

毕清芮, 马新院, 薛玉冉, 等. 基于 SSR 标记的 MCID 法鉴定新疆地方梨品种及其遗传多样性分析[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(10): 1933-1941.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.10.018

基于 SSR 标记的 MCID 法鉴定新疆地方梨品种及其遗传多样性分析

毕清芮¹, 马新院¹, 薛玉冉¹, 樊国全², 王邵鹏², 牛莹莹¹

(1.新疆农业大学园艺学院/特色果树研究中心, 新疆 乌鲁木齐 830052; 2.新疆农业科学院轮台果树资源圃, 新疆 轮台 841600)

摘要: 为深入探究新疆地方梨品种的遗传关系, 本研究采用简单重复序列(SSR)标记技术对 28 个新疆地方梨品种进行遗传多样性分析。同时, 利用人工绘制品种鉴别示意图(MCID)法建立品种鉴定图(CID)。结果表明, 新疆地方梨品种间遗传差异较小, 遗传分化为中等程度。通过构建新疆地方梨品种的聚类树状图, 发现 28 个新疆地方梨品种具有较高的遗传多样性, 遗传相似性系数为 0.52~0.98。群体结构分析结果表明, 最佳群体群组数值(K)=3 时新疆地方梨品种被划分为 3 个组, 各品种之间存在普遍的基因交流。采用 MCID 法构建新疆地方梨品种的 CID 图谱, 并验证了该方法的有效性。本研究结果可为今后梨种质资源评价和利用提供理论依据。

关键词: 梨; 简单重复序列(SSR); 遗传多样性; 品种鉴定

中图分类号: S661.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)10-1933-09

Identification of local pear cultivars in Xinjiang Uygur Autonomous Region by MCID method based on SSR markers and analysis of their genetic diversity

BI Qingrui¹, MA Xinyuan¹, XUE Yuran¹, FAN Guoquan², WANG Shaopeng², NIU Yingying¹

(1. College of Horticulture, Xinjiang Agricultural University/Research Center of Featured Fruit Trees, Urumqi 830052, China; 2. Luntai Fruit Tree Resource Nursery, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Luntai 841600, China)

Abstract: To further explore the genetic relationship of local pear cultivars in Xinjiang Uygur Autonomous Region, the genetic diversity of 28 local pear cultivars was analyzed by simple sequence repeat (SSR) marker technology. At the same time, the cultivar identification diagram (CID) was established by manual cultivar identification diagram (MCID). The results showed that the genetic differences among the local pear cultivars in Xinjiang Uygur Autonomous Region were small, and the genetic differentiation was moderate. By constructing the clustering tree diagram of local pear cultivars in Xinjiang Uygur Autonomous Region, it was found that 28 local pear cultivars had high genetic diversity, and the genetic similarity coefficient ranged from 0.52 to 0.98. The results of population structure analysis showed that the local pear cultivars in Xinjiang Uygur Autonomous Region were divided into three groups when the best group value (K) was three, and there was a general gene exchange among cultivars. The CID of Xinjiang local pear cultivars was constructed by MCID method, and the effectiveness of the method was verified. The results of this study provide a theoretical basis for the evaluation and utilization of pear germplasm resources in the future.

Key words: pear; simple sequence repeat (SSR); genetic diversity; cultivars identification

收稿日期: 2023-11-18

基金项目: 新疆维吾尔自治区天池博士计划项目; 新疆维吾尔自治区
高校基本科研业务费科研项目(XJEDU2022P045)

作者简介: 毕清芮(1998-), 女, 新疆塔城人, 硕士研究生, 研究方向
为果树种质资源。(E-mail) bb957707@163.com

通讯作者: 牛莹莹, (E-mail) 1170791833@qq.com

梨属于蔷薇科(Rosaceae)梨亚科(Pomoideae)梨属(*Pyrus* SPP.), 目前得到分类学认可的梨属植物约

30 种^[1]。中国是梨属植物的重要起源地之一,拥有丰富的种质资源储备。这些种质资源在中国得到了广泛的研究和应用。新疆是梨属植物的原生分布地之一,新疆梨、白梨、秋子梨、杏叶梨、西洋梨、杜梨、木梨及褐梨都是新疆地方梨品种^[2]。随着果树生物信息学技术和分子生物学技术的不断进步,育种工作者在果树遗传多样性研究、品种鉴定、功能基因定位与注释、基因图位克隆及遗传图谱构建等方面取得了极大的研究进展,为梨的分子育种奠定了良好的基础。

简单重复序列(SSR)标记技术由 Zietkiewicz 等首次开发,具有数量丰富、多态性高、操作简便快捷、结果稳定等优点,这种标记技术能够直接揭示 DNA 分子水平上的差异,而且不受环境因素的影响^[3]。研究结果表明,SSR 标记技术对植物遗传多样性、亲缘关系、植物分类、种质资源鉴定、物种进化及基因精细定位等研究具有重要意义。SSR 在基因组中随机分布,并且数量多、重复性好、多态性丰富,在葡萄^[4]、杏^[5]、柑橘^[6]、梨^[7]、李^[8]、核桃^[9]等遗传变异程度较高的植物上均已广泛应用。为了解决品种鉴定的问题,Wang 等^[10]于 2011 年开发出一种基于 DNA 标记的植物品种快速鉴定方法-人工绘制品种

鉴别示意图(MCID)法,该方法仅需几对引物就能鉴定多个品种,该方法是对当前 DNA 标记信息分析方法的改进,它充分展现了 DNA 标记在植物品种鉴定中的独特优势。目前,MCID 法已被应用于葡萄^[11]、柿^[12]、茶树^[13]、苹果^[14]等植物品种鉴定工作中,为植物的品种鉴定提供了有效的手段。目前利用 SSR 分子标记鉴定梨品种的研究较多^[15-17],而 MCID 法的应用较少。

本研究拟以公开发表的砀山酥梨基因组为参考,对 28 份新疆地方梨种质资源的基因组重测序数据进行匹配。同时开发 SSR 标记,对 28 个新疆地方梨品种进行多样性研究,通过 MCID 法建立品种鉴别图(Cultivar identification diagram,CID)。本研究结果可为梨种质资源的鉴定、保护和利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

如表 1 所示,选取 28 个新疆地方梨品种。所有品种来自新疆农业科学院轮台果树资源圃,春季梨树展叶后,采集新鲜叶片,采用硅胶干燥剂保存叶片。

表 1 28 份供试梨品种

Table 1 Twenty-eight tested pear cultivars

编号	品种或类型(系)	分类	编号	品种或类型(系)	分类
1	褐色句句梨	新疆梨(<i>Pyrus sinkiangensis</i> Yu.)	15	库尔勒黄酸梨	砂梨(<i>Pyrus pyrifolia</i> Nakai.)、新疆梨(<i>Pyrus sinkiangensis</i> Yu.)
2	轮台句句梨	新疆梨(<i>Pyrus sinkiangensis</i> Yu.)	16	艾温切可	新疆梨(<i>Pyrus sinkiangensis</i> Yu.)、西洋梨(<i>Pyrus communis</i> L.)
3	霍城句句梨	新疆梨(<i>Pyrus sinkiangensis</i> Yu.)	17	莎车耐西普特	新疆梨(<i>Pyrus sinkiangensis</i> Yu.)
4	黄句句梨	新疆梨(<i>Pyrus sinkiangensis</i> Yu.)	18	霍城冬黄梨	白梨(<i>Pyrus bretschneideri</i> Rehd)
5	伊犁红句句梨	新疆梨(<i>Pyrus sinkiangensis</i> Yu.)	19	八月梨	白梨(<i>Pyrus bretschneideri</i> Rehd)
6	库车阿木特	新疆梨(<i>Pyrus sinkiangensis</i> Yu.)	20	酸秤砣	白梨(<i>Pyrus bretschneideri</i> Rehd)
7	绿梨	新疆梨(<i>Pyrus sinkiangensis</i> Yu.)	21	棋盘梨	白梨(<i>Pyrus bretschneideri</i> Rehd)
8	耐西普特	新疆梨(<i>Pyrus sinkiangensis</i> Yu.)、白梨(<i>Pyrus bretschneideri</i> Rehd)	22	塔西阿木特	白梨(<i>Pyrus bretschneideri</i> Rehd)
9	阿克苏句句梨	新疆梨(<i>Pyrus sinkiangensis</i> Yu.)	23	奎可阿木特 1 号	新疆梨(<i>Pyrus sinkiangensis</i> Yu.)、西洋梨(<i>Pyrus communis</i> L.)
10	莎车晚红香	新疆梨(<i>Pyrus sinkiangensis</i> Yu.)	24	奎可阿木特 2 号	新疆梨(<i>Pyrus sinkiangensis</i> Yu.)、西洋梨(<i>Pyrus communis</i> L.)
11	句句梨	砂梨(<i>Pyrus pyrifolia</i> Nakai.)、西洋梨(<i>Pyrus communis</i> L.)、新疆梨(<i>Pyrus sinkiangensis</i> Yu.)	25	红香梨	西洋梨(<i>Pyrus communis</i> L.)
12	棉梨	西洋梨(<i>Pyrus communis</i> L.)	26	大果奎可阿木特	西洋梨(<i>Pyrus communis</i> L.)
13	也历克阿木特	西洋梨(<i>Pyrus communis</i> L.)	27	可特阿木特	新疆梨(<i>Pyrus sinkiangensis</i> Yu.)、西洋梨(<i>Pyrus communis</i> L.)
14	黑酸梨	砂梨(<i>Pyrus pyrifolia</i> Nakai.)、新疆梨(<i>Pyrus sinkiangensis</i> Yu.)	28	库尔勒香梨	白梨(<i>Pyrus bretschneideri</i> Rehd)、新疆梨(<i>Pyrus sinkiangensis</i> Yu.)

1.2 梨基因组 DNA 提取

利用试剂盒(天根生化科技有限公司产品,货号 DP360)提取梨幼叶中 DNA。提取的 DNA 置于 -20°C 保存备用,采用 1% 琼脂糖凝胶检验 DNA 质量。

1.3 SSR 位点搜索与引物设计

利用 BWA (Burrows-Wheeler Aligner) 软件^[18]将干净数据 (Clean data) 比对到参考基因组序列上,使用 Primer3 (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/Primer3>) 进行引物设计,用 Oligo5.0 软件 (<http://www.oligoarchitect.com/>) 对引物进行评估^[19]。引物合成由上海生物工程股份有限公司完成。

1.4 PCR 扩增与产物的检测

从 17 216 条引物中随机挑选 104 条引物,用于 PCR 扩增,PCR 扩增产物用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

1.5 利用 SSR 标记技术分析遗传多样性指标及分化

使用二进制的方式构建 (0, 1) 矩阵,通过 Datatrans 2007 宏程序^[20]转换数据格式,并采用 POPGENE version 2.0^[21] 和 GenAlEx 6.50 软件^[22] 对基因型数据进行计算分析。分析指标包括观测等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、Nei's 基因多样性指数 (H) 以及 Shannon's 多样性指数 (I) 和固定指数 (F)。利用 PowerMarker ver 3.25^[23] 进行杂合度和多态信息含量 (PIC) 分析,同时确定了最小等位基因频率 (MAF) 和遗传多样性。最后,利用 NTSYS-pc 程序中的 UPGMA (Unweighted pair-group method with arithmetic means) 生成系统树^[24]。利用 STRUCTURE 2.3.4^[25] 分析最佳群体群组数值 (K),从 $K=2$ 运行到 $K=10$,每次运行迭代 10 次。最佳 K 值使用在线工具 Structure Harvester ([https://taylor0.biolgy.ucla.edu/structure Harvester](https://taylor0.biolgy.ucla.edu/structure%20Harvester)) 估算。

1.6 利用 SSR 标记技术构建 CID 图谱

用 100 对引物扩增梨基因组 DNA,选取扩增出的条带分辨率高、重复性好的 10 对引物,将清晰、多态性好的条带用于品种鉴定,采用上述 10 对引物引物用于 PCR 扩增。

使用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶,在 DYCZ-30 型电泳槽中电泳,电压 200 V,电流 100 mA,电泳 90 min。通过银染显色,并拍照记录凝胶图像。条带清

晰,多态性好的引物被用于品种鉴定。当某个引物的指纹图谱中存在特定条带时,将其单独分离出来,并将具有相同条带模式的品种归为同一亚群。随着越来越多的具有多态性特异引物的应用,直到最后一个品种被成功分离。

1.7 MCID 可重复性检验

参照刘更森^[14]的方法,随机选择 3 组梨品种验证 MCID 的可重复性。

2 结果与分析

2.1 SSR 位点分布及特点

在梨基因组序列中共搜索到 43 310 个 SSR 位点,其中,单核苷酸重复的 SSR 位点有 4 种,二核苷酸重复的 SSR 位点有 12 种,三核苷酸重复的 SSR 位点有 60 种,四核苷酸重复的 SSR 位点有 180 种,五核苷酸重复的 SSR 位点有 387 种,六核苷酸重复的 SSR 位点有 778 种。6 种 SSR 类型中,单核苷酸重复的 SSR 有 20 621 个,占总 SSR 的 47.61%;二核苷酸重复的 SSR 位点有 14 419 个,占总 SSR 的 33.29%;三核苷酸重复的 SSR 有 3 538 个,占总 SSR 的 8.17%;四核苷酸重复的 SSR 有 2 414 个,占总 SSR 的 5.57%;五核苷酸重复的 SSR 有 1 212 个,占总 SSR 的 2.80%;六核苷酸重复的 SSR 有 1 106 个,占总 SSR 的 2.55% (图 1)。

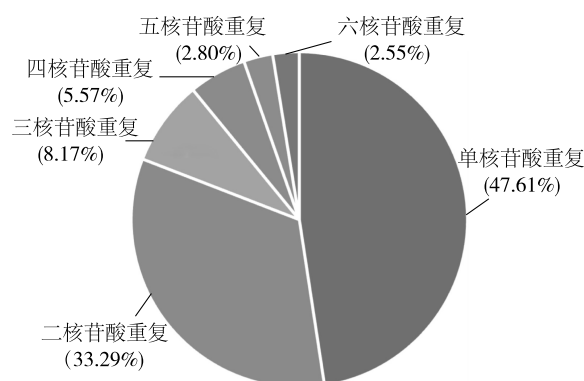


图 1 梨基因组不同类型简单重复序列 (SSR) 的占比

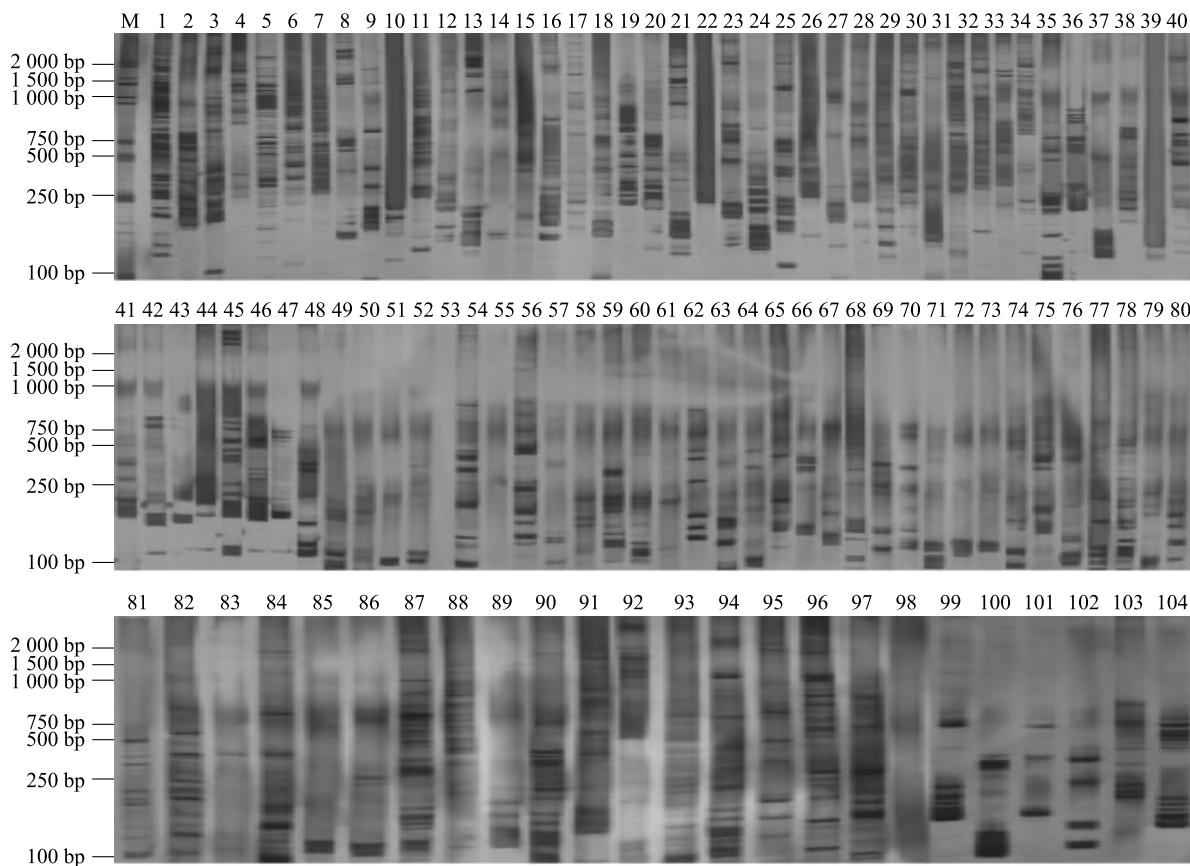
Fig.1 Proportion of different types of simple sequence repeats (SSRs) in pear genome

2.2 SSR 标记开发及多态性分析

采用 Primer3.0 软件进行引物批量设计,共得到引物 61 621 对,对基因型与参考基因组存在差异的 SSR 标记进一步筛选,得到 17 216 对,从中随机选择

均匀分布在 17 条染色体的 104 对 SSR 引物合成。如图 2 所示,用砀山酥梨 DNA 模板进行筛选,其中

100 对引物显示出了多态性,引物多态性占比为 96.15%。



M:DNA 标准分子量;1~104;第 1~104 号引物。

图 2 104 对引物扩增结果

Fig.2 Amplification results of 104 pairs of primers

2.3 遗传多样性及 UPGMA 聚类分析

如表 2 所示,以条带清晰、重复性好为原则筛选 10 对引物。10 对引物的观测等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、Nei's 基因多样性指数 (H) 及 Shannon's 信息指数 (I) 的平均值分别为 2.000、1.540、0.326、0.496。全基因组 SSR 标记的最小等位基因频率 (MAF) 的平均值为 0.771,遗传多样性平均值为 0.320,多态性信息含量 (PIC) 平均值为 0.260,固定指数 (F) 的平均值为 0.169,说明 28 个品种间的遗传分化为中等程度。如图 3 所示,利用 NTSYS-pc2.0 软件构建了 28 个梨品种的聚类图,遗传相似性系数 (GS) 为 0.52~0.98,表明梨品种具有较高的遗传多样性。当遗传相似系数为 0.52 时,28 个品种被分为 2 类,第 1 类包括 26 个品种,第 2 类包括耐西普特和库尔勒香梨 2

个品种。在第 1 类中,分类存在分歧的可特阿木特在遗传相似系数为 0.72 时与其他品种分开,表明该品种在遗传进化的过程中与新疆梨和西洋梨发生基因交流的程度较小。当 GS 为 0.95 左右时,句句梨与绿梨聚为一类。遗传相似系数为 0.85 左右时,奎可阿木特 1 号与伊犁红句句梨、库车阿木特聚为一类;当 GS 为 0.91 左右时,奎可阿木特 1 号与伊犁红句句梨、库车阿木特分离。当 GS 为 0.80 左右时,莎车晚香红与黑酸梨、库尔勒黄酸梨聚为一类;当 GS 为 0.89 左右时,黑酸梨与库尔勒黄酸梨聚为一类,莎车晚香红单独成一类。当 GS 为 0.92 时,分类存在分歧的艾温切可与归属于新疆梨系统的莎车耐西普特聚为一类。表明在基因进化的过程中,各品种间可能存在很大程度的基因交流。

表 2 10 对核心引物
Table 2 Ten pairs of core primers

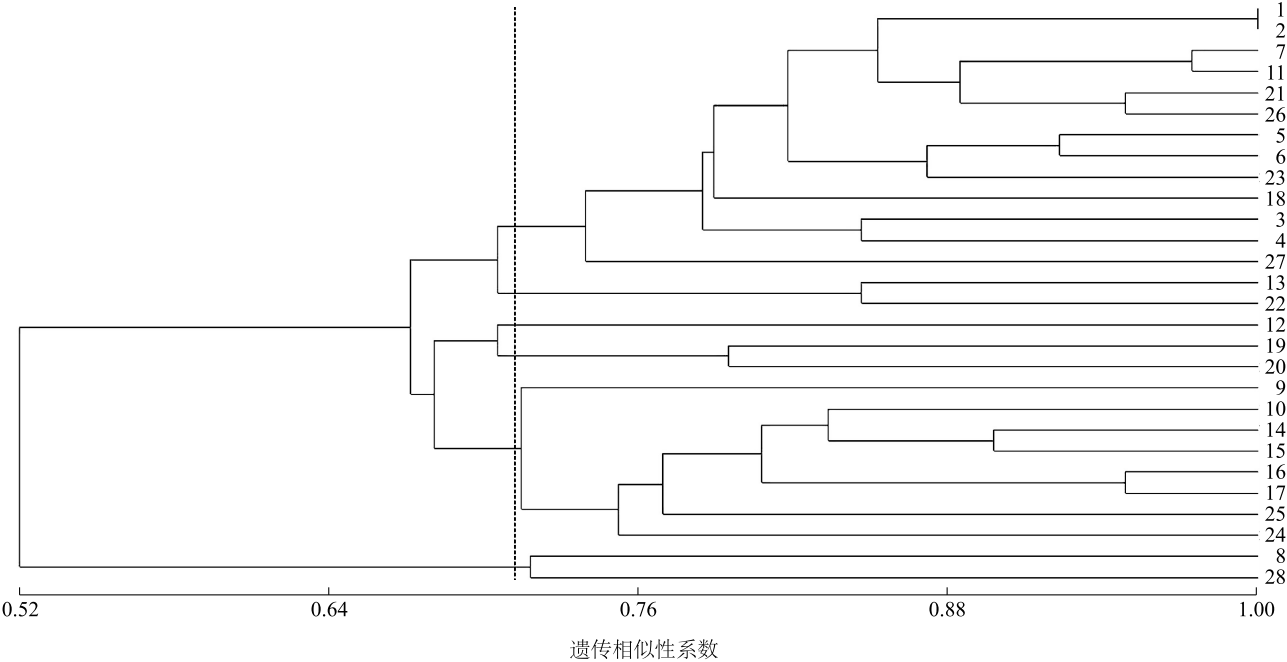
引物编号	引物序列(5'→3')	解链温度(℃)
Y1290	GGTCCTCAGAAGTTGGTGA	59.5
	CGGCCTACTGTTTCTCGGTT	
Y128	TGAGGGACAGAGCAACATCA	59.3
	AGGCATCCCATTGGACAGTTG	
Y480	GCACTACCCGTTAGAAATACTGG	59.5
	TCCAGTCTCGAGTCAACCACA	
Y809	AACGTTGAATTGTGGGTGCA	58.0
	CCAGTGGCTTGCTACATATCT	
Y632	ACCAGAAGTTTCAGGCATGT	58.7
	AGTGCCTTCTCCTTCTGGGA	
Y428	TCCGTAAACCTAGCCATTCCA	59.3
	TTCTCTACTAACTCAGCCGCC	
Y416	AGGATCACTTCCCTGGACAA	57.4
	ACCTGTAAAGAGTGCACAGT	
Y478	AGAACCAACCCACATACCCA	59.3
	CTCTCTTCTCCCTCCCTCC	
Y35	ACACAGAGATGTTTGCACACA	59.3
	TAGGTGGCTGTCATTGCGTG	
Y1120	AGGTGGCAGAAACCAAAACA	59.0
	TTTGTGTCCCAAGCGACGTA	

2.4 基于 SSR 遗传多态性的群体结构分析

如图 4 所示,取 ΔK (相邻 K 值的对数似然值变化率)最大值对应的 K 值(最佳群体群组数值)为最优值, ΔK 最大时 $K=3$,即 28 个新疆地方梨品种可划分为 3 个组,由图 5 可以看出,3 个组中都有混合现象,说明新疆地方梨品种之间存在不同程度的基因渗透。其中第一组和第三组混合结果有一定的相似性。

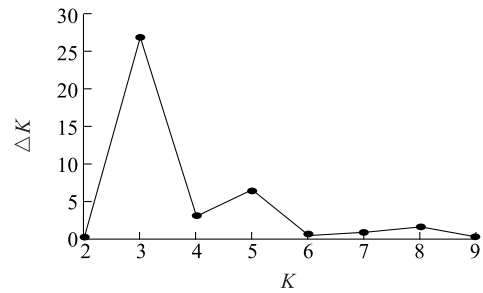
2.5 MCID 法绘制 CID 图谱

利用 10 对 SSR 引物对 28 个新疆地方梨品种进行鉴定,使用(0,1)矩阵进行条带统计。如图 6 所示,利用引物 Y1920 扩增梨基因组 DNA,其中 11 个地方梨品种扩增出了清晰、可重复的大小为 105 bp 和 115 bp 的条带,11 个地方梨品种包括褐色句句梨、轮台句句梨、霍城句句梨、黄句句梨、伊犁红句句梨、库车阿木特、绿梨、句句梨、霍城名名梨梨、棋盘梨、奎可阿木特 1 号,引物 Y1920 将 28 个新疆地方梨品种分成 2 组。引物 Y128 可进一步将 2 组新疆地方梨品种分为 4 组。库车阿木特、霍城冬黄梨、奎可阿木特 1 号扩增出 100 bp 大小的条带,与褐色句



编号 1~28 的梨品种见表 1。
图 3 28 个梨种质的 UPGMA 聚类分析
Fig.3 UPGMA clustering analysis of 28 pear germplasms

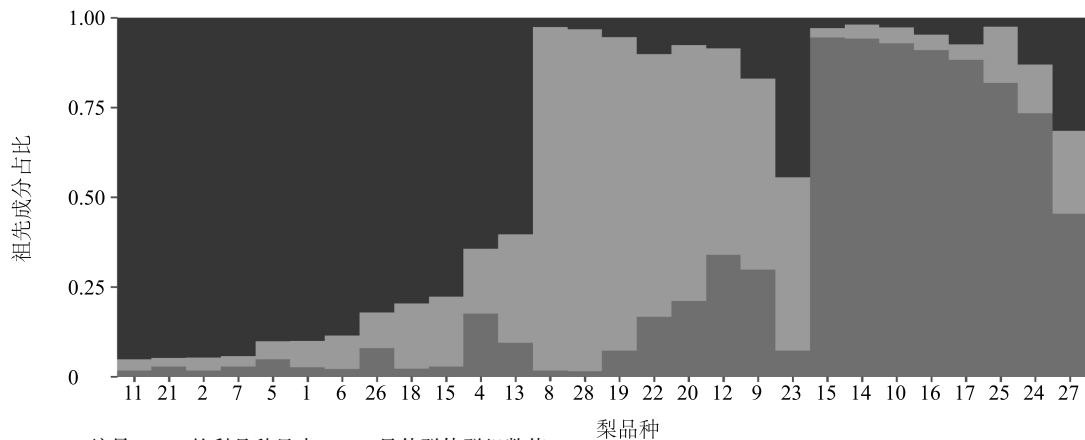
句梨、轮台句句梨、黄句句梨、伊犁红句句梨、绿梨、句句梨、霍城句句梨、棋盘梨区分开。引物 Y480 进一步将库车阿木特单独区分出来;利用引物 Y632 扩增霍城冬黄梨、奎可阿木特 1 号基因组 DNA,霍城冬黄梨产生大小为 225 bp 的条带,奎可阿木特 1 号产生大小为 210 bp 的条带。以此类推,直至所有品种被完全分离。如图 6 所示,28 个品种间均存在差异,但其差异较小,可能是由于各品种间的亲缘较近。



K :最佳群体群组数值; ΔK :相邻 K 值的对数似然值变化率。

图 4 K 值与 ΔK 的关系

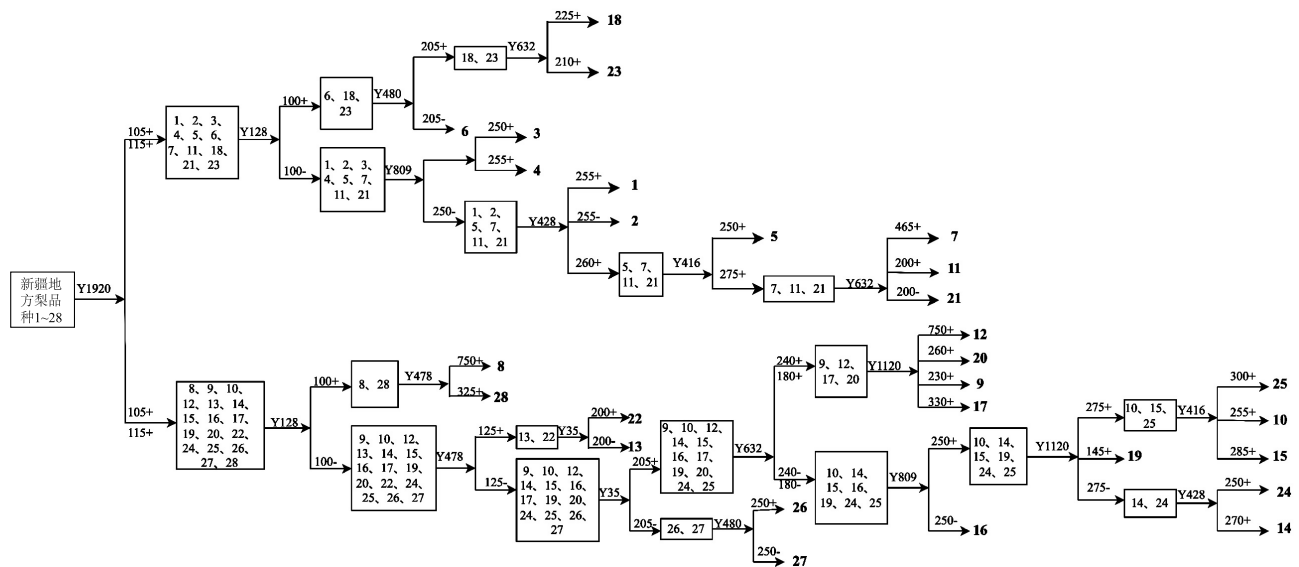
Fig.4 The relationship between K and ΔK



编号 1~28 的梨品种见表 1。 K :最佳群体群组数值。

图 5 新疆地方梨的群体结构分析 ($K=3$)

Fig.5 Analysis of population structure of local pears in Xinjiang Uygur Autonomous Region ($K=3$)



编号 1~28 的梨品种见表 1。引物 Y1290、Y128、Y480、Y809、Y632、Y428、Y416、Y478、Y35、Y1120 见表 2。+表示扩增出该条带,-表示为未扩增出该条带。加粗字体表示被完全分离出的品种。

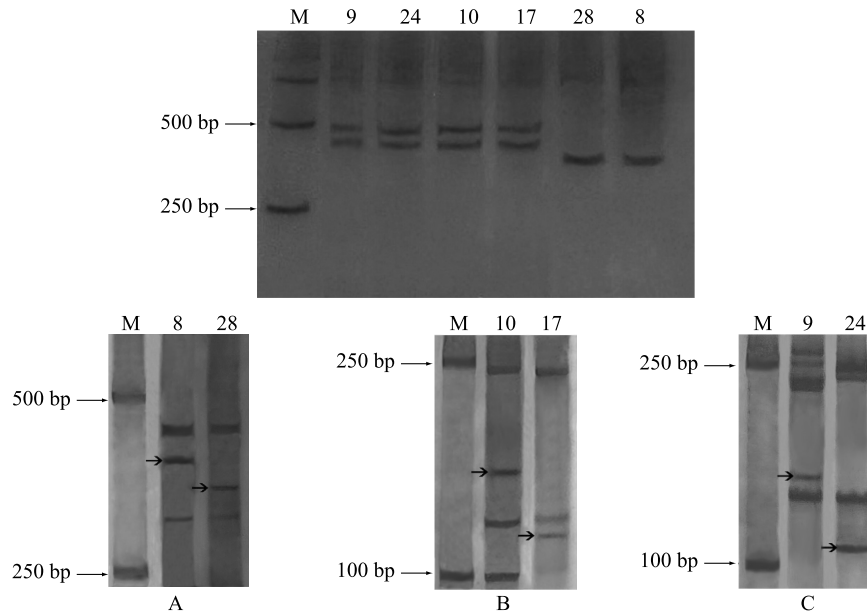
图 6 10 对简单重复序列 (SSR) 引物鉴别 28 个新疆地方梨品种的品种鉴定图谱 (CID)

Fig.6 Cultivar identification diagram (CID) of 28 local pear cultivars in Xinjiang Uygur Autonomous Region identified by 10 pairs of simple sequence repeat (SSR) primers

2.6 MCID 法可重复性检验

如图 7 所示,根据 CID 图谱选取库尔勒香梨、耐西普特、阿克苏句句梨、莎车耐西普特、莎车晚香红、奎可阿木特 2 号,利用引物 Y35 扩增基因组 DNA,6 个品种被分为 2 组。第 1 组为阿克苏句句梨、莎车耐西普特、莎车晚香红、奎可阿木特 2 号,扩增出 500 bp 条带;第 2 组为库尔勒香梨和耐西普特,扩增

出 430 bp 条带。引物 Y128 将 A 组库尔勒香梨(380 bp)和耐西普特(400 bp)区分开,在将莎车耐西普特(140 bp)和莎车晚香红(180 bp)区分开,将奎可阿木特 2 号(110 bp)和阿克苏句句梨(160 bp)区分开。本结果与 CID 预期结果一致,这 6 个品种都被区分出来。



M: DNA 标准分子量;9:阿克苏句句梨;24:奎可阿木特 2 号;10:莎车晚香红;17:莎车耐西普特;28:库尔勒香梨;8:耐西普特。箭头所指为目标条带。

图 7 6 个梨品种的简单重复序列 (SSR) 引物扩增条带

Fig.7 Simple sequence repeat (SSR) primer amplified bands of six pear cultivars

3 讨论

梨资源丰富,品种繁多,并且形态受环境等因素影响,仅用形态学方法难以在较短时间内对梨品种进行准确分类鉴定,利用分子标记可以实现快速高效的遗传多样性及品种鉴定,获得品种间的遗传相似度及亲缘关系^[26]。本研究基于 28 个新疆地方梨基因组测序数据检测到 43 310 个 SSR 位点,其中六核苷酸重复的类型最多,为 778 种。将新疆地方梨基因组与参考基因组比对,筛选出引物 61 621 对,进一步筛选得到 17 216 对引物,随机选择 104 对进行合成开发,聚丙烯酰胺凝胶电泳结果显示 100 对引物扩增的条带清晰度较好。部分引物可能由于特异性不高等原因条带扩增效果差^[27]。

Lăcis 等^[28]利用 6 个 SSR 标记对 206 份不同来

源的梨种质资源进行基因型分析,并对其进行了遗传多样性评估,等位基因数为 15~28,杂合度为 0.519~0.956。有研究利用 8 个 SSR 位点对 141 份梨种质资源进行鉴定,同时利用 13 个梨品种公开的基因组作为参考,对 141 份梨种质资源进行亲缘关系分析。研究表明,8 对 SSR 引物共扩增出 97 个等位基因,杂合度为 0.65~0.89,聚类结果显示 141 份梨种质资源可划分为 3 个类群,群体分化系数(F_{st})为 0.074^[29]。在本研究中,观测等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、Nei's 基因多样性(H)、Shannon's 多样性指数(I)分别为 2.000、1.540、0.326、0.496。经过分析发现,这 28 个梨品种之间遗传多样性的水平相对较低;最小等位基因频率(MAF)的平均值为 0.771,遗传多样性平均指数为 0.320,多态性信息含量(PIC)平均值为

0.260,说明多态性水平较低($PIC \leq 0.5$)^[30],遗传变异水平较低。Chen等^[31]认为 $F_{st} \geq 0.15$ 为中等程度的分化, $F_{st} \geq 0.4$ 为较强程度的分化,而本研究中 F_{st} 为0.169,说明28个新疆地方梨品种间遗传分化程度为中等。聚类结果显示,遗传相似性系数为0.52~0.98,当 $GS=0.52$ 时,28个品种被分为2类,库尔勒香梨与耐西普特被聚为一类,表明这2个品种亲缘关系较近。牛莹莹^[1]基于形态学开展梨属植物亲缘关系分析,研究结果表明,库尔勒香梨、耐西普特与新疆梨亲缘关系更近,与本研究聚类结果不一致,这可能是由于基因重组表现出不同的基因型^[32]。群体遗传结构能够反映不同群体之间的遗传背景复杂程度与基因交流程度,本研究中群体结构分析结果揭示了28个新疆地方梨品种之间存在不同程度的基因渗透, ΔK 最大时 $K=3$,即28个新疆地方梨品种可被划分为3组,各品种之间普遍存在着基因交流,遗传背景显得较为复杂和多元化。

随着分子生物学的发展,DNA分子标记技术成为品种鉴定的有力工具^[33]。而基于DNA分子标记的MCID法能够直观、快速地将各个品种区分开,目前已在多种果树上应用。刘更森^[14]基于SSR分子标记结合MCID法对60个苹果品种进行鉴定,成功利用8对引物构建了这些品种的CID图谱。戚建锋等^[12]基于SSR分子标记结合MCID法,对72个柿品种进行了准确的鉴定,仅使用了6对引物成功地构建了72个柿品种的CID图谱。本研究采用MCID法,选取10对SSR引物,成功构建了28个新疆地方梨品种CID图谱。CID图谱能够更加高效、准确地进行梨品种鉴定,为梨种质资源的研究和利用提供有力支持。鉴别其他不同梨品种时,可以依托已有的CID图谱进行品种的鉴定。若遇到已有SSR引物无法区分的新品种,可以进一步增加新的引物,从而使现有的CID图谱得以扩展,形成一个更全面的CID图谱,为后续梨品种的鉴定工作奠定坚实基础。

4 结论

利用104对核心SSR标记对28个新疆地方梨品种的遗传多样性进行研究。研究结果表明,新疆地方梨品种遗传多样性较高,遗传相似性系数为0.52~0.98。聚类分析与群体结构分析结果表明,各地方梨品种之间存在基因交流,当 $K=3$ 时,28个新疆地方梨品种被划分为3组,各组之间存在混合

现象,遗传背景较为复杂。利用开发成功的SSR标记,采用MCID法构建新疆地方梨品种的CID图谱,并验证了该方法的有效性。本研究结果表明,MCID法快速、简单,结果可靠,为今后梨种质资源评价和利用提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 牛莹莹. 新疆梨属植物亲缘关系及分类研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学,2022.
- [2] CHEN X N, ZHANG M Y, SUN M Y, et al. Genome-wide genetic diversity and IBD analysis reveals historic dissemination routes of pear in China[J]. Tree Genetics & Genomes,2022,18(1):1-12.
- [3] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics,1994,20(2):176-183.
- [4] PELS Y F, BÉVILACQUA L, BLANC S, et al. A molecular marker set combining a retrotransposon insertion and SSR polymorphisms is useful for assessing diversity in *Vitis*[J]. Université de Bordeaux,2021,55(2):4473.
- [5] REZAEI M, KAVAND A R, HEMATI M. Screening by SSR markers revealed synonyms among 38 Iranian local apricot cultivars propagated by nurseries[J]. Acta Horticulturae,2021,1315:44.
- [6] CHEN P, LIU J B, WANG L, et al. Genetic background of the citrus landrace 'Huarongdao Zhoupigan' revealed by simple sequence repeat marker and genomic analyses[J]. Scientia Horticulturae,2021,289:110456.
- [7] WOLF J, KISS T, NECAS T. The use of SSRs for the identification of unknown asian pear cultivars[J]. Acta Horticulturae,2021,1307:32.
- [8] SHI Y, ZHU H H, ZHANG J W, et al. Development and validation of molecular markers for double flower of *Prunus mume*[J]. Scientia Horticulturae,2023,310:111761.
- [9] XU L L, WANG Y, YUAN X, et al. Genetic diversity and relationship analysis of 21 walnut varieties based on SSR markers[J]. Molecular Plant Breeding,2021,12(9):1-7.
- [10] WANG Y J, LI X Y, HAN J, et al. Analysis of genetic relationships and identification of flowering-mei cultivars using EST-SSR markers developed from apricot and fruiting-mei[J]. Scientia Horticulturae,2011,132(1):12-17.
- [11] 张中海,张安世,高登涛,等. 巨峰系葡萄主栽品种的SRAP遗传多样性分析与MCID法快速鉴定[J]. 东北农业科学,2022,47(4):38-42.
- [12] 戚建锋,李晓鹏,王文然,等. 利用基于SSR标记的MCID法鉴定72个柿地方品种[J]. 植物遗传资源学报,2018,19(5):895-903.
- [13] 黄丹娟,马建强,马春雷,等. 基于SSR荧光标记的MCID快速鉴定13个湖北茶树品种[J]. 南方农业学报,2018,49(6):

- 1045-1052.
- [14] 刘更森. 苹果 SSR 和 SNP 标记开发及在遗传图谱构建和品种鉴定中的应用[D]. 长沙:湖南农业大学,2018.
- [15] 王 斐,张艳杰,欧春青,等. 梨品种 SSR 分子鉴定体系的建立及应用[J]. 分子植物育种,2021,19(22):7499-7509.
- [16] 赵瑞娟. 梨品种 SSR 特征指纹数据表构建与应用[D]. 北京:中国农业科学院,2017.
- [17] 赵瑞娟,薛华柏,王 磊,等. 梨属植物 SSR 分子标记核心引物的筛选及其聚类分析[J]. 果树学报,2017,34(10):1229-1238.
- [18] HENG L, RICHARD D. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform [J]. Bioinformatics, 2009, 25(14):1754-1760.
- [19] LIU G S, ZHANG Y G, TAO R, et al. Identification of apple cultivars on the basis of simple sequence repeat markers[J]. Genetics and Molecular Research,2014,13(3):7377-7387.
- [20] 盖红梅. SSR 数据处理宏程序 DataTrans 1.0[J]. 分子植物育种,2011:1359-1365. DOI:10.5376/mpb.cn.2011.09.0048.
- [21] YEH F C, BOYLE T J B. Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits [J]. Belgian Journal of Botany,1997,129:157.
- [22] PEAKALL R, SMOUSE P E. GenAlEx 6.5:genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update[J]. Bioinformatics,2012,28(19):2537-2549.
- [23] KEJUN L, MUSE S V. PowerMarker:an integrated analysis environment for genetic marker analysis[J]. Bioinformatics,2005, 21(9): 2128-2129.
- [24] 刘清文,宋 跃,李甲明,等. 利用核心简单重复序列(SSR)标记分析西洋梨品种资源遗传多样性[J]. 农业生物技术学报,2015,23(5):579-587.
- [25] RAJ A, STEPHENS M, PRITCHARD J K. FastSTRUCTURE: variational inference of population structure in large SNP data sets [J]. Genetics,2014, 197(2):573-589.
- [26] 齐 丹,曹玉芬,胡红菊,等. 中国南方 154 份梨地方品种基于 SSR 标记的遗传多样性与群体结构分析[J]. 中国南方果树,2023,52(5):104-110,122.
- [27] 贺 丹,吴芳芳,张佼蕊,等. 牡丹转录组 SSR 信息分析及其分子标记开发[J]. 江苏农业学报,2019,35(6):1428-1433.
- [28] LĀCIS G, KOTA-DOMBROVSKA I, KĀRKLIŅA K, et al. Genetic diversity and relatedness of Latvian *Pyrus* germplasm assessed by a set of SSR Markers[J]. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences,Section B: Natural,Exact, and Applied Sciences,2022, 76(4):438-447.
- [29] MIRANDA C, URRESTARAZU J, SANTESTEBAN L G, et al. Genetic diversity and structure in a collection of ancient spanish pear cultivars assessed by microsatellite markers[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science American Society for Horticultural Science,2010,135:428-437.
- [30] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism [J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3):314-331.
- [31] CHEN R, SHIMONO A, AONO M, et al. Genetic diversity and population structure of feral rapeseed (*Brassica napus* L.) in Japan [J]. PLoS One,2020,15(1):e0227990.
- [32] 张安世,张中海,高登涛,等. 基于 iPBS 的巨峰系葡萄品种遗传多样性分析及 MCID 法快速鉴定[J]. 中国南方果树,2020, 49(4):111-115,121.
- [33] 高玉江,侯佳贤,郑亚杰,等. 分子标记技术在落叶果树上的应用[J]. 吉林农业科学,2005(1):57-60.

(责任编辑:成纾寒)