

文献著录格式: 赵海军, 王建民, 闫闪闪, 等. 牡丹亚组间杂交子代真实性的 SSR 鉴定 [J]. 浙江农业科学, 2025, 66 (7): 1672-1675.
DOI: 10.16178/j.issn.0528-9017.20240351

牡丹亚组间杂交子代真实性的 SSR 鉴定

赵海军¹, 王建民¹, 闫闪闪¹, 张佩¹, 盖伟玲^{2*}

(1. 菏泽市牡丹区牡丹研究院, 山东 菏泽 274000; 2. 青岛农业大学, 山东 青岛 266109)

摘要: 以滇牡丹 (*Paeonia delavayi*) 和日本牡丹栽培品种为亲本进行亚组间杂交, 是培育牡丹优异品种的重要育种途径, 对其杂交子代真实性进行早期的分子鉴定, 可以缩短育种周期, 提高育种效率, 降低育种成本。本研究以滇牡丹为母本, 以日本牡丹栽培品种岛锦为父本, 通过人工授粉杂交获得了 2 株实生幼苗, 利用简单重复序列标记 (SSR 分子标记) 技术确认了种苗的真实性。结果表明, 2 株杂交苗在 2 对 SSR 引物中具有亲本特异性互补型条带, 证实了它们是真实杂交种。该研究所应用的 SSR 分子标记技术具有准确、高效的特性, 可用于早期鉴定牡丹杂交子代, 为培育优良牡丹品种提供技术支持。

关键词: 牡丹亚组间杂交; 实生子代苗; SSR 分子标记

中图分类号: S685.11 文献标志码: A 文章编号: 0528-9017(2025)07-1672-04

Authenticity identification of inter-subgroup hybridization offspring of *Paeonia* × *suffruticosa* Andr. based on SSR markers

ZHAO Haijun¹, WANG Jianmin¹, YAN Shanshan¹, ZHANG Pei¹, GAI Weiling^{2*}

(1. Peony Research Institute of Mudan District Heze City, Heze 274000, Shandong; 2. Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong)

Abstract: Inter-subgroup hybridization between *Paeonia delavayi* and Japanese peony cultivars as parents is an important breeding pathway to cultivate excellent peony varieties, and early molecular characterization of the authenticity of their hybrid offspring can shorten the breeding cycle, improve the breeding efficiency, and reduce the breeding cost. In this study, two offspring seedlings were obtained by hand-pollination hybridization between *Paeonia delavayi* as the female parent and Japanese peony cultivar Daojin as the male parent. The authenticity of the hybrid offspring was identified using SSR molecular marker technology. The results revealed that two hybrid seedlings had parental specific complementary bands in two pairs of SSR primers, confirming that they were true hybrid species. The SSR molecular marker technology applied by this research institute has accurate and efficient characteristics, which can be used for early identification of peony hybrid offspring and provide technical support for cultivating excellent peony varieties.

Keywords: peony inter-subgroup hybridization; offspring seedling; SSR molecular marker

滇牡丹 (*Paeonia delavayi*) 属于芍药科 (*Paeoniaceae*) 芍药属 (*Paeonia*) 牡丹组 (*Sect. Mouton*) 肉质花盘亚组 (*Subsect. Delavayanae*), 是紫牡丹 (*P. delavayi*)、黄牡丹 (*P. lutea*)、狭叶牡丹 (*P. angustifolia*) 的合称^[1]。滇牡丹花色丰富, 包括纯黄色、纯红色、深紫黑色、

香槟色、绿色、复色以及许多自然杂交后形成的过渡色, 并且花香浓郁怡人, 是牡丹杂交育种的优良原始亲本资源^[2]。日本牡丹栽培品种属于牡丹组革质花盘亚组 (*Subsect. Vaginatae*), 日本牡丹栽培品种具有花色艳、花型大、花径直立等优点。以滇牡丹和日本牡丹栽培品种为亲本进行的杂交, 属于亚

收稿日期: 2024-03-27

基金项目: 山东省农业良种工程项目 (2020LZGC011)

作者简介: 赵海军 (1970—), 男, 汉族, 山东菏泽人, 高级农艺师, 本科, 主要从事牡丹研究工作, E-mail: 15065066999@163.com。

通信作者: 盖伟玲 (1971—), 女, 山东青岛人, 实验师, 硕士, 主要从事花卉育种栽培研究工作, E-mail: yanpingyu211@outlook.com。

组间杂交,是培育牡丹优异品种的重要育种途径。牡丹通过杂交获得种子,从播种到开花需要3~5 a,育种周期较长。因此,对杂交子代在早期鉴别真伪,是缩短育种周期,提高育种效率,降低育种成本的有效途径。

SSR分子标记技术具有多态性高、稳定、高效等优点,在牡丹杂交苗早期鉴定中具有科学性和准确性^[3]。本研究以滇牡丹(*Paeonia delavayi*)为母本,以日本栽培牡丹品种岛锦为父本进行杂交。对所获得的杂交实生幼苗利用SSR标记进行早期的真实性鉴定,在杂交育种早期鉴定杂交真伪,淘汰假杂种,减少育种过程中的工作量,缩短育种周期,以期对牡丹新品种早期选育提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验以滇牡丹为母本,日本牡丹栽培品种岛锦为父本,于2021年4月授粉35朵,获得饱满种子69粒,2021年8月初大田点播,2022年4月初发芽,获得2棵实生子代苗。供试亲本及杂交所得实生子代苗,均栽植于菏泽市牡丹区牡丹研究院试验基地,供试亲本为四年生,杂交子代为一年生。2023年4月,取2株实生子代苗(图1)及亲本嫩叶液氮速冻,-80℃冰箱保存,以备后续使用。

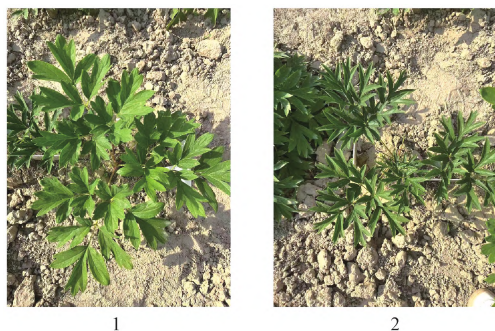


图1 杂交实生子代苗

Fig.1 Hybrid offspring seedlings

1.2 基因组DNA提取

利用植物基因组DNA提取试剂盒(SP Plant DNA Kit D5511, OMEGA)对样本基因组DNA进行提取,使用Micro drop 2000和琼脂糖凝胶电泳分别对DNA浓度和完整性进行检测,检测参数:琼脂糖凝胶浓度1%,电压 $5\text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$,时间为20 min。DNA稀释至浓度为 $30\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。

1.3 SSR-PCR扩增

反应体系总体积为10 μL ,包括1 $\times$ PCR缓冲液,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP,0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 荧光标记的通用引物,0.15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 正向引物,0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 反向引物和0.2 U *Taq* 聚合酶(Easy *Taq* DNA Polymerase, AP111, 全世金)。PCR反应程序见表1,操作均在避光环境下进行。

表1 PCR反应程序

Table 1 PCR reaction program

步骤	反应温度/ $^{\circ}\text{C}$	时间	
1	94	3 min	
2	94	30 s	} 35个循环
3	T_m	30 s	
4	72	15 s	
5	72	7 min	
6	16	Pulse	

1.4 牡丹SSR引物合成与筛选

针对样本品种,查阅牡丹SSR引物相关文献,张艳丽等^[4-5]对滇牡丹不同花色类群开发的10对EST SSR引物,用于包括岛锦在内的21个日本牡丹品种的DNA指纹图谱构建。参考Blacket等^[6]通用引物法,在特异引物后进行修饰,并合成荧光修饰的通用引物,进行荧光基因分型,合成引物序列见表2。利用亲本DNA对所合成引物进行多态性分析,选择可重复、具有明显多态性的引物用于后续杂交苗的鉴定。

1.5 杂交实生幼苗SSR分子鉴定

利用筛选到的SSR引物添加荧光标记,对杂交幼苗及父母本进行PCR扩增,扩增产物在3730XL系统下进行毛细管电泳和基因分型,对比父母本与杂交幼苗的基因型结果鉴定子代真伪性。子代扩增条带中存在双亲互补条带,即为真实性杂种;只存在母本特异性条带的子代为自交种或假杂种。

2 结果与分析

2.1 DNA提取和检测

选择亲本和杂交子代幼嫩叶片组织为样本材料提取DNA,使用浓度为1%的琼脂糖凝胶进行电泳,检测所提取DNA纯度。结果显示,胶图条带单一,DNA溶液不黏稠,无色素、悬浊物,无RNA、蛋白质、糖类等杂质污染, $D_{260}/D_{280}\geq 1.800$, $D_{260}/D_{230}\geq 1.500$ (表3),总量满足多次PCR需求,适合用于下一步PCR扩增。

表 2 引物信息

Table 2 Primer information

引物	引物序列 5'-3'	5'端修饰	重复碱基	退火温度/℃	条带大小/bp
P1	F TGGCGCTCCACACGGTATCTT	Tail C	(CTC)4	58.24	228
	R ATCGTGTTCGGTTCGCCGGT			59.08	
P2	F TCGATGCCCGCAGGGTTTCT	Tail C	(GCA)4	58.42	381
	R ACAGGTCTTGTCGGCCTTGT			58.01	
P3	F TCCCAAAAGAGGGCGGTGCT	Tail C	(AAG)4	58.25	306
	R TCCCCTCCGAAACGGCATGT			58.05	
P4	F ATGGCGAGATTGCCCGCTCT	Tail C	(TTAA)3	58.20	228
	R TGCAGTCACCACCATCCGTCA			58.10	
P5	F CGTCATACTGAACGCCGCCGA	Tail C	(TCTCGC)3	59.85	208
	R TCACGTTGGATGTTCACTGCCCA			58.76	
P6	F CGGCGTGCCCTTGAGACGTG	Tail C	(AGA)5	58.91	157
	R TGCCTCGAAAACTCGCCTTCTCC			59.48	
P7	F AGCGTGAAGCAACAAGCCGTG	Tail C	(CATTT)3	58.82	167
	R ACTGCGTTTCACGGCGAGGA			59.01	
P8	F AGCAGAGAAGGTAGGCGGCG	Tail C	(ACTGA)	58.59	171
	R AGCGCTGAAGGCCAGTCATGG			59.45	
P9	F GGGGACTCAAATCCTTGCGAAAACCA	Tail C	(CAC)4	59.68	189
	R AGGCCTAGTTTTGGTCTGGGCG			58.83	
P10	F CAGCTGGCTTCCACGCAGT	Tail C	(GGT)4	59.63	177
	R TAGCCATGCCGCCTCCACCT			59.97	
Tail C	CAGGACCAGGCTACCGTG	FAM		59.00	

表 3 样品 DNA 浓度检测结果

Table 3 Results of DNA concentration of samples

样品	类型	浓度值/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	吸光度				消光因子
			D_{260}	D_{280}	D_{260}/D_{280}	D_{260}/D_{230}	
滇牡丹	DNA	583.481	11.670	6.282	1.858	1.970	50.00
岛锦	DNA	382.362	7.647	3.932	1.945	2.074	50.00
子代 1	DNA	573.446	11.469	5.959	1.925	1.993	50.00
子代 2	DNA	192.732	3.855	1.973	1.954	2.183	50.00

2.2 杂交亲本 SSR 引物筛选

将合成的 10 对引物在亲本中通过 PCR 扩增进行多态性筛选,检测出 1~2 个多态性条带,经过重复性筛选,确定 P5、P10 两对引物在亲本中存在多态性且重复性良好,可用于杂交幼苗的鉴定。

2.3 杂交实生幼苗的分子鉴定结果

图 2 毛细管电泳结果显示,引物 P5、P10 在供试材料中分别扩增出目的片段,子代 1 和子代 2 在 P5 引物中扩增出了父本条带,但是母本自交也可出现子代 1 和子代 2 的条带,杂交子代的条带在父母本中均存在,且母本自交均可出现以上 2 种条带,因此,不能确定子代为滇牡丹与岛锦的杂交种;引物 P10 结果显示,岛锦为纯合基因型,滇牡丹为杂合基因型,子代 1 和 2 中均存在父本的特异条带,因此,可确定子代 1 和 2 都具有父母本互

补型条带,均为滇牡丹与岛锦的真实杂种。

3 讨论

在已有的关于牡丹杂交子代的品种鉴定研究中,通常采用形态学的方法进行鉴定,对形态学的指标人为地进行主观判断,具有操作简单的优点,然而,植物在生长发育过程中形态易受到环境影响而改变^[7]。更重要的是,相同杂交组合的不同子代个体基因型不同,造成形态学的不一致,使得难以分辨其真伪。本研究所获得的 2 株实生子代苗为同一杂交组合,但由于其基因型不同,形态学具有明显差异,子代 1 明显具有父本特征,可初步认定为杂交成功,子代 2 从形态学特征难以鉴定其是否杂交成功,而利用 SSR 分子标记技术检测到父本基因存在,可以鉴定其为真实杂种。

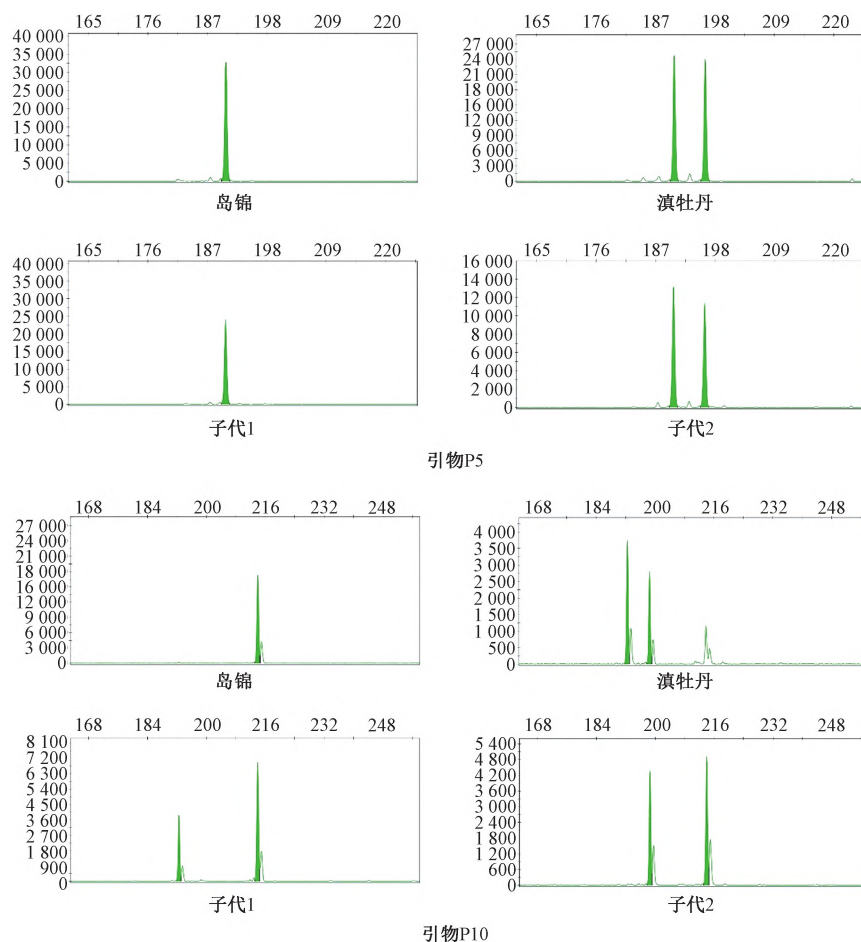


图2 引物P5和P10毛细管电泳结果

Fig. 2 Results of capillary electrophoresis of primers P5 and P10

本研究成功筛选出可用于鉴定牡丹亚组间杂交种的2对SSR引物,丰富了杂交子代鉴定的技术手段,为牡丹亚组间杂交子代的真实性鉴定提供了实用可行的技术参考。本研究利用SSR分子标记将滇牡丹与日本牡丹栽培品种岛锦杂交后的2株杂交子代植株进行真实性鉴定,将滇牡丹应用在牡丹杂交育种工作中,促进了牡丹的基因交流,SSR分子标记鉴定杂交子代均为真实杂种。但杂种后代尚未开花,该方法仅可作为早期鉴定方法,用于淘汰假杂种,缩短育种周期,减少育种工作量,而判断一个牡丹品种是否具有观赏价值和商品价值,后期还需要结合开花性状进一步分析鉴定。

参考文献:

- [1] 王莲英,袁涛,王福,等. 中国芍药科野生种迁地保护与新品种培育[M]. 北京:中国林业出版社,2013.
- [2] 曹羲君. 牡丹高代杂种与滇牡丹的引种及应用[D]. 北

京:北京林业大学,2010.

- [3] 陈梦洁,吕长平,秧拯民,等. 基于SSR标记的牡丹杂交子代真实性鉴定[J]. 分子植物育种,2023,21(6): 1948-1954.
- [4] 张艳丽,王雁,李正红,等. 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.
- [5] 孙嘉磊,杨志刚,罗兵,等. 21个日本牡丹品种DNA指纹图谱构建与EST-SSR标记遗传多样性分析[J]. 江苏农业科学,2015,43(9): 50-53.
- [6] BLACKET M J, ROBIN C, GOOD R T, et al. Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments: an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence[J]. Molecular Ecology Resources, 2012, 12(3): 456-463.
- [7] 罗柳明,李荣琛,李紫瑶,等. 基于RNA-seq牡丹SSR标记开发及通用性分析[J]. 分子植物育种,2021,19(3): 889-898.

(责任编辑:董宇飞)