

利用 ISSR 标记探讨贵州地方樱桃种质玛瑙红的起源原因

宋常美^{1,2} 文晓鹏¹

(1 贵州大学贵州省农业生物工程重点实验室 2 贵阳学院生物与环境工程系)

摘要: 为探讨玛瑙红的起源原因, 利用 ISSR 标记对贵州省纳雍县地方樱桃种质玛瑙红、酸樱桃、黑珍珠和 4 种欧洲甜樱桃等种质的亲缘关系进行分析。结果表明: 用 15 条稳定性强、条带清晰及多态性丰富的引物进行 PCR 扩增, 共获得 286 个标记位点, 其中多态性位点为 249 个, 多态性比例为 87.06%; 采用 NTSYS2.01 软件计算, 7 种樱桃相似性系数为 0.41~0.94, 玛瑙红与酸樱桃的相似系数为 0.57。玛瑙红和酸樱桃在分子水平上的遗传差异很大, 该种质可能为酸樱桃的实生变异种质。

关键词: 樱桃; 种质; 玛瑙红; 贵州; ISSR

中图分类号: S718.43 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2011)06-0094-04

SONG Chang-mei^{1,2}; WEN Xiao-peng¹. **Exploring the original causes of cherry cultivar Manaohong originated from Nayong County, Guizhou Province using ISSR markers.** *Journal of Beijing Forestry University* (2011) 33(6) 94-97 [Ch, 13 ref.]

1 Guizhou Key Laboratory of Agricultural Bioengineering, Guizhou University, Guiyang, 550025, P. R. China;

2 Department of Biological and Environmental Engineering, Guiyang College, 550003, P. R. China.

In this paper, genetic relationship among local cherry cultivar Manaohong originated from Nayong County of Guizhou Province, as well as: sour cherry, black pearl and four sweet cherry cultivars were investigated using ISSR markers. The purpose was to investigate the causes of variation on Manaohong. A total of 286 markers were scored from 15 primers, which were demonstrated highly reproducible, clear and polymorphic bands. Among the obtained markers, 249 were polymorphic, accounting for 87.06% of the total. As analyzed by NTSYS2.01, the genetic similarity among the seven accessions ranged from 0.41 to 0.94, and the genetic similarity between Manaohong and sour cherry was 0.57. Manaohong has significant genetic differences with sour cherry on molecular level, possibly it is a hybridization variation of sour cherry.

Key words cherry; germplasm; Manaohong; Guizhou Province; ISSR

玛瑙红樱桃 (*Prunus pseudocerasu* L.) 是 1996 年在贵州省纳雍县发现的地方优质种质资源, 因色泽深红而得名, 现已进行大面积推广栽培, 并获得较好的经济效益。经多年观察鉴定, 品种性状稳定, 有关专家初步认为系纳雍县地方酸樱桃 (*P. pseudocerasu* L. 'Suanyingtao') 芽变, 但二者果实品质及耐储性等性状有明显差异, 其亲缘关系值得进一步探讨。种质亲缘关系的鉴定方法主要有形态学观察、同工酶分析、染色体检测及 DNA 标记鉴定等^[1]。DNA

分子标记能直接反应遗传物质的变异, 可作为品种识别的标记^[2], 已被广泛用于果树亲缘关系的鉴定中^[3-5], 如有学者利用 ISSR 标记研究了部分樱桃种质的亲缘关系^[6-7]。本文利用 ISSR 标记对玛瑙红樱桃及酸樱桃、黑珍珠 (*P. pseudocerasu* L. 'Black pearl') 和 4 种欧洲甜樱桃 (*P. avium* L.) 的亲缘关系进行分析, 旨在为新品种审定和知识产权保护提供科学依据。

收稿日期: 2011-05-25

基金项目: 贵州省科技攻关项目 (黔科合字 NY[2010]3033)、贵州省自然科学基金项目 (黔科合 J 字 [2009]2082)。

第一作者: 宋常美, 博士生, 讲师。主要研究方向: 植物生物技术。电话: 0851-8297863 Email: gzgyscm@126.com 地址: 550003 贵阳市贵阳学院生物与环境工程系。

责任作者: 文晓鹏, 博士, 教授。主要研究方向: 植物生物技术。电话: 0851-8297863 Email: xpwense@hotmail.com 地址: 550025 贵阳市贵州大学农业生物工程重点实验室。

本刊网址: <http://journal.bjfu.edu.cn>

1 材料与方法

1.1 材料

于 2010 年 4 月中下旬采集 7 份樱桃材料(表 1) 的幼嫩叶片, 带回实验室用液氮处理后, 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

表 1 7 份樱桃的特征及来源地

Tab.1 Characteristics of 7 cherries and its origins

序号	材料	来源	特征
1	玛瑙红	贵州纳雍	果较大, 椭圆形, 果顶突出, 核小, 扁椭圆形, 色暗红, 果柄较长, 耐储存
2	酸樱桃	贵州纳雍	果小, 球形, 核近球形, 色暗红, 果柄较长, 耐储存
3	黑珍珠	重庆	果较大, 近球形, 色紫红
4	斯帕克里 <i>P. avium</i> L. 'Sparkla'	加拿大	果圆形, 红色, 柄短, 早熟丰产
5	沙米豆 <i>P. avium</i> L. 'Shami Beans'	加拿大	果大, 心形, 色紫红
6	早生凡 <i>P. avium</i> L. 'Early Compact Van'	加拿大	果较大, 肾形, 果顶较平, 色深红
7	红灯 <i>P. avium</i> L. 'Hongdeng'	中国, 那翁 × 黄玉	果大, 肾形, 色紫红, 核大, 果柄粗短

1.3 PCR 扩增

ISSR 引物参照加拿大哥伦比亚大学(UBC) 公布的序列(<http://zhidao.baidu.com/question/141178305.html>), 由上海生物工程技术服务有限公司合成。以随机抽取的 3 个样品基因组 DNA 为模板, 利用梯度 PCR 扩增仪筛选引物及退火温度。经优化确定 ISSR 扩增体系(总体积 $20\text{ }\mu\text{L}$) 为: 引物 $1.0\text{ }\mu\text{mol/L}$, DNA 模板 2.5 mg/L , $2\times\text{ Taq}$ 聚合酶混合液(天根生化科技北京有限公司) $10.0\text{ }\mu\text{L}$, 甲酰胺 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s , $49.1\sim 56.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (温度因引物不同而异) 退火 45 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s , 30 个循环; 最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物在含 EB 的 1.5% 琼脂糖凝胶中以 90 V 恒定电压电泳 1 h 左右, DL 2000 Marker(天根生化科技北京有限公司) 为标准分子量对照, 紫外凝胶成像系统照相。

1.4 数据统计分析

ISSR 为显性标记, 强带和弱带均记为 1, 无带记为 0, 对扩增产物的条带总数和多态性条带进行数量统计, 利用 NTSYSpc2.10e 软件, 按每两份材料间的遗传差异, 计算 Nei-Li 相似系数($S_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$) 或遗传距离($D_{ij} = 1 - S_{ij}$), 式中 N_{ij} 为样品 i 和样品 j 共有的带数, N_i 为样品 i 特有的带数, 而 N_j 为样品 j 特有的带数^[8]。然后根据结果, 用 UPGMA 法进行聚类分析, 聚类结果等级界线的划分参照陈守良等^[9]的方法。

2 结果与分析

2.1 多态性分析

采用 15 条扩增条带清晰、多态性及稳定性好的 ISSR 引物进行 PCR 扩增(表 2、图 1), 在 286 个位点

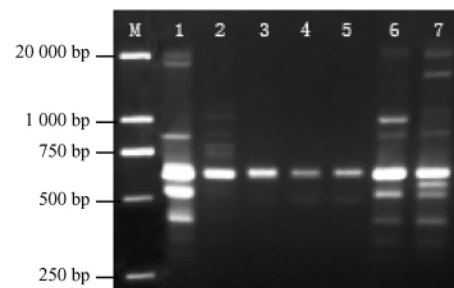
1.2 DNA 提取

采用北京天根公司生产的 Plant Genomic DNA Kit(DP305-03) 试剂盒提取樱桃幼嫩叶片的基因组 DNA, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计测定 DNA 质量及浓度, 稀释至 $20\text{ ng}/\mu\text{L}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

表 2 15 条引物退火温度及扩增结果

Tab.2 Annealing temperature and amplification results of 15 primers

引物	序列	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$	总位点数	多态性 位点数	多态性 比率/%
808	(Ag) ₈ C	56.1	20	17	85.00
809	(Ag) ₈ g	55.7	23	18	78.26
810	(gA) ₈ T	53.3	14	10	71.43
814	(CT) ₈ A	49.1	14	14	100.00
815	(CT) ₈ g	50.3	17	16	94.12
823	(TC) ₈ C	53.3	13	10	76.92
827	(AC) ₈ g	53.3	19	17	89.47
830	(Tg) ₈ C	56.1	27	26	96.30
836	(Ag) ₈ YA	49.1	18	18	100.00
842	(gA) ₈ Yg	54.9	21	18	85.71
868	(gAA) ₆	51.1	20	16	80.00
880	(ggAgA) ₃	50.6	24	21	87.50
888	BDB(CA) ₇	56.8	17	17	100.00
889	BDB(AC) ₇	56.8	20	20	100.00
m05	(gCT) ₄ Y	54.9	19	16	84.21



1. 酸樱桃; 2. 玛瑙红; 3. 斯帕克里;
4. 沙米豆; 5. 早生凡; 6. 红灯; 7. 黑珍珠
图 1 供试樱桃样品的 ISSR(引物为 m05) 扩增电泳图谱

Fig.1 ISSR profiles of seven cherry accessions amplified with primer m05

上扩增出分子量为 $0.15\sim 2.0\text{ kb}$ 的谱带, 平均每条引物扩增出 19 条谱带, 其中多态性带 249 条, 多态率达 87.06% 。15 条引物大部分表现较高的多态

性,其中4条引物的多态性谱带比率为100%。重复实验显示ISSR标记稳定性较强,多态性条带丰富,利用2~3条引物便能有效地将所有样品进行区分,因此可用于樱桃种质鉴定。

2.2 遗传相似系数

供试材料的Jaccard相似系数在0.41~0.94之间,同属欧洲甜樱桃的沙米豆和红灯之间的相似系数最小,仅为0.41;而斯帕克里和沙米豆的相似系数却高达0.94,平均相似系数为0.67,略高于3种中国樱桃之间的平均相似系数(0.64)。玛瑙红与黑珍珠的相似系数最高(0.62),而与酸樱桃和红灯间的相似系数均为0.57,与斯帕克里、沙米豆和早生凡间的相似系数约为0.53,但酸樱桃与黑珍珠间

的相似系数却达0.73。

2.3 ISSR 聚类分析

采用UPGMA法进行聚类分析(图2),结果表明,以相似系数0.53为阈值,供试7种樱桃可聚为两大类,其中红灯、黑珍珠和玛瑙红及酸樱桃聚为第一类;斯帕克里、沙米豆和早生凡聚为第二类。这说明中国樱桃和欧洲甜樱桃在DNA水平上具有较大差别,亲缘关系的远近与地域具有较大相关性。以相似系数0.64为阈值可将第一类分为两个亚类,其中玛瑙红单独成为一类,红灯、黑珍珠和酸樱桃聚为另一类,说明玛瑙红在DNA水平上与其余3份种质具有较大的遗传差异。

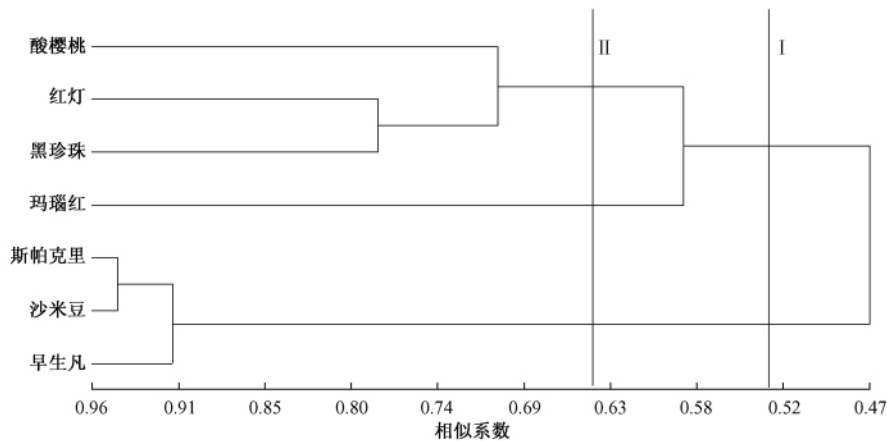


图2 供试樱桃种质的UPGMA聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrogram of tested cherry accessions

3 讨论

玛瑙红果实较大,果肉较硬,果色深红,果柄较长,耐储性较强,有关专家认为可能是酸樱桃的芽变。但本文分子标记数据显示,玛瑙红和酸樱桃的遗传相似系数仅0.57。张太平等^[10]在柚(*Citrus maxima* (Burm.) Merr.)上的研究表明,相似性系数在0.90以上的种质基本为无性繁殖变异品系,芽变品种/株系和母株之间的遗传背景较为一致。本文玛瑙红和酸樱桃间基于分子标记的遗传差异较大,并不支持芽变的观点。事实上,二者形态学性状差异较大:玛瑙红平均单果重3.1g,果实为椭圆形,果顶突出,果核为两端尖锐的扁椭圆形,果柄长1.8cm,叶片平均长度和宽度分别为11.4和6.2cm,较母株早熟5~7d,且耐储性更强;酸樱桃平均单果重1.1g,果实为球形,果核为近球形,果柄长1.2cm,叶片平均长度和宽度分别为7.4和4.5cm。结合分子标记数据及形态学数据分析,本文认为玛瑙红并非本地酸樱桃芽变,可能是实生变异,但父本不清楚,有可能是欧洲甜樱桃,因为玛瑙红某些形态学性状与欧洲甜樱桃相似,可能是欧洲甜樱桃花粉传至

中国酸樱桃上杂交所得。

本文研究结果显示供试的中国樱桃和多数欧洲甜樱桃分别聚为两类,且3份来自加拿大的甜樱桃聚为一类,从分子水平上印证了传统分类方法的结论。但尽管如此,本文中由中国选育的欧洲甜樱桃红灯与3种中国樱桃聚为一类,而不与3种来自加拿大的甜樱桃聚为一类。这种现象与某些研究中的结论相似,即艾呈祥等^[6]利用ISSR标记将山东泰安的莱阳短枝樱桃(*P. pseudocerasu* L. 'Laiyang Short')和红灯及佐藤锦(*P. avium* L. 'Satonishiki')聚在一起,利用SSR技术^[11]将欧洲甜樱桃岱红(*P. avium* L. 'Daihong')和莱阳短枝聚在一起。这可能是引种交流导致基因在不同地区间渗入所致^[12],也可能是分子标记更能反映基因组本质差异所致^[13]。王志峰等^[13]认为在相同地理纬度和生态环境条件下,品种进化方向可能趋于一致,基因型间的相似性增加,因此欧洲甜樱桃在中国的长期栽培过程中可能与中国樱桃进化趋于一致,也可能渗入了中国樱桃基因,所以中国选育的红灯和岱红能与中国樱桃聚类。当然,欧洲甜樱桃能与中国樱桃聚类,不排除因引物数量较少,难以扫描到整个

基因组,所以无法较为全面地反应种质间遗传差异的信息所致,而具体原因仍需进一步研究。针对此现象,若结合多种标记及形态学标记一起进行分析,将获得更加准确可靠的信息。

参 考 文 献

- [1] 伊凯,闫忠业,刘志,等. 苹果芽变选种鉴定及应用研究[J]. 果树学报, 2006, 23(5): 745-749.
- [2] KAWCHUK L M, LYNCH D R, HACHEY J *et al.* Identification of a codominant amplified polymorphic DNA marker linked to the verticillium wilt resistance gene in tomato [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1994, 89(6): 661-664.
- [3] 宁允叶,熊庆娥,曾伟光,等. 红阳猕猴桃全红芽变系的 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 2003, 30(5): 511-413.
- [4] 徐月,曹庆芹,冯永庆,等. 短雄花序板栗芽变的 AFLP 分析[J]. 园艺学报, 2006, 33(6): 1321-1324.
- [5] ZHAO G L, DAI H Y, CHANG L L *et al.* Isolation of two novel complete Ty1-copia retrotransposons from apple and demonstration of use of derived S-SAP markers for distinguishing bud sports of *Malus domestica* cv. Fuji[J]. *Tree Genetics and Genomes* 2010, 6: 149-159.
- [6] 艾呈祥,张力思,李国田,等. ISSR 标记 34 份樱桃种质资源的遗传分析[J]. 中国农学通报, 2008, 24(4): 47-51.
- [7] LI M M, CAI Y L, QIAN Z Q, *et al.* Genetic diversity and differentiation in Chinese sour cherry *Prunus pseudocerasus* Lindl., and its implications for conservation [J]. *Genetic Resources and Crop Evolution* 2009, 56: 455-464.
- [8] NEI M, LI W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(10): 5269-5273 [2011-03-01]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC413122/?page=1>.
- [9] 陈守良,徐克学,盛国英. 中国散生竹类的数量分类和确定分类等级的探讨[J]. 植物分类学报, 1983, 21(2): 113-120.
- [10] 张太平,彭少麟,王峥嵘,等. 柚类品种遗传相互关系的 RAPD 标记研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2001, 9(4): 322-328.
- [11] 艾呈祥,辛力,余贤美,等. 樱桃主栽品种的遗传多样性分析[J]. 园艺学报, 2007, 34(4): 871-876.
- [12] 张淑青,刘冬成,刘威生,等. 普通杏品种 SSR 遗传多样性分析[J]. 园艺学报, 2010, 37(1): 23-30.
- [13] 王志峰,孙日飞,孙小镭,等. 山东省黄瓜地方品种资源亲缘关系的 AFLP 分析[J]. 园艺学报, 2004, 31(1): 103-105.

(责任编辑 冯秀兰)

《Chinese Birds》(《中国鸟类》) 征稿启事

为加强中国与世界的鸟类学学术交流,提高中国鸟类学的学术水平和国际影响,北京林业大学申办了中国首份鸟类学学术期刊《Chinese Birds》(《中国鸟类》)(CN11-5870/Q)。该刊由北京林业大学和中国动物学会鸟类学分会共同主办,高等教育出版社出版。《Chinese Birds》为面向全球的英文学术期刊,主要发表经同行评议的研究论文、综述和研究简报等,收稿范围涵盖鸟类学所有研究方向。

中国科学院院士郑光美先生担任该刊主编,编委会成员为来自国内外各高校、学会及科研院所的知名学者。

该刊为季刊,16开。欢迎国内外从事鸟类学研究的专家学者积极投稿,该刊免收稿件评审费及版面费。

联系人:程朋军、颜帅

地 址:北京市海淀区清华东路35号北京林业大学148信箱《Chinese Birds》编辑部

邮 编:100083

电 话:86-10-62337915 86-10-62337605

网 址:www.chinesebirds.net

Email: pjcheng@bjfu.edu.cn (程朋军)

yanshuai@bjfu.edu.cn (颜帅)