

· 专题论坛 ·

SSR分子标记在牡丹亲缘关系研究中的应用与研究进展

郭琪^{1,3}, 郭大龙^{2,3}, 郭丽丽^{1,3}, 张琳^{1,3}, 侯小改^{1,3*}

¹河南科技大学农学院, 洛阳 471003; ²河南科技大学林学院, 洛阳 471003

³河南省油用牡丹工程技术研究中心, 洛阳 471003

摘要 SSR标记具有操作简便、共显性和重复性好等特点。该文总结了通过生物信息学技术、磁珠富集法及二代测序技术开发牡丹(*Paeonia suffruticosa*) SSR标记引物的方法, 并根据现有研究结果解析了牡丹基因组中SSR位点频率及分布, 详细阐述了SSR标记在牡丹种质资源的遗传多样性、亲缘关系和遗传关系等方面的应用概况, 旨在为今后牡丹SSR标记的研究与应用提供参考。

关键词 牡丹, SSR, 分子标记, 遗传多样性, 亲缘关系

郭琪, 郭大龙, 郭丽丽, 张琳, 侯小改 (2015). SSR分子标记在牡丹亲缘关系研究中的应用与研究进展. 植物学报 50, 652–664.

牡丹(*Paeonia suffruticosa*)隶属芍药科芍药属, 为多年生木本落叶灌木, 是我国的传统名花, 其栽培历史悠久(1 600年)(洪德元和潘开玉, 1999)。中国是牡丹栽培的起源和发展中心, 牡丹在亚洲的许多国家、美国、欧洲和澳大利亚也广泛种植(Cheng, 2007), 并已成为世界常见的著名观赏花卉。随着牡丹育种的不断发展, 科研工作者利用各种分子标记对芍药属种间及栽培品种间的遗传关系进行了研究, 如陈向明等(2001)利用随机扩增多态性DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)对7种花色系的35个牡丹栽培品种进行了分析; Hou等(2006)利用扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)对30份牡丹栽培品种进行了多态性检测; Guo等(2009)采用相关序列扩增多态性(sequence related amplified polymorphism, SRAP)对16个具有不同花色的牡丹栽培品种间的遗传关系进行了研究。但是他们的研究结果并不完全一致, 这可能是由于在研究过程中使用了不同的实验材料以及所选择的样本数量和分子标记的种类不尽相同所致。

研究者运用不同的分子标记技术对不同植物材料的遗传多样性、品种鉴定及亲缘关系等进行了深入广泛的研究(Agarwal et al., 2008)。SSR是基于PCR

的分子标记技术, 该标记通过特异性引物的设计对保守区域进行扩增, 因重复单位的数目不同而产生多态性, 如蒋晓英等(2013)利用36对SSR引物对39份杂交水稻(*Oryza sativa*)样品进行了遗传多样性鉴定; 王玉民等(2014)用SSR标记分析了40个玉米(*Zea mays*)品种的遗传多样性和亲缘关系。与SSR分子标记技术相比, AFLP分子标记具有多态性高、结果可靠且稳定等特点, 如王东升等(2013)利用AFLP分子标记对分布于山东省内5个样地的51个野核桃(*Juglans cathayensis*)单株的遗传多样性进行了分析, 但该标记操作复杂且成本较高(Patzak, 2001); RAPD分子标记虽然成本较低, 但其重复性较差(魏霜等, 2014), 如张杨等(2014)利用该标记方法解析了金钗石斛(*Dendrobium nobile*)、铁皮石斛(*D. officinale*)和齿瓣石斛(*D. devonianum*) 3种石斛属植物的种间关系。ISSR分子标记具有操作简便和多态性丰富等优点, 如董海燕等(2014)利用ISSR分子标记技术对红花檵木(*Loropetalum chinense* var. *rubrum*) 41个品种的遗传多样性进行了分析, 但因该标记只有显性的特点, 故不能鉴定纯合子和杂合子(Vijayan, 2007)。SRAP分子标记是一种新型的分子标记技术, 具有操作简便和共显性等优点, 如张冬菊等(2014)用该方法对56个

收稿日期: 2015-02-12; 接受日期: 2015-06-23

基金项目: 国家自然科学基金(No.31370697, No.31372026)、河南省高校科技创新团队支持计划(No.14IRTSTHN014)、河南省高校科技创新人才支持计划(No.13HASTIT004)和河南科技大学创新团队资助(No.2015TTD003)

* 通讯作者。E-mail: hxg382@126.com

切花菊品种的遗传多样性进行了研究, 以及Uzun等(2010)对杏的一些栽培品种的遗传研究, 但该标记只对基因的编码区进行特异性扩增。谭祖猛等(2008)综述了这些常见的分子标记技术在油菜(*Brassica campestris*)杂种优势上的应用研究, 提出靶位区域扩增多态性(TRAP)分子标记技术可以提高预测杂种优势的准确性, 但该方法基于已知的cDNA或EST序列信息, 因此操作复杂且对技术要求较高。而SSR标记广泛存在于真核生物的整个基因组中, 具有操作简便、共显性、扩增产物稳定、多态性高、易于分离条带及结果分析等优点, 已成为植物遗传图谱构建、基因型分析和遗传多样性研究的一个较好的选择(Akkak et al., 2009; Akritidis et al., 2009; Yu et al., 2013)。不同的分子标记技术在牡丹上的应用研究已有很多, 几种常用的分子标记状况如表1所示。此外, 基于SSR标记技术的优势, 在牡丹中已开发的SSR标记也有很多(Wang et al., 2009; Homolka et al., 2010; Zhang et al., 2011; Hou et al., 2011a, 2011b; Gai et al., 2012; Zhang et al., 2012; Gao et al., 2013; Wu et al., 2014), 这为利用SSR分子标记技术进行牡丹遗传多样性、亲缘关系以及分子标记辅助育种等研究奠定了良好的基础。本文重点综述牡丹SSR分子标记的开发应用及研究情况, 旨在为SSR标记在牡丹中的应用提供参考。

1 SSR分子标记的特点

微卫星(microsatellite)又称简单序列重复(simple sequence repeats, SSR), 是指在真核生物整个基因组中存在序列较短且重复出现的核苷酸序列, 最早由Tautz (1989)发现。SSR两端的序列往往是相对保守的单拷贝序列, 由于重复序列数目或重复程度不同而呈现出多态性, 因此可根据侧翼序列设计1对引物, 利用PCR技术扩增, 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测扩增产物, 获得多态性序列后分析结果。

在真核生物基因组中, 存在大量的微卫星序列。并且在植物中, 已经证明微卫星标记是一种信息量大且具有特异性位点的分子标记(Condit and Hubbell, 1991)。在单子叶植物中, 每隔64.6 kb含有1个短串联重复序列(short tandem repeats, STR), 在双子叶植物中则是每隔21.2 kb含有1个序列STR (Wang et al.,

表1 牡丹微卫星长度分布
Table 1 The length distribution of microsatellites from *Paeonia suffruticosa*

Base types	Numbers	Percentage (%)
Mononucleotide	4 604	1.90
Dinucleotide	187 934	77.80
Trinucleotide	28 429	11.77
Tetranucleotide	19 087	7.90
Pentanucleotide	164	0.07
Hexanucleotide	1 333	0.55

1994; Provan et al., 1996; Smulders et al., 1997)。该标记的重要和特殊性在于其有以下几方面优点。(1) 密切相关物种的微卫星DNA所在区域的生物基因组相对保守, SSR引物可通用, 说明SSR侧翼序列具保守性; (2) 在植物的非编码区, 改变重复序列的重复次数不影响植物的生长发育, 品种间位点变异广泛, 多态性高; (3) SSR位点的等位基因数目较多, 杂合程度较高, 多态性信息含量较大; (4) 共显性, 呈孟德尔式遗传, 可鉴别出杂合子和纯合子, 对个体鉴定具有特殊意义, 同时还可以很好地鉴定杂交后代的差异性状来源; (5) 对DNA质量要求不高, 并且仅需微量的DNA组织就能通过PCR技术进行分析; (6) 常使用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测单拷贝差异, 遗传信息量大。

2 牡丹SSR标记开发

由于牡丹的基因组非常大, 约为16 G (Gao et al., 2013), 而SSR标记开发的数量有限, 目前还达不到覆盖全基因组的水平。因此, 在牡丹中开发更为有效的SSR标记非常重要。下面将分类介绍两种不同手段开发牡丹SSR引物的方法。

2.1 基于生物信息学技术开发的SSR标记

根据原始序列鉴定SSR分子标记, SSRs可以分为基因组SSRs和表达序列标签(expressed sequence tag-simple sequence repeats, EST-SSRs)。传统方法开发基因组SSRs分子标记不仅耗时长而且成本高, 并且涉及基因组文库的构建和测序(Eujayl et al., 2004)。相反, EST-SSRs比非编码序列更为保守, 且在较低成本下可以迅速开发。因此, 与基因组SSR标记相比, EST-SSRs标记在相关物种中能够表现出更

高水平的通用性(Wu et al., 2014)。同时, EST序列的获得也相对容易, 可直接从生物信息公共数据库中下载, 得到相关序列后, 去除载体序列, 降低EST序列并进行拼接, 从而得到新的EST序列。再对其进行SSR搜索(韩明利等, 2011)。

Hou等(2011b)从GenBank数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>)检索到2 204条牡丹序列, 并用DNASTAR (<http://www.dnastar.com>; DNASTAR Inc., Madison, Wisconsin, USA)组装成非冗余的一致序列, 用软件MISA对存在SSRs标记的序列进行进一步筛选, 对901条包含SSRs标记的序列进行鉴定, 从SSR侧翼区域成功设计了29对引物, 其中10对引物在45个牡丹栽培品种的PCR产物中具有一定的多态性。Wu等(2014)从3 783条序列中鉴定出4 373个EST-SSR标记, 设计了788对引物, 其中有149对引物在凤丹(*P. ostii* cv. 'Feng Dan')和红乔(*P. suffruticosa* cv. 'Hong Qiao')两个品种的杂交后代中显示出多态性。Homolka等(2010)来自NCBI dbEST数据库的2 024条牡丹ESTs序列中, 筛选出726条含有各种重复的序列片段, 有473条包含SSR的unigenes, 得到了598个微卫星片段, 设计了25对引物, 但只有5对引物在18个牡丹品种中显示出多态性。

鉴于目前牡丹在GenBank、EMBL和DDBJ等公共数据库中的序列有限, 限制了该方法在牡丹研究中的应用。随着GenBank数据库中牡丹序列的增加, 牡丹SSR分子标记的开发将更容易。

2.2 基于实验手段开发SSR引物

2.2.1 磁珠富集法

该方法的基本原理是用限制性内切酶酶切基因组总DNA, 将得到的DNA片段与带有生物素标记的微卫星探针杂交, 利用生物素与链霉亲和素亲和性强的特性, 完成重复序列目标片段的富集, 通过克隆和测序, 从而得到含有SSR的重复序列。Yu等(2013)用限制性内切酶*RsaI*和*XmnI*将基因组DNA双酶切成约500 bp大小的片段, 然后用(AG)₁₂、(AT)₁₂、(CG)₁₂、(GT)₁₂、(ACG)₁₂、(ACT)₁₂、(CCA)₈、(AAGT)₈和(AGAT)₈微卫星探针, 再通过阳性克隆和DNA测序共设计出48对牡丹SSR引物, 其中12对在48个牡丹栽培品种中显示出多态性; Wang等(2009)用相同的方法, 共设计了45对用于微卫星位点片段的扩增引

物, 其中有14对在20个牡丹栽培品种中显示出多态性。这种方法的缺点是更适用于已有序列发布的物种, 并且有时所设计的EST-SSR引物会跨越内含子而无法扩增出目的片段。

Zane等(2002)提出了一种节约成本和时间的快速分离微卫星的FIASCO (fast isolation by AFLP of sequences containing repeats)方法, 该方法基于磁珠表面链霉亲和素能够与探针上生物素之间强且稳定的共价结合的原理, 使用磁珠(streptavidin magnetosphere paramagnetic particles)和生物素标记的微卫星探针来富集基因中的微卫星位点(郭大龙, 2007b)。这实质上与Hakki和Akkaya (2000)的方法类似。Hou等(2011a)用FIASCO方法对洛阳红(*P. suffruticosa* cv. 'Luoyang Hong')进行了微卫星位点分离。方法是用链霉亲和素磁珠与(GA)₁₅(Bio-(GA)₁₅)和(AC)₁₅(Bio-(AC)₁₅)生物素标记探针进行富集, 使用合适引物的聚合酶链式反应(PCR)对回收的DNA进行扩增, 将扩增的产物进行纯化, 连接到pMD-18T载体上, 再转移到大肠杆菌DH5 α 感受态细胞进行阳性克隆及测序, 并对微卫星富集区的侧翼进行特异性引物设计。通过该方法, 他们设计了26对引物, 并且这26对引物在40个牡丹栽培品种中均表现出高度多态性。Homolka等(2010)使用Refseth等(1997)开发的SSR富集方法开发牡丹SSR引物。方法是将接头引物Sau 3A (A: 5'-TTCCATAACCCCA-ATCTTCT-3'和B: 5'-TATCCTAATCTTTTTTCTCTTTTCC-3')链接到大小为0.9–1.7 kb的DNA片段两端, 用5'生物素标记的寡核苷酸与(AG)₁₀、(CA)₁₀和(TA)₁₀探针杂交, 用链霉亲和素磁珠捕获SSR片段, 并经热变性的生物素标记的寡核苷酸释放, 分离的片段用寡核苷酸进行扩增, 再通过阳性克隆和测序, 设计了26对SSR引物, 其中有8对在32个牡丹品种显示出多态性。

2.2.2 二代测序技术

二代测序技术(next-generation sequencing, NGS) (Schuster, 2008)的出现和发展大大加快了生物学研究的进程, 并广泛用于基因组和转录组测序及植物基因组深度测序(Pazos-Navarro et al., 2011; Mal-
ausa et al., 2011)。NGS能产生大量的序列读长(reads), 序列的产生、组装和分析需要不同的实验

手段,如文库构建和生物信息学技术等。NGS已经成功用于分子标记的识别,包括SSRs和单核苷酸多态性(SNPs),目前该技术在白梨(*Pyrus bretschneideri*) (Wu et al., 2013)、甜瓜(*Cucumis melo*) (Garcia-Mas et al., 2012)、美洲花柏(*Chamaecyparis lawsoniana*) (Jennings et al., 2011)、黄扁柏(*Callitropsis nootkatensis*) (Jennings et al., 2011)和薇甘菊(*Mikania micrantha*) (Yan et al., 2011)等众多植物的基因组测序中已得到应用。而在牡丹SSR研究中,应用最多的NGS有两种方法:一是使用罗氏454测序(Roche 454 GS FLX),该技术基于乳液PCR和焦磷酸测序(Wall et al., 2009)。目前Gao等(2013)用454-GS-FLX高通量钛焦磷酸测序开发SSR标记,得到了675 221个牡丹片段,其中包含SSR序列数为237 134,鉴定的SSR序列数为164 043的片段存放在NCBI公共数据库(登录号: SRA098186)中。该方法是将得到的基因组DNA链接到T₄载体两端,经PCR扩增及生物素标记探针与链霉亲和素磁珠杂交,然后将DNA进行罗氏454测序(Roche 454 GS FLX),对测序结果进行处理分析。共设计合成了100对引物,对23个牡丹品种进行验证。二是使用Illumina测序,该测序技术单次运行产生的短read读段大于1亿条,每条read长约35–76 bp,数据产量约为3–6 Gb,平均费用约为每Mb \$4 (罗纯等, 2015)。Illumina测序是以双链DNA片段为测序模版。Gilmore等(2013)用Illumina测序开发微卫星标记,产生了48 457 692个片段,包括48 157 663个编码片段和300 029个非编码片段,其中包含SSRs的序列有11 203条,从芍药(*Paeonia lactiflora*)中得到了1 504对SSR引物,对4个芍药品种测试结果显示有384对引物具有多态性,其中有230对产生的多态性片段长度范围为72–500 bp,137对引物没有产物或者产生的片段长度超过500 bp,用21个SSR多态性标记在93个芍药、牡丹及其杂交品种中进行验证。Wu等(2014)用Illumina对洛阳红的花蕾进行转录组测序,共得到59 275条序列。用软件SSRIT在ESTs数据库中搜索SSRs,有2 989条序列含有SSR,用软件ORF Finder鉴定EST序列中的起始密码子和终止密码子,发现有1 384条序列的SSR侧翼序列距离过短而不适合引物设计。而在设计的引物中,有373对EST-SSR引物能够产生预期

大小的SSR产物,对373个SSR标记分析发现有219个标记(58.7%)在编码区,147个标记(39.4%)在非编码区,其中有42个标记在3'非编码区,有105个标记在5'非编码区,剩余的7个标记则在未知蛋白质的序列中出现。373对引物在亲本中进行筛选,发现有149对(39.4%)表现出多态性,包括54个二核苷酸位点,41个三核苷酸位点,5个四核苷酸位点,1个五核苷酸位点和48个六核苷酸位点。二、三、四、五和六核苷酸位点的多态性比例分别为38.8%、35.0%、31.3%、33.3%和49.0%。

3 牡丹基因组中SSR标记的频率及分布

SSR标记广泛分布于真核生物的基因组中,包括基因编码区和非编码区。Wu等(2014)从洛阳红花蕾的转录组测序结果中得到59 275条序列,其中有39 987条EST序列,平均每698 bp出现1个SSRs。用软件SSRIT从3 787 (6.4%)条序列中得到了4 373条EST-SSRs序列,其中有500条(13.2%)序列包含的SSR标记不止一个,平均含1个SSR标记的EST长度为9.24 kb。在识别的片段中,二核苷酸重复的频率为46.26%,最为丰富,其次是三核苷酸(27.30%)、六核苷酸(21.88%)、四核苷酸(3.06%)和五核苷酸(1.49%)。其中,在二核苷酸中,最常见的片段是AG/CT (41.4%)和GA/TC (39.9%),其次是AT/TA (11%)、CA/TG (4.4%)、AC/GT (2.9%)和CG/GC (0.4%)。在三核苷酸序列中,CCA/TGG (10.3%)和GAA/TTC (10.3%)最丰富。然而,在四、五和六核苷酸序列中没有明显的优势片段。SSR长度主要分布在12–24 bp之间,占总SSRs的99.1%,其中长度为18 bp的SSR最常见,其次是25–66 bp (0.9%)。Gao等(2013)通过二代测序技术(NGS),发现在这些读取片段的核苷酸中,腺嘌呤最丰富,其次是胞嘧啶、胸腺嘧啶和鸟嘌呤。SSR标记重复的长度为1–4 bp (单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸和四核苷酸),其中二核苷酸重复序列最丰富,最常见的片段是(AC)_n和(AG)_n,这也是所有SSRs标记中最主要的片段。在三核苷酸序列中,A/T重复占主导地位,其中AAC/GTT重复序列最丰富,其次是AAG/CTT重复序列,而CCG和ACG重复序列极少见,这与Sonah等(2011)的研究结果一致。最常见的五核苷酸和六核苷酸重复序列,是

包括二核苷酸CG的AACGT/ACGTT和AAGGAG/CCTTCT重复序列。五核苷酸重复序列在单核苷酸至六核苷酸重复中最少,这与Wu等的研究结果一致。目前已报道的关于牡丹基因组中SSR标记频率分布见表1。由于牡丹基因组很大,其测序工作尚未完成,根据目前已报道的SSR引物(表2),通过实验,对已开发的部分引物进行多态性检测,发现82对SSR引物具有多态性(表3)。

4 牡丹SSR标记的应用

4.1 遗传多样性研究

牡丹栽培历史悠久,在其长期的栽培史中,通过不断的自然选择和人工培育,已经形成了数量众多的牡丹栽培品种,从而丰富了牡丹的遗传变异(郭大龙, 2007a)。由于SSR标记揭示的多态性水平高,因此更适宜进行遗传多样性分析。Yu等(2013)用12对SSR引物在48个牡丹样本中扩增,共发现了42个等位基因,等位基因数目(the numbers of alleles, Na)变化范围为2–9个,平均3.5个;有效等位基因数目(the effective numbers of alleles, Ne)变化范围为1.4–4.7个,平均2.4个。观测杂合度(observed heterozygosity, Ho)为0.333–1.000,平均0.785;期望杂合度(expected heterozygosity, He)为0.298–0.795,平均0.541。多态性信息含量(polymorphism information content, PIC)范围为0.257–0.794,平均为0.468。Shannon指数范围为0.594–1.771,平均值为0.906。此外, 12个微卫星标记中的11个(除了seq4)也在芍药中有多态性,每个位点的等位基因为2–4,并且

除了seq7外,所有引物在川赤芍(*P. veitchii*)中均可交叉扩增。Wu等(2014)用30对EST-SSR引物对36个牡丹品种进行多态性评估,结果表明,这30对引物都有多态性,并发现254个等位基因,等位基因数目(Na)变化范围为3–12,平均7.4个;此外,观测杂合度(Ho)范围为0.19–0.81,平均0.52;期望杂合度(He)范围为0.43–0.87,平均0.74。30个SSR标记的多态性信息含量(PIC)范围为0.36–0.85,平均为0.69。这些结果说明,EST-SSRs位点的多态性信息量丰富。此外,有28个SSR标记的PIC值大于0.5。Shannon指数范围为0.83–2.14,平均值为1.56,也能反应其多态性。Gao等(2013)选择100对SSR引物对3个牡丹品种的多态性进行验证,发现24对引物有很高的多态性,随后它们被用于23个品种间的多态性分析。结果表明,等位基因位点数目为2–5个;期望杂合度介于0.085 0–0.727 5之间,观测杂合度为0–0.841 0。Hou等(2011b)用开发的20个新EST-SSR标记对两个品种群(洛阳品种群和嵩县品种群)的45个牡丹品种的多态性进行分析,发现洛阳品种群的等位基因数目(Na)范围为2–4个,平均2.6个,期望杂合度(He)范围为0.208 7–0.658 1,平均为0.410 3;嵩县品种群的等位基因数目(Na)范围为1–4个,平均2.4个,期望杂合度(He)范围为0.223 9–0.593 3,平均为0.404 1。这些结果说明新开发的20个EST-SSR标记的多态性较好。

4.2 亲缘关系研究

目前,在牡丹亲缘关系研究中,应用的分子标记主要是RAPD (苏雪等, 2006)和AFLP标记(Hou et al.,

表2 牡丹SSR标记的开发近况

Table 2 The recent development of SSR markers in *Paeonia suffruticosa*

Author	Total number of sequences examined	Number of SSR-containing sequences	Total number of identified SSRs	Total number of primers designed	Year of publication	Journal of publication
Jing Wu	59 275	4 373	3 787	2 989	2014	<i>Mol Breed</i>
Zhimin Gao	675 221	237 134	164 043	100	2013	<i>BMC Genomics</i>
Haiping Yu	–	–	–	48	2013	<i>Sci Hortic</i>
Barbara Gilmore	48 457 692	11 203	–	1 504	2013	<i>J Am Soc Hortic Sci</i>
Xiaogai Hou	2 204	901	–	29	2011	<i>Am J Bot</i>
Xiaogai Hou	–	362	24	24	2011	<i>Biol Plant</i>
Andreas Homolka	96	56	41	26	2010	<i>Am J Bot</i>
Jingxiu Wang	240	58	–	45	2009	<i>Conserv Genet</i>

表3 82对牡丹SSR引物信息

Table 3 The information of 82 pair SSR primers in *Paeonia suffruticosa*

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Expected size (bp)	Repeat motif	Annealing temperature (°C)	GenBank accession number
PS001	F: AAACACCCAAGCAAATCG R: AATGAAACGCCGTCCTCT	475	(CT) ₆	54	GBGY01000001
PS005	F: GAGACCACCGAGTCACAG R: TCAGAGCATGTCCGAAAC	480	(GA) ₉	53	GBGY01000005
PS007	F: GACTTCGATAGCCTTGGG R: ATCTCAGCCGTTGTTTGG	203	(CT) ₈	55	GBGY01000007
PS021	F: AGATGGGAAGTTAAGGTGA R: GTATGTTGGTAAATGGGTTT	382	(GA) ₆	54.5	GBGY01000021
PS026	F: TTCCCTCCATTCTAACAC R: ACCCTAGCCTCTGACATT	187	(AG) ₆	56	GBGY01000026
PS041	F: GCACCGATAACTTCCAAAC R: GCAGGCGATGCTACAAAC	488	(TC) ₇	57	GBGY01000041
PS043	F: TCTCGCATTATCCTACAT R: TTGCCATAATTCTTCTACCT	243	(CT) ₇	53	GBGY01000043
PS047	F: AGACGACGAGCAAAGATAT R: AAAGGGCAAGATTGGAAAT	126	(TC) ₈	54	GBGY01000047
PS052	F: CAAATCTGCTAATTAAAGAC R: GATAGAAGGGAAAGGAAG	235	(CT) ₇	53	GBGY01000052
PS053	F: ATTGCCAGATTTGTTCAG R: CACCACTATTATCCCTTG	407	(AG) ₇	55.5	GBGY01000053
PS054	F: GAAGGATCTGAGAAGCATA R: AGTGAAGGAGACAACCCA	123	(GA) ₆	54	GBGY01000054
PS057	F: CATCGTCAATTTACTCATC R: TAACATCCAAAGCAACTC	212	(TC) ₆	56	GBGY01000057
PS068	F: CTTTGGCATTCTCATTCA R: GGTGGTATTGGGCTTCTT	174	(TC) ₇	55	GBGY01000068
PS074	F: TGCCTTGCTCCTCCTTGT R: CGGTTAGCCATGAATCCC	236	(CT) ₇	54	GBGY01000074
PS076	F: ATGCCACCTTTTCCTAAT R: TTCTTGTTCCCTTGTTTT	258	(TC) ₈	52	GBGY01000076
PS094	F: GCTGCTTGCTTACTCATC R: TTCTTGTACTCTGCCTCC	363	(AGC) ₆	55	GBGY01000095
PS095	F: TCCCAAGACCTCAAACAAC R: CCATCAATACGAGCCAAC	394	(CCA) ₅	56	GBGY01000096
PS099	F: GGGTCCAACAACCAAAC R: GGTCAGCAAGAGCCAAAG	330	(TGG) ₅	54	GBGY01000100
PS105	F: GTCACCGTCGTCTTCATC R: CTGGACCATATTTGTTGTATG	196	(CCA) ₅	54.5	GBGY01000106
PS111	F: GCAGATCATGGCGACAAAAC R: TGCTGAGGCGAAAGAACAG	372	(CAA) ₅	52	GBGY01000111
PS119	F: GCAAAGACAACAGCCTCG R: CTCACCATCCAATCCAC	289	(CAG) ₆	53	GBGY01000119
PS121	F: CTGTACCGAACCTGCTTG R: TGTGGTGAGGCTAAATCC	365	(TCA) ₅	55	GBGY01000123
PS125	F: GCCCTAACCTATCCCTA R: AAACCCACCAAGACAAAC	452	(TCA) ₇	53	GBGY01000128
PS134	F: CATCAACTTCGGCTAACA R: CAAACCTACCCAGTCCTAC	387	(CAC) ₅	54.4	GBGY01000134
PS147	F: TCTGGCAAATACCGTGAA R: AGCGGAGAAGGATAAATAAG	480	(TTC) ₅	56	GBGY01000150

表3 (续) Table 3 (continued)

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Expected size (bp)	Repeat motif	Annealing temperature (°C)	GenBank accession number
PS148	F: CTCCACCCGTATCACTCATC R: CGTCTCCTCCATCAACCT	353	(TGG) ₅	57.5	GBGY01000151
PS153	F: ATGTCCAAACTGGCAATA R: CCCTCCCTCAACACTTAC	260	(CT) ₁₀	55	GBGY01000156
PS157	F: CTCCCTGAACTCCCTACC R: CTTTCTAAACAGCCAACG	322	(AG) ₆	54	GBGY01000160
PS160	F: TAGAAGTGGAGGCATCAG R: GAGAAGTTTTGGGTGTCA	125	(CT) ₇	54	GBGY01000162
PS167	F: TTGTTGGTCGGCATCTCA R: GGGAATGGTCTCGTAGCG	317	(AG) ₈	57	GBGY01000169
PS173	F: TCTTCCGCCATTACTGAT R: CCTACCTTCGCTAAAACC	120	(GA) ₆	54	GBGY01000175
PS177	F: GAGAAAGGCAAGCGAGTC R: TCCATTGTTTGTGGGTGT	441	(GA) ₆	55	GBGY01000179
PS179	F: GTGATGGTCTGATGGAGGA R: AGAAAGCGGAGGAGTGGAG	234	(GA) ₆	56	GBGY01000181
PS180	F: CCCCAGAAATGGAGGAGTC R: AGGGCAGTAGCAGAAAGAAAGTC	188	(CT) ₆	56	GBGY01000182
PS186	F: GAGGTGACGGATGGAGTT R: CCTAAAGAAGGTTGTGGC	356	(GT) ₈	55	GBGY01000188
PS198	F: TATGCCTTTGGAGTTTGG R: TTCGTGGCTTGTCTGT	277	(TC) ₇	54.5	GBGY01000200
PS202	F: GTGGTGGTCCATCTTGAAG R: TTGCTTGAGCGAGTGTTATC	163	(TC) ₇	54	GBGY01000204
PS203	F: AGTTTTGGGATTCCGTAC R: CAGTGGGATTTTATTTGC	179	(TA) ₈	56	GBGY01000205
PS219	F: TGACATTGGCATTCCCTTG R: CAGACCCTACCCTCTTG	211	(GAA) ₆	54.5	GBGY01000221
PS227	F: GGGATACTGGGATAGGAC R: ACTTGGGAATTACTGACG	173	(TTC) ₆	53	GBGY01000229
PS228	F: TGAGGCGTGGTAGAGGTT R: TCAAGGAGGTGAGGGAGT	121	(TCT) ₅	54	GBGY01000230
PS240	F: AGTAGAATACGAAGAGGCATC R: CAAGACCGTGAACAAATATC	251	(GAA) ₆	55	GBGY01000242
PS273	F: CCCTCAGATGGGATGGAA R: CGGTGGTGGTACAACGAAC	314	(GCCGCT) ₄	53	GBGY01000274
PS296	F: CTCTTTTCGCTGCCACAAC R: CTCTGCTCTTCCCGTCTT	419	(GAAGCA) ₄	56	GBGY01000296
PS308	F: ACTACTCTATTGCGAAACC R: GTCTTATGGCGGCTATGT	189	(TC) ₇	54.5	GBGY01000308
PS309	F: AAGCAAAGCCGTGGAGAT R: GTGCGTGAAAAGGAGACAGAAC	257	(CT) ₆	55	GBGY01000309
PS318	F: ATCTACTCCCTATCCGTCAC R: CCCACAGCTACCTCCTTG	369	(CCACA) ₄	54	GBGY01000318
PS321	F: TGCTACCAGCTCCTCCAT R: ACCATCTCCACCATTTTCG	249	(ATCA) ₅	53	GBGY01000321
PS357	F: CACAAGGGTCAGCAGTTT R: CATTGGTAGGCGGTCTTT	231	(ATC) ₅	53.5	GBGY01000355
PS363	F: TTCAACCACATCTCCCTC R: CTACCACCATAAGTGTAAGAG	457	(TTG) ₇	54	GBGY01000361
PS364	F: GGAGCAAACCCTAAGCAC	205	(CTT) ₅	53.5	GBGY01000362

表3 (续) Table 3 (continued)

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Expected size (bp)	Repeat motif	Annealing temperature (°C)	GenBank accession number
PS365	R: ATAGCGAGGACCGTGAAT F: AACCAAATAACCTAAATG	350	(CCA) ₇	54	GBGY01000363
PS371	R: GAGTGGATGTGGGAGACG F: CATTGAGCCACCCATAGA	219	(CAC) ₅	55	GBGY01000369
21A	R: GCAACAATCCTGGTAGTGA F: CAACTTTGCCAACTTCGTCCACTTC	295	(TTC) ₁₂	55	—
26A	R: CCCGTCATGAACAAGAAGAAGGAAA F: TGGGCCCTACAAGTGATGATATTCC	245	(TTG) ₇	54	—
42A	R: ATGGAATCCAGGTTTGTGAATGTGA F: GTTTGGTTGTCATCAAGTTGTCTGA	345	(TG) ₁₈	56	—
45A	R: ATCAACAAGATTACTCCTACGCCCC F: TCAAAGCCAAATGGATACGGTCGCG	200	(AC) ₁₃	57	—
49A	R: TTCTTGTTTTCGTTCCTCGCCCCCT F: TCTGGGTGATAGGTGGAGCTGGTGC	314	(TGC) ₅	55	—
51A	R: GGAAGACGCCACAATGAAATCACA F: TATTGGACCCAGTCGATGATGTTTG	259	(CA) ₈	54.5	—
55A	R: GTGTGTGTCGTGCGTTGTGTTAGTG F: ATCCCAGTCCCGCCTTGCTGCTATC	285	(CT) ₈	56	—
56A	R: TTCACAACACACGCACACACGCACA F: CAGGTGGCATTGCTTCTCTCTCT	388	(AC) ₁₅	55	—
59A	R: TTGGCCCAATCACATGTAATCCCTC F: TACAACACTTCTCGCCTAACGCACC	270	(AC) ₁₈	56	—
63A	R: AGACATGGTGCAAGTATGGGAGACG F: CACCGCATATCTCCAACCTCACCTC	277	(TC) ₉ (AC) ₁₇	54	—
65A	R: TTGGGTAGAGATAGGAGGTTGGGGC F: CATACTCCATCATGATGCTGCTGT	355	(TGG) ₅	57	—
73A	R: ATGAAGGCTCAGTAAGAACCTCGGA F: CCATCTCAGGGTCAGGGTTCTCGTA	375	(CAG) ₅	55	—
77A	R: TAGAGTGACCTTCACCCCATCGG F: AACAGCTCAGGACCATGTGAAAAGT	363	(GA) ₁₃	56	—
87A	R: AATGTATGCGATATCTGACTGCCGA F: TGTAATCGATCGAGTTTCTTGGGTC	188	(TG) ₁₅	54	—
91A	R: CCTAACACTCCACCACTAAGTCGCT F: TCAGCCCCTAGCATAGAAGAATCCA	384	(GT) ₉ ttgta(TG) ₁₆	57	—
93A	R: TCTCACTACCACCTACGCGATGTTT F: CCTTCTTCTCCTTCGATAGCCACCC	432	(TG) ₁₀	55	—
99A	R: CACGCACTACAACCCAGCCTACACT F: AAAGGCTGCAAGTCGTATCCTCTCA	406	(TG) ₁₄	57	—
Seq4	R: AGGCAGTACATCAGGCAGAGGAGGT F: AACTGCTGAGGGCATAGAG	233	(TGG) ₆	55	KC121549
ACG9797	R: CATGATGTTGAGCCACCC F: GGTGCTGGGTGTTT	192	(ACG) ₈	54	FE529797
C-8918	R: GTTGGAGTTGGAGAGGTTG F: AAGAAGGGGAGGAGGAG	201	(AAG) ₅ (AGG) ₄	53	FE528918
PSESP2	R: GCGAGAAGAAAAGGCAAAAT F: GACGGAGAGAAAGAGAGCATA	403	(GAA) ₅	54	FE528847
PSESP7	R: GACAAAGACTGACACAGCGAT F: GGCTAATCTTGTGCTCAG	174	(A) ₂₉	55	FE527983
PAC28	R: AACCCCTCTTCTCCTCA F: CTGCAGGTCGACGATTAC	247	(AC) ₁₇	54.5	GQ480169
	R: AGTCCTGAGTAACATTGCCT				

表3 (续) Table 3 (continued)

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Expected size (bp)	Repeat motif	Annealing temperature (°C)	GenBank accession number
PC1	F: CTACCCACGACCCTTTTGAG R: AGCACTCTCACAACTTTCATAC	243	(AG) ₇	56	GQ480171
Pde106	F: TGGATTCTTATTTGTTTGAG R: ACACCGTGTAGCAGATGATGA	86-358	(AG) ₁₉	53	-
Pdel29b	F: CTGCCATTTCTTGCCTTCTTTGT R: TCTACCCTGCCAACAGCACATAC	253-308	(TGG) ₆	55	-
AT8051F	F: GGTATCAATCCGTGTGC R: GCGAAAATTTAGATGAGTGT	99-612	(AT) ₅	54.5	-
P05	F: TCGCCCAACCTGTCGTGGAGAT R: TTGAATAGAGCGGAATGGAAAA	129-437	(AG) ₉	54	-
Pae12	F: AAAGCTTTTGCACAACACACA R: ATAGCGCGAAAATTGAGGTG	97-155	(TA) ₆	53	-

2006), 应用SSR标记的研究报道较少。Zhang等(2012)利用EST-SSR研究了48个牡丹栽培种和8个牡丹野生种间的亲缘关系, 发现来源相同的栽培品种的亲缘关系较近, 紫斑牡丹(*P. rockii*)与西北牡丹群的亲缘关系较近。Yuan等(2010)从牡丹3个野生种, 即紫斑牡丹、延安牡丹(*P. yananensis*)和稷山牡丹(*P. jishanensis*)的159个样本个体中检测到152个等位基因, 其中有14个SSR标记位点。在检测到的等位基因中, 有36个(26.97%)为3个野生种所共有, 21个(13.81%)为稷山牡丹特有, 3个(1.97%)是延安牡丹特有, 71个(56.71%)为紫斑牡丹特有。之后, 分别对55个延安牡丹、68个稷山牡丹和123个紫斑牡丹的等位基因位点进行检测, 发现在延安牡丹的55个等位基因中, 42个(76.36%)与稷山牡丹共享, 46个(83.64%)与紫斑牡丹共享。因此, 延安牡丹的基因组是来自稷山牡丹和紫斑牡丹。同时, 共享等位基因的分布也表明, 稷山牡丹和紫斑牡丹在物种特异性的遗传成分中占有相当大的比重, 而延安牡丹所占的物种特异性的遗传成分比例很低, 同时主坐标分析结果表明, JWM个体是与YWM个体的基因混合体, 并且RGQ群体在遗传和空间上比紫斑牡丹的任何群体都更接近延安牡丹。同时, Yuan等(2010)还结合叶绿体基因片段分析, 证明了延安牡丹是以稷山牡丹为母本、紫斑牡丹为父本的杂交后代。

4.3 种质资源的遗传多样性研究

牡丹具有极高的观赏和药用价值, 其花大、形美、色艳且香浓, 为众人所喜爱。在长期的驯化栽培和

自然选择下, 牡丹形成了众多的栽培品种。同时, 牡丹组(Section *Moutan* D.C.) (包括革质花盘亚组(Subsection *Vaginatae*)和肉质花盘亚组(Subsection *Delavayanae*))野生种为我国所特有。由于牡丹分类地位的不断更新以及新品种的不断开发, 使其种质资源遗传多样性研究更加困难。因此, 众多学者开始致力于其遗传关系的研究, 常用系统发生树(phylogenetic tree)对牡丹种质资源遗传多样性进行分析。

Wu等(2014)将开发的30对EST-SSR引物用于56个牡丹种质资源遗传关系的调查, 进一步说明了EST-SSR标记开发的有效性。在NJ树状图中, 紫斑牡丹及其栽培品种群与四川牡丹紧密相关, 这与Zhao等(2008)的研究结果一致; 凤丹与日本品种群的栽培品种有更多的遗传相似性, 这与日本栽培品种起源于中国, 尤其是来自中原牡丹品种群的结论相一致。在系统发生树的几个分支中存在一些不一致的分支, 这可能是受研究样品数量限制的结果。Gao等(2013)对23个品种进行聚类分析, 结果表明, 紫斑牡丹和凤丹是所有21个品种的祖先; *P. suffruticosa* cv. 'Yao Huang'、*P. suffruticosa* cv. 'Dou Lv'、*P. suffruticosa* cv. 'Shui Jing Bai'和*P. suffruticosa* cv. 'Liu Li Guan Zhu'与中原品种群聚在一起, 说明它们的遗传关系密切; 来自日本的*P. suffruticosa* cv. 'Taiyoh'、*P. suffruticosa* cv. 'Shima Nisshiki'和*P. suffruticosa* cv. 'Gun Pou Den'与中原品种群聚在一起, 说明这3个日本牡丹品种来自中国的中原牡丹品种群; *P. suffruticosa* cv. 'Huai

Nian'、*P. suffruticosa* cv. 'Ju Yuan Shao Nv'和*P. suffruticosa* cv. 'Xin Xing'与西北品种群聚在一起,反映了它们的密切关系,并且在聚类分析图上形成了另一个分支。

Yu等(2013)为了解牡丹野生种与栽培品种间的遗传关系,基于SSR标记构建了NJ树。结果表明,芍药组(Section *Paeon* D.C.)的*P. suffruticosa* cv. 'Tao Hua Fei Xue'、*P. suffruticosa* cv. 'Fen Yu Nv'、*P. suffruticosa* cv. 'Qiao Ling'和*P. suffruticosa* cv. 'Da Fu Gui'先形成一个独立的分支,之后与川赤芍聚集在一起,在聚类图中形成一个外围组。牡丹组品种主要聚集在两个分支中。在分支1中,9个西北品种群的品种和紫斑牡丹品种分布在一个亚支,说明紫斑牡丹是西北品种群的祖先,这与先前的研究结果相一致,并且它们有相同的形态学特征,如在花瓣的基部都有清晰的黑紫色或紫红色斑点(周志钦等, 2003; Cheng, 2007)。在分支A中, *P. suffruticosa* cv. 'Hong Zhuang Su Guo'、*P. suffruticosa* cv. 'Hong Lou Cang Jiao'、*P. suffruticosa* cv. 'Qing Xin Bai'、*P. suffruticosa* cv. 'Gao Yuan Sheng Huo'和*P. suffruticosa* cv. 'Lan Zhang Cai Wei' 5个重瓣或半重瓣花形的品种聚集在一起。同时,所有单瓣花型品种,如*P. suffruticosa* cv. 'Ye Guang Bei'、*P. suffruticosa* cv. 'Bing Xin Fen He'、*P. suffruticosa* cv. 'Han Hai Bin Xin'和*P. suffruticosa* cv. 'Ming Mou'与紫斑牡丹品种聚集在分支B中。牡丹花的原始形式是单瓣花,但可能由于栽培条件不同,导致雌蕊瓣化形成了半重瓣或重瓣花形,说明花的形态与遗传信息存在一些关系,这与Hou等(2006)的研究结果一致。分支2是由中原牡丹品种群的品种组成, *P. suffruticosa* cv. 'Er Qiao'和*P. suffruticosa* cv. 'Luo Yang Hong'聚在一起,清晰地说明了二者的起源。在聚类分析图中,相似系数较高的栽培品种聚在一起,说明它们的亲缘关系较近。

5 结语

牡丹不仅具有很高的观赏价值,而且在药用和籽油开发中也具广阔的应用前景。但由于其栽培历史悠久,遗传背景复杂,野生种与栽培品种及栽培品种间的亲缘关系尚不十分清楚。对于牡丹亲缘关系、

栽培品种的起源和分子标记辅助育种等问题都需进一步研究。而SSR标记具有分布广泛、多态性丰富、突变率高、重复性好、共显性和操作简便等优点,已被广泛应用于各种花卉、农作物及林木等的遗传研究。但是,目前SSR标记在牡丹中的应用较少,主要是由于SSR标记数量不足,因此大量开发牡丹SSR标记势在必行。

随着测序技术和计算机科学的发展,将会在公共数据库中搜索到越来越多的牡丹序列,SSR识别软件也将会识别到更多适宜标记的序列,从而更加准确且快速地进行牡丹遗传多样性的评价、遗传图谱的构建、数量性状位点的检测、重要性状基因和分子标记间的连锁,以及最终促进分子标记的辅助育种。

参考文献

- 陈向明, 郑国生, 张圣旺 (2001). 牡丹栽培品种的RAPD分析. 园艺学报 28, 370–372.
- 董海燕, 季孔庶, 侯伯鑫, 赵宏波 (2014). 基于ISSR标记的红花檉木品种亲缘关系分析. 园艺学报 41, 365–374.
- 郭大龙 (2007a). 牡丹种质资源遗传多样性研究进展. 北方园艺 (9), 61–65.
- 郭大龙 (2007b). 植物微卫星引物开发方法. 安徽农业科学 35, 5361–5363.
- 韩明利, 崔娜, 于志海, 李天来, 侯丽霞 (2011). EST-SSR标记在蔬菜遗传育种中的应用. 生物技术 21, 94–97.
- 洪德元, 潘开玉 (1999). 芍药属牡丹组的分类历史和分类处理. 植物分类学报 37, 351–368.
- 蒋晓英, 杨春文, 林清, 吴红, 杨勋毅, 刘捷, 雷开荣 (2013). SSR标记技术在杂交水稻和杂交玉米种子质量鉴定中的应用研究. 中国农学通报 29, 41–46.
- 罗纯, 张青林, 罗正荣 (2015). 第二代测序技术在植物遗传研究中的应用. 广东农业科学 42, 186–192.
- 苏雪, 张辉, 董莉娜, 张建清, 朱学秦, 孙坤 (2006). 应用RAPD技术对甘肃栽培牡丹品种的分类鉴定研究. 西北植物学报 26, 696–701.
- 谭祖猛, 李云昌, 胡琼, 梅德圣, 程计华 (2008). 分子标记在油菜杂种优势利用中的研究进展. 植物学通报 25, 230–239.
- 王东升, 辛红, 邢世岩, 刘晓静, 吴岐奎 (2013). 基于AFLP标记的山东省5个野核桃群体的遗传多样性分析. 植物资源

- 与环境学报 22(3), 63–69.
- 王玉民, 尹大鹏, 张春宵, 康岭生, 金峰学, 姜昱 (2014). 利用SSR标记分析35份糯玉米种质的遗传多样性. 玉米科学 22, 27–31, 35.
- 魏霜, 袁俊杰, 程文杰, 林利平, 李小健, 鄞杰平, 黄锦炎, 刘碧琳, 刘晓莹 (2014). 兰花的分子标记研究进展. 检验检疫学刊 (2), 73–76.
- 张冬菊, 李世超, 吴鹏夫, 张晓, 李秋香, 杨树华, 贾瑞冬, 葛红 (2014). 基于表型和SRAP标记的切花菊品种遗传多样性分析. 园艺学报 41, 118–130.
- 张杨, 陈志宽, 赖育菠, 黄树林, 邵红伟 (2014). 应用RAPD分子标记技术探讨3种石斛属植物的种间关系. 亚热带植物科学 43, 123–126.
- 周志钦, 潘开玉, 洪德元 (2003). 牡丹组野生种间亲缘关系和栽培牡丹起源研究进展. 园艺学报 30, 370–372.
- Agarwal M, Shrivastava N, Padh H (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep* 27, 617–631.
- Akkak A, Scariot V, Torello Marinoni D, Boccacci P, Beltramo C, Botta R (2009). Development and evaluation of microsatellite markers in *Phoenix dactylifera* L. and their transferability to other *Phoenix* species. *Biol Plant* 53, 164–166.
- Akritidis P, Mylona PV, Tsaftaris AS, Polidoros AN (2009). Genetic diversity assessment in greek *Medicago truncatula* genotypes using microsatellite markers. *Biol Plant* 53, 343–346.
- Cheng FY (2007). Advances in the breeding of tree peonies and a cultivar system for the cultivar group. *International Journal Plant Breeding* 1, 89–104.
- Condit R, Hubbell SP (1991). Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genome. *Genome* 34, 66–71.
- Eujayl I, Sledge MK, Wang L, May GD, Chekhovskiy K, Zwonitzer JC, Mian MAR (2004). *Medicago truncatula* EST-SSRs reveal cross-species genetic markers for *Medicago* spp. *Theor Appl Genet* 108, 414–422.
- Gai SP, Zhang YX, Mu P, Liu CY, Liu S, Dong L, Zheng GS (2012). Transcriptome analysis of tree peony during chilling requirement fulfillment: assembling, annotation and markers discovering. *Gene* 497, 256–262.
- Gao ZM, Wu J, Liu ZA, Wang LS, Ren HX, Shu QY (2013). Rapid microsatellite development for tree peony and its implications. *BMC Genomics* 14, 886.
- Garcia-Mas J, Benjak A, Sanseverino W, Bourgeois M, Mir G, González VM, Hénaff E, Câmara F, Cozzuto L, Lowy E, Alioto T, Capella-Gutiérrez S, Blanca J, Cañizares J, Ziarsolo P, Gonzalez-Ibeas D, Rodríguez-Moreno L, Droege M, Du L, Alvarez-Tejado M, Lorente-Galdos B, Melé M, Yang L, Weng Y, Navarro A, Marques-Bonet T, Aranda MA, Nuez F, Picó B, Gabaldón T, Roma G, Guigó R, Casacuberta JM, Arús P, Puigdomènech P (2012). The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 11872–11877.
- Gilmore B, Bassil N, Nyberg A, Knaus B, Smith D, Barney DL, Hummer K (2013). Microsatellite marker development in peony using next generation sequencing. *J Amer Soc Hort Sci* 138, 64–74.
- Guo DL, Hou XG, Zhang J (2009). Sequence-related amplified polymorphism analysis of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andrews) cultivars with different flower colours. *J Hortic Sci Biotechnol* 84, 131–136.
- Hakki EE, Akkaya MS (2000). Microsatellite isolation using amplified fragment length polymorphism markers: no cloning, no screening. *Mol Ecol* 9, 2152–2154.
- Homolka A, Berenyi M, Burg K, Kopecky D, Fluch S (2010). Microsatellite markers in the tree peony, *Paeonia suffruticosa* (Paeoniaceae). *Am J Bot* 97, e42–e44.
- Hou XG, Guo DL, Cheng SP, Zhang JY (2011a). Development of thirty new polymorphic microsatellite primers for *Paeonia suffruticosa*. *Biol Plant* 55, 708–710.
- Hou XG, Guo DL, Wang J (2011b). Development and characterization of EST-SSR markers in *Paeonia suffruticosa* (Paeoniaceae). *Am J Bot* 98, e303–e305.
- Hou XG, Yin WL, Li JJ, Wang HF (2006). AFLP analysis of genetic diversity of 30 tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) cultivars. *Scientia Agric Sinica* 39, 1709–1715.
- Jennings TN, Knaus BJ, Mullins TD, Haig SM, Cronn RC (2011). Multiplexed microsatellite recovery using massively parallel sequencing. *Mol Ecol Resour* 11, 1060–1067.
- Malausa T, Gilles A, Meglécz E, Blanquart H, Duthoy S, Costedoat C, Dubut V, Pech N, Castagnone-Sereno P, Délye C, Feau N, Frey P, Gauthier P, Guillemaud T, Hazard L, Corre V, Lung-Escarmant B, Malé PJG, Ferreira S, Martin JF (2011). High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Mol Ecol Resour* 11, 638–644.
- Patzak J (2001). Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica* 121, 9–18.

- Pazos-Navarro M, Dabauza M, Correal E, Hanson K, Teakle N, Real D, Nelson MN** (2011). Next generation DNA sequencing technology delivers valuable genetic markers for the genomic orphan legume species, *Bituminaria bituminosa*. *BMC Genet* **12**, 104.
- Provan J, Powell W, Waugh R** (1996). Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theor Appl Genet* **92**, 1078–1084.
- Refseth UH, Fangan BM, Jakobsen KS** (1997). Hybridization capture of microsatellites directly from genomic DNA. *Electrophoresis* **18**, 1519–1523.
- Schuster SC** (2008). Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat Methods* **5**, 16–18.
- Smulders MJM, Bredemeijer G, Rus-Kortekaas W, Arens P, Vosman B** (1997). Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theor Appl Genet* **94**, 264–272.
- Sonah H, Deshmukh RK, Sharma A, Singh VP, Gupta DK, Gacche RN, Rana JC, Singh NK, Sharma TR** (2011). Genome-wide distribution and organization of microsatellites in plants: an insight into marker development in *Brachypodium*. *PLoS One* **6**, e21298.
- Tautz D** (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res* **17**, 6463–6471.
- Uzun A, Gulsen O, Seday U, Bircan M, Yilmaz KU** (2010). SRAP based genetic analysis of some apricot cultivars. *Rom Biotech Lett* **15**, 5396–5404.
- Vijayan K** (2007). Molecular markers and their application in mulberry breeding. *Int J Indust Entomol* **15**, 145–155.
- Wall PK, Leebens-Mack J, Chanderbali AS, Barakat A, Wolcott E, Liang HY, Landherr L, Tomsho LP, Hu Y, Carlson JE, Ma H, Schuster SC, Soltis DE, Soltis PS, Altman N, dePamphilis CW** (2009). Comparison of next generation sequencing technologies for transcriptome characterization. *BMC Genomics* **10**, 347.
- Wang JX, Xia T, Zhang JM, Zhou SL** (2009). Isolation and characterization of fourteen microsatellites from a tree peony (*Paeonia suffruticosa*). *Conserv Genet* **10**, 1029–1031.
- Wang LY, Wang Z, Weber JL, Zhong G, Tanksley SD** (1994). Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor Appl Genet* **88**, 1–6.
- Wu J, Wang ZW, Shi ZB, Zhang S, Ming R, Zhu SL, Khan MA, Tao ST, Korban SS, Wang H, Chen NJ, Nishio T, Xu X, Cong L, Qi KJ, Huang XS, Wang YT, Zhao X, Wu JY, Deng C, Gou CY, Zhou WL, Yin H, Qin GH, Sha YH, Tao Y, Chen H, Yang Y, Song Y, Zhan DL, Wang J, Li LT, Dai MS, Gu C, Wang YZ, Shi DH, Wang XW, Zhang HP, Zeng L, Zheng DM, Wang CL, Chen MS, Wang GB, Xie L, Sovero V, Sha SF, Huang WJ, Zhang SJ, Zhang MY, Sun JM, Xu LL, Li Y, Liu X, Li QS, Shen JH, Wang JY, Paull RE, Bennetzen JL, Wang J, Zhang SL** (2013). The genome of the pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.). *Genome Res* **23**, 396–408.
- Wu J, Cai CF, Cheng FY, Cui HL, Zhou H** (2014). Characterisation and development of EST-SSR markers in tree peony using transcriptome sequences. *Mol Breed* **34**, 1853–1866.
- Yan Y, Huang X, Fang XT, Lu L, Zhou RC, Ge XJ, Shi SH** (2011). Development and characterization of EST-SSR markers in the invasive weed *Mikania micrantha* (Asteraceae). *Am J Bot* **98**, e1–e3.
- Yu HP, Cheng FY, Zhong Y, Cai CF, Wu J, Cui HL** (2013). Development of simple sequence repeat (SSR) markers from *Paeonia ostii* to study the genetic relationships among tree peonies (Paeoniaceae). *Sci Hortic* **164**, 58–64.
- Yuan JH, Cheng FY, Zhou SL** (2010). Hybrid origin of *Paeonia* × *yananensis* revealed by microsatellite markers, chloroplast gene sequences, and morphological characteristics. *Int J Plant Sci* **171**, 409–420.
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T** (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol Ecol* **11**, 1–6.
- Zhang JJ, Shu QY, Liu ZA, Ren HX, Wang LS, De Keyser E** (2012). Two EST-derived marker systems for cultivar identification in tree peony. *Plant Cell Rep* **31**, 299–310.
- Zhang JM, Liu J, Sun HL, Yu J, Wang JX, Zhou SL** (2011). Nuclear and chloroplast SSR markers in *Paeonia delavayi* (Paeoniaceae) and cross-species amplification in *P. ludlowii*. *Am J Bot* **98**, e346–e348.
- Zhao X, Zhou ZQ, Lin QB, Pan KY, Li MY** (2008). Phylogenetic analysis of *Paeonia* sect. *Moutan* (Paeoniaceae) based on multiple DNA fragments and morphological data. *J Syst Evol* **46**, 563–572.

Application of Simple Sequence Repeat Molecular Markers in the Study of Tree Peony

Qi Guo^{1,3}, Dalong Guo^{2,3}, Lili Guo^{1,3}, Lin Zhang^{1,3}, Xiaogai Hou^{1,3*}

¹College of Agriculture, Henan University of Science & Technology, Luoyang 471003, China; ²College of Forestry, Henan University of Science & Technology, Luoyang 471003, China; ³Henan Engineering Technology Research Center of *Paeonia suffruticosa* For Oil, Luoyang 471003, China

Abstract Simple sequence repeat (SSR) markers have the characteristics of simple operation, codominance and reliable reproducibility in phylogenetic studies. This paper summarizes the techniques for developing peony SSR marker primers: bioinformatics technology, magnetic beads enrichment and next-generation sequencing. Furthermore, we summarize the current findings of the frequency and distribution of SSR loci in peony genome. We hope our summary on the application of SSR markers on tree peony will provide useful references to people who are working on the species.

Key words *Paeonia suffruticosa*, simple sequence repeat, molecular marker, genetic diversity, genetic relationship

Guo Q, Guo DL, Guo LL, Zhang L, Hou XG (2015). Application of simple sequence repeat molecular markers in the study of tree peony. *Chin Bull Bot* **50**, 652–664.

* Author for correspondence. E-mail: hxg382@126.com