

基于叶绿体 DNA *trnL-F* 序列研究部分 鸢尾属的亲缘关系

牟少华¹, 孙振元², 彭镇华²

(1. 国际竹藤网络中心, 北京 100102; 2. 中国林业科学研究院 林业研究所, 北京 100091)

摘要: 利用通用引物, 采用 PCR 技术从 24 个鸢尾样品中扩增了叶绿体基因组 *trnL-F* 间隔区的 DNA 片段, 进行了序列测定, 序列长度为 1 003 ~ 1 113 bp, 比较长度为 954 bp, 其中共有 92 个位点发生了单个碱基的置换, 14 个位点发生了缺失, 因此有进化意义的位点共 106 个, 约占总序列比较长度的 11.11%。运用 DNAMAN 软件分析了这些鸢尾的亲缘关系, 可分为 2 个相对独立的大组。第一大组可以分为 2 组: 3 个种源马蔺关系很近形成一组, 粗根鸢尾、溪荪和喜盐鸢尾聚成一组。第二大组也分为 2 组: 6 个种源的马蔺与野鸢尾聚在一起, 再和小鸢尾聚成一组; 3 个种源的鸢尾、高原鸢尾、德国鸢尾、矮鸢尾、野鸢尾、扇形鸢尾、红籽鸢尾和 *I. unguicularis* 聚成一组。

关键词: 鸢尾属; 亲缘关系; 叶绿体 DNA (cpDNA); *trnL-F* 序列

中图分类号: S68.03 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2010)05-0112-05

Relationship of *Iris* Inferred from the Chloroplast DNA *trnL-F* Sequence Variation

MU Shao-hua¹, SUN Zhen-yuan², PENG Zhen-hua²

(1. International Center for Bamboo and Rattan, Beijing 100102, China;

2. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: The intergenic region of *trnL* and *trnF* was amplified by PCR for 24 samples of *Iris*. The lengths of the segments varied from 1 003 bp to 1 113 bp, of which 954 bp was compared. The number of the evolutionary loci was 106, including 92 transpositional loci and 14 missing ones, which was 11.11% of the compared lengths. Their relationships were performed using software DNAMAN. It showed that all the samples were divided into two parts. The first part included two groups, one was *I. lactea* from Taipu, Xiwuqi and Wulumuqi, the other included *I. tigridia*, *I. sanguinea* and *I. halophila*. The second part included two groups. One group included *I. lactea* from Beijing, Minqin, Guyuan, Taishan, Wuwei and Zhuozhou, *I. dichotoma* and *I. proantha*. The other group included *I. tectorum*, *I. collettii*, *I. germanica*, *I. pumila*, *I. dichotoma*, *I. wattii*, *I. foetidissima* and *I. unguicularis*.

Key words: *Iris*; Relationship; Chloroplast DNA (cpDNA); *TrnL-F* sequence

鸢尾属 (*Iris* L.) 是鸢尾科宿根草本植物, 其品种繁多, 花姿奇特, 花大而艳丽, 色彩丰富, 是园艺上久负盛名的花卉。我国具有丰富的鸢尾属植物种质资源, 约有 60 个种、13 个变种及 5 个变型^[1]。

国内对鸢尾的生物学特性、生理生化特性、孢粉学、细胞学等都有比较深入地研究, 但是分子生物学方面的研究起步较晚。目前, 已利用 RAPD 技术对吉林产的 8 种鸢尾属植物进行了研究, 从 3 级 60 个

引物中筛选出 6 个谱带清晰稳定的多态性引物, 采用 UPGMA 法对八种鸢尾进行聚类, 得到了其亲缘关系图, 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^[2]。黄芸等^[3]运用 RAPD 标记, 用 OPD-08 (5'-gtgtgcccca-3') 等作随机扩增引物进行随机扩增时, 得到了可识别鸢尾、野鸢尾、蝴蝶花、德国鸢尾这些物种基因组 DNA 的多态片段。秦民坚等^[4]对鸢尾、

收稿日期: 2010-07-12

基金项目: 国家科技基础条件平台项目 (2005DKA21003)

作者简介: 牟少华 (1976-), 女, 山东栖霞人, 助理研究员, 博士, 主要从事种质资源和分子生物学方面的研究。

通讯作者: 彭镇华 (1931-), 男, 江西吉水人, 教授, 主要从事木本遗传育种、森林生态等方面的研究。

野鸢尾、蝴蝶花和德国鸢尾进行叶绿体 *rbcL* 基因序列分析,建立了分子系统树。利用双向聚丙烯酰胺凝胶电泳对蝴蝶花(*I. japonica*) 绿白嵌合叶片的蛋白质进行分离,并初步鉴定了蛋白质的相对分子量和等电点^[5]。

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。它具有分子量小、多拷贝和结构简单等特点^[6-8]。但是,针对不同的植物类群, *trnL-F* 基因片段积累的变异量并不相同。为进一步验证这个叶绿体片段是否能为解决鸢尾属种间和种下的系统学问题提供依据,本研究选取了叶绿体

trnL-F 间隔区基因片段,对部分该属植物的叶绿体基因组进行遗传操作和序列分析,以期初步揭示这些鸢尾种类的亲缘关系,为该属植物的种质资源保存以及可持续利用提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

选取 24 个鸢尾属植物群体(表 1)。每个群体随机选取 20 个单株,每株取一片幼叶,每个叶片取相同质量组成混合样作为一个样品,用于总 DNA 的提取。

表 1 鸢尾属植物的来源和编号
Tab.1 The sources and codes of *Iris*

编号 Code	中 名 Chinese name	学 名 Formal name	材 料 来 源 Sources
LsaTH	溪荪	<i>I. sanguinea</i> Donn	吉林通化市郊
LfoKM	红籽鸢尾	<i>I. foetidissima</i> L.	云南昆明植物园
LunKM	-	<i>I. unguicularis</i> Poir.	云南昆明植物园
LlaZZ	马蔺	<i>I. lactea</i> Pall	河北涿州市郊
LlaWLMQ	马蔺	<i>I. lactea</i> Pall	新疆乌鲁木齐南山
LlaTP	马蔺	<i>I. lactea</i> Pall	内蒙古沽源县太仆寺
LlaXWQ	马蔺	<i>I. lactea</i> Pall	内蒙古锡林郭勒西乌珠穆沁旗
LlaGY	马蔺	<i>I. lactea</i> Pall	宁夏固原市郊
LlaMQ	马蔺	<i>I. lactea</i> Pall	甘肃民勤沙生植物园
LlaWW	马蔺	<i>I. lactea</i> Pall	甘肃武威市区西郊
LlaTS	马蔺	<i>I. lactea</i> Pall	山东泰山玉皇顶
LlaBJ	马蔺	<i>I. lactea</i> Pall	北京香山
CteBJ	鸢尾	<i>I. tectorum</i> Maxim.	中国科学院植物所
CteKM	鸢尾	<i>I. tectorum</i> Maxim.	云南昆明植物园
CteNJ	鸢尾	<i>I. tectorum</i> Maxim.	江苏中科院植物所
CwaKM	扇形鸢尾	<i>I. wattii</i> Baker	云南昆明植物园
CprNJ	小鸢尾	<i>I. proantha</i> Diels	江苏中科院植物所
PdiBJ	野鸢尾	<i>I. dichotoma</i> Pall.	中国林科院后山路边及山坡
PdiWLHT	野鸢尾	<i>I. dichotoma</i> Pall.	内蒙古乌兰浩特
XhaHEB	喜盐鸢尾	<i>I. halophila</i> Pall.	黑龙江哈尔滨市郊
NcoDQ1	高原鸢尾	<i>I. collettii</i> Hook.	云南迪庆州香格里拉高山植物园
HiWLHT	粗根鸢尾	<i>I. tigridia</i> Bunge	内蒙古省乌兰浩特
IpuBJ	矮鸢尾	<i>I. pumila</i> L.	北京植物园
IgeBJ	德国鸢尾	<i>I. germanica</i> Linn.	北京植物园

引物“c”和“f”由上海博亚生物技术有限公司(BIOASIA) 北京分公司合成,稀释到 20 pmol/μL。 *Taq* 酶购自 TaKaRa 生物公司。PCR 扩增和产物纯化试验在中国林业科学研究院林业研究所国家林业局林木培育重点实验室完成。测序工作由北京三博远志生物技术公司完成。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 总 DNA 提取采用 CTAB 方法^[9]。DNA 的浓度及质量用琼脂糖凝胶电泳估测和检查,最后稀释到 50 ~ 100 ng/μL 备用。

1.2.2 DNA 片段的扩增 在离心管中加入上述 DNA 样品 1 μL,引物“c”和“f”各 1 μL,超纯水

37.75 μL, dNTP Mixture(2.5 mmol/L) 4 μL, 10 × PCR Buffer(Mg² + Plus) 5 μL, *Taq* DNA polymerase(5 U/μL) 0.25 μL。扩增按照卢孟柱等^[10]的扩增程序在 PCR 仪(Biometra Tgradient) 上进行,扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上鉴定大小和估测浓度。

1.2.3 扩增产物纯化 DNA 纯化采用 Promega 公司的纯化试剂盒 Winzard PCR Preps DNA Purification System 的 prototal 方法,取 5 μL PCR 产物进行琼脂糖电泳(1.0%),紫外显影仪上观察后,切取 cpDNA 放入 1.5 mL 的离心管中,70℃ 水浴中溶化。加入 resin 1 mL,混匀 20 s。安装好注射器和过滤器,把加 resin 的 cpDNA 倒入注射器中,挤出液体。

加 80% 异丙醇到注射器中,洗膜后转移到离心管中,10 000 r/min 离心 2 min 后转移过滤器至新的离心管中,加 50 μ L 1 \times TE Buffer,静置 1 min 后,离心 20 s。弃去过滤器, -20 $^{\circ}$ C 贮存。

1.2.4 序列测定 纯化好的 PCR 产物送交北京三博远志生物技术公司进行序列测定,自动测序仪型号为 ABI3730XL。

1.2.5 序列分析与系统树构建 序列排列用 ClustalX 软件完成^[11],排序后适当手工校正,删除引物和边缘的部分序列,将双向测定的序列按照正链的方向拼接成完整的序列,整理以待分析。排好的序列用 DNAMAN 软件(Version 4.0, Lynnon Biosoft 1994 - 1998) 进行系统发育和同源性分析。利用 Bootstrap(1 000 次重复)^[12] 检验各分支的置信度。

2 结果与分析

2.1 *trnL-F* 片段的扩增

根据已发表的 *trnL-F* 序列的通用特异引物,采用 PCR 方法,从 24 个鸢尾样品中分别扩增出了相应的 *trnL-F* 片段,在琼脂糖凝胶上长度约 1 000 bp。

2.2 *trnL-F* 片段的序列变异

序列测定获得 24 个样品 *trnL-F* 片段的序列。序列长度为 1 003 ~ 1 113 bp,比较长度为 954 bp,其中共有 92 个位点发生了单个碱基的置换,14 个位点发生了缺失,因此有进化意义的位点共 106 个,约占总序列比较长度的 11.11%。

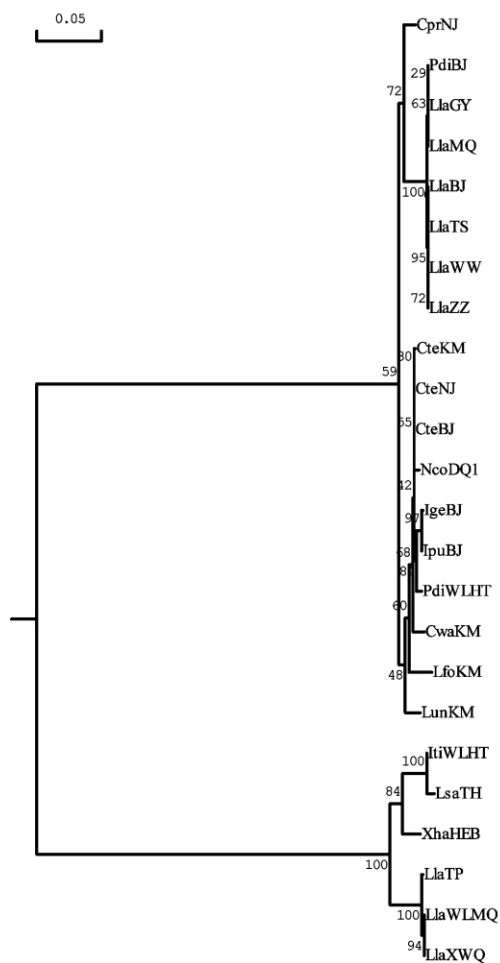
2.3 鸢尾属植物的亲缘关系分析

依据鸢尾样品的 cpDNA 序列计算 24 个样品间的遗传距离,运用 DNAMAN(Version 4.0) 软件进行系统位置分析,构建的系统发育关系树见图 1,同源关系树见图 2。采用 Bootstrap 方法 1 000 次重复验证分支的可靠性,其得分值见图 1。

利用分子序列探讨鸢尾属内系统发育的研究,存在内部分支分辨率和支持率较低的状况,这与菊科属内系统发育的研究结果相同^[13-17]。尽管支持率存在较低的状况,但这些分支内部的所有种类拥有 95% 以上的同源序列(图 1),因而这些分支的可信度较高,从中获得的信息对所讨论的问题具有较高的支持程度。

总体上 24 个鸢尾属植物样品分为 2 个相对独立的大组。第一大组可以分为 2 组: 3 个种源马蔺(LlaTP、LlaWLMQ 和 LlaXWQ) 关系很近形成一组,粗根鸢尾(ItiWLHT)、溪荪(LsaTH) 和喜盐鸢尾(XhaHEB) 聚成一组。第二大组也分为 2 组: 6 个种源的马蔺(LlaBJ、LlaTS、LlaWW、LlaZZ、LlaMQ 和

LlaGY) 与野鸢尾(PdiBJ) 聚在一起,再和小鸢尾(CprNJ) 聚成一组,3 个种源的鸢尾(CteNJ、CteKM 和 CteBJ)、高原鸢尾(NcoDQ1)、德国鸢尾(IgeBJ)、矮鸢尾(IpuBJ)、野鸢尾(PdiWLHT)、扇形鸢尾(CwaKM)、红籽鸢尾(LfoKM) 和 *I. unguicularis* (LunKM) 聚成一组。



编号同表 1; 图 2 同。

Number as indicated in Tab. 1; The same as Fig. 2.

图 1 依据 *trnL-F* 核苷酸序列构建的鸢尾系统发育树

Fig. 1 The phylogenetic tree reconstructed for *Iris* based on the sequence of the *trnL-F* intergenic region

红籽鸢尾(LfoKM) 和 *I. unguicularis*(LunKM) 虽然属于无附属物鸢尾亚属,但是与该亚属的其他鸢尾种类关系都很远,从树型图上二者所处的系统位置来看,似乎应单独处于亚属的分类地位。由于分支内部的支持率仅为 48% 和 59%,所以这一结果还需要进一步验证。

鸡冠状附属物亚属的小鸢尾(CprNJ) 以 72% 的分支支持率和 97% 的同源率与 6 个马蔺样品和野鸢尾聚成一组,而与鸢尾距离相对较远,研究结果表明将其归于鸡冠状附属物亚属不合适。扇形鸢尾

(CwaKM) 虽然与鸢尾聚在一组内,但是关系也较远。

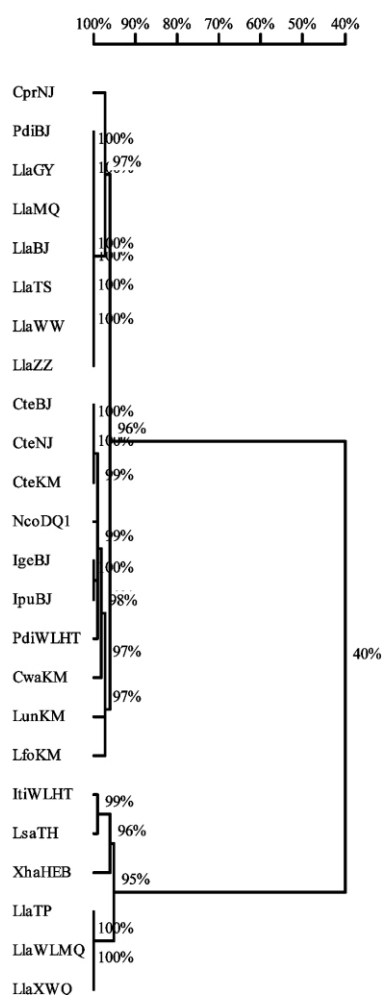


图2 依据 *trnL-F* 核苷酸序列构建的鸢尾同源关系树

Fig.2 The homology-tree reconstructed for *Iris* based on the sequence of the *trnL-F* intergenic region

3 讨论

3.1 *trnL-F* 片段的序列变异

叶绿体 *trnL-F* 间隔区的核苷酸序列在鸢尾属植物样品中呈现了较大的变异,变异位点占到总序列比较长度的 11.11%。不同种、种源如此大的变异,可以弥补种源内单株间 DNA 差异。因此本研究没有进一步作同一样品多个克隆的测序。较大的 DNA 变异一方面是由于鸢尾属植物是比较古老的植物,起源于第三纪^[18]。另一方面,由于基因间隔区为非编码序列,所承受的自然选择压力较小,发生的变异被保留的机会很大^[19]。这样的变异程度在进行系统位置分析中能够给出较好的分辨能力,适合于阐明属内水平的关系,并为系统位置分析的准确性提供保证。

3.2 鸢尾属植物的亲缘关系

由于鸢尾属植物分布广泛,样品的采集非常困

难。加上鸢尾属植物的形态变异非常大,给系统位置研究带来了很大障碍。本研究虽然没有收集到我国鸢尾属整个分布范围内的样品,但基本上包括了我国东北、西南及西北地区,可以初步探讨在此范围内鸢尾属植物种间和种源间的亲缘关系。

从构建的系统发育树可以看出,9 个不同种源的马蔺样品被划分成两个独立的大组。这表明马蔺的分化具有地理变异性,新疆和内蒙古的马蔺与其他地方的马蔺明显分为 2 个不同的类群。

红籽鸢尾(LfoKM) 和 *I. unguicularis*(LunKM) 虽然属于无附属物鸢尾分类群,但是与该分类群的其它鸢尾种类关系都很远,从树型图上二者所处的系统位置来看,应单独处于亚属的分类地位。由于分支内部的支持率仅为 48% 和 59%,所以这一结果还需要进一步验证。

鸡冠状附属物分类群的小鸢尾(CprNJ) 以 79% 的分支支持率和 97% 的同源率与 6 个马蔺样品和野鸢尾聚成一组,而与鸢尾距离相对较远,研究结果表明将其归于鸡冠状附属物分类群不合适。扇形鸢尾(CwaKM) 虽然与鸢尾聚在一组内,但是关系也较远。

3.3 叶绿体 DNA 基因间序列用于系统位置关系分析

由于叶绿体 *trnL-F* 间隔区的 DNA 是其遗传物质 DNA 的一部分,在鸢尾属植物中具有稳定性,不随季节的改变而发生变化。因此,采用叶绿体 *trnL-F* 间隔区的 DNA 序列变异的分析方法,较好地确立了部分鸢尾属植物种间以及不同地理变异种之间的相互关系,并初步建立了鸢尾属植物的系统位置关系,显示了该 DNA 分析方法不但具有较好的通用性,而且有较好的分辨能力。在此基础上,采集代表整个鸢尾属植物分布区的样品,采用本研究分析方法,将会有助于建立鸢尾属植物完整的系统发育体系。但同时由于 cpDNA 是单亲遗传(uniparentally inherited),因此并不能解释所有的系统发育问题,如研究类群间的杂交或渐渗现象(introgression)。因此,愈来愈多的学者开始注重将多个不同来源或不同功能的适用 DNA 序列相互结合,或与传统的形态性状结合起来共同分析,以期获得更多的发育信息,进而得到更接近真实系统发育历史的研究结果^[20]。

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 [M]. 第 16 卷,第 1 分册. 北京: 科学出版社,1985.
- [2] 刘云. 吉林省八种鸢尾植物的 RAPD 分析及结构植物学分析 [D]. 哈尔滨: 东北师范大学,2001: 45.

- [3] 黄芸,杨光. RAPD 法鉴定射干类中药[J]. 中草药,2002,33(10):935-937.
- [4] 秦民坚,黄芸,杨光,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.
- [5] 胡金勇,曾英,桑玉英. 双向电泳分析鸢尾绿白嵌合叶片的蛋白质[J]. 云南植物研究,2002,24(3):387-391.
- [6] 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.
- [7] 卢孟柱,谢红丽,张辉,等. 利用叶绿体 DNA 变异研究胡杨系统发育[J]. 西北植物学报,2000,20(6):1148-1154.
- [8] 汤陵华,孙加祥,宇田津撒朗,等. 太湖地区水稻地方品种籼粳分类方法的比较[J]. 江苏农业学报,2003,19(3):139-144.
- [9] Taberlet P, Gielly L. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA[J]. Plant Mol Biol,1991,17:1105-1109.
- [10] 卢孟柱,谢红丽,张辉,等. 利用叶绿体 DNA 变异研究胡杨系统发育[J]. 西北植物学报,2002,20(6):1148-1154.
- [11] Thompson J D, Gibson T J. The Clustal-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research,1997,25:4876-4882.
- [12] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. Evolution,1985,39:783-791.
- [13] Fernandes I A, Aguilar J F, Panero J L, et al. A phylogenetic analysis of *Doronicum* (Asteraceae, Senecioneae) based on morphological, nuclear ribosomal (ITS) and chloroplast (*trnL-F*) evidence[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution,2001,20:41-64.
- [14] Garcia J N, Garnatje T, Susanna A, et al. Tribal and subtribal delimitation and phylogeny of the *Cardueae* (Asteraceae): a combined nuclear and chloroplast DNA analysis[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution,2002,22:51-64.
- [15] Garcia J N, Susanna A, Mozaffarian V, et al. Generic delimitation and phylogeny of the subtribe *Centraureinae* (Asteraceae): a combined nuclear and chloroplast DNA analysis[J]. Annals of Botany,2001,87:503-515.
- [16] Garcia J N, Susanna A, Mozaffarian V, et al. The natural delimitation of *Centaurea* (Asteraceae: Cardueae): ITS sequence analysis of the *Centaurea jacea* group[J]. Plant Systematics and Evolution,2000,223:185-199.
- [17] Vilatersana R, Susanna A, Garcia N, et al. Genetic delimitation and phylogeny of the *Carduncellus-Cartharrus* complex (Asteraceae) based on ITS sequences[J]. Plant Systematics and Evolution,2000,221:89-105.
- [18] 谢航. 中国鸢尾有关分类群的讨论及属下分类系统的修订[D]. 哈尔滨: 东北师范大学,1996.
- [19] Demesore B, Sodji N, Petit R P. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants[J]. Mol Eol,1995,4:129-131.
- [20] 田欣,李德铎. DNA 序列在植物系统学研究中的应用[J]. 云南植物研究,2002,24(2):170-184.