

基于 SSR 标记的梨栽培品种分子身份证的构建

张靖国 田 瑞 陈启亮 杨晓平 胡红菊

湖北省农业科学院果树茶叶研究所, 武汉 430209

摘要 以 20 个梨栽培品种为例, 利用 SSR 标记构建梨分子身份证体系。从分布在梨 17 个连锁群的 60 对 SSR 引物中筛选出分别位于 17 条染色体的 17 对多态性引物对 20 个梨栽培品种进行扩增, 共检测到等位基因 136 个, 每对引物检测到的等位基因数在 5~11 之间, 平均 8 个; 共检测到基因型 203 个, 每个引物检测到的基因型在 7~17 之间, 平均为 12 个, 表明所选引物具有较高的鉴别力。多态信息含量指数 (PIC) 变幅为 0.614~0.848, 平均为 0.733。38 个双引物组合可区分全部供试品种。根据引物对不同品种扩增条带大小进行编码, 然后将每个品种 17 个 SSR 位点的赋值依次组合, 建立了 20 个梨栽培品种的分子身份证。

关键词 梨; SSR; 分子身份证; 品种

中图分类号 S 661.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)01-0012-06

中国是世界上梨生产第一大国, 2010 年中国梨栽培面积和产量分别为 104 万 hm^2 和 1 523 万 t, 分别占世界的 68.2% 和 67.3% [1]。同时中国又是世界梨属 (*Pyrus* L.) 植物的主要起源中心之一, 品种资源十分丰富, 类型复杂多样。现已定名的梨属植物有 13 个种, 收集保存梨种质资源 2 000 份以上 [2]。随着梨品种选育和推广的加速, 品种资源的异地交流更加频繁, 造成同名异物或同物异名现象非常普遍, 为梨品种资源的评价和利用带来极大不便。另外, 由于一些骨干亲本的反复利用使得品种间遗传差异变小、遗传背景狭窄, 为梨品种的准确鉴定提出了更高的要求。

传统的形态学特征鉴定方法可能受环境影响而发生改变, 不仅需具备较强的专业基础知识, 而且耗时费力。DNA 分子标记技术由于不受环境条件的影响, 可从分子水平上对品种的遗传特异性进行快速、准确的鉴定, 克服了传统形态标记鉴定周期长、误差大、性状差异小的缺点, 因而在草莓 [3]、柑橘 [4]、桃 [5] 等作物中的指纹图谱、分子身份证等方面研究中被广泛应用。国际植物品种权保护联盟 (UPOV) 已将 DNA 分子标记鉴定纳入农作物品种 DUS (distinctness, uniformity, stability) 测试内容, 并在

BMT 测试指南草案中将构建 DNA 指纹数据库的标记方法确定为 SSR 和 SNP。而 SSR 标记因具有多态性高、重复性好、共显性遗传和易于检测等优点, 已被 UPOV 生物化学和分子技术工作组验证为植物新品种保护最广泛应用的标记体系 [6]。

分子身份证 (molecular ID) 是近年来国内学者提出的一个概念, 并作为品种特异识别的一个标准。其功能与分子指纹图谱相同, 可将 DNA 指纹进行数字化编码赋值, 以达到品种检索时更加直观的目的 [5]。高运来等 [7] 利用 43 对 SSR 引物建立了黑龙江 83 份大豆品种的分子身份证; 陈昌文等 [5] 利用 16 对 SSR 分子标记构建了 202 份中国桃地方品种、育成品种及其野生近缘种的分子身份证。SSR 标记在梨遗传多样性分析 [8]、亲子鉴定 [9] 和遗传连锁图谱构建 [10] 等方面已得到广泛应用, 而关于梨分子身份证方面研究目前鲜有报道。本研究以华中地区有一定分布面积的 20 份梨栽培品种为试材, 利用 SSR 分子标记建立梨分子身份证体系, 以期对梨品种资源的分子鉴定和品种权保护提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验材料选取在华中地区分布面积较大的梨栽

收稿日期: 2013-02-21

基金项目: 农业部农作物种质资源保护项目 (NB2011-20130135-11)

张靖国, 硕士, 助理研究员。研究方向: 果树种质资源和分子育种。E-mail: chongtianhe@163.com

通信作者: 胡红菊, 研究员。研究方向: 果树种质资源。E-mail: hongjihu@sina.com

表 1 供试品种

Table 1 Materials in the study

序号 No.	品种 Cultivars	学名 Genera species	亲本 Parentage
1	砀山酥梨 Dangshansuli	<i>P. bretschneideri</i>	地方品种 Landrace
2	鸭梨 Yali	<i>P. bretschneideri</i>	地方品种 Landrace
3	雪花 Xuehua	<i>P. bretschneideri</i> .	地方品种 Landrace
4	黄冠 Huangguan	<i>P. hybrid</i>	雪花×新世纪 Xuehua×Shinseiki
5	中梨 1 号 Zhongli 1	<i>P. hybrid</i>	新世纪×早酥 Shinseiki×Zaosu
6	金花梨 Jinhuali	<i>P. hybrid</i>	金川雪梨实生 Jinchuanxueli seedling
7	翠冠 Cuiguan	<i>P. pyrifolia</i>	幸水 Kousui (杭青×新世纪 Hangqing×Shinseiki)
8	黄花 Huanghua	<i>P. pyrifolia</i>	黄蜜梨×三花 Huangmi×Sanhua
9	雪青 Xueqing	<i>P. hybrid</i>	雪花×新世纪 Xuehua×Shinseiki
10	金晶 Jinjing	<i>P. pyrifolia</i>	丰水梨实生 Housui seedling
11	华梨 1 号 Huali 1	<i>P. pyrifolia</i>	湘南×江岛 Syounan×Ejima
12	华梨 2 号 Huali 2	<i>P. pyrifolia</i>	二宫白×菊水 Ninomiyahuri×Kikusui
13	金水 1 号 Jinshui 1	<i>P. pyrifolia</i>	长十郎×江岛 Chojuro×Ejima
14	金水 2 号 Jinshui 2	<i>P. pyrifolia</i>	长十郎×江岛 Chojuro×Ejima
15	鄂梨 1 号 Eli 1	<i>P. hybrid</i>	伏梨×金水酥 Fuli×Jinshuisu
16	鄂梨 2 号 Eli 2	<i>P. hybrid</i>	中香 Zhongxiang(伏梨×启发 Fuli×Qifa)
17	新高 Niitaka	<i>P. pyrifolia</i>	天之川×长十郎 Amanokawa×Chojuro
18	丰水 Housui	<i>P. pyrifolia</i>	幸水 Kousui×I-33
19	圆黄 Wonhwang	<i>P. pyrifolia</i>	早生赤×晚三吉 Waseaka×Okusankichi
20	黄金 Whangkeumbae	<i>P. pyrifolia</i>	新高×二十世纪 Niitaka×Nijisseiki

培品种 20 份,其中包括地方品种 3 份,选育品种 17 份(表 1),均采自国家果树种质武昌砂梨圃。

1.2 DNA 提取

采用改良 CTAB 法提取梨叶片基因组 DNA。所提 DNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,并用分光光度法定量后,−20 °C 保存备用。

1.3 SSR 引物筛选

为了使构建的分子身份证能够尽量全面地反映梨全基因组所有染色体遗传信息,参照 Terakami 等^[10]和 Celton 等^[11]构建的梨遗传连锁图,选择分布于梨 17 个连锁群的 60 对 SSR 引物用于筛选,引物序列参照 Yamamoto 等^[12]、Liebhard 等^[13]的方法。正向引物 5' 端加了 1 个 FAM 的荧光标记。所有引物由北京鼎国生物科技有限公司合成。

1.4 PCR 扩增及产物检测

PCR 反应体系包括 10×PCR buffer(含 Mg²⁺) 5 μL, Taq 酶(2 U/μL) 1 μL, dNTPs (10 mmol/L) 1 μL, 上下游引物(10 mmol/L) 各 1 μL, DNA 模板(50 ng/μL) 1 μL, 加 ddH₂O 至 50 μL。PCR 反应在 Gene Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer,

USA) 上进行。PCR 反应程序为 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 48~56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。

扩增产物经过 ABI3730X Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) 分离, 采用 ROX500 作为分子质量分析内标, 通过 GeneMapper v 4.0 软件分析得到不同样品扩增片段的长度。

1.5 数据统计分析

SSR 位点的多态性信息量 (polymorphism information content, PIC) 的简化计算公式为 $PIC = 1 - \sum P_i^2$, 式中 P_i 表示第 i 个等位位点出现的频率。使用软件 Minimal Marker^[14] 计算区分 20 份品种所需要的最少引物组合。

2 结果与分析

2.1 引物筛选

通过 60 对 SSR 引物对随机选择的 3 个品种进行扩增检测, 最终确定多态性高且分别位于 17 条染色体上的 17 对 SSR 引物(表 2)用于分子身份证的构建。

表 2 17 对 SSR 引物的相关特征

Table 2 The characterization of 17 pairs of primer

染色体 Chromosome	引物 Primer	引物序列 Primer sequence	等位基因数 Number of alleles	基因型数 Number of genotypes	PIC
LG1	NH013a	F:GGTTTGAAGAGGAATGAGGAG R:CATTGACTTTAGGGCACATTTC	7	11	0.746
LG2	BGT23b	F:CACATTCAAAGATTAAGAT R:ACTCAGCCTTTTTTCCAC	8	14	0.795
LG3	CH03g12	F:GCGCTGAAAAAGGTCAGTTT R:CAAGGATGCGCATGTATTTG	10	17	0.838
LG4	NH011a	F:GGTTCACATAGAGAGAGAGAG R:TTTGCCGTTGGACCGAGC	7	10	0.652
LG5	CH04g09	F:TTGTGCGACAAGCCAGTTTA R:GAAGACTCATGGGTGCCATT	5	7	0.614
LG6	CH03d12	F:GCCCAGAAGCAATAAGTAAACC R:ATTGCTCCATGCATAAAGGG	7	9	0.634
LG7	CH04e05	F:AGGCTAACAGAAATGTGGTTTTG R:ATGGCTCCTATTGCCATCAT	7	11	0.783
LG8	CH01h10	F:TGCAAAGATAGGTAGATATATGCCA R:AGGAGGGATTGTTTGTGCAC	8	15	0.784
LG9	CH05c07	F:TGATGCATTAGGGCTTGTACTT R:GGGATGCATTGCTAAATAGGAT	8	12	0.727
LG10	NH017a	F:CAGAAAGGAGAGGGCTACAG R:CCCTCACCAATCAAAACTC	11	14	0.848
LG11	CH03d02	F:AAACTTTCACTTTCACCCACG R:ACTACATTTTTAGATTTGTGCGTC	9	15	0.809
LG12	CH01f02	F:ACCACATTAGAGCAGTTGAGG R:CTGGTTTGTTCCTCCAGC	8	13	0.767
LG13	NH009b	F:CCGAGCACTACCATTGA R:CGTCTGTTTACCGCTTCT	7	9	0.628
LG14	NH004a	F:AGGATGGGACGAGTTTAGAG R:CCACATCTCTCAACCTACCA	6	12	0.754
LG15	CH02d11	F:AGCGTCCAGAGCAACAGC R:AACAAAAGCAGATCCGTTGC	9	12	0.676
LG16	NH007b	F:TACCTTGATGGAACTGAAC R:AATAGTAGATTGCAATTACTC	8	10	0.672
LG17	NH015a	F:TTGTGCCCTTTTTCTACC R:CTTTGATGTTACCCTTGCTG	10	12	0.737

2.2 引物等位基因信息分析

筛选确定的 17 对 SSR 引物在供试每份梨品种中均能扩增到 1 个或 2 个等位基因。17 对引物在 20 份试材中共检测到等位基因 136 个,每对引物检测到的等位基因数在 5(CH04g09)~11(NH017a)之间,平均为 8 个(表 3)。17 对引物在 20 份梨品种中共检测到基因型 203 个,每个引物检测到的基因型数在 7(CH04g09)~17(CH03g12)之间,平均为 12 个。引物位点的 PIC 变幅为 0.614(CH04g09)~0.848(NH017a),平均为 0.733,表明引物的多态信息含量指数差异较大。

引物检测到等位基因数、基因型数越多,PIC 值越高,表明其区分品种的能力也越强,在分子身份证构建中具有的价值也越高。等位基因数、基因型数和 PIC 值均大于平均值的引物有 NH017a、CH03g12、CH03d02、CH01h10、CH01f02、NH015a、BGT23b、CH05c07。

供试材料均为二倍体,而 SSR 为共显性遗传,因此每个 SSR 位点均由 2 个相同(纯合体)或不同的(杂合体)等位基因组成。根据每个 SSR 位点扩增到的等位基因大小依次编号为 0~9,如果超过 9 时则赋值为 A(表 3)。

表 3 等位基因的赋值标准
Table 3 Alleles encoded standard

引物 Primer	编码 Code										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	A
NH013a	199	203	205	207	213	215	219				
BGT23b	186	188	190	192	200	210	214	220			
CH03g12	168	170	172	174	176	178	182	184	186	188	
NH011a	157	161	171	175	177	179	181				
CH04g09	132	136	138	146	148						
CH03d12	71	75	85	89	91	93	97				
CH04e05	184	194	202	204	206	210	214				
CH01h10	90	92	94	98	104	108	114	116			
CH05c07	111	115	123	125	129	133	135	137			
NH017a	86	88	90	92	94	98	100	102	104	108	110
CH03d02	176	178	180	182	186	188	190	202	216		
CH01f02	156	158	160	162	164	166	176	180			
NH009b	139	145	149	153	155	157	159				
NH004a	74	90	96	100	104	110					
CH02d11	100	102	112	116	118	120	124	126	130		
NH007b	120	122	134	136	138	140	146	148			
NH015a	100	102	106	110	112	114	116	134	136	140	

2.3 分子身份证的构建

将 17 对引物扩增到的等位基因按照表 3 进行赋值,然后将各品种在 17 个染色体 SSR 位点的赋值依次串联起来,即为其分子身份证编码(表 4)。如 砀山酥梨 分子 ID 为 0146770622331511460667253313483728,表明其第 1~17 号染色体上所选定的 17 个 SSR 位点的所扩增到的等位基因编码依次为 01、46、77、06、22、33、15、11、46、06、67、25、33、13、48、37、28。

表 4 20 份梨品种的分子身份证

Table 4 Molecular ID code of 20 pear cultivars

品种名 Cultivars	分子身份证 Molecular ID
砀山酥梨 Dangshansuli	0146770622331511460667253313373728
鸭梨 Yali	2213296624553577262723340322110723
雪花 Xuehua	0607555613663566144612365505330708
黄冠 Huangguan	0602575612163516441422673505343728
中梨 1 号 Zhongli 1	1525691511023617364822035544130304
金花梨 Jinhuali	0035776623554546372668440222385502
翠冠 Cuiguan	2507575613663511146801445502330708
黄花 Huanghua	1424162613261344152514663534030711
雪青 Xueqing	0002572512663516146917330503351705
金晶 Jinjing	0527275511561314442500130525031778
华梨 1 号 Huali 1	0133170023560647111213343522037728
华梨 2 号 Huali 2	1227082601664445116804344623030719
金水 1 号 Jinshui 1	1124364512450126662A45460502002728
金水 2 号 Jinshui 2	1204885623661506166812463523037728
鄂梨 1 号 Eli 1	2325183622265522011403226655230308
鄂梨 2 号 Eli 2	2545065522660546131613000505130768
新高 Niitaka	0124465623220114162A11361525360488
丰水 Housui	0527275511663314142602335505037708
圆黄 Wonhwang	0500291511562224461A02355504086788
黄金 Whangkeumbae	0124665513220511162314665525334708

供试 20 个梨品种中除了雪花、翠冠、华梨 1 号和丰水外,其余 16 个品种均至少含有 1 个特异等位基因,因此仅用 1 对引物就可以使其从供试 20 个品种中得到特异区分(表 5)。其中,鸭梨、黄冠、华梨 2 号、金水 1 号和鄂梨 1 号都含有 4 个特异等位基因,为最多。不同引物检测到的特异等位基因数在 0(CH04e05, NH004a)~6(CH02d11, NH015a)之间。

表 5 1 对引物即可区分的种质

Table 5 The cultivars which can be distinguished by one primer

引物名称 Primer	种质名称及其具有的特异等位基因编码 Germplasm name and its special allele code number
NH013a	鄂梨 1 号 Eli 1(3)、黄花 Huanghua(4)、黄冠 Huangguan(6)
BGT23b	鸭梨 Yali(1)、砀山酥梨 Dangshansuli(6)
CH03g12	新高 Niitaka(4)
NH011a	鄂梨 1 号 Eli 1(3)、金水 1 号 Jinshui 1(4)
CH04g09	华梨 2 号 Huali 2(0)、鸭梨 Yali(4)
CH03d12	中梨 1 号 Zhongli 1(0)、黄冠 Huangguan(1)、金水 1 号 Jinshui 1(4)
CH01h10	金水 2 号 Jinshui 2(0)、华梨 2 号 Huali 2(5)
CH05c07	鄂梨 1 号 Eli 1(0)、鸭梨 Yali(2)、黄花 Huanghua(5)、金花梨 Jinhuali(7)
NH017a	砀山酥梨 Dangshansuli(0)、黄金 Whangkeumbae(3)、雪青 Xueqing(9)
CH03d02	金水 1 号 Jinshui 1(5)、金花梨 Jinhuali(8)
CH01f02	金晶 Jinjing(1)、黄冠 Huangguan(7)
NH009b	新高 Niitaka(1)、金花梨 Jinhuali(2)、华梨 2 号 Huali 2(4)
CH02d11	鄂梨 1 号 Eli 1(2)、黄冠 Huangguan(4)、雪青 Xueqing(5)、新高 Niitaka(6)、砀山酥梨 Dangshansuli(7)
NH007b	金水 1 号 Jinshui 1(2)、圆黄 Wonhwang(6)
NH015a	鸭梨 Yali(3)、中梨 1 号 Zhongli 1(4)、雪青 Xueqing(5)、鄂梨 2 号 Eli 2(6)、金晶 Jinjing(7)、华梨 2 号 Huali 2(9)

2.4 最佳引物组合

MinimalMarker 软件分析表明,利用 2 对引物组合即可区分出供试的 20 份梨品种。能区分全部供试品种的 38 对双引物组合见表 6,引物 A 与其相应的引物 B 中任一引物组成的 2 对引物组合均可将 20 个供试梨品种区分开来。

表 6 可区分全部供试 20 品种的引物组合

Table 6 Primers combination distinguished all cultivars in the study

引物 A Primer A	引物 B Primer B
CH03g12	BGT23b, NH013a, CH04g09, CH04e05, CH01h10 NH017a, CH03d02, CH01f02, NH004a, CH02d11 NH007b, NH011a
NH017a	CH05c07, CH04g09, CH03d02, CH01f02, NH009b, NH015a, CH01h10,
CH01h10	BGT23b, CH05e07, CH03d02, CH01f02, NH007b, CH03d12, CH04e05,
CH03d02	NH004a, CH02d11, NH007b, NH015a
BGT23b	NH011a, NH009b, NH015a
CH01f02	NH013a, CH04e05, NH009b
NH004a	NH007b, NH015a

3 讨 论

SSR 引物是遗传连锁图构建的理想标记,而目前多数主要作物的遗传连锁图谱已经完成。因此,在进行指纹图谱或分子身份证研究时,可以考虑利用遗传连锁图谱中揭示的遗传信息。如王黎明等^[15]在构建甜高粱分子身份证时从分布在高粱染色体 10 个连锁群上的 103 对 SSR 引物中筛选出 41 对多态性引物进行研究。陈昌文等^[5]参照桃遗传连锁图上的 SSR 位点信息,每条染色体选择 2 个 SSR 位点,共筛选出 16 个 SSR 位点用于中国桃主要品种资源及其野生近缘种的分子身份证构建。目前已经有较为饱和的梨遗传连锁图^[10-11],大量的 SSR 位点已经定位于对应染色体的遗传连锁群上。本研究从已经定位于梨遗传连锁图上的 SSR 位点进行筛选,最终确定分布于 17 个连锁群的 17 个 SSR 位点进行分子身份证构建,以求能够反映不同染色体上的遗传信息。此外,本研究选定的 17 对 SSR 引物中的 8 对引物(以 CH 开头)是从苹果中开发的^[13],其在梨分子身份证构建中的成功应用表明苹果与梨基因组具有较高的相似性。

SSR 扩增产物的检测方法主要有银染技术和荧光标记分析技术 2 种。郝晨阳等^[16]小麦利用详细地比较了常规的 SSR 荧光标记分析技术和银染技术,认为荧光标记分析技术具有更高的灵敏性、数

据收集与处理效率高、数据更准确和更经济等优点。高源等^[17]利用 SSR 荧光检测技术进行了梨的遗传多样研究。本研究结果也表明,SSR 荧光检测较传统的银染技术(本试验前期研究曾采用过)在扩增条带大小判读识别上明显具有准确性好、效率高等优点。

由于 SSR 为共显性遗传,对于二倍体品种,每个 SSR 位点可以检测到 2 个等位基因。在构建指纹图谱或分子身份证时,许多研究者采用的 SSR 方法只选择其中的 1 个等位基因,如陈昌文等^[5]在构建桃主要品种资源及其野生近缘种的分子身份证时,考虑到材料的特殊性和分子身份证位数因素而从 203 个等位基因中选择 1、2、3 用于赋值,对每个 SSR 位点只选择较小的片段进行赋值。为了避免遗传信息的丢失,本研究没有对检测到的等位基因进行人为的取舍,每个 SSR 位点的 2 个等位基因都用于分子身份证的构建。

SSR 引物检测到的等位基因数与所用材料的遗传背景有关。雷天刚等^[4]筛选出 12 对 SSR 引物能鉴别 42 个柑橘品种,平均每个引物可以鉴别种质 3.5 个。而陈昌文等^[5]筛选出的核心引物平均每个可区分 22 份种质,这与其研究试材涵盖大量不同地方品种、选育品种和野生近缘种且遗传背景非常丰富有关。本研究选取的 20 份梨主要栽培品种,既有主要古老地方白梨品种如砀山酥梨等,也有引进优良日韩砂梨品种和国内育种单位选育的含有砂梨、白梨和西洋梨血统的种间杂种如黄冠、鄂梨 1 号和鄂梨 2 号等,遗传背景较为丰富。本研究筛选的 17 对 SSR 引物具有较高的鉴别力,平均每个可区分 11.9 份种质,2 对引物组合即可区分全部 20 份供试品种(其中包括遗传背景较近的品种,如具有共同亲本的姊妹系品种‘金水 1 号’和‘金水 2 号’、具有亲子关系的‘新高’和‘黄金’等)。

建立梨的分子身份证不仅是保护品种资源知识产权、维护生产者和育种家利益的需要,对梨种质资源的管理和利用也具有重要意义。本研究已初步建立了 20 份梨栽培品种的分子身份证体系,可为这些品种的鉴定和保护提供依据。随着新品种(系)的不断推出和优异种质的陆续发掘,下一步拟对更多的梨品种资源进行研究,以期建立一个较为完善的梨分子身份证数据库。

参 考 文 献

- [1] FAO. Pear statistics,2010[DB/OL]. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.
- [2] 田路明,曹玉芬,董星光.中国梨种质创新研究进展:梨产业技术研究与应用[M].北京:中国农业出版社,2010:29-34.
- [3] 王壮伟,赵密珍,袁骥,等.38个欧美草莓栽培品种SSR指纹图谱的构建[J].果树学报,2011,28(6):1032-1037.
- [4] 雷天刚,何永睿,吴鑫,等.柑橘栽培品种(系)DNA指纹图谱库的构建[J].中国农业科学,2009,42(8):2852-2861.
- [5] 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.
- [6] 滕海涛,吕波,赵久然.利用DNA指纹图谱辅助植物新品种保护的可能性[J].生物技术通报,2009(1):1-4.
- [7] 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.
- [8] JIANG Z W, TANG F Y, HUANG H W, et al. Assessment of genetic diversity of Chinese sand pear landraces (*Pyrus pyrifolia* Nakai) using simple sequence repeat markers[J]. Hort Science, 2009, 44(3): 619-626.
- [9] SAWAMURA Y, TAKADA N, YAMAMOTO T, et al. Identification of parent-offspring relationships in 55 Japanese pear cultivars using S-RNase allele and SSR markers[J]. J Japan Soc Hort Sci, 2008, 77(4): 364-373.
- [10] TERAOKAMI S, KIMURA T, NISHITANI C, et al. Genetic linkage map of the Japanese pear Housui identifying three homozygous genomic regions[J]. J Japan Soc Hort Sci, 2009, 78(4): 417-424.
- [11] CELTON J M, CHAGNÉ D, TUSTIN S D, et al. Update on comparative genome mapping between *Malus* and *Pyrus*[J]. BMC Research Notes, 2009, 2: 182.
- [12] YAMAMOTO T, KIMURA T, SHODA M, et al. Development of microsatellite markers in the Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) [J]. Molecular Ecology Notes, 2002, 2(1): 14-16.
- [13] LIEBHARD R, GIANFRANCESCHI L, KOLLER B, et al. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus domestica* Borkh.) [J]. Molecular Breeding, 2002, 10: 217-214.
- [14] FUJII H, OGATA T, SHIMADA T, et al. Development of a novel algorithm and the computer program for the identification of minimal marker sets of discriminating DNA markers for efficient cultivar identification: proceedings of Plant & Animal Genomes XV Conference, January 13-17, 2007[C]. San Diego, CA: Town & Country Convention Center, 2007.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 高源,田路明,刘凤之,等.TP-M13-SSR技术在梨遗传多样性研究中的应用[J].果树学报,2011,28(3):394-399.

Establishment of molecular ID for pear cultivars based on SSR markers

ZHANG Jing-guo TIAN Rui CHEN Qi-liang YANG Xiao-ping HU Hong-ju

Institute of Fruit and Tea, Hubei Academy of Agricultural Science, Wuhan 430209, China

Abstract Seventeen pairs of SSR primers with clear polymorphic bands were screened from 60 pairs of SSR locus covering 17 linkage groups of pear genetic map and amplified with 20 pear cultivars. 136 polymorphic bands in total were obtained with 5~11 bands per primer locus (8.0 bands on average). The polymorphism information content (PIC) of the 17 SSR loci ranged from 0.614 to 0.848 with an average of 0.733. All pear cultivars studied could be identified with 38 different combinations of 2 markers each. Bands amplified by each marker were coded based on size of fragment and used as a molecular ID.

Key words pear; SSR; molecular ID; cultivar

(责任编辑:张志钰)