

# 铁线莲属植物 ISSR-PCR 反应体系优化及遗传多样性分析

余伟军<sup>1</sup>, 姚红<sup>1</sup>, 孙瑞琦<sup>1</sup>, 王桂青<sup>1</sup>, 钟淮钦<sup>2</sup>, 黄敏玲<sup>2,①</sup>, 曾黎辉<sup>1,①</sup>

(1. 福建农林大学园艺学院, 福建 福州 350002; 2. 福建省农业科学院作物研究所, 福建 福州 350013)

**摘要:** 对铁线莲属 (*Clematis* Linn.) 植物基因组 DNA 的 ISSR-PCR 反应体系进行了优化, 并采用 ISSR 分子标记对 32 个铁线莲属植物 (包括 8 个野生种、1 个变种和 23 个品种) 及 2 个近缘属植物的遗传多样性进行研究。结果显示: 铁线莲属植物基因组 DNA ISSR-PCR 最佳反应体系的总体积为 25.0  $\mu\text{L}$ , 包括 40  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  模板 DNA 1.0  $\mu\text{L}$ 、0.4  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  引物 1.0  $\mu\text{L}$ 、0.15  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs 2.0  $\mu\text{L}$ 、10 $\times$  *Ex Taq* Buffer ( $\text{Mg}^{2+}$  Plus) 2.0  $\mu\text{L}$ 、*TaKaRa Ex Taq* 酶 0.2  $\mu\text{L}$  和 ddH<sub>2</sub>O 18.8  $\mu\text{L}$ 。对 32 个铁线莲属植物及 2 个近缘属植物基因组 DNA 的 ISSR-PCR 分析结果显示: 共扩增出 172 条条带 (位点), 平均每条引物扩增出 13.2 个位点, 其中, 多态性位点 168 个, 平均每条引物扩增出 12.9 个多态性位点, 平均多态性位点百分率为 98.2%。聚类分析结果显示: 32 个铁线莲属植物及 2 个近缘属植物的遗传距离在 0.22~1.21 之间。在遗传距离 1.02 处, 将 32 个铁线莲属植物分为 3 个大组, ‘杰出’ (‘Superba’) 单独聚为 1 个大组, ‘斯托尔韦克’ (‘Stolwijk Gold’) 和 ‘柠檬之梦’ (‘Lemon Dream’) 聚为 1 个大组, 其余植物聚为第 3 大组; 在遗传距离 0.92 处, 将第 3 大组进一步划分为 3 个亚组, 第 1 亚组包括 ‘阿迪森’ (‘Addisonii’)、‘帕斯卡’ (‘Pascal’) 和 ‘樱桃唇’ (‘Cherry Lip’), 第 2 亚组包括短柱铁线莲 (*C. cadmia* Buch.-Ham. ex Wall.)、灰叶铁线莲 [*C. canescens* (Turcz.) W. T. Wang et M. C. Chang]、毛蕊铁线莲 (*C. lasiandra* Maxim.)、曲柄铁线莲 (*C. repens* Finet et Gagnep.)、‘铃儿响叮当’ (‘Jingle Bells’) 和 ‘雀斑’ (‘Freckles’), 第 3 亚组包括吴兴铁线莲 (*C. huchouensis* Tamura) 等 20 个铁线莲属植物; 在遗传距离 0.77 处, 将第 3 亚组划分为 7 个小组。研究结果表明: ISSR 分子标记能够应用于铁线莲属植物的遗传多样性分析。

**关键词:** 铁线莲属; ISSR-PCR; 反应体系优化; 遗传多样性

中图分类号: Q946-33; S68 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2019)02-0042-07

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2019.02.06

## Optimization of ISSR-PCR reaction system and analysis on genetic diversity of *Clematis* plants

YU Weijun<sup>1</sup>, YAO Hong<sup>1</sup>, SUN Ruiqi<sup>1</sup>, WANG Guiqing<sup>1</sup>, ZHONG Huaiqin<sup>2</sup>, HUANG Minling<sup>2,①</sup>, ZENG Lihui<sup>1,①</sup> (1. College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Crop Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2019, 28(2): 42-48

**Abstract:** ISSR-PCR reaction system of genomic DNA of *Clematis* Linn. plants was optimized, and genetic diversity of 32 plants of *Clematis* (including 8 wild species, 1 variety, and 23 cultivars) and 2 plants of related genera was researched by using ISSR molecular marker. The results show that total volume of optimal ISSR-PCR reaction system of genomic DNA from *Clematis* plants is 25.0  $\mu\text{L}$ , including 1.0  $\mu\text{L}$  of 40  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  template DNA, 1.0  $\mu\text{L}$  of 0.4  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  primer, 2.0  $\mu\text{L}$  of 0.15  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs, 2.0  $\mu\text{L}$  of *Ex Taq* Buffer ( $\text{Mg}^{2+}$  Plus), 0.2  $\mu\text{L}$  of *TaKaRa Ex Taq* polymerase, 18.8  $\mu\text{L}$  of ddH<sub>2</sub>O. The result of ISSR-PCR analysis on genomic DNA from 32 plants of *Clematis* and 2 plants of

收稿日期: 2018-08-31

基金项目: 福建农林大学科技创新项目 (KFA17352A); 福建省自然科学基金项目 (2016J01109)

作者简介: 余伟军 (1991—), 男, 福建宁德人, 硕士研究生, 主要从事铁线莲及百香果遗传育种方面的研究。

①通信作者 E-mail: 837223458@qq.com; lhzheng@hotmail.com

related genera shows that 172 bands (loci) are amplified with average of 13.2 loci per primer, in which, there are 168 polymorphic loci with average of 12.9 polymorphic loci per primer and average percentage of polymorphic loci of 98.2%. The cluster analysis result shows that genetic distance of 32 plants of *Clematis* and 2 plants of related genera is 0.22–1.21. At the genetic distance of 1.02, 32 plants of *Clematis* are divided into three major groups, ‘Superba’ is clustered into one major group, ‘Stolwijk Gold’ and ‘Lemon Dream’ are clustered into one major group, the rest are clustered into the third major group. At the genetic distance of 0.92, the third major group is further divided into three subgroups, the first subgroup includes ‘Addisonii’, ‘Pascal’, and ‘Cherry Lip’, and the second subgroup does *C. cadmia* Buch.-Ham. ex Wall., *C. canescens* (Turcz.) W. T. Wang et M. C. Chang, *C. lasiandra* Maxim., *C. repens* Finet et Gagnep., ‘Jingle Bells’, and ‘Freckles’, the third subgroup does 20 plants of *Clematis* such as *C. huchouensis* Tamura. At the genetic distance of 0.77, the third subgroup is divided into seven small groups. It is suggested that ISSR molecular marker can be applied to the genetic diversity analysis on *Clematis* plants.

**Key words:** *Clematis* Linn.; ISSR-PCR; reaction system optimization; genetic diversity

铁线莲(*Clematis florida* Thunb.)中观花品种的观赏性好、抗逆性强,是园林应用中不可多得的藤本花卉。铁线莲在日本以及欧洲许多国家的各类花园和家庭园艺中均有应用<sup>[1]</sup>,深受人们喜爱。铁线莲属(*Clematis* Linn.)中部分种类具有清热利尿和止痛祛风等功效<sup>[2]</sup>,药用价值和经济价值很高。目前,越来越多的研究人员致力于铁线莲属植物的开发与利用,以获得更大的市场效益。

全世界铁线莲属植物有 350 多种<sup>[3]</sup>,除南极洲外,在全世界范围内广泛分布。国内该属植物超过 140 种,在全国各地均有分布,其中,在华中和西南地区的分布面积较大,并且,该属植物在云南分布的种类最多,约有 60 种以及 20 变种<sup>[4]</sup>。

《中国植物志》<sup>[5]89-235</sup> 将铁线莲属植物划分为 8 组:尾叶铁线莲组[Sect. *Viorna* (Reichb.) Prantl]、长瓣铁线莲组[Sect. *Atragene* (Linn.) DC.]、黄花铁线莲组[Sect. *Meclatis* (Spach) Tamura]、灌木铁线莲组(Sect. *Fruticella* Tamura)、威灵仙组(Sect. *Clematis* Tamurin)、铁线莲组(Sect. *Viticella* DC.)、绣球藤组(Sect. *Cheiroopsis* DC.)和丝铁线莲组(Sect. *Naraveliopsis* Hand.-Mazz.)。已有研究者对铁线莲属植物的组织构造、细胞学和形态特征等方面<sup>[6-10]</sup>进行研究,为该属植物的鉴定和分类奠定了基础。由于铁线莲属植物分布广泛,种类繁多,遗传背景复杂多样,仅通过花萼性状和雄蕊被毛等生物学特征不能准确地鉴定和分类,因此,应在形态学研究的基础上结合分子生物学方法,对该属植物进行更全面的研究。

ISSR(inter-simple sequence repeat)分子标记使用的引物无需了解 DNA 序列,且较 RFLP、RAPD 和

SSR 具有更高的多态性和遗传稳定性<sup>[11-12]</sup>。本研究利用 ISSR 技术建立铁线莲 ISSR-PCR 最佳反应体系,对收集的国内外 32 个铁线莲属植物(包括 8 个野生种、1 个变种和 23 个品种)以及 2 个近缘属植物[包括铁筷子品种‘水晶’(*Helleborus thibetanus* ‘Winterbells’)和耧斗菜品种‘喜鹊’(*Aquilegia viridiflora* ‘Magpie’)]进行亲缘关系和遗传多样性分析,以期铁线莲属植物中种、变种和品种的分类提供科学依据,并为铁线莲属植物种质资源的利用和新品种选育提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试 34 份材料中,包括短柱铁线莲(*Clematis cadmia* Buch.-Ham. ex Wall.)、吴兴铁线莲(*C. huchouensis* Tamura)、灰叶铁线莲[*C. canescens* (Turcz.) W. T. Wang et M. C. Chang]、贵州铁线莲(*C. kweichowensis* C. Pei)、毛蕊铁线莲(*C. lasiandra* Maxim.)、棉团铁线莲(*C. hexapetala* Pall.)、曲柄铁线莲(*C. repens* Finet et Gagnep.)和厚叶铁线莲(*C. crassifolia* Benth.) 8 个野生种,分别采自浙江省湖州市长兴县、浙江省湖州市吴兴区、四川省阿坝藏族羌族自治州马尔康县、湖北省十堰市竹溪县、湖南省怀化市沅陵县、北京市怀柔区喇叭沟门满族乡、四川省乐山市峨眉山和广东省从化市吕田镇;还包括大花小木通[*C. armandii* var. *farquhariana* (Rehder et E. H. Wilson) W. T. Wang] 1 个变种,‘灵感’(‘Inspiration’)、‘如古’(‘Rooguchi’)、‘包查德伯爵

夫人’(‘Comtesse de Bouchaud’)、‘魔法喷泉’(‘Magic Fountain’)、‘翠鸟’(‘Kingfisher’)、‘钻石’(‘Diamantina’)、‘红星’(‘Red Star’)、‘皇帝’(‘Kaiser’)、‘杰出’(‘Superba’)、‘斯托尔韦克’(‘Stolwijk Gold’)、‘柠檬之梦’(‘Lemon Dream’)、‘阿迪森’(‘Addisonii’)、‘帕斯卡’(‘Pascal’)、‘樱桃唇’(‘Cherry Lip’)、‘苹果花’(‘Apple Blossom’)、‘倒影’(‘Reflections’)、‘乌托邦’(‘Utopia’)、‘绿玉’(‘Alba Plena’)、‘铃儿响叮当’(‘Jingle Bells’)、‘雀斑’(‘Freckles’)、‘波兰精神’(‘Polish Spirit’)、‘前卫’(‘Avant Garde’)和‘开心果’(‘Pistachio’) 23 个铁线莲属品种以及铁筷子品种‘水晶’和耧斗菜品种‘喜鹊’ 2 个近缘属植物,均购自浙江虹越花卉股份有限公司。

ISSR 分子标记使用的 86 条通用引物由铂尚生物技术(上海)有限公司合成。 $10\times Ex Taq$  Buffer ( $Mg^{2+}$  Plus)、 $dNTPs$  和  $TaKaRa Ex Taq$  酶购自宝生物工程(大连)有限公司。

## 1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采用 CTAB 法<sup>[13]</sup> 提取基因组 DNA,采用质量体积分数 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的基因组 DNA,并用 UV-9000S 紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司)测定基因组 DNA 的浓度和质量,于  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存、备用。

1.2.2 ISSR-PCR 反应体系的优化 在  $25.0\text{ }\mu\text{L}$  ISSR-PCR 反应体系中,包括  $TaKaRa Ex Taq$  酶  $0.2\text{ }\mu\text{L}$ ,  $10\times Ex Taq$  Buffer ( $Mg^{2+}$  Plus)  $2.0\text{ }\mu\text{L}$ , 模板 DNA 浓度分别为 10、20、40、60、80 和  $100\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , 引物浓度分别为 0.2、0.3、0.4、0.5 和  $0.6\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $dNTPs$  浓度分别为 0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 和  $0.35\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在进行其中某一因子或水平实验时,其他因子固定为模板 DNA 浓度  $40\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、引物浓度  $0.4\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  及  $dNTPs$  浓度  $0.20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。扩增反应程序为:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 50 s,  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火 1 min,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 40 个循环;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。PCR 产物于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。扩增反应参数的优化均使用引物 879。

1.2.3 ISSR 引物的筛选及退火温度的确定 利用优化的 ISSR-PCR 反应体系,以灰叶铁线莲和‘樱桃唇’基因组 DNA 为模板,对 86 条 ISSR 引物进行筛选,选出扩增结果重复性好、扩增条带清晰且多态性高的引物。

设置  $45.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $47.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $50.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $51.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $54.0\text{ }^{\circ}\text{C}$  和  $55.4\text{ }^{\circ}\text{C}$  6 个退火温度,确定所筛选引物的最佳退火温度。

1.2.4 ISSR 扩增 利用筛选出来的引物、最佳退火温度以及优化的 ISSR-PCR 反应体系对供试 34 份材料的基因组 DNA 进行扩增。扩增产物在  $0.5\times TAE$  电泳缓冲液中用质量体积分数 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,EB 染色 10 min,JS-2000 凝胶成像分析系统(上海培清科技有限公司)扫描并保存电泳图。

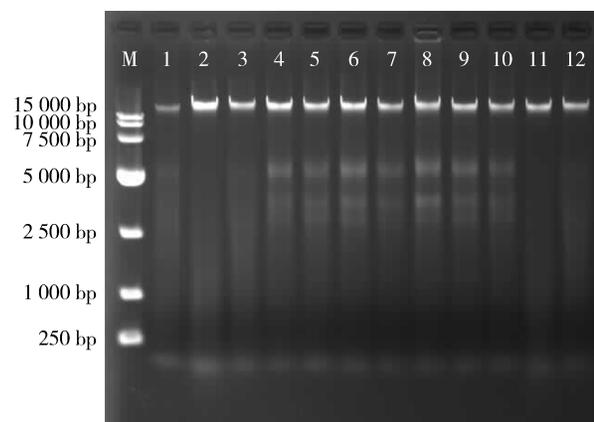
## 1.3 数据整理和统计

统计 ISSR-PCR 扩增产物同一位置的条带,有条带记为“1”,无条带记为“0”,利用 EXCEL 2003 软件进行数据统计。利用 SPSS 13.0 统计分析软件计算各材料间的遗传距离。

## 2 结果和分析

### 2.1 DNA 提取及检测

部分铁线莲属植物基因组 DNA 的电泳检测结果见图 1。结果显示:扩增条带明亮清晰。各样品的  $OD_{260}/OD_{280}$  比值在 1.6~2.0 之间,说明蛋白质和多酚类等干扰物质含量少。



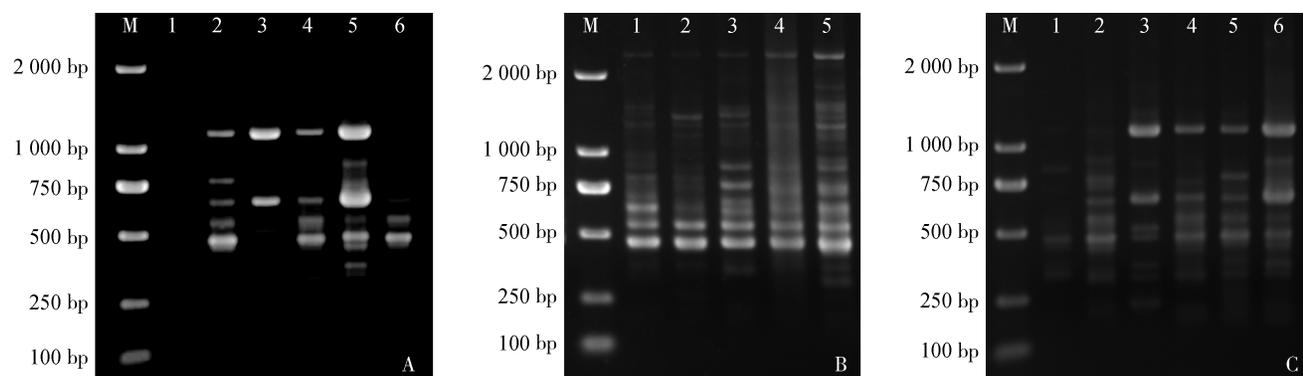
M: DL15000 marker. 1: 短柱铁线莲 *Clematis cadmia* Buch.-Ham. ex Wall.; 2: 吴兴铁线莲 *C. huchouensis* Tamura; 3: 灰叶铁线莲 *C. canescens* (Turcz.) W. T. Wang et M. C. Chang; 4: 贵州铁线莲 *C. kweichowensis* C. Pei; 5: 毛蕊铁线莲 *C. lasiandra* Maxim.; 6: 棉团铁线莲 *C. hexapetala* Pall.; 7: ‘灵感’ ‘Inspiration’; 8: ‘如古’ ‘Rooguchi’; 9: 曲柄铁线莲 *C. repens* Finet et Gagnep.; 10: ‘包查德伯爵夫人’ ‘Comtesse de Bouchaud’; 11: 厚叶铁线莲 *C. crassifolia* Benth.; 12: ‘魔法喷泉’ ‘Magic Fountain’.

图 1 铁线莲属部分植物基因组 DNA 的电泳检测结果  
Fig. 1 Electrophoresis detection result of genomic DNA from some of *Clematis* Linn. plants

### 2.2 ISSR-PCR 反应体系优化

铁线莲属植物基因组 DNA 的 ISSR-PCR 反应体系优化结果见图 2。结果显示:当模板 DNA 浓度为  $40 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、引物浓度为  $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和 dNTPs 浓度为  $0.15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,扩增条带较多且清晰度最

好。最终确定 ISSR-PCR 最佳反应体系的总体积为  $25.0 \mu\text{L}$ ,包括  $40 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  模板 DNA  $1.0 \mu\text{L}$ 、 $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  引物  $1.0 \mu\text{L}$ 、 $0.15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs  $2.0 \mu\text{L}$ 、 $10 \times \text{Ex Taq Buffer (Mg}^{2+} \text{ Plus)}$   $2.0 \mu\text{L}$ 、*TaKaRa Ex Taq* 酶  $0.2 \mu\text{L}$  和 ddH<sub>2</sub>O  $18.8 \mu\text{L}$ 。



A: 模板 DNA 浓度,1~6 依次为 10、20、40、60、80 和  $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  模板 DNA Template DNA concentration, 1-6 are in order of 10, 20, 40, 60, 80, and  $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  template DNA; B: 引物浓度,1~5 依次为 0.2、0.3、0.4、0.5 和  $0.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  引物 Primer concentration, 1-5 are in order of 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, and  $0.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  primer; C: dNTPs 浓度,1~6 依次为 0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 和  $0.35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs dNTPs concentration, 1-6 are in order of 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, and  $0.35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs. M: DL2000 marker.

图 2 铁线莲属植物基因组 DNA 的 ISSR-PCR 反应体系优化结果  
Fig. 2 Optimization result of ISSR-PCR reaction system of genomic DNA from *Clematis* Linn. plants

### 2.3 ISSR 引物的筛选和扩增结果

分别用灰叶铁线莲和‘樱桃唇’的基因组 DNA 为模板,对 86 条 ISSR 引物进行筛选,选出扩增条带

多且清晰的引物 13 条。对筛选出的 13 条引物分别设置 6 个退火温度进行 PCR 扩增,确定各引物的最佳退火温度(表 1)。

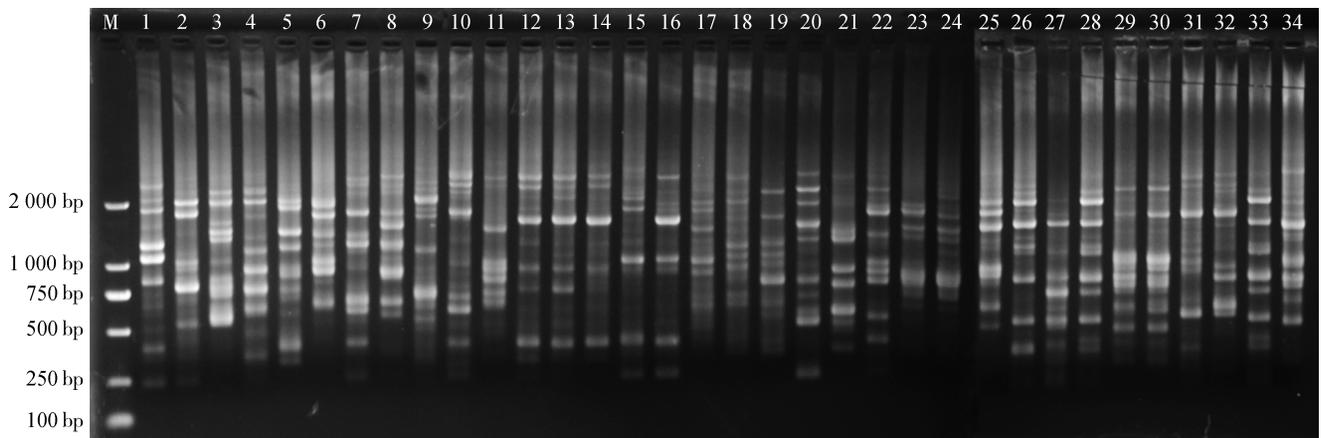
表 1 用于 32 个铁线莲属植物及 2 个近缘属植物基因组 DNA ISSR-PCR 反应的引物和退火温度及扩增结果

Table 1 Primers and annealing temperature used for ISSR-PCR reaction of genomic DNA from 32 plants of *Clematis* Linn. and 2 plants of related genera and their amplification results

编号 No.	引物 Primer 序列 Sequence	退火温度/℃ Annealing temperature	位点数 Number of loci	多态性位点数 Number of polymorphic loci	多态性位点百分率/% Percentage of polymorphic loci
811	GAGAGAGAGAGAGAC	54.0	16	15	93.8
812	GAGAGAGAGAGAGAA	54.0	14	14	100.0
835	AGAGAGAGAGAGAGYC	51.8	6	6	100.0
845	CTCTCTCTCTCTCTRG	54.0	18	16	88.9
847	CACACACACACACARC	54.0	11	11	100.0
854	TCTCTCTCTCTCTCRG	51.8	5	5	100.0
860	TGTGTGTGTGTGTGRA	54.0	13	13	100.0
866	CTCCTCCTCCTCCTC	55.4	17	17	100.0
868	GAAGAAGAAGAAGAA	51.8	15	15	100.0
879	CTTCACTTCACTTCA	54.0	12	12	100.0
892	TAGATCTGATATCTGAATCCC	54.0	18	17	94.4
899	CATGGTGTGGTCATTGTTCCA	51.8	11	11	100.0
900	ACTTCCCCACAGGTTAACACA	54.0	16	16	100.0
总计 Total			172	168	
均值 Average			13.2	12.9	98.2

利用筛选出的13条引物对32个铁线莲属植物及2个近缘属植物基因组DNA进行ISSR-PCR反应,扩增结果(表1)显示:13条引物共扩增出172条条带(位点),平均每条引物扩增出13.2个位点,其中,多态性位点168个,平均每条引物扩增出12.9个

多态性位点,平均多态性位点百分率为98.2%。13条引物中,引物845和892扩增出的位点数最多,均为18个。其中,引物886对32个铁线莲属植物及2个近缘属植物基因组DNA的ISSR-PCR扩增图谱见图3。



M: DL2000 marker. 1: 短柱铁线莲 *Clematis cadmia* Buch.-Ham. ex Wall.; 2: 吴兴铁线莲 *C. huchouensis* Tamura; 3: 灰叶铁线莲 *C. canescens* (Turcz.) W. T. Wang et M. C. Chang; 4: 贵州铁线莲 *C. kweichowensis* C. Pei; 5: 毛蕊铁线莲 *C. lasiantha* Maxim.; 6: 棉团铁线莲 *C. hexapetala* Pall.; 7: ‘灵感’ ‘Inspiration’; 8: ‘如古’ ‘Rooguchi’; 9: 曲柄铁线莲 *C. repens* Finet et Gagnep.; 10: ‘包查德伯爵夫人’ ‘Comtesse de Bouchaud’; 11: 厚叶铁线莲 *C. crassifolia* Benth.; 12: ‘魔法喷泉’ ‘Magic Fountain’; 13: ‘翠鸟’ ‘Kingfisher’; 14: ‘钻石’ ‘Diamantina’; 15: ‘红星’ ‘Red Star’; 16: ‘皇帝’ ‘Kaiser’; 17: ‘杰出’ ‘Superba’; 18: ‘斯托尔韦克’ ‘Stolwijk Gold’; 19: ‘柠檬之梦’ ‘Lemon Dream’; 20: 耧斗菜品种‘喜鹊’ *Aquilegia viridiflora* ‘Magpie’; 21: 铁筷子品种‘水晶’ *Helleborus thibetanus* ‘Winterbells’; 22: ‘阿迪森’ ‘Addisonii’; 23: ‘帕斯卡’ ‘Pascal’; 24: ‘樱桃唇’ ‘Cherry Lip’; 25: ‘苹果花’ ‘Apple Blossom’; 26: ‘倒影’ ‘Reflections’; 27: ‘乌托邦’ ‘Utopia’; 28: ‘绿玉’ ‘Alba Plena’; 29: ‘铃儿响叮当’ ‘Jingle Bells’; 30: ‘雀斑’ ‘Freckles’; 31: ‘波兰精神’ ‘Polish Spirit’; 32: ‘前卫’ ‘Avant Garde’; 33: ‘开心果’ ‘Pistachio’; 34: 大花小木通 *C. armandii* var. *farquhariana* (Rehder et E. H. Wilson) W. T. Wang.

图3 引物886对32个铁线莲属植物及2个近缘属植物基因组DNA的ISSR-PCR扩增图谱  
Fig. 3 ISSR-PCR amplification pattern of genomic DNA from 32 plants of *Clematis* Linn. and 2 plants of related genera using primer 886

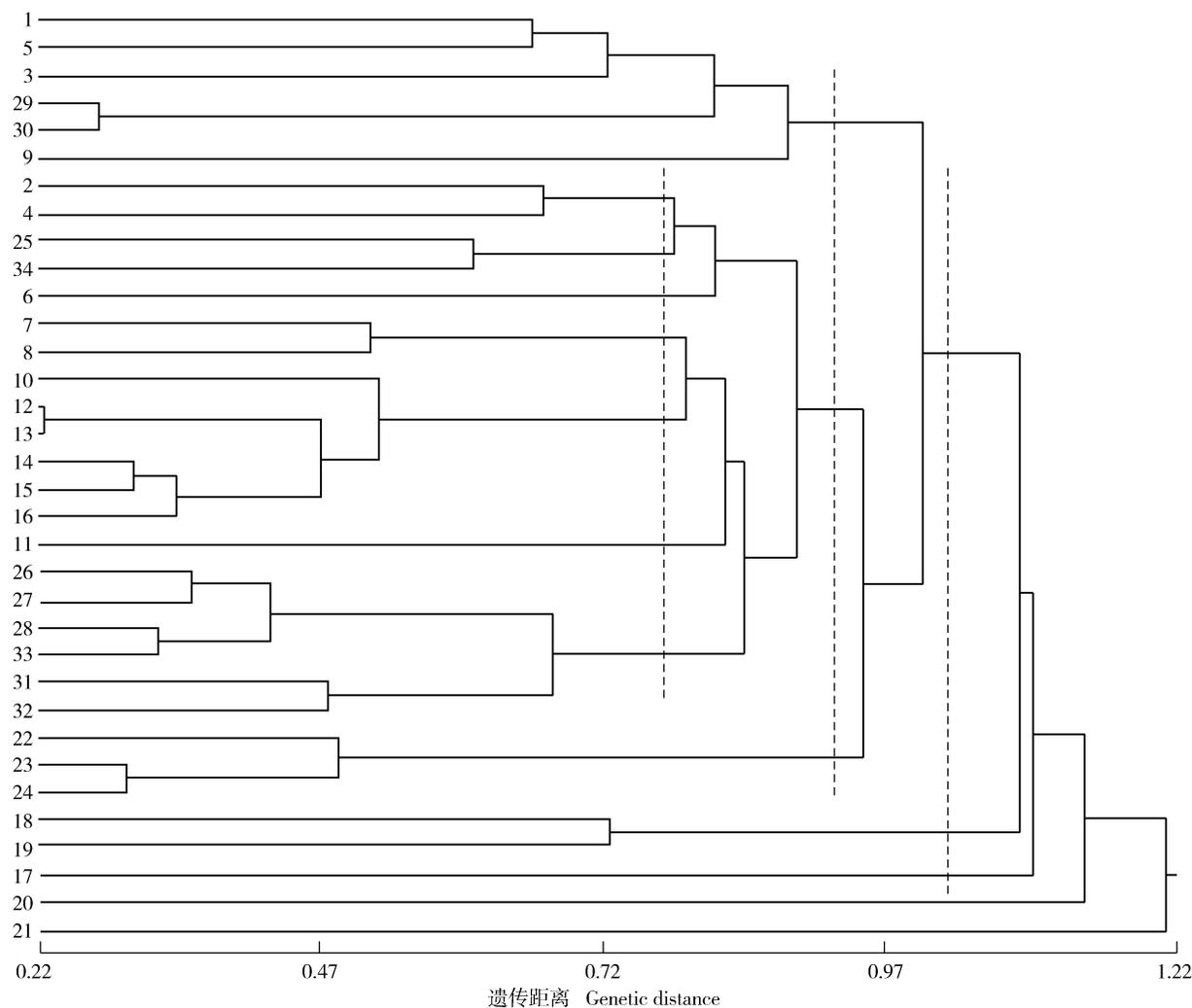
#### 2.4 遗传多样性分析

基于ISSR-PCR扩增结果的32个铁线莲属植物及2个近缘属植物的聚类图见图4。

由图4可以看出:32个铁线莲属植物及2个近缘属植物的遗传距离在0.22~1.21之间,其中,32个铁线莲属植物的遗传距离在0.22~1.09之间,铁筷子品种‘水晶’和耧斗菜品种‘喜鹊’与32个铁线莲属植物的遗传距离较远。在遗传距离1.02处,将32个铁线莲属植物分为3个大组,‘杰出’单独聚为1个大组,‘斯托尔韦克’和‘柠檬之梦’聚为1个大组,其余29个铁线莲属植物聚为第3大组;在遗传距离0.92处,将第3大组进一步划分为3个亚组,第1亚组包括‘阿迪森’、‘帕斯卡’和‘樱桃唇’,第2亚组包括短柱铁线莲、灰叶铁线莲、毛蕊铁线莲、曲柄铁

线莲、‘铃儿响叮当’和‘雀斑’,第3亚组包括吴兴铁线莲等20个铁线莲属植物;在遗传距离0.77处,将第3亚组又进一步划分为7个小组,其中,吴兴铁线莲和贵州铁线莲聚为1个小组。

供试32个铁线莲属植物中,8个野生种(短柱铁线莲、毛蕊铁线莲、灰叶铁线莲、曲柄铁线莲、吴兴铁线莲、贵州铁线莲、棉团铁线莲和厚叶铁线莲)、1个变种(大花小木通)与23个品种间亲缘关系的分析结果显示:短柱铁线莲、毛蕊铁线莲、灰叶铁线莲和曲柄铁线莲与‘铃儿响叮当’和‘雀斑’的亲缘关系较近;吴兴铁线莲、贵州铁线莲、棉团铁线莲和大花小木通与‘苹果花’的亲缘关系较近;厚叶铁线莲与‘灵感’、‘如古’和‘包查德伯爵夫人’等品种的亲缘关系较近。



1: 短柱铁线莲 *Clematis cadmia* Buch.-Ham. ex Wall.; 2: 吴兴铁线莲 *C. huchouensis* Tamura; 3: 灰叶铁线莲 *C. canescens* (Turcz.) W. T. Wang et M. C. Chang; 4: 贵州铁线莲 *C. kweichowensis* C. Pei; 5: 毛蕊铁线莲 *C. lasiandra* Maxim.; 6: 棉团铁线莲 *C. hexapetala* Pall.; 7: ‘灵感’ ‘Inspiration’; 8: ‘如古’ ‘Rooguchi’; 9: 曲柄铁线莲 *C. repens* Finet et Gagnep.; 10: ‘包查德伯爵夫人’ ‘Comtesse de Bouchaud’; 11: 厚叶铁线莲 *C. crassifolia* Benth.; 12: ‘魔法喷泉’ ‘Magic Fountain’; 13: ‘翠鸟’ ‘Kingfisher’; 14: ‘钻石’ ‘Diamantina’; 15: ‘红星’ ‘Red Star’; 16: ‘皇帝’ ‘Kaiser’; 17: ‘杰出’ ‘Superba’; 18: ‘斯托尔韦克’ ‘Stolwijk Gold’; 19: ‘柠檬之梦’ ‘Lemon Dream’; 20: 耧斗菜品种‘喜鹊’ *Aquilegia viridiflora* ‘Magpie’; 21: 铁筷子品种‘水晶’ *Helleborus thibetanus* ‘Winterbells’; 22: ‘阿迪森’ ‘Addisonii’; 23: ‘帕斯卡’ ‘Pascal’; 24: ‘樱桃唇’ ‘Cherry Lip’; 25: ‘苹果花’ ‘Apple Blossom’; 26: ‘倒影’ ‘Reflections’; 27: ‘乌托邦’ ‘Utopia’; 28: ‘绿玉’ ‘Alba Plena’; 29: ‘铃儿响叮当’ ‘Jingle Bells’; 30: ‘雀斑’ ‘Freckles’; 31: ‘波兰精神’ ‘Polish Spirit’; 32: ‘前卫’ ‘Avant Garde’; 33: ‘开心果’ ‘Pistachio’; 34: 大花小木通 *C. armandii* var. *farquhariana* (Rehder et E. H. Wilson) W. T. Wang.

图4 基于ISSR-PCR扩增结果的32个铁线莲属植物及2个近缘属植物的聚类图

Fig. 4 Dendrogram of 32 plants of *Clematis* Linn. and 2 plants of related genera based on ISSR-PCR amplification result

### 3 讨 论

本研究建立的铁线莲属植物基因组DNA ISSR-PCR最佳反应体系的总体积为25.0  $\mu\text{L}$ ,包括40  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 模板DNA 1.0  $\mu\text{L}$ 、0.4  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物1.0  $\mu\text{L}$ 、0.15  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs 2.0  $\mu\text{L}$ 、10 $\times$ Ex Taq Buffer

(Mg<sup>2+</sup> Plus) 2.0  $\mu\text{L}$ 、TaKaRa Ex Taq 酶 0.2  $\mu\text{L}$  和 ddH<sub>2</sub>O 18.8  $\mu\text{L}$ 。筛选出的13条引物对32个铁线莲属植物及2个近缘属植物基因组DNA的ISSR-PCR反应结果显示:共扩增出172个条带(位点),其中,多态性位点168个,平均多态性位点百分率为98.2%,说明ISSR分子标记可以应用于铁线莲不同品种以及野生种间的鉴别,也为进一步的杂交育种工

作中亲本选择与杂交组合的制定提供依据。

《铁线莲栽培12月计划》<sup>[14]</sup>将铁线莲品种划分为常绿组(包括常绿大洋组、常绿木通组和常绿卷须组)、华丽杂交组、葡叶组、大叶组、西藏组、蒙大拿组、全缘组、德克萨斯组、尾叶组、长瓣组、早花大花组、晚花大花组、南欧组和佛罗里达组。本研究对32个铁线莲属植物的聚类结果与铁线莲的园艺分类结果较为一致,如第1等级划分出蒙大拿组(‘杰出’)和长瓣组(‘金叶子’和‘柠檬之梦’)与其他组间的差异;第2等级划分出德克萨斯组(‘阿迪森’、‘帕斯卡’和‘樱桃唇’)与其他组之间的差异;第3等级划分出常绿组(‘苹果花’)、全缘组(‘灵感’和‘如古’)和大花组(‘包查德伯爵夫人’、‘魔法喷泉’、‘翠鸟’、‘钻石’、‘红星’和‘皇帝’)与其他组间的差异,由此可见,ISSR分子标记不仅能够区分铁线莲不同品种的分组,对于同一分组中亲缘关系较近的类群也能检测出较高的多态性<sup>[15]</sup>。

本研究首次从分子水平鉴定了铁线莲属野生种与品种间的亲缘关系,结果显示:短柱铁线莲、毛蕊铁线莲、灰叶铁线莲和曲柄铁线莲与常绿卷须组的亲缘关系较近;吴兴铁线莲、贵州铁线莲和棉团铁线莲与常绿木通组的亲缘关系较近;厚叶铁线莲与全缘组和早花大花组的亲缘关系较近。相关研究结果表明:短柱铁线莲和吴兴铁线莲属于铁线莲组<sup>[16]</sup>,毛蕊铁线莲、曲柄铁线莲和贵州铁线莲属于尾叶铁线莲组<sup>[17]</sup>,灰叶铁线莲属于灌木铁线莲组<sup>[18]</sup>,棉团铁线莲属于威灵仙组棉团铁线莲亚组(Subsect. *Angustifolia* Tamura)<sup>[5]153-156.[19]</sup>,而本文的研究结果显示短柱铁线莲和毛蕊铁线莲的亲缘关系更近,吴兴铁线莲和贵州铁线莲的亲缘关系更近。推测导致这一结果的原因可能是由于生物学性状容易受到环境等外界因素的影响,说明传统的生物学形态分类方法不能完全准确鉴定铁线莲属植物的亲缘关系,建议结合分子标记等生物学方法与形态学性状进行进一步验证。

本研究结果还显示:‘魔法喷泉’与‘钻石’并非市场上所说的同物异名,而是2个不同的园艺品种。此外,2个近缘属植物铁筷子品种‘水晶’和耧斗菜品种‘喜鹊’与‘杰出’的遗传距离较近,建议进行授粉杂交,观察这2个品种是否能够通过与铁线莲属植物进行属间远缘杂交来改造铁线莲属植物的基因组,获得更多的优良性状。

#### 参考文献:

- [1] 章银柯,江燕. 我国铁线莲属植物研究现状及其园林应用[J]. 北方园艺, 2007(3): 122-124.
- [2] 陈文允,普春霞. 云南省铁线莲属药用资源调查[J]. 云南中医学院学报, 2006, 29(1): 31-33.
- [3] 王文采,李良千. 铁线莲属一新分类系统[J]. 植物分类学报, 2005, 43(5): 431-488.
- [4] 江南,管开云,王仲朗. 云南铁线莲属植物地理分布及区系特征[J]. 云南植物研究, 2007, 29(2): 145-154.
- [5] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第二十八卷[M]. 北京:科学出版社, 1999.
- [6] 王璇,张玉华,蔡少青,等. 来源于铁线莲属透骨草的鉴别研究[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(4): 198-254.
- [7] YANG Q E. Cytology of ten species in *Anemone*, one in *Anemoclema* and six in *Clematis* (Trib. Anemoneae, Ranunculaceae) from China [J]. 植物分类学报, 2002, 40(5): 396-405.
- [8] 胡玉涛,周政昆. 9种铁线莲属药用植物的比较鉴别[J]. 基层中药杂志, 2002, 16(4): 36-37.
- [9] SHI J H, LI L Q. Leaf epidermal feature in *Clematis* (Ranunculaceae) with reference to its systematic significance [J]. 植物学报, 2003, 45(3): 257-268.
- [10] 孙诚,谢磊,李良千. 铁线莲属尾叶铁线莲组(毛茛科)基于形态学证据的分支系统学[J]. 植物学通报, 2007, 24(1): 87-98.
- [11] TSUMURA Y, OHBA K, STRAUSS S H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1996, 92(1): 40-45.
- [12] 张立荣,徐大庆,刘大群. SSR和ISSR分子标记及其在植物遗传育种研究中的应用[J]. 河北农业大学学报, 2002, 25(1): 90-94.
- [13] 赵孟良,韩睿,马胜超,等. 菊芋基因组DNA提取方法的比较[J]. 中国蔬菜, 2012(14): 41-44.
- [14] 米米童. 铁线莲栽培12月计划[M]. 武汉:湖北科学技术出版社, 2018: 4-8.
- [15] 韦荣昌,李虹,蒋建刚,等. 多倍体无籽罗汉果及其亲本遗传背景的ISSR分析[J]. 园艺学报, 2012, 39(2): 387-394.
- [16] WANG W-T. A revision of *Clematis* sect. *Viticella* (Ranunculaceae) [J]. 广西植物, 2007, 27(1): 1-28.
- [17] 谢磊. 铁线莲属尾叶铁线莲组的修订——兼论铁线莲属基于花粉形态学证据的系统发育[D]. 北京:中国科学院植物研究所, 2005: 29-35.
- [18] WANG W-T, LI L-Q. A revision of *Clematis* sect. *Fruticella* (Ranunculaceae) [J]. 植物分类学报, 2005, 43(3): 193-209.
- [19] WANG W-T. A revision of *Clematis* sect. *Clematis* (Ranunculaceae) [J]. 植物分类学报, 2003, 41(1): 1-62.

(责任编辑:张明霞)