

苹果遗传连锁图谱构建及抗早期落叶病的基因定位

李 爽, 张军科, 党伟锋

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要:以“秦冠”×“富士” F_1 群体的 158 个株系为试材, 得到最佳 SSR-PCR 反应体系: 在 20 μL 总的反应体系中 *Taq* DNA 聚合酶 0.5 U、引物 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、 Mg^{2+} 1.8 mmol/L、模板 DNA 浓度 15 ng/ μL 、dNTPs 0.30 mmol/L。利用 SSR 分子标记, 采用 JoinMap 3.0 软件构建“秦冠”×“富士”的遗传连锁图谱。结果表明: 从 340 对 SSR 引物中筛选出 49 对具有多态性的引物, 在群体中共获得 75 个 SSR 标记, 其中 17 个不符合孟德尔遗传规律, 其余 27 个位点可定位到 10 个连锁群上。对苹果杂交 F_1 代早期落叶病进行抗性遗传分析, 最后将抗早期落叶病基因定位到了遗传连锁图谱中的第 10 个连锁群上。与已经发表的苹果遗传连锁框架图对比结果表明, 抗早期落叶病基因被定位在已发表图谱的第 8 连锁群上。

关键词:苹果; SSR; 遗传图谱; 体系优化; 基因定位

中图分类号:Q 946-33 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)24-0145-05

SSR 标记又称简单序列重复, 是目前较为常用的分子标记之一, 因为其操作比较简单、具有共显性、对 DNA 质量要求较低、稳定性强等优点被广泛应用到苹果^[1-4]、梨^[5]、桃^[7-11]等果树的性状标记上。在 SSR 标记中, 检出各成分的浓度是 PCR 是否成功的关键。但是由于国内外所用 SSR 标记检测方法不同, 国外 SSR 标记检测多采用片段荧光测序的方法来识别, 对 PCR 产物的要求很低, 而国内多采用变性 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 对产物要求很高, 直接使用国外方法导致 SSR 标记体系获得的条带难以通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

早期落叶病主要包括斑点落叶病和褐斑病 2 种, 是我国苹果产区普遍发生且较为严重的一种病害, 该病大流行时, 造成大片果树中下部叶片脱落, 严重影响苹果树的正常生长、花芽形成、果实增大和翌年苹果的产量与品质^[6]。该研究通过对 SSR-PCR 体系中各种成分的浓度筛选, 从而得到最佳的 PCR 反应体系, 并且应用 SSR 标记构建苹果的遗传连锁图谱, 并且试图将抗早期落叶病基因定位到遗传图谱中, 为抗病育种提供理论依据。

第一作者简介:李爽(1984-), 女, 吉林四平人, 在读硕士, 研究方向为果树育种及生物技术。E-mail: dingli5257@126.com。

责任作者:张军科(1969-), 男, 甘肃灵台人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 现主要从事果树育种及生物技术研究工作。E-mail: 171912577@qq.com。

基金项目:现代苹果产业技术体系洛川试验站资助项目(CARS-28)。

收稿日期:2011-10-08

1 材料与方法

1.1 试验材料

“秦冠”(母本)、“长富 2 号”(父本)及其杂交获得的 F_1 代植株 158 个。

1.2 试验方法

1.2.1 SSR 分析 苹果总 DNA 的提取: 基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法^[12]; SSR 引物合成和筛选: 利用双亲筛选法对 340 对苹果 SSR 引物, 引物名称和序列参照文献^[13-15]和 www.hidras.com 网站; 引物由上海生工公司合成。引物按照能否在父母本上产生多态性条带进行筛选, 多态性引物用于群体 SSR 标记; SSR 体系优化: 随机选择具有多态性的引物 CH03h06 用于对 SSR 反应体系优化。在 20 μL 总的反应体系中, Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L、引物 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 、模板 DNA 30 ng/ μL 、*Taq* DNA 聚合酶 1 U、dNTPs 0.3 mmol/L, 用 ddH_2O 补齐 20 μL 。当 1 种成分进行梯度试验时, 其它成分浓度不变。扩增程序为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 35 个循环, 72℃ 后延伸 8 min。PCR 扩增在 PTC-100PCR 仪上进行。梯度试验: Mg^{2+} 浓度(mmol/L)梯度分别为 1.3、1.8、2.5、4; 引物浓度($\mu\text{mol/L}$)梯度分别为 0.005、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6; 模板 DNA 浓度(ng/L)梯度分别为 10、15、30、45、60; dNTP 浓度(mmol/L)梯度分别为 0.1、0.2、0.3、0.4; *Taq* 酶用量(U)梯度 0.5、1.0、1.5、2.0; PCR 扩增产物检测: PCR 反应后, 在 PCR 体系中加入 9 μL SSCP 分析变性缓冲液, 置于 PCR 仪中 94℃ 变性 6 min, 然后放入冰水混合物中冷却。制备 10% 变性聚丙烯酰胺凝胶, 上样 6 μL 变性的 PCR 产物, 体系优化时, 电泳电压为 10~15 V/cm 电极间距离, 恒压电泳 5 h; 遗传图谱构建时, 电泳电压为 30~40 V/cm 电极间距离, 恒压电泳

3 h。电泳结束后,凝胶进行银染观察。

1.2.2 遗传图谱构建 利用优化后的 SSR-PCR 反应体系,对筛选出的具有多态性的引物进行杂交后代群体的 SSR 标记,构建苹果遗传连锁图谱。

1.2.3 数据统计及遗传作图 将 F_1 各个体的带型按照 cp 模式分别统计,利用 JoinMap 3.0 软件构建苹果遗传图谱。

1.2.4 杂交后代苹果早期落叶病田间鉴定 杂交苗的抗病性采用田间发病率调查法,在秋季 7 月份和 9 月份中旬 2 次分别调查树冠 1.2 m 以下叶片发病率,每株调查的叶片总数不少于 30 片,每株系 3 次重复,按照《农业部新农田间药效试验准则》对病害状况进行分级,标准见表 1。

表 1 苹果早期落叶病病害分级标准

Table 1 The grading standard of apple early deciduous disease

病级代表值 Grading standard(x)	病斑展叶面积比例 Proportion of scab leaf area(X)
0	$X=0$
1	$0 \leq X \leq 10$
3	$11 \leq X \leq 25$
5	$26 \leq X \leq 40$
7	$41 \leq X \leq 65$
9	$X > 65$

2 结果与分析

2.1 Mg^{2+} 浓度对 SSR 反应的影响

在 20 μ L PCR 反应体系中,加入 *Taq* DNA 聚合酶 1 U、引物 0.3 μ mol/L、dNTPs 0.3 mmol/L、模板 DNA 30 ng/ μ L 的条件下,进行了 Mg^{2+} 浓度优化。结果表明,当 Mg^{2+} 浓度为 1.3 mmol/L 时无扩增产物,在 1.8、2.0、2.5、4.0 mmol/L 时,均扩增出了条带且比较清晰,但随着 Mg^{2+} 浓度的升高非特异性扩增越来越明显(图 1)。由此可见,1.8 mmol/L Mg^{2+} 既能获得较为理想的目标条带,又有较低的非特异条带,因此该浓度为苹果 SSR-PCR 反应体系的较佳的 Mg^{2+} 浓度。

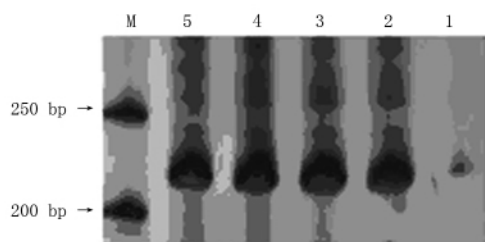


图 1 不同 Mg^{2+} 浓度的 PCR 扩增结果

注:M:分子量标准 Mrker 500;1: 1.3;2: 1.8;3: 2.0;4:2.5;5:4.0 mmol/L。

Fig.1 Results of PCR under different Mg^{2+} concentration

Note:M;molecular Marker 500;1: 1.3;2: 1.8;3: 2.0;4:2.5;5:4.0 mmol/L。

2.2 模板 DNA 浓度对 SSR 反应的影响

在 20 μ L 反应体系中,加入 *Taq* DNA 聚合酶 1 U、引物 0.3 μ mol/L、dNTPs 0.3 mmol/L、 Mg^{2+} 2.0 mmol/L 条件下,进行了模板 DNA 浓度优化。结果表明,模板 DNA 浓度在 10 ng/ μ L 时条带较弱,在 15、30、45 和 60 ng/ μ L 模板浓度下均可扩增出目的条带,随着

模板浓度的增加,在 PCR 扩增中非特异性条带越来越明显(图 2)。由此可见,15 ng/ μ L 的模板 DNA 浓度既能获得较为理想的目标条带,又有较低的非特异条带,因此该浓度为苹果 SSR-PCR 反应体系的较佳的模板 DNA 浓度。

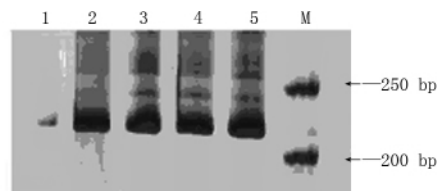


图 2 不同模板 DNA 用量的扩增结果

注:M:分子量标准 Mrker 500;1: 10;2: 15;3: 30;4:45;5:60 (ng/ μ L)。

Fig.2 Results of PCR under different concentration of DNA

Note:M;molecular Marker 500;1: 10;2: 15;3: 30;4:45;5:60 (ng/ μ L)。

2.3 不同引物浓度对 SSR 反应的影响

在 20 μ L 反应体系中,加入 *Taq* DNA 聚合酶 1 U、dNTPs 0.3 mmol/L、 Mg^{2+} 2.0 mmol/L、模板 DNA 浓度 30 ng/ μ L 条件下,进行了引物浓度的优化。结果表明,引物浓度在 0.005 μ mol/L 时无扩增条带,在 0.05~0.6 μ mol/L 均可扩增出条带,0.05 μ mol/L 条带较弱,0.1、0.2、0.4、0.5、0.6 μ mol/L 的引物均可产生比较清晰的条带,随着引物浓度的增大,引物二聚体及非特异性扩增就越来越明显(图 3)。由此可见,0.1 μ mol/L 的引物浓度能获得较为理想的目标条带,又有较低的非特异条带,因此该浓度为苹果 SSR-PCR 反应体系的较佳的引物浓度。

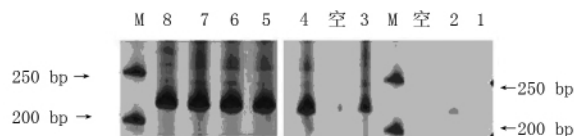


图 3 不同引物浓度的扩增结果

注:M: 分子量标准 Mrker 500;1: 0.005;2: 0.05;3: 0.1;4: 0.2;

5: 0.3;6: 0.4;7: 0.5;8: 0.6 μ mol/L。

Fig.3 Results of PCR under different concentration of primers

Note:M; molecular Marker 500;1: 0.005;2: 0.05;3: 0.1;4: 0.2;

5: 0.3;6: 0.4;7: 0.5;8: 0.6 μ mol/L。

2.4 dNTPs 浓度对 SSR 反应的影响

在 20 μ L 反应体系中,加入 *Taq* DNA 聚合酶 1 U、引物 0.3 μ mol/L、 Mg^{2+} 2.0 mmol/L、模板 DNA 浓度为 30 ng/ μ L 条件下,进行了 dNTPs 浓度的优化。结果表明,浓度在 0.1 mmol/L 时无扩增条带,0.2、0.3、0.4 mmol/L 均有较为清晰的扩增条带,尤其当浓度为 0.3 mmol/L 时条带最稳定,应为较佳的 dNTPs 浓度(图 4)。

2.5 酶用量对 SSR 反应的影响对 SSR 反应的影响

在 20 μ L 反应体系中,加入引物 0.3 μ mol/L、 Mg^{2+} 2.0 mmol/L、模板 DNA 浓度 30 ng/ μ L、dNTPs 浓度 0.3 mmol/L 条件下,进行了 *Taq* DNA 聚合酶用量的优化。结果表明,*Taq* 聚合酶浓度的大小对 PCR 扩增结果影响不大,酶用量从 0.5~2.0 个酶单位均可扩增出清晰的条带(图 5),本着节约的原则,0.5 U 是苹果 SSR 标记时 PCR 反应的最佳酶用量。

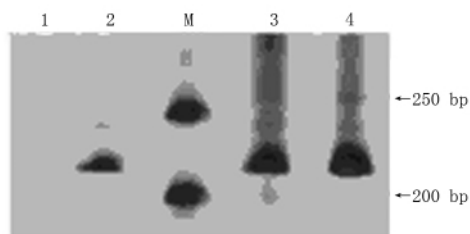


图4 不同 dNTPs 浓度的 PCR 扩增结果

注:M: 分子量标准 Mrker 500;1: 0.1;2: 0.2;3: 0.3;4: 0.4 mmol/L。

Fig. 4 Results of PCR under different concentration of dNTPs

Note:M; molecular Marker 500;1: 0.1;2: 0.2;3: 0.3;4: 0.4 mmol/L.

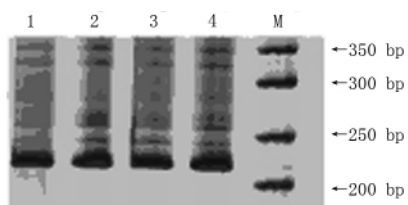


图5 不同 Taq 聚合酶浓度的 PCR 扩增结果

注:M:分子量标准 Marker 500;1: 0.5; 2: 1.0;3: 1.5; 4: 2.0(U)。

Fig. 5 Results of PCR under different Taq DNA polymerase concentration

Note:M; molecular Marker 500;1: 0.5; 2:1.0;3: 1.5;4: 2.0 (U).

2.6 苹果 SSR 标记引物筛选结果

以“秦冠”、“富士”2 个亲本为材料,对 340 对 SSR 引物进行筛选,最后得到具有多态性的引物 49 对: AT0000400、CH01A07b、CH01b09b、CH01C06、CH01D11、CH02g09、CH04C10、CH01f03b、CH01F09、CH03D07、CH03E03、CH03H06、CH04c03、CH04C10、CH04A12、CH05c02、CH02D12、CH03A04、CH03a08、CH05C07、CH05d02、CH05D11、CH05E03、CH05e04、CH05E05、CH05F06、CH05g05、CH05G07、CH05h12、Hi01b01、Hi01c09、Hi02f06、Hi03a06、Hi03c04、Hi03c05、Hi03e04、Hi03f06、Hi03g06、Hi04d02、Hi04e04、Hi04g11、Hi05b02、Hi05b09、Hi05d10、Hi05e07、Hi06b06、Hi22f06、Hi23b12、Hi24f04。

2.7 “秦冠”×“富士”杂交 F₁ 代早期落叶病的抗性遗传分析

由表 2 可知,“秦冠”×“富士”杂交 F₁ 代 158 株群体中,无 0 级后代出现,即无免疫植株,所有后代均不同程度的感染早期落叶病,可见早期落叶病抗性为数量性状的可能性较大。杂交后代按照感病系数分类,抗病和感病单株数分别为 84 和 74 株,经卡方检验,分离比例符合 1:1 的比例 $\chi^2=0.622 < \chi^2_{0.05}=3.84$,因此可初步确定早期落叶病为数量性状遗传。

表 2 “秦冠”×“富士”杂交 F₁ 代早期落叶病调查Table 2 Investigation of apple early deciduous disease in F₁ progenies

F ₁	抗病 Resistant			感病 Susceptible			总数 Total
	1 级	3 级	5 级	7 级	9 级		Total
	17	29	38	58	16		158

2.8 苹果 SSR 遗传图谱构建及抗斑点落叶病的基因定位

以“秦冠”、“富士”以及其 F₁ 代 158 株系为材料,对已筛选的 49 对引物进行 PCR,共扩增出 75 个标记,平均每对引物 1.5 个,部分引物扩增产生的多态性位点见图 6。经统计分析,其中 17 个位点不符合孟德尔遗传,其余 27 个位点可定位到 10 个连锁群上,将早期落叶病抗病性性状按照抗病和感病转换成抗病基因标记的有无,将抗早期落叶病的抗病基因定位到了遗传连锁图谱中的第 10 个连锁群上。

与已经发表的苹果遗传连锁框架图对比结果表明,抗早期落叶的抗病基因被定位在已发表图谱的第 8 连锁群上。并且应用优化的体系获得的 SSR 标记在连锁群中的定位与框架图谱中的定位基本一致,说明该研究获得方法体系可获得稳定准确的标记,并构建遗传连锁图,筛选更多标记并作图正在进行中。

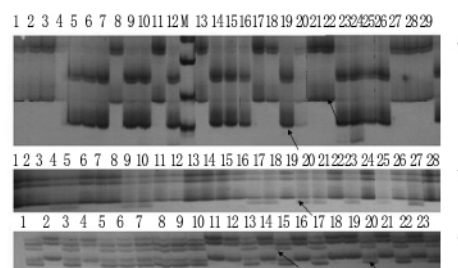


图6 部分苹果 SSR 引物在优化的 PCR 条件下获得的产物电泳图

注:a. 引物 Hi05e07;b. 引物 Hi01b09;c. 引物 CH03a08;箭头所指为多态性条带。

Fig. 6 Results of partial apple SSR primers under optimized condition

Note:a, primer pair Hi05e07;b, primer pair Hi01b09;c, primer pair CH03a08; Arrow for polymorphism strip.

3 讨论

3.1 SSR 标记在苹果育种中的应用

近年来,SSR 标记因为其具有共显性遗传、多态性高、分布于整个基因组中等优点被广泛应用。秦伟等^[4]利用 SSR 分子标记,以 21 份新疆苹果种质资源为试材,研究新疆苹果种质资源的亲缘关系;何晓薇等^[16]以 24 个苹果品种以及来自 3 个不同杂交组合的 60 个 F₁ 代结果单株为试材,对与苹果果皮颜色性状相关的 DNA 分子标记进行了研究,筛选到了 1 个与苹果果皮红色/非红色性状相关的 SSR 标记 CN444542-156,该标记在红色表型上表现为隐性,在非红色表型上表现为显性;王爱德等^[17]采用 10 对 SSR 引物对 25 个苹果品种的多态性进行了区分。

3.2 SSR 体系优化

SSR 多态性标记因同时具多态性百分率高、重复性好、稳定性好且呈共显性等特点,是一种较为理想的分子标记技术,在果树种质资源遗传多样性和基因标记分子标记等遗传育种领域已较广泛应用。筛选 SSR 引物建立稳定的反应体系是 SSR 多态性标记应用的基础。该研究得到的 SSR 优化体系:20 μL 总的反应

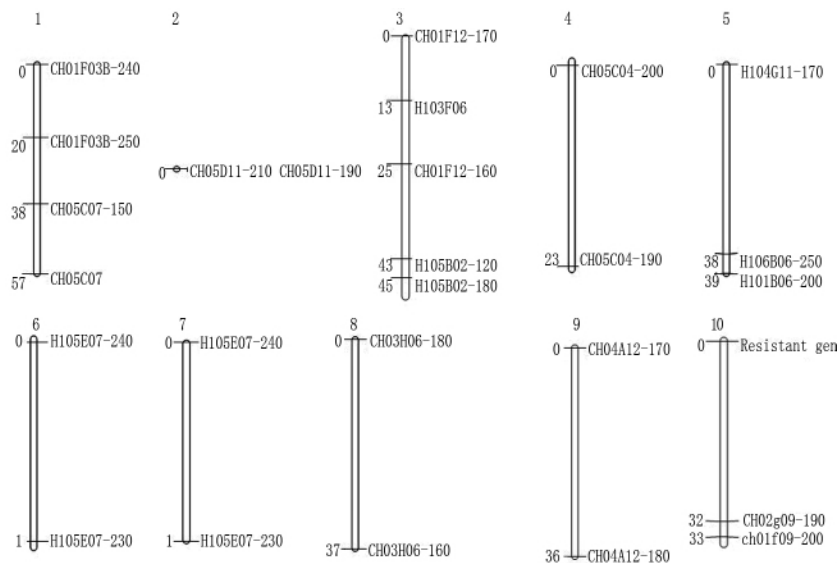


图7 苹果遗传连锁图

Fig. 7 Genetic linkage map of apple

体系 *Taq* DNA 聚合酶 0.5 U、引物 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、 Mg^{2+} 1.8 mmol/L、模板 DNA 浓度 15 ng/ μL 、dNTPs 0.30 mmol/L。与徐兴兴等^[18]对金冠苹果 SSR 反应体系优化结果相比, Mg^{2+} 浓度低, 引物浓度小, dNTPs 浓度高, 酶用量少。该研究获得的 SSR 优化体系可供苹果种质资源和遗传育种研究参考。

3.3 遗传图谱的构建

国内外苹果研究中, 利用各种分子标记已经构建了多张较为完整的苹果遗传连锁图谱^[19-23], 但是由于苹果遗传背景的不同, 各图谱会有所差别, 并且对病害以及其各种农艺性状的定位都会有所不同。“富士”和“秦冠”品种的综合性状优良, 不仅在我国现有栽培品种中占有重要地位, 同时也是十分重要的杂交育种亲本材料。

该研究用 49 对具有多态信息的 SSR 引物, 共获得 75 个 SSR 标记, 其中 17 个不符合孟德尔遗传, 27 个位点可定位到 10 个连锁群上。同时找到了 2 个与抗早期落叶病相连锁的引物, 并将抗早期落叶病基因定位到连锁图谱中的第 10 连锁群上。这为苹果抗早期落叶病分子标记辅助育种提高选择效率, 为开展抗病育种及防治提供理论依据, 为苹果抗性育种早期选择提供理论依据, 缩短育种周期。

参考文献

- [1] Patocchi A, Bigler B, Koller B. Vr2, a new apple scab resistance gene [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 1087-1092.
- [2] Silfverberg-Silworth E, Matasci C L, van Kaauwen M P. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus × domestica* Borkh.) genome [J]. *Tree Genetics and Genomes*, 2006, 2(4): 202-224.
- [3] 高源, 刘凤之, 曹玉芬, 等. 苹果属种质资源亲缘关系的 SSR 分析 [J]. *果树学报*, 2007, 24(2): 129-134.
- [4] 秦伟, 刘立强, 廖康, 等. 新疆苹果种质资源亲缘关系 SSR 分析 [J]. *新疆农业科学*, 2011, 48(1): 48-52.
- [5] 张好艳, 吴俊, 张绍铃. 基于 SSR 标记的梨资源遗传多样性分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2008, 16(6): 983-989.
- [6] 赵进春, 龚欣, 刘立军, 等. 苹果不同品种斑点落叶病发病情况调

查[J]. *中国南方果树*, 2001, 30(6): 58-59.

- [7] 吴俊, 束怀瑞, 张开春, 等. Construction and analysis of peach genetic map [J]. *园艺学报*, 2004, 31(5): 593-597.
- [8] 张桂粉, 韩明玉, 赵彩平, 等. 桃熟性性状的 SSR 标记 [J]. *西北农业学报*, 2007, 16(3): 112-115.
- [9] 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]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 99(12): 65-72.
- [10] Sosinski B, Gannavarapu M, Hager L D, et al. Characterization of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 101(3): 421-428.
- [11] Aranzana M J, Carb J, Arus P. Microsatellite variability in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]; cultivar identification, marker mutation, pedigree inferences and population structure [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 106(8): 1341-1352.
- [12] 杨英军, 李学强, 张军科. 落叶果树韧皮部提取 DNA 的方法研究 [J]. *河南农业大学学报*, 2001, 35(1): 97-98.
- [13] Liebhard R, Gianfranceschi L, Koller B, et al. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus domestica* Borkh.) [J]. *Mol Breed*, 2002(10): 217-241.
- [14] Gianfranceschi L, Soglio V. The European project HiDRAS: innovative multidisciplinary approaches to breeding high quality disease resistant apples [J]. *Acta Hort*, 2004, 663: 327-330.
- [15] Guilford P, Prakash S, Zhu J M, et al. Microsatellites in *Malus × domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 249-254.
- [16] 何晓薇, 王彩虹, 田义朝, 等. 苹果果皮颜色性状 SS 标记 [J]. *果树学报*, 2009(3): 113-116.
- [17] 王爱德, 李天忠, 许雪峰, 等. 苹果品种的 SSR 分析 [J]. *园艺学报*, 2005, 32(5): 875-877.
- [18] 徐兴兴, 梁海永, 甄志先, 等. 苹果 SSR 反应体系的建立 [J]. *果树学报*, 2006, 23(2): 161-164.
- [19] Hemmat M, Weeden N F, Manganaris A G, et al. Molecular marker linkage map for apple [J]. *Hered*, 1994, 85: 4-11.
- [20] Liebhard R, Koller B, Gianfranceschi L, et al. Creating a saturated reference map for the apple (*Malus domestica* Borkh.) genome [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 106(8): 1497-1508.
- [21] Maliepaard C, Alston F H, van Arkel G, et al. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 60-73.

番茄离体培养及快繁殖技术研究

黄 刚, 孙光英, 郑晓峰, 李竹莹

(黔东南民族职业技术学院, 贵州 凯里 556000)

摘 要:以番茄种子为试材,采用正交实验方法配制不同的培养基,研究不同浓度的 6-BA、NAA、IBA 对不定芽诱导及丛生芽增殖的影响。结果表明:愈伤组织诱导的适宜培养基为:MS+6-BA 2.0 mg/L+IBA 0.3 mg/L+蔗糖 30 g/L;不定芽诱导适宜培养基为:MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L;丛生芽增殖的适宜培养基为:MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L+蔗糖 30 g/L;生根培养基为:1/2 MS+NAA 0.6 mg/L+蔗糖 30 g/L。

关键词:番茄;组织培养;快速繁殖;正交实验

中图分类号:S 641.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)24-0149-03

番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)属茄科番茄属,具有很高的经济价值及广泛的市场前景^[1]。目前我国种植优良番茄品种大多数从国外引进,进口种子价格昂贵,自制种子难以保证原种的优良特性,而利用组织培养技术繁殖番茄既可保证原种优良特性,又可以在短期内获得大量种苗^[2]。现以番茄的种子作为外

植体,获得无菌苗,再利用无菌苗的子叶进行离体培养,研究不同激素组合对番茄子叶愈伤组织诱导及不定芽诱导的影响,并且在此基础上筛选出了进行快速繁殖的最佳培养基。

1 材料与方法

1.1 试验材料

番茄种子为市场销售种子“以色列 198”。

1.2 试验方法

该试验基本培养基为 MS,附加不同浓度的细胞分裂素和生长素。用 0.4% 琼脂粉固化,蔗糖浓度 3.0%,培养基 pH 5.8~6.0,培养温度(25±1)℃,光照强度 1 500~2 000 lx,光照时间 12 h/d。

1.2.1 无菌苗的获取 取番茄种子先用洗涤剂浸泡

第一作者简介:黄刚(1976-),男,湖南隆回人,本科,讲师,现主要从事植物组织培养教学及研究工作。E-mail: huanggang. n@163.com。

基金项目:贵州省黔东南州科技局 2007 年度州级科技三项费专项经费资助项目(20070023)。

收稿日期:2011-09-14

[22] Conner J P, Brown S K, Weeden N F. Randomly amplified polymorphic DNA ~ based genetic linkage maps of three apple cultivars [J]. J. Amer., 1997, 22: 350-359.

[23] Seglias N P, Gessler C. Genetic of apple powdery mildew resistance from *Malus zumi*(PI2) integrated control of pome fruit diseases[J]. IOBC/WPRS Bulletin, 1997, 20: 195-208.

Genetic Mapping and Localization of the Early Deciduous Disease Resistant Gene in Apple

LI Shuang, ZHANG Jun-ke, DANG Wei-feng

(College of Horticulture, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: With the material of apple cultivar ‘Qinguan’ as the maternal parent, ‘Fuji’ as male parent and their F₁ 158 progenies, an optimized PCR reaction system for SSR were obtained: in a 20 μL total volume, Taq DNA polymerase 0.5 U, primer 0.1 μmol/L, dNTPs 0.3 mmol/L, template DNA 15 ng/μL and Mg²⁺ 1.8 mmol/L. A consensus genetic map from ‘Qinguan’ × ‘Fuji’ was constructed by JoinMap 3.0 with SSR markers. The results showed that 340 SSR primer pairs, 49 were proved having polymorphism between father and mother parents, and 75 SSR markers were acquired by the polymorphic primer pairs. Among these SSR markers, 17 were distorted from the Mendelin ratio, 27 were located on the genetic linkage map composed by 10 linkage groups and early deciduous disease resistance gene location to the tenth linkage groups, compared with the already published apple genetic linkage: early deciduous disease resistant gene was positioned in published maps of the eighth linkage groups.

Key words: apple; SSR; genetic mapping; system optimization; gene localization