

# 早熟油桃紫金红 1 号亲本的 SSR 鉴定

沈志军, 马瑞娟, 俞明亮, 宋宏峰, 蔡志翔

(江苏省农业科学院 园艺研究所, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 油桃新品种紫金红 1 号是从早熟油桃中实生选育的, 果实经济性状优良。以 23 个疑似亲本的油桃品种为试材, 利用 SSR 标记共显性的特点, 进行了紫金红 1 号亲本鉴定。SSR-PCR 扩增结果表明, 163 对 SSR 引物中有 48 对能在试材中扩增出多态性良好、谱带清晰的产物, 其中 17 对 SSR 引物扩增出的 20 个 SSR 位点呈现共显性带型。基于 185 个 SSR 等位基因信息的亲缘关系分析发现, 紫金红 1 号与早红 2 号之间的亲缘关系最近, 相似系数为 0.881, 在树状图上也聚为一类。经共显性 SSR 位点遗传规律分析, 使用 3 个 SSR 引物(CPPCT15、BPPCT031、UDP96-018)的扩增位点, 可排除早红 2 号以外的其他品种作为紫金红 1 号亲本的可能。认为早红 2 号自交获得紫金红 1 号可能性很大, 或至少是其亲本之一。

**关键词:** 油桃; SSR; 亲本鉴定

中图分类号: S662.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)06-0205-05

## Parental Analysis of New Nectarine Variety Zijinhong1 by SSR

SHEN Zhi-jun, MA Rui-juan, YU Ming-liang, SONG Hong-feng, CAI Zhi-xiang

(Institute of Horticulture, Jiangsu Academy of Agriculture Science, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** New nectarine variety Zijinhong1 was selected from naturally pollinated seedlings of early matured nectarine because of its superior quality in economic traits. However, its parents were still unknown. Twenty three nectarine varieties which were suspected to be its parents, as well as Zijinhong1 itself, were used as plant material, and SSR markers for its co-dominant characteristic were used to analyze the probable parents. The results of SSR-PCR showed that 48 primers out of 163 could produce polymorphism and legible alleles. Twenty loci amplified by 17 primers performed co-dominant pattern. Genetic relationship based on 185 alleles showed that EarlyRed 2 was the most similar variety to Zijinhong1 with a SM coefficient of 0.881, and the two varieties were clustered into one group in dendrograme. According to the statistic of inheritance of co-dominant loci, three loci amplified by CPPCT15, BPPCT031 and UDP96-018, respectively, could dispose all tested varieties possibly to be the parents of Zijinhong1 except EarlyRed 2. So Zijinhong1 may most probably selected from self-cross seedlings of EarlyRed 2, or EarlyRed 2 was at least one parent of Zijinhong1.

**Key words:** Nectarine; SSR; Parental analysis

油桃(*Prunus persica* var. *nectarine* Maxim)是普通桃(*P. persica* (L.) Batsch)变种, 其果皮无毛、色泽艳丽、果实商品价值高, 现已成为桃品种改良和生产发展的重要方向之一。我国油桃育种开始于 20 世纪 80 年代, 现已推出瑞光系列、中油系列、沪油系列, 以及玫瑰红、双喜红、霞光等品种, 为我国油桃产业的发展起到巨大的推动作用。

紫金红 1 号油桃系江苏省农科院园艺所 2007

年通过江苏省农林厅鉴定的早熟油桃新品种, 是以早熟油桃的自然实生种子经胚拯救培养培育而成的早熟油桃品种<sup>[1]</sup>, 该品种表现早熟(在南京地区 6 月上旬成熟); 外观美丽(果实圆形, 果面全红或近全红); 果形大(平均单果重 125.4 g, 最大 200.0 g); 风味品质优良(果肉黄色, 硬溶质, 风味甜); 早果, 丰产, 适应南方产区高温多湿气候等特点。紫金红 1 号油桃现已在江苏及周边桃产区推广, 表现优良, 且

收稿日期: 2009-09-03

基金项目: 国家自然科学基金(30871681); 国家“863”项目(2006AA100108); 国家科技基础条件平台项目(2005DKA21002-21); 江苏省科技基础设施建设计划(BM2008008); 现代农业产业技术体系建设资金(nycyts-31)。

作者简介: 沈志军(1978-), 男, 江苏如皋人, 助研, 硕士, 主要从事桃种质资源收集和育种研究。

通讯作者: 俞明亮(1965-), 男, 江苏姜堰人, 研究员, 博士, 主要从事桃种质资源和育种研究。

在南方桃产区具有进一步辐射推广的潜力。

SSR(Simple sequence repeat)作为一种共显性,多态性程度高,且结果稳定的分子标记已广泛应用到桃指纹图谱构建<sup>[2-4]</sup>、亲缘关系分析<sup>[5,6]</sup>、性状标记<sup>[7,8]</sup>、遗传连锁图谱构建<sup>[9,10]</sup>等诸多领域。SSR 标记也成功应用于日本桃的亲本分析中,并证实 SSR 是进行桃亲本分析的一种有效标记<sup>[11,12]</sup>。本研究采用桃中开发的 SSR 标记,进行紫金红 1 号油桃的亲本鉴定,从而为推测紫金红 1 号油桃的亲本提供分子依据。

# 1 材料和方法

## 1.1 植物材料

根据紫金红 1 号品种选育记载,23 个疑似亲本的油桃品种被选为试材(表 1),进行 SSR 分析。所有试材来源于国家果树种质南京桃圃。

表 1 紫金红 1 号与其他品种的 SM 相似性系数

Tab.1 Similarity coefficient between Zijinhong1 and other varieties

| 编号<br>Code | 品种<br>Variety       | 相似系数<br>Similarity<br>coefficient |
|------------|---------------------|-----------------------------------|
| N01        | 超五月火 Chaowuyuehuo   | 0.861                             |
| N02        | 华光 Huaguang         | 0.735                             |
| N03        | 曙光 Shuguang         | 0.788                             |
| N04        | 艳光 Yanguang         | 0.834                             |
| N05        | 沪油 002 Huyou002     | 0.735                             |
| N06        | 金山早红 Jinshanzaohong | 0.821                             |
| N07        | 瑞光 2 号 Ruiguang 2   | 0.768                             |
| N08        | 瑞光 3 号 Ruiguang 3   | 0.795                             |
| N09        | 瑞光 22 号 Ruiguang 22 | 0.828                             |
| N10        | 阿姆肯 Armking         | 0.841                             |
| N11        | 早红 2 号 EarlyRed 2   | 0.881                             |
| N12        | 601                 | 0.795                             |
| N13        | 801                 | 0.748                             |
| N14        | 阳光 Sunraycer        | 0.709                             |
| N15        | 五月火 Mayfire         | 0.868                             |
| N16        | 紫金红 1 号 Zijinhong 1 | 1.000                             |
| N17        | 莱特甜 Laitetian       | 0.821                             |
| N18        | 早丰甜 Zaofengtian     | 0.828                             |
| N19        | 双喜红 Shuangxihong    | 0.848                             |
| N20        | 早红珠 Zaohongzhu      | 0.828                             |
| N21        | 瑞光 18 号 Ruiguang 18 | 0.801                             |
| N22        | 瑞光 28 号 Ruiguang 28 | 0.762                             |
| N23        | 布雷顶峰 Buleidingfeng  | 0.841                             |
| N24        | 美味 Flavortop        | 0.781                             |

## 1.2 试验方法

春季取新梢顶部的幼嫩叶片,用液氮研磨成粉末状,采用俞明亮等<sup>[13]</sup>的改良 SDS 法提取基因组 DNA。

SSR 引物 163 对<sup>[14-17]</sup>由上海英俊生物技术有限公司合成,SSR-PCR 反应体系和反应程序采用沈志军等<sup>[18]</sup>在桃中优化的方法。经筛选获得 48 对多态性良好,扩增谱带清晰的 SSR 引物用于紫金红 1 号的亲本分析。

## 1.3 结果统计和分析

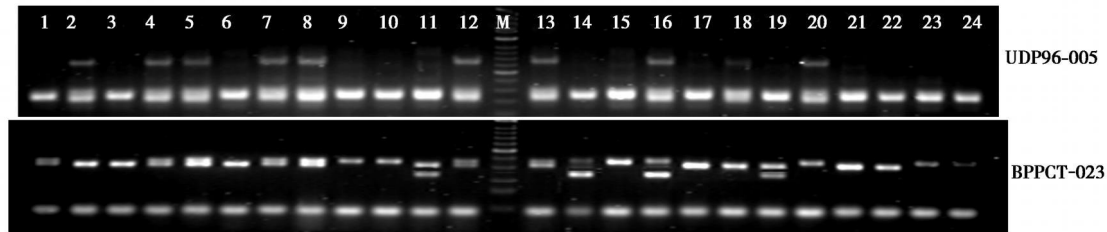
亲本分析使用 2 种方法:①亲缘关系分析法,根据条带有无统计 1/0 矩阵,用 NTSYS 软件计算 SM 相似系数,UPGMA 法进行聚类<sup>[19]</sup>;④共显性标记遗传规律分析法,因共显性标记能区分显性纯合(AA)、隐性纯合(aa)和杂合(Aa)3 种基因型,根据同一位点共显性标记的 5 种遗传规律(即  $AA \times aa = Aa$ ,  $Aa \times aa = Aa + aa$ ,  $Aa \times Aa = AA + Aa + aa$ ,  $AA \times AA = AA$ ,  $aa \times aa = aa$ ),进行亲本的推断。

# 2 结果与分析

## 2.1 SSR 扩增结果

163 对 SSR 引物中有 48 对能扩增出多态性良好、谱带清晰的产物;48 对 SSR 引物共扩增出 185 个 SSR 等位基因,每个 SSR 引物扩增等位基因数为 1 个到 12 个不等,平均每对引物的等位基因数为 3.85 个。其中 17 对引物的扩增出的 20 个位点在 24 个油桃品种呈现出典型的共显性带型,分别为 UDP96-001、UDP96-003、UDP96-008、UDP96-018、UDP98-407、UDP98-409、BPPCT 008、BPPCT 015、BPPCT 020、BPPCT 022、BPPCT 023、BPPCT 031、BPPCT 035、pchms2、pchgms29、MA064a、CPPCT5。

SSR 引物对油桃品种具有较强的鉴别能力。48 对 SSR 引物的扩增谱带,能区分 24 份试材中的 22 个,金山早红与莱特甜、瑞光 3 号与 601 分别具有完全一致的指纹图谱。紫金红 1 号的 SSR 指纹比较容易识别,仅使用 UDP96-005 和 BPPCT 023 2 个引物组合即可与其他品种区分(图 1)。



泳道编号对应表 1 中油桃品种编号,M 为标准 DNA。

The lane code coincides with the variety code in Table 1, and M is standard DNA marker.

图 1 引物 UDP96-005 和 BPPCT 023 在 24 个油桃品种中的扩增谱带

Fig.1 SSR-PCR products of 24 nectarine varieties amplified by UDP96-005 and BPPCT 023

## 2.2 紫金红1号与其他油桃品种的相似性及亲缘关系

经NTSYS统计软件计算,紫金红1号与其他油桃品种的SM相似系数为0.709~0.881,相似性系数最高的为早红2号(表1),其次为五月火、超五月火、双喜红、布雷顶峰、阿姆肯、艳光等品种。根据相似系数矩阵UPGMA法聚类获得的亲缘关系树状图中(图2),紫金红1号先与早红2号聚为一类,再与曙光、金山早红、莱特甜、双喜红、早丰甜聚为一个小组,因而这些品种是紫金红1号亲本的可能性比较大。

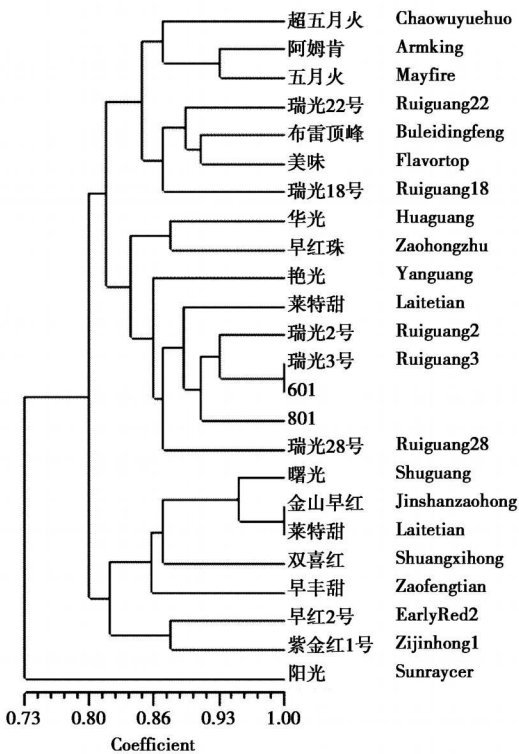


图2 24个油桃品种的亲缘关系树状图

Fig. 2 Dendrogram of 24 nectarine varieties based on SSR information

## 2.3 SSR共显性遗传规律分析紫金红1号的亲本

共显性标记能区分AA、aa、Aa3种基因型,并在后代中呈现与质量性状类似的遗传规律,因而可用于亲本分析。如引物CPPCT5在24个油桃品种中表现为3种带型(图3),即两种纯合类型(—、—)和杂合类型(=),若假设紫金红1号基因型(泳道16)为显性纯合(AA),其位点的遗传可通过3种途径获得:<sup>①</sup>AA自交,即泳道15基因型进行自交,只有1种可能;<sup>④</sup>Aa杂合类型自交,即(泳道2、9、10、11、14、20、21、22、23、24的基因型)×(泳道2、9、10、11、14、20、21、22、23、24的基因型),共有55种可能;<sup>④</sup>AA×Aa侧交,获得AA和Aa基因型,即泳道15基因型×(泳道2、9、10、11、14、20、21、22、23、24),共有10种可

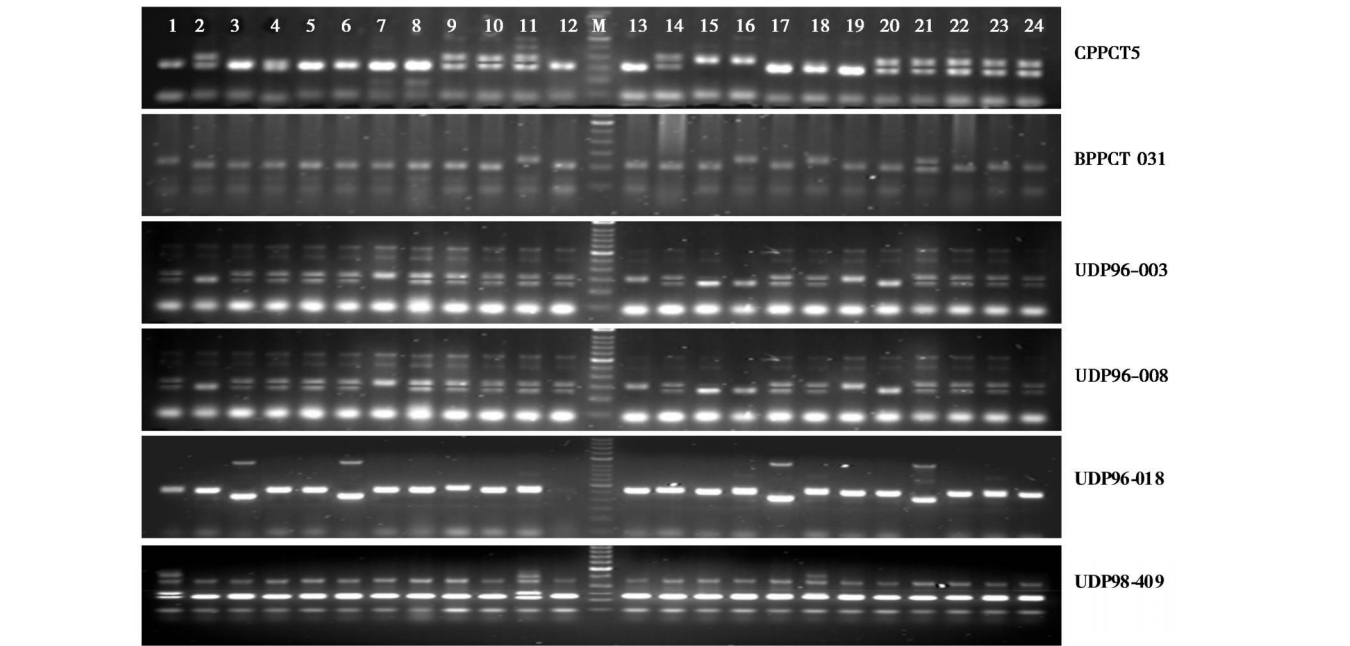
能。因而引物CPPCT15的扩增结果可以推测,紫金红1号基因型获有66种可能。另一方面,使用排除法可去除非紫金红1号基因型获得的途径:<sup>①</sup>aa基因型自交,即(泳道1、3、4、5、6、7、8、12、13、17、18、19基因型)×(泳道1、3、4、5、6、7、8、12、13、17、18、19基因型),共排除78种;<sup>④</sup>aa×Aa侧交,即(泳道1、3、4、5、6、7、8、12、13、17、18、19基因型)×(泳道2、9、10、11、14、20、21、22、23、24的基因型),共排除120种可能;<sup>④</sup>aa×AA杂交,即(泳道1、3、4、5、6、7、8、12、13、17、18、19基因型)×泳道15基因型,共排除12种可能。因而引物CPPCT15的扩增结果共可排除210种可能。进而可以排除泳道1、3、4、5、6、7、8、12、13、17、18、19基因型作为紫金红1号的亲本可能性,因为这12个基因型无论是进行自交(aa×aa),侧交(aa×Aa),还是杂交(aa×AA)均不能获得紫金红1号油桃的基因型(AA)。

同理,引物BPPCT031扩增产物可排除泳道2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15、17、19、20、22、23、24共19个品种作为亲本的可能;引物UDP96-003可为排除泳道13、19基因型作为亲本的可能;引物UDP96-008可排除泳道7、13、19基因型作为亲本;引物UDP96-018可以排除泳道3、7、17、21基因型。但并非所有引物的扩增产物均可用以排除亲本,如UDP98-409,扩增产物中有2个均表现出共显性SSR位点,但不能排除任何一种基因型作为紫金红1号油桃亲本的可能。

使用上述5对SSR引物中的至少3对(CPPCT15、BPPCT031、UDP96-018)即可排除除早红2号(泳道11)以外的所有品种作为紫金红1号亲本的可能,且其他呈共显性的SSR引物扩增产物也表明早红2号自交带型可遗传给紫金红1号。因而认为紫金红1号是早红2号实生后代的可能性较大。

## 3 讨论

共显性标记在同一位点能体现出3种基因型(AA、aa、Aa),显性标记在同一位点只能体现出两种基因型(AA、aa),因而在亲本分析中共显性标记更能体现出优势。在桃研究领域,日本学者Yamamoto等<sup>[11]</sup>用10对SSR引物获得的43个SSR位点进行了冈山白的亲本分析,发现冈山白遗传了所有的上海水蜜的SSR位点,两者之间有很近的亲缘关系,认为冈山白很有可能就是上海水蜜的后代。因为几乎所有日本栽培桃品种都是冈山白的后代,或是冈山白的实生变异或芽变,这也进一步从分子水平上证实了日本桃起源于中国。同时,他还用SSR标记



泳道编号对应表 1 中油桃品种编号, M 为标准 DNA。  
The lane code coincides with the variety code in Table 1, and M is standard DNA marker.

图 3 24 个油桃品种中呈共显性的部分 SSR 引物扩增图

Fig. 3 Six co-dominant SSR markers among 24 nectarine varieties

对 9 个杂交育种后代、2 个芽变、5 个自然实生的日本桃栽培品种进行了亲本分析<sup>[12]</sup>,发现 Akatsuki 和 Gyousei 在 SSR 水平上表现出相同的基因型,因此认为 Gyousei 是 Akatsuki 的芽变;但另一个原认为是芽变的品种 Hikawa Hakuhou 与它的母株 Hakuhou 之间表现出 12 个位点不同,从而推翻了两者之间的芽变关系;自然实生品种 Abe Hakuto、Kawanakajima Hakuto、Kouyou Hakuto、Shimizu Hakuto 与它们的亲本之一 Hakuto 在每个 SSR 位点上表现出一个等位基因相同,这表明这 4 个品种不是芽变,而是 Hakuto 的后代。本研究结果也证实了 SSR 用于桃亲本分析是一种很有效的标记。

根据历年育种试验记载,紫金红 1 号选育时采集了曙光、早红 2 号、华光、瑞光 3 号等早熟油桃品种的自然实生种子,经过胚拯救获得的后代单株 506 株<sup>[1]</sup>。从材料选择上,本研究尽可能多地使用了紫金红 1 号的疑似亲本作比对。桃自交能亲和,首先获得自身花粉的可能性最大,因而认为紫金红 1 号是早红 2 号实生后代的可能性较大,但试验材料位于国家桃种质资源圃,品种繁多,不能排除其他品种授粉的可能。

SSR 标记进行亲本分析过程中,基于相似系数的亲缘关系分析和共显性标记遗传规律分析是两个不可缺少的部分。但是在李属植物中,普通桃(*P. persica*)自交、杂交均能亲和,长期演化后亲缘关系相对较近,遗传多样性相对较窄<sup>[20]</sup>,在所试材中

与紫金红 1 号差异最大的阳光,两者之间的相似系数也达到 0.709,因而单独从亲缘关系的角度很难判定紫金红 1 号的亲本。单独从共显性带型遗传的角度也不够完善,因为在所选材料的范围内,并非所有 SSR 引物均能呈现出共显性的带型,本研究中仅有 17 对 SSR 引物扩增出 20 个位点表现出共显性带型,且一些带型不能用于推测亲本,配合带型进行亲缘关系分析更能从整体的角度理解亲本与子代的遗传关系。从本研究结果看,紫金红 1 号与早红 2 号相似系数最高(0.881),早红 2 号的带型也可遗传给紫金红 1 号,进而可以推测两者之间的父子关系。因此,我们认为亲缘关系分析和带型遗传分析是 SSR 亲本分析中两个不可缺少的部分。

此外,在使用的 48 对 SSR 引物获得的 185 个位点上,试验材料中发现瑞光 3 号和 601、莱特甜和金山早红分别具有相同的 SSR 谱带,经过多年的观察和鉴定,两对品种的形态学性状、生物学特性和果实经济性状均很相似,因而认为它们分别属于统一基因型的可能性很大。

参考文献:

[1] 俞明亮,马瑞娟,杜平,等.早熟油桃新品种——紫金红 1 号的选育[J].果树学报,2008,25(1):134-135.  
[2] Aranzana M J, Arus P, Carbo J. AFLP and SSR markers for genetic diversity analysis and cultivar identification in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] [J]. Acta Horticulture, 2001, 546: 367-370.

- [ 3 ] Arus P, Aranzana M J, Carbo J. SSR and AFLP markers for gempasm evaluation and cultivar identification in peach[ J]. *Acta Horticulturae*, 2003, 606: 35– 40.
- [ 4 ] Aranzana M J, Carbo J, Arus P. Microsatellite variability in peach [ *Prunus persica* ( L. ) Batsch ] : cultivar identification, marker mutation, pedigree inferences and population structure [ J ]. *Theor Appl Genet*, 2003, 106( 8 ) : 1341– 1352.
- [ 5 ] Cheng H Y, Yang W C, Hsiao J Y. Genetic diversity and relationship among peach cultivars based on Random Amplified Microsatellite Polymorphism ( RAMP ) [ J ]. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 2001, 42( 3 ) : 201– 206.
- [ 6 ] Martinez Gomez P, Anulsekhar S, Potter D. Relationships among peach, almond, and related species as detected by simple sequence repeat markers[ J ]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2003, 128( 5 ) : 667– 671.
- [ 7 ] Lu Zhenxiang, Sosinski B, Reghard G L, *et al.* Construction of a genetic linkage map and identification of AFLP markers for resistance to root-knot nematodes in peach rootstocks[ J ]. *Genome*, 1998, 41: 199– 207.
- [ 8 ] Bielenberg D G, Wang Y, Fan S, *et al.* A deletion affecting several gene candidates is present in the Evergrowing peach mutant[ J ]. *Journal of Heredity*, 2004, 95( 5 ) : 436– 444.
- [ 9 ] Yamamoto T, Shimada T, Imai T, *et al.* Characterization of morphological traits based on a genetic linkage map in peach [ J ]. *Breeding Science*, 2001, 51( 4 ) : 271– 278.
- [ 10 ] Pancaldi M, Kacer Y, Kuden A B, *et al.* Using microsatellite sequence from peach for fingerprinting and genealogical analysis of almond[ J ]. *Rivista di Frutticoltura di Ortofloricultura*, 1999, 161( 11 ), 70– 73.
- [ 11 ] Yamamoto T, Mochida K, Hayashi T. Shanghai suimitsuto, one of the origins of Japanese peach cultivar[ J ]. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 2003, 72( 2 ) : 116– 121.
- [ 12 ] Yamamoto T, Mochida K, Imai T, *et al.* Parentage analysis in Japanese peaches using SSR markers[ J ]. *Breeding Science*, 2003, 53( 1 ) : 35– 40.
- [ 13 ] Dirlwanger E, Cosson P, Tavaud M, *et al.* Development of microsatellite markers in peach [ *Prunus persica* ( L. ) Batsch ] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry[ J ]. *Theor Appl Genet*, 2002, 105: 127– 138.
- [ 14 ] 俞明亮, 马瑞娟, 沈志军, 等. 桃果肉颜色、果皮茸毛和花粉育性性状的分子标记[ J ]. *园艺学报*, 2006, 33( 3 ) : 511– 517.
- [ 15 ] Aranzana M J, Garica Mas J, Carbo J, *et al.* Development and variability analysis of microsatellite markers in peach [ J ]. *Plant Breeding*, 2002, 121: 1, 87– 92.
- [ 16 ] Cipriani G, Lot G, Huang Wg, *et al.* AC/ GT and AG/ CT microsatellite repeat in peach [ *Prunus persica* ( L. ) Batsch ] : isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*[ J ]. *Theor Appl Genet*, 1999, 99: 65– 72.
- [ 17 ] Sosinski B, Gannavarapu M, Hager L D, *et al.* Characterization of microsatellite markers in peach [ *Prunus persica* ( L. ) Batsch ] [ J ]. *Theor Appl Genet*, 2000, 101: 421– 428.
- [ 18 ] 沈志军, 马瑞娟, 俞明亮, 等. 桃 SSR-PCR 主要因子对扩增产物的影响[ J ]. *江苏农业学报*, 2006, 22( 1 ) : 76– 78.
- [ 19 ] Hormaza J I. Molecular characterization and similarity relationships among apricot ( *Prunus Armeniaca* L. ) genotypes using simple sequence repeats[ J ]. *Theor Appl Genet*, 2002, 104: 321– 328.
- [ 20 ] Marilyn L, Warbuton, and Fredrick A B. Genetic diversity in peach ( *Prunus persica* L. Batch ) revealed by Randomly Ampillified Polymorphic DNA( RAPD ) markers and compared to inbreeding coefficients[ J ]. *J Amer Soc HORT SCI*, 1996, 12( 6 ) : 1012– 1019.