

# 36 个马铃薯品种的 SSR 分析

张自强<sup>1</sup>, 于肖夏<sup>1</sup>, 鞠天华<sup>2</sup>, 马艳红<sup>1</sup>, 于卓<sup>1,3</sup>, 蒙美莲<sup>1</sup>, 李长青<sup>1</sup>

(1. 内蒙古农业大学 农学院, 内蒙古 呼和浩特 010019; 2. 赤峰天泽生物科技  
有限责任公司, 内蒙古 赤峰 025457; 3. 呼和浩特市合创农业科技研究中心, 内蒙古 呼和浩特 011517)

**摘要:**为明确 36 个马铃薯品种在 DNA 分子水平上的遗传差异, 利用 SSR 分子标记技术对其多态性进行了分析。试验从 90 对 SSR 引物中筛选出适宜于 36 个马铃薯品种基因组 DNA 扩增的引物 10 对, PCR 扩增获得 301 个 SSR 条带, 多态性条带百分率为 71.1%。引物 STACCA3 和 SSR111 扩增的 SSR 指纹图谱差异明显, 可作为 36 个马铃薯品种间鉴别的分子依据。36 个马铃薯品种间的遗传距离(GD)变幅为 0.33~0.85, 平均为 0.54, 其中, 大于 GD 平均值的品种有 20 个, 占供试品种的 55.56%。以 GD 值 0.57 为基准, 将 36 个马铃薯品种划分成 7 类, 从 DNA 分子水平揭示出各供试品种间的亲缘关系。

**关键词:**马铃薯; 品种; SSR 分析; 遗传差异

中图分类号: S533 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)01-0093-05

## SSR Analysis on 36 Potato Varieties

ZHANG Zi-qiang<sup>1</sup>, YU Xiao-xia<sup>1</sup>, JU Tian-hua<sup>2</sup>, MA Yan-hong<sup>1</sup>,  
YU Zhuo<sup>1,3</sup>, MENG Mei-lian<sup>1</sup>, LI Chang-qing<sup>1</sup>

(1. Agronomy College, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, China; 2. Chifeng Tianze Bio-Technology CO., LTD, Chifeng 025457, China; 3. Huhhot Hechang Agriculture Scientific Research Center, Huhhot 011517, China)

**Abstract:** To know the genetic differences in DNA level among 36 potato varieties, the polymorphism among the tested plants were analyzed based on SSR molecular marker. 10 primer combinations, which suited the genome DNAs of 36 potato varieties, were selected from the 90 primer combinations. 301 bands of SSR markers were amplified, the percentage of polymorphism bands reached 71.1%. The differences in SSR fingerprints amplified with primers STACCA3 and SSR111 were significant. It can be used as molecular evidence to distinguish 36 potato varieties. The genetic distance(GD) of 36 tested plants ranged from 0.33 to 0.85, and the average of genetic distance was 0.54. There were 20 varieties, GD of which was greater than the average GD, accounting for 55.56% of the varieties tested. Using the GD value of 0.57 as threshold, 36 tested plants could be clustered into 7 groups, the genetic relationships among tested varieties were revealed at DNA molecular level.

**Key words:** Potato; Varieties; SSR analysis; Genetic difference

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)是粮、菜、饲和工业原料兼用的主要农作物,其适应性广、丰产性好、营养丰富、经济效益高<sup>[1-7]</sup>。马铃薯起源于美洲的安第斯山脉,根据 Spooner 的分类,马铃薯除普通栽培种外,还有 7 个原始栽培种和 199 个野生种,具有丰富的耐逆抗病虫等优良基因<sup>[8]</sup>。目前,我国生产中主栽的马铃薯品种均为四倍体,据邱宏等<sup>[9]</sup>利用 RAPD 和 AFLP 这 2 种显性分子标记分析 71 份

中国各地的主要马铃薯品种结果显示,我国现有马铃薯主要品种遗传基础狭窄。SSR(Simple Sequence Repeat, 简单序列重复)是一种真核生物基因组中普遍存在的重复序列,重复序列一般由 1~6 个碱基组成,重复次数在不同物种或同一物种不同基因型之间是高度可变的。SSR 标记呈共显性,多态性丰富,重复性好,已广泛应用于许多作物的基因定位和 QTL 分析、遗传连锁图谱构建、辅助育种、遗传多样

收稿日期:2011-12-01

基金项目:“十二五”国家科技支撑计划课题(2012BAD02B05);内蒙古科技创新引导奖励资金项目(2011);国家现代农业产业(马铃薯)技术体系建设专项资金项目(nycyt-x-15; gwzj-21);呼和浩特市农业综合开发科技创新项目(2011-计-2)

作者简介:张自强(1984-),男,河南原阳人,博士研究生,主要从事马铃薯遗传育种研究。

通讯作者:于卓(1958-),男,内蒙古托克托人,教授,博士,博士生导师,主要从事马铃薯及饲用作物育种研究。

性研究、品种真实性鉴定及纯度检测等<sup>[10-19]</sup>。

本试验拟利用 SSR 分子标记技术对 36 个马铃薯品种的遗传差异进行分析, 以期对马铃薯杂交育种的亲本选配及新种质创制提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

材料为 36 个马铃薯品种(表 1), 其中, 标有英文字母“J”的 13 个品种引自日本北海道大学, 标有英文字母“MH”的 3 个品种引自美国, 其余 20 份材

料均为目前国内主栽品种。这些材料均为原种, 由内蒙古农业大学马铃薯育种研究中心提供。

### 1.2 研究方法

1.2.1 DNA 提取与检测 剪取各供试材料的幼嫩叶片, 用植物基因组试剂盒(购自北京天根生化科技有限公司)提取 DNA(每种材料随机取 20 个单株的叶片混合), 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度, 将各材料的 DNA 浓度稀释至 50 ng/ $\mu$ L 置冰箱中保存备用。

表 1 供试材料及代号

Tab.1 Cultivars and number of the tested plants

代号 Number	品种 Cultivars	代号 Number	品种 Cultivars	代号 Number	品种 Cultivars	代号 Number	品种 Cultivars
1	J07-1	10	J08-1	19	陇薯 7 号 Longshu-7	28	涩皮红 Sepihong
2	J07-2	11	J08-2	20	大西洋 Atlantic	29	MH01
3	J07-3	12	J08-3	21	LK99	30	MH02
4	J07-4	13	J08-4	22	夏坡蒂 Shepody	31	MH03
5	J07-5	14	紫花白 Zihuabai	23	费乌瑞它 Favorita	32	B-2503
6	J07-6	15	克新 1 号 Kexin-1	24	黑美人 Heimeiren	33	B-2027
7	J07-7	16	陇薯 3 号 Longshu-3	25	底西芮 Desiree	34	B-1879
8	J07-8	17	陇薯 5 号 Longshu-5	26	青薯 168 Qingshu168	35	BC-1879
9	J07-9	18	陇薯 6 号 Longshu-6	27	水洗红 Shuixihong	36	B-AMT

1.2.2 SSR-PCR 扩增反应 ①扩增反应体系: ddH<sub>2</sub>O 为 12.0  $\mu$ L, 10  $\times$  Buffer(不含 Mg<sup>2+</sup>) 为 2.0  $\mu$ L, Mg<sup>2+</sup> 为 2.0  $\mu$ L, dNTPs 为 0.8  $\mu$ L, Taq 酶为 0.2  $\mu$ L, Forward primer 为 1.0  $\mu$ L, Reverse primer 为 1.0  $\mu$ L, 模板 DNA 为 1.0  $\mu$ L。②扩增反应程序: 使用 Bio-Rad MyCycler PCR 仪 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 1 个循环后终止反应。③聚丙烯酰胺电泳检测: 预电泳时间 30 min, 功率为 70 W, 取 6  $\mu$ L 扩增产物, 在 6% 聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳, 电泳时间 90 min, 功率为 70 W。银染检测。④引物筛选: 以 36 个马铃薯品种基因组 DNA 为模板, 进行 SSR 适宜引物筛选, 试验所用的 90 对 SSR 引物由上海生工生物有限公司合成。

1.2.3 SSR 标记的数据处理 记录胶板上清晰的条带, 按照点样顺序逐条对多态性带进行比对, 在有差异谱带的位置进行记录, “有带”记作“1”, “无带”记作“0”, 生成“0”、“1”组成的数矩阵, 对没有

多态性的条带, 只记录每对引物扩增的相同位点总数。计算相关遗传系数<sup>[20]</sup>。

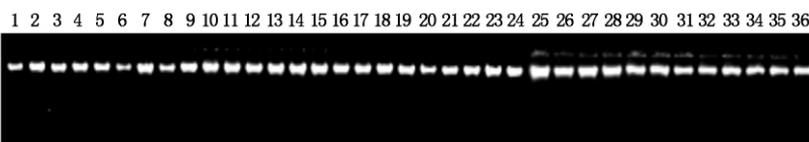
多态性条带百分率(Percentage of polymorphic bands, 简称 P):  $P = (K/N) \times 100\%$ , 其中 K 为多态条带数目, N 为扩增出的条带总数。

供试材料的遗传相似系数(GS)和遗传距离(GD): 遗传相似系数  $GS = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$ , 其中  $N_{ij}$  是指材料 i 和材料 j 共有的片段数目,  $N_i + N_j$  指在 2 个材料中出现的片段数目之和; 遗传距离  $GD = 1 - GS$ 。根据类平均聚类方法(UPGMA), 运用 NT-SYSpC 2.1 分析软件进行聚类<sup>[21]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组 DNA 质量检测

36 个马铃薯品种基因组 DNA 的电泳条带均匀、清晰, 无拖尾现象, 说明所提取的 DNA 纯度很高, 完全能满足 SSR 分析的要求(图 1)。



1~36 马铃薯品种顺序同表 1, 图 2、表 4 同。

The order of 1-36 potato varieties as Tab. 1. The same as Fig. 2, Tab. 4.

图 1 供试材料基因组 DNA 电泳检测

Fig.1 Electrophoresis of DNA of tested plants by agarose gels

## 2.2 SSR 适宜引物筛选

以 36 个马铃薯品种的基因组 DNA 为模板, 从 90 对 SSR 引物中筛选出多态性丰富、条带清晰、重

复性好的适宜引物 10 对(表 2), 用于品种间的 SSR 比较分析。

表 2 SSR 分析所用的引物及其碱基序列

Tab. 2 Primers and their nucleotide sequences used in SSR analysis

引物编号 Primer code	正向引物 Forward primer	反向引物 Reversed primer
STM1106	5'-TCCAGCTGATTGGTTAGGTTG-3'	5'-ATGCCAATCTACTCGTCATGG-3'
STACCA3	5'-AATTCATGTTTGCGGTACGTC-3'	5'-ATGCAGAAAGATGTCAAAATTGA-3'
SSR111	5'-TTCTCCCTTCATCAGTTCT-3'	5'-TTTGCTGCTATACTGCTGACA-3'
S180	5'-ACTGCTGTGGTTGGCGTC-3'	5'-ACGGCATAGATTTGGAAGCATC-3'
S7	5'-GACTGGCTGACCCTGAACT-3'	5'-GACAAAATTACAGGAACTGCAAA-3'
POTM1-2	5'-AATAATACTGTGATGCCACAATGG-3'	5'-GTGGCATGTCTTCCAAGGTAC-3'
STINHVI	5'-GGAGTCAAAGTTTGCTCACATC-3'	5'-CACCCCTAACCCCATATC-3'
STIIKA	5'-TTCGTTGCTTACCTACTA-3'	5'-CCCAAGATTACCACATTC-3'
STU6SNRN	5'-GAAGTTTTATCAGAATCC-3'	5'-ATCACCTCATCAGCAATC-3'
S192	5'-ACTTCTGCATCTGGTGAAGC-3'	5'-GGTCTGGATTCCCAGGTTG-3'

注: 引物由上海生工合成。

Note: The adapters and primers were compounded by Shanghai Sangon.

## 2.3 SSR 扩增结果

利用筛选出的 10 对 SSR 适宜引物, 对 36 个马铃薯品种基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 结果见表 3。10 对引物共扩增出 301 个 SSR 条带, 其 DNA 片段长度多在 500 ~ 2 000 bp, 平均每个引物扩增出 30.1 个条带, 其中多态性条带 217 个, 多态性条带百分率

为 71.1%, 表明供试材料的 SSR 多态性丰富。在这 10 对引物中, 以引物 STACCA3 和 SSR111 扩增的条带最多, 分别为 35 个和 36 个。供试材料间的 SSR 指纹图谱存在一定差异, 用这 2 个引物可以将 36 个马铃薯品种区别开来(图 2)。

表 3 供试材料的 SSR 引物及扩增结果

Tab. 3 Primers used in SSR and amplification results of tested plants

引物 Primer	扩增条带数 No. of amplified bands	多态性条带数 No. of polymorphic bands	多态性条带百分率/% Percentage of polymorphic bands
STM1106	33	26	78.8
STACCA3	35	29	82.9
SSR111	36	30	83.3
S180	26	20	76.9
S7	22	12	54.5
POTM1-2	28	15	53.6
STINHVI	25	18	72.0
STIIKA	33	26	78.8
STU6SNRN	31	21	67.7
S192	32	20	62.5
合计 Total	301	217	71.1

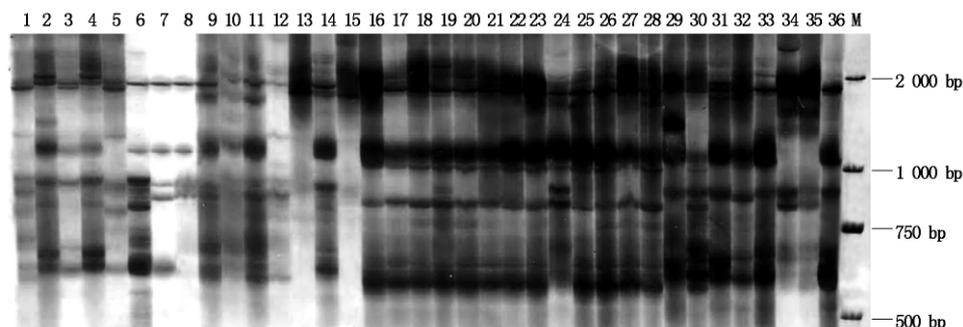


图 2 引物 STACCA3 对 36 份马铃薯材料 DNA 的扩增结果

Fig. 2 DNA augmentation result with prime STACCA3 (Maker: DL2000)



划分成 7 类, 该聚类结果可从 DNA 分子水平揭示各供试品种间的亲缘关系。

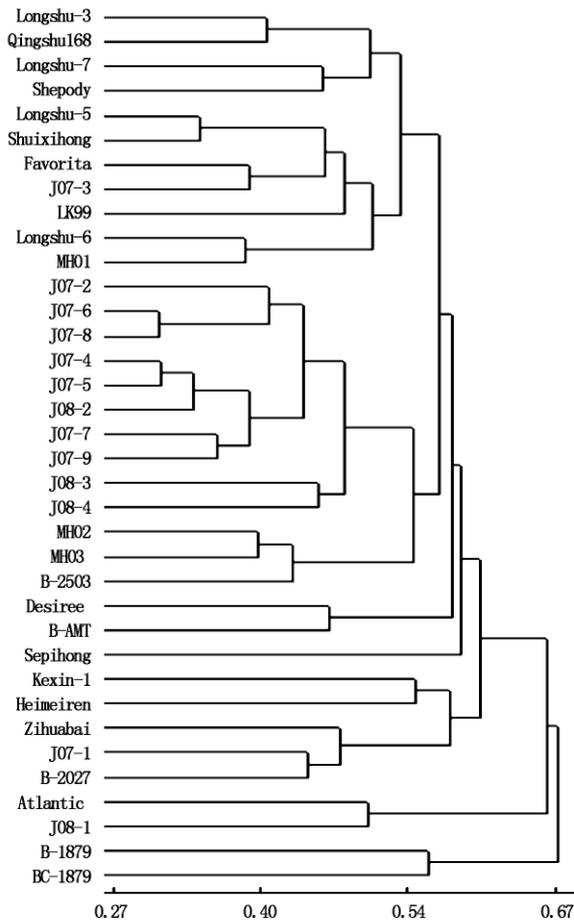


图 3 36 个马铃薯品种的 SSR 标记的聚类分析

Fig. 3 Dendrogram of Potato cultivars based on SSR

#### 参考文献:

- [1] 金黎平, 屈冬玉, 谢开云, 等. 我国马铃薯种质资源和育种技术研究进展 [J]. 种子 2003 5(131): 98-100.
- [2] 孙秀梅. 国外种质资源在我国马铃薯育种中的利用 [J]. 中国马铃薯 2000 16(2): 110-111.
- [3] 刘思决, 于卓, 蒙美莲, 等. 6 个彩薯马铃薯品种的 ISSR 分析 [J]. 华北农学报 2010 25(5): 117-120.
- [4] 田连奎. 马铃薯规范化生产的增产效果和经济效益 [J]. 内蒙古农业科技 1986(1): 38-40.
- [5] 杨海鹰, 云庭, 段跃, 等. 内蒙古马铃薯产业发展的思路与对策 [J]. 内蒙古农业科技 2001(1): 3-7.
- [6] 司马兰兰, 徐洁. 宁夏南部山区马铃薯高效栽培技术研究 [J]. 内蒙古农业科技 2007(1): 42-43.
- [7] 张自强, 刘宇杰, 于卓, 等. 马铃薯 ISSR 体系优化及其品种间遗传差异分析 [J]. 内蒙古农业大学学报, 2010 31(3): 95-99.
- [8] Spooner D M, Hijmans R J. Potato systematics and germplasm collecting, 1989-2000 [J]. Amer J of Potato Research 2001 78: 237-268.
- [9] 邱宏, 陈伊里, 金黎平. RAPD 和 AFLP 标记分析中国马铃薯主要品种的遗传多样性 [J]. 作物学报, 2006 32(6): 899-904.
- [10] Ahmad R, Potter D, Southwick S M. Genotyping of peach and nectarine cultivars with SSR and SRAP molecular markers [J]. J Amer Soc Hort Sci 2004 129(2): 204-210.
- [11] 张海英, 王振国, 毛爱军, 等. 与黄瓜白粉病抗病基因紧密连锁的 SSR 分子标记 [J]. 华北农学报 2008 23(6): 77-80.
- [12] 籍贵芬, 张立英. 与甜高粱相关的 SSR 分子标记筛选初报 [J]. 华北农学报 2010 25(2): 129-132.
- [13] 苏志芳, 包阿东, 马庆. SSR 标记技术及其在小麦遗传多样性研究中的应用 [J]. 内蒙古农业科技 2008(2): 22-24.
- [14] 史红丽, 韩明玉, 赵彩平. 桃遗传多样性的 SRAP 和 SSR 标记分析 [J]. 华北农学报 2009 24(6): 187-192.
- [15] 李凌雨, 孟全业, 王学雄, 等. 60 个玉米自交系的 SSR 标记分析 [J]. 华北农学报 2007 22(3): 25-29.
- [16] 郭健, 尹利, 张雅慧. 玉米杂交种子纯度的 SSR 检测与田间鉴定的比较研究 [J]. 内蒙古农业科技, 2007(6): 37-40.
- [17] 吴连成, 侯本军, 库丽霞, 等. 用 SSR 标记分析豫综 5 号和金皇后综合种的遗传变异 [J]. 华北农学报, 2007 22(6): 37-40.
- [18] 王小国, 梁红艳, 张薇. 来自小麦基因组的 SSR 标记在早熟禾亚种植物中的通用性分析 [J]. 华北农学报 2007 22(4): 155-157.
- [19] Ghislain M, Spooner D M, Rodriguez F *et al.* Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato [J]. Theor Appl Genet 2004 108: 881-890.
- [20] Nei M, Li W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proc Nat Acad Sci USA 1979 6: 5269-5273.
- [21] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统 [M]. 北京: 科学出版社 2002.