

DOI: 10.13332/j.1000-1522.20150349

利用荧光标记 SSR 绘制中国芍药品种分子身份证

张 嘉¹ 刘爱青² 张淑玲³ 解莹然¹ 刘 燕¹

(1 花卉种质创新与分子育种北京市重点实验室,国家花卉工程技术研究中心,城乡生态环境北京实验室,北京林业大学园林学院
2 菏泽市曹州牡丹园管理处 3 洛阳国际牡丹园)

摘要:为了开发芍药品种分子鉴定方法,本研究采用 SSR 标记技术,在目前芍药 SSR 引物开发较少的情况下,采用文献相关引物 84 对,并结合自行设计的 27 对引物,将 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶与四重荧光毛细管电泳技术相结合,从 111 对引物中筛选出 29 对扩增稳定、多态性高的核心引物;共检测到 223 个 SSR 等位位点,平均每对引物为 7.69 个,有效等位基因数 (N_e) 为 3.658 ± 0.328 , Shannon 多样性指数 (I) 为 1.371 ± 0.104 ,观测杂合度 (H_o) 为 0.532 ± 0.045 ,期望杂合度 (H_e) 为 0.645 ± 0.036 ,多态性信息含量 PIC 值介于 0.20 ~ 0.84,平均 0.60。基于最少引物鉴定最多种质的原则,按照 PIC 值由高到低顺序串联排序的方式,最终筛选出 4 对 SSR 引物 (Pmg153、Knu73、Pmg209、J38)。结果表明:筛选出的 4 对 SSR 引物组合可以有效鉴定 66 个芍药品种;采用个位数字和大写英文字母结合对不同带型进行编码,成功绘制了 66 个中国传统芍药品种的分子身份证。本研究为芍药品种鉴定提供了一种快速、准确与高效的分子检测方法,也有助于中国传统芍药品种的遗传改良与芍药新品种保护。

关键词:芍药; SSR 荧光标记; 分子身份证; 品种鉴定

中图分类号:S682.1⁺2 文献标志码:A 文章编号:1000-1522(2016)06-0101-09

ZHANG Jia¹; LIU Ai-qing²; ZHANG Shu-ling³; XIE Ying-ran¹; LIU Yan¹. **Using the SSR with fluorescent labeling to establish SSR molecular ID code for cultivars of the Chinese herbaceous peony.** *Journal of Beijing Forestry University* (2016)**38**(6) 101-109 [Ch,20 ref.]

- 1 Beijing Key Laboratory of Ornamental Plants Germplasm Innovation & Molecular Breeding, National Engineering Research Center for Floriculture, Beijing Laboratory of Urban and Rural Ecological Environment, College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing, 100083, China;
2 Management Office of Caozhou Paeonia Garden in Heze, Heze, Shandong, 274000, China;
3 Luoyang International Peony Garden, Luoyang, Henan, 471000, China.

Herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) is a perennial herbaceous plant which belongs to Sect. *Paeonia* in family Paeoniaceae. It is a traditional flower with 3000-year history and has hundreds of cultivars in China. However, it is difficult to distinguish cultivars accurately only by the traditional morphological identification method. Establishing the multi-level molecular identification techniques can improve the accuracy of cultivar identification. In order to develop a molecular identification method, we used the SSR technique to establish the molecular ID code of 66 cultivars of Chinese traditional herbaceous peony. In this research, 111 pairs of SSR primers with 84 from literatures and 27 self-designed, were labeled with 6% none-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis and quadruple fluorescence capillary electrophoresis. Then 29 pairs of primers with high polymorphism and good repeatability were selected. The results showed that 223 polymorphic alleles were revealed by the 29 primer pairs, with an average of 7.69 alleles per pair. The effective number of alleles (N_e) was 3.658 ± 0.328 , Shannon diversity index (I) was 1.371 ± 0.104 , observed heterozygosity (H_o) was $0.532 \pm$

收稿日期: 2015-09-22 修回日期: 2015-12-24
基金项目: 北京市科委计划项目 (D161100001916004)。
第一作者: 张嘉。主要研究方向: 园林植物资源与育种。Email: jzbjfu@163.com 地址: 100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学园林学院。
责任作者: 刘燕, 教授, 博士生导师。主要研究方向: 园林植物资源与育种。Email: chbly@sohu.com 地址: 同上。
本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

0.045, expected heterozygosity (H_e) was 0.645 ± 0.036 , and the range of PIC at 29 SSR loci of 66 cultivars was 0.20–0.84, 0.60 on average. Based on the principle of distinguishing the most varieties using the minimum pairs of primers, 4 pairs of primers (Pmg153, Knu73, Pmg209, J38) were selected out. This study indicates that the 4 pairs of primers can identify the 66 varieties of Chinese traditional herbaceous peony and can successfully establish 66 molecular ID codes by different single digits and uppercase letters. It not only provides a rapid, accurate and efficient molecular identification method for herbaceous peony cultivars, but also contributes to genetic improvement of cultivars of Chinese traditional herbaceous peony and is significant for protection of the new varieties.

Key words herbaceous peony; fluorescent labeled SSR marker; molecular identity; cultivar identification

芍药 (*Paeonia lactiflora* Pall.) 为芍药科 (Paeoniaceae) 芍药属 (*Paeonia*) 芍药组 (Sect. *Paeonia*) 多年生草本植物,在我国有 3 000 多年的栽培历史。芍药品种繁多,仅靠传统的形态鉴别法难以准确区分,因此,建立从形态到分子的多层次品种鉴定技术,提高品种识别的准确性,对于品种资源的保存、开发、利用和知识产权保护均具有重要意义。

随着分子标记技术的发展,SSR 标记因其扩增稳定、重复性好、操作简便、易于推广,已被国际植物品种权保护联盟 (UPOV) 生物化学和分子技术工作组认定为植物新品种保护最广泛应用的标记体系^[1]。目前,利用 SSR 标记技术构建分子身份证的园林植物仅有菊花 (*Chrysanthemum × morifolium*)^[2]、百合^[3–4] (*Lilium regale*)、月季 (*Rosa chinensis*)^[5]、欧美芍药 (*Paeonia lactiflora*)^[6]、桂花 (*Osmanthus fragrans*)^[7] 和白蜡 (*Fraxinus chinensis*)^[8]。

近年来在芍药中也开发了一批稳定性好的 SSR 标记^[6,9–12],但仅季丽静等^[6,12]利用 15 对引物绘制了从欧美地区引进的 61 份观赏芍药新种质分子身份证。关于中国芍药品种分子身份证的构建尚未见相关报道。

本研究利用多重毛细管检测技术与 SSR 相结合,克服传统聚丙烯酰胺凝胶电泳检测效率偏低、难以准确读取片段大小且不能对大规模不同批次品种的 DNA 指纹鉴定数据进行有效整合的缺点,绘制了 66 份芍药品种的分子身份证,为芍药品种鉴定提供了一种快速、准确和高效的检测方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为栽培历史悠久的中国芍药品种共 66 个 (表 1),于 2014—2015 年花期分别采自山东菏泽曹州牡丹园和洛阳国际牡丹园。每个品种随机选取 3 株,取上部幼嫩单叶 3~4 片,混合后用锡箔纸

包好,置于冰盒带回北京林业大学国家花卉工程技术研究中心实验室,液氮冷冻后放置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

1.2 SSR 引物合成

为筛选出适用引物,在目前芍药 SSR 引物开发较少的情况下,采用了文献^[6,9–12]相关引物 84 对,又自行设计了 27 对,组成初筛的 111 对引物。所有引物均由上海生工生物工程公司合成,HAP 纯化。

从 111 对引物中筛选出扩增条带清晰、稳定、多态性高的 29 对引物 (表 2) 用于样品的扩增,并进行荧光标记,每 4 对为一组,共 8 组。每组 4 对正向引物分别由 6-FAM (蓝)、HEX (黄)、TAMRA (黑色) 和 ROX (红) 4 种荧光基团进行生物素标记,由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。

1.3 DNA 提取与检测

采用试剂盒法 (天根,DP320) 提取芍药叶片基因组 DNA。所提取的 DNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并用紫外分光光度法确定其浓度和纯度,稀释至 $25\sim30\text{ ng}/\mu\text{L}$ 后至于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 SSR-PCR 反应体系和扩增程序

PCR 反应在 $10\text{ }\mu\text{L}$ 体系中进行: $5\text{ }\mu\text{L}$ $2\times\text{ Taq}$ MasterMix, $0.5\text{ }\mu\text{L}$ Forward Primer, $0.5\text{ }\mu\text{L}$ Reverse Primer, $1\text{ }\mu\text{L}$ Template DNA, $3\text{ }\mu\text{L}$ RNASE-Free Water。PCR 扩增在 ABI VERITY 梯度 PCR 仪上进行。扩增程序为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 5 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 30 s , Ta 退火温度 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 30 s , 35 个循环, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.5 SSR 引物筛选

选用‘天山红星’、‘粉玉奴’、‘晴雯’、‘大富贵’、‘紫凤朝阳’、‘巧玲’6 个形态差异较大的芍药品种基因组 DNA,采用温度梯度 PCR 对上述引物进行初步筛选。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,得到 77 对可用于进一步筛选的引物及其合适的退火温度。

表 1 66 个中国芍药品种					
Tab.1 Sixty-six cultivars of the Chinese herbaceous peony					
编号 Code	品种 Cultivar	编号 Code	品种 Cultivar	编号 Code	品种 Cultivar
1	‘美人面’ ‘Meirenmian’	23	‘金带围’ ‘Jindaiwei’	45	‘红茶花’ ‘Hongchahua’
2	‘红盘金球’ ‘Hongpanjinqiu’	24	‘红艳飞霜’ ‘Hongyanfeishuang’	46	‘湖光山色’ ‘Huguangshanse’
3	‘白玉盘’ ‘Baiyupan’	25	‘天山红星’ ‘Tianshanhongxing’	47	‘紫檀镶玉’ ‘Zitanxiangyu’
4	‘粉玉奴’ ‘Fenyunu’	26	‘紫凤朝阳’ ‘Zifengchaoyang’	48	‘多叶紫’ ‘Duoyezi’
5	‘银红皱’ ‘Yinhongzhou’	27	‘银龙含珠’ ‘Yinlonghanzhu’	49	‘银龙探海’ ‘Yinlongtanhai’
6	‘紫莲望月’ ‘Zilianwangyue’	28	‘紫雁飞霜’ ‘Ziyanfeishuang’	50	‘黑海波涛’ ‘Heihaibotao’
7	‘粉荷’ ‘Fenhe’	29	‘粉盘藏珠’ ‘Fenpancangzhu’	51	‘蝶恋花’ ‘Dielianhua’
8	‘冰青’ ‘Bingqing’	30	‘粉珠盘’ ‘Fenzhupan’	52	‘金簪刺玉’ ‘Jinzanciyu’
9	‘纱巾贯顶’ ‘Shajingguanding’	31	‘红峰’ ‘Hongfeng’	53	‘巧玲’ ‘Qiaoling’
10	‘桃花飞雪’ ‘Taohuafeixue’	32	‘铁杆紫’ ‘Tieganzi’	54	‘粉银针’ ‘Fenyinzhen’
11	‘粉妆园’ ‘Fenzhuangyuan’	33	‘杨妃出浴’ ‘Yangfeichuyu’	55	‘紫凤羽’ ‘Zifengyu’
12	‘墨紫含金’ ‘Mozihanjin’	34	‘五花龙玉’ ‘Wuhualongyu’	56	‘春晓’ ‘Chunxiao’
13	‘朱砂判’ ‘Zhushapan’	35	‘英雄花’ ‘Yingxionghua’	57	‘莲台’ ‘Liantai’
14	‘艳阳天’ ‘Yanyangtian’	36	‘红云迎日’ ‘Hongyunyingri’	58	‘盘托绒花’ ‘Pantuoronghua’
15	‘紫光霞配’ ‘Ziguangxiapei’	37	‘黄金轮’ ‘Huangjinlun’	59	‘奇花露霜’ ‘Qihualushuang’
16	‘贵妃插翠’ ‘Guifeichacui’	38	‘晴雯’ ‘Qingwen’	60	‘紫芙蓉’ ‘Zifurong’
17	‘鱼鳞红’ ‘Yulinhong’	39	‘大富贵’ ‘Dafugui’	61	‘红凤换羽’ ‘Hongfenghuanyu’
18	‘永生红’ ‘Yongshenghong’	40	‘枣红’ ‘Zaohong’	62	‘粉球’ ‘Fenqiu’
19	‘银线绣红袍’ ‘Yinxianxiuhongpao’	41	‘珠光’ ‘Zhuguang’	63	‘圆叶锦球’ ‘Yuanyejinqiu’
20	‘紫绒系金’ ‘Zirongxijin’	42	‘玫瑰飘香’ ‘Meiguipiaoxiang’	64	‘黑绣球’ ‘Heixiuqiu’
21	‘紫袍金带’ ‘Zipaojindai’	43	‘艳紫向阳’ ‘Yanzixiangyang’	65	‘平顶红’ ‘Pingdinghong’
22	‘雪山紫玉’ ‘Xueshanziyu’	44	‘竹叶红’ ‘Zhuyehong’	66	‘紫绫’ ‘Ziling’

表 2 29 对荧光标记引物信息			
Tab.2 Information of 29 pairs of SSR primers			
序号 No.	引物 Primers	引物序列 Primer sequence(5'-3')	重复基序 Repeat motifs
1	C9	F:AAGAAAATAACCACAGCCTAAGA R:TAGGTTGATTACTTGAACACCAC	(CA) ₉ AA(CA) ₃
2	C10	F:TAAGTTATTTTGACAACCTGAGCAT R:GAACCATCATTCCTAACCTACACAT	(CT) ₁₁
3	C15	F:AAAACAAATCAAGAAGCAAAGGAAC R:GAGGTGAAGGGATAACCCCATAT	(CA) ₁₆
4	C19	F:AGATGACCCATTTCACCCTAA R:AAAGCAAGCAGCTAACTCGA	(TC) ₁₄
5	C26	F:TAGCCATCCCACTGACTTTCC R:CCATAAGGGTGATGATGCTTG	(AC) ₁₂ AG(AC) ₂ G (CA) ₁₀
6	C27	F:AATTACCAAATCATGGGCAAAA R:AATCAACCTCCAGAAGAAACAAAA	(CT) ₂₁
7	J4	F:GCTATACCTTGATAATCAACATTCAACC R:ATTGTAAGTTTTTGAACTTTTCCTCTAA	(AC) ₉
8	J5	F:TGAGTCATTGTCATGTATTCTAAGCAAG R:TTAGAGCAGTGATAAGGTCTCTATTCTAAGG	(CT) ₂₂
9	J12	F:GTCGTAAGACAACCTGGGGTAAATCG R:TGTGGGTCTACTCGTAATCCTATCAT	(GA) ₁₃ GG(GA) ₂
10	J16	F:AGGAAACCCCTTACATTAATAGATATCATAC R:TCAGACCTTCATTTGCATAACAAA	(GT) ₂₂ (TG) ₁₆ (AG) ₁₇

表 2(续)

序号 No.	引物 Primers	引物序列 Primer sequence(5'-3')	重复基序 Repeat motifs
11	J18	F:CTGCCCCAACAGGCCATCT	(TG) ₁₃
		R:GCTTTAACACCAGCCCAATCTAA	
12	J24	F:AGAGTTGAGAATAAGCGTAAGAGTCAG	(TG) ₈
		R:TCAGGAATTTTAGTAGAAATAAACACACA	
13	J28	F:ATCTAAGGATGAGATTGAGATGAACAA	(AC) ₁₀
		R:GGAGGTAGTGAGAAATGTATTTACAA	
14	J29	F:TATTGTCTGATTTGGCACATAAGTTG	(CA) ₇
		R:CACCATAAGGGTGATGATCGTG	
15	J30	F:CAAGAGTAACCAAGGAAATGGATGT	(CT) ₁₄
		R:CTTGGCTTTGCTCGAAGCAC	
16	J36	F:GGAAAGGAGAAAGAGGACACTCA	(AC) ₂₀ (TA) ₉
		R:CACATCGGGATTGTTAGCG	
17	J38	F:GTGCTTAATTGCTTGACAACAGAT	(TC) ₂₀ GCG(CA) ₉
		R:GGAAAAGGGAAGATAAATAGGAACA	
18	J47	F:TCTACAGACATCCAATAGCCTAAACA	(GA) ₁₄
		R:TTCAAGATCTGGAGGTTTGTATGTG	
19	knu21	F:TCCCCTAAGCTTTGTTC	(CT) ₁₃ , (GA) ₁₀
		R:CTGTTACAGAGTTCTCCCAAGAG	
20	knu39	F:CAAGGCATGCATCACTCTC	(GA) ₁₅
		R:TGATTTGTCCGGTAAAAATGTG	
21	knu73	F:CCATCGACAGGACATACATT	(TG) ₂₀
		R:TGCTGAGCGGTAGAGAA	
22	knu116	F:TGGCCAAGAGTAATTATGTGTTT	(CT) ₃₁
		R:GGTGGGTGAGAGAAAAGG	
23	knu124	F:GTGGCATGGATCATTTGG	(TG) ₇ , (TG) ₅
		R:TCATCCCATGAAGTCAATAAAA	
24	knu136	F:TTGGGAAGGGAAAAACAAA	(GTT) ₅
		R:TTGAACTGTGGGTCTCGG	
25	Pmg164	F:CCCTACTTTCTCCCTCCTGCTC	(AG) ₉
		R:TTGTATTATCTTTGTGCCCCAT	
26	Pmg153	F:CATTTACTCCTTCGCATTCAAC	(TC) ₁₄
		R:TAActCCAGATGGGTATTTTGT	
27	Pmg209	F:TCTCCAACCCTTGAATAGCTCA	(GA) ₁₉
		R:CCTTCCCTATCTCCTCCTCCAC	
28	Pmg180	F:TTCTCCAACCCTTGAATAGCTC	(GA) ₁₉
		R:TCTCCTCCTCCACCATTACCAC	
29	P20	F:CTGAGAAGCACTATGTTTCAT	(TC) ₉ (CA) ₆
		R:ACACCAAAACCATTTACACA	

增加‘春晓’、‘莲台’、‘奇花露霜’、‘粉池金鱼’、‘粉珠盘’、‘粉盘藏珠’6 份形态差异小的芍药品种后,共计 12 个芍药品种,经 PCR 后对上述初筛出的 77 对引物进行复筛。PCR 产物采用 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,300 V 稳压 2.0 ~ 3.0 h。银染显色^[13]并拍照记录。将得到的谱带按 0、1 读取,选取能跑出清晰易读、重复性高的条带的引物进行 5'生物素荧光修饰。

1.6 毛细管电泳检测

利用复筛获得的 29 对荧光引物对 66 个品种进行扩增,PCR 产物送北京睿博兴科生物技术有限公司进行毛细管电泳检测,用 GeneMarker 对电泳结果

进行片段大小及基因分型分析^[14]。

1.7 数据统计分析

用 Microsatellite Toolkit 分析等位基因数和多态性信息含量 (Polymorphism Information Content, PIC)^[15]。

$$PIC = 1 - \sum_{j=1}^i P_{ij}^2$$

式中: P_{ij} 表示位点 i 的第 j 个等位变异出现的频率,反映每个 SSR 位点的多态性水平。

利用 GenAlEx 6.41 分析遗传多样性参数。

1.8 分子身份证构建

按照引物多样性指数的高低顺序,选择引物组

合。根据每对引物对不同品种扩增片段对应的分子量大小,按从小到大依次编码为1~9;如果条带数超过9条则依次增加A~Z进行编码;0表示该泳道由于基因片段丢失而无带的零等位基因。

2 结果与分析

2.1 引物筛选结果

毛细管电泳结果显示:29对引物在66个中国芍药品种中共扩增出374条带,且均具有多态条带,多态位点百分率达100%;各引物的PIC值变幅为0.20~0.84,平均为0.60;各引物多态条带为3~29,平均每对引物能扩增12.9条多态性片段,扩增片段长95~407(表3)。

29对SSR引物共检测到223个SSR等位位点,

平均每对引物为7.69个,有效等位基因数(N_e)为 3.658 ± 0.328 ,Shannon多样性指数(I)为 1.371 ± 0.104 ,观测杂合度(H_o)为 0.532 ± 0.045 ,期望杂合度(H_e)为 0.645 ± 0.036 (表4)。由于采用四重荧光毛细管电泳技术^[16],可以完成对4对引物扩增条带的同时检测,检测的效率得以显著提高。图1为引物P20在‘粉玉奴’、‘英雄花’、‘紫绒系金’、‘粉珠盘’、‘冰青’和‘奇花露霜’间的扩增带型。

2.2 构建品种分子身份证

由于中国芍药品种属二倍体,因此每个SSR位点均由2个相同(纯合体)或不同的(杂合体)等位基因组成^[17]。引物的等位基因数、基因型数越多,PIC值越高,能区分品种的能力也越强,在构建分子身份证中价值也越高^[8, 18]。基于最少引物鉴定最

表3 29对荧光标记引物对66份中国芍药品种的扩增结果
Tab.3 Amplified results of 66 cultivars of the Chinese herbaceous peony on 29 pairs of SSR primers

组号 Group number	引物 Primers	多态性信息含量 Polymorphism information content	5'端标记荧光 Fluorescent labelled	退火温度 Annealing temperature/℃	扩增带型 Size of bands	扩增片段大小 Size of bands amplified/bp
1	P20	0.72	6-FAM	53.4	15	95~109
	Knu21	0.72	HEX	59.8	16	263~279
	knu136	0.22	TAMRA	55	4	216~228
	J24	0.39	ROX	58.4	4	403~407
2	J47	0.41	6-FAM	58.8	5	114~124
	J30	0.77	HEX	59.3	20	194~224
	J29	0.53	TAMRA	58.7	11	232~268
	C10	0.78	ROX	57.1	18	330~360
3	J36	0.64	6-FAM	67	11	269~289
	Knu73	0.84	HEX	58.6	25	227~283
	Knu39	0.71	TAMRA	55.9	14	269~285
	C19	0.56	ROX	55.8	8	379~393
4	J18	0.46	6-FAM	59.1	7	153~165
	Knu124	0.20	HEX	54.8	4	289~293
	Pmg164	0.23	TAMRA	56	3	348~350
	C26	0.81	ROX	65	21	378~404
5	Pmg180	0.76	6-FAM	60.1	22	179~203
	J12	0.71	HEX	58.2	15	245~261
	J16	0.75	TAMRA	56.5	10	289~389
	J28	0.51	ROX	58.2	5	326~334
6	Knu116	0.54	6-FAM	57.2	7	145~159
	J5	0.31	HEX	55.4	3	212~216
	C9	0.62	ROX	56.2	12	387~405
7	Pmg209	0.83	6-FAM	67	29	187~213
	J38	0.79	HEX	57	20	237~267
	Pmg153	0.84	TAMRA	57.4	25	354~406
8	C15	0.75	6-FAM	61.8	18	187~203
	J4	0.32	TAMRA	61.7	4	271~275
	C27	0.76	ROX	57.9	18	365~395
总计 Sum					374	
平均 Mean		0.60			12.9	

表 4 66 个芍药品种在 29 个 SSR 位点上检测到的遗传多样性
Tab.4 Genetic diversity of 66 cultivars of the Chinese herbaceous peony revealed by 29 SSR primers

引物 Primers	平均等位基因数 Average number of alleles	有效等位基因数 Effective number of alleles	Shannon 多样性指数 Shannon diversity index	观测杂合度 Observed heterozygosity	期望杂合度 Expected heterozygosity
Pmg153	12.000	7.147	2.127	0.879	0.860
Knu73	14.000	7.054	2.181	0.515	0.858
Pmg209	13.000	6.655	2.200	0.667	0.850
J38	10.000	5.516	1.856	0.569	0.819
C26	12.000	5.839	1.990	0.652	0.829
C10	9.000	5.278	1.765	0.719	0.811
Pmg180	12.000	4.656	1.879	0.606	0.785
J30	12.000	4.959	1.789	0.646	0.798
C27	11.000	4.694	1.861	0.250	0.787
J16	10.000	4.504	1.710	0.277	0.778
C15	10.000	4.427	1.760	0.879	0.774
Knu21	9.000	4.037	1.643	0.697	0.752
P20	8.000	3.969	1.591	0.864	0.748
J12	8.000	3.870	1.593	0.379	0.742
C9	8.000	3.018	1.383	0.612	0.669
J36	8.000	3.024	1.468	0.092	0.669
J28	7.000	2.422	1.055	0.970	0.587
Knu39	7.000	3.984	1.530	0.697	0.749
J29	7.000	2.501	1.140	0.576	0.600
J18	4.000	2.276	0.917	0.727	0.561
C19	6.000	2.637	1.134	0.123	0.621
J24	3.000	2.029	0.732	0.500	0.507
Knu116	4.000	2.569	1.045	0.652	0.611
Knu124	3.000	1.280	0.437	0.182	0.219
J47	4.000	1.834	0.849	0.477	0.455
k136	4.000	1.315	0.456	0.273	0.239
J4	3.000	1.639	0.628	0.212	0.390
P164	2.000	1.365	0.438	0.258	0.268
J5	3.000	1.577	0.601	0.470	0.366
平均值 Mean	7.690	3.658	1.371	0.532	0.645
方差 SE	0.659	0.328	0.104	0.045	0.036

多种质的原则^[19], 仅用 4 对引物组合 (Pmg153、Knu73、Pmg209 和 J38) 可将 66 份品种完全区分, 扩增带型见表 5。其中, 引物 P153 的多态位点数达 12 个, 单独使用即可将‘杨妃出浴’、‘英雄花’、‘晴雯’等 11 个品种进行区分。根据每个 SSR 位点扩增到的等位基因多少依次编号为 0~9, 如果超过 9 时则赋值为 A~Z, 形成带型编号(表 5)。将每对引物在样品上扩增的带型编号进行串联排列, 得到 66 份芍药品种的分子身份证代码(表 6)。其中, 对应位置上代码相同, 表示该引物在样品上扩增带型相同。

3 讨 论

本研究最终用于分子身份证构建的 29 对引物中, 23 对源自文献, 自行合成 6 对, 共检测到 223 个

SSR 等位位点, 平均每对引物对品种扩增的等位位点 7.69 个, PIC 值介于 0.20~0.84, 平均 0.60。通过 SSR 标记技术, 结合 Microsatellite Toolkit 和 GenAIEx 6.41 进行数据处理, 根据引物的多样性指数高低先后选择引物组合, 最终用 4 对引物进行种质区分, 构建了 66 个芍药品种的有效分子身份证。其中引物 P153 的扩增效率最高, 可以独立区分 11 个品种。此外, SSR 引物的多态性信息含量与所用材料的遗传背景有关。如季丽静^[6]利用 J5 区分 89 份芍药属材料, PIC 值为 0.562, 而本实验中 PIC 值仅为 0.31。

SSR 扩增产物的检测方法主要有聚丙烯酰胺凝胶电泳检测技术 (PAGE) 和荧光标记分析技术 2 种^[20]。PAGE 检测成本低, 但无法精确读取扩增片段大小且对人体有害, 对于大规模数据收集和分析

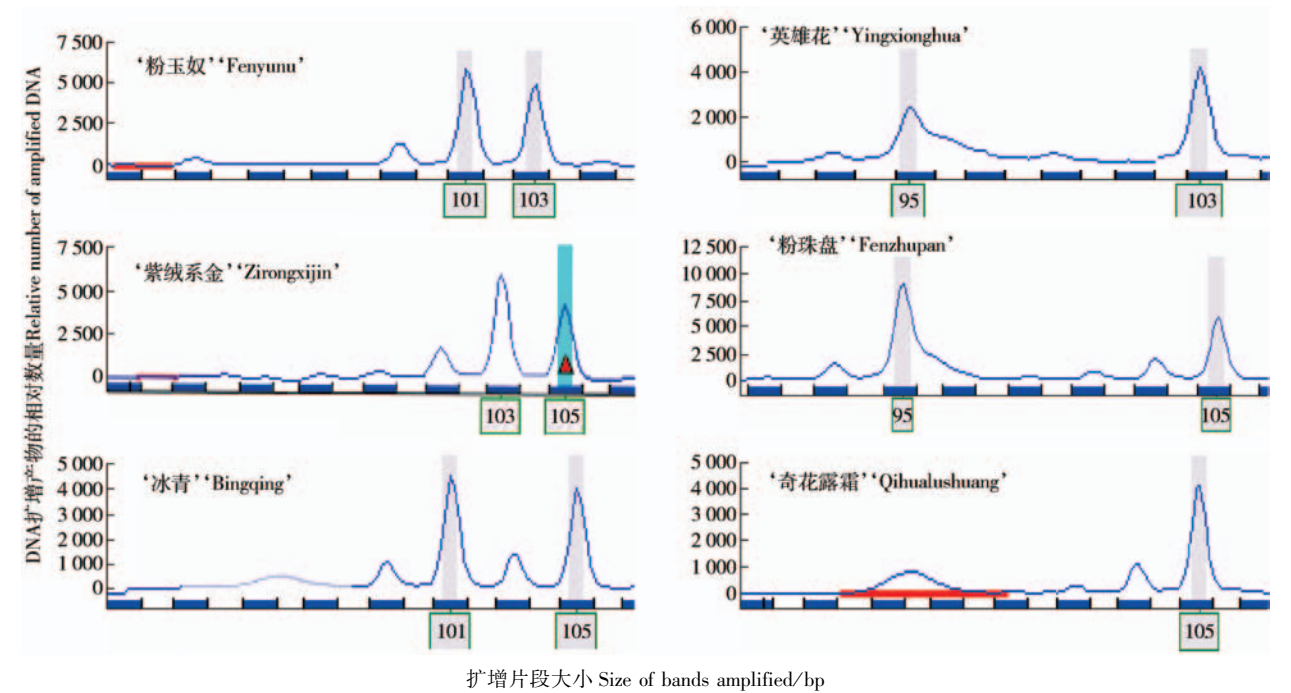


图 1 引物 P20 在不同芍药品种间扩增产物的带型

Fig.1 Amplification bands between different genotypes of *Paeonia lactiflora* using primer P20

表 5 4 对引物的扩增带型编号

Tab.5 The code of 4 pairs of SSR primers

引物 Primer					带型编号				
Pmg153	Knu73	Pmg209	J38	Code of pattern	Pmg153	Knu73	Pmg209	J38	Code of pattern
—	—	—	—	0	368/394	257/281	191/197	249/265	F
354/354	227/227	187/187	237/237	1	384/386	259/259	191/201	253/253	G
354/366	227/231	187/189	237/239	2	384/406	259/267	191/203	261/265	H
354/368	227/233	187/211	237/247	3	388/390	259/277	191/207	263/263	I
354/386	227/259	189/189	237/249	4	388/394	263/263	197/199	265/265	J
354/390	231/231	189/191	237/263	5	390/392	265/277	199/199	267/267	K
354/394	231/259	189/195	237/265	6	390/394	265/281	199/201		L
366/366	231/281	189/197	239/239	7	390/396	265/283	201/201		M
366/368	233/233	189/199	239/247	8	392/394	277/277	203/205		N
366/388	233/259	189/201	239/249	9	394/396		205/207		O
366/390	233/265	189/205	239/265	A	404/406		207/207		P
366/394	233/267	189/207	247/247	B			209/211		Q
368/368	233/279	189/211	247/263	C			211/213		R
368/388	257/265	189/213	247/265	D			213/213		S
368/390	257/277	191/191	249/263	E					

注：—表示未获得扩增带型；空格代表可扩充带型。Notes：— means non-amplified SSR pattern；blank space means extensible pattern.

效率低,工作量大,而 SSR 荧光标记能区分 1 bp 以上的数据,灵敏性高,容易检测出非目标扩增产物,且价格昂贵。本研究将 PAGE 检测和 SSR 荧光标记相结合,先通过 PAGE 检测初步确定具有多态性的引物和其扩增的目的片段范围,进而通过 SSR 荧光标记准确读取目的片段大小,节约了成本,提高了检测效率。

构建分子身份证的方法有 3 种^[4],本研究采用数字与字母相结合的方式,直接将引物扩增的条带按照顺序对其进行编码,理论上每对引物最多可以编码 36 (10 个个位数和 26 个小写字母) 种带型。本研究选取了多态性较好的 29 对引物,其中 PIC 值高于平均值的有 17 对,可以区分 17³⁶个芍药品种。研究选取的芍药品种包含了所有花色和花型,经过

表 6 66 个中国芍药品种分子身份证代码
Tab.6 Molecular identity code of 66 cultivars of the Chinese herbaceous peony

编号 Code	品种 Cultivar	分子身份证代码 Molecular identity code	编号 Code	品种 Cultivar	分子身份证代码 Molecular identity code
1	‘美人面’ ‘Meirenbian’	C8SB	34	‘五花龙玉’ ‘Wuhualongyu’	2LIA
2	‘红盘金球’ ‘Hongpanjinqiu’	N84F	35	‘英雄花’ ‘Yingxionghua’	IK7J
3	‘白玉盘’ ‘Baiyupan’	2522	36	‘红云迎日’ ‘Hongyunyingri’	2NJ7
4	‘粉玉奴’ ‘Fenyunu’	38Q7	37	‘黄金轮’ ‘Huangjinlun’	H2H1
5	‘银红皱’ ‘Yinhongzhou’	4E80	38	‘晴雯’ ‘Qingwen’	B5NJ
6	‘紫莲望月’ ‘Zilianwangyue’	O191	39	‘大富贵’ ‘Dafugui’	771J
7	‘粉荷’ ‘Fenhe’	D8E2	40	‘枣红’ ‘Zaohong’	N1G3
8	‘冰青’ ‘Bingqing’	C8N8	41	‘珠光’ ‘Zhuguang’	OK7J
9	‘纱巾贯顶’ ‘Shajinguanding’	95I7	42	‘玫瑰飘香’ ‘Meiguipiaoxiang’	8G6D
10	‘桃花飞雪’ ‘Taohuafeixue’	FDQD	43	‘艳紫向阳’ ‘Yanzixiangyang’	7K67
11	‘粉妆园’ ‘Fenzhuangyuan’	8F48	44	‘竹叶红’ ‘Zhuyehong’	63LH
12	‘墨紫含金’ ‘Mozihanjin’	58E6	45	‘红茶花’ ‘Hongchahua’	JLBJ
13	‘朱砂判’ ‘Zhushapan’	55FI	46	‘湖光山色’ ‘Huguangshanse’	N5OJ
14	‘艳阳天’ ‘Yanyangtian’	25E2	47	‘紫檀镶玉’ ‘Zitanxiangyu’	25E2
15	‘紫光霞配’ ‘Ziguangxiapei’	F6IC	48	‘多叶紫’ ‘Duoyezi’	I854
16	‘贵妃插翠’ ‘Guifeichacui’	8GIA	49	‘银龙探海’ ‘Yinlongtanhai’	56I6
17	‘鱼鳞红’ ‘Yulinhong’	5K4E	50	‘黑海波涛’ ‘Heihaiботao’	6BE7
18	‘永生红’ ‘Yongshenghong’	FDAD	51	‘蝶恋花’ ‘Dielianhua’	FHID
19	‘银线绣红袍’ ‘Yinxianxiuhongpao’	C8SB	52	‘金簪刺玉’ ‘Jinzanciyu’	I842
20	‘紫绒系金’ ‘Zirongxijin’	FDAC	53	‘巧玲’ ‘Qiaoling’	I815
21	‘紫袍金带’ ‘Zipaojindai’	4LEI	54	‘粉银针’ ‘Fenyinzen’	1IKA
22	‘雪山紫玉’ ‘Xueshanziyu’	P3M3	55	‘紫凤羽’ ‘Zifengyu’	65E2
23	‘金带围’ ‘Jindaiwei’	FCPD	56	‘春晓’ ‘Chunxiao’	CGN9
24	‘红艳飞霜’ ‘Hongyanfeishuang’	N1E6	57	‘莲台’ ‘Liantai’	GJ5G
25	‘天山红星’ ‘Tianshanhongxing’	N1ND	58	‘盘托绒花’ ‘Pantuoronghua’	6AC7
26	‘紫凤朝阳’ ‘Zifengchaoyang’	N837	59	‘奇花露霜’ ‘Qihualushuang’	EH43
27	‘银龙含珠’ ‘Yinlonghanzhu’	AFE5	60	‘紫芙蓉’ ‘Zifurong’	N8D7
28	‘紫雁飞霜’ ‘Ziyanfeishuang’	28F1	61	‘红风换羽’ ‘Hongfenghuanyu’	N8DI
29	‘粉盘藏珠’ ‘Fenpancangzhu’	C4NB	62	‘粉球’ ‘Fenqiu’	86I8
30	‘粉珠盘’ ‘Fenzhupan’	C3L3	63	‘圆叶锦球’ ‘Yuanyejinqiu’	JFIJ
31	‘红峰’ ‘Hongfeng’	55E5	64	‘黑绣球’ ‘Heixiuqiu’	N1G5
32	‘铁杆紫’ ‘Tieganzi’	61G3	65	‘平顶红’ ‘Pingdinghong’	MBRJ
33	‘杨妃出浴’ ‘Yangfeichuyu’	KM4K	66	‘紫绫’ ‘Ziling’	E943

反复验证构建的分子身份证可以应用到品种鉴别中。

建立分子身份证对于保护品种知识产权、维护生产者和育种者权利以及种质资源的管理均有重要意义。随着更多的品种被收集以及新品种(系)的不断推出,研究拟在初步建立的 66 份芍药品种分子身份证基础上,通过增加检测 SSR 位点的数量,增

强品种鉴别度和鉴定的可靠性,以期建立一个较为完善的芍药品种分子身份证数据库。

参 考 文 献

[1] 滕海涛,吕波,赵久然,等. 利用 DNA 指纹图谱辅助植物新品种保护的可能性[J]. 生物技术通报, 2009(1): 1-6.
TENG H B, LÜ B, ZHAO J R, et al. DNA fingerprint profile involved in plant variety protection practice [J]. Biotechnology Bulletin, 2009(1): 1-6.

[2] 张轶. 基于三种标记的中国传统菊花品种鉴定及分类研究 [D]. 北京:北京林业大学, 2014.

ZHANG Y. Studies on the identification and classification of Chinese traditional chrysanthemum cultivars based on three types of markers [D]. Beijing:Beijing Forestry University, 2014.

[3] 葛亮. 基于转录组信息的百合 SSR 标记开发及种质分子鉴定研究 [D]. 北京:中国农业科学院, 2012.

GE L. Development of SSR markers based on transcriptome and their application in germplasm identification of *Lilium* [D]. Beijing:Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012.

[4] 徐雷锋. 利用荧光标记 SSR 构建百合种质资源分子身份证 [J]. 园艺学报, 2014, 41(10): 2055-2064.

XU L F. Using the fluorescent labeled SSR markers to establish molecular identity of Lily germplasms [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2014, 41(10): 2055-2064.

[5] 黄平,崔鹏娇,郑勇奇,等. 基于 SSR 标记月季品种鉴定及遗传关系分析 [J]. 林业科学, 2012, 48(10): 55-62.

HUANG P, CUI P J, ZHENG Y Q, et al. SSR-Based molecular identification and analysis of genetic relationships among *Rose* varieties [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2012, 48(10): 55-62.

[6] 季丽静. 观赏芍药部分新种质 SSR 遗传多样性分析及 DNA 指纹图谱构建 [D]. 北京:北京林业大学, 2013.

JI L J. Study of genetic diversity on partial new germplasm of *Paeonia* and establishment of DNA fingerprint by SSR markers [D]. Beijing:Beijing Forestry University, 2013.

[7] 段一凡,王贤荣,梁丽丽,等. 桂花品种 SSR 荧光指纹图谱的构建 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2014, 38(增刊): 1-6.

DUAN Y F, WANG X R, LIANG L L, et al. Fingerprinting and identification of *Osmanthus fragrans* cultivars using fluorescence-labeled SSR markers [J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2014, 38(Suppl.): 1-6.

[8] 胡春龙,张晨,刘翠兰,等. 基于 SSR 标记构建白蜡种质资源分子身份证 [J]. 山东农业科学, 2015, 47(5): 6-9, 22.

HU C L, ZHANG C, LIU C L, et al. Establishment of molecular ID for *Fraxinus germplasms* based on SSR markers [J]. Shandong Agricultural Sciences, 2015, 47(5): 6-9, 22.

[9] CHENG Y, KIM C, SHIN D, et al. Development of simple sequence repeat (SSR) markers to study diversity in the herbaceous peony (*Paeonia lactiflora*) [J]. Journal of Medicinal Plants Research, 2011, 5(31): 6744-6751.

[10] SUN J, YUAN J, WANG B, et al. Development and characterization of 10 microsatellite loci in *Paeonia lactiflora* (Paeoniaceae) [J]. American Journal of Botany, 2011, 98(9): 242-243.

[11] LI L, CHENG F, ZHANG Q. Microsatellite markers for the Chinese herbaceous peony *Paeonia lactiflora* (Paeoniaceae) [J]. American Journal of Botany, 2011, 98(2): 16-18.

[12] 张建军,季丽静,刘仲赫,等. 引进观赏芍药新种质的 SSR 指纹图谱构建 [J]. 东北林业大学学报, 2015, 43(3): 70-74.

ZHANG J J, JI L J, LIU Z H, et al. Constructing SSR fingerprinting for introduced new germplasm of *Paeonia* L. [J]. Journal of Northeast Forestry University, 2015, 43(3): 70-74.

[13] 李建武,李宁. SSR 标记变性聚丙烯酰胺凝胶快速银染方法的建立 [J]. 中国马铃薯, 2015, 29(3): 136-140.

LI J W, LI N. Establishment of rapid silver-stained method of denaturing polyacrylamide gel of microsatellite markers [J]. Chinese Potato Journal, 2015, 29(3): 136-140.

[14] 王蕊,田红丽,王凤格,等. 玉米 DNA 指纹鉴定中两种 SSR 数据分析软件 GeneMapper 和 GeneMarker 的应用比较 [J/OL]. 分子植物育种(网络版), 2012, 10: 1171-1178.

WANG R, TIAN H L, WANG F G, et al. The application comparison of two SSR data analysis softwares GeneMapper and GeneMarker used in the identification of *Maize* variety [J/OL]. Fenzi Zhiwu Yuzhong(Online), 2012, 10: 1171-1178.

[15] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. [J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314-331.

[16] 程本义,夏俊辉,龚俊义,等. SSR 荧光标记毛细管电泳检测法在水稻 DNA 指纹鉴定中的应用 [J]. 中国水稻科学, 2011, 25(6): 672-676.

CHENG B Y, XIA J H, GONG J Y, et al. Application of capillary electrophoresis detection with fluorescent SSR markers in rice DNA fingerprint identification [J]. Chinese Journal Rice Science, 2011, 26(6): 672-676.

[17] 张靖国,田瑞,陈启亮,等. 基于 SSR 标记的梨栽培品种分子身份证的构建 [J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(1): 12-17.

ZHANG J G, TIAN R, CHEN Q L, et al. Establishment of molecular ID for *Pyrus* based on SSR markers [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2014, 33(1): 12-17.

[18] 高源,田路明,刘凤之,等. 利用 SSR 荧光标记构建 92 个梨品种指纹图谱 [J]. 园艺学报, 2012, 39(8): 1437-1446.

GAO Y, TIAN L M, LIU F Z, et al. Using the SSR fluorescent labeling to establish SSR fingerprints for 92 cultivars in *Pyrus* [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2012, 39(8): 1437-1446.

[19] 邱杨,李锡香,李清霞,等. 利用 SSR 标记构建萝卜种质资源分子身份证 [J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(3): 648-654.

QIU Y, LI X X, LI Q X, et al. Establishment of the molecular identification for radish germplasm using SSR markers [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2014, 15(3): 648-654.

[20] 麻丽颖,孔德仓,刘华波,等. 36 份枣品种 SSR 指纹图谱的构建 [J]. 园艺学报, 2012, 39(4): 647-654.

MA L Y, KONG D C, LIU H B, et al. Construction of SSR fingerprint on 36 Chinese Jujube cultivars [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2012, 39(4): 647-654.

(责任编辑 冯秀兰
责任编辑 张德强)