



19个枇杷杂交新品种(系)的SSR鉴定和指纹图谱构建

胡文舜, 邓朝军, 许奇志, 蒋际谋, 姜帆, 陈秀萍, 郑少泉

引用本文:

胡文舜, 邓朝军, 许奇志, 等. 19个枇杷杂交新品种(系)的SSR鉴定和指纹图谱构建[J]. 热带亚热带植物学报, 2020, 28(2): 153–162.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4131>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

低温对枇杷苗叶片与根尖的生理状况及超微结构的影响

Influence of Low Temperature on Physiological and Cell Ultrastructure of Leaves and Roots of *Eriobotrya japonica* Seedlings
热带亚热带植物学报. 2019, 27(4): 452–460 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4001>

桉树及其杂交种叶片形态的遗传变异特征

Genetic Variation Patterns in Leaf Morphology on Eucalypts and Their Hybrids
热带亚热带植物学报. 2018, 26(6): 589–596 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3882>

木豆种质资源形态与农艺性状的多样性分析

Diversity Analysis of Morphological and Agronomic Traits in *Cajanus cajan*
热带亚热带植物学报. 2017, 25(1): 51–56 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3633>

茶树品种(品系)芽叶色泽表型遗传数量分类研究

Numerical Taxonomy of Leaf Color Phenotypes for Tea (*Camellia sinesis*)
热带亚热带植物学报. 2016, 24(4): 444–451 <https://doi.org/10.11926/j.issn.1005-3395.2016.04.012>

地方果蔗品种种质资源形态与农艺性状的多样性分析

Diversity Analysis of Morphology and Main Agronomic Traits in Chewing Cane
热带亚热带植物学报. 2015(4): 399–404 <https://doi.org/10.11926/j.issn.1005-3395.2015.04.006>

19 个枇杷杂交新品种(系)的 SSR 鉴定和指纹图谱构建

胡文舜, 邓朝军, 许奇志, 蒋际谋, 姜帆, 陈秀萍, 郑少泉*

(福建省农业科学院果树研究所, 福建省龙眼枇杷育种工程技术研究中心, 福州 350013)

摘要: 为探究枇杷(*Eriobotrya japonica*)杂交品种真实性和 DNA 指纹图谱,对新育成的 19 个枇杷杂交品种(系)进行 SSR 标记鉴定分析。结果表明,从已发表的 89 对 SSR 引物中筛选出扩增条带清晰稳定的多态性引物 19 对,在 24 份枇杷材料中共扩增到 83 条带,每对引物平均扩增 4.37 条, PIC 值为 0.234~0.983, 平均为 0.764。经 12 对具有父本特征带多态性引物鉴定,19 个杂交新品种(系)全部为真杂种,真杂种率为 100%。UPGMA 聚类分析表明,19 个杂交新品种(系)的遗传相似系数为 0.728~0.969,与杂交亲本‘新白 2 号’和‘贵妃’聚为同一个大类,并可细分为 4 个亚类,红肉与白肉的枇杷品种(系)间无明显划分。同时利用 8 对多态性 SSR 引物组合,构建了 19 个枇杷杂交新品种(系)的分子指纹图谱。这为枇杷品种鉴定、新品种权保护和杂交育种提供重要参考依据。

关键词: 枇杷; 杂交育种; SSR; 杂种鉴定; 指纹图谱

doi: 10.11926/jtsb.4131

Identification and Fingerprint Construction of 19 New Hybrid Varieties (Lines) of Loquat by SSR

HU Wen-shun, DENG Chao-jun, XU Qi-zhi, JIANG Ji-mou, JIANG Fan, CHEN Xiu-ping, ZHENG Shao-quan*

(Fruit Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fujian Breeding Engineering Technology Research Center for Longan & Loquat, Fuzhou 350013, China)

Abstract: In order to understand the loquat (*Eriobotrya japonica*) hybrid authenticity and DNA fingerprint, 19 new loquat varieties or lines were analyzed by using SSR marker. Nineteen pairs SSR primers with clear and stable fragments were selected from eighty-nine previously published SSR. Totally, 83 amplified bands were detected from 24 materials of loquat, with an average of 4.37 for each primer pair. Polymorphism information content values ranged from 0.234 to 0.983, with an average of 0.764. The authenticity of all 19 new loquat varieties or lines were confirmed by 12 SSR markers with special bands of male parent, and the true hybrid rate was 100%. The genetic similarities among hybrids ranged from 0.728 to 0.969. The UPGMA dendrograms indicated that 19 hybrids could be get together into one big group (with the crossing parents ‘Xinbai No. 2’ and ‘Guifei’) and divided into 4 subgroups, and do not cluster by color of flesh. Furthermore, the DNA fingerprints for the 19 cultivars were established by 8 polymorphic SSR primers. So, these would provide references for cultivar

收稿日期: 2019-08-09 接受日期: 2019-09-18

基金项目: 福建省农业科学院科技创新团队项目(STIT2017-1-4); 农业农村部物种品种资源保护(热带作物)项目(151821301354052701); 福建省科技厅星火项目(217S0009)资助

This work was supported by the Project for Science and Technology Innovation Team of Fujian Academy of Agriculture Sciences (Grant No. STIT2017-1-4), and the Project of Species Resource Protection (Tropical Crops) of Ministry of Agriculture and Rural Affairs (Grant No. 151821301354052701), and the Spark Plan of Department of Science and Technology of Fujian Province (Grant No. 217S0009).

作者简介: 胡文舜(1984~), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向为龙眼、枇杷遗传育种与分子生物学。E-mail: huwenshun06@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: zsq333555@163.com

identification, protection of new variety right and crossbreeding of loquat.

Key words: Loquat; Cross breeding; SSR marker; Hybrid identification; Fingerprint

近年来,随着枇杷(*Eriobotrya japonica*)实生选种^[1]、芽变选种^[2],尤其是杂交育种^[3-7]的积累和发展,新品种数量明显增多,如何快速准确地进行新品种真实性鉴定对枇杷产业的良性发展具有重要意义。与传统的形态学性状鉴定方法相比,DNA 分子标记具有可靠性高、信息量大、检测迅速、操作方便等突出优点^[8]。

国际植物新品种权保护联盟(UPOV)在 BMT 分子测试指南中确定了 SSR (simple sequence repeat)和 SNP (single nucleotide polymorphisms)作为构建 DNA 指纹数据库的标记^[9]。我国发布实施的农业行业标准《NY/T 2594-2014 植物品种鉴定 DNA 指纹方法总则》^[10]也推荐 SSR 为当前主要标记方法,SNP 作为适时推进的标记方法。SSR 标记技术较为成熟,现已应用在水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)、棉花(*Gossypium* sp.)、大豆(*Glycine max*)、油菜(*Brassica napus*)和苹果(*Malus pumila*)等多种农作物的 DNA 指纹库构建上,玉米(*Zea mays*)、水稻、大豆等部分作物也开始采用 SNP 技术建立指纹库^[11]。

目前 UPOV 发布实施和我国研制的枇杷品种特异性、一致性和稳定性(DUS)测试指南^[12-13]均只是依据表型性状,尚未将 DNA 分子标记纳入。SSR 分子标记已广泛应用于枇杷遗传多样性^[14-18]和连锁图谱^[19-20]研究,在种质鉴别和 DNA 指纹图谱构建上也有报道,孙淑霞等^[21]利用 108 对 SSR 标记对枇杷白肉突变体和野生型进行检测,但未发现多态性;何桥^[22]利用 55 对 SSR 引物鉴定区分了‘大五星’枇杷的 9 个天然三倍体和 1 个二倍体材料;龙治坚^[23]利用 6 对 SSR 引物的条带组合,构建了 44 份枇杷栽培品种和野生材料的 DNA 指纹图谱。从亲本相同或近似的枇杷杂交组合后代中选育出来的新品种,由于遗传基础较为接近,品种间鉴别区分的难度增加,至今尚未见对枇杷系列杂交新品种的分子标记鉴别报道。本研究选取福建省农业科学院果树研究所近年来选育的 19 个枇杷杂交新品种(系),采用 SSR 分子标记进行杂种真实性鉴定和遗传多样性分析,并构建其 DNA 指纹图谱,以期对枇杷新品种权申请及优良品种推广提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

以 24 份二倍体枇杷(*Eriobotrya japonica*)品种(系)为试材,其中 19 份为福建省农业科学院果树研究所近年来育成的杂交新品种(系),3 份亲本品种‘新白 2 号’、‘早钟 6 号’和‘贵妃’,2 份地方品种‘解放钟’和‘新白 7 号’(与‘贵妃’表型近似)(表 1),均保存在国家果树种质福州枇杷圃和福建省农业科学院果树研究所枇杷育种园。品种成熟期和果肉颜色性状描述参照《枇杷种质资源描述规范和数据标准》^[24],成熟期以福州地区早熟品种‘早钟 6 号’(4 月上、中旬)和晚熟品种‘解放钟’(5 月上旬)为参照划定,即极早熟(3 月下旬)、早熟(4 月上、中旬)、中熟(4 月下旬)和晚熟(5 月上旬)。

1.2 DNA 提取和 SSR-PCR 扩增

2017 年 7-8 月采摘新鲜嫩叶,用保鲜袋封存后置于冰盒带回实验室。基因组 DNA 提取采用改良的 CTAB 法,DNA 质量和浓度的检测采用 1% 的琼脂糖电泳和微量紫外分光光度计(GENEQ UANT, Eppendorf)。稀释 DNA 浓度至 50 ng/ μ L, -20 $^{\circ}$ C 保存。

SSR 引物参考前人^[13,17,23,25]的方法,挑选已验证多态性较好的引物进行合成,共计 89 对。引物合成由铂尚生物技术(上海)有限公司完成。

PCR 扩增反应体系总体积为 10 μ L,其中 PCR Master Mix 5 μ L, 10 μ mol/L 正、反向 SSR 引物各 0.5 μ L,模板 DNA 1 μ L, ddH₂O 3 μ L。反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 53 $^{\circ}$ C ~62 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。扩增产物在 6% 聚丙烯酰胺凝胶上恒压电泳(120 V, 90~120 min), GeneGreen 核酸染料染色 15 min,最后在 BIO-RAD 凝胶成像系统上拍照记录。

1.3 杂种真实性鉴定

筛选具有父本特征性条带的多态性 SSR 引物,用于杂种后代真假鉴定。杂种扩增结果为具有双亲互补带型或父本特征带型的确认为真杂种^[8]。

表 1 供试 24 份枇杷品种(系)

Table 1 24 loquat cultivars or lines used in this study

序号 No.	编号 Code	品种(系) Cultivar (line)	来源 Source	主要特征 Main characteristics
1	XB7	‘新白 7 号’ ‘Xinbai No. 7’	实生苗选种 Seedling selection	晚熟, 果肉黄白色 Late mature, flesh yellowish white
2	XB2	‘新白 2 号’ ‘Xinbai No. 2’	实生苗选种 Seedling selection	中熟, 果肉乳白色 Middle mature, flesh milky
3	ZZ6	‘早钟 6 号’ ‘Zaozhong No. 6’	‘解放钟’×‘森尾早生’ ‘Jiefangzhong’×‘Senweizaosheng’	早熟, 果肉橙红色 Early mature, flesh orange red
4	GF	‘贵妃’ ‘Guifei’	实生苗选种 Seedling selection	晚熟, 果肉黄白色 Late mature, flesh yellowish white
5	JFZ	‘解放钟’ ‘Jiefangzhong’	实生苗选种 Seedling selection	晚熟, 果肉橙黄色 Late mature, flesh orange yellow
6	42-103	‘白早钟 3 号’ ‘Baizaozhong No. 3’	‘早钟 6 号’×‘新白 2 号’ ‘Zaozhong No. 6’×‘Xinbai No. 2’	早中熟, 果肉黄白色 Early-mid mature, flesh yellowish white
7	42-268	‘白早钟 11 号’ ‘Baizaozhong No. 11’	‘早钟 6 号’×‘新白 2 号’ ‘Zaozhong No. 6’×‘Xinbai No. 2’	早中熟, 果肉黄白色 Early-mid mature, flesh yellowish white
8	42-161	‘白早钟 7 号’ ‘Baizaozhong No. 7’	‘早钟 6 号’×‘新白 2 号’ ‘Zaozhong No. 6’×‘Xinbai No. 2’	早熟, 果肉乳白色 Early mature, flesh milky
9	42-262	‘白早钟 16 号’ ‘Baizaozhong No. 16’	‘早钟 6 号’×‘新白 2 号’ ‘Zaozhong No. 6’×‘Xinbai No. 2’	早熟, 果肉乳白色 Early mature, flesh milky
10	42-264	‘白早钟 17 号’ ‘Baizaozhong No. 17’	‘早钟 6 号’×‘新白 2 号’ ‘Zaozhong No. 6’×‘Xinbai No. 2’	中熟, 果肉黄白色 Middle mature, flesh yellowish white
11	42-197	‘白早钟 1 号’ ‘Baizaozhong No. 1’	‘早钟 6 号’×‘新白 2 号’ ‘Zaozhong No. 6’×‘Xinbai No. 2’	极早熟, 果肉乳白色 Very early mature, flesh milky
12	42-206	‘白早钟 9 号’ ‘Baizaozhong No. 9’	‘早钟 6 号’×‘新白 2 号’ ‘Zaozhong No. 6’×‘Xinbai No. 2’	中熟, 果肉黄白色 Middle mature, flesh yellowish white
13	42-286	‘冠红 1 号’ ‘Guanhong No. 1’	‘早钟 6 号’×‘新白 2 号’ ‘Zaozhong No. 6’×‘Xinbai No. 2’	中熟, 果肉橙红色 Middle mature, flesh orange red
14	42-120	‘白早钟 2 号’ ‘Baizaozhong No. 2’	‘早钟 6 号’×‘新白 2 号’ ‘Zaozhong No. 6’×‘Xinbai No. 2’	早中熟, 果肉乳白色 Early-mid mature, flesh milky
15	42-301	‘冠红 2 号’ ‘Guanhong No. 2’	‘早钟 6 号’×‘新白 2 号’ ‘Zaozhong No. 6’×‘Xinbai No. 2’	中熟, 果肉橙红色 Middle mature, flesh orange red
16	42-275	‘白早钟 5 号’ ‘Baizaozhong No. 5’	‘早钟 6 号’×‘新白 2 号’ ‘Zaozhong No. 6’×‘Xinbai No. 2’	中晚熟, 果肉黄白色 Mid-late mature, flesh yellowish white
17	42-309	‘白早钟 13 号’ ‘Baizaozhong No. 13’	‘早钟 6 号’×‘新白 2 号’ ‘Zaozhong No. 6’×‘Xinbai No. 2’	中熟, 果肉黄白色 Middle mature, flesh yellowish white
18	42-132	‘白早钟 10 号’ ‘Baizaozhong No. 10’	‘早钟 6 号’×‘新白 2 号’ ‘Zaozhong No. 6’×‘Xinbai No. 2’	中晚熟, 果肉黄白色 Mid-late mature, flesh yellowish white
19	42-74	‘白早钟 4 号’ ‘Baizaozhong No. 4’	‘早钟 6 号’×‘新白 2 号’ ‘Zaozhong No. 6’×‘Xinbai No. 2’	中熟, 果肉乳白色 Middle mature, flesh milky
20	061-272	‘白早钟 8 号’ ‘Baizaozhong No. 8’	‘早钟 6 号’×‘贵妃’ ‘Zaozhong No. 6’×‘Guifei’	中熟, 果肉黄白色 Middle mature, flesh yellowish white
21	061-17	‘白早钟 14 号’ ‘Baizaozhong No. 14’	‘早钟 6 号’×‘贵妃’ ‘Zaozhong No. 6’×‘Guifei’	中晚熟, 果肉黄白色 Mid-late mature, flesh yellowish white
22	061-121	‘白早钟 19 号’ ‘Baizaozhong No. 19’	‘早钟 6 号’×‘贵妃’ ‘Zaozhong No. 6’×‘Guifei’	晚熟, 果肉黄白色 Late mature, flesh yellowish white
23	062-100	‘白早钟 15 号’ ‘Baizaozhong No. 15’	‘贵妃’×‘早钟 6 号’ ‘Guifei’×‘Zaozhong No. 6’	中晚熟, 果肉黄白色 Mid-late mature, flesh yellowish white
24	062-29	‘白早钟 12 号’ ‘Baizaozhong No. 12’	‘贵妃’×‘早钟 6 号’ ‘Guifei’×‘Zaozhong No. 6’	中熟, 果肉黄白色 Middle mature, flesh yellowish white

1.4 数据分析

统计扩增图谱的强带或清晰弱带, 同一迁移位置按照条带的有无分别赋值“1”和“0”, 建立 0/1 矩阵。计算多态性位点百分率($P, \%$)= $(k/n) \times 100\%$, 其中 k 是多态位点数, n 为所测位点总数。SSR 位点的多态性信息量 (polymorphism information content, PIC) 按如下公式计算: $PIC = 1 - \sum P_i^2$, 式中, P_i 表示第 i 个等位位点出现的频率^[26]。采用 NTSYS-

pc2.10e 软件计算 Dice 遗传相似系数, 按 UPGMA (unweighted pairgroup method using arithmetic averages) 方法进行聚类分析。采用 SPSS Statistics 25.0 进行单因子方差分析 (One-Way ANOVA), LSD 法测验分析组间差异显著性。利用 Quantity One 软件估算扩增片段的分子量大小, 辅以人工校对后逐一编号, 参照葛亚英等^[27]方法构建品种指纹图谱。

2 结果和分析

2.1 多态性引物筛选

利用‘新白 2 号’、‘早钟 6 号’、‘贵妃’、‘解放钟’和‘新白 7 号’等 5 份材料对 89 对 SSR 引物进行筛选, 得到带型清晰、稳定性和重复性好的多态性引

物 19 对(表 2), 占 21.35%。用这 19 对引物对所有 24 份供试材料进行 PCR, 共获得 83 条扩增条带(图 1)。每对引物扩增条带为 2~9 条, 平均 4.37 条; 多态性条带比率为 50.00%~100.00%, 平均 71.71%; 多态性信息含量(PIC)为 0.234~0.983, 平均 0.764, 有 17 对引物的 PIC 大于 0.550。

表 2 19 对 SSR 多态性引物

Table 2 19 polymorphism SSR primer pairs

引物 Primer	序列 (5'~3') Sequence	长度 Length (bp)	条带数 No. of bands	多态性比率(P)/% Polymorphism rate	多态性信息量 PIC	参考文献 Reference
7950 ^{L, ES}	GATCTTTTGTTCGAGAGGTG CTTTCGCATTCCATTTCCTG	420~430	2	50.00	0.789	17
Hi15h12 ^{M, GS}	GAACAAGAAGGACGCGAATC GTTTGGCCCTCGTTATCACTACCA	100~450	9	55.56	0.983	28
2121 ^{L, ES}	CCATTTTCGACATCTTGCATAG AAGTTCAATGAGGTGCAGAA	400~420	2	100.00	0.659	17
CH04c07 ^{M, GS}	GGCCTTCCATGTCTCAGAAAG CCTCATGCCCTCCACTAACA	110~120	2	50.00	0.373	29
CH01h10R ^{M, GS}	TGCAAAGATAGGTAGATATATGCCA AGGAGGGATTGTTTGTGCAC	90~150	4	100.00	0.829	29
CH04g12 ^{M, GS}	CACCGATGGTGTCAACTTGT CAACAAAATGTGATCGCCAC	145~195	5	80.00	0.955	29
8119 ^{L, ES}	ACCCGTTAGTTGATGATGTT GTTTATGGGTTTGGTTCGG	95~410	7	28.57	0.234	17
8106 ^{L, ES}	GCAGCAGTTATACTCCACAT AAGAAGAGACGGGAAATGAC	200~350	4	100.00	0.856	17
CH01f07a ^{M, GS}	CCCTACACAGTTTCTCAACCC CGTTTTTGGAGCGTAGGAAC	150~210	5	40.00	0.729	29
3842 ^{L, ES}	TTCCAAAATCCAAAGCCTTC CGAAAAAGTGGACCGAACAC	180~290	4	50.00	0.770	17
4019 ^{L, ES}	GAGAGCAGCACCAACGTTTA AGAAGCGCAGAGCTTGTAGC	210~510	3	66.67	0.875	17
CH03d10 ^{M, GS}	CTCCCTTACCAAAAACACCAAAA GTGATTAAGAGAGTGATCGGGG	162~185	6	100.00	0.935	29
HgA8b ^{P, GS}	AACAAGCAAAGGCAGAACAA CATAGAGAAAAGCAAAGCAAA	150~220	4	75.00	0.833	30
88 ^{L, GS}	AACTGATGAAGCAAGGCAAGA AGATCCGGAGAGGATCCAAA	195~230	6	100.00	0.890	31
CDPP725-03/04 ^{L, GS}	GTATGCATGGCGGTCAAAAAG GCCGACTTTCCATTCTTCC	195~235	6	50.00	0.869	32
CDPP725-41/42 ^{L, GS}	CGAAGCTCTCCATTGTGTGCT CACCGTCACCTTCTCTCTGT	140~155	3	66.67	0.560	32
LM-4 ^{L, GS}	CGATGAGCCAAAGTATGATCA CGGAATCATCTTCATCACCT	110~125	2	50.00	0.579	32
LM-15 ^{L, GS}	GCTAACTCTGAAAGTGGTGA GCGACGTGTTTCAATTCTGA	190~240	3	100.00	0.842	32
LM-36 ^{L, GS}	CGTCGATAAAGGCACGCTAT GTCGCACCTGATTCAGATCA	150~275	6	100.00	0.959	32
平均 Mean			4.37	71.71	0.764	

L、M 和 P 分别为枇杷、苹果和梨开发的引物; GS: gSSR; ES: EST-SSR。

L, M and P indicate SSR primers developed from loquat, apple and pear, respectively; GS: gSSR; ES: EST-SSR.

2.2 杂种真实性鉴定

根据父本特征带的有无, 筛选出 CH04c07、8119、8106、HgA8b、88、LM-04、LM-15 和 LM-36 共 8 对 SSR 引物对‘早钟 6 号’×‘新白 2 号’的后代进行鉴定; CH04c07、CH04g12、8119、8106、88、LM-04、LM-15 和 LM-36 共 8 对 SSR 引物对‘早钟 6 号’×‘贵妃’的后代进行鉴定; 7950、Hi15h12、CH04g12、8106、88、CDPP725-03/04、LM-04、

LM-15 和 LM-36 共 9 对 SSR 引物对‘贵妃’×‘早钟 6 号’的后代进行鉴定。结果表明(表 3), 19 个枇杷杂交新品种全部具有父本特异位点, 真杂种率达到 100%。单对引物的杂种鉴定效率为 0%~100%, 其中引物 88 和 LM-04 对 3 个杂交组合的鉴定效率高, 19 个杂交品种表现为父母本特异带互补型, 真杂种率均达到 100%; 引物 8106 (图 1)和 LM-36 在‘早钟 6 号’×‘贵妃’、‘贵妃’×‘早钟 6 号’组合的 5 个杂交

品种中扩增出双亲特异条带, 真杂种率均达到 100%。19 个杂交新品种均得到至少 3 对引物的证实, 这也说明这些 SSR 引物的鉴定结果可靠。

2.3 聚类分析

以 19 对多态性 SSR 引物(表 2)对 24 个枇杷品种扩增获得的 83 个位点数据, 建立原始矩阵,

应用 NTSYSpc 2.20v 软件得出 Dice 相似系数。19 个杂交新品种间的平均遗传相似系数为 0.852, 相似系数最大的为 0.969 (42-275 与 42-309), 最小的为 0.728 (42-275 与 061-17); 其余 15 个品种间的平均遗传相似系数为 0.783, 相似系数最大的为 0.983 (‘新白 7 号’与‘贵妃’), 最小的为 0.636 (‘新白 2 号’与‘早钟 6 号’)。

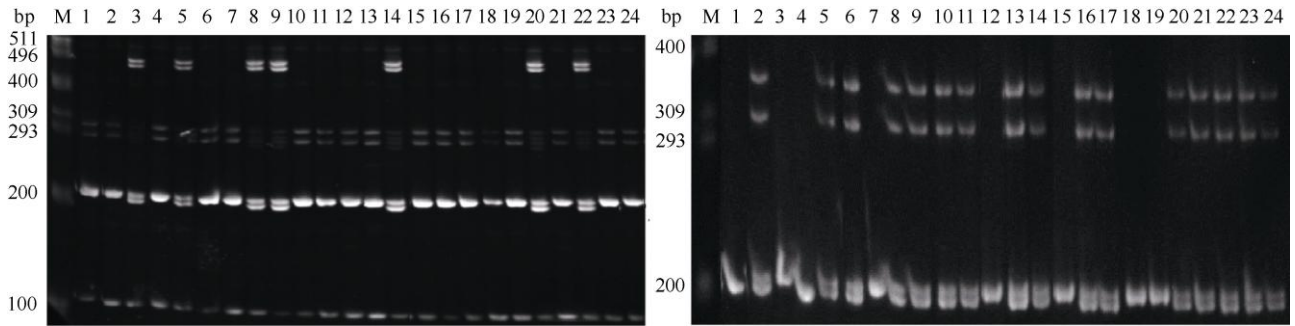


图 1 引物 Hi15h12 (左)和 8106 (右)对 24 份枇杷材料的扩增结果。M: Marker; 1~24:见表 1。

Fig. 1 Amplification of 24 loquat cultivars by Hi15h12 (left) and 8106 (right) primers. M: Marker; 1-24: See Table 1.

表 3 19 个枇杷杂交新品种的真实性鉴定

Table 3 Hybrid purity identification of 19 new loquat cultivars

引物 Primer	‘早钟 6 号’×‘新白 2 号’♂ ‘Zaozhong No. 6’×‘Xinbai No. 2’			‘早钟 6 号’×‘贵妃’ ‘Zaozhong No. 6’×‘Guifei’			‘贵妃’×‘早钟 6 号’♂ ‘Guifei’×‘Zaozhong No. 6’		
	NA	SP	HP	NA	SP	HP	NA	SP	HP
CH04c07	14	14	100	3	0	0	2	-	-
8119		14	100		2	66.67		-	-
8106		9	64.29		3	100		2	100
HgA8b		9	64.29		-	-		-	-
88		14	100		3	100		2	100
LM-04		14	100		3	100		2	100
LM-15		14	100		2	66.67		1	50
LM-36		12	85.71		3	100		2	100
CH04g12		-	-		1	33.33		1	50
7950		-	-		-	-		0	0
Hi15h12		-	-		-	-		0	0
CDPP725-03/04		-	-		-	-		1	50

NA: 杂交后代数; SP: 具父本特异带后代数; HP: 真杂种率(%); -: 非特异性引物。

NA: Number of hybrids; SP: Number of hybrids with special bands of male parent; HP: True hybrid rate (%); -: Non-specific prime.

UPGMA 聚类结果表明, 24 个品种在遗传相似系数 0.776 处可分为 2 大类(图 2)。第 I 类包括以白肉枇杷为主的 22 个品种, 在相似系数 0.830 处可分为 4 个亚类。第 i 类由中、晚熟, 果肉黄白/乳白色的‘新白 7 号’、‘贵妃’、‘白早钟 9 号’和‘新白 2 号’等 4 个品种组成; 第 ii 类包括‘白早钟 3 号’等 13 个

白肉和‘冠红 1 号’等 2 个红肉品种, 并可进一步细分为 A 和 B 两个组, 其中 A 组主要为中熟品种(早中熟、中熟和中晚熟品种分别有 2、6 和 2 个); 第 iii 类由特早熟、果肉乳白色的‘白早钟 1 号’单独组成; 第 iv 类包括中、晚熟, 果肉黄白色的‘白早钟 14 号’和‘白早钟 15 号’共 2 个品种。第 II 类包括 2

个红肉品种，分别为果肉橙红色的‘早钟 6 号’和橙黄色的‘解放钟’，其中‘早钟 6 号’是‘解放钟’×‘森尾早生’的杂交后代^[33]。3 个杂交亲本中的‘新白 2 号’和‘贵妃’与全部 19 个杂交后代聚在一类，这也表明与‘早钟 6 号’相比，‘新白 2 号’和‘贵妃’具有一定的遗传优势。

将 24 个枇杷品种的成熟期表型简并为早熟(特早熟和早熟)、中熟(早中熟和中熟)和晚熟(中晚熟和

晚熟) 3 个组，并分析组内与组间的品种相似系数差异。结果表明，中熟组内品种相似系数(0.870±0.005)极显著高于($P<0.01$)中熟-早熟组间品种相似系数(0.834±0.009)和中熟-晚熟组间品种相似系数(0.839±0.05)，但早熟组和晚熟组的组内与组间品种差异均未全部达到显著水平，这也表明中熟表型分类与分子标记鉴定分类结果较为一致，如中熟品种主要聚集在 A 组(图 2)。

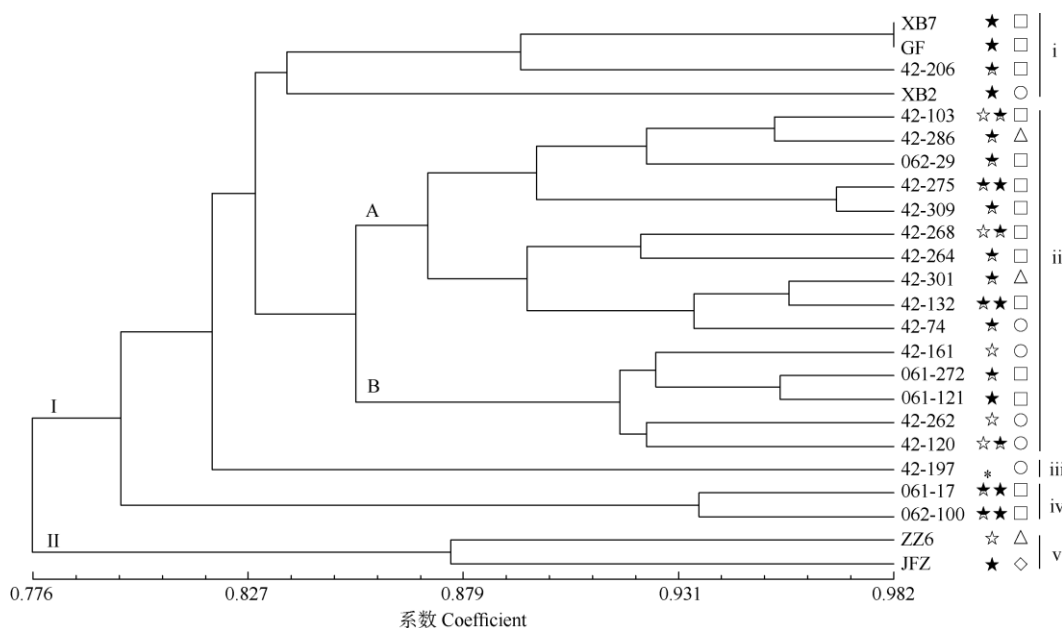


图 2 24 个枇杷品种的 UPGMA 聚类图。*：极早熟；☆：早熟；★：中熟；★：晚熟；△：橙红色；◇：橙黄色；□：黄白色；○：乳白色。编号见表 1。

Fig. 2 UPGMA phylogenetic tree of 24 loquat cultivars. *：Very-early mature；☆：Early mature；★：Middle mature；★：Late mature；△：Orange red；◇：Orange yellow；□：Yellow white；○：Milky. Code see Table 1.

2.4 品种指纹图谱构建

根据引物特异性条带、PIC 值和引物组合鉴定效率，从 19 对多态性 SSR 引物中选择 8 对扩增和鉴别效果较好的引物(Hi15h12、LM-36、CH04g12、4019、8106、7950、CH01f07a 和 2121)。利用这 8 对引物组合扩增的 36 个位点，建立了 24 份枇杷品种材料的分子指纹图谱(图 3)，品种间差异位点数≥ 2，其中‘新白 7 号’和‘贵妃’、‘冠红 1 号’和‘白早钟 13 号’、‘白早钟 14 号’和‘白早钟 15 号’的差异位点数为 2。每份品种都有唯一的可视化指纹图谱，19 个枇杷杂交新品种可以明确地相互区分。

3 讨论

SSR 标记具有多态性高、共显性遗传、检测易

等诸多优点，但其引物开发繁琐，一般需要建立 DNA 文库或 cDNA 文库。当前枇杷 SSR 标记的开发相对滞后，早期多从苹果属植物中筛选通用性引物^[15,22]，近年来先后开展了基因组 SSR (gSSR)引物^[25,32]和表达序列标签 SSR (EST-SSR)引物的开发^[17,34]。本试验从已报道的多样性引物中选取了 89 对 SSR 引物，包括枇杷的 EST-SSR 引物 33 对^[17]、gSSR 引物 17 对^[25]，苹果的 gSSR 引物 37 对^[14,22]，梨的 gSSR 引物 2 对^[14]，最终分别筛选到 6 ($PIC=0.697$)、6 ($PIC=0.783$)、6 ($PIC=0.801$)和 1 对($PIC=0.833$)，共 19 对适宜的 SSR 多态性引物。这也表明在多态性引物获得率和 PIC 值上，gSSR 要普遍高于 EST-SSR，这可能与 EST-SSR 标记来源于相对保守的转录区域有关；从苹果属和梨属植物筛选的通用性引物，可以补充枇杷引物数量。但随着高通量

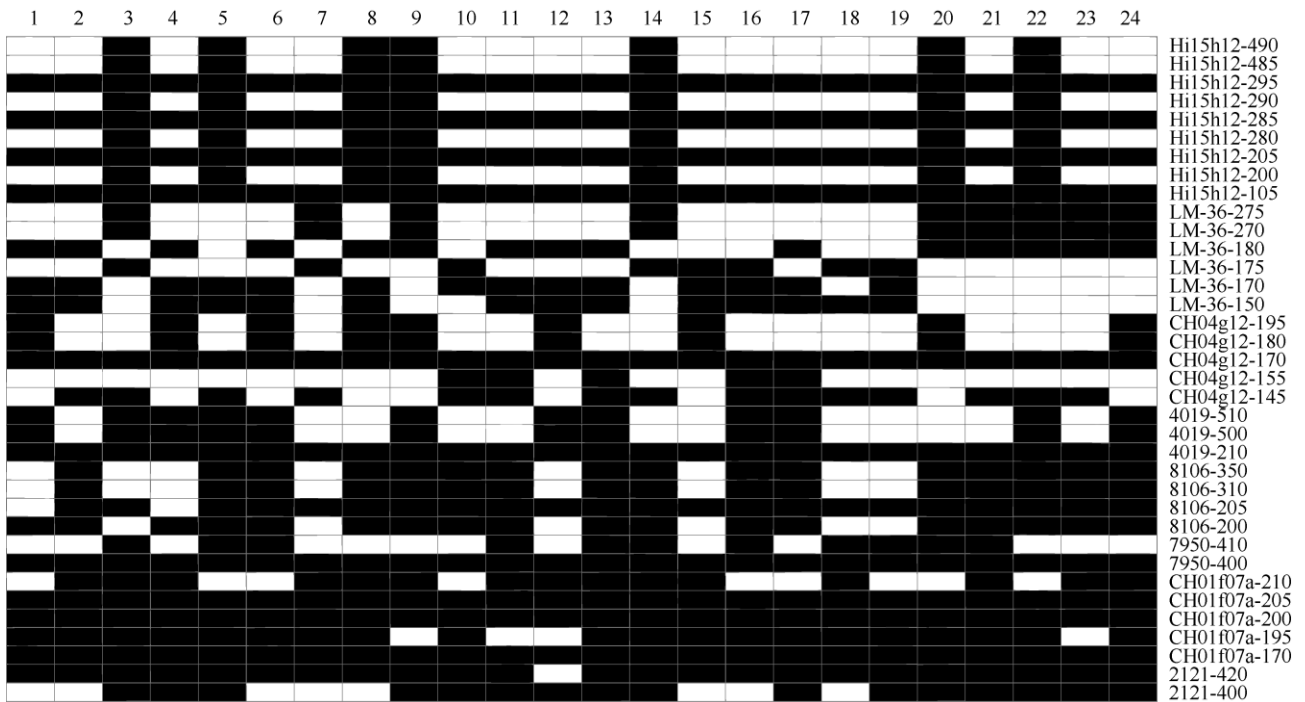


图3 24个枇杷品种的SSR指纹图谱。1~24见表1。

Fig. 3 Fingerprint of 24 loquat cultivars based on SSR marker. 1–24 see Table 1.

测序技术的广泛应用, 基于转录组或基因组测序数据批量开发枇杷EST-SSR或gSSR标记将是今后主流策略。

杂种后代的真实性鉴定可为优良品种选育及性状遗传研究提供基础。本研究的19个枇杷杂交新品种(系), 经SSR鉴定全部为真杂种, 即真杂种率为100%。杂交亲本‘早钟6号’枇杷表现早熟、大果、果肉橙红色等特点; ‘新白2号’枇杷表现中熟、中等果、果肉乳白色等特点; ‘贵妃’枇杷表现晚熟、大果、果肉黄白色等特点。亲本间表型性状的明显差异使得杂种后代多样性较为丰富, 19个枇杷杂交新品种(系)的遗传相似系数为0.728~0.969, 平均0.852; 果实成熟期出现了特早熟的超亲遗传后代, 如‘白早钟1号’, 其成熟期比母本‘早钟6号’提早1个星期以上; 果肉颜色具有乳白色、黄白色和橙红色等不同类型。关于枇杷果肉色泽的遗传, 按现有研究报道^[20,35–37], 可归纳为“红白肉枇杷杂交F₁后代红肉与白肉的分离比为1:0或1:1, 白肉杂交后代全部为白肉枇杷, 红肉杂交后代分离比为1:0或3:1”, 可见枇杷果实白肉颜色极可能是受隐性单基因控制的性状; Fu等^[38]报道八氢番茄红素合成酶基因*EjPSY2A*突变成为*EjPSY2A^d*, 抑制了枇杷

果肉中类胡萝卜素的积累, 红肉枇杷为*EjPSY2A*纯合型或*EjPSY2A/EjPSY2A^d*杂合型, 白肉枇杷为*EjPSY2A^d*纯合型。本试验杂种真实性鉴定结果也证实, 选择早熟红肉品种为母本、中熟白肉品种为父本进行杂交可以选育出早熟/特早熟白肉的优良后代, 这也为今后枇杷杂交亲本的选配提供了很好的实践依据与理论支持。

植物品种DNA指纹鉴定的判定原则可根据不同植物的具体情况分别确定^[10], 如苹果品种间相似度 $\leq 90\%$ 时, 判定为不同品种^[39]; 而水稻^[40]、大豆^[41]、玉米^[42]等大多数作物以样品间差异位点数 ≥ 2 时, 判定为不同品种。本研究利用8对SSR引物组合构建了24个枇杷品种的DNA指纹图谱, 所有品种间均至少存在2个差异位点, 能够被明确区分。但由于采用聚丙烯酰胺电泳检测, 在标记等位基因数多或条带大小近似时分辨能力有限, 加之部分杂交品种间的高度遗传相似性增加了鉴别的难度, 因此需要更多的引物才能区分开, 这在面对大批量枇杷资源鉴定时尤为明显。如果能结合应用灵敏度和分辨率高、数据收集和处理通量大的毛细管电泳技术, 检测结果将更为稳定、准确和高效。

今后应在广泛收集评价枇杷品种资源的基础

上, 开发出一套代表性强、适用性广的 SSR 核心引物并研究制订品种分子标记鉴定技术规程, 为枇杷品种鉴定、DNA 指纹库构建、新品种权申请与保护等提供行业标准, 具有重要的研究意义和应用价值。

参考文献

- [1] WANG H K, QIAN J L, YANG Z X, et al. Breeding of a new cold-resistant and high quality white pulp loquat cultivar 'Dongyu' [J]. *J Fruit Sci*, 2016, 33(11): 1464–1467. doi: 10.13925/j.cnki.gsx.20160174. 王化坤, 钱剑林, 杨忠星, 等. 抗寒优质白肉枇杷新品种‘冬玉’的选育 [J]. *果树学报*, 2016, 33(11): 1464–1467. doi: 10.13925/j.cnki.gsx.20160174.
- [2] LI J, SUN S X, CHEN D, et al. Comparative analysis of biological characteristics and fruit quality in white-flesh loquat mutant and its wild type [J]. *SW Chin J Agric Sci*, 2017, 30(7): 1495–1498. doi: 10.16213/j.cnki.scjas.2017.7.005. 李靖, 孙淑霞, 陈栋, 等. 枇杷白肉突变体与野生型生物学特性和果实品质比较分析 [J]. *西南农业学报*, 2017, 30(7): 1495–1498. doi: 10.16213/j.cnki.scjas.2017.7.005.
- [3] YANG Y S, JIANG X S, WEN X P, et al. A new mid-season loquat cultivar 'Guimi' [J]. *J Fruit Sci*, 2016, 33(6): 773–776. doi: 10.13925/j.cnki.gsx.20150547. 杨勇胜, 江旭升, 文晓鹏, 等. 中熟枇杷新品种‘贵蜜’的选育 [J]. *果树学报*, 2016, 33(6): 773–776. doi: 10.13925/j.cnki.gsx.20150547.
- [4] YANG Y S, LI Q H, JIANG X S, et al. Breeding report of a new late-maturing loquat cultivar 'Qianxing' [J]. *J Fruit Sci*, 2016, 33(3): 378–381. doi: 10.13925/j.cnki.gsx.20150342. 杨勇胜, 李庆宏, 江旭升, 等. 晚熟枇杷新品种‘黔星’的选育 [J]. *果树学报*, 2016, 33(3): 378–381. doi: 10.13925/j.cnki.gsx.20150342.
- [5] ZHANG X Y, LUO J, YE Z W, et al. A new mid-season loquat cultivar 'Torch' [J]. *J Fruit Sci*, 2017, 34(12): 1628–1630. doi: 10.13925/j.cnki.gsx.20170106. 张学英, 骆军, 叶正文, 等. 枇杷新品种‘火炬’的选育 [J]. *果树学报*, 2017, 34(12): 1628–1630. doi: 10.13925/j.cnki.gsx.20170106.
- [6] HU Z Q, LIN Y G, GUO D Z. A new early maturity and high quality white pulp loquat cultivar 'Rongzao 3' [J]. *S China Fruits*, 2017, 46(3): 154–156. doi: 10.13938/j.issn.1007-1431.20160298. 胡章琼, 林永高, 郭德章. 优质早熟白肉枇杷新品种‘榕早 3 号’选育 [J]. *中国南方果树*, 2017, 46(3): 154–156. doi: 10.13938/j.issn.1007-1431.20160298.
- [7] QING Y. Breeding of series new loquat cultivars with white flesh, big fruit and especial-early mature by Fujian Academy of Agricultural Sciences [J]. *Fruit Growers Friend*, 2018(5): 46–47. 清扬. 又白, 又大, 又早——福建省农科院培育出系列特早熟枇杷新品种 [J]. *果农之友*, 2018(5): 46–47.
- [8] HU W S, HUANG A P, JIANG F, et al. Identification and genetic diversity of reciprocal hybrids in longan (*Dimocarpus longan*) by SSR [J]. *Acta Hort Sin*, 2015, 42(10): 1899–1908. doi: 10.16420/j.issn.0513-353x.2015-0131. 胡文舜, 黄爱萍, 姜帆, 等. 龙眼正反交后代的 SSR 鉴定及遗传多样性分析 [J]. *园艺学报*, 2015, 42(10): 1899–1908. doi: 10.16420/j.issn.0513-353x.2015-0131.
- [9] UPOV (Union for the Protection of New Varieties of Plants). Guidelines for DNA-profiling: Molecular Marker Selection and Database Construction ("BMT Guidelines") [S]. Geneva: UPOV, 2007.
- [10] WANG F G, YI H M, ZHAO J R, et al. NY/T 2594–2014 General guideline for identification of plant varieties by DNA fingerprinting [S]. Beijing: China Agriculture Press, 2014. 王凤格, 易红梅, 赵久然, 等. NY/T 2594–2014 植物品种鉴定 DNA 指纹方法 总则 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2014.
- [11] WANG F G, ZHAO J R, TIAN H L, et al. The progress of the crop varieties DNA fingerprint database construction [J]. *Mol Plant Breed*, 2015, 13(9): 2118–2126. doi: 10.13271/j.mpb.013.002118. 王凤格, 赵久然, 田红丽, 等. 农作物品种 DNA 指纹库构建研究进展 [J]. *分子植物育种*, 2015, 13(9): 2118–2126. doi: 10.13271/j.mpb.013.002118.
- [12] UPOV. TG/159/3, Guidelines for the Conduct of Tests for Distinctness, Uniformity and Stability loquat [S]. Geneva: UPOV, 1998.
- [13] HUANG B. A study on establishment of loquat varieties DUS and relative research [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2011: 32–38. 黄彪. 枇杷品种 DUS 测试指南的研制及其相关研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 2011: 32–38.
- [14] HU W S, LI T, ZHENG S, et al. Genetic diversity and relationship analysis of 43 wild loquat (*Eriobotrya japonica*) germplasm in Yunnan [J]. *Fujian Fruits*, 2010(4): 20–28. doi: 10.3969/j.issn.1004-6089.2010.04.005. 胡文舜, 李韬, 郑姗, 等. 43 份云南野生枇杷种质遗传多样性与亲缘关系分析 [J]. *福建果树*, 2010(4): 20–28. doi: 10.3969/j.issn.1004-6089.2010.04.005.
- [15] HE Q, LI X W, LIANG G L, et al. Genetic diversity and identity of Chinese loquat cultivars/accessions (*Eriobotrya japonica*) using apple SSR markers [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2011, 29(1): 197–208. doi: 10.1007/s11105-010-0218-9.

- [16] WU D, FAN W G, HE Q, et al. Genetic diversity of loquat [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.] native to Guizhou Province (China) and its potential in the genetic improvement of domesticated cultivars [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2015, 33(4): 952–961. doi: 10.1007/s11105-014-0809-y.
- [17] LI X Y, XU H X, FENG J J, et al. Development and application of genetic simple sequence repeat markers from the transcriptome of loquat [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 2014, 139(5): 507–517. doi: 10.21273/jashs.139.5.507.
- [18] FUKUDA S, NISHITANI C, HIEHATA N, et al. Genetic diversity of loquat accessions in Japan as assessed by SSR markers [J]. *J Jpn Soc Hort Sci*, 2013, 82(2): 131–137. doi: 10.2503/jjshs1.82.131.
- [19] GISBERT A D, MARTÍNEZ-CALVO J, LLÁCER G, et al. Development of two loquat [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.] linkage maps based on AFLPs and SSR markers from different Rosaceae species [J]. *Mol Breed*, 2009, 23(3): 523–538. doi: 10.1007/s11032-008-9253-8.
- [20] XIE L X, JIANG J M, ZHANG L J, et al. Construction and analysis of a genetic linkage map for loquat [J]. *Fujian J Agric Sci*, 2014, 29(10): 960–965. doi: 10.19303/j.issn.1008-0384.2014.10.006.
谢丽雪, 蒋际谋, 张立杰, 等. 枇杷遗传连锁图谱的初步构建与分析 [J]. *福建农业学报*, 2014, 29(10): 960–965. doi: 10.19303/j.issn.1008-0384.2014.10.006.
- [21] SUN S X, XIE H J, LI J, et al. Molecular identification of fragments associated with fruit flesh color in loquat [J]. *SW China J Agric Sci*, 2012, 25(6): 2227–2230. doi: 10.16213/j.cnki.scjas.2012.06.069.
孙淑霞, 谢红江, 李靖, 等. 枇杷果肉色泽深浅性状的分子标记鉴定 [J]. *西南农业学报*, 2012, 25(6): 2227–2230. doi: 10.16213/j.cnki.scjas.2012.06.069.
- [22] HE Q. Genetic diversity analysis and cultivar identification of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) based on SSR [D]. Chongqing: Southwest University, 2010: 38–49.
何桥. 基于 SSR 标记的枇杷遗传多样性分析与品种鉴别 [D]. 重庆: 西南大学, 2010: 38–49.
- [23] LONG Z J. Genetic diversity analysis and fingerprint construction of *Eriobotrya* based on SSR and SCoT markers [D]. Chongqing: Southwest University, 2010: 51–55.
龙治坚. 枇杷属植物的遗传多样性分析和指纹图谱初步构建 [D]. 重庆: 西南大学, 2013: 51–55.
- [24] ZHENG S Q, CHEN X P, XU X D. Descriptors and Data Standard for Loquat (*Eriobotrya* spp.) [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2006: 69–77.
郑少泉, 陈秀萍, 许秀淡, 等. 枇杷种质资源描述规范和数据标准 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2006: 69–77.
- [25] CHEN Z, CHEN Z Y, LONG Z J, et al. SSR analysis of genetic diversity of 67 accessions in *Eriobotrya* [J]. *J SW Univ (Nat Sci)*, 2014, 36(8): 12–19. doi: 10.13718/j.cnki.xdzk.2014.08.003.
陈志, 陈志友, 龙治坚, 等. 67 份枇杷属种质资源遗传多样性的 SSR 分析 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2014, 36(8): 12–19. doi: 10.13718/j.cnki.xdzk.2014.08.003.
- [26] ANDERSON J A, CHURCHILL G A, AUTRIQUE J E, et al. Optimizing parental selection for genetic linkage maps [J]. *Genome*, 1993, 36(1): 181–186. doi: 10.1139/g93-024.
- [27] GE Y Y, ZHANG F, SHEN X L, et al. Analysis of genetic diversity and construction of fingerprint of *Vriesea* by ISSR [J]. *Sci Agric Sin*, 2012, 45(4): 726–733. doi: 10.3864/j.issn.0578-1752.2012.04.013.
葛亚英, 张飞, 沈晓岚, 等. 丽穗凤梨 ISSR 遗传多样性分析与指纹图谱构建 [J]. *中国农业科学*, 2012, 45(4): 726–733. doi: 10.3864/j.issn.0578-1752.2012.04.013.
- [28] SILFVERBERG-DILWORTH E, MATASCI C L, van der WEG W E, et al. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus × domestica* Borkh.) genome [J]. *Tree Genet Genomes*, 2006, 2(4): 202–204. doi: 10.1007/s11295-006-0045-1.
- [29] LIEBHARD R, GIANFRANCESCHI L, KOLLER B, et al. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus × domestica* Borkh.) [J]. *Mol Breed*, 2002, 10(4): 217–241. doi: 10.1023/a:1020525906332.
- [30] HAN H W, YANG M S, XU X X. Identification on the main cultivated varieties of *Pyrus* using SSR DNA marker [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2006, 22(12): 383–386. doi: 10.3969/j.issn.1000-6850.2006.12.091.
韩宏伟, 杨敏生, 徐兴兴, 等. 利用 SSR 标记鉴定主要梨栽培品种 [J]. *中国农学通报*, 2006, 22(12): 383–386. doi: 10.3969/j.issn.1000-6850.2006.12.091.
- [31] GISBERT A D, GUILLEM A, MARTÍNEZ-CALVO J, et al. Development of microsatellite markers of loquat (*Eriobotrya japonica*) and its application on genetic diversity studies [J]. *Acta Hort*, 2007, 750: 107–112. doi: 10.17660/actahortic.2007.750.14.
- [32] XIANG S Q, WANG W X, HE B, et al. Development and characterization of new polymorphic microsatellite markers in loquat [J]. *Acta Hort*, 2011, 887: 75–78. doi: 10.17660/actahortic.2011.887.10.
- [33] CHEN Y T, LAI Z X, CHEN J Y, et al. RAPD analysis of genetic relationship among loquat cultivars Zaozhong 6, Jiefangzhong and Moriowase [J]. *J Fujian Agric For Univ (Nat Sci)*, 2004, 33(1): 46–50. doi: 10.3969/j.issn.1671-5470.2004.01.012.
陈义挺, 赖钟雄, 陈菁瑛, 等. 枇杷品种早钟 6 号与解放钟、森尾早生亲缘关系的 RAPD 分析 [J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2004, 33(1): 46–50. doi: 10.3969/j.issn.1671-5470.2004.01.012.

- [34] ZHENG T T, WEI W L, YANG X H, et al. Development of SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of *Eriobotrya japonica* [J]. *Subtrop Plant Sci*, 2015, 44(4): 274–278. doi: 10.3969/j.issn.1009-7791.2015.04.002.
郑婷婷, 魏伟淋, 杨向晖, 等. 基于枇杷转录组序列的 SSR 分子标记引物开发 [J]. *亚热带植物科学*, 2015, 44(4): 274–278. doi: 10.3969/j.issn.1009-7791.2015.04.002.
- [35] ZHENG S Q, XU X D, HUANG J S, et al. Study on heredity of several characters in loquat: I. Genetic tendency of fruit agronomic characters [J]. *J Fujian Acad Agric Sci*, 1993, 8(1): 19–26. doi: 10.19303/j.issn.1008-0384.1993.01.004.
郑少泉, 许秀淡, 黄金松, 等. 枇杷若干性状的遗传研究: I. 果实性状的遗传倾向研究 [J]. *福建省农科院学报*, 1993, 8(1): 19–26. doi: 10.19303/j.issn.1008-0384.1993.01.004.
- [36] FUKUDA S, YOSHIDA T, HIEHATA N, et al. The inheritance and identification of RAPD marker on fruit flesh color in loquat [J]. *Hort Res*, 2009, 8(1): 7–11. doi: 10.2503/hrj.8.7.
- [37] SONG H Y, HE X L, QIAO Y C, et al. Hybridization of ‘Zaozhong No. 6’ and big-fruit Spanish loquat cultivars and fruit evaluation of the hybrids [J]. *J S Chin Agric Univ*, 2015, 36(1): 65–70. doi: 10.7671/j.issn.1001-411X.2015.01.012.
宋红彦, 何小龙, 乔燕春, 等. ‘早钟 6 号’与西班牙大果枇杷品种杂交及其后代果实品质评价 [J]. *华南农业大学学报*, 2015, 36(1): 65–70. doi: 10.7671/j.issn.1001-411X.2015.01.012.
- [38] FU X M, FENG C, WANG C Y, et al. Involvement of multiple phytoene synthase genes in tissue- and cultivar-specific accumulation of carotenoids in loquat [J]. *J Exp Bot*, 2014, 65(16): 4679–4689. doi: 10.1093/jxb/eru257.
- [39] GAO H, LI S B, WANG L X, et al. NY/T 2478–2013 Identification of apple variety: SSR marker method [S]. Beijing: China Agriculture Press, 2014.
高华, 李硕碧, 王立新, 等. NY/T 2478–2013 苹果品种鉴定技术规范 SSR 分子标记法 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2014.
- [40] XU Q, WEI X H, ZHUANG J Y, et al. NY/T 1433–2014 Protocol for identification of rice varieties: SSR marker method [S]. Beijing: China Agriculture Press, 2014.
徐群, 魏兴华, 庄杰云, 等. NY/T 1433–2014 水稻品种鉴定技术规范 SSR 标记法 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2014.
- [41] WANG F G, YI H M, ZHAO J R, et al. NY/T 1432–2014 Protocol for the identification of maize varieties: SSR marker method [S]. Beijing: China Agriculture Press, 2014.
王凤格, 易红梅, 赵久然, 等. NY/T 1432–2014 玉米品种鉴定技术规范 SSR 标记法 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2014.
- [42] LI D M, LIU P, CHEN L J, et al. NY/T 2595–2014 Identification of soybean varieties: SSR marker method [S]. Beijing: China Agriculture Press, 2014.
李冬梅, 刘平, 陈立君, 等. NY/T 2595–2014 大豆品种鉴定技术规范 SSR 分子标记法 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2014.