

doi:10.11937/bfyy.20173034

毛樱桃与李子杂交新品种的早期鉴定

张建瑛, 田新华, 殷东生, 李 静, 李 京

(黑龙江省林业科学研究所, 黑龙江 哈尔滨 150080)

摘 要:以毛樱桃与李子品种“晚黄李”杂交后代 F1-2 为试材, 采用叶片形态学观察、染色体检验、分子 SRAP 技术检测方法, 研究了杂交后代与父母本的真实性关系, 以期为樱桃新品种选育及配套栽培技术提供参考依据。结果表明: 杂交后代 F1-2 是毛樱桃与“晚黄李”的杂交种, 其遗传基础更多来自于毛樱桃。

关键词:毛樱桃; 杂交后代; 叶形鉴定; 染色体鉴定; 分子鉴定

中图分类号:S 662.503.6 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2018)06-0052-04

毛樱桃(*Prunus tomentosa* Thunb.) 属蔷薇科李属樱亚属, 又称为山樱桃、野樱桃, 广泛分布于我国的东北、华北及西北等地^[1]。毛樱桃品种的树形优美, 花朵繁多娇嫩, 果实硕大、艳丽可作观赏、园林绿化植物。该树抗性强, 也可作为相关果树育苗的良好砧木, 也能适应不同的土壤、气候环境^[2]。同时, 果实内含物质营养丰富, 可作为果酱、果汁和果酒等产品加工的原材料^[3]。为此开展毛樱桃品种的开发、利用显得很有价值。

近几年育种工作者也大力开展毛樱桃的新品种开发工作^[4-7], 这些新品种的开发大多是实生苗选育而成, 通过杂交途径改良很少, 课题组通过多年开展的对毛樱桃选育及杂交工作, 以毛樱桃与“晚黄李”^[8]杂交后代表型很好, 但准确地对杂种后代进行早期鉴定也是杂交育种的一项重要工作。以往的鉴定工作主要靠育种学家的经验基础、植物的外观形状, 因此对于杂种幼苗的预选和淘汰有很大的盲目性。近几十年来, 生理生化、分子生物学等领域的高速发展为杂种幼苗的鉴定提

供了科学可靠的方法, 在很大程度上提高了育种的目的性, 缩短了育种周期^[9-10]。该研究以毛樱桃与李子品种“晚黄李”杂交授粉得到的杂交后代中筛选出确具有优良性状的一个系号 F1-2 为试材, 采用叶片形态学观察、染色体检验、分子 SRAP 技术检测方法, 对毛樱桃杂交后代进行早期鉴定, 以期为樱桃新品种的育种工作提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试毛樱桃、“晚黄李”及杂交后代 F1-2 由黑龙江省绥棱县云水相约樱桃种植专业合作社提供。

1.2 试验方法

1.2.1 叶片形态学鉴定

随机选取毛樱桃、“晚黄李”及杂交后代 F1-2 成熟叶片各 10 片, 测量叶片纵径(叶尖至叶基)长度, 将每个叶片沿纵轴平均分为 11 等份, 从叶片尖端开始测量每个等份的横径长度, 计算横径与纵径比值, 进行叶片形状分析。

1.2.2 染色体鉴定

取待测新鲜植物叶片 1 cm² 置于培养皿里, 加入 1 mL 4 ℃预处理的提取缓冲液, 用锋利的刀片快速将其切碎; 组织捣碎液用 30 μm 滤网过滤至上样管中, 收集的滤液中加入 1 mL Staining

第一作者简介:张建瑛(1980-), 女, 硕士, 副研究员, 现主要从事林木植物培育等研究工作。E-mail: zhangjianying1124@126.com.

基金项目:黑龙江省森工总局应用研究资助项目(sgzjY2015017)。

收稿日期:2017-10-11

solution(Partec)染液,充分混匀后避光染色 5 min;采用 Partec PA- I 型流式细胞仪对样品进行染色体倍性检测。

1.2.3 叶片分子生物学鉴定

DNA 的提取采用 CTAB 法。毛樱桃×“晚黄李”后代 F1-2 及其亲本各取 2 g 冷冻的嫩叶在液氮中研磨,65 ℃水浴 0.5 h,混匀。加入氯仿/异戊醇(CI),混匀,放置 10 min,12 000 r·min⁻¹离心 10 min,重复 2 次;−20 ℃静置 30 min;12 000 r·min⁻¹离心 10 min,弃上清液,70%乙醇冲洗沉淀 3 次,晾干。加 50 μL TE 溶解 DNA,同时加入 1 μL RNase,37 ℃反应 1 h,利用琼脂糖凝胶电泳法测定 DNA 浓度。SRAP 分析:SRAP 引物采用张琪静^[1]已发表 UCD-CH11、UDP98-412 的 2 对序列及 1 对随机引物 A1(表 1),引物由北京康普森生物有限公司合成。扩增反应在美国 Abi Veriti 型基因梯度 PCR 仪上进行。扩增体系如下:反应体积 20 μL, H₂O 12.7 μL, 2.4 μL Mg²⁺ (15 mmol·L⁻¹), 0.8 μL dNTPs(2.5 mmol·L⁻¹), 1.5 μL 引物(5 μmol·L⁻¹), 0.1 U Taq DNA 聚合酶(5 U·μL⁻¹), 2.5 ng 模板 DNA (15 ng)。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,33 个循环;72 ℃延伸 9 min。PCR 产物经 6%的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。重复 3 次。

表 1 SRAP-PCR 引物名称及序列

引物	序列(5'-3')
UCD-CH11(A)	TGCTATTAGCTTAATGCCTCCC
	ATGCTATGTCATAAGGTGTGC
UDP98-412(B)	AGGGAAAGTTTCTGCTGCAC
	GCTGAAGACGACGATGATGA
随机 A1(C)	TCTGGCATAA
	TTATGCCAGA

2 结果与分析

2.1 叶片形态学鉴定

在苗木生长旺季即每年的 7 月中旬至 8 月中旬,挑选成熟的叶片进行观察比对。由图 1 可以看出,杂种后代 F1-2 的叶形与母本毛樱桃十分相近,叶尖部与父本相近,叶片中、后部与母本更加

相近,而且叶片的纹路与毛樱桃也相近,与父本相差较大。图 2 显示三者叶片均呈抛物线形式,开始阶段杂种后代 F1-2 与毛樱桃、“晚黄李”的横/纵比上下差距不大,随着叶片的伸展杂种后代 F1-2 与毛樱桃横/纵比明显高于“晚黄李”,不过毛樱桃率先比杂种后代 F1-2 与“晚黄李”达到了峰值,而杂种后代 F1-2 与“晚黄李”几乎同步达到峰值,只是杂种后代 F1-2 高于“晚黄李”,之后三者开始进入了相对一致的下阶段。

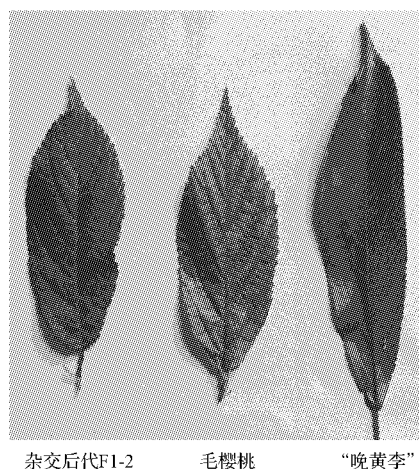


图 1 毛樱桃、“晚黄李”及杂交后代 F1-2 叶形

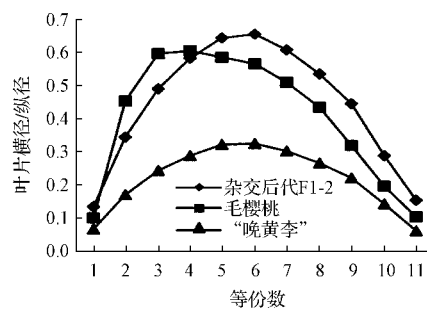
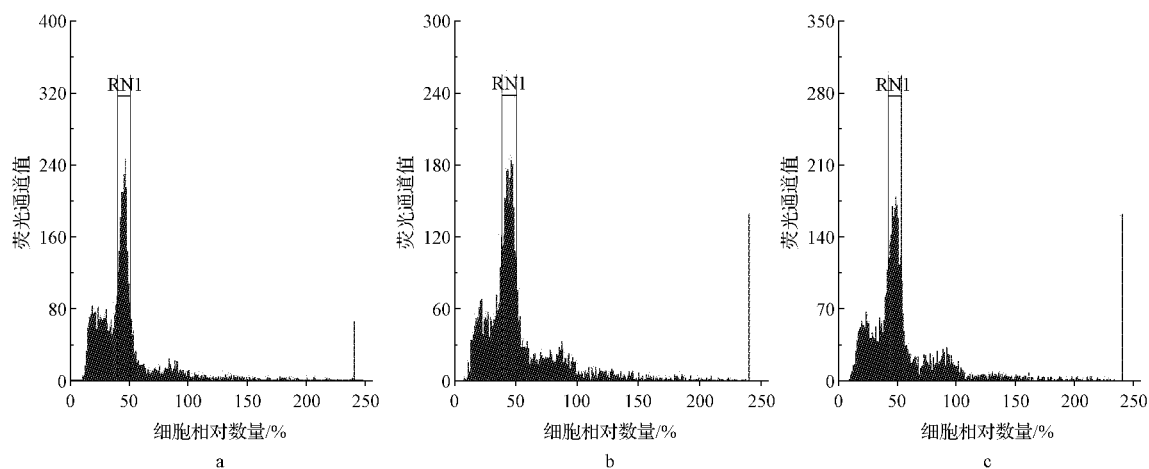


图 2 毛樱桃、“晚黄李”及杂交后代 F1-2 叶形变化及趋势

2.2 染色体鉴定

倍性是种质资源的一个重要数据,毛樱桃与“晚黄李”杂交后代是染色体突变还是正常的后代可以通过流式细胞仪技术检测。由图 3 可知,毛樱桃的荧光通道值为 320,“晚黄李”的荧光通道值是 240,杂种后代 F1-2 的荧光通道值为 280,介于二者之间,因毛樱桃、“晚黄李”的倍性已知为二



注:a.毛樱桃;b.“晚黄李”;c.杂交后代 F1-2。

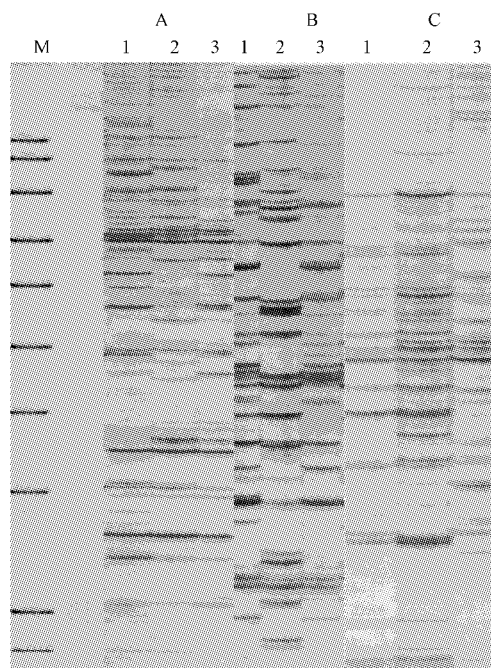
图3 毛樱桃、“晚黄李”及杂交后代 F1-2 倍性鉴定

倍体,结合荧光通道值即可看出,杂交后代 F1-2 也属于二倍体,这说明杂交后代 F1-2 与父母本染色体一致,不存在倍性差异,可见,通过流式细胞仪的方法对检测毛樱桃这样母本父本及后代都是二倍体的树种,其鉴定结果并不明显。

2.3 叶片分子鉴定

3对 SRAP 引物经 6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳后,发现毛樱桃、“晚黄李”及杂交后代 F1-2 扩增产物所得的带型因引物组合不同扩出的带型也有所不同(图 4)。UCD-CH11 在毛樱桃和“晚黄李”中分别扩增出 26、24 条带,杂交后代 F1-2 没有出现新带;UDP98-412 在毛樱桃和“晚黄李”中分别扩增出 24、25 条带,“晚黄李”的 7 条带在杂种后代 F1-2 中消失,毛樱桃的 1 条带在杂种后代 F1-2 中消失;一条随机引物在毛樱桃和“晚黄李”中分别扩增出 23、24 条清晰的带,“晚黄李”的 5 条带在杂种后代 F1-2 中消失,毛樱桃的 3 条带在杂种后代 F1-2 中消失。3 对 SRAP 引物在毛樱桃和“晚黄李”中均扩增出 73 条带,平均每对 SRAP 引物产生 24 条带,说明 SRAP 技术能够应用在毛樱桃、“晚黄李”及杂交后代 F1-2 的分子鉴定中。

SRAP 电泳结果读取记录特异性条带结果表明,3 对 SRAP 引物在毛樱桃和“晚黄李”之间找到 21 个差异带,有 16 个标记(6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21)在毛樱桃中出现,“晚黄李”中没有出现,形成了毛樱桃的特异



注:M. 100 bp DNA 分子质量标准;A. UCD-CH11;B. UDP98-412;C. 随机引物。1. 毛樱桃;2. “晚黄李”;3. 杂交后代 F1-2。

图4 3对 SRAP 引物在毛樱桃、“晚黄李”及杂交后代 F1-2 中的扩增结果

带。有 5 个标记(1、2、3、4、5)在“晚黄李”中出现,在毛樱桃中没有体现,为“晚黄李”的特异带。杂交后代 F1-2 含有 7 个和“晚黄李”相似的特异带,占标记总数的 30%,同时,杂交后代 F1-2 均能找到毛樱桃的特异带。3 对 SRAP 引物的结果证明,杂交后代 F1-2 是毛樱桃和“晚黄李”的真实杂种。

3 结论与讨论

该试验通过外观、染色体检测及分子标记技术等对所获得的杂种后代的真实性进行了鉴定,结果表明,3种方法各有优缺点,通过叶片、叶形这些直观的外在表型可以初步判断出杂交后代的亲缘性、相似性。而通过对染色体的判断发现对于染色体组不存在倍性差异的2个树种杂交所产生的后代,利用流式细胞仪检测出来的差异并不明显,因此利用该方法具有一定的局限性,更加适合倍性差异的树种之间的鉴定,这与刘焕芳等^[12]得出的结论相一致。

分子标记技术能够从机理深层次解析杂种后代与亲本的关系,通过SRAP检测发现杂交后代F1-2具备了7个与“晚黄李”相似的特异带、16个与毛樱桃相似的特异带,为杂交后代F1-2是毛樱桃和“晚黄李”的真实杂种的结论提供了依据,这与陈瑞丹等^[13]、王晶等^[14]关于分子方面的鉴定结论一致,说明分子辅助鉴定手段可行。

参考文献

[1] 俞德浚. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1986.

- [2] 魏立敏, 秦岳, 高宝宁. 毛樱桃资源的开发与利用[J]. 中国林副特产, 2017(2): 87-88.
- [3] 高海生, 肖月娟. 毛樱桃果实营养成分分析研究[J]. 河北职业技术学院学报, 2002(6): 110-112.
- [4] 张杰清. 观花新种绿萼毛樱桃[J]. 园林, 2003(2): 47.
- [5] 孙希祥, 徐玉芬. 毛樱桃新品种吉祥的选育[J]. 中国果树, 2005(5): 35.
- [6] 唐世勇, 邢英丽, 王永杰, 等. 观赏毛樱桃新品种红祥瑞的选育[J]. 农业科技通讯, 2009(5): 180-181.
- [7] 冯宝元, 郑宏鹏, 周运宁, 等. 毛樱桃新变种: 垂枝毛樱桃[J]. 山西果树, 1999(2): 3.
- [8] 田新华, 张建瑛, 李京. 九台晚李的组织培养方法[J]. 中国林副特产, 2016(5): 11-13.
- [9] 阮颖, 周朴华, 刘春林. 九种李属植物的RAPD亲缘关系分析[J]. 园艺学报, 2002, 29(3): 218-223.
- [10] 王鸿霞, 叶乃好, 李文生, 等. 樱桃属种间杂种的早期分子鉴定[J]. 中国科学院研究生院学报, 2006, 23(5): 671-765.
- [11] 张琪静. 毛樱桃资源遗传多样性及与李属近缘种亲缘关系的研究[M]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2007.
- [12] 刘焕芳, 陈学森, 段成国, 等. 甜樱桃与中国樱桃杂种的胚胎抢救及杂种鉴定[J]. 园艺学报, 2004, 31(3): 303-308.
- [13] 陈瑞丹, 张启翔. 梅花杂交育种中杂种F1代的早期鉴定[J]. 北京林业大学学报, 2004(26): 64-70.
- [14] 王晶, 张晓明, 闫国华, 等. 草原樱桃和对樱杂交后代的分子鉴定[J]. 北方园艺, 2012(1): 116-119.

Early Identification for New Varieties of *Prunus tomentosa* Thunb. and *Prunus salicina* Lindl.

ZHANG Jianying, TIAN Xinhua, YIN Dongsheng, LI Jing, LI Jing
(Heilongjiang Institute of Forestry Science, Harbin, Heilongjiang 150080)

Abstract: Hybrid progeny F1-2 of *Prunus tomentosa* Thunb. and *Prunus salicina* Lindl. ‘Wanhuang’ were used as test material, leaf morphological observation, chromosome analysis, SRAP molecular detection methods were used to study the relationship between the hybrids and the authenticity of the parents, in order to provide the reference basis for the breeding and cultivation of new varieties of cherry. The results showed that the hybrid F1-2 was a hybrid of *Prunus tomentosa* Thunb. and *Prunus salicina* Lindl. ‘Wanhuang’. The genetic base was more from *Prunus tomentosa* Thunb.

Keywords: *Prunus tomentosa* Thunb.; hybrid progeny; leaf shape identification; chromosome identification; molecular identification