

牡丹栽培品种的 RAPD 分析

陈向明¹ 郑国生^{2,*} 张圣旺²

(¹ 合肥教育学院, 合肥 230001; ² 山东农业大学生命科学学院, 泰安 271018)

摘要: 对 7 种花色系的 35 个牡丹栽培品种进行 RAPD 分析, 34 个随机引物共扩增出 418 个位点, 其中 337 个 (80.62%) 多态位点表明受试品种间丰富的遗传多态性。同一花色的不同品种间和不同花色系间都存在较大的遗传多态性, 不同花色系间多态性位点频率大小依次排序为蓝色系 > 黄色系 > 深红色系 > 黑色系 > 白色系 > 绿色系 > 红色系; 利用 UPGMA 软件进行聚类分析, 35 个品种被分为 5 个遗传聚类组, 除红色系外, 其它 6 种花色与遗传聚类组的划分无必然相关性。

关键词: 牡丹; 品种; 基因组; 遗传多样性; RAPD

中图分类号: S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2001) 04-0370-03

1 目的、材料与方法

有关牡丹的研究多集中在形态学、栽培学和细胞学方面^[1,2], 品种的随机扩增 DNA 多样性分析亦有报道^[3]。本研究选用 7 种花色系 35 个牡丹栽培品种进行 RAPD 分析, 试材分别来自山东菏泽牡丹园和安徽宁国牡丹园, 序号及品种名见图 1, 其中 1~5 为黑色品种, 6~10 为黄色, 11~15 为兰色, 16~20 为深红色, 21~25 为绿色, 26~30 为白色, 31~35 为红色。每品种选取 5~10 个单株的嫩叶剪碎混合。DNA 提取参照 Racder 的方法, UV-120 紫外分光光度计检测 DNA 浓度, DNA 样品溶于 100 μL TE 溶液, -20 保存备用。从 Operon 公司产的 220 组 10 个寡聚核苷酸随机引物中筛选出扩增谱带数多且清晰的 34 个引物用于全基因组遗传多样性分析 (表 1)。PCR 的反应体系为 20 μL , 含 Tris-HCl 10 mmol \cdot L⁻¹ (pH 8.3), KCl 50 mmol L⁻¹, MgCl₂ 2 mmol L⁻¹, dNTP 100 μmol L⁻¹, TaqDNA 聚合酶 (Promega 公司生产) 1.5 单位, 引物 0.2 μmol L⁻¹ 及模板 DNA 20 ng。反应混合物用 20 μL 石蜡油覆盖。扩增反应在 PTC-100 型 PCR 仪上进行, 94 30 s, 36 40 s, 72 1 min, 45 个循环, 72 5 min。扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶 (含溴化乙锭 0.5 μg mL⁻¹) 上 70 V 下电泳分离 4 h, 紫外灯下观察、照相。每引物对 35 个品种重复扩增 3 次, 每次扩增均有 1 个泳道不加模板 DNA 为对照。扩增谱带按有 (1)、无 (0) 记录, 计算任意两样品间的遗传距离。利用 UPGMA 软件进行聚类分析并构建系统树。

2 结果与分析

2.1 RAPD 分析

34 个随机引物对供试 35 个品种共扩增出 418 个位点, 平均每个引物扩增出 11.94 个位点, 变幅为 8~22, 其中多态性位点 337 个 (80.62%), 表明供试牡丹栽培品种间存在丰富的遗传多态性 (表 1)。

——RAPD 分析表明同一色系不同品种间存在很大差异, 但不同花色系间差异程度不同,

收稿日期: 2000-12-22; 修回日期: 2001-05-22

基金项目: 山东省良种产业化工程项目

*通讯作者

以扩增多态性位点频率为标准，其顺序依次为蓝色系 > 黄色系 > 深红色系 > 黑色系 > 白色系 > 绿色系 > 红色系（表 2）。表明同一花色系的不同品种可能具有多种不同的起源，其多态性位点的差异从 DNA 分子水平上反映了亲缘关系的远近。例如，蓝色系内 5 个品种间亲缘关系较远，而红色系内 5 个品种间亲缘关系相对较近。

表 1 34 个引物的碱基序列及其对 35 个牡丹品种的扩增结果

Table 1 34 primers and their amplification on 35 tree peony cultivars

引物 Primers	碱基顺序 5'→3' Nucleotide sequences 5'→3'	扩增位点总数 Total sites amplified	多态性位点数 Polymorphic sites
S5	TGC GCCCTTC	16	13
S7	GGT GACG CAG	12	9
S8	GTC CACACGG	9	7
S10	AGGGG ICTTG	11	8
S25	GAAACGGGTG	12	10
S27	GTGATCGCAG	11	9
S30	GTGATCGCAG	8	6
S34	TCTGTGCTGG	13	10
S36	AGCCAGCGAA	10	8
S37	GACCGCTTGT	11	8
S43	CCTGCCGTCA	10	7
S44	TCTGGTGAGG	10	8
S45	TGAGCGGACA	13	11
S46	ACCTGAACGG	13	11
S75	GACGGATCAG	8	6
S84	AGCGTGICTG	12	9
S85	CTGAGACGGA	17	14
S86	GTGCCTAACC	12	10
S88	TCACGTCCAC	13	11
S90	AGGCGCGICT	16	14
S92	CAGCTCACGA	8	7
S96	AGCGTCCTCC	11	9
S97	AGCGTGICTG	18	15
S98	GGCTCATGTG	11	8
S103	AGACGTCCAC	22	19
S104	GGAA GTCGCC	10	9
S107	CTGCATCGTG	18	16
S109	TGTAGCTGGG	9	6
S124	GGTGATCAGG	15	12
S127	CCGATATCCC	17	15
S129	CCAA GCTTCC	10	7
S132	ACGGTAC CAG	13	10
S133	GGCTGCAGAA	10	9
S147	AGATGCAGCC	9	7
Total		418	337

2.2 聚类分析

根据品种间的遗传距离，以 15 为阈值，将 35 个品种划分为 5 个遗传聚类组，组 5 个品种，均为红色花系，组 9 个品种，来自 3 个花色系，组 5 个品种，来自 3 个花色系，组 15 个品种，来自 4 个花色系，组仅有黑色花系的 1 个品种（图 2）。同一聚类组内的品种间具有相对较近的亲缘关系，而不同聚类组间亲缘关系相对较远。因而 V 组的青龙卧墨池与其它 34 个品种亲缘关系较远，而 5 个红色品种均属聚类组 I，说明它们亲缘关系较近。但除红色系外的 6 种花色系 30 个品种分属不同类别。因而，遗传聚类组的划分与不同花色无必然的相关性，同一花色系的不同品种可能具有不同的起源。其中黄色、蓝色、深红色 3 个色系的不同品种在各个遗传聚类组间的随机分布大于其它 4 个花色系，从分子水平上反映了其基因组间的遗传多样性和亲缘关系。

表 2 7 种花色牡丹品种基因组遗传多样性比较

Table 2 Comparison of genomic diversity between 7 flower color series of tree peony cultivars

花 色 系 Flower color series	扩增位 点 数 Total sites amplified	多态性位 点 数 Polymorphic sites	多态性位点 Percentages of polymorphic sites (%)
黑色 Black	203	98.60	48.56
黄色 Yellow	246	144.64	58.85
蓝色 Blue	249	146.91	59.57
深红色 Deep red	228	125.42	54.55
绿色 Green	164	63.96	39.23
白色 White	171	70.11	40.91
红色 Red	132	42.24	31.58



图1 引物 S98 对不同花色系 35 个牡丹品种扩增的全基因组 DNA 指纹图谱

1 青龙卧墨池 2 冠世墨玉 3 黑花葵 4 种生黑 5 烟笼紫 6 姚黄 7 甘草黄 8 金阁 9 黄花葵 10 御衣黄
11 蓝绣球 12 紫蓝葵 13 菱花沾露 14 垂头蓝 15 蓝田玉 16 四旋 17 紫二乔 18 云芳 19 轻罗 20 紫葵
21 豆绿 22 绿香球 23 绿幕 24 荷花绿 25 娇容三变 26 昆山夜光 27 白玉 28 赛雪塔 29 仙鹤卧雪
30 玉楼 31 大胡红 32 十八号 33 珊瑚台 34 赵粉 35 西施 M 为分子量标准

Fig. 1 The genomic fingerprints of 35 tree peony cultivars with different flower color amplified with primer S98

1 Qinglongwomochi 2 Guanshimoyu 3 Heihuakui 4 Zhongshenghei 5 Yanlongzi 6 Yaohuang 7 Gancaohuang 8 Jing
9 Huanghuakui 10 Yuyihuang 11 Lanxiuqiu 12 Zilankui 13 Linghuazhanlu 14 Chuitoulan 15 Lantianyu 16 Sixuan
17 Zi'erqiao 18 Yunfang 19 Qingluo 20 Zikui 21 Doulu 22 Lixiangqiu 23 Lünü 24 Hehualü 25 Jiaorongsanbian
26 Kunshanyeguang 27 Baiyu 28 Saixueta 29 Xianhewoxue 30 Yulou 31 Dahuhong 32 Shibahao 33 Shanhutai
34 Zhaofen 35 Xishi M was the molecular weight marker

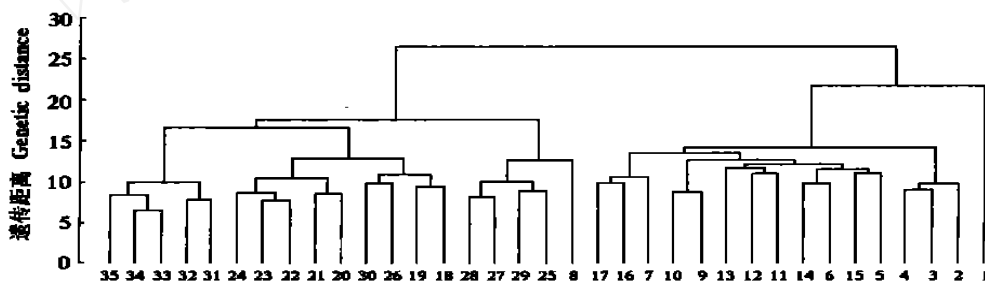


图2 牡丹 7 个花色 35 个品种 RAPD 聚类树状图

(品种编号名称见图 1)

Fig. 2 The dendrogram of RAPD in 35 tree peony cultivars with 7 flower color

(See Fig. 1 for variety name)

参考文献:

- 1 于玲, 何丽霞. 牡丹野生种间蛋白质谱带的比较研究. 园艺学报, 1998, 25 (1): 99~101
- 2 于玲, 何丽霞. 甘肃紫斑牡丹与中原牡丹类染色体的比较研究. 园艺学报, 1997, 24 (1): 79~83
- 3 裴颜龙, 邹喻苹, 尹 蓁, 等. 矮牡丹与紫斑牡丹 RAPD 分析初报. 植物分类学报, 1995, 33 (4): 350~356

RAPD Analysis of Tree Peony Cultivars

Chen Xiangming¹, Zheng Guosheng², and Zhang Shengwang²

(¹Hefei Education College, Hefei 230001; ²Life Science College, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018)

Abstract: The genomic diversity of thirty-five tree peony cultivars of 7 different flower color were analysed by RAPD. The results showed that 337 (80.62%) polymorphic sites were detected among the total 418 sites amplified indicating abundant genomic diversity of tree peony cultivars. Similar results were also revealed between accessions within the same flower color series, but significant differences were observed between different flower color series in the order as Blue series > Yellow > Dark red > Black > White > Green > Red ones based upon the percentage of the polymorphic sites. The genetic distance and genetic relationships of the accessions were constructed through unweighted paired group method with arithmetic averages cluster analysis, all accessions were grouped into 5 genetic types, no significant correlation between flower color series and genetic types were detected except Red flower series.

Key words: Tree peony cultivar; Genome; Genetic diversity; RAPD