

春石斛杂交育种及亲缘关系的 AFLP 分析

郑勇平^{1,2}, 郑泉³, 俞继英², 张瑛², 范文锋²

(1. 南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037; 2. 浙江森禾种业股份有限公司, 浙江 杭州 310012;
3. 南京农业大学 生命科学学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 春石斛 *Dendrobium nobile* 为亚热带花卉。为了解决种苗依赖进口的问题, 从 2002 年开始, 从国内外引进春石斛资源, 从中精选符合中国国情的花色品种和单株作为杂交育种材料, 从 2002-2006 年授粉组合共计 345 个, 成功育苗 144 个, 成功率 41.74%, 所得杂交后代 5029 号和 5041 号 2 个最符合育种目标。对 30 个引进的品种和杂交获得的品种进行荧光 AFLP(扩增片段长度多态性)分析, 构建春石斛新品种的 DNA 指纹图谱, 为品种鉴定、评价和品种创新、新品种保护提供可靠方便的技术手段。图 2 表 3 参 8

关键词: 园艺学; 春石斛; 杂交育种; AFLP 分析

中图分类号: S682.31; S603.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5692(2009)01-0137-05

Hybridization breeding and AFLP analysis of relative relationship of *Dendrobium nobile*

ZHENG Yong-ping^{1,2}, ZHENG Quan³, YU Ji-ying², ZHANG Ying², FAN Wen-feng²

(1. School of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China; 2. Zhejiang Senhe Seed Co., Ltd., Hangzhou 310012, Zhejiang, China; 3. School of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China)

Abstract: *Dendrobium nobile* (Orchidaceae), subtropical flower, usually blossoms in spring. It is a very important and popular potted-flower in Europe, Japan and USA. To avoid over-reliance on the seedling import, authors had introduced about 141 species, varieties, and cultivars, and selected those who were suitable for planting in China for hybrid breeding. Between 2002 and 2006, there were 345 pollination hybrid crosses, 144 of them were bred successfully and the success rate was 41.74%. In 2004, the success rate of hybrid crosses were 58.62%. 12 hybrid crosses had very excellent prospect for development. In 12 hybrid crosses, No. 5029 and No. 5041 as two most important ones, had been put into mass production. Authors had set up the DNA fingerprinting of new varieties of *Nobile-Type Dendrobium* with Fluorescent AFLP (amplified fragment length polymorphism) technology, and provided a reliable and convenient technical means for identification, evaluation, protection and innovation of varieties. [Ch, 2 tab. 3 fig. 8 ref.]

Key words: horticulture; *Dendrobium nobile*; hybridization breeding; AFLP (amplified fragment length polymorphism) analysis

春石斛 *Dendrobium nobile* 是兰科 Orchidaceae 石斛属 *Dendrobium* 亚热带花卉^[1], 日本是春石斛的主要生产国和消费国。日本园艺工作者经过百余年的多代杂交选择, 培育出了大量的优良品系^[2], 其

收稿日期: 2008-05-12; 修回日期: 2008-08-19

基金项目: 浙江省科学技术重点项目(2005c22082)

作者简介: 郑勇平, 教授级高级工程师, 从事林木与花卉引育繁和产业化开发研究。E-mail: paul_senhe@yahoo.

com.cn

花色艳丽,多密着于鳞茎,花期长,耐低温性强,可调节花期在春节上市,成为近年来年宵花市中的流行盆花。国内也有人尝试通过杂交育种培育新品种,及组织培养进行扩繁^[3-4]。为了解决种苗依赖进口的问题,作者从2002年开始,收集资源,进行杂交选育新品种,并利用扩增片段长度多态性(AFLP)技术^[5-7]构建春石斛品种的DNA指纹图谱,为品种鉴定、评价和品种创新,新品种保护提供可靠方便的技术手段。

1 材料与方法

1.1 种质资源收集

2002年从日本引进8个春石斛品种;2003年从泰国引进26个品种和72个杂交组合,从中国上海引进7个品种,从中国台湾引进1个品种和4个杂交组合;2005年从中国广州和中国上海引进原生种18个;2006年从中国深圳引进优良品种5个。通过组织培养培育成盆花,选出符合中国国情的品种和单株作为杂交育种材料。

1.2 杂交育种

育种目标:抗性强,早熟,着花率高,单花序花朵数3朵以上,花梗朝上,花瓣厚实,花期长,中大花型和迷你型,分枝性好。根据性状互补原则,按育种目标,以优良性状较多的个体为母本,与母本具有互补性状的个体为父本进行杂交。杂交获得的果荚发育成熟后,将种子培养试管苗,测定成活率,并进行性状观测。

1.3 春石斛品种亲缘关系的AFLP分析

从341个原生种、栽培品种和杂交育种获得的杂交后代单株中,选出30个优良单株(表1)进行亲缘关系的AFLP分析。

采用改良的Doyle的方法提取DNA^[8],在做选择性扩增时,引物中加入了荧光内标,电泳过程在ABI377测序仪上进行。试验方法:取健康正常幼叶低温干燥后,按十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法从试材鲜叶中提取基因组DNA,经检测后将DNA稀释至200 ng·μL⁻¹备用,37℃保温5h,8℃保存4h,4℃过夜;然后预扩增,在0.2 mL离心管中加入25 μL反应体系:模板DNA 2 μL, Pre-ampmix 1 μL, dNTPs 1 μL, 10×PCR buffer 2.5 μL, Taq酶 0.5 μL, 蒸馏水 18 μL。预扩增反应条件:94℃变性2 min, 94℃变性30 s, 56℃复性30 s, 72℃延伸80 s, 72℃延伸5 min;再进行选择性扩增,将预扩增产物1:20稀释,作为选择模板,在0.2 mL离心管中加入25 μL选择性扩增体系:预扩增稀释样品2 μL, 10×PCR buffer 2.5 μL, dNTPs 0.5 μL, ECRI引物1 μL, Mse I 4种1 μL, Taq酶 0.5 μL, 蒸馏水 17.5 μL。混匀离心数秒,按下列参数进行聚合酶链式反应(PCR)循环:第1循环扩增:94℃变性30 s, 65℃退火30 s, 72℃延伸80 s;以后每个循环退火温度递减0.7℃,其他不变,扩增12个循环;接着按下列参数扩增23个循环:94℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸80 s;最后采用荧光AFLP电泳,电泳在ABI377测序仪进行跑胶和AFLP多态性带分析,通过测序仪上的数据收集系统进行统计,采用NTSYSp Version 2.10e统计软件进行数据分析,进行一维聚类分析。

表1 供试的春石斛品种

Table 1 Cultivars and hybrid progeny of *Dendrobium nobile* used in this study

泳道序号	杂交品种编号或品种名	杂交方式(♀ × ♂)	花部性状
1	5064	(黄花,粉楔角,纯黄心) × (紫花,紫白心)	白花,粉楔角,黄心
2	0274	(红花,黄心) × (红花,黄心)	红花,黄心
3	5027	(红花,黄紫心) × (黄花,粉楔角)	白花,粉楔角,紫心
4	1401	(红花,黄心)自交	红花,黄心
5	'Senlan No.5'		粉红花,白心,粉红花眼
6	5063	(白花,粉楔角,紫黄心) × (粉花,黄紫心)	粉花,紫心
7	5041	(白花,粉楔角,黄唇) × (红花,紫唇)	红花,紫唇

续表 1

泳道序号	杂交品种编号或品种名	杂交方式(♀ × ♂)	花部性状
8	'Senlan No.8'		淡粉红花, 淡黄心
9	'Yellow Tsuden'		黄花, 红心
10	5029	(黄花, 红心) × (红花, 紫唇)	白花, 粉楔角, 红心
11	'Fairy Flake Karumen'		红花, 紫唇
12	'Pinx Dell Elegame'		粉白花, 黄心
13	'Senlan No.11'		白花, 粉边, 黄心
14	'Senlan No.12'		淡黄花, 微粉楔角
15	'Senlan No.13'		淡黄花
16	'Fairy Flaka'		红花, 紫唇
17	'Senlan No.15'		淡黄花, 微红心
18	'Senlan No.16'		淡黄花, 粉边
19	5059	(粉花, 黄心) × (白花, 粉色楔角, 黄紫心)	白花, 粉楔角, 紫黄心
20	'Senlan No.18'		粉白花, 绿心
21	5060	(粉花, 黄紫心) × (红花, 黄紫心)	白花, 粉楔角, 黄心
22	'Hamana Lake Maki'		淡粉花, 绿心
23	'Senlan Number 20'		杏黄花, 红心
24	5046	(黄花, 粉楔角, 紫心) 自交	紫花, 深紫心
25	'White Rabbit Sakura'		白花, 粉楔角, 黄唇
26	'Sakura Hime'		粉白花, 绿心, 迷你型
27	'Santana Anary'		黄花
28	'Lai's Pearl Queen'		白花, 株型较小
29	5019	(红花, 黄心) × (白花, 深紫心)	白花, 黄心
30	RSG012		粉红花, 紫心

2 结果与分析

2.1 杂交育种结果

由表 2 可以看出, 异交成功率比自交成功率高。另外, 2006 年迷你型与大花型品种杂交的成功率较低。

从杂交后代中选出 5029 号和 5041 号最符合育种目标。5029 号: 白花粉色楔角紫红心, 中花型, 株高 35 cm, 花期 1 月底, 茎直径 1.1 cm, 着花率高, 每花序花朵数为 3 朵。5041 号: 红花, 紫唇, 中大花型, 株高 35 cm, 花期 1 月底, 茎直径 1.1 cm, 着花率高, 每花序花朵数为 3 朵。

2.2 春石斛品种亲缘关系的 AFLP 分析结果

2.2.1 引物筛选 建立 AFLP 分析体系后, 以泳道序号 H111-8, H113-2, RYG009, KWG011 等品种

表 2 杂交育种成功率

Table 2 Success ratio of hybridization breeding

年份	杂交方式	授粉组合/个	获得果荚数	成功育苗个数	成功率/%
2004	自交	23	12	8	34.78
2005	姊妹交	56	30	22	39.28
2004	异交	29	21	17	58.62
2005	异交	170	104	80	47.05
2006	异交	67	24	17	25.37
合计		345	191	144	41.74

作为试材筛选引物,以确认合适的引物。从64对 AFLP 引物组合中筛选出8对多态性较高,带型质量较好,分辨率较高的引物。从表3可知,8对引物组合在30个春石斛品种中共在1102个位点上扩增出条带,平均每对引物扩增位点137.8个,扩增位点数量最多的引物 E-AAG/M-CTG 为158个,8对引物组合共扩增出778条多态性条带,平均每对引物扩增位点97.3个,多态性位点扩增位点的比例平均为70.6%,区分率均达100%;引物 E-ACA/M-CTC 扩增条带信号强度一致性好,条带分布较均匀;与之相比,引物 E-AGG/M-CTG 扩增条带信号强度差异相对较大,但条带分布均匀性好。

表3 筛选出的 AFLP 引物对 30 个供试春石斛品种的扩增结果

Table 3 Amplified result of filtrating AFLP primer to 30 testing *Dendrobium nobile*

引物序号	选择碱基	扩增位点/对	多态性位点/对	多态性位点比率/%	区分率/%
4-3	E-AAG/M-CAG	126	91	72.22	100
4-7	E-AAG/M-CTG	158	112	70.89	100
5-5	E-ACA/M-CTA	137	91	66.42	100
5-6	E-ACA/M-CTC	149	121	81.21	100
8-6	E-ACG/M-CTC	142	101	71.13	100
10-3	E-AGG/M-C AG	142	93	65.49	100
10-5	E-AGG/M-CTA	135	95	70.37	100
10-6	E-AGG/M-CTG	113	72	63.72	100
合计		1102	776	70.42	100

2.2.2 遗传多样性分析 图1为应用引物组合 E-AAG/M-CAG 对供试的30个春石斛品种进行 AFLP 扩增的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果。该引物组合共扩增出126个可分析位点,其中多态性位点91个,占72.2%。采用其他7个引物组合多态位点平均占70.6%。可见,供试品种间在DNA一级结构组成上存在相当大的差异,具有较高的遗传多样性,可作为 AFLP 技术鉴定品种的依据。如品种‘DeLL ELegame’与‘SenLan No. 11’采用本引物组合只有3个多态性位点,采用其他引物组合在DNA指纹图谱上差异也很小,可见这2个品种具有很高的遗传一致性,亲缘关系很近;而‘Santana Anary’与其他品种的遗传距离最远,多态性也较高,在该引物组合扩增的指纹图谱上共有23个多态性带。

2.2.3 亲缘关系分析 应用不加权配对组算术方法(UPGMA)进行遗传聚类(图2),30个春石斛品种在0.62水平上分为2个大类,其中‘Sakura Hime’品种和其他品种的遗传距离最远,在观赏形态上该品种为淡黄色,无花眼、花心和楔角的分离,与其他春石斛品种也有明显差异,从花色遗传品质上该品种更接近原生种,可单独分为一类。其他品种在0.65水平上又可分为2类,5046,0274,5027,1401,‘Senlan No.5’,5063,‘Yellow Tsuden’,5026,‘Fairy Flaka’品种聚为一类,其他品种为另一类;再其次,在0.68,0.73和0.79遗传距离水平上,又可分为不同的小类群。

2.3.4 品种花色特征和遗传距离分析 通过30个品种花色特征(表1)和遗传距离分析(图2),可以看出,品种亲缘关系与花色特征有一定的相关性,‘Santana Anary’品种与其他品种花色特征差异最大,同时在遗传距离上最远,花色相近的品种往往比较容易聚成一类,但也不是绝对的,12号和13号品种在遗传距离上非常相近,但花色特征有一定的差别,‘Senlan No.15’和‘Senlan No.16’品种是同一个品种的2个无性系突变,在遗传距离上非常接近。品种株型和着花节位与品种的亲缘关系远近相关度较小。

3 结论与讨论

作者对春石斛进行多年的杂交育种,获得了一定量的杂交品种,从中进行优良品种选育,其中,5029号和5041号最符合育种目标。在春石斛的亲缘关系的 AFLP 分析过程中,采用荧光 AFLP 技

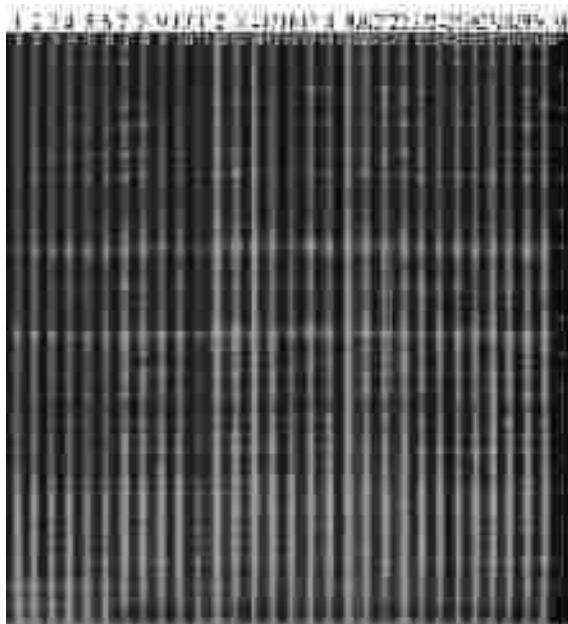


图 1 AFLP 指纹图谱

Figure 1 Fingerprint atlas of AFLP

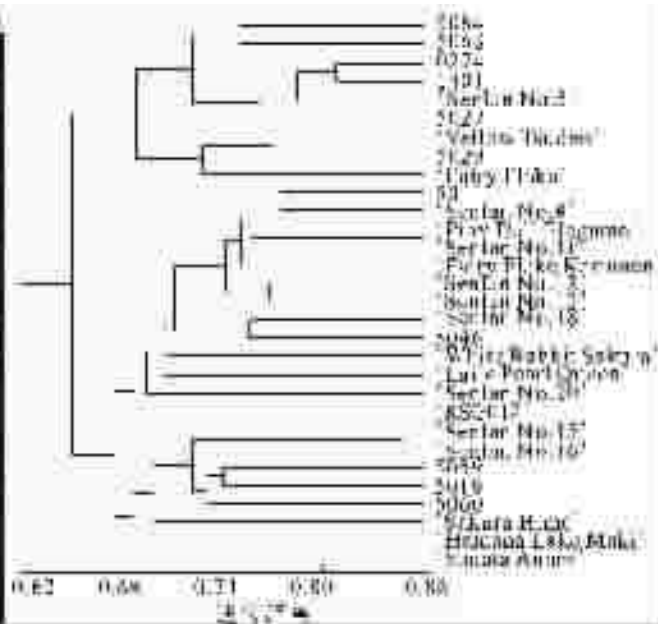


图 2 聚类分枝图

Figure 2 Clustering ramification chart

术，在做选择性扩增时，引物中加入了荧光内标，电泳过程在 ABI377 测序仪上进行。这种电泳技术比普通的银染电泳更加清晰，可区分的条带更多，而且采用测序仪上的电脑程序，进行多态性数据处理，精确度更高，且电泳中加入荧光内标更容易标定 DNA 片段的分子质量，进行特异条带的定位更为方便。特别是 E-ACA/M-CTC 引物组合扩增的有效条带和多态性条带都很多，得到的 DNA 指纹图谱也非常清晰，在 DNA 提取质量得到保证的前提下，具有很高的稳定性。采用荧光 AFLP 技术构建春石斛新品种的 DNA 指纹图，可为品种鉴定、评价和品种创新、新品种保护提供可靠方便的技术手段。

致谢：浙江林学院许绍远教授审阅，在此深表谢意！

参考文献：

- [1] 占吉和. 中国石斛属的初步研究[J]. 植物分类学报, 1980, **18** (4): 427 - 449.
ZHAN Jihe. Preliminary study on China *Dendrobium*[J]. *J Syst Evol*, 1980, **18** (4): 427 - 449.
- [2] 松泽正二. 洋兰家庭栽培[M]. 赵梁军, 李志兰, 译. 北京: 中国林业出版社, 2001.
- [3] 毛碧增, 李凤玉, 王春, 等. 春石斛组织培养技术研究[J]. 浙江大学学报: 理学版, 2003, **30** (5): 580 - 583.
MAO Bizeng, LI Fengyu, WANG Chun, *et al.* Study on the tissue culture technique of *Dendrobium nobile* [J]. *Zhejiang Univ J Nat Sci*, 2003, **30** (5): 580 - 583.
- [4] 廖飞雄, 王恒明, 黄群慧. 春石斛的工厂化快速繁殖技术研究[J]. 西南农业学报, 2006, **19** (5): 943 - 945.
LIAO Feixiong, WANG Henming, HUANG Qunhui. Study on the factory plantation rapid propagation technique of *Dendrobium nobile*[J]. *Southwest China Agric J*, 2006, **19** (5): 943 - 945.
- [5] DEHAAN L R, EHLKE N J. Illinois bundleflower genetic diversity determined by AFLP analysis[J]. *Crop Sci*, 2003, **43**: 402 - 408.
- [6] RAJAPAKSE S, BOLTHOFF L E, HE G. Genetic linkage mapping in peach using morphologica, RFLP and RAPP markers[J]. *Theor Appl Genet*, 1995, **90**: 503 - 510.
- [7] VOS P, HONGERS R, REIJANS M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, **23** (21): 4 407 - 4 414.
- [8] DOYLE J J, DOYLE J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue[J]. *Focus*, 1990, **12**: 13 - 15.