

芍药属植物杂交亲和性及杂交后代 ISSR 分子鉴定

孙晓梅¹, 崔金秋¹, 王慧聪¹, 周文强², 王 丹², 杨宏光¹

(1. 沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 沈阳市植物园, 辽宁 沈阳 110163)

摘 要:以 4 个牡丹品种、8 个芍药品种为亲本,进行了杂交亲和性研究。结果表明:牡丹“彩绘×冠群芳”和芍药“粉玉奴×红玛瑙”组内杂交具有较高的亲和性;以芍药“粉玉奴”为母本,分别以牡丹“彩绘”、“粉中冠”为父本杂交获得了远缘杂交种子,并用 ISSR 分子标记对牡丹芍药远缘杂交后代进行真实性鉴定,2 个子代确定为芍药和牡丹的远缘杂交后代,均属偏母型。扩增结果中出现了父母本都不具有的谱带,说明子代不仅遗传了亲本的特征而且突变产生亲本所不具备的新性状。

关键词:牡丹;芍药;杂交;ISSR

中图分类号:S 682.1⁺2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)09-0098-04

芍药(*Paeonia lactiflora*)和牡丹(*Paeonia suffruticosa*)均属芍药属(*Paeonia* L.)植物,其生长缓慢,杂交育种周期长,新品种的繁育和推广需要 10 余年,而远缘杂交中容易出现牡丹、芍药花期不遇、杂交不亲和与杂种败育等问题。

芍药属组内近缘杂交主要包括品种群内或品种群间、亚组间的杂交^[1]。我国在组间远缘杂交育种的研究工作中也取得了一定成绩。已经开始研究组间远缘杂交育种,通过反复试验,至今已获得杂种苗^[2]。国内也在组间杂交和远缘杂交的初步试验中获得了成功^[3-4]。我国第一个组间远缘杂交种“和谐”也已经诞生^[5]。

该研究于 2011—2014 年在沈阳农业大学开展了芍药属植物杂交育种工作,并以 1 个芍药品种和 2 个牡丹品种为亲本,以其 2 个杂交子代为试验材料,应用 ISSR 分子标记方法对组内和组间的杂交亲和性以及杂交后代的鉴定进行了研究,以确定杂种真实性,旨在筛选杂交亲和性较高的组合,同时合理利用现有的种质资源,获得一批杂交亲本材料,以期为新品种的选育提供优良种质并为今后的育种工作提供实践依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

芍药品种“桃花石”(‘Taohuashi’),“胜桃花”

(‘Shengtaohua’),“蓝田飘香”(‘Lantianpiaoxiang’),“宏峰”(‘Hongfeng’),“粉翠楼”(‘Fencuilou’),“粉玉奴”(‘Fenyunu’),“红玛瑙”(‘Hongmanao’),“粉玉楼”(‘Fenyulou’),牡丹品种“曹州红”(‘Caozhouhong’),“冠群芳”(‘Guanqunfang’),“彩绘”(‘Caihui’),“粉中冠”(‘Fenzhongguan’)由沈阳农业大学花卉研究基地提供。

以牡丹组与芍药组为试材,母本为“粉玉奴”,父本为“彩绘”、“粉中冠”;获得杂交种“粉玉奴×彩绘”和“粉玉奴×粉中冠”,运用分子标记手段进行杂种真实性的早期鉴定。

1.2 试验方法

1.2.1 2 个芍药品种自交亲和性试验 以芍药“粉玉奴”和“红玛瑙”为试材,分别进行去雄套袋、去雄不套袋、不去雄套袋 3 种处理。

1.2.2 杂交试验 于 2011—2014 年进行杂交试验,选取生长健壮的植株作为母本,将母本花蕾在露色期用镊子将雄蕊和花瓣摘掉,用备好的硫酸纸袋套在柱头上,用回形针将袋口下端扎紧。观察母本柱头粘液分泌情况,在粘液分泌前 1 d 开始授粉,连续 3 d,共授粉 3 次。在授粉约 7 d 后,柱头表面开始变干、萎蔫、粘液硬化,此时摘除纸袋,使其透光通风,有利于种子发育和成熟。当母本心皮呈蟹黄色且微裂时摘下,收集种子。杂交组合详见表 1。

1.2.3 2 个远缘杂种的 ISSR-PCR 反应及其检测 试验参照高昊丹^[6]对芍药属品种 ISSR-PCR 反应的最佳扩增试验结果进行操作。PCR 反应的程序为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 45 s;各引物退火温度 40 s;72℃ 90 s;42 个循环;72℃ 延伸 7 min;所得 PCR 扩增产物 4℃ 保

第一作者简介:孙晓梅(1970-),女,博士,教授,研究方向为园林植物遗传育种。E-mail:xiaomei7280@126.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31470696);沈阳市科技攻关资助项目(F13-100-3-00)。

收稿日期:2015-12-18

存。最终筛选 3 条背景清晰、信号较强、扩增条带重复性、多态性均较好的引物用于 PCR 反应(表 2)。应用上述体系及引物对 2 个杂交品种“粉玉奴×彩绘”、“粉玉奴×粉中冠”的基因组 DNA 模板进行扩增反应。

表 1 牡丹组与芍药组组内和组间杂交组合

Table 1 Hybridization combination between Sect. *Moutan* and *Paeonia*

母本 Female		父本 Male						
♀		♂						
		“彩绘”‘Caihui’			“粉中冠”‘Fenzhongguan’			
牡丹组内杂交组合 Hybridization combinations of Sect. <i>Moutan</i>	“曹州红”‘Caozhouhong’	✓						
	“冠群芳”‘Guanqunfang’	✓					✓	
	“彩绘”‘Caihui’						✓	
	“粉中冠”‘Fenzhongguan’	✓						
♀		♂						
		“桃花石” ‘Taohuashi’	“粉玉奴” ‘Fenyunu’	“胜桃花” ‘Shengtaohua’	“蓝田飘香” ‘Lantianpiaoxiang’	“宏峰” ‘Hongfeng’	“粉玉楼” ‘Fenyulou’	“红玛瑙” ‘Hongmanao’
芍药组内杂交组合 Hybridization combinations of Sect. <i>Paeonia</i>	“红玛瑙”‘Hongmanao’	✓	✓					
	“桃花石”‘Taohuashi’		✓	✓				
	“胜桃花”‘Shengtaohua’	✓					✓	
	“宏峰”‘Hongfeng’				✓			
	“粉玉楼”‘Fenyulou’		✓					✓
牡丹组与芍药组杂交组合 Hybridization combinations of Sect. <i>Moutan</i> and Sect. <i>Paeonia</i>	“粉玉奴”‘Fenyunu’						✓	✓
	“曹州红”‘Caozhouhong’				“粉玉奴”‘Fenyunu’	✓		
	“冠群芳”‘Guanqunfang’				✓			
	“彩绘”‘Caihui’				✓			
	“粉中冠”‘Fenzhongguan’				✓			

注:“✓”表示设定的杂交组合。

Note: ‘✓’ is the hybridization combination.

表 2 ISSR 引物序列及其最佳退火温度

Table 2 Sequences of primers and the best annealing temperature

引物编号 Primer ID	序列 Primer sequences(5'-3')	退火温度 Annealing temperature/℃
0531-009	ACACACACACACACGGA	58.5
0531-018	AGAGAGAGAGAGAGCTTG	53.8
0531-022	AGAGAGAGAGAGAGGYC	52.0

1.3 项目测定

电泳图谱中产生的每个条带(DNA 片段)代表 1 个引物的结合位点,被称为 1 个分子标记(marker)。在同一引物的 PCR 产物中,电泳迁移率一致的条带具有同源性,可看作是位于同一位点。统计条带时只记录清晰稳定的条带,对于模糊不清、无法准确识别的条带不予记录。根据各扩增条带的有无进行统计,用“1”代表有带

(显性),用“0”代表无带(隐性),由此可形成一个 0/1 二元数据矩阵。

2 结果与分析

2.1 2 个芍药品种自交亲和性试验

由表 3 可知,在去雄套袋试验中,“粉玉奴”和“红玛瑙”均没有产生种子;在去雄不套袋试验中,“粉玉奴”和“红玛瑙”分别产生 76 粒与 81 粒种子,“红玛瑙”子房膨大,每个样本均有结实,“粉玉奴”子房瘦小,自然结实率相对偏低,不适宜做父本;在不去雄套袋试验中,“粉玉奴”产生 6 粒种子,“红玛瑙”产生 9 粒种子。结果表明,“粉玉奴”与“红玛瑙”均有微弱的自交结实性,作为杂交母本时需及时去雄,以免柱头被自身花粉污染。

表 3 3 种处理方式结实情况

Table 3 Setting ration of three different treatments

自交亲本 Inbred parent	去雄套袋 Emasculation and bagging			去雄不套袋 Emasculation and not bagging			不去雄套袋 Bagging and not emasculation		
	数量 Quantity	结种数 Number of vaccination	结实率 Setting rate	数量 Quantity	结种数 Number of vaccination	结实率 Setting rate	数量 Quantity	结种数 Number of vaccination	结实率 Setting rate
	/朵	/粒	/(粒·朵 ⁻¹)	/朵	/粒	/(粒·朵 ⁻¹)	/朵	/粒	/(粒·朵 ⁻¹)
“粉玉奴”‘Fenyunu’	15	0	0.00	15	76	5.07	15	6	0.40
“红玛瑙”‘Hongmanao’	8	0	0.00	8	81	10.13	8	9	1.13

2.2 不同杂交组合亲和性及结实率

2.2.1 牡丹组内杂交亲和性及结实率 由表 4 可知,“彩绘×冠群芳”结实率较高,“彩绘×粉中冠”、“彩绘×曹州

红”、“粉中冠×彩绘”、“粉中冠×冠群芳”均未获得种子。

2.2.2 芍药组内杂交亲和性及结实率 由表 5 可知,“红玛瑙×粉玉奴”和“红玛瑙×粉玉楼”的结实率较高,“桃花

石×红玛瑙”、“桃花石×胜桃花”、“粉玉奴×桃花石”、“蓝田飘香×宏峰”、“宏峰×胜桃花”均未获得种子。

2.2.3 芍药组与牡丹组远缘杂交亲和性及结实率 由表6可知,“粉玉奴×彩绘”、“粉玉奴×粉中冠”具有一定

表4 牡丹组内杂交结实情况

Table 4 Setting ratio of cross combinations of Sect. *Moutan*

杂交组合 Hybridization combinations (♀×♂)	授粉花数 Number of pollination /朵	结种数 Number of vaccination /粒	单花结实率 Setting rate of one flower /(粒·朵 ⁻¹)
“彩绘×冠群芳”‘Caihui×Guanqunfang’	5	65	13.00
“彩绘×粉中冠”‘Caihui×Fenzhongguan’	5	0	0.00
“彩绘×曹州红”‘Caihui×Caozhouhong’	5	0	0.00
“粉中冠×彩绘”‘Fenzhongguan×Caihui’	5	0	0.00
“粉中冠×冠群芳”‘Fenzhongguan×Guanqunfang’	5	0	0.00

表5 芍药组内杂交结实情况

Table 5 Setting ratio of hybridization combinations of Sect. *Paenonia*

杂交组合 Hybridization combinations (♀×♂)	授粉花数 Number of pollination /朵	结种数 Number of vaccination /粒	单花结实率 Setting rate of one flower /(粒·朵 ⁻¹)
“桃花石×红玛瑙”‘Taohuashi×Hongmanao’	2	0	0.00
“桃花石×胜桃花”‘Taohuashi×Shengtaohua’	2	0	0.00
“粉玉奴×桃花石”‘Fenyunu×Taohuashi’	8	0	0.00
“粉玉奴×红玛瑙”‘Fenyunu×Hongmanao’	80	578	7.23
“粉玉奴×粉玉楼”‘Fenyunu×Fenyulou’	66	268	4.06
“胜桃花×桃花石”‘Shengtaohua×Taohuashi’	3	5	1.67
“蓝田飘香×宏峰”‘Lantianpiaoxiang×Hongfeng’	1	0	0.00
“宏峰×胜桃花”‘Hongfeng×Shengtaohua’	3	0	0.00
“红玛瑙×粉玉奴”‘Hongmanao×Fenyunu’	3	35	11.67
“红玛瑙×粉玉楼”‘Hongmanao×Fenyulou’	3	32	10.67
“粉玉楼×粉玉奴”‘Fenyulou×Fenyunu’	6	7	1.17

结实率,但结实率较低。

2.5 ISSR-PCR 扩增结果与分析

由表7可知,3条引物对5个样品的DNA共扩增获得162条清晰可辨的条带,其中多态性条带102条。由图1可知,在“粉玉奴×彩绘”的杂交组合中共检测到85个位点,双亲与子代共有位点18个。在“粉玉奴×粉中冠”的杂交组合中共检测到85个位点,双亲与子代共有位点14个。

表6 芍药组与牡丹组远缘杂交结实情况

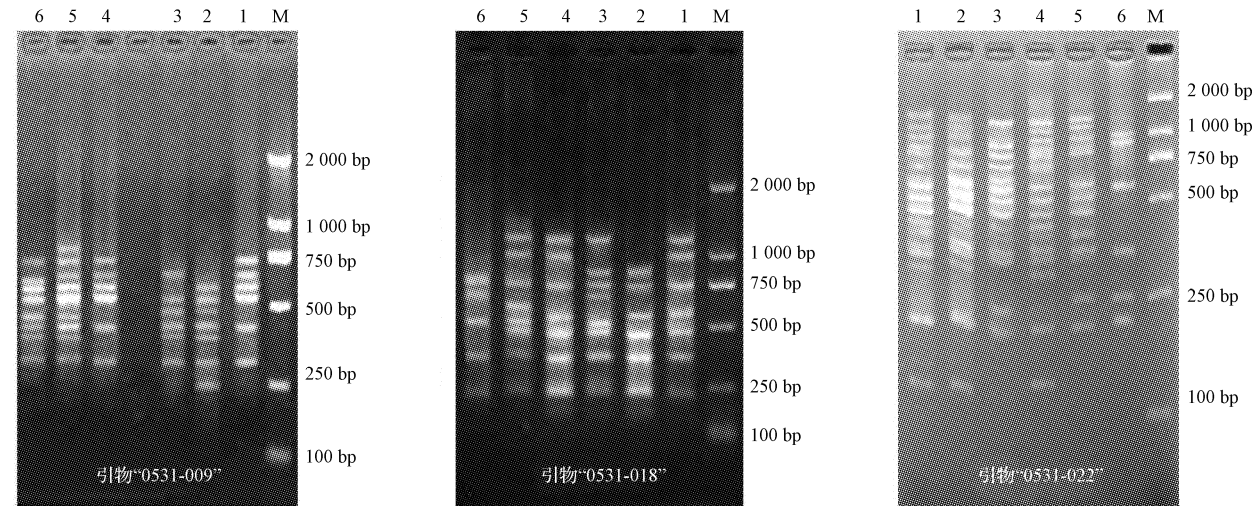
Table 6 Setting ratio of different hybridization combinations of Sect. *Moutan* and Sect. *Paenonia*

杂交组合 Hybridization combinations (♀×♂)	授粉花数 Number of pollination /朵	结种数 Number of vaccination /粒	单花结实率 Setting rate of one flower /(粒·朵 ⁻¹)
“粉玉奴×曹州红”‘Fenyunu×Caozhouhong’	20	0	0.00
“粉玉奴×冠群芳”‘Fenyunu×Guanqunfang’	19	0	0.00
“粉玉奴×彩绘”‘Fenyunu×Caihui’	120	7	0.06
“粉玉奴×粉中冠”‘Fenyunu×Fenzhongguan’	95	10	0.11

表7 ISSR 分析所用引物及扩增结果

Table 7 The primers alignment and amplified results of ISSR analysis

引物编号 Primer ID	扩增条带数 The number of amplified bands/条	多态性条带数 Number of polymorphic bands/条	多态性条带率 Rate of polymorphic bands /%
0531-009	43	25	58.14
0531-018	41	23	56.10
0531-022	78	54	69.83
总计	162	102	—
平均	54	34	62.96



注:M. Marker DL 2 000;1. “粉玉奴(♀)”;2. “粉玉奴(♀)×彩绘(♂)”;3. “彩绘(♂)”;4. “粉玉奴(♀)”;5. “粉玉奴(♀)×粉中冠(♂)”;6. “粉中冠(♂)”。

Note:M. Marker DL 2 000;1. ‘Fenyunu(♀)’;2. ‘Fenyunu(♀)×Caihui(♂)’;3. ‘Caihui(♂)’;4. ‘Fenyunu(♀)’;5. ‘Fenyunu(♀)×Fenzhongguan(♂)’;6. ‘Fenzhongguan(♂)’.

图1 3对引物对杂交后代的ISSR-PCR产物电泳结果

Fig.1 The amplified results of ISSR-PCR for 3 pair of primers

在运用 ISSR 分子标记鉴定的杂交后代中,除了产生与双亲互补的位点,还产生了双亲都不具有的特异位点。在“粉玉奴×彩绘”的杂交组合中,用引物“0531-009”扩增时,杂种后代在 760 bp 处产生了 1 个新扩增位点。在“粉玉奴×粉中冠”的杂交组合中,用引物“0531-009”扩增时,杂种后代在 250 bp 处产生了 1 条新扩增位点;用引物“0531-018”扩增时,杂种后代在 580 bp 处产生了 1 条新扩增位点。

3 结论与讨论

试验结果表明,“彩绘×冠群芳”为牡丹组内杂交组合,亲和性较好;“红玛瑙×粉玉奴”为芍药组内杂交组合,为较优良组合;“粉玉奴×彩绘”、“粉玉奴×粉中冠”为芍药组和牡丹组远缘杂交组合,2 个组合均具有一定亲和性,日后可进一步开展杂交工作。该试验中以“红玛瑙”为母本,“粉玉奴”为父本,结果表明“粉玉奴”作为父本材料潜力巨大,除了要选择育性较好的母本,还需选择亲和性较高的亲本组合。

该研究采用 ISSR 分子标记技术对杂种后代进行鉴定,检测结果表明,3 条引物中出现了父本、母本的单态位点,子代与双亲共有位点以及非双亲位点和缺失位点。子代与母本“粉玉奴”的亲缘关系较近,属偏母型杂种。2 个杂交种与双亲具有一定数量的共有位点,也有特异位点出现,该试验认为子代可能发生了较大的重组变异,出现了不同于亲本的特异性状,在日后的工作中可以继续试验观察,重点培育和利用。

该研究认为,利用 ISSR 标记技术在鉴定远缘杂种与品种间遗传关系方面非常有效,这与许多研究结论有相同之处,吴学尉等^[7]利用 ISSR 标记技术构建了百合 40 个杂交子代的 DNA 指纹图谱,检测到杂种表现出与

双亲互补带。该试验结果显示,大多数引物扩增到多态性条带中子代与双亲带互补,少数扩增带在双亲中显示,却在 F₁ 代中缺失,这些特殊的 ISSR 标记可能因为染色体在配子形成过程中产生交换或 DNA 分子碱基修饰引发突变,从而导致位点缺失^[8-9]。此外,在 F₁ 代中发现了父、母本中未出现的增加带,这可能由于染色体在配子形成过程中发生不等价交换,产生了新片段,致使杂种后代表现分离。该试验中筛选的 3 种引物在不同组合中均明显体现出较好的扩增效果,因此,该研究认为三者可以作为芍药属组间杂种鉴定的通用引物。杂种真实性的早期鉴定尤为重要,通过确定杂种偏向父本或母本可以预测 F₁ 代成年株表型性状,为日后定向培育兼具亲本优势的新品种提供有利依据。

参考文献

- [1] 何桂梅. 牡丹远缘杂交育种及其胚培养与体细胞胚发生的研究[D]. 北京:北京林业大学,2006.
- [2] 于晓南. 牡丹远缘杂交育种及新品种介绍[M]. 北京:中国林业出版社,2005:196-198.
- [3] 何桂梅. 中国观赏园艺研究进展[M]. 北京:中国林业出版社,2005:267-272.
- [4] 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,2008:1-53.
- [5] 郝青,刘政安,舒庆艳,等. 中国首例芍药牡丹远缘杂交种的发现及鉴定[J]. 园艺学报,2008,35(6):853-858.
- [6] 高昊丹. 芍药属植物的综合评价及其亲缘关系的研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2012.
- [7] 吴学尉,崔光芬,吴丽芳,等. 百合杂交后代 ISSR 鉴定[J]. 园艺学报,2009,36(5):749-754.
- [8] 鹿金颖,毛永民,申莲英. 用 AFLP 分子标记鉴定冬枣自然授粉实生后代杂种的研究[J]. 园艺学报,2005,32(4):680-683.
- [9] 陈琼,穆鼎,义鸣放,等. 不同倍性百合杂交后代的核型及分子标记鉴定[J]. 园艺学报,2007,34(6):1477-1484.

Hybridization Affinity of *Paeonia* Plant and ISSR Molecular Identification of Hybrids

SUN Xiaomei¹, CUI Jinjiu¹, WANG Huicong¹, ZHOU Wenqiang², WANG Dan², YANG Hongguang¹

(1. College of Forest, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866; 2. Shenyang Botanical Garden, Shenyang, Liaoning 110163)

Abstract: Taking 4 varieties of *Paeonia suffruticosa* and 8 varieties of *Paeonia lactiflora* as parents, the crossbreeding affinity was studied. The results showed that ‘Caihui×Guanqunfang’ and ‘Fenyunu×Hongmanao’ had a higher affinity for hybrids. Using ‘Fenyunu’ as female, ‘Caihui’ and ‘Fenzhongguan’ as males to hybrid, the seeds were got, and the authenticity of hybrids was identified by ISSR. The results showed that two offspring were identified as *Paeonia suffruticosa* and *Paeonia lactiflora* hybrids, they were partial female. The bands which were absent in parents were found indicating the hybrids were not only genetic the parental characteristics but also produced some new traits which the parental did not have.

Keywords: *Paeonia suffruticosa*; *Paeonia lactiflora*; crossbreeding; ISSR