

DOI:10.13332/j.1000-1522.20190040

毛白杨多态 SSR 引物库和种质资源指纹图谱库构建

韩志强 任勇谕 夏宇飞 耿喜宁 杜康 康向阳

(林木分子设计育种高精尖创新中心, 林木育种国家工程实验室, 林木花卉遗传育种教育部重点实验室,
北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要:【目的】针对毛白杨优树种质资源形态学差异小、不易区分等问题, 利用多态 SSR 引物构建优树种质资源指纹图谱, 为毛白杨种质资源管理、新品种选育、知识产权保护等提供参考。【方法】本研究以山东冠县毛白杨种质资源库 469 个优树无性系为对象, 从毛白杨 SSR 多态引物筛选入手, 通过荧光 SSR 引物 PCR 扩增和毛细管电泳仪检测筛选 SSR 引物, 并构建指纹图谱。【结果】在 2 317 对 SSR 引物中, 共计得到清晰、特异、多态、稳定扩增的 SSR 引物 406 对, 这些 SSR 引物在 19 条染色体上的分布数量介于 3~39 对之间, 利用 BLAST 比对分析可将其中 389 对 SSR 引物定位到毛果杨基因组, 构建了毛白杨优树种质资源多态 SSR 引物库。应用多态性较高的 SSR 核心引物, 以及特异的 SSR 辅助引物相结合的技术策略, 筛选出 25 对多态性较高的 SSR 核心引物, 以及 13 对特异的 SSR 辅助引物, 构建了毛白杨种质资源库内 469 个优良无性系指纹图谱库, 并完成了指纹图谱的 QR 编码。【结论】本研究成功构建了毛白杨种质资源多态 SSR 引物库和优树无性系指纹图谱库, 对与毛白杨类似的林木种质资源遗传变异研究以及品种鉴定、系谱分析等具有重要意义。

关键词: 毛白杨; 多态 SSR 引物; 种质资源; 指纹图谱; QR 编码

中图分类号: S792.117; S722.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-1522(2019)07-0010-09

引文格式: 韩志强, 任勇谕, 夏宇飞, 等. 毛白杨多态 SSR 引物库和种质资源指纹图谱库构建 [J]. 北京林业大学学报, 2019, 41(7):10-18. Han Zhiqiang, Ren Yongyu, Xia Yufei, et al. Construction of polymorphic SSR primer library and germplasm resource fingerprint database of *Populus tomentosa* [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2019, 41(7): 10-18.

Construction of polymorphic SSR primer library and germplasm resource fingerprint database of *Populus tomentosa*

Han Zhiqiang Ren Yongyu Xia Yufei Geng Xining Du Kang Kang Xiangyang

(Beijing Advanced Innovation Center for Tree Breeding by Molecular Design, National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants of Ministry of Education, College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: [Objective] Aimed at the problems that the morphological differences of superior tree germplasm resources of *Populus tomentosa* were small and difficult to distinguish, polymorphic SSR primers were used to construct the fingerprint of superior tree germplasm resources, provide references for the germplasm resource management, breeding of new cultivar, intellectual property protection, etc. [Method] In this study, 469 superior trees from *Populus tomentosa* germplasm resource bank in Guanxian County, Shandong Province of eastern China were used as material. Firstly, the SSR polymorphic primers were screened by PCR amplification and capillary electrophoresis detection, and then the fingerprint was constructed. [Result] In 2 317 pairs of SSR primers, a total of 406 pairs of SSR primers with clear, specific, polymorphic and stable amplification were obtained. These SSR primers distributed on 19 chromosomes and

收稿日期: 2019-01-15 修回日期: 2019-05-12

基金项目: 国家重点研发计划课题(2016YFD0600403), 北京市共建项目专项。

第一作者: 韩志强, 博士。研究方向: 细胞遗传与细胞工程。Email: zhiqiangybfq@163.com 地址: 410004 湖南省长沙市韶山南路 498 号。

责任作者: 康向阳, 教授, 博士生导师。主要研究方向: 林木细胞遗传与细胞工程育种。Email: kangxy@bjfu.edu.cn 地址: 100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学生物科学与技术学院。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

ranged in 3–39 pairs. Further, 389 pairs of SSR primers were located into the genome of *P. trichocarpa* based on BLAST comparison analysis, and a polymorphic SSR primer library of *Populus tomentosa* germplasm resources was constructed. On this basis, 25 pairs of SSR primers with high polymorphism and 13 pairs of specific SSR-assisted primers were used to construct the fingerprint of 469 superior trees in the germplasm resource bank of *Populus tomentosa*, and the QR coding of the fingerprint was completed. [Conclusion] This study successfully constructed the polymorphic SSR primer library and the superior tree fingerprint library of *Populus tomentosa* germplasm resources, and be of great significance to the study of genetic variation, variety identification and pedigree analysis of *Populus tomentosa*.

Key words: *Populus tomentosa*; polymorphic SSR primer; germplasm resource; fingerprint database; QR code

毛白杨(*Populus tomentosa*)是中国特有的乡土树种,栽培和利用历史悠久,一直是黄河流域及华北平原地区用材林、农田林网和城乡绿化的主栽树种之一,也是重要的能源、纸浆、胶合板等用材树种^[1]。20世纪80年代初,朱之悌组织中国10省研究人员开展毛白杨基因资源调查、选优和收集工作,建立了含1047株源于优树根萌苗材料的“档案库”和850株源于优树花枝嫁接苗材料的“标本园”,在保存了日益减少的毛白杨基因资源同时,也为毛白杨的种质资源保护和遗传改良奠定了基础^[2]。在我国近几十年来迅速发展的杨树育种工作中,育种学家们已经培育出了大量的优良新品种。然而,由于新品种的遗传基础较为狭窄,同时品种之间的形态学差异也越来越小,这给杨树知识产权保护和新品种的鉴定带来了困难。因此,对杨树新品种进行快速、准确地鉴别已成为目前急需解决的问题。

DNA 指纹图谱是品种纯度和真实性鉴定的有效途径,直接反映植物遗传物质在 DNA 分子水平上的差异^[3],其中简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)标记具有多态性高、重复性好、共显性、多等位基因变异等优点,是动植物品种鉴定、系谱分析和遗传多样性分析等的有利工具^[4],为利用现代分子生物学技术实现毛白杨种质资源准确、快速区分和有效管理提供了有利条件。随着毛果杨(*P. trichocarpa*)全基因组序列的发布,国际杨树基因组委员会公布了大量杨树 SSR 引物信息,为杨树 DNA 指纹图谱构建提供了便利条件。Dayanandan 等最早开展了涉及 36 个美洲山杨(*P. tremuloides*)基因型的 SSR 分子标记研究^[5]。随着分子生物学快速发展,尤其是毛果杨全基因组测序顺利完成,大量的杨树 SSR 引物信息于国际杨树基因组委员会的官方网站逐渐公布,促进了 SSR 标记在杨树中的应用,主要集中于美洲黑杨、欧洲黑杨及其杂种的遗传图谱构建^[6]、品种指纹图谱构建^[7]、系谱关系鉴定^[8]等方面。但是,有关毛白杨多态 SSR 引物库和种质资源

指纹图谱库构建等工作尚未见报道。

目前,毛白杨优树种质资源库内尚保存选自 9 省的优树 469 个基因型^[9],丰富的种质资源储备为毛白杨的遗传改良工作奠定了良好的基础。本论文基于为今后开展毛白杨群体遗传研究以及分子标记辅助选择育种提供公共资源和便利条件的目的,以山东冠县毛白杨种质资源库 469 个优树无性系为对象,采用 TP-M13-SSR 毛细管电泳自动检测法,筛选毛白杨 SSR 多态引物,构建毛白杨多态 SSR 引物库,以及涉及 469 份毛白杨优良无性系种质的指纹图谱库,为毛白杨种质资源库管理、品种鉴定以及知识产权保护和系谱分析等提供技术支撑,同时为杨树的育种工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1983—1984 年,北京林业大学(中国,北京)组织全国省(市)毛白杨良种选育攻关协作组,在前期资源普查的基础上,从黄淮海流域 100 万 km²(30°~40°N、105°~125°E)毛白杨分布区的 10 省 100 个县市,选取了 1047 株毛白杨优树,于 1986 年建立山东省冠县毛白杨种质资源库。目前,种质资源库尚保存选自北京、河北、山东、河南、山西、陕西、甘肃、江苏和宁夏 9 省的优树 469 个基因型,包括 75 个雌性无性系、394 个雄性无性系,其中天然三倍体 28 株^[9]。

1.2 DNA 提取与 PCR 扩增

利用植物基因组 DNA 提取试剂盒(Tiagen Biotech Co. Ltd, Beijing, China)进行毛白杨总 DNA 的提取。本研究根据 Schuelke 的方法共需要 3 种引物^[10],包括 5'端接有 M13 序列(5'-TGTAACG ACGGCCAGT-3')的上游引物,普通的下游引物以及标有荧光(ROX, FAM, TAMRA, HEX)的 M13 引物。PCR 具体程序如下:94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 待测引物的最适退火温度 30 s, 72 °C 30 s 共 25 个循

环; 94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 30 s 共 8 个循环; 72 °C 8 min, 4 °C 保存。PCR 产物委托睿博兴科生物科技(北京)有限公司在 ABI-3730XL 基因分析仪上进行测试, 其结果应用 GeneMarker 1.75 软件等^[11], 进行读取及分析。

1.3 多态性引物筛选

随机选取国际杨树基因组协会(International Populus Genome Consortium)公布的 SSR 数据库(IPGC; http://www.ornl.gov/sci/ipgc/ssr_resource.htm)中的 2 317 对 SSR 引物为筛选对象。在上游引物 5'端加以 M13 荧光染料标记, 所有引物(上游引物, 下游引物以及 M13 荧光标记引物)均委托北京睿博兴科生物技术有限公司进行合成。应用上述引物, 以 469 个毛白杨优株 DNA 为模板进行 TP-M13-SSR PCR, 筛选在不同优树样本间具有多态性的引物。通过软件 POPGEN VERSION 1.32 计算所有多态性引物的等位标记位点数(N_a)、有效等位标记数(N_e)、期望杂合度(H_e)、观察杂合度(H_o)、Shannon's 多态性指数(I)等遗传参数^[12]。

1.4 DNA 指纹图谱的构建

利用 CERVUS 3.0 软件, 进行个体鉴定以判断个体基因型在所鉴定群体中是否唯一, 确认后参考马红勃等^[13]和王静毅等^[14]图谱代码构建方法编辑毛白杨无性系指纹图谱代码, 即记录各毛白杨种质在每个 SSR 位点上的等位标记配置(略去单位 bp, 仅记录数字, 并用"/"连接), 再将 SSR 位点按固定顺序进行编码, SSR 位点依次记为字母 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N、O、P、Q、R、S、T、U、V、W、X、Y、Z、AA、AB、AC、AD、AE、AF、AG、AH、AI、AJ、AK、AM, 字母 A 前面数字 1、2 分别代表雌、雄。每个无性系的 DNA 经不同的引物扩增后将会形成由字母和阿拉伯数字组成的一系列编号, 便形成了该无性系的 SSR 指纹图谱代码。即每一条字符串能唯一标识一份毛白杨无性系, 可以将每一条字符串作为每一份无性系材料的分子身份证号码。

1.5 指纹图谱 QR 编码

应用 QRCode 转化工具进行编码, 将各个无性系的名称、性别、类型、植物学分类和指纹图谱代码等情况录入该软件(<https://www.the-qr-code-generator.com>), 形成指纹图谱 QR 编码。

2 结果与分析

2.1 毛白杨多态 SSR 引物库构建

以 469 个毛白杨优株 DNA 为模板进行 TP-M13-SSR PCR, 在 2 317 对 SSR 引物中共计筛选到在不同优树样本间具有多态性的引物中有差异的稳定多

态的 SSR 引物 406 对, 初步完成了毛白杨多态 SSR 引物库的构建。如表 1, 引物库部分引物示例中信息包括引物序列, PCR 产物碱基长度, 以毛白杨 DNA 为模板的等位标记配置类型以及所在染色体具体位置。

通过表 2 可知, 引物库内定位到各染色体上的引物对数范围为 7~39, 其中有 17 对引物未能在基因组内定位。

2.2 毛白杨指纹图谱构建最佳引物组合筛选

利用初步筛选出的稳定变异等位标记的 38 对 SSR 引物对 469 个毛白杨优株无性系进行荧光标记毛细管电泳检测。由表 3 可知, 38 对 SSR 引物共检测出 231 个等位标记, 不同引物扩增的等位标记数明显不同, 可检测到有效等位标记数为 2(LG_III-2)至 14(GCPM_1571-1)个, 平均每个引物 6.079 个等位标记。平均多态性信息含量(PIC)变动范围为 0.034(ORPM-221)至 0.569(PMGC_2606), 平均值为 0.378。平均期望(H_o)及观察杂合度(H_e)分别为 0.601 和 0.427, Shannon 信息指数(I)为 0.106~1.225, 每个引物平均值为 0.770(表 3), 说明这套引物有较好的鉴别能力。其中, 引物 PMGC_2606、GCPM_112-1、GCPM-2012、GCPM_1072-2、GCPM_1063 为鉴定效率最高的引物, PIC 大于 0.5, 等位变异数范围为 7~14, 在以后毛白杨 DNA 指纹数据库的构建中应重点应用。

Shannon's 指数和 PIC 均高于平均值的引物 25 对, PMGC_2606、GCPM_112-1、GCPM-2012、GCPM_1072-2、GCPM_1063、PMGC_2571、GCPM_1504-1、GCPM_2570-1、PMGC_223、GCPM_1571-1、GCPM_1411-1、GCPM_2627-1、LG_V-2、GCPM_1524-1、LG_XVI-6、LG_XVI-9、PMGC-2818、GCPM-2768、LG_XVI-7、GCPM_1572-2、GCPM_3474-1、GCPM_XIX-11、LG_IX-1、GCPM-124、GCPM_1184-1。25 对 SSR 引物可区分的种质从 5 份到 78 份不等, 平均为 26.4 份。区分率最高的引物是 GCPM_1571-1(17.27%), 最低的为 LG_IX-1(1.06%)。

利用 CERVUS 3.0 软件进行个体鉴定, 确认每一个基因型在所鉴定的种质资源库内是唯一的。选取 No.1—No.5 号引物, 鉴定其对毛白杨种质的区分率, 可以区分 156 份毛白杨种质, 区分率为 33.17%; 其次是 No.1—No.10 号引物组合, 可以区分 262 份毛白杨种质, 区分率为 55.77%; 再次是 No.1—No.15 号引物组合, 可以区分 361 份毛白杨种质, 区分率为 76.97%; No.1—No.20 号引物组合, 可以区分 448 份毛白杨种质, 区分率为 95.52%(表 4)。继续增加引物对数, 将 No.1—No.25 号引物组合在一起, 可

表 1 毛白杨优良无性系种质特异 SSR 引物库信息

Tab. 1 Specific SSR primer information of *Populus tomentosa* superior clonal germplasm

引物 Primer	上游引物(5'-3') Forward primer sequence (5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse primer sequence (5'-3')	染色体 Chromosome	位置 ^a Location ^a	等位标记配置类型 Allele configuration type
GCPM_1053-1	AAAAATGATAACCAGGAAAAA	TCGAGTTATCTCAGCCTCAT	Chr01	14.84	188/196, 188/215, 186/188, 188/227, 188/188
GCPM_1153-1	TTCCTTTACACAATGACAA	TTTAAAACTGGGTCCGTAA	Chr11	11.14	176/179, 179/182, 189/189, 171/174, 180/189
GCPM_1056-1	CCACATTTATGTCCCTCTGT	AAGCTGAAGCTGCTCTCTTA	Chr06	11.08	134/134, 132/132, 144/144, 124/124
GCPM_1063	AGTTAATTGCGCATGTTCTT	AAACAACTCCAGCAAACAT	Chr05	6.00	166/187, 166/185, 166/191, 167/174
GCPM_1065	TGCAATCATATATTCCTCCC	ATAAAATTACTGCGTGCCAT	Chr06	24.97	178/178, 184/184, 172/172, 163/163
GCPM_1005-1	CTAAGTAGTGAAAGAGGCGG	CTCCTGTAAATGTATCCCA	Chr18	0.26	123/123, 128/128, 121/121, 126/130
GCPM_108-1	CTGCAAGATGTAAGTGATCG	CAGCATTAGAGCCAAGCTA	Chr18	15.09	121/121, 123/123, 126/126, 117/117
GCPM_1120-1	TGCAAAATCCAAACACAGATA	ACGAATCATCTTACGCACTT	Chr10	6.05	236/257, 245/245, 236/265, 236/260
GCPM_1157-1	CCTCTACCACATATTCCAA	AGTGGTTAAATGCGAGTGT	Chr14	17.49	170/170, 173/175, 172/172, 170/175
GCPM_122-2	GAAACCAGAAAGCAACAATC	TGTTTCAACATCACCATGTC	Chr02	1.05	201/206, 203/203, 206/206, 201/206
GCPM_1223-1	CCTGAAGATGAAGATTTTGC	TTGAAGTTGAAGGGAGAAA	Chr12	1.04	117/123, 114/117, 117/117, 117/122
GCPM_1224-2	TGTCTTCTCTACAGCAAGG	CACCGAGAAGAACTTTCAG	Chr09	11.04	153/153, 109/153, 112/153, 142/142
GCPM_1033-1	TGAATTAAGGTGGTGGTTC	GGGTGAAATTCGATTTGTAT	Chr16	9.83	223/230, 228/228, 230/230
GCPM_1036-1	AAGTGAATATTCCGCAAC	GCTGGGATGGATCTAGAAA	Chr01	35.79	163/163, 170/170, 172/175
GCPM_1002-1	AAGAACCAGCACTTCCTGTA	ATGACTAATCACTGTGGGC	Chr01	11.45	149/149, 159/168, 159/159
GCPM_1054-1	AGGTCTGTGCAAGGAATAAA	GTCTGTAATCAAGCCAAAGC	Chr07	0.86	159/164, 159/166, 159/172
GCPM_1224-1	AAAATGAATTGGCAGAAAAGA	GCTTCTTAGCTCAACCAGAA	Chr09	11.04	196/216, 196/205, 196/207
GCPM_1023-1	AGAAATATTGTGGATGGACG	TTTAATTGAGATTCGGGCTA	Chr11	2.13	114/114, 110/110, 118/118
GCPM_1175-1	TCATCAACTGACCTCTACC	CAAAGCAAAAACAAAACAAA	Chr14	13.38	190/209, 190/221, 193/196
GCPM_1072-2	AGGAAAACAAAGGAGAGGAG	ATGCTTAAAAGGGGATCTCT	Chr06	4.20	141/146, 143/156, 152/157
GCPM_11-1	TTGCTGTTAGCATCATTTTC	TTGCTCTTTTGTGGAGAT	Chr01	47.40	154/154, 151/151, 151/154
GCPM_1116-1	GGGGCTAATATCAGTTTCTT	TGAGAAAACCTTGAAAATA	Chr04	0.40	193/199, 199/199
GCPM_1092-1	TTCTAAATATAAGAAACC AATGAATG	TATCCCCTTGTAAATTCCT	Chr01	4.82	217/217, 224/224
GCPM_112-1	TTAGAGGAGAGAACTGCTGC	TGGTCTGCAACACAAGATT	Chr16	0.14	132/142, 128/132
GCPM_1145-1	CTGAGAAATCCAACCTCTTG	TACAGTAAGAAAGTGCTGCG	Chr02	15.10	171/171, 191/191
GCPM_1041-2	ATGACTTCATTGGGAAGAAA	GACGATTTGGACTCCACTAA	Chr13	14.59	167/167, 159/159
GCPM_1079-1	CAAATTGGAGACTTCTCTGC	TATTTCAATCTCCATCGTC	Chr05	20.82	222/222, 210/219
GCPM_1184-1	TCTTGCGGAGAGAAGTAGAG	GGATTTGGTGAATAATGAAG	Chr03	14.83	156/168, 154/164
GCPM_1187-1	TGCTCTGTATTGTTCCCTT	TCTCAAGTAGGGTCCAGCTA	Chr03	13.98	192/192, 189/189
GCPM_1209-1	CGCTGTTGATGGATTACAA	GAAAACATAGGAAAGTCGGA	Chr12	12.35	132/137, 136/136
GCPM_1220-1	ACTCTTGTTAAACCAAGCCA	ACTACCTTCTTCCCTCAC	Chr13	10.27	215/215, 204/215
GCPM_1017-1	GTTAATTCCCACGTCGTTA	CGAATGAAGAAAAACCATTC	Chr06	22.44	161/167, 169/173
GCPM_1025-1	AAGGTGCTCCACTACTTT	TGTGGCTAGGTAGTTGGTT	Chr03	10.31	135/230, 186/186
GCPM_124	TTTGAGCACTTCAACTACCA	TGTCTCCCTTAGTCACCAC	Chr01	6.33	205/208, 199/208
GCPM_1242-1	TCGTGCAAATAAAAGCATT	ATGGATATGTGCTCCTTTG	Chr02	15.83	231/231, 229/229
GCPM_1246	TCAAGTCAGAAACTTCCA	TTGATTCTATGGGTTTACC	Chr10	16.43	222/222, 222/236
GCPM_1251-1	CTGCATTTGTTCTAATTTT	AAAATGATAAGCTCGTTTGG	Chr04	5.51	143/143, 130/130

注: ^a表示SSR标记位点在染色体上的分布位置。Note: ^aSSR markers were distributed in chromosomes (size in Mb) of *Populus*.

表 2 毛白杨多态 SSR 引物库基本信息

Tab. 2 Basic information of polymorphic SSR primer library in *Populus tomentosa*

项目 Item	所在染色体 Chromosomal localization	未定位引物 Unlocated chromosome
染色体 Chromosome	1 2 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19	
引物对数 Number of primers	39 39 17 37 28 32 23 31 13 7 13 18 12 6 6 22 3 15 16	17

表3 38对SSR核心引物信息表

Tab. 3 38 pairs of SSR core primer information

编号 No.	引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	N_a	N_e	I	杂合性 Heterozygosity			鉴定效率 Identification efficiency	
						PIC	H_o	H_e	区分种质数 Distinguishing germplasm number	区分率 Distinguishing rate/%
1	GCPM_1571-1	F: AAGAAGGGTGGTAAGCTTTT R: TCCGTAGATCTCTCTCCAAA	14	1.694	0.958	0.392	0.054	0.410	81	17.27
2	GCPM_1063	F: AGTTAATTGCGCATGTTCTT R: AAACAAACTCCAGCAAACAT	11	2.492	1.160	0.520	0.990	0.599	60	14.74
3	PMGC_2606	F: AATTTACATTTCTTTATCATCACC R: GCTGTCTAACATGCCATTGC	10	2.756	1.225	0.569	0.990	0.638	50	12.29
4	GCPM_1411-1	F: TCAACGACTTTTTCATTGTG R: AGCATTCTTGCTGGTGTTAT	10	1.476	0.778	0.312	0.206	0.323	48	11.79
5	PMGC_2571	F: TCTCGCAGATTCATGTAACCC R: GACTGTATGTTGACCATGCC	10	2.360	1.048	0.491	0.941	0.577	50	12.29
6	GCPM_1184-1	F: TCTTGGCGAGAGAAGTAGAG R: GGATTTGGTGAAAATTGAAG	9	1.696	0.913	0.389	0.435	0.411	39	9.58
7	GCPM_1504-1	F: AGGTCTGTGCAAGGAATAAA R: GTCTGTAATCAAGCCAAAGC	9	2.400	1.078	0.497	0.995	0.584	41	10.07
8	GCPM_1072-2	F: AGGAAAACAAAGGAGAGGAG R: ATGCTTAAAAGGGGATCTCT	8	2.677	1.198	0.558	0.966	0.627	35	8.60
9	PMGC-2818	F: AAGCTTCATCGTCTGCTTG R: CGTATCAATTCAGACTCTCG	8	2.171	0.903	0.435	0.872	0.540	33	8.11
10	GCPM_112-1	F: TTAGAGGAGAGAACTGCTGC R: TGGTCTGCAACACAAGATT	7	2.647	1.168	0.548	0.990	0.623	25	6.14
11	GCPM-2012	F: GGTGATGAAGATCTGGGATA R: ACCCAAATTACAGAACAACG	7	2.549	1.067	0.528	0.980	0.608	24	5.90
12	GCPM_88-1	F: TAAACTGCTTTTAGTTGCC R: TCCATGTTGTGTGATCTGAG	7	1.088	0.230	0.080	0.025	0.081	21	5.16
13	PMGC_2088-2	F: TCACAAAAGGTTAACGACTTCG R: CAGTACTCAGCTGCAGGTCC	7	1.381	0.561	0.254	0.017	0.276	24	5.89
14	GCPM_2627-1	F: TAAGTCCCACTACACCCAAC R: GAGTTCGAGAGAGGGAATCT	6	2.325	0.950	0.477	0.995	0.571	20	4.91
15	LG_V-2	F: AAAGAAACCAGACCACACAC R: CGCTTGCCTTAATTAACAGT	6	2.312	0.967	0.473	0.995	0.568	19	4.67
16	GCPM-2768	F: CAGCAAAATCATCACAAATC R: AGGGTTTGGTAGAGAAGACC	6	2.136	0.852	0.422	0.988	0.532	19	4.67
17	GCPM_2570-1	F: AACCCACTTCTCTCTCTGT R: TGAGACTTCCGACTCGTAG	6	2.362	0.996	0.495	0.928	0.577	19	4.67
18	LG_VIII-3	F: ATCCGACTTCGATATCTTCA R: CTACCTGAAACACAGGAAGC	6	1.544	0.698	0.328	0.032	0.353	20	4.91
19	GCPM_1153-1	F: TTCCTTTCACACAATGACAA R: TTAAAAAAGTGGGTCCGTAA	6	1.381	0.633	0.265	0.273	0.276	18	4.42
20	GCPM_3652-1	F: TAAACTGCTTTTAGTTGCC R: TCCATGTTGTGTGATCTGAG	6	1.069	0.180	0.065	0.015	0.065	18	4.42

表 3(续)
Tab.3(Continued)

编号 No.	引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	N_a	N_e	I	杂合性 Heterozygosity			鉴定效率 Identification efficiency	
						PIC	H_o	H_e	区分种质数 Distinguishing germplasm number	区分率 Distinguishing rate/%
21	PMGC_223	F: CGATGAGGTTGAAGAAGTCG R: ATATATGTACCGGCACGCCAC	5	2.309	0.939	0.472	0.831	0.568	14	3.44
22	GCPM_3474-1	F: GATCCGAAAACAACAACAAT R: ACCCCTTTCTCTTCTCAATC	5	2.212	0.901	0.445	0.985	0.549	13	3.19
23	GCPM-124	F: TTGAGCACTTCAACTACCA R: TGTCTTCCCTTAGTCACCAC	5	2.045	0.757	0.391	0.993	0.512	11	2.70
24	LG_XVI-9	F: CTCGCAGCTCTTCTCATAGT R: CCTACCCATTTATGACCAAA	5	2.326	0.953	0.476	0.946	0.571	13	3.19
25	PMGC_2140	F: GCTGTCAGAATCAAACACTTC R: AAGCAGATAACTAAGACATGCC	5	1.405	0.617	0.274	0.197	0.289	11	2.70
26	GCPM_1056-1	F: CCACATTTATGTCCCTCTGT R: AAGCTGAAGCTGCTCTCTTA	5	1.485	0.589	0.288	0.017	0.327	13	3.19
27	ORPM-221	F: TGGAGGCTGTCTGTTTTGTG R: AGATTTGAGCGACTCCGAAA	5	1.035	0.106	0.034	0.0074	0.034	10	2.26
28	GCPM_1832-1	F: TTACTTGCTAGCTGCCAATC R: CCTAAAAGTTTGCTATGCGA	5	1.222	0.428	0.176	0.039	0.182	10	2.46
29	LG_XVI-7	F: ACAAATCAAAGTCACAGCCT R: ATAGTGTTCATCGGACCTG	4	2.201	0.861	0.441	0.985	0.546	8	1.97
30	GCPM_1572-2	F: TGTTGTGGATTGTGATTAGG R: ACACTTCAAACAGAACACC	4	2.074	0.781	0.402	0.995	0.519	9	2.21
31	LG_VIII-4	F: ATCTTTCAAGAAGCTTGACG R: AGCATTCTTGCTGGTGTAT	4	1.125	0.240	0.106	0.017	0.112	7	1.72
32	GCPM_3367-1	F: CAGGACATTTAACTCCTTCG R: TTAAGTCTCAACAGAGGGA	4	1.110	0.236	0.096	0.015	0.099	8	1.97
33	GCPM_XIX-11	F: CAACATGAAATGAGCTGCTA R: TCCACATGATGCTGATTTG	3	2.043	0.746	0.391	0.872	0.511	10	2.46
34	GCPM_1524-1	F: TTCAATGGAAAGGGATAATG R: TCATTTGTAACATCACGC	3	2.359	0.933	0.485	0.961	0.577	9	2.21
35	LG_XVI-6	F: ATAGCGATCATCAAAGGAAA R: AAATATTCATGTGGAGGCAC	3	2.295	0.906	0.470	0.985	0.565	8	1.97
36	LG_IX-1	F: CCAACTTCAATGCTAGGAAC R: TGGTAAGCCTGAGGATACAC	3	2.260	0.894	0.463	0.948	0.558	5	1.06
37	ORPM_197	F: GTCAGTTTGCCCTCTTCGTC R: TGAGGGCGTCTCTCTTTTA	2	1.380	0.447	0.237	0.138	0.275	3	0.74
38	LG_III-2	F: ATTGATTATATTTGCCGCAT R: TGGACATCTCACTACCTTCC	2	1.244	0.347	0.177	0.202	0.197	2	0.49
均值 Average value			6.017	1.912	0.770	0.378	0.601	0.427		

注: N_a , 等位标记数量; N_e , 有效等位标记数量; I , Shannon's 信息指数; H_o , 观察杂合度; H_e , 期望杂合度; PIC, 多态性信息含量。Notes: N_a , number of alleles per locus; N_e , effective number of alleles; I , Shannon's information index; H_o , observed heterozygosity; H_e , expected heterozygosity; PIC, polymorphism information content.

表4 毛白杨指纹图谱构建最佳引物组合筛选

Tab. 4 Optimum primer combination applied to construction of the fingerprint of *Populus tomentosa*

引物组合 Primer combination	鉴定效率 Identification efficiency	
	区分种质数 Distinguishing germplasm number	区分率 Distinguishing rate/%
No.1—No.5	156	33.17
No.1—No.10	262	55.77
No.1—No.15	361	76.97
No.1—No.20	448	95.52
No.1—No.25	456	97.29
No.1—No.30	463	98.77
No.1—No.38	469	100.00

以区分的毛白杨种质数量增加到 456 份, 区分率为 97.29%, 已基本将材料区分开。以上 25 对引物可以作为毛白杨种质鉴定的核心引物。此时, 仍有 13 个毛白杨种质不能够相互区分, 参考以 13 份毛白杨种质为模板的等位变异的 SSR 引物, 进一步增加引物的数量, 直至再增加 13 对, 总引物数增加为 38 对时, 可全部区分 469 份毛白杨种质。这样, 在增加 13 对辅助引物后, 区分率达到 100%。

2.3 基于 SSR 的毛白杨优良无性系 DNA 指纹图谱构建

2.3.1 指纹图谱代码

对引物进行组合以鉴定组合引物的区分率, 利用 CERVUS 3.0 软件明确 38 个 SSR 标记可建立 469 份毛白杨优良无性系的 DNA 指纹图谱。标记 LG_III-2、GCPM_2570-1、PMGC_2606、ORPM_197、PMGC_2140、PMGC_223、LG_IX-1、LG_VIII-3、GCPM_112-1、GCPM_2627-1、LG_VIII-4、GCPM_

1504-1、GCPM_1411-1、LG_V-2、GCPM_1153-1、GCPM_1524-1、LG_XVI-6、LG_XVI-9、PMGC-2818、GCPM-2768、LG_XVI-7、GCPM-2012、GCPM_1832-1、GCPM_3367-1、GCPM_88-1、GCPM_3652-1、GCPM_3474-1、GCPM_XIX-11、GCPM_1571-1、GCPM_1572-2、GCPM_1072-2、PMGC_2088-2、GCPM_1184-1、GCPM_1063、GCPM_1056-1、PMGC_2571、ORPM-221、GCPM-124 依次记为字母 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N、O、P、Q、R、S、T、U、V、W、X、Y、Z、AA、AB、AC、AD、AE、AF、AG、AH、AI、AJ、AK、AM, 记录每份材料经不同的 38 对 SSR 标记扩增出现的等位标记碱基长度(bp), 依据试验之前设计的指纹图谱代码构建方法, 为 469 份供试材料建立能够相互区别于其它供试材料的指纹图谱代码(表5)。例如无性系 2-3, 指纹代码第一个数字 1, 代表其为雌株, A391/396 代表位点 LG_III-2 的等位标记配置为 391 bp/396 bp, 以此类推。

2.3.2 指纹图谱 QR 编码

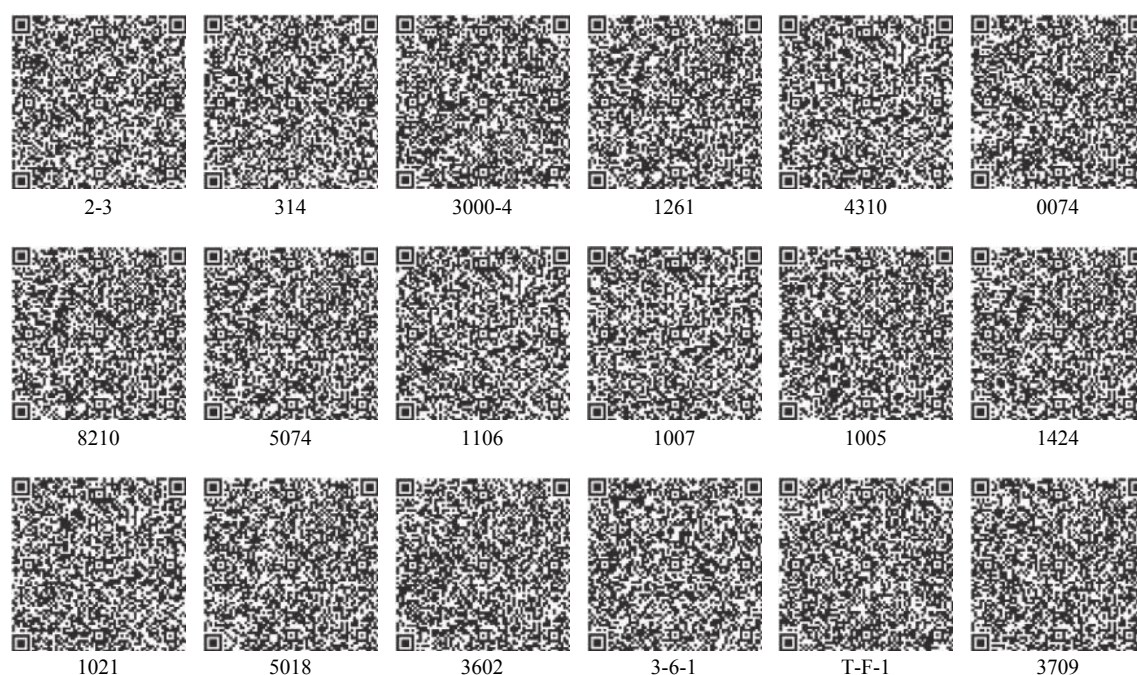
利用 QRCode 转化工具对所有毛白杨优良无性系材料指纹图谱代码进行转换, 为每份毛白杨种质构建一份二维指纹代码图(图1), 图1中仅列举了 18 个毛白杨优良无性系材料的二维指纹图谱代码图, QR 编码中包含了毛白杨优良无性系编号、毛白杨优良无性系性别、毛白杨优良无性系类型、毛白杨优良无性系植物学分类、毛白杨优良无性系指纹图谱代码等信息。图1中毛白杨优良无性系的 QR 编码中 2-3 包含以下信息, 物种: 毛白杨; 名称: 2-3; 种源: 山东; 性别: 雌; 倍性: 二倍体; 植物学分类: 杨柳科杨属白杨组; 指纹代码如下: 1A391/396B236/246C165/184D206/206E191/191F178/178G388/388H237/237I133/143J237/257K387/387L157/164M242/242N196/20

表5 毛白杨优良无性系 SSR 指纹代码

Tab. 5 SSR fingerprint code of *Populus tomentosa* superior clones

编号 No.	SSR 指纹代码 SSR fingerprint code
2-3	1A391/396B236/246C165/184D206/206E191/191F178/178G388/388H237/237I133/143J237/257K387/387L157/164M242/242N196/207O180/189P170/173Q115/130R221/234S138/140T194/196U352/368V126/138W152/152X121/121Y145/145Z144/144AA121/133AB398/398AC178/178AD118/118AE151/157AF185/185AG153/163AH166/191AI146/146AJ106/118AK220/220AM205/209
314	1A396/396B236/246C165/184D206/206E191/191F176/178G388/405H237/237I131/133J237/257K387/387L157/162M236/236N196/207O180/180P170/175Q115/130R218/221S138/140T194/204U352/364V129/138W156/156X121/121Y145/145Z144/144AA121/133AB398/405AC178/178AD118/123AE148/151AF185/185AG153/153AH166/185AI146/146AJ106/118AK220/220AM205/209
3-3-4	2A396/396B236/246C165/184D206/206E191/191F176/178G388/405H237/237I131/133J237/257K387/387L157/162M220/236N196/207O180/180P170/173Q115/130R218/221S138/140T194/204U352/364V129/138W156/156X121/121Y145/145Z144/144AA121/133AB398/405AC178/178AD118/123AE148/151AF185/185AG153/153AH166/185AI146/146AJ106/118AK220/220AM205/209
3000-4	1A396/396B236/246C165/184D206/206E191/191F176/178G388/405H237/237I131/133J237/257K387/387L157/162M236/236N196/207O180/180P170/173Q115/130R218/221S138/140T194/204U352/364V129/138W156/156X121/121Y145/145Z144/144AA121/133AB405/405AC178/178AD118/123AE185/185AF185/185AG153/153AH166/185AI146/146AJ106/118AK220/220AM205/209
6319	2A396/396B236/246C165/184D206/206E191/191F176/178G388/405H237/237I131/133J237/257K387/387L157/162M236/236N196/207O180/180P170/170Q115/130R218/221S138/140T194/204U352/364V129/138W156/156X121/121Y145/145Z144/144AA121/133AB398/405AC178/178AD118/123AE148/151AF185/185AG153/153AH166/185AI146/146AJ106/118AK220/220AM205/209

注: 本表格只示例部分毛白杨优良无性系指纹代码。Note: only part of the clone fingerprint code of *Populus tomentosa* is showed in this table as example.



仅列举了 18 个毛白杨优株无性系材料的二维指纹图谱 QR 编码。The two-dimensional fingerprinting QR codes of only 18 superior clone materials of *Populus tomentosa* are listed.

图 1 毛白杨优株无性系指纹图谱 QR 编码

Fig. 1 Fingerprinting QR codes of *Populus tomentosa* superior clones

70I80/189P170/173Q115/130R221/234S138/140T194/
196U352/368V126/138W152/152X121/121Y145/145Z
144/144AA121/133AB398/398AC178/178AD118/118
AE151/157AF185/185AG153/163AH166/191AI146/1
46AJ106/118AK220/220AM205/209。

3 结论与讨论

3.1 毛白杨多态 SSR 引物库构建

SSR 分子标记是检测种质资源遗传信息的有效工具, 直接反映植物遗传物质在 DNA 分子水平上的差异, 具有多态性高、重复性好、共显性、多等位标记变异等优点, 能有效检测 DNA 水平上的遗传变异, 并提供大量的遗传变异信息^[15]。本研究中构建了由 406 对 SSR 引物组成的毛白杨多态 SSR 引物库, 其中包括引物在染色体上的定位以及等位标记的片段大小等信息, 首次为毛白杨品种鉴定、系谱分析和遗传多样性评价等提供了可供参考的 SSR 引物公共资源。

3.2 毛白杨指纹图谱库核心引物筛选

选择合适的引物是建立动植物分子指纹图谱进而构建其分子身份证的重要前提^[16]。构建种质资源的指纹图谱, 要求用最少的引物对数区分最多的种质^[17]。本研究首先筛选出稳定的多态 SSR 引物 406 对, 初步完成了毛白杨多态 SSR 引物库的构建。在此基础上, 采取应用多态性较高的 SSR 核心引物, 以及特异的 SSR 辅助引物相结合的策略, 完成毛白

杨优树种质资源指纹图谱库核心引物的筛选。在 SSR 引物库构建中首先进行了多态性较高的 SSR 核心引物筛选, 主要依据获得的多态 SSR 引物对毛白杨种质鉴别的区分率, 引物扩增等位标记数、Shannon's 指数、多态性信息含量(PIC)等指标, 从 5 对引物开始, 由高到低选择多态性高的 SSR 引物, 并逐步增加引物组合的数量, 直至再增加多态性 SSR 引物也难以显著增加鉴别材料数量为止, 以获得可对毛白杨种质资源库大多数无性系实现鉴别的引物组合, 达到以最少的引物区分最多的种质的目的。本研究筛选 25 对高多态性 SSR 核心引物, 可鉴别毛白杨种质资源库中 469 个优树无性系的 97.29%, 即 456 个优树无性系。此外, SSR 引物库构建还应用了部分多态性不高的引物, 主要是由于随着供试材料的增加, 会出现诸多相同 SSR 位点而难以检测差异的材料, 尤其是变异极少的材料, 此时继续采用 Shannon's 指数及多态性信息较高的 SSR 引物已难以显著提高种质的区分率。因此, 从足够多的毛白杨多态 SSR 引物库中筛选一些特殊差异位点而获得少数特异种质材料可鉴别的指纹图谱, 即通过筛选添加毛白杨特异的 SSR 辅助引物, 达到区分全部毛白杨种质的目的。本研究在筛选了 25 对高多态的核心 SSR 引物的基础上, 同时也应用了 13 对特异的 SSR 辅助引物, 实现了毛白杨种质资源库 469 个优良无性系指纹图谱构建, 为今后毛白杨遗传资源管理、品种鉴定、系谱分析和知识产权保护等奠定了基础。

3.3 QR 编码

QR 编码 QR Code 属于矩阵式二维条码, 为日本 Denso 公司研制, 是一种新型图形符号自动识读处理码制。QR Code 是目前应用最广泛的二维条码之一(Denso wave. QRCode Features [EB/OL]. <http://www.densowave.com/qrcode/index-e.html>, 2010-12-20)。本研究在构建毛白杨种质资源库 469 个优良无性系指纹图谱的基础上, 进一步构建了指纹图谱 QR 编码。指纹图谱代码易于理解, 但其包含信息量少。而指纹图谱 QR 编码虽然比较抽象, 但是可以录入较多相关信息, 所包含的信息量较大, 可以随时修改, 只需对 QR 编码进行解码, 即可得到种质相关信息, 具有高效、方便等特点, 有利于毛白杨种质鉴定工作的高效开展。

参 考 文 献

- [1] 朱之梯, 康向阳, 张志毅. 毛白杨天然三倍体选种研究 [J]. *林业科学*, 1998, 34(4): 22-31.
Zhu Z T, Kang X Y, Zhang Z Y. Studies on selection of natural triploids of *Populus tomentosa* [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 1998, 34(4): 22-31.
- [2] 朱之梯. 毛白杨遗传改良 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2006.
Zhu Z T. Genetic improvement of *Populus tomentosa* Carr. [M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 2006.
- [3] Guichoux E, Lagache L, Wgner S, et al. Current trends in microsatellite genotyping [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2011, 11(4): 591-611.
- [4] Powell W, Machray G C, Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats [J]. *Trends in Plant Science*, 1996, 7(1): 215-222.
- [5] Dayanandan S, Rajora O P, Bawa K S. Isolation and characterization of microsatellites in trembling aspen (*Populus tremuloides*) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 96(6/7): 950-956.
- [6] Yin T M, Difazio S P, Gunter L E, et al. Large-scale heterospecific segregation distortion in *Populus* revealed by a dense genetic map [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 109(3): 451-463.
- [7] Liu H L, Yang W X, Hou J, et al. Genetic identification of 43 elite clonal accessions of *Populus deltoides* by SSR fingerprinting [J]. *Canadian Journal of Plant Science*, 1918, 96(3): 494-502.
- [8] Han Z Q, Gao P, Geng X N, et al. Identification of the male parent of superior half-sib *Populus tomentosa* individuals based on SSR markers [J/OL]. *Molecular Breeding*, 2017, 37(12): 155 [2019-01-13]. <https://doi.org/10.1007/s11032-017-0754-1>.
- [9] 白凤莹, 曾青青, 康宁, 等. 毛白杨基因库优树倍性检测及性状对比分析 [J]. *北京林业大学学报*, 2015, 37(4): 113-118.
Bai F Y, Zeng Q Q, Kang N, et al. Ploidy level and contrast analysis of the traits for superior trees of *Populus tomentosa* Carr. in gene pool [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2015, 37(4): 113-118.
- [10] Schuelke, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments [J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18: 233-234.
- [11] Hulce D, Li X, Snyder-Leiby T, et al. GeneMarker® genotyping software: tools to increase the statistical power of DNA fragment analysis [J]. *Journal of Biomolecular Techniques*, 2011, 22(Suppl.): 35.
- [12] Yeh F C, Yang R C, Boyle T. POPGENE Version 1.32: Microsoft Windows-based freeware for populations genetic analysis [Z]. Edmonton: University of Alberta, 1999.
- [13] 马红勃, 许旭明, 韦新宇, 等. 基于 SSR 标记的福建省若干水稻品种 DNA 指纹图谱构建及遗传多样性分析 [J]. *福建农业学报*, 2010, 25(1): 33-38.
Ma H B, Xu X M, Wei X Y, et al. DNA fingerprints and genetic diversity analysis based on SSR markers for rice cultivars in Fujian [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2010, 25(1): 33-38.
- [14] 王静毅, 陈业渊, 黄秉智, 等. 部分香蕉品种 SSR 指纹图谱的构建 [J]. *果树学报*, 2009, 26(5): 733-738.
Wang J Y, Chen Y Y, Huang B Z, et al. Establishment of fingerprinting for bananas (*Musa nana*) by SSR marker [J]. *Journal of Fruit Science*, 2009, 26(5): 733-738.
- [15] Powell W, Machray G C, Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeat [J]. *Trends in Plant Science*, 1996, 1(7): 215-222.
- [16] 陈琛, 张兴桃, 程斐, 等. 秋甘蓝品种的 SSR 指纹图谱的构建 [J]. *园艺学报*, 2011, 38(1): 159-164.
Chen C, Zhang X T, Cheng F, et al. Establishment of SSR fingerprinting on autumn cabbage hybrids and their parents [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2011, 38(1): 159-164.
- [17] 刘本英, 王丽鸾, 李友勇, 等. ISSR 标记鉴别云南茶树种质资源的研究 [J]. *茶叶科学*, 2009, 29(5): 355-364.
Liu B Y, Wang L Y, Li Y Y, et al. ISSR markers for discriminating tea germplasm resources from Yunnan Province [J]. *Journal of Tea Science*, 2009, 29(5): 355-364.

(责任编辑 范娟
责任编委 康向阳)