

# 基于叶绿体基因组的单核苷酸多态位点的落叶松属(*Larix* Mill.)植物的分子鉴定新方法

——以8个种/变种的分析为例

李 斌<sup>1,2</sup>, 左云娟<sup>3,4\*</sup>, 刘艳磊<sup>5</sup>, 杨志荣<sup>6</sup>, 靳晓白<sup>7</sup>, 潘伯荣<sup>8</sup>, 常 青<sup>8</sup>, 索志立<sup>9\*</sup>

<sup>1</sup>中国林业科学研究院林业研究所, 北京

<sup>2</sup>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

<sup>3</sup>中国科学院东南亚生物多样性研究中心, 云南 勐腊

<sup>4</sup>中国科学院西双版纳热带植物园综合保护中心, 云南 勐腊

<sup>5</sup>河北工程大学园林与生态工程学院, 河北 邯郸

<sup>6</sup>中国科学院植物研究所国家植物标本馆, 北京

<sup>7</sup>国家植物园, 北京

<sup>8</sup>中国科学院新疆生态与地理研究所, 新疆 乌鲁木齐

<sup>9</sup>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: 2023年4月30日; 录用日期: 2023年7月18日; 发布日期: 2023年7月27日

## 摘 要

高通量测序技术可低成本获得叶绿体全基因组序列, 为落叶松属植物的精确鉴定提供了可能。我们利用叶绿体全基因组中的527个单核苷酸多态位点, 作为分子性状, 首次精准鉴定落叶松属8个种/变种, 研制了分子分类检索表。单核苷酸多态位点存在种间差异。喜马拉雅红杉(*Larix himalaica* W. C. Cheng & L. K. Fu)、新疆落叶松(*L. sibirica* Ledeb.)和欧洲落叶松(*L. deciduas* Mill.)的物种特有单核苷酸多态位点数量均较多, 遗传分化较大。落叶松(原变种) (*L. gmelinii* (Rupr.) Kuzen. var. *gmelinii*)、黄花落叶松(*L. gmelinii* var. *olgensis* (A. Henry) Ostenf. & Syrach)、千岛落叶松(*L. gmelinii* var. *japonica* (Maxim. ex Regel) Pilg.)以及凯杨德落叶松(*L. cajanderi* Mayr)之间遗传差异较小。结果显示叶绿体基因组的单核苷酸多态位点信息, 可用于落叶松属植物不同基因型的分子鉴定。本研究对于落叶松属植物种质资源的分类鉴定、保护和利用具有重要价值。

## 关键词

落叶松属, 叶绿体基因组, 单核苷酸多态位点, 植物鉴定

\*通讯作者。

# A Novel Method for Molecular Identification of Plants in *Larix* Mill. Using Single Nucleotide Polymorphic Characters from Complete Chloroplast Genomes

—Analysis on Eight Species/Varieties as an Example

Bin Li<sup>1,2</sup>, Yunjuan Zuo<sup>3,4\*</sup>, Yanlei Liu<sup>5</sup>, Zhirong Yang<sup>6</sup>, Xiaobai Jin<sup>7</sup>, Borong Pan<sup>8</sup>, Qing Chang<sup>8</sup>, Zhili Suo<sup>9\*</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing

<sup>3</sup>Southeast Asia Biodiversity Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Mengla Yunnan

<sup>4</sup>Center for Integrative Conservation, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla Yunnan

<sup>5</sup>School of Landscape and Ecological Engineering, Hebei University of Engineering, Handan Hebei

<sup>6</sup>National Herbarium (PE), Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing

<sup>7</sup>China National Botanical Garden, Beijing

<sup>8</sup>Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi Xinjiang

<sup>9</sup>State Key Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing

Received: Apr. 30<sup>th</sup>, 2023; accepted: Jul. 18<sup>th</sup>, 2023; published: Jul. 27<sup>th</sup>, 2023

## Abstract

The low experimental cost of high-throughput sequencing technology for yielding sequence data of complete chloroplast genomes has made it possible to challenge the accurate identification of *Larix* plants. In this study, five hundred and twenty-seven single nucleotide polymorphic characters from the complete chloroplast genomes were used for the first time as molecular traits to identify *Larix* plants and compile a molecular classification key. There are differences in aspects of single nucleotide polymorphic characters between species and varieties. Among the eight species/varieties, *L. himalaica* W. C. Cheng & L. K. Fu, *L. sibirica* Ledeb. and *L. deciduas* Mill. has larger number of diverged single nucleotide characters. Genetic variation levels among the four genotypes as named *L. gmelinii* (Rupr.) Kuzen. var. *gmelinii*, *L. gmelinii* var. *olgensis* (A. Henry) Ostenf. & Syrach, *L. gmelinii* var. *japonica* (Maxim. ex Regel) Pilg. and *L. cajanderi* Mayr are comparatively low. Our results indicated that single nucleotide polymorphic characters from the chloroplast genomes could be used for discrimination of different genotypes in *Larix*. This study is valuable for identification, conservation and utilization of plant germplasm resources of *Larix*.

## Keywords

*Larix* Mill., Complete Chloroplast Genome, Single-Nucleotide Polymorphic Character, Plant Identification

Copyright © 2023 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

落叶松属(*Larix* Mill.)隶属于松科(Pinaceae),为落叶乔木,是针叶林的主要构成树种之一,全球约15种[1]。落叶松生长速度快,木材用于造纸、建筑、家具等,也是重要的造林和绿化树种[1] [2]。落叶松属植物通常利用叶、雌雄花、球果等器官进行物种鉴定。在实际应用中,首先查阅标本、图片和植物志的描述,理解关键形态特征,然后在野外或现地进行种类鉴定。由于种间形态特征存在一定程度的相似性,具有分类价值的形态特征数量有限,同时,形态分类特征的确定和利用容易受到人为判断的影响,实际鉴定过程中存在难度,例如,对种子进行物种名称鉴定、落叶期间的植株名称鉴定等。落叶松属植物资源多样性的精确鉴定一直是学术界关注的重要课题。

先前的研究报道了落叶松属植物的核型[3]、等位酶[4] [5]以及12个叶绿体DNA片段标记[6],然而,上述方法提供的信息量少[7] [8] [9] [10]。物种的精准鉴定和演化关系的深入研究,需要更多可量化的分子水平的分类性状[11] [12] [13]。近年,高通量测序技术大幅降低了基因组测序实验成本,突破了形态特征和DNA片段等标记信息量少的局限。叶绿体全基因组序列已广泛用于系统发生关系分析[14]-[22]。本研究利用落叶松属8个种/变种的叶绿体全基因组序列大数据,分析单核苷酸多态位点,解决物种的精确鉴定难题。

## 2. 材料与方法

**Table 1.** *Larix* samples and Genbank accession numbers of chloroplast genome sequences used in this study

**表 1.** 落叶松属的供试样品名称及叶绿体基因组序列号

	Name of species/varieties 名称	Genbank accession no. 序列号
1	<i>L.cajanderi</i> EH93 凯杨德落叶松	MK468641.1
2	<i>L.cajanderi</i> EH97 凯杨德落叶松	MK468644.1
3	<i>L.cajanderi</i> EH98 凯杨德落叶松	MK468645.1
4	<i>L.cajanderi</i> EH104 凯杨德落叶松	MK468647.1
5	<i>L.cajanderi</i> EH96 凯杨德落叶松	MK468643.1
6	<i>L. gmelinii</i> var. <i>japonica</i> LgKa01 千岛落叶松	LC228572.1
7	<i>L. gmelinii</i> var. <i>japonica</i> LgCh01 千岛落叶松	LC228570.1
8	<i>L. gmelinii</i> var. <i>japonica</i> LgCh02 千岛落叶松	LC228571.1
9	<i>L. gmelinii</i> var. <i>olgensis</i> 2017LYS 黄花落叶松	MF990370.1
10	<i>L. gmelinii</i> var. <i>gmelinii</i> EH83 落叶松(原变种)	MK468634.1
11	<i>L.decidua</i> 欧洲落叶松	AB501189.1
12	<i>L. kaempferi</i> Lk Ho1 日本落叶松	LC574969.1
13	<i>L. kaempferi</i> Lk Ho3 日本落叶松	LC574971.1
14	<i>L. kaempferi</i> Lk Ho2 日本落叶松	LC574970.1
15	<i>L. kaempferi</i> Lk Ka2 日本落叶松	LC574974.1
16	<i>L. kaempferi</i> Lk Ho4 日本落叶松	LC574972.1
17	<i>L.sibirica</i> 新疆落叶松	MF795085.1
18	<i>L. himalaica</i> Lh01 喜马拉雅红杉	MN822883.1
19	<i>Picea brachytyla</i> var. <i>complanata</i> 油麦吊云杉	OK539526.1

18 个样品的叶绿体全基因组序列代表落叶松属的 8 个种和变种(表 1)。用 MAFFT v7.055b 软件[23] (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software>) 比对序列。根据本团队发表的方法[7] [8] [9], 用 MEGA 7.0 [24] 和 DnaSP v6 软件[25] (<http://www.ub.edu/dnasp/>) 鉴定单核苷酸多态位点(图 1)。具有分类价值的单核苷酸多态位点, 用于研制分子鉴定检索表(图 1)。以油麦吊云杉 *Picea brachytyla* (Franch.) Pritz. var. *complanata* (Mast.) Cheng ex Rehd. 作为外群对照, 基于叶绿体全基因组序列数据, 用 MEGA 7.0 软件[26] 的 Tamura 3-parameter model 参数模型运算遗传关系(图 2)、计算遗传距离(表 3)。

**Table 2.** Base composition of valuable single nucleotide variable sites for classification of the eight species/varieties of *Larix*  
**表 2.** 落叶松属 8 个种和变种的有分类价值的单核苷酸变异位点的数目及碱基构成

	Name of species/varieties 名称	A/C/G/T 碱基构成	Total 合计
1	<i>L. cajanderi</i> 凯杨德落叶松	0/2/1/2	5
2	<i>L. decidua</i> 欧洲落叶松	20/31/36/13	100
3	<i>L. gmelinii</i> var. <i>gmelinii</i> 落叶松(原变种)	3/1/0/2	6
4	<i>L. gmelinii</i> var. <i>japonica</i> 千岛落叶松	3/1/1/2	7
5	<i>L. gmelinii</i> var. <i>olgensis</i> 黄花落叶松	2/3/1/4	10
6	<i>L. kaempferi</i> 日本落叶松	5/3/5/10	23
7	<i>L. himalaica</i> 喜马拉雅红杉	34/28/23/48	133
8	<i>L. sibirica</i> 新疆落叶松	32/27/22/43	124
9	<i>L. gmelinii</i> var. <i>gmelinii</i> + <i>L. gmelinii</i> var. <i>olgensis</i> 落叶松+黄花落叶松	2/0/2/1	5
10	<i>L. himalaica</i> + <i>L. sibirica</i> 喜马拉雅红杉 + 新疆落叶松	24/40/30/20	114
	Total 总计	125/136/121/145	527

1-1a. Type C<sub>3048</sub>G<sub>6945</sub>G<sub>11324</sub>A<sub>11524</sub>T<sub>15161</sub>C<sub>17281</sub>G<sub>18268</sub>T<sub>20355</sub>A<sub>20732</sub>G<sub>21184</sub>G<sub>21206</sub>T<sub>22817</sub>C<sub>24562</sub>C<sub>24588</sub>G<sub>25136</sub>  
T<sub>26847</sub>T<sub>27261</sub>G<sub>27421</sub>C<sub>28811</sub>T<sub>30342</sub>A<sub>30737</sub>T<sub>34592</sub>A<sub>35635</sub>G<sub>35910</sub>C<sub>36093</sub>G<sub>36902</sub>C<sub>38260</sub>A<sub>38550</sub>G<sub>38571</sub>T<sub>39411</sub>  
G<sub>39617</sub>C<sub>40235</sub>C<sub>40239</sub>G<sub>42740</sub>C<sub>43630</sub>G<sub>45478</sub>G<sub>47414</sub>C<sub>49317</sub>G<sub>49557</sub>C<sub>57488</sub>A<sub>58082</sub>A<sub>59054</sub>C<sub>60978</sub>T<sub>61744</sub>G<sub>62603</sub>  
C<sub>63417</sub>T<sub>64490</sub>T<sub>64526</sub>A<sub>64560</sub>C<sub>65142</sub>C<sub>66177</sub>T<sub>67618</sub>C<sub>67730</sub>A<sub>69044</sub>C<sub>69765</sub>G<sub>69914</sub>C<sub>70177</sub>G<sub>70409</sub>G<sub>71118</sub>C<sub>71204</sub>  
C<sub>71305</sub>C<sub>71468</sub>A<sub>71887</sub>G<sub>71945</sub>C<sub>75283</sub>A<sub>78518</sub>T<sub>79548</sub>C<sub>80241</sub>A<sub>80979</sub>T<sub>83738</sub>C<sub>86046</sub>C<sub>86325</sub>A<sub>86424</sub>T<sub>86544</sub>G<sub>86546</sub>  
A<sub>86753</sub>C<sub>87067</sub>A<sub>87120</sub>A<sub>87269</sub>C<sub>87437</sub>G<sub>87857</sub>C<sub>88060</sub>C<sub>90246</sub>G<sub>90604</sub>A<sub>95650</sub>C<sub>96614</sub>A<sub>100710</sub>C<sub>100723</sub>G<sub>101276</sub>  
G<sub>101780</sub>T<sub>104127</sub>T<sub>104383</sub>A<sub>104814</sub>C<sub>109950</sub>G<sub>110552</sub>C<sub>111130</sub>T<sub>112577</sub>A<sub>113169</sub>G<sub>113327</sub>T<sub>113411</sub>C<sub>114709</sub>C<sub>115049</sub>  
G<sub>116606</sub>C<sub>117509</sub>G<sub>119070</sub>C<sub>119189</sub>C<sub>119980</sub>T<sub>119988</sub>A<sub>120849</sub>G<sub>122585</sub>A<sub>122586</sub>A<sub>122753</sub>A<sub>122865</sub>C<sub>122987</sub>  
..... 喜马拉雅红杉和新疆落叶松 *L. himalaica* and *L. sibirica*



1-1b. Type **T**<sub>3048</sub>**A**<sub>6945</sub>**A**<sub>11324</sub>**C**<sub>11524</sub>**G**<sub>15161</sub>**A**<sub>17281</sub>**A**<sub>18268</sub>**C**<sub>20355</sub>**G**<sub>20732</sub>**A**<sub>21184</sub>**A**<sub>21206</sub>**C**<sub>22817</sub>**T**<sub>24562</sub>**T**<sub>24588</sub>**T**<sub>25136</sub>  
**A**<sub>26847</sub>**G**<sub>27261</sub>**A**<sub>27421</sub>**T**<sub>28811</sub>**C**<sub>30342</sub>**C**<sub>30737</sub>**G**<sub>34592</sub>**C**<sub>35635</sub>**A**<sub>35910</sub>**T**<sub>36093</sub>**A**<sub>36902</sub>**A**<sub>38260</sub>**G**<sub>38550</sub>**T**<sub>38571</sub>**A**<sub>39411</sub>  
**A**<sub>39617</sub>**T**<sub>40235</sub>**T**<sub>40239</sub>**T**<sub>42740</sub>**A**<sub>43630</sub>**A**<sub>45478</sub>**T**<sub>47414</sub>**T**<sub>49317</sub>**T**<sub>49557</sub>**T**<sub>57488</sub>**G**<sub>58082</sub>**C**<sub>59054</sub>**T**<sub>60978</sub>**G**<sub>61744</sub>**A**<sub>62603</sub>  
**T**<sub>63417</sub>**C**<sub>64490</sub>**G**<sub>64526</sub>**G**<sub>64560</sub>**T**<sub>65142</sub>**T**<sub>66177</sub>**C**<sub>67618</sub>**T**<sub>67730</sub>**C**<sub>69044</sub>**A**<sub>69765</sub>**A**<sub>69914</sub>**T**<sub>70177</sub>**A**<sub>70409</sub>**T**<sub>71118</sub>**T**<sub>71204</sub>  
**T**<sub>71305</sub>**T**<sub>71468</sub>**C**<sub>71887</sub>**T**<sub>71945</sub>**A**<sub>75283</sub>**C**<sub>78518</sub>**C**<sub>79548</sub>**T**<sub>80241</sub>**C**<sub>80979</sub>**C**<sub>83738</sub>**T**<sub>86046</sub>**T**<sub>86325</sub>**C**<sub>86424</sub>**G**<sub>86544</sub>**A**<sub>86546</sub>  
**T**<sub>86753</sub>**A**<sub>87067</sub>**G**<sub>87120</sub>**T**<sub>87269</sub>**T**<sub>87437</sub>**A**<sub>87857</sub>**A**<sub>88060</sub>**T**<sub>90246</sub>**T**<sub>90604</sub>**C**<sub>95650</sub>**A**<sub>96614</sub>**C**<sub>100710</sub>**A**<sub>100723</sub>**A**<sub>101276</sub>  
**A**<sub>101780</sub>**C**<sub>104127</sub>**C**<sub>104383</sub>**C**<sub>104814</sub>**T**<sub>109950</sub>**A**<sub>110552</sub>**T**<sub>111130</sub>**A**<sub>112577</sub>**G**<sub>113169</sub>**T**<sub>113327</sub>**G**<sub>113411</sub>**T**<sub>114709</sub>**T**<sub>115049</sub>  
**T**<sub>116606</sub>**T**<sub>117509</sub>**A**<sub>119070</sub>**A**<sub>119189</sub>**A**<sub>119980</sub>**G**<sub>119988</sub>**G**<sub>120849</sub>**T**<sub>122585</sub>**C**<sub>122586</sub>**G**<sub>122753</sub>**G**<sub>122865</sub>**T**<sub>122987</sub>

..... 喜马拉雅红杉和新疆落叶松之外的 6 个种和变种

The six taxa other than *L. himalaica* and *L. sibirica*

1-1-1a. Type **T**<sub>3178</sub>**C**<sub>4678</sub>**A**<sub>6645</sub>**A**<sub>7016</sub>**G**<sub>9451</sub>**A**<sub>12723</sub>**C**<sub>13355</sub>**C**<sub>13774</sub>**C**<sub>14544</sub>**G**<sub>14642</sub>**A**<sub>15359</sub>**C**<sub>16001</sub>**C**<sub>19035</sub>**T**<sub>19624</sub>**C**<sub>19625</sub>  
**A**<sub>20188</sub>**T**<sub>21672</sub>**T**<sub>23113</sub>**T**<sub>28472</sub>**T**<sub>28504</sub>**A**<sub>36441</sub>**A**<sub>36991</sub>**T**<sub>37198</sub>**C**<sub>37488</sub>**T**<sub>38861</sub>**A**<sub>40326</sub>**T**<sub>44047</sub>**A**<sub>46958</sub>**T**<sub>47618</sub>**T**<sub>48595</sub>  
**A**<sub>52228</sub>**T**<sub>52359</sub>**A**<sub>55395</sub>**T**<sub>55519</sub>**T**<sub>61344</sub>**T**<sub>61872</sub>**T**<sub>61904</sub>**G**<sub>61910</sub>**G**<sub>62587</sub>**T**<sub>63027</sub>**A**<sub>65631</sub>**G**<sub>65861</sub>**G**<sub>66321</sub>**T**<sub>67934</sub>**T**<sub>69126</sub>  
**C**<sub>69127</sub>**A**<sub>69910</sub>**T**<sub>69911</sub>**A**<sub>69932</sub>**G**<sub>69962</sub>**C**<sub>69969</sub>**T**<sub>69976</sub>**C**<sub>69979</sub>**C**<sub>69996</sub>**G**<sub>70005</sub>**C**<sub>70023</sub>**T**<sub>70030</sub>**C**<sub>70104</sub>**G**<sub>71012</sub>**A**<sub>71112</sub>  
**T**<sub>71809</sub>**G**<sub>71975</sub>**T**<sub>72944</sub>**T**<sub>73234</sub>**A**<sub>73613</sub>**G**<sub>75312</sub>**A**<sub>76697</sub>**A**<sub>77615</sub>**C**<sub>78809</sub>**C**<sub>79049</sub>**A**<sub>79184</sub>**G**<sub>81614</sub>**T**<sub>84007</sub>**G**<sub>84200</sub>**C**<sub>84436</sub>  
**C**<sub>84437</sub>**C**<sub>84916</sub>**C**<sub>85164</sub>**G**<sub>85512</sub>**T**<sub>85641</sub>**C**<sub>85766</sub>**G**<sub>87119</sub>**T**<sub>88308</sub>**G**<sub>88740</sub>**T**<sub>88914</sub>**A**<sub>89061</sub>**A**<sub>91117</sub>**C**<sub>91357</sub>**T**<sub>91447</sub>**G**<sub>95649</sub>  
**T**<sub>97000</sub>**T**<sub>97196</sub>**A**<sub>97209</sub>**C**<sub>97218</sub>**A**<sub>101019</sub>**T**<sub>101127</sub>**T**<sub>101392</sub>**G**<sub>101454</sub>**T**<sub>101456</sub>**G**<sub>101457</sub>**C**<sub>101487</sub>**T**<sub>102595</sub>**A**<sub>103716</sub>  
**A**<sub>107709</sub>**A**<sub>108056</sub>**A**<sub>109139</sub>**T**<sub>111049</sub>**T**<sub>111414</sub>**A**<sub>111767</sub>**G**<sub>111800</sub>**T**<sub>112966</sub>**G**<sub>113102</sub>**A**<sub>113515</sub>**C**<sub>114023</sub>**C**<sub>114585</sub>**G**<sub>114799</sub>  
**C**<sub>114968</sub>**T**<sub>115063</sub>**T**<sub>115597</sub>**T**<sub>115614</sub>**T**<sub>115988</sub>**T**<sub>116491</sub>**T**<sub>116579</sub>**A**<sub>117577</sub>**C**<sub>117848</sub>**A**<sub>119158</sub>**C**<sub>119989</sub>**T**<sub>120334</sub>**A**<sub>120651</sub>  
**T**<sub>121433</sub>**A**<sub>122343</sub>**T**<sub>122457</sub> ..... 喜马拉雅红杉 *L. himalaica*

1-1-1b. Type **G**<sub>3178</sub>**T**<sub>4678</sub>**C**<sub>6645</sub>**C**<sub>7016</sub>**A**<sub>9451</sub>**C**<sub>12723</sub>**G**<sub>13355</sub>**A**<sub>13774</sub>**T**<sub>14544</sub>**A**<sub>14642</sub>**G**<sub>15359</sub>**T**<sub>16001</sub>**A**<sub>19035</sub>**G**<sub>19624</sub>**A**<sub>19625</sub>  
**C**<sub>20188</sub>**C**<sub>21672</sub>**G**<sub>23113</sub>**C**<sub>28472</sub>**C**<sub>28504</sub>**G**<sub>36441</sub>**C**<sub>36991</sub>**C**<sub>37198</sub>**A**<sub>37488</sub>**C**<sub>38861</sub>**G**<sub>40326</sub>**C**<sub>44047</sub>**C**<sub>46958</sub>**C**<sub>47618</sub>**C**<sub>48595</sub>  
**G**<sub>52228</sub>**C**<sub>52359</sub>**G**<sub>55395</sub>**C**<sub>55519</sub>**C**<sub>61344</sub>**C**<sub>61872</sub>**G**<sub>61904</sub>**T**<sub>61910</sub>**T**<sub>62587</sub>**C**<sub>63027</sub>**G**<sub>65631</sub>**T**<sub>65861</sub>**A**<sub>66321</sub>**C**<sub>67934</sub>**G**<sub>69126</sub>  
**A**<sub>69127</sub>**C**<sub>69910</sub>**A**<sub>69911</sub>**C**<sub>69932</sub>**A**<sub>69962</sub>**A**<sub>69969</sub>**C**<sub>69976</sub>**T**<sub>69979</sub>**A**<sub>69996</sub>**C**<sub>70005</sub>**A**<sub>70023</sub>**C**<sub>70030</sub>**A**<sub>70104</sub>**T**<sub>71012</sub>**G**<sub>71112</sub>  
**C**<sub>71809</sub>**T**<sub>71975</sub>**G**<sub>72944</sub>**C**<sub>73234</sub>**G**<sub>73613</sub>**T**<sub>75312</sub>**G**<sub>76697</sub>**G**<sub>77615</sub>**T**<sub>78809</sub>**A**<sub>79049</sub>**C**<sub>79184</sub>**T**<sub>81614</sub>**C**<sub>84007</sub>**A**<sub>84200</sub>**G**<sub>84436</sub>  
**G**<sub>84437</sub>**A**<sub>84916</sub>**A**<sub>85164</sub>**T**<sub>85512</sub>**C**<sub>85641</sub>**T**<sub>85766</sub>**T**<sub>87119</sub>**C**<sub>88308</sub>**T**<sub>88740</sub>**G**<sub>88914</sub>**C**<sub>89061</sub>**T**<sub>91117</sub>**A**<sub>91357</sub>**C**<sub>91447</sub>**T**<sub>95649</sub>  
**C**<sub>97000</sub>**C**<sub>97196</sub>**C**<sub>97209</sub>**T**<sub>97218</sub>**C**<sub>101019</sub>**G**<sub>101127</sub>**C**<sub>101392</sub>**A**<sub>101454</sub>**A**<sub>101456</sub>**T**<sub>101457</sub>**T**<sub>101487</sub>**G**<sub>102595</sub>**C**<sub>103716</sub>  
**C**<sub>107709</sub>**C**<sub>108056</sub>**G**<sub>109139</sub>**G**<sub>111049</sub>**C**<sub>111414</sub>**T**<sub>111767</sub>**T**<sub>111800</sub>**C**<sub>112966</sub>**A**<sub>113102</sub>**G**<sub>113515</sub>**T**<sub>114023</sub>**T**<sub>114585</sub>**A**<sub>114799</sub>  
**T**<sub>114968</sub>**C**<sub>115063</sub>**C**<sub>115597</sub>**C**<sub>115614</sub>**C**<sub>115988</sub>**C**<sub>116491</sub>**G**<sub>116579</sub>**C**<sub>117577</sub>**A**<sub>117848</sub>**G**<sub>119158</sub>**A**<sub>119989</sub>**C**<sub>120334</sub>**C**<sub>120651</sub>  
**A**<sub>121433</sub>**T**<sub>122343</sub>**C**<sub>122457</sub> ..... 喜马拉雅红杉之外的 7 个种和变种

The seven taxa other than *L. himalaica*

1-1-2a. Type **A**<sub>3115</sub>**T**<sub>6649</sub>**A**<sub>10352</sub>**C**<sub>11045</sub>**T**<sub>19484</sub>**C**<sub>21226</sub>**A**<sub>21366</sub>**A**<sub>24615</sub>**A**<sub>24640</sub>**T**<sub>24910</sub>**T**<sub>25199</sub>**G**<sub>28368</sub>**A**<sub>30015</sub>**G**<sub>30566</sub>**T**<sub>30639</sub>  
**A**<sub>30874</sub>**C**<sub>31163</sub>**T**<sub>31201</sub>**A**<sub>34853</sub>**C**<sub>35316</sub>**A**<sub>35380</sub>**G**<sub>35916</sub>**G**<sub>36955</sub>**T**<sub>36997</sub>**C**<sub>37605</sub>**T**<sub>37645</sub>**C**<sub>38106</sub>**T**<sub>38775</sub>**A**<sub>40426</sub>**T**<sub>40445</sub>  
**C**<sub>47132</sub>**T**<sub>50121</sub>**G**<sub>61886</sub>**T**<sub>66211</sub>**A**<sub>66455</sub>**G**<sub>67767</sub>**T**<sub>68080</sub>**A**<sub>69696</sub>**A**<sub>69878</sub>**A**<sub>69894</sub>**T**<sub>70182</sub>**C**<sub>70407</sub>**C**<sub>70479</sub>**T**<sub>70745</sub>**C**<sub>71480</sub>  
**C**<sub>72279</sub>**T**<sub>72584</sub>**G**<sub>72779</sub>**C**<sub>73125</sub>**A**<sub>73141</sub>**A**<sub>73223</sub>**A**<sub>73537</sub>**C**<sub>76876</sub>**C**<sub>76921</sub>**T**<sub>77037</sub>**G**<sub>77183</sub>**G**<sub>78511</sub>**C**<sub>78812</sub>**A**<sub>79013</sub>**G**<sub>79052</sub>  
**T**<sub>79303</sub>**T**<sub>79428</sub>**G**<sub>79635</sub>**T**<sub>79808</sub>**C**<sub>80692</sub>**C**<sub>81981</sub>**G**<sub>82531</sub>**G**<sub>82735</sub>**A**<sub>83083</sub>**A**<sub>83883</sub>**T**<sub>84341</sub>**C**<sub>84545</sub>**C**<sub>84999</sub>**T**<sub>85211</sub>**G**<sub>85456</sub>  
**T**<sub>85549</sub>**T**<sub>85598</sub>**T**<sub>86138</sub>**G**<sub>86139</sub>**C**<sub>86226</sub>**T**<sub>86648</sub>**T**<sub>86661</sub>**G**<sub>86754</sub>**T**<sub>86768</sub>**A**<sub>86842</sub>**T**<sub>87016</sub>**C**<sub>87436</sub>**T**<sub>87466</sub>**T**<sub>87494</sub>**T**<sub>88252</sub>  
**A**<sub>90199</sub>**A**<sub>91321</sub>**G**<sub>91360</sub>**T**<sub>91793</sub>**T**<sub>91941</sub>**G**<sub>92005</sub>**A**<sub>93244</sub>**T**<sub>95104</sub>**A**<sub>96997</sub>**T**<sub>97686</sub>**A**<sub>98130</sub>**C**<sub>99540</sub>**A**<sub>101713</sub>**C**<sub>102483</sub>  
**C**<sub>103243</sub>**A**<sub>103325</sub>**T**<sub>103370</sub>**T**<sub>103499</sub>**C**<sub>104154</sub>**A**<sub>104807</sub>**G**<sub>106843</sub>**T**<sub>111297</sub>**T**<sub>111808</sub>**T**<sub>112309</sub>**G**<sub>112794</sub>**G**<sub>112838</sub>**T**<sub>116646</sub>  
**A**<sub>117289</sub>**C**<sub>117320</sub>**A**<sub>117458</sub>**A**<sub>117847</sub>**C**<sub>118724</sub>**T**<sub>121618</sub> ..... 新疆落叶松 *L. sibirica*

1-1-2b. Type **G**<sub>3115</sub>**C**<sub>6649</sub>**C**<sub>10352</sub>**G**<sub>11045</sub>**A**<sub>19484</sub>**A**<sub>21226</sub>**G**<sub>21366</sub>**C**<sub>24615</sub>**G**<sub>24640</sub>**C**<sub>24910</sub>**G**<sub>25199</sub>**A**<sub>28368</sub>**G**<sub>30015</sub>**T**<sub>30566</sub>**A**<sub>30639</sub>  
**G**<sub>30874</sub>**T**<sub>31163</sub>**G**<sub>31201</sub>**G**<sub>34853</sub>**A**<sub>35316</sub>**C**<sub>35380</sub>**A**<sub>35916</sub>**A**<sub>36955</sub>**C**<sub>36997</sub>**A**<sub>37605</sub>**C**<sub>37645</sub>**A**<sub>38106</sub>**C**<sub>38775</sub>**G**<sub>40426</sub>**C**<sub>40445</sub>  
**T**<sub>47132</sub>**C**<sub>50121</sub>**T**<sub>61886</sub>**C**<sub>66211</sub>**G**<sub>66455</sub>**A**<sub>67767</sub>**G**<sub>68080</sub>**C**<sub>69696</sub>**C**<sub>69878</sub>**C**<sub>69894</sub>**C**<sub>70182</sub>**A**<sub>70407</sub>**A**<sub>70479</sub>**C**<sub>70745</sub>**A**<sub>71480</sub>  
**T**<sub>72279</sub>**C**<sub>72584</sub>**A**<sub>72779</sub>**A**<sub>73125</sub>**G**<sub>73141</sub>**G**<sub>73223</sub>**G**<sub>73537</sub>**A**<sub>76876</sub>**T**<sub>76921</sub>**C**<sub>77037</sub>**A**<sub>77183</sub>**T**<sub>78511</sub>**A**<sub>78812</sub>**G**<sub>79013</sub>**T**<sub>79052</sub>  
**C**<sub>79303</sub>**G**<sub>79428</sub>**T**<sub>79635</sub>**C**<sub>79808</sub>**A**<sub>80692</sub>**G**<sub>81981</sub>**T**<sub>82531</sub>**A**<sub>82735</sub>**G**<sub>83083</sub>**G**<sub>83883</sub>**G**<sub>84341</sub>**A**<sub>84545</sub>**A**<sub>84999</sub>**C**<sub>85211</sub>**T**<sub>85456</sub>  
**G**<sub>85549</sub>**A**<sub>85598</sub>**G**<sub>86138</sub>**T**<sub>86139</sub>**A**<sub>86226</sub>**G**<sub>86648</sub>**C**<sub>86661</sub>**C**<sub>86754</sub>**A**<sub>86768</sub>**G**<sub>86842</sub>**C**<sub>87016</sub>**T**<sub>87436</sub>**G**<sub>87466</sub>**C**<sub>87494</sub>**C**<sub>88252</sub>  
**C**<sub>90199</sub>**G**<sub>91321</sub>**T**<sub>91360</sub>**G**<sub>91793</sub>**G**<sub>91941</sub>**T**<sub>92005</sub>**G**<sub>93244</sub>**G**<sub>95104</sub>**G**<sub>96997</sub>**G**<sub>97686</sub>**G**<sub>98130</sub>**G**<sub>99540</sub>**C**<sub>101713</sub>**A**<sub>102483</sub>  
**T**<sub>103243</sub>**G**<sub>103325</sub>**A**<sub>103370</sub>**C**<sub>103499</sub>**A**<sub>104154</sub>**C**<sub>104807</sub>**A**<sub>106843</sub>**C**<sub>111297</sub>**C**<sub>111808</sub>**G**<sub>112309</sub>**C**<sub>112794</sub>**T**<sub>112838</sub>**C**<sub>116646</sub>  
**C**<sub>117289</sub>**T**<sub>117320</sub>**G**<sub>117458</sub>**T**<sub>117847</sub>**A**<sub>118724</sub>**C**<sub>121618</sub> ..... 新疆落叶松之外的 7 个种和变种

The seven taxa other than *L. sibirica*

1-1-3a. Type **A**<sub>71013</sub> ..... 喜马拉雅红杉 *L. himalaica*

1-1-3b. Type **G**<sub>71013</sub> ..... 新疆落叶松 *L. sibirica*

1-1-3c. Type **C**<sub>71013</sub> ..... 喜马拉雅红杉和新疆落叶松之外的 6 个种和变种

The six taxa other than *L. himalaica* and *L. sibirica*

1-2a. Type **C**<sub>2380</sub>**C**<sub>2714</sub>**C**<sub>4555</sub>**G**<sub>5743</sub>**C**<sub>8925</sub>**G**<sub>9224</sub>**C**<sub>10462</sub>**A**<sub>11256</sub>**C**<sub>18931</sub>**C**<sub>21101</sub>**C**<sub>21104</sub>**A**<sub>24282</sub>**G**<sub>24702</sub>**G**<sub>24745</sub>**T**<sub>26570</sub>**G**<sub>27495</sub>  
**G**<sub>27530</sub>**T**<sub>28156</sub>**G**<sub>28534</sub>**G**<sub>28663</sub>**T**<sub>28765</sub>**G**<sub>29013</sub>**C**<sub>29490</sub>**T**<sub>31695</sub>**C**<sub>33606</sub>**T**<sub>35584</sub>**G**<sub>36132</sub>**A**<sub>36141</sub>**C**<sub>37460</sub>**C**<sub>38815</sub>**C**<sub>40466</sub>  
**C**<sub>43325</sub>**G**<sub>43785</sub>**G**<sub>43790</sub>**C**<sub>46140</sub>**C**<sub>46174</sub>**A**<sub>47571</sub>**A**<sub>48226</sub>**G**<sub>49003</sub>**C**<sub>49823</sub>**G**<sub>51873</sub>**G**<sub>52234</sub>**C**<sub>52340</sub>**G**<sub>54101</sub>**C**<sub>55975</sub>**A**<sub>56383</sub>  
**G**<sub>56392</sub>**G**<sub>57569</sub>**A**<sub>58226</sub>**A**<sub>60191</sub>**G**<sub>60626</sub>**T**<sub>61881</sub>**C**<sub>65618</sub>**A**<sub>68644</sub>**G**<sub>70032</sub>**C**<sub>70059</sub>**G**<sub>71171</sub>**G**<sub>71217</sub>**G**<sub>71791</sub>**C**<sub>71837</sub>**A**<sub>72312</sub>  
**G**<sub>72885</sub>**G**<sub>74440</sub>**G**<sub>75381</sub>**C**<sub>75581</sub>**C**<sub>80839</sub>**T**<sub>81746</sub>**C**<sub>83757</sub>**T**<sub>84823</sub>**A**<sub>85180</sub>**A**<sub>89913</sub>**G**<sub>90093</sub>**G**<sub>91261</sub>**G**<sub>92416</sub>**T**<sub>95936</sub>**A**<sub>97033</sub>  
**C**<sub>99728</sub>**A**<sub>100513</sub>**T**<sub>105603</sub>**G**<sub>105604</sub>**A**<sub>105605</sub>**C**<sub>105664</sub>**C**<sub>106543</sub>**C**<sub>106822</sub>**A**<sub>107318</sub>**T**<sub>111562</sub>**G**<sub>113183</sub>**C**<sub>115943</sub>**T**<sub>117616</sub>  
**C**<sub>118123</sub>**A**<sub>118665</sub>**G**<sub>121378</sub>**A**<sub>121379</sub>**G**<sub>121382</sub>**A**<sub>121385</sub>**G**<sub>121496</sub>**T**<sub>121500</sub>**G**<sub>122528</sub>**G**<sub>122567</sub>**A**<sub>122701</sub>

..... 欧洲落叶松 *Larix decidua*

1-2b. Type **T**<sub>2380</sub>**A**<sub>2714</sub>**T**<sub>4555</sub>**A**<sub>5743</sub>**T**<sub>8925</sub>**A**<sub>9224</sub>**T**<sub>10462</sub>**G**<sub>11256</sub>**T**<sub>18931</sub>**T**<sub>21101</sub>**T**<sub>21104</sub>**C**<sub>24282</sub>**A**<sub>24702</sub>**A**<sub>24745</sub>**C**<sub>26570</sub>**C**<sub>27495</sub>  
**C**<sub>27530</sub>**C**<sub>28156</sub>**A**<sub>28534</sub>**A**<sub>28663</sub>**G**<sub>28765</sub>**A**<sub>29013</sub>**T**<sub>29490</sub>**C**<sub>31695</sub>**T**<sub>33606</sub>**G**<sub>35584</sub>**A**<sub>36132</sub>**G**<sub>36141</sub>**T**<sub>37460</sub>**T**<sub>38815</sub>**T**<sub>40466</sub>



T<sub>43325</sub>A<sub>43785</sub>A<sub>43790</sub>T<sub>46140</sub>T<sub>46174</sub>G<sub>47571</sub>G<sub>48226</sub>A<sub>49003</sub>T<sub>49823</sub>A<sub>51873</sub>A<sub>52234</sub>T<sub>52340</sub>A<sub>54101</sub>T<sub>55975</sub>T<sub>56383</sub>  
 A<sub>56392</sub>A<sub>57569</sub>G<sub>58226</sub>T<sub>60191</sub>A<sub>60626</sub>G<sub>61881</sub>T<sub>65618</sub>T<sub>68644</sub>C<sub>70032</sub>G<sub>70059</sub>C<sub>71171</sub>A<sub>71217</sub>A<sub>71791</sub>G<sub>71837</sub>G<sub>72312</sub>  
 T<sub>72885</sub>T<sub>74440</sub>T<sub>75381</sub>T<sub>75581</sub>T<sub>80839</sub>C<sub>81746</sub>A<sub>83757</sub>G<sub>84823</sub>C<sub>85180</sub>G<sub>89913</sub>T<sub>90093</sub>A<sub>91261</sub>A<sub>92416</sub>G<sub>95936</sub>G<sub>97033</sub>  
 T<sub>99728</sub>T<sub>100513</sub>C<sub>105603</sub>T<sub>105604</sub>G<sub>105605</sub>T<sub>105664</sub>A<sub>106543</sub>T<sub>106822</sub>G<sub>107318</sub>C<sub>111562</sub>A<sub>113183</sub>T<sub>115943</sub>G<sub>117616</sub>  
 G<sub>118123</sub>G<sub>118665</sub>T<sub>121378</sub>G<sub>121379</sub>A<sub>121382</sub>G<sub>121385</sub>T<sub>121496</sub>C<sub>121500</sub>A<sub>122528</sub>A<sub>122567</sub>C<sub>122701</sub>

..... 欧洲落叶松之外的 7 个种和变种

The seven taxa other than *L. decidua*

1-3a. Type G<sub>25129</sub>C<sub>96826</sub>C<sub>100510</sub>T<sub>100515</sub>T<sub>100516</sub> ..... 凯杨德落叶松 *Larix cajanderi*

1-3b. Type C<sub>25129</sub>A<sub>96826</sub>T<sub>100510</sub>C<sub>100515</sub>C<sub>100516</sub> ..... 凯杨德落叶松之外的 7 个种和变种

The seven taxa other than *L. cajanderi*

1-4a. Type A<sub>70052</sub> ..... 落叶松原变种、黄花落叶松和千岛落叶松

*L. gmelinii* var. *gmelinii*, *L. gmelinii* var. *olgensis*  
and *L. gmelinii* var. *japonica*

1-4b. Type C<sub>70052</sub> ..... 落叶松原变种、黄花落叶松和千岛落叶松之外的 5 个种和变种

The five taxa other than *L. gmelinii* var. *gmelinii*, *L. gmelinii* var. *olgensis* and *L. gmelinii* var. *japonica*

1-4-1a. Type A<sub>60056</sub>A<sub>89995</sub>G<sub>17720</sub>T<sub>20380</sub>G<sub>112575</sub> ..... 落叶松和黄花落叶松

*L. gmelinii* var. *gmelinii* and *L. gmelinii* var. *olgensis*

1-4-1b. Type G<sub>60056</sub>G<sub>89995</sub>T<sub>17720</sub>C<sub>20380</sub>T<sub>112575</sub> ..... 落叶松和黄花落叶松之外的 6 个种和变种

The six taxa other than *L. gmelinii* var. *gmelinii* and *L. gmelinii* var. *olgensis*

1-4-2a. Type T<sub>20699</sub>C<sub>35715</sub>A<sub>63508</sub>A<sub>72800</sub>T<sub>75101</sub>A<sub>102934</sub> ..... 落叶松 *Larix gmelinii* var. *gmelinii*

1-4-2b. Type G<sub>20699</sub>T<sub>35715</sub>C<sub>63508</sub>G<sub>72800</sub>C<sub>75101</sub>C<sub>102934</sub> ..... 落叶松之外的 7 个种和变种

The seven taxa other than *Larix gmelinii* var. *gmelinii*

1-4-3a. Type T<sub>38350</sub>T<sub>54102</sub>C<sub>79139</sub>A<sub>91303</sub>C<sub>91336</sub>T<sub>91338</sub>T<sub>91343</sub>G<sub>91350</sub>G<sub>91356</sub>G<sub>112291</sub>

..... 黄花落叶松 *L. gmelinii* var. *olgensis*

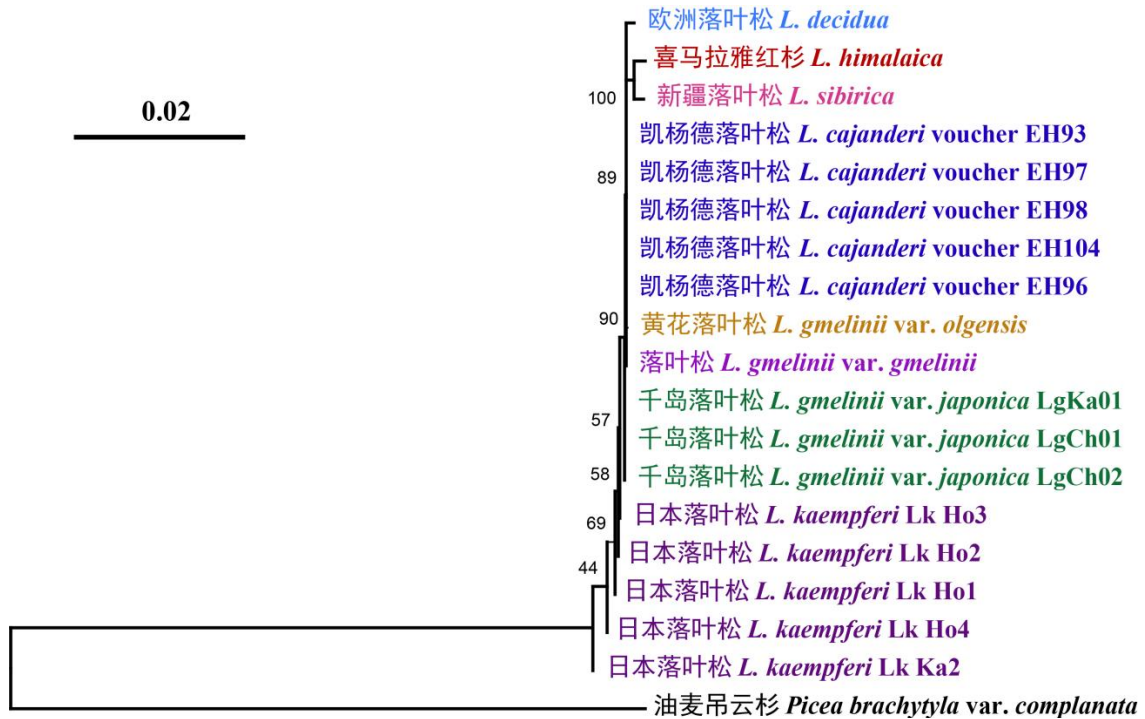
1-4-3b. Type G<sub>38350</sub>C<sub>54102</sub>T<sub>79139</sub>G<sub>91303</sub>A<sub>91336</sub>C<sub>91338</sub>A<sub>91343</sub>A<sub>91350</sub>T<sub>91356</sub>C<sub>112291</sub>

..... 黄花落叶松之外的 7 个种和变种

The seven taxa other than *L. gmelinii* var. *olgensis*

- 1-4-4a. Type **T**<sub>33431</sub>**A**<sub>51877</sub>**C**<sub>82207</sub>**G**<sub>84462</sub>**A**<sub>89773</sub>**A**<sub>91778</sub>**T**<sub>109111</sub> ... 千岛落叶松 *L. gmelinii* var. *japonica*
- 1-4-4b. Type **C**<sub>33431</sub>**G**<sub>51877</sub>**T**<sub>82207</sub>**C**<sub>84462</sub>**T**<sub>89773</sub>**C**<sub>91778</sub>**A**<sub>109111</sub> ..... 千岛落叶松之外的 7 个种和变种  
The seven taxa other than *L. gmelinii* var. *japonica*
- 1-5a. Type **T**<sub>37204</sub>**A**<sub>40425</sub>**C**<sub>40958</sub>**T**<sub>46447</sub>**T**<sub>58419</sub>**G**<sub>63375</sub>**G**<sub>69143</sub>**T**<sub>71274</sub>**A**<sub>72703</sub>**G**<sub>77246</sub>**T**<sub>77297</sub>**C**<sub>84702</sub>**A**<sub>102432</sub>**T**<sub>106592</sub>  
**T**<sub>107627</sub>**A**<sub>107799</sub>**T**<sub>108987</sub>**T**<sub>111818</sub>**G**<sub>112677</sub>**T**<sub>114972</sub>**G**<sub>115010</sub>**C**<sub>115560</sub>**A**<sub>118514</sub>  
..... 日本落叶松 *L. kaempferi*
- 1-5b. Type **C**<sub>37204</sub>**G**<sub>40425</sub>**A**<sub>40958</sub>**C**<sub>46447</sub>**G**<sub>58419</sub>**A**<sub>63375</sub>**T**<sub>69143</sub>**C**<sub>71274</sub>**G**<sub>72703</sub>**T**<sub>77246</sub>**C**<sub>77297</sub>**A**<sub>84702</sub>**G**<sub>102432</sub>**G**<sub>106592</sub>  
**C**<sub>107627</sub>**G**<sub>107799</sub>**G**<sub>108987</sub>**G**<sub>111818</sub>**A**<sub>112677</sub>**G**<sub>114972</sub>**T**<sub>115010</sub>**T**<sub>115560</sub>**G**<sub>118514</sub>  
..... 日本落叶松之外的 7 个种和变种  
The seven taxa other than *L. kaempferi*

**Figure 1.** Molecular taxonomic key to eight taxa in genus *Larix* based on the singletons from the whole chloroplast genome  
**图 1.** 落叶松属 8 个分类单元分子分类检索表



**Figure 2.** Phylogenetic tree of the eight *Larix* species/varieties based on complete chloroplast genome sequences using the neighbour-joining method with the Tamura3-parameter model. The numbers near the branches are bootstrap support values (%) of 1,000 replications

**图 2.** 基于叶绿体全基因组序列的落叶松属 8 个种/变种的系统发生关系。分支图中的数字为 1,000 次重复抽样的自展支持率

### 3. 结果

落叶松属 18 个样品的叶绿体基因组序列的总长度为 121,971~122,598 bp。比对序列长度为 125,077 个核苷酸，5'-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的位置编号为 125,077。在



比对序列中,有 615 个变异位点,占叶绿体基因组序列总长度的~0.502%;有分类价值的单核苷酸多态位点合计 527 个,占叶绿体基因组序列总长度的~0.430%,占变异位点总数的~85.691%。有分类价值的 527 个单核苷酸多态位点可以用来区分 8 个种/变种,作为分子分类性状纳入分子鉴定检索表(图 1)。其中,第 71013 个变异位点含有 3 类不同的核苷酸。

物种特有的单核苷酸多态位点的数目存在种间差异。喜马拉雅红杉(133 个)、新疆落叶松(124 个)和欧洲落叶松(100 个)的单核苷酸多态位点的数目较多,是日本落叶松(23 个)的 5~6 倍,是另外 4 个种/变种(落叶松原变种、千岛落叶松、黄花落叶松和凯杨德落叶松)(5~10 个)的 10~20 倍(表 2)。

落叶松原变种、黄花落叶松、凯杨德落叶松以及千岛落叶松(在线裸子植物数据库官网 [https://www.conifers.org/pi/Larix\\_gmelinii\\_japonica.php](https://www.conifers.org/pi/Larix_gmelinii_japonica.php))两两之间的遗传距离均较小,低于 25,遗传关系较近(表 3)。喜马拉雅红杉、新疆落叶松及欧洲落叶松与其余的种/变种之间的遗传距离较大,分别为 200 多、200 以上和 90 以上(表 3),遗传分化明显较大。喜马拉雅红杉与新疆落叶松共同拥有 114 个独特的单核苷酸多态位点,与其余 6 个种/变种差异显著,喜马拉雅红杉与新疆落叶松之间的遗传距离大于 200,表明二者之间不仅存在一定的近缘关系,而且也存在较大程度的遗传分化。落叶松(原变种)和黄花落叶松之间遗传距离较小,且共同拥有 5 个独特的单核苷酸多态位点,显示了较为近缘的关系。

单核苷酸多态位点的构成存在物种间差异。喜马拉雅红杉和新疆落叶松的单核苷酸多态位点中, **T** 的数量最多, **G** 的数量最少;欧洲落叶松的单核苷酸多态位点中, **T** 的数量最少, **G** 的数量最多(表 2)。基于叶绿体全基因组序列数据的分析结果显示,18 个样品按照各自所属的种或变种聚类在一起(图 2),与形态分类一致。

#### 4. 讨论

在系统位置上,落叶松属植物是松科的一个属,自然分布于亚洲、欧洲和北美洲的北方和温带地区,为冬季落叶的乔木树种,约 1 mm 宽、约~10 mm 长的倒披针状条形的小叶、通常螺旋排列、簇状着生于枝上,在乔木树种中是形态特征较为独特的类群。叶绿体基因组的比对序列中,相同位点的数目(不包括缺失数据 missing data 和空位 gaps)为 118,756 个,占叶绿体基因组序列总长度的~96.866%,种/变种间相似度较高。

喜马拉雅红杉的球果为圆柱形或卵状圆柱形,苞鳞显著外露,苞鳞的长度比种鳞要长,小枝下垂,在中国植物志中被分类在红杉组内,形态上与落叶松组的树种(本研究中的其余 7 个种和变种)差异明显。落叶松组的球果为卵球形或狭卵球形,苞鳞的顶端不外露或微微外露,苞鳞的长度比种鳞要短,小枝不下垂。

新疆落叶松的种鳞呈三角状卵形、卵形或近菱形,先端为圆形,通常背面密被略带紫棕色的毛。欧洲落叶松的球果中部的种鳞为近圆形,苞鳞先端的尖头微微露出。落叶松的成熟球果的种鳞为五角状卵形,先端截形或微凹,背面无毛;短枝顶端的叶枕之间有黄白色长柔毛。日本落叶松的球果的种鳞为卵状矩圆形或卵方形,背面有褐色细小疣状突起和短粗毛。幼枝被褐色柔毛。黄花落叶松的球果的种鳞为阔方卵形或方圆形。苞鳞的顶端不外露。千岛落叶松的球果的苞鳞较薄,披针形到长圆状卵形,先端渐尖,具一突出的中脉。凯杨德落叶松 *L. cajanderi* 是 *L. gmelinii* (Rupr.) Kuzen. var. *gmelinii* 的异名(在线世界植物志官网 <http://www.worldfloraonline.org/>; 在线生物物种名录 (Catalogue of Life) 官网 <https://www.catalogueoflife.org/>; 英国邱园皇家植物园(Royal Botanic Gardens)在线世界植物(Plans of the world online)官网 <https://powo.science.kew.org/>)。

**Table 3.** Pairwise genetic distances between the eighteen samples of *Larix* based on complete chloroplast genome sequences with deletion of 85 variable base sites which have no value in classification

**表 3.** 基于叶绿体全基因组序列(其中不包含 85 个没有分类价值的核苷酸变异位点)的落叶松属 18 个样品之间的遗传距离

No. of sample 样品号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	0																
2	0	0															
3	0	0	0														
4	0.82	0.82	0.82	0													
5	0	0	0	0.82	0												
6	14.95	14.95	14.95	14.94	14.95	1.63											
7	14.95	14.95	14.95	14.94	14.94	1.63	0.82										
8	14.12	14.12	14.12	14.12	14.12	0.82	0.82	22.44									
9	21.23	21.23	21.23	22.06	21.25	22.43	23.26	22.44	16.62								
10	15.51	15.51	15.51	16.34	15.52	17.44	17.44	16.62	15.52	96.54							
11	91.63	91.63	91.63	92.45	91.64	95.66	96.47	95.68	99.02	96.54	105.80						
12	25.79	25.79	25.79	25.78	25.78	27.82	28.63	27.82	34.12	29.96	105.81	0					
13	25.80	25.80	25.80	25.78	25.79	27.82	28.63	27.82	34.12	29.96	105.81	0	0				
14	25.79	25.79	25.79	25.78	25.78	27.82	28.63	27.82	34.12	29.96	105.80	0	0	0			
15	25.79	25.79	25.79	25.78	25.78	27.82	28.63	27.82	34.12	29.96	105.80	0	0	0	0		
16	25.79	25.79	25.79	25.81	25.81	27.84	28.66	27.85	34.12	29.96	105.85	0	0	0	0	0	
17	210.45	210.45	210.45	211.27	210.46	211.47	212.28	211.46	217.04	214.55	284.43	220.97	221.00	220.98	220.98	220.24	220.24
18	218.24	218.24	218.25	218.24	217.43	219.36	219.32	218.49	230.66	224.84	297.79	232.74	232.76	232.74	232.74	233.69	225.74

Notes: the sample numbers are same as shown in Table 1. The data shown in Table 2 is the actual value  $\times 10^5$   
注: 样品序号同表 1。表 2 中的数据为实际数据乘以  $10^5$

本研究引入核苷酸分子数据, 获得了关于落叶松属植物分类鉴定的较为直观、简明的新认识。日本落叶松的 5 个体表现为较宽幅的遗传变异(图 2 及表 3), 可能与长期杂交育种有关[26] [27]。通过人工杂交育种拓展遗传背景获取杂种优势的事例很多, 例如, 兰科(Orchidaceae)的卡特兰属(*Cattleya* Lindl.)的属间杂种数量高达 5746 个, 兰科的 7 个属(蝴蝶兰属 *Phalaenopsis* Blume、兰属 *Cymbidium* Sw.、卡特兰属、兜兰属 *Paphiopedilum* Pfitz.、石斛属 *Dendrobium* Sw.、文心兰属 *Oncidium* Sw.和万代兰属 *Vanda* W. Jones ex R. Br.)合计有杂种 10 万多个, 包括品种(种)间杂种以及属间杂种[28]。由于理解和概念不同, 不同学者的物种标准和范围有很大不同, 分类争议较大。

对于记载明确的杂交组合, 深入分析各组学层面的遗传变异规律, 有助于加深理解不同基因型的分类地位和利用价值, 是重要的研究方向之一。在全球范围内全面收集各科属的各种变异类型的代表样品, 不仅仅是相关研究团队的事, 也应该是标本馆的工作内容, 结合标本保存和共享, 进行形态和分子水平的比较分析, 有助于研制各科属完整的分子分类检索表。基于形态特征建立的经典植物分类系统需要利用新的生物学证据校准和完善。

对 21 国 40 个植物标本馆的 4500 份标本的抽样调查发现, 超过 50% 的热带植物标本存在名称鉴定错误[29]。植物鉴定仍然是具有挑战性的世界性课题。首先, 需要有栽培园艺学和育种学相关知识, 才能识别出或区分开野生种和杂种。野生种是长期进化的产物, 数量有限; 杂种是天然杂交或人工杂交产生的后代, 杂种的数量与育种规模的大小有关。在分类学研究过程中, 野生种和杂种通常是区别对待的。其次, 需要分类学和系统发生学相关知识才能理解野生种的分类学地位或系统发生位置; 还需要分子生物学、组学和生物信息学相关知识才能理解基因组水平上的分子性状、微观信息及其利用价值与利用方法。植物分类鉴定是多学科联合攻关的创新研究方向之一。

我们的方法原理在芍药属(*Paeonia* L.) [7]、胡桃属(*Juglans* L.) [8]、紫薇属(*Lagerstroemia* L.) [9] [30]、柿属(*Diospyros* L.) [10]、鹅掌楸属(*Liriodendron* L.) [30]以及藻类的马尾藻属(*Sargassum* C. Agardh) [31]等类群方面已有发表, 对落叶松属植物的首次成功鉴定, 表明本方法不仅适用于被子植物和藻类的物种鉴定, 也可用于裸子植物的分类鉴定, 相关成果也便于人工智能(Artificial Intelligence, 简称 AI)使用。

落叶松属植物的分类学研究积累了大量资料。中国数字植物标本馆(<http://www.cvh.ac.cn/spms/list.php?taxonName=Larix>)目前有来自国内外的落叶松属植物标本 4591 份的形态特征图片, 中国植物志的中文版(<http://www.iplant.cn/info/Larix?t=z>)和英文版(<http://www.iplant.cn/info/Larix?t=foc>)的网络电子版提供了落叶松属植物的详细形态特征描述和全球地理分布信息[2], 但是, 并没有收录到落叶松属的全部物种。例如, 其中没有关于凯杨德落叶松和千岛落叶松的标本信息。标本数量较多的名称依次为红杉(*L. potaninii* Batal.) (1300 份)、落叶松(756 份)、华北落叶松(*L. gmelinii* var. *principis-rupprechtii* (Mayr) Pilg.) (410 份)、新疆落叶松(396 份)、黄花落叶松(283 份)、怒江红杉(*L. speciosa* W. C. Cheng & Y. W. Law) (155 份)、日本落叶松(217 份)、西藏红杉(*L. griffithii* Mast.) (109 份)、大果红杉(*L. potaninii* var. *australis* A. Henry ex Hand.-Mazz) (102 份)、四川红杉(*L. mastersiana* Rehder & E. H. Wilson) (66 份)、喜马拉雅红杉(65 份)、太白落叶松(*L. chinensis* Beissn.) (40 份)及欧洲落叶松(33 份)。

过去 100 多年来积累了大量的植物标本, 标本馆的业务内容除了采集保存标本之外, 还包括馆际的借阅、交换和赠送标本, 北京的国家植物标本馆的空间已经变得非常有限, 很难继续容纳更多的标本。长期以来, 标本馆以收集野生种为主, 栽培品种只占一小部分。标本馆为植物分类学研究提供第一手科研材料, 同时标本数字化工作的推进极大方便了标本数据资源的利用和共享。植物标本的实际情况比较复杂。有的标本最初按照新物种发表, 后来发现是杂种。例如, 河北核桃(麻核桃) *Juglans hopeiensis* Hu 的标本是在野外采集的, 最初作为核桃属的 1 个新种发表, 后来经过研究发现, 应该是胡桃楸 *Juglans*



*mandshurica* Maxim.与野生的家核桃 *Juglans regia* L.之间的天然杂交后代。*Paeonia suffruticosa* Andr.这个种名最初发表时依据的是栽培牡丹品种的植株。有的植物种在标本馆可以看到标本,但是在野外找不到活植物。例如,怪柳属的金塔怪柳 *Tamarix jintaenia* P. Y. Zhang et M. T. Liu 和莎车怪柳 *Tamarix sachensis* P. Y. Zhang & M. T. Liu。野外采集到标本的植物,有的是历史上曾经栽培过、后来被逸散到自然界的半栽培化植物。栽培植物品种的标本应该纳入标本馆未来发展的重点收集保存范围之一。

应该设立一些课题,推动积极思考标本馆的发展、挑战与展望,例如,分析各科属植物标本的馆藏现状、评价每个物种在分类鉴定研究过程中最少需要保存多少份标本,展示潜在的各种问题。最初没有意料到的一个收获是正规干燥制作的植物标本,在相对湿度较低的室温保存环境下,几十年后仍然可以提取出 DNA,可以用高通量测序方法获得叶绿体基因组的全长序列。因此,应该重新审视和制定兼顾形态分类和分子研究需求的植物标本的馆藏标准与保存方法,评估是否有必要为每个物种收藏 1300 份标本(如,红杉)才能达到研究目的,超量的标本或不符合规定标准的标本应该如何利用和处理等。标本馆应该由收藏转型为应对全球植物分类研究需求的收集和保存,利用国际间标本馆际免费互赠和交换标本通道逐步完成各科属的全部物种(基因型)标本的补充收集目标[32],标本馆的现有空间显然远远不够用。干燥的环境条件可以长期保存植物标本和其中的 DNA。应该在交通便利的干旱区(如,敦煌地区)建立备份标本馆设施或标本保存中心,解决标本馆空间不足以及最大限度地避免虫害等对标本的侵蚀等问题,管理成本也较低,保存效果也较好。

## 感谢

本研究得到国家林业和草原局北方林木种子检验中心李庆梅老师、中国科学院植物研究所卢思聪老师热情指导,国家植物标本资源库和植物物种信息与大数据平台刘慧圆老师热情讨论。

## 基金项目

国家自然科学基金项目(No. 31770744)及河北省自然科学基金青年基金项目(C2022402017)。

## 参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志第 7 卷: 落叶松属(松科) [M]. 北京: 科学出版社, 1978. <http://www.cn-flora.ac.cn/>
- [2] Wu, Z.Y., Hong, D.Y. and Raven, P.H. (1999) Flora of China, Volume 4, *Larix* (Pinaceae). Science Press, Beijing and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, 33-37. <http://www.iplant.cn/foc>
- [3] 李林初. 落叶松属的核型及系统位置的研究[J]. 植物分类学报, 1993, 31(5): 405-412. <http://www.plantsystematics.com/CN/Y1993/V31/I5/405>
- [4] 王玲, 卓丽环, 杨传平, 张捷. 兴安落叶松等位酶水平的遗传多样性[J]. 林业科学, 2009, 45(8): 170-174. <http://www.cqvip.com/QK/71135X/201107/31398678.html>
- [5] 张学科, 毛子军, 宋红, 孟斌. 五种落叶松遗传关系的等位酶分析[J]. 植物研究, 2022, 22(2): 224-230. <http://bbr.nefu.edu.cn/CN/Y2002/V22/I2/224>
- [6] Guo, Q., Li, H., Qian, Z., Lu, J. and Zheng, W. (2021) Comparative Study on the Chloroplast Genomes of Five *Larix* Species from the Qinghai-Tibet Plateau and the Screening of Candidate DNA Markers. *Journal of Forestry Research*, **32**, 2219-2226. <https://doi.org/10.1007/s11676-020-01279-4>
- [7] Suo, Z.L., Zhang, C.H., Zheng, Y.Q., et al. (2012) Revealing Genetic Diversity of Tree Peonies at Micro-Evolution Level with Hyper-Variation Chloroplast Markers and Floral Traits. *Plant Cell Reports*, **31**, 2199-2213. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1330-0>
- [8] Suo, Z.L., Chen, L.N., Pei, D., Jin, X.B. and Zhang, H.J. (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>
- [9] Suo, Z.L., Li, W.Y., Jin, X.B. and Zhang, H.J. (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>
- [10] 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 序列揭示德阳栎和油栎为栽培栎的最近缘物种[J]. 农业科学, 2018, 8(6): 657-673. <https://doi.org/10.12677/hjas.2018.86100>
- [11] LePage, B.A. and Basiger, J.F. (1995) The Evolutionary History of the Genus *Larix* (Pinaceae). United States Department of Agriculture, Forest Service, Intermountain Research Station, General Technical Report GTR-INT-319, U.S. Department of Agriculture Forest Service, Washington DC, 19-29.
- [12] 毛子军, 王秀华, 周丹, 杨永富. 落叶松属系统学研究概况[J]. 东北林业大学学报, 1999, 27(2): 39-44. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-5382.1999.02.010>
- [13] 洪德元. 生物多样性事业需要科学、可操作的物种概念[J]. 生物多样性, 2016, 24(9): 979-999. <https://doi.org/10.17520/biods.2016203>
- [14] Bondar, E.I., Putintseva, Y.A., Oreshkova, N.V. and Krutovsky, K.V. (2019) Siberian Larch (*Larix sibirica* Ledeb.) Chloroplast Genome and Development of Polymorphic Chloroplast Markers. *BMC Bioinformatics*, **20**, Article No. 38. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2571-x>
- [15] Kim, S.-C., Lee, J.-W., Lee, M.-W., Baek, S.-H. and Hong, K.-N. (2018) The Complete Chloroplast Genome Sequences of *Larix kaempferi* and *Larix olgensis* var. *koreana* (Pinaceae). *Mitochondrial DNA Part B*, **3**, 36-37. <https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1419092>
- [16] Li, B., Lin, F.R., Huang, P., Guo, W. and Zheng, Y. (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>
- [17] 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>
- [18] 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 1148. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01148>
- [19] 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 15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00015>
- [20] 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>
- [21] 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>
- [22] Guo, C., Liu, K.J., Li, E.Z., et al. (2023) Maternal Donor and Genetic Variation of *Lagerstroemia indica* Cultivars. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, Article No. 3606. <https://doi.org/10.3390/ijms24043606>
- [23] 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>
- [24] 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>
- [25] Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., et al. (2017) DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*, **34**, 3299-3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
- [26] 张晓放, 董茜, 罗明哲, 于朝龙, 吕晓亮. 日本落叶松育种研究现状及趋势[J]. 林业科技, 2005, 30(3): 10-11. <http://doi.org/10.3969/j.issn.1001-9499.2005.03.004>
- [27] 王若森, 倪伯春. 日本杂交落叶松引种研究[J]. 林业勘探设计, 2009, 152(4): 58-60.
- [28] 卢思聪, 张毓, 石雷, 赵世伟, 等. 世界栽培兰花百科图鉴[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2014: 50-51.
- [29] 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>
- [30] 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>
- [31] 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. <https://doi.org/10.12677/hjas.2022.1211151>
- [32] 王文采, 等. 世界植物简志[M]. 北京: 北京出版集团北京出版社, 2021: 1-172.