

# 中国首例芍药牡丹远缘杂交种的发现及鉴定

郝青<sup>1,2</sup>, 刘政安<sup>1\*</sup>, 舒庆艳<sup>1</sup>, 王亮生<sup>1</sup>, 陈富飞<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院植物研究所北京植物园, 北京 100093; <sup>2</sup>中国科学院研究生院, 北京 100049; <sup>3</sup>榆中县和平牡丹园, 兰州 730101)

**摘要:** 我国首次发现芍药和牡丹的远缘杂交种, 将该杂交种命名为‘和谐’。通过对牡丹、芍药栽培品种及杂交种‘和谐’的观察和研究发现: ‘和谐’的形态兼具芍药与牡丹且多趋于芍药的特征, 从DNA水平上检测到了与牡丹、芍药共有的特征条带。从形态学和分子生物学两方面证明了‘和谐’为芍药和牡丹远缘杂交形成的宿根类植物。

**关键词:** 牡丹; 芍药; 远缘杂交; 伊藤杂种; SRAP

**中图分类号:** S 685.11; S 682.1<sup>+</sup>2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 06-0853-06

## Identification of Intersectional Hybrid Between Section *Moutan* and Section *Paeonia* Found in China for the First Time

HAO Qing<sup>1,2</sup>, LIU Zheng-an<sup>1\*</sup>, SHU Qing-yan<sup>1</sup>, WANG Liang-sheng<sup>1</sup>, and CHEN Fu-fei<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Beijing Botanical Garden, Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; <sup>2</sup>Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; <sup>3</sup>Peace Peony Garden, Lanzhou 730101, China)

**Abstract:** This paper reported the discovery process and identification method for the first intersectional hybrid between sect *Moutan* and sect *Paeonia* in China, which was named after ‘Hexie’. According to observation and comparison on morphology of sect *Moutan*, sect *Paeonia* and ‘Hexie’, the morphology of ‘Hexie’ had the features similar to both herbaceous peony and tree peony, but more similar to herbaceous peony; Using SRAP (sequence-related amplified polymorphism) molecular marker technique, the results revealed that the amplified fragments respectively unique to sect *Moutan* and sect *Paeonia* showed additivity in ‘Hexie’, which proved that it was could be the hybrid of the both section. ‘Hexie’ was proposed to be perennial herb by intersectional hybridization between the two sections identified from the aspects of morphology and molecular biology.

**Key words:** tree peony; herbaceous peony; intersectional hybrid; Itoh hybrid; SRAP

芍药属 (*Paeonia* L.) 由 3 个组组成, 即牡丹组 (sect *Moutan*)、芍药组 (sect *Paeonia*) 和北美芍药组 (sect *Oneapia*)。由于组间花期不遇或杂交普遍表现不亲和等原因, 获得组间杂交种的几率很低。1948 年日本的伊藤东一开始尝试芍药组与牡丹组间远缘杂交, 并获得杂种。之后引起美国牡丹芍药育种者的重视, 到 2006 年 3 月有 90 个品种被命名 (于小楠 等, 2005; 何桂梅 等, 2006), 这些杂种被园艺界统称为“伊藤杂种”, 它已成为芍药属一个独特的类群。中国一些学者虽然也在不断努力, 但至今未见有开花植株的报道。本文就中国首次发现的芍药牡丹远缘杂交后代‘和谐’, 从形态特征、生长习性、SRAP 分子标记等方面进行了系统的研究, 为加快我国芍药牡丹远缘杂交育种奠定基础。

收稿日期: 2008 - 01 - 18; 修回日期: 2008 - 04 - 01

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX2-YW-Z-064); 林业科技支撑计划专题项目 (2006BAD01A1801)

\*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: liuzhengan@ibcas.ac.cn)

## 1 材料与方法

以远缘杂交种‘和谐’及牡丹和芍药 29 个栽培品种为试验材料,材料均取自中国科学院植物研究所北京植物园牡丹芍药种质资源圃。因篇幅所限,本文选取牡丹品种‘蓝海银波’和芍药品种‘粉玉奴’为代表进行试验结果的叙述和分析。

从 2005 年起连续两年对试验材料进行形态和习性调查,利用英国皇家园艺协会比色卡 (RH-SCC) 描述花色,用分光色差计 NF333 (Nippon Denshoku Industries Co., Ltd) 测定花色,即测定 CIE  $L^*$   $a^*$   $b^*$  表色系统的各个参数 (亮度  $L^*$  值、色相  $a^*$  值和色相  $b^*$  值)。2007 年进行 DNA 检测。DNA 的提取采用 CTAB 法并稍加改进 (Doyle & Doyle, 1987),所有的 DNA 稀释成  $30 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,  
-20 °C 贮存,作为下一步 PCR 的模板。

SRAP 反应体系总体积为  $20 \mu\text{L}$ ,其中模板 DNA  $90 \text{ ng}$ ,  $1 \times \text{PCR Buffer}$ ,  $\text{Mg}^{2+} 2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , dNTPs  $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , *Taq* 酶  $1 \text{ U}$ ,引物浓度  $0.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。SRAP-PCR 程序为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 37 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min 30 s, 退火温度每个循环增加 1 °C,共 8 个循环;然后, 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min 30 s, 32 个循环;最后 72 °C 延伸 7 min。SRAP 反应在 Eppendorf Mastercycler Gradient (Type 5331, Germany) 扩增仪上进行。所选引物序列参考 Li 和 Quiros (2001)、Budak 等 (2004) 论文中的引物,从中选出正向 (forward primer) 和反向引物 (reverse primer),正向引物有 Me2、Me4、Me5、Me7、Me8,反向引物有 Em1、Em2、Em8、Em10。引物的合成由上海生工生物工程技术有限公司完成。

扩增反应结束后,用 2% 琼脂糖凝胶检测扩增产物,EB 染色,室温下 110 V 电压电泳 1 h,凝胶成像系统 White/Ultraviolet Transilluminator (UVP, America) 照相,记录试验结果。以 100 bp Plus DNA Ladder Marker 为标准分子量 (北京全式金生物技术有限公司),通过统计分析得到 DNA 指纹。

## 2 结果与分析

### 2.1 ‘和谐’的发现及命名

2005 年 4 月下旬在北京昌平的苗圃中发现一株“芍药”,叶片光亮,花蕾稍尖,无蜜。5 月中旬第 1 朵花开放,花单瓣,基部有黑紫斑,雄蕊量少,雌蕊正常 (图版, 1)。当时仅认为其是一个罕见的“紫斑芍药”,是难得的育种亲本。2005 年 9 月 22 日,将该植株引种到中国科学院植物研究所北京植物园牡丹芍药种质资源圃中,并分株成 4 棵,发现根部与芍药差异较大。2006 年对该植株的根、茎、叶、花、果进行系统调查分析时,发现其兼具明显的牡丹和芍药的特征,以其作母本,连续两年用牡丹、芍药及其混合花粉做杂交试验,秋季调查均未获得种子。初步推断为芍药和牡丹的远缘杂交种,并将其命名为‘和谐’。

### 2.2 形态特征和生长习性鉴定

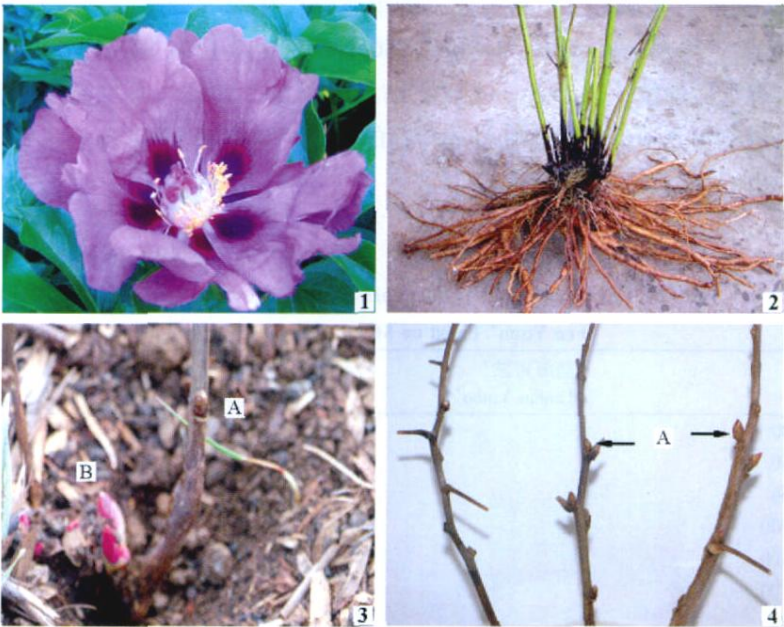
2006 年春,4 棵分株苗杂种优势强,生长旺盛,枝叶繁茂,均正常开花。花单瓣型,浅紫红色, RHSCC 和  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  测得的数值分别为 72B、35.3、47.1、-17.3。花径平均为 15 cm,花瓣数 9~11 枚,花瓣基部具有明显的黑紫色斑,其 RHSCC 和  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  的值分别为 59A 和 17.3、8.1、0.2。在对‘和谐’形态特征和生长习性调查的基础上,将其分别与资源圃内的近千个牡丹和芍药栽培品种进行了比较,结果见表 1。

该植株根系线形,接近牡丹,根茎部半木质化 (图版, 2); 6 月份腋芽明显形成 (图版, 3A), 大小排列有序,自下而上逐渐变小,与牡丹正好相反 (图版, 4), 8 月份通过体式显微镜观察其均为叶芽;幼蕾与芍药差别较大,光滑且无蜜腺,花瓣基部具有明显黑紫斑的特征,类似紫斑牡丹;叶形、叶片质感,生长习性类似于芍药,属多年生草本,地上部的茎、叶、腋芽霜后开始干枯,但根茎

部分半木质化，有粗大鳞芽 1~2 个，一般为混合芽，类似芍药，但较芍药鳞芽更接近地表（图版，3B）；2006、2007 两年的平均始花期在中国科学院北京植物园种质资源圃内为 5 月 10 日，介于牡丹、芍药之间，单株花期较长，10 d 左右。综合以上调查结果表明‘和谐’兼具有牡丹、芍药的双重特征，从形态特征和生长习性上来看是芍药、牡丹（紫斑牡丹）组间杂交新类型，遗传背景复杂。

表 1 ‘和谐’与牡丹、芍药栽培品种形态特征、生长习性的比较  
Table 1 Comparison of morphological characterization and growth habits among tree peony, herbaceous peony and ‘Hexie’

材料 Material	根 Root	腋芽 Axillary bud	鳞芽 Bulbil	生长习性 Growth habit	开花时间 Flowering time	花盘 Faceplate	花蕾蜜腺 Floral nectary	心皮数 Number of capel	花瓣腹斑 Petal blotch
牡丹 Tree peony	线形, 韧皮部占 3/4 Linetype, phloem account for 3/4	有 Present	无 Absent	灌木, 落叶枝条越冬 Shrub, the defoliate tress live through the winter	北京 4 月下旬 Late April in Beijing	花盘发达, 包裹心皮 Faceplate developed, wrap the capel	无 Absent	1~10	有些品种有斑或晕, 有些无 Some cultivars have blotch or flare, some not
芍药 Herbaceous peony	纺锤形, 木质部占 2/3 Spindletype, xylem account for 2/3	无 Absent	有 Present	草本, 宿根越冬 Herbage, perennial root live through the winter	北京 5 月中下旬 Mid-May to late May in Beijing	花盘仅留痕迹 Faceplate only leave vestige	有 Present	2~5	无 Absent
‘和谐’ ‘Hexie’	线形, 韧皮部占 1/2 Linetype, phloem account for 1/2	有 Present	有 Present	草本, 宿根越冬, 根茎半木质化 Herbage, perennial root live through the winter, the rootstock in semi-lignification	北京 5 月上中旬 Early May to mid-May in Beijing	花盘包裹心皮约 1/3 Faceplate wrap the capel and account for about 1/3	无 Absent	3~5	有 Present



图版说明：1. ‘和谐’盛花期；2. ‘和谐’根部状况；3. ‘和谐’腋芽（A）和鳞芽（B）；4. ‘粉玉奴’、‘和谐’、‘蓝海银波’（从左至右）的腋芽。

Explanation of plates: 1. Fully-bloomed flowers of ‘Hexie’; 2. Root of ‘Hexie’; 3. Axillary bud (A) and bulbil (B) of ‘Hexie’; 4. Comparison of axillary bud among ‘Fen Yunu’, ‘Hexie’ and ‘Lanhai Yinbo’ (From left to right).

2.3 DNA分子标记水平鉴定

从牡丹‘蓝海银波’、芍药‘粉玉奴’及杂交种‘和谐’的DNA分子标记结果图1, A可以看出, ‘和谐’与‘蓝海银波’在大约1300 bp处有共同的扩增条带, 与‘粉玉奴’在600 bp处具有共同的条带 (Me8/Em2); 同样, 图1, B中, ‘和谐’与上述两个品种在不同的位置也具有共同的扩增条带 (Me4/Em1)。

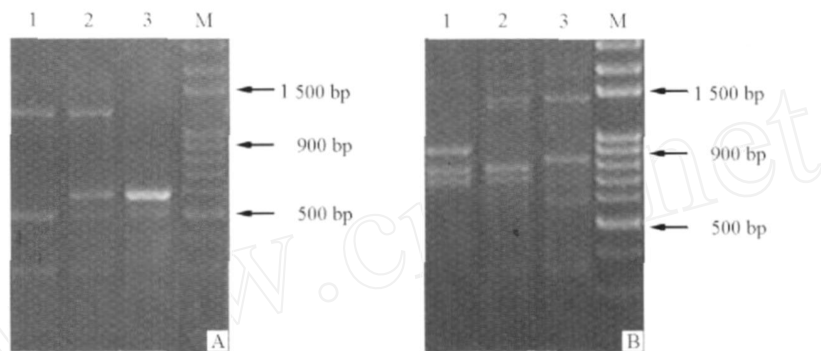


图1 引物组合 Me8/Em2 (A)、Me4/Em1 (B) 在‘蓝海银波’牡丹、‘粉玉奴’芍药和杂交种‘和谐’中的扩增结果

1. ‘蓝海银波’; 2. ‘和谐’; 3. ‘粉玉奴’。M为分子量标准, 即100 bp plus DNA ladder

Fig. 1 A profile of PCR products of ‘Lanhai Yinbo’, ‘Fen Yunu’ and ‘Hexie’ using primer pairs of Me8/Em2 (A) and Me4/Em1 (B)

1. ‘Lanhai Yinbo’; 2. ‘Hexie’; 3. ‘Fen Yunu’. M: 100 bp plus DNA ladder marker

表2的结果表明, 在‘和谐’中共检测到44个位点, 其中与牡丹、芍药供试品种‘蓝海银波’、‘粉玉奴’三者共有位点16个; 与牡丹‘蓝海银波’共有位点11个, 占‘蓝海银波’所检测位点的26.2%; 与芍药‘粉玉奴’共有位点13个, 占‘粉玉奴’中检测位点的24.1%; ‘蓝海银波’的单态位点有10个 (表2中未显示), ‘粉玉奴’的单态位点有22个 (表2中未显示), 在‘和谐’中出现了4个新的位点 (Me5Em10-380、Me5Em1-950、Me7Em10-170、Me4Em1-1600, 表2中未显示)。其它栽培品种也有类似的结论。因此, 本研究结果表明在‘和谐’杂交种中既检测到了与牡丹、芍药共有的位点, 也检测到了分别来自牡丹或芍药的位点, 从而在DNA分子水平上证实‘和谐’是牡丹与芍药杂交产生的远缘杂交种。

表2 利用15对SRAP引物获得的‘和谐’、‘蓝海银波’及‘粉玉奴’的DNA指纹图谱比较

Table 2 Comparison of DNA fingerprints of the ‘Hexie’, ‘Lanhai Yinbo’ and ‘Fen Yunu’ based on SRAP-PCR by 15 primer pairs

标记编号 Marker code	‘蓝海银波’ ‘Lanhai Yinbo’	‘和谐’ ‘Hexie’	‘粉玉奴’ ‘Fen Yunu’
Me2Em8-500	—	—	—
Me2Em8-380	—	—	—
Me2Em8-360	—	—	—
Me2Em10-500	—	—	—
Me2Em10-400	—	—	—
Me2Em10-300	—	—	—
Me4Em2-500	—	—	—
Me4Em8-700	—	—	—
Me4Em8-520	—	—	—
Me4Em8-400	—	—	—
Me4Em10-350	—	—	—

续表 2

标记编号 Marker code	‘蓝海银波’ ‘Lanhai Yinbo’	‘和谐’ ‘Hexie’	‘粉玉奴’ ‘Fen Yunu’
Me5Em10-1200	—	—	
Me5Em10-500	—	—	
Me8Em2-1300	—	—	
Me8Em2-600		—	—
Me8Em2-500	—	—	—
Me8Em2-300	—	—	
Me5Em8-300	—	—	
Me5Em1-1300	—	—	—
Me7Em1-750		—	—
Me7Em1-500		—	—
Me7Em1-450	—	—	—
Me7Em1-230		—	—
Me8Em1-1300	—	—	—
Me8Em1-500		—	—
Me8Em1-450	—	—	—
Me4Em1-800	—	—	
Me4Em1-700	—	—	
Me4Em1-1450		—	—
Me7Em8-490		—	—
Me7Em8-380	—	—	—
Me7Em8-200	—	—	—
Me7Em8-1300	—	—	
Me7Em10-1000	—	—	—
Me7Em10-870	—	—	—
Me7Em10-750		—	—
Me7Em10-450	—	—	—
Me7Em2-1200	—	—	—
Me7Em2-1000	—	—	
Me7Em2-600	—	—	—

注：各编号的 SRAP 标记为显示杂交种及牡丹芍药关系的明显分子证据的位点。“—”表示在该位点上有条带，未显示单态带。

Note: The SRAP marker codes are locus showing clearly molecular evidences for expressing the relation of hybrid, tree peony and herbaceous peony “—” means present, with the omission of single bands

### 3 讨论

1948年，日本育种家伊藤东一用滇牡丹 (*P. delavayi*) 和日本芍药 ‘花香殿’ (Kakoden) 杂交，得到了世界上第一个芍药牡丹组间杂种。美国学者经过不懈努力，目前已获得百余个杂交后代，有 90 个品种被命名。我国芍药牡丹组间杂交育种刚刚起步，能够开花的组间杂交种植株一直未见报道，‘和谐’的发现弥补了我国这方面的空白，其成功开花是我国芍药属植物育种史上的一个里程碑。

‘和谐’具有很强的杂种优势，生长旺盛，病虫害少；具有腋芽，幼蕾无蜜腺，花瓣基部有明显的黑紫斑，多年生根线形，这些特征类似牡丹；具有鳞芽，多年生草本，这些特征又类似于芍药；根茎在秋天趋于半木质化，冬季地上部分枯萎，既具有腋芽又具有鳞芽，这些特征介于牡丹和芍药之间；花期较长，开花期在北京介于牡丹与芍药之间，具有较高的应用价值。

利用 DNA 分子标记鉴定亲子代关系，需要在杂交后代中检测到如下证据：(1) 与双亲共同具有的位点 (或扩增带)；(2) 分别与亲本之一共同具有的位点 (或扩增带)，如果满足这两个条件则能说明两个亲本之间发生了遗传重组 (向太和 等，2000; 段世华 等，2002; 索志立 等，2004, 2005)。本试验的 SRAP 指纹图谱显示，杂交种 ‘和谐’ 中既有分别来自牡丹、芍药的特征带，又具

三者共有的条带。综合研究表明‘和谐’分子鉴定结果与形态、生长习性调查结果完全一致,是芍药、牡丹远缘杂交后代。

‘和谐’在苗圃被发现,伴随着紫斑牡丹生长,花瓣基部黑紫斑接近牡丹,茎、叶等生物学特征酷似芍药。我们在全国牡丹、芍药的调查中发现有些芍药的自然花期与紫斑牡丹的花期是相遇的,‘和谐’连续两年与牡丹、芍药相互杂交,仅以芍药为母本时得到了少量种子。因此作者推测‘和谐’的出现很可能是:芍药为母本、紫斑牡丹为父本的自然杂交后代;芍药为母本、紫斑牡丹为父本的人工杂交后代,虽然获得种子,但在培育过程中因缺乏系统管理和观察,而将其随商品牡丹流入民间。总之,无论是哪种情况形成的远缘杂交种都给我们一些启示:紫斑牡丹和芍药的杂交是可以形成远缘杂交后代的,其后代生长旺盛,优势明显。紫斑牡丹和芍药品种完全可以作为亲本使用培育远缘杂种。‘和谐’的生态习性、真正亲本和遗传规律等方面有待进一步研究。

## References

- Budak H, Sheaman R C, Pamaksiz I, Riordan T P, Dweikat I. 2004. Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buffalograsses based on phylogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs, and SRAPs. *Theoretical and Applied Genetics*, 109 (2): 280 - 288.
- Doyle J J, Doyle J L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 19: 11 - 15.
- Duan Shi-hua, Mao Jian-ning, Zhu Ying-guo. 2002. Genetics analysis and identification of hybrid rice HL-Type (Honglian-2) and their backbone parental with RAPD markers. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 20 (3): 171 - 178. (in Chinese)
- 段世华, 毛加宁, 朱英国. 2002. 红莲型杂交稻(红莲2号)及其骨干亲本的RAPD分析与鉴定. *武汉植物学研究*, 20 (3): 171 - 178.
- He Guimei, Sun Ju-fang, Cheng Fang-yun. 2006. Origin and development of the intersectional hybrid of sect *Moutan* and sect *Paeonia*. *Northern Horticulture*, (6): 106 - 108. (in Chinese)
- 何桂梅, 孙菊芳, 成仿云. 2006. 牡丹芍药组间杂交种的起源及其发展. *北方园艺*, (6): 106 - 108.
- Li G, Quiros C F. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SARP) a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theoretical and Applied Genetics*, 103 (3): 455 - 461.
- Suo Zhi-li, Zhou Shi-liang, Zhang Hui-jin, Zhang Zhiming. 2004. DNA molecular evidences of the inter-specific hybrids between *Paeonia ostii* and *P. suffruticosa* based on ISSR markers. *Forest Research*, 17 (6): 700 - 705. (in Chinese)
- 索志立, 周世良, 张会金, 张治明. 2004. 杨山牡丹和牡丹种间杂交后代的DNA分子证据. *林业科学研究*, 17 (6): 700 - 705.
- Suo Zhi-li, Zhou Shi-liang, Zhang Hui-jin, Zhang Zhiming, Chen Fu-fei, Chen Fu-hui. 2005. DNA molecular evidences of the hybrids between *Paeonia rockii* and *P. suffruticosa* based on ISSR markers. *Acta Botanica Yunnanica*, 27 (1): 42 - 48. (in Chinese)
- 索志立, 周世良, 张会金, 张治明, 陈富飞, 陈富慧. 2005. 紫斑牡丹与牡丹种间杂交后代的DNA分子证据. *云南植物研究*, 27 (1): 42 - 48.
- Xiang Tai-he, Wang Xiu-feng, Li Li, Wu Jia-dao, Yang Jian-ba. 2000. Identification of rice hybrids (Shanyou 63, Shanyou 64 and Shanyou-wan 3) and their parents using RAPD markers. *Acta Agronomica Sinica*, 26 (3): 292 - 296. (in Chinese)
- 向太和, 汪秀峰, 李莉, 吴家道, 杨剑波. 2000. 利用RAPD标记对我国主栽的汕优杂交稻和其亲本进行区别和鉴定. *作物学报*, 26 (3): 292 - 296.
- Yu Xiao-nan, Cheng Fang-yun, He Guimei, Sun Ju-fang. 2005. Intersectional and intrasectional hybrids of tree peony and its new cultivars// Zhang Qi-xiang. *Advance in ornamental horticulture of China*. Beijing: China Forestry Publishing House. (in Chinese)
- 于小楠, 成仿云, 何桂梅, 孙菊芳. 2005. 牡丹远缘杂交育种及新品种介绍/张启翔. *中国观赏园艺研究进展*. 北京: 中国林业出版社.