湖南产牡丹遗传多样性的 ISSR 分析

张旻桓[1]，金晓玲[1*]，成仿云[2]，卢惊鸿[1]，吴　莎[1]

1. 中南林业科技大学，湖南 长沙　410004
2. 北京林业大学，北京　100083

摘　要：目的　深入了解和掌握湖南产牡丹 *Paeonia suffruticosa* 的亲缘关系及遗传多样性。**方法**　利用 ISSR 分子标记生物技术从 100 条 ISSR 引物中筛选出条带清晰、多态性好的引物 7 条，对源自湖南省内牡丹种质资源及部分实生后代共 47 份样品 DNA 进行扩增实验。**结果**　共扩增获得 77 条带型完整清晰的谱带，其中多态性带为 67 条，多态位点比率为 87.01%，表明湖南产牡丹种质资源多态性较高，具有较高的遗传多样性。经计算机软件计算结果分析，平均有效等位基因数为 1.395 4，平均 Nei's 基因多样性指数为 0.248 0，平均 Shannon's 信息指数为 0.385 9；各品种间的 Jaccard 相似系数介于 0.532 5～0.961 0，平均为 0.751 5。UPGMA 作图法将 47 份材料划分为 2 个类群 3 个亚类，很好地将不同来源的品种区分开来。**结论**　从分子水平上揭示了湖南产牡丹品种间亲缘关系及较高的遗传多样性，为耐湿热牡丹的新品种选育工作提供了理论依据。

关键词：牡丹；亲缘关系；ISSR；分子标记；遗传多样性

中图分类号：R282.12　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2016)07 - 1193 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.07.022

ISSR analysis on genetic diversity of *Paeonia suffruticosa* in Hunan province

ZHANG Min-huan[1], JIN Xiao-ling[1], CHENG Fang-yun[2], LU Jing-hong[1], WU Sha[1]

1. Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China
2. Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: Objective　In order to understand the genetic relationship and genetic diversity of peony (*Paeonia suffruticosa*) in Hunan province, the DNA fingerprints of 47 peony germplasm materials of Hunan province were studied. **Methods**　Seven primers selected from 100 ISSR primers could obtain high polymorphism and reproducibility bands using ISSR markers. **Results**　Total 77 DNA bands were amplified including 67 polymarphic bands, counting for 87.01%. Genetic similarity analysis showed that Hunan peony germplasm resourses with high genetic diversity. Through the computer software analysis, peony variety tested the average effective number of alleles was 1.395 4, the average Nei's genetic diversity index is 0.248 0, the average Shannon's information index was 0.385 9; Between each type of the similarity coefficient of Jaccard was 0.532 5—0.961 0, with an average of 0.751 5, which was a sign of close genetic relationship between the materials. These 47 germplasm resourses were divided into two groups and three subgroups by UPGMA analysis, which could distinguish the varieties from different sources. **Conclusion**　It reveals from the molecular level of Hunan local peony varieties, genetic relationship, and genetic diversity so as to provides the theoretical basis for the varieties breeding worke of heat and humid resistance of peony.

Key words: *Paeonia suffruticosa* Andr.; genetic relationship; ISSR; molecular marker; genetic diversity

牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 为芍药科（Paeoniaceae）芍药属 *Paeonia* L. 牡丹组 Sect. Moutan DC. 植物，是我国特有的植物种质资源[1-3]。经过长期的自然和人工选择，中国牡丹已形成了 4 个牡丹品种群：中原牡丹品种群、西北牡丹品种群、西南牡丹品种群和江南牡丹品种群[4]。牡丹在南推应用中的关键问题是耐湿热性较差，这严重地影响了其在南方湿热地区的栽培和应用。湖南是牡丹自然分布区之一，有 1 000 多年的栽培历史。湘西桑植县、龙山县、永顺县、石门县等地曾有野生的杨山

收稿日期：2015-07-01

基金项目：林业公益性行业科研专项经费资助（201404710）；湖南省教育厅“十二五”重点学科资助项目（2011-76）；长沙市科技局重点项目（K1406010-21）；中南林业科技大学青年基金重点项目（QJ2012008A）

作者简介：张旻桓（1981—），女，在读博士，研究方向为园林植物与应用。Tel: 13617316866　(0731)85623025　Fax: (0731)85623025　E-mail: youlan924@qq.com

***通信作者**　金晓玲，女，博士，教授，博士生导师，主要从事植物新品种选育和引种驯化。Tel: (0731)85623031　E-mail: Jxl0716@hotmail.com

牡丹 *Paeonia ostii* T. Hong et J. X. Zhang 分布[5]。20 世纪 80 年代，由于农民乱挖根皮，致使野生杨山牡丹几近消失。所幸的是，2006 年在湘西张家界地区永顺县、新晃县等地相继发现了一批百年以上的古牡丹，为我国古牡丹群之最。另外，湖南邵阳多年种植牡丹“凤丹”和“香丹”，选育了一批自然杂交的品种，这些品种除了药用价值外，还具有较高的观赏价值[6]。湖南牡丹从地域而言属江南牡丹品种群，适应江南地区高温多湿的气候环境，是一个较为耐湿热的优秀群体，是研究江南牡丹可能的起源和耐湿热型牡丹育种的重要资源[7]。湖南牡丹的研究相对比较落后，目前主要集中在品种资源的初步调查方面，对湖南产牡丹品种的亲缘关系和遗传多样性分析等方面的研究近乎空白，极大地制约了湖南耐湿热牡丹品种这一优良育种材料的开发和利用。为此，本实验采用 ISSR 分子标记技术对湖南产牡丹品种的亲缘关系和遗传多样性进行研究，为耐湿热型牡丹品种选育和开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

实验于 2014 年 4～11 月在中南林业科技大学重点实验室完成。共收集样品 47 份，经笔者鉴定为牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr.。其中湘西张家界紫色系列品种样品 18 个、粉色系列品种样品 9 个，另外有湘西张家界杨山牡丹样品 10 个、湖南邵阳品种凤丹和香丹样品各 5 个，紫色系列品种、粉色系列品种和杨山牡丹均是古牡丹，在湘西栽培数年。其中单瓣样品 20 个，重瓣品种 27 个，在湖南栽培均表现良好。采集新鲜嫩叶保存于−80 ℃冰箱[8-11]。供试品种及来源见表 1。

表 1 供试材料及来源

Table 1 Plant materials tested by ISSR and origins

编号	品种	来源	花型	编号	品种	来源	花型
1	紫色品种 1-1	湖南永顺	重瓣型	25	凤丹 N-1	湖南宁乡	单瓣型
2	粉色品种 1-1	湖南永顺	重瓣型	26	香丹 N-1	湖南宁乡	单瓣型
3	紫色品种 1-2	湖南永顺	重瓣型	27	凤丹 N-2	湖南宁乡	单瓣型
4	紫色品种 1-3	湖南永顺	重瓣型	28	紫色品种 N-3	湖南宁乡	重瓣型
5	杨山 1-1	湖南永顺	单瓣型	29	杨山 N-1	湖南永顺	单瓣型
6	杨山 1-3	湖南永顺	单瓣型	30	杨山 N-2	湖南永顺	单瓣型
7	杨山 1-2	湖南永顺	单瓣型	31	凤丹 N-3	湖南宁乡	单瓣型
8	紫色品种 1-4	湖南永顺	重瓣型	32	凤丹 N-4	湖南宁乡	单瓣型
9	粉色品种 1-2	湖南永顺	重瓣型	33	杨山 N-4	湖南永顺	单瓣型
10	杨山 1-4	湖南永顺	单瓣型	34	香丹 N-2	湖南宁乡	单瓣型
11	粉色品种 1-4	湖南永顺	重瓣型	35	杨山 N-3	湖南永顺	单瓣型
12	杨山 1-5	湖南永顺	单瓣型	36	紫色品种 N-2	湖南宁乡	重瓣型
13	紫色品种 1-5	湖南永顺	重瓣型	37	香丹 N-3	湖南宁乡	单瓣型
14	粉色品种 1-3	湖南永顺	重瓣型	38	紫色品种 N-4	湖南宁乡	重瓣型
15	粉色品种 1-5	湖南永顺	重瓣型	39	粉色品种 N-1	湖南宁乡	重瓣型
16	紫色品种 1-7	湖南永顺	重瓣型	40	紫色品种 N-1	湖南宁乡	重瓣型
17	粉色品种 1-6	湖南永顺	重瓣型	41	香丹 N-4	湖南宁乡	单瓣型
18	紫色品种 S-1	湖南长沙	重瓣型	42	紫色品种 N-5	湖南宁乡	重瓣型
19	紫色品种 S-5	湖南长沙	重瓣型	43	杨山 N-5	湖南永顺	单瓣型
20	紫色品种 S-2	湖南长沙	重瓣型	44	凤丹 N-5	湖南宁乡	单瓣型
21	紫色品种 S-3	湖南长沙	重瓣型	45	粉色品种 N-2	湖南宁乡	重瓣型
22	紫色品种 S-6	湖南长沙	重瓣型	46	粉色品种 N-3	湖南宁乡	重瓣型
23	紫色品种 S-4	湖南长沙	重瓣型	47	香丹 N-5	湖南宁乡	单瓣型
24	紫色品种 1-6	湖南永顺	重瓣型				

1.2 基因组总 DNA 的提取

取叶片样品 0.5 g 加液氮研磨成细粉末状待用，用 CTAB 法提取植物基因组 DNA，装入离心管中，置于−80 ℃冰箱保存。提取的样品用分光光度计定量检测质量浓度，再用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳计算 DNA 样品的质量浓度和纯度，将样品质量浓度稀释至 50 ng/μL 保存于−20 ℃冰箱备用[12-15]。

1.3 ISSR-PCR 优化反应体系和引物筛选

依据牡丹 ISSR-PCR 反应体系研究资料，大致确定本研究中反应体系各成分浓度范围，采用 5 因素 4 水平的正交试验设计进行反应体系优化，依据扩增产物的条带清晰度、丰富度、条带差异性和可重复性判断体系的优劣，最终建立的最佳反应体系（20 μL）：25 mmol/L Mg^{2+} 2.0 μL、2.5 mmol/L dNTPs 1.6 μL、10 μmol/L Primer 1.0 μL、10 U/μL Taq DNA 聚合酶 1.0 μL；50 ng/μL DNA 模板 1.0 μL，10× Buffer 2.0 μL，ddH_2O 11.4 μL。利用此体系对全部样品进行扩增，都有较稳定丰富的扩增产物。在基因扩增仪（美国 Bio RAD）上进行 PCR 反应，首先在 94 ℃下预变性 5 min；然后 94 ℃变性 45 s； 45～57 ℃（根据各引物的退火温度）退火 45 s，72 ℃、延伸 1.5 min，共计 35 个循环；最后 72 ℃总延伸 7 min。

选用哥伦比亚大学（UBC）开发的 ISSR 通用引物 100 个，引物由上海生工生物工程有限公司合成，利用优化的反应体系进行引物筛选；反应体系通过优化后对 100 个引物筛选，确定每个引物的最佳退火温度（T_m），用梯度 PCR 仪逐级生成的温度进行摸索，依据扩增产物清晰、背景浅、无弥散现象、片段大小分布均匀、数量稳定性最终确定 T_m。

1.4 PCR 反应产物的检测

将 ISSR-PCR 扩增产物用 1.8%的琼脂糖凝胶在电泳仪上上样，在电泳恒压 110 V，电流为 80 mA 下电泳 1 h，用 GenGenius 凝胶成像系统观察并照相保存。

1.5 数据处理

标准相对分子质量以电泳图谱中 200 bp DNA ladder marker 为对照，ISSR 电泳扩增片断记录后人工读带，同一位置清晰出现扩增的相对分子质量相同的条带视为同一位点。对每个样品的扩增带按有或无进行记录，分别计为“1”和“0”，建立数据矩阵，用 PopGen32 软件计算多态位点比率（PPB），用 NTSYS-pc 2.1 软件 UPGMA 方法构建品种亲缘关系[16-21]。

2 结果与分析

2.1 引物的筛选结果

利用优化的体系对 100 个引物进行筛选，最终确定 7 个引物用于分析；利用优化的 PCR 反应体系对 7 个引物退火温度进行摸索，大部分引物的退火温度在 45～57 ℃（表 2）。在筛选的 7 个引物中多态位点百分比达到 100%的有 1 条引物，占所筛选出引物的 14.29%；引物 UBC 841 的扩增条带数量为最多，扩增条带和多态性条带分别为 13 和 12（图 1）；引物 UBC 815 扩增条带数量相对较少，扩增条带和多态性条带分别为 9 和 8，多态性条带率为 88.9%；最低的多态性条带比率为引物 UBC 866，仅 60%，扩增条带为 10 条，多样性条带为 6 条。

2.2 聚类分析

根据相似性系数，建立聚类分支树状图（图 2），47 个样本，相似系数 0.57 为阈值时可以将品种资源分为 2 类，第 1 大类包含 36 份种质资源，其中 22 份为重瓣品种，14 份为单瓣品种；第 2 大类包括 11 份种质资源，其中 6 份为单瓣品种，5 份为重瓣品种。大部分紫色系列品种和粉色系列品种聚在一大类，仅 5 份重瓣品种另聚一大类，

表 2 不同 ISSR 引物的扩增效果

Table 2 Amplified results of different ISSR primers

引物	序列	扩增条带数	多态性条带数	多态性比率/%	T_m/℃
815	CTC TCT CTC TCT CTC TG	9	8	88.9	54
841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	13	12	92.3	56
868	GAA GAA GAA GAA GAA GAA	10	9	90.0	57
853	TCT CTC TCT CTC TCT CRT	12	11	91.7	51
824	TCT CTC TCT CTC TCT CG	12	12	100.0	54
835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	11	9	81.8	59
866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC	10	6	60.0	59

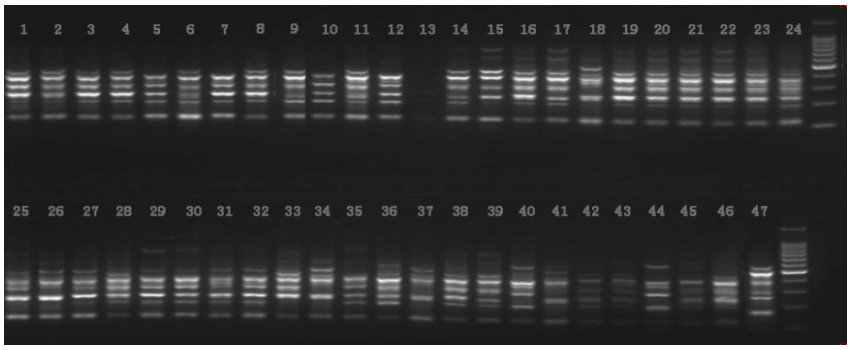

图 1　引物 UBC 841 对 47 个牡丹样本的扩增效果

Fig. 1　Electrophoresis of primer UBC 841 tested in 47 paonia samples

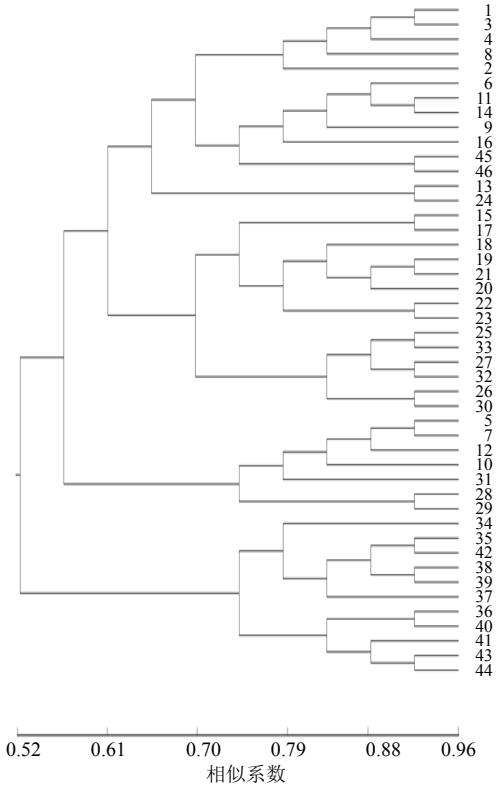

图 2　牡丹品种的 UPGMA 聚类图

Fig. 2　UPGMA clustering map of peony cultivars

这说明湘西的古牡丹中紫色系列品种和粉色系列品种大部分可能为同一来源。第 2 大类中包含了 5 个重瓣品种，这种情况有 2 种可能，一种是这 4 个紫色品种和 1 个粉色品种与其他重瓣系列品种来源不同，另一种可能是由于有一些品种从湘西引种至长沙多年，本身发生了一定的变异。这 5 个重瓣品种与个别香丹和凤丹聚在了一起，这可能与采样的香丹和凤丹的种源有一定的关系，也可能采集的凤丹和香丹是其杂交后代，在表型性状上未显现。以相似系数 0.61 为阈值，可将第一大类中的 35 份种质资源聚为 2 个亚类。第 1 亚类包含来自湘西永顺的大部分重瓣系列品种，第 2 亚类将杨山牡丹、香丹和凤丹聚为一亚类，这说明湖南产牡丹香丹与杨山牡丹和凤丹有较近的亲缘关系，香丹极有可能是起源于湖南邵阳。同时在第 2 亚类中也可以清楚地看到，杨山牡丹和凤丹有非常近的亲缘关系，从这一方面也证实了凤丹为杨山牡丹的栽培品种。同时，有 8 个重瓣品种与杨山牡丹、凤丹和香丹聚在了一起，说明这些重瓣品种与湖南产起源的牡丹有极近的亲缘关系，从另一方面也推测这些品种可能起源于湖南。

通过 NTSYS-PC V2.1 进行数据分析（图 2），47 个牡丹样本间的遗传相似系数在 0.532 5～0.961 0，其平均值为 0.751 5，结果表明这些品种间有相对较近的亲缘关系。这从分子水平上揭示了湖南产牡丹品种间亲缘关系及遗传多样性，为耐湿热牡丹的新品种选育工作提供了理论依据。

从上述聚类结果可知，湖南产牡丹品种间亲缘关系较复杂，花色相同品种间遗传相似性较高，湘西古牡丹表现品种亲缘关系更近，而单瓣品种由于长期的栽培或自然杂交而出现亲缘关系明显差异的情况，分别归于不同的大类。虽然在聚类图中显示，同栽培区域的种质优先聚在一起，但并不能说明来自同一区域的种质聚为一类。湖南栽培牡丹品种大致与野生资源各自聚类，栽培牡丹和野生种在形态特征上具有一定的区别，说明湖南产牡丹的亲缘关系远近与形态特征有一定的关系。同时，一些单瓣品种和部分重瓣品种也能单独聚类，可以从一定程度上反映其遗传组成相对复杂，供试样品亲缘关系的远近与栽培区域也没有明显的相关性。

2.3 遗传多样性分析

利用 ISSR 分子标记技术从 100 条 ISSR 引物中筛选出多态性好、条带清晰的 7 条引物用于 47 个牡丹品种的遗传多样性分析。结果表明，7 条多态性引物对源自湖南省内牡丹种质及部分实生后代共 47 份种质 DNA 进行扩增实验，共扩增得到 77 条带型清晰完整的谱带，其中多态性条带为 67 条，多态位点比率为 87.01%，表明湖南牡丹种质资源多态性较高，具有较高的遗传多样性。经过计算机软件计算分析，结果表明：平均有效等位基因数为 1.395 4，平均 Nei's 基因多样性指数为 0.248 0，平均 Shannon's 信息指数为 0.385 9。UPGMA 作图法将 47 份材料划分为 2 个类群 3 个亚类，很好地将不同来源的品种区分开来。这从分子水平上揭示了湖南产牡丹品种间亲缘关系及遗传多样性，为耐湿热牡丹的新品种选育工作提供了理论依据。

3 讨论与结论

3.1 湖南产牡丹种质资源的多样性

从种质的分布范围及区内材料平均遗传相似系数可知，湖南产牡丹在来源相同的牡丹种质资源中表现出了密切的亲缘关系，不同区域牡丹品种间遗传差异相对较大，有较高的遗传多样性，可进行育种研究，以期利用其遗传差异优势创造优良品种。但目前湖南产牡丹品种来源不清、品种命名混乱，有时甚至存在品种辨别不清的问题，同时品种少，花型和花色也相对比较单一，以白色、玫红色、紫色和粉色为主。2012 年中南林业科技大学牡丹研究课题组开展了湖南牡丹资源的深入调查，在调查中发现，湖南牡丹品种资源有一些已经迭失或死亡，同时在调查中发现了一些新的变异株系，对其进行拟命名，由于未正式发表，因此实验中采用紫色系列品种和粉色系列品种的统称，用序号加以区分。

3.2 湖南牡丹的可能起源

聚类结果显示，湖南湘西古牡丹群中，大部分紫色系列品种和粉色系列品种与杨山牡丹、凤丹和香丹有一定的遗传距离，说明这些古牡丹品种有可能是从外地引种至当地。紫色系列品种中有 4 个品种与杨山牡丹亲缘关系非常近，因湖南湘西原有野生杨山牡丹分布，推测有部分紫色重瓣品种可能是起源于当地。有 5 个古牡丹品种与杨山牡丹、凤丹和香丹有较近的遗传关系，聚为一大类，这些品种很有可能是起源于湖南湘西的品种，在过去被农户从山上引种下来种植在庭院。另外，香丹也与杨山牡丹和 5 个重瓣品种聚在一起，它与杨山牡丹和凤丹有很近的亲缘关系，这说明香丹很有可能是起源于湖南。

3.3 湖南牡丹资源的开发利用

对湖南产牡丹品种现状的调查与了解，清楚地看到南方地区牡丹品种的匮乏，还需加快适应南方气候、耐湿热性强、观赏价值高的新品种选育，这些新品种的选育应建立在湖南牡丹品种的优良基因的基础上，充分发挥其育种价值。加强对资源的鉴定、评价和创新利用研究，开展本土牡丹资源进行综合方面的鉴定与评价工作，弄清各种质资源的遗传背景和遗传特性，以牡丹的种质创新为目标，将栽培、培育和驯化后的本土牡丹品种进行广泛应用，尽快把牡丹资源优势转化成产品优势，促进牡丹产业的发展。

参考文献

[1] 洪 涛, 张家勋, 李嘉珏. 中国野生牡丹研究 (一) 芍药属牡丹组新分类群 [J]. 植物研究, 1992, 12(3): 223-234.

[2] 石颜通, 周 波, 张秀新, 等. 牡丹 89 个不同种源品种遗传多样性和亲缘关系分析 [J]. 园艺学报, 2012, 39(12): 2499-2506.

[3] 洪德元. 紫斑牡丹及其一新亚种 [J]. 植物分类学报, 1998, 36(6): 538-543.

[4] 李嘉珏. 中国牡丹品种图志 (西北、西南、江南卷) [M]. 北京: 中国林业出版社, 2005.

[5] 李嘉珏. 中国牡丹与芍药 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1999.

[6] Cheng F Y. Advances in the breeding of tree peonies and a cultivar system for the cultivar group [J]. *Int J Plant Sci*, 2007, 1(2): 89-104.

[7] 侯伯鑫, 刘正先, 杨曦坤, 等. 湖南牡丹栽培历史和本土牡丹园建设 [J]. 中国城市林业, 2006(6): 52-55.

[8] 史倩倩, 王 雁, 周 琳, 等. 十大花色中原牡丹传统品种核型分化程度 [J]. 林业科学研究, 2012, 25(4): 470-476.

[9] 魏玉杰, 张金文, 何庆祥, 等. 不同生态区罂粟种质的遗传多样性 ISSR 分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(2): 239-243.

[10] Hou X G, Guo D L, Wang J. Development and characterization of EST-SSR markers in *Paeonia suffruticosa* (Paeoniaceae) [J]. *Am J Bot*, 2011, 98: e303-e305.

[11] Park Y H, Ahn S G, Choi Y M, *et al*. Rose (*Rosa hybrida* L.) EST-derived microsatellite markers and their

transferability to strawberry (*Fragaria* spp.) [J]. *Sci Horticult*, 2010, 125: 733-739.

[12] 吴 蕊, 张秀新, 薛璟祺, 等.紫牡丹远缘杂交后代幼苗的形态标记和 ISSR 标记鉴定 [J]. 园艺学报, 2011, 38(12): 2325-2332.

[13] Lin C J, Wang J R, Lin H D, *et al*. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in *Hemibarbus labeo* (Cyprinidae) using PCR-based isolation of microsatellite arrays (PIMA) [J]. *Mol Ecol Notes*, 2007, 7(5): 788-790.

[14] 李瑞奇, 杨鑫雷, 张 艳, 等. 河北省冬小麦品种 ISSR 标记遗传多样性分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(3): 526-533.

[15] 张玉梅, 徐刚标, 申响保, 等. 珙桐天然种群遗传多样性的 ISSR 标记分析 [J]. 林业科学, 2012, 48(8): 62-67.

[16] 庞利铮, 成仿云, 钟 原, 等. 紫斑牡丹关联分析群体的表型分析 [J]. 北京林业大学学报, 2012, 34(6): 115-120.

[17] 韩丽晓. 苟药属杂交及杂种鉴定的研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2012.

[18] 卢家仕, 卜朝阳, 吕维莉, 等. 不同产地石斛属种质资源的 ISSR 遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2013, 44(1): 96-100.

[19] Lee C C, Shen S R, Lai Y J. *et al*. Rutin and quercetin, bioactive compounds from tartary buckwheat, prevent liver inflammatory injury [J]. *Food Funct*, 2013, 4(5): 794-802.

[20] 唐 辉, 陈宗游, 史艳财, 等. 正交设计优化地枫皮 ISSR-PCR 反应体系 [J]. 中草药, 2013, 44(5): 610-615.

[21] 晏慧君, 付 坚, 李 俊, 等. 云南普通野生稻遗传多样性和亲缘关系 [J]. 植物学通报, 2006, 23(6): 670-676.