福建农业学报 27(8):810～814,2012
Fujian Journal of Agricultural Sciences
文章编号：1008－0384（2012）08－810－05

李华伟，罗文彬，纪荣昌，等. 福建省马铃薯新品种(系)的SSR遗传分析和指纹图谱构建[J].福建农业学报,2012,27(8):810－814.
LI H-W，LUO W-B，JI R-C，et al. Analysis of Genetic and Construction of Fingerprinting with SSR Markers for New Potato Varieties in Fujian Province [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*，2012，27（8）：810－814.

福建省马铃薯新品种（系）的SSR遗传分析和指纹图谱构建

李华伟，罗文彬，纪荣昌，刘中华，邱思鑫，汤　浩

（福建省农业科学院作物研究所，福建　福州　350013）

摘　要：为对福建省马铃薯新品种（系）鉴定提供分子水平上的依据，利用筛选出的11对多态性较好的SSR标记对9份马铃薯新品种（系）及其主要亲本进行遗传分析并构建指纹图谱。结果表明，供试材料共扩增出89个等位位点，其中84个为多态性位点，多态性比率达94.38%。不同引物扩增出等位位点数5（STM1049）-15（STI027）个，平均8.09个。利用STI027、STI052、STI033、STI047、STM3023和STM0030共6对引物构建了供试品种（系）的SSR指纹图谱。其中引物STI027可以将13份品种（系）完全区分开，引物STM0030可以将10个品种（系）区分开。聚类分析表明，在相似系数0.628处，可将13份品种（系）分为四类，聚类结果与供试品种（系）的系谱来源有较好一致性。

关键词：马铃薯；SSR标记；遗传多样性；DNA指纹图谱

中图分类号：S 532　　**文献标识码**：A

Analysis of Genetic and Construction of Fingerprinting with SSR Markers for New Potato Varieties in Fujian Province

LI Hua-wei，LUO Wen-bin，JI Rong-chang，LIU Zhong-hua，QIU Si-xin，TANG Hao

（*Crop Research Institute*，*Fujian Academy of Agricultural Sciences*，*Fuzhou*，*Fujian*　350013，*China*）

Abstract：For the purpose of new varieties（lines）identification at the molecular level，11 pairs of SSR（Simple Sequence Repeats）primer markers were employed to analysis of genetic and construction of fingerprinting for 9 new potato varieties and its parents in Fujian.. The results showed that，89 alleles loci were amplified，including 84 polymorphic alleles，and the ratio of polymorphism reached 94.38%. The numbers of alleles site amplified with different primers was 5－15，and the average value was 8.09. The fingerprinting of 13 potato varieties was constructed by 6 pairs of primers，STI027，STI052，STI033，STI047，STM3023，and STM0030. All the potato varieties were univocally identified using SSR primer STI027，and ten potato varieties were univocally identified using SSR primer STM0030. UPGMA cluster analysis of genetic similarity showed that all the materials were clustered into four groups at the genetic similarity of 0.628. The cluster analysis result was accordance with the genetic relationships.

Key words：potato；SSR markers；genetic analysis；DNA fingerprinting

马铃薯是福建省继水稻、甘薯之后的第三大粮食作物，由于冬种马铃薯效益的不断提高，已成为农民增产增收的主要途径。传统的马铃薯品种鉴定多基于形态学特征，但由于存在诸多弊端已不能满足育种工作的需要，如何快速准确的鉴别马铃薯品种已成为当前马铃薯生产和科研中急需解决的问题。

简单重复序列（Simple Sequence Repeats，SSR）又称微卫星DNA，由于SSR广泛分布于整个基因组，具有多态性丰富共显性、扩增结果稳定、重复性好等特点，已被广泛应用于马铃薯遗传多样性分析和指纹图谱的构建。唐铭霞等[1]利用SSR标记分析了四川省马铃薯主栽品种的遗传多样性，将遗传关系相近的品种划分在一类。腾长才等[2]对青海省马铃薯主栽品种进行了SSR遗传多样性分析，

收稿日期：2012－06－27初稿；2012－07－23修改稿
作者简介：李华伟（1982－），男，研究实习员，主要从事薯类遗传育种研究（E-mail：hwlpoto@126.com）
通讯作者：汤浩（1968－），男，研究员，主要从事马铃薯育种栽培研究（E-mail：tanghao918@sohu.com）
项目基金：福建省农业科学院青年人才创新基金（2011QA-7）；现代农业产业技术体系（CARS-10）

将 12 份材料划分五大类。段艳凤等[3]利用 SSR 标记构建了中国 88 个马铃薯审定品种的指纹图谱并进行了遗传多样性分析,结合 6 对引物可将供试材料完全分开,聚类结果与材料系谱来源有较好的一致性,且同栽培区域育成的品种聚在一起。SSR 标记自用于马铃薯品种鉴别与遗传多样性研究以来，已被证明其能区分马铃薯品种有效的手段。

福建省农科院作物所近年来在马铃薯品种选育、引进和推广工作中取得了一定进展，目前已成功选育出闽薯 1 号、福克 76、福克 212 三个马铃薯新品种[4-6]，引进紫花 851、中薯 3 号、中薯 7 号和克新 19 号等品种进行大面积推广种植。本研究以福建省已审定和引进的马铃薯新品种及筛选的后代品系为材料，利用 SSR 标记进行遗传分析并构建指纹图谱，以期为福建省马铃薯新品种的鉴定、管理、育种实践、品种审定及知识产权保护等方面提供一定的科学依据。

1　材料与方法

1.1　供试材料

13 份供试材料中闽薯 1 号、福克 76、福克 212 分别是 2008、2010、2011 年通过福建省品种审定委员会审定的马铃薯品种。大西洋为国外引进品种，0805609、0804804、0711103、0721706、0721709、0719107 新品系为福建省农科院作物所选育的高代品系，其余材料为主要亲本材料。供试材料均由福建省农科院作物所提供。

1.2　试验方法

1.2.1　DNA 提取　在马铃薯苗期取幼嫩马铃薯叶片，利用经典的 CTAB 小量法快速提取基因组 DNA，提取后以 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 浓度。样品稀释到 25～50 ng・μL^{-1}，保存于－20℃冰箱。

1.2.2　SSR 标记分析　从 18 对 SSR 引物中筛选出 11 对多态性好扩增条带清新的引物（表 1），引物来自 Ghislain[7] 和 Feingold[8]，由宝生物工程（大连）有限公司合成。PCR 扩增体系参照段艳凤的方法进行。PCR 反应总体积为 20 μL，含模板 DNA2.0 μL，上游 primer（10 pmol μL^{-1}）0.8 μL、下游 primer（10 pmol・μL^{-1}）0.8 μL、dNTPs（2.5 mmol・L^{-1}）1.6 μL、10×PCR buffer（含 Mg^{2+}）2.0 μL、*Taq* DNA 聚合酶（2.5 U・μl^{-1}）0.4 μL、ddH_2O 12.4 μL。

反应程序为 94℃预变性 5 min；94℃变性 30 s，退火 30 s（温度范围 50～58℃），72℃延伸 45 s，35 个循环；72℃延伸 7 min，4℃保存。PCR 扩增产物用 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测，恒定电压 160 V，电流 400 mA，电泳 1.5 h，电泳结束后用硝酸银染色观察结果。

1.2.3　数据分析　统计电泳图上同一迁移位置的条带，清晰的条带记为 1，无带或不易分辨的记为 0，形成［1，0］数据矩阵。

材料间遗传相似系数（GS）采用 *Nei* 和 *Li* 的计算方法[9]，计算公式为：$GS=2N_{ij}/(N_i+N_j)$，$GD=1-GS$；其中 N_{ij} 为材料 *i* 和 *j* 共有的扩增片段数目，N_i 为材料 *i* 中出现的扩增片段数目，N_j 为材料 *j* 中出现的扩增片段数目。用 NTSYS-pc2.11 软件的 SAHN 程序和 UPGMA 方法进行聚类分析，并通过 Tree plot 模块生成聚类图。

2　结果与分析

2.1　SSR 标记多态性及遗传多样性分析

11 对 SSR 引物在 13 份供试材料中共扩增出 89 个等位位点，其中 84 个位点呈现多态，多态性比率达 94.38%，每对 SSR 引物扩增出等位位点数为 5（STM1049）～15（STI027）个，平均为 8.09 个。扩增片段大小在 100～1 000 bp。

遗传距离计算结果显示（表 2），13 份品种（系）的遗传距离范围为 0.159～0.469，平均值为 0.316，说明供试材料之间的亲缘关系较近。遗传距离最近的是 0721709 和 0719107，为 0.159，2 个材料均以郑薯 6 号为亲本筛选出的后代品系，其次是中薯 3 号和 0721706，为 0.171。最远的是闽薯 1 号和 0711103，为 0.469，这可能是因为闽薯 1 号的亲本均为国外审定品种，0711103 为国内审定品种的后代品系，二者之间亲缘关系较远，地理间也存在差异，其次是闽薯 1 号和 0804804，为 0.468。

2.2　指纹图谱分析

根据 11 对引物的 0、1 统计结果，可以将 61.5%以上的品种（系）分开的引物有 6 对 SSR 引物（STI027、STI052、STI033、STI047、STM3023、STM0030），其中引物 STI027 可以将 13 份品种（系）完全区分开，引物 STM0030 可以将 76.9%（10 份材料）的材料区分开。结合以上分析的 6 对引物组合可将 13 份材料完全区分开。本研究按照 STI027、STI052、STI033、STI047、STM3023、STM0030 引物组合，构建了马铃薯指纹图谱数据库。图 1 和图 2 分别为引物 STI027 和 STM0030 在马铃薯材料扩增的结果。

表 1 11 对 SSR 引物及其扩增情况

Table 1 Amplification results and polymorphism of 16 SSR markers used in this study

引物名称	图位	正向引物(5′-3′) 反向引物(5′-3′)	等位位点数	多态性位点数	多态性比率/%
STM1049	Ⅰ	CTACCAGTTTGTTGATTGTGGTG AGGGACTTTAATTTGTTGGACG	5	4	80
STI029	Ⅱ	GACTGGCTGACCCTGAACTC GACAAAATTACAGGAACTGCAAA	6	5	83.33
STI052	Ⅱ	TCATCACAACGTGACCCC GGGCTTGAATGATGTGAAGCTC	9	9	100
STI060	Ⅲ	ACTTCTGCATCTGGTGAAGC GGTCTGGATTCCCAGGTTG	6	6	100
STM3023	Ⅳ	AAGCTGTTACTTGATTGCTGCA GTTCTGGCATTTCCATCTAGAGA	6	6	100
STI005	Ⅵ	GCTGCTAAACACTCAAGCAGAA CAACTACAAGATTCCATCCACAG	9	8	88.89
STI033	Ⅶ	TGAGGGTTTTCAGAAAGGGA CATCCTTGCAACAACCTCCT	9	9	100
STI047	Ⅶ	ACTGCTGTGGTTGGCGTC ACGGCATAGATTTGGAAGCATC	8	7	87.5
STGBSS	Ⅷ	AATCGGTGATAAATGTGAATGC ATGCTTGCCATGTGATGTGT	6	5	83.33
STI027	Ⅷ	CGCAAATCTTCATCCGATTC TCCGGCGGATAATACTTGTT	15	15	100
STM0030	Ⅻ	AGAGATCGATGTAAAACACGT GTGGCATTTTGATGGATT	10	10	100
总计			89	84	
平均			8.09	7.63	94.38

表 2 13 个品种(系)间遗传距离

Table 2 Genetic distance among the 13 potato varieties

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0.000												
2	0.431	0.000											
3	0.423	0.339	0.000										
4	0.345	0.438	0.310	0.000									
5	0.379	0.376	0.181	0.259	0.000								
6	0.468	0.481	0.408	0.365	0.397	0.000							
7	0.405	0.318	0.200	0.286	0.229	0.395	0.000						
8	0.441	0.345	0.333	0.398	0.321	0.432	0.373	0.000					
9	0.214	0.452	0.419	0.388	0.319	0.424	0.397	0.402	0.000				
10	0.469	0.379	0.245	0.364	0.300	0.414	0.243	0.295	0.410	0.000			
11	0.432	0.398	0.306	0.390	0.248	0.424	0.171	0.307	0.351	0.289	0.000		
12	0.380	0.370	0.273	0.309	0.237	0.351	0.233	0.283	0.291	0.277	0.273	0.000	
13	0.429	0.410	0.200	0.293	0.217	0.380	0.200	0.220	0.429	0.286	0.292	0.159	0.000

2.3 聚类分析

以 11 对 SSR 引物的 0、1 统计数据按照 UPGMA 进行聚类分析，得到供试材料的遗传关系树状图（图 2）。以遗传相似系数为 0.628 为标准，可将供试的材料分为 4 个类群，一个大类群 A 和三个小类群 B、C、D 类，A 类包含 9 个品种，占供试材料的 69.2%。A 类群在遗传相似系数为 0.676 处又可分为 2 个亚类，紫花 851 单独分在一

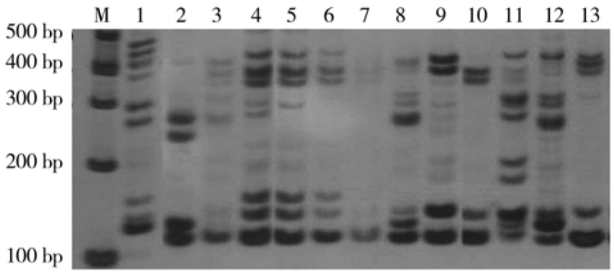

图 1　引物 STI027 在 13 份材料中的扩增结果

Fig. 1　DNA fragments amplified by SSR primer STI027 in 13 potato varieties

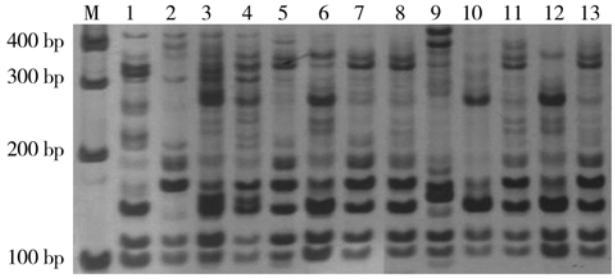

图 2　引物 STM0030 在 13 份材料中的扩增结果

Fig. 2　DNA fragments amplified by SSR primer STM0030 in 13 potato varieties

类，说明紫花 851 与其他 8 个品种的亲缘关系较远。其他 8 个品种趋向分布在同一类群，且亲缘关系较近的基本上分在一类。B 类包含 2 个品种闽薯 1 号和大西洋，遗传相似系数为 0.786，亲缘关系较近；C 类仅含福克 212；D 类仅含 0804804。结合系谱信息，亲缘关系相近的品种闽薯 1 号和大西洋、福克 76 和卡它丁、0721709 和 0721707 聚在一起，说明聚类结果与品种（系）的系谱来源有较好的一致性。

3　讨论与结论

SSR 标记已被广泛应用于马铃薯遗传多样性分析和指纹图谱的构建，随着马铃薯全基因组测序的完成和大量 SSR 引物的开发，将促进 SSR 分子标记技术在马铃薯品种鉴定及资源保护中的应用。Norero 等[10]利用 3 对 SSR 引物可将其中的 36 个品种区分开，4 对引物可将所有品种完全区分；Ashkenazi 等[11]利用 7 对 SSR 标记鉴定 12 个不同的马铃薯栽培品种，结果表明 2 对 SSR 标记即可将所有品种完全区分。

本研究利用 SSR 分子标记对供试材料进行了遗传分析，亲缘关系相近的划分在同一类群，说明 SSR 标记能够比较准确的检测材料的遗传背景和

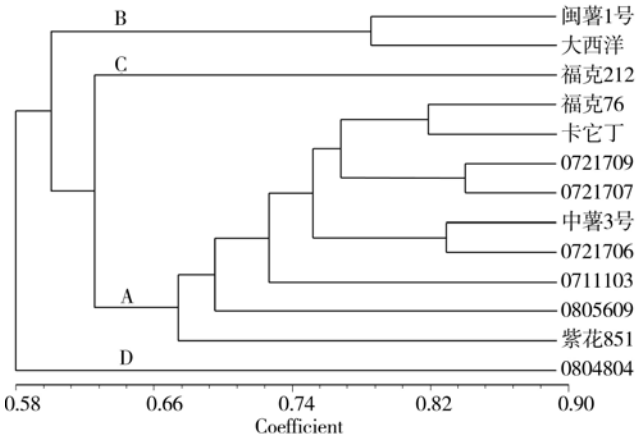

图 3　13 份供试马铃薯材料的聚类结果

Fig. 3　Dendrogram of 13 potato varities based on SSR analysis

遗传关系。在实际应用中，SSR 标记在马铃薯品种鉴定和遗传多样性的应用，将有助于马铃薯遗传资源的挖掘，品种审定及知识产权保护。本文从筛选出的 11 对多态性较好的 SSR 引物中，选取扩增条带稳定、清晰的 6 对，利用他们的指纹组合构成了供试材料的指纹数据，可将材料逐一区分。

基于 PCR 的 RAPD[12]和 AFLP[13-15]标记在马铃薯上的应用已有报道，但其存在稳定性较差、费时耗财等缺点。SSR 标记为共显性标记，多态性高、扩增结果稳定等特点，已成为研究马铃薯最理想的分子标记。腾长才等利用 SSR 标记将不同熟性的马铃薯材料聚到一类。段艳凤等利用 SSR 标记将不同地理来源的马铃薯材料聚到一类。说明 SSR 标记能较好的揭示群体内完整的遗传信息。本研究聚类分析结果将材料分为 4 类，与系普来源有较好的一致性，这与实际遗传背景相一致，说明所用引物的可靠性和真实性，与前人的研究结果相符合[3,15]。

SSR 标记不受环境因素的影响，能弥补田间形态学鉴定的不足。随着新选育品种数量的增加，现有的引物组合鉴别能力降低，无法将品种逐一区分。因此，应根据实际情况增加引物组合的数量，使不同 SSR 位点的多态性指数和该位点不同等位基因的频率具有更好的代表性[16-18]。本研究利用 11 对 SSR 标记对 13 份供试材料进行了遗传分析和建立了 DNA 指纹数据库，从分子水平上揭示了材料之间的差异。由于试验用引物和材料较少，不能准确反映不同品种在整个基因组上的差异。因此，应根据分布于全基因组中 SSR 引物，筛选出代表信息量更丰富、更全面、更准确、鉴别能力更强的

引物组合，不断扩增和丰富马铃薯品种指纹数据库。

参考文献：

[1] 唐铭霞，何卫，胡建军，等．四川省马铃薯主栽品种的遗传多样性分析［J］．西南农业学报，2010，23（6）：1805－1808.

[2] 腾长才，张永成，张凤军．青海省马铃薯主要栽培品种的SSR遗传多样性［J］．分子植物育种，2009，7（3）：555－561.

[3] 段艳凤，刘杰，卞春松，等．中国88个马铃薯审定品种SSR指纹图谱构建与遗传多样性分析［J］．作物学报，2009，35（8）：1451－1457.

[4] 汤浩，梁金平，曾军，等．马铃薯新品种闽薯1号选育及配套栽培技术研究［J］．福建农业学报，2007，22（2）：150－153.

[5] 罗文彬，汤浩，梁金平，等．马铃薯新品种福克76选育与栽培技术［J］．福建农业学报，2010，25（4）：418－421.

[6] 罗文彬，纪荣昌，许泳清，等．马铃薯新品种福克212的选育及其特征特性［J］．福建农业学报，2011，26（6）：957－960.

[7] GHISLAIN M，SPOONER D M，RODRÍGUEZ 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.

[8] FEINGOLD S，LLOYD J，NORERO N，et al. Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.)［J］. Theor Appl Genet，2005，111：456－466.

[9] NEI M，LI W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction end nucleases［J］. Proc Nat Acad Sci USA，1979，76：5269－5273.

[10] NORERO N，MALLEVILLE J，HUARTE M，et al. Cost efficient potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar identification by microsatellite amplification［J］. Potato Res，2002，45：131－138.

[11] ASHKENAZI V，CHANI E，LAVI U，et al. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses［J］. Genome，2001，44：50－62.

[12] 刘福翠，谭学林，郭华春．云南省马铃薯品种资源的RAPD分析［J］．西南农业学报，2004，33（6）：1349－1352.

[13] 李凤云，盛万民，刘昭军，等．马铃薯品种遗传多样性的AFLP分析［J］．中国农学通报，2007，23（8）：58－61.

[14] 邸宏，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.

[15] 邸宏，陈伊里，金黎平．中国马铃薯部分栽培品种遗传多样性的AFLP分析[J].园艺学报,2006,33(6):1349－1352.

[16] 金光辉．中国马铃薯主要育成品种的种质资源分析［J］．作物品种资源，1999，4：12－13.

[17] 徐敏．中国马铃薯审定品种亲缘关系及遗传多样性研究［D］．北京：中国农业科学院，2007.

[18] 匡猛，杨伟华，许红霞，等．中国棉花主栽品种DNA指纹图谱构建及SSR标记遗传多样性分析［J］．中国农业科学，2011，44（1）：20－27.

（责任编辑：柯文辉）