

# 甜樱桃先锋及其芽变品种的 SSR 分析

张广和<sup>1</sup>, 唐美玲<sup>1</sup>, 张文娜<sup>2</sup>, 赵 明<sup>1</sup>

(1. 烟台市农业科学研究院 山东 烟台 265500; 2. 中国农业大学 园艺植物研究所, 北京 100009)

**摘 要:** 短枝先锋和早生凡是先锋的 2 个短枝型芽变品种, 应用 SSR 技术, 筛选了 9 对引物来区分这 3 个品种。结果表明: 只有引物 pchgms4 没有扩增产物, 其余 8 对引物扩增效果理想; 单独利用引物 pchpgms3 可以完全区分这 3 个品种; 引物 PceGA25 与引物组合 EMPA017 可以区分这 3 个品种。

**关键词:** 甜樱桃; 分子标记; SSR

**中图分类号:** S 662.503.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)07-0108-03

甜樱桃(*Prunus avium* L.)起源于里海和黑海地区, 16 世纪在欧洲开始经济栽培, 引入中国已有 100 多年的历史。早期对甜樱桃品种缺乏可靠的鉴定方法, 致使出现同物异名和同名异物现象, 品种混乱问题对甜樱桃生产造成很大的损失。先锋(Van)、早生凡(Early Compact Van)和短枝先锋(Van Compact)是加拿大育成的 3 个优良甜樱桃品种, 目前也是我国的主栽品种。其中早生凡和短枝先锋是先锋的短枝型芽变品种, 经过栽培观察, 它们的生物学特性相差很小, 只有枝条性状相差较大, 但短枝性状在苗期并不是很明显, 因此通过植物学特性观察很难区分这 3 个品种。

分子标记技术的发展, 为品种鉴定提供了新的途径。目前用于鉴定品种的分子标记有很多种, 与其它分子标记相比, SSR (Simple Sequence Repeats) 标记具有数量丰富, 分布于整个基因组; 多态性高、呈共显性遗传、重复性好; 易于分析、操作简单, 结果稳定可靠等优点, 现已被广泛应用于樱桃遗传多样性分析、品种进化分析等方面<sup>[14]</sup>。但利用 SSR 鉴定樱桃芽变品种的研究未见报道。因此拟利用 SSR 标记从 DNA 水平上区分以上 3 个品种, 为正确鉴定这 3 个品种提供分子依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

先锋、短枝先锋和早生凡采自烟台市农业科学院樱桃种质资源圃, 3 个品种均是 2001 年高接在种质资源圃内, 目前均已开花结果。2008 年 5 月采取嫩叶, 液氮速冻后, -80℃保存备用。另外从北京农林科学研究院采的先锋嫩叶, 冰盒带回实验室, -80℃保存备用。

### 1.2 方法

**第一作者简介:** 张广和(1963-), 男, 本科, 高级农艺师, 现主要从事果树新品种选育及栽培技术研究工作。

**收稿日期:** 2009-02-10

**1.2.1 樱桃基因组 DNA 提取** 参照赵玉军等<sup>[3]</sup>方法, 通过琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计测定来检测 DNA 质量和浓度。将提取的 DNA 样品稀释到 50 ng · μL<sup>-1</sup>后, 置于-20℃保存。

**1.2.2 SSR 引物序列及 PCR 反应程序** 根据参考文献<sup>[6-10]</sup> 选择了 9 对 SSR 引物: 即 PceGA25、EMPA013、EMPA017、pchgms4、pchpgms3、BPPCT 030、BPPCT 041、UDP98-409、UDP97-403, 引物序列如表 1 所示, 由上海生工生物公司合成。PCR 反应体系 20 μL: 50 ng DNA 模板, 1×PCR buffer 2 μL, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol · L<sup>-1</sup>) 1.2 μL, dNTP (10 mmol · L<sup>-1</sup>) 0.4 μL, 引物各 1 μmol · L<sup>-1</sup>, 0.5 U Taq DNA 聚合酶。PCR 反应程序: 94℃预变性 2 min; 然后按 94℃ 30 s, 退火温度 52℃ 30 s, 72℃延伸 30 min, 35 个循环; 72℃延伸 7 min。用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 胶片用银染的方法染色。

**1.2.3 数据分析** 电泳图谱的每条带均为 1 个分子标记, 代表 1 对 SSR 引物的结合位点。品种相似系数(pair similarity coefficient)用 Nei 和 Li 计算法, 计算公式为  $S_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$ , 其中  $N_{ij}$  为 2 个品种共有的等位变异数,  $N_i$ 、 $N_j$  分别为第 i 和第 j 品种各自的等位变异数 (Nei & Li, 1979)。

## 2 结果与分析

### 2.1 SSR 引物扩增结果

试验采用退火温度统一的反应体系, 9 对引物中, 只有引物 pchgms4 没有扩增产物, 其余 8 对产物扩增效果理想。扩增结果如图 1 和表 1 所示, 8 对引物共扩增出 147 个位点, 扩增产物在 50~250 bp 之间, 每对引物可以检测到 2~11 个数目不等的等位基因, 其中 UDP97-403 等位变异数最少, 只有 2 个, PceGA25 等位变异数最多 11 个。

### 2.2 SSR 技术区分先锋与芽变品种结果

如图 1 所示, 只有引物 5 pchpgms3 能够完全区分这

3 个品种引物。引物 2 EMPA013、引物 8 UDP98-409 和引物 9UDP97-403 对 3 个品种进行扩增,产物完全一样,不能区分这 3 个品种。其中引物 1 PceGA 25 与引物 3 EMPA017 组合、引物 1 与引物 6 BPPCT 030 组合或者引物 1 与引物 7 BPPCT 041 组合也能够完全区分这 3 个品种。单独利用引物 1 PceGA25 只能够区分先锋和短枝先锋,也能够区分先锋与早生凡,但区分不开短枝先锋与早生凡;单独利用引物 3 EMPA017、引物 6 BP-

PCT 030 和引物 7 BPPCT 041 只能够区分早生凡和短枝先锋,但是先锋与早生凡的扩增结果一致。引物 6 与引物 7 能够区分先锋和短枝先锋,也能够区分早生凡和短枝先锋,但早生凡和先锋的扩增产物却完全相同;由图 2 还可以看出,从所采的先锋与北京林果所采的先锋扩增结果完全一致,从而说明 SSR 技术稳定性好、结果可靠。

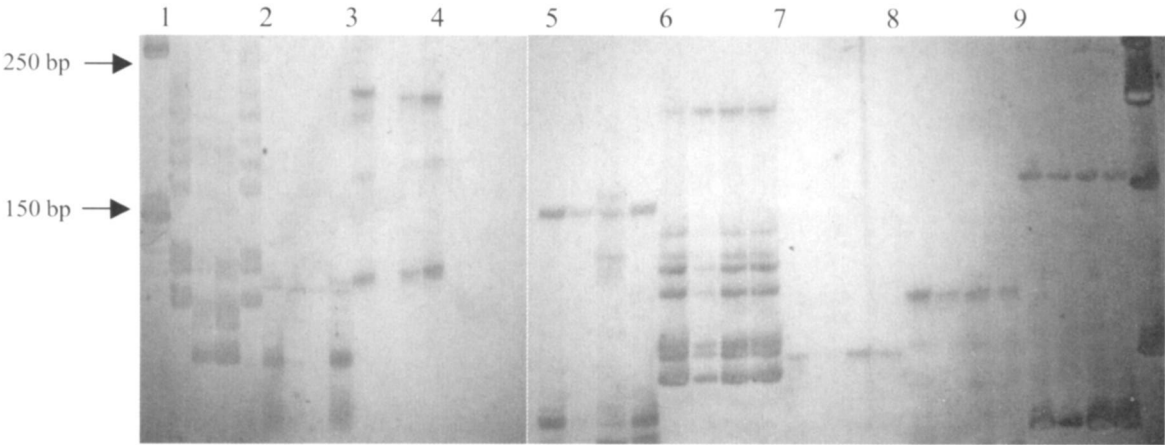


图1 9 对引物对先锋、短枝先锋、早生凡和先锋扩增结果  
注: 1~9: 9 对引物顺序同表 1; 每对引物对 4 个品种进行扩增依次是: 先锋、短枝先锋、早生凡和先锋(采自北京林果所)。

2.3 品种间遗传相似系数分析

表 1 引物序列及扩增多态性位点数

编号	引物	引物序列	片段长度	位点数
1	PceGA25	5'-GCA ATT CGA GCT G TA TTT CAG ATG-3' 5'-CAG TTG GGG GCT ATC ATG CTT AC-3'	100 ~ 250	11
2	EMPA013	5'-CCCTTC CAC CAT AGG TAG CC-3' 5'-TGG AAT TGT AGA GAA CCG AGG-3'	50 ~ 100	3
3	EMPA017	5'-ATT TCA ATG TGG GGA TGAGC-3' 5'-TGA AGT GAG GGA AAT GGA GC-3'	100 ~ 200	0~4
4	pchgm4	5'-ATC TTC ACA ACC CTA ATG TG-3' 5'-GTT GAG GCA AAA GACTTC AAT-3'	无扩增产物	
5	pelpgms3	5'-AGG CTA TGT CGG TAC ACT CTC CAT G-3' 5'-CAA CCT GTG ATT GCT GCT ATT AAA G-3'	100 ~ 250	3~5
6	BPPCT 030	5'-AAT TGT ACT TGC CAA TGC TAT GA-3' 5'-CTG CTT TCT GCT CAC ACC-3'	120 ~ 300	6~8
7	BPPCT 041	5'-CAA TAA GGC ATT TGG AGG C-3' 5'-CAG CCG AAC CAA GGA GAG-3'	50 ~ 150	3~4
8	UDP98-409	5'-GCTG ATGGGTTTATGTTTTC 3' 5'-GGGACTCTATCTCTATCAACA -3'	70 ~ 200	5
9	UDP97-403	5'-CTGCTTACAACCTCGAAGC-3' 5'-GCTGGACCAACTGAGACTCA-3'	100 ~ 250	2

如图 1 所示,引物 5 pelpgms3 在先锋中扩增产物为 3 条,而在短枝先锋的扩增产物为 2 条,对早生凡的扩增产物为 5 条。对于先锋与短枝先锋来说,共有条带为 2 条,根据 1.2.3 公式得出先锋与短枝先锋的遗传相似系数为 1.25;对于先锋与早生凡来说,共有谱带为 2 条,因此先锋与早生凡的遗传相似数为 0.5;对于短枝先锋和

早生凡来说,共有谱带为 2 条,因此遗传相似系数为 0.555。单从遗传相似系数来看短枝先锋和早生凡与先锋相比遗传物质上发生了很大改变。

3 讨论

果树发生芽变是由于芽的分生组织细胞受到外界因子影响而发生遗传物质改变,归根到底说就是 DNA 的改变,因此利用分子标记鉴定芽变是可行的。到目前为止 RAPD、AFLP 在果树芽变鉴定中都有一定的应用<sup>[11-13]</sup>,研究发现在这些标记中,效果最好的还是 AFLP。但是由于 AFLP 操作程序复杂,成本高,筛选到的标记一般需要转为 SCAR 标记才可以用于生产。因此该研究选用 SSR 分子标记技术来区分先锋与它的 2 个短枝芽变品种,一旦筛选到标记就可以直接应用于生产。

由于 SSR 技术是基于 PCR 的一种标记,其反应条件易受模板 DNA 质量、Taq 酶、dNTP 和 Mg<sup>2+</sup> 浓度及退火温度等影响。其中退火温度是最大的影响因素,由于每对引物的退火温度不同导致了 PCR 扩增时不能大批量进行,因此该研究采用统一的退火温度也得到了很好的扩增效果,这与 Adam-Blondon A F 等在利用 SSR 技术构建葡萄遗传图谱时研究一样,利用 245 个 SSR 引物,退火温度只采用 2 个,56℃和 60℃也取得了满意的结果<sup>[14]</sup>。研究共筛选了 9 对引物,其中就有一对能够完

全区分这 3 个品种。说明只要筛选到合适的引物, SSR 标记也可以用来鉴定芽变品种。

### 参考文献

- [1] 张琪静, 张新忠, 李贺, 等. 甜樱桃 SSR 体系的建立、优化及应用[J]. 果树学报, 2007, 24(6): 770-773.
- [2] 艾成祥, 张力思, 魏海蓉, 等. 甜樱桃品种 SSR 指纹图谱数据库的建立[J]. 中国农学通报, 2007, 23(5): 55-58.
- [3] 艾成祥, 辛力, 余贤美, 等. 樱桃主栽品种遗传多样性的研究[J]. 园艺学报, 2007(4): 871-876.
- [4] Decroocq V, Hagen L S, Favé M G, et al. Microsatellite markers in the hexaploid *Prunus domestica* species and parentage lineage of three European plum cultivars using nuclear and chloroplast simple-sequence repeats[J]. Molecular Breeding, 2004, 13: 135-142.
- [5] 赵玉军, 李光晨, 王涛, 等. 苹果基因组 DNA 的快速提取[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(2): 124-126.
- [6] Yildiz A K, Selim C, Claudio C, et al. Simple Sequence Repeat (SSR) Markers Differentiate Turkish Sour Cherry Germplasm[J]. Journal of the American Pomological Society, 2006, 60(3): 136-143.
- [7] Didlewanger E, Cosson P, Tavaudet 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.

- [8] Cipriani G, Lot G, Huang W G, et al. AC/ GT and AG/ CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus* [J]. Theor Appl Genet, 1999, 99: 65-72.
- [9] Clarke J B, Tobutt K R. Development and characterization of polymorphic microsatellites from *Prunus avium* Napoleon [J]. Molecular Ecology Notes, 2003, 3: 578-580.
- [10] Vaughan S P, Russell K. Characterization of novel microsatellites and development of multiplex PCR for large-scale population studies in wild cherry, *Prunus avium*[J]. Molecular Ecology Notes, 2004(4): 429-431.
- [11] 宁允叶, 熊庆娥, 曾伟光, 等. 红阳猕猴桃全红型芽变系的 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 2003, 30(5): 511-513.
- [12] 曾柏全, 甘霖, 熊新耀, 等. 冰糖橙优良芽变的 AFLP 分析[J]. 江西农业大学学报, 2006(2): 150-154.
- [13] 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.
- [14] Adam-Blondon A F, Roux G, Claux D, et al. Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics[J]. Theor Appl Genet, 2004, 109: 1017-1027.

## Analysis Sweet Cherry Van and Sport Mutation Varieties by SSR

ZHANG Guang-he<sup>1</sup>, TANG Mei-ling<sup>1</sup>, ZHANG Wen-na<sup>2</sup>, ZHAO Ming<sup>1</sup>

(1. Academy of Yantai Agricultural Science, Yantai, Shandong 265500 China; 2. College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** Van Compact and Early Compact Van are bud mutation varieties from Van. SSR technology was used to research the DNA differences of these three varieties. The results indicated that 8 primers had ideal result except primer pchgms4. Primer pchgms3 could completely separate the three species, while primer combination PceGA25 and EM-PA017 could different the three varieties.

**Key words:** Sweet cherry; Molecular marker; SSR

## 日本的堆肥好氧发酵处理技术

· 知识窗 ·

这套设备的另一个技术关键点是: 将过去排气管道的多个小孔变成 4 个大孔, 在 4 个大孔中放入木屑, 将机器翻动堆肥改为用机械抓手翻动堆肥。这两条途径解决了管道孔的堵塞问题。处理过的堆肥松软、无味无菌, 用来垫圈, 有利于牲畜的健康卫生。因为堆肥在发酵过程中发酵温度高达 80℃ 以上(一般堆肥发酵温度还不到 60℃), 所以, 在堆肥制作过程中可以杀灭病菌、寄生虫以及杂草种子, 有利于防止作物病虫害和杂草的传播, 这样制作的堆肥可以安全地施到农田里。同时从堆肥过程中回收的氨可以作为追肥施入稻田。1 t 生粪可以回

收 1 kg 氨, 生产磷氨液肥, 经过技术开发每吨用肥成本可以从 905 日元降到 600 日元以下; 发酵热量回收为 1 t 生粪可以回收 23.8 L 煤油, 可以获得 1 450 日元利益; 二氧化碳气体用于园艺, 又可获利 500 日元左右。

此套回收设备的成本和适用农户规模: 一套回收设备的成本还不到 100 万日元, 设备自重较轻, 2 吨运输车就可以运输。规模养殖户(规模养殖户在日本一般是指牛 10 头以上、猪 100 头以上、鸡 2 000 只以上、马 10 头以上)和一般农户都可以用, 最小的设备可以解决 60 头牛的粪便, 但规模大的养殖场使用效果会

更好。

畜牧业是一个成本昂贵的行业。一方面畜牧业部门有把其他行业的废料再次转变成资源进行利用的特点, 例如畜牧业把食品加工业的下脚料作为饲料和垫圈料使用。另一方面, 中国缺乏淡水资源, 在发展畜牧业时如果水源被污染, 将来很难治理。

在畜产草地研究所的试验场, 记者在堆肥处理现场闻到的不是臭味, 而是有点像是酒糟的味道; 用手抓起一把处理过的堆肥, 手感是干燥而松软的; 在温室记者看到的供草莓生长的肥料和热量, 就是从堆肥回收的。