

殷纪伟,韩贝贝,马莹雪,等. 基于 SSR 分子标记的 154 份桃品种遗传多样性分析[J]. 江苏农业科学,2023,51(16):18-26.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.16.003

基于 SSR 分子标记的 154 份桃品种遗传多样性分析

殷纪伟^{1,2}, 韩贝贝¹, 马莹雪¹, 武星廷¹, 徐振江², 姜建福³, 陈昌文³, 韩瑞玺¹

(1. 农业农村部科技发展中心, 北京 100176; 2. 华南农业大学农学院, 广东广州 510642;

3. 中国农业科学院郑州果树研究所, 河南郑州 450009)

摘要:利用简单重复序列(SSR)分子标记对桃种质资源的遗传多样性和群体结构进行分析,构建桃品种的分子数据库,为桃品种的鉴定提供技术依据。利用 10 个 SSR 标记对 154 份桃品种进行指纹采集,通过聚类分析和群体结构分析研究其遗传多样性。结果表明,10 对 SSR 引物共检测出 140 个等位变异,变异范围为 8~27;共获得 304 个基因型,变化范围为 17~59;引物多态性信息含量(PIC)变化范围为 0.510 9~0.824 2,申请品种保护和登记的品种遗传多样性较已知品种低。根据 Nei's 遗传距离进行非加权组平均法(UPGMA)聚类分析,供试品种可划分为 5 个大类,各品种间的遗传距离在 0.029 3~1.000 0 之间,其中 2 对品种未区分开。对供试品种进行群体结构分析,发现可以划分为 4 个亚群,大部分材料的亲缘关系比较单一。方差分析结果表明,10% 的遗传变异来自群体间,72% 的遗传变异来自群体内部,群体内的变异大于群体间。154 份桃品种的遗传多样性水平适中,群体间的遗传分化程度处于中等水平,同一育种单位的品种遗传距离较近。研究结果可为不同类型桃育种创新、分子指纹数据库的构建及品种鉴定提供参考依据。

关键词:桃;SSR;遗传多样性;群体结构

中图分类号:S662.102

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2023)16-0018-08

桃(*Prunus persica* L.)是蔷薇科(Rosaceae)李属(*Prunus*)的一种重要落叶果树,是全球第三大重要的温带水果^[1]。中国拥有世界上最长的桃栽培历史^[2],种质资源比较丰富,其种植面积、产量均居世界首位^[3]。利用 DNA 分子标记技术对桃进行品种鉴定及种质资源的遗传多样性研究,对我国桃种质资源利用和育种创新具有重大意义。随着基因组学的不断发展,基于 DNA 的遗传标记在植物分子研究中被广泛应用,简单重复序列(SSR)分子标记技术由于具有可重复性好、共显性遗传等优点,在 DNA 指纹分析和遗传多样性分析方面有重要的应用价值^[4]。目前,SSR 分子标记技术已经被用于鉴定葡萄^[5]、柑橘^[6]、苹果^[7]、猕猴桃^[8]、樱桃^[9]等果树品种或种质资源。近年来 SSR 分子标记技术被广泛应用于各项研究中,如品种鉴定、遗传图谱构建、遗传多样性研究等。Cheng 等利用 7 对 SSR 引

物构建了 32 个桃地方品种的指纹图谱,并评估了品种的遗传多样性和亲缘关系^[10];葛志刚等利用 SSR 标记对 22 个蟠桃品种及另外 9 种类型桃品种的遗传多样性的分析结果显示,蟠桃的遗传多样性较高^[11];Xie 等采用 34 个 SSR 标记分析了浙江地区的 94 份桃种质资源的多样性,发现引进品种的种质多样性高于地方品种^[12];李雄伟等利用 16 个 SSR 标记对国内外 669 份桃的遗传多样性进行测试并构建了相应的分子指纹图谱^[13];凌士鹏等对不同来源的桃品种进行 SSR 分析,发现聚类结果和品种的地理分布之间存在一定的相关性,相同地理来源的品种较为集中地聚在一起^[14];根据桃果实性状,可以将桃划分为多个类型,魏姗姗等开发了 18 个 SSR 标记对桃果实的形状进行分析,发现扁球形桃类群的遗传多样性较球形丰富,对桃有无毛性状的分析结果表明,有毛类群的遗传多样性和基因杂合度高于无毛类群^[15];刘伟等以 60 份山东省地方桃种质资源为研究材料,利用 SSR 标记构建了分子身份证,相关研究可为山东省地方桃品种资源鉴定和种质资源利用与保护奠定基础^[16]。通过对桃种质资源的遗传多样性进行评价,可为今后桃种质资源创新和利用提供参考依据。但是,目前对于新育成的桃品种,尚未有人分析并及时构建 DNA 分子数据

收稿日期:2022-10-11

基金项目:物种品种资源保护项目(编号:h20210472);农产品质量安全标准体系建设(编号:2130109)。

作者简介:殷纪伟(1998—),男,安徽宣城人,硕士研究生,从事分子生物学研究。E-mail:jiwyin@163.com。

通信作者:韩瑞玺,博士,高级农艺师,主要研究方向为植物新品种保护和 DNA 分子技术应用。E-mail:wudifeixue007@163.com。

库。本研究首次以近 5 年申请品种权保护的桃品种为材料,并且通过果实类型进行聚类分析,前人在此方面的研究报道较少。随着国内桃新品种权申请量逐年增加,通过比较申请品种权保护品种和已知品种间的遗传多样性,不同育种单位和地区育种水平的相关研究较少。本研究构建了 154 份桃品种的 DNA 指纹数据库,并对申请品种保护的品种和已知品种间进行遗传多样性比较分析,可为加快我国桃种质资源的创新利用和桃品种权保护提供参考,为桃品种鉴定和辅助桃新品种特异性、一致性和稳定性测试(简称 DUS 测试)提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本试验于 2022 年在农业农村部科技发展中心植物新品种测试中心进行,试验材料包括申请新品种权保护的品种 63 份、登记品种 13 份、已知品种 78 份,共 154 份,由农业农村部植物新品种测试中心提供,供试品种的基本信息见表 1。

DNA 聚合酶、PCR Buffer 等购于南京诺维赞生物科技股份有限公司;甲酰胺、LIZ500 购于 ABI 公司。主要设备仪器:Nano Drop 1000 微量分光光度仪、ETC-811 定性 PCR 仪、Applied BiosystemsTM 3730 基因分析仪、组织研磨仪等。

1.2 SSR 引物

本研究中用于检测的 SSR 引物选自《桃品种鉴定 SSR 分子标记法》中规定的 10 对核心引物(表 2),普通引物、荧光引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,根据等位变异大小在荧光引物 5'端添加 6-羧基荧光素(FAM)、六氯荧光素(HEX)、羧基四甲基罗丹明(TAMRA)荧光基团。

1.3 DNA 提取和 PCR 扩增

采用改良的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法^[17]提取新鲜叶片的基因组 DNA,并用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行 DNA 的完整性检测,用紫外分光光度计 Nano drop1000 测定 DNA 的质量和浓度,并将其稀释至 50 ng/ μ L,于 -20℃ 保存。PCR 扩增反应总体积为 10 μ L,包含 1 μ L 50 ng/ μ L DNA 模板、1 μ L 10 \times PCR Buffer、各 0.3 μ L 10 μ mol/L 上下游引物、0.1 μ L Taq DNA 聚合酶、2.5 mmol/L dNTP,加 6.5 μ L ddH₂O 补足至 10 μ L。PCR 扩增参考《桃品种鉴定 SSR 分子标记法》中的扩增程序,具体如下:95℃ 5 min;95℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 30 s,共 35

个循环;4℃ 保存 20 min。

1.4 PCR 产物检测

分别吸取 1.2 μ L 不同荧光标记扩增产物,混匀后加超纯水稀释 100 倍,从稀释混合液中分别吸取 1 μ L 加入 96 孔板中。每孔另外加入 8.9 μ L 去离子甲酰胺、0.1 μ L ABI GeneScan 500LIZ 分子量内标,离心 30 s 后于 94℃ 变性 5 min,冷却后上机检测,具体操作步骤和流程参考仪器操作说明。

1.5 数据分析方法

用 SSR Analyser (V1.2.6, <http://172.16.2.68:8080/ssr3/no/index>)对电泳的原始数据进行处理。用 Powermarker V3.25 计算不同品种间的遗传距离,并构建基于 Nei's 遗传距离的非加权组平均法(UPGMA)聚类图。利用 Ntsys 2.11 进行遗传相似度分析,用 Structure 2.3.4 软件进行群体结构分析,假定群体数目(K 值)为 1~10 并且逐一进行测试,每个 K 值重复估算 20 次,迭代次数 5 000 次,马尔可夫链蒙特卡洛方法(Markov chain monte carlo, MCMC)值为 50 000 次。使用 $\ln P(D)$ 的平均值进行种群估计,并通过 Structure Harvester 程序估算最佳种群数量的 K 值,对群体间及群体内分子变异作方差检验(AMOVA),分析群体内、群体间的遗传变异情况。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记多态性和遗传多样性分析

根据 SSR 标记的等位变异范围,进行多重电泳组合,本研究将 10 对引物分为 4 组来提高电泳效率,图 1 为品种 SpringPrince 的毛细管电泳结果。用 SSR Analyser 软件处理毛细管电泳的原始数据,从表 3 可以看出,10 对 SSR 引物在 154 份材料中共检测出 140 个等位变异位点,变异范围为 8~27,平均值为 14;共获得 304 个基因型组合,变化范围为 17~59 个,平均值为 30.4 个。多态性信息含量能够反映一个群体的遗传变异程度,本研究中, PIC 值的变化范围为 0.510 9~0.824 2,平均值为 0.698 4,其中 PIC 值最高的标记是 SSR125(0.824 2),最低的标记是 SSR107(0.510 9),各标记的 PIC 值均高于 0.5,说明该标准所选引物多态性较好,适用于桃品种的鉴定,能够有效反映桃品种的遗传多样性信息。供试材料的基因多样性变化范围为 0.530 8~0.839 6,平均值为 0.728 2,表明供试材料的遗传多样性丰富,遗传背景较为复杂。

154 份桃品种中共包括 63 份申请保护品种、13

表 1 154 份桃品种的基本信息

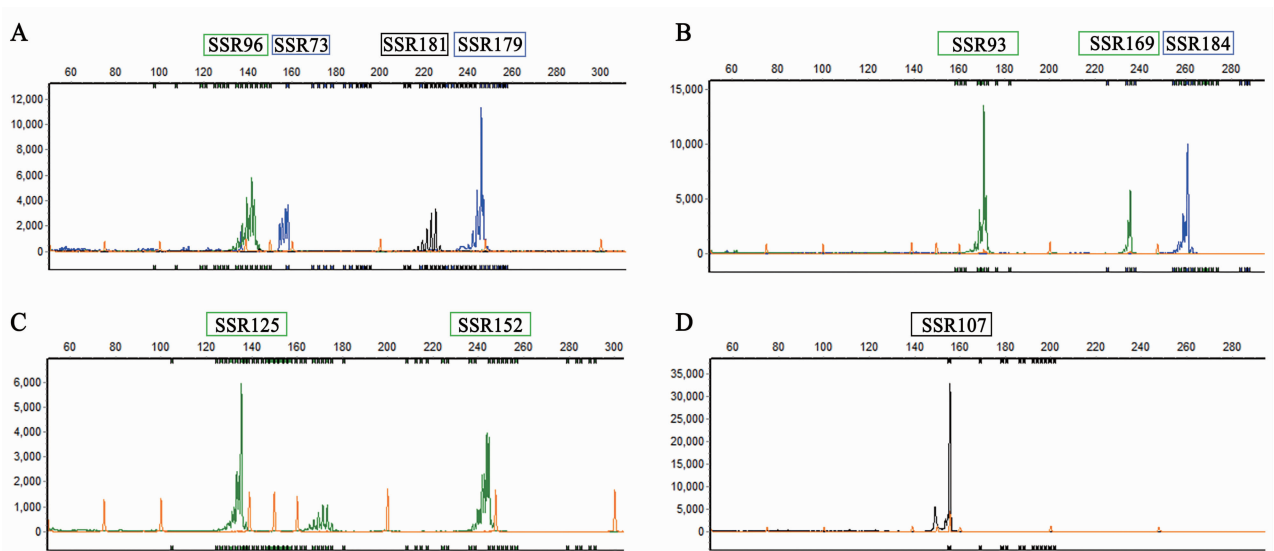
样品编号	品种名称	品种分类	样品编号	品种名称	品种分类	样品编号	品种名称	品种分类
T1	春雪垂柳	已知品种	T45	中油蟠 11 号	已知品种	T89	陇油金蜜	申请品种
T2	沐雪垂柳	已知品种	T46	中油丹玉	已知品种	T90	聊大红金桃	申请品种
T3	粉恋串	申请品种	T47	中油金缘	申请品种	T91	金陵黄露	登记品种
T4	粉恋垂枝	申请品种	T48	中油金瑞	申请品种	T92	金童 6 号	已知品种
T5	红恋串	申请品种	T49	夏至红	已知品种	T93	大金旦	已知品种
T6	红恋垂枝	申请品种	T50	理想油桃	已知品种	T94	锦绣	已知品种
T7	万重红	申请品种	T51	早红油	申请品种	T95	陇金 2 号	申请品种
T8	浅紫恋	申请品种	T52	瑞光 3 号	已知品种	T96	陇金 6 号	已知品种
T9	白重瓣垂枝	已知品种	T53	兴津油桃	已知品种	T97	陇金 5 号	登记品种
T10	朱粉垂枝	已知品种	T54	中油金冠	申请品种	T98	金凤	已知品种
T11	绛桃	已知品种	T55	中油金铭	登记品种	T99	北京晚蜜	已知品种
T12	红垂柳	已知品种	T56	中农金辉	登记品种	T100	秋彤	已知品种
T13	万重粉	登记品种	T57	曙光	已知品种	T101	甘峪秋蜜	申请品种
T14	报春	登记品种	T58	瑞光 28 号	申请品种	T102	川中岛	已知品种
T15	复色垂枝碧桃	申请品种	T59	双喜红	申请品种	T103	甘露暑蜜	申请品种
T16	撒金碧桃	已知品种	T60	瑞光 18 号	已知品种	T104	白凤	已知品种
T17	人面桃	已知品种	T61	中油桃 5 号	已知品种	T105	南桂桃 1 号	申请品种
T18	中蟠 7 号	申请品种	T62	中油桃 4 号	已知品种	T106	上海水蜜	已知品种
T19	中蟠 16 号	申请品种	T63	中油 13 号	申请品种	T107	天津水蜜	已知品种
T20	中蟠 18 号	申请品种	T64	中油 20 号	申请品种	T108	深州水蜜	已知品种
T21	晚蟠桃	已知品种	T65	甘露早油	已知品种	T109	新风蜜露	已知品种
T22	瑞蟠 4 号	已知品种	T66	陇油桃 2 号	已知品种	T110	优蜜	已知品种
T23	中蟠 9 号	申请品种	T67	陇油 3 号	登记品种	T111	中桃金蜜	申请品种
T24	中蟠 11 号	已知品种	T68	陇油桃 1 号	已知品种	T112	松森	已知品种
T25	中蟠 15 号	申请品种	T69	陇油 5 号	登记品种	T113	仓方早生	已知品种
T26	中蟠 19 号	申请品种	T70	陇油桃 9 号	登记品种	T114	霞晖 6 号	登记品种
T27	中蟠 21 号	申请品种	T71	中桃金霞	已知品种	T115	大久保	已知品种
T28	早露蟠桃	已知品种	T72	中油蟠 2 号	已知品种	T116	晚蜜	已知品种
T29	奉化蟠桃	已知品种	T73	中油蟠 1 号	已知品种	T117	春蜜	已知品种
T30	玉露蟠桃	已知品种	T74	中油蟠 7 号	申请品种	T118	黄金蜜桃 1 号	已知品种
T31	农神蟠桃	已知品种	T75	中油蟠 9 号	申请品种	T119	黄金蜜桃 3 号	已知品种
T32	蟠桃皇后	已知品种	T76	中油蟠 5 号	申请品种	T120	陇蜜 12 号	已知品种
T33	新疆蟠桃	已知品种	T77	金霞油蟠	申请品种	T121	陇蜜 10 号	已知品种
T34	中蟠桃 11 号	申请品种	T78	金霞	已知品种	T122	陇蜜 11 号	已知品种
T35	中蟠 13 号	申请品种	T79	金湘玉	申请品种	T123	陇蜜 17 号	申请品种
T36	中蟠桃 10 号	申请品种	T80	中桃金丽	申请品种	T124	陇蜜 15 号	登记品种
T37	陇蟠 1 号	申请品种	T81	中桃金魁	申请品种	T125	陇红蜜 1 号	申请品种
T38	早黄蟠桃	已知品种	T82	中桃金甜	申请品种	T126	金秋红蜜	已知品种
T39	瑞蟠 101 号	申请品种	T83	中桃金钻	申请品种	T127	燕红	已知品种
T40	瑞蟠 21 号	已知品种	T84	中桃金饴	申请品种	T128	夏之脆	申请品种
T41	中蟠 1 号	已知品种	T85	中桃金美	申请品种	T129	SpringPrince	已知品种
T42	中蟠 17 号	申请品种	T86	锦花	申请品种	T130	NJC83	已知品种
T43	中油金夏	申请品种	T87	紫金黄脆	申请品种	T131	秋甜	登记品种
T44	中油蜜玉	申请品种	T88	锦枫	申请品种	T132	夏丽	登记品种
T133	中桃抗砧 1 号	申请品种	T141	南山甜桃	已知品种	T149	中桃 5 号	已知品种
T134	新疆毛桃 1 号	已知品种	T142	白花山桃	已知品种	T150	紫胭瑞玉	申请品种
T135	丹玉	申请品种	T143	Chiyemarn	已知品种	T151	紫胭瑞阳	申请品种

表 1(续)

样品编号	品种名称	品种分类	样品编号	品种名称	品种分类	样品编号	品种名称	品种分类
T136	割谷	已知品种	T144	卡里南	已知品种	T152	紫胭瑞秋	申请品种
T137	吊枝白	已知品种	T145	映霜红	申请品种	T153	金京红	申请品种
T138	白花	已知品种	T146	京玉	已知品种	T154	秋忆	申请品种
T139	西眉 2 号	已知品种	T147	霞脆	申请品种			
T140	肥城百里 10 号	已知品种	T148	春美	已知品种			

表 2 用于桃品种鉴定的 10 对 SSR 引物信息

引物名称	引物序列(5'→3')	退火温度(℃)	荧光染料	等位变异范围(bp)
SSR73	F:TTGCTGCTGAAAAATAATGAACA;R:GGGTGGCCTGTTGAGAATATAA	56	5'FAM	159 ~ 196
SSR93	F:AACTGCCTTAGCTTAGACTGGCT;R:AAGACGAGAAACCACCTTGAATC	56	5'HEX	160 ~ 182
SSR96	F:AACCTCAATCATTCTTTACACAAGC;R:CTGCTTAAGGAGGAACCTCAAAT	56	5'HEX	99 ~ 171
SSR107	F:TGCAGACTAGGCTTTTACAGACAA;R:GATCTCCAAGTCATCTCCATCTG	56	5'TAMRA	156 ~ 204
SSR125	F:TAGCGCCATTGTTACACAC;R:GCTGGGAGAGAAAGATGACTGT	56	5'HEX	103 ~ 191
SSR152	F:GTTCGACTCCCATATCCAA;R:CTCCAAAGTACAGAGCCTATCG	56	5'HEX	226 ~ 256
SSR169	F:TTCTTATTCTGGAATGCATCG;R:ACATTTGCCCAAAATATGGTG	56	5'HEX	232 ~ 270
SSR179	F:ATCACGTCGAAAGTTCCTAGA;R:CGCCTCTCCCTCAGTA	56	5'FAM	216 ~ 270
SSR181	F:AGAATGCAGGCC TTCCTTCT;R:GCACCTTGCTTATCATCCGA	56	5'TAMRA	184 ~ 256
SSR184	F:TGAATGTCTTCCTGCTCTG;R:ATGAACATGAACCAGTCAAGGA	56	5'FAM	225 ~ 289



A—SSR96、SSR73、SSR181、SSR179；B—SSR93、SSR169、SSR184；C—SSR125、SSR152；D—SSR10

图1 SpringPrince 在 10 个 SSR 标记下的电泳峰值

份登记品种和 78 份已知品种,利用 GenAlEx6. 503 对申请和登记的品种与已知品种进行群体遗传多样性分析(表 4)。已知品种的等位基因数、有效等位基因数分别为 12、4. 534, Shannon’s 信息指数(*I*)为 1. 762,期望杂合度(*H_e*)为 0. 752,均高于申请品种保护和登记品种,说明已知品种的群体遗传多样性比申请品种保护和登记的品种更丰富。

2.2 聚类分析

本研究通过计算各品种间的遗传距离,用 UPGMA 法对 154 份桃品种进行聚类分析,发现该聚类结果和品种类型有一定的相关性(图 2)。154 份桃种质被划分为 5 个主要类群,其中类群 I 全部为观赏类桃品种,类群 II 主要是蜜桃品种,类群 III 主要为蟠桃品种,类群 IV 主要为黄桃品种,类群 V 主要为油

表 3 10 个 SSR 标记在 154 份桃品种中的多态性

分子标记	等位基因 频率	基因型 数量(个)	等位变异 位点数(个)	基因多样性 指数	多态信息 含量
SSR73	0.407 9	17	8	0.657 6	0.594 2
SSR93	0.435 1	17	9	0.717 9	0.678 2
SSR96	0.379 9	29	17	0.756 7	0.724 8
SSR107	0.668 8	26	11	0.530 8	0.510 9
SSR125	0.297 4	59	27	0.839 6	0.824 2
SSR152	0.369 3	47	20	0.811 0	0.794 6
SSR169	0.625 0	24	11	0.572 5	0.543 2
SSR179	0.376 6	25	11	0.754 3	0.719 9
SSR181	0.266 4	35	16	0.828 6	0.807 2
SSR184	0.248 2	25	10	0.812 8	0.786 6
Mean	0.407 5	30.4	14	0.728 2	0.698 4

桃品种。观赏类桃与可食用桃品种间的遗传信息差异较大,单独聚为一类。而其他几个类群中存在品种类型相互交叉的现象,如油蟠桃品种在类群Ⅲ、类群Ⅴ中均有分布,类群Ⅱ中除了蜜桃品种外,还有些黄桃品种。在 154 份材料中,共有 2 对品种未区分开,分别是甘峪秋蜜(T101)和中油桃4号

表 4 申请品种保护和登记品种与已知品种遗传多样性的比较

群体	<i>N</i>	<i>N_a</i>	<i>N_e</i>	<i>I</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>
申请保护和 登记品种	76	10.100	3.801	1.553	0.559	0.695
已知品种	78	12.000	4.534	1.762	0.546	0.752
平均	77	11.050	4.168	1.658	0.552	0.723

注:*N*表示个体数;*N_a*表示等位基因数;*N_e*表示有效等位基因数;*I*表示 Shannon's 信息指数;*H_o*表示观测杂合度;*H_e*表示期望杂合度。

(T62),川中岛(T102)和中油桃5号(T61),由于该标准选用的是 SSR 随机标记,可能未覆盖相应的等位变异差异区域,因此从分子水平上表现出相似性。除此之外,中蟠9号(T23)和中油蟠9号(T75)、中蟠19号(T26)和中蟠1号(T41)、中桃金霞(T71)和金霞(T78)的遗传距离最小,均为0.0293。进一步分析发现,同一育种单位的品种聚在一起,遗传距离较近,如北京市林业果树科学研究院选育的瑞蟠系列品种瑞蟠4号(T22)、瑞蟠21号(T40)和瑞蟠101号(T39),其中瑞蟠21号是由瑞蟠4号为父本杂交选育的极晚熟品种,瑞蟠101号则是由

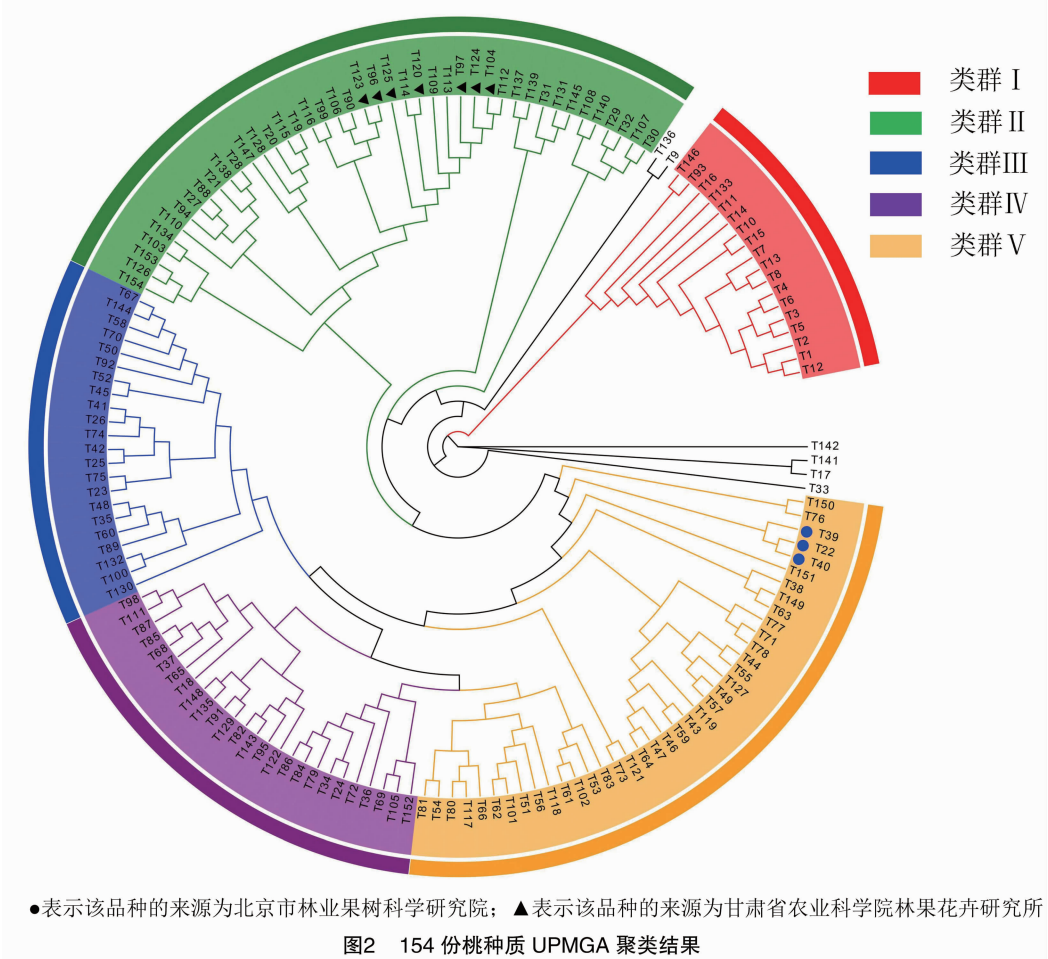


图2 154 份桃种质 UPMGA 聚类结果

瑞蟠 21 号为父本杂交选育的晚熟黄肉品种。此外遗传距离较近的还有甘肃省农业科学院林果花卉研究所的陇系列品种陇金 6 号 (T96)、陇红蜜 1 号 (T125)、陇蜜 17 号 (T123)、陇蜜 15 号 (T124)、陇蜜 12 号 (T120) 等,其中陇蜜 15 号和陇蜜 12 号都是由陇蜜 9 号为母本杂交选育而来。同一育种单位的品种由于遗传背景相似而聚在一起,说明该聚类结果符合实际育种现状。为了探讨利用该分子数据库在桃特异性、一致性、稳定性 (DUS) 测试中筛选近似品种的可行性,随机选取 6 个申请品种与对应的近似品种进行分析。从表 5、图 2 可以看出,申请品种中油金夏 (T43)、中油蜜玉 (T44)、金京红 (T153) 等对近似品种的选择比较合理,二者的遗传距离较近,但是中蟠 7 号 (T18)、中蟠 9 号 (T23)、中桃金饴 (T84) 在分子水平上有更加近似的品种。

表 5 申请品种和近似品种的信息

申请品种编号	申请品种名称	近似品种编号	近似品种名称	遗传距离
T18	中蟠 7 号	T38	早黄蟠桃	0.658 6
T23	中蟠 9 号	T38	早黄蟠桃	0.679 3
T43	中油金夏	T59	双喜红	0.079 3
T44	中油蜜玉	T49	夏至红	0.241 3
T84	中桃金饴	T130	NJC83	0.505 9
T153	金京红	T126	金秋红蜜	0.176 2

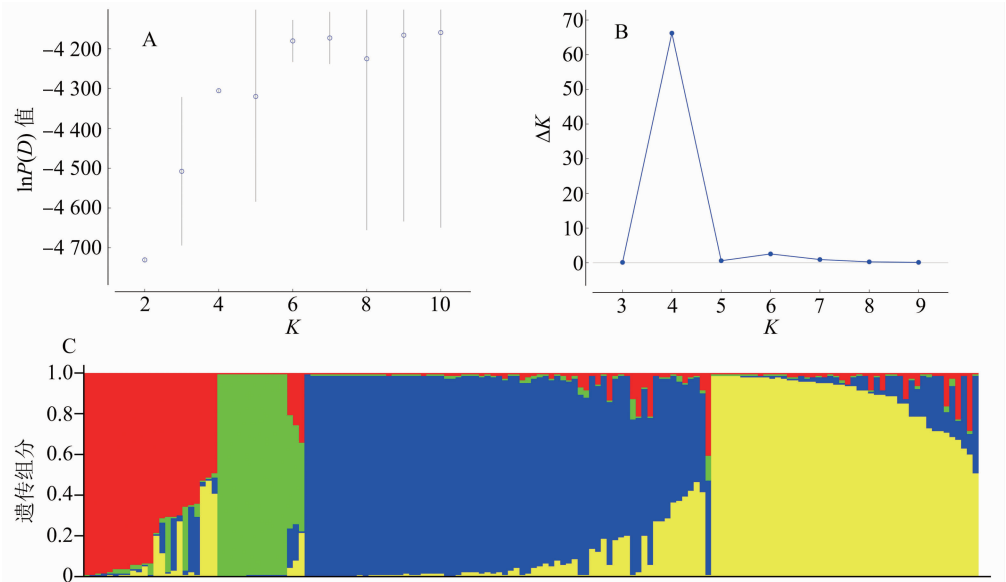
2.3 群体结构分析

为了揭示 154 份桃品种的群体结构,基于贝叶

斯的方法分析了不同类型桃品种的群体遗传结构。结果表明,当 $K=4$ 时,似然值最大,如图 3 - A、图 3 - B 所示。遗传多样性分析结果显示,将 154 份桃品种划分为 4 个亚群较为合适,分别命名为 I、II、III、IV (图 3 - C、图 4)。亚群 I 共有 23 份材料,主要是蟠桃和蜜桃品种;亚群 II 共有 15 份材料,主要为观赏类桃品种;亚群 III 有 70 份材料,大部分为油桃品种;亚群 IV 有 46 份材料,以蜜桃品种为主。从群体结构来看,大部分材料的亲缘关系比较单一,还有部分材料的亲缘关系比较复杂。分子变异方差分析 (AMOVA) 结果表明,90% 的变异来自于个体间,个体间的遗传变异大于群体间的遗传变异,同时群体内的遗传变异远高于群体间的遗传变异 (表 6)。群体间遗传分化的程度可以通过遗传分化指数来判定^[18],当 $0 \leq F_{st} < 0.05$ 时,表示遗传分化水平极低;当 $0.05 \leq F_{st} < 0.15$ 时,表明遗传分化处于中等水平;当 $0.15 \leq F_{st} < 0.25$ 时,表示遗传分化较大;当 $F_{st} \geq 0.25$ 时,表示群体间有很大的遗传分化。本研究中, $F_{st} = 0.099$,表明该群体间遗传分化程度中等。

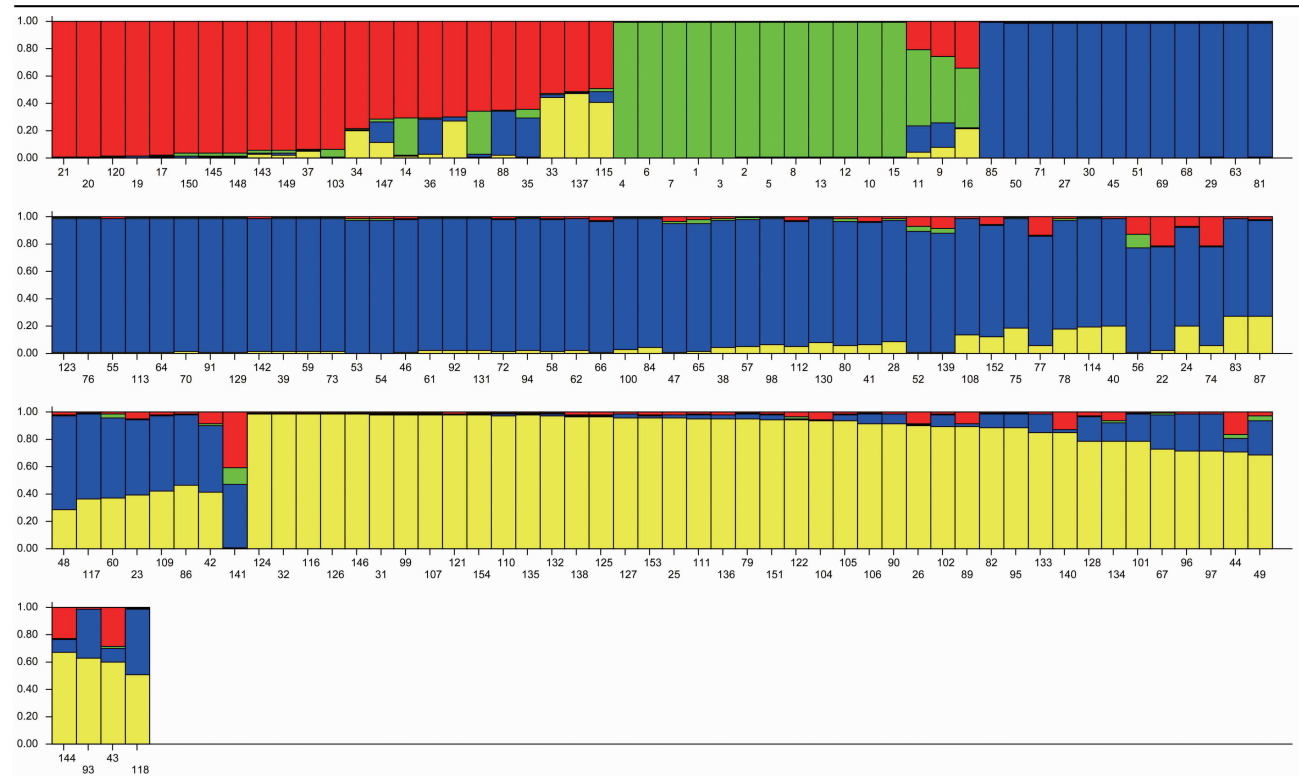
3 讨论

SSR 分子标记技术具有较高的稳定性和准确性,已被广泛应用于各类种质资源的鉴定和遗传多样性分析中。近年来,关于桃种质资源的 SSR 引物的研究也越来越多,Jouy 等选出 16 对具有高多态性



A—使用 $\ln P(D)$ 均值对种群结构进行估算的结果, K 值范围为 1~10; B—利用 $\ln P(D)$ 得到的 ΔK 变化曲线, K 值范围为 1~10; C—154 份桃个体呈现的不同颜色聚类。I—红色; II—绿色; III—蓝色; IV—黄色

图3 基于 10 个 SSR 分子标记对 154 个桃品种进行群体结构分析的结果



每个条形图代表 1 个个体，不同的颜色表示用 Q 值计算估计得到的各成分系数，不同颜色堆积表明该分类结果下每个样品的混合程度

图4 154 份桃品种个体的层次结构群体分析结果

表 6 154 份桃群体内和群体间的 AMOVA 分析结果

变异	自由度	总方差	变异组分	占总变异的比例 (%)	遗传分化指数 (F_{st})
群体间	4	106.237	0.373	10	0.099 ($P < 0.001$)
群体内个体间	149	604.905	0.671	18	
所有个体间	154	418.500	2.718	72	
总计	307	1 129.643	3.762	100	

的标记用于品种鉴定和保护^[19]。关利平等从已发表的桃基因组 SSR 引物中筛选出 10 对核心引物用于指纹库的构建^[20]。本研究所用 10 对引物的平均 PIC 值为 0.698 4,多态性含量均大于 0.5,高于叶宇芸等研究中所用的 20 对 SSR 引物^[21]。在本研究中,10 对引物等位基因平均值和有效等位基因数 ($N_a = 11.05, N_e = 4.168$) 均显著高于凌士鹏等的研究结果^[14,22-23],说明本研究选用的 10 个 SSR 标记多态性较为丰富,可用于桃品种的鉴定和遗传多样性分析。相较于李雄伟等构建的分子数据库^[13],本研究所用引物较少,但采用了精度更高的 ABI 3730 基因分析仪采集指纹,并用 SSR Analyser 软件处理,更利于数据的整合和可视化。从本研究中的聚类分析结果来看,报春 (T14) 等观赏桃类单独聚在一起,说明观赏桃与鲜食桃的遗传差异较大,其起源

可能存在较大差异,与周平等的研究结果^[24] 相似。而油蟠类型的品种在前人研究中也很少提到,该聚类结果显示,油蟠桃类品种在油桃、蟠桃群体中均有分布,说明油桃、蟠桃这 2 类群体间的杂交可以创制更多新种质。各亚群既有独立进化,又有部分品种出现高度遗传混合,亚群内品种间遗传相似度较高,尤其是对于同一育种单位、同一地区的品种。因此,将不同类型、不同地域的桃品种间进行杂交育种,有利于桃种质资源的创新。AMONA 分析结果显示,群体间的遗传变异小于群体内,与王淋等的研究结果^[3]一致,这种现象在核桃^[25]、油桐^[26] 等木本植物中也有发现,这也与多年生木本植物的遗传变异规律^[27-28] 相符。

DNA 指纹数据库的构建在品种管理和品种保护方面具有重要的应用价值。本研究利用 10 个 SSR

标记构建了 154 份桃的 DNA 指纹数据库,一方面可用于品种真实性的鉴定、品种管理和维权等,另一方面还可辅助 DUS 测试中近似品种的筛选。植物新品种保护条例规定,授权品种必须满足特异性 (distinctness)、一致性 (uniformity) 和稳定性 (stability) 的要求。近似品种选择是否合理会直接影响测试品种特异性的审查结果,而申请者了解的品种有限,原则上近似品种应从世界范围内的已知品种中选择。通过采集申请品种和目前市场上已知品种的指纹信息,构建桃分子指纹库,再利用 SSR 分子标记技术辅助筛选近似品种,结合桃已知品种表型数据库,能够进一步提高近似品种选择的准确性,加快品种授权的速度,并且降低重复授权的风险。另外,还可利用 DNA 指纹数据库的信息,对申请品种和已知品种进行聚类分析,根据品种间的遗传距离对品种进行分类和区分,这种方法也能够较好地辅助近似品种的选择。目前,DNA 指纹数据库已被应用于梨^[29]、枇杷^[30]等果树的近似品种的筛选和特异性判定中。

我国桃种质资源丰富,DNA 分子标记技术较传统表型分析具有较高的稳定性和准确性,被广泛应用于桃种质资源鉴定和遗传多样性分析方面,但是采用的标记类型比较单一,后续可加强对桃品种研究方面新型分子标记的开发,如单核苷酸多态性 (SNP)、表达序列标签微卫星 (EST-SSR)、多核苷酸多态性 (MNP) 等,同时建立桃品种的 DNA 指纹库,利用分子标记构建品种特异性指纹,为桃品种鉴定和品种权保护服务。

4 结论

本研究利用 10 对 SSR 核心引物构建了 154 份桃品种的 DNA 指纹数据库,能够进行品种鉴定并辅助 DUS 测试中近似品种的筛选。分析申请品种与已知品种的遗传多样性和群体结构,发现已知品种的遗传多样性更加丰富,同一育种单位的品种遗传距离较近,群体间的遗传分化程度呈中等水平,可为我国桃种质资源的创新提供一定参考价值。

参考文献:

- [1] Zeballos J L, Abidi W, Giménez S R, et al. Mapping QTLs associated with fruit quality traits in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] using SNP maps[J]. Tree Genetics and Genomes, 2016, 12(3): 1-17.
- [2] Cheng Z P, Huang H W. SSR fingerprinting Chinese peach cultivars and landraces (*Prunus persica*) and analysis of their genetic relationships[J]. Scientia Horticulturae, 2009, 120(2): 188-193.
- [3] 王 淋, 敖 敦, 包文泉, 等. 基于 SSR 分子标记的桃品种鉴别及指纹图谱构建[J]. 中南林业科技大学学报, 2021, 41(6): 131-138.
- [4] Guan L, Cao K, Li Y, et al. Detection and application of genome-wide variations in peach for association and genetic relationship analysis[J]. BMC Genetics, 2019, 20(1): 1-13.
- [5] 王富强, 李贝贝, 樊秀彩, 等. 葡萄品种 SSR 分子鉴定体系的建立及应用[J]. 果树学报, 2020, 37(9): 1281-1293.
- [6] 李 益, 马先锋, 唐 浩, 等. 柑橘品种鉴定的 SSR 标记开发和指纹图谱库构建[J]. 中国农业科学, 2018, 51(15): 2969-2979.
- [7] 王 娟, 宋尚伟. SSR 标记在苹果种质资源及遗传育种研究中的应用[J]. 河南农业科学, 2009(5): 16-19.
- [8] 高建有, 李洁维, 罗 庆, 等. 基于 SSR 分子标记的 63 份猕猴桃种质资源的遗传多样性[J]. 分子植物育种, 2022, 20(17): 5711-5723.
- [9] 付 涛, 王志龙, 林 立, 等. 樱属植物种质资源系统鉴定方法的研究[J]. 园艺学报, 2015, 42(12): 2455-2468.
- [10] Cheng Z P, Huang H W. SSR fingerprinting Chinese peach cultivars and landraces (*Prunus persica*) and analysis of their genetic relationships[J]. Scientia Horticulturae, 2009, 120(2): 188-193.
- [11] 葛志刚, 俞明亮, 马瑞娟, 等. 蟠桃种质 SSR 标记的遗传多样性分析[J]. 果树学报, 2009, 26(3): 300-305.
- [12] Xie R J, Li X W, Chai M L, et al. Evaluation of the genetic diversity of Asian peach accessions using a selected set of SSR markers[J]. Scientia Horticulturae, 2010, 125(4): 622-629.
- [13] 李雄伟, 孟宪桥, 贾惠娟, 等. 桃品种特异性荧光 SSR 分子标记数据库构建[J]. 果树学报, 2013, 30(6): 924-932.
- [14] 凌士鹏, 孙 萍, 林贤锐, 等. 基于 SSR 标记的桃种质资源遗传多样性研究[J]. 江西农业学报, 2018, 30(11): 14-18.
- [15] 魏姗姗, 杨敏生, 梁海永. 桃品种遗传多样性 SSR 分析[J]. 耕作与栽培, 2022, 42(1): 1-5.
- [16] 刘 伟, 李 森, 李桂祥, 等. 应用 SSR 荧光标记法构建山东地方桃种质资源分子身份证[J]. 山东农业科学, 2022, 54(2): 6-13.
- [17] Matthes N, Westphal K, Haldemann C, et al. Validation of a modified CTAB method for DNA extraction from protein-rich maize feedstuffs[J]. Journal of Consumer Protection and Food Safety, 2020, 15(4): 331-340.
- [18] Wright S. The genetical structure of populations[J]. Ann Eugen, 1949, 15(1): 323-354.
- [19] Jouy C, Gandelin M H, Guitouni C, et al. Management of peach tree reference collections: ongoing research & development program relevant to the community plant variety rights protection system[J]. Acta Horticulturae, 2012, 962(1): 51-56.
- [20] 关利平, 王玲玲, 曹 珂, 等. 桃品种鉴定的 SSR 核心引物筛选及其应用[J]. 中国果树, 2021, 6(1): 33-38.
- [21] 叶宇芸, 王清明, 马建伟, 等. 基于 SSR 标记的桃品种遗传多样性分析及遗传相似系数比较[J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(3): 39-45.

曾凡松,翟亚美,袁 斌,等. 小麦白粉菌 *BgtVosA*、*BgtVelB*、*BgtBrlA* 基因的克隆及在调控无性繁殖中的作用[J]. 江苏农业科学,2023,51(16):26–34.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2023.16.004

小麦白粉菌 *BgtVosA*、*BgtVelB*、*BgtBrlA* 基因的克隆 及在调控无性繁殖中的作用

曾凡松¹, 翟亚美¹, 袁 斌¹, 龚双军¹, 向礼波¹, 薛敏峰¹, 阙亚伟¹, 史文琦¹,
郑 磊², 张 强², 杨立军¹, 喻大昭¹

(1. 农业农村部华中作物有害生物综合治理重点实验室/农作物重大病虫害防控湖北省重点实验室/
湖北省农业科学院植保土肥研究所, 湖北武汉 430064; 2. 山东金正大生态工程集团股份有限公司, 山东临沂 276700)

摘要:为了明晰小麦白粉菌 *BgtVosA*、*BgtVelB*、*BgtBrlA* 基因的序列特点及它们在白粉菌产孢过程中的表达动态,为解析 velvet 蛋白在调控白粉菌无性繁殖中的作用提供理论依据,采用基于 RNA-seq 数据的克隆测序技术获得 *BgtVosA*、*BgtVelB*、*BgtBrlA* 基因的 CDS 序列,用生物信息学方法分析它们编码的蛋白质序列特征和空间结构,用 RT-qPCR 监测它们在白粉菌分生孢子形成时期的表达模式。结果表明,*BgtVosA*、*BgtVelB*、*BgtBrlA* 基因的 ORF 长度依次为 1470、1341、1143 bp,分别编码 489、446、380 个氨基酸,分子量在 54.0~48.0 ku,属于碱性、亲水性、热不稳定蛋白质,均含有核定位信号,不含跨膜螺旋和信号肽,空间结构呈现出近球形。*BgtVosA*、*BgtVelB*、*BgtBrlA* 分别与其他真菌来源的 *VosA*、*VelB*、*BrlA* 蛋白具有同源性,且与白粉菌同源蛋白具有更近的亲缘关系,氨基酸序列在白粉菌自然群体中均高度保守。*BgtVosA*、*BgtVelB* 属于典型的 velvet 蛋白家族成员,可能通过分子互作形成复合物,但其结构与构巢曲霉同源蛋白复合物存在明显差异。在小麦白粉菌无性繁殖阶段,*BgtVosA*、*BgtVelB* 基因均显著上调 ($P < 0.01$),*BgtBrlA* 表达水平没有显著变化 ($P > 0.05$)。DNA 结合区域分析推测 *BgtVosA*–*BgtVelB* 复合物不能靶向 *BgtBrlA* 启动子,调控其 *BgtBrlA* 的表达。*BgtVosA*、*BgtVelB* 基因在调控白粉菌无性生殖中起重要作用。

关键词:小麦白粉菌; Velvet 蛋白; *BrlA* 基因; 无性产孢; 表达分析

中图分类号:S435.121.4⁺6 **文献标志码:**A **文章编号:**1002–1302(2023)16–0026–09

小麦白粉病是由禾谷类白粉菌小麦专化型

收稿日期:2022–11–23

基金项目:国家小麦产业技术体系建设专项(编号:CARS–3–1–2)。

作者简介:曾凡松(1980—),男,湖北宜昌人,博士,副研究员,主要从事小麦病害防控研究。E-mail:zengfansong2005@126.com。

通信作者:杨立军,博士,研究员,主要从事小麦病害防控研究。

E-mail:Yanglijun1993@163.com。

(*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, *Bgt*)引起的重要病害。白粉病降低小麦的产量和品质,在我国常年发生面积约 700 万 hm^2 ,对小麦生产造成了严重威胁^[1]。禾谷类白粉菌只能在活的寄主上生活,可通过有性生殖和无性生殖繁衍后代,其中有性生殖每年只发生 1 次;而无性生殖可在 1 个生长季节发生很多次,产生的分生孢子不仅是无性世代的繁殖

[22] Ali F, Behzad G, Nazari A H, et al. Assessment of the genetic diversity of almond *Prunus dulcis* using microsatellite markers and morphological traits[J]. Iranian Journal of Biotechnology, 2008, 6(2): 98–106.

[23] 史红丽,韩明玉,赵彩平. 桃遗传多样性的 SARP 和 SSR 标记分析[J]. 华北农学报,2009,24(6):187–192.

[24] 周 平,郭 瑞,张小丹,等. SSR 分析 50 份桃种质资源遗传多样性[J]. 福建农业学报,2017,32(1):47–50.

[25] Massimo V, Cristina C, Steluta R, et al. Genetic diversity of walnut (*Juglans regia* L.) in the Eastern Italian Alps[J]. Forests, 2017, 8(3):81.

[26] Zhang L L, Liu X L, Peng J H. Genetic diversity and geographic differentiation of tung tree, *Vernicia fordii* (Euphorbiaceae), a

potential biodiesel plant species with low invasion risk [J]. Agronomy, 2019, 9(7):402.

[27] Yeh F C, Chong D K, Yang R C. RAPD variation within and among natural populations of trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) from Alberta[J]. Journal of Heredity, 1995, 86(6):454–460.

[28] Gillies A M, Navarro C, Lowe A J, et al. Genetic diversity in Mesoamerican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assessed using RAPDs[J]. Heredity, 1999, 83(6):722–732.

[29] 王 斐,张艳杰,欧春青,等. 梨品种 SSR 分子鉴定体系的建立及应用[J]. 分子植物育种,2021,19(22):7499–7509.

[30] 胡文舜,邓朝军,许奇志,等. 19 个枇杷杂交新品种(系)的 SSR 鉴定和指纹图谱构建[J]. 热带亚热带植物学报,2020,28(2):153–162.