

蜂糖李种质鉴定中孢粉学与 InDel 标记的应用

解为玮¹,徐丹彤¹,陈方策¹,宋贞富²,钟思玲²,敖艳飞²,
安 星²,王红林³,何业华¹,郑乾明^{3*},刘朝阳^{1*}

(¹亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室·华南农业大学园艺学院,广州 510642;

²安顺市农业科学院,贵州安顺 561000; ³贵州省农业科学院果树科学研究所·农业农村部
喀斯特山区作物基因资源与种质创新重点实验室,贵阳 550006)

摘要:【目的】寻找能够特异性地区分蜂糖李种质和其他李种质,以及蜂糖李中的不同品系(黄皮、青皮和一点红)的鉴定方法。【方法】选择蜂糖李中的3个品系(黄皮、青皮和一点红)及其他9个李种质作为研究对象,利用扫描电子显微镜(SEM)观察花粉形态并进行聚类分析,同时结合重测序数据进行分子标记开发,并利用21份其他李种质对分子标记的准确性进行验证。【结果】扫描电镜结果表明,蜂糖李与四月李、三月李在花粉形态上存在显著差异,而一点红蜂糖李与其他蜂糖李相比在花粉外壁纹饰上也存在一定差异。在分子标记开发方面,筛选出2对表现稳定的InDel分子标记,联合使用能够将蜂糖李与其他21份李种质有效区分,同时还筛选出一对InDel分子标记,可用于区分蜂糖李中的3个品系。【结论】研究结果为蜂糖李的种质鉴定提供了重要的孢粉学和分子标记依据,有望对蜂糖李产业的标准化与品质提升提供帮助。

关键词:蜂糖李;孢粉学;InDel;分子标记;种质鉴定

中图分类号:S662.3

文献标志码:A

文章编号:1009-9980(2024)07-1297-13

Application of palynology and InDel markers in germplasm identification in Fengtangli plum

XIE Weiwei¹, XU Dantong¹, CHEN Fangce¹, SONG Zhenfu², ZHONG Siling², AO Yanfei², AN Xing²,
WANG Honglin³, HE Yehua¹, ZHENG Qianming^{3*}, LIU Chaoyang^{1*}

(¹State Key Laboratory of Subtropical Agricultural Biological Resource Conservation and Utilization/College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China; ²Anshun Academy of Agricultural Sciences, Anshun 561000, Guizhou, China; ³Institute of Pomology Science, Guizhou Academy of Agricultural Science/Ministry of Agriculture and Rural Affairs Key Laboratory of Crop Genetic Resources and Germplasm Innovation in Karst Region, Guiyang 550006, Guizhou, China)

Abstract:【Objective】Fengtangli, a superior Chinese plum variety that was bred from the local landraces in Zhenning county of Anshun City, is renowned for its crisp and tender texture. In recent years, the increasing market demand for Fengtangli seedlings has resulted in a proliferation of inferior and counterfeit seedlings being marketed as high-quality products. On the market, the visually similar Siyueli has been seen falsely sold as Fengtangli, consequently disrupting the market equilibrium. Additionally, distinct lines within the Fengtangli variety have been identified, exhibiting many variations such as yellow-skinned, green-skinned, and partially red-skinned fruits upon maturation. These phenotypic variations not only affect the fruit quality but also the required cultivation and management practices. The presence of mixed lines complicates standardized orchard management, harvest scheduling and fruit grading processes, negatively impacting the overall economic yield of the orchards. Hence, it is impera-

收稿日期:2024-04-01 接受日期:2024-04-22

基金项目:广州市科技计划项目(202206010038);安顺市科技计划项目(安市科农重[2020]01号);贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2022]重点018号)

作者简介:解为玮,女,在读硕士研究生,从事中国李遗传育种研究。E-mail:20213137120@stu.scau.edu.cn

*通信作者 Author for correspondence. E-mail:18798006784@163.com; E-mail:liuchaoyang@scau.edu.cn

tive to accurately identify and differentiate the intrinsic variations within Fengtangli as well as between Fengtangli and other plum germplasms to advance standardization and augment the quality control in the Fengtangli industry. **【Methods】** Flower buds were collected from 5-year-old fruit trees in the orchard at the stage of flower bud swelling to white bell, and pollen was collected after air-drying under natural conditions. Gold-spray treatment was performed using an ion sputtering instrument under vacuum, followed by observation of pollen micro-morphology under a scanning electron microscope. Young leaves from the plum germplasms were sampled for DNA extraction via an optimized CTAB method. Targeted InDel loci were identified from resequencing data using bioinformatics tools, and primers for these loci were designed. Amplification via PCR and validation of the InDel markers were performed, with the confirmation conducted through the agarose gel electrophoresis. **【Results】** This study conducted a systematic analysis of the pollen micro-morphology of Fengtangli and other Chinese plum germplasms. The analysis revealed that the pollen of the materials tested exhibited isopolar and radially symmetric forms with three colporate apertures, conforming to the classification of N3P4C5 type pollen. In view of the polar point, the pollen presented a trifid circula shape, and in view of the equatorial point, it showed an elongate ellipse, reflecting a degree of morphological uniformity. However, significant differences were observed in the polar axis length and equatorial axis length among the germplasms, especially between the Siyueli and Sanyueli compared to the Fengtangli. Within the three Fengtangli lines, the partially red-skinned line had a slightly longer equatorial axis length than the yellow-skinned and green-skinned lines. Moreover, the pollen exine ornamentation of all tested germplasms displayed a “striate-perforate” type, but there were significant differences in the direction of the striations, density and porosity. Among the three Fengtangli lines, differences in pollen were primarily reflected in the characteristics of the exine ornamentation. The ridge width was relatively larger in the yellow-skinned line, while the green-skinned and partially red-skinned line had similar ridge numbers, with minor differences in the distance between ridges, particularly in the partially red-skinned line, which had significantly smaller aperture and porosity than the other two lines. Cluster analysis, based on multiple morphological indexes of pollen, revealed the similarities and relatedness among the tested plum germplasms. The clustering results indicated that the plum germplasms were effectively grouped according to pollen characteristics at a certain Euclidean distance criterion, with the Siyueli forming a unique group due to its distinctive pollen morphology. Further analysis showed that the three lines of Fengtangli and several other plum germplasms exhibited high similarity in pollen morphology. These findings provided significant palynological evidence for understanding the classification and relatedness of Fengtangli and related plum germplasms. In the aspect of InDel molecular markers, based on predicted InDel sites from resequencing data, two pairs of primers successfully amplified the strips of target DNA in 12 plum germplasms. These results showed consistency across multiple PCR assays, demonstrating the effectiveness of these primer combinations and providing a molecular basis for distinguishing Fengtangli from other 21 representative plum germplasms. Concurrently, the primer P3-38 produced specific bands through PCR amplification in the three main lines of Fengtangli, effectively distinguishing them. **【Conclusion】** Palynological analysis revealed that the distinctions among different species within the *prunus* and three main lines of Fengtangli were primarily concentrated on exine ornamentation. Based on pollen appearance and exine ornamentation data, the cluster analysis indicated significant differences between Fengtangli and both Sanyueli and Siyueli, suggesting that their relatedness may be relatively distant. Thus, palynology can serve as an auxiliary method for distinguishing them. Although palynological results can express a broader range of genetic information, but as a method for variety identification, they pos-

sess certain limitations. Meanwhile, the InDel molecular markers developed by resequencing were highly effective for identifying three main lines of Fengtangli as well as its differentiation from other Chinese plum germplasms, compensating the limitation inherent in palynology.

Key words: Fengtangli; Palynology; InDel; Molecular marker; Germplasm identification

蜂糖李是由贵州省安顺市农业科学院等单位从安顺市镇宁县地方李品种中选育出的优质中国李品种,口感脆嫩,入口化渣,风味独特,无酸涩苦味,是李中珍品^[1]。近年来,由于蜂糖李市场行情持续向好,其栽培生产规模不断扩大,对优质纯正种苗的需求也急剧增加,导致蜂糖李苗木市场出现了一些以次充好、以假乱真的问题;在果实成熟季节,还存在着外观与蜂糖李相似,但口感相差甚远的四月李等地方李品种,冒充蜂糖李出售的现象,扰乱了蜂糖李的生产和销售秩序。此外,蜂糖李中还存在着一定程度的品系混杂问题,在果品质、果皮颜色、叶片形态、树体产量等方面出现了不同类型的变异。根据成熟时果皮颜色的差异,发现有黄皮蜂糖李(成熟时果皮为黄色)、青皮蜂糖李(成熟时果皮为绿色)、一点红蜂糖李(成熟时靠近果柄的部位出现不规则片状红色)等品系,他们在果品质、配套栽培管理技术方面也存在一定程度的差异;品系的混杂会给生产中果园标准化管理、果实采摘和果品分级等方面带来一定的不便,影响果园的综合经济效益。因此,鉴定和区分蜂糖李以及蜂糖李品种内的品系类型,对蜂糖李产业的标准化和品质提升至关重要。为了蜂糖李产业的可持续发展,寻找有效方法进行蜂糖李种质鉴定,区分蜂糖李内自然变异的群体以及与其他李种质之间的差异具有重要意义。

在种质分类与鉴定中,常用的方法包括形态学标记、孢粉等方面的微形态标记、同工酶与分子标记等^[2]。植物花粉的形态特征通常相对稳定,携带丰富的遗传信息,因此对花粉外观的研究已经成为常见的种质鉴定和植物分类方法,在果树、蔬菜、花卉等各类型园艺作物中有广泛的应用^[3-5]。分子标记在基因水平上标记遗传差异,不受组织、器官或环境的影响,在果树种质鉴定中也得到广泛应用。随着测序技术的发展,分子标记已发展至第三代,其中SSR等第二代分子标记在李的种质鉴定中应用较为广泛^[6-7]。InDel分子标记作为第三代分子标记,通过检测基因组中核苷酸片段的插入和缺失而开发,具有条带清晰、稳定性强以及经济便捷等特点。在柚^[8]、

乌菜^[9]、辣椒^[10]等园艺作物的种质鉴定中已有成功应用,然而在中国李种质鉴定与分类中还未见报道。开发更多类型的分子标记对完善蜂糖李的鉴别体系具有非常重要的作用。

笔者选择了黄皮蜂糖李、青皮蜂糖李、一点红蜂糖李这3种成熟时果实表皮颜色不同的蜂糖李品系、6个蜂糖李原产地贵州安顺市的本地李种质(蜜李1号、安顺本地晚熟李、晚熟青脆李、四月李、打帮李、冰脆李),以及3个其他地区的李种质(台湾蜜李、三月李、三华李)作为试验材料,结合孢粉学和InDel分子标记技术,分析蜂糖李与其他李种质在花粉形态和基因层面上的差异,并利用另外来自不同区域的12个代表性的李品种对筛选到的分子标记进行进一步验证,同时寻找蜂糖李3个品系之间的差异,以期为蜂糖李的种质鉴定和未来的育种工作提供孢粉学与分子层面的依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

笔者选取的试验材料主要来源于贵州省安顺市农业科学院与广东省广州市华南农业大学所属的李种质资源圃。12份李种质涵盖了黄皮蜂糖李、青皮蜂糖李、一点红蜂糖李、蜜李1号、安顺本地晚熟李、晚熟青脆李、四月李、打帮李、冰脆李、台湾蜜李、三月李及三华李,这些被用于进行孢粉学分析和分子标记试验,具体信息详见表1。上述种质的果实成熟期表型详见图1。此外,为了验证分子标记的准确性,收集了包括粉黛脆李、凤凰李、脆红李、国峰7号、大红袍、黄干核李、岭溪李、柰李、黄金奈李、恐龙蛋、味帝及紫叶李等在内的另外12份李种质材料。

1.2 花粉的收集与微观形态观察

选择果园内5年生果树,待其花蕾膨大为铃铛状、雌雄蕊未显露、花朵即将开放时,即大蕾期,采摘花蕾。用干净的镊子小心去掉花瓣和花萼,收集花药,将花药平铺在硫酸纸上自然阴干48 h,待花粉散出后,收集花粉存放于1.5 mL离心管中,在离心管中加入少数硅胶粒使花粉保持干燥,常温存放。

表1 蜂糖李和其他李种质信息

Table 1 Information on Fengtangli and other plum germplasms

序号 No.	种质名称 Germplasm name	采集地 Collection location	种质类型 Germplasm types
1	黄皮蜂糖李 Huangpifengtangli	贵州省安顺市镇宁县 Zhenennin County, Anshun City, Guizhou Province	贵州本地李种质 Guizhou local plum germplasm
2	青皮蜂糖李 Qingpifengtangli	贵州省安顺市镇宁县 Zhenennin County, Anshun City, Guizhou Province	贵州本地李种质 Guizhou local plum germplasm
3	一点红蜂糖李 Yidianhongfengtangli	贵州省安顺市关岭县 Guanling County, Anshun City, Guizhou Province	贵州本地李种质 Guizhou local plum germplasm
4	蜜1号 Mili No. 1	贵州省安顺市普定县 Puding County, Anshun City, Guizhou Province	贵州本地李种质 Guizhou local plum germplasm
5	安顺本地晚熟李 Anshunbendiwanshuli	贵州省安顺市普定县 Puding County, Anshun City, Guizhou Province	贵州本地李种质 Guizhou local plum germplasm
6	晚熟青脆李 Wanshuqingcuili	贵州省安顺市普定县 Puding County, Anshun City, Guizhou Province	贵州本地李种质 Guizhou local plum germplasm
7	四月李 Siyueli	贵州省安顺市镇宁县 Zhenennin County, Anshun City, Guizhou Province	贵州本地李种质 Guizhou local plum germplasm
8	打帮李 Dabangli	贵州省安顺市镇宁县 Zhenennin County, Anshun City, Guizhou Province	贵州本地李种质 Guizhou local plum germplasm
9	冰脆李 Bingcuili	贵州省安顺市紫云县 Ziyun County, Anshun City, Guizhou Province	贵州本地李种质 Guizhou local plum germplasm
10	台湾蜜李 Taiwanmili	贵州省安顺市普定县 Puding County, Anshun City, Guizhou Province	引进李种质 Introduction of plum germplasm
11	三月李 Sanyueli	广东省广州市从化区 Conghua District, Guangzhou City, Guangdong Province	广东本地李种质 Guangdong local plum germplasm
12	三华李 Sanhuali	广东省信宜市钱排镇 Qianpai Town, Xinyi City, Guangdong Province	广东本地李种质 Guangdong local plum germplasm

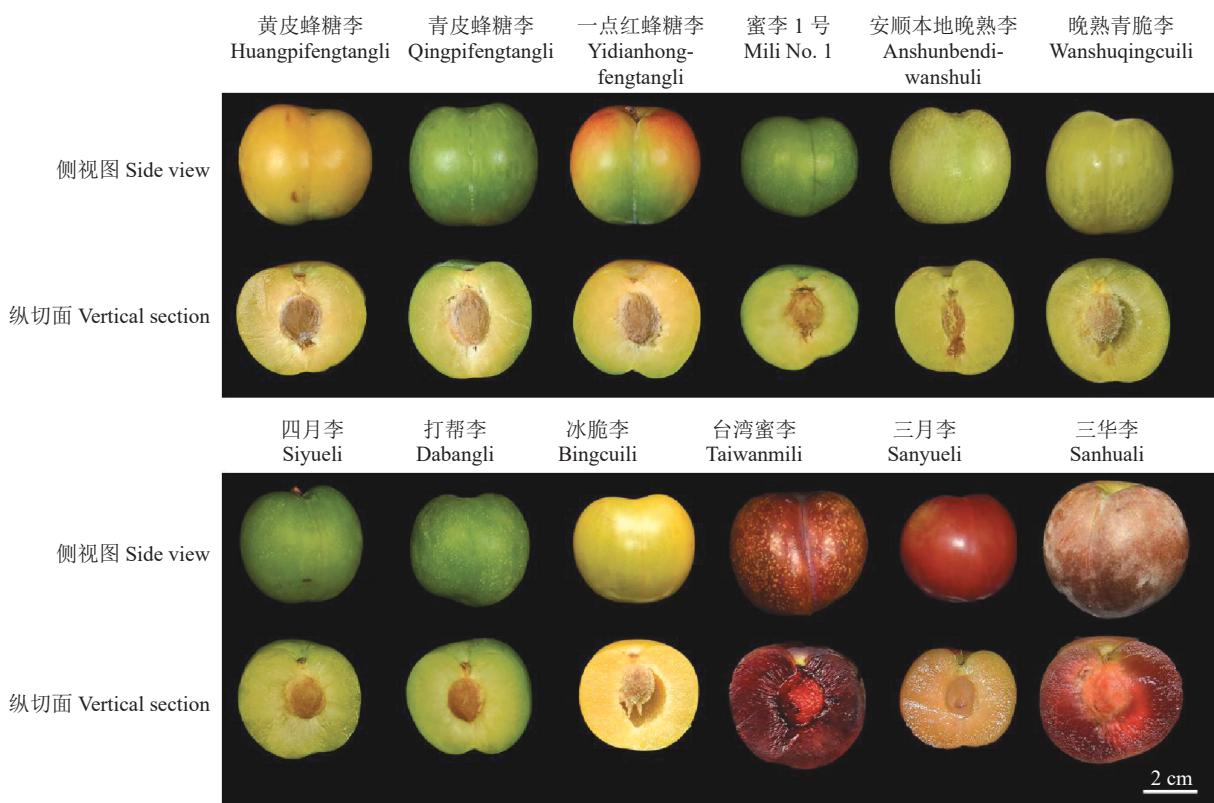


图1 供试种质成熟果实侧视图与纵切图

Fig. 1 Side view and longitudinal section of mature fruits for trial germplasms

将花粉均匀散布在贴有双面胶的样品台上,在真空状态下使用离子溅射仪(HITACHI, MC1000, 日本)进行喷金处理,并置于扫描电子显微镜(HITACHI, SU8100, 日本)下进行观测,选择具有代表性的极面和赤道面视野拍照,并观察局部的形态与纹饰特征。

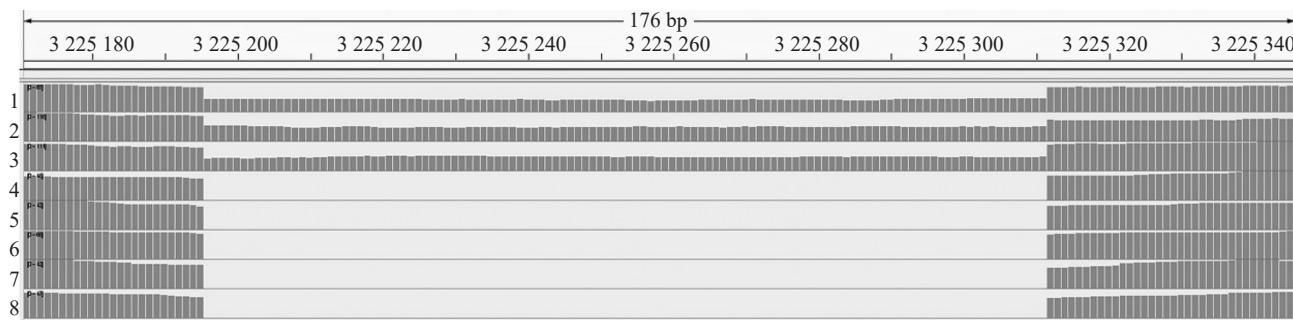
1.3 DNA提取与重测序

采集供试李种质的幼嫩叶片,采用改良版的CTAB法提取黄皮蜂糖李、青皮蜂糖李、一点红蜂糖李、蜜李1号、安顺本地晚熟李、晚熟青脆李、四月李、打帮李的DNA^[11]。使用超声波法将DNA片段化,并对处理后的片段DNA进行纯化、末端修复、3'端加A、连接测序接头,构建文库,再利用 Illumina 平台进行测序,将原始数据过滤后得到Clean reads, 将

数据对比到已发表的三月李参考基因组(<https://www.rosaceae.org/Analysis/9450778>)上,并使用BWA软件将Clean reads与参考基因组序列对比,上述的重测序工作由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。

1.4 InDel位点筛选与引物设计

使用Genome Analysis Toolkit(GATK)v3.8软件对InDel位点进行初步预测,后使用基因组可视化工具Integrative Genomics Viewer(IGV)v2.12.3软件进行精细筛选,筛选蜂糖李中特异的InDel位点(图2),记录差异区域的具体位置信息。使用TBtools-II v2.0软件中的Fasta Extract功能,提取差异区域上下游大约1 kb的序列。利用Primer Premier 5.0软件,在差异区域上下游位置设计引物,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。



1. 黄皮蜂糖李;2. 青皮蜂糖李;3. 一点红蜂糖李;4. 蜜李1号;5. 安顺本地晚熟李;6. 晚熟青脆李;7. 四月李;8. 打帮李。

1. Huangpifengtangli; 2. Qingpifengtangli; 3. Yidianhongfengtangli; 4. Mili No. 1; 5. Anshunbendiwanshuli; 6. Wanshuqingcuili; 7. Siyueli; 8. Da-bangli.

图2 IGV中筛选出的符合标准的InDel位点

Fig. 2 InDel sites filtered in IGV according to criteria

1.5 InDel标记检测

使用江苏康为世纪生物科技股份有限公司的2×Flash PCR MasterMix(Dye)作为PCR反应试剂。PCR扩增体系(20 μL):10 μL 2×Flash PCR MasterMix(Dye), 0.8 μL Forward Primer(10 μmol·L⁻¹), 0.8 μL Reverse Primer(10 μmol·L⁻¹), 1 μL模板DNA(质量浓度20~60 ng·μL⁻¹), 7.4 μL ddH₂O。扩增程序为:98 °C预变性2 min; 94 °C变性10 s; 55 °C退火15 s; 72 °C延伸7 s, 34次循环, 72 °C延伸1 min。PCR产物用2%的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 数据分析

使用Image J v2.9.0软件分析花粉的极轴长、赤道轴长、花粉粒形状、花粉大小、条脊宽、沟脊宽和网孔密度等形态指标数据(n=10)。花粉形态描述主要参考《孢粉学手册》^[12],花粉粒形状按极赤比(P/E)

划分,P/E>2为超长球形,2≥P/E>1.14为长球形。使用SPSS 22.0进行单因素方差分析和聚类分析。在单因素方差分析中,采用Duncan's法进行差异比较,对花粉数据应用平均连锁法,并基于欧氏距离进行聚类分析。使用Photoshop 2021软件对图像进行标注和组图处理。

2 结果与分析

2.1 花粉微观形态特征

2.1.1 极性、对称类型及萌发器官 如图3所示,所有供试材料的花粉粒均为单粒花粉,花粉的赤道面均可将其分割为对称的两部分,即花粉为等极。花粉均具有4个对称面,呈辐射对称,并且具有3个环状孔沟,三沟均匀垂直于赤道分布。根据NPC分类系统^[12],所有供试材料的花粉均属于N3P4C5型。

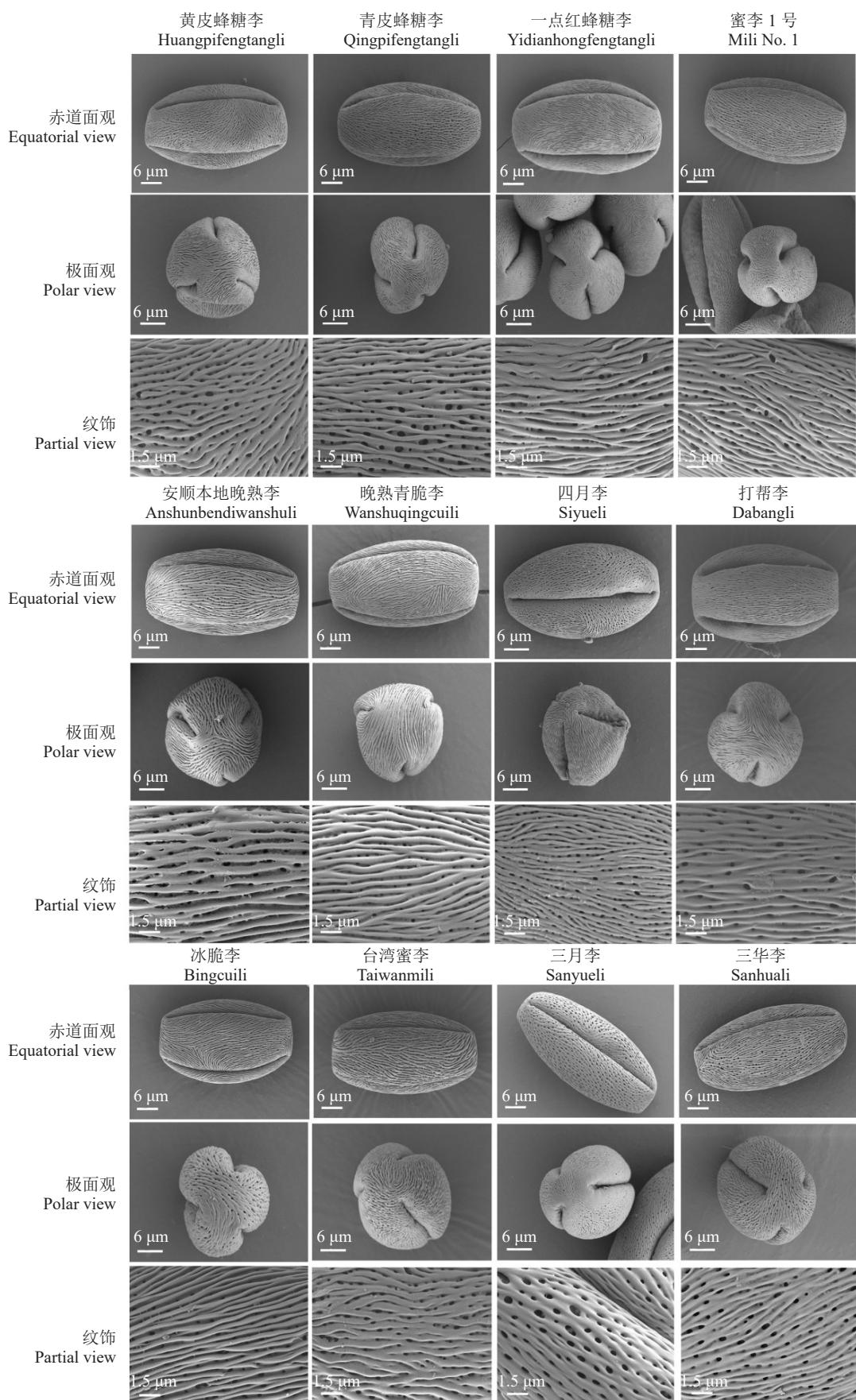


图 3 花粉形态与外壁纹饰

Fig. 3 Pollen morphology and exine ornamentation

2.1.2 形状及大小 所有供试材料花粉的极面观均为三裂圆形,赤面观均为长椭圆形,但种质间的极轴与赤道轴长度存在一定差距。由表2可知,所有花粉的极轴长度为 $36.64\sim44.83\text{ }\mu\text{m}$,均值 $40.91\text{ }\mu\text{m}$,根据Erdtman^[12]的花粉大小分类标准,本研究中的所有供试材料的花粉均属于中等大小($25\sim50\text{ }\mu\text{m}$)。但四月李的花粉极轴长度为 $36.64\text{ }\mu\text{m}$,显著小于其他李种质;三月李的花粉极轴长度为 $44.83\text{ }\mu\text{m}$,在供试材料中最长;两者与蜂糖李花粉在极轴长度上差距较

大。黄皮、青皮和一点红蜂糖李的花粉极轴长度相似,三者的极轴长平均值约为 $40.51\text{ }\mu\text{m}$ 。

所有供试材料花粉的赤道轴长度平均值为 $22.04\text{ }\mu\text{m}$,不同李种质的花粉在赤道轴上差距较大,蜜李1号、晚熟青脆李、四月李、三月李的赤道轴长度小于蜂糖李与其他李种质。在蜂糖李中,一点红蜂糖李的花粉赤道轴稍长于黄皮与青皮蜂糖李。根据极赤比划分花粉形状,除蜜李1号、晚熟青脆李、三月李为超长球形外($P/E>2$),蜂糖李与其他李种

表2 花粉大小与形态特征

Table 2 Pollen size and morphological characteristics

种质名称 Germplasm name	花粉大小 Pollen size/ μm		极赤比 P/E	花粉形状 Shape of pollen	极面观 Polar view	赤面观 Equatorial view
	极轴长 Polar axis length	赤道轴长 Equatorial axis length				
黄皮蜂糖李 Huangpifengtangli	$40.80\pm2.22\text{ bc}$	$22.75\pm0.48\text{ ab}$	$1.91\pm0.23\text{ abcd}$	长球形 Prolate	三裂圆形 Trifid circular	长椭圆形 Elongate ellipse
青皮蜂糖李 Qingpifengtangli	$40.63\pm0.92\text{ bc}$	$22.61\pm0.38\text{ ab}$	$1.83\pm0.07\text{ cd}$	长球形 Prolate	三裂圆形 Trifid circular	长椭圆形 Elongate ellipse
一点红蜂糖李 Yidianhongfengtangli	$40.09\pm1.47\text{ bc}$	$23.16\pm0.32\text{ a}$	$1.80\pm0.11\text{ d}$	长球形 Prolate	三裂圆形 Trifid circular	长椭圆形 Elongate ellipse
蜜李1号 Mili No. 1	$41.96\pm1.89\text{ abc}$	$19.97\pm0.64\text{ d}$	$2.02\pm0.20\text{ abc}$	超长球形 Perprolate	三裂圆形 Trifid circular	长椭圆形 Elongate ellipse
安顺本地晚熟李 Anshunbendiwanshuli	$40.75\pm3.44\text{ bc}$	$22.53\pm0.42\text{ ab}$	$1.82\pm0.17\text{ cd}$	长球形 Prolate	三裂圆形 Trifid circular	长椭圆形 Elongate ellipse
晚熟青脆李 Wanshuqingcuili	$40.78\pm3.99\text{ bc}$	$20.53\pm1.09\text{ d}$	$2.07\pm0.18\text{ ab}$	超长球形 Perprolate	三裂圆形 Trifid circular	长椭圆形 Elongate ellipse
四月李 Siyueli	$36.64\pm2.04\text{ d}$	$20.46\pm0.55\text{ d}$	$1.77\pm0.12\text{ d}$	长球形 Prolate	三裂圆形 Trifid circular	长椭圆形 Elongate ellipse
打帮李 Dabangli	$40.56\pm1.75\text{ bc}$	$22.92\pm0.66\text{ a}$	$1.95\pm0.22\text{ abcd}$	长球形 Prolate	三裂圆形 Trifid circular	长椭圆形 Elongate ellipse
冰脆李 Bingcuili	$39.66\pm1.33\text{ c}$	$22.19\pm0.56\text{ b}$	$1.86\pm0.22\text{ bcd}$	长球形 Prolate	三裂圆形 Trifid circular	长椭圆形 Elongate ellipse
台湾蜜李 Taiwanmili	$41.43\pm2.42\text{ bc}$	$22.89\pm0.43\text{ ab}$	$1.85\pm0.20\text{ cd}$	长球形 Prolate	三裂圆形 Trifid circular	长椭圆形 Elongate ellipse
三月李 Sanyueli	$44.83\pm1.97\text{ a}$	$21.32\pm0.57\text{ c}$	$2.11\pm0.17\text{ a}$	超长球形 Perprolate	三裂圆形 Trifid circular	长椭圆形 Elongate ellipse
三华李 Sanhuali	$42.80\pm4.91\text{ ab}$	$23.11\pm0.84\text{ a}$	$1.92\pm0.30\text{ abcd}$	长球形 Prolate	三裂圆形 Trifid circular	长椭圆形 Elongate ellipse

注:同列不同小写字母表示差异显著($p<0.05$)。下同。

Note: Different small letters in the same column indicate significant difference ($p<0.05$). The same below.

质皆为长球形($2\geq P/E > 1.14$)。

2.1.3 外壁纹饰 供试李种质的外壁纹饰均为“条纹-穿孔”,即由条纹与穿孔组成,条脊大部分接近纵向平行排列,但不同种质在条纹与穿孔细节上存在较大差异,例如条纹走向、条纹疏密程度、孔频等(表3)。

在蜂糖李的3个品系中,花粉差异主要体现在外壁纹饰特征上。黄皮蜂糖李的脊宽相对较大,而青皮蜂糖李与一点红蜂糖李的脊宽数值相近,三者在脊间距方面差异相对较小。此外,在蜂糖李的3

个品系中,一点红蜂糖李的孔频显著小于其他两个品系,孔径显著小于青皮蜂糖李,与黄皮蜂糖李差异不显著。蜂糖李与其他供试种质在外壁纹饰特征上也存在较大差异。蜜李1号、冰脆李和三华李的脊宽相对较小,而安顺本地晚熟李、台湾蜜李和三月李的脊宽较大,上述6个种质在脊宽上与蜂糖李存在显著差异。此外,安顺本地晚熟李在脊间距上显著大于其他供试李种质,而四月李则小于其他李种质。

2.1.4 聚类分析结果 根据极轴长、赤道轴长、极赤

表3 花粉外壁纹饰特征

Table 3 Pollen exine ornamentation characteristics

种质名称 Germplasm name	脊宽 Ridge width/ μm	脊间距 Distance between ridges/μm	孔径 Aperture/μm	孔频 Porosity/ (No. · μm ⁻²)	外壁纹饰类型 Types of exine ornamentation
黄皮蜂糖李 Huangpifengtangli	0.28±0.04 c	0.22±0.04 bc	0.20±0.03 ab	1.27±0.04 d	条纹-穿孔 Striate-perforate
青皮蜂糖李 Qingpifengtangli	0.26±0.03 cd	0.21±0.04 bcd	0.23±0.04 a	1.25±0.05 d	条纹-穿孔 Striate-perforate
一点红蜂糖李 Yidianhongfengtangli	0.25±0.06 cd	0.19±0.05 bcde	0.16±0.04 bc	0.92±0.02 f	条纹-穿孔 Striate-perforate
蜜李1号 Mili No. 1	0.20±0.03 ef	0.20±0.02 bcd	0.20±0.04 ab	2.33±0.06 a	条纹-穿孔 Striate-perforate
安顺本地晚熟李 Anshunbendiawanshuli	0.39±0.05 a	0.35±0.04 a	0.25±0.03 a	0.76±0.01 g	条纹-穿孔 Striate-perforate
晚熟青脆李 Wanshuqingcuili	0.26±0.02 cd	0.23±0.03 b	0.15±0.02 bc	1.07±0.04 e	条纹-穿孔 Striate-perforate
四月李 Siyueli	0.23±0.06 de	0.15±0.03 e	0.14±0.02 c	1.95±0.01 b	条纹-穿孔 Striate-perforate
打帮李 Dabangli	0.23±0.02 de	0.19±0.04 bcde	0.25±0.06 a	0.91±0.04 f	条纹-穿孔 Striate-perforate
冰脆李 Bingcuili	0.20±0.03 ef	0.19±0.04 cde	0.20±0.04 ab	0.81±0.01 g	条纹-穿孔 Striate-perforate
台湾蜜李 Taiwanmili	0.33±0.07 b	0.22±0.07 bc	0.16±0.03 bc	1.37±0.01 c	条纹-穿孔 Striate-perforate
三月李 Sanyueli	0.37±0.06 ab	0.20±0.02 bcd	0.25±0.03 a	1.02±0.03 e	条纹-穿孔 Striate-perforate
三华李 Sanhuali	0.18±0.03 f	0.18±0.04 de	0.22±0.05 a	1.26±0.02 d	条纹-穿孔 Striate-perforate

比、花粉形状、脊宽、脊间距、孔径、孔频等8项指标，对供试李种质的孢粉数据进行聚类分析。其中，花粉形状作为描述性特征，因而在聚类分析中将其数字化，长球形与超长球形分别编号为0与1。聚类分析结果如图4所示，显示了花粉的相似度，同时有助于确定不同种质之间的亲缘关系。

在欧氏平方距离为20时，供试的李种质被划分为两大组，其中四月李独立成一组。而在欧氏平方距离为15时，供试的李种质被划分为三大组，四月

李和三月李被分开，表明他们的花粉形态与蜂糖李存在较大差异，亲缘关系可能较远。与此同时，3个蜂糖李品系与打帮李、安顺本地晚熟李、台湾蜜李被聚为最小的一支，这说明他们的花粉形态相似。

2.2 蜂糖李分子标记开发与筛选

笔者在本研究中设计并使用了多对引物用于蜂糖李分子标记的开发与筛选，最终筛选到2对引物用于鉴别蜂糖李，他们在本研究的12个李种质中均成功扩增出目标条带，引物序列如表4所示。

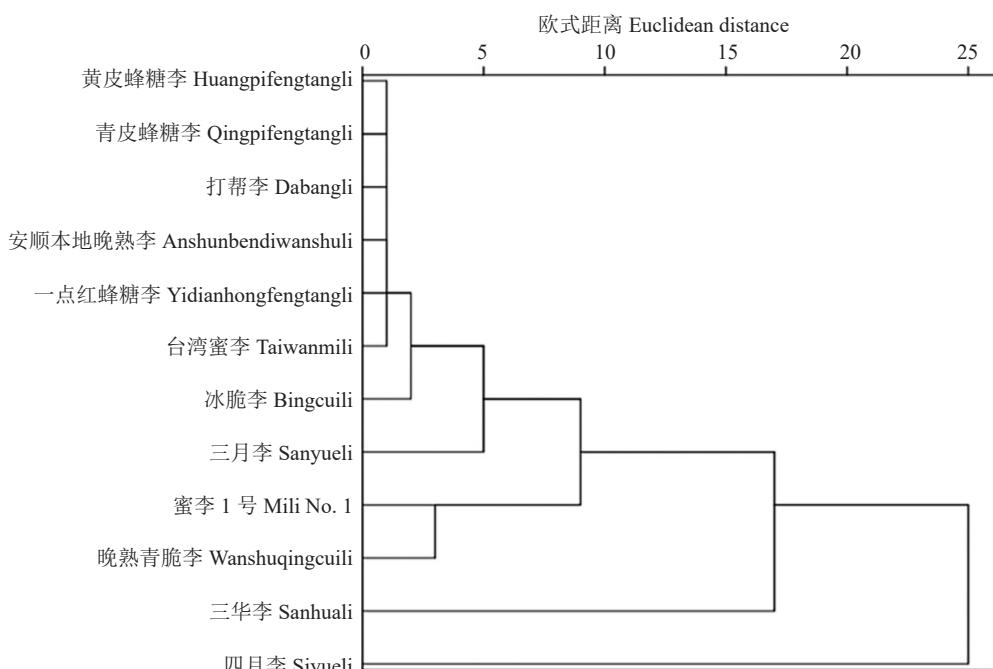


图4 花粉形态数据欧式距离聚类分析

Fig. 4 Clustering analysis of pollen morphology data based on Euclidean distance

表4 InDel标记引物信息
Table 4 InDel marker primer information

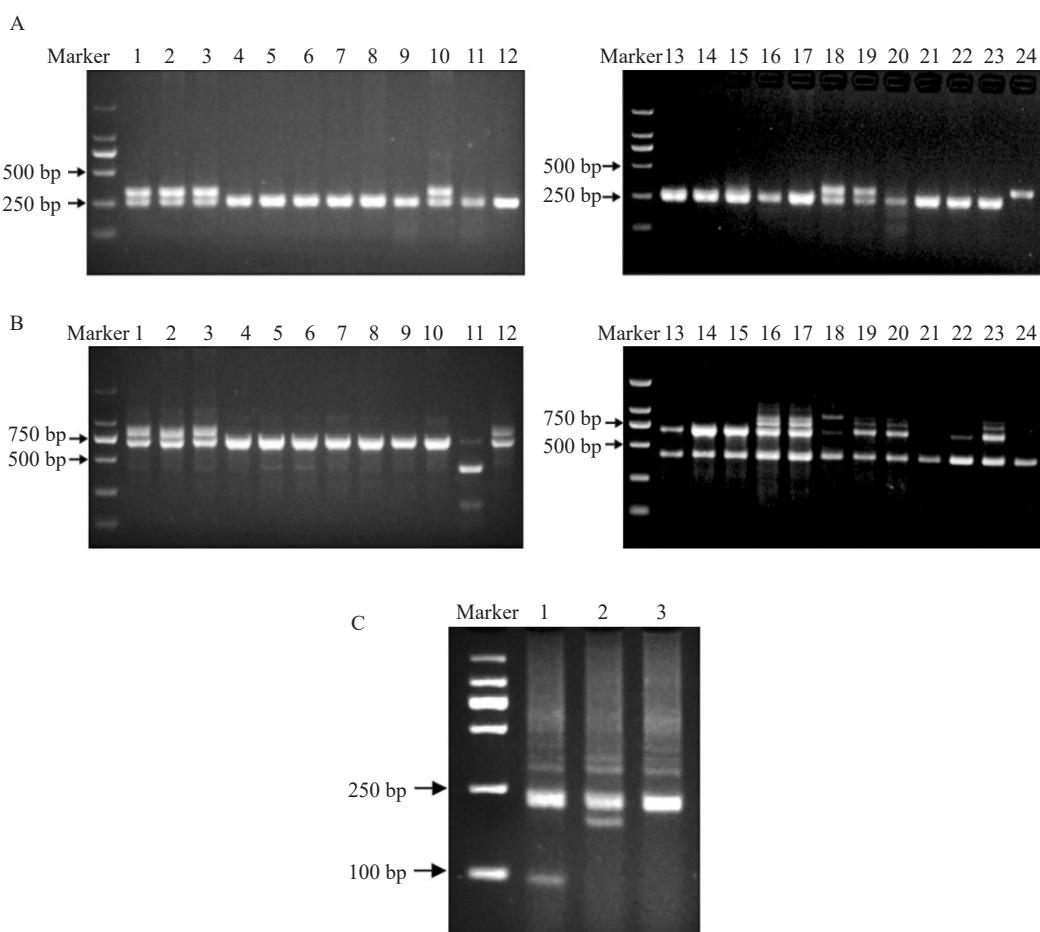
引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences (5'-3')
P1-21-F	TGGCTTCCAAACATCCTC
P1-21-R	GTAGAGGCATCCAGCACA
P4-46-F	ACATCATCACGACCAGTA
P4-46-R	CATCCACCAACAGCAACA
P3-38-F	CCTTCTCAAATGGCTCCTC
P3-38-R	ATAGCCTCACTCCCGAAAG

为进一步验证本研究筛选的引物的特异性和准确性,笔者额外收集了来自中国不同地理区域的12个李种质的DNA样本,进行InDel分子标记的验证分析。这些样本主要包括西南地区的粉黛脆李、凤

凰李、脆红李;北方地区的国峰、大红袍、黄干核;华南地区的岭溪李;华东地区的槜李、奈李;以及杏李中的恐龙蛋、味帝和用于观赏的种质紫叶李。

使用引物P1-21检测时,蜂糖李与台湾蜜李、黄干核李、岭溪李带型一致,为双条带,而其他李种质表现为单带型。当使用引物P4-46进行检测时,蜂糖李与三华李的带型相同,与其他李种质的带型均存在差异,尽管粉黛脆李、凤凰李等种质也表现为双条带,但其中一条带的位置在500 bp以下,与蜂糖李和三华李明显不同。经多次PCR检测,结果稳定一致,因此使用引物P1-21与P4-46结合,可以区分出蜂糖李与本研究中所用的其他李种质(图5)。

同时,笔者还利用重测序数据中预测到的InDel



A. P1-21; B. P4-46; C. P3-38。1. 黄皮蜂糖李;2. 青皮蜂糖李;3. 一点红蜂糖李;4. 蜜李1号;5. 安顺本地晚熟李;6. 晚熟青脆李;7. 四月李;8. 打帮李;9. 冰脆李;10. 台湾蜜李;11. 三月李;12. 三华李;13. 粉黛脆李;14. 凤凰李;15. 脆红李;16. 国峰7号;17. 大红袍;18. 黄干核李;19. 岭溪李;20. 桢李;21. 黄金奈李;22. 恐龙蛋;23. 味帝;24. 紫叶李。

A. P1-21; B. P4-46; C. P3-38. 1. Huangpifengtangli; 2. Qingpifengtangli; 3. Yidianhongfengtangli; 4. Mili No. 1; 5. Anshunbendiwanhuli; 6. Wanshuqingcuili; 7. Siyueli; 8. Dabangli; 9. Bingcuili; 10. Taiwanmili; 11. Sanyueli; 12. Sanhuali; 13. Fendaicuili; 14. Fenghuangli; 15. Cuihongli; 16. Guofeng No. 7; 17. Dahongpao; 18. Huangganheli; 19. Lingxili; 20. Zuili; 21. Huangjinnaili; 22. Konglongdan; 23. Weidi; 24. Ziyeli.

图5 InDel标记P1-21、P4-46、P3-38对供试李种质的检验结果

Fig. 5 Test results of InDel markers P1-21, P4-46, and P3-38 in the evaluated plum germplasm

位点,对蜂糖李的3个品系,即黄皮、青皮和一点红,进行了分子标记引物的设计。经过一系列的引物筛选,笔者发现标记P3-38可在3个蜂糖李品系中经PCR扩增产生不同的条带,黄皮蜂糖李在100 bp位置产生一个特异的条带,青皮蜂糖李在100~250 bp之间产生一个特异的条带,而一点红蜂糖李均未发现有上述两个特异条带。因此,利用该引物可有效区分蜂糖李的3个主要品系(图5)。

3 讨 论

3.1 中国李的花粉形态特征及外壁纹饰差异

本研究中12个供试李种质的花粉均为单粒花粉,按照极性、对称类型以及萌发器官的特征,他们被划分为NPC分类系统中的N3P4C5类型。供试李种质花粉的形状为长球形或超长球形,极面观呈三裂圆形,赤面观则呈长椭圆形,外壁纹饰由条纹与穿孔构成。在前人研究中,李属植物花粉的赤道轴与极轴长度接近,形状为近球形,例如部分杏品种^[13]以及喜马拉雅臭樱^[14],但更多的研究表明李花粉通常为长球形或超长球形,如棕李^[15]、多数欧洲李^[16-17],这些观察结果与本研究一致,同时在NPC分类上也与本研究的结果相符。

在亲缘关系较近的植物花粉中,花粉外观的差异更多体现于外壁纹饰上,外壁纹饰对种质鉴定与分类的研究具有重要意义^[18]。在猕猴桃属植物中,花粉外壁纹饰可分为条纹、规则瘤状、不规则瘤状、小沟状或穿孔等4种类型,判别花粉外壁纹饰对其分类与分组有着较大价值^[19]。同时,在龙胆科^[20]、凤仙花^[4]等植物中也发现了同科、同属的外壁纹饰上存在差异的现象。在李属植物中,花粉的外壁纹饰被发现有条纹-穿孔、脑纹-穿孔、疣状-穿孔、穿孔但表面较光滑、条纹无穿孔等^[15,17]。全球主要的李栽培与商业品种为欧洲李或中国李,他们在国际上均被划分在真李组内^[21]。本研究供试种质,包括贵州本地李种质、广东李种质与引进种质,均为二倍体的中国李,在外壁纹饰上的表现均为条纹-穿孔,与前人对福建产李种质棕李的发现一致^[15],这可能说明了原产自南方的李种质之间的亲缘关系较为密切,这与魏潇等^[22]的观点相符。

因此,笔者认为李属花粉的大小、形状、极面与赤面观上的差距较小,李属植物中不同种间的差异主要集中于外壁纹饰上。在亲缘关系较近的同一组

间,外壁纹饰的类型差距也相对较小,主要的差异表现在外壁纹饰的孔频、孔径、脊宽和脊间距上。在本研究的3个蜂糖李品系中,一点红蜂糖李的外壁纹饰的孔频、孔径与其余品系存在一定的差距,蜂糖李与其他种质间的差异也主要集中于上述特征,孢粉学中的外壁纹饰特征能为鉴别蜂糖李及其品系提供一定的参考信息。

3.2 蜂糖李与四月李的孢粉学差异及进化程度

通过对花粉外观和外壁纹饰数据的聚类分析,笔者发现蜂糖李与三月李、四月李之间存在较大的差距,这暗示他们的亲缘关系较远。在实际生产中,从种苗到果实销售过程中,四月李常与蜂糖李发生混淆,但他们无论从管理到果实品质上都存在较大的差异。孢粉学上的较大差异对蜂糖李与四月李的区分具有一定的参考价值,孢粉学可以作为区分蜂糖李与四月李的辅助方法。

植物花粉大小的进化趋势在不同的研究中存在不同的观点。在一些植物中,如玉兰亚属^[23]和枇杷^[24],认为花粉由大到小进化。然而,也有研究认为花粉由小型演化为大型^[18,25]。在外层纹饰的进化趋势上,普遍认为植物花粉的复杂性随着进化程度的增加而增加。外壁纹饰通常呈现从简单到复杂、从条纹到穿孔、从颗粒与棒刺状到条纹网状的演化规律^[26-27]。在前人对中国李的孢粉学研究中,中国李花粉通常表现出较为规则的条纹结构且穿孔较少,因此认为中国李的进化程度相对较低^[28]。在本研究的供试李种质中,多数为大型花粉,条纹较为规则,条脊主要呈波浪形或条形,存在少量的分支与交叉。与其他供试种质相比,四月李的花粉条纹较密,孔径相对较小。四月李在贵州的种植历史相对较久,属于较为原始的种质,其花粉外壁纹饰特征在供试种质中进化程度也相对更低。

3.3 分子标记与孢粉学结合在种质鉴别中的准确性

花粉作为植物的繁殖器官,其结构主要由基因型决定,受环境等外部因素的影响较小^[12]。然而,由于在不同的研究中对花粉的处理和保存方法存在差异,以及花粉外壁纹饰特点的判定标准不够一致,存在主观性,因此不能单纯依赖孢粉学来进行种质区分和鉴别^[18]。在实际应用中,应结合基因分析和形态学等多方面的数据进行综合判定才更为准确。

在DNA分子标记的实际应用中,种质鉴别是最

广泛的应用之一,主要使用共显性标记,如SSR标记和InDel标记。桃^[29]、山杏^[30]等物种的研究已表明了SSR标记在构建指纹图谱或分子身份证方面的的重要性。随着全基因组重测序技术的发展,InDel标记在果树的真假杂种鉴定方面具有优越性^[31]。王珏等^[32]对中国樱桃进行了InDel标记的开发,并发现在蔷薇科果树中具有较强的通用性。汤雨晴等^[8]利用InDel标记鉴别金兰柚,利用最少两对InDel分子标记即可区分金兰柚与其他47个柚品种,证明使用引物组鉴别种质具有一定的可靠性。笔者利用重测序数据筛选出的InDel分子标记P1-21与P4-46可以区分蜂糖李与供试的其他21个李种质。在本研究中贵州本地的李种质如打帮李、安顺本地晚熟李与蜂糖李在孢粉上差距较小,而他们在标记P1-21与P4-46的鉴定中表现出不同的带型,能够直观、快捷地对他们进行鉴别区分。

孢粉学结果虽然能够表达更多的遗传信息,可作为判断种质之间亲缘关系的一种重要的参考依据,但作为品种鉴别的方法,具有一定的局限性。在本研究中,一点红蜂糖李的花粉外壁纹饰与其他品系存在差异,同时标记P3-38能区分蜂糖李中的黄皮、青皮和一点红。这对引物能在任何生长阶段为这3个品系的鉴别提供参考,弥补了孢粉学上存在的时效性问题。但未来还需进一步对上述引物的准确性进行验证,对蜂糖李中的品系进行进一步的划分,并开发更多的分子标记以及其他鉴别方法,完善蜂糖李的鉴别体系。

4 结 论

笔者在本研究中揭示了蜂糖李与三月李、四月李在孢粉特征上存在显著区别,不同品系蜂糖李孢粉差距集中在外壁纹饰上。笔者还开发了2对InDel分子标记,联合使用能够将蜂糖李与其他21份李种质有效区分,同时还筛选出一对InDel分子标记,可用于区分蜂糖李中的3个品系。

参考文献 References:

- [1] 张毅,李用奇,肖祎,吴家丽,程蕾.李新品种‘蜂糖李’的选育及栽培技术[J].中国南方果树,2018,47(6):146-148.
ZHANG Yi, LI Yongqi, XIAO Yi, WU Jiali, CHENG Lei. Breeding and cultivation techniques of the new plum variety ‘Fengtangli’[J]. South China Fruits, 2018, 47(6):146-148.
- [2] 周婷,沈星诚,周道建,范俊俊,赵明明,张往祥,曹福亮.海棠品种分类研究进展[J].园艺学报,2018,45(2):380-396.
ZHOU Ting, SHEN Xingcheng, ZHOU Daojian, FAN Junjun, ZHAO Mingming, ZHANG Wangxiang, CAO Fuliang. Advances in the classification of crabapple cultivars[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2018, 45(2):380-396.
- [3] 黄礼森,李树玲,傅仓生,李振兰.中国梨属植物花粉形态的比较观察[J].园艺学报,1993,20(1):17-22.
HUANG Lisen, LI Shuling, FU Cangsheng, LI Zhenlan. Comparative observations on morphological characteristics of pollen of *Pyrus* in China[J]. Acta Horticulturae Sinica, 1993, 20(1): 17-22.
- [4] 王茜,杨旭东,夏常英,李瑾,于胜祥.凤仙花组(*Impatiens* sect. *Impatiens*)植物花粉形态研究[J].园艺学报,2020,47(5):893-906.
WANG Qian, YANG Xudong, XIA Changying, LI Jin, YU Shengxiang. Pollen morphology of *Impatiens* sect. *Impatiens* (Balsaminaceae)[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2020, 47(5): 893-906.
- [5] 陈朝文,朱海生,凌永胜,郑雅超,方桂花,李扬,王智卿,林金秀,郑凯玲.20个丝瓜品种的花粉形态特征研究[J].福建农业学报,2023,38(1):31-38.
CHEN Chaowen, ZHU Haisheng, LING Yongsheng, ZHENG Yachao, FANG Guihua, LI Yang, WANG Zhiqing, LIN Jinxiu, ZHENG Kailing. Morphological characteristics of pollens of 20 varieties of luffa[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2023, 38(1):31-38.
- [6] 宋海岩,孙淑霞,李靖,涂美艳,王玲利,徐子鸿,陈栋,江国良.基于SSR标记检测与重测序技术的3个李品种鉴定与遗传背景简析[J].中国南方果树,2023,52(3):94-101.
SONG Haiyan, SUN Shuxia, LI Jing, TU Meiyuan, WANG Lingli, XU Zihong, CHEN Dong, JIANG Guoliang. Identification and genetic background analysis of three plum varieties based on SSR marker detection and resequencing technology[J]. South China Fruits, 2023, 52(3):94-101.
- [7] 左力辉,韩志校,梁海永,杨敏生.不同产地中国李资源遗传多样性SSR分析[J].园艺学报,2015,42(1):111-118.
ZUO Lihui, HAN Zhixiao, LIANG Haiyong, YANG Minsheng. Analysis of genetic diversity of *Prunus salicina* from different producing areas by SSR markers[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2015, 42(1):111-118.
- [8] 汤雨晴,杨惠栋,闫承璞,王斯好,王雨亭,胡钟东,朱方红.基于重测序的‘金兰柚’基因组InDel标记的开发及应用[J].园艺学报,2023,50(1):15-26.
TANG Yuqing, YANG Huidong, YAN Chengpu, WANG Siyu, WANG Yuting, HU Zhongdong, ZHU Fanghong. Development and application of Jinlan pummelo (*Citrus maxima*) InDel markers based on genome re-sequencing[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2023, 50(1):15-26.
- [9] 马福萌,王明霞,刘童光,张其安,方凌,王本勤,刘雪静.安徽乌菜DNA提取与InDel引物筛选[J].中国瓜菜,2014,27(2):36-38.

- MA Fumeng, WANG Mingxia, LIU Tongguang, ZHANG Qi'an, FANG Ling, WANG Benqin, LIU Xuejing. DNA extraction and indel primer screening of Wucai (*Brassica campestris* L. ssp. *chinese* (L.) Makino var. *rosularis* Tsen et Lee) in Anhui[J]. *China Cucurbits and Vegetables*, 2014, 27(2): 36-38.
- [10] 姜童, 王辉, 陈宁, 付翔, 杨延杰, 林多. 利用 InDel 指纹图谱评价鲁西南地区簇生朝天椒品种的相似度[J]. *华北农学报*, 2018, 33(2): 126-132.
- JIANG Tong, WANG Hui, CHEN Ning, FU Xiang, YANG Yanjie, LIN Duo. Similarity evaluation of clustered pepper varieties in southwest Shandong Province with InDel fingerprint[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2018, 33(2): 126-132.
- [11] 谢志亮, 何业华, 彭兵, 刘成明, 胡中沂, 余小玲, 方少秋, 韩景忠, 卢敏. 几种三华李基因组 DNA 提取方法的比较研究[J]. *中国南方果树*, 2010, 39(1): 56-59.
- XIE Zhiliang, HE Yehua, PENG Bing, LIU Chengming, HU Zhongyi, YU Xiaoling, FANG Shaoqiu, HAN Jingzhong, LU Min. Comparison of total DNA extraction methods for 'Sanhua' plum[J]. *South China Fruits*, 2010, 39(1): 56-59.
- [12] ERDTMAN G. *Handbook of palynology: Morphology, taxonomy, ecology*[M]. New York: Verlag Munksgaard, 1969: 1-48.
- [13] 罗新书, 陈学森, 郭延奎, 苗良, 于希志. 杏品种孢粉学研究[J]. *园艺学报*, 1992, 19(4): 319-325.
- LUO Xinshu, CHEN Xuesen, GUO Yankui, MIAO Liang, YU Xizhi. Studies on the pollen morphology of apricot variety resources[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 1992, 19(4): 319-325.
- [14] SHI W T, WEN J, LUTZ S. Pollen morphology of the *Maddenia* clade of *Prunus* and its taxonomic and phylogenetic implications[J]. *Journal of Systematics and Evolution*, 2013, 51(2): 164-183.
- [15] 廖汝玉, 任丽花, 曾志芳, 尹兰香. 桔李的孢粉学初步研究[J]. *热带亚热带植物学报*, 2016, 24(4): 429-436.
- LIAO Ruyu, REN Lihua, ZENG Zhifang, YIN Lanxiang. Palynological studies on the Nai plum germplasms[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2016, 24(4): 429-436.
- [16] ĆALIĆ D, DEVRNJA N, KOSTIĆ I, KOSTIĆ M. Pollen morphology, viability, and germination of *Prunus domestica* cv. Požegača[J]. *Scientia Horticulturae*, 2013, 155: 118-122.
- [17] 孙琪, 廖康, 耿文娟, 周宏伟, 樊丁宇, 刘欢, 曹倩. 基于花粉微观特征的新疆欧洲李亲缘关系分析[J]. *果树学报*, 2015, 32(3): 393-403.
- SUN Qi, LIAO Kang, GENG Wenjuan, ZHOU Hongwei, FAN Dingyu, LIU Huan, CAO Qian. Phylogenetic relationship analysis of European plum in Xinjiang based on pollen microscopic characteristics[J]. *Journal of Fruit Science*, 2015, 32(3): 393-403.
- [18] 刘有春, 陶承光, 刘威生, 刘宁, 刘硕, 章秋平, 郁香荷, 张玉萍, 徐铭, 张同喜. 花粉形态在核果类果树遗传起源和系统关系研究中的应用[J]. *园艺学报*, 2013, 40(9): 1701-1709.
- LIU Youchun, TAO Chengguang, LIU Weisheng, LIU Ning, XU Ming, ZHANG Tongxi. Application of pollen morphology in the genetic origin and phylogenetic relationship of stone fruit trees[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2013, 40(9): 1701-1709.
- [19] 赵洋, 穆雪, 李春艳, 汪卫星. 猕猴桃属(*Actinidia* Lindl.)植物亲缘关系研究进展[J]. *果树学报*, 2019, 36(9): 1214-1228.
- ZHAO Yang, MU Xue, LI Chunyan, WANG Weixing. Research advances on the genetic relationships of kiwifruit (*Actinidia* Lindl.)[J]. *Journal of Fruit Science*, 2019, 36(9): 1214-1228.
- [20] 李洪池, 吴天彧, 罗建. 西藏色季拉山区龙胆科 30 种植物的花粉形态特征[J]. *园艺学报*, 2021, 48(12): 2427-2442.
- LI Hongchi, WU Tianyu, LUO Jian. Pollen morphological characteristics of 30 species of Gentianaceae in Shergyla Mountain Area, Tibet[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2021, 48(12): 2427-2442.
- [21] 刘硕, 徐铭, 刘家成, 章秋平, 马小雪, 刘宁, 张玉萍, 张玉君, 赵海娟, 刘威生. 世界李育种概况[J]. *中国农业科学*, 2023, 56(9): 1744-1759.
- LIU Shuo, XU Ming, LIU Jiacheng, ZHANG Qiuping, MA Xiaoxue, LIU Ning, ZHANG Yuping, ZHANG Yujun, ZHAO Haijuan, LIU Weisheng. An overview of the worldwide plum breeding[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2023, 56(9): 1744-1759.
- [22] 魏潇, 章秋平, 刘威生. 中国李种质资源研究进展[J]. *园艺学报*, 2020, 47(6): 1203-1212.
- WEI Xiao, ZHANG Qiuping, LIU Weisheng. Research progress on plum germplasm resources in China[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2020, 47(6): 1203-1212.
- [23] 王啸博, 曹颖, 郭伟, 马琳, 刘秀丽. 玉兰亚属 44 种(品种)的花粉形态特征研究[J]. *园艺学报*, 2023, 50(11): 2417-2434.
- WANG Xiaobo, CAO Ying, GUO Wei, MA Lin, LIU Xiuli. Morphological characteristics of pollen from 44 species of subgen. *Yulania*[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2023, 50(11): 2417-2434.
- [24] 杨向晖, 吴颖欣, 林顺权. 6 种枇杷属植物花粉形态扫描电镜观察[J]. *果树学报*, 2009, 26(4): 572-576.
- YANG Xianghui, WU Yingxin, LIN Shunquan. SEM observation on the pollen morphology of six *Eriobotrya* plants[J]. *Journal of Fruit Science*, 2009, 26(4): 572-576.
- [25] 刘伟, 李桂祥, 董晓民, 李勃, 韩真, 张安宁. 肥城桃花粉粒形态观察[J]. *果树学报*, 2018, 35(1): 38-45.
- LIU Wei, LI Guixiang, DONG Xiaomin, LI Bo, HAN Zhen, ZHANG Anning. Observation on pollen grains of Feicheng peaches[J]. *Journal of Fruit Science*, 2018, 35(1): 38-45.
- [26] NOROOZI M, GHAHREMANINEJAD F, BOGLER D, WITHERSPOON J M, RYAN G L, MILLER J S, RIAHI M, COHEN J I. Parsing a plethora of pollen: the role of pollen size and shape in the evolution of Boraginaceae[J]. *Cladistics*, 2022, 38(2): 204-226.
- [27] WALKER J W. Evolution of exine structure in the pollen of primitive angiosperms[J]. *American Journal of Botany*, 1974, 61(8): 891.

- [28] 刘有春,刘威生,郁香荷,孙猛,刘宁,章秋平,张玉萍,徐铭,刘硕.欧洲李(*Prunus domestica*)及其近缘种的孢粉学研究[J].果树学报,2010,27(4):526-532.
LIU Youchun, LIU Weisheng, YU Xianghe, SUN Meng, LIU Ning, ZHANG Qiuping, ZHANG Yuping, XU Ming, LIU Shuo. Palynological study on *Prunus domestica* and its related species[J]. Journal of Fruit Science, 2010, 27(4): 526-532.
- [29] 王琳,敖敦,包文泉,张淑宁,陈俊兴,李凤鸣,孟繁庆,杨钰莹,白玉娥.基于SSR分子标记的桃品种鉴别及指纹图谱构建[J].中南林业科技大学学报,2021,41(6):131-138.
WANG Lin, AO Dun, BAO Wenquan, ZHANG Shuning, CHEN Junxing, LI Fengming, MENG Fanqing, YANG Yuying, BAI Yu'e. Research on the identification of main peach varieties and construction of fingerprint based on SSR markers[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2021, 41(6): 131-138.
- [30] 金玲,刘明国,董胜君,吴月亮,张欣.97个山杏无性系的遗传多样性及SSR指纹图谱[J].林业科学,2018,54(7):51-61.
JIN Ling, LIU Mingguo, DONG Shengjun, WU Yuejiang,
- ZHANG Xin. Genetic diversity and fingerprints of 97 *Armenia-sibirica* clones based on SSR markers[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2018, 54(7): 51-61.
- [31] 孙世航,林苗苗,齐秀娟,孙雷明,钟云鹏,方金豹.应用InDel标记进行软枣猕猴桃杂交子代真实性鉴定[J].果树学报,2018,35(1):32-37.
SUN Shihang, LIN Miaomiao, QI Xiujuan, SUN Leiming, ZHONG Yunpeng, FANG Jinbao. Application of InDel markers on progeny identification in *Actinidia arguta*[J]. Journal of Fruit Science, 2018, 35(1): 32-37.
- [32] 王珏,王燕,张静,陈涛,王磊,陈清,汤浩茹,王小蓉.中国樱桃InDel标记开发及其在蔷薇科果树中通用性评价[J].园艺学报,2020,47(1):98-110.
WANG Jue, WANG Yan, ZHANG Jing, CHEN Tao, WANG Lei, CHEN Qing, TANG Haoru, WANG Xiaorong. Development of insertion-deletion (InDel) markers based on whole-genome sequencing data in Chinese cherry and their transferability in Rosaceae fruit trees[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2020, 47 (1): 98-110.