园艺学报，2021，48 (9)：1755－1767.
Acta Horticulturae Sinica
doi：10.16420/j.issn.0513-353x.2020-0953；http：//www. ahs. ac. cn

利用 ISSR 标记及 rDNA-ITS 序列分析河北省野生铁线莲的亲缘关系

王　鑫，李明阳，田　琳，刘冬云*
（河北农业大学园林与旅游学院，河北保定 071000）

摘　要：通过 ISSR 和 rDNA-ITS 两种分子标记方法对河北省 17 个类群的野生铁线莲种间亲缘关系进行了鉴定。利用 UPGMA 法对 ISSR 扩增的条带结果进行聚类分析，并用 PCR 法扩增 ITS，通过 Clustal X，MEGA 等软件比较和分析 ITS 的序列特征，最后对两种分子标记的结果综合分析。结果表明，利用筛选出的 ISSR 引物扩增出多态性条带 104 条，多态性百分比为 100%，等位基因数（N_a）为 2.00，有效等位基因数（N_e）为 1.3069，Nei's 基因多样性（*H*）为 0.2196，Shannon's 多样性信息指数（*I*）为 0.3675。聚类结果显示，在遗传距离为 0.66 处，17 种野生铁线莲被分为 5 类；铁线莲的 17 个铁线莲样本 ITS 序列长度为 543～561 bp，含变异位点 87 个，信息位点 37 个，特异性鉴别位点 50 个。其中，长瓣铁线莲与半钟铁线莲、太行铁线莲与狭裂太行铁线莲遗传距离为 0，槭叶铁线莲与其他种的遗传距离较大，亲缘关系较远。

关键词：铁线莲；ISSR；ITS；种质资源；亲缘关系
中图分类号：S 682；S 687.3　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0513-353X（2021）09-1755-13

ISSR and rDNA-ITS Sequence Analysis of the Genetic Relationship of *Clematis* in Hebei Province

WANG Xin，LI Mingyang，TIAN Lin，and LIU Dongyun*
（*College of Landscape and Tourism*，*Hebei Agricultural University*，*Baoding*，*Hebei* 071000，*China*）

Abstract：：The ISSR and rDNA-ITS sequence analysis were used to identify the genetic relationship of 17 wild species of *Clematis* L. in Hebei Province. The ISSR amplified result was conducted cluster analysis by UPGMA method. After PCR amplification，the ITS sequence characteristics were compared and analyzed by Clustal X，MEGA and other software. Finally，the results of these two molecular markers method were comprehensively analyzed. The results showed that primer combinations can amplify 104 polymorphism bands with the percentage of polymorphic bands（*PPB*）of 100.0%. The average observed number of alleles（N_a）was 2.00；the number of effective alleles（N_e）was 1.3069；the Nei's gene diversity（*H*）was 0.2196；the Shannon's information index（*I*）was 0.3675. According to the clustering results，17 species were divided into five groups at a genetic distance of 0.66. Moreover，the length of ITS sequences varied from 543 to 561 bp，including 87 variable sites，37 information sites and 50 singleton

收稿日期：2021－01－18；**修回日期：**2021－05－19
基金项目：河北省铁线莲属植物种质资源收集与新种质创新（20326339D）；现代林业学科群项目（XK1008601519）
* 通信作者 Author for correspondence（E-mail：Liudongyun0505@163.com）

specific discrimination sites in the 17 *Clematis* L. species. The genetic distance between *C. macropetala* and *C. ochotensis*，*C. kirilowii* and *C. kirilowii* var. *chaneti* was 0，and the genetic distance between *C. acerfolia* and others was large and the genetic relationship was far.

Keywords：*Clematis*；ISSR；ITS；germplasm resource；genetic relationship

铁线莲属（*Clematis* L.）植物约有 300 余种，花色丰富，花形多变，花期跨度长，可从早春至深秋，花果均具有较高的观赏性和园林应用价值（钱仁卷 等，2017），同时，药用价值高，又具有较强的抗逆性和耐寒性（王江勇 等，2020）。中国铁线莲属植物约 147 种，其中约 98 种为我国特有种，主要分布于华中和西南地区。在华北地区，北京当地野生铁线莲属植物共 11 种，主要分布于北部和西部，其中槭叶铁线莲（*C. acerifolia*）为北京市特有种，黄花铁线莲（*C. intricata*）、棉团铁线莲（*C. hexapetala*）、半钟铁线莲（*C. ochotensis*）及长瓣铁线莲（*C. macropetala*）等有较高的园林利用价值（刘晶晶和高亦珂，2013）。河北省拥有丰富的野生铁线莲属植物资源，其中不乏观赏性状和适应性优良的类型，但目前对河北省野生铁线莲种质资源的研究及应用未见报道。

孙正海等（2012）、王楠等（2016）分别以滑叶藤和铁线莲为试材，研究建立和优化了 ISSR-PCR 反应体系。蒋明等（2011）和李骁等（2012）通过比较 ITS 序列，为柱果铁线莲（*C. uncinata*）、芹叶铁线莲（*C. aethusifolia*）等 14 种铁线莲属植物的分子鉴定提供了依据。在系统发育研究方面，大多数主要是根据核糖体 DNA 中的 ITS 序列片段和叶绿体 DNA 序列片段分析，构建铁线莲属植物系统发育关系。其中穆琳和谢磊（2011）发现槭叶铁线莲（*C. acerifolia*）可能是铁线莲属中分布于北温带古老类群的孑遗；盛璐（2015）研究认为槭叶铁线莲等 4 亚属 7 组的 18 个种（或变种）以及下载的序列（4 亚属 13 组）为多系或并系类群，组间关系也比较复杂。属间分支系统发育学研究也随着相应技术的提高（Salem et al.，2019）得到了更好的发展。

ISSR 分子标记是在 SSR 标记基础上完善的，已成为遗传学研究的重要手段，所扩增的产物多个条带可通过凝胶电泳得到产物谱带进行分辨，扩增谱带多为显性表现（杨九艳 等，2006）。通过染色体研究和测序技术检测植物基因组（ITS）的遗传变异，并基于基因和 DNA 片段变异或者序列碱基变异位点所反映的信息来进行系统发育分析，其结果更接近客观自然，揭示的系统发育关系也更具客观性和可比性（赵欢 等，2009）。由于每种鉴定方法的原理不同，聚类分析结果通常会存在差异，为确保鉴定结果的准确性，常采用多种分子标记方法进行综合分析（史灵燕 等，2019）。野生铁线莲经过长期自然进化，其遗传背景复杂。因此掌握其遗传关系对铁线莲育种研究具有重要意义。本研究中运用 ISSR 分子标记及 ITS 序列分析相结合的方法开展铁线莲属植物的分子系统学研究，希望为解决铁线莲属植物的系统学问题和完善铁线莲属属下分类系统积累分子证据，同时为种质资源的鉴别与利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试材及取样

试验材料为 17 个类群的野生铁线莲（图 1），均采自河北省野外不同地区，引种后种植于河北农业大学试验基地，供试材料的采集地点和形态特征见表 1。

图 1　17 个类群的野生铁线莲

Fig. 1　Seventeen wild clematis

表 1　供试铁线莲形态特征及采集信息

Table 1　The morphological characteristics and collect information of the tested *Clematis* L.

编号 No.	种 Species	植株类型 Plant type							
		生活型 Life form	叶型 Leaf form	花萼 Calyx	花色 Sepals color	花型 Flower form	花期（月份） Blooming period	果期（月份） Fruiting period	采集地 Collection place
1	黄花铁线莲 *Clematis intricata*	木质藤本 Woody vines	一至二回羽状复叶 One to two pinnately compound leaves	4	黄色 Yellow	钟状 Bell shape	6～7	8～9	张家口市蔚县 Yu County，Zhangjiakou City
2	芹叶铁线莲 *C. aethusifolia*	草质藤本 Herbaceous vines	一至二回羽状复叶 One to two pinnately compound leaves	4	淡黄色 Canary yellow	钟状 Bell shape	7～8	9	邯郸市武安市 Wu'an City，Handan City
3	褐毛铁线莲 *C. fusca*	草质藤本 Herbaceous vines	一回羽状复叶 One pinnately compound leaves	4	紫色 Purple	钟状 Bell shape	6～7	8～9	秦皇岛市青龙县 Qinglong County，Qinhuangdao City
4	钝萼铁线莲 *C. peterae*	木质藤本 Woody vines	一回羽状复叶 One pinnately compound leaves	4～5	白色 White	轮状 Wheel shape	5～6	7～8	邯郸市磁县 Ci County，Handan City
5	大叶铁线莲 *C. heracleifolia*	灌木 Shrub	三出复叶 Ternately compound leaves	4	蓝紫色 Bluish violet	筒状 Tubular	7～8	9～10	保定市易县 Yi County，Baoding City
6	毛果扬子铁线莲 *C. puberula*	草质藤本 Herbaceous vines	一回羽状或二回三出复叶 One pinnately or two ternately compound leaves	4	白色 White	十字型 Cross	7～9	9～10	邯郸市磁县 Ci County，Handan City
7	狭裂太行铁线莲 *C. kirilowii* var. *chaneti*	木质藤本 Woody vines	一回羽状复叶 One pinnately compound leaves	4 或 5～6	白色 White	轮状 Wheel shape	6～8	8～9	保定市满城区 Mancheng District，Baoding City
8	太行铁线莲 *C. kirilowii*	木质藤本 Woody vines	一回羽状复叶 One pinnately compound leaves	4 或 5～6	白色 White	轮状 Wheel shape	6～8	8～9	保定市易县 Yi County，Baoding City
9	短尾铁线莲 *C. brevicaudata*	木质藤本 Woody vines	二回三出复叶 Bipinnately and ternately compound leaves	4	白色 White	轮状 Wheel shape	7～8	9～10	保定市阜平县 Fuping County，Baoding City
10	卷萼铁线莲 *C. tubulosa*	灌木 Shrub	三出复叶 Ternately compound leaves	4	蓝紫色 Bluish violet	筒状 Tubular	7～8	10	承德市兴隆县 Xinglong County，Chengde City
11	粗齿铁线莲 *C. argentilucida*	木质藤本 Woody vines	一回羽状复叶 One pinnately compound leaves	4	白色 White	轮状 Wheel shape	5～7	7～10	石家庄市赞皇县 Zanhuang County，Shijiazhuang City
12	灌木铁线莲 *C. fruticosa*	灌木 Shrub	一回羽状复叶 One pinnately compound leaves	4	黄色 Yellow	钟状 Bell shape	7～8	10	张家口市涿鹿县 Zhuolu County，Zhangjiakou City
13	棉团铁线莲 *C. hexapetala*	木质藤本 Woody vines	单叶 Simple leaf	4～8	白色 White	轮状 Wheel shape	6～7	8～9	承德市兴隆县 Xinglong County，Chengde City
14	羽叶铁线莲 *C. pinnata*	木质藤本 Woody vines	一回羽状复叶 One pinnately compound leaves	4	白色 White	筒状 Tubular	9～10	11～12	秦皇岛市青龙县 Qinglong County，Qinhuangdao City
15	长瓣铁线莲 *C. macropetala*	木质藤本 Woody vines	二回三出复叶 Bipinnately and ternately compound leaves	4	蓝色或淡紫色 Blue or lavender	钟状 Bell shape	7	8	保定市易县 Yi County，Baoding City
16	槭叶铁线莲 *C. acerfolia*	灌木 Shrub	单叶 Simple leaf	5～8	白色或粉红色 White or pink	高脚碟状 Salver-form	3 月中旬～4 月中旬	5～6	石家庄市赞皇县 Zanhuang County，Shijiazhuang City
17	半钟铁线莲 *C. ochotensis*	木质藤本 Woody vines	二回三出复叶 Bipinnately and ternately compound leaves	4	淡蓝色 Light blue	钟状 Bell shape	5～6	7～8	保定市易县 Yi County，Baoding City

1.2　DNA 的提取与检测

采用新型植物基因组 DNA 提取试剂盒（CW0531S，康为世纪），按照试剂盒说明书提取 17 个铁线莲样本的 DNA 后，母液电泳图条带明亮清晰。以 1 μL 的 ddH_2O 为空白对照，用 Themro 微量紫外分光光度计进行 DNA 纯度检测，其纯度（OD_{260}/OD_{280}）在 1.6 ～ 2.0 之间，说明说明 DNA 杂质少，纯度高可用于后续反应。将 DNA 母液浓度稀释成 40 ng · μL^{-1} 的工作液，1%的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3　ISSR 引物筛选

从加拿大哥伦比亚大学公布的 100 条 ISSR 通用引物中进行筛选，通过设置退火温度梯度进行试验，以大叶铁线莲和短尾铁线莲 DNA 为模板，最终筛选出能扩增出清晰条带的引物。温度梯度设置：45.7、47.7、50.4、51.8、54.0、55.4 ℃。25.0 μL 的 ISSR-PCR 反应体系：2.0 μL DNA 工作液、2.0 μL 引物、12.5 μL 2 × Es *Taq* Master Mix、8.5 μL ddH_2O。ISSR-PCR 扩增程序：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 50 s；50 ℃退火 1 min；72 ℃延伸 1 min；36 个循环；72 ℃延伸 10 min；4 ℃保存。将 BIO-RAD 扩增仪设置好程序后，利用筛选的引物对 17 份样品进行扩增。扩增后的产物利用 US EVERBRIGHT 的 6× SuperStain Loading Buffer 进行染色，1%琼脂糖凝胶电泳检测（1 × TAE 缓冲液，120 V，100 mA，0.5 h），FR-2000 凝胶成像分析系统扫描并保存电泳图。

1.4　ITS 扩增

取基因组 DNA 1 μL 作为模板，利用李骁等（2012）的最适引物（F：AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG；R：TTCTCCGCTTATTGATATGC），进行 PCR 扩增，PCR 扩增体系 20 μL：DNA 工作液 1.0 μL、上游引物、下游引物各 0.5 μL、2 × Es *Taq* Master Mix 10.0 μL、ddH_2O 8 μL。PCR 反应程序：95 ℃预变性 5 min；95 ℃变性 30 s；60→50 ℃退火 30 s；72 ℃延伸 45 s；33 个循环；72 ℃延伸 10 min；4 ℃保存。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。对目的条带进行切胶回收，分别用扩增引物进行正向测序。

1.5　数据分析

依据人工读带原则，记录在产物同一位置显现出来的条带，清晰无拖尾的条带记为“1”，无条带记为“0”，将条带结果用 Excel 统计，利用 NTsys 2.10 软件，使用 UPGMA 法（朱元娣 等，2014）绘制聚类分析图。使用 POPGENE 软件计算等位基因数（N_a）、有效等位基因数（N_e）、Shannon’s 信息指数（*I*）、Nei’s 基因多样性（*H*）等指标。

2　结果与分析

2.1　ISSR 标记分析

2.1.1　多态性

从 100 条引物中筛选出的 12 条引物可扩增出 104 条明亮，无拖带，重复高的谱带。其中共扩增出多态性条带 104 条，其中特异性条带 104 条。每个引物平均扩增出 8.7 个位点，特异性位点为 8.7 个，多态性百分比为 100%（表 2）。这 12 条引物可扩增出 6～12 条数量不等的条带。扩增条带

片段大小为 200 ~ 2 000 bp。其中，引物 U824 扩增出的多态性条带最多（图 2），为 12 条。引物 U836 和引物 U844 扩增出的多态性条带数最少，为 6 条。

利用 POPGENE 1.32 分析 17 份铁线莲样本 DNA 多样性。铁线莲等位基因数（N_a）为 2.00，有效等位基因数（N_e）为 1.3069，Nei's 基因多样性（H）为 0.2196，Shannon's 多样性信息指数（I）为 0.3675，表明 17 份铁线莲种质资源基因组 DNA 多态性较高，基因库较为丰富，有着广泛的遗传基础。

表 2　用于 17 种铁线莲基因组 DNA ISSR-PCR 反应的引物信息及多态性分析

Table 2　Primers information and polymorphism used for ISSR-PCR reaction of genomic DNA from 17 plants of *Clematis* L.

引物名称 Primer name	引物序列 Primer 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
U815	CTCTCTCTCTCTCTCTG	54.0	11	11	100
U824	TCTCTCTCTCTCTCTCG	55.4	12	12	100
U834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	57.5	7	7	100
U835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	50.4	9	9	100
U836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	55.4	6	6	100
U840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	55.4	7	7	100
U841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	55.4	10	10	100
U843	CTCTCTCTCTCTCTCTRA	54.0	8	8	100
U844	CTCTCTCTCTCTCTCTRC	55.4	6	6	100
U845	CTCTCTCTCTCTCTCTRG	55.4	10	10	100
U866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC	55.4	7	7	100
U899	CATGGTGTTGGTCATTGTTCCA	51.8	11	11	100

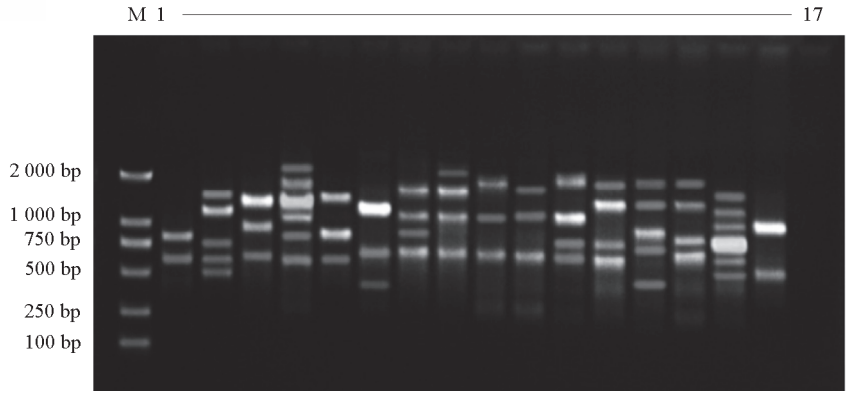

图 2　引物 U824 的 PCR 扩增电泳图谱

Fig. 2　The electrophoretogram of PCR amplified patterns by ISSR primer

2.1.2　聚类

利用软件 NTsys 2.10 对原始数据矩阵进行处理，根据 UPGMA 法对 ISSR 分子标记结果进行聚类分析。在遗传距离为 0.66 处，17 种野生铁线莲被分为 5 类。第Ⅰ类包括钝萼铁线莲、短尾铁线莲、羽叶铁线莲等 10 种，第Ⅱ类只有芹叶铁线莲，第Ⅲ类包括太行铁线莲、狭裂太行铁线莲、棉团铁线莲；第Ⅳ类包括灌木铁线莲和槭叶铁线莲；第Ⅴ类包括褐毛铁线莲（图 3）。

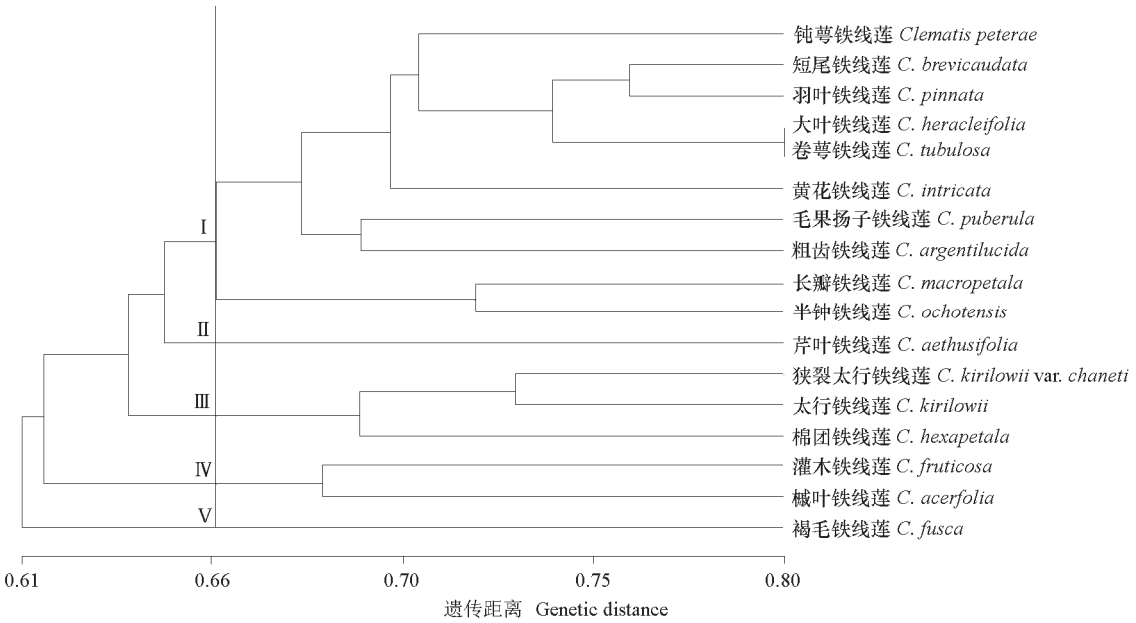

图 3　17 种植物遗传距离的 ISSR 聚类图

Fig. 3　ISSR dendrogram of 17 plants of *Clematis*

2.2　ITS 序列分析

2.2.1　序列特点

PCR 扩增电泳检测显示所有样品在 500～750 bp 之间均有单一扩增条带（图 2），切胶回收测序。17 个样品的测序结果经过拼接获得了 ITS 全长序列，其中个别样品的个别碱基存在 SNP 位点。铁线莲属的 17 种植物 ITS 序列长度为 543～561 bp，其中序列最长的是褐毛铁线莲，槭叶铁线莲次之，二者在长度上仅差 2 个碱基；毛果扬子铁线莲的序列最短。ITS1 长度为 164～180 bp，G＋C 含量为 58.90%～63.89%；ITS2 的长度为 219～227 bp，G＋C 含量为 65.60%～70.00%（表 3）。其中含变异位点 87 个，信息位点（在两个及以上分类单元的序列中存在差异，且其中至少有两种变异类型在该位点出现两次及以上）37 个，特异性鉴别位点 50 个（表 4）。将 17 种铁线莲 ITS 序列提交至 NCBI 数据库获得的登录号为 MW383262～MW383278。

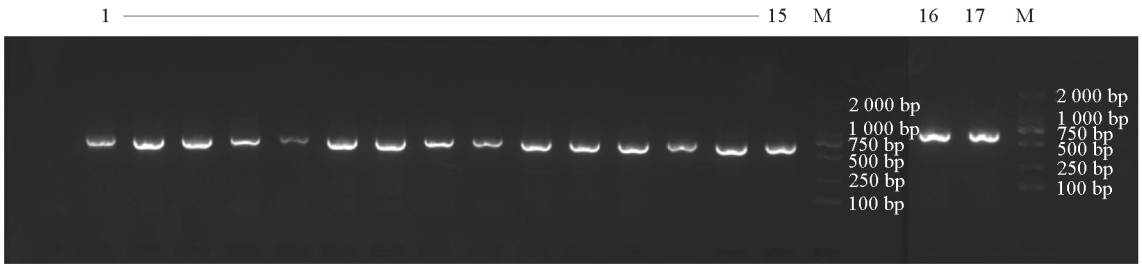

图 4　PCR 扩增电泳图谱

Fig. 4　The electrophoretogram of PCR amplified patterns by primer

表 3　ITS 序列（包括 ITS1 和 ITS2）长度及其 G + C 含量

Table 3　Length of ITS（including ITSl and ITS2）and content of G + C

编号 No.	样本 Sample	ITS 长度/bp Size	ITS G + C/%	ITS1 长度/bp Size	ITS1 G + C/%	ITS2 长度/bp Size	ITS2 G + C/%
1	黄花铁线莲 *C. intricata*	550	60.00	164	59.15	227	65.60
2	芹叶铁线莲 *C. aethusifolia*	549	60.88	171	60.36	219	67.10
3	褐毛铁线莲 *C. fusca*	561	61.50	180	61.67	223	66.80
4	钝萼铁线莲 *C. peterae*	550	61.27	172	60.47	219	67.60
5	大叶铁线莲 *C. heracleifolia*	550	61.64	172	61.05	219	68.00
6	毛果扬子铁线莲 *C. puberula*	543	60.89	164	58.90	220	67.70
7	狭裂太行铁线莲 *C. kirilowii* var. *chaneti*	544	61.76	165	59.39	220	70.00
8	太行铁线莲 *C. kirilowii*	545	61.76	165	59.76	221	69.70
9	短尾铁线莲 *C. brevicaudata*	550	61.38	172	60.47	219	67.90
10	卷萼铁线莲 *C. tubulosa*	550	61.57	172	61.05	219	67.90
11	粗齿铁线莲 *C. argentilucida*	550	61.68	172	60.59	219	68.50
12	灌木铁线莲 *C. fruticosa*	543	60.04	165	56.97	219	67.10
13	棉团铁线莲 *C. hexapetala*	549	61.38	169	59.17	221	69.20
14	羽叶铁线莲 *C. pinnata*	550	61.79	172	61.05	219	68.50
15	长瓣铁线莲 *C. macropetala*	548	60.95	171	59.65	218	67.40
16	槭叶铁线莲 *C. acerfolia*	559	62.79	180	63.89	220	68.60
17	半钟铁线莲 *C. ochotensis*	557	61.40	179	60.89	219	67.60

表 4　17 种铁线莲属植物的特异性鉴别位点

Table 4　Singletom specific discrimination site of 17 species in *Clematis*

样本编号 No.	位点/bp Loci 8	29	47	48	49	53	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	79
1	T	A	G	C	A	G	G	C	G	—	C	—	C	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T
2	T	A	G	C	G	A	G	C	G	T	C	—	C	G	C	—	—	—	—	—	—	—	G	C	G	C	C	—	C
3	T	A	G	C	A	A	G	C	G	C	C	G	C	C	C	C	G	G	C	G	G	C	G	C	G	C	T	C	C
4	T	A	G	C	G	A	G	C	G	C	T	—	C	G	C	—	—	—	—	—	—	—	G	C	G	C	C	C	G
5	T	A	G	C	G	A	G	C	G	C	T	—	C	G	C	—	—	—	—	—	—	—	G	C	G	C	C	C	C
6	T	A	R	C	G	A	G	C	G	C	T	—	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	C
7	T	T	G	C	A	A	C	C	C	G	G	—	T	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	C
8	T	W	G	C	A	A	C	C	C	G	G	—	T	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	C
9	T	A	G	C	G	A	G	C	G	C	T	—	C	G	C	—	—	—	—	—	—	—	G	C	G	C	C	T	C
10	T	A	G	C	G	A	G	C	G	C	T	—	C	G	C	—	—	—	—	—	—	—	G	C	G	C	C	C	C
11	T	A	G	Y	G	A	G	C	G	C	T	—	C	G	C	—	—	—	—	—	—	—	G	C	G	C	C	C	C
12	T	A	G	C	A	G	G	A	A	A	C	—	C	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T
13	C	A	G	C	A	A	C	T	T	A	G	—	C	G	G	—	—	—	—	—	—	—	G	G	A	—	—	—	T
14	T	A	G	C	G	A	G	C	G	C	T	—	C	G	C	—	—	—	—	—	—	—	G	C	G	C	C	C	C
15	T	A	G	C	G	A	A	C	G	C	G	—	C	C	C	—	—	—	—	—	—	—		C	G	G	T	C	C
16	C	A	G	C	A	G	G	C	G	C	C	G	C	C	T	C	C	—	G	C	G	C	G	C	G	C	T	C	C
17	T	A	G	C	G	C	A	C	G	C	G	—	C	C	T	C	C	G	G	C	G	C	G	C	G	C	T	C	C

样本编号 No.	位点/bp Loci 81	82	95	104	107	122	123	133	139	140	142	146	147	151	152	155	158	174	177	309	310	311	325	366	367	386	402	403	406
1	C	A	C	A	A	T	T	A	C	C	G	G	T	A	G	A	A	C	T	T	T	A	T	—	C	C	C	T	A
2	C	C	T	A	W	T	T	A	C	C	K	G	T	A	G	A	A	T	T	T	T	A	T	—	G	C	—	—	A
3	C	C	T	A	A	T	T	A	A	C	G	G	T	A	G	A	G	T	T	C	T	—	T	G	T	C	—	—	A
4	C	T	C	A	A	T	T	A	A	C	G	G	T	A	G	A	C	T	T	T	T	A	C	—	G	C	—	—	A
5	C	C	C	A	A	T	T	A	A	C	G	G	T	A	G	A	C	T	T	T	T	A	C	—	G	C	—	—	A
6	T	C	C	A	A	T	T	A	A	C	G	G	T	A	G	A	C	C	T	T	T	A	C	C	G	C	—	—	A
7	C	C	C	A	A	T	T	A	G	A	G	T	C	A	G	A	A	G	C	T	T	A	T	—	G	C	—	—	C
8	C	C	C	A	A	T	T	A	G	A	G	T	C	A	G	A	A	G	C	T	T	A	T	—	G	C	—	—	C
9	C	C	C	A	A	T	T	A	A	C	G	G	T	A	G	A	C	T	T	T	T	A	C	—	G	C	—	—	A
10	C	C	C	A	A	T	T	A	A	C	G	G	T	A	G	A	C	T	T	T	T	A	C	—	G	C	—	—	A

续表 4

样本编号 No.	位点/bp Loci																												
	81	82	95	104	107	122	123	133	139	140	142	146	147	151	152	155	158	174	177	309	310	311	325	366	367	386	402	403	406
11	C	C	C	A	A	T	T	A	A	C	R	G	T	A	G	A	C	T	T	T	T	A	C	—	G	C	—	—	A
12	C	C	C	G	A	T	T	A	A	C	G	G	T	A	A	A	A	T	T	T	C	A	T	—	G	C	—	—	A
13	C	C	C	A	A	T	T	A	G	A	G	G	T	A	G	G	A	C	C	T	T	A	T	—	G	C	—	—	C
14	C	C	C	A	A	T	T	A	A	C	G	G	T	A	G	A	C	T	T	T	T	A	C	—	G	C	—	—	C
15	C	C	T	A	A	T	T	A	A	C	G	G	T	A	G	A	G	T	T	T	T	A	C	—	G	A	—	—	A
16	C	C	T	A	A	C	C	G	A	C	G	G	C	G	A	A	A	T	T	T	C	A	T	—	G	C	—	—	A
17	C	C	T	A	A	T	T	A	A	C	G	G	T	T	G	A	A	T	T	T	T	A	C	—	G	C	—	—	A

样本编号 No.	位点/bp Loci																												
	407	408	416	428	429	464	469	470	475	488	492	499	505	532	539	541	544	546	547	548	549	550	551	552	553	554	556	558	559
1	A	G	T	T	T	T	T	T	C	T	C	C	T	G	T	T	T	C	C	C	G	G	T	C	G	A	A	T	T
2	C	G	T	T	T	T	C	T	C	G	C	T	T	G	T	T	C	G	—	—	—	—	—	—	G	A	A	T	T
3	C	G	T	T	T	T	C	T	C	G	C	T	T	G	T	C	A	C	A	C	G	—	—	—	G	A	A	T	T
4	C	G	T	T	T	T	T	T	T	G	C	C	T	G	T	T	C	G	—	—	—	—	—	—	G	A	G	T	C
5	C	G	T	T	T	T	C	C	T	G	C	C	T	G	T	T	C	G	—	—	—	—	—	—	G	A	G	T	T
6	C	A	T	T	T	T	T	C	T	G	C	C	T	G	C	T	C	G	—	—	—	—	—	—	G	A	G	T	T
7	C	G	C	T	T	T	C	C	C	C	C	C	T	G	C	T	C	G	G	A	—	—	—	—	G	G	A	T	-
8	C	G	C	T	T	T	C	C	C	C	C	C	T	G	C	T	C	G	G	A	—	—	—	—	G	G	A	T	T
9	C	G	C	T	T	T	T	T	T	G	C	C	T	R	T	T	C	G	—	—	—	—	—	—	G	A	G	T	C
10	C	G	T	T	T	T	C	C	T	G	Y	C	T	G	T	T	C	G	—	—	—	—	—	—	G	A	G	T	T
11	C	G	T	T	T	C	T	T	T	G	C	C	T	G	C	T	C	G	—	—	—	—	—	—	G	A	G	T	C
12	C	G	T	T	T	T	C	T	C	G	C	T	T	G	T	T	C	G	—	—	—	—	—	—	G	A	A	T	T
13	C	G	T	T	T	T	C	C	C	G	C	C	T	G	C	T	C	G	G	A	—	—	—	—	G	G	A	A	T
14	C	G	C	T	T	T	Y	Y	T	G	Y	C	T	G	T	T	C	G	—	—	—	—	—	—	G	A	G	T	T
15	C	G	T	T	T	T	T	T	C	C	C	T	T	G	C	T	C	G	—	—	—	—	—	—	G	A	G	T	—
16	C	G	T	C	C	T	T	C	C	G	C	T	C	G	T	T	C	G	G	—	—	—	—	—	T	A	A	C	—
17	C	G	T	T	T	T	T	T	C	G	C	T	T	G	C	T	C	G	—	—	—	—	—	—	G	A	G	T	T

注：1－17 样本编号详见表 1，下同。

Note：Sample numbers 1－17 are show in table 1，the same below.

2.2.2　进化距离

根据 Kimura-2 参数遗传距离模型计算，最终得到 ITS 序列间遗传距离（表 5）。

表 5　ITS 序列间的 Kimura 进化距离

Table 5　Pairwise divergence of ITS sequences using Kimura-2 parameter distance

样本编号 No.	遗传相似距离 Genetic distances among 17 plants in *Clematis* L.																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1																	
2	0.025																
3	0.029	0.015															
4	0.035	0.021	0.031														
5	0.033	0.015	0.025	0.006													
6	0.037	0.023	0.033	0.013	0.008												
7	0.045	0.035	0.045	0.045	0.039	0.041											
8	0.045	0.035	0.045	0.045	0.039	0.041	0										
9	0.035	0.017	0.027	0.008	0.002	0.01	0.037	0.037									
10	0.033	0.015	0.025	0.006	0	0.008	0.039	0.039	0.002								
11	0.037	0.019	0.029	0.009	0.004	0.008	0.039	0.039	0.006	0.004							
12	0.031	0.021	0.029	0.033	0.029	0.037	0.045	0.045	0.031	0.029	0.033						
13	0.041	0.035	0.045	0.043	0.039	0.039	0.023	0.023	0.041	0.039	0.039	0.039					
14	0.037	0.019	0.029	0.009	0.004	0.011	0.035	0.035	0.002	0.004	0.008	0.033	0.039				
15	0.041	0.017	0.025	0.023	0.017	0.021	0.037	0.037	0.019	0.017	0.017	0.035	0.041	0.021			
16	0.049	0.031	0.039	0.049	0.043	0.051	0.057	0.057	0.045	0.043	0.047	0.033	0.055	0.047	0.045		
17	0.039	0.015	0.027	0.023	0.017	0.021	0.039	0.039	0.019	0.017	0.017	0.031	0.039	0.021	0.009	0.039	

17 种铁线莲的遗传距离在 0 ~ 0.057 之间，平均遗传距离为 0.029。说明这 17 个类群的野生铁线莲亲缘关系较近，各野生种遗传变异相对较小。其中太行铁线莲（8）与狭裂太行铁线莲（7）、大叶铁线莲（5）与卷萼铁线莲（10）的遗传距离最小，均为 0，表明这 2 种野生铁线莲亲缘关系很近。太行铁线莲、狭裂太行铁线莲与槭叶铁线莲（16）的遗传距离相对较大，说明槭叶铁线莲与这 2 种铁线莲亲缘关系较远，并且槭叶铁线莲与其他 16 种铁线莲的进化遗传距离均较大（0.031 ~ 0.057），证明槭叶铁线莲与其他铁线莲亲缘关系较远。

2.2.3 系统发育分析

基于测定的 17 条 ITS 序列，采用 UPGMA 法对 17 个类群的野生铁线莲植物的亲缘关系进行分析，并构建系统发育树（图 5）。

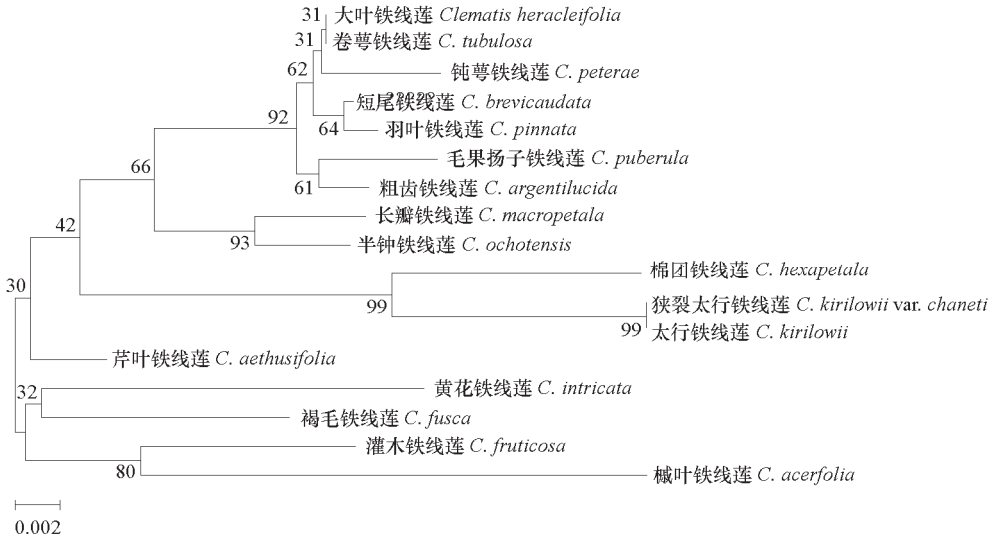

图 5 基于 ITS 序列构建的铁线莲系统发育树

0.002 为各分支比例尺长度。

Fig. 5 Molecular phylogenetic tree inferred from ITS of 17 species in *Clematis*

The length of the scale is 0.002，which can be used to calculate the genetic distance of each branch.

17 个铁线莲样本大致聚为 5 类：大叶和卷萼聚为一类，并且与钝萼也有较高的同源性；短尾和羽叶聚为一类；毛果扬子和粗齿聚为一类；长瓣和半钟聚为一类；太行、狭裂太行和棉团聚为一类，以上 13 种和芹叶聚为一类。黄花和褐毛聚为一类；灌木和槭叶聚为一类，以上 4 种铁线莲又聚为一类。由聚类图分析可得，槭叶与其它铁线莲相比同源性较低，亲缘关系相对较远。

2.3 河北 17 个类群的野生铁线莲的亲缘关系

采用 ISSR 及 ITS 序列分析 2 种方法鉴定了 17 个类群的铁线莲野生种，结果表明 ITS 和 ISSR 都能很好地对铁线莲进行聚类分析，而且产生的结果相似。

半钟、长瓣的亲缘关系较近，聚为一类；大叶、卷萼之间的亲缘关系较近，聚为一类；毛果扬子、粗齿亲缘关系较近，聚为一类；短尾、羽叶亲缘关系较近，聚为一类；太行、狭裂太行及棉团亲缘关系较近，聚为一类；灌木、槭叶亲缘关系较近，聚为一类；芹叶单独聚为一类。

两种分子标记对于黄花、钝萼、褐毛的聚类结果不同，基于 ISSR 的聚类分析结果，黄花单独聚为一类，钝萼单独聚为一类；而基于 ITS 序列的聚类结果中，黄花与褐毛聚为一类；钝萼与大叶、卷萼聚为一类。

结合系统分类学（王文采和李良千，2005）及形态特征，对铁线莲亲缘关系可得到进一步的结果。长瓣铁线莲、半钟铁线莲同属于长瓣铁线莲亚属下的长瓣铁线莲组，其特征为木质藤本，萼片蓝紫色，叶型为二回三出复叶，花单朵顶生，聚伞花序，二者表型相近，分子聚类结果支持这一观点。大叶铁线莲、卷萼铁线莲同属于大叶铁线莲组下的大叶铁线莲亚组，半灌木，萼片蓝紫色，花型为筒状，叶为三出复叶，花型、叶型及花果期均相似，本研究分子聚类结果与之相同，亲缘关系较近。毛果扬子、粗齿、短尾、钝萼同属于威灵仙组下的钝萼铁线莲亚组，木质藤本，其中，钝萼铁线莲叶为一回羽状复叶，花为白色、轮型，花型、叶型、果型、花期和果期与大叶铁线莲、卷萼铁线莲均不相同，后 3 种在形态学中的表现与 ISSR 聚类结果相近。太行铁线莲属于威灵仙组下的威灵仙亚组，狭裂太行是太行的变种，本亚组与钝萼铁线莲亚组很接近，主要区别为叶为三出复叶或一回羽状复叶，小叶通常全缘，但在分子聚类结果中，太行与钝萼聚类较远，可能是因为选用的表型分析载体是花和叶片。棉团铁线莲和太行铁线莲同属威灵仙组，花序均为聚伞花序，萼片为白色，花型为轮型，叶型同为一至二回羽状复叶，表型相近，可在形态学上进一步证明已得到的二者分子聚类结果。有研究表明，表型多样性容易受到个体和环境的共同影响（朱弘 等，2018），须结合分子结果才能进一步证明其亲缘关系。

羽叶铁线莲属于大叶铁线莲组下的羽叶铁线莲亚组，木质藤本，叶为三出复叶或一至二回羽状复叶。萼片斜上展，蓝白色，筒状花。短尾铁线莲叶型，一至二回羽状复叶或二回三出复叶，花白色，轮状，萼片伸展。短尾铁线莲、羽叶铁线莲从形态学上明显不同，很容易区分，羽叶铁线莲常为匍匐状（Xie et al.，2005）。然而羽叶铁线莲的分类地位在形态学上是模糊的（Xie et al.，2005）。王文采等的最近的一次修订，把羽叶铁线莲置于大叶铁线莲组中（Wang & Xie，2007）。虽然在从形态学上短尾铁线莲与大叶铁线莲及羽叶铁线莲明显不同，但分子证据表明短尾铁线莲与后两种关系非常密切，这与之前的分子系统发育研究结果（Xie et al.，2011）是一致的，可能存在种间杂交；褐毛铁线莲属于尾叶铁线莲组下的褐毛铁线莲亚组，木质藤本，叶为一回羽状复叶，萼片外面被褐色毛，淡紫色钟状花。黄花属于黄花铁线莲组，木质藤本。叶为一至二回羽状复叶，通常斜上展，黄色钟状花。黄花铁线莲和褐毛铁线莲萼片颜色及叶的延展状态不同，叶型也有很大不同，黄花铁线莲中间裂片披针形或狭卵形，而褐毛铁线莲叶片为卵圆形，在形态上相差较大。二者在形态学上表现的亲缘关系较远，与 ISSR 聚类结果相似。

灌木铁线莲属于灌木铁线莲组，小灌木，叶为单叶，萼片镊合状排列斜上展，黄色钟状花。灌木铁线莲与黄花铁线莲花的形态相似，二者具有向上伸展的黄色萼片和披针形至线性的花丝。依据这些形态特征说明二者密切相关（王文采和李良，2005）。形态学结果与分子结果大致符合；槭叶铁线莲与其他种的 ITS 遗传距离相比较大，属于绣球藤组，直立小灌木。单叶掌状浅裂，萼片水平开展，高脚碟状花冠，白色略带粉红。与其他 16 种铁线莲的形态性状相差较多，在形态学上进一步验证了 ITS 结果的准确性。槭叶铁线莲与其他铁线莲亲缘关系较远；芹叶铁线莲属于尾叶铁线莲组下的尾叶铁线莲亚组。叶型较其他铁线莲有明显的差别，为二至三回羽状细裂复叶。在分子的聚类结果中，芹叶也单独聚为了一类。

3　讨论

在野生种中，部分铁线莲形态上十分相似，ITS 序列可将两个近缘种区分开。根据 ITS 序列结果，槭叶铁线莲与其他 16 种亲缘关系较远。这验证了穆琳和谢磊（2011）对槭叶铁线莲系统位置探

究的结果，其可能属于铁线莲属中古老类群孑遗。

通过 ISSR 标记、ITS 序列分析结果及属下分类等级，发现其聚类结果支持王文采系统以及其他形态学分类系统（刘庆超 等，2014），所研究 4 亚属 7 组的 15 个种及 2 个变种为多系或并系类群，组间关系也比较复杂。可能是由于该属分化时间较早，同时，也存在种间杂交可能。

结合系统分类能更好地用于铁线莲的遗传多样性分析。另外，鉴定结果也显示铁线莲野生种的多态性高，有些不同野生种间遗传差异较大。本研究明确了 17 个类群的野生铁线莲亲缘关系，对铁线莲属资源评价和遗传育种研究具有一定指导意义。

References

Jiang Ming，Zhou Ying-qiao，Li Rong-rong. 2011. Sequence analysis of ITS of 8 medicinal plants of *Clematis*. Chinese Herbal Medicine，42 (9)：1802－1806. (in Chinese)

蒋　明，周英巧，李嵘嵘. 2011. 铁线莲属 8 种药用植物 ITS 序列分析.中草药，42 (9)：1802－1806.

Li Xiao，Wang Pei，Zhao Long，Ju Ai-hua. 2012. rDNA-ITS sequence analysis of *Clematis mongolicum*. Journal of Inner Mongolia Medical College，34 (4)：325－330. (in Chinese)

李　骁，王　佩，赵　龙，鞠爱华. 2012. 铁线莲属蒙药材的 rDNA-ITS 序列分析. 内蒙古医学院学报，34 (4)：325－330.

Liu Jing-jing，Gao Yi-ke. 2013. Investigation on germplasm resources of clematis in Beijing area. Heilongjiang Agricultural Science，(4)：65－69. (in Chinese)

刘晶晶，高亦珂. 2013. 北京地区野生铁线莲属植物种质资源调查研究. 黑龙江农业科学，(4)：65－69.

Liu Qing-chao，Wang Kui-ling，Lu Wan-pei，Liu Qing-hua. 2014. Reasearch progress of *Clematis* in China. Journal of Plant Genetic Resource，15 (3)：483－490，497. (in Chinese)

刘庆超，王奎玲，卢婉佩，刘庆华. 2014. 我国铁线莲属植物资源研究进展. 植物遗传资源学报，15 (3)：483－490，497.

Mu Lin，Xie Lei. 2011. Systematic location of *Clematis acerfolia*—analysis of ITS and chloroplast DNA sequences. Journal of Beijing Forestry University，33 (5)：49－55. (in Chinese)

穆　琳，谢　磊. 2011. 槭叶铁线莲的系统位置初探——来自 ITS 和叶绿体 DNA 序列片段的分析. 北京林业大学学报，33 (5)：49－55.

Qian Ren-juan，Zheng Jian，Hu Qing-di，Ma Xiao-hua，Zhang Xu-Le. 2017. Research progress on ornamental germplasm resources of *Clematis* in China. Chinese Agricultural Science Bulletin，33 (21)：75－81. (in Chinese)

钱仁卷，郑　坚，胡青荻，马晓华，张旭乐. 2017. 中国铁线莲属观赏种质资源研究进展. 中国农学通报，33 (21)：75－81.

Salem S A，Muhammad A K，Hussein M M，Ehab H E，Muhammad A，Muhammad F. 2019. Biochemical and molecular characterization of cowpea landraces using seed storage protein and SRAP marker patterns. Saudi Journal of Biological Sciences，26 (1)：74－82.

Sheng Lu. 2015. Karyotype analysis and molecular systematics of *Clematis*[Ph. D. Dissertation]. Nanjing：Nanjing Forestry University.

盛　璐. 2015. 铁线莲属植物的核型分析及分子系统学研究[博士论文]. 南京：南京林业大学.

Shi Ling-yan，Liu Bao-wei，Gu Xin-ying. 2019. Application of biochemical and ISSR molecular markers in identification of *Auricularia auricular*. Northern Horticulture，43 (9)：136－141. (in Chinese)

史灵燕，刘保卫，顾新颖. 2019. 生化和 ISSR 分子标记在黑木耳品种鉴定中的应用，北方园艺，43 (9)：136－141.

Sun Zheng-hai，Wang Jin，Li Shi-feng，Lin Kai-wen，Hu Yi-chen，Wang Shi-jin. 2012. Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction system for Rattan. Journal of Yunnan Agricultural University（Natural Science），27 (5)：746－750. (in Chinese)

孙正海，王　锦，李世峰，林开文，胡祎晨，王仕锦. 2012. 滑叶藤 ISSR-PCR 反应体系建立及优化. 云南农业大学学报（自然科学），27 (5)：746－750.

Wang Jiang-yong，Qiao Qian，Zhang Jie，Hu Feng-rong. 2020. Research progress of *Clematis* and application in garden. Journal of Shandong Agricultural University（Natural Science），51 (2)：217－221. (in Chinese)

王江勇，乔　谦，张　杰，胡凤荣. 2020. 铁线莲属植物研究进展与园林应用. 山东农业大学学报（自然科学版），51 (2)：217－221.

Wang Nan，Wang Jin，Li Zong-yan，Yang Kun-mei，He Hui，Xiao Zhen-dong. 2016. ISSR-PCR reaction system optimization and primer screening

of Clematis horticulture varieties. Northern Horticulture，(1)：80－83. (in Chinese)

王　楠，王　锦，李宗艳，杨坤梅，何　辉，肖振东. 2016. 铁线莲园艺品种 ISSR-PCR 反应体系优化与引物筛选. 北方园艺，(1)：80－83.

Wang W T，Xie L. 2007. A revision of Clematis sect. Tubulosae（Ranunculaceae）. Acta Phytotaxonomica Suiica，45：425－457.

Wang Wen-cai，Li Liang-qian. 2005. A new classification system of *Clematis*. Acta Botanica Taxa，(5)：431－488. (in Chinese)

王文采，李良千. 2005. 铁线莲属一新分类系统. 植物分类学报，(5)：431－488.

Xie L，Shi J H，Li L Q. 2005. Identity of *Clematis tatarinowii* and *C. pinnata* var. *ternatifolia*（Ranunculaceae）. Annales Botanici Fennici，42：305－308.

Xie L，Wen J，Li L Q. 2011. Phylogenetic analyses of *Clematis*（Ranunculaceae）based on sequences of nuclear ribosomal ITS and three plastid regions. Systematic Botany，36：907－921.

Yang Jiu-yan，Yang Jie，Yang Ming-bo，Ju Aihua，Qu bi. 2006. ISSR analysis of medicinal plants of the genus *Caragana* in Ordos Plateau. Chinese Herbal Medicine，37 (10)：1562－1566. (in Chinese)

杨九艳，杨　劼，杨明博，鞠爱华，渠　弼. 2006. 鄂尔多斯高原锦鸡儿属药用植物的 ISSR 分析. 中草药，37 (10)：1562－1566.

Zhao Huan，Wu Wei，Zheng You-liang，Pan Hong-mei，Zhai Juan-yuan. 2009. Application of ribosomal DNA ITS sequence analysis in the study of medicinal plants. Shi Zhen Chinese Medicine，20 (4)：959－962. (in Chinese)

赵　欢，吴　卫，郑有良，潘红梅，翟娟园. 2009. 核糖体 DNA ITS 序列分析在药用植物研究中的应用. 时珍国医国药，20 (4)：959－962.

Zhu Hong，Zhu Shu-xia，Li Yong-fu，Yi Xian-gui，Duan Yi-fan，Wang Xian-rong. 2018. Leaf phenotypic variation in natural populations of *Cerasus dielsiana*. Chinese Journal of Plant Ecology，42 (12)：1168－1178. (in Chinese)

朱　弘，朱淑霞，李涌福，伊贤贵，段一凡，王贤荣. 2018. 尾叶樱桃天然种群叶表型性状变异研究. 植物生态学报，42 (12)：1168－1178.

Zhu Yuan-di，Cao Min-ge，Xu Zheng，Wang Kun，Zhang Wen. 2014. Phylogenetic relationship between Xinjiang wild apple（*Malus sieversii* Roem.）and Chinese apple（*Malus* × *domestica* subsp. *chinesnsis*）based on ITS and matK sequences. Acta Horticulturae Sinica，41 (2)：227－239. (in Chinese)

朱元娣，曹敏格，许　正，　王　昆，张　文. 2014. 基于 ITS 和 matK 序列探讨新疆野苹果与中国苹果的系统演化关系. 园艺学报，41 (2)：227－239.