

利用叶绿体全基因组的单核苷酸多态位点对鹅掌楸和北美鹅掌楸的分子鉴定

刘 儒¹, 潘文婷¹, 李 斌^{2,3*}, 靳晓白⁴, 李锐丽⁴, 索志立^{5*}

¹中国林业科学研究院亚热带林业实验中心, 江西 新余

²中国林业科学研究院林业研究所, 北京

³中国林业科学研究院林木遗传和育种国家重点实验室, 北京

⁴国家植物园, 北京

⁵中国科学院植物研究所系统与进化植物学国家重点实验室, 北京

收稿日期: 2022年10月4日; 录用日期: 2022年11月4日; 发布日期: 2022年11月15日

摘 要

鉴定植物是人类认识自然的重要内容之一。由于工作量巨大, 经历了漫长而艰辛的研究历程。标本馆和植物园为植物鉴定研究提供了重要支撑。基于形态分类的植物志的出版是植物鉴定研究进展过程中的里程碑式的工作。新的研究阶段需要从全球视角开展植物鉴定研究。植物的种间、属间甚至科间存在或多或少的形态相似性, 用于植物分类的有价值的形态性状数量少。形态特征和基于DNA短片段的标记提供的信息量有限, 学界期待分辨率高的植物种鉴定技术。高通量测序技术使植物叶绿体全基因组序列的获得成为可能。我们首次利用叶绿体基因组的499个单核苷酸多态位点, 研制北美鹅掌楸和鹅掌楸的分子鉴定检索表。分析结果显示, 在鹅掌楸属内的物种形成过程中, 叶绿体全基因组内有75个基因和64个基因间隔区发生了种级水平的遗传分化。本研究利用了叶绿体全基因组序列提供的丰富的单核苷酸多态位点信息, 可为鹅掌楸属植物资源的深入研究、保护和利用提供技术基础。

关键词

鹅掌楸属, 叶绿体基因组, 单核苷酸多态位点, 植物鉴定

Molecular Identification of *Liriodendron chinense* and *L. tulipifera* Based on Single-Nucleotide Polymorphic Sites from the Complete Chloroplast Genomes

Ru Liu¹, Wenting Pan¹, Bin Li^{2,3*}, Xiaobai Jin⁴, Ruili Li⁴, Zhili Suo^{5*}

*通讯作者。

文章引用: 刘儒, 潘文婷, 李斌, 靳晓白, 李锐丽, 索志立. 利用叶绿体全基因组的单核苷酸多态位点对鹅掌楸和北美鹅掌楸的分子鉴定[J]. 农业科学, 2022, 12(11): 1098-1108. DOI: 10.12677/hjas.2022.1211151

¹Subtropical Experimental Center, Chinese Academy of Forestry, Xinyu Jiangxi

²Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing

³State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing

⁴China National Botanical Garden, Beijing

⁵State Key Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing

Received: Oct. 4th, 2022; accepted: Nov. 4th, 2022; published: Nov. 15th, 2022

Abstract

Identification of plants is one of the important contents for human to understand nature. Due to the huge workload, it has gone through a long and arduous research process. Herbaria and botanical gardens provide important support for plant identification research. The publication of Flora based on morphological classification is a milestone in the advances of plant identification research. In the new stage, plant identification research should be carried out from a global perspective. There are more or less morphological similarities among species, genera and even families, the number of valuable morphological characters for plant classification is fewer. Morphological characteristics and DNA fragment-based markers could only provide limited information for plant identification. New technologies with high resolution are highly expected. High throughput sequencing technology makes it possible to obtain the whole chloroplast genome sequence of plants. For the first time, we compiled a molecular identification key to *Liriodendron chinense* and *L. tulipifera* using 499 single-nucleotide polymorphic sites from the chloroplast genomes. Our analysis indicated that, during speciation in the genus *Liriodendron*, genetic differentiation occurred in 75 gene regions and 64 intergenic regions in the chloroplast genomes at species level. This study that utilized the richer bio-information of single-nucleotide polymorphic sites from the complete chloroplast genomes would provide technical support for deeper study on plant resources in *Liriodendron* and their conservation and utilization.

Keywords

Liriodendron, Chloroplast Genome, Single-Nucleotide Polymorphic Site, Species Identification

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

在人类认识自然的过程中，鉴定植物是重要内容之一。通过形态特征鉴定为每一种植物命名。形态鉴定是对具有重要鉴定意义的分类特征，特别是花器官、果实、叶等，进行观察、测量、比较和分析，根据形态特征的组合，结合前人的研究进展，对植物进行分类鉴定。

具体操作过程是，首先到野外采集鲜活植物的枝、叶、花和果实，对于高大的乔木，需要利用高枝剪取枝，草本植物需要连根拔起，采集全植株。夹在报纸或草纸的中间，用木板制成的标本夹压平、固定，利用吹风设备，暖风吹 24 小时，没有吹风设备条件时，需要每天更换报纸晾干。干燥后带回标本馆，平移到台纸上，利用乳胶粘贴固定，或利用细纸条或线缝合固定在台纸上，台纸的左上角贴一个纸条，

记录采集地点、海拔高度、经纬度、采集人和采集日期[1]。

装订好的植物标本,由专门的技术人员首先归类到科,存放在该科最靠后面的标本柜内。有项目推动的植物标本通常很快鉴定到种名。野外调查人员顺便采集和赠送标本馆的大量标本,通常会尽快完成装订,由于没有项目推动,一直保存在柜子里等待鉴定。利用空调尽量保持室内温度在 22 度左右,北京相对比较干燥,每周运行 1~2 次除湿设备。标本保存 20~30 年后才鉴定出种名的情况很常见,也有装订完 70 多年后才鉴定到种名的标本。原因是有些标本(特别是热带、亚热带植物的标本)没有能够鉴定的专家。研究专科专属植物的专家通常到各国的标本馆观察标本,也顺便协助鉴定。鉴定名称写在一个纸条上,通常粘贴在台纸的右下角。已经有鉴定名称的植物标本,其他专家发现鉴定错误时,会在旁边另外贴一个纸条,写上拟更新的鉴定名和鉴定日期,鉴定人签名。有些植物标本的鉴定种名被更新过 5~6 次,台纸上贴着每次的名称鉴定信息纸条。使用者在文献中通常引用最新的鉴定种名,但也鼓励持慎重的验证姿态。有的植物标本最初就被错误地放在了别的科属内,这样的情况偶有发现。一些大型标本馆保存着几百年前的标本。国家植物标本馆内也保存着由于未能采集到全套重要器官而无法鉴定到种名的标本。国际间标本馆际交换赠送的标本通常装订精致,鉴定到了种名。

经过 80 余家科研、教学单位的 312 位作者和 164 位绘图人员对 80 余年的工作积累(标本和文献)进行分析和整理,2004 年中国植物志的编写全部完成,共出版 80 卷 126 册,记录了中国植物共 301 科 3408 属 31,142 种。中国植物志的内容主要来自标本馆的植物标本鉴定信息及野外和植物园的观察记录。数字中国植物志已经上线(<http://www.iplant.cn>)。Goodwin *et al.* (2015) [2]调查评价了 21 个国家 40 个标本馆的 4500 份植物标本,发现 50% 以上的热带植物标本存在种名鉴定错误。根据全世界 6 大洲、250 多个国家或地区的植物接受名统计,全球共有植物 1045 科 16,164 属,332,750 种,其中包括苔藓植物、蕨类植物、裸子植物和被子植物[3] [4]。由于工作量巨大,有些植物类群在植物志分册出版后又发表了很多研究新进展,未能及时写入。植物志中存在的错误和需要补充的内容,有待再版时更新。植物标本存在一定程度的褪色和干缩变形,不能完全等同于野外的活植物,鉴定植物名称需要一定的经验。

植物园引种栽培活植物便于近距离详细观察记录植物的形态特征、习性和生活史,对于植物鉴定非常重要。例如,北京的国家植物园采集到野外活植物或种子,先在原始材料圃栽植或播种。进入原始材料圃的植物必须详细登记,包括每个种苗的植物名称、来源、数量、采种母树原产地生态环境及生长发育状况等信息,以便于制定栽培措施和推广应用。每个种苗有一个总的登记号码(或称为引种编号),用引种编号也可以查询到利用每个种苗培育出的苗木[5]。引种编号的重要作用在于即使后来出现该植物的鉴定名称或分类位置发生了变化,也可以追溯到它的来源和最初观察记录信息。这些苗木成活后,根据科研和科普价值,结合园林景观设计的配植方法,移栽到植物园展览区,供长期观察、研究、科普宣传和展示。绘制定植位置图是基础工作,定植位置图上的每株植物都关联一个信息库。早年采用手绘图纸、记录表格或卡片,现在使用 AutoCAD 或 ArcGIS 软件绘制图纸,配有相关信息数据库,包括苗木定植记录、引种记录、繁殖记录等子库。国外还开发了 BG-Base 和 BG-Map 等专门用于植物园信息管理的计算机软件系统。展览区的植物定期清查、核准并评估植物生长状况,对位置图和相关数据库信息进行更新。植物园展览区栽植的每株乔灌木和每种草本植物都有一个牌子,注明了植物的拉丁学名、中文名、编号、科、属、分布等信息,也可以扫描二维码查询更多信息[5] [6]。不足之处是原始材料圃和定植区的面积(约 0.54 平方千米)小,操作空间十分有限。1956 年北京的国家植物园建园以来,能够引种的各气候区的植物绝大部分进行了栽培试验,开发了各种相关技术。北京的国家植物园是本地区物种多样性最高的技术和应用推广中心。在汲取经验教训的基础上,2001 年批准建设的秦岭国家植物园采取了围山建园和就地保护相结合的策略,规划总面积 639 平方千米,是目前世界上占地面积最大的植物园。植物鉴定研究过程中,支撑性工作在时间和工作量方面占据很大比例。长期以来,标本馆、植物园、国家基因库、大型苗

圃等植物收集、保存、繁育基地,为植物鉴定研究事业提供了重要支撑。

由于植物的种间、属间甚至科间存在或多或少的形态相似性,用于植物分类的有价值的形态性状数量有限。例如,鹅掌楸(木兰科鹅掌楸属的乔木树种)的花朵形似杯状,与郁金香(百合科郁金香属的多年生草本植物)的花很相似,欧洲人称之为“郁金香树”(tulip tree)。学界期待分辨率高的技术方法配合形态特征的鉴定方法来鉴定植物种。

植物鉴定技术研发方面,经历了基于形态特征的分类、基于同工酶特征条带的分类、基于 DNA 片段长度和片段数目差异(如 RAPD、AFLP 及 RFLP)的分类,基于 DNA 片段的核苷酸序列差异[*rbcL*、*matK*、*trnH-psbA*、internal transcribed spacer (ITS)序列以及泛素-蛋白酶体系统相关 DNA 序列]的分类[7] [8],也报道了利用浅层测序技术开发细胞核 DNA SSR 标记的研究[9]。但是,这些技术都是出于降低实验成本的角度考虑遗传差异检测。它们的不足是信息量少、有些 DNA 标记不能定位到基因组内的具体位置上,应用价值有限[7] [8]。

高通量测序技术可以获得植物完整的叶绿体基因组全长序列,打破了形态特征和 DNA 片段标记信息量少的瓶颈,实验成本也降低到了一般项目组可以负担的水平。叶绿体全基因组序列已经广泛用于植物的系统发生关系分析和生物地理研究[10]-[18]。Li *et al.* (2016)报道了鹅掌楸(*Liriodendron chinense*)的叶绿体基因组的全长序列[19]。本研究以鹅掌楸属植物为例,基于叶绿体全基因组序列数据,研制鹅掌楸属物种的分子鉴定检索表方法。我们的研究方法和原理在芍药属(*Paeonia* L.) [20]、胡桃属(*Juglans* L.) [21]、紫薇属(*Lagerstroemia* L.) [8]、柿属(*Diospyros* L.) [22]以及马尾藻属(*Sargassum* C. Agardh) [23]方面已有发表,但在鹅掌楸属方面为首次报道。

Table 1. Chloroplast genome sequence data used in the present study

表 1. 本研究使用的叶绿体基因组序列数据

Species name	Accession number
种名	序列号
<i>Liriodendron chinense</i> isolate HNSN	MK887907.1
<i>Liriodendron chinense</i> isolate JXLS	MK887906.1
<i>Liriodendron chinense</i> isolate JXXY	MK887905.1
<i>Liriodendron chinense</i>	KU170538.1
<i>Liriodendron chinense</i> isolate GZLP	MK887904.1
<i>Liriodendron tulipifera</i> voucher S. Kim 1045	MT682878.1
<i>Liriodendron tulipifera</i> voucher K.M. Van Neste 484	MN990625.1
<i>Liriodendron tulipifera</i>	MK477550.1
<i>Liriodendron tulipifera</i>	DQ899947.1

鹅掌楸属植物隶属于木兰分支(Magnoliids)的木兰科(Magnoliaceae),是核心被子植物(Mesangiospermae)的早期趋异的谱系[4]。鹅掌楸属(*Liriodendron* L.)是珍贵的第三纪孑遗谱系,全世界有 2 个现存的乔木种,一个是原产于东亚地区(中国的东南部地区和越南的北部地区)的鹅掌楸(*L. chinense* Sarg.),另一个是原产于北美洲东部的北美鹅掌楸(*L. tulipifera* L.) [24] [25] [26] [27] [28]。两大陆间断分布的特征,使其具有重要的系统发生和生物地理研究价值。鹅掌楸是速生的乔木,木材纤维长度可达 1.7 mm,是优良的造纸材

料, 叶形独特, 树形优美, 花朵为艳丽的杯型, 观赏价值高, 17 世纪就已被引种到欧洲, 是历史悠久的重要园林绿化树种, 目前在许多地区广泛引种。鹅掌楸具有药用价值, 也是中国的珍稀濒危保护植物[29]。鹅掌楸属这两个种作为亲本材料, 其杂交后代在园林绿化和观赏方面表现优异[24] [28]。为了深入研究和评估鹅掌楸属植物的种质资源状况、分析杂交过程的遗传变异机制, 野生资源的种级鉴定是基础。由于形态特征和 DNA 片段提供的信息量少, 为了提供更加便捷、精准的物种鉴定方法, 我们利用叶绿体基因组序列的单核苷酸多态位点, 首次研制鹅掌楸属物种的分子鉴定检索表, 为资源的保护与利用提供技术支持。

2. 材料与方法

利用 5 个和 4 个个体分别代表鹅掌楸(*Liriodendron chinense*)和北美鹅掌楸(*L. tulipifera*)。利用 MAFFT v7.055b 软件[30] (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software>)对 9 条叶绿体全基因组序列(见表 1)进行比对。利用 Suo *et al.* (2012, 2015, 2016) [20] [21] [22]和索志立等(2022) [23]报道的方法, 确定单核苷酸多态位点的位置。比对后的序列矩阵的长度为 160,427 个核苷酸, 5'-端(左端)起的第 1 个核苷酸字母的位置编号为 1, 最后一个核苷酸字母(即最右端的核苷酸字母)的位置编号为 160,427。利用 Mega 7.0 软件[31]从左到右顺次检测和记录单核苷酸多态位点(见图 1)。种间有差异、种内个体间没有差异的单核苷酸多态位点作为分子分类性状, 用于编写鹅掌楸属物种的分子鉴定检索表。利用 Mega 7.0 软件[31]生成鹅掌楸属 2 个种 9 个个体之间的遗传关系(见图 2)。

3. 结果

基于叶绿体全基因组序列数据, 共获得揭示种级水平遗传差异的单核苷酸多态位点 499 个, 利用这些位点构建鹅掌楸和北美鹅掌楸的分子鉴定检索表(见图 1)。9 个样品按照鹅掌楸(*Liriodendron chinense*)和北美鹅掌楸(*L. tulipifera*)聚类为 2 组(见图 2), 与基于形态特征的分类结果一致。单核苷酸多态位点数据显示, 在鹅掌楸属的物种形成过程中, 叶绿体全基因组序列内部, 有 75 个基因和 64 个基因间隔区发生了种级水平的遗传分化(见表 2)。*ycf1* 区的遗传分化最大, 有 48 个单核苷酸多态位点。体现种级水平遗传差异的单核苷酸多态位点, 可用于物种水平上鉴定鹅掌楸属植物资源。

Table 2. Gene regions and intergenic regions and the amount of single-nucleotide polymorphic site involving genetic differentiation in chloroplast genomes between *Liriodendron chinense* and *L. tulipifera*

表 2. 鹅掌楸和北美鹅掌楸的叶绿体基因组内与物种遗传分化有关的基因和基因间隔区及单核苷酸多态位点数目

No. 序号	Gene region/ intergenic region 基因区/间隔区	SNP number 单核苷酸 多态位点数目	No. 序号	Gene region/ intergenic region 基因区/间隔区	SNP number 单核苷酸 多态位点数目
1	accD	7	36	petA	3
2*	accD-psaI	2	37*	petA-psbJ	5
3	atpA	2	38	petB	4
4	atpB	5	39*	petB-petD	1
5*	atpB-rbcL	1	40	petD	3
6	atpE	2	41*	petD-rpoA	1
7	atpF	6	42	petG	2
8*	atpF-atpH	4	43	petL	1
9	atpH	1	44*	petL-petG	2
10*	atpH-atpI	8	45	petN	1

Continued

11	atpI	3	46*	petN-psbM	1
12	ccsA	4	47	psaA	3
13*	ccsA-ndhD	2	48	psaB	5
14	cemA	4	49	psaC	1
15	clpP	5	50*	psaI-ycf4	4
16*	clpP-psbB	3	51	psaJ	6
17	infA	1	52*	psaJ-rpl33	1
18	matK	9	53	psbA	1
19*	matK-rps16	7	54*	psbA-trnK	2
20	ndhA	8	55	psbB	4
21	ndhB	3	56*	psbB-psbT	1
22	ndhC	1	57	psbC	2
23*	ndhC-trnV	5	58	psbD	2
24	ndhD	4	59	psbF	2
25	ndhE	2	60*	psbF-petL	2
26	ndhF	15	61*	psbI-trnS	2
27*	ndhF-rpl32	10	62*	psbJ-psbL	3
28	ndhG	1	63	psbK	3
29*	ndhG-ndhI	1	64*	psbK-psbI	5
30	ndhH	1	65*	psbM-trnD	5
31*	ndhH-rps15	1	66	psbT	1
32	ndhI	2	67	rbcL	4
33	ndhJ	1	68*	rbcL-accD	4
34*	ndhJ-ndhK	1	69	rpl14	3
35	ndhK	3	70*	rpl14-rpl16	3
71	rpl16	3	106*	rrn4.5-rrn23	1
72*	rpl16-rps3	1	107	rrn5	1
73	rpl2	7	108*	trnC-petN	7
74	rpl20	1	109	trnD	1
75*	rpl20-rps12	3	110*	trnD-trnY	1
76	rpl23	1	111*	trnE-trnT	2
77*	rpl2-trnH	4	112*	trnfM-rps14	1
78	rpl32	1	113*	trnF-ndhJ	4
79*	rpl32-trnL	9	114	trnG	4
80*	rpl33-rps18	1	115	trnH	1
81	rpl36	2	116*	trnH-psbA	5
82*	rpl36-infA	1	117*	trnK-matK	3
83	rpoA	1	118	trnL	4
84	rpoB	8	119*	trnL-trnF	2
85*	rpoB-trnC	3	120*	trnL-ycf15	1
86	rpoC1	8	121	trnM	1

Continued

87	rpoC2	15	122*	trnM-atpE	2
88*	rpoC2-rpoC	1	123*	trnN-trnR	1
89	rps11	3	124*	trnP-psaJ	4
90	rps15	1	125	trnS	1
91*	rps15-ycf1	1	126*	trnS-rps4	1
92	rps16	7	127*	trnS-trnG	2
93*	rps16-trnQ	19	128	trnT	1
94	rps18	1	129*	trnT-psbD	5
95	rps19	2	130*	trnT-trnL	3
96	rps2	6	131	trnV	3
97	rps3	2	132*	trnV-trnM	1
98*	rps3-rps19	5	133*	trnW-trnP	1
99	rps4	3	134	ycf1	48
100*	rps4-trnT	1	135*	ycf1-trnN1	1
101	rps7	2	136	ycf2	14
102*	rps7-trnV	4	137	ycf3	2
103	rps8	1	138	ycf4	4
104*	rps8-rpl14	3	139*	ycf4-cemA	3
105*	rnl16-rps7	4			

*: indicates the intergenic regions; *: 基因间隔区。

4. 讨论

鹅掌楸隶属于木兰科的鹅掌楸亚科(Liriodendroideae),直到晚第三纪(Late Tertiary)(距今 2330 万年~距今 164 万年),鹅掌楸属的几个种仍然分布于整个北半球[2]。第三纪(距今 6500 万年~距今 260 万年)的这 2 个子遗种,出现于中新世(2300 万年前到 533 万年前)的中后期(Middle to Late Miocene),在晚新生代(Late Cenozoic)(注:新生代开始于 6700 万年前,延续至今),其分布范围缩小[2]。现存的这 2 个种典型地间断分布于两个大陆。

叶绿体基因组是光合作用的重要细胞器-叶绿体的遗传密码,大量基因和基因间隔区的核苷酸序列发生了遗传分化,表明地球的光环境相关因子在鹅掌楸属的物种形成过程中产生了巨大影响。这方面是未来深入研究的重要方向之一。本研究提供了一种更加精准、便捷的物种鉴定方法,对于鹅掌楸属植物资源的全球清查、保护和利用具有重要意义。本方法也适用于具有叶绿体基因组的藻类鉴定[23],在分类学上,藻类已经从植物界独立出来。藻类广泛分布于海洋和湖泊,至少有 10 万种以上,具有重要的环境保护价值和经济价值。但是,由于调查、采集艰难,分类学研究严重滞后。经过长期努力,虽然采集保存了大量藻类等的生物标本,但是在液体里保存的标本基本上难以提取到 DNA,目前为止已经收集到的海洋藻类等生物标本的利用价值有限,兼顾 DNA 保存的海洋藻类等生物标本野外采集和保存方法的研发是未来的研究重点之一。同时,海洋藻类等生物较为广泛地存在寄生、共生、甚至内生等现象,需要通过人工养殖、培养和镜检观察等多种方法研究获得纯物种 DNA 的技术。由于水生的藻类可以浮游移动,且同一物种内个体间形态变异幅度大,应该建立鉴定用关键形态特征的特写照片与 DNA 数据配套的技术资料。物种鉴定研究主要包含本文中提到的这几个重要环节(采集、保存、观察记录、分析数据和鉴定),应该增加人员数量和科研经费,加快研究的进程。

1-1a. Type C94T172A186A282T293G467A507G1174A1814A1865G1992C2097C2182T2364A2608A2707
T2943T3133T3134C3135T3367C3478G3761T3841C3910C4146T4232T4491G4531A5529C5606
C5632C5641A5746T6092G6100C6372A6383T6506C6815A6865G6905G6999G7141T7278T7308
C7318C7344T7353A7359A7408C7459A7532G8056A8151G8335T8378A8568C8810A8836C8841
G9094T9284T9311A9363C9999G10015C10146A10506G10507G10906A11456T12215T12812G12934
T13320C13676G13981C14032T14266T14321A14552A14585G14665C15076G15172T15194C15200
T15361T15483C15626T15658G16042G16344G16662T16970C17021A17207T17499C17541T17558
T18269C18655C18723C19060C19067A19251T19505C19577A19888T20513C20617A20626C21061
T21186C21433T21942T22298T22832G23062C23069C23757C23808A24241C24791G25098G25228
C25294T25510C26074G26545G26929T27910A28285G28673G28858A29508C29613T29712A29855
T29885T30028G30110A30256T30751G31451C31957G32097T32109T32193C32231C32489T32912
C33168T33694C34076C34562C34630G34880C35069T35422A35715G36300C36856T39248G39804
C40194A40195T40270A41138A41849T43776T43923A46064A46236C47098G47231A47655G47664
C47706G48169C48659T48832A49167G49276G49432A49433G49572G49793G49861T50371A50403
T50638T50705G51282A51413A51577G51852C51928G52227G52994G53599G53873C53918A53961
G54528G54652T54742G55169T55295G55342A55459A55538G55646C55932G55966C56019C56213
T56593T57889C58212A58704A58745A59077G59697A59772G59825G59960T60656C60792C60961
C61036A61042A61052T61482A61737C62319C62504G62733T62809T62902T62949C62986G63020
T63231C63528C63892A63994A64406C64949A64996A65012C65477A65479T65961C66388A67159
C67217A67314T67408G67622A67657T67659C67848T67913T69321G69399T69456G69573C69599
G69759C69788C70057T70317T70376G70531A70536T70724A70725T70727C70728G70730C70731
T70915A71386A71759A72181G72535G72798C73116T73629A74143T74670G74809T75357G75607
G75645G75680G76447G76448C76511T76699C77627G77675G79304A79307A79314A79483G79857
C80489C80691G80861C81370C82114A82569C82707G82798G83057G83067A83150C83356A83613
A84041C84068G84084T84294C84333C84478T84564A84624A84633G84715G84782G84962C86051

(a)

T86485A86512A86846T86865T86898T86946C87283T87414G87528G87829G88448G88464T88524
G88529C88614C89163C89283T90689A90695T93020T95382C95643C96310T96640T98921A101939
C102297C103255T103471G103658A103838T112975C113400C113934G114481C114980A114982
T114983T114989A114991A114992A115001A115082C115185G115256C115404G115452C115560
A115567G116456T116493T116577T116675A116761A117311A117312G117371A117414C117473
A117688A117726G117751C117880T117915C118228A118240A118928A118930T118932G119227
G119275T119500T119700A120173T120331G120649C120669A120857G121411A122013T122703
G122722T123415T123940T124265T124477G124650A124693G124734T125398C125406G125746
A126054T126308G127895G128016C128143A128354G129530T129670C129733G129951C129956
C129968T130007A130113A130147T130300C130378A130494C130774T130776T130779T130815
T130872G131041G131217C131219C131409A131441G131543A131795G132202G132417G132991
C133140C133185C133278T133287C133371T133389C133625C133684C133762C133766T133792
C133800C133801T133924C133927C133975A133999C134018C134518G135065G135599A136024
T145161C145341A145528G145744G146702T147060A150078A152359G152689G153356A153617
A155979T158304A158310G159716G159836G160385 *L. chinense*

1-1b. Type G94C172C186C282G293A467G507A1174G1814C1865T1992T2097A2182C2364G2608G2707
C2943G3133A3134A3135G3367T3478A3761C3841A3910T4146G4232G4491T4531G5529A5606
A5632T5641G5746C6092T6100T6372C6383C6506A6815G6865T6905T6999A7141A7278G7308
T7318T7344G7353G7359G7408T7459G7532T8056G8151A8335G8378G8568T8810C8836G8841
C9094G9284G9311G9363T9999T10015T10146C10506C10507A10906G11456C12215T12812T12934
C13320A13676T13981A14032G14266C14321C14552G14585A14665A15076A15172G15194T15200
G15361C15483A15626T15658A16042T16344A16662C16970A17021G17207C17499A17541G17558
C18269T18655G18723T19060T19067G19251C19505T19577C19888C20513T20617T20626T21061
C21186A21433C21942C22298C22832T23062A23069C23757T23808G24241T24791T25098A25228
A25294T25510T26074A26545C26929T27910G28285A28673A28858G29508A29613G29712C29855

(b)

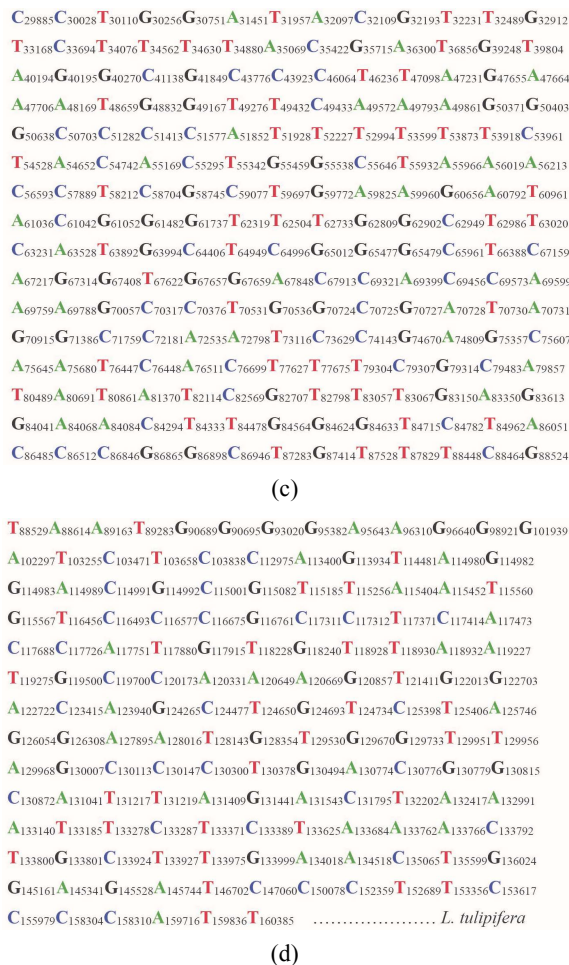


Figure 1. Molecular taxonomic key to *Liriodendron chinense* and *L. tulipifera* based on the 499 single-nucleotide polymorphic sites (SNPs) in the chloroplast genomes. The figure following the nucleotide character indicates the position of the corresponding SNP from the 5' end of the complete chloroplast genome sequence alignment

图 1. 基于叶绿体基因组内的 499 个单核苷酸多态位点的鹅掌楸和北美鹅掌楸的分子鉴定检索表。核苷酸字母后面的数字为单核苷酸多态位点从 5' 末端起位于叶绿体基因组内的位置

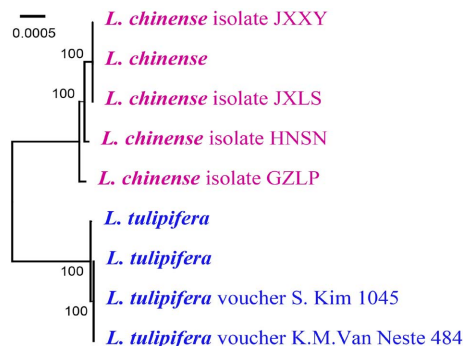


Figure 2. Phylogenetic tree of the 9 individuals representing 2 *Liriodendron* species based on the complete chloroplast genome sequences using the neighbour-joining method with the Jukes-Cantor parameter model. The numbers near the branches are bootstrap support values (%) of 1000 replications

图2. 采用 Jukes-Cantor 参数模型利用邻接法生成的基于叶绿体全基因组序列数据的鹅掌楸属 2 个种 9 个个体的遗传关系树状图。分支附近的数值是 1000 次重复获得的自展支持率

5. 结论

本研究获得的分子分类特征来自叶绿体基因组的全长序列, 信息量大。高通量测序技术打破了形态特征和 DNA 短片段信息量少以及设计引物的局限。单核苷酸多态位点是纳米级的分子分类性状, 物种鉴定灵敏度高。本方法可以利用植物体的局部微小绿色组织作为分析样品, 实现物种鉴定, 克服了形态分类依赖全套植物重要器官(叶、花器官和果实)的问题。

致 谢

在调查标本馆系统、植物园系统、种质资源圃、国家基因库及讨论物种标本鉴定和数据分析等方面, 得到如下老师的热情支持、帮助和指导, 他们是杨志荣、王忠涛、傅连中、马欣堂、李文清、解孝满、鲁仪增、孙忠民、李宇航、张素萍、王少青、陈志云、张兵兰、张会金、徐秀萍、王风花, 深表感谢。

基金项目

亚热带林木国家林木种质资源库中央财政林业改革发展资金林木良种繁育补助项目(2021, 2022), 国家自然科学基金项目(No. 31770744)。

参考文献

- [1] 伍玉明, 等. 生物标本的采集、制作、保存与管理[M]. 北京: 科学出版社, 2010.
- [2] Goodwin, Z.A., Harris, D.J., Filer, D., *et al.* (2015) Wide Spread Mistaken Identity in Tropical Plant Collections. *Current Biology*, **25**, R1057-R1069. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.002>
- [3] 王文采, 等. 世界植物简志[M]. 北京: 北京出版社, 2022.
- [4] The Angiosperm Phylogeny Group (2016) An Update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the Orders and Families of Flowering Plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **181**, 1-20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>
- [5] 俞德浚, 周多俊, 刘克辉, 陆荣刚, 王名金, 黄应森. 植物园原始材料圃建立系统管理制度的商榷[M]//植物引种驯化集刊, 第一集. 北京: 科学出版社, 1965: 170-178.
- [6] E-莱德雷, J-格琳, 主编. 达尔文植物园技术手册[M]. 靳晓白, 等, 译. 郑州: 河南科学技术出版社, 2005.
- [7] 邹喻苹. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [8] Suo, Z.L., Li, W.Y., Jin, X.B., *et al.* (2016) A New Nuclear DNA Marker Revealing Both Microsatellite Variations and Single Nucleotide Polymorphic Loci: A Case Study on Classification of Cultivars in *Lagerstroemia indica* L. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, **8**, 266-271. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000296>
- [9] Li, B., Lin, F., Huang, P., *et al.* (2022) Development of Nuclear SSR and Chloroplast Genome Markers in Diverse *Liriodendron chinense* Germplasm Based on Low-Coverage Whole Genome Sequencing. *BMC Biological Research*, **53**, Article No. 21. <https://doi.org/10.1186/s40659-020-00289-0>
- [10] Dobrogojski, J., Adamiec, M. and Luciński, R. (2020) The Chloroplast Genome: A Review. *Acta Physiologiae Plantarum*, **42**, Article No. 98. <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03089-x>
- [11] Dong, W.P., Xu, C., Li, D.L., *et al.* (2016) Comparative Analysis of the Complete Chloroplast Genome Sequences in Psammophytic *Haloxylon* Species (Amaranthaceae). *PeerJ*, **4**, e2699. <https://doi.org/10.7717/peerj.2699>
- [12] Xu, C., Dong, W.P., Li, W.Y., *et al.* (2017) Comparative Analysis of Six *Lagerstroemia* Complete Chloroplast Genomes. *Frontiers in Plant Science*, **8**, Article No. 15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00015>
- [13] Dong, W.P., Xu, C., Li, W.Q., *et al.* (2017) Phylogenetic Resolution in *Juglans* Based on Complete Chloroplast Genomes and Nuclear DNA Sequences. *Frontiers in Plant Science*, **8**, Article No. 1148. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01148>
- [14] Li, W.Q., Liu, Y.L., Yang, Y., *et al.* (2018) Interspecific Chloroplast Genome Sequence Diversity and Genomic Resources in *Diospyros*. *BMC Plant Biology*, **18**, Article No. 210. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1421-3>
- [15] Dong, W.P., Xu, C., Liu, Y.L., *et al.* (2021) Chloroplast Phylogenomics and Divergence Times of *Lagerstroemia* (Lythraceae). *BMC Genomics*, **22**, Article No. 434. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07769-x>

- [16] Dong, W.P., Lu, Y.Z., Xu, C., *et al.* (2021) Chloroplast Phylogenomic Insights into the Evolution of *Distylium* (Hamamelidaceae). *BMC Genomics*, **22**, Article No. 293. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07590-6>
- [17] Dong, W.P., Sun, J.H., Liu, Y.L., *et al.* (2021) Phylogenomic Relationships and Species Identification of the Olive Genus *Olea* (Oleaceae). *Journal of Systematics and Evolution*. <https://doi.org/10.1111/jse.12802>
- [18] Dong, W.P., Liu, Y.L., Li, E.Z., *et al.* (2022) Phylogenomics and Biogeography of *Catalpa* (Bignoniaceae) Reveal Incomplete Lineage Sorting and Three Dispersal Events. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **166**, Article ID: 107330. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2021.107330>
- [19] Li, B., Li, Y.D., Cai, Q.C., *et al.* (2016) The Complete Chloroplast Genome of a Tertiary Relict Species *Liriodendron chinense* (Magnoliaceae). *Conservation Genetics Resources*, **8**, 279-281. <https://doi.org/10.1007/s12686-016-0556-5>
- [20] Suo, Z.L., Zhang, C.H., Zheng, Y.Q., *et al.* (2012) Revealing Genetic Diversity of Tree Peonies at Micro-Evolution Level with Hyper-Variable Chloroplast Markers and Floral Traits. *Plant Cell Reports*, **31**, 2199-2213. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1330-0>
- [21] Suo, Z.L., Chen, L.N., Pei, D., *et al.* (2015) A New Nuclear DNA Marker from Ubiquitin Ligase Gene Region for Genetic Diversity Detection of Walnut Germplasm Resources. *Biotechnology Reports*, **5**, 40-45. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.11.003>
- [22] 李文清, 杨勇, 解孝满, 鲁仪增, 常青, 靳晓白, 索志立. E3 泛素-蛋白连接酶 UPL3 DNA 序列揭示德阳柿和油柿为栽培柿的最近缘物种[J]. 农业科学, 2018, 8(6): 657-673. <https://doi.org/10.12677/HJAS.2018.86100>
- [23] 索志立, 顾翠花, 左云娟, 杨志荣, 孙忠民, 杨强发, 靳晓白. 利用叶绿体基因组大单拷贝区的单核苷酸多态位点鉴定紫薇属和马尾藻属植物[J]. 植物学研究, 2022, 11(2): 218-228. <https://doi.org/10.12677/br.2022.112026>
- [24] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第三十卷第一分册[M]. 北京: 科学出版社, 1980: 196-198.
- [25] Parks, C.R., Miller, N.G., Wendel, J.F., *et al.* (1983) Genetic Divergence within the Genus *Liriodendron* (Magnoliaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **70**, 658-666. <https://doi.org/10.2307/2398983>
- [26] Parks, C.R. and Wendel, J. F. (1990) Molecular Divergence between Asian and North American Species of *Liriodendron* (Magnoliaceae) with Implications for Interpretation of Fossil Floras. *American Journal of Botany*, **77**, 1243-1256. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1990.tb11376.x>
- [27] Chen, J.H., Hao, Z.D., Guang, X.M., *et al.* (2019) *Liriodendron* Genome Sheds Light on Angiosperm Phylogeny and Species-Pair Differentiation. *Nature Plants*, **5**, 18-25. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0323-6>
- [28] Cao, Y., Feng, J., Hwarari, D., *et al.* (2022) Alterations in Population Distribution of *Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg. and *Liriodendron tulipifera* Linn. Caused by Climate Change. *Forests*, **13**, Article 488. <https://doi.org/10.3390/f13030488>
- [29] 傅立国. 中国植物红皮书: 稀有濒危植物(第一册) [M]. 北京: 科学出版社, 1992: 408-409.
- [30] Katoh, K. and Standley, D.M. (2013) MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 772-780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- [31] Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, **33**, 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>