

TP-M13-SSR 技术及其在苹果种质资源遗传多样性研究中的应用

高源, 王昆, 田路明, 曹玉芬, 刘凤之

(中国农业科学院果树研究所/农业部果树种质资源利用重点开放实验室, 辽宁兴城 125100)

摘要: 利用在 SSR 扩增产物检测过程中的一种基于荧光测序技术的高通量低成本分析技术体系 TP-M13-SSR, 对苹果种质资源的 25 份地方品种进行了遗传多样性研究, 得到其遗传多样性、多态性信息含量和位点杂合度的变化范围分别为 0.5032 ~ 0.8448, 0.3952 ~ 0.8268 和 0.4400 ~ 0.9600。UPGMA 法聚类分析将 25 个苹果品种分为 2 大类, 与地理起源和亲缘关系相关。这种方法具有经济、灵敏、高效等优点, 在苹果遗传多样性研究中得到成功应用。本文讨论了 TP-M13-SSR 技术的优缺点, 以及在果树种质资源遗传多样性研究中的应用潜力。

关键词: 苹果; TP-M13-SSR; 遗传多样性

TP-M13-SSR Technique and Its Applications in Analysis of Genetic Diversity for Apple Germplasm Resources

GAO Yuan, WANG Kun, TIAN Lu-ming, CAO Yu-fen, LIU Feng-zhi

(Key Laboratory of the Use of Fruit Germplasm Resources, Ministry of Agriculture/ Research Institute of Pomology, Chinese Academy Agricultural Sciences, Xingcheng 125100)

Abstract: An economical detection method of simple sequence repeat with tailed primer M13 (TP-M13-SSR) was used in genetic diversity analysis of 25 regional apple cultivars. The ranges of gene diversity, *PIC* and locus heterozygosity on 5 SSR loci were 0.5032 - 0.8448, 0.3952 - 0.8268 and 0.4400 - 0.9600, respectively. UPGMA cluster analysis showed that the apple species were classified into two groups, correlatively with geographic origin and relationship. The method has advantages of high-throughput, sensitiveness, cost-effectiveness and high accuracy. It had been used in genetic diversity analysis of apple successfully. In addition, the merits and demerits of the TP-M13-SSR technique as well as the potential of application in genetic diversity about fruit tree were assessed.

Key words: Apple; TP-M13-SSR; Genetic diversity

通常所说的遗传多样性是指种内不同种群之间或一个种群内不同个体的遗传变异^[1]。遗传多样性分析是种质资源研究的重要内容之一, 它作为生物多样性的重要组成部分, 是生态系统多样性和物种多样性的基础, 任何物种都具有其独特的基因库和遗传组织形式, 物种的多样性也就显示了基因多样性^[2]。因此, 遗传多样性分析是了解种质资源

遗传基础的重要途径, 同时还可以为种质资源在育种研究和实践的应用提供参考和指导。

TP-M13-SSR (simple sequence repeat with tailed primer M13) 是在 SSR 技术和常规荧光 SSR 技术的基础上发展起来的分子标记检测技术。自 Litt 等^[3]首次将 SSR 技术 (simple sequence repeat, 又称 microsatellite) 用于进行人类遗传学研究以来, SSR 技术

收稿日期: 2010-03-18 修回日期: 2010-11-14

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资助项目 (2060302-6-1)

作者简介: 高源, 助理研究员, 主要从事苹果种质资源的研究。E-mail: anglebaby2004@163.com

通讯作者: 刘凤之, 研究员。E-mail: apgr@vip.163.com

因多态性高、分布广、重复性好、共显性以及成本较低等优点而被广泛应用。但在大规模、多批次的数据收集和分析时仍存在相当大的难度,如不同等位变异的准确识别及不同批次反应数据的统一。荧光测序技术^[4]在 SSR-PCR 扩增产物检测上的应用,实现了数据收集和处理的自动化,克服了银染法的不足。但其一个重要限制因素即是成本过高,一旦试验需要增加另外的 SSR 位点时,必须重新合成新增位点的荧光引物。Oetting 等^[5]首次将一段 19bp 的核苷酸序列(称为 tailed primer,即尾巴引物)引入到短串联重复(short tandem repeat, STR)标记体系中,并与荧光分析技术和多重 PCR 技术相结合。Schuelke^[6]又用 M13 序列作为尾巴引物和通用引物对该技术体系进行了完善,最终实现了 SSR 技术与荧光自动测序技术的完美整合,形成了一套低成本的基于荧光测序技术的 SSR 扩增产物检测体系,即 TP-M13-SSR 技术。它需要一个具有普适性的用荧光标记的 M13 引物,并把 M13 的正向引物和一个 SSR 反向引物相连(称为 TP-M13 引物),利用 3 条引物序列进行 PCR 扩增,其 PCR 产物在 DNA 测序仪上进行自动荧光检测,在很大程度上解决了分析通量较低、扩增产物检测流程繁琐、数据记录的工作量过大等一系列问题^[7]。此方法已被应用到玉米、高粱等作物的遗传多样性、基因型鉴定等研究中^[7-8]。

1 材料与方法

1.1 材料

25 份地方苹果品种(*Malus domestica* Borkh.)均取自中国农业科学院果树研究所国家果树种质兴城苹果资源圃(表 1)。

表 1 25 份供试苹果材料

Table 1 25 Apple cultivars for TP-M13-SSR analysis

编号 Code	材料名称 Material name	编号 Code	材料名称 Material name
1	东北黄海棠	14	晚白海棠
2	牛妈妈海棠	15	热碾子
3	绵苹果	16	平顶海棠
4	热碾子实生	17	早白海棠
5	大古城八棱海棠实生	18	三块石海棠 1
6	滦庄沙果实生	19	三块石海棠 2
7	三块石海棠 1 实生	20	大古城八棱海棠
8	河北平顶海棠实生	21	小矾山八棱
9	小矾山八棱海棠实生	22	小矾山八棱 1
10	晚白海棠实生	23	红海棠
11	烟台草原海棠	24	俄罗斯苹果
12	玲铛果	25	短枝碾子
13	河北八棱		

1.2 试验方法及数据处理

1.2.1 基因组 DNA 的提取 利用德国 QIAGEN 的 DNeasy Plant mini Kit 提取供试材料的基因组 DNA。

1.2.2 引物合成 在 TP-M13 自动荧光检测系统中,用 3 条引物进行 PCR 扩增。第 1 条引物是把普通的 SSR 反向引物和 M13 的正向引物相连合成带有 M13 尾巴的引物,即 TP-M13 引物;第 2 条为正常的 SSR 正向引物;第 3 条是 5' 端带有荧光标记的 M13 正向引物。本试验选用的 30 对普通的 SSR 引物均来源于 Yamamoto 等^[9]、Gianfranceschi 等^[10]以及 Liebhard 等^[11]报道的序列,TP-M13-SSR 引物由上海 Sangon 公司合成,5' 端带有荧光标记的 M13 正向引物(其名称及序列见表 2)则由美国 ABI 公司合成。

表 2 5' 端带有荧光标记的 M13 正向引物及序列

Table 2 The M13 forward primer fluorescent-labelled at 5' end

引物名称 Primer name	标记荧光 Fluorescent labelled	引物序列(5' - 3') Primer sequence
M13-B	6FAM™	5'6FAM™-CAC GAC GTT GTA AAA CGA C-3'
M13-G	VIC™	5'VIC™-CAC GAC GTT GTA AAA CGA C-3'
M13-Y	NED™	5'NED™-CAC GAC GTT GTA AAA CGA C-3'

1.2.3 试验程序 TP-M13-SSR 引物的 2 条引物序列之间具有 19bp 的差别,因此这种不对等性使得在应用 TP-M13-SSR 检测技术时,必须严格控制 PCR 反应的退火温度,最好是为每一对带 M13 尾巴的引物确定出最适的退火温度。在实际运行过程中,各引物的确切退火温度可以通过梯度 PCR 方法来确定。为得到最佳的 TP-M13-SSR 扩增效果,PCR 反应分 2 步进行:第 1 步为 TP-M13-SSR 引物的扩增获得 PCR 产物,第 2 步为 5' 端带有荧光标记的 M13 正向引物的扩增,实现 SSR 扩增产物的荧光标记。所采用的 PCR 反应体系也必须经过优化,带尾巴序列的引物即 F 链的用量应该小于或等于不带尾巴序列的引物即 R 链的 1/4,带荧光基团的通用引物(M13)在量上必须与不带尾巴序列的引物保持相等。在筛选引物时,一般都是先用 PAGE 检测尾巴引物的扩增效果,然后选取扩增效果理想的扩增产物进行荧光检测。

其方法参照 Schuelke^[6]提供的巢式 PCR,经优

化后,具体如下。

(1)第1次扩增。PCR反应体系:模板DNA(20ng/ μ l)2 μ l,F-primer(2 μ mol/L)0.12 μ l,R-primer(2 μ mol/L)1.2 μ l,10 \times PCR buffer(不含Mg²⁺)1 μ l,Mg²⁺(25mmol/L)0.8 μ l,dNTP(25mmol/L)0.1 μ l,Taq酶(5U/ μ l)0.12 μ l,ddH₂O 4.66 μ l,反应总体积10 μ l。PCR反应程序:94 $^{\circ}$ C 5min、94 $^{\circ}$ C 45s、48~60 $^{\circ}$ C退火、重复步骤2到步骤3(35个循环)、72 $^{\circ}$ C 10min,4 $^{\circ}$ C保存待用。

(2)第2次扩增。PCR反应体系:以第1次PCR产物为模板,在其中加入5'端带有荧光标记的M13正向引物(2 μ mol/L)1.8 μ l,10 \times PCR buffer(不含Mg²⁺)0.1 μ l,Taq酶(5U/ μ l)0.08 μ l,ddH₂O 0.12 μ l。PCR反应程序:94 $^{\circ}$ C 5min、94 $^{\circ}$ C 30s、53 $^{\circ}$ C 30s、72 $^{\circ}$ C 30s、重复步骤2到步骤4(16个循环)、72 $^{\circ}$ C 10min,4 $^{\circ}$ C保存待用。

1.2.4 扩增产物的纯化 毛细管电泳对DNA的纯度要求非常严格,必须对扩增产物进行纯化,尽量去净残留的盐分、蛋白质,残留的去污剂(SDS等)及残留的RNA。

具体步骤如下:(1)选择不同颜色的荧光标记引物,根据扩增产物分子量大小的不同,混合纯化。取2 μ l PCR产物,加入3倍的无水乙醇,轻轻震荡混匀2~3min,3000r/min离心30min;(2)轻轻倒出液

体,倒置离心管片刻后,700r/min离心30~60s,以甩干液体;(3)加入60 μ l 70%乙醇,轻轻震荡混匀2~3min,3000r/min离心10min;(4)轻轻倒出液体,倒置离心管片刻后,700r/min离心30~60s,静置5min;(5)加入60 μ l ddH₂O,震荡混匀,室温避光溶解1h,4 $^{\circ}$ C保存备用。

1.2.5 扩增产物的自动荧光检测 在96孔板的每个孔中分别加1 μ l纯化的PCR产物,8.5 μ l甲酰胺(含0.17%的分子内标),离心,然后95 $^{\circ}$ C变性5min,置冰上10min,用ABI3730进行自动荧光检测。

1.2.6 数据分析 待电泳结束后,对样品的原始数据用GeneMapper3.0软件进行分析,获得不同样品扩增片段的长度,再利用Power Marker V3.25对供试材料进行遗传多样性分析。

2 结果与分析

2.1 TP-M13-SSR引物的筛选及条件优化

对合成的30对TP-M13-SSR引物进行筛选,初步筛选出稳定性高、重复性好的5对引物(表3)。其中引物KA4b和BGT23b的序列来自于梨。摸索出各引物最佳退火温度,用于25个地方品种的遗传多样性研究。

表3 5对TP-M13-SSR引物及优化条件

Table 3 Five pairs of TP-M13-SSR primers and optimum conditions

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	引物序列(5'-3') Primer sequence	退火温度($^{\circ}$ C) Annealing temperature
KA4b	F:CAC GAC GTT GTA AAA CGA C-AAA GGT CTC TCT CAC TGT CT	R:CCT CAG CCC AAC TCA AAG CC	48
BGT23b	F:CAC GAC GTT GTA AAA CGA C-CAC ATT CAA AGA TTA AGA T	R:ACT CAG CCT TTT TTT CCC AC	50
CH01f03b	F: CAC GAC GTT GTA AAA CGA C-GAG AAG CAA ATG CAA AAC CC	R:CTC CCC GGC TCC TAT TCT AC	60
CH02b12 ¹	F: CAC GAC GTT GTA AAA CGA C-GGC AGG CTT TAC GAT TAT GC	R:CCC ACT AAA AGT TCA CAG GC	59
CH03d07	F: CAC GAC GTT GTA AAA CGA C-CAA ATC AAT GCA AAA CTG TCA	R:GGC TTC TGC CCA TGA TTT TA	51

2.2 TP-M13-SSR的遗传多样性检测

利用筛选出的5对引物对苹果的25个地方品种进行扩增,准确获得不同材料在不同位点的SSR扩增产物的片段大小(图1),共获得41个等位基因。5个SSR位点所揭示出的25份苹果材料的遗传多样性(基因多样性)的变化范围为0.5032~

0.8448,多态性信息含量的变化范围为0.3952~0.8268;两者中,最高的均是CH02b12¹,最低的均是梨引物BGT23b,平均值分别为0.7278和0.6837;位点杂合度的变化范围为0.4400~0.9600(表4)。25份种质材料在位点KA4b的遗传多样性水平偏离平衡的程度最高,而在位点CH02b12¹的偏离程度最低。

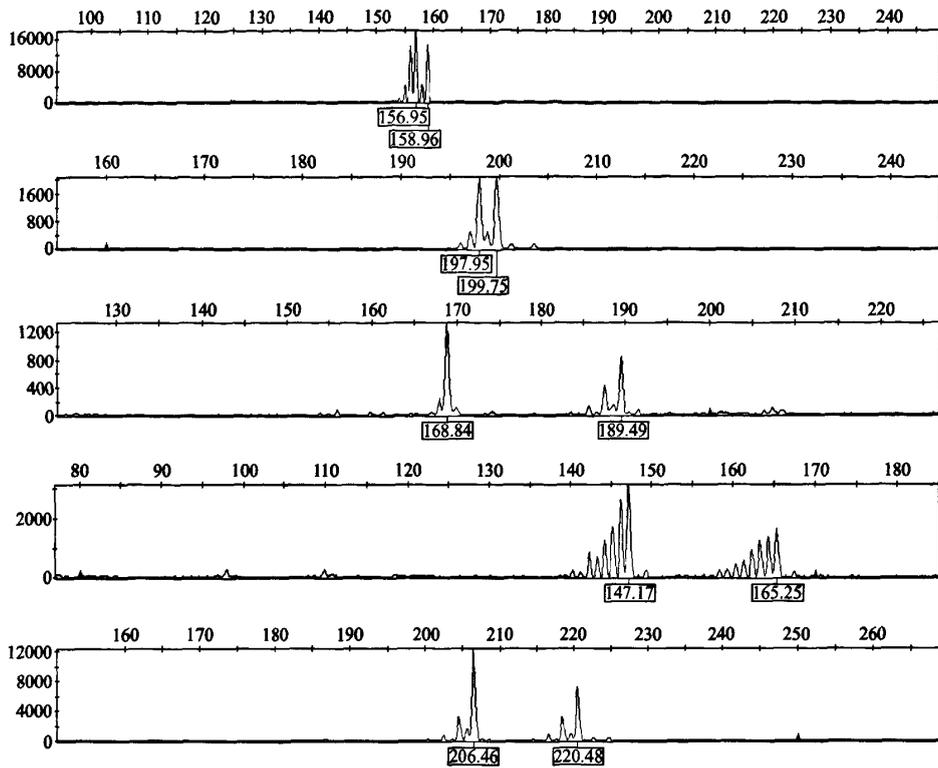


图 1 TP-M13-SSR 所检测的苹果不同地方品种在不同 SSR 位点的多态性

Fig. 1 The polymorphism revealed by TP-M13-SSR in different regional apple cultivars at different loci

表 4 5 个 SSR 位点在 25 个苹果地方品种上检测到的遗传多样性

Table 4 Genetic diversity of 25 apple regional cultivars revealed by five SSR primers

标记 Marker	主等位基因频率 Major allele frequency	基因型数 Genotype No.	等位基因数 Allele No.	基因多样性 Gene diversity	杂合度 Heterozygosity	多态性信息含量 PIC
KA4b	0.46	9	6.0	0.6992	0.4400	0.6567
BGT23b	0.58	4	3.0	0.5032	0.6800	0.3952
CH01f03b	0.26	14	10.0	0.8104	0.9600	0.7843
CH02b12 ¹	0.24	18	11.0	0.8448	0.8000	0.8268
CH03d07	0.36	14	11.0	0.7816	0.9600	0.7554
平均 Mean	0.38	11	8.2	0.7278	0.7680	0.6837

2.3 聚类分析

根据 5 对 SSR 引物的扩增数据计算相似系数并进行聚类(图 2)。25 份材料的相似系数在 0.1111~1.0000 之间。25 份材料均能分开,在相似系数为 0.43 处可以明显分为 2 个类群,与地理起源和亲缘关系相关。类群 I 包括河北的热碓子、红海棠、短枝碓子、早白海棠以及绵苹果,说明河北地方

品种中热碓子与栽培品种的起源种绵苹果亲缘关系更近,更接近于栽培品种;类群 II 包括全部供试的来自于河北的地方品种及其各自相应的实生材料;在两大类群之外,还有 5 个品种,分别是小矾山八棱、烟台草原海棠、牛妈妈海棠、俄罗斯苹果以及三块石海棠 1 实生,其地理分布相对较远,相似性较小,未与前两个类群聚到一起。

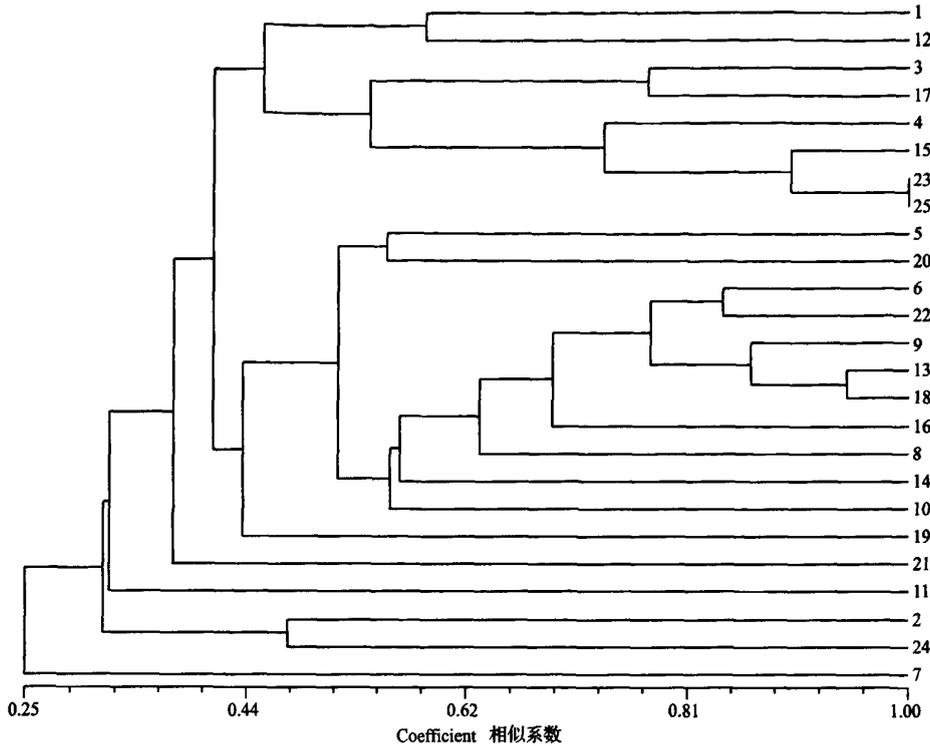


图 2 25 个苹果地方品种 SSR 聚类分析图

Fig. 2 Dendrogram of 25 apple regional cultivars based on SSR data

红海棠和短枝礅子完全聚到了一起,这主要是因为检测位点较少,所利用检测位点正好是其完全相同的位点,需要增加 SSR 位点进一步检测其间相似性。

3 讨论

3.1 TP-M13-SSR 自动荧光检测技术的优缺点

TP-M13 自动荧光检测系统快速、高效、精确、灵敏度高,能区分大小相差 2 个碱基的片段,适宜于苹果种质资源的遗传多样性研究。李莉等^[12]在水稻上比较了高密度琼脂糖凝胶电泳、放射性³²P 标记的聚丙烯酰胺电泳以及与分析软件相结合的自动荧光测序系统的分离效果,发现后者非常适合 SSR 分析,能够区别仅为 2bp 之差的差异片段。郝晨阳等^[13]在小麦上详细地分析、比较了常规的 SSR 荧光标记分析技术和银染技术,发现 SSR 荧光标记分析技术具有更高的灵敏性、更经济、数据收集和处理效率高、数据更准确等优点,更适于进行遗传多样性的分析和研究。TP-M13 自动荧光检测技术较常规荧光 SSR 技术进一步地降低成本,因为 TP-M13 自动荧光检测系统只需要标记 1 条引物,而这条引物在对不同 SSR 标记进行检测的时候均可使用,这

要比荧光标记 SSR 引物要廉价的多。因此,2000 年 Schuelke^[6]把这种方法形象的比喻为“穷人的方法”。

通常,在利用普通的荧光检测系统时,可以在同一 PCR 反应中同时进行多个 SSR 标记的扩增组合,利用不同标记之间扩增片段大小的差异以及荧光标记的颜色来进行检测和读取数据;但是,在 TP-M13 自动荧光检测系统中却比较困难,最多同时进行 2~3 个差异较大的 SSR 标记。而且,由于体系中所采用的 TP-M13 引物与正常的 SSR 正向引物序列长度之间的差别,必须再依据峰图的高低,不断优化 PCR 扩增体系,主要是通过调整模板 DNA 和荧光引物的用量,以及第 1 次 PCR 反应的退火温度,摸索出低成本、高通量、杂带少的反应体系。

本研究中,TP-M13 自动荧光检测技术在基因组约为 1.5Gbp^[14]的苹果种质资源遗传多样性研究上的成功应用,再一次验证了前人的结论,使机器自动收集、分析数据代替了银染方法中人工读取胶板的繁琐工作,在很大程度上降低了系统误差,提高苹果种质资源遗传多样性研究的效率。当利用数量较多的 SSR 标记对苹果的若干材料进行遗传多样性研究时,使用 TP-M13 自动荧光检测系统将会是非常

经济、准确、高效的检测方法。同时,其他基因组较大的种质在进行遗传多样性研究时也可以尝试使用 TP-M13 自动荧光检测系统。

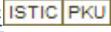
3.2 梨引物在苹果遗传多样性研究中的应用

本研究中的 5 对 SSR 引物中有 2 对是梨引物,并且经过条件优化,在此研究中得到了很好的应用。王彩虹等^[15]曾用来自于苹果基因组的 6 个 SSR 标记引物,对蔷薇科植物的 6 个属 19 个种的基因组 DNA 进行了 PCR 扩增,得到了与在苹果上大小相似的 SSRs 产物,证明了其通用性。本研究则证明了来自于梨的 SSR 引物在苹果种质资源研究中的通用性。不足之处在于 2 对引物的多态性相对较差,基因多态性、位点杂合度和多态性信息含量均不高,但在苹果种质资源的遗传多样性研究中可以起到一定的作用,增加了检测位点的数量,丰富了遗传多样性水平研究的内容。以后可以在进一步的研究中,发掘这种通用性的引物,相互弥补种质资源研究中引物量的不足。

参考文献

- [1] 陈灵芝. 中国的生物多样性现状及其保护对策[M]. 北京: 科学出版社, 1993
- [2] 洪德元. 植物细胞分类学[M]. 北京: 科学出版社, 1990
- [3] Litt M, Luty J. A hyper variable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene[J]. *Am J Hum Genet*, 1989, 44: 397-401
- [4] Smith L M, Sanders J Z, Kaicer R J, et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis[J]. *Nature*, 1986, 321: 674-679
- [5] Oetting A. Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers[J]. *Genomics*, 1995, 30: 450-458
- [6] Schuelke M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments[J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 233-234
- [7] 李会勇, 王天宇, 黎裕, 等. TP-M13 自动荧光检测法在高粱 SSR 基因型鉴定中的应用[J]. *植物遗传资源学报*, 2005, 6(1): 68-70
- [8] 刘志斋, 王天宇, 黎裕. TP-M13-SSR 技术及其在玉米遗传多样性研究中的应用[J]. *玉米科学*, 2007, 15(6): 10-15, 31
- [9] Yamamoto T, Kimura T, Sawamura Y, et al. Simple sequence repeats for genetic analysis in pear[J]. *Euphytica*, 2002, 124: 129-137
- [10] Gianfranceschi G L, Seglias G N, Tarchini R, et al. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple[J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 1069-1076
- [11] Liebhard R, Gianfranceschi L, Koller B, et al. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.) [J]. *Mol Breed*, 2002, 10: 217-241
- [12] 李莉, 杨剑波, Mackill D J, 等. 水稻 SSR 不同检测和分析方法的比较研究[J]. *中国水稻科学*, 2000, 14(3): 185-188
- [13] 郝晨阳, 王兰芬, 贾继增, 等. SSR 荧光标记和银染技术的比较分析[J]. *作物学报*, 2005, 31(2): 144-149
- [14] Arumuganathan K, Earle E D. Nuclear DNA Content of Some Important Plant Species [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1991, 9(3): 208-218
- [15] 王彩虹, 田义轲, 赵静. 来自苹果的 SSRs 在蔷薇科植物资源上的通用性分析[J]. *园艺学报*, 2005, 32(3): 500-502

用

作者: 高源, 王昆, 田路明, 曹玉芬, 刘凤之, GAO Yuan, WANG Kun, TIAN Lu-ming, CAO Yu-fen, LIU Feng-zhi
作者单位: 中国农业科学院果树研究所/农业部果树种质资源利用重点开放实验室, 辽宁兴城, 125100
刊名: 植物遗传资源学报 
英文刊名: JOURNAL OF PLANT GENETIC RESOURCES
年, 卷(期): 2011, 12(2)

参考文献(15条)

1. 王彩虹;田义轲;赵静 来自苹果的SSRs在蔷薇科植物资源上的通用性分析[期刊论文]-园艺学报 2005(03)
2. Arumuganathan K;Earle E D Nuclear DNA Content of Some Important Plant Species 1991(03)
3. 郝晨阳;王兰芬;贾继增 SSR荧光标记和银染技术的比较分析[期刊论文]-作物学报 2005(02)
4. 李莉;杨剑渡;Mackill D J 水稻SSR不同检测和分析方法的比较研究[期刊论文]-中国水稻科学 2000(03)
5. Liebhارد R;Gianfranceschi L;Koller B Development and characterization of 140 new microsatellites in apple(Malus x domestica Borkh.) [外文期刊] 2002
6. Gianfranceschi á L;Seglias á N;Tarchini R Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple[外文期刊] 1998(8)
7. Yamamoto T;Kimura T;Sawamura Y Simple sequence repeats for genetic analysis in pear 2002
8. 刘志斋;王天宇;黎裕 TP-M13-SSR技术及其在玉米遗传多样性研究中的应用[期刊论文]-玉米科学 2007(06)
9. 李会勇;王天宇;黎裕 TP-M13自动荧光检测法在高粱SSR基因型鉴定中的应用[期刊论文]-植物遗传资源学报 2005(01)
10. Schuelke M An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments[外文期刊] 2000(2)
11. Oetting A Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers[外文期刊] 1995
12. Smith L M;Sanders J Z;Kaicer R J Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis 1986
13. Litt M;Luty J A hyper variable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene 1989
14. 陈灵芝 中国的生物多样性现状及其保护对策 1993
15. 洪德元 植物细胞分类学 1990

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201102010.aspx