

基于 SSR 标记的油桃品种需冷性分析

史芳芳, 梁武军, 张延磊* (新疆兵团第十二师农业科学研究所, 新疆乌鲁木齐 830088)

摘要 [目的]利用已发表的桃 SSR 引物分析桃品种资源圃油桃遗传多样性, 以期对油桃育种和反季节栽培研究提供参考。[方法]利用 24 对 SSR 引物分别对 27 个油桃品种进行 PCR 扩增, 筛选出多态性好、稳定性高的引物对 27 个油桃品种进行毛细管电泳分析, 并采用遗传相似系数对扩增结果进行分析。[结果]从合成的 24 对 SSR 引物中筛选出 5 对条带清晰、具有多态性的引物, 利用聚类分析软件, 将油桃分成两大类, 第一大类包括 23 个栽培种, 其遗传系数在 0.9 以上, 第二大类包括 4 个原始种, 其遗传系数在 0.75~0.85, 同时鉴别出 2 个同物异名的栽培种质资源。[结论]基于文献中发表的 SSR 桃引物筛选出多态性较好的引物可用于油桃 SSR 分析。毛细管电泳可以将扩增条带分离至 1 bp, 能更好地地区分种内差异。27 个油桃品种有 2 个原始品种, 即台农甜蜜和黑油皇后, 与 23 个栽培品种亲缘关系较远, 可以作为母本进行杂交育种, 且可以作为需冷性品种候选种质。

关键词 油桃; SSR; 亲缘关系; 种质资源

中图分类号 S662.1 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)07-0059-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.07.019

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



SSR Analysis on Required Cooling of Nectarin Cultivated Varieties

SHI Fang-fang, LIANG Wu-jun, ZHANG Yan-lei (Institute of Agricultural Sciences of the 12th Division of Xinjiang Production and Construction Corps, Urumqi, Xinjiang 830088)

Abstract [Objective] To provide reference for nectarine breeding and off-season cultivation, the genetic diversity of nectarine in peach variety resource nursery was analyzed by using published peach SSR primers. [Method] 27 nectarine varieties were amplified by PCR with 24 pairs of SSR primers. 27 nectarine varieties were analyzed by capillary electrophoresis with the good polymorphism and high stability primers, and the amplification results were analyzed by genetic similarity coefficient. [Result] Five pairs of primers with clear bands and polymorphism were selected from 24 pairs of SSR primers. Nectarine was divided into two categories, the first of which included 23 cultivated species, in which the genetic coefficient of cultivated species was above 0.9. The second group consisted of 4 original species, that of original species was between 0.75 and 0.85, meanwhile it could clearly identify the synonyms of two germplasm resources. [Conclusion] Based on the SSR peach primers published in the literature, the primers with good polymorphism could be used for SSR analysis of nectarine. Capillary electrophoresis could isolate the amplified bands to 1bp. There were two original species of 27 nectarine varieties, namely Tainong sweet and black oil queen, which were not closely related to 23 cultivated varieties and could be used as female parents to cross breeding, and can be used as a candidate germplasm for required cooling research.

Key words Nectarine; SSR; Genetic relationship; Germplasm resources

目前,很多基层科研单位在开展桃品种的引种筛选试验研究,一方面进行品种适应性观察试验,另一方面为今后开展桃品种杂交试验提供较为丰富的种质,但多数单位仅从果实性状调查、植株长势等农艺性状方面进行判断,或从形态学方面对品种进行分类,因此对于一些种间的杂种进行归类十分困难^[1],致使调查、评价筛选不足^[2]。随着研究水平的深入,对种质资源的遗传评价已上升到分子水平^[3],调查本区域内资源圃中油桃的亲缘关系对种质资源的遗传评价及今后开展育种工作具有重要意义。桃种质资源收集、利用、评价是桃育种创新的基础^[4]。桃的种质资源分析多集中在对本地区内的桃品种进行遗传评价^[5-6],而对具有丰富地域性的引进品种进行遗传分析的较少。笔者利用已公布的 SSR 分子标记,对收集保存于新疆第十二师农科所果树资源圃,来源于全国南北方各地品种或品系 27 份油桃种质,包括栽培品种(系)、原始种质进行遗传分析,从 DNA 水平评估遗传多样性,并进一步探究引进的原始种质与栽培品种间的亲缘关系,为今后的遗传育种提供可靠的遗传背景信息。

基金项目 十二师农业科技攻关项目“果树种质资源引种与省力高效标准化栽培示范”(SR2016024);十二师农业科技攻关项目“盆栽桃规模化生产关键技术研究示范”(SR2017015)。

作者简介 史芳芳(1977—),女,山东潍坊人,高级农艺师,硕士,从事农作物育种及农业科研推广工作。*通信作者,高级农艺师,从事农业科研推广工作。

收稿日期 2019-09-04

1 材料与方法

1.1 试验材料 油桃种质资源共 27 份,均来自于新疆兵团第十二师农业科学研究所桃资源圃,包括原始种和栽培种。供试材料信息见表 1。

表 1 供试桃种质资源基本信息

Table 1 Basic information of peach germplasm resources

编号 No.	品种(品系) Variety	编号 No.	品种(品系) Variety	编号 No.	品种(品系) Variety
1	紫金红 1 号	10	紫金红 2 号	19	中金金辉
2	枫叶油桃	11	杏花雨	20	黑油皇后(野生)
3	金海霞(野生)	12	中油 16	21	万寿红油桃
4	短枝油桃(野生)	13	锦春花	22	神州龙蛋
5	台农甜蜜(野生)	14	旭日	23	台农早红油
6	鲁油 2 号	15	红芒果	24	天后油
7	中油 11	16	188 油桃	25	蓬仙 11 号
8	郑 4-24	17	中油 13	26	仙岛 14 号
9	紫金红 3 号	18	6 号油桃	27	中油 9 号

1.2 SSR 扩增 利用上海生工工程有限公司植物提取试剂盒进行 DNA 提取,从已发表的 SSR 引物^[7-10]中筛选出能在 27 份样本间稳定扩增、多态性好的 5 对蔷薇类 SSR 引物(表 2)用于遗传分析。反应体系 20 μL,扩增程序:94 °C 预变性 3 min,94 °C 预变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 次循环;72 °C 延伸 10 min;4 °C 保存。扩增结束后,加入微量上

样缓冲液混匀,5 μ L 扩增产物琼脂糖凝胶电泳分离,电泳缓冲液为1 \times TAE,150 V 稳压电泳 20 min。电泳结束后凝胶成像系统紫外成像观察扩增效果和多态性。将扩增产物寄到杭州奥盛仪器有限公司进行毛细管电泳 SSR 分析。

表 2 筛选出多态性较好的油桃 SSR 引物信息

Table 2 SSR primer information of nectarine with better polymorphism

序号 No.	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Prime sequence
1	BPPCT001	F primer: AATTCCCAAAGGATGTGTATGAG R primer: CAGGTGAATGAGCCAAAGC
2	CPPCT002	F Primer: GGAGCTGCAATATTGCTG R Primer: GTTAGGGAAGCATCTCAC
3	UDP96-008	F Primer: TTGTACACACCCTCAGCCTG R Primer: TGCTGAGGTTTCAGGTGAGTG
4	BPPCT007	F primer: TCATTGCTCGTCATCAGC R primer: CAGATTCTGAAAGTTAGCGGTA
5	MA071a	F Primer: CAATATAAACTTTTCTCCTCAACCC R Primer: ACCACCACCCAGTCAAAC

1.3 统计分析 选取扩增清晰的条带,在相同迁移位置,有条带记为“1”,无条带记为“0”,不同引物扩增的结果构成原始的“0,1”二元数据矩阵。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。

2 结果与分析

2.1 SSR 扩增结果及多态性引物筛选 将供试的 27 份油桃品种或品系用不同的 SSR 引物进行扩增,经过毛细管电泳后以条带多态性为标准,从合成的 24 对 SSR 引物中筛选出 5 对条带清晰、具有多态性的引物(表 2)。这些引物共扩增出 54 条 DNA 片段,具有多态性片段 15 条,占比 28%,平均每个

引物 11.2 条,最多 15 条,最少 7 条,扩增片段的长度多数集中在 100~300 bp,图 1 为引物 CPPCT002 扩增的情况,小于 100 bp 条带不计作有效带,因此,此引物有效扩增条带为 5 条,即 141、127、135、156、163 bp。

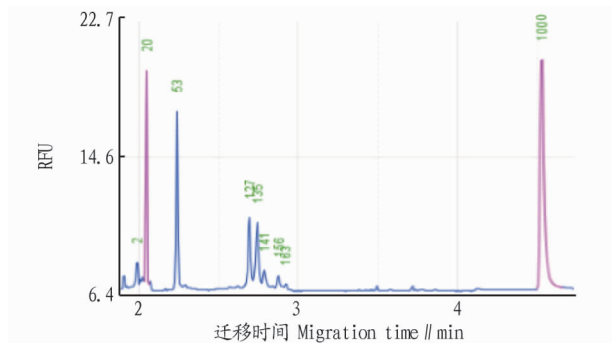
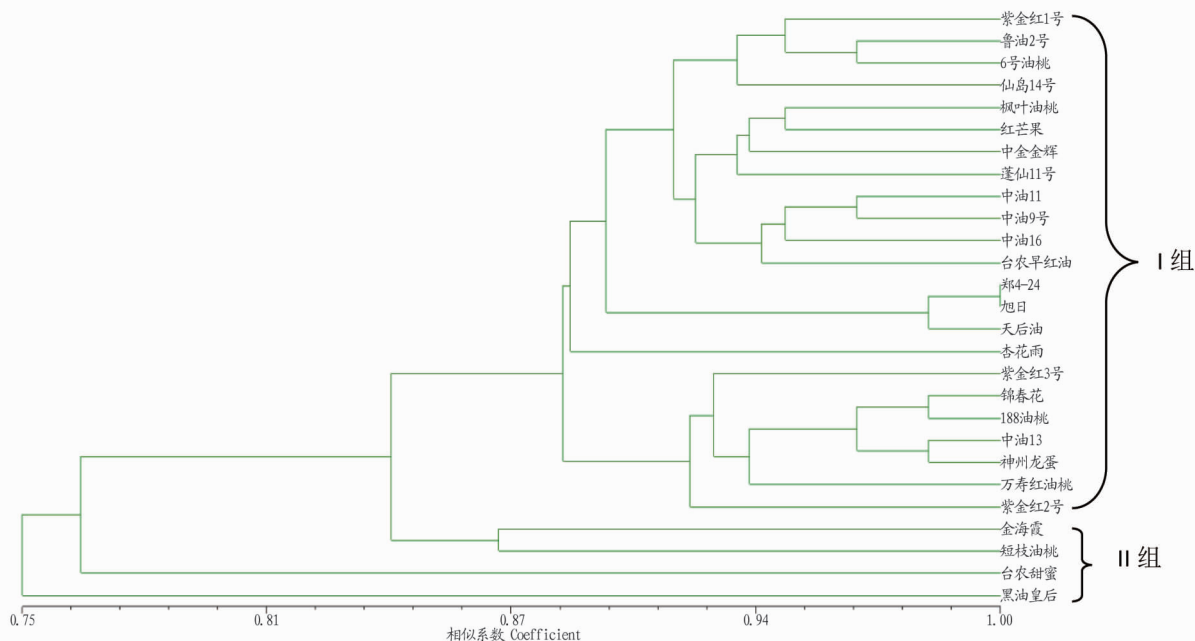


图 1 引物 CPPCT002 扩增得到的 SSR 毛细管电泳图谱

Fig. 1 SSR capillary electrophoresis pattern obtained by amplification of primer CPPCT002

2.2 遗传多样性及系统进化分析 依据聚类分析,27 份油桃种质可划分为 2 个类群(图 2),23 个品种(系)归为第一大类,属于栽培种,遗传距离在 0.9 以上,其中,郑 4-24 与旭日遗传距离为 0,相似系数为 1,可能是品种的地区交叉传播产生的同物异名现象。其余 4 个品种(系)归为第二大类,属于原始品种,在遗传距离为 0.87 处,金海霞与短枝油桃聚在一起,0.77 处台农甜蜜单独一类,0.75 处黑油皇后也单独一类。总体聚类表明,栽培品种间存在较低的遗传变异,遗传背景相近。原始品种遗传变异较栽培种高,遗传背景与栽培种较远,其中,地方品种黑油皇后与其他栽培种品种遗传距离最远。



注:I组.栽培种 II组.原始种

Note:I group. Cultivated varieties;II group. Original varieties

图 2 油桃聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of nectarine

从相似性矩阵(图 3)可以看出,黑油皇后与其他品种相

似系数在 0.59~0.81,台农甜蜜相似系数在 0.59~0.83,短枝

油桃相似系数在 0.66~0.87,金海霞相似系数在 0.72~0.90。油桃杂交的最佳母本。结合聚类分析结果,黑油皇后可作为资源圃中与其他栽培种

Table with 20 columns representing different peach varieties and rows showing similarity coefficients between them. The table is a lower triangular matrix where the diagonal is all 1.000000. The first row is '黑油皇后' (1.000000). The second row is '桃叶油桃' (0.9259259, 1.000000). The third row is '金海霞' (0.8518519, 0.8518519, 1.000000). The fourth row is '短枝油桃' (0.8333333, 0.8333333, 0.8703704, 1.000000). The fifth row is '台农甜蜜' (0.7892859, 0.7892859, 0.7222222, 0.7777778, 1.000000). The sixth row is '鲁油2号' (0.9444444, 0.9074074, 0.9074074, 0.8148148, 0.7407407, 1.000000). The seventh row is '中油11' (0.9074074, 0.9074074, 0.8703704, 0.8148148, 0.7407407, 0.9259259, 1.000000). The eighth row is '黑4-24' (0.9074074, 0.9444444, 0.8333333, 0.8148148, 0.7407407, 0.8888889, 0.8888889, 1.000000). The ninth row is '紫金红2号' (0.8888889, 0.8518519, 0.8518519, 0.8333333, 0.7962963, 0.9074074, 0.8703704, 0.8333333, 1.000000). The tenth row is '紫金红2号' (0.8703704, 0.8703704, 0.8703704, 0.8148148, 0.7777778, 0.8888889, 0.8888889, 0.8518519, 0.9074074, 1.000000). The eleventh row is '香花男' (0.9259259, 0.8888889, 0.8148148, 0.7962963, 0.7222222, 0.9074074, 0.8703704, 0.8703704, 0.8518519, 0.8333333, 1.000000). The twelfth row is '中油16' (0.9074074, 0.9074074, 0.8703704, 0.8148148, 0.7407407, 0.9259259, 0.9259259, 0.8888889, 0.8703704, 0.8888889, 0.8703704, 1.000000). The thirteenth row is '锦香花' (0.9444444, 0.9074074, 0.8703704, 0.8518519, 0.8148148, 0.9259259, 0.8888889, 0.8888889, 0.9444444, 0.9259259, 0.9074074, 0.8888889, 1.000000). The fourteenth row is '旭日' (0.9074074, 0.9444444, 0.8333333, 0.8148148, 0.7407407, 0.8888889, 0.8888889, 1.000000, 0.8333333, 0.8518519, 0.8703704, 0.8888889, 0.8888889, 1.000000). The fifteenth row is '红芭果' (0.9444444, 0.9444444, 0.8703704, 0.8518519, 0.7777778, 0.9259259, 0.9259259, 0.9259259, 0.8703704, 0.8888889, 0.9074074, 0.9259259, 0.9259259, 1.000000). The sixteenth row is '18号油桃' (0.9259259, 0.8888889, 0.8518519, 0.8333333, 0.7962963, 0.9074074, 0.8703704, 0.8703704, 0.9259259, 0.9074074, 0.8888889, 0.8703704, 0.9814815, 0.8703704, 0.9074074, 1.000000). The seventeenth row is '中油13' (0.9074074, 0.9074074, 0.8703704, 0.8518519, 0.8148148, 0.8888889, 0.8888889, 0.9074074, 0.9259259, 0.8703704, 0.8888889, 0.9629630, 0.8888889, 0.9259259, 0.9444444, 1.000000). The eighteenth row is '6号油桃' (0.9444444, 0.9074074, 0.8703704, 0.8148148, 0.7407407, 0.9629630, 0.8888889, 0.8888889, 0.8703704, 0.8518519, 0.9074074, 0.8888889, 0.9259259, 0.8888889, 0.9259259, 0.9074074, 0.8888889, 1.000000). The nineteenth row is '中金海霞' (0.9259259, 0.9259259, 0.8518519, 0.8333333, 0.7962963, 0.9074074, 0.9074074, 0.9074074, 0.8518519, 0.8703704, 0.8888889, 0.9074074, 0.9074074, 0.9444444, 0.8888889, 0.9444444, 0.9074074, 1.000000). The twentieth row is '万寿红油桃' (0.8888889, 0.8518519, 0.8518519, 0.7962963, 0.7962963, 0.9074074, 0.8703704, 0.8333333, 0.9259259, 0.9074074, 0.8518519, 0.8703704, 0.9444444, 0.8333333, 0.8703704, 0.9259259, 0.9444444, 0.8888889, 1.000000). The twenty-first row is '黑油皇后' (0.7892859, 0.7892859, 0.7222222, 0.6666667, 0.5929630, 0.8148148, 0.7407407, 0.7407407, 0.7222222, 0.7037037, 0.7592959, 0.7407407, 0.7777778, 0.7407407, 0.7777778, 0.7592959, 0.7407407, 0.8148148, 0.7962963, 0.7222222, 1.000000). The twenty-second row is '天乐油桃' (0.8888889, 0.9259259, 0.8148148, 0.7962963, 0.7222222, 0.8703704, 0.8703704, 0.9814815, 0.8148148, 0.8333333, 0.8518519, 0.8703704, 0.8703704, 0.9814815, 0.9074074, 0.8518519, 0.8703704, 0.8888889, 0.8148148, 0.7222222, 0.000000). The twenty-third row is '崔山11号' (0.9259259, 0.9259259, 0.8518519, 0.8333333, 0.7962963, 0.9074074, 0.9074074, 0.9074074, 0.8518519, 0.8703704, 0.8888889, 0.9074074, 0.9074074, 0.9444444, 0.8888889, 0.9074074, 0.9074074, 0.9259259, 0.8518519, 0.7962963, 0.8888889, 1.000000). The twenty-fourth row is '崔山14号' (0.9444444, 0.9074074, 0.8333333, 0.8148148, 0.7407407, 0.9259259, 0.8888889, 0.8888889, 0.8703704, 0.8518519, 0.9074074, 0.8888889, 0.9259259, 0.8888889, 0.9259259, 0.9074074, 0.8703704, 0.7777778, 0.8703704, 0.9074074, 1.000000). The twenty-fifth row is '中油3号' (0.9444444, 0.9444444, 0.9074074, 0.8518519, 0.7777778, 0.9629630, 0.9629630, 0.9259259, 0.9074074, 0.9259259, 0.9074074, 0.9629630, 0.9259259, 0.9259259, 0.9444444, 0.9074074, 0.9259259, 0.9259259, 1.000000). The twenty-sixth row is '神州龙蜜' (0.9259259, 0.9259259, 0.8888889, 0.8703704, 0.8333333, 0.9074074, 0.9074074, 0.9074074, 0.9259259, 0.9444444, 0.8888889, 0.9074074, 0.9814815, 0.9074074, 0.9444444, 0.9629630, 0.9814815, 0.9074074, 0.9259259, 0.9259259, 0.7892859, 0.8888889, 0.9259259, 0.9074074, 0.9444444, 1.000000). The twenty-seventh row is '台农甜蜜2号' (0.9074074, 0.9074074, 0.8703704, 0.8148148, 0.7407407, 0.9259259, 0.9259259, 0.8888889, 0.8703704, 0.8888889, 0.9074074, 0.9259259, 0.8888889, 0.9259259, 0.8703704, 0.7407407, 0.8703704, 0.9074074, 0.9259259, 0.9629630, 0.9074074, 1.000000).

图 3 相似性矩阵 Fig. 3 Similarity matrix

3 讨论

3.1 SSR 技术中应用毛细管电泳的优势 SSR 技术已被广泛用于物种亲缘关系分析,但目前,很多科研单位和大学为了节约成本或者大规模进行 SSR 筛选试验仍在使用琼脂糖凝胶或者聚丙烯酰胺电泳,二者的分辨率很低,特别是琼脂糖凝胶电泳只能进行初筛,而且聚丙烯酰胺电泳试剂配制过程复杂,电泳时间长,需要染色,脱色等步骤,即便跑出条带,有时会因为某个环节出现问题,导致最终电泳条带显示不明显,或者没有拉开条带距离,不能将差异大小小于 10 bp 的基因片段分离开,条带特异性表现不充分。

毛细管电泳原理基于微流体技术,分辨率可以达到 1 bp。与传统毛细管电泳相比,毛细管电泳所需样品量低于 1 μL,检测灵敏度能够达到 5 pg/μL,样品分析时间可短至几十秒,而且分离检测过程全部由仪器自动来完成,无人工介入,无交叉污染。与传统电泳相比,毛细管电泳可用的引物范围较广,适用于绝大多数 SSR 引物,因此试验成本更经济。与聚丙烯酰胺凝胶电泳相比,毛细管电泳根据峰值获得的数值化数据更精确,后期数据分析更简便,操作过程简单,且通量高,全程无毒无害^[11]。

该研究选用桃资源圃 27 份油桃资源作为试验材料,采用 SSR 分析技术结合毛细管电泳检测技术,筛选出适用于鉴定该试验的油桃 SSR 引物 5 对,建立了一套简单、经济、高效的油桃品种(品系)亲缘关系鉴定方法,为完善桃品种快速鉴定方法提供参考。

3.2 需冷量不同油桃筛选 新疆冬季时间比较漫长,种植的桃树一般开花期和结果期均较内地晚,桃树需冷量较高,但目前已有科研单位研究通过引进需冷量低的设施品种进行反季节栽培,达到提早上市。基于此,通过油桃 SSR 分析,结合物候期观察试图将低需冷量油桃品种(品系)与较高需

冷量油桃品种(品系)分离开,便于筛选出适合于设施反季节栽培品种,并为今后开展桃品种杂交育种试验提供参考。该研究将已知需冷量低的品种台农甜蜜作为目标筛选品种,通过 SSR 分子标记分析,筛选出与台农甜蜜遗传系数接近的品种(品系)作为需冷量低的候选品种(品系),后期对初筛品种重点开展物候期观察,最终确定反季节栽培品种。该研究结果表明黑油皇后、短枝油桃和金海霞品种与台农甜蜜遗传系数更为接近,可以作为今后研究重点。

参考文献

[1] 凌士鹏,孙萍,林贤锐,等. 基于 SSR 标记的桃种质资源遗传多样性研究[J]. 江西农业学报,2018,30(11):14-18.
[2] 克里木·伊明,韩立群,玛尔哈巴·吾斯曼,等. 新疆桃果实质性状调查与评价研究[J]. 新疆农业科学,2017,54(6):1041-1046.
[3] 叶宇芸,王清明,马建伟,等. 基于 SSR 标记的桃品种遗传多样性分析及遗传相似系数比较[J]. 华南农业大学学报,2017,38(3):39-45.
[4] 周平,郭端,张小丹,等. SSR 分析 50 份桃种质资源遗传多样性[J]. 福建农业学报,2017,32(1):47-50.
[5] 胡紫璟,毛娟,赵长增,等. 利用 SSR 标记分析 27 份扁桃种质资源的亲缘关系[J]. 甘肃农业大学学报,2015,50(4):56-62.
[6] 沈志军,马瑞娟,俞明亮,等. 无锡水蜜桃种群遗传多样性及与其他群体亲缘关系的 SSR 分析[J]. 植物遗传资源学报,2009,10(3):367-372.
[7] ARANZANA M J,GRACIA-MAS J,CARBÓ J,et al. Development and variability analysis of microsatellite markers in peach[J]. Plant breeding,2002,121(1):87-92.
[8] CIPRIANI G, LOT G, HUANG W G,et al. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [Prunus persica (L.) Batsch]: Isolation, characterization and cross-species amplification in Prunus[J]. Theor Appl Genet, 1999,99:65-72.
[9] DIRLEWANGER E,COSSON P,TAUAUD M,et al. Development of microsatellite markers in peach [Prunus persica (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (Prunus avium L.) [J]. Theor Appl Genet,2002,105:127-138.
[10] LI X W,MENG X Q,JIA H J,et al. Peach genetic resources: Diversity, population structure and linkage disequilibrium[J]. BMC Genetics,2013,14:84-99.
[11] 于滔,曹士亮,张建国,等. 利用芯片毛细管电泳检测技术鉴定玉米种子纯度的研究[J]. 中国种业,2019(6):52-55.