

利用SSR荧光标记构建山东地方梨种质资源分子身份证

冉昆¹, 隋静², 王宏伟¹, 魏树伟¹, 张勇¹, 董冉¹, 董肖昌¹, 王少敏^{1*}

(¹山东省果树研究所, 山东泰安 271000; ²莱芜职业技术学院, 山东莱芜 271100)

摘要:【目的】利用SSR荧光标记构建45份山东地方梨种质资源的分子身份证。【方法】从SSR富集文库中开发并设计40对引物, 从中筛选出10对多态性良好的引物, 采用SSR荧光标记毛细管电泳技术检测扩增条带分子质量的方法对山东地方梨种质资源进行分析, 获得相应的扩增条带。采用个位数字和小写英文字母对不同带型进行编码, 按照10对引物扩增带型数由少到多顺序串联排序的方式构建供试样品的分子身份证。【结果】10对SSR引物共检测到111个SSR等位位点和189个带型, 平均每对引物对品种扩增的等位位点11.1个, 带型18.9个。采用个位数字和小写英文字母结合对不同带型进行编码, 成功构建了45份山东地方梨种质资源的分子身份证, 可以将材料完全区分开。【结论】构建了45份山东地方梨种质资源分子身份证, 有利于山东地方梨种质资源的保护与利用。

关键词: 梨; 种质资源; 山东; SSR荧光标记; 分子身份证

中图分类号: S661.2

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2018)Suppl.-071-08

Using the fluorescent labeled SSR markers to establish the molecular ID of pear germplasm resources in Shandong

RAN Kun¹, SUI Jing², WANG Hongwei¹, WEI Shuwei¹, ZHANG Yong¹, DONG Ran¹, DONG Xiaochang¹, WANG Shaomin¹

(¹Shandong Institute of Pomology, Tai'an 271000, Shandong, China; ²Laiwu Vocational and Technical College, Laiwu 271100, Shandong, China)

Abstract: 【Objective】As the origin and diversity center of oriental pears, China is very rich in *Pyrus* germplasm, and more than 3 000 cultivars have been recorded. According to the origin and geographical distribution, pears cultivated in China are generally divided into four systems: Chinese White Pear (*P. bretschneideri* Rehd.), Sand Pear, Ussurian Pear and Sinkiang Pear. Shandong is one of the main cultivation areas of pear in China, with long cultivation history and rich germplasm resources, such as the famous local varieties of 'Chili' in Laiyang, 'Xiangshui' in Qixia and 'Changba' in Huangxian. However, it is difficult to distinguish different cultivars or germplasm accurately only by the traditional morphological identification method. Establishing the multi-level molecular identification techniques can improve the accuracy of cultivar identification. In this paper, 45 pear germplasm resources collected from different regions of Shandong province were used as materials to establish molecular ID code by simple sequence repeat (SSR) markers. 【Methods】The experiment was conducted from June 2016 to October 2017 at Shandong Institute of Pomology. The 45 germplasm resources tested were collected from the germplasm resources nursery of Tianping Lake core demonstration orchard, Tai'an Comprehensive Experimental Station. 40 pairs of primers were developed and designed from SSR-enriched library, and 10 pairs of primers with high polymorphisms and good repeatability were selected, and then

收稿日期: 2018-11-08 接受日期: 2018-12-06

基金项目: 现代农业(梨)产业技术体系建设专项(CARS-28-36); 山东省自然科学基金(ZR2015YL075); 山东省农业科学院青年科研基金(2015YQN41); 山东省农业良种工程(2016LZGC034); 山东省农业科学院农业科技创新工程(CXGC2016A03、CXGC2018F03)

作者简介: 冉昆, 男, 副研究员, 研究方向: 梨种质资源评价与利用。Tel: 0538-8207123, E-mail: rankun@shandong.cn

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 0538-8298262, E-mail: wangshaomin@shandong.cn

were labeled with FAM fluorescent for amplification and capillary electrophoresis. Genomic DNA was extracted from fresh leaves according to the CTAB protocol. The PCR was carried out in a final volume of 20 μL containing 2 μL DNA template ($10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 2 μL $10\times$ PCR buffer (including MgCl_2), 0.4 μL dNTPs ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 0.3 μL of each of the two primers ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 0.2 μL *Taq* DNA polymerase, and 14.8 μL sterile distilled water. PCR reaction was programmed as: one cycle of 5 min at 94°C as initial denaturation, followed by 35 cycles, in which each cycle consisted of a denaturation step at 94°C for 30 s, an annealing step at suitable temperature for 35 s, and an extension step at 72°C for 40 s, followed by final extension at 72°C for 5 min. The products of 45 samples with each primer pairs were analyzed. Each band pattern was coded by different single digit or lowercase letters. Meanwhile, according to the number of band patterns, in an ascending order, the 10 primer pairs were decided, and molecular ID codes of 45 pear germplasm were established. The software POPGENE 32 was used to analyze the data, and the number of alleles amplified by the primers, the amplification band type, and the gene diversity and polymorphism information content of the samples at different SSR sites were obtained. **【Results】**The results showed that a total of 111 polymorphic alleles and 189 polymorphic patterns were revealed by the 10 primer pairs, with an average of 11.1 alleles and 18.9 patterns for each primer pairs. The length of the amplified fragment was 85-295 bp. The molecular ID codes of 45 tested germplasm were different, which could distinguish all germplasm resources. This study indicated that the detection technology by using fluorescent labeled SSR markers had the merits of reliable, efficient and high-throughput, and that it is convenient and efficient to establish the molecular ID of pear germplasm using the above encoded mode of patterns. **【Conclusion】**The molecular ID codes of 45 pear germplasm resources in Shandong were established using the fluorescent labeled SSR markers, and the constructed molecular ID was different from one another and could completely distinguish 45 pear germplasm resources. It not only provides a rapid, accurate and efficient molecular identification method for pear germplasm resources in Shandong, but also contributes to provide a reference for varieties identification, evaluation and utilization, and genetic relationship analysis.

Key words: Pear; Germplasm resources; Shandong; Fluorescent labeled SSR marker; Molecular ID

梨最早起源于中国的西南部, 现有记载的栽培品种超过 3000 个, 根据起源地和地理分布, 一般将中国栽培的梨分为四个系统, 即白梨、砂梨、秋子梨和新疆梨^[1-2]。山东是我国梨主产区之一, 种质资源极为丰富, 长期以来形成了胶东半岛、鲁西北平原和鲁中南三大梨主产区, 有诸多驰名中外的品种, 如‘莱阳茌梨’‘栖霞香水’‘黄县长把’等^[3]。由于各地交流频繁, 种质混杂现象十分普遍, 且随着品种更新加快, 大量地方品种已破坏甚至消失, 而这些地方品种常具有优良的特异性状, 因此是育种的重要材料^[4]。

SSR (simple sequence repeats) 标记具有多态性丰富、共显性、稳定性好、易于检测等优点, 在多样性分析、品种鉴定、遗传作图、基因定位等领域得到了广泛的应用^[5-6]。其中, SSR 荧光标记技术相对于传统的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel elec-

trophoresis, PAGE) 技术, 具有准确度高、适用于大批量样品的检测分析等优点, 已广泛用于园艺作物研究, 如无花果^[7]、甘蔗^[8]、百合^[9]、芍药^[10]、苹果^[11-13]、桃^[14-15]、枣^[16-17]、柑橘^[18]、甜樱桃^[19]、茶树^[20]、葡萄^[21-23]等。

随着梨属植物 SSR 引物的陆续开发, SSR 技术已广泛用于梨属植物的遗传图谱构建、遗传多样性分析、品种鉴定和分子身份证构建等研究^[4, 24-30]。但目前应用 SSR 荧光标记技术构建山东地方梨种质资源分子身份证的报道还未见到。种质资源的准确鉴定是资源保护、保存和育种利用的重要前提, 因此, 准确鉴定山东地方梨种质资源并构建分子身份证, 对山东地方梨种质资源的收集保护和评价利用具有重要意义。本研究利用开发筛选的 SSR 引物, 采用 SSR 荧光标记毛细管电泳技术结合带型编码方式构建 45 份山东梨种质资源的分子身份证, 以期为山东地方梨种质资源的准确鉴定和评价利用提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

试验于2016年6月至2017年10月在山东省果

树研究所进行。供试的45份材料采自国家梨产业技术体系泰安综合试验站天平湖核心示范园种质资源圃(表1)。每个品种随机选取3株,取幼嫩叶3~4片,混合后用锡箔纸包好,置于冰盒带回实验室,液

表1 45份供试梨种质资源

Table 1 45 resources of pear for SSR analysis

编号 Code	资源名称 Name of cultivar or species	引种地区 Introduction area	编号 Code	资源名称 Name of cultivar or species	引种地区 Introduction area
1	古梗梨 Gugengli	栖霞 Qixia	24	红梨 Hongli	费县 Feixian
2	苏梨 Suli	莱芜 Laiwu	25	天宝香 Tianbaoxiang	费县 Feixian
3	梨果 Ligu	莱芜 Laiwu	26	子母梨 Zimuli	费县 Feixian
4	金坠子 Jinzhuzi	莱芜 Laiwu	27	鸭广梨 Yaguangli	冠县 Guanxian
5	四棱梨 Silengli	栖霞 Qixia	28	银梨 Yinli	聊城 Liaocheng
6	木梨 Muli	历城 Licheng	29	冠梨 Guanli	宁阳 Ningyang
7	桑皮梨 Sangpili	乳山 Rushan	30	糖把梨 Tangbali	泰安 Taian
8	窝窝梨 Wowoli	崂山 Laoshan	31	花皮秋 Huapiqiu	滕州 Tengzhou
9	棠梨 Tangli	海阳 Haiyang	32	绵梨 Mianli	费县 Feixian
10	桑皮梨 Sangpili	海阳 Haiyang	33	酸梨 Suanli	冠县 Guanxian
11	黄县长把 Huangxian Changba	龙口 Longkou	34	鸭梨 Yali	冠县 Guanxian
12	面梨 Mianli	商河 Shanghe	35	铁皮梨 Tiepili	冠县 Guanxian
13	麻黄梨 Mahuangli	商河 Shanghe	36	二马黄 Ermahuang	平原 Pingyuan
14	胎黄梨 Taihuangli	齐河 Qihe	37	大香水 Daxiangshui	莱阳 Laiyang
15	池梨 Chili	博山 Boshan	38	荏梨 Chili	莱阳 Laiyang
16	平梨 Pingli	博山 Boshan	39	渣梨 Zhali	夏津 Xiajin
17	黑面梨 Heimianli	历城 Licheng	40	墩子梨 Dunzili	泰安 Taian
18	柰子 Naizi	齐河 Qihe	41	铁梨 Tieli	乐陵 Laoling
19	线穗子梨 Xiansuizili	昌邑 Changyi	42	车头梨 Chetouli	烟台 Yantai
20	大梨 Dali	昌邑 Changyi	43	马里金梨 Malijinli	枣庄 Zaozhuang
21	古根梨 Gugenli	昌邑 Changyi	44	小香水 Xiaoxiangshui	莱阳 Laiyang
22	谢花甜 Xiehuatian	昌邑 Changyi	45	瓶梨 Pingli	莱阳 Laiyang
23	面梨子 Mianlizi	费县 Feixian			

氮冷冻后于-80℃冰箱中保存备用。

1.2 SSR引物合成及筛选

采用MagneSphere Magnetic Separation Products (Promega)试剂盒磁珠富集短基因组DNA,产物纯化后进行克隆并筛选,建立SSR富集文库,从中开发并设计分布于梨17个连锁群的40对引物,引物由上

海生工生物工程公司合成,HAP纯化。采用丙烯酰胺凝胶电泳对初筛合格的引物进行复筛,从中筛选出扩增条带清晰、稳定、多态性高的10对引物用于样品扩增。正向引物的5'端加1个FAM荧光标记,由上海英骏生物技术有限公司合成(表2)。

1.3 DNA提取及PCR体系

表2 引物信息

Table 2 Information of 10 pairs of SSR primers

引物名称 Primer name	正向引物(5'-3') Forward primer sequence	反向引物(5'-3') Reverse primer sequence	重复基元 Repeat motifs
P5	CCCACCCGCGAAGAGTAATA	CTTCTCCAGCAAGCAAACC	(AG)13
P9	ACAATCACCTTGGAGTTAGA	CATCACAAATTGGAGAAGAG	(TC)15(AC)12
P10	ATCCATAGACCAGCACCAAG	CCGTGTCAAGTATTATTTTCG	(AG)14
P14	TCTCCTCTGCCATTTCTGTA	ATCTGCCGCTGCTGTTCTGT	(AG)9
P17	TCCTTACTACTCGAACTATCTG	AGTTTTGCGTAGAGTCTGGTC	(GA)14
P18	AAGCCATCTACAAGTCTC	ATTCATCACAGTTTCTCCC	(AG)15
P19	AACTCATTATACTTTGGACTAGC	GAAATACGGAAGACAAACACT	(AG)13
P27	CCTTGACGACTCACAAAACA	TGAAATAGATTGATGACGGA	(AC)8
P34	GCTTTTGAGTCTTCTGTGA	ATATGCTTGTGCTCCTTTT	(TG)6TT(TG)7(TC)6
P37	TTTGAAAGCTCTTTGAACC	GAACTGTTGTGAAAGGTCA	(GA)26

采用CTAB法提取样品总DNA。用1%琼脂糖凝胶电泳和微量紫外分光光度计检测DNA质量和浓度,并将浓度稀释至 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 下保存备用。SSR-PCR反应体系(共 $20 \text{ } \mu\text{L}$): ddH₂O $14.8 \text{ } \mu\text{L}$, dNTP $0.4 \text{ } \mu\text{L}$, Buffer $2 \text{ } \mu\text{L}$, 正向引物 $0.3 \text{ } \mu\text{L}$ ($20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 反向引物 $0.3 \text{ } \mu\text{L}$ ($20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), DNA模板 $2 \text{ } \mu\text{L}$, *Taq* E $0.2 \text{ } \mu\text{L}$ 。PCR扩增程序是: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min ; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s , 适宜退火温度复性 35 s , $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 40 s , 35 个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 5 min 。反应在Biometra梯度PCR仪上进行。

1.4 SSR荧光标记毛细管电泳检测

对PCR扩增产物进行纯化,将甲酰胺与分子质量内标按100:1的体积比混匀后,取 $15 \text{ } \mu\text{L}$ 加入上样板中,再加入 $1 \text{ } \mu\text{L}$ 稀释10倍的PCR产物,然后使用美国ABI3730XL测序仪进行毛细管电泳。待电泳结束后,利用Genemarker中的Fragment(Plant)片段分析软件对测序仪得到的原始数据进行分析,将各泳道内分子质量内标的位置与各样品峰值的位置做比较分析,得到片段大小。利用软件POPGENE 32分析数据获得引物扩增的等位基因数、扩增带型、样品在不同SSR位点的基因多样性和多态性信息含量。

1.5 分子身份证构建

利用10对引物对45份样品进行扩增,得到各样品扩增的指纹数据,将指纹数据转换为数字编码,即分子身份证。转换方法如下:将每对引物在某一样品上扩增出的每一种带型用个位阿拉伯数字1、2、3、……、9编码表示,为保证每一种带型只占一位数字,带型数大于9时,分别用a、b、c代表第10、11、12种带型,依次类推,无带用0表示,这样,每种引物在某一样品上的扩增带型用1位数字或字母表示;按照引物扩增带型数由少到多的顺序,将每个样品在10对引物上的扩增带型数据串联起来,即得到每个样品以10位数字或字母表示的分子身份证^[9]。

2 结果与分析

2.1 毛细管电泳结果

如表3所示,10对SSR引物对45份梨种质资源进行扩增,共检测到111个等位位点,每个引物检测到的等位位点4~19个,每对引物平均11.1个。共检测到189个带型,每个引物检测到带型数8~26个,每对引物平均18.9个。扩增的片段长85~295 bp。图1为引物P5对‘桑皮梨’‘面梨子’和‘槎子梨’的扩增

表3 10对SSR荧光引物对45份梨种质资源扩增结果
Table 3 Amplified results of 45 pear resources with 10 fluorescent-labelled SSR primers

引物名称 Primer name	退火温度 Annealing temperature/ $^\circ\text{C}$	等位基因数 Number of alleles detected	多态性信息含量 Polymorphism information content	扩增带型 Amplified bands	扩增片段大小 Size of bands amplified/bp
P5	54	15	0.83	24	245~295
P9	56	19	0.84	26	85~147
P10	57	4	0.55	8	265~277
P14	55	5	0.63	9	133~139
P17	53	14	0.83	23	148~178
P18	51	12	0.82	20	177~213
P19	57	14	0.81	23	220~256
P27	54	10	0.78	22	123~141
P34	58	10	0.74	20	210~242
P37	52	8	0.61	14	190~214

带型。

2.2 分子身份证编码

按表2引物的顺序即P5、P9、P10、P14、P17、P18、P19、P27、P34和P37,将每对引物在样品上扩增的带型编码进行串联排列(表4),得到45份山东地方梨种质资源的分子身份证代码,在对应的位置上,代码相同表示该引物在样品上扩增带型相同(表5)。结果表明,得到的45份供试材料的分子身份证代码均不相同,能够将所有种质资源区分开。

3 讨论

SSR标记具有高稳定性和高准确性等优点,目前主要通过聚丙烯酰胺凝胶电泳和荧光标记分析技术检测SSR扩增产物^[8,16]。其中,PAGE检测成本低,但存在读带不准确、对人体有害、对于大规模数据收集和分析效率低等缺点;而荧光标记分析技术解决了上述问题,更适用于大批量样品的检测分析^[31]。高源等^[25]对92个梨品种的研究表明,SSR荧光标记毛细管电泳检测法的数据具有高重复性、高准确性的优点。本研究结果也表明,SSR荧光标记技术较传统的PAGE技术(本研究前期曾采用)在扩增条带大小判读识别上明显具有准确性好、效率高等优点。

迄今为止,从梨基因组序列、EST和NGS等数据库已开发了1 000多对SSR引物^[28,30,32]。大量SSR标记被定位到相应的染色体上,获得了高质量的梨遗传连锁图谱,为种质鉴定、遗传多样性分析、起源演化与亲缘关系、目的基因定位等研究奠定了基础^[29-30,33-35]。分子身份证是在得到DNA指纹图谱的基础上,通过运用不同的编码方式对指纹图谱进行

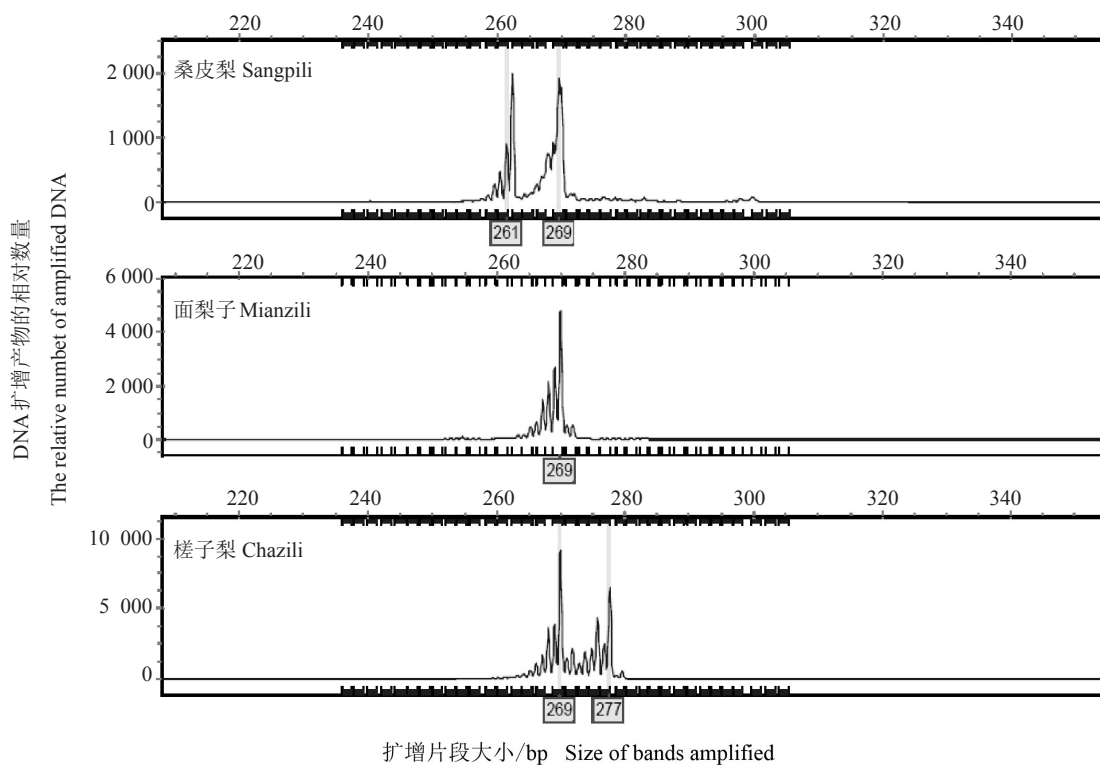


图 1 引物 P5 对不同梨样品扩增产物的带型

Fig. 1 Amplification bands between different genotypes of pear using primer P5

表 4 10 对 SSR 引物的扩增带型编号
Table 4 The code of different SSR patterns

带型编号 Code of pattern	P5	P9	P10	P14	P17	P18	P19	P27	P34	P37
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	245/277	85	265	133	148/158	177	220	123/135	210/238	190/196
2	257/273	95	265/269	133/135	148/174	179/189	222	123/137	212/228	190/198
3	261/269	95/101	265/277	133/137	150	181	224	123/139	214	194
4	261/277	95/103	267/269	135	150/160	181/187	224/236	129/135	214/220	194/198
5	263/269	95/107	267/277	135/137	152/164	181/189	224/238	129/137	214/222	194/200
6	267	95/121	269	135/143	154	181/197	224/240	129/141	214/226	196/200
7	269	99	269/277	137	154/158	183	224/246	131/137	214/228	198
8	269/273	101	277	137/139	154/160	185/189	224/256	133/137	214/230	198/200
9	269/277	103		139	154/164	187	226	133/139	214/242	198/202
a	269/283	103/125			154/168	187/191	226/256	133/141	220/226	198/204
b	269/287	107/141			156	187/197	228/240	135	222	198/214
c	271	109			156/164	189	236/252	135/137	222/226	200
d	273	111/147			156/168	189/195	238	135/139	222/228	200/202
e	273/277	113/127			156/178	189/197	238/246	137	222/238	200/204
f	273/283	119/141			158	191	238/248	137/139	226/238	
g	273/287	119/143			158/164	191/195	238/256	137/141	226/242	
h	275	121/137			158/174	193	240	137/143	228	
i	275/287	121/141			160/164	193/195	240/246	137/147	228/238	
j	277	121/143			160/168	195	242/246	139	228/242	
k	277/287	121/145			160/176	213	244/246	139/141	238/242	
l	279	127/139			160/178		246	139/143		
m	287	127/141			162		246/256	141		
n	293	127/147			164/170		252/256			
o	295	139/145								
p		141								
q		141/147								

注:-表示未获得扩增带型;空格表示可扩充带型。

Note: -means non-amplified SSR pattern; Blank space means extensible pattern.

表 5 45 份山东地方梨种质资源分子身份证代码表
Table 5 Molecular ID of 45 pear germplasm resources of Shandong

样品编号 Code	品种名或种名 Name of cultivar or species	分子身份证编号 Molecular ID	样品编号 Code	品种名或种名 Name of cultivar or species	分子身份证编号 Molecular ID
1	古梗梨 Gugengli	7285fcenkc	24	红梨 Hongli	ip326f0hhe
2	苏梨 Suli	la12h6n371	25	天宝香 Tianbaoxiang	h2338f6lja
3	梨果 Ligu	7b4485e335	26	子母梨 Zimuli	gj156fomgc
4	金坠子 Jinzhuizi	hm828c7g68	27	鸭广梨 Yaguangli	m824l22744
5	四棱梨 Silengli	5f58fj3395	28	银梨 Yinli	7q33i9aeid
6	木梨 Muli	5285cc5gd8	29	冠梨 Guanli	8i1599gfh8
7	桑皮梨 Sangpili	4q339g3ne7	30	糖把梨 Tangbali	hm828c7h68
8	窝窝梨 Wowoli	3235ak55f7	31	花皮秋 Huapiqiu	j282ic5e9c
9	棠梨 Tangli	k7334j1m3c	32	绵梨 Mianli	h2336j8mje
10	桑皮梨 Sangpili	c119ff94ba	33	酸梨 Suanli	gj72fe5g5c
11	黄县长把 Huangxian Changba	fp3474njjc	34	鸭梨 Yali	ml22j8ie7c
12	面梨 Mianli	1e62fcme9c	35	铁皮梨 Tiepili	hq83ic6g79
13	麻黄梨 Mahuangli	9f228b5fd8	36	二马黄 Ermahuang	eq34cc8g7c
14	胎黄梨 Taihuangli	9f248ce175	37	大香水 Daxiangshui	7i35g4nfhc
15	池梨 Chili	id82ci58g7	38	荏梨 Chili	3i87ia6ah7
16	平梨 Pingli	bn84cd5eh8	39	渣梨 Zhali	7c3857fehc
17	黑面梨 Heimianli	3k85ngh928	40	墩子梨 Dunzili	fm346fem68
18	柰子 Naizi	o562b5j293	41	铁梨 Tieli	m2191734bb
19	线穗子梨 Xiansuizili	4675dc8ecc	42	车头梨 Chetouli	n91621d142
20	大梨 Dali	ai159bgfh8	43	马里金梨 Malijinli	j282ic5e9d
21	古根梨 Gugenli	n916kcb888	44	小香水 Xiaoxiangshui	6f75f3efj6
22	谢花甜 Xiehuatian	3o74dkged4	45	瓶梨 Pingli	7f75f3egj6
23	面梨子 Mianlizi	jf31ec4d15			

数字化处理后得到字符串形式的结果,使得品种鉴别和检索变得更加快捷^[9]。张靖国等^[11]利用 17 对 SSR 引物构建了 20 份梨栽培品种的分子身份证;薛华柏等^[6]利用 25 对 SSR 引物对分别属于砂梨、白梨、新疆梨、西洋梨和秋子梨的 124 个梨品种进行扩增,构建了梨品种 SSR 特征指纹数据表和分子身份证;张小双等^[37]利用 17 对 SSR 引物构建了 53 份秋子梨的分子身份证,建立了每份种质的条形码标识。本研究用来自梨基因组的 10 对 SSR 标记构建了 45 份山东地方梨种质资源的分子身份证,共检测到 111 个 SSR 等位点,平均每对引物对品种扩增的等位点 11.1 个, PIC 值为 0.55~0.84, 平均 0.75。

对于分子身份证的构建,不同研究者采用的编码方法不一致^[9, 12]。本研究采用数字与字母相结合的方式,直接将引物扩增的条带按照顺序对其进行编码,理论上每对引物最多可以编码 36(10 个个位数和 26 个小写字母)种带型^[9]。研究选取了扩增条带清晰、稳定、多态性较好的 10 对引物,其中 PIC 值高于平均值的有 6 对,理论上可以区分 6⁶ 个梨种质资源。本研究选取的 45 份山东地方梨种质资源基本涵盖了目前生产上仍有栽培和分布的品种资源,构建的分子身份证可以用于品种资源的准确鉴定。

地方种质资源往往具有很多优良的特异性状,是

抗逆育种和品质育种的宝贵基因库。目前,山东地方梨种质资源急剧减少,90%以上的资源遭到破坏,迫切需要收集保护,分子身份证的构建对于种质资源精准鉴别和保护利用非常重要。本研究初步构建了 45 份山东地方梨种质资源的分子身份证,可为这些种质资源的准确鉴定提供依据。今后将进一步加大对山东地方梨种质资源的收集力度,通过构建分子身份证,生成每份种质资源的特异标识,从而快速高效地鉴定梨种质资源,有效避免资源收集的重复,甄别同名异物及同物异名资源,提高种质鉴定和评价的效率。

4 结 论

采用 SSR 荧光标记毛细管电泳检测技术构建了 45 份山东地方梨种质资源的分子身份证,构建的分子身份证互不相同,可以将材料完全区分开,为山东地方梨种质资源的准确鉴定、评价利用及亲缘关系分析提供了参考依据。

参考文献 References:

- [1] 蒲富慎,王宇霖. 中国果树志·梨[M]. 上海:上海科学技术出版社,1963.
PU Fushen, WANG Yulin. China fruit flora· Pear[M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Press, 1963.
- [2] WU J, WANG Y, XU J, KORBAN S S, FEI Z, TAO S, MING

- R, TAI S, KHAN A M, POSTMAN J D, GU C, YIN H, ZHENG D, QI K, LI Y, WANG R, DENG C H, KUMAR S, CHAGNÉ D, LI X, WU J, HUANG X, ZHANG H, XIE Z, LI X, ZHANG M, LI Y, YUE Z, FANG X, LI J, LI L, JIN C, QIN M, ZHANG J, WU X, KE Y, WANG J, YANG H, ZHANG S. Diversification and independent domestication of Asian and European pears [J]. *Genome Biology*, 2018, 19(1): 77.
- [3] 束怀瑞, 贾元淑, 戚其家, 于锡斌, 邵达元. 山东果树志: 梨志 [M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1996.
- SHU Huairui, JIA Yuanshu, QI Qijia, YU Xibin, SHAO Dayuan. *Shandong fruit flora: Pear* [M]. Jinan: Shandong Scientific and Technical Press, 1996.
- [4] 岳晓燕, 黄新忠, 宗宇, 滕元文. 福建省梨地方品种的遗传多样性研究 [J]. *园艺学报*, 2015, 42(1): 119-130.
- YUE Xiaoyan, HUANG Xinzhong, ZONG Yu, TENG Yuanwen. Genetic diversity of cultivated pears from Fujian province revealed by cpDNA haplotypes and nuclear microsatellites [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2015, 42(1): 119-130.
- [5] 曹玉芬, 刘凤之, 高源, 姜立杰, 王昆, 马智勇, 张开春. 梨栽培品种 SSR 鉴定及遗传多样性 [J]. *园艺学报*, 2007, 35(2): 305-310.
- CAO Yufen, LIU Fengzhi, GAO Yuan, JIANG Lijie, WANG Kun, MA Zhiyong, ZHANG Kaichun. SSR analysis of genetic diversity of pear cultivars [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2007, 35(2): 305-310.
- [6] 左力辉, 韩志校, 梁海永, 杨敏生. 不同产地中国李资源遗传多样性 SSR 分析 [J]. *园艺学报*, 2015, 42(1): 111-118.
- ZUO Lihui, HAN Zhixiao, LIANG Haiyong, YANG Minsheng. Analysis of Genetic Diversity of *Prunus salicina* from different producing areas by SSR markers [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2015, 42(1): 111-118.
- [7] ACHTAK H, OUKABLI A, ATER M, SANTONI S, KJELLBERG F, KHADARI B. Microsatellite markers as reliable tools for fig cultivar identification [J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2009, 134(6): 624-631.
- [8] PAN Y B. Databasing molecular identities of sugarcane (*Saccharum* spp.) clones constructed with microsatellite (SSR) DNA markers [J]. *American Journal of Plant Sciences*, 2010, 1(2): 87-94.
- [9] 徐雷锋, 葛亮, 袁素霞, 任君芳, 袁迎迎, 李雅男, 刘春, 明军. 利用荧光标记 SSR 构建百合种质资源分子身份证 [J]. *园艺学报*, 2014, 41(10): 2055-2064.
- XU Leifeng, GE Liang, YUAN Suxia, REN Junfang, YUAN Yingying, LI Yanan, LIU Chun, MING Jun. Using the fluorescent labeled SSR markers to establish molecular identity of Lily germplasms [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2014, 41(10): 2055-2064.
- [10] 张嘉, 刘爱青, 张淑玲, 解莹然, 刘燕. 利用荧光标记 SSR 绘制中国芍药品种分子身份证 [J]. *北京林业大学学报*, 2016, 38(6): 101-109.
- ZHANG Jia, LIU Aiqing, ZHANG Shuling, XIE Yingran, LIU Yan. Using the SSR with fluorescent labeling to establish SSR molecular ID code for cultivars of the Chinese herbaceous peony [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2016, 38(6): 101-109.
- [11] MORIYA S, IWANAMI H, OKADA K, YAMAMOTO T, ABE K. A practical method for apple cultivar identification and parent-offspring analysis using simple sequence repeat markers [J]. *Euphytica*, 2011, 177(1): 135-150.
- [12] 高源, 刘凤之, 王昆, 王大江, 龚欣, 刘立军. 苹果部分种质资源分子身份证的构建 [J]. *中国农业科学*, 2015, 48(19): 3887-3898.
- GAO Yuan, LIU Fengzhi, WANG Kun, WANG Dajiang, GONG Xin, LIU Lijun. Establishment of molecular ID for some apple germplasm resources [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(19): 3887-3898.
- [13] 高源, 王昆, 王大江, 龚欣, 刘立军, 刘凤之. 利用 TP-M13-SSR 标记构建苹果栽培品种的分子身份证 [J]. *园艺学报*, 2016, 43(1): 25-37.
- GAO Yuan, WANG Kun, WANG Dajiang, GONG Xin, LIU Lijun, LIU Fengzhi. Molecular ID establishment of apple cultivars by TP-M13-SSR [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, 43(1): 25-37.
- [14] 陈昌文, 曹珂, 王力荣, 朱更瑞, 方伟超. 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*, 2011, 44(10): 2081-2093.
- CHEN Changwen, CAO Ke, WANG Lirong, ZHU Gengrui, FANG Weichao. Molecular ID establishment of main China peach varieties and peach related species [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(10): 2081-2093.
- [15] 李雄伟, 孟宪桥, 贾惠娟, 王力荣, 王志强, 马瑞娟, 吴大军, 董冰, Maria José Aranzana, Pere Arús, 高中山. 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.
- LI Xiongwei, MENG Xianqiao, JIA Huijuan, WANG Lirong, WANG Zhiqiang, MA Ruijuan, WU Dajun, DONG Bing, Maria José Aranzana, Pere Arús, GAO Zhongshan. Construction of peach genotype database with fluorescent-labeled SSR markers [J]. *Journal of Fruit Science*, 2013, 30(6): 924-932.
- [16] 麻丽颖, 孔德仓, 刘华波, 王斯琪, 李颖岳, 庞晓明. 36 份枣品种 SSR 指纹图谱的构建 [J]. *园艺学报*, 2012, 39(4): 647-654.
- MA Liying, KONG Decang, LIU Huabo, WANG Siqi, LI Yingyue, PANG Xiaoming. Construction of SSR fingerprint on 36 Chinese Jujube cultivars [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2012, 39(4): 647-654.
- [17] 王斯琪, 唐诗哲, 孔德仓, 贺润平, 刘华波, 麻丽颖, 刘君, 王哲, 李颖岳, 申连英, 庞晓明. 利用 SSR 标记进行枣树子代苗父本鉴定 [J]. *园艺学报*, 2012, 39(11): 2133-2141.
- WANG Siqi, TANG Shizhe, KONG Decang, HE Rumping, LIU Huabo, MA Liying, LIU Jun, WANG Zhe, LI Yingyue, SHEN Lianying, PANG Xiaoming. Application of SSR markers for the identification of paternal parent for the seedlings of Chinese jujube [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2012, 39(11): 2133-2141.
- [18] 李益, 马先锋, 唐浩, 李娜, 江东, 龙桂友, 李大志, 牛英, 韩瑞玺, 邓子牛. 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): 149-159.
- LI Yi, MA Xianfeng, TANG Hao, LI Na, JIANG Dong, LONG Guiyou, LI Dazhi, NIU Ying, HAN Ruixi, DENG Ziniu. SSR markers screening for identification of Citrus cultivar and construction of DNA fingerprinting library [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(15): 149-159.
- [19] EROGUL D, CAKIR B. Molecular characterization of sweet cherry genotypes and rootstocks by using *Prunus* SSR sequences [J]. *Austin Journal of Biotechnology & Bioengineering*, 2015, 2

- (3): 1044.
- [20] 王让剑, 杨军, 孔祥瑞, 高香凤. 基于荧光标记 SSR 的 CID 法快速鉴定福建茶树品种[J]. 茶叶科学, 2016, 36(2): 210-218.
WANG Rangjian, YANG Jun, KONG Xiangrui, GAO Xiangfeng. An efficient identification of tea cultivars in Fujian with a strategy of cultivar identification diagram (CID) based on fluorescent labeled SSR Markers[J]. Journal of Tea Science, 2016, 36(2): 210-218.
- [21] CIPRIANI G, SPADOTTO A, JURMAN I, DI GASPERO G, CRESPIAN M, MENEGHETTI S, FRARE E, VIGNANI R, CRESTI M, MORGANTE M, PEZZOTTI M, PE E, POLICRI TI A, TESTOLIN R. The SSR-based molecular profile of 1005 grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions uncovers new synonymy and parentages, and reveals a large admixture amongst varieties of different geographic origin[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 121(8): 1569-1585.
- [22] 尹玲, 张晨, 向江, 张雅丽, 安云鹤, 徐海英, 赵胜建, 郭修武, 卢江. 我国新育成葡萄品种 SSR 指纹图谱的建立[J]. 果树学报, 2015, 32(3): 366-373.
YIN Ling, ZHANG Chen, XIANG Jiang, ZHANG Yali, AN Yunhe, XU Haiying, ZHAO Shengjian, GUO Xiuyu, LU Jiang. The SSR fingerprinting of grapevine cultivars newly-developed in China[J]. Journal of Fruit Science, 2015, 32(3): 366-373.
- [23] 李贝贝, 姜建福, 张颖, 樊秀彩, 孙海生, 张国海, 刘崇怀. 葡萄品种 DNA 指纹数据库的构建及遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2018, 19(2): 338-350.
LI Beibei, JIANG Jianfu, ZHANG Ying, FAN Xiucui, SUN Haisheng, ZHANG Guohai, LIU Chonghui. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars based on SSR markers[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19(2): 338-350.
- [24] 卜海东, 张冰冰, 宋洪伟, 梁英海, 刘延杰, 程显敏, 顾广军, 刘畅. 利用 SSR 结合表型性状构建寒地梨资源核心种质[J]. 园艺学报, 2012, 39(11): 2113-2123.
BU Haidong, ZHANG Bingbing, SONG Hongwei, LIANG Yinghai, LIU Yanjie, CHENG Xianmin, GU Guangjun, LIU Chang. Construction core collections of pear germplasm in cold region by SSR and phenotypic traits[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2012, 39(11): 2113-2123.
- [25] 高源, 田路明, 刘凤之, 曹玉芬. 利用 SSR 荧光标记构建 92 个梨品种指纹图谱[J]. 园艺学报, 2012, 39(8): 1437-1446.
GAO Yuan, TIAN Luming, LIU Fengzhi, CAO Yufen. Using the SSR fluorescent labeling to establish SSR fingerprints for 92 cultivars in *Pyrus*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2012, 39(8): 1437-1446.
- [26] TIAN L M, GAO Y, CAO Y F, LIU F Z, YANG J. Identification of Chinese white pear cultivars using SSR markers[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2012, 59(3): 317-326.
- [27] FAN L, ZHANG M Y, LIU Q Z, LI L T, SONG Y, WANG L F, ZHANG S L, WU J. Transferability of newly developed pear SSR markers to other Rosaceae species[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2013, 31: 1271-1282.
- [28] ZHANG M Y, FAN L, LIU Q Z, SONG Y, WEI S W, ZHANG S L, WU J. A novel set of EST-derived SSR markers for pear and cross-species transferability in Rosaceae[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2014, 32(1): 290-302.
- [29] WU J, LI L T, LI M, KHAN M A, LI X G, CHEN H, YIN H, ZHANG S L. High-density genetic linkage map construction and identification of fruit-related QTLs in pear using SNP and SSR markers[J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(20): 5771-5781.
- [30] ERFANI-MOGHADAM J, ZAREI A. Assessment of genetic structure among different pear species (*Pyrus* spp.) using apple-derived SSR and evidence of duplications in the pear genome [J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2018, 32(3): 591-601.
- [31] 张靖国, 田瑞, 陈启亮, 杨晓平, 胡红菊. 基于 SSR 标记的梨栽培品种分子身份证的构建[J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(1): 12-17.
ZHANG Jingguo, TIAN Rui, CHEN Qiliang, YANG Xiaoping, HU Hongju. Establishment of molecular ID of pear cultivars based on SSR markers[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2014, 33(1): 12-17.
- [32] XUE H, ZHANG P, SHI T, YANG J, WANG L, WANG S, SU Y, ZHANG H, QIAO Y, LI X. Genome-wide characterization of simple sequence repeats in *Pyrus bretschneideri* and their application in an analysis of genetic diversity in pear[J]. BMC Genomics, 2018, 19(1): 473.
- [33] 薛华柏, 杨健, 王龙, 王苏珂, 张慧蓉, 乔玉山, 章镇, 李秀根. 29 个梨品种 SSR 特征指纹数据表的构建[J]. 果树学报, 2015, 32(6): 1028-1035.
XUE Huabai, YANG Jian, WANG Long, WANG Suke, ZHANG Huirong, QIAO Yushan, ZHANG Zhen, LI Xiugen. Construction of SSR characteristic fingerprinting data table for 29 pear cultivars[J]. Journal of Fruit Science, 2015, 32(6): 1028-1035.
- [34] 王龙, 薛华柏, 杨健, 王苏珂, 苏艳丽, 李秀根. 80 个梨品种 SSR 特征指纹数据表的构建[J]. 果树学报, 2016, 33(增刊): 43-51.
WANG Long, XUE Huabai, YANG Jian, WANG Suke, SU Yanli, LI Xiugen. Construction of SSR characteristic fingerprinting data table for 80 pear cultivars[J]. Journal of Fruit Science, 2016, 33(Suppl.): 43-51.
- [35] 王磊, 王龙, 薛华柏, 李秀根, 李疆. 梨遗传连锁图谱的构建与比较分析[J]. 中国农业科学, 2016, 49(12): 2353-2367.
WANG Lei, WANG Long, XUE Huabai, LI Xiugen, LI Jiang. Construction of SSR genetic linkage map and comparison on pears[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2016, 49(12): 2353-2367.
- [36] 薛华柏, 赵瑞娟, 王磊, 杨健, 王龙, 王苏珂, 苏艳丽, 李秀根. 梨品种 SSR 特征指纹图谱与分子身份证构建[J]. 中国南方果树, 2018, 47(增刊): 42-49.
XUE Huabai, ZHAO Ruijuan, WANG Lei, YANG Jian, WANG Long, WANG Suke, SU Yanli, LI Xiugen. Construction of SSR characteristic fingerprinting and molecular ID of pear cultivars [J]. South China Fruits, 2018, 47(Suppl.): 42-49.
- [37] 张小双, 曹玉芬, 齐丹, 张莹, 田路明, 董星光, 霍宏亮, 徐家玉, 刘超. 秋子梨基于 SSR 荧光标记的分子身份证构建及亲缘关系分析[J]. 中国南方果树, 2018, 47(4): 92-98.
ZHANG Xiaoshuang, CAO Yufen, QI Dan, ZHANG Ying, TIAN Luming, DONG Xingguang, HUO Hongliang, XU Jiayu, LIU Chao. Establishment of molecular ID and genetic diversity analysis of *Pyrus ussuriensis* based on fluorescent labeled SSR markers[J]. South China Fruits, 2018, 47(4): 92-98.