

# 利用 SSR 技术鉴定芒果实生后代真假杂种及其遗传特性分析<sup>1</sup>

党志国<sup>1</sup> 郑燕萍<sup>1</sup> 朱敏<sup>1,2</sup> 陈业渊<sup>1,2</sup> 高爱平<sup>1</sup> 黄建峰<sup>1</sup> 罗睿雄<sup>1</sup> 余东<sup>3</sup> 雷新涛<sup>1\*</sup>

(1.中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所,海南,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,福建,福州,350013。)

**摘要:** 【目的】鉴定芒果杂交后代 F1 的真实性与群体遗传特性分析,为进一步开展芒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,平均 6.154 个,平均有效等位基因数 ( $N_e$ ) 为 2.557, Shannon's 信息指数 ( $I$ ) 为 1.078,观测杂合度 ( $H_0$ ) 为 0.571,期望杂合度 ( $H_e$ ) 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 GF、JH、KT、TN、A61、Juile、KT 的 F1 子代,真杂种率均大于 50%,其中 JH、TN、A61 真杂种率高于 80%,在期望杂合度与观测杂合度上, TN、KT、Juile、JH、HY、GF 的杂合度也相对较高, NDM、R2E2、HY、Villard、YX 真杂种率低,分别为 25%、13.71%、25.15%、33.33%、36.36%。【结论】芒果品种 TN、KT、Juile、JH、HY、GF 的杂交亲和性较强, NDM、R2E2、HY、Villard、YX 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:** 芒果; SSR 分子标记; 杂种鉴定; 遗传特性

## Identification of true and false hybrids of mango solid progeny and their genetic characterization using SSR technology

DANG zhiguo<sup>1</sup> ZHENG yanping<sup>1</sup> ZHU min<sup>1,2</sup> CHEN yeyuan<sup>1,2</sup> GAO aiping<sup>1</sup> HUANG jianfeng<sup>1</sup> LUO ruixiong<sup>1</sup> YU dong<sup>3</sup> LEI xingtao<sup>1\*</sup>

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

**Abstract:** 【Objective】As a perennial woody fruit tree, mango 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 hybrid breeding. As a new type of molecular marker, SSR markers are mainly used in genetic diversity analysis, genetic relationship analysis and fingerprint construction in mango, but the use of SSR markers to identify the true and false hybrids of mango

收稿日期: 接受日期:

基金项目: 热带果树种质资源精准评价与创新利用(ZDKJ2021014); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助(CARS-31); 海南省芒果产业技术体系(HNARS-07)专项资金资助; 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。Tel: 18898956559, e-mail: dangsan@126.com;

\*通信作者 Author for correspondence. Tel: 18689550655, E-mail: xtlei@263.net

F1 has not been reported. In this study, 13 varieties were selected as parental materials, and SSR technology was used to detect the true and false hybrids and analyze the genetic characteristics of 1001 F1 progeny plants with the breeding objectives of large fruit, red, high solid content, high yield and stable yield, which provided theoretical guidance for clarifying the hybridization affinity of mango breeding parents and the selection of breeding parents. **【 Methods 】** The 13 mango varieties Guifei, Jinhuang, Tainong No.1, Baixiangya, Hongyu, R2E2, Yexiang, Tommy, Kate, Villard, Nanjomai, Juile and A61 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, Nandoumai, Yexiang, Villard, R2E2, Tommy, Hongyu, A61 and Kate. The seedlings were obtained after sowing. Punch the leaves with a puncher and take 100 mg of fresh tissue. The DNA of mango F1 generation 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, PCR products were detected by agarose gel electrophoresis ( 1 % concentration ) and capillary fluorescence electrophoresis. In the previous transcriptome data of mango, 200 pairs of primers were selected for screening, and 200 pairs of primers were synthesized by using each parent as the template of DNA. The screened primers were used for SSR analysis. The genetic parameters such as number of alleles (  $N_a$  ), number of effective genes (  $N_e$  ), observed heterozygosity (  $H_o$  ), expected heterozygosity (  $H_e$  ), fixation index (  $F$  ) and Shannon 's information index (  $I$  ) were calculated by Cervus software; The polymorphism information index ( PIC ) was calculated by GenALEX6.0 software, and the genetic differentiation coefficient was obtained; Structure was used to analyze the genetic structure of the population and the genetic diversity of mango F1 generation; The unweighted pair-group method with arithmetic means ( UPGMA ) was used to cluster the populations of mango fruit 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 (  $N_e$  ) was 2.557, Shannon 's information index (  $I$  ) was 1.078, observed heterozygosity (  $H_o$  ) was 0.571, expected heterozygosity (  $H_e$  ) was 0.579, and polymorphism information content ( PIC ) was 0.526; 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 GF, YX 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 GF population was higher and the population differentiation was the highest; The genetic differentiation between GF and Juile was obvious, and the genetic differentiation between the other varieties was small; The female parent was the F1 progeny of GF, JH, KT, TN, A61, Juile and KT. The true hybrid rate was more than 50 %, and the true hybrid rate of JH, TN and A61 was as high as 80 %; In terms of expected heterozygosity and observed heterozygosity, the heterozygosity of TN, KT, Juile, JH, HY and GF was also relatively high, and the true heterozygosity of NDM, R2E2, HY, Villard and YX was low, which was 25 %, 13.71 %, 25.15 %, 33.33 % and 36.36 %, respectively. **【 Conclusion 】** Through the  $F_{st}$  results among varieties, it was found that the genetic differentiation between HY and R2E2, HY and YX, HY and NDM, Juile and R2E2, Juile and NDM, GF and NDM, GF and Juile was obvious, and the genetic

differentiation between the remaining varieties was small ; SSR identification of mango F1 generation showed that the cross compatibility of mango varieties TN, KT, Juile, JH, HY and GF was strong, while the cross compatibility of NDM, R2E2, HY, Villard and YX 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

芒果 (*Mangifera indica* Linn) 为漆树科芒果属植物, 素有“热带果王”之称, 具有一定的营养价值与经济价值<sup>[1]</sup>。芒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 等其它分子标记技术, SSR 标记 (simple sequence repeats, 简单重复序列) 具有位点丰富、重复性好、鉴别能力强、多态性高、呈共显性<sup>[2]</sup>等优点, 被广泛应用于花生<sup>[3-5]</sup>, 小豆<sup>[6]</sup>, 板栗<sup>[7]</sup>, 石榴<sup>[8,9]</sup>, 水稻<sup>[10]</sup>, 茶树<sup>[11]</sup>, 苹果<sup>[12]</sup>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, 在芒果的研究中, 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, 姚全胜<sup>[14]</sup>等利用 SSR 技术对 184 株杂交实生苗鉴定证实该技术可以对芒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。本研究以大果、红色、高固形物、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, 对明确芒果育种亲本杂交亲和性和育种亲本选配提供理论指导

## 1 材料与方法

### 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芒果育种圃, 13 个芒果品种贵妃、金煌、台农 1 号、白象牙、红玉、R2E2、椰香、汤米、凯特、Villard、南逗迈、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、南逗迈、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, 每母本收获后代数量见表 8 中样品量, 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 100mg, 采用磁珠法基因组 DNA 提取试剂盒提取芒果的基因组 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 °C 保存备用。

### 1.3 引物筛选

在前期获得芒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，通过预实验，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

表 1 PCR 反应体系 (15 $\mu$ L)

Table 1 PCR reaction system (15 $\mu$ L)

反应体系 Reaction system	用量( $\mu$ L) Dosage
2 $\times$ Taq PCR Mix	7.5
ddH <sub>2</sub> O	4.5
上游引物 (10mM)	1
下游引物 (10mM)	1
DNA	1

扩增反应为：95 $^{\circ}$ C 预变性 5min，95 $^{\circ}$ C 变性 30S，52 $^{\circ}$ C-62 $^{\circ}$ C 退火 30S，72 $^{\circ}$ C 延伸 30S，10 个循环，每个循环降 1 $^{\circ}$ C；95 $^{\circ}$ C 变性 30S，52 $^{\circ}$ C 退火 30S，72 $^{\circ}$ C 延伸 30S，25 个循环；72 $^{\circ}$ C 末端延伸 20min，4 $^{\circ}$ C 保存。

#### 1.5 PCR 产物检测

采用琼脂糖凝胶电泳检测 (1%浓度) 与毛细管荧光电泳检测。

#### 1.6 数据统计与分析

利用 Excel 中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；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 核心引物对枞果实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)。

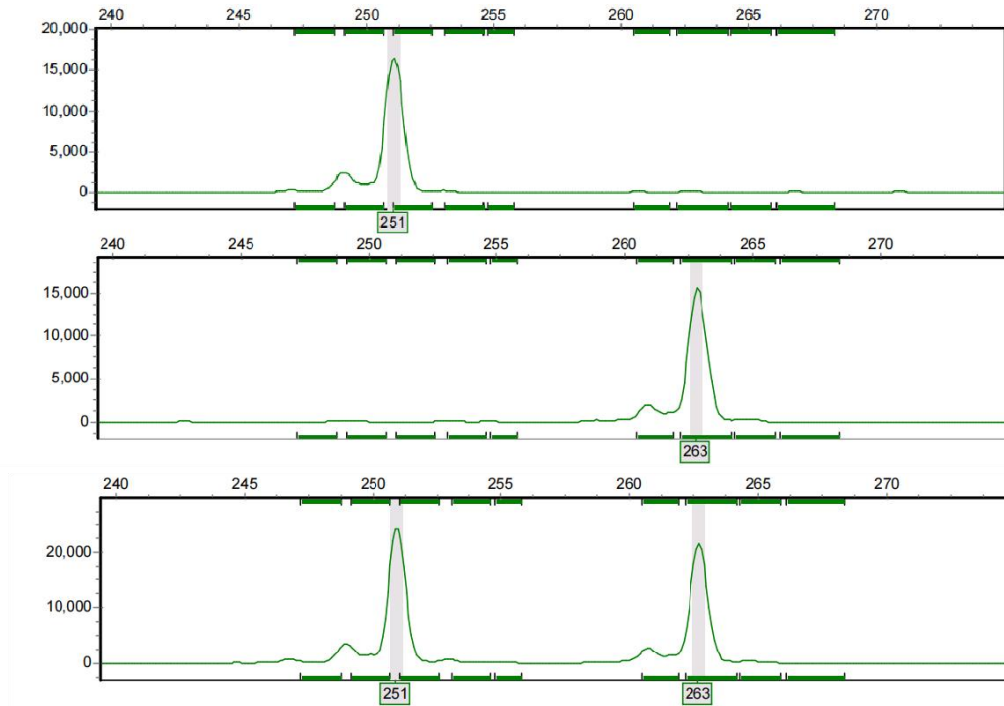


图 1 SSR 引物 MG-030 在部分杧果样品中的扩增情况

Fig.1 Amplification of SSR primer MG-030 in some mango samples

表 2 13 对 SSR 引物序列

Table 2 13 pairs of SSR primer sequences

引物编号 Gene 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	AGTGCTTGGGCGTTAGAGAA
MG-039	CCGAAATTAATTCCCGTGGT	TGAAGCTGGACAGTTGAGCA
MG-046	CAATGACCCACATCATCAA	AAGGCCACGTATGTACCAGC
MG-055	TACCTCGTAATCCAGTCGGC	CGCACACGCACTCTTTAGAA
MG-061	CTCTGCCTGTAAACCACCGT	CATGCAGCATTGCAATTACC
MG-063	GATTGAGGTTGGCCAGCTA	GTCCATTGTAGGCCCTGAGA
MG-079	AGAATCATGGGCAGGCAATA	TGAAATTAGGACCCAGCCAG
MG-114	CACAGGCCCAACTTATTGCT	GGAGACCAGAGGTTGACGAA
MG-146	ATCTTCTGGTACAGGCGGTG	TTCCCACTCTTCCACGTTT

MG-150	AGCGCCTTAAGATAGCCACA	AAGTCCATGAAGCTTGGGTG
MG-177	CATTGTCTCTGCACCAAACG	CTTGGCTATGGCTCCATCAT
MG-187	CCACGGGAATGTACCTGCTA	AGAAGATGCCGTACCAATGC

## 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， $0.25 > PIC < 0.5$  时，为中度多态性， $PIC > 0.5$  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）。

表 3 杧果 SSR 标记位点遗传参数

Table 3 Genetic parameters of mango SSR markers

Locus	N	Na	Ne	I	Ho	He	F	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	1003.231	6.154	2.557	1.078	0.571	0.579	0.008	0.526

注：Locus：筛选出的引物对名称；N：总群体内有效个体数；Na：等位基因数；Ne：有效等位基因数；I：香农信息指数；Ho：观测杂合度；He：期望杂合度；F：固定指数；PIC：多态信息指数。

## 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，GF 最高，Juile 最低，说明在总群体内，GF 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 GF、YX、Juile 相对于其它品种而言，等位基因在群体中分布较均匀。GF 平均 Shannon's 信息指数（I）最高，Juile 最

低，说明 GF 群体中遗传多样性较高，种群分化程度最高，反之，Juile 最低。GF 的观测杂合度 ( $H_o$ ) 与期望杂合度 ( $H_e$ ) 均为最高，表明 GF 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，当种群中纯合体过量时， $F > 0$ ；反之，当杂合体过量时， $F < 0$  (表 4)。

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

品种		N	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F
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
GF	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
HY	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
JH	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
KT	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
NDM	Mean	30.04	3.65	1.98	0.75	0.51	0.41	0.42	-0.17
	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
TM	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
TN	Mean	68.43	4.57	2.48	1.03	0.53	0.56	0.57	0.05
	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
YX	Mean	10.74	3.30	2.23	0.88	0.48	0.50	0.52	0.02
	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；uHe：无偏期望杂合度；GF：贵妃；HY：红玉；JH：金黄；KT：凯特；NDM：南逗迈；TM：汤米；TN：台农 1 号；YX：椰香。

#### 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 HY 显示显著偏离 Hardy-Weinberg ( $P < 0.05$ ) (表 5)。

表 5 哈代温伯格平衡检验  
Table 5 Hardy-Weinberg Equilibrium Test

Pop	DF	ChiSq	P
A61	5.435	7.012	0.476
GF	14.696	135.862	0.138
HY	10.609	152.947	0.046
JH	10.478	35.536	0.361
Juile	1.941	1.608	0.485
KT	13.478	83.055	0.183
NDM	5.391	15.568	0.354
R2E2	8.609	92.969	0.139
TM	10.043	65.464	0.107
TN	9.478	32.890	0.336
Villard	7.609	27.708	0.231
YX	4.217	6.240	0.488

注：GF：贵妃；HY：红玉；JH：金黄；KT：凯特；NDM：南逗迈；TM：汤米；TN：台农1号；YX：椰香

## 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 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，群体间存在较大的遗传分化。通过品种间 Fst 结果发现，HY 和 R2E2、HY 和 YX、HY 和 NDM、Juile 和 R2E2、Juile 和 NDM、GF 和 NDM、GF 和 Juile 间遗传分化明显，其余品种间遗传分化较小（图 2）。

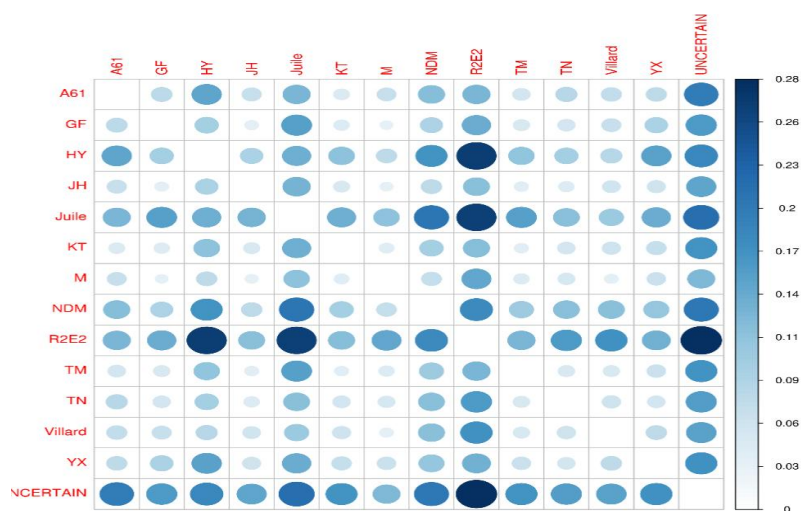


图 2 品种间遗传分化

Fig.2 Coefficient of genetic differentiation among breeds

## 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 HY、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，则其余品种的遗传距离较小，遗传差异不明显（图 3）。根据样品间及群体间的遗传距离，运用 Phylip 软件对其进行 UPGMA 方法构建群体间聚类分析，芒果品种 KT 和 TM 被聚为一类，品种 HY 和 Juile 被聚为一类，亲缘关系较近（图 4）。



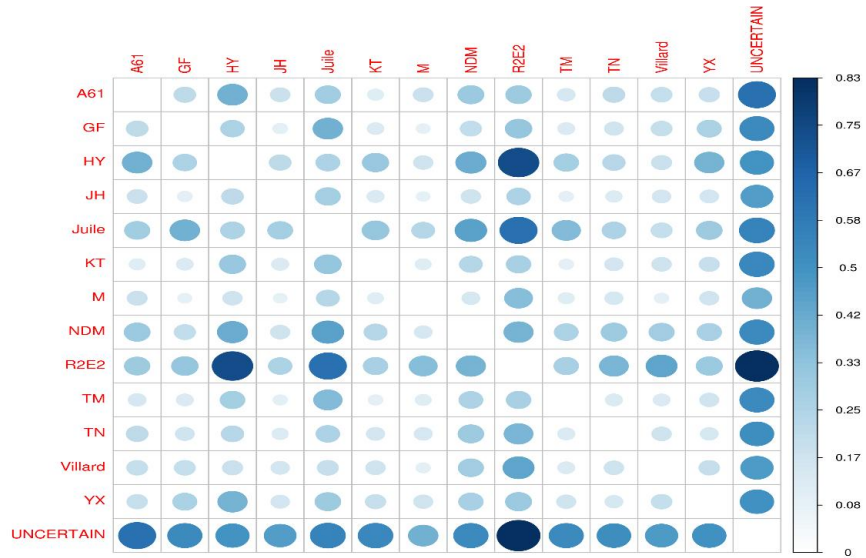


图 3 品种间遗传距离

Fig.3 Genetic distance among varieties

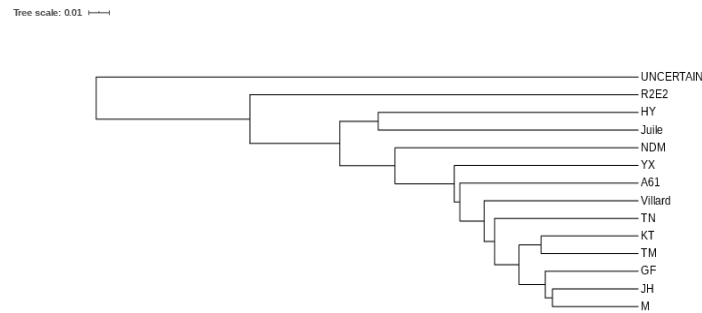


图 4 聚类分析

Fig.4 Cluster Analysis

### 2.7 Structure 分析

Structure 分析显示当  $K=3$  时， $\Delta K=35$  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 为一簇，HY 为一簇，A61、GF、JH、Juile、KT、NDM、TM、TN、Villard 和 YX 聚为一簇，因此 12 个品种可以划分为 3 大亚群，遗传背景分为 3 个类型。

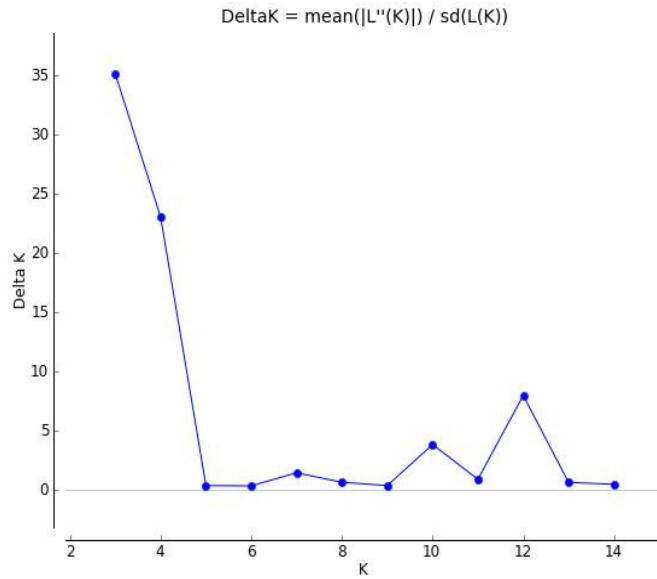


图 5 基于  $\Delta K$  变化值分析遗传群体分化

Fig.5 Genetic population differentiation based on  $\Delta K$  variation was provided

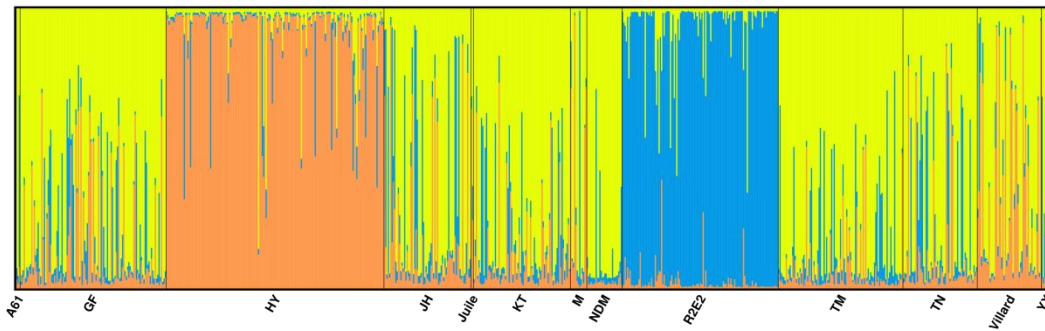


图 6 基于 Structure 分析的 12 个品种的遗传结构图

Fig.6 Genetic Structure map of 12 varieties based on Structure 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）。

表 6 模拟双亲鉴定率

Table 6 simulated parental identification rate

Father given known mother:				
Level	Confidence (%)	Critical Delta	Assignments	Assignment Rate
Strict	95.00	0.00	9901	99%
Relaxed	80.00	0.00	9901	99%

Unassigned	99	1%
Total	10000	100%

表 7 实际双亲鉴定率

Table 7 Actual parental identification rate

Father given known mother:				
Level	Confidence (%)	Critical Delta	Assignment Rate	
			Observed	Expected
Strict	95.00	0.00	704 (801)	87% (99%)
Relaxed	80.00	0.00	704 (801)	87% (99%)
Unassigned			105 (8)	13% (1%)
Total			809 (809)	100%

## 2.9 杂交鉴定结果

从可鉴定的父本中得出，A61 为母本的 3 个杂交后代中，真杂种率为 80%；GF 为母本的 116 个后代中，自交率为 38.46%，真杂种率为 61.54%；HY 为母本的 167 个后代，其自交率为 74.8%，真杂种率为 25.2%；JH 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 HY，50%来自 NDM；NDM 为母本的后代中，杂交率低，真杂种率为 25%，其自交率为 75%；KT 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%；TM 为母本的后代中，自交率为 56.57%，真杂种率为 43.43%；TN 为母本的 59 个后代中，其自交率为 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%；YX 为母本的 11 个后代中，自交率为 63.64%，其真杂种率为 36.36%（表 8）。结果表明，在 12 个已知品种中，NDM、R2E2、HY、Villard、YX 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大于 50%，其品种的杂交亲和性较强。

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

		父本												
		A61	GF	HY	JH	Juile	NDM	KT	R2E2	TM	TN	Villard	YX	BXY
品种	样品量	杂种率												
A61	5			20%	20%	40%						20%		
GF	117	3.42%	38.46%	17.09%	8.55%		1.71%	2.56%	7.69%	8.55%	2.5%		6.84%	2.56%
HY	167	4.19%	0.60%	74.85%	3.59%				0.60%		10.78%	4.19%	1.20%	
JH	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%					50%					
NDM	28				7.14%		75%		14.29%		3.57%			
KT	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%
TM	99	8.08%	1.01%	4.04%	2.02%	1.01%		1.01%	10.10%	56.57%	9.10%	7.07%		
TN	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%		
YX	11										9.09%	27.27%	63.64%	

### 3 讨论

SSR 分子标记技术作为一种便捷、可靠的方法被广泛利用于不同作物 F1 代的真伪杂种鉴定及验证<sup>[15-17]</sup>、遗传图谱的构建<sup>[18]</sup>、杂种纯度鉴定<sup>[19-21]</sup>、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芒果杂交育种是否成功的关键。在自然授粉群体中，芒果亲本很难被鉴定，现研究指出目前大多芒果品种 80%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的<sup>[14]</sup>。芒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%，所以有必要开展芒果杂交后代的早期鉴定工作，排除假杂种，提高芒果育种效率。

芒果为高度杂合体，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。当对于遗传变异小的群体中，鉴定出的可能父本较多，会导致多个父本剔除不了，本实验利用 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，为芒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，有可能因无效等位基因导致一些杂合子的单条带无法检测出来所造成，其 Hokanson<sup>[22]</sup>、Kapoor<sup>[23]</sup>等人研究指出模拟结果与实际结果相差较大是由于无效等位基因存在造成。

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<sup>[24]</sup>。DNA 分子标记能够反映出遗传变异程度，本研究通过 13 对 SSR 标记，对 809 份芒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 标记位点显示芒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 (H0) 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  $0 < PIC < 0.25$  之间，为低多态性， $0.25 < PIC < 0.5$  为中度多态性， $PIC > 0.5$  为高度多态性，本实验中 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，能够有效地揭示芒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。本试验对 12 个芒果亲本进行 Structure 分析，准确推断出它的品种结构图。结果显示当  $K=3$  时  $\Delta K$  值最大，说明被检测的品种分为三个簇，R2E2 为一簇，HY 为一簇，A61、GF、JH、Juile、KT、NDM、TM、TN、Villard 和 YX 聚为一簇，说明这 12 个亲本的遗传背景分为 3 个类型。根据亲权鉴定结果显示，R2E2 品种聚为一簇，HY 品种聚为一

簇，其它品种聚为一簇。由此可见，R2E2 和 HY 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 TN、KT、Juile、JH、HY、GF 的杂交亲和性较强；NDM、R2E2、HY、Villard、YX 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。其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. 杧果杂交 F<sub>1</sub> 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(04):953-958.
- LI Zhiqiang, DANG Zhiguo, ZHAO Zhichang, HUANG Jianfeng, GAO Aiping, CHEN Yeyuan. Genetic Diversity Analyze of Mango's F<sub>1</sub> Hybrids and Construction of Genetic Map[J]. Molecular Plant Breeding, 2016, 14(04):953-958.
- [2] 李文秀, 贺军军, 张华林, 罗萍. SSR 分子标记鉴定橡胶树 F<sub>1</sub> 真伪杂种[J]. 热带作物学报, 2021, 42(05):1305-1309.
- LI Wenxiu, HE Junjun, ZHANG Hualin, LUO Ping. Identification of F<sub>1</sub> Hybrids of *Hevea brasiliensis* by SSR Markers[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(05):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(01):26-36.
- LIU Hong, LIU Zhenjiang, RAO Dehua, LU qing, LI Shaoxiong, 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(01):26-36.
- [4] 王辉, KHERA Pawan, 李双铃, 任艳, 袁美, 庄伟建, VARSHNEY Rajeev 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, 2015, 44(04):350-354.
- WANG Hui, KHA Pawan, LI Shuangling, REN Yan, YUAN Mei, ZHUANG Weijian, VARSHNEY Rajeev K, GUO Baozhu, XIE Lianhui. Application of SS R markers in peanut F<sub>1</sub> hybrid identification[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University, 2015, 44(04):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(04):22-25.
- HU Dongqing, WANG Xiuzhen, TANG Yueyi, GAO Huayuan, CHEN Dianxu, WU Qi, Zhang SHU wei, WANG Chuantang. Identification of Hybrids in Groundnut Using SSR Markers[J]. Journal of Peanut Scienc, 2012, 41(04):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 F<sub>1</sub> 真假杂种[J]. 北京农学院学报, 2014, 29(01):1-5.
- LIU Junrui, XIE Mengjiao, Yan Long, LI Han, YANG Kai, SUN XinZhan, ZHANG Yun, NIU Xiao, SUN Dongjing, LI Wanqiang, WAN Ping. Identification of F<sub>1</sub> hybrid in adzuki bean by SSR markers [J]. Journal Of Beijing University Of Agriculture, 2014, 29(01):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(04):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(04):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]. 北京林业大学, 2020.

HONG Wenjuan. Genetic Diversity Analysis and Finger prints Construction of Pomegranate Germplasm Resources Based on SSR Markers[D]. 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]. 西南大学, 2010.

ZHAO Lihua. Study On Genetic Diversity And Genetic Relationship Of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Germplasm[D]. 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(05):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 Bulletin, 2021, 27(05):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 F<sub>1</sub> 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(03):748-757.

LEI Yu, DUAN Jihua, HUANG Feiyi, KANG Yankai, LUO Yi, CHEN Yuhong, DING Ding, YAO Lina, DONG Lijuan, LI Saijun. Identification and Genetic Diversity of Tea F<sub>1</sub> Hybrids Based on SSR Markers[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2021, 22(03):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 Dajiang, 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] 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. 杧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(02):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(02):265-269.

[14] 陈道勤, 邱永生, 王勤南, 黄锦福, 吉家乐. 杧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+66.

CHEN Daoqin, QIU Yongsheng, WANG Qinnan, HUANG Jinfu, JI Jiale. Study on the influencing factors of mango artificial hybridization pollination seed setting rate[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2020(18):64+66.

[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(08):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 ‘Mantianhong’ and ‘Hongxiang-su’ by Genic-SSR[J]. Journal of Fruit Science, 2017, 34(08):925-934.

[16] 李文秀, 贺军军, 张华林, 罗萍. SSR 分子标记鉴定橡胶树 F<sub>1</sub> 真伪杂种[J]. 热带作物学报, 2021,

42(05):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(05):1305-1309.

[17] 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(05):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(05):6-9.

[18] 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]. 西南大学, 2012.

HAN Guohui. Construction of citrus linkage map based on EST-SSR, Genomic-SSR and SCoT markers and genetic analysis of hybrids and polyploids.[D]. Southwestern University, 2012.

[19] 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(01):177-185.

LIU Wei, Luo Xinping, ZHANG Huiyun, JIANG Nonghui, 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(01):177-185.

[20] Takeru Gonai, Toru Manabe, Eiichi Inoue, Mikio Hayashi, Toshiya Yamamoto, Tateki Hayashi, Fumio Sakuma, Masakazu Kasumi. 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.

[21] 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, ZHANG 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.

[22] S.C. Hokanson, AK Szewc-McFadden, JR McPerson. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus domestica* borkh. core subset collection[J]. TAG Theoretical and Applied Genetics, 1998, 97(5-6):671-683.

[23] Kapoor M, Mawal P, Sharma V, Gupta RC. Analysis of genetic diversity and population structure in *Asparagus* species using SSR markers[J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2020, 14:18(1):50.

[24] 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:1-19[2022-03-15].

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:1-19[2022-03-15].