

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2015.03.004

“大五星”天然三倍体枇杷株系的 SSR 分析^①

徐波^{1,2}, 姜琬¹, 李晓林¹, 郭启高¹,
孙海艳¹, 向素琼¹, 何桥¹, 梁国鲁¹

1. 西南大学园艺园林学院, 重庆 400716; 2. 重庆市巴南区农产品质量安全中心, 重庆 401320

摘要: 利用从 103 对简单重复序列(SSR)引物中筛选出的 62 对多态性引物, 对 8 份“大五星”天然三倍体枇杷株系和 1 份二倍体枇杷单株进行 PCR 扩增, 共扩增出 152 个等位位点, 每个位点扩增出 2~3 个等位基因, 平均 2.45 个, 引物多态信息量介于 0.099 至 0.586 之间, 平均多态信息量为 0.358. 62 对 SSR 引物将供试枇杷株系完全区别开, 各株系间 Dice 相似系数范围为 0.493~0.954, A376 与 A368 株系之间的 Dice 相似系数最高, A313 与 A332 株系之间的 Dice 相似系数最低. 在 62 对引物中, CL22, Contig1, NZ02b01, Hi15h12, EJ014, CH04c06 和 CH01h02 共 6 对引物能鉴定出 A379, A322, A348 和 A332 这 4 个“大五星”天然三倍体枇杷株系的倍性.

关键词: 枇杷; 三倍体; 简单重复序列(SSR)

中图分类号: S667.3

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2015)03-0022-06

枇杷(*Eriobotrya japonica* Lindl.)为蔷薇科苹果亚科枇杷属(*Eriobotrya*)植物, 原产于中国的西南地区, 属于常绿果树. 枇杷果实酸甜适口, 具有丰富的营养, 并且具有润喉、止咳、健胃等药用价值, 备受消费者喜爱, 是我国南方的特色水果. 多倍化是植物进化过程中普遍存在的一种自然现象, 是促进植物进化改变的重要力量, 同时也是新品种选育和遗传改良的重要途径, 通过利用多倍体的器官巨大性、不育性等特性可以提高作物产量、改善品质、增加次生代谢物质含量、培育无核果实等^[1-3]. 自然界中枇杷同样存在多倍化现象, 因此对枇杷多倍体的研究具有重要的意义.

近年来, 分子标记技术在种质资源研究中得到广泛应用^[4-5]. 简单重复序列(SSR)分子标记具有数量丰富、共显性遗传、多态性高、特异性强、重复性好等特点, 在生物遗传多样性分析、品种鉴别、种质资源管理、遗传图谱和系谱构建以及品种保护等方面得到了广泛的应用^[6-9].

1 材料与方法

8 份三倍体枇杷($2n=3x=51$)株系均是从“大五星”种子中实生筛选而来(表 1), “大五星”二倍体单株 A2x($2n=2x=34$). 本研究 9 份供试材料的倍性已由梁国鲁^[10]和汪卫星^[11]等人鉴定. 在晴朗无露水的上午, 采取适量健康无病虫害的嫩叶, 分别做好标记, 带回实验室, 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存, 备用.

① 收稿日期: 2014-03-10

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2013BAD02B02).

作者简介: 徐波(1986-), 男, 四川资阳人, 硕士研究生, 主要从事园艺植物分子生物学研究.

通信作者: 梁国鲁, 研究员; 何桥, 副研究员.

表 1 供试“大五星”三倍体枇杷株系及二倍体单株

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
株系	A376	A368	A379	A313	A322	A348	A332	A35	A2x
倍性	3x	3x	3x	3x	3x	3x	3x	3x	2x

注: 3x 表示 $2n=3x=51$, 2x 表示 $2n=2x=34$.

基因组 DNA 提取采用改良 CTAB 法^[12]并结合实际加以改进, 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳和 Nano Drop 2000 检测 DNA 质量, 并调整各样品 DNA 终质量浓度为 10 mg/L 左右.

PCR 采用 20 μ L 体系, 各组分: 10 \times PCR Buffer 2.0 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 2.0 μ L, 10 mmol/L dNTPs 混合物 0.1 μ L, 10 mmol/L 上下游引物各 0.5 μ L, 5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶 0.1 μ L, 10 mg/L 基因组 DNA 1.0 μ L, 灭菌去离子水 13.8 μ L.

PCR 扩增程序为: 在 94 $^{\circ}$ C 条件下预变性 2.5 min; 在 94 $^{\circ}$ C 条件下变性 30 s, 于适宜温度下退火 30 s, 在 72 $^{\circ}$ C 条件下延伸 30 s, 进行 35 个循环; 在 72 $^{\circ}$ C 条件下延伸 10 min; 于 4 $^{\circ}$ C 下保存.

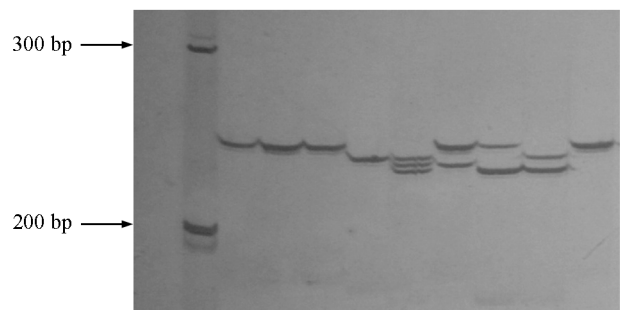
使用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶对 PCR 扩增产物在恒定功率为 60 W 的条件下进行电泳, 电泳时间为 90 min 左右. 利用银染方法进行检测, 待玻璃板干燥后拍照保存. 对扩增图谱进行数据统计, 扩增出的每条多态性条带为一个等位变异条带, 有条带则记为 1, 无条带则记为 0, 获得统计数据矩阵. 利用 NTSYS-pc 2.10e 软件进行数据分析, 并进行聚类.

2 结果与分析

本实验使用的 55 对 SSR 引物(表 2 中前 55 对引物)是从 81 对苹果 SSR 引物筛选得到的, 能在供试枇杷株系中产生稳定、清晰, 具有多态性的条带, 引物转化率为 67.9%, 说明 SSR 引物在近缘物种具有较高的转化率, 在科内属间具有较高的通用性^[13-14]; 其余 7 对引物是从反转录合成的引物中筛选得到的. 62 对引物共扩增出 152 个等位位点, 每个位点扩增出 2~3 个等位基因, 平均 2.45 个, CH01d08 和 Hi04e04 引物的多态信息量最高, 均为 0.586, 多态信息量最低的为 AU223657 和 CH02c09, 两个引物的多态信息量都为 0.099, 所有引物的平均多态信息量为 0.358.

2.1 基因型分析

利用 62 对 SSR 引物在供试枇杷株系产生的多态性条带, 对“大五星”天然三倍体株系的基因型进行分析, 结果见表 2. 其中 CH01h02-222 bp 为 A322 株系特有的等位位点. 引物 CH01h02 在 A332 株系中扩增出了 222 bp, 199 bp 和 195 bp 这 3 个等位基因; 引物 CH04c06 在 A332 株系中扩增出了 214 bp, 195 bp 和 185 bp 这 3 个等位基因; 引物 Hi15h12 在 A322 株系中扩增出了 229 bp, 224 bp 和 219 bp 这 3 个等位基因(图 1); 引物



条带从左到右, 依次为 100 bp marker, 其余为实验样品, 顺序见表 1.

图 1 引物 Hi15h12 的扩增图谱

NZ02b01 在 A332 株系中扩增出了 270 bp, 266 bp 和 246 bp 这 3 个等位基因; 引物 CL22.Contig1 在 A379 株系中扩增出 237 bp, 226 bp, 190 bp 这 3 个等位基因; 引物 EJ014 在 A348 株系中扩增出 196 bp, 194 bp, 175 bp 这 3 个等位基因, 其余 56 对 SSR 引物单独在一个株系中只能扩增出 1 个或者 2 个等位基因. 通过对比三倍体株系和二倍体株系的基因型, 在三倍体株系中均出现了新的等位基因, 这表明外源基因在三倍体形成过程中有渗入现象.

表 2 62 对 SSR 引物在供试材料中的基因型(bp)

序号	引物名称	A376	A368	A379	A313	A322	A348	A332	A35	A2x
1	AU223657	247/247	247/247	247/247	247/247	247/247	247/247	247/240	247/247	247/247
2	CH01b12	180/160	180/160	180/160	180/160	160/160	164/160	180/180	164/160	180/160
3	CH01c08	122/122	122/122	122/122	134/122	134/122	134/122	134/122	134/122	134/122
4	CH01d03	123/123	123/123	123/123	123/123	127/123	123/123	127/127	123/123	123/123
5	CH01d08	290/290	290/290	290/277	300/277	300/277	300/290	277/277	300/277	300/277
6	CH01f03b	180/180	180/180	180/180	180/180	180/180	180/180	193/193	180/180	180/180
7	CH01f07a	186/186	186/186	186/186	186/186	186/186	195/195	186/186	186/186	186/186
8	CH01h01	123/123	123/123	123/123	123/123	127/123	127/123	127/123	127/127	127/123
9	CH01h02	199/195	199/195	199/195	195/195	195/195	199/195	222/199/195	195/195	199/195
10	CH02c06	160/158	160/158	160/158	160/160	160/160	160/158	160/158	160/160	160/160
11	CH02c09	258/258	258/258	258/258	258/258	258/258	258/258	264/258	258/258	258/258
12	CH02d10a	212/212	212/212	216/216	216/216	216/216	216/210	210/210	212/212	216/216
13	CH02d12	242/223	242/223	242/223	242/223	242/223	242/223	242/223	242/223	242/223
14	CH02e12	138/138	138/138	138/138	150/138	138/138	150/138	138/138	138/138	150/138
15	CH02f06	121/121	121/121	121/121	121/118	121/118	121/121	121/121	121/121	121/118
16	CH03a09	150/150	150/150	150/150	150/150	140/140	150/150	140/140	140/140	150/150
17	CH03b01	178/166	178/166	178/166	180/180	178/178	178/178	178/178	178/178	180/180
18	CH03d10	154/154	154/154	154/154	154/154	154/154	154/154	160/154	154/154	156/154
19	CH03g06	178/178	178/178	178/178	176/176	176/176	176/176	178/178	178/178	176/176
20	CH03h06	162/162	162/162	162/162	162/162	162/162	162/162	154/154	162/162	162/162
21	CH04a12	147/145	147/145	145/145	145/145	145/145	147/145	147/145	145/145	145/145
22	CH04c06	195/185	195/185	195/185	195/185	217/185	195/185	214/195/185	217/185	195/185
23	CH04c10	123/107	123/107	123/107	123/107	123/107	134/123	123/107	123/107	123/107
24	CH04d07	123/123	123/123	123/123	147/147	123/123	147/123	123/123	123/123	147/123
25	CH04f03	180/180	180/180	180/180	180/180	180/180	180/180	182/182	180/180	180/180
26	CH04g07	152/152	152/152	152/152	148/148	152/152	148/148	148/148	152/152	148/148
27	CH04g09	162/160	160/160	160/160	163/160	162/162	162/160	162/160	160/160	163/160
28	CH04g12	176/176	176/176	176/176	138/138	176/138	176/138	138/138	176/138	138/138
29	CH04h02	198/198	198/198	198/198	198/198	196/196	198/198	198/198	198/198	198/198
30	CH05a02	123/115	123/115	115/115	123/115	123/115	115/115	123/112	123/112	115/115
31	CH05a03	170/170	170/170	170/170	170/170	170/170	170/170	166/166	170/170	170/170
32	CH05a04	185/162	185/162	185/162	185/162	185/162	185/162	185/162	166/162	185/162
33	CH05g03	161/161	161/143	161/143	143/143	161/143	161/143	143/143	161/143	143/143
34	CH05g07	168/168	168/168	168/168	174/174	174/174	168/168	168/168	174/174	174/174
35	CH05g08	170/170	170/170	170/170	164/170	170/170	170/170	170/170	170/17	164/164
36	CH05h05	192/192	192/192	192/192	205/192	192/192	205/192	202/186	192/192	205/192
37	CH05h12	196/190	196/190	196/190	196/196	196/190	196/190	196/190	196/190	196/196
38	CH-vf1	160/157	157/157	157/157	157/157	156/148	160/157	157/148	156/148	157/157
39	CN493139	153/153	153/153	153/153	156/153	156/153	156/153	153/153	153/153	156/153
40	GD142	160/160	160/160	160/160	170/170	170/170	170/160	170/160	170/170	170/170
41	Hi02c07	130/130	130/130	130/130	130/130	146/130	146/130	146/130	130/130	130/130
42	Hi03a03	190/190	190/190	190/190	190/190	190/190	183/183	183/183	190/190	183/183
43	Hi04a05	201/201	201/201	201/201	201/201	209/201	209/201	209/201	209/201	209/201
44	Hi04e04	236/202	236/202	236/236	204/202	204/202	236/204	236/202	204/202	204/202
45	Hi04g05	236/234	236/234	236/234	234/234	236/236	234/234	236/234	236/234	236/234
46	Hi07e08	218/218	218/218	218/218	218/218	226/218	226/218	215/215	226/215	218/215
47	Hi07h02	252/240	252/238	252/240	238/238	252/240	238/238	252/240	240/238	238/238
48	Hi08a04	325/325	325/325	325/325	370/325	370/325	370/325	370/325	325/325	370/325

续表 2

序号	引物名称	A376	A368	A379	A313	A322	A348	A332	A35	A2x
49	Hi15h12	238/238	238/238	238/238	229/229	229/224/219	238/224	238/219	229/219	238/238
50	Hi23d11	190/190	190/190	186/186	190/190	190/190	190/190	190/190	190/190	190/190
51	MS06c09	164/164	164/164	164/164	163/160	164/164	163/160	164/164	164/164	163/160
52	MS06g03	172/172	172/172	172/172	172/160	173/173	170/160	172/172	173/173	172/160
53	NH007b	147/129	147/129	147/129	129/129	147/129	147/129	129/129	147/129	129/129
54	NZ02b01	270/246	270/246	270/246	270/246	270/246	266/246	270/266/246	246/246	270/246
55	U78949	210/210	210/210	210/210	210/200	210/210	210/200	200/200	210/210	210/200
56	CL22. Contig1	237/226	237/226	237/226/190	226/190	237/226	237/226	237/226	237/237	237/226
57	EJ012	217/214	217/217	217/217	217/217	217/214	217/217	217/217	217/214	217/217
58	EJ014	194/175	194/175	194/175	196/196	196/194	196/194/175	196/175	194/194	194/175
59	EJ037	250/225	250/225	250/225	250/225	250/225	250/225	225/207	250/225	250/250
60	EJ088	211/211	211/211	211/211	192/192	211/211	211/211	211/192	211/211	211/192
61	EJ106	248/248	248/248	248/236	248/248	248/248	248/248	248/236	248/248	248/248
62	EJ329b	152/152	152/152	152/152	148/148	152/148	152/148	152/152	152/152	148/148

2.2 遗传关系分析

62对SSR引物将供试枇杷株系完全区别开,株系间Dice相似系数范围为0.493~0.954,A376与A368株系之间的Dice相似系数最高,A313与A332株系之间的Dice相似系数最低;以Dice相似系数采用非加权平均法(UPGMA)进行聚类分析,在Dice相似系数为0.660处可将9个株系分为3组,其中A376,A368,A379,A322和A35等5个株系聚为一类,A313,A2x和A348等3个株系聚为一类,A332株系单独聚为一类。

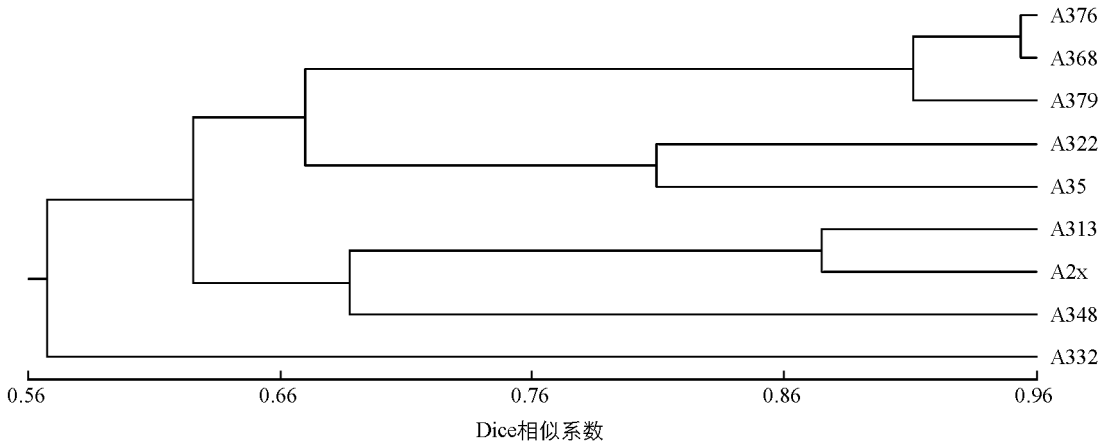


图 2 供试材料 UPGMA 法聚类分析树状图结果图

3 讨论

3.1 “大五星”天然三倍体枇杷的进化与 SSR 分析

利用 SSR 标记的共显性特点,可将该分子标记技术用于杂种的鉴定研究,如徐勇等人^[15]利用 SSR 辅助鉴定了一套小麦缺体-四体,并为其提供了一种简易的鉴定方法,本研究同样证实了 SSR 分子标记的这一功能.由于三倍体生物具有 3 个染色体组,因而每个基因座位的等位位点都应该是 3 个,但在本实验结果中发现,除了引物 CL22. Contig1,NZ02b01,Hi15h12,EJ014,CH04c06 及 CH01h02 扩增出 3 个等位位点外,绝大多数引物都只扩增出 1~2 个等位位点.分析其原因可能是每个等位基因拷贝数没有被准确地检测到,而等位基因的发生频率又仅通过条带的有无来进行判断,造成了检测的误差^[16].在自然界中,未减数 2n 配子的融合是产生多倍体的主要方式^[17],对于同源三倍体而言,虽然染色体组增加了一套,但如果等位

基因并没有发生突变,只是增加了等位基因拷贝数,因此其检测结果并不会存在差异.同时,多倍体的进化过程中,保持原有的功能、基因沉默和分化并执行新的功能3种情况在多倍体基因组中的重复基因上都可能出现,位点间重组、基因转换或协作进化也可能相互作用,这就导致了其进化过程极其复杂^[18].梁国鲁^[10]认为A322,A376和A332这3个株系是同源三倍体,是通过自花授粉的方式产生的,而A368和A379这2个株系可能是部分同源三倍体,都含有外源基因.在本研究中,在A376,A368,A313和A35这4个株系中只检测到2个等位基因,在A379,A322,A348和A332这4个株系中都检测到3个不同的等位基因,三倍体株系中均出现了新的等位基因,这说明在天然三倍体的进化过程中外源基因的渗入程度或核苷酸的突变频率存在差异,有的发生变异较多,有的发生变异则较少.

3.2 多倍体的SSR鉴定

研究表明,利用CL22,Contig1,NZ02b01,Hi15h12,EJ014,CH04c06和CH01h02这6对引物能鉴定供试的4份“大五星”天然三倍体枇杷株系的倍性.同样Watanabe等人^[19]利用NH007b,CH03a09,CH05g03和CH05g08这4对SSR引物共鉴定出5个单株的倍性为三倍体,说明SSR分子标记是枇杷倍性检测的有效手段;然而在本研究中,这4对SSR引物都只能扩增出1或2个等位位点,并不能鉴定供试三倍体株系中任何一个株系的倍性,这表明SSR标记适用于鉴定与重组染色体来源密切相关的异源三倍体枇杷倍性,但在同源三倍体枇杷倍性的鉴定上存在局限.此外,本研究发现部分引物在三倍体株系中只能扩增出1个等位基因,而在二倍体株系中却能扩增出2个等位基因(表3),如引物CH01c08在A376,A368和A379这3个三倍体株系中只能扩增出122 bp 1个等位基因,在二倍体株系中却同时扩增出122 bp和134 bp 2个等位基因;CH02e12在A322,A332和A35这3个三倍体株系中只能扩增出138 bp 1个等位基因,在二倍体株系中却同时扩增出138 bp和150 bp 2个等位基因.OMRA等人^[20]在四倍体西瓜(*Citrullus lanatus*)和二倍体西瓜的SSR分析中也发现这样的情况.边禹等人^[21]利用AFLP对不同倍性“早红3号”枇杷基因组进行分析时,发现与二倍体相比,三倍体和四倍体均具有特异片段的缺失.这表明遗传偏好现象可能存在于多倍体形成进化过程中,导致了遗传的不平衡遗传,然而其作用机理仍待研究.

参考文献:

- [1] 胡晓丽,周春江,岳良松.三倍体毛白杨无性系的AFLP分子标记鉴定[J].北京林业大学学报,2006,28(2):9-14.
- [2] 刘文革,阎志红,赵胜杰,等.不同染色体倍性西瓜对枯萎病的抗性研究[J].长江蔬菜:学术版,2009(18):19-20.
- [3] 姜金仲,郝晨,李云,等.四倍体刺槐花器原基分化及其成熟表型变异[J].林业科学,2008,44(6):34-38.
- [4] 倪书邦,毛常丽,吴裕.橡胶树部分种质资源的荧光AFLP分析[J].西南大学学报:自然科学版,2012,34(2):53-58.
- [5] 刘朝贵,李小孟,须建,等.三大产区莼菜遗传多样性及亲缘关系的RAPD分析[J].西南大学学报:自然科学版,2012,34(10):54-59.
- [6] 秦玥,傅大立,吴硕,等.华仁杏EST-SSR标记引物设计与开发[J].植物研究,2013,33(4):517-520.
- [7] LUNT D H, HUTEHINSON W F, CARVALHO G R. An Efficient Method for PCR-Based Identification of Microsatellite Arrays (PIMA) [J]. Molecular Ecology, 1999(8): 893-894.
- [8] 雷天刚,张学昆,陆合,等.甘蓝型油菜黄籽品种SSR指纹图谱的构建[J].西南农业大学学报:自然科学版,2005,27(3):361-364.
- [9] 彭忠华,赵致,张明生,等.SSR标记对高海拔玉米自交系遗传多样性的研究[J].西南农业大学学报:自然科学版,2006,28(1):17-21.
- [10] 梁国鲁.天然三倍体枇杷的筛选及其遗传特性与基因型分析[D].重庆:西南大学,2006.
- [11] 汪卫星.天然与人工合成三倍体枇杷基因变异及其DNA甲基化分析[D].重庆:西南大学,2008.
- [12] FREDERICK M A, ROGER B, ROBERT E K, et al. Short Protocols in Molecular Biology [M]. New York: John Wiley & Sons, 1999: 2-12.
- [13] VENDRAMIN E, DETTORI M T, GIOVINAZZI J, et al. A Set of EST-SSRs Isolated from Peach Fruit Transcriptome

- and Their Transportability Across Prunus Species [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2007, 7(2): 307–310.
- [14] AMOLD C, ROSSETTO M, MCNALLY J, et al. The Application of SSRs Characterized for Grape(*Vitis Vinifera*) to Conservation Studied in Vitaceae [J]. *Ameriean Journal of Botany*, 2002, 89(1): 22–28.
- [15] 徐 勇, 沈福成, 王三根, 等. 小麦缺体-四体的 SSR 辅助鉴定 [J]. *西南农业大学学报*, 2001, 23(3): 202–204.
- [16] NORDSTROM S, HEDREN M. Development of Polymorphic Nuclear Microsatellite Markers for Polyploid and Diploid Members of the Orchid Genus *Dactylorhiza* [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2007, 7: 644–647.
- [17] THOMPSON J D, LUMARET R. The Evolutionary Dynamics of Polyploid Plants: Origins, Establishment and Persistence [J]. *Trends Ecol Evol*, 1992, 7(9): 303–306.
- [18] WENDEL J. Genome Evolution in Polyploids [J]. *Plant Molecular Biology*, 2000, 42: 225–249.
- [19] MANUABU WATANABE, TOSHIYA YAMAMOTO, MARI OHARA, et al. Cultivar Differentiation Identified by SSR Markers and the Application for Polyploid Loquat Plants [J]. *The Japanese Society for Horticultural Science*, 2008, 77(4): 388–394.
- [20] OMRAN S A, GUERRA-SANZ J M, GARRIDO CÁRDENAS J A. Methodology of Tetraploid Induction and Expression of Microsatellite Alleles in Triploid Watermelon [J]. *Proceedings of the IXth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding f Cucurbitaceae*, 2008, 381–384.
- [21] 边 禹, 汪卫星, 韩国辉, 等. 不同倍性“早红 3 号”枇杷基因组 AFLP 分析 [J]. *山西农业大学学报: 自然科学版*, 2010, 30(3): 209–211.

Genetic Analysis of “Dawuxing” Natural Triploid Loquats Based on SSR

XU Bo^{1,2}, JIANG Wan¹, LI Xiao-lin¹, GUO Qi-gao¹,
SUN Hai-yan¹, XIANG Su-qiong¹, HE Qiao¹, Liang Guo-lu¹

1. *School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China;*

2. *Chongqing Banan Quality and Safety of Agro-Products Center, Chongqing 401320, China*

Abstract: Sixty-two high-polymorphism pairs of SSR primers, screened out from 103 pairs of SSR primers, amplified 152 alleles in 8 natural triploids and one diploid of ‘Dawuxing’ loquat. The number of alleles per locus ranged from 2 to 3, and averaged 2.45. The value of allelic polymorphism information content (PIC) ranged from 0.099 to 0.586, and averaged 0.358. The 9 loquat trees could be differentiated completely by the 62 pairs SSR primers. The Dice similarity coefficient among the trees varied from 0.493 to 0.954, the maximum was detected between A376 and A368 and the minimum between A313 and A332. Of the 62 pairs of primes, 6 pairs (CL22, Contig1, NZ02b01, Hi15h12, EJ014, CH04c06 and CH01h02) could identify the ploidy of A379, A322, A348 and A332.

Key words: *Eriobotrya japonica* Lindl.; triploid; simple sequence repeats (SSR)

