

# 基于 TP-M13-SSR 指纹图谱的中国原产 苹果属植物分子身份证的建立

高 源, 刘凤之, 王 昆, 王大江, 龚 欣, 刘立军

(中国农业科学院果树研究所/农业部园艺作物种质资源利用重点实验室, 辽宁兴城 125100)

**摘要:** 利用 TP-M13-SSR 分子标记方法, 构建 27 份中国原产苹果属植物在 12 个 SSR 位点的指纹图谱, 并运用条码技术生成其分子身份证。12 对引物共获得 251 个等位基因, 平均 21 个。引物多态性好, 仅用引物 CH05b06 即可区分全部供试材料。27 份苹果材料在 12 个 SSR 位点遗传多样性、多态性信息含量和位点杂合度的变化范围分别为 0.6620~0.9455、0.6327~0.9211 和 0.6538~0.9319。基于 CH05b06 位点处获得的指纹谱图即可得到每份供试材料独有的分子身份证。TP-M13-SSR 分子标记技术适用于苹果属植物种质资源的指纹图谱构建, 利于分子基础数据库的积累。基于苹果种质资源 TP-M13-SSR 指纹图谱可获得每份苹果种质资源独有的分子身份证。

**关键词:** 中国原产; 苹果属; TP-M13-SSR; 分子身份证

## Establishment of Molecular Identity Card for *Malus* Mill. Originated From China Based on the Fingerprints of TP-M13-SSR

GAO Yuan, LIU Feng-zhi, WANG Kun, WANG Da-jiang, GONG Xin, LIU Li-jun

(Research Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Xingcheng Liaoning 125100)

**Abstract:** In this work, we used 27 apple (*Malus* Mill.) accessions originated from China to assess the feasibility of using tailed primer M13 microsatellite markers (TP-M13-SSR) to establish genetic fingerprints and barcode technology to establish molecular identity cards of the apple collection. For the 27 accessions, twelve SSR markers resulted in the amplification of 251 alleles, with an average of 21 alleles per locus. The ranges of gene diversity, *PIC* and locus heterozygosity of the accessions at 12 SSR loci were 0.6620-0.9455, 0.6327-0.9211 and 0.6538-0.9319, respectively. The primer CH05b06 successfully differentiated all of the accessions. Based on the genetic fingerprints at CH05b06, we could obtain the special molecular identity cards for every accession. This technology could be used to establish genetic fingerprints and then obtain molecular identity cards for every accession, which could develop a set of reference standards for the apple collection which could be used as a database to identify unknown apple varieties.

**Key words:** China origin; *Malus* Mill.; TP-M13-SSR; molecular identity card

种质资源是新品种选育和农业生物技术发展的重要物质基础。我国是世界苹果属植物最大的起源中心之一, 全世界共有苹果属植物 35 种, 其中包含我国原产的 17 个野生种和 6 个栽培种<sup>[1-2]</sup>, 在研究苹果属植物的起源和亲缘演化等方面占有重要地位。苹果种质资源类型多样, 有些种间个体差异不甚明显,

加之各地交流频繁, 造成苹果属植物种类混杂现象层出不穷。苹果种质资源的准确鉴定是种质资源保存和利用的前提, 对于苹果种质资源的鉴定方法有形态学观察、同工酶<sup>[3-4]</sup>以及分子标记<sup>[5-8]</sup>等方法。

TP-M13-SSR (simple sequence repeat with tailed primer M13) 技术是在 SSR 技术和荧光测序技术基

收稿日期: 2015-02-13 修回日期: 2015-04-28 网络出版日期: 2015-10-14

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20151014.1126.004.html>

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2011006); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201303093)

第一作者研究方向为果树种质资源。E-mail: gaoyuan02@caas.cn

通信作者: 王昆, 研究方向为果树种质资源。E-mail: wangkun5488@163.com

础之上发展起来的,经过 M. Schuelke<sup>[9]</sup> 完善,而形成基于荧光测序技术的 SSR 扩增产物检测体系。后来,经过不断改进和尝试,而被应用到苹果等果树种质资源的研究中<sup>[8,10-12]</sup>。其具有重复性高、结果准确性好等优点,并且在较大程度上解决了分析通量较低、扩增产物检测流程繁琐、数据记录的工作量过大等一系列问题<sup>[13]</sup>。

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数字化处理后得到字符串形式的结果<sup>[14]</sup>。其将 DNA 指纹数字化,能够更加简单明了地区分种质资源之间的差异,达到在种质资源检索时更加直观的目的;并可通过计算机对种质资源差异自动比对,克服人工比对的繁琐和低效等问题<sup>[14-15]</sup>。国内祁伟<sup>[16]</sup> 较早地应用 ISSR 和 SRAP 分子标记分别绘制了红麻与蓖麻 DNA 指纹图谱,并建立其分子身份证;而在果树种质资源的分子身份证研究上,则是艾呈祥等<sup>[17]</sup> 较早地利用 10 对 SSR 引物构建了 38 份甜樱桃种质的指纹图谱,将分子指纹赋值后建立这些品种的分子身份证。国外 K. Ohtsubo 等<sup>[18]</sup> 利用 SSR 分子标记的方法构建了水稻的分子身份证;Y. B. Pan<sup>[19]</sup> 利用 21 对 SSR 引物构建了 1025 份甘蔗种质资源的分子身

份证数据库。分子身份证研究已在大豆<sup>[20]</sup>、茶树<sup>[21]</sup>、甘蔗<sup>[22]</sup>、苧麻<sup>[23]</sup>、桃<sup>[15]</sup>、甜高粱<sup>[24]</sup>、水稻<sup>[25]</sup> 和萝卜<sup>[26]</sup> 等作物上得以开展,而苹果属植物的指纹图谱构建研究虽取得许多进展<sup>[27-29]</sup>,但是基于指纹图谱的分子身份证研究国内外尚未见报道。

本研究利用 TP-M13-SSR 技术建立中国原产苹果属代表植物的指纹图谱,并以此为基础,获得其独特的条形码鉴定标识即分子身份证,以期实现苹果种质资源的快速鉴定,并为苹果种质资源收集和保存以及鉴定评价提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

27 份中国原产的苹果属代表植物材料均取自中国农业科学院果树研究所国家果树种质兴城苹果资源圃(NRAGR, National Repository of Apple Germplasm Resources),每份种质在圃内均为无性繁殖,具有各自独立的国圃号。但由于编目工作相对滞后,有些苹果种质资源还未获得其国圃号(表 1)。27 份材料分别归属于 21 个种、1 个亚种和 3 个变种,其中昭觉山定子为山定子的变种、平邑甜茶为湖北海棠的变种、槟子为绵苹果的变种、吉尔吉斯苹果为新疆野苹果的亚种。

表 1 27 份中国原产的苹果属植物材料

Table 1 27 accessions of *Malus* Mill. originated from China

编号	国圃号	材料名称	学名
Code	Code in NRAGR	Accession name	Scientific name
1	未编目	山定子	<i>M. baccata</i> (L.) Borkh.
2	未编目	昭觉山定子	<i>M. baccata</i> var. <i>zhaojiaoensis</i> (Jiang) Ponom
3	GPPG0866	毛山定子	<i>M. manshurica</i> (Maxim.) Komarov
4	GPPG0867	丽江山定子	<i>M. rockii</i> Rehd.
5	GPPG0851	湖北海棠	<i>M. hupehensis</i> (Pamp.) Rehd.
6	未编目	平邑甜茶	<i>M. hupehensis</i> (Pamp.) Rehd. var. <i>pinyiensis</i> Jiang
7	GPPG0865	垂丝海棠	<i>M. halliana</i> (Anon.) Koehne
8	GPPG0863	锡金海棠	<i>M. sikkimensis</i> (Wenzig) Koehne
9	GPPG0840	三叶海棠	<i>M. sieboldii</i> (Reg.) Rehd.
10	GPPG0852	维西三叶	<i>M. sieboldii</i> (Reg.) Rehd.
11	GPPG0841	复县三叶	<i>M. sieboldii</i> (Reg.) Rehd.
12	GPPG0853	变叶海棠	<i>M. toringoides</i> (Rehd.) Hughes
13	GPPG0854	小金海棠	<i>M. xiaojinensis</i> Cheng et Jiang
14	GPPG1072	西蜀海棠	<i>M. prattii</i> (Hemsl.) Schneid.
15	未编目	沧江海棠	<i>M. ombrophila</i> Hand.
16	未编目	河南海棠	<i>M. honanensis</i> Rehd.
17	未编目	台湾林檎	<i>M. doumeri</i> (Bois.) Chev. C. R. Ac.
18	GPPG0257	绵苹果	<i>M. domestica</i> subsp. <i>chinensis</i> Li Y. N.
19	GPPG1006	槟子	<i>M. domestica</i> subsp. <i>chinensis</i> var. <i>binzi</i> Li Y. N.
20	GPPG0809	花红	<i>M. asiatica</i> Nakai.
21	GPPG0976	楸子	<i>M. prunifolia</i> (Willd.) Borkh.
22	未编目	八棱海棠	<i>M. robusta</i> (Carr.) Rehd.

表 1(续)

编号 Code	国圃号 Code in NRAGR	材料名称 Accession name	学名 Scientific name
23	GPPG0864	西府海棠	<i>M. micromalus</i> Makino
24	未编目	海棠花	<i>M. spectabilis</i> (Ait.) Borkh.
25	GPPG0858	陇东海棠	<i>M. kansuensis</i> (Batal.) Schneid.
26	GPPG0802	新疆野苹果	<i>M. sieversii</i> (Ledeb.) Roem.
27	GPPG0955	吉尔吉斯苹果	<i>M. sieversii</i> (Ledeb.) Roem. subsp. <i>kirghisroum</i> (AL.) Ponom.

## 1.2 试验方法及数据处理

**1.2.1 试验方法** 采用德国 QIAGEN 的 DNeasy Plant Mini Kit 提取供试材料春季嫩叶的基因组 DNA。从 R. Liebhard 等<sup>[30]</sup>报道的序列中选取扩增产物片段长度在 100 ~ 300 bp 之间的普通 SSR 引物 32 对,加 M13 接头后形成的 TP-M13-SSR 引物由上海 Sangon 公司合成;5'端带有荧光标记的 M13 正向引物(5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3')则由美国 ABI 公司合成,分别标记 6FAM<sup>TM</sup>、VIC<sup>TM</sup>和 NED<sup>TM</sup>3 种荧光。

PCR 体系和扩增产物的纯化体系参照高源等<sup>[8]</sup>的方法。PCR 反应在 Bio-Rad PTC-200 上进行。PCR 扩增并经过纯化后的 TP-M13-SSR 荧光标记产物在美国 ABI 3730 基因测序仪上进行荧光检测,收集原始数据。

**1.2.2 数据处理** 利用 GeneMapper3.0 软件对 ABI 3730 收集数据进行分析,获得不同样品扩增片段的长度。利用 PopGen32 对获得的供试材料指纹图谱数据进行分析。根据扩增片段的有无统计所有二元数据,有扩增条带的记为 1,无带记为 0,未扩增记为 9。将每份材料在所有供试 SSR 位点获得的 0、

1 数据按序排列,利用条码技术将每份材料的按相同位点顺序排列的 0、1 序列转化成每份材料独特的条码标识即分子身份证。

## 2 结果与分析

### 2.1 TP-M13-SSR 引物的筛选及条件优化

由于 TP-M13-SSR 正向引物比反向引物多了长为 19 bp 的 M13 接头,使得引物退火温度相较于普通 SSR 引物发生改变,且更易出现扩增不稳定的情况。因此必须对引物第 1 次 PCR 条件进行优化,并对引物进行筛选。从 27 份材料中随机选取 2 份材料,在 50 ~ 60℃ 之间以 0.5℃ 为梯度设定退火温度进行 PCR 扩增,用 3% 的琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测。最终筛选出稳定性高、重复性好的 12 对 TP-M13-SSR 引物用于 27 份中国原产苹果属植物指纹图谱构建(表 2)。

### 2.2 中国原产苹果属植物 TP-M13-SSR 指纹图谱和遗传多样性分析

27 份材料在 12 个 SSR 位点的扩增片段长度构成每份材料的 TP-M13-SSR 指纹信息(表 3)。如

表 2 12 对 TP-M13-SSR 引物及优化条件

Table 2 12 pairs of TP-M13-SSR primers and optimum conditions

引物名称 Primer name	正向引物序列(5' - 3') Forward primer sequence	反向引物序列(5' - 3') Reverse primer sequence	退火温度(℃) Annealing temperature
CH01f03b	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGACG</u> AGAGAAGCAAATGCAAAACCC	R: CTCCCGGCTCCTATTCTAC	58
CH02b12	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGACG</u> CGCAGGCTTTACGATTATGC	R: CCCACTAAAAGTTACAGGC	59
CH03d07	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGACCA</u> AAATCAATGCAAAACTGTCA	R: GGCTTCTGGCCATGATTTTA	51
CH04e03	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGACTT</u> GAAAGATGTTGGCTGTGC	R: TGCATGTCTGTCTCCTCCAT	60
CH04h02	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGACG</u> GGAAGCTGCATGATGAGACC	R: CTCAAGGATTTTCATGCCAC	55.5
CH05c06	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGACAT</u> TGGAAGTCTCCGTATTGTGC	R: ATCAACAGTAGTGGTAGCCGGT	58
CH05d08	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGACTC</u> ATGGATGGGAAAAAGAGG	R: TGATTGCCACATGTCAGTGTT	55.5
CH02a04	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGACG</u> AAACAGGCCGCAATTATTG	R: AAAGGAGACGTTGCAAGTGG	58
CH05b06	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGACACA</u> AGCAAACCTAATACCACCG	R: GAGACTGGAAGAGTTGCAGAGG	55
CH05d04	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGACACT</u> TGTGAGCCGTGAGAGGT	R: TCCGAAGGTATGCTTCGATT	60
CH01f07a	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGACCC</u> CTACACAGTTTCTCAACCC	R: CGTTTTTGAGCGTAGGAAC	59
CH04g07	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGACCC</u> CTAACCTCAATCCCAAT	R: ATGAGGCAGGTGAAGAAGGA	57

下划线部分序列为 5'端 M13 接头

Underlined sequences indicate the 5'M13 tail

表 3 27 份中国原产苹果属植物在 12 个 SSR 位点的指纹图谱

Table 3 The fingerprints of 27 accessions originated from China at 12 SSR loci

材料编号 No. of accession	引物名称 Primer name											
	CH01f03b	CH02b12	CH03d07	CH04e03	CH04f02	CH05c06	CH05d08	CH02a04	CH05b06	CH05d04	CH01f07a	CH04g07
1	167/187	133/145	192/206	184	187/195	110	131/139	189/215	187/217	197/209	192/232	172
2	167/169	145/149	182/194	190/200/212	177/191	110/122/136	139/141	109	171/177	187/193	182/194	170/192
3	169	135/149/157	290/296	200/208	185/201	120/124	127/137	109	225/235	201/231	216/220/246	174
4	167/169	151/155	182/184	186/204	191/199/207	110/132	127/133/143/159	109	157/183/223/235/249	191/197	192/196/210/224/172/176/182	
5	167/169/171	145/147/149	196/200	186/192/200	193/199/211/225	110/128/132	145/153/175	109	167/219/235	201/207	184/192	168/174/188
6	169/207	137/147/161	182/188	182/210	191/205	104/110	131/151	109	177/193	187/209	194/204	164/184
7	163/195	147/161	224/244	218/222/238	195/199/245	110/132/138	141/161	115	179/215	191/195	216/224/246/254	168/192
8	167/169/223	145/149	194	190/200/210	183/193	112/122/136	137/143	109	171/177	193/201	184/196	170/192
9	225	139/143	188/194	204/228/242	189	114/120	131/137	103/109/121	163/171	177/195	206/210	182/186/190
10	169/171	145/149	182/200	182/190/200	199/211	110/128	137/153	109/111	219/235	189	186/208	168/176
11	169	135/159	182	210/220	179/203/211	112/120	135/141	109	163/183	219	202	174/204
12	169/229	145/149	182/194	190/200	187/191	110/122/136	137/141	109	171/177	187/193	204/208/214	170
13	169/197	149/161/189	224	192/198/200/220	177/191/193	110/122/134/136	141/145/157	109/125	171/175	201/211/227	184/196	170/178/190
14	169/201	161/169	182/224	200/220/222	187/195/209	124/144	141/155	109/113	173/189	193	184/194	188/226
15	169/189	147/157	182/204	198/218/254	195/197	104/110/132	141/157	101/109	151/179/221/235	171/191	158/212/216/244	182/208
16	169	129/137/161	182/188/194	194/204	185/207	108/118	141/149	109	177/225	193/211	186/206	164/174
17	227	133/151/163	182/188	216/220/230	151/165/195	104/108	137/147/151/155	107/117/125	195/199	191/193	196	196/210
18	177/189	147/149	220/222	206/212	211/217	126	137/141	123/137	195/225	193	-	166/168
19	169/189/201	147/149	188/222	184/220	183/193	128/144	133/139	117/129	159/181	191/193	216/220	168/178
20	167/171	135/147	188/204	194/204/218	187/195	108/124/128	123/135	109	167/179	203	202/206	176/182
21	169/189	149	188	206/226	187/205	128/154	133/135	105/111	187/213/235	211	212/218/242/248	174/184
22	169	149/173	188/236	222/242	177/191	104/126	141	109/111	215/223	205/209	216	174/210
23	169/201	147/173	188/238	214/226	177/199	110/132/154	141	109/117	185/213	207/225	208	168/174
24	169/201	145/147	188/224	198/206	185/197	110/128	141/149	109/129	175/211	209	210/214	174/182
25	161/169/223	139	184	198/204/206	171	108/110	149/161	101/111	157/163/195/221/235	177/203	182/198/216	164/174/194
26	175/177	157/159	188	206/214/216	193/203/271	124/130	139	115/121	191/205/247	173/185/209	208/210	176/178
27	167/175/177	115/137/145/157	188	188/214/220/222	193/203/211/271	122/140	139	107/115/121	191/205/247	171/191/209	180/210/212	176/178

“-”表示没有扩增

“-” means there is no amplification

图 1 为山定子 12 个 SSR 位点的 TP-M13-SSR 指纹图谱,图谱中供试材料在每个 SSR 位点获得的等位基因数据即为表 4 中山定子对应的扩增片段长度。12 对引物共获得 251 个等位基因,平均 21 个。引物对 CH05b06 在 27 份中国原产苹果属植物材料中扩增等位基因数达 30 个,仅用引物 CH05b06 即可区分全部供试材料。12 个 SSR 位点所揭示出的 27 份苹果材料的遗传多样性的变化范围为 0.6620 ~ 0.9455,多态性信息含量的变

化范围为 0.6327 ~ 0.9211;引物多态性信息含量越高,其多态性越好;其揭示材料的遗传多样性越高,引物对供试材料的区分率越高。两者中,最高的均是 CH05b06,最低的均是 CH02b12,平均值分别为 0.7937 和 0.7799,两者均高于平均值的有 CH04h02、CH05c06、CH05d08 和 CH01f07a;位点杂合度的变化范围为 0.6538 ~ 0.9319,最高的仍为 CH05b06,最低的为 CH01f03b (表 4)。

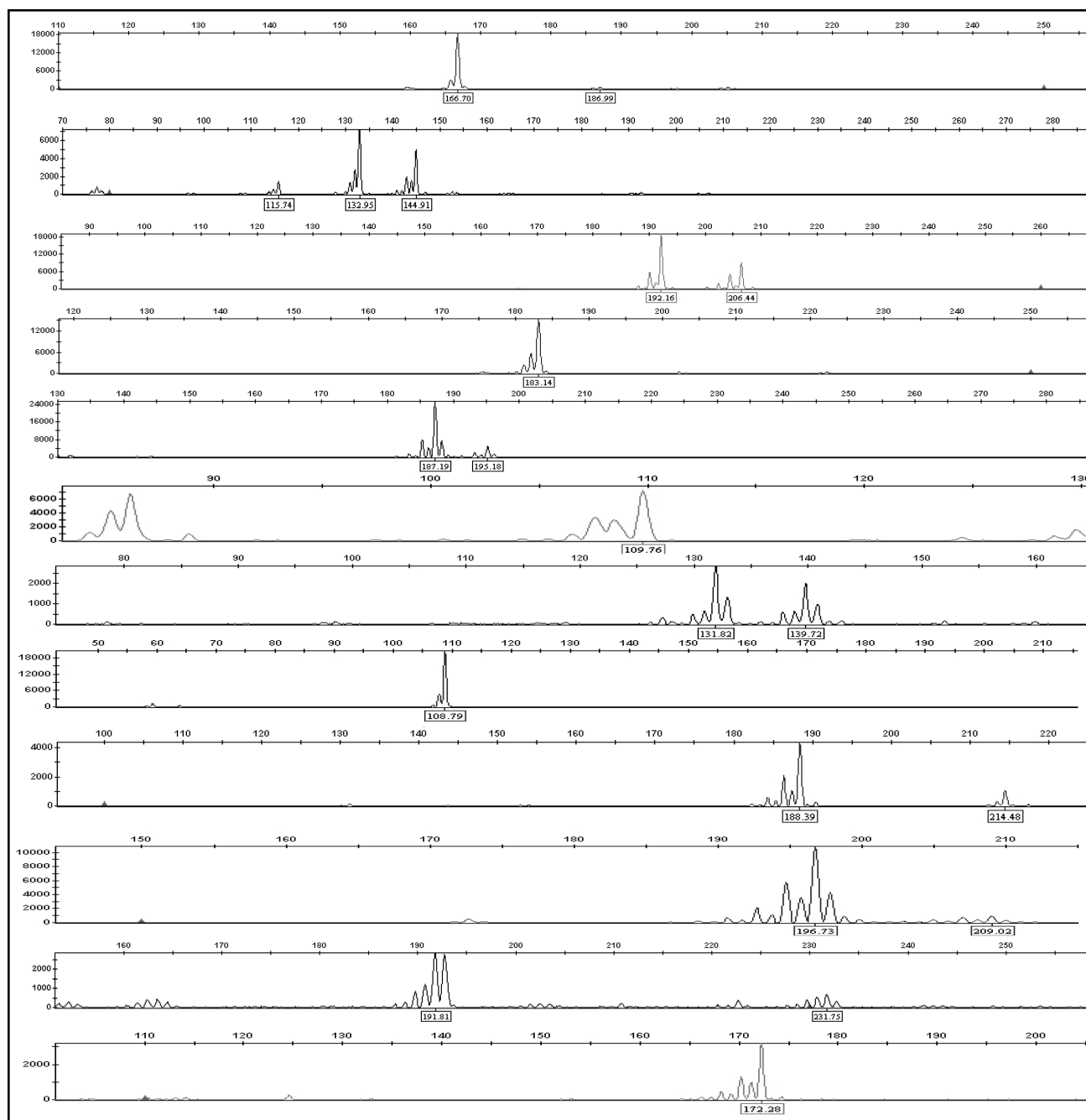


图 1 山定子 12 个 SSR 位点的 TP-M13-SSR 指纹图谱

Fig. 1 The TP-M13-SSR fingerprinting of Shandingzi at 12 SSR loci

表 4 12 个 SSR 位点在 27 份中国原产苹果属植物材料上检测到的遗传多样性  
Table 4 Genetic diversity of 27 apple accessions originated from China at 12 SSR loci

标记	主等位基因频率	等位基因数	基因多样性	杂合度	多态性信息含量
Marker	Major allele frequency	Allele number	Genetic diversity	Heterozygosity	PIC
CH01f03b	0.2192	17	0.6760	0.6538	0.6452
CH02b12	0.2385	20	0.6620	0.6923	0.6327
CH03d07	0.2462	17	0.7618	0.7308	0.7261
CH04e03	0.1615	25	0.7337	0.6923	0.7089
CH04h02	0.1154	24	0.9149	0.9037	0.9086
CH05c06	0.2142	19	0.8762	0.8566	0.8452
CH05d08	0.2058	19	0.8423	0.8496	0.8315
CH02a04	0.2438	14	0.6927	0.6834	0.6935
CH05b06	0.0867	30	0.9455	0.9319	0.9211
CH05d04	0.2239	20	0.7068	0.7255	0.7322
CH01f07a	0.1032	26	0.9274	0.9183	0.9149
CH04g07	0.1859	20	0.7851	0.7934	0.7987
平均 Mean	0.1870	21	0.7937	0.7860	0.7799

2.3 中国原产苹果属植物分子身份证的建立

根据 27 份中国原产苹果属植物材料的指纹图谱,仅用 CH05b06 即可区分全部材料。将在位点 CH05b06 获得的指纹图谱数据转化为二元数据(表




























5),将每份材料在所有供试 SSR 位点获得的 0、1 数据按序排列,利用条码技术将每份材料的按相同位点顺序排列的 0、1 序列转化成每份材料独特的条码标识即分子身份证。所有供试材料的分子身份证见表 6。

表 5 27 份供试材料在位点 CH05b06 的二元数据  
Table 5 The binary data of 27 apple accessions at CH05b06

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
151	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
157	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
159	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
163	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
167	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
171	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
173	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
175	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
177	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
179	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
181	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
183	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
185	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
187	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
189	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
191	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
193	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
195	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
199	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
205	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
211	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
213	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
215	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
219	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
221	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
223	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
225	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
235	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
247	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
249	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

第 1 行为供试材料编号;第 1 列为在 SSR 位点 CH05b06 获得的等位基因  
The first line are the numbers of the accessions,and the first row are the alleles' s size at CH05b06

表 6 27 份中国原产苹果属植物的分子身份证  
Table 6 The molecular identity cards of 27 accessions originated from China

材料名称 Accession name	分子身份证 Molecular identity card	材料名称 Accession name	分子身份证 Molecular identity card
山定子		沧江海棠	
昭觉山定子		河南海棠	
毛山定子		台湾林檎	
丽江山定子		绵苹果	
湖北海棠		槟子	
平邑甜茶		花红	
垂丝海棠		楸子	
锡金海棠		八棱海棠	
三叶海棠		西府海棠	
维西三叶		海棠花	
复县三叶		陇东海棠	
变叶海棠		新疆野苹果	
小金海棠		吉尔吉斯苹果	
西蜀海棠			

3 讨论

荧光测序技术与 SSR 分子标记技术的结合,实现了对 SSR 分子标记数据的高效和准确的收集<sup>[31]</sup>,能够区别仅为 2bp 之差的差异片段<sup>[32]</sup>,适用于苹果种质资源的指纹图谱构建。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,更适用于大批量苹果种质资源材料的检测与分析。而选择合适的引物是建立苹果分子指纹图谱进而构建其分子身份证的另一重要前提。本文中

取的 SSR 引物多态性均较好,仅用引物 CH05b06 即可区分全部的供试材料。但是随着供试材料的增加,可能会出现具有相同 SSR 位点的材料,因此就需要增加 SSR 检测位点,筛选核心引物,以最少的引物量、最特异的引物区分最多的苹果种质,获得不同苹果种质资源材料互异的指纹图谱。TP-M13-SSR 分子标记可以用相对廉价的方式将 SSR 分子标记结果数据化,在需要新增加 SSR 检测位点时,不需要对已检测过的材料进行重复检测,有利于苹果种质资源研究中分子基础数据库的积累。

DNA 指纹图谱是构建分子身份证的基础,分子

身份证与指纹图谱功能相同,但却是不同的两个概念。指纹图谱是指能够区分生物个体之间差异的电泳图谱,但分子身份证将 DNA 指纹数字化,达到种质资源检索时更加直观的目的。相对于指纹图谱,分子身份证能够更加简单明了地区分生物个体之间的差异。分子身份证一经提出,便被赋予种质资源本身作为识别种质资源的一个标准。不同研究者在进行分子身份证的构建时,采用了不同的编码方法。目前构建分子身份证的编码方法主要有 3 类<sup>[14]</sup>,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。本研究是根据荧光标记 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,再利用条码技术转化成条形码标识,即分子身份证。这种条形码标识的分子身份证可以利用条码扫描器进行扫描而更加快地识别苹果种质,彻底摆脱人工读取字符串式分子身份证的麻烦。此种苹果种质资源的分子身份证构建体系在国内外尚属首例,这将在建立我国苹果种质资源的分子数据库,以及苹果种质资源保存和利用研究中有实际应用价值和广阔的应用前景。

利用条码技术将获得的 DNA 指纹图谱信息转化为每份材料独有的分子身份证,使得不同苹果种质资源之间分子差异转变成了可见的、并可被机器快速识别差异,排除环境和人为等因素的影响。目前现存的条码码制多种多样,选用条码时,要根据信息含量的多少和条码标签的尺寸大小选择合适的条码码制。国家果树种质质城苹果圃保存苹果资源千余份,种类繁多,类型多样。近些年,随着苹果种质资源收集力度加大,资源保存数量迅速增加。通过分子标记技术手段建立苹果种质资源的指纹图谱,生成每份资源分子身份证。既避免重复性的收集和保存,剔除同名异物和同物异名的苹果种质资源,又有利于苹果种质资源的鉴定评价和提供利用。

#### 参考文献

- [1] 俞德俊. 中国果树分类学[M]. 北京:中国农业出版社,1979: 2-81
- [2] 董玉琛,刘旭. 中国作物及其野生近缘植物·果树卷[M]. 北京:中国农业出版社,2006:55-84
- [3] 李育农,李晓林. 苹果属植物过氧化物酶同工酶酶谱的研究[J]. 西南农业大学学报,1995,17(5):371-377
- [4] 史燕山,骆建霞. 苹果元帅系品种过氧化物酶同工酶酶谱的比较[J]. 天津农学院学报,1995(1):11-14
- [5] 王爱德,李天忠,许雪峰,等. 苹果品种的 SSR 分析[J]. 园艺学报,2005,32(5):875-877
- [6] 祝军,王涛,赵玉军,等. 应用 AFLP 分子标记鉴定苹果品种[J]. 园艺学报,2007,27(2):102-106
- [7] 高源,刘凤之,曹玉芬,等. 苹果属种质资源亲缘关系的 SSR 分析[J]. 果树学报,2007,24(2):129-134
- [8] 高源,王昆,田路明,等. 应用 TP-M13-SSR 技术鉴定苹果品种[J]. 果树学报,2010,27(5):833-837
- [9] Scheulke M. An Economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments[J]. Nat Biotechnol,2000,18:233-234
- [10] 高源,王昆,龚欣,等. 八棱海棠 TP-M13-SSR 亲缘关系研究[J]. 果树学报,2010,27(3):25-29
- [11] 高源,王昆,田路明,等. TP-M13-SSR 技术及其在苹果种质资源遗传多样性研究中的应用[J]. 植物遗传资源学报,2011,12(2):228-233
- [12] Cao Y F, Tian L M, Gao Y, et al. Genetic diversity of cultivated and wild Ussurian Pear (*Pyrus ussuriensis* Maxim.) in China evaluated with M13-tailed SSR markers[J]. Genet Resour Crop Evol,2012,59:9-17
- [13] 李会勇,王天宇,黎裕,等. TP-M13 自动荧光检测法在高粱 SSR 基因型鉴定中的应用[J]. 植物遗传资源学报,2005,6(1):68-70
- [14] 徐雷锋,葛亮,袁素霞,等. 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
- [15] 陈昌文,曹珂,王力荣,等. 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
- [16] 祁伟. 应用 ISSR 和 SRAP 分子标记绘制红麻与蓖麻 DNA 指纹图谱[D]. 福州:福建农林大学,2008
- [17] 艾呈祥,张力思,魏海蓉,等. 甜樱桃品种 SSR 指纹图谱数据库的建立[J]. 中国农学通报,2007,23(5):55-58
- [18] Ohtsubo K, Nakamura S. Cultivar identification of rice (*Oryza sativa* L.) by polymerase chain reaction method and its application to processed rice products[J]. J Agric Food Chem,2007,55(4):1501-1509
- [19] Pan Y B. Databasing molecular identities of sugarcane (*Saccharum* spp.) clones constructed with microsatellite (SSR) DNA markers[J]. Am J Plant Sci,2010,1(2):87-94
- [20] 高运来,朱荣胜,刘春燕,等. 黑龙江部分大豆品种分子 ID 的构建[J]. 作物学报,2009,35(2):211-218
- [21] 杨阳,刘振,赵洋,等. 湖南省主要茶树品种分子指纹图谱的构建[J]. 茶叶科学,2010,30(5):367-373
- [22] 刘新龙,马丽,陈学宽,等. 云南甘蔗自育品种 DNA 指纹身份证构建[J]. 作物学报,2010,36(2):202-210
- [23] 王晓飞,陈建华,栾明宝,等. 苎麻种质资源分子身份证构建的初步研究[J]. 植物遗传资源学报,2010,11(6):802-805
- [24] 王黎明,焦少杰,姜艳喜,等. 142 份甜高粱品种的分子身份证构建[J]. 作物学报,2011,37(11):1975-1983
- [25] 颜静宛,田大刚,许彦,等. 杂交稻主要亲本的 SSR 分子身份证数据库的构建[J]. 福建农业学报,2012,26(2):148-152
- [26] 邱杨,李锡香,李清霞,等. 利用 SSR 标记构建萝卜种质资源分子身份证[J]. 植物遗传资源学报,2014,15(3):648-654
- [27] Moriya S, Iwanami H, Okada K, et al. A practical method for apple cultivar identification and parent-offspring analysis using simple sequence repeat markers[J]. Euphytica,2011,177(1):135-150
- [28] 王立新,张小军,史星云,等. 苹果栽培品种 SSR 指纹图谱的构建[J]. 果树学报,2012,29(6):971-977
- [29] 高源,王昆,刘凤之,等. 适宜加工用苹果品种 TP-M13-SSR 指纹图谱构建及遗传关系分析[J]. 园艺学报,2014,41(5):946-956
- [30] Liebhard R, Gianfranceschi L, Koller B, et al. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus × domestica* Borkh.) [J]. Mol Breeding,2002,10:217-241
- [31] 郝晨阳,王兰芬,贾继增,等. 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
- [32] 李莉,杨剑波, Mackill D J, et al. 水稻 SSR 不同检测和分析方法的比较研究[J]. 中国水稻科学,2000,14(3):185-188