

DOI:10.11686/cyxb2024515

http://cyxb.magtech.com.cn

张献芳, 聂刚, 黄思源, 等. 基于SSR标记的象草F₁代杂种分子鉴定及表型变异分析. 草业学报, 2025, 34(11): 114-124.

ZHANG Xian-fang, NIE Gang, HUANG Si-yuan, et al. Identification of hybrids and analysis of phenotypic variation in the F₁ generation of *Pennisetum purpureum* based on SSR markers. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(11): 114-124.

基于SSR标记的象草F₁代杂种分子鉴定及表型变异分析

张献芳, 聂刚, 黄思源, 余帅, 左粟田, 张新全*

(四川农业大学草业科技学院, 四川 成都 611130)

摘要:采用传统杂交方法,以象草品种“GM1”为母本、新品系“F-B”为父本进行杂交,获得536个杂种后代,并从中选取150个有代表性的F₁代株系群体进行变异分析。本研究结合表型性状和SSR分子标记,对这些后代进行杂种鉴定及表型变异分析,旨在为象草种质创新和品种改良提供技术支持。结果表明:1)F₁代群体较亲本表型变异丰富,其中叶长明显强于亲本,具有明显的杂种优势,性状存在显著差异,变异系数为5.90%~21.05%;2)筛选出的14对SSR引物共扩增得到219条清晰条带,其中多态性条带118条,多态性比率(PPB)54.18%;每个SSR位点的多态信息含量(PIC)为29.59%~44.63%,均值为35.40%;3)对亲本及杂交F₁代进行聚类分析可知,基于表型数据的聚类分析将杂交后代分为3类;基于SSR分子标记的聚类分析将杂交后代分为4类,SSR分子标记进一步证实了母本在遗传上的主导地位;4)利用特异性引物可以准确鉴定出真杂种,鉴定率高达98%,大部分真杂种条带为双亲互补型,部分为父本型,表明F₁代中存在父母本的遗传信息。通过对150个F₁代株系群体的表型性状和筛选出的15对SSR核心引物分析,能有效鉴定杂种的真实性,为后续杂交育种选育新品系提供后备材料。

关键词:象草;杂种F₁代;杂种鉴定;SSR分子标记;表型分析;遗传多样性

Identification of hybrids and analysis of phenotypic variation in the F₁ generation of *Pennisetum purpureum* based on SSR markers

ZHANG Xian-fang, NIE Gang, HUANG Si-yuan, YU Shuai, ZUO Su-tian, ZHANG Xin-quan*

College of Grassland Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

Abstract: In plant breeding, it is important to generate hybrids with sufficient phenotypic variation for germplasm innovation and variety improvement. In this study, we used the traditional hybridization method to cross *Pennisetum purpureum* ‘GM1’ (female parent) with the new line ‘F-B’ (male parent), producing 536 hybrid offspring. We selected 150 representative F₁ lines for variation analysis, and performed hybrid identification and phenotypic variation analysis based on phenotypic traits and simple sequence repeat (SSR) markers. The main findings were as follows: 1) The F₁ generation showed greater phenotypic variation than the parents. Leaf length exhibited significant hybrid vigor and trait differences, with variation coefficients of 5.90%–21.05%; 2) Fourteen selected SSR primers amplified 219 clear bands, of which 118 were polymorphic, representing a polymorphism rate of 54.18%. The polymorphism information content value for SSR loci ranged from 29.59% to 44.63% (mean 35.40%); 3) A

收稿日期:2024-12-27;改回日期:2025-03-10

基金项目:国家现代农业产业技术体系(CARS-34)和四川省“十四五”饲草育种攻关项目(2021YFYZ0013)资助。

作者简介:张献芳(1998-),女,贵州毕节人,在读硕士。E-mail: 752396642@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: zhangxq@sicau.edu.cn

cluster analysis based on phenotypic data grouped the hybrids into three categories, while SSR-based analysis divided them into four. The SSR-based analysis confirmed the maternal parent's genetic dominance; 4) Specific primers accurately identified true hybrids with a 98% success rate. Most true hybrids had complementary parental bands, and some were the paternal-type. These results show that SSR analysis can reveal parental genetic information for the F₁ generation. Analyses based on phenotypic traits and 15 SSR core primers were able to effectively identify authentic hybrids among 150 F₁ hybrid progenies, highlighting materials that will be suitable for breeding new lines.

Key words: *Pennisetum purpureum*; F₁ hybrid progenies; hybrid identification; SSR molecular marker; phenotypic analysis; genetic diversity

象草(*Pennisetum purpureum*)是禾本科狼尾草属的多年生C₄植物^[1],原产于非洲、亚洲南部和澳大利亚等热带及亚热带地区,为一种多年生暖季型牧草^[2]。因其分蘖力强,营养丰富,适口性好,具有产量高、抗病虫能力强等特点成为反刍动物的优质饲草来源。然而,象草属于异花授粉植物,其杂交后代容易出现假杂种现象,且种子结实率低,这为其遗传改良和育种工作带来了一定的挑战。我国象草育种工作起步较晚,自20世纪80年代初我国才开始引进美洲狼尾草(*Pennisetum glaucum*)、象草及其杂交种。经过多年的研究和培育,截至2024年,我国已有8个象草品种通过国家牧草品种审定委员会审定登记^[3-4],其中包括引进品种3个,育成品种3个,地方品种2个。近年来,随着畜牧业的不断发展,对优质牧草的需求日益增加,培育具有自主知识产权的象草新品种已成为我国畜牧业发展的重要任务之一。

杂交育种是国内外常用的育种方法,具有成本低、后代分离广、优势明显、能够将双亲的优良性状集中在杂交后代中等优点^[5]。通过杂交育种,育种家能够精确地控制亲本的遗传背景,优化组合有利基因,从而培育出具有高产、优质、抗逆等优良性状的新品种。杂交育种的技术关键在于F₁杂种真实性的鉴定^[6]。象草虽是高度自交不亲和植物,但某些基因型仍然能够产生少量自交种子,可能会出现少数假杂种,因此鉴定杂种真实性显得尤为重要,这有助于加快象草育种进程。目前杂种鉴定方法主要有表型鉴定、细胞遗传学、分子细胞遗传学和分子标记^[7]。表型鉴定是确定远缘杂种真实性的最传统、最基本的方法,它通过比较杂交子代和父母本之间的形态差异,达到鉴定真假杂种的目的。王丽宏等^[8]对65份野生狼尾草种质资源表型性状进行研究。在数量性状上狼尾草抽穗前后株高、冠幅和花序数变异较大,质量性状上株型和抗倒伏性、遗传多样性较高。真假杂种表型鉴定测试周期长、耗费大且结果易受环境影响,准确的鉴定须结合其他方法使用,才更科学可靠。

随着生物技术的快速发展,DNA分子标记技术日益完善,为快速杂种鉴定提供技术支撑^[9]。简单序列重复(simple sequence repeats, SSR)又称微卫星DNA分子标记,是近年来发展起来的一种以特异引物PCR为基础的分子标记技术。SSR标记技术不仅能够有效区分纯合子与杂合子,而且其结果更为可靠,具有极高的应用价值。因而目前已成为遗传标记中的热点,广泛应用于品种特异性、一致性和稳定性(distinctness, uniformity, stability, DUS)测试、种质资源遗传图谱构建、品种纯度检测及目标性状分子标记筛选等领域^[10]。谢文刚等^[11]利用SSR标记技术对140个鸭茅(*Dactylis glomerata*)杂种单株和亲本DNA进行扩增,分析杂种与亲本扩增的多态性条带数,并鉴别真假杂种,试验表明用SSR进行鸭茅杂种鉴定及遗传变异分析是可行的。赵欣欣等^[12]利用SSR分子标记通过4对引物对5个杂交组合150份杂交后代进行鉴定,共得出108份真杂种。汪阳等^[13]利用SSR分子标记对55个白三叶(*Trifolium repens*)杂种进行鉴定,利用3对特异性引物在55个杂交后代中快速准确地鉴定出53个真杂种。但利用SSR标记对象草杂交后代鉴定的相关报道较少,本研究基于前人挖掘的SSR标记,并结合全基因组开发的数据,成功筛选出了适用于象草杂种真实性鉴定的引物标记。

本研究以象草品种‘桂牧1号’(GM1)为母本,以象草新品系“F-B”为父本,进行杂交,以期获得具有双方优良特性的新品种。利用SSR分子标记技术对150份象草杂种进行鉴定和遗传分析,并结合杂交后代形态特征进行分析比较,旨在筛选出拥有亲本优良性状的真杂种,为后续培育出适应环境能力强、产量高、品质卓越的象草新品种奠定坚实的基础,并提供宝贵的参考资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为国审品种‘桂牧1号’(简称GM1)和商用品系F-B及其150个象草杂交后代,亲本材料信息如表1所示。

表1 亲本材料相关信息

Table 1 Relevant information of parent materials

亲本 Parents	材料来源 Materials origin	特征 Characteristic
GM1 ♀	广西壮族自治区畜牧研究所 Guangxi Zhuang Autonomous Region Institute of Animal Husbandry	产量高,叶量丰富;披散型;被毛稀疏 High yield, abundant leaf quantity; loose type; sparse coat
F-B ♂	四川农业大学 Sichuan Agricultural University	叶直立,分蘖性强;紧凑型;越冬性好,花粉活力强 Leaf upright, strong tillering; compact; good overwintering, strong pollen activity

1.2 试验方法

1.2.1 杂交材料的获得 杂交亲本材料于2021年种植于四川农业大学攀枝花象草种质资源圃内,在其生长第2年的开花期进行田间有性杂交。当种子成熟后,对GM1种子进行采收并做好标记,将其带回实验室让其自然风干后人工脱粒去除杂质,存放于室内干燥处。将种子均匀地播种在培养皿中,置于25℃恒温光照培养箱中培养,光照/黑暗时间为12 h/12 h,光照强度为25000 lx,相对湿度60%~70%;待幼苗长出2~3片真叶时,将其移栽至育苗杯(16 cm×16 cm)中育苗;2022年5月待幼苗有明显分蘖时逐株将其移栽至四川农业大学雅安教学科研试验基地,单株种植,株行距为0.8 m×0.6 m,移栽后采用常规田间管理办法进行统一管理,最终获得536个杂交后代。通过对杂交后代群体进行田间初步评价,筛选出150个综合评价较优、越冬性较好的群体开展后续研究。

1.2.2 表型性状测定与方法 以双亲为对照测定杂种相关性状指标,所有指标均以单株为单位进行观测。每株随机选取5个分蘖并对其株高、叶片数、茎节数、叶长、叶宽、茎粗、节间长、叶绿素进行测定,取5个分蘖测定的平均值作为该单株的测量值。测定性状按照NY/T 2356-2013《植物品种特异性、一致性和稳定性测试指南—狼尾草属》^[14]进行,相关记载标准如下所示,株高(plant height, PH):地面至植株最高部位的绝对高度(cm),求其平均值(cm);叶片数(number of leaves, NL):地面至植株最高部位所有叶片的数量(片),求其平均值(片);茎节数(number of stem segments, NS):目测地面至植株最高部位的节数(节),求其平均值(节);叶长(leaf length, LL):植株从下到上第5片叶,叶基至叶尖的绝对长度(cm),求其平均值(cm);叶宽(leaf width, LW):植株从下到上第5片叶,叶片的最宽处(mm),求其平均值(mm);茎粗(stem diameter, SD):从基部起茎秆第3节的直径(mm),求其平均值(mm);节间长(internode length, IL):从基部起茎秆第3节的长度(cm),求其平均值(cm);叶绿素(chlorophyll, Chl):选取健康叶片用叶绿素仪(TYS-4N,北京)测定叶绿素含量,求其平均值。

1.2.3 DNA提取与纯度检测 父母本及其每个单株均随机采集2~3片无病虫害的新鲜幼嫩叶片,用无水乙醇擦拭干净叶片表面,无纺布擦干后贮藏于有硅胶的自封袋中带回实验室。采用植物基因组DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取DNA。并用分光光度计(UV-6100,上海)及1%琼脂糖凝胶电泳对DNA的浓度与纯度进行检测,将合格DNA样品放置于-20℃冰箱中保存备用。

1.2.4 SSR-PCR反应体系及电泳检测 PCR所用2×Taq PCR Master Mix混合液和2000 bp DNA Ladder Marker,均购自北京天根生化科技有限公司。反应体系总体积为15 μL,包括模板DNA 1.5 μL(20 ng·μL⁻¹)、正反引物各0.6 μL(10 pmol·μL⁻¹)、PCR-Mix 7.5 μL(10 ng·μL⁻¹)和ddH₂O 4.8 μL。

PCR反应程序为:第1步94℃预变性5 min;第2步94℃变性30 s,50~60℃退火45 s,72℃延伸1 min,共35个循环;第3步72℃延伸7 min,最后4℃冰箱保存。PCR扩增产物用8%聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测。每个样

品点样 2 μL , 2000 bp DNA Ladder 为分子量标准, 先 200 V 电压预电泳 30 min, 而后 300 V 电压电泳 2.5 h, 在 0.1% 的 AgNO_3 溶液中染色 15 min, 在 NaOH 溶液 (15 g NaOH、0.19 g 十水合四硼酸钠) 中显色, 相机拍照保存以供分析。

1.2.5 SSR 引物的筛选 试验用双亲和随机选取的 3 个杂种 DNA 进行引物筛选, 选择扩增清晰、可重复、后代表现出有明显差异的条带以及多态性高的引物, 用于下一步杂种后代的真实性鉴定和遗传变异分析。试验所用 14 条引物从武炳超等^[15]、王成然^[16]、Guo 等^[17] 研究中筛选得出, 由成都擎科梓熙生物技术有限公司合成, 引物信息详见表 2。

表 2 供试引物信息

Table 2 Primer information of this test

引物名称 Primer name	上游引物 Forward primer (5'-3')	下游引物 Reverse primer (5'-3')	退火温度 Annealing temperature (T_m , $^{\circ}\text{C}$)
SSR4	CATGCATATATGACTTTTCCCCAA	ATGATAAATAGGATAGCCATGCCG	58
SSR9	CGTACCTTCTCGCAATAAGGAGAT	GAAGAAGGTTACCTCTTTTCGGTA	58
SSR23	AGGTTCTGCTTCTGGAGGTGAC	TAGATTTGTTTCATGATGATGCGTG	58
SSR40	AAGCTCGATTTTGAGCATCTCC	GATCTGGACCACTGATCAACAGAC	58
SSR55	AAGTCCACATCATCCCGGTC	GTGGCTTACCTGATCCGAGC	58
PaSSR3	TCCATGGAGTACCCGAAGAG	ACATCAACCACTGCAACCAA	50
PaSSR9	TGGATGGAGGACAGTGATGA	ACGACCAGGAAAGCCTTACA	50
PaSSR14	GTCCACGAGAGAGGGAAGAG	GTAGCATATCCCGCCTGTGT	50
PaSSR23	CAGCAAATGCAGCCTATCAA	CTGTTGGTCACTGGTCCCTT	50
PaSSR34	TGCAGAGAAACCAATTGCAG	CCGTTTCATAAGCTGGTGTT	50
WSSR31	TGTGTTTTTCATCCTCAAGTGTGT	CAAATGTAAGATGATAAATGCAGCG	58
WSSR48	CTTGTGTGCCAGGTCGAGACAC	ACGACTAGGTGCTTAGCTAGGGG	58
HSSR4	GTAAGTGGTTCTCCTGCTTCT	ACTAGGTTACTGCTGCTTGTTG	56
C106112-g1	CCAAGCGCTCCTTCTTCTGA	CACGGCACTGATCACTCTGT	60

1.2.6 杂种 SSR 多态性分析 将 SSR 扩增产物的每个条带视为一个位点, 按条带有或无分别赋值, 同位点上扩增出条带的记为“1”, 无条带的记为“0”, 以数字 0、1 构建 SSR 标记矩阵, 统计多态性条带数, 计算多态性百分比。

1.3 数据统计分析

1.3.1 表型数据分析 利用 Excel 2021 进行数据统计, 求其平均值 (X), 标准差 (δ) 以及变异系数, 使用 Origin 2024 进行聚类分析, 通过 SPSS 25.0 进行方差分析。并计算 Shannon—Wiener 遗传多样性指数 (H') 进行遗传多样性评价, 根据性状平均值 (X) 和标准差 (δ) 将材料分为 10 级, 按第 1 级 [$X_i < (X - 2\delta)$] 到第 10 级 [$X_i \geq (X + 2\delta)$], 每 0.5δ 为 1 级^[18]。

计算每个性状的总体平均值:

$$X = \sum_{i=1}^n X_i / n, i=1, 2, 3, \dots, n$$

标准差的计算公式如下:

$$\delta = \sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2 / (n - 1)}, i=1, 2, 3, \dots, n$$

Shannon—Wiener (H') 的计算公式如下:

$$H' = -\sum P_i \times \ln P_i, i=1, 2, 3, \dots, n$$

式中: P_i 为某性状第 i 级别内材料份数占总份数的百分比, X_i 表示总体的测量值, \bar{X} 表示总体均值, n 为每个个体的测量值。

1.3.2 SSR 标记数据分析 利用 Excel 2021 进行统计整理, 计算各引物的多态性条带比率 (polymorphism band ratio, PPB) 和多态性信息含量 (polymorphism information content, PIC)^[19]。利用 NTSYS 2.10 软件根据试验统计的“1”“0”原始矩阵计算供试材料的遗传相似系数。基于遗传相似系数, 用 Origin 2024 绘制聚类分析图。

$$PPB(\%) = \text{多态性条带/扩增总条带数} \times 100$$

$$PIC_i = 2 \times f_i(1 - f_i)$$

式中: PIC_i 为标记 i 的多态信息量; f_i 为第 i 种等位基因占总基因数的比率; $1 - f_i$ 是缺少的基因频率。

2 结果与分析

2.1 象草杂交 F_1 代的多样性分析

象草亲本及 150 份杂交后代群体 8 个表型性状的方差分析结果见表 3。从表中可知: 在确认各样本所在总体的方差具有齐性 (即方差相等) 的前提下, 通过 F 检验分析发现, 8 个性状在个体间的差异均达到显著水平 ($P < 0.05$)。此外, 8 个性状的变异系数为 5.90%~21.05%, 平均值为 11.39%。其中: 茎粗变异系数最高 (21.05%), 其次是叶宽 (16.45%), 表明这两个性状的变异幅度大, 易受环境影响或存在较大的遗传差异。变异系数最低的性状为叶长 (5.90%), 其次是株高 (6.71%), 表明叶长、株高的变异幅度较小, 遗传较稳定。各性状变异系数从高到低排序为: 茎粗 > 叶宽 > 茎节数 > 叶绿素 > 节间长 > 叶片数 > 株高 > 叶长。与父母本相比, 叶长表现出明显的超亲优势, 叶宽、叶绿素弱于亲本, 剩余平均值在父母本观测值之间。对 8 个农艺性状进行遗传多样性分析 (表 3), 各性状多样性指数为 1.604~1.841, 平均值为 1.743。其中, 株高多样性指数最大, 为 1.841, 其次是节间长、叶绿素, 分别为 1.826、1.824, 最小的是茎节数, 为 1.604。说明株高、节间长、叶绿素这 3 个性状遗传基础较为丰富, 受外界环境影响较大。

表 3 象草亲本及杂交 F_1 代群体农艺性状的变异性分析

Table 3 Variability analysis of agronomic traits of parent and hybrid F_1 generation population of *P. purpureum*

性状 Traits	平均值 Average			范围 Range	变异系数 Coefficient of variation (CV, %)	多样性指数 Shannon— Wiener (H')	F 值 F value
	母本 Female line (GM1)	父本 Male line (F-B)	F_1 代 F_1 generation				
	株高 Plant height (PH, cm)	297.04±5.40	396.34±10.86				
叶片数 Number of leaves (NL, No.)	16.00±1.58	24.00±2.86	19.88±1.58	16.40~24.00	7.95	1.615	6.146**
茎节数 Number of stem segments (NS, No.)	10.00±0.71	15.00±1.14	13.30±1.66	9.00~25.00	12.39	1.604	9.722**
叶长 Leaf length (LL, cm)	110.06±5.23	108.58±4.65	111.00±6.55	94.34~129.78	5.90	1.808	9.075**
叶宽 Leaf width (LW, mm)	38.03±2.36	40.08±2.48	36.19±5.96	23.31~62.19	16.45	1.764	14.456**
茎粗 Stem diameter (SD, mm)	11.30±0.89	17.05±0.26	13.70±2.89	9.20~26.65	21.05	1.661	14.758**
节间长 Internode length (IL, cm)	14.42±1.02	16.22±1.67	15.13±1.45	10.41~18.62	9.60	1.826	4.969**
叶绿素 Chlorophyll (CHI, spad)	49.36±3.33	58.84±0.95	45.64±5.06	24.15~58.56	11.05	1.824	4.709**

注: **表示在 0.05 水平上差异显著。

Note: ** show significant difference at the 0.05 level.

对象草亲本及杂交 F_1 代表型性状进行聚类分析, 结果如图 1 所示: 在相似系数为 0.420 时, 150 个杂交 F_1 代可划分为 3 个类群。第 I 类群包括 2 个子代, 占整个群体的 1.33%。第 II 类群包括 37 个子代, 占整个群体的 24.70%, 与“F-B”(♂) 聚在一起, 该类群子代植株高大、叶片宽大、茎秆粗壮, 株高、叶片数、茎粗平均值分别为

363.3 cm、21片、15.7 mm。第Ⅲ类群包括109个子代,占整个群体的74.00%,与“GM1”(♀)聚在一起。该类群子代植株较矮、节间短、叶片短且窄、茎秆纤细,株高、节间长、叶长、叶宽、茎粗平均值分别为325.7 cm、15.0 cm、110.4 cm、35.5 mm、13.7 mm。与父本聚在一起子代综合性状表现优秀,与母本聚在一起子代综合性状相对较差,因此在后续以高产、叶量丰富、茎秆粗壮为选育目标时,第Ⅱ类群的37个子代可作为象草亲本选配及相关性状基因挖掘的备用材料。

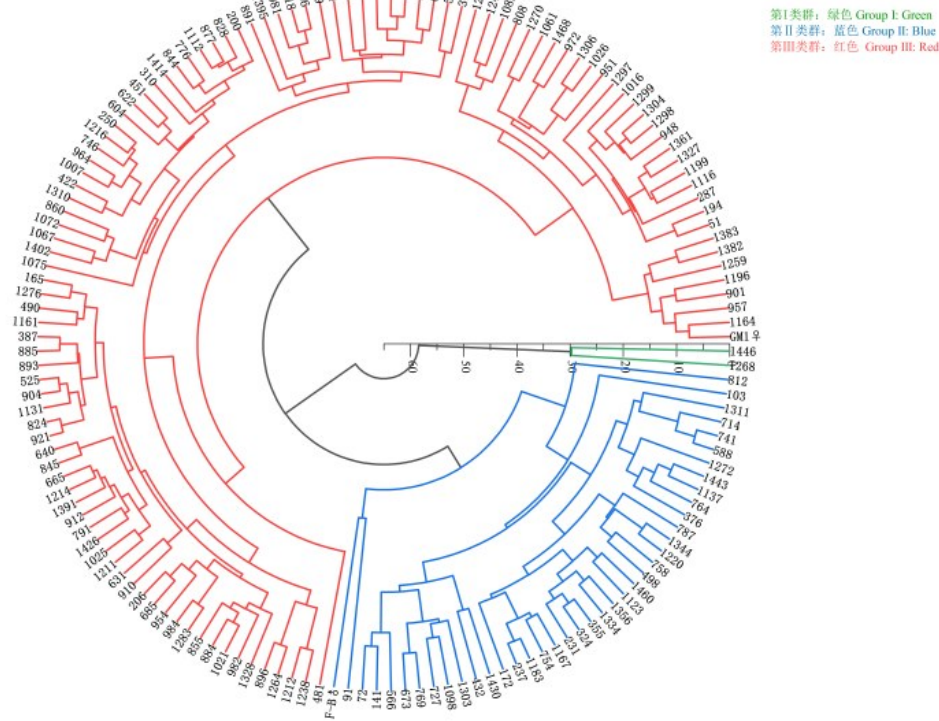


图1 基于表型性状的聚类分析

Fig. 1 Cluster analysis based on phenotypic traits

图中GM1♀表示母本,F-B♂表示父本,其余数字表示采样编号,下同。In the figure, GM1♀ represents the female parent, F-B♂ represents the male parent, and the remaining numbers indicate the sample numbers. The same below.

2.2 象草亲本及杂交后代SSR扩增产物的多态性分析

基于筛选出的14对引物对象草亲本及其150个杂交F₁代进行扩增,结果如表4所示,共得到清晰可辨条带219条。其中,多态性条带118条,多态位点占比54.18%;平均每对引物扩增出15.64条条带,平均多态性条带8.43条;每个SSR位点的多态性信息含量(PIC)为29.59%~44.63%,平均值为35.40%。这些引物出现4种扩增带型:双亲互补型(图2A)、父本型(图2B)、母本型(图2C)和其他型(图2D),其中WSSR31和C106112-g1呈双亲互补型图谱,可利用其对象草杂种进行快速鉴定。基于SSR分子标记对象草亲本及杂交F₁代进行聚类分析,结果如图3所示:在相似系数为0.810处时可将150个F₁代划分为4类,第Ⅰ类73个杂交后代与“GM1”(♀)聚在一起,杂交后代占比48.70%;第Ⅱ类72个杂交后代聚成一类,杂交后代占比48.00%;第Ⅲ类“F-B”(♂)单独聚成一类,这表明父本在遗传上与杂交后代或“GM1”(♀)存在明显的差异;第Ⅳ类5个杂交后代聚在一起,杂交后代占比3.33%。

2.3 象草杂种鉴定

根据象草杂交亲本及其杂种的电泳谱带特征,对杂种进行鉴定。鉴定结果显示(图2),后代出现以下4种类型:1)双亲互补型:同时具有父母本特异性条带的杂种;2)父本型:仅具有父本特异性条带的杂种;3)母本型:仅具

有母本特异性条带的杂种;4)其他型:扩增出除父母本特异性条带以外的条带。其中双亲互补型和父本型可判定为真杂种,其余扩增的带型需要结合其他引物进一步鉴定^[20]。

利用挑选的双亲互补引物对象草亲本和150个杂种进行鉴定,先用WSSR31进行鉴定,从扩增结果(图4)可知,父本具有3条母本不具有的条带,其中101份杂种具有父本特征带,49份杂种无父本特征带,未鉴定出的杂交后代是否为真杂种还需结合其他引物再次鉴定。SSR鉴定结果表明,杂交后代在任何一对引物扩增后具有父本特征带或兼具父母本特征带,均能证明杂种的真实性。由此初步判定,150份杂种中已有101份真杂种,引物WSSR31鉴定效率为67.33%。

用引物WSSR31进行扩增时,发现49份杂种未出现父本特征带或父本特征带不明显。利用另一个引物C106112-g1对这些杂种进行再次扩增,结果有46份杂种成功扩增出父本特征带,且被判定为真杂种,引物C106112-g1的鉴定效率在90%以上。从扩增结果可知(图5),1、2、5、6号材料等利用WSSR31未扩增出父本特征带的杂交后代,换引物C106112-g1

表4 象草SSR条带的多样性

Table 4 Polymorphism of SSR bands in *P. purpureum*

引物名称 Primer name	扩增总条 带数 Total number of amplified bands	多态性条带 数 Number of polymor- phic bands	多态条带 比率 Poly- morphism band ratio (PPB, %)	多态信息含量 Polymorphism information content (PIC, %)
SSR4	13	6	46.15	36.07
SSR9	10	8	80.00	44.63
SSR23	9	5	55.56	30.47
SSR40	21	15	71.43	41.48
SSR55	7	1	14.29	29.93
PaSSR-3	17	12	70.59	36.15
PaSSR-9	17	6	35.29	38.89
PaSSR-14	19	11	57.89	29.66
PaSSR-23	9	3	33.33	29.59
PaSSR-34	24	7	29.17	36.37
C106112-g1	11	9	81.82	32.46
WSSR31	14	9	64.29	36.92
WSSR48	16	12	75.00	39.49
HSSR4	32	14	43.75	33.52
总计 Total	219	118	/	/
平均 Average	15.64	8.43	54.18	35.40

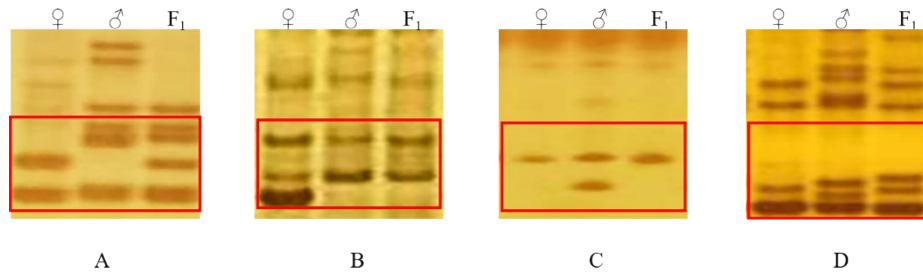


图2 引物的SSR图谱类型

Fig. 2 SSR fingerprint pattern

A: 双亲互补型 Complementary pattern of both parents, C106112-g1; B: 父本型 Male-specific pattern, HSSR4; C: 母本型 Female-specific pattern, WSSR31; D: 其他型 Other types, PaSSR-34. ♀: 母本 Female parent; ♂: 父本 Male parent; F₁: 杂交子代 Hybrid offspring.

鉴定则可得到多条父本特征带,因此,当仅有1对引物无法判断杂种的真实性时,可结合多对引物相互补充以提高鉴定的效率和杂种的获得率。经过两对引物的综合鉴定,150份杂种中确认有147份为真杂种,其杂种真实性比率高达98%。

3 讨论

杂交育种是植物遗传改良的主要途径之一,进行杂种鉴定、剔除杂交群体中非双亲杂种是保证遗传规律分析和性状连锁分析准确性的必要前提^[21]。传统的杂种真伪鉴别一般是利用形态学鉴定,但该方法不仅周期长,易受环境因素影响、误差大,且难以鉴定性状差异较小的品种^[22]。SSR分子标记技术具有共显性、结果可靠、重复性好、多态性高、检测快速简便等特点^[23],已被普遍应用于各种植物杂种真实性鉴定中。杨丽娟等^[24]利用SSR分子

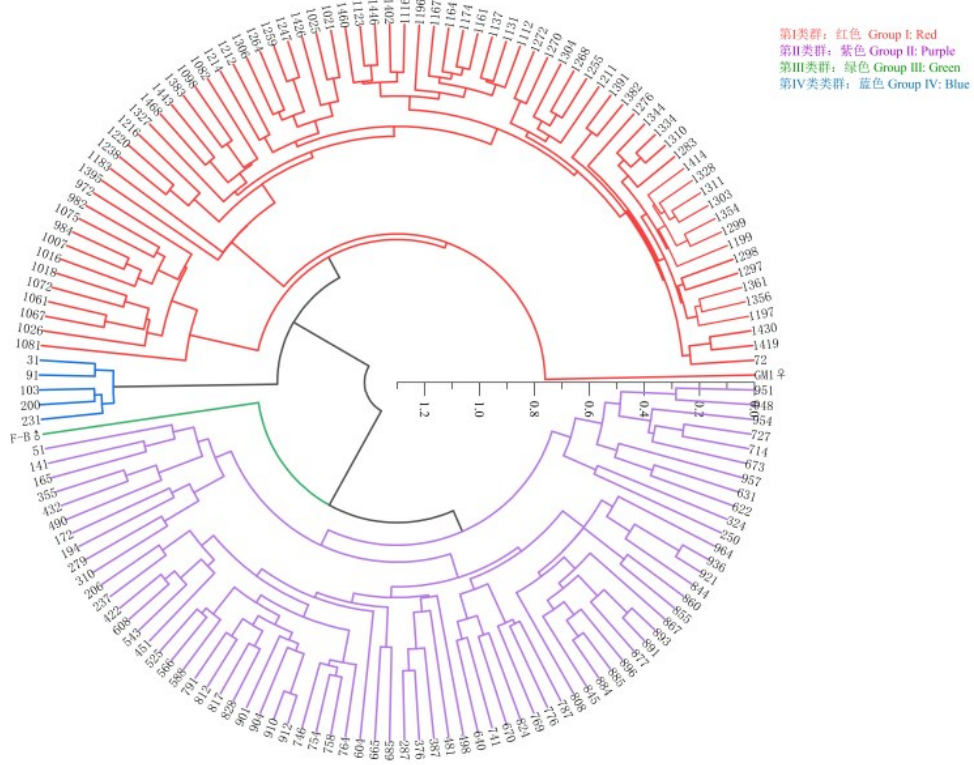


图 3 基于 SSR 标记的聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis based on SSR markers

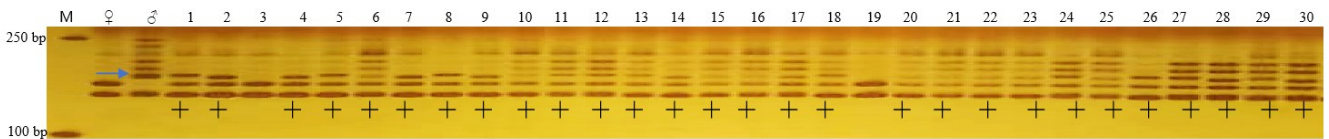


图 4 引物 WSSR31 对部分杂交后代的扩增

Fig. 4 Amplification of some hybrid progeny by primer WSSR31

M: 2000 bp Marker; 箭头所指条带为父本特征带 The strip pointed by the arrow is the male parent feature strip; “+”所标注的条带为真杂种 Bands marked with ‘+’ are true hybrids. 下同 The same below.

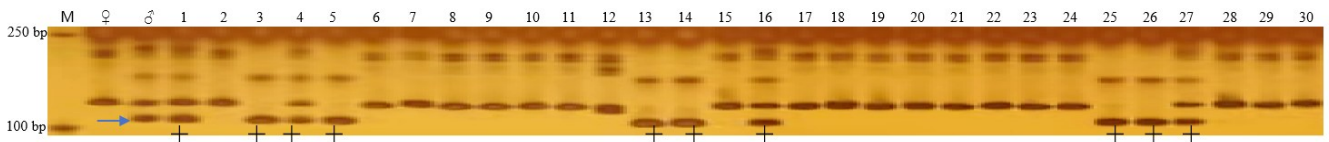


图 5 引物 C106112-g1 对部分杂交后代的扩增

Fig. 5 Amplification of some hybrid progeny by primer C106112-g1

标记对‘大苦 1 号’荞麦 (*Fagopyrum tataricum*) × 红心金荞 (*F. cymosum*)、巨荞 (*F. giganteum*) × 红心金荞、小米荞 (*F. tataricum*) × 红心金荞、巨荞 × 小米荞、巨荞 × 小米荞、巨荞 × 大野荞 (*F. megaspartanium*) 6 个杂交组合杂种进行鉴定, 鉴定出 3 个真杂种: 大苦 1 号 × 红心金荞、小米荞 × 红心金荞、巨荞 × 红心金荞。本研究使用 2 对 SSR 引物对 150 株杂交 F₁ 代进行了杂种鉴定, 其中 147 株被鉴定为真杂种, 真杂种比例高达 98%。2 对 SSR 引物中 C106112-g1 (93.88%) 鉴定效率最高, 由此可知 SSR 标记鉴定杂种需要 2 对及 2 对以上的引物相互验证, 才能达到更精确的检测结果。同时, 在杂种后代的真实性鉴定中, 扩增位点中有部分个体出现带型缺失的现象。韩国

辉等^[25]认为带型的缺失是有性杂交染色体的异常交换或是杂合位点受引物干扰而无法显现引起的。

从SSR多态性分析可知,本研究中14对引物的PIC平均值为35.40%,除引物SSR55、PaSSR-14、PaSSR-23小于30%以外,其他引物的PIC均大于30%。14对引物共扩增出条带219条,其中多态性位点占比为54.18%,PPB平均值高于50%,这表明本研究筛选出来的SSR引物具有较高的多态性。此外,在亲本及杂交F₁代表型性状的聚类分析中,与父本表型相似的有37个杂交后代,与母本表型相似的有109个杂交后代;SSR标记的聚类分析结果显示73个F₁代群体与母本聚为一组,父本则独立成组,未与任何F₁代或母本紧密聚集,说明象草杂交F₁代与母本的遗传关系相近。这一现象在枣(*Ziziphus jujuba*)和酸枣(*Ziziphus jujuba* var. *spinosa*)^[26]、甘蔗(*Saccharum officinarum*)和蔗茅(*Saccharum rufipilum*)^[27]杂交F₁代群体的杂种鉴定及遗传关系分析中也出现过。谷艳鹏等^[28]认为父本独立为组可能与亲本的遗传物质传递以及所用引物的数量和特征有关。综上所述,象草杂交F₁代群体与亲本遗传关系的分析为其杂交育种提供了有价值的遗传信息,为后续的象草育种工作提供了重要的方向和依据。

4 结论

象草杂交F₁代群体较亲本表型变异丰富,变异系数为5.90%~21.05%。利用14对SSR引物对象草亲本GM1和F-B以及150个杂交F₁代进行分析,共得到清晰可辨条带219条,多态性条带118条,每个SSR位点的多态信息含量(PIC)平均值为35.40%,具有较高的多态性,可直接用于象草遗传多样性分析、杂种鉴定等相关研究。基于SSR分子标记聚类分析发现,父本在遗传上与杂交后代或“GM1”(♀)存在明显的差异。利用特异性引物准确鉴定出147个真杂种,鉴定率高达98%。基于表型数据的聚类分析将亲本及杂交后代分为3类;其中第Ⅱ、Ⅲ类群为综合性状表现优异类群,分别与“F-B”(♂)和“GM1”(♀)聚在一起,为后续杂交育种选育新品系提供宝贵材料基础。

参考文献 References:

- [1] Lu L Y. Study on physiology and differential expression genes responding to Al of elephant grass roots and identification of MATE family. Lanzhou: Lanzhou University, 2023.
卢丽燕. 象草根系响应铝的生理和差异表达基因研究及MATE家族鉴定. 兰州: 兰州大学, 2023.
- [2] Chen X, Chen M X. Research progress on elephant grass silage processing and its application in animal production. *Modern Animal Husbandry Science and Technology*, 2024(5): 71–74.
陈晓, 陈美秀. 象草青贮技术及其在动物应用中的研究进展. *现代畜牧科技*, 2024(5): 71–74.
- [3] Hou X C, Teng K, Guo Q, *et al.* Research advances in forage *Pennisetum* resource. *Chinese Bulletin of Botany*, 2022, 57(6): 814–825.
侯新村, 滕珂, 郭强, 等. 狼尾草属牧草研究进展. *植物学报*, 2022, 57(6): 814–825.
- [4] Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. Publicity on grass varieties approved by the National Grass Variety Examination and Approval Committee in 2024. (2024-07-24)[2024-07-30]. http://www.moa.gov.cn/xw/zxfb/202407/t20240724_6459585.htm.
中华人民共和国农业农村部. 关于2024年全国草品种审定委员会审定通过草品种的公示. (2024-07-24)[2024-07-30]. http://www.moa.gov.cn/xw/zxfb/202407/t20240724_6459585.htm.
- [5] Li L. Garden plant genetics and breeding. Chongqing: Chongqing University Press, 2016.
李凌. 园林植物遗传育种. 重庆: 重庆大学出版社, 2016.
- [6] Jia K X, Zhang X L, Meng Y J, *et al.* SSR marker identification and character analysis of *Perilla* F₁ hybrid. *Molecular Plant Breeding*, 2024, 22(17): 5701–5706.
贾凯旋, 张笑玲, 孟义江, 等. 紫苏杂种F₁的SSR标记鉴定及性状分析. *分子植物育种*, 2024, 22(17): 5701–5706.
- [7] Deng Y M, Jia X P, Liang L J. Identification methods of hybridity in ornamental plants distant hybridization. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2016, 30(7): 1308–1315.
邓衍明, 贾新平, 梁丽建. 观赏植物远缘杂交后代的鉴定方法. *核农学报*, 2016, 30(7): 1308–1315.
- [8] Wang L H, Li H B, Sun X B, *et al.* Principal component and cluster analysis on the phenotypic traits of *Pennisetum*

- alopecuroides*. Journal of Hebei Agricultural University, 2019, 42(2): 91–94.
- 王丽宏, 李会彬, 孙鑫博, 等. 狼尾草主要表型性状的主成分和聚类分析. 河北农业大学学报, 2019, 42(2): 91–94.
- [9] Xia L, Yang M F, Liang X J, *et al.* *Passiflora caerulea* L. interspecific hybrid F₁ progeny molecular identification and genetic diversity analysis. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2024, 44(5): 16–21.
- 夏玲, 杨梦飞, 梁昕景, 等. 西番莲种间杂交F₁后代分子鉴定及遗传多样性分析. 热带农业科学, 2024, 44(5): 16–21.
- [10] Lu X F. The morphological diversity and SSR marker of *Dactylis glomerata*. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2010.
- 路小帆. 鸭茅形态多样性和SSR标记分析. 成都: 四川农业大学, 2010.
- [11] Xie W G, Zhang X Q, Chen Y X, *et al.* Identification and genetic variation analysis of orchardgrass hybrids (*Dactylis glomerata*) by SSR molecular markers. Acta Prataculturae Sinica, 2010, 19(2): 212–217.
- 谢文刚, 张新全, 陈永霞, 等. 鸭茅杂种的SSR分子标记鉴定及其遗传变异分析. 草业学报, 2010, 19(2): 212–217.
- [12] Zhao X X, Zhang X Q, Miao J M, *et al.* Identification by SSR molecular markers and comparative analysis in morphological characterization in *Lolium multiflorum* hybrid progenies. Journal of Agricultural Biotechnology, 2013, 21(7): 811–819.
- 赵欣欣, 张新全, 苗佳敏, 等. 多花黑麦草杂交种SSR分子标记鉴定及表型比较分析. 农业生物技术学报, 2013, 21(7): 811–819.
- [13] Wang Y, Yan S B, Zhang R, *et al.* Phenotypic identification and SSR analysis of *Trifolium repens* F₁ hybrid progeny. Acta Agrestia Sinica, 2024, 32(6): 1657–1664.
- 汪阳, 闫三博, 张睿, 等. 白三叶杂交F₁代群体的表型鉴定及SSR分析. 草地学报, 2024, 32(6): 1657–1664.
- [14] Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability—*Pennisetum*: NY/T 2356-2013. Beijing: China Agriculture Press, 2013.
- 中华人民共和国农业部. 植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南—狼尾草属: NY/T 2356-2013. 北京: 中国农业出版社, 2013.
- [15] Wu B C, Zhang H, Tong L, *et al.* Research on genetic and phenotypic differences of *Pennisetum purpureum* mutants generated by irradiation. Acta Prataculturae Sinica, 2018, 27(11): 77–86.
- 武炳超, 张欢, 童磊, 等. 象草不同辐射剂量诱变系表型及遗传变异研究. 草业学报, 2018, 27(11): 77–86.
- [16] Wang C R. Development and application of G-SSR markers based on genome survey sequencing of Napier grass (*Pennisetum purpureum*). Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2019.
- 王成然. 基于象草Survey测序的G-SSR分子标记开发与应用. 成都: 四川农业大学, 2019.
- [17] Guo Y D, Liu L Y, Yue Y S, *et al.* Development of SSR markers based on transcriptome sequencing and verification of their conservation across species of ornamental *Pennisetum* Rich. (Poaceae). Agronomy, 2022, 12(7): 1683.
- [18] Niu X J, Wang X D, Wang J P, *et al.* Phenotypic diversity analysis and comprehensive evaluation of local sorghum germplasm resources. Journal of Plant Genetic Resources, 2024, 25(4): 922–935.
- 牛雪婧, 王新栋, 王金萍, 等. 高粱地方种质资源表型多样性分析及综合评价. 植物遗传资源学报, 2024, 25(4): 922–935.
- [19] Wang Y, Yi L M, Ban W T, *et al.* Identification of F₁ hybrids of perennial ryegrass based on SSR molecular markers. Chinese Journal of Grassland, 2021, 43(11): 10–17.
- 汪阳, 易莉美, 班晚婷, 等. 基于SSR分子标记的多年生黑麦草杂交F₁代杂种鉴定. 中国草地学报, 2021, 43(11): 10–17.
- [20] Liu Y R. Screening of SSR molecular marker primers in identification of blueberry hybrid authenticity. Changchun: Jilin Agricultural University, 2023.
- 刘伟然. 蓝莓杂种真实性鉴定中SSR分子标记引物的筛选. 长春: 吉林农业大学, 2023.
- [21] Xue H B, Wang F F, Wang L, *et al.* Identification of the hybrids and analysis of genetic variation of a pear progeny derived from crossing between 'Mantianhong' and 'Hongxiangsu' by Genic-SSR. Journal of Fruit Science, 2017, 34(8): 925–934.
- 薛华柏, 王芳芳, 王磊, 等. '满天红'×'红香酥'杂种鉴定及遗传变异Genic-SSR分析. 果树学报, 2017, 34(8): 925–934.
- [22] Wu Q, Cao G Y, Yin L, *et al.* Identification of peanut hybrid F₁ with *AhMITE* markers. Journal of Peanut Science, 2017, 46(3): 48–53.
- 吴琪, 曹广英, 尹亮, 等. 利用AhMITE转座子分子标记鉴定花生杂交F₁代真假杂种. 花生学报, 2017, 46(3): 48–53.
- [23] Zhu J C, Guo Y S, Liu Z D, *et al.* Identification of the F₁ hybrids of grape using SSR molecular markers. Journal of Shenyang Agricultural University, 2016, 47(2): 148–152.
- 朱骏驰, 郭印山, 刘镇东, 等. 利用SSR分子标记鉴定葡萄F₁代杂种. 沈阳农业大学学报, 2016, 47(2): 148–152.

- [24] Yang L J, Rao Q L, Li H Y, *et al.* Identification of perennial interspecific hybrids on genus *Fagopyrum*. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(2): 387–395.
杨丽娟, 饶庆琳, 李洪有, 等. 荞麦属植物多年生种间杂种的鉴定. *植物遗传资源学报*, 2019, 20(2): 387–395.
- [25] Han G H, Xiang S Q, Wang W X, *et al.* Identification and genetic diversity of hybrid progenies from Shatian pummelo by SSR. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(22): 4678–4686.
韩国辉, 向素琼, 汪卫星, 等. 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*, 2010, 43(22): 4678–4686.
- [26] Yan F F, Zheng X J, Luo Z, *et al.* Genetic diversity analysis of hybrid progeny from Chinese jujube and wild jujube by SSR. *Journal of Northwest Forestry University*, 2018, 33(3): 91–97.
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. *西北林学院学报*, 2018, 33(3): 91–97.
- [27] Yao C X, Wang X H, He L L, *et al.* DNA fingerprint construction of different generations of *Saccharum* spp. \times *Erianthus fulvus* using SSR marker. *Molecular Plant Breeding*, 2011, 9(3): 381–389.
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. *分子植物育种*, 2011, 9(3): 381–389.
- [28] Gu Y P, Zhang Z R, Sun T, *et al.* Hybrid identification and genetic relationship analysis of F₁ hybrid population of *Sorbus pohnuashanensis* and *Sorbus hupehensis* var. *paucijuga* based on EST-SSR marker. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2022, 31(4): 65–73.
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. *植物资源与环境学报*, 2022, 31(4): 65–73.