

东北师范大学 2012 级长白山综合实习报告



基于 cpDNA 的耧斗菜属植物 (*Aquilegia*) 分子系统学研究

小组名称: 植物一组

小组组长: 林伟凡

小组成员: 骆 佩 薛军红 姚巧缤

吕莘辰 邓明姣 严惠馨

赵世尧 杨宗泽

指导教师: 李霖锋

基于 cpDNA 的耧斗菜属植物 (*Aquilegia*) 分子系统学研究

林伟凡、骆佩、薛军红、姚巧缤、吕莘辰、邓明姣、严惠馨、赵世尧、杨宗泽
(东北师范大学生命科学学院·长春 130024)

Molecular Phylogeny Analyses of *Aquilegia* Based on cpDNA

LIN Wei-fan LUO Pei YAO Qiao-Bin XUE Jun-Hong LV Xin-Chen
DENG Ming-Jiao YAN Hui-Xin ZHAO Shi-Yao YANG Zong-Ze
(School of Life Sciences, Northeast Normal University, Changchun 130024)

摘要 毛茛科 (Ranunculaceae) 耧斗菜属 (*Aquilegia*), 起源于亚洲北部地区并广泛分布于北半球温带地区, 共 70 余种, 我国分布有 13 种。耧斗菜属植物生境复杂、表型多样, 属内各物种在形态结构、生理学和生态位等方面具显著差异, 是研究物种起源、形成与适应性分化的理想材料。在近年来国外关于耧斗菜的研究屡见不鲜、国内此方面的研究甚少的情况下, 本研究以取自华北地区赤峰的华北耧斗菜 (*Aquilegia yabeana*)、取自长白山区的小花耧斗菜 (*Aquilegia parviflora*)、长白耧斗菜 (*Aquilegia japonica*) 和尖萼耧斗菜 (*Aquilegia oxysepala*) 为研究对象, 对其 cpDNA 序列进行系统发育分析研究, 发现分布于长白山区的长白耧斗菜和尖萼耧斗菜的亲缘关系最近, 从而为在形态学分类基础上进一步探究耧斗菜属植物的系统演化关系、谱系发育等奠定了更加坚固的理论基础。

关键词 耧斗菜属 ; cpDNA; 系统发育

Abstract Ranunculaceae *Aquilegia*, originated in the northern part of the Asia and widely distributed in the temperate regions of the northern hemisphere, has more than 70 species around the world, among which China has 13 species. Because of their complex habitats, *Aquilegia* plants have diverse phenotypic, and each of them has significant differences from those within the same genus in many aspects, such as physiological and morphological structure, ecological niche and so on. As a result, *Aquilegia* became an ideal material to do the research on species' origination, formation and adaptive differentiation. In recent years, foreign research on *Aquilegia* is common while the domestic is not so much. Under this circumstance, we did this research and chose *Aquilegia yabeana*, *Aquilegia parviflora* and *Aquilegia japonica* that got in the Changbai Mountains as well as *Aquilegia oxysepala* that got in the Chifeng of the North China as our research objects. After the phylogenetic analysis on those cpDNA sequences, we found that *Aquilegia japonica* and *Aquilegia oxysepala* have the closest genetic relationship among those four distributed in the Changbai Mountains, which will provide solid theoretical basis for us to explore *Aquilegia* plants' phylogenetic relationship and pedigree development on the base of morphological classification.

Keywords *Aquilegia*; cpDNA; phylogenetic

耧斗菜属 (*Aquilegia*) 隶属于毛茛科 (*Ranunculaceae*), 约 70 个物种, 广泛分布于北半球温带地区。根据《中国植物志》记载, 我国共有 13 个耧斗菜属物种, 分布于西南至西北和东北。耧斗菜属植物为多年生草本; 叶为 2—3 回 3 出叶; 萼片 5, 辐射对称, 颜色如花瓣; 花瓣 5, 向后延长成一长距, 稀无距; 雄蕊多数, 雌蕊 5, 分离, 有胚珠多颗。毛茛科耧斗菜属植物为美丽的花卉, 具有特化的花、多样的传粉者和种间杂交可育等特征, 是十多年来倍受植物进化生物学家关注的一个类群。

叶绿体基因多为顺反子, 基因序列高度保守, 其进化速率平均约为 $0.2-1.0 \times 10^{-9}$, 仅为核基因组的 1/5 (Wolfe *et al*, 1987)。虽然相对于核基因组的序列进化, 叶绿体的进化速率较慢, 但叶绿体基因组序列的不同区域进化速率却不完全相同, LSC 高于 SSC, 非编码区高于编码区, 不同编码基因间也表现出不同的进化速率。基于此, 选择合适的区域序列, 可以进行不同分类阶元物种之间的系统发育分析研究, 且序列片段变异速率适中, 较适合进行植物系统发育分析 (燕安等, 2004)。而相对于核基因组的复杂和线粒体基因组的高频突变, 叶绿体基因组较为保守, 同时叶绿体基因组较小易于测序, 因而叶绿体基因组更适合进行植物的系统发育分析 (Tian *et al*, 2002)。叶绿体 DNA (cpDNA) 大多属于母系遗传, 不受遗传重组的影响 (黄瑶等, 1994), 有相对独立的进化路线, 可不依赖于其他

任何数据即可构建分子进化树，从而为系统进化关系的揭示提供准确而可靠的信息（Bremer et al, 2002）。

1952 年，Grant 根据耧斗菜的花部性状将其分为 5 种类型：(1) 无距耧斗菜 (*A. ecalcarata*)，耧斗菜属内唯一无花距的种；(2) 欧耧斗菜 (*A. vulgaris*) 花蓝色或紫色低垂，距极具弯曲具有长花瓣；(3) 高山耧斗菜 (*A. alpina*) 与欧耧斗菜相似，但距为直距；(4) 加拿大耧斗菜 (*A. canadensis*) 花红色或黄色，距短且直立，花瓣短，该种群吸引蜂鸟，具浓香；(5) 蓝紫耧斗菜 (*A. viridiflora*) 花朵直立，黄色或蓝色，距长，花瓣长，花朵具微香。可见，花距的形态在耧斗菜属植物的分类中具有重要意义。

根据现有的分类工作，结合耧斗菜属植物研究现状，本研究以采自东北地区的 3 种耧斗菜属植物与华北地区的 1 种耧斗菜属植物为标本，将其与全球不同地区的 16 种耧斗菜属植物进行基于 cpDNA 的谱系发育分析，发现分布于长白山区的长白耧斗菜和尖萼耧斗菜的亲缘关系最近。

1. 材料与方法

1.1 研究材料

本研究共涉及 4 种耧斗菜属植物标本，分别是采自于长白山区的尖萼耧斗菜 *A. oxysepala*、长白耧斗菜 *A. japonica* 和小花耧斗菜 *A. parviflora* 以及采自于华北地区赤峰的华北耧斗菜 *A. Yabeana*，并利用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 提供的其余 16 种

稷斗菜属植物的 cpDNA 序列进行分析研究。

1.2 试剂和仪器

1.2.1 主要实验试剂

试剂名称	生产厂家
β -巯基乙醇	上海生工生物工程公司
EDTA	上海生工生物工程公司
Tris	上海生工生物工程公司
硼酸	北京化工厂
氯仿	北京化工厂
无水乙醇	北京化工厂
BSA	Takara (大连)
引物合成	Takara (大连)
dNTPS	Takara (大连)
Tap 聚合酶	Takara (大连)
10*buffer	Takara (大连)
液氮	中国科学院长春应用化学研究所

1.2.2 主要实验仪器

设备名称	生产厂家
电泳仪—JY1600C	北京军意东方电泳设备有限公司
台式离心机	Sigma, Backman
电热恒温水浴锅	天津市泰斯特仪器公司

电子天平	OHAUS corp.USA
ABI 2720 PCR 仪	Applied Biosystems
移液枪	Eppendorf、Gilson
高压灭菌锅	上海申安医疗器械公司
Eppendorf 管	江苏海门江海仪器配件厂

1.3 研究方法

1.3.1 叶绿体基因组 DNA 的提取

本研究采用的实验材料为硅胶干燥的耧斗菜属植物样本,采用康为试剂盒法对其叶绿体基因组 DNA 进行提取。

①将实验材料放入已灭菌、预冷却的研钵中,液氮冷冻试验材料后,迅速研磨、粉碎。

②将已研磨成粉末的实验材料转移至 2ml 离心管中,加入提前预热至 65℃的 Buffer GP1 液 700ul 和 2ul-巯基乙醇,缓慢震荡、混合均匀后。65℃水浴 30 分钟。

③冷却至室温后,加入 700ul 氯仿,缓慢震荡、充分混合均匀。

④10000rpm 离心 5 分钟,小心地将上清液转至到洁净的 2ml 离心管中。

⑤加入 700ul Buffer GP2,充分混匀。

⑥将上一步所得溶液全部加入 Spin Column DM 中 (Spin Column DM 已放入 Collection Tube 中), 10000rpm, 离心 30 秒, 弃废液。

(将 Spin Column DM 放回 Collection Tube 中)。如不能一次将所有溶液转入, 可分两次进行。

⑦向 Spin Column DM 中加入 700ul Buffer GW1 (使用前检查是否已加乙醇), 10000rpm, 离心 30 秒, 弃废液。将 Spin Column DM 放回 Collection Tube 中。

⑧向 Spin Column DM 中加入 700ul Buffer GW2 (使用前检查是否放回 Collection Tube 中)。

⑨重复操作⑧一次。

⑩10000rpm 离心 2 分钟, 弃废液。将 Spin Column DM 置于室温放置 5 分钟, 以彻底晾干吸附材料中残余的 Buffer GW2。

⑪将 Spin Column DM 放入一个新的 1.5ml 的离心管中, 加入 100ul Buffer GE, 室温放置 5 分钟, 10000rpm, 离心 1 分钟, 收集 DNA 溶液, -20℃低温保存。

1.3.2 聚合酶链式反应 (PCR)

PCR 扩增反应的总体积为 30ul, PCR 反应体系为: ddH₂O × 22.5ul, 10 × buffer × 0.3ul; Taq DNA 聚合酶, BSA 0.6ul, 引物 1 和引物 2 分别为 0.5ul, 以及 2ul 的模板 DNA。

扩增程序为: 95℃预变性 5min; 94℃变性 30s, 48℃复性 30s, 72℃延伸 90s, 35 个循环; 72℃补平 8min, 4℃保存。实验所用 PCR 检测仪和毛细管荧光电泳仪型号分别为 ABI2720 (ABI, USA) 和 ABI3730 (ABI, USA)。PCR 结束后, 取 5ul 反应液电泳检查。PCR 扩增产物送至公司进行测序。

1.3.3 琼脂糖凝胶电泳

配制 1.5% 的琼脂糖平板凝胶（含 EB），在 1×TBE 缓冲液中电泳，电压为 120V，在 FOTODYNE 型透射紫外仪上观察。

1.3.4 数据处理方法

先运用 ClustalX version 1.81（PC version Thompson *et al*, 1997）软件对 cpDNA 序列进行比对，然后运用 BioEdit（Hall, 1999）对比对后的序列进行手动整理，最后利用 MEGA5（Sudhir Kumar *et al* 1990s）软件采用 Neighbor-joining 法构建系统发育树后对其进行谱系发育分析。

2. 研究结果分析

2.1 引物筛选

根据已优化的 PCR 反应体系和程序，对叶绿体通用引物进行筛选。试验中引物的退火温度和时间由引物的长度、碱基组成及其浓度和模板 DNA 的序列长度所决定，引物的退火温度会对引物与模板的特异性结合产生影响，因此对于不同引物的退火温度需要进行细致的筛选。本实验中以初步的最适温度为标准，设置梯度为 2℃ 的退火温度，确定引物的最佳退火温度。最终获得电泳条带清晰、明亮、单一的引物共 10 对。分别为：*trnD(GUC)-psbM*、*matK*、*ndhJ-trnF(GAA)*、*ndhC-trnV(UAC)*、*ycf6-psbM*、*rps12-rpl20*、*atpH-atpI*、*ndhA intron*、*trnC(GCA)-ycf6*、*trnC(GCA)-rpoB*。

表一：引物序列

Region ^a	Forward ^b	Reverse ^b	T ^o	Length ^d
<i>trnD(GUC)-psbM</i>	GGGACTGTAGTTCAATCGGT ^{*2}	ACTCCCTCACTAAGAAAAAG ^{*2}	48	651
<i>matK</i>	CGTTTAATCACTCGAATGTATCA ⁵	AACATGTTGATCGTAAATAA ^{*4}	48	498
<i>ndhJ-trnF(GAA)</i>	ATGCCYGAAAGTTGGATAGG ¹	CTCGTGTCAACCAGTTCAAAT ¹	50	643
<i>ndhC-trnV(UAC)</i>	TATTATTAGAAATGYCCARAAAATATCATATTC ¹	TCATATACTAAAACCCGATTGC ¹	50	605
<i>ycf6-psbM</i>	ATGGAAGTAAATATTGTCGC ^{*2}	TCCATTGATTTGATTGTTTCG ^{*2}	52	558
<i>rps12-rpl20</i>	AATAGAAACACAAGACAGCCAAT ^{*2}	ACGTCCTCTCTATACACCG ^{*2}	52	515
<i>atpH-atpI</i>	CCAAYCCAGCAGCAATAAC ¹	GTATATGGAATTTAATGCCTAGAAG ¹	52	551
<i>ndhA intron</i>	GGTTGACGCCACAGATTCCA ^{*1}	GAATCCTTATGGGGCTTTACG ^{*1}	58	597
<i>trnC(GCA)-ycf6</i>	GCCCGAGCAAGACTTACTATATCCAT ^{*2}	TACGAGTGCTCAGACATTCA ^{*2}	56	520
<i>trnC(GCA)-rpoB</i>	CACACRGATTTGAACTGGGG ^{*2}	TTGAATGAAAAATGGAAGC ^{*2}	54	573

a Refers to maps by Shaw *et al.*, 2005, 2007.

b Internal primers designed in this study in noncoding portions are identified with position of 5' with repspect to the 5' of the forward primer, using sequences of *A. bertolonii* as references.

c Annealing temperature (°C).

d Amplicon length are inferred from *A. bertolonii* sequences.

* Modified from:

1 Shaw *et al.*, 2007

2 Shaw *et al.*, 2005

3 Taberlet *et al.*, 1991

4 Johnson & Soltis, 1994

5 This study

下图展示的是 2 对引物的 4 个样品电泳结果。

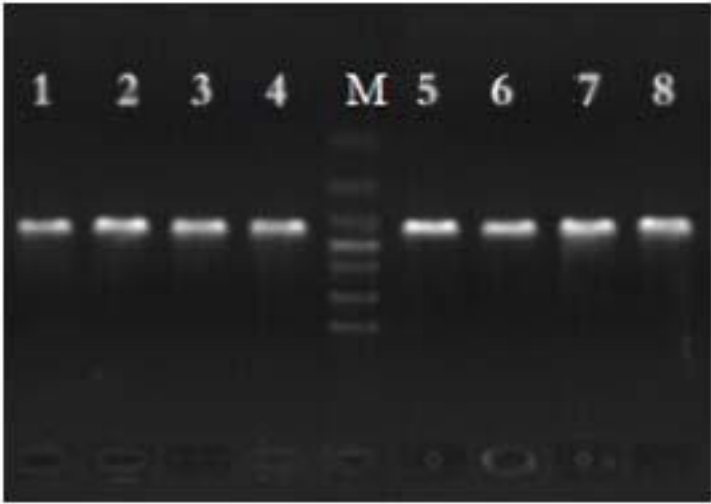


图 1：引物电泳结果

2.2 基于 cpDNA 序列的系统发育分析

分子系统发育树的构建共使用 20 个不同耧斗菜物种 cpDNA 拼接序列。由于前期分别对 20 个物种的 10 种不同单个基因组序列进行处理时发现，各个物种间变异个数过少，导致分辨率较低，无法进行有效的发育树构建，所以分别将 20 个不同物种的基因组序列进行序列拼接。后使用 ClustalX 软件和 BioEdit 软件对 20 种耧斗菜物种叶绿体扩增 DNA 序列进行比对，手动将两端切齐调整后进行分析。将比对校正后的序列保存成 Fasta 文件格式，使用 MEGA 软件，运用 Test Neighbor-Joining 法对测序结果进行系统发育树的构建。在分析过程中，Gaps 作缺失处理。

选择外类群时，一般选择亲缘关系较近种作为外类群。若所研究的种与外类群的亲缘关系太远，则会导致 cpDNA 序列差异太大，因此排序较为困难。李春雨等人推测天葵属可能起源于耧斗菜属和尾囊草属杂交的祖先。Tucker 对耧斗菜属与天葵属的花发育研究 (Tucker *et al* 2005)表明天葵属花瓣发育与耧斗菜属中无距耧斗菜 (*A. ecalcarata*) 非常相近，故选用天葵属植物作为本实验外类群。

从幼苗发育形态、植株的形态学特征方面分析，长白耧斗菜高 15-40 厘米，茎下部无叶，茎上部常具 1 叶，萼片蓝紫色，瓣片淡黄色，距蓝紫色，渐细，顶端钩状弯曲。尖萼耧斗菜茎高 40-80 厘米，萼片紫色，花瓣黄白色，距长 1.5-2 厘米，末端强烈内弯呈钩

状。小花耧斗菜，茎高 15-45 厘米，萼片蓝紫色，生林缘，具短距，距长 3-5 毫米，末端直或微弯。华北耧斗菜，茎高 40-60 厘米，萼片紫色，花瓣紫色，顶端圆截形，距长 1.7-2 厘米，末端钩状内曲。但从耧斗菜属植物花的形态特征分析可知，长白耧斗菜和尖萼耧斗菜有较近的亲缘关系。

用 Test Neighbor-Joining 构建分子系统发育树，建树结果参照图 2。其中长白耧斗菜、尖萼耧斗菜、小花耧斗菜和华北耧斗菜为带黑色圆点。

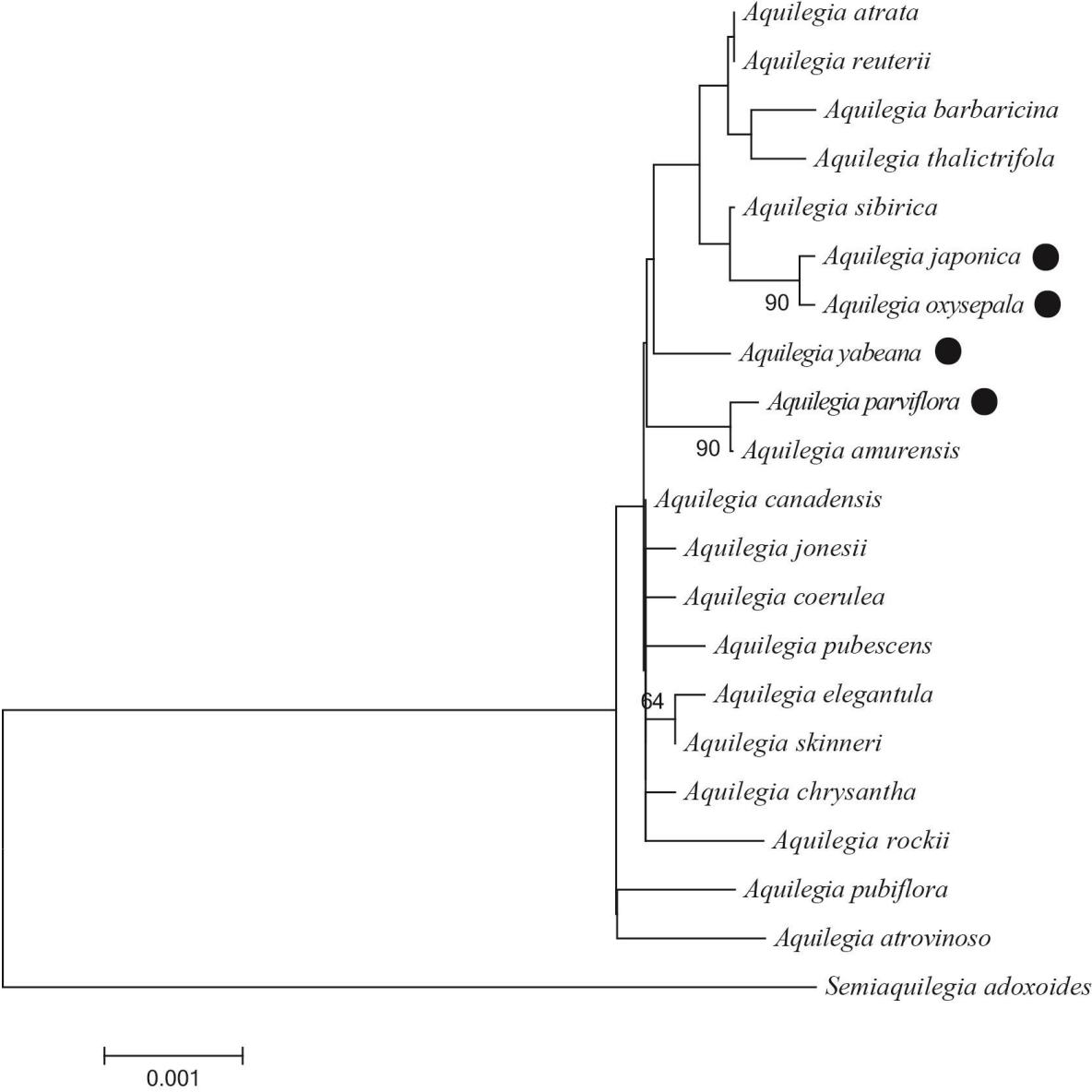


图2 NJ 聚类树

根据分子系统发育树的分枝情况可分为四组，第一组包括 *A. canadensis*、*A. jonesii*、*A. coerulea*、*A. pubescens*、*A. elegantula* 和 *A. chrysantha*、*Aquilegia skinneri* 和 *A. rockii*，主要起源于北美洲美国和墨西哥等地区。根据形态学特征分析，*A. canadensis* 和 *A. chrysantha* 花色为红色或黄色，其余为蓝紫色。根据 Hodges 和 Arnold(1994b)对种群进行的遗传分析，证实了花部性状以及种的遗传标记均与分布生境和传粉者密切相关，所以传粉者的转变可能是耧斗菜属植物花色变化的诱因。这一组的耧斗菜属物种无法形成聚合枝可能是由于所使用的 cpDNA 序列中变异位点过少导致无法进一步进行区分。第二组包括 *A. yabeana*、*A. parviflora* 和 *A. amurensis*，起源于亚洲中东地区，多生长于西藏、云南、四川等地。从分子发育分析图可知，这一组由两个平行枝组成，其 *A. yabeana* 采自华北地区赤峰，*A. Parviflora* 采自长白山区，其分化原因可能是由于地理因素导致。第三组包括 *A. pubiflora* 和 *A. atrovinosa*，其花为暗紫色，多生长于新疆和哈萨克斯坦等地区。第四组包括 *A. atrata*、*A. reuterii*、*A. barbaricina*、*A. thalictrifolia*、*A. sibirica*、*A. japonica* 和 *A. oxysepala*，建树结果表明这一枝出现分枝，其原因可能为地理位置上的隔离。但在东北地区一定范围内的不同耧斗菜物种可以产生基因交流，如 *A.japonica* 和 *A.oxysepala*。其中，*A.oxysepala* 为变种，Taylor (1984)的实验表明可能由于种间杂交和地理隔离等因素产生多种变种，*A.oxysepala* 和北美地区耧斗菜不易产生杂交，由此说明

并非所有的耧斗菜属物种间均为杂交亲和。

如图可知, *A.japonica* 和 *A.oxysepalae* 具有高达 90%的支持率, 表明长白耧斗菜和尖萼耧斗菜的亲缘关系最近。根据其形态特征, 两者距的分化相似性高即末端强烈内弯呈钩状, 从另一种分类方式说明两者具较高的亲缘关系。*A.parviflora* 和 *A.yabeana* 由于地理位置的差异已呈现出不同的分化趋势, 符合其根据距的分化所进行的形态学特征分类, 即 *A.parviflora* 具有较小的距且末端直或微弯; *A.yabeana* 距相对较长, 末端钩状内曲。

3. 讨论

综上所述, 根据形态特征和地理分布进行植物分类的确可以对植物进行整体性整合分类, 但是由于耧斗菜属植物可以进行种间杂交, 并且随着传粉媒介对花距性状的选择而诱发的性状改变, 基于形态特征的分类不能够完全满足耧斗菜属植物的分类。由实验可知, 这种根据 cpDNA 基因组序列谱系发育分析和前人在耧斗菜属内依据花瓣和传粉者而划分的属下分类系统大部分重合。由此可知, 叶绿体基因组更适合进行植物的系统发育分析, 在耧斗菜属植物划分上具很好的分类学意义。耧斗菜属植物测序的完成与下一代定序技术的发展, 为耧斗菜种群水平上的基因表达和序列变异研究以及其他性状的进化研究提供了可能 (Hodges and Derieg, 2009)。而我国耧斗菜属植物资源丰富, 但目前研究甚少, 在将来的研究中应在形态学基础上充分利用分子系统学研究技术, 开展大量遗传学等方面的研

究，这不仅对耧斗菜属植物的分类具有重要意义，而且对被子植物的进化比较等研究也具有重大意义。

参考文献

1. Anon. 1984 *Aquilegia formosa* and its relatives. Newsl. Friends Bot. Gard. (St. Andrews), no.17: 5-6 (1984) –
2. Baker_HG 1976 Analysis of amino acids in flower nectars of hybrids and their parents, with phylogenetic implications. New Phytol. 76, 87-98.
3. Barthlott W. 1981 Epidermal and seed surface character of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects. Norddordic Journal of Botany 1 (3): 345-355
4. Prazmo, W. 1965. Cytogenetic studies on the genus *Aquilegia*. IV. Fertility relationships among the *Aquilegia* species. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 34:667–685.
5. Kramer, E. M., V. S. Di Stilio and P. Schlüter. 2003 Complex patterns of gene duplication in the APETALA3 and PISTILLATA lineages of the Ranunculaceae. International Journal of Plant Sciences, 164:1-11
6. Kramer EM, VE Irish 2000 Evolution of the petal and stamen developmental programs: evidence from comparative studies of the lower eudicots and basal angiosperms. Int J Pl Sci 161(Suppl):S29-S40.
7. Huang S.Q., 2007, Studies on plant-pollinator interaction and its significances, Shengwu Duoyangxing (Biodiversity Science), 15(6): 569-575 (黄双全, 2007, 植物与传粉者相互作用的研究及其意义, 生物多样性, 15(6): 569-575)
8. Anderson E., and Brenhilda S., 1931, Species hybrids in *Aquilegia*, Annals of botany, 45(180): 639-646
9. Azucena C., Ricardo P., Mónica M., María C.C., and Carlos M.H., 2007, Intra-plant variation in nectar sugar composition in two *Aquilegia* species: contrasting patterns under field and glasshouse conditions, Annals of Botany, 99: 653-660
10. Gould B., and Kramer E.M., 2007, Virus-induced gene silencing as a tool for functional analyses in the emerging model plant *Aquilegia* (columbine, Ranunculaceae), PlantMethods, 3(1): 6
11. Brunet J., and Eckert C.G., 1998, Effects of floral morphology and display on outcrossing in blue columbine, *Aquilegia caerulea* (Ranunculaceae), Functional Ecology, (12): 596-606
12. 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京:北京科学出版社, 2001.
13. 胡春云, 郑小艳, 滕元文. 梨属叶绿体非编码区 trnL-trnF 和 accD-psaI 特征及其在系统发育研究中的应用价值[J]. 园艺学报, 2011, 38(12)3: 2261–2272.
14. Yang J.L., Eckert G., and Hodges S.A., 2005, Cross-species amplification of microsatellite loci in *Aquilegia* and *Semiaquilegia* (Ranunculaceae), Molecular Ecology Notes, 5(2): 317-320
15. Yao D.Q., Zhang W.W., Yuan L.H., Pan J.S., He H.L., and Cai R., VIGS: the revolution of plant function genomics research, Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding), 7 (1):155-161 (姚丹青, 张微微, 原丽华, 潘俊松, 何欢乐, 蔡润, 2009, VIGS: 植物功能基因组学研究的革命, 分子植物育种, 7(1): 155-161)
16. Zhang X., and Borevitz J., 2007, SNP/tiling arrays for genotypeing, mapping, and QTL candidate gene identification, Molecular Plant Breeding, 5(2): 240 (Chinese Journal in English)
17. Wang W, Lu A-M, Ren Y, Endress ME, Chen Z-D. 2009b. Phylogeny and classification of Ranunculales: evidence from four molecular loci and
18. morphological data. Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics 11:81–110.
19. Weber W. 2003. The Middle Asian Element in the Southern Rocky Mountain Flora of the western United States: a critical biogeographical review. Journal of Biogeography 30: 649–685.