



# 植物多样性对苏大附中中学生放学后路线的影响

作者：李浩然 徐嘉程 王廷羽 周允哲

指导教师：王心悦 刘知远



## 摘要

利用DNA条形码调查苏州大学附属中学内四条路径的植物多样性，配合实地统计和调查问卷，了解同学们的活动情况。据此推断校园内各路径植物多样性对同学们放学后活动路线的影响。

## 前言

在学习压力日渐增长的环境下，保持一个良好的心态，对学生的日常生活和学习有着极强的促进效果，校园环境是越来越重要，而绿化则是校园环境的重要组成部分，对学生有巨大影响。

近十年，条形码技术的应用日渐成熟。使用植物上的 *rbcL*、*matK* 等基因作为条形码，进行物种分子鉴定，操作简单，不需要具备较高的分类学知识和能力。

本课题利用DNA条形码技术，扩增和比对植物叶绿体上的 *rbcL* 基因，以鉴别植物的物种，更好的了解校园植物的多样性和亲缘关系，并试图以此探究他们对人类影响的独特性。

预测：植物的多样性和人流量呈正相关。

## 材料与与方法

### 1. 1 材料

实验采集样本来自苏大附中内四条路径上能采集到的所有植物样本。使用试剂：DNA提取裂解液（6M 盐酸胍）、硅胶树脂（Silica）、洗涤缓冲液、去离子水、PCR扩增采用 *rbcLaF* / *rbcLaRev*引物、2%琼脂糖凝胶、DNA marker。

### 1. 2 方法

#### 1. 2. 1 取样方法

去除主观因素的前提下选择苏大附中4条路径。取其中所有（共28个）植物样本。图1、2是路径1、2的实景照片。

#### 1. 2. 2 用Silica方法提取样本DNA。

#### 1. 2. 3 PCR扩增 *rbcL* 目的基因。

#### 1. 2. 4 凝胶电泳

扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳分离（135V，30min），以Gelred核酸染料显色。以凝胶成像分析系统记录，成功扩增的目的条带送去苏州金唯智公司测序。

#### 1. 2. 5 人流量统计

选取5个晴朗的晚上，从同一时间开始，分别在4条路径上计时3分钟，统计单位时间内经过该路径的人流量（单位：人/分钟）。

#### 1. 2. 6 调查问卷

在苏大附中平面图上标记四条所选择的路径（图3），描述路段情况，请同学们扫描图4中调查问卷的二维码，在与目的地相同距离的情况下选择路径，统计选择每条路的总人数。将走读生与住读生选择的路径分开，分别单独制作饼图观察。

#### 1. 2. 7 数据分析

利用DNA Subway查看序列质量，使用BLAST比对物种，并统计成功测序的植物的种类。

将各日四条路径单位时间内的人流量取平均值，绘制柱状统计图，观察并分析数据，并与预测进行比较。

将统计结果按照 走读生寻路/住读生寻路 分别制作饼图，观察数据占比，并与预测进行比较。



图2. 路径2的实景照片，几乎没有植物存在。



图1. 路径1的实景照片，可见植物多样性丰富。



图3. 路径1-4在校园平面图的大致位置。



图5(a) 图5(b)



图4. 本次实验所用的调查问卷的二维码链接。

图5. 问卷调查所选路段寻路意向统计图。此饼图为问卷调查的调查结果。显示的住读生和走读生对于两条路线的选取倾向。5(a)为住读生寻路意向统计图，5(b)为走读生寻路意向统计图。

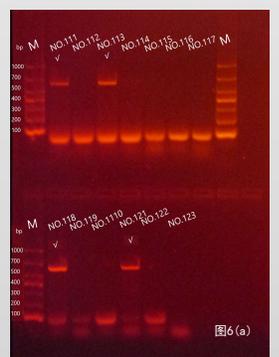


图6(a)



图6(b)

图6. 植物样本 *rbcL* 条形码PCR扩增结果。M代表的是DNA Marker，目的条带长度在600-700bp之间。扩增成功的样本上被送去测序（用“√”标记）。

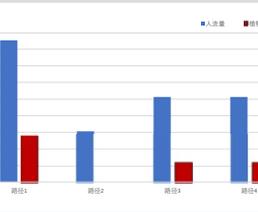


图7. 各路径五日平均人流量与植物多样性对比。蓝色柱为根据五天内每日每路段的平均人流量算出的各路径人流量平均数。红色柱为对应路径上采集的植物种类。

路段编号	样本序列	学名	常用名	路段编号	样本序列	学名	常用名
1	1111	<i>Magnolia kobus</i>	日本辛夷	3	121	<i>Pyrus commis</i>	梨
1	113	<i>Osmanthus minor</i>	小叶月桂	3	124	<i>Citrus reticulata</i>	橘子
1	118	<i>Chimonanthus praecox</i>	腊梅	3	125	<i>Osmanthus minor</i>	小叶月桂
1	11111	<i>Lactuca estiva</i>	莴苣	4	132	<i>Magnolia x soulangeana</i>	二乔木兰
1	1112	<i>Forzythia suspensa</i>	连翘	4	135	<i>Magnolia x soulangeana</i>	二乔木兰
1	1113	<i>Corallaria majalis</i>	铃兰				

图8. 4条路径上使用 *rbcL* 条形码成功鉴定的植物样本序号、常见名与学名。

## 实验结果

我们根据统计的数据取平均值，得到了如图五所示的结果：路径1为42.70人/分钟，路径2为15.26人/分钟，路径3为25.60人/分钟，路径4为25.62人/分钟。人流量结果为：路径1>路径3≈路径4>路径2。路径1所占比例为住读生寻路的65.5%，高于路径2的34.5%，路径3为52.2%，路径4为47.8%，两者基本相同。

我们采集了26种样本，路径1采集了14种样本，路径2采集了0种样本，路径3采集了6种样本，路径4采集了6种样本。其中成功测序的有12种，第一条路成功了6种，第二条路成功了4种，第三条路成功了2种，失败的有14种。

结合 *rbcL* 测序结果与形态学分析，路径1含有已知的植物为：日本辛夷、小叶月桂、腊梅、莴苣、铃兰、连翘、香樟以及7种未知的植物。

路径2几乎不含有植物

路径3含有已知的植物为：梨、橘子、小叶月桂、肉桂以及2种未知植物。

路径4含有已知的植物为：二乔木兰1、二乔木兰2、欆木、薄荷以及2种未知的植物。

综合数据分析，我们得到了与我们预期相符的结果，即在植物种类比较多的路上，人流量比较大。植物多样性极多的路径1是植物多样性为零的路径2的2.79倍。植物多样性几乎相同的路径3和路径4，人流量差距小。路径1的植物多样性多于路径3和路径4，人流量是路径3和路径4的1.67倍。

## 问题讨论

经过此次的实验，我们发现实验结果和我们的预期情况基本吻合，在这样的情况下，我们通过讨论提出了以下问题：

本次实验，我们的样本量较大，但是实验的失败率较高。对此我们小组内部进行了讨论，讨论出了一些结论：首先，采样时节为秋天，所以植物内部产生较多果糖，糖类物质可能影响到实验的结果；其次，可能是由于实验操作中的不规范造成的大批量失败；第三，由于第二次实验时我们未将提取出来的样本即刻放入冰中低温保存，而是暴露在常温中，这可能导致提取物中的DNA酶发挥作用，从而导致实验的失败。

本次实验的过程中，在路径4的样本实验中，出现了两种外观不同，但实验结果却相同的个体。对此，我们讨论的结果是：一、可能是我们所采用的dna片段导致的误差，我们采取的是植物叶绿体上的 *rbcL* 基因，由于这两种植物的突变位点并没有在这500到600个bp的基因片段上显示出来；二、也可能是在实验时获得的序列质量较低，导致了序列上的错误位点较多，所以在比对之前裁剪的部位太长，所以导致长度不够体现出这两种植物区别，导致的此次实验误差。

根据本次的实验结果（如果我们有幸继续进行实验），我们小组对后续的研究方向进行了讨论。首先，我们应该从所选路线的采样植物出发，来寻找他们的异同之处，以此来探究植物多样性真正吸引人的原因。其次，我们可以选择两条植物密度相似，而人流量完全不同的路线，来探究原因。

## 参考文献

- DeSalle R, Egan MG and Siddall M. (2005) The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360, 1905-1916.
- Hebert PDN, Cywinka A, Ball SL, DeWaard JR. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270 (1512): 313-321.
- Meyer OP, Paulay G. (2005) DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology* 3(12): e422.
- Huang J, Xu Q, Sun, ZJ, Tang GL and Su, ZY. (2007) Identifying earthworms through DNA barcodes. *Pedobiologia* 51, 4:301-309

## 致谢

苏州工业园区生物创新课程；冷泉港亚洲DNA学习中心；冷泉港亚洲DNA学习中心Xinyue.Wang, Zhiyuan.Liu, John Mark Olson, Cheng.Du等老师；苏州大学附属中学高二生物教研组。