

长白山野外综合实习论文



长白山槭属植物系统发育关系研究

实习组别: _____ 植物 2 组 _____

小组组长: _____ 曹外芳 _____

小组成员: _____ 付颖 谭瑾 王曼祺 喻桂辉 _____

_____ 赵静珂 钟希悦 周晨 _____

指导老师: _____ 孙明洲老师 _____

2016 年 9 月 7 日

长白山槭属植物系统发育关系研究

曹外芳 付颖 谭瑾 王曼祺 喻桂辉 赵静珂 钟希悦 周晨
(东北师范大学生命科学学院·长春 130024)

摘要 本课题是针对长白山地区十种常见的槭属植物进行的研究，通过前期在 NCBI 数据库下载与研究对象有关的分子学数据，以及后期的分子实验获得了十种槭属植物的 cpDNA 序列。我们以与槭属植物亲缘关系较近的槭树科金钱槭属中的金钱槭为外类群，比较分析了十种槭树 *psbA-trnH*、*trnL-trnF*、*rpL16* 三个基因片段，并将三个片段比对校正后拼接成一个序列，用邻接法（neighbor-joining method）进行聚类分析，并建立了单倍型网络图。该研究从分子水平上揭示了长白山十种常见的槭属植物系统发育的关系与进化的本质，为槭属植物的分类与利用提供了参考和理论依据。

关键词 槭属；cpDNA 序列；系统发育；长白山地区

Phylogeny of *Acer* Linn. in Changbai Mountain

CAO Wai-Fang FU Ying TAN Jin WANG Man-Qi
YU Gui-Hui ZHAO Jing-Ke ZHONG Xi-Yue ZHOU Chen
(School of Life Sciences, Northeast Normal University, Changchun 130024)

Abstract In this study, both cladistic analysis and phenetic analysis were conducted to evaluate the phylogeny of ten species of *Acer* Linn. in Changbai Mountain. Three gene sequences (including *psbA-trnH*, *trnL-trnF* and *rpL16*) were gotten from NCBI or DNA sequencing, and then we stitched them into one sequence after they were blasted and adjusted. At last, we constructed cluster analysis with neighbor-joining method by taking-with *Dipteronia sinensis* Oliv. as the outgroup. Haplotype net workgraph was also drawn. This research in molecular level concentrates upon revealing the objective law of phylogeny and evolution of *Acer* Linn. in Changbai Mountain. New data and evidence for further research on classification system and the use of *Acer* Linn. were also proposed.

Key words *Acer* Linn.; cpDNA sequences ; Phylogeny ; Changbai Mountain

系统发育，是指某一个类群的形成和发展过程。植物物种的系统发育关系和物种形成过程一直以来都是植物进化生物学研究中最基本的问题。系统发育关系的重建能够很好的解决各个物种间的关系，而物种形成研究是理解自然界物种多样性产生和变化的基础^[1]。

随着 20 世纪 50 年代以来分子生物学理论和技术手段的发展，以及分子进化中性理论的提出，大大推动了生物系统分类的飞速发展，衍生出新的学科——分子系统学（molecular phylogenetics），即通过对生物大分子（蛋白质、核酸等）序列的变异和分子进化的研究，来阐明生物各类群（包括已绝灭的生物类群）间的谱系发生关系。在过去的 30 多年间，伴随着一系列基因组计划的实施，以及二代高通量测序技术的成熟和第五代纳米孔单分子测序技术的出现，DNA 数据量呈爆炸式的增长，使分子系统发育理论和技术被广泛应用于生物各个分支的系统发育和分类研究中，促进了人们对一些重要植物类群系统发育关系、物种形成及生物地理学的认识。

叶绿体分子系统学通过对叶绿体中所含的遗传物质进行分析来探讨植物的系统发育关系，它具有如下特点：(1)cpDNA 序列和基因排列顺序的高度保守为获取数据提供了便利条件，使得 cpDNA 的分子数据积累很快；按目前的技术条件，一个月甚至一两个星期就能构建一种植物 cpDNA 限制图谱所需的整套分子杂交资料；(2)当用限制位点突变进行分析时，每个位点可以作为一个简单的二态性状处理；当分析核营酸序列数据时，每个核苷酸位置可以作为四态性状处理，构建数据矩阵很方便；(3)cpDNA 数据中的同型异源性的总体水平只有 3.9%，趋同演化和平行演化很少发生^[2-4]。

目前利用核苷酸序列对不同类群的系统发育关系、物种形成模式及生物地理学的研究已经非常成熟^[5]。

槭属（*Acer* Linn.）隶属于槭树科（Aceraceae），是一类观赏价值极高、具有较大经济利用价值的木本植物。世界范围内，目前已发现约 200 余种槭属植物，多分布于亚洲、欧洲、北美洲、非洲北部。其中，有 160 余种在中国有所分布，足可见中国拥有着极其丰富的槭树资源，是世界槭树的现代分布中心^[6]。

槭属植物多为乔木或灌木，落叶或常绿。冬芽具多数覆瓦状排列的鳞片，或仅具 2 或 4 枚对生的鳞片。叶对生，单叶或复叶（小叶最多达 11 枚），不裂或分裂；花序由着叶小枝的顶芽生出，下部具叶，或由小枝旁边的侧芽生出，下部无叶；花小，整齐，雄花与两性花同株或异株，稀单性，雌雄异株；萼片与花瓣均 5 或 4，稀缺花瓣；花盘环状或微裂，稀不发育；雄蕊 4-12，通常 8，生于花盘内侧、外侧，稀生于花盘上；子房 2 室，花柱 2 裂稀不裂，柱头通常反卷；果实系 2 枚相连的小坚果，凸起或扁平，侧面有长翅，张开成各种大小不同的角度^[7]。

槭属植物中的许多类群是研究东亚和北美植物间断分布的典型材料，因此深受广大学者的青睐。槭属与其近缘属的分类界限清楚，依据其叶对生以及翅果等同源特征易与其它近缘类群区分，但槭属分类研究因其形态特征变异显著且高度可塑性而引起广泛争议。自从 19 世纪末

以来,不同的学者建立了各自不同的分类系统,导致此属下分类一度模糊不清^[8]。同时,也有学者认为,槭属植物组间演化线在长期演化过程中丢失,或者因为在极短时间内许多组就已分化完成,因而导致槭属属下分类较为困难^[9]。

目前,国内对于槭树植物的相关研究主要集中在引种、栽培技术、生理、形态学以及分类等方面,而利用分子生物学手段对多种槭属植物进行系统研究的比较少^[10]。刘旭等^[11]利用 ISSR 标记对长白山地区 9 种主要槭属植物进行遗传多样性分析,结果表明,长白山地区主要槭属植物 ISSR 标记结果与叶片形态学有一定的相似性,但多数实验材料的亲缘关系与形态特征关系不大。李倩中等^[12]采用 SRAP 分子标记分析 31 份槭属植物材料的遗传多样性及亲缘关系,表明植物材料多态性比率为 98.04%,材料间遗传相似系数变幅较大,为 0.387,说明 31 份槭属植物间分化明显,在 DNA 水平上存在较高的遗传多样性。

本研究利用长白山区 10 种常见槭属植物的 cpDNA 序列,以金钱槭为外类群,比较分析了研究对象的三个基因片段 (*psbA-trnH*、*trnL-trnF*、*rpl16*),使用邻接法进行聚类分析,并结合其形态学特征综合探讨长白山区槭属植物的系统发育关系,为槭属植物的分类与利用提供新依据。

1. 实验材料

选取长白山地区的十种槭属植物为研究对象,包括色木槭 (*Acer mono Maxim*)、元宝槭 (*Acer truncatum Bunge*)、小楷槭 (*Acer komarovii Pojark*)、花楷槭 (*Acer ukurunduense Trauty.Et Mey*)、簇毛槭 (*Acer barbinerve Maxim*)、青楷槭 (*Acer tegmentosum Maxim*)、白牛槭 (*Acer mandshuricum Maxim*)、拧筋槭 (*Acer triflorum Kom*)、茶条槭 (*Acer ginnala Maxim*)、假色槭 (*Acer pseudo-sieboldianum (Pax.) Komarov*)。材料采集后用硅胶干燥备用。采集地点的详细信息见表 1。

表 1 十种槭属植物样品采样点概况

样品名称	拉丁学名	采样地	样品编号
青楷槭	<i>Acer tegmentosum Maxim</i>	永青林场	AB1
元宝槭	<i>Acer truncatum Bunge</i>	永青电站	AC1
拧筋槭	<i>Acer triflorum Kom</i>	二十一林斑	AD1
小楷槭	<i>Acer komarovii Pojark</i>	永青电站	AE1
簇毛槭	<i>Acer barbinerve Maxim</i>	二十一林斑	AF1
花楷槭	<i>Acer ukurunduense Trauty.Et Mey</i>	露水河南山	AG1
色木槭	<i>Acer mono Maxim</i>	永青林场	AH1
白牛槭	<i>Acer mandshuricum Maxim</i>	永青电站	AI1
茶条槭	<i>Acer ginnala Maxim</i>	二十一林斑	AJ1
假色槭	<i>Acer pseudo-sieboldianum (Pax.) Komarov</i>	永青电站	AK1

2 实验方法

2.1 收集数据

访问 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 查找十种槭属植物和外类群金钱槭的

cpDNA 序列，经过数据的收集与分析，最终选择使用以 *rpL16*、*trnL-trnF*、*psA-trnH* 三个叶绿体基因片段对槭属植物的系统发育关系进行研究。对于未在数据库中查找到的序列，将会在实验室中进行分子学实验，对其进行补充。

2.2 分子生物学实验

2.2.1 植物基因组 DNA 的提取

选择需要进行分子实验补充实验数据的植物叶片作为实验材料，使用试剂盒法提取植物体的基因组 DNA。

①称取适量的植物材料，并转移至2mL离心管中，将实验材料置于研磨机中研磨、粉碎，该过程尽量保证低温操作。

②将已研磨成粉末的实验材料加入提前预热至65℃的Buffer GP1液700μL 和0.7μL β-巯基乙醇，迅速颠倒混匀，65℃水浴加热1h，每10min混匀一次。

③加入700μL氯仿，充分混合均匀。

④12000rpm，离心5min，小心地将上清液转至到洁净的1.5mL离心管中。

⑤ 加入700μL 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），12000rpm，离心30s，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700μL Buffer GW1(使用前检查是否已加无水乙醇)，12000rpm，离心30s，弃废液。将Spin Column DM放回Collection Tube中。

⑧向Spin Column DM中加入700μL Buffer GW2，离心30s，弃废液。

⑨重复操作⑧一次。

⑩12000rpm离心2min，弃废液。将Spin Column DM置于室温放置5min，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180μL Buffer GE，室温放置5min，以确保DNA的充分溶解，然后12000rpm，离心5min。收集DNA溶液，-20℃低温保存。

2.2.2 聚合酶链式反应(PCR)

根据不同引物的最适退火温度，结合张冬梅^[10]等关于槭属植物 ISSR 反应体系研究所确定的槭属植物的最适反应体系扩增程序，并对实验条件进行优化，进行如下设计：PCR 扩增反应的总体积为 30μL，主要包括 23.1μL dH₂O，3μL 10X Buffer，0.6μL dNTP，上、下游引物分别为 0.5μL，Taq 酶 0.3μL 以及模板 DNA 2μL。

反应程序为：95℃，5min；95℃，30s；退火温度 48℃，30s；延伸 72℃，90s；35 个循环；延伸 72℃，10min；4℃保存。PCR 结束后，取 5μL 反应液电泳检验。

2.2.3 琼脂糖凝胶电泳与测序

取 40ml 0.5M TBE 缓冲液并称量 0.6g 琼脂糖于锥形瓶中，将其置于微波炉中加热融化，待溶液稍冷却后加入 1.2μL EBF 试剂并混匀、冷却后配制成 1.5%的琼脂糖凝胶，最后将 PCR 产

物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后将其送至测序公司进行测序。

2.2.4 系统树和单倍型的构建

先运用 ClustalX version1.81 软件对 cpDNA 序列进行比对，再使用 BioEdit 软件对对比后的序列进行手动调整，然后用 Dnasp 软件将上一步保存的“*. phy”类型文本转换成“*. meg”文本格式，最后使用 MAGE5 打开文件，设置 Test of phylogeny 为 Bootstrap method，计算次数为 1000，选择 Substitutions type 参数为 Nucleotide，利用 NJ 法构建系统发育树。最后再利用 TCS version 1.21 软件构建单倍型网络图^[13]。

3. 结果及分析

3.1 形态学观察结果

通过对本次实习在长白山地区采集到的十种槭属植物进行观察，并参考《东北植物检索表》^[14]，最后总结出各个物种的形态学特征如表 2 所示。

表 2 十种槭属植物的形态学观察结果

物种名	经典分类	叶型	叶的分裂	叶基形状	果实形状
青楷槭	大花槭组	单叶	3-7 裂，通常 5 裂	圆形或近心形	小坚果微扁平
元宝槭	桐状槭组	单叶	常 5 裂，稀 7 裂	截形，稀近于心形	小坚果压扁状
拧筋槭	三小叶组	复叶	侧脉 11-13 对	顶生小叶基部楔形 或阔楔形，侧生小叶 基部倾斜或钝形	小坚果凸起， 近于球形
小楷槭	大花槭组	单叶	常 5 裂，稀 3 裂，	心形或近于心形 每个裂片再分裂成小裂片	小坚果微扁平
簇毛槭	尖齿槭组	单叶	5 裂	心形或近于心形	小坚果近球形
花楷槭	穗状槭组	单叶	常 5 裂，稀 7 裂	截形或近于心形	小坚果软球形
色木槭	桐状槭组	单叶	常 5 裂，有时 3 裂或 7 裂	截形或近于心形	小坚果压扁状
白牛槭	三小叶组	复叶	侧脉 9-11 对	中生小叶基部楔形， 两侧小叶基部倾形	小坚果凸起
茶条槭	茶条槭组	单叶	较深的 3-5 裂	圆形，截形或略近心形	小坚果凸起，脉 纹显著
假色槭	鸡爪槭组	单叶	9-11 裂	心形或近心形	小坚果凸起， 脉纹明显

3.2 系统发育树的构建与分析

由于单个基因序列各个物种间变异个数较少，分辨率较低，无法进行可信度较高的系统发育树的构建，所以我们分别将同一物种的三个不同的 cpDNA 序列进行拼接，然后使用 ClustalX 软件和 BioEdit 软件对拼接后的序列进行比对，手动将序列两端切齐调整，并将比对校正后的序列保存为“*. meg”文件格式，使用 MEGA 软件，运用 Neighbor-Joining 法对序列进行系统发育树的构建。在分析的过程中，Gaps 作缺失处理。

选择外类群时，一般选择亲缘关系较近属中的物种。如果所研究的属与外类群的亲缘关系太远，就会导致 cpDNA 差异太大，使排序困难。从幼苗的发育形态、植株的形态学特征来看，

槭属植物与金钱槭属中的金钱槭有较近的亲缘关系，所以本研究选择以金钱槭 (*Dipteronia sinensis* Oliv.) 作为外类群^[15, 16]。

根据从 NCBI 数据库下载的十种槭属植物 *rpL16*、*psbA-trnH*、*trnL-trnH* 三个基因片段的 cpDNA 序列以及补充的分子学实验结果，得到图 1 所示的系统树。分支所示数据为重复 1000 次的自展值，该值越大，分支的可信度越高。可能由于由 *rpL16*、*PsbA-trnH*、*TrnL-trnF* 基因拼接而成的 cpDNA 序列相对较为保守，信息位点少，所得到的 NJ 聚类树的分辨率和支持率较低。

由图1可知，通过MEGA软件，运用Neighbor-Joining法计算，对元宝槭 (*Acer truncatum* Bunge) 和色木槭 (*Acer mono* Maxim) 较近的亲缘显示出高的支持率。同时两者形态特征仅在叶基形状有少许差异 (元宝槭一般叶基为截型，色木槭一般为近心型)，也说明了两者可能具有较近的亲缘关系。同时，拧筋槭 (*Acer triflorum* Kom) 和花楷槭 (*Acer triflorum* Kom) 通过计算也显示出较高的支持率，说明两者具有可信度较高的亲缘地理关系，但是从形态学特征来看，两者的分化趋势并非一致。例如，花楷槭的叶型是单叶，而拧筋槭为复叶。假色槭 (*Acer pseudo-sieboldianum* (Pax.) Komarov) 和茶条槭 (*Acer ginnala* Maxim)，聚为一类的支持率仅为45，低于50，分化结果的参考价值较低。

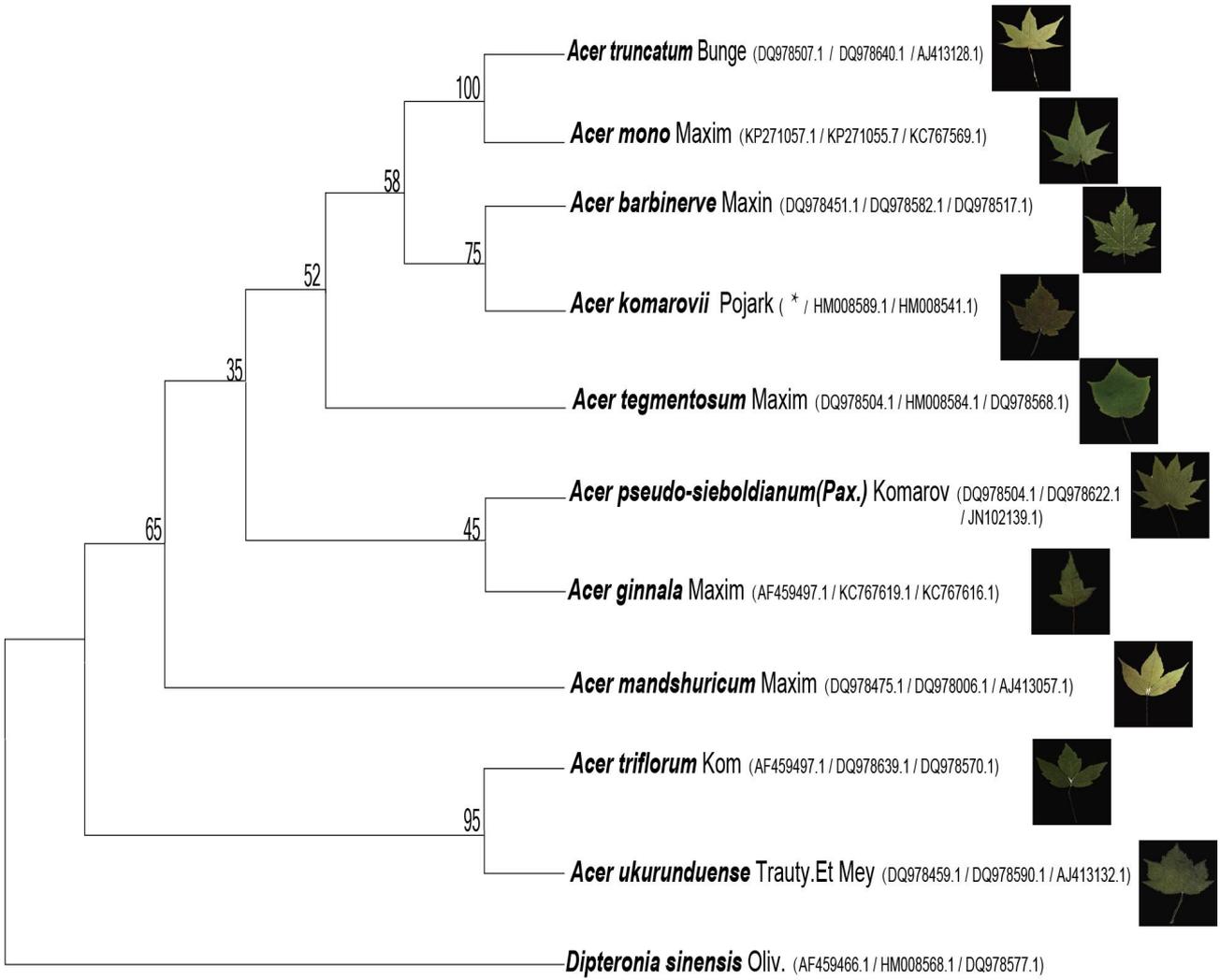


图1 基于槭树 cpDNA 的 NJ 聚类树

注：图中物种拉丁学名后括号内的编号均为建树时所用的 cpDNA 序列在 NCBI 数据库中相应的序列号；“*”表示小组进行分子学实验测得的小楷槭 rpL16 的 cpDNA 序列，在 NCBI 数据库中无对应序列号。

3.3 单倍型网络图的构建与分析

应用 TCS1.21 软件，基于最大简约法（maximum parsimony method, MP）建立长白山十种常见槭属植物 cpDNA 单倍型网络图（图2）。

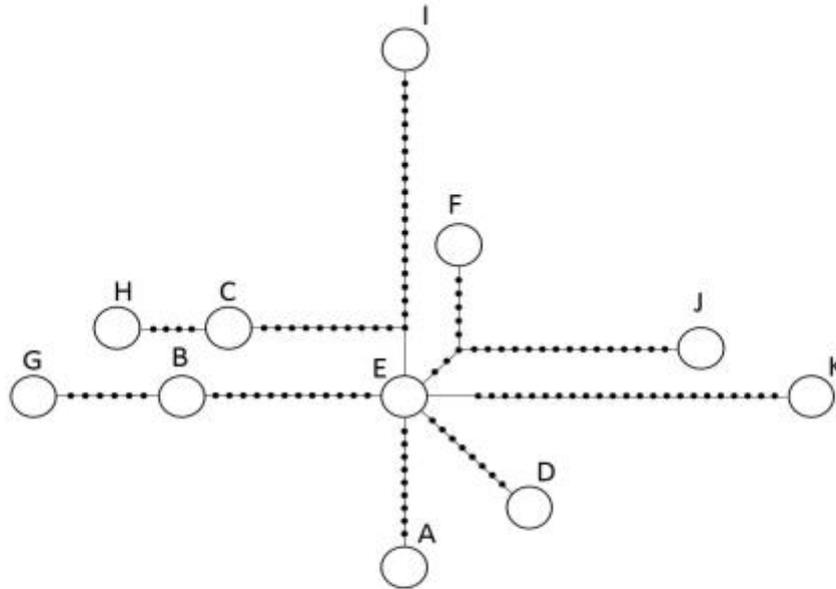


图2 单倍型网络图

- | | |
|-----------------------------------|--|
| A <i>Acer tegmentosum</i> Maxim | B <i>Acer truncatum</i> Bunge |
| C <i>Acer triflorum</i> Kom | D <i>Acer komarovii</i> Pojark |
| E <i>Acer barbinerve</i> Maxim | F <i>Acer ukurunduense</i> Trauty.Et Mey |
| G <i>Acer mono</i> Maxim | H <i>Acer mandshuricum</i> Maxim |
| I <i>Acer ginnala</i> Maxim | J <i>Acer pseudo-sieboldianum</i> (Pax.) Komarov |
| K <i>Dipteronia sinensis</i> Oliv | |

注：图中空心圆圈代表单倍型，圆圈的大小代表某种特定单倍型的比例，字母代单倍型的种类，线上的小圆点为没有观察到的假定单倍型，单倍型之间的连线代表等位基因之间一种突变的途径。

由图2可知，每一种单倍型（B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L）中只包含了一个物种的个体。其中单倍型之间比较分散，无向外发散性突变的中心单倍型，单倍型 F 可由单倍型 L（外类群）经过 25 次碱基突变成。

单倍型网络图与 NJ 聚类树的构建结果相比，除均表明元宝槭和色木槭具有较近的亲缘关系，元宝槭可能是由色木槭演化而来或者色木槭是由元宝槭演化而来之外，其余结果均有较大的出入，可能是由于构建模型时由于对 Gap 的处理不同且两者所采用的算法不同导致的。

4. 讨论

方文培^[8]根据植物学形态特征将槭属植物划分为十五组，本研究中的十种材料分别属于桐状槭组（元宝槭和色木槭）、尖齿槭组（簇毛槭）、三小叶组（拧筋槭和白牛槭）、鸡爪槭组（假色槭）、穗状槭组（花楷槭）、茶条槭组（茶条槭）、大花槭组（青楷槭和小楷槭）。根

据系统发育图，元宝槭和色木槭聚到一起，与方文培^[7]和傅沛云^[17]的分组相一致，说明两者亲缘关系较近。小楷槭和青楷槭同属于大花槭组，但是由图 1 可知，小楷槭和簇毛槭聚在一起，且具有较高的自展值，这与方文培^[7]的分组有所不同。

傅沛云^[17]按叶片类型将东北地区的槭属植物划分为单叶和复叶两大类型，色木槭、元宝槭、小楷槭、花楷槭、假色槭、簇毛槭、青楷槭、茶条槭等属于单叶类，白牛槭和拧筋槭属于复叶类。但是由 NJ 聚类树可知，拧筋槭与单叶类的花楷槭聚集在一起，而并未与同属于复叶类的白牛槭聚集在一起，这与傅沛云^[17]的研究又是相悖的。

根据刘旭^[12]等对长白山主要槭属植物遗传亲缘关系的研究结果，花楷槭和簇毛槭聚到一起，亲缘关系较近，ISSR 系数达 0.70。同时，傅沛云^[17]也认为两者的形态学特征相似。这与我们所得到的系统发育树中花楷槭和拧筋槭聚在一起的研究结果有所不同。方文培^[7]将拧筋槭和白牛槭划分为三小叶组，拧筋槭和白牛槭也同属于复叶类，但是由本研所得到的系统发育图来看，两者并未聚集到一起。导致少数种没有优先聚集在一起的原因可能是由于所用材料因自然选择与人工选择，随着时间的推移，与其他槭属植物发生了基因的交流、渗透。除此之外，也可能与槭树各个组在历史系统发育中是相对独立的有关。

综合以上分析，长白山地区十种主要槭属植物基于 cpDNA 序列的系统发育关系与叶片的形态学特征有一定关系，但是仅仅根据形态学特征去判断槭属植物之间的亲缘关系也是片面的。在将来的研究中应在形态学的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，根据各物种之间的遗传距离选配强优势杂交组合，以减少亲本选配的盲目性，提高育种效率。在一定范围内，双亲的基因差异越大，亲缘关系越远，杂种优势越强^[18]。本研究结果为槭树新品种繁育提供了基础，也为利用槭树优异的形状与丰富的遗传多样性进行品种的遗传改良提供了可能。

参考文献

- [1]王瑞红. 玄参属系统发育与生物地理学分析及砾玄参复合种的亲缘地理学研究[D]. 浙江:浙江大学, 2015.
- [2]莫日根. 论花粉形态种内变异的意义[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 1992, 23(1):133-137.
- [3]Doebley J, Renfroe W, Blanton A. Restriction site variation in the zea chloroplast genome[J]. *Genetics*, 1987, 117(1): 139-147.
- [4]Perl-Treves R, Galun E. The cucumis plastome : physical map intragenetic variation and phylogenetic relationships[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1985, 71:417-429.
- [5]李倩中, 刘晓宏, 苏家乐. 我国槭树科植物研究进展[J]. 江苏农业科学, 2008(6):184-185.
- [6]刘毓, 赵遵田, 刘媛. 国外优良彩叶槭树引种可行性研究[J]. 山东科学, 2010, 23(2):47-50.
- [7]方文培. 中国植物志(第 46 卷)[M]. 北京:科学出版社, 1981(46):66-289.
- [8]杨鹏鸣, 李家美. 槭树科分类研究进展[J]. 河南科技学院学报(自然科学版), 2010, 38(1):50-54.
- [9]Ogata K. A systematic study of the genus Acer. *Bull Univ Forest*[J]. 1967, 63:89-206.

- [10]张冬梅,魏华丽,苏金乐,等. 槭属 ISSR-PCR 反应体系的确立[J]. 上海农业学报,2008,24(1): 51-54.
- [11]刘旭,郭太君,王刚. 长白山地区主要槭属植物遗传亲缘关系研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(20): 10580-10581.
- [12]李倩中, 刘晓宏, 苏家乐. 槭属种质遗传多样性及亲缘关系的 SRAP 分析[J]. 江苏农业科学, 2010(2695):1032-1036.
- [13]杨玉杰. 构建分子系统树的简易方法[J]. 生物学通报, 2013, 48(4):4-6.
- [14]刘慎谔. 东北植物检索表[M]. 北京:科学出版社, 1959.
- [15]邹喻萍, 葛颂, 王晓东. 系统进化与进化植物学中分子标记[M]. 北京: 北京科学出版社, 2011.
- [16]胡春云, 郑小艳, 腾元文. 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):22261-22272.
- [17]傅沛云. 中国植物检索表(槭树科) [M]. 北京: 科学出版社, 1995:395-399.
- [18]刘全儒, 郭延平, 于明. 植物系统分类学——综合理论及方法[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.