

苹果品种的 SSR分析

王爱德 李天忠 许雪峰 韩振海*

(中国农业大学园艺植物研究所, 北京 100094)

摘要: 利用 SSR方法对苹果 25个品种进行了基因组多态性分析, 从 20对引物中筛选出 10对多态性引物用于正式扩增, 一共扩增出 97个位点, 平均每对引物扩增出 9.7个位点, 扩增条带的多态性百分率在 56.4%~100%之间。用两对引物 (GD142和 02b1) 即可区分全部供试品种。根据 SSR分析结果, 应用 NTSYS软件进行相似性系数计算, 利用 UPGMA法构建聚类树状图。其结果表明, 供试苹果品种分为 4个类群, 与传统系谱基本一致。

关键词: 苹果; SSR; 品种鉴定; 指纹图谱

中图分类号: S 661.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 05-0875-03

SSR Analysis for Apple Cultivars

Wang Aide, Li Tianzhong, Xu Xuefeng, and Han Zhenhai*

(Institute for Horticultural Plants, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: By using simple sequence repeat (SSR), 25 apple cultivars were used for genomic polymorphic analysis. 97 alleles were amplified by using 10 pairs of primers selected from 20 pairs, of which average 9.7 alleles per pair of primer were amplified and polymorphic percentage of amplified band was 56.4% - 100%. Two pairs of primer (GD142 and 02b1) could distinguish all cultivars used in the study. Based on the SSR results, calculation of the similarity coefficient and also UPGMA cluster analysis showed that the apple cultivars could be classified into the four groups of being similar to the traditional classification.

Key words: Apple; SSR; Cultivar identification; Fingerprinting

1 目的、材料与方法

苹果品种鉴定是苹果种质资源研究的基础。本研究应用 SSR分子标记技术鉴定 25个苹果品种并绘制指纹图谱, 以为苹果种质资源鉴定和品种亲缘关系分析在分子水平上提供依据。

试材 (表 1) 取自中国农业科学院果树研究所 (兴城) 苹果种质资源圃。取 1年生枝条上的健康嫩叶备用。基因组 DNA提取与纯化按照邹喻苹等^[1]的方法, 提取的 DNA质量和浓度经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测合格后, 将样品稀释到 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 保存备用。SSR引物按 Guilford等^[2]、Hokanson等^[3]、Gianfranceschi等^[4]报道的序列由上海 Sangon公司合成, 由 20对引物筛选出稳定性强、多态性好的 10对引物进行正式试验, 引物的退火温度经筛选试验获得。PCR扩增仪为美国 MJ公司生产的 PTC-200。SSR反应条件经过优化确定为: $15 \mu\text{L}$ 体系含 50 ng 基因组 DNA, Tris-HCl $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 9.0), KCl $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, MgCl_2 $1.67 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, dNTP $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 引物 $0.33 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Taq 聚合酶 1 U 。PCR程序是: 94°C 预变性 5 min , 然后 94°C 变性 30 s , 60°C 退火 1 min , 72°C 延伸 1 min , 35个循环, 最后 72°C 延伸 5 min 。扩增产物用 6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染检测^[5]。电泳图谱的每条带均为一个分子标记, 代表一个引物的结合位点。根据条带的有无统

收稿日期: 2005-02-25; 修回日期: 2005-05-23

基金项目: 教育部 '青年教师奖励基金' 资助项目; 国家转基因植物专项资助项目 (JY04-B-02)

*通讯作者 Author for correspondence

计所有的二元数据；有带记作 1，无带记为 0，根据二元数据计算多态性位点百分数，采用 NTSYS 统计分析软件^[7]对数据进行分析，品种间的相似系数按 Jaccard 公式计算，以非加权类平均法（UPGMA）进行聚类分析，并建立树状图。

表 1 供试苹果品种

Table 1 Apple cultivars used in this study

编号	品种	亲本或起源	编号	品种	亲本或起源
Na	Varieties	Parents or Origin	Na	Varieties	Parents or Origin
1	金冠 Golden Deli	不详 Unknown	14	新乔纳金 New Jonagold	乔纳金芽变 Spot of Jonagold
2	国光 Ralls	不详 Unknown	15	印度 Indo	不详 Unknown
3	金星 Kinsei	金冠 × 国光 Golden Deli × Ralls	16	王林 Orin	金冠实生 Seeding of Golden Deli
4	富士 Fuji	国光 × 元帅 Ralls × Delicious	17	陆奥 Mutsu	金冠 × 印度 Gold Deli × Indo
5	华冠 Huaguan	金冠 × 富士 Golden Deli × Fuji	18	东光 Toko	金冠 × 印度 Gold Deli × Indo
6	清明 Qingming	金冠 × 富士 Golden Deli × Fuji	19	黄魁 Yellow Transparent	不详 Unknown
7	元帅 Delicious	不详 Unknown	20	甜丰 Tianfeng	黄魁 × 金冠 Yellow Transparent × Gold Deli
8	世界第一 Sekaiichi	元帅 × 金冠 Delicious × Golden Deli	21	翠秋 Cuiqiu	金冠 × 黄魁 Golden Deli × Yellow Transparent
9	红玉 Jonathan	可口香实生 Seeding of Esopus Spitzenburg	22	嘎拉 Gala	红基橙 × 金冠 Kidd's Orange Red × Gold Deli
10	初秋 Hatsuaki	金冠 × 红玉 Golden Deli × Jonathan	23	粉红女士 Pink Lady	金冠 × 威廉女士 Gold Deli × Lady Williams
11	津轻 Tsgaru	金冠 × 红玉 Golden Deli × Jonathan	24	秦冠 Qinguan	金冠 × 鸡冠 Gold Deli × Jiguan
12	红月 Kogetsu	金冠 × 红玉 Golden Deli × Jonathan	25	鸡冠 Jiguan	不详 Unknown
13	乔纳金 Jonagold	金冠 × 红玉 Golden Deli × Jonathan			

2 结果分析与讨论

2.1 引物筛选与 SSR 多态性

从 20 对 SSR 引物中筛选出 10 对多态性较高、稳定性较好、分辨率较高的引物。10 对引物在 25 个苹果品种中共在 97 个位点上扩增出条带，平均每对引物有 9.7 个扩增位点，每对引物可以检测到等位位点的个数从 6 ~ 17 个不等；每对引物的多态性百分率在 56.4% ~ 100% 之间，10 对引物对 25 个苹果品种的分辨率均在 55% 以上（表 2）。引物 GD142 和 02b1 即可将所有的品种区分开，分辨率分别为 78% 和 88%。

分析引物 02b1 构建的指纹图谱（图 1）可以看出：一些品种的亲缘关系较近带型相似，例如

‘初秋’（10）和‘乔纳金’（13），‘鸡冠’（25）和‘秦冠’（24）；而有些品种亲缘关系虽近，但带型差异却较大，例如‘津轻’（11），‘红月’（12）和‘初秋’（10），‘陆奥’（17）和‘东光’（18）；有些品种亲缘关系较远却有极相似的带型，例如‘元帅’（7）和‘初秋’（10），‘红玉’（9）和‘黄魁’（19）。说明在基因型高度杂合的苹果品种群体内存在极为复杂的谱带关系。这与夏阳^[6]对 31 个苹果品种进行同工酶分析得出的结论相似。

2.2 苹果品种的聚类分析

根据 10 对引物的扩增数据计算品种间的相似系数并进行聚类（图 2）。25 个苹果品种的相似系数在 0.601 ~ 0.953 之间，平均为 0.793。25 个苹果品种均能分开，在相似系数为 0.68 处可以分为 4 个类群，类群 包括一个品种，即‘红玉’（9）；类群 由两个品种组成即‘秦冠’（24）和‘鸡冠’（25），‘鸡冠’是‘秦冠’的父本，这两个品种聚为一类说明‘秦冠’在遗传上更多地继承了‘鸡冠’的遗传物质；类群 由 3 个品种组成，分别为‘金星’（3）、‘嘎拉’（22）和‘粉红女士’（23），这 3 个品种都含有金冠的血缘；类群 由另外 19 个品种组成，聚类结果与传统系谱基本一致。

表 2 10 对 SSR 引物对 25 个供试苹果品种的扩增结果

Table 2 Amplified results of 25 apple cultivars with 10 SSR primers

引物 Primer	退火温度 Annealing temperature ()	等位位点 No. of alleles detected	多态性带比例 Ratio of polymorphic bands (%)
CH02F06	60	7	81.4
CH01F09	60	9	73.5
04h11	53	6	78.8
CH01H10	62	7	82.0
CH02D12	66	9	65.9
CH02D11	64	7	66.3
CH01G12	56	8	56.4
GD142	56	15	100.0
GD147	58	17	86.6
02b1	65	12	100.0

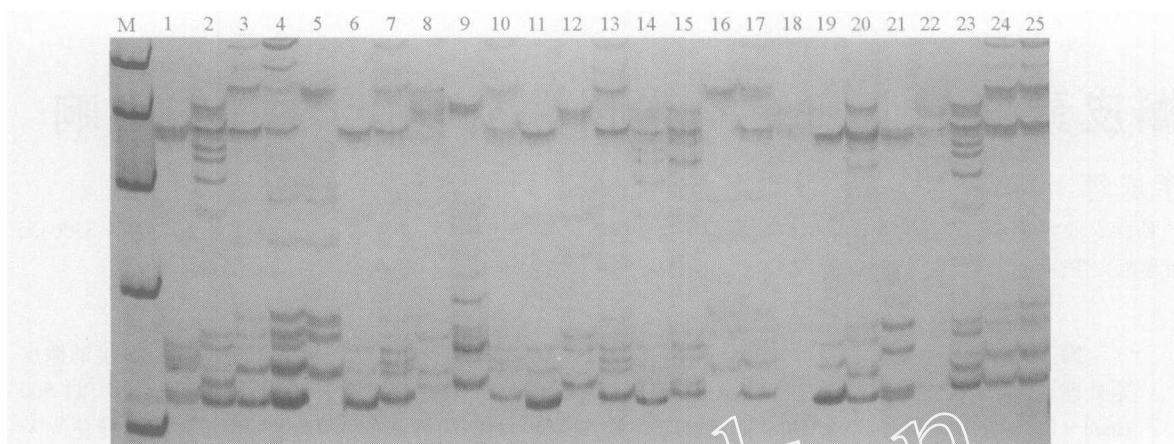


图 1 引物 02b1 对 25 个苹果品种的 SSR 扩增情况

编号见表 1, 下同。M: Gene Ruler™ 50 bp DNA ladder plus

Fig 1 Amplification of primer 02b1 in 25 cultivars of apple

The same series No. as in Table 1. The same below. M: Gene Ruler™ 50 bp DNA ladder plus

在 02b1 这个位点上, 有些品种虽然具有相同的带型 (图 1), 但是在另外 9 个位点上差异较大, 所以它们之间的相似系数较小, 例如 ‘秦冠’ (24) 和 ‘鸡冠’ (25), ‘国光’ (2) 和 ‘粉红女士’ (23)。

聚类结果与传统系谱也存在差别, 例如 ‘国光’ (2) 没有和 ‘金星’ (3) 聚到一起, ‘初秋’ (10)、‘津轻’ (11)、‘红月’ (12) 和 ‘乔纳金’ (13) 也没有紧密地聚到一起。原因一是生产上常用苹果品种是依据其商业性状进行人工选择, 所检测的位点可能与其重要的商业性状不是连锁的; 二是不同的选择标准导致了复杂的遗传多样性; 三是所检测的位点较少, 不能完全反映出整个苹果基因组的复杂情况, 导致系谱偏离。

SSR 分析中最重要的环节是引物的筛选, 只要能开发出合适的引物并对分析体系进行优化就能挖掘 SSR 在种质资源研究中的巨大潜力。本试验通过对 25 个苹果品种的 SSR 分析, 可见 DNA 多态性丰富, 其中某些特征条带可以作为品种转育过程中的血缘控制加以利用。本试验结果将为苹果杂交育种过程中的血缘控制和亲本选配以及研究物种起源和演化提供技术和理论支持。

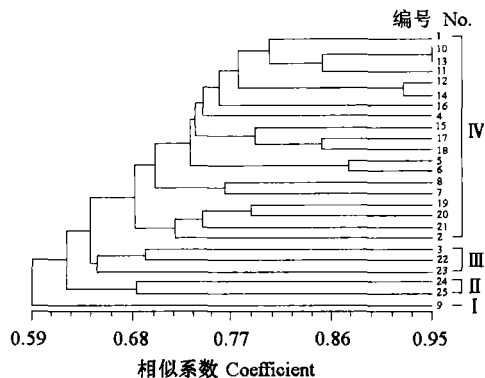


图 2 供试品种相似性树状图

Fig 2 Dendrogram of similarity among cultivars in this study

参考文献:

- 1 邹喻苹, 葛 颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记. 北京: 科学出版社, 2001. 18~19
Zou Y P, Ge S, Wang X D. Molecular marker in systemic and evolutionary botany. Beijing: Science Press, 2001. 18~19 (in Chinese)
- 2 Guilford P, Prakash S, Zhu J M, Rikkerink E, Gardiner S, Bassett H, Forster R. Microsatellites in *Malus domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 249~254
- 3 Hokanson S C, Lamboy W F, SzevecMcFadden A K, McFerson J R. Microsatellite (SSR) variation in a collection of *Malus* (apple) species and hybrids. *Euphytica*, 2001, 118: 281~294
- 4 Gianfranceschi L, Seglias N, Tarchini R, Komjanc M, Gessler C. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 1069~1076
- 5 Bassam B J, Caetano-Anolle G, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 1991, 196: 80~83
- 6 夏 阳. 苹果过氧化物同工酶研究. 甘肃农业大学学报, 1996, 31 (1): 77~80
Xia Y. Studies on isoperoxidase of apple cultivars. *Journal of Gansu Agricultural University*, 1996, 31 (1): 77~80 (in Chinese)