

# 草莓属种质资源亲缘关系的 SSR 标记分析

韩柏明, 赵密珍\*, 王 静, 于红梅

(江苏省农业科学院园艺研究所, 南京 210014)

**摘 要:** 用 20 对 SSR 引物对草莓属 83 份资源包括 14 个种和自然五倍体以及未鉴定的材料进行 PCR 扩增。在 20 个 SSR 位点共获得 363 个等位基因。每个位点扩增等位基因 8 ~ 34 个, 平均 18.2 个, 各位点多态性信息含量 (PIC) 在 0.6691 ~ 0.9431, 平均为 0.8598。聚类分析表明, 同属一个种的草莓资源被紧密地聚在一起。以种为单位, 3 个八倍体种智利草莓、弗州草莓和栽培种凤梨草莓亲缘关系很近, 而八倍体种与其他低倍性野生种亲缘关系较远; 在低倍性草莓种中, 伞房草莓、五叶草莓、日本草莓、蝦夷草莓、高原草莓、黄毛草莓和绿色草莓聚在一组, 具有较近的亲缘关系, 而森林草莓、东北草莓、东方草莓、麝香草莓和自然五倍体草莓聚在一组, 具有较近的亲缘关系。自然五倍体草莓可能起源于森林草莓或东北草莓与东方草莓或麝香草莓的自然杂交。

**关键词:** 草莓属; 种质资源; 亲缘关系; SSR

**中图分类号:** S 668.4

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2012) 12-2352-09

## Phylogenetic Relationships Among *Fragaria* Germplasm by SSR Markers

HAN Bai-ming, ZHAO Mi-zhen\*, WANG Jing, and YU Hong-mei

(Institute of Horticulture, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** Twenty SSR primer pairs were used to amplify SSR fragments for 83 *Fragaria* materials which belonging to 14 species, natural pentaploid strawberry and the unknown species. The 20 SSR primers generated a total 363 alleles. The number of alleles per locus ranged from 8 to 34, and averaged 18.2. The value of allelic polymorphism information content (PIC) ranged from 0.6691 to 0.9431, and averaged 0.8598. The dendrogram result showed that the samples clustered clearly among the same species. Among the species, the three octoploid species *F. chiloensis*, *F. virginiana* and *F. × ananassa* were clustered together, which showed the closest relationship. The three octoploid species had the distant relationship from other species. *F. corymbosa*, *F. pentaphylla*, *F. nipponica*, *F. yezoensis*, *F. tibetica*, *F. nilgerrensis* and *F. viridis* were clustered together and have closest relationship. And *F. vesca*, *F. mandschurica*, *F. oriebtalis*, *F. moschata* and the natural pentaploid strawberry were clustered together and have closest relationship. The origin of natural pentaploid strawberry may come from the cross of *F. oriebtalis*, *F. moschata* and *F. vesca*, *F. mandschurica*.

**Key words:** *Fragaria*; germplasm; genetic relationship; SSR

收稿日期: 2012-08-13; 修回日期: 2012-11-13

基金项目: 江苏省农业科学院博士后基金项目 (6511006); 农业部作物种质资源保护项目 (NB2012-2130135-7)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhaomz@jaas.ac.cn)

草莓属 (*Fragaria*) 约有 20 个种, 由二倍体、四倍体、六倍体和八倍体种构成, 其中仅一个八倍体用于栽培, 即起源于美洲种弗州草莓和智利草莓自然杂交的凤梨草莓。草莓属植物在其演化过程中经历了一系列的多倍化和自然杂交过程 (邓明琴 等, 2005)。目前, 对草莓属植物的亲缘关系和系统发生关系已进行形态学、细胞学、孢粉学和分子生物学方面的研究。雷家军等 (2006) 通过形态学方法对中国自然分布的 11 个草莓野生种进行了植物学性状描述和系统分类研究。时翠平 (2001) 通过核型分析和花粉形态学分析, 对 4 个草莓二倍体种的演化关系进行了探讨, 认为黄毛草莓是比较原始的种。雷家军等 (2001a, 2001b)、张颖君 (2003) 应用 RAPD 技术对部分野生草莓资源进行鉴定和种间亲缘关系的分析。Harrison 等 (1997) 应用 cpDNA-RFLP 技术研究了草莓属 9 个种之间的亲缘关系, 发现草莓叶绿体 DNA 在草莓属不同种之间变异程度很低。翁天均 (2011) 应用 45S rDNA-FISH 与 GISH 技术对草莓属 15 个种的亲缘关系和系统演化进行了分析, 结果显示森林草莓是比较原始的种。目前对草莓属种质资源的亲缘关系和系统演化的研究还很不充分, 许多问题还有待进一步澄清, 比如八倍体、六倍体、四倍体草莓和二倍体草莓之间的亲缘演化关系等都有待进一步研究。

SSR 标记具有多态性高、共显性、重复性好等优点, 并且 SSR 位点在属内种间, 甚至科内属间具有保守性 (Thomas & Scott, 1993)。

随着国内外越来越多草莓属植物的 SSR 引物被陆续开发 (Lewers et al., 2005; Bassil et al., 2006a, 2006b; Gil-Ariza et al., 2006; Keniry et al., 2006; Monfort et al., 2006; 董清华 等, 2011; 王静 等, 2011), SSR 技术已经被用于草莓属植物的遗传图谱构建、品种鉴定、遗传多样性分析等 (Sargent et al., 2004a, 2006, 2008; Lewers et al., 2005; Shimomura & Hirashima, 2006; Govan et al., 2008; Gil-Ariza et al., 2009; Njuguna, 2010)。但目前应用 SSR 标记研究草莓属种质资源亲缘关系的报道还很少见, 仅有 Sargent 等 (2004b) 的报道。

江苏省农业科学院国家草莓种质资源圃中收集和保存了国内外各类草莓资源, 其中草莓野生种质资源 100 多份, 经形态学鉴定包含 13 个草莓野生种, 但部分资源通过形态学还不能确定其种的归属。本研究应用 SSR 分子标记, 对草莓属 13 个野生种和 1 个栽培种之间的亲缘关系进行分析, 并对收集的部分草莓野生种质资源进行鉴定, 以期对草莓种质资源的保存和利用提供一些理论上的依据。

## 1 材料与方法

83 份草莓材料取自江苏省农业科学院国家果树种质南京草莓圃 (表 1)。2011 年春季分别取未展开的各草莓幼嫩叶片, 液氮研磨成粉末状后, 采用天根 DNA 提取试剂盒提取草莓未展开幼嫩叶片的总 DNA 用于 SSR 及其产物的检测。

PCR 反应所用 *Taq* 酶和反应缓冲液 (包含  $Mg^{2+}$  离子, dNTP) 来自广东东胜生物工程公司产品, 引物由 Invitrogen (上海) 公司合成。所用引物序列见表 2, 其中引物 UFFa04G04、UFFa14F08、UFFa16H07、UFFa20G06、UFFa19B10、UFFa02G01、UFFa01E03、UFFa03B05 参照 Bassil 等 (2006a), 引物 ChFaM1 参照 Gil-Ariza 等 (2006), 引物 EMFn170 参照 Govan 等 (2008), 引物 PBCESSRFXA9、PBCESSRFXA10 参照 Keniry 等 (2006), 引物 FAC-001、FAC-009 参照 Lewers 等 (2005), 引物 CFVCT015 参照 Monfort 等 (2006), 引物 SF-5G02、SF-1B07 参照 Njuguna (2010), 引物 EMFxa381877、EMFxa380097、EMFxa381827 参照 Sargent 等 (2008)。扩增反应在 Biometra Gradient PCR 仪上进行, PCR 反应体系 20  $\mu$ L, 含 1  $\times$  PCR 缓冲液, 2 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> dNTPs, 0.4 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 引物, 40 ng DNA, 0.8 U *Taq* DNA 聚合酶。94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50 ~ 60  $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s,

循环 32 次; 72 ℃延伸 10 min。产物经 6%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳结束后银染检测, 干燥后扫描记录结果。

对扩增图谱进行数据统计, 每对 SSR 引物检测一个位点, 根据条带的有无统计所有二元数据, 有带计为 1, 无带计为 0, 获得矩阵, 将矩阵用 NTSYS-PC 软件进行数据分析, 相似性数据采用 Dice 系数, 选用 UPGMA 法进行聚类分析。

表 1 草莓试材  
Table 1 The materials of *Fragaria* used in the experiment

序号 Code	材料 Material	种 Species	倍性 Ploidy	序号 Code	材料 Material	种 Species	倍性 Ploidy
1	吉林 15	伞房草莓	4x	27	NC001	绿色草莓	2x
	Jilin 15	<i>F. corymbosa</i> Lozinsk.				<i>F. viridis</i> Duch.	
2	钱 002	伞房草莓	4x	34	黑 3	绿色草莓	2x
	Qian 002	<i>F. corymbosa</i> Lozinsk.			Hei 3	<i>F. viridis</i> Duch.	
3	山西 1 号	伞房草莓	4x	28	吉林 12	东北草莓	2x
	Shanxi 1	<i>F. corymbosa</i> Lozinsk.			Jilin 12	<i>F. mandshurica</i> Staudt	
4	钱 004	伞房草莓	4x	29	68	东北草莓	2x
	Qian 004	<i>F. corymbosa</i> Lozinsk.				<i>F. mandshurica</i> Staudt	
5	COY 002	伞房草莓	4x	30	吉林 19 号	东北草莓	2x
		<i>F. corymbosa</i> Lozinsk.			Jilin 19	<i>F. mandshurica</i> Staudt	
6	锡金	弗州草莓	8x	31	刘艳 1	东北草莓	2x
	Xijin	<i>F. virginiana</i> Duch.			Liuyan 1	<i>F. mandshurica</i> Staudt	
7	金州	弗州草莓	8x	32	东北 0501	东北草莓	2x
	Jinzhou	<i>F. virginiana</i> Duch.			Dongbei 0501	<i>F. mandshurica</i> Staudt	
8	德国 0402	弗州草莓	8x	33	内蒙	东北草莓	2x
	Germany 0402	<i>F. virginiana</i> Duch.			Neimeng	<i>F. mandshurica</i> Staudt	
9	德国 2 号	弗州草莓	8x	35	WMH001	东北草莓	2x
	Germany 2	<i>F. virginiana</i> Duch.				<i>F. mandshurica</i> Staudt	
10	S3-1	弗州草莓	8x	36	DL002-027	东北草莓	2x
		<i>F. virginiana</i> Duch.				<i>F. mandshurica</i> Staudt	
11	S7-6	弗州草莓	8x	38	C4	麝香草莓	6x
		<i>F. virginiana</i> Duch.				<i>F. moschata</i> Lozinsk.	
12	茂县	森林草莓	2x	37	黑 10	东方草莓	4x
	Maoxian	<i>F. vesca</i> L.			Hei 10	<i>F. oriebtalis</i> Lozinsk.	
13	东北	森林草莓	2x	39	吉林 5	东方草莓	4x
	Dongbei	<i>F. vesca</i> L.			Jilin 5	<i>F. oriebtalis</i> Lozinsk.	
14	野生 2 号	森林草莓	2x	40	牡丹 1	东方草莓	4x
	Yesheng 2	<i>F. vesca</i> L.			Mudan 1	<i>F. oriebtalis</i> Lozinsk.	
15	付巨	森林草莓	2x	41	牡丹 2	东方草莓	4x
	Fuju	<i>F. vesca</i> L.			Mudan 2	<i>F. oriebtalis</i> Lozinsk.	
16	日本 4 号	森林草莓	2x	42	牡丹 3	东方草莓	4x
	Japan 4	<i>F. vesca</i> L.			Mudan 3	<i>F. oriebtalis</i> Lozinsk.	
17	李四季	森林草莓	2x	43	牡丹 4	东方草莓	4x
	Lisiji	<i>F. vesca</i> L.			Mudan 4	<i>F. oriebtalis</i> Lozinsk.	
18	林芝	高原草莓	4x	44	牡丹 5	东方草莓	4x
	Linzhi	<i>F. tibetica</i> Staudt et Dickoré			Mudan 5	<i>F. oriebtalis</i> Lozinsk.	
19	西藏 3 号	高原草莓	4x	45	牡丹 6	东方草莓	4x
	Xizang 3	<i>F. tibetica</i> Staudt et Dickoré			Mudan 6	<i>F. oriebtalis</i> Lozinsk.	
20	西藏 0401	高原草莓	4x	46	牡丹 7	东方草莓	4x
	Xizang 0401	<i>F. tibetica</i> Staudt et Dickoré			Mudan 7	<i>F. oriebtalis</i> Lozinsk.	
21	新疆 1 号	绿色草莓	2x	47	牡丹 8	东方草莓	4x
	Xinjiang 1	<i>F. viridis</i> Duch.			Mudan 8	<i>F. oriebtalis</i> Lozinsk.	
22	加拿大 2 号	绿色草莓	2x	48	牡丹 9	东方草莓	4x
	Canada 2	<i>F. viridis</i> Duch.			Mudan 9	<i>F. oriebtalis</i> Lozinsk.	
23	德国 3 号	绿色草莓	2x	49	牡丹 10	东方草莓	4x
	Germany 3	<i>F. viridis</i> Duch.			Mudan 10	<i>F. oriebtalis</i> Lozinsk.	
24	绿色 1	绿色草莓	2x	50	WDLL-002	东方草莓	4x
	Lüse 1	<i>F. viridis</i> Duch.				<i>F. oriebtalis</i> Lozinsk.	
25	新疆 0501	绿色草莓	2x	51	S7-7	东方草莓	4x
	Xinjiang 0501	<i>F. viridis</i> Duch.				<i>F. oriebtalis</i> Lozinsk.	
26	绿色 2	绿色草莓	2x	52	S20-4	东方草莓	4x
	Lüse 2	<i>F. viridis</i> Duch.				<i>F. oriebtalis</i> Lozinsk.	

续表 1

序号 Code	材料 Material	种 Species	倍性 Ploidy	序号 Code	材料 Material	种 Species	倍性 Ploidy
53	S20-5	东方草莓 <i>F. orientalis</i> Lozinsk.	4x	69	街亭 Jieting	五叶草莓 <i>F. pentaphylla</i> Lozinsk.	2x
54	东北 4-4 Dongbei 4-4	未鉴定 Unidentified		70	黑 7 Hei 7	自然五倍体 Natural pentaploid	5x
55	东北 4 Dongbei 4	未鉴定 Unidentified		71	黑 6 Hei 6	自然五倍体 Natural pentaploid	5x
56	神农 4 Shennong 4	未鉴定 Unidentified		72	DF	自然五倍体 Natural pentaploid	5x
57	神农 6 Shennong 6	未鉴定 Unidentified		73	东方 Dongfang	自然五倍体 Natural pentaploid	5x
58	东北 4-3 Dongbei 4-3	未鉴定 Unidentified		74	吉 4 Ji 4	自然五倍体 Natural pentaploid	5x
59	东北 4-1 Dongbei 4-1	未鉴定 Unidentified		75	黑 1 Hei 1	自然五倍体 Natural pentaploid	5x
60	东北 4-2 Dongbei 4-2	未鉴定 Unidentified		76	黄毛 Huangmao	黄毛草莓 <i>F. nilgerrensis</i> Schlecht.	2x
61	S7-9	五叶草莓 <i>F. pentaphylla</i> Lozinsk.	2x	77	湖北黄毛 Hubei Huangmao	黄毛草莓 <i>F. nilgerrensis</i> Schlecht.	2x
62	S7-10	五叶草莓 <i>F. pentaphylla</i> Lozinsk.	2x	78	日本 2 号 Japan 2	日本草莓 <i>F. nipponica</i> Makino	2x
63	五叶 Wuye	五叶草莓 <i>F. pentaphylla</i> Lozinsk.	2x	79	蝦夷 Ezo	蝦夷草莓 <i>F. yezoensis</i> Hara	2x
64	甘 5 Gan 5	五叶草莓 <i>F. pentaphylla</i> Lozinsk.	2x	80	智利 Chilean	智利草莓 <i>F. chiloensis</i> (L.) Duch.	8x
65	钱 002 Qian 002	五叶草莓 <i>F. pentahhylla</i> Lozinsk.	2x	81	全明星 Allstar	凤梨草莓 <i>F. × ananassa</i> Duch.	8x
66	甘肃 Gansu	五叶草莓 <i>F. pentaphylla</i> Lozinsk.	2x	82	丰香 Toyonoka	凤梨草莓 <i>F. × ananassa</i> Duch.	8x
67	天水 0701 Tianshui 0701	五叶草莓 <i>F. pentaphylla</i> Lozinsk.	2x	83	TWH-001	凤梨草莓 <i>F. × ananassa</i> Duch.	8x
68	甘 4 Gan 4	五叶草莓 <i>F. pentaphylla</i> Lozinsk.	2x				

2 结果与分析

2.1 SSR 扩增结果

利用筛选的 20 对 SSR 引物对 83 份草莓种质资源进行扩增，获得 363 个等位基因，不同引物扩增的等位基因数 8 ~ 34 个，平均为 18.2 个；各位点多态性信息含量（PIC）在 0.6691 ~ 0.9431，平均为 0.8598。图 1 为引物 UFFa14F08 在部分资源中的扩增图谱。

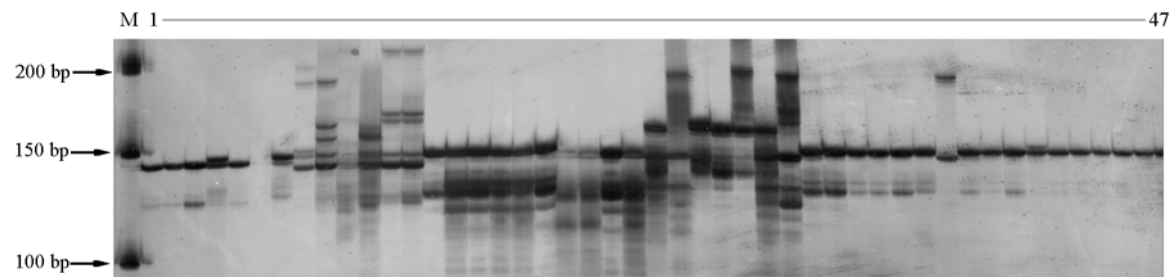


图 1 引物 UFFa14F08 在部分资源中的扩增图谱

1 ~ 47 为试材号，详见表 1。

Fig. 1 PCR profile of some accessions amplified by primer UFFa14F08

The same code as shown in Table 1.

表 2 SSR 引物及扩增结果  
Table 2 SSR Primers and the statistic of amplification result

引物 Primer	引物序列 (5' - 3') Sequence of primer (5' - 3')	重复序列 Repeat motif	片段大小/bp Size range	等位基因数 Number of Alleles	多态性信息 含量 PIC
UFFa04G04	F: ACGAGGCCTTGCTTCTTTGTA R: GCTCCAGCTTTATTGTCTTGCT	(TTC) <sub>7</sub>	187	13	0.8357
UFFa14F08	F: GTTTCCTCAGGGCCAAAAT R: CTTGAGTAGTCCTCTCACCATTG	(TC) <sub>9</sub> (TA) <sub>5</sub>	137	22	0.8619
UFFa16H07	F: CTCTACCACCATTCAAAACCTC R: CACTGGAGACATCTAGCTCAAAC	(CT) <sub>11</sub>	248	22	0.9283
UFFa20G06	F: ACTCAACCACCACATTTCACAC R: GAGAAGTTGTCAATAGTCCAGGTG	(CT) <sub>11</sub>	154	27	0.9223
UFFa19B10	F: ATTTCTGTTGTCTCCCTCCTTC R: GCTCGATCTCTAGCTTTCTCTCT	(CT) <sub>10</sub> (TC) <sub>6</sub>	183	34	0.9431
UFFa02G01	F: ACGAGGTGGGTTTTGTGTTGT R: CCCAGATGAAGAAACCGATCTA	(AG) <sub>6</sub>	159	17	0.7758
UFFa01E03	F: ACCCCATCTTCTTCAAATCTCA R: GACAAGGCCAGAGCTAGAGAAG	(CAC) <sub>10</sub>	185	19	0.9059
UFFa03B05	F: GGAATCCAAGTTACAGGCTTCA R: AAGGAGCCTCTCCAATAGCTTC	(AGC) <sub>6</sub> AA(CAA) <sub>3</sub>	231	13	0.8589
ChFaM1	F: GGAGATTATGCACAAAATATAGAGA R: CCAGAACTCCATCAGCCTCT	(GA) <sub>20</sub>	210 ~ 260	23	0.8737
EMFn170	F: CAGTTTGCCCAACAACAAGG R: TTGATGGCAACAAATCACG	(CT) <sub>9</sub>	184 ~ 239	23	0.8872
PBCESSRFXA9	F: TGACAAACATTCAACCACAC R: GTGCCCTCAGAAGACTACC	(CT) <sub>8</sub>	194 ~ 255	18	0.8768
PBCESSRFXA10	F: GGAGCAAGGAAGCAAGGT R: CCGTGGGAGAAGTTGAAG	(GA) <sub>7</sub>	185 ~ 204	12	0.8069
FAC-001	F: AAATCCTGTTCTGCCAGTG R: TGGTGACGTATTGGGTGATG	(AAAAT) <sub>7</sub>	212	16	0.8926
FAC-009	F: CATCGACTGCAAGTGTGGAC R: TGGCTACCAAAGAACACGAA	(TG) <sub>6</sub>	244	12	0.7959
CFVCT015	F: CAAAATGTATTAGGGCCTGCAT R: GAAGCGGGTTGAGCATGT	(GA) <sub>18</sub>	144	27	0.9374
SF-5G02	F: CTTTTGCTGCTAGCTCTTGTG R: TACGTA CTCCACATCCCATTTG	(TC) <sub>11</sub>	229	22	0.8783
SF-1B07	F: GGAGAGACAGACCTCAAAGGTG R: GAGGGGTTCTGTTTTTGACAAG	CTs(AG) <sub>7</sub>	163	18	0.8575
EMFxa381877	F: CCACAAATGAGGGAAGATTAGG R: CATCTCGAAGTCACTGGTATATGG	(AT) <sub>5</sub>	184	8	0.6691
EMFxa380097	F: GTTTTGCTTGGAGGTGTAAAGG R: GCTGCTGCTCTCTGTGAATGTG	(AG) <sub>5</sub>	185	9	0.8619
EMFxa381827	F: AGGTCTATGGTCCTGAAGCAAC R: CACTTGCCGCAGAAGAAAAA	(TA) <sub>9</sub>	155	8	0.8270
平均 Average				18.2	0.8598

2.2 聚类分析

根据 83 个样品在 20 个 SSR 位点检测的 363 个等位基因，计算样品间的 (Dice) 遗传相似系数，并进行聚类分析。结果 (图 2) 表明，经过形态学、染色体倍性检测等鉴定为同一个种的草莓资源被很好地聚在一起，如 6 份来源不同的弗州草莓资源被聚在一起，3 份草莓栽培品种资源被聚在一起，其他同属于东北草莓、森林草莓、五叶草莓、伞房草莓、绿色草莓、黄毛草莓但不同来源的草莓资源均被紧密地聚在一起，另外，6 份来源于东北的自然五倍体草莓也紧密地聚在一起。

以种为单位，在遗传相似系数 0.71 处分为两个组，八倍体的弗州草莓、智利草莓和栽培种凤梨草莓聚为一组 (I 组)。其他样品聚为一组 (II 组)。在 I 组中，栽培种凤梨草莓和智利草莓首先聚在一起，再和弗州草莓聚在一起。

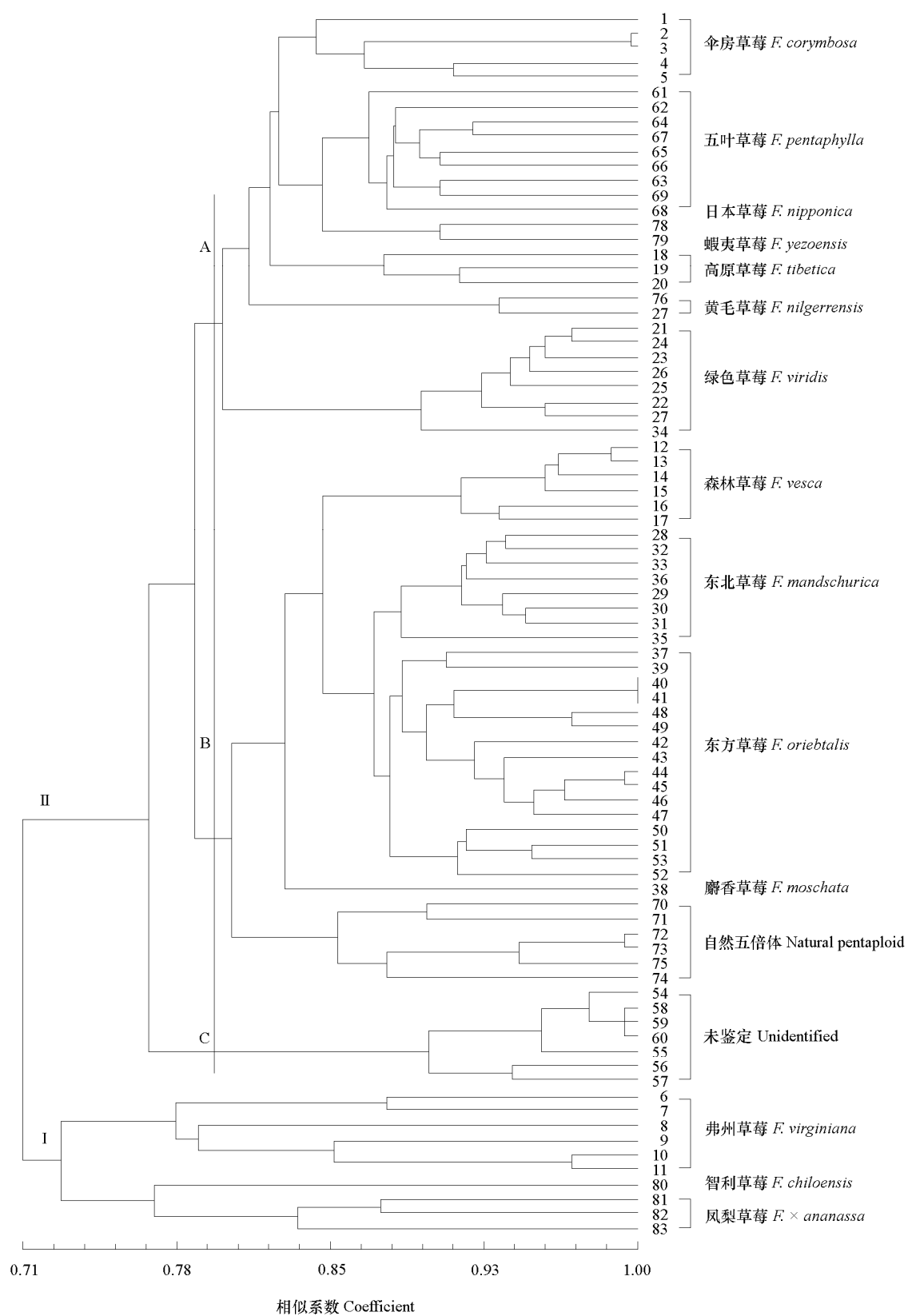


图 2 基于 SSR 标记的聚类分析

Fig. 2 Dendrogram by cluster analysis based on SSR markers

在相似系数 0.80 处, 又可将 II 组分为 3 个亚组。伞房草莓、五叶草莓、日本草莓、蝦夷草莓、高原草莓、黄毛草莓和绿色草莓聚为 A 组。在 A 组中, 来自日本的日本草莓和蝦夷草莓聚在一起, 蝦夷草莓是日本草莓的变种, 其相似系数达到 0.9068。自然五倍体草莓与森林草莓、东北草莓、东方草莓、麝香草莓聚为 B 组, 东北草莓和东方草莓首先聚在一起, 再依次与森林草莓和麝香草莓聚在一起, 表明东北草莓和东方草莓亲缘关系较近。自然五倍体草莓与森林草莓、东北草莓、东方草莓、麝香草莓聚在一起, 表明自然起源的草莓五倍体材料可能起源于森林草莓或东北草莓与东方草莓或麝香草莓自然杂交。7 份来源于东北和湖北神农架野生材料聚为一组 (C 组), 这 7 份野生材料, 通过形态学还未能鉴定属于哪个种, 通过 SSR 分子标记分析, 这 7 份材料单独聚在一起, 而不与其他草莓种聚在一起, 因此可能是一个新种。

通过 SSR 标记的聚类分析, 对于部分通过形态学还未最终确定种的归属的野生材料进行了分子鉴定。初步明确了钱 002 (2)、COY002 (5) 应归属伞房草莓; WMH-001 (35) 应归属于东北草莓; 牡丹江 1 号 (40), 牡丹江 2 号 (41), 牡丹江 3 号 (42), 牡丹江 4 号 (43), 牡丹江 5 号 (44), 牡丹江 6 号 (45), 牡丹江 7 号 (46), 牡丹江 8 号 (47), 牡丹江 9 号 (48), 牡丹江 10 号 (49) 等应归属于东方草莓。

### 3 讨论

本研究从 80 对草莓 SSR 引物中筛选出 20 对条带清晰、多态性高的引物用于草莓属不同种间亲缘关系的分析。通过 SSR 聚类分析, 能够将通过形态学鉴定属于同一个种的来源不同的草莓野生材料紧密的聚在一起, 并对一些新收集的野生材料的归属进行了分子鉴定。

栽培种八倍体的凤梨草莓起源于弗州草莓和智利草莓的杂交种。在本研究中, 栽培品种先与智利草莓聚在一起, 再与弗州草莓聚在一起, 这说明栽培种凤梨草莓与智利草莓的亲缘关系更近一些。关于八倍体草莓的起源, 前人通过种间杂交试验 (Federova, 1946; Senanayake & Bringham, 1967)、细胞遗传学 (Bringham, 1990) 以及分子系统学 (Rousseau-Gueutin et al., 2009) 等探讨了八倍体草莓与低倍体草莓之间可能的起源和演化关系。本研究中 3 个八倍体草莓单独的聚为一组, 与草莓低倍性野生种的亲缘关系相对较远, 本结果并未能揭示八倍体草莓的起源, 这可能是八倍体草莓的染色体组的遗传背景过于复杂。下一步将尝试利用母系遗传的叶绿体 DNA 去探讨八倍体草莓的起源。

本研究表明, 森林草莓、东北草莓、东方草莓、麝香草莓和自然五倍体材料聚在一组。其中二倍体的东北草莓与四倍体的东方草莓首先聚在一起, 再依次与森林草莓、麝香草莓和自然五倍体材料聚在一起。东北草莓与东方草莓在形态学上相近, 在自然分布上都有共同的分布地域, 均分布在内蒙古、黑龙江、吉林等地。因此, 四倍体的东方草莓很可能起源于二倍体的东北草莓, 这与雷家军等 (2001b) 的研究结果一致。另外, 本结果表明, 森林草莓与东北草莓和东方草莓的亲缘关系较近, 张颖君 (2003) 应用 RAPD 技术并结合前人的研究结果推测, 森林草莓依次演化为东北草莓和东方草莓, 本研究结果进一步证实这一点。本研究结果显示六倍体的麝香草莓与东方草莓、东北草莓和森林草莓聚在一组, 表现出较近的亲缘关系, 这与雷家军等 (2001b) 应用 RAPD 技术分析的结果相似。六倍体的麝香草莓可能起源于东方草莓与森林草莓或东北草莓自然杂交经过未减数配子加倍形成的。但麝香草莓分布于欧洲, 对于我国是否存在麝香草莓的自然分布还无定论。我国很可能存在未发现的麝香草莓的自然分布。

葛会波等 (1997) 通过染色体观察, 在国内首先发现了草莓的自然五倍体类型吉林 2 号, 黑龙江 1 号, 之后, 在我国吉林省、黑龙江省等地又发现许多自然五倍体野生草莓群体, 这些自然五倍

体草莓植株形态相近, 但不同地点采集的自然五倍体草莓育性变化较大。在形态学上, 自然五倍体草莓与麝香草莓、东方草莓相近。本研究结果表明, 在分子水平上, 自然五倍体草莓与麝香草莓、东方草莓、东北草莓、森林草莓具有较近的亲缘关系。因此, 自然五倍体草莓可能来源于四倍体东方草莓或二倍体东北草莓与六倍体麝香草莓的自然杂交, 也可能来自东方草莓的未减数配子与东北草莓或森林草莓的自然杂交。

五叶草莓依次与日本草莓及其变种蝦夷草莓、伞房草莓、高原草莓、黄毛草莓和绿色草莓聚在一组。本结果显示, 伞房草莓与五叶草莓的亲缘关系很近, 而与东方草莓的亲缘关系较远, 但从形态学上观察, 与五叶草莓相比, 伞房草莓更近似于东方草莓。Iwatsubo 和 Naruhashi (1989) 通过染色体核型分析发现日本草莓及其变种蝦夷草莓与森林草莓的核型很近似。本研究结果显示日本草莓及其变种蝦夷草莓与森林草莓并未表现出很近的亲缘关系, 与森林草莓相比, 日本草莓及其变种蝦夷草莓与五叶草莓的亲缘关系更近一些。另外, 对于 7 份未鉴定的聚在一起草莓资源是否为一个新种, 还有待进一步通过形态学、细胞学和分子生物学技术鉴定。

## References

- Bassil N V, Gunn M, Folt A K, Lewers K. 2006a. Microsatellite markers for *Fragaria* from 'Strawberry Festival' expressed sequence tags. *Molecular Ecology Notes*, 6: 473 - 476.
- Bassil N V, Njuguna W, Slovin J P. 2006b. EST-SSR markers from *Fragaria vesca* L. cv. Yellow Wonder. *Molecular Ecology Notes*, 6: 806 - 809.
- Bringham R S. 1990. Cytogenetics and evolution in American *Fragaria*. *Hort Science*, 25 (8): 879 - 881.
- Deng Ming-qin, Lei Jia-jun. 2005. China fruit records-volume strawberry. Beijing: China Forestry Publishing House: 17 - 20. (in Chinese)
- 邓明琴, 雷家军. 2005. 中国果树志·草莓卷. 北京: 中国林业出版社: 17 - 20.
- Dong Qing-hua, Wang Xi-cheng, Zhao Mi-zhen, Song Chang-nian, Ge An-jing, Wang Jing. 2011. Development of EST-derived SSR markers and their application in strawberry genetic diversity analysis. *Scientia Agricultura Sinica*, 44 (17): 3603 - 3612.
- 董清华, 王西成, 赵密珍, 宋长年, 葛安静, 王 静. 2011. 草莓 EST-SSR 标记开发及在品种遗传多样性分析中的应用. *中国农业科学*, 44 (17): 3603 - 3612.
- Federova N J. 1946. Crossability and phylogenetic relations in the main species of *Fragaria*. *Acad des Sci URSS Compt Rend*, 52: 545 - 547.
- Ge Hui-bo, Lei Jia-jun, Guo Zhen-huai. 1997. A preliminary report on chromosome number and interspecific hybridization in *Fragaria*. *Journal of Agricultural University Hebei*, 20 (3): 56 - 60. (in Chinese)
- 葛会波, 雷家军, 郭振怀. 1997. 草莓属植物染色体观察及种间杂交研究初报. *河北农业大学学报*, 20 (3): 56 - 60.
- Gil-Ariza D J, Amaya I, Botellia M A, Muñzblanco J, Caballero J L, López-Aranda J M, Valpuesta V, Sánchez-Sevilla J F. 2006. EST-derived polymorphic microsatellites from cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa*) are useful for diversity studies and varietal identification among *Fragaria* species. *Molecular Ecology Notes*, 6: 1195 - 1197.
- Gil-Ariza D J, Amaya I, Lopez-Aranda J M, Sanchez-Sevilla J F, Botella M A, Valpuesta V. 2009. Impact of plant breeding on the genetic diversity of cultivated strawberry as revealed by expressed sequence tag-derived simple sequence repeat markers. *J Amer Soc Hort Sci*, 134 (3): 337 - 347.
- Govan C L, Simpson D W, Johnson A W, Tobutt K R, Sargent D J. 2008. A reliable multiplexed microsatellite set for genotyping *Fragaria* and its use in a survey of 60 *F. × ananassa* cultivars. *Mol Breeding*, 22: 649 - 661.
- Harrison R E, Luby J J, Furnier G R. 1997. Chloroplast DNA restriction fragment variation among strawberry (*Fragaria* spp.) taxa. *J Amer Soc Hort Sci*, 122 (1): 63 - 68.
- Iwatsubo Y, Naruhashi N. 1989. Karyotypes of three species of *Fragaria* (Rosaceae). *Cytologia*, 54: 493 - 497.
- Keniry A, Hopkins C J, Jewell E, Morrison B, Spangenberg G C, Edwards D, Batley J. 2006. Identification and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers from *Fragaria × ananassa* expressed sequences. *Molecular Ecology Notes*, 6: 319 - 322.
- Lei Jia-jun, Dai Han-ping, Deng Ming-qin, Zhao Mi-zhen, Qian Ya-ming. 2006. Studies on the taxonomy of the strawberry (*Fragaria*) species distributed in China. *Acta Horticulture Sinica*, 33 (1): 1 - 5. (in Chinese)



- 雷家军, 代汉萍, 邓明琴, 赵密珍, 钱亚明. 2006. 中国草莓属植物的分类研究. 园艺学报, 33 (1): 1 - 5.
- Lei Jia-jun, Deng Ming-qin, Wu Lu-ping, Mochizuki T, Noguchi Y, Song K. 2001a. *Fragaria viridis* Duch. distributed in China was certified by classificatory observation and RAPD analysis. Acta Horticulture Sinica, 28 (2): 119 - 122. (in Chinese)
- 雷家军, 邓明琴, 吴禄平, 望月龙也, 野口裕司, 曾根一纯. 2001a. 新疆天山野生草莓与绿色草莓 (*Fragaria viridis* Duch) 同一性的鉴定. 园艺学报, 28 (2): 119 - 122.
- Lei Jia-jun, Tatsuya Mochizuki, Deng Ming-qin. 2001b. Studies on the diploid stawberry species *Fragaria mandschurica* Staudt. Journal of Fruit Science, 18 (6): 337 - 340. (in Chinese)
- 雷家军, 望月龍也, 邓明琴. 2001b. 草莓属二倍体种东北草莓 (*Fragaria mandschurica* Staudt) 研究. 果树学报, 18 (6): 337 - 340.
- Lewers K S, Styan S M N, Hokanson S C. 2005. Strawberry GenBank - derived and genomic simple sequence repeats (SSR) markers and their utility with strawberry, blakberry, and red and black raspberry. J Amer Soc Hort Sci, 130 (1): 102 - 115.
- Monfort A, Vilanova S, Davis T M, Arús P. 2006. A new set of polymorphic simple sequence repeat (SSR) markers from a wild strawberry (*Fragaria vesca*) are transferable to other diploid *Fragaria* species and to *Fragaria* × *ananassa*. Molecular Ecology Notes, 6: 197 - 200.
- Njuguna W. 2010. Development and use of molecular tools in *Fragaria* [Ph. D. Dissertation]. Eugene: Oregon State University.
- Rousseau-Gueutin M, Gaston A, Aïnouche A, Aïnouche M L, Olbricht K, Staudt G, Richard L, Denoyes-Rothan B. 2009. Tracking the evolutionary history of polyploidy in *Fragaria* L. (strawberry): New insights from phylogenetic analyses of low-copy nuclear genes. Molecular Phylogenetics and Evolution, 51: 515 - 530.
- Sargent D J, Cipriani G, Vilanova S, Gil-Ariza D, Arús P, Simpson D W, Tobutt K R, Monfort A. 2008. The development of a bin mapping population and the selective mapping of 103 markers in the diploid *Fragaria* reference map. Genome, 51: 120 - 127.
- Sargent D J, Clarke J, Simpson D W, Tobutt K R, Arús P, Monfort A, Vilanova S, Denoyes-Rothan B, Rousseau M, Foltá K M, Bassil N V, Battey N H. 2006. An enhanced microsatellite map of diploid *Fragaria*. Theor Appl Genet, 112: 1349 - 1359.
- Sargent D J, Davis TM, Tobutt K R, Wilkinson M J, Battey N H, Simpson D W. 2004a. A genetic linkage map of microsatellite, gene-specific and morphological markers in diploid *Fragaria*. Theor Appl Genet, 109: 1385 - 1391.
- Sargent D J, Hadonou A M, Wilkinson M J, Battey N H, Hawkins J A, Simpson D W. 2004b. Cross-species amplification and phylogenetic reconstruction using *Fragaria* microsatellite primers. Acta Horticulturae, 649: 87 - 92.
- Senanayake Y D A, Bringham R S. 1967. Origin of *Fragaria* polyploids. I. Cytological analysis. Amer J Bot, 54 (2): 221 - 228.
- Shi Cui-ping. 2001. Cytological studies of *Fragaria* plants [M. D. Dissertation]. Baoding: Agricultural University of Heibei. (in Chinese)
- 时翠平. 2001. 草莓属 (*Fragaria*) 植物细胞学研究 [硕士论文]. 保定: 河北农业大学.
- Shimomura K, Hirashima K. 2006. Development and characterization of simple sequence repeats (SSR) as markers to identify strawberry cultivars (*Fragaria* × *ananassa* Duch.). Journal of Japanese Society for Horticultural Science, 75 (5): 399 - 402.
- Thomas M R, Scott N S. 1993. Miceosatelite repeat in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STS). Thero Appl Genet, 88: 973 - 980.
- Wang Jing, Zhao Mi-zhen, Yu Hong-mei, Wang Zhuang-wei. 2011. Development and utilization of EST-SSR marker in strawberry. Journal of Fruit Science, 28 (4): 721 - 726. (in Chinese)
- 王 静, 赵密珍, 于红梅, 王壮伟. 2011. 草莓 EST-SSR 标记的开发与应用. 果树学报, 28 (4): 721 - 726.
- Weng Tian-jun. 2011. Study on relationship and systematic taxonomy of wild species in *Fragaria* by 45S rDNA-FISH and GISH analysis [Ph. D. Dissertation]. Chongqing: Southwest University. (in Chinese)
- 翁天均. 2011. 基于 45S rDNA-FISH 与 GISH 分析的草莓属 (*Fragaria*) 野生种亲缘关系与系统分类研究 [博士论文]. 重庆: 西南大学.
- Zhang Ying-jun. 2003. Studies on the relationship of strawberry (*Fragaria*) by using RAPD [M. D. Dissertation]. Baoding: Agricultural University of Heibei. (in Chinese)
- 张颖君. 2003. 草莓属 (*Fragaria*) 植物亲缘关系的 RAPD 研究 [硕士论文]. 保定: 河北农业大学.