

基于 EST-SSR 标记的花楸树和少叶花楸杂交 F₁ 代群体的杂种鉴定及遗传关系分析

谷艳鹏¹, 张泽人¹, 孙涛², 韩庆军², 栗宁宁², 鲁仪增², 窦德泉^{1,①}, 郑健^{1,①}

(1. 北京农学院园林学院, 北京 102206; 2. 山东省林草种质资源中心, 山东 济南 250102)

摘要: 以花楸树 [*Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl.] 为母本、少叶花楸 [*S. hupehensis* var. *paucijuga* (D. K. Zang et P. C. Huang) L. T. Lu] 为父本进行种间杂交, 利用筛选出的 9 对扩增结果稳定且具多态性的 EST-SSR 引物, 对杂交 F₁ 代群体进行杂种鉴定, 并对亲本和杂交 F₁ 代群体的基因分离规律以及遗传多样性和遗传关系进行分析。结果显示: 共获得 184 株杂交 F₁ 代, 其中 175 株在 9 个 EST-SSR 位点上均扩增出双亲条带, 说明这些单株为真杂种, 杂种率达 95.1%; 另 9 株在 3~7 个位点上呈现异常基因型, 即缺失双亲条带或出现新条带。9 对 EST-SSR 引物中, 仅 sorsd29 在亲本中的扩增结果为 aa×bb 型(纯合互补型), 其他 8 对引物在亲本中的扩增结果为 aa×bc 型(父本型)、ab×cd 型(双亲互补型)或 ab×ac 型(杂合互补型), 因而, 在 175 株真杂种中, 仅 sorsd29 位点未出现基因分离, 另 8 个位点均出现了基因分离, 经 χ^2 检验, F₁ 代分离比与期望分离比均无显著 ($P>0.05$) 差异。用 9 对 EST-SSR 引物从 175 株 F₁ 代真杂种中共扩增出 28 个等位基因, 观测等位基因数、有效等位基因数、多态性信息含量、Shannon's 信息指数、观测杂合度和期望杂合度的均值分别为 3.1、2.9、0.566、1.076、0.920 和 0.640。基于 Nei's 遗传距离, 采用 UPGMA 法构建系统聚类图, 结果显示: 在 Nei's 遗传距离 0.28 处, 少叶花楸单独成组 I, 花楸树和 175 株 F₁ 代单株聚为组 II; 在 Nei's 遗传距离 0.24 处, 组 II 可进一步分为 2 个亚组, 其中 81 株 F₁ 代单株聚为亚组 II₁, 另 94 株 F₁ 代单株与花楸树聚为亚组 II₂。综合分析结果表明: 采用 EST-SSR 分子标记法可对花楸树和少叶花楸的杂交 F₁ 代群体进行有效的杂种鉴定; 获得的杂交 F₁ 代单株的基因分离情况符合孟德尔分离定律, 且与母本花楸树有较近的遗传关系; 总体上看, 杂交 F₁ 代群体中 175 株真杂种的遗传多样性较为丰富。

关键词: 花楸树; 少叶花楸; EST-SSR 标记; 杂种鉴定; 遗传多样性; 遗传关系

中图分类号: Q946-33; S603; S684 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2022)04-0065-09

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2022.04.08

Hybrid identification and genetic relationship analysis of F₁ hybrid population of *Sorbus pohuashanensis* and *Sorbus hupehensis* var. *paucijuga* based on EST-SSR marker GU Yanpeng¹, ZHANG Zeren¹, SUN Tao², HAN Qingjun², LI Ningning², LU Yizeng², DOU Dequan^{1,①}, ZHENG Jian^{1,①} (1. School of Landscape Architecture, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; 2. Shandong Provincial Center of Forest and Grass Germplasm Resources, Jinan 250102, China) *J. Plant Resour. & Environ.*, 2022, 31(4): 65-73

Abstract: The interspecific hybridization was conducted by using *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl. as female parent and *S. hupehensis* var. *paucijuga* (D. K. Zang et P. C. Huang) L. T. Lu as male parent, the F₁ hybrid population was identified by using nine pairs of EST-SSR primers with stable amplification results and polymorphism, and the gene segregation rule, genetic diversity, and genetic relationship of

收稿日期: 2022-03-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31770369); 北京农学院学位与研究生教育改革与发展项目(2021YJS040); 山东省重点研发计划(重大科技创新工程)项目(2021LZGC023)

作者简介: 谷艳鹏(1997—), 女, 河南濮阳人, 硕士研究生, 主要从事林木种质资源与育种研究。

①通信作者 E-mail: doudequan@hotmail.com; buazhengjian708@126.com

引用格式: 谷艳鹏, 张泽人, 孙涛, 等. 基于 EST-SSR 标记的花楸树和少叶花楸杂交 F₁ 代群体的杂种鉴定及遗传关系分析[J]. 植物资源与环境学报, 2022, 31(4): 65-73.

parents and F_1 hybrid population were analyzed. The results show that 184 F_1 hybrid individuals are obtained, in which the parental bands are all amplified in 175 individuals at nine EST-SSR loci, indicating that these individuals are real hybrids, and the hybrid rate reaches 95.1%; the other nine individuals have abnormal genotypes at 3–7 loci, either missing parental bands or appearing new bands. Among nine pairs of EST-SSR primers, only the amplification result of sorsd29 in parents is aa × bb type (homozygous and complementary type), and the amplification results of the other eight pairs of primers in parents are aa × bc type (male parent type), ab × cd type (parental complementary type), or ab × ac type (heterozygous and complementary type), therefore, among 175 real hybrid individuals, only sorsd29 locus doesn't show gene segregation, while the other eight loci all show gene segregation, and there is no significant ($P>0.05$) difference between the segregation ratio of F_1 generation and expected segregation ratio according to χ^2 test. In total, 28 alleles are amplified from 175 F_1 real hybrid individuals by using nine pairs of EST-SSR primers, and the means of number of observed alleles, number of effective alleles, polymorphism information content, Shannon's information index, observed heterozygosity, and expected heterozygosity are 3.1, 2.9, 0.566, 1.076, 0.920, and 0.640, respectively. The UPGMA method was used to construct systematic clustering diagram based on Nei's genetic distance, and the result shows that at the Nei's genetic distance of 0.28, *S. hupehensis* var. *paucijuga* is group I individually and *S. pohuashanensis* and 175 F_1 individuals are clustered into group II; at the Nei's genetic distance of 0.24, group II can be further divided into two subgroups, in which 81 F_1 individuals are clustered into subgroup II₁, and the other 94 F_1 individuals and *S. pohuashanensis* are clustered into subgroup II₂. The comprehensive analysis result shows that an effective hybrid identification can be conducted for F_1 hybrid population of *S. pohuashanensis* and *S. hupehensis* var. *paucijuga* by using the EST-SSR molecular marker method; the gene segregation situations of F_1 hybrid individuals are all in accord with Mendel's law of segregation, and they have relatively close genetic relationships with the female parent *S. pohuashanensis*. In general, the 175 real hybrid individuals of F_1 hybrid population have relatively rich genetic diversities.

Key words: *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl.; *Sorbus hupehensis* var. *paucijuga* (D. K. Zang et P. C. Huang) L. T. Lu; EST-SSR marker; hybrid identification; genetic diversity; genetic relationship

种间杂交可以将不同亲本的优良性状集中到杂交子代^[1],是获得具有丰富表型变异及高抗性优良杂种的有效途径^[2,3]。大部分植物从人工授粉、杂交子代繁育、良种选育到产业化研究和应用,均需经过漫长的时间,制约了植物杂交育种和新品种选育的效率和进程。杂交子代早期鉴定能够缩短育种年限,加快育种进程^[4],因而杂种鉴定是杂交育种进程中十分重要的步骤^[5,6]。传统的杂种鉴定主要依赖于植株的外部形态特征,例如株高、叶片形状和大小、花形和花色、果形和果色、生长习性等,但是植株的发育状况及外部环境因子均可能会影响杂种鉴定的准确性^[7]。随着分子生物学技术的发展,分子标记技术已被广泛应用于植物的杂种鉴定。SSR (simple sequence repeat) 标记技术是杂种鉴定中最常用的分子标记技术之一,已应用于梅树 (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.)^[8]、紫薇 (*Lagerstroemia indica* Linn.)^[9] 和青榨槭 (*Acer davidii* Franch.)^[10] 等园林植物以及大豆 [*Glycine max* (Linn.) Merr.]^[11]、落花生 (*Arachis hypogaea* Linn.)^[12]、糯玉米 (*Zea mays* var. *ceratina*

Kulesh)^[13] 和甘薯 [*Ipomoea batatas* (Linn.) Lam.]^[14] 等农作物的杂种鉴定和遗传多样性分析工作。

花楸树 [*Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl.] 和少叶花楸 [*S. hupehensis* var. *paucijuga* (D. K. Zang et P. C. Huang) L. T. Lu] 均为蔷薇科 (Rosaceae) 花楸属 (*Sorbus* Linn.) 落叶乔木。花楸树的叶、花和果观赏价值均较高,其体内富含蛋白质、可溶性糖、黄酮类和酚类等多种成分^[15-17],应用前景广阔。然而,由于野生花楸树原分布于中国北方海拔 900~2 500 m 的区域,在低海拔区域栽培时易受到夏季高温胁迫^[18],导致植株在越夏时叶片出现“日灼”现象,目前已从分子层面对花楸树响应高温胁迫及叶片“日灼”机制开展了系列研究^[19-21]。少叶花楸为山东特有的濒危树种^[22],生于海拔 300~1 000 m 的山坡沟边及林缘,在低海拔区域生长良好,并表现出较强的耐热性,目前针对少叶花楸的研究主要集中在地理分布^[23]、形态特征^[24]、光合特性^[25]、染色体核型^[26] 等方面。通过杂交育种的方法,将少叶花楸的耐热特性引入花楸树,可提高花楸树的耐热性能,这对选育耐热或适应

低海拔地区种植的花楸树新品种有重要意义。

为此,作者采用实生苗杂交育种方法,对花楸树和少叶花楸进行种间杂交,并利用EST-SSR标记技术对杂交F₁代群体进行杂种鉴定及遗传多样性和遗传关系分析,以期筛选出适宜于花楸树和少叶花楸杂交后代早期杂种鉴定的分子标记,进而为花楸属植物遗传图谱构建以及耐热品种中耐热基因的QTL定位提供基础研究资料。

1 材料和方法

1.1 材料

以花楸树为母本(SP)、少叶花楸(SH)为父本,于2020年4月采用常规人工控制授粉方法进行杂交;同年10月采集果实,经种实调制后获得纯净、饱满的杂交种子;同年11月将获得的杂交种子经低温春化处理,于2021年1月在温室播种于装有育苗基质[V(草炭):V(蛭石)=3:1]的营养钵(直径12 cm、高12 cm)中;2021年4月将幼苗移栽至花盆(直径27.5 cm、高31 cm)中,统一水肥管理。有22株子代在育苗过程中死亡,最终获得184株成活的杂交F₁代植株(编号为PH1至PH184),栽植于北京农学院花楸种质资源圃中。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA的提取及检测 于2021年4月采集杂交亲本及子代幼嫩叶片(每株约100 mg),利用新型快速植物基因组DNA提取(离心柱型)试剂盒(型号DP3112,北京百泰克生物技术有限公司)提取每个单株叶片基因组DNA;用质量分数1%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量,并置于-20℃冰箱中保

存、备用。

1.2.2 引物筛选 使用本课题组开发的55对EST-SSR引物^[27],委托北京睿博兴科生物技术有限公司,在正向引物的5'端分别添加HEX、FAM、TAMRA和ROX荧光染料接头,合成荧光引物。以2个亲本及随机选取的4株F₁代单株的基因组DNA为模板进行引物筛选。

使用S1000 PCR仪(美国Bio-Rad公司)进行PCR扩增。扩增体系总体积25.0 μL,包含2×Taq PCR MasterMix(北京爱博森生物科技有限公司)12.5 μL、100.0 ng·μL⁻¹基因组DNA 0.5 μL以及10.0 μmol·L⁻¹正向和反向引物各1.0 μL,并用无菌双蒸水补足体积。扩增程序为:95℃预变性5 min;95℃变性30 s、相应温度退火30 s、72℃延伸45 s,30个循环;最后于72℃延伸7 min。

用ABI 3730xl DNA分析仪(美国Applied Biosystems公司)对扩增产物进行毛细管电泳。取1.0 μL扩增产物,加入8.5 μL去离子甲酰胺和0.5 μL Liz-500分子量内标,依次于95℃变性5 min、4℃保温10 min后,于4℃条件下3 000 r·min⁻¹离心1 min后进行毛细管电泳分析;毛细管电泳条件为13 kV预电泳3 min;1.5 kV进样10 s;10 kV电泳40 min。根据毛细管电泳结果筛选出9对在亲本中具有多态性的特异性EST-SSR引物用于杂种鉴定。各引物的基本信息见表1。

1.2.3 杂种鉴定 以184株杂交F₁代单株的基因组DNA为模板,按照前述扩增体系和程序进行PCR扩增和毛细管电泳。对扩增结果进行分析,具有双亲特异位点的杂交后代为真杂种,而双亲位点缺失的杂交后代则需进行重复验证。

表1 用于花楸树和少叶花楸杂交F₁代群体EST-SSR标记分析的9对多态性引物信息

Table 1 Information of nine pairs of polymorphic primers used for EST-SSR marker analysis on F₁ hybrid population of *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl. and *S. hupehensis* var. *paucijuga* (D. K. Zang et P. C. Huang) L. T. Lu

引物 Primer	重复基序 Repeat motif	正向引物序列(5'→3') Forward primer sequence (5'→3')	反向引物序列(5'→3') Reverse primer sequence (5'→3')	退火温度/℃ Annealing temperature
sorsd29	(GA) ₁₂	AAAGCTGACACCCCAATGTC	CAGAGCAGCTTCACCTTTCC	57
sorsd39	(GA) ₁₈	GAAGCACAGAATCAGCAAA	ATGCCCTTTTGCTTTCACAC	57
sors51	(AG) ₁₅	GCGAAACAAACAGATGGATG	CGCTGACCTGAGAGACTTCC	57
sors85	(CT) ₁₁	CGGCTTTTGCATCATCTTT	CCTTGACAGAGCATTCAGCA	57
sors33	(AG) ₁₃	TTATATGGCCGCAATTTCAT	CCGAGGAAGAAGAACAGTCTC	57
sors89	(CT) ₁₁	CAAATGATGCATGACACATACAA	GGAAGACGAACAGAGGCAAG	57
sors60	(AG) ₁₆	CATGACCCAAAGCAGAGGAT	TTTCTCACTCATCAGAGTCACCA	57
sors71	(CT) ₁₀	TCAATGGGGCTTTGATTAGC	AAGCAGAGGAGAGAGCTCTGAA	57
sorsk10	(TTC) ₆	TTTGAGCCATTGAGTGTTC	TGGTGTTCGAGTTTTCTG	52

1.3 数据统计分析

使用 GeneMarker 2.2.0 软件对毛细管电泳数据进行统计分析,将每个峰值的位置与泳道中的 GeneScan500LIZ 分子质量内标进行比较,读取扩增片段长度,记录等位基因。

使用 POPGENE 32 软件计算杂交 F_1 代群体的观测等位基因数、有效等位基因数、Shannon's 信息指数、期望杂合度、观测杂合度和遗传距离;使用 CERVUS 3.0 软件统计每个 EST-SSR 位点的多态性信息含量;基于遗传距离,使用 MEGA 7.0 软件对双亲和杂交 F_1 代群体进行 UPGMA 聚类分析。

用 a、b、c、d 对不同等位基因进行标记,利用 SPSS 26.0 软件中的卡方 (χ^2) 拟合优度检验对杂交 F_1 代群体的基因型分离情况进行分析^[28],以确定基因型分离情况与孟德尔分离定律的符合程度。

2 结果和分析

2.1 杂交 F_1 代单株的杂种鉴定结果

根据 9 对 EST-SSR 引物的扩增结果获得花椒树和少叶花椒及其杂交 F_1 代的基因型。在 184 株 F_1

代单株中,有 9 株 F_1 代单株分别在 3~7 个位点上出现异常基因型,占 F_1 代单株总数的 4.9%;有 175 株单株在 9 个 EST-SSR 位点上均扩增出双亲条带,这些单株均可认为是真杂种后代,杂种率达 95.1%。

由 9 对 EST-SSR 引物在亲本和 9 株异常 F_1 代单株中的扩增结果(表 2)可见:在出现异常基因型的 F_1 代单株中,PH1 有 6 个位点出现母本或父本条带的缺失,其中 3 个位点扩增出新条带;PH4 有 6 个位点出现母本或父本条带缺失,其中 3 个位点扩增出新条带;PH6 有 5 个位点出现母本或父本条带缺失,除 sors51 外,另 4 个位点均扩增出新条带;PH7 有 4 个位点出现母本或父本条带缺失,其中 2 个位点扩增出新条带;PH8 有 3 个位点出现母本条带缺失,其中 2 个位点扩增出新条带;PH9 有 4 个位点出现母本或父本条带缺失,其中 2 个位点扩增出新条带;PH10 有 7 个位点出现母本或父本条带缺失,除 sors51 位点外,其他 6 个位点均扩增出新条带;PH19 有 6 个位点出现母本或父本条带缺失,这 6 个位点均扩增出新条带;PH26 有 6 个位点出现母本或父本条带缺失,除 sors51 位点外,其他 5 个位点均扩增出新条带。

表 2 9 对 EST-SSR 引物在亲本及 9 株异常 F_1 代中的扩增结果

Table 2 Amplification result of nine pairs of EST-SSR primers in parents and nine abnormal F_1 individuals

样本 ¹⁾ Sample ¹⁾	不同引物对应位点的基因型 ²⁾ Genotype at loci corresponding to different primers ²⁾								
	sorsd29	sorsd39	sors51	sors85	sors33	sors89	sors60	sors71	sorsk10
SP	151/151	274/274	206/206	249/249	258/266	191/197	221/229	215/221	241/244
SH	147/147	270/286	274/274	251/253	248/256	179/195	221/233	205/221	241/250
PH1	147/147	212/214	206/206	251/253	248/252	189/201	—	—	—
PH4	—	260/274	206/206	251/253	248/252	197/199	—	205/205	—
PH6	—	278/278	206/206	247/251	252/266	197/199	—	—	—
PH7	—	262/278	206/206	—	—	189/195	—	205/205	—
PH8	—	—	—	251/253	252/256	189/195	—	—	—
PH9	—	274/278	206/206	251/253	—	197/201	—	—	—
PH10	151/153	262/274	206/206	253/255	244/266	179/189	—	221/226	—
PH19	—	250/260	188/206	—	246/248	173/197	229/239	209/221	—
PH26	—	270/278	206/206	251/255	252/252	171/197	221/237	—	—

¹⁾ SP: 花椒树(母本) *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl. (female parent); SH: 少叶花椒(父本) *S. hupehensis* var. *paucijuga* (D. K. Zang et P. C. Huang) L. T. Lu (male parent); PH: 杂交 F_1 代单株 Hybrid individuals of F_1 generation.

²⁾ —: 表示该位点扩增出双亲条带 Representing that the parental bands are amplified at this locus.

2.2 杂交 F_1 代中真杂种单株的基因分离规律

依据 9 对 EST-SSR 引物的扩增结果对花椒树和少叶花椒杂交 F_1 代 175 株真杂种的基因分离规律进行分析,结果见表 3。

由表 3 可见:引物 sorsd29 在亲本中的扩增结果

为 aa×bb 型,即纯合互补型;引物 sorsd39、sors51 和 sors85 在亲本中的扩增结果为 aa×bc 型,即父本型;引物 sors33 和 sors89 在亲本中的扩增结果为 ab×cd 型,即双亲互补型;引物 sors60、sors71 和 sorsk10 在亲本中的扩增结果为 ab×ac 型,即杂合互补型^[28]。

表3 基于9对 EST-SSR 引物扩增结果的花楸树和少叶花楸杂交 F₁ 代中 175 株真杂种的基因分离规律Table 3 Gene segregation rule of 175 real hybrids of F₁ hybrid generation of *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl. and *S. hupehensis* var. *paucijuga* (D. K. Zang et P. C. Huang) L. T. Lu based on amplification results of nine pairs of EST-SSR primers

引物 ¹⁾ Primer ¹⁾	亲本基因型 Genotype of parents	F ₁ 代分离比 Segregation ratio of F ₁ generation	期望分离比 Expected segregation ratio	自由度 Degree of freedom	卡方 Chi-square (χ^2)
sorsd29	aa×bb	ab = 175			
sorsd39	aa×bc	ab : ac = 95 : 80	1 : 1	1	1.286
sors51	aa×bc	ab : ac = 95 : 80	1 : 1	1	1.286
sors85	aa×bc	ab : ac = 91 : 84	1 : 1	1	0.280
sors33	ab×cd	ac : ad : bc : bd = 47 : 38 : 39 : 51	1 : 1 : 1 : 1	3	2.714
sors89	ab×cd	ac : ad : bc : bd = 39 : 37 : 45 : 54	1 : 1 : 1 : 1	3	3.994
sors60	ab×ac	aa : ac : ab : bc = 43 : 47 : 52 : 33	1 : 1 : 1 : 1	3	4.451
sors71	ab×ac	aa : ac : ab : bc = 37 : 36 : 52 : 50	1 : 1 : 1 : 1	3	4.863
sorsk10	ab×ac	aa : ac : ab : bc = 46 : 38 : 48 : 42	1 : 1 : 1 : 1	3	1.114

¹⁾ 每对引物代表 1 个特异性位点 Each pair of primer represents one specific locus.

由表 3 还可见:由于引物 sorsd29 在亲本中的扩增结果为纯合互补型,因而,其 F₁ 代 175 株真杂种均未出现基因分离现象,基因型均为 ab 型。另 8 对引物在这 175 株 F₁ 代真杂种中的扩增结果均出现基因分离现象,其中,引物 sorsd39、sors51 和 sors85 在 F₁ 代中的扩增结果呈现 2 种基因型,即 ab 和 ac,分离比略有不同,但均接近 1 : 1,经 χ^2 检验,与期望分离比无显著 ($P > 0.05$) 差异;引物 sors33 和 sors89 在 F₁ 代中的扩增结果呈现 4 种基因型,即 ac、ad、bc 和 bd;引物 sors60、sors71 和 sorsk10 在 F₁ 代中的扩增结果也呈现 4 种基因型,即 aa、ac、ab 和 bc,这 5 对引物扩增结果呈现的 4 种基因型在 F₁ 代群体中的分离比存在一定差异,但经 χ^2 检验,与期望分离比(1 : 1 : 1 : 1) 均无显著差异,表明在花楸树和少叶花楸的杂交 F₁

代中,上述 8 对 EST-SSR 引物对应位点的基因型均符合孟德尔分离定律。

2.3 杂交 F₁ 代中真杂种的遗传多样性

依据 9 对 EST-SSR 引物的扩增结果对花楸树和少叶花楸杂交 F₁ 代中 175 株真杂种的遗传多样性进行分析,结果见表 4。

由表 4 可见:9 个 EST-SSR 位点共包含 28 个等位基因,均值为 3.1;有效等位基因数为 2.0~4.0,均值为 2.9;多态性信息含量和 Shannon's 信息指数分别为 0.375~0.705 和 0.693~1.386,均值分别为 0.566 和 1.076;观测杂合度和期望杂合度分别为 0.737~1.000 和 0.501~0.752,均值分别为 0.920 和 0.640。总体上看,sors33 和 sors89 位点的各项遗传多样性指数均较大,sorsd29 位点的各项遗传多样性指数均最小。

表4 基于9对 EST-SSR 引物扩增结果的花楸树和少叶花楸杂交 F₁ 代 175 株真杂种的遗传多样性Table 4 Genetic diversity of 175 real hybrids of F₁ hybrid generation of *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl. and *S. hupehensis* var. *paucijuga* (D. K. Zang et P. C. Huang) L. T. Lu based on amplification results of nine pairs of EST-SSR primers

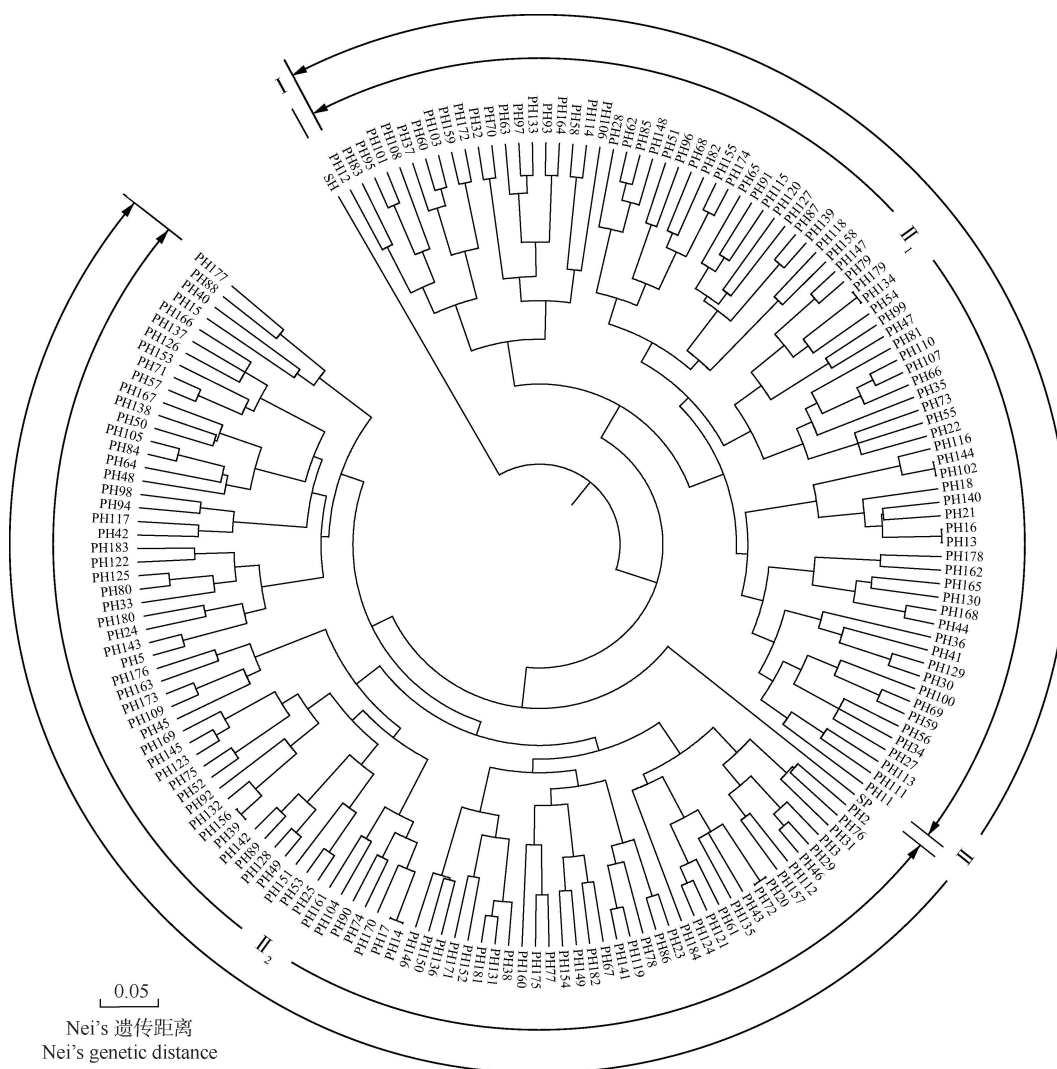
引物 ¹⁾ Primer ¹⁾	观测等位基因数 Number of observed alleles	有效等位基因数 Number of effective alleles	多态性信息含量 Polymorphism information content	Shannon's 信息指数 Shannon's information index	观测杂合度 Observed heterozygosity	期望杂合度 Expected heterozygosity
sorsd29	2	2.0	0.375	0.693	1.000	0.501
sorsd39	3	2.7	0.553	1.038	1.000	0.626
sors51	3	2.7	0.553	1.038	1.000	0.626
sors85	3	2.7	0.554	1.039	1.000	0.627
sors33	4	4.0	0.705	1.386	1.000	0.752
sors89	4	4.0	0.700	1.382	1.000	0.750
sors60	3	2.6	0.541	1.018	0.754	0.611
sors71	3	2.8	0.568	1.061	0.789	0.642
sorsk10	3	2.6	0.549	1.031	0.737	0.621
均值 Mean	3.1	2.9	0.566	1.076	0.920	0.640

¹⁾ 每对引物代表 1 个特异性位点 Each pair of primer represents one specific locus.

2.4 亲本与杂交 F₁ 代真杂种的聚类分析

依据花楸树和少叶花楸及其杂交 F₁ 代 175 株真

杂种的 Nei's 遗传距离,采用 UPGMA 法构建系统聚类图,结果见图 1。



SP: 花楸树(母本) *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl. (female parent); SH: 少叶花楸(父本) *S. hupehensis* var. *paucijuga* (D. K. Zang et P. C. Huang) L. T. Lu (male parent); PH: 杂交 F₁ 代单株 Hybrid individuals of F₁ generation.

图 1 基于 9 对 EST-SSR 引物扩增结果的花楸树、少叶花楸及 175 株杂交 F₁ 代真杂种的 UPGMA 聚类图

Fig. 1 UPGMA cluster diagram of *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl., *S. hupehensis* var. *paucijuga* (D. K. Zang et P. C. Huang) L. T. Lu, and 175 real hybrids of F₁ hybrid generation based on amplification results of nine pairs of EST-SSR primers

由图 1 可见:在 Nei's 遗传距离 0.28 处,供试样本分为 2 组,其中少叶花楸单独为组 I,花楸树和 175 株 F₁ 代单株聚为组 II。在 Nei's 遗传距离 0.24 处,组 II 分为 2 个亚组,其中 81 株 F₁ 代单株聚为亚组 II₁,占 F₁ 代真杂种总数的 46.3%;另 94 株 F₁ 代单株与花楸树聚为亚组 II₂,占 F₁ 代真杂种总数的 53.7%。总体上看,175 株 F₁ 代单株与花楸树有较近的遗传关系。

3 讨论和结论

在植物杂种鉴定方面,分子标记可从基因组水平上揭示杂交种与亲本之间的遗传差异,且不受环境条件和生长发育状况的影响,能够在幼苗早期进行鉴定^[29]。本研究使用 9 对 EST-SSR 引物对花楸树和少叶花楸的 184 株杂交 F₁ 代进行了杂种鉴定,其中

175株被鉴定为真杂种,杂种率达95.1%,其余9株单株的扩增结果中存在缺失双亲条带或出现新条带的现象,在F₁代单株中出现新条带的原因可能有2个:一是在减数分裂过程中发生基因重组或突变^[30],二是在花粉采集和去雄或人工授粉过程中出现花粉污染的情况。

当杂交群体受到选择、突变、遗传漂变等影响时,子代的基因型比例会偏离孟德尔遗传定律,这种现象被称为偏分离^[31];基因偏分离现象会影响标记间的重组率,从而影响植物的遗传作图^[32]。周宁宁等^[33]对月季(*Rosa chinensis* Jacq.)杂交F₁代基因型的分离情况进行了分析,发现在20个SSR标记中有9个标记产生了偏分离;汪国云等^[34]对杨梅(*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.)杂交群体的研究表明,8个SSR标记中有2个标记产生了偏分离。本研究中,除9株F₁代单株出现异常基因型外,175株杂交F₁代真杂种中有8个位点的分离比符合孟德尔分离定律,未发生显著的杂种偏分离现象,说明亲本间的基因兼容性较高^[35],也进一步支持了“在花楸属种类中花楸树与少叶花楸的遗传距离相对较近”^[36]的研究结果。然而,花楸树与少叶花楸在分布区域、生长习性、表型性状(特别是小叶数量)及抗热性上有较大差异,通过种间杂交可以选育综合双亲优良性状的杂种后代。此外,本研究中所有的标记均未发生偏分离,进一步表明所选的9对EST-SSR引物均可用于构建花楸树与少叶花楸杂交F₁群体的遗传图谱。

SSR标记具有数量大、多态性高、共显性、可靠性高和多等位基因检测等优点^[37]。本研究使用的9对EST-SSR引物在175株F₁代真杂种中共扩增出28个等位基因,平均每个位点3.1个等位基因,平均有效等位基因数为2.9。多态性信息含量是评价引物的多态性的重要指标,多态性信息含量大于0.50,说明引物的多态性水平高;多态性信息含量小于0.25,则说明引物的多态性水平低^[38]。本研究中,9对EST-SSR引物的平均多态性信息含量为0.566,除引物sorsd29的多态性信息含量小于0.5外,其他8对EST-SSR引物的多态性信息含量均大于0.5,表明本研究筛选出来的EST-SSR引物具有较高的多态性。

SSR标记多用于植物天然群体遗传多样性分析^[39,40],但在人工杂交群体的遗传多样性研究中应用尚不广泛,目前已应用于茶树[*Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze.]^[41]、牡丹(*Paeonia* × *suffruticosa*

Andr.)^[42]和紫薇^[43]等栽培植物的杂交群体遗传多样性研究和遗传变异分析。本研究采用EST-SSR标记研究了花楸树和少叶花楸杂交F₁代群体的遗传多样性参数,结果显示该杂交F₁代群体的Shannon's信息指数、观测杂合度和期望杂合度等遗传多样性参数均略高于茶树、牡丹和紫薇等树种的杂交F₁代群体,表明花楸树和少叶花楸的杂交F₁代群体遗传变异显著、遗传多样性丰富,说明EST-SSR标记可应用于花楸属种类杂交后代群体的遗传多样性研究和杂种鉴定。

花楸树和少叶花楸杂交F₁代真杂种群体具有丰富的遗传变异,但聚类分析结果显示F₁代群体与母本聚为一组,而父本则独立成组,说明花楸树和少叶花楸杂交F₁代真杂种群体与母本的遗传关系较近,这一现象也存在于甘蔗(*Saccharum* spp.)和蔗茅(*Erianthus fluvius* Ness)^[44]、枣(*Ziziphus jujuba* Mill.)和酸枣(*Z. acidojujuba* Cheng et Liu)^[45]以及菊花脑(*Chrysanthemum nankingense* Hand.-Mazt.)和甘菊[*C. lavandulifolium* (Fisch. ex Trautv.) Makino]^[46]的杂交F₁代群体与亲本的遗传关系中。这一现象一方面可能与亲本的遗传物质传递直接相关,另一方面也与所用引物数量及引物特征间接相关^[45]。虽然本研究使用的9个EST-SSR标记能鉴定出花楸树和少叶花楸杂交F₁代的真杂种,并分析其遗传多样性,但是总体来看,使用的EST-SSR标记数量相对较少,且并未发现这9个标记与叶片“日灼”现象有关,故本研究中所有F₁代单株与母本聚为一类,并不能确定这些F₁代单株是否与母本同样表现出在越夏时叶片出现“日灼”现象,因此,后续需对这些杂交F₁代群体的表型性状变异进行深入研究,特别是叶片“日灼”等与抗热性有关的性状,或者开发与抗热性状相关联的EST-SSR标记。

总之,本研究以花楸树为母本、少叶花楸为父本,成功进行了种间杂交并获得了175个杂种单株构成的杂交F₁代群体,且杂交群体具有丰富的遗传多样性。筛选出的9对EST-SSR引物多态性较高,且在杂交群体中未出现明显偏分离,可用于后续遗传图谱的构建及QTL定位。

参考文献:

- [1] WANG L, LIU P F, ZHAO H, et al. Comparative transcriptome analysis between interspecific hybridization (Huaren apricot ♀ × almond ♂) and intraspecific hybridization (Huaren apricot) during

- young fruit developmental stage[J]. *Scientia Horticulturae*, 2018, 240: 397-404.
- [2] WANG Y Q, DU K, DENG Q X, et al. Identification of interspecific hybrids between loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) and bengal loquat (*E. bengalensis* Hook.) [J]. *Pakistan Journal of Botany*, 2017, 49(3): 897-902.
- [3] 卢明艳, 梁英海, 赵晨辉, 等. 山楂海棠杂交后代苹果腐烂病抗性评价[J]. *北方园艺*, 2014(6): 115-117.
- [4] 柴戈霞. 紫花含笑传粉生物学与杂交育种研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学风景园林学院, 2018: 9.
- [5] 尹跃, 赵建华, 何昕孺, 等. 枸杞种间杂交 F₁ 群体的 SSR 鉴定及遗传分析[J]. *西北农业学报*, 2019, 28(12): 2027-2034.
- [6] 袁金玲, 马婧瑕, 钟远标, 等. 基于 SSR 标记的丛生竹杂种鉴定、遗传分析和指纹图谱构建[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2021, 45(5): 10-18.
- [7] ZHAO X H, ZHANG J C, ZHANG Z Y, et al. Hybrid identification and genetic variation of *Elymus sibiricus* hybrid populations using EST-SSR markers[J]. *Hereditas*, 2017, 154(1): 15.
- [8] 杨秋玲. 抗寒梅花杂交种及部分杂种子代鉴定研究[D]. 北京: 北京林业大学园林学院, 2019: 48-58.
- [9] 彭婵, 李振芳, 马林江, 等. 紫薇属种间杂种 SSR 分子鉴定与遗传分析[J]. *北方园艺*, 2020(13): 83-90.
- [10] 穆莹, 张梦璐, 白云海, 等. 基于 EST-SSR 标记的青榨槭天然种群遗传多样性分析[J]. *植物资源与环境学报*, 2022, 31(2): 57-63.
- [11] LI F Y, LIU X, WU S Y, et al. Hybrid identification for *Glycine max* and *Glycine soja* with SSR markers and analysis of salt tolerance[J]. *PeerJ*, 2019, 7(1): e6483.
- [12] DARVHANKAR M, KASUNDRAS, KAMDAR J, et al. Identification of true hybrid progenies in peanut using simple sequence repeat (SSR) markers[J]. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 2019, 20(1/2): 14-21.
- [13] 杨亚桐, 董安忆, 刘松涛, 等. 基于 SSR 分子标记的糯玉米遗传多样性研究[J]. *江苏农业科学*, 2020, 48(2): 83-86.
- [14] 苏一钧, 王娇, 霍恺森, 等. 甘薯引进种 SSR 遗传多样性分析[J]. *江苏农业学报*, 2018, 34(5): 984-997.
- [15] LI H Y, MATSUURA M, LI W, et al. Chemical constituents from the fruits of *Sorbus pohuashanensis* [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2012, 43: 166-168.
- [16] 柴晓东. 百华花楸果实有效成分的研究[J]. *辽宁林业科技*, 2015(4): 31, 75.
- [17] 徐嫚嫚, 于雪丹, 郑勇奇, 等. 花楸树 (*Sorbus pohuashanensis*) 营养物质与药用成分探究[J]. *林业科学研究*, 2020, 33(2): 154-160.
- [18] ZHANG Z, PEI X, ZHANG R L, et al. Molecular characterization and expression analysis of small heat shock protein 17.3 gene from *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl. in response to abiotic stress [J]. *Molecular Biology Reports*, 2020, 47(12): 9325-9335.
- [19] 张泽, 裴鑫, 鲁仪增, 等. 花楸树小热激蛋白 23.8 基因 (*SpHSP23.8*) 克隆与表达分析[J]. *植物资源与环境学报*, 2020, 29(5): 9-20.
- [20] 赵冬雪, 刘聪聪, 鲁仪增, 等. 花楸树热激蛋白 *SpHSP70-2* 基因的克隆及表达分析[J]. *西北林学院学报*, 2021, 36(5): 42-50.
- [21] ZHAO D X, QI X Y, ZHANG Y, et al. Genome-wide analysis of the heat shock transcription factor gene family in *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl identifies potential candidates for resistance to abiotic stresses [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2022, 175: 68-80.
- [22] 李文清, 臧德奎, 解孝满, 等. 山东珍稀濒危保护树种[M]. 北京: 科学出版社, 2016: 33.
- [23] 仝伯强, 王磊, 臧德奎, 等. 山东特有树种资源调查[J]. *安徽农业科学*, 2019, 47(16): 130-132.
- [24] 彭海英. 花楸属部分植物形态与核型研究[D]. 南京: 南京林业大学生物与环境学院, 2016: 55-56.
- [25] 赵洋, 陈云, 张晓晨, 等. 遮阴对少叶花楸幼苗光合和叶绿素荧光参数的影响[J]. *东北林业大学学报*, 2019, 47(1): 30-34.
- [26] LI J B, ZHU K L, WANG Q, et al. Genome size variation and karyotype diversity in eight taxa of *Sorbus sensu stricto* (Rosaceae) from China [J]. *Comparative Cytogenetics*, 2021, 15(2): 137-148.
- [27] WU Y H, HE R Q, LU Y Z, et al. Development and evaluation of EST-SSR markers in *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl. and their application to other *Sorbus* species[J]. *Trees*, 2020, 34(3): 455-467.
- [28] 尹宝颖, 张媛, 孙福来. 苹果 F₁ 群体的 SSR 鉴定与遗传多样性分析[J]. *河北农业大学学报*, 2019, 42(5): 46-51.
- [29] DRIDI J, FENDRI M, BRETON C M, et al. Characterization of olive progenies derived from a Tunisian breeding program by morphological traits and SSR markers[J]. *Scientia Horticulturae*, 2018, 236: 127-136.
- [30] NADEEM M, WANG X W, AKOND M, et al. Hybrid identification, morphological evaluation and genetic diversity analysis of *Rosa × hybrida* by SSR markers[J]. *Australian Journal of Crop Science*, 2014, 8(2): 183-190.
- [31] 王哲. 植物杂交后代中基因偏分离的产生原因及其进化意义[J]. *遗传*, 2016, 38(9): 801-810.
- [32] 宋宪亮, 孙学振, 张天真. 偏分离及对植物遗传作图的影响[J]. *农业生物技术学报*, 2006, 14(2): 286-292.
- [33] 周宁宁, 李淑斌, 李远波, 等. 二倍体月季 F₁ 群体的 SSR 鉴定与遗传分析[J]. *园艺学报*, 2017, 44(1): 151-160.
- [34] 汪国云, 沈禹彤, 贾慧敏, 等. ‘荸荠’×‘东魁’杨梅杂交群体构建与 SSR 杂种鉴定[J]. *果树学报*, 2015, 32(4): 555-560.
- [35] 范智权, 孙加雷, 单建伟, 等. 杂种偏分离的遗传和分子机理研究进展[J]. *遗传*, 2015, 37(2): 148-156.
- [36] 杜婉. 花楸属部分植物次生构造和亲缘关系研究[D]. 南京: 南京林业大学生物与环境学院, 2016: 31-34.
- [37] WU J T, WANG Q N, XIE J, et al. SSR marker-assisted management of parental germplasm in sugarcane (*Saccharum* spp.

- hybrids) breeding programs[J]. *Agronomy*, 2019, 9(8): 449.
- [38] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32: 314-331.
- [39] WU Y H, GU Y P, LU Y Z, et al. Genetic diversity in natural populations of *Sorbus pohuashanensis* based on EST-SSR markers [J]. *Trees*, 2021, 35(6): 1831-1843.
- [40] YOUSEFZADEH H, RAEISI S, ESMAILZADEH O, et al. Genetic diversity and structure of rear edge populations of *Sorbus aucuparia* (Rosaceae) in the Hyrcanian Forest [J]. *Plants*, 2021, 10(7): 1471.
- [41] 雷雨,段继华,黄飞毅,等.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.
- [42] 王业云.牡丹杂交后代的形态学和SSR分子标记鉴定[D].北京:中国林业科学研究院林业研究所,2016:38.
- [43] 吴际洋,焦 垚,叶远俊,等.大花紫薇与紫薇杂交F₁群体表型评价及分子标记连锁分析[J].*园艺学报*, 2018, 45(11): 2153-2163.
- [44] 姚春雪,王先宏,何丽莲,等.甘蔗与蔗茅杂交不同世代的SSR指纹图谱构建[J].*分子植物育种*, 2011, 9(3): 381-389.
- [45] 闫芬芬,郑兴娟,罗 智,等.枣和酸枣杂交后代遗传多样性的SSR分析[J].*西北林学院学报*, 2018, 33(3): 91-97, 152.
- [46] 刘颖鑫,李沛瞳,迟天华,等.菊花脑×甘菊种间F₁杂种的鉴定和遗传多样性分析[J].*园艺学报*, 2019, 46(8): 1553-1564.

(责任编辑:吴芯夷)

欢迎订阅 2023 年《中国种业》

《中国种业》是由农业农村部主管,中国农业科学院作物科学研究所和中国种子协会共同主办的全国性、专业性、技术性种业科技期刊,为全国优秀农业期刊。本刊主要宣传报道与农作物种业相关的产业政策、科研进展、技术和品种创新、种子经营与管理等内容的综述性文章、研究论文以及新品种选育、推广、栽培等技术方法文章,已被中国核心期刊(遴选)数据库、中国期刊全文数据库、中国学术期刊综合评价数据库、中文科技期刊数据库、中国科技期刊精品数据库、《中国生物学文摘》和中国生物学文献数据库、JST日本科学技术振兴机构数据库(日)(2021)等数据库收录。

期刊定位:以行业导刊面目出现,做到权威性、真实性和及时性。主要栏目:种业论坛、专题论述、种业巡礼、种业管理、学法用法、问题与探讨、植物新品种保护、种子加工、经验

交流、研究论文、育繁制种、良种良法、实用技术、新品种与品种资源等。信息量大,技术实用。读者对象:各级种子管理、经营企业的领导和技术人员,各级农业科研、推广部门人员,大中专农业院校师生,农村专业户和广大农业生产经营者。

本刊为月刊,大16开本。每期定价20元,全年定价240元。国内统一连续出版物号CN 11-4413/S,国际标准连续出版物号ISSN 1671-895X。全国各地邮局均可订阅,邮发代号82-132,亦可直接汇款至编辑部订阅。

地址:北京市中关村南大街12号《中国种业》编辑部(邮编100081);电话:010-82105796(编辑部),010-82105795(广告发行部);网址:https://www.chinaseedqks.cn;E-mail:chinaseedqks@163.com;微信公众号:中国种业;编辑部QQ群:115872093,956938503;读者QQ群:289113905。