

利用 SSR 技术鉴定杧果实生后代 真假杂种及其遗传特性分析

党志国¹, 郑燕萍¹, 朱敏^{1,2}, 陈业渊^{1,2}, 高爱平¹,
黄建峰¹, 罗睿雄¹, 余东³, 雷新涛^{1*}

(¹中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 海口 571101; ²中国热带农业科学院三亚研究院,
海南三亚 572024; ³福建省农业科学院果树研究所, 福州 350013)

摘要:【目的】鉴定杧果杂交后代F₁的真实性与群体遗传特性,为进一步开展杧果遗传改良与群体构建、亲本选择提供依据。【方法】选择13个主要品种为亲本试材,混合种植进行自然授粉,获得1001个F₁后代,利用SSR标记对其进行遗传多样性研究。【结果】以亲本DNA为模板,筛选出了13对引物应用于遗传多样性研究,检测到等位基因数范围3~9个,平均6.154个,平均有效等位基因数(Ne)为2.557,Shannon's信息指数(I)为1.078,观测杂合度(Ho)为0.571,期望杂合度(He)为0.579,多态性信息含量(PIC)为0.526;UPGMA聚类分析显示,在遗传相似系数为0.50时,可分为3个类群,与群体结构分析结果基本一致;F₁代真假杂种鉴定结果中,母本为贵妃、金煌、凯特、台农1号、A61、Juile、凯特的F₁子代,真杂种率均高于50%,其中金煌、台农1号、A61真杂种率高于80%,在期望杂合度与观测杂合度方面,台农1号、凯特、Juile、金煌、红玉、贵妃的杂合度也相对较高,南迢迢、R2E2、红玉、Villard、椰香真杂种率低,分别为25.00%、13.71%、25.15%、33.33%、36.36%。【结论】杧果品种台农1号、凯特、Juile、金煌、红玉、贵妃的杂交亲和性较强,南迢迢、R2E2、红玉、Villard、椰香品种极易自交,且品种间存在许多等位基因的现象,遗传多样性较为丰富。

关键词:杧果; SSR分子标记; 杂种鉴定; 遗传特性

中图分类号:S667.7

文献标志码:A

文章编号:1009-9980(2024)12-2397-11

Identification of true hybrids of open-pollination seedling progenies in mango and genetic characterization of the progenies using SSR markers

DANG Zhiguo¹, ZHENG Yanping¹, ZHU Min^{1,2}, CHEN Yeyuan^{1,2}, GAO Aiping¹, HUANG Jianfeng¹, LUO Ruixiong¹, YU Dong³, LEI Xintao^{1*}

(¹Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, Hainan, China; ²Sanya Research Institute of Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya 572024, Hainan, China; ³Fruit Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, Fujian, China)

Abstract:【Objective】As a perennial woody fruit tree, mango (*Mangifera indica* L.) has the problems of high genomic heterozygosity, unclear self-compatibility and hybridization affinity of most breeding parents, and low seed setting rate of artificial pollination, which brings some difficulties to the selection of parents for mango hybridization. SSR markers are mainly used in genetic diversity analysis, genetic relationship analysis and fingerprint construction in mango, but the use of SSR markers for identifying the true hybrids of mango F₁ progeny has not been reported. In this study, 13 varieties were selected as parental materials, and SSR technology was used to detect the true hybrids and analyze the genetic characteristics of 1001 F₁ progeny plants in order to provide theoretical guidance for clarifying the hybridization affinity of mango breeding parents and the selection of breeding parents.【Methods】The 13

收稿日期:2024-04-01 接受日期:2024-09-28

基金项目:海南省重大科技计划项目(ZDKJ2021014);财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系专项(CARS-31);海南省杧果产业技术体系专项(HNARS-07);福建省属公益类科研院所基本科研专项(2021R1028005)

作者简介:党志国,男,副研究员,博士,研究方向为果树遗传育种与种质资源评价。E-mail:dangsan@126.com

*通信作者 Author for correspondence. E-mail:xtlei@263.net

mango varieties were mixed and planted for natural pollination. The mature fruits were harvested from the fruiting mother tree. The mother varieties included 12 varieties such as Guifei, Tainong No. 1, Jinhuang, Juile, Nan Doc Mai, Yexiang, Villard, R2E2, Tangmi, Hongyu, A61 and Keitt. The seedlings were obtained after sowing. 100 mg of fresh tissue of the leaves of each seedling were taken with a puncher. The DNA was extracted by magnetic bead genomic DNA extraction kit, and the concentration and purity of DNA were detected by ultraviolet spectrophotometer and 1% agarose gel electrophoresis, the PCR products were detected by agarose gel electrophoresis (1% concentration) and capillary fluorescence electrophoresis. 200 pairs of primers were selected from the previous transcriptome data of mango for screening, and 200 pairs of primers were synthesized using each parent as the template of DNA. The screened primers were used for SSR analysis. The genetic parameters such as number of alleles (Na), number of effective genes (Ne), observed heterozygosity (Ho), expected heterozygosity (He), fixation index (F) and Shannon's information index (I) were calculated by the Cervus software; The polymorphism information index (PIC) was calculated by the GenALEX6.0 software, and the genetic differentiation coefficient was obtained; The Structure was used to analyze the genetic structure of the population and the genetic diversity of mango F_1 generation; The unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) was used to cluster the populations of mango offspring by using the selected SSR core primers. 【Results】 Thirteen pairs of primers with stable amplification and clear bands were screened, and 13 loci with good polymorphism and stability were determined. The PIC value was between 0.314 and 0.741, and the polymorphism of the loci was high. The number of alleles ranged from 3 to 9, with an average of 6.154. The average effective number of alleles (Ne) was 2.557, the Shannon's information index (I) was 1.078, the observed heterozygosity (Ho) was 0.571, the expected heterozygosity (He) was 0.579, and the polymorphism information content (PIC) was 0.526; The UPGMA cluster analysis showed that when the genetic similarity coefficient was 0.50, it could be divided into three groups, which was basically consistent with the results of population structure analysis. Compared with other varieties, the alleles of mango varieties Guifei, Yexiang, and Juile were more evenly distributed in the population, the average Shannon's information index (I) was higher, and Juile was the lowest, indicating that the genetic diversity in the Guifei population was higher and the population differentiation was the highest; The genetic differentiation between Guifei and Juile was obvious, and the genetic differentiation between the other varieties was small; The true hybrid rates of the open-pollination progenies generated from the mother plants of Guifei, Jinhuang, Keitt, Tainong No. 1, A61, Juile and Keitt were over 50%, and the true hybrid rate of Jinhuang, Tainong No. 1 and A61 was as high as 80%; In terms of expected heterozygosity and observed heterozygosity, the heterozygosity of Tainong No. 1, Keitt, Juile, Jinhuang, Hongyu and Guifei was also relatively high, and the true heterozygosity of Nan Doc Mai, R2E2, Hongyu, Villard and Yexiang, was low, which was 25.00%, 13.71%, 25.15%, 33.33% and 36.36%, respectively. 【Conclusion】 The genetic differentiation between Hongyu and R2E2, Hongyu and Yexiang, Hongyu and Nan Doc Mai, Juile and R2E2, Juile and Nan Doc Mai, Guifei and Nan Doc Mai, Guifei and Juile was obvious, and the genetic differentiation between the remaining varieties was small; The SSR identification of mango open-pollination generation showed that the crossing compatibility of mango varieties Tainong No. 1, Keitt, Juile, Jinhuang, Hongyu and Guifei was strong, while the crossing compatibility of Nan Doc Mai, R2E2, Hongyu, Villard and Yexiang, varieties was weak, which was easy to self-fertilize, and there were many alleles among the varieties, and the genetic diversity was rich.

Key words: Mango; SSR; Hybrid identification; Genetic characteristics

杧果(*Mangifera indica* Linn.)为漆树科杧果属植物,素有“热带果王”之称,具有一定的营养价值与经济价值^[1]。杧果作为多年生木本果树,基因组杂合度高,且大部分育种亲本自交亲和性、杂交亲和性不够清晰,人工授粉结实率低,给杂交育种亲本的选配带来了一定难度。

分子标记是继传统形态标记、细胞标记、生化标记之后兴起的新技术。相对于RFLP、PAPD、STS、AFLP等其他分子标记技术,简单重复序列标记(simple sequence repeats, SSR)具有位点丰富、重复性好、鉴别能力强、多态性高、呈共显性^[2]等优点,被广泛应用于花生^[3~5]、小豆^[6]、板栗^[7]、石榴^[8~9]、水稻^[10]、茶树^[11]和苹果^[12]等多种作物杂交后代的真假鉴定以及遗传多样性分析等。

目前,在杧果的研究中,SSR主要应用于遗传多样性分析、亲缘关系分析以及指纹图谱的构建^[13],姚全胜等^[14]利用SSR技术对184株杂交实生苗进行鉴定,证实该技术可以对杧果杂种的真实性进行快速验证,但是多亲本、大样本实生后代杂种鉴定研究未见报道。笔者在本研究中以大果、红色、高可溶性固形物含量、丰产稳产为育种目标,选择13个品种为亲本材料,采用SSR技术对其1001个F₁后代株进行真假杂种检测及遗传特性分析,为明确杧果育种亲本杂交亲和性和育种亲本选配提供理论指导。

1 材料和方法

1.1 试验材料

材料种植于中国热带农业科学院品种资源研究所儋州实验基地五队的杧果育种圃,13个杧果品种贵妃、金煌、台农1号、白象牙、红玉、R2E2、椰香、汤米、凯特、Villard、南迢迈、Juile、A61混合种植,进行自然授粉。从挂果母本树上收获成熟果实,母本品种包括贵妃、台农1号、金煌、Juile、南迢迈、椰香、Villard、R2E2、汤米、红玉、A61、凯特等12个品种,播种后获得实生后代,共1001份材料,并从13个品种中鉴定出实生后代的可能父本,并分析其遗传特性。

1.2 DNA提取

用打孔器在叶片上打孔,取新鲜组织100 mg,采用磁珠法基因组DNA提取试剂盒提取杧果的基因组DNA,用紫外分光光度计和1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA浓度和纯度,-20℃保存备用。

1.3 引物筛选

在前期获得杧果的转录组数据中选取200对引

物中进行筛选,由天一辉远生物科技有限公司合成,通过预试验,对每对引物都进行多次重复扩增。以各亲本作为DNA的模板对合成的200对引物进行筛选,将筛选得到的引物对样品进行SSR分析。

1.4 SSR-PCR体系

PCR反应体系如表1,扩增反应为:95℃预变性5 min,95℃变性30 s,52~62℃退火30 s,72℃延伸30 s,10个循环,每个循环降1℃;95℃变性30 s,52℃退火30 s,72℃延伸30 s,25个循环;72℃末端延伸20 min,4℃保存。

表1 PCR反应体系(15 μL)

Table 1 PCR reaction system (15 μL)

反应体系 Reaction system	用量 Dosage/μL
2×Taq PCR Mix	7.5
ddH ₂ O	4.5
上游引物 Forward primer/(10 mmol·L ⁻¹)	1.0
下游引物 Reverse primer /(10 mmol·L ⁻¹)	1.0
DNA	1.0

1.5 PCR产物检测

采用1%琼脂糖凝胶电泳检测与毛细管荧光电泳检测。

1.6 数据统计与分析

利用Excel统计扩增的等位基因位点信息。利用Cervus软件计算等位基因数(Na)、有效基因数(Ne)、观测杂合度(Ho)、期望杂合度(He)、固定指数(F)、Shannon's信息指数(I)等遗传参数;利用GenALEX6.0软件计算多态信息指数(PIC),获得遗传分化系数;利用R语言绘制热点图;利用Structure分析群体遗传结构;采用非加权组平均法(UPGMA),利用筛选出的SSR核心引物对杧果实生后代进行群体间的聚类分析。

2 结果与分析

2.1 SSR引物筛选

通过对每个亲本进行多次重复性检测,筛选出13对稳定扩增、条带清晰的引物对(表2),确定13个多态性和稳定性较好的位点(图1)。

2.2 各位点遗传多样性

13对引物在杧果中共获得80个等位基因,每对引物扩增的等位基因数为3~9个,其中MG-039、MG-046和MG-187检测到9个等位基因。每个位点有效等位基因数平均为2.557。Shannon's信息指数平均

表 2 13 对 SSR 引物序列
Table 2 13 pairs of SSR primer sequences

引物编号 Primer code	正向引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')
MG-023	CGGAGGCCTACAGGTGAATA	TGCATTGAACCAAACCTTGA
MG-030	GAGACAGGAAGCGAAAGCAG	AGTGCTTGGCGTTAGAGAA
MG-039	CCGAAATTAATTCCCGTGGT	TGAAGCTGGACAGTTGAGCA
MG-046	CAATGACCCACATCATCCAA	AAGGCCACGTATGTACCAGC
MG-055	TACCTCGTAATCCAGTCGGC	CGCACACGCACTCTTAGAA
MG-061	CTCTGCCTGTAAACCACCGT	CATGCAGCATTGCAATTACC
MG-063	GATTGAGGTTGGCCAGCTA	GTCCATTGTTAGGCCCTGAGA
MG-079	AGAACATGGCAGGCAATA	TGAAATTAGGACCCAGCCAG
MG-114	CACAGGCCCAACTTATTGCT	GGAGACCAGAGGTTGACGAA
MG-146	ATCTTCTGGTACAGGCGGTG	TTTCCCACCTTCCACGTT
MG-150	AGCGCCTTAAGATAGGCCACA	AAGTCATGAAGCTTGGGTG
MG-177	CATTGTCTCTGCACCAAACG	CTTGGCTATGGCTCCATCAT
MG-187	CCACGGGAATGTACCTGCTA	AGAAGATGCCGTACCAATGC

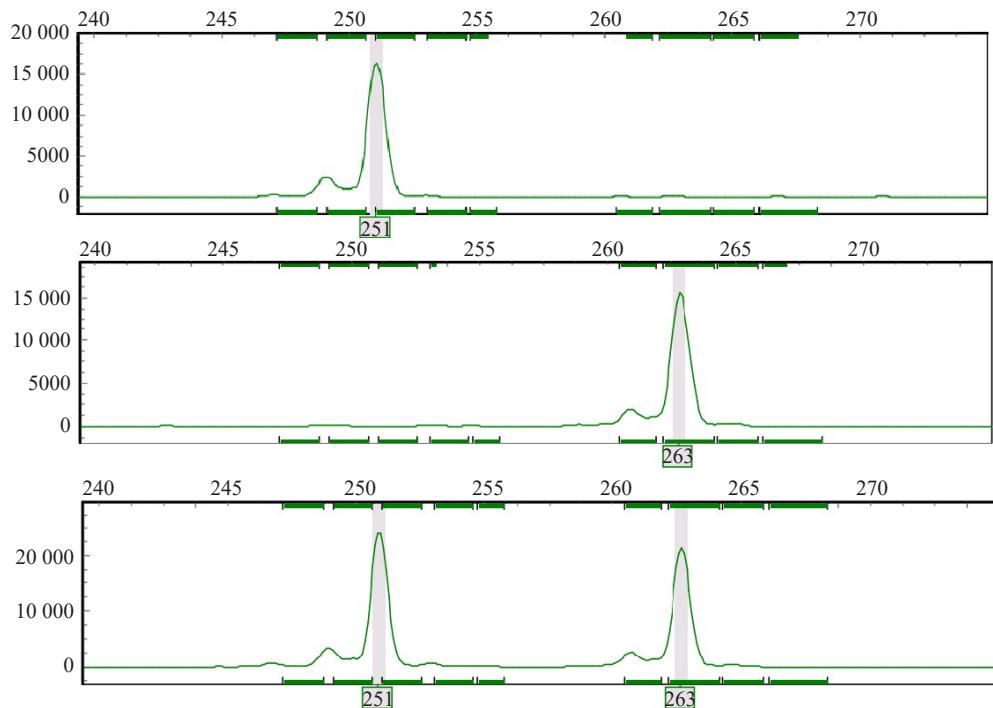


图 1 SSR 引物 MG-030 在部分杧果样品中的扩增情况
Fig. 1 Amplification of SSR primer MG-030 in some mango samples

为 1.027, 其中 MG-023 位点的 Shannon's 信息指数最高。平均期望杂合度略高于平均观测杂合度。一般认为, $0.25 < \text{PIC} \leq 0.5$ 时, 为中度多态性; $\text{PIC} > 0.5$ 时, 为高度多态性。13 个位点中 PIC 值在 0.314~0.741 之间, 表明这 13 个位点多态性较高(表 3)。

2.3 群体遗传多样性

在有效个体数(N)与等位基因数(Na)方面, 贵妃最高, Juile 最低, 说明在总群体内, 贵妃对应位点实际观测到的等位基因类型最多。有效等位基因数

值(Ne)越接近等位基因数(Na)的绝对值时, 表明等位基因在群体中分布越均匀, 即贵妃、椰香、Juile 相对于其他品种而言, 等位基因在群体中分布较均匀。贵妃平均 Shannon's 信息指数(I)最高, Juile 最低, 说明贵妃群体中遗传多样性较高, 种群分化程度最高, 反之, Juile 最低。贵妃的观测杂合度(H_o)与期望杂合度(H_e)均为最高, 表明贵妃的多态性高。固定指数(F)能够衡量种群中基因型的实际频率是否偏离 Hardy-Weinberg(哈代温伯格)理论比例, 当

表3 杧果 SSR 标记位点遗传参数
Table 3 Genetic parameters of mango SSR markers

位点 Locus	有效个体数 <i>N</i>	等位基因数 <i>Na</i>	有效等位基因数 <i>Ne</i>	香农信息指数 <i>I</i>	观测杂合度 <i>Ho</i>	期望杂合度 <i>He</i>	固定指数 <i>F</i>	多态信息指数 PIC
MG-023	1022	6	4.487	1.550	0.750	0.777	0.036	0.741
MG-030	1015	7	2.545	1.207	0.643	0.607	-0.060	0.564
MG-039	992	9	2.452	1.283	0.686	0.592	-0.159	0.565
MG-046	1022	9	2.044	0.961	0.498	0.511	0.025	0.450
MG-187	1021	9	1.489	0.742	0.324	0.328	0.013	0.314
MG-055	929	7	2.491	0.999	0.595	0.599	0.005	0.529
MG-063	968	3	2.801	1.061	0.602	0.643	0.063	0.567
MG-079	1017	4	1.577	0.655	0.389	0.366	-0.065	0.320
MG-114	977	5	2.620	1.033	0.438	0.618	0.291	0.538
MG-146	1017	6	2.222	1.086	0.625	0.550	-0.137	0.509
MG-150	1022	4	2.715	1.063	0.623	0.632	0.013	0.562
MG-177	1022	5	3.284	1.344	0.711	0.696	-0.023	0.651
MG-061	1018	6	2.516	1.028	0.538	0.603	0.107	0.522
平均 Mean	1 003.231	6.154	2.557	1.078	0.571	0.579	0.008	0.526

种群中纯合体过量时, $F>0$;反之,当杂合体过量时, $F<0$ (表4)。

2.4 哈代温伯格平衡检验

利用Hardy-Weinberg定律研究12种不同杧果

的基因,其中11个品种处于平衡状态,其中品种红玉显示显著偏离Hardy-Weinberg($p<0.05$)(表5)。

2.5 品种间遗传分化指数*Fst*

*Fst*指亲缘关系地方群体间的平均近交系数,当

表4 群体遗传多样性
Table 4 Population genetic diversity

品种 Variety	数据 Data	有效个体数 <i>N</i>	等位基因数 <i>Na</i>	有效等位基因数 <i>Ne</i>	香农信息指数 <i>I</i>	观测杂合度 <i>Ho</i>	期望杂合度 <i>He</i>	无偏期望杂合度 <i>uHe</i>	固定指数 <i>F</i>
A61	Mean	12.91	3.65	2.22	0.92	0.55	0.51	0.53	-0.09
	SE	0.06	0.23	0.14	0.07	0.05	0.03	0.04	0.06
贵妃 Guifei	Mean	173.91	5.43	2.56	1.09	0.57	0.58	0.58	0.00
	SE	1.30	0.49	0.15	0.06	0.03	0.03	0.03	0.05
红玉 Hongyu	Mean	170.09	4.74	1.93	0.78	0.55	0.44	0.44	-0.14
	SE	3.52	0.40	0.11	0.06	0.08	0.04	0.04	0.11
金煌 Jinhuang	Mean	85.00	4.78	2.57	1.06	0.52	0.56	0.57	0.04
	SE	0.54	0.36	0.18	0.07	0.03	0.03	0.03	0.05
Juile	Mean	1.87	2.09	1.87	0.60	0.52	0.38	0.51	-0.36
	SE	0.07	0.17	0.14	0.09	0.09	0.05	0.07	0.10
凯特 Keitt	Mean	110.35	5.35	2.51	1.06	20.50	0.56	0.56	0.10
	SE	1.49	0.41	0.16	0.06	0.04	0.03	0.03	0.05
南逗迈	Mean	30.04	3.65	1.98	0.75	0.51	0.41	0.42	-0.17
Nan Doc Mai	SE	0.50	0.22	0.20	0.07	0.06	0.04	0.04	0.06
R2E2	Mean	127.39	4.52	1.80	0.68	0.51	0.38	0.38	-0.18
	SE	0.58	0.24	0.12	0.07	0.08	0.04	0.04	0.09
汤米 Tangmi	Mean	126.83	4.74	2.38	0.99	0.52	0.53	0.53	0.01
	SE	0.65	0.33	0.16	0.07	0.04	0.03	0.03	0.06
台农1号	Mean	68.43	4.57	2.48	1.03	0.53	0.56	0.57	0.05
Tainong No.1	SE	1.04	0.35	0.15	0.06	0.04	0.03	0.03	0.06
Villard	Mean	50.91	4.30	2.39	0.99	0.56	0.54	0.55	-0.03
	SE	0.70	0.21	0.14	0.06	0.04	0.03	0.03	0.06
椰香	Mean	10.74	3.30	2.23	0.88	0.48	0.50	0.52	0.02
Yexiang	SE	0.18	0.19	0.18	0.06	0.05	0.03	0.04	0.08

注:Mean 代表均值,SE 代表标准误。

Note: Mean represents mean, SE represents standard error.

表 5 哈代温伯格平衡检验

Table 5 Hardy-Weinberg Equilibrium Test

品种 Variety	自由度 df	卡方检验 ChiSq	p
A61	5.435	7.012	0.476
贵妃 Guifei	14.696	135.862	0.138
红玉 Hongyu	10.609	152.947	0.046
金煌 Jinhuang	10.478	35.536	0.361
Juile	1.941	1.608	0.485
凯特 Keitt	13.478	83.055	0.183
南逗迈 Nan Doc Mai	5.391	15.568	0.354
R2E2	8.609	92.969	0.139
汤米 Tangmi	10.043	65.464	0.107
台农 1 号 Tainong No.1	9.478	32.890	0.336
Villard	7.609	27.708	0.231
椰香 Yexiang	4.217	6.240	0.488

Fst 在 0.05~0.15 时, 表明群体间存在中等程度的遗传分化, Fst>0.05 时, 群体间存在较大程度的遗传分化。通过品种间 Fst 结果发现, 红玉和 R2E2、红玉和椰香、红玉和南逗迈、Juile 和 R2E2、Juile 和南逗迈、贵妃和南逗迈、贵妃和 Juile 间遗传分化明显, 其余品种间遗传分化不明显(图2)。

2.6 品种间遗传距离与聚类分析

遗传距离作为衡量品种间不同性状综合遗传差异大小的指标, 能够直观反映亲本品种间的遗传差异。品种 R2E2 和红玉、R2E2 和 Juile 间的遗传距离最大, 分别为 0.7377 和 0.6220, 表示该品种间遗传差异较大, 其余品种的遗传距离较小, 遗传差异不明显(图3)。

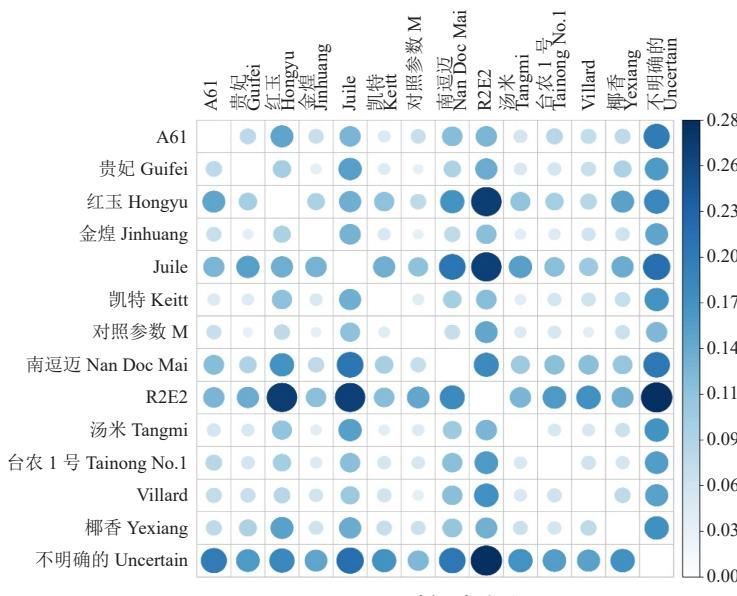


图 2 品种间遗传分化

Fig. 2 Coefficient of genetic differentiation among breeds

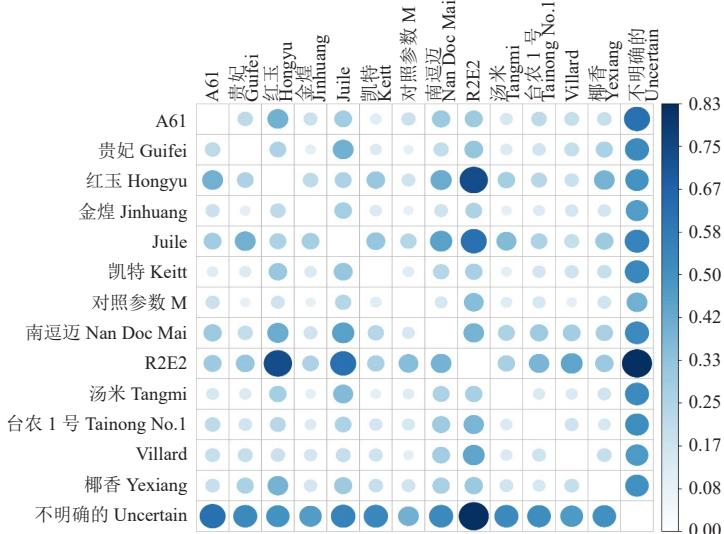


图 3 品种间遗传距离

Fig. 3 Genetic distance among varieties

根据样品间及群体间的遗传距离,运用Phylogenetic Tree 软件采用UPGMA方法进行群体间聚类分析,凯特和汤米被聚为一类,红玉和Juile被聚为一类,亲缘关系较近(图4)。

2.7 Structure分析

Structure分析显示,当K=3时,ΔK=35,值最大

(图5),可将所有个体分成3个群体。由群体遗传结构(图6)可知,不同颜色表示不同遗传组成,同一颜色占比最高的能够聚为同一类亚群,即R2E2为一族,红玉为一族,A61、贵妃、金煌、Juile、凯特、南迢迈、汤米、台农1号、Villard和椰香聚为一族,因此12个品种可以划分为三大亚群,遗传背景分为3个类型。

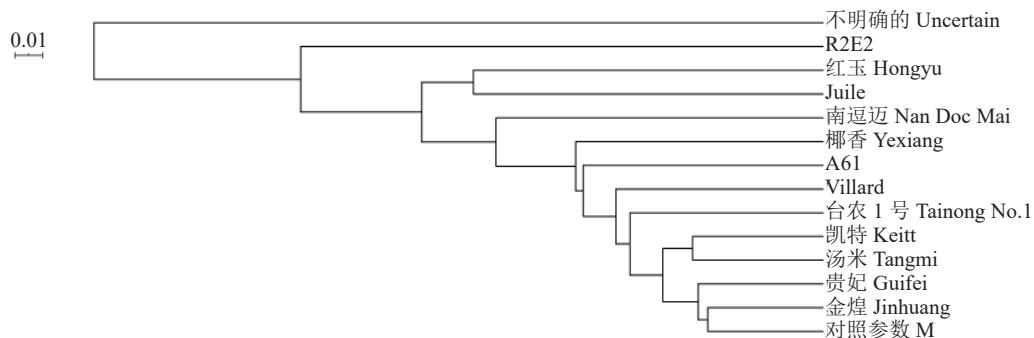


图4 聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis

2.8 亲权鉴定

对双亲本均未知组合进行亲权分析,然后从中挑选出已知母本并不是第一候选亲本将其剔除,其中共剔除191个样本,剔除比例为19.1%,对809个子代和候选父本(母本已知)进行亲权关系鉴定,实际鉴定率为87%(表6,表7)。

2.9 杂交鉴定结果

从可鉴定的父本中得出,以A61为母本的3个杂交后代中,真杂种率为80%;贵妃为母本的116个后代中,自交率为38.46%,真杂种率为61.54%;红玉为母本的167个后代中,其自交率为74.8%,真杂种率为25.2%;金煌为母本的69个后代中,自交率低,真杂种率为82.61%;Juile为母本的2个杂交后代中,其父本50%来自红玉,50%来自南迢迈;南迢迈为母本

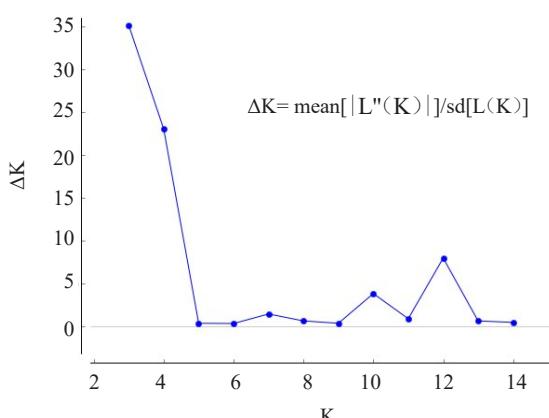


图5 基于ΔK变化值分析遗传群体分化

Fig. 5 Genetic population differentiation based on ΔK variation

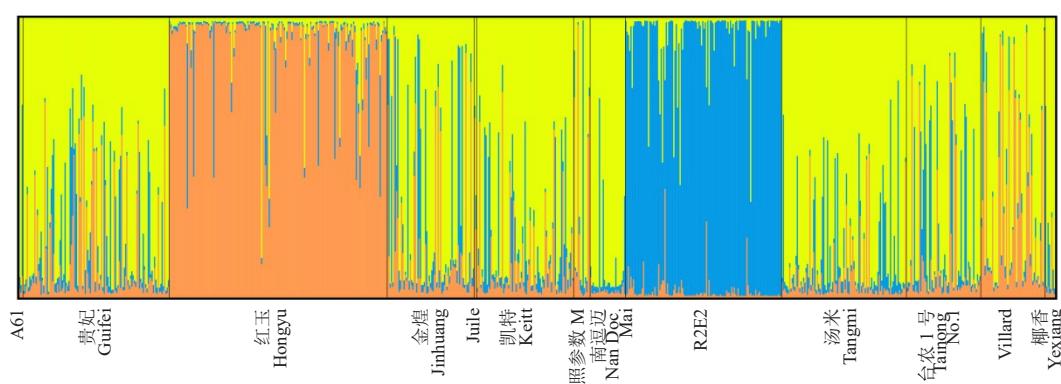


图6 基于Structure分析的12个品种的遗传结构

Fig. 6 Genetic structure of 12 varieties based on Structure analysis

表 6 模拟双亲鉴定率
Table 6 Simulated parental identification rate

已知母本鉴定的可能父本 The possible male parent identified by the known female parent				
水平 Level	置信度 Confidence/%	临界增量 Critical delta	达到要求样本数 Required number of samples	达到要求样本百分比 Achieve the required percentage of samples/%
处于严格置信区间的样本数 Number of samples in the strict confidence interval	95.00	0.00	9901	99
处于宽松置信区间的样本数 Number of samples in a loose confidence interval	80.00	0.00	9901	99
没有匹配到的样本数 Number of samples not matched			99	1
合计 Total			10 000	100

表 7 实际双亲鉴定率
Table 7 Actual parental identification rate

已知母本鉴定的可能父本 The possible male parent identified by the known female parent				
水平 Level	置信度 Confidence/%	临界增量 Critical delta	达到要求的期望样本数 Number of expected samples that meet the requirements	达到要求的期望样本百分比 The percentage of expected samples that meet the requirements/%
处于严格置信区间的样本数 Number of samples in the strict confidence interval	95.00	0.00	704(801)	87(99)
处于宽松置信区间的样本数 Number of samples in a loose confidence interval	80.00	0.00	704(801)	87(99)
没有匹配到的样本数 Number of samples not matched			105(8)	13(1)
合计 Total			809(809)	100

注:括号中的数值代表在置信区间实际样本数量与模拟匹配率。

Note: The values in brackets represent the actual number of samples and the simulation matching rate in the confidence interval.

的后代中,杂交率低,真杂种率为25.00%,其自交率为75.00%;凯特为母本的77个后代中,真杂种率为72.73%,自交率为27.27%;母本为R2E2的后代群体中,自交率为82.69%,真杂种率为17.31%;汤米为母本的后代中,自交率为56.57%,真杂种率为43.43%;台农1号为母本的59个后代中,自交率为16.95%,真杂种率为83.05%;Villard为母本的51个后代中,自交率为66.67%,真杂种率为33.33%;椰香为母本的11个后代中,自交率为63.64%,真杂种率为36.36%(表8)。结果表明,在12个已知品种中,南逗迈、R2E2、红玉、Villard、椰香自交率高,初步说明其自交亲和性强,极易自交;其余品种的杂交率均高于50%,其品种的杂交亲和性较强。

3 讨 论

SSR分子标记技术作为一种便捷、可靠的方法被广泛应用于不同作物F₁代的真伪杂种鉴定及验

证^[15]、遗传图谱的构建^[16]、杂种纯度鉴定^[17-20]、遗传多样性分析等。

杂交是品种创新和选育的重要环节,亲本的选择选配是决定杧果杂交育种是否成功的关键。在自然授粉群体中,杧果亲本很难被鉴定,现研究指出目前80%的杧果品种都来自实生选育,仅20%左右的品种通过控制授粉及混合自然授粉所选育^[14]。杧果作为定向育种难度大、育种周期长的作物,大部分育种亲本不明确,在国际上常规人工杂交育种坐果率仅为0.3%,所以有必要开展杧果杂交后代的早期鉴定工作,排除假杂种,提高杧果育种效率。

杧果为高度杂合体,在生产过程中后代容易受自花授粉的影响,产生基因变异,且不同品种中极易进行自然杂交。对于遗传变异小的群体,鉴定出的可能父本较多,会导致多个父本剔除不了,笔者在本试验中利用SSR分子标记技术对其进行亲权鉴定,13个SSR位点上,1001个后代中809个后代与其父

表8 品种间真杂种率
Table 8 True hybrid rate among varieties

品种 Variety	样品数 Sample	A61	贵妃	红玉	金煌	Juile	南逗迈	凯特	R2E2	汤米	台农1号	Villard	椰香	白象牙	%
			Guifei	Hongyu	Jinhuang		Nan Doc Mai	Keitt		Tangmi	Tainong No.1		Yexiang	Baixiangya	
A61	5			20.00	20.00	40.00						20.00			
贵妃 Guifei	117	3.42	38.46	17.09	8.55		1.71	2.56	7.69	8.55	2.50		6.84	2.56	
红玉 Hongyu	167	4.19	0.60	74.85	3.59				0.60		10.78	4.19	1.20		
金煌 Jinhuang	69	20.29	1.45	7.25	17.39		2.90		11.59	15.94	5.80	8.70	5.80	2.90	
Juile	2			50.00			50.00								
南逗迈 Nan Doc Mai	28				7.14		75.00		14.29		3.57				
凯特 Keitt	77	5.19	1.30	2.60			3.90	27.27	5.19	40.26	3.90	6.49	3.90		
R2E2	124	0.81			8.87				86.29	1.61	0.81		0.81	0.81	
汤米 Tangmi	99	8.08	1.01	4.04	2.02	1.01		1.01	10.10	56.57	9.10		7.07		
台农1号 Tainong No.1	59	1.70	6.78	15.21				3.39	15.25	15.25	16.95		23.73	1.69	
Villard	51	5.88	3.92			1.96			1.96	19.61		66.67			
椰香 Yexiang	11									9.09	27.27	63.64			

母本基因型基本符合孟德尔遗传定律,初步表明这些位点能够精准鉴定出可能父本,为杧果杂交育种性状遗传提供基础数据,未鉴定出亲本的后代在亲权鉴定中产生位点不匹配的错误,有可能因为无效等位基因使一些杂合子的单条带无法检测出来,Hokanson等^[21]和Kapoor等^[22]的研究指出,模拟结果与实际结果相差较大是无效等位基因的存在造成的。

物种的遗传多样性本质是生物体遗传物质的变异,遗传多样性水平越高,该物种或种群对新环境的适应能力就越强^[23]。DNA分子标记能够反映出遗传变异程度,笔者在本研究中通过13对SSR标记,对809份杧果样品进行遗传多样性分析,根据群体遗传结构聚类为三大不同亚群。该SSR标记位点显示杧果品种间存在许多等位基因的现象,等位基因数变化范围为3~9,平均等位基因数(Na)为6.154,平均有效等位基因数(Ne)为2.557,Shannon's信息指数(I)为1.078,观测杂合度(Ho)平均为0.571,期望杂合度(He)平均为0.579,多态性信息含量(PIC)平均为0.526,多态性信息含量在 $0 < PIC \leq 0.25$ 之间,为低多态性, $0.25 < PIC \leq 0.5$ 为中度多态性, $PIC > 0.5$ 为高度多态性,在本试验的13个标记中有10个为高度多态性,3个为中度多态性。试验中所有SSR位点在样品间表现出好的多态性,各指标之间大多体现较高的一致性,表明引物的多态性较高,能够有效地揭示杧果实生后代的遗传多样性,更好地鉴别现有的主栽品种。

Structure分析是将遗传相似的基因型个体聚在一起,假定每一个被分析的个体在所有的类别中都有共同的祖先,估计各类别的属于该祖先的概率值,是一种分析群体遗传结构的常用方法。本试验中对12个杧果亲本进行Structure分析,准确推断出它的品种结构图。结果显示,当K=3时,ΔK值最大,说明被检测的品种分为三个簇,R2E2为一簇,红玉为一簇,A61、贵妃、金煌、Juile、凯特、南逗迈、汤米、台农1号、Villard和椰香聚为一簇,说明这12个亲本的遗传背景分为3个类型。亲权鉴定结果显示,R2E2品种聚为一簇,红玉品种聚为一簇,其他品种聚为一簇。由此可见,R2E2和红玉两个品种,将会得到它们的纯合体基因型。

4 结 论

在杧果F₁代杂种鉴定中,杧果品种台农1号、凯特、Juile、金煌、红玉、贵妃的杂交亲和性较强;南逗迈、R2E2、红玉、Villard、椰香品种极易自交,且品种间存在许多等位基因的现象,遗传多样性较为丰富。该结果为进一步开展杧果遗传改良与群体构建、亲本选择提供了前期依据。

参考文献 References:

- [1] 李志强,党志国,赵志常,黄建峰,高爱平,陈业渊.芒果杂交F₁代群体的遗传多样性分析及遗传图谱的构建[J].分子植物育种,2016,14(4):953-958.
LI Zhiqiang, DANG Zhiguo, ZHAO Zhichang, HUANG Jianfeng, GAO Aiping, CHEN Yeyuan. Genetic diversity analyze of

- mango's F₁ hybrids and construction of genetic map[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2016, 14(4):953-958.
- [2] 李文秀, 贺军军, 张华林, 罗萍. SSR 分子标记鉴定橡胶树 F₁ 真伪杂种[J]. 热带作物学报, 2021, 42(5):1305-1309.
- LI Wenxiu, HE Junjun, ZHANG Hualin, LUO Ping. Identification of F₁ hybrids of *Hevea brasiliensis* by SSR markers[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2021, 42(5):1305-1309.
- [3] 刘洪, 徐振江, 饶得花, 鲁清, 李少雄, 刘海燕, 陈小平, 梁炫强, 洪彦彬. 基于形态学性状和 SSR 标记的花生品种遗传多样性分析和特异性鉴定[J]. 作物学报, 2019, 45(1):26-36.
- LIU Hong, XU Zhenjiang, RAO Dehua, LU Qing, LI Shaohong, LIU Haiyan, CHEN Xiaoping, LIANG Xuanqiang, HONG Yanbin. Genetic diversity analysis and distinctness identification of peanut cultivars based on morphological traits and SSR markers[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2019, 45(1):26-36.
- [4] 王辉, PAWAN K, 李双铃, 任艳, 袁美, 庄伟建, VARSHNEY R K, 郭宝珠, 谢联辉. SSR 分子标记在花生杂种鉴定中的应用[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2015, 44(4):350-354.
- WANG Hui, PAWAN K, LI Shuangling, REN Yan, YUAN Mei, ZHUANG Weijian, VARSHNEY R K, GUO Baozhu, XIE Lian-hui. Application of SSR markers in peanut F₁ hybrid identification[J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2015, 44(4):350-354.
- [5] 胡东青, 王秀贞, 唐月异, 高华援, 陈殿绪, 吴琪, 张树伟, 王传堂. 利用 SSR 标记鉴定花生真杂种[J]. 花生学报, 2012, 41(4):22-25.
- HU Dongqing, WANG Xiuzhen, TANG Yueyi, GAO Huayuan, CHEN Dianxu, WU Qi, ZHANG Shuwei, WANG Chuantang. Identification of hybrids in groundnut using SSR markers[J]. *Journal of Peanut Science*, 2012, 41(4):22-25.
- [6] 刘俊睿, 谢梦娇, 闫龙, 李晗, 杨凯, 孙新展, 张运, 牛晓, 孙东京, 李永强, 万平. SSR 分子标记鉴定小豆 F₁ 真假杂种[J]. 北京农学院学报, 2014, 29(1):1-5.
- LIU Junrui, XIE Mengjiao, YAN Long, LI Han, YANG Kai, SUN Xinzhan, ZHANG Yun, NIU Xiao, SUN Dongjing, LI Yongqiang, WAN Ping. Identification of F₁ hybrid in adzuki bean (*Vigna angularis*) by SSR markers[J]. *Journal of Beijing University of Agriculture*, 2014, 29(1):1-5.
- [7] 白晓倩, 陈于, 张仕杰, 赵玉强, 王武, 朱灿灿. 基于表型性状和 SSR 标记的板栗品种遗传多样性分析及分子身份证构建[J]. 植物遗传资源学报, 2022, 23(4):972-984.
- BAI Xiaoqian, CHEN Yu, ZHANG Shijie, ZHAO Yuqiang, WANG Wu, ZHU Cancan. Genetic diversity analysis and fingerprinting of chestnut varieties based on phenotypic traits and SSR markers[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(4):972-984.
- [8] 洪文娟. 石榴种质资源 SSR 分子标记遗传多样性分析及指纹图谱构建[D]. 北京:北京林业大学, 2020.
- HONG Wenjuan. Genetic diversity analysis and finger prints construction of pomegranate germplasm resources based on SSR markers[D]. Beijing:Beijing Forestry University, 2020.
- [9] 赵丽华. 石榴(*Punica granatum* L.)种质资源遗传多样性及亲缘关系研究[D]. 重庆:西南大学, 2010.
- ZHAO Lihua. Study on genetic diversity and genetic relationship of pomegranate (*Punica granatum* L.) germplasm[D]. Chongqing:Southwest University, 2010.
- [10] 刘奇燕, 丁显萍, 张萍, 张雯, 韩海英, 王亚清, 朱昌栋. 杂交水稻种子 SSR 分子标记纯度鉴定[J]. 安徽农学通报, 2021, 27(5):9-10.
- LIU Qiyan, DING Xianping, ZHANG Ping, ZHANG Wen, HAN Haiying, WANG Yaqing, ZHU Changdong. Purity identification of SSR molecular markers in hybrid rice seeds[J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2021, 27(5):9-10.
- [11] 雷雨, 段继华, 黄飞毅, 康彦凯, 罗意, 陈宇宏, 丁玎, 姚利娜, 董丽娟, 李赛君. 茶树杂交 F₁ 真假杂种的 SSR 鉴定及遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2021, 22(3):748-757.
- LEI Yu, DUAN Jihua, HUANG Feiyi, KANG Yankai, LUO Yi, CHEN Yuhong, DING Ding, YAO Lina, DONG Lijuan, LI Sai-jun. Identification and genetic diversity of tea F₁ hybrids based on SSR markers[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, 22(3):748-757.
- [12] 高源, 王大江, 王昆, 丛佩华, 李连文, 朴继成. 基于荧光 SSR 分析中国原产苹果属植物 17 个种的遗传多样性和遗传结构[J]. 果树学报, 2020, 37(11):1611-1622.
- GAO Yuan, WANG Da Jiang, WANG Kun, CONG Peihua, LI Lianwen, PIAO Jicheng. Genetic diversity and population structure of 17 species of *Malus* Mill. native to China based on fluorescent SSR analysis[J]. *Journal of Fruit Science*, 2020, 37(11):1611-1622.
- [13] 陈道勤, 邱永生, 王勤南, 黄锦福, 吉家乐. 芒果人工杂交授粉结实率影响因素研究[J]. 现代农业科技, 2020(18):64.
- CHEN Daoqin, QIU Yongsheng, WANG Qinnan, HUANG Jin-fu, JI Jiale. Study on the influencing factors of mango artificial hybridization pollination seed setting rate[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2020(18):64.
- [14] 姚全胜, 雷新涛, 黄忠兴, 朱敏, 王松标, 黄丽芳, 马小卫, 詹儒林, 武红霞. 杠果炭疽病抗性杂交群体的构建及 SSR 分子标记鉴定[J]. 果树学报, 2010, 27(2):265-269.
- YAO Quansheng, LEI Xintao, HUANG Zhongxing, ZHU Min, WANG Songbiao, HUANG Lifang, MA Xiaowei, ZHAN Rulin, WU Hongxia. Construction of the resistance to anthracnose for crossed mango population and identification by SSR molecular markers[J]. *Journal of Fruit Science*, 2010, 27(2):265-269.
- [15] 薛华柏, 王芳芳, 王磊, 杨健, 王龙, 王苏珂, 苏艳丽, 乔玉山, 李秀根. ‘满天红’×‘红香酥’杂种鉴定及遗传变异 Genic-SSR 分析[J]. 果树学报, 2017, 34(8):925-934.
- XUE Huabai, WANG Fangfang, WANG Lei, YANG Jian, WANG Long, WANG Suke, SU Yanli, QIAO Yushan, LI Xiugen. Identification of the hybrids and analysis of genetic variation of a pear progeny derived from crossing between ‘Mantian-

- hong' and 'Hongxiangsu' by Genic-SSR[J]. Journal of Fruit Science, 2017, 34(8):925-934.
- [16] 魏秀清,许玲,章希娟,许家辉.龙眼优良杂交株系的SSR鉴定[J].东南园艺,2017,5(5):6-9.
WEI Xiuqing, XU Ling, ZHANG Xijuan, XU Jiahui. Identification of individual hybrid progeny in longan (*Dimocarpus longan*) by SSR[J]. Southeast Horticulture, 2017, 5(5):6-9.
- [17] 韩国辉.基于EST-SSR、Genomic-SSR和SCoT标记的柑橘连锁图谱构建及杂种和多倍体遗传分析[D].重庆:西南大学,2012.
HAN Guohui. Construction of molecular linkage map and genetic analysis of hybrids and polyploidy of citrus based on EST-SSR, Genomic-SSR and SCoT markers[D]. Chongqing: Southwest University, 2012.
- [18] 刘伟,罗心平,张惠云,蒋依辉,肖志丹,袁沛元,邱燕萍,凡超,杨晓燕,高贤玉,左艳秀,向旭.荔枝新种质‘燎原’的分子标记鉴定[J].分子植物育种,2016,14(1):177-185.
LIU Wei, LUO Xinping, ZHANG Huiyun, JIANG Yihui, XIAO Zhidan, YUAN Peiyuan, QIU Yanping, FAN Chao, YANG Xiaoyan, GAO Xianyu, ZUO Yanxiu, XIANG Xu. Identification of a novel litchi germplasm 'Liaoyuan' by molecular markers[J]. Molecular Plant Breeding, 2016, 14(1):177-185.
- [19] GONAI T, MANABE T, INOUE E, HAYASHI M, YAMAMOTO T, HAYASHI T, SAKUMA F, KASUMI M. Overcoming hybrid lethality in a cross between Japanese pear and apple using gamma irradiation and confirmation of hybrid status using flow cytometry and SSR markers[J]. Scientia Horticulturae, 2006, 109(1):43-47.
- [20] 马凯,赵钰,张恒,韩立群,赵国庆,王继勋.基于SSR标记的中亚生态区核桃(*Juglans regia L.*)遗传多样性与种群结构分析[J].果树学报,2021,38(11):1854-1867.
MA Kai, ZHAO Yu, ZHAO Heng, HAN Liqun, ZHAO Guoqing, WANG Jixun. Analysis of genetic diversity and population structure of walnut (*Juglans regia L.*) in Central Asia ecological region based on SSR markers[J]. Journal of Fruit Science, 2021, 38(11):1854-1867.
- [21] HOKANSON S C, SZEWC-MCFADDEN A K, LAMBOY W F, MCFERSON J R. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus × domestica* Borkh. core subset collection[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 97(5):671-683.
- [22] KAPOOR M, MAWAL P, SHARMA V, GUPTA R C. Analysis of genetic diversity and population structure in *Asparagus* species using SSR markers[J]. Journal, Genetic Engineering & Biotechnology, 2020, 18(1):50.
- [23] 姚国琼,杨帆,严苓方,孙正海,李伟.基于转录组SSR的三角梅遗传多样性分析[J/OL].分子植物育种,2014:1-19[2022-03-15].
<https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220228.2219.017.html>.
YAO Guoqiong, YANG Fan, YAN Lingfang, SUN Zhenghai, LI Wei. Analysis of *Bougainvillea glabra* Choisy genetic diversity based on SSR of transcriptome[J/OL]. Molecular Plant Breeding, 2024: 1- 19[2022-03-15]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220228.2219.017.html>.