

芍药属植物分子水平遗传多样性研究进展

于晓南 季丽静 王琪

(北京林业大学园林学院,国家花卉工程技术中心)

摘要: 芍药属植物种质资源丰富,种及品种繁多,具有重要的观赏价值和药用价值。从分子水平上系统论述了芍药属中种质资源较为丰富的牡丹组与芍药组的遗传多样性研究进展,认为:种源不同是造成芍药属遗传差异的最主要因素;在种源一致的前提下,其遗传多样性与部分形态特征尤其是花色、花型、株高存在很大的相关性。所有分子标记技术与DNA序列分析所得的研究结果差异很大,但可以肯定的是:基于形态学分类将牡丹组划分为2个亚组是完全合理的;研究者大多“重牡丹而轻芍药”,使得在分子水平上对芍药组植物遗传多样性的研究还是不够深入。今后须综合利用多种遗传标记及序列分析手段,加快芍药属全基因组序列的开发与各种新型标记方法的探索应用。同时,对芍药属植物遗传多样性研究趋势进行了展望,以期为该属植物的资源保护与利用提供科学借鉴。

关键词: 芍药属;分子标记;遗传多样性

中图分类号: S682.1⁺2 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2012)03-0130-07

YU Xiao-nan; JI Li-jing; WANG Qi. **Research advances in molecular genetic diversity of *Paeonia* L.** *Journal of Beijing Forestry University* (2012) 34(3) 130-136 [Ch, 75 ref.] College of Landscape Architecture, National Engineering Research Center for Floriculture, Beijing Forestry University, 100083, P. R. China.

Germplasm resources are rich and the species and the varieties are wide in *Paeonia* L., which is of important ornamental and medicinal value. This paper systematically discusses the research advances in genetic diversity of *Paeonia* Sect. *Moutan* DC and Sect. *Paeonia*, which contain relatively rich germplasm resources from the level of DNA molecular. It was suggested that different provenances were the main factor contributing to the genetic differences in *Paeonia*; genetic diversity had a great correlation with flower color, flower type and plant height only on the premise of consistent provenance. All the research results were widely different by molecular markers and DNA sequence analysis, but it could be sure that dividing Sect. *Moutan* into two subsections was perfectly reasonable; most researchers paid more attention to *P. suffruticosa* than to *P. lactiflora*, as a result, research activities on genetic diversity in Sect. *Paeonia* were still not deep-going enough. Henceforth, we must utilize comprehensively various genetic markers and sequence analysis to accelerate the development of whole genome sequences in *Paeonia*, and further the exploration and application of all kinds of new marker methods. Meantime, the advance research direction of genetic diversity in *Paeonia* was presented, which will undoubtedly provide scientific references and information on the conservation and utilization of *Paeonia* resources.

Key words *Paeonia* L.; molecular marker; genetic diversity

芍药属(*Paeonia* L.) 共分为3个组,即牡丹组(Sect. *Moutan*)、芍药组(Sect. *Paeonia*)和北美芍药组(Sect. *Onaepia*)^[1],该属包括大约35个野生种。牡丹组所有种皆为我国特有^[2],根据最新的分类研究成果^[2-3],可将牡丹组分为9个种,广泛分布于我国云南、西藏、陕西、安徽等地。芍药组是芍药属中分布范围最广、种类最多的组,包括22个种,分布从

亚洲温带最东部的日本至欧洲最西部的葡萄牙和非洲西北部的摩洛哥,向南至我国云南的宁南,北缘进入北极圈。北美芍药组仅包括两个种,全部分布于北美西部^[4]。我国是芍药属植物的自然分布中心和多样化中心,其悠久的栽培历史极大丰富了芍药属种质资源;但由于其遗传背景复杂、亲缘关系模糊、品种混淆等问题^[5],使得育种工作受到了

收稿日期: 2011-11-28

基金项目: “948”国家林业局引进项目(2012-4-59)。

第一作者: 于晓南, 博士, 副教授。主要研究方向: 园林植物。电话: 010-82371556-8048 Email: yuxiaonan626@126.com 地址: 100083 北京市清华东路35号北京林业大学园林学院。

本刊网址: <http://journal.bjfu.edu.cn>

很大限制。

近半个世纪以来,随着育种工作的不断深入,对于芍药属种质资源遗传多样性的研究已经引起了研究者们广泛的关注,尤其是在分子水平上取得了一些可喜的研究成果。由于北美芍药组包含种类太少、栽培起步较晚,研究颇少,故本文从分子水平对芍药属中种质资源较为丰富的牡丹组与芍药组植物进行了遗传多样性概述,为该属植物的资源保护与利用提供科学参考。

1 牡丹组分子水平遗传多样性研究

目前,牡丹组分子水平遗传多样性研究已广泛深入到牡丹种间、种及品种间和品种间,主要应用的是分子标记技术和DNA序列分析。其中,分子标记技术主要有RAPD(random amplified polymorphic DNA,随机扩增多态性DNA)、AFLP(amplified fragment length polymorphism,扩增片段长度多态性)、ISSR(inter-simple sequence repeat,锚定SSR间隔标记)、SSR(simple sequence repeat,简单重复序列)等,序列分析包括nrDNA(nuclear ribosomal DNA)的ITS(internal transcribed spacer)序列、cpDNA(chloroplast DNA)基因、Adh(alcohol dehydrogenase)基因、GPAT(glycerol-3-phosphate acyltransferase)基因等。DNA水平的多态性是造成遗传多样性的根本因素,分子标记和DNA序列分析即是以DNA的多态性为基础,直接检测其遗传变异的研究手段,它们具有准确、直观且不受环境等外界因子干扰等显著优点。

1.1 野生种分子水平遗传多样性

RAPD标记因其技术简单,对所需设备要求低,只要少量的DNA样品就能显示出大量的遗传多样性而被最早应用于牡丹遗传分析的各个方面。裴颜龙等^[6]最初用RAPD标记技术探讨紫斑牡丹(*P. rockii*)和矮牡丹(*P. jishanensis*)的遗传多样性,结果表明,该标记技术对检测种群与居群间的多态性是完全适用的,紫斑牡丹与矮牡丹亲缘关系非常接近。之后,邹喻苹等^[7]进一步采用RAPD技术对7个野生种15个居群进行了牡丹组种内和种间遗传关系的分析。10个引物共获得121个多态性位点,UPGMA法构建的树系图表明,供试的7个种能很好地分开,种内相似性系数高达0.9。该研究结果与洪德元等^[2]前期根据形态性状对该组所做的分类处理基本吻合。

虽然RAPD技术用于牡丹的基因组分析是灵敏而有效的工具,但其可重复性较差,已渐渐被一些新的标记方法所替代。袁涛^[8]利用AFLP标记对7

个野生种进行多态性分析,表明野生牡丹遗传多样性极高,供试的7个野生种被分为2大类群,革质花盘亚组的矮牡丹、紫斑牡丹、四川牡丹(*P. decomposita*)和杨山牡丹(*P. ostii*)聚为一类,黄牡丹(*P. delavayi* var. *lutea*)、狭叶牡丹(*P. potaninii*)和大花黄牡丹(*P. ludlowii*)聚为一类,并认为将牡丹组划分为2个亚组是合理的。

近年来,随着牡丹组SSR引物的相继开发^[9-11],SSR标记技术已被证实对芍药属亲缘关系、遗传多样性与品种鉴定、种质资源的利用和保护等方面都有重要的意义。Yuan等^[12]采用22个形态性状、3个cpDNA和14个SSR分子标记方法探索延安牡丹(*P. yananensis*)、矮牡丹、紫斑牡丹的亲缘关系,结果表明,延安牡丹从形态上已区别于矮牡丹和紫斑牡丹,3个cpDNA片段(petB-petD, rps16-trnQ, bA-trnH)显示延安牡丹与矮牡丹亲缘关系较为接近,结合SSR分析,证实延安牡丹是以矮牡丹为母系亲本,紫斑牡丹为父系亲本经杂交起源的。本研究首次提出了通过利用形态学、母系遗传的cpDNA并结合微卫星标记,是一种研究植物杂交机制的强有力的新方法。

由于SSR标记需要设计特定的引物,在牡丹组研究中受到了一定的限制,各种基于SSR的标记方法层出不穷,应用于牡丹的主要有EST-SSR(expressed sequence tag-ssr,表达序列标签微卫星)、ISSR、nSSR(nucleus ssr,核微卫星)、cpSSR(chloroplast ssr,叶绿体微卫星)等。目前,基于牡丹EST信息建立SSR标记是一种有效而可行的方法,有助于牡丹遗传多样性分析及基因组学方面的研究^[13-14]。Hou等^[15]根据EST序列分析设计出10对新的EST-SSR引物并应用于2大种群45个牡丹品种,结果表明,每对引物等位基因位点数的变化从1~4不等,期望杂合度从0.2087到0.6581不等。这些引物在杨山牡丹、紫斑牡丹和矮牡丹之间均扩增成功。该研究为今后进一步的品种鉴定、遗传图谱构建及分子标记辅助育种等提供便利条件。Zhang等^[16]采用7对核微卫星(nSSR)、6对叶绿体微卫星(cpSSR)标记显示了滇牡丹(*P. delavayi*)居群内中等水平的遗传多样性,该研究还证实这些标记同样适用于大花黄牡丹的扩增。ISSR标记同样证实滇牡丹并不濒危^[17-18],该研究结果与在形态多样性和核型多样性的分析一致^[19]。研究还发现,滇牡丹不同花色组及类型间存在基因交流,亲缘关系主要与花色、株高差异程度有关^[18]。另外,利用花色色素组成作为标记^[20]对牡丹的研究也得到了基于形态学的分类是完全合理的结论。

随着测序技术的日渐成熟, DNA 序列分析技术也被很好地运用到牡丹组遗传多样性研究中。最早开展基因序列分析研究的是 Sang 等^[21], 对芍药属 33 个种 nrDNA 的 ITS 序列进行了测定, 发现了网状进化问题。为了进一步探索其系统发育关系, Sang 等^[22-25]、Ferguson 等^[26] 又进行了一系列种间关系的探索研究, 并且指出, 多序列(ITS、Adh1A、matK、psbA-trnH and trnL (UAA)-trnF (GAA) of cpDNA 等) 分析所得到的系统进化树比单序列分析得到的能更好地建立芍药属种间关系。该结论与形态学和人工杂交所得的结果相一致; 但遗憾的是, 其所涉及到的野生种仅包括紫斑牡丹、滇牡丹、四川牡丹和矮牡丹 4 个, 且未能很好地解决这 4 个种的关系。Tank 等^[27] 随后对 19 个种群内代表 13 个芍药属植物的核编码叶绿体表达的单拷贝 GPAT 基因进行了扩增、克隆和测序, 得到了分辨良好、自展值较高的基因树, 证明了紫斑牡丹和四川牡丹的关系比矮牡丹更加接近, 同时也表明利用单拷贝核基因对研究植物的系统进化非常有利。林启冰等^[28] 通过结合前人的研究成果测定了牡丹组 7 个种 10 个野生居群的全部 Adh1A、Adh1B 和 Adh2 基因序列, 构建了牡丹组全部 8 个种的 Adh1A、Adh1B 和 Adh2 基因树, 同时进行了这些序列的合并分析。研究结果表明, 牡丹组 8 个种分为 2 个自展值达 90% 以上的单系分枝, 分别对应传统形态划分的革质花盘亚组和肉质花盘亚组, 滇牡丹和大花黄牡丹、银屏牡丹 (*P. suffruticosa* ssp. *yinpingmudan*) (巢湖) 和杨山牡丹、矮牡丹和卵叶牡丹 (*P. qiui*) 以及紫斑牡丹和四川牡丹各种之间有更近的亲缘关系。Adh 基因树上显示, 银屏牡丹巢湖居群与杨山牡丹种间关系较为接近, 其嵩县居群与卵叶牡丹也有一定的关系; 但由于牡丹组 Adh 基因树分辨力不高, 因此这 3 个种间的紧密关系也值得进一步探索。迄今为止, 在分子水平上对牡丹组野生种间亲缘关系最为全面的报道是赵宣等^[29] 对牡丹组来自于 15 个居群包括所有野生种的 GPAT 基因片段进行的 PCR-RFLP 分析和测序研究, 建立了很高自展值支持、分辨良好的牡丹组种间关系基因树, 滇牡丹和大花黄牡丹聚为 1 支 (99% 以上), 其余 6 个种聚为另 1 支 (自展值 100%)。在这 6 个种中, 紫斑牡丹和四川牡丹聚为 1 支, 其余 4 种构成 1 个单系群, 其中矮牡丹和卵叶牡丹聚为 1 支, 银屏牡丹和杨山牡丹聚为 1 支。该研究结果与基于形态学性状的系统发育关系^[30] 和其后来基于多基因序列和形态性状方面的研究^[31] 以及 Adh 基因序列研究^[28] 结果基本一致。随后, 自 Hebert 等^[32] 首次提出 DNA 条形码

技术后, 周世良研究组采用该最新技术对牡丹组 37 份个体的物种问题进行了澄清^[33], 利用来自叶绿体基因组的 4 个 DNA 片段 (ndhF、rps16-trnQ、trnL-F 和 trnS-G) 分析了该分类群的系统发育关系, 探讨了组内进化谱系和分类学上所命名的物种之间的关系。结果表明, 叶绿体基因与核基因所揭示的包括卵叶牡丹、四川牡丹、杨山牡丹、矮牡丹和紫斑牡丹等在内的进化线与形态分化所建立的物种限定不完全一致。

1.2 野生种与品种的分子水平遗传多样性

牡丹野生种与品种的遗传多样性主要集中在探讨它们之间的亲缘关系远近。AFLP 和 RAPD 技术结合^[8] 得出了革质花盘亚组各种与中国栽培牡丹的关系与其在形态学与孢粉学方面所做的结论基本一致。孟丽等^[34] 通过 RAPD 技术表明革质花盘亚组的野生类群与栽培品种间有较近的亲缘关系, 其中亲缘关系最近的是杨山牡丹, 最远的是矮牡丹; 然而这与蛋白质数据^[35] 和花粉形态学分析^[36] 的结论并不完全一致。而荧光标记 AFLP 技术却证明矮牡丹和卵叶牡丹有较近的亲缘关系^[37]。该研究还表明, 株高并不是决定遗传聚类划分的唯一因素, 但在其他性状差别不大时, 株高相近的品种间亲缘关系相对较近。王佳^[38] 通过 AFLP 标记对杨山牡丹和江南地区牡丹品种的遗传多样性和起源进行研究, 结果表明, 地理距离与遗传距离之间不存在明显相关性。江南牡丹的可能起源影响最大的是中原牡丹, 其次是西南和西北牡丹品种。杨山牡丹与江南牡丹品种的起源也有一定的关系。SRAP (sequence-related amplified polymorphism, 相关序列扩增多态性) 标记^[39] 显示: 野生种滇牡丹和大花黄牡丹关系接近, 与其他牡丹品种的关系都较远, 而杨山牡丹与所有品种的关系都较近。

除此之外, 研究者们对牡丹组野生种与品种的杂交子代也作了一系列探索。索志立等^[40] 利用 ISSR 标记技术构建了以杨山牡丹为母本、牡丹品种‘赵粉’和‘紫二乔’为父本进行人工杂交的亲子代 DNA 指纹图谱, 并在杂交后代中检测到了分别来自双亲的特征带。利用相同的方法^[41], 又获得了紫斑牡丹与牡丹种间杂交亲子代的指纹图谱, 从 DNA 水平上证实了紫斑牡丹确实参与了我国栽培牡丹品种的起源。杂交子代不仅遗传了亲本的特征, 有的还产生了变异^[42]。

1.3 品种的分子水平遗传多样性

牡丹组品种因划分为多个品种群^[43], 花型丰富、花色多变, 其核心种质具有丰富的遗传多样性^[44]。Hosoki 等^[45] 首先对 19 个中国牡丹品种的

亲缘关系进行了 RAPD 分析,筛选的 11 条引物组合共产生 92 个多态性位点,相似性系数为 0.722 ~ 0.928,供试品种经聚类后分为 4 组;但该结果与基于花型^[46]与花色^[47]的分类结果不完全相同。陈向明等^[48-49]分别对 7 种花色彩的 35 个牡丹品种进行 RAPD 分析探讨其丰富的遗传多态性,并且首次提出产地来源较花色对牡丹品种亲缘关系的影响更为突出。苏雪等^[50]采用 RAPD 标记技术对甘肃栽培紫斑牡丹品种的分类进行了研究,筛选的 10 个引物产生的位点中共有 114 个具有多态性。聚类分析表明,楼子类品种大部分表现出很高的遗传相似性,但遗传距离与各色系间却没有明显的相似性。ISSR 标记分析证实遗传关系的划分与花型和花色之间没有相关性^[51]。不仅如此,AFLP 技术也证实了产地来源对牡丹亲缘关系的影响比其他性状更为突出^[52-54],进一步从分子水平上证明了种源组成是造成品种遗传差异的前提性标准。

形态性状特别是花色、花型与牡丹品种的遗传多样性存在着很大的相关性。王燕青等^[55-56]利用正交设计建立并优化了牡丹 SRAP 反应体系,构建了 33 个牡丹品种的指纹图谱,UPGMA 法聚类分析表明,遗传差异与品种的重瓣性高低和花型有很大关系。其中皇冠型与托桂型、单花类和台阁类品种均分别有较近的亲缘关系,但该结果与牡丹传统花型分类不完全一致。Guo 等^[57]用 SRAP 标记技术研究了 16 个不同花色牡丹品种的遗传多样性,20 对引物组合共产生 71.4% 的多态性,结果显示,SRAP 将品种分为 3 类,品种群的分类主要以花色为基础,然而遗传关系相近的品种花色并不完全一致。

2 芍药组分子水平遗传多样性研究

基于国人大多重牡丹而轻芍药的审美观,芍药组的遗传多样性研究发展相对较为滞后。早期研究者们大多侧重于对芍药品种的研究,对于种以及种和品种之间的研究才刚刚起步。

2.1 品种的水平遗传多样性

关于种源划分类群的理论很早就被提出。Hosoki 等^[58]首次用 10 个 RAPD 引物从分子水平上揭示了种源的不同是芍药品种遗传差异的主要原因,并根据种源的不同将 20 个芍药品种分成了欧洲品种系、日本品种系和中国品种系,得出了欧洲芍药品种系是以 *P. lactiflora*、*P. tenuifolia* 和 *P. officinalis* 为主要亲本,日本芍药品种系是以 *P. lactiflora* 和 *P. japonica* 为主要亲本,中国芍药品种系主要以 *P. lactiflora* 作为亲本的结论,该研究结果与其利用形态性状和花色素含量分析^[59]的结果一

致。ISSR 标记技术表明基于分子标记的聚类分析结果与基于形态性状的分类结果具有较强的相关性^[60]。

除了 RAPD、ISSR 标记外,高效稳定、重复性好的芍药 SRAP 扩增反应体系已经建立^[61],该体系为今后利用该标记对芍药品种的分子鉴别和多样性研究等奠定了基础。王晓茵^[62]利用 SRAP 技术对我国芍药 150 份种质资源进行了遗传多样性研究,从 120 个引物对中筛选出 8 个引物组合用于正式扩增,多态性比率为 94%。从聚类分析可以发现,各分类群与地域来源和花色分类方案呈现一定的关联,具有在地域性基础上按花色进行聚类的一般规律和特点,显示中国芍药品种地理资源的遗传多样性。

另外,目前为止只有部分栽培芍药品种亲缘关系比较清晰^[63],芍药品种的遗传多样性还有待研究。

2.2 野生种与品种的水平遗传多样性

早前研究者们大多用 RAPD 技术作了一些零星的报道。RAPD 标记^[64]表明野生群体的多态位点高于药用栽培群体及观赏栽培群体,野生与药用群体之间遗传距离最远,药用与观赏群体之间遗传距离最近,此结果与芍药根部解剖结构的研究结果^[65]一致。它首次揭示了芍药种群的遗传分化,在分子水平上为赤芍和白芍道地性的形成找到了依据。陈丙奎等^[66]用 RAPD 标记对我国主要栽培白芍原植物 10 个居群内遗传多样性进行评估,多态率达 63.64%,说明其存在较丰富的遗传多样性,研究还证实花色并非是遗传分组的主要特征。郭先锋等^[67]采用 17 条 RAPD 引物对 5 种野生芍药和 26 个栽培芍药品种的亲缘关系进行了研究,该结果表明 26 个品种间的遗传背景相对一致,与野生种芍药的遗传基础最为近密,与其他 4 种野生芍药的遗传差异则较大。按照与栽培品种亲缘关系由近到远的次序 4 个野生近缘种依次排列为美丽芍药(*P. mairei*)、草芍药(*P. obovata*)、川赤芍(*P. veitchii*)和块根芍药(*P. anomala*)。

近几年,对芍药组遗传多样性的研究重心开始转回探究其野生种的种质资源遗传多样性及起源分析上。胡文清等^[68]采用 AFLP 标记对山西省交城县崤岭山居群半同胞家系的芍药野生居群进行父系分析及遗传结构的研究,9 对引物共得到清晰判读 AFLP 扩增带 255 条,其中多态性条带 113 条。结果表明:芍药受地理距离的影响显著,花粉散布符合邻近距离散布模式;芍药遗传多样性水平不高,亲本和子代际之间的遗传多样性水平差别不

明显;近距离范围内存在显著的空间遗传结构。Li等^[69]首先开发完成了应用于中国芍药的10对SSR引物,并对11个野生分布区内的中国芍药和143个中国芍药栽培品种进行了亲缘关系及栽培品种起源问题的研究。SSR位点等位基因型分析显示,野生资源的遗传多样性(shannon-waver遗传多样性指数 $I=0.83$)与同属的牡丹($I=1.47$)相比处于较低水平,可以把野生资源分为东北组、华北组和西北组3个组,芍药品种资源的遗传多样性明显高于野生资源。由此可推测中国芍药品种的形成经过了一个先引种驯化、后广泛杂交的过程^[70]。随后,Sun等^[71]又开发完成了10对应用于芍药的微卫星引物。

继Sang等^[21-25]对芍药属植物进行核糖体ITS序列、叶绿体基因组matK基因、叶绿体基因组基因间隔序列研究后,Pan等^[72]综合利用叶绿体基因间隔序列(psbA-trnH 和 rps16-trnQ)和核基因组序列分析了芍药组内3个野生种芍药(*P. lactiflora*)、川赤芍(*P. veitchii*)、新疆芍药(*P. anomala*)的遗传差异,并推测新疆芍药是芍药和川赤芍的天然2倍体杂种。夏涛^[73]利用同样的方法分析了整个芍药组23个种的亲缘关系,发现芍药与新疆芍药亲缘关系最近,其次是川赤芍,与3个四倍体种的亲缘关系都较远。

3 芍药组和牡丹组遗传多样性的研究进展

芍药组与牡丹组虽属于同属,但其组间关系及杂种研究历来被人们所忽略,故研究进展也非常缓慢。朱红霞^[74]建立并优化了适宜于牡丹和芍药的荧光AFLP反应体系,并利用该体系绘制了形态特征相似的5个牡丹品种(‘贵妃插翠’、‘黑花魁’、‘烟笼紫珠盘’、‘冠世墨玉’、‘李园春’)和6个芍药品种(‘赵园粉’、‘紫袍金带’、‘莲台子’、‘Primevere’、‘莲台’、‘种生粉’)的DNA指纹图谱;但遗憾的是,该研究未涉及到牡丹和芍药之间的亲缘关系。Hao等^[75]利用SRAP标记对13个中国牡丹品种、14个中国芍药品种和2个组间杂种进行了研究,24对引物组合共产生187个为多态性位点。研究结果表明,通过特定的引物组合所产生的多态性能够将这29个品种很好地区分开,而2个特定的引物组合Me8/Em8和Me8/Em1更能够区分出不同组的品种,其遗传相似性系数GS(genetic similarity coefficient)、基因多样性GD(gene diversity)和Shannon信息指数分别为0.45、0.19、0.32。UPGMC聚类分析和主成分分析均揭示了组间杂种与芍药

组及牡丹组的关系,该研究也被证明对芍药属种质创新项目中遗传背景评估与分析、杂交育种过程中的亲本选择以及分子标记辅助育种等方面都具有重要的指导意义。

4 结论与讨论

芍药属植物种质资源丰富,品种繁多,其野生种与品种的遗传多样性是物种长期生存与进化的标志。由于遗传信息储存在基因组的DNA序列中,因此从分子水平研究野生种、种与品种、品种的遗传多样性,可以从根本上揭示他们的遗传组成与亲缘关系。国内外研究结果显示:产地来源即种源不同是造成芍药属遗传差异的最主要因素;在种源一致的前提下,其遗传多样性与部分形态特征尤其是花色、花型、株高等有很大的相关性。DNA分子标记技术(RAPD、AFLP、ISSR、SSR等)和DNA序列分析研究(ITS、matK、Adh、GPAT等)表明,不同的研究方法所得出的结果差异很大;但可以肯定的是,基于形态学分类将牡丹组划分为2个亚组是完全合理的。鉴于各标记方法的局限性,灵活选择何种分子标记作为研究也显得至关重要。早期研究者大多“重牡丹而轻芍药”,对芍药组植物的研究也大多局限于现有的栽培品种,样本数量太小,且偏重于RAPD标记和PCR扩增序列,使得芍药组的遗传多样性研究发展相对较为缓慢,分子水平研究不够深入,芍药组各个种与品种之间亲缘关系也有待进一步的详细研究。目前看来,今后势必要加快芍药属植物全基因组序列的开发与各新型标记方法(EST-SSR、nSSR、cpSSR、SRAP等)的探索及应用。

近年来,分子生物学领域不断取得重大突破,毋庸置疑地成为科技革命的重要推动力。从分子水平上开展遗传多样性研究可以及时发现并保护濒危植物,增强品种改良的目的性,同时能更好地为杂交育种亲本选择提供依据;但就目前分子水平的研究进展来看,很多研究结论还是存在分歧与问题。为此,要改变“重牡丹轻芍药”的局面,需加大对芍药组遗传多样性的研究投入,使牡丹与芍药能够均衡发展;为确保遗传多样性研究的准确性,应综合利用形态学、孢粉学、细胞学、同工酶分析尤其是分子生物学等多种遗传标记的证据,从各个水平层次上提取有价值的信息,尽量选择共显性标记(如SSR、RFLP、等位酶技术等)以及新型高效的标记方法(如SRAP等)进行研究;设置相应的芍药属种质资源保护区,弄清许多优秀国内外品种的来源;同时加强对芍药属植物花型、花色及株高分子机理和转基因技术的研究,为分子育种的开展做好

充分准备。通过结合上述方法,可望更加准确地评定芍药属各种质资源的遗传多样性,为后续的芍药属植物基因改良、育种选优工作奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 李嘉珏. 中国牡丹与芍药[M]. 北京: 中国林业出版社, 1999: 29-67.
- [2] 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(4): 351-368.
- [3] HONG D Y, PAN K Y. *Paeonia cathayana* D. Y. Hong & K. Y. Pan, a new tree peony, with revision of *P. suffruticosa* ssp. *yinpingmudan* [J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 2007, 45(3): 285-288.
- [4] 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(4): 340-349.
- [5] HONG D Y, PAN K Y, YU H. Taxonomy of the *Paeonia delavayi* complex (Paeoniaceae) [J]. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 1998, 85: 554-564.
- [6] 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.
- [7] 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, 1999, 37(3): 220-227.
- [8] 袁涛. 中国牡丹部分种与品种(群)亲缘关系的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 1998.
- [9] WANG J X, XIA T, ZHANG J M. Isolation and characterization of fourteen microsatellites from a tree peony (*Paeonia suffruticosa*) [J]. *Conservation Genetics* 2009, 10: 1029-1031.
- [10] HOMOLKA A, BERENYI M, BURG K, et al. Microsatellite markers in the tree peony, *Paeonia suffruticosa* (Paeoniaceae) [J]. *American Journal of Botany* 2010, 97(6): 42-44.
- [11] HOU X G, GUO D L, CHENG S P, et al. Development of thirty new polymorphic microsatellite primers for *Paeonia suffruticosa* [J]. *Biologia Plantarum* 2011, 55(4): 708-710.
- [12] YUAN J H, CHENG F Y, ZHOU S L. Hybrid origin of *Paeonia* × *yananensis* revealed by microsatellite markers, chloroplast gene sequences, and morphological characteristics [J]. *International Journal of Plant Sciences* 2010, 171(4): 409-420.
- [13] 张艳丽. 基于牡丹 EST 信息的滇牡丹 SSR 标记开发[J]. 林业科学研究, 2011, 24(2): 171-175.
- [14] 侯小改. 牡丹 EST 资源的 SSR 信息分析[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2011, 37(2): 172-176.
- [15] HOU X G, GUO D L, WANG J. Development and characterization of EST-SSR markers in *Paeonia suffruticosa* (Paeoniaceae) [J]. *American Journal of Botany* 2011, 98(11): 303-305.
- [16] ZHANG J M, LIU J, SUN H L, et al. Nuclear and chloroplast SSR markers in *Paeonia delavayi* (Paeoniaceae) and cross-species amplification in *P. ludlowii* [J]. *American Journal of Botany*, 2011, 98(12): 1-3.
- [17] 杨淑达, 施苏华, 龚洵, 等. 滇牡丹遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 生物多样性, 2005, 13(2): 105-111.
- [18] 王晓琴. 香格里拉滇牡丹遗传多样性研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2009.
- [19] 龚洵, 潘跃芝, 杨志云. 滇牡丹的多样性和现状评估[J]. 西北植物学报, 2003, 23(2): 218-223.
- [20] WANG L S, HASHIMOTO F, SHIRAISHI A, et al. Phenetics in tree peony species from China by flower pigment cluster analysis [J]. *Journal of Plant Research* 2001, 114: 213-221.
- [21] SANG T, CRAWFORD D J, STUESSY T F. Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implications for biogeography and concerted evolution [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(15): 6813-6817.
- [22] SANG T, DONOGHUE M J, ZHANG D. Evolution of alcohol dehydrogenase genes in peonies (*Paeonia*): phylogenetic relationships of putative nonhybrids species [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1997, 14(10): 994-1007.
- [23] 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(8): 1120-1136.
- [24] SANG T, ZHANG D. Reconstructing hybrid speciation using sequence of low copy nuclear genes: hybrid origins of five *Paeonia* species based on Adh gene phylogenies [J]. *Systematic Botany*, 1999, 24(2): 148-163.
- [25] SANG T. Utility of low-copy nuclear gene sequences in plant phylogenetics [J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 2002, 37(3): 121-147.
- [26] FERGUSON D, SANG T. Speciation through homoploid hybridization between allotetraploids in peonies (*Paeonia*) [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, 98(7): 3915-3919.
- [27] TANK D C, SANG T. Phylogenetic utility of the glycerol-3-phosphate acyltransferase gene: evolution and implications in *Paeonia* (Paeoniaceae) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2001, 19(3): 421-429.
- [28] 林启冰, 周志钦, 赵宣, 等. 基于 Adh 基因家族序列的牡丹组 (Sect. *Moutan* D C.) 种间关系 [J]. 园艺学报, 2004, 31(5): 627-632.
- [29] 赵宣, 周志钦, 林启冰, 等. 芍药属牡丹组 (*Paeonia* sect. *Moutan*) 种间关系的分子证据: GPAT 基因的 PCR-RFLP 和序列分析 [J]. 植物分类学报, 2004, 42(3): 236-244.
- [30] ZHOU Z Q, PAN K Y, HONG D Y. Phylogenetic analyses of *Paeonia* section *Moutan* (tree peonies, Paeoniaceae) based on morphological data [J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 2003, 41: 436-446.
- [31] ZHAO X, ZHOU Z Q, LIN Q B, et al. Phylogenetic analysis of *Paeonia* sect. *Moutan* (Paeoniaceae) based on multiple DNA fragments and morphological data [J]. *Journal of Systematics and Evolution* 2008, 46(4): 563-572.
- [32] HEBERT P D N, RATNASINGHAM S, DE WAARD J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species [J]. *Proceedings of the Royal Society of London series B-Biological Sciences*, 2003, 270 (Suppl. 1): 96-99.
- [33] 张金梅, 王建秀, 夏涛, 等. 基于系统发育分析的 DNA 条形码技术在澄清芍药属牡丹组物种问题中的应用 [J]. 中国科学: C 辑: 生命科学, 2008, 38(12): 1166-1176.

- [34] 孟丽, 郑国生. 部分野生与栽培牡丹种质资源亲缘关系的 RAPD 研究[J]. 林业科学 2004 40(5): 110-115.
- [35] 于玲, 何丽霞, 李嘉珏, 等. 牡丹野生种间蛋白质谱带的比较研究[J]. 园艺学报, 1998 25(1): 99-101.
- [36] 袁涛, 王蓬英. 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.
- [37] 侯小改, 尹伟伦, 李嘉珏, 等. 牡丹矮化品种亲缘关系的 AFLP 分析[J]. 北京林业大学学报, 2006 28(5): 73-77.
- [38] 王佳. 杨山牡丹遗传多样性与江南牡丹品种资源研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2009.
- [39] HAN X Y, WANG L S, SHU Q Y, *et al.* Molecular characterization of tree peony germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers[J]. *Biochemical Genetics* 2008, 46: 162-179.
- [40] 索志立, 周世良, 张会金, 等. 杨山牡丹和牡丹种间杂交后代的 DNA 分子证据[J]. 林业科学研究 2004 17(6): 700-705.
- [41] 索志立, 张会金, 张治明, 等. 紫斑牡丹与牡丹种间杂交后代的 DNA 分子证据[J]. 云南植物研究 2005 27(1): 42-48.
- [42] 张栋. 牡丹远缘杂交及部分杂交后代的 AFLP 分子标记鉴定[D]. 北京: 北京林业大学, 2008.
- [43] 李嘉珏. 中国牡丹品种图志[M]. 北京: 中国林业出版社, 2006: 4-6.
- [44] 李保印, 周秀梅, 张启翔. 中原牡丹品种资源的核心种质构建研究[J]. 华北农学报 2011 26(3): 100-105.
- [45] HOSOKI T, KIMURAD D, HASEGAWA R, *et al.* Comparative study of Chinese tree peony cultivars by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis [J]. *Scientia Horticulturae*, 1997 70(1): 67-72.
- [46] 喻衡. 菏泽牡丹[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1980: 16-36.
- [47] HOSOKI T, HAMADA N, KANDO T, *et al.* Comparative study of anthocyanins in tree peony flowers [J]. *Journal of the Japanese Society Horticulture* 1991 60(2): 395-403.
- [48] 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.
- [49] 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.
- [50] 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.
- [51] SUE Z L, LI W Y, YAO J, *et al.* Applicability of leaf morphology and intersimple sequence repeat markers in classification of tree peony (*Peoniaceae*) cultivars [J]. *HortScience*, 2005 40(2): 329-334.
- [52] 周兴文, 杨秋生, 李永华. 牡丹基因组 AFLP 银染反应体系的建立和优化[J]. 2006 40(6): 602-606.
- [53] 侯小改, 尹伟伦, 李嘉珏, 等. 部分牡丹品种遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 中国农业科学 2006 39(8): 1709-1715.
- [54] 刘萍, 芦锰. 7 种不同花色 35 个牡丹品种遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 河南中医学院学报 2009 24(3): 30-32.
- [55] 王燕青, 季孔庶. 利用正交设计优化牡丹 SRAP-PCR 反应体系[J]. 分子植物育种 2009 7(1): 199-203.
- [56] 王燕青. 利用 SRAP 标记构建菏泽牡丹优良品种指纹图谱[D]. 北京: 北京林业大学, 2008.
- [57] GUO D L, HOU X G, ZHANG J. Sequence-related amplified polymorphism analysis of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andrews) cultivars with different flower colors [J]. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 2009 84: 131-136.
- [58] HOSOKI T, NAGASAKO T, KIMURA D, *et al.* Classification of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora*) cultivars by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis [J]. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 1997 65(4): 843-849.
- [59] HOSOKI T, SEO M, HAMADA M, *et al.* New classification method of herbaceous peony cultivars based on morphological characters and distribution pattern of flavone/flavonol components in the petal [J]. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 1991 59(4): 787-793.
- [60] 王淼, 于恒秀, 龚志云, 等. 芍药栽培品种 ISSR 反应体系的优化和应用[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2007, 28(2): 78-82.
- [61] 孙宪芝, 王晓茵, 马燕, 等. 应用正交设计建立芍药的 SRAP 反应体系[J]. 华北农学报 2008 23(增刊): 198-200.
- [62] 王晓茵. 中国芍药品种遗传多样性 SRAP 分析和核心种质的初步构建[D]. 泰安: 山东农业大学, 2010.
- [63] 于恒秀, 王淼, 梁国华, 等. ISSR 引物鉴定芍药栽培品种之间亲缘关系的初步研究[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(2): 271-274.
- [64] 周红涛, 胡世林, 郭宝林, 等. 芍药野生与栽培群体的遗传变异研究[J]. 药学报 2002 37(5): 383-388.
- [65] 杭悦宇, 陈丙奎, 黄春洪, 等. 传统中药白芍原植物分类鉴定及根形态解剖研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2004, 12(3): 221-225.
- [66] 陈丙奎, 杭悦宇, 周义锋, 等. 白芍传统品种原植物遗传多样性及亲缘关系分析[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(2): 17-21.
- [67] 郭先锋, 王蓬英. 部分芍药种质资源的 RAPD 分析[J]. 园艺学报 2007 34(5): 1321-1326.
- [68] 胡文清, 鲁衡, 刘伟, 等. 芍药野生居群体系分析与遗传结构研究[J]. 园艺学报 2011 38(3): 503-511.
- [69] LI L, CHENG F Y, ZHANG Q X. Microsatellite markers for the Chinese herbaceous peony *Paeonia lactiflora* (*Paeoniaceae*) [J]. *American Journal of Botany* 2011 98(2): 16-18.
- [70] 李林. 中国芍药 (*Paeonia lactiflora* Pall.) 种质资源遗传多样性及品种起源研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2010.
- [71] SUN J, YUAN J X, WANG B S, *et al.* Development and characterization of 10 microsatellite loci in *Paeonia lactiflora* (*Paeoniaceae*) [J]. *American Journal of Botany* 2011 98(9): 242-243.
- [72] PAN J, ZHANG D, SANG T. Molecular phylogenetic evidence for the origin of a diploid hybrid of *Paeonia* (*Paeoniaceae*) [J]. *American Journal of Botany* 2007 94(3): 400-408.
- [73] 夏涛. 芍药科的分子系统学研究: 以芍药属芍药组为重点[D]. 北京: 中国科学院植物研究所, 2008.
- [74] 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.
- [75] HAO Q, LIU Z A, SHU Q Y, *et al.* Studies on *Paeonia* cultivars and hybrids identification based on SRAP analysis [J]. *Hereditas*, 2008, 145: 38-47.

(责任编辑 李 斐)