

草原樱桃和对樱杂交后代的分子鉴定

王 晶, 张 晓明, 闫 国华, 周 宇, 张 开 春

(北京市农林科学院 林业果树研究所, 北京 100093)

摘 要:草原樱桃具有较强的抗寒、抗旱、抗病虫害性,而对樱是北京当地的中国樱桃品种。为了培育出适合北京及华北地区的抗逆性强的砧木,分别在 2005 年和 2006 年将草原樱桃和对樱杂交,共得到 17 个杂交后代。现采用 SRAP 技术验证了草原樱桃和对樱的 17 个杂交后代的杂种真实性。聚类分析结果表明:17 个杂交后代的遗传基础更多的来自于草原樱桃。

关键词:草原樱桃;对樱;SRAP;杂种鉴定

中图分类号:S 662.5 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)01-0116-04

草原樱桃(*Prunus fruticosa* Pall.) 属蔷薇科樱桃亚属小乔木状的落叶灌木,原产于欧洲东部、中部至西伯利亚的草原和森林草原中,具有较强的抗寒、抗旱、抗病虫害等特点。野生种不仅可以作为干旱坡地保持水土的树种,还可作为欧洲甜樱桃和酸樱桃的砧木^[1]。对樱(*Prunus pseudocerasus* Lindl. cv. Duiying)属樱桃亚属中国樱桃种的半野生小乔木,分布在北京地区,其开花早、花色艳、果酸甜可口、抗逆性强,是樱花和樱桃栽培品种的优良砧木^[2]。为了培育出适合北京及华北地区的抗逆性强的樱桃砧木,将从东北引进的草原樱桃(具体名称不详)作为母本,对樱作为父本,分别在 2005 年和 2006

年进行杂交,一共得到 17 个杂交后代,形态表现均具有双亲的特征并且分离明显。其中,17 号后代表现出优良的砧木特性,具有抗寒及抗旱性强、容易扦插、抗病虫害、果实酸甜可口而且丰产等优点。相关序列多态性分析(Sequence-related amplified polymorphism, SRAP)是以 PCR 为基础的分子标记技术,由美国加州大学蔬菜作物系 Li 等^[3]于 2000 年发明,设计正向引物对富含 GC 的外显子进行扩增,反向引物对富含 AT 的内含子、启动子区域进行特异扩增,因不同物种的内含子、启动子与间隔长度不等而产生多态性。由于 SRAP 操作简便、稳定可靠、多态性高、标记分布均匀等特点,被广泛应用于植物遗传多样性分析、种质鉴定、遗传图谱构建、重要性状基因标记及基因定位等诸多领域^[4-6]。该文利用 SRAP 技术,进一步验证了草原樱桃和对樱所有后代的杂种真实性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

草原樱桃、对樱及其 17 个杂交后代的嫩叶采自北京市农林科学院林业果树研究所试验场后即放在冰盒中

第一作者简介:王晶(1976-),女,博士,助理研究员,现从事樱桃遗传育种工作。E-mail:sduwj@126.com。

责任作者:张开春(1965-),男,博士,研究员,现从事樱桃育种研究工作。

基金项目:北京市科技新星资助项目(2007B042);北京市农林科学院一般资助项目(2010A005);公益性行业(农业)科研专项经费资助项目(200903019)。

收稿日期:2011-09-13

[4] 陈跃中.“当代中式”景观的探索:上海世博中国园“亩中山水”设计[J].中国园林,2010(5):42-46.

[5] 王维.青溪.唐诗三百首(卷一·五言古诗)[M].北京:中华书局,2003.

New Chinese Style Landscape Inherit from the Traditional Landscape

YANG Li-yi, LI Juan, XU Xian-sheng

(College of Horticulture, Hainan University, Haikou, Hainan 570228)

Abstract: Based on ‘Spirit’, ‘Imagery’, ‘Shape’ as the breakthrough point, summed up the idea that the new Chinese landscape inherit from Chinese traditional landscape. Then took Acre park as an example to analysis, explored the deduction how the Chinese traditional landscape was interpreted in modern language.

Key words: New Chinese Landscape; traditional Chinese landscape; spirit; imagery; shape

带回实验室,立即用液氮冻存于-80℃冰箱,用于DNA的提取。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA提取 采用CTAB法提取樱桃叶片基因组DNA^[27]。琼脂糖凝胶电泳检测DNA浓度及纯度,调整DNA浓度到10 ng/μL,-20℃保存备用。

1.2.2 SRAP分析 SRAP引物采用Li G等^[3]已发表的序列,选择EM1分别和ME1、ME2、ME3组成3对引物(表1),引物由上海生物工程有限公司合成。20 μL的SRAP-PCR反应体系中包含20 ng模板DNA、0.4 μmol/L引物、1×buffer、1 U Taq(购自上海生物工程有限公司)。扩增反应在Biometra PCR仪上进行。扩增程序为:94℃预变性5 min;94℃变性1 min,34℃复性1 min,72℃延伸1 min,5个循环;94℃变性1 min,50℃复性1 min,72℃延伸1 min,35个循环;最后72℃延伸10 min。PCR产物经6%的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。试验重复3次,验证结果的稳定性。

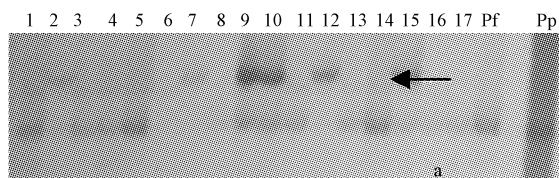
表1 SRAP-PCR引物名称及序列

Table 1 Primers' names and sequences of SRAP-PCR

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
EM1	GACTGCGTACGAATTAAT
ME1	TGAGTCCAAACCGGATA
ME2	TGAGTCCAAACCGGAGC
ME3	TGAGTCCAAACCGGAAT

2 结果与分析

2.1 SRAP引物在草原樱桃、对樱及其后代中的扩增情况



3对SRAP引物在草原樱桃、对樱及其后代中的扩增产物,经6% PAGE胶电泳后,得到清晰稳定带型,可以看出不同的引物组合扩出的带型不同(图1)。EM1+ME1在草原樱桃和对樱中分别扩增出24和20条清晰的带,17个杂交后代没有出现新带;EM1+ME2在草原樱桃和对樱中分别扩增出22和25条清晰的带(图2a),3条对樱的带在杂种后代中消失(图2b);EM1+ME3在草原樱桃和对樱中分别扩增出26和23条清晰的带。3对SRAP引物在草原樱桃和对樱中共扩增出74和69条带,平均每对SRAP引物产生24条带,因此SRAP技术可以应用在草原樱桃、对樱及其后代的分子鉴定中。另外,有些杂交后代中出现了不同于双亲的新带(图2a)和部分对樱的带在杂种后代中消失(图2b),说明草原樱桃和对樱的遗传物质在后代中发生了重组。

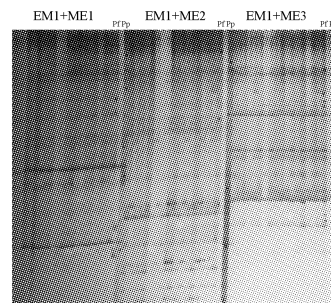


图1 3对SRAP引物在草原樱桃、对樱及其后代中的扩增结果
注: Pf: 草原樱桃; Pp: 对樱。

Fig. 1 Amplification results of three pairs of SRAP primers in *Prunus fruticosa*, *Prunus pseudocerasus* (Duiying) and 17 hybrids.
Note: Pf: *Prunus fruticosa*; Pp: *Prunus pseudocerasus* (Duiying).

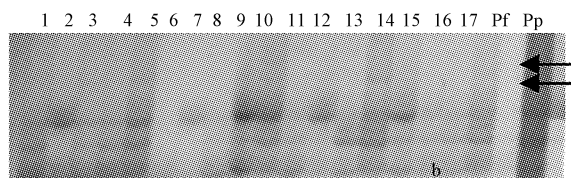


图2 后代中扩增出新带(a)及对樱带在后代中消失(b)

注: 1~17: 杂交后代; Pf: 草原樱桃; Pp: 对樱。

Fig. 2 New band amplified in hybrids (a) and specific bands of *Prunus pseudocerasus* disappeared in hybrids (b)

Note: 1~17: hybrids; Pf: *Prunus fruticosa*; Pp: *Prunus pseudocerasus* (Duiying).

2.2 草原樱桃和对樱杂交后代的真实性鉴定

对SRAP电泳结果读取时,分别用1、0记录特异性条带的有、无,带型不清或数据缺失者记为“-”。结果显示,3对SRAP引物在草原樱桃和对樱之间找到23个差异带(表2,A~W),每1个差异带可以看做1个标记。有11个标记(ABCDEFGHIJK)在对樱中出现,草原樱桃中没有出现,是对樱的特异带。有12个标记(LM-NOPGRSTUVW)在草原樱桃中出现,在对樱没有出现,是草原樱桃的特异带。17个杂交后代都有草原樱桃的特异带,其中3个特异带在所有后代和草原樱桃中出现

而对樱中不出现(MRT)。另外,有4个标记在所有后代和草原樱桃中不出现而在对樱中出现(CGIJ)。因此,7个标记的带型在所有后代和草原樱桃完全一致,占标记总数的30.4%,充分说明17个后代来自草原樱桃。另外,每一个后代都能找到对樱的特异带(表2):后代1(CEI)、后代2(BCK)、后代3(DEI)、后代4(AEI)、后代5(ACEDI)、后代6(CEIK)、后代7(ACI)、后代8(ABC-DEK)、后代9(ACEK)、后代10(ABCEGHI)、后代11(ABD)、后代12(A)、后代13(ACDEIK)、后代14(AB-CEI)、后代15(BCEI)、后代16(ABCDEK)和后代17(AB-

CDEK)。综上所述,3对SRAP引物的结果证明,17个后代都是草原樱桃和对樱的真实杂种。

表2 草原樱桃和对樱及其杂种中SRAP标记的多态性结果

Table 2 Polymorphism of SRAP markers in *Prunus fruticosa*, *Prunus pseudocerasus* (Duiying) and hybrids

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	Pf	Pp
A	—	—	—	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
B	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1
C	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1
D	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
E	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1
G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
I	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1
K	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
M	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0
P	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0
R	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0
S	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0
U	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
V	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0
W	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0

注:A~W为不同的SRAP标记;1~17为杂交后代;Pf为草原樱桃;Pp为对樱。

Note: A~W; different SRAP bands; 1~17; hybrids; Pf: *Prunus fruticosa*; Pp: *Prunus pseudocerasus* (Duiying).

2.3 草原樱桃、对樱及杂种后代的聚类分析

利用SRAP标记在草原樱桃、对樱及杂种后代中产生的多态性表数据,用NTSYSpc version 2.1软件分析草原樱桃、对樱及杂种后代的相似性系数。结果表明,草原樱桃、对樱及杂种后代之间的相似性系数分布在0.93~0.29。后代和草原樱桃的相似性系数为0.7,和对樱的相似性系数为0.29。相似性系数越大说明遗传相似程度越高,因此后代和草原樱桃的遗传相似程度更高。此结果与30.4%的标记在17个后代中均表现和草原樱桃一致的带型相符,进一步说明杂种后代中保留了更多的草原樱桃的遗传物质。此结果可能由细胞质遗传导致,也预示在杂交的过程中,草原樱桃的遗传力比对樱更强。这种变化可能有利于樱桃杂种的快速进化、遗传协调和遗传稳定性。另外,从图3可看出,和草原樱桃相似性系数最大的杂种是11和14,和对樱相似性系数最大的杂种是13和10。杂种1和5及杂种8和17之间的相似性大于0.93。17个杂种可以分为三大类,杂种1、5、3、6、15、11、14、2、8、17和草原樱桃的关系更为紧密,分为一类,杂种4、7、12、9、16、10分为一类,杂种13和对樱的关系最近,单独分为一类。

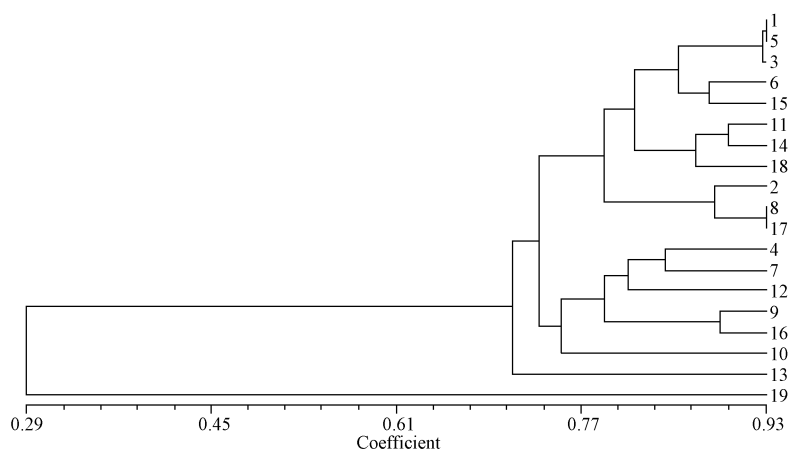


图3 草原樱桃、对樱及杂种后代的相似性分析

注:1~17:杂种后代;18:草原樱桃;19:对樱。

Fig. 3 Cluster analysis of *Prunus fruticosa*, *Prunus pseudocerasus* (Duiying) and hybrids

Note: 1~17; hybrids; 18: *Prunus fruticosa*; 19: *Prunus pseudocerasus* (Duiying).

3 结论与讨论

SRAP技术由于操作简单、结果稳定、多态性丰富,被广泛应用于遗传连锁图谱构建、杂种鉴定和品种/居群的聚类分析,已经在小麦、杨树、甘薯和樱桃等农作物上应用^[8-11]。该研究证明,SRAP技术可以运用到草原樱桃中,平均每对SRAP引物产生26~20条带,多于提莫菲维小麦的6条^[8],接近于杨树^[9]。

睢薇等曾经多次将草原樱桃和欧洲甜樱桃杂交,但是没有成功,主要原因是倍性不同^[12]。草原樱桃和对樱

虽然亲缘关系较远,但是二者都是四倍体^[13],具有产生杂种后代的遗传基础。通过2a的努力得到了草原樱桃和对樱的17个种间杂种。多数杂种表现出抗病虫害的特点,特别是17号后代兼具双亲的特征而且品质优良,既可以作为砧木也可以作为加工樱桃品种。形态观察虽然直观,但是不能排除表现受环境影响。试验中仅利用3对SRAP引物就成功地鉴定了草原樱桃和对樱远源杂交后代的真实性。

路娟等^[11]研究了SRAP技术在甜樱桃和中国樱桃

中的应用,但是没有用草原樱桃做试验。聚类分析表明^[10],草原樱桃和对樱的相似性为 0.29。路娟的研究表明,中国樱桃和欧洲甜樱桃的相似性为 0.52,说明草原樱桃和中国樱桃的遗传相似性比中国樱桃和欧洲甜樱桃的遗传相似性更低。

聚类分析表明,17 个杂种和草原樱桃的关系更为密切,说明草原樱桃更容易将遗传物质传入下一代。这种远缘杂交过程中双亲遗传物质不对等传递的现象,也发生在提莫菲维小麦和葡萄牙野麦的远缘杂交后代及奥利亚罗非鱼(♀)×鳊(♂)远缘杂交子代中^[8,14],同时广泛发生在原生质体融合产生的体细胞杂种中^[15-16]。在多种植物的自然形成或是合成的多倍体中都观察到了不同的遗传和表观遗传的变化,例如序列消除、染色体重排、基因沉默、DNA 的甲基化和转座子的激活,一方亲本的染色体片断化及丢失^[17-19],导致杂种的基因组结构发生改变^[20],造成不同染色体组间的进一步快速分化,这有利于染色体的二倍体化行为。该文中 SRAP 结果揭示,草原樱桃和对樱远缘杂交后代的编码区及附近序列经过多种遗传变化,保留了所有草原樱桃的特征带,丢失了部分对樱的特征带,并出现了新的带型,可能有利于杂种后代染色体的二倍化和正常的染色体配对。17 号杂种不仅品质优良而且丰产,充分说明该杂种的染色体组已经可以正常精确配对。

参考文献

- [1] 杨凤军,李宝江. 草原樱桃花粉特性及其授粉试验[J]. 北方园艺, 2005(3):69-70.
- [2] 闫国华,张开春,周宇,等. 中国樱桃‘对樱桃’不定根离体再生植株的研究[J]. 园艺学报,2003,30(5):583-585.
- [3] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction; it's application to mapping and gene tagging in *Brassica*[J]. Theor Appl Genet, 2001, 103:455-461.
- [4] Ferriol M, Pico B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers [J]. Theor Appl Genet, 2003, 107(2):271-282.
- [5] Ferriol M, Pico B, Nuez F. Genetic diversity of Some accession of *Cucurbita maxima* from Spain using RAPD and SBAP markers[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2003, 50(3):227-238.
- [6] Ferriol M, Pico B, Pascual F. Molecular diversity of a germplasm collection of squash(*Cucurbita moschata*) determined by SRAP and AFLP marker [J]. Crop Science, 2004, 44:653-664.
- [7] 王关林,方宏筠. 植物基因工程[M]. 2 版. 北京:科学出版社,2002:742-744.
- [8] 耿广东,张素勤,贾开家,等. 提莫菲维小麦与葡萄牙野燕麦远缘杂交后代的 SRAP 分析[J]. 华北农学报,2010,25(1):110-112.
- [9] 陈罡,关明东,叶景丰,等. 杨树 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 北方园艺,2010(16):132-134.
- [10] 李爱贤,刘庆昌,王庆美,等. 利用 SRAP 标记构建甘薯分子连锁图谱[J]. 作物学报,2010,36(8):1286-1295.
- [11] 路娟,张绍铃,刘庆忠,等. 樱桃 SRAP-PCR 体系优化及其遗传多样性分析[J]. 果树学报,2009,26(2):163-169.
- [12] 睢薇,丁晓东,霍俊伟,等. 草原樱桃与欧洲甜樱桃远缘杂交不亲和原因初探[J]. 东北农业大学学报,1999,30(2):148-153.
- [13] 蔡宇良,李珊,曹东伟,等. 利用 DNA 扩增片段序列对樱桃种质资源的遗传分析[J]. 园艺学报,2006,33(2):249-254.
- [14] 王金龙,杨弘,吴婷婷,等. 奥利亚罗非鱼(♀)×鳊(♂)远缘杂交子代的遗传结构[J]. 中国水产科学,2007,14(1):32-38.
- [15] 涂玉琴,孙建,葛贤宏,等. 芥蓝与菘蓝族间原生质体融合及杂种愈伤分析[J]. 中国油料作物学报,2009,31(4):522-526.
- [16] 史永忠,邓秀新. 柑桔原生质体融合再生叶肉亲本型植株的遗传分析[J]. 遗传学报,1999,26(3):244-248.
- [17] Song K, Lu P, Tang K, et al. Rapid genome change in synthetic polyploids of Brassica and its implications for polyploidy evolution[J]. Proc Natl Acad Sci, 1995, 92:7719-7723.
- [18] Liu B, Wendel J F. Epigenetic phenomena and the evolution of plantal polyploids[J]. Mol. Phyl. Evo., 2003, 29:365-379.
- [19] Ma X F, Gustafson J P. Genome evolution of polyploids; a process of cytological and genetic diploidization[J]. Cytogenet Genome Res., 2005, 109:236-249.
- [20] Madlung A, Comai L. The effect of stress on genome regulation and structure [J]. Ann. Bot., 2004, 94:481-495.

Molecular Identification of Hybrids between *Prunus fruticosa* and *Prunus pseudocerasus* by SRAP Method

WANG Jing, ZHANG Xiao-ming, YAN Guo-hua, ZHOU Yu, ZHANG Kai-chun

(Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100093)

Abstract: *Prunus fruticosa* Pall. had the advantages in cold, drought, pest and disease resistance. *Prunus pseudocerasus* Lindl. cv. Duiying is a *Prunus pseudocerasus* variety adaptable to Beijing environment. Hybridizations between *Prunus fruticosa* and *Prunus pseudocerasus* (Duiying) were done in 2005 and 2006 respectively to breed stress tolerant cherry stock for Beijing and North China area. Total 17 hybrids were obtained. The truth of the 17 hybrids were identified by SRAP. In addition, cluster analysis results showed that more genetic substances were from *Prunus fruticosa* than *Prunus pseudocerasus* in 17 hybrids.

Key words: *Prunus fruticosa*; *Prunus pseudocerasus* (Duiying); SRAP; hybrid identification