



东北师范大学

长白山野外综合实习研究课题

鸢尾属植物的通用叶绿体引物筛选

学 院：生命科学学院

指导教师：孙明洲

小组组长：杨晓松

小组成员：王滨 于静 郝佩佩 管清华

何韶华 王昭颖

日 期：2017 年 10 月 4 日

鸢尾属植物的通用叶绿体引物筛选

杨晓松王滨于静郝佩管清华何韶华王昭颖
东北师范大学生命科学学院，长春 130024

摘 要：Carol A. 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、野鸢尾合并到鸢尾属中，极大的推动了鸢尾属的分子系统学研究。Wilson 长期致力于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，先后基于 *trnK* 和 *ndh* 等叶绿体基因和核基因 ITS 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关系进行了研究，探讨了各类群间的亲缘关系。现在我国关于鸢尾属植物、尤其是特有种的研究并不多。基于此，本实验以长白山脉鸢尾植物为实验材料，利用叶绿体 DNA(cpDNA) 的保守性和单性遗传的特征使 cpDNA 的同源性分析，对长白山脉的鸢尾属植物的通用的叶绿体引物进行了筛选。本实验获得的结果为，在鸢尾属不同类群间易于扩增的引物。该结果为之后研究我国分布的鸢尾属植物的系统发育关系奠定了基础，对于今后了解植物之间母系遗传的相关亲缘关系以及遗传与进化方面的研究有所帮助。

关键词：鸢尾属 叶绿体基因 引物筛选

长白山^[1-2]是我国东北第一高山，最高峰白云峰为海拔 2619m，由于受海洋湿气团的影响，降雨量较丰富，气候湿润，适于植物生长，种类繁多，又加以植被垂直分布明显，植被类型多样性，是目前地球上为数不多的保存完整自然生态系统之一。区内植物属长白山植物区系，植被主要以红松阔叶林、针阔混交林、针叶林、岳桦林、高山苔原等组成，并从下到上依次形成五个植被分布带，各个植被分布带的物种数量分别为：阔叶红松林带 132 科 480 属 1 189 种，暗针叶林带 69 科 200 属 355 种，亚高山岳桦林带 47 科 130 属 185 种，高山冻原带 37 科 91 属 137 种，具有明显的垂直分布规律^[3]。红松阔叶林带处于海拔 1100 米以下的玄武岩台地上^[4]。地势平缓，气候温湿，植物种类繁多，结构复杂，层次不甚清晰^[5]。乔、灌、藤、草、蕨等在这一植物带中有多种分布。针叶林带位于海拔 1100—1700 米的倾斜玄武岩高原上。气候冷湿，植物层次清晰，

整齐高大。除针叶树之外，伴生有槭树、花楸等阔叶树，林下灌木、草本种类较针阔混交林带明显减少。岳桦林带在海拔 1700—2000 米之间，占据火山锥体下部，坡度陡，气温低，降水多，湿度大，风力强，树木矮小弯曲。该带代表树种是岳桦，伴有散生的长白落叶松、东北赤杨、花楸等。灌木以耐寒种类为主。高山苔原带处于海拔 2000 米以上的火山锥体上部，气温低，湿度大。随着海拔的增高，植物逐渐稀疏，种类逐渐减少，生长期很短。该带植物矮小为匍匐状，根系肥大，花序大型，色彩鲜艳，为典型的苔原植被类型^[6]。

本实验研究材料为长白山脉采集的鸢尾属植物。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)。该属植物观赏性高，生态幅广，很多种类具有极强的抗逆能力，是育种和园林应用的良好材料。鸢尾属是鸢尾科中物种数量最多的属，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。长白山脉鸢尾属资源十分丰富，但由于科技开发的滞后和交通不便等原因，大部分野生资源仍处于野生状态。长白山脉的鸢尾属植物大多具有花色艳丽，开花期长，花径较大，适应性强等特点。分布于长白山脉的几种主要的鸢尾属植物如表一所示^[7]。

表 1 长白山野生鸢尾的种类、储配、分布、生境、花期等一览表

种	分 布			生境	花期 (月 份)	花径 (cm)	花色
	阔 叶 林 带	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	淡紫色或深红紫色
溪荪 <i>I. sanguinea</i>	+	+	++	湿草地、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
马蓴 <i>I. lactea</i>	+	+	-	向阳土壤较肥沃的 山坡、路 旁、沟边、草地等 处	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. dichotama</i>	+	+	-	向阳草地、干山坡	7~8	3.5 ~ 4.5	花蓝紫色或浅蓝色

将野生鸢尾的储量多少划为五个档次：“-”表示无，“+”表示较少，“++”表示少，“+++”表示中等，“++++”表示多。

叶绿体DNA为一环状分子^[8]。其大小与结构在不同植物中高度保守的同时，其部分基因序列显示出较高的种间特异性^[9]。因此被广泛应用于植物的系统发育与进化研究^[2]植物细胞质含有两个基因组，即叶绿体和线粒体基因组。叶绿体基因与核基因组显着相反^[10]。叶绿体DNA（cpDNA）的遗传是最常见的克隆。它也不受植物核基因组广泛特征的多倍体，基因重复和重组的影响。因此，cpDNA在被子植物的大小，结构和基因含量方面差异不大。线粒体DNA（mtDNA）与叶绿体基因组的特征具有对比特征，影响其对通用引物的设计和应用的效用^[11]。mtDNA在植物中很大，具有较慢的核苷酸替代率，广泛的分子内重组水平，反过来又是非保守的基因。相比之下，上述cpDNA特征使其成为可用于植物分子分析的大多数通用引物的设计的理想选择^[12]。与核基因组相比，叶绿体基因组中较慢的突变率意味着靶向单核苷酸cpSSR的引物通常更普遍，并且可以经常在相关物种上扩增^[13]。方法为从所选材料中提取DNA，然后设计 SSR引物并分析，再进行PCR扩增并测序、分析，最后电泳比对^[14]。另外，还有其他部位的通用引物，例如靶向叶绿体ITS（cpITS）^[15]的通用引物、靶向atpB-rbcL，rps14-psaB和petA-psbE的基因间隔物的引物和靶向叶绿体非编码区的通用引物等^[16]。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验中的材料为鸢尾属玉蝉花，其采集于吉林省长白山区北坡。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 的提取

用 CTAB 法提取叶绿体 DNA^[17]，具体操作步骤如下：

在 30ml 离心管中加入 5-7.5mlCTAB 溶液[2%(W/V)CTAB,1.4MNaCl,0.2%(V/V)巯基乙醇,20mM EDTA,100mMTris-HCl, pH8.0]，水浴预热至 60℃；称取 0.5-1.0g 新鲜的植物叶组织放在研钵中，加入液氮，研成粉末，将粉末倒入预热的 CTAB 溶液中，混匀，继续在 60℃水浴中保温 30 分钟；加入等体积的氯仿；异戊醇（24:1，V/V），轻轻摇晃混匀；室温下，3200rpm 离心 10 分钟；用吸管将上清液移入干净的离心管中，加入三分之二体积的冰冷异丙醇，轻轻摇匀，使核酸沉淀出来；

1000rpm 离心 5-6 分钟沉淀 DNA, 倒掉上清液, 将沉淀用 10-20ml 洗液 (76%乙醇, 10m M 醋酸铵) 冲洗 20 分钟; 3200 rpm 离心沉淀核酸, 轻轻倒出洗液, 核酸在室温下风干; 将沉淀溶解于 1 ml TE (10mMTris-HCl, pH7.4, 1mMEDTA) 中; 加入 RNaseA 至终浓度 10ug/ml, 37℃水浴 30 分钟; 用 2 倍体积的 TE 或蒸馏水稀释, 加入 7.5M 醋酸铵至终浓度为 2.5M, 然后加入 2.5 倍体积的冷乙醇, 轻轻摇匀; 20000rpm 转速, -4℃下离心 10 分钟, 倒掉上清液, 沉淀于室温下风干, 即得到 DNA, 然后溶于适量的 TE 中备用。

1.2.2 PCR 的扩增

PCR 反应体系总体积为 10μL, 其中引物 (浓度 2μmol/L) 为 1.5μL, dNTP (浓度 10mmol/L) 为 0.25μL, 模板 DNA (浓度 10ng/μL) 为 2μL, Taq DNA 聚合酶 (浓度 5Unit/μL) 为 0.2μL, 10xBuffer 为 1μL, Mg²⁺ (浓度 25mmol/L) 为 0.8μL, 其余用水补齐。利用 PCR 扩增仪确立反映程序: 94℃预变性 5min; 94℃变性 30s; 50℃-60℃退火 30s; 72℃延伸 30s, 35 次循环; 72℃充分延伸 5min; 4℃保存^[18]。

1.2.3 琼脂凝胶电泳

用 TAE 电泳缓冲液制备 1.2%琼脂糖凝胶。将 10 μL PCR 扩增产物分别和 2 μL 上样缓冲液混合, 点样。用 100 bp ladder DNA marker 作分子量标记。3 ~ 5 V/cm 恒压, 电泳 40 min, 将电泳后的胶置于 EB 溶液中, 浸泡 15min, 凝胶成像仪观察并分析记录^[19]。

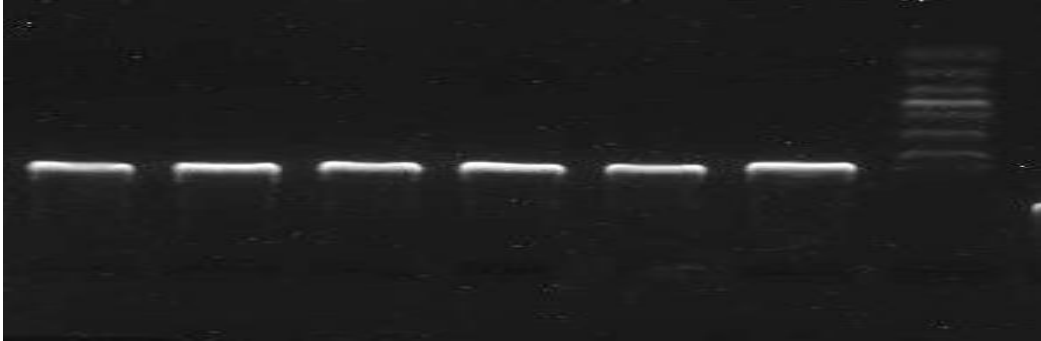
2 实验结果

表二 叶绿体通用引物相关信息

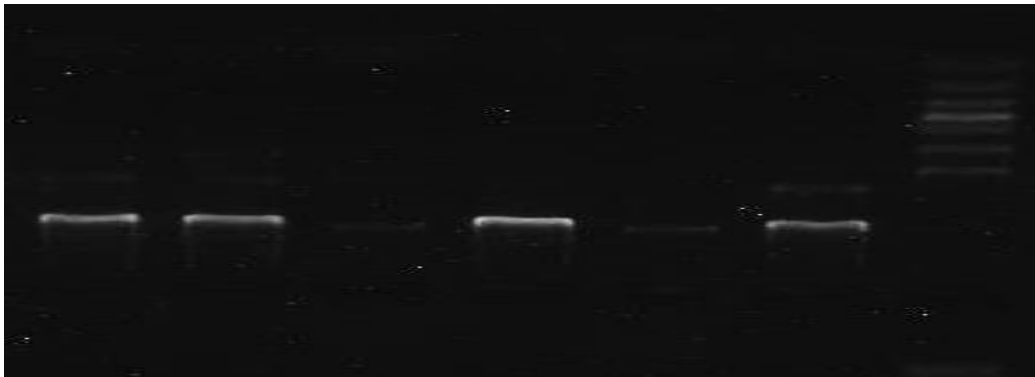
引物编号	引物名称及序列 (5'-3')	产物大小/bp	退火温度/°C	PCR 扩增结果
<i>trnS-trnF</i>	<i>trnS</i> f; CGAGGGTTCGAATCCCTCTC <i>trnF</i> f;AGAGCATCGCATTTGTAATG	—	—	A
<i>rpl23-psbA</i>	<i>rpl23</i> : TAAGACAGAAATAAAGCATTGCGTCGAAC <i>psbA</i> 3' : CTAGCACTGAAAACCGTCTT	—	—	B
<i>trnM-psaA</i>	<i>trnM</i> f;GAACCCGTGACCTCAAGGTTATG <i>psaA</i> r;ATTCGTTCCGCGGAACCAGAAGT	—	—	B
<i>trnH-psbA</i>	<i>psbA</i> ;CGAAGCTCCATCTACAAATGG <i>trnH</i> ;ACTGTCCCTTGATCCACTTGGC	—400	47	A
<i>rpl20-5' rps12</i>	<i>rpl23</i> : TTTGTTCTACGTCTACTAGG <i>psbA</i> 3' : GTCGAGGAACTAGTACTAG	—1000	48	A
<i>psbA-psbF</i>	<i>trnM</i> f;GTTTTACTTTTTGGGCATGCTTCG <i>psaA</i> r;CGCAGTTCGTCTTGGACCAGTGG	—	—	B
<i>trnS-trnG</i>	<i>trnS</i> f; TCGATTGCAAGTTGCTGGAGGAC <i>trnF</i> f;AGCTAGCTTGAACGTGGACTGCCG	—750	48	A
<i>trnL-ndhJ</i>	<i>rpl23</i> : ACGTTAAGGCTAGCCTTACGGCAA <i>psbA</i> 3' : GGCCTAGCCTAAGCCTTAGCTAA	—1100	48	A
<i>TrnL-TrnF</i>	<i>trnM</i> f;CCTTGAATGCCCTTGAACGA <i>psaA</i> r;CCGGTAACCTGGAACGGTAA	—600	48	A
<i>TrnT-TrnL</i>	<i>trnS</i> f; CGAAGCAACATCTACAAATGG <i>trnF</i> f;ACTGTCCGGGATCCACTTGGC	—	—	B
<i>TrnT-TrnF</i>	<i>rpl23</i> : CGAGGGTTCGAATCCCTCTC <i>psbA</i> 3' : AGAGCATCGCATTTGTAATG	—	—	B
<i>TrnL</i>	<i>trnM</i> f;GAACCCTTTCCCTCAAGGTTATG <i>psaA</i> r;ATTCGTTACCTTAACCAGAAGT	—	—	B

A: PCR 扩增成功 B: PCR 扩增失败

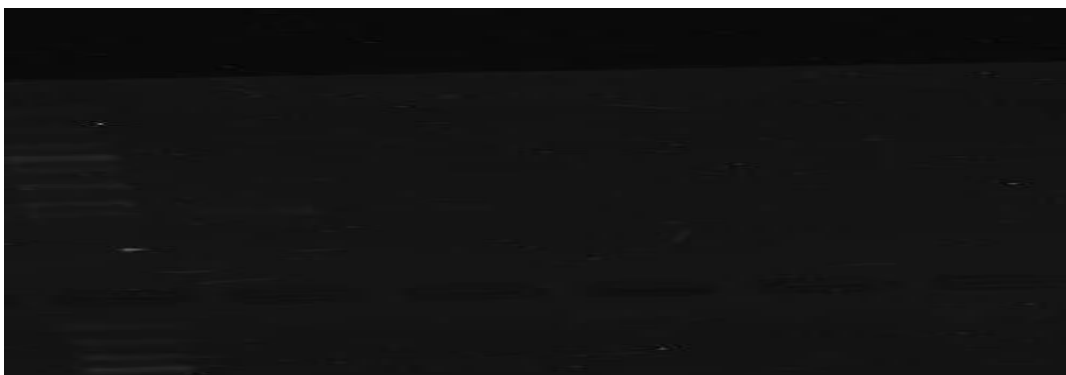
图一 引物为 A35: *trnS-trnF* 琼脂凝胶电结果泳图



图二 引物为 A31: *rpl23-psbA* 琼脂凝胶电结果泳图



图三 引物为 A34: *trnfM-psaA* 琼脂凝胶电结果泳图



从做的 10 个引物中来看，部分引物的 PCR 扩增效果好，我们选取了其中三对引物如上图一~三。

trn 基因通用引物在鸢尾属中的扩增

叶绿体基因 trnS-T 间隔区序列位于非编码区。非编码区序列的测定在植物不同层次系统学中的研究也越来越受到重视。序列结果分析表明，这段序列在鸢尾属中的表达十分完整，在各个位点的信息都进行了正常的表达，这表明电泳效果与预期相差较少，而较少的序列差异，对于以后植物种属同源性的研究有很大帮助。叶绿体引物为 A35: *trnS-trnF* 时，PCR 扩增产物的条带单一、稳定、清晰，且亮度相当，重复性和稳定性较好。这说明筛选的 cpDNA 非编码序列引物及其 PCR 反应扩增体系可用于鸢尾属的引物筛选。

rpl23-psbA 序列基因通用引物的扩增

此段序列中的某些扩增也出现了一定的问题，电泳的最后结果十几个片段发生了变异或者是缺失，致使最后的结果与预期产生了一定的偏差这也可能是此段序列中发生了短序列插入和缺失等现象。研究表明插入或缺失等现象十分容易发生在非编码区，短序列的插入和缺失是由于 DNA 复制错误引起的。叶绿体引物为 A31: *rpl23-psbA* 时，PCR 扩增产物的条带较为清晰稳定，但序列 27-1 和序列 85-1 没有扩增出条带，这说明所筛选引物不适用于鸢尾属的 PCR 反应扩增体系；

psbD-trnT 序列基因通用引物的扩增

根据最后的实验结果表明，psbD-trnT 序列在表达发生了一定的问题，多数位点都发生了缺失，致使电泳的结果并不是十分理想，这可能整段序列都发生了缺失或者是在鸢尾属中这段序列并未发生表达，因而无法检测。叶绿体引物为 A34: *trnfM-psaA* 时，经 PCR 扩增后无条带产生，因此所筛选的 cpDNA 非编码序列引物及其 PCR 反应扩增体系不可用于鸢尾属的引物筛选。

3 讨论分析

叶绿体基因在植物的整个基因组中来说是比较保守的基因，且叶绿体 DNA 序列只能够推断杂交物种形成中的母系来源，比较适合于低等级类群的系统发育研究。如 Araujo 利用 2 个叶绿体片段研究柑橘亚科 12 个属的系统进化关系。Makarevitch 使用 cpDNA (trnL 和 trnL-trnF 基因间隔区) 和 RAPDs 对 22 种俄罗斯莺尾进行研究，认为其中 16 个种来自亚属 *Subgen.Limniris* 下亚组 *sect.Limniris* 等^[21]。

另有一些科学家对于叶绿体基因的其他序列也进行了研究，如：Hilu 对 *matK*^[20] 基因的进化速率、模式、碱基替代的类型进行了研究，阐明了 *matK* 在科以上水平的应用；对 21 种植物的 cpDNA trnL-F 间隔区序列的同源性进行了比较，探讨了桑树的起源和进化。张文衡利用该序列讨论了双参属的归属问题。

由通用引物产生叶绿体 DNA 具有分子量小、多拷贝和结构简单等特点。叶绿体 DNA (cpDNA) 的保守性和单性遗传的特征使 cpDNA 的同源性分析成为研究植物亲缘关系的一种重要手段。

今后随着科技的发展对于叶绿体引物的研究将会越来越先进。而叶绿体引物的研究对于今后了解植物之间母系遗传的相关亲缘关系及基于同源性的相关多态性将有更大的帮助，对于以后遗传与进化方面的研究都将有很大的作用^[22]。

参考文献

- [1]黄瑶. 叶绿体 DNA 及其在植物系统学研究中的应用 [J].植物学通报, 1994, 11(2);11—25.
- [2]长白山自然保护区概况[J]. 野生动物保护用, 1979, (01);13-15+31. [2017-10-08].
- [3]曹长清, 于洪杰, 高春荣, 门庆有. 长白山区野生鸢尾属植物的保护对策及开发利用[J/OL].
- [4]长白山自然保护区概况[G]. 野生动物保护用, 1979, (01);13-15+31. [2017-10-08].
- [5]程运江. 柑橘体细胞胞质遗传及叶绿体 SSR 引物开发研究[D].华中农业大学, 2004.
- [6]长白山自然保护区概况[J]. 野生动物保护用, 1979, (01);13-15+31. [2017-10-08].
- [7]崔凯峰, 马宏宇, 黄利亚, 张德文, 陈庆红, 冯秀春, 邵志娟, 刘利. 长白山区 5 种鸢尾属植物资源调查及引种驯化[J]. 北华大学学报(自然科学版), 2016, 17(04);463-468. [2017-10-08].
- [8]PetitRJ , DemesureB, Dumolin-Lap ègueS.CpDNA and plant mtDNA primers[A] .In;KarpA, IsaacPG, IngramD(eds).Molecular tools for screening biodiversity; plants and animals [M] .London ;Champan& Hall, 1996, 256 -261.
- [9]Chloroplast-specific universal primers and their uses in plant studies N.HAIDER*Department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy Commission of Syria, P.O. Box 6091, Damascus, Syria
- [10]Utility of Arabidopsis Chloroplast Simple Sequence Repeat (cpSSR) Primers in Cabbage (Brassica oleracea L. var. capitata L.) ZHANG Yang-yong*, FANG Zhi-yuan, WANG Qing-biao, LIU Yu-mei, YANG Li-mei, ZHUANG Mu, and SUN Pei-tian (Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)
- [11]贺燕飞, 李同建, 吴永恒, 赵珊红, 徐玲玲, 廖亮. 苎麻叶绿体 SSR 引物筛选及分析[J/OL]. 广西植物, 2015, 35(04);464-467. (2014-06-19)[2017-10-11].
- [12]陶花. 野生小豆种质资源遗传多样性分析及叶绿体 SSR 引物的筛选[D].新疆农业大学, 2007.
- [13]Matsumoto et al., 1998; Conti et al., 1999; Xiang et al. 2002; Steane et al., 2003
- [14]Yi et al., 2004;苏应娟等, 2004
- [15]Chiangetal., 1998; Su et al., 2005
- [16]马玉婷.植物叶绿体 trn 基因通用引物在转基因植物及其产品检测中的应用.
- [17]植物 DNA 提取方法研究进展(衡水学院生命科学系, 河北衡水 053000) 吕亚慈.
- [18]张扬勇, 方智远, 王庆彪, 刘玉梅, 杨丽梅, 庄木, 孙培田. 拟南芥叶绿体 SSR 引物在甘蓝上的应用.
- [19]杨坤梅, 杨璧嘉, 李宗艳, 林萍. 硬叶兜兰叶绿体 DNA SSR 反应体系的优化及引物筛

- 选[J]. 分子植物育种, 2015, 13(02);443-449. [2017-10-08]. DOI: 10.13271/j.mpb.013.000443
- [20]石林春. 植物叶绿体基因组中 *matK* 基因的分布及引物通用性研究[A]. 中国科学技术协会、贵州省人民政府.第十五届中国科协年会第 21 分会场: 中药与天然药物现代研究学术研讨会论文集[C].中国科学技术协会、贵州省人民政府;, 2013;5.
- [21]贺燕飞, 李同建, 吴永恒, 等.苧麻叶绿体 SSR 引物筛选与分析.[J]广西植物 Aug.2015, 35 (4) : 464-467.
- [22]牟少华, 孙振元, 彭镇华.基于叶绿体 *DNAtrnL-F* 序列研究部分鸢尾属的亲缘关系. [J] 华北农学报, 2010, 25 (5) : 112-116.