

基于 SSR 标记的草莓品种亲缘关系分析

韩柏明, 赵密珍, 王 静, 于红梅

(江苏省农业科学院园艺研究所, 南京 210014)

摘要: 用 18 对 SSR 引物对 96 份草莓栽培品种资源进行扩增。在 18 个 SSR 位点共获得 184 个条带, 其中多态性条带为 172 个, 多态性条带比率为 93.5%, 不同引物扩增的多态性条带数为 4~19 个, 平均为 9.56 个。各位点多态性信息含量(PIC) 值在 0.5726~0.8885 之间, 平均 0.8066。NTSYS 软件进行相似性系数计算, UPGMA 法进行聚类分析结果显示, 96 份来源不同的草莓品种被混杂地聚在一起, 草莓品种的亲缘关系与其来源并不存在明显的相关性, 中国地方品种的聚类相对集中, 中国地方品种与中国选育品种之间亲缘关系相对较远。欧美品种和日本品种的遗传基础要宽于中国选育品种和地方品种。

关键词: 草莓; 亲缘关系; SSR

Genetic Relationships of Strawberry Cultivars by SSR Analysis

HAN Bai-ming, ZHAO Mi-zhen, WANG Jing, YU Hong-mei

(Institute of Horticulture, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014)

Abstract: Eighteen SSR primer pairs were used to amplify SSR fragments for 96 strawberry cultivars. The 18 SSR primers generated a total of 184 bands among which 172 (93.5%) bands were found to be polymorphic. The number of polymorphic bands amplified per primer pair ranged from 4 to 19, with a average of 9.56. The value of locus polymorphism information content(PIC) ranged from 0.5726 to 0.8885, with a average of 0.8066. The genetic similarity revealed by NTSYS and the clustering results of UPGMA showed that these 96 strawberry cultivars from different origins could not separately clustered well. There was no significant correlation between the genetic relationships and the origins of the cultivars. The cluster of Chinese landraces was relatively concentrated, while the genetic relationships between Chinese landraces and the developed cultivars in China were relatively farther. The genetic variations of the Euramerican cultivars and Japanese cultivars were more obvious than those of the Chinese landraces and the developed cultivars in China.

Key words: Strawberry; genetic relationship; SSR

草莓属蔷薇科草本植物, 全世界约 20 个种, 由一系列二倍体、四倍体、六倍体和八倍体种构成, 但仅八倍体的凤梨草莓被作为栽培种, 其起源于美洲种弗州草莓和智利草莓的自然杂交。我国虽然分布着丰富的野生草莓资源, 但栽培种凤梨草莓却是从国外引入的。目前我国的草莓品种资源包括 20 世纪 50 年代以前由国外引入的品种、20 世纪 50 年代以后我国选育的品种以及从欧美、日本、前苏联、东

欧国家引入的品种; 其中 20 世纪 50 年代以前由国外引入的品种由于管理不善, 失去原有的品种名, 各地引种后习惯以果形、地名等加以命名, 形成了我国的地方品种^[1]。由于我国的草莓品种资源来源复杂, 加之不同地区的频繁引种, 容易造成品种名称的混乱, 导致同物异名或同名异物现象。SSR 分子标记具有试验操作简单、多态性较高、共显性、重复性好等特点, 并且 SSR 引物在相同的种属间具有较好

收稿日期: 2012-06-15 修回日期: 2012-07-26 网络出版日期: 2013-02-04

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130204.1643.004.html>

基金项目: 江苏省农业科学院博士后基金资助项目(6511006); 江苏省自主创新项目(CX(11)1010)

作者简介: 韩柏明, 博士, 助理研究员, 主要从事草莓资源的科研工作。E-mail: baiming-han@163.com

通信作者: 赵密珍, 研究员。E-mail: zhaomz@jaas.ac.cn

的通用性^[2],因此 SSR 标记在植物的遗传资源研究中得到广泛的应用^[3-5]。随着国内外越来越多草莓属植物的 SSR 引物被陆续开发出来^[6-10],SSR 技术已经被广泛用于草莓属植物的遗传图谱构建、品种鉴定、遗传多样性分析等研究中^[11-17]。本试验应用 SSR 标记技术分析我国草莓品种资源的亲缘关系,为草莓资源的保存和利用提供一些有益的参考。

表 1 试验材料

Table 1 The materials in the experiment

序号 No.	品种 Cultivars	类型 Type	序号 No.	品种 Cultivars	类型 Type	序号 No.	品种 Cultivars	类型 Type
1	平顶山草莓	中国地方品种 CL	33	石莓 1 号	中国选育品种 DCC	65	阿特莱斯	欧美品种 EC
2	抚顺大鸡冠	中国地方品种 CL	34	春星	中国选育品种 DCC	66	红宝石	欧美品种 EC
3	扇子面	中国地方品种 CL	35	森加森加拉	欧美品种 EC	67	图德拉	欧美品种 EC
4	石头河子	中国地方品种 CL	36	赛娃	欧美品种 EC	68	弗吉尼亚	欧美品种 EC
5	抚松	中国地方品种 CL	37	硕丰	中国选育品种 DCC	69	特里布特	欧美品种 EC
6	马钢	中国地方品种 CL	38	达赛莱克特	欧美品种 EC	70	哈尼	欧美品种 EC
7	昌黎红鸡心	中国地方品种 CL	39	益香	中国选育品种 DCC	71	高斯克	欧美品种 EC
8	三路局	中国地方品种 CL	40	硕露	中国选育品种 DCC	72	莱森	欧美品种 EC
9	中国四季	中国地方品种 CL	41	长虹 1 号	中国选育品种 DCC	73	盛冈 16	日本品种 JC
10	安阳草莓	中国地方品种 CL	42	美珠	中国选育品种 DCC	74	爱莓	日本品种 JC
11	沈阳四季	中国地方品种 CL	43	明晶	中国选育品种 DCC	75	久留米	日本品种 JC
12	丹东小果	中国地方品种 CL	44	明旭	中国选育品种 DCC	76	佐贺清香	日本品种 JC
13	鲁迅公园	中国地方品种 CL	45	石莓 2 号	中国选育品种 DCC	77	宫本 7 号	日本品种 JC
14	通化四季	中国地方品种 CL	46	雪蜜	中国选育品种 DCC	78	久能早生	日本品种 JC
15	昌黎大果	中国地方品种 CL	47	里瓦	欧美品种 EC	79	幸香	日本品种 JC
16	绥棱 7 号	中国地方品种 CL	48	罗伯逊	欧美品种 EC	80	甜查理	欧美品种 EC
17	绥棱	中国地方品种 CL	49	森加利特桑	欧美品种 EC	81	章姬	日本品种 JC
18	昌黎四季	中国地方品种 CL	50	姆托	欧美品种 EC	82	奈良	日本品种 JC
19	安阳草莓	中国地方品种 CL	51	黎明	欧美品种 EC	83	骏河	日本品种 JC
20	保定鸡心	中国地方品种 CL	52	全明星	欧美品种 EC	84	红珍珠	日本品种 JC
21	长白	中国地方品种 CL	53	米得维	欧美品种 EC	85	八千代	日本品种 JC
22	福建四季	中国地方品种 CL	54	梯旦	欧美品种 EC	86	红福	日本品种 JC
23	大连四季	中国地方品种 CL	55	希尔伯特	欧美品种 EC	87	千代田	日本品种 JC
24	四季	中国地方品种 CL	56	卡农家	欧美品种 EC	88	春香	日本品种 JC
25	硕香	中国选育品种 DCC	57	早光	欧美品种 EC	89	奈良 8 号	日本品种 JC
26	石莓 5 号	中国选育品种 DCC	58	维斯托尔	欧美品种 EC	90	明宝	日本品种 JC
27	硕蜜	中国选育品种 DCC	59	甜心	欧美品种 EC	91	女峰	日本品种 JC
28	石莓 4 号	中国选育品种 DCC	60	帝国	欧美品种 EC	92	静宝	日本品种 JC
29	春旭	中国选育品种 DCC	61	剑桥之娇	欧美品种 EC	93	丰香	日本品种 JC
30	戈雷拉	欧美品种 EC	62	卡尔特	欧美品种 EC	94	北辉	日本品种 JC
31	栃乙女	日本品种 JC	63	石桌	欧美品种 EC	95	奈良 2 号	日本品种 JC
32	艾拉维拉	欧美品种 EC	64	红岗利特德	欧美品种 EC	96	丽红	日本品种 JC

CL: Chinese landraces, DCC: Developed cultivars in China, EC: Euramerican cultivars, JC: Japanese cultivars

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料取自江苏省农业科学院国家果树种质南京草莓圃,共 96 个草莓栽培品种(表 1),根据不同来源分为 4 种类型:中国地方品种、中国选育品种、欧美品种和日本品种。

1.2 方法

2011 年春季取未展开的草莓幼嫩叶片,液氮研磨成粉末状后,采用天根 DNA 提取试剂盒提取总 DNA,用于 SSR 分析。

PCR 反应所用 *Taq* 酶和反应缓冲液(包含 Mg^{2+} 离子,dNTP)来自广东东胜生物工程公司,引物由 In-vitrogen(上海)公司合成。引物来源和序列详见表 2。

表 2 SSR 引物及扩增结果

Table 2 SSR primers and the statistic of amplification result

引物 Primer	参考文献 Reference	引物序列(5'-3') Sequence of primer(5'-3')	扩增条带数 Total bands	多态性条带数 Polymorphic bands	多态性位点百分率 (%)Rate of polymorphic bands	PIC Polymorphism information content
UFFa19B10	N. V. Bassil et al ^[7]	F:ATTTCTGTTGTCTCCCTCCTTC R:GCTCGATCTCTAGCTTTCTCTCT	17	17	100	0.8885
UFFa01E03	N. V. Bassil et al ^[7]	F:ACCCATCTTCTCAAATCTCA R:GACAAGCCAGAGCTAGAGAAG	8	6	75.00	0.8401
UFFa14F08	N. V. Bassil et al ^[7]	F:GTTTCTCTCAGGGCCAAAAT R:CTTGAGTAGTCTCTCACCATTG	9	7	77.78	0.7812
UFFa04G04	N. V. Bassil et al ^[7]	F:ACGAGCCCTTGTCTTTTGTA R:GCTCCAGCTTTATTGTCTTGCT	8	7	87.50	0.8643
UFFa20G06	N. V. Bassil et al ^[7]	F:ACTCAACCACCACATTTACAC R:GAGAAGTTGTCAATAGTCCAGGTG	13	13	100	0.8850
UFFa10H04	N. V. Bassil et al ^[7]	F:AGATCATCAGGACAGCTACGACT R:CCTTCACAAGATAGTAACCACAGC	8	7	87.50	0.8224
UFFa16H07	N. V. Bassil et al ^[7]	F:CTTACCACCATTCAAAACCTC R:CACTGGAGACATCTAGCTCAAAC	10	9	90.00	0.8203
UFFa20H10	N. V. Bassil et al ^[7]	F:GATGTGCTAGGACTCATACTTGG R:TAAAAGACGAGCCATCTGA	7	6	85.71	0.6889
PBCESSRA9	A. Keniry et al ^[10]	F:TGACAAACATTCAACCACAC R:GTGCCCTCAGAAGACTACC	8	7	87.50	0.7090
PBCESSRA10	A. Keniry et al ^[10]	F:GGAGCAAGGAAGCAAGGT R:CCGTGGGAGAAGTTGAAG	6	5	83.33	0.5726
EMFn170	C. L. Govan et al ^[11]	F:CAGTTTGCCCAACAACAAGG R:TTGATGGCAACAAATCACC	11	11	100	0.8734
Fa1A-6	K. Shimomura et al ^[12]	F:CCACCCTCCAATATAACCC R:AGGAGAACCAAGATTAAGCC	20	19	95.00	0.8718
Fa2A-6	K. Shimomura et al ^[12]	F:GGAGTTTGAACCAAGCC R:CACTGTCCAGTTCCCTTCC	15	15	100	0.8492
FAC001	K. S. Lewers et al ^[13]	F:AAATCCTGTTCTGCCAGTG R:TGGTGACGTATTGGGTGATG	8	8	100	0.8172
FAC009	K. S. Lewers et al ^[13]	F:CATCGACTGCAAGTGTGGAC R:TGGCTACCAAGAACACGAA	5	4	80.00	0.7483
EMFxa380097	D. J. Sargent et al ^[16]	F:GTTTTGCTTGAGGTTGTAAGG R:GCTGCTGCTCTTGTAAATGTG	13	13	100	0.8686
SF-5-G02	W. Njuguna et al ^[17]	F:CTTTGCTGCTAGCTCTTTGTG R:TACGTACTCCACATCCCATTG	10	10	100	0.8069
SF-1-B07	W. Njuguna et al ^[17]	F:GGAGAGACAGACCTCAAAGGTG R:GAGGGTTCTGTTTTGACAAG	8	8	100	0.8116
平均 Mean			10.22	9.56	91.63	0.8066
合计 Total			184	172		

扩增反应在 Biometra Gradient PCR 仪上进行,PCR 反应体系为 20 μ L,含 1 \times PCR 缓冲液,2 mmol/LdNTPs,0.4 mmol/L 引物,40 ng DNA,0.8 U *Taq* DNA 聚合酶。反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,50 ~ 60 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,32 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。产物经 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳结束后银染检测,干燥后扫描记录结果。

1.3 数据处理

对扩增图谱进行数据统计,每对 SSR 引物检测 1 个位点,根据条带的有无统计所有二元数据,有带计为 1,无带计为 0,获得矩阵,将矩阵用 NTSYS-PC 软件进行数据分析,遗传相似性数据采用 Dice 系数,选用 UPGMA 法进行聚类分析,并根据遗传相似性数据计算遗传距离。

2 结果与分析

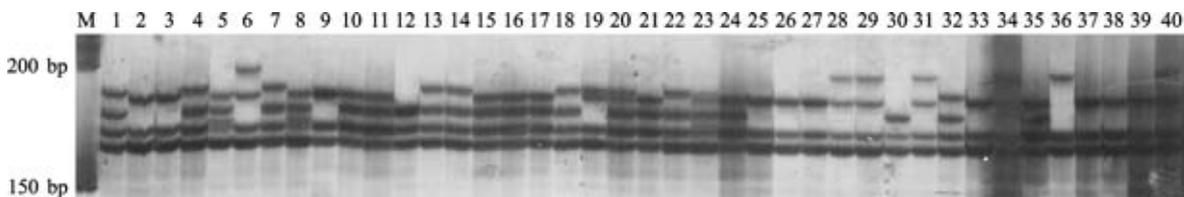
2.1 SSR 标记多态性分析

从 60 对草莓 SSR 引物中筛选出 18 对条带清

晰、多态性高的引物,利用这 18 对 SSR 引物对 96 份草莓品种资源进行扩增,共获得 184 个条带,其中多态性条带为 172 个,不同引物扩增的多态性条带为 4~19 个,平均为 9.56 个。各引物的多态性条带百分率在 75%~100% 之间,平均为 91.63%,说明所选引物具有较高的多态性。各位点 PIC 值在 0.5726~0.8885 之间,平均为 0.8066(表 2)。图 1 为引物 UFFa14F08 在部分品种(序号为 1~40)中的扩增图谱。

2.2 聚类分析

根据草莓品种来源,把 96 份草莓品种资源分为



M:50 bp marker;1~40:表 1 中编号 1~40 的试验材料

M:50 bp marker,1-40:The materials coded 1-40 in Table 1

图 1 引物 UFFa14F08 在部分品种中的扩增图谱

Fig. 1 PCR result of some accessions amplified by primer UFFa14F08

4 类:中国地方品种、中国选育品种、欧美品种和日本品种。根据 96 个样品在 18 个 SSR 位点检测的条带数据,计算样品间的(Dice)遗传相似系数,并进行聚类分析(图 2)。聚类结果表明一些系谱关系很近的品种被很好的聚在一起,如硕香、硕蜜和硕丰,春香和丰香,石莓 1 号和石莓 4 号,春星和全明星,戈雷拉和艾拉维拉,幸香和佐贺清香等。此外,不同来源的草莓品种的聚类是混杂的,并不是按照不同的来源聚为明显的 4 类。在遗传相似系数 0.72 处可将所有的草莓资源分为 2 类,在第 I 类中包括 38 份草莓资源,其中以中国的地方品种居多(20 份),另外还包括 13 份欧美品种和 5 份日本品种。在遗传相似系数 0.74 处可将第 I 类分为 A、B、C 3 个亚类, A 亚类有 16 份资源,以中国地方品种为主,夹杂有 4 份欧美品种;在 B 亚类中的 21 份资源中,8 份中国地方品种较为紧密的聚在一起,绥棱和绥棱 7 号没有被分开,可能是一个品种;C 亚类为 1 份欧美品种里瓦。在第 I 类中,中国地方品种被集中地聚成 2 大类,分别处在 A、B 2 个亚类内。在第 II 类中,包括 16 份中国选育品种、4 份中国地方品种、19 份欧美品种和 19 份日本品种。中国地方品种比较集中地聚在一起;中国选育的品种、欧美品种和日本品种处在更加分散的状态。中国的地方品种和中国选育的品种表现出较远的亲缘关系。在中国地方

品种中,以某些特性或产地、果型等命名的某一类品种,在聚类图中并不是紧密的聚在一起,而是比较分散。

2.3 不同类型草莓品种的遗传基础

对 24 个中国地方品种、16 个中国选育品种、32 个欧美品种和 24 个日本品种的遗传距离分析表明(表 3),中国地方品种和中国选育品种的遗传变异幅度分别为 0~0.3842 和 0.0905~0.3920,而平均遗传距离分别为 0.2235 和 0.2407;欧美品种和日本品种的遗传变异幅度分别为 0~0.4413 和 0.0613~0.4329。而平均遗传距离分别为 0.3194 和 0.2714。欧美和日本品种的遗传变异幅度和平均遗传距离均高于中国地方品种和中国选育品种,因此相对于中国地方品种和中国选育品种来说,欧美品种和日本品种具有更大的遗传多样性,具有更宽的遗传基础。这反映出欧美和日本草莓育种工作基础较好,育种的时间长,选育出较多不同遗传类型的草莓品种。

3 讨论

本研究从 60 对草莓 SSR 引物中筛选出 18 对条带清晰、多态性高的引物用于 96 份草莓品种资源亲缘关系的分析。通过 SSR 聚类分析,96 份草莓品种资源的遗传相似系数在 0.62~1.00 之间,绝大多

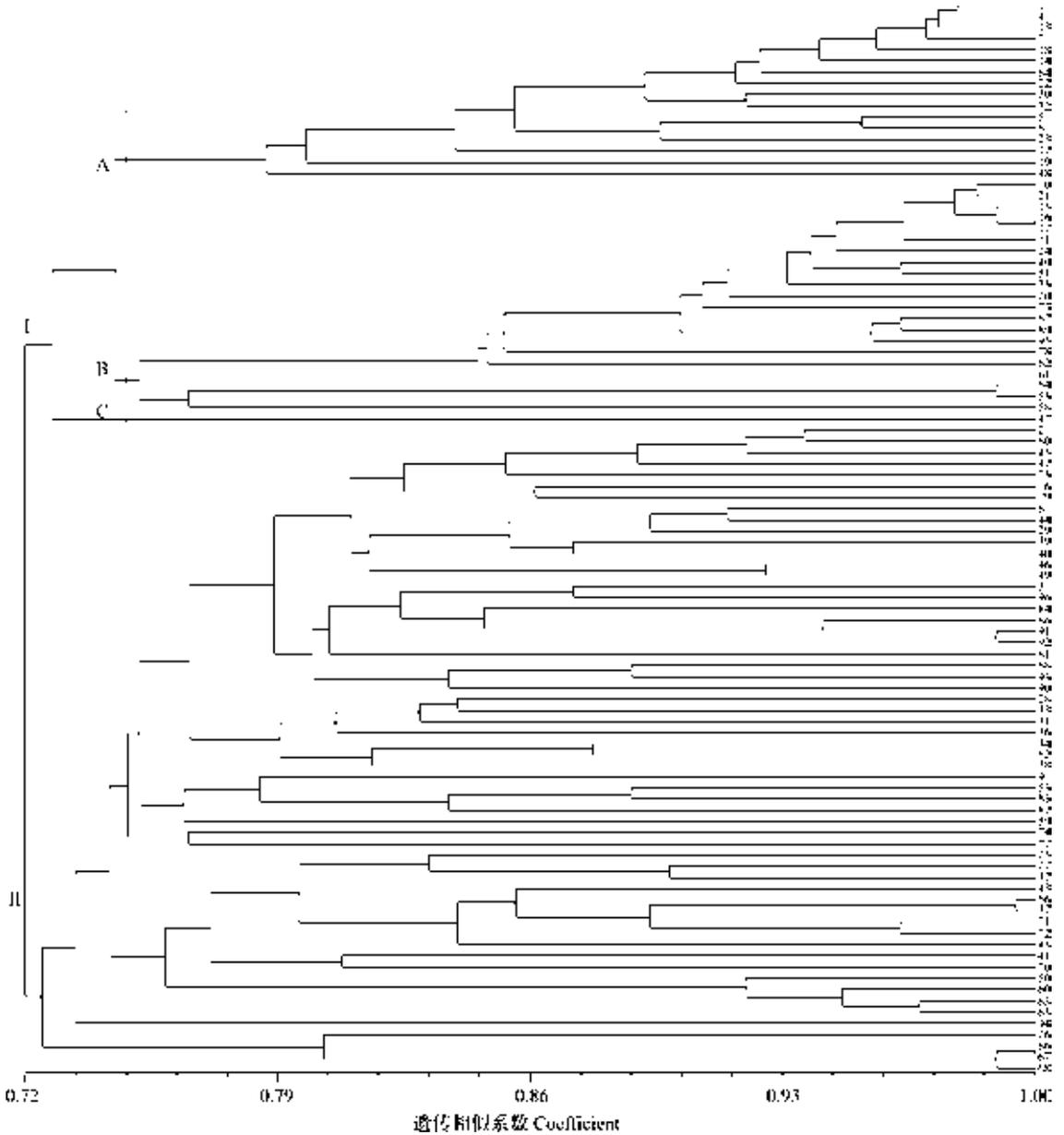


图2 基于 SSR 标记的 96 份草莓品种聚类图

Fig. 2 Dendrogram of strawberry cultivars based on SSR marker

表3 不同类型草莓品种的遗传距离

Table 3 Genetic distances between different type of strawberry cultivars

品种类型 Type of cultivars	品种数 No. of accessions	最小遗传距离 Minimum genetic distances	最大遗传距离 Maximum genetic distances	平均遗传距离 Average genetic distances
中国地方品种 Chinese landraces	24	0	0.3842	0.2235
中国选育品种 Developed cultivars in china	16	0.0905	0.3920	0.2407
欧美品种 Euramerican cultivars	32	0	0.4413	0.3194
日本品种 Japanese cultivars	24	0.0613	0.4329	0.2714

数品种资源之间的遗传相似系数在 0.70 以上,说明不同来源的草莓品种资源的亲缘关系很近,表明草莓品种资源的遗传基础比较狭窄,这与 T. M. Sjulín 等^[18]对 134 个北美草莓品种遗传多样性的研究结果相似。现代草莓栽培品种资源遗传基础狭窄的原因可能是由于一方面现代栽培种凤梨草莓起源于法国,起源地比较集中,导致凤梨草莓自身遗传基础的狭窄;另一方面在凤梨草莓中仅少量性状优良的品种参与了现代草莓栽培品种的起源。

从聚类分析结果看,来源不同的草莓品种资源的聚类是混杂的,并不能分出明显的品种群,这与张运涛等^[19]应用 AFLP 技术对草莓品种亲缘关系的研究结果类似。来源不同的品种在聚类图上表现出整体分散,部分集中,这可能与所有现代草莓栽培品种的起源地相同,其遗传基础相对狭窄有关。现代欧美品种的形成是欧洲品种和美洲品种彼此相互引种和相互杂交形成的,彼此之间有很近的亲缘关系;中国选育的品种和地方品种以及日本品种都直接的或间接的来源于欧美品种。因此拓宽现代草莓栽培品种的遗传基础是今后草莓育种的重要课题。在聚类图中我国地方品种相对独立,与其他来源的品种资源尤其是我国选育的品种之间表现出较远的亲缘关系,这可能是因为我国的地方品种引进时间较长,在长期的栽培过程中积累了一些适应性的无性系变异。今后应利用我国的一些地方品种作为亲本与欧美品种、日本品种以及我国选育的新品种之间进行杂交,可能会获得一些好的品系。

建国以来,我国草莓育种工作虽然选育出了一批新品种,但对不同来源草莓品种遗传距离的分析表明,中国选育品种和地方品种的遗传基础相对来说仍然比较狭窄。今后应加强育种工作,选育出适应更多生态类型和具有更多特性的草莓品种。

参考文献

- [1] 邓明琴,雷家军. 中国果树志:草莓卷[M]. 北京:中国林业出版社,2005:104,116,129
- [2] Thomas M R, Scott N S. Microsatellite repeat in grapevine reveal

- DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STS) [J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 88: 973-980
- [3] 陆苏瑀,俞明亮,马瑞娟,等. 硬肉桃品种群 SSR 标记的遗传多样性分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2010, 11(3): 374-379
- [4] 张羽,李新生,冯志峰,等. 陕西省有色稻资源的 SSR 多态性分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2011, 12(5): 828-832
- [5] 刘龙洲,翟文强,陈亚丽,等. 设施用厚皮甜瓜品种 SSR 标记遗传多样性分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2012, 13(3): 381-385
- [6] 董清华,王西成,赵密珍,等. 草莓 EST-SSR 标记开发及在品种遗传多样性分析中的应用[J]. *中国农业科学*, 2011, 44(17): 3603-3612
- [7] Bassil N V, Gunn M, Folta A K, et al. Microsatellite markers for *Fragaria* from 'Strawberry Festival' expressed sequence tags [J]. *Mol Ecol Notes*, 2006, 6: 473-476
- [8] Bassil N V, Njuguna W, Slovin J P. EST-SSR markers from *Fragaria vesca* L. cv. Yellow Wonder [J]. *Mol Ecol Notes*, 2006, 6: 806-809
- [9] 王静,赵密珍,于红梅,等. 草莓 EST-SSR 标记的开发与应用[J]. *果树学报*, 2011, 28(4): 721-726
- [10] Keniry A, Hopkins C J, Jewell E, et al. Identification and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers from *Fragaria* × *ananassa* expressed sequences [J]. *Mol Ecol Notes*, 2006, 6: 319-322
- [11] Govan C L, Simpson D W, Johnson A W, et al. A reliable multiplexed microsatellite set for genotyping *Fragaria* and its use in a survey of 60 *F.* × *ananassa* cultivars [J]. *Mol Breeding*, 2008, 22: 649-661
- [12] Shimomura K, Hirashima K. Development and characterization of simple sequence repeats (SSR) as markers to identify strawberry cultivars (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) [J]. *J Jpn Soci Hort Sci*, 2006, 75(5): 399-402
- [13] Lewers K S, Styan S M N, Hokanson S C. Strawberry genbank-derived and genomic simple sequence repeats (SSR) markers and their utility with strawberry, blackberry, and red and black raspberry [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 2005, 130(1): 102-115
- [14] Sargent D J, Clarke J, Simpson D W, et al. An enhanced microsatellite map of diploid *Fragaria* [J]. *Theor Appl Genet*, 2006, 112: 1349-1359
- [15] Sargent D J, Davis T M, Tobutt K R, et al. A genetic linkage map of microsatellite, gene-specific and morphological markers in diploid *Fragaria* [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 1385-1391
- [16] Sargent D J, Cipriani G, Vilanova S, et al. The development of a bin mapping population and the selective mapping of 103 markers in the diploid *Fragaria* reference map [J]. *Genome*, 2008, 51: 120-127
- [17] Njuguna W. Development and use of molecular tools in *Fragaria* [D]. Eugene: Oregon state university, 2010
- [18] Sjulín T M, Dale A. Genetic diversity of north American strawberry cultivars [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1987, 114: 823-827
- [19] 张运涛,冯志广,李天忠,等. 草莓品种亲缘关系的 AFLP 分子标记分析[J]. *园艺学报*, 2006, 33(6): 1199-1202