

DOI:10.12171/j.1000-1522.20200286

## 基于全长转录组序列、核基因与叶绿体基因 分析琼岛杨在杨属的亲缘关系

徐家洪 曾晴 叶富余 胡杨阳 时寰宇 张璇 陈金辉

(热带特色林木花卉遗传与种质创新教育部重点实验室, 海南省热带珍稀名贵树种工程研究中心,  
海南省热带特色花木资源生物学重点实验室, 海南大学林学院, 海南 海口 570228)

**摘要:**【目的】琼岛杨是我国热带地区发现的一种杨树, 至今其分类和进化鲜有报道。本研究旨在通过三代全长转录组测序等方法了解琼岛杨在杨属中的分类与进化。【方法】基于 Pacbio Sequel 测序技术获取的热胁迫下琼岛杨、加杨和小叶杨完整全长转录本数据, 通过直系同源基因计算非同义替换值(Ka)、同义替换值(Ks)及 Ka/Ks 值, 比较直系同源基因在热胁迫下的表达模式, 并结合毛果杨和簸箕柳的直系同源基因, 构建了 5 个树种的进化树来分析杨树亲缘关系。通过克隆琼岛杨核基因(nrDNA: *UDP-SQ* 和 *POPTRDRAFT\_575699*)和叶绿体基因(cpDNA: *atp I* 和 *trnF*), 分析基因序列在琼岛杨种群中的多态性, 计算琼岛杨种内遗传距离, 及与 19 个树种(5 个杨树组和 1 个类外群组)的种间遗传距离。基于最大似然法和最小进化法构建了琼岛杨与 19 个树种的进化树, 以分析琼岛杨在杨属的亲缘关系。【结果】三代转录组测序共获得 660 组琼岛杨、小叶杨和加杨的直系同源基因, Ks 平均值为 0.150 5, 峰值为 0.02, Ka/Ks < 1, 占比 97.27%, 这显示了 3 种杨树较近的亲缘关系。直系同源基因表达模式分析发现, 3 种杨树在热胁迫下具有相同的表达模式。利用遗传距离法计算琼岛杨与 19 个树种中 *atp I*、*trnF*、*UDP-SQ* 和 *POPTRDRAFT\_575699* 等 4 种基因遗传距离的平均值, 发现琼岛杨与白杨组具有最近亲缘关系, 平均值为 0.011。【结论】基于三代全长转录组测序获得的直系同源基因分析显示出, 琼岛杨与其他杨树具有较近亲缘关系。克隆 cpDNA 和 nrDNA 基因, 计算遗传距离和构建的进化树均表明琼岛杨与白杨组具有最近亲缘关系。cpDNA 的多态性以及进化分支置信度明显高于 nrDNA, 表明在琼岛杨中 cpDNA 比 nrDNA 基因更具物种鉴别能力。

**关键词:** 琼岛杨; 直系同源基因; 核基因; 叶绿体基因; 亲缘关系

**中图分类号:** S722.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-1522(2021)10-0028-10

**引文格式:** 徐家洪, 曾晴, 叶富余, 等. 基于全长转录组序列、核基因与叶绿体基因分析琼岛杨在杨属的亲缘关系 [J]. 北京林业大学学报, 2021, 43(10): 28-37. Xu Jiahong, Zeng Qing, Ye Fuyun, et al. Genetic relationship of *Populus qionghaoensis* in *Populus* based on full-length transcriptome sequences, nuclear genes and chloroplast genes [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2021, 43(10): 28-37.

### Genetic relationship of *Populus qionghaoensis* in *Populus* based on full-length transcriptome sequences, nuclear genes and chloroplast genes

Xu Jiahong Zeng Qing Ye Fuyun Hu Yangyang Shi Huanyu Zhang Xuan Chen Jinhui

(Key Laboratory of Genetics and Germplasm Innovation of Tropical Special Forest Trees and Ornamental Plants, Ministry of Education, Hainan Province Rare and Valuable Tree Species Engineering Research Center, Hainan Key Laboratory for Biology of Tropical Ornamental Plant Germplasm, Institute of Tropical Agriculture and Forestry, College of Forestry, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China)

收稿日期: 2020-09-17 修回日期: 2020-12-16

基金项目: 海南大学教育教学改革研究项目(hdjy2063), 国家级大学生创新创业训练计划项目(202010589058), 海南省研究生创新科研课题(Hys2020-111), 海南大学科研启动经费项目(KYQD(ZR)1830)。

第一作者: 徐家洪。主要研究方向: 林木分子育种学。Email: jiahongxuhn@sina.com 地址: 570228 海南省海口市美兰区人民大道 58 号海南大学林学院。

责任作者: 陈金辉, 副教授。主要研究方向: 林木分子育种学。Email: jinhuichen@hainanu.edu.cn 地址: 同上。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

**Abstract:** [Objective] *Populus qionghdaoensis* is a plant of the *Populus* genus found in tropical regions of China. So far, there is few studies focus on its classification and evolution. This study aimed to understand the classification and evolution of *P. qionghdaoensis* in genus by third-generation full-length transcriptome sequencing and other methods. [Method] Based on the Pacbio Sequel sequencing technology, the complete full-length transcript data of *P. qionghdaoensis*, *P. canadensis* and *P. simonii* under heat stress were obtained. Then, the non-synonymous substitutions (Ka), sense substitution (Ks) and Ka/Ks value of homologous genes of three *Populus* were calculated. We further compared the expression patterns of orthologous genes under heat stress, and constructed the phylogenetic tree of five species to analyze the genetic relationship of *Populus* by combining the orthologous genes of *P. trichocarpa* and *Salix suchowensis*. Finally, we cloned nuclear genes (nrDNA; *UDP-SQ* and *POPTRDRAFT\_575699*) and chloroplast genes (cpDNA; *atp I* and *trnF*) of *P. qionghdaoensis* to analyze the polymorphism of these gene sequences in the population of *P. qionghdaoensis*, calculated the intraspecific genetic distances of *P. qionghdaoensis*, and the interspecific genetic distances between *P. qionghdaoensis* and 19 species (five *Populus* groups and one out-of-class group). Based on the maximum likelihood method and the minimum evolution method, the evolutionary tree of *P. qionghdaoensis* and 19 tree species were constructed to analyze the genetic relationship of *P. qionghdaoensis*. [Result] Third-generations of transcriptome sequencing obtained a total of 660 groups of orthologous genes from *P. qionghdaoensis*, *P. canadensis* and *P. simonii*. The average of Ks was 0.1505, the peak value was 0.02, and the ratio of Ka/Ks < 1 was 97.27%, showing the close relationship of the three *Populus* species. Analysis of orthologous gene expression patterns revealed that they had the same expression pattern under heat stress. The average genetic distance of four genes including *atp I*, *trnF*, *UDP-SQ* and *POPTRDRAFT\_575699* between *P. qionghdaoensis* and 19 tree species was 0.011, indicating that genetic relationship between *P. qionghdaoensis* and poplar group was closest. [Conclusion] The analysis of orthologous genes based on third-generation full-length transcriptome sequencing reveals that *P. qionghdaoensis* has a close relationship with other *Populus*. The results of genetic distances and constructing evolutionary trees show that *P. qionghdaoensis* has a close relationship with Leuce by cloning sequences of cpDNA and nrDNA genes. The polymorphism and evolutionary branch confidence of cpDNA are significantly higher than that of nrDNA, indicating that cpDNA is more capable of species discrimination than nrDNA genes in *P. qionghdaoensis*.

**Key words:** *Populus qionghdaoensis*; orthologous gene; nrDNA; cpDNA; genetic relationship

传统的树种分类主要根据形态学差异、杂交亲和力和地理分布等特征开展<sup>[1]</sup>。但树木种群内极易发生变异,以及现在的人工杂交种众多,仅根据形态学特征进行分类已不能完全满足需要<sup>[2-4]</sup>。20世纪中叶,分子进化学被提出,这为生物进化的研究提供更可靠的方法。从核酸和蛋白序列比对分析生物进化原因和进化机制,可以更深层次探究生物进化的原因和关系,比较转录组、分子标记以及单基因克隆技术等都在植物分类和进化研究中被大量采用<sup>[5-10]</sup>。在转录组学中的应用主要是通过搜索和比较不同物种的同源基因,分析氨基酸或核苷酸替换数(Ka:非同义替换, Ks:同义替换)的差异,并建立不同物种间系统进化树,以分析各物种的进化地位<sup>[11]</sup>。但由于技术的限制,之前基于二代测序获取的序列读长较短,且拼接过程容易发生错误,很难准确预测直系同源基因全长。随着三代全长转录组测序技术的发

展,这一问题迎刃而解,为不同物种进化分析提供了更完整和准确的序列<sup>[12-14]</sup>。

相对于比较转录组,通过克隆较短的 DNA 片段以比较物种的基因变异,具有高效快速等特点,被广泛用于鉴定物种亲缘关系。这种亲缘鉴定可分为核 DNA(nrDNA)和叶绿体 DNA(cpDNA)2 种方法。cpDNA 属于单亲遗传,研究 cpDNA 的变化可以反映种内和种间的差异,被前人广泛应用于物种亲缘鉴定<sup>[15]</sup>,但 cpDNA 不能反映种间杂交和基因渐渗问题。而 nrDNA 进化速率较快,会发生基因重组,分析 nrDNA 可以探索物种内和物种间的基因传递,在物种分化和物种系统发育上也被广泛应用<sup>[16-18]</sup>。因此,结合 nrDNA 和 cpDNA 同时分析物种亲缘将提供更可靠的信息。

杨树(*Populus spp.*)作为林木研究的模式植物,具有生长快、适应性强、用途广等特点,被世界许多

国家和地区广泛引种栽培,是人工用材林的重要树种<sup>[19]</sup>。我国具有丰富的杨树种质资源,有许多种为中国所特有,充分挖掘、开发和利用这些杨树资源,对培育杨树优良新品种具有重要意义。作为我国热带唯一的杨树树种,琼岛杨(*P. qionghaensis*)具有对热带高温高湿等不利于杨树生存环境的适应性<sup>[20]</sup>。了解物种的起源对于物种的适应性机制的挖掘及新品种的筛选和培育具有重要作用。因此,本研究基于琼岛杨对高温环境的独特适应性,通过高温胁迫处理,采用单分子实时和高通量测序技术比较了琼岛杨、加杨(*P. canadensis*)和小叶杨(*P. simonii*)的转录组差异,筛选直系同源基因,并结合 nrDNA 和 cpDNA 分析了琼岛杨与其他树种的亲缘关系及进化地位,为抗高温杨树新品种的开发及培育奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

研究使用的加杨、琼岛杨和小叶杨幼苗被种植于海南大学的同一温室大棚中。筛选生长一致的幼苗用于对照组和热胁迫处理(40 °C, 1 h),然后收集它们的叶片进行 RNA 提取及质量检测,通过 PacBio Sequel II 系统测序获得了三代全长转录组序列,转录组数据已保存在中国科学院北京基因组研究所大数据中心(登录号: CRA002150, CRA002154 和 CRA002160)<sup>[21-23]</sup>。20 个琼岛杨植株叶片采自其自然分布区域海南省白沙县黎族自治县青松乡。

### 1.2 DNA 提取, PCR 扩增及测序

DNA 的提取采用传统 CTAB 法<sup>[24]</sup>。应用 25 μL DNA 聚合酶链式反应(PCR)体系,加入琼岛杨 DNA 1 μL,正反向引物各 1 μL(表 1),引物序列来自之前的研究<sup>[25-27]</sup>、12.5 μL 2 × Taq PCR masterMix(购自 TIANGEN 公司)、9.5 μL ddH<sub>2</sub>O 于 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。PCR 产物回收使用 DNA 纯化回收试剂盒(购自 TIANGEN 公司),然后送至广州天一辉公司使用 Sanger 法进行测序。

### 1.3 转录本的注释及 CDS 预测

使用 BLAST 搜索 NT 数据库( $e \leq 10^{-10}$ )<sup>[28-29]</sup>。使用 Diamond BLASTX 搜索 NR、KOG、Swiss-Prot、GO 和 KEGG 数据库( $e \leq 10^{-10}$ )<sup>[30-34]</sup>。使用 Hmmscan 分析 Pfam 数据库<sup>[35]</sup>。

### 1.4 推定直系同源基因组中 Ka/Ks 值的估算

ANGEL 软件被用来确定 cDNA 的蛋白编码序列(CDS),默认采用该软件容错模式。运用 OrthoMCL

表 1 琼岛杨扩增序列引物信息

Tab. 1 Amplified sequence primer information of *P. qionghaensis*

基因名称 Gene name	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
UDP-SQ	DSH3 F:	TCTGCTTCCACTTCTTGC
	DSH3 R:	CATACTCTCCCATTGTCCC
POPTRDRAFT_575699	DSH6 F:	GCCTCCTGATTATTATGC
	DSH6 R:	TATTACAAGCCCTTCCAG
trnF	trnL-trnF F:	CGAAATTGGTAGACGCTACG
	trnL-trnF R:	ATTTGAAGTGGTGACACGAG
atp I	atp I -atpH F:	CCAACCCAGCAGCAATAAC
	atp I -atpH R:	TATTTACAAGTGGTATTCAAGCT

算法对 CDS 序列进行直系同源基因识别和筛选<sup>[36]</sup>。采用 paml-codeml 计算 Ks、Ka 和 Ka/Ks。利用公式  $T = K/2r$  估算杨树的分化时间<sup>[37]</sup>,其中,  $K$  为遗传分歧,用 Ks 的平均值表示,  $r$  为双子叶植物同义替代率的平均值,为  $1.5 \times 10^{-8}$  年/位点<sup>[38-39]</sup>。

### 1.5 nrDNA 和 cpDNA 基因序列获得与分析

克隆了 20 株琼岛杨和 1 株加杨的 4 个基因序列:糖生物合成酶(UDP-SQ)、POPTRDRAFT\_575699、tRNA-Phe(trnF)和 ATP 合酶 CF0A 亚基(atp I)基因,并结合从 NCBI 下载的 5 个杨树组(15 个树种)和 1 个类外群组(3 个树种)的 4 个基因序列进行分析(表 2)。运用 BioEdit V7.0.9 软件对各基因序列进行多重比较、校对、剪切及拼接,并且对 nrDNA 的 UDP-SQ 和 POPTRDRAFT\_575699,以及 cpDNA 的 trnF 和 atp I 序列进行组合<sup>[18]</sup>。然后使用 MEGA 7.0 对琼岛杨各基因及 nrDNA 和 cpDNA 组合的种内及种间遗传距离进行计算,分析各基因 G+C 平均含量、并使用最大似然法(maximum likelihood)和最小进化法(minimum evolution)构建系统发育树<sup>[3,40]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 杨树基因注释

转录组测序分别获取了 101 791、88 161 和 66 657 个小叶杨、琼岛杨和加杨的全长转录本,平均长度分别为 2 400、2 435 和 2 336 bp。加杨、琼岛杨和小叶杨分别有 33 840、39 343 和 45 217 个基因被注释,占比分别为 50.77%、44.63% 和 44.42%(表 3)。我们分别从 3 种杨树中随机选取 1 000 个转录本在 NR 数据库中比对,图 1 显示琼岛杨与毛果杨(*P. trichocarpa*)的比对率最高(53.38%),然后依次是胡杨(*P. euphratica*, 22.63%)、毛白杨(*P. tomentosa*, 2.84%)。加杨和小叶杨在毛果杨中的比对率也是最高,分别为 59.48% 和 60.59%。

表 2 NCBI 数据库获取的基因序列

Tab. 2 Gene sequences obtained from NCBI database

物种名称 Species name	序列编号 GenBank			
	<i>atp I</i>	<i>trnF</i>	<i>UDP-SQ</i>	<i>POPTRDRAFT_575699</i>
琼岛杨 <i>Populus qionghdaoensis</i>	MW389752 ~ MW389771	MW389731 ~ MW389750	MW389689 ~ MW389708	MW389710 ~ MW389729
山杨 <i>P. davidiana</i>	KF941071	KF940742	KF940382	KF940143
毛白杨 <i>P. tomentosa</i>	KF941073	KF940744	KF940384	KF940145
响叶杨 <i>P. adenopoda</i>	KF941089	KF940760	KF940400	KF940150
大叶杨 <i>P. lasiocarpa</i>	KF941086	KF940757	KF940397	KF940158
异叶杨 <i>P. heterophylla</i>	KX454634	KX454606	KX417462	KX417432
椅杨 <i>P. wilsonii</i>	KX454638	KX454610	KX417466	KX417436
小叶杨 <i>P. simonii</i>	KF941080	KF940751	KF940391	KF940152
苦杨 <i>P. laurifolia</i>	KF941083	KF940754	KF940394	KF940155
毛果杨 <i>P. trichocarpa</i>	KF941091	KF940762	KF940402	KF940163
加杨 <i>P. canadensis</i>	MW389772	MW389751	MW389709	MW389730
黑杨 <i>P. nigra</i>	KF941087	KF940758	KF940398	KF940159
阿富汗杨 <i>P. afghanica</i>	KF941088	KF940759	KF940399	KF940160
美洲黑杨 <i>P. deltoides</i>	KF941099	KF940770	KF940410	KF940171
灰胡杨 <i>P. pruinosa</i>	KF941092	KF940763	KF940403	KF940164
胡杨 <i>P. euphratica</i>	KF941096	KF940767	KF940407	KF940168
冬青叶杨 <i>P. ilicifolia</i>	KX454633	KX454605	KX417461	KX417431
三蕊柳 <i>Salix triandra</i>	KF941097	KF940768	KF940408	KF940169
钻天柳 <i>S. arbutifolia</i>	KF941094	KF940765	KF940405	KF940166
大黄柳 <i>S. raddeana</i>	KF941095	KF940766	KF940406	KF940167

表 3 转录组数据注释结果

Tab. 3 Annotation of transcriptome data

注释数据库 Annotation database	加杨 <i>P. canadensis</i>	琼岛杨 <i>P. qionghdaoensis</i>	小叶杨 <i>P. simonii</i>
Nt	33 530 (50.30%)	38 920 (44.15%)	44 886 (44.10%)
Nr	33 035 (49.56%)	38 338 (43.49%)	44 366 (43.59%)
KEGG	32 611 (48.92%)	37 898 (42.99%)	43 820 (43.05%)
Swiss-Prot	28 388 (42.59%)	32 860 (37.27%)	38 210 (37.54%)
GO	22 121 (33.19%)	25 472 (28.89%)	30 206 (29.67%)
Pfam	22 121 (33.19%)	25 472 (28.89%)	30 206 (29.67%)
KOG	21 311 (31.97%)	24 422 (27.70%)	28 118 (27.62%)
合计 Total	33 840 (44.42%)	39 343 (44.63%)	45 217 (50.77%)

## 2.2 琼岛杨与其他两种杨树基因功能分类及直系同源基因分析

GO 功能注释显示加杨、琼岛杨和小叶杨分别富集到 257、322 和 216 个功能组，3 种杨树的生物过程富集的基因最多，多为代谢过程和细胞过程。琼岛杨与其他 2 种杨树基因的 GO 功能分类结果相差较大，琼岛杨与加杨中仅发现 2 个共同富集的功能组，分别是碳水化合物代谢过程和单一生物碳水化

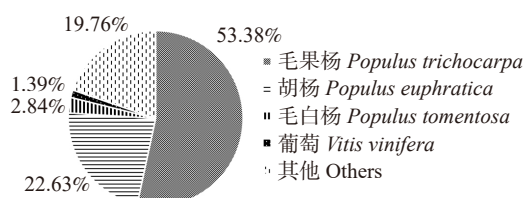


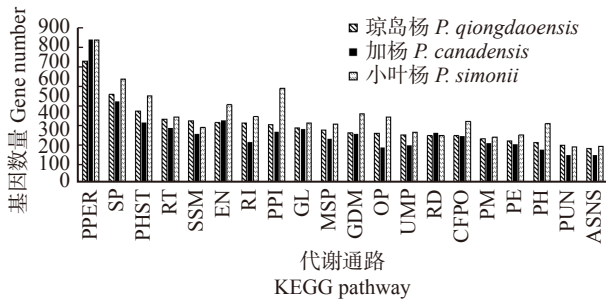
图 1 琼岛杨转录本在 Nr 数据库中的物种分布图

Fig. 1 Species distribution diagram of *P. qionghdaoensis* in Nr database

合物的代谢过程。

KEGG 通路分析显示 3 种杨树的基因均参与了 121 个相同代谢通路，并且 3 种杨树各代谢通路中的基因占总基因的比例呈现一致性，加杨、琼岛杨和小叶杨中参与内质网中的蛋白质加工的基因最多，分别为 834、709 和 831 个基因(图 2)。这显示了琼岛杨与其他 2 种杨树的基因在代谢过程中的功能具有相似性。

加杨、琼岛杨和小叶杨共识别 660 组直系同源基因，并计算了 Ka、Ks 和 Ka/Ks 平均值。如图 3A 所示，共有 18 个基因 Ka/Ks > 1(2.73%)，其中 10 个基因 Ka/Ks > 2，大量基因 Ka/Ks < 1(97.27%)，这表明大量基因在杨树的进化过程中可能会进行纯化选择。



横坐标为3种杨树富集基因最多的前20条KEGG通路。PPER. 内质网中的蛋白质加工; SP. 剪接体; PHST. 植物激素信号转导; RT. RNA 转运; SSM. 淀粉和蔗糖代谢; EN. 胞吞; RI. 核糖体; PPI. 植物与病原体的相互作用; GL. 糖酵解/糖异生; MSP. mRNA 监测途径; GDM. 乙醛酸和二羧酸酯代谢; OP. 氧化磷酸化; UMP. 泛素介导的蛋白水解; RD. RNA 降解; CFPO. 光合生物中的碳固定; PM. 丙酮酸代谢; PE. 过氧化物; PH. 光合作用; PUM. 嘌呤代谢; ASNS. 氨基糖和核苷酸糖代谢。Abscissa is top 20 KEGG pathways with the most enriched genes in three *Populus*. PPER, protein processing in endoplasmic reticulum; SP, spliceosome; PHST, plant hormone signal transduction; RT, RNA transport; SSM, starch and sucrose metabolism; EN, endocytosis; RI, ribosome; PPI, plant-pathogen interaction; GL, glycolysis/gluconeogenesis; MSP, mRNA surveillance pathway; GDM, glyoxylate and dicarboxylate metabolism; OP, oxidative phosphorylation; UMP, ubiquitin mediated proteolysis; RD, RNA degradation; CFPO, carbon fixation in photosynthetic organisms; PM, pyruvate metabolism; PE, peroxisome; PH, photosynthesis; PUM, purine metabolism; ASNS, amino sugar and nucleotide sugar metabolism.

图2 3种杨树基因功能分类

Fig. 2 Function classification in three *Populus* genes

660组直系同源基因的Ks平均值为0.1505, 在0.02左右, 直系同源基因数量达到峰值(图3B)。基于直系同源基因构建的进化树显示出琼岛杨与其他杨树具有明显差异(图4A), 并估计了3种杨树分化时间大概为1.21百万年前, 该时间处于新生代的第四纪的更新世。为了更好的体现琼岛杨与其他杨树的亲缘关系, 我们另外结合了毛果杨和簸箕柳(*Salix suchowensis*)搜索5个树种直系同源基因, 共

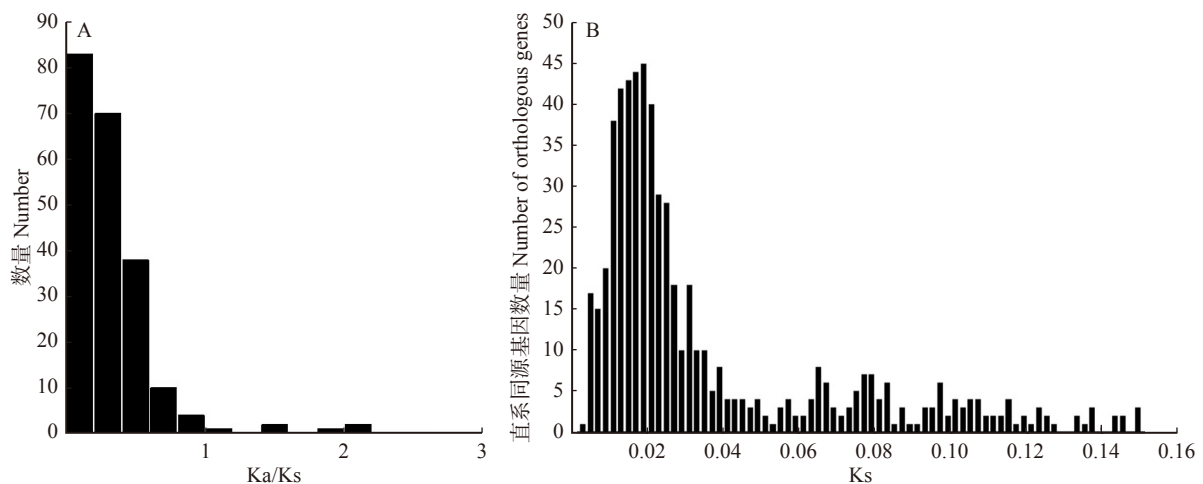


图3 杨树直系同源基因的Ka/Ks (A)及Ks (B)分布图

Fig. 3 Distribution bar graph of Ka/Ks (A) and Ks (B) of *Populus* orthologous genes

获得220组直系同源基因, 并构建了5个物种进化树, 图4B显示出毛果杨、加杨和小叶杨被聚为一个分支, 琼岛杨和簸箕柳各为一分支。

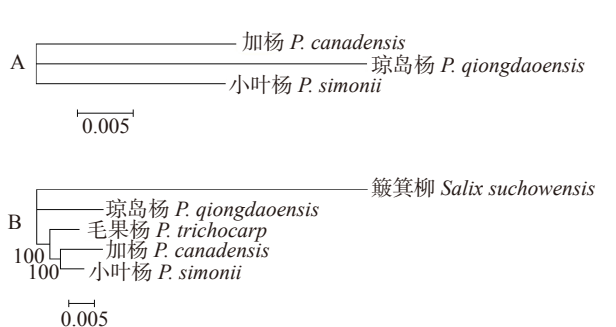
### 2.3 3种杨树直系同源基因差异表达模式分析

660组直系同源基因表达分析显示: 尽管正常状态下, 3种杨树基因表达模式具有差异, 但在热胁迫下的基因表达模式很相似(图5)。660个直系同源基因组中, 加杨有48个基因未表达, 琼岛杨中136个基因未表达, 小叶杨中142个未表达。加杨、琼岛杨和小叶杨中显著差异表达的基因分别为42、21和17个, 其中4个同源基因在3种杨树中都显著差异表达, 2个在琼岛杨和小叶杨中显著差异表达, 5个在琼岛杨和加杨中都差异表达, 且差异表达倍数相近(表4)。

### 2.4 琼岛杨cpDNA和nrDNA的序列多态性分析

为寻找琼岛杨更近的亲缘树种, 我们采用单基因克隆的方法获得了琼岛杨 *atp I*、*trnF*、*UDP-SQ* 和 *POPTRDRAFT\_575699* 基因序列, 基因长度分别为1025、902、608和485 bp; G+C含量分别为29.56%、30.82%、45.23%和45.36%。2个cpDNA序列组合长度为1927 bp, 2个nrDNA序列组合长度为1093 bp, G+C含量为30.15%和45.29%。nrDNA的G+C含量明显高于cpDNA。

*atp I*、*trnF*、*UDP-SQ* 和 *POPTRDRAFT\_575699* 插入和缺失碱基数分别为27、18、3和0个(表5); 单倍型数(单倍型多样性)分别为19(0.995)、18(0.989)、4(0.521)和2(0.100)个; 多态位点分别为16、53、16和1个; 突变总数分别为18、56、17和1个; 简约位点分别为11、37、2和0个; 单一位点分别为5、16、14和1个(表5)。综上所述, 在琼岛杨中, cpDNA的序列多态性相对较高, 进化较快, 可提高种间鉴别能力, nrDNA的序列相对保守, 进化相对较慢。



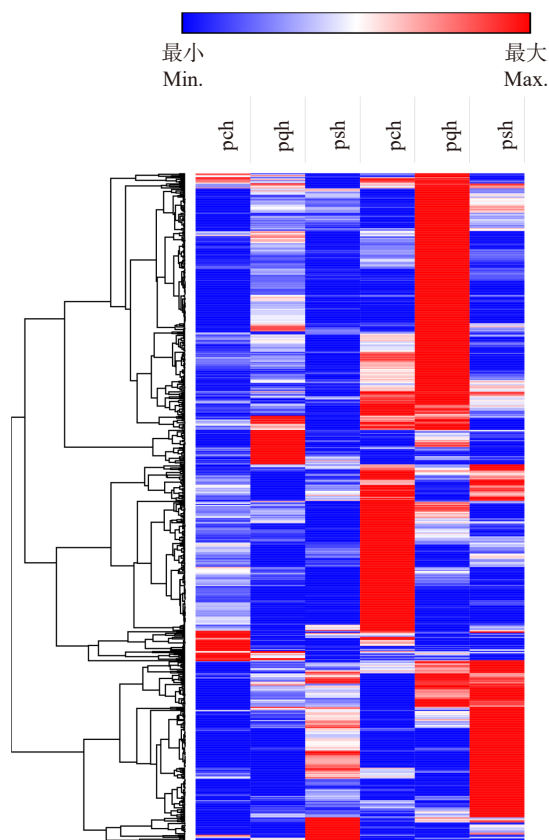
A. 琼岛杨、加杨和小叶杨直系同源基因进化树；B. 琼岛杨、加杨、小叶杨毛果杨和簸箕柳直系同源基因进化树。A, phylogenetic tree of orthologous genes of *P. qiongdaoensis*, *P. canadensis* and *P. simonii*; B, phylogenetic tree of orthologous genes of *P. qiongdaoensis*, *P. canadensis*, *P. simonii*, *P. trichocarpa* and *Salix suchowensis*.

图 4 琼岛杨系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *P. qiongdaoensis*

### 2.5 nrDNA 与 cpDNA 分析琼岛杨亲缘关系

利用遗传距离法计算琼岛杨组合基因序列 cpDNA 和 nrDNA 种内遗传距离以及与 19 种其他树种的种间遗传距离, 结果显示 cpDNA 序列组合的种内和种间遗传距离分别为 0 ~ 0.012 和 0.011 ~ 0.053, nrDNA 序列组合分别为 0 ~ 0.010 和 0.006 ~ 1.088。种间的遗传距离普遍大于种内遗传距离, 表明种间的遗传分化明显大于种内的遗传分化, 但也出现种间遗传距离小于种内遗传距离的情况, 表明这些杨树与琼岛杨亲缘关系非常近。为了更准确地分析琼岛杨与其他树种的亲缘关系, 进一步分析琼岛杨 *atp I*, *trnF*, *UDP-SQ*, *POPTRDRAFT\_575699* 以及组合基因序列 cpDNA 和 nrDNA 与其他树种的遗传距离(表 6)。所有基因遗传距离的平均值显示出



pch、pqh 和 psh 分别为加杨、琼岛杨和小叶杨热胁迫处理; pcq、pqh 和 psq 分别为加杨、琼岛杨和小叶杨对照组。The heat stress of *P. canadensis*, *P. qiongdaoensis* and *P. simonii* is named as pch, pqh and psh; the control of *P. canadensis*, *P. qiongdaoensis* and *P. simonii* is named as pcq, pqh and psq.

图 5 3 种杨树直系同源基因表达热图

Fig. 5 Heat map of orthologous genes in three *Populus* species

琼岛杨与白杨组亲缘最近, 平均值为 0.011, 之后是青杨组(平均值 0.015)和黑杨组(平均值 0.016)。白

表 4 3 种杨树差异表达直系同源基因

Tab. 4 Differentially expression of orthologous genes in three *Populus*

直系同源基因编号 Gene No. of orthologous gene	琼岛杨 <i>P. qiongdaoensis</i>			加杨 <i>P. canadensis</i>			小叶杨 <i>P. simonii</i>		
	热处理 Heat stress	对照 Control	log <sub>2</sub> FC	热处理 Heat stress	对照 Control	log <sub>2</sub> FC	热处理 Heat stress	对照 Control	log <sub>2</sub> FC
OG07438	354.35	35.80	4.56	88.68	7.28	5.05	52.66	4.20	4.56
OG07244	188.23	4.62	6.66	1 329.18	31.22	6.85	103.81	1.39	7.16
OG09422	23.28	0.37	7.43	22.24	0.24	7.97	3.46	0.38	4.18
OG05822	3 381.21	2.03	12.19	318.20	0.48	10.80	370.24	0.11	12.65
OG07321	7.95	118.86	-2.97	6.49	115.96	-2.74			
OG07470	75.24	13.14	3.82	17.13	3.28	3.84			
OG07300	16.63	0.70	6.06	557.70	1.35	10.04			
OG07384	279.51	11.27	6.08	583.29	20.48	6.31			
OG09172	1 918.37	35.74	7.28	188.21	21.07	4.62			
OG07291	113.69	13.64	4.39				242.96	4.12	6.94
OG07327	366.43	0.47	11.10				254.73	0.59	9.79

注: FC. 差异倍数。Note: FC, fold change.

表5 琼岛杨克隆基因序列长度及变异位点信息

Tab. 5 Length and variant site information of amplified sequences of *P. qionghdaoensis*

基因名称 Gene name	长度 Length /bp	插入/缺失个数 Number of the insertion or deletion	单倍型数 Number of haplotype	单倍型多样性 Haplotype diversity	多态位点 Polymorphic site	突变总数 Number of mutation	简约型位点 Parsimony informative site	单一位点 Single site
<i>atp I</i>	1 025	27	19	0.995	16	18	11	5
<i>trnF</i>	902	18	18	0.989	53	56	37	16
<i>UDP-SQ</i>	608	4	4	0.521	16	17	2	14
<i>POPTRDRAFT_575699</i>	485	2	2	0.100	1	1	0	1

表6 琼岛杨与其他树种遗传距离

Tab. 6 Genetic distance between *P. qionghdaoensis* and other *Populus* species

物种名称 Species name	分组 Group	nrDNA组合 nrDNA combination	cpDNA组合 cpDNA combination	<i>UDP-SQ</i>	<i>POPTRDRAFT_575699</i>	<i>atp I</i>	<i>trnF</i>	平均值 Average	各组平均值 Average of each group
<i>P. davidiana</i>	白杨组 Leuce	0.009	0.014	0.007	0.004	0.014	0.025	0.012	0.011
<i>P. tomentosa</i>		0.006	0.014	0.007	0.000	0.014	0.023	0.011	
<i>P. adenopoda</i>		0.006	0.012	0.007	0.000	0.013	0.023	0.010	
<i>P. lasiocarpa</i>	大叶杨组 Leucoides	0.013	0.013	0.007	0.007	0.014	0.025	0.013	0.388
<i>P. heterophylla</i>		1.073	0.016	0.013	1.158	0.017	1.169	0.575	
<i>P. wilsonii</i>		1.064	0.016	0.009	1.160	0.017	1.193	0.577	
<i>P. simonii</i>	青杨组 Tacamahaca	0.015	0.013	0.009	0.007	0.014	0.026	0.014	0.015
<i>P. laurifolia</i>		0.015	0.017	0.009	0.007	0.018	0.032	0.016	
<i>P. trichocarpa</i>		0.009	0.017	0.009	0.002	0.017	0.029	0.014	
<i>P. nigra</i>	黑杨组 Aigeiros	0.020	0.011	0.011	0.011	0.012	0.023	0.015	0.016
<i>P. afghanica</i>		0.018	0.014	0.011	0.009	0.014	0.026	0.015	
<i>P. canadensis</i>		0.018	0.016	0.010	0.008	0.022	0.026	0.017	
<i>P. deltoides</i>		0.018	0.016	0.011	0.009	0.017	0.029	0.017	
<i>P. pruinosa</i>	胡杨组 Turanga	0.013	0.018	0.013	0.002	0.020	0.027	0.016	0.205
<i>P. euphratica</i>		0.016	0.018	0.015	0.004	0.020	0.027	0.017	
<i>P. ilicifolia</i>		1.088	0.018	0.017	1.159	0.020	1.195	0.583	
<i>S. triandra</i>	外类群 Outgroup	0.083	0.053	0.049	0.040	0.053	0.062	0.057	0.056
<i>S. arbutifolia</i>		0.083	0.052	0.053	0.036	0.051	0.062	0.056	
<i>S. raddeana</i>		0.081	0.053	0.047	0.038	0.052	0.062	0.056	

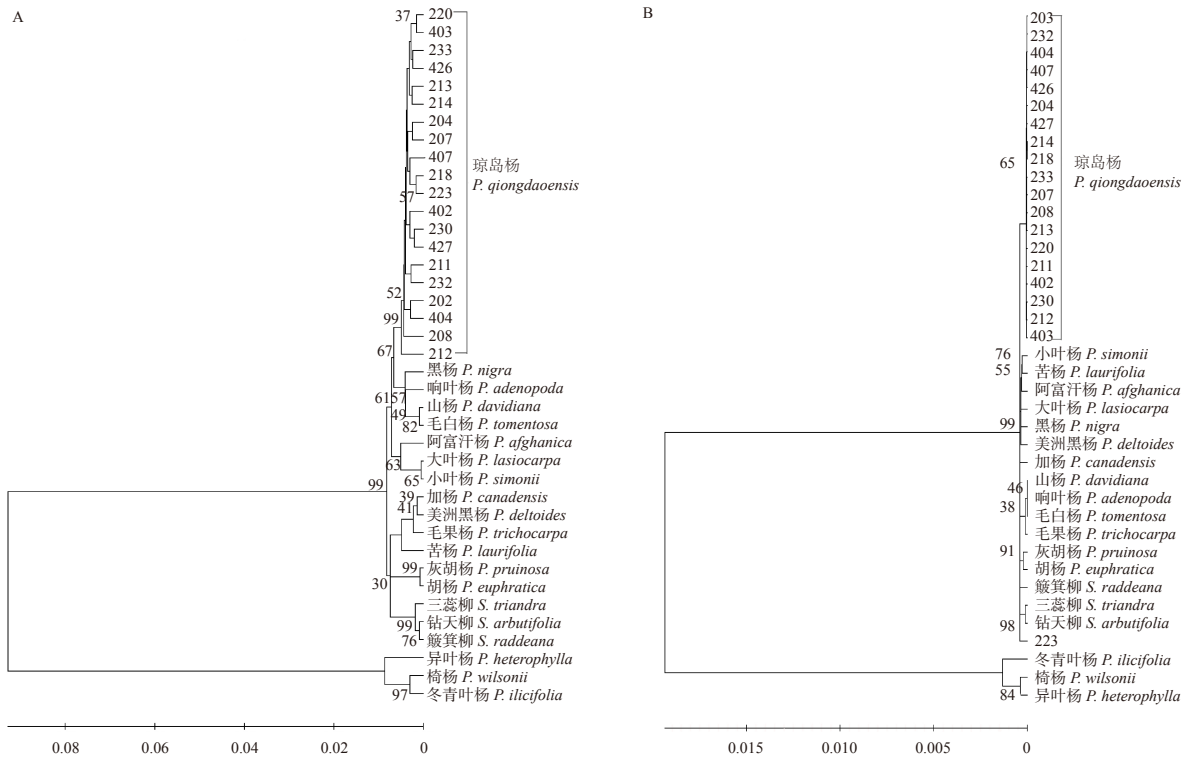
杨组中, 琼岛杨与响叶杨(*P. adenopoda*)遗传距离最近(0.010), 毛白杨次之(0.011), 最后是山杨(0.012), 最大的山杨的平均遗传距离小于与其他派系杨树的遗传距离, 显示了琼岛杨与白杨组具有最近亲缘关系。

我们使用了最大似然法和最小进化法分别构建所有基因及组合基因的系统进化树, 所有基因通过两种方法构建的进化树均把琼岛杨聚到一起。我们展示了最大似然法构建的进化树, cpDNA 构建的进化树显示琼岛杨与白杨组具有最近亲缘关系, 且置信度均超过 50, *trnF* 中置信度 50, *atp I* 中置信度 58, cpDNA 序列组合置信度为 67(图 6A)。nrDNA 构建的进化树显示琼岛杨与白杨组也具有较近亲缘

关系, 置信度均小于 50(图 6B), *UDP-SQ* 中置信度为 15, *POPTRDRAFT\_575699* 中置信度为 40, 且均把类外群分到杨树大分支, 显示出 nrDNA 序列对于琼岛杨与其他物种间的区分度较差。

### 3 结论与讨论

鉴定物种的亲缘关系, 通过直系同源基因的比较是最直接有效的方法<sup>[41]</sup>。通过搜索我们获取的转录本数据, 加杨、琼岛杨和小叶杨一共获取了 660 组直系同源基因。计算物种的直系同源基因的 Ka、Ks 及 Ka/Ks 值可用于评估物种的亲缘关系、计算分化时间及研究进化过程中受正选择的基因<sup>[42-43]</sup>。本研究中 3 个物种的直系同源基因的 Ks 值平均值为



A. cpDNA 组合序列最大似然进化树; B. nrDNA 组合序列最大似然进化树。A, cpDNA combination sequence maximum likelihood phylogenetic tree; B, maximum likelihood evolutionary tree of nrDNA combined sequence.

图 6 琼岛杨与 19 个树种的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of the *P. qiongdaoensis* and 19 tree species

0.150 5, 峰值为 0.02,  $K_s$  值水平相对较低,  $K_a/K_s < 1$  占比 97.27%, 表明 3 种杨树具有较近亲缘关系。构建的系统发育树也显示琼岛杨与加杨和小叶杨具有较近亲缘关系, 但琼岛杨更为进化, 并通过  $T = K/2r$  估算出琼岛杨与这 2 个物种的分化时间大概为 1.21 百万年前左右的更新世<sup>[44]</sup>。不同物种相同处理条件下同类基因的表达模式也能反映物种的亲缘关系。在我们研究中, 660 组直系同源基因表达量分析显示: 尽管正常状态下, 3 种杨树大量的基因表达模式存在差异, 但在热胁迫下它们的表达模式却很相似, 进一步表明了琼岛杨、加杨和小叶杨具有较近亲缘关系。另外, 我们结合毛果杨和簸箕柳搜索了 5 个树种直系同源基因共 220 组, 基于这些直系同源基因构建了 5 个树种的进化树, 结果显示: 加杨、小叶杨和毛果杨被聚为同一分支, 琼岛杨和簸箕柳各为一个支。同时, 琼岛杨、加杨和小叶杨的转录本与毛果杨的比对率均为最高, 说明了这些杨树具有较近亲缘关系, 但琼岛杨与其他杨树间具有一定差异。

我们进一步通过单基因克隆的方法分析了琼岛杨在杨属中的进化地位, 该技术是用于物种亲缘关系分析的重要方法之一<sup>[45-47]</sup>。我们在 20 株琼岛杨上克隆了 4 个基因序列, 通过琼岛杨种内的分析显示 *atp I* 和 *trnF* 多态位点分别为 16 和 53, 明显高于 nrDNA 的 *UDP-SQ*(16)和 *POPTRDRAFT\_575699*(1),

这表明 cpDNA 相对于 nrDNA 可能进化速率更快, 在琼岛杨中 cpDNA 可能具有更好的物种鉴别能力。另外, 为了分析琼岛杨的亲缘关系, 我们结合 19 个树种进行了序列多重比较, 通过遗传距离法计算 *atp I*、*trnF*、*UDP-SQ*、*POPTRDRAFT\_575699* 以及组合基因序列 cpDNA 和 nrDNA 与其他树种的遗传距离, 平均遗传距离(0.011)均显示琼岛杨与白杨组亲缘最近, 这与 Wang 等<sup>[48]</sup>的研究一致。使用最大似然法和最小进化法构建的所有基因的系统进化树均把琼岛杨聚到一起, 表明该方法适用于琼岛杨亲缘关系分析。其中, cpDNA 和 nrDNA 组合序列构建的进化树均显示琼岛杨与白杨组具有最近亲缘关系, 遗传距离和构建的进化树结果表明: 琼岛杨确实与白杨组亲缘关系最近。另外, cpDNA 序列组合的进化分支置信度明显高于 nrDNA 序列组合, 综上所述结果表明: 在琼岛杨中, cpDNA 基因比 nrDNA 基因更适合用于物种鉴别。

参 考 文 献

[1] Cervera M T, Storme V, Soto A, et al. Intraspecific and interspecific genetic and phylogenetic relationships in the genus *Populus* based on AFLP markers[J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 2005, 111(7): 1440-1456.  
 [2] 殷继艳, 张建国, 何彩云, 等. 新疆额尔齐斯河流域杨属植物种间关系的 SSR 分析[J]. *林业科学研究*, 2016, 29(1): 17-24.



- Yin J Y, Zhang J G, He C Y, et al. Phylogenetic relationship analysis of *Populus* along Erqis River[J]. Forest Research, 2016, 29(1): 17–24.
- [3] 冯楚航, 何彩云, 王莹, 等. 叶绿体全基因组序列确定钻天柳在杨柳科中的系统发育位置[J]. 林业科学研究, 2019, 32(2): 73–77.
- Feng C H, He C Y, Wang Y, et al. Phylogenetic position of *Chosenia arbutifolia* in the Salicaceae inferred from whole chloroplast genome[J]. Forest Research, 2019, 32(2): 73–77.
- [4] 李宽钰, 黄敏仁, 王明麻, 等. 白杨派、青杨派和黑杨派的DNA多态性及系统进化研究[J]. 南京林业大学学报, 1996, 20(1): 6–11.
- Li K Y, Huang M R, Wang M X, et al. Study on DNA polymorphisms and phylogenetics of *Populus: Aigeiros, Tacamahaca* and *Leuce* section[J]. Journal of Nanjing Forestry University, 1996, 20(1): 6–11.
- [5] 周文彬. 银杏东西谱系分化机制研究—基于叶绿体基因组和比较转录组方法[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- Zhou W B. Revealing mechanisms underlying lineage divergence of *Ginkgo biloba* using plastid genomic and comparative transcriptomic approaches [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016.
- [6] 李佳蔓, 员涛, 周安佩, 等. 基于 cpDNA 和 rDNA ITS 片段分析西南地区青杨派杨树的系统发育与进化关系[J]. 西北植物学报, 2015, 35(6): 1113–1122.
- Li J M, Yuan T, Zhou A P, et al. Phylogeny of poplar in section *Tacamahaca* species from southwest China based on sequence data of cpDNA fragments and rDNA ITS[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2015, 35(6): 1113–1122.
- [7] 熊茜, 张妹, 余道平, 等. 峨眉拟单性木兰 B 类基因的克隆及系统进化分析[J]. 分子植物育种, 2018, 16(17): 5540–5548.
- Xiong X, Zhang M, Yu D P, et al. Cloning and phylogenetic analysis of B-class MADS-Box gene in *Parakmeria omeiensis*[J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(17): 5540–5548.
- [8] 江泽慧. 竹类植物基因组学研究进展[J]. 林业科学, 2012, 48(1): 159–166.
- Jiang Z H. Progress in bamboo genomics research[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2012, 48(1): 159–166.
- [9] Luo Y, Ding N, Shi X, et al. Generation and comparative analysis of full-length transcriptomes in sweetpotato and its putative wild ancestor I[J/OL]. The Preprint Server for Biology, 2017: 112425 [2020–07–30]. <https://doi.org/10.1101/112425>.
- [10] Koenig D, Jiménez-Gómez J M, Kimura S, et al. Comparative transcriptomics reveals patterns of selection in domesticated and wild tomato[J]. PNAS, 2013, 110(28): E2655–E2662.
- [11] Kimura M. The neutral theory of molecular evolution[M]. London: Cambridge University Press, 1983.
- [12] Roberts R J, Carneiro M O, Schatz M C. The advantages of SMRT sequencing[J/OL]. Genome Biology, 2013, 14(7): 405 [2020–07–03]. <http://genomebiology.com/2013/14/7/405>.
- [13] Hackl T, Hedrich R, Schultz J, et al. Proofread: large-scale high-accuracy PacBio correction through iterative short read consensus[J]. Bioinformatics, 2014, 30(21): 3004–3011.
- [14] Wang B, Tseng E, Regulski M, et al. Unveiling the complexity of the maize transcriptome by single-molecule long-read sequencing[J/OL]. Nature Communications, 2016, 7: 11708 [2020–06–24]. <https://doi.org/10.1038/ncomms>.
- [15] Curtis S E, Clegg M T. Molecular evolution of chloroplast DNA sequence[J]. Molecular Biology and Evolution, 1984, 1(4): 291–301.
- [16] Pennisi E. Wanted: a barcode for plants[J]. Science, 2007, 318: 190–191.
- [17] 于华会, 杨志玲, 杨旭, 等. 药用植物种质资源 ITS 序列研究进展[J]. 中药草, 2010, 41(3): 419–496.
- Yu H H, Yang Z L, Yang X, et al. Advances in studies on ITS sequences of medicinal plants germplasm resources[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2010, 41(3): 419–496.
- [18] 孙芳芳, 聂迎彬, 马松梅, 等. 基于 ITS 和 cpDNA 序列的梭梭和白梭梭物种分化[J]. 林业科学, 2019, 55(3): 46–56.
- Sun F F, Nie Y B, Ma S M, et al. Species differentiation of *Haloxylon ammodendron* and *Haloxylon persicum* based on ITS and cpDNA sequences[J]. Senticia Silvae Sinicae, 2019, 55(3): 46–56.
- [19] 栾鹏慧, 苏晓华, 张冰玉. 杨属 (*Populus* L.) 种质资源遗传学评价研究进展[J]. 植物学报, 2011, 46(5): 586–595.
- Luan H H, Su X H, Zhang B Y. Research progress in genetic evaluation of *Populus* L. germplasm resources [J]. Chinese Bulletin of Botany, 2011, 46(5): 586–595.
- [20] 符国瑗. 海南植物区系一新发现——琼岛杨[J]. 海南大学学报 (自然科学版), 1988, 6(4): 76–77.
- Fu G Y. A new discovery of Hainan flora-*Populus qionghaoensis*[J]. Natural Science Journal of Hainan University, 1988, 6(4): 76–77.
- [21] Xu J, Fang M, Li Z, et al. Third-generation sequencing reveals lncRNA-regulated HSP genes in the *Populus × canadensis* Moench heat stress response[J/OL]. Frontiers in Genetics, 2020, 11: 249 [2020–05–07]. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00249>.
- [22] Xu J, Zheng Y, Pu S, et al. Third-generation sequencing found lncRNA associated with heat shock protein response to heat stress in *Populus qionghaoensis* seedlings[J/OL]. BMC Genomics, 2020, 21: 572 [2020–08–24]. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06979-z>.
- [23] Xu J, Du R, Meng X, et al. Third-generation sequencing indicated lncRNA could regulate *eIF2D* to enhance protein translation under heat stress in *Populus simonii*[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2020, 39(7): 240–250.
- [24] 汪结明, 项艳, 沈周高, 等. 杨树基因组 DNA 提纯方法的优化及其 RAPD 鉴定[J]. 中国农学通报, 2006, 22(5): 59–62.
- Wang J M, Xiang Y, Shen Z G, et al. Optimization of method for extracting poplar genomic DNA and Its RAPD appraisal[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2006, 22(5): 59–62.
- [25] Du S H, Wang Z S, Zhang J G. A novel set of single-copy nuclear DNA markers for the genetic study of Salicaceae[J]. Genetics & Molecular Research, 2014, 13(3): 4911–4917.

- [26] Taberlet P. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA[J]. *Plant Molecular Biology*, 1991, 17(5): 1105–1109.
- [27] Liu X, Wang Z, Shao W, et al. Phylogenetic and taxonomic status analyses of the abaso section from multiple nuclear genes and plastid fragments reveal new insights into the north America origin of *Populus* (Salicaceae)[J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 7: 2022 [2020–07–04]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02022>.
- [28] Altschul S F, Madden T L, Schäffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(17): 3389–3402.
- [29] Li W, Jaroszewski L, Godzik A. Tolerating some redundancy significantly speeds up clustering of large protein databases[J]. *Bioinformatics*, 2002, 18(1): 77–82.
- [30] Koonin E V, Fedorova N D, Jackson J D, et al. A comprehensive evolutionary classification of proteins encoded in complete eukaryotic genomes[J/OL]. *Genome Biology*, 2004, 5(2): R7 [2020–07–15]. <http://genomebiology.com/2004/5/2/R7>.
- [31] Tatusov R L, Fedorova N D, Jackson J D, et al. The COG database: an updated version includes eukaryotes[J/OL]. *BMC Bioinformatics*, 2003, 4: 41 [2020–07–11]. <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/4/41>.
- [32] Bairoch A, Apweiler R. The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1): 45–48.
- [33] Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, et al. The KEGG resource for deciphering the genome[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(Database issue): D277–D280.
- [34] Ashburner M, Ball C A, Blake J A, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology[J]. *Nature Genetics*, 2000, 25(1): 25–29.
- [35] Finn R D, Coggill P, Eberhardt R Y, et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(D1): D279–D285.
- [36] Li L, Stoeckert C J, Roos D S. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes[J]. *Genome Research*, 2003, 13(9): 2178–2189.
- [37] Eyre-Walker A. Fundamentals of molecular evolution (2nd ed)[J/OL]. *Heredity*, 2000, 84(6): 735 [2020–06–01]. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2000.0728d.x>.
- [38] Koch M A, Haubold B, Mitchell-Olds T. Comparative evolutionary analysis of chalcone synthase and alcohol dehydrogenase loci in *Arabidopsis*, *Arabis*, and related genera (Brassicaceae)[J]. *Molecular Biology & Evolution*, 2000, 17(10): 1483–1498.
- [39] Jia Y, Liu M L, Yue M, et al. Comparative transcriptome analysis reveals adaptive evolution of *Notopterygium incisum* and *Notopterygium franchetii*, two high-alpine herbal species endemic to china[J/OL]. *Molecules*, 2017, 22(7): 1158 [2020–07–11]. <https://doi.org/10.3390/molecules22071158>.
- [40] Sudhir K, Glen S, Koichiro T. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J/OL]. *Molecular Biology & Evolution*, 2016(7): 1870 [2020–07–22]. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- [41] 陈君. 中国白栎组单拷贝核基因标记的开发及系统发育关系研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2017.
- Chen J. Development of single-copy nuclear gene markers and phylogeny research of section *Quercus* in China[D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2017.
- [42] 刘合霞, 李博. 牛耳朵与黄花牛耳朵比较转录组学分析[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(6): 1853–1863.
- Liu H X, Li B. Comparative transcriptome analysis of *Primulina eburnea* and *Primulina lutea*[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(6): 1853–1863.
- [43] 赵松子, 龚春, 幸伟年. 普通油茶与茶比较基因组学和进化分析[J]. *江西林业科技*, 2013(4): 1–5.
- Zhao S Z, Gong C, Xing W N. Comparative genomic and phylogenetic *Camellia oleifera* and *C. sinensis*[J]. *Jiangxi Forestry Science and Technology*, 2013(4): 1–5.
- [44] Zheng B X, Xu Q Q, Shen Y P. The relationship between climate change and quaternary glacial cycles on the Qinghai-Tibetan Plateau: review and speculation[J]. *Quaternary International*, 2002, 97(1): 93–101.
- [45] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identification through DNA barcodes[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2003, 270: 313–321.
- [46] Hebert P D N, Stoeckle M Y, Zemplak T S, et al. Identification of birds through DNA barcodes[J]. *PLOS Biology*, 2004, 2(10): 1657–1663.
- [47] Hebert P D N, Ratnasingham S, de Waard J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2003, 270(Suppl.1): S96–S99.
- [48] Wang T, Fan L, Guo X, et al. Characterization of the complete chloroplast genome of *Populus qionghdaoensis* T. Hong et P. Luo[J]. *Conservation Genetics Resources*, 2016, 8(4): 435–437.

(责任编辑 范娟 赵田芸  
责任编辑 卢孟柱)