

和文志,潘鹏举,杨玲,等.基于 ISSR 标记的铁线莲园艺品种遗传多样性和指纹图谱构建[J].江苏农业科学,2019,47(12):79-82.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.12.016

# 基于 ISSR 标记的铁线莲园艺品种遗传多样性分析和指纹图谱构建

和文志<sup>1</sup>,潘鹏举<sup>1</sup>,杨玲<sup>1,2</sup>,王昌命<sup>2,3</sup>

(1.西南林业大学生命科学学院,云南昆明 650224; 2.云南省高校林木生物技术重点实验室,云南昆明 650224;

3.西南林业大学林学院,云南昆明 650224)

**摘要:**为进一步明确铁线莲属 16 个园艺品种之间的亲缘关系和遗传多样性,利用 12 条 ISSR 引物对 16 份材料进行 PCR 扩增,共获得 117 条清晰的条带,多态性条带占比为 97.44%。利用引物 UBC815 和 UBC817 构建 16 个铁线莲品种的指纹图谱,可以有效地对铁线莲进行区分和鉴定。利用 NTSYS 软件计算出铁线莲品种间的遗传相似系数为 0.20~0.73,平均相似系数为 0.51。通过 UPGMA 法进行聚类分析,在相似系数为 0.53 时,可将 16 份材料划分为 4 大类。结果表明,铁线莲品种之间的遗传关系较为复杂,利用 ISSR 分子标记技术可以从分子水平揭示 16 份材料的遗传多样性水平和亲缘关系。

**关键词:**铁线莲;品种;ISSR;遗传多样性;指纹图谱

**中图分类号:** Q756;S682.390.3

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1002-1302(2019)12-0079-04

铁线莲为毛茛科(Ranunculaceae)铁线莲属(*Clematis* L.)植物,现已知的铁线莲约有 300 种,广泛分布于世界各地。我国约有 133 种,主要分布在华中和西南地区<sup>[1]</sup>。铁线莲具有非常高的药用价值和观赏价值。该属植物不仅花型多样,有平盘形、十字形、钟形、长瓣形等,还兼具花期长、色彩丰富的特点,拥有“藤本皇后”的美誉。在园艺家和植物学家几百年的栽培和育种过程中,培育出了上千个各具特色的铁线莲园艺品种<sup>[2]</sup>。这些品种中,绝大部分都是由多个不同的种杂交而来,还有部分品种是由野生种驯化而来<sup>[3]</sup>。长时间的人工选择过程中,铁线莲品种的遗传背景和各品种之间的亲缘关系变得模糊不清,有些杂交品种已经找不到最初的杂交亲本,这给杂交育种亲本选择带来一定的困难。同时,铁线莲很多品种外观形态相似度高,导致铁线莲品种鉴定越来越难。由于受环境影响因素较大,传统形态学分类方法难以对铁线莲品种进行有效区分。因此,运用分子生物学手段对铁线莲品种遗传多样性和亲缘关系进行研究,可为铁线莲品种在分子水平的分类与鉴定提供依据。目前,在有关铁线莲品种遗传多样性研究上,前人多从形态学和细胞学<sup>[4-7]</sup>等方面开展了一些研究,利用分子生物学手段进行相关研究的报道较少。

简单重复间序列(inter-simple sequence repeat, ISSR)标记技术具有操作简单、稳定性好和多态性丰富等特点,广泛应

用于植物品种鉴定、基因作图与定位、遗传多样性和系统发育等的研究。孙正海等建立了铁线莲 ISSR-PCR 的反应体系,并且进行反应体系优化和引物筛选,但未进一步研究该分子标记技术在铁线莲品种遗传多样性研究中的可行性与稳定性<sup>[8-9]</sup>。本研究利用 ISSR 分子标记技术从分子水平对铁线莲 16 个园艺品种遗传多样性进行探究,为 ISSR 分子标记技术在铁线莲品种分类鉴定、亲缘关系分析以及种质资源利用和新品种培育过程中亲本选择提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验材料为 2015 年 12 月从国外引进的 16 个铁线莲园艺品种。试验地为西南林业大学一号教学楼前苗圃,位于云南省昆明市盘龙区,属于北亚热带低纬高原山地季风气候,年平均气温 16.5℃,年均降水量 1 450 mm,无霜期 278 d。采集生长良好的植物幼嫩叶片,置于放入硅胶的自封袋当中,带回实验室置于 -80℃ 冰箱保存备用。品种信息(来自世界园艺铁线莲协会)详见表 1。

### 1.2 方法

**1.2.1 DNA 提取与检测** 采用 DNA 提取试剂盒(OMEGA D2485-01)提取植物基因组 DNA。利用 Nanodrop ND-2000 微量核酸蛋白检测仪检测 DNA 质量及浓度。利用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 链的完整性,电泳缓冲液为 0.5×TBE。

**1.2.2 ISSR 引物筛选与 PCR 扩增** 试验所选 100 条引物(UBC801~UBC900)由哥伦比亚大学公布,昆明硕擎生物科技有限公司合成。PCR 反应体系为 25 μL,包括模板 DNA,引物 2 μL,12.5 μL PCR 反应混合物(Master Mix),加入双蒸水使体系达到 25 μL。反应程序:94℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 90 s, 50℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 43 个循环;72℃ 延伸

收稿日期:2018-02-27

基金项目:西南林业大学生物学优势特色重点学科研究生创新基金;  
云南省教育厅项目(编号:50097505);国家林业局林业科技成果国家  
级推广项目(编号:201528);云南省高校林木生物技术重点实验室  
资助。

作者简介:和文志(1991—),男,河南周口人,硕士研究生,研究方向  
为细胞分化与调控。E-mail: hewenzhi@yeah.net。

通信作者:杨玲,硕士,副教授,主要从事生物技术方面的研究及教  
学。E-mail: yanglres@sina.com。

表 1 16 个铁线莲品种的基本信息

编号	品种名	园艺类型	花色	花形	单瓣或重瓣	花期
1	美佐世 Misayo	早花大花型	浅蓝紫色	平盘状	单瓣	5—10 月
2	普鲁吐斯 Proteus	早花大花型	粉色	平盘状	5—7 月开重瓣或半重瓣,8—9 月开单瓣	5—7 月,8—9 月
3	天真一瞥 Innocent Glance	早花大花型	粉色	平盘重瓣状	重瓣	5—7 月
4	塞西尔 Cecile	长瓣型	紫蓝色	长瓣重瓣状	半重瓣	4—6 月
5	艾米莉亚花盘 Emilia Plater	意大利型	浅红紫色	平盘状	单瓣	7—9 月
6	月光 Moonlight	早花大花型	亮黄至乳白	平盘状	单瓣	5—6 月,9 月
7	小鸭 Piilu	早花大花型	粉紫色	平盘状	重瓣或半重瓣	5—6 月,8—9 月
8	蓝天使 Blue Angel	晚花大花型	浅蓝色	平盘状	单瓣	7—9 月
9	格拉芙泰美女 Gravetve Beauty	德克萨斯型	深红色	平盘状	单瓣	5—10 月
10	钻石球 Diamond Ball	早花大花型	浅蓝色	平盘状	重瓣	6—8 月
11	迈克莱特 Mikelite	意大利型	深紫红色	平盘状	单瓣	5—9 月
12	紫铃铛 Rooguchi	单叶型	紫蓝色	铃铛状	单瓣	5—9 月
13	包查德女伯爵 Comtesse de Bouchaud	晚花大花型	粉色	平盘状	单瓣	5—9 月
14	面白 Omoshiro	早花大花型	浅粉色,边缘深红	平盘状	单瓣	5—6 月,8—9 月
15	吉恩斯 Girenas	早花大花型	浅粉色	平盘状	单瓣	6—9 月
16	红衣主教 Rouge Cardinal	晚花大花型	深红色	平盘状	单瓣	5—9 月

10 min;最后 4 ℃ 保存。采用 2% 琼脂糖凝胶加入 8 μL PCR 扩增产物,在 4 V/cm 电压下电泳 2.5 h,筛选出能扩增出清晰条带的引物。

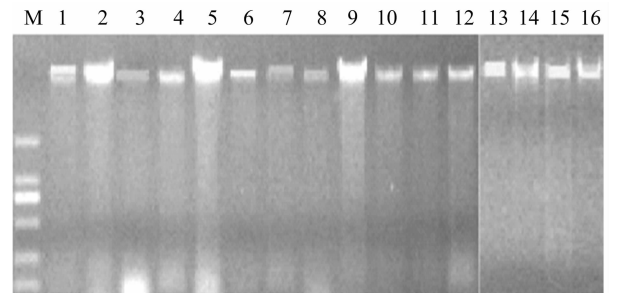
从上述 100 条引物中初步筛选出 28 条进行退火温度梯度的试验,筛选出条带数量丰富、清晰稳定的引物 12 条,并确定最适退火温度。最后,利用这 12 条引物对 16 个铁线莲品种进行 ISSR-PCR 扩增,使用凝胶成像系统进行拍照分析。

1.2.3 数据记录与分析 根据凝胶成像结果,同一引物扩增出来的条带,在同一迁移率上出现条带记为“1”,丢失条带记为“0”,建立 0、1 二元数据矩阵。选择多态性位点比较丰富的引物,构建 16 个铁线莲品种的指纹图谱;利用 NTSys2.1 数据分析软件计算品种间的遗传距离和遗传相似系数,并采用 UPGMA 法构建其遗传聚类图。

2 结果与分析

2.1 铁线莲 DNA 提取效果

利用 DNA 提取试剂盒提取铁线莲 16 个品种的 DNA 都是一条完整清晰的谱带(图 1),没有 RNA 污染、拖尾和弥散现象,利用超微量核酸蛋白测定仪测得 DNA 的浓度为 55 ~ 120 ng/μL。提取的 DNA 可以满足 ISSR-PCR 反应对模板 DNA 的质量要求。



maker(M)为 D2000, 1~16 为铁线莲品种编号(表 1)条带从上到下依次为 2 000、1 000、750、500、250、100 bp。下图同  
图1 16个铁线莲品种基因组 DNA 电泳结果

2.2 ISSR 引物筛选及扩增结果

从 100 条 ISSR 引物中筛选出 12 条扩增条带清晰稳定、数量丰富的引物,分别为 UBC809、UBC810、UBC815、UBC821、UBC817、UBC826、UBC828、UBC830、UBC836、UBC856、UBC859、UBC888。通过退火温度梯度(44.7 ~ 62.5 ℃)试验,确定了每条引物的最佳退火温度。利用筛选出的引物对 16 个供试材料进行 ISSR-PCR 扩增。12 条引物共扩增出 117 条带,其中特异性条带共有 114 条,每个引物平均扩增出来 9.75 个位点,平均特异性位点达到 9.5 个,多态性比率达到 97.44%(表 2);扩增出的条带片段大小为 250 ~ 1 500 bp。引物 UBC817、UBC815 和 UBC856 扩增结果见图 2、图 3、图 4。

表 2 12 条引物扩增结果

引物名称	序列信息	退火温度 (℃)	总条带 (条)	特异性带 (条)	多态性比例 (%)
UBC809	(AG) <sub>8</sub> G	49	11	11	100.00
UBC810	(GA) <sub>8</sub> T	49	9	9	100.00
UBC815	(CT) <sub>8</sub> G	49	9	8	88.89
UBC821	(GT) <sub>8</sub> T	51.5	8	8	100.00
UBC817	(CA) <sub>8</sub> A	51.5	15	15	100.00
UBC826	(AC) <sub>8</sub> C	55	13	12	92.31
UBC828	(TG) <sub>8</sub> A	54	10	10	100.00
UBC830	(TG) <sub>8</sub> G	54	9	8	88.89
UBC836	(AG) <sub>8</sub> YA	51.6	10	10	100.00
UBC856	(AC) <sub>8</sub> YA	54	8	8	100.00
UBC859	(TG) <sub>8</sub> RC	44.7	9	9	100.00
UBC888	BDBD(AC) <sub>6</sub> A	52.7	6	6	100.00
总计			117	114	
平均			9.75	9.5	97.44

注:Y = (C,T);R = (A,G);B = (C,G,T);D = (A,G,T)

2.3 16 个铁线莲园艺品种的 ISSR 聚类结果

利用 12 条引物扩增出来的 117 谱带建立 16 个铁线莲品

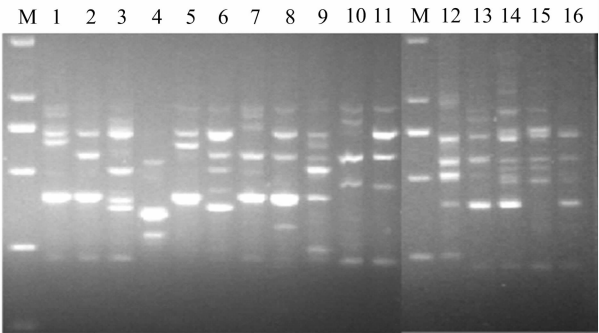


图2 引物 UBC817 对16个铁线莲品种的扩增结果

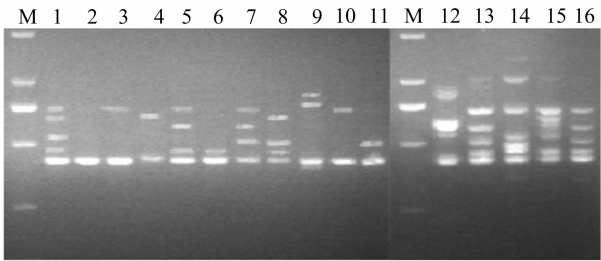


图3 引物 UBC815 对 16 个铁线莲品种的扩增结果

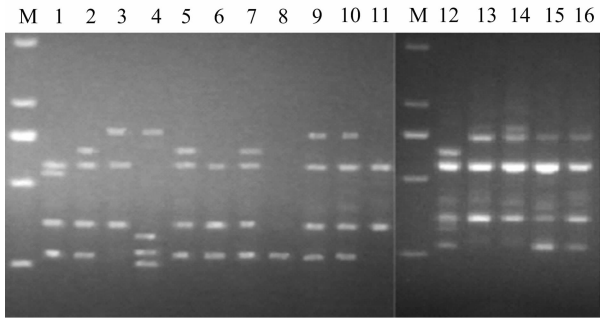


图4 引物 UBC-856 对 16 个铁线莲品种的扩增结果

种的遗传相似系数矩阵(表3),各品种之间的相似系数在0.20~0.73之间,平均相似系数为0.51。说明铁线莲品种具有较高的遗传多样性,各品种间的遗传变异较大,环境适应能力较强。其中,包查德女伯爵和红衣主教相似系数最大,为0.73,这表明2个品种之间的亲缘关系相对较近;塞西尔和迈克莱特相似系数最小,为0.20,表明这2个品种的亲缘关系相对较远。从遗传相似系数来看,塞西尔同其他品种之间的遗传相似系数较小,为0.20~0.35,表明该品种与其他品种相比遗传变异大、亲缘关系远。

表3 不同铁线莲品种间的遗传相似系数

编号	相似系数															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	1.000 0															
2	0.536 6	1.000 0														
3	0.613 6	0.615 4	1.000 0													
4	0.314 3	0.266 7	0.303 0	1.000 0												
5	0.584 3	0.481 0	0.588 2	0.268 7	1.000 0											
6	0.461 5	0.529 4	0.513 5	0.321 4	0.453 3	1.000 0										
7	0.617 0	0.619 0	0.711 1	0.250 0	0.593 4	0.475 0	1.000 0									
8	0.580 6	0.530 1	0.606 7	0.281 7	0.711 1	0.455 7	0.589 5	1.000 0								
9	0.522 7	0.717 9	0.619 0	0.333 3	0.447 1	0.567 6	0.577 8	0.516 9	1.000 0							
10	0.574 7	0.623 4	0.650 6	0.276 9	0.547 6	0.493 2	0.696 6	0.568 2	0.578 3	1.000 0						
11	0.463 4	0.611 1	0.512 8	0.200 0	0.455 7	0.529 4	0.547 6	0.554 2	0.615 4	0.597 4	1.000 0					
12	0.412 4	0.482 8	0.451 6	0.240 0	0.489 4	0.433 7	0.565 7	0.510 2	0.623 7	0.521 7	0.505 7	1.000 0				
13	0.514 9	0.505 5	0.515 5	0.202 5	0.551 0	0.413 8	0.563 1	0.588 2	0.453 6	0.583 3	0.461 5	0.490 6	1.000 0			
14	0.490 2	0.478 3	0.591 8	0.225 0	0.484 8	0.545 5	0.500 0	0.504 9	0.489 8	0.515 5	0.521 7	0.448 6	0.666 7	1.000 0		
15	0.533 3	0.550 0	0.604 7	0.352 9	0.436 8	0.605 3	0.543 5	0.527 5	0.604 7	0.588 2	0.525 0	0.421 1	0.585 9	0.720 0	1.000 0	
16	0.526 3	0.588 2	0.593 4	0.301 4	0.543 5	0.518 5	0.618 6	0.583 3	0.571 4	0.577 8	0.494 1	0.500 0	0.730 8	0.571 4	0.666 7	1.000 0

采用UPGMA法对供试的16个铁线莲园艺品种进行聚类分析,结果表明,在相似系数为0.50处,可将16份材料聚为3类(图5)。其中,塞西尔划为A类,紫铃铛划为B类,C类包括其余14个品种。在相似系数为0.53处,可将16份材料划分为4个类群。塞西尔划为第1类;紫铃铛划为第2类;第3类包括月光、迈克莱特、格拉芙泰美女和普鲁吐斯;其余10个品种划为第4类。

2.4 16个铁线莲园艺品种的ISSR指纹图谱构建

利用扩增出条带清晰、条带数量多、多态性丰富的引物构建16个铁线莲品种的遗传指纹图谱。利用引物UBC815和UBC817构建16个铁线莲品种的指纹图谱(表4),该指纹图谱可以有效地对这些铁线莲品种进行区分、鉴定。

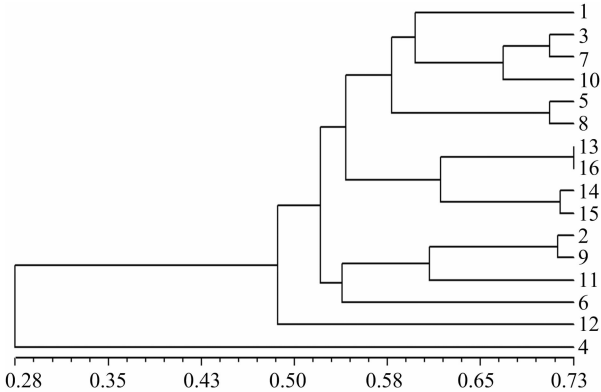


图5 基于ISSR标记的16个铁线莲品种的UPGMA聚类

表 4 引物 UBC815、UBC817 构建 16 个铁线莲品种的数字指纹图谱

编号	品种名称	指纹图谱	
		UBC815	UBC817
1	美佐世	000110111	110110000100001
2	普鲁吐斯	000000001	000101000100001
3	天真一瞥	000100001	101100010110001
4	塞西尔	000010001	000000100010100
5	艾米莉亚花盘	000101011	100110000100000
6	月光	000000011	100101010010000
7	小鸭	000101101	111001000100001
8	蓝天使	000010111	100101000101001
9	格拉芙泰美女	011000001	100111010100011
10	钻石球	000100001	111001001000001
11	迈克莱特	000000101	100101001000001
12	紫铃铛	010001001	100101010100010
13	包查德女伯爵	100101111	110101000100001
14	面白	100100011	101101110100001
15	吉恩斯	000110011	101101110000001
16	红衣主教	000101111	000101000100001

3 结论与讨论

本研究利用 ISSR 分子标记技术筛选出的 12 条引物扩增出 117 个位点,多态性条带的比例为 97.44%,每条引物扩增出的条带数为 6~15 条,多态性条带所占比例为 88.89%~100%。其中 12 条引物中有 9 条引物扩增出的条带多态性达到了 100%,说明铁线莲栽培品种具有较高的遗传多样性和复杂的遗传背景。利用引物 UBC815 和 UBC817 建立起的 16 个铁线莲品种的 DNA 指纹图谱可以对不同品种进行有效地区分和快速鉴定。对材料进行 ISSR 聚类分析,在相似系数 0.50 处可将 16 份材料聚为 3 类。A 类只有品种塞西尔;B 类只有紫铃铛;C 类有普鲁吐斯、格拉芙泰美女、迈克莱特、月光、美佐世、天真一瞥、小鸭、钻石球、艾米莉亚花盘、蓝天使、包查德女伯爵、红衣主教、面白和吉恩斯。其中,包查德女伯爵与红衣主教之间的相似系数最大,为 0.73,亲缘关系最近,遗传背景相似。从花朵形态特征来看,包查德女伯爵和红衣主教除花朵颜色不同外,都具有相同数量苞片,花期都为 6—9 月,花型都是平盘型,萼片中部具有竖状条纹,说明 ISSR 分子聚类与形态聚类在一定程度上的一致性。C 类中铁线莲的花型都为平盘型,A 类花型为长瓣型,B 类为铃铛型。以此来看,按照花型分类也可以将材料划分为 3 类,这与 ISSR 聚类结果保持一致,拥有相同花型的品种之间可能具有相对较近的亲缘关系。但是在同一花型中,不同品种的花朵颜色、单重瓣及萼片数量等性状表现不一,这可能是铁线莲品种之间相互杂交导致种质资源混杂的结果,说明分子聚类结果与形态学分类结果存在一定的差异。塞西尔和迈克莱特之间的相似系数最小,为 0.20,说明这 2 个品种之间的亲缘关系较远。在铁线莲新品种培育中,可以利用这 2 个品种进行杂交,可能

会产生较好的杂种优势。

按照栽培品种的生境特点、开花特性及开花时间等,园艺家将铁线莲品种划为不同的品种类群。按照 ISSR 分子标记聚类结果将 16 份材料划分的 3 大类群中,A 类只有 1 个长瓣型品种;B 类只有 1 个单叶型品种;C 类中包括 8 个早花大花型品种、1 个德克萨斯型品种、2 个意大利型品种和 3 个晚花大花型品种。ISSR 聚类结果显示,不同园艺类型的铁线莲品种划分到同一类中,表明按照园艺性状分类结果与分子标记聚类结果存在一定的差异。这主要是因为园艺家对铁线莲品种的分类是为了园艺种植的考量,分类依据主要是植物生长环境、适应能力、花朵大小、颜色和开放时间等园艺特性。分子聚类与园艺分类的差异体现了铁线莲品种之间的遗传变异程度之大,这是长期人工选择和自然进化的共同作用的结果。ISSR 聚类结果可以为铁线莲品种亲缘关系鉴定和杂交育种中亲本选择提供参考。与形态学标记相比,以遗传物质 DNA 为基础的 ISSR 分子标记重复性好,稳定性高,受环境因素影响小,在植物花卉种源信息鉴定、品种分类和遗传多样性评价等<sup>[10-12]</sup>方面具有广泛的应用。

参考文献:

[1]中国科学院中国植物志编委会.中国植物志(第 28 卷)[M].北京:科学出版社,2000.

[2]李同水.藤本皇后铁线莲[M].长春:吉林科学技术出版社,2012.

[3]Gardner N,Hokanson S C. Intersimple sequence repeat fingerprinting and genetic variation in a collection of *Clematis* cultivars in commercial germplasm[J]. HortScience,2005,40(7):1982-1987.

[4]王磊,王红梅,贾君,等.铁线莲属植物品种及野生种的物候期观察分析[J].浙江农业科学,2016,57(2):198-201.

[5]孟雪,郝笑微,王锦.铁线莲 8 个小花品种的适生性比较[J].安徽农业科学,2011,39(35):21597-21599.

[6]高露璐,李林芳,马育珠,等.铁线莲品种群的花期观赏性状分析[J].园艺学报,2017,44(5):921-932.

[7]任佳伦.铁线莲品种开花生物学特性及核型分析[D].杭州:浙江农林大学,2016.

[8]孙正海,王锦,李世峰,等.滑叶藤 ISSR-PCR 反应体系建立及优化[J].云南农业大学学报(自然科学版),2012,27(5):746-750.

[9]王楠,王锦,李宗艳,等.铁线莲园艺品种 ISSR-PCR 反应体系优化与引物筛选[J].北方园艺,2016(1):80-83.

[10]张俊杰,马旭,廖源,等.昆明 56 个桂花品种 ISSR 分析[J].西部林业科学,2015,44(3):45-52.

[11]罗清,卢业飞,於艳萍,等.24 份杜鹃属植物的 ISSR 分子鉴定[J].西北林学院学报,2016,31(3):154-158.

[12]苗美美,赵明明,刘绪明,等.百合(*Lilium* spp.)杂交后代 ISSR 分析亲缘关系[J].分子植物育种,2016(2):437-441.