

HB 柚有性后代的杂种鉴定和遗传多样性分析

杨海健 伊华林

华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070

摘要 以 HB 柚为母本, 与江西无核椪柑杂交, 获得 380 株杂交后代。筛选出 5 对 SSR 引物对其中的 90 株后代进行检测, 杂种率为 97.8%; 杂种后代中出现了部分条带缺失和新条带。采用 UPGMA 聚类分析法分析后代群体和亲本的遗传关系, 相似系数为 0.720 时, 可将杂种后代分为 4 类, 而与父母本聚在一起的杂种植株占少数。

关键词 HB 柚; 杂交育种; 杂种鉴定; SSR; 遗传多样性; UPGMA 聚类分析

中图分类号 S 666.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)05-0574-04

我国柚类资源丰富, 但优良的柚品种不多, 并且果肉颜色单一, 大多数为白肉品种。随着消费者对柑橘不同种类的需求, 创造风味佳、红肉、无籽、易剥皮的品种成为了育种工作的重点。杂交育种能重组父母本遗传物质, 获得的材料往往出现新的性状^[1], 是培育柑橘新品种的有效途径^[2]。HB 柚果肉粉红色, 与其他良种柚相比, 果肉偏酸苦; 江西无核椪柑属无籽椪柑, 但果实偏小, 产量低; 以 HB 柚和无核椪柑作为育种亲本杂交, 有望从后代中筛选出大果、无籽、高产、色艳、风味佳的新品种。常规的柑橘杂交育种, 后代性状分离广泛, 获得的优良个体比率低, 因此需要较大的杂交后代群体, 并利用有效的方法进行早期高效鉴定, 以提高育种效率。

柑橘杂种苗鉴定方法很多, 有形态学、同工酶等方法, 这些方法在鉴定杂种上均有其局限性^[3], 例如形态学标记要求父母本有明显的形态差异, 同工酶在取材上受到限制等。DNA 分子标记不受组织类别、外界环境和发育状态的干扰^[4], 曾被誉为是最为理想的遗传标记^[5]。SSR (simple sequence repeats) 为共显性标记, 具有多态性高、重复性好、操作简单等优点^[6]。前人研究^[7-9]已证实 SSR 以其多态性和稳定性优于同工酶标记和 RAPD 分子标记, 从庞晓明^[10]对几种常用分子标记分析来看, SSR 是较为理想的鉴定杂种苗真实性的方法。

本研究以 HB 柚为母本, 选择与其亲缘关系较

远的江西无核椪柑做父本, 通过同属异类间的杂交创造一批变异系数高的杂种群体, 随机选取 90 株后代进行 SSR 分子标记鉴定, 确定后代的杂种率, 并对杂种后代的遗传多样性进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 2010—2011 年在华中农业大学国家柑橘育种中心进行。以成年 HB 柚为母本, 江西无核椪柑为父本, 于 2010 年杂交授粉。

1.2 花粉的采集和杂交授粉

采集江西无核椪柑花粉, 充分干燥, 4 °C 备用。摘除 HB 柚花序上未开放和已经开放的花, 每花序留 1 或 2 朵将要开放的花, 去雄授粉、套袋。待果实成熟后采集果实, 取种子播种。

1.3 基因组 DNA 的提取

采用 CTAB 法提取杂交苗和父母本幼嫩叶片的基因组 DNA, 经 Thermo NanoDrop 2000 超微量紫外分光光度计检测 DNA 质量和浓度。

1.4 SSR-PCR 体系

PCR 扩增反应在 Applied Biosystems 梯度 PCR 仪上进行。SSR 扩增体系和程序参照刘勇^[11]的方法。

1.5 PAGE 凝胶电泳和染色

电泳凝胶采用 6% 的聚丙烯酰胺凝胶。电泳条

收稿日期: 2011-11-21

基金项目: 国家现代柑橘产业技术体系专项

杨海健, 硕士研究生, 研究方向: 果树种质创新与遗传育种. E-mail: yanghaijian126@126.com

通讯作者: 伊华林, 博士, 教授, 研究方向: 果树遗传育种. E-mail: yihualin@mail.hzau.edu.cn

件;功率 80 W,电压 2 000 V。

1.6 杂交后代遗传多样性分析

利用筛选出的 5 对引物进行 SSR 分析,采用韩国辉等^[12]的方法,构建数据矩阵,利用 NTSYS-pc2.1 软件,按 UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages)方法进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 杂交后代的获得

以 HB 柚为母本与江西无核椪柑杂交,共获得饱满种子 436 粒。采用温室播种获得植株 380 株,成苗率为 87.2%。对后代幼苗观察发现,叶形出现不同程度的变异,主要表现为翼叶变窄变长。

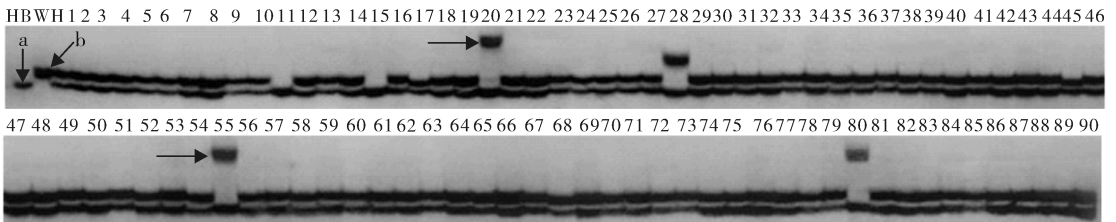
2.2 杂交苗的 SSR 分子标记鉴定

对 20 对引物进行筛选,选出 5 对能在父母本之间获得清晰稳定差异条带的引物组合(表 1)。利用这 5 对引物对 90 株杂交后代进行真杂种的鉴定,结果显示有 88 株为杂种,其余 2 株(11、15)在所有引物中均未出现父本条带,杂种率 97.8%。杂种后代的扩增图谱中,出现了父母本没有的新条带(图 1、图 2)和少量母本条带的缺失现象。但通过 5 对引

物的相互印证后,所有出现新条带和带型缺失的杂交后代都被确定为杂种。因此笔者认为,采用 SSR 分子标记技术鉴定杂交后代的真实性需要通过多对引物的相互验证才能获得更准确的结果。引物 CS2 扩增图谱(图 1)中出现父本条带的有 86 株,是 5 对引物中获得杂种率最高的引物,为 93.3%。引物 TAA1 确定 38 株为杂种,在 5 对引物中杂种率最少。

表 1 筛选的 5 对 SSR 引物序列
Table 1 Five pairs of SSR primers screened

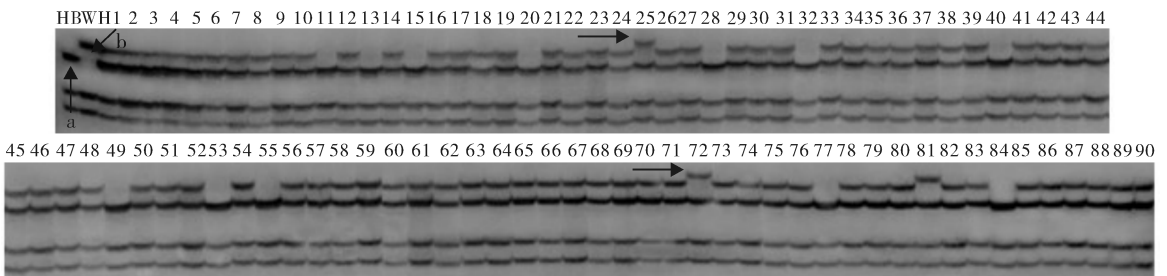
引物 Primer	序列(5'-3') Sequences
TAA1	5'-GACAACATCAACAACAGCAAGAGC-3' 5'-AAGAAGAAGAGCCCCATTAGC-3'
TAA15	5'-GAAAGGGTACTTGACCAGGC-3' 5'-CTTCCCAGCTGCACAAGC-3'
CS2	5'-GAAAGCGATTGCTGAAAAGG-3' 5'-CAAACGAAACAAGCCCTAAAA-3'
TAA27	5'-GGATGAAAAATGCTCAAAATG-3' 5'-TAGTACCCACAGGAAGAGAGC-3'
CMS20	5'-GGAGCATATAAGCATAAACACC-3' 5'-AGGAAAACGCATAAACCGTG-3'



HB: HB 柚(母本) HB pummelo(Maternal); WH: 江西无核椪柑(父本) Jiangxi seedless Ponkan (Paternal); 1-90: 杂交后代 Off-springs marker; a: 母本特异标记 Maternal marker; b: 父本特异标记 Paternal marker; → 示新条带 New band.

图 1 引物 CS2 在 90 个后代中的扩增结果

Fig. 1 The amplification bands of CS2 primer in 90 offsprings



HB: HB 柚(母本) HB pummelo(Maternal); WH: 江西无核椪柑(父本) Jiangxi seedless Ponkan (Paternal); 1-90: 杂交后代 Off-springs; a: 母本特异标记 Maternal special marker; b: 父本特异标记 Paternal special marker; → 示新条带 New band.

图 2 引物 TAA27 在 90 个后代中的扩增结果

Fig. 2 The amplification bands of TAA27 primer in 90 offsprings

2.3 杂交后代群体与两亲本的聚类分析

根据 5 对引物的 PCR 扩增结果,对杂种后代与两亲本进行 UPGMA 聚类分析(图 3),结果表明:在相似系数为 0.720 时,可将 88 株杂种后代分为 4 类;其中 21 株与父本 WH 分为一组,占总数的

23.9%;6 株与母本 HB 柚聚为一组,占 6.8%。另二组各有 17 株和 44 株植株,分别占 19.3%和 50.0%。随着相似系数的增大,与父母本聚在一起的植株数越来越少,说明了杂交后代遗传具多样性,为后期优系选育提供了材料基础。

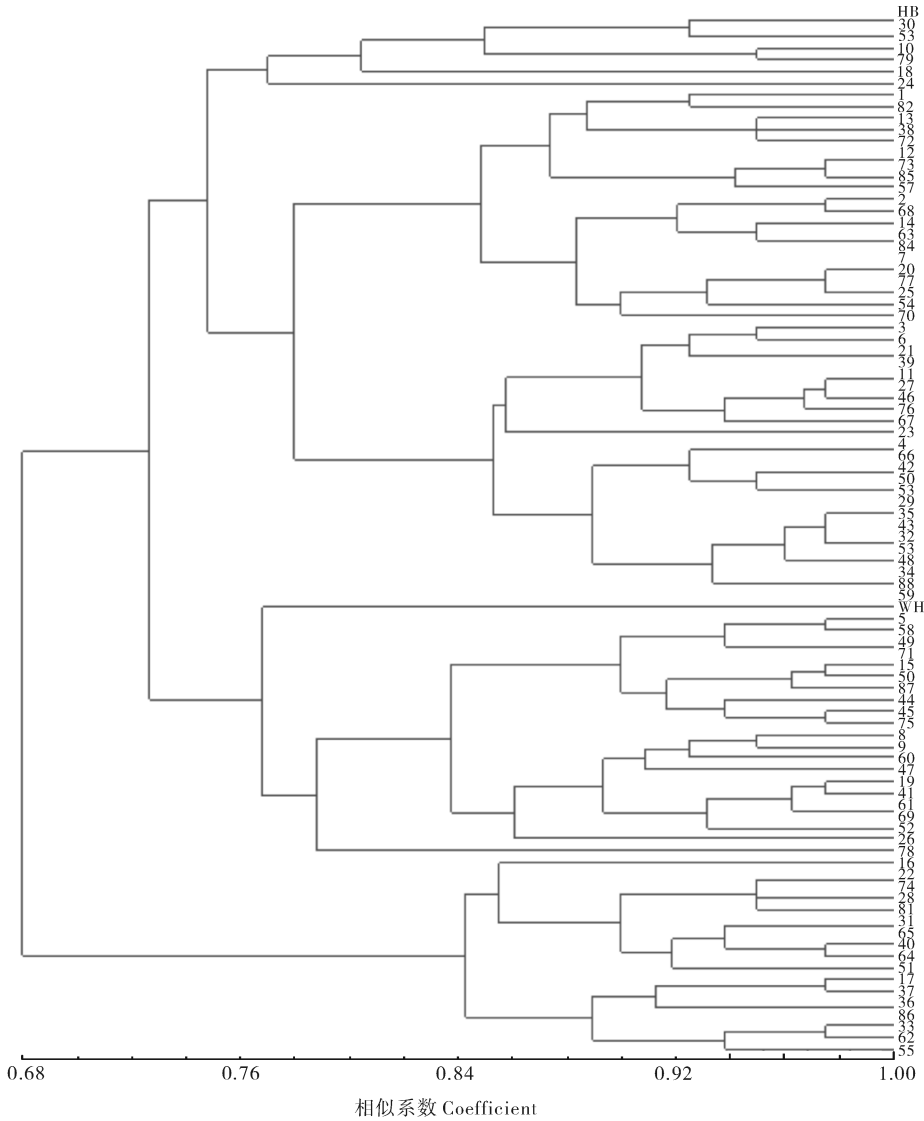


图 3 杂交亲本与后代遗传关系的聚类图

Fig.3 Dendrograms of parents and offsprings

3 讨论

本研究的 90 株杂交后代中,鉴定的杂种率为 97.8%。5 对引物中,CS2 鉴定杂种率最高,为 93.3%,但并没有鉴定出所有的杂种。说明 SSR 鉴定杂种需要多对的引物相互验证,才能达到更精确的检测结果。同时我们发现,只用 CS2 和 TAA27 这 2 对引物就已经获得了最终的鉴定结果,说明此 2 对引物组合在鉴定 HB 柚与椪柑杂交后代真实性

上具有较高的效率。

部分杂种后代在扩增图谱中出现了父母本没有的新带型或带型缺失,可能是杂交过程中发生了基因重组。Hunt 等^[13]指出新带型的出现可能与不同的等位基因上同源核苷酸序列配对形成的异源双链 DNA 分子有关。而 Ayliffle 等^[14]通过测序证实了这一点。韩国辉等^[12]认为带型的缺失是有性杂交染色体的异常交换或是杂合位点受引物干扰而无法显现引起的。唐建民等^[8]在采用 RAPD 方法对小

金海棠和山荆子杂种实生苗进行的早期鉴定研究中,利用新带型鉴定出了所有的杂种。韩国辉等^[12]在利用 SSR 鉴定沙田柚杂交群体时发现出现带型缺失的后代全为杂种。在本研究中,出现新带型或带型缺失的后代通过多对引物的相互验证后,均确定为杂种,与前人的研究结果一致。

在所有的引物扩增图谱中,11 和 15 两株后代的带型与母本完全一致,并没有出现新带型,可能是所用引物不够或母本自花授粉所得,也可能来源于珠心苗。Cameron^[15]指出即使是典型的单胚品种也会偶然出现双胚或三胚现象。因此,HB 柚是否存在偶然的三胚现象还有待于进一步的探讨。

有性杂交是产生变异后代、为育种提供新种质的重要方法,同时 SSR 是快速鉴别杂种后代、研究后代遗传多样性的有效技术。在杂种后代与亲本的聚类分析中,后代表现了丰富的遗传多样性,为品种选育提供了材料。

参 考 文 献

[1] 沈德绪,王元裕,陈力耕. 柑橘遗传育种学[M]. 北京:科学出版社,1998;126.
 [2] 宋健坤. 柑橘三倍体种质资源的创造及遗传分析[D]. 武汉:华中农业大学图书馆,2006.
 [3] 雷天刚,何永睿,吴鑫,等. 利用 SSR 标记鉴定柚和杂柑品种[J]. 分子植物育种,2007,5(5):720-724.
 [4] 徐小勇,刘继红,邓秀新. 柑橘生物技术研究进展[J]. 中国生物

工程杂志,2003,23(8):35-38.
 [5] 白瑞霞,彭建营. DNA 分子标记在果树遗传育种研究中的应用[J]. 西北植物学报,2004,24(8):1547-1554.
 [6] 蒋彩虹,王元英,孙玉合. SSR 和 ISSR 标记技术应用进展[J]. 中国烟草科学,2007,28(2):1-5.
 [7] RUIZ C, BRETO M P, ASINS M J. A quick methodology to identify sexual seedlings in citrus breeding programs using SSR markers[J]. Euphytica, 2000, 112: 89-94.
 [8] 唐建民,周世良,成明昊,等. 用 RAPD 和 SSR 分子标记鉴定小金海棠 F1 代杂种实生苗的研究[J]. 农业生物技术科学,2006, 22(2):36-40.
 [9] 程运江. 柑橘体细胞胞质遗传及叶绿体 SSR 引物开发[J]. 华中农业大学学报,2011,30(6):780-783.
 [10] 庞晓明. 用分子标记研究柑橘属及其近缘属植物的亲缘关系和枳的遗传多样性[D]. 武汉:华中农业大学图书馆,2002.
 [11] 刘勇. 柚类资源分子系统学及其核心种质构建研究[D]. 武汉:华中农业大学图书馆,2005.
 [12] 韩国辉,向素琼,汪卫星,等. 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,2010,43(22):4678-4686.
 [13] HUNT G J, PAGE R E. Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in the honey bee[J]. Theor Appl Genet, 1995, 85: 15-20.
 [14] AYLIFFLE M A, LAWRENCE G J, ELLIS J G, et al. Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause non-parental RAPD bands[J]. Nucleic Acid Research, 1994, 22(9): 1632-1636.
 [15] CAMERON J W. Sexual and nucellar embryo in F₁ hybrids and advanced crosses of *Citrus and Poncirus* [J]. J Am Soc Hort Sci, 1979, 104(3):408-410.

Identification and genetic diversity analysis of hybrid progenies from HB pummelo

YANG Hai-jian YI Hua-lin

College of Horticulture and Forestry Sciences,
 Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Five pairs SSR primers was selected to identify 90 offsprings obtained from crossing HB pomelo (*Citrus grandis* Osbeck) with Jiangxi seedless Ponkan (*C. reticulata* Blanco). The rate of true hybrid was 97.8%. There were lost and novel bands in some of the hybrids. The genetic relationship between parents and offsprings was analyzed with UPGMA. The hybrids could be divided into four groups with similarity coefficient of 0.720 and only few progenies were clustered with parents. These created germplasms provided new materials for the citrus cultivar improvement.

Key words HB pummelo; cross-breeding; hybrid identification; SSR; genetic diversity; UPGMA cluster analysis

(责任编辑:张志钰)