

# 利用 SSR 标记进行枣树子代苗父本鉴定

王斯琪<sup>1</sup>, 唐诗哲<sup>1</sup>, 孔德仓<sup>2</sup>, 贺润平<sup>3</sup>, 刘华波<sup>1</sup>, 麻丽颖<sup>1</sup>, 刘 君<sup>1</sup>,  
王 哲<sup>1</sup>, 李颖岳<sup>1</sup>, 申连英<sup>4</sup>, 庞晓明<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>北京林业大学林木育种国家工程实验室, 树木花卉遗传育种教育部重点实验室, 计算生物学中心, 生物科学与技术学院, 北京 100083; <sup>2</sup>河北省沧县国家枣树良种基地, 河北沧州 061000; <sup>3</sup>山西省农业科学院植物保护研究所, 太原 030031; <sup>4</sup>河北农业大学中国枣研究中心, 河北保定 071001)

**摘 要:** 利用 SSR 标记技术对‘冬枣’自然授粉实生苗 1 728 株和‘灵宝大枣’自然授粉实生苗 530 株进行父本鉴定, 利用可能的父本材料从 376 对引物中筛选出 8 对条带清晰、多态性较高且具有高度区分度的引物。采用荧光 M13 毛细管电泳技术, 用这 8 对引物在亲本材料中共检测到 45 个多态等位条带, 每对引物的平均多态条带数为 5.625, PIC 值变幅为 0.58~0.86, 平均为 0.71。利用 Cervus3.0 软件对具有 8 对引物数据的子代进行父本分析, 鉴定出‘冬枣’×‘木枣’实生苗 399 株、‘冬枣’×‘小芽枣’实生苗 390 株、‘冬枣’×‘映山红’实生苗 357 株、‘灵宝大枣’×‘紫圆枣’(‘紫枣’)实生苗 204 株、‘灵宝大枣’×‘柿饼枣’实生苗 126 株。

**关键词:** 枣; SSR; 父本鉴定; 毛细管电泳

**中图分类号:** S 665.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2012) 11-2133-09

## Application of SSR Markers for the Identification of Paternal Parent for the Seedlings of Chinese Jujube

WANG Si-qi<sup>1</sup>, TANG Shi-zhe<sup>1</sup>, KONG De-cang<sup>2</sup>, HE Run-ping<sup>3</sup>, LIU Hua-bo<sup>1</sup>, MA Li-ying<sup>1</sup>, LIU Jun<sup>1</sup>,  
WANG Zhe<sup>1</sup>, LI Ying-yue<sup>1</sup>, SHEN Lian-ying<sup>4</sup>, and PANG Xiao-ming<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants, Ministry of Education, Center for Computational Biology, College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; <sup>2</sup>National Key Forestry Station for Improved Jujube Cultivars, Cangzhou, Hebei 061001, China; <sup>3</sup>Institute of Plant Protection, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China; <sup>4</sup>Research center of Chinese Jujube, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China)

**Abstract:** The paternal parents of 1 728 open-pollinated seedlings of ‘Dongzao’ (*Ziziphus jujuba* Mill.) and 530 open-pollinated seedlings of ‘Lingbao Dazao’ were identified with SSR technique. Eight primer pairs were selected from 376 primer pairs, which amplified distinct, polymorphic segments and showed high differential rate. Twelve candidate parents were analyzed by capillary electrophoresis using fluorescent M13 multi-state detection method. Totally, 45 polymorphic alleles were revealed, with an average of 5.625 for each primer pairs. Polymorphism information content values for the primer pairs ranged from 0.58 to 0.86, with an average of 0.71. Using software Cervus3.0, 399 hybrids from ‘Dongzao’ ×

收稿日期: 2012-07-12; 修回日期: 2012-09-23

基金项目: 林业公益性行业专项项目 (201004017); 中央高校基本业务费项目 (BLYX200924, JD-03)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: xmpang@bjfu.edu.cn)

‘Muzao’ were identified, and 390 from ‘Dongzao’ × ‘Xiaoyazao’, 357 from ‘Dongzao’ × ‘Yingshanhong’, 204 from ‘Lingbao Dazao’ × ‘Ziyuanzao (Zizao)’, 126 from ‘Lingbao Dazao’ × ‘Shibingzao’ were also identified.

**Key words:** jujube; SSR; paternal parent analysis; capillary electrophoresis

中国目前有报道的枣 (*Ziziphus jujuba* Mill.) 种质资源近 900 份 (刘孟军和汪民, 2009), 含有丰富的变异。在枣树人工杂交育种中, 由于其花小, 人工去雄授粉操作困难和坐果率低等原因而不易获得杂种后代 (鹿金颖 等, 2005), 因而枣树遗传研究相对滞后。利用现代分子生物学技术对枣树实生苗进行杂种鉴定, 可以获得实生苗的父母本信息, 为枣树重要性状的遗传研究和品种改良工作奠定基础。申连英 (2005) 采用“局部隔离法”建立了‘冬枣’ × ‘临猗梨枣’ 杂交 F<sub>1</sub> 代, 其实是借助分子标记技术进行亲子代关系分析。鹿金颖等 (2005) 利用 AFLP 分子标记鉴定出‘冬枣’自然授粉实生后代杂种‘冬枣’ × ‘金丝小枣’ 杂交实生苗 34 株, ‘冬枣’ × ‘尖枣’ 杂交实生苗 15 株。BWB (breeding without breeding) 育种策略 (E1-Kassaby et al., 2007) 的提出, 将表型的选择和遗传标记技术联系起来, 为树木育种提供了一个新的方法, 不但节约了时间, 更大大降低了育种管理成本。Wang 等 (2010) 利用 BWB 育种策略建立了欧洲赤松选择育种模型, 取得了良好的效果。Moriya 等 (2011) 利用 15 个 SSR 标记鉴定了 69 个苹果栽培品种的亲子代关系, 并分析了产生子代突变现象的原因。利用分子标记技术进行亲本鉴定在杏 (Gerald et al., 2009)、油桃 (沈志军 等, 2009) 等果树中得到了广泛的应用。

SSR (simple sequence repeat) 标记方法具有多态性高、易检测、重复性高、数量丰富等优点, 是共显性标记, 已被广泛应用于遗传多样性分析、指纹图谱、遗传图谱的构建 (张智俊 等, 2011), 亲子关系的鉴定多采用 SSR 标记 (Adamg et al., 2010)。Ma 等 (2011) 和麻丽颖等 (2012) 开发了大量枣属 SSR 引物, 为枣树子代苗的鉴定提供了新的技术基础。本研究中筛选出 8 对多态性较高的 SSR 引物, 对 2 258 株已知母本的枣树子代苗进行了父系鉴定, 建立了一个完整的利用 SSR 标记进行枣树亲子关系分析的体系。

1 材料与方法

1.1 材料

从‘冬枣’ (山西柳林) 和‘灵宝大枣’ (河北邯郸) 植株上收集种子, 2011 年 3 月播种于北京林业大学枣树育种和栽培实践基地 (河北沧州), 共获得‘冬枣’实生苗 1 728 株, ‘灵宝大枣’实生苗 530 株。采集两个母本植株周围 (方圆 1 km) 所有的枣品种为可能的父本来源, 共包括 12 个品种 (表 1)。2011 年 7 月采集幼苗新鲜叶片于 - 70 °C 冰箱中保存待用。

表 1 供试材料  
Table 1 List of materials used in the study

| 采集地 Origin   | 母本 Mother     | 可能的父本 Candidate father | 采集地 Origin  | 母本 Mother                | 可能的父本 Candidate father |
|--------------|---------------|------------------------|-------------|--------------------------|------------------------|
| 山西<br>Shanxi | 冬枣<br>Dongzao | 冬枣 Dongzao             | 河北<br>Hebei | 灵宝大枣<br>Lingbao<br>Dazao | 葫芦枣 Huluzao            |
|              |               | 映山红 Yingshanhong       |             |                          | 辣椒枣 Lajiaozao          |
|              |               | 小芽枣 Xiaoyazao          |             |                          | 雪枣 Xuezhao             |
|              |               | 木枣 Muzao               |             |                          | 梨枣 Lizao               |
|              |               |                        |             |                          | 灵宝大枣 Lingbao Dazao     |
|              |               |                        |             |                          | 柿饼枣 Shibingzao         |
|              |               |                        |             |                          | 紫圆枣 Ziyuanzao          |
|              |               |                        |             |                          | 紫枣 Zizao               |

## 1.2 SSR-PCR 扩增及毛细管电泳检测

取新鲜叶片, 用改良的 CTAB 法进行基因组 DNA 的提取。在打样机打磨叶片过程中加入适量的 PVP (上海生工生物工程股份有限公司), 采用 3% 的 CTAB 提取液加入 2% 的巯基乙醇, 65 °C 水浴 60 min, 用等体积酚: 氯仿 (1:1) 抽提后再用等体积氯仿抽提, 然后用等体积冰冻的异丙醇沉淀 DNA, 70% 乙醇洗涤两次, 用 TE 缓冲液溶解 DNA。所得 DNA 经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测后保存于 -20 °C 冰箱待用。

选择本实验室利用磁珠富集法开发的 ‘冬枣’ SSR 引物, 利用 12 个亲本材料进行引物多态性筛选。SSR 引物由金唯智 (北京) 生物科技有限公司合成, 利用三引物法 PCR (即在 5' 端加有 M13 尾巴序列的特异正向引物、特异反向引物及带有荧光标记的通用型 M13 引物, 利用毛细管电泳技术同时检测不同荧光染料标记的多个 SSR 位点) 扩增 SSR 位点 (麻丽颖 等, 2012)。SSR-PCR 反应体系为 10 μL, 包括 10~15 ng 基因组 DNA, 5 μL 2 × Taq PCR mix (博迈德生物科技有限公司), 反向引物 3.2 pmol, 正向引物 0.8 pmol, 带荧光标记的 M13 引物 3.2 pmol。PCR 程序: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s、55 °C 退火 40 s、72 °C 延伸 40 s, 经 30 个循环; 94 °C 变性 30 s、53 °C 退火 40 s、72 °C 延伸 40 s, 8 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min (Schuelke, 2000)。扩增产物送金唯智 (北京) 生物科技有限公司进行毛细管电泳检测。

利用 GeneMarker V1.75 (Soft Genetics LLC, USA) 软件读取毛细管电泳数据, 读取后的原始数据经过 FlexiBin v2 (Amos et al., 2007) 程序矫正。SSR 位点的多态性信息量 (polymorphism information content, PIC) 按如下计算公式进行计算:  $PIC = 1 - \sum P_i^2$ , 其中  $P_i$  表示第  $i$  个等位位点出现的频率 (Botstein et al., 1980)。

## 1.3 亲子关系鉴定

亲子关系鉴定中基于子代每一个 SSR 位点的两个等位基因, 一个来自父本, 一个来自母本的原理, 利用 Cervus3.0 软件中已知性别的群体鉴定模型进行父系分析 (Adamg et al., 2010)。依据 Cervus3.0 软件说明, 似然比 (likelihood ratio) 值越大, 鉴定结果的准确性越高。最终鉴定结果的准确度用 LOD 值的大小来衡量。LOD 值为正值时, 所鉴定出的亲本组合为真实亲本组合的概率大于非真实亲本组合, 随着 LOD 值的增大, 鉴定出真实亲本的可能性也随着增大。根据所选择引物数量的不同讨论本次亲子代鉴定的最佳引物数以及不同引物数对鉴定结果的影响。

# 2 结果与分析

## 2.1 引物筛选结果

随机选择 12 个亲本材料中的 6 个亲本进行引物多态性的初步筛选, 从 376 对引物中挑选出 PIC 值较高、扩增效果较好的 32 对引物, 再利用余下的另外 6 个亲本材料进行多态性的二次筛选。选择其中 8 个 PIC 值在 0.5 以上, 扩增结果无杂带的标记用于亲子代关系分析 (表 2)。

8 个标记在 12 个亲本材料中共扩增出 45 个等位性条带, 每对引物的平均扩增条带数为 3~8 个, 平均 5.625 个。各标记的 PIC 值从 0.58 到 0.86, 平均为 0.71 (表 3)。「紫圆枣」和「紫枣」在 8 对引物中的扩增结果一样, 「柿饼枣」和「紫圆枣」、「紫枣」在 8 对引物中有 7 对扩增结果一样, 只在 BFU1409 中有扩增差异。因此, 所选择的引物能够准确区分亲本材料中的 11 个品种。

图 1 为引物 BFU0377 在部分亲本材料中的多态扩增效果。

表 2 SSR 引物信息表  
Table 2 SSR primers used in this study

| 引物名称<br>Name | 重复基序<br>Repeat motifs | 正向引物 (5'-3')<br>Forward primer | 反向引物 (5'-3')<br>Reverse primer | 目标片段长/bp<br>Expected length |
|--------------|-----------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| BFU0277      | (GA) <sub>11</sub>    | GCACTACCTGTGGAAC TCA           | AGTGTGACCTGGCAAGAAGA           | 236                         |
| BFU0574      | (CA) <sub>7</sub>     | GAAGGTTGAAGATGCTCTCTC          | CCTGACATCCATTTGAAGGAA          | 114                         |
| BFU1279      | (TTAA) <sub>4</sub>   | TTTTTCAAGACCTCCACGATG          | TCCCACCACTTTCCTCTCAT           | 165                         |
| BFU1409      | (CA) <sub>6</sub>     | CAAATGATGGATCGAGCAAA           | AATGGAGGACAAACCGTCAC           | 165                         |
| BFU0581      | (CA) <sub>7</sub>     | TGAGAAGGTTGAAGATGCTCTC         | CCTGACATCCATTTGAAGGAA          | 117                         |
| BFU0377      | (CT) <sub>10</sub>    | CCAGCTGGTATCCAATTGCT           | ACGACGATGCCATGAAAGAT           | 283                         |
| BFU1383      | (ATTA) <sub>3</sub>   | TGTTGCTGGTTCAATTCCAG           | CTTATGGCTTTTTCATTTTGTGA        | 151                         |
| BFU0308      | (TC) <sub>11</sub>    | TTTCCACCCCAAAATACCA            | AGACGCTGGATGAGGATGAT           | 176                         |

表 3 SSR 引物的多态检测  
Table 3 Polymorphism detected with SSR primers

| 引物名称<br>Primer name | 多态位点数<br>Polymorphic loci number | 多态信息含量<br>Polymorphism information content (PIC) | 引物名称<br>Primer name | 多态位点数<br>Polymorphic loci number | 多态信息含量<br>Polymorphism information content (PIC) |
|---------------------|----------------------------------|--|---------------------|----------------------------------|--|
| BFU0277             | 5                                | 0.64   | BFU0377             | 6                                | 0.75   |
| BFU0574             | 6                                | 0.78   | BFU1383             | 3                                | 0.66   |
| BFU1279             | 5                                | 0.61   | BFU0308             | 8                                | 0.86   |
| BFU1409             | 6                                | 0.58   | 总计 Total            | 45                               | 5.66   |
| BFU0581             | 6                                | 0.78   | 平均 Mean             | 5.625                            | 0.71   |

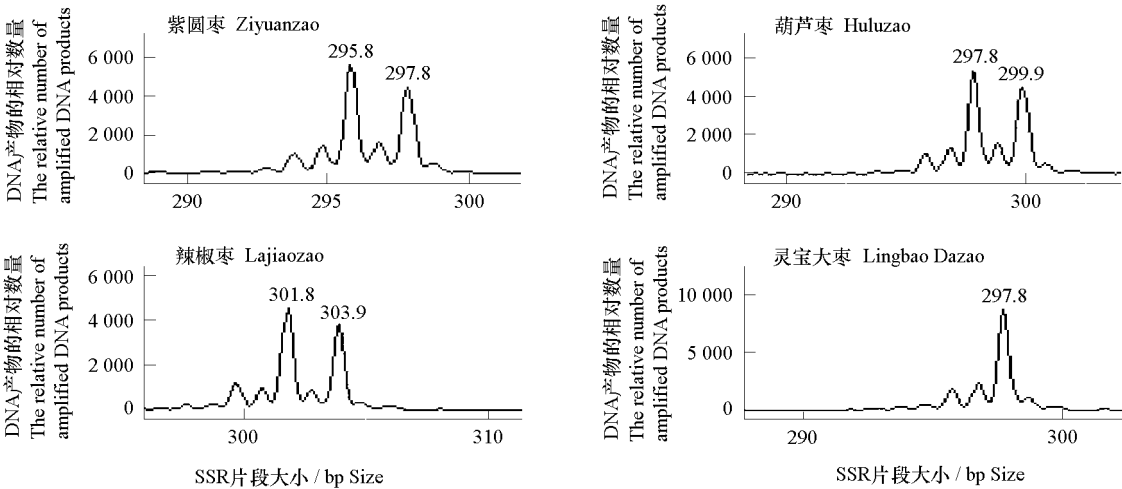


图 1 4 个枣品种在 BFU0377 号引物中的毛细管电泳检测图  
Fig. 1 Four sample images of capillary electrophoresis detection results for jujube cultivars with BFU0377 primer

2.2 亲子关系鉴定

将毛细管电泳矫正结果经过 Cervus3.0 软件分析，以所用到的 8 对引物中至少 6 对与鉴定出的父、母本相匹配并且在 Cervus3.0 软件中给出的 LOD 值为正值，同时鉴定出唯一的父本作为标准。确定以‘冬枣’为母本，‘木枣’为父本的子代 399 株，‘小芽枣’为父本的子代 390 株，‘映山红’为父本的子代 357 株；以‘灵宝大枣’为母本、‘紫圆枣’（‘紫枣’）为父本的子代 204 株，‘柿饼枣’

为父本的子代 126 株。部分未鉴定出准确父本的子代苗主要因为部分位点缺失, 或  $LOD$  值过低。图 2 显示的是引物 BFU1383 在‘冬枣’ $\times$ ‘映山红’群体中亲本及其子代的扩增情况。‘冬枣’和‘映山红’各具有两个等位基因, 在其杂交子代中, 理论上应有图 2 中子代 1、子代 2、子代 4、子代 5 所示的扩增结果产生, 但其中子代 3 只在 170.6 处有一单峰, 只遗传了母本‘冬枣’的一个等位基因, 从父本‘映山红’中遗传的等位基因可能发生缺失, 也可能发生突变, 突变成为峰值为 170.5 的条带, 在子代中显示出纯合的单峰形式。

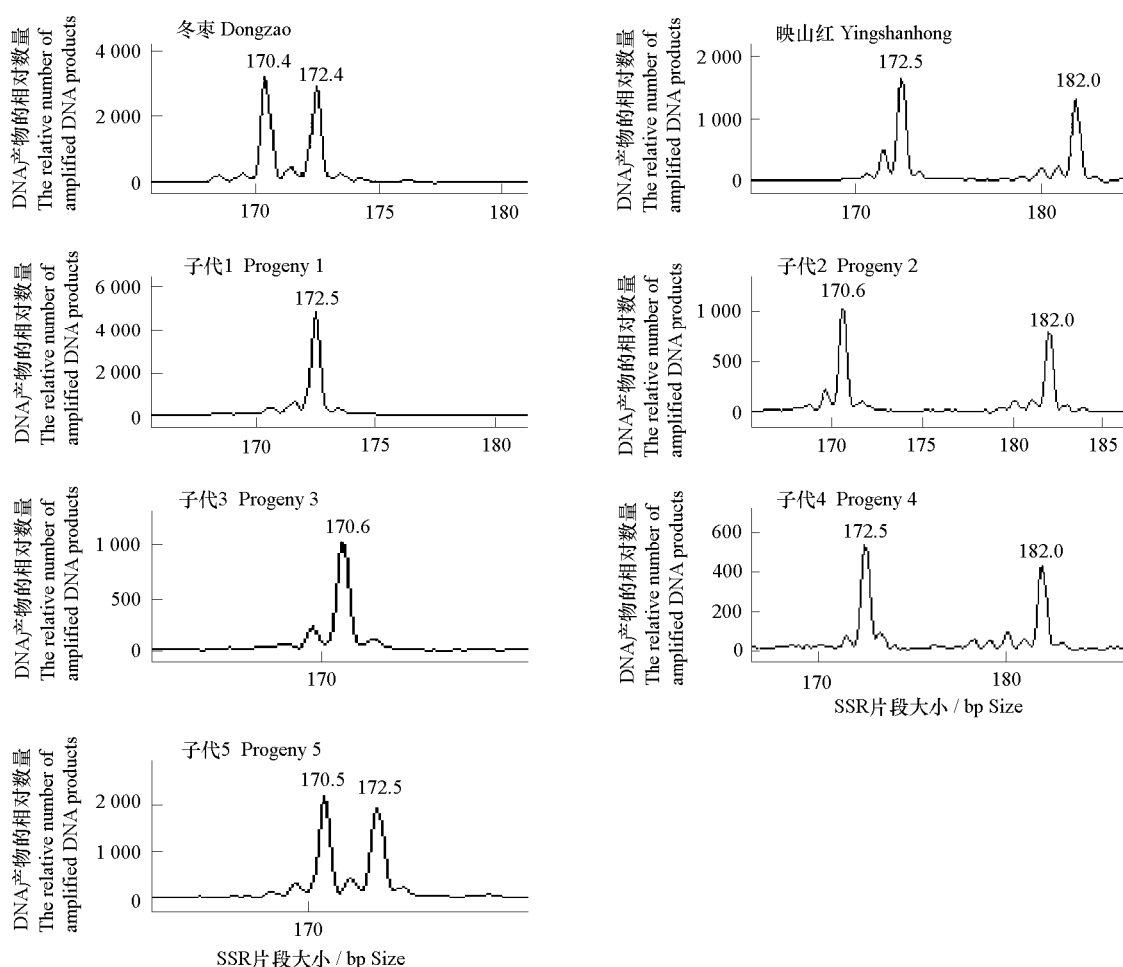


图 2 ‘冬枣’ $\times$ ‘映山红’亲本及其子代在 BFU1383 号引物中的毛细管电泳检测图  
Fig.2 Images of capillary electrophoresis detection results for the parents and offspring of ‘Dongzao’ $\times$ ‘Yingshanhong’ with BFU1383 primer

### 2.3 引物数对亲子鉴定结果的影响

选择  $PIC$  值最高的 3 对和 6 对引物分别对随机挑选的 12 个子代苗进行亲子关系鉴定并与 8 对引物鉴定结果进行比较 (表 4、表 5、表 6)。从鉴定结果可以看出, 用 3 对引物对子代苗进行亲子关系鉴定, 大多数个体显示出不止一个可能父本。增加引物至 6 对后, 以‘冬枣’为母本的子代苗显示出只有一个可能父本, 但是以‘灵宝大枣’为母本的子代苗仍然具有多个可能父本。继续增加引物至 8 对, 全部子代苗均鉴定出了唯一的父本, 并且随着引物数的增加, 每个子代苗表示鉴定结果准确度的  $LOD$  值不断增加。

表 4 3 对 SSR 引物父母本鉴定结果

Table 4 The results of parental analysis based on three SSR primer pairs

| 子代名称<br>Offspring name | 可能母本<br>Candidate mother | 可能父本<br>Candidate father | LOD值<br>LOD score |
|------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------|
| 1                      | 冬枣 Dongzao               | 小芽枣 Xiaoyazao            | 5.46              |
| 2                      | 冬枣 Dongzao               | 木枣 Muzao                 | 3.90              |
|                        | 冬枣 Dongzao               | 映山红 Yingshanhong         | 3.90              |
| 3                      | 冬枣 Dongzao               | 木枣 Muzao                 | 4.88              |
|                        | 灵宝大枣 Lingbao Dazao       | 辣椒枣 Lajiaozao            | 4.88              |
|                        | 灵宝大枣 Lingbao Dazao       | 冬枣 Dongzao               | 4.88              |
|                        | 冬枣 Dongzao               | 灵宝大枣 LingbaoDazao        | 4.88              |
| 4                      | 冬枣 Dongzao               | 小芽枣 Xiaoyazao            | 4.62              |
| 5                      | 冬枣 Dongzao               | 小芽枣 Xiaoyazao            | 3.75              |
| 6                      | 冬枣 Dongzao               | 葫芦枣 Huluzao              | 4.38              |
|                        | 冬枣 Dongzao               | 木枣 Muzao                 | 4.38              |
|                        | 冬枣 Dongzao               | 小芽枣 Xiaoyazao            | 4.38              |
|                        | 冬枣 Dongzao               | 映山红 Yingshanhong         | 4.38              |
| 7                      | 冬枣 Dongzao               | 小芽枣 Xiaoyazao            | 4.51              |
| 8                      | 冬枣 Dongzao               | 木枣 Muzao                 | 3.97              |
|                        | 冬枣 Dongzao               | 映山红 Yingshanhong         | 3.97              |
| 9                      | 冬枣 Dongzao               | 小芽枣 Xiaoyazao            | 3.75              |
| 10                     | 冬枣 Dongzao               | 小芽枣 Xiaoyazao            | 4.49              |
| 11                     | 灵宝大枣 Lingbao Dazao       | 紫圆枣 Ziyuanzao            | 6.70              |
|                        | 灵宝大枣 Lingbao Dazao       | 柿饼枣 Shibingzao           | 6.70              |
|                        | 灵宝大枣 Lingbao Dazao       | 紫枣 Zizao                 | 6.70              |
| 12                     | 灵宝大枣 Lingbao Dazao       | 紫圆枣 Ziyuanzao            | 6.55              |
|                        | 灵宝大枣 Lingbao Dazao       | 柿饼枣 Shibingzao           | 6.55              |
|                        | 灵宝大枣 Lingbao Dazao       | 紫枣 Zizao                 | 6.55              |

表 5 6 对 SSR 引物父母本鉴定结果

Table 5 The results of parental analysis based on six SSR primer pairs

| 子代名称<br>Offspring name | 可能母本<br>Candidate mother | 可能父本<br>Candidate father | LOD值<br>LOD score |
|------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------|
| 1                      | 冬枣 Dongzao               | 小芽枣 Xiaoyazao            | 8.35              |
| 2                      | 冬枣 Dongzao               | 木枣 Muzao                 | 6.70              |
| 3                      | 冬枣 Dongzao               | 木枣 Muzao                 | 6.08              |
| 4                      | 冬枣 Dongzao               | 小芽枣 Xiaoyazao            | 6.05              |
| 5                      | 冬枣 Dongzao               | 小芽枣 Xiaoyazao            | 4.22              |
| 6                      | 冬枣 Dongzao               | 小芽枣 Xiaoyazao            | 8.70              |
| 7                      | 冬枣 Dongzao               | 小芽枣 Xiaoyazao            | 5.94              |
| 8                      | 冬枣 Dongzao               | 映山红 Yingshanhong         | 5.81              |
| 9                      | 冬枣 Dongzao               | 小芽枣 Xiaoyazao            | 6.55              |
| 10                     | 冬枣 Dongzao               | 映山红 Yingshanhong         | 6.21              |
| 11                     | 灵宝大枣 Lingbao Dazao       | 紫圆枣 Ziyuanzao            | 9.11              |
|                        | 灵宝大枣 Lingbao Dazao       | 柿饼枣 Shibingzao           | 9.11              |
|                        | 灵宝大枣 Lingbao Dazao       | 紫枣 Zizao                 | 9.11              |
| 12                     | 灵宝大枣 Lingbao Dazao       | 紫圆枣 Ziyuanzao            | 9.70              |
|                        | 灵宝大枣 Lingbao Dazao       | 柿饼枣 Shibingzao           | 9.70              |
|                        | 灵宝大枣 Lingbao Dazao       | 紫枣 Zizao                 | 9.70              |

表 6 8 对 SSR 引物父母本鉴定结果

Table 6 The results of parental analysis based on eight SSR primer pairs

| 子代名称<br>Offspring name | 可能母本<br>Candidate mother | 可能父本<br>Candidate father | LOD 值<br>LOD score |
|------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|
| 1                      | 冬枣 Dongzao               | 小芽枣 Xiaoyazao            | 9.66               |
| 2                      | 冬枣 Dongzao               | 木枣 Muzao                 | 8.02               |
| 3                      | 冬枣 Dongzao               | 木枣 Muzao                 | 6.98               |
| 4                      | 冬枣 Dongzao               | 小芽枣 Xiaoyazao            | 7.99               |
| 5                      | 冬枣 Dongzao               | 小芽枣 Xiaoyazao            | 4.51               |
| 6                      | 冬枣 Dongzao               | 小芽枣 Xiaoyazao            | 10.00              |
| 7                      | 冬枣 Dongzao               | 小芽枣 Xiaoyazao            | 7.88               |
| 8                      | 冬枣 Dongzao               | 映山红 Yingshanhong         | 7.13               |
| 9                      | 冬枣 Dongzao               | 小芽枣 Xiaoyazao            | 7.45               |
| 10                     | 冬枣 Dongzao               | 映山红 Yingshanhong         | 6.89               |
| 11                     | 灵宝大枣 Lingbao Dazao       | 柿饼枣 Shibingzao           | 13.99              |
| 12                     | 灵宝大枣 Lingbao Dazao       | 柿饼枣 Shibingzao           | 13.60              |

3 讨论

本研究中通过 SSR 分子标记分析获得 5 个确定的并且群体数在 100 以上的全同胞 F<sub>1</sub> 群体，其中有 3 个以‘冬枣’为母本的群体数量较大，都在 300 以上。‘冬枣’是一种优质晚熟鲜食枣品种（马庆华 等，2009），用‘冬枣’作为母本杂交产生的子代遗传了母本的优良特质，是重要的育种材料。同时，两亲本杂交产生的 F<sub>1</sub> 群体是目前果树遗传作图利用较多的供试材料（Billotte et al., 2005），因此本试验中得到的材料为枣树重要性状的遗传研究奠定了坚实的基础。

本研究中采用了多态性高、扩增效果稳定的 SSR 标记，比 AFLP、RAPD 等标记更具有稳定性，可以广泛的应用于品种鉴定、指纹图谱构建、遗传多样性分析等（郭长奎 等，2010）。并且，本研究所选择的引物均为本实验室利用磁珠富集法开发的‘冬枣’SSR 引物，基因组 SSR 标记相较于 EST-SSR 标记，多态性更高，扩增效果也较好。同时，本研究的 SSR 扩增检测方法利用了毛细管电泳检测手段，数据结果更加直观、易统计。

对于亲子关系鉴定，引物的选择对鉴定结果的影响较大，增加引物的数量可以提高鉴定结果的准确性。但本研究中的材料数量较大，每增加一对引物即大幅度的增加实验成本，因此引物的选择十分重要，要选择多态性高、扩增效果好的引物，同时还能有较强的区分度。本研究中所选择的 8 对引物是从 376 对‘冬枣’SSR 引物中筛选出来的，对于区分 12 个品种有较强的区分率。通过与 3 对、6 对引物鉴定结果比较也可以看出，本研究的 8 对引物已经基本具备了准确鉴定子代苗父、母本的能力。对于其它群体的亲子代关系鉴定，引物的选择主要考虑亲本的数量和引物的多态性，可能亲本的数量越多，用来进行鉴定的引物也随之增加，因此可以通过不断增加多态性高的引物来试验合适的引物数，最终找到能准确鉴定出唯一父母本的最佳引物组合。不同的试验可能要根据所分析候选父本的多少和亲缘关系而决定。

通过鉴定结果可以看出，本试验中所选择的 12 个亲本材料大部分比较容易区分，这一方面是由于品种本身的亲缘关系较远，另一方面也是由于所选择的引物的高度多态性。而在本试验中，有两组亲本较难区分，一组是‘紫圆枣’、‘紫枣’、‘柿饼枣’。‘紫圆枣’和‘紫枣’在 8 对引物中均扩增出相同的条带，后续试验发现‘紫圆枣’和‘紫枣’在其它引物中也表现了完全相同的扩增带型，表明二者亲缘关系非常近。‘紫圆枣’是从‘紫枣’中选出来的优系，可能是来源于芽变等。‘柿饼

枣’和他们的亲缘关系也较近,8对引物中只有引物BFU1409显示出了不同的扩增效果。此外‘映山红’和‘木枣’的相似度也很高,8对引物中只有引物BFU0377和BFU0308显示出了不同的扩增效果。‘映山红’是从‘木枣’中选育出的优系,因此和‘木枣’亲缘关系很近。

本研究中还有部分子代苗由于数据缺失或 $LOD$ 值较低,不能精确地确定其父本来源,可通过再次增加引物的方法来提高鉴定结果的准确性,同时也不排除有个别外来花粉的污染。此外,在本研究中所鉴定的1728株‘冬枣’自然授粉实生苗和530株‘灵宝大枣’自然授粉实生苗,绝大部分个体在8对引物中均符合父母本各遗传一条等位基因的规律。但也存在子代等位位点缺失或突变,部分子代在扩增过程中产生了一条既不来自母本也不来自父本的增加带。吴学尉等(2009)认为这可能是由于选取的材料都是高度杂合的品种,由于配子形成过程中染色体的不等价交换产生的新片段,导致 $F_1$ 代表现分离。若要深入研究其变异的本质,可将产生变异的子代扩增序列与亲本序列一同进行测序,比对分析其变异的来源。Moriya等(2011)在鉴定苹果栽培品种的亲子代关系时,发现了子代产生突变是由于SSR重复单元数的增加或减少,其两端的保守序列并没有发生碱基的变化。同时,本研究中也发现了一些子代个体在某一对引物下扩增产生了条带的缺失,房经贵等(2000)认为这是由于配子形成过程中染色体的交换及DNA分子碱基修饰引起的突变造成位点缺失。

综上所述,本研究建立了一套完善的利用SSR标记进行父本鉴定的分析体系,筛选出可用于枣树亲子代鉴定、遗传多样性分析、指纹图谱构建的高多态性SSR标记,为枣树分子育种奠定了重要基础。

## References

- Adam J, Clayton M, Small, Kimberly A, Paczolt, Nicholas R. 2010. A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology Resources*, 10: 6–30.
- Amos W, Hoffman J, Frodsham A, Zhang L, Best S, Hill A. 2007. Automated binning of microsatellite alleles: Problems and solutions. *Molecular Ecology Notes*, 7: 10–14.
- Billotte N, Marseillac N, Risterucci A M, Adon B, Brottier P, Baurens F C, Singh R, Herra A, Asmady H, Billot C, Amblard P, Gasselot T D, Courtois B, Asomo D, Cheah S C, Rohde W, Ritter E, Charrier A. 2005. Microsatellite-based high density linkage map in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Theor Appl Genet*, 110: 754–765.
- Botstein D, White R L, Skolnick M, Davis R W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics*, 32 (3): 314–331.
- El-Kassaby Y, Lstiburek M, Liewlaksaneeyanawin C, Slavov G T, Howe G T. 2007. Breeding without breeding: approach, example, and proof of concept//Isik F. Proceedings of the IUFRO division 2 joint conference: Low input breeding and conservation of forest genetic resources. Antalya, Turkey: 43–54.
- Fang Jing-gui, Zhang Zhen, Ma Zheng-qiang, Liu Da-jun, Wang San-hong, Lavi U. 2000. The polymorphism and segregation patterns of AFLP markers in the  $F_1$  progenies from the cross of two mango cultivars. *Scientia Agricultura Sinica*, 33 (3): 19–24. (in Chinese)
- 房经贵, 章 镇, 马正强, 刘大钧, 王三红, Lavi U. 2000. AFLP 标记在两个芒果品种间杂交  $F_1$  代的多态性及分离方式. *中国农业科学*, 33 (3): 19–24.
- Gerald S D, Judy Y, Deborah A G, Thomas G. 2009. A practical method for almond cultivar identification and parental analysis using simple sequence repeat markers. *Euphytica*, 168: 41–48.
- Guo Chang-kui, Li Jiang, Lu Ting, Yu Jing, Luo Shu-ping. 2010. RAPD and ISSR analysis on genetic relationships of jujube resources in Xinjiang. *Nonwood Forest Research*, 28 (3): 14–19. (in Chinese)
- 郭长奎, 李 疆, 陆 婷, 于 静, 罗淑萍. 2010. 新疆枣资源亲缘关系的 ISSR 和 RAPD 分析. *经济林研究*, 28 (3): 14–19.



- Liu Meng-jun, Wang Min. 2009. Germplasm resources of Chinese jujube. Beijing: China Forestry Publishing House. (in Chinese)
- 刘孟军, 汪 民. 2009. 中国枣种质资源. 北京: 中国林业出版社.
- Lu Jin-ying, Mao Yong-min, Shen Lian-ying, Peng Shi-qi, Liu Min. 2005. Application of AFLP markers for identification of hybrids from open pollinated Dongzao (*Ziziphus jujuba* Mill.) progenies. *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (4): 680 - 683. (in Chinese)
- 鹿金颖, 毛永民, 申连英, 彭士琪, 刘 敏. 2005. 用 AFLP 分子标记鉴定冬枣自然授粉实生后代杂种的研究. *园艺学报*, 32 (4): 680 - 683.
- Ma Li-ying, Kong De-cang, Liu Hua-bo, Wang Si-qi, Li Ying-yue, Pang Xiao-ming. 2012. Construction of SSR fingerprint on 36 Chinese jujube cultivars. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (4): 647 - 654. (in Chinese)
- 麻丽颖, 孔德仓, 刘华波, 王斯琪, 李颖岳, 庞晓明. 2012. 36 份枣品种 SSR 指纹图谱的构建. *园艺学报*, 39 (4): 647 - 654.
- Ma Qing-hua, Shen Lian-ying, Wang Gui-xi, Liang Li-song. 2009. Analysis of genetic background for the selection of advanced trees of Dongzao (*Ziziphus jujuba* Mill. cv. Dongzao) by AFLP markers. *Journal of Plant Genetic Resources*, 10 (4): 504 - 510. (in Chinese)
- 马庆华, 申连英, 王贵禧, 梁丽松. 2009. 应用 AFLP 技术分析冬枣优良单株的遗传基础. *植物遗传资源学报*, 10 (4): 504 - 510.
- Ma Q H, Wang G X, Liang L S. 2011. Development and characterization of SSR markers in Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) and its related species. *Scientia Horticulturae*, 129 (2011): 597 - 602.
- Moriya S, Iwanami H, Okada K, Yamamoto T, Abe K. 2011. A practical method for apple cultivar identification and parent-offspring analysis using simple sequence repeat markers. *Euphytica*, 177: 135 - 150.
- Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18: 233 - 234.
- Shen Lian-ying. 2005. Construction of genetic linkage map and mapping QTL for some traits in Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) [Ph. D. Dissertation]. Baoding: Agricultural University of Hebei. (in Chinese)
- 申连英. 2005. 枣 (*Ziziphus jujuba* Mill.) 遗传连锁图谱构建及性状的 QTL 定位研究[博士论文]. 保定: 河北农业大学.
- Shen Zhi-jun, Ma Rui-juan, Yu Ming-liang, Zhu Hong-feng, Cai Zhi-xiang. 2009. Parental analysis of new nectarine variety Zijinhong 1 by SSR. *Agriculturae Boreall-Sinica*, 24 (5): 205 - 209. (in Chinese)
- 沈志军, 马瑞娟, 俞明亮, 宋宏峰, 蔡志翔. 2009. 早熟油桃紫金红 1 号亲本的 SSR 鉴定. *华北农学报*, 24 (5): 205 - 209.
- Wang Xiao-ru, Takeshi Torimaru, Dag Lindgren, Anders Fries. 2010. Marker-based parentage analysis facilitates low input 'breeding without breeding' strategies for forest trees. *Tree Genetics & Genomes*, 6: 227 - 235.
- Wu Xue-wei, Cui Guang-fen, Wu Li-fang, Zhang Yi-ping, Ming Jun, Wang Jie, Wang Ji-hua. 2009. Identification of ISSR in lily hybrids. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (5): 749 - 754. (in Chinese)
- 吴学尉, 崔光芬, 吴丽芳, 张艺萍, 明 军, 王 杰, 王继华. 2009. 百合杂交后代 ISSR 鉴定. *园艺学报*, 36 (5): 749 - 754.
- Zhang Zhi-jun, Guan Yu, Yang Li, Yu Li, Luo Shu-ping. 2011. Analysis of SSRs information and development of SSR markers from moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) ESTs. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (5): 989 - 996. (in Chinese)
- 张智俊, 管 雨, 杨 丽, 余 利, 罗淑萍. 2011. 毛竹 EST 资源 SSR 标记分析与筛选. *园艺学报*, 38 (5): 989 - 996.