

# 基于 SSR 标记的澳洲坚果种质资源 DNA 指纹图谱的构建

李志强, 吴超, 贺熙勇, 陶亮, 耿建建, 马静, 宫丽丹\*

(云南省热带作物科学研究所, 云南景洪 666100)

**摘要:**【目的】筛选一套 SSR 引物, 构建澳洲坚果种质 DNA 指纹图谱, 为澳洲坚果种质资源收集和品种保护提供技术支持。【方法】对澳洲坚果基因组序列进行 SSR 位点搜索并设计引物, 以表型差异较大的 4 份种质为试材, 利用琼脂糖电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳筛选多态性引物, 将筛选得到的引物荧光标记, 建立基于荧光 SSR 标记的澳洲坚果种质鉴定体系。【结果】挑选的 240 对 SSR 引物经 PCR 扩增后进行 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 选取其中 155 对 SSR 引物进行 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。最终选择 22 对扩增稳定、多态性高的 SSR 引物进行荧光标记, 经毛细管电泳检测, 获得 83 份澳洲坚果的基因型数据。利用其中 9 对荧光引物组合, 构建了上述材料的 DNA 指纹图谱。【结论】筛选获得高效 SSR 引物, 用于澳洲坚果种质资源的快速分子鉴定。

关键词: 澳洲坚果; SSR 标记; 毛细管电泳; DNA 指纹图谱

中图分类号: S664.9

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2022)11-2028-08

## Construction of DNA fingerprint of macadamia germplasm based on SSR markers

LI Zhiqiang, WU Chao, HE Xiyong, TAO Liang, GENG Jianjian, MA Jing, GONG Lidan\*

(Yunnan Institute of Tropical Crops, Jinghong 666100, Yunnan, China)

**Abstract:** 【Objective】 Using molecular markers to construct DNA fingerprints is an effective strategy to identify plant germplasm. SSR (Simple Sequence Repeats) molecular markers are preferred for plant DNA fingerprinting constantly, due to their abundance, co-dominant inheritance, and reproducibility. The aim of this study was to construct macadamia DNA fingerprint using a series of SSR primers in order to provide technical support for macadamia nut germplasm collection and variety protection. 【Methods】 The genome DNA sequence of macadamia (*M. integrifolia*) was searched on NCBI website. The repeated base sites in the sequence were screened, and the primer 3 was used to design primers in batch. The standard primers were synthesized for subsequent test, according to the primer selection standard: the repeat unit is more than 2 bases, the number of repetitions is more than 8 times, and it is evenly distributed on the chromosome. The genomic DNA of the test material was extracted by CTAB method. The SSR-PCR reaction system is: 10 × Buffer 2 μL, 2.5 mmol · L<sup>-1</sup> dNTP 0.4 μL, positive and negative primers 0.3 μL respectively, DNA template 2 μL (20 ng · μL<sup>-1</sup>), 5U *Taq* 0.2 μL, ddH<sub>2</sub>O 14.8 μL. The PCR amplification procedure was shown as follows: Pre denaturation at 94 °C for 5 min; Denaturation at 94 °C for 30 s, renaturation at 65 °C to 50 °C for 30 s, extension at 72 °C for 40 s, a total of 35 cycles; The final extension was made at 72 °C for 3 min. 4 materials with large phenotypic differences were selected for primer screening. Firstly, PCR amplification products were detected by 2% agarose gel electrophoresis, followed by PAGE detection with good amplification effect. Secondly, the initially selected PCR products plus the buffer denatured at 94 °C for 10 min, and silver staining was made after 6% dena-

收稿日期: 2022-03-14 接受日期: 2022-05-27

基金项目: 农业农村部热带作物种质资源保护项目(18210012); 云南省热带作物科技创新体系建设项目(RF2022-13)

作者简介: 李志强, 男, 助理研究员, 硕士, 研究方向为澳洲坚果种质资源与育种。Tel: 15368639770, E-mail: 977782501@qq.com

\*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13887932361, E-mail: gld2001@126.com

turing polyacrylamide gel electrophoresis and primers with good amplification effect and polymorphism were selected. Thirdly, the screened SSR primers were labeled with 6-FAM fluorescent dye. After PCR amplification, 0.3  $\mu\text{L}$  PCR product, 0.5  $\mu\text{L}$  internal lane standards and 9.5  $\mu\text{L}$  deionized formamide, were mixed and added to PCR plate, denatured at 95  $^{\circ}\text{C}$  for 5 min, cooled at 4  $^{\circ}\text{C}$  and then centrifuged. The capillary electrophoresis was performed with 3730xl sequencer. The allele loci of each primer were counted. The homozygous loci were recorded as X/X, the heterozygous loci were recorded as X/Y, the small fragment data in the heterozygous loci were in the front, the large fragment data were on the back, and the allele variation deletion loci were recorded as 0, for forming DNA fingerprint data. Referring to the methods of Yang Wenjuan and Guo Yanchun, the alleles obtained from each pair of primers were coded with numbers + English letters, and the numbers 1-9 were used in the order of molecular weight from small to large, and the parts beyond 9 were expressed with English letters A-Z, so as to construct the fingerprint code of the tested materials. DNA molecular ID cards in the form of bar code and quick response (QR) code were produced through online bar code generator and quick response (QR) code generator respectively. 【Results】 240 pairs of primers were initially selected, and detected by 2% agarose gel electrophoresis after PCR amplification. 155 pairs of SSR primers were selected for 6% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. Finally, 22 pairs of SSR primers with stable amplification and high polymorphism were selected for fluorescence labeling, and 83 macadamia germplasm genotypes were obtained by capillary electrophoresis. The DNA fingerprints and DNA molecular ID card of the above materials were constructed using the combination of 9 pairs of fluorescent primers. For instance, primer P202 had 13 polymorphic loci, encoded in proper order as 286 (1), 286 / 288 (2), 286 / 290 (3), 286 / 292 (4), 288 (5), 288 / 290 (6), 288 / 292 (7), 288 / 294 (8), 290 (9), 290 / 292 (a), 292 (b), 292 / 294 (c) and 300 (d). The 9 pairs of primers were arranged and combined in the order of P211, P127, p238, p132, p118, p163, p202, p141 and P84, the coding information of each germplasm in each primer was counted. For example, the SSR fingerprint code of Jingha 57 is H7A49A52I, the first letter “H” indicates that the amplified fragment of germplasm Jingha 57 in primer P211 were ranked 17th in the primer polymorphism fragment gradient, and the second number “7” indicated that the amplified fragment of germplasm Jingha 57 in primer P127 were ranked 7th in the primer polymorphism fragment gradient, The third letter “A” indicated that the amplified fragment of germplasm Jingha 57 in primer P238 ranks first in the gradient of polymorphic fragment of the primer, and the other codes were analogized in turn. 【Conclusion】 SSR primers with high efficiency were obtained and used for rapid molecular identification of Macadamia germplasm resources.

**Key words:** Macadamia; SSR marker; Capillary electrophoresis; DNA fingerprint

澳洲坚果(*Macadamia spp.*)是世界上重要的坚果作物之一,原产于澳大利亚东海岸亚热带雨林<sup>[1-3]</sup>。我国大陆地区于20世纪70年代末开始澳洲坚果引种试种,至2020年末,中国澳洲坚果种植面积已占全世界的63%。种质资源的收集与保护及优良品种的选育是澳洲坚果产业持续发展的关键。目前国内澳洲坚果育种工作以国外引种和国内实生选种为主,随着育种工作的推进,新品种登记及审定数量不断增加。在生产中,同物异名或同名异物的现象已开始出现,危害育种者和生产者的权益。在澳

洲坚果种质资源收集过程中,如何对其快速鉴定以避免重复收集及实现有效利用,是澳洲坚果种质资源收集及保护工作的重要内容。

利用分子标记构建DNA指纹图谱广泛用于苹果<sup>[4-5]</sup>、柑橘<sup>[6]</sup>、杏<sup>[7]</sup>、核桃<sup>[8-9]</sup>等果树的品种保护及种质鉴定。澳洲坚果相关研究中,蔡元保等<sup>[10]</sup>建立SCoT标记反应体系并对12份澳洲坚果种质扩增,通过3对引物组合将供试材料完全区分,构建了12份材料的指纹图谱。SSR标记具有共显性,重复性好等优点,被国际植物新品种保护联盟(UPOV)推荐为构

建DNA指纹数据库的分子标记之一<sup>[1]</sup>,亦是国内植物品种鉴定DNA分子标记法推荐的方法之一<sup>[2]</sup>。将SSR标记应用于澳洲坚果DAN指纹图谱研究,在国内外尚未见报道。

笔者在本研究中基于已公布的基因组序列设计、筛选一套高多态性SSR引物,通过毛细管电泳建立澳洲坚果部分种质的DNA指纹图谱,构建其分子身份证,以期为澳洲坚果新品种保护及种质资源快速分子鉴定提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

试验材料均取自农业部景洪澳洲坚果种质资源圃。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA提取 每份材料从3个单株采集新鲜幼嫩叶片混合,采用CTAB法提取叶片基因组DNA。

1.2.2 SSR引物 在NCBI网站上搜索并下载澳洲坚果基因组序列(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=CM023674.1>),利用Kmer-SSR搜索重复碱基位点,然后编程处理序列,使用Primer3批量设计引物。

1.2.3 PCR扩增 PCR反应体系:10×Buffer 2 μL, 2.5 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP 0.4 μL,正反引物各0.3 μL, DNA模板2 μL(20 ng·μL<sup>-1</sup>), 5 U Taq 0.2 μL, ddH<sub>2</sub>O 14.8 μL。

PCR扩增程序:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,65℃到50℃降落复性30 s,72℃延伸40 s,共35个循环;最终72℃延伸3 min。

1.2.4 电泳检测 PCR产物在2%琼脂糖凝胶电泳中检测,选取其中条带明亮单一、扩增效果好的进行后续PAGE检测;将初步挑选出来的PCR产物加入上样缓冲液,94℃变性10 min,于6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳1.5 h(恒定功率90 W),银染检测。从中挑选具有多态性且与预期扩增产物片段大小一致的引物;筛选后的SSR引物标记6-FAM荧光染料合成荧光引物,经PCR扩增,取PCR产物0.3 μL、分子质量内标0.5 μL和去离子甲酰胺9.5 μL混合加入PCR板,95℃变性5 min,4℃冷却后离心,使用3730XL测序仪进行毛细管电泳。

1.2.5 数据处理 利用Genemarker V2.2.0软件对测序仪得到的原始数据进行分析,通过比较泳道内分子质量内标与样品峰值的位置,得到片段大小。

统计各样品等位基因位点,纯合位点记录为X,杂合位点记录为X/Y,杂合位点中的小片段数据在前,大片段数据在后,等位变异缺失位点记录为0。参照杨文娟<sup>[3]</sup>和郭艳春等<sup>[4]</sup>的方法,将每对引物获得的全部等位基因进行数字+英文字母形式的编码,按分子质量从小到大的顺序用数字1~9依次表示,超出9的部分用英文字母A~Z依次表示,构建供试材料的指纹图谱代码。通过在线条码生成器(<http://barcode.cnaidc.com/html/BCGcode128b.php>)和二维码生成器(<https://cli.im/>),分别生成条形码和二维码形式的DNA分子身份证。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物筛选

根据重复单元2个碱基以上,重复次数8次以上,在染色体上分布均匀的原则,从基因组中搜索设计的SSR引物中共挑选240对用于后续筛选。从供试样品中选取表型差异较大的4份材料(J72、J99、HAES695、O.C)对240对引物进行PCR扩增,PCR产物经2%琼脂糖电泳检测后,初步筛选出155对扩增效果较好SSR引物。上述155对SSR引物经6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,评价扩增片段的多态性、稳定性,挑选了22对多态性高、扩增稳定、带型较清晰的SSR引物(表1)。将最终得到的22对SSR引物合成FAM标记的荧光引物用于毛细管电泳检测。

### 2.2 DNA指纹图谱构建

利用22对多态性引物对83份澳洲坚果种质进行毛细管电泳检测。选取引物P84、P118、P127、P132、P141、P163、P202、P211、P238共9对构建该群体的DNA指纹图谱。将每对引物扩增得到的多态性片段根据大小进行数字+英文字母形式的编码(表2),如引物P202共有13个多态性位点,从小到大依次编码为286(1)、286/288(2)、286/290(3)、286/292(4)、288(5)、288/290(6)、288/292(7)、288/294(8)、290(9)、290/292(A)、292(B)、292/294(C)、300(D)。9对引物按照P211、P127、P238、P132、P118、P163、P202、P141、P84的顺序排列组合,将每份种质对应的引物位点编码统计组合,形成该种质的SSR指纹图谱代码(表3)。如景哈57的SSR指纹图谱代码为H7A49A52I(图1)。对照表2,第1个字母“H”表示种质景哈57在引物P211中的扩增片段位于该引物多

表 1 22 对 SSR 引物信息  
Table 1 Information of 22 pairs of SSR primers

引物 Primer	重复基团 Repeat types	正向序列 Forward primer	反向序列 Reverse primer	多态性信息量 PIC
P4	(AGGTCG)8	GTGGTGGTCAAGGACTTGGT	TGTCAGAATGCCATCTCTCA	0.740 1
P11	(CGAAAACA)16	TGGGTCTTATGAAAAGTGGAGA	GGGCAAACCTTAAGAGTAGATCAGC	0.875 9
P15	(GCC)8	TCGTAAGTAGCCGCGTGATC	GCGGTGGTGAGATGGATCTT	0.459 3
P16	(GCGT)10	GCAGGTCCCCATCCTTCATG	ACACCAATCTATCTGGCTTTGGA	0.820 5
P28	(CT)13	GCAGCTCTGTACAATGAGCC	AGCTCACCTTCCAATCTAGTATCC	0.735 6
P33	(AG)16	TGGATCTATGCACTTCCCCT	TCTTAATTAGCGGTTGGGAC	0.834 0
P35	(AG)21	TGGGTTTTCTTGACTCACTTG	GCTACCCAGCCAGAAACAGA	0.770 7
P74	(AAG)12	AGAGGGTAAACGTGAGAAACCC	CGTCCTCTCCTCTTCTCTGA	0.821 3
P84	(AT)12	AACCTGATGTCTGGCCCAAT	TGATACTGCATATCAAGAAGCCA	0.788 8
P89	(TA)13	AGTTGAATGAAGAGGCCGGG	TTGCTTTCTTCGACACGCA	0.800 2
P95	(TCT)10	CCCCCTCAAGTGAAGAAAAGT	TGTCCTTAACCTCCATATAAAAGGC	0.638 2
P98	(AAC)14	TCTGACCCTTAGATCACTGTTGT	TGACCATAGGAGAAGTAGTGAGGA	0.635 6
P108	(GA)12	TGTTGTTGATCTCCAATCGAAGC	TCCCCCTCCCTCTTTTTTGA	0.843 8
P118	(AT)14	ACTCAAAACACAGATCAACGGC	ACTTGGCTGCGAAAGAGTTG	0.834 9
P127	(GTT)11	TGCCATTTAAATAGGATAAGGCTG	TGGAATCAAGATTCAAGATTCGGG	0.757 9
P132	(TA)12	ATTAGACACAAAACAAAATACATGCT	CCAGTCCGACCTGGTTGG	0.767 6
P141	(TAT)11	ACCCCATACATATCAGTAAGAGGG	TGGCCCTTGTTTTCTTGGGA	0.823 6
P163	(TC)9	CTGTCACCCTTCCGGAAC	TCATCTGTTTCAGAGGCTTGCT	0.744 2
P202	(AT)14	GCTCTTCCACCTCATCTGGG	TGCTACGCTCTGATACGCTCT	0.600 4
P211	(AG)16	AGTAGCAGCCGAGATCACTG	TCTCTCCCTTGACATTCTCA	0.800 1
P238	(TAT)13	AGCTCCCTCAATGGCCTAGA	GGAAACATCACAAGGTTGAAGGT	0.722 3
P240	(AAATAAA)10	CGGACTCGATTGGGCCTATC	TACCATTTACACGCTCGGT	0.790 3

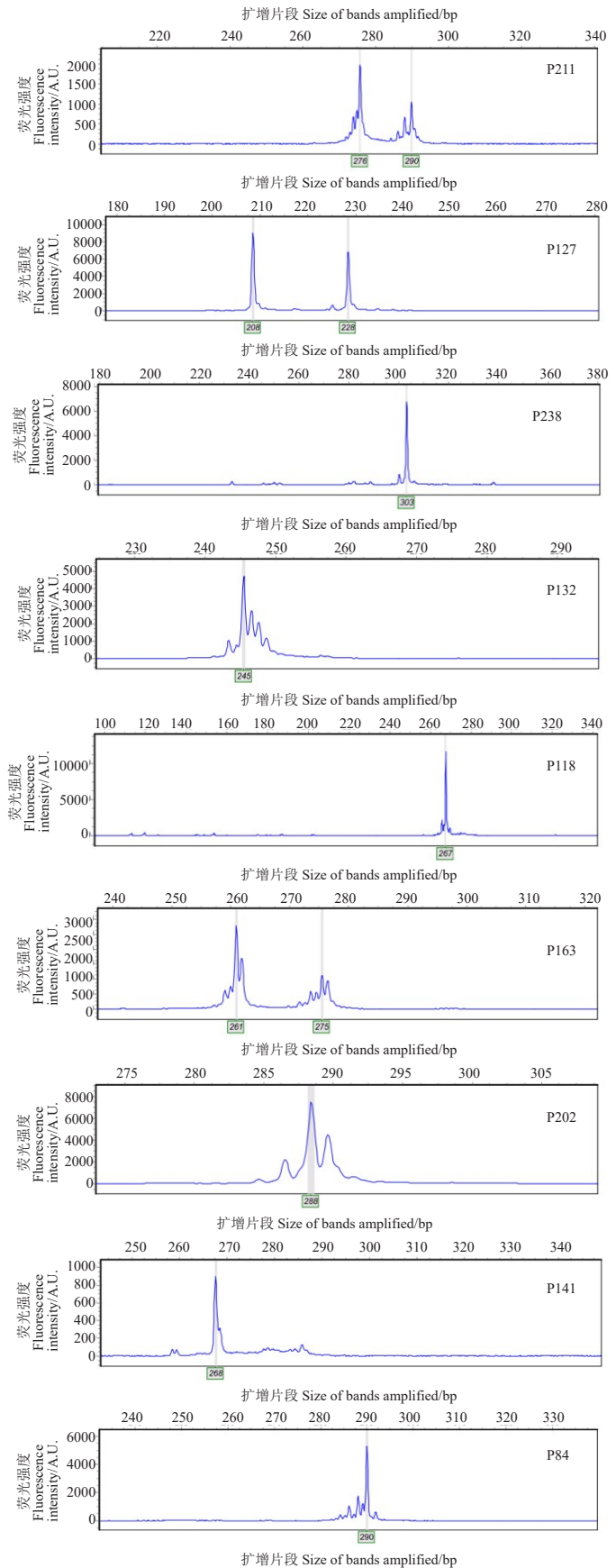
表 2 9 对 SSR 引物毛细管电泳结果及带型编码

Table 2 Amplification results and code typing of 9 pairs of SSR primers detected with capillary electrophoresis

引物名称 Primer name	毛细管电泳多态性片段及编码 Code of capillary electrophoresis polymorphism fragments
P211	266/278(1) 268(2) 268/270(3) 268/276(4) 268/278(5) 268/280(6) 268/290(7) 270/276(8) 270/278(9) 270/280(A) 270/290(B) 274/278(C) 274/288(D) 276/278(E) 276/280(F) 276/288(G) 276/290(H) 278(I) 278/290(J) 280(K) 280/290(L) 284(M) 286(N) 290(O)
P127	205(1) 205/208(2) 208(3) 208/215(4) 208/222(5) 208/225(6) 208/228(7) 208/232(8) 215(9) 218/222(A) 215/225(B) 215/228(C) 215/232(D) 218/225(E) 222/225(F) 222/232(G) 225(H) 225/228(I) 225/232(J) 228(K) 228/232(L) 232(M) 254/257(N)
P238	233(1) 248(2) 248/281(3) 281(4) 281/284(5) 284(6) 297(7) 297/303(8) 297/306(9) 303(A) 303/309(B) 309(C) 311(D) 319/331(E) 326(F) 334(G) 344(H)
P132	243/248(1) 243/250(2) 243/254(3) 245(4) 245/248(5) 245/250(6) 245/252(7) 245/254(8) 245/258(9) 245/264(A) 248(B) 248/252(C) 248/254(D) 248/258(E) 248/264(F) 250(G) 250/252(H) 250/254(I) 250/264(J) 250/266(K) 252(L) 252/254(M) 252/258(N) 254/264(O) 256(P) 264(Q) 270(R)
P118	120(1) 120/227(2) 120/267(3) 120/269(4) 120/273(5) 153/227(6) 227(7) 227/275(8) 267(9) 267/269(A) 267/271(B) 267/300(C) 269(D) 271(E) 271/273(F) 271/275(G) 271/277(H) 273(I) 273/275(J) 273/277(K) 275(L) 275/277(M) 275/279(N) 277(O) 277/279(P) 0/0(Q)
P163	257(1) 257/261(2) 257/263(3) 257/271(4) 257/275(5) 257/278(6) 261(7) 261/263(8) 261/271(9) 261/275(A) 263(B) 263/275(C) 263/278(D) 271/275(E) 285/298(F) 285/300(G) 292(H) 294(I) 298/304(J) 302/306(K)
P202	286(1) 286/288(2) 286/290(3) 286/292(4) 288(5) 288/290(6) 288/292(7) 288/294(8) 290(9) 290/292(A) 292(B) 292/294(C) 300(D)
P141	266/280(1) 268(2) 268/287(3) 268/290(4) 268/293(5) 270/280(6) 278(7) 278/284(8) 278/287(9) 278/310(A) 278/332(B) 280(C) 280/284(D) 280/287(E) 280/290(F) 280/293(G) 280/295(H) 284/287(I) 284/295(J) 287(K) 287/290(L) 287/293(M) 287/295(N) 287/298(O) 287/308(P) 290(Q) 290/293(R) 290/294(S) 290/303(T) 0(U)
P84	271(1) 273(2) 275/277(3) 275/290(4) 279(5) 279/282(6) 279/284(7) 279/288(8) 282(9) 282/286(A) 282/288(B) 284(C) 284/286(D) 284/288(E) 284/290(F) 286/288(G) 288(H) 290(I) 0(J)

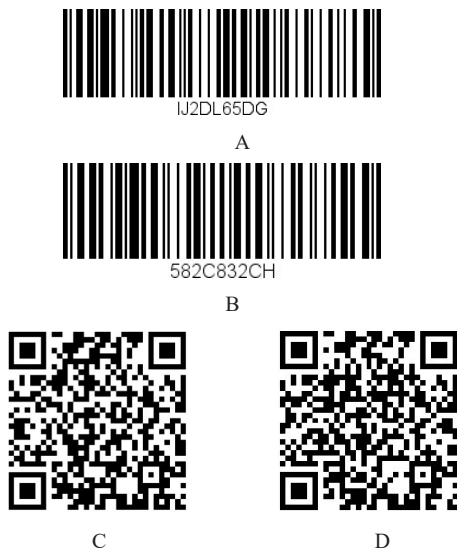
**表 3 83 份澳洲坚果种质资源的 SSR 指纹图谱代码**  
**Table 3 SSR fingerprinting of 83 macadamia germplasm resources**

材料名称 Accession name	SSR 指纹图谱 SSR fingerprinting	材料名称 Accession name	SSR 指纹图谱 SSR fingerprinting
景哈 22 Jingha22	B74B9472C	桂热 1 号 Guire1	582C832CH
景哈 8 Jingha8	L34BI15UH	景哈 27 Jingha27	674F312L9
景哈 36 Jingha36	EK2C9C5RE	景哈 32 Jingha32	EJ2BEC7GE
景哈 15 Jingha15	4J4CHA24C	景哈 G6 JinghaG6	4844E52RC
景哈 28 Jingha28	384BEA74E	景哈 24 Jingha24	J84BL42GE
景哈 25 Jingha25	B84BE574F	景哈 90 Jingha90	H84BEA43C
景哈 47 Jingha47	EM8CE47RC	景哈 42 Jingha42	L84CQ35QE
景哈 3 Jingha3	H7CC955ME	景哈 38 Jingha38	484BE42MC
广 9 Guang9	2B9NIF181	景哈 57 Jingha57	H7A49A52I
广 11 Guang11	3KGC955MC	95 号	MF6PIIBB1
HAES246	7647M22FF	J100	C8EBL357H
HAES294	5H44M15CI	J72	111BMG1TJ
HAES344	II2CKB7FF	J59	KB49F71I9
HAES508	78BG722EF	J99	MF6PIIB72
HAES695	LI46E72M2	J79	6LC2123CC
HAES741	78BG422EF	J63	674F312LC
HAES788	I744I28CI	J64	31A4955RC
HAES800	633D775QI	J65	F72B9954I
HAES816	6MAG622EF	T7	582BJ32HH
HAES856	J7CLI22EC	J104	AM2DE95RG
HAES863	6844123FC	J103	GGFRGKC21
HAES900	H55EO15P4	J101	9KA4K18GE
HAES918	6MAGD22EF	DM-1	5L2GE19F9
HAES948	6MA2626OI	J102	NN44BJAA1
HAES951	IE25J82QF	YB2-715	JA4JIB7C5
HAES842	J84C232EB	YB3-108	I9ADI15JB
HAES781	I844AB1CC	YB3-168	KM23L35IH
D	F821435NF	YB3-1483	J84DJ35EG
O.C	IJ2DL65DG	YB3-1484	IM3LJ15DG
A38	J73BJ77QE	YB3-1903	582BJ62DA
A203	4IA49AFRE	YB3-2044	KL44773S5
H2	8L7BBE75D	YB3-2045	K74B472E1
A4	IDAOJ15I2	YB4-404	KGAIN37E8
T2	J24BP619C	YB4-477	K4AQI77E8
D4	L54KP8417	YB4-588	F3A22B7H6
A16	IDAFJ358F	YB5-11	EM4B4B2NB
X8	FC78JD9C2	YB5-356	ID4MI12KB
X35	O84BC31KC	YB6-1061	K448I26DB
X18	I82LM366D	YB6-1060	I44DI29E1
Daddow	IE25J82QE	YB6-1186	54HAJ71L1
Queen Anne	DADLIHD73	YB6-1385	K8AB572FB
X13	788H122EE		



**图 1 景哈 57 在 9 个 SSR 位点的毛细管电泳检测带型**  
**Fig. 1 The Band features of Jingha 57 detected by capillary electrophoresis at 9 SSR loci**

态性片段梯度中的第17位,第2个数字“7”表示种质景哈57在引物P127中的扩增片段位于该引物多态性片段梯度中的第7位,第3个字母“A”表示种质景哈57在引物P238中的扩增片段位于该引物多态性片段梯度中的第10位,其余代码依次类推。将每份种质的SSR指纹图谱代码导入在线条形码生成器,生成条形码DNA分子身份证,将每份种质的主要信息和SSR指纹图谱代码导入二维码生成程序,生成二维码DNA分子身份证,图2为部分种质的示例。



A. O.C 条形码 DNA 分子身份证;B. 桂热一号条形码 DNA 分子身份证;C. O.C 二维码 DNA 分子身份证;D. 桂热一号二维码 DNA 分子身份证。

A. Bar code DNA molecular identification of O.C; B. Bar code DNA molecular identification of Guire1; C. Quick response code DNA molecular identification of O.C; D. Quick response code DNA molecular identification of Guire1.

图2 澳洲坚果种质条形码和二维码DNA分子身份证示例

Fig. 2 Bar code and quick response code of the macadamia germplasm

## 3 讨论

### 3.1 SSR标记的选择

随着分子标记技术不断发展,多种DNA标记被应用于植物DNA指纹图谱的构建。相较于其他分子标记类型,SSR标记有其独特的优势,目前仍然比任何其他传统的DNA指纹方法更重要<sup>[15-16]</sup>。文雁成等<sup>[17]</sup>研究表明,与SRAP标记相比,SSR标记以其扩增谱带少、易于识别和统计而更适合用于引物组合法构建品种指纹图谱。李志远等<sup>[18]</sup>认为SNP标记检测成本较高,鉴别相同数量品种所需要

的SNP标记数多于SSR标记。早期SSR标记开发存在成本高、周期长的问题,鉴于高通量测序费用的降低及越来越多物种基因组的发布,从已知序列识别重复位点开发SSR标记变得简单、快速和经济。

SSR标记的检测技术主要为聚丙烯酰胺凝胶电泳后银染及毛细管电泳的荧光检测。银染技术存在人工读取胶板误差较大问题。荧光标记的毛细管电泳检测无论是检测效率还是数据读取的自动化和准确性,都优于银染检测,特别是针对较大群体材料的检测<sup>[19-20]</sup>。与基于普通SSR标记的DNA指纹鉴定方法相比,基于SSR荧光标记的DNA指纹鉴定效率更高、结果更准确<sup>[21]</sup>。本次研究选择用聚丙烯酰胺凝胶电泳对引物进行初步筛选,最后将多态性引物荧光标记用于供试材料的分析。兼顾了引物筛选中的费用成本及检测效率,获得了澳洲坚果高效的SSR引物。

### 3.2 指纹图谱的构建

DNA指纹图谱是鉴别品种、品系的有力工具,非常适合于品种资源的鉴定工作<sup>[22]</sup>。在我国不同澳洲坚果种植区,存在新登记品种的主要特征相似、对同一优株不同命名的现象,易造成育种工作的重复及品种权纠纷。有些“假品种”与既有品种高度相似,苗期不易鉴别,后期给种植户带来一定的经济损失。DNA指纹图谱可在早期从分子水平上为品种鉴别保护提供技术支持。随着澳洲坚果种质资源保存数量的增加,利用分子标记技术构建澳洲坚果种质资源DNA指纹图谱,可有效避免种质资源的重复性收集和保存。

指纹库构建时采用什么样的数据记录方式不仅影响数据库构建的难易程度,还影响数据库使用的方便程度<sup>[23]</sup>。早期构建数据库时根据谱带的有无进行1/0形式编号的方法已很少使用,目前,对等位基因进行排列赋值的方法受到越来越多研究者的青睐。笔者选择扩增稳定、重复性好的特异引物按固定顺序排列组合,建立部分澳洲坚果种质的指纹数据库。并对各引物扩增的等位基因由小到大进行排列,以数字、英文字母的方式开始赋值,将每份材料的DNA数据转换为字符串,再将字符串转化为条形码及二维码形式,使其更具直观性,易被扫描识别,特别是二维码可添加文本图片信息,在资源圃种质资源的管理中应用更广。笔者在本研究中部分引物

的等位基因位点可能随着建库规模的扩大而增加,造成数据库的变动。但笔者认为,鉴于目前澳洲坚果种质资源收集保存较少,该简易直观的建库方法可满足现阶段的工作需求。

## 4 结 论

基于澳洲坚果基因组设计、筛选的 SSR 标记,可有效用于澳洲坚果种质资源的鉴定。

### 参考文献 References:

- [1] MAST A R, WILLIS C L, JONES E H, DOWNS K M, WESTON P H. A smaller macadamia from a more vagile tribe: inference of phylogenetic relationships, divergence times, and diaspora evolution in macadamia and relatives (tribe Macadamieae; Proteaceae)[J]. *American Journal of Botany*, 2008, 95(7): 843-870.
- [2] NOCK C J, BATEN A, BARKLA B J, FURTADO A, HENRY R J, KING G J. Genome and transcriptome sequencing characterises the gene space of *Macadamia integrifolia* (Proteaceae) [J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1):937.
- [3] O'CONNOR K, HAYES B, HARDNER C, NOCK C, BATEN A, ALAM M, HENRY R J, TOPP B. Genome-wide association studies for yield component traits in a macadamia breeding population[J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1):199.
- [4] 王立新, 张小军, 史星雲, 高华, 赵政阳. 苹果栽培品种 SSR 指纹图谱的构建[J]. *果树学报*, 2012, 29(6):971-977.  
WANG Lixin, ZHANG Xiaojun, SHI Xingyun, GAO Hua, ZHAO Zhengyang. Establishment of SSR fingerprinting database on major apple (*Malus × domestica*) cultivars[J]. *Journal of Fruit Science*, 2012, 29(6):971-977.
- [5] 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.
- [6] 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):2969-2979.  
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):2969-2979.
- [7] 刘娟, 廖康, 曼苏尔·那斯尔, 孙琪, 刘欢, 贾杨. 新疆杏品种(系)遗传多样性分析及 DNA 指纹图谱库构建[J]. *中国农业科学*, 2015, 48(4):748-758.  
LIU Juan, LIAO Kang, Mansuer·Nasir, SUN Qi, LIU Huan, JIA Yang. Analysis of genetic diversity and construction of DNA fingerprint database of Xinjiang apricot varieties (lines)[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(4):748-758.
- [8] 周于波, 朱鹏, 龚伟, 王景燕, 闫思宇, 吴开志. 四川核桃良种 SSR 指纹图谱构建及遗传多样性分析[J]. *西北植物学报*, 2018, 38(7):1254-1261.  
ZHOU Yubo, ZHU Peng, GONG Wei, WANG Jingyan, YAN Siyu, WU Kaizhi. SSR fingerprint construction and genetic diversity analysis of elite *Juglans regia* cultivars in Sichuan[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2018, 38(7):1254-1261.
- [9] 何旭东, 郑纪伟, 田雪瑶, 教忠意, 窦全琴. 薄壳山核桃品种亲缘关系分析与指纹图谱构建[J]. *林业科学研究*, 2021, 34(4):95-102.  
HE Xudong, ZHENG Jiwei, TIAN Xueyao, JIAO Zhongyi, DOU Quanqin. Genetic relationship analysis and fingerprint construction of *Carya illinoensis* varieties[J]. *Forest Research*, 2021, 34(4):95-102.
- [10] 蔡元保, 杨祥燕, 陈显国, 曾黎明, 郭凌飞, 林玉虹, 崔明勇. 澳洲坚果 SCoT 反应体系的建立及应用[J]. *热带亚热带植物学报*, 2013, 21(3):253-258.  
CAI Yuanbao, YANG Xiangyan, CHEN Xianguo, ZENG Liming, GUO Lingfei, LIN Yuhong, CUI Mingyong. Establishment and application of SCoT amplification system for macadamia[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2013, 21(3):253-258.
- [11] International Union for the Protection of New Varieties of Plants. Guidelines for DNA-profiling: Molecular markers selection and database construction[M]. Geneva: UPOV, 2006.
- [12] 中华人民共和国农业部. 植物品种鉴定 DNA 分子标记法总则: NY/T 2594—2016[S]. 北京: 中国农业出版社, 2016.  
Ministry of Agriculture and Rural of the People's Republic of China. General guideline for identification of plant varieties using DNA markers: NY/T 2594—2016[S]. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2016.
- [13] 杨文娟. 芝麻应用核心种质 DNA 分子身份证和种质资源数据库共享平台构建[D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.  
YANG Wenjuan. Establishment of DNA molecular identification of *Sesamum indicum* applied core germplasm and information database of germplasm resource[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018.
- [14] 郭艳春, 张力岚, 陈思远, 祁建民, 方平平, 陶爱芬, 张列梅, 张立武. 黄麻应用核心种质的 DNA 分子身份证构建[J]. *作物学报*, 2021, 47(1):80-93.  
GUO Yanchun, ZHANG Lilan, CHEN Siyuan, QI Jianmin, FANG Pingping, TAO Aifen, ZHANG Liemei, ZHANG Liwu. Establishment of DNA molecular fingerprint of applied core germplasm in jute (*Corchorus* spp.) [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2021, 47(1):80-93.
- [15] SELKOE K A, TOONEN R J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers[J]. *Ecology Letters*, 2006, 9(5):615-629.

- [16] GUICHOUX E, LAGACHE L, WAGNER S, CHAUMEIL P, LÉGER P, LEPAIS O, LEPOITTEVIN C, MALAUSA T, REVARDEL E, SALIN F, PETIT R J. Current trends in microsatellite genotyping[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2011, 11(4): 591-611.
- [17] 文雁成,王汉中,沈金雄,刘贵华. SRAP和SSR标记构建的甘蓝型油菜品种指纹图谱比较[J]. *中国油料作物学报*, 2006, 28(3):233-239.  
WEN Yancheng, WANG Hanzhong, SHEN Jinxiong, LIU Guihua. Comparison of cultivar fingerprints constructed with SRAP and SSR markers in *Brassica napus* L.[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2006, 28(3):233-239.
- [18] 李志远,于海龙,方智远,杨丽梅,刘玉梅,庄木,吕红豪,张杨勇. 甘蓝 SNP 标记开发及主要品种的 DNA 指纹图谱构建[J]. *中国农业科学*, 2018, 51(14):2771-2788.  
LI Zhiyuan, YU Hailong, FANG Zhiyuan, YANG Limei, LIU Yumei, ZHUANG Mu, LÜ Honghao, ZHANG Yangyong. Development of SNP markers in cabbage and construction of DNA fingerprinting of main varieties[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(14):2771-2788.
- [19] 易红梅,王凤格,赵久然,王璐,郭景伦,原亚萍. 玉米品种 SSR 标记毛细管电泳荧光检测法与变性 PAGE 银染检测法的比较研究[J]. *华北农学报*, 2006, 21(5):64-67.  
YI Hongmei, WANG Fengge, ZHAO Jiuran, WANG Lu, GUO Jinglun, YUAN Yaping. Comparison of two maize SSR detection methods: Capillary electrophoresis with fluorescence detection method and denaturing PAGE silver-staining detection method[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2006, 21(5): 64-67.
- [20] 郝晨阳,王兰芬,贾继增,董玉琛,张学勇. SSR 荧光标记和银染技术的比较分析[J]. *作物学报*, 2005, 31(2):144-149.  
HAO Chenyang, WANG Lanfen, JIA Jizeng, DONG Yuchen, ZHANG Xueyong. Comparison of fluorescence and silver-staining detection systems of microsatellite markers[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2005, 31(2):144-149.
- [21] 郑永胜,张晗,王东建,孙加梅,王雪梅,段丽丽,李华,王玮,李汝玉. 基于荧光检测技术的小麦品种 SSR 鉴定体系的建立[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(19):3725-3735.  
ZHENG Yongsheng, ZHANG Han, WANG Dongjian, SUN Jiamei, WANG Xuemei, DUAN Lili, LI Hua, WANG Wei, LI Ruyun. Development of a wheat variety identification system based on fluorescently labeled SSR markers[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(19):3725-3735.
- [22] 王忠华. DNA 指纹图谱技术及其在作物品种资源中的应用[J]. *分子植物育种*, 2006, 4(3):425-430.  
WANG Zhonghua. DNA fingerprinting technology and its application in crop germplasm resources[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2006, 4(3):425-430.
- [23] 王凤格,杨扬,易红梅,赵久然,任洁,王璐,葛建镛,江彬,张宪晨,田红丽,侯振华. 中国玉米审定品种标准 SSR 指纹库的构建[J]. *中国农业科学*, 2017, 50(1):1-14.  
WANG Fengge, YANG Yang, YI Hongmei, ZHAO Jiuran, REN Jie, WANG Lu, GE Jianrong, JIANG Bin, ZHANG Xianchen, TIAN Hongli, HOU Zhenhua. Construction of an SSR-based standard fingerprint database for corn variety authorized in China[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(1):1-14.

## 欢迎订阅 2023 年《北方园艺》

中文核心期刊(1992-2020) 中国农业核心期刊 中国农林核心期刊  
美国化学文摘社(CAS)收录期刊 2015、2016、2018 年期刊数字影响力 100 强

《北方园艺》是由黑龙江省农业科学院主管、主办的园艺类综合性学术期刊。创刊以来,《北方园艺》始终与时代同频,策划新栏目,报道行业热点,不断推出具有创新价值、学术价值和实用价值的科研成果,在全国园艺类核心期刊中排名第三;在新时代背景下,《北方园艺》积极推动传统媒体与新兴媒体的融合发展,探索新型出版模式,设有专属投稿网站和微信公众号,学术传播力不断提升。2020 年获得农林领域高质量科技期刊 T2 行列。

为增加文章的可读性和更好的体现研究成果,本刊增加了内文和封二新品种彩版宣传;作者也可将团队试验成果以音视频形式在本刊微信公众号传播,具体事宜联系编辑部。

国际标准刊号:ISSN 1001-0009 国内统一刊号:CN 23-

1247/S

邮发代号:14-150

半月刊 每月 15、30 日出版 单价:35.00 元 全年:840.00 元

全国各地邮局均可订阅,或直接向编辑部汇款订阅。

投稿网址:<http://bfyy.haasep.cn>

地址:黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路 368 号《北方园艺》编辑部

邮编:150086

电话:0451-51522860

E-mail:bfyybjb@vip.163.com

