

芒果 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 、EMS 诱变及 SC-SSR 分子标记遗传多样性分析

张月华¹, 王 军², 杨永利³, 马小卫¹, 潘宏兵^{3*}

1. 中国热带农业科学院南亚热带作物研究所, 广东湛江 524000; 2. 凉山彝族自治州林业草原科学研究院, 四川西昌 615000; 3. 攀枝花市农林科学研究院, 四川攀枝花 617061

摘 要: 诱变育种是短时间内增加物种遗传多样性和表型变异的最有效方法之一。为探明诱变创制芒果突变体基因库可行性, 本研究以凯特芒果为试验材料, 通过 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线辐射枝条和 EMS 溶液浸泡种子创制诱变群体材料, 利用 SC-SSR 分子标记进行遗传多样性分析。结果表明: $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线辐射半致死剂量为 31.37 Gy, 0.2% EMS 溶液浸泡半致死时间为 5.9 h; 利用 16 对 SC-SSR 引物分析 100 份诱变材料和 1 份凯特材料的遗传多样性, 共检测出 117 个多态性位点, 引物多态性条带百分比、多态性信息含量 (PIC)、观测等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、Nei's 基因多样性指数 (H) 和 Shannon's 信息指数 (I) 平均值分别为 93.18%、0.610、1.923、1.583、0.334 和 0.493; 试验材料间遗传相似系数在 0.373~0.984 之间, 平均为 0.779。诱变增加了芒果遗传信息, 其中 EMS 诱变种子变异更大, 本研究结果为芒果诱变育种提供了理论依据。

关键词: 芒果; $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线辐射; EMS 诱变; SC-SSR 分子标记

中图分类号: S667.7 文献标志码: A

Genetic Diversity Analysis of SC-SSR Molecular Markers in Mango Irradiated by $^{60}\text{Co-}\gamma$ and EMS Mutagenesis

ZHANG Yuehua¹, WANG Jun², YANG Yongli³, MA Xiaowei¹, PAN Hongbing^{3*}

1. South Subtropical Crops Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang, Guangdong 524000, China; 2. Forestry and Grassland Research Institute of Liangshan Yi Autonomous Prefecture, Xichang, Sichuan 615000, China; 3. Agricultural and Forestry Research Institute of Panzhihua, Panzhihua, Sichuan 617061, China

Abstract: Mutation breeding is one of the most promising approaches for increasing genetic and phenotypic variability in a short period of time. In order to explore the feasibility of creating a mango mutant gene library through mutagenesis. The study used Keitt mango as test materials, irradiated branches with $^{60}\text{Co-}\gamma$ ray and soaked seeds in EMS solution to create a mutagenesis population, and analyzed the Genetic diversity by SC-SSR molecular markers. The results indicated that the semi-lethal dose of $^{60}\text{Co-}\gamma$ ray radiation is 31.37 Gy, and the semi-lethal time of immersion in 0.2% EMS solution is 5.9 hours. The genetic diversity of 100 mutagenized materials and Keitt material was analyzed through 16 pairs of SC-SSR primers, and a total of 117 polymorphic sites were detected. The average values of sexual locus, primer percentage of polymorphism bands, polymorphism information content (PIC), number of observed alleles (N_a), number of effective alleles (N_e), Nei's gene diversity index (H) and Shannon's information index (I) were 93.18%, 0.610, 1.923, 1.583, 0.334 and 0.493, respectively. The genetic similarity coefficient among test materials ranged from 0.373 to 0.984, with an average of 0.779. The study indicated that mutagenesis significantly enhanced genetic diversity in mango, among which EMS mutagenesis seed variation was greater, and the results lay a solid theoretical foundation for mango mutation breeding.

Keywords: mango; $^{60}\text{Co-}\gamma$ radiation mutation breeding; EMS mutagenesis; SC-SSR molecular marker

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.09.004

收稿日期 2023-10-22; 修回日期 2023-12-07

基金项目 广东省自然科学基金项目 (No. 2021A1515010966); 四川省作物及禽畜育种公关项目 (No. 2021YFyZ0023); 岭南特色水果新品种区域示范及推广项目 (No. 440000220000000035430)。

作者简介 张月华 (1995—), 女, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 果树育种与栽培。*通信作者 (Corresponding author): 潘宏兵 (PAN Hongbing), E-mail: 94168621@qq.com。

芒果果实成熟时, 风味浓郁、果肉色泽金黄且多汁, 素有“热带水果之王”之美誉。我国芒果种植面积位居世界第二位^[1], 根据农业农村部南亚办统计数据, 2021 年全国芒果种植面积约 37.46 万 hm^2 , 产量 395.80 万 t ^[2]。芒果起源于印度和东南亚, 目前我国芒果栽培品种如凯特、圣心、澳芒、帕拉英达、金白花主要来源于美国、澳大利亚、缅甸、泰国等国家。自 20 世纪 60 年代起, 国内芒果育种专家主要通过实生和杂交育种的方式来选种, 已筛选出桂香芒、红象牙、台农 1 号、金煌、贵妃、粤西 1 号、热农 2 号、攀西红芒、攀育 2 号、景东晚芒、云热-5007 等新品种^[3-5]。由于通过传统的人工杂交授粉方法工作量大, 且结实率低, 目前芒果新品种的选育仍是通过农家品种筛选和实生选种。自主知识产权的优良品种缺乏是影响我国芒果产业健康发展的主要问题之一, 想要选育出能适应多个优势产区大面积推广种植的新品种还需较长时间。

诱变作为一种创造新种质、选育新品种的实用性技术, 具有变异类型丰富、变异率高、育种周期短等优势^[6], 被广泛应用于果树育种改良, 常见诱变技术包括 γ 射线、中子、离子束、航天、EMS、 NaN_3 诱变, 目前成功选育出柑橘、苹果、梨、葡萄、山楂等新品种(系)^[7-9]。国外 1960 年首次报道了芒果诱变育种研究, 并且开展了相关诱变剂量筛选研究^[10]。RIME 等^[11]分析 Arka Puneet 芒果的 EMS 诱变群体, 筛选出浓度 0.8% EMS 诱变芒果矮化效果最好, 育成矮化突变体新材料 R8P12。SAÚCO 等^[12]首次发现并报道了 Gomera-1 芒果芽变四倍体。国内广西亚热带作物研究所用 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐射芒果种子、枝条, 均未获得优良变异材料^[3]。黄镜浩等^[13]用秋水仙碱处理芒果茎尖, 发现细胞加倍效果不明显。近年, 本课题组分别用浓度 0.2% EMS 和秋水仙碱处理凯特芒果胎萌种子, 筛选出抗畸形病单株和同源四倍体单株。分子标记具有操作简便、效率高、重复性好等特点, 已成为植物基因组 DNA 研究的重要手段, 其中 SSR、AFLP、ISSR、SRAP、SCoT、SNP 等分子标记, 已被广泛应用于芒果遗传多样性分析、指纹图谱构建、遗传图谱构建、杂交子代鉴定等研究^[14-19]。采用分子标记对诱变材料进行评价, 有利于筛选出适合某种植物的最佳诱变育种方法和技术, 进一步提高诱变效率。SC-SSR^[20]是近年基于 SCoT 和 ISSR 分子标记技

术开发的起始密码子-微卫星扩增多态性分子标记, 能将标记位点与表达序列紧密联系, 同时具有较高扩增多态性, 已被应用于猕猴桃^[21]种质资源遗传多样性分析和指纹图谱构建。芒果 SC-SSR 分子标记反应体系已建立优化^[22]。本研究以凯特芒果为材料, 通过 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐射和 EMS 溶液浸泡创制诱变群体材料, 再用 SC-SSR 分子标记分析诱变群体遗传变异, 为芒果诱变育种实践提供理论依据, 便于加快创制芒果突变体育种新材料。

1 材料与方法

1.1 材料

选用凯特芒果枝条和种子为试材, 供试凯特芒果种植于四川省攀枝花市农林科学研究院芒果科技示范园。

1.2 方法

1.2.1 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐射诱变 2021 年 4 月, 选取直径为 1.5~2.0 cm 的 2 年生芒果枝条 10 个, 在中部密集芽上 1.0 cm 处短截, 分别在 0、3、6、9、12、15 d 调查剪口饱满芽、裂纹芽数量, 确定辐射枝条短截预处理时间。同年 5 月, 剪取长 9 cm 的短截预处理辐射接穗, 送至云南华源核辐射技术有限公司进行 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐射诱变, 辐射剂量设 0、10、20、30、40、50、60 Gy 共 7 个处理, 剂量率为 1 Gy/min。每处理接穗 40 个, 重复 3 次。辐射处理后, 所有接穗均嫁接于 3 年生缅甸 8 号苗砧木, 60 d 后调查成活率。相对成活率=(辐射接穗成活率/对照接穗成活率) $\times 100\%$ 。根据接穗的不同辐射剂量对应的相对成活率, 拟合直线回归方程 $y=bx+a$, 确定 $y=50\%$ 的 x 值即为半致死剂量 (LD_{50}), 再以半致死剂量辐射处理接穗, 培育一批诱变苗。

1.2.2 EMS 溶液浸泡诱变 2021 年 9 月, 用 0.067 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH 7.0) 配成浓度为 0.2% EMS 溶液 (含 1%二甲基亚砜), 浸泡果实生育期 120 d 的种子, 浸泡时间设 0、2、4、6、8 h 共 5 个处理, 每处理种子数 50 个, 重复 3 次。每浸泡 1 h 轻搅动种子 1 min, 浸泡后用清水浸泡清洗 2~3 次, 每次 5 min, 最后按照株行距 20 cm $\times$ 30 cm 在砂床进行播种育苗。播种 10 d 后调查萌发率, 30 d 后调查成苗率和株高, 拟合处理时间与相对成苗率直线回归方程, 计算 EMS 溶液浸泡芒果种子半致死时间, 再以半致死时间浸泡种子, 培育一批诱变苗。

1.2.3 SC-SSR 分子标记检测 2022 年 9 月，取 0.1 g 凯特芒果及其诱变材料[⁶⁰Co-γ 射线辐射 60 株（F1~F60），EMS 溶液浸泡 40 株（E1~E40）] 的嫩叶，CTAB 法提取 DNA，采用 1%的琼脂糖凝胶电泳和超微量紫外分光光度计分别检测 DNA 纯度和浓度，样品检测合格后用于 PCR 扩增，并放置于-20 ℃冰箱中保存。选 SCoT、ISSR 引物各 10 个（表 1），用 2 种引物组合对研究材料进行多态性引物筛选。PCR 反应体系（20 μL）：10 μL Taq PCR Mix，2 μL 引物（1 μmol/L），50 ng DNA 模板。PCR 扩增程序参考张安世等^[21]的方法，仅将循环数改为 32 个。PCR 产物用 2%琼脂糖胶电泳分离，再用凝胶成像系统拍照，其中样品扩增条带统计按照有条带记为“1”，无条带记为“0”。

表 1 本研究选用的 SC-SSR 标记引物组合
Tab. 1 Combination of SC-SSR marker primers used in this study

SCoT 引物 SCoT primer	序列（5'-3'）Sequence (5'-3')	ISSR 引物 ISSR primer	序列（5'-3'）Sequence (5'-3')
SCoT24	CACCATGGCTACCACCAT	UBC807	AGAGAGAGAGAGAGAGT
SCoT27	ACCATGGCTACCACCGTG	UBC808	AGAGAGAGAGAGAGAGC
SCoT31	CCATGGCTACCACCGCCT	UBC810	GAGAGAGAGAGAGAGAT
SCoT34	ACCATGGCTACCACCGCA	UBC821	GTGTGTGTGTGTGTGTT
SCoT36	GCAACAATGGCTACCACC	UBC827	ACACACACACACACACG
SCoT53	ACAATGGCTACCACCGAC	UBC844	CTCTCTCTCTCTCTCTRC
SCoT54	ACAATGGCTACCACCAGC	UBC846	CACACACACACACACART
SCoT55	ACAATGGCTACCACCTACC	UBC847	CACACACACACACACARC
SCoT73	CCATGGCTACCACCGGCT	UBC856	ACACACACACACACACYA
SCoT74	CCATGGCTACCACCGGCA	UBC889	DBDACACACACACACAC

2 结果与分析

2.1 ⁶⁰Co-γ 射线辐射对枝条成活率的影响

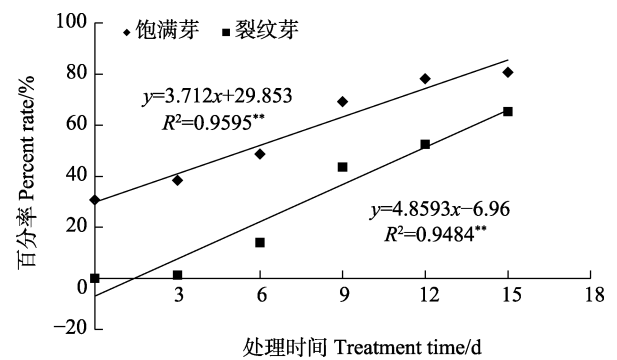
2.1.1 短截芒果枝条密集芽的动态变化 由图 1 可知，健壮芒果枝条经中部短截处理促进截口密集芽萌动，随处理时间增加，饱满芽、裂纹芽数量逐渐增多，饱满芽率高于裂纹芽率。处理时间与饱满芽率、裂纹芽率的直线拟合方程分别为 $y=3.712x+29.853$ （ $R^2=0.9595$ ）、 $y=4.8593x-6.96$ （ $R^2=0.9484$ ）。根据拟合方程计算出辐射枝条短截预处理时间为 8 d，确保采集的接穗有六成饱满芽（59.55%）和少于四成裂纹芽（31.91%）。

2.1.2 短截芒果枝条辐射半致死剂量 由表 2 可知，与对照（0 Gy）相比，接穗经 ⁶⁰Co-γ 射线辐射后嫁接成活率和相对成活率均显著降低，随辐射剂量增加成活率和相对成活率降低幅度逐步增加。辐射剂量为 60 Gy 时，成活率和相对成活率分别比对照降低了 67.50%和 88.04%。辐射剂量

1.3 数据处理

采用 Excel 2019 软件进行数据处理，采用 SAS 9.3 软件进行方差分析，使用单因素方差分析和 Duncan’s 法比较处理间的差异显著性。整理形成标记扩增电泳条带（0，1）矩阵数据，用 POPGENE 32 软件计算多态性比率（PPB）、观测等位基因（ N_a ）、有效等位基因（ N_e ）、Nei’s 遗传多样性指数（ H ）、Shannon 多样性指数（ H' ）、多态性信息含量（PIC），计算参照 Botstein 公式^[23]。利用 NTSYSpc 2.1 软件计算试验材料的遗传相似系数，使用非加权组平均法（UPGMA）进行聚类分析，以遗传相似系数进行主成分分析（PCA），遗传距离=1-遗传相似系数。使用 MEGA 7.0 软件绘制环形遗传聚类图。

与相对成活率拟合直线方程 $y=-1.2545x+89.356$ （ $R^2=0.9312$ ）（图 2），相关系数达极显著水平，根据方程计算短截芒果枝条的半致死剂量（LD₅₀）为 31.37 Gy。

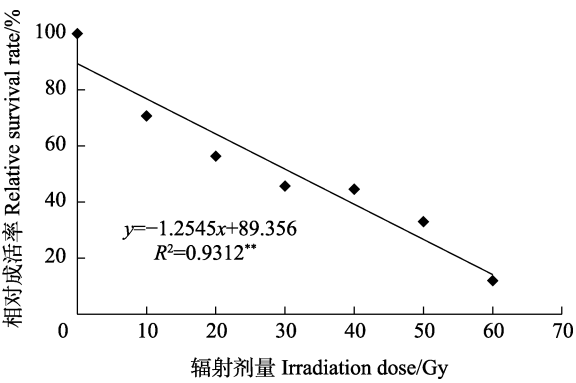


**表示极显著相关（ $P<0.01$ ）。
** Indicates extremely significant correlation ($P<0.01$).
图 1 短截芒果枝条密集芽的动态变化
Fig. 1 Dynamic changes of dense buds of mango branches treated with short-cutting

表 2 不同辐射剂量对短截芒果接穗成活率的影响
Tab. 2 Effects of different irradiation doses on survival rate of mango scions treated with short-cutting

辐射剂量 Irradiation dose/Gy	成活率 Survival rate/%	相对成活率 Relative survival rate/%
0	76.67±2.89 ^a	100.00±0.00 ^a
10	54.17±5.20 ^b	70.65±6.79 ^b
20	43.33±1.44 ^{bc}	56.52±1.89 ^{bc}
30	35.00±2.50 ^{cd}	45.65±3.26 ^{cd}
40	34.17±3.82 ^{de}	44.57±4.98 ^{de}
50	25.00±0.00 ^{de}	32.61±0.00 ^{de}
60	9.17±1.44 ^e	11.96±1.88 ^e

注：同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著（ $P<0.05$ ）。
Note: Different lowercase letters after the same column of data indicate significant difference among treatments ($P<0.05$).



**表示极显著相关（ $P<0.01$ ）。
** indicates extremely significant correlation ($P<0.01$).
图 2 辐射剂量与相对成活率的回归方程

Fig. 2 Regression equation between irradiation dose and relative survival rate

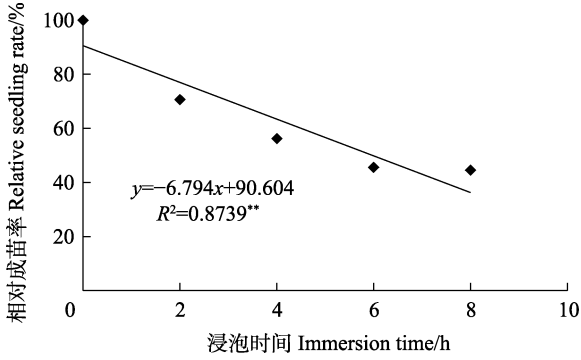
2.2 EMS 浸泡处理对种子萌发和成苗的影响

种子在浓度为 0.2% EMS 溶液中经不同浸泡时间处理后，萌发率、成苗率、相对成苗率和株高均显著低于对照（0 h），浸泡时间越长其降低幅度越大（表 3）。浸泡 2、4 h 的萌发率、成苗率和相对成苗率差异不显著，但株高降低显著。浸泡 8 h 后的萌发率、成苗率、相对成苗率和株高最低，分别是 20.67%、17.33%、40.62%和 10.20 cm，分别比对照降低了 60.66%、25.34%、59.38%和 11.77 cm。不同浸泡时间的成苗率均明显低于萌发率，随浸泡时间的增加，萌发率降低减少，降低幅度为 3.34%~38.66%。浸泡时间与相对成苗率拟合直线方程 $y=-6.794x+90.604$ ($R^2=0.8739$) (图 3)，相关系数达极显著水平，根据方程计算芒果种子的半致死时间（LD₅₀）为 5.9 h。

表 3 EMS 不同浸泡时间对芒果种子出苗率和株高的影响
Tab. 3 Effects of different EMS immersion time on seedling rate and height of mango

浸泡时间 Immersion time/h	萌发率 Germination rate/%	成苗率 Seedling rate/%	相对成苗率 Relative seedling rate/%	株高 Plant height/cm
0	81.33±5.03 ^a	42.67±3.06 ^a	100.00±0.00 ^a	21.97±1.70 ^a
2	67.33±4.16 ^b	30.67±1.15 ^b	71.87±2.71 ^b	15.87±0.65 ^b
4	58.67±3.06 ^b	26.00±4.00 ^b	60.94±9.38 ^b	12.30±0.98 ^c
6	42.00±4.00 ^c	20.67±2.31 ^c	48.44±5.41 ^c	11.03±0.93 ^{cd}
8	20.67±3.06 ^d	17.33±3.06 ^c	40.62±7.16 ^c	10.20±0.50 ^d

注：同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著（ $P<0.05$ ）。
Note: Different lowercase letters after the same column of data indicate significant difference among treatments ($P<0.05$).



**表示极显著相关（ $P<0.01$ ）。
** indicates extremely significant correlation ($P<0.01$).
图 3 浸泡时间与相对成活率的回归方程

Fig. 3 Regression equation between immersion time and relative survival rate

2.3 诱变材料 SC-SSR 分子标记分析

2.3.1 引物筛选 选取 6 份材料（凯特、F7、F8、F50、E2、E8）DNA 模板用于引物筛选，从 100 对引物中筛选出多态性引物 16 对（表 4），用于试验材料 NAD 模板 PCR 扩增分析。
2.3.2 多态性分析 基于筛选出的 16 对 SC-SSR 引物，对 101 份试验材料进行 PCR 扩增，经琼脂糖电泳检测，扩增条带大小主要集中在 250~1000 bp 之间，共扩增出 126 条带（图 4），其中多态性条带 117 条，平均多态性条带为 7.3 条，平均多态性条带比率为 93.18%。结果表明，SC-SSR 引物扩增多态性好。
2.3.3 遗传多样性分析 由表 4 可知，16 对引物扩增条带分析显示观测等位基因数范围为 1.750~2.00，平均值为 1.923；有效等位基因数范围为 1.114~1.796，平均值为 1.583；Nei's 基因多样性

表 4 SC-SSR 标记遗传多样性参数
Tab. 4 The genetic diversity parameters of SC-SSR maker

引物组合 Primers combination	扩增总条带数 Total number of bands (TNB)	多态性条带数 Number of poly- morphism bands (NPB)	多态性条带百分比 Percentage of polymorphism bands (PPB)/%	多态性信 息含量 PIC	观测等位 基因数 Na	有效等位 基因数 Ne	Nei's 基因 多样性 指数 <i>H</i>	Shannon's 信息 指数 <i>I</i>
SCoT24-UBC807	8	7	87.50	0.601	1.875	1.552	0.304	0.444
SCoT24-UBC810	10	8	80.00	0.524	1.778	1.465	0.264	0.396
SCoT24-UBC827	11	10	90.91	0.818	1.909	1.612	0.342	0.499
SCoT24-UBC856	9	8	88.89	0.537	1.875	1.536	0.307	0.455
SCoT27-UBC807	6	6	100.00	0.729	2.000	1.539	0.317	0.478
SCoT27-UBC810	6	6	100.00	0.582	2.000	1.646	0.379	0.563
SCoT27-UBC844	10	10	100.00	0.731	2.000	1.671	0.389	0.574
SCoT31-UBC808	7	5	71.43	0.129	1.750	1.292	0.204	0.330
SCoT31-UBC856	6	6	100.00	0.454	2.000	1.757	0.426	0.616
SCoT34-UBC827	6	5	83.33	0.591	1.833	1.641	0.342	0.491
SCoT53-UBC847	6	6	100.00	0.729	1.857	1.796	0.412	0.577
SCoT54-UBC810	11	11	100.00	0.825	2.000	1.785	0.430	0.619
SCoT55-UBC847	9	9	100.00	0.822	2.000	1.713	0.407	0.595
SCoT73-UBC807	6	6	100.00	0.682	2.000	1.757	0.423	0.613
SCoT73-UBC821	6	6	100.00	0.507	2.000	1.114	0.093	0.178
SCoT73-UBC856	9	8	88.89	0.507	1.889	1.461	0.298	0.458
Mean	7.9	7.3	93.18	0.610	1.923	1.583	0.334	0.493

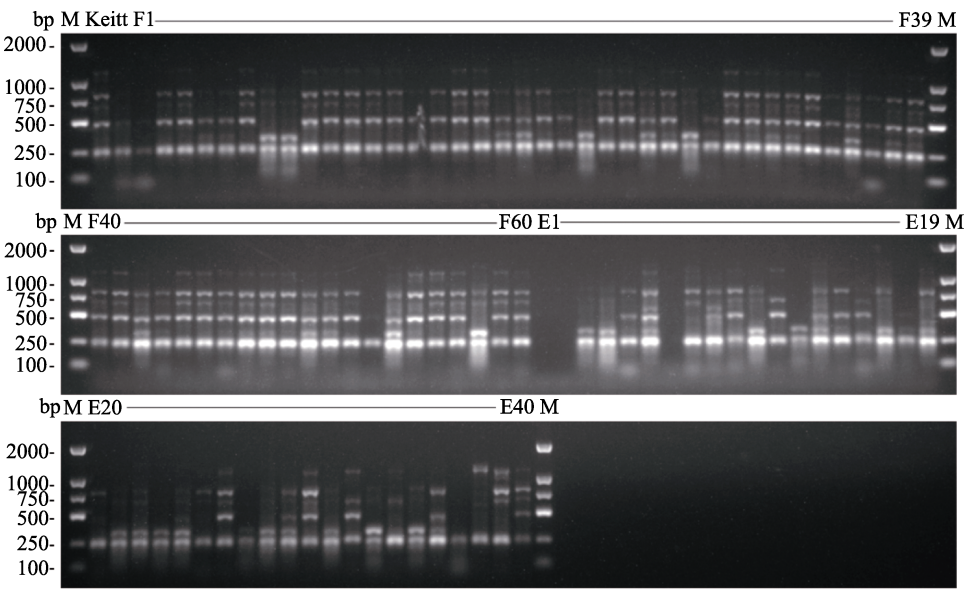


图 4 引物 SCoT73-UBC807 对试验材料的 SC-SSR 扩增结果
Fig. 4 Amplified results using ScoT73-UBC807 for experimental materials

指数范围为 0.093~0.430，平均值为 0.334；Shannon's 信息指数范围为 0.178~0.619，平均值为 0.493；多态性信息含量介于 0.129~0.825，平均值为 0.610。说明芒果诱变试验材料遗传多样性丰富，SC-SSR 分子标记适用于芒果遗传多样性分析。

2.3.4 遗传相似系数分析 基于 SC-SSR 分子标记数据，用 NTSYSpc 2.1 软件计算获得的 101 份试验材料两两间遗传相似系数在 0.373~0.984 之间，平均为 0.779。将遗传相似系数转换为遗传距离作频数分布直方图（图 5），96.69%的遗传距离分布在 0.05~0.51 之间，遗传距离小于 0.05 的有 25

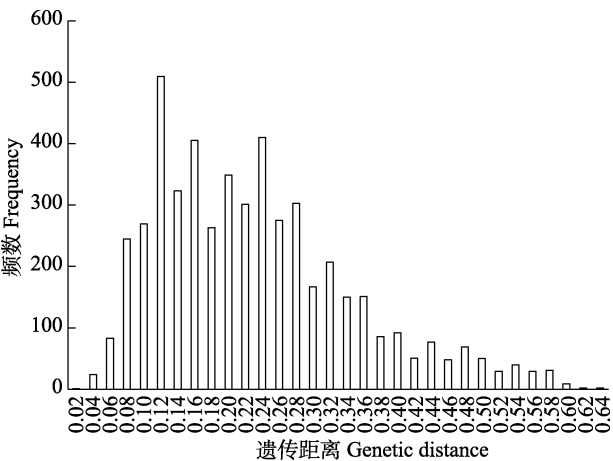


图 5 试验材料遗传距离频数分布

Fig. 5 The frequency distribution of genetic distance between experimental materials

个(0.50%),遗传距离大于0.51有142个(2.81%),说明少数试验材料间的差异性大。100个诱变材料与对照凯特的遗传距离为0.040~0.556,平均为0.156,F3遗传距离最小,E2遗传距离最大;其中60份⁶⁰Co-γ射线辐射诱变材料与对照的遗传距

离为0.040~0.254,平均为0.103;其中40份EMS浸泡诱变材料与对照的遗传距离在0.095~0.556之间,平均为0.259。结果表明,种子EMS浸泡比枝条⁶⁰Co-γ射线辐射的变异大。

2.3.5 聚类分析 选遗传距离数据,用UPGMA方法对试验材料进行聚类分析,101份试验材料被分为三大类群(图6)。I类群共11份试验材料,占总数的10.89%,I-1亚群包括E13、E21、E22、E23、E27、E28、E31、E33、E35,I-2亚群包括E3和E4;II类群共3份试验材料,占总数的2.97%,II-1亚群仅有E37,II-2亚群包括E2和E7;III类群共87份试验材料,占总数的86.14%,III-1亚群包括E18和E36,III-2亚群仅有E20,III-3亚群包括23份EMS诱变、60份⁶⁰Co-γ射线辐射诱变和凯特。结果表明,不同种子EMS诱变试验材料多数聚类在一起,部分与枝条⁶⁰Co-γ射线辐射诱变和凯特试验材料聚类在一起,表明诱变处理方法基因组DNA水平变异的差异明显。

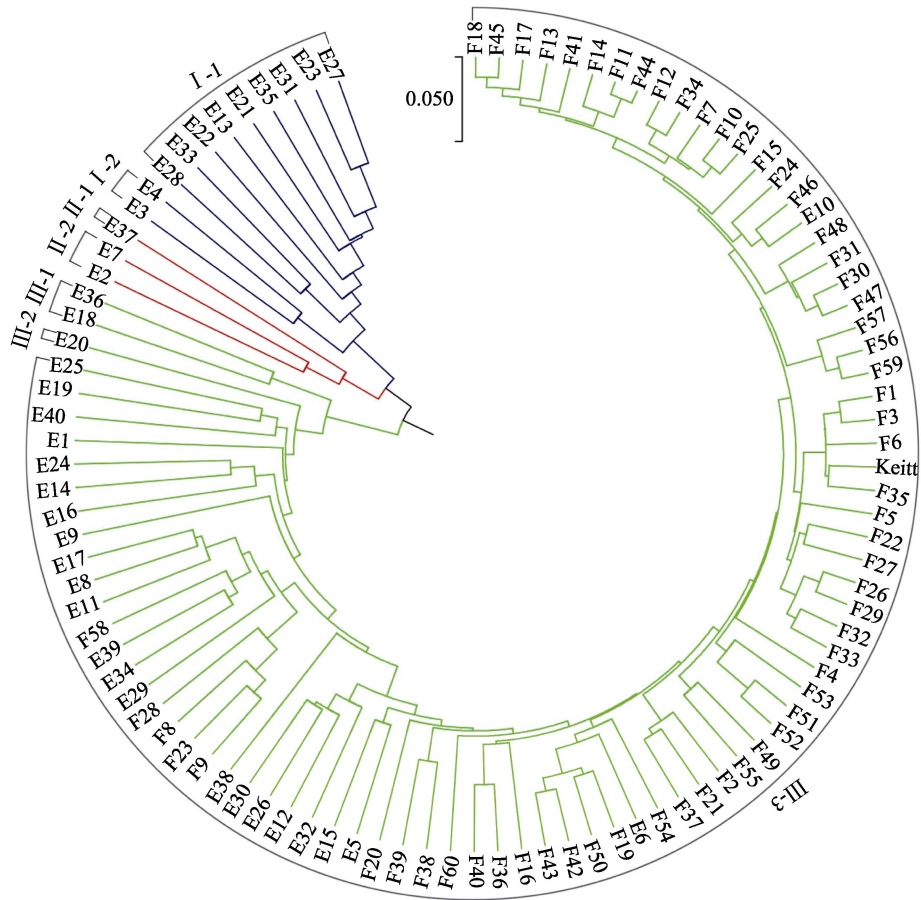


图 6 基于 SC-SSR 标记的试验材料聚类

Fig. 6 Dendrogram of experimental materials based on SC-SSR markers

2.3.6 主成分分析 基于 SC-SSR 标记获得的试验材料遗传相似系数, 用 NTSYSpc 2.1 软件进行主成分分析, 其中前 3 个主成解释释率分别为 26.12%、6.75% 和 5.12%, 以第一主成分和第二主成分作二维主成分分析图 (图 7)。101 份试验材料被划分为 3 个类群 (A、B 和 C 类群), A 类群 12 份, B 类群 2 份, C 类群 87 份。主成分分析与聚类分析结果相比较, A 类群与 I 类群仅有 E3、E18 和 E37 划分聚类不一致, B 类群与 II 类群仅有 E37 划分聚类不一致, C 类群与 III 类群仅有 E13 和 E18 划分聚类不一致。

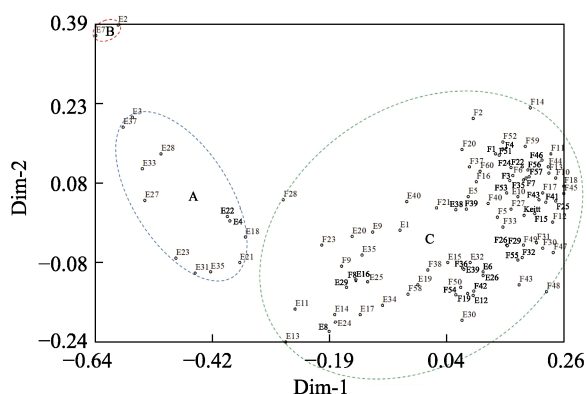


图 7 试验材料的主成分分析

Fig. 7 The principal component analysis of experimental materials

3 讨论

因我国保存的芒果种质资源主要是从美国和东南亚国家引进, 遗传信息狭窄, 综合性状优良种质资源数量少, 人工杂交结实率低, 培育突破性芒果新品种难度较大。研究认为 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 、EMS 等诱变是创制水稻、油菜、西瓜、柑橘、菊花等植物育种新材料的重要手段, 通过诱变能快速构建植物突变体基因库, 获得更多有益的新种质材料, 可用于功能基因组研究和品种选育^[24-26]。在诱变过程中增加辐射剂量、EMS 浓度或处理时间能提高诱变效率, 同时也相应提高诱变材料的致死率^[27], 目前常以半致死率来确定植物诱变适宜的辐射剂量和 EMS 浓度、处理时间。本研究发现, 辐射剂量增加嫁接成活率降低, EMS 处理时间增加萌发率和成苗率降低, 与澳洲坚果^[28]、白桦^[29]、高粱^[30]等研究结果相似。通过模拟直线方程计算出的枝条 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线辐射半致死剂量和种子 0.2% EMS 溶液浸泡半致死处

理时间, 可为芒果相关诱变育种提供参考借鉴。

本研究对芒果诱变试验材料进行 SC-SSR 分子标记分析, 16 对引物扩增条带的 PPB 为 93.18%。高于罗聪等^[16]应用 SCoT 标记分析的 73 份芒果资源 (PPB 为 73.63%) 和余贤美等^[31]利用 ISSR 标记分析的芒果野生居群 (PPB 为 87.25%)。PIC 值能反应基因变异程度高低, 研究材料群体的 PIC 值越大, 该基因座杂合子比例就越大, 提供的遗传信息越高^[32]。本研究所选的 SC-SSR 标记获得的 PIC 为 0.610, 高于 SSR、CDDP、SRAP 标记在芒果上的应用^[33-35], 参考 BOTSEIN 等^[36]提出的 PIC 指标判别方法, 获得 14 个 SC-SSR 基因座为高度多态位点 (PIC>0.50), 能较好地提供遗传信息。综合认为, SC-SSR 标记扩展检测多态位点效率高, 在芒果遗传多样性分析、指纹图谱构建、变异材料鉴定等方面研究应用前景广。

芒果为高度杂合的多年生果树, 种质资源遗传多样性丰富。报道基于 SSR 荧光标记分析国内 145 份芒果品种及其近缘野生种的遗传相似系数在 0.50~0.78 之间^[15], SSR 标记分析国内 116 份芒果果实生资源的遗传相似系数在 0.60~1.00 之间^[33], SRAP 标记分析芒果品种贵妃、金煌及其 98 株杂交 F_1 代群体的相似系数在 0.52~0.92 之间^[18], 相比较发现, 本研究选用 SC-SSR 标记分析凯特及其 100 份诱变试验材料的遗传相似系数在 0.37~0.98 之间, 遗传多样性更丰富, 认为在可利用种质资源有限的情况下诱变优于实生、杂交对芒果遗传变异的影响。进一步分析发现, 芒果种子 EMS 浸泡比枝条 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线辐射诱变变异大, 与常媚瑕等^[27]研究不同诱变方法对朝天椒种子诱变效应和邓仁菊等^[37]诱变筛选火龙果抗寒突变体结果一致, 原因可能是受 2 种诱变机理差异影响所致, EMS 诱变多是碱基点突变, 辐射诱变多是大片缺失或者颠换。已有研究表明不同萌发状态的草莓种子对 EMS 的敏感程度不同^[38], 推测不同生育期芒果种子对 EMS 的敏感程度同样会存在差异, 还需开展相关研究提高芒果种子 EMS 诱变效率。

聚类分析和主成分分析结果基本一致, 101 份试验材料被划分为三大类群, I、II 类群全部为 EMS 浸泡诱变试验材料, III 类群为凯特、部分 EMS 浸泡和全部 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线辐射诱变试验材料。多数 EMS 诱变试验材料聚集在一起, 离凯特较远, 而多数 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线辐射诱变聚集在一起, 离

凯特较近。可见不同诱变方法在同种植物上诱变差异明显,同时也可能在基因组同位点产生相近变异,需进一步研究探讨其他诱变方法在芒果上的应用,优化芒果高效诱变育种技术,加快芒果突变体基因库构建。

4 结论

^{60}Co - γ 射线辐射短截预处理 8 d, 凯特芒果枝条的半致死剂量为 31.37 Gy。0.2%EMS 溶液浸泡处理果实生育期 120 d, 凯特芒果种子的半致死时间为 5.9 h。EMS 浸泡种子比 ^{60}Co - γ 射线辐射枝条更易获得丰富的遗传变异。

参考文献

- [1] 陈业渊, 党志国, 林电, 胡美姣, 黄建峰, 朱敏, 张贺, 韩冬银, 高爱平, 高兆银, 黄媛媛. 中国杧果科学研究 70 年[J]. 热带作物学报, 2020, 41(10): 2034-2044.
CHEN Y Y, DANG Z G, LIN D, HU M J, HUANG J F, ZHU M, ZHANG H, HAN D Y, GAO A P, GAO Z Y, HUANG Y Y. Mango scientific research in China in the past 70 years[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2020, 41(10): 2034-2044. (in Chinese)
- [2] 王芳. 芒果产业经济信息月报[DB/OL]. (2023-03-13) [2023-10-13]. <http://www.cars31.cn/contents/9/1935.html>.
WANG F. Mango industry economic information monthly [DB/OL]. (2023-03-13)[2023-10-13]. <http://www.cars31.cn/contents/9/1935.html>. (in Chinese)
- [3] 罗世杏, 黄国弟, 李日旺, 张宇, 唐莹莹, 郭丽梅, 唐玉娟, 赵英, 陈永森, 覃昱茗, 莫永龙, 彭鹏. 广西杧果科学研究 60 年[J]. 农业研究与应用, 2022, 35(4): 1-8.
LUO S X, HUANG G D, LI R W, ZHANG Y, TANG Y Y, GUO L M, TANG Y J, ZHAO Y, CHEN Y S, QIN Y M, MO Y L, PENG P. 60 years of mango research in Guangxi[J]. Agricultural Research and Application, 2022, 35(4): 1-8. (in Chinese)
- [4] 张翠仙, 解德宏, 陈于福, 柏天琦, 尼章光. 云南芒果产业发展现状[J]. 中国果树, 2020(6): 112-117.
ZHANG C X, XIE D H, CHEN Y F, BAI T Q, NI Z G. The development of mango industry in Yunnan[J]. China Fruit Science, 2020(6): 112-117. (in Chinese)
- [5] 罗睿雄, 赵志常. 芒果种质资源遗传多样性[M]. 北京: 中国农业出版社, 2022: 24-99.
LUO R X, ZHAO Z C. Genetic diversity of mango germplasm resources[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2022: 24-99. (in Chinese)
- [6] 高文杰, 陈敏健, 刘爱琴, 帅鹏. 木本植物 EMS 诱变育种研究进展[J]. 分子植物育种, 2019, 17(20): 6768-6774.
GAO W J, CHEN M J, LIU A Q, SHUAI P. Advances in mutation breeding of woody plants of EMS[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(20): 6768-6774. (in Chinese)
- [7] 邓秀新, 钟彩虹, 王力荣, 李绍华, 张绍铃, 张志宏, 丛佩华, 易干军, 陈学森, 陈厚彬, 钟彩虹. 果树育种 40 年回顾与展望[J]. 果树学报, 2019, 36(4): 514-520.
DENG X X, ZHONG C H, WANG L R, LI S H, ZHANG S L, ZHANG Z H, CONG P H, YI G J, CHEN X S, CHEN H B, ZHONG C H. Retrospection and prospect of fruit breeding for last four decades in China[J]. Journal of Fruit Science, 2019, 36(4): 514-520. (in Chinese)
- [8] 赵子漪, 陶凤琳, 赵斯琪. 木本植物诱变育种研究进展[J/OL]. 分子植物育种, 1-8[2024-07-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230308.0857.004.html>.
ZHAO Z Y, TAO F L, ZHAO S Q. Progress of study on ligneous plants mutation breeding[J/OL]. Molecular Plant Breeding, 1-8[2024-07-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230308.0857.004.html>. (in Chinese)
- [9] 吴潇, 齐开杰, 殷豪, 张绍铃. 诱变技术在落叶果树育种中的应用[J]. 园艺学报, 2016, 43(9): 1633-1652.
WU X, QI K J, YIN H, ZHANG S L. Applying of the induced mutation techniques in the breeding of deciduous fruit tree varieties[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2016, 43(9): 1633-1652. (in Chinese)
- [10] 黄镜浩, 马蔚红, 王松标. 杧果选育种研究回顾与应用展望[J]. 中国南方果树, 2006, 35(5): 25-28.
HUANG J H, MA W H, WANG S B. Review of mango breeding research and application prospects[J]. Southern China Fruits, 2006, 35(5): 25-28. (in Chinese)
- [11] RIME J, DINESH M R, SANKARAN M, SHIVASHANKARA K S, REKHA A, RAVISHANKAR K V. Evaluation and characterization of EMS derived mutant populations in mango[J]. Scientia Horticulturae, 2019, 254: 55-60.
- [12] SAÚCO V G, MARTÍN M J G, GALVÁN D F, TORRES A C, JUÁREZ J, NAVARRO L. Occurrence of spontaneous tetraploid nucellar mango plants[J]. Hortscience, 2001, 36(4): 755-757.
- [13] 黄镜浩, 王松标, 马蔚红, 汪卫星, 梁国鲁. 秋水仙碱对芒果茎尖的诱变作用[J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2006, 28(6): 926-929.
HUANG J H, WANG S B, MA W H, WANG W X, LIANG G L. Mutagenesis of colchicine in mango stem tips[J]. Journal of Southwest Agricultural University (Natural Science Edition), 2006, 28(6): 926-929. (in Chinese)
- [14] 石胜友, 武红霞, 王松标, 刘丽琴, 王一承, 马蔚红. 杧果种质遗传多样性的表型分析和 AFLP 分析[J]. 园艺学报, 2006, 33(5): 755-757.

- 2011, 38(3): 449-456.
- SHI S Y, WU H X, WANG S B, LIU L Q, WANG Y C, MA W H. Genetic diversity of mango germplasm based on morphological charaters and AFLP markers[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2011, 38(3): 449-456. (in Chinese)
- [15] 唐玉娟, 罗世杏, 黄国弟, 宋恩亮, 李日旺, 赵英, 张宇, 莫永龙, 唐莹莹. 基于 SSR 荧光标记的杧果种质资源遗传多样性分析及分子身份证构建[J]. *热带作物学报*, 2023, 44(11): 2292-2304.
- TANG Y J, LUO S X, HUANG G D, SONG E L, LI R W, ZHAO Y, ZHANG Y, MO Y L, TANG Y Y. Genetic diversity analysis and molecular ID construction of mango germplasm based on SSR fluorescence markers[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2023, 44(11): 2292-2304. (in Chinese)
- [16] 罗聪, 何新华, 陈虎, 胡颖, 欧世金. 应用 SCoT 分子标记分析 73 份芒果资源的遗传多样性[J]. *园艺学报*. 2011, 38(增刊): 2511.
- LUO C, HE X H, CHEN H, HU Y, OU S J. Genetic diversity analysis of 73 mango resources by SCoT markers[J]. *Chinese Journal of Horticulture*, 2011, 38(Suppl.): 2511. (in Chinese)
- [17] 王露露, 王磊, 姚全胜, 周开兵, 柳风. 基于简化基因组技术的 33 份芒果品种遗传分析[J]. *分子植物育种*, 2024, 22(11): 3627-3637.
- WANG L L, WANG L, YAO Q S, ZHOU K B, LIU F. Genetic analysis of 33 mango varieties based on genotyping by sequencing[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2024, 22(11): 3627-3637. (in Chinese)
- [18] 李志强, 党志国, 赵志常, 黄建锋, 高爱平, 陈业渊. 芒果杂交 F_1 代群体的遗传多样性分析及遗传图谱的构建[J]. *分子植物育种*, 2016, 14(4): 953-958.
- LI Z Q, DANG Z G, ZHAO Z C, HUANG J F, GAO A P, CEHN Y Y. Genetic diversity analysis and construction of genetic map of F_1 hybrid population of mango[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2016, 14(4): 953-958. (in Chinese)
- [19] LI X, ZHENG B, XU W, MA X, WANG S, QIAN M, WU H. Identification of F_1 hybrid progenies in mango based on fluorescent SSR markers[J]. *Horticulturae*, 2022, 8(12): 1122.
- [20] 郭大龙, 侯小改, 刘崇怀, 郭明晓. 一种新的 DNA 分子标记技术: 起始密码子-微卫星扩增多态性[J]. *植物生理学报*, 2012, 48(4): 408-412.
- GUO D L, HOU X G, LIU C H, GUO M X. A new molecular marker technology: start codon-simple sequence repeat (SC-SSR)[J]. *Plant Physiology Journal*, 2012, 48(4): 408-412. (in Chinese)
- [21] 张安世, 张中海, 方金鲍, 林苗苗, 骆扬, 齐秀娟. 猕猴桃 SC-SSR 遗传多样性分析及指纹图谱构建[J]. *分子植物育种*, 2017, 15(11): 4706-4714.
- ZHANG A S, ZHANG Z H, FANG J B, LIN M M, LUO Y, QI X J. Genetic diversity analysis and fingerprints construction of SC-SSR makers in kiwifruit (*Actinidia* Lindl.)[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15(11): 4706-4714. (in Chinese)
- [22] 覃昱茗, 张宇, 黄国弟, 莫永龙, 罗世杏, 荣涛. 杧果 SC-SSR 分子标记反应体系的建立与优化[J]. *农业研究与应用*, 2021, 34(3): 37-43.
- QIN Y M, ZHANG Y, HUANG G D, MO Y L, LOU S B, RONG T. Establishment and optimization of SC-SSR molecular marker reaction system for mango[J]. *Agricultural Research and Application*, 2021, 34(3): 37-43. (in Chinese)
- [23] ANDERSON J A, CHURCHILL G A, AUTRIQUE J E. Optimizing parental selection for genetic linkage maps[J]. *Genome*, 1993, 36(1): 181-186.
- [24] 李准, 伊华林, 吴巨勋. $^{60}\text{Co-}\gamma$ 辐射诱变在果树育种中的应用与展望[J]. *中国果树*, 2022(5): 21-27.
- LI Z, YI H L, WU J X. The application of $^{60}\text{Co-}\gamma$ radiation mutation in fruit tree plant breeding in China[J]. *China Fruit Science*, 2022(5): 21-27. (in Chinese)
- [25] 谢玲玲, 周火强, 弭宝彬, 倪向红, 陈玲欢. EMS 诱变技术研究概况及应用进展[J]. *湖南农业科学*, 2020, 417(6): 92-95.
- XIE L L, ZHOU H Q, MI B B, NI X H, CHEN L H. Research progress and application of EMS mutagenesis technology[J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2020, 417(6): 92-95. (in Chinese)
- [26] 黄冬福, 付文婷, 韩世玉, 何建文. 农作物 EMS 诱变研究进展[J]. *北方园艺*, 2015(24): 188-194.
- HUANG D F, FU W T, HAN S Y, HE J W. Research progress of landscape plants reducing atmospheric particulate matter[J]. *Northern Horticulture*, 2015(24): 188-194. (in Chinese)
- [27] 常媚瑕, 吴媛, 苏世贤. $^{60}\text{Co-}\gamma$ 辐射对朝天椒种子诱变效应的影响[J]. *分子植物育种*, 2021, 19(17): 5755-5767.
- CHANG M X, WU Y, SU S X. Effects of $^{60}\text{Co-}\gamma$ radiation on seeds of *Capsicum frutescens*[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19(17): 5755-5767. (in Chinese)
- [28] 孔广红, 柳颀, 倪书邦, 范秋红, 宫丽丹, 陶亮, 陶丽, 陈丽兰, 贺熙勇. 澳洲坚果接穗 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线辐射诱变育种适宜剂量的研究[J]. *西南农业学报*, 2016, 29(1): 39-43.
- KONG G H, LIU J, NI S B, FAN Q H, GONG L D, TAO L, TAO L, CHEN L L, HE X Y. Research for proper dose of $^{60}\text{Co-}\gamma$ ray in *Macadamia* branches radiation breeding[J]. *Southwest Chinese Journal of Agricultural Sciences*, 2016, 29(1): 39-43. (in Chinese)
- [29] 徐瑞廷, 刘中原, 韩雅婷, 解庆军, 董文芳, 樊滢博, 高彩

- 球. 白桦种子 EMS 诱变条件分析及突变体库初步构建[J/OL]. 分子植物育种, 1-9[2024-07-11]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20221009.1804.032.html>.
- XU R T, LIU Z Y, HAN Y T, XIE Q J, DONG W F, FAN Y B, GAO C Q. Analysis of EMS mutation conditions of *Betula platyphylla* seeds and preliminary construction of mutant library[J/OL]. Molecular Plant Breeding, 1-9[2024-07-11]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20221009.1804.032.html>. (in Chinese)
- [30] 于森, 陈冰嫻, 石贵山. EMS 诱导粒用高粱的突变体筛选和鉴定[J]. 核农学报, 2023, 37(1): 1-7.
- YU M, CHEN B R, SHI G S. Screening and identification of mutants of grain sorghum induced by EMS[J]. Chinese Journal of Nuclear Agriculture. 2023, 37(1): 1-7. (in Chinese)
- [31] 余贤美, 艾呈祥. 杧果野生居群遗传多样性 ISSR 分析[J]. 果树学报, 2007, 24(3): 329-333.
- YU X M, AI C X. Genetic diversity of wild mango (*Mangifera indica* L.) populations detected by ISSR[J]. Journal of Fruit Science, 2007, 24(3): 329-333. (in Chinese)
- [32] 王静毅, 王家保, 武耀廷, 黄国弟, 周俊岸, 李日旺. 广西主要杧果资源遗传关系的 SSR 分析[J]. 热带作物学报, 2009, 30(9): 1301-1307.
- WANG J Y, WANG J B, WU Y T, HUANG G D, ZHOU J A, LI R W. Analysis of genetic diversity of major accessions of mango (*Mangifera indica* L.) in Guangxi using SSR markers[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2009, 30(9): 1301-1307. (in Chinese)
- [33] 黄丽芳, 闫林, 范睿, 姚全胜, 刘洋, 雷新涛. 芒果实生资源遗传多样性的 SSR 分析[J]. 热带作物学报, 2011, 32(10): 1828-1832.
- HUANG L F, YAN L, FAN R, YAO Q S, LIU Y, LEI X T. Genetic diversity analysis of seeding resources of mango (*Mangifera indica* L.) by SSR markers[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2011, 32(10): 1828-1832. (in Chinese)
- [34] 王明, 应东山, 王琴飞, 李丽萍, 张如莲. 我国芒果主栽品种遗传多样性分析及指纹图谱构建[J]. 南方农业学报, 2015, 46(7): 1154-1159.
- WANG M, YING D S, WANG Q F, LI L P, ZHANG R L. Genetic diversity analysis and fingerprint construction for mango cultivars in China[J]. Journal of Southern Agriculture, 2015, 46(7): 1154-1159. (in Chinese)
- [35] 张宇, 黄国弟, 莫永龙, 罗世杏, 赵英, 唐玉娟, 陆祖双, 单彬, 荣涛. CDDP 结合 SRAP 标记分析杧果品种的遗传多样性[J]. 中国南方果树, 2022, 51(2): 57-63.
- ZHANG Y, HUANG G D, MO Y L, LUO S X, ZHAO Y, TANG Y J, LU Z S, SHAN B, RONG T. Genetic diversity of mango species assessed by CDDP and SRAP molecular markers[J]. Southern China Fruits, 2022, 51(2): 57-63. (in Chinese)
- [36] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, DAVIS R W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314.
- [37] 邓仁菊, 范建新, 王永清, 杨芳锡, 李顺雨. 火龙果幼苗离体辐射诱变及其对低温胁迫的生理响应[J]. 热带作物学报, 2018, 39(2): 260-266.
- DENG R J, FAN J X, WANG Y Q, YANG F X, LI S Y. Radiation mutagenesis of pitaya (*Hylocereus undulatus* Britt.) seedlings *in vitro* and its physiological response to the low temperature stress[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2018, 39(2): 260-266. (in Chinese)
- [38] 宋兰芳, 华明艳, 崔少杰, 金凤媚, 孔维东, 孙海波. EMS 诱变对不同萌发状态草莓种子发芽率的影响[J]. 贵州农业科学, 2023, 51(7): 74-78.
- SONG L F, HUA M Y, CUI S J, JIN F M, KONG W D, SUN H B. Effects of EMS mutagenesis on germination rate of strawberry seeds in different germination states[J]. Journal of Guizhou Agricultural Sciences, 2023, 51(7): 74-78. (in Chinese)