

利用 SSR 标记开发观赏植物分子身份证数据库—用于 DUS 审查与品种权实施与维权

Development of Databases of Molecular IDs of Ornamental Varieties using SSR Markers for PBR enforcement and DUS Examination

国家林草植物新品种分子测定实验室

Laboratory for Molecular Identification of Plant Varieties, NFGA

## 主要内容 Content

### 1、分子标记开发

Developing molecular markers for variety identification

利用已有的标记 Use available markers  
开发新的标记 Develop new markers

### 2、林业植物品种DNA指纹库构建

Constructing DNA Profiling for PVP

标记条等带/峰值  
SSR Bands/Peaks



数字代码  
Digital codes



二维码  
QM Code

### 3、分子技术的实际应用场景

Scenarios of using molecular techniques

# 分子标记开发

## Development of molecular markers

## 分子数据库构建流程 Database of Molecular IDs of varieties



## 技术研发阶段 Technical development Stage

### 试验材料收集 Sample collection

- ✓ 104个月季品种叶片样本收集自北京植物园 104 varieties from Beijing Botanical Garden
- ✓ 48个月季品种叶片样本收集自月季测试站 48 varieties from Rose DUS examination station, Kunming

### SSR 标记选择 SSR markers screening

- ✓ 从已发表文献中收集了130 个SSR标记 over 130 SSR loci from published papers
- ✓ 40 个SSR位点表现出多态性 40 SSR loci are polymorphic

### 品种识别

- ✓ 3对品种在40个SSR位点上具有同样的分子指纹数据 (主要是芽变品种)
- ✓ 其余品种可以被明显区分开



## 月季品种采样 Sample collection of Rose varieties



月季测试站  
Rose DUS test station



月季测试站  
Rose DUS test station



## 月季品种SSR标记分析 DNA profiling using SSR markers



叶片样品 Leaf sample



DNA提取 DNA extraction

毛细管电泳 Capillary electrophoresis



## 品种鉴定力比较 Comparisons of discrimination power of primers

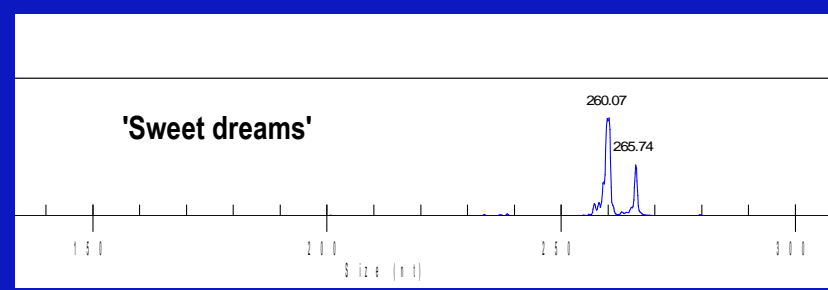
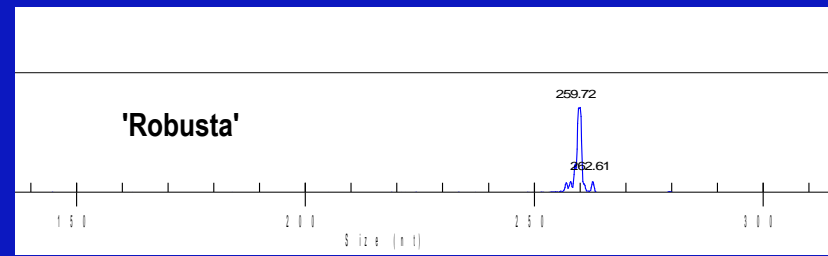
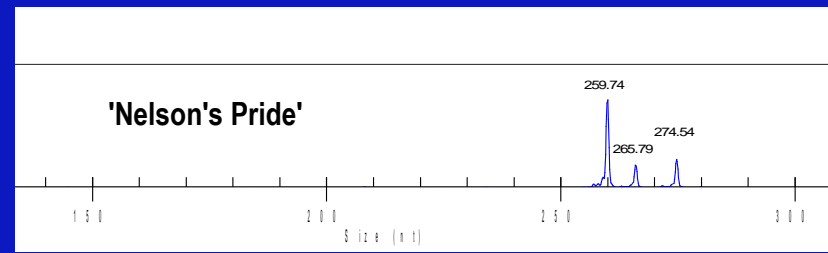
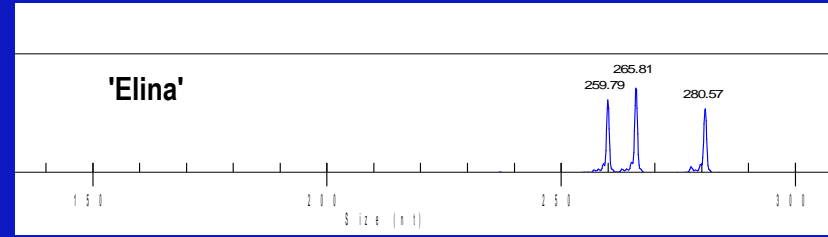
Locus Name	Nucleotide diversity ( $\pi$ )	Total number of mutations ( $\eta$ )	Region length (bp)	$D_i^a$	$D_i^b$	Site
Rhcp2	0.00193	3	205	0.4130	0.3446	<i>matK-trnK-UUUU</i>
Rhcp5	0.02362	53	221	0.1231	0.9016	<i>trnK-UUUU-Rps16</i>
Rhcp6	0.06351	150	271	0.4544	0.9885	<i>rps16-trnQ-UUUG</i>
Rhcp11	0.04529	78	113	0.3111	0.5339	<i>trnR-UCU-aptA</i>
Rhcp13	0.00906	58	266	0.3700	0.5196	<i>atpF-atpH</i>
Rhcp14	0.05264	76	282	0.4642	0.8277	<i>atpH-aptL</i>
Rhcp16	0.00891	34	296	0.2170	0.9495	<i>rpoC1</i>
Rhcp19	0.04801	48	200	0.3534	0.9996	<i>petN-psbM</i>
Rhcp22	0.01792	24	197	0.3020	0.9727	<i>trnG-UUC-trnFM-CAU</i>
Rhcp24	0.02778	23	114	0.1043	0.9084	<i>ycf3</i>
Rhcp29	0.01671	48	322	0.4523	0.7457	<i>accD-psaI</i>
Rhcp31	0.03396	53	252	0.5046	0.9991	<i>rps18-rpl20</i>
Rhcp34	0.03085	92	272	0.3925	0.7929	<i>rpl 20</i>
Rhcp38	0.07443	81	269	0.9350	0.9930	<i>petD-rpoA</i>
Rhcp41	0.01791	39	352	0.6307	0.9790	<i>rpl 16-rps3</i>

'a' indicates the discriminating power base on the genotype of cpSSR; 'b' indicates the discriminating power base on the genotype of nucleotide mutations.

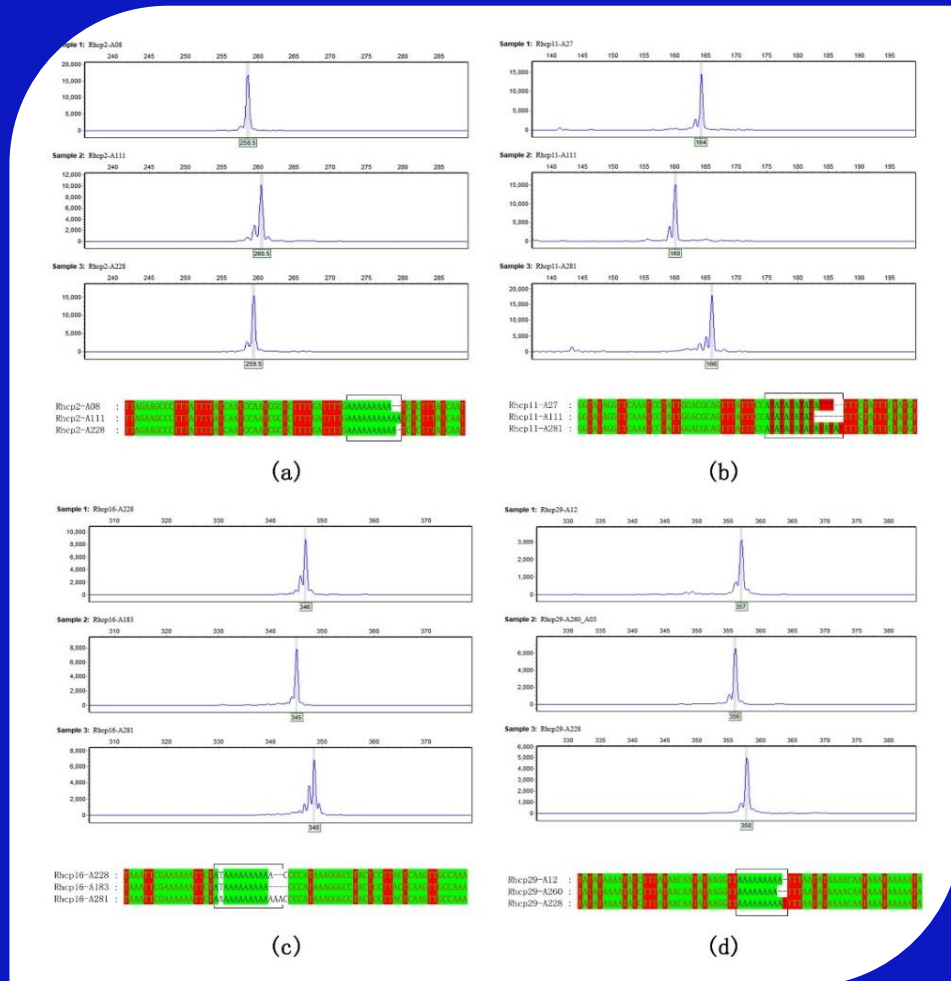
月季品种  
Rose varieties



## 品种特异标记 Variety specific markers



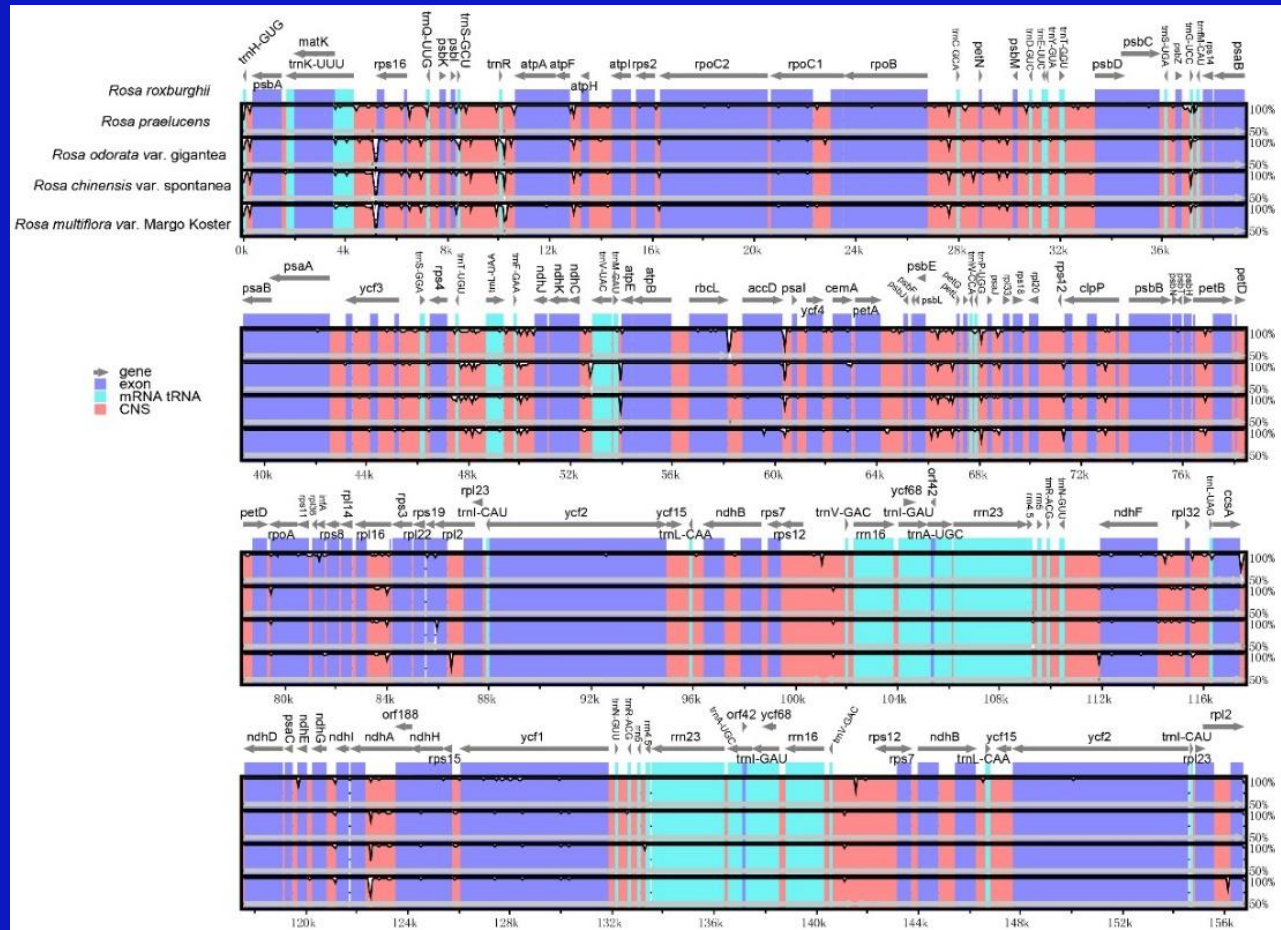
## SSR变异验证 cp SSR variation in rose varieties



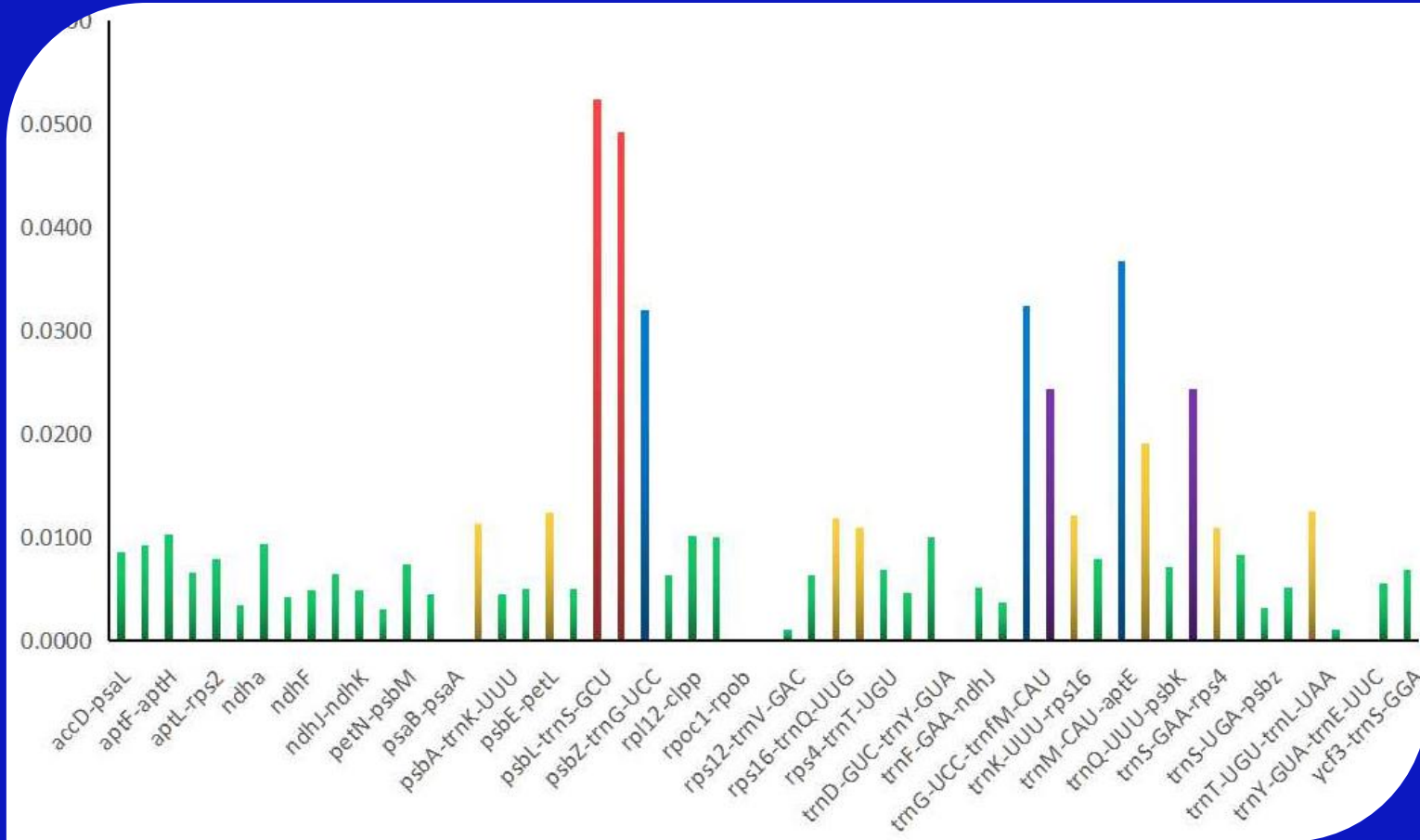
月季品种  
Rose varieties

# 叶绿体基因组比较分析 Comparative analysis of cp genomes

蔷薇属不同种  
Different rose species



# 叶绿体基因组SNP变异区分析 SNP mutation in cp genome



蔷薇属  
Rose genus

## 标准化阶段 Standardization stage

DNA提取优化 Optimizing DNA Extraction  
改良CTAB法/试剂盒法 improved CTAB or Commercial DNA Extraction Kit

核心引物筛选 Core Primers Selection  
7对核心引物+7对扩展核心引物 7 pairs core primers + 7 additional primers

标准品种选择 Selection Standard Variety  
用于标定引物对应等位基因的大小 Calibrating the Size of Alleles  
使得不同批次实验获得的数据有可对比性 Ensure Data Comparability

PCR产物检测 DNA Fragments Detetion  
毛细荧光电泳法 (Beckman 8000系列, ABI 3730等/SSR-seq法)



# 品种分子身份证数据库构建

## Development of database of variety MIDs

## 数据库扩展阶段 Database Extension Stage

### ➤ 品种来源及数量 sampling

- ✓ 全部收集自月季测试站（700+份） from DUS test station 700+
- ✓ 获得DNA分子指纹数据约600个品种 600+ DNA profiling

### ➤ 数据库使用核心引物 Core Primers using to Database

- ✓ 7对核心引物，全部600多个品种
- ✓ 7对扩展核心引物，部分品种

## 月季品种DNA指纹库构建 Database of DNA Profiles

No.	Variety Name	Locus1				Locus 2			.....
		A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	
1	Altesse75	369	373			260			
.....									
29	Elina	369	375	389		260	266	281	
30	Faithful Friend	373	381	389		260	281		
31	Falstaff	358	369	373	389	260	266	271	
32	Ferdy	358	373			260	269		
33	Festival Jewel	373	381	389		260	266		
34	Fiona	373	381	389		260	266		
.....									
80	Nelson's Pride	369	381	389		260	266	275	
81	Norwich Cathedral					260	266		
82	Nostalgia	373	389			266	281		
83	Old Blush	369	375			260			
84	Open Arms	373	375	381		266			
85	Oranges and lemons								
.....									
109	Robusta	373	385	389		260			
110	Romantic meillandina					260	266		
111	Rose Ball	373	381	389		260	266	281	
112	Rosita Vendela	369	373	389		260	266		
.....									
134	Sweet dreams	369	373	381	389	260	266		
.....									
152	羽仕妆	375	389			260			

单批样品 Single collection

编号	品种名称	P1-Rw55E12				P2-H10D03				P3-CTG623				P4-Rw10M24				P5-Rw59A12			
		A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A4
A1	大丰收	205				233	240	251		239				288	297			236	268		
A108	金香檳	205				225	233	251		235	239	244		279	286	299		236	239	268	
A76	天堂	199	205			233	243	249		227	239			269	286			233			
A43	瑞普索迪	186	193			233	240			235	243			278	286			233	251		
A14	朱红女王	186	192	205		233	240			239	244			269	288			233	236		
A314	咖啡时间	183	195	205		225	233	240	242	271				288	299			231	236	239	251
A293	约瑟夫的外衣	192	199	205		225	233			235	239	246		269	288	297		236	239	251	268
A144	彩云	186	192	205		225	233	240		239	244			269	285	299		236	239		
A16	萨曼莎	183	199			225	240	251		235	244			297	299			231	233	235	268
A2	第一红	186	193	205		233	240	251		244	249			288				235	268		
A147	大奖章	183	205			225	233	240		235	239			269	272	286		235	251		
A110	白玛利	183	205			233	235	240		239	244			279	286	299		268			
A78	兰和平	183	195	205		235	242	249		239	246			269	278			239	245	251	268
A45	友禅	186	205			233	240	242		239	244			279	285			235	239	251	268
A315	日本黄包菜	183	192			233	240	242		244	257			269	297			235	268		
A294	西班牙舞娘	195	199	205		233	240			239				279	285	297		233	235	251	
A17	黑美人	192	195	205		225	233	242		239	244	257		286				239	268		
A3	夏洛特	183	205			225	235	240	242	244				285				233	235	268	
A148	游园会	186	205			233	240	242	249	239	244			269	285			233	251	268	
A111	冰山	192	205			235	251			227	239	257		278	286	299		235	239	245	
A85	新星	192	205			233	240			239	244			269	285			239	251	268	
A51	俏佳人	186	205			240	242			239	244			285	297	299		233	239	251	268
A319	卡里加比(篝火)	192	199	205		225	235	249		239	244			286	299			235	239	251	268
A295	盟友	186	205			225	240	242		239				269	285	286		233	235	268	
A23	红魔	201	203	205		233	240	242		239				288	299			235	268		
A4	萨莎90	186	205			225	235	240	242	235	239			279	286			233	236	239	
A112	多头白	186	192	199		233	248			227	244			279	285	297		235	251	268	
A86	美雀	183	192	205		233	235	240		239	246	257		286	299			233	239	251	
A52	安娜	183	203			233	240			239	244	271		286				231	235	239	
A320	樱桃(摩纳哥公爵)	186	205			225	233	242	251	239	244	257		279	285			233	235	268	
A296	法国条纹	186	195			225	240	251		244				286				233	235	239	
A150	第一夫人	199	205			233	242			235	239	244		285	299			233	235	251	268

多批样品 Multiple collections

## 牡丹品种DNA指纹库 Database of DNA Profiles of tree peonies

➤材料: 678个牡丹品种叶片样本 material: 678 varieties

✓ 357个收集自国家牡丹基因库 357 varieties from national peony genebank

✓ 327个收集自牡丹测试站 327 varieties from DUS test station

➤SSR 标记筛选 Selection of SSR markers

✓ 自主开发了60个SSR Developing 60 SSR markers

✓ 收集已发表的牡丹SSR标记信息500余对, 487对SSR引物可检测到PCR扩增产物

✓ 遗传作图定位到染色体\_78个SSR位点, 其中约60个SSR位点检测到PCR扩增产物且有多态性

✓ over 70 SSR markers was mapped to chromosome, and 60 SSR markers were polymorphic

➤正在进行 Be doing this work

✓ 大量样本检测结果分析

✓ 核心引物提炼

✓ 标准品种确定



## 牡丹品种样品采集 Sample collection of tree peony





## 杨树品种DNA指纹库 DNA Profiles of Poplar varieties

表 4 国家级审定杨树良种品种分子身份证（微卫星标记）

品种名称	Locus1				Locus2		Locus3		Locus4			Locus5			Locus6			Locus7		Locus8		Locus9			Locus10	
	AL #1	AL #2	AL #3	AL #4	AL #1	AL #2	AL #1	AL #2	AL #1	AL #2	AL #3	AL #1	AL #2	AL #3	AL #1	AL #2	AL #3	AL #1	AL #2	AL #1	AL #2	AL #1	AL #2	AL #3	AL #1	AL #2
渤海 1 号杨	227	230			206		208		194	210		211	213		144	147		135	176	273	276	265			207	210
渤海 2 号杨	227	230			206		208		194	213		211	213		140	142		135	176	273	273	243	268		207	214
毛白杨 CFG1012	235	240			203		173		191	200		209			155	157		176		241	255	213	238		212	
毛白杨 CFG37	235	240			203		175		191	200		210			155	157		176		241	255	213	213		212	
黄淮 3 号杨	223	227			206		208	210	194			207	211		145	147		135	176	222	273	284			207	
廊坊杨 1 号	227	235			206		208		194			207			142	147		135		272	284	256			207	
廊坊杨 2 号	223	227	232		206		207	210	194	213		213			144	147	149	135	176	272		257	292		207	
南林 95 杨	223	227			206		207	209	194			211			147	149		135		273		250	257		207	
照林 6 号杨	213	223			198		212		194	213		207	213		148	159		176		246		225	231	243	210	
哲林 4 号杨	223	230			198		212		194	213		203			150	159		176		244	246	205	247		210	
三毛杨 7 号	235	240	248		203		190	219	192	195		205	207	209	145	155	157	176		206	238	207	248		212	
毛白杨 8 号	235	240	244		203		199	203	188	192	194	205	207	209	155	157		176		206	238	210			212	
北林雄株 1 号	236	244			203		190	217	189	192	195	210	212	216	132	146	161	176		206	237	205	246		212	
北林雄株 2 号	236	248			203		210		189	191	194	209	211	216	132	146	157	176		206	237	205	205		212	
辽育 1 号杨	223	235			206		207		194			203	215		142	151		135		222	273	207	277		207	
山地 1 号杨	223	230			206		216		213			204	213		159			176		226	256	211	272		210	

## 三角梅品种DNA指纹库 DNA Profiles of *Bougainvillea* varieties

	BSW10	BSW15	BSW20	BSW25	BSW49	BSW56	BSW57	BSW69	BSW82
1	197/201	235/235	173/176	201/209	243/246	175/175	177/186	171/171	159/159
2	199/199	235/235	173/176	201/201	240/243	175/175	186/192	175/175	159/159
3	197/197	*	173/173	201/201	240/240	173/173	177/192	175/175	159/159
4	197/199	235/239	170/173	201/211	240/246/249	175/175	177/192/195	171/175	159/159
5	199/199	235/235	173/173	207/211	243/243	175/177	186/192	177/181	150/159
6	197/197	235/235	173/176	201/201	240/243	175/175	186/192	175/175	156/159
7	199/199	235/235	170/173	201/211	243/246	167/167	180/195	175/175	159/159
8	197/199	237/237	173/176	201/209	243/246	167/167	177/189	171/171	159/159
9	197/197	231/231	170/173	201/209	240/246	167/167	177/192	171/175	*
10	197/197	235/235	173/173	201/209	240/246	173/173	177/192	175/175	159/159

	BSW10	BSW15	BSW20	BSW25	BSW49	BSW56	BSW57	BSW69	BSW82
135	197/199	235/237	173/173	201/201	240/240	167/175	180/192	173/173	156/156
136	197/197	235/235	173/173	201/201	240/246	167/167	177/180	171/173	162/162
137	197/197	235/235	173/173	201/209	243/246	167/175	177/186	171/173	156/159/162
138	197/197	235/235	173/173	201/201	240/246	167/173/175	177/192	173/173	156/159
139	197/197	235/235	173/173	201/201	240/246	185/185	183/183	173/173	156/159
140	197/197	231/235	173/173	201/201	243/243	185/185	183/183	173/173	150/159
141	197/197	235/237	173/173	201/201	240/246	167/167	177/177	171/173	162/162
142	197/197	231/235	173/173	201/201	243/246	181/181	177/183	173/173	150/162
143	197/197	235/237	173/173	201/211	243/249	199/199	177/183	171/173	159/162
144	197/201	235/235	170/173	209/209	240/246	199/199	195/195	173/173	159/159

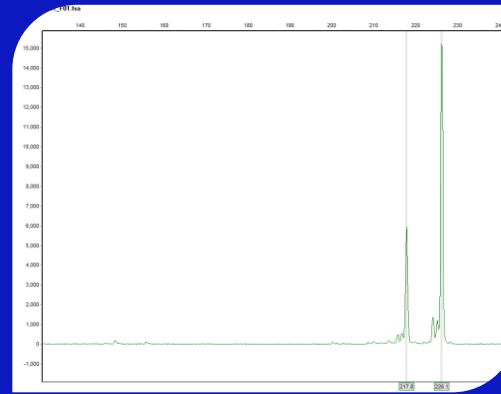
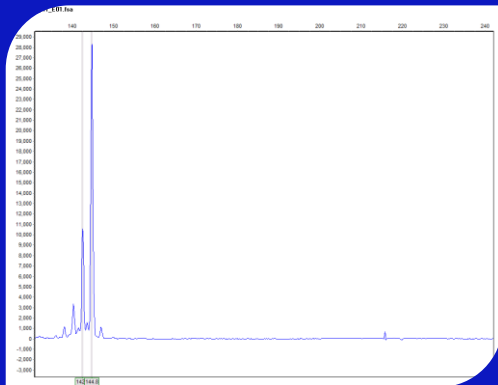
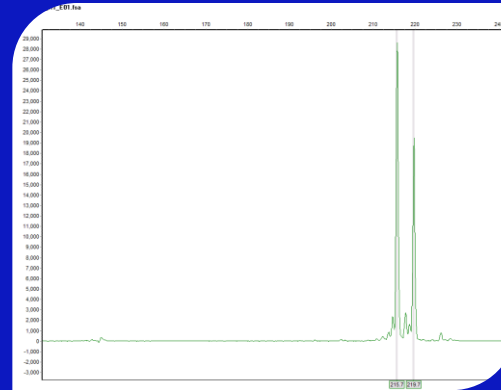
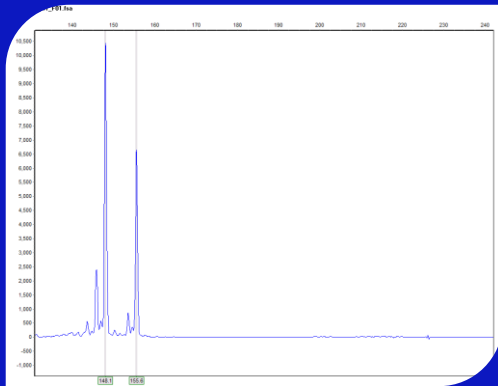
构建了三角梅分子身份证数据库 SSR marker profiles were developed for 144 *Bougainvillea* varieties



# 应用场景

## Scenarios for applicaton

## 表型相同DNA不同 Morphologically undistinguishable evident DNA differences



样品错误 Sample error, propbabaly!

## 相同品种重复申报 Repeated PBR application of the same variety

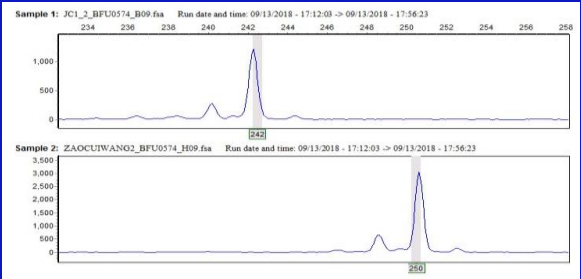
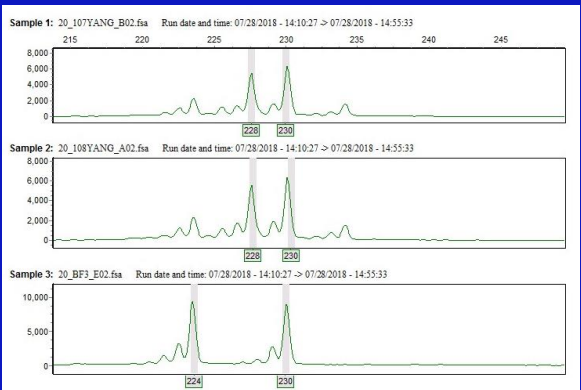
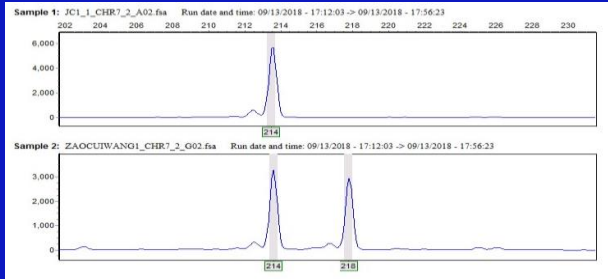
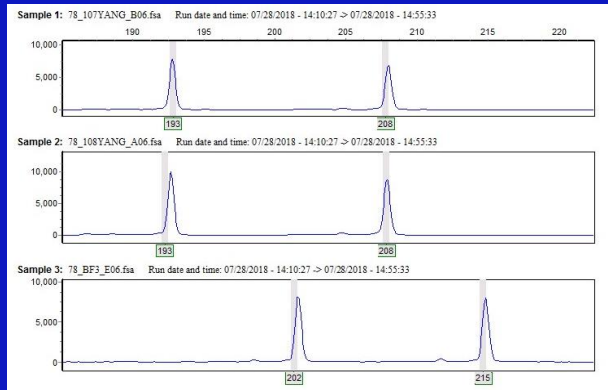
杨树品种 1  
Poplar Variety 1

杨树品种 2  
Poplar Variety 2

杨树品种 3  
Poplar Variety 3

杨树品种 4  
Poplar Variety 4

杨树品种 5  
Poplar Variety 5



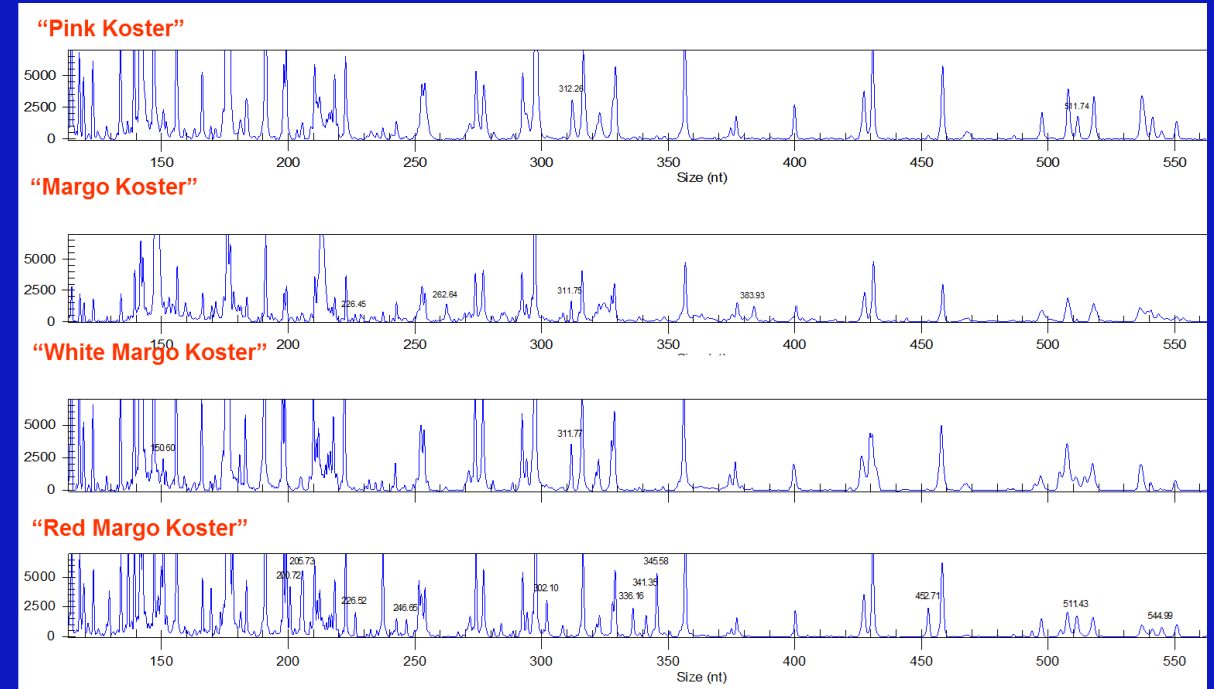
待测品种  
Candidate

待测品种  
Candidate

2018年比较分析了5个杨属品种 Five Poplar varieties were tested, 2 of which have the same DNA profile



## EDV 判定 EDV determination



表型差异显著（花色），但DNA指纹高度相似 Mophloically different, highly similar in DNA profiles  
 较为常见（花卉、果树等品种） Common in flower and fruit plants

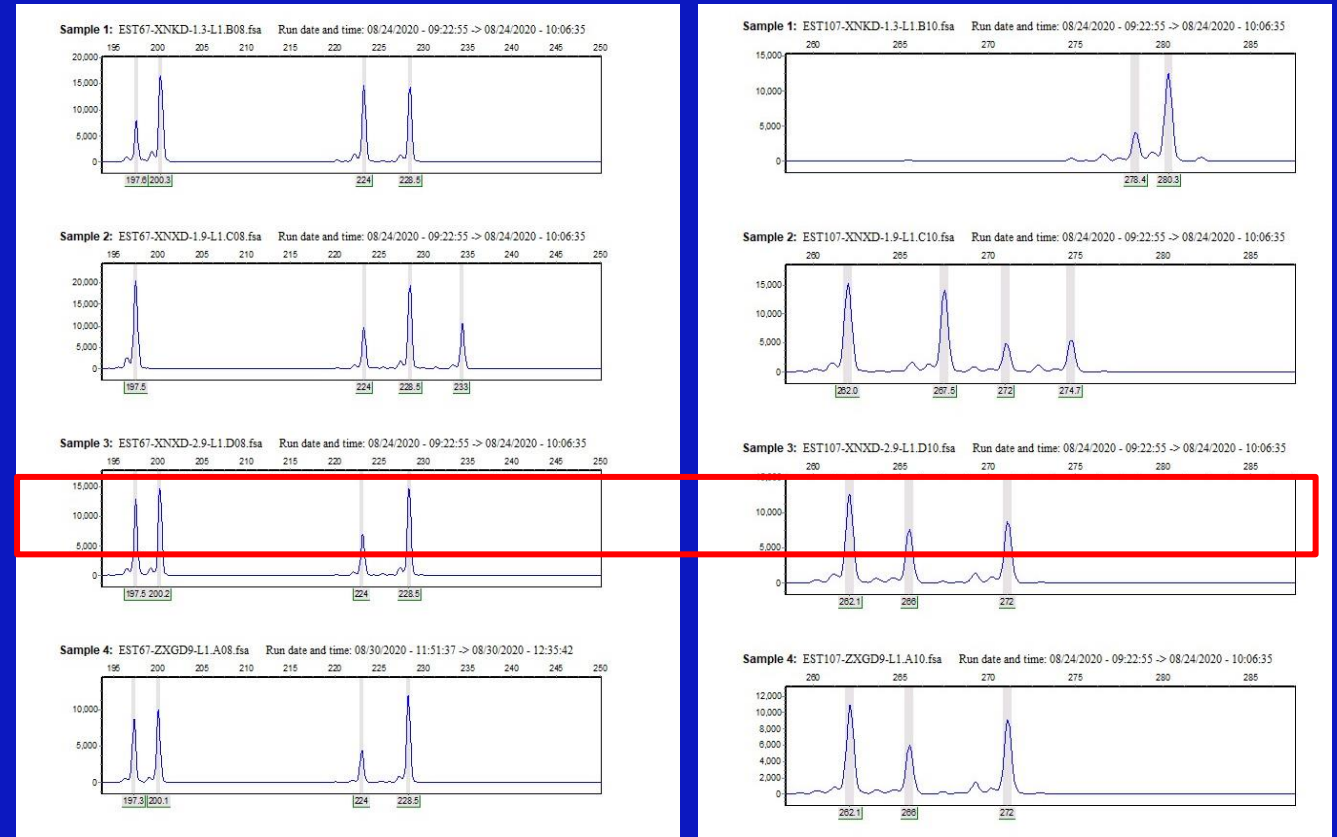
## 辅助维权 Application in infringement cases

2019年，辅助测试了猕猴桃属材料4份，其中两份在30个位点上存在相似的SSR指纹

Four accessions of *Actinidia chinensis* were tested by SSR markers.

The results showed that two accessions have same SSR fingerprints.

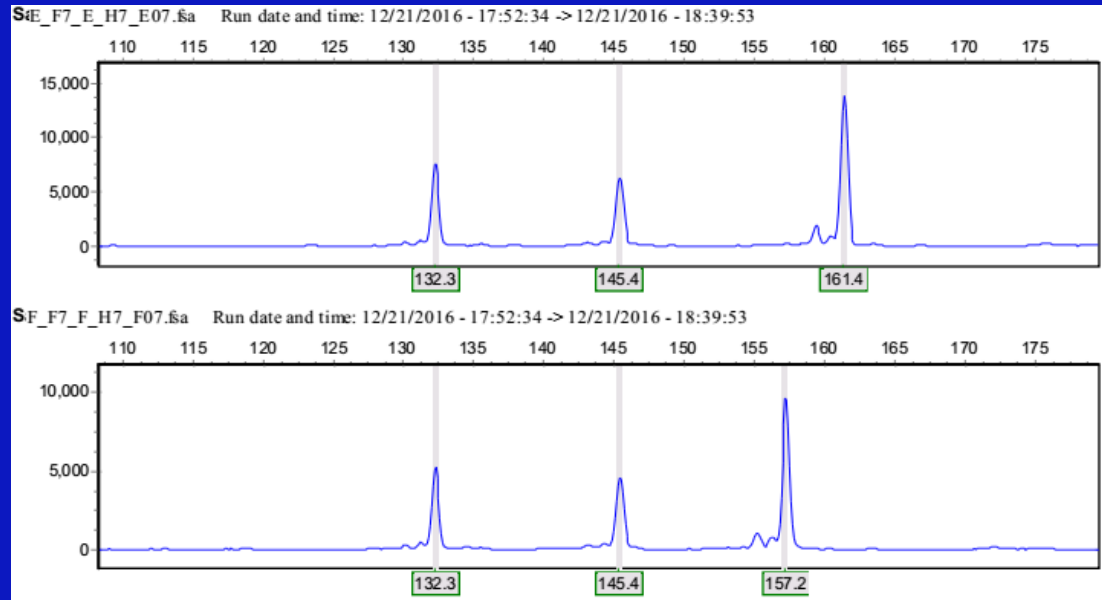
EDV or same accession?  
More phenotypic data



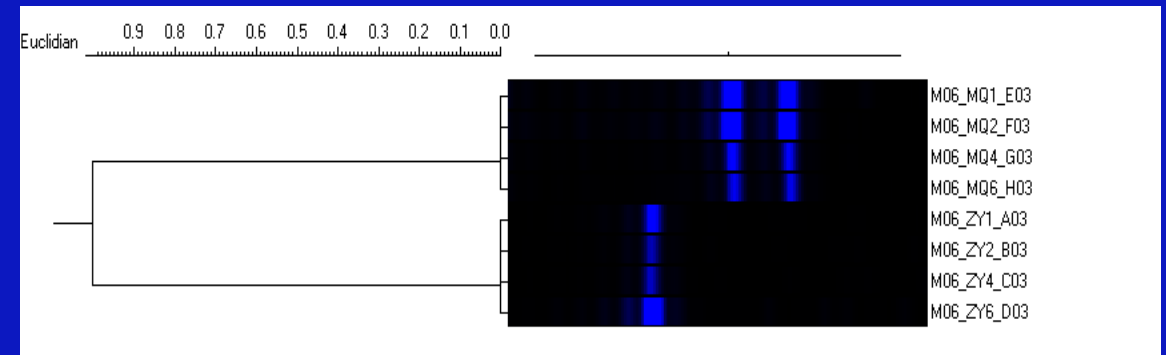
## 良种审定中的应用 Application in National listing

建立了杨属, 刺槐, 梓属分子测定技术体系;

Technical system for molecular IDs for varieties of *Populous* L., *Robinia pseudoacacia* and *Catalpa* L.



三倍体杨树 *Populous* L. triploid



二倍体梓树 *Catalpa* L. diploid

## 小结 Summary

- 1、收集保存了1300余份月季品种组织、DNA材料；  
Samples for DNA analyses were collected of over 1300 rose varieties
- 2、建立了基于AFLP/SSR分子标记的月季品种鉴定体系；  
AFLP and SSR systems were established for identification of Rose varieties
- 3、构建了月季DNA分子数据库  
Database of DNA profiles with SSR markers were constructed for Rose varieties
- 4、开发了月季叶绿体基因组SNPs分子标记1000余个  
1000+SNPs from cp genomes were developed
- 5、验证了150个SNPs位点，评价分析品种鉴定力  
Over 150 SNPs were verified and their discrimination power were assessed in rose varieties

## 应用场景 Scenarios for application





## 致谢 Acknowledgments

1 国家林业和草原局植物新品种保护办公室

PVP office of NFGA

2 国家林业和草原局种苗司

Department of Seed and Seedling Administration of NFGA

3 国家自然科学基金委

National Natural Science Foundation of China

4 会议组织方

Workshop organizers