利用分子标记鉴定李、杏种质资源

Identification on plum and apricot germplasm resources by using molecular markers

目 次

前言

1 范围

2 规范性引用文件

3 术语和定义

4 缩略语

5 原理

6 主要仪器设备与试剂耗材

7 试剂配制

8 参照种质

9 操作步骤

10 基因型对比

11 结果判定

附录A （资料性附录） 主要仪器设备与试剂、耗材

附录B （规范性附录） 试剂配制

附录C （规范性附录） 核心引物

附录D （资料性附录） 参照种质

**前 言**

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由辽宁省农业科学院提出。

本标准由辽宁省农村经济委员会归口。

本标准起草单位：辽宁省果树科学研究所。

本标准主要起草人：刘硕、刘宁、刘威生、章秋平、张玉萍、马小雪、张玉君、徐铭、赵海娟、刘家成。

**利用分子标记鉴定李、杏种质资源**

1. **范围**

本标准规定了利用简单重复序列（Simple sequence repeats，SSR）分子标记快速鉴定李、杏种质资源技术有关的术语和定义、缩略语、原理、主要仪器设备与试剂耗材、试剂配制、参照种质、操作步骤、基因型对比、结果判定。

 本标准适用于李、杏种质资源的SSR分子标记指纹对比鉴定。

1. **规范性引用文件**

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 30989—2014 高通量基因测序技术规程

GB/T 37870—2019 个体鉴定的高通量测序方法

GB/T 30988-2014 多酚类植物基因组DNA提取纯化及测试方法标准

1. **术语和定义**

下列术语和定义适用于本文件。

**3.1**

 **分子标记 Molecular marker**

 是指遗传标记的一种，是在基因水平上的标记，可直接在DNA分子上检测遗传变异。

**3.2**

 **SSR标记 Simple sequence repeats**

是指由若干个核苷酸碱基（一般为2～6个）构成基本单元，以几十至几百次的重复形成的生物遗传信息序列，因基本单元重复次数的差异而形成SSR基因座多态性，根据SSR基因座两侧保守的单拷贝序列设计一对特异引物来扩增SSR序列，即可揭示其等位基因多态性。

**3.3**

 **核心引物 Core primers**

指适用于李、杏种质资源基因组DNA鉴定优先选用的一组SSR引物，其拥有多态性丰富、重复性好等综合特性，可用于李、杏种质资源的DNA多样性检测鉴定。

**3.4**

 **DNA分型 DNA genotyping**

 利用生物学检测方法测定个体DNA序列，并将其与其他个体的DNA序列或参考DNA序列进行比对，以确定该个体与其他个体的遗传组成（基因型）差异的过程。将待测李、杏种质资源与参照种质的SSR基因型进行比对，分析待测种质与参照种质的SSR基因型是否有差异，并确定其SSR产物片段大小。

1. **缩略语**

下列缩略语适用于本文件。

Bp: 碱基对（Base pair）

 DNA：脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic acid）

 Hi-Di：高度去离子甲酰胺（Highly deionized formamide）

 nt：碱基（Nucleotide）

 SSR：简单重复序列（Simple sequence repeats）

 PVP：聚乙烯吡咯烷酮（Polyvinyl pyrrolidone）

1. **原理**

简单重复序列广泛存在于李、杏基因组中，且多已开发成SSR分子标记，相同的SSR位点在不同的李、杏种质资源材料的等位基因数量可能不同，因此形成SSR标记多态性。由于每个SSR位点两侧的序列一般是相对保守的单拷贝序列，因此，可根据其两侧的序列设计一对特异引物，利用PCR技术对两条引物间的DNA序列进行扩增。获得的PCR产物经过纯化、毛细管电泳分离得到序列长度不同的DNA片段，经基因分型软件加以区分。因此，根据SSR位点的多态性，利用PCR扩增和电泳技术可以鉴定李、杏种质资源。

1. **主要仪器设备与试剂耗材**

主要仪器设备与试剂、耗材参见附录A。

1. **试剂配制**

试剂配制方法参见附录B。

1. **核心引物**

从150对SSR引物筛选出来，可以鉴定李、杏种质资源的优异SSR引物。相关信息参见附录C。

1. **参照种质**

参照种质为用于与待测种质进行基因型比对的若干标准李、杏种质，在进行等位变异检测时，应同时包括相应参照品种。参照种质参见附录D。

1. **操作步骤**
	1. **样品准备**

受检及参照李、杏种质样品均采集幼嫩叶片，按照GB/T 30988-2014的规定执行。选取每份待测种质和参照种质样株50株，每株取新鲜、幼嫩、健康的叶片于离心管，做好标记置于液氮罐中浸泡后，保存于-80℃冰箱。

* 1. **DNA提取**

采用改良CTAB法提取李、杏样品DNA；采用基因组DNA提取试剂盒法需依照说明书进行提取。改良CTAB法DNA提取步骤如下：

a） 将液氮冷冻后的叶片样品放入研钵中磨成粉末，然后迅速将粉末勺入2mL离心管中，加入65℃预热的CTAB提取液600μL，加入适量PVP粉末（或1%的β-巯基乙醇溶液），充分混匀1分钟后置于65℃水浴锅中50min，每隔5分钟摇荡一次。

b) 取出离心管置于冰上10min，然后置于4℃高速离心机中，12000rpm离心15min。使用移液枪取上清液至新1.5mL离心管中。

c） 加入RNA消化酶10μL并摇晃均匀，随后置于37℃培养箱消化60min。

d) 取出离心管加入等体积的氯仿、异戊醇（24：1）后，充分混匀，室温下静置10分钟，离心机12000rpm离心15min。

e) 取上清液500μL置于新的1.5mL离心管中。加入二倍体积的-20℃冰乙醇溶液，轻轻摇晃，置于-20℃冰箱60min或4℃过夜。

f) 取出离心管并置于4℃高速离心机中，12000rpm离心30min，弃上清，利用75%乙醇洗涤沉淀两次，管口向下置于室温下自然阴干。

g) 加入100μL体积TE溶液溶解DNA沉淀，待完全溶解后利用核酸测定仪检测DNA浓度，将DNA浓度稀释至20ng/μL，置于-20℃冰箱保存。

* 1. **PCR扩增**
		1. **PCR反应体系**

PCR反应体系：总体积20μL，包括5μL DNA模板，0.8μL上游荧光引物（10mM），0.8μL下游荧光引物（10mM），TaqMix酶10μL，以及3.4μL ddH2O。

* + 1. **PCR反应程序**

PCR反应程序：1）95℃变性5min；2）95℃变性30s；3）依照附录C推荐的引物退火温度退火30s；4）72℃延伸45s；5）重复2）~4）步骤35个循环；6）72℃延伸10min；7）PCR产物置于4℃保存。

* 1. **PCR扩增产物检测**
		1. **PCR产物纯化**

将PCR扩增产物置于96孔PCR板进行纯化操作，步骤如下：

1）20μLPCR产物加入5μL 5M的NaCl（终浓度0.5M）。

2）加入25μL 24％的PEG8000溶液（终浓度12％）；混匀。

3）置于室温4℃ 30min。

4）置于离心机4500xg，4℃离心30min后，立即将板反扣在厚的吸水纸上，离心至150xg，去除上清。

5）加入70μL 75％乙醇，4500xg，4度离心15min，立即再板反扣在厚的吸水纸上，离心至150xg，去除上清；重复一次。

6）50℃或室温干燥，加入10μL ddH2O溶解，即为纯化的PCR产物，测序时取1μL做模板。

* + 1. **毛细管电泳上机样品制备**

1）每份PCR产物取2μL于新的96孔PCR板中，每份样品加入0.5μL内标（GS500LIZ）及50μL的Hi-Di稀释液，剧烈震荡5min，使内标充分混匀。

2）将96孔平板放入PCR仪中，95℃加热5min，程序结束后迅速放在冰上冷却2min。做好上机表后，在ABI3730 DNA测序仪进行检测。

1. **基因型对比**

每个样品SSR位点的等为变异以DNA片段长短的形式表示。使用Genemapper 4.0软件读取ABI3730检测的等位基因峰图，依照软件说明书整理每条引物每个个体的峰值大小并记录在EXCEL表格中，汇成基因型矩阵。根据待测种质与参照种质的SSR基因峰位置，确定是否有差异。

1. **结果判定**

用附录C中的引物进行检测，如果待测种质能扩增出与参照种质中的标准李、杏种质相同的基因峰时，则判定待测种质为某特定李、杏种质；若待测种质不能扩增出与参照种质中的标准李、杏种质相同条带时，则判定待测种质与参照种质不同。

附 录 A

（资料性附录）

主要仪器设备与试剂、耗材

1. **1 主要仪器设备与试剂、耗材**

主要仪器设备与试剂、耗材见表A.1

**表A. 1 主要仪器设备与试剂、耗材**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **步骤/类别** | **主要仪器设备** | **主要试剂** | **主要耗材** |
| DNA提取 | 高速离心机、分光光度计、移液器、水浴锅、天平、磁力搅拌器 | 十六烷基三乙基溴化铵（CTAB）、聚乙烯吡咯烷酮（PVP）、氯化钠、三羟甲基氨基甲烷（Tris碱）、β-巯基乙醇溶液、Rnase A、氯仿、异戊醇、冰乙酸、冰乙醇、液氮 | 1.5mL、2mL离心管、移液枪配套枪头、枪头盒、研钵、乳胶手套 |
| PCR扩增 | PCR扩增仪器、制冰机 | TaqMix 酶、SSR荧光引物、ddH2O | 96孔PCR板 |
| 毛细管凝胶电泳 | ABI3730 DNA 分析仪 | Hi-Di高纯甲酰胺、内标（GS500LIZ） | 96孔PCR板、移液枪配套枪头、枪头盒 |

**附 录 B**

**（规范性附录）**

**试剂配制**

1. **1 DNA提取试剂的配置**
2. **1.1 1M Tris-HCL溶液（PH=8.0）**

称量121.1 g Tris置于1 L烧杯中，加入约800 ml的去离子水，充分搅拌溶解，加入42ml浓盐酸调节pH值。将溶液定容至1 L，高温高压灭菌后，室温保存。

1. **1.2 0.5M EDTA溶液（PH=8.0）**

称取186.1 g Na2EDTA·2H2O，置于1 L烧杯中；加入约800 ml的去离子水，充分搅拌；用NaOH调节pH值至8.0（约20 g NaOH)；加去离子水将溶液定容至1 L；适量分成小份后，高温高压灭菌，室温保存。

1. **1.3 2% CTAB溶液**

分别称取CTAB 20 g，NaCl 81.816 g，PVP 20 g，分别量取1 mol/L Tris-HCl溶液（pH8.0）100 mL，0.5 mol/L EDTA 溶液（pH8.0）40 mL，定容至1000 mL。

1. **1.4 氯仿—异戊醇（24: 1）**

分别量取240 mL氯仿和10 mL异戊醇，将两者混匀。

1. **1.5 75%酒精溶液**

量取150mL无水乙醇，50mLddH2O置于烧杯中，充分混匀。

**B. 2 PCR扩增溶液的配制**

**B. 2.1 特异性荧光引物**

用超纯水分别配制前引物和后引物终浓度均为10 µmol/L的储存液，各量取10 µL混合。注：荧光引物需避光保存。

**附 录 C**

**（规范性附录）**

**核心引物**

1. **1 核心引物**

**核心引物见表C. 1。**

**表C. 1 核心引物**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 原始编号 | 引物名称 | 正向引物序列 | 反向引物序列 | 退火温度 |
| 1 | ampa101 | cagtttgatttgtgtgcctctc | gatccaccctttgcataaaatc | 55-57℃ |
| 2 | ampa112 | caaagtgtcattgttcttgctag | aaggccaaaactccagtagaag | 55-57℃ |
| 3 | cpdct040 | tgatgaggcctagaaattgga | cacagcaatcagcaaaaagc | 55-57℃ |
| 4 | cppct013 | gcatttcgagagctgtattt | gtcttacgtgcagcttcatt | 55-57℃ |
| 5 | cpsct005 | ctgcaagcactgcggatctc | cccatattcccaacccatta | 55-57℃ |
| 6 | cpsct034 | aggtggacaatagccgtgat | tttccagaccctgagaaagc | 55-57℃ |
| 7 | pchgms5 | cgcccatgacaaactta | gtcaagaggtacaccag | 55-57℃ |
| 8 | udap-413 | ccaggacccaaaccctaaaa | tgcaaacacaacacctacctaca | 55-57℃ |
| 9 | udap-418 | cagaaatagccccagcacat | ttcttgcgccaaaaacaact | 55-57℃ |
| 10 | ssrpacita5 | gttgtgtttacttttttcttaacgg | gtatcacaagtgagaacataagagg | 55-57℃ |
| 11 | udap-410 | ttgttgacaagaagaaaacaaagc | caacgggttggtttcagaag | 55-57℃ |
| 12 | udap-420 | ttccttgcttcccttcattg | cccagaacttgattctgacca | 55-57℃ |
| 13 | udp98411 | aagccatccactcagcactc | ccaaaaaccaaaaccaaagg | 55-57℃ |
| 14 | ampa109 | gtgtcccgaattccaatatcc | tttgtctcaacactttccctctc | 55-57℃ |
| 15 | ampa116 | attgaaggccccttatgtgag | caaaaaggcgttacagatgatg | 55-57℃ |
| 16 | aprigms2 | accacctcttgcaaagaacc | gaaatttcaagcacacgatcc | 55-57℃ |
| 17 | paca18 | tccaaacctaccgtttctcat | caacagcacaaacagaaccac | 55-57℃ |
| 18 | cpsct042 | tggctcaaaagctcgtagtg | ccaacctttcgtttcgtctc | 55-57℃ |
| 19 | bppct017 | ttaagagtttgtgatgggaacc | aagcataatttagcataaccaagc | 55-57℃ |
| 20 | cpdct041 | tgtttgcacgtttttgaaagc | tggaggggtacaaggaacaa | 55-57℃ |
| 21 | cppct021 | cggatcccagttgtattaaatg | gaggaactggttatcaccttgg | 55-57℃ |
| 22 | cppct026 | agacgcagcacccaaactac | cattacatcaccgccaacaa | 55-57℃ |
| 23 | cpsct030 | caacagcgagtgtcacgttt | aggcaacggacaaaaatctg | 55-57℃ |
| 24 | cpsct039 | gccgcaactcgtaaggaata | tccaccgttgattacccttc | 55-57℃ |
| 25 | epdcu3117 | cagagggaacagtgtgagca | tgttgttgtcgaccctgaaa | 55-57℃ |
| 26 | pchgms1 | gggtaaatatgcccattgtgcaatc | ggatcattgaactacgtcaatcctc | 55-57℃ |
| 27 | uda020 | tgtgcaccaaacacaactga | gcagtgttgccaatgttgat | 55-57℃ |
| 28 | udap-416 | ttcagactcgaaaacacacataca | tggaggaggtttatgagcaa | 55-57℃ |
| 29 | udp96-013 | attcttcactacacgtgcacg | ccccagacatactgtggctt | 55-57℃ |
| 30 | udp97-402 | tcccataaccaaaaaaaacacc | tggagaagggtgggtacttg | 55-57℃ |
| 31 | udp98-412 | agggaaagtttctgctgcac | gctgaagacgacgatgatga | 55-57℃ |
| 32 | ssrpacita10 | ggtgaggtctgtgctgaatatgcca | cgattaaagaaataagaaaaagagc | 55-57℃ |
| 33 | ssrpacita17 | cacggggagaattgggtggccttag | ggagtctataaataaatggttgcgc | 55-57℃ |
| 34 | ssrpacita21 | gattatataagttggtttttgtaag | gtattctataatgtataaatgtacg | 55-57℃ |
| 35 | ssrpacita23 | gtgaatacaaaattttactacattg | cggtctctgactctctgacttgcgg | 55-57℃ |
| 36 | ssrpacita7 | cttttgtgcctcagcttcccaacac | cctggcctgaccctaagcaattcg | 55-57℃ |
| 37 | udap-404 | catgaacagggtcaaaagca | tatatccttacgcggcctca | 55-57℃ |
| 38 | udap-414 | caagcacaagcgaacaaaat | ggtggtttcttatccgatgc | 55-57℃ |
| 39 | udp96005 | gtaacgctcgctaccacaaa | cacccagctcatacacctca | 55-57℃ |
| 40 | aprigms24 | atctgctctttccctcacct | gattatccctcaacccatcc | 55-57℃ |
| 41 | paca33 | tcagtctcatcctgcatacg | catgtggctcaaggatcaaa | 55-57℃ |
| 42 | pacb26 | ccaatcatgaaatcataaagcaa | tgggatgtcctattgttttca | 55-57℃ |
| 43 | pacc3 | tgacttgatcagactcgaca | ttgcatttgcatttacaataga | 55-57℃ |
| 44 | epdcu5100 | ctcttctcgcctcccaattt | gcttagccctgggtacaag | 55-57℃ |
| 45 | cpsct021 | gccacttcggctaaaagaga | tccatatctcctcctgcttga | 55-57℃ |

**附 录 D**

**（规范性附录）**

**参照种质**

1. **1 参照种质**

**参照种质见表D. 1。**

**表D. 1 参照种质**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **编号** | **种质名称** | **分类** | **原产地** | **编号** | **种质名称** | **分类** | **原产地** |
| 1 | 大白玉巴达 | *P. armeniaca* L*.* | 北京 | 20 | 奉化李 | *P. salicina* Lindl. | 浙江奉化 |
| 2 | 龙泉务香白杏 | *P. armeniaca* L*.* | 北京 | 21 | 毕克齐紫李 | *P. salicina* Lindl. | 呼和浩特 |
| 3 | 骆驼黄 | *P. armeniaca* L*.* | 河北 | 22 | 金县紫李 | *P. salicina* Lindl. | 辽宁金县 |
| 4 | 沙金红 | *P. armeniaca* L*.* | 河北 | 23 | 昌黎玉皇李 | *P. salicina* Lindl. | 河北昌黎 |
| 5 | 小白玉巴达 | *P. armeniaca* L*.* | 河北 | 24 | 赤峰紫李 | *P. salicina* Lindl. | 内蒙赤峰 |
| 6 | 吨葫芦 | *P. armeniaca* L*.* | 河北昌黎 | 25 | 法库黄牛心 | *P. salicina* Lindl. | 辽宁法库 |
| 7 | 串枝红 | *P. armeniaca* L*.* | 河北邢台 | 26 | 巴彦李 | *P. salicina* Lindl. | 黑龙江巴彦 |
| 8 | 建平香白  | *P. armeniaca* L*.* | 天津蓟县  | 27 | 巴黄李 | *P. salicina* Lindl. | 黑龙江友谊 |
| 9 | 巴斗杏  | *P. armeniaca* L*.* | 安徽萧县  | 28 | 胭脂红李 | *P. salicina* Lindl. | 湖北枣阳 |
| 10 | 白玉扁 | *P. armeniaca* L*.* | 河北 | 29 | 朱砂李 | *P. salicina* Lindl. | 辽宁海城 |
| 11 | 龙王帽 | *P. armeniaca* L*.* | 河北涿鹿 | 30 | 昌黎大紫李 | *P. salicina* Lindl. | 河北昌黎 |
| 12 | 一窝蜂 | *P. armeniaca* L*.* | 河北涿鹿 | 31 | 红皮红心李 | *P. salicina* Lindl. | 广东广州 |
| 13 | 国仁 | *P. armeniaca* L*.* | 辽宁熊岳 | 32 | 黄干核 | *P. salicina* Lindl. | 辽宁熊岳 |
| 14 | 平渡海棠红  | *P. armeniaca* L*.* | 山东平度  | 33 | 黄李梅 | *P. salicina* Lindl. | 黑龙江绥棱 |
| 15 | 曲阜平黄  | *P. armeniaca* L*.* | 山东曲阜  | 34 | 李子梅 | *P. salicina* Lindl. | 吉林长春 |
| 16 | 车头1号 | *P. armeniaca* L*.* | 山东泰安 | 35 | 昌黎大红李 | *P. salicina* Lindl. | 河北昌黎 |
| 17 | 新世纪 | *P. armeniaca* L*.* | 山东泰安 | 36 | 知—大红李 | *P. salicina* Lindl. | 黑龙江知一 |
| 18 | 关音脸 | *P. armeniaca* L*.* | 山东烟台 | 37 | 横道河子大红李 | *P. salicina* Lindl. | 黑龙江横河道 |
| 19 | 白仁  | *P. armeniaca* L*.* | 山东烟台  | 38 | 蜜李 | *P. salicina* Lindl. | 浙江桐乡 |