

基于 cpDNA 序列对长白山区鸢尾属植物系统发育的研究

李媛媛 杨柳 吕凤凤 田雪 安婷婷 王勃 车旭

(东北师范大学生命科学院, 长春 130024)

摘要: 本研究通过引物筛选、PCR、琼脂糖凝胶电泳检测、测序, 获得了长白山区 7 种鸢尾属植物的 cpDNA 序列。 *atpH* 片段的长度为 520bp, *PSbI* 片段的长度为 358bp。本研究以肖鸢尾 (*Morea*, NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 为外类群, 用最大简约法 (MP) 进行聚类分析, 获得了较一致的系统树。分析结果表明, cpDNA 序列对于探讨组 (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 Genebank 中的鸢尾属植物的序列比对, 本研究倾向于支持赵毓棠建立的中国鸢尾属植物属下的分类系统。本研究为进一步探讨鸢尾属植物的系统演化关系、谱系发育、品种培育等提供了新的参考和理论依据。

关键词: 鸢尾属; cpDNA; 系统分类

Abstract: cpDNA sequences of seven kinds of genus *Iris* and an outgroup (*Morea*) were obtained by primer design, PCR, agarose gel electrophoresis and cluster analysis. The *atpH* sequence length is 520bp, *PSbI* sequence length is 358bp. A more consistent systematic tree was obtained by cluster analysis with maximum parsimony method taking *M. iridioides* L. as the outgroup. 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 *Iris* species in Genebank, our study supports the classification system of the under group of Chinese *Iris* species, established by ZhaoYutang. This study provides new data for further research on the phylogenetic and phylogeographic relationships of genus *Iris*.

Key words : *Iris*; cpDNA; Systematic classification

鸢尾科植物为多年生草本。地下部分具根状茎、球茎或鳞茎; 叶多基生, 少互生, 基部成鞘状, 具平行脉; 大多数种类只有花茎, 少数种类具有地上茎; 花两性, 辐射对称; 花被裂片 6 枚, 呈两轮排列; 雄蕊 3 枚; 花柱 1, 中轴胎座; 蒴果^[2]。

鸢尾属是鸢尾科的模式属, 属名 (*Iris*) 来源于希腊神话中的众神使者和彩虹女神^[1]。

鸢尾属植物的根状茎长条形或块状, 横走或斜伸; 叶顶端渐尖; 大多数物种只有花茎而无明显的地上茎; 花较大, 蓝紫色、紫色、红紫色、黄色、白色; 蒴果卵圆形、椭圆形或圆球形。本属的模式种为德国鸢尾 (*I. germanica* L.)^[3]。鸢尾属植物约有 260-300 种, 我国约

分布有 60 种、13 变种及 5 变型^[4]，东北地区分布有鸢尾属植物 19 种，其中，辽宁省分布约 16 种^[5]，长白山区鸢尾属植物约有 10 种^[6]。

鸢尾属植物在地下部分和地上部分均表现出非常大的变化趋势，因此植物体的形状特征差异很大，在系统分类上存在较大的困难，分类学家们先后建立了多个鸢尾属下的分类系统，但是因为分类时依据的形态学特征不同，取舍也存在差异，因此建立的各分类系统都有其片面性。我国鸢尾属植物分类系统是在 Rodioninko 建立的系统基础上产生的，并随着系统研究的深入也不断进行了修订^[7]。目前，cpDNA 序列在探讨科、亚科、属内的系统发育与分类问题的研究上取得了许多重要进展。cpDNA 基因组(120~210kb)和分子量(0.85×10⁵~1.0×10⁵kD)均较小，有利于提取与分离。并且其重复序列少，在结构和序列上都相对保守，所编码基因的含量、组成、排列和结构基本一致。叶绿体基因组由于具有长度较小、包含大量 DNA 成分、在分子水平上差异明显、且呈单亲遗传、极少或没有发生重组和种内变异、不受基因的缺失、重叠及假基因的干扰等特性，适合于各种不同分类阶元的系统发育研究，为比较进化研究提供了基本的信息支持^[8]。

目前，在国内，叶绿体基因在探讨科、亚科、属内的系统发育与分类问题的研究上取得了重要进展。秦民坚等^[9]对鸢尾、野鸢尾、蝴蝶花和德国鸢尾进行叶绿体 *rbcL* 基因序列分析，成功建立了分子系统树。刘云等^[10]利用 RAPD 技术对吉林省的 8 种鸢尾属植物进行了研究，从 3 级 60 个引物中筛选出 6 个条带清晰的多态性引物，采用 UPGMA 法对八种鸢尾进行聚类分析，得到了亲缘关系图，并且认为北陵鸢尾 (*I. typhifolia* Kitagawa) 和溪荪 (*I. sanguinea* Donn ex Horn.) 有较近的亲缘关系。目前，基于叶绿体基因探讨我国长白山区鸢尾属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鸢尾属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鸢尾属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鸢尾属植物的系统演化、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 7 种样品均来自长白山地区，采集地点的详细信息参见表 1

表 1 鸢尾样品采样点概况

样品名称	学名	采样地	纬度	经度	样本数(个)	样本编号
燕子花	<i>Iris laevigata</i> Fisch.	三角龙湾	42°21'6"	126°26'5"	2	I20、I22
	<i>I. laevigata</i> Fisch.	敦化黄泥河镇	40°50'5"	123°48'4"	2	I55、I58
山鸢尾	<i>I. setosa</i> Pall. ex Link	长白山保护区	42°02'39"	128°06'9"	4	B1、B2、B3、B4
单花鸢尾	<i>I.uniflora</i> Pall. ex Link	黑河五道豁洛	49°49'4"	126°53'5"	4	C1、C2、C3、C4
细叶单花鸢尾	<i>I.uniflora</i> var. <i>caricina</i> Kitagawa	东丰	42°40'4"	125°31'3"	4	D1、D2、D3、D4
	<i>I.ensata</i> Thunb.	二道水田村	42°30'3"	128°08'1"	2	E1、E2
玉蝉花	<i>I.ensata</i> Thunb.	三角龙湾	42°21'6"	126°26'2"	2	E3、E4
	<i>I.sanguinea</i> Donn ex Horn.	敦化	43°35'5"	128°02'1"	4	F1、F2、F3、F4
朝鲜鸢尾	<i>I.odaesanensis</i>	临江珍珠门	41°54'3"	126°45'1"	4	G1、G2、G3、G4

1.2 实验材料采样图



图1 样品采集地点示意图

1.3 实验试剂和仪器

1.3.1 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 \times buffer	Takara(大连)
液氮	中国科学院长春应用化学研究所

1.3.2 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厂

1.4 实验方法

1.4.1 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 2 ml 离心管中,加入提前预热至 65 $^{\circ}$ C 的 Buffer GP1 液 700 μ l 和 2 μ l β -巯基乙醇,缓慢震荡、混合均匀后,65 $^{\circ}$ C 水浴 30 分钟。
- ③冷却至室温后,加入 700 μ l 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(Spin Column DM 已放入 Collection Tube 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 pin 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 $^{\circ}$ C 低温保存。

1.4.2 聚合酶链式反应(PCR)

PCR 扩增反应的总体积为 30 μ L，PCR 反应体系为 ddH₂O 22.5 μ L,10 \times buffer,0.3 μ L Taq DNA 聚合酶,BSA 0.6 μ L,引物 1 和引物 2 分别 0.5 μ L，以及 2 μ L 的模板 DNA。

反应程序为：95 $^{\circ}$ C,5min；94 $^{\circ}$ C，30s；退火温度，48 $^{\circ}$ C，30s；72 $^{\circ}$ C，90s；35 个循环；72 $^{\circ}$ C，8min；4 $^{\circ}$ C 保存。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 5 μ l 反应液电泳检查。PCR 扩增产物送至英俊公司进行测序。

1.4.3 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 引物筛选

2.1.1 实验所用引物序列

引物名称	序列(5'-3')	退火温度 (T _m / $^{\circ}$ C)	变异位点(个)
<i>trnS(GCU)</i>	GCCGCTTTAGTCCACTCAGC	48	4
<i>trnG(UCC)</i>	GAACGAATCACACTTTTACCAC		
<i>Trn L-F(c)</i>	CGAAATCGGTAGACGCTACG	48	5
<i>Trn L-F(f)</i>	ATTTGAACTGGTGACACGAG		
<i>trnH</i>	ACTGCCTTGATCCACTTGGC	48	2
<i>psbA</i>	CGAAGCTCCATCTACAAATGG		
<i>rps16F</i>	GTGGTAGAAAGCAACGTGCGACTT	46	6
<i>rps16R2</i>	TCGGGATCGAACATCAATTGCAAC		
<i>atpF</i>	ACTCGCACACACTCCCTTTCC	48	4
<i>atpH</i>	GCTTTTATGGAAGCTTTAACAAT		
<i>psbK</i>	TTAGCCTTTGTTTGGCAAG	44	8
<i>psbI</i>	AGAGTTTGAGAGTAAGCAT		
<i>RpoC2-f</i>	CGAGCAGTTTCTTGRAAACTCGC	48	7
<i>RpoC2-r</i>	GAGGATTAATGKCRGATCCWCAAGG		

2.1.2 引物筛选

根据已优化的PCR反应体系和程序,对叶绿体通用引物进行筛选。实验中引物的退火温度和时间由引物的长度、碱基组成及其浓度和模版DNA的序列长度所决定,引物的退火温度会对引物与模版的特异性结合产生影响,因此对于不同引物的退火温度需要进行细致的筛选^[11-12]。本试验中以初步的最适温度为标准,设置梯度为2℃的退火温度,确定引物的最佳退火温度。最终获得电泳条带清晰、明亮、单一的引物共2对。分别为*atpF-atpH*和*PsbI-PsbK*。

2.2 序列特征

使用 ClustalX 软件对 7 种鸢尾品种叶绿体 *atpF-atpH* 和 *PsbI-PsbK* 的扩增 DNA 序列进行排序、手动调整,并将两端切齐后进行分析,*atpF-atpH* 和 *PsbI-PsbK* 序列长度分别为 520bp,和 358bp,序列矩阵总长度为 878bp。不同引物的碱基含量差异不大,组合序列的碱基 A、T、C 和 G 的含量分别为 32.2%、34%、16.5%和 17.3%,AT 的含量较高。将 gap(空位)作 missing(缺失)处理时,G+C 的含量(33.8%)低于 A+T 的含量(66.2%)。

表 2 叶绿体通用引物序列特征

序列特征	<i>atpF-atpH</i>	<i>PsbI-PsbK</i>	组合序列
序列比对长度/bp	520	358	878
A 含/%	29.5	35.6	32.2
G 含/%	19.3	14.3	17.3
C 含/%	16.9	16.1	16.5
T 含/%	34.3	34	34
gaps	24	37	113
Tajima's D	0.77319	0.39757	-2.04075
h	8	9	12
hd	0.876	0.925	0.948

2.3 基于 cpDNA 序列的系统发育分析

将比对校正后的序列保存成 NEXUS 文件格式,使用 PAUP40b10 软件^[13],运用最大简约法(Maxim parsimony, MP)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^[14-15]。从幼苗发育形态、植株的形态学特征来看,鸢尾属植物与肖鸢尾属内的 *M. iridioides* L.有较近的亲缘关系,所以本实验选择亲缘关系较近的肖鸢尾属内的 *M. iridioides* L.作为外类群。

用肖鸢尾属内的 *M. iridioides* L.作为外类群,用最大简约法(Maximum parsimony, MP)进

行聚类分析，所得系统树的支持率在 60% 以上，结果参见图 2。

从图 2 中可以看出，7 个鸢尾属植物聚成三个分枝，第一大分枝包括山鸢尾 *I. setosa* Pall. ex Link、燕子花 *Iris laevigata* Fisch.、玉蝉花 *I. ensata* Thunb. 和溪荪 *I. sanguinea* Donn ex Horn.，第一分枝又分为两个分枝，其中，溪荪 *I. sanguinea* Donn ex Horn. 单独分成一枝，*I. setosa* Pall. ex Link、*Iris laevigata* Fisch.、*I. ensata* Thunb. 三者亲缘关系较近；第二大分枝包括窄叶单花鸢尾 *I. uniflora* var. *caricina* Kitagawa 和单花鸢尾 *I. uniflora* Pall. ex Link；朝鲜鸢尾 *I. odaesanensis* 则单独分成一枝，上述结果说明，这七个物种之间也存在着一定的遗传差异。

图 2 中，肖鸢尾属与鸢尾属两个植物类群明显地分开，并且鸢尾属下的无附属物组与紫苞鸢尾组也明显分开，说明 cpDNA 序列更加适用于研究和探讨属之间、组（系）之间分类等级的系统发育研究。

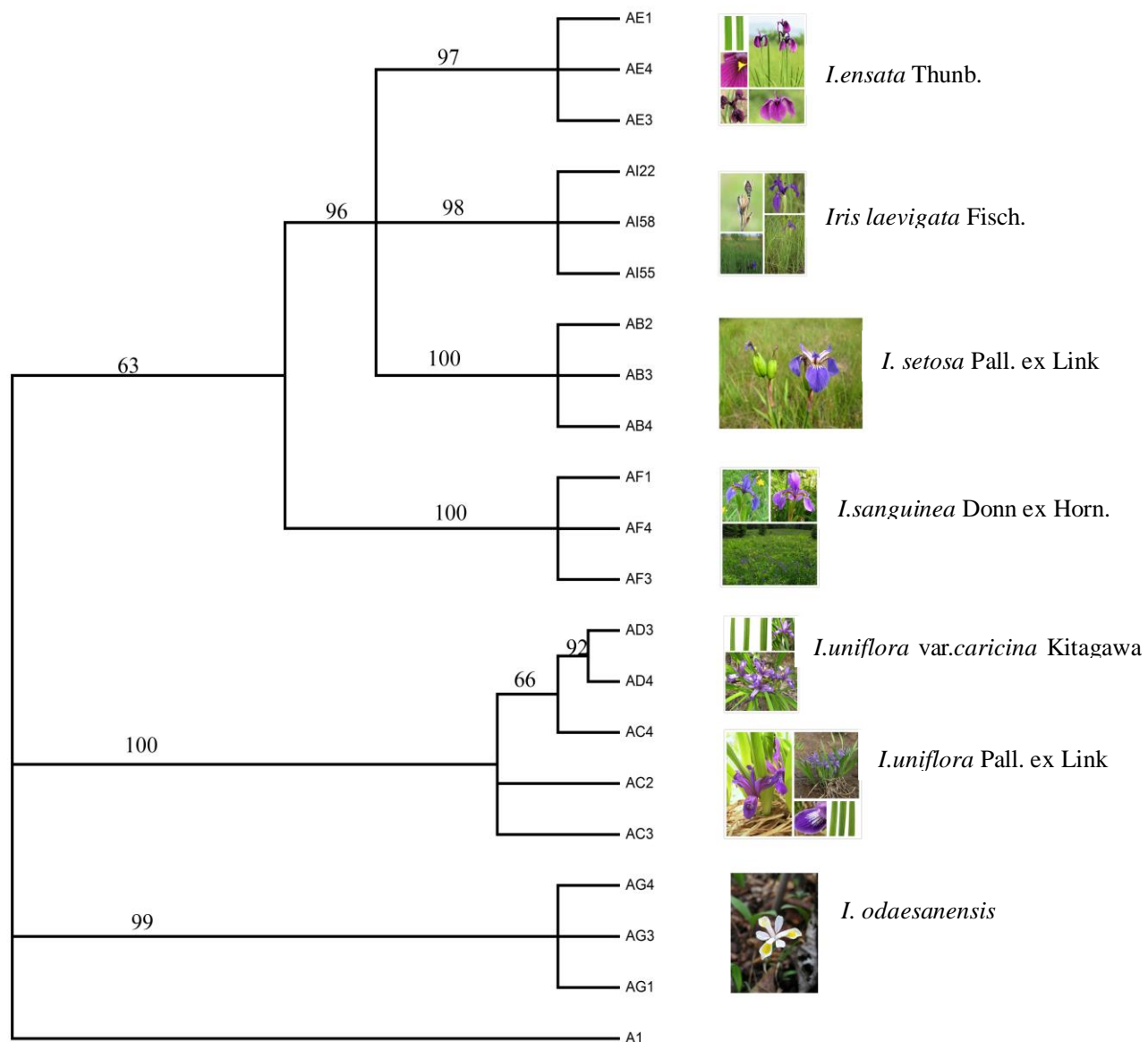


图2 MP 聚类树

3 结论

图2中，鸢尾属植物分为3大支，一支包括 *Iris laevigata* Fisch.、*I. setosa* Pall. ex Link、*I. ensata* Thunb.、*I. sanguinea* Donn ex Horn. 为 Sect. *Limniris* Tausch；一支包括 *I. uniflora* Pall. ex Link 和 *I. uniflora var. caricina* Kitagawa 聚合为 Sect. *Ioniris* Spach em. Rodion.；另一支则为 *I. odaesanensis*。Flora of China (《中国植物志》) 中，*I. odaesanensis* 为无附属物组，但是图2中却被分离出来，单独成一支，因此应进一步探讨鸢尾属植物组内多样性。

通过 MP 聚类树的分析结果可知，*I. uniflora var. caricina* Kitagawa 和 *I. uniflora* Pall. ex

Link 聚到一起，这与《中国植物志》中二者同属于紫苞鸢尾组分类一致，且 *I.uniflora* var. *caricina* Kitagawa 为 *I.uniflora* Pall. ex Link 的变种。

燕子花 *Iris laevigata* Fisch.、山鸢尾 *I. setosa* Pall. ex Link、玉蝉花 *I. ensata* Thunb.、溪荪 *I. sanguinea* Donn ex Horn. 在中国植物志中，依据其形态学特征，为无附属物亚属下的无附属物组。四种鸢尾的共同特征均具有明显的根状茎，根为绳索状，不是纺锤形；有明显的花被管，花被中脉上无附属物。花柱分裂至基部；花凋谢后花被管不残存在果实上。在图 2 中，四种植物恰巧聚在了一起，说明分子进化分析结果与形态学分析结果一致。

Flora of China (《中国植物志》) 中认为 *I. odaesanensis* 属于无附属物组，但是在 MP 聚类树种被单独分为一类。经过查阅资料，得知 *I. odaesanensis* 具有匍匐茎，而无附属物组的其他植物没有，据此我们初步认为 *I. odaesanensis* 不属于无附属物组。

[参考文献]

- [1] 牟少华.我国部分鸢尾属 (*Iris*) 植物系统位置研究[J]. 中国林业科学研究院博士学位论文, 2005, 6.
- [2] 赵毓棠.中国植物志(第十六卷·第一分册)[M].北京:科学出版社,1985:120-197.
- [3] 芦建国, 彭河忠.鸢尾属植物的抗性研究进展[J].江西农业学报, 2012, 24(2): 48-51
- [4] 傅沛云, 孙启时, 陈佑安等.东北草本植物志, 第 12 卷[M].北京: 科学出版社, 1998.
- [5] 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.
- [6] 余小芳.四川鸢尾属植物的系统学及种子休眠与萌发特性研究[J].四川农业大学, 2009.
- [7] 王 玲 卓丽环.基于 ITS 序列的鸢尾属植物部分种的系统分类[J].东北林业大学学报.2006,34(4)
- [8] 王 玲.鸢尾属部分种发育生物学与系统演化的研究[J].东北林业大学博士学位论文.2005, 12.
- [9] 秦民坚, 黄 芸等.射干及类似药用植物叶绿体 *rbcL* 基因序列分析[J].药学学报, 2003.38(2):147-152.
- [10] 刘 云.吉林省产八种鸢尾属(*Iris*L.)植物的 RAPD 分析及结构植物学分析[J].东北师范大学, 2001.
- [11] 胡尚力, 徐刚标, 梁艳等.伯乐树 cpDNA-PCR 反应体系的优化与引物筛选[J]. 中南林业科技大学学报. 2013, 33(7): 67-71.
- [12] 张玉梅, 徐刚标, 谷振军.珙桐cpDNA非编码序列引物反应条件优化与筛选[J].中南林业科技大学学报, 2011, 31(3): 183-186.
- [13] 彭铁成, 徐 芳, 罗静瑶等.基于叶绿体基因的香蕉遗传多样性研究[J].热带生物学报, 2012, 33(7): 293-297.
- [14] 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.
- [15] 胡春云, 郑小艳, 滕元文.梨属叶绿体非编码区 *tmL-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)3: 2261-2272.