

苹果部分种质资源分子身份证的构建

高源, 刘凤之, 王昆, 王大江, 龚欣, 刘立军

(中国农业科学院果树研究所/农业部园艺作物种质资源利用重点实验室, 辽宁兴城 125100)

摘要: 【目的】以国家果树种质兴城梨、苹果圃保存的 131 份苹果地方品种、育成品种及其野生近缘种为试材, 利用 TP-M13-SSR 标记构建苹果种质分子身份证。【方法】基于 TP-M13-SSR 指纹图谱, 筛选可以将苹果种质区分的引物组合, 并对其等位基因进行编码建立种质分子身份证。【结果】(1) 从 131 份材料中随机选取两份材料, 对第一次 PCR 条件进行优化和引物筛选, 从 32 对合成引物中筛选出 16 对稳定性高和重复性好的 TP-M13-SSR 引物用于 131 份苹果属植物指纹图谱构建。(2) 16 对 SSR 引物在供试种质间共检测出等位基因 326 个, 每对引物平均检测到等位基因数为 20.3 个。CH05d04 对种质扩增的等位基因数最多为 49 个, 位点期望杂合度最高为 0.878; 其次是 CH01f07a 为 48 个。利用 PopGen32 软件计算引物的多态性信息含量, 16 对引物的平均多态性信息含量为 0.7558。16 对 SSR 引物可区分供试苹果种质资源数量从 11 份到 71 份不等, 平均每对 SSR 引物可区分 49 份苹果种质, 区分率为 8.09%—52.21%。其中对苹果种质区分率最高的是 CH01f07a, 最低的为 BGT23b。(3) 根据引物扩增的多态性信息含量和对苹果种质的区分率, 将两者均较高的引物 CH05d04、CH01f07a、CH03d07、CH04e03、CH04h02 和 CH04g07 两两组合, CH04h02 和 CH01f07a 引物组合分辨率最高, 可以区分 120 份苹果种质。继续增加组合中引物数量, 在增加到 3 对引物时, 即可将全部苹果种质区分开来。(4) 把可以将全部供试苹果种质资源材料全部区分的 3 对核心引物 CH04h02、CH05d04 和 CH01f07a 获得等位基因按照从大到小的顺序排列, 并用阿拉伯数字从 01 开始赋值; 将每份材料在 3 个位点获得的等位基因按照赋值数字编码获得每份供试材料独有的字符串, 利用条码技术将每对引物的分子身份证转化成可被机器快速扫描的条码分子身份证。【结论】依据引物扩增的多态性信息含量和对苹果种质的区分率, 筛选核心引物组合, 区分全部供试苹果地方品种、育成品种及其野生近缘种质资源, 并基于指纹图谱构建其可被机器快速识别的分子身份证, 使每份种质具有可辨的分子身份证, 达到利用最少、最特异引物区分最多苹果种质的目的。

关键词: 苹果; 种质资源; TP-M13-SSR; 分子身份证

Establishment of Molecular ID for Some Apple Germplasm Resources

GAO Yuan, LIU Feng-zhi, WANG Kun, WANG Da-jiang, GONG Xin, LIU Li-jun

(Research Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops(Germplasm Resources Utilization), Ministry of Agriculture, Xingcheng 125100, Liaoning)

Abstract: 【Objective】 A total of 131 apple germplasms including landraces, bred cultivars and related species selected from the National Repository of Pear and Apple Germplasm Resources in Xingcheng, China were studied with tailed primer M13 microsatellite markers (TP-M13-SSR). An analysis was made to establish the molecular ID of 131 apple germplasms. 【Method】 Based on genetic fingerprints, germplasms were distinguished with selected SSR markers, alleles that were amplified by each marker were coded, then was combined as a molecular ID. 【Result】 Two accessions selected from a total of 131 accessions were used for optimization of the first PCR detecting conditions and SSR primer screening. 16 pairs of TP-M13-SSR primers with high stability

收稿日期: 2015-04-13; 接受日期: 2015-08-04

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201303093)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2011006)

联系方式: 高源, E-mail: gaoyuan02@caas.cn. 通信作者王昆, E-mail: wangkun5488@163.com

and good repeatability were used to establish the fingerprints of 131 accessions of *Malus* Mill. By using 16 selected SSR markers, 326 polymorphic sites were detected with a mean value of 20.3. The amplification of CH05d04 for all germplasms obtained 49 alleles with the highest expected heterozygosity 0.878, and the amplification of CH01f07a for all germplasms obtained 48 alleles. The polymorphism information content was calculated by PopGen32 with 0.7558 on average. 16 SSR markers could distinguish 11 accessions at least, 71 accessions at most, and 49 accessions on average. The identified rate was 8.09%-52.21%. The identified rate of CH01f07a was the highest, and the identified rate of BGT23b was the lowest. Based on the PIC of amplification and identified rate, each pair of two SSR primers was combined together to identify all the accessions. The combination of CH04h02 and CH01f07a could distinguish 120 accessions at most. More SSR primers were combined together. Finally three SSR primers could distinguish all the accessions. All the alleles of the three core SSR markers were sequenced from small to large, and the assignment was from number 01. A character string was constituted by combining all the codes of the three primers for every accession. By using barcode technology molecular ID can be transferred into a barcode ID that can be quickly scanned by machine. **【Conclusion】** Based on the PIC of amplification and identified rate, core SSR primers can be screened out to distinguish all the landraces, bred cultivars, and related species. And by constructing fingerprints, every apple germplasm obtains its differentiable molecular ID that can be recognized by the machine. The purpose was to distinguish the most apple germplasms by using the least and the most specific primers.

Key words: apple(*Malus* Mill.); germplasm resources; TP-M13-SSR; molecular ID

0 引言

【研究意义】中国是世界苹果属植物最大的起源中心之一^[1-2],有历史记载的种质资源有上千种。各地资源的频繁交流,造成苹果种质混杂现象层出不穷。准确鉴定苹果种质资源将有助于保护知识产权,也是苹果种质资源纯度保持的重要保证。**【前人研究进展】**以往,苹果种质资源鉴定有形态学、同工酶^[3-4]及分子标记^[5-8]等方法。TP-M13-SSR (simple sequence repeat with tailed primer M13) 技术是在 SSR 技术和荧光测序技术基础上发展形成的对 SSR 扩增产物进行荧光测序的检测体系^[9],具有重复性高、结果准确等优点,解决了分析通量较低、扩增产物检测流程繁琐、数据记录工作量过大等一系列问题^[10]。DNA 指纹图谱因其具有多位点性、高变异性和稳定遗传等特点,被认为是品种鉴定最简单、有效的方法^[11]。而分子身份证则是在得到 DNA 指纹图谱的基础上,运用不同的编码方式对指纹图谱进行数字化处理后得到字符串能够更加简单明了地区分种质资源,计算机自动比对种质资源差异,克服人工比对的繁琐、低效等问题^[12-13]。分子身份证研究已在大豆^[14]、茶树^[15]、甘蔗^[16-17]、苧麻^[18]、甜高粱^[19]、水稻^[20-21]、萝卜^[22]和红麻^[23]等作物上得以开展。而果树种质资源的分子身份证研究较少,仅在樱桃^[24]、桃^[13]、葡萄^[25]和梨^[26]上进行过研究。**【本研究切入点】**目前,苹果种质资源指纹图谱构建工作研究较少^[27-29],基于指纹图谱的分子身份证研究国内外尚未见报道。**【拟解决的关键问题】**本研究利用国家果树种质兴城梨、苹果圃保存的 131 份苹果地方品

种、育成品种及其近缘野生种为研究试材,通过 TP-M13-SSR 技术建立种质的指纹图谱,构建其独特的条形码鉴定标识即分子身份证,以期实现苹果种质资源的快速分子鉴定,并为苹果种质资源收集和保存以及研究和利用提供理论基础,为中国苹果资源的知识产权保护提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

131 份材料均取自国家果树种质兴城梨、苹果圃,包括 35 份地方品种(1—35 号)、77 份育成品种(36—112 号)和 19 份近缘野生种(113—131 号)(表 1)。

1.2 DNA 的提取及扩增体系

利用德国 QIAGEN 的 DNeasy Plant Mini Kit 提取嫩叶基因组 DNA。在 TP-M13 自动荧光检测系统中,用 3 条引物来进行 PCR 扩增。第 1 条引物是把普通的 SSR 引物的正向引物分别和 M13 的反向引物相连接合成带有 M13 尾巴的引物,即 TP-M13 引物;第 2 条引物为正常的 SSR 反向引物;第 3 条引物是 5'端带有荧光标记的 M13 正向引物。第 1 和第 2 条引物以普通 SSR 引物加 M13 接头生成即为 TP-M13-SSR 引物。选取已报道的长度在 100—300 bp 的普通 SSR 引物 32 对^[30-32],加 M13 接头后 TP-M13-SSR 引物由上海 Sangon 公司合成;5'端带有荧光标记的 M13 正向引物(5'-CACGACGTTGTAACGAC-3')则由美国 ABI 公司合成,分别标记 3 种荧光 6FAMTM、VICTM和 NEDTM,即合成分别标记 3 种荧光的 M13 正向引物。

表 1 131 份苹果种质名称及分子身份证编码

Table 1 Name and molecular ID code of 131 apple germplasms

编号 Code	材料名称 Accession name	学名 Scientific name	分子身份证编码 Molecular ID	编号 Code	材料名称 Accession name	学名 Scientific name	分子身份证编码 Molecular ID
1	绵苹果 Mianpingguo	<i>M.domestica</i>	192206063131	34	西府海棠 Xifuhaitang	<i>M.micromalus</i>	031313201919
2	小矾山槟子 Xiaofanshanbinzig	<i>M.domestica</i>	051005062325	35	海棠花 Haitanghua	<i>M.spectabilis</i>	061214142022
3	圆叶海棠 Yuanyehaitang	<i>M.prunifolia</i>	061309141120	36	露香 Luxiang	<i>M.domestica</i>	102306102026
4	平遥古城海棠 Pingyaoguchenghaitang	<i>M.prunifolia</i>	102006103131	37	龙丰 Longfeng	<i>M.domestica</i>	132225251420
5	大秋 Daqiu	<i>M.prunifolia</i>	050912131318	38	兴平 Xingping	<i>M.domestica</i>	132225252127
6	大楸子 Daqiuzi	<i>M.prunifolia</i>	072206192122	39	绿光 Lüguang	<i>M.domestica</i>	101025251422
7	吉林小黄海棠 Jilinxiaohuanghaitang	<i>M.prunifolia</i>	071212141819	40	宁丰 Ningfeng	<i>M.domestica</i>	071025250406
8	楸子 Qiuzi	<i>M.prunifolia</i>	071615153131	41	奎二 Kuier	<i>M.domestica</i>	092312131318
9	牛妈妈海棠 Niumamahaitang	<i>M.prunifolia</i>	112407092022	42	伏锦 Fujin	<i>M.domestica</i>	071006091326
10	宁夏海棠 Ningxiahaitang	<i>M.prunifolia</i>	061308141120	43	新元帅 Xinyuanshuai	<i>M.domestica</i>	091009102226
11	东北黄海棠 Dongbeihuanghai	<i>M.prunifolia</i>	010225251823	44	大沙河元帅 Dashaheyuanshuai	<i>M.domestica</i>	082125252226
12	莱芜难咽 Laiwunanyan	<i>M.prunifolia</i>	062205110920	45	国玲 Guoling	<i>M.domestica</i>	070906131822
13	河北八棱 Hebeibaleng	<i>M.robusta</i>	070906132123	46	富秋 Fuqiu	<i>M.domestica</i>	112409141427
14	三块石海棠 1 Sankuashihaitang1	<i>M.robusta</i>	070906133131	47	秋锦 Qiujin	<i>M.domestica</i>	091010131322
15	小矾山八棱 Xiaofanshanbaleng	<i>M.robusta</i>	071106121830	48	垂枝国光 Chuzhiguoguang	<i>M.domestica</i>	092213131318
16	热碾子 Regunzi	<i>M.robusta</i>	061406061919	49	新花 Xinhua	<i>M.domestica</i>	282812141818
17	冷海棠 Lenghaitangshisheng	<i>M.robusta</i>	192706140920	50	早金冠 Zaojinguan	<i>M.domestica</i>	152207121822
18	早白海棠 Zaobaihaitang	<i>M.robusta</i>	062206122022	51	伏红 Fuhong	<i>M.domestica</i>	092106091121
19	平顶海棠 Pingdinghaitang	<i>M.robusta</i>	141913131921	52	甜红玉 Tianhongyu	<i>M.domestica</i>	112306092021
20	三块石海棠 2 Sankuashihaitang2	<i>M.robusta</i>	111410133131	53	胜利 Shengli	<i>M.domestica</i>	102207132122
21	红海棠 Honghaitang	<i>M.robusta</i>	072306170102	54	中秋 Zhongqiu	<i>M.domestica</i>	101106090713
22	短枝碾子 Duanzhigunzi	<i>M.robusta</i>	062206171919	55	脆红 Cuihong	<i>M.domestica</i>	071106102121
23	晚白海棠 Wanbaihaitang	<i>M.robusta</i>	192209121321	56	寒富 Hanfu	<i>M.domestica</i>	071116231320
24	怀来八楞海棠 Huailaibalenghaitang	<i>M.robusta</i>	030912142323	57	斯托诺维 Sitonuowe	<i>M.domestica</i>	121814181522
25	冬白果 Dongbaigu	<i>M.sieversii</i>	061512122024	58	翠秋 Cuiqiu	<i>M.domestica</i>	072207131423
26	红果子 Hongguozi	<i>M.sieversii</i>	080814142325	59	国帅 Guoshuai	<i>M.domestica</i>	091010141427
27	霍城白果子 Huochengbaizuozi	<i>M.sieversii</i>	070911142323	60	眉短 Meiduan	<i>M.domestica</i>	101007091721
28	克孜阿尔玛 Keziaerma	<i>M.sieversii</i>	081906241321	61	嵌合体国光 Qianhetiguoguang	<i>M.domestica</i>	092302151318
29	柠檬海棠 Ningmenghaitang	<i>M.sieversii</i>	070809210921	62	烟红 Yanhong	<i>M.domestica</i>	091009101720
30	阿留斯坦 Aliusitan	<i>M.sieversii</i>	081013141823	63	平枝国光 Pingzhiguoguang	<i>M.domestica</i>	091313131419
31	白海棠 Baihaitang	<i>M.sieversii</i>	061012212024	64	红国光 Hongguoguang	<i>M.domestica</i>	091009102226
32	冬红果 Donghongguo	<i>M.sieversii</i>	112112121823	65	岳红 Yuehong	<i>M.domestica</i>	132212122026
33	花红 Huahong	<i>M.asiatica</i>	071111111618	66	达尔文 Daerwen	<i>M.domestica</i>	101206142123

续表 1 Continued table 1

编号 Code	材料名称 Accession name	学名 Scientific name	分子身份证编码 Molecular ID	编号 Code	材料名称 Accession name	学名 Scientific name	分子身份证编码 Molecular ID
67	长祝 Changzhu	<i>M.domestica</i>	070809101421	100	早翠绿 Zaocuilü	<i>M.domestica</i>	071616161321
68	长红 Changhong	<i>M.domestica</i>	071106142022	101	丹霞 Danxia	<i>M.domestica</i>	092210121322
69	友谊 Youyi	<i>M.domestica</i>	081209101421	102	岱绿 Dailü	<i>M.domestica</i>	132206131920
70	锦玉 Jinyu	<i>M.domestica</i>	112306091421	103	国庆 Guoqing	<i>M.domestica</i>	282813231320
71	伏帅 Fushuai	<i>M.domestica</i>	071606131313	104	短枝印度 Duanzhiyindu	<i>M.domestica</i>	222606091320
72	香国光 Xiangguoguang	<i>M.domestica</i>	102209122226	105	青香 Qingxiang	<i>M.domestica</i>	172310121622
73	宁光 Ningguang	<i>M.domestica</i>	082212131320	106	双红 Shuanghong	<i>M.domestica</i>	101109131421
74	宁冠 Ningguan	<i>M.domestica</i>	282809121318	107	金红 Jinhong	<i>M.domestica</i>	282813141325
75	辽伏 Liaofu	<i>M.domestica</i>	070909161321	108	东光 Dongguang	<i>M.domestica</i>	102213231322
76	迎秋 Yingqiu	<i>M.domestica</i>	081105101313	109	甜黄魁 Tianhuankui	<i>M.domestica</i>	070810121121
77	宁酥 Ningsu	<i>M.domestica</i>	102006091421	110	新红 Xinhong	<i>M.domestica</i>	082110121821
78	宁秋 Ningqiu	<i>M.domestica</i>	071106141118	111	金阳 Jinyang	<i>M.domestica</i>	081216162222
79	胜利红冠 Shenglihongguan	<i>M.domestica</i>	111407131821	112	实矮 Shiai	<i>M.domestica</i>	142312133131
80	中国彩苹 Zhongguocaiping	<i>M.domestica</i>	071808082022	113	樱叶海棠 Yingyehaitang	<i>M.cerasifolia</i>	040607110924
81	奎花 Kuihua	<i>M.domestica</i>	092507142122	114	垂丝海棠 Chuisihaitang	<i>M.halliana</i>	071712141324
82	秋金星 Qiujinxing	<i>M.domestica</i>	101515151921	115	芦氏湖北海棠 Lushihaitang	<i>M.hupehensis</i>	061706151018
83	十三陵短枝 Shisanlingduanzhi	<i>M.domestica</i>	091011112327	116	平邑甜茶 Pingyitiancha	<i>M.hupehensis</i>	091603141317
84	青冠 Qingguan	<i>M.domestica</i>	051106132022	117	兴山湖北 Xingshanhubei	<i>M.hupehensis</i>	070718181013
85	平阴短枝 Pingyinduanzhi	<i>M.domestica</i>	092509102226	118	毛山定子 Maoshandingzi	<i>M.manshurica</i>	061411223131
86	烟红蜜 Yanhongmi	<i>M.domestica</i>	102309141822	119	西蜀海棠 Xishuhaitang	<i>M.prattii</i>	282807070913
87	昌红 Changhong	<i>M.domestica</i>	102309131315	120	维西三叶 Weixisanye	<i>M.sieboldii</i>	131904041019
88	矮丰 Aifeng	<i>M.domestica</i>	102309131322	121	复县三叶 Fuxiansanye	<i>M.sieboldii</i>	282817171616
89	新国光 Xinguoguang	<i>M.domestica</i>	092214141318	122	红三叶 Hongsanye	<i>M.sieboldii</i>	030614142828
90	北京 0201 Beijing0201	<i>M.domestica</i>	091010102226	123	林芝海棠 Linzhihaitang	<i>M.sikkimensis</i>	051006100913
91	燕山红 Yanshanhong	<i>M.domestica</i>	091009131326	124	四川变叶 Sichuanbianye	<i>M.toringoides</i>	030903060913
92	富红 Fuhong	<i>M.domestica</i>	081013131322	125	变叶海棠 Bianyehaitang	<i>M.toringoides</i>	070903063131
93	秀水国光 Xiushuiguoguang	<i>M.domestica</i>	091009131826	126	小金变叶 Xiaojinbianye	<i>M.toringoides</i>	060910150914
94	金光 Jinguang	<i>M.domestica</i>	112410231421	127	昭觉山定子 Zhaojueshandingzi	<i>M.baccata</i>	030903060813
95	瑞香 Ruixing	<i>M.domestica</i>	101106061121	128	山荆子 Shanjingzi	<i>M.baccata</i>	051208141229
96	锦红 Jinhong	<i>M.domestica</i>	081209161621	129	锡金海棠 Xijinhaitang	<i>M.sikkimensis</i>	07111407131119
97	八月酥 Bayuesu	<i>M.domestica</i>	282806092021	130	沧江海棠 Cangjianghaitang	<i>M.ombrophila</i>	011112010603052123
98	战寒香 Zhanhanxiang	<i>M.domestica</i>	282813131321	131	丽江山定子 Lijiangshandingzi	<i>M.rockii</i>	091317060912142027
99	云青 Yunqing	<i>M.domestica</i>	091610121322				

PCR 体系和扩增产物的纯化体系参照高原等^[8]建立的体系。为得到最佳的 TP-M13-SSR 扩增效果, PCR 反应分两步进行, 第一步为 TP-M13-SSR 引物的扩增获得 PCR 产物, 第二步为 5'端带有荧光标记的 M13 正向引物的扩增, 实现 SSR 扩增产物的荧光标记。PCR 反应在 Bio-Rad PTC-200 上进行。PCR 扩增并经过纯化后的 TP-M13-SSR 荧光标记产物在美国 ABI 3730 基因测序仪上进行荧光检测, 收集原始数据。

1.3 数据处理与标准化

GeneMapper3.0 软件分析 ABI3730 收集的数据, 获得不同样品扩增片段的长度。PopGen32 分析获得的供试材料指纹图谱数据, 获得引物多态性, 将每对引物获得的等位基因按照从大到小的顺序排列, 并用阿拉伯数字从 01 开始赋值, 将每份材料在 3 个位点获得的等位基因按照赋值数字编码获得每份供试材料独有的字符串。再

利用条码技术将每份材料按相同位点顺序排列的编码字符串转化成每份材料独特的条码标识即分子身份证。

2 结果

2.1 TP-M13-SSR 引物的筛选及条件优化

由于 TP-M13-SSR 正向引物比反向引物多了 19 bp 的 M13 接头, 使得引物退火温度较普通 SSR 引物更易出现扩增不稳定的情况。因此, 必须对引物第一次 PCR 条件进行优化, 并对引物进行筛选。从 131 份材料中随机选取两份材料, 在 45—60℃以 0.5℃为梯度设定退火温度进行 PCR 扩增, 用 3%的琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测。最终筛选出稳定性高、重复性好的 16 对 TP-M13-SSR 引物(包含 2 对梨引物), 优化退火温度(引物名称及序列见表 2), 用于 131 份苹果属植物指纹图谱构建。

表 2 16 对 TP-M13-SSR 引物及优化条件

Table 2 16 pairs of TP-M13-SSR primers and optimum conditions

引物名称 Primer name	正向引物序列 Forward primer sequence (5'-3')	反向引物序列 Reverse primer sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature (°C)
KA4b	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> AAAGGTCCTCTCACTGTCT	R:CCTCAGCCCAACTCAAAGCC	48
BGT23b	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> CACATTCAAAGATTAAGAT	R:ACTCAGCCTTTTTTCCAC	50
CH01f03b	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> GAGAAGCAAATGCAAACCC	R:CTCCCCGGTCCTATTCTAC	58
CH02b12	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> GGCAGGCTTTACGATTATGC	R:CCCACTAAAAGTTCACAGGC	59
CH03d07	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> CAAATCAATGCAAACACTGTCA	R:GGCTTCTGGCCATGATTTTA	51
CH04e03	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> TTGAAGATGTTGGCTGTGC	R:TGCATGTCTGTCTCCTCCAT	60
CH04h02	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> GGAAGCTGCATGATGAGACC	R:CTCAAGGATTCATGCCAC	55.5
CH05e06	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> ATTGGAAGCTCCTCGTATTGTGC	R:ATCAACAGTAGTGGTAGCCGGT	58
CH05d08	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> TCTATGGATGGGAAAAAGAGG	R:TGATTGCCACATGTCAAGTGT	55.5
CH02a04	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> GAAACAGGCGCCATTATTTG	R:AAAGGAGACGTTGCAAGTGG	58
CH05b06	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> ACAAGCAAACCTAATACCACCG	R:GAGACTGGAAGAGTTGCAGAGG	55
CH05d04	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> ACTTGTGAGCCGTGAGAGGT	R:TCCGAAGGTATGCTTCGATT	60
CH01f07a	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> CCCTACACAGTTTCTCAACCC	R:CGTTTTTGGAGCGTAGGAAC	59
CH04g07	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> CCCTAACCTCAATCCCAAT	R:ATGAGGCAGGTGAAGAAGGA	57
CH05e04	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> CAAGGAGAAGACCGTGTGAAATC	R:CATGGATAAGGCATAGTCAGGA	58
CH05h12	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> TTGCGGAGTAGGTTGCTTT	R:TCAATCCTCATCTGTGCCAA	60

下划线部分序列为 5'端 M13 接头 Underlined sequences indicate the 5'M13 tail

2.2 TP-M13-SSR 引物扩增多态性

16 对 TP-M13-SSR 引物扩增 131 份苹果种质, 共检测到 326 个等位基因, 平均每对引物对品种扩增的等位基因数是 20.3 个。不同 SSR 引物扩增获得的等位基因数体现苹果种质不同位点 SSR 序列基本单元重复数的差异, 而不同苹果种质扩增获得的 SSR 产物片段差

异即体现苹果种质之间的差异。16 对引物对 131 份苹果种质扩增的条带数及位点杂合度如表 3, 从表中可以看出, BGT23b 对种质扩增的等位基因数最少为 7 个, 位点期望杂合度最低为 0.122; CH05d04 对种质扩增的等位基因数最多为 49 个, 位点期望杂合度最高为 0.878; 其次是 CH01f07a 为 48 个。等位基因数超过平

均数的引物还有 CH03d07、CH04e03、CH04h02、CH05b06 和 CH04g07。引物扩增可获得的等位基因数越多,期望杂合度越高,表明其更能反映不同品种的差异。利用 PopGen32 软件计算引物的多态性信息含量,16 对引物的平均多态性信息含量为 0.7558,高于平均多态性信息含量的引物有 CH03d07、CH04e03、CH04h02、CH05c06、CH02a04、CH05d04、CH01f07a、CH04g07 和 CH05h12。在等位基因数高于平均值的引物和多态性信息含量高于平均值的引物中,共有的为

CH05d04、CH01f07a、CH03d07、CH04e03、CH04h02 和 CH04g07。16 对 SSR 引物可区分供试苹果种质资源数量从 11 份到 71 份不等,平均每对 SSR 引物可区分 49 份苹果种质,区分率为 8.09%—52.21%。其中对苹果种质区分率最高的是 CH01f07a,最低的为 BGT23b。只用 1 对 SSR 引物难以将全部供试苹果种质资源分开。但是,多态性信息含量和对苹果种质区分率高的引物将在本试验中构建苹果种质资源分子身份证价值最大。

表 3 16 个 SSR 位点在 131 份苹果材料上检测到的遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of 131 apple accessions from China at 16 SSR loci

标记 Marker	等位基因数 Allele No.	期望杂合度 Expected heterozygosity	表观杂合度 Observed heterozygosity	多态性信息含量 PIC	可区分种质数量 Germplasms No. can be distinguished	区分率 Identified rate (%)
KA4b	11	0.635	0.537	0.644	21	15.44
BGT23b	7	0.122	0.088	0.151	11	8.09
CH01f03b	14	0.740	0.106	0.731	21	15.44
CH02b12	20	0.728	0.722	0.718	43	31.62
CH03d07	24	0.823	0.760	0.818	58	42.65
CH04e03	25	0.827	0.746	0.832	67	49.26
CH04h02	28	0.866	0.867	0.858	67	49.26
CH05c06	19	0.817	0.819	0.816	51	37.50
CH05d08	20	0.748	0.677	0.749	45	33.09
CH02a04	19	0.857	0.832	0.856	59	43.38
CH05b06	23	0.700	0.674	0.711	56	41.18
CH05d04	26	0.878	0.709	0.873	59	43.38
CH01f07a	31	0.885	0.887	0.886	71	52.21
CH04g07	25	0.846	0.850	0.831	63	46.32
CH05e04	16	0.762	0.614	0.775	43	31.62
CH05h12	18	0.840	0.810	0.844	53	38.97
平均 Average	20.3	0.7546	0.6686	0.7558	49.3	36.21

2.3 最佳引物组合的筛选与 TP-M13-SSR 指纹图谱

根据每对引物对全部供试苹果种质区分率的鉴定结果,只用 1 对 SSR 引物难以将全部供试苹果种质资源分开。分子身份证的最终目的是对所有供试苹果种质均赋予可辨的分子身份证,而又要同时满足用最少的引物区分最多的苹果种质的要求,否则将会造成最终构建的分子身份证过余冗繁。因此,有必要通过逐步增加引物设定引物组合,筛选可以将全部供试苹果种质可以全部区分的引物。

将多态性信息含量和对苹果种质区分率高的引物即 CH05d04、CH01f07a、CH03d07、CH04e03、CH04h02 和 CH04g07,两两组合,鉴定其对供试苹果种质的区

分率。CH04h02 和 CH01f07a 引物组合分辨率最高,可以区分 120 份苹果种质;其次是 CH04g07 和 CH01f07a 引物组合,可以区分 118 份苹果种质;再其次是 CH05d04 和 CH01f07a 引物组合,可以区分 117 份苹果种质(表 4)。

根据 2 对引物组合的区分结果,继续增加引物组合的数量。在增加到 3 对引物时,即可将全部苹果种质区分开来。其中 3 对引物为 CH04h02、CH05d04 和 CH01f07a,其为等位基因数和多态性信息含量均居前三位的苹果引物。利用此 3 对引物构建全部苹果种质的指纹图谱,其中,寒富和山定子在 3 个位点的指纹图谱见图 1 和图 2。

表 4 2 对引物组合对苹果种质的区分

Table 4 Apple germplasms can be distinguished by using a pair of primers

组号 Number	引物组合 Primer combination	未能区分的种质 Germplasms can not be distinguished	区分率 Identified rate (%)
1	CH05d04, CH01f07a	4, 41, 43, 49, 53, 66, 70, 72, 73, 80, 88, 101, 103, 105	89.31
2	CH03d07, CH04e03	3, 5, 10, 16, 21, 22, 38, 41, 43, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 63, 64, 65, 66, 68, 72, 74, 75, 80, 81, 89, 90, 92, 95, 97, 106, 116, 128, 131	74.00
3	CH03d07, CH04h02	3, 10, 13, 14, 38, 41, 43, 44, 48, 49, 53, 63, 64, 66, 68, 73, 92, 93, 94, 97, 114, 128, 131	82.44
4	CH03d07, CH04g07	42, 43, 45, 48, 53, 57, 64, 68, 70, 73, 88, 89, 93, 101, 107, 128, 131	87.03
5	CH03d07, CH05d04	5, 7, 13, 14, 21, 22, 24, 41, 43, 47, 48, 49, 52, 53, 64, 65, 66, 70, 73, 76, 80, 88, 89, 90, 94, 95, 97, 109, 113, 116, 128, 129, 131	74.81
6	CH03d07, CH01f07a	3, 5, 10, 16, 22, 41, 43, 44, 45, 48, 49, 52, 57, 63, 66, 72, 80, 88, 89, 92, 93, 95, 99, 107	81.67
7	CH04e03, CH04h02	3, 10, 13, 14, 38, 41, 43, 48, 49, 63, 64, 66, 68, 92, 106, 128, 131	87.02
8	CH04e03, CH04g07	3, 5, 9, 10, 13, 14, 26, 28, 40, 41, 48, 49, 64, 65, 66, 68, 71, 75, 79, 81, 88, 90, 92, 95, 97, 100, 105, 107, 110, 128, 131	76.34
9	CH04e03, CH05d04	5, 13, 14, 21, 22, 41, 43, 49, 64, 65, 66, 72, 74, 88, 90, 95, 97, 102, 103, 106, 109, 110, 116, 128, 131	80.92
10	CH04e03, CH01f07a	3, 5, 10, 16, 18, 22, 41, 43, 44, 48, 49, 63, 66, 83, 91, 92, 95, 103, 105, 123, 128	83.97
11	CH04h02, CH04g07	3, 10, 13, 14, 41, 48, 49, 53, 54, 61, 64, 66, 73, 75, 86, 92, 93, 97, 128, 131	84.73
12	CH04h02, CH05d04	13, 14, 43, 45, 53, 64, 71, 73, 81, 90, 91, 94, 97, 128, 131	88.55
13	CH04h02, CH01f07a	3, 10, 41, 43, 49, 63, 66, 92, 93, 128, 131	91.60
14	CH04g07, CH05d04	5, 32, 36, 41, 42, 43, 49, 52, 53, 55, 56, 64, 65, 66, 68, 72, 73, 88, 90, 97, 101, 110, 128, 131	81.68
15	CH04g07, CH01f07a	3, 5, 10, 41, 49, 66, 78, 88, 92, 93, 104, 127, 128	90.08

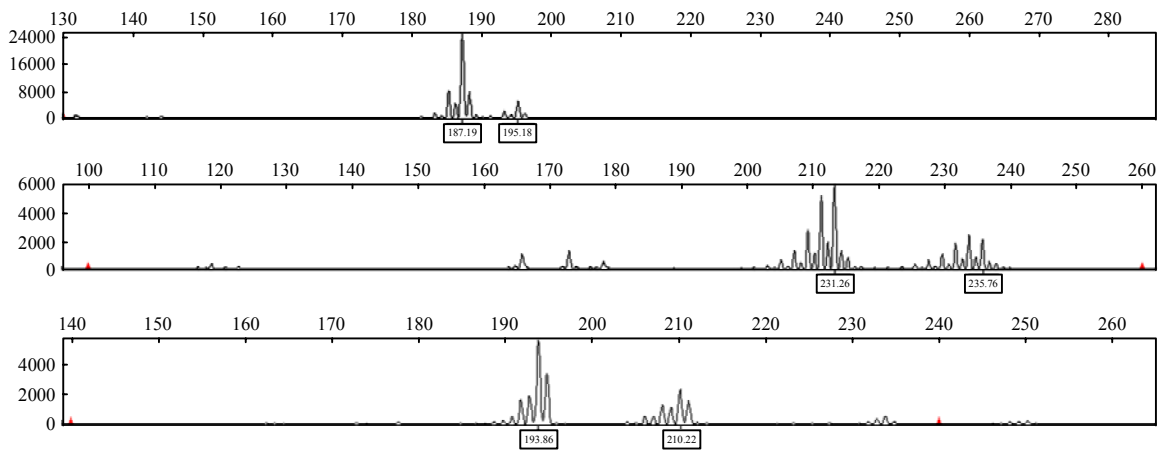


图 1 寒富在 3 个 SSR 位点 CH04h02、CH05d04 和 CH01f07a 的 TP-M13-SSR 指纹图谱

Fig. 1 The TP-M13-SSR fingerprinting of Hanfu at 3 SSR loci CH04h02, CH05d04 and CH01f07a

2.4 种质分子身份证编码

把可将全部供试苹果种质资源材料全部区分的 3 对 TP-M13-SSR 引物 CH04h02、CH05d04 和 CH01f07a 获得等位基因按照从大到小的顺序排列，并用阿拉伯数字从 01 开始赋值（表 5）。例如，引物 CH04h02 对全部供试材料扩增共获得 27 个等位基因，最小的为

141 bp，最大的为 247 bp，另外未获得等位基因的位点记为-9；将等位基因按照从小到大顺序排列，并从 01 开始赋值，即 141 bp 等位基因赋值为 01，依次类推，247 bp 等位基因赋值为 27，记为-9 的位点赋值为 28。将每份材料在 3 个位点获得的等位基因按照赋值数字编码获得每份供试材料独有的字符串（表 1）。

例如, 绵苹果在 3 个位点 CH04h02、CH05d04 和 CH01f07a 获得的等位基因分别为 187 bp/195 bp、215 bp/235 bp 和 194 bp/210 bp, 其对应的赋值数字分别为 07/11、16/23 和 13/20, 按序排列获得的字符串即为

071116231320。再利用条码技术将每份材料的按相同位点顺序排列的编码字符串转化成每份材料独特的条码标识即分子身份证。例如: 绵苹果的条形码分子身份证见图 3。

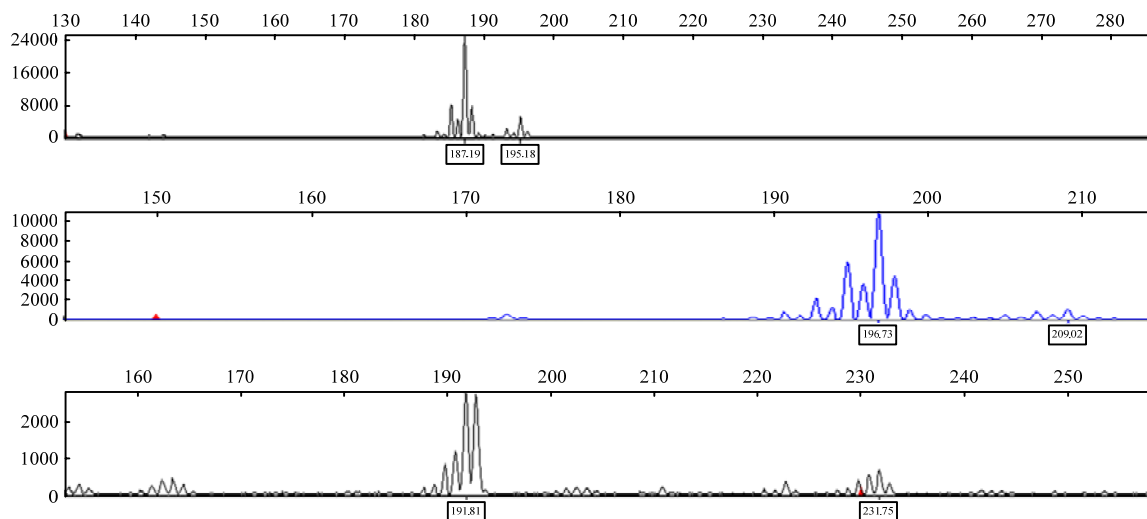


图 2 山荆子在 3 个 SSR 位点 CH04h02、CH05d04 和 CH01f07a 的 TP-M13-SSR 指纹图谱

Fig. 2 The TP-M13-SSR fingerprinting of Shanjingzi at 3 SSR loci CH04h02, CH05d04 and CH01f07a

表 5 等位基因赋值标准

Table 5 Alleles encoded standard

引物 Primer	编码 Code			引物 Primer	编码 Code		
	CH04h02	CH05d04	CH01f07a		CH04h02	CH05d04	CH01f07a
1	141	173	104	17	207	219	204
2	163	175	116	18	209	221	206
3	177	187	142	19	211	223	208
4	179	189	144	20	213	225	210
5	183	191	158	21	215	227	212
6	185	193	164	22	217	233	214
7	187	195	170	23	219	235	216
8	189	197	182	24	221	237	218
9	191	199	184	25	225	-9	220
10	193	201	186	26	237		222
11	195	203	190	27	247		224
12	197	205	192	28	-9		228
13	199	207	194	29			232
14	201	209	196	30			244
15	203	211	198	31			-9
16	205	213	202				



图 3 绵苹果的条形码分子身份证

Fig. 3 The molecular identity card of Mianpingguo

3 讨论

3.1 SSR 核心引物选择

SSR 分子标记为共显性标记, 用于构建指纹图谱的 SSR 引物定要具备多态性好、稳定性和重复性高的特点。但是, 构建苹果种质的分子身份证, 还要求用最少的引物数量区分最多的种质。因此, 依据引物对苹果种质鉴别的区分率、引物扩增等位基因数和多态性信息含量, 由高到低, 从 1 对引物开始, 逐步增加引物组合的数量, 直至获得可对全部苹果种质能够全部鉴别的引物组合, 达到最少的引物可以区分最多的苹果种质的目的。并且, 保证最终确定的可对苹果种质进行全部区分的引物具有最高的等位基因数和多态性信息含量。利于需要鉴定苹果种质数量增加时, 提高利用相同的引物可对试材有效区分的可能性。本试验中筛选的 3 对核心引物组合可将全部供试苹果种质进行区分, 在未来进一步的苹果种质的分子身份证构建中可以作为参考。

本试验中 2 对梨引物对苹果种质的指纹图谱构建具有一定的价值, 但是由于其多态性远低于最终的 3 对核心引物, 未能在最终的分子身份证构建中得到利用。

3.2 TP-M13-SSR 技术用于构建分子身份证优缺点

荧光测序技术与 SSR 分子标记技术的结合, 实现了对 SSR 分子标记数据的高效和准确的收集^[33], 能够区别仅为 2 bp 之差的差异片段^[34], 适用于苹果种质资源的指纹图谱构建。基于 DNA 测序仪建立的荧光标记 SSR 毛细管电泳检测法可以得到目标 DNA 片段的准确大小, 检测结果更为稳定、准确和高效, 更适用大批量苹果种质资源材料的检测与分析。而选择合适的引物是建立苹果分子指纹图谱进而构建其分子身份证的另一重要前提。本文选取的 SSR 引物多态性均较好, 利用 3 对可区分全部的供试材料。但是随着供试材料的增加, 可能会有具有诸多相同 SSR 位点而难以检测差异的材料出现, 尤其是变异极少的亲子代材料, 例如: 芽变等, 因此, 就需要通过增加 SSR 检测位点,

从足够多的 SSR 分子标记引物中筛选差异位点而获得不同苹果种质资源材料互异的指纹图谱, 达到获取核心引物, 以最少的引物量、最特异的引物区分苹果种质的目的。TP-M13-SSR 分子标记可以用相对廉价的方式将 SSR 分子标记结果数据化, 在需要新增加 SSR 检测位点时, 不需要对已检测过的材料进行重复检测, 有利于苹果种质资源研究中分子基础数据库的积累。

3.3 DNA 指纹图谱与分子身份证编码

DNA 指纹图谱是构建分子身份证的基础, 分子身份证与指纹图谱功能相同, 但却是不同的 2 个概念。指纹图谱是指能够区分生物个体之间差异的电泳图谱, 但分子身份证将 DNA 指纹数字化, 达到种质资源检索时更加直观的目的。相对于指纹图谱, 分子身份证能够更加简单明了地区分生物个体之间的差异。分子身份证一经提出, 便被赋予种质资源本身作为识别种质资源的一个标准。

不同研究者在进行分子身份证的构建时, 采用了不同的编码方法。目前构建分子身份证的编码方法主要有 3 类^[12], 第一类是以 1 和 0 代表等位基因位点扩增 DNA 条带的有无, 将 SSR 图谱转换为由 1 和 0 组成的字符串, 或在此基础上将二进制转化成十进制进行编码, 构成分子身份证; 第二类是将每对引物扩增的条带按从小到大排列, 依次编码; 有 2 个等位基因时取其中碱基数较少的一个; 第三类是将获得一系列带型用数字进行编码, 按照固定引物顺序, 串联各带型编码, 即可形成一组数据, 也就是该品种的分子身份证。研究者在选取分子身份证的编码方法时, 应根据研究对象的特点, 秉着统计方便, 书写简洁的原则进行。本研究综合已有的第一类和第二类编码方法, 根据荧光标记 SSR 指纹图谱, 筛选特异引物, 将每对引物扩增等位基因按照从小到大排列, 并用阿拉伯数字从 01 开始赋值, 将每份材料在特异位点获得的等位基因按照赋值数字编码获得每份供试材料独有的字符串即分子身份证; 再利用条码技术将其转化成条形码标识, 即条码分子身份证。这样既可以体现可将供试材料全部区分的每个位点所获得的等位基因情况, 又可以使获得的分子身份证长度不至于太长, 兼顾第一类和第二类编码方法的优点。

这种条形码标识的分子身份证可以利用条码扫描器进行扫描而更加快速的识别苹果种质, 彻底摆脱人工读取字符串式分子身份证的麻烦。此种苹果种质资源的分子身份证构建体系在国内外尚属首例, 这将在建立中国苹果种质资源的分子数据库, 以及苹果种质

资源保存和利用研究中有广阔的应用前景。其对苹果种质资源的高效利用、苹果新品种识别鉴定、品种标识、假冒伪劣品种鉴定等方面均有重要的意义和实际应用价值。

利用条码技术将获得的 DNA 指纹图谱信息转化为每份材料独有的分子身份证,使得不同苹果种质资源之间分子差异转变成了可见的、并可被机器快速识别差异,排除环境和人为等因素的影响。目前现存的条码制多种多样,选用条码时,要根据信息含量的多少和条码标签的尺寸大小选择合适的条码制。国家果树种质兴城苹果圃保存苹果资源千余份,种类繁多,类型多样。近些年,随着苹果种质资源收集力度加大,资源保存数量迅速增加。通过分子标记技术手段建立苹果种质资源的指纹图谱,生成每份资源分子身份证。既避免重复性的收集和保存,剔除同名异物和同物异名的苹果种质资源,有利于苹果种质资源的鉴定评价和提供利用。

4 结 论

依据引物扩增的多态性信息含量和对苹果种质的区分率,从 16 对 SSR 引物中筛选出最少的 3 对核心引物组合,区分 131 份苹果地方品种、育成品种及其野生近缘种质资源,并基于指纹图谱构建其可被机器快速识别的分子身份证。

References

- [1] 俞德俊. 中国果树分类学. 北京: 中国农业出版社, 1979: 2-81.
Yu D J. *Taxonomy of China Fruits*. Beijing: China Agriculture Press, 1979: 2-81. (in Chinese)
- [2] 董玉琛, 刘旭. 中国作物及其野生近缘植物: 果树卷. 北京: 中国农业出版社, 2006: 55-84.
Dong Y C, Liu X. *Crops and Their Wild Relatives in China: Vol. Fruit Crops*. Beijing: China Agriculture Press, 2006: 55-84. (in Chinese)
- [3] 李育农, 李晓林. 苹果属植物过氧化物酶同工酶酶谱的研究. 西南农业大学学报, 1995, 17(5): 371-377.
Li Y N, Li X L. Research on peroxidase isozyme in *Malus* Mill. *Journal of Southwest Agricultural University*, 1995, 17(5): 371-377. (in Chinese)
- [4] 史燕山, 骆建霞. 苹果元帅系品种过氧化物酶同工酶酶谱的比较. 天津农学院学报, 1995, 1: 11-14.
Shi Y S, Luo J X. Comparison of peroxidase zymograms of "Delicious" apple cultivars. *Journal of Tianjin Agricultural College*, 1995, 1: 11-14. (in Chinese)
- [5] 王爱德, 李天忠, 许雪峰, 韩振海. 苹果品种的 SSR 分析. 园艺学报, 2005, 32(5): 875-877.
Wang A D, Li T Z, Xu X F, Han Z H. SSR analysis for apple cultivars. *Acta Horticulturae Sinica*, 2005, 32(5): 875-877. (in Chinese)
- [6] 祝军, 王涛, 赵玉军, 张文, 李光晨. 应用 AFLP 分子标记鉴定苹果品种. 园艺学报, 2007, 27(2): 102-106.
Zhu J, Wang T, Zhao Y J, Zhang W, Li G C. Identification of apple varieties with AFLP molecular markers. *Acta Horticulture Sinica*, 2007, 27(2): 102-106. (in Chinese)
- [7] 高源, 刘凤之, 曹玉芬, 王昆. 苹果属种质资源亲缘关系的 SSR 分析. 果树学报, 2007, 24(2): 129-134.
Gao Y, Liu F Z, Cao Y F, Wang K. SSR analysis of genetic relationship for apple germplasm resources. *Journal of Fruit Science*, 2007, 24(2): 129-134. (in Chinese)
- [8] 高源, 王昆, 田路明, 曹玉芬, 刘凤之. 应用 TP-M13-SSR 技术鉴定苹果品种. 果树学报, 2010, 27(5): 833-837.
Gao Y, Wang K, Tian L M, Cao Y F, Liu F Z. Identification of apple cultivars by TP-M13-SSR technique. *Journal of Fruit Science*, 2010, 27(5): 833-837. (in Chinese)
- [9] Scheulke M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 2000, 18: 233-234.
- [10] 李会勇, 王天宇, 黎裕, 石云素, 宋艳春, 陆平. TP-M13 自动荧光检测法在高粱 SSR 基因型鉴定中的应用. 植物遗传资源学报, 2005, 6(1): 68-70.
Li H Y, Wang T Y, Li Y, Shi Y S, Song Y C, Lu P. Application of the TP-M13 automated fluorescent-labelled system of SSR genotyping in sorghum. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2005, 6(1): 68-70. (in Chinese)
- [11] 王壮伟, 赵密珍, 袁骥, 吴伟民, 钱亚明. 38 个欧美草莓栽培品种 SSR 指纹图谱的构建. 果树学报, 2011, 28(6): 1032-1037.
Wang Z W, Zhao M Z, Yuan J, Wu W M, Qian Y M. Establishment of SSR fingerprinting database for 38 cultivars of strawberry (*Fragaria ananassa*) native to Europe and America. *Journal of Fruit Science*, 2011, 28(6): 1032-1037. (in Chinese)
- [12] 徐雷锋, 葛亮, 袁素霞, 任君芳, 袁迎迎, 李雅男, 刘春, 明军. 利用荧光标记 SSR 构建百合种质资源分子身份证. 园艺学报, 2014, 41(10): 2055-2064.
Xu L F, Ge L, Yuan S X, Ren J F, Yuan Y Y, Li Y N, Liu C, Ming J. Using the fluorescent labeled SSR markers to establish molecular identity of Lily germplasms. *Acta Horticulture Sinica*, 2014, 41(10): 2055-2064. (in Chinese)
- [13] 陈昌文, 曹珂, 王力荣, 朱更瑞, 方伟超. 中国桃主要品种资源及

- 其野生近缘种的分子身份证构建. 中国农业科学, 2011, 44(10): 2081-2093.
- Chen C W, Cao K, Wang L R, Zhu G R, Fang W C. Molecular ID establishment of main China peach varieties and peach related species. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(10): 2081-2093. (in Chinese)
- [14] 高运来, 朱荣胜, 刘春燕, 李文福, 蒋洪蔚, 李灿东, 姚丙晨, 胡国华, 陈庆山. 黑龙江部分大豆品种分子 ID 的构建. 作物学报, 2009, 35(2): 211-218.
- Gao Y L, Zhu R S, Liu C Y, Li W F, Jiang H W, Li C D, Yao B C, Hu G H, Chen Q S. Establishment of molecular ID in soybean varieties in Heilongjiang, China. *Acta Agronomica Sinica*, 2009, 35(2): 211-218. (in Chinese)
- [15] 杨阳, 刘振, 赵洋, 梁国强. 湖南省主要茶树品种分子指纹图谱的构建. 茶叶科学, 2010, 30(5): 367-373.
- Yang Y, Liu Z, Zhao Y, Liang G Q. Construction of DNA fingerprints for tea cultivars originated from Hunan province. *Journal of Tea Science*, 2010, 30(5): 367-373. (in Chinese)
- [16] 刘新龙, 马丽, 陈学宽, 应雄美, 蔡青, 刘家勇, 吴才文. 云南甘蔗自育品种 DNA 指纹身份证构建. 作物学报, 2010, 36(2): 202-210.
- Liu X L, Ma L, Chen X K, Ying X M, Cai Q, Liu J Y, Wu C W. Establishment of DNA fingerprint ID in sugarcane cultivars in Yunnan. *Acta Agronomica Sinica*, 2010, 36(2): 202-210. (in Chinese)
- [17] Pan Y B. Databasing molecular identities of sugarcane (*Saccharum* spp.) clones constructed with microsatellite (SSR) DNA markers. *American Journal of Plant Sciences*, 2010, 1(2): 87-94.
- [18] 王晓飞, 陈建华, 栾明宝, 祁建民, 许英, 孙志民. 苕麻种质资源分子身份证构建的初步研究. 植物遗传资源学报, 2010, 11(6): 802-805.
- Wang X F, Chen J H, Luan M B, Qi J M, Xu Y, Sun Z M. Establishment of molecular identification in ramie germplasms. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2010, 11(6): 802-805. (in Chinese)
- [19] 王黎明, 焦少杰, 姜艳喜, 严洪冬, 苏德峰, 孙广全. 142 份甜高粱品种的分子身份证构建. 作物学报, 2011, 37(11): 1975-1983.
- Wang L M, Jiao S J, Jiang Y X, Yan H D, Su D F, Sun G Q. Establishment of molecular identity in 142 sweet sorghum varieties. *Acta Agronomica Sinica*, 2011, 37(11): 1975-1983. (in Chinese)
- [20] 颜静宛, 田大刚, 许彦, 王锋. 杂交稻主要亲本的 SSR 分子身份证数据库的构建. 福建农业学报, 2011, 26(2): 148-152.
- Yan J W, Tian D G, Xu Y, Wang F. Constructing SSR molecular database for identity system of hybrid rice parents. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2011, 26(2): 148-152. (in Chinese)
- [21] Ohtsubo K, Nakamura S. Cultivar identification of rice (*Oryza sativa* L.) by polymerase chain reaction method and its application to processed rice products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(4): 1501-1509.
- [22] 邱杨, 李锡香, 李清霞, 陈亦辰, 沈镛, 王海平, 宋江萍. 利用 SSR 标记构建萝卜种质资源分子身份证. 植物遗传资源学报, 2014, 15(3): 648-654.
- Qiu Y, Li X X, Li Q X, Chen Y C, Shen D, Wang H P, Song J P. Establishment of the molecular identification for radish germplasm using SSR markers. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2014, 15(3): 648-654. (in Chinese)
- [23] 刘倩, 戴志刚, 陈基权, 温岚, 龚友才, 粟建光. 应用 SRAP 分子标记构建红麻种质资源分子身份证. 中国农业科学, 2013, 46(10): 1974-1983.
- Liu Q, Dai Z G, Chen J Q, Wen L, Gong Y C, Su J G. Establishment of molecular identity for kenaf germplasm using SRAP marker. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(10): 1974-1983. (in Chinese)
- [24] 艾呈祥, 张力思, 魏海蓉, 苑克俊, 金松南, 刘庆忠. 甜樱桃品种 SSR 指纹图谱数据库的建立. 中国农学通报, 2007, 23(5): 55-58.
- Ai C X, Zhang L S, Wei H R, Yuan K J, Jin S N, Liu Q Z. Construction of molecular fingerprinting database for sweet cherry using SSR markers. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2007, 23(5): 55-58. (in Chinese)
- [25] 杜晶晶, 刘国银, 魏军亚, 刘德兵, 杨小振. 基于 SSR 标记构建葡萄种质资源分子身份证. 植物研究, 2013, 33(2): 232-237.
- Du J J, Liu G Y, Wei J Y, Liu D B, Yang X Z. Establishment of molecular ID for grape germplasm based on SSR markers. *Bulletin of Botanical Research*, 2013, 33(2): 232-237. (in Chinese)
- [26] 张靖国, 田瑞, 陈启亮, 杨晓平, 胡红菊. 基于 SSR 标记的梨栽培品种分子身份证的构建. 华中农业大学学报, 2014, 33(1): 12-17.
- Zhang J G, Tian R, Chen Q L, Yang X P, Hu H J. Establishment of molecular ID for pear cultivars based on SSR markers. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2014, 33(1): 12-17. (in Chinese)
- [27] Moriya S, Iwanami H, Okada K, Yamamoto T, Abe K. A practical method for apple cultivar identification and parent-offspring analysis using simple sequence repeat markers. *Euphytica*, 2011, 177(1): 135-150.
- [28] 王立新, 张小军, 史星云, 高华, 赵政阳. 苹果栽培品种 SSR 指纹图谱的构建. 果树学报, 2012, 29(6): 971-977.
- Wang L X, Zhang X J, Shi X Y, Gao H, Zhao Z Y. Establishment of SSR fingerprinting database on major apple (*Malus × Domestica*) cultivars. *Journal of Fruit Science*, 2012, 29(6): 971-977. (in Chinese)
- [29] 高源, 王昆, 刘凤之, 聂继云, 王大江, 龚欣, 刘立军. 适宜加工用苹果品种 TP-M13-SSR 指纹图谱构建及遗传关系分析. 园艺学报, 2014, 41(5): 946-956.

- Gao Y, Wang K, Liu F Z, Nie J Y, Wang D J, Gong X, Liu L J. Establishment of TP-M13-SSR fingerprints and analysis of genetic relationship for 44 processing apple cultivars. *Acta Horticulture Sinica*, 2014, 41(5): 946-956. (in Chinese)
- [30] Liebhard R, Gianfranceschi L, Koller B, Ryder C D, Tarchini R, Vandeweg E, Gessler C. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus×domestica Borkh.*). *Molecular Breeding*, 2002, 10: 217-241.
- [31] Yamamoto T, Kimura T, Sawamura Y, Manabe T, Kotobuki K, Hayashi T, Ban Y, Matsuta N. Simple sequence repeats for genetic analysis in pear. *Euphytica*, 2002, 124: 129-137.
- [32] Yamamoto T, Kimura T, Shoda M, Ban Y, Hayashi T, Matsuta N. Development of microsatellite markers in the Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Molecular Ecology Notes*, 2002, 2: 14-16.
- [33] 郝晨阳, 王兰芬, 贾继增, 董玉琛, 张学勇. SSR 荧光标记和银染技术的比较分析. *作物学报*, 2005, 31(2): 144-149.
- Hao C Y, Wang L F, Jia J Z, Dong Y C, Zhang X Y. Comparison of fluorescence and silver-staining detection systems of microsatellite markers. *Acta Agronomica Sinica*, 2005, 31(2): 144-149. (in Chinese)
- [34] 李莉, 杨剑波, Mackill D J, Colowit P M. 水稻 SSR 不同检测和分析方法的比较研究. *中国水稻科学*, 2000, 14(3): 185-188.
- Li L, Yang J B, Mackill D J, Colowit P M. Comparison of different detection methods for rice SSR analysis. *Chinese Journal of Rice Science*, 2000, 14(3): 185-188. (in Chinese)

(责任编辑 李莉)