

# 利用流式细胞仪鉴定山楂种质资源的倍性

崔金鑫, 李月梅, 张蕊婧, 赵 瑞, 张吉军

(河北科技师范学院 园艺科技学院, 河北 秦皇岛 066004)

**摘 要:**以 25 份山楂资源为试材, 采用流式细胞仪方法对山楂资源的倍性进行了鉴定, 并前用幼叶去壁低渗染色体压片法的鉴定结果进行了比较, 以期对山楂资源的育种利用提供参考。结果表明: 14 份材料的倍性与前人的鉴定结果一致, 有 6 份材料与前人的鉴定结果不同, 还有 5 份材料的倍性为首次报道; 流式细胞仪法是鉴定山楂种质资源倍性的有效方法, 并且该次倍性鉴定结果对今后的山楂杂交育种和种质创新具有一定的参考意义。

**关键词:**山楂; 倍性; 流式细胞仪; 种质资源

**中图分类号:**S 661.502.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)01-0084-03

山楂属蔷薇科(Rosaceae)梨亚科(Pyrinae)山楂属(*Crataegus*)植物, 其中羽裂山楂的大果变种(*C. pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br.)为我国原产特有的果树资源<sup>[1]</sup>。山楂具有抗寒、耐旱、病虫害少、适应性强等优点, 其果实具有较高的营养、保健和药用价值, 广泛用于鲜食和加工。山楂在我国栽培历史悠久, 经长期的人工选育下形成了众多的品种和类型。杂交育种能很好实现亲本间的优势互补, 是将来山楂品种选育的发展方向。对山楂资源进行收集、评价, 进而用于杂交育种对于我国山楂产业的发展具有重要意义。而倍性鉴定是种质资源评价的重要内容之一。

我国已有许多研究人员运用果树倍性鉴定的经典方法即茎尖或幼叶酶解去壁低渗染色体压片法对一些山楂种质资源的倍性进行了鉴定<sup>[2-6]</sup>。发现 2 倍体的山楂属植物为 34 条染色体, 同时还鉴定出一些 3 倍体(如: “白瓢绵”、“磨盘”、“伏里红”)和 4 倍体的山楂材料(如: “阿尔泰”山楂和“准格尔”山楂)资源<sup>[5]</sup>。流式细胞仪是果树倍性鉴定的新方法, 近年来国内一些研究者陆续使用该方法鉴定了苹果<sup>[7]</sup>、草莓<sup>[8]</sup>、柑橘<sup>[9]</sup>、枣<sup>[10]</sup>、柿<sup>[11]</sup>、葡萄<sup>[12]</sup>、猕猴桃<sup>[13]</sup>等果树资源的倍性。在国外有研究者采用流式细胞仪鉴定了山楂种子胚乳材料的倍性<sup>[14]</sup>, 而在国内至今尚鲜见流式细胞仪在山楂倍性鉴定方面的报道。该研究利用流式细胞仪对山楂资源的倍性进行

鉴定, 以期对山楂资源的评价和利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

该研究使用的山楂资源均嫁接于河北科技师范学院园艺试验站中。“益都敞口”、“大旺”、“平邑大红子”、“蒙阴大金星”、“开原软籽”、“新宾软籽”、“阿尔泰”、“伏里红”、“艳果红”、“西丰红”、“甜水”、“秋金星”、“白瓢绵”、“寒丰”、“集安紫肉”、“滦红”、“磨盘”17 份材料的接穗采自于国家果树种质沈阳农业大学山楂圃; “雾灵红”、“歪把红”采自于河北兴隆县。“大金星”、“面楂”、“山东大绵球”、“大红”、“红保罗”、“山里红”源自于河北省秦皇岛市昌黎县。

### 1.2 试验方法

1.2.1 山楂幼叶的采集 在春天采集刚展开的山楂材料的嫩叶 3 片, 放入密封袋内, 放入少许水滴保湿, 并标记好材料名称。

1.2.2 试样细胞核悬液制备 称取 500 mg 幼叶, 在滴有 2 mL 提取缓冲液的培养皿中用手术刀片切碎, 260 目尼龙网过滤, 1 000 r/min 离心 5 min, 沉淀用提取缓冲液漂洗 3 次。

1.2.3 细胞核悬液特异性染色 制备的核悬液离心后弃去上层液体, 加入 2 mL 染色缓冲液, 暗处常温下染色 30 min, 500 目尼龙网过滤, 滤液用标准试管收集, 随即上机测定。提取缓冲液成分: 15 mol/L Tris-HCl (pH 7.5), 80 mol/L KCl, 20 mol/L NaCl, 20 mol/L EDTA-Na<sub>2</sub>, 15 mol/L 巯基乙醇, 0.05% 的 TritonX-100。染色缓冲液为提取缓冲液内加入 20 mg/L RNA 酶 A 和 20 mg/L 碘化丙啶(PI; propidium iodide)。

1.2.4 流式细胞光度仪测定 流式细胞光度测定所用

**第一作者简介:**崔金鑫(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向为果树遗传育种。

**责任作者:**张吉军(1972-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为果树遗传育种。E-mail: zjjqhd@163.com

**基金项目:**河北科技师范学院博士基金资助项目(2013YB019)。

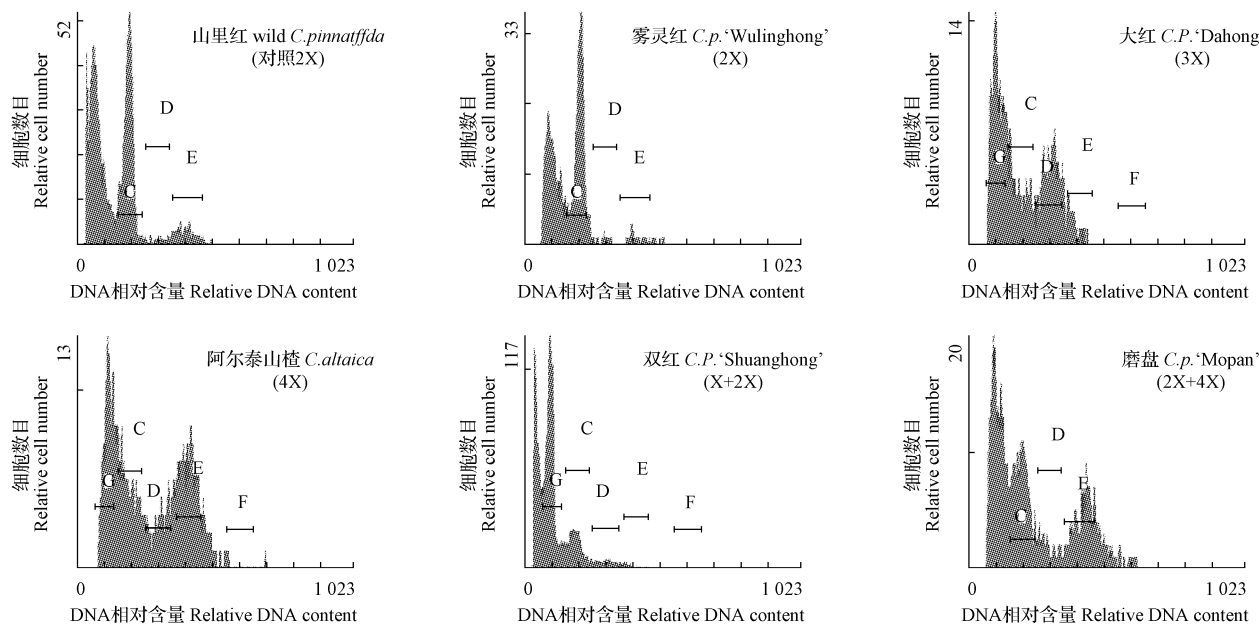
**收稿日期:**2015-07-24

机型为美国 B-D 公司生产的 FACSscan 流式细胞光度计。以‘山里红’作为 2 倍体(2X)的对照。

2 结果与分析

该研究利用流式细胞仪对 25 份山楂种质资源的倍性进行了鉴定。从取材到倍性鉴定所有工作在半天之内完成,表明流式细胞仪在倍性鉴定方面的高效。在 25 份材料中共鉴定出 2 倍体 19 份,分别是“大金星”、“寒

丰”、“集安紫肉”、“滦红”、“秋金星”、“甜水”、“西丰红”、“艳果红”、“平邑大胖子”、“山东大绵球”、“开原软籽”、“新宾软籽”、“白瓢绵”、“雾灵红”、“益都敞口”、“大旺”、“蒙阴大金星”、“歪把红”和“面楂”;3 倍体 2 份,为“伏里红”和“大红”;4 倍体 1 份为“阿尔泰”;嵌合体或混倍体 3 份为“双红”、“红保罗”(X+2X)和“磨盘”(2X+4X)。部分山楂材料的倍性鉴定图谱如图 1 所示。



注: C, 2X, D, 3X, E, 4X, G, 1X。  
Note: C, 2X, D, 3X, E, 4X, G, 1X。

图 1 部分山楂材料的流式细胞仪倍性鉴定

Fig. 1 The ploidy graph of some *Crataegus* accessions measured by flow cytometry

将该次的倍性鉴定结果与前人利用染色体压片法鉴定的结果进行了对比,在 25 份材料中发现 14 份材料的倍性与前人的鉴定结果一致,6 份不同,5 份为首次报道。倍性鉴定结果不一致和首次报道的汇总如表 1 所示。

表 1 山楂倍性流式细胞仪鉴定结果与前人的对照

Table 1 Ploidy comparison between measurement in this experiment and previous researches

材料名称 Accession name	该研究测定的倍性 Ploidy measured in this experiment	前人测定的倍性 Ploidy measured by previous researches
“双红” ‘Shuanghong’	X+2X	2X <sup>[5-6]</sup>
“白瓢绵” ‘Bairangmian’	2X	3X <sup>[5-6]</sup>
“雾灵红” ‘Wulinghong’	2X	3X <sup>[15]</sup>
“益都敞口” ‘Yiduchangkou’	2X	3X <sup>[6]</sup> 、4X <sup>[6]</sup>
“大旺” ‘Dawang’	2X	3X <sup>[6]</sup>
“磨盘” ‘Mopan’	2X+4X	3X <sup>[2-3,5-6]</sup>
“红保罗” ‘Paul’s Scarlet’	X+2X	—
“蒙阴大金星” ‘Mengyindajinxing’	2X	—
“歪把红” ‘Waibahong’	2X	—
“面楂” ‘Mianzha’	2X	—
“大红” ‘Dahong’	3X	—

3 讨论

酶解去壁低渗染色体压片法是果树材料倍性鉴定的经典方法,具有直观、可靠等优点,但操作步骤多,要求操作者有丰富的经验。流式细胞仪是倍性鉴定的新方法,操作步骤较少。该试验中 25 份山楂材料的倍性鉴定工作在半天内完成,体现了该方法的高效性。在果树种质资源大规模倍性鉴定和倍性育种时可以考虑先用流式细胞仪法进行快速筛查,然后针对筛选出的材料再采用酶解去壁低渗染色体压片法进行倍性验证。

14 份材料的鉴定结果与前人的一致,6 份不同。前人对一些山楂材料的倍性鉴定结果也存在差异。例如:对于“益都敞口”、“大旺”2 个品种,宋文芹等<sup>[3]</sup>将它们鉴定为 2 倍体,而辛孝贵<sup>[5]</sup>将“益都敞口”鉴定为 4 倍体,郭太君等<sup>[6]</sup>将“大旺”鉴定为 3 倍体。因此,不同研究者鉴定结果有差异属常见现象,原因可能是果树材料中存在的同名异物现象。因此,首先要明确研究材料的一致性。其次,对于鉴定结果不一致的材料作者还要继续采用其它的倍性鉴定方法,例如酶解去壁低渗染色体压片

法、气孔大小测定、花粉粒大小测定等。几种鉴定方法的结果能够相互验证才可靠。

该研究首次在山楂中发现 3 份倍性嵌合体或混倍体,这体现了流式细胞仪在倍性鉴定中的灵敏性。这些材料的不同倍性细胞在组织发生层的具体分布还有待通过梢端组织纵向石蜡切片等方法进一步确定。

种质资源倍性是关系它们在杂交育种中利用的重要方面,前人研究表明 3 倍体的山楂材料存在花粉败育<sup>[16]</sup>和无融合生殖现象<sup>[17]</sup>。该研究中新发现了一份 3 倍体山楂材料,应当继续研究该材料的生殖生物学特性和遗传学行为。该研究表明,流式细胞仪是山楂倍性的高效、灵敏的方法,倍性结果还为这些山楂资源在育种中的利用提供了参考。

### 参考文献

- [1] 辛孝贵,张育明. 中国山楂种质资源与利用[M]. 北京:中国农业出版社,1997.
- [2] 张育明,辛孝贵,王巨. 中国山楂属植物染色体数目和同工酶的研究[J]. 中国农业科学,1983(3):37-44.
- [3] 宋文芹,李秀兰,陈端阳,等. 我国部分山楂属植物染色体数目的研究[J]. 园艺学报,1985,12(2):73-76.
- [4] 蒲富慎,林盛华,张德学. 我国山楂一些种和品种的染色体数目观察[J]. 中国果树,1987(2):17-19.
- [5] 辛孝贵. 我国山楂属和山楂栽培品种染色体数目的研究[J]. 沈阳农

业大学学报,1991,22(1):27-35.

- [6] 郭太君,丰宝田,孙宪忠. 我国北方染色体数目研究[J]. 特产研究,1989(3):14-15.
- [7] 李斌,石荫坪,束怀瑞,等. 利用流式细胞光度术鉴定苹果倍性的研究[J]. 西北植物学报,1998,18(4):499-504.
- [8] 李斌,束怀瑞,石荫坪,等. 流式细胞光度术用于草莓倍性鉴定的研究[J]. 西北农业大学学报,1998,26(4):45-48.
- [9] 张俊娥,刘继红,邓秀新. 采用倍性分析仪鉴定柑橘愈伤组织的遗传变异[J]. 遗传学报,2003,30(2):169-174.
- [10] 蒋洪恩,刘孟军. 秋水仙碱诱导冬多倍体的研究[J]. 园艺学报,2004,31(5):647-650.
- [11] 陈绪中,罗正荣. 鄂柿 1 号离体叶片秋水仙素诱导和再生植株倍性鉴定[J]. 果树学报,2005,22(5):554-556.
- [12] 孙马,王跃进. 中国野生葡萄染色体倍性研究[J]. 西北农业学报,2006,15(6):148-152.
- [13] 饶静云,刘义飞,黄宏文. 中华猕猴桃不同倍性间杂交后代倍性分离和遗传变异分析[J]. 园艺学报,2012,39(8):1447-1456.
- [14] TALENT N, DICKINSON T A. Polyploidy in *Crataegus* and *Mespilus* (Rosaceae, Maloideae): evolutionary inferences from flow cytometry of nuclear DNA amounts[J]. Can J Bot, 2005, 83(10):1268-1304.
- [15] 赵焕淳,丰宝田. 中国果树志·山楂卷[M]. 北京:中国林业出版社,1996.
- [16] 丰宝田,郭太君,王铭,等. 伏山楂花粉败育和赤霉素刺激单性结实的试验研究[J]. 特产科学试验,1986,2(2):11-14.
- [17] MUNIYAMMA M, PHIPPS J B. Cytological proof of apomixis in *crataegus* (Rosaceae) [J]. Amer J Bot, 1979, 66(2):149-155.

## Measuring the Ploidy of Hawthorn Germplasm Resources by Flow Cytometry

CUI Jinxin, LI Yuemei, ZHANG Ruijing, ZHAO Rui, ZHANG Jijun

(College of Horticulture Technology, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao, Hebei 066004)

**Abstract:** In order to provide reference for utilization in breeding the ploidy of 25 accessions of hawthorn germplasm resources was measured by flow cytometry and comparison was drawn with others previous measurement by young leaf squash and chromosomes counting method. The results showed that the ploidy of 14 accessions was identical with previous measurements, the ploidy of 6 accessions was different from previous results, and the ploidy of 5 accessions was reported for the first time. This research showed that flow cytometry was a high efficient method for ploidy measurement of hawthorn germplasm resources, and ploidy measurement in this research provided reference for the proper utilization of the germplasm resources in future hawthorn improvement and cross breeding.

**Keywords:** hawthorn; ploidy; flow cytometry; germplasm resources