

凤梨草莓与绿色草莓种间杂种一代的 形态学观察及SSR分析

史芳芳^{1,2}, 汪泉², 赵密珍^{1*}, 王静¹, 关玲¹

(¹江苏省农业科学院园艺研究所, 南京 210014; ²新疆生产建设兵团十二师农科所, 乌鲁木齐 830088)

摘要:【目的】利用形态学特征与分子标记分析相结合的方法,有效地对绿色草莓与凤梨草莓杂交后代进行种间杂种真实性鉴定和遗传多样性分析。【方法】以八倍体栽培草莓品种‘宁玉’为母本、二倍体野生绿色草莓为父本进行种间杂交,获得了30个F₁代株系,从40对SSR标记引物中筛选出父母本有差异条带的引物进行后代杂种真实性鉴定。采用UPGAM聚类法进行亲本与子代的聚类分析,结合形态学特征比较,评价子代遗传特征。【结果】对父母本、F₁代主要形态学特征的调查分析结果表明,F₁代所有植株的长势强于父本,偏母本;对数量性状中亲优势值的数据统计结果表明,后代具有一定的杂种优势。用筛选出的20对引物鉴别父母本,二者有差异,利用其进行后代分析,其中12对引物鉴定出30个后代均具有父本扩增片段,结果表明,30个杂交后代均为绿色草莓与栽培草莓的真杂种。同时,从杂种扩增的谱带来看,某些后代出现了变异,主要表现为新谱带的出现或某些谱带的消失。进一步对亲本与子代之间遗传关系进行分析,结合形态学特征与UPGMA聚类分析结果,可将子代分为3个大类。【结论】通过形态学与SSR标记技术鉴定出所有杂交后代均为种间真杂种,聚类分析表明了后代具有遗传多样性,筛选出的12对SSR引物为二倍体野生绿色草莓资源杂交后代鉴定与遗传多样性分析提供了丰富的筛选标记。

关键词: 绿色草莓; 凤梨草莓; SSR标记; 形态性状; 杂种鉴定

中图分类号: S668.4

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2017)02-0175-11

Identification of interspecific hybrids derived from *Fragaria × ananassa* × *F. viridis* by morphological features and SSR markers

SHI Fangfang^{1,2}, WANG Quan², ZHAO Mizhen^{1*}, WANG Jing¹, GUAN Ling¹

(¹Institute of Horticulture, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu, China; ²The Center of Popularization of Agricultural Technology of the 12th Division of Xinjiang Production and Construction Corps, Urumqi 830088, Xinjiang, China)

Abstract: 【Objective】To identify the interspecific hybrids derived from *Fragaria × ananassa* Duch. × *F. viridis* Duch. and to analyze the genetic relationships between these hybrids and their parents by using the morphological characteristics and SSR markers. 【Methods】Thirty F₁ progenies were obtained from an interspecific cross of ‘Ningyu’ (*Fragaria × ananassa*) × *Fragaria viridis*. According to descriptors and data standard for strawberry (*Fragaria* spp.), the main botanical characteristics including the plant traits, leaf traits, floral traits and stolon traits were investigated of the F₁ progenies and their parents. The genomic DNAs of leaves were extracted by rapid genomic DNA extraction Reagent kit of BioTeke Corporation, and the quality and concentration of genomic DNA were detected by 1% agarose gel electrophoresis. In this study, 40 pairs of SSR primers were randomly selected. The PCR reaction cycling profile was 94 °C for 4 min followed by 35 cycles at 94 °C for 30 s, 55 °C for 45 s, 72 °C for 60 s, and a final extension at 72 °C for

收稿日期: 2016-06-22 接受日期: 2016-10-04

基金项目: 农业部物种资源保护项目(2015NWB007); 兵团重点领域创新团队计划(2016BD006)

作者简介: 史芳芳, 助理研究员, 研究方向为植物生物技术。Tel: 18099666919, E-mail: 451784039@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. E-mail: njzhaomz@163.com

5 min. PCR amplifications were conducted in a final volume of 25 μL containing 50 ng template DNA, PCR buffer mix, 0.4 μL DNA *Taq* polymerase and 0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of each primer. The genetic diversity analysis was performed on a 6% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis for strip analysis. Gels were stained with silver staining. The polymorphisms of the materials of the parents were analyzed by the 40 pairs of SSR primers. The discrepant primers were selected to identify the hybrids of the offspring. The clear specific bands possessing genes of male parent were used to identify the hybrids. The matrix was obtained by the statistical data on the amplification chart, which was analyzed by using the ntsys-pc software. The similarity data were analyzed by the Dice coefficient and UPGMA cluster. 【Results】 The vigor of F_1 generation was stronger than that of the male parent, but similar to the female parent according to the investigation and analysis of the main morphological characteristics of parents and F_1 generation. The offsprings had some heterosis based on the caculation of the mid-parent heterosis of the quantitative traits. The 20 pairs of primers selected could distinguish the parents, of which 12 pairs of primers were used to identify the hybrids in the 30 progenies. The results showed that the offsprings possessed the same fragment as their male parent. All the F_1 individuals were the interspecific hybrids between the *Fragaria* \times *ananassa* \times *Fragaria viridis*. At the same time, some offsprings showed variation for the appearance of new bands or the disappearance of some bands. The genetic relationship between the parents and the offsprings was further analyzed. According to the results of morphology and UPGMA cluster analysis, the offsprings could be divided into three groups. The first group (group I) contained 5 materials including the female parent ‘Ningyu’. The second group (Group II) consisted of 7 materials including the male parent *Fragaria viridis*. The remaining 20 offsprings belonged to the third group, accounting for 2/3 of the proportion of offspring. 【Conclusion】 This study confirmed that the individuals of hybrid progeny of the cultivated strawberry and the wild strawberry were true hybrids by morphological features and SSR analysis. 12 pairs of SSR primers could be effectively used for identifying the hybrids derived from (*Fragaria* \times *ananassa* Duch.) \times *Fragaria viridis*. The primers EMFvi109, EMFvi108, EMFvi025, EMFvi072, EMFvi146, EMFvi133, EMFvi092 and other ones could be used as important primers in the study of the classification of wild strawberry and cultivated strawberry. The analysis of the morphological characteristics showed that the descendants had some heterosis. Six of the offspring were gathered together with *Fragaria viridis* by the cluster analysis.

Key words: *Fragaria viridis* Duch.; *F.* \times *ananassa* Duch.; SSR molecular marker; Morphological characteristics; Hybrid identification

草莓属 (*Fragaria*) 种质资源丰富, 已知有约 24 个野生种^[1], 在世界各地广泛栽培的主要是八倍体种凤梨草莓 (*F.* \times *ananassa* Duch.)^[2], 系谱和遗传多样性分析表明, 种内品种间杂交致使栽培品种遗传背景狭窄^[3], 抗病性和抗逆性减弱。野生草莓资源不仅对不良环境具有较好的生态适应性, 还蕴藏着丰富的抗性基因^[4-5], 尤其在提高栽培品种抗逆性、抗病性、芳香性、固形物含量等方面有较大潜力。野生草莓资源的利用是草莓新品种改良的潜力所在^[6], 是栽培品种改良非常重要的遗传资源。目前, 国外很多

学者通过草莓种间杂交得到了具有潜在利用价值的种间杂交后代材料^[7-8]。我国有 11 个草莓野生种的自然分布^[9], 但对野生草莓的杂交利用研究仅见少量报道^[10-12]。绿色草莓 (*F. viridis* Duch., $2n=2x=14$) 为二倍体野生资源, 广泛分布于欧洲、亚洲东部 (高加索) 和中部 (西伯利亚)^[13-16], 绿色草莓在我国仅分布于新疆^[17]。沈阳农业大学 1988 年从新疆天山收集到的新疆 1 号野生草莓最初被认为是森林草莓的一个类型, 但多年观察后发现 2 者许多性状明显不同。通过从欧洲引入绿色草莓后, 判定其为绿色草莓。

国内对于绿色草莓的研究报道极少,葛春峰等^[18]利用单一的形态学鉴定方法对绿色草莓的自交后代进行了性状观察及评价。绿色草莓的利用是拓宽栽培植物品种遗传背景的重要途径之一,通过种间杂交获得杂交后代可以将野生绿色草莓种质资源中存在的优良性状基因向栽培品种转移,从而进一步培育出符合生产要求的新品种。

研究种间杂种后代的遗传基础,对评价种间杂种后代真实性及其进一步研究利用具有重要意义。草莓属种间远缘杂交已有不少研究,但在杂交后代的检测上除表型外,仍较多地依赖于体细胞染色体数来确定杂交后代的可靠性^[19]。由于草莓属植物品种数量繁多,种间形态差异较小,传统的研究方法不能全面地对草莓属植物种间的亲缘关系做出更为准确分析,而分子标记的开发则为该方面的研究提供了一种全新的手段。迄今为止,尽管已有少量关于草莓分子标记进行野生草莓与栽培草莓杂种鉴定的研究报道^[19-20],但有的只是采用分辨率较低的琼脂糖凝胶电泳对结果做了分析^[12,19],导致多态性比率降低,不能完整准确地反映后代遗传特性,也没有对标记进行聚类分析,而对绿色草莓与栽培草莓杂交后代进行鉴定的报道更少^[21]。因此,筛选出适合的分子标记引物,对于野生绿色草莓与栽培种草莓杂交后代的杂种鉴定、亲缘关系分析以及草莓品种的改良具有重要意义。

笔者以栽培草莓‘宁玉’与绿色草莓的30个杂

交后代为试材,选择了20对多态性较好的凤梨草莓SSR标记引物和20对绿色草莓特异SSR标记引物同时对后代进行遗传差异分析,旨在获得栽培种凤梨草莓与绿色草莓杂交后代SSR标记引物,从而证实种间杂种后代的可靠性。同时,从DNA分子水平上探讨绿色草莓与凤梨草莓种间杂种的遗传基础,一方面通过杂交后代中亲本特征带型的分析,可进一步验证种间杂种的真实性;另一方面,利用遗传图谱结合形态学特征可对远缘杂交草莓属植物品种进行遗传多样性分析,从而更好地在草莓遗传资源与育种研究中加以利用。

1 材料和方法

1.1 材料

绿色草莓(*F. viridis* Duch.)、栽培草莓(*F. × ananassa* Duch.)品种‘宁玉’均取自江苏省农业科学院园艺研究所国家草莓种质资源圃。2012年春,在江苏省农科院园艺所草莓试验园内,将绿色草莓、草莓栽培品种‘宁玉’进行常规杂交。绿色草莓为母本时,杂交22朵花,未获得杂交果实;‘宁玉’为母本时,杂交20朵花,得到88粒杂交种子,经催芽后播种培育30株实生苗,后扩繁为株系。

1.2 形态学鉴定

按《草莓种质资源描述规范和数据标准》中的方法^[22],对亲本和F₁代株系各选取3株进行植株姿态、叶、花、匍匐茎等主要形态特征的调查测定(表1)。

表1 调查性状

Table 1 Character survey

	植株姿态 Plant posture	叶 Leaf	花 Flower	匍匐茎 Stolon
性状 Character	株高、株态 Height of plant, plant posture	叶形、叶柄茸毛、叶柄长、叶长、叶宽 Leaf shape, petiole hair, length of petiole, length of leaf and width of leaf	花梗茸毛、花序高低、花冠径、雄蕊 位置、花粉活力 Lodicel hair, position of inflorescence relative to foliage, flower size, position of stamen and pollen vitality	匍匐茎抽生习性、颜色、茸毛 Branch habit of stolon, stolon color and stolon hair

1.3 SSR鉴定

1.3.1 基因组DNA提取 以草莓父母本及后代叶片为材料,采用百泰克新型快速植物基因组DNA提取试剂盒提取基因组DNA,并采用1%(ω,下同)琼脂糖凝胶电泳检测基因组DNA的质量,电泳结束后,在自动凝胶图像分析仪上观测并拍照,并通过核酸测定仪检测DNA浓度。最后将样品DNA质量浓度稀释到50 mg·L⁻¹,于-20℃保存。

1.3.2 SSR引物选择 选取40对草莓SSR引物,其中20对引物是多态性较好的凤梨草莓SSR引物,引物序列参考已发表的文献^[23-28];另外20对引物则选择绿色草莓SSR引物,序列参考www.rosaceae.org/species/fragaria/fragaria-vesca网站上发布的引物序列,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3.3 PCR扩增 采用25 μL PCR扩增反应体系,

其中包括 1 μL (约 50 ng) 模板 DNA、12.5 μL PCR buffer mix (含 Mg^{2+})、0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物(上、下引物各 1 μL)、*Taq* DNA 聚合酶 0.4 μL 、 ddH_2O 9.1 μL 。

PCR 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。扩增产物首先用 1% 琼脂糖凝胶电泳验证引物的正确性, 再用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行条带分析, 电泳结束后银染检测。

1.3.4 SSR 引物筛选 利用 40 对 SSR 引物对父母本材料进行多态性差异分析并筛选, 从中选取扩增条带有差异的引物对, 用于后代杂种鉴定。

1.3.5 杂交后代真实性鉴定 根据筛选出的多态性高、父母本间有特异条带的引物对杂交后代进行真实性鉴定。后代扩增结果中具有父本特异性带的即为真杂种, 而只具有母本特异性带无父本特征带的后代为假杂种或自交种。

1.3.6 扩增数据处理 对扩增图谱进行数据统计, 根据条带的有无统计所有二元数据, 有带计为 1, 无带计为 0, 获得矩阵, 将矩阵用 NTSYS-PC 软件进行数据分析, 相似性数据采用 Dice 系数, 选用 UPGMA 法进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 形态学鉴定

在形态学鉴定中, 对父母本及子代的 15 个形态特征进行了调查, 结果表明, F_1 代的株高多数介于双亲之间, 但与野生父本绿色草莓相比明显偏高; 株态多数与母本‘宁玉’一致(介于直立与开张之间); 叶形大部分趋向于父本野生种; 叶柄茸毛部分与父本一致(直立), 部分与母本一致(斜生), 各占一半; 叶柄长、叶片长及叶片宽大部分倾向于母本; 花絮高低与母本一致, 均低于叶面; 花冠径介于父母本之间; 父母本花粉活力超过 90%, 后代花粉活力仅为 20% 左右, 活力极低; 雄蕊高低大部分与母本一致, 低于雌蕊, 小部分高于雌蕊(与父本一致)或平于雌蕊; 匍匐茎茸毛、花梗茸毛存在直立、斜生和紧贴 3 种状态, 部分与父本绿色草莓一致(斜生), 部分与母本‘宁玉’一致(紧贴), 还有一部分后代茸毛直立, 与父母本完全不同; 匍匐茎颜色偏向于父本绿色草莓, 30 个株系中有 28 个匍匐茎颜色偏红色, 与父本一致, 其余 2 个显绿色, 同母本‘宁玉’一致; 30 个株系大部分匍匐茎抽生习性与

母本‘宁玉’一致(奇数节不形成苗和匍匐茎), 仅有 4 个株系抽生习性与父母本不同, 即奇数节不形成苗但抽生匍匐茎。但总体来说, F_1 代形态特征介于父母本之间。 F_1 代所有植株的长势强于父本, 偏母本, 株高、叶柄长、叶片长、叶片宽等性状的中亲优势值为 4.5%~17.3%, 具有一定的杂种优势(表 2)。鉴于形态特征的明显差异, 特别针对花粉活力、花特性、叶形和茸毛 4 个形态学特征进行了拍照, 具体差异见图 1、图 2。

表 2 杂交 F_1 代的杂种优势表现

Table 2 Heterosis performance of hybrid F_1 generation

项目 Item	株高 Plant height/cm	叶柄长 Length of petiole/cm	叶片长 Length of leaf/cm	叶片宽 Width of leaf/cm
母本 Female parent	8.70	5.80	5.90	5.30
父本 Male parent	4.60	4.90	3.80	2.80
F_1 均值 Average value of F_1 progenies	7.80	5.59	5.34	4.36
中亲值 Average value of parent	6.65	5.35	4.85	4.05
中亲优势 Mid parent heterosis	17.30	4.50	10.10	7.70

注: 中亲优势 = $(F_1 \text{ 均值} - \text{中亲值}) / \text{中亲值} \times 100$ 。

Note: Mid-parent heterosis = $[(\text{Average value of progenies} - \text{Average value of parents}) / \text{Average value of parents}] \times 100$.

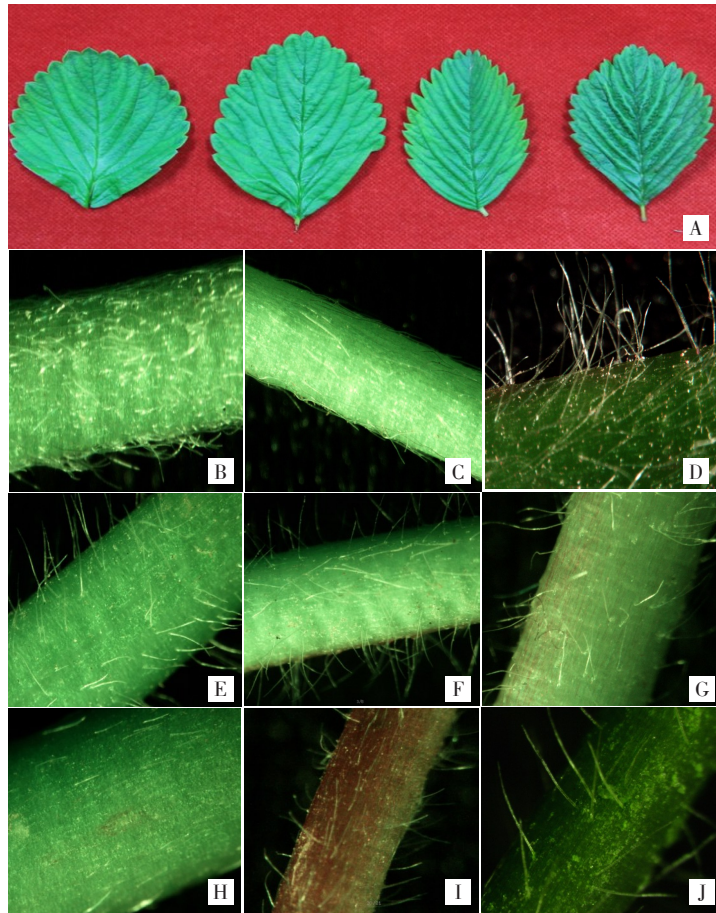
2.2 基因组 DNA 的检测及引物的验证

通过琼脂糖凝胶电泳和核酸测定仪对父母亲本及 30 份杂交后代的 DNA 质量和质量浓度进行检测, 结果表明, 供试材料 DNA 质量和质量浓度较高, DNA 质量浓度为 $250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 按 5 倍稀释为工作浓度 ($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。通过琼脂糖凝胶电泳对合成引物进行验证, 结果表明, 40 对引物均能较好的扩增出父母本特异条带, 说明引物选取合理(图 3)。

2.3 SSR 引物筛选

通过 40 对引物对父母本进行 SSR-PCR 扩增的结果分析, 用筛选出父母本具有差异条带的 20 对引物进行遗传多样性分析, 对父母本条带大小相同的扩增位置不做后代分析, 20 对引物中有 12 对引物(表 3)是父本特异引物, 编号是 P4、P5、P6、P7、P8、P10、P11、P19、P26、P34、P35、P39, 利用这些引物对 30 个后代进行鉴定。

后代扩增结果有 3 种带型: (1) 叠加型, 如后代

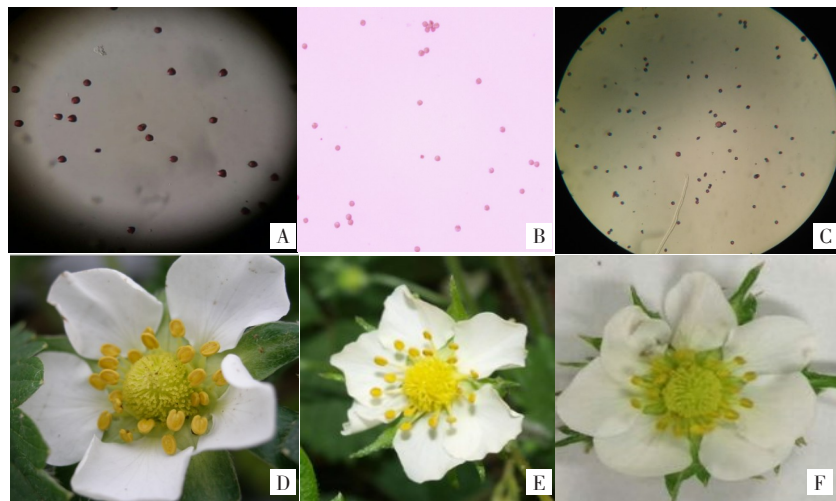


A. 叶形(从左至右): 宁玉、后代株系 26、绿色草莓、后代株系 4; B~D. 绿色草莓、宁玉、后代株系 34 的花梗茸毛; E~G. 宁玉、绿色草莓、后代株系 14 的叶柄茸毛; H~J. 宁玉、绿色草莓、后代株系 27 的匍匐茎茸毛。

A. Leaf shape (from left to right): Ningyu, offspring 26, *Fragaria viridis* Duch., offspring 4; B~D. Pedicel hair of *Fragaria viridis* Duch., Ningyu, offspring 34; E~G. Petiole hair of Ningyu, *Fragaria viridis* Duch., offspring 14; H~J. Stolon hair of Ningyu, *Fragaria viridis* Duch., offspring 27.

图 1 亲本及部分后代叶形和茸毛特征

Fig. 1 Feature map of leaf shape and hair of parents and a part of offsprings

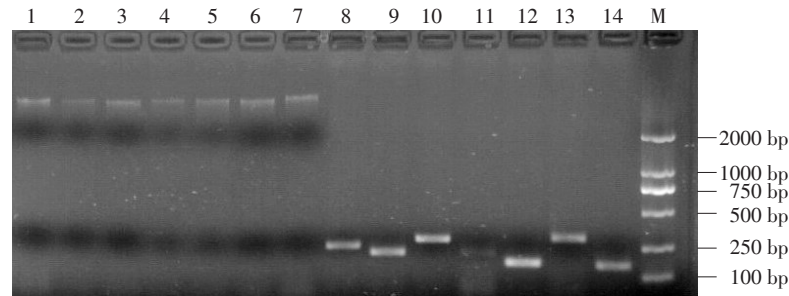


A~C. 宁玉、绿色草莓、后代 1 花粉染色活力鉴定; D~F. 宁玉、绿色草莓、后代 3 花特征。

A~C. Pollen vitality of Ningyu, *Fragaria viridis* Duch., offspring 1; D~F. Flower feature of Ningyu, *Fragaria viridis* Duch., offspring 3.

图 2 亲本及部分后代花粉活力及花特性

Fig. 2 Pollen vitality and feature of flower of parents and a part of offsprings



M: D2000 marker; 1~7. 基因组 DNA; 8~14. 引物验证条带。

M: D2000 marker; 1~7. Genomic DNA; 8~14. Verification strip of primer.

图3 部分材料基因组 DNA 及合成引物电泳检测

Fig. 3 Electrophoresis analysis of partial genomic DNA and synthetic primer

表3 12对鉴定杂种后代 SSR 引物序列

Table 3 The SSR primers of 12 pairs for identification of hybrid progeny

引物编号 Primer code	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
P4	EMFvi109.Forward EMFvi109.Reverse	CTGCAACTTGTTTCCCGTTATT AATTGCAGCAGTAGCAGCAG
P5	EMFvi018.Forward EMFvi018.Reverse	CAAACATGGAAGGAAAAGAAGG GTCAGAGAGACCCATCTGAACC
P6	EMFvi108.Forward EMFvi108.Reverse	GGACCCAAAACATTGAATAAAA GAAGAGGGGAGGAGCAATAAAT
P7	EMFvi025F EMFvi025R	TTGTGATCTCGTAGAAGGAGCA GGGTTCCGTGAACTAAACTTG
P8	EMFvi146F EMFvi146R	ACGAAAAACAGCATACACATCG TACCGCCCTTAAAGTTTGAGTA
P10	EMFvi072F EMFvi072R	AGGTCTTCAATCACACTCCGAT TATTTCCACACTCCGAAACAT
P11	EMFvi133F EMFvi133R	ATGCAGCTCAGAGAAAGGTTAG AGTTGGGAAGAGGGAAGAAAAG
P19	EMFvi092 F EMFvi092R	ACAGAGGGAATGAGATTCAAGA GACTGATGTCTCAATCTGTGGC
P26	UFFa04G04F UFFa04G04R	ACGAGGCCTTGTCTTTTGTA GCTCCAGCTTTATTGTCTTGT
P34	PBCESSRFXA10F PBCESSRFXA10R	GGAGCAAGGAAGCAAGGT CCGTGGGAGAAGTTGAAG
P35	FAC-001F FAC-001R	AAATCCTGTTCTGCCAGTG TGGTGACGTATTGGGTGATG
P39	SF-1B07F SF-1B07R	GGAGAGACAGACCTCAAAGGTG GAGGGTTCTGTTTTGACAAG

5、7、8、13、17、19、20~32 在引物 P5 (243~269 bp) 中表现为在 250 bp 附近具有父母本 2 者叠加或部分叠加到一起的条带; (2) 缺失型, 如后代 1、3~6、9、12、14~20、22、25、27、31、33 在引物 P4 (255~331 bp) 中表现为缺失母本 3 条特征带中的一条; (3) 新带型, 如后代 2、13 在引物 P5 (243~269 bp) 中的表现为出现父母本特征条带之外的带型, 在大于母本特征带之处, 具有一条新带。

2.4 杂种鉴定

利用 12 对引物对 30 个后代进行鉴定, 结果表明, 不同的后代在相同的引物扩增条件下谱带不一致, 扩增条带中会出现条带缺失或新条带的情况。为了更准确地判断杂交后代的杂种真实性, 并没有采用排除法鉴定后代, 而是将 30 个后代用 12 对引物同时鉴定, 使鉴定结果更具可靠性。结果表明, 30 个后代均为真杂种, 其鉴定结果见表 4 和表 5, 部分杂种后代扩增片段及带型分析见图 4 和图 5。

从表 4 可以看出, 每种引物至少可以鉴定出 11 个以上杂交后代的杂种真实性, 引物对杂种鉴定率为 36.7%; 表 5 说明每个后代被 2 对以上引物鉴定为真杂种, 其中, 后代 7 和 8 被全部 12 对引物鉴定为杂种, 这些结果充分验证了每个后代的杂种真实性, 表明了后代通过杂交具有父本特征, 父本的某种特性在后代得到了遗传。

表4 12对 SSR 引物鉴定杂种

Table 4 The SSR primers of 12 pairs for identifying hybrid

引物编号 Primer code	鉴定杂种后代(含父本特异带) Identification of hybrid progeny (Contains specific bands of male parent)
P4	2,7,8,10,13,21,23,24,26,28,29,30,32
P5	5,7,8,13,17,19,20~32
P6	1,2,5,7,8,10,14,15,17,19,21~28,30,32
P7	7,8,10,20,23,24,26,28,29,30,32
P8	5,7,8,17,19,20,24~28,31,32
P10	2~8,12,13,17,19,20~24,28,29,30,32,33
P11	2,5,7,8,10,13,17,19,20,21,24~32
P19	2,5,7,8,10,13,17,19,20~32
P26	1~33
P34	2,5,7,8,10,13,17,19,20,21,23~32
P35	1~21,23,25,27,29~33
P39	2,5,7,8,10,13,17,19,20,21,23~32

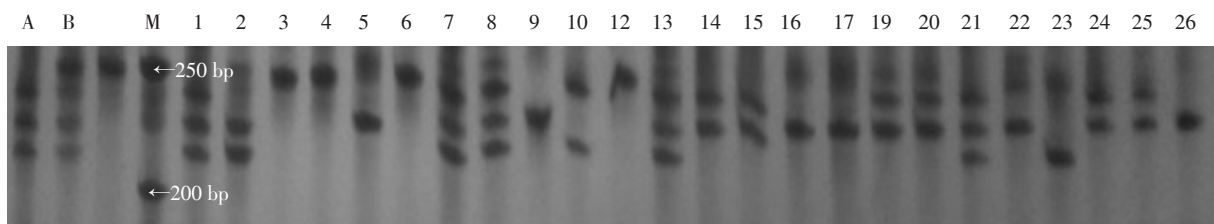
表5 30个后代杂种鉴定引物
Table 5 The hybrid identification primers of 30 progeny

杂交后代 Hybrid progeny	杂种鉴定引物 Hybrid identification primer	杂交后代 Hybrid progeny	杂种鉴定引物 Hybrid identification primer	杂交后代 Hybrid progeny	杂种鉴定引物 Hybrid identification primer
1	P6,P26,P35	12	P10,P26,P35	24	P4, P5, P6, P7, P8, P10, P11, P19, P26, P34, P39
2	P4, P6, P10, P11, P19, P26, P34, P35, P39	13	P4, P5, P10, P11, P19, P26, P34, P35, P39	25	P5, P6, P8, P11, P19, P26, P34, P35, P39
3	P10, P26, P35	14	P6, P26, P35	26	P4, P5, P6, P7, P8, P11, P19, P26, P34, P39
4	P10, P26, P35	15	P6, P26, P35	27	P5, P6, P8, P11, P19, P26, P34, P35, P39
5	P5, P6, P8, P10, P11, P19, P26, P34, P35, P39	17	P5, P6, P8, P10, P11, P19, P26, P34, P35, P39	28	P4, P5, P6, P8, P10, P11, P19, P26, P34, P39
6	P10, P26, P35	19	P5, P6, P8, P10, P11, P19, P26, P34, P35, P39	29	P4, P5, P7, P10, P11, P19, P26, P34, P35, P39
7	全部引物 All primers	20	P5, P7, P8, P10, P11, P19, P26, P34, P35, P39	30	P4, P5, P6, P7, P10, P11, P19, P26, P34, P35, P39
8	全部引物 All primers	21	P4, P5, P6, P10, P11, P19, P26, P34, P35, P39	31	P5, P8, P11, P19, P26, P34, P35, P39
9	P26, P35	22	P5, P6, P10, P19, P26	32	P4, P5, P6, P7, P8, P10, P11, P19, P26, P34, P35, P39
10	P4, P6, P7, P11, P19, P26, P34, P35, P39	23	P4, P5, P6, P7, P10, P19, P26, P34, P35, P39	33	P10, P26, P35



M. 50 bp marker; A. 宁玉; B. 绿色草莓; 1~19. 后代; 1, 2 为叠加带型。
M. 50 bp marker; A. Ningyu; B. *Fragaria viridis* Duch.; 1-19. Offspring; 1, 2 showed superposition.

图4 P6引物在‘宁玉’(母本)、绿色草莓(父本)及部分后代的SSR扩增
Fig. 4 The SSR amplification of ‘Ningyu’ (female parent), *Fragaria viridis* Duch. (male parent) and the part offsprings by the P6 primer



M. Marker; A. 宁玉; B. 绿色草莓; 2,3,4,5,6,7,8,9,10,12,13,14,15,16,17,19,21,22,23,24,25,26 为缺失带型。
M. Marker; A. Ningyu; B. *Fragaria viridis* Duch.; 2,3,4,5,6,9,10,12,13,14,15,16,17,19,21,22,23,24,25,26 showed missing bands.

图5 P10引物扩增父母本及部分后代
Fig. 5 The SSR amplification of female parent, male parent and the part offsprings by the P10 primer

2.5 聚类分析

根据 20 对 SSR 引物对 30 个后代的检测结果, 计算样品间的 (Dice) 遗传相似系数, 并进行聚类分析。从树状图 (图 6) 上发现, 可将 32 份材料分为 3 大类, 第一类群 (I 组) 包括 5 份供试材料, 其中母本 ‘宁玉’ 在该类群; 第 2 类群 (II 组) 包括 20 份供试材料, 占后代比例的 2/3, 表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; 其余 7 份

后代属于第 3 类群 (III), 其中父本绿色草莓在该类群中。

结果表明, 父本绿色草莓与母本 ‘宁玉’ 的相似系数为 0.245 614, 说明亲缘关系较远。经形态学鉴定, 后代 3、4、6、9、12、33 与绿色草莓的叶形、株态、叶脉、花序高低等形态特征相似 (图 7), 这与聚类分析结果基本一致, 进一步说明这 6 个后代与父本绿色草莓遗传特征较近。

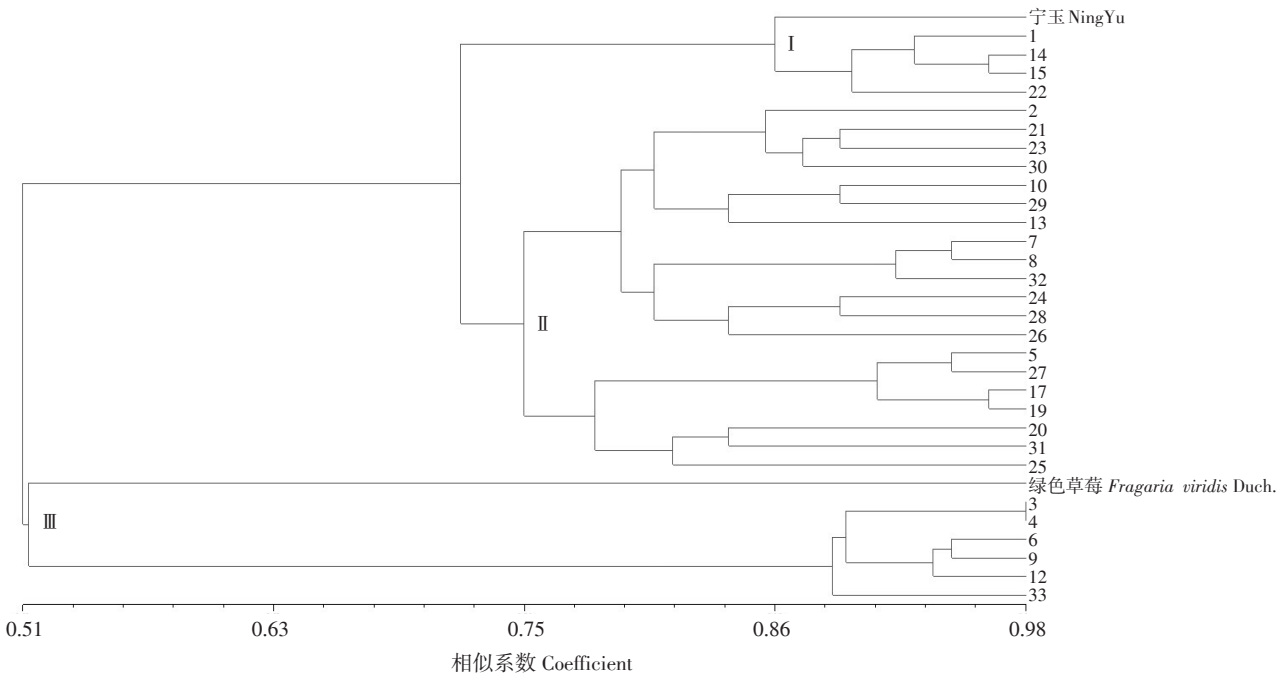


图 6 基于 SSR 标记的聚类分析

Fig. 6 Clustering analysis based on SSR markers



A. 宁玉; B. 绿色草莓; 3,4,6,9,12,33. 子代。

A. Ningyu; B. *Fragaria viridis* Duch.; 3,4,6,9,12,33. Progeny.

图 7 父母本与部分子代 (聚类在一起) 植株姿态

Fig. 7 Plant posture of male parent, female parent and partial progeny (clustering together)

3 讨论

3.1 SSR技术鉴定远缘杂种

目前,用于植物杂交后代的鉴定方法主要有形态学及分子标记等。形态性状是最直接、最基础的鉴定方法^[29]。草莓属的杂交后代从外部性状上来鉴别主要包括株高、株态、叶形、叶柄茸毛、花梗茸毛、匍匐茎抽生习性、匍匐茎颜色等,通过这些外部性状的调查和测量,可以初步将草莓种间杂交后代从形态学上进行鉴定。但形态特征容易受环境条件的影响,不能真实、准确地反应其后代的遗传变异。本研究利用SSR技术能准确地检测杂种后代与父母本的遗传关系,可以在分子水平上精确反映杂种与父母本遗传物质传递及变异的情况,在遗传育种研究领域上发挥了重要的作用。SSR技术在草莓种质资源亲缘关系分析中应用较多^[23-28,30],在草莓种间杂交方面应用较多的为RAPD技术^[19,31]。SSR技术被应用到其他植物杂交后代的鉴定,如朱骏驰等^[32]以葡萄‘玫瑰香’×‘红地球’杂交组合后代株系为材料,采用SSR分子标记对杂交后代单株进行杂种真实性鉴定,筛选出在双亲间有特异位点的SSR引物,对210株杂交后代进行了鉴定,结果表明,210株杂交后代中有183个单株具有父本和母本的特异性条带,并结合田间形态学分析,确定为真实性杂种。近几年鲜见运用SSR技术鉴定草莓远缘杂交遗传关系的研究,而且对绿色草莓与凤梨草莓杂交鉴定方面的报道至今未见。因此,本研究对绿色草莓遗传变异及改良栽培草莓品质、抗逆性、抗病性等方面的研究有较大价值^[33]。

笔者利用SSR技术在绿色草莓与凤梨草莓杂交后代中检测到了来源于绿色草莓与凤梨草莓的特异性扩增片段,从DNA分子水平上证实了种间杂种后代与母本凤梨草莓栽培种或野生父本绿色草莓之间的遗传关系。同时,通过形态学特征鉴定,30个后代株系在形态性状上存在着一定差异,部分与父本或母本表现亲近,部分表现为双亲中间状态,数量性状的数据分析结果表明后代具有杂种优势。

在形态学基础上,利用SSR技术研究种间杂交后代株系与父母本的遗传关系,结果表明30个后代具有父本的特征条带而被鉴定为真杂种。同时,从杂交后代扩增到的条带看,后代谱带有的出现双亲之和,即出现父本和母本条带的叠加或部分叠加,称

之为叠加型;有的出现母本特异条带消失或部分消失,称之为消失型;也会出现新带型,即后代出现父母本都不具有的条带^[34]。这些结果均表明了草莓通过远缘杂交可导致后代的基因重组,并产生丰富的变异,这为杂交后代选育提供了依据。另外,本研究利用不同引物对所有后代进行了多次鉴定,至少2对SSR标记引物鉴定出杂种后代,其中2个后代被全部12对引物鉴定为杂种,这使杂种鉴定结果更加准确和全面。

3.2 亲本和子代之间的遗传图谱分析

笔者还将SSR标记用于30份草莓杂交后代与亲本之间的遗传多样性分析,结果表明,SSR分子标记体系的聚类结果与草莓后代形态学鉴定的情况相符,在0.51水平上完全可以把父本二倍体绿色草莓与母本八倍体‘宁玉’及其他后代的草莓株系区分开来,可用于远缘杂交草莓属植物品种遗传多样性分析^[20]。有关草莓遗传图谱的报道多见于不同品种之间的聚类分析^[35-36],国内文献中鲜见草莓杂交亲本与子代聚类分析的报道。本研究利用遗传图谱分析了后代中具有3组遗传关系,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,而且分析结果与形态学鉴定结果相吻合,进一步验证了SSR标记分析及聚类分析的正确性。

参考文献 References:

- [1] 雷家军,薛莉,代汉萍,邓明琴.世界草莓属(*Fragaria*)植物的种类与分布[C]//张运涛,雷家军.草莓研究进展(IV).北京:中国农业出版社,2015:349-360.
LEI Jiajun, XUE Li, DAI Hanping, DENG Mingqin. Species and distribution of the genus (*Fragaria*) plants in the world[C]//ZHANG Yuntao, LEI Jiajun. Advances in strawberry research IV. Beijing: China Agricultural Press, 2015: 349-360.
- [2] 邓明琴,雷家军.中国果树志-草莓卷[M].北京:中国林业出版社,2005:20-32.
DENG Mingqin, LEI Jiajun. Chinese fruit-strawberry volume[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2005: 20-32.
- [3] SJULIN T M, DALE A. Genetic diversity of North American strawberry cultivars[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 1987, 112(2): 375-385.
- [4] STAUCT G. The species of *Fragaria*, their taxonomy and geographical distribution[J]. Acta Horticulture, 1989, 265: 23-33.
- [5] 高凤娟.野生草莓种质资源在草莓育种中的应用[J].北方果树,1999(3):1-3.
GAO Fengjuan. The utilization of wild strawberry germplasm re-

- sources on strawberry breeding[J]. Northern Fruits, 1999(3): 1-3.
- [6] HIRVIT H E. The volatiles of two new strawberry cultivars, 'Annelie' and 'Alaska Pioneer', obtained by backcrossing of cultivated strawberries with wild strawberries, *Fragaria vesca*, *rügen* and *Fragaria virginiana*[J]. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 1982, 175(2): 113-116.
- [7] EVANS W D. Guelph SOI synthetic octoploid strawberry breeding clone[J]. HortScience, 1982, 17: 833-834.
- [8] BUUER A. Progress in breeding decaploid *Fragaria* × *vescana*[J]. Acta Horticulturae, 1993, 348: 60-63.
- [9] 雷家军, 杨高, 代汉平, 吴禄平, 邓明琴. 我国的草莓野生资源[J]. 果树科学, 1997, 14(3): 198-200.
- LEI Jiajun, YANG Gao, DAI Hanping, WU Luping, DENG Mingqin. Wild strawberry resources in China[J]. Journal of Fruit Science, 1997, 14(3): 198-200.
- [10] 雷家军, 代汉萍, 邓明琴, 吴禄平, 胡文玉. 草莓种间杂交的研究[J]. 园艺学报, 2002, 29(6): 519-523.
- LEI Jiajun, DAI Hanping, DENG Mingqin, WU Luping, HU Wenyu. Studies on the interspecific hybridization in the genus *Fragaria*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2002, 29(6): 519-523.
- [11] 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.
- MA Hongxiang, CHEN Peidu. Production and cytogenetics of interspecific hybrids from the cross of *Fragaria nilgerrensis* Schlecht. and *Fragaria* × *ananassa* Duch.[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(12): 1966-1970.
- [12] 董静, 张运涛, 王桂霞, 金万梅, 钟传飞, 王丽娜, 常琳琳. 五叶草莓与凤梨草莓种间杂交 F₁ 代的形态学及 SSR 标记鉴定[J]. 西北农业学报, 2010, 19(11): 145-148.
- DONG Jing, ZHANG Yuntao, WANG Guixia, JIN Wanmei, ZHONG Chuanfei, WANG Lina, CHANG Linlin. Identification of F₁ interspecies hybrids between *Fragaria pentaphylla* and *F. ananassa* by morphological and SSR Markers[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2010, 19(11): 145-148.
- [13] 雷家军, 邓明琴, 吴禄平, 望月龙也, 野口裕司, 曾根一纯. 新疆天山野生草莓与绿色草莓 (*Fragaria viridis* Duch.) 同一性的鉴定[J]. 园艺学报, 2001, 28(2): 119-122.
- LEI Jiajun, DENG Mingqin, WU Luping, MOCHIZUKI T, NOGUCHI Y, SONE K. *Fragaria viridis* Duch. distributed in China was certified by classificatory observation and RAPD analysis[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2001, 28(2): 119-122.
- [14] SARGENT D J, GEIBEL M, HAWKINS J A. Quantitative and qualitative differences in morphological traits revealed between diploid *Fragaria* species[J]. Annals of Botany, 2004, 94(6): 787-796.
- [15] SARGENT D J, DAVIS T M, SIMPSON D W. Strawberry (*Fragaria* spp.) structural genomics[M]//Genetics and genomics of Rosaceae. New York: Springer, 2009: 437-456.
- [16] HUMMER K E, NATHEWET P, YANAGI T. Decaploidy in *Fragaria iturupensis* (Rosaceae)[J]. American Journal of Botany, 2009, 96(3): 713-716.
- [17] 雷家军, 代汉萍, 谭昌华, 邓明琴, 赵密珍, 钱亚明. 中国草莓属 (*Fragaria*) 植物的分类研究[J]. 园艺学报, 2006, 33(1): 1-5.
- LEI Jiajun, DAI Hanping, TAN Changhua, DENG Mingqin, ZHAO Mizhen, QIAN Yaming. Studies on the taxonomy of the strawberry (*Fragaria*) species distributed in China[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2006, 33(1): 1-5.
- [18] 葛春峰, 张海元, 陈丙义, 蔡斌华, 乔玉山. 绿色草莓 (*Fragaria viridis* Duch.) 自交后代的性状观察及评价[J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(3): 630-638.
- GE Chunfeng, ZHANG Haiyuan, CHEN Bingyi, CAI Binhua, QIAO Yushan. Characteristics and evaluation of self-cross progenies of *Fragaria viridis* Duch. [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2014, 15(3): 630-638.
- [19] 马鸿翔, 陈佩度, 余桂红, 任丽娟. 利用 GISH 和 RAPD 检测黄毛草莓 × 凤梨草莓种间杂种[J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(3): 256-261.
- MA Hongxiang, CHEN Peidu, YU Guihong, REN Lijuan. GISH and RAPD detecting the interspecific hybrids from the cross of *Fragaria nilgerrensis* Schlecht. × *F. ananassa* Duch.[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2005, 6(3): 256-261.
- [20] 董清华, 王西成, 赵密珍, 宋长年, 葛安静, 王静. 草莓 EST-SSR 标记开发及在品种遗传多样性分析中的应用[J]. 中国农业科学, 2011, 44(17): 3603-3612.
- DONG Qinghua, WANG Xicheng, ZHAO Mizhen, SONG Changnian, GE Anjing, WANG Jing. Development of EST-derived SSR markers and their application in strawberry genetic diversity analysis[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(17): 3603-3612.
- [21] 陈丙义, 李金凤, 陈孟龙, 蔡斌华, 糜林, 高志红, 章镇, 乔玉山. 通过种间杂交获得十倍体草莓新种质[J]. 园艺学报, 2013, 40(增刊): 2633.
- CHEN Bingyi, LI Jinfeng, CHEN Menglong, CAI Binhua, MI Lin, GAO Zhihong, ZHANG Zhen, QIAO Yushan. Obtaining new germplasm of decaploid strawberry by interspecific hybridization [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2013, 40(Suppl.): 2633.
- [22] 赵密珍. 草莓种质资源描述规范和数据标准[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006: 19-33.
- ZHAO Mizhen. Descriptors and data standard for strawberry (*Fragaria* spp.) [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2006: 19-33.
- [23] JAMES C M, WILSON F, HADONOU A M. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in diploid strawberry (*Fragaria vesca* L.) for mapping, diversity studies and clone identification[J]. Molecular Ecology Notes, 2003(3): 171-173.
- [24] SARGENT D J, HADONOU A M, SIMPSON D W. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers from *Fragaria viridis*, a wild diploid strawberry[J]. Molecular Ecology Notes, 2003(3): 550-552.

- [25] HHADONOU A M, SARGENT D J, WILSON F. Development of microsatellite markers in *Fragaria*, their use in genetic diversity analysis, and their potential for genetic linkage mapping[J]. *Genome*, 2004, 47: 429-438.
- [26] MONFORT A, VILANOVA S, DAVIS T M. A new set of polymorphic simple sequence repeat (SSR) markers from a wild strawberry (*Fragaria vesca*) are transferable to other diploid *Fragaria* species and to *Fragaria*×*ananassa*[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2006 (6): 197-200.
- [27] BASSIL N V, NJUGUNA W, SLOVIN J P. EST-SSR markers from *Fragaria vesca* L. cv. Yellow Wonder[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2006, 6(3): 806-809.
- [28] BASSIL N V, GUNN M, FOLTA K. Microsatellite markers for *Fragaria* from 'Strawberry Festival' expressed sequence tags[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2006, 6(2): 473-476.
- [29] 薛丹丹, 郭海林, 郑轶琦, 陈宣, 刘建秀. 结缕草属植物杂交后代杂种真实性鉴-SRAP 分子标记[J]. *草业学报*, 2009, 18(1): 72-79.
XUE Dandan, GUO Hailin, ZHENG Yiqi, CHEN Xuan, LIU Jianxiu. Hybrid identification of progenies of *Zoysia* crosses by SRAP marker[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2009, 18(1): 72-79.
- [30] 忻雅, 阮松林, 马华升, 王淑珍, 方献平, 肖文斐, 吴根良. 基于 SSR 和 SCAR 标记的草莓主栽品种指纹图谱构建及亲缘关系分析[J]. *江西农业大学学报*, 2013, 35(2): 307-312.
XIN Ya, RUAN Songlin, MA Huasheng, WANG Shuzhen, FANG Xianping, XIAO Wenfei, WU Genliang. Establishment of DNA fingerprinting and analysis of genetic relationship among main strawberry (*Fragaria ananassa*) cultivars in southern China[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2013, 35(2): 307-312.
- [31] 马鸿翔, 陈佩度, 余桂红, 任丽娟. 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.
MA Hongxiang, CHEN Peidu, YU Guihong, REN Lijuan. Cytogenetics and RAPD analysis of interspecific hybrids *Fragaria mandshurica* Staudt and *F. ananassa* Duch. [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2007, 34(3): 597-604.
- [32] 朱骏驰, 郭印山, 刘镇东, 李坤, 杨晓旭, 石广丽, 牛早柱, 李成祥, 郭修武. 利用 SSR 分子标记鉴定葡萄 F1 代杂种[J]. *沈阳农业大学学报*, 2016, 47(2): 148-152.
ZHU Junchi, GUO Yinshan, LIU Zhendong, LI Kun, YANG Xiaoxu, SHI Guangli, NIU Zaozhu, LI Chengxiang, GUO Xiuyu. Identification of the F1 hybrids of grape using SSR molecular markers[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2016, 47(2): 148-152.
- [33] 陆欢, 张丹, 章炉军, 王瑞娟, 尚晓冬, 谭琦. 金针菇种质资源 5 个农艺性状与 SSR 标记的关联分析[J]. *农业生物技术学报*, 2015, 23(1): 96-106.
LU Huan, ZHANG Dan, ZHANG Lujun, WANG Ruijuan, SHANG Xiaodong, TAN Qi. Association analysis of five agronomic traits with SSR markers in *Flammulina velutipes* germplasm[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2015, 23(1): 96-106.
- [34] 唐建民, 周世良, 成明昊, 林启冰, 周志钦. 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]. *中国农学通报*, 2006, 22(2): 36-40.
TANG Jianmin, ZHOU Shiliang, CHENG Minghao, LIN Qibing, ZHOU Zhiqin. Identification of the F1 hybrids of *Malus xiaojinensis* using RAPD and SSR molecular markers[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2006, 22(2): 36-40.
- [35] 张运涛, 冯志广, 李天忠, 董静, 王桂霞, 张开春, 韩振海. 草莓品种亲缘关系的 AFLP 分子标记分析[J]. *园艺学报*, 2006, 33(6): 1199-1202.
ZHANG Yuntao, FENG Zhiguang, LI Tianzhong, DONG Jing, WANG Guixia, ZHANG Kaichun, HAN Zhenhai. Genetic relationships of strawberry cultivars by AFLP analysis[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2006, 33(6): 1199-1202.
- [36] 韩柏明, 赵密珍, 王静, 于红梅. 草莓属种质资源亲缘关系的 SSR 标记分析[J]. *园艺学报*, 2012, 39(12): 2352-2360.
HAN Baiming, ZHAO Mizhen, WANG Jing, YU Hongmei. Phylogenetic relationships among *Fragaria* germplasm by SSR markers [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2012, 39(12): 2352-2360.