



基于 *rbcL* 序列的鸢尾属植物系统发育分析

学 院：生命科学学院

指导教师：孙明洲

年 级：2015 级

姓 名：刘智剑 莫 艳 次拉姆 刘馨元

郝继艳 李得梅 孟书益

基于 *rbcL* 序列的鸢尾属植物系统发育分析

刘智剑 莫艳 次拉姆 刘馨元 郝继艳 李得梅 孟书益

摘 要 本实验选取长白山地区及其他地区分布的鸢尾属 32 个种（100 个个体）为材料，对其叶绿体 DNA 的 *rbcL* 序列进行测序，并进行分析研究。发现软件构建的系统发育树与学术界使用形态分类学有一定的差异，但进一步的信息确认还需后续的研究证实。

关键词 鸢尾属； *rbcL* 基因； 系统发育分析

1. 介绍

1.1 鸢尾属概况

鸢尾属 (*Iris*) 由林奈创立，模式物种为原产欧洲的德国鸢尾 (*I. germanica* L.)，属被子植物门 (Magnoliophyta) 单子叶植物纲 (Liliopsida) 天门冬目 (Asparagales) 鸢尾科 (Iridaceae)，模式物种为德国鸢尾 (*I. germanica* L.)。

鸢尾属约有 260 多个物种，形态特征差异显著，分布范围广大，较严格的分布在北温带，集中分布在北美洲、欧洲、中国和中东、北非等地区，是欧亚大陆植物区系中的重要成分。鸢尾属植物分布的环境多变，从山地、草原到河岸、湿地等都有分布。虽然有些鸢尾属物种分布在湿地等较为潮湿的环境中，但绝大部分鸢尾属物种分布在沙漠、半沙漠或干旱、山地等环境中。我国约有鸢尾属植物 60 种、13 个变种、5 个变型，约占全球鸢尾属物种的 1/5，主要分布于东北、西北、西南地区。其中，东北分布有 20 种，占全国的 1/3。鸢尾属植物集药用价值、观赏价值于一身。

早期的鸢尾属研究工作，主要依据形态特征和地理分布范围等展开，包括物种描述、鉴定与发表，并建立和发表了多个鸢尾科（属）下的分类系统。其中，比较有影响力的是 G.H.M. Lawrence (1953) 系统、Brian F. Mathew (1981, 1989) 和 G. I. Rodionenko (1961, 1987) 系统。但是，上述系统都依据形态特征来构建，参考了大量的非同源性状，且缺少对我国的鸢尾属物种的研究，而我国是鸢尾属植物的现代分布中心之一，这无疑是巨大的缺陷。

1.3 叶绿体 DNA

叶绿体基因组 (cpDNA) 占植物总基因组 DNA 的 10-20%，双链闭环结构，一般为 120-220kb (多在 120-160kb 之间)，被 2 个长约 22-25kb 的反向重复序列 (IR) 分成大拷贝区 (LSC) 和小两个单拷贝区 (SSC)。

由于叶绿体基因组较小、单亲遗传、不参加基因重组 (即不受选择压力)，且不受基因的重叠、缺失及假基因的干扰，有独立的进化路线，不依赖于其他任何数据即可构建分子系统树、查明植物的进化历史^[1]，因此，叶绿体基因组逐渐

成为分子进化和分子系统学研究的焦点。其分子水平上的差异明显,为比较进化研究提供了基本的信息支持,同时编码区和非编码区序列进化速率相差较大,适于不同分类阶元的系统发育研究^[2]。

rbcL 基因编码 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶/氧化酶的大亚基,现今已被广泛用于被子植物科、亚纲乃至整个种子植物主要类群间系统进化关系的研究^[3~5]。Reeves 等^[6]通过多基因组分析了鸢尾科不同属间的关系,发现 *rbcL* 拓扑结构与基因组综合拓朴树差异较大,尤其针对某些属如 *Watsonia* 和 *Lapeirousia*,推测 *rbcL* 序列在鸢尾科的系统分析较其它基因(*trnL-F*) 具有更精确的信息位点。

1.4 鸢尾属研究现状

Carol A. Wilson 长期致力于鸢尾科(鸢尾属)植物的系统学研究,发表了一系列比较有影响的文章(2006, 2009, 2011, 2012, 2016),先后基于 *trnK*、*ndh*、*ITS* 等叶绿体和核基因序列,对多个分布在欧亚大陆、北美、北非等地的鸢尾属植物的系统发育进行了研究,探讨了各类群间的亲缘关系,研究了部分存争议类群的分类地位,并初步修订了属下分类系统。Wilson 的研究表明,单纯基于形态学特征建立的属下分类系统与鸢尾属植物的演化过程和亲缘关系不相符,支持将射干、野鸢尾和 *Hermodactylus* 合并到鸢尾属中,极大的推动了鸢尾属的分子系统学研究。美国学者 Arnold 的研究团队对鸢尾属植物的遗传结构、授粉等方面展开了较为深入的研究,并对鸢尾属植物的演化和起源等进行了探讨。

肖月娥等采用 8 个微卫星标记、3 个叶绿体基因片段对分布在我国东北、华东、朝鲜半岛和日本的玉蝉花(*I. ensata*)的群体遗传结构进行了研究,在 6 个居群、192 个个体中发现了 83 个等位基因,种群内的遗传多样性指数较高— $H_E=0.578$, $H_D=0.608$; 遗传分化为中等水平, $F_{ST}=0.133$, $P<0.001$); Mantel 检验没有显示出地理隔离模式($r=0.339$, $P=0.161$)。检验除了 5 个叶绿体单倍型,其中一个在 6 个居群中都有分布。

作为鸢尾属的主要产区之一,长白山的资源较为丰富。为了及时掌握长白山地区鸢尾属资源的遗传多样性并为迫在眉睫的种质资源保护提供理论依据,本研究选取叶绿体的 *rbcL* 基因作为目的片段对长白山地区内分布的 32 个物种的遗传多样性进行了综合分析,旨在通过叶绿体 DNA 的 *rbcL* 序列在鸢尾属中的核苷酸变异了解鸢尾属的系统发育,旨在为整个鸢尾属亲缘关系及系统分类研究提供理论依据。

2. 材料与方法

2.1 实验材料

以分布于长白山地区(表 1)及其他地区 32 个种(100 个个体)的鸢尾属材料为研究对象。采集个体幼嫩叶片后立刻放入硅胶袋中使叶片快速脱水干燥,带

回实验室保存。

表 1 长白山野生鸢尾（部分）的种类、储量、分布、生境、花期等

种	分 布			生境	花期 (月份)	花径 (cm)	花色
	阔叶 林带	针阔混 交林带	针叶 林带				
玉蝉花 <i>Iris ensata</i>	++	++	+	湿草地、沼泽地、草甸、 林缘	6~7	9-13	深紫色或深红 紫色
溪荪 <i>I. sanguinea</i>	+++	++	++	草地、沼泽地、草甸、 林缘、山坡	6~7	6-7	蓝色或蓝紫色
燕子花 <i>I. laevigana</i>	++	++	+	沼泽地及湿草地	5~6	9-10	蓝紫色
山鸢花 <i>I. setosa</i>	++	++	+	湿草甸及林缘	6~7	7-8	蓝紫色
马阔 <i>I. lactea</i>	+++	+	+-	向阳土壤较肥沃的山 坡、路旁、沟边、草地	6~7	5-6	淡蓝色、蓝色、 蓝紫色
单花鸢尾 <i>I. uniflora</i>	++	++	-	山坡、林缘、林间草地、 疏林下	5~6	4-6	蓝紫色
矮鸢尾 <i>I. kobayashii</i>	++	++	-	干燥的山坡、荒地	5	3	蓝紫色带有黄 斑
紫苞鸢尾 <i>I. ruthenica</i>	+++	++	-	向阳的山坡和草地	4~5	3.5-5	蓝紫色
长白鸢尾 <i>I. mandshurica</i>	++	++	-	向阳草地、山坡及疏林 灌丛间	5	4-5	花黄色
野鸢尾 <i>I. dichotoma</i>	++	++	-	向阳草地、干山坡	7~8	3.5-4.5	花蓝紫色或浅 蓝色
五台山鸢尾 <i>I. odaesanensis</i>	-	+	-	向阳山坡、裸露的岩石 缝上	5	2.5-3.5	淡黄色

2.2 实验方法

2.2.1 DNA 的提取及 PCR 扩增

采用 CTAB 法从硅胶干燥的叶片中提取总 DNA^[7]。rbcL 片断的 PCR 扩增在基因扩增仪上完成。引物序列由公司合成。扩增反应体系为 25 μ L,包括模板 DNA 10~20ng;引物各 0.2 μ mol/L;dNTP0.2mmol/L;Tris-HCl(pH8.3)10mmol/L;MgCl 22.0mmol/L;BSA12.5(g 和 Taq 聚合酶(TaKaRa)1U。扩增程序为 94℃ 预热 4min,然后 94℃ 变性 50s,55℃ 退火 50s,72℃ 延伸 1.5min,35 个循环;最后 72℃ 延伸 7min。

2.2.2 扩增产物纯化及测序

PCR 扩增产物在 1 . 2 %琼脂糖凝胶电泳中检测纯度,使用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒对琼脂糖凝胶进行纯化回收,送测序公司进行双向测序,测序引物采用其扩增引物。部分序列峰图杂乱,因此对其进行基因克隆后再测序。

2.3 处理数据并重建系统发育树

利用软件 Clustal X^[8]对所得序列进行对位排列并加以手工校正。利用 Mega 6.0^[9],采用邻接法构建系统发育树。利用 FigTree^[10]软件,将树文件转换为环形系统发育树。

3. 结果

以 *Moraea pritzeliana* 作为外类群, 构建系统发育树 (图 1)。结果显示, 除 *I. confusa* 单独聚类外, 其余物种分为两大分支, 一支由 *Iris germanica*, *I. scariosa*, *I. flavissima*, *I. halophila* var. *sogaliana*, *I. potaninii*, *I. pandurata*, *I. tigridia*, *Belamcanda chinensis*, *halophila* var. *sogdiana*, *I. flavissima*, *I. mandshurica*, *I. ensata*, *I. subdichotoma*, *I. rossii*, *I. decora* 组成; 另一支由 *I. collettii*, *I. sanguinea*, *I. bulleyana*, *I. ruthenica*, *I. uniflora*, *I. setosa*, *I. laevigata*, *I. lactea*, *I. dichotoma*, *I. songarica*, *I. kobayashii*, *I. ventricosa*, *I. halophila*, *I. maackii*, *I. loczyi*, *I. tenuifolia* 组成。

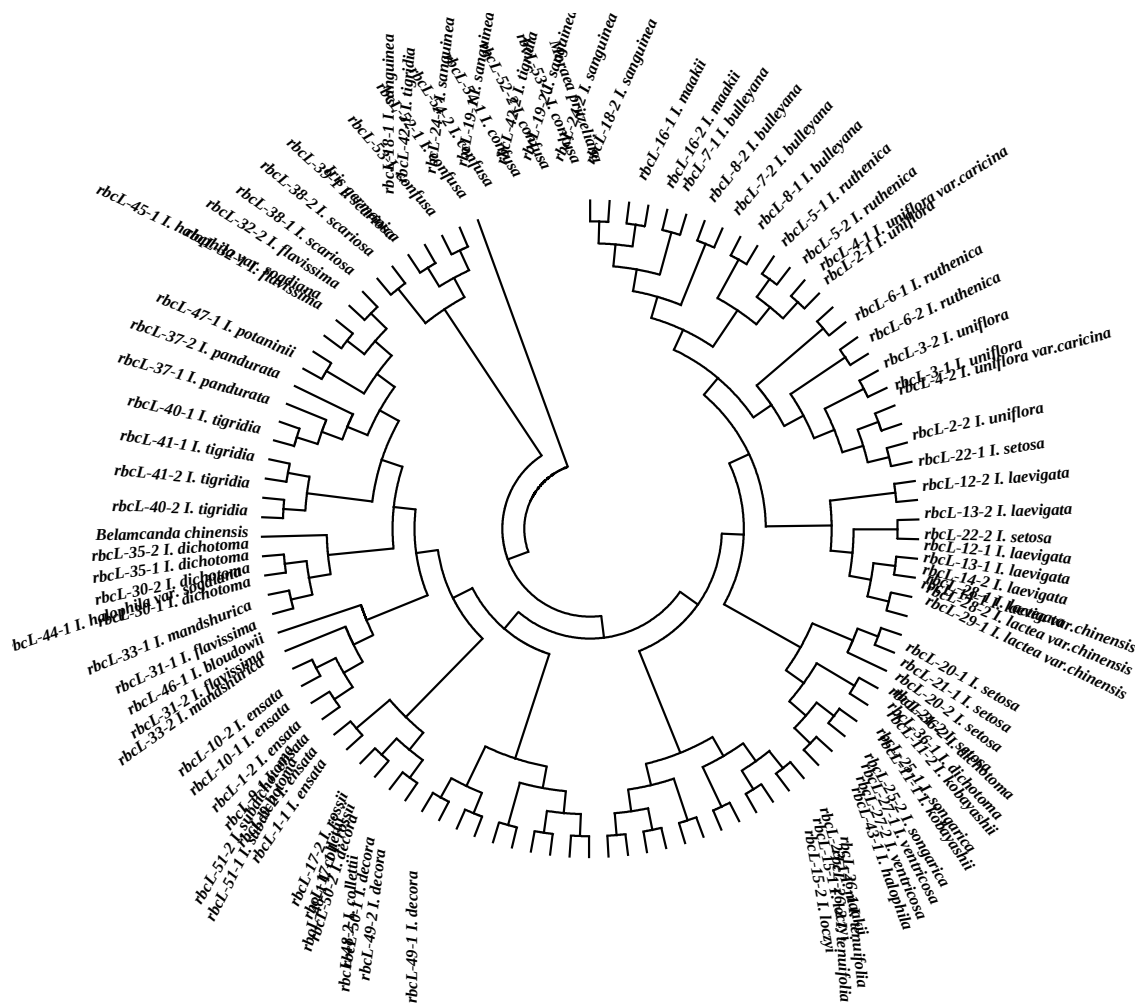


图 1 以叶绿体 DNA 的 *rbcL* 片段构建的系统发育树

4. 讨论

鸢尾属由赵毓棠先生在 1985 年提出并进行分类修订^[11], 之后诸多学者不断从形态学、解剖学、细胞学和分子生物学等学科对该属做了系统分类的研究。然

而，由于各学者依据不同的形态特征和不同学科的分类证据，从而导致属下许多物种的具体分类位置仍存在分歧与争议。本研究聚类结果大体支持赵毓棠先生的分类系统（表 2）。

表 2 实验材料依据赵毓棠先生的分类系统进行形态学分类

亚属及组名	物种	形态特征
鸡冠状附属物亚属 鸡冠状附属物组	<i>I. confusa</i>	鸡冠状附属物 有 2 ~ 3 朵花，鸡冠状附属物
尼泊尔鸢尾亚属	<i>I. collettii</i> , <i>I. decora</i>	根状茎小，根肉质
琴瓣鸢尾亚属 琴瓣鸢尾组	<i>I. halophila</i> var. <i>sogaliana</i> , <i>I. halophila</i>	外花被裂片提琴状
无附属物亚属 无附属物组	<i>I. ensata</i> , <i>I. rossii</i> , <i>I. sanguinea</i> , <i>I. bulleyana</i> , <i>I. setosa</i> , <i>I. laevigata</i> , <i>I. lactea</i> , <i>I. songarica</i> , <i>I. kobayashii</i> , <i>I. ventricosa</i> , <i>I. maackii</i> , <i>I. loczyi</i> , <i>I. tenuifolia</i>	无附属物
无附属物亚属 紫苞鸢尾组	<i>I. ruthenica</i> , <i>I. uniflora</i>	无附属物 紫色苞片
须毛状附属物亚属 果实顶裂组	<i>Iris germanica</i>	须毛状附属物 蒴果自顶端开裂
须毛状附属物亚属 果实侧裂组	<i>I. scariosa</i> , <i>I. flavissima</i> , <i>I. potaninii</i> , <i>I. pandurata</i> , <i>I. tigridia</i> , <i>I. flavissima</i> , <i>I. mandshurica</i>	须毛状附属物 蒴果从侧面开裂
野鸢尾亚属	<i>I. subdichotoma</i> , <i>I. dichotoma</i>	花茎高，二歧状分支
射干属	<i>Belamcanda chinensis</i>	二歧状伞房花序，多分枝

该系统属下分为 6 个亚属，其中无附属物亚属的物种数量最多，分布范围最广。本研究中紫苞鸢尾组（*I. ruthenica*, *I. uniflora*）镶嵌到无附属物组里，推测这两个物种起源于无附属物组，而后独立分化出去。须毛状附属物亚属聚成 3 个小支，其中 *Iris germanica*, *I. scariosa*, *I. flavissima* 为一支，*I. potaninii*, *I. pandurate*, *I. tigridia* 为一支，*I. flavissima*, *I. mandshurica* 为一支，三支表现出较远的亲缘关系，说明该亚属的遗传多样性较高。

尼泊尔鸢尾亚属包含 *I. collettii*, *I. decora*，该亚属根状茎小，且根肉质。本研究中，两个种共同聚类，赵毓棠先生认为尼泊尔鸢尾亚属是一个比较自然的分类群，本研究同意其观点。

琴瓣鸢尾亚属的 *I. halophila* var.*sogaliana* 镶嵌于须毛状附属物中间，*I. halophila* 则与无附属物亚属共同聚类，这说明琴瓣鸢尾亚属尚需做进一步研究。

参考文献

- [1] Chen B W, Hong J S, Shi X B. Study on genetic diversity of *Cunninghamia lanceolata* and *Taiwania flousiana* by using chloroplast microsatellites.[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2000, 36(3):46-51.
- [2] Tian X, Li D. Application of DNA sequences in plant phylogenetic study[J]. *Acta Botanica Yunnanica*, 2002, 24(2):170-184.
- [3] Chase M W, Soltis D E, Olmstead R G, et al. Phylogenetics of Seed Plants: An Analysis of Nucleotide Sequences from the Plastid Gene *rbcL*[J]. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 1993, 80(3):528-580.
- [4] Donoghue M J, Olmstead R G, Smith J F, et al. Phylogenetic Relationships of Dipsacales Based on *rbcL* Sequences[J]. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 1992, 79(2):333-345.
- [5] Chase M W, Bruijn A Y D, Cox A V, et al. Phylogenetics of Asphodelaceae (Asparagales): An Analysis of Plastid *rbcL*, and *trnL-F*, DNA Sequences[J]. *Annals of Botany*, 2000, 86(5):935-951.
- [6] Reeves G, Chase M W, Goldblatt P, et al. Molecular systematics of Iridaceae: evidence from four plastid DNA regions.[J]. *American Journal of Botany*, 2001, 88(11):2074-2087.
- [7] Shi S H, Zhang Q, Chen Y Q. A simple method for isolation of total RNA and DNA from silicagel-dried and fresh leaves of plants[J]. *Actaentiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 1996.
- [8] Shi S H, Zhang Q, Chen Y Q. A simple method for isolation of total RNA and DNA from silicagel-dried and fresh leaves of plants[J]. *Actaentiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 1996.
- [9] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice[J]. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(22):4673-80.
- [10] Rambaut A (2009) FigTree 1.3.1. Available at <http://tree.Bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- [11] Zhao Y T. *Flora of China*[M]. Beijing: Science Press, 1985: 120—198.