

林榕燕,陈艺荃,钟淮钦,等. SRAP 标记在秋石斛杂交后代鉴定中的应用[J]. 江苏农业科学,2021,49(22):55-59.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.22.009

SRAP 标记在秋石斛杂交后代鉴定中的应用

林榕燕¹, 陈艺荃², 钟淮钦¹, 林 兵¹, 叶秀仙¹

(1. 福建省农业科学院作物研究所/福建省特色花卉工程技术研究中心, 福建福州 350013;

2. 福建省农业科学院农业工程技术研究所, 福建福州 350003)

摘要:基于序列相关扩增多态性(SRAP)分子标记对秋石斛四面佛与水芙蓉的杂交后代进行鉴定,并进行遗传多样性和聚类分析。结果显示,共筛选出 5 对 SRAP 引物组合用于杂交后代真实性的鉴定,供试 17 个杂交后代新株系均鉴定为真杂种;5 对 SRAP 引物组合共扩增到 23 个多态性条带,多态性比例为 88.46%。从聚类结果可以看出,绝大多数杂交后代在亲缘关系上先倾向于母本后倾向于父本;遗传相似系数分析结果表明,杂交后代与母本间的遗传相似系数大于父本,说明供试杂交后代在遗传上更偏向于母本,与聚类结果吻合。由研究结果可以看出,所筛选的 5 对 SRAP 引物组合用于秋石斛杂交后代鉴定是可行的。

关键词:秋石斛;SRAP 标记;杂交后代鉴定;聚类分析;遗传相似性分析

中图分类号:S682.310.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)22-0055-04

秋石斛(*Dendrobium* spp.),别称蝴蝶石斛,为兰科石斛属植物,其花朵鲜艳、花期长,是一种重要的切花和盆花种类^[1]。秋石斛喜温暖、湿润的生长环境,对温度的要求高,低温被普遍认为是秋石斛在我国推广应用的瓶颈^[2]。因此,培育出性状优异、抗寒性强、具有自主知识产权的秋石斛新品种已成为秋石斛育种的重要方向。目前,杂交育种仍然是获得秋石斛新品种最为常用的方法,笔者所在课题组前期采用表型性状、序列相关扩增多态性(SRAP)分子标记、种质适应性及抗寒性生理分析等评价方法,建立了石斛兰综合评价体系,筛选出多个综合性状优异的亲本,并对其开展杂交结实性研究,其中以四面佛为母本、水芙蓉为父本的这一杂交组合的结实率达 100%,杂交种子经无菌播种繁殖后获得了一批后代群体。但是由于石斛兰新品种的选育周期较长,为加快育种进程,对其杂交后代真实性的早期鉴定显得尤为必要。

随着分子生物学技术的发展,分子标记技术因

其众多优点而成为目前国内外植物杂交鉴定的高效技术手段之一。SRAP 标记是一种基于 PCR 的新型分子标记^[3],具有重复性好、共显性高、操作简便等优点,目前已被广泛应用于菊花^[4]、百合^[5]、大豆^[6]、枇杷^[7]等多种植物杂交后代的鉴定研究中,但目前尚未有基于 SRAP 分子标记的秋石斛杂交后代鉴定的相关报道。因此,本研究基于 SRAP 分子标记手段,对秋石斛四面佛与水芙蓉杂交后代新株系进行鉴定,以期对秋石斛杂种后代的早期选择及新品种(系)的快速鉴定提供方法。

1 材料与方法

1.1 材料

以秋石斛四面佛、水芙蓉及其 17 个杂交后代新株系(编号:1~17)为试验材料,供试材料均取自福建省农业科学院作物研究所特色兰花工程化实验室育种圃。试验于 2020 年 11 月在福建省特色花卉工程技术研究中心花卉分子实验室进行。

1.2 试验方法

1.2.1 叶片总 DNA 的提取 采用改良的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法进行秋石斛亲本及其杂交后代新株系叶片总 DNA 的提取,经 1% 琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测其完整性和纯度后,将 DNA 产物于 -20 ℃ 条件下保存备用。

1.2.2 秋石斛 SRAP-PCR 扩增的体系和程序 基于笔者所在课题组前期的研究结果^[8],利用筛选

收稿日期:2021-04-16

基金项目:福建省省属公益类科研院所专项(编号:2019R1031-6);

福建省农业科学院自由探索项目(编号:ZYTS2019003);福建省农业科学院科技创新团队建设项目(编号:CXTD2021010-2)。

作者简介:林榕燕(1990—),女,福建平潭人,硕士,助理研究员,主要从事花卉生物技术研究。E-mail:lryyan@163.com。

通信作者:叶秀仙,副研究员,主要从事花卉育种与组织培养技术研究。E-mail:yxx7861@163.com。

出的能在 48 份石斛兰中扩增出清晰条带的 14 对引物组合对供试材料进行 PCR 扩增。PCR 反应体系的总体积为 50 μL , 包括 5.0 μL 含 Mg^{2+} 的 Buffer, 4.0 μL 2.5 mmol/L dNTPs, 0.5 μL 5 U/ μL *Taq* 聚合酶, 2.0 μL 50 ng/ μL 模板 DNA, 各 2.0 μL 上游、下游引物, 34.5 μL ddH₂O。采用变温复性反应程序进行 PCR 扩增, 通过 2.5% 琼脂糖凝胶电泳分离产物, 获得电泳图谱后拍照保存。

1.2.3 秋石斛杂交后代真实性的鉴定 从 14 对 SRAP 引物组合中筛选出具有父本特征条带的引物组合, 利用筛选出的引物组合对杂交后代群体进行鉴别, 将具有父本特征条带的杂种鉴定为真杂种。

1.2.4 数据分析 观察分析电泳图谱, 对其中的 DNA 条带数进行统计, 在同一迁移位置上有扩增条带的记作 1, 无条带的则记作 0, 在 Excel 中构建 1、0 原始数据矩阵。基于数据矩阵, 利用 Excel 计算引

物的多态性比率, 利用 NTSYS - pc2. 10e 软件绘制亲本与杂交后代间的遗传距离矩阵与遗传相似系数矩阵。而后根据遗传距离矩阵进行聚类分析, 获得聚类图; 根据相似系数矩阵, 在 Excel 中绘制亲本与杂种间的遗传相似系数箱式图。

2 结果与分析

2.1 秋石斛 SRAP 引物的初筛选

将 19 份供试材料的 DNA 浓度稀释至同一水平后, 随机选择 2 个杂交后代的新株系样本进行 14 对 SRAP 引物组合的初步筛选, 筛选出 8 对能够扩增出明显条带的引物。随后, 利用这 8 对引物组合对供试的 19 个样品进行扩增, 发现有 5 对 SRAP 引物组合 (Me1 + Em2、Me1 + Em3、Me1 + Em8、Me4 + Em2 及 Me6 + Em6) 能扩增出清晰条带, 且父本能扩增出母本没有的特异性条带 (表 1)。

表 1 秋石斛杂交后代鉴定的 SRAP 标记引物信息

引物组合	正向引物序列	反向引物序列
Me1 + Em2	5' - TGAGTCCAAACCGGATA - 3'	5' - GACTGCGTACGAATTTGC - 3'
Me1 + Em3	5' - TGAGTCCAAACCGGATA - 3'	5' - GACTGCGTACGAATTGAC - 3'
Me1 + Em8	5' - TGAGTCCAAACCGGATA - 3'	5' - GACTGCGTACGAATTCTG - 3'
Me4 + Em2	5' - TGAGTCCAAACCGGACC - 3'	5' - GACTGCGTACGAATTTGC - 3'
Me6 + Em6	5' - TGAGTCCAAACCGGTAA - 3'	5' - GACTGCGTACGAATTGCA - 3'

2.2 杂交后代的真实性鉴定

利用筛选出的 5 对 SRAP 引物组合对 17 个杂交后代新株系进行真实性鉴定 (表 2), 其中能扩增出具有父本特异性条带的新株系便是真杂种, 否则为假杂种。结果表明, 在 Me1 + Em8 和 Me6 + Em6 引物组合的扩增结果中, 鉴定出有 16 个杂交后代新株系为真杂种, 鉴定效率达 94. 12%; 而 Me1 + Em2、Me1 + Em3、Me4 + Em2 引物组合检测到 10、12、11 个杂交后代新株系具有父本特异条带, 鉴定效率分别为 58. 82%、70. 59% 和 64. 71%。此外, 在 Me1 + Em8 引物组合中未检测到 5 号杂交后代新株系具

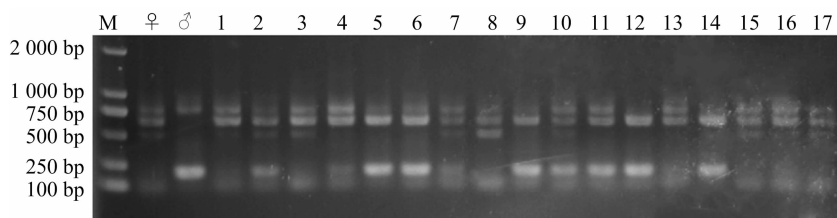
有父本特异条带; 而在 Me1 + Em2 引物组合的扩增结果中 (图 1), 发现 5 号杂交后代新株系具有父本特征条带, 鉴定其为真杂种; Me1 + Em3、Me4 + Em2 及 Me6 + Em6 引物组合中同样鉴定出 5 号杂交后代新株系, 为真杂种。综合 5 对引物组合的扩增结果, 供试的 17 个秋石斛杂交后代新株系均具有父本特异性条带, 鉴定为真杂种, 鉴定效率达到 100%。

2.3 SRAP 引物的多态性分析

从图 1 可以看出, 秋石斛不同杂交后代株系间的 SRAP 存在多态性, 因此对筛选出的 5 对 SRAP 引物组合进行多态性分析。由表 3 可以看出, 5 对

表 2 基于 SRAP 标记的秋石斛杂交后代鉴定结果

引物组合	父本特征带数 (条)	真杂种数 (种)	鉴定出的杂交后代新株系
Me1 + Em2	1	10	2、4、5、6、7、9、10、11、12、14
Me1 + Em3	1	12	1、2、4、5、6、8、9、10、11、12、13、14
Me1 + Em8	1	16	1、2、3、4、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17
Me4 + Em2	1	11	1、2、4、5、6、9、11、12、13、15、16
Me6 + Em6	2	16	1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16



M—DL2000 marker; ♀—母本四面佛; ♂—父本水芙蓉; 1~17—17个杂交后代新株系

图1 秋石斛杂交后代的 SRAP 引物组合 Me1+Em2 鉴定结果

引物组合共扩增出 26 个条带,其中多态性条带数有 23 个,平均每对引物组合扩增到 4.6 个多态性条带,多态性位点比例为 88.46%。Me1 + Em2、Me1 + Em8 及 Me4 + Em2 引物组合的多态性比例均为 100.00%,Me6 + Em6 引物组合的多态性比例仅为 71.43%。

表3 秋石斛 SRAP 引物的多态性分析

引物名	总条带 (条)	多态性条带 (条)	多态性比率 (%)
Me1 + Em2	5	5	100.00
Me1 + Em3	6	5	83.33
Me1 + Em8	2	2	100.00
Me4 + Em2	6	6	100.00
Me6 + Em6	7	5	71.43

2.4 亲本与杂交后代的聚类分析

根据统计结果建立 0,1 型数据,利用 NTSYS - pc2.10e 软件构建秋石斛亲本与杂交后代的聚类图。从图 2 可以看出,19 个供试材料间的遗传距离为 0.05 ~ 0.27,其中 2 号杂交后代新株系与 4 号杂交后代新株系间的遗传距离最近。在遗传距离 0.23 处,19 个供试秋石斛材料被分为 3 大聚类群:第 I 类,包含母本四面佛、17 号杂交后代新株系;第 II 类,包含 15 个杂交后代新株系,有 1 ~ 5 号杂交后代新株系及 7 ~ 16 号杂交后代新株系,占供试杂交后代新株系的 88.24%;第 III 类,包含父本水芙蓉和 6 号杂交后代新株系。

2.5 杂交亲本与后代的遗传相似系数分析

根据 NTSYS - pc2.10e 软件构建的秋石斛亲本与杂交后代的遗传相似系数矩阵,其中母本四面佛与父本水芙蓉间的遗传相似系数仅为 0.46,为遗传相似系数矩阵中的最低值。基于遗传相似系数矩阵,绘制亲本与杂交后代的遗传相似系数箱式图。由图 3 可以看出,母本四面佛与杂交后代新株系间的遗传相似系数为 0.62 ~ 0.85,其中母本四面佛与 3 号杂交后代新株系间的遗传相似系数最高,与 6

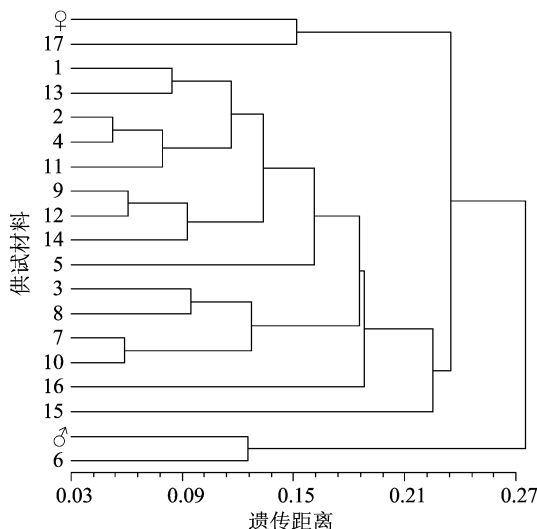


图2 基于 SRAP 分子标记的秋石斛聚类分析结果

号杂交后代新株系间的遗传相似系数最低,母本四面佛与杂交后代新株系间的平均遗传相似系数为 0.72。父本水芙蓉与杂交后代新株系间的遗传相似系数为 0.54 ~ 0.85,其中父本水芙蓉与 6 号杂交后代新株系间的遗传相似系数最高,与 3 号杂交后代新株系间的遗传相似系数最低,父本水芙蓉与杂交后代新株系间的平均遗传相似系数为 0.66。杂交后代与母本的遗传相似系数较父本的大,说明杂交后代与母本的亲缘关系更近,表现为偏母性遗传,这与聚类分析中绝大多数杂交后代新株系在遗传上先倾向于母本后倾向于父本的结果相吻合。

对 17 个杂交后代新株系间的遗传相似系数进行分析发现,5 号杂交后代新株系与 15 号杂交后代新株系间、5 号杂交后代新株系与 17 号杂交后代新株系间、14 号杂交后代新株系与 15 号杂交后代新株系间的遗传相似系数最低,为 0.62;2 号杂交后代新株系与 4 号杂交后代新株系间、4 号杂交后代新株系与 11 号杂交后代新株系间、7 号杂交后代新株系与 10 号杂交后代新株系间、9 号杂交后代新株系与 12 号杂交后代新株系间、12 号杂交后代新株系与 14 号杂交后代新株系间的遗传相似系数最高,为

0.92。17 个杂交后代新株系间的平均遗传相似系数为 0.79, 高于杂交后代与父母本间的遗传相似系数。

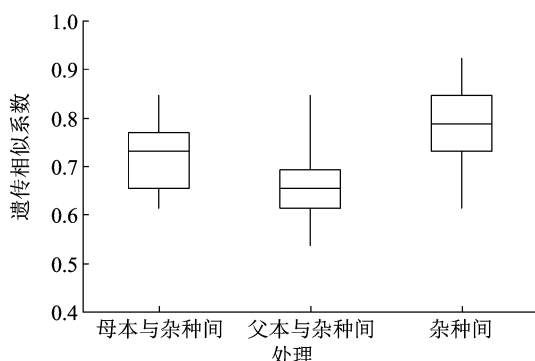


图3 亲本与杂种间遗传相似系数箱式图

3 结论与讨论

SRAP 分子标记技术因具有较高的重复性和共显性, 且引物开发成本较低, 目前已被成功应用于多种植物杂交后代真实性鉴定和遗传多样性分析中^[9-12]。本研究共筛选出 5 对 SRAP 引物组合用于秋石斛杂交后代的真实性鉴定研究。结果表明, 供试的 17 个杂交后代新株系均鉴定为真杂种, 鉴定效率为 100%, 说明 SRAP 分子标记技术应用于秋石斛杂交后代真实性鉴定研究中是可行的。李玉萍等利用 SRAP 分子标记技术对春兰与大花蕙兰杂种株系进行早期鉴定, 证实了 SRAP 分子标记作为兰花育种中早期杂交种筛选鉴定的有效性^[13]。在杂交后代真实性鉴定的过程中, 发现引物组合 Me1 + Em2 鉴定出的真杂种数量为 10 个, 未鉴定出 1 号、3 号、8 号、13 号、15 号、16 号及 17 号杂交后代新株系, 引物组合 Me1 + Em8 鉴定出 16 个真杂种, 鉴定出 7 个未在 Me1 + Em2 引物组合鉴定出的杂交后代新株系, 但未鉴定出 5 号杂交后代新株系, 说明用不同引物组合鉴定的结果存在差异, 因此, 利用多对引物组合的互补作用进行鉴定, 结果更为可靠^[14]。

本研究利用筛选出的 5 对 SRAP 引物组合对秋石斛亲本及其杂交后代进行 PCR 扩增, 并对其多态性进行分析, 发现多态性条带占比为 88.46%, 与洋葱的 87%^[15] 和苹果的 89.77%^[16] 相当, 说明供试 19 个秋石斛样本具有较高的遗传多样性。聚类分析结果显示, 17 号杂交后代新株系与母本四面佛间的亲缘关系较近, 对其表型性状进行观测发现, 二者均为紫色系花; 6 号杂交后代新株系与父本水芙蓉间的亲缘关系较近, 表型性状观测结果显示, 二

者在花型上具有较大相似性, 萼片均为椭圆形; 其余 15 个杂交后代新株系在亲缘关系上先倾向于母本后倾向于父本。对秋石斛亲本与杂交后代的遗传相似系数分析发现, 杂交后代新株系间的遗传相似系数高于杂交后代与亲本间的遗传相似系数, 且杂交后代与母本的遗传相似系数较父本的大, 说明该组合杂交后代的遗传基础趋向于变窄^[17], 且表现为偏母性遗传, 与聚类结果相印证。上述结果表明, SRAP 分子标记可较准确地反映秋石斛 17 个杂交后代新株系与秋石斛亲本间的差异, 且聚类结果与花色、花型等有较大相关性。

杂种鉴定是育种的基础工作之一, 对杂种后代群体进行及时有效的鉴定可提高育种效率, 对秋石斛新品种选育具有重要作用。本研究利用 SRAP 分子标记技术对秋石斛杂交后代新株系的真实性进行鉴定, 并从分子水平探讨了不同杂交后代新株系间及杂交后代新株系与亲本间的亲缘关系远近, 取得了较好的效果, 为秋石斛杂交后代真实性的鉴定、种质资源评价提供了技术支撑。鉴定出的真杂种后代加快了秋石斛新品种的选育进程, 可为秋石斛品种的进一步开发利用提供优良种质。

参考文献:

- [1] 高小坤. 秋石斛品种资源的评价与筛选[J]. 山东林业科技, 2018, 48(5): 9-13.
- [2] 陆顺教, 何嘉琦, 易双双, 等. 秋石斛‘三亚阳光’中苗低温胁迫生理响应研究及耐寒指标筛选[J]. 热带作物学报, 2021, 42(1): 116-122.
- [3] 马孟莉, 张婷婷, 朱玉道, 等. 利用 SRAP 标记分析草果遗传多样性[J]. 分子植物育种, 2020, 18(16): 5428-5435.
- [4] 刘颖鑫, 李沛瞳, 迟天华, 等. 菊花脑 × 甘菊种间 F₁ 杂种的鉴定和遗传多样性分析[J]. 园艺学报, 2019, 46(8): 1553-1564.
- [5] 孙宇明, 冯丽媛, 李琬玥, 等. SRAP 分子标记鉴定百合杂交后代[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2015, 33(1): 53-58.
- [6] 刘雪骄, 王明玖, 索荣臻. 利用 SRAP 分子标记鉴定内蒙古栽培大豆与野生大豆杂交后代真实性[J]. 大豆科学, 2017, 36(2): 193-198.
- [7] 袁卫明, 宋虎卫, 杨益花, 等. 枇杷 SRAP 标记体系优化及对枇杷矮化杂交种的鉴定[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(12): 36-40.
- [8] 林榕燕, 叶秀仙, 钟淮钦, 等. 基于 SRAP 分子标记的石斛兰种质资源遗传多样性分析[J]. 福建农业学报, 2018, 33(5): 469-473.
- [9] Zhao X P, Zou G F, Zhao J, et al. Genetic relationships and diversity among populations of *Paris polyphylla* assessed using SCoT and SRAP markers [J]. Physiology and Molecular Biology of Plants: an International Journal of Functional Plant Biology, 2020, 26(6): 1281-1293.

王红宝,丁 丁,郑伶俐,等. 天目琼花组培快繁技术体系的优化[J]. 江苏农业科学,2021,49(22):59-63.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.22.010

天目琼花组培快繁技术体系的优化

王红宝¹, 丁 丁¹, 郑伶俐¹, 王金禹¹, 郑丽锦², 郭艳超¹

(1. 河北省农林科学院滨海农业研究所, 河北唐山 063200; 2. 河北省林业技术推广总站, 河北石家庄 050090)

摘要:为获得一套完整高效的天目琼花组培快繁技术体系,以河北滨海地区天目琼花带腋芽茎段为试验材料,系统分析了外植体的消毒方法,不同激素配比及浓度对天目琼花腋芽诱导、不定芽增殖、不定芽生根和水培炼苗移栽的影响。结果表明,外植体最佳灭菌方法是依次用 75% 乙醇处理 40 s、2% NaClO 处理 3 min、0.1% HgCl₂ 处理 3 min,成活率为 58.33%;MS+0.2 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 为初代芽诱导的理想培养基,诱导率为 91.67%;不定芽增殖以 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA 培养基效果佳,株高为 6.04 cm,增殖系数可达 7;不定芽生根最适配方为 1/2MS+1.5 mg/L NAA,可诱导出健壮发达的根系,生根率为 92.2%;生根苗移栽基质为草炭:蛭石=1:1,成活率达 100%。研究成果更符合工厂化育苗的要求,为天目琼花产业化生产提供技术支持。

关键词:天目琼花;不定芽;增殖;生根;快速繁殖

中图分类号:S684.04⁺3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)22-0059-05

天目琼花 (*Viburnum sargentii*) 属忍冬科 (Caprifoliaceae) 红果类荚蒾属 (*Viburnum* L.) 落叶灌木,别称佛头花^[1]。天目琼花夏天开白花,花瓣宛如蝴蝶,叶片具掌状三出脉;秋天叶片变红,浆果近似球形;秋冬呈鲜红色^[2]。天目琼花作为一种优良的观花观果灌木,被广泛种植于林缘或道路两旁等^[3];此外还具有丰富的药用、保健价值,其中果实中黄酮类、酚类物质含量丰富^[4],具有抗氧化活性,

广泛应用于调控氧化应激和炎症反应研究^[5],茎中含有人体必需的脂肪酸,可用于治疗类风湿性关节炎^[6]。该树种在观赏和药用方面都具有较好的市场发展前景。

天目琼花一般采用扦插繁殖^[7-8],易受季节和取材数量等因素限制,且出苗不整齐,而组织培养技术生产具有繁殖快、成本低、保持母本优良性状等优点^[9-11]。目前,有关荚蒾属类植物的组织培养的研究已有报道^[12-14],但研究材料来自不同品种和地区,不同培养阶段选择的外植体、激素种类及配比浓度也不尽相同^[12-13],有的至今未形成完整的快繁体系,导致组培苗质量、诱导率和增殖系数等关键技术方面存在差异^[15]。因此,本研究以河北滨海地区天目琼花带芽茎段为试材,通过适时取材、合理消毒、优化激素种类配比和浓度,旨在建立一套成活率高、苗木质量好、育苗时间短的高效快繁技

收稿日期:2021-03-24

基金项目:河北省重点研发项目(编号:16226322D);河北省农林科学院创新工程(编号:2019-1-6-3)。

作者简介:王红宝(1992—),女,河北石家庄人,硕士,助理研究员,主要从事植物抗逆生理生态及分子遗传育种研究。E-mail:1252146220@qq.com。

通信作者:郭艳超,博士,研究员,主要从事植物抗逆生理生态及分子遗传育种研究。E-mail:guoyanchao2008@sina.com。

[10] 杨柳燕,杨 贞,蔡友铭,等. SRAP 分子标记在铁皮石斛后代品种鉴定中的应用[J]. 分子植物育种,2018,16(17):5690-5695.

[11] 侯祥文,徐诗涛,王德立,等. 海南岛鸟巢蕨自然种群遗传多样性 SRAP 分析[J]. 热带生物学报,2021,12(1):25-32.

[12] Bhatt J, Kumar S, Patel S, et al. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers based genetic diversity analysis of cumin genotypes[J]. Annals of Agrarian Science, 2017, 15(4): 434-438.

[13] 李玉萍,罗凤霞,汤庚国,等. 兰花杂交育种中杂种 F₁ 的早期鉴

定[J]. 核农学报,2016,30(4):676-684.

[14] 高轶静,方锋学,刘昔辉,等. 甘蔗与斑茅割手密复合体杂交后代的分子标记鉴定[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(5): 912-916.

[15] 刘湘萍,杜敏霞,赵 彦,等. 洋葱种质资源遗传多样性的 SRAP 和 ISSR 分析[J]. 中国蔬菜,2021(3):43-49.

[16] 李慧峰,冉 昆,王 涛. 利用 SRAP 标记构建山东省苹果资源指纹图谱[J]. 沈阳农业大学学报,2020,51(4):470-475.

[17] 吴洋洋,仰小东,杨信程,等. 菊花不完全双列杂交 F₁ 代遗传关系的 SRAP 分析[J]. 园艺学报,2017,44(6):1116-1124.