云 南 植 物 研 究 2005，27（1）：42～48
Acta Botanica Yunnanica

紫斑牡丹与牡丹种间杂交后代的 DNA 分子证据*

索志立[1]，张会金[1]，张治明[1]，陈富飞[2]，陈富慧[2]
（1 中国科学院植物研究所，北京 100093；2 榆中县和平牡丹园，甘肃 兰州 730101）

摘要：据推测紫斑牡丹 *Paeonia rockii*（S. G. Haw et L. A. Lauener）T. Hong et J. J. Li 是直接或间接参与中国牡丹品种群起源的野生种之一，杂交是栽培牡丹品种的重要培育途径。但尚未见到 DNA 分子方面相关证据的报道。本研究以紫斑牡丹作母本（♀），分别以 3 个牡丹品种 '海棠争润'（*P. suffruticosa* 'Hai Tang Zheng Rong'）、'胭脂红'（*P. suffruticosa* 'Yan Zhi Hong'）和 '盛丹炉'（*P. suffruticosa* 'Sheng Dan Lu'）作父本（♂），进行人工杂交，获得了杂交后代。利用 DNA ISSR（Inter-simple sequence repeats，简单重复序列间隔区）标记技术构建的亲子代 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，因而在 DNA 水平上证实了花瓣基部带紫斑的栽培牡丹品种杂交起源的可能性。

关键词：紫斑牡丹；牡丹；杂交；ISSR 标记；品种鉴定
中图分类号：Q 943　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0253－2700(2005)01－0042－07

DNA Molecular Evidences of the Hybrids between *Paeonia rockii* and *P. suffruticosa* Based on ISSR Markers

SUO Zhi-Li[1]，ZHANG Hui-Jin[1]，ZHANG Zhi-Ming[1]，CHEN Fu-Fei[2]，CHEN Fu-Hui[2]
(1 *Institute of Botany*，*Chinese Academy of Sciences*，Beijing 100093，China；
2 *Peace Peony Garden*，Lanzhou 730101，China)

Abstract：*Paeonia rockii* is considered to be one of the main progenitors of Chinese tree peony cultivars，and hybridization is likely to be the most important way for incorporation of genetic composition of *P. rockii*. However，no molecular evidence has shown relatedness of woody peony cultivars to *P. rockii* so far. In this study，*P. rockii* was used as a maternal parent crossing with other three Chinese woody peony cultivars (*P. suffruticosa* 'Hai Tang Zheng Rong'，*P. suffruticosa* 'Yan Zhi Hong' and *P. suffruticosa* 'Sheng Dan Lu') as paternal parents. The relationships between the F_1 hybrids and their parents were analyzed using ISSR (Inter-simple sequence repeat) markers. Our results showed that ISSR fragments present in both parents were detected in the genomes of the F_1 generation. Therefore，it is possible that some Chinese woody peony cultivars with a large black-purple blotch at the lower part of petals originated through hybridization with *P. rockii* as a parent. Our results also suggest that ISSR markers are useful for identification of hybrids and classification of cultivars.

* 基金项目：中国科学院知识创新工程重要方向性项目（Kscx2-sw-108）和国家自然科学基金项目（30470177）资助
收稿日期：2004－06－25，2004－08－30 接受发表
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。E－mail：zlsuo@ns.ibcas.ac.cn

Key words：*Paeonia rockii*；*P. suffruticosa*；Hybridization；ISSR Marker；Cultivar identification

紫斑牡丹（*Paeonia rockii*（S. G. Haw et L. A. Lauener）T. Hong et J. J. Li）为芍药科（Paeoniaceae）芍药属（*Paeonia* L.）牡丹组（Section *Moutan* DC）落叶亚灌木（洪涛等，1992；洪德元和潘开玉，1999），据推测是中国西北紫斑牡丹品种群的原种，并参与了其它的中国牡丹品种群中花瓣基部具有紫斑的栽培牡丹品种的起源（王莲英，1997；李嘉珏，1999）。邹喻苹等（1999）利用 RAPD 标记分析后推测，紫斑牡丹、杨山牡丹（*P. ostii* T. Hong et J. X. Zhang）、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）等野生种可能都参与了中国栽培牡丹品种的起源。花粉形态特征也支持紫斑牡丹是起源中国牡丹栽培品种的主要野生种之一的观点（席以珍，1984；袁涛和王莲英，2002）。在 DNA 水平上对牡丹组野生种及品种的研究规模都比较小，虽然揭示了一些规律，但多数研究仍然限于实验条件及研究方法的探索阶段（裴颜龙等，1995；Hosoki 等，1997；邹喻苹等，1999；陈向明等，2001，2002）。1990 年以来，中国园艺学家开始将种源作为牡丹品种的一级分类标准（王莲英，1997；李嘉珏，1999），但是，即使在较新出版的牡丹专著（王莲英，1997；李嘉珏，1999）中，也缺乏杂交牡丹品种的亲本记载。然而，这对于理解牡丹品种的演化关系是重要的基本资料（李嘉珏，1999）。ISSR（Inter-simple sequence repeat）标记具有多态性高、稳定性较好的特点，近年来，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（Godwin 等，1997）。本文的目的在于，通过对紫斑牡丹（*P. rockii*）杂交组合的 ISSR 标记分析，（1）为紫斑牡丹参与中国栽培牡丹品种起源寻找 DNA 分子证据；（2）为牡丹的鉴定以及种和种下水平的分类及谱系关系的研究探索新的 DNA 分子标记技术。

1　材料与方法

1.1　供试材料及紫斑牡丹后代的获得

以中国科学院植物研究所北京植物园引自陕西省太白山自然保护区的 15 年生的紫斑牡丹（*P. rockii*）作母本（♀），分别以 12 年生的 3 个牡丹品种‘海棠争润’（*P. suffruticosa*‘Hai Tang Zheng Rong’）、‘胭脂红’（*P. suffruticosa*‘Yan Zhi Hong’）和‘盛丹炉’（*P. suffruticosa*‘Sheng Dan Lu’）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 F_1 代种子，随即播种育苗。翌年春季，采集亲本及其 F_1 代的叶片，用硅胶快速干燥后备用。供试材料如表 1。

1.2　DNA 提取与引物筛选

采用改进的 CTAB 法（Doyle and Doyle，1987；邹喻苹等，2001）从叶片中提取总 DNA，用 2.0 mol/L NaCl 除去多糖。从 70 个 ISSR 引物中筛选出能获得清晰条带、反应稳定的 4 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℃。在引物序列中，R＝A/G。

1.3　ISSR－PCR 扩增实验

ISSR-PCR 扩增在 T-personal 48 型 PCR 仪（Biometra(r)，made in Germany）上进行。25 μl PCR 反应体系中含 25 ng DNA 模板、10 mmol/L Tris-HCl（pH 8.3）、50 mmol/L KCl、2.0 mmol/L $MgCl_2$、1 mmol/L dNTP、0.2 μmol/L 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（TaKaRa Biotechnology（Dalian）Co.，

Ltd.)。PCR 程序为：94℃预变性 3 min；94℃变性 40 s，（在适合引物退火的温度下）退火 15 s，72℃延伸 1.5 min，38 个循环；最后，72℃延伸 8 min。PCR 产物用 2.0%琼脂糖（Promega 公司）凝胶在 1×TBE 缓冲液中在 3 V/cm 的电压下电泳 3.5 h，溴化乙锭（Ethidium bromide，EB）染色。用 BIO-RAD 公司的凝胶成像系统摄影。

1.4 数据分析

长度为 200～1 200 bp 范围内的 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，并生成各个体的 DNA 指纹图谱（省略单态带和亲子代三者的共有带后，如表 2 所示）。如编号为 IS01－885 的标记指利用 ISSR－01 引物 PCR 扩增产生的分子量为 885 bp 的 DNA 片段，作为一个 ISSR 标记，以此类推。

表 1 供试材料

Table 1 Materials used in the study

个体号 No. of plant	名称 Name	主要特征 Major characteristics	来源 Source
1	‘海棠争润’(♂) *P. suffruticosa* ‘Hai Tang Zheng Rong’	菊花型，浅红色 Chrysanthemum-like flower form，light red	山东省菏泽 Heze City，Shandong Province
2	紫斑牡丹（♀） *P. rockii*	单瓣型；花白色；花瓣基部具紫红色斑 Single-petal white flower with purplish red blotches at the lower part of petals.	陕西省太白山 Mt. Taibaishan，Shaanxi Province
3	紫斑牡丹×‘海棠争润’ *P. rockii* ×‘Hai Tang Zheng Rong’	幼苗 Seedling	人工杂交 Artificial cross
4	‘胭脂红’(♂) *P. suffruticosa* ‘Yan Zhi Hong’	千层台阁型；花洋红色，润泽 Pavilion-like flower form，carminated and sleek flower.	山东省菏泽 Heze City，Shandong Province
5	紫斑牡丹×‘胭脂红’ *P. rockii* ×‘Yan Zhi Hong’	幼苗 Seedling	人工杂交 Artificial cross
6	‘盛丹炉’(♂) *P. suffruticosa* ‘Sheng Dan Lu’	楼子台阁型；花粉红色带紫色 Pavilion-like flower form，purplish pink flower.	山东省菏泽 Heze City，Shandong Province
7	紫斑牡丹×‘盛丹炉’ *P. rockii* ×‘Sheng Dan Lu’	幼苗 Seedling	人工杂交 Artificial cross

2 结果与分析

2.1 ISSR-PCR 扩增结果

通常，利用 DNA 分子标记对亲子代关系的鉴定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）（段世华等，2002）。

在本研究中，4 个 ISSR 引物的扩增结果（图 1）以及获得的 ISSR 标记指纹图谱（表 2）显示：

在紫斑牡丹与‘海棠争润’的杂交组合中共检测到 53 个位点，其中双亲与子代三者的共有位点有 26 个（在表 2 中未显示），父本的单态位点有 2 个（位点编号：IS03－862 和 IS04－751，表 2 中未显示），母本的单态位点有 4 个（IS01－1010、IS01－605、IS01－560 和 IS03－605，表 2 中未显示）；子代与父本共有的位点有 7 个（编号分别为：IS01－585、IS01－545、IS03－1150、IS04－940、IS04－910、IS05－841 和 IS05－641），在母本不具有但父本具有的 10 个位点中占 70%；子代与母本紫斑牡丹共有的位点有 7 个（编号分别为：IS01－360、IS03－772、IS04－766、IS05－920、IS05－778、IS05－673 和 IS05－574），在父本不具有但母本具有的 11 个位点中占 63.6%；在子代中出现了 3 个新位点（IS03－663、IS04－710 和 IS04－612，表 2 中未显示）。

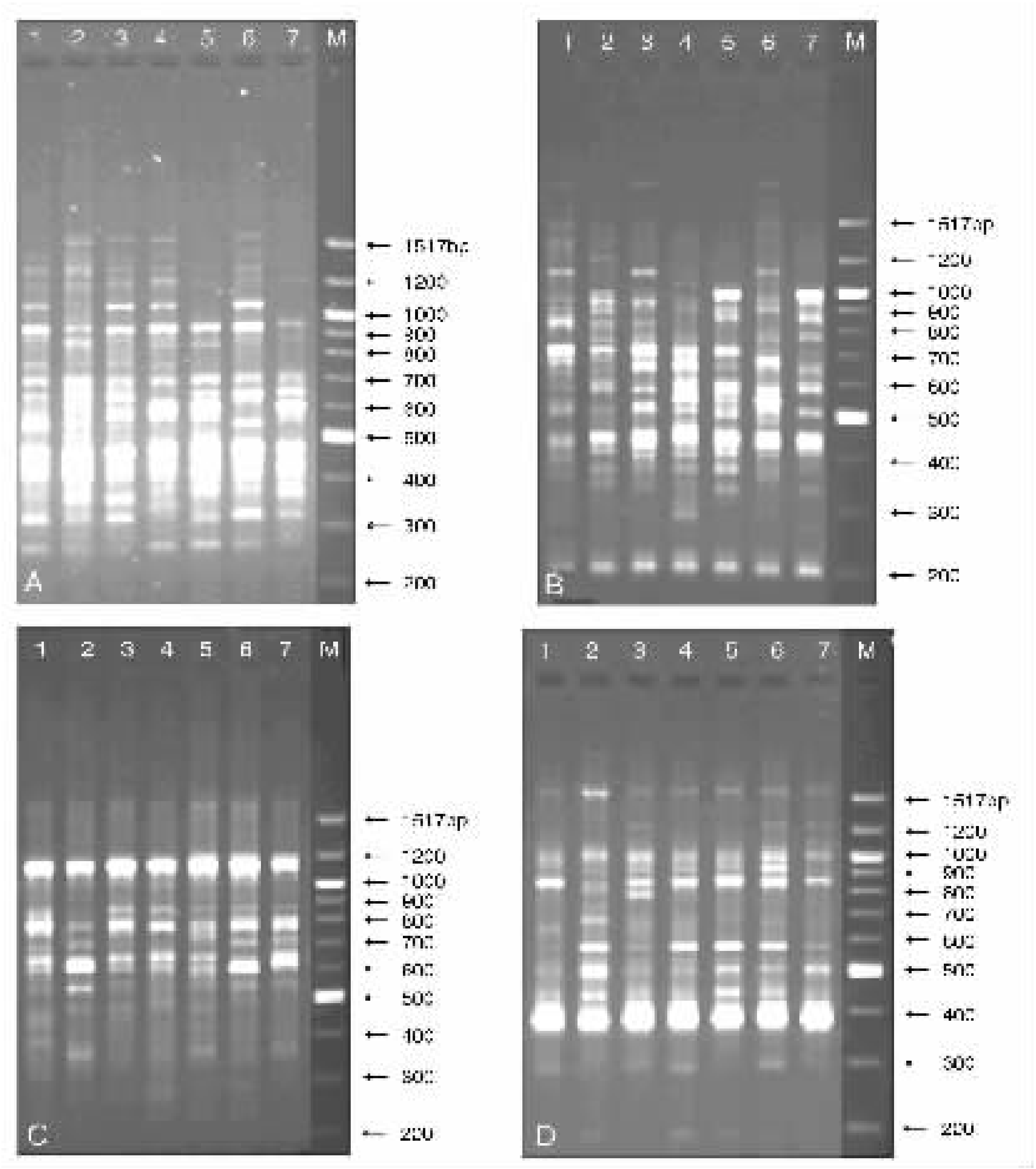

图 1　杂交后代及其亲本的 DNA ISSR 标记电泳结果

A：ISSR－01 引物；B：ISSR－03 引物；C：ISSR－04 引物；D：ISSR－05 引物

图中样品号（泳道号）分别为：1＝‘海棠争润’（♂）；2＝紫斑牡丹（♀）；3＝紫斑牡丹×‘海棠争润’(F_1 代)；4＝‘胭脂红’（♂）；5＝紫斑牡丹×‘胭脂红’(F_1 代)；6＝‘盛丹炉’（♂）；7＝紫斑牡丹×‘盛丹炉’(F_1 代)。M 为 100 bp Ladder DNA 分子量标准。

Fig. 1　DNA amplification patterns of the samples of the cross combinations by ISSR primers

A：ISSR－01 primer；B：ISSR－03 primer；C：ISSR－04 primer；D：ISSR－05 primer.

Sample numbers shown in the photos are as follows，1 = *P. suffruticosa*‘Hai Tang Zheng Rong’（♂）；2 = *P. rockii*（♀）；3 = *P. rockii* ×‘Hai Tang Zheng Rong’（F_1 hybrid）；4 = *P. suffruticosa*‘Yan Zhi Hong’；5 = *P. rockii* ×‘Yan Zhi Hong’（F_1 hybrid）；6 = *P. suffruticosa*‘Sheng Dan Lu’（♂）；7 = *P. rockii* ×‘Sheng Dan Lu’（F_1 hybrid）. M is 100 bp Ladder DNA size marker.

表 2 利用 4 个 ISSR 引物获得的杂交后代及其亲本的 DNA 指纹图谱的比较

Table 2 Comparison of DNA fingerprints of the hybrids and their parents based on ISSR-PCR by 4 primers

标记编号 Marker code	‘海棠争润’ ‘Hai Tang Zheng Rong’ (♂)	紫斑牡丹 *P. rockii* (♀)	紫斑牡丹×‘海棠争润’ *P. rockii* ×‘Hai Tang Zheng Rong’	‘胭脂红’ ‘Yan Zhi Hong’ (♂)	紫斑牡丹×‘胭脂红’ *P. rockii* × ‘Yan Zhi Hong’	‘盛丹炉’ ‘Sheng Dan Lu’ (♂)	紫斑牡丹×‘盛丹炉’ *P. rockii* × ‘Sheng Dan Lu’
IS01 – 885		—					—
IS01 – 865				—	—		
IS01 – 645		—			—		
IS01 – 605		—					—
IS01 – 585	—		—				
IS01 – 545	—		—				
IS01 – 380				—	—	—	—
IS01 – 360		—	—				
IS01 – 325		—			—		
IS03 – 1150	—		—				
IS03 – 1080				—	—	—	—
IS03 – 1020		—			—		—
IS03 – 820		—			—		
IS03 – 780						—	—
IS03 – 772		—	—				
IS03 – 726		—					—
IS03 – 645		—					—
IS03 – 605		—					—
IS03 – 560				—	—		
IS04 – 940	—		—	—	—	—	—
IS04 – 910	—		—	—	—	—	—
IS04 – 766		—	—				
IS04 – 710				—	—		
IS04 – 650		—					—
IS04 – 612				—	—	—	—
IS05 – 920		—	—				
IS05 – 841	—		—	—	—	—	—
IS05 – 778		—	—				
IS05 – 673		—	—				
IS05 – 641	—		—				
IS05 – 574		—	—				

注：各编号的 ISSR 标记为显示杂交组合亲子代关系的明显分子证据的位点。单态带以及各杂交组合中亲子代三者的共有带均已省略。

Notes: the ISSR marker codes are locus showing clearly molecular evidences for identification of the hybrids, with the omission of single bands and the bands shared among the three individuals of each cross.

在紫斑牡丹与‘胭脂红’的杂交组合中共检测到 56 个位点，其中双亲与子代三者的共有位点有 23 个（表 2 中未显示），父本的单态位点有 5 个（位点编号：IS01 – 339、IS03 – 1150、IS03 – 780、IS03 – 663 和 IS04 – 751，表 2 中未显示），母本的单态位点有 10 个（IS01 – 1010、IS01 – 885、IS01 – 560、IS01 – 360、IS03 – 772、IS03 – 685、IS03 – 645、IS05 – 815、IS05 – 778 和 IS05 – 673，表 2 中未显示），子代与父本的共有位点有 9 个（编号分别为：IS01 – 865、IS01 – 380、IS03 – 1080、IS03 – 560、IS04 – 940、IS04 – 910、IS04 – 710、IS04 – 612 和 IS05 – 841）；在母本不具有而父本具有的 14 个位点中占 64.3%；子代与母本

（紫斑牡丹）的共有位点有 4 个（编号分别为：IS01－645、IS01－325、IS03－1020 和 IS05－820），在父本不具有而母本具有的 14 个位点中占 28.6%；在子代中出现了 2 个新位点（IS03－862 和 IS04－792，表 2 中未显示）。在紫斑牡丹与'盛丹炉'的杂交组合中共检测到 51 个位点，其中双亲与子代三者的共有位点 21 个（表 2 中未显示），父本的单态位点 2 个（位点编号：IS03－1150 和 IS03－560，表 2 中未显示），母本的单态位点 8 个（IS01－1010、IS01－766、IS01－360、IS03－820、IS03－772、IS05－815、IS05－778 和 IS05－673，表 2 中未显示）；子代与父本的共有位点 7 个（编号为：IS01－380、IS03－1080、IS03－780、IS04－940、IS04－910、IS04－612 和 IS05－841），在母本不具有但父本具有的 9 个位点中占 77.8%；子代与母本（紫斑牡丹）的共有位点 7 个（IS01－855、IS01－605、IS03－1020、IS03－726、IS03－645、IS03－605 和 IS04－650），在父本不具有但母本具有的 15 个位点中占 46.7%；在子代中出现了 2 个新位点（IS03－862 和 IS04－710）。因此，本研究结果表明这些后代确实是牡丹与紫斑牡丹杂交产生的杂种，从而在 DNA 分子水平上证实存在由紫斑牡丹向栽培牡丹品种群遗传渗入的途径。

3　讨论与结论

牡丹组植物均为虫媒传粉植物（Zhou 等，1990；罗毅波等，1998）。传统上从自然杂交而来的众多优良实生苗中选择花型和花色方面有特色的植株作为品种，进行大量无性繁殖和推广，有时也采取人工辅助混合花粉授粉的方法来创造新的类型。牡丹是中国重要的花卉植物，对品种起源的忽视严重地阻碍了对中国牡丹种质资源的利用（李嘉珏，1999）。本研究结果在 DNA 水平上支持以往根据形态特征研究结果提出的推测：即紫斑牡丹是参与中国栽培牡丹品种起源的主要野生种之一（王莲英，1997；李嘉珏，1999；袁涛和王莲英，2003），同时也表明 DNA ISSR 指纹技术在牡丹的种间和种下水平的区分比较有效，可以用于杂交后代的鉴定、品种的苗期快速鉴定以及品种间遗传关系的分析。

〔参　考　文　献〕

王莲英，1997. 中国牡丹品种图志（中国花卉协会牡丹芍药分会）[M]. 北京：中国林业出版社，8：16

李嘉珏，1999. 中国牡丹与芍药 [M]. 北京：中国林业出版社，59—62

邹喻苹，葛颂，王晓东，2001. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京：科学出版社，9—25

Chen XM（陈向明），Zheng GS（郑国生），Meng L（孟丽），2002. RAPD-PCR analysis of genetic diversity of different color 35 tree *Paeonia* cultivars [J]. *Sci Agric Sin*（中国农业科学），**35**：546—551

Chen XM（陈向明），Zheng GS（郑国生），Zhang SW（张圣旺），2001. RAPD analysis of tree peony cultivars [J]. *Acta Hort Sin*（园艺学报），**28**（4）：370—372

Duan SH（段世华），Man JN（毛加宁），Zhu YC（朱英国），2002. Genetic analysis and identification of hybrid rice HL-type（Honglian-2）and their backbone parental with RAPD markers [J]. *J Wuhan Bot Res*（武汉植物学研究），**20**（3）：171—178

Hong DY（洪德元），Pan KY（潘开玉），1999. Taxonomical history and revision of the *Paeonia* sect. *Moutan*（Paeoniaceae）[J]. *Acta Phytotax Sin*（植物分类学报），**37**（4）：351—368

Hong T（洪涛），Zhang JX（张家勋），Li JJ（李嘉珏），*et al*，1992. Study on the Chinese wild woody peonies.（Ⅰ）new taxa of *Paeonia* L. sect. *Moutan* DC [J]. *Bull Bot Res*（植物研究），**12**（3）：223—234

Luo YB（罗毅波），Pei YL（裴颜龙），Pan KY（潘开玉），*et al*，1998. A study on pollination biology of *Paeonia suffruticosa* subsp. *spontanea*（Paeoniaceae）[J]. *Acta Phytotax Sin*（植物分类学报），**36**（2）：134—144

Pei YL（裴颜龙），Zou YP（邹喻苹），Yin Z（尹蓁），*et al*，1995. Preliminary report of RAPD analysis in *Paeonia suffruticosa* Subsp. *spontanea* and *Paeonia rockii* [J]. *Acta Phytotax Sin*（植物分类学报），**33**（4）：350—356

Xi YZ（席以珍），1984. The pollen morphology and exine ultrastructure of *Paeonia* L. in China [J]. *Acta Bot Sin*（植物学报），**26**：241—246

Yuan T（袁涛），Wang LY（王莲英），2002. Discussion on the origination of Chinese tree-peony cultivars according to pollen grain morphology [J]. *J Beijing Forest Univ*（北京林业大学学报），**24**：5—11

Yuan T（袁涛），Wang LY（王莲英），2003. Morphological studies on *Paeonia* sect. *Moutan* subsect. *Vaginatae* in China [J]. *Acta Hort Sin*（园艺学报），**30**（2）：187—191

Zou YP（邹喻苹），Cai ML（蔡美琳），Wang ZP（王子平），1999. Systematic studies on *Paeonia* sect. *Moutan* DC. based on RAPD analysis [J]. *Acta Phytotax Sin*（植物分类学报），**37**：220—227

Doyle JJ，Doyle JL，1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*，**19**：11—15

Godwin ID，Aitken EAB，Smith LW，1997. Application of inter simple sequence repeat（ISSR）markers to plant genetics [J]. *Electrophoresis*，**18**：1524—1528

Hosoki T，Kimura D，Hasegawa R，*et al*，1997. Comparative study of tree peony（*Paeonia suffruticosa* Andr.）cultivars and hybrids by random amplified polymorphic DNA（RAPD）analysis [J]. *J Japan Soc Hort Sci*，**66**（2）：393—400

Zhou SL（周世良），Hong DY（洪德元），Pan KY（潘开玉），1990. Pollination biology of *Paeonia jishanensis*（Paeoniaceae），with special emphasis on pollen and stigma biology [J]. *Bot J Linn So*，**130**：43—52