

草莓品种亲缘关系的 AFLP 分子标记分析

张运涛^{1,2} 冯志广² 李天忠² 董 静¹ 王桂霞¹ 张开春¹ 韩振海²

(¹北京市农林科学院林业果树研究所, 北京 100093; ²中国农业大学园艺植物研究所, 北京 100094)

摘 要: 利用 AFLP 技术对我国国家草莓资源圃内保存的 107 个草莓品种进行了 DNA 多态性分析。从 64 对 “2+2” 引物中筛选出 10 对引物应用于扩增基因组 DNA, 共获得清晰可辨的 581 条带, 其中 412 条为多态性带。UPGMA 方法聚类分析结果显示, AFLP 分子鉴定结果与其系谱关系非常一致, 表明 AFLP 指纹图谱分析能很好地鉴别草莓品种之间的遗传关系。

关键词: 草莓; AFLP; 亲缘关系; 分子鉴定

中图分类号: S 668.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 06-1199-04

Genetic Relationships of Strawberry Cultivars by AFLP Analysis

Zhang Yuntao^{1,2}, Feng Zhiguang², Li Tianzhong², Dong Jing¹, Wang Guixia¹, Zhang Kaichun¹, and Han Zhenhai²

(¹ Forestry and Pomology Institute, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100093, China; ² Institute of Horticultural Plants, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: The AFLP analysis was conducted in order to investigate the blood relationship among the 107 strawberry cultivars conserved in Beijing, the National Strawberry Germplasm Repository. 10 pairs primers were selected from 64 primer pairs (2+2) to amplify the genomic DNA s. Total 581 AFLP fragments were obtained, 412 of them were polymorphic markers. The phylogenetic tree generated by UPGMA method showed the genetic relationship among cultivars identified by AFLP was better identical with their pedigree. AFLP technique was proved to be a very reliable method to study the genetic relationships of strawberry cultivars.

Key words: Strawberry; AFLP; Genetic relationship; Molecular identification

现代草莓栽培品种均属于凤梨草莓 (*Fragaria × ananassa* Duch.), 起源于两个美洲种弗州草莓和智利草莓的自然杂交。我国虽然拥有极为丰富的野生草莓资源, 但目前生产上使用的栽培品种多数引自国外。由于不同地区之间频繁引种以及草莓本身的繁殖特性, 使得品种名称十分混乱, 同物异名和同名异物的现象非常普遍^[1]。本试验利用 AFLP 技术对草莓栽培品种进行分析, 旨在探索该技术在鉴定草莓种质资源遗传多样性和亲缘关系中的有效性, 为草莓种质资源的收集、保存、利用提供理论依据。

1 材料与方法

供试材料来自北京国家草莓种质资源圃保存的 107 个草莓栽培品种 (表 1)。以幼嫩叶片为材料, 采用改进的 CTAB 法提取 DNA, 并用紫外吸收法和 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测^[2~5]。

AFLP 荧光标记的 PCR 反应程序, 模板的酶切、连接、预扩增及选择性扩增的反应液配方和反应程序参照文献 [6]。在此基础上进行改进, 找出了最佳反应体系: 预扩产物按 1:20 稀释, 作为选扩模板; 选择性扩增: 在 0.2 mL 离心管中加入 25 μL 总体: 预扩增稀释样品 2 μL, 10×PCR buffer 2.5 μL, dNTPs 0.5 μL, *Eco*R I 引物 1 μL (共 8 种), *Mse* I 引物 1 μL (共 4 种), *Taq* 酶 0.5 μL, H₂O 17.5 μL], 混匀, 离心 5~10 s, 按下列参数进行 PCR 循环: 94℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 80 s; 以后每轮循环温度递减 0.7℃, 扩增 12 轮; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 80 s, 扩增 23 轮。远红外双

收稿日期: 2006-04-28; 修回日期: 2006-09-13

基金项目: 北京市科委资助项目 (H012010390113)

荧光 ABI 377测序仪分析 AFLP图谱。聚丙烯酰胺变性胶浓度为 6%，厚度 0.2 mm，电泳缓冲液为 1×TBE，每样品电泳加入量 1 μL，电泳，计算机同步显示荧光自动检测，将电泳图谱中同一位置上的条带视为 1个性状，有条带计“1”，无计“0”。聚类分析采用 Statistica软件，UPGMA 聚类法。

表 1 供试材料

Table 1 Strawberry cultivars used in the experiment

序号 No	品种 Cultivars	来源 Sources	序号 No	品种 Cultivars	来源 Sources	序号 No	品种 Cultivars	来源 Sources
1	阿特拉斯 Atlas	美洲 America	37	高斯克 Govevor Sincoe	美洲 America	73	日出 Sunrise	美洲 America
2	矮丰 Mohawk	美洲 America	38	戈雷拉 Gorella	欧洲 Europe	74	赛尔娃 Selva	美洲 America
3	艾拉维拉 Elvira	欧洲 Europe	39	鬼怒甘 Kinuama	日本 Japan	75	三星 Tristar	美洲 America
4	爱迪 Addie	欧洲 Europe	40	哈尼 Honeoye	美洲 America	76	森加森加拉 Senga Sengana	欧洲 Europe
5	爱尔桑塔 El Santa	欧洲 Europe	41	号手 Trumpeter	美洲 America	77	盛冈 16 Morioka 16	日本 Japan
6	安娜 Anna	欧洲 Europe	42	红灯 Hongdeng	中国 China	78	石莓 1 Shimei 1	中国 China
7	八千代 Yachiyo	日本 Japan	43	红手套 Red Gauntled	欧洲 Europe	79	石桌 1 Shizhuo 1	中国 China
8	宝交早生 Hokowase	日本 Japan	44	红衣 Redcoat	美洲 America	80	首红 Redchief	美洲 America
9	北辉 Kitanokagayaki	日本 Japan	45	火花 Sparkle	美洲 America	81	硕丰 Shuofeng	中国 China
10	波波拉特卡 Pupuratka	欧洲 Europe	46	佳节 Holiday	美洲 America	82	硕露 Shuolu	中国 China
11	波哥塔 Bogota	欧洲 Europe	47	剑桥之娇 Cambridge Favorite	欧洲 Europe	83	硕蜜 Shuomi	中国 China
12	波混 Bohun	欧洲 Europe	48	奖赏 Bounty	美洲 America	84	苏维尼亚 Suweinier	欧洲 Europe
13	波卡洪塔斯 Pocahontas	美洲 America	49	静宝 Shizutakara	日本 Japan	85	绥中 Suizhong	中国 China
14	布兰登堡 Blandenbunrg	欧洲 Europe	50	静香 Shizunoka	日本 Japan	86	索菲亚 Sofia	欧洲 Europe
15	昌黎红鸡心 Changli Hongjixin	中国 China	51	久留米 103 Kurume 103	日本 Japan	87	泰后 Tahoe	美洲 America
16	长虹 1 Changhong 1	中国 China	52	久能早生 Kunouwase	日本 Japan	88	汤姬 Yuhime	日本 Japan
17	长虹 2 Changhong 2	中国 China	53	骏河 Sunaga	日本 Japan	89	特里拉 Tenira	欧洲 Europe
18	常德乐 Chandler	美洲 America	54	卡林纳 Karina	欧洲 Europe	90	梯旦 Titan	美洲 America
19	春香 Harunoka	日本 Japan	55	卡麦罗莎 Camarosa	美洲 America	91	提奥加 Tioga	美洲 America
20	春星 Chunxing	中国 China	56	开拓者 Settler	美洲 America	92	甜查理 Sweet Charlie	美洲 America
21	春旭 Chunxu	中国 China	57	康弗吐拉 Confitura	欧洲 Europe	93	铁庄稼 Surecrop	美洲 America
22	达娜 Donner	美洲 America	58	丽红 Reiko	日本 Japan	94	图特拉 Tudla	欧洲 Europe
23	达赛莱克特 Darselect	欧洲 Europe	59	栃乙女 Tochiotome	日本 Japan	95	威斯塔尔 Veestar	美洲 America
24	大连四季 Dalian Siji	中国 China	60	罗宾逊 Luobinson	美洲 America	96	卫士 Guardian	美洲 America
25	丹东大果 Dandong Daguo	中国 China	61	马岗 Magang	中国 China	97	新红光 Xin Hongguang	中国 China
26	道格拉斯 Douglas	美洲 America	62	玛丽亚 Maliya	欧洲 Europe	98	新明星 Xin Mingxing	中国 China
27	帝国 Empire	美洲 America	63	米德威 Midway	美洲 America	99	星都 1号 Xingdu 1	中国 China
28	多佛 Dover	美洲 America	64	明宝 Meiho	日本 Japan	100	星都 2号 Xingdu 2	中国 China
29	绯美子 Himiko	日本 Japan	65	明晶 Mingjing	中国 China	101	幸香 Sachinoka	日本 Japan
30	丰香 Toyonoka	日本 Japan	66	明磊 Minglei	中国 China	102	印度卡 Induka	欧洲 Europe
31	弗吉尼亚 Virginia	欧洲 Europe	67	明旭 Mingxu	中国 China	103	园艺四季 Yuanyi Siji	中国 China
32	福建四季 Fujian Siji	中国 China	68	女峰 Nyoho	日本 Japan	104	早光 Earliglow	美洲 America
33	抚松大鸡冠 Fusong Dajiguan	中国 China	69	诺宾卡 HOBBICA	欧洲 Europe	105	章姬 Akihime	日本 Japan
34	富丽 Fuli	欧洲 Europe	70	派加罗 Pajaro	美洲 America	106	肇国 Hatsukuni	日本 Japan
35	嘎玛 Gama	欧洲 Europe	71	千代田 Chiyoda	日本 Japan	107	钻石 Diamante	美洲 America
36	港丰 Gangfeng	日本 Japan	72	全明星 Allstar	美洲 America			

2 结果与分析

2.1 DNA提取结果及检测

用紫外分光光度计对所提取的 DNA 进行检测时发现，OD260/OD280 值在 1.8 左右。电泳检测发现基因组 DNA 主带清晰完整，无弥散带，RNA 去除干净，点样孔清晰无发亮现象，杂质祛除干净，DNA 纯度较高，符合 AFLP 技术要求。

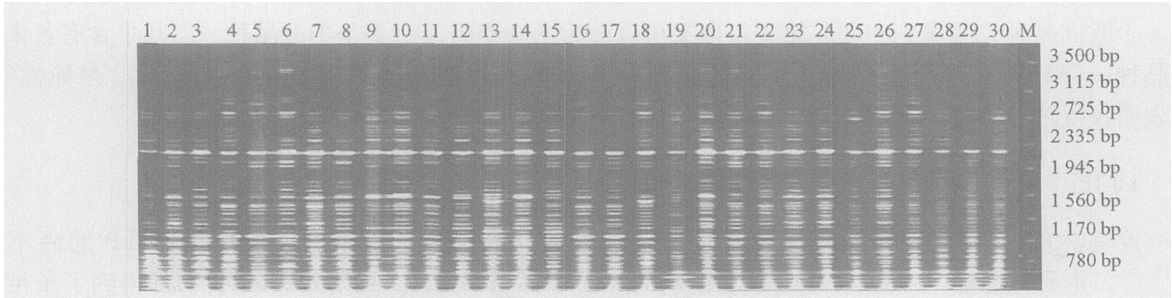


图 1 引物 E3/M8 扩增的 AFLP 图谱

Fig 1 AFLP patterns of strawberry cultivars (primer E3/M8)

2.2 AFLP 引物筛选和体系建立

本研究选用“2+2”引物组合方式对 *EcoR* I (8个) 和 *Mse* I (8个) 完全排列的 64个引物组合进行筛选, 结果有 10对电泳图谱条带清晰, 多态性丰富, 重复性好。这 10对引物对 107份材料进行 AFLP 分析, 共扩增出了 581条带, 其中 412条为多态性带, 多态性位点 70.9%, 平均每对引物产生 58.1条带和 41.2条多态性带。引物对 E3/M8 (图 1) 共扩增出 72条带, 其中多态性带最多, 55条 (76.4%); E6/M5 只产生了 37条带, 多态性带 21条 (56.8%), 在所有引物对中最少。

2.3 聚类分析

在聚类图 (图 2) 上可以看出绝大多数材料的相似系数在 0.75~0.95之间, 说明亲缘关系比较近, 很难在它们之间划分出明显的类群。

分析得出一些大致规律: (1) 近年培育的品种遗传基础更加接近, 早期品种的遗传背景较为丰富。如长虹 1号和长虹 2号, 星都 1号和星都 2号, 新明星和全明星, 丰香和港丰都在相似系数很高的水平聚到一起。系谱考证长虹 1号和长虹 2号、星都 1号和星都 2号均属于同一亲本组合的姊妹系, 新明星是从全明星中优选出的, 港丰是从丰香的实生种子中选育而出。而欧洲早期的品种在聚类图中的位置比较分散, 即使相对集中到一起的品种相似系数也比较小, 说明它们亲缘关系较远。(2) 品种的亲缘关系与来源有一定相关性, 但并不明显, 可以总结为大聚集, 小混杂。在相似系数 0.76的水平可以把供试草莓品种分为 4个大组, 第 1组以日本品种为主, 第 4组以欧洲品种为主, 第 2组和第 3组美洲品种较多, 源自我国的品种则分散于各个组中。大组内部亲缘

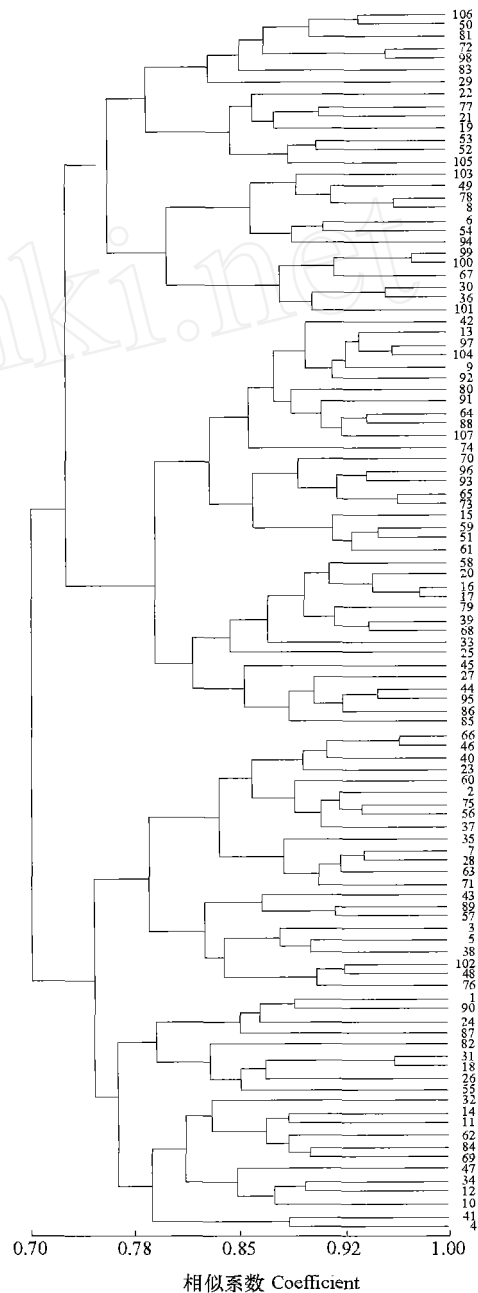


图 2 草莓品种聚类图

Fig 2 Dendrogram of strawberry cultivars

关系比较混杂,如第1组中多数是日本品种,混有3个欧洲品种,且聚到一起;第2组内又可以分为两个小组,一多是美洲品种,二几乎含有各来源的品种。(3)具有某些特性的品种在聚类图中很分散,例如大果性、四季性、抗病性、早熟性等,这表明仅仅依靠表现性状来评价一个品种是远远不够的,需深入了解其性状的遗传规律。

3 讨论

曾有学者用不同的分子标记方法对草莓的遗传背景做了一些研究,但应用 AFLP 的尚不多见^[7~9]。本研究通过10对引物组合成功鉴别107个草莓品种的亲缘关系,不同引物都得到了条带丰富的 AFLP 标记,而且重复结果相同,这表明本试验所得到的草莓品种指纹图谱是非常稳定的,可作为品种亲缘关系与品种鉴别的参考依据。

凤梨草莓栽培和育种最早起源于欧洲,很多综合性状优良的品种和品系都含有欧洲品种的遗传因素,这表现在植株生长势强、抗逆性好、产量较高等方面,代表品种有森加森加拉、戈雷拉等。美洲品种和日本品种在亲本选择上都考虑了许多欧洲品种的优点,并且发展了具有自己特色的育种目标,比较突出的是大果性、果实硬度、含糖量等,但是由于历史原因很多系谱记载并不完全或存在误差,通过 AFLP 分子标记,本试验所做的聚类图可以比较清楚认识和分析这种关系。

在本研究中,利用一对高效引物就可以区分遗传上非常接近的品种,如索非亚和帝国,阿特拉斯和梯旦,高斯克和开拓者等,这些品种都具有相同或相似的父母本,亲缘关系很近,常规方法很难区分。另外亲本和子代的关系也能在图谱中很好地表现出来,如丰香和春香,高斯克和佳节,甜查理和派加罗等,属于亲代和子代的遗传关系,遗传距离较近。

参考文献:

- 马鸿翔,盛炳成,戴子林,陈秀兰,顾 军. 草莓品种的遗传距离研究. 江苏农业学报, 1995, 11 (3): 41~45
Ma H X, Sheng B C, Dai Z L, Cheng X L, Gu J. Studies on genetic distances among strawberry varieties. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 1995, 11 (3): 41~45 (in Chinese)
- 明 军,张后翔,毛庆山,晏小兰. '美人'梅与其近缘种亲缘关系的 AFLP 研究. 园艺学报, 2002, 29 (6): 588~589
Ming J, Zhang Q X, Mao Q S, Yan X L. AFLP analysis of genetic relationships of *Pruus mume* 'Meiren' and relatives. Acta Horticulturae Sinica, 2002, 29 (6): 588~589 (in Chinese)
- 夏秀忠,冯 斗,覃 艳. AFLP 对广西主栽木薯品种的遗传多态性分析. 西南农业学报, 2005, 18 (6): 818~821
Xia X Z, Feng D, Tan Y. AFLP analysis of genetic diversity within and among Guangxi main cassava cultivars. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2005, 18 (6): 818~821 (in Chinese)
- 孙德岭,赵 前,宋文芹,陈瑞阳. 白菜类蔬菜亲缘关系的 AFLP 分析. 园艺学报, 2001, 28 (4): 331~335
Sun D L, Zhao Q, Song W Q, Chen R Y. Relationships analysis of Chinese cabbage species by AFLP. Acta Horticulturae Sinica, 2001, 28 (4): 331~335 (in Chinese)
- 陈 华,易干军,徐小彪,曾继吾. 猕猴桃 AFLP 分析体系的建立. 西北植物学报, 2005, 25 (8): 1528~1535
Chen H, Yi J G, Xu X B, Zeng J W. Construction of the AFLP analysis system for actinidia genome. Acta Bot Boreal Occident Sin, 2005, 25 (8): 1528~1535 (in Chinese)
- 李 鸣,谭裕模,李杨瑞,李容柏,高国庆. 甘蔗 (*Saccharum officinarum* L.) 品种遗传差异的 AFLP 分子标记分析. 作物学报, 2004, 30 (10): 1008~1013
Li M, Tan Y M, Li Y R, Li R B, Gao G Q. AFLP molecular analysis of genetic difference between cultivars in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). Acta Agronomica Sinica, 2004, 30 (10): 1008~1013 (in Chinese)
- Bell J A, Simpson D W, Harris D C. Development of a method for screening strawberry germplasm for resistance to *Phytophthora cactorum*. Acta Horticulturae, 1997, 439: 175~179
- Landry B S, Li R Q, Khannizadeh S. A cladistic approach and RAPD markers to characterize 75 strawberry cultivars and breeding lines. Res Reports, 1997, 16: 28~33
- Hancock J F, Callow P A, Shaw D V. Randomly amplified polymorphic DNAs in the cultivated strawberry, *Fragaria ×ananassa*. J. Amer Soc Hort Sci, 1994, 119 (4): 862~864