-98.
- [19] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [20] Wang J, Gao P, Kang M, et al. Refugia within refugia: the case study of a canopy tree (*Eurycorymbus cavaleriei*) in subtropical China [J]. Journal of Biogeography, 2009, 36: 2156-2164.
- [21] Guo X D, Wang H F, Bao L, et al. Evolutionary history of a wide-spread tree species *Acer mono* in East Asia [J]. Ecology and Evolution, 2014, 4: 4332-4345.
- [22] Ikuyo S, Dick C W, Barnes B V, et al. Comparative phylogeography of red maple (*Acer rubrum* L.) and silver maple (*Acer saccharinum* L.): Impacts of habitat specialization, hybridization and glacial history [J]. Journal of Biogeography, 2011, 38(5): 992-1005.
- [23] Vargas-Rodriguez Y L, Platt W J, Urbatsch L E, et al. Large scale patterns of genetic variation and differentiation in sugar maple from tropical Central America to temperate North America [J]. BMC Evolutionary Biology, 2014, 15: 1-14.
- [24] 何长青. 观光木谱系地理学研究 [D]. 湖南: 中南林业科技大学, 2015.