

DOI: 10.13332/j.1000-1522.20140134

牡丹遗传作图最适 F_1 分离群体的选择

蔡长福^{1,2} 刘改秀³ 成仿云¹ 吴静¹ 钟原¹ 李敏³

(1 北京林业大学园林学院, 国家花卉工程技术研究中心 2 福建省龙岩市林业科学研究所 3 洛阳国家牡丹园)

摘要:以3株‘凤丹’植株 M24、M49、M68 为母本,分别以中原牡丹‘红乔’、日本牡丹‘花王’和‘黑龙锦’为父本,采用控制授粉杂交方式,制备了3个规模较大的 F_1 杂交分离群体(个体数量分别为 366、233、197)。采用简单重复序列(SSR)标记技术,对这3个分离群体亲本进行多态性检测,结果表明,‘凤丹’M24 × ‘红乔’分离群体亲本间的多态性水平最高,19对SSR引物共检测到27个多态性位点,亲本间遗传距离为0.707 0;因此,选取了该分离群体作为构建牡丹遗传图谱的作图群体。在此基础上,利用SSR标记技术对作图群体中随机抽取的195株子代个体进行了基因型检测,结果显示19对SSR引物在作图群体中有15对具有多态性,其中13对引物在 $P < 0.01$ 水平上符合孟德尔期望分离比,占多态性标记总数的86.7%;测量分析了这195株子代个体的苗高、地径、当年生枝长、复叶长、复叶宽和叶柄长等6个表型性状,结果显示这6个表型性状在作图群体中变异明显,表型值的变异系数均超过15%。综上所述,‘凤丹’M24 × ‘红乔’ F_1 分离群体适合作为构建牡丹遗传连锁图谱的作图群体。

关键词:牡丹; SSR; 作图群体; 遗传图谱

中图分类号: S685.11 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2015)03-0139-09

CAI Chang-fu^{1,2}; LIU Gai-xiu³; CHENG Fang-yun¹; WU Jing¹; ZHONG Yuan¹; LI Min³. **Selecting optimal F_1 segregation population for genetic linkage mapping in tree peony.** *Journal of Beijing Forestry University* (2015) **37**(3) 139-147 [Ch, 36 ref.]

1 National Engineering Research Center for Floriculture, College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing, 100083, P. R. China;

2 Research Institute of Forestry, Longyan, Fujian, 364000, P. R. China;

3 National Peony Garden, Luoyang, Henan, 471006, P. R. China.

We established three large F_1 segregation populations of tree peony (*Paeonia* Sect. *Moutan*) through controlled hybridization, using three seeding individuals of *P. ostii* ‘Fengdan’ as female parents, labeled as M24, M49 and M68, and using *P. × suffruticosa* Zhongyuan Group ‘Hongqiao’, *P. × suffruticosa* Japan Group ‘Huawang’ and ‘Hei Longjin’ as male parents, correspondingly. The number of progeny of the three populations is 366, 233 and 197, respectively. We detected the levels of polymorphism between parents of the three segregation populations by employing 19 pairs of simple sequence repeat (SSR) primers. The results showed that, 19 pairs of SSR primers could produce the most informative polymorphism loci of 27 between the ‘Fengdan’ M24 and ‘Hongqiao’ among the parents of three segregation populations. The genetic distance between ‘Fengdan’ M24 and ‘Hongqiao’ was 0.707 0, the farthest among the parents of three segregation populations. Therefore, the segregation population of ‘Fengdan’ M24 × ‘Hongqiao’ was selected for the construction of genetic linkage map in tree peony. On this basis, segregations of genotype in randomly selected 195 progeny from mapping population were investigated using SSR marker. Of 19 pairs of SSR primers, 15 pairs showed the polymorphisms in mapping population, and 13 pairs (86.7%) of them segregated in an expected Mendelian ratio ($P <$

收稿日期: 2014-04-18 修回日期: 2014-07-19

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划课题(2012BAD01B0704)。

第一作者: 蔡长福。主要研究方向: 园林植物遗传育种。Email: caizhf@163.com 地址: 100083 北京市清华东路35号北京林业大学园林学院。

责任作者: 成仿云, 博士, 教授。主要研究方向: 园林植物资源与育种。Email: chengfy8@263.net 地址: 同上。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

0.01)。Furthermore, hereditary variations in plant height, ground diameter, current year branch length, compound leaf length, compound leaf width, and petiole length of those 195 progeny were measured and analyzed. The results indicated that the differences of the 6 phenotypic traits of mapping population were significant, and their variation coefficients were all greater than 15%. All above lead to the conclusion that segregation population of ‘Fengdan’ M24 × ‘Hongqiao’ was optimal for the construction of genetic linkage map in tree peony.

Key words *Paeonia* Sect. *Moutan*; SSR; mapping population; genetic linkage map

牡丹 (*Paeonia* Sect. *Moutan*) 是芍药科 (*Paeoniaceae*) 芍药属 (*Paeonia*) 植物, 其花大色艳, 奇丽无比, 被誉为“花中之王”“国色天香”, 是原产中国的世界著名花卉之一。牡丹栽培历史悠久, 其育种经历了引种驯化、实生苗选育以及有性杂交选育等不同的发展阶段, 形成了至少由 17 个品种群构成的复杂系统^[1]。然而, 目前国内外牡丹育种仍然以传统杂交育种为主, 存在育种目标不明确、周期长、效率低等问题, 已无法满足牡丹产业化快速发展的需求。分子标记辅助选择 (Marker-assistant selection, MAS) 技术, 可有效提高育种工作的定向性和育种中间材料的筛选效率, 有助于缩短育种周期, 有针对性地选育新品种, 是解决牡丹传统育种中存在问题的有效途径。

制备合适的作图群体是构建高效遗传图谱的关键, 是开展数量性状位点 (Quantitative trait loci, QTL) 定位研究的前提, 是实施 MAS 的基础。理想的作图群体, 要求群体亲本多态性高, 规模较大, 表型、抗性和分子水平上均发生最大分离^[2]。牡丹是多年生的木本植物, 具有基因组高度杂合、自交不亲和、童期长^[3]等特点, 与大多数的一年生作物相比, 制备一个理想的作图群体难度更大。目前, 牡丹的杂交育种研究, 多以创制杂交新品种为目的, 而在作图群体制备、遗传图谱构建等方面的研究仍未见报道; 因此, 制备一个合适的遗传作图群体, 对牡丹的

遗传育种研究具有重要意义。

本研究的主要目的就是建立一个适合构建牡丹遗传连锁图谱的作图群体。基于本课题组长期、大量的牡丹杂交育种工作^[4-6], 研究中选择了牡丹品种‘凤丹’作为杂交母本, 中原牡丹品种‘红乔’、日本牡丹品种‘花王’和‘黑龙锦’作为杂交父本, 采用控制授粉杂交方式, 制备了 3 个品种间杂交的 F₁ 分离群体。在此基础上, 利用 SSR 分子标记技术, 对所制备的 3 个杂交组合的亲本进行多态性检测, 选出一个亲本 DNA 多态性较高, 表型、抗性差异较大的分离群体, 作为构建牡丹遗传连锁图谱的作图群体, 并对该作图群体进行了基因型检测和表型变异分析。该作图群体的制备, 将为进一步构建牡丹遗传连锁图谱, 获得控制牡丹重要园艺性状的数量性状位点, 开展牡丹分子标记辅助选择奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

杂交母本为凤丹品种群 (*P. ostii* Fengdan Group) 中 3 株表型相似的‘凤丹’植株, 分别编号为‘凤丹’M24、‘凤丹’M49、‘凤丹’M68; 杂交父本分别为中原牡丹品种群 (*P. × suffruticosa* Zhongyuan Group) 的‘红乔’、日本牡丹品种群 (*P. × suffruticosa* Japan Group) 的‘花王’和‘黑龙锦’ (表 1)。所有试验材料均来自于洛阳国家牡丹园。

表 1 牡丹杂交亲本的选择及其主要表型性状

Tab. 1 Main phenotypic traits of the selected peony hybrid parents

亲本 Parent	名称 Name	表型性状 Phenotypic trait
母本 Female parent	‘凤丹’ M24、‘凤丹’ M49、‘凤丹’ M68	植株高大, 生长势强, 单瓣白色花, 花期早 Big plant, strong growth vigor, single white flowers, early blooming
	‘Fengdan’ M24, ‘Fengdan’ M49, ‘Fengdan’ M68	
	‘红乔’ ‘Hongqiao’	
父本 Male parent	‘花王’ ‘Huawang’	株高中等, 生长势强, 蔷薇型红色花, 花期晚 Medium plant, strong growth vigor, rose-shaped red flowers, late blooming
	‘黑龙锦’ ‘Hei Longjin’	
	‘Hei Longjin’	

表2 19对牡丹 SSR 引物序列及其在6个杂交亲本组合中的多态性信息

Tab. 2 Primer sequences of 19 peony's SSR markers and polymorphism information of each marker in the six selected combinations of peony hybrid parents

引物名称 Primer name	正向引物序列(5'-3') Forward primer(5'-3')	反向引物序列(5'-3') Reverse primer(5'-3')	最适退火温度 Optimum annealing temperature/ °C	片段 长度 Product size/ bp	重复基序 SSR motif	GenBank 登录号 GenBank accession number	SSR 多态性信息 SSR polymorphism information	
							等位点数 Number of alleles	PIC 值 PIC value
SSR1	<ROX>TTGCTTGGTGAAGGTGTT	CTTCGATAACCGCAGGAGGAT	50.0	324	(TC) ₉ , (TC) ₅	FJ024294	5	0.62
SSR2	<FAM>AGTGGTGGAAGATTGGAC	AAATACTCCGTCTTACTGTGAA	55.0	211	(AG) ₂₄	EU678295	3	0.48
SSR3	<HEX>CATTTCCCACTTCCAACCTCT	GGCAACACGCTTATGACACA	55.5	372	(AG) ₈	AY016265.1	2	0.24
SSR4	<ROX>CAATCCGAGTCGTAAGC	CACCTCTAGACCCAGAG	56.0	162	(TGG) ₅	JX855803	3	0.55
SSR5	<HEX>TGCTGTGGACATAGGGTAA	CAGGTCGAGGTAGAAGAGTG	55.5	334	(GGT) ₅	JX855799	1	0.00
SSR6	<ROX>GCCACAAGAAAACAAAACC	CCTTCACCACTACTTCCCCAT	54.0	267	(CT) ₁₇	FJ024291	4	0.56
SSR7	<FAM>GTAGGAGATAGACCGATTGATA	GAAGTCTGTAGGGGCACA	56.0	291	(CAC) ₆	JX855796	3	0.55
SSR8	<FAM>GCTGCATAATCTACTATTCCA	ACATACTAGAGGGCGTTGT	54.0	129	(TCA) ₃	KC121550	2	0.38
SSR9	<HEX>GACCGATTTGACCCTCTA	CTCCCATGTGATGTTGTG	52.5	219	(GA) ₁₁	JX855800	4	0.56
SSR10	<FAM>GACTATTTTGCACCAGACAT	AAGATACAAGCAGTTCACGC	54.0	357	(ATTT) ₇	AY016279.1	7	0.69
SSR11	<ROX>TCACTTCTAGACCCAGAGC	TGCAAGCATCCACCAT	57.0	334	(CAC) ₅	JX855802	1	0.00
SSR12	<ROX>CGGAAGTTTTCTTTGAC	ATCCTTTTGTAACTCCTGATT	48.0	151	(AG) ₅	JX855804	1	0.00
SSR13	<ROX>GTTATAGAACCCTGACAT	TGAGAGACAAATAATCGTG	48.0	323	(TC) ₅ , (TC) ₅ , (CA) ₈	FJ024288	5	0.64
SSR14	<ROX>CAAACCTACCTGAATGTTCCGGCTC	CATCAAATTACCAAAGAAATCCT	50.0	323	(TC) ₂₀ , (TATC) ₅	FJ024296	2	0.14
SSR15*	<TAMRA>GACCACGGTGAGCTTATT	ATCAAACCCGACATTCCT	50.2	356	(ACCCAT) ₃	GBGY01000335	2	0.14
SSR16*	<ROX>TAATCACCAATGAGCCA	CGTCTGCGCCGAATACTT	50.2	395	(TTCATT) ₃	GBGY01000334	3	0.46
SSR17*	<HEX>GCAAAGACAACAGCCTCG	CTCACCATCCAATCCAC	57.2	289	(CAG) ₆	GBGY01000120	3	0.48
SSR18*	<HEX>ATCTAACACCCCTTCTCC	CAAGAATTTGACTTCCCAG	54.0	261	(CATCTC) ₃	GBGY01000299	2	0.38
SSR19*	<HEX>ATTCAAATAGTCTTTCGTGC	TATGCTGTAGTTGGAGC	55.0	316	(AAAT) ₄	GBGY01000207	3	0.45

注: *是作者所在课题组利用牡丹转录组信息开发的5个EST-SSR标记;PIC:多态性信息量。Notes: * refer 5 EST-SSR which were developed from tree peony transcriptome by authors; PIC: Polymorphism information content.

1.2 杂交群体的建立

杂交试验于2008年4月在洛阳国家牡丹园进行,采用控制授粉杂交方式,共建立了3个杂交组合:‘凤丹’M24 × ‘红乔’、‘凤丹’M49 × ‘花王’和‘凤丹’M68 × ‘黑龙锦’。当年8月上旬,杂交果实成熟,当果皮变为蟹黄色、果实刚开始开裂时,按杂交组合分别将杂交果实采收并置于阴凉处晾干。待果皮完全开裂、种子颜色开始变黑时,将种子剥离,并立即用湿沙进行种子沙藏。9月初开始播种,播种基质为V(草炭):V(蛭石):V(珍珠岩)=1:1:1,播种容器为穴盘^[7]。2009年10月,统计3个杂交组合的种子出苗率,并将杂种幼苗从穴盘中移栽至大田,移栽株行距为10 cm × 50 cm。2010年7月,分别统计3个杂交组合杂种苗的移栽成活率。

1.3 杂交亲本的SSR多态性检测

1.3.1 基因组DNA提取

取上述杂交亲本植株的嫩叶,放入硅胶中干燥

保存,采用TIANGEN新型植物基因组提取试剂盒(北京天根生物科技公司)提取基因组DNA。利用1%琼脂糖凝胶电泳的方法^[8],对提取的DNA样品进行质量检测,并将合格的样品置于-20℃冰箱中保存备用。

1.3.2 牡丹SSR标记检测

利用19对牡丹SSR引物,对杂交试验中的6个亲本进行检测,分析杂交亲本之间的多态性。19对SSR引物中,有14对为已经公开的引物^[9-12],另外5对为作者所在课题组利用牡丹转录组信息开发的引物(表2)。所有引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)的反应体系和反应程序参照Yu等^[12]的方法。采用10 μL的PCR反应体系,以25 ng牡丹DNA为模板,加入5 μL的1 × Power Taq PCR MasterMIX(百

泰客公司), 0.5 μL 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的正反向引物, 最后加入适量的双蒸水至 10 μL 。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 最适退火温度(表 2)退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物使用 DNA 自动测序仪(ABI3730)进行多态性分析。

1.4 作图群体遗传结构分析

从作图群体(‘凤丹’M24 \times ‘红乔’)中随机抽取 195 个子代, 利用上述 19 对 SSR 引物(表 2)进行基因型检测, 分析作图群体的遗传结构。牡丹基因组 DNA 提取和 SSR 标记检测的方法如 1.3 所述。

1.5 作图群体表型性状调查

2012 年 9 月, 调查记录作图群体中随机选出的 195 个子代的表型性状, 包括苗高、地径、当年生枝长、复叶长、复叶宽和叶柄长等 6 个性状。牡丹表型性状的测定标准和测定方法, 参照庞利铮等^[8]的研究。

1.6 数据分析

用 GeneMarker V1.75 软件对 PCR 产物的荧光检测结果进行判读和数据收集。利用 PowerMarker ver. 3.23 计算 SSR 标记的多态信息含量(Polymorphism information content, PIC)、等位基因数、等位基因频率及杂交亲本之间的遗传距离^[13]。用 JoinMap4.0 软件分析亲本及子代基因型的分离类型, 并进行孟德尔分离的卡方检验^[14]。应用 SPSS18.0 软件对作图群体的表型数据进行统计, 分

析群体表型性状的遗传变异情况。

2 结果与分析

2.1 杂交群体的建立

3 个杂交组合共获得 1 384 粒种子, 其中有 955 粒种子出苗, 平均出苗率为 69.0%。不同杂交组合的出苗率略有差别, 其中‘凤丹’M24 \times ‘红乔’杂交组合的出苗率最高, 为 71.7%, 比‘凤丹’M49 \times ‘花王’杂交组合和‘凤丹’M68 \times ‘黑龙锦’杂交组合分别高出 2.9%、7.5%(表 3)。由此可见, ‘凤丹’与中原牡丹和日本牡丹的杂交亲和性都比较高, 属于近缘杂交, 而且中原牡丹‘红乔’比日本牡丹‘花王’和‘黑龙锦’表现出更高的杂交亲和性。

对比不同杂交组合的移栽成活率显示, ‘凤丹’M68 \times ‘黑龙锦’杂交组合的移栽成活率(91.6%)明显高于‘凤丹’M24 \times ‘红乔’和‘凤丹’M49 \times ‘花王’杂交组合(分别为 80.3% 和 82.0%)。通过田间观察发现, 3 个杂交组合幼苗移栽的地点不同, 其中‘凤丹’M24 \times ‘红乔’和‘凤丹’M49 \times ‘花王’杂交组合的幼苗种植在同一地块, ‘凤丹’M68 \times ‘黑龙锦’杂交组合的幼苗种植在另一地块。两地块间的土壤立地条件和水肥管理差异较大, 这可能是造成杂交幼苗移栽成活率显著差异的原因。总之, 3 个杂交组合的幼苗, 移栽后共有 796 株成活, 平均移栽成活率为 83.4%, 最终获得了 3 个子代数分别为 366、233、197 的牡丹 F_1 杂交分离群体。

表 3 牡丹不同杂交组合的育苗结果

Tab. 3 Results of breeding in different cross combinations of peonies

杂交组合 Hybrid combination	杂交种子数 Hybrid seed number/grain	出苗株数 Emergence number	出苗率 Emergence rate/%	移栽成活株数 Transplanting survival number	移栽成活率 Transplanting survival rate/%
‘凤丹’M24 \times ‘红乔’ ‘Fengdan’ M24 \times ‘Hongqiao’	636	456	71.7	366	80.3
‘凤丹’M49 \times ‘花王’ ‘Fengdan’ M49 \times ‘Huawang’	413	284	68.8	233	82.0
‘凤丹’M68 \times ‘黑龙锦’ ‘Fengdan’ M68 \times ‘Hei Longjin’	335	215	64.2	197	91.6
总计 Total	1 384	955	69.0	796	83.4 (Average)

2.2 杂交亲本的 SSR 多态性检测

利用 19 对 SSR 引物, 对已建立的 3 个 F_1 杂交群体的亲本进行检测。结果表明: 1) 19 对 SSR 引物的多态性各不相同(表 2)。每对 SSR 引物可检测到的等位位点数为 1~7 个, 平均 2.9 个; 每对 SSR 引物的 PIC 值为 0.00~0.69, 平均值为 0.39。2) ‘凤丹’M24 \times ‘红乔’杂交组合亲本间的多态性最高, 19 对 SSR 引物共检测到 27 个多态性位点, 平均 1.4 个; 而相同的 19 对引物, 在其他两个杂交组合‘凤丹’M49 \times ‘花王’和‘凤丹’M64 \times ‘黑龙锦’都只能

检测到 22 个多态性位点, 平均 1.2 个(表 4), 均低于‘凤丹’M24 \times ‘红乔’杂交组合亲本间的多态性。

利用 PowerMarker ver. 3.23 计算了 3 个杂交组合亲本间的遗传距离(表 5), 结果显示: ‘凤丹’M24 \times ‘红乔’杂交组合亲本间的遗传距离为 0.707 0, 大于其他两个杂交组合‘凤丹’M49 \times ‘花王’和‘凤丹’M68 \times ‘黑龙锦’亲本间的遗传距离(分别为 0.616 1 和 0.587 1)。由此可见, ‘凤丹’M24 \times ‘红乔’杂交组合亲本间的多态性最高、遗传距离最远, 故选择该杂交组合的 F_1 杂交分离群体作为构建牡丹

表4 19对SSR引物在3组杂交亲本中的多态性检测

Tab. 4 Investigation of polymorphism in three hybrid parents using 19 SSR markers

杂交组合 Hybrid combination	等位位点数 Number of alleles	多态性等位 位点数 Polymorphism alleles number	多态性比例 Percentage of polymorphism/%	平均每对引物产生的多态 性等位位点数 Mean polymorphism alleles number per marker
‘凤丹’ M24 × ‘红乔’ ‘Fengdan’ M24 × ‘Hongqiao’	43	27	62. 8	1. 4
‘凤丹’ M49 × ‘花王’ ‘Fengdan’ M49 × ‘Huawang’	38	22	57. 9	1. 2
‘凤丹’ M68 × ‘黑龙锦’ ‘Fengdan’ M68 × ‘Hei Longjin’	39	22	56. 4	1. 2

表5 杂交亲本之间的遗传距离

Tab. 5 Genetic distance between parents of three hybrid populations

杂交亲本 Hybrid parent	‘凤丹’ M24 ‘Fengdan’ M24	‘凤丹’ M49 ‘Fengdan’ M49	‘凤丹’ M68 ‘Fengdan’ M68	‘红乔’ ‘Hongqiao’	‘花王’ ‘Huawang’
‘凤丹’ M49 ‘Fengdan’ M49	0. 040 0				
‘凤丹’ M68 ‘Fengdan’ M68	0. 080 0	0. 040 0			
‘红乔’ ‘Hongqiao’	0. 707 0	0. 667 0	0. 707 0		
‘花王’ ‘Huawang’	0. 587 1	0. 616 1	0. 656 1	0. 338 6	
‘黑龙锦’ ‘Hei Longjin’	0. 587 1	0. 547 1	0. 587 1	0. 438 7	0. 287 7

遗传图谱的作图群体。

2.3 作图群体的遗传结构

利用19对SSR引物检测了作图群体(‘凤丹’

M24 × ‘红乔’)中随机抽取的195个单株及亲本的基因型(表6)。由表可知,19对SSR引物在作图群体的亲本和195个F₁子代中都能进行有效扩增,其

表6 19个SSR标记在作图群体中的分离情况

Tab. 6 Segregation of 19 SSR markers in mapping population

引物名称 Primer name	亲本基因型 Parent genotype		F ₁ 子代基因型 F ₁ progeny genotype	分离比例 Separation ratio	卡方值 χ ² value	自由度 df
	母本(♀) Female	父本(♂) Male				
SSR1	aa	bb	ab	不分离 nondisjunction		
SSR5	aa	aa	aa	不分离 nondisjunction		
SSR11	aa	aa	aa	不分离 nondisjunction		
SSR12	aa	aa	aa	不分离 nondisjunction		
SSR2	a0	cd	ac: ad: 0c: 0d	26: 78: 28: 63	41. 16 **	3
SSR6	a0	cd	ac: ad: 0c: 0d	46: 52: 49: 48	0. 38	3
SSR3	aa	b0	a0: ab	90: 105	1. 15	1
SSR9	ab	cc	ac: bc	96: 99	0. 05	1
SSR10	aa	bc	ab: ac	89: 106	1. 48	1
SSR13	aa	bc	ab: ac	86: 109	2. 71	1
SSR4	ef	eg	ee: ef: eg: fg	52: 57: 32: 54	7. 93	3
SSR7	ef	eg	ee: ef: eg: fg	39: 74: 36: 46	18. 52 **	3
SSR18	ef	eg	ee: ef: eg: fg	59: 44: 47: 45	2. 97	3
SSR8	hk	hk	hh: hk: kk	52: 93: 50	0. 46	2
SSR18	hk	hk	hh: hk: kk	47: 108: 40	2. 76	2
SSR19	lm	ll	ll: lm	91: 104	0. 87	1
SSR14	nn	np	nn: np	101: 94	0. 25	1
SSR15	nn	np	nn: np	105: 95	0. 13	1
SSR16	nn	np	nn: np	83: 112	4. 31	1

注: 当 P < 0. 01 时, df = 1, χ² = 6. 64; df = 2, χ² = 9. 21; df = 3, χ² = 11. 35; ** 表示卡方值大于卡方检验临界值。Notes: P < 0. 01; df = 1, χ² = 6. 64; df = 2, χ² = 9. 21; df = 3, χ² = 11. 35; ** indicated χ² value greater than Chi-square threshold.

中有 15 对引物在作图群体中具有多态性, F_1 子代的基因型产生分离。这 15 对 SSR 引物, 按分离类型可分为 8 种类型 ($a_0 \times cd$ 、 $aa \times b_0$ 、 $ab \times cc$ 、 $aa \times bc$ 、 $ef \times eg$ 、 $hk \times hk$ 、 $lm \times ll$ 、 $nn \times np$), 其中有 3 对引物, SSR2、SSR3 和 SSR6, 出现了哑等位位点 (null allele) 现象。对这些有多态性的 SSR 标记进行分离比例卡方检验 ($P < 0.01$), 其中有 13 个标记的分离比例符合孟德尔期望分离比, 占分离标记总数的 86.7%。以上分析表明, 作图群体基因型的分离类型较丰富, 在 86.7% 的水平上

符合孟德尔期望分离比, 适合用于构建牡丹遗传连锁图谱。

2.4 作图群体表型性状的变异

对比作图群体亲本的表型性状, 结果显示: 母本‘凤丹’M24 的地径、株高和当年生枝长分别比父本‘红乔’高出 104.3%、63.3%、59.0%; 母本的复叶长、复叶宽和叶柄长分别比父本低了 18.6%、10.0%、30.1% (表 7)。由此可见, 作图群体亲本间的表型差异明显, 其中株型的差异较大, 而叶部性状的差异相对较小。

表 7 作图群体 6 个表型性状的统计分析

Tab. 7 Statistical analysis of 6 phenotypic traits in mapping population

表型性状 Phenotypic trait	杂交亲本 Hybrid parent			F_1 子代 F_1 progeny					
	母本 Female	父本 Male	平均值 Mean	最大值 Maximum	最小值 Minimum	平均值 Mean	标准差 Standard deviation	变异系数 Variable coefficient/%	F 值 F-value
地径 Ground diameter	4.70	2.30	3.50	1.77	0.46	0.89	0.19	20.89	
株高 Plant height	147.00	90.00	118.50	44.50	5.00	23.52	6.62	28.16	
当年生枝长 Annual shoot length	8.22	5.17	6.69	42.00	3.00	14.70	5.63	38.28	2.899**
复叶长 Compound leaf length	26.95	33.10	30.03	31.71	8.94	22.47	3.60	16.04	6.601**
复叶宽 Compound leaf width	16.60	18.45	17.53	26.63	8.67	18.60	2.87	15.43	4.769**
叶柄长 Petiole length	10.53	15.07	12.80	13.57	4.02	8.12	1.82	22.43	5.787**

注: 各表型性状最大值、最小值、平均值和标准差的单位为 cm; ** 表示在 0.01 水平差异显著。Notes: Unit of maximum, minimum, mean, and standard deviation for each phenotypic trait is centimeter; ** indicated significant difference at 0.01 level.

统计分析作图群体 195 个 F_1 子代的表型性状, 结果显示: F_1 子代当年生枝长的平均值为 14.70 cm, 比亲本的平均值高出 119.73%; 而且性状的分离程度大, 最大值为 42.00 cm, 最小值为 3.00 cm, 高于或低于双亲; 变异系数达到 38.28%。 F_1 子代叶柄长的平均值为 8.12 cm, 较亲本均值的 12.80 cm 降低了 36.56%; 最大值为 13.57 cm, 最小值为 4.02 cm, 介于或低于双亲; 变异系数为 22.43%。 F_1 子代复叶长的平均值为 22.47 cm, 比亲本的平均值低了 25.17%; 但是分离较广, 最大值为 31.71 cm, 最小值为 8.94 cm, 介于或小于双亲值; 变异系数为 16.04%。 F_1 子代复叶宽的平均值为 18.60 cm, 较亲本均值高出 6.10%; 最大值为 26.63 cm, 最小值为 8.67 cm, 高于或低于双亲; 变异系数为 15.43%。 F_1 子代群体的地径和株高平均值分别为 0.89 cm 和 23.52 cm, 明显低于亲本的平均值, 这是由于牡丹是多年生木本植物, 地径和株高都会随着株龄的增长而逐渐增加, 因此多年生的杂交亲本, 其地径和株高明显高于幼龄期的子代个体; 地径和株高在作图群体中的分离程度较广, 变幅分别为 0.46 ~ 1.77 cm 和 5.00 ~ 44.50 cm, 变异系数分别达到 20.89% 和

28.16%。 F_1 子代表型性状的方差分析表明: 当年生枝长、复叶长、复叶宽和叶柄长 4 个性状在作图群体内均达到极显著差异 (地径和株高 2 个性状因无重复, 无法进行方差分析)。综上所述, 作图群体 6 个表型性状均出现超亲分离, 表型值的变异系数均超过 15%, 其中 4 个性状在个体间的差异极显著。由此可见, 作图群体的表型性状分离程度较高、变异明显、个体之间差异显著, 适合用于构建遗传连锁图谱。

3 讨 论

作图群体亲本间的遗传多态性程度, 决定了图谱构建的效率^[15]。理论上应选择亲缘关系远的品种或种作为分离群体的亲本, 但是如果亲本之间的遗传差异太大, 杂种的染色体配对和重组就会受到抑制, 导致连锁位点间的重组率偏低, 从而影响图谱的可信度和适用范围^[16], 甚至导致不育, 影响分离群体的建立; 因此, 分离群体亲本选择时, 不仅要考虑亲本间的遗传多态性, 还要兼顾杂交后代的可育性。牡丹栽培历史悠久, 具有起源复杂、遗传变异丰富、高度杂合等特性^[17], 杂种的结实率及可育性与

杂交母本的育性、杂交亲本的亲和性密切相关^[4-5,18]。本研究以结籽率高、抗逆性强、花期早、白色花的‘凤丹’3株实生单株为母本,分别以‘红乔’‘花王’和‘黑龙锦’为父本,构建了3个规模较大的牡丹 F_1 杂交群体(个体数量分别为366、233、197)。3个杂交组合的杂种平均出苗率达69.0%,说明‘凤丹’与中原牡丹和日本牡丹之间亲和性较强,与刘改秀等^[7]、韩欣等^[19]的研究结果一致。在此基础上,利用SSR分子标记技术分析了3个杂交组合亲本间的多态性,结果显示,‘凤丹’M24 × ‘红乔’杂交组合亲本间的多态性最高,19对SSR引物共检测到27个多态性位点;因此,选择‘凤丹’M24 × ‘红乔’杂交组合的 F_1 分离群体作为构建牡丹遗传图谱的作图群体。

有效的分子标记是快速构建高密度遗传连锁图谱的另一关键因素。SSR分子标记具有多态性丰富、共显性等优点,是构建高密度分子遗传图谱的有效工具^[20]。近年来,许多观赏植物如月季(*Rosa chinensis*)^[21]、梅花(*Prunus mume*)^[22]、康乃馨(*Dianthus caryophyllus*)^[23-24]等构建了基于SSR标记的遗传图谱。牡丹至今尚未构建遗传连锁图谱,其中一个重要原因是牡丹有效的SSR标记数量有限。随着第二代测序技术的发展,SSR标记开发变得越来越高效、经济、可行,牡丹SSR标记的开发也显现出快速发展的趋势。Gai等^[25]利用牡丹转录组挖掘了大量的标记,并成功开发了121对扩增稳定的SSR引物。Zhang等^[26]也利用牡丹转录组成功开发了19个SSR标记。本课题组,目前也正利用自己测序的一个牡丹转录组数据库,进行大量的SSR标记开发,为进一步构建牡丹遗传图谱作准备。本研究从现有的牡丹SSR标记中,筛选了14个扩增稳定的标记,并利用新开发了5个EST-SSR,共19个标记,检测了牡丹作图群体的遗传结构。研究结果表明,有15个有多态性的SSR标记出现等位位点分离,共有8种分离类型,86.7%的基因型符合孟德尔期望分离比($P < 0.01$)。张德强等^[27-28]构建的毛白杨(*Populus tomentosa*)遗传图谱,其作图群体的基因型在80.2%水平上符合孟德尔期望分离比,而月季、菊花(*Dendranthema morifolium*)、梅花、紫薇(*Lagerstroemia indica*)等观赏植物的作图群体,符合孟德尔期望分离比的基因型则在77%~92%之间不等^[22,29-32]。由此可见,本研究筛选出的牡丹 F_1 杂交分离群体,符合孟德尔期望分离的比率较高,适合用于遗传图谱构建。

表型性状遗传变异是基因变异在形态上的呈现,表型遗传变异的研究是植物种质资源开发应用

的基础,对杂交育种、品种选育以及QTL分析具有重要意义。目前牡丹表型性状的研究,主要在牡丹自然群体中开展。王晓琴^[33]调查了滇牡丹(*Paeonia delavayi*)群体的茎、叶和花部性状,发现这些性状的变异都较大,变异系数都在15%以上,茎部性状变异程度大于叶部性状。李宗艳等^[34]研究了黄牡丹(*Paeonia lutea*)群体的表型变异,其中花部性状变异在20%以上,但是叶部性状变异较小,变异系数在10%~12%之间。庞利铮等^[8]研究了紫斑牡丹(*Paeonia rockii*)群体的表型,群体数量性状的变异系数范围为10%~30%。本研究构建的‘凤丹’M24 × ‘红乔’ F_1 作图群体,由于大部分个体仍处于童期,花部性状尚未完全表现出来,因此只调查了群体的6个主要生长性状,包括苗高、地径、当年生枝长、复叶长、复叶宽和叶柄长。结果显示,这6个性状的变异系数在15.43%~38.28%之间,其中叶部性状变异程度比滇牡丹、黄牡丹和紫斑牡丹自然群体的变异更大。这可能是‘凤丹’与‘红乔’杂交后代,由于亲本基因型间杂合产生新的非加性效应或互作效应,导致变异系数与变异幅度更大,表现出丰富的表型性状多样性。此外,在许多植物作图群体表型分析中,普遍认为若变异系数超过10%,则表明群体的性状变异明显^[35-36]。‘凤丹’M24 × ‘红乔’作图群体的6个表型性状变异系数均超过15%。由此可见,该作图群体,表型性状分离广泛、变异显著,适合用于牡丹遗传图谱构建和QTL分析。

4 结 论

1) 本文以3株‘凤丹’植株为母本,分别以‘红乔’‘花王’和‘黑龙锦’为父本,通过控制授粉杂交方式,制备了用于构建牡丹遗传连锁图谱的3个品种间杂交分离群体。3个群体的个体株数分别为366、233、197,这些大规模的分群体为牡丹遗传连锁图谱构建及品种内和品种间比较基因组学研究提供了宝贵的材料。

2) 对3个分离群体的亲本进行SSR标记多态性检测,选取了在DNA水平差异最大的杂交组合‘凤丹’M24 × ‘红乔’得到的 F_1 分离群体,作为构建牡丹遗传连锁图谱的作图群体。

3) 从已选取作图群体中随机抽取195个单株,进行基因型检测和表型分析。作图群体基因型分离类型丰富,在 $P < 0.01$ 水平上有86.7%符合孟德尔期望分离比。作图群体的表型性状差异明显,6个表型值的变异系数均超过15%。由此可见,所选的‘凤丹’M24 × ‘红乔’ F_1 分离群体适合用于构建牡

丹遗传连锁图谱。

参 考 文 献

- [1] CHENG F Y. Advances in the breeding of tree peonies and a cultivar system for the cultivar group[J]. International Journal for Plant Breeding, 2007, 1(2): 89-104.
- [2] ANDERSON J A, CHURCHIL G A, AUTRUQUE J E. Optimizing parental selection for genetic linkage maps[J]. Genome, 1993, 36(1): 181-185.
- [3] 成仿云,陈德忠. 紫斑牡丹新品种选育及牡丹品种分类研究[J]. 北京林业大学学报, 1998, 20(2): 27-32.
CHENG F Y, CHEN D Z. Breeding of new varieties in flare tree peony and varieties classification in tree peonies[J]. Journal of Beijing Forestry University, 1998, 20(2): 27-32.
- [4] 肖佳佳. 芍药属杂交亲和性及杂种败育研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2010.
XIAO J J. A study on the crossing compatibility and hybrid abortion of *Paeonia* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2010.
- [5] 王越岚. 牡丹的杂交育种及组间杂种育性的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2009.
WANG Y L. Cross-breeding in tree peony and fertility research of intersectional hybrids [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2009.
- [6] 吴静,成仿云,张栋. ‘正午’牡丹的杂交利用及部分杂种 AFLP 鉴定[J]. 西北植物学报, 2013, 33(8): 1551-1557.
WU J, CHENG F Y, ZHANG D. Utilizing ‘High Noon’ in the crossing breeding of tree peonies and early identification of some hybrids by AFLP markers[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2013, 33(8): 1551-1557.
- [7] 刘改秀,王海歌,李敏,等. 牡丹杂种 F₁ 代育苗研究[J]. 现代农业科技, 2012(22): 155-176.
LIU G X, WANG H G, LI M, et al. A study of hybrid seeding of F₁ progeny in tree peonies[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2012(22): 155-176.
- [8] 庞利铮,成仿云,钟原,等. 紫斑牡丹关联分析群体的表型分析[J]. 北京林业大学学报, 2012, 34(6): 115-120.
PANG L Z, CHENG F Y, ZHONG Y, et al. Phenotypic analysis of association population for flare tree peony[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2012, 34(6): 115-120.
- [9] 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.
- [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): e42-e44.
- [11] WANG J X, XIA T, ZHANG J M, et al. Isolation and characterization of fourteen microsatellites from a tree peony (*Paeonia suffruticosa*) [J]. Conservation Genetics, 2009, 10(4): 1029-1031.
- [12] YU H P, CHENG F Y, ZHONG Y, et al. Development of simple sequence repeat (SSR) markers from *Paeonia ostii* to study the genetic relationships among tree peonies (Paeoniaceae) [J]. Scientia Horticulturae, 2013, 164: 58-64.
- [13] LIU K J, MUSE S V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis [J]. Bioinformatics, 2005, 21(9): 2128-2129.
- [14] VAN OOIJEN J W. JoinMap® 4: software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations [DB/CD]. Wageningen: Plant Research International, 2006.
- [15] HELENTJARIS T. A genetic linkage map for maize based on RFLPs[J]. Trends in Genetics, 1987, 3: 217-221.
- [16] 徐云碧,朱立煌. 分子数量遗传学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994: 291.
XU Y B, ZHU L H. Molecular quantitative genetics [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1994: 291.
- [17] YUAN J H, CORNILLE A, GIRAUD T, et al. Independent domestications of cultivated tree peonies from different wild peony species[J]. Molecular Ecology, 2014, 23(1): 82-95.
- [18] 苏美和. 牡丹育种技术及杂交一代遗传多样性的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2013.
SU M H. Breeding technology of *Paeonia suffruticosa* and analysis of genetic diversity of F₁ progenies of *Paeonia suffruticosa* [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2013.
- [19] 韩欣,成仿云,肖佳佳,等. 以‘凤丹白’为母本的杂交及其育种潜力分析[J]. 北京林业大学学报, 2014, 36(4): 121-125.
HAN X, CHENG F Y, XIAO J J, et al. Crosses of *Paeonia ostii* ‘Feng Dan Bai’ as maternal parents and an analysis on the potential in tree peony breeding [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2014, 36(4): 121-125.
- [20] 苗明军,李成琼,司军. SSR 标记及其在园艺植物育种中的应用[J]. 长江蔬菜, 2010(10): 1-5.
MIAO M J, LI C Q, SI J. SSR markers and their application in horticulture plant breeding [J]. Journal of Changjiang Vegetables, 2010(10): 1-5.
- [21] MOGHADDAM H, LEUS L, DE RIEK J, et al. Construction of a genetic linkage map with SSR, AFLP and morphological markers to locate QTLs controlling pathotype-specific powdery mildew resistance in diploid roses [J]. Euphytica, 2012, 184(3): 413-427.
- [22] SUN L D, YANG W R, ZHANG Q X, et al. Genome-wide characterization and linkage mapping of simple sequence repeats in mei (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) [J]. PLoS ONE, 2013, 8(3): e59562.
- [23] YAGI M, YAMAMOTO T, ISOBE S, et al. Identification of tightly linked SSR markers for flower type in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) [J]. Euphytica, 2014, 198(2): 175-183.
- [24] YAGI M, YAMAMOTO T, ISOBE S, et al. Construction of a reference genetic linkage map for carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) [J]. BMC Genomics, 2013, 14(1): 734.
- [25] GAI S P, ZHANG Y X, MU P, et al. Transcriptome analysis of tree peony during chilling requirement fulfillment: assembling, annotation and markers discovering [J]. Gene, 2012, 497(2): 256-262.
- [26] ZHANG J J, SHU Q Y, LIU Z A, et al. Two EST-derived marker systems for cultivar identification in tree peony [J]. Plant Cell Reports, 2012, 31(2): 299-310.
- [27] 张德强,张志毅,宋婉,等. 毛白杨遗传作图最适分离群体的选

- 择[J]. 北京林业大学学报, 2003, 25(4): 21-24.
- ZHANG D Q, ZHANG Z Y, SONG W, et al. Optimizing segregation population selection for genetic linkage maps in *Populus tomentosa* [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2003, 25(4): 21-24.
- [28] ZHANG D Q, ZHANG Z Y, YANG K, et al. Genetic mapping in (*Populus tomentosa* × *Populus bolleana*) and *P. tomentosa* Carr. using AFLP markers [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 108(4): 657-662.
- [29] ZHANG F, CHEN S, CHEN F, et al. SRAP-based mapping and QTL detection for inflorescence-related traits in chrysanthemum (*Dendranthema morifolium*) [J]. Molecular Breeding, 2011, 27(1): 11-23.
- [30] HIBRAND-SAINT OYANT L, CRESPEL L, RAJAPAKSE S, et al. Genetic linkage maps of rose constructed with new microsatellite markers and locating QTL controlling flowering traits [J]. Tree Genetics & Genomes, 2007, 4(1): 11-23.
- [31] HE D, LIU Y, CAI M, et al. The first genetic linkage map of crape myrtle (*Lagerstroemia*) based on amplification fragment length polymorphisms and simple sequence repeats markers [J]. Plant Breeding, 2014, 133(1): 138-144.
- [32] 刘阳, 蔡明, 贺丹, 等. 紫薇遗传作图 F₁ 分离群体的选择 [J]. 东北林业大学学报, 2013, 41(9): 72-75.
- LIU Y, CAI M, HE D, et al. Construction of F₁ segregation population for genetic linkage maps in *Lagerstroemia* [J]. Journal of Northeast Forestry University, 2013, 41(9): 72-75.
- [33] 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.
- WANG X Q. Studies on genetic diversity of *Paeonia delavayi* in Shangri-la [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2009.
- [34] 李宗艳, 张海燕. 黄牡丹表型变异及多样性研究 [J]. 西北林学院学报, 2011, 26(4): 117-122.
- LI Z Y, ZHANG H Y. Morphological variation and diversity in populations of *Paeonia lutea* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2011, 26(4): 117-122.
- [35] 李煜, 王大玮, 李周岐, 等. 杜仲遗传作图群体的建立 [J]. 西北林学院学报, 2012, 27(2): 62-65.
- LI Y, WANG D W, LI Z Q, et al. Establishment of mapping population in *Eucammia ulmoides* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2012, 27(2): 62-65.
- [36] 贺丹, 唐婉, 刘阳, 等. 尾叶紫薇与紫薇 F₁ 代群体主要表型性状与 SSR 标记的连锁分析 [J]. 北京林业大学学报, 2012, 34(6): 121-125.
- HE D, TANG W, LIU Y, et al. Linkage analysis of phenotypic traits of *Lagerstroemia caudata* and *L. indica* F₁ population using SSR markers [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2012, 34(6): 121-125.

(责任编辑 董晓燕
责任编辑 戴思兰)