

二倍体月季 F₁ 群体的 SSR 鉴定与遗传分析

周宁宁, 李淑斌, 李远波, 蹇洪英, 晏慧君, 王其刚, 陈敏, 邱显钦, 张颢, 唐开学*

(云南省农业科学院花卉研究所, 国家观赏园艺工程技术研究中心, 云南省花卉育种重点实验室, 昆明 650205)

摘要: 以中国古老月季品种‘月月粉’(*Rosa chinensis* ‘Old Blush’, 用 OB 表示)为母本, ‘无刺光叶蔷薇’(*Rosa wichuriana* ‘Basye’s Thornless’, 用 W 表示)为父本, 构建 F₁ 代共 296 个单株。从 146 对 SSR 标记中筛选出亲本间多态性好且条带清晰的 23 对 SSR 标记, 对随机选择的 94 株 F₁ 进行杂种鉴定和遗传分析。结果表明: 筛选到 3 个纯合显性标记分别为 Fv512、Fv609 和 305, 可单独一次性鉴定全部杂种真实性; 随机筛选的 94 株子代均为真杂种; 20 个 SSR 标记用于基因型分析, 有 9 个标记出现了偏分离, 并在统计上达到显著或极显著水平, 偏分离率 45%, 说明该 F₁ 群体基于 SSR 位点的基因型偏分离率较高, 在进行高密度遗传图谱构建时应重视偏分离标记对作图的影响; UPGMA 聚类分析显示, 94 株 F₁ 的遗传变异大, 且遗传多样性丰富, 可划分为 2 个大类 7 个亚类。

关键词: 月季; 二倍体; F₁ 群体; 杂种鉴定; SSR 标记; 偏分离

中图分类号: S 685.12

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2017) 01-0151-10

Hybrids Identification and Genetic Analysis in Diploid Roses Population (F₁) Using SSR Markers

ZHOU Ningning, LI Shubin, LI Yuanbo, JIAN Hongying, YAN Huijun, WANG Qigang, CHEN Min, QIU Xianqin, ZHANG Hao, and TANG Kaixue*

(National Engineering Research Center For Ornamental Horticulture; Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences; Yunnan Flower Breeding Key Lab, Kunming 650205, China)

Abstract: A segregating population of 296 F₁ diploid hybrids has developed from a cross between *Rosa chinensis* ‘Old Blush’ (OB) as maternal plant and *Rosa wichuriana* ‘Basye’s Thornless’ (W) as paternal plant. In this study, twenty-three SSR markers were found polymorphic within two parents among one hundred and forty-six SSR marks. We selected 94 progenies randomly from F₁ population, used twenty-three SSR marks to test the authenticity of hybrids and the genetic relationship. Three homozygous dominant markers (Fv512, Fv609 and 305) were screened from the SSR marker sets, each marker is enough to identify the entire hybrids in our population. In total, all of progenies were identified as real interspecific hybrids, it suggested that the hybrid reliability is very high in our F₁ population. Twenty markers were used to examine the genotype segregation, chi-square test indicated that nine (45%) markers

收稿日期: 2016-07-25; **修回日期:** 2016-12-21

基金项目: 云南省应用基础研究计划面上项目 (2016FB061); 国家自然科学基金项目 (31160402); 云南省应用基础研究计划面上自筹项目 (2013FZ148)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: kxtang@hotmail.com)

exhibited segregation distortion with a significance levels at 5% and 1%, it suggested that F_1 population have a high segregation distortion rate and the segregation distortion markers should be excluded when genetic linkage map construction. The UPGMA based dendrograms indicated that the genetic variation and diversity of 94 progenies was significant, and these progenies could be classified into 2 groups and 7 subgroups.

Keywords: *Rosa chinensis*; *Rosa wichuriana*; diploid; F_1 population; hybrids identification; SSR marker; segregation distortion

月季是蔷薇科蔷薇属 (*Rosa* L.) 植物, 其品种超过 33 000 种 (Thomas, 2000; Young, 2007)。多数切花月季品种无香, 多刺, 抗病性差; 多数藤本月季品种为一季开花, 传统杂交育种在新品种性状改良上已不再占优势。应用分子标记可以对种质资源、杂交亲本和后代个体进行大规模的基因型鉴定, 构建遗传图谱, 并与表型数据建立联系, 从而大大提高育种效率和规模 (盖钧镒 等, 2015)。

对杂交群体子代的鉴定与选择是构建高质量图谱的前提材料保障 (Lincoln & Lander, 1992)。微卫星 DNA, 即简单重复序列 (SSR) 以其共显性、重复性好、易于操作和不受环境影响等优点已成为种质资源鉴定 (Chetan Kumar et al., 2012) 和群体遗传分析 (Ellis & Burke, 2007) 等首选的分子标记, 如在棉花 (Selvakumar et al., 2010)、向日葵 (Pallavi et al., 2011)、玉米 (Hipi et al., 2013)、龙眼 (胡文舜 等, 2015)、柠檬 (Li et al., 2015a)、水稻 (Sundaram et al., 2008; Bora et al., 2016)、粟 (Kumar et al., 2016) 和绿豆 (Nirmala et al., 2016) 等中的应用均取得了较好的结果。近年来, 月季遗传图谱构建和性状定位已取得了一定的进展 (Roman et al., 2015)。

本研究中以二倍体的中国古老月季品种 ‘月月粉’ (OB) 为母本, 以从美国德克萨斯 A & M 大学引进的 ‘无刺光叶蔷薇’ (W) 为父本, 构建了 296 个单株的二倍体 F_1 遗传分离群体。采用 SSR 分子标记技术对该群体进行杂种真实性鉴定和基于 SSR 位点的基因型分离情况分析, 并采用 UPGMA 聚类法分析子代和亲本的遗传关系, 为后期在此群体上开展遗传学研究提供材料保障和理论支撑。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

供试材料为中国古老月季 ‘月月粉’ (吕经娟 等, 2014) 和引自美国 A & M 大学的 ‘无刺光叶蔷薇’ (李淑斌 等, 2015a), 以及随机选取的二者杂交 F_1 代 94 个单株 (用 F_1 -1, F_1 -2, …, F_1 -94 表示), 种植于云南省农业科学院花卉研究所国家观赏园艺工程技术研究中心苗圃。2015 年 8 月采集叶片提取 DNA, 置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中备用。SSR 引物序列 40 对来自于李淑斌等 (2015b) 的文献, 49 对来自 Yu 等 (2015) 的文献, 60 对来自于法国国家农业科学院 (INRA)。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取、PCR 扩增、电泳检测

采用改良 CTAB 法提取 DNA, 用 0.8% 的琼脂糖胶检测质量, 用紫外分光光度计将 DNA 浓度标准化为 $10\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。PCR 反应体系: Premix Taq™ version 2.0 (购自 TaKaRa 公司, 产品编号: R004A) $5.0\text{ }\mu\text{L}$, $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ primerF $0.4\text{ }\mu\text{L}$, $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ primerR $0.4\text{ }\mu\text{L}$, 模板 DNA $3.0\text{ }\mu\text{L}$, ddH₂O $1.2\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序: $94\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min, $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s, $55\text{ }^\circ\text{C}$ 复性 30 s, $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 60 s, 30 个循环;

最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物在 8% 的变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 采用银染技术显色, 利用 Image Lab 3.0 软件获取图片。

1.2.2 杂交后代的 SSR 鉴定

筛选出亲本间有明显特征性条带的多态性 SSR 引物, 在亲本和随机选取的 94 个 F₁ 单株中进行扩增, 扩增结果中具有双亲特征条带的即为真杂种 (胡文舜 等, 2015)。对双亲位点缺失的杂种后代样本进行重复验证。

1.2.3 杂交后代的遗传分析

基因型分析用 a、b、c、d 对每个样本的不同等位基因进行标记 (Gianfranceschi et al., 1998), 利用卡方测验分析 SSR 位点的基因型分离情况 (Yamamoto et al., 2002)。对等位基因条带的有无用 ‘0、1’ 矩阵统计, 应用 NTSYSpc 2.20v 软件中的 Similarity-Qualitative date 工具获得 Dice 相似系数 (胡文舜 等, 2015), 基于获得的 Dice 相似系数数据, 应用 Clustering-SAHN 工具进行 UPGMA 聚类分析, 分析后代群体与亲本的遗传关系。

2 结果与分析

2.1 特异引物筛选

利用父母本对 149 对 SSR 引物进行筛选, 根据双亲具有特异性谱带的原则, 筛选出 23 对条带清晰、易于统计的多态性引物用于全部子代扩增 (表 1)。

表 1 ‘月月粉’ 和 ‘无刺光叶蔷薇’ 间具有多态性的 SSR 引物
Table 1 Polymorphic primers selected from *R. chinensis* ‘Old Blush’ and *R. wichuriana* ‘Basye’s Thornless’

名称 Name	重复单元 Repeat motif	上游引物 (5'-3') Forward primer sequence	下游引物 (5'-3') Reverse primer sequence
Fv512	(GGA)5	AAATTCCTCCCCACCCTAAAC	ATAATTGGGGGAGATACAACCTGG
Fv609	(TCT)8	AGGCTACTATCCCAACAGTGTCA	ACAAAGGACACAGAGAAAAGTGC
Fv620	(GAG)7	ATGATGAGGATGAGGATGACAAT	TGCTTACCCTTTCTACATCTTG
Fv501	(CT)8	ACTAAACCGCCAATTTCTCTAGG	CATCAGTAGTTTTCTGGAGGAGG
Fv503	(AG)17	TGACCACTTCAGCTCCCTAATAA	CCGTTTTACGTTACAGGTGTATGA
Fv505	(GA)6	TTTATATCATGGAGCATTGACCC	GATCAGATAGGGCTGATGATGAC
FV603	(GCT)5	ATCCAGTACAGACGACAACATGA	GATGTCAAGTCCATTTGGAGAG
FV614	(CT)28	AAACACAGACCCAGAAAAGACAA	ACCTCCTCTTCCTCACCATAAG
304	(GA)16	GGGTCCGACTGGAAATAAGA	CTTTCTCTCTGATCGCCTGC
305	(CAAGAA)6	GATGCTGAGCAGAGCAACAG	GTTGCTCGGGTTGTGAAACT
308	(AGA)9	ATCACCTTCTGCTGAAACGG	GGAGTCGAGATCACCTGAGA
310	(ATCT)7	GGAGTCGAGATCACCTGAGA	GGCTGGAGAAGCTGAAATTG
316	(GAG)8	GTAGACGAGGATCCGAACCA	ACTCAGCAGGCCGCTTATTA
317	(TC)14	ATTCTCAAATCCAGCGAACG	CCGAAATTGCCAGATCCTAT
334	(AAAAC)3	TCTTTCAGGCCTCTCACCTT	AAACGACGAAGCACCTCACT
354	(TTGAAG)3	TAGAGCCGAAACCAGTTGCT	GAGGCGTGAACGAACTAAGC
361	(TCT)7	TGTGCCTCGAGAGGTTCTT	TTGACTTGAAGTTGGAGGG
373	(CT)10	ACAAACTTCGCGATTCTCT	AGTTCAGACGTTGGAGTGC
379	(GGA)6	GTCATCAAGGAGGACCAGGA	GATCAGCGACCACCATGTC
Rh50		TGATGAAATCATCCGAGTGTCA	TCACTTTCATTGGAATGCCAGAAT
RW25J16	(GA)14	TGGACCTTCCCTTTGTTTCC	GCTTGCCACATATTGTTGA
RW34L6	(CT)16	CTCCTTAGACTCGGGACCA	CAGGCACGCCATTTCTAACT
CL4230	(CTT)20	GGATTCATGTGGGTGAAACA	GCTCGAATTCAGAAAAGT

2.2 F₁ 群体的杂种性质鉴定

筛选的 23 对引物中 Fv512、Fv609 和 305 在亲本中的基因型为纯合显性标记 *aa* × *bb* 型 (图 1),

扩增结果显示, 这 3 个标记在子代中的基因型全部为 ab 型, 说明 94 个单株全部为真杂种。

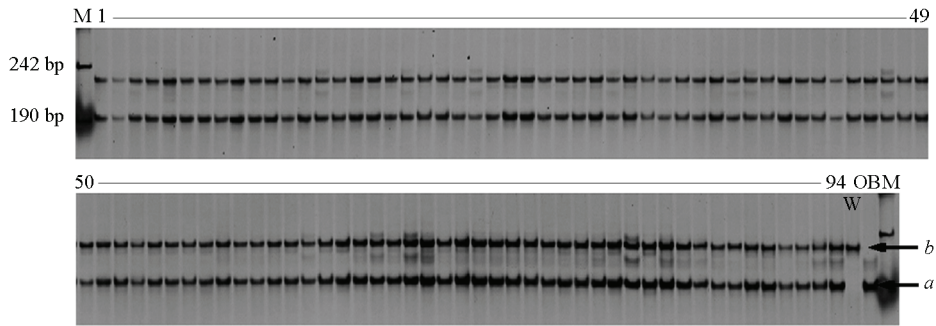


图 1 引物 Fv512 在亲本及 94 个子代中的扩增结果

M: Marker; 1~94: 子代 F_1 -1~ F_1 -94; OB: 母本‘月月粉’(aa); W: 父本‘无刺光叶蔷薇’(bb)。

Fig. 1 Amplification of primer Fv512 in the parents and 94 progenies

M: Marker; 1 - 94: Progenies F_1 -1 - F_1 -94; OB: Female parent ‘Old Blush’ (aa); W: Male parent ‘Basye’s Thornless’ (bb) .

标记 Fv503、354 和 Rh50 在亲本中的基因型为 $ab \times cc$ 型 (图 2), 316、379 和 RW25J16 在亲本中基因型为 $ab \times cd$ 型 (图 3)。其中, Fv503、354、Rh50 和 316 标记在子代中的扩增显示全部子代均同时继承了分别来自亲本的各一个等位基因条带, 而 379 标记在 F_1 -41 和 F_1 -49 样本的扩增异常, 均出现一条母本和两条父本条带, RW25J16-9 标记在 F_1 -49 样本的扩增异常, 同时出现了父母本的各两条条带。

以上 9 个标记中, 除 Fv512 之外, 其他 8 个标记在后代中的扩增中均出现了亲本没有的新条带, 且新条带的片段大小有规律可循, 表现为相同基因型的子代中出现相同的非亲本条带。如图 2 可见, $n1$ 只在基因型为 bc 的个体中出现, 而 $n2$ 只在基因型为 ac 的个体中出现。亲本间基因型为 $aa \times ab$ 、 $ab \times aa$ 、 $ab \times bb$ 或 $ab \times ac$, 即父母本有相同一条带 (图 4) 的 14 个 SSR 标记, 在杂种后代中出现非亲本条带的标记有 4 个, 分别为 Fv501、Fv614、310 和 334。

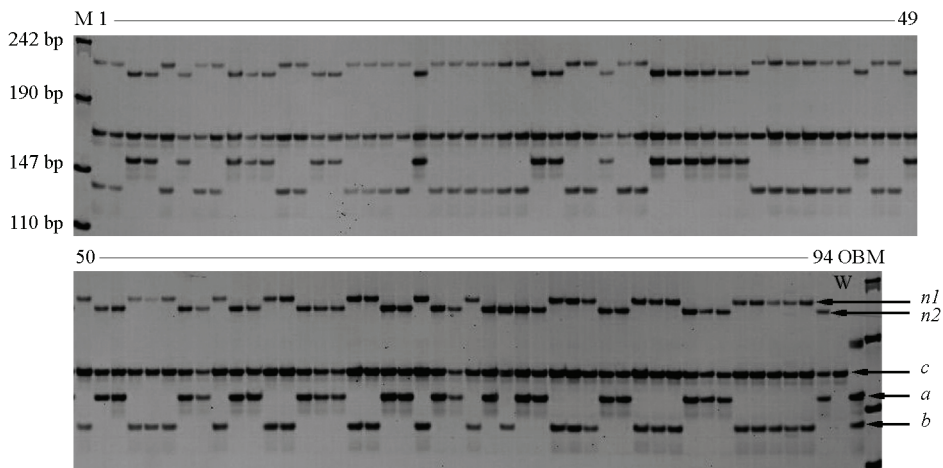


图 2 引物 354 在亲本及 94 个子代中的扩增结果

M: Marker; 1~94: 子代 F_1 -1~ F_1 -94; OB: 母本‘月月粉’(ab); W: 父本‘无刺光叶蔷薇’(cc); $n1$ 和 $n2$: 子代中新条带。

Fig. 2 Amplification of primer 354 in the parents and 94 progenies

M: Marker; 1 - 94: Progenies F_1 -1 - F_1 -94; OB: Female parent ‘Old Blush’ (ab); W: Male parent ‘Basye’s Thornless’ (cc);

$n1$ and $n2$: New bands in progenies.

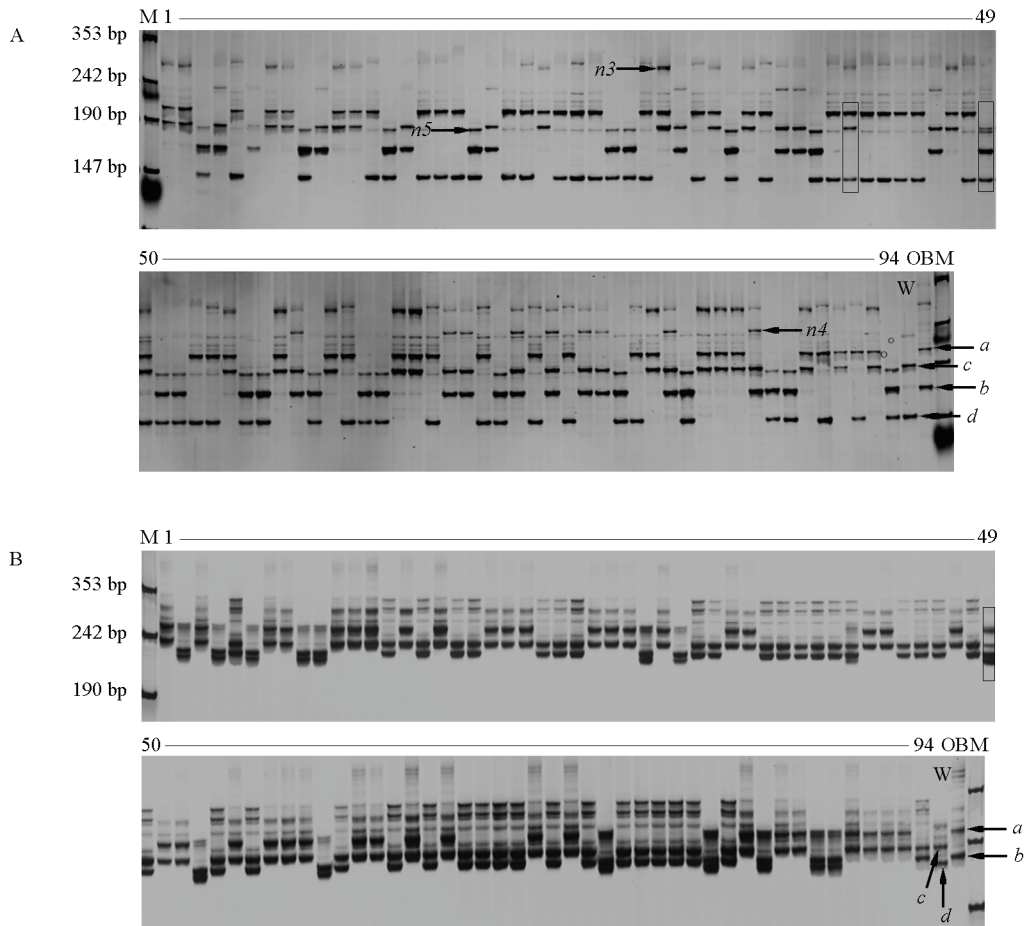


图 3 引物 379 (A) 和 RW25J16-9 (B) 在亲本及 94 个子代中的扩增结果

M: Marker; 1~94: 子代 F₁-1~F₁-94; OB: 母本‘月月粉’(ab); W: 父本‘无刺光叶蔷薇’(cd);
n3、n4、n5: 子代中新条带; 方框表示扩增异常位点。

Fig. 3 Amplification of primer 379 (A) and RW25J16-9 (B) in the parents and 94 progenies

M: Marker; 1 - 94: Progenies F₁-1 - F₁-94; OB: Female parent ‘Old Blush’ (ab); W: Male parent ‘Basye’s Thornless’ (cd);
n3, n4, n5: New bands in progenies; Frame indicate abnormal expansion of gene loci.

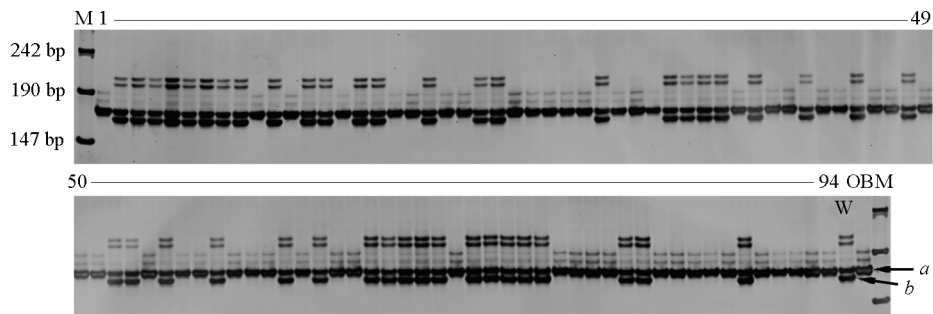


图 4 引物 308 在亲本及 94 个子代中的扩增结果

M: Marker; 1~94: 子代 F₁-1~F₁-94; OB: 母本‘月月粉’(aa); W: 父本‘无刺光叶蔷薇’(ab)。

Fig. 4 Amplification of primer 308 in the parents and 94 progenies

M: Marker; 1 - 94: Progenies F₁-1 - F₁-94; OB: Female parent ‘Old Blush’ (aa); W: Male parent ‘Basye’s Thornless’ (ab) .

2.3 F₁ 群体基于 SSR 位点的基因型分离规律

统计 SSR 位点在 F₁ 代个体中的基因型分离情况, 然后利用卡方检验计算样本的实际观测值与理论推断值之间的偏离程度。由表 2 可见: 标记 Fv512、Fv609 和 305 无分离; 自由度为 1 的标记 Fv603、Fv614、304、308、354、361、373 和 CL4230 卡方值均小于 3.841, 自由度为 3 的标记 304、316 和 379 卡方值均小于 7.815, 因此认为这 11 个 SSR 标记的等位基因分离符合孟德尔分离定律, 为正常分离; 相反, 自由度为 1 的标记 Fv620、Fv501、Fv503、Fv505、334、Rh50 和自由度为 3 的标记 317、RW25J16、RW34L6 的卡方值分别大于 3.841 和 7.815, 表明这 9 个标记的等位基因实际分离值与理论推测值发生了偏离, 不同标记的偏分离程度不同。

表 2 23 个 SSR 标记在杂种后代中的分离观察
 Table 2 Segregation observed for 23 SSRs

名称 Name	亲本基因型 Genotype	实际观察分离比 Segregation	期望分离比 Expected ratio	χ^2
Fv512	aa × bb	ab = 94		
Fv609	aa × bb	ab = 94		
Fv620	ab × bb	ab : bb = 67 : 27	1 : 1	17.02***
Fv501	ab × aa	ab : aa = 61 : 33	1 : 1	8.34**
Fv503	ab × cc	bc : ac = 60 : 34	1 : 1	7.19**
Fv505	ab × aa	ab : aa = 62 : 32	1 : 1	9.57**
FV603	ab × aa	aa : ab = 48 : 46	1 : 1	0.17
Fv614	aa × ab	aa : ab = 47 : 47	1 : 1	0
304	ab × ac	aa : ab : ac : bc = 22 : 27 : 22 : 23	1 : 1 : 1 : 1	0.72
305	aa × bb	ab = 94		
308	aa × ab	aa : ab = 50 : 44	1 : 1	1.53
310	ab × bb	ab : bb = 48 : 45 (1 个缺失 One progeny was absence)	1 : 1	0.09
316	ab × cd	ac : ad : bc : bd = 21 : 22 : 27 : 24	1 : 1 : 1 : 1	0.89
317	ab × cd	ac : ad : bc : bd = 33 : 54 : 4 : 3	1 : 1 : 1 : 1	77.49***
334	ab × ac	aa : ab : ac : bc = 15 : 26 : 18 : 35	1 : 1	10.25*
354	ab × cc	ac : bc = 42 : 52	1 : 1	1.06
361	ab × bb	ab : bb = 49 : 45	1 : 1	0.17
373	ab × cc	ac : bc = 44 : 50	1 : 1	0.19
379	ab × cd	ac : ad : bc : bd = 24 : 30 : 18 : 22	1 : 1 : 1 : 1	3.19
Rh50	ab × cc	ac : bc = 62 : 32	1 : 1	9.57**
RW25J16	ab × cd	ac : ad : bc : bd = 40 : 0 : 39 : 15	1 : 1 : 1 : 1	48.38***
RW34L6	ab × ac	aa : ab : ac : bc = 39 : 30 : 6 : 19	1 : 1 : 1 : 1	25.91***
CL4230	ab × cc	ac : bc = 52 : 42	1 : 1	1.06

*: 0.01 < P ≤ 0.05; **: 0.001 < P ≤ 0.01; ***: P ≤ 0.001.

2.4 亲本与 F₁ 代杂种的聚类分析

统计具有基因型分离的 20 对 SSR 引物在亲本和 94 株 F₁ 中的扩增结果, 共获得 52 个等位基因, 以此建立 0、1 矩阵, 应用 NTSYSpc 2.20v 软件中的 Similarity-Qualitative date 工具获得 Dice 相似系数数据。结果显示: 两个亲本间的遗传背景差异较大, 相似系数仅有 0.349; 94 株 F₁ 杂种间的相似系数介于 0.431 ~ 0.957, 其中 F₁-9 与 F₁-91 的遗传相似性最小, F₁-26 和 F₁-40 遗传相似性最大; 94 株 F₁ 分别与母本 OB 的相似系数介于 0.588 ~ 0.740, 平均相似系数为 0.671, 其中 F₁-11 与 OB 的遗传相似性最小, F₁-5 与 OB 的遗传相似性最大; 94 株 F₁ 分别与父本 W 的相似系数介于 0.612 ~ 0.780, 平均相似系数为 0.674, 其中 F₁-56、F₁-60 与父本遗传相似性最小, F₁-11 与 W 遗传相似性最大。

基于获得的 Dice 相似系数数据, 应用 Clustering-SAHN 工具进行 UPGMA 聚类分析 (图 5)。在相似系数 0.678 处可将 94 株 F₁ 划分为 2 大类: 第 I 类与 OB 聚类在一起, 共 62 株, 占 66%; 第 II 类与 W 聚类在一起, 共 32 株, 占 34%。在相似系数 0.752 处可进一步将第 I 类 F₁ 细分为 4 个亚类, 第 II 类 F₁ 细分为 3 个亚类。上述表明, 杂交后代产生了广泛的遗传变异, 多样性丰富。

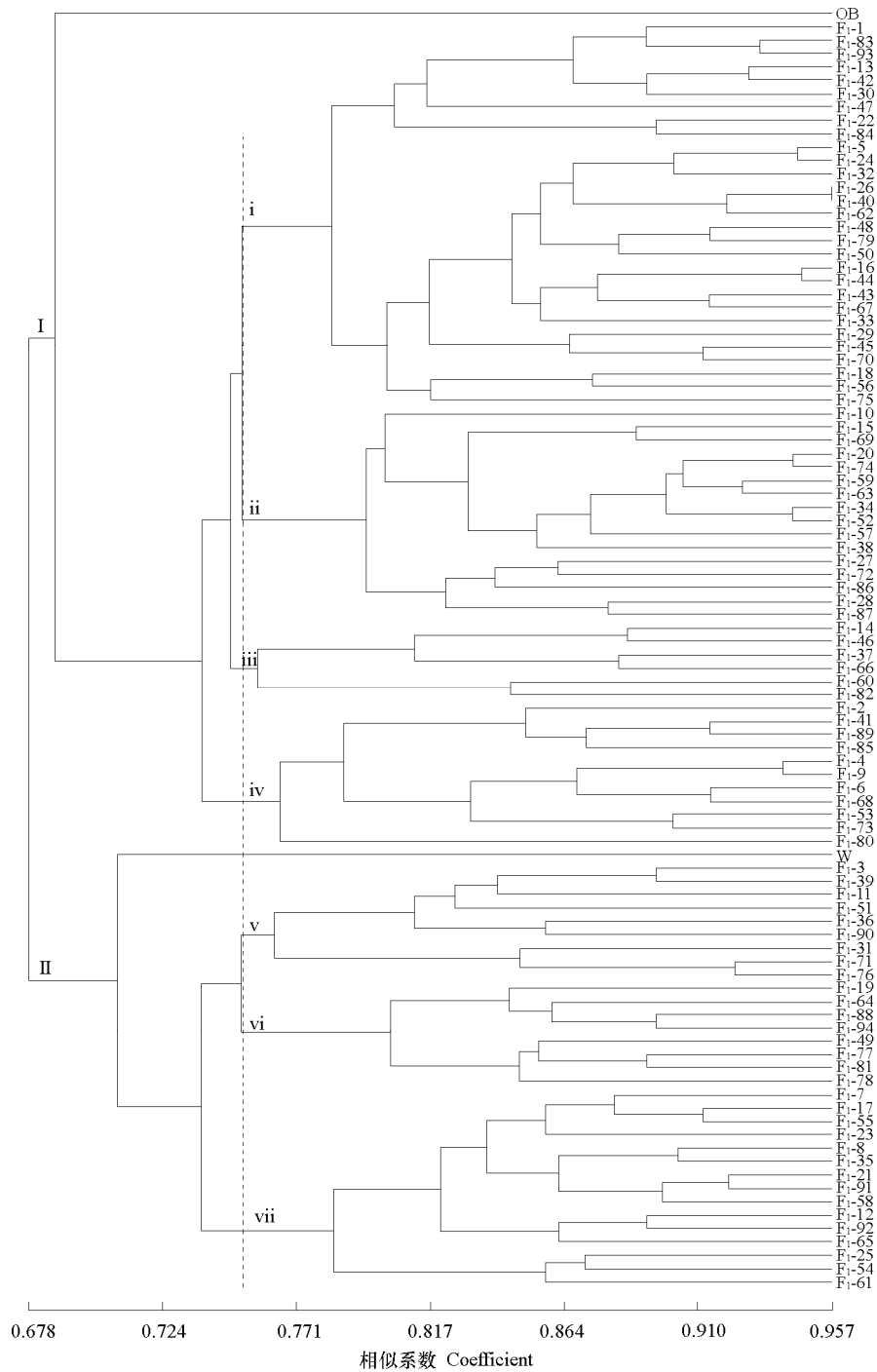


图 5 亲本与 94 株杂种后代遗传关系的聚类图
Fig. 5 Dendrograms of parents and ninety-four progenies

3 讨论

3.1 杂种后代的真实性鉴定和不同 SSR 标记的鉴定能力分析

亲本间具有多态性的不同 SSR 标记的杂种鉴定能力亦不相同, 根据鉴定能力将其划分为 3 种类

型。第1类, 纯合显性标记 $aa \times bb$ 型, 理论上只需1个标记即可鉴定出全部的杂种后代(韩国辉等, 2010)。如本研究中筛选出的3个纯合显性标记 Fv512、Fv609 和 305, 对 $OB \times W$ 组合的鉴定表明每个标记的杂种鉴定效率均达到 100%, 是理想的种子纯度鉴定标记, 但此类标记的缺点是不能筛选出杂交过程中因染色体异常产生的多倍体。第2类, $ab \times cc$ 、 $aa \times bc$ 和 $ab \times cd$ 等类型标记, 此类标记的特点为亲本间无相同等位基因, 理论上也只需一个即可鉴定全部杂种, 但由于其在杂种后代中的扩增会产生许多亲本没有的新条带, 较难判定其性质, 因此其杂种鉴定能力较纯合显性标记次之。不过 $ab \times cd$ 型的标记在一定程度上可以弥补纯合显性标记的不足, 帮助筛选杂种后代中的染色体异常植株。如图3中 F_1 -41 在引物 379 位点基因型为 acd , 而在其它位点上表现正常; F_1 -49 在引物 379 位点基因型为 bcd , 在引物 RW25J16-9 位点基因型为 $abcd$, 而在其它位点上表现正常。因此, F_1 -41 和 F_1 -49 需要进行更可靠的倍性检测分析, 确定是否为染色体异常植株。第3类, $aa \times ab$ 、 $ab \times bb$ 、 $ab \times ac$ 等类型标记, 此类标记的特点为亲本间具有一条相同等位基因的多态性标记, 在杂种后代中无法判定亲本间相同等位基因位点的来源, 其鉴定能力最差。因此, 选择 $aa \times bb$ 型和 $ab \times cd$ 型标记组合分析, 可大大提高杂种鉴定效率, 节约试验成本。

杂交后代即使被判定为真杂种, 其扩增谱带也会出现亲本没有的新条带。Reidy 等(1992)对后代中出现非亲本条带的现象在狒狒和人类的 CEPH 谱系研究中进行了首次报道, 随后 Hunt 和 Page(1992)对单倍体雄蜂混合模板扩增出现了二倍体特征条带, 提出等位基因在 PCR 扩增过程中会产生异源双链体(Heteroduplex)。Ayliffe 等(1994)利用亚麻锈病菌对后代的非亲本条带进行了序列分析, 证明了子代的非亲本条带来源于不同长度的等位核苷酸序列之间形成的异源双链体。本试验中发现在亲本间无相同条带(亲本基因型为 $aa \times bb$ 、 $ab \times cd$ 或 $ab \times cc$)的9对引物中, 有8对引物在子代中的扩增出现了非亲本带, 占 88.9%, 而亲本间有一条相同条带(亲本基因型为 $aa \times ab$ 、 $ab \times aa$ 、 $ab \times bb$ 或 $ab \times ac$)的14对引物中, 只有4对引物在子代中的扩增出现非亲本带, 占 28.6%。由此推测, 亲本间遗传多样性越高的位点, 在杂交后代中产生异源双链体的可能性越大。

3.2 SSR 标记在子代中的基因型分离情况分析

20个具有基因型分离的 SSR 标记中, 11个标记等位基因分离符合孟德尔分离, 有9个标记等位基因分离表现为偏分离, 偏分离比例占了 45%。根据草莓基因组和月季基因组的同线性关系, 从草莓第5连锁群开发的 Fv501、Fv503 和 Fv505 标记, 在月季群体杂种后代中的偏分离方向一致, 推测导致这种偏离的原因可能是由于偏离位点引起(Matsushita et al., 2003)。Fv620、Fv603、Fv614 开发自草莓第6连锁群, 其中 Fv603 和 Fv614 表现出正常分离, Fv620 的偏分离表现为偏母本分离, 偏向任何亲本或杂合体的偏分离标记广泛分布在不同的连锁群上, 产生的原因缺乏一般的规律性(宋宪亮等, 2006)。引物 317 在亲本中的基因型为 $ab \times cd$, 子代的基因型分离比为 $ac : ad : bc : bd = 33 : 54 : 4 : 3$, 其中 $ac + ad = 87$, $bc + bd = 7$, 推测这种偏分离的原因可能是在受精过程中, 雄配子选择造成(Cormick, 1993)。引物 RW25J16 在亲本中的基因型为 $ab \times cd$, 子代的基因型分离比为 $ac : ad : bc : bd = 40 : 0 : 39 : 15$, 其中 $ac + bc = 79$, $ad + bd = 15$, 推测这种偏分离的原因可能是在受精过程中合子选择造成(Howden et al., 1998), 其中 $ad = 0$, 推测此位点可能是致死位点。

偏分离会影响遗传作图中标记间的重组距离和标记的顺序(Wang et al., 2005), 对偏分离的研究有助于更好地定位偏分离基因和发现偏分离位点, 获得更准确的遗传图谱和 QTL 定位。目前在月季上开展的遗传图谱的构建多属于框架图阶段, 涉及到的基因型也比较少, 对月季群体偏分离的研究报道较少, 随着月季高密度遗传图谱的建成, 月季群体基因型偏分离的研究将会进一步得以重视。

3.3 亲本与后代群体的遗传多样性分析

‘月月粉’和‘无刺光叶蔷薇’的亲缘关系较远, 聚类分析显示两个材料间遗传差异大 (Dice 相似系数仅 0.349)。母本‘月月粉’属于中国古老月季, 连续开花, 花粉色, 重瓣, 植株直立生长, 茎干有刺, 易感病; 父本‘无刺光叶蔷薇’是光叶蔷薇的后代, 为一季开花, 花白色, 单瓣, 植株匍匐生长, 茎干无刺, 抗病性强。通过杂交后, 其杂种后代群体产生了显著的遗传变异, 可划分为 2 大类 7 个亚类, 杂种间存在丰富遗传多样性。田间表型观察也显示, F₁ 代植株花瓣数表现为单瓣与重瓣性状分离; 花色出现白、淡粉、粉和深粉色的性状分离; 茎干皮刺出现无刺和有刺性状分离及刺密度的差异。目前本课题组已通过对 OB、W、F₁、F₂、BC₁OB 和 BC₁W 等 6 个世代的二倍体月季分离群体的构建, 提出了连续开花可能受双隐性基因位点共同调控的观点 (Li et al., 2015b)。下一步的研究将继续构建更多的世代, 扩大群体数量, 对更多目标性状进行遗传规律分析, 为利用目标性状的遗传育种提供理论支持, 同时通过该群体构建二倍体月季高密度遗传图谱, 开展目标性状的精细定位和相关基因发掘研究, 以期解析月季重要园艺性状的遗传调控机制。

References

- Ayliffe M A, Lawrence G J, Ellis J G, Pryor A J. 1994. Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands. *Nucleic Acid Research*, 22 (9): 1632 - 1636.
- Bora A, Choudhury P R, Pande V, Mandal A B. 2016. Assessment of genetic purity in rice (*Oryza sativa* L.) hybrids using microsatellite markers. *3 Biotech*, 6 (1): 1 - 7.
- Chetan Kumar M R, Vishwanath K, Shivakumar N, Rajendra Prasad S, Radha B N, Ramegowda. 2012. Utilization of SSR markers for seed purity testing in popular rice hybrids (*Oryza sativa* L.). *Annals of Plant Sciences*, 1 (1): 1 - 5.
- Cormick S M. 1993. Male gametophyte development. *The Plant Cell*, 5: 1265 - 1275.
- Ellis J R, Burke J M. 2007. EST-SSRs as a resource for population genetic analyses. *Heredity*, 99: 125 - 132.
- Gai Jun-yi, Liu Kang, Zhao Jin-ming. 2015. A review on advances in science and technology in Chinese seed industry. *Scientia Agricultura Sinica*, 48 (17): 3303 - 3315. (in Chinese)
- 盖钧镒, 刘康, 赵晋铭. 2015. 中国作物种业科学技术发展的评述. *中国农业科学*, 48 (17): 3303 - 3315.
- Gianfranceschi L, Seglias N, Tarchini R, Komjanc M, Gessler C. 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theor Appl Genet*, 96: 1069 - 1076.
- Han Guohui, Xiang Suqiong, Wang Weixing, Wei Xu, He Bo, Li Xiao-lin, Liang Guolu. 2010. Identification and genetic diversity of hybrid progenies from Shatian Pummelo by SSR. *Scientia Agricultura Sinica*, 43 (22): 4678 - 4686. (in Chinese)
- 韩国辉, 向素琼, 汪卫星, 魏旭, 何波, 李晓林, 梁国鲁. 2010. 沙田柚杂交后代群体的 SSR 鉴定与遗传多样性分析. *中国农业科学*, 43 (22): 4678 - 4686.
- Hipi A, Surahman M, Ilyas S, Giyanto. 2013. Seed genetic purity assessment of maize hybrid using microsatellite markers (SSR). *International Journal of Applied Science and Technology*, 3 (5): 66 - 71.
- Howden R, Park S K, Moore J M, Orme J, Grossniklaus U, Twell D. 1998. Selection of T-DNA-tagged male and female gametophytic mutants by segregation distortion in *Arabidopsis*. *Genetics*, 149: 621 - 631.
- Hu Wen-shun, Huang Ai-ping, Jiang Fan, Jiang Ji-mou, Chen Xiu-ping, Zheng Shao-quan. 2015. Identification and genetic diversity of reciprocal hybrids in longan (*Dimocarpus longan*) by SSR. *Acta Horticulturae Sinica*, 42 (10): 1899 - 1908. (in Chinese)
- 胡文舜, 黄爱萍, 姜帆, 蒋际谋, 陈秀萍, 郑少泉. 2015. 龙眼正反交后代的 SSR 鉴定及遗传多样性分析. *园艺学报*, 42 (10): 1899 - 1908.
- Hunt G J, Page R E. 1992. Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in the honey bee. *Theoretical and Applied Genetics*, 85 (1): 15 - 20.
- Kumar S, Jacob S R, Satyavathi C T, Dadlani M, Arun Kumar M B. 2016. Utility of SSR markers in assessing the purity and identity of pearl millet hybrids. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 25 (1): 121 - 124.
- Li O J, Chen X M, Xia P X, Pei Z Y, Wang Y, Lan Q K, Zhang R W. 2015a. EST-SSR marker-based assay for purity identification of melon “Green

- Angle". *Advances in Applied Biotechnology-volume II*, 66: 637 - 642.
- Li S B, Zhou N N, Zhou Q, Yan H J, Jian H Y, Wang Q G, Chen M, Qiu X Q, Zhang H, Wang S F, Li S F, Tang K X. 2015b. Inheritance of perpetual blooming in *Rosa chinensis* 'Old Blush'. *Horticultural Plant Journal*, 1 (2): 108 - 112.
- Li Shu-bin, Zhou Ning-ning, Zhou Qing, Yan Hui-jun, Jian Hong-ying, Wang Qi-gang, Chen Min, Qiu Xian-qin, Zhang Hao, Wang Shu-fang, Li Shu-fa, Tang Kai-xue. 2015a. Inheritance of perpetual blooming in *Rosa chinensis* 'Old Blush'. *Acta Horticulturae Sinica*, 42 (11): 2223 - 2228. (in Chinese)
- 李淑斌, 周宁宁, 周青, 晏慧君, 蹇洪英, 王其刚, 陈敏, 邱显钦, 张颢, 王书芳, 李树发, 唐开学. 2015a. '月月粉' 连续开花习性遗传规律分析. *园艺学报*, 42 (11): 2223 - 2228.
- Li Shu-bin, Zhou Ning-ning, Wang Qi-gang, Chen Min, Zhou Qing, Jian Hong-ying, Yan Hui-jun, Qiu Xian-qin, Zhang Hao, Wang Shu-fang, Tang Kai-xue. 2015b. High throughput development of rose SSR markers based on *Fragaria vesca* genome sequence. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 28 (6): 2681 - 2685. (in Chinese)
- 李淑斌, 周宁宁, 王其刚, 陈敏, 周青, 蹇洪英, 晏慧君, 邱显钦, 张颢, 王书芳, 唐开学. 2015b. 基于草莓基因组序列高通量开发月 SSR 标记. *西南农业学报*, 28 (6): 2681 - 2685.
- Lincoln S E, Lander E S. 1992. Systematic detection of errors in genetic linkage data. *Genomics*, 14 (3): 604 - 610.
- Lü Jing-juan, Li Shu-bin, Zhou Ning-ning, Jian Hong-ying, Wang Qi-gang, Zhang Hao, Tang Kai-xue. 2014. Callus induction and plant regeneration of *Rosa wichuraiana* 'Basye's Thornless'. *Plant Science Journal*, 32 (2): 139 - 147. (in Chinese)
- 吕经娟, 李淑斌, 周宁宁, 蹇洪英, 王其刚, 张颢, 唐开学. 2014. '光叶蔷薇' 器官间接再生体系的建立及 GUS 基因转化的初步研究. *植物科学学报*, 32 (2): 139 - 147.
- Matsushita S, Iseki T, Fukuta Y, Araki E, Kobayashi S, Osaki M, Yamagishi M. 2003. Characterization of segregation distortion on chromosome 3 induced in wide hybridization between *Indica* and *Japonica* type rice varieties. *Euphytica*, 134: 27 - 32.
- Nirmala S, Mukesh Y, Venkataraman B K, Kumar S R, Kumar J P. 2016. Hybridization between salt resistant and salt susceptible genotypes of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) and purity testing of the hybrids using SSRs markers. *Journal of Integrative Agriculture*, 15 (3): 521 - 527.
- Pallavi H M, Gowda Rame, Shadakshari Y G, Bhanuprakash K, Vishwanath K. 2011. Identification of SSR markers for hybridity and seed genetic purity testing in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Seed Science & Technology*, 39 (54): 259 - 264.
- Reidy M F, Hamilton W J, Aquadro C F. 1992. Excess of non-parental bands in offspring from known primate pedigrees assayed using RAPD PCR. *Nucleic Acids Research*, 20 (4): 918.
- Roman H, Rapicault M, Miclot A S, Larenaudie M, Kawamura K, Thouroude T, Chastellier A, Lemarquand A, Dupuis F, Foucher F, Loustau S, Hibrand-Saint Oyant L. 2015. Genetic analysis of the flowering date and number of petals in rose. *Tree Genetics & Genomes*, 11: 85.
- Selvakumar P, Ravikesavan R, Gopikrishnan A, Thiyagu K, Preetha S, Manikanda Boopathi N. 2010. Genetic purity analysis of cotton (*Gossypium* spp.) hybrids using SSR markers. *Seed Science and Technology*, 38 (2): 358 - 366.
- Song Xian-liang, Sun Xue-zhen, Zhang Tian-zhen. 2006. Segregation distortion and its effect on genetic mapping in plants. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 14 (2): 286 - 292. (in Chinese)
- 宋宪亮, 孙学振, 张天真. 2006. 偏分离及对植物遗传作图的影响. *农业生物技术学报*, 14 (2): 286 - 292.
- Sundaram R M, Naveenkumar B, Biradar S K, Balachandran S M, Mishra B, Ilyas Ahmed M, Viraktamath B C, Ramesha M S, Sarma N P. 2008. Identification of informative SSR markers capable of distinguishing hybrid rice parental lines and their utilization in seed purity assessment. *Euphytica*, 163: 215 - 224.
- Thomas C. 2000. *Modern roses XI: the world encyclopedia of roses*. San Diego: Academic Press.
- Wang C, Zhu C, Zhai H, Wan J. 2005. Mapping segregation distortion loci and quantitative trait loci for spikelet sterility in rice (*Oryza sativa* L.). *Genetic Research*, 86: 97 - 106.
- Yamamoto T, Kimura T, Sawamura Y, Manabe T, Kotobuki K, Hayashi T, Ban Y, Matsuta N. 2002. Simple sequence repeats for the genetic analysis of pair. *Euphytica*, 124: 129 - 137.
- Young M A. 2007. *Modern roses 12: the comprehensive list of roses in cultivation or of historical or botanical importance*. American Rose Society.
- Yu C, Luo L, Pan H T, Guo X L, Wan H H, Zhang Q X. 2015. Filling gaps with construction of a genetic linkage map in tetraploid roses. *Frontier in Plant Science*, 5 (796): 1 - 19.