

吉林省新育成大豆品种 SSR 指纹图谱身份证的构建

陈 亮,郑宇宏,范旭红,孟凡凡,孙星邈,张云峰,王明亮,王曙明

(吉林省农业科学院 大豆研究所/大豆国家工程研究中心,吉林 长春 130033)

摘要:为快速鉴定和准确评价大豆新品种,以吉林省 98 个大豆品种为材料,从大豆 20 个连锁群上均匀分布的 320 对 SSR 标记引物中初筛出 12 对扩增稳定、条带清晰、多态性高的引物,为以最少引物组合有效区分品种,揭示参试材料间丰富的遗传多样性,又进一步依据每对引物多样性指数的高低,复筛出了由 7 个 SSR 标记构成的核心引物组合,并最终以此构建吉林省近年育成大豆品种的 SSR 指纹图谱身份证。结果表明:98 个参试大豆品种都有唯一的指纹图谱身份证代码,说明所选用的 7 个 SSR 核心标记可靠且有效;此外,以 SSR 标记扩增的整体带型作为编码依据能够有效提高大豆品种指纹图谱身份证构建的准确性。本研究完善了大豆品种指纹图谱身份证技术体系,能够满足当前吉林省乃至全国大豆品种分子鉴定的需求。

关键词:大豆;SSR;指纹图谱身份证
中图分类号:S565. 1 **文献标识码:**A **DOI:**10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2016. 06. 0896

Establishment of SSR Fingerprint ID for New Soybean Varieties in Jilin

CHEN Liang , ZHENG Yu - hong , FAN Xu - hong , MENG Fan - fan , SUN Xing - miao , ZHANG Yun - feng , WANG Ming-liang , WANG Shu-ming

(Soybean Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences/National Engineering Research Center for Soybean, Changchun 130033, China)

Abstract: Currently a novel method should be developed for the rapid identification and accurate evaluation of new soybean varieties. In this paper, a total of 98 released soybean varieties in Jilin were studied with SSR markers. Twelve SSR markers that had clear, stable and reproducible electrophoretic maps were selected from 320 randomly selected SSR markers located on each chromosome of soybean. In order to distinguish effectively soybean varieties with minimal primer pairs and reveal rich genetic diversities between the test materials, 7 core SSR markers were selected from aforementioned 12 SSR markers according to diversity index. At last, the bands amplified by each of the 7 core SSR markers were coded, and then the codes were combined as a fingerprint ID for soybean varieties. The results showed that each tested soybean variety had unique SSR fingerprint ID, and 7 core SSR markers were reliable and efficient. In addition, using the whole band-types amplified by each of the 7 core SSR markers coded as fingerprint ID for soybean varieties can reduce complexity effectively in recording polymorphic amplification profiles. This paper not only improve the establishment method of SSR fingerprint ID for new soybean varieties, but also meet the requirements of molecular identification for new soybean varieties in Jilin province and even the whole country.

Keywords: Soybean; SSR; Fingerprint ID

传统的作物品种鉴定方法以种子、幼苗和植株形态特征、农艺性状差异等为依据,虽然简单、经济,但所需周期较长,且表型特征易受环境影响,鉴别错误时有发生,无法满足当今品种鉴定的需要^[1-2]。随着分子生物学技术的发展,借助 DNA 标记指纹身份证技术直接检测品种间基因型的差异,已成为准确、高效的品种鉴定技术^[3-5]。与 RFLP、RAPD、AFLP、SNP 等标记相比,SSR 标记具有稳定、重复性高、操作简便、成本较低等优点^[6-8],目前已被广泛应用于大豆^[9-12]、水稻^[13-15]、油菜^[16]、桃^[17]等农作物品种指纹图谱身份证的构建,为在分子水平上鉴定品种提供了科学依据。迄今国内已报道的大豆品种 SSR 指纹图谱身份证研究结果都能够

准确反映参试大豆品种(系)间的基因型差异。然而,在统计 SSR 标记扩增片段时,这些报道都是依据扩增片段的大小,对应分子量从大到小,依次记录为 1,2,3,⋯,n,然后规定第 N 个标记引物的扩增结果对应分子身份证的第 N 位。虽然这种编码方式可以保证指纹图谱身份证每位都只对应 1 位数,且书写简洁,但仍存在不足之处,即当 SSR 扩增条带较多、分布复杂时,该记录方法容易出现读带误差、统计困难等问题。针对这一问题,有研究者在小麦^[18]、油菜^[16]等作物上提出了根据每对 SSR 扩增带型的差异,直接对带型进行整体编号,该方法可以避免人工统计所引起的误差。本研究参照此方法,将 SSR 标记扩增的整体带型作为指纹图谱身

收稿日期:2016-07-18
基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-04-PS11);吉林省农业科技创新工程(C62150403);吉林省科技发展计划(20140309010NY,20150520121JH);吉林省人社厅博士后人才项目(2013-2015);中国农业科技东北创新中心博士后进站项目(2013-2015)。
第一作者简介:陈亮(1981-),男,博士,助理研究员,主要从事大豆遗传育种与种子繁育研究。E-mail:liangchen119@126.com。
通讯作者:王曙明(1963-),男,博士,研究员,主要从事大豆遗传育种与种子繁育研究。E-mail:shumingw@263.net。

份证的编码依据,以吉林省 2005 - 2012 年审定的 98 个大豆品种为材料,借助筛选的核心 SSR 标记引物组合构建参试材料的指纹图谱,最终达到有效简化 SSR 带型记录、以最少引物组合有效区分大豆品种的目的,以满足当前大豆种子生产、销售等环节对新品种进行快速、准确分子鉴定的需求。

1 材料与方法

1.1 材料

选取吉林省 2005 - 2012 年审定的 98 个大豆品种为参试材料(表 3),以上材料均由吉林省农业科学院大豆研究所收集并保存。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 利用改进的 CTAB 法^[19],从 0.1 g 大豆幼嫩叶片中提取基因组 DNA,并稀释到 10 ~ 15 ng·μL⁻¹,置于 - 20℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 SSR 标记引物的合成与筛选 根据 SoyBase 网站提供的 SSR 标记引物序列,由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。选取均匀分布在大豆 20 个连锁群上的 320 对 SSR 标记引物,先以 20 个大豆品种为材料,进行 SSR 标记引物的初步筛选,获得 12 对扩增稳定、条带清晰、多态性高的引物,再对所有的 98 个大豆品种进行 SSR 指纹图谱的构建。

1.2.3 PCR 扩增与电泳检测 PCR 扩增反应体系总的体积为 20 μL,其中含有 10 ~ 15 ng 基因组 DNA,0.25 μmol·L⁻¹ 上下游引物,200 μmol·L⁻¹

dNTPs,0.5 U *Taq* 酶(TaKaRa),1 × PCR 缓冲液(10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.3; 50 mmol·L⁻¹ KCl; 1.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂)。PCR 扩增反应程序为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,循环 30 次;72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增反应结束后,在扩增产物中加入 3 μL 上样缓冲液(36% 甘油;30 mmol·L⁻¹ EDTA;0.05% 溴酚蓝;0.035% 二甲苯青),取 2.5 μL 在 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中恒压电泳分离,硝酸银染色显影检测。

1.2.4 SSR 带型的记录与数据统计分析 根据非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果,采用人工读带的方式,记录每对 SSR 标记引物在参试大豆品种上扩增出来的整体带型,并作为一个等位变异,然后将每对 SSR 标记引物在参试材料上扩增出来的全部带型按从简到繁的次序排列,顺次记录为 1,2,3, ..., n,最后的结果是每一种 SSR 带型都被 1 个数字所赋值。利用 POPGENE 1.31 统计软件计算每对 SSR 标记引物的等位变异数和多样性指数;利用 CANOCO 4.5 统计软件进行主坐标分析。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记引物的筛选

随机选取 20 个大豆品种,对均匀分布在大豆 20 个连锁群上的 320 对 SSR 标记引物进行初步筛选,得到 12 对扩增稳定、条带清晰、多态性高的 SSR 标记引物(图 1),这 12 对 SSR 标记引物分别为 Satt697、Satt235、Satt422、Sat128、Satt160、Satt367、Sat155、Satt448、Sat245、Satt494、Sat288、Sat351。

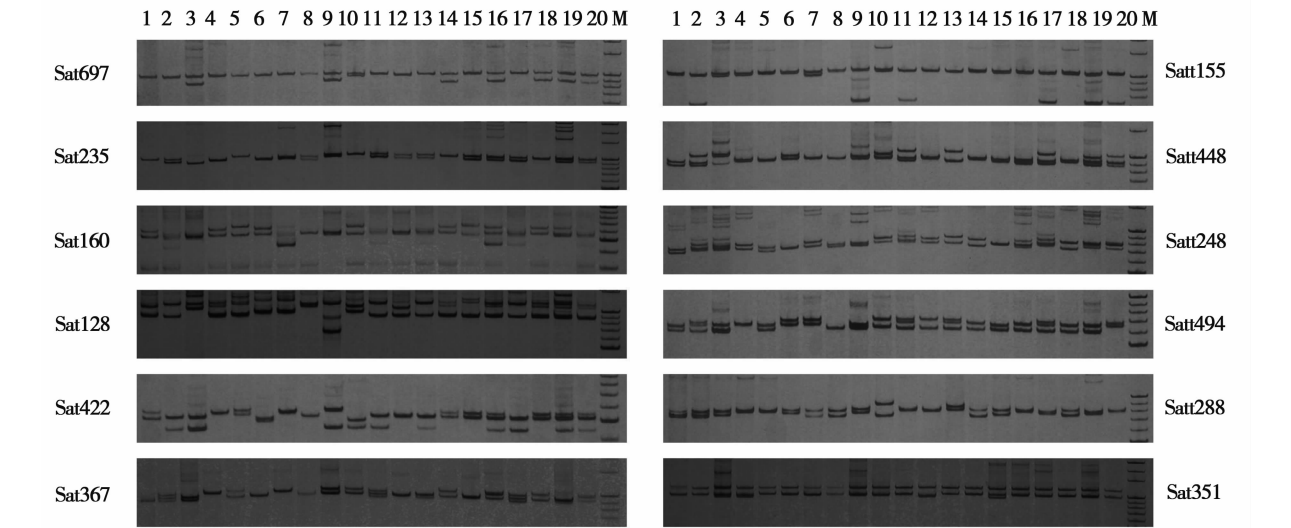


图 1 12 对初筛 SSR 标记引物在 20 个大豆品种中的等位变异特征

Fig. 1 The allelic variation amplified with 12 pairs of SSR marker primers in 20 soybean varieties

利用这 12 对 SSR 标记引物对全部参试材料进行检测,每对 SSR 标记引物检测到的平均等位变异数目为 3.75,变化幅度为 3 ~ 5;SSR 标记引物的平均多样性指数为 0.41,变化幅度为 0.13 ~ 0.63;SSR

标记引物的平均个体识别能力为 0.61,变化幅度为 0.26 ~ 0.78。以上参数说明这些标记可以揭示参试材料间丰富的遗传多样性。此外,主坐标分析(PCoA)结果表明,初筛获得的 12 对 SSR 标记引物

能够将参试材料完全区分开。由图 2 可见,在横、纵两个坐标轴上,98 个参试大豆品种被明确划分为 Cluster I、II、III、IV 4 类。

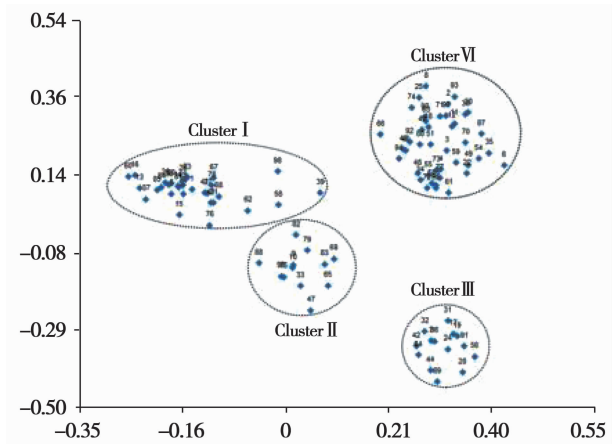


图 2 基于 12 对 SSR 标记引物的 98 个参试大豆品种的主坐标分析图

Fig. 2 Principal coordinates analysis of 98 soybean varieties based on 12 pairs of SSR marker primers

2.2 SSR 指纹图谱身份证构建所需核心引物的确定

为了达到用最少的 SSR 标记引物区分最多品种的目的,以 12 对 SSR 标记引物多样性指数的高低为选择依据(表 1),首先从多样性指数最高的引物 Satt422 开始筛选参试品种,但无任何参试品种能够被区分开;再加入多样性指数第二高的引物 Sat351,结果发现能够区分开 10 个品种;再加入多样性指数第三高的引物 Satt160,结果有 49 个品种能够被区分开;再加入多样性指数第四高的引物 Sat128,结果发现能够区分开 72 个品种;再加入多样性指数第五高的引物 Sat155,结果发现能够区分

开 84 个品种;再加入多样性指数第六高的引物 Satt697,结果发现能够区分开 94 个品种;最后加入多样性指数第七高的引物 Sat245,结果发现全部 98 个参试品种都能够被区分开(表 2)。

此外,鉴于 Satt422、Sat351、Satt160、Sat128、Sat155、Satt697、Sat245 这 7 对 SSR 标记引物的等位变异数分别为 3,3,4,5,3,3 和 5,按引物组合能够区分最大品种数 $N = G_1 \times G_2 \times G_3 \times \cdots \times G_n$ (G_1 、 G_2 、 $G_3 \cdots G_n$ 为每对引物的等位变异数)的理论值进行计算^[20-21],7 对 SSR 标记引物能够区分品种数目的理论值是 8 100 个。以上结果表明这 7 对 SSR 标记引物能够作为核心引物用于大豆品种 SSR 指纹图谱身份证的构建。

表 1 12 对 SSR 标记引物的等位变异数和多样性指数
Table1 Number of allelic variation and diversity index of 12 pairs of SSR marker primers

SSR 标记引物 SSR marker primer	等位变异数 Number of allelic variation	多样性指数 Diversity index
Satt422	3	0. 63
Sat351	3	0. 57
Satt160	4	0. 56
Sat128	5	0. 54
Sat155	3	0. 48
Satt697	3	0. 44
Sat245	5	0. 41
Satt235	4	0. 36
Satt367	4	0. 32
Satt448	5	0. 29
Satt494	3	0. 26
Sat288	3	0. 13

表 2 逐个增加 SSR 标记引物组合对大豆品种的区分

引物组合 Primer pairs	区分开的材料小计 Subtotal of distinguished materials	区分开的材料累计 Total of distinguished materials
Satt422	0	0
Satt422 + Sat351	10	10
Satt422 + Sat351 + Satt160	39	49
Satt422 + Sat351 + Satt160 + Sat128	23	72
Satt422 + Sat351 + Satt160 + Sat128 + Sat155	12	84
Satt422 + Sat351 + Satt160 + Sat128 + Sat155 + Satt697	10	94
Satt422 + Sat351 + Satt160 + Sat128 + Sat155 + Satt697 + Sat245	4	98

2.3 参试大豆品种 SSR 指纹图谱身份证的构建

记录 7 个核心 SSR 标记在 98 个参试大豆品种中 PCR 扩增后获得的整体带型(每一种带型代表 1 个等位变异),并对这些带型(等位变异)进行数字编码。以 Satt422 标记为例,其具有 3 个等位变异(表 1),即 PCR 扩增后其在参试大豆品种中具有 3

种带型,这 3 种带型按从简单到复杂次序排列,依次被编码为 1、2、3。以同样方式,对其它核心 SSR 标记扩增后的整体带型进行数字编码。对于参试的每一个品种,7 个核心 SSR 标记将赋予该品种 7 个带型编码,再按照固定的 SSR 标记顺序串联这 7 个带型编码(依次为 Satt422、Sat351、Satt160、Sat128、

Sat155、Satt697、Sat245),即可形成 1 组由 7 个数字排列成的数据,也就是各品种指纹图谱身份证代码。以表 3 中的吉育 202 为例,其指纹图谱身份证代码为 3213311,其表示第 1 个 SSR 核心标记(Satt422)的扩增带型为 3 号带型,第 2 个 SSR 核心标记(Sat351)的扩增带型为 2 号带型,第 3 个 SSR 核心标记(Satt160)的扩增带型为 1 号带型,第 4 个

SSR 核心标记(Sat128)的扩增带型为 3 号带型,第 5 个 SSR 核心标记(Sat155)的扩增带型为 3 号带型,第 6 个 SSR 核心标记(Satt697)的扩增带型为 1 号带型,第 7 个 SSR 核心标记(Sat245)的扩增带型为 1 号带型。由表 3 可见,98 个参试大豆品种都有 1 个与之对应的唯一的指纹图谱身份证代码,这说明所选用的 7 个 SSR 核心标记是可靠且有效的。

表 3 98 个参试大豆品种的 SSR 指纹图谱身份证代码
Table 3 The SSR fingerprint ID of 98 soybean varieties

品种名称 Variety name	ID	品种名称 Variety name	ID	品种名称 Variety name	ID	品种名称 Variety name	ID	品种名称 Variety name	ID
吉育 202 Jiyu202	3213311	吉科豆 2 号 Jikedou 2	1341331	吉青 3 号 Jiqing 3	1213131	吉育 83 Jiyu 83	1331231	吉育 85 Jiyu 85	1144315
吉育 79 Jiyu 79	1133111	吉育 104 Jiyu 104	2334322	吉育 89 Jiyu 89	3311225	吉黑 2 号 Jihe1 2	1122234	吉育 74 Jiyu 74	3221213
吉育 94 Jiyu 94	3222334	吉育 301 Jiyu 301	1323335	吉育 76 Jiyu 76	2111211	吉育 84 Jiyu 84	1113211	吉青 2 号 Jiqing 2	2132333
吉科豆 9 号 Jikedou 9	3112131	吉育 405 Jiyu 405	1132111	吉育 81 Jiyu 81	1131112	吉育 105 Jiyu 105	3233311	吉育 99 Jiyu 99	2225223
吉育 203 Jiyu 203	3313132	吉育 93 Jiyu 93	3232312	吉育 302 Jiyu 302	3141235	吉育 35 Jiyu 35	3343211	吉育 505 Jiyu 505	1232131
吉育 52 Jiyu 52	3334233	吉育 503 Jiyu 503	2331211	吉育 70 Jiyu 70	1212111	吉育 501 Jiyu 501	2332111	吉育 49 Jiyu 49	1233114
吉育 69 Jiyu 69	3142311	吉育 68 Jiyu 68	2123332	吉育 502 Jiyu 502	1233311	吉育 32 Jiyu 32	1314332	吉育 64 Jiyu 64	2223332
吉育 57 Jiyu 57	2321133	吉育 67 Jiyu 67	3222112	吉育 404 Jiyu 404	2235131	吉育 92 Jiyu 92	3234213	吉科豆 7 号 Jikedou 7	3211234
吉育 90 Jiyu 90	3212334	吉密豆 2 号 Jimidou 2	3311214	吉育 504 Jiyu 504	1313333	吉育 88 Jiyu 88	2122222	吉育 86 Jiyu 86	1241331
吉农 18 Jinong 18	1331213	吉黑 4 号 Jihe1 4	1233321	吉育 403 Jiyu 403	1213213	吉科豆 5 号 Jikedou 5	2133324	吉育 100 Jiyu 100	3212111
吉育 82 Jiyu 82	2233135	吉育 38 Jiyu 38	1342311	吉育 73 Jiyu 73	2225212	吉育 50 Jiyu 50	2241122	吉育 103 Jiyu 103	1233332
吉育 55 Jiyu 55	3113122	吉黑 3 号 Jihe1 3	3122322	吉育 87 Jiyu 87	1121112	吉育 56 Jiyu 56	1211134	吉育 59 Jiyu 59	3315232
吉育 71 Jiyu 71	3313113	吉育 72 Jiyu 72	3224132	吉育 46 Jiyu 46	2135133	吉育 61 Jiyu 61	2143323	吉育 54 Jiyu 54	1122221
吉育 60 Jiyu 60	2312115	吉育 201 Jiyu 201	3334232	吉林小粒 6 号 Jilinxiaoli 6	3341133	吉林小粒 8 号 Jilinxiaoli 8	3334211	吉育 36 Jiyu 36	1111311
吉育 66 Jiyu 66	3211311	吉科豆 1 号 Jikedou 1	1223115	吉育 58 Jiyu 58	1312224	吉育 75 Jiyu 75	3213132	吉育 95 Jiyu 95	3312331
吉育 63 Jiyu 63	1325322	吉科豆 8 号 Jikedou 8	3134132	吉育 401 Jiyu 401	3321121	吉育 43 Jiyu 43	3332125	吉育 91 Jiyu 91	1313124
吉育 80 Jiyu 80	2114123	吉育 62 Jiyu 62	2311111	吉科豆 3 号 Jikedou 3	3331323	吉林小粒 7 号 Jilinxiaoli 7	3235122	吉科豆 6 号 Jikedou 6	3311112
吉育 96 Jiyu 96	1242211	吉育 34 Jiyu 34	2313134	吉育 39 Jiyu 39	1132124	吉育 45 Jiyu 45	1342121	吉育 77 Jiyu 77	3341221
吉育 406 Jiyu 406	1133123	吉育 47 Jiyu 47	1213331	吉育 101 Jiyu 101	1221312	吉育 65 Jiyu 65	2321321		
吉育 402 Jiyu 402	3313331	吉育 97 Jiyu 97	3131313	吉黑 1 号 Jihe1 1	1131221	吉育 102 Jiyu 102	3332211		

3 讨论

3.1 核心引物的确定

迄今报道的大豆品种 SSR 指纹图谱身份证研究结果都已证实,利用 SSR 指纹图谱身份证区分鉴定品种是有效、可行的。高运来等^[9]以黑龙江省来自 6 个积温带的 83 份大豆品种为材料,利用 9 对 SSR 标记引物将参试大豆品种完全区分开,并构建了参试大豆品种的 9 位分子 ID;丁俊杰等^[10]以黑龙江省 103 份抗大豆灰斑病的大豆品种(系)为材料,利用与抗灰斑病基因连锁的 7 个 SSR 标记有效区分了各品种(系),并构建了供试品种(系)的 7 位分子身份证;何琳等^[11-12]利用 10 对 SSR 标记引物将 2012 年黑龙江垦区区域试验的 121 份大豆品系区分开,又利用 6 对 SSR 标记引物将长江流域国家区域试验的 45 份大豆品种区分开,并分别获得了 6 和 10 位的分子 ID。然而,如何在确保数字代码唯一性的前提下,尽量使用较少的引物组合来构建品种 SSR 指纹图谱身份证的探讨较少。

本研究最初从均匀分布于大豆 20 个连锁群上的 320 对 SSR 标记引物中,筛选出 12 对扩增稳定、条带清晰、多态性高的引物,若用初筛获得的 12 对 SSR 标记引物构建参试大豆品种的 SSR 指纹图谱身份证,则 SSR 指纹图谱身份证会有 12 位,在以后的应用过程中势必会大大增加工作量,不利于后续的比对鉴定和推广应用。为了筛选并确定核心引物,按照引物的多样性指数高低依次组合,确定了可以完全区分参试材料的 7 对 SSR 标记引物,且 98 个参试大豆品种都有一组唯一的指纹图谱身份证代码,既遵循了指纹图谱身份证构建的唯一性原则,又遵循了简约性原则。本研究同时也参考了甘蓝型油菜种质分子身份证构建的研究方法,尝试以引物的多态性信息含量为参数进行核心引物的筛选,但效果并不是很理想(数据未列出),猜测可能是由于甘蓝型油菜是异源双二倍体,其基因组中 SSR 标记分布、拷贝数等特性与大豆有所不同而导致。

3.2 SSR 等位变异的记录

已报道的大豆品种 SSR 指纹图谱身份证的构建方法,在记录 SSR 等位变异时,大多根据聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果,在相同迁移率的位置上,有清晰的条带记录为“1”,无条带或不易分辨的弱带计为“0”,每条带相当于 1 个等位变异,最后建立原始数据的 0-1 矩阵^[22-24]。然而,当聚丙烯酰胺凝胶上 DNA 样品数量较多、PCR 扩增后标记条带较复杂

时,以上等位变异记录方式特别容易出现误差,这将直接影响后续的数据统计分析结果。针对这一问题,本研究参考其它作物 SSR 等位变异的记录方法,首先比较 SSR 标记引物扩增获得的带型间差异,然后对每对 SSR 标记引物在参试大豆品种上扩增出来的整体带型进行记录,使每一种 SSR 带型都被 1 个数字所赋值,不但避免了通过记录相同位置有或无条带可能引起的误差,而且能够有效简化 SSR 等位变异的记录方式。

3.3 SSR 指纹图谱身份证的应用与发展

SSR 指纹图谱身份证是一种随着 DNA 分子标记技术的发展而建立起来的种质鉴定方法,其在 SSR 指纹图谱的基础上将品种的基因型特征数字化,即每个品种都有一组唯一的数字代码,能够更加简单明了地区分鉴定品种^[25]。SSR 标记所具有的稳定、简便、成本低等优点使得 SSR 指纹图谱身份证被广泛应用于大豆、水稻、油菜等农作物品种指纹图谱身份证的构建,这为在分子水平上快速鉴定和准确评价新品种提供了科学依据。随着 SSR 标记技术及其检测技术的发展,在今后的 SSR 指纹图谱身份证应用工作中,可考虑将指纹图谱身份证号码标注于大豆种子的外包装,一方面实现种子的全程可追溯管理,另一方面可有效判定一品多名、多品一名的问题,保障农业生产用种安全。此外,鉴于品种具有商品属性,指纹图谱身份证数据是较为片面的,其无法完全涵盖一个品种的所有特征特性,因此在今后的品种管理工作中,应注意指纹图谱身份证(基因型)鉴定与田间性状(表现型)鉴定的紧密结合,发展更完善的品种特异身份证技术体系,为种质资源、品种权的保护与管理提供有力的技术支撑。

4 结论

以吉林省近年育成大豆品种为试材,根据多样性指数高低筛选出 7 对核心引物,以 SSR 标记扩增的整体带型的等位变异作为编码依据,构建的 98 个品种的 SSR 指纹图谱身份证都有唯一的代码。该方法可快速、准确鉴定大豆品种,完善了大豆品种指纹图谱身份证技术体系。

参考文献

- [1] Donini P, Cooke R J, Reeves J C. Molecular markers in variety and seed testing[M]//Arenceibia A D. Plant genetic engineering: Towards the third millennium. Amsterdam. Netherlands: Elsevier Science Beshoten Vennootschap, 2000: 27-34.

[2] 关荣霞, 刘燕, 刘章雄, 等. 利用 SSR 方法鉴定大豆品种纯度[J]. 分子植物育种, 2003, 1(3): 357-360. (Guan R X, Liu Y, Liu Z X, et al. Purity identification of soybean varieties with SSR technique[J]. Molecular Plant Breeding, 2003, 1(3): 357-360.)

[3] Grover A, Sharma P C. Development and use of molecular markers; Past and present [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2016, 36(2): 290-302.

[4] Shivakumar M, Gireesh C, Ramesh S V. DNA finger printing - a tool for identification of cultivars [J]. Popular Kheti, 2014, 2(2): 160-162.

[5] Song J Y, Piao X M, Choi Y M, et al. Evaluation of genetic diversity and comparison of biochemical traits of soybean (*Glycine max* L.) germplasm collections [J]. Plant Breeding Biotechnology, 2013, 1(4): 374-384.

[6] Varshney R K, Graner A, Sorrells M E. Genic microsatellite markers in plants: Features and applications [J]. Trends in Biotechnology, 2005, 23(1): 48-55.

[7] Tavaud-Pirra M, Sartre P, Nelson R, et al. Genetic diversity in a soybean collection [J]. Crop Science, 2009, 49(3): 895-902.

[8] Salimi S, Abdola A R. Evaluation of genetic diversity in soybean genotypes (*Glycine max*) based on SDS-PAGE [J]. International Journal of Plant Production, 2013, 4(2): 287-291.

[9] 高运来, 朱荣胜, 刘春燕, 等. 黑龙江部分大豆品种分子 ID 的构建 [J]. 作物学报, 2009, 35(2): 211-218. (Gao Y L, Zhu R S, Liu C Y, et al. Establishment of molecular ID in soybean varieties in Heilongjiang, China [J]. Acta Agronomica Sinica, 2009, 35(2): 211-218.)

[10] 丁俊杰, 姜翠兰, 顾鑫, 等. 利用与大豆灰斑病抗性基因连锁的 SSR 标记构建大豆品种(系)的分子身份证 [J]. 作物学报, 2012, 38(12): 2206-2216. (Ding J J, Jiang C L, Gu X, et al. Establishment of molecular ID of soybean varieties (lines) using SSR markers linked to resistance genes against *Cercospora sojina* [J]. Acta Agronomica Sinica, 2012, 38(12): 2206-2216.)

[11] 何琳, 刘业丽, 裴宇峰, 等. 2012 年黑龙江垦区大豆参试品系纯度鉴定、分子 ID 构建及遗传多样性分析 [J]. 大豆科学, 2013, 32(5): 591-595. (He L, Liu Y L, Xue Y F, et al. Purity identification, molecular ID establishment and genetic diversity analysis of soybeans attending Heilongjiang reclamation regional test in 2012 [J]. Soybean Science, 2013, 32(5): 591-595.)

[12] 何琳, 何艳琴, 刘业丽, 等. 长江流域片国家区试大豆品种分子 ID 构建及遗传多样性分析 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2014, 26(3): 5-9. (He L, He Y Q, Liu Y L, et al. Molecular ID establishment and genetic diversity analysis of soybeans attending national regional test of Yangtze River Basin [J]. Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2014, 26(3): 5-9.)

[13] 辜大川, 邱东峰, 殷明珠, 等. 水稻优异资源分子身份证的建立 [J]. 湖北农业科学, 2012, 51(24): 5579-5583. (Gu D C, Qiu D F, Yin M Z, et al. Establishment of molecular identity card of elite rice resources [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2012, 51(24): 5579-5583.)

[14] 陆徐忠, 从夕汉, 刘海珍, 等. 杂交水稻亲本分子身份证及 SSR 指纹数据库的建立 [J]. 核农学报, 2012, 26(6): 853-861. (Lu X Z, Cong X H, Liu H Z, et al. Establishment of DNA fingerprinting database for parental lines of hybrid rice [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2012, 26(6): 853-861.)

[15] 陆徐忠, 倪金龙, 李莉, 等. 利用 SSR 分子指纹和商品信息构建水稻品种身份证 [J]. 作物学报, 2014, 40(5): 823-829. (Lu X Z, Ni J L, Li L, et al. Construction of rice variety identity using SSR fingerprint and commodity information [J]. Acta Agronomica Sinica, 2014, 40(5): 823-829.)

[16] 马琳, 刘海珍, 陆徐忠, 等. 130 份甘蓝型油菜种质分子身份证的构建 [J]. 中国油料作物学报, 2013, 35(3): 231-239. (Ma L, Liu H Z, Lu X Z, et al. Molecular identity of 130 *Brassica napus* varieties [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2013, 35(3): 231-239.)

[17] 陈昌文, 曹珂, 王力荣, 等. 中国桃主要品种资源及其野生近缘种的分子身份证构建 [J]. 中国农业科学, 2011, 44(10): 2081-2093. (Chen C W, Cao K, Wang L R, et al. Molecular ID establishment of main China peach varieties and peach related species [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(10): 2081-2093.)

[18] 王立新, 赵昌平, 邱军, 等. 记录小麦 SSR 带型的快捷方法 [J]. 麦类作物学报, 2006, 26(4): 164-168. (Wang L X, Zhao C P, Qiu J, et al. A new scoring method of SSR patterns for wheat [J]. Journal of Triticeae Crops, 2006, 26(4): 164-168.)

[19] Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. Focus, 1990, 12: 13-15.

[20] 赵久然, 王风格, 郭景伦, 等. 中国玉米新品种 DNA 指纹库建立系列研究 II 适于玉米自交系和杂交种指纹图谱绘制的 SSR 核心引物的确定 [J]. 玉米科学, 2003, 11(2): 3-5. (Zhao J R, Wang F G, Guo J L, et al. Series of research on establishing DNA fingerprinting pool of Chinese new maize cultivars II. Confirmation of a set of SSR core primer pairs [J]. Journal of Maize Sciences, 2003, 11(2): 3-5.)

[21] 刘峰, 冯雪梅, 钟文, 等. 适合棉花品种鉴定的 SSR 核心引物的筛选 [J]. 分子植物育种, 2009, 7(6): 1160-1168. (Liu F, Feng X M, Zhong W, et al. Screening of SSR core primer pairs for identifying cotton cultivar [J]. Molecular Plant Breeding, 2009, 7(6): 1160-1168.)

[22] Rodrigues D H, de Alcântara Neto F, Schuster I. Identification of essentially derived soybean cultivars using microsatellite markers [J]. Crop Breeding and Applied Biotechnology, 2008, 8(1): 74-78.

[23] Mulato B M, Möller M, Zucchi M I, et al. Genetic diversity in soybean germplasm identified by SSR and EST-SSR markers [J]. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 2010, 45(3): 276-283.

[24] Ristova D, Šarčević H, Šimon S, et al. Genetic diversity in south-east European soybean germplasm revealed by SSR markers [J]. Agriculturae Conspectus Scientificus, 2010, 75(1): 21-26.

[25] 杜晶晶, 刘国银, 魏军亚, 等. 基于 SSR 标记构建葡萄种质资源分子身份证 [J]. 植物研究, 2013, 33(2): 232-237. (Du J J, Liu G Y, Wei J Y, et al. Establishment of molecular ID for grape germplasm based on SSR markers [J]. Bulletin of Botanical Research, 2013, 33(2): 232-237.)