

## 新疆早熟棉品种 SSR 指纹图谱构建与品种鉴别

薛艳<sup>1</sup>,张新宇<sup>1</sup>,沙红<sup>3</sup>,李雪源<sup>3</sup>,孙杰<sup>1\*</sup>,李保成<sup>2\*</sup>

(1. 石河子大学农学院 / 新疆兵团绿洲生态农业重点实验室, 新疆石河子 832003; 2. 新疆农垦科学院, 新疆石河子 832003; 3. 新疆农业科学院经作所, 乌鲁木齐 830052)

**摘要:**以新疆自 1978 年以来审定命名的 42 个早熟棉品种为材料,利用 SSR 分子标记对新疆早熟棉品种进行研究。从 2300 对 SSR 引物中筛选出了 52 对具有稳定多态性的引物,每对引物可检测到 3~24 个多态性片段,共检测到 506 个,平均 9.7 个,片段大小介于 100~2000 bp 之间。对所得到的 52 个 SSR 指纹图谱进行组合和综合分析,用其中 2 对就可将所有供试品种区分开来。同时,分别对 42 个早熟棉品种进行指纹分析,获得各个品种的特异性指纹,可为今后棉花种子真伪快速鉴别奠定基础。

**关键词:**陆地棉; SSR 指纹图谱; 品种鉴别

**中图分类号:**S562 **文献标识码:**A

**文章编号:**1002-7807(2010)04-0360-07

## Construction of Fingerprinting Map Based on SSR and Identification of Cultivars for Earliness Cultivars in Upland Cotton in Xinjiang

XUE Yan<sup>1</sup>, ZHANG Xin-yu<sup>1</sup>, SHA Hong<sup>3</sup>, LI Xue-yuan<sup>3</sup>, SUN Jie<sup>1\*</sup>, LI Bao-cheng<sup>2\*</sup>

(1. College of Agriculture / Key Laboratory of Oasis Eco-Agriculture of Bingtuan Production and Construction Group, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China; 2. Xinjiang Academy of Farmland Reclamation, Shihezi, Xinjiang 832003, China; 3. Institute of Industrial Crops, Xinjiang Academy of Agricultural Science, Urumqi 830052, China)

**Abstract:** The research on 42 earliness cultivars planted in Xinjiang was conducted, using SSR molecular markers. Among 2300 pairs of primers, 52 pairs with steady polymorphism were selected. Three to 24 polymorphic loci were detected by each pair of primers. There were 506 polymorphic fragments detected in total. The average number of polymorphic fragments detected were 9.7 per pair of primers. The band size ranged from 100 to 2000 bp. The 52 SSR fingerprint maps were combined and analyzed comprehensively, it turned out to be that all the cotton cultivars could be identified by two primer pairs. The results indicated that the SSR markers can help to construct fingerprint map with high efficiency and accuracy rapidly, and it is feasible and effective to identify cotton cultivars with SSR molecular markers. This study will lay a solid foundation for rapid authentication and quality control of cotton seeds with large sample size.

**Key words:** upland cotton; SSR fingerprint; identification

优良品种是作物高产的基础,品种混杂和纯度降低会明显降低产量、影响品质。快速准确地进行品种鉴别及纯度检验对种子质量标准化、品种审定、真假种子辨别、产权纠纷均有重要作用。目前,我国种子生产和经营管理还不太规范,不合格的种子屡屡混入市场并用于生产,造成减产和经济损失。因此,品种鉴定显得尤为重要。

分子标记技术的发展带动了 DNA 指纹图谱技术的快速发展。指纹图谱是鉴别品种(系)的有力工具,已在农作物品种鉴定、种子纯度检测和品种亲缘关系及分类等方面得到应用,并发挥着越来越重要的作用。由于 SSR (simple sequence repeat, SSR) 标记具有信息量大、重复性好和可信度高等特点<sup>[1]</sup>,已被广泛用于玉米、大豆、水稻、大

收稿日期:2010-02-09

作者简介:薛艳(1983-),女,硕士,xueyan\_8@sina.com;\* 通讯作者,sunjiezh@vip.sina.com,xjlbc@sohu.com

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划项目(2007BAD44B07)

麦等作物的指纹图谱构建及遗传多样性分析<sup>[2-6]</sup>。但有关新疆早熟棉品种 SSR 指纹图谱的构建尚未见报道。本研究旨在探讨利用 SSR 技术构建新疆早熟棉品种指纹图谱,为今后利用该技术进行棉花品种鉴定、多样性评价、亲缘关系分析和品种权保护等提供分子水平上的依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

新疆自 1978 年至 2009 年审定并推广的早熟棉品种“新陆早 1 号”到“新陆早 42 号”,共 42 个。其中,新陆早 2 号、5-9 号、12-13 号、15-16 号、19 号、22 号、24-26 号、32-33 号、35 号、37 号由石河子大学孙杰提供;“新陆早 38 号”到“新陆早 42 号”由新疆农垦科学院棉花所李保成提供;其余品种由新疆农业科学院李雪源课题组提供。

上述品种的种子经硫酸脱绒后播种于灭过菌的蛭石中,28~30℃光照培养箱中培养至幼苗长出 2~3 片真叶,取棉花叶片用于基因组 DNA 的提取。

### 1.2 棉花基因组 DNA 提取

采用改良的 CTAB 法<sup>[7]</sup>提取棉花叶片基因组 DNA,并根据实际情况稍加改动。DNA 经纯度和完整性鉴定后,稀释至 26 ng·μL<sup>-1</sup>用于 PCR 反应模板。

### 1.3 SSR 分析

TML、TMK、BNL (Brookhaven National Laboratory) SSR 引物来自 CottonDB (<http://algodon.tamu.edu>)<sup>[8]</sup>公布的序列, JESPR (Jenkins, El-Zik, Saha, Pepper, and Reddy) SSR 引物来自 Reddy 等发表的序列。上述引物由上海博亚公司合成,共 2300 对。

SSR 扩增反应在 Cycler-9600 上进行。反应体系为 10 μL, 含有 10×PCR buffer 1.0 μL, Mg<sup>2+</sup> (25 mmol·L<sup>-1</sup>)1.0 μL, dNTP (10 mmol·L<sup>-1</sup>)0.2 μL, Taq 酶 (5 U)0.15 μL, Primer F 和 Primer R 引物 (10 μmol·L<sup>-1</sup>)各 0.5 μL, 模板 DNA (26 ng·μL<sup>-1</sup>)1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 5.65 μL。

PCR 反应程序为:95℃预变性 2 min, 94℃变性 45 s, 55℃退火 45 s, 72℃延伸 1 min, 30 个循环, 72℃延伸 7 min<sup>[9]</sup>。PCR 扩增产物经 9% 的非

变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染(10% 硝酸银)检测<sup>[10]</sup>。

### 1.4 数据统计与分析

将聚丙烯酰胺凝胶电泳的谱带转换成数字指纹模式,在相同的迁移位置上有带的计为 1,无带的计为 0。根据指纹图谱出现的概率公式  $1/2^n$  (2 为等位基因的数目, n 为多态位点数, 2<sup>n</sup> 则为检测 n 个位点涉及的所有可能的试材个数) 统计图谱的置信概率<sup>[11]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 具有多态性 SSR 引物的筛选

查阅系谱,先用新陆早 1 号、新陆早 7 号、新陆早 12 号、新陆早 13 号、新陆早 26 号、新陆早 33 号 6 个亲缘关系较远的品种对 2300 对 SSR 引物进行初步筛选。将获得的具有多态性引物用 42 个新疆早熟棉品种进一步筛选,筛选出扩增带型稳定、多态性好的引物 52 对。这 52 对引物在 42 个早熟棉品种中共扩增出 636 个条带,其中多态性条带(等位性变异)506 个,平均每对引物可以检测到 9.73 个(表 1),条带大小介于 100~2000 bp 之间。

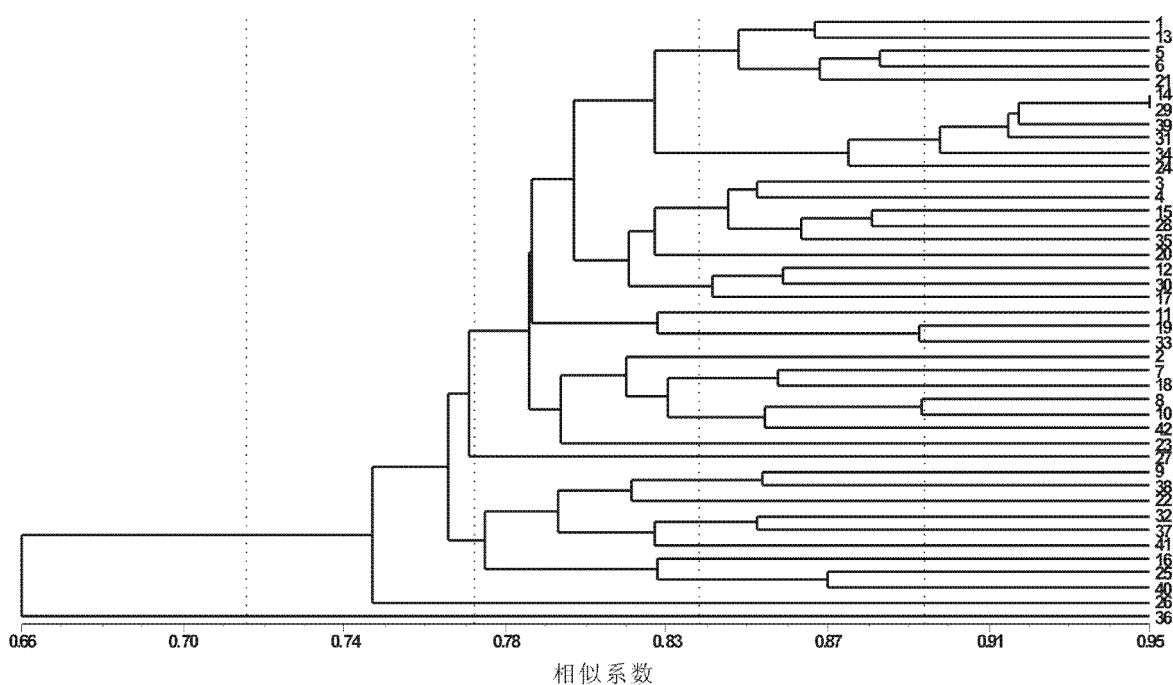
### 2.2 聚类分析

在选取 0.77 为阈值时,也就是说在相似系数为 0.77 时,42 个早熟棉品种大体上可划分为 4 个类群(图 1)。其中新陆早 36 号和新陆早 26 号分别聚为一类。其它品种又分为两大类群,即第 III 类群和第 IV 类群。第 III 类群包括新陆早 9 号、新陆早 38 号、新陆早 22 号、新陆早 32 号、新陆早 37 号、新陆早 41 号、新陆早 16 号、新陆早 25 号和新陆早 40 号,共 9 个品种;第 IV 类群则由剩余的供试品种组成,各品种间的遗传相似系数为 0.688~0.951,其均值为 0.807,占供试品种的 73.8%。可见,绝大多数供试品种都聚在第 IV 类中,而聚在其它类的品种只有少数。这说明,无论是过去育成的主栽品种还是近年育成的品种以及从外地引进的品种,在 DNA 水平上彼此间的差异并不是很大,绝大多数供试品种的亲缘关系比较近,遗传基础比较狭窄。聚类分析反映了一定的系谱来源,但并不十分吻合。

表 1 42 个早熟棉品种中检测到的 SSR 等位基因数

Table.1 The alleles detected by SSR in 42 earliness cotton cultivars

编号	SSR 引物	等位基因	多态性 等位基因	多态性 百分率	编号	SSR 引物	等位基因	多态性 等位基因	多态性 百分率
PM1	BNL1066	12	9	0.75	PM27	JESPR13	11	7	0.64
PM2	BNL1079	11	7	0.64	PM28	JESPR154	8	2	0.26
PM3	BNL1161	13	13	1.00	PM29	JESPR156	4	3	0.75
PM4	BNL1395	14	10	0.71	PM30	JESPR157	15	11	0.73
PM5	BNL1408	15	11	0.73	PM31	JESPR163	6	5	0.83
PM6	BNL1417	12	8	0.67	PM32	JESPR196	7	3	0.43
PM7	BNL174	8	6	0.75	PM33	JESPR205	14	13	0.93
PM8	BNL197	8	7	0.88	PM34	JESPR290	12	8	0.67
PM9	BNL261	7	4	0.57	PM35	JESPR291	11	11	1.00
PM10	BNL272	4	4	1.00	PM36	JESPR295	19	16	0.84
PM11	BNL285	11	11	1.00	PM37	JESPR4	5	4	0.80
PM12	BNL3264	17	15	0.88	PM38	JESPR43	26	18	0.72
PM13	BNL3447	10	7	0.91	PM39	JESPR50	14	11	0.79
PM14	BNL3454	13	11	0.70	PM40	JESPR65	14	12	0.86
PM15	BNL3458	12	10	0.85	PM41	JESPR7	7	7	1.00
PM16	BNL3594	8	6	0.83	PM42	JESPR90	6	3	0.50
PM17	BNL3627	9	5	0.75	PM43	JESPR96	8	6	0.75
PM18	BNL3635	19	14	0.56	PM44	TMK12	13	12	0.92
PM19	BNL3779	13	11	0.74	PM45	JESPR199	19	15	0.79
PM20	BNL3860	14	9	0.85	PM46	BNL3436	11	10	0.91
PM21	BNL3874	10	9	0.64	PM47	JESPR14	7	4	0.57
PM22	BNL3976	15	12	0.90	PM48	JESPR153	26	24	0.96
PM23	BNL3985	14	12	0.80	PM49	JESPR179	19	19	1.00
PM24	BNL3997	7	5	0.86	PM50	JESPR181	16	14	0.88
PM25	BNL4029	17	12	0.71	PM51	JESPR56	18	15	0.83
PM26	JESPR1	9	6	0.71	PM52	TML05	20	19	0.95
小计		304	238		小计		332	268	
总计		636	506		平均		12.23	9.73	



数字 1 代表新陆早 1 号, 2 代表新陆早 2 号, 其它依此类推。

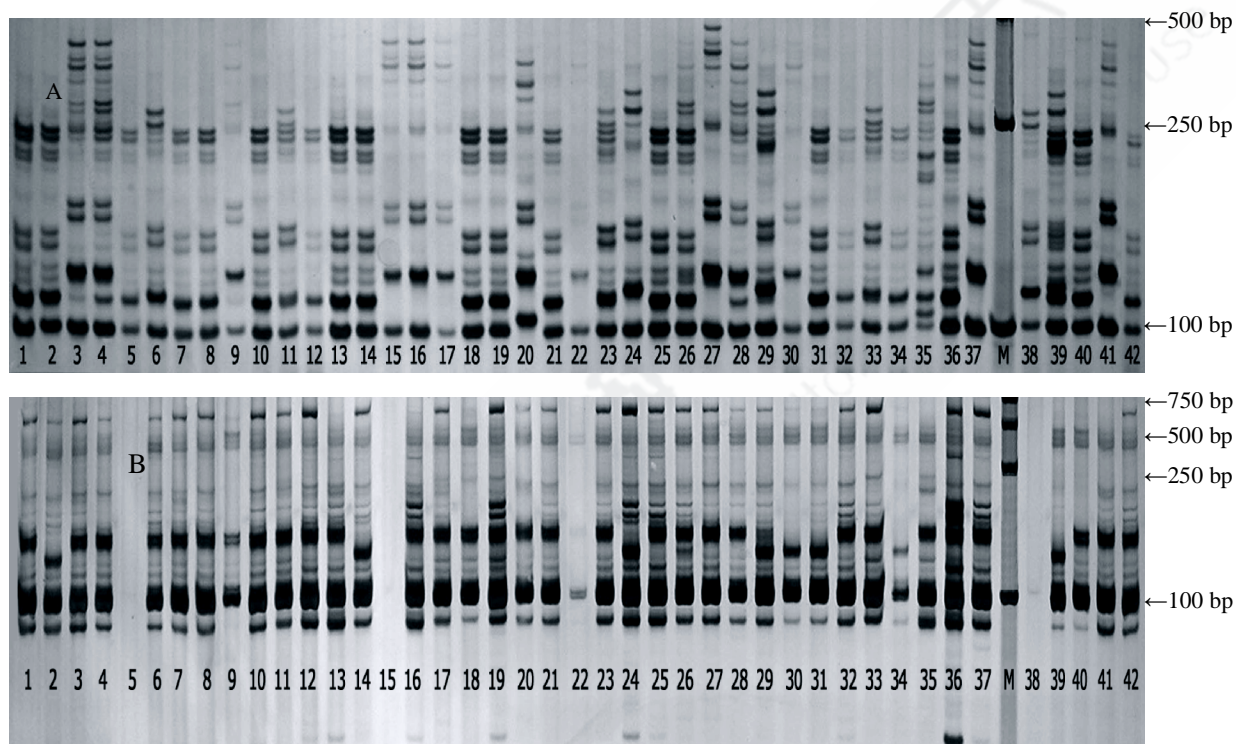
图 1 42 个早熟棉品种 SSR 聚类树状图

Fig.1 Dendrogram of 42 earliness cotton cultivars

### 2.3 棉花品种鉴别及 SSR 指纹图谱构建

所获得的 52 对具有多态性的 SSR 引物均可以用于新疆早熟棉品种的鉴别。引物 JESPR153 检测出清晰的条带数和多态性位点数最多,分别为 26 个和 24 个(图 2A),能够鉴别出 16 个品种;引物 TML05 检测出的条带数和多态性位点次数次之,分别为 20 个和 19 个(图 2-B),能鉴别出 19 个品种。单一引物均不能将所有新疆早熟棉品种区别开。

为了进一步提高鉴别能力,将引物 JESPR153、TML05 扩增的产物混合在一起进行品种的鉴别和指纹图谱分析<sup>[12]</sup>,如图 3 所示,2 个引物的扩增混合物能鉴定的位点数为 32 个,能够将 42 个棉花品种完全区分开。分别以 1 和 0 代表某个扩增出多态性 DNA 带的出现和缺失,按照条带片段从上到下的顺序,将这些图谱转换为由 1 和 0 组成的字串,构成数字指纹图谱,可通过字串的排列顺序不同鉴定不同棉花品种(表 2)。



A:引物 JESPR153;B:引物 TML05;1-42 分别代表新陆早 1 号-新陆早 42 号;M:分子量 Marker;下同。

图 2 SSR 引物对 42 个棉花品种的扩增结果

Fig.2 The PCR amplified results using SSR primer on forty-two cultivars of cotton

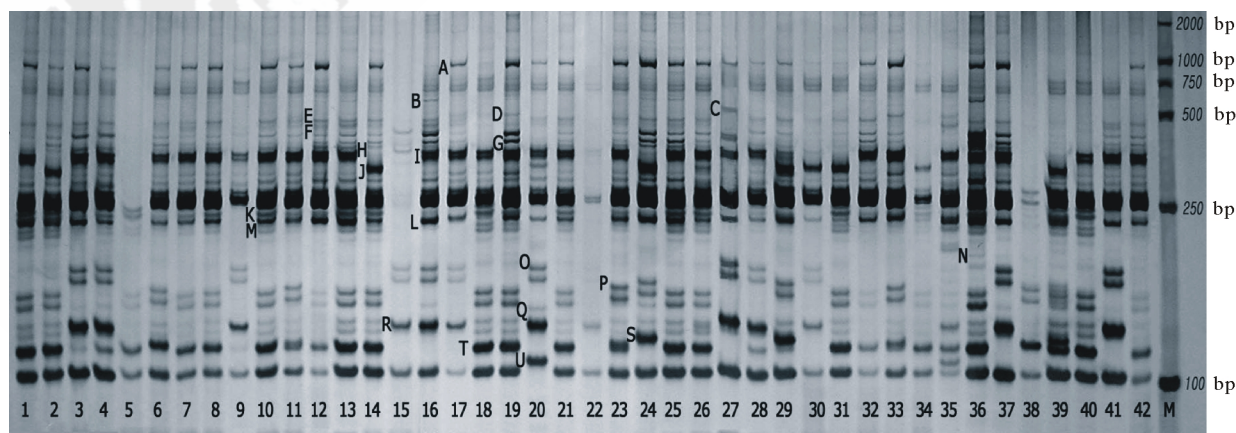


图 3 引物 JESPR153 和引物 TML05 对 42 个棉花品种的扩增结果

Fig.3 The PCR result using primer JESPR153 and TML05 on 42 cotton cultivars

表2 新疆早熟棉品种的数字指纹图谱

Table 2 The numbered finger printing of 42 earliness cotton cultivars

序号	材料名称	A-G	H-N	O-U	序号	材料名称	A-G	H-N	O-U
1	新陆早 1 号	1000100	0101110	0000010	22	新陆早 22 号	0000000	0000000	0001000
2	新陆早 2 号	1000101	1011110	0000010	23	新陆早 23 号	1000111	1101110	0100010
3	新陆早 3 号	1000110	1100100	1001000	24	新陆早 24 号	1100101	1010100	0000100
4	新陆早 4 号	1000100	1101110	1001010	25	新陆早 25 号	1100111	1101110	0000010
5	新陆早 5 号	0000000	0001000	0000010	26	新陆早 26 号	1000101	1111110	0000010
6	新陆早 6 号	1000101	0100100	0100010	27	新陆早 27 号	0010000	0100100	1001000
7	新陆早 7 号	1000111	0101100	0000010	28	新陆早 28 号	1000100	0100100	1001010
8	新陆早 8 号	1000101	1101110	0000010	29	新陆早 29 号	1000101	1110100	0000110
9	新陆早 9 号	0000000	0100000	1001000	30	新陆早 30 号	0000100	0010100	1001000
10	新陆早 10 号	1000110	1101100	0000010	31	新陆早 31 号	0000101	0011110	0000010
11	新陆早 11 号	1000110	0101100	0100010	32	新陆早 32 号	1000101	1100100	0000010
12	新陆早 12 号	1000111	1101100	0000010	33	新陆早 33 号	1001001	0100100	0100010
13	新陆早 13 号	0000111	1101110	0000010	34	新陆早 34 号	0000000	0010000	0000010
14	新陆早 14 号	1000101	1011110	0000010	35	新陆早 35 号	0001010	0100110	0001011
15	新陆早 15 号	0000000	0000000	1001000	36	新陆早 36 号	1000101	0101111	0000010
16	新陆早 16 号	0100111	1100100	1001000	37	新陆早 37 号	1000101	1100100	1001000
17	新陆早 17 号	1001111	0100100	1001000	38	新陆早 38 号	0000000	0000000	0100010
18	新陆早 18 号	0000000	0101010	0000010	39	新陆早 39 号	0000000	0011110	0100110
19	新陆早 19 号	1001011	0101110	0000010	40	新陆早 41 号	0000000	0101010	0000010
20	新陆早 20 号	1000100	0100100	1011001	41	新陆早 41 号	0000111	0100100	1001000
21	新陆早 21 号	1000111	1101110	0000010	42	新陆早 42 号	1000101	0100100	0010010

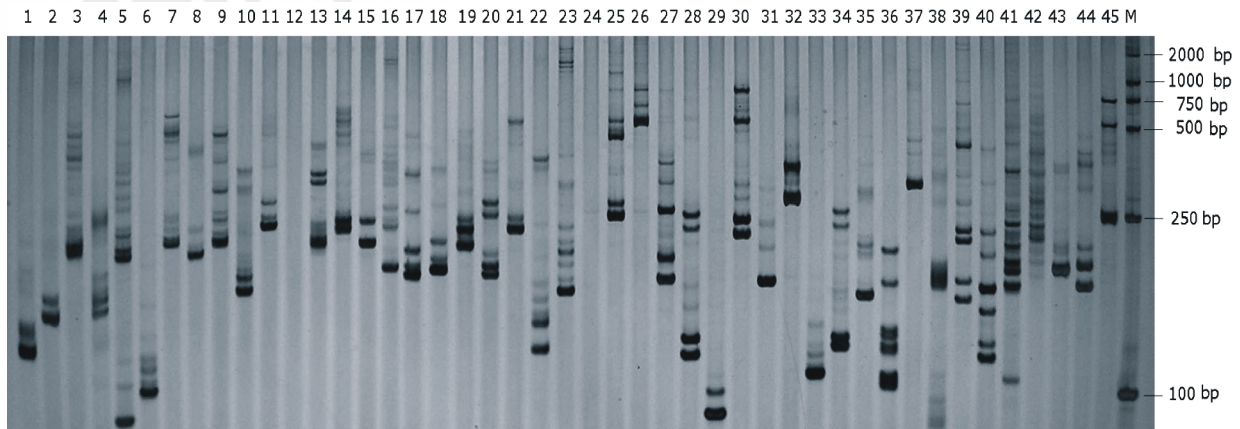
#### 2.4 早熟陆地棉品种的 SSR 指纹特征图谱构建

理论上,所用的多态性引物越多,品种的鉴别越准确可靠。为了方便、准确地鉴定新疆早熟陆地棉品种,并为以后新育成品种(系)的鉴定提供一种标准,本研究用入选的 52 对多态性 SSR 引物分别对每一个品种进行扩增,构建该品种的 SSR 特征指纹图谱(图 4)。根据每对引物的多态性计算图谱的置信概率为  $4.52 \times 10^{-74[13]}$ ,这个指纹

图谱可以用作该品种真伪的鉴定依据。

### 3 结论与讨论

SSR 标记的等位基因变异来源于基因组 DNA 复制时的滑动、不对称交换等原因引起的重复序列的变化,因而表现出高度的多态性。同时,SSR 标记相对于其它分子标记具有检测快捷、简便、稳定的特点<sup>[1]</sup>。SSR 技术是从 DNA 分子水平



M:分子量标记;1-45 分别代表引物 PM1-引物 PM45。

图 4 早熟棉品种新陆早 41 号 SSR 指纹图谱(部分)

Fig.4 The SSR fingerprinting of cotton cultivar Xinluzao No. 41

检测基因组中的遗传位点,只要基因组 DNA 序列不同,就能产生不同的 DNA 指纹。Macaulay 等发现利用 15 个多态性 SSR 可以区分 59 个遗传基础极其狭窄的日本粳稻育成品种,而利用其中 5 个,即可区分 53 个品种<sup>[14]</sup>。Russell 等在大麦的研究中发现,由 4 个 SSR 组成的 3 个不同组合均可以区分 24 个大麦品种,错误概率仅为千分之一<sup>[15]</sup>。利用杂交种双亲在一些 SSR 位点上的差异,可以将杂交种与其双亲甚至一些异源花粉造成的杂交种区分开。SSR 标记技术也被广泛用于棉花重要农艺性状 QTL 的标记与定位<sup>[16]</sup>、棉花的遗传多样性分析及杂交种纯度鉴定<sup>[17-18]</sup>。

本研究首次对利用 SSR 标记技术构建 42 个新疆早熟棉花品种指纹图谱进行了探索。试验从 2300 对引物中筛选出扩增带型稳定、多态性强、重复性好的 52 对引物进行棉花品种遗传多样性分析,每对引物可检测到 3~24 个多态性片段,共检测到 506 个,平均 9.7 个,片段大小介于 100~2000 bp 之间。对所得的 52 个 SSR 指纹图谱进行组合和综合分析,用其中两对引物就可将所有供试品种区分开来。利用多态性位点较多的 2 个引物 JESPR153、TML05 构建 42 个新疆早熟棉花品种的指纹图谱,获得指纹图谱的置信概率为 1/4294967296,即其它任何棉花品种出现与之相同指纹图谱的概率为 1/4294967296,结果稳定可靠。因此,筛选在棉花品种间具有多态性的引物,建立各品种的 SSR 指纹,可以有效地解决品种的鉴别问题。

SSR 标记对新疆早熟棉材料具有很好的区分效果,尽管许多供试材料有相似的遗传背景,但 SSR 标记仍然可检测到高水平的多态性。随着杂交棉的推广,对以鉴定杂交棉种子纯度为目的的快速、准确和易行的方法的需求十分迫切。本研究筛选出了 52 对差异性引物,利用 45 对引物分别构建了 42 个新疆早熟棉品种各自的特异指纹图谱,并建立相应的数据库,从而可以快速、准确地鉴别出各个品种的真伪,为今后大容量快速鉴别棉花种子的真伪奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] 李育强,陈浩东,洪亚辉,等. 湘杂棉 SSR 指纹图谱的构建及应用[J]. 棉花学报, 2009, 21 (3): 175-178.
- [2] 吴渝生,杨文鹏,郑用琰. 3 个玉米杂交种和亲本 SSR 指纹图谱的构建[J]. 作物学报, 2003, 29(4): 496-500.
- [3] YAO Qi-lun, Yang Ke-cheng, Pan Guang-lang, et al. Genetic diversity of maize (*Zea mays* L.) landraces from southwest china based on SSR data[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2007, 34(9): 851-860.
- [4] 张晓丽,郭 辉,王海岗,等. 中国普通野生稻与栽培稻种 SSR 多样性的比较分析[J]. 作物学报, 2008, 34(4): 591-597.
- [5] 张亦红,张 京. 大麦品种资源遗传多样性的 SSR 标记评价[J]. 麦类作物学报, 2008, 28(2): 214-219.
- [6] WANG Hai-yan, Wang Xiu-e, Chen Pei-du, et al. Assessment of genetic diversity of Yunnan, Tibetan, and Xinjiang wheat using SSR marker[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2007, 34(7): 623- 633.
- [7] 马 轩,杜雄明. 提取棉花基因组 DNA 的一点探讨[J]. 棉花学报, 2004, 16(1):40-43.
- [8] REDDY O U K, Pepper A E, Abdurakhmonov I, et al. New dinucleotide and trinucleotide microsatellite markers resources for cotton genome research[J]. Cotton Science, 2001, 5: 103-113.
- [9] 田海燕,田新惠,李艳军,等. 棉花 DNA 的提取及其 SSR 分子标记体系的建立[J]. 石河子大学学报:自然科学版, 2007, 25(2): 150-152.
- [10] 宋国立,张春庆,贾继曾,等. 棉花 AFLP 银染技术及品种指纹图谱应用初报[J]. 棉花学报, 1999, 11(6): 281-283.

- [11] 付瑜华,李 杰,王海燕,等. 木薯商业品种的指纹图谱构建[J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(1): 51-55.  
FU Yu-hua, Li Jie, Wang Hai-yan, et al. Establishment of fingerprints for several commercial cultivars in cassava[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2007, 8(1): 51-55.
- [12] 全志武,汪 静,潘 磊,等. 10 个藕莲品种 SSR 指纹图谱的构建与品种鉴别[J]. 中国蔬菜, 2008(3): 15-17.  
QUAN Zhi-wu, Wang Jing, Pan Lei, et al. Construction of fingerprinting map and identification of cultivars for ten rhizome lotus cultivars by SSR markers[J]. China Vegetable, 2008(3): 15-17.
- [13] 艾呈祥,余贤美,马国斌,等. 甜瓜杂交种 SSR 指纹图谱的构建[J]. 果树学报, 2006, 23(3): 415-419.  
AI Cheng-xiang, Yu Xian-mei, Ma Guo-bin, et al. Establishment of fingerprinting for melon hybrids by SSR markers[J]. Journal of Fruit Science, 2006, 23(3): 415-419.
- [14] RUSSELL J R, Fuller J D, Macaulay M, et al. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs[J]. Theor Appl Genet, 1997, 95: 714-722.
- [15] RUSSELL J R, Fuller J D, Young G, et al. Discrimination between barley genotypes using microsatellite markers [J]. Genome, 1997, 40: 442-450.
- [16] 殷剑美,武耀廷,张 军,等. 陆地棉产量性状 QTLs 的分子标记及定位[J]. 生物工程学报, 2002, 18(2): 162-166.  
YIN Jian-mei, Wu Yao-ting, Zhang Jun, et al. Tagging and mapping of QTLs controlling lint yield and yield components in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) using SSR and RAPD markers[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2002, 18(2): 162-166.
- [17] 武耀廷,张天真,郭旺珍,等. 陆地棉品种 SSR 标记的多态性及用于杂交种纯度检测的研究 [J]. 棉花学报, 2001, 13(3): 131-133.  
WU Yao-ting, Zhang Tian-zhen, Guo Wang-zhen, et al. Detecting polymorphism among upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars and their roles in seed purity of hybrids with SSR markers[J]. Acta Gossypii Sinica, 2001, 13(3): 131-133.
- [18] 易成新,张天真. 分子标记用于棉花杂交种纯度测验的初步研究[J]. 棉花学报, 1999, 11(6): 318-320.  
YI Cheng-xin, Zhang Tian-zhen. Preliminary studies on molecular marker used in purity test of hybrid seeds in upland cotton [J]. Acta Gossypii Sinica, 1999, 11(6): 318-320. ●