

ISSR 分子标记技术在桃品种鉴定中的应用

孙淑霞,李靖,陈栋,谢红江,涂美艳,江国良

(四川省农业科学院园艺研究所,成都 610066)

摘要:为了有效地鉴别桃苗木优良品种或类型,为桃种质资源研究和新品种保护提供理论基础,利用 ISSR 标记对 28 份桃种质进行了品种鉴定及亲缘关系检测。结果发现:23 条 ISSR 引物共扩增出 188 条 DNA 片段,其中 96 条具有多态性,多态性频率为 51.06%;材料间遗传相似系数 GS 变幅为 0.84~0.97,平均为 0.92。获得 28 份供试材料的指纹图谱,鉴定出 9 条特异出现 DNA 片段和 11 条特异缺失 DNA 片段。通过 UPGMA 聚类分析发现,供试材料中地理来源及部分农艺性状相近的品种或类型聚为小类,但大的聚类群没有明确的划分标识,可能与桃种质在地区间互换及所选择的 ISSR 标记有关。

关键词:桃;ISSR;品种鉴定;指纹图谱

中图分类号:S662.1

文献标志码:A

论文编号:2010-2097

Molecular Identification of Peach Germplasm by ISSR Markers

Sun Shuxia, Li Jing, Chen Dong, Xie Hongjiang, Tu Meiyang, Jiang Guoliang

(Horticulture Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066)

Abstract: To differentiate and identify varieties and types of peach germplasm, the genetic diversity and cultivar identification among 28 peach accessions by ISSR markers were explored. 23 ISSR primers amplified 188 bands, 96 bands were polymorphic, and the polymorphic percentage was 51.06%. The genetic similarity coefficient (GS) estimated from these molecular data ranged from 0.84 to 0.97, with an average of 0.92. Each genotype had a unique banding profile, and a total of 20 specific ISSR fragments were available to be converted into sequence characterized amplified region (SCAR) or simple sequence repeat (SSR) markers. UPGMA analysis showed that there were not distinct clusters and sub-clusters were consistent with geographical origins and agricultural character of peaches. The results of cluster analysis might be related to the germplasm exchanges between different regions and the characteristics of ISSR markers.

Key words: peach; ISSR; cultivar identification; fingerprint

0 引言

桃 (*Prunus persica* L. Batseh.) 属于蔷薇科 (Rasaceae) 桃属 (*Prunus*), 原产于中国, 具有丰富的种质资源。长期以来, 人们主要通过营养繁殖来保持果树遗传稳定性, 靠引种、选优、实生选种、杂交选种等手段来改良树种。但果树生命周期长, 遗传高度杂合, 实生后代单株占地面积大, 养护费用高, 给育种工作带来

很多不便。因此, 开展果树分子标记辅助育种尤为重要。

通过多年嫁接繁殖及不同地域相互交换, 桃同名异物或同物异名现象严重, 仅依靠传统的形态特征很难识别。目前, 关于桃分子标记方面的工作主要侧重于遗传多样性及亲缘关系分析上^[1-3], 对品种 DNA 指纹鉴定的研究还很少^[4]。DNA 指纹能从本质上反映生物

基金项目:公益性行业(农业)科研专项经费项目“桃优质高效安全生产栽培技术体系的建立与应用推广”(3-37);国家桃产业技术体系“成都综合实验站”(nycytx-31-zs-10);成都市技术应用与推广计划重点项目“龙泉山脉优质特色伏季水果科技示范带建设”(09YTZD986NC-012)。

第一作者简介:孙淑霞,女,1977年生,助理研究员,博士,主要从事果树分子生物学研究。通信地址:610066 成都市静居寺路20号 四川省农业科学院园艺研究所, Tel: 028-84504786, E-mail: sshuxia@163.com。

通讯作者:江国良,男,1962年生,四川人,研究员,博士,主要从事果树生态育种研究。通信地址:610066 成都市静居寺路20号 四川省农业科学院园艺研究所, Tel: 028-84504786, E-mail: jiang-guoliang@163.com。

收稿日期:2010-07-09, **修回日期:**2010-09-25。

个体差异,具有高度个体特异性和稳定可靠性,对指导亲本选配及实生苗童期鉴定具有重要意义。

ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) 标记是基于简单序列而设计的寡核苷酸序列引物,是一种以PCR扩增为基础的分子标记技术,谱带丰富,可以检测到基因组中多个位点的差异。张青林等^[5]对ISSR标记及其在果树上的应用进行了综述,Hu等^[6]对观赏桃遗传关系进行了ISSR指纹分析,充分揭示了ISSR标记在果树种质鉴定中的重要性与高效性。本研究利用ISSR标记对来自国外和国内28份桃种质进行品种鉴定分析,以期对桃种质资源的研究利用提供参考,为新品种登记、注册和产权保护提供可靠依据。

1 材料与方法

1.1 材料与DNA提取

供试材料达60余份,均来自于四川省农业科学院园艺研究所中江桃品种园;其中28份通过ISSR分析获得特异指纹,剩余30余份用于对获得的特异指纹检验。部分字母编号为国外引进或名称混淆材料。基因

组DNA的提取参照Doyle等^[7]改良的CTAB法,并稍加改进。新鲜幼叶在液氮研磨后将磨碎的材料移入5mL离心管中,加入3mL 65℃预热的CTAB提取液[100 mmol/L Tris-HCL, 20 mmol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl (m/v), 2.5% CTAB (m/v), 2% PVP (m/v), 2% (v/v) β -巯基乙醇(随用随加)]。摇匀,65℃水浴45 min,期间轻轻摇匀3次。加入2 mL 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),上清液再加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),得到的DNA用TE溶解后再重复以上步骤加以纯化。

1.2 引物筛选与PCR扩增

所用ISSR引物参照加拿大哥伦比亚大学UBC公司公布的第9套引物序列([Http://www.biotech.ubc.ca/ser-vices/naps/primers/Primers.pdf](http://www.biotech.ubc.ca/ser-vices/naps/primers/Primers.pdf))。从95条ISSR中筛选出23条扩增效果好可用于品种鉴定的ISSR引物,详见表2。PCR反应体系参照艾呈祥等^[8]建立的李ISSR体系进行优化,各组分的浓度为:1×PCR Buffer, 0.125 mmol/L dNTP, 2.0 mmol/L MgCl₂, 1 U TaqDNA聚合酶, 0.3 μ mol/L引物和50 ng/ μ L基因组DNA,加水

表1 用于ISSR分析的引物、序列、总条带、多态性条带和多态性频率

引物	序列5' - 3'	总条带	多态性条带	多态性频率/%
UBC 807	(AG) ₈ T	7	3	42.86
UBC 808	(AG) ₈ C	6	3	50.00
UBC 809	(AG) ₈ G	8	6	75.00
UBC 810	(GA) ₈ T	8	4	50.00
UBC 811	(GA) ₈ C	8	4	50.00
UBC 812	(GA) ₈ A	6	4	66.66
UBC 816	(CA) ₈ T	7	3	42.86
UBC 825	(AC) ₈ T	10	6	60.00
UBC 826	(AC) ₈ C	9	2	22.22
UBC 827	(AC) ₈ G	13	7	53.85
UBC 834	BDB(CA) ₇	8	6	75.00
UBC 835	(AG) ₈ YC	7	5	71.43
UBC 836	(AG) ₈ YA	8	2	25.00
UBC 840	(GA) ₈ YT	9	7	77.77
UBC 841	(GA) ₈ YC	6	4	66.66
UBC 842	(GA) ₈ YG	9	4	44.44
UBC 844	(CT) ₈ RC	10	5	50.00
UBC 855	(TC) ₈ RT	12	5	41.67
UBC 857	(AC) ₈ YG	9	4	44.44
UBC 873	(GACA) ₄	6	5	83.33
UBC 874	(CCCT) ₄	6	5	83.33
UBC 880	(GGAGA) ₃	8	1	12.50
UBC 888	BDB(CA) ₇	8	1	12.50

补足至 25 μL 。扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 后延伸 6 min。PCR 扩增产物用 1.0 \times TAE 配制的 2.0% 琼脂糖凝胶电泳分离, 在 150 V 电压下电泳 1~2 h, 电泳结束后在凝胶成像系统 (Alpha Innotech) 中观察、照相、记录。根据等位基因数、可重复性和鉴别能力进行引物筛选。

1.3 数据统计分析

将 ISSR 扩增产物以 0、1、9 统计建立数据库。在相同迁移位置, 有带记为 1, 无带记为 0, 扩增失败或缺失数据记为 9。利用 NTSYS-pc 统计分析软件^[9] 计算遗传相似系数 (GS)。计算公式为: $GS = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$, 其中 N_{ij} 为材料 i 和 j 共有的扩增片段数, N_i 为材料 i 中出现

的扩增片段数, N_j 为材料 j 中出现的扩增片段数。根据 GS 值或者遗传距离 $GD(1-GS)$ 按不加权重对群算术平均法 (UPGMA) 进行遗传相似性聚类。

2 结果与分析

2.1 ISSR 多态性分析

通过对 95 条 ISSR 引物筛选分析, 选择了其中 23 条扩增条带明亮, 重复性好, 具有特异条带的引物用于对 28 份桃品种鉴定分析。每条 ISSR 引物可扩增出 6~13 条 DNA 片段, 平均 8.17 条 (图 1, 表 1)。23 条 ISSR 引物共扩增出 188 条带, 其中 96 条具有多态性, 多态性频率为 51.06%。这些多态性片段主要分布在 250~2000 bp 的范围内, 能有效地把 28 份供试桃材料鉴定区分开来。

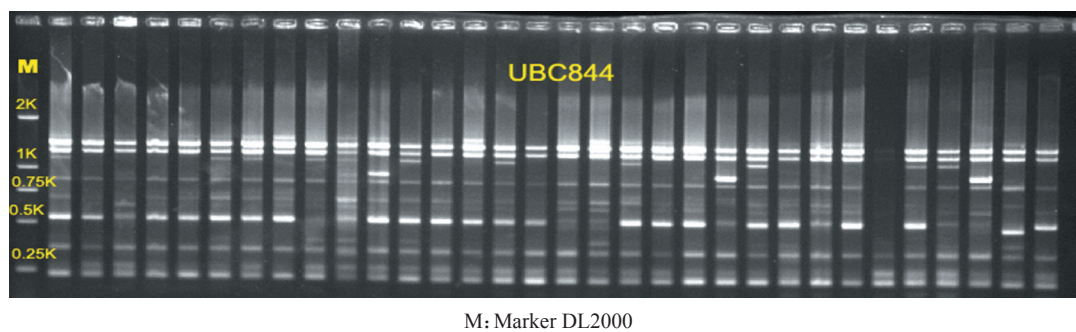


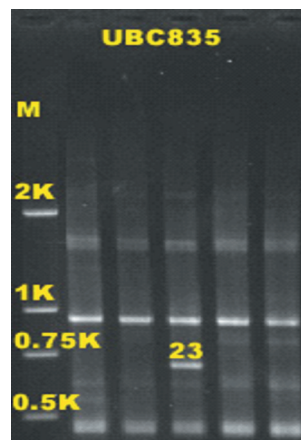
图 1 ISSR 引物 UBC844 对部分供试样本的扩增

2.2 ISSR 指纹鉴定

在供试的 60 余份桃样本中, 通过 ISSR 标记多次重复扩增检验, 得到其中 28 份材料的特异指纹谱带, 见表 2。在 5 份样本中鉴定出特异出现谱带, 如 1-D9 中有 3 条特异出现谱带, 分别是 UBC857-942 和 883, UBC888-310; 在 3-D5 和 ‘粉肉碧桃’ 中各出现 2 条, 分别是 UBC841-1930 和 1862, UBC844-422 及 UBC855-929; 在 ‘红碧桃’ 和 ‘红垂枝’ 中各有 1 条, 分别是 UBC835-732 (见图 2) 和 UBC874-736。在 9 份材料中鉴定出 11 条特异缺失谱带, 除 ‘酒花桃’ 和 5-1 分别出现 2 条特异缺失外, 其余 7 份各对应一条特异缺失, 见表 2。每条特异出现或特异缺失条带在 60 余份供试样本中都是唯一的。

2.3 ISSR 聚类分析

为更直观地显示 ISSR 标记检测到的桃品种间的差异, 对所获 28 份品种 188 条谱带进行聚类分析 (图 3)。结果表明, 28 份桃种质两两间的相似系数分布在 0.84~0.97 之间, 平均值为 0.92。其中, 桃 5-1 与 2-D10 的遗传相似系数最小, 表明这 2 种质间的遗传距离最远, 遗传相似程度最低。3-D5 与 3-D8 的相似系数最大, 为 0.97, 表明二者的亲缘关系最近, 遗传相似程度



“23”为 ‘红碧桃’ 所对应编号的特异条带; M: Marker DL2000

图 2 ISSR 引物 UBC835 扩增的特异条带

最高, 可能为同物异名, 或者其亲本相似。以遗传相似系数 0.97 为标准, 23 条 ISSR 引物扩增的 188 个条带数据, 能将其中 26 份品种完全区分开。

当遗传相似系数为 0.925 时, 供试材料可分为 5 大类群和 2 个分支 (如图 3), 每一类群并没有明显的划分标识, 2 分支分别是观赏桃 ‘粉肉碧桃’ 和欧洲材料 1-D5。其中, 第 1 大类群又分为 3 小类, 第 1 小类中字母编号的供试材料为来自欧洲的桃资源, 第 2 小类为

表2 用于ISSR鉴定的品种,特异出现和特异缺失条带及相应指纹谱带

品种	特异条带	特异缺失	ISSR 指纹
早熟有明	—	—	UBC844-691, UBC834-794
中油5号	—	—	UBC809-415; 364, UBC840-657
菊花桃	—	—	UBC874-736, UBC808-1429
1-D9	UBC857-942; 883 UBC888-310	—	UBC857-942; 883
霞光	—	—	UBC808-738, UBC810-772
2-D10	—	UBC812-654	UBC812-654
761	—	—	UBC874-690, UBC811-826
1-D8	—	UBC841-914	UBC841-914, 或 UBC840-1385; 371; 281
2-D8	—	—	UBC844-691, UBC827-1170
4-D4	—	—	UBC855-2071; 1732
1-D6	—	UBC825-840	UBC825-840
4-D2	—	—	UBC807-264, UBC857-963
中油蟠3号	—	—	UBC807-264, UBC825-1344; 1198
红碧桃	UBC835-732	UBC812-434	UBC835-733 或 UBC812-434
酒花桃	—	UBC825-309 UBC841-439	UBC825-309 或 UBC841-439
中油4号	—	—	UBC873-709; 650, UBC834-1358
5-2	—	—	UBC807-264, UBC816-975
2-D7	—	—	UBC811-826; 466; 391
3-D5	UBC841-1930; 1862	—	UBC841-1930; 1862
5-1	—	UBC844-691; 571	UBC844-691; 571
加纳岩	—	—	UBC811-827; 561
3-D8	—	—	UBC844-691, UBC810-518
早黄蟠	—	UBC842-420	UBC842-420
京艳	—	—	UBC825-309 或 UBC880-748
绛桃	—	UBC826-495	UBC826-495
1-D5	—	UBC855-1732	UBC855-1732
红垂枝	UBC874-736	—	UBC874-736, UBC836-863
粉肉碧桃	UBC844-422 UBC855-929	—	UBC844-422 或 UBC855-929

中国品种,其中部分农艺性状相似。其他4个类群也有类似特征。

3 结论与讨论

通过利用95条ISSR引物对60余份国内外桃样本筛选鉴定,获得了其中28份样本的23条ISSR标记的指纹图谱。这23条ISSR引物对供试桃种质扩增稳定,条带清晰明亮,多态性好,能很好地对品种加以鉴定,为进一步研究利用这部分资源提供了分子层面的参考。

获得了5份桃样本9条ISSR特异出现条带,其中2份1-D9和3-D5是引进材料,其余3份为国内品种。在

9份样本中出现11条ISSR特异缺失条带,其中仅在‘红碧桃’中鉴定出特异出现和特异缺失2种条带,无论是特异出现还是特异缺失,这20条特异谱带可转化为SCAR或SSR等PCR标记,用于对相应品种及杂交后代指纹鉴定。这些研究方法和结果对建立桃核心种质、新品种保护以及种苗质量仲裁检验等具有重要意义。

ISSR聚类图揭示了多数来源地相同的种质表现出较为密切的亲缘关系,可能是来源地相同的种质或品种,其亲本相似或相近。但也有同一来源地的品种未聚在一起的情况,如国外引进材料4-D4与中国的

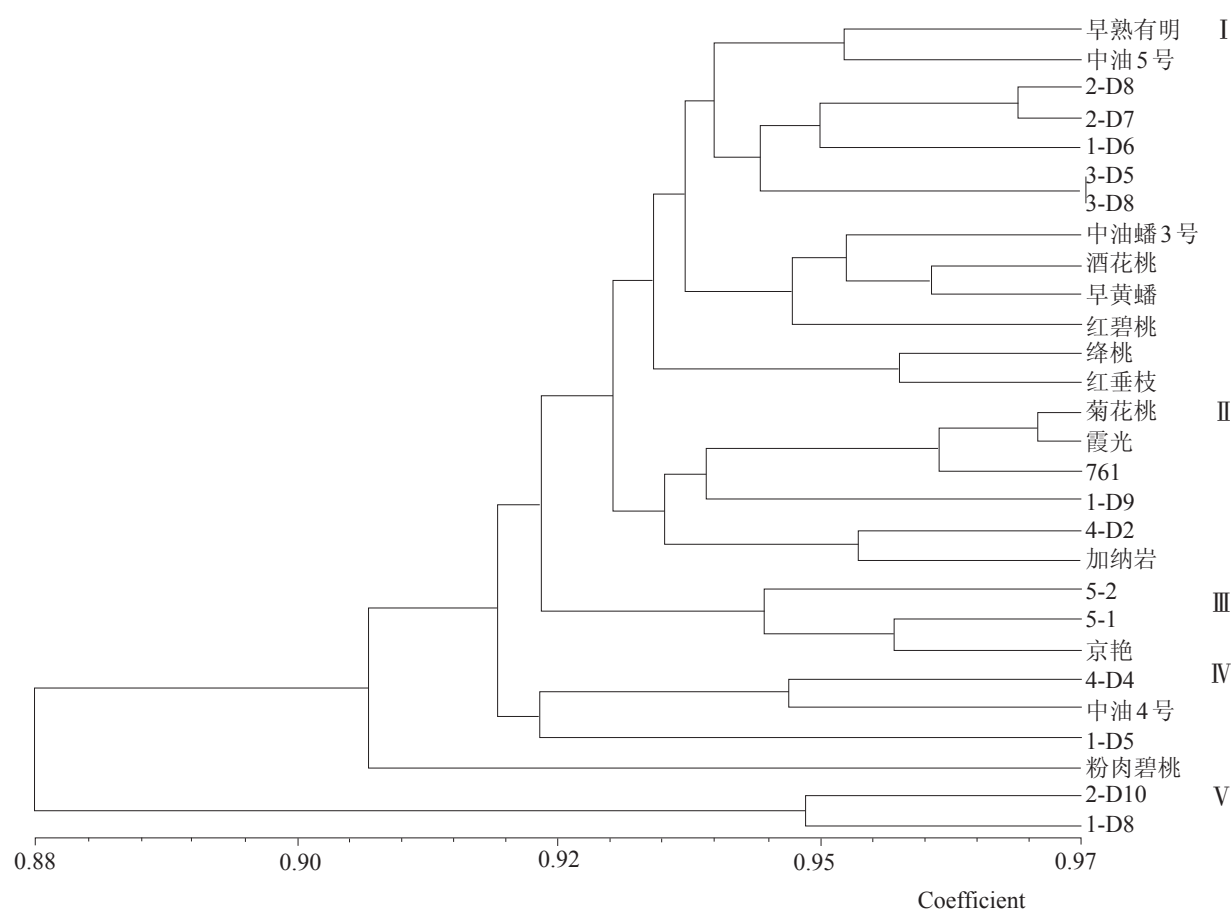


图3 利用UPGMA距离法对28份桃种质的ISSR聚类分析

‘中油4号’聚在一起,这种现象可能是因为地区间的引种交流导致了某些基因在不同地区之间的渗入,也可能是分子标记方法可反映基因组本质的差异所致^[10],仍需今后进行更多的研究探讨。

对于难以鉴定、亲缘关系很近的品种或一些芽变品种,需要综合形态学、生物化学、分子标记技术等多种方法进行鉴定^[11]。一些新开发出的分子标记在桃等果树研究上还鲜见应用,随着技术和设备的进步,有望在今后的鉴定工作中发挥至关重要的作用。

参考文献

- [1] Aranzana M J, Garcia-mas J, Carbo J, et al. Development and variability analysis of microsatellite markers in peach[J]. Plant Breeding,2002,121:87-92.
- [2] Wunsch A, Carreral M, Hormaza J I. Molecular characterization of local Spanish peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] germplasm[J]. Genetic Resources and Crop Evolution,2006,53:925-932.
- [3] Xu D H, Wahyuni S, Yamaguchi M, et al. Genetic diversity and relationships of Japanese peach (*Prunus persica* L.) cultivars revealed by AFLP and pedigree tracing[J]. Genetic Resources and Crop Evolution,2006,53:883-889.
- [4] Aranzana M J, Carbo J, Arus P. Microsatellite variability in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: cultivar identification, marker mutation, pedigree inferences and population structure[J]. Theor Appl Genet,2003b,106:1341-1352.
- [5] 张青林,罗正荣.ISSR及其在果树上的应用[J].果树学报,2004,21(1):54-58.
- [6] Hu D, Zhang Z, Zhang Q, et al. Ornamental peach and its genetic relationships revealed by Inter-simple sequence repeat (ISSR) fingerprints[J]. Acta Hort. (ISHS),2006,713:113-120.
- [7] Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue[J]. BRL Focus,1990,12:13-15.
- [8] 艾呈祥,张力思,李国田,等.ISSR标记对34份樱桃种质资源的遗传分析[J].中国农学通报,2008,24:47-51.
- [9] Rohlf F J. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.1[M]. Exeter Publications, N. Y,2000.
- [10] 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,2004,31:103-105.
- [11] 王姣,刘崇怀,樊秀彩,等.葡萄种类和品种鉴定技术研究进展[J].植物遗传资源学报,2008,9:401-405.