

文章编号:1001-1498(2004)06-0700-06

杨山牡丹和牡丹种间杂交后代的 DNA 分子证据

索志立¹, 周世良², 张会金¹, 张治明¹

(1. 中国科学院植物研究所,北京 100093; 2. 中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放实验室,北京 100093)

摘要:以杨山牡丹作母本,分别以牡丹品种‘赵粉’(*Paonia suffruticosa* Andr. cv. ‘Zhao Fen’)和‘紫二乔’(*P. suffruticosa* cv. ‘Zi Er Qiao’)作父本,进行人工杂交,获得了杂交后代。利用 DNA ISSR 标记技术构建的亲代 DNA 指纹图谱显示,在杂交后代中检测到了分别来自双亲的特征带。建立起来的专用于牡丹研究的 ISSR 标记技术方法可以用于牡丹杂交种的苗期快速鉴定。

关键词:杨山牡丹;牡丹;杂交;ISSR 标记;DNA 指纹图谱;品种鉴定

中图分类号:S682.1 **文献标识码:**A

杨山牡丹(*Paonia ostii* T. Hong et J. X. Zhang)由洪涛等^[1]于 1992 年首次发表,为芍药科(Paeoniaceae)芍药属(*Paonia* L.)牡丹组(Section *Moutan* DC)革质花盘亚组(Subsect. *Vaginatae* F. C. Stern)的落叶亚灌木,是中国栽培牡丹品种的近缘野生种之一^[1-16]。中国牡丹的起源和演化一直是研究的热点^[4-16]。邹喻苹等^[4]利用随机引物扩增 DNA 多态性(RAPD)标记的分析结果显示杨山牡丹与紫斑牡丹(*P. rockii* (S. G. Haw et L. A. Lauener) T. Hong et J. J. Li)、卵叶牡丹(*P. qiui* Y. L. Pei et Hong)、四川牡丹(*P. decomposita* Hand.-Mazz.)、延安牡丹(*P. yananensis* T. Hong et M. R. Li)以及矮牡丹(*P. jishanensis* T. Hong et W. Z. Zhao)亲缘关系较近,推测这几个野生种同步于革质花盘亚组,可能都参与了中国栽培牡丹品种的起源^[4,8,10,12-14,16]。花粉形态特征也支持杨山牡丹是中国牡丹栽培品种的主要起源种之一^[15,16]。利用 RAPD 分子标记技术对牡丹组野生种和品种的研究规模都相对较小,虽然揭示了一些规律,但多数研究仍局限于实验条件及研究方法的探索阶段^[17-23]。微卫星序列为短串联重复 DNA 序列,是几个碱基对(一般为 1~5 个)的一个重复片段,如(CA)_n、(GAG)_n、(GACA)_n等,称为简单重复序列(Simple Sequence Repeats,简称 SSR)。在真核生物物的整个基因组中广泛存在。根据微卫星序列设计引物,直接 PCR 扩增微卫星位点之间的区域,检测遗传多态性的分子标记技术称为 ISSR (Inter-simple sequence repeat) 标记技术。ISSR 标记是继 RAPD 标记之后出现的一种新的 DNA 分子标记,具有稳定性较好的特点。近年来,在国际上已广泛应用于物种及栽培品种的起源、演化、亲缘关系以及分子标记辅助育种等方面的研究^[20,24]。笔者以杨山牡丹作母本,以牡丹品种‘赵

收稿日期:2004-03-10

基金项目:中国科学院资助项目(Kscx2-sw-108)

作者简介:索志立(1964—),男,博士,主要从事植物遗传育种学、园艺植物学以及系统与进化植物学研究。

粉'(*P. suffruticosa* Andr. cv. 'Zhao Fen')和'紫二乔'(*P. suffruticosa* cv. 'Zi Er Qiao')作父本(),进行人工杂交,并利用 ISSR 标记技术对亲子代进行鉴定,目的在于:(1)为杨山牡丹起源中国栽培牡丹品种的途径的存在寻找 DNA 分子证据;(2)为牡丹品种的苗期快速鉴定以及为牡丹的种和种下水平的分类及系谱关系的研究探索新的 DNA 分子标记方法。

1 材料与方方法

1.1 供试材料与杨山牡丹后代的获得

如表 1 所示,以中国科学院植物研究所北京植物园引自河南省内乡宝天曼的 15 年生以上的杨山牡丹作母本(),分别以 12 年生以上的牡丹品种'赵粉'和'紫二乔'作父本(),春季花蕾开放前套袋隔离,采集花粉,进行人工杂交,当年秋季获得杂交子代种子,随即播种育苗。翌年春季,采集亲本及其子代的叶片,用硅胶快速干燥后备用。用于 ISSR 分析的样品有二个杂交组合含共同的母本杨山牡丹。组合 包括杨山牡丹、'赵粉'及其杂交子代(杨山牡丹 × '赵粉');组合 包括杨山牡丹、'紫二乔'及其杂交子代(杨山牡丹 × '紫二乔')。

表 1 供试材料

个体号 (杂交组合号)	植物名称	年龄/a	主要特征	来源
1()	'赵粉'()	12~15	花粉色;皇冠型,有时呈荷花型、金环型或托桂型	山东省菏泽
2(,)	杨山牡丹()	15~18	花白色;花瓣基部具浅紫晕、单瓣型	河南省内乡宝天曼
3()	杨山牡丹 × '赵粉'(F ₁ 代)	1	幼苗	人工杂交
4()	'紫二乔'()	12~15	花复色;蔷薇型	山东省菏泽
5()	杨山牡丹 × '紫二乔'(F ₁ 代)	1	幼苗	人工杂交

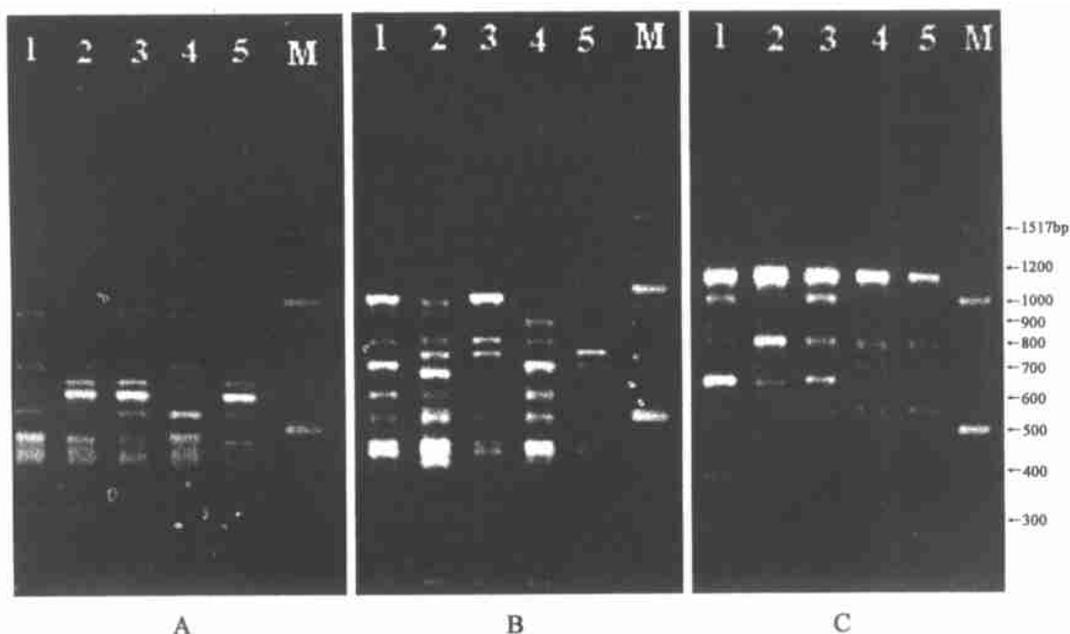
1.2 DNA 提取与引物筛选

采用 CTAB 法^[25]从叶片中提取总 DNA,用 RNA 酶(RNase)消化后,将总 DNA 溶于 TE (1mmol L⁻¹ Tris-HCl (pH8.0),0.1 mmol L⁻¹ EDTA (pH8.0))溶液中,标定浓度后备用。

从 70 个 ISSR 引物中筛选出能获得清晰条带、反应稳定的 5 个引物用于正式 PCR 扩增。引物编号、序列和退火温度分别为:(1) ISSR-01:(CA)₆RG,50 ;(2) ISSR-03:(CT)₈RC,52 ;(3) ISSR-04:(CT)₈RG,52 ;(4) ISSR-05:(CTC)₄RC,48 ;(5) ISSR-13:(AGTG)₄,48 。在引物序列中,R=A/G。

1.3 ISSR-PCR 实验

ISSR-PCR 扩增在 T-personal 48 型 PCR 仪中进行。25 μL PCR 反应体系中,含 25 ng DNA 模板,10 mmol L⁻¹ Tris-HCl (pH8.3),50 mmol L⁻¹ KCl,2.0 mmol L⁻¹ of MgCl₂,1 mmol L⁻¹ dNTP,0.2 μmol L⁻¹ 引物和 1 U Taq DNA 聚合酶。引物和 Taq 酶购自宝生物工程(大连)有限公司。PCR 程序为:94 预变性 3 min;94 变性 40 s,Ta(各 ISSR 引物的退火温度)15 s,72 延伸 1.5 min,38 个循环;最后,72 延伸 8 min。PCR 产物用 20 g kg⁻¹ 琼脂糖(Promega 公司)凝胶在 TBE 缓冲液中 3 V cm⁻¹ 的电压下电泳 3.5 h,溴化乙锭染色。用 BIO-RAD 公司的凝胶成像系统摄影,如图 1 所示。



A:ISSR-01 引物;B:ISSR-03 引物;C:ISSR-04 引物。图中样品号(泳道号)分别为:1——‘赵粉’(♀),2——杨山牡丹(♀),3——杨山牡丹×‘赵粉’(F₁代),4——‘紫二乔’(♀),5——杨山牡丹×‘紫二乔’(F₁代)。M为100 bp Ladder DNA 分子量标准。

图1 牡丹杂交后代及其亲本的DNA ISSR 标记电泳结果

1.4 数据分析

长度为200~1200 bp之间的清晰而稳定的ISSR-PCR扩增片段用于统计分析,用Quantity One软件(Version 4.2.1)计算扩增片段的分子量。各个样品在同一位点上有扩增片段时记为1,无扩增片段时记为0,构建0,1矩阵。根据0,1矩阵生成各个体的DNA指纹图谱。计算Nei氏遗传距离。利用PAUP*4.0b10软件,采用邻接法进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 ISSR-PCR扩增结果

利用DNA分子标记对亲后代关系的鉴定通常需要在杂交后代中检测到如下证据:(1)与双亲共同具有的位点(或扩增带);(2)分别与亲本之一共同具有的位点(或扩增带);如果满足这样的条件则表明两个亲本之间发生了遗传重组^[26,27]。

在本研究中,如DNA指纹图谱(表2)所示,在杂交组合中共检测到40个位点,其中双亲与子代的共有位点为25个,子代与父本(‘赵粉’)的共有位点有3个(编号分别为:IS04-1007、IS04-885和IS04-785),子代与母本(杨山牡丹)的共有位点有6个(编号分别为:IS01-600、IS03-688、IS03-400、IS05-920、IS13-815和IS13-692)。在组合中共检测到43个位点,其中双亲与子代的共有位点为24个,子代与父本(‘紫二乔’)的共有位点有4个(编号分别为:IS03-742、IS04-885、IS13-1142和IS13-590),子代与母本(杨山牡丹)的共有位点有5个(编号分别为:IS01-655、IS03-688、IS13-900、IS13-815和IS13-692)。

表 2 利用 5 个 ISSR 引物获得的杂交后代及其亲本的 DNA 指纹图谱的比较

序号	标记编号*	‘赵粉’ (♂) I**	杨山牡丹 × ‘赵粉’ (F ₁ 代) I	杨山牡丹 (♀) I, II	杨山牡丹 × ‘紫二乔’ (F ₁ 代) II	‘紫二乔’ (♂) II
1	IS01-655			—	—	
2	IS01-600		—	—	—	
3	IS03-950			—	—	
4	IS03-742				—	—
5	IS03-688		—	—	—	
6	IS03-400		—	—	—	
7	IS04-1007	—	—			
8	IS04-885	—	—		—	—
9	IS04-785	—	—			
10	IS05-920		—	—		
11	IS13-1142				—	—
12	IS13-900			—	—	
13	IS13-815		—	—	—	
14	IS13-692		—	—	—	
15	IS13-590				—	—

注: * 如编号为 IS01-655 的标记指利用 ISSR-01 引物 PCR 扩增产生分子量为 655 bp 的 DNA 片段,作为一个 ISSR 标记,以此类推,未显示单态带; ** 杂交组合号。

2.2 遗传距离及聚类分析

如表 3 所示,在杂交组合 中, F₁ 代与其母本间的遗传距离为 0.086,与其父本间的遗传距离为 0.147;在组合 中, F₁ 代与其母本间的遗传距离为 0.139,与其父本间的遗传距离为 0.211。相对于父本而言,两个组合中的 F₁ 代在遗传上与母本较近。在图 2 中,两个半同胞子代首先与其母本杨山牡丹聚类在一起。两个牡丹品种(‘赵粉’和‘紫二乔’)之间的遗传距离(0.194)略大于其与杨山牡丹之间的遗传距离(0.176 和 0.188),这暗示品种间的遗传分化较大、品种遗传背景较复杂。

表 3 杨山牡丹后代及其亲本之间的 Nei 氏遗传距离矩阵

个体号 (杂交组合号)	名称	1	2	3	4	5
1()	‘赵粉’()	0.000				
2(,)	杨山牡丹()	0.176	0.000			
3()	杨山牡丹 × ‘赵粉’(F ₁ 代)	0.147	0.086	0.000		
4()	‘紫二乔’()	0.194	0.188	0.246	0.000	
5()	杨山牡丹 × ‘紫二乔’(F ₁ 代)	0.286	0.139	0.139	0.211	0.000

3 讨论与结论

分子生物学技术的发展已经能够直接利用 DNA 所含的信息研究植物品种遗传资源评价

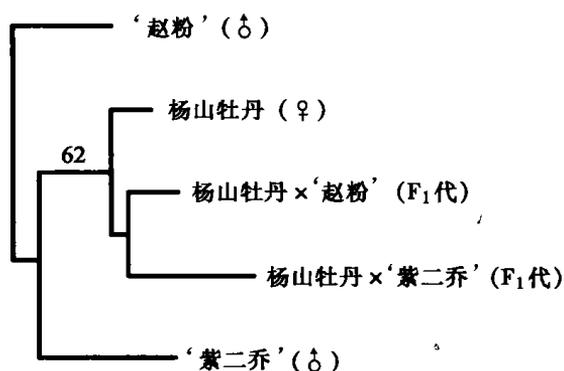
和品种分类^[4,17-29]。在牡丹的研究方面, Sang 等^[28,29]用核基因 ITS、叶绿体基因 *matK*、*psbA-trnH* 和 *trnL-trnF* 间隔区序列数据揭示了芍药属牡丹组的 5 个物种的系统关系。然而,上述基因序列在牡丹组物种间的分化已经很小,在品种水平上没有分辨率。本研究结果表明 DNA 指纹技术(如 ISSR 标记技术)在牡丹种和种下分类等级上非常有效。类似的研究很多,例如,红莲型杂交稻(*Oryza sativa* L.) (红莲 2 号, HL-type hybrid rice (Honglian-2)) 及其骨干亲本的 RAPD 分析也显示杂种中出现了双亲均具有的标记^[25],在中国主栽的汕优杂交稻(*Oryza sativa* L.) (rice

hybrids: “Shanyou 63”、“Shanyou 64”和“Shanyouwan 3”) 中检测到双亲带型的 RAPD 标记互补带^[26],这相当于本研究在杨山牡丹后代中检测到的分别与各亲本共同具有的位点。

综上所述,ISSR 分子标记技术可以用于研究牡丹的种间、种内以及种下水位的分类和遗传关系以及杂交种的鉴定。

参考文献:

- [1] 洪涛,张家勋,李嘉珏,等. 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] 洪涛,Osti GL. 中国野生牡丹研究(二) 芍药属牡丹组新分类群[J]. 植物研究,1994,14(3):237~240
- [3] 洪涛,戴振伦. 中国野生牡丹研究(三) 芍药属牡丹组新分类群[J]. 植物研究,1997,17(1):1~5
- [4] 邹喻苹,蔡美琳,王子平. 芍药属牡丹组的系统学研究——基于 RAPD 分析[J]. 植物分类学报,1999,37(4):220~227
- [5] 张赞平,侯小改. 杨山牡丹的核型分析[J]. 遗传,1996,18(5):3~6
- [6] 潘开玉. 芍药科分布格局及其形成的分析[J]. 植物分类学报,1995,33:340~349
- [7] 洪德元,潘开玉. 芍药属牡丹组的分类历史和分类处理[J]. 植物分类学报,1999,37:351~368
- [8] 王莲英. 中国牡丹品种图志[M]. 北京:中国林业出版社,1997
- [9] 王莲英,袁涛. 中国牡丹与芍药[M]. 北京:金盾出版社,1999
- [10] 李嘉珏. 中国牡丹与芍药[M]. 北京:中国林业出版社,1999
- [11] 刘典立. 洛阳市志 第 16 卷 牡丹志[M]. 郑州:中州古籍出版社出版,1998
- [12] 周仁超,姚崇怀. 芍药属牡丹组革质花盘组的系统演化探讨[J]. 植物研究,2002,22(1):72~75
- [13] 袁涛,王莲英. 我国芍药属牡丹组革质花盘亚组的形态学研究[J]. 园艺学报,2003,30(2):187~191
- [14] Zhou Z Q, Pan K Y, Hong D Y. Phylogenetic analysis of *Paeonia* section Moutan (tree peonies, Paeoniaceae) based on morphological data[J]. Acta Phytotaxonomica Sinica, 2003, 42(5):436~446
- [15] 席以珍. 中国芍药属花粉形态及其外壁超微结构的观察[J]. 植物学报,1984,26:241~246
- [16] 袁涛,王莲英. 根据花粉形态探讨中国栽培牡丹的起源[J]. 北京林业大学学报,2002,24(1):5~11
- [17] 裴颜龙,邹喻苹,尹葵,等. 矮牡丹与紫斑牡丹 RAPD 分析初报[J]. 植物分类学报,1995,33:350~356
- [18] 李涛,尹葵,裴颜龙,等. 用 RAPD 技术进行牡丹品种鉴定初探[J]. 植物引种驯化集刊,1995,10:46~54
- [19] Hosoki T, Kimura D, Hasegawa R, et al. Comparative study of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) cultivars and hybrids by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis[J]. J Japan Soc Hort Sci, 1997, 66(2):393~400
- [20] 邹喻苹,葛颂,王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京:科学出版社,2001



分支上的数字是 1 000 次重复抽样检测的自展(bootstrap)值

图 2 杂交后代与其亲本之间遗传关系的邻接树

- [21] 陈向明,郑国生,张圣旺. 牡丹栽培品种的 RAPD 分析[J]. 园艺学报,2001,28(4):370~372
- [22] 陈向明,郑国生,孟丽. 不同花色牡丹品种亲缘关系的 RAPD-PCR 分析[J]. 中国农业科学,2002,35(5):546~551
- [23] 邹喻苹,蔡美琳,张志宪,等. 矮牡丹的遗传多样性与保护对策[J]. 自然科学进展,1999,5:468~471
- [24] Godwin I D, Aitken E A B, Smith L W. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics[J]. Electrophoresis,1997,18:1524~1528
- [25] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochemical Bulletin. 1987,19:11~15
- [26] 段世华,毛加宁,朱英国. 红莲型杂交稻(红莲2号)及其骨干亲本的 RAPD 分析与鉴定[J]. 武汉植物学研究,2002,20(3):171~178
- [27] 向太和,汪秀峰,李莉,等. 利用 RAPD 标记对我国主栽的汕优杂交稻和其亲本进行区别和鉴定[J]. 作物学报. 2000,26(3):292~296
- [28] Sang T, Crawford D J, Stuessy T F, et al. Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using sequences of internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA: implications for biogeography and concerted evolution[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 1995, 92:6813~6817
- [29] Sang T, Crawford D J, Stuessy T F. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae) [J]. American Journal of Botany, 1997, 84:1120~1136

DNA Molecular Evidences of the Inter-specific Hybrids between *Paeonia ostii* and *P. suffruticosa* Based on ISSR Markers

SUO Zhi-li¹, ZHOU Shi-liang², ZHANG Hui-jin¹, ZHANG Zhi-ming¹

(1. Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China;

2. Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: *Paeonia ostii* was believed to be one of the main progenitors of the Chinese tree peony cultivars, and hybridization was the most important pathway for incorporation of genetic composition of *P. ostii*. However, no experimental evidence had been reported till now. In this study, *P. ostii* was used as a maternal parent crossing with other two Chinese tree peony cultivars which were used as paternal parents. The relationships between the F₁ hybrids and their parents were analyzed by means of DNA fingerprinting based on ISSR (Inter-simple sequence repeats) markers, and ISSR fragments typically inherited from both parents were detected in the genomes of the F₁ generation. This study also indicated that ISSR marker was suitable for identification of F₁ hybrids in *P. suffruticosa* at seedling stage.

Key words: *Paeonia ostii*; *P. suffruticosa*; crossing; ISSR Marker; DNA fingerprinting; cultivar identification