

浙江红花油茶 × 广宁红花油茶杂交子代的表型性状及其 SSR 分子鉴定

周文才¹, 田仟仟^{1,2}, 李田¹, 黄彬¹, 温强^{1*}

(1. 江西省林业科学院·油茶资源培育与利用江西省重点实验室, 南昌 330013;
2. 江西农业大学, 南昌 330045)

摘要: 浙江红花油茶(*Camellia chekiangoleosa*)种仁含油率和油酸含量高, 广宁红花油茶(*Camellia semiserrata*)具有较强的生长势和抗性。为了利用浙江红花油茶和广宁红花油茶的优点, 培育优良种质材料, 该文对浙江红花油茶与广宁红花油茶的 45 个 F₁ 杂交子代进行表型性状分析, 以掌握杂交子代的表型性状情况, 同时利用 SSR 标记对其进行杂种真伪鉴定, 并筛选可用于油茶杂交子代鉴定的 SSR 标记。结果表明: (1) 浙江红花油茶×广宁红花油茶的 F₁ 子代表现为树形高大、生长迅速, 且其叶脉、萼片、柱头均倾向于父本广宁红花油茶的性状, 而花和叶片形态等性状与母本浙江红花油茶接近, 叶片颜色与大小等特征介于双亲特征之间。(2) 从 32 个 SSR 标记中筛选出了 8 个可区分双亲且能明确子代来源的完全互补型标记, 用于开展杂交子代鉴定, 其中 7 个标记的杂种鉴定率高达 100%, 1 个标记杂种鉴定率为 55.56%; 8 个标记相互补充鉴定出 45 个杂交子代全是真杂种。(3) 将 8 个 SSR 标记对杂交子代进行鉴定能力验证, 表明利用这些 SSR 标记鉴定油茶杂交子代真实性是可行的。该研究为油茶物种间的杂交育种提供参考, 同时也为后续油茶物种间的杂交子代 SSR 标记鉴定提供依据。

关键词: 红花油茶, 子代鉴定, SSR 标记, 表型性状, 杂交育种

Phenotypic traits and SSR molecular identification of hybrid progenies of *Camellia chekiangoleosa* × *C. semiserrata*

ZHOU Wencai¹, TIAN Qianqian^{1,2}, LI Tian¹, HUANG Bin¹, WEN Qiang^{1*}

(1. Jiangxi Academy of Forestry • Key Laboratory of Cultivation and Utilization of Oil Tea Resources of Jiangxi Province, Nanchang 330013, China; 2. Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: *Camellia chekiangoleosa* has high oil content and oleic acid content, while *Camellia semiserrata* has strong growth vigor and resistance. In order to take advantage of the advantages of *C. chekiangoleosa* and *C. semiserrata* and cultivate excellent germplasm materials, In this paper, the phenotypic traits of 45 F₁ hybrid progenies of *C. chekiangoleosa* and *C. semiserrata* were analyzed to grasp the phenotypic traits of the hybrids, in addition, SSR markers were used to identify hybrids, and SSR markers that could be used to identify the hybrids of oil tea were screened. The results were as follows: (1) The F₁ hybrids of *C. chekiangoleosa* × *C. semiserrata*

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFD1000402); 国家自然科学基金项目 (32201592; 31860179); 江西省重点研发计划项目 (20201BBF61003; 20224BBF61027); 江西省林业厅林业创新项目(YCYJZX (2023) 131、YCYJZX (2023) 111、202221); 江西省林业科学院基础研究与人才科研专项(2022511001)和江西省林业科学院科研及成果推广专项博士启动项目(2021521001)。

第一作者: 周文才, (1978-), 博士, 研究员, 从事经济林遗传育种研究, (E-mail) zhouwencai2000@2000.com。

***通信作者:** 温强, 博士, 研究员, 研究方向为经济林遗传育种, (E-mail) jxwenqiang@aliyun.com。

showed tall tree and rapid growth, and their leaf veins, sepals and stigmas were all tended to the traits of the male parent *C. semiserrata*, while flower and leaf morphology and other traits were similar to the female parent *C. chekiangoleosa*, and the characteristics of leaf color and size were between those of the parents. (2) From the 32 SSR markers, 8 fully complementary markers that can distinguish parents and determine the origin of offspring were screened out for identification of hybrids, among which the hybrid identification rate of 7 markers was as high as 100%, and the hybrid identification rate of 1 marker was 55.56%. 45 hybrids were all true hybrids identified by the complementarity of 8 markers. (3) The 8 SSR markers were used to verify the ability to identify the hybrids, indicating that it was feasible to use these SSR markers to identify the authenticity of the hybrids of oil tea. This study provide a reference for interspecies cross breeding of oil tea, and also provide a basis for the SSR marker identification of hybrids of oil tea.

Key words: *Camellia chekiangoleosa*, hybrids identification, SSR markers, phenotypic traits, cross breeding

油茶泛指山茶科山茶属植物中具有较高油用价值的木本油料作物,其茶油中含有大量对人体有益的油酸、亚油酸以及生育酚、角鲨烯等活性物质,是一种优质的功能性食用油(秦声远等, 2018; 罗晓岚和朱文鑫, 2010; 田仟仟等, 2021)。浙江红花油茶(*Camellia chekiangoleosa*)和广宁红花油茶(*C. semiserrata*) 等是油茶中的主栽品种(孙佩光等, 2012)。浙江红花油茶又名浙江红山茶,喜夏凉、冬寒、不耐热,主要分布于江西、浙江、湖南、湖北、皖南等山区海拔 600~1 400 m 的山地。广宁红花油茶即南山茶,喜温暖湿润、耐半荫,具有较强的生长势,主要分布于广东和广西。与其他油茶物种相比,无论是种仁脂肪酸含量,还是种仁营养成分价值,红花油茶都有着较大的优势,尤其是浙江红花油茶,其油酸含量平均在 80%以上,种仁含油率高达 60%以上,显著高于普通油茶(含量 40%左右)(贺义昌等, 2020; 周文才等, 2019; 吴雪辉等, 2016),而种仁含油率和油酸含量是产量和品质的重要指标,此外,其相对含量高低不受果实采收时期的影响,具有高产稳产的特性,为高种仁含油率、高品质的油茶优良材料(周文才等, 2019; 田潇潇等, 2018)。

杂交育种试验成本低、后代性状分离广,且杂交子代兼具双亲优良性状,是培育油茶新品种的重要途径(李凌, 2016)。因此,利用油用性状优良的浙江红花油茶与生长势和抗性强的广宁红花油茶进行杂交,有望培育性状更加优良的高产杂交子代。有研究表明油茶物种间的杂交子代性状多表现为双亲性状中间型,但有倾向于某一亲本的趋势(周盛等, 2001)。杨志玲等(2004)以浙江红花油茶为母本与其他红山茶组物种进行杂交中发现,浙江红花油茶与广宁红花油茶的杂交组合获得的杂交结实率是最高的。到目前为止,浙江红花油茶与广宁红花油茶的杂交子代性状情况相关研究未见报道。

油茶属虫媒异花授粉植物,其遗传杂合度高,存在杂交育种周期长以及杂交过程中易发生混杂致使 F_1 子代出现假子代等问题。有学者认为浙江红花油茶是宛田红花油茶或广宁红花油茶演化到山茶品种群的过渡物种,又或是广宁红花油茶到香港红山茶(*C. hongkongensis*)演化过程中一个至关重要的物种(Yusuke Sakata, 1988),这就不难解释自然条件下浙江红花油茶与广宁红花油茶等近缘种间的生殖隔离不明显,会产生杂交子代的现象(顾志建等, 1997)。另外,在实施人工杂交育种的过程中也存在外来花粉污染造成子代混杂的可能,而明确 F_1 子代的真实性是构建遗传图谱、开展子代测定等的前提(周文才等, 2015),因此,对杂交子代进行早期鉴定是有必要的,可以提高育种效率,节约成本。

子代鉴定的方法主要有形态特征、染色体计数、荧光原位杂交和分子标记等。根据杂交子代的表型来判断子代的真实性是最基本的方法,具有直观便捷的优点,但鉴定周期长且易受观察者主观和栽培环境影响,无法保证鉴定结果的准确性(Ye et al., 2013; Dridi et al., 2018)。细胞学方法中的荧光原位杂交及染色体计数具有较高的鉴定效率,但操作繁杂、费

时费力。分子标记鉴定不仅具有鉴定效率高、操作简便、不受栽培环境和生长发育条件的影响等优点,还可明确子代和亲本的基因型,从基因组的水平上揭示子代与双亲间的遗传差异(Yang et al., 2010; Khajudparn et al., 2012; Khan et al., 2013)。分子标记中的简单重复序列标记(simple sequence repeats, SSR),因具有共显性、重复性好、稳定可靠、操作简单等优点,也已被广泛应用于茶树(雷雨等, 2021)、沙田柚(韩国辉等, 2010)、菊花(刘颖鑫等, 2019)等物种的杂种鉴定。然而,由于油茶杂交群体不易获得,有关杂种后代鉴定的研究鲜有报道,只是在同属的物种中有利用 SSR 标记鉴定杂交子代的研究报道,徐晶等(2009)利用分别来自叶绿体 DNA、rDNA 的内部转录间隔区和核基因组共 5 个 SSR 标记,对金花茶(*C. nitidissima*)×七星白(*C. japonica*)以及金花茶×茶梅(*C. sasanqua*)的 6 个杂交子代进行杂种鉴定,鉴定效率为 83.33%。

本研究以油茶杂交育种及品种分子鉴定为研究区域,以浙江红花油茶为母本,广宁红花油茶为父本,采用人工杂交获得 45 株 F_1 子代,通过对杂交子代进行表型测定,同时筛选 SSR 标记并利用该标记开展杂交子代的鉴定,拟探讨以下几个问题:(1)浙江红花油茶 × 广宁红花油茶的杂交子代表型偏向父本、母本、还是介于父母本之间;(2)能否获得适于油茶种间杂种鉴定的特异 SSR 标记;(3)SSR 标记能否对浙江红花油茶 × 广宁红花油茶杂交子代进行真伪鉴定及其鉴定效率又如何。本研究结果可为油茶物种间的杂交育种提供参考,同时也为后续油茶物种间的杂交子代 SSR 标记鉴定提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料和 DNA 提取

以广宁红花油茶为父本,浙江红花油茶为母本经常规杂交后获得 45 株 F_1 子代。杂交子代为 5 年生实生苗,栽植于江西省林业科学院试验基地。每份样本采集 3~5 片嫩叶,并保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱待用。利用改良 CTAB 法(温强等, 2006)提取 DNA 后,用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,Nanodrop2000 (Thermo Scientific, USA)检测 DNA 的浓度和纯度,最后将 DNA 浓度稀释至 $100\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2 SSR 引物设计和 PCR 扩增

基于浙江红花油茶全长转录组序列利用 Primer 3.0 软件进行 SSR 引物设计。引物 PCR 扩增体系为 $10\text{ }\mu\text{L}$: $10\times\text{Buffer}$ $1.0\text{ }\mu\text{L}$, Mg^{2+} ($25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $1.0\text{ }\mu\text{L}$, dNTPs ($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $1.0\text{ }\mu\text{L}$, $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Primer-F、Primer-R 各 $0.4\text{ }\mu\text{L}$, Taq 酶 ($5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $0.1\text{ }\mu\text{L}$, DNA 模板 ($100\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $0.5\text{ }\mu\text{L}$, 加灭菌 ddH₂O 补齐到 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 扩增程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s , $57\sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (因不同引物而异)退火 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s , 共 25 个循环;最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 扩增产物用 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 150 V 电压电泳 90 min 后进行银染显色,并拍照记录。

1.3 引物的筛选和可靠性验证

经过初步 PCR 扩增筛选出 32 个条带清晰、多态性好的标记。再经两个亲本以及 6 个杂交子代样本筛选出可区分双亲和子代并能明确子代位点来源的 SSR 标记,用于后续的 45 个 F_1 子代样本的扩增。为确保杂交子代鉴定试验结果的可靠性,选取 3 个广宁红花油茶样本 (非父本)和 3 个浙江红花油茶样本(非母本)对杂交子代鉴定率低的 SSR 标记进行可靠性验证。双亲和杂交子代的等位基因用 A、B、C、D 英文字母表示。

2 结果与分析

2.1 杂交子代表型性状

浙江红花油茶×广宁红花油茶的 F_1 子代在表型上表现为亲本性状中间型,从整体看树形高大、生长迅速更倾向于父本广宁红花油茶的性状(表 1, 图 1)。 F_1 子代的枝、叶及叶柄光

滑无毛，老枝灰白色，新梢红色；叶片绿色略偏黄，薄革质，椭圆或长椭圆形，侧脉约 8 对，叶脉明显，边缘 3/4 有锯齿；子代播种种植后第 4 年开花，花顶生单花，红色，花冠直径 7~8 cm，花瓣 7~8 片，柱头 5 裂、中裂；苞片及萼片早期黄绿色被毛，后期淡褐色被毛，9~10 片，宿存。

表 1 双亲及杂交子代的表型性状

Table 1 Phenotypic traits of parents and F₁ hybrid progenies

样本 Sample	枝条 Branch	叶片 Blade	花 Flower	苞片及萼片 Bract and sepal	生长势 Growth potential
母本 Female parent	光滑无毛，老枝灰白色，新梢褐色 Smooth hairless, old branches gray white, new brown	椭圆形或长椭圆形，革质，叶长 8~13 cm, 叶宽 4~6 cm, 叶脉不明显，叶缘 2/3 有宽锯齿 Elliptic or oblong, leathery, leaves 8-13 cm long, 4-6 cm wide, veins indistinguishable, leaf margin 2/3 broadly serrated	杯形，花冠直径 6~8 cm，花瓣 6~7 片，柱头 3 裂、中裂 Cup-shaped, corolla 6-8 cm in diameter, petals 6-7, stigma 3-lobed, medium lobe	9~10 片，褐色被毛 9-10 pieces, brown coat	一般 Average
父本 Male parent	光滑无毛，老枝灰白色，新梢红色 Smooth hairless, old branches gray white, new red	椭圆形或长椭圆形，薄革质，叶长 12~16 cm, 叶宽 4~7 cm, 叶脉明显，叶缘 2/3 有宽锯齿 Elliptic or oblong, thinly leathery, 12-16 cm long, 4-7 cm wide, veins distinct, leaf margin 2/3 broadly serrated	筒形，花冠直径 6~9 cm，花瓣 9~12 片，柱头 4~5 裂、中裂 Cylindrical, corolla 6-9 cm in diameter, 9-12 petals, stigma 4-5, medium split	10~11 片，早期黄绿色无毛，后期红褐色被短涓毛 10-11 pieces, early yellow-green hairless, late reddish-brown short trickling	强 Strong
杂交子代 Hybrid progenies	光滑无毛，老枝灰白色，新梢红色 Smooth hairless, old branches gray white, new red	椭圆或长椭圆形，薄革质，叶长 10~16 cm, 叶宽 4~7 cm, 叶脉明显，叶缘 2/3 有宽锯齿 Elliptic or oblong, thinly leathery, leaves 10-16 cm long, 4-7 cm wide, veins distinct, leaf margin 2/3 broadly serrated	杯形，花冠直径 7~8 cm，花瓣 7~8 片，柱头 5 裂、中裂 Cup-shaped, corolla 7-8 cm in diameter, petals 7-8, stigma 5-lobed, medium lobed	9~10 片，早期黄绿色被毛，后期淡褐色被毛 9-10 pieces, early yellow-green coat, late light brown coat	强 Strong



P₁. 父本; P₂. 母本; 1-45. 杂交子代。下同。
P₁. Male parent; P₂. Female parent; 1-45. Hybrid progenies. The same below.

图 1 双亲及杂交子代的照片
Fig.1 Photos of parents and hybrid progenies

2.2 杂交子代鉴定的引物筛选

初步筛选出的 32 对 SSR 引物在双亲和 6 个杂交子代(10 号、12 号、13 号、28 号、33 号和 40 号)中均可扩增，其中亲本间表现为多态性的引物有 20 对，多态性比例为 62.5%。从中选择 8 对扩增条带清晰并呈现共显性的 SSR 引物，用于 45 株杂交子代鉴定，详细引物信息见表 2。

表 2 8 对多态性 EST-SSR 引物信息
Table 2 Information on 8 polymorphic EST-SSR primers

引物 Primer	登录号 Accession No.	重复基序 Repeat motif	引物序列 Primer sequence (5'-3')	溶解温度 T _m (°C)
CC_eSSR152	MW436436	(TC)14	F: TCCCCAAACAGTTGAAGAAGCT	60.1
			R: TCCTTCGAGAACCTTGGTGC	60.0
CC_eSSR162	OK044176	(TAT)14	F: GGCCCAGTTGAAAGGTTGGT	60.8
			R: TCGGTTATAGTGCCACATGG	57.4
CC_eSSR165	MW436437	(AGA)6	F: GGGTCTCACGCTACTCACTC	59.5
			R: CACACCACATCCTCTGGTCC	60.0
CC_eSSR171	OK044181	(TAC)7	F: AATCAAGAACATCGTGCGCG	59.9
			R: TCGATGCTCTTCGAGACCCT	60.4
CC_eSSR174	OK044183	(TGG)6	F: GAGAAATTGCCGCTGGTGTG	60.1
			R: CCTCCGCCCACCTTATTACC	59.9
CC_eSSR270	OK044216	(AAACA)5	F: GTCTTCCCACTGCTTCGTGA	60.0
			R: TCCTCTGTGTGCAGTTGAGT	58.9
CC_eSSR292	OK044227	(CAGAC)6	F: TCGCCGATTCTTCTTCGTT	59.8
			R: GCGGTGGTGGTCGAGAATAG	60.5
CC_eSSR296	OK044230	(AACCA)5	F: ACTCCCTAAAAGCTTGCGCA	60.3

2.3 杂交子代的 SSR 分子鉴定

SSR 标记是共显性标记,对二倍体材料扩增后,可根据 F_1 子代基因型来鉴定真假子代。表现具有双亲特征条带或具父本特征条带的子代样本为真杂种,而只表现为母本特征条带无父本特征条带的为假杂种(胡文舜等,2015)。通过 8 对 SSR 引物对 45 个 F_1 子代进行鉴定,结果表明所有子代均为真子代,单对引物的杂种鉴定效率为 55.56%~100%(表 3)。引物 CC_eSSR152、CC_eSSR174 和 CC_eSSR296 在亲本扩增出 2 个等位基因,基因型为纯合互补型(AA×BB),扩增出的 F_1 子代的基因型均为 AB 型,鉴定出 45 个真杂种,鉴定效率为 100%,对真假子代的鉴定最为直观有效。引物 CC_eSSR162、CC_eSSR165、CC_eSSR171、CC_eSSR270 和 CC_eSSR292 在亲本中的基因型表现为双亲互补型,其中引物 CC_eSSR165(AB×CC)、CC_eSSR171(AA×BC)、CC_eSSR270(CC×AB) 和 CC_eSSR292(AA×BC) 扩增出 3 个等位基因,引物 CC_eSSR162(AB×CD) 扩增出 4 个等位基因。引物 CC_eSSR162、CC_eSSR165、CC_eSSR171 和 CC_eSSR270 在 45 个 F_1 子代中扩增出的带型均具双亲特征带,真杂种的鉴定效率均为 100%。引物 CC_eSSR292 在 F_1 子代中有 25 个子代扩增出基因型为 AB 或 AC,即继承了分别来自双亲(父本 AA、母本 BC)各一个等位基因,鉴定为真杂种,其余 20 个样本的基因型(BB、CC)仅继承了母本的等位基因而未出现父本等位基因,鉴定为假子代,因此其鉴定效率为 55.56%(表 3)。

表 3 F_1 子代的基因型信息

Table 3 Genotype information of F_1 hybrid progenies

SSR 标记 SSR marker	标记类型 Marker type	基因型 Genotype	F ₁ 子代数量 Number of F ₁			真杂种数量 Number of true hybrids	鉴定率 Identification rate
			双亲带型 Paternal and maternal marker bands	父本带型 Paternal marker band	具母本 1 条带 One of the maternal marker bands		
CC_eSSR152	纯合互补型	AA×BB	45	0	0	45	100%
CC_eSSR174	Homozygous	AA×BB	45	0	0	45	100%
CC_eSSR296	complementary type	AA×BB	45	0	0	45	100%
CC_eSSR162	双亲互补型	AB×CD	45	0	0	45	100%
CC_eSSR165	Parents	AB×CC	45	0	0	45	100%
CC_eSSR171	complementary	AA×BC	45	0	0	45	100%
CC_eSSR270	type	CC×AB	45	0	0	45	100%
CC_eSSR292		AA×BC	25	0	20	25	55.56%

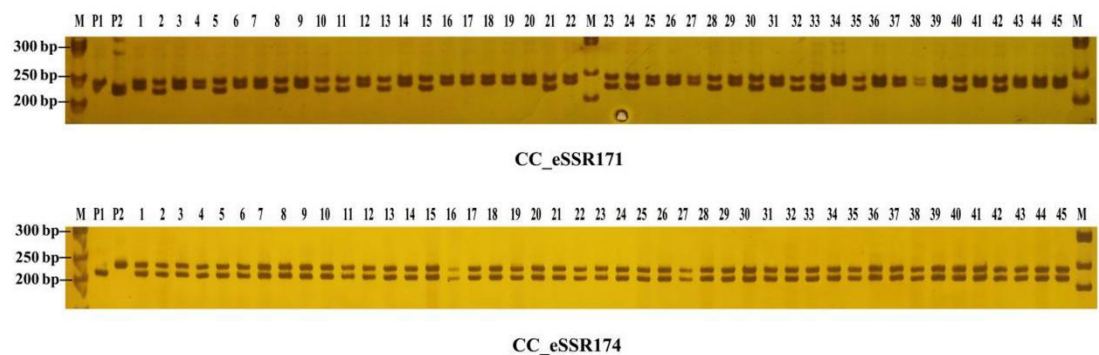
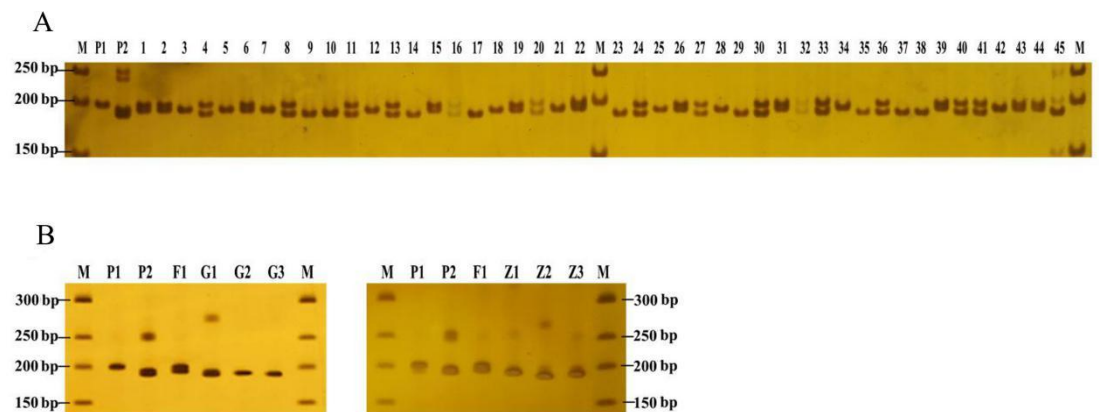


图 2 SSR 引物对 45 个杂交子代鉴定的凝胶电泳图

Fig. 2 Gel electrophoresis image of SSR primer for identification of 45 hybrid progenies

2.4 杂交子代鉴定结果验证

另外选取 3 个非父本的广宁红花油茶个体(G1、G2、G3)和 3 个非母本的浙江红花油茶个体(Z1、Z2、Z3)检测引物 CC_eSSR292 对真父子代的鉴定结果。在图 3a 中，引物 CC_eSSR292 扩增的真子代的基因型为杂合型，能够完美的继承父母本各一个等位基因；图 3b 中，引物 CC_eSSR292 扩增的非杂交子代的 6 个个体并未继承双亲的等位基因，而是扩增出新的等位基因，为假杂种，表明引物 CC_eSSR292 对杂交子代的鉴定结果是可靠的。



A. 引物 CC_eSSR292 对 45 个杂交子代的扩增；B. 引物 CC_eSSR292 的可靠性验证。M. DNA maker。

A. Amplification of 45 hybrid progenies by primer CC_eSSR292; B. reliability verification of primer CC_eSSR292. M. DNA maker.

图 3 引物 CC_eSSR292 的扩增凝胶电泳图

Fig. 3 Gel electrophoresis image of primer CC_eSSR292

3 讨论与结论

3.1 杂交子代表型分析

杂交育种的目的是通过杂交获得综合双亲优良性状的杂交子代，是当前培育油茶新品种的重要途径。本研究中我们选择浙江红花油茶×广宁红花油茶的杂交组合进行人工杂交，其中作为母本的浙江红花油茶(GHY26) 材料是我们团队筛选出具有亚油酸含量高 (7.31%)、果实产量高 (平均冠幅产量达到 2.12 kg/m²)等优良性状的优株（董乐等，2021），我们期望选育出具有双亲优良性状的高产油茶新品种。

前人以浙江红花油茶作母本获得的杂交子代在表型性状上更偏向于母本特征，如王湘南

等（2020）对浙江红花油茶和滇山茶杂交得到的子代进行观测，发现在开花、枝叶及树体生长等表型性状较大程度的遗传到母本的特征。在花瓣数量及花型上，高继银等（2016）培育的浙江红花油茶与杜鹃红山茶杂交子代同样偏向于母本。本研究中，我们得到的 F_1 杂交子代在花和叶片形态等表型性状上与母本浙江红花油茶接近，叶片颜色、大小等特征处于双亲特征之间，叶脉、萼片、柱头、生长势更接近父本广宁红花油茶，这与前人的研究结果有所不同，本研究中 F_1 杂交子代较好地结合了双亲的优点，且父本广宁红花油茶对子代的表型有较大影响，这也为今后利用父本广宁红花油茶的优点开展浙江红花油茶杂交品种选育提供了依据。至于子代的果实产量和亚油酸含量等特征的倾向性还有待于后续进一步试验观测。

3.2 杂交子代鉴定的 SSR 引物筛选

浙江红花油茶在表型上与同组内的广宁红花油茶、厚叶红山茶(*C. crassissima*)、闪光红山茶(*C. lucidissima*)相近，且在种内存在丰富的表型变异，尤其是叶片形态差异显著，仅仅依据形态特征很难鉴定杂种的真实性（温强等，2015）。加上浙江红花油茶自交不亲和，长期异交，遗传背景高度杂合，因此对其进行杂种鉴定时，宜选择合适且有效的共显性标记，才能避免误判。有学者认为不同 SSR 标记对杂交子代的鉴定能力不尽相同，相较于杂合型的 SSR 标记，纯合型标记的鉴定效率更高，仅用一个标记就可以鉴定出所有的杂交后代（韩国辉等，2010）。周宁宁等（2017）根据 SSR 标记在月季杂交子代中的鉴定能力划分为三种类型：首先是纯合显性标记 $AA \times BB$ 型，杂种鉴定效率能够达到 100%，其次是 $AB \times CC$ 、 $AA \times BC$ 和 $AB \times CD$ 基因型标记，鉴定能力稍次之，最后是鉴定能力最差的 $AA \times AB$ 、 $AB \times BB$ 、 $AB \times AC$ 等类型标记。随后尹宝颖等（2019）对苹果杂交子代进行鉴定，将 9 个 SSR 标记分为了完全互补型($AA \times BB$ 、 $AB \times CD$ 和 $AB \times CC$ 型)和不完全互补型($AA \times AB$ 和 $AB \times BC$ 型)两大类，前一类标记的鉴定效率高，后者标记的鉴定能力较差，需要进一步验证。以上报道均认为 $AA \times BB$ 、 $AB \times CC$ 、 $AA \times BC$ 和 $AB \times CD$ 类型的 SSR 标记的鉴定率较高，理论上仅需要一个标记就可以鉴定出所有杂交子代，其中 $AA \times BB$ 和 $AB \times CD$ 型标记的杂种鉴定效果最好，可以大大提高鉴定效率。本试验中用于油茶杂交子代鉴定的 8 个 SSR 标记均为完全互补型，其中 CC_eSSR152、CC_eSSR174 和 CC_eSSR296 的基因型为 $AA \times BB$ 类型，CC_eSSR162 的基因型为 $AB \times CD$ ，这 4 个标记的杂种鉴定效率同前人的研究结果一致，都达到 100%，不同的是 CC_eSSR165 ($AB \times CC$)、CC_eSSR171 ($AA \times BC$)和 CC_eSSR270 ($CC \times AB$) 标记的鉴定效率也高达 100%，表明油茶杂交子代鉴定的 SSR 引物筛选范围较大，这为今后开展油茶其它物种杂交子代鉴定等相关研究提供参考。

3.3 SSR 标记鉴定杂交子代能力分析

韩国辉等（2010）认为对于杂合的显性标记至少要 5 个父本特异标记才能鉴定出 97% 的真杂种，我们从 32 个 SSR 标记中筛选出 8 个具有较高杂种鉴定率的标记，经 F_1 子代群体验证，有 7 个均能一次性单独鉴定所有杂交子代，无论是筛选效率还是鉴定效率都比较高。杂交子代真假性的鉴定过程中除了考虑最大程度确保鉴定的准确性外，还要考虑试验工作量的问题。雷雨等（2021）从 32 个 SSR 标记中各筛选出 3 个标记对福鼎大白茶×保靖黄金茶 1 号以及安徽 1 号×保靖黄金茶 1 号茶树的两个杂交子代群体进行子代鉴定，杂种鉴定率分别为 85.42% 和 79.55%。尹宝颖等（2019）从 35 个 SSR 标记中筛选出了 9 个标记用于鉴定鸡冠和富士苹果 F_1 代，有 225 株为真杂种，鉴定率为 93%。李文秀等（2021）仅选用 3 个多态性 SSR 标记就可以完成 35 株橡胶树杂交子代的真实性鉴定，且这 3 个标记都具有较高的杂种鉴定率。本研究中，我们利用 8 个共显性标记对浙江红花油茶和广宁红花油茶的 45 株 F_1 子代进行杂种真实性鉴定，其中 CC_eSSR152、CC_eSSR162、CC_eSSR165、CC_eSSR171、CC_eSSR174、CC_eSSR270 和 CC_eSSR296 这 7 个标记的杂交子代鉴定效率高达 100%，CC_eSSR292 标记的鉴定效率为 55.56%。综合 SSR 标记的鉴定结果，判定 45 个 F_1 子代都是真杂种。因此，我们选用的 8 个 SSR 标记鉴定油茶杂交子代是完全可行的，

同时, 针对 SSR 引物鉴定杂交子代结果的可靠性验证也表明 SSR 标记适用于油茶杂交子代的鉴定。

参考文献:

- DONG L , LI T , HUANG WY, et al., 2021, Selection and comprehensive evaluation of superior individual plant in *Camellia chekiangoleosa*[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 41(11):35-45.[董乐, 李田, 黄文印, 等, 2021. 浙江红花油茶优株筛选与综合评价[J]. 中南林业科技大学学报, 41(11):35-45.]
- DRIDI J, FENDRI M, BRETON CM, et al., 2018, Characterization of olive progenies derived from a Tunisian breeding program by morphological traits and SSR markers[J]. Sci Hort-Amsterdam, 236:127-136.
- GAO JY, LIU XK, ZHAO QM. 2016. Illustrations of the new camellia hybrids that bloom year-round, [M]. Hangzhou, Zhejiang Science and Technology Press:1-581.[高继银, 刘信凯, 赵强民, 2016. 四季茶花杂交新品种彩色图集[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社: 1-581.]
- GU ZJ, SUN XF, 1997, A karyomorphological study of seventeen species of Chinese *Camellia*[J]. Acta Botan Yunnan, 19(2): 159-170.[顾志建, 孙先凤, 1997. 山茶属 17 个种的核形态学研究[J]. 云南植物研究, 19(2): 159-170.]
- HAN GH, XIANG SQ, WANG WX, et al., 2010. Identification and genetic diversity of hybrid progenies from shatian pummelo by SSR[J]. Sci Agricult Sin, 43(22):4678-4686.[韩国辉, 向素琼, 汪卫星, 等, 2010. 沙田柚杂交后代群体的 SSR 鉴定与遗传多样性分析[J]. 中国农业科学. 43(22):4678-4686.]
- HE YC, WU MJ, DONG L, et al., 2020. Analysis of kernel oil content and variation of fatty acid composition of *Camellia chekiangoleosa* in the main producing areas[J]. Non-Wood For Res, 38(3):37-45.[贺义昌, 吴妹杰, 董乐, 等, 2020. 主产区浙江红花油茶籽仁含油率及脂肪酸组成变异分析[J]. 经济林研究, 38(3): 37-45.]
- HU WS, HUANG AP, JIANG F, et al., 2015. Identification and genetic diversity of reciprocal hybrids in Longan (*Dimocarpus longan*) by SSR[J]. Acta Horticult Sin, 42(10):1899-1908.[胡文舜, 黄爱萍, 姜帆, 等, 2015. 龙眼正反交后代的 SSR 鉴定及遗传多样性分析[J]. 园艺学报, 42(10): 1899-1908.]
- KHAJUDPARN P, PRAJONGJAI T, POOLSAWAT O, et al., 2012. Application of ISSR markers for verification of F₁ hybrids in mungbean (*Vigna radiata*) [J]. Genet Mol Res, 11(3): 3329-3338.
- KHAN H, SIVALINGAM P N, CHAUHAN S, et al., 2013. Improved crossing technique and identification of true F₁ hybrids of *Ziziphus mauritiana* Lam. by molecular markers[J]. Sci Hort-Amsterdam, 150: 164-171.
- LI L, 2016. Garden plant genetics and breeding, Chongqing: Chongqing University Press:157-173.[李凌, 2016. 园林植物遗传育种[M]. 重庆:重庆大学出版社: 157-173.]
- LI WX , HE JJ, ZHANG HL, et al., 2021, Identification of F₁ hybrids of *Hevea brasiliensis* by SSR Markers[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 42(5):1305-1309.[李文秀, 贺军军, 张华林, 等, 2021. SSR 分子标记鉴定橡胶树 F₁ 真伪杂种 [J]. 热带作物学报, 42(5): 1305-1309.]
- LEI Y, DUAN JH, HUANG FY, et al., 2021. Identification and genetic diversity of tea F₁ hybrids based on SSR markers[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 22(03):748-757.[雷雨, 段

-
- 继华, 黄飞毅, 等, 2021. 茶树杂交 F₁ 真假杂种的 SSR 鉴定及遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 22(03):748-757.]
- LIU YX, LI PT, CHI TH, et al., 2019. Identification and genetic diversity analysis of interspecific F₁ hybrids between *Chrysanthemum nankingense*×*C. lavandulifolium*[J]. Acta Horticult Sin, 46(8):1553-1564.[刘颖鑫, 李沛瞳, 迟天华, 等, 2019. 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, 46(8):1553-1564.]
- LUO XL, ZHU WX, 2010. Processing technology of oil-tea camellia seed oil and comprehensive utilization of *camellia oleifera* resources[J]. Chin Oils And Fats, 35(9): 13-17.[罗晓岚, 朱文鑫, 2010. 油茶籽油加工和油茶资源综合利用[J]. 中国油脂, 35(9):13-17.]
- QIN SY, RONG J, ZHANG WJ, et al., 2018. Cultivation history of *Camellia oleifera* and genetic resources in the Yangtze River Basin[J]. Biodiversity Science, 26(04): 384-395.[秦声远, 戎俊, 张文驹, 等, 2018. 油茶栽培历史与长江流域油茶遗传资源[J]. 生物多样性, 26(04):384-395.]
- SUN PG, CHEN XY, XI RC, et al., 2012. Research progress on the evaluation of *Camellia oleifera* germplasm resources [J]. Chin For Sci Technol, 26(3): 1-6.[孙佩光, 陈晓阳, 奚如春, 等, 2012. 油茶种质资源评价研究进展[J]. 林业科技开发, 26(3):1-6.]
- XU J, HUANG LD, , XU Y, et al., 2009, Identifying hybrids of golden camellia using SSR molecular markers[J]. J Fudan Univ (Nat Sci), 48(5):668-673.[徐晶, 黄连冬, 徐颖, 等, 2009. 用 SSR 分子标记鉴定金花茶杂交种(英文)[J]. 复旦学报(自然科学版), 48(5):668-673.]
- WEN Q, YE JS, LEI XL, et al., 2006. Study on the inter-simple sequence repeat condition of *Camellia oleifera*[J]. J Centr S For Univ, 26(6):22-26.[温强, 叶金山, 雷小林, 等, 2006. 油茶 ISSR 反应体系建立及优化[J]. 中南林业科技大学学报, 26(6):22-26.]
- WEN Q, ZHU H, YE JS, et al., 2015, Authentication of *Camellia chekiangoleosa* and its close species using RPB2 gene sequences[J]. Mol Plant Breed, 13(11):2559-2565.[温强, 朱恒, 叶金山, 等, 2015. 利用 RPB2 基因序列甄别浙江红山茶及其近缘种[J]. 分子植物育种, 13(11):2559-2565.]
- WANG XN, CHEN YZ, WANG R, et al., 2020, The breeding of two new *Camellia* varieties[J]. J Centrl S Univ For Technol, 40(8):1-6.[王湘南, 陈永忠, 王瑞, 等, 2020. 2 个山茶新品种的选育[J]. 中南林业科技大学学报, 40(8):1-6.]
- TIAN QQ, HUANG JJ, WEN Q, et al., 2021. The current situation and trend of molecular breeding in Oil-tea Camellia[J]. S Chin For Sci, 49(5): 53-59.[田仟仟, 黄建建, 温强, 等, 2021. 油茶分子育种现状与趋势[J]. 南方林业科学, 49(5):53-59.]
- TIAN XX, FANG XZ, SUN HZ, et al., 2018. Analysis of triacylglycerols in different oil-tea camellia cones[J]. For Res, 31(2):41-47.[田潇潇, 方学智, 孙汉洲, 等, 2018. 不同油茶物种及品种果实中甘油三酯成分分析[J]. 林业科学研究, 31(2):41-47.]
- WU XH, SHEN B, HUANG YF, et al., 2016. Analysis and evaluation of nutrient ingredients in *Camellia chekiangoleosa*[J]. Nonw For Res, 34(3):130-134.[吴雪辉, 沈冰, 黄永芳, 等, 2016. 红花油茶营养成分分析及评价[J]. 经济林研究, 34(3):130-134.]
- YANG D, HU X, LIU Z, et al., 2010. Intergeneric hybridizations between *Opisthopappus taihangensis* and *Chrysanthemum lavandulifolium*[J]. Sci Hort-Amsterdam, 125(4):718-723.
- YANG ZL, LI JY, FAN ZQ, 2004. A preliminary study on the Cross-compatibility among Sect. *Camellia* species and *C. japonica* cultivars in the genus *Camellia*[J]. For Res,

-
- 17(5):680-684.[杨志玲, 李纪元, 范正琪, 2004. 山茶属红山茶组物种间及其与品种杂交亲和性研究初报[J]. 林业科学研究, 17(5):680-684.]
- YE S, WANG Y, HUANG D, et al., 2013, Genetic purity testing of F₁ hybrid seed with molecular markers in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*)[J]. Sci Hort-Amsterdam, 155(2):92-96.
- YIN BY, ZHANG Y, SUN FL, et al., 2019. Identification and genetic diversity of apple F₁ hybrids based on SSR markers[J]. J Hebei Agric Univ, 42(5):46-51.[尹宝颖, 张媛, 孙福来, 等, 2019. 苹果 F₁ 群体的 SSR 鉴定与遗传多样性分析 [J]. 河北农业大学学报, 42(5):46-51.]
- YUSUKE S. 1988, Studies on the flower colours in the genus *Camellia*, with special reference to the phylogenies of the genus[J]. Bull Fac Agr Kagosh Univ, 38: 9-62.
- ZHOU NN, LI SB, LI YB, 2017, Hybrids identification and genetic analysis in diploid roses population (F₁) using SSR markers[J]. Acta Hort Sin, 44(1):151-160.[周宁宁, 李淑斌, 李远波, 等. 2017, 二倍体月季 F₁ 群体的 SSR 鉴定与遗传分析 [J]. 园艺学报, 44(1):151-160.]
- ZHOU S, ZHU JH, XIAO JZ, et al., 2001, Distant crossing trial with oil tea camellia[J]. Econom For Res, 19(1):20-25.[周盛, 朱金惠, 肖景治, 等, 2001. 油茶远缘杂交育种试验[J]. 经济林研究, 19(1):20-25.]
- ZHOU WC, HOU J, GUO W, et al., 2015, Identification of the true hybrids for *Populus deltoides* by using SSR markers[J]. J Nanjing For Univ (Nat Sci Ed) , 39(3):45-49.[周文才, 侯静, 郭炜, 等, 2015. 基于 SSR 标记的美洲黑杨杂交子代的鉴定[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 39(3):45-49.]
- ZHOU WC, XIAO XY , SHEN JL, et al., 2019. Review on germplasm resources and breeding strategy for *Camellia chekiangoleosa*[J]. S Chin For Sci, 47(6):20-24.[周文才, 肖相元, 沈敬理, 等, 2019. 浙江红花油茶种质资源述评及育种策略 [J]. 南方林业科学, 47(6):20-24.]