



东北师范大学

长白山野外实习论文

基于 cpDNA 序列对长白山区五加科植物系统发育的研究

实习组别： 11 组

指导教师： 孙明洲

小组成员：李倩倩 刘奉天 林秀芳 宋晨阳

贲旻熙 曹静娴 张国丽 陆世华

二〇一四年十月

基于 cpDNA 序列对长白山区五加科植物系统发育的研究

李倩倩 刘奉天 林秀芳 宋晨阳 贾旻熙 曹静娴 张国丽 陆世华
(东北师范大学生命科学学院, 长春 130024)

摘要: 本研究对长白山区分布的五加科(Araliaceae) 5 属 6 种植物的 cpDNA 序列进行测序, 以伞形科当归属(*Angelica*)的朝鲜当归(*A. gigas* Nakai, NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 为外类群, 比较分析了 *matK* 和 *ndhF* 两个基因片段, *matK* 片段的长度为 834 bp~2576 bp, *ndhF* 片段的长度为 1935bp~2226 bp。本研究采用邻接法 (NJ), 对五加科的系统发育关系进行了研究和分析, 从而在分子水平上揭示植物系统发育与进化的真实本质。分析结果表明, cpDNA 序列用来探讨组 (Section) 或系 (Series) 一级分类单位之间的系统发育关系更加可靠。结合形态学特征, 以及 Genbank 中的五加科植物的序列比对, 本研究倾向于何景 (西北师范大学) 建立的中国五加科植物的分类系统^[1]。本研究为进一步探讨五加科植物的系统演化关系、谱系发育、品种选育等后继工作提供了新的参考和理论依据。

关键词: 五加科; cpDNA 序列; 系统发育; 长白山

Phylogeny of Araliaceae in Changbai Mountain Based on Sequence Data of Chloroplast DNA

LI Qian-qian, LIU Feng-Tian, LIN Xiu-Fang, SONG Chen-Yang, BEN Min-Xi,
CAO Jing-Xian, ZHANG Guo-Li, LU Shi-Hua
(Life Science, Northeast Normal University, Changchun 130024, China)

Abstract: We sampled six species representing-belonging to five genres in Araliaceae and an outgroup (Umbelliferae) and sequenced their cpDNA. We analyzed *matK* and *ndhF* gene sequence. The *matK* sequence length is 834 bp~2576 bp and the *ndhF* sequence length is 1935bp~2226 bp. A more consistent systematic tree was constructed by cluster analysis with neighbor-joining method taking-with *Angelica gigas* Nakai as the outgroup. This study was in molecular level in order to reveal the objective law of plant phylogeny and evolution. The analysis indicates that the cpDNA sequence is more effective in studying the phylogenetic relationships among groups of section or series. Through analysis on both the molecular data and morphological characteristics, considering the sequence of Chinese Araliaceae species in Genbank, our study supports the classification system of Chinese Araliaceae species established by He Jing^[1]. This study provides new data and evidence for further research on the phylogenetic and phylogeographic relationships of Araliaceae.

Key words : Araliaceae; cpDNA sequences; Phylogeny; Changbai Mountain

五加科植物为乔木、灌木或木质藤木, 少为多年生草本, 常有刺。单叶、羽状复叶或掌状复叶, 互生, 稀对生或轮生。花辐射对称, 两性或杂性, 稀单性异株, 多聚成伞形花序,

或为头状、总状或穗状花序，或再组成复花序；苞片及小苞片小，宿存或早落；萼筒与子房合生，顶端具萼齿或呈波状或全缘；花瓣通常 5（有时 3 至 10 余）；雄蕊与花瓣同数而生，有时为花瓣的 2 倍或无定数，花药丁字状着生；子房下位，2—15 室，稀 1 室或更多室，花柱与子房室同数，离生或不同程度合生，胚珠倒生，单个悬垂于子房室顶端。果实为浆果状核果、核果或浆果。种子通常侧扁^[3]。

本科药用植物甚多，已知可供药用的有 114 种，其中，如人参(*Panax ginseng* C.A.Mey)、西洋参(*Panax quinquefolius* L.)、三七(*Panax pseudoginseng* Wall. var. *notoginseng*(Burkill) Hoo et Tseng)、竹节参(*Panax pseudoginseng* Wall. var. *japonicus* (C. A. Mey.) Hoo et Tseng)、槲木(*Aralia chinensis* L.)等均属珍稀名贵药材。本科的模式种为美洲刺参(*Oplopanax horridus* Miq)。五加科植物约有 80 余属、900 多种，广布于两半球的温带和热带地区；中国约分布有 23 属、160 种；其中，东北地区产 5 属 7 种。

前人在五加科分类中依据形态学特征进行了大量的研究，G.Bentham(1867)最早根据花瓣在花芽中的排列情况、雄蕊数目以及胚胎类型等特征，将当时已发表的 38 个属，分为 5 个族。H.Harms(1894)比较全面总结早期的工作，将五加科分为 3 族。J.Hutchinson(1967)将五加科分为 7 族。在编写中国植物志时（第五十四卷），何景与曾沧江对中国五加科植物分类上提出了将五加科分为五族的新纲要^[2]，以其科学性和独创性在植物分类研究方面达到国际先进水平，被瑞典和苏联学者誉为“自 1894 年以来最完善最科学的植物分类系统”。

目前国内五加科植物研究较多的向其柏等^[4-6]，也依然只是运用形态学手段在大参属^[7]、槲木^[8]属等属内进行分类研究，而在科内的分子系统学研究方面不足。植物系统发育研究已不再局限于以植物丰富的形态特征为依据，目前利用 DNA 测序以及分子标记等分子生物学手段进行植物分子系统学研究已经十分普遍。分子数据是独立于形态学性状的数据，易于获取和分析，且排除了人为主观的因素，能有效的弥补形态分类学研究的不足^[9]。

植物叶绿体基因组(cpDNA)为单亲遗传，其 DNA 片段容易扩增和测序，因而被广泛的应用于分子系统学研究。但叶绿体基因组序列相对保守，进化速率较慢，在属下类群的系统学研究中应用有限^[10-12]。本研究是基于科类群的系统发育研究，此外，五加科核基因的应用有难度，进行叶绿体 DNA 片段有效筛选，适当增加用于研究分析的叶绿体 DNA 片段数目，仍然不失为一个直接可行的方法^[14-15]。基于上述原因，本研究筛选了 2 个的叶绿体片段(matK、ndhF)用于五加科分子系统树的构建，据此探讨该科的 5 个近缘类群，五加属、槲木属、刺楸属、刺参属和人参属的系统位置、分类学范围以及相互间的亲缘关系等系统学问题^[16-17]。

目前，基于叶绿体基因探讨我国长白山区^[13]五加科植物系统发育的相关研究还未见报道。本研究将利用长白山区五加科植物部分种的叶绿体基因组序列，结合其形态学特征、生境差异等综合探讨长白山区五加科植物的系统发育关系，旨在对经典分类系统进行验证和探讨。同时，为进一步研究和探讨五加科植物的系统演化、品种选育等提供新的参考和依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

试验所用材料均为用硅胶进行干燥处理后的植物叶片。本实验所用的 6 种样品均采集自地处长白山腹地的抚松县露水河镇，采集地点的详细信息参见表 1。

表 1 五加科植物样品采样点概况

样品名称	学名	采样地	样品数（个）
------	----	-----	--------

无梗五加	<i>Acanthopanax sessiliflorus</i> Seem	露水河红松王	5
刺五加	<i>Acanthopanax senticosus</i> Harms	露水河红松王	2
辽东楤木	<i>Aralia elata</i> Seem	露水河永青林场	1
刺楸	<i>Kalopanax septemlobum</i> Koidz	露水河红松王	3
刺参	<i>Oplopanax elatus</i> Nakai	露水河黎明林场	1
人参	<i>Panax ginseng</i> C.A.Mey	露水河永青林场	7

1.2 实验试剂与仪器

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)
Tag 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, Beckman
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
仪液枪	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

1.3 实验方法

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标本，用康为试剂盒法提取植物体的叶绿体基因组 DNA。

- ①将实验材料放入已灭菌、预冷却的研钵中，液氮冷冻实验材料后，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 700μl 和 2μl β-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 700μl 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 2 ml 离心管中。
- ⑤加入 700 μ l Buffer GP2, 充分混匀。
- ⑥将上一步所得溶液全部加入 Spin Column DM 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 700 μ l Buffer GW1(使用前检查是否已加无水乙醇), 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 700 μ l 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 100 μ l Buffer GE, 室温放置 5 分钟, 10000rpm, 离心 1 分钟, 收集 DNA 溶液, -20° C 低温保存。

1.3.2 聚合酶链式反应(PCR)

PCR 扩增反应体系为 ddH₂O, 10 $\times$ buffer, TaqDNA 聚合酶, BSA, 引物以及模板 DNA。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, 取反应液电泳检查。PCR 扩增产物送至英俊公司进行测序。

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 $\times$ TBE 缓冲液中电泳, 电压为 120V, 在 FOTODYNE 型透射紫外仪上观察。

2 实验结果和分析

2.1 基于 cpDNA 序列分析得到分子系统树

将比对校正后的序列保存成 NEXUS 文件格式, 使用 MEGA 软件^[9], 运用邻接法(NJ)对测序结果进行系统发育树构建。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属作为外类群。如果所研究的属与外类群的亲缘关系太远, 就会导致 cpDNA 序列差异太大, 因此排序比较困难^[18]。从幼苗发育形态、植株的形态学特征来看, 五加科植物与伞形科内的 *A. gigas* Nakai 有较近的亲缘关系, 所以本实验选择亲缘关系较近的伞形科内的 *A. gigas* Nakai 作为外类群。

以伞形科内的 *A. gigas* Nakai 作为外类群, 将 matK 和 ndhF 两个基因片段进行序列分析, 用邻接法(neighbor-joining, NJ)进行聚类分析, 所得分子系统树的结果参见下图。

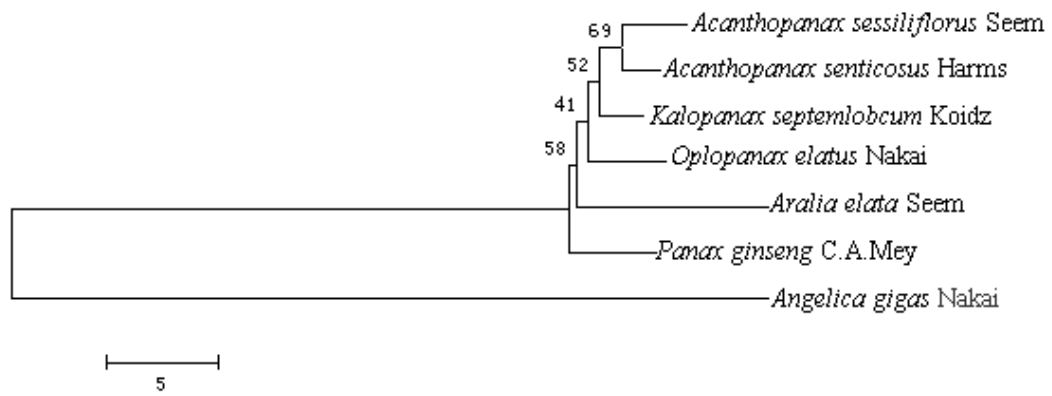


图 2-1 五加科内六个物种及一个外类群的 *matK* 基因 NJ 系统树。
分支长度表示进化速率，数字为各分支的自展支持率。

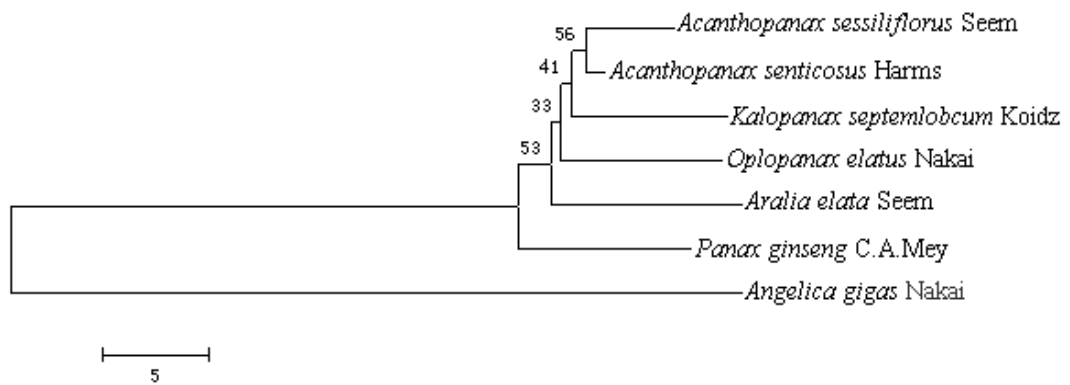


图 2-2 五加科内六个物种及一个外类群的 *ndhF* 基因 NJ 系统树。
分支长度表示进化速率，数字为各分支的自展支持率。

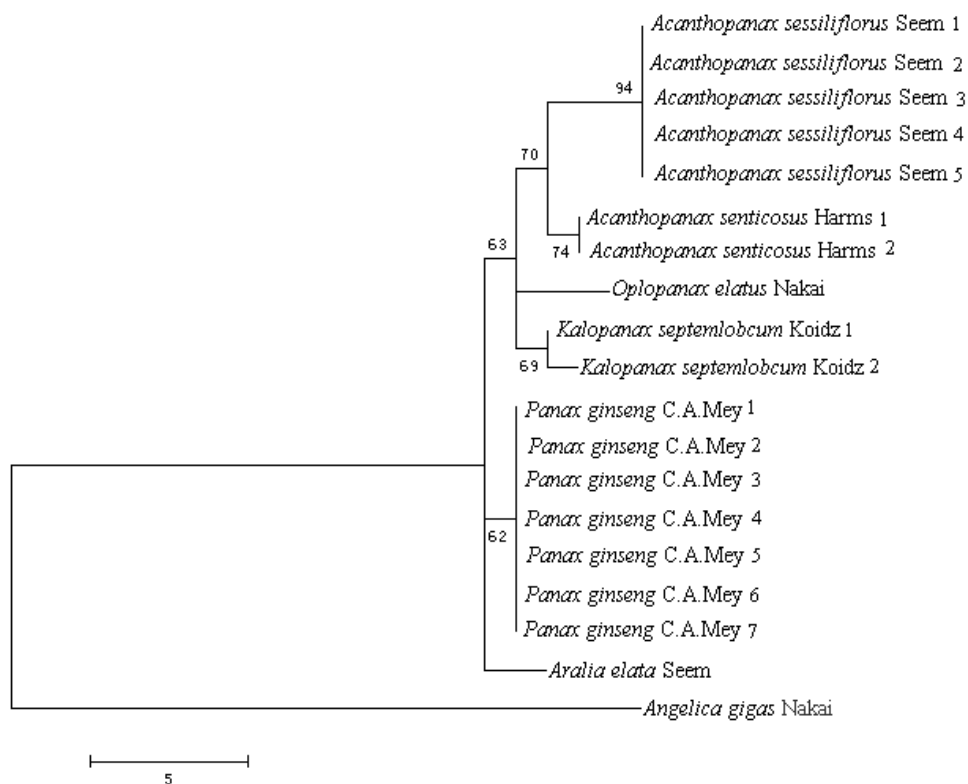


图 3-1 五加科内六个物种多个个体及一个外类群的 *matK* 基因 NJ 系统树。
分支长度表示进化速率，数字为各分支的自展支持率。

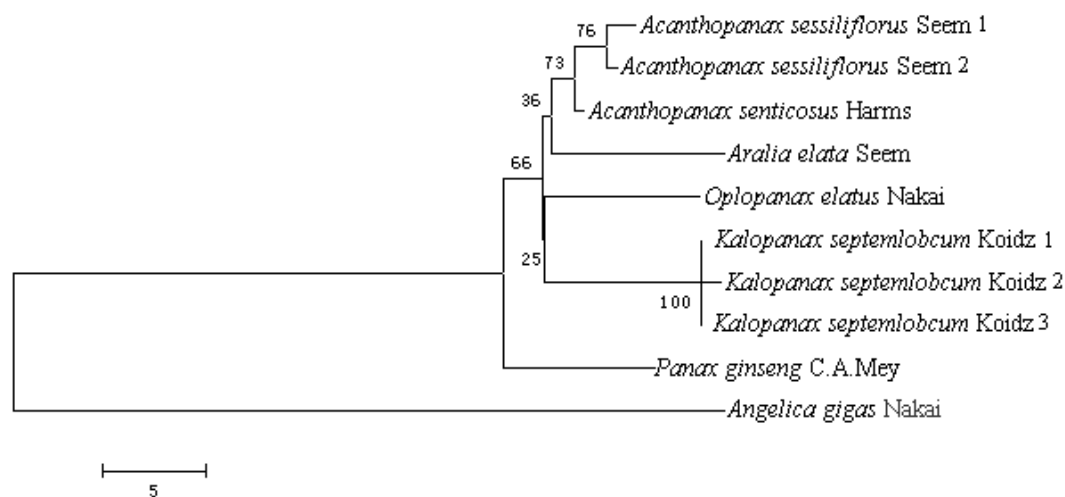


图 3-2 五加科内六个物种多个个体及一个外类群的 *ndhF* 基因 NJ 系统树。
分支长度表示进化速率，数字为各分支的自展支持率。

2.2 基于 *matK* 和 *ndhF* 两个基因片段对五加科系统位置的再分析

从图 2-1 与图 2-2 可以看出:无梗五加(*A.sessiliflorus* Seem)和刺五加(*A. senticosus* Harms)聚到一个枝上，这与《中国植物志》中两者同属于五加属分类一致。其他四个物种分别属于不同属，各占一个分支，五加科内五个属六个种的亲缘关系由远及近依次是：无梗五加(*A.sessiliflorus* See)、刺五加(*A. senticosus* Harms)、刺楸(*K. septemlobcum* Koidz)、刺参(*O. elatus*

Nakai)、辽东槲木(*A. elata* Seem)、人参(*P. ginseng* C.A.Mey)。另外, 两图均表明辽东槲木(*A. elata* Seem)是六个物种中进化速率最快的。

从图 3-1 和图 3-2 可以看出五加科内的六个物种的属间关系比较明确, 但是亲缘关系与图 2-1 与图 2-2 中的结果有差距, 进化速率上也不同。

3 讨论

图 2-1 与图 2-2 结果一致, 但是支持率不高, 分支长短有差别。大体上能对五加科系统分类提供支持依据。图 3-1 和图 3-2 结果差异更大。结果不理想的原因复杂多样, 一般有两点比较重要: 一, 缺乏合适的 DNA 片段, 在很大程度上会对该科的分子系统学研究造成影响; 二, 由于染色体多倍化, 形成了复杂的基因进化背景, 这也将增加系统分析的难度。

目前, 五加科仍然缺乏一个可信度较高的分子系统发育框架, 主要原因可能由于五加科物种数量众多, 系统演化关系较为复杂, 亲缘关系及进化程度等方面仍不明确。因此, 五加科的系统发育以及相互间的亲缘关系等系统学问题有待进一步研究。本研究为五加科的系统发育研究提供了依据。

[参考文献]

- [1]何景.中国植物志（第五十四卷）[M].北京:科学出版社.1978.
- [2]曾沧江,何景.五加科分族新纲要.植物分类学报.1982,20(2).
- [3]傅沛云等.东北植物检索表[M].北京:科学出版社.1995:452-460.
- [4]向其柏.五加科植物的新分类群及某些修订[J].南京林学院学报.1985,2.
- [5] Porter P. LOWRY II, SHANG Chih-Bei. Contributions to the study of Chinese Araliaceae: New species and synonyms in *Brassaiopsis* and *Schefflera*. 植物分类学报. 2006, 44 (6): 641-648.
- [6]邓云飞.中国五加科植物资料.云南植物研究.2002,24(5):603-606.
- [7]向其柏.五加科大参属的研究[J].南京林学院学报.1985,1.
- [8]李湘萍,向其柏.中国槲木属的研究[J].南京林业大学学报.1992, 16(2).
- [9]方伟,杨俊波,杨世雄,李德铎.基于叶绿体四个 DNA 片段联合分析探讨山茶属长柄山茶组、金花茶组和超长柄茶组的系统位置与亲缘关系.云南植物研究.2010,32(1):1-13.
- [10]汪小全,洪德元.植物分子系统学近五年的研究进展概况.植物分类学报.1997,35(5):465-480.
- [11]张韵洁,李德铎.叶绿体系统发育基因组学的研究进展.植物分类与资源学报.2011,33(4):365-375.
- [12]万海清,梁明山,许介眉.分子生物学手段在植物系统与进化研究中的应用.植物学通报.1998,15(4):8-17.
- [13]涂英芳,杨野,衣俊鹏等.长白山野生观赏植物[M].北京:中国林业出版社.1993.
- [14]田欣,李德铎.DNA 序列在植物系统学研究中的应用.云南植物研究.2002,24(2):170-184.
- [15]杨俊波,杨世雄,李德铎,雷立公,池田达哉,吉野熙道.基于 *matR* 基因序列分析的山茶科系统关系.云南植物研究.2006,28(1):29-36.
- [16]陈永燕,李德铎,王红.基于三个 DNA 片段讨论菖蒲科的分子系统学.云南植物研究.2002,24(6):699-706.
- [17]郑小艳,曹家树,滕元文.DNA 序列分析在植物分子系统学研究中的应用现状——以蔷薇科为例.园艺学报.2009,36(12):1827-1836.
- [18]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.