

华仁杏杂种鉴定及遗传变异分析

刘梦培¹, 傅大立^{1,2*}, 李芳东¹, 傅建敏¹, 田敏³, 梁臣⁴

(1. 中国林业科学研究院经济林研究开发中心, 河南 郑州 450003; 2. 北京林业大学, 北京 100083;
3. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; 4. 河南省洛阳林业科学研究所, 河南 洛阳 471002)

摘要:以华仁杏 6 个杂交组合为实验材料, 利用 SSR 分子标记技术研究亲本与杂种扩增谱带的多态性, 以甄别真假杂种。筛选出在亲本和杂种之间存在双亲互补带型的引物 6 对, 除 2 个杂种无法鉴别外, 其余品种均可鉴别为真杂种。另外亲缘关系和遗传变异分析结果表明, 各个组合杂交后代表现出来的一致性较高, 遗传多样性水平相差不大, 但当父本选择 X1 时, 母本选择 H1 或 H3 杂交后代差异比较显著。

关键词:华仁杏; SSR; 杂种鉴定; 聚类分析; 遗传变异

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

Identification and Genetic Variation Analysis of *Armeniaca cathayana* Hybrids

LIU Meng-pei¹, FU Da-li^{1,2*}, LI Fang-dong¹, FU Jian-min¹, TIAN Min³, LIANG Chen⁴

(1. Non-timber Forestry Research and Development Center, Chinese Academy of Forestry, Zhengzhou 450003, Henan, China;
2. Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;
3. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China;
4. Research Institute of Forestry in Luoyang, Luoyang 471002, Henan, China)

Abstract: With six hybridized combinations of *Armeniaca cathayana* as experimental materials, the SSR molecular marker technology was used to identify hybrids through amplification polymorphism bands and 6 primers with parent complementary belt type were screened. Most of the hybrids were identified as true hybrids except two. In addition, the genetic relationship and genetic variation analysis results showed that all the hybrid combination displayed high consistency and not significant genetic diversity was found. When choosing X1 as male parent and H1 or H3 as female parent, the differences of hybrids were significant. The results of hybrid identification and genetic variation analysis can be used in future's hybrid parents breeding, genetic linkage map construction and QTL mapping of important character of *A. cathayana*.

Key words: *Armeniaca cathayana*; SSR; hybrid identification; clustering analysis; genetic variation

杂交育种是植物遗传改良的关键技术, 有利于综合双亲的优良性状, 培育高产稳产的优良品种。华仁杏 (*Armeniaca cathayana* D. L. Fu et al.)^[1] 作为一种新种, 杂交育种方面工作还没有开始。杏属虽为自交不亲和品种, 但也存在一定程度的自交, 所以有必要对华仁杏杂交后代进行真实性鉴定。传统的

杂种鉴定方法多基于形态学鉴定, 但这种鉴定方法难度大, 周期长。随着分子生物学的发展, 分子标记技术已成功应用在植物杂交后代的研究中, SSR 标记具有共显性、多态性好、稳定性高等优点^[2], 在水稻 (*Oryza sativa* L.)、玉米 (*Zea mays* L.)、棉花 (*Gossypium* spp.)、花生 (*Arachis hypogaea* Linn.)、竹子

收稿日期: 2011-04-07

基金项目: 国家十一五科技支撑项目资助(2006BAD01A1703-2)

作者简介: 刘梦培(1984—), 女, 河北邢台人, 硕士研究生, 主要从事经济林分子与常规育种研究。

* 通讯作者: 傅大立(1965—), 男, 北京林业大学博士后, 中国林业科学研究院经济林研究开发中心研究员, 从事林木种质资源分类与遗传育种研究。E-mail: fu_dali@163.com

等^[3-7]物种的杂种鉴定中广泛应用。本研究以华仁杏6个杂交组合的亲本及杂交后代为实验材料,应用SSR分子标记技术进行杂种鉴定及遗传变异分析,以期对华仁杏杂种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

5个杂交亲本为X1、X2、H1、H2、H3。其中杂交后代A(X1×H1)成活6株,B(H2×H1)成活6株,C(X2×H1)成活6株,D(X1×H3)成活1株,E(X2×H3)成活2株,F(H1×H3)成活3株。植物材料采自国家林业局泡桐研究开发中心种质资源圃。

华仁杏所用PCR所需10×PCR Buffer Without MgCl₂、MgCl₂、dNTP MiX、Taq DNA Polymerase、Marker均购于TaKaRa公司,SSR引物参照国内外发表的蔷薇科稳定多态的40对引物序列,由上海生工公司合成,实验于2009—2010年在中国林科院亚热带林业研究所植物细胞工程实验室内完成。

1.2 华仁杏基因组提取及SSR-PCR反应体系优化

采用改良CTAB法^[8]提取植物基因组DNA,提取的DNA通过1.0%琼脂糖电泳检测,并存放于-20℃冰箱备用,最终用TE稀释至50 ng·μL⁻¹作为模板DNA。

SSR-PCR优化反应体系总体积20 μL,其中10×PCR Buffer 2.0 μL、25 mmol·L⁻¹MgCl₂ 1.2 μL、10 mmol·L⁻¹dNTPs MiX 0.4 μL、5 U·μL⁻¹Taq DNA聚合酶 0.3 μL、10 μmol·L⁻¹的上下游引物各0.5 μL、DNA模板 0.5 μL、ddH₂O 14.6 μL。SSR扩增程序94℃预变性5 min,94℃变性45 s,最适宜退火温度退火45 s,72℃延伸90 s,35个循环,72℃延伸10 min,4℃保存。

1.3 SSR-PCR产物检测

SSR产物检测采用一种新的微卫星PAGE DNA的显带方法^[9]。SSR-PCR产物在8%(29:1)聚丙烯酰胺凝胶上分离,胶片大小为195 mm×120 mm×1 mm,8 μL PCR产物与2 μL含有gelred的溴酚蓝上样缓冲液PCR管中混合均匀,取3 μL上样,120 V电压下电泳3 h。电泳结束后,自来水冲洗玻璃板双面,预冷,剥下凝胶,清水冲洗后,直接放入全自动紫外与可见分析装置拍照和分析。

1.4 数据统计与分析

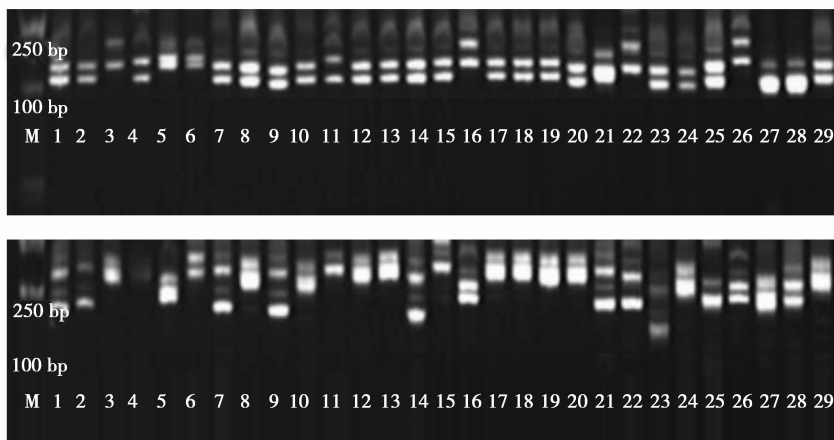
杂种鉴定分析方法:筛选清晰、稳定、子代表现出双亲互补带型的引物,用于杂种鉴定。

遗传变异分析:用NTSYSpc2.10^[10]软件进行类平均法(UPGMA法)聚类分析;用PopGene Version 1.31^[11]软件进行遗传距离分析和等位基因数、期望杂合度和Shannon多样性等相关指标分析。

2 结果与分析

2.1 华仁杏杂种真实性鉴定

从40对SSR引物中筛选出6对清晰、稳定、后代表现出双亲互补带型的引物,引物Pchgms4和引物BPPCT034检测图谱见图1。从表1中我们得出,Pchgms4和Bppct034产生的等位基因数为5,剩余引物产生的等位基因数为4。6对引物鉴定的真杂种数在3~9个范围内,以引物Bppct034最多,鉴定比率为37.5%,Pchgms3和Pchgms4鉴定比率最少,鉴定比率为12.5%。其中部分杂种可通过两条引物中任意一条鉴定,如A(X1×H1-1)可通过引物Bppct009或引物Bppct034鉴定,D(X1×H3)可通过引物Aprigms18或引物96-005加以鉴定。



(1~5为杂交亲本;6~29为杂交子代)

图1 引物Pchgms4(上)和引物BPPCT034(下)对华仁杏亲本及杂交种的SSR检测图谱

杂交后代只具有双亲特征带的杂交后代为真杂种,其他类型需做进一步分析。杂种鉴定结果主要表现为4种类型:双亲互补性、父本型、母本型和其

他型,其中22个杂交种为双亲互补型,为真杂种,剩余B(H2 × H1-4)1个杂交后代和C(X2 × H1-6)1个杂交后代需做进一步鉴定。

表1 6对引物的杂种鉴定结果

| 引物编号 | 引物序列 | 等位基因数 | 鉴定真杂种数 | 鉴定比率/% |
|-----------|--|-------|--------|--------|
| Pchgms3 | F—ACGGTATGTCCGTACACTCTCCATG R—CAACCTGTGATTGCTCCTATTA AAC | 4 | 3 | 12.5 |
| Pchgms4 | F—ATCTTCACAACCCCTAATGTC R—GTTGAGGCAAAAGACTTCAAT | 5 | 3 | 12.5 |
| BPPCT009 | F—ATTCGGGTGCGAACTCCCT R—ACGAGCACTAGAGTAACCCCTCTC | 4 | 7 | 29.2 |
| BPPCT034 | F—CTACCTGAAATAAGCAGAGCCAT R—CAATGGAGAATGGGGTGC | 5 | 9 | 37.5 |
| Aprigms18 | F—TCTGAGTTCAGTGGGTAGCA R—ACAGAATGTGCGTTGCTTTA | 4 | 7 | 29.2 |
| 96-005 | F—GTAACGCCTCGCTACCACAAA R—CCTGCATATGACCACCCAG | 4 | 6 | 25.0 |

2.2 杂交种与其亲本亲缘关系分析

杂交种与其亲本间的亲缘关系见图2。A(X1 × H1)杂交6株后代中,6株均与其父本X1的相似系数高于与其母本H1的相似系数,亲缘关系与其父本较近,与其母本较远(图2:A);B(H2 × H1)6株杂交后代中,亲本间的亲缘关系高于杂交后代与亲本间的亲缘关系(图2:B);C(X2 × H1)杂交后代杂交种(X2 × H1 -6)与母本的亲缘关系较近(图2:C);

D(X1 × H3)的1株杂交种与父本X1的亲缘关系更近(图2:D);E(X2 × H3)2株杂交后代中,杂交种(X2 × H3 -1)与母本的亲缘关系较近,(X2 × H3 -2)无法断定(图2:E);F(H1 × H3)3株杂交后代均与父本H1的亲缘关系近于与其母本的亲缘关系(图2:F)。总的来说,各个杂交组合杂交后代表现出来的一致性较高,尤其是杂交组合A(X1 × H1)、B(H2 × H1)、D(X1 × H3)和F(H1 × H3)。

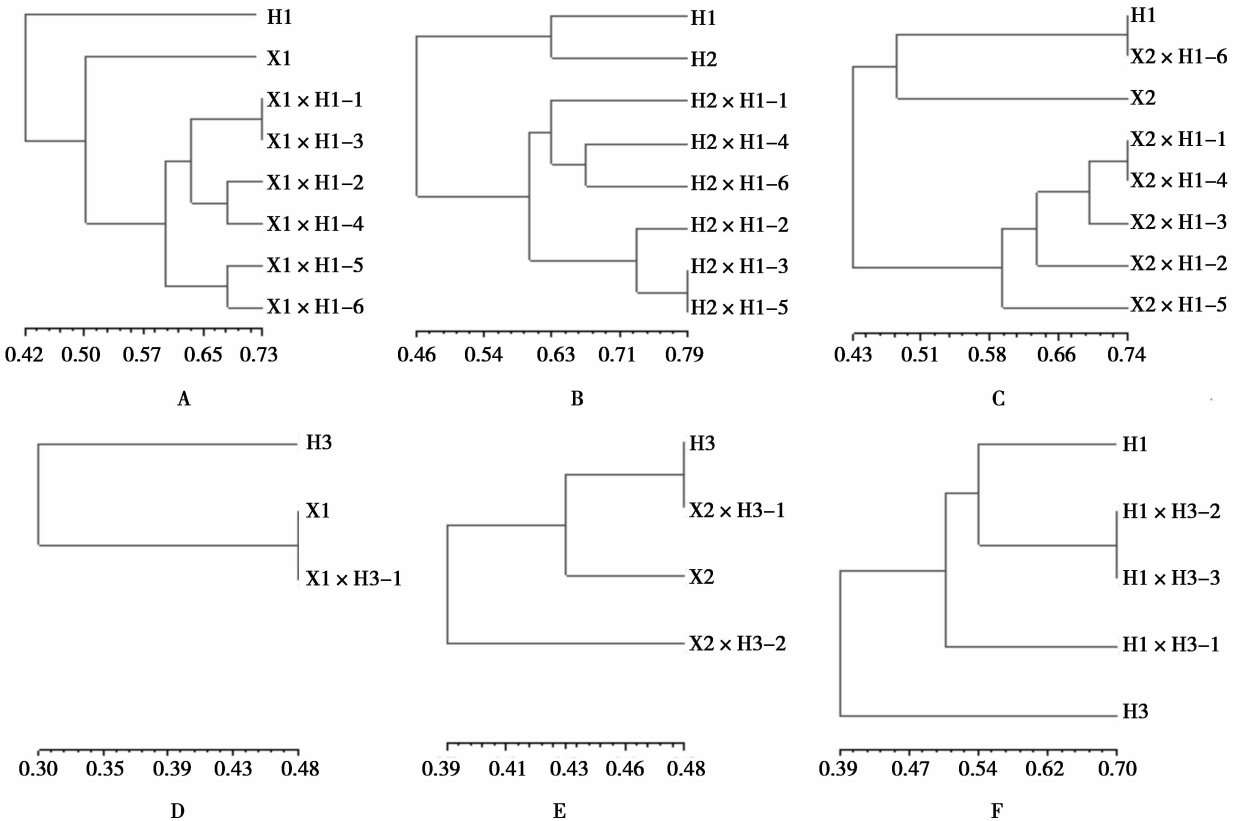


图2 杂交后代与亲本间亲缘关系的比较

2.3 华仁杏杂交后代遗传距离和遗传相似系数分析

从遗传变异相关系数上分析杂交后代(表2),除 $\delta X1 \times \text{♀} H3$ 杂交后代外,等位基因数以 $\delta H2 \times \text{♀} H1$ 杂交后代最高, $\delta X2 \times \text{♀} H3$ 杂交后代最低;有效等位基因数 $\delta H1 \times \text{♀} H3$ 杂交后代最高, $\delta X1$

$\times \text{♀} H1$ 杂交后代最低;期望杂合度和 Shannon 遗传多样性指数均以 $\delta X2 \times \text{♀} H1$ 杂交后代 $> \delta H2 \times \text{♀} H1$ 杂交后代 $> \delta H1 \times \text{♀} H3$ 杂交后代 $> \delta X2 \times \text{♀} H3$ 杂交后代 $> \delta X1 \times \text{♀} H1$ 杂交后代。总体来说,6个组合杂交后代的遗传多样性水平相差不大。

表2 华仁杏杂交后代遗传变异分析

| 项目 | 等位基因数 Na | 有效等位 基因数 Ne | 期望杂合度 H | Shannon 多样性 指数 I |
|--------------------------------|-------------|----------------|------------|---------------------|
| $\delta X1 \times \text{♀} H1$ | 1.576 9 | 1.303 8 | 0.185 0 | 0.283 3 |
| $\delta H2 \times \text{♀} H1$ | 1.769 2 | 1.417 8 | 0.247 8 | 0.377 3 |
| $\delta X2 \times \text{♀} H1$ | 1.730 8 | 1.440 0 | 0.259 6 | 0.389 0 |
| $\delta X1 \times \text{♀} H3$ | 1 | 1 | 1 | 1 |
| $\delta X2 \times \text{♀} H3$ | 1.500 0 | 1.353 6 | 0.207 1 | 0.302 4 |
| $\delta H1 \times \text{♀} H3$ | 1.576 9 | 1.448 9 | 0.245 3 | 0.353 6 |
| (平均) | 1.961 5 | 1.621 6 | 0.365 1 | 0.541 5 |

从遗传距离和遗传相似系数上分析杂交后代(表3)。 $\delta X2 \times \text{♀} H3$ 与 $\delta X2 \times \text{♀} H1$ 杂交后代和 $\delta H2 \times \text{♀} H1$ 杂交后代与 $\delta X1 \times \text{♀} H1$ 杂交后代遗传相似系数最高,分别为0.824 2和0.821 8,两对组合亲缘关系较近,说明当父本选择 X2 时,母本选择 H3 或 H1 表现出来的杂交后代差异很小,当母本选

择 H1 时,父本选择 H2 或 X1 同样杂交后代差异也很小。而 $\delta X1 \times \text{♀} H1$ 杂交后代与 $\delta X1 \times \text{♀} H3$ 杂交后代遗传距离最高,为0.429 5,两者亲缘关系最远。说明当父本选择 X1 时,母本选择 H1 或 H3 杂交后代差异显著。

表3 华仁杏杂交后代遗传距离和遗传相似度分析

| 项目 | $\delta X1 \times \text{♀} H1$ | $\delta H2 \times \text{♀} H1$ | $\delta X2 \times \text{♀} H1$ | $\delta X1 \times \text{♀} H3$ | $\delta X2 \times \text{♀} H3$ | $\delta H1 \times \text{♀} H3$ |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| $\delta X1 \times \text{♀} H1$ | * * * * * | 0.821 8 | 0.789 9 | 0.650 8 | 0.784 0 | 0.712 7 |
| $\delta H2 \times \text{♀} H1$ | 0.196 3 | * * * * * | 0.785 0 | 0.660 2 | 0.768 2 | 0.788 5 |
| $\delta X2 \times \text{♀} H1$ | 0.235 8 | 0.242 0 | * * * * * | 0.736 2 | 0.824 2 | 0.669 4 |
| $\delta X1 \times \text{♀} H3$ | 0.429 5 | 0.415 2 | 0.306 3 | * * * * * | 0.782 7 | 0.737 7 |
| $\delta X2 \times \text{♀} H3$ | 0.243 3 | 0.263 7 | 0.193 4 | 0.245 0 | * * * * * | 0.733 3 |
| $\delta H1 \times \text{♀} H3$ | 0.338 7 | 0.237 6 | 0.401 3 | 0.302 4 | 0.310 3 | * * * * * |

3 讨论

杂种鉴定是杂交育种的一个重要环节,快速、准确鉴定真杂种是杂交育种工作的重要前提和基础^[12]。植物杂种鉴定的方法主要有形态学鉴定、细胞学鉴定、同工酶鉴定^[13-16]及分子标记鉴定^[17-19]。如张新玲^[14]采用了常规染色体组型分析方法对小麦属(*Triticum* Linn.) 2个种间杂种及3个亲本进行了核型分析,鉴定出2个杂种均为真杂种;罗向东^[15]运用天冬氨酸转氨酶(AAT)、苹果酸脱氢酶(MDH)以及酯酶(EST)3种同工酶对栽培黄瓜(*Cucumis sativus* Linn.)与野黄瓜(*Cucumis hystrix* Chakr.)正反杂种进行了鉴定。但形态学鉴定、细

胞学鉴定和同工酶鉴定易受环境条件和发育阶段的影响,具有相对局限性。分子标记技术已成为现在进行杂种鉴定的理想工具,鉴定速度快,环境影响因素小,鉴定的准确率高,确保了被鉴定杂种的真实性,提高了育种利用的有效性。目前广泛应用的分子标记有RAPD、ISSR、AFLP、SSR等,但RAPD标记重复性差、ISSR标记多为显性、AFLP标记操作复杂等,相对来说,SSR标记以其共显性、重复性高的优点在杂种鉴定的研究中广泛应用。如卢江杰^[7]利用在竹类植物中有较高通用性的SSR标记可以对杂交竹种的真实性进行早期鉴定。田蕾等^[17]为建立鉴定大豆(*Soybean* sp.)杂种的方法,采用亲本间有多态性的3对SSR引物,对148个耐盐与盐敏感大豆

品种正反交 F1 植株进行分子鉴定。可见 SSR 分子标记技术在杂种鉴定中得到了广泛的应用。

本研究仅利用 6 对引物就将 24 个杂种中的 22 个鉴定为真杂种,杂种鉴定比率 91.25%。说明利用 SSR 分子标记进行杂种鉴定是切实可行的,也是快速高效的鉴定方法。同时也说明华仁杏存在一定程度的自交,所以有必要对华仁杏杂交后代进行真实性鉴定,提高杂交育种的效率,为新品种的选育奠定良好的基础。

本研究也从聚类分析、遗传距离和遗传多样性等相关分析对华仁杏杂交后代进行了遗传变异分析。研究结果表明,6 个组合杂交后代表现出来的一致性较高,尤其是杂交组合 A($X1 \times H1$)、B($H2 \times H1$)、D($X1 \times H3$) 和 F($H1 \times H3$)。另外 6 个组合杂交后代遗传距离范围在 0.196 3 ~ 0.429 5 之间,以 $\delta X1 \times \text{♀} H1$ 杂交后代与 $\delta X1 \times \text{♀} H3$ 杂交后代遗传距离最高,从而可推出当父本选择 X1 时,母本选择 H1 和 H3 杂交后代差异显著。这一结论可以服务于华仁杏杂交亲本的选育。但实验有相对不足之处,就是杂交后代数量相对较少,结果分析可能有一定偏差。但作者认为本研究提供了一种理论方法,利用分子标记技术进行杂种鉴定和遗传变异分析,为杂交育种提供理论指导是值得推广的。

参考文献:

[1] 傅大立,李炳仁,傅建敏,等. 中国杏属一新种[J]. 植物研究, 2010,30(1):1-3

[2] 段艳凤,刘 杰,卞春松,等. 中国 88 个马铃薯审定品种 SSR 指纹图谱构建与遗传多样性分析[J]. 作物学报,2009,35(8): 1451-1454

[3] 辛业芸,张 展,熊易平,等. 应用 SSR 分子标记鉴定超级杂交水稻组合及其纯度[J]. 中国水稻科学,2005,19(2):95-100

[4] 李汝玉,李 群,谭振馨,等. 利用 SSR 标记技术检测玉米杂交种纯度[J]. 玉米科学,2005,13(1):15-18

[5] 吴玉香,高燕会,祝水金. 4 个栽培棉种间四元杂种的 SSR 标记鉴定[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2007,33(1):56-60

[6] 张平湖,刘冠明. 花生杂交 F1 代真假杂种 SSR 标记鉴定体系的建立[J]. 广东农业科学,2009(10):49-51

[7] 卢江杰,吉永胜彦,方 伟,等. 3 种竹类植物杂种的分子鉴定[J]. 林业科学,2009,45(3):29-33

[8] Zeng J,Zou Y P,Bai J Y,*et al.* Preparation of Total DNA from "Recalcitrant Plant Taxa"[J]. Acta Bot Sin,2002,44(6):694-697

[9] 刘梦培,田 敏,傅大立,等. 一种新的微卫星 PAGE 的 DNA 显带方法[J]. 湖南农业科学,2010,9(17):145-148

[10] Rohlf F J. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version (1.08) [M]. NY, USA: Exeter Software Setauket,1993

[11] Yeh F C, Yang R C, Boyle T B J,*et al.* POPGENE, the User-friendly Shareware for Population Genetic Analysis [M]. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada, 1997

[12] 郑轶琦,宗俊勤,薛丹丹,等. SRAP 分子标记在假剑草杂交后代真实性鉴定中的应用[J]. 草业学报,2009,17(2):135-140

[13] Watanabe K. Successful ovary culture and production of F1 hybrids and androgenic haploids in Japanese Chrysanthemum species [J]. The Journal of Heredity, 1977, 6: 317-320

[14] 张新玲,石书兵,刘 俊,等. 小麦属 2 个种间杂种及 3 个亲本的核型分析[J]. 农艺科学,2007,23(6):238-244

[15] 罗向东,戴亮芳,刘 强,等. 栽培黄瓜与野黄瓜正反杂交的几种同工酶分析[J]. 植物分类学报,2006,44(5):488-493

[16] 郭海林,刘建秀,朱雪花,等. 结缕草植物杂交育种及其杂种鉴定——同工酶的变异分析[J]. 草业学报,2006,15(6):101-108

[17] 田 蕾,关荣霞,刘章雄,等. 用 SSR 标记鉴定大豆杂交组合 F1 的方法研究[J]. 植物遗传资源学报,2008,9(4):443-447

[18] Liu L W, Wang Y, Gong Y Q,*et al.* Assessment of genetic purity of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) hybrid using molecular markers [J]. Scientia Horticulturae, 2007, 115: 7-12

[19] Wang J, Zhong G Y, Register J C,*et al.* Identification of parents of F1 hybrids through SSR profiling of maternal and hybrid tissue [J]. Euphytica, 2002, 124: 29-34