

草莓五倍体种间杂种的获得及回交研究*

雷家军, 谭昌华, 代汉萍, 庞 兰
沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110161

摘 要: 从草莓品种与野生种杂交组合宝交早生(8x) × 森林草莓(2x)、哈尼(8x) × 森林草莓(2x)和哈尼(8x) × 黄毛草莓(2x)中分别各得到1株五倍体种间杂种WBT1、WBT2和WBT3,对其植物学性状、果实性状、花粉大小及生活力等进行了观察。用五倍体杂种与栽培品种哈尼和全明星进行回交,得到了六倍体、七倍体和九倍体后代实生苗,对这些不同倍性杂种的来源进行了分析。这些整合野生草莓基因的不同倍性种间杂种具有进一步杂交利用的潜力,对改良现代栽培草莓具有较大意义。

关键词: 草莓; 种间杂交; 五倍体; 回交

中图分类号: S668.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-5684(2010)03-0284-05

Study on Obtaining Pentaploid Interspecific Hybrids and its Backcross in Strawberry

LEI Jia-jun, TAN Chang-hua, DAI Han-ping, PANG Lan

College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China

Abstract: The pentaploid interspecific hybrids WBT1, WBT2 and WBT3 were obtained respectively from the cross combinations Hokowase (8x) × *F. vesca* (2x), Honeoye (8x) × *F. vesca* (2x) and Honeoye (8x) × *F. nilgerrensis* (2x). The botanical and fruit trait, and pollen size and viability of the three pentaploid interspecific hybrids were observed. The hexaploid, heptaploid, nonuploid seedlings were obtained from the backcross of the pentaploid interspecific hybrids with cultivars Honeoye and Allstar. The origins of the seedlings with various ploidy were postulated. These different ploidy hybrids integrated wild strawberry genes have further potential for hybridization utilization to improve modern strawberry cultivars.

Key words: strawberry (*Fragaria* spp.); interspecific hybridization; pentaploid; backcross

草莓为蔷薇科(Rosaceae)草莓属(*Fragaria*)多年生浆果类果树。全世界草莓属约有20个常见种,除大果栽培种凤梨草莓(*F. ananassa* Duch.)外,其余种均为野生状态。野生草莓具有许多优良性状,尤其在抗寒、抗病、固形物含量、芳香性等方面更具独特之处,是改良现代栽培草莓的重要基因资源。国外较早开展了草莓种间杂交育种研究,其中以日本学者野口裕司的工作较为领先,他们用原产于中国的黄毛草莓(2x)与栽培品种丰香(8x)杂交得到五倍体,再加倍成为十倍体,从中选出优系IH1,其产量和果实大小已接近栽培品种,果实粉白色,具浓郁的桃香味^[1]。我国自然分布

有11个种,是世界上野生草莓种类最丰富的国家,而且很多是珍稀类型^[2]。如我们从甘肃收集到的五叶草莓(2x),其果实白色,香味浓,极抗叶部病害,是一稀有的珍贵资源;从黑龙江收集到的东方草莓(4x),其果较大,香味特浓,固形物含量达14.5%,比普通栽培草莓品种高近一倍,抗寒性极强。另外,新近还发现我国分布有不同育性的自然五倍体类型^[3-4]。充分利用我国优异的野生草莓资源,开展种间杂交和回交利用,可拓宽栽培草莓的遗传基础,使栽培草莓品种在抗病性、抗逆性、品质等方面得到改良。

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(30971976), 辽宁省教育厅创新团队项目(2008T176), 国家科技支撑计划项目(2008BAD92B04)
作者简介: 雷家军,男,博士,教授,研究方向:草莓种质资源与遗传育种。
收稿日期: 2009-08-17 修回日期: 2009-09-25

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验在沈阳农业大学草莓园进行。试材包括二倍体野生种森林草莓 (*F. vesca* L.)、黄毛草莓 (*F. nilgerrensis* Schlecht.) 及八倍体栽培品种宝交早生 (Hokowase)、哈尼 (Honeoye)、全明星 (Allstar)。

1.2 试验方法

2001年5月在露地进行宝交早生 (8x) × 森林草莓 (2x)、哈尼 (8x) × 森林草莓 (2x) 和哈尼 (8x) × 黄毛草莓 (2x) 3个组合的杂交,采集杂交种子。2002年3月温室播种,5月定植于露地,8月利用匍匐茎根尖检查杂种实生苗倍性,9月将杂种按单系栽植。2003年田间性状观察,并进一步核实现生苗倍性。2004年5月利用得到的五倍体 WBT1、WBT2、WBT3 与栽培品种哈尼和全明星正反交。2005年3月温室播种回交种子,5月栽植于露地。2006—2008年调查回交后代性状。

1.2.1 种间杂交 选未开放的大花蕾,剥取花药,于硫酸纸盒中阴干散粉。每组合杂交 40~80 朵花,同时对所有母本均去雄 10 朵花套袋作为对照,以观察去雄效果。杂交后 15~20 d 去袋。调查杂交结实率、果实结籽数等。

1.2.2 花粉大小及生活力观察 花粉粒大小采用番红染色测定,五倍体花粉大小分为 3 级: > 30.1 μm 为大; 30.0 μm > 15.1 μm 为中; 15.0 μm 为小。用显微镜随机观察 3 个视野,3 个类型分别测量 30 个花粉粒。花粉生活力测定采用琼脂培养基萌发、碘—碘化钾染色、过氧化物酶 3 种方法^[5]。每种方法设 3 次重复,每次重复观察 150~200 粒花粉,计算有生活力花粉的比例。

1.2.3 根尖染色体数目检测 于田间取匍匐茎苗根尖,用饱和对二氯苯预处理 2 h,卡诺固定 12~24 h,5 mol/L 盐酸解离 5~7 min,卡宝品红染色后压片镜检^[6]。

1.2.4 果实品质测定 可溶性固形物含量用手持测糖仪测定。维生素 C 含量用分光光度计法测定^[7]。

2 结果与分析

2.1 草莓五倍体种间杂种的获得及其性状

对八倍体栽培品种与二倍体野生草莓进行的

杂交后代进行倍性鉴定,3 个杂交组合分别随机鉴定 10 株,各得到 1 株五倍体种间杂种 ($2n = 5x = 35$)。

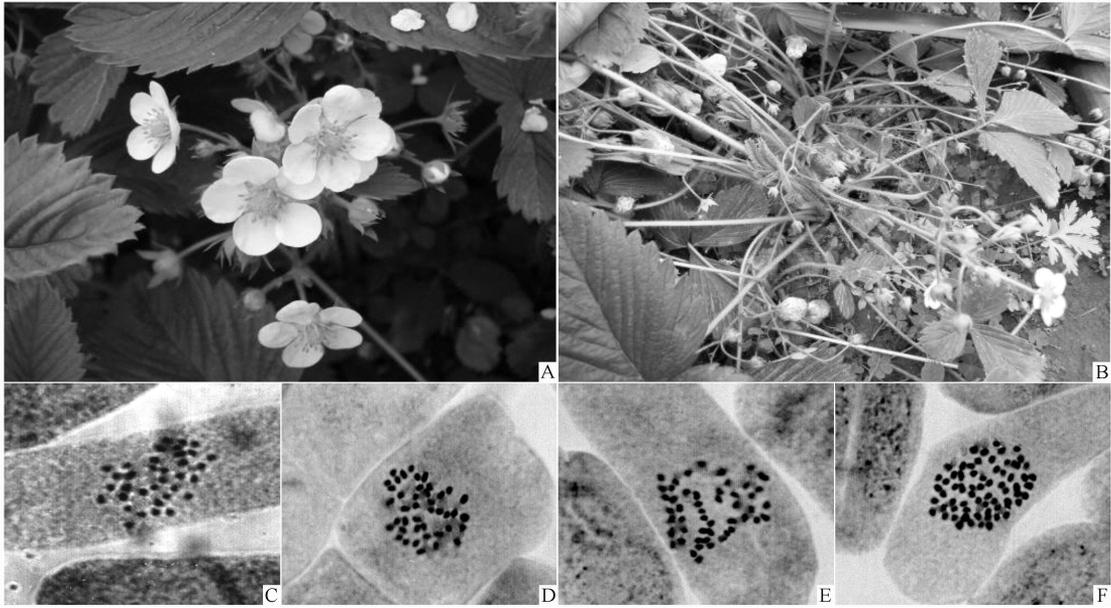
2.1.1 WBT1 来源于宝交早生 (8x) × 森林草莓 (2x)。植株较矮,高约 12.5 cm,半开张,新茎少。中心小叶椭圆形。匍匐茎抽生能力弱,数量少。聚伞花序,花序平于叶面,花序数较少,每花序 6~8 朵花。花较小,雄蕊高于雌蕊,雌蕊较短,育性差,雄蕊发育正常。种子深红色,凸于果面。果实红色,畸形,最大单果重 3.72 g,有香味,汁液少。果实中可溶性固形物 9.0%,维生素 C 47.62 mg/100g。

2.1.2 WBT2 来源于哈尼 (8x) × 森林草莓 (2x)。植株高,约 23.0 cm,健壮,半开张,新茎分枝力弱。中心小叶卵圆形,叶片大,深绿色,通常为 3 片小叶,但有 4 裂片或 5 裂片现象,叶柄粗。匍匐茎抽生能力中等。花序低于植株,花序数较多,每花序常 11~18 朵花,花较小,花药小而饱满,雌蕊较小,育性差。果实红色,畸形,最大单果重 3.63 g,种子大而少,黄绿色,平于果面,分布不均匀,果肉黄白色,有香味,汁液中等。果实中可溶性固形物 9.8%,维生素 C 57.97 mg/100g。

2.1.3 WBT3 来源于哈尼 (8x) × 黄毛草莓 (2x)。株高中等,约 16.0 cm,半开张。中心小叶椭圆形,3 小叶,但常见有 4 裂片或 5 裂片现象。匍匐茎抽生能力弱,数量少。花序平于植株,花序数中等,每花序 9~12 朵花,花药较大。种子小,黄绿色,平于果面。果实红色,畸形,最大单果重 4.15 g,香味浓,汁液中等。果实中可溶性固形物 11.5%,维生素 C 49.24 mg/100 g (图 1-A,B)。

2.2 草莓五倍体种间杂种花粉大小及生活力

由于草莓花粉经番红染液染色后均变为圆形,因此草莓种间杂种及对照的花粉在形状上基本没有区别,但有大小之分,便于调查。由表 1 可看出,五倍体种间杂种的花粉有大花粉、中等花粉、小花粉 3 种类型,大小花粉之间直径约相差 3 倍,其中中等花粉所占比例最大,在 60% 以上。八倍体栽培草莓品种花粉大小一致,只有中等大小花粉。



A、B、C. 分别为五倍体种间杂种 WB T3 花、果实及根尖染色体 ($2n = 5x = 35$) Flower, fruit and chromosome number of root tip cells of the pentaploid interspecific hybrid WB T3 ($2n = 5x = 35$); D、E、F. 分别为五倍体种间杂种回交组合全明星 \times WB T2 后代 3 株实生苗根尖染色体:六倍体 H4-16 ($2n = 6x = 42$)、七倍体 H4-8 ($2n = 7x = 49$)、九倍体 H4-1 ($2n = 9x = 63$) Chromosome number of root tip cells of three seedlings from backcross of Allstar \times WB T2: H4-16 (F, $2n = 6x = 42$)、H4-8 (E, $2n = 7x = 49$)、H4-1 (D, $2n = 9x = 63$)

图 1 草莓五倍体种间杂种开花结果状态及回交后代杂种倍性

Fig. 1. Flowering and fruiting state of the pentaploid interspecific hybrid and the ploidy of off springs from the backcross of WB T2 and cv. Allstar in strawberry

表 1 草莓五倍体种间杂种的花粉大小及比例

Table 1. Pollen size and proportion of pentaploid interspecific hybrids in strawberry

材料 Materials	花粉直径/ μm Diameter of pollens			所占比例/ $\%$ Proportion		
	中等花粉 Middle pollen	大花粉 Big pollen	小花粉 Small pollen	中等花粉 Middle pollen	大花粉 Big pollen	小花粉 Small pollen
WB T1 (5x)	20.40 \pm 2.50	38.25 \pm 0.63	11.33 \pm 0.71	66.7	13.3	20.0
WB T2 (5x)	19.70 \pm 1.49	35.25 \pm 1.26	12.00 \pm 1.00	74.1	18.5	11.1
WB T3 (5x)	20.21 \pm 2.73	35.46 \pm 3.92	11.48 \pm 1.03	62.9	16.1	21.0
全明星 Allstar (8x)	27.50 \pm 1.39			100.0		
哈尼 Honeoye (8x)	26.25 \pm 0.76			100.0		

由表 2 可看出,用琼脂培养基萌发法测定,2 个八倍体栽培品种的花粉生活力略高于 3 个五倍体种间杂种,且 3 个五倍体种间杂种的花粉生活力相差不大;用过氧化物酶法测定,八倍体栽培品种花粉生活力明显高于五倍体种间杂种。采用这 2 种方法测定时花粉生活力数据相当,较为准确。用 I- KI 染色法测定时种间杂种及八倍体栽培品种花粉生活力最高,都在 95% 以上,且差异不大。

表 2 不同方法测定的草莓五倍体种间杂种花粉生活力

Table 2. Pollen viability of pentaploid interspecific hybrids and comparison of measuring methods in strawberry

试材 Materials	萌发法 Germination	碘 - 碘化钾法 I - KI	过氧化物酶法 Peroxidase
WB T1 (5x)	65.5	98.9	66.6
WB T3 (5x)	74.2	98.8	57.9
WB T2 (5x)	73.4	95.4	71.6
全明星 Allstar (8x)	76.1	99.0	93.1
哈尼 Honeoye (8x)	75.7	99.8	93.7

2.3 草莓五倍体种间杂种与栽培品种回交及后代性状

种间杂交所有亲本去雄套袋作为对照,均未得到正常膨大的果实及饱满种子,表明去雄效果良好。从表3可以看出3个五倍体草莓种间杂种与2个八倍体栽培品种回交结实及播种出苗情况,以五倍体作母本全部不结实,以栽培品种做母本情况略好。WBT1作亲本的4个组合,只有哈尼×WBT1获得45粒种子,播种后出苗41株,出

苗率达到91.1%。WBT2作亲本时,哈尼×WBT2的杂交结实率为2.4%,得到5粒种子,平均单果饱满种子仅2.5粒,只得到1株实生苗,移栽到温室中后期死亡;全明星×WBT2杂交结实率5.8%,得到70粒种子,播种出苗20株。WBT3与哈尼正反交均未获得杂交种子;全明星×WBT3组合获得47粒种子,播种出苗25株,而WBT3×全明星只有2个果实略膨大但未获得饱满种子。

表3 草莓五倍体种间杂种回交结实及播种出苗情况

Table 3. Rate of fruit-setting and germination of the backcross of pentaploid interspecific hybrids and cultivars in strawberry

杂交组合 Cross combinations	杂交花朵数 No. of flowers crossed	结实花朵数 No. of flowers fruit-setting	杂交结实率/% Rate of fruit-setting	平均单果 种子数 No. of seeds per fruit	共获种子数 No. of seeds obtained	播种出苗数 No. of seedlings obtained	出苗率/% Rate of germination
哈尼 Honeoye ×WBT1	30	5	16.7	9.0	45	41	91.1
WBT1 ×哈尼 Honeoye	29	0	0				
全明星 Allstar ×WBT1	38	0	0				
WBT1 ×全明星 Allstar	34	0	0				
哈尼 Honeoye ×WBT2	85	2	2.4	2.5	5	1	20.0
WBT2 ×哈尼 Honeoye	104	0	0				
全明星 Allstar ×WBT2	86	5	5.8	14.0	70	20	28.6
WBT2 ×全明星 Allstar	80	7	8.8	27.1	190	0	0
哈尼 Honeoye ×WBT3	42	0	0				
WBT3 ×哈尼 Honeoye	75	0	0				
全明星 Allstar ×WBT3	45	4	8.9	11.8	47	25	53.2
WBT3 ×全明星 Allstar	76	2	2.6				

对哈尼×WBT1后代41株实生苗性状进行观察,在株高、叶形、匍匐茎数量、丛生状况等方面变异很大。随机观察了3株实生苗的倍性,1株为七倍体,2株为九倍体。

对全明星×WBT2组合的20株后代实生苗进行观察,发现变异很大。随机检查了5株实生苗的染色体倍性及突出性状(表4)。所检测的5株中2株为六倍体,2株为七倍体,1株为九倍体(图1-D, E, F)。

对全明星×WBT3后代25株实生苗进行观察,植株平均高度比全明星×WBT2后代稍矮一些,同样在株高、叶形、匍匐茎数量、丛生状况等方面也有较大变异。检查了7株实生苗的染色体数目,其中2株六倍体,3株七倍体,2株九倍体。

回交后代中出现的六倍体、七倍体植株可能来自双亲正常减数配子结合,而九倍体植株则可能来自母本的正常减数配子(4x)与父本的未减数配子(5x)结合(图2)。我们在试验中观察到五倍

体杂种花粉大小变化较大,有大花粉、中等花粉和小花粉存在,父本可能形成2x、3x配子,并可能存在2n花粉(即5x未减数配子)。

表4 全明星×WBT2后代实生苗倍性及植物学性状

Table 4. The ploidy and differential botanical traits of the seedlings from the backcross of the pentaploid interspecific hybrid WBT2 and cv. Allstar in strawberry

实生苗代号 Seedlings	倍性 Ploidy	植物学性状 Differential botanical traits
H4-1	9x	植株高大,长势强旺,叶片大,叶柄粗,匍匐茎多而粗
H4-4	7x	植株高中等,丛生,叶片小,匍匐茎少
H4-5	6x	植株矮小,叶片近圆形,绒毛少,匍匐茎少
H4-8	7x	植株高,长势强旺,叶片黄绿色,匍匐茎红色,纤细
H4-16	6x	植株高中等,叶片椭圆形,锯齿深,匍匐茎中等

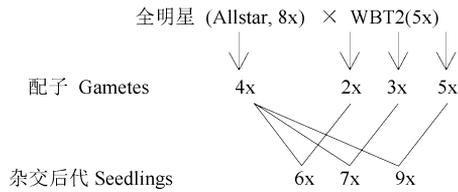


图2 草莓五倍体种间杂种 WBT2 与全明星回交后代不同倍性的可能来源

Fig. 2. Origin of various ploidy seedlings from the cross of the pentaploid interspecific hybrid WBT2 and Allstar

3 讨论

3.1 草莓种间杂交后代倍性变异

对 $2n$ 配子的研究在很多植物上都有报道^[8]。关于草莓未减数配子也有报道,Bringhurst^[9]利用八倍体智利草莓 (*F. chiloensis*, $2n = 56$) 与二倍体森林草莓 (*F. vesca*, $2n = 14$) 杂交得到五倍体、六倍体、九倍体后代,其中六倍体来自智利草莓的正常减数配子 ($4x$) 和森林草莓的未减数配子 ($2x$) 的结合,九倍体可能来自智利草莓的未减数配子 ($8x$) 和森林草莓的正常减数配子 ($1x$) 的结合。时翠平等^[10]报道了在草莓中存在未减数配子,并进行了细胞学研究,结果发现,草莓 $2n$ 花粉的形成主要是由于减数分裂过程中,中期 2 个纺锤体的定向发生改变所致,即由正常的十字形变为平行形和八字形,进而导致二分体和三分体的形成。每个二分体将产生 2 个 $2n$ 花粉,每个三分体将产生 1 个 $2n$ 花粉和 2 个 n 花粉,此外还发现有极少量的 $4n$ 花粉。在本研究中,五倍体种间杂种 WBT1、WBT2、WBT3 作父本与栽培品种杂交都得到了九倍体实生苗,推测可能来自母本的正常减数配子 ($4x$) 与父本的未减数配子 ($5x$) 的结合。五倍体种间杂种可能存在未减数配子,可以作为研究草莓遗传变异的试材。草莓五倍体种间杂种作父本与栽培品种杂交时得到的后代奇数倍性较多,育性较差,可作为杂交育种的中间材料。

3.2 草莓种间杂交及其应用前景

远缘杂交是植物育种中一种极有潜力的手段,通过种间、属间杂交可获得未曾有过的新类型。雷家军^[5,11]认为利用种间杂交并结合染色体加倍技术是将野生资源充分整合到栽培草莓中的有效手段。Kantor^[12]以凤梨草莓与麝香草莓 (*F. moschata*, $2n = 6x = 42$) 杂交获得了具有麝香葡萄

风味的种间杂种“凤梨麝香草莓” (*F. anaschata*)。Trajkovski^[13]利用 $8x$ 的栽培品种与 $4x$ 森林草莓杂交所得的材料与 $8x$ 栽培品种回交,获得了性状接近栽培品种的品系 F9352003,具有森林草莓的风味并抗叶部病害。马鸿翔^[14]以黄毛草莓与凤梨草莓品种春霄和硕香杂交,通过胚拯救获得了五倍体种间杂种,田间抗病性鉴定表明其对叶斑病和炭疽病的抗性与野生亲本表现一致。本试验利用种间杂交获得了 3 个五倍体种间杂种,整合了我国原产的 $2x$ 野生种黄毛草莓和森林草莓的基因,利用五倍体种间杂种与栽培品种进行了回交,得到了 $6x$ 、 $7x$ 、 $9x$ 等不同倍性的后代材料,可以进一步杂交利用,并推测了五倍体种间杂种可以产生 $2n$ 配子。这些新倍性材料的获得为培育 $8x$ 及 $10x$ 、 $12x$ 等高倍体草莓新品种、新类型带来希望,对改良现代栽培草莓的品质、抗性等有较大意义。

参考文献:

- [1] Noguchi Y, Mochizuki T, Sone K. Interspecific hybrids originated from crossing Asian wild strawberry (*F. nilgerrensis* and *F. iinur-mae*) to *F. × ananassa* [J]. HortScience, 1997, 32: 439.
- [2] 雷家军, 代汉萍, 谭昌华, 等. 中国草莓属 (*Fragaria*) 植物的分类研究 [J]. 园艺学报, 2006, 33 (1): 1-5.
- [3] Lei Jiajun, Li Yuhua, Du Guodong, et al. A natural pentaploid strawberry genotype from the Changbai Mountains in Northeast China [J]. HortScience, 2005, 8: 1194-1195.
- [4] 邓明琴, 雷家军. 中国果树志 草莓卷 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2005, 85-96.
- [5] 胡晋. 花粉的保存和生活力测定 [J]. 种子, 1992 (6): 33-36.
- [6] 雷家军, 代汉萍, 邓明琴, 等. 草莓染色体加倍研究 [J]. 园艺学报, 1999, 26 (1): 13-18.
- [7] 张宪政, 陈凤玉, 王荣富. 植物生理学实验技术 [M]. 沈阳: 辽宁科学出版社, 1994, 267-271.
- [8] 张新忠, 闫立英, 刘国俭, 等. $2n$ 配子在植物育种和种质创新中利用的研究进展 [J]. 华北农学报, 2003, 18: 30-35.
- [9] Bringhurst R S, Gill T. Unreduced and doubled-unreduced gametes [J]. Amer J Botany, 1970, 57 (8): 969-976.
- [10] 时翠平, 葛会波, 张成合, 等. 草莓未减数配子形成的细胞学研究 [J]. 中国农业科学, 2002, 35 (10): 1260-1263.
- [11] 雷家军, 代汉萍, 邓明琴, 等. 草莓种间杂交的研究 [J]. 园艺学报, 2002, 29 (6): 519-523.
- [12] Kantor T S. Results of breeding and genetical work on the production of economically useful varieties from incongruent crosses of *F. ananassa* Duch. × *F. moschata* Duch. [J]. Genetika, 1983, 19: 2050-2059.
- [13] Trajkovski K. Further work on species hybridization in *Fragaria* at Balsgard [J]. Acta Hort, 1997, 439: 67-73.
- [14] 马鸿翔, 陈佩度. 黄毛草莓与凤梨草莓种间杂种的获得及其细胞遗传学分析 [J]. 中国农业科学, 2004, 37 (12): 1966-1970.