

利用荧光标记 SSR 构建百合种质资源分子身份证

徐雷锋¹, 葛亮^{1,*}, 袁素霞¹, 任君芳², 袁迎迎¹, 李雅男¹, 刘春¹,
明军^{1,**}

(¹ 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ² 阿坝藏族羌族自治州林业科学技术研究所, 四川汶川 623000)

摘要: 以 96 份百合种质资源为材料, 使用 SSR 标记进行百合种质分子身份证构建试验。从 172 对百合 SSR 引物中筛选出 20 对多态性好的核心引物, 采用四重荧光毛细管电泳技术检测扩增条带分子量的方法对百合资源进行标记分析, 获得供试样品相应的扩增带型。采用个位数字和小写英文字母对不同带型进行编码, 按照 20 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。结果显示: 20 对 SSR 引物共检测到 69 个 SSR 等位位点和 170 个带型, 平均每对引物对品种扩增的等位位点 3.45 个, 带型 8.50 个。对带型进行编码的结果表明: 96 份百合种质资源的 SSR 分子身份证互不相同, 可以将材料完全区分开。

关键词: 百合; 种质资源; SSR 荧光标记; 分子身份证

中图分类号: S 682.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 10-2055-10

Using the Fluorescent Labeled SSR Markers to Establish Molecular Identity of Lily Germplasms

XU Lei-feng¹, GE Liang^{1,*}, YUAN Su-xia¹, REN Jun-fang², YUAN Ying-ying¹, LI Ya-nan¹, LIU Chun¹,
and MING Jun^{1,**}

(¹ *Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China*; ² *Aba Tibetan and Qiang Autonomous Prefecture Institute of Forestry Science and Technology, Wenchuan, Sichuan 623000, China*)

Abstract: In this paper, 96 lily germplasms collected from different countries were used to established molecular identity by simple sequence repeat (SSR) markers. In this research, 20 of 172 SSR primer pairs, with high polymorphisms and good repeatability, were selected, and then were labeled with four kinds of fluorescent for amplification and capillary electrophoresis. The products of 96 samples with each primer pairs were analyzed. Each band pattern were coded by different single digit or lowercase letters. Meanwhile, according to the number of band patterns, from less to more, the order of 20 primer pairs were decided, and molecular identities of 96 lily germplasms were established. The results showed

收稿日期: 2014-05-28; **修回日期:** 2014-08-04

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项项目(200903008-06); 国家自然科学基金项目(31272205); 国家科技支撑计划项目(2012BAD01B07); 北京市花卉重点项目(YLHH2006001, YLHH201200101); 国家‘863’计划项目(2011AA100208); 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

* 共同第一作者

** 通信作者 Author for correspondence (E-mail: mingjun@caas.cn)

that a total of 69 polymorphic alleles and 170 polymorphic patterns were revealed by the 20 primer pairs, with an average of 3.45 alleles and 8.50 patterns for each primer pairs, and all molecular identities of germplasms are different. This study indicated that the detection technology by using fluorescent labeled SSR markers had merits of reliable, efficient and high-throughput, and that it is convenient and efficient to establish the molecular identities of lily germplasms using the above encoded mode of patterns.

Key words: lily; germplasm resource; fluorescent labeled SSR marker; molecular identity

百合属(*Lilium* L.)植物约 100 个种和变种,中国原产约 47 个种和变种(龙雅宜和张金政,1998)。近 50 年来已培育的百合品种达 9 400 个(International Lily Register, <http://www.lilyregister.com/>)。随着育成品种数量的不断增长以及种质交流的日趋频繁,准确地鉴别百合品种非常重要。

用于种质鉴定的分子标记技术主要包括 ISSR、RAPD、SRAP、SSR 和 SNP 等,其中 SSR (simple sequence repeats) 分析技术更具有在染色体上分布均匀、多态性丰富、共显性、分辨率高和易于检测等优点(Morgante & Olivieri, 1993)。Dangl 等(2009)采用 12 对 SSR 引物构建了 18 份加利福尼亚扁桃种质的指纹图谱。Oliveira 等(2010)采用 48 对 SSR 引物构建了 32 份大豆种质的指纹图谱。Pan (2010)利用 21 对 SSR 引物构建了 1 025 份甘蔗种质的分子身份证库;Moriya 等(2011)利用 15 对引物构建了 95 份苹果种质的指纹图谱。杨阳等(2010)利用 17 对 SSR 引物构建了湖南省 36 份茶树品种(系)的分子指纹图谱;王黎明等(2011)利用 103 对 SSR 引物构建了 142 份甜高粱品种的分子身份证。由于分子身份证是指纹图谱数字化后得到的字符串,其构建实现了品种比对的自动化,具有高效、准确和方便的优点,更适合进行大规模的品种比对。

目前常用的 SSR-PCR 分析是利用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测扩增产物,但该方法的缺点是不能准确读出目标 DNA 片段的大小,检测效率偏低和难以对大规模不同批次品种 DNA 指纹鉴定数据进行有效整合(程本义等,2011)。与常规的凝胶电泳检测法相比,基于 DNA 测序仪的 SSR 荧光标记毛细管电泳检测方法可以得到目标 DNA 片段的准确大小,检测结果更为精确,适用于大批量样品的检测分析。SSR 荧光标记毛细管电泳检测技术已成功应用于小麦(Fujita et al., 2009)、无花果(Achta et al., 2009)、甘蔗(Pan, 2010)、大豆(Oliveira et al., 2010)、苹果(Moriya et al., 2011)、水稻(程本义等,2011)、枣(麻丽颖等,2012)和梨(高源等,2012)等的品种鉴定研究中。

近年来在百合中也开发了一批稳定性好的 SSR 标记,并已应用于系统进化和遗传多样性等研究中。杨素丽等(2008)和 Lee 等(2011)先后利用 NCBI 上的百合 EST 序列开发了一批 SSR 引物;葛亮等(2012)利用 19 对 SSR 核心引物对部分百合资源进行了遗传系统进化分析;Kawase 等(2010)和 Sakazono 等(2013)利用双重抑制 PCR 技术开发了一批 SSR 引物;Yuan 等(2013)利用岷江百合(*L. regale*)转录组数据开发了 494 对 SSR 引物。这些工作为利用 SSR 引物构建百合的分子身份证奠定了良好基础,但至今尚未见相关研究报道。

本试验中利用筛选到的 SSR 引物,采用荧光测序技术结合新的带型编码方式构建 96 份百合样本的分子身份证,并探索高精度、高通量和高效率构建百合分子身份证的技术体系,以期品种鉴定和亲缘关系分析等相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2010 年 10 月至 2012 年 6 月在中国农业科学院蔬菜花卉研究所进行。试验材料共 96 份,

其中包括 22 个原生种, 74 个杂交品种。

1.2 DNA 提取及 PCR 体系

选取新鲜的百合幼叶, 用改良 CTAB 法 (Beek et al., 1992) 提取各样品材料的总 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, 并将其浓度稀释至 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, -20°C 下保存备用。

从 Yuan 等 (2013) 报道的 172 对 EST-SSR 引物中筛选出扩增条带清晰、稳定、多态性高的 20 对引物 (表 1) 用于样品的扩增。合成 20 对荧光标记引物, 每 4 对标记为一组, 共分 5 组, 每组 4 对引物的正向引物上分别加注的荧光染料为 6-FAM (蓝)、HEX (黄)、TAMRA (黑色) 和 ROX (红) 荧光基团 (表 1), 由北京诺赛基因组研究中心有限公司合成。

SSR-PCR 反应体系参照葛亮等 (2012) 的体系进行。采用温度梯度 PCR (Gradient PCR) 对引物退火温度进行优化, 得到各对引物合适的退火温度 (表 1)。PCR 循环条件是: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 合适退火温度退火 30 s, 72°C 延伸 45 s, 35 个循环; 72°C 延伸 7 min。反应在 Bio-Rad PTC-200 上进行。

1.3 SSR 荧光标记毛细管电泳检测

对 96 份百合样品荧光标记引物的扩增产物进行纯化, 去除残留的盐分、蛋白质等杂质; 取纯化后的荧光标记引物扩增产物 $2 \mu\text{L}$, 4 种荧光标记引物 6-FAM、HEX、TAMRA、ROX 扩增产物分别稀释 50 倍、30 倍、10 倍、10 倍; 将每组的 4 种荧光标记产物每种取 $1 \mu\text{L}$ 混合, 离心混匀, 取 $1 \mu\text{L}$ 加入 96 孔板中; 按每孔 $10 \mu\text{L}$ 体系, 每孔含 $1 \mu\text{L}$ 稀释后的扩增产物、 $8.9 \mu\text{L}$ 甲酰胺和 $0.1 \mu\text{L}$ 片段大小标准 GS500 (-250) LIZ, 计算所需甲酰胺和 LIZ 的量, 将两者混合做成预混液, 分装到 96 孔板中; 95°C 变性 5 min, 置冰上 10 min, 离心后在 ABI3130xl 遗传分析仪上进行片段大小测定; 用 GeneMapper 对上机结果进行片段大小及基因分型分析。

1.4 百合 EST-SSR 分子身份证构建

利用 20 对引物对 96 个样品进行扩增, 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 20 对引物上的扩增带型数据串联起来, 即得到每个样品以 20 位数字或字母表示的分子身份证。

2 结果与分析

2.1 毛细管电泳结果

如表 1 所示, 20 对 SSR 引物对 96 份百合种质资源进行扩增, 共检测到 69 个等位位点, 每个引物检测到的等位位点 2 ~ 6 个, 每对引物平均 3.45 个。共检测到 170 个带型, 每个引物检测到带型数 3 ~ 17 个, 每对引物平均 8.50 个。扩增的片段长 101 ~ 471 bp。由于采用四重荧光毛细管电泳技术, 可以完成对 4 对引物扩增条带的同时检测, 检测的效率得以显著提高。图 1 为引物 ivflmre125 在 ‘Rita’、‘Prato’ 和 ‘Brunello’ 间的扩增带型。

表 1 20 对荧光标记引物及其对 96 份百合种质资源扩增结果

Table 1 Labelled fluorescent of 20 pairs of SSR primers and amplified results of 96 lily cultivars

组号 Group number	引物名称 Primer name	5'端标记荧光 Fluorescent labelled	退火温度/℃ Annealing temperature	等位基因数 Number of alleles detected	扩增带型 Amplified bands	扩增片段大小/bp Size of bands amplified
1	ivflmre125	6-FAM	55	2	3	174 ~ 201
	ivflmre141	HEX	61	3	7	140 ~ 173
	ivflmre407	TAMRA	59	4	6	140 ~ 215
	ivflmre422	ROX	56	3	6	112 ~ 124
2	ivflmre79	6-FAM	51	3	8	379 ~ 471
	ivflmre100	HEX	56	5	14	178 ~ 201
	ivflmre136	TAMRA	59	4	10	174 ~ 192
	ivflmre138	ROX	52	3	6	199 ~ 211
3	ivflmre179	6-FAM	55	3	8	185 ~ 191
	ivflmre302	HEX	64	3	7	208 ~ 233
	ivflmre342	TAMRA	63	2	4	158 ~ 161
	ivflmre381	ROX	59	3	8	244 ~ 253
4	ivflmre486	6-FAM	56	3	8	101 ~ 110
	ivflmre588	HEX	59	3	8	108 ~ 116
	ivflmre725	TAMRA	54	4	11	135 ~ 174
	ivflmre738	ROX	51	6	14	195 ~ 216
5	ivflmre768	6-FAM	52	4	13	168 ~ 185
	ivflmre771	HEX	52	3	7	227 ~ 239
	ivflmre1014	TAMRA	64	3	5	217 ~ 239
	ivflmre1024	ROX	56	5	17	261 ~ 280
总数 Sum				69	170	
平均值				3.45	8.50	
Average						

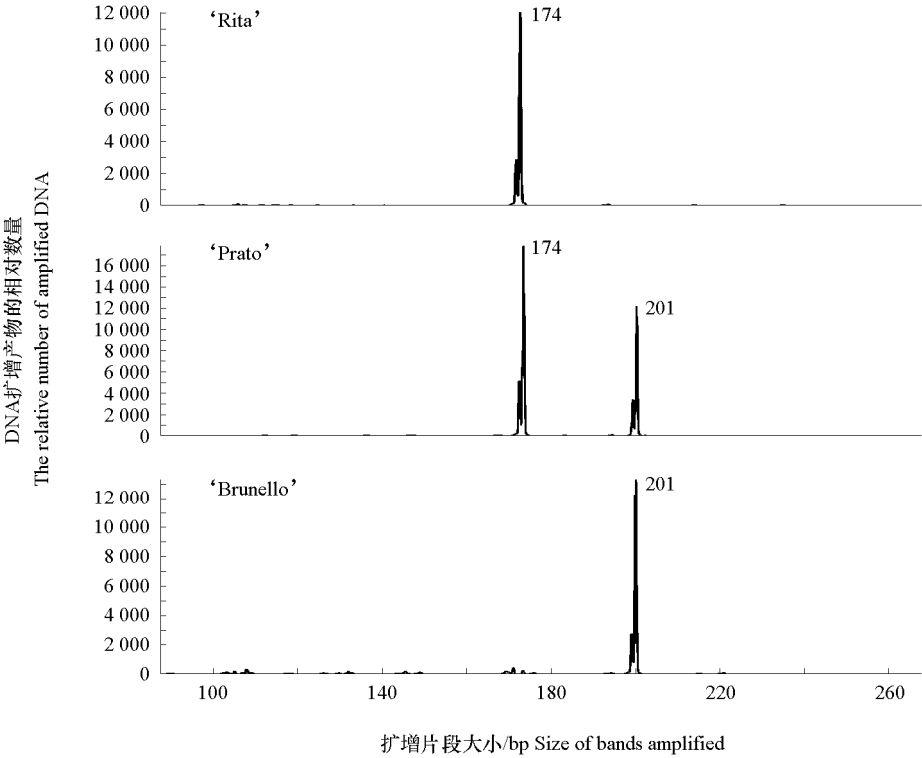


图 1 引物 ivflmre125 在不同百合样品间扩增产物的带型

Fig. 1 Amplification bands between different genotypes of lily using primer ivflmre125

2.2 种质分子身份证编码

按表 2 引物的顺序即 ivflmre125、ivflmre342、ivflmre1014、ivflmre407、ivflmre422、ivflmre138、ivflmre771、ivflmre141、ivflmre302、ivflmre179、ivflmre588、ivflmre79、ivflmre486、ivflmre381、ivflmre136、ivflmre725、ivflmre768、ivflmre738、ivflmre100 和 ivflmre1024, 将每对引物在样品上扩增的带型编码进行串联排列, 得到 96 份样品的分子身份证代码 (表 3)。得到的 96 个供试材料的分子身份证代码均不相同, 能够将所有种或品种区分开, 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 2 20 对引物的扩增带型编号
Table 2 The code of different SSR patterns

带型编号 Code of pattern	Ivflmre 125	Ivflmre 342	Ivflmre 1014	Ivflmre 407	Ivflmre 422	Ivflmre 138	Ivflmre 771	Ivflmre 141	Ivflmre 302	Ivflmre 179
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	174	158	217	140	118	199	227	140	208	185
2	201	158/161	217/218	140/142	112/118	205	227/230	140/147	208/216	185/188
3	174/201	161	217/218/ 239	140/145	112/124	205/211	227/233	147	216	185/191
4			217/239	145	118/124	211	230	147/173	216/233	188
5				145/215	124	199/205	230/233	173	233	191
6							233	140/147/ 173	208/216/ 233	188/191
7										185/188/ 191

带型编号 Code of pattern	Ivflmre 588	Ivflmre 79	Ivflmre 486	Ivflmre 381	Ivflmre 136	Ivflmre 725	Ivflmre 768	Ivflmre 738	Ivflmre 100	Ivflmre 1024
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	108	379	101	244	174/180	135	174	195	178	261
2	108/111	379/423	101/105	244/250	174/186	156	174/180	195/206	184	261/262
3	108/116	379/471	101	244/253	180	135/156	174/185	195/209	184/190	261/264
4	111	423	105	250	180/186	156/162	180	197	184/195	261/273
5	111/116	423/471	105/110	250/253	186	156/174	180/185	197/206	190	261/264/ 273
6	116	471	110	253	186/192	162	185	197/209	190/195	262/264
7	108/111/ 116	379/423/ 471	101/105/ 110	244/250/ 253	192	162/174	168	209	195	264
8					174/180/ 186	174	168/174	209/214	195/201	264/273
9					180/186/ 192	135/162	168/180	209/214/ 216	178/184	264/273/ 280
A						135/156/ 174	168/180/ 185	197/206/ 209	178/184/ 190	273
B							168/185	197/214/ 216	178/184/ 190/195	264/280
C							174/180/ 185	197/209/ 214	178/184/ 195	280
D								195/197/ 209	184/190/ 195	273/280
E									190/195/ 201	261/262/ 264/280
F										261/273/ 280
G										262/280

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 3 96 份百合种及品种分子身份证代码表

Table 3 Molecular identity code of 96 *Lilium* accessions

样品 编号 Code	种名或品种名 Name of cultivar or specie	类别 Type	分子身份证编号 Molecular identity code	样品 编号 Code	种名或品种名 Name of cultivar or specie	类别 Type	分子身份证编号 Molecular identity code
1	Brunello	A	23112212167421115a2b	49	Love Story	O	11144261551552523361
2	Black Bird	A	2310421224647151444a	50	Red Reflex	O	11441361551662426862
3	Matrix	A	23111322342421234b4a	51	Sunny Sulawesi	O	11143261551662426181
4	Orange Pixie	A	23111211246451515457	52	True Emotion	O	11441261551342326881
5	Detroit	A	23112312142421204477	53	Acapulco	O	11441261551652526871
6	Lollypop	A	23111311246441511b00	54	Mero Star	O	11441361541362426881
7	Monte Negro	A	23111211144441510457	55	Star Fighter	O	11444261541662420372
8	Navona	A	2343431224347159457a	56	Nova Zembla	O	11441351561662446371
9	Red Latin	A	23122212244421512020	57	Casa Blanca	O	11445161541664426771
10	ValdiSole	A	23210312276421611a18	58	Sorbonne	O	11445161541654426871
11	Tresor	A	2312130627342122ca29	59	Con Amore	O	11141131541544422861
12	Heart Balance	A	23111211257542613b28	60	Bellpasso	O	231212313574442244a9
13	Prunotto	A	23114212157442811a29	61	Tom Pouce	O	234613123534245145c0
14	Rita	A	11355422513554544963	62	Acapulco	O	11441331541214523752
15	Connecticut King	A	32431332451224946c71	63	Tahiti	O	33412232523244625ddf
16	Pollyanna	A	2310421235140401445c	64	Lombardia	O	23310214335424521a5a
17	Elite	A	2311021125542442542b	65	Yelloween	OT	12241432521541554961
18	Prato	A	331353326324245ac64e	66	Robina	OT	11341332513541556976
19	Yellow Jiant	A	23111212354424529457	67	Gold city	OT	11150312543562423984
20	Butter Pixie	A	23111313401456504020	68	Shocking	OT	11254432523562525371
21	White Heaven	L	23111213310411524424	69	Flashpoint	OT	113415325235623b5973
22	Snow Queen	L	2311121301644450244a	70	Serano	OT	11451312512562455972
23	Pink Perfection	T	12141413544466066030	71	Lesotho	OT	11351502523762555972
24	Ceb Dazzle	LA	23212314376420631429	72	Belladonna	OT	11351332526762555982
25	Royal Sunset	LA	23311314373470531a28	73	Conca D'or	OT	11151332523564385371
26	Advantage	LA	2300433231140151002b	74	Red Hot	OT	11444361551305306781
27	Bonsoir	LA	23111316126441618a28	75	<i>L. regale</i>	W	121414235164325b4386
28	Courier	LA	23424314323422522a27	76	<i>L. henryi</i>	W	12141413546042685787
29	Mestre	LA	23424316223452514a4a	77	<i>L. davidii</i> var. <i>unicolor</i>	W	2311131335544255625g
30	Mombasa	LA	23211314323472562a97	78	<i>L. concolor</i>	W	203110000514425234ba
31	Pirandello	LA	23411314226422247528	79	<i>L. pumilum</i>	W	13311213452442712a27
32	Turandot	LA	2342531433344450443c	80	<i>L. brownii</i> var.	W	2111124305544251640a
33	Triumphator	LO	33411236513242524545	81	<i>L. leucanthum</i>	W	11150413516462746707
34	White Triumph	LO	33411232513242525545	82	<i>L. sulphureum</i>	W	21311060356442516480
35	Raizan I	NL	2111120301644252463a	83	<i>L. distichum</i>	W	102113130064277197e6
36	Rodina	O	11441261541541526372	84	<i>L. lancifolium</i>	W	2311130333242320362c
37	Siberia	O	1144126154111446871	85	<i>L. leichtlinii</i> var. <i>maximowiczii</i>	W	20411213134443617620
38	Sorbonne	O	11441161543621426871	86	<i>L. dauricum</i>	W	2021126003642360142a
39	Rodina	O	12441261541541526372	87	<i>L. davidii</i>	W	2312523213147321164d
40	Top White	O	11441361541611526371	88	<i>L. concolor</i> var. <i>megalanthum</i>	W	2031126313642352261a
41	Rialto	O	11141561541301526872	89	<i>L. duchartrei</i>	W	322114663060235157e7
42	Trofeo	O	11441361541401326371	90	未定名 Unnamed	W	22111243356454606428
43	Sheila	O	11440361541601526371	91	<i>L. pumilum</i>	W	13314213356444715727
44	Tiber	O	11441261541641466872	92	<i>L. bakerianum</i>	W	11144432523564455071
45	Constanta	O	11141251541601526773	93	<i>L. davidii</i>	W	23121213436424501417
46	Florian	O	1114136150104202b272	94	<i>L. henryi</i>	W	12141332521655455781
47	Robinvan Gale	O	11441261541342426871	95	<i>L. citronella</i>	W	2311230233247550405a
48	Roadstar	O	11441261551142446871	96	<i>L. henryi</i>	W	1314101554663557a747

注: A 表示亚洲百合杂种系; L 表示麝香百合杂种系; T 表示喇叭百合杂种系; LA 表示铁炮百合杂种系与亚洲百合杂种系的杂交后代; LO 表示铁炮百合杂种系与东方百合杂种系的杂交后代; NL 表示新铁炮百合; O 表示东方百合杂种系; OT 表示东方百合杂种系与喇叭百合杂种系的杂交后代; W 表示原生种。重名的为来自不同种源的种或不同公司的品种。

Note: A means Asiatic hybrids; L means Longiflorum hybrids; T means Trumpet hybrids; LA means LA hybrids; LO means LO hybrids; NL means New Longiflorum hybrids; O means Oriental hybrids; OT means OT hybrids; W means Species. Samples with the same name are from different source.

此外, 由于不是来自同一个克隆的无性系, 来自不同产地的 3 个湖北百合 (*L. henryi*) 样品 76、94 和 96 的分子身份证互不相同, 来自不同产地的两个川百合 (*L. davidii*) 样品 87 和 93 的分子身份证也不相同。

3 讨论

3.1 荧光标记 SSR 毛细管电泳检测法的稳定性和准确性

SSR 标记已被证明是一种具有高稳定性和高准确性的分子标记 (Powell et al., 1996; 明军 等, 2002)。此外, 在对 SSR-PCR 扩增产物检测的方法中, 基于 DNA 测序仪建立的荧光标记 SSR 毛细管电泳检测法可以得到目标 DNA 片段的准确大小, 检测结果更为稳定、准确和高效, 更适用大批量品种的检测分析。龚亚明等 (2009) 针对豌豆的研究表明, EST-SSR 荧光标记毛细管电泳检测法具有很好的重复性, 表现很高的稳定性。程本义等 (2011) 对水稻的研究表明 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。本试验利用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测方法对荧光标记 SSR 毛细管电泳检测法的结果进行了验证, 结果显示两种检测技术的结果完全一致 (数据未列出), 表明该检测方法可以对目标 DNA 片段进行准确检测, 结果可靠。

3.2 指纹图谱和分子身份证的区别

指纹图谱和分子身份证是两个不同的概念。指纹图谱是指能够鉴别生物个体之间差异的电泳图谱, 其鉴定品种的基础在于对比电泳图谱中的差异来区分品种 (高运来 等, 2009), 但由于指纹图谱存在谱带较多、人工比对判读费时费力和统计分析较繁琐复杂等问题, 限制了其在大规模品种鉴定中的使用。而分子身份证是指在得到电泳图谱的基础上, 通过运用不同的编码方式对电泳图谱进行数字化处理后得到字符串形式的结果。相对于指纹图谱, 分子身份证能够简单明了地区分品种间的差异。由于分子身份证是指纹图谱数字化后的结果, 这样就可以通过计算机对各品种的分子身份证自动比对, 使品种的比对更加高效、方便和准确, 从而克服了指纹图谱进行人工比对的繁琐、低效等问题, 可以在大规模品种比对中广泛使用。

3.3 分子身份证的编码方法

构建分子身份证的编码方法主要有以下 3 类:

(1) 根据 SSR 指纹图谱, 以 1 和 0 分别代表某个等位基因位点扩增 DNA 条带的有无, 将 SSR 图谱转换为由 1 和 0 组成的字符串, 即构成分子身份证 (Ohtsubo & Nakamura, 2007; 刘新龙 等, 2010; 赵新燕 等, 2010)。也有在此基础上将二进制转化成十进制进行编码 (郝冬梅 等, 2011)。

(2) 将每对引物扩增的条带按从小到大排列, 依次编码; 有两个等位基因时取其中碱基数较少的一个 (陈昌文 等, 2011)。

(3) 将获得一系列带型用数字进行编码, 按照固定引物顺序, 串联各带型编码, 即可形成一组数据, 也就是该品种的分子身份证 (王立新 等, 2006, 2007)。

本研究中所使用的分子标记是 EST-SSR 标记, 为充分利用每一个位点的带型数据, 杂合带型也进行了编码, 这样可以充分利用引物区分更多的品种。本研究中所用的 20 对引物, 只扩增出 69 个等位位点, 而带型却有 170 种, 多态性增加了 1 倍之多。在对带型编码时, 首次采用 0 到 9 的 10 个个位数字和 26 个小写英文字母对带型进行编码, 使一对引物在分子身份证上对应一位数或一个字母, 书写简洁, 从而避免了仅使用数字对带型编码时, 因引物扩增带型过多需要使用两位数字进行编码的情况。

研究者在选取分子身份证的编码方法时,应根据研究对象的特点,秉着统计方便,书写简洁的原则进行。针对 SSR 标记多态性丰富的作物,可以采取第二种编码方法进行编码。针对 SSR 标记多态性不好或者引物不足的作物,为了充分利用带型的多态性可以采用本研究使用的编码方式进行编码。

3.4 品种分子身份证数据库的可扩充性

世界各国育种机构每年都有大量的百合新品种育成并推向市场,所以,必须建立新品种的分子身份证来及时更新数据库。随着新品种的不断增多,可能产生本研究中不包含的新的带型,此时可以按照本研究的编码方法对新的基因型进行编码。理论上每对引物最多可以编码 $36(10 \text{ 个个位数和 } 26 \text{ 个小写字母})$ 种带型,所以,利用所选用的 20 对引物最多可以区分 20^{36} 个百合品种,可以满足现在及将来对百合品种鉴定的要求。此外,随着百合品种的不断增多,本研究中筛选的 20 对核心引物可能不能将有些品种区分开,此时,可增加新的有效的 SSR 引物或与其他类型的分子标记一同使用来进行品种鉴定。

3.5 用分子标记进行种质鉴定的问题

用分子标记对种质进行鉴定目前还处于研究阶段,存在的主要问题有:1) 很难区分亲缘关系非常近的种质,尤其不能区分由于芽变产生的品种。其原因主要为多数分子标记是基于基因组上随机的一些片段开发的,这些标记并不一定和重要的形态性状连锁;2) 对于基因组未测序的物种,无法实现设计的引物在各条染色体上的均匀分布,不能代表整个基因组的信息。现有的单纯意义的分子身份证是较为片面的,并不能完全表示一个品种包含的所有信息,应与染色体水平、细胞学水平和形态水平等鉴定相结合,才能更加准确地描述一个品种的全部身份信息。

References

- Achtak H, Oukabli A, Ater M, Santoni S, Kjellberg F, Khadari B. 2009. Microsatellite markers as reliable tools for fig cultivar identification. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134 (6): 624 - 631.
- Beek J G, Verkerk R, Zabel P, Lindhout P. 1992. Mapping strategy for resistance genes in tomato based on RFLPs between cultivars: Cf9 (resistance to *Cladosporium fulvum*) on chromosome 1. *Theoretical and Applied Genetics*, 84 (1): 106 - 112.
- Chen Chang-wen, Cao Ke, Wang Li-rong, Zhu Geng-rui, Fang Wei-chao. 2011. Molecular ID establishment of main china peach varieties and peach related species. *Scientia Agricultura Sinica*, 44 (10): 2081 - 2093. (in Chinese)
- 陈昌文, 曹珂, 王力荣, 朱更瑞, 方伟超. 2011. 中国桃主要品种资源及其野生近缘种的分子身份证构建. *中国农业科学*, 44 (10): 2081 - 2093.
- Cheng Ben-yi, Xia Jun-hui, Gong Jun-yi, Yang Shi-hua. 2011. Application of capillary electrophoresis detection with fluorescent SSR markers in rice DNA fingerprint identification. *China J Rice Sci*, 25 (6): 672 - 676. (in Chinese)
- 程本义, 夏俊辉, 龚俊义, 杨仕华. 2011. SSR 荧光标记毛细管电泳检测法在水稻 DNA 指纹鉴定中的应用. *中国水稻科学*, 25 (6): 672 - 676.
- Dangl G S, Yang J, Golino D A, Gradziel T. 2009. A practical method for almond cultivar identification and parental analysis using simple sequence repeat markers. *Euphytica*, 168: 41 - 48.
- Fujita Y, Fukuoka H, Yano H. 2009. Identification of wheat cultivars using EST-SSR markers. *Breeding Science*, 59 (2): 159 - 167.
- Gao Yuan, Tian Lu-ming, Liu Feng-zhi, Cao Yu-fen. 2012. Using the SSR fluorescent labeling to establish SSR fingerprints for 92 cultivars in *Pyrus*. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (8): 1437 - 1446. (in Chinese)
- 高源, 田路明, 刘凤之, 曹玉芬. 2012. 利用 SSR 荧光标记构建 92 个梨品种指纹图谱. *园艺学报*, 39 (8): 1437 - 1446.
- Gao Yun-lai, Zhu Rong-sheng, Liu Chun-yan, Li Wen-fu, Jiang Hong-wei, Li Can-dong, Yao Bing-chen, Hu Guo-hua, Chen Qing-shan. 2009. Establishment of molecular ID in soybean varieties in Heilongjiang, China. *Acta Agronomica Sinica*, 35 (2): 211 - 218. (in Chinese)

- 高运来, 朱荣胜, 刘春燕, 李文福, 蒋洪蔚, 李灿东, 姚丙晨, 胡国华, 陈庆山. 2009. 黑龙江部分大豆品种分子 ID 的构建. 作物学报, 35 (2): 211 - 218.
- Ge Liang, Yuan Su-xia, Wang Chun-cheng, Shan Hong-chen, Yang Chun-qi, Feng Hui-ying, Liang Yun, Xu Lei-feng, Liu Chun, Ming Jun. 2012. Assessment of phylogenetic relationships of some *Lilium* species and cultivars using EST-SSR markers. Acta Horticulturae Sinica, 39 (11): 2189 - 2198. (in Chinese)
- 葛 亮, 袁素霞, 王春城, 单宏臣, 杨春起, 冯慧颖, 梁 云, 徐雷锋, 刘 春, 明 军. 2012. 百合部分种及品种系统进化关系的 EST-SSR 标记分析. 园艺学报, 39 (11): 2189 - 2198.
- Gong Ya-ming, Hu Qi-zan, Mao Wei-hua, Li Ya-dan, Zhang Gu-wen, Ding Ju. 2009. Application and evaluation of fluorescent EST-SSR markers detection technique with capillary electrophoresis in pea. Acta Agriculture Zhejiangensis, 21 (6): 540 - 543. (in Chinese)
- 龚亚明, 胡齐赞, 毛伟华, 李亚丹, 张古文, 丁 桔. 2009. EST-SSR 荧光标记毛细管电泳检测法在豌豆上的应用及评价. 浙江农业学报, 21 (6): 540 - 543.
- Hao Dong-mei, Qiu Cai-sheng, Yu Wen-jing, Deng Xin, Jia Wan-qi, Chen Xin-bo, Long Song-hua, Guo Yuan, Wang Yu-fu. 2011. Construction of flax molecular ID card system by RAPD marker and genetic diversity analysis. Chinese Agricultural Science Bulletin, 27 (5): 168 - 174. (in Chinese)
- 郝冬梅, 邱财生, 于文静, 邓 欣, 贾婉琪, 陈信波, 龙松华, 郭 媛, 王玉富. 2011. 亚麻 RAPD 标记分子身份证体系的构建与遗传多样性分析. 中国农学通报, 27 (5): 168 - 174.
- Kawase D, Hayashi K, Takeuchi Y, Yumoto T. 2010. Population genetic structure of *Lilium japonicum* and serpentine plant *L. japonicum* var. *abeanum* by using developed microsatellite markers. Plant Biosystems, 144 (1): 29 - 37.
- Lee S I, Park K C, Song Y S, Son J H, Kwon S J, Na J K, Kim J H, Kim N S. 2011. Development of expressed sequence tag derived-simple sequence repeats in the genus *Lilium*. Genes & Genomics, 33 (6): 727 - 733.
- Liu Xin-long, Ma Li, Chen Xue-kuan, Ying Xiong-mei, Cai Qing, Liu Jia-yong, Wu Cai-wen. 2010. Establishment of DNA fingerprint ID in sugarcane cultivars in Yunnan, China. Acta Agronomica Sinica, 36 (2): 202 - 210. (in Chinese)
- 刘新龙, 马 丽, 陈学宽, 应雄美, 蔡 青, 刘家勇, 吴才文. 2010. 云南甘蔗自育品种 DNA 指纹身份证构建. 作物学报, 36 (2): 202 - 210.
- Long Ya-yi, Zhang Jin-zheng. 1998. The conservation and utilization of lily plant resources. Journal of Plant Resources and Environment, 7 (1): 40 - 44. (in Chinese)
- 龙雅宜, 张金政. 1998. 百合属植物资源的保护与利用. 植物资源与环境学报, 7 (1): 40 - 44.
- 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.
- Ming Jun, Zhang Qi-xiang, Ru Chan-gan, Yan Xiao-lan, Mao Qing-shan. 2004. The evolution of identification of gardening plants with DNA molecular markers. World Forestry Research, 16 (5): 12 - 16. (in Chinese)
- 明 军, 张启翔, 茹产敢, 晏晓兰, 毛庆山. 2004. 园林及园艺植物品种鉴定的 DNA 分子标记技术. 世界林业研究, 16 (5): 12 - 16.
- Morgante M, Olivieri A. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. The Plant Journal, 3 (1): 175 - 182.
- 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 (1): 135 - 150.
- Ohtsubo K, Nakamura S. 2007. Cultivar identification of rice (*Oryza sativa* L.) by polymerase chain reaction method and its application to processed rice products. Journal of Agricultural And Food Chemistry, 55 (4): 1501 - 1509.
- Oliveira M B, Vieira E S N, Schuster I. 2010. Construction of a molecular database for soybean cultivar identification in Brazil. Genetics and Molecular Research, 9 (2): 705 - 720.
- Pan Y B. 2010. Databasing molecular identities of sugarcane (*Saccharum* spp.) clones constructed with microsatellite (SSR) DNA markers. American Journal of Plant Sciences, 1 (2): 87 - 94.
- Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding, 2 (3): 225 - 238.

- Sakazono S, Hiramatsu M, Watanabe M, Okubo H. 2013. Development and characterization of microsatellite markers for *Lilium longiflorum* (Liliaceae). *Applications in Plant Sciences*, 1 (9): 1300014.
- Wang Li-ming, Jiao Shao-jie, Jiang Yan-xi, Yan Hong-dong, Su De-feng, Sun Guang-quan. 2011. Establishment of molecular identity in 142 sweet sorghum varieties. *Acta Agronomica Sinica*, 37 (11): 1975 - 1983. (in Chinese)
- 王黎明, 焦少杰, 姜艳喜, 严洪冬, 苏德峰, 孙广全. 2011. 142 份甜高粱品种的分子身份证构建. *作物学报*, 37 (11): 1975 - 1983.
- Wang Li-xin, Li Yun-fu, Chang Li-fang, Huang Lan, Li Hong-bo, Ge Ling-ling, Liu Li-hua, Yao Ji. 2007. Method of ID constitution for wheat cultivars. *Acta Agronomica Sinica*, 33 (10): 1738 - 1740. (in Chinese)
- 王立新, 李云伏, 常利芳, 黄 岚, 李宏博, 葛玲玲, 刘丽华, 姚 骥. 2007. 建立小麦品种 DNA 指纹的方法研究. *作物学报*, 33 (10): 1738 - 1740.
- Wang Li-xin, Zhao Chang-ping, Qiu Jun, Li Hong-bo, Ge Ling-ling, Sun Hui, Yao Ji. 2006. A New scoring method of SSR patterns for wheat. *Journal of Triticeae Crops*, 26 (4): 164 - 168. (in Chinese)
- 王立新, 赵昌平, 邱 军, 李宏博, 葛玲玲, 孙 辉, 姚 骥. 2006. 记录小麦 SSR 带型的快捷方法. *麦类作物学报*, 26 (4): 164 - 168.
- Yang Su-li, Ming Jun, Liu Chun, Mu Ding, Li Ming-yang. 2008. Data mining for simple sequence repeats marker development in expressed sequence tags from *Lilium* L. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (7): 1069 - 1074. (in Chinese)
- 杨素丽, 明 军, 刘 春, 穆 鼎, 李名扬. 2008. 基于 EST 信息的百合 SSR 标记的建立. *园艺学报*, 35 (7): 1069 - 1074.
- Yang Yang, Liu Zhen, Zhao Yang, Liang Guo-qiang. 2010. Construction of DNA fingerprints for tea cultivars originated from Hunan Province. *Journal of Tea Science*, 30 (5): 367 - 373. (in Chinese)
- 杨 阳, 刘 振, 赵 洋, 梁国强. 2010. 湖南省主要茶树品种分子指纹图谱的构建. *茶叶科学*, 30 (5): 367 - 373.
- Yuan S X, Ge L, Liu C, Ming J. 2013. The development of EST-SSR markers in *Lilium regale* and their cross-amplification in related species. *Euphytica*, 189 (3): 393 - 419.
- Zhao Xin-yan, Huang Li, Ren Xiao-ping, Jiang Hui-fang, Chen Yu-ning. 2010. Establishment of DNA fingerprint identity of arachis species with high oil content. *Acta Agric Boreali-Sin*, 25 (6): 64 - 70. (in Chinese)
- 赵新燕, 黄 莉, 任小平, 姜慧芳, 陈玉宁. 2010. 野生花生高油种质 DNA 指纹身份证构建. *华北农学报*, 25 (6): 64 - 70.

征 订

欢迎订阅《园艺学报》

《园艺学报》是中国园艺学会和中国农业科学院蔬菜花卉研究所主办的学术期刊,创刊于 1962 年,刊载有关果树、蔬菜、观赏植物、茶及药用植物等方面的学术论文、研究报告、专题文献综述、问题与讨论、新技术新品种以及园艺研究动态与信息,适合园艺科研人员、大专院校师生及农业技术推广部门专业技术人员阅读参考。

《园艺学报》是中文核心期刊,中国科技核心期刊;被英国《CAB 文摘数据库》、美国 CA 化学文摘、日本 CBST 科学技术文献速报、俄罗斯 AJ 文摘杂志、CSCD 中国科学引文数据库等多家数据库收录。《园艺学报》荣获“第三届国家期刊奖”及“新中国 60 年有影响力的期刊”、“中国国际影响力优秀学术期刊”、“百种中国杰出学术期刊”、“中国权威学术期刊”、“中国精品科技期刊”等称号。

《中国学术期刊影响因子年报》2013 年公布的《园艺学报》复合总被引频次为 11 071,复合影响因子为 1.734;期刊总被引频次为 5 146,期刊影响因子为 1.112。

《中国科技期刊引证报告》2013 年公布的《园艺学报》扩展总被引频次为 6 106,扩展影响因子为 1.333;核心总被引频次为 4 328,核心影响因子为 1.047;在中国科技核心期刊综合评价总分排名中居第 29 位。

《园艺学报》为月刊,每月 25 日出版。每期定价 40 元,全年 480 元。国内外公开发售,全国各地邮局办理订阅,国内邮发代号 82 - 471,国外发行由中国国际图书贸易总公司承办,代号 M448。漏订者可直接寄款至编辑部订购。编辑部地址:北京市海淀区中关村南大街 12 号中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部。

邮政编码:100081;电话:(010) 82109523。E-mail: yuanyixuebao@126.com。网址: <http://www.ahs.ac.cn>。