

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201408028

王清明, 程怡, 马建伟, 等. 基于引物“随机组合”构建观赏桃 SSR 指纹图谱 [J]. 广西植物, 2016, 36(3):289-296

WANG QM, CHEN Y, MA JW, et al. Construction of SSR fingerprint for ornamental peach based on primers “random combination” [J]. *Guihaia*, 2016, 36(3):289-296

基于引物“随机组合”构建观赏桃 SSR 指纹图谱

王清明^{1,2}, 程怡¹, 马建伟¹, 张云婷¹, 张勇^{1*}

(1. 四川农业大学园艺学院, 成都 625014; 2. 广元市农业科学研究院, 四川 广元 628017)

摘要: 近年来,我国观赏桃新品种日渐繁多、名称混乱、市场难以监管,同时用以区分品种的 SSR 指纹图谱的构建方法在研究界无统一的科学标准,尤其是构成最终引物组合的核心引物的确定,具体操作流程层出不穷、五花八门。为探索筛选 SSR 指纹图谱核心引物的科学方法,同时构建观赏桃 SSR 指纹图谱,该研究选用 35 对已报道的 SSR 引物对 22 份观赏桃种质进行试验。结果表明:通过 PCR 扩增与分析,多态性较高的 8 对引物——候选引物总共扩增出 31 个多态性条带,变幅为 3~5 个, PIC 值变幅为 0.458~0.668, MI 值变幅为 1.374~3.340。采用“随机组合”法对 8 对引物进行 C_8^1 、 C_8^2 、 C_8^3 ... 依次分析,得到区分能力最强的 3 种不同的最少引物组合方式——候选组合,并能区分出 18 份种质,从中发现区分能力最强的 3 种引物组合方式并不都是由引物 PIC 值、alleles 数量或 MI 值等多态性指标最高的引物组成,而是由互补性最强的引物组成。选用组合内各引物多态性条带总数最多的组合方式“4-3”(BPPCT001+BPPCT015a+BPPCT017+BPPCT025)为 22 份观赏桃种质构建了指纹图谱。基于此,通过常规多态性指标筛选候选引物可以确定出单对引物鉴别能力最强的少量引物;通过“随机组合”筛选候选组合可以进一步确定出引物之间互补性最强的几种组合方式;根据组合内各引物的多态性条带总数确定最终核心引物可以确定出可扩容性最大的引物组合。该研究最终建立了候选引物——候选组合——核心引物组合“三步法”确定 SSR 指纹图谱核心引物组合的科学方法,不仅为 22 份供试观赏桃种质构建了 SSR 指纹图谱,也为其它作物 SSR 指纹图谱的构建提供了新的思路。

关键词: 观赏桃, 种质, SSR 标记, 分子身份证, 引物组合法

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2016)03-0289-08

Construction of SSR fingerprint for ornamental peach based on primers “random combination”

WANG Qing-Ming^{1,2}, CHENG Yi¹, MA Jian-Wei¹, ZHANG Yun-Ting¹, ZHANG Yong^{1*}

(1. College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; 2. Guangyuan Academy of Agricultural Sciences, Guangyuan 625014, China)

Abstract: In the recent years, the nomenclature of the cultivars of ornamental peach in China is falling into mess under the rapidly increasing of new cultivars. This makes it more and more hardly to deal with the market regulation. Meanwhile, there is no statistically unified scientific standard for the methods of constructing SSR fingerprint in research community, especially for filter the core primers that consisted of the finally unique group, the concrete operating procedures are plenty, variable and mess. In order to explore the statistically unified scientific method for filtering the core primers

收稿日期: 2014-12-28 修回日期: 2015-03-24

基金项目: 四川省教育厅重点项目(12ZZ011); 四川农业大学学科建设“双支”计划项目; 教育部留学归国人员资助项目[Supported by the Key Project of Sichuan Education Department(12ZZ011); Project Sponsored by SCAU; Foundation for Returned Overseas Students of Sichuan Province]。

作者简介: 王清明(1990-), 男, 四川达州人, 硕士, 主要从事园艺植物种质资源与遗传育种研究, (E-mail) 332686960@qq.com。

*通讯作者: 张勇, 博士, 副教授, 主要从事园艺植物种质资源与遗传育种研究, (E-mail) zhyong@sicau.edu.cn。

of the finally unique group and construct the SSR fingerprint for experimental ornamental peach, we selected 35 pairs of SSR primers reported previously to test on 22 ornamental peach germplasms. After PCR amplification and analysis firstly, 8 pairs of primers among them with high polymorphism called “candidate primers” were detected 31 polymorphism bands in total, ranging from 3–5 per pairs of primer. And the 8 pairs of primers gained 0.458–0.668 in PIC values and 1.374–3.340 in MI values correspondingly. Secondly, we analyzed C_8^1 、 C_8^2 、 C_8^3 ... successively by “random combinations” method, obtained 3 different primer combinations consisting with lest of primers called “candidate combination”, which possessed the strongest discrimination ability. All of the three could distinguish 18 accessions. And the 3 best primer groups were not consisted with the series of primers which possessed high leaves of PIC values, MI values or high numbers of alleles and so on, but a series primers which possessed an high leaves of complementarity. Lastly, the combination “4–3” (BPPCT001+BPPCT015a+BPPCT017+BPPCT025), which possessed the most polymorphism bands in total of the primers among groups, was finally chosen to establish the fingerprint for the 22 ornamental peach germplasms tested. The results showed that to filter candidate primers according to routine polymorphic index could select the few pairs of primers which possessed the strongest discrimination ability per pairs of primer; to filter candidate combination according to “random combination” could furtherly select the few compound modes which possessed the strongest complementarity; to filter core primer combination according to numbers of the bands in total of primers among groups could finally select the unique group which possessed the largest expandable sex. Therefore, “3 steps” for candidate primers-candidate combination-core primer combination was advocated as a scientific method to fitter the core primers of SSR fingerprint. It did constructed the SSR fingerprint for the 22 ornamental peach germplasms tested, and would provide a new approach to construct SSR fingerprints for other crops.

Key words: ornamental peach, germplasm, SSR marker, molecular ID, primer combination method

观赏桃 (Ornamental peach) 又称桃花, 属于蔷薇科李属植物, 包括桃 (*Prunus persica*) 以及桃与其近缘种的杂交种 (胡东燕和张佐双, 2010), 如 ‘白花山碧桃’。据文物考证, 桃在我国可追溯到 6 000 ~ 7 000 年前的新时代时期 (汪祖华和庄恩及, 2001), 而以花见长的观赏桃在唐朝就有专门栽培 (王仁裕和丁如明, 1985), 桃花品种到清代已是琳琅满目 (陈淏子和伊钦恒, 1985)。观赏桃在国外同样受到青睐, 其发展遍及五洲各地, 它明艳的气质深刻影响着世界园林历史的变迁 (Everett, 1967)。观赏桃的双重授粉方式 (自花授粉和异花授粉) 极大丰富着其种质资源, 据 2004 年的一次统计约有 267 个桃花名称 (胡东燕, 2004)。近 10 年来, 以中国农业科学院郑州果树研究所、江苏省农业科学院园艺研究所和北京市农林科学院林业果树研究所等单位为主要阵地的观赏桃新品种选育研究极大地推动了观赏桃种质资源的发展 (俞明亮等, 2010)。品种的丰富致使 “一物多名, 一名多物” 的现象在观赏桃上时有发生, 这个观赏桃种质创新工作和商品流通都造成了很大障碍。因此, 给不同的观赏桃种质冠以独一无二的特异标识成为亟待之求。

随着 SSR (Simple Sequence Repeat) 标记在不同物种中深度开发, SSR 指纹图谱 (Fingerprint) 在近年来蓬勃发展。SSR 指纹图谱是利用 SSR 扩增条

带为种质建立特异身份标识的一种 DNA 分子图谱, 或称分子身份证 (Molecular ID)。2005 年, SSR 标记操作简单、单位点扩增以及实验室间的高重复性等优势促成了国际植物品种权保护组织 (UPOU) 明确将其确定为构建品种指纹数据库的标准方法 (Jördens, 2005)。按照组成 SSR 指纹图谱所需的引物数量可以分为特征谱带法和引物组合法。特征谱带法可以追溯到 1984 年, 英国遗传学家 Jefferys et al (1985) 首次获得人源小卫星 DNA 与人体核 DNA 酶切片段的杂交带图纹, 并以此命名为指纹图谱 (Fingerprint), 它是将单对 (条) 引物或探针在种质上扩增出的特异条带作为该种质的指纹图谱。但特征谱带法的开放性和可容性差, 难以在大规模的种质鉴定中发挥作用。2000 年, 郭景伦等 (2000) 率先利用引物组合法在国内构建了玉米的 RAPD 指纹图谱。经过 10 余年的发展, 引物组合法中的核心引物法在 SSR 指纹图谱的运用中越来越受到青睐。但遗憾的是, 筛选核心引物作为构建 SSR 引物的关键步骤之一, 在以往的实践中未见统一的标准。大多研究是以等位基因多态性条带数量 (Polymorphic bands)、多态信息含量 (Polymorphism information content, PIC) 和标记索引指数 (Mark index, MI) 等多态性指标为标准进行选择。例如: 麻丽颖等 (2012) 单纯依靠各引物的 alleles 数目来选择核心引物, 陈

表 1 供试观赏桃材料

Table 1 Ornamental peach accession in this study

编号 No.	种质 Germplasm	主要形态特征 Main morphological characteristics
1	‘贺春’ ‘Hechun’	树型直立; 叶绿色; 花型月季型, 粉色 Tree upright; leaves green; flowers rose type, pink
2	‘春艳’ ‘Chunyan’	树型直立; 叶绿色; 花型单瓣型, 粉红色 Tree upright; leaves green; flowers single lobe type, pink-red
3	‘寿红’ ‘Shouhong’	树型矮型, 节间短; 叶绿色, 叶缘皱波状; 花型梅花型, 红色 Tree dwarf type, short internodes; leaf green, leaf margin crisped; flowers plum type, red
4	‘二色’ ‘Erse’	树型直立; 叶绿色; 花型月季型, 粉、红二色, 有粉红跳枝 Tree upright; leaves green; flowers rose type, pink and red, pink-red jump sticks
5	‘人面’ ‘Renmian’	树型直立; 叶绿色; 花型月季型, 粉色 Tree upright; leaves green; flowers rose type, pink
6	‘满山红’ ‘Manshanhong’	树型矮型, 节间短; 叶绿色, 花型牡丹型, 红色 Tree dwarf, short internodes; leaves green, flower peony type, red
7	‘白重瓣垂枝’ ‘Baichongbanchuizhi’	树型垂枝型; 叶绿色; 花型月季型, 白色 Tree shidare type; leaves green; flowers rose type, white
8	‘报春’ ‘Baochun’	树型直立; 叶绿色; 花型月季型, 粉红色 Tree upright; leaves green; flowers rose type, pink-red
9	‘锦春’ ‘Jinchun’	树型直立, 幼叶叶绿色, 成熟叶片紫红色, 花型单瓣型或梅花型, 红色 Tree upright, young leaves green, mature leaves purple, flowers single lobe type or plum type, red
10	‘红叶垂枝’ ‘Hongyechuizhi’	树型垂枝型; 叶绿色; 花型月季型, 红色 Tree shidare type; leaves green; flowers rose type, red
11	‘满天红’ ‘Mantianhong’	树型矮型, 节间短; 叶绿色; 花型月季型, 玫瑰红色 Tree dwarf type, short internodes; leaves green; flowers rose type, rose-red
12	‘红绣球’ ‘Hongxiuqiu’	树型直立; 叶绿色; 花型牡丹型, 红色 Tree upright; leaves green; flowers peony type, red
13	‘红菊花’ ‘Hongjuhua’	树型直立; 叶绿色, 边缘略卷; 花型菊花型, 花瓣披针卵形, 红色 Tree upright; leaves green, margin slightly roll; flowers chrysanthemum type, petals lanceolate-ovate, red
14	‘单粉’ ‘Danfen’	树型直立; 叶绿色; 花型单瓣型, 粉色 Tree upright; leaves green; flowers single lobe type, pink
15	‘红叶碧’ ‘Hongyebi’	树型直立; 幼叶叶绿色, 成熟叶片紫红色; 花型牡丹型, 红色 Tree upright; young leaves green, mature leaves purple-red; flowers peony type, red
16	‘洒红’ ‘Sahong’	树型直立; 叶绿色; 花型牡丹型, 粉、红、白复色 Tree upright; leaves green; flowers peony type, pink, red and white complex color
17	‘菊花’ ‘Juhua’	树型直立; 叶绿色, 边缘略卷; 花型菊花型, 花瓣披针卵形, 粉色 Tree upright; leaves green, margin slightly roll; flowers chrysanthemum type, petals lanceolate-ovate, pink
18	‘红雨垂枝’ ‘Hongyuchuizhi’	树型垂枝型; 叶绿色; 花型梅花型, 粉红色 Tree shidare type; leaves green; flowers plum type, pink-red
19	‘单瓣垂枝’ ‘Danbanchuizhi’	树型垂枝型; 叶绿色; 花型单瓣型, 红色 Tree shidare type; leaves green; flowers single lobe type, red
20	‘单粉垂枝’ ‘Danfenchuizhi’	树型垂枝型; 叶绿色; 花型单瓣型, 粉色 Tree shidare type; leaves green; flowers single lobe type, pink
21	‘朱粉垂枝’ ‘Zhufenchuizhi’	树型垂枝型; 叶绿色, 花型梅花型, 粉红色, 偶有粉色跳枝 Tree shidare type; leaves green; flower plum type, pink-red, pink jump sticks occasionally
22	‘羽衣垂枝’ ‘Yuyichuizhi’	树型垂枝型; 叶绿色, 叶缘细锯齿近细圆齿; 花型梅花型, 粉红色 Tree shidare type; leaves green; leaf margin serrulate and nearly crenulate; flower plum type, pink-red

昌文等(2011)以 PIC 值为主要标准逐一剔除对引物组合鉴定能力影响最小的引物来最终确定核心引物。引物组合法的精髓在于利用了不同引物在种质上的扩增效果具有差异的特点,它将多对引物的扩增条带进行有序组合,进而形成不同种质独一无二的指纹图谱。因此,充分利用不同引物扩增效果的互补性和降低核心引物组合扩增效果的冗余性,方可实现引物组合的最大效力。传统的筛选方法单纯依靠多态性指标,虽可以找到鉴别效力极高的引物,但是忽略了不同引物之间的效力重叠与互补的问题,即引物的多态性高低和由该引物组成的引物组合的多态性高低不能直接画等号。

SSR 指纹图谱不仅在玉米(盖树鹏等,2011)、水稻(陆徐忠等,2014)等大宗作物中取得了成功,且在桃等多种园艺植物中颇有报道。陈昌文等(2011)为 176 份桃品种构建了 SSR 指纹图谱,为今后有关桃的 SSR 指纹图谱研究提供了宝贵经验。但这项研究的材料主要集中在食用桃品种,而对于近 5 年来新报道的观赏桃品种和观食两用桃品种却较少涉及,如‘贺春’(刘佳琴等,2010)‘报春’(朱更瑞等,2011)‘锦春’(刘佳琴等,2011)‘红菊花’(王力荣等,2011)等。该研究基于引物组合“合力”考虑,将“随机组合”引入核心引物筛选的环节中,以期找到筛选核心引物的科学方法,并以此方法为 22 份观赏桃种质构建 SSR 指纹图谱。

1 材料与方 法

1.1 供试材料和 DNA 提取

22 份观赏桃种质来自四川农业大学教学科研园区,主要引自北京市农林科学研究所和中国农业科学院郑州果树研究所。每份种质分别调查统计 20 个个体,按胡东燕等(2010)对观赏桃不同树型、叶色、花型和花色等主要形态学性状的界定标准,对 22 份种质进行描述(表 1)。同时,从每份种质中选取 20 个个体进行混合取样,摘取春季幼嫩新叶,采用刘燕(2011)优化的 CTAB 法提取总 DNA。

1.2 SSR-PCR 反应

SSR 引物来源于 Dirlwanger et al(2002)报道在桃上的 35 对单位点扩增引物。

PCR 扩增在 Bio-rad DNA Engine Single bay PCR 仪(eppendorf,德国)上进行。反应体系为 25 μL ;DNA 模板 40 ng,引物各 10×10^{-9} mol, Mg^{2+} $50 \times$

10^{-6} mol, dNTPs 7.5×10^{-6} mol, $10 \times \text{Buffer}$ (free Mg^{2+}) 2.5 μL , Taq 酶 2 U,所有试剂购自天根生化科技(北京)有限公司。扩增程序是 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,32 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。退火温度根据生工生物工程(上海)股份有限公司提供的引物使用说明进行调整。

用 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 PCR 产物,用快速银染法(高东等,2009)进行染色。为保证试验的重复性,具有多态性的引物在最适条件下重复扩增 2 次,若电泳结果不一致,则增加第 3 次试验,以能够重复的结果为准。

1.3 数据分析

在相同电泳迁移率位置上,有扩增条带记为 1,无则记为 0,从而建立起 0,1 格式矩阵,统计各引物产生的等位基因数量(alleles 数目)、多态性信息量(polymorphism information content, PIC)和标记索引系数(marker index, MI)。PIC 值由公式“ $\text{PIC}_i = 1 - \sum P_{ij}^2$ ”计算(Senior et al,1998);MI 值由公式“ $\text{MI} = \text{alleles 数目} \times \text{PIC}$ ”计算(Smith et al,1997)。以“引物使用最少”为原则,确定核心引物组合。用“+、-”式构建 SSR 指纹图谱(陈琛等,2011)。

2 结果与分析

2.1 扩增结果

选取多态性较高、稳定性较好的 8 对引物对 22 份种质进行分析(表 2,表 3)。8 对引物在 22 份材料中共扩增出 31 个条带,且都是多态性条带,多态位点百分率为 100%,单对引物扩增条数变幅为 3~5,平均每对引物扩增出约 3.9 个多态性条带,扩增条带最多的 5 对引物分别是 BPPCT001、BPPCT017、BPPCT037、BPPCT015a、BPPCT025;8 对引物的 PIC 值变幅为 0.458~0.668,平均为 0.527,大小排前五的引物依次是 BPPCT001、BPPCT025、BPPCT017、BPPCT007 和 BPPCT023;8 对引物的 MI 值变幅为 1.374~3.340,平均为 2.055,大小排前五的引物依次是 BPPCT001、BPPCT017、BPPCT037、BPPCT025 和 BPPCT015a。三个指标在各引物中大小排序不完全一致。

2.2 引物组合

2.2.1 特征谱带法 35 对引物中, BPPCT014、BPPCT015a 和 BPPCT017 分别产生 1、2 和 2 个特征条带。其中, PIC 值仅为 0.082 的引物 BPPCT014 能够

表 2 8 对 SSR 引物序列信息表

Table 2 Sequence information of the 8 pairs of SSR primer filtered

引物名称 SSR name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	连锁群 Linkage group	退火温度 Annealing temperature (°C)
BPPCT001	AAT TCC CAA AGG ATG TGT ATG AG CAG GTG AAT GAG CCA AAG C	2	56
BPPCT007	TCA TTG CTC GTC ATC AGC CAG ATT TCT GAA GTT AGC GGT A	3	59
BPPCT015a	ATG GAA GGG AAG AGA AAT CG GTC ATC TCA GTC AAC TTT TCC G	4	57
BPPCT017	TTA AGA GTT TGT GAT GGG AAC C AAG CAT AAT TTA GCA TAA CCA AGC	5	56
BPPCT023	TGC AGC TCA TTA CCT TTT GC AGA TGT GCT CGT AGT TCG GAC	4	59
BPPCT025	TCC TGC GTA GAA GAA GGT AGC CGA CAT AAA GTC CAA ATG GC	6	58
BPPCT026	ATA CCT TTG CCA CTT GCG TGA GTT GGA AGA AAA CGT AAC A	5	55
BPPCT037	AAT TAA CTC CAA CAG CTC CA ATG GTT GCT TAA TTC AAT GG	5	58

表 3 8 对 SSR 引物的多态性信息

Table 3 Polymorphic information of the 8 pairs of SSR primers detected

引物名称 Primer name	多态条带 数量 No. of band	多态信 息含量 PIC	标记索 引指数 MI	引物名称 Primer name	多态条带 数量 No. of band	多态信 息含量 PIC	标记索 引指数 MI
BPPCT001	5	0.668	3.340	BPPCT023	3	0.513	1.539
BPPCT007	3	0.516	1.548	BPPCT025	4	0.623	2.492
BPPCT015a	4	0.499	1.996	BPPCT026	3	0.458	1.374
BPPCT017	5	0.567	2.835	BPPCT037	4	0.504	2.016
总计 Total	31	-		平均 Average	3.9	0.527	2.055

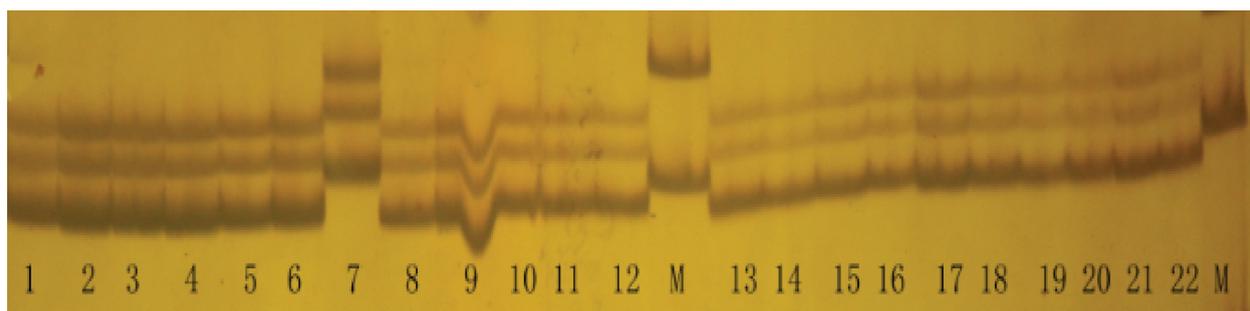


图 1 引物 BPPCT014 在 22 份观赏桃种质上扩增结果

Fig. 1 Amplification of BPPCT014 on 22 ornamental peach germplasms

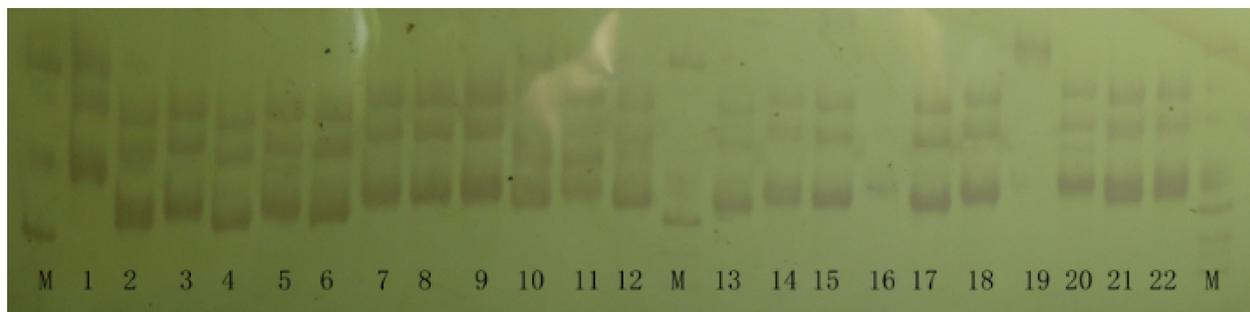


图 2 引物 BPPCT015a 在 22 份观赏桃种质上扩增结果

Fig. 2 Amplification of BPPCT015a on 22 ornamental peach germplasms

区分‘白重瓣垂枝’,且其他所有品种的谱带相同(图 1);而 PIC 值较大的 BPPCT015a、BPPCT017 各

自产生的 2 个特征图谱能够分别区分出‘贺春’和‘单瓣垂枝’(图 2)、“寿红”和‘白重瓣垂枝’(图 3)。

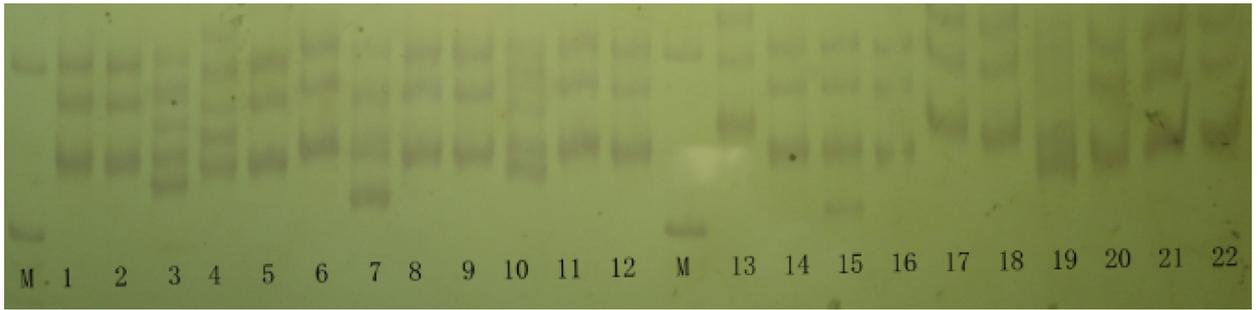


图 3 引物 BPPCT017 在 22 份观赏桃种质上扩增结果

Fig. 3 Amplification of BPPCT017 on 22 ornamental peach germplasms

表 4 8 对引物的随机组合

Table 4 Random combination of 8 primers

组合类型 Combination type	组合引物 Combination primer	区分种质数目 Distinguishable germplasms number	无法区分种质数目 Indistinguishable germplasms number
双引物组合 Two-combination	BPPCT001+ BPPCT015a	11	4、5、7、9、13、14、15、17、20、21、22
三引物组合 Three-combination	BPPCTR001+BPPCT007+BPPCT015a	16	5、13、17、20、21、22
	BPPCT001+BPPCT015+BPPCT025	16	7、9、13、17、21、22
	BPPCT001+BPPCT007+BPPCT017	16	12、13、16、17、21、22
	BPPCT001+BPPCT017+BPPCT025	16	12、13、16、17、21、22
四引物组合 (候选组合) Candidate-combination	BPPCT001+ BPPCT007+ BPPCT015a+ BPPCT017	18	13、17、21、22
	BPPCT001+ BPPCT007+ BPPCT015a+ BPPCT025	18	13、17、21、22
	BPPCT001+ BPPCT015a+ BPPCT017+ BPPCT025	18	13、17、21、22

表 5 四引物组合各指标总和

Table 5 Total amount of indicates of four primer combinations

引物组合 Primer combination	组合命名 Combination naming	等位基因总数 Total alleles	多态信息量 Total PIC	标记索引系数 Total MI
BPPCT001+ BPPCT007+ BPPCT015a+ BPPCT017	4-1	17	2.250	9.719
BPPCT001+ BPPCT007+ BPPCT015a+ BPPCT025	4-2	16	2.306	9.376
BPPCT001+ BPPCT015a+ BPPCT017+ BPPCT025	4-3	18	2.357	10.663

2.2.2 引物组合法 将 8 对 SSR 引物依次进行 C_8^1 、 C_8^2 、 C_8^3 ... 随机组合, 直至能够完全区分出 22 个观赏桃品种(表 4)。 C_8^1 组合显示了所有引物均无法区分 13、17 和 21、22 两对种质, 而剩余的 18 份种质可以被 3 种不同的 C_8^4 组合(下文简称“候选组合”)完全区分, 平均每对引物区分 4.5 份种质。 C_8^4 组合还显示了 BPPCT001 是唯一能够区分开 9、11 和 14 的引物, BPPCT015a 是唯一能够区分 12 和 16 的引物, 奠定了它们在本研究中作为核心引物理论上的必要性; 随机组合时, 3 种“候选组合”也都包含了这两对引物, 用实践验证了推定。

综合表 3 和表 4 的数据可以看出, 3 种“候选组合”所覆盖的 5 对引物(BPPCT001、BPPCT007、BP-

PCT015a、BPPCT017、BPPCT025) 其多态性条带数目、PIC 值、MI 值均比较高。但这个现象并不绝对, 例如, BPPCT007 的多态性条带数目和 MI 值均低于 BPPCT037, 却被 2 种“候选组合”选中, 而 BPPCT037 相应地被摒弃; BPPCT015a 作为 3 种“候选组合”的必须引物, 其 PIC 值大小在 8 对引物中仅排名第 7。

2.3 指纹图谱

3 种“候选组合”中, “4-3”(BPPCT001+ BPPCT015a+ BPPCT017+ BPPCT025) 的总多态性条带数目、总 PIC 值和总 MI 值均最大(表 5)。将总多态性条带数目最大的组合“4-3”确定为最佳随机组合, 即核心引物组合, 并为 22 份观赏桃种质构建 SSR

表 6 22 个观赏桃品种的 SSR 指纹图谱
Table 6 SSR fingerprints of 22 ornamental peaches

引物名称 Primer name	SSR 指纹 SSR fingerprint																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
BPPCT001	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
BPPCT001	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BPPCT001	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BPPCT001	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
BPPCT001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
BPPCT015a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
BPPCT015a	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BPPCT015a	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
BPPCT015a	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+
BPPCT017	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
BPPCT017	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
BPPCT017	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BPPCT017	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BPPCT017	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BPPCT025	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
BPPCT025	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BPPCT025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
BPPCT025	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-

指纹图谱(表 6)。

3 讨论与结论

3.1 引物多态性

扩增结果揭示了本研究中的 8 对引物的多态性比较丰富。在引用相同引物来源的桃的研究中,陈霖等(2010)在 42 份观赏桃种质中平均每对引物扩增出 7.75 个多态性条带,陈昌文等(2011)在 176 份中国桃种质中平均每对引物扩增出 12.7 个多态性条带,都高于本研究中的 3.9 个多态性条带。但这并不反映本研究中的引物多态性低,相反,它只从实践上验证了供试种质数量越大,遗传背景越丰富,种质之间的变异空间越大,越容易扩增出更丰富的多态性条带。本研究 8 对引物的多态性条带比例均为 100%,高于陈霖等(2010)的研究, PIC 值变幅为 0.458~0.668, MI 值变幅为 1.374~3.340,足见其多态性均比较丰富。

3.2 核心引物确定

最早的指纹图谱可以归结为特征谱带法,是利用单对引物对具有特殊谱带的种质进行标记;但当供试的种质材料数目扩大时,特征谱带法的特殊谱带有可能失去其特殊性。为解决特征谱带法的局限性,郭景伦等(2000)提出了引物组合法,它利用不

同引物间的特异性“互补”来为种质构建组合指纹(后称“复指纹”),然后以“复指纹”的形式来实现对规模较大的种质进行区分。由这种“复指纹”所构建的指纹图谱在理论上具有更好的“扩容性”,即当新的种质加入并获得其特有“复指纹”时,群体内原有种质的特殊“复指纹”能够继续保持其特殊性。“扩容性”的大小可以反映出引物组合对种质的区分能力,而“扩容性”的大小不仅与组合中各引物自身的多态性有关,更直接取决于引物组合的多态性。因此,核心引物的选择至关重要,其选择程序应具有科学性。王风格等(2003)便指出了核心引物的筛选应遵循一定的算法。

本研究先以 alleles 数目、PIC 值、MI 值等主要多态性指标以及引物扩增的稳定重复性确定了 8 对引物作为“候选引物”,然后采用随机组合的方式选出区分能力最强的 3 种 C_8^4 组合作为“候选组合”,最后以总 alleles 数目最大的“4-3”作为最佳随机组合,即核心引物组合。这种核心引物组合的筛选方式延续了传统上依靠多态性指标的方法,同时还引入了数学上的“随机组合”。通过“随机组合”,所有候选引物可以进行 C_8^1 、 C_8^2 、 C_8^3 ... 无隙组合,从而规避了多态性指标同样很高但其多态信息情况过于相似,多态性不能效力互补的几对引物组合而成的区分能力“1+1<2”的情况。多态性指标统计表明,等

位基因多态性位点数目、PIC 值和 MI 值 3 个指标在 8 对引物中表现不完全一致,与王风格等(2003)的结果一同指出了不能单纯依靠多态性指标进行核心引物的筛选,引物的多态性高低与引物组合的多态性高低不能画等号。通过“随机组合”,本研究成功规避了 alleles 数目和 MI 值均高于 BPPCT007 的 BPPCT037,并遴选出 PIC 值极低但能和其它候选引物的多态信息有效互补的 BPPCT015a。足见,“随机组合”是从“候选引物”中找出区分能力最强的最少引物组合的科学方法。引物的多态性来源于 alleles 在不同种质间的变异,而 PIC 值是衡量引物多态性最主要的指标之一。因此,当“随机组合”结果出现 2 种或 2 种以上的最少引物组合方式时,应该以 alleles 数目为第一标准、PIC 值为第二标准、其它指标次之来最终确定出唯一的最佳随机组合。本研究以 alleles 数目为标准从 3 种“候选组合”中选出了“4-3”作为最佳随机组合,并构建指纹图谱。

随着种质资源的日益丰富,商业流通对构建 DNA 指纹图谱有着深刻要求;再者,由于种质之间遗传信息不断交叉,不同种质的区分难度也不断增加,各物种高质量的核心引物组合亟待确立。笔者倡议以“三步法”确立核心引物组合的引物:首先以稳定重复性、alleles 数目、PIC 值等为第一、二、三…指标选出“候选引物”,然后以“随机组合”从“候选引物”中选出“候选组合”,最后分别以总 alleles 数目、PIC 值等为第一、二…指标确定出最佳随机组合,即核心引物组合。

参考文献:

CHEN C, ZHANG XT, CHEN F, et al, 2011. Establishment of SSR finger printing on Autumn Cabbage and their parents [J]. Acta Horti Sin, 38(1): 159-164. [陈琛, 张兴桃, 程斐, 等, 2011. 秋甘蓝品种的 SSR 指纹图谱的构建 [J]. 园艺学报, 38(1): 159-164.]

CHEN CW, CAO K, WANG LR, et al, 2011. Molecular ID establishment of main China peach varieties and peach related species [J]. Sci Agric Sin, 44(10): 2 081-2 093. [陈昌文, 曹珂, 王力荣, 等, 2011. 中国桃主要品种资源及其野生近缘种的分子身份证构建 [J]. 中国农业科学, 44(10): 2 081-2 093.]

CHEN HZ, YI QH, 1985. Flower kingdom [M]. Beijing: Agriculture Publishing House: 172-175. [陈洪子, 伊钦恒, 1985. 花镜 [M]. 北京: 农业出版社: 172-175.]

CHEN J, MA RJ, YU ML, et al, 2010. Research progress on ornamental peach germplasm innovative utilization [J]. Jiangsu Agric Sci, (5): 237-240. [陈霁, 马瑞娟, 俞明亮, 等, 2010. 观赏桃种质资源与创新利用研究进展 [J]. 江苏农业科学, (5): 237-240.]

DIRLEWANGER E, COSSON E, TAVAUD M, et al, 2002. Devel-

opment of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.) [J]. Theor Appl Gen, 105: 127-138.

EVERETT TH, 1967. New illustrated encyclopedia of gardening [M]. New York: New York Botanical Garden Press.

GAI SP, WANG RX, HUANG JY, 2011. Fingerprinting establishment of maize elite inbred lines and hybrids by SSR Markers in Shandong Province [J]. Chin Agric Sci Bull, 27(24): 40-44. [盖树鹏, 王日新, 黄进勇, 2011. 山东省玉米骨干自交系和杂交种的 SSR 指纹图谱构建 [J]. 中国农学通报, 27(24): 40-44.]

GAO D, DU F, ZHU YY, 2009. Low-background and high-resolution contracted silver-stained method in polyacrylamide gels electrophoresis [J]. Hereditas, 31(6): 668-673. [高东, 杜飞, 朱有勇, 2009. 低背景、高分辨率 PAGE 简易银染法 [J]. 遗传, 31(6): 668-673.]

GUO JL, ZHAO JR, KONG YF, et al, 2000. Application research of primer combination method on identification authenticity of maize inbred lines using DNA fingerprinting [J]. ACTA Agric Boreal-Sin, 15(2): 27-31. [郭景伦, 赵久然, 孔艳芳, 等, 2000. 引物组合法在利用 DNA 指纹鉴定玉米自交系真伪中的应用研究 [J]. 华北农学报, 15(2): 27-31.]

HU DY, 2004. Studies on ornamental peaches systematics using molecular markers [D]. Beijing: Beijing Forestry University. [胡东燕, 2004. 分子标记技术在桃花品种系统分类中的应用研究 [D]. 北京: 北京林业大学.]

HU DY, ZHANG ZQ, 2010. Ornamental peaches [M]. Beijing: China Forestry Publishing House: 37-47. [胡东燕, 张佐双, 2010. 观赏桃 [M]. 北京: 中国林业出版社: 37-47.]

JEFFREYS AJ, WILSON V, THEIN SL, 1985. Individual-specific fingerprints of human DNA [J]. Nature, 316(7): 76-79.

JÖRDENS R, 2005. Progress of plant variety protection based on the International Convention for the protection of new varieties of plants (UPOV Convention) [J]. World Patent Inform, 27(3): 232-243.

LIU JC, WANG SD, LAN YP, et al, 2011. Breeding of an edible ornamental nectarine 'Jinchun' [J]. J Fruit Sci, 28(5): 934-935. [刘佳琴, 王尚德, 兰彦平, 等, 2011. 观食两用桃新品种——锦春的选育 [J]. 果树学报, 28(5): 934-935.]

LIU JC, WANG SD, ZHOU LD, et al, 2010. New peach cultivars 'Hechun', 'Yongchun' used for table and ornament [J]. Acta Horti Sin, 37(5): 843-844. [刘佳琴, 王尚德, 周连弟, 等, 2010. 鲜食观赏兼用桃新品种“贺春”和“咏春” [J]. 园艺学报, 37(5): 843-844.]

LIU Y, 2011. Genetic diversity of 13 ornamental peach by RAPD and ISSR [D]. Ya'an: Sichuan Agriculture University. [刘燕, 2011. 利用 RAPD 和 ISSR 技术对 13 个观赏桃品种的遗传多样性分析 [D]. 雅安: 四川农业大学.]

LU XZ, NI JL, LI L, et al, 2014. Construction of rice variety identity using SSR fingerprint and commodity information [J]. Acta Agron Sin, 40(5): 823-829. [陆徐忠, 倪金龙, 李莉, 等, 2014. 利用 SSR 分子指纹和商品信息构建水稻品种身份证 [J]. 作物学报, 40(5): 823-829.]

MA LY, KONG DC, LIU HB, et al, 2012. Construction of SSR Fingerprint on 36 Chinese Jujube cultivars [J]. Acta Horti Sin, 39(4): (下转第 341 页 Continue on page 341)