

## 石蒜属种间杂交种的鉴定和分子身份证构建

王黎, 周琪, 高燕会

(浙江农林大学 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 杭州 311300)

**摘要:** 【目的】鉴定石蒜属 *Lycoris* 种间杂交种  $F_1$  的真实性。【方法】利用荧光标记表达序列标签简单序列重复 (EST-SSR) 方法, 构建亲本石蒜 *L. radiata*、中国石蒜 *L. chinensis*、换锦花 *L. sprengeri* 和石蒜-中国石蒜、石蒜-换锦花杂交种  $F_1$  共 78 个样品的分子身份证, 并分析遗传关系。【结果】15 对多态性强的荧光标记 EST-SSR 引物得到扩增条带 92 条, 每对引物平均扩增 6.13 条; 多态性信息量 (PIC) 为 0.6292~1.0000, 平均为 0.9137。引物 SSR203+SSR115 对石蒜-换锦花、石蒜-中国石蒜杂交种  $F_1$  代的真实性鉴定率分别为 96.30% 和 96.15%。非加权组平均法 (UPGMA) 聚类分析表明: 石蒜、中国石蒜、换锦花及其种间杂交种的遗传相似系数为 0.76~0.98, 在相似系数为 0.77 处 25 个亲本和 53 个杂交种聚为 I 和 II 两大类, I 类包括亲本换锦花、石蒜-换锦花杂交种, II 类包括石蒜、中国石蒜以及中国石蒜-石蒜杂交种, II 类又可分为 IIa、IIb 和 IIc 等 3 个亚类。利用荧光标记 EST-SSR 基因型编码, 构建了 78 个石蒜属亲本及杂交种的分子身份证。【结论】荧光标记 EST-SSR 可用于石蒜属种间杂交种的早期鉴定。图 1 表 5 参 26

**关键词:** 石蒜属; 杂种鉴定; 简单序列重复 (SSR); 分子身份证

中图分类号: S682 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2022)03-0562-09

## Construction of molecular identification card of *Lycoris* interspecific hybrids

WANG Li, ZHOU Qi, GAO Yanhui

(State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

**Abstract:** [Objective] This study is aimed to identify the authenticity of  $F_1$ , an interspecific hybrids among *Lycoris*. [Method] With 78 samples collected of  $F_1$ , an interspecific hybrids among *L. radiata*, *L. chinensis* and *L. sprengeri*, expressed sequence tag simple sequence repeat (EST-SSR) was employed to construct their molecular identification cards before an analysis was conducted of their genetic relationships. [Result] fluorescence labeled EST-SSR primers yielded 92 amplified bands that averaged 6.13 per pair; polymorphism information (PIC) was 0.629 2 to 1.000 0 and averaged 0.913 7. The authenticity identification rate of primers SSR203+SSR115 for the  $F_1$  generation of *L. radiata*-*L. sprengeri* and *L. chinensis*-*L. radiata* was 96.30% and 96.15%, respectively. UPGMA cluster analysis showed that the genetic similarity coefficients of parents (*L. radiata*, *L. chinensis* and *L. sprengeri*) and their hybrids ranged from 0.76 to 0.98, and with the similarity coefficient being 0.77, the 25 parents and 53 hybrids could be clustered into 2 groups, namely group I and group II. Group I included *L. sprengeri* parents and hybrids between *L. radiata* and *L. sprengeri* whereas group II, including *L. radiata*, *L. chinensis* and the hybrids between *L. radiata* and *L. chinensis*, could be divided into

收稿日期: 2021-04-18; 修回日期: 2022-01-19

基金项目: 浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划项目 (2019R412008); “十四五”浙江省科技计划项目 (2021C02071-6); “十三五”浙江省科技计划项目 (2016C02056-13); 国家自然科学基金资助项目 (31670696)

作者简介: 王黎 (ORCID: 0000-0001-7070-0588), 从事观赏植物遗传改良和生物技术研究。E-mail: 3025575869@qq.com。通信作者: 高燕会 (ORCID: 0000-0001-8827-9867), 副教授, 博士, 从事观赏植物新品种选育研究。E-mail: gaoyanhui408@126.com

three subclades: II a, II b and II c. The unique molecular identity cards of 78 *Lycoris* parents and hybrids were constructed based on the fluorescent EST-SSR genotypes coding. [Conclusion] Fluorescence labelled EST-SSR can be used for early identification of interspecific hybrids in *Lycoris*, which can provide important reference for variety identification and cross breeding of *Lycoris*. [Ch, 1 fig. 5 tab. 26 ref.]

**Key words:** *Lycoris*; hybrid identification; EST-SSR; molecular identification card

石蒜属 *Lycoris* 植物隶属百合目 Liliiflorae 石蒜科 Amaryllidaceae, 具地下鳞茎, 为多年生草本植物; 全球约有 20 多种, 中国有 15 种, 主要分布在江苏、浙江和安徽等地<sup>[1]</sup>。石蒜属植物花型花色变异丰富, 种间杂交亲和性高, 对石蒜属植物进行遗传育种改良, 极有希望选育出有中国特色的切花新品种<sup>[2]</sup>, 市场前景和园林应用前景极为广阔。同时, 石蒜鳞茎富含生物碱、黄酮及多糖等化学成分, 药用价值较高<sup>[3-4]</sup>。目前, 石蒜属植物新品种选育主要通过种间和种内杂交、自然群体选择, 对其杂交种真实性的鉴定主要根据开花时花色和花型等农艺性状的变化来判断; 但由于石蒜属植物生长周期长, 种子播种后 5~6 a 才开花, 早期鉴定及分类较为困难, 从而影响销售和生产。

常用的杂种鉴定方法有形态标记法、生化标记法和 DNA 标记法等。形态标记耗时费力, 易受环境条件和检测人员主观判断的影响; 生化标记数目少且稳定性差, 不能进行多年生植物杂交种的早期鉴定, 无法满足生产和市场的需求; 相比之下, DNA 标记简单序列重复 (SSR)、目标起始密码子多态性 (SCoT)、内部简单序列重复 (ISSR)、相关序列扩增多态性 (SRAP) 和荧光标记 SSR 能反映生物个体或种群间某些特异性 DNA 片段, 不受生物自身生长阶段和环境条件的影响, 标记数量较多, 重复性好, 开发成本低, 不影响性状表达<sup>[5-7]</sup>, 已在冬瓜 *Benincasa hispida*<sup>[8]</sup>、甜菜 *Beta vulgaris*<sup>[9]</sup>、姜黄属 *Curcum* 植物<sup>[10]</sup>、枇杷 *Eriobotrya japonica*<sup>[11]</sup> 等种质资源遗传多样性、杂交种鉴定、品种鉴定和分子身份证的构建等方面得到广泛应用。其中 SSR 标记是以 PCR 技术为基础、较成熟的遗传标记, 但由于工作量大、精度低、分析量小, 无法完成大批量样品的检测, 而荧光标记 SSR 能准确获得目标 DNA 片段的大小 (精确至 1 bp), 检测结果稳定、准确且高效适用于大批量品种的检测分析, 已被应用于落花生 *Arachis hypogaea*<sup>[12]</sup>、高山杜鹃 *Rhododendron lapponicum*<sup>[13]</sup>、百合属 *Lilium*<sup>[14]</sup>、芒 *Miscanthus sinensis*<sup>[15]</sup> 等 F<sub>1</sub> 代杂交种真实性和纯度检测、遗传多样性分析、核心种质的构建等。石艳等<sup>[16]</sup> 开发了石蒜属植物换锦花 *L. sprengeri* 的表达序列标签 SSR (EST-SSR) 标记, 用于鉴定换锦花-中国石蒜 *L. chinensis* 杂交种, 为石蒜属种间杂交种 F<sub>1</sub> 的鉴定提供了借鉴。为进一步完善石蒜属植物种间杂交种 F<sub>1</sub> 的鉴定技术, 本研究筛选了 15 对 EST-SSR 引物, 通过 EST-SSR 荧光标记毛细管电泳技术构建亲本换锦花、石蒜 *L. radiata*、中国石蒜以及石蒜-换锦花、石蒜-中国石蒜杂交种等 78 个样品的分子身份证, 并进行杂交种真实性鉴定, 为石蒜属植物的亲缘关系分析、品种选育、杂交种早期鉴定及资源保护和利用等提供理论参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样品材料

石蒜、中国石蒜、换锦花及石蒜-中国石蒜、石蒜-换锦花杂交种 F<sub>1</sub> 共 78 个样品, 均栽植于浙江农林大学石蒜属种质资源圃, 于 2020 年 8—9 月盛花期采集各材料花瓣。

### 1.2 基因组 DNA 提取和 EST-SSR 引物筛选

采用改良 CTAB 法提取供试材料花瓣基因组 DNA, 用 Nanodrop 2000 测定 DNA 的质量和浓度, 经质量浓度为 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像系统拍照。

分别以亲本 (中国石蒜、石蒜和换锦花) 基因组 DNA 为模板, 从 59 对石蒜属植物通用 EST-SSR 引物中筛选条带清晰、重复性好且具多态性的引物进行扩增<sup>[16]</sup>。EST-SSR PCR 扩增反应体系 (10.0 μL) 为: Taq DNA 聚合酶 1.0×16.67 nkat, 氯化镁 (MgCl<sub>2</sub>) 1.0 mmol·L<sup>-1</sup>, dNTPs 0.2 mmol·L<sup>-1</sup>, 引物 0.8 μmol·L<sup>-1</sup>, DNA 40 ng。PCR 反应程序为 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 S, 退火温度 30 S, 72 °C 延伸 30 S, 35 次循环; 72 °C 延伸 10 min; 16 °C 保温 30 min。用质量浓度 10.0% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离银染显色检测扩增反应产物, 显色后记录观察拍照。

### 1.3 荧光标记 EST-SSR 毛细管电泳和杂交种鉴定

从 59 对多态性引物中筛选到 15 对具多态性的 EST-SSR 引物 (表 1), 在正向引物中分别加注 FAM (蓝)、HEX (绿)、TAMRA (黄) 和 ROX (红) 荧光, 对 78 个样品进行多重 PCR 扩增。利用遗传分析仪 (ABI 3730XL, ThermoFisher Scientific, 美国) 进行毛细管电泳检测分析。根据电泳结果, 选择在亲本 (中国石蒜、石蒜和换锦花) 种内一致、种间具多态性、特异、单一且重复性好的引物用于杂交种鉴定。比较亲本与杂交种  $F_1$  的 EST-SSR PCR 扩增产物, 杂交种  $F_1$  具有父母本互补型或有变异型扩增带型的样品鉴定为真实杂种。计算杂交种鉴定率=真实杂交种样本数/样本总数 $\times 100\%$ 。

表 1 15 对 EST-SSR 引物序列和 PCR 产物

Table 1 Sequences and PCR products of 15 pair of SSR primers

引物	标记荧光	引物序列 (5'→3')	重复单元	产物长度/bp	退火温度/℃
SSR7	ROX	TCATGCATCGCACATGTCAC/AATGTAACCGGTCGCTCCAG	(GGA)5	181	52.0
SSR15	FAM	GACGCCCAAACAGCCAATTT/TGGAAAGGTTGAGCTTCGGG	(CCT)5	247	52.0
SSR20	TAMRA	ACAAGTTGGCCCTGTTGTCA/CATTCGATCACTCGGTCCGT	(TCT)5	115	53.2
SSR32	TAMRA	CCAGTCGTTCCGTTCCATCA/CTGCTGCACTTGTTCCTAAC	(TTC)5	165	52.2
SSR85	TAMRA	TCAACACAAGTGTCAATTTCCAAT/ATGGCCCATCAAGGTTGGT	(TTA)6	108	52.6
SSR96	TAMRA	CCGGCCTACAACAAAGGTCT/AACTGTTGCAGCGACCATG	(GGT)5	154	52.0
SSR115	FAM	ATTCTGATCGGCGAAGGAGG/ATTTGCAAGGCGGTCAGAGA	(GGC)5	235	49.0
SSR138	ROX	TCACGAGAGAGGAGGGAGAA/CTCCTTGCAGATCATGGTGT	(CAA)5	211	52.0
SSR142	ROX	TGTCAGTTGATGGGCTTCGG/TGGTTGCAAGTACAGTTGGT	(CCA)5	174	53.0
SSR147	FAM	CCAAACAGCAGCTCAAGCAG/TTCGGTTTCGAGATTGGGGG	(CCG)5	248	52.8
SSR198	FAM	TCAGGGAATAAACCTCCGCC/ACTTGCTATCCTTGGGGCTT	(ATC)5	223	51.7
SSR203	ROX	ACGTGAGCAGTCTCCTACT/GACATGCCCACTTCTCCCAA	(GAG)5	204	52.0
SSR220	FAM	ACTGGTGTCACTTGTGTGCA/GCTGGGCTCCCATCATTTCA	(GAT)5	225	51.0
SSR221	HEX	ATCTTGAGCTGCGTGTGCGAA/CTCATCCACGCCTTCTCCTC	(TTG)5	254	52.2
SSR253	HEX	CGCCCGTGCAATTTCAAGTT/GCAAGTTGGCAACTCCACAG	(AAT)5	277	52.4

### 1.4 数据统计分析与分子身份证构建

利用 Gene mapper 4.1 软件整理分析 EST-SSR 荧光标记的毛细管电泳数据, 根据每个引物对每个样品扩增后有无峰, 转化成 0/1 格式的二元矩阵, 无信号或数据缺失赋值“2”。利用 POPgene 1.32 计算观测等位基因数 ( $N_a$ ), 有效等位基因数 ( $N_e$ ), Nei's 基因遗传多样性指数 ( $H$ ), Shannon's 指数 ( $I_n$ ) 和多态性信息量 (PIC)。使用 NTsys2.10e 计算石蒜属亲本及杂交种的 Nei's 遗传距离和 SM 遗传相似系数, 并用非加权组平均法 (UPGMA) 进行聚类分析。

参照徐雷峰等<sup>[14]</sup>方法将获得的荧光标记 EST-SSR 多态性数据转换为数字 (1~9) 表示, 当基因型数大于 9 时, 用小写字母 (a、b、c、...) 依次表示, 无带用 0 表示。按照引物扩增带型数由少到多的顺序, 记录各样品在 15 对引物上的扩增带型数据, 通过个位数字或小写字母编码构建各杂交种的分子身份证。

## 2 结果与分析

### 2.1 亲本特异型 EST-SSR 引物的筛选

荧光毛细管电泳检测发现: 15 对引物在 25 个样品中均能获得大小精确的 DNA 片段, 筛选其中具有种内一致性且种间多态性的 4 对引物。由表 2 可知: SSR203 和 SSR15 在 3 个亲本中均能得到特征条带, SSR32 可在石蒜和中国石蒜中得到特征条带, SSR198 可在石蒜和换锦花中得到特征条带。因此 SSR203、SSR115 和 SSR198 用来鉴定石蒜-换锦花杂交种 (包括正交和反交) 的真实性, SSR203、

表 2 4 个荧光标记 EST-SSR 引物在石蒜属亲本上的特征条带

Table 2 Characteristic bands of 4 fluorescent labeled EST-SSR primers on the parents of *Lycoris*

引物	条带长度/bp		
	换锦花	石蒜	中国石蒜
SSR203	204	189	195
SSR115	226	230	228
SSR32		175	169
SSR198	228	221	

SSR115 和 SSR32 可鉴定石蒜-中国石蒜杂交种的真实性。

## 2.2 杂交种 F<sub>1</sub> 代的鉴定

利用 SSR203、SSR115 和 SSR198 对 27 个石蒜-换锦花杂交种 F<sub>1</sub> 代进行鉴定。由表 3 可知：SSR203 从石蒜-换锦花杂交 F<sub>1</sub> 后代群体中鉴定到 88.46% 的真实杂交种，其中具有双亲特征条带 (189/204 bp) 的占 69.23%，出现特异条带的有 19.23%；SSR115 从石蒜-换锦花杂交种 F<sub>1</sub> 群体中鉴定到 84.61% 的真实杂交种，其中具有双亲特征条带的占 53.85%，出现特异条带的占 30.77%；SSR198 只鉴定到 53.85% 的真实杂交种。分别利用 SSR203+SSR115、SSR203+SSR115+SSR198 进行多重 PCR，从石蒜-换锦花正反交 F<sub>1</sub> 杂交群体中均鉴定到 96.30% 的真实杂交种，大于 SSR203+SSR198 (88.89%) 和 SSR115+SSR198 (88.89%) 组合的鉴定结果。因此采用 SSR203+SSR115 和 SSR203+SSR115+SSR198 可以早期鉴定石蒜-换锦花杂交种 F<sub>1</sub> 的真实性。

同样，利用引物 SSR203、SSR115 和 SSR32 对石蒜-中国石蒜杂交种 F<sub>1</sub> 进行鉴定。SSR203 鉴定石蒜-中国石蒜杂交种 F<sub>1</sub> 的真实杂交种占 80.77%，其中具有双亲特征条带 (175/169 bp) 的占 42.31%，具变异条带的有 38.46%；SSR115 和 SSR32 鉴定石蒜-中国石蒜杂交种 F<sub>1</sub> 群体的真实性分别为 50.00% 和 69.23%。采用 SSR203+SSR115、SSR203+SSR32 和 SSR203+SSR115+SSR32 多重 PCR 扩增，石蒜-中国石蒜杂交种 F<sub>1</sub> 群体的真实杂交种鉴定效率均达 96.15%，高于 SSR115+SSR32 鉴定效率 (76.92%)。因此可用 SSR203+SSR115、SSR203+SSR32 和 SSR203+SSR115+SSR32 对石蒜和中国石蒜杂交种真实性进行鉴定。

为节省成本，缩短育种周期和减少工作量，本研究采用 SSR203+SSR115 对石蒜-换锦花、石蒜-中国石蒜杂交种 F<sub>1</sub> 代进行早期鉴定。

表 3 EST-SSR 引物对石蒜属种间杂交种鉴定

Table 3 Identification of interspecific hybridization of *Lycoris* by EST-SSR primers

引物	石蒜-换锦花杂交种的真实鉴定率/%	引物编号	石蒜-中国石蒜杂交种的真实鉴定率/%
SSR203	88.46	SSR203	80.77
SSR115	84.61	SSR115	50.00
SSR198	53.85	SSR32	69.23
SSR203+SSR115	96.30	SSR203+SSR115	96.15
SSR203+SSR198	88.89	SSR203+SSR32	96.15
SSR115+SSR198	88.89	SSR115+SSR32	76.92
SSR203+SSR115+SSR198	96.30	SSR203+SSR115+SSR32	96.15

## 2.3 杂交种遗传多样性分析

2.3.1 引物多态性分析 筛选出的 15 对荧光标记 EST-SSR 引物在 78 个样品中扩增效果较好 (表 4)，共得到扩增条带 92 条，扩增条带最多的是 SSR32 (10 条)，最少的是 SSR21 (2 条)，平均 6.13 条。多态性信息量 (PIC) 为 0.6923~1.0000，其中 SSR253 最小 (0.6923)，SSR20 和 SSR142 最高 (1.0000)，平均为 0.9137。所有 PIC 值均大于 0.5000，说明均为高多态性引物，可反映杂交种间遗传差异和遗传多样性。

2.3.2 石蒜属种间杂交种的遗传多样性分析 以 15 对荧光标记 EST-SSR 标记扩增结果计算遗传相似系数并进行 UPGMA 聚类分析。由图 1 可知：各样品遗传相似系数为 0.76~0.98，在相似系数为 0.77 处 25 个亲本和 53 个杂交种聚为 I 和 II 两大类，I 类主要为换锦花、石蒜-换锦花杂交种，但包含了 58、60、61、64 和 66 等石蒜-中国石蒜杂交种，且与石蒜-换锦花杂交种聚在一起，推测 5 个杂交种的母本可能是石蒜。II 类包括 II a (石蒜)、II c (中国石蒜)、II b (中国石蒜-石蒜杂交种) 等 3 个亚类，说明本研究所用的 15 对荧光标记 EST-SSR 可用作石蒜、中国石蒜、换锦花及种间杂交种的早期鉴定。

## 2.4 种间杂交种 F<sub>1</sub> 的分子身份证编码

由表 5 可知：15 对荧光标记 EST-SSR 引物扩增各样品，共得到 153 种带型，平均每条扩增 10.2 带型，其中 SSR221 扩增带型最少 (2 种)，SSR32 扩增带型最多 (30 种)。根据表 4 对 15 对荧光标记 EST-SSR 引物扩增得到的基因型或带型赋值并排序，以此对各样品的扩增情况编码分子身份证，扩增条带位置相同则编码符号相同，说明基因型相同。由表 6 可知：各亲本和各杂交种均具有唯一的分子身份证，15 对荧光标记 EST-SSR 引物可有效鉴别石蒜属亲本和种间杂交种。

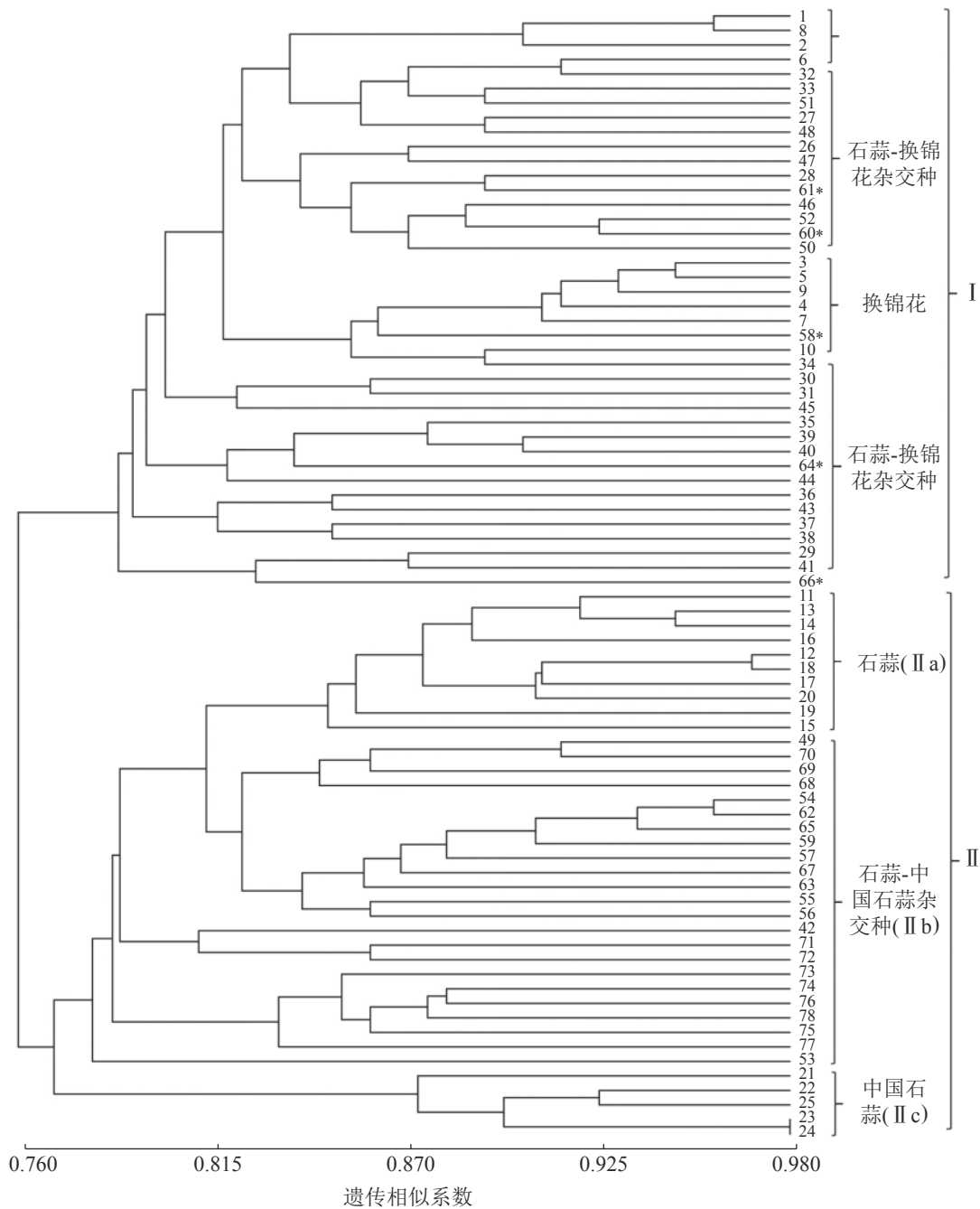


图1 基于荧光标记 EST-SSR 的石蒜属亲本和杂交种的聚类图

Figure 1 Cluster diagram of *Lycoris* parents and hybrids based on EST-SSR

### 3 结论与讨论

SSR 荧光标记在毛白杨 *Populus tomentosa*<sup>[17]</sup> 和建兰 *Cymbidium ensifolium*<sup>[18]</sup> 等核心种质构建、落花生<sup>[12]</sup> 和山茶属 *Camellia* 植物<sup>[19]</sup> 等分子身份证构建以及三叶青 *Tetrastigma hemsleyanum*<sup>[20]</sup>、杂交兰<sup>[21]</sup> 等种质资源遗传多样性研究中得到验证。本研究表明：利用荧光标记 EST-SSR 检测石蒜属各亲本及杂交种的真实性、分析其间遗传关系，精准高效，结果可靠。

本研究利用 15 对荧光标记 EST-SSR 引物从石蒜、中国石蒜、换锦花和种间杂交种共 78 个样品中扩增到 92 个条带，平均每对引物 6.13 条；15 对 ESR-SSR 引物多态性信息量均大于 0.5000，平均为 0.9137，较好地反映了杂交种间的遗传差异和遗传多样性，与茶 *Camellia sinensis*<sup>[22]</sup>、百合<sup>[14, 23]</sup> 等的研究结果类似。利用荧光标记 EST-SSR 引物鉴定石蒜-换锦花、石蒜-中国石蒜杂交种 F<sub>1</sub> 代，发现 SSR203+SSR115

表 4 EST-SSR 引物扩增条带的等位基因数和多态性信息量

Table 4 Number of alleles and polymorphism information of 15 EST-SSR primers

引物	Na	Ne	H	I <sub>n</sub>	PIC	扩增条带/条	引物	Na	Ne	H	I <sub>n</sub>	PIC	扩增条带/条
SSR7	1.974 4	1.291 4	0.218 1	0.369 4	0.974 4	6	SSR142	2.000 0	1.270 5	0.210 7	0.364 2	1.000 0	8
SSR15	1.833 3	1.167 7	0.136 8	0.250 2	0.833 3	7	SSR147	1.987 2	1.678 3	0.387 6	0.570 2	0.987 2	3
SSR20	2.000 0	1.382 5	0.273 1	0.440 4	1.000 0	5	SSR198	1.782 1	1.203 0	0.156 8	0.273 1	0.782 1	6
SSR32	1.987 2	1.193 0	0.159 5	0.293 1	0.987 2	10	SSR203	1.974 4	1.378 7	0.264 2	0.426 8	0.974 4	5
SSR85	1.897 4	1.212 6	0.168 0	0.298 0	0.897 4	6	SSR220	1.974 4	1.294 5	0.219 9	0.371 7	0.974 4	6
SSR96	1.871 8	1.082 1	0.259 2	0.409 8	0.871 8	5	SSR221	1.910 3	1.643 6	0.377 0	0.550 5	0.910 3	2
SSR115	1.846 2	0.214 9	0.167 3	0.292 0	0.846 2	7	SSR253	1.692 3	1.096 4	0.083 7	0.164 6	0.692 3	9
SSR138	1.974 4	1.252 8	0.196 0	0.340 9	0.974 4	7	平均	1.913 7	1.224 1	0.218 5	0.361 0	0.913 7	6.13

表 5 15 对荧光标记 EST-SSR 引物在亲本及杂交种 F<sub>1</sub> 上的扩增带型

Table 5 Amplification patterns of 15 pairs of fluorescent labeled EST-SSR primers on parents and hybrid F<sub>1</sub>

基因型数	SSR15	SSR253	SSR138	SSR32	SSR20	SSR142	SSR198	SSR85	SSR147	SSR7	SSR220	SSR221	SSR96	SSR203	SSR115
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	241	263/268	202	166/172	116	247	220/228	83/105	245	173/188	224	249/255	149/154	189	226
2	241/244	269	202/206	166/175	117/120	247/253	221	89/94	245/248	182	224/228	255	151	189/195	226/228
3	242	272/277	202/209	166/181	118	247/254	221/228	100	245/251	182/185	224/234		151/154	189/204	226/230
4	242/250	274	206	166/188	118/121	247/256	221/230	107/110	248	182/188	224/237		151/156	195	226/231
5	244	274/277	206/209	169	171/120	247/259	222/228	108	251	185/188	224/244		151/157	195/204	226/242
6	244/246	274/279	206/212	169/172	121	247/260	228	108/110		188	228		154	201/207	227/231
7	244/250	277	206/215	169/175		247/262	229	110		191	228/237		154/156	204	228
8	245	277/279	206/218	169/178		247/267	230			203	237		154/157	207	228/230
9	246/254	278	209	169/188		247/270					238/244		156		230
a	248	279	209/215	169/191		270							157		230/242
b	250	291	209/212	169/194											231
c	250/254		212	172											237
d	254		212/215	172/175											
e			215	172/178											
f			215/221	172/181											
g				172/191											
h				175											
i				175/178											
j				175/188											
k				175/191											
l				175/194											
m				178											
n				178/185											
o				178/188											
p				178/191											
q				185											
r				185/188											
s				188											
t				188/191											
u				188/194											

说明：基因型数用1~9表示，大于9时用小写字母依次表示，0表示无条带；-表示没有带型

等引物对杂交种鉴定的真实性分别达 96.30% 和 96.15%，与 SSR203+SSR115+SSR198 和 SSR203+SSR115+SSR32 等引物鉴定结果相同，因此用 SSR203+SSR115 引物对石蒜-换锦花、石蒜-中国石蒜杂交种 F<sub>1</sub> 进行鉴定，可大大缩短育种周期，减少工作量并节约成本。

分子身份证构建以 DNA 指纹图谱为基础，是识别种质资源的标志，可以更加简单明了地识别和检

表6 石蒜、中国石蒜、换锦花及种间杂交种分子身份证代码

Table 6 Molecular ID codes of parent *L. radiata*, *L. chinensis*, *L. sprengeri* and interspecific hybrids

编号	亲本	编号	石蒜-换锦花杂交种	编号	中国石蒜-石蒜杂交种
1	6aek3267522161a	26	574n37053312833	53	eb8m31013242120
2	5a4e3467331131a	27	57fi43053412330	54	50b74177124232a
3	7a7k32a7542231a	28	5b4p44653312423	55	a1b737063342300
4	7a7k4267342131a	29	525q4177023230a	56	82b73777335234b
5	2ad14467322241a	30	57bi42363321b43	57	3b7i31071341310
6	7adj4767521131a	31	57bn44051211040	58	544c61051342541
7	ca423767321171a	32	57fi43351312433	59	104737671642328
8	ca4e3467531231a	33	5bbi44161212031	60	507764053212633
9	77fi6467536271a	34	507u42365212b33	61	5b4344053212431
10	5afi3267332271a	35	505662663222733	62	50b737771342328
		36	74d427353232333	63	02dc42771342728
11	53am25451212a71	37	52aa22051212252	64	52bf2277335283b
12	537m45451212a71	38	57bt22353212336	65	e07741771342328
13	54ap62251312b71	39	5bbf21353222833	66	2a838703252738
14	542p61451212b71	40	5bbh63361222633	67	0bfc3a77327232a
15	543u63251312b71	41	525841061252275	68	70f731a3367272a
16	55a243251312a71	42	fafg42b53322314	69	d0ek34a73312728
17	50ao63251312871	43	566421b61212734	70	d0d743a7122261c
18	57a225a51212a71	44	0abs17765222533	71	50bd4346326262c
19	557t22251312b71	45	5afu4216122208d	72	00c047a03262328
20	5ae442251312b71	46	075k64653212333	73	00bi33703562080
		47	0bbt35353312833	74	5b4r47703312060
21	e00d31062022040	48	50bm43353112334	75	1bfl44704312060
22	00053a042082047	49	40f743a73242738	76	0cf747005312080
23	0015380717a2247	50	504d24251212733	77	8b6d42703572060
24	0015380417a2247	51	50bi41851222433	78	5bb641771342080
25	00c531001682247	52	504l44b53212634		

说明：1~10为换锦花；11~20为石蒜；21~25为中国石蒜；26~52为石蒜-换锦花杂交种；53~78为石蒜-中国石蒜杂交种

索种质资源<sup>[24]</sup>。本研究利用 15 对荧光标记 EST-SSR 引物共扩增出 92 个条多态性条带，153 种带型，按照统计方便、书写简洁、字符串长短适中、易于检索及充分利用引物的原则，采用基因型赋值编码法<sup>[14]</sup>对石蒜属亲本和杂交种单一位点带型或杂合带型进行编码，构建石蒜属植物亲本和杂交种的分子身份证，较好地地区分了 78 份石蒜属植物材料，说明该方法适用于石蒜属植物的鉴定。

以 RAPD、ISSR 和 SCoT 等分子标记技术分析石蒜属植物种质资源的遗传多样性，建立遗传距离和遗传相似系数矩阵，构建相应分子树状图和指纹图谱<sup>[2, 25-26]</sup>，其目的主要是为了杂交种的亲本配制、野生资源的高效利用等。本研究利用 15 对荧光标记 EST-SSR 引物扩增了 78 个石蒜属植物的遗传物质，发现各样本遗传相似系数为 0.76~0.98；UPGMA 聚类分析发现：相似系数为 0.77 时，25 个亲本和 53 个杂交种聚为两大类，I 类包括亲本换锦花、石蒜-换锦花的杂交种，II 类又分为 II a、II b 和 II c 等 3 个亚类，包括石蒜、中国石蒜-石蒜杂交种和中国石蒜，说明 15 对荧光标记 EST-SSR 可将石蒜、中国石蒜、换锦花及种间杂交种有效聚类，结合杂交种的遗传多样性认为：荧光标记 EST-SSR 可有效鉴定石蒜属杂交种 F<sub>1</sub>，并厘清其间的遗传关系。

#### 4 参考文献

[1] 裴鉴, 丁志遵. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 16-27.

- PEI Jian, DING Zhizun. *Flora of China* [M]. Beijing: Science Press, 1985: 16 – 27.
- [2] 张露, 蔡友铭, 诸葛强, 等. 石蒜属种间亲缘关系 RAPD 分析[J]. 遗传学报, 2002, **29**(10): 915 – 921.  
ZHANG Lu, CAI Youming, ZHUGE Qiang, *et al.* Analysis of the Inter-species relationships on *Lycoris* (Amaryllidaceae) by use of RAPD [J]. *Acta Genet Sin*, 2002, **29**(10): 915 – 921.
- [3] 袁菊红. 石蒜属化学成分及其提取、检测方法研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2010, **38**(2): 684 – 686, 692.  
YUAN Juhong. Research advances on the chemical constituents of *Lycoris* and their extraction and detection methods [J]. *J Anhui Agri Sci*, 2010, **38**(2): 684 – 686, 692.
- [4] 张成华, 朱庆均, 田景振. 石蒜应用研究现状[J]. *食品与药品*, 2017, **19**(4): 298 – 301.  
ZHANG Chenghua, ZHU Qingjun, TIAN Jingzhen. Progress in chemical constituents, bioactivities and clinical application of *Lycoris radiate* [J]. *Food Drug*, 2017, **19**(4): 298 – 301.
- [5] 刘程宏, 董亚南, 韩燕丽, 等. 谷子分子标记研究与应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, **12**(3): 1002 – 1008.  
LIU Chenghong, DONG Yanan, HAN Yanli, *et al.* Research and application of molecular markers in millet [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, **12**(3): 1002 – 1008.
- [6] 吴晓雯, 王铁杆, 刘颖, 等. DNA 分子标记技术在坛紫菜 (*Pyropia haitanensis*) 中的应用[J]. 渔业研究, 2020, **42**(3): 281 – 287.  
WU Xiaowen, WANG Tiegang, LIU Ying, *et al.* Application of DNA molecular marker technology in *Pyropia haitanensis* [J]. *J Fisheries Res*, 2020, **42**(3): 281 – 287.
- [7] GARCIA-LOR A, CURK F, SNOUSSI-TRIFA H, *et al.* A nuclear phylogenetic analysis: SNPs, indels and SSRs deliver new insights into the relationships in the ‘true citrus fruit trees’ group (Citrinae, Rutaceae) and the origin of cultivated species [J]. *Ann Bot*, 2013, **111**(1): 1 – 19.
- [8] 叶新如, 刘建汀, 李永平, 等. 基于 EST-SSR 标记的 MCID 法鉴定冬瓜种质资源[J]. *核农学报*, 2021, **35**(4): 780 – 788.  
YE Xinru, LIU Jianting, LI Yongping, *et al.* Identification of wax gourd by using EST-SSR markers bated MCID method [J]. *J Nucl Agric Sci*, 2021, **35**(4): 780 – 788.
- [9] 赵尚敏, 李晓东, 付增娟, 等. 基于 SSR 标记的甜菜种质资源遗传多样性及群体结构分析[J]. *北方农业学报*, 2021, **49**(1): 1 – 9.  
ZHAO Shangmin, LI Xiaodong, FU Zengjuan, *et al.* Analysis of genetic diversity and population structure of sugarbeet germplasm resources by SSR markers [J]. *J Northern Agric*, 2021, **49**(1): 1 – 9.
- [10] SAHOO A, BEHURA S, SINGH S, *et al.* EST-SSR marker-based genetic diversity and population structure analysis of Indian *Curcuma* species: significance for conservation [J]. *Braz J Bot*, 2021, **44**: 411 – 428.
- [11] 胡文舜, 邓朝军, 许奇志, 等. 19 个枇杷杂交新品种 (系) 的 SSR 鉴定和指纹图谱构建[J]. *热带亚热带植物学报*, 2020, **28**(2): 153 – 162.  
HU Wenshun, DENG Chaojun, XU Qizhi, *et al.* Identification and fingerprint construction of 19 new hybrid varieties (lines) of loquat by SSR [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2020, **28**(2): 153 – 162.
- [12] 李双铃, 王辉, 任艳, 等. 利用荧光标记 SSR 技术鉴定花生 F<sub>1</sub> 代杂交种[J]. *花生学报*, 2009, **38**(4): 35 – 38.  
LI Shuangling, WANG Hui, REN Yan, *et al.* Identification of peanut hybrids using SSR marker with fluorescence labeled M<sup>13</sup>-tailed primer [J]. *J Peanut Sci*, 2009, **38**(4): 35 – 38.
- [13] 张露, 王继华, 解玮佳, 等. 基于系谱和 SSR 标记的高山杜鹃杂交种亲缘关系分析[J]. *西北植物学报*, 2016, **36**(12): 2421 – 2432.  
ZHANG Lu, WANG Jihua, XIE Weijia, *et al.* Ancestor parents speculation for Alpine *Rhododendron* hybrids based on the pedigree and SSR markers [J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2016, **36**(12): 2421 – 2432.
- [14] 徐雷锋, 葛亮, 袁素霞, 等. 利用荧光标记 SSR 构建百合种质资源分子身份证[J]. *园艺学报*, 2014, **41**(10): 2055 – 2064.  
XU Leifeng, GE Liang, YUAN Suxia, *et al.* Using the fluorescent labeled SSR markers to establish molecular identity of lily germplasms [J]. *Acta Horti Sin*, 2014, **41**(10): 2055 – 2064.
- [15] 丁力, 申方群, 黄红梅, 等. 芒种内 F<sub>1</sub> 杂交种的配制及杂种真实性的分子鉴定[J]. *中国草地学报*, 2015, **37**(2): 55 – 59, 82.  
DING Li, SHEN Fangqun, HUANG Hongmei, *et al.* Making up Intraspecific F<sub>1</sub> hybrids among *Miscanthus sinensis* and



- identification of hybrid realness by SSR markers [J]. *Chin J Grassland*, 2015, **37**(2): 55 – 59,82.
- [16] 石艳, 童再康, 高燕会. 换锦花 EST-SSR 标记开发及遗传多样性分析[J]. *核农学报*, 2018, **32**(6): 1089 – 1096.  
SHI Yan, TONG Zaikang, GAO Yanhui. Development of EST-SSR markers and genetic diversity analysis in *Lycoris sprengeri* [J]. *J Nucl Agric Sci*, 2018, **32**(6): 1089 – 1096.
- [17] 毛秀红, 朱士利, 李善文, 等. 基于荧光 SSR 标记的毛白杨核心种质构建[J]. *北京林业大学学报*, 2020, **42**(7): 40 – 47.  
MAO Xiuhong, ZHU Shili, LI Shanwen, et al. Core germplasm construction of *Populus tomentosa* based on the fluorescent SSR markers [J]. *J Beijing For Univ*, 2020, **42**(7): 40 – 47.
- [18] 艾叶, 陈璐, 谢泰祥, 等. 基于 SSR 荧光标记构建建兰品种核心种质[J]. *园艺学报*, 2019, **46**(10): 1999 – 2008.  
AI Ye, CHEN Lu, XIE Taixiang, et al. Construction of core collection of *Cymbidium ensifolium* cultivars based on SSR fluorescent markers [J]. *Acta Horti Sin*, 2019, **46**(10): 1999 – 2008.
- [19] 陶乃奇, 张斌, 刘信凯, 等. 利用荧光标记 SSR 鉴别 21 个茶花新品种[J]. *植物学报*, 2019, **54**(1): 37 – 45.  
TAO Naiqi, ZHANG Bin, LIU Xinkai, et al. Identification of 21 new *Camellia* hybrid varieties by fluorescence-labelled simple sequence repeat markers [J]. *Chin Bull Bot*, 2019, **54**(1): 37 – 45.
- [20] 尹明华, 徐文慧, 谢妮妮, 等. 三叶青种质资源遗传多样性的 SSR 荧光标记分析[J]. *中草药*, 2018, **49**(23): 5649 – 5656.  
YIN Minghua, XU Wenhui, XIE Nini, et al. Genetic diversity analysis of *Tetrastigma hemsleyanum* germplasm resources based on fluorescently labeled SSR markers [J]. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 2018, **49**(23): 5649 – 5656.
- [21] 钟淮钦, 林榕燕, 林兵, 等. 杂交兰转录组 SSR 信息分析及 EST-SSR 标记开发应用[J]. *中国细胞生物学学报*, 2020, **42**(2): 286 – 295.  
ZHONG Huaiqin, LIN Rongyan, LIN Bing, et al. Analysis on SSR information in transcriptome and development of EST-SSR markers for hybrid *Cymbidium* [J]. *Chin J Cell Biol*, 2020, **42**(2): 286 – 295.
- [22] 杨军, 孔祥瑞, 王让剑, 等. 基于 EST-SSR 荧光标记和毛细管电泳检测技术分析邵武碎铜茶群体遗传多样性与亲缘关系研究[J]. *茶叶学报*, 2019, **60**(4): 137 – 143.  
YANG Jun, KONG Xiangrui, WANG Rangjian, et al. Genetic diversity and relationship of Shaowu Suitong teas determined by calillary electrophoresis using fluorescent EST-SSR markers [J]. *Acta Tea Sin*, 2019, **60**(4): 137 – 143.
- [23] 陈庭见智, 袁文斌, 吴景芝, 等. 基于 SSR 分子标记的紫斑百合和栽培百合亲缘关系研究[J]. *南方农业学报*, 2019, **50**(12): 647 – 2655.  
CHEN Tingjianzhi, YUAN Wenbin, WU Jingzhi, et al. Phylogenetic relationship between *Lilium nepalense* and cultivated lilies based on SSR molecular markers [J]. *J Southern Agric*, 2019, **50**(12): 647 – 2655.
- [24] 李慧峰, 王涛, 冉昆. 利用 SSR 荧光标记构建 41 份山东省苹果资源分子身份证[J]. *沈阳农业大学学报*, 2020, **51**(1): 70 – 77.  
LI Huifeng, WANG Tao, RAN Kun. Using the fluorescent labeled ssr markers to establish the molecular identity of 41 *Malus* germplasms in Shandong Province [J]. *J Shenyang Agric Univ*, 2020, **51**(1): 70 – 77.
- [25] 邓传良, 周坚, 卢龙斗, 等. 长筒石蒜种质资源的 RAPD 及 ISSR 研究[J]. *云南植物研究*, 2006, **28**(3): 300 – 304.  
DENG Chuanliang, ZHOU Jian, LU Longdou, et al. Study on germplasm resources of *Lycoris longituba* (Amaryllidaceae) by RAPD and ISSR [J]. *Acta Bot Yunnan*, 2006, **28**(3): 300 – 304.
- [26] GAO Yanhui, ZHU Yuqiu, TONG Zaikang, et al. Analysis of genetic diversity and relationships among genus *Lycoris* based on start codon targeted (SCoT) marker [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2014, **57**: 221 – 226.