

于少帅,赵文霞,姚艳霞,等. 新疆野苹果和栽培苹果特异性 SSR 标记开发及应用[J]. 江苏农业科学,2020,48(21):68-73,83.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.21.012

新疆野苹果和栽培苹果特异性 SSR 标记开发及应用

于少帅¹, 赵文霞², 姚艳霞², 淮稳霞², 覃伟权¹, 阎 伟¹

(1. 中国热带农业科学院椰子研究所,海南文昌 571339;

2. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所/国家林业和草原局森林保护学重点实验室,北京 100091)

摘要:根据全基因组测序已完成的栽培苹果基因组,设计、筛选针对新疆野苹果的特异性 SSR 引物。通过 PCR 扩增、基因测序筛选了 15 对可以在新疆野苹果和栽培苹果中扩增出稳定性高且具备多态性目的条带的特异性 SSR 引物;其中 8 对仅能在栽培苹果中扩增出特异性目的条带。15 对特异性 SSR 引物对新疆野苹果和栽培苹果不同居群的 SSR 分析表明,新疆野苹果遗传多样性较为丰富,与栽培苹果不同居群分化程度较为显著,基因流水平较低。聚类分析表明,这 15 对特异性 SSR 引物可以将新疆野苹果和栽培苹果不同居群清晰区分。本研究利用新开发的 SSR 引物不仅可以揭示新疆野苹果和栽培苹果的遗传多样性和系统发育关系,对初步了解 SSR 变异位点的生物学功能以及丰富新疆野苹果和栽培苹果基因组的认识也有一定的作用,从而为更好地有效利用相关资源提供研究基础。

关键词:新疆野苹果;栽培苹果;SSR 标记;遗传多样性

中图分类号:S661.101 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)21-0068-06

新疆野苹果 (*Malus sieversii*) 属第三纪孑遗植物,是林果产业可持续发展的重要天然种质基因库。近年来,受人类活动的干扰和苹果小吉丁虫等病虫害威胁,新疆野苹果自然种群无法更新,大面积衰败和死亡。因此,探究新疆野苹果林生态退化机制,筛选抗病虫害、抗逆性新疆野苹果株系,加强新疆野苹果资源的保护和利用已成为新疆野苹果生产上亟待解决的迫切问题。这对于新疆野果林的生态保育与修复、苹果优质新品种培育和我国果品产业的可持续健康发展具有一定的理论意义和应用价值。

近年来,新疆野苹果的生存状态受人类活动、病虫害等影响严重^[1-3]。自然条件下植物的健康状况往往不是受单一因子的影响,而是受病害、虫害、生境、植物自身特征等多种因子综合影响^[4]。研究发现,受苹果小吉丁虫危害枯死的新疆野苹果枝干上分布着大量苹果腐烂病菌,苹果小吉丁虫往往和苹果腐烂病等混合发生,复合危害新疆野苹果林的

生存状态^[3]。因此,在新疆野苹果保育过程中采取单一的防治手段较难起到较为理想的保护、防治效果。在寻找引起新疆野苹果种群退化的关键因子,保护新疆野苹果的同时,保护、选育和栽培具有抗逆性新疆野苹果遗传资源应该是控制其种群衰退最为经济有效的措施。

新疆野苹果的遗传变异和系统发育研究表明,新疆伊犁哈萨克自治州巩留县、新源县等地的新疆野苹果种群存在丰富的遗传多样性,种群内部遗传分化程度较高。新疆野苹果种群内不同个体叶形等表型性状的变异与简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR) 标记的位点有一定的相关性^[5-9]。Klabunde 等用 11 对 SSR 引物对 152 份不同苹果叶斑病抗性的巴西栽培苹果接穗的遗传多样性进行评估发现,不同抗性栽培苹果间存在丰富的遗传多样性,其中在苹果叶斑病抗病、感病品种间遗传结构差异显著,有 120 个等位位点是抗病品种独有的^[10]。作为一种分辨率高、遗传信息量大、操作相对简单的标记方法,SSR 标记被广泛应用于新疆野苹果遗传结构、系统发育和表型性状相关性研究中^[5,7-8,11-13]。但是,应用于新疆野苹果遗传变异研究的 SSR 引物均为非特异性引物,SSR 引物扩增序列的功能未知,因此,新疆野苹果种群或个体间遗传差异的具体序列及生物学作用难以确定。

因新疆野苹果全基因组尚未测序,对于其基因

收稿日期:2020-02-02

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(编号:CAFYBB2017SZ003);国家重点研发计划(编号:2016YFC0501503)。

作者简介:于少帅(1987—),男,山东莱阳人,博士,助理研究员,主要从事分子植物病理学相关研究。E-mail:hzyss@163.com。

通信作者:姚艳霞,博士,副研究员,主要从事森林保护相关研究。

E-mail:yaoyx@caf.ac.cn。

的认识尚不全面。本研究根据全基因组测序已完成的栽培苹果基因组,筛选与苹果抗逆性相关的功能基因序列。根据选择的模板设计 SSR 引物,筛选在新疆野苹果和栽培苹果中具备扩增特异性、稳定性和多态性的 SSR 引物。通过新开发的 SSR 引物,丰富对新疆野苹果基因组的了解。通过开发的特异性 SSR 引物对新疆野苹果或栽培苹果进行遗传多样性分析,可以明确新疆野苹果种群或个体间在基因水平或生物学功能方面的差异。

表 1 样品信息

| 种类 | 采样地点 | 类群编号 | 样品编号 |
|-------|------|-----------|--|
| 新疆野苹果 | 伊犁巩留 | GL(0) | GL(0) - 1, GL(0) - 2, GL(0) - 3, GL(0) - 4 |
| 新疆野苹果 | 伊犁巩留 | GL(I) | GL(I) - 1, GL(I) - 2, GL(I) - 3, GL(I) - 4 |
| 新疆野苹果 | 伊犁巩留 | GL(II) | GL(II) - 1, GL(II) - 2, GL(II) - 3, GL(II) - 4 |
| 新疆野苹果 | 伊犁巩留 | GL(III) | GL(III) - 1, GL(III) - 2, GL(III) - 3, GL(III) - 4 |
| 新疆野苹果 | 伊犁巩留 | GL(IV) | GL(IV) - 1, GL(IV) - 2, GL(IV) - 3, GL(IV) - 4 |
| 新疆野苹果 | 伊犁巩留 | GL(V) | GL(V) - 1, GL(V) - 2, GL(V) - 3, GL(V) - 4 |
| 新疆野苹果 | 伊犁巩留 | GL1 | GL1 - 1, GL1 - 2, GL1 - 3, GL1 - 4 |
| 新疆野苹果 | 伊犁巩留 | GL2 | GL2 - 1, GL2 - 2, GL2 - 3, GL2 - 4 |
| 新疆野苹果 | 伊犁新源 | XY(0) | XY(0) - 1, XY(I) - 1, XY(I) - 2, XY(I) - 3 |
| 栽培苹果 | 山东青岛 | LS | LS - 1, LS - 2, LS - 3, LS - 4 |
| 栽培苹果 | 山东烟台 | LY | LY - 1, LY - 2, LY - 3, LY - 4 |

1.1.2 试剂和仪器 植物基因组 DNA 提取试剂盒、SYBR Green I 染料购自北京艾德莱生物科技有限公司,2 × *Taq* Mix 购自北京博迈德基因技术有限公司,Hi - Di 去离子甲酰胺、POP - 7 Polymer、GS - 500LIZ 分子量内标购自美国应用生物系统公司,LongGene A200 型基因扩增仪、DYY - 6C 型电泳仪购自北京市六一仪器厂,乙醇等其他化学试剂购自国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 样品干燥粉碎后取 0.1 g,通过十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取新疆野苹果和栽培苹果叶片基因组 DNA,用 1% 琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白检测仪检测 DNA 质量与浓度,-20 ℃ 保存备用。

1.2.2 SSR 引物设计 采用 NCBI 上已报道的栽培苹果品种金冠基因组为模板设计 SSR 引物。栽培苹果品种金冠基因组序列号为 NC024253^[14]。根据已报道的栽培苹果品种金冠的苹果基因组,筛选与苹果抗逆性相关的基因片段,用 SSRHunter 软件对获得的与苹果抗逆性相关的基因片段进行扫描获得微卫星片段。用扫描获得的微卫星片段为模板,采用 Primer Premier 5 软件设计了 49 对 SSR 引

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品调查采集 新疆野苹果枝叶样品分别于 2016 年 8 月至 2017 年 9 月采自新疆维吾尔自治区伊犁哈萨克自治州巩留县和新源县,栽培苹果枝叶样品于 2017 年 7 月至 8 月采自山东省青岛市和烟台市。包括 11 类 44 份样品,每个类群采 4 份样品,样品信息如表 1 所示。

物,初步筛选获得 34 对能扩增出 SSR 片段的引物,34 对引物信息如表 2 所示。引物合成及 DNA 测序由北京睿博解码生物科技有限公司完成。

1.2.3 PCR 扩增 毛细管电泳 PCR 反应体系是 30 μL,包括 1 μL DNA 模板、1 μL forward/reverse 引物(10 μmol/L)、15 μL 2 × PCR Master Mix (包括 0.05 U/μL *Taq* DNA polymerase、4 mmol/L MgCl₂、0.4 mmol/L dNTPs),剩余用 ddH₂O 补齐。PCR 反应条件为 95 ℃ 5 min;然后是 95 ℃ 30 s、52 ℃ 30 s 和 72 ℃ 30 s,循环 35 次;最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 扩增结束后,取 0.3 μL PCR 产物用 ABI 3730XL DNA analyzer 进行毛细管电泳分析。DNA 测序 PCR 反应体系 25 μL:1 μL DNA 模板、0.5 μL forward/reverse 引物(10 μmol/L)、12.5 μL 2 × PCR Master Mix (包括 0.05 U/μL *Taq* DNA polymerase、4 mmol/L MgCl₂、0.4 mmol/L dNTPs),最后用 ddH₂O 补齐。PCR 扩增条件是 95 ℃ 5 min;然后是 95 ℃ 30 s、52 ℃ 30 s 和 72 ℃ 30 s,循环 35 次;最后 72 ℃ 延伸 10 min。

1.3 数据处理和分析

利用 GeneMarker 2.2.0 软件通过植物分析类型 GS500 大小的标准对等位基因进行定位。SSR 位

表 2 SSR 引物信息

| 引物名称 | 引物序列(5'→3') | | 所在基因编码信息 | 重复序列 |
|------------|---------------------------|----------------------------|---------------------|---------|
| | 正向引物 | 反向引物 | | |
| XS2-1-2 | AATTCTCTAATATTTTGTACCTCCA | CACCGAAACGGAGGAGGA | 组氨酸激酶 5 | TC(10) |
| XS4-1-4-2 | GAGTGGCGAAGGGTTTGG | CATCGGCTAAAGATTACACCAAC | 聚腺苷结合蛋白互作蛋白 7 | AG(8) |
| XS4-1-5-2 | TTCTAGCCCACAGAGGGTTTC | GGAAATAACTAGAAGTCTACAACAG | 聚腺苷结合蛋白互作蛋白 7 | TC(10) |
| XS13-1-6-2 | TAACAATGGTGGCTCGAAGAAC | AAGACAACCCAAATTAAGTGCAT | 转录抑制因子 MYB5 | TA(11) |
| XS24-1-3-2 | TAATCGGGCCTAGTTAAACAAGAC | AAGAACTTGAAAGGTTGTTGAATA | 转录因子 RAX3 | ACA(5) |
| XS24-1-5-2 | ATCAATTTGCACAAACACATTACAT | AGGAGGCCACAGGAGGACA | 转录因子 RAX3 | ACA(5) |
| XS25-1-8 | TCTTGGAGTACCCATCGGA | CCTCAACTCAATCAAACATCAA | 转录因子 bHLH74 亚型 X1 | ATT(6) |
| XS26-1-5 | CCTATGGGATATATGCTGCG | ATCTCCTCCCCTCCCCA | 类 AP2 乙烯应答转录因子 ANT | AG(14) |
| XS33-1-1 | CGGCCGGTGGCTAATTT | AAAGCCAGGTAGGAGGGAA | 蛋白质增强抗病 2 型 | CT(5) |
| XS34-1-2 | AGAGCAAAAGTGTCTTGAGTA | TTTCAGATCATCTCATCAATA | 类 TMV 抗性蛋白 N | TCC(6) |
| XS43-1-1 | ATTTACAGGGGCTAATTTTGG | CTGAAGAAACAAGAACAGAAAGT | 潜在抗病蛋白 At5g66900 | TA(5) |
| XS50-1-10 | GAATTGCATCTGAATCACTCCC | CAACACCACGAAGGAAAAACAT | 类 TMV 抗性蛋白 N | TC(7) |
| XS62-1-4 | AATATTATGCAAGTTTCGAGCG | AAC TTCTAATTAGTAAGAGAGCTGA | 类 TMV 抗性蛋白 N | GA(5) |
| XS63-1-10 | CACTCTCAGATTAAGTTTGGTTTCA | CACTTCTGCTCGATCCTGC | TMV 抗性蛋白 N | CAA(4) |
| XS66-1-6 | GCCGAATCATCATTACAGCTAGA | CATAATATTCTAAGGGGTCCGGT | 类 TMV 抗性蛋白 NX1 型 | GAA(4) |
| XS66-2-6 | CCGAATCATCATTACAGCTAGAGAG | CATAATATTCTAAGGGGTCCGGT | 类 TMV 抗性蛋白 NX2 型 | GAA(4) |
| XS67-1-3 | TTATGTATGTTTTCTGAGTTGGTG | TAACATCACACCAATTGTCTAAGA | 假定抗病性 RPP13 蛋白 X1 型 | TGTT(3) |
| XS67-2-3 | TTATGTATGTTTTCTGAGTTGGTG | GTAACATCACACCAATTGTCTAAG | 假定抗病性 RPP13 蛋白 X2 型 | TGTT(3) |
| XS67-3-3 | TTATGTATGTTTTCTGAGTTGGTG | GTAACATCACACCAATTGTCTAAG | 假定抗病性 RPP13 蛋白 X3 型 | TGTT(3) |
| XS71-1-4 | CCGTCAAGGACAAACCGAAG | ACCATCAAAGCGGTTAAGAATC | 类 TMV 抗性蛋白 N | AG(5) |
| XS71-1-5 | AACTCCGTCAAGGACAAACC | CTCCTATAACTATAACGATGATGAC | 类 TMV 抗性蛋白 N | GA(5) |
| XS72-1-1 | CTCTTAGTTGGTCTTAGCTTGCTCC | GTTTCTTGGGTTTAAAGTTGCTGTT | 类转录因子 TCP8X4 型 | CT(8) |
| XS72-1-7 | ATCAAGATCAATCAGCCAACAG | AAGAAGAAGAATAAGAGGAAGAGGA | 类转录因子 TCP8X4 型 | AGC(5) |

点的多态性通过多态性等位基因百分比和等位基因数量来评估。不同类群间的遗传多样性通过观察杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)来评估,通过 N_a 、 N_e 、香农指数(I)和 Nei's 遗传多样性指数(H)来分析,这些参数由 POPGENE1.32 软件完成^[15]。基因分化水平通过基因分化指数(F_{st})和基因流(N_m)来评估。基于 Nei's 无偏差遗传距离和简单匹配系数(SM)通过 UPGMA 法则计算。利用 MEGA 7.0 软件和 NTSYSpc 2.10e 软件(Exeter Software, Setauket, NY)构建系统发育树^[16]。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物 PCR 扩增分析

通过 PCR 扩增验证新设计的 SSR 引物的特异性、稳定性和多态性。结果表明,34 对 SSR 引物能在新疆野苹果或栽培苹果中稳定扩增出 SSR 目的条带,而其他 SSR 引物为非特异性扩增。34 对引物中,8 对引物只能在栽培苹果中扩增出 SSR 目的条带,引物信息如表 2 所示;26 对引物既能在新疆野

苹果又能在新疆野苹果中扩增出 SSR 目的条带。这 26 对既能在栽培苹果又能在新疆野苹果中扩出目的条带的 SSR 引物中,具有多态性的引物有 15 对,引物信息如表 2 所示,其他 11 对引物无多态性。

2.2 新疆野苹果、栽培苹果遗传分化和 SSR 位点多态性分析

在新疆野苹果和栽培苹果 11 个居群 44 个个体中,15 对 SSR 引物共扩增出 62 个等位基因,平均每个位点扩增出 4.13 个等位基因。根据基因多样性 N_a 、Nei 指数、香农指数、 H_e 、 H_o 等遗传多样性参数可知,检测的新疆野苹果样品遗传多样性较为丰富。一般认为 F_{st} 值为 0~0.05 时,遗传分化低; F_{st} 值为 0.05~0.25 时,为中等程度遗传分化; F_{st} 值 >0.25,表明其具备显著的遗传分化水平^[17]。11 个居群间的遗传分化指数(F_{st})为 0.250 3,基因流(N_m)为 0.749 0,说明居群间具有较高分化水平,基因流较低,11 个居群的分化水平较为显著,结果如表 3 所示。15 对 SSR 引物在 44 份样品中共扩增出 62 个等位基因,平均每对引物扩增出 4.13 个等位

基因。引物 XS72-1-1 和 XS71-1-4 扩增出的等位基因个数相对较多,分别为 9 个和 8 个;引物 XS24-1-5-2 扩增出的等位基因个数相对较少,仅有 2 个等位基因,结果如表 4 所示。引物 XS72-

1-1 和 XS71-1-4 所在基因序列编码的蛋白分别为类转录因子 TCP8X4 型和类 TMV 抗性蛋白 N, SSR 引物 XS24-1-5-2 所在基因序列编码的蛋白则为转录因子 RAX3^[14]。

表 3 新疆野苹果和栽培苹果不同居群遗传多样性和遗传分化参数

| 类群 | 多态性位点数(个) | 多态性位点百分率(%) | 等位基因数(个) | 单位点平均等位基因数(个) | 单位点平均有效等位基因数(个) | 平均 Nei's 遗传多样性指数 | 平均 Shannon 信息指数 | 平均观测杂合度 | 平均预期杂合度 |
|----------|-----------|-------------|----------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 汇总 Total | 15 | 100.00 | 62 | 4.133 3±1.922 3 | 2.436 4±1.061 3 | 0.516 2±0.193 3 | 0.946 1±0.415 0 | 0.481 3±0.261 8 | 0.522 2±0.195 5 |
| GL(0) | 11 | 73.33 | 36 | 2.400 0±1.055 6 | 1.895 8±0.682 4 | 0.387 5±0.261 9 | 0.647 1±0.452 1 | 0.533 3±0.376 4 | 0.442 9±0.299 4 |
| GL(Ⅰ) | 13 | 86.67 | 34 | 2.266 7±0.883 7 | 1.854 6±0.632 7 | 0.395 8±0.216 4 | 0.629 2±0.366 4 | 0.400 0±0.324 6 | 0.452 4±0.247 3 |
| GL(Ⅱ) | 12 | 80.00 | 32 | 2.133 3±0.833 8 | 1.681 0±0.559 3 | 0.341 4±0.216 4 | 0.546 7±0.359 3 | 0.388 9±0.362 8 | 0.391 3±0.247 0 |
| GL(Ⅲ) | 14 | 93.33 | 35 | 2.333 3±0.899 7 | 1.930 9±0.778 4 | 0.412 5±0.202 9 | 0.660 1±0.362 3 | 0.450 0±0.343 3 | 0.471 4±0.231 9 |
| GL(Ⅳ) | 14 | 93.33 | 39 | 2.600 0±0.910 3 | 2.059 6±0.711 9 | 0.454 4±0.199 5 | 0.750 8±0.360 0 | 0.461 1±0.310 0 | 0.524 0±0.227 6 |
| GL(Ⅴ) | 14 | 93.33 | 37 | 2.466 7±0.833 8 | 1.888 7±0.726 5 | 0.402 1±0.202 8 | 0.671 4±0.361 9 | 0.516 7±0.305 7 | 0.459 5±0.231 8 |
| GL1 | 12 | 80.00 | 35 | 2.333 3±1.234 4 | 2.047 3±1.039 6 | 0.406 2±0.253 3 | 0.660 6±0.474 7 | 0.500 0±0.366 0 | 0.464 3±0.289 5 |
| GL2 | 14 | 93.33 | 42 | 2.800 0±1.207 1 | 2.289 9±0.922 5 | 0.483 8±0.226 1 | 0.822 4±0.439 4 | 0.566 7±0.394 9 | 0.554 6±0.258 2 |
| LS | 8 | 53.33 | 23 | 1.533 3±0.516 4 | 1.485 3±0.503 2 | 0.247 9±0.250 1 | 0.348 6±0.346 7 | 0.483 3±0.504 1 | 0.283 3±0.285 9 |
| LY | 12 | 80.00 | 30 | 2.000 0±0.654 7 | 1.638 6±0.502 4 | 0.331 2±0.211 6 | 0.514 3±0.329 0 | 0.483 3±0.406 1 | 0.378 6±0.241 8 |
| XY(0) | 12 | 80.00 | 35 | 2.333 3±1.046 5 | 1.893 9±0.712 3 | 0.393 7±0.238 2 | 0.640 2±0.420 3 | 0.500 0±0.400 9 | 0.450 0±0.272 3 |

表 4 SSR 引物在新疆野苹果和栽培苹果样品中的多态性分析

| 引物名称 | 扩增片段长度(bp) | 单位点扩增的等位基因总数(个) | 基因分化系数 | 基因流 |
|------------|------------|-----------------|---------|----------|
| XS4-1-4-2 | 322~338 | 4 | 0.374 3 | 0.417 9 |
| XS13-1-6-2 | 227~235 | 5 | 0.369 0 | 0.427 5 |
| XS24-1-5-2 | 297~303 | 2 | 0.005 2 | 48.125 0 |
| XS25-1-8 | 291~303 | 3 | 0.336 0 | 0.494 0 |
| XS26-1-5 | 286~292 | 4 | 0.225 2 | 0.859 9 |
| XS33-1-1 | 194~456 | 4 | 0.164 0 | 1.274 5 |
| XS62-1-4 | 261~293 | 4 | 0.130 0 | 1.673 1 |
| XS63-1-10 | 271~304 | 3 | 0.178 8 | 1.147 8 |
| XS66-1-6 | 292~382 | 3 | 0.514 3 | 0.236 1 |
| XS66-2-6 | 292~382 | 3 | 0.557 0 | 0.198 8 |
| XS71-1-4 | 320~440 | 8 | 0.209 5 | 0.943 3 |
| XS71-1-5 | 368~418 | 4 | 0.300 6 | 0.581 7 |
| XS72-1-1 | 251~291 | 9 | 0.188 8 | 1.074 2 |
| XS72-1-7 | 313~319 | 3 | 0.181 3 | 1.128 7 |
| 汇总 | | 62 | | |
| 平均 | | 4.133 3 | 0.250 3 | 0.749 0 |

2.3 新疆野苹果和栽培苹果系统发育分析

系统发育分析表明,新疆野苹果和栽培苹果 Nei's 无偏差遗传距离在 -0.001 5~0.808 4 之间,如表 5 所示。新疆新源县的新疆野苹果 XY(0)与新疆巩留县的新疆野苹果 GL2 的遗传距离值最小,2 个新疆野苹果居群具有较高的遗传相似性。新疆

野苹果 GL(0)种群与山东青岛的栽培苹果 LS 种群的遗传距离值最大,说明 2 个种群遗传分化较大。基于 Nei's 无偏差遗传距离通过 UPGMA 法构建了新疆野苹果和栽培苹果不同种群的系统发育树。通过新开发的 15 对 SSR 引物,可将 11 个新疆野苹果和栽培苹果居群清晰分开,共形成 2 个大的进化分枝。采自山东烟台、青岛的栽培苹果种群 LS 和 LY 单独位于一个进化分枝,采自新疆新源和巩留的新疆野苹果种群单独聚于一个进化分枝(图 1)。基于 SM 相似性系统构建的 UPGMA 系统发育树表明,不同种群新疆野苹果和栽培苹果 44 个个体聚于不同的进化分枝,可以清晰区分。采自新疆巩留和新源的新疆野苹果 36 个个体聚在一个进化分枝,栽培苹果 8 个个体聚于一个进化分枝(图 2)。

3 结论与讨论

本研究根据栽培苹果金冠的基因组,选择与苹果抗逆性相关的 DNA 序列为模板设计 SSR 引物^[14]。最终,成功设计并筛选到 15 对 SSR 引物可在新疆野苹果和栽培苹果中稳定扩增出特异性、多态性的目的条带;8 对 SSR 引物仅能在栽培苹果中特异性扩增出 SSR 目的条带,并且差异的 SSR 目的条带编码的蛋白产物也是已知的。因此,通过新开发的 SSR 引物,可以初步筛选出一些抗源材料或抗

表 5 新疆野苹果和栽培苹果不同居群 Nei's 无偏差遗传距离

| 居群 | Nei's 无偏差遗传距离 | | | | | | | | | |
|-------|---------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|---------|---------|
| | GL(0) | GL(Ⅰ) | GL(Ⅱ) | GL(Ⅲ) | GL(Ⅳ) | GL(Ⅴ) | GL1 | GL2 | LS | LY |
| GL(Ⅰ) | 0.078 0 | | | | | | | | | |
| GL(Ⅱ) | 0.046 8 | 0.053 5 | | | | | | | | |
| GL(Ⅲ) | 0.177 0 | 0.062 5 | 0.060 5 | | | | | | | |
| GL(Ⅳ) | 0.119 1 | 0.038 6 | 0.046 3 | 0.026 3 | | | | | | |
| GL(Ⅴ) | 0.085 8 | 0.043 5 | 0.097 3 | 0.082 3 | 0.030 9 | | | | | |
| GL1 | 0.074 1 | 0.047 2 | 0.027 0 | 0.039 2 | 0.030 3 | 0.112 5 | | | | |
| GL2 | 0.076 2 | 0.046 9 | 0.091 7 | 0.093 8 | 0.014 3 | 0.030 2 | 0.029 7 | | | |
| LS | 0.808 4 | 0.592 6 | 0.697 6 | 0.652 0 | 0.490 2 | 0.613 2 | 0.667 3 | 0.562 8 | | |
| LY | 0.733 3 | 0.572 6 | 0.603 1 | 0.542 0 | 0.357 1 | 0.566 8 | 0.524 3 | 0.436 0 | 0.142 8 | |
| XY(0) | 0.115 3 | 0.068 4 | 0.112 0 | 0.076 1 | 0.054 6 | 0.049 2 | 0.054 8 | -0.001 5 | 0.552 1 | 0.485 0 |

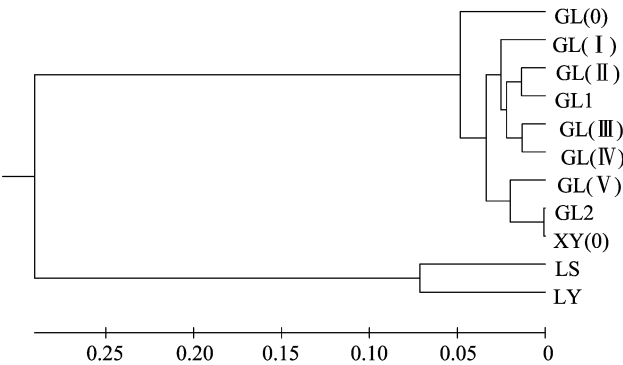


图1 新疆野苹果和栽培苹果不同居群间 UPGMA 进化树

性基因,这些材料对于新疆野果林生态恢复和优良抗性品种创制具有一定的作用。通过 15 对 SSR 引物对我国不同地区新疆野苹果和栽培苹果进行遗传多样性和系统发育分析,揭示了新疆野苹果和栽培苹果种群内存在丰富的遗传多样性。新疆野苹果和栽培苹果遗传关系较近,但遗传分化较为明显。新疆野苹果不同种群亲缘关系较近,遗传分化不明显。栽培苹果不同类群遗传关系较近。

研究表明,新疆野苹果 2 个居群的 Nei's 无偏差遗传距离为负值,2 个类群分别是 1 个采自新源的新疆野苹果居群和 1 个采自巩留的新源野苹果居

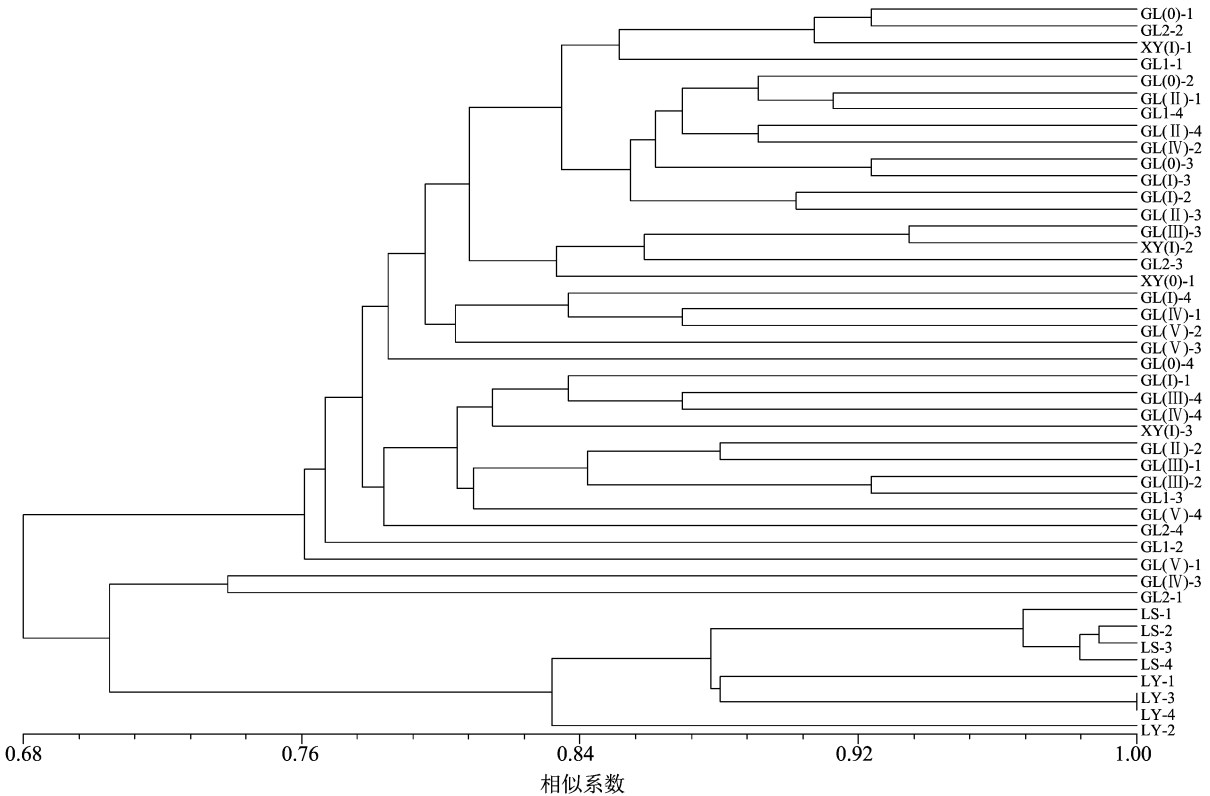


图2 新疆野苹果和栽培苹果不同个体间 UPGMA 进化树

群。已有研究表明,生活在天山公路两边的马鹿种群之间遗传距离为负值,种群间杂合度、基因型数量无差异;马鹿栖息地被公路隔绝,栖息地内杂合度、基因型数量降低,马鹿迁徙交流受公路影响而导致种群退化^[18]。受人类活动影响,近交导致种群内杂合度降低,遗传距离为负值。由此可见,适当增加不同种群新疆野苹果间的基因交流,有利于增加不同居群的杂合度,增加基因型数量,且能有效防止种群退化现象的发生。

目前引起新疆野苹果枯死的胁迫因子尚不清楚,因此,同一灾害条件下,表现出健康状态的个体所具有的抗性类型也不明确。通过不同症状新疆野苹果个体的分子遗传变异特征,或许可以找到一些与新疆野苹果抗逆相关的线索。DNA 分子标记在不同抗性植物乃至栽培苹果的遗传多样性和系统发育研究中有很好的应用^[19-24]。DNA 分子标记有显性分子标记和共显性分子标记 2 种,共显性标记揭示的遗传信息更全面、细腻,其中,由于植物体内存在大量的简单重复序列,因此,共显性的 SSR 标记揭示的遗传信息更为丰富,并且检测成本低、周期短,对 DNA 质量要求不苛刻,操作相对简便^[25]。SSR 标记在不同抗性植物乃至栽培苹果的分子遗传检测中有很好的应用^[8,10,26]。

本研究采用 SSR 分子标记用于新疆野苹果不同抗性材料的分子遗传和系统发育研究。但目前用于新疆野苹果遗传多样性分析的 SSR 引物扩增的目的片段均为非特异性扩增,目的条带的功能及编码的蛋白尚不明确,因此通过 SSR 引物对新疆野苹果或栽培苹果不同种群、不同个体进行分析,所揭示的遗传差异片段具备的生物学功能有待确定。而本研究基于确切基因模板设计的 SSR 引物,所得序列编码的蛋白均已知,如 SSR 引物 XS72-1-1 和 XS71-1-4 所在基因序列编码的蛋白分别为类转录因子 TCP8X4 型和类 TMV 抗性蛋白 N,SSR 引物 XS24-1-5-2 所在基因序列编码的蛋白为转录因子 RAX3^[14]。基于本研究设计的 15 对 SSR 分子标记,不仅可以揭示新疆野苹果或栽培苹果不同种群、不同个体间丰富的遗传多样性及彼此之间的系统发育关系,而且差异片段的生物学功能也一目了然,有利于深刻了解植物间的遗传变异。

参考文献:

[1]王春晓,赵福,赵健桐,等. 新疆发生苹果小吉丁虫[J]. 新疆

农业科学,1995(5):225-226.

- [2]刘华,臧润国,丁易,等. 天山西部新疆野苹果种群特征[J]. 林业科学,2010,46(11):1-7.
- [3]刘爱华,张新平,温俊宝,等. 天山野苹果林苹果小吉丁与苹果腐烂病复合危害研究[J]. 新疆农业科学,2014,51(12):2240-2244.
- [4]Agrios G N. 植物病理学[M]. 3 版. 沈崇尧,译. 北京:中国农业出版社,2009:121-130.
- [5]Zhang C Y, Chen X S, He T M, et al. Genetic structure of *Malus sieversii* population from Xinjiang, China, revealed by SSR markers[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2007, 34(10): 947-955.
- [6]张春雨,陈学森,林群,等. 新疆野苹果群体遗传结构与遗传多样性的 SRAP 分析[J]. 园艺学报, 2009, 36(1): 7-14.
- [7]Dong Y, Zhang J, Ren Y C, et al. Study on genetic diversity of natural population in *Malus sieversii* with microsatellite[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2013, 14(5): 771-777.
- [8]左力辉,张文林,邱彤,等. 新疆野苹果叶形性状变异及其与 SSR 标记关联分析[J]. 园艺学报, 2015, 42(4): 759-768.
- [9]张艳敏,冯涛,张春雨,等. 新疆野苹果研究进展[J]. 园艺学报, 2009, 36(3): 447-452.
- [10]Klabunde G H F, Junkes C F O, Tenfen S Z A, et al. Genetic diversity and apple leaf spot disease resistance characterization assessed by SSR markers[J]. Crop Breeding and Applied Biotechnology, 2016, 16(3): 189-196.
- [11]Omasheva M E, Chekalin S V, Galiakparov N N. Evaluation of molecular genetic diversity of wild apple *Malus sieversii* populations from Zailiysky Alatau by microsatellite markers[J]. Genetika, 2015, 51(7): 759-765.
- [12]秦伟,刘立强,廖康,等. 新疆苹果种质资源亲缘关系的 SSR 分析[J]. 新疆农业科学, 2011, 48(1): 48-52.
- [13]秦伟,沙红,刘立强,等. 新疆野苹果资源遗传多样性 SSR 分析[J]. 果树学报, 2012, 29(2): 161-165.
- [14]Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, et al. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.) [J]. Nature Genetics, 2010, 42(10): 833-839.
- [15]Yeh F C, Boyle T J B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits[J]. Belgian Journal of Botany, 1997, 129: 157.
- [16]Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [17]Freeland J R, Kirk H, Petersen S D, et al. 分子生态学[M]. 9 版. 戎俊,译. 北京:高等教育出版社, 2015: 55-58.
- [18]周璨林. 天山马鹿种群数量、遗传结构、家域及系统发育关系研究[D]. 乌鲁木齐:新疆大学, 2015: 84-85.
- [19]Bagnaresi P, Biselli C, Orrù L, et al. Comparative transcriptome profiling of the early response to *Magnaporthe oryzae* in durable resistant vs susceptible rice (*Oryza sativa* L.) genotypes[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e51609.
- [20]Chmielarz M, Sobkowiak S, Debski K, et al. Diversity of phytophthora infestans from Poland[J]. Plant Pathology, 2014, 63

(下转第 83 页)

由于云南省的地理和气候条件比较多样,相关研究表明,云南省的选种工作,要选出适应不同环境条件的良种,特别是希望在少数几个选种的中心,能够照顾到不同地区的需要,不从生态观点出发,是很难建立一套适用的工作方法^[9-15]。本研究在云南省中海拔地区种植 27 个高原粳稻品种,高海拔地区种植 13 个高原粳稻品种,采集 2017 年云南省区域试验的 12 个性状田间表现数据,将水稻育种的传统评价方法与相关分析、通径分析、主成分分析及灰色关联度的分析相结合,得知与育种目标关联度较大的性状,在水稻品种选育过程中,品系(组合)的优劣其实就是其综合性状的外在表现,采用此方法可以克服人为的主观因素,提高品种(组合)评价的准确性和育种效率。为明确主要农艺性状之间的关系,并给云南省高原粳稻的品种选育提供一定的理论依据,研究结果表明,此方法可以快速计算出每个材料的综合评分和排名,有助于提高育种材料的筛选效率。所建立方法的评价结果与品种区域试验意见趋于一致,证明此方法能有效筛选出优良品种,接下来的工作可以通过此法分析了解各主要性状对产量影响的相对重要性,对品种的各性状进行综合评估,把田间的表现型与室内考种数据结合起来,使人们对后代的选择更加合理,有效提高育种材料的筛选效率。

研究证明此法在云南省品种选育中的运用是行之有效的。结合各组合性状的相关分析,说明在云南省高原稻区选育适宜云南省中海拔地区的常规粳稻品种时应注重选择生育期偏长、株高偏高及千粒质量与有效穗适中的大穗多粒型品种,而在云南省高原稻区选育适宜云南省高海拔地区的常规粳稻品种时应注重选择生育期适中、株高偏高、成穗率高及千粒质量与有效穗适中的大穗多粒型品种的品种类型,并注意性状间的协调发展,以充分

表现品种潜力,选育出优异的高原粳稻品种。

参考文献:

- [1] Peng S B, Tang Q Y, Zou Y B. Current status and challenges of rice production in China[J]. Plant Production Science, 2009, 12(1): 3-8.
- [2] 王宏广. 中国粮食安全研究[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [3] 张洪程, 张军, 龚金龙, 等. “籼改粳”的生产优势及其形成机理[J]. 中国农业科学, 2013, 46(4): 686-704.
- [4] 秦志列, 王术, 王伯伦. 不同穗型水稻产量形成及物质生产分析[J]. 中国农学通报, 2006, 22(4): 181-184.
- [5] 吴伟明, 程式华. 水稻根系育种的意义与前景[J]. 作物育种信息, 2005, 19(8): 27-28.
- [6] 程式华, 曹立勇, 陈深广, 等. 后期功能型超级杂交稻的概念及生物学意义[J]. 中国水稻科学, 2005, 19(3): 280-284.
- [7] 张旭. 水稻生态育种[M]. 北京: 农业出版社, 1991.
- [8] 吴文革, 张洪程, 吴桂成, 等. 超级稻群体籽粒库容特征的初步研究[J]. 中国农业科学, 2007, 40(2): 250-257.
- [9] 张耗, 谈桂露, 薛亚光, 等. 江苏省粳稻品种近 60 年演进过程中产量与形态生理特征的变化[J]. 作物学报, 2010, 36(1): 133-140.
- [10] Kim D M, Lee H S, Kwon S J, et al. High-density mapping of quantitative trait loci for grain-weight and spikelet number in rice[J]. Rice, 2014, 7(1): 14.
- [11] Zhuang J Y, Fan Y Y, Rao Z M, et al. Analysis on additive effects and additive-by-additive epistatic effects of QTLs for yield traits in a recombinant inbred line population of rice[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 105(8): 1137-1145.
- [12] 钟楚, 朱颖墨, 朱勇, 等. 云南不同类型一季稻产量形成及其与气象因子的关系[J]. 应用生态学报, 2013, 24(10): 2831-2842.
- [13] 段骅, 杨建昌. 高温对水稻的影响及其机制的研究进展[J]. 中国水稻科学, 2012, 26(4): 393-400.
- [14] 刘向蕊, 陈小荣, 杨军, 等. 冷害隶属函数在水稻耐低温性状的评价[J]. 江西农业大学学报, 2013, 35(4): 675-681.
- [15] 刘奇华, 周学标, 杨连群, 等. 生育前期遮光对水稻灌浆期剑叶生理特性及籽粒生长的影响[J]. 应用生态学报, 2009, 20(9): 2135-2141.

(上接第 73 页)

(1): 203-211.

- [21] Kasso D, Jean-Philippe B, Jean-Louis D, et al. Forest refugia revisited: nSSRs and cpDNA sequences support historical isolation in a wide-spread African tree with high colonization capacity, *Milicia excelsa* (Moraceae)[J]. Molecular Ecology, 2010, 19(20): 4462-4477.
- [22] Pan D, Wei Y M, Chen G Y, et al. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) of wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*) in Israel and its ecological association[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2010, 38(1): 1-11.
- [23] López-Pujol J, Bosch M, Simon J, et al. Population genetics and

conservation priorities for the critically endangered island endemic *Delphinium pentagynum* subsp. *formenterianum* (Ranunculaceae)[J]. Biodiversity and Conservation, 2003, 12(9): 1937-1951.

- [24] Wei T, Ou B, Li J B, et al. Transcriptional profiling of rice early response to *Magnaporthe oryzae* identified OsWRKYs as important regulators in rice blast resistance[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e59720.
- [25] 朱玉贤, 李毅. 现代分子生物学[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 147-159.
- [26] 朱元媛, 曹敏格, 许正, 等. 基于 ITS 和 matK 序列探讨新疆野苹果与中国苹果的系统演化关系[J]. 园艺学报, 2014, 41(2): 227-239.