



不同花色紫斑牡丹的 CDDP 体系优化 及其遗传多样性分析

陈 燕, 李婉茹, 唐 红*

(甘肃农业大学 林学院, 兰州 730000)

摘 要: 利用 CDDP (Conserved DNA-derived Polymorphism) 分子标记方法, 对 47 个不同花色紫斑牡丹品种的基因组 DNA 进行遗传多样性分析。结果显示: (1) 采用正交实验设计, 对影响紫斑牡丹 CDDP-PCR 反应的引物浓度、DNA 模板浓度两因素进行优化, 优化后紫斑牡丹 CDDP-PCR 反应体系为: 总反应体系 20 μL , 其中包括 2 $\times$ Es Taq MasterMix 酶(含染料) 10 μL , 10 pmol/ μL 引物 1.5 μL , 15 ng/ μL DNA 模板 4 μL , ddH₂O 4.5 μL 。(2) 21 条引物中, 有 19 条产生了清晰的条带。19 条引物共扩增出 112 条带, 其中多态性条带 97 条, 占总条带数的 86.61%, 多态性比例高。(3) UPGMA 聚类显示, 47 个紫斑牡丹品种的聚类大体按照花色聚类, 品种间遗传相似系数数值在 0.72~0.95, 说明品种间相似度高, 差异程度小。研究表明, CDDP 分子标记方法适用于紫斑牡丹遗传关系分析, 且特异条带的产生为深入研究紫斑牡丹品种鉴别提供理论依据。

关键词: 紫斑牡丹; CDDP; 分子标记; 引物筛选; 遗传多样性

中图分类号: Q346⁺.5; S685.11

文献标志码: A

System Optimization and Genetic Diversity of Different Color *Paeonia rockii* by CDDP Markers

CHEN Yan, LI Wanru, TANG Hong*

(Gansu Agriculture University Academy of Forestry, Lanzhou, 730000)

Abstract: CDDP molecular marker was used to analysis genetic diversity of 47 *Paeonia rockii* DNA. The results showed that: (1) the orthogonal experimental design was used to optimize CDDP amplification system on *P. rockii* resources in primers and template DNA. A suitable CDDP reaction system was established: the CDDP reaction mixture, with a total volume of 20 μL , consisted of 10 μL of 2 $\times$ Es Taq MasterMix, 1.5 μL of 1.0 pmol/ μL primer, 4 μL of 15 ng/ μL DNA and 4.5 μL of ddH₂O. (2) 19 of 21 primers yielded 112 bands, 97 were polymorphic which accounted for 86.61% of all bands. (3) The results of UPGMA showed that: 47 *P. rockii* were grouped together with the same color in general. The similarity index value was 0.72~0.95 which showed the similarity degree among 47 *P. rockii* was high and the difference degree was low. In total, CDDP molecular marker was suitable for analyzing genetic diversity of *P. rockii*. The emergence of specific bands could provide theoretical basis for further study the identification of *P. rockii*.

Key words: *Paeonia rockii*; CDDP (conserved DNA-derived polymorphism); molecular marker; primer screening; genetic diversity

收稿日期: 2018-06-30; 修改稿收到日期: 2018-09-18

基金项目: 甘肃省农牧厅生物技术专项 (GNSW-2014-7)

作者简介: 陈 燕 (1993—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事观赏性植物应用方面研究。E-mail: 13057581080@163.com

* 通信作者: 唐 红, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事园林观赏植物遗传育种研究。E-mail: gsth@21cn.com

牡丹原产于中国,素有国色天香的美誉,古有“自李唐来,世人甚爱牡丹”之说。目前中国的栽培牡丹划分为中原、西北、江南和西南四大品种群,其中西北牡丹即紫斑牡丹是仅次于中原牡丹品种群的第二大品种群^[1]。紫斑牡丹因花基部有一块明显的紫斑而得名。在长期的自然选择及人工栽培下,紫斑牡丹的遗传变异类型更加丰富。但是,紫斑牡丹种源复杂,不同地区各自命名,因此同名异物、同物异名的情况很普遍,这就给紫斑牡丹的品种鉴定和育种工作带来了诸多困难。开发简单快捷、信息量丰富、鉴别能力强的分子标记技术对植物品种鉴定及选育是必要的^[2]。自 20 世纪末以来,牡丹种质资源 DNA 水平上的研究一直被国内外学者关注,但多侧重于探讨牡丹组野生种间亲缘关系、遗传多样性及起源和分类^[3],关于紫斑牡丹品种水平上的遗传多样性及品种鉴定研究相对较少^[4-6]。裴颜龙等^[7]最早用 RAPD 技术研究了矮牡丹和紫斑牡丹基因组 DNA,发现,RAPD 技术不仅可以检测野生牡丹居群内与居群间的遗传变异,还具有研究种间进化和亲缘关系的潜力;陈向明等^[8]利用 RAPD-PCR 技术研究了不同花色牡丹品种的亲缘关系;朱红霞^[9]利用 AFLP 分子标记技术初步建立了牡丹、芍药部分品种的 DNA 指纹图谱;王燕青^[10]和王娟^[11]等分别利用 SRAP-PCR 标记研究了 33 个中原牡丹品种间的遗传多样性和 20 个牡丹品种基因组 DNA 多态性。然而,这些传统意义上的随机 DNA 分子标记得到的位点通常与目标性状基因距离较远,品种间鉴别效率不高。随着 DNA 分子标记技术的不断发展,新型标记方法如 CDDP、EST-EER、SNP 等也逐渐运用在植物分子水平的研究^[12-14]。

CDDP (conserved DNA-derived polymorphism) 分子标记技术是由 Collard 和 Mackill 于 2009 年在水稻研究中开发出来的基于 DNA 保守序列的新型分子标记方法。它是一种目的基因标记方法,能产生与目标性状连锁的功能性分子标记^[15-16]。对水稻、菊花、大豆、玫瑰的研究表明,CDDP 分子标记方法具有操作简单、成本低廉、多态性丰富等优点^[16-18]。该方法是对 RAPD、AFLP、ISSR 等传统标记方法的有效补充,更是对形态学、细胞学鉴定方法的辅助,能从分子角度为植物品种间的遗传多样性分析及鉴定提供科学帮助。本研究利用 CDDP 分子标记对 47 个不同花色紫斑牡丹品种的全基因组 DNA 进行遗传多样性分析,为紫斑牡丹品种鉴定提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2018 年 4 月至 6 月在甘肃农业大学林学院林木遗传分子实验室完成。供试材料为 47 个紫斑牡丹栽培品种(表 1)。根据成仿云等^[1]提出的花色、花型分类标准,随机选择具有代表性的品种作为试验材料。所有材料均采于甘肃省兰州市榆中县和平油用牡丹良种种苗繁育基地。于 2018 年 4 月采集紫斑牡丹茎秆顶端的嫩叶,每个品种采集嫩叶约 1 g,将采集到的嫩叶表面灰尘等杂物擦去,用锡箔纸包裹好,置于液氮中存放,带回实验室之后立即取出并存放在-80℃冰箱中,用于后续的 DNA 提取。

1.2 研究方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取与检测 采用天根公司的植物 DNA 提取试剂盒提取紫斑牡丹嫩叶的基因组 DNA,采用超微量分光光度计检测 DNA 浓度与质量,并将部分 DNA 原液稀释成浓度为 15 ng/ μ L 的母液,保存在-4℃冰箱备用,DNA 原液存放在-20℃冰箱中。

1.2.2 CDDP-PCR 扩增体系优化 1)反应体系优化 试验所用的 21 条引物均由上海生工生物有限公司合成,引物编号及序列信息见表 2。所有引物稀释成 10 pmol/ μ L 的母液,用 20 μ L 离心管分装后保存在-20℃冰箱备用。

CDDP-PCR 反应总体积为 20 μ L,其中 2 $\times$ Es Taq MasterMix(含染料)10 μ L,采用正交试验设计对引物浓度、DNA 模板浓度进行 2 因素 4 水平优化,选出适合紫斑牡丹的反应体系。以“天女散花”为 DNA 模板,MYB1(Pr1)为引物,共 16 个处理(表 3)。

反应程序为 94℃预变性 3 min;94℃变性 1 min,退火 1 min,72℃延伸 2 min,35 个循环;72℃后延伸 5min,最后 4℃短期保存。

2)退火温度筛选 根据候小改等提出的 PCR 复性温度一般低于引物 T_m 值 15℃到 5℃,由 PCR 仪自动生成 8 个温度梯度。以引物 18 为例,其 T_m 值为 62.7℃,则在 42.7~57.7℃的温度范围内,PCR 仪自动生成的温度分别为 47.7、48.1、49.4、51.2、53.6、55.6、56.9 和 57.7℃。用此法分别对 21 条引物进行最适退火温度的筛选。

1.2.3 电泳及检测 取 6 μ L 扩增产物在溶有 4 s gelred 核酸染料 2%琼脂糖凝胶上电泳分离,电压 5 V/cm,电泳 2 h,最后在凝胶成像系统上观察并采集图像。

表 1 供试紫斑牡丹品种信息
Table 1 Varieties information of *Paeonia rockii* used in this study

编号 No.	品种 Cultivar	花色 Flower color	花型 Flower type
1	粉楼 Fenlou	粉色 Pink	皇冠型 Crown form
2	红莲 Honglian	红色 Red	荷花型 Lotus form
3	玉冠蓝带 Yuguanlandai	白色 White	皇冠型 Crown form
4	玉楼藏娇 Yuloucangjiao	白色 White	荷花型 Lotus form
5	醉妃 Zuifei	粉色 Pink	皇冠型 Crown form
6	天女散花 Tiannvsanhua	红色 Red	皇冠型 Crown form
7	海黄 Haihuang	黄色 Yellow	菊花型 Chrysanthemun form
8	天山侠女 Tianshanxianv	粉色 Pink	绣球型 Hydrangea form
9	点金白燕尾 Dianjinbaiyanwei	白色 White	绣球型 Hydrangea form
10	紫宫春秀 Zigongchunxiu	紫色 Purple	菊花型 Chrysanthemun form
11	玉冠彩带 Yuguancaidai	白色 White	皇冠型 Crown form
12	黑元帅 Heiyuanshuai	白色 White	单瓣型 Single form
13	金环银线 Jinhuanyinxian	紫红色 Purplish red	皇冠型 Crown form
14	紫海 Zihai	紫色 Purple	托桂型 Anemone form
15	红海风云 Honghaifengyun	黑色 Black	托桂型 Anemone form
16	四川 Sichuan	粉色 Pink	单瓣型 Single form
17	粉楼飘彩 Fenloupiaocai	粉色 Pink	皇冠型 Crown form
18	丹凤凌空 Danfenglingkong	白色 White	荷花型 Lotus form
19	青丝万缕 Qingsiwanlv	粉色 Pink	蔷薇型 Rose form
20	白壁蓝瑕 Baibilanxia	红色 Red	荷花型 Lotus form
21	冰山翡翠 Bingshanfeicui	紫黑色 Purplish black	绣球型 Hydrangea form
22	理想 Lixiang	红色 Red	绣球型 Hydrangea form
23	雪里藏金 Xuelicangjin	粉色 Pink	皇冠型 Crown form
24	黑发女郎 Heifanvlang	白色 White	单瓣型 Single form
25	玉叶白 Yuyebai	白色 White	单瓣型 Single form
26	金波荡漾 Jinbodangyang	白色 White	皇冠型 Crown form
27	棕斑白 Zongbanbai	白色 White	单瓣型 Single form
28	蓝塔点金 Lantadianjin	蓝色 Blue	皇冠型 Crown form
29	菊花粉 Juhuafen	白色 White	托桂型 Anemone form
30	北极熊 Beijixiong	白色 White	单瓣型 Single form
31	蓝荷 Lanhe	蓝色 Blue	单瓣型 Single form
32	冰山雪莲 Bingshanxuelian	白色 White	单瓣型 Single form
33	黄云 Huangyun	黄色 Yellow	蔷薇型 Rose form
34	菊花黄 Juhuahuang	黄色 Yellow	托桂型 Anemone form
35	华夏金龙 Huaxiajinlong	黄色 Yellow	单瓣型 Single form
36	黄鹤楼 Huanghelou	黄色 Yellow	皇冠型 Crown form
37	墨绸 Mochou	黑色 Black	皇冠型 Crown form
38	龙首黑 Longshouhei	黑色 Black	单瓣型 Single form
39	墨海银波 Mohaiyinbo	黑色 Black	托桂型 Anemone form
40	大漠风云 Damofengyun	复色 Double color	荷花型 Lotus form
41	五颜六色 Wuyanliuse	复色 Double color	绣球型 Hydrangea form
42	黑妹 Heimei	黑色 Black	荷花型 Lotus form
43	和平二桥 Hepingerqiao	粉色 Pink	皇冠型 Crown form
44	黑天鹅 Heitiane	黑色 Black	菊花型 Chrysanthemun form
45	墨冠玉珠 Moguanyuzhu	黑色 Black	皇冠型 Crown form
46	墨海 Mohai	黑色 Black	托桂型 Anemone form
47	夜光杯 Yeguangbei	黑色 Black	单瓣型 Single form

表 2 用于紫斑牡丹品种遗传关系分析的 CDDP 引物							
Table 2 Details about CDDP primers used to assess genetic diversity in <i>P. rockii</i>							
基因 Gene	氨基酸序列 Amino acid motif	引物名称 Primer name	引物编号 Primer code	引物序列 Primer sequence	长度 Length /bp	GC /%	最佳退火温度 Optimal annealing temperature/℃
MYB	GKSCR	MYB1	Pr1	GGCAAGGGCTGCCGC	15	80	51.6
	GKSCR	MYB2	Pr2	GGCAAGGGCTGCCGG	15	80	47.9
WRKY	WRKYGQ	WRKY-F1	Pr3	TGGCGSAAGTACGGCCAG	18	67	48.7
	GKHNH	WRKY-R1	Pr4	GTGGTTGTGCTTGCC	15	60	46.6
	TTYEG	WRKY-R2	Pr5	GCCCTCGTASGTSGT	15	67	49.6
	GEHTC	WRKY-R3	Pr6	GCASGTGTGCTCGCC	15	73	49.6
	TTYEG	WRKY-R2B	Pr7	TGSTGSATGCTCCCG	15	67	50.0
	GEHTC	WRKY-R3B	Pr8	CCGCTCGTGTGSACG	15	73	50.9
ERF	HYRGVR	ERF1	Pr9	CACTACCGCGGSCTSCG	17	77	57.8
	AEIRDP	ERF2	Pr10	GCSGAGATCCGSGACCC	17	77	49.9
	WLGTF	ERF3	Pr11	TGGCTSGGCACSTTCGA	17	65	53.6
KNOX	KGKLPK	KNOX-1	Pr12	AAGGGSAAAGCTSCCSAAG	18	61	49.6
	HWWELH	KNOX-2	Pr13	CACTGGTGGGAGCTSCAC	18	67	50.6
	KRHWKP	KNOX-3	Pr14	AAGCGSCACTGGAAGCC	17	65	44.6
MADS	MGRGKV	MADS-1	Pr15	ATGGGCCGSGGCAAGGTGC	19	74	53.6
	MGRGKV	MADS-2	Pr16	ATGGGCCGSGGCAAGGTGG	19	74	62.4
	LCDAEV	MADS-3	Pr17	CTSTGCGACCGSGAGGTC	18	72	— —
	LCDAEV	MADS-4	Pr18	CTSTGCGACCGSGAGGTG	18	72	53.7
ABP1	TPIHR	ABP1-1	Pr19	ACSCCSATCCACCGC	15	73	52.5
	TPIHR	ABP1-2	Pr20	ACSCCSATCCACCGG	15	73	— —
	HEDVQ	ABP1-3	Pr21	CACGAGGACCTSCAGG	16	69	44.5

表 3 PCR 正交试验设计表				
Table 3 Orthogonal design for PCR				
处理 Treatment	2×Es Taq MasterMix/ μ L	模板 DNA 含量 Content of template DNA/ng	引物含量 Content of primer /pmol	超纯水 Distilled and deionized water/ μ L
1	10	15	5	8.5
2	10	15	10	8.0
3	10	15	15	7.5
4	10	15	20	7.0
5	10	30	5	7.5
6	10	30	10	7.0
7	10	30	15	6.5
8	10	30	20	6.0
9	10	45	5	6.5
10	10	45	10	6.0
11	10	45	15	5.5
12	10	45	20	5.0
13	10	60	5	5.5
14	10	60	10	5.0
15	10	60	15	4.5
16	10	60	20	4.0

1.2.4 数据统计 将每条 CDDP 引物扩增出来的每条带视为一个位点,采用 Gel-Pro analyzer 条带统计软件结合人工识别的方法统计位点总数及多态性位点数,条带清晰的记为 1,缺失记为 0。引物的位点多态信息量 (polymorphism information content, PIC)按公式 $PIC=1-\sum(P_i)^2$,其中 P_i 为第 i 种等位位点占总等位位点的比率。

2 结果与分析

2.1 紫斑牡丹 CDDP 反应体系优化

根据表 3 正交试验设计扩增结果(图 1)可以看出,扩增出的条带清晰明亮,条带数量多且整齐。当 DNA 含量固定为 15、30、45 和 60 ng 时,随着引物量的增加,扩增条带数目也在增加,但当引物含量超过 15 pmol 时,条带数又开始减少,因此引物浓度不宜过高,最佳值为 15 pmol。当引物含量一定时,随着 DNA 浓度的增加,扩增的条带数也增加,且亮度提高。最后确定 15 号为最佳体系,即 20 μ L 体系中,DNA 模板量为 60 ng,引物含量为 15 pmol。最后确立紫斑牡丹 CDDP 反应最佳体系为:PCR 总反应体系 20 μ L,其中包括 2 $\times$ Es Taq MasterMix 酶

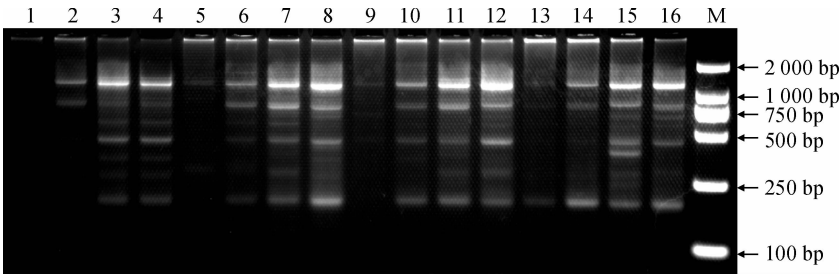
(含染料)10 μ L,1.0 pmol/ μ L 引物 1.5 μ L,15 ng/ μ L DNA 模板 4 μ L,ddH₂O 4.5 μ L。

2.2 引物的筛选

采用上述稳定的紫斑牡丹 CDDP 反应体系,以紫斑牡丹品种“醉妃”基因组为 DNA 模板,对 21 条引物进行多态性筛选。试验结果显示,除引物 Pr17 和 Pr20 没有扩增出任何条带,其余 19 条引物均能扩增出清晰可辨的条带,每条引物扩增出的条带数 2~6 条不等(图 2)。因此,除引物 Pr17 和引物 Pr20 外,其余 19 条引物均可用于紫斑牡丹品种的多态性分析。

2.3 引物退火温度的筛选

引物的退火是影响 PCR 扩增结果的关键因素。退火温度过低,扩增出的产量较高,但是很容易引起模板 DNA 与引物的错配从而导致杂带较多;退火温度过高,DNA 模板和引物结合差,条带数目少,亮度低。理想状态下,引物处于最佳退火温度,才既可以保证引物同目的序列有效退火又可以减少非特异性的结合。本实验以“醉妃”为 DNA 模板对所有引物的最适退火温度进行筛选,扩增产物在 2% 琼脂糖上电泳分离。以 Pr18 引物为例,其在 47.4、48.1、

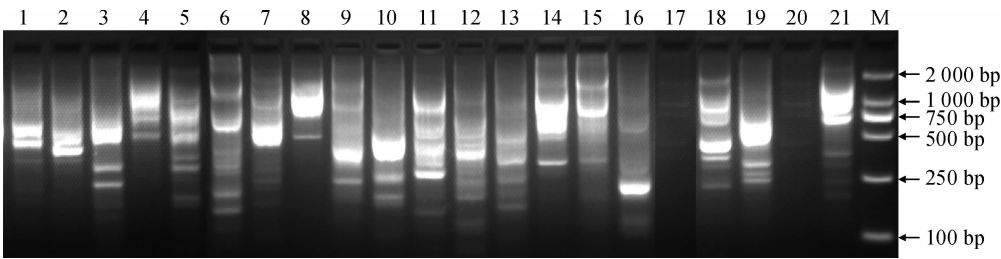


1~16 对应表 3 中的处理号; M. DL2000

图 1 正交试验下的扩增结果

1-16 was correspond to those treatments listed in Table 3; M. DL2000 plus

Fig. 1 The results of orthogonal design



1~21 引物 1~21; M. DL2000

图 2 21 条引物对紫斑牡丹品种“醉妃”的扩增结果

1-21 primer 1-21; M. DL2000

Fig. 2 The amplification of 21 CDDP primers to *P. rockii* cultivar ‘Zuifei’

49.4、51.2、53.6、55.6、56.9 和 57.7 ℃时都能扩增出清晰明亮的条带,但在温度为 53.6 ℃时,扩增出的条带无弥散拖尾现象,条带最为清晰整齐(图 3)。确定该引物的最佳退火温度为 53.6 ℃。各引物最佳退火温度见表 2。

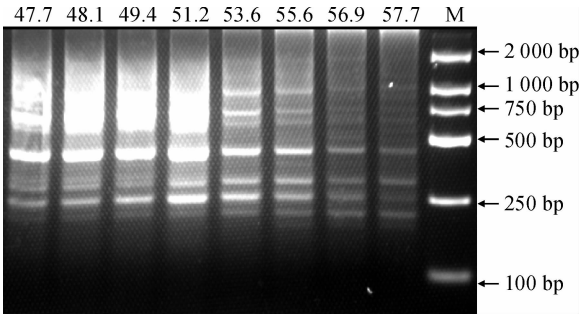


图 3 引物 MADS-4(Pr18)退火温度筛选

Fig. 3 The annealing temperature screening of primer MADS-4(Pr18)

2.4 CDDP 分子标记鉴定紫斑牡丹品种的遗传多态性分析

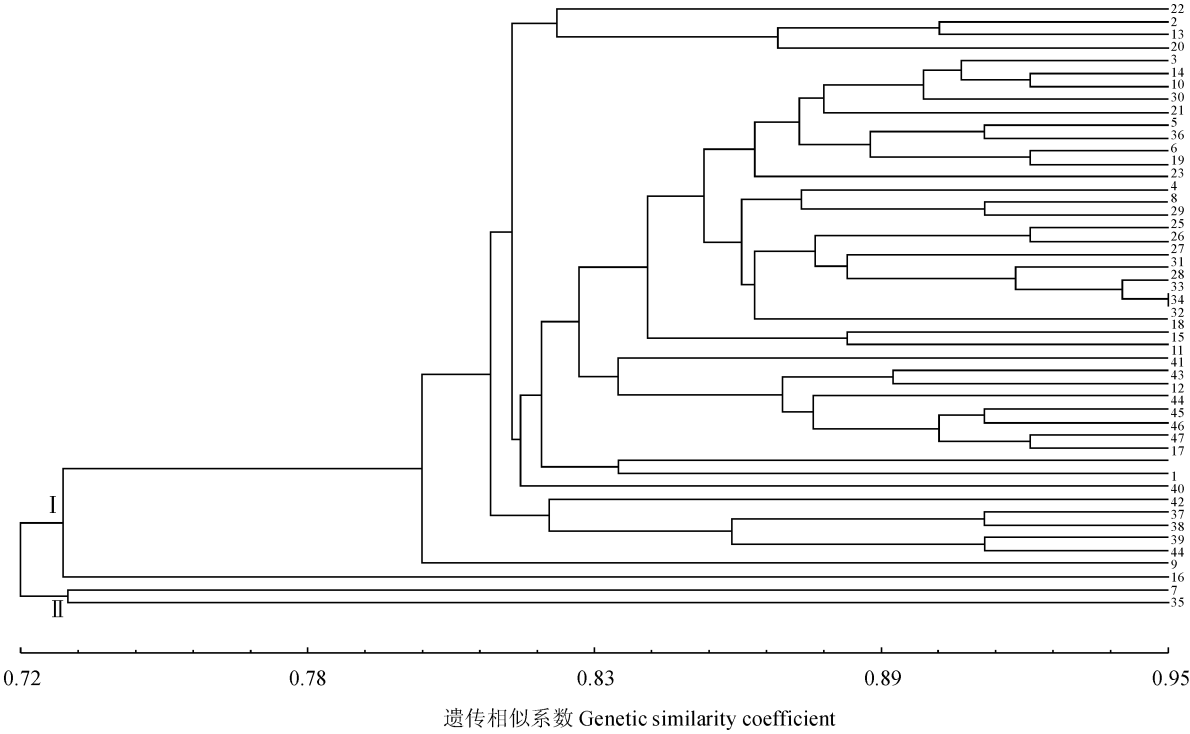
从表 4 可看出,筛选出来的 19 条适用于紫斑牡丹引物一共扩增出 112 条带,其中多态性条带 97 条,多态性比率为 86.61%。PIC 是衡量基因变异程度高低的多态信息含量的指标:当 $PIC > 0.5$ 时,则表示该位点呈高度多态性;当 $0.25 < PIC < 0.5$ 时,则表示该位点呈中度多态性;当 $PIC < 0.25$ 时,则表示该位点呈低度多态性。本试验中引物 PIC 值最大为 0.81(Pr11),最小值为 0.50(Pr16),平均值为 0.74,说明 47 份紫斑牡丹品种间变异水平较高。

由 UPGMA 聚类分析(图 4)可知,47 份紫斑牡丹的遗传相似系数变化范围是 0.72~0.95,平均遗传相似系数为 0.835,显示供试样品遗传多样性高。当遗传相似系数为 0.72 时,所有供试材料聚为两类,第Ⅰ类由 45 个供试样品组成,第Ⅱ类由 2 个黄

表 4 CDDP 引物扩增结果

Table 4 The amplification results about CDDP primers

引物编号 Primer No.	条带数 Number of bands	多态性条带数 NPB	多态性比率 PPB/%	特异条带数 Number of special bands	特异条带比率 Percent of special bands/%	PIC	鉴别力 DP
Pr1	7	7	100.00	0	0.00	0.77	7
Pr2	6	5	83.33	0	0.00	0.77	5
Pr3	6	4	66.67	2	33.33	0.76	2
Pr4	7	7	100.00	1	14.29	0.78	2
Pr5	7	7	100.00	2	28.57	0.80	11
Pr6	7	7	100.00	4	57.14	0.69	5
Pr7	8	8	100.00	5	62.50	0.74	5
Pr8	6	6	100.00	1	16.67	0.75	6
Pr9	6	6	100.00	2	33.33	0.68	2
Pr10	6	4	66.67	0	0.00	0.80	0
Pr11	6	6	100.00	0	0.00	0.81	13
Pr12	7	7	100.00	5	71.43	0.74	2
Pr13	5	4	80.00	1	20.00	0.65	2
Pr14	5	2	40.00	1	20.00	0.80	1
Pr15	6	4	66.67	0	0.00	0.78	4
Pr16	3	2	66.67	2	66.67	0.50	1
Pr18	6	6	100.00	0	0.00	0.80	11
Pr19	4	3	75.00	3	75.00	0.75	3
Pr21	4	2	50.00	1	25.00	0.74	1
总计 Total/ 平均 Average	112	97	86.61	30	26.79	0.74	83

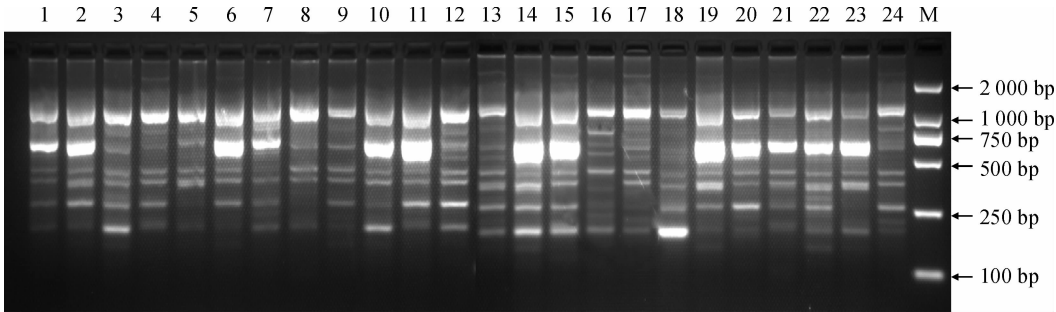


材料编号同表 1

图 4 47 份紫斑牡丹材料的 UPGMA 聚类分析图

Material number is shown in Table 1

Fig. 4 Dendrogram obtained from 47 *P. rockii* genotypes based on UPGMA analysis generated by SM



1~24 对应表 1 中材料编号;M: DL2000

图 5 5 号引物的样品扩增图

1—24 was correspond to sample numbers listed in Table 1; M: DL2000

Fig. 5 The amplification of Pr5 primer to individual of *P. rockii*

色品种:“海黄”和“华夏金龙”组成。从观赏性状上看,相同花色的品种大体上聚为一类,但也并非完全聚在一起。

2.5 紫斑牡丹品种鉴定

任意 2 个品种在同一引物下产生的带型不同则表明该引物可以区分这 2 个品种。本研究中 CDDP 引物 ERF3(Pr11)可区分的样本数最多(13 个),引物 ERF2(Pr10)可区分的样本数最少为 0。由表 4 知,CDDP 引物对紫斑牡丹的鉴别力在 0~13 之间,

其中鉴别力超过 10 的有 3 条引物,分别是 WRKY-R2(Pr5)、ERF3(Pr11)和 MADS-4(Pr18)。

根据表 4 条带分析结果,19 条引物共产生了 30 条特异性条带,除引物 Pr1、Pr2、Pr10、Pr11、Pr15 及 Pr18 没有产生特异性条带,其余 13 条引物均产生了 1~5 条特异性条带。特异性条带即只有某一品种具有或者某一品种缺失的条带,它能够便捷地将该品种与其他品种区分开来,为紫斑牡丹品种间的鉴别提供了研究方向。部分扩增结果见图 5。

3 讨论

3.1 利用 CDDP 分子标记技术分析紫斑牡丹遗传多样性

遗传多样性可能是对进化的适应,它是物种适应不断变化的环境的一个重要反应^[19]。通常情况下,一个物种的遗传多样性越丰富,其对环境的适应能力也就越强。普遍认为稀有的或者分布区狭窄的物种遗传多样性水平偏低^[20]。然而,近年来一些研究发现,一些特有的和濒危的物种仍然保持着较高的遗传变异^[5]。本研究采用的 CDDP 分子标记方法,得出供试的 47 份紫斑牡丹的多态性比例达 86.61%,这一结果高于杨美玲等^[5]用 ISSR 标记方法在 16 份紫斑牡丹研究出的 71.6%和裴颜龙等^[7]利用 RAPD 标记方法在紫斑牡丹中得出的 27.6%。在特异性条带比例上,CDDP 分子标记的方法产生的特异性比例为 26.79%,远高于苏雪等^[6]用 RAPD 技术在 16 个紫斑牡丹品种中的 3.33%。与以上分子标记方法相比,CDDP 法具有操作更简便、应用成本低等优点,因此 CDDP 分子标记方法是分析紫斑牡丹品种遗传多样性新的可靠的方法。

3.2 利用 CDDP 分子标记技术进行紫斑牡丹品种鉴别

甘肃是紫斑牡丹主产地,也是早期人工培育紫斑牡丹的中心。成仿云等^[21]利用自然杂交和人工杂交的方式培育出了 500 多个紫斑牡丹新品种。在

不定向的人工杂交过程中,60 余个中原牡丹品种被引入,导致紫斑牡丹更加多元化的遗传背景。遗传多样性的最直接反应是形态多样性。紫斑牡丹从形态上表现出极高的多样性,植株高矮、花色、花型、叶片形状等均有很大差异。

紫斑牡丹品种群是由野生紫斑牡丹引种驯化形成了一些原始品种后,再由中原牡丹品种的种质介入而产生了一大批传统品种,最后又通过回交和中原牡丹的再次介入产生了许多新品种。最主要和直接的种源是裂叶紫斑牡丹,而矮牡丹和阳阳山牡丹通过中原牡丹间接地产生了影响。目前尚没有文献关于紫斑牡丹品种间鉴别的报道,一般研究多偏向于紫斑牡丹遗传多样性的分析,关于品种鉴别研究收获较少,只有苏雪等利用 RAPD 技术将 16 个紫斑牡丹品种区分开来。本研究采用特异条带加单一引物鉴别的方式,将统计出的 0、1 条带转化为十进制数,分析比较后一共区分出了 39 个品种,品种鉴别性高,可为以后紫斑牡丹品种鉴别提供新方向。

种质资源保护及优良品种选育的重要前提就是对不同种质资源的精确鉴定和遗传多样性描述^[22]。根据条带分析,引物 11 鉴别性最强,共可以鉴别 13 个品种,这是截至目前紫斑牡丹品种鉴定中突破前人研究的成果。这些特异性标记是区分紫斑牡丹品种的关键信息,在紫斑牡丹品种的特征描述、保护和开发利用中起到至关重要的作用。

参考文献:

[1] 成仿云,李嘉珏,陈德忠,等. 中国紫斑牡丹[M]. 北京:中国林业出版社,2005: 1-2.

[2] 李 田,郭俊娥,郑成淑,等. 菊花品种的遗传多样性分析及 CDDP 指纹图谱构建[J]. 北京林业大学学报,2014, 36(4): 94-101.

LI T, GUO J E, ZHENG C S, *et al.* Genetic diversity and construction of fingerprinting of chrysanthemum cultivars by CDDP markers[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2014, 36(4): 94-101.

[3] 李莹莹,郑成淑. 利用 CDDP 标记的菏泽牡丹品种资源的遗传多样性[J]. 中国农业科学,2013, 46(13): 2 739-2 750.

LI Y Y, ZHENG C S. Genetic diversity of tree peony cultivar resources in Heze revealed by CDDP markers[J]. *Scientia Ag-*

ricultura Sinica, 2013, 46(13): 2 739-2 750.

[4] 庞利铮. 芍药属 SSR 标记在紫斑牡丹实生群体中的多态性分析[C]//中国园艺学会. 中国观赏园艺研究进展,2012: 85-91.

[5] 杨美玲,唐 红. 紫斑牡丹遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 西北植物学报,2012, 32(4): 693-697.

YANG M L, TANG H. Genetic diversity of *Paeonia rockii* revealed by ISSRs[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2012, 32(4): 693-697.

[6] 苏 雪,张 辉,董莉娜,等. 应用 RAPD 技术对甘肃栽培牡丹品种的分类鉴定研究[J]. 西北植物学报,2006, 26(4): 696-701.

SU X, ZHANG H, DONG L N, *et al.* RAPD classification and identification of *Paeonia rockii* varieties planted in Gansu

Province [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2006, **26**(4): 696-701.

[7] 裴颜龙,邹喻苹,尹 蓁,等. 矮牡丹与紫斑牡丹 RAPD 分析初报[J]. 植物分类学报, 1995, **33**(4): 350-356.

PEI Y L, ZOU Y P, YIN Z, *et al.* Preliminary report of RAPD analysis in *Paeonia suffruticosa* subsp. *spontanea* and *Paeonia rockii* [J]. *Journal of Systematics and Evolution*, 1995, **33**(4): 350-356.

[8] 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.

CHEN X M, ZHENG G S, MENG L. RAPD-SSR analysis of genetic diversity of different color 35 tree paeonia cultivars[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, **35**(5): 546-551.

[9] 朱红霞. 牡丹、芍药品种 DNA 指纹图谱绘制的初步研究[D]. 北京:北京林业大学, 2004.

[10] 王燕青. 利用 SRAP 标记构建菏泽牡丹优良品种指纹图谱 [D]. 南京:南京林业大学, 2008.

[11] 王 娟,郭大龙,候小改,等. 不同花型牡丹品种亲缘关系的 SRAP 分析[J]. 中国农学通报, 2011, **27**(28): 167-171.

WANG J, GUO D L, HOU X G, *et al.* SRAP analysis of genetic relationships of the different tree peony flower forms [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, **27**(28): 167-171.

[12] 李莹莹. 基于 CDDP 标记的牡丹遗传多样性分析及分子身份证构建[D]. 山东泰安:山东农业大学, 2013.

[13] 王小文. 基于 CDDP 标记的不同花色牡丹的遗传关系分析 [D]. 山东泰安:山东农业大学, 2015.

[14] 姚丹青,楼坚锋,朱文莹,等. 基于 SNP 标记的黄瓜遗传多样性分析[J]. 上海农业学报, 2017, **33**(1): 21-30.

YAO D Q, LOU J F, ZHU W Y, *et al.* Genetic diversity analysis of cucumber based on SNP markers[J]. *Acta Agricultrae Shanghai*, 2017, **33**(1): 21-30.

[15] COLLARD B C Y, MACKILL D J. Conserved DNA-Derived polymorphism(CDDP): a simple and novel method for generating DNA markers in plants[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2009, **27**: 558-562.

[16] 李 田. 菊花遗传多样性分析及 CDDP 指纹图谱构建[D]. 山东泰安:山东农业大学, 2014.

[17] 李 强,苏二虎,高聚林,等. 大豆 CDDP 分子标记技术体系的优化_验证及引物筛选[J]. 大豆科学, 2013, **32**(3):310-315,320.

LI Q, SU E H, GAO J L, *et al.* Optimization, validation and primer screening of CDDP Molecular system in soybean[J]. *Soybean Science*, 2013, **32**(3):310-315,320.

[18] 姜丽媛,臧德奎,李文清,等. 野生玫瑰基因组 DNA 提取及 CDDP 引物筛选[J]. 山东农业科学, 2016, **48**(11): 13-17.

JIANG L Y, ZANG D K, LI W Q, *et al.* Genomic DNA extraction and CDDP primer screening of *Rosa rugosa* [J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2016, **48**(11): 13-17.

[19] STEVENS L, SALOMON B, SUN G. Microsatellite variability and heterozygote excess in *Elymus trachycaulus* populations from British Columbia in Canada [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2007, **35**: 725-736.

[20] YANG S, SHI S, GONG X. Genetic diversity of *Paeonia delavayi* as revealed by ISSRs [J]. *Chinese Biodiversity*, 2005, **13**(2): 105-111.

[21] 成仿云,陈德忠. 紫斑牡丹新品种选育及牡丹品种分类研究 [J]. 北京林业大学学报, 1998, **20**(2): 27-32.

CHENG F Y, CHEN D Z. Studies on the selection and breeding of new hybrids from blotched tree peony (*Paeonia rockii* cvs.) and the cultivars classification of tree peony[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 1998, **20**(2): 27-32.

[22] LUO C, HE X H, YING H, *et al.* Genetic relationship and diversity of *Mangifera indica* L.: revealed through SCoT analysis[J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2012, **59**(7): 1 505-1 515.

(编辑:宋亚珍)