

基于叶绿体片段序列的杨属系统发育关系分析

员涛^{1,2}, 李佳蔓^{1,2}, 周安佩^{1,2}, 颜璐茜^{1,2}, 纵丹^{1,2}, 李旦³, 何承忠^{1,2,4,*}

西南林业大学¹云南省高校林木遗传改良与繁育重点实验室,²西南地区生物多样性保育国家林业局重点实验室,³云南生物多样性研究院,⁴西南山地森林资源保育与利用省部共建教育部重点实验室, 昆明650224

摘要: 以早柳为外类群, 对杨属5个派32个种及杂种63份个体叶绿体DNA (cpDNA)的*rbcL-a*、*psbI-psbK*、*psbA-trnH*、*trnL-F*序列片段进行系统发育分析。结果表明, 4个片段联合后的序列长为2 416 bp, G+C含量为34.1%, 含32个信息位点数。最大简约法(MP)和最大似然法(ML)构建的系统进化树的树形一致, 白杨派和大叶杨派能各自聚类为单独分支, 而青杨派树种被聚分为2组, 显示出多系起源的特征。其中, 三脉青杨、青杨、大青杨、辽杨为第1组, 位于系统树的基部, 与胡杨形成姐妹种关系, 其余青杨派树种为第2组, 与大叶杨亲缘关系较近。黑杨派中的钻天杨和北京杨与同派其他树种差异明显, 但与白杨派树种具有同源性, MP和ML的支持率分别为95%和91%, 其余黑杨派树种高度同源, 以100%的MP和ML支持率呈姐妹群。该研究结果为杨属树种的起源与系统进化关系提供了分子水平的证据。

关键词: 杨属; 叶绿体DNA; 片段序列; 系统发育

Analysis of Phylogenetic Relationship of *Populus* Based on Sequence Data of Chloroplast Regions

YUN Tao^{1,2}, LI Jia-Man^{1,2}, ZHOU An-Pei^{1,2}, YAN Lu-Xi^{1,2}, ZONG Dan^{1,2}, LI Dan³, HE Cheng-Zhong^{1,2,4,*}

¹Key Laboratory for Forest Genetic and Tree Improvement & Propagation in Universities of Yunnan Province, ²Key Laboratory of Biodiversity Conservation in Southwest China, State Forestry Administration, ³Yunnan Academy of Biodiversity, ⁴Key Laboratory for Forest Resources Conservation and Use in the Southwest Mountains of China, Ministry of Education, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China

Abstract: Using *Salix matsudana* as an outgroup, the plastid genomic regions, namely, *rbcL-a*, *psbI-psbK*, *psbA-trnH* and *trnL-F*, were used to investigate the phylogenetic relationship of 63 *Populus* individuals representing 32 species of 5 sections. Our analysis showed that the total length of four chloroplast regions was 2 416 bp containing 34.1% G+C and 32 informative sites. The consistent phylogenetic tree was presented by maximum parsimony (MP) and maximum likelihood (ML). Section *Leuce* formed a separate clade, like section *Leucoides*, whereas section *Tacamahaca* was divided into two groups, revealing a characteristic of polyphyletic origins. One group contained *P. trinervis*, *P. cathayana*, *P. ussuriensis* and *P. maximowiczii* located at the base of the tree with sister relationship to *P. euphratica*, while another group contained other species in section *Tacamahaca* together with *P. lasiocarpa*. Belonged to section *Aigeiros*, *P. nigra* var. *italica* and *P. beijingensis* were clearly separated from their consectional species and grouped with section *Leuce* with 95% bootstrap supported by MP and 91% bootstrap supported by ML, while remanent species in section *Aigeiros* exhibited sister relationship with 100% bootstrap supported by both MP and ML. These results provide molecular evidence for the origin and phylogenetic relationship of species in genus *Populus*.

Key words: *Populus*; chloroplast DNA; region sequence; phylogeny

杨树是杨柳科(Salicaceae)杨属(*Populus*)植物的统称, 在农业防护林、植被修复、能源生产中扮演着重要角色(马金龙等2013; 陈仲等2014)。中国是杨树集中分布区之一, 拥有十分丰富的杨树资源, 但杨属种内变异十分丰富, 种间天然杂种和人工杂种较多, 给基于表型的形态分类造成了很大的困难(张金凤和朱之悌2007; Feng等2013)。杨

属在传统分类学中一般被分为5个派, 即白杨派(section *Leuce*)、青杨派(section *Tacamahan*)、黑

收稿 2015-03-01 修定 2015-07-13

资助 国家林业公益性行业科研专项(201104076)、国家自然科学基金(31360184、31460205)、云南省中青年学术与技术带头人后备人才培养基金(2012HB021)。

* 通讯作者(E-mail: hcz70@163.com; Tel: 0871-63863213)。

杨派(section *Aigeiros*)、胡杨派(section *Turanga*)和大叶杨派(section *Leucoides*), 但广泛的自然杂交现象使派间及种间的系统关系难以明确(Taylor 2002; Du等2013)。随着分子标记和具有遗传决定性的基因组序列的应用, 人们尝试从不同角度来解决这一问题。李宽钰等(1996)采用RAPD研究了杨属白杨派、青杨派和黑杨派20个种28份无性系的DNA多态性和系统进化关系, 结果表明, 青杨派与黑杨派的遗传距离较近, 与白杨派关系较远, 并推测白杨派较早从杨属中分离出来。史全良等(2001)对杨属5个派15个种杨属核基因组的ITS(internal transcribed spacers)序列进行了研究, 结果表明杨属为单系起源, 共分为2个大支, 白杨派起源较早, 单独为一支, 其他4个派组成一支, 且各派之间明显独立。Hamzeh和Dayanandan (2004)通过对比基于

与带有主观性的传统分类学相比, 系统发育学首先考虑的是进化关系, 然后才是定位某一类群至某种分类级中(Nei和Kumar 2000), 因此, 对杨属系统发育的研究不仅可以为系统分类提供参考, 还能揭示树种间的进化关系。近几年来, 叶绿体基因组学的研究越来越受到重视。相对于核基因, 叶绿体基因比较保守、稳定性高、分子量小、结构简单, 且为单亲遗传, 有独立的进化路线, 在种水平上有一定的变异, 更利于系统发育的研究(Wan等2013; Semerikova和Semerikov 2014)。卫尊征等(2010)利用rbcl-a、*psbI-psbK*、*psbA-trnH*、*trnL-F*序列片段直接进行PCR扩增测序, 通过序列组合后的比较分析, 探讨杨属各派别之间的系统发育关系, 旨在为杨属树种的起源、系统进化和系统学分类提供分子生物学证据。

材料与方 法

1 植物材料

杨树材料主要取自于西藏昌都地区、云南省西北部、四川省甘孜州的乡土树种, 部分材料来自于北京、吉林、内蒙古、湖南、甘肃等地, 包含杨属青杨派、黑杨派、白杨派、胡杨派、大叶杨派及天然杂种共计32个种63份样本(表1)。采集嫩叶, 用硅胶干燥保存并带回实验室备用。

2 方法

将硅胶干燥处理后的杨树叶片研磨为粉末状, 采用改良SDS法(Murray和Thompson 1980)提取基因组总DNA, 用8%琼脂糖和核酸检测仪共同检测DNA的浓度和质量, 统一浓度为50~200 ng· μL^{-1} 后于-20 °C冰箱中保存。

扩增反应体系为25 μL , 含5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 正反向引物(表2)各1 μL 、DNA模板1 μL 、2 \times Taq Master-Mix 12.5 μL 、去离子水9.5 μL 。PCR反应程序为94 °C预变性4 min; 94 °C变性30 s, 57 °C(*rbcl-a*、*psbI-psbK*、*pabA-trnH*)/59 °C(*trnL-F*)退火45 s, 72 °C延伸1 min, 共35个循环; 72 °C延伸10 min。扩增产物由北京华大基因科技股份有限公司完成测序。

3 数据分析

采用BioEdit 7.0 (Hall 1999)进行序列的拼接与人工校对, 以确保准确性, 使用CLUSTAL_X 2.0 (Thompson等1997)进行多序列的比对切齐。

利用MEGA 5.02软件(Tamura等2011)分析序列长度、碱基组成等序列特征, 比较不同片段序列在杨树中的碱基多态性。通过Kimura 2-parameter (K2P)模型计算树种派间和派内的遗传距离, 应用DnaSP v5 (Librado和Rozas 2009)计算核苷酸多样性、Indel多样性等相关指数。

采用PAUP 4.0软件(Swofford 2002)对4种基因序列进行非一致性长度检验(ILD检验) (Farris等1995), 结果表明4种叶绿体基因序列的吻合度高($P=0.97>0.05$), 可将序列进行合并, 并以联合序列作为数据分析的基础。通过PAUP 4.0中的最大简约法(maximum parsimony, MP)和最大似然法(maximum likelihood, ML)构建系统发育树。MP采用1 000次循环bootstrap检验(Felsenstein 1985)各分支

表1 杨树样本及采集地

Table 1 The sample site of *Populus* in this study

派别	树种	样本数	来源
青杨派	三脉青杨(<i>P. trinervis</i> C. Wang et Tung)	3	四川
	川杨(<i>P. szechuanica</i> Schneid)	2	云南
	德钦杨(<i>P. haoana</i> W. C. Cheng & C. Wang)	3	云南
	小叶杨(<i>P. simonii</i> Carr)	2	云南、四川
	辽杨(<i>P. maximowiczii</i> Henry)	1	内蒙古
	小青杨(<i>P. pseudo-simonii</i> Kitagawa)	1	内蒙古
	青杨(<i>P. cathayana</i> Rehder)	1	内蒙古
	大青杨(<i>P. ussuriensis</i> Komarov)	1	吉林
	昌都杨(<i>P. qamdoensis</i> C. Wang & S. L. Tung)	4	西藏
	藏川杨(<i>P. szechuanica</i> var. <i>tibetica</i> C. K. Schneider)	3	云南、四川、西藏
	缘毛杨(<i>P. ciliate</i> Wallich ex Royle)	3	云南
	滇杨(<i>P. yunnanensis</i> Dode)	3	云南
	乡城杨(<i>P. xiangchengensis</i> C. Wang & S. L. Tung)	3	四川
	康定杨(<i>P. kangdingensis</i> C. Wang & S. L. Tung)	5	四川
	西南杨[<i>P. schneideri</i> (Rehder) N. Chao]	1	四川
黑杨派	美洲黑杨(<i>P. deltoides</i> Bartr)	2	云南
	四季杨(<i>P. deltoides</i> × <i>P. nigra</i> cv. Chile)	1	云南
	钻天杨(<i>P. nigra</i> var. <i>italica</i> Koehne)	1	北京植物园
	北京杨(<i>P. beijingensis</i> W. Y. Hsu)	1	北京
	加杨(<i>P. canadensis</i> Moench)	1	北京
	山海关杨(<i>P. deltoides</i> 'Shan Hai Guan')	1	内蒙古
	黑杨1-69 (<i>P. deltoides</i> 'Lux')	2	内蒙古、山东
白杨派	清溪杨[<i>P. rotundifolia</i> var. <i>duclouxiana</i> (Dode) Gombocz]	2	云南
	山杨(<i>P. davidiana</i> Dode)	3	云南、西藏
	响叶杨(<i>P. adenopoda</i> Maxim)	1	湖南
	新疆杨(<i>P. bolleana</i> Lauche)	2	北京、内蒙古
	银白杨(<i>P. alba</i> Linnaeus)	1	北京
胡杨派	胡杨(<i>P. euphratica</i> Olivier)	1	甘肃
大叶杨派	大叶杨(<i>P. lasiocarpa</i> Olivier)	3	四川
天然杂种	疑似缘毛杨(<i>P. ciliate</i> sp.)	3	云南
	疑似椅杨(<i>P. wilsonii</i> sp.)	1	四川
	疑似杂交杨(<i>Populus</i> sp.)	1	云南
外类群	旱柳(<i>Salix matsudana</i> Koidzumi)	1	云南

表2 PCR引物及来源

Table 2 PCR primers and sources used in this study

cpDNA片段	引物名称	序列	参考文献
<i>rbcL</i>	F	5'-ATGTCACCACAAAACAGAGACTAAAGC-3'	Kress和Erickson (2007)
	R	5'-GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3'	
<i>psbI-psbK</i>	psbI	5'-AGAGTTTGAGAGTAAGCAT-3'	Lahaye等(2008)
	psbK	5'-TTAGCCTTTGTTTGCAAG-3'	
<i>pabA-trnH</i>	pasA	5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3'	Lahaye等(2008)
	trnH	5'-CGGCATGGTGGATTCCAAATCC-3'	
<i>trnL-F</i>	c	5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3'	Taberlet等(1991)
	f	5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'	

的支持率; ML树的最佳进化模型是在MODELTEST 3.7软件(Posada和Crandall 1998)根据PAUP 4.0计算出联合序列在所有模型下的似然值,以AIC(Akaike information criterion)为准则进行筛选,分支支持率的检验采用bootstrap 1 000次循环(Felsenstein 1985)。

实验结果

1 叶绿体基因片段的序列特征

杨属63份材料的序列特征如表3所示,编码区*rbcL-a*片段序列全长为553 bp, G+C平均含量为43.3%,核苷酸多样性指数(π)为0.00384,无Indel产生;非编码区3个片段均有Indel产生,其中,*psbA-trnH*序列提供的信息位点数最低(4个),但核苷酸多样性指数最高,为0.00373,而*trnL-F*序列核苷酸 π 值最低,仅0.00266,但具有较高的信息位点数(13个)和Indel(12个)。联合序列对齐后的长度为2 416 bp, G+C含量为34.1%,核苷酸多样性指数为0.00330,序列共有21个Indel,占0.9%,即平均115 bp有1个Indel。

2 基于叶绿体基因序列的遗传距离分析

以合并后的联合序列作为数据分析的基础,采用K2P模型计算杨属派间的遗传距离,结果表

明,63份杨树样本的平均遗传距离为0.00336。其中,青杨派内个体间的平均遗传距离为0.00181,与大叶杨派的遗传关系最近(0.00165),与黑杨派最远(0.00586);黑杨派内不同个体间具有较大的遗传差异,其平均遗传距离为0.00253,与其他各派树种的亲缘关系均较远(0.00564~0.00630);白杨派内个体的差异较小,平均遗传距离为0.00184,与大叶杨派(0.00402)和青杨派树种(0.00463)的遗传差异较小;胡杨派与大叶杨派的遗传距离最小(0.00444),其次为青杨派(0.00468),与白杨派的遗传距离最大(0.00673)(表4)。

3 基于叶绿体基因序列的杨属系统发育关系分析

以早柳为外类群构建杨树的系统发育树。其中,ML树的最佳进化模型为TrN+I,MP树的树长(tree length)为125,一致性指数(consistency index, CI)为0.9520,保持性指数(retention index, RI)为0.9766,存留一致性指数(rescaled consistency index, RC)为0.9297。两种方法得到的树形完全一致(图1)。

由系统发育树可知,青杨派树种可分为2个分支,表明青杨派属于多系起源;辽杨、青杨、大青杨、三脉青杨起源较早,共同构成第1组,并与胡杨以50%的支持率构成一个分支,其中辽杨和青杨

表3 每个叶绿体基因片段和联合片段的序列特征

Table 3 Characteristics of each cpDNA region and the combination of four regions

cpDNA片段	对齐长度/bp	G+C平均含量/%	信息位点	核苷酸多样性		碱基的插入和缺失	
				π	θ	Event	Site
<i>rbcL-a</i>	553	43.3	6	0.00384	0.00384	—	—
<i>psbI-psbK</i>	436	28.7	9	0.00372	0.00786	4	4
<i>psbA-trnH</i>	372	30.2	4	0.00373	0.00829	5	52
<i>trnL-F</i>	1 055	32.7	13	0.00266	0.00339	12	88
联合序列	2 416	34.1	32	0.00330	0.00504	21	144

表4 杨属派间遗传距离

Table 4 Genetic distance among sections in *Populus*

派别	青杨派	黑杨派	白杨派	胡杨派	大叶杨派
青杨派	—				
黑杨派	0.00586	—			
白杨派	0.00463	0.00575	—		
胡杨派	0.00468	0.00630	0.00673	—	
大叶杨派	0.00165	0.00564	0.00402	0.00444	—

的同源性最高,支持率达95%;其余青杨派树种起源较晚,为第2组,与大叶杨具有较近的亲缘关系。黑杨派中的钻天杨和北京杨与白杨派树种高度同源,与白杨派树种以95%(91%)的支持率构成一个分支;黑杨I-69、四季杨、山海关杨、美洲黑杨、加杨为姐妹种,以100%的支持率置于系统树基部,表明起源较早;与青杨派相同,黑杨派树种

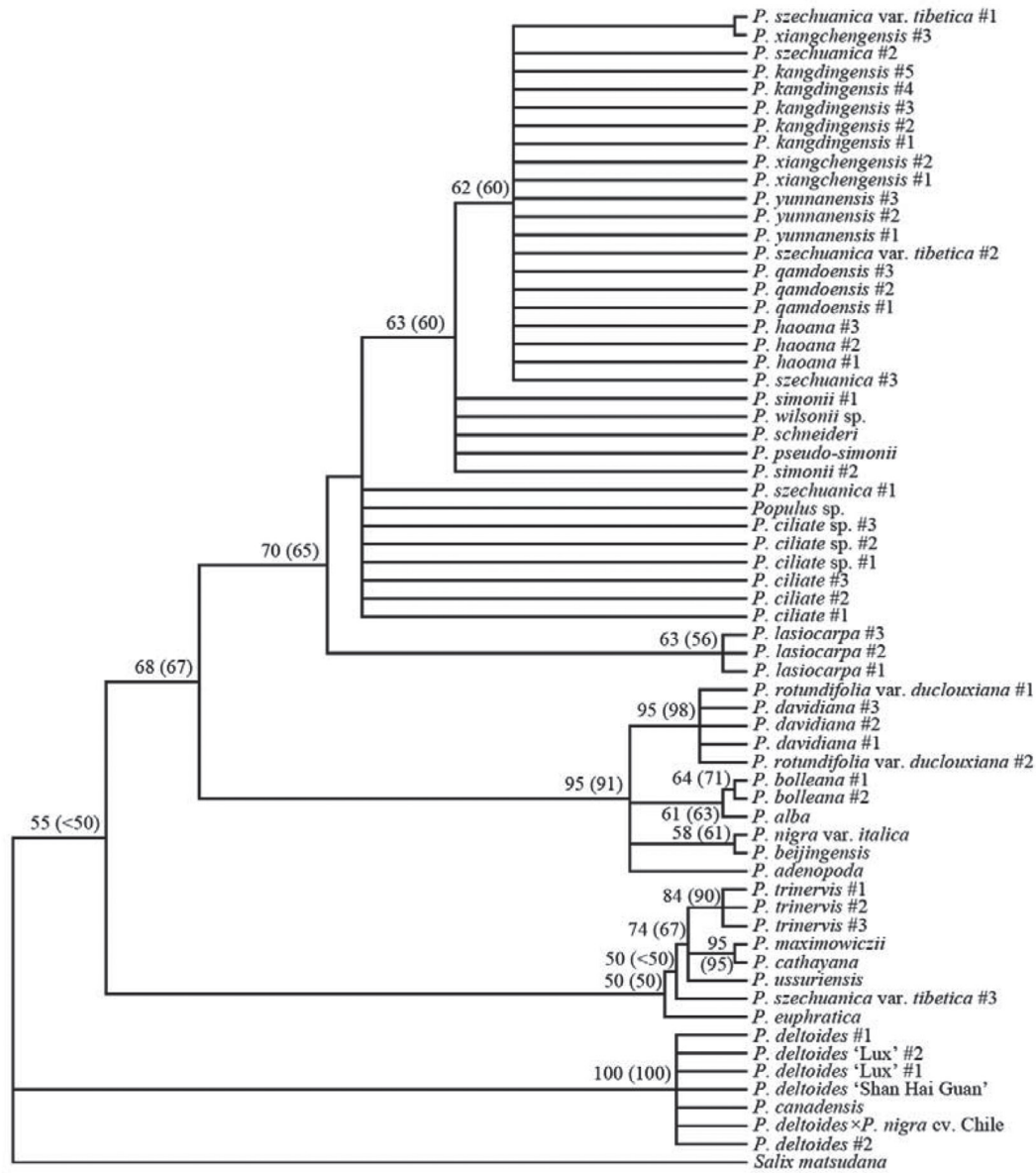


图1 基于叶绿体联合片段的MP/ML系统发育树
 Fig.1 MP/ML phylogenetic tree based on cpDNA combination region
 括号内数值为ML树形的支持率。

也为多系起源。白杨派为单系起源, 其中, 山杨和清溪杨呈姐妹种关系, 以95% (98%)的支持率聚为一个小分支, 新疆杨与银白杨的亲缘关系较近, 支持率为61% (63%)。

讨 论

1 杨属叶绿体基因片段的序列特征

叶绿体基因组是仅次于核基因组的第二大基因组, 不仅拥有较大的数据比较分析空间, 且DNA

的核酸置换率适中, 编码区和非编码区进化速率差异较大, 是研究系统发育学的理想材料, 适合不同分类水平的系统发育研究(Richard和Jeffrey 1994; Agrawal等2014)。本研究所采用的4种叶绿体基因片段中, *rbcL*基因比较保守, 已被广泛地应用于植物分子系统学的研究(Chase等1993; Hasebe等1995; Fay和Chase 1996; Schwarzbach和Ricklefs 2000); 非编区 $psbI-psbK$ 、 $psbA-trnH$ 和 $trnL-F$ 片段序列均为DNA候选条形码之一, 进化速率快, 能较

好解决属内种间的系统关系(Kress和Erickson 2007; Lahaye等2008; 卫尊征等2010)。本研究中采用的叶绿体片段序列分析结果表明: *rbcL*片段的G+C含量较高, 信息位点较少, 无Indel的产生, 这是因为*rbcL*为编码区片段, 自然选择压力较大(Hasebe等1995); *psbA-trnH*片段较短而变幅较大(308~335 bp), 具有大量的碱基缺失和插入事件, 且派间有独特的碱基插入和缺失区, 但信息位点较少; *trnL-F*片段最长, 对齐后长度为1 055 bp, 提供的信息位点为13个, 相对较多, 但与卫尊征等(2010)所报道的信息位点数存在差异, 可能是由于供试材料的杨树种、样本数量和外类群选择的不同而引起的, 也进一步说明杨属种间存在着较为丰富的*trnL-F*序列变异。

2 杨属的系统发育关系

黑杨派树种起源问题的主要分歧在于欧洲黑杨的分类地位(Hamzeh和Dayanandan 2004)。宋红竹等(2007)利用扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)技术的研究表明, 欧洲黑杨与其他黑杨派树种有明显分离, 但仍属于黑杨派。Castiglione等(1993)利用随机扩增多态性DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)技术也得到类似的结果。而基于单亲遗传的叶绿体基因组和线粒体基因组的研究结果均表明, 欧洲黑杨与美洲黑杨的关系较远, 与白杨派的亲缘关系较近(Smith和Sytsma 1990; Barrett等1993; Rajora和Dancik 1995a, b, c; Wang等2014)。本研究供试材料中的钻天杨为欧洲黑杨的变种, 北京杨是钻天杨为母本、青杨为父本的派间杂种, 叶绿体基因均来源于欧洲黑杨, 而其他黑杨派树种的叶绿体基因则来源于美洲黑杨, 两者在系统树中具有很明显的不同系统位置, 这也是导致派内个体间遗传距离较大的主要原因。钻天杨和北京杨的叶绿体基因序列与白杨派有较高的同源性(MP和ML分支支持率分别为95%和91%), 而美洲黑杨起源的时间较欧洲黑杨早(Hamzeh和Dayanandan 2004), 本研究结果支持欧洲黑杨的祖先起源于母本为白杨派、父本为美洲黑杨的远古杂种的观点(Hamzeh和Dayanandan 2004)。此外, 派间杂种北京杨与母本钻天杨同源, 与父本青杨的差异较大, 这与杨树叶绿体基因为母性遗传的特性相符合。

目前在对杨树派间遗传关系的研究中, 通常认为青杨派与黑杨派的亲缘关系较近, 白杨派与其他树种的遗传距离较远。胡志昂(1981)运用同工酶研究了杨属5个派的树种, 结果表明白杨派与其他各派的关系较远; 李善文等(2007)应用AFLP分子标记对杨属派别进行了分析, 结果表明青杨派与黑杨派具有较近的遗传关系。史全良等(2001)对杨属5个派的核基因组ITS序列分析结果也得到相同结果。但在本研究结果中, 系统树将青杨派树种聚分为2组, 印证了青杨派属于多系起源的观点, 其中, 由三脉青杨、青杨、辽杨和大青杨构成的青杨派第1组和白杨派起源较古老, 位于系统树的基部, 而由缘毛杨、滇杨等树种组成的青杨派第2组起源较晚, 位于系统树的顶部, 而白杨派和欧洲黑杨组成的分支则处于2组青杨派的中间, 由此推测缘毛杨等组成的青杨派第2组为自然杂种, 且父本为青杨派第1组的树种。同时, 藏川杨作为川杨的变种, 不仅没有与川杨的分类地位一致, 且3个个体间也显示了较大的叶绿体基因序列差异, 这表明藏川杨很可能为多系起源, 具有独特的进化路线, 支持了卫尊征等(2010)的观点。此外, 青杨派2个组的分支支持率均较低, 尤其是缘毛杨、滇杨、川杨等青杨派第1组内的树种呈现姐妹关系, 表明所选叶绿体片段在这些树种及个体间没有产生足够的信息位点, 不能阐明其进化关系, 需选用进化速率更快和信息位点更丰富的序列片段进行研究。

白杨派树种为单系起源, 这已被多数研究结果所证实。本研究对山杨、清溪杨、响叶杨、新疆杨、银白杨5种山杨派树种叶绿体基因序列的系统发育分析也证实了这一点。白杨派在传统分类方法中一直存在着白杨亚派和山杨亚派之分, 但派内树种的亚派归类却存在争议。本研究构建的MP和ML进化树中, 白杨亚派的新疆杨和银白杨同源, 山杨亚派中的山杨和清溪杨同源, 但响叶杨为这4个树种的姐妹群, 不能够明确归于白杨亚派或山杨亚派。

胡杨派树种被认为杨属中较为进化的树种, 但其系统关系还存在争议。史全良等(2001)对核基因组ITS序列的分析表明胡杨派与黑杨派的关系较近, 而卫尊征等(2010)对*trnL-F*序列的分析结果

却显示胡杨派与青杨派的关系紧密, Wang等(2014)应用12个质体片段序列的分析结果也表明胡杨与青杨派树种之间的亲缘关系较近。基于AFLP分子标记的研究结果显示胡杨独立为一个分支(李善文等2007), 或与白杨派关系较近(Cervera等2005)。在育种实践中, 胡杨派则杂交困难, 几乎不能与其他派杂交(中国林业科学院林业研究所树木改造室遗传选种研究组1960; 徐玮英1988; 李善文等2004; 张志毅等2006)。本研究结果显示, 胡杨与三脉青杨、青杨等构成的青杨派第1组的遗传距离较近, 在系统发育树中聚为同一个分支, 与卫尊征等(2010)、Wang等(2014)研究结果一致, 但支持率较低, 表明胡杨派与青杨派第1组内树种之间有一定的遗传差异。由于上述研究中胡杨派供试材料均较少, 胡杨派在杨属中的系统进化地位尚需要进一步研究。

大叶杨主要生存于高山区, 种质资源及育种等方面的研究报道较少。李善文等(2007)对杨属5个派AFLP数据的聚类图表明, 大叶杨单独为一个支系, 史全良等(2001)对ITS序列的分析也得到类似结果。本研究结果表明, 疑似椅杨的天然杂交种嵌于青杨派第1组分支中, 可能其母本来自于青杨派树种, 而大叶杨聚为独立分支, 与上述研究结果一致。

参考文献

- 陈仲, 廖维华, 王静澄, 高凯, 孙吉, 安新民(2014). 影响农杆菌介导的杨树遗传转化技术的因素. 植物生理学报, 50 (8): 1126~1134
- 胡志昂(1981). 杨属植物的同工过氧化物酶. 植物分类学报, 19 (3): 291~296
- 李宽钰, 黄敏仁, 王明麻, 陈道明, 何祯祥(1996). 白杨派、青杨派和黑杨派的DNA多态性及系统进化研究. 南京林业大学学报, 20 (1): 6~11
- 李善文, 张有慧, 张志毅, 安新民, 何承忠, 李百炼(2007). 杨属部分种及杂种的AFLP分析. 林业科学, 43 (1): 37~41
- 李善文, 张志毅, 何承忠, 安新民(2004). 中国杨树杂交育种研究进展. 世界林业研究, 17 (2): 37~41
- 马金龙, 姜国斌, 姚善涇, 孙若峥, 邓绍立(2013). 微透析法研究盐胁迫下杨树嫩茎内源激素和叶片叶绿素荧光参数的变化. 植物生理学报, 49 (9): 943~948
- 史全良, 诸葛强, 黄敏仁, 王明麻(2001). 用ITS序列研究杨属各组之间的系统发育关系. 植物学报, 43 (3): 323~325
- 宋红竹, 张琦纹, 周春江(2007). 杨树部分种的AFLP遗传多样性分析. 林业科学, 43 (12): 64~69
- 卫尊征, 郭丽琴, 张金凤, 李百炼, 张德强, 郭华(2010). 利用trnL-F序列分析杨属树种的系统发育关系. 北京林业大学学报, 32 (2): 27~33
- 徐伟英(1988). 杨树. 哈尔滨: 黑龙江人民出版社, 265~281
- 张金凤, 朱之悌(2007). 杨树分派的分子系统与派间杂交研究进展. 安徽农学通报, 13 (1): 48~51
- 张志毅, 李善文, 何占国(2006). 中国杨树资源与杂交育种研究现状及发展对策. 河北林业科技, (增刊): 20~24
- 中国林业科学院林业研究所树木改造室遗传选种研究组(1960). 杨树选种学. 北京: 科学出版社, 10~164
- Agrawal R, Agrawal N, Tandon R, Raina SN (2014). Chloroplast genes as genetic markers for inferring patterns of change, maternal ancestry and phylogenetic relationships among *Eleusine* species. *AoB Plants*, 6: 56
- Barrett JW, Rajora OP, Yeh FCH, Dancik BP, Strobeck C (1993). Mitochondrial DNA variation and genetic relationship of *Populus* species. *Genome*, 36 (1): 87~93
- Castiglione S, Wang G, Damiani G, Bandi C, Bisoffi S, Sala F (1993). RAPD fingerprints for identification and for taxonomic studies of elite poplar (*Populus* spp.) clones. *Theor Appl Genet*, 87: 54~59
- Cervera MT, Storme V, Soto A, Ivens B, Montagu MV, Rajora OP, Boerjan W (2005). Intraspecific and interspecific genetic and phylogenetic relationships in the genus *Populus* based on AFLP markers. *Theor Appl Genet*, 111: 1440~1456
- Chase MW, Soltis DE, Olmstead RG, Morgan D, Les DH, Mishler BD, Duvall MR, Price RA, Hills HG, Qiu YL et al (1993). Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Ann Missouri Bot Gard*, 80: 528~580
- Du FK, Xu F, Qu H, Feng S, Tang J, Wu R (2013). Exploiting the transcriptome of Euphrates poplar, *Populus euphratica* (Salicaceae) to develop and characterize new EST-SSR markers and construct an EST-SSR database. *PLoS ONE*, 8 (4): e61337
- Farris JS, Kallersjo M, Kluge AG, Bult C (1995). Testing significance of incongruence. *Cladistics*, 10: 315~319
- Fay MF, Chase MW (1996). Resurrection of *Themidaceae* for the *Brodiea* alliance, and recircumscription of *Alliaceae*, *Amaryllidaceae* and *Agapanthoideae*. *Taxon*, 45: 441~451
- Felsenstein J (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39 (4): 783~791
- Feng JJ, Jiang DC, Shang HY, Dong M, Wang GN, He XY, Zhao CM, Mao KS (2013). Barcoding poplars (*Populus* L.) from western China. *PLoS ONE*, 8 (8): e71710
- Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 98/95/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*, 41: 95~98
- Hamzeh M, Dayanandan S (2004). Phylogeny of *Populus* (Salicaceae) based on nucleotide sequences of chloroplast *trnT-trnF* region and nuclear rDNA. *Am J Bot*, 91 (9): 1398~1408
- Hasebe M, Wolfe PG, Pryer KM, Ueda K, Ito M, Sano R, Gastony GJ, Yokoyama J, Manhart JR, Murakami N et al (1995). Fern phylogeny based on *rbcL* nucleotide sequences. *Am Fern J*, 85 (4): 134~181
- Kress WJ, Erickson DL (2007). A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding

- trnH-psbA* spacer region. PLoS ONE, 2 (6): e508
- Lahaye R, Savolainen V, Duthoit S, Maurin O, van der Bank M (2008). A test of *psbK-psbI* and *atpF-atpH* as potential plant DNA barcodes using the flora of the Kruger National Park as a model system (South Africa). Nat Preceding, 101: 1~21
- Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, Warner J, Pupulin F, Gigot G, Maurin O, Duthoit S, Barraclough TG, Savolainen V (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. Proc Natl Acad Sci USA, 105 (8): 2923~2928
- Librado P, Rozas J (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, 25 (11): 1451~1452
- Murray MG, Thompson WF (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res, 8: 4321~4325
- Nei M, Kumar S (2000). Molecular evolution and phylogenetics. New York: Oxford University Press, 73~86
- Posada D, Crandall KA (1998). MODELTEST: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics, 14 (9): 817~818
- Rajora OP, Dancik BP (1995a). Chloroplast DNA variation in *Populus*. I. Intraspecific restriction fragment diversity within *Populus deltoides*, *P. nigra*, and *P. maximowiczii*. Theor Appl Genet, 90: 317~323
- Rajora OP, Dancik BP (1995b). Chloroplast DNA variation in *Populus*. II. Intraspecific restriction fragment polymorphisms and genetic relationships among *Populus deltoides*, *P. nigra*, *P. ×Canadensis* and *P. maximowiczii*. Theor Appl Genet, 90: 324~330
- Rajora OP, Dancik BP (1995c). Chloroplast DNA variation in *Populus*. III. Novel chloroplast DNA variants in natural *Populus × canadensis* hybrids. Theor Appl Genet, 90: 331~334
- Richard GO, Jeffrey DP (1994). Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. Am J Bot, 81: 1205~1224
- Schwarzbach AE, Ricklefs RE (2000). Systematic affinities of Rhizophoraceae and Anisophylleaceae, and intergeneric relationships within Rhizophoraceae, based on chloroplast DNA, nuclear ribosomal DNA, and morphology. Am J Bot, 87 (4): 547~564
- Semerikova SA, Semerikov VL (2014). Molecular phylogenetic analysis of the genus *Abies* (Pinaceae) based on the nucleotide sequence of chloroplast DNA. Russ J Genet, 50 (1): 7~19
- Smith RL, Sytsma KJ (1990). Evolution of *Populus nigra* (sect. *Aigeiros*): introgressive hybridization and the chloroplast contribution of *Populus alba* (sect. *Populus*). Am J Bot, 77 (9): 1176~1187
- Swofford DL (2002). PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Mol Biol, 17: 1105~1109
- Tamura K, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol, 28 (10): 2731~2739
- Taylor G (2002). *Populus: Arabidopsis* for forestry. Do we need a model tree? Ann Bot, 90: 681~689
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmouh F, Higgins DG (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res, 25 (24): 4876~4882
- Wan XQ, Zhang F, Zhong Y, Ding YH, Wang CL, Hu TX (2013). Study of genetic relationships and phylogeny of the native *Populus* in southwest China based on nucleotide sequences of chloroplast *trnT-trnF* and nuclear DNA. Plant Syst Evol, 299: 57~65
- Wang ZS, Du SH, Dayanandan S, Wang DS, Zeng YF, Zhang JG (2014). Phylogeny reconstruction and hybrid analysis of *Populus* (Salicaceae) based on nucleotide sequences of multiple single-copy nuclear genes and plastid fragments. PLoS ONE, 9 (8): e103645