

## 补血草种间杂种的形态学观察与 SRAP 分析

高灵均 俞红强 义鸣放\*

(中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100193)

**摘要** 为了更好地开发利用补血草属植物,获得新的种间杂种,并为杂种的进一步筛选以及优异性状新种质的获得打下基础,以二色补血草为母本,黄花补血草为父本进行杂交实验,通过形态学观察及 SRAP 分子标记对杂交后代进行鉴定和分析。本实验共获得 11 株杂交后代,经形态学观察表明,杂交种的生长习性与母本一致,花萼色与父本一致,而其叶幅、叶数、茎木质化程度和开花次数等多数性状介于父母本之间;SRAP 分子标记对杂交后代及父母本扩增共得到 91 个 DNA 片段,其中 11 个是亲本和杂种后代共有的,80 条为多态性带,占 88%;并且所有杂种后代均具有亲本的扩增片段,为真杂种。杂种 F1-6、7 和 11 号性状优良,可通过组培繁殖形成无性系,作为补血草新类型推广。

**关键词** 补血草; 种间杂交; 形态观察; SRAP 分子标记

中图分类号 Q 945

文章编号 1007-4333(2010)06-0046-06

文献标志码 A

## Examination of morphological features and SRAP analysis of interspecific hybrids in *Limonium* Mill.

GAO Ling-jun, YU Hong-qiang, YI Ming-fang\*

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract** For better use of the field species in *Limonium* Mill. and sustainable acquisition of new interspecific hybrids for further screening and new germ plasm, the crossing experiment between *Limonium bicolor* and *Limonium aureum* were carried out and the offsprings were identified and analysed by morphological features and SRAP molecular markers. In total, 11 interspecific hybrids were eventually obtained. The following morphology observation showed that the growth habit of the hybrids was similar to *Limonium bicolor*, and the calyx color of the hybrids was similar to *Limonium aureum*. The growth characters of hybrids such as leaf diameter, leaf number, degree of lignification of the stem, state of the branch, flowering time and flowering frequency displayed a number of features intermediate between both parents. In the SRAP experiment, 91 DNA bands were obtained, in which 11 bands were presented in both parents and hybrids and 80 polymorphic with a proportion of 88%. All the hybrids displayed the typical bands of parents and their intergenetic status was then implied. The character of F1-6, 7 and 11 were excellent. They can propagate by tissue culture and popularize as a new ornamental.

**Key words** *Limonium* Mill.; interspecific hybridization; examination of morphology; SRAP molecular markers

补血草属(*Limonium* Mill.)植物花色鲜艳,花枝繁茂,除了具有作鲜切花、干花等观赏价值外,还可药用及作为蜜源植物<sup>[1-2]</sup>,还有防风固沙、改造盐碱地等作用<sup>[3-4]</sup>,是一种应用价值极高的植物。

因此,杂交育种对更好地开发利用补血草属植物具有十分重要的意义。目前,我国对补血草属植物的研究主要集中在引种繁殖<sup>[5-6]</sup>及一些生理研究上<sup>[7-8]</sup>。国外对补血草属植物的研究较多,如引种繁

收稿日期: 2010-05-21

基金项目: 北京市园林绿化局资助项目

第一作者: 高灵均, 硕士研究生, E-mail: lingjun000@126.com

通讯作者: 义鸣放, 教授, 主要从事花卉栽培生理研究, E-mail: ymfang@cau.edu.cn

殖、生物学特性、遗传特性、采后保鲜、杂交育种<sup>[9-12]</sup>等方面。由于补血草属植物在北京地区主要应用于鲜切花配花使用,且主要为勿忘我、情人草 2 个种,其他补血草属植物的应用还没有得到重视推广,所以北京地区引种栽培的补血草属植物种类较少,本研究旨在利用已经在北京引种驯化成功的二色补血草和黄花补血草进行远缘杂交,以期培育出新的种间杂种,为杂种的进一步筛选以及优异性状新种质的获得打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料二色补血草(*Limonium bicolor*),二年生草本,其花萼在初期呈现紫红色或粉红色,随着成熟花色逐渐变浅,花萼宽膜质,花后宿存,引自北京山区;黄花补血草(*Limonium aureum*)一年生草本,其花萼金黄色,漏斗状,膜质宿存,引自甘肃武威地区。以引种多年的二色补血草和黄花补血草各 5 株实生植株为试验材料。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 杂交

本试验于 2008 年 5 月下旬在北京市昌平景观园林有限责任公司昌平实验基地进行,采用传统杂交方法以 1 200 朵二色补血草为母本,黄花补血草为父本进行杂交。在二色补血草开花前用羊皮纸袋套袋,大头针封口。待其开花以后,在早上 08:00 后采下足够数量的黄花补血草将要开放的花,放入培养皿中置于室内,2~3 h 后,待花粉散出,对二色补血草授粉,授粉后再将羊皮纸袋套上,封口。在袋中花朵全部受精完成后,拆袋换挂牌。在 7 月底 8 月初种子成熟后采收,低温贮藏。

#### 1.2.2 杂种 F<sub>1</sub> 代植株形态学观察

2008 年 8 月底,将杂种种子播至穴盘,10 月上旬将幼苗移栽至选种圃中。2009 年 6 月,将杂交种与随机选择的亲本各 10 株进行形态学观察鉴定。观测的形态学性状包括叶长、叶数、茎木质化程度、花枝状态、花萼色、开花时间、开花次数和生长习性等<sup>[13]</sup>。

#### 1.2.3 杂种 F<sub>1</sub> 代植株分子鉴定

DNA 提取采用 CTAB 法,并稍加改良。将 0.2 g 植物叶片在液氮中充分研磨,转移到 2 mL 离心管中,加入 800  $\mu$ L 预热的提取缓冲液,65  $^{\circ}$ C 水浴 60 min;4  $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液加入

$V(\text{Tris-饱和酚}):V(\text{氯仿}):V(\text{异戊醇})=25:24:1$  的混合液 600  $\mu$ L,混匀;4  $^{\circ}$ C

12 000 r/min 离心 10 min,取上清液加入 2/3 体积预冷的异丙醇,混匀,静置 10 min,12 000 r/min 离心 10 min;体积分数为 70% 的乙醇洗涤,干燥后加入 200  $\mu$ L TE 缓冲液溶解备用。

SRAP 反应体系总体系为 20  $\mu$ L,其中模板 DNA 50 ng/ $\mu$ L,  $\text{Mg}^{2+}$  2.5 mmol/L, dNTP 0.3 mmol/L, Taq 酶 1.5 U,引物浓度 0.3  $\mu$ mol/L。SRAP-PCR 程序为:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94  $^{\circ}$ C 变性 1 min,35  $^{\circ}$ C 退火 1 min,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 5 个循环;然后 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min,50  $^{\circ}$ C 退火 1 min,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环;最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。所选引物序列参考文献<sup>[14-15]</sup>中的引物,从中选出正向引物和反向引物,正向引物有 Me1、Me2、Me3、Me4、Me5、Me6、Me7 和 Me8,反向引物有 Em3、Em5、Em6 和 Em8。引物的合成由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

扩增反应结束后,用质量分数为 2% 琼脂糖凝胶检测扩增产物,EB 染色,室温下 110 V 电压电泳 40 min,凝胶成像系统照相,记录试验结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 种间杂种 F<sub>1</sub> 的形态特征

二色补血草与黄花补血草种间杂种 F<sub>1</sub> 代与其双亲形态特征比较见表 1。杂种后代全部为二年生植株,生长习性与母本二色补血草一致;开花次数有一次或连续、花枝状态有聚合或分散,部分与母本一致,部分与父本一致,与母本一致较多;叶幅、叶数、茎木质化程度等则介于双亲之间;叶边缘形状多数与父本一致;而所有的杂交后代的花萼色均为黄色,与父本一致。图 1 为双亲与杂交后代叶、茎、花萼、花的典型性状表现对比,图 2 为双亲与杂交后代成株后的对比。

### 2.2 DNA 分子标记水平鉴定

表 2 结果表明,以 12 对引物对杂种后代株系及其父母本试验材料扩增,共得到 91 个 DNA 片段,其中 11 个扩增片段是亲本和杂种后代共有的,80 条为多态性带,占全部扩增条带的 88%。在扩增片段中共发现 29 条二色补血草有而黄花补血草没有的片段,黄花补血草有而二色补血草没有的片段有 26 条。

表1 杂交种与父母本形态特征及生长习性的比较

Table 1 Comparison of morphological characterization and growth habits among the crossbreed and their parents

材料	叶长/cm	叶数	叶边缘	茎木质化程度*	花枝状态	花萼色	开花时间	开花次数	生长习性
二色补血草 <i>L. bicolor</i>	43	47	波状	高	聚合	粉色	5月中下旬	1	二年生
黄花补血草 <i>L. aureum</i>	22	平整	低	分散	黄色	4月下旬	连续	一年生	
F <sub>1</sub> -1	19	23	平整	中	聚合	黄色	5月上旬	1	二年生
F <sub>1</sub> -2	17	30	平整	中	分散	浅黄色	5月上旬	连续	二年生
F <sub>1</sub> -3	31	45	平整	低	分散	黄色	5月上旬	连续	二年生
F <sub>1</sub> -4	20	48	平整	中	聚合	浅黄色	5月中旬	1	二年生
F <sub>1</sub> -5	38	51	平整	中	聚合	浅黄色	5月中旬	1	二年生
F <sub>1</sub> -6	24	43	平整	高	聚合	浅黄色	5月中旬	1	二年生
F <sub>1</sub> -7	25	30	平整	高	聚合	浅黄色	5月中旬	1	二年生
F <sub>1</sub> -8	40	45	平整	高	分散	浅黄色	5月下旬	1	二年生
F <sub>1</sub> -9	22	28	平整	中	分散	黄色	5月上旬	连续	二年生
F <sub>1</sub> -10	35	40	波状	高	聚合	浅黄色	5月下旬	1	二年生
F <sub>1</sub> -11	21	25	平整	中	聚合	浅黄色	5月中旬	1	二年生

注:基部远离地面直向上生长为高;茎基部远离地面,顶部较柔软状态为中;茎柔软,贴服于地面为低。



1~4 依次为叶、茎、花萼、花;A 为二色补血草;B 为杂交种;C 为黄花补血草。

图1 父母本与杂交种的形态特征

Fig. 1 Morphological characters of parents and crossbreed

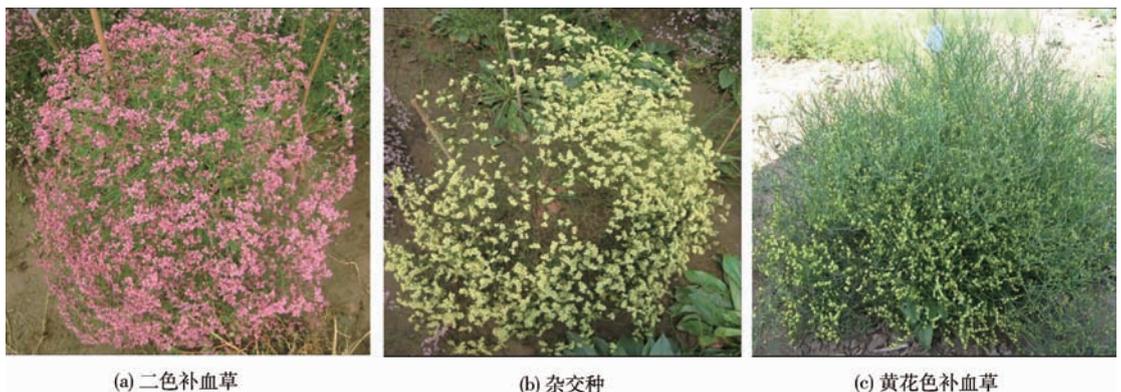


图2 父母本与杂交种

Fig. 2 Parents and crossbreed

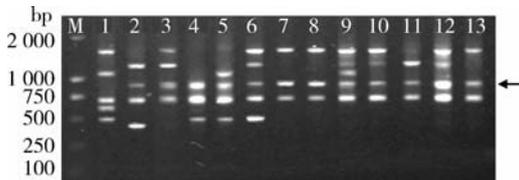
表 2 12 对引物扩增的二色补血草×黄花补血草亲本及后代与亲本之间的特异性扩增片段

Table 2 Special bands from parents and 11 offsprings from *L. bicolor*×*L. aureum* using 12 primer pairs

引物	扩增片段	二色补血草	黄花补血草	杂种后代 F <sub>1</sub>										
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Me8Em1	2	—			—	—	—	—	—		—	—	—	—
	3		○	○			○	○	○	○	○	○	○	○
	5		○				○	○						
	6	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Me1Em2	1	—		—	—		—	—	—	—	—		—	—
	2		○	○	○	○	○		○	○	○	○	○	○
	5		○				○			○			○	
Me2Em2	1	—			—		—	—	—	—			—	—
	2	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	4		○	○	○			○	○	○	○	○	○	○
	5	—		—	—	—	—	—	—	—		—	—	—
	6	—		—	—	—	—	—	—	—	—		—	—
	7													
Me4Em2	1	—		—	—		—	—	—	—	—		—	—
	2		○	○		○			○	○	○	○		
	3	—			—									
	4		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	7	—		—	—	—								
Me5Em2	4		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		○
	6	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	7		○	○	○	○								
Me8Em2	1	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3		○		○	○		○	○	○	○	○	○	○
Me1Em3	1		○	○	○	○		○	○	○	○	○	○	○
	4	—		—	—	—		—		—	—	—	—	—
	5	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	6		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	9	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Me2Em3	1	—		—	—	—		—	—	—	—	—	—	—
	2		○										○	
	3		○		○			○						○
	5	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	7		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	10	—		—	—	—					—	—	—	—
	11													
Me1Em4	2	—		—	—		—	—						—
	4		○	○	○	○	○	○		○	○	○	○	○
Me4Em4	3	—		—	—	—	—	—					—	
Me6Em4	3		○	○	○	○			○	○		○	○	○
	4		○						○					
	5	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	6	—		—	—	—	—	—	—	—		—	—	—
	7	—		—	—	—					—	—	—	—
	8													
	9													
Me8Em4	1	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	—		—	—	—	—	—			—	—	—	—
	4		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	5	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

注：—、○分别为二色补血草和黄花补血草的特异性扩增片段。

二色补血草和黄花补血草的特异性扩增片段均在其杂种后代株系的扩增片段中被发现。父本黄花补血草在 900 bp 处有 1 条特异性扩增条带(图 3, 箭头所示), 杂种后代株系均含有此条带, 同时也检测出了来自二色补血草的条带以及三者共有的条带, 此结果从 DNA 分子水平上证实了 11 株杂种为真正的种间杂交后代<sup>[16-17]</sup>。



箭头为父本黄花补血草的一条特异性扩增带

M 为分子量标准; 1 为二色补血草; 2 为黄花补血草;

3~13 为杂种后代。

图 3 引物组合 Me4Em2 在二色补血草、黄花补血草及杂种后代的 SRAP 扩增结果

Fig. 3 SRAP bands of the parents and their progenies from *L. bicolor* and *L. aureum* by primer pair Me4Em2

### 3 结论与讨论

1) 本试验通过二色补血草与黄花补血草杂交获得了种间杂种。观察比较杂种 F<sub>1</sub> 代与亲本形态性状的结果显示, 杂交种的生长习性与母本一致, 花萼色与父本一致, 而其叶幅、叶数、茎木质化程度、开花时间和开花次数等多数性状介于父母本之间。从杂种中筛选出具有目标性状的植株, 即适合作切花的黄色花萼的植株 F<sub>1</sub> 的 6、7 和 11 号, 可通过组培繁殖形成无性系, 作为补血草新类型推广。

2) SRAP 标记通过独特的引物设计内含子、启动子与间隔区长度不等而产生多态性。这种分子标记是在较为严格的条件下 PCR 扩增获得多态性位点, 具有简便、稳定、产率中等及在基因组中分布均匀等优点。

3) 利用 DNA 分子标记鉴定亲子关系, 需要在杂交后代中检测到如下证据: ①与双亲共同具有的位点; ②分别与亲本之一共同具有的位点, 如果满足这 2 个条件则能说明 2 个亲本之间发生了遗传重组<sup>[18-20]</sup>。本试验的 SRAP 指纹图谱显示, 11 株杂种中既有分别来自父母本的特征带, 又具有三者共有的条带。综合研究表明, 杂交后代分子鉴定结果与形态、生长习性调查结果完全一致, 是二色补血草

和黄花补血草远缘杂交后代。

4) 在本试验中, 11 个杂种后代间也存在着一定的差异, 部分与母本或父本表现相近, 部分表现为双亲中间状态。在此基础上进一步利用 SRAP 技术研究种间杂交后代间的遗传多样性, 结果表明在 DNA 分子水平, 各杂交种间也存在不同程度的异质性, 但是, 不同亲本的 DNA 特异片段是否与某一优良性状存在连锁关系, 需要深入研究, 从而更准确地评价和鉴定远缘杂种后代。

### 参 考 文 献

- [1] 吴冬青, 李彩霞, 冯雷, 等. 金色补血草花色抗氧化活性及抑菌作用研究[J]. 中兽医医药杂志, 2005(5): 22-23
- [2] 辛华. 山东盐碱地上的夏秋季蜜源植物——补血草[J]. 蜜蜂杂志, 2000(6): 28
- [3] 邓旺华, 王雁. 补血草属植物在城市绿化中的应用[J]. 中国城市林业, 2006, 4(2): 58-60
- [4] 董必慧. 江苏沿海滩涂中华补血草的保护性研究[J]. 中国野生植物资源, 2005, 24(6): 28-30
- [5] 范小峰, 杨颖丽, 刘军梅, 等. 黄花补血草愈伤组织的诱导和植株再生[J]. 西北植物学报, 2007, 27(2): 257-261
- [6] 张瑞麟, 范敏, 吴慧, 等. 耳叶补血草的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(4): 680
- [7] 骆建霞, 王丹, 李建科, 等. 3 种补血草属植物光合特性的日变化[J]. 西北农林科技大学学报, 2006, 34(8): 121-124
- [8] 孙宏彦, 杨帆, 游捷, 等. 氮素形态和营养液浓度对二色补血草生长的影响[J]. 中国农业大学学报, 2008, 13(1): 36-41
- [9] Burchi G, Mercatelli E, Maletta M, et al. Results of a breeding activity on *Limonium* spp. [J]. Acta Horticulturae, 2006, 714: 43-49
- [10] Talia M A C, Pacucci C. Bioagronomic assessment of three *Limonium* species (*L. bellidifolium* Dumort, *L. perezii* Hubb., *L. sinensis* Kuntze) [J]. Colture Protette. Gruppo Calderini Edagricole Srl, Bologna, 2005, 34: 127-130
- [11] Morgan E R, Burge G K. Interspecific hybridization between *Limonium perigrinum* Bergius and *Limonium purpuratum* L [J]. Euphytica, 1995, 15: 221-224
- [12] Morgan E R, Burge G K. Production of inter-specific hybrids between *Limonium perezii* (Stapf) Hubb. and *Limonium sinuatum* (L.) [J]. Mill Euphytica, 1998,

- 102;109-115
- [13] 程志芳, 钱春桃, 陈学军, 等. 辣椒属种间杂交及杂种鉴定研究[J]. 园艺学报, 2007, 34(4): 883-888
- [14] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SARP) a new marker system based on a simple PCR reaction; Its application to mapping and gene tagging in *Brassica*[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103(3): 455-461
- [15] Budak H, Shearman R C, Parmaksiz I, et al. Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buffalo grasses based on phylogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs, and SRAPs[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109(2): 280-288
- [16] 马鸿翔, 陈佩度. 东北草莓×凤梨草莓种间杂种一代的细胞遗传学观察与 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 2007, 34(3): 597-604
- [17] 郝青, 刘政安. 中国首例芍药牡丹远缘杂交种的发现及鉴定[J]. 园艺学报, 2008, 35(6): 853-858
- [18] 吴学尉, 崔光芬, 吴丽芳, 等. 百合杂交后代 ISSR 鉴定[J]. 园艺学报, 2009, 36(5): 749-754
- [19] 郑轶琦, 宗俊勤, 薛丹丹, 等. SRAP 分子标记在假俭草杂交后代真实性鉴定中的应用[J]. 草地学报, 2009, 17(2): 135-138
- [20] 薛丹丹, 郭海林, 郑轶琦, 等. 结缕草属植物杂交后代杂种真实性鉴定——SRAP 分子标记[J]. 草业学报, 2009, 18(1): 72-79

## 欢迎订阅 2011 年《中国农业科学》中、英文版

《中国农业科学》中、英文版由农业部主管、中国农业科学院主办。主要刊登农牧业基础科学和应用基础科学研究论文、综述、简报等。设有作物遗传育种; 耕作栽培·生理生化; 植物保护; 土壤肥料·节水灌溉·农业生态环境; 园艺; 园林; 贮藏·保鲜·加工; 畜牧·兽医等栏目。读者对象是国内外农业科研院(所)、农业大专院校的科研、教学人员。

《中国农业科学》中文版影响因子、总被引频次连续多年居全国农业科技期刊最前列或前列位次。1999年起连续 10 年获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”资助; 2001 年入选中国期刊方阵双高期刊; 1999 年获“首届国家期刊奖”, 2003、2005 年获“第二、三届全国国家期刊奖提名奖”; 2004—2006 年连续荣获第四、五届全国农业优秀期刊特等奖; 2001 年起 6 次被中信所授予“百种中国杰出学术期刊”称号; 2008 年获中国科技信息研究所“精品科技期刊”称号, 及武汉大学中国科学评价中心“权威期刊”称号。在北京大学《中文核心期刊要目总览(2008 年版)》中位居“农业综合类核心期刊表”首位。2010 年 1 月起中文版改为半月刊, 将有更多最新农业科研成果通过《中国农业科学》及时报道。

《中国农业科学》英文版(Agricultural Sciences in China)2002 年创刊, 2006 年 1 月起正式与国际著名出版集团 Elsevier 合作, 海外发行由 Elsevier 全面代理, 全文数据在 ScienceDirect 平台面向世界发行。2010 年 1 月起英文版页码增至 160 页。2010 年 Agricultural Sciences in China 被 SCIE 收录。

《中国农业科学》中文版大 16 开, 每月 1、16 日出版, 国内外公开发行。每期 224 页, 定价 49.50 元, 全年定价 1188.00 元, 国内统一刊号: CN11-1328/S, 国际标准刊号: ISSN0578-1752, 邮发代号: 2-138, 国外代号: BM43。

《中国农业科学》英文版大 16 开, 每月 20 日出版, 国内外公开发行。每期 160 页, 国内订价 36.00 元, 全年 432.00 元, 国内统一刊号: CN11-4720/S, 国际标准刊号: ISSN1671-2927, 邮发代号: 2-851, 国外代号: 1591M。

邮编: 100081; 地址: 北京中关村南大街 12 号《中国农业科学》编辑部

电话: 010-82109808, 82106279, 82106283, 82106282, 传真: 010-82106247

网址: www.ChinaAgriSci.com E-mail: zgnykx@mail.caas.net.cn