

# 利用TP-M13-SSR标记构建苹果栽培品种的分 子身份证

高 源, 王 昆\*, 王大江, 龚 欣, 刘立军, 刘凤之

(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:** 以国家果树种质兴城梨、苹果圃保存的 314 份来自 19 个国家的苹果栽培品种为试材, 利用 TP-M13-SSR 标记, 基于 TP-M13-SSR 指纹图谱构建苹果种质分子身份证。16 对 SSR 引物在供试种质间共检测出等位基因 357 个, 平均每对引物检测到 22.3 个。根据引物扩增等位基因数和 Shannon's 指数, 从 1 对引物开始逐步增加引物数量筛选可将供试材料全部区分的引物组合, 最终确定 6 对核心引物可以区分全部供试苹果种质。基于供试苹果种质在 6 个 SSR 位点的指纹图谱, 将等位基因编码成字符串获得分子身份证, 利用条码技术其进一步转化成可被机器快速扫描的条码分子身份证, 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; 栽培品种; TP-M13-SSR; 指纹图谱; 分子身份证

**中图分类号:** S 661.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2016) 01-0025-13

## Molecular ID Establishment of Apple Cultivars by TP-M13-SSR

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

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

**Abstract:** A total of 314 apple cultivars from 19 countries all over the world in the national pear and apple repository of Xingcheng were studied with tailed primer M13 microsatellite markers (TP-M13-SSR). Analysis was made to establish the 314 apple cultivars molecular ID. The results showed that by using 16 selected SSR markers, 357 alleles were detected with a mean value of 22.3 alleles. Based on number of alleles and Shannon's information index, more and more loci were added to distinguish all the apple accessions, and finally six core primers at least were screened to establish germplasms molecular ID. Base on genetic fingerprints at six loci, loci that amplified by each marker were coded, then the code were combined as a molecular ID. Using barcode technology molecular ID can be transferred into barcode ID that can be scanned quickly by machine. Every apple germplasm obtain it's special molecular ID. The purpose that using least primers distinguishes most apple germplasms has been come true.

**Key words:** apple; cultivar; TP-M13-SSR; genetic fingerprints; molecular ID

**收稿日期:** 2015-06-23; **修回日期:** 2016-01-13

**基金项目:** 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2011006); 农业部农作物种质资源物种保护项目 (NB2013-2130135-39)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wangkun5488@163.com)

苹果是世界上最重要的果树之一,2013年全世界苹果栽培面积是521.76万 $\text{hm}^2$ ,产量达到8082.252万t(FAO, 2013)。苹果栽培品种资源复杂多样,现代生产上栽培的苹果品种近万个,曾有记载的品种有6000余个(董玉琛和刘旭,2006)。中国乃至世界各地的频繁交流,造成苹果种质混杂现象层出不穷。苹果栽培品种资源的准确鉴定是知识产权保护、保存和育种利用的重要前提,是保证苹果种质资源纯度的重要基础。

苹果种质资源的鉴定方法主要有形态学观察,同工酶(李育农和李晓林,1995;史燕山和骆建霞,1995)和分子标记(王爱德等,2005;祝军等,2007)等。TP-M13-SSR(simple sequence repeat with tailed primer M13)技术结合了SSR分子标记技术和荧光测序技术,具有重复性高,结果准确等优点,在较大程度上解决了分析通量较低,扩增产物检测流程繁琐,数据记录的工作量大等一系列问题(李会勇等,2005)。经过不断地改进和尝试,现已被应用到苹果种质资源的鉴定和遗传多样性等研究中(高源等,2010,2011,2014)。指纹图谱是指能够区分生物个体之间差异的电泳图谱(陈昌文等,2011),而分子身份证是在得到DNA指纹图谱的基础上,通过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形式的结果(徐雷锋等,2014)。目前,已经在红麻和蓖麻(祁伟,2008)、苧麻(王晓飞等,2010)、甜高粱(王黎明等,2011)、水稻(Ohtsubo & Nakamura, 2007;颜静宛等,2011)、大豆(高运来等,2009)、甘蔗(Pan, 2010;刘新龙等,2010)和萝卜(邱杨等,2014)等作物上开展了分子身份证构建研究,甜樱桃(艾呈祥等,2007)、桃(陈昌文等,2011)、葡萄(杜晶晶等,2013)和梨(张靖国等,2014)等果树的分子身份证研究也在逐步开展。但是,基于指纹图谱的苹果种质资源的分子身份证研究国内外尚未见报道。

以国家果树种质兴城梨、苹果圃保存的314份苹果栽培品种资源为研究试材,利用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,以期实现苹果栽培品种的快速分子鉴定,为苹果品种的知识产权保护提供依据,并为苹果种质资源收集和保存以及引种利用提供理论基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

试验于2013年8—11月在中国农业科学院作物科学研究所农业部作物基因资源与种质创制重点实验室进行。314份苹果栽培品种均取自中国农业科学院果树研究所国家果树种质兴城梨、苹果圃,其中包括美国育成品种96份,中国育成品种75份,前苏联育成品种38份,日本育成品种30份,加拿大育成品种24份,法国育成品种12份,英国育成品种11份,新西兰育成品种8份,德国育成品种7份,波兰育成品种2份,捷克和瑞士育成品种各2份,意大利、澳大利亚、阿尔及利亚、保加利亚、匈牙利、比利时和丹麦育成品种各1份。

### 1.2 DNA提取及PCR体系

采用德国QIAGEN的DNeasy Plant Mini Kit提取供试材料春季嫩叶的基因组DNA。从Liebhard等(2002)和Yamamoto等(2002a, 2002b)报道的序列中选取扩增产物片段长度在100~300bp之间的普通SSR引物32对,加M13接头后形成的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'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3')由美国ABI公司合成,分别标记3种荧光6FAMTM(Blue)、VICTM(Green)和NEDTM(Yellow)。

PCR 体系和扩增产物的纯化参照高源等 (2010) 的方法。PCR 反应在 Bio-Rad PTC-200 上进行。PCR 扩增并经过纯化后的 TP-M13-SSR 荧光标记产物用美国 ABI 3730 基因测序仪进行荧光检测, 收集原始数据。

### 1.3 数据条码化处理

利用 GeneMapper3.0 软件对 ABI3730 收集的数据进行分析, 获得不同样品扩增片段的长度。利用 PopGen32 对获得的指纹图谱数据进行分析, 获得引物多态性以及可将材料全部区分的引物。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的按相同位点顺序排列的编码字符串转化成各自独特的条码标识 (即分子身份证)。

## 2 结果与分析

### 2.1 TP-M13-SSR 引物的筛选及条件优化

从 314 份供试材料中随机选取两份材料, 设定退火温度为 45 ~ 60 °C, 以 0.5 °C 为梯度, 进行 PCR 扩增, 用 3% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 筛选出稳定性高重复性好的 16 对 TP-M13-SSR 引物 (包含两对梨引物) 和优化退火温度 (表 1), 用于指纹图谱构建。

TP-M13-SSR 引物的退火温度均与原 SSR 引物的退火温度不同, 主要是由于 TP-M13-SSR 正向引物比反向引物多了长为 19 bp 的 M13 接头, 因此必须对引物第 1 次 PCR 条件进行优化, 并对引物进行筛选。

表 1 筛选出 16 对 TP-M13-SSR 引物及优化条件

Table 1 Sixteen pairs of TP-M13-SSR primers and optimum conditions

引物名称 Primer name	正向引物序列 (5' - 3') Forward primer sequence	反向引物序列 (5' - 3') Reverse primer sequence	退火温度/°C T <sub>m</sub>
KA4b	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> AAAGGTCTCTCTCACTGTCT	R: CCTCAGCCCAACTCAAAGCC	48.0
BGT23b	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> CACATTCAAAGATTAAGAT	R: ACTCAGCCTTTTTTCCCAC	50.0
CH01f03b	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> GAGAAGCAAATGCAAAACCC	R: CTCCCCGGCTCTATTTCTAC	58.0
CH02b12	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> GCGCAGGCTTTACGATTATGC	R: CCCACTAAAAGTTCACAGGC	59.0
CH03d07	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> CAAATCAATGCAAAACTGTCA	R: GGCTTCTGGCCATGATTTTA	51.0
CH04e03	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> TTGAAGATGTTTGGCTGTGC	R: TGCATGTCTGTCTCCTCCAT	60.0
CH04h02	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> GGAAGCTGCATGATGAGACC	R: CTCAAGGATTTTCATGCCAC	55.5
CH05c06	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> ATTGGAAGCTCCGTATTGTGC	R: ATCAACAGTAGTGGTAGCCGGT	58.0
CH05d08	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> TTCATGGATGGGAAAAAGAGG	R: TGATTGCCACATGTCAAGTGT	55.5
CH02a04	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> GAAACAGGCGCCATTATTTG	R: AAAGGAGACGTTGCAAGTGG	58.0
CH05b06	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> ACAAGCAACCTAATACCACCG	R: GAGACTGGAAGAGTTGCAGAGG	55.0
CH05d04	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> CTTGTGAGCCGTGAGAGGT	R: TCCGAAGGATGCTTCGATT	60.0
CH01f07a	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> CCCTACACAGTTTCTCAACCC	R: CGTTTTTGGAGCGTAGGAAC	59.0
CH04g07	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> CCCTAACCTCAATCCCCAAT	R: ATGAGGCAGGTGAAGAAGGA	57.0
CH05e04	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> CAAGGAGAAGACCGTGTGAAATC	R: CATGGATAAGGCATAGTCAGGA	58.0
CH05h12	F: <u>CACGACGTTGTAAAACGAC</u> TTGCGGAGTAGGTTTGCTTT	R: TCAATCCTCATCTGTGCCAA	60.0

注: 下划线部分序列为 5' 端 M13 接头。

Note: Underlined sequences indicate the 5' M13 tail.

## 2.2 TP-M13-SSR引物检测多态性

从表 2 中可以看出, 16 对 TP-M13-SSR 引物对 314 份苹果栽培品种进行扩增, 共检测到 357 个等位基因, 平均每对引物对品种扩增的等位基因数是 22.3 个。BGT23b 对种质扩增的等位基因数最少 7 个, CH04h02 对所有种质扩增的等位基因数最多 (37 个), 其次是 CH05d04 (30 个)。扩增产物片段差异即体现不同苹果栽培品种之间的差异, 引物扩增可获得的等位基因数越多, 表明其更能反映不同品种的差异。16 对引物的平均 Shannon's 指数为 2.1135。等位基因数和 Shannon's 指数均高于平均值的引物有 CH03d07、CH04e03、CH04h02、CH05c06、CH05b06、CH05d04、CH01f07a、CH04g07 和 CH05h12。

16 对 SSR 引物可区分的种质从 7 份到 111 份不等, 平均为 63.9 份。区分率最高的是 CH04h02 (35.35%), 最低的为 BGT23b (2.23%)。

表 2 16 个 SSR 位点在 314 份苹果材料上检测到的遗传多样性  
Table 2 Genetic diversity of 314 apple accessions from China at 16 SSR loci

标记 Marker	等位基因数 Allele No.	Shannon's 指数 Shannon's information index	可区分种质数量 Germplasms No. which can be distinguished	区分率/% Identified rate
KA4b	9	1.1932	16	5.10
BGT23b	7	0.2265	7	2.23
CH01f03b	14	1.7927	26	8.28
CH02b12	19	1.8012	46	14.65
CH03d07	25	2.2953	66	21.02
CH04e03	24	2.4461	77	24.52
CH04h02	37	2.8572	111	35.35
CH05c06	23	2.2669	76	24.20
CH05d08	21	1.9590	40	12.74
CH02a04	22	2.4980	82	26.11
CH05b06	29	2.1165	59	18.79
CH05d04	30	2.7284	99	31.53
CH01f07a	25	2.5598	90	28.66
CH04g07	27	2.6253	92	29.30
CH05e04	19	2.0309	58	18.47
CH05h12	26	2.4187	78	24.84
总数 Total	357			
平均 Mean	22.3	2.1135	63.9	20.36

## 2.3 最佳引物组合的筛选

选取 Shannon's 指数高于 2.5 的 4 对引物, 即 CH04h02、CH05d04、CH01f07a 和 CH04g07, 两两组合, 鉴定其对供试苹果栽培品种的区分率。CH04h02 和 CH01f07a 引物组合分辨率最高, 可以区分 288 份苹果种质, 区分率为 91.72%; 其次是 CH04h02 和 CH01f07a 引物组合, 可以区分 287 份苹果种质, 区分率为 91.40%; 再其次是 CH04h02 和 CH04g07 引物组合, 可以区分 277 份苹果种质, 区分率为 88.22% (表 3), 种质编号同表 5。

根据两对引物组合的区分结果, 继续增加引物组合的数量。将 Shannon's 指数高于 2.5 的 4 对引物三三组合, 其中三引物组合 CH04h02 + CH05d04 + CH01f07a 可以区分 306 份苹果种质, 区分率最高为 97.45%。

继续增加引物数量, 将 Shannon's 指数高于 2.5 的 4 对引物 CH04h02、CH05d04、CH01f07a 和 CH04g07 全部组合在一起, 可以区分的苹果栽培品种的数量增加到 308 份, 区分率为 98.09%。仍有

6 组材料不能够相互区分即 15 号和 119 号, 59 号和 119 号, 81 号和 84 号, 96 号和 229 号以及 301 号, 101 号和 105 号, 305 号和 318 号。进一步增加引物的数量, 在供试引物中挑选等位基因数和 Shannon's 指数较高的引物 CH05b06 和 CH05h12, 可将最终剩余的 6 组材料区分。最终, 利用 6 对引物 CH04h02, CH05b06、CH05d04、CH01f07a、CH04g07 和 CH05h12 即可将供试的苹果栽培品种全部区分, 区分率达到 100%。

**表 3 两对引物组合对苹果栽培品种的区分**  
**Table 3 Apple germplasms can be distinguished by using two pairs of primers**

引物组合 Primer combination	未能区分开的种质编号 Germplasms No. which can not be distinguished	区分率/% Identified rate
CH04h02 + CH05d04	2, 3, 8, 9, 17, 27, 28, 32, 33, 35, 43, 47, 52, 53, 55, 56, 58, 82, 86, 88, 95, 128, 165, 185, 189, 193, 194, 195, 196, 201, 202, 203, 206, 209, 211, 236, 243, 245, 248, 256, 260, 261, 267, 268, 327	91.40
CH04h02 + CH01f07a	3, 6, 8, 13, 18, 20, 26, 29, 32, 33, 37, 47, 54, 55, 68, 80, 93, 104, 128, 138, 141, 181, 185, 186, 193, 196, 209, 211, 226, 227, 236, 244, 266, 274, 295, 308, 311, 317, 321, 325, 326, 327, 329	91.72
CH04h02 + CH04g07	3, 6, 12, 13, 17, 18, 24, 27, 29, 35, 37, 43, 47, 54, 55, 58, 80, 85, 86, 93, 95, 116, 120, 122, 128, 130, 135, 138, 143, 150, 162, 164, 177, 181, 184, 185, 196, 209, 210, 211, 227, 230, 245, 249, 256, 260, 266, 268, 274, 280, 283, 284, 307, 308, 309, 311, 325, 326, 329	88.22
CH05d04 + CH01f07a	8, 12, 13, 17, 29, 32, 34, 35, 42, 47, 49, 50, 56, 62, 64, 66, 69, 78, 85, 86, 87, 92, 95, 118, 128, 153, 160, 167, 168, 169, 170, 172, 174, 180, 181, 186, 193, 196, 199, 200, 209, 211, 212, 213, 214, 236, 243, 246, 256, 259, 260, 265, 272, 274, 284, 285, 287, 288, 298, 306, 307, 308, 311, 313, 320, 323, 324, 325, 326, 327, 329	85.99
CH05d04 + CH04g07	1, 7, 8, 9, 12, 13, 16, 17, 19, 20, 28, 29, 34, 35, 52, 54, 55, 58, 62, 66, 69, 71, 78, 86, 88, 90, 95, 110, 112, 123, 128, 148, 153, 163, 169, 170, 181, 185, 186, 199, 204, 205, 209, 211, 213, 214, 215, 226, 227, 235, 245, 246, 255, 256, 257, 259, 260, 261, 268, 274, 284, 287, 300, 304, 308, 311, 324, 325, 326, 328, 329	85.67
CH01f07a + CH04g07	3, 6, 8, 12, 13, 17, 21, 24, 28, 29, 34, 37, 40, 42, 47, 50, 53, 54, 55, 62, 64, 65, 66, 68, 69, 78, 80, 88, 89, 90, 93, 95, 102, 107, 111, 127, 128, 138, 151, 168, 169, 170, 172, 181, 185, 189, 194, 196, 197, 209, 211, 214, 227, 234, 235, 238, 241, 246, 247, 256, 259, 260, 266, 284, 287, 295, 296, 297, 299, 308, 321, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329	86.31

## 2.4 TP-M13-SSR指纹图谱与种质分子身份证编码

利用可将全部供试苹果栽培品种区分的 6 对引物构建其 TP-M13-SSR 指纹图谱, 图 1 示红星在 6 个 SSR 位点的指纹图谱。

将全部供试苹果种质在 6 个位点获得的等位基因按照从小到大的顺序排列, 并用阿拉伯数字从 01 开始赋值 (表 4)。

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 5)。

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: 金冠的条形码分子身份证见图 2。



表 5 314 份种质的分子身份证编码  
Table 5 Molecular ID code of 314 germplasms

编号 Number	品种 Cultivar	分子身份证编码 Molecular ID	编号 Number	品种 Cultivar	分子身份证编码 Molecular ID
1	露香 Luxiang	142709140610182404141418	51	昌红 Changhong	142714140913111304131422
2	龙丰 Longfeng	172608120101121806131014	52	矮丰 Aifeng	142714140913112004251314
3	兴平 Xingping	172612130101192513261423	53	新国光 Xinguoguang	132606141414111604041822
4	绿光 Lüguang	141419190101122013141919	54	北京 0201 Beijing 0201	131414141010202404131418
5	宁丰 Ningfeng	111410120101020404101113	55	燕山红 Yanshanhong	131406140913112404041822
6	奎二 Kuier	132705141213111604041822	56	富红 Fuhong	121404141313112004101314
7	伏锦 Fujin	111414230609112404131214	57	秀水国光 Xiushui Guoguang	131406140913162404131418
8	新元帅 Xinyuanshuai	131414280910202404141418	58	金光 Jinguang	152806141026121904151318
9	大沙河元帅 Dashaha Yuanshuai	122514140101202401011418	59	瑞香 Ruixiang	141514140606091913161314
10	国玲 Guoling	111314140613162004141418	60	锦红 Jinhong	121614140916141910141314
11	富秋 Fuqiu	152804140914122503041322	61	八月酥 Bayuesu	010109140609181904141418
12	秋锦 Qiujin	131406141013112004131818	62	战寒香 Zhanhanxiang	010114211313111904151420
13	垂枝国光 Chuizhi Guoguang	132606141313111604041822	63	云青 Yunqing	132014141012112007251418
14	新花 Xinhua	010106141214161604061422	64	早翠绿 Zaocuilü	112009141616111904101820
15	早金冠 Zaojinguan	192613140712162006251213	65	丹霞 Danxia	132614141012112004251418
16	伏红 Fuhong	132509140609091904131821	66	岱绿 Dailü	172609140613171809151818
17	甜红玉 Tianhongyu	152709140609181913141418	67	国庆 Guoqing	010106141326111804101314
18	胜利 Shengli	142609140713192004251214	68	短枝印度 Duanzhi Yindu	263407140609111814251418
19	中秋 Zhongqiu	141507140609051104141818	69	青香 Qingxiang	212707141012142013251418
20	脆红 Cuihong	111509140610191904141818	70	双红 Shuanghong	141514140913121904131420
21	寒富 Hanfu	111514292526111804101314	71	金红 Jinhong	010114141314112313150812
22	斯托诺 Situonouwei	162217211420132004102121	72	东光 Dongguang	142614141326112014251418
23	翠秋 Cuiqiu	112614230713122101011213	73	甜黄 Tianhuangkui	111214211012091904061218
24	国帅 Guoshuai	131401011014122504131419	74	新红 Xinhong	122514141012161906131214
25	眉短 Meiduan	141414140709151903031319	75	金阳 Jinyang	121614141616202007101314
26	嵌合体国光 Qianheti Guoguang	132706140215111605051823	76	实矮 Shiai	182714141213010101011323
27	烟红 Yanhong	131414140910151804131418	77	津轻 Tsugaru	172607140612111814250813
28	平枝国光 Pingzhi Guoguang	131705141313121704041822	78	岩木 Yanmu	111410130209122107141219
29	红国光 Hongguoguang	132706141313111604041822	79	新世界 Xinshijie	172612130213192513261423
30	岳红 Yuehong	172614271212182404131423	80	红王将 Beni Shogun	141712130101112504131323
31	达尔文 Darwin	141609110614192111110819	81	萌 Meng	151511130101091104151321
32	长祝 Changzhu	111209140910121904041818	82	美香 Meixiang	141712130101112504131423
33	长红 Changhong	111514140614182010141318	83	恋姬 Koihime	121412130101111904041314
34	友谊 Youyi	121609140910121904141418	84	秋香 Qiuxiang	172612130101111914261414
35	锦玉 Jinyu	152709140609121913141418	85	青森早生 Qingsenzaosheng	172712130101111904141414
36	伏帅 Fushuai	11201421061311103251214	86	姬神 Himekami	151712130210121904140202
37	香国光 Xiangguoguang	142614250912202404251318	87	初秋 Chuqiu	091411130213121804151313
38	宁光 Ningguang	122614141213111804151314	88	中幸 Zhongxing	131712130210181904141213
39	宁冠 Ningguan	010109140912111609151314	89	未希生命 Weixishengming	17271313010121904141414
40	辽伏 Liaofu	111309140916111904101820	90	夏光 Xiaguang	141812130101192103161421
41	迎秋 Yingqiu	121509140510111104131418	91	金世纪 Jinshiji	141712120210122504131323
42	宁酥 Ningsu	142414140609121904121223	92	芳明 Fangming	172612120101121914261414
43	宁秋 Ningqiu	111514210614091604042123	93	宫崎短枝 Gongqi Duanzhi	142406141014122504131423
44	胜利红冠 Shengli Hongguan	151815240713161903041218	94	长富 1 号 Nagafu 1	091414210909061104131423
45	中国彩苹 Zhongguo Caiping	112203090808182006121214	95	印度 India	131414142126111913141919
46	奎花 Kuihua	133001010714192003091219	96	坂田津轻 Bantian Jinqing	172608140612111814251320
47	秋金星 Qiujinxing	141901011515171912191219	97	阳光 Sunshine	152601010714121914261414
48	青冠 Qingguan	091509140613182007080818	98	长富 2 号 Nagafu 2	141414140909111104170101
49	平阴短枝 Pingyin Duanzhi	133014140910202404131419	99	乙女 Alps Otome	111507140606191909141318
50	烟红蜜 Yanhongmi	142706140914162004041822	100	赤诚 Akagi	172614140612111814251419

续表 5

编号 Number	品种 Cultivar	分子身份证编码 Molecular ID	编号 Number	品种 Cultivar	分子身份证编码 Molecular ID
101	王林 Orin	142114141326192014150809	150	赫木特 Plikna Z Hermhut	111501010711172106101214
102	新乔纳金 New Jonagold	152009140911111815251213	151	波 11 Bo 11	152209141313162013151313
103	千秋 Qianqiu	172606140926111104141419	152	包曼 Baumann	121306140615111903091418
104	世界一 Shijieyi	192613140712162006251112	153	克拉普 Clapp's Seedling	010109140613182006070818
105	惠 Megumi	132709140913161904131318	154	仑巴瑞 Lambourne Lord	111511110101122104261213
106	初秋 Chuqiu	142602141414121804151313	155	拉克斯坦 Laxton's Superb	121514140304182004141212
107	巴布斯基诺 Babusijino	121201011717171906101012	156	西林 Cellini	101301010101121301011321
108	奥别尔基卡 Aobierjika	121201010711132304261219	157	阿林屯 Allington Pippin	122201010909101310141212
109	赫林 Helin	131505141927161804061318	158	巴斯美 Beauty of Bath	131407141010192003101214
110	莫斯科透明 Mosike Touming	131414170813171804120909	159	发现 Discovery	141807140810181903071221
111	阿波尔特 Aboerte	202414201721192306101221	160	桃苹 Peach	121913170915181904061212
112	五月 Wuyue	102501010915181903261223	161	詹姆斯格里夫 Zhanmusigelifu	113006140616172003060718
113	600 克安东诺夫卡 600 Ke Andongnuofuka	152814141026121904151318	162	满堂红 King of Pippin	122114140613161808090813
114	沙拉托尼 Shalatuoni	121501011111131904141419	163	桔苹 Cox's Orange Pippin	071214140613161808090713
115	花奎 Huakui	111414231221111704151220	164	威塞克旭 Mike Wiacek McIntosh	143006140606172003040712
116	优异玫瑰 Youyi Meigui	142117210812091704061010	165	酸王 Suanwang	051006120101121904120814
117	褐色凤梨 Hese Fengli	131913231717181806100618	166	甜麦 Tianmai	121211130207192407121113
118	金色洛索善 Jinse Luosuoshan	141513171314070721241019	167	甜格力 Tiangeli	121806120101192103070814
119	苏伊斯列波 Suyisiliebo	222317211521102504102121	168	苦缙甘 Kufeigan	181806190101102107080819
120	红魁 Hongkui	121406140714101904161321	169	克洛登 Cloden	152014251226182013251318
121	白罗斯马林 Bailuosimalin	122209091417171803031120	170	白卡维 Calville Blanche	152709231319202407151418
122	拿破仑 Napoleon	131405141010112004131818	171	门斯 Rt du Mans	151714142626111910131212
123	黄魁 Huangkui	111421250612091104061120	172	红鸽 Pigeon	273006140713182412230813
124	甜安东诺夫卡 Tianandongnuofuka	111905140606182204131220	173	青龙 White Pippin	223609140614171801010818
125	西伯利亚白点 Xiboliyabaidian	111209141316161606080811	174	里斯金 Lysgolden	131406141013112004131818
126	理想 Dream	141915150813202312130918	175	红卡维 Calville Rouge	141506140726191904091318
127	秋力蒙 Qiulimeng	121423231423161804181820	176	莱蒂 Lady	152209141212121904251318
128	初笑 Chuxiao	111414140613091804161220	177	一面红 Boiken	152701011420212507151419
129	凤凰卵海棠果 Fenghuangluan Haitangguo	111909141321212204130918	178	安塔略 Antalue	141712130101122504131423
130	草莓苹果 Caomei Pingguo	010109141515162012151520	179	凯赛威廉 Kaisaiweilian	131814140913172003131213
131	甜伊萨耶娃 Tianyisayewa	122701010608181914191111	180	赫尔斯太 Heersitai	142214141010091912141113
132	格鲁晓夫卡 Geluxiaofuka	111515170926182012150712	181	磅 Mere de Menage	132709140606111104121313
133	米丘林·纪念 Miqulin Jinian	132917240716192204091220	182	皮诺娃 Pinova	152014141013111903151214
134	女游击队员 Nuyoujiduiyuan	193214240714192103041818	183	因夫兰斯基 Inflancki	202309170620091806060914
135	北方西纳波 Beifangxinabo	010114140614111803040809	184	意大利早红 Yidali Zaohong	152614140913091101011213
136	克龙谢尔透明 Kelongxieer Touming	061514170813131803121012	185	五月金 Maigold	152006141013091114251314
137	冬甜 Dongtian	131514140914182009101923	186	镱罗 Goro	152006141013192009151314
138	金塔干 Jintagan	111901010715171903121212	187	秋金星 Qiujinxing	141901011515171912191219
139	克里斯克 Kelisike	232514170723192003032123	188	乔纳金 Jonagold	021809140912111815251314
140	希特实生 Xiteshisheng	152301011215192004101319	189	乔纳红 Jonared	152501010710192013141419
141	褐色条纹 Hesetiaowen	121901010722191910191112	190	黄皮 Yellow Skin	101712190101192004131419
142	肉桂海棠 Rouguihaitang	142714230607121703151212	191	大锦 Twenty Ounce	151712190101192009141419
143	法国灰苹 Faguohuiping	111506141020122003120814	192	宝玉 Hubbardston	151513130101122103041419
144	伊朗桃苹 Strawberry Apple	111515230610092404040713	193	英格兰 Ingram	151712180210171904101419
145	格杰克库奎 Gjecee Kuge	132016230606171803032126	194	昆麻斯 Apple of Commerce	121512130101101709131314
146	阿伊瓦尼亚 Aiyiwaniya	232814180621081007082121	195	无锈金冠 Wuxiu Jinguan	132012130213122115261314
147	捷 9 Jie 9	142209140101121901010409	196	斯塔克矮生 Stark Spur	202612130213112115261314
148	捷 18 Jie 18	151714140615131612221414	197	早生红 Zaoshenghong	141711130101132504151319
149	西蒙飞 Simonffy Piros	121509141414172004091221	198	矮威尔 Well Spur Gelicious	131414140910202403131419
			199	阿兹威尔矮生 Aziweier Aisheng	131414140101202303131419
			200	新红星 Starkrimson	131314140910202403131419

续表 5

编号 Number	品种 Cultivar	分子身份证编码 Molecular ID	编号 Number	品种 Cultivar	分子身份证编码 Molecular ID
201	红鲁比 Ruby Red	020414141012202403251319	251	梅露斯 Melrose	131507140910182413141919
202	红印度 Arkansas Black	091414140913112403131423	252	花嫁 Wealthy	172701010606181912141219
203	元帅 Delicious	141414140910202403130310	253	玉馥 Grimes Golsen	122614140928111202251419
204	英金 Akin	151709140606151912141213	254	普利阿姆 Priam	142214140612182014151414
205	瑞光 Rome Beauty	111507140616141706131214	255	斯派金 Spigold	030414140912111910151214
206	奥查克金 Ozark Gold	092014140613111513151314	256	金晕 Blushing Golden	141414140912112015271414
207	红祝 Summer Champion	172709140912191907131418	257	金冠 Golden Delicious	213514141112111515251314
208	倭锦 Ben Davis	151709140912161909131318	258	红金 Red Gold	121717231415161803121214
209	紫玉 Lowver	111104141515162206060820	259	醇露 Winesap	101413151516161801011223
210	六月红 Red June Sweet	151714231321161802131319	260	新红皇	131401011417181806131213
211	翠玉 Yellow Newtown Pippin	131310220101122004101223		Nured Royal Delicios	
212	甜帅 Sweet Delicious	133201010811202504041314	261	锅屋 Coopermarket	121715231427202513161419
213	荣冠 York Imperial	152701011515122015261419	262	红斜子 Cogswell	111406140814152010140820
214	斯塔克金矮生	132706140101121701011923	263	茄南果 Chenango	131314230909111907101416
	Stark Spur Gold Delicious		264	君袖 Northern Spy	131505140926151909101223
215	矮黄 Yellow Spur	132706141414121704041923	265	小町 Xiaoting	101114141018111903251421
216	拉里坦 Raritan	142401011014122504131423	266	老笃 Laodi	111309210616111703102121
217	优金 Prime Gold	121409141114122104041424	267	多一露 Doyle	010107140910161803091419
218	贝挠尼 Benoni	131401010810202101012324	268	丹顶 Red June	010101011212181903091419
219	大猩猩 Mother	010114140101202101011212	269	早生旭 Early McIntosh	111514210624112002060812
220	祝光	111209140910121903201919	270	金花 Williams Favorite	131814230711151902091919
	American Summer Pearmain		271	紫香蕉	153301011212181903091419
221	赤阳 Rainier	020414230712122003151319		Black Gilliflower	
222	柳玉 Smith Cider	151714140707112007251214	272	维斯塔·贝拉	151813140616172002031219
223	珍宝 Seark Jumbo	131314141718192010180101		Vista Bella	
224	丰艳 Fengyan	131809140707182002121219	273	祥玉 Winer Banana	030423261219091903101224
225	藤牧 1 号 Mato	161809250608202404141818	274	孟诺尔 Monroe	020309140607181903130510
226	甜旭 Sweet McIntosh	123006140814202104091313	275	马空 Macoun	023709141313172002081321
227	国光 Ralls	131706141313111604201923	276	阿堪 Arkansas	121414231026182003091425
228	红露 Honglu	010107140616151706131214	277	醉玉 Helm	101301010808091805111519
229	考特兰德 Cortland	172701010606141812141219	278	紫云 Whitney	131813260714161906170812
230	红玉 Jonathan	151509140609181913141419	279	帕顿 Patten	142614170606192002121319
231	金矮生 Golden Spur Delicious	202614141212112015251314	280	矮早辉 Stark Earlibaze	151714141526172003060101
232	可口香 Esopud Spitzenburg		281	蜜脆 Honeycrisp	102014140915192002121223
233	米尔顿 Milton	131514230910111809131419	282	斯巴坦 Spartan	141414140913172002131314
234	虾夷衣 Roxbury Russet	142101011430101804060810	283	紫倭锦 Drumbo	133009141112172009251319
235	黄锦 Cooper's Early	123009141010181912161924	284	拉方 Lawfam	142006140607171903150814
236	解放 Liberty	121214140610111902101319	285	森马兰 Summer Land	202614271414122115261314
237	早捷 Geneva Early	080814181212182002031213	286	早红 Zaohong	010106141313111503031923
238	杰西麦克 Jerseymac	051513141516162003121318	287	诺达 Norda	131314211421162203061220
239	纽蕃 Newfane	133013140808192103121919	288	森马兰 Summer Land	142314141212111703151313
240	米勒矮生	143114140910192403131419	289	短枝旭 McIntosh Spur	141806140613172002030813
	Miller Sturdy Spur Delicious	131414140910010103131419	290	乔雅尔 Joyal	142006141013172002020812
241	红星 Starking Delicious		291	布达衣 Budai Domokos	131304141010112003131919
242	鲁比 Ruby	040413230910070903131014	292	诺桑 Norsan	131314140910202403130817
243	青香蕉 White Winter Pearmain	121409140709112404201919	293	拉宝 Lobo	122209140826091210141215
244	红冠 Richared Delicious	040407141026192007131419	294	白星 Lowtosh	111517260626181810121213
245	顶红 Top Red Delicious	131314140910010103130515	295	早生赤 Early Red Bird	121717231415161803121214
246	一斗金 Iowa Beauty	152614140913112503131423	296	诺安 Norand	101017170814161702121019
247	光辉 Guanghui	151909091011181910170819	297	芦塔什 Rutosh	142105141013172003030510
248	卡蒂纳 Cardinal	131911141819031411130808	298	史东塔什 Stonetosh	143014140607172404140813
249	梨形果 Lixingguo	141709141212121603131319	299	约斯基 Yoshkee	111509140812171712251213
250	蜜金 Honey Gold	111514261326182012151313	300	阿特拉斯 Atlas	182014140725171902090812

续表 5

编号 Number	品种 Cultivar	分子身份证编码 Molecular ID	编号 Number	品种 Cultivar	分子身份证编码 Molecular ID
301	绿星 Saintlawrence	010114140609151702081119	308	弗来堡 Freyberg	132007141026192007131419
302	旭 McIntosh	141814140613172002030813	309	华丽 Galant	142614141012202404251318
303	美尔巴 Melba	172714170813182003060810	310	红金嘎拉 Red Golden Gala	172607140609111814251318
304	红纹 Fameuse	213609140614171808250811	311	新嘎拉 Royal Gala	152614140913091114151112
305	美尔塔什 Meltosh	131809141229172009251319	312	太平洋玫瑰 Pacific Rose	122014141212111903151213
306	澳洲青苹 Granny Smith	142214140912122204121318	313	红奥 Hongao	172607140612111814251414
307	南方脆 Nanfanguai	152514140912112015251218	314	毕斯马克 Bismark	101309141314111204041220

注: 1~30 和 32~76 为中国育成品种, 77~106 为日本育成品种, 107~144 为前苏联育成品种, 145 为阿尔及利亚育成品种, 146 为保加利亚育成品种, 147~148 为捷克育成品种, 149 为匈牙利育成品种, 150~151 为波兰育成品种, 152 为比利时育成品种, 153 为丹麦育成品种, 154~164 为英国育成品种, 165~176 为法国育成品种, 177~183 为德国育成品种, 184 为意大利育成品种, 185~186 为瑞士育成品种, 31 和 187~281 为美国育成品种, 282~305 为加拿大育成品种, 306 为澳大利亚育成品种, 307~314 为新西兰育成品种。

Note: Number 1 - 30 and 32 - 76 are from China, number 77 - 106 are from Japan, number 107 - 144 are from Former USSR, number 145 is from Albania, number 146 is from Bulgaria, number 147 - 148 are from Czech, number 149 is from Hungary, number 150 - 151 are from Poland, number 152 is from Belgium, number 153 is from Denmark, number 154 - 164 are from England, number 165 - 176 are from France, number 177 - 183 are from Germany, number 184 is from Italy, number 185 - 186 are from Swiss, number 31 and 187 - 281 are from the USA, number 282 - 305 are from Canada, number 306 is from Australia, number 307 - 314 are from New Zealand.



图 2 ‘金冠’的条形码分子身份证  
Fig. 2 The molecular identity card of Golden Delicious

### 3 讨论

#### 3.1 DNA指纹图谱与分子身份证

指纹图谱是指能够区分生物个体之间差异的电泳图谱, 因其具有多位点性、高变异性和简单稳定的遗传性等特点, 而被认为是品种鉴定最简单、有效的方法 (王壮伟 等, 2011)。而分子身份证将 DNA 指纹数字化, 达到种质资源检索时更加直观的目的 (陈昌文 等, 2011)。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, 但却是不同的两个概念。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, 并可通过计算机对种质资源差异自动比对, 克服人工比对的繁琐、低效等问题 (徐雷锋 等, 2014)。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。基于 DNA 指纹图谱构建的苹果种质资源的分子身份证将苹果种质之间微观的差异转变成可宏观识别的差异, 并可作为苹果种质的特征标识加以利用。

#### 3.2 TP-M13-SSR技术与核心引物选择

TP-M13-SSR 技术实现了对 SSR 分子标记数据的高效和准确地收集 (郝晨阳 等, 2005), 可以得到目标 DNA 片段的准确大小, 适用于苹果种质资源的指纹图谱构建。TP-M13-SSR 分子标记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。

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重要前提。构建苹果种质的分子身份证, 要求用最少的引物数量区分最多的种质。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 Shannon's 指数, 由高到低, 从一对引物开始, 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, 达到以最少的引物区分最多的种质的目的。本研究选取的 SSR 引物多态性较好, 利用 4 对引物可区分其中 98.09% 的材料, 而用 6 对引物可区分全部的供试材料。主要是由于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。本试验中的短枝旭即为旭的芽变, 两者只有在位点 CH05b06 处获得了不同的等位基因。因此最初的 Shannon's 指数较高的 4 对引物不能将其区分, 只能继续增加引物 CH05b06 才可达到区分目的。诸如此类情况, 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。本试验中筛选的 6 对核心引物组合可将全部供试苹果种质进行区分, 可为今后的苹果种质的分子身份证构建提供参考。

### 3.3 分子身份证编码

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 (徐雷锋 等, 2014), 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。本研究中是根据荧光标记 SSR 检测结果, 筛选可将供试苹果种质全部区分的特异引物, 构建指纹图谱, 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。目前现存的条码码制多种多样, 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码制, 保证每份种质最终获得清晰可辨的条码。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, 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, 能够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, 排除环境和人为等因素的影响。

基于 TP-M13-SSR 分子标记的 DNA 指纹图谱建立苹果栽培品种的分子身份证, 在国内外未见报道。本研究的结果对苹果新品种识别鉴定、品种标识、假冒伪劣品种鉴定、品种推广以及苹果种质资源的分子数据库的建立等均有重要的意义和实际应用价值。

## References

- Ai Chen-xiang, Zhang Li-si, Wei Hai-rong, Yuan Ke-jun, Jin Song-nan, Liu Qing-zhong. 2007. Construction of molecular fingerprinting database for sweet cherry using SSR markers. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 23 (5): 55 - 58. (in Chinese)
- 艾呈祥, 张力思, 魏海蓉, 苑克俊, 金松南, 刘庆忠. 2007. 甜樱桃品种 SSR 指纹图谱数据库的建立. *中国农学通报*, 23 (5): 55 - 58.
- Chen Chang-wen, Cao Ke, Wang Li-rong, Zhu Geng-rui, Fang Wei-chao. 2011. Molecular ID establishment of main China peach varieties and peach related species. *Scientia Agricultura Sinica*, 44 (10): 2081 - 2093. (in Chinese)
- 陈昌文, 曹珂, 王力荣, 朱更瑞, 方伟超. 2011. 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*, 44 (10): 2081 - 2093.
- Dong Yu-chen, Liu Xu. 2006. *Crops and their wild relatives in China · Fruit crops*. Beijing: China Agriculture Press: 55 - 84. (in Chinese)
- 董玉琛, 刘旭. 2006. *中国作物及其野生近缘植物 · 果树卷*. 北京: 中国农业出版社: 55 - 84.

- Du Jing-jing, Liu Guo-yin, Wei Jun-ya, Liu De-bing, Yang Xiao-zhen. 2013. Establishment of molecular ID for grape germplasm based on SSR markers. *Bulletin of Botanical Research*, 33 (2): 232 - 237. (in Chinese)
- 杜晶晶, 刘国银, 魏军亚, 刘德兵, 杨小振. 2013. 基于 SSR 标记构建葡萄种质资源分子身份证. *植物研究*, 33 (2): 232 - 237.
- FAO. 2013. Value of agricultural production. <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>.
- Gao Yuan, Wang Kun, Liu Feng-zhi, Nie Ji-yun, Wang Da-jiang, Gong Xin, Liu Li-jun. 2014. Establishment of TP-M13-SSR fingerprints and analysis of genetic relationship for 44 processing apple cultivars. *Acta Horticulture Sinica*, 41 (5): 946 - 956. (in Chinese)
- 高源, 王昆, 刘凤之, 聂继云, 王大江, 龚欣, 刘立军. 2014. 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*, 41 (5): 946 - 956.
- Gao Yuan, Wang Kun, Tian Lu-ming, Cao Yu-fen, Liu Feng-zhi. 2010. Identification of apple cultivars by TP-M13-SSR technique. *Journal of Fruit Science*, 27 (5): 833 - 837. (in Chinese)
- 高源, 王昆, 田路明, 曹玉芬, 刘凤之. 2010. 应用 TP-M13-SSR 技术鉴定苹果品种. *果树学报*, 27 (5): 833 - 837.
- Gao Yuan, Wang Kun, Tian Lu-ming, Cao Yu-fen, Liu Feng-zhi. 2011. TP-M13-SSR technique and its applications in analysis of genetic diversity for apple germplasm resources. *Journal of Plant Genetic Resources*, 12 (2): 228 - 233. (in Chinese)
- 高源, 王昆, 田路明, 曹玉芬, 刘凤之. 2011. TP-M13-SSR 技术及其在苹果种质资源遗传多样性研究中的应用. *植物遗传资源学报*, 12 (2): 228 - 233.
- Gao Yun-lai, Zhu Rong-sheng, Liu Chun-yan, Li Wen-fu, Jiang Hong-wei, Li Can-dong, Yao Bing-chen, Hu Guo-hua, Chen Qing-shan. 2009. Establishment of molecular ID in soybean varieties in Heilongjiang, China. *Acta Agronomica Sinica*, 35 (2): 211 - 218. (in Chinese)
- 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. 2009. 黑龙江部分大豆品种分子 ID 的构建. *作物学报*, 35 (2): 211 - 218.
- Hao Chen-yang, Wang Lan-fen, Jia Ji-zeng, Dong Yu-chen, Zhang Xue-yong. 2005. Comparison of fluorescence and silver-staining detection systems of microsatellite markers. *Acta Agronomica Sinica*, 31 (2): 144 - 149. (in Chinese)
- 郝晨阳, 王兰芬, 贾继增, 董玉琛, 张学勇. 2005. SSR 荧光标记和银染技术的比较分析. *作物学报*, 31 (2): 144 - 149.
- Li Hui-yong, Wang Tian-yu, Li Yu, Shi Yun-su, Song Yan-chun, Lu Ping. 2005. Application of the TP-M13 automated fluorescent-labelled system of SSR genotyping in sorghum. *Journal of Plant Genetic Resources*, 6 (1): 68 - 70. (in Chinese)
- 李会勇, 王天宇, 黎裕, 石云素, 宋艳春, 陆平. 2005. 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*, 6 (1): 68 - 70.
- Li Yu-nong, Li Xiao-lin. 1995. Research on peroxidase isozyme in *Malus* Mill. *Journal of Southwest Agricultural University*, 17 (5): 371 - 377. (in Chinese)
- 李育农, 李晓林. 1995. 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*, 17 (5): 371 - 377.
- Liebhart R, Gianfranceschi L, Koller B, Ryder C D, Tarchini R, Van De Weg, Gessler C. 2002. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Molecular Breeding*, 10: 217 - 241.
- Liu Xin-long, Ma Li, Chen Xue-kuan, Ying Xiong-mei, Cai Qing, Liu Jia-yong, Wu Cai-wen. 2010. Establishment of DNA fingerprint ID in sugarcane cultivars in Yunnan. *Acta Agronomica Sinica*, 36 (2): 202 - 210. (in Chinese)
- 刘新龙, 马丽, 陈学宽, 应雄美, 蔡青, 刘家勇, 吴才文. 2010. 云南甘蔗自育品种 DNA 指纹身份证构建. *作物学报*, 36 (2): 202 - 210.
- Ohtsubo K, Nakamura S. 2007. 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*, 55 (4): 1501 - 1509.
- Pan Y B. 2010. Databasing molecular identities of sugarcane (*Saccharum* spp.) clones constructed with microsatellite (SSR) DNA markers. *American Journal of Plant Sciences*, 1 (2): 87 - 94.
- Qi Wei. 2008. Depict the fingerprint bands of kenaf *Hibiscus cannabinus* L. and castor *Ricinus communis* L. with ISSR and SRAP molecular marker [M. D. Dissertation]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University. (in Chinese)
- 祁伟. 2008. 应用 ISSR 和 SRAP 分子标记绘制红麻与蓖麻 DNA 指纹图谱 [硕士论文]. 福州: 福建农林大学.
- Qiu Yang, Li Xi-xiang, Li Qing-xia, Chen Yi-chen, Shen Di, Wang Hai-ping, Song Jiang-ping. 2014. Establishment of the molecular identification

- for radish germplasm using SSR markers. *Journal of Plant Genetic Resources*, 15 (3): 648 - 654. (in Chinese)
- 邱杨, 李锡香, 李清霞, 陈亦辰, 沈镛, 王海平, 宋江萍. 2014. 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*, 15 (3): 648 - 654.
- Shi Yan-shan, Luo Jian-xia. 1995. Comparison of peroxidase zymograms of 'Delicious' apple cultivars. *Journal of Tianjin Agricultural College*, 2 (1): 11 - 14. (in Chinese)
- 史燕山, 骆建霞. 1995. 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*, 2 (1): 11 - 14.
- Wang Ai-de, Li Tian-zhong, Xu Xue-feng, Han Zhen-hai. 2005. Analysis for apple cultivars. *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (5): 875 - 877. (in Chinese)
- 王爱德, 李天忠, 许雪峰, 韩振海. 2005. 苹果品种的 SSR 分析. *园艺学报*, 32 (5): 875 - 877.
- Wang Li-ming, Jiao Shao-jie, Jiang Yan-xi, Yan Hong-dong, Su De-feng, Sun Guang-quan. 2011. Establishment of molecular identity in 142 sweet sorghum varieties. *Acta Agronomica Sinica*, 37 (11): 1975 - 1983. (in Chinese)
- 王黎明, 焦少杰, 姜艳喜, 严洪冬, 苏德峰, 孙广全. 2011. 142 份甜高粱品种的分子身份证构建. *作物学报*, 37 (11): 1975 - 1983.
- Wang Xiao-fei, Chen Jian-hua, Luan Ming-bao, Qi Jian-min, Xu Ying, Sun Zhi-min. 2010. Establishment of molecular identification in ramie germplasms. *Journal of Plant Genetic Resources*, 11 (6): 802 - 805. (in Chinese)
- 王晓飞, 陈建华, 栾明宝, 祁建民, 许英, 孙志民. 2010. 苧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*, 11 (6): 802 - 805.
- Wang Zhuang-wei, Zhao Mi-zhen, Yuan Ji, Wu Wei-min, Qian Ya-ming. 2011. Establishment of SSR fingerprinting database for 38 cultivars of strawberry (*Fragaria ananassa*) native to Europe and America. *Journal of Fruit Science*, 28 (6): 1032 - 1037. (in Chinese)
- 王壮伟, 赵密珍, 袁骥, 吴伟民, 钱亚明. 2011. 38 个欧美草莓栽培品种 SSR 指纹图谱的构建. *果树学报*, 28 (6): 1032 - 1037.
- Xu Lei-feng, Ge Liang, Yuan Su-xia, Ren Jun-fang, Yuan Ying-ying, Li Ya-nan, Liu Chun, Ming Jun. 2014. Using the fluorescent labeled SSR markers to establish molecular identity of lily germplasms. *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (10): 2055 - 2064. (in Chinese)
- 徐雷锋, 葛亮, 袁素霞, 任君芳, 袁迎迎, 李雅男, 刘春, 明军. 2014. 利用荧光标记 SSR 构建百合种质资源分子身份证. *园艺学报*, 41 (10): 2055 - 2064.
- Yamamoto T, Kimura T, Sawamura Y, Manabe T, Kotobuki K, Hayashi T, Ban Y, Matsuta N. 2002a. Simple sequence repeats for genetic analysis in pear. *Euphytica*, 124 (1): 129 - 137.
- Yamamoto T, Kimura T, Shoda M, Ban Y, Hayashi T, Matsuta N. 2002b. Development of microsatellite markers in the Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Mol Ecol Notes*, 2 (1): 14 - 16.
- Yan Jing-wan, Tian Da-gang, Xu Yan, Wang Feng. 2011. Constructing SSR molecular database for identity system of hybrid rice parents. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 26 (2): 148 - 152. (in Chinese)
- 颜静宛, 田大刚, 许彦, 王锋. 2011. 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*, 26 (2): 148 - 152.
- Zhang Jing-guo, Tian Rui, Chen Qi-liang, Yang Xiao-ping, Hu Hong-ju. 2014. Establishment of molecular ID for pear cultivars based on SSR markers. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 33 (1): 12 - 17. (in Chinese)
- 张靖国, 田瑞, 陈启亮, 杨晓平, 胡红菊. 2014. 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*, 33 (1): 12 - 17.
- Zhu Jun, Wang Tao, Zhao Yu-jun, Zhang Wen, Li Guang-chen. 2007. Identification of apple varieties with AFLP molecular markers. *Acta Horticulturae Sinica*, 27 (2): 102 - 106. (in Chinese)
- 祝军, 王涛, 赵玉军, 张文, 李光晨. 2007. 应用 AFLP 分子标记鉴定苹果品种. *园艺学报*, 27 (2): 102 - 106.