

变性高效液相色谱技术在大豆品种鉴定中的应用

彭 梓, 谭建锡, 周慧平, 袁小雅, 朱金国, 王利兵

(湖南出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 湖南 长沙 410004)

摘 要:单核苷酸多态性(SNPs)和插入-删除标记(InDel)在基因组中广泛分布, 日益成为主要作物的重要遗传标记。利用变性高效液相色谱(DHPLC)技术检测大豆品种的 SNP 和 InDel 的多态性, 可为大豆种质的品种鉴定提供一种新型的快速检测方法。基于公共数据库中的大豆基因信息, 筛选了 3 条 DNA 序列作为目标分析片段, 以大豆种质粤夏 119 作为参比基因型, 利用 DHPLC 技术平台对 10 份大豆品种进行了鉴定。结果表明: 混合参比 DNA 后的大豆样本产生 DHPLC 谱图均具有多态性, 谱型与测序基因型一一对应。综合 3 条目标片段的 DHPLC 特征谱图可以区分所有大豆品种。试验结果验证了 DHPLC 应用于大豆品种鉴定的可行性和可靠性。由于 DHPLC 分辨率高、快速、操作简单、安全等优点, 在大豆的品种鉴定中具有良好的应用前景。

关键词: SNP; InDel; 大豆; 鉴定; 变性高效液相色谱技术

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2015.05.0881

Application of Denaturing High-Performance Liquid Chromatography for Soybean Variety Identification

PENG Zi, TAN Jian-xi, ZHOU Hui-ping, YUAN Xiao-ya, ZHU Jin-guo, WANG Li-bing

(Hunan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changsha 410004, China)

Abstract: Single nucleotide polymorphisms (SNP) and insertions/deletions (InDel) can be found within every genomic sequence, which have been used as genetic markers for staple crops. Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) could be used to test the SNP and InDel, which would be applied for the rapid identification of diverse soybean varieties. In order to test the feasibility and reliability of DHPLC for discriminating between the diverse soybeans, the DHPLC analysis on 10 soybean varieties were conducted. In this study, based on the information in soybean genome database, three DNA fragments were screened. The reference homozygous DNA from Yuexia 119 was added to PCR product of each soybean variety for the DHPLC analysis. The results showed the 3 screened DNA fragments were polymorphic across mixed samples of soybean variety and Yuexia 119 with distinct DHPLC elution profiles produced. Sequence analysis confirmed that the distinct DHPLC patterns corresponded to different DNA sequences. The set of distinct characteristic profiles in 3 DNA fragments differentiated in all the soybean varieties. The study demonstrates the power and usefulness of this technique for identifying soybean varieties. Due to the advantages of high resolution, high through-put, simplicity and safety, DHPLC is a promising technology for identification of soybean.

Keywords: SNP; InDel; Soybean; Identification; Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC)

中国是大豆的原产地, 有着丰富的大豆资源。随着目前育成大豆品种数目的增多, 品种遗传背景越趋相似。对大豆品种实行准确鉴定, 对大豆种子质量标准化、保护品种知识产权和育种家的权益具有重要作用。传统大豆品种鉴定一般采用形态标记方法, 但由于育成品种种质间亲缘关系越来越近, 品种间性状差异变小, 给鉴定工作带来一定难度。

近年来, DNA 分子标记技术由于可直接反映 DNA 分子水平上的差异已被广泛用于品种鉴

定^[1-2]。目前应用于大豆种质资源研究的分子标记技术主要有 RAPD^[3-4]、RFLP^[5]、ISSR^[6]和 SSR^[7-8]。在各类分子标记中, 单核苷酸突变(SNP)和一段核苷酸的插入或缺失(InDel)是在基因组内分布最广泛而稳定的序列变异类型, 也是目前最具发展潜力的遗传分子标记, 在品种鉴定、遗传作图、遗传多样性评估、分子标记辅助育种等方面得到了广泛应用^[9-13]。近年来启动的大豆基因组测序、SNP 挖掘及标记开发研究, 积累了不少大豆基因组的 SNP 和 InDel 信息, 且 SNP 在大豆基因组中分布频率高达

收稿日期: 2015-02-26
基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划(2012BAC01B07)。
第一作者简介: 彭梓(1981-), 女, 博士, 高级工程师, 主要从事植物资源工程研究。E-mail: pz_penny81@aliyun.com。
通讯作者: 王利兵(1967-), 男, 研究员, 博导, 主要从事植物资源工程研究。E-mail: Wanglb19@126.com。

0.003 7(1SNP/273 bp)^[14-16],这为进一步研究开发大豆的 SNP 等分子标记提供了便利。

检测 SNP 的方法有很多,包括:测序、SSCP、芯片等。测序法步骤繁琐;SSCP 分辨率低、耗时、重复性较差;芯片 SNP 检测位点虽多,但技术费用较高。而变性高效液相色谱(DHPLC)法检测不仅能同时检测 SNP 和 InDel,且通量高、操作简便,产生的 DHPLC 图谱与序列的多态性直接相关^[17-19]。用 DHPLC 技术进行 SNPs 检测时,由于不同类型纯合子的滞留时间几乎相同,很难区分。因此,需要在纯合样本中混合参比 DNA,在部分变性的条件下,将发生错配的异源杂合双链 DNA 与完全匹配的同源双链 DNA 分离,通过分离片段出峰时间的差异,判断检测结果。目前 DHPLC 技术在疾病相关基因的 SNP 突变检测^[19-21]以及物种的 SNP 遗传作图^[22-23]研究方面都获得了较好的应用,但鲜有在种质鉴定方面的应用报道。

本研究旨在探索一种简便、灵敏度高且快速准确的大豆品种鉴定方法。在查询基因组数据库以及研究并公开的 SNP 数据信息的基础上,通过利用 DHPLC 检测平台,最终建立一种新型、简便的大豆种质品种鉴定技术。

1 材料与方法

1.1 材料

选用 10 份大豆种质,包括 5 份选育品种[楚龙 0-52 (CL0-52)、楚龙 0-56 (CL0-56)、粤夏 110 (452)、粤夏 119 (461)、粤夏 124 (466)],5 份地方品种[菜皮豆 (275)、丹、田豆 (256)、白大豆 (353)、益阳 2 号 (益 2)]。所有材料均由湖南省农业科学院作物研究所大豆研究室提供。

1.2 基因组 DNA 提取

采集参试大豆品种的幼叶,于研钵中用液氮速冻,迅速研磨成粉末。取 100 mg 采用 CTAB 法提取基因组 DNA^[24]。

1.3 目标分析片段筛选

为了筛选大豆基因组中具有高多态性并适合于 DHPLC 分析的 DNA 片段, DNA 序列的查找和筛选方法为:(1)基于 Song 等^[16]在大豆 SNP 多态性研究中发现并公布 1 号染色体的 SNP 信息,获取最小等位基因频率(MAF) > 0.2 的 SNP 位点,并根据大豆基因组数据库(<http://soybase.org/>)提供的基因组信息,筛选目标 SNP 位点上游、下游各 600 bp 的 1 201 bp 非重复性基因序列;(2)使用 Wavemaker 软件(美国 Transgenomic 公司),分析 DNA 序列的解链温度及片段的解链域。通过调整片段大小、删除

解链温度差异大的序列区,优化解链曲线,获得解链温度相差 5℃ 以下,片段大小为 200 ~ 600 bp 并包含目标 SNP 位点的 DNA 序列。从筛选获得 1 号染色体的 DNA 序列中,随机选择 3 条 DNA 序列进行引物设计。

1.4 PCR 引物设计和扩增

以随机抽取的 DNA 序列为模板,运用 Primer Prime 5.0 软件设计相应的 PCR 扩增引物。Amp I 片段 402 bp 引物序列为 5'- CTGGCGAT-GAGAATCTGTA -3', 5'- GCAATGCAACTTATATGT-GAA -3'; Amp II 片段 380 bp 引物序列为 5'- CCTC-CTCCACAACCCGCATCT -3', 5'- CCTCTCCTCTTC-CCTGCCAATTC-3'; Amp III 片段 465 bp 引物序列为 5'- AGAGCGAGGGTGAAGAGG -3', 5'- CCACACTG-CATACTTTTGGA-3'。以上引物由上海生工公司合成。PCR 扩增反应在 Veriti PCR 仪上进行,反应体系为 25 μL,组成成分为 1 × buffer(with Mg²⁺)、250 μmol·L⁻¹ dNTP、0.2 μmol·L⁻¹ 引物对、50 ng 模板 DNA 和 1.0 U Pfu DNA 酶。PCR 扩增程序包括:94℃ 预变性 2 min;94℃ 变性 30 s,退火温度下退火 45 s,72℃ 延伸 1 min,30 个循环;72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存。退火温度分别为 Amp I 50℃、Amp II 60℃ 和 Amp III 56℃。

1.5 DHPLC 检测

1.5.1 样本预处理 取每份大豆材料 PCR 扩增产物 5 μL,分别与 461 的 PCR 扩增产物两两等体积混合。混合样本及单个 PCR 产物均用 Veriti PCR 扩增仪进行变性、复性^[3],即:95℃ 变性 5 min 后,以 1℃·min⁻¹速度降温至室温后准备上样。

1.5.2 色谱分析条件 通过输入目标分析片段的 DNA 序列,利用 Wavemaker 软件系统自动模拟预测分离梯度和柱温。5 μL 变性复性后的待测样本自动注入 DHPLC 分析系统,并经流动相 A 液(0.1 mol·L⁻¹ TEAA, pH7.0)和 B 液(0.1 mol·L⁻¹ TEAA, 25% 乙腈)以 0.9 mL·min⁻¹的速度带至 DNA Sep 柱洗脱分离。

为获取最佳分析条件,以 461 为测试样本,以预测的分离梯度和柱温进行 DHPLC 分析。如有必要,在预测温度的基础上以 0.5℃ 为梯度对柱温进一步优化,筛选纯合型 DNA 样本(同源双链 DNA)的最适检测温度,作为 DHPLC 工作温度。

1.5.3 谱型鉴别 供试大豆种质为基因纯合型样本,其 PCR 产物的谱型峰应为单峰。如果所有单个样本的谱型峰为单峰,说明 DHPLC 分析系统运行状态良好。比较混合样本与单个样本之间的 DHPLC 谱峰的个数和峰型变化情况,以及混合样本之

间的谱峰差异。

谱峰的个数或峰型变化说明两样本序列不一致;峰型无变化则说明两样本序列相同,检测样本基因型与 461 一致。

1.6 直接测序

10 份大豆样本经目标分析片段的特异性引物扩增并纯化后,交由上海生工公司进行双向测序。使用 CodonCode Aligner V3.71 对测序峰图进行序列拼接,去除引物区。利用 MEGA 4.0 软件将所得 9 份大豆样本序列与大豆品种 461 序列进行比较,找出变异位点,确定基因型。

2 结果与分析

2.1 工作温度优化选择

DNA Sep 柱温是 DHPLC 分析一项关键的技术

参数^[25]。通过 Wavemarker 软件分析 Amp I , Amp II , Amp III 序列,得到推荐工作温度分别为 56.5, 59.1 和 57.5℃。大豆 461 为基因纯合型样本,将其 PCR 扩增产物作为测试样本,在预测的温度下进行 DHPLC 分析,可获得同源双链 DNA 在特定温度下的图谱峰型。结果发现,3 条目标序列的软件预测温度并非都适合于纯合型样本的分析。如图 1,在 Amp I 的预测温度(56.5℃)下,大豆 461 获得的图谱峰出现少数肩峰。这可能由于柱温过高,致使同源性 DNA 片段发生了部分解链。以 0.5℃为梯度降低工作温度后,获得的峰型逐渐变窄。在 54.5℃下,样本图谱的主峰明显,为单一峰,消除了肩峰对峰型判断的影响。通过对温度的优化获得 Amp I 、 Amp II 和 Amp III 的 DHPLC 工作温度为 54.5,59.1 和 56.5℃。

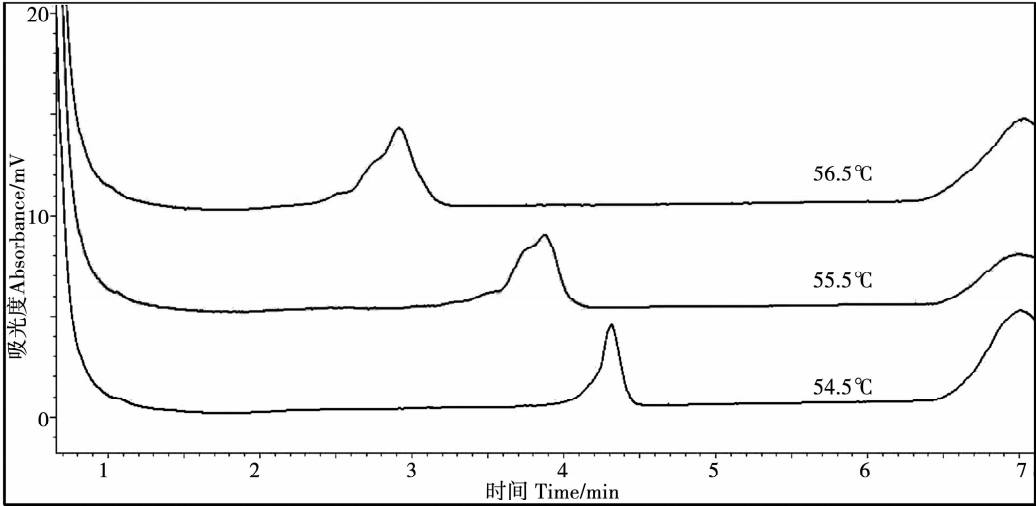


图 1 不同工作温度下 461 的 DHPLC 图谱
Fig. 1 DHPLC elution profiles for 461 with homozygous sequence at three column temperatures

2.2 DHPLC 图谱的多态性

在优化条件下,对单个大豆的 PCR 产物以及单个大豆与 461 的混合 PCR 产物进行 DHPLC 分析,获得了不同类型的峰型图谱。结果显示所有大豆材料的单个 PCR 产物样本均为单峰,符合 DHPLC 对纯合型样本的分析特征。混合样本中有部分表现出与单个样本相似的图谱峰型,即单峰;另有部分混合样本的 DHPLC 图谱与单个样本的图谱峰型截然不同,表现为多峰。这些 DHPLC 多峰型图谱在峰的数量和峰的保留时间上又存在着部分样本之间具有相似性和部分样本之间具有差异性的特征。

图 2 为片段 Amp I 、Amp II 及 Amp III 不同混合样本的 DHPLC 图谱。Amp I 片段的 9 份混合样本

中,只有 1 份样本产生单峰,另外 8 份样本产生 3 种不同类型的多峰图谱。其中 CL0-52、CL0-56 和 466 与 461 的混合样本产生保留时间基本一致的双峰图谱;另外 5 份混合样本中,275 与 256 产生的三峰峰型基本一致,而丹、353 和 452 表现为峰保留时间上与 275 与 256 存在明显差异的另一种类型的三峰图谱。Amp II 片段的 9 份混合样本中,5 份产生单峰,4 份产生双峰,并由于峰保留时间上的差异丹与 461 的混合样本又可明显区别于另外 3 份样本所产生的双峰类型。Amp III 只有 1 份混合样本表现为单峰,其余 8 份样本表现为两种类型的三峰图谱。其中 CL0-52、CL0-56、275 和 益 2 四份大豆材料具有类似的图谱峰型,与另外 4 份大豆材料 466、丹、256 和 452 的三峰图谱在峰保留时间上有所区别。

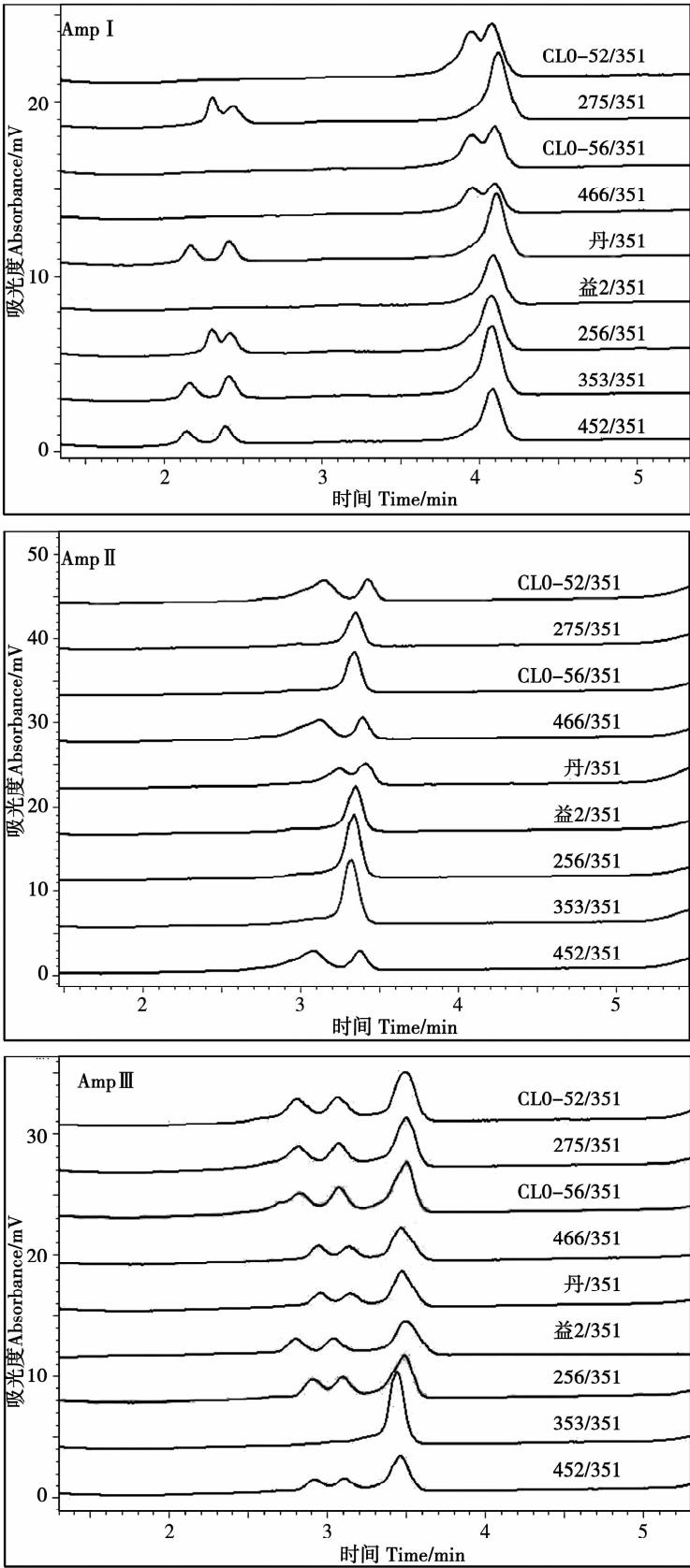


图2 Amp I、Amp II 及 Amp III 片段分析中不同混合样本的 DHPLC 图谱
Fig.2 DHPLC elution profiles for the mixed samples of each soybean variety
and 461, obtained by DHPLC analysis of Amp I, Amp II and Amp III

2.3 DNA 序列与 DHPLC 图谱的相关性

DHPLC 图谱的多态性理论上应来源于样本中 DNA 序列变异位点的多态性。被测大豆种质与 461 的混合 PCR 产物样本产生单峰,可推测该大豆种质与 461 目标分析片段的序列相同。被测大豆种质与 461 的混合 PCR 产物样本产生多峰,则可能说明该大豆种质的目标分析片段与 461 之间存在一定程度上 DNA 变异。而由于不同大豆种质与 461 之间的 DNA 变异位点的差异,各个混合样本之间其多峰类型亦会不同。为了评估是否可以将 DHPLC 图谱与特定 DNA 序列相对应,我们对 10 份大豆样本进行了测序,并进行了比对分析。

测序结果证实 10 份大豆样本的 3 个目标片段均为纯合 DNA,无序列变异。与 461 混合后的大豆样本,其 DHPLC 峰型与单个样本无差异,依旧只产

生单峰的,测序结果也证实其与 461 的目标分析片段序列一致。其他表现为多峰的,目标分析片段与 461 存在多种 DNA 变异,其峰型与 DNA 的变异类型直接相关。所有具有相似峰型的大豆种质其目标分析片段的 DNA 序列均一致;任一种 DNA 变异类型都产生其特征性 DHPLC 图谱。如图 3 所示,混合样本表现为 A 型的单峰图谱的,其测序结果与 461 一致。如被测大豆的序列与 461 在 Amp III 片段上存在 T91C、T190G、C342A 3 个碱基变异,即产生 B 型图谱;C 型图谱的产生则是由于被测大豆与 461 的 Amp III 片段存在 T91C、T190G 两个碱基变异。由此可见,即使是只有 1 个位点差异的两种 DNA 变异类型,依旧可以通过 DHPLC 图谱进行明显区分,展现出 DHPLC 检测分析的高灵敏性。

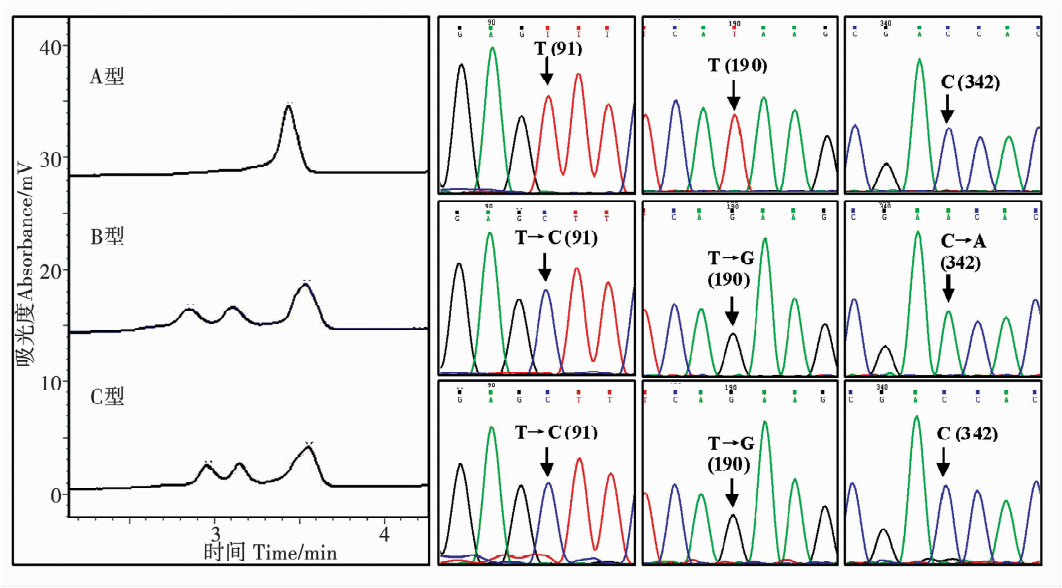


图 3 Amp III 片段的 3 种 DHPLC 谱型及其对应的序列变异位点

Fig. 3 Three DHPLC elution profiles for Amp III and corresponding sequence variants by sequencing

10 份大豆材料的测序结果显示 3 条目标分析片段在不同样本之间的序列变异类型主要为 SNP 位点突变,只有 Amp II 除了 SNP 突变以外,还存在多个碱基的插入和缺失 (InDel) (表 1)。试验结果

进一步证实了 DHPLC 图谱的多态性来源于样本中异源双链的 SNP 和 InDel 突变位点和数量的多态性。3 条目标片段不同 DHPLC 谱峰对应的序列变异见表 2。

表 1 DHPLC 目标分析片段及其引物序列

Table 1 Characteristics of the DNA fragment screened in this study and the sequence of primers

DNA 片段 DNA fragment	染色体 Chr	片段大小 PCR fragment size/bp	退火温度 Annealing temperature/℃	引物序列 Primer sequences	
				正向 Forward (5'-3')	反向 Reverse (5'-3')
Amp I	1	402	50	CTGGCGATGAGAATCTGTA	GCAATGCAACTTATATGTGAA
Amp II	1	380	60	CCTCCTCCACAACCCGCATCT	CCTCTCCTCTTCCCTGCCAATTC
Amp III	1	465	56	AGAGCGAGGGTGAAGAGG	CCACACTGCATACTTTTGGGA

表 2 三条目标分析片段的 DHPLC 图谱及序列多态性信息

Table 2 A list of DHPLC profile patterns and their corresponding sequence variants observed from three DNA fragments

DNA 片段 DNA fragment	DHPLC 图谱 DHPLC profile pattern	序列变异 Sequence variation
Amp I	TYPE A	无 None
		No. 128 A→G
	TYPE B	No. 192 T→C
		No. 7 C→A
	TYPE C	No. 51 C→A
		No. 59 A→T
		No. 113 T→A
		No. 130 A→G
		No. 192 T→C
		No. 214 A→T
	TYPE D	No. 14 C→T
		No. 28 A→G
		No. 78 T→G
		No. 133 T→A
		No. 138 T→G
		No. 153 AT→GA
Amp II	TYPE A	无 None
		No. 101 A→G
	TYPE B	No. 8 T→C
		No. 69 ins CAGAGACCTGCTTCA
		No. 82 TC→CT
		No. 101 A→G
		No. 112 G→A
		No. 132 C→A
		No. 142 C→A
		No. 268 A→C
		No. 283 Del
		ATGTTGCGCTTGACGACTGTGCTGAAGCATGCAAAGAGCTCATC
Amp III	TYPE A	无 None
		No. 91 T→C
	TYPE B	No. 190 T→G
		No. 342 C→A
	TYPE C	No. 91 T→C
		No. 190 T→G

2.4 大豆的 DHPLC 鉴定

供试大豆材料均为基因纯合型样本,因此 10 份单个大豆样本的 DHPLC 分析结果均表现为一致的单峰图谱。为了区别这些高度纯合但彼此之间存在序列差异的大豆样本,需要与一个参比 DNA 混合

形成异源双链后进行下一步 DHPLC 分析,利用混合样本之间 DHPLC 图谱的差异对各个大豆材料进行区分鉴定。本试验筛选了 3 个目标片段,并选取 461 PCR 产物作为参比 DNA,综合每种大豆材料 3 个目标分析片段的 DHPLC 图谱类型,获得了每种

大豆材料的特征性 DHPLC 指纹图谱,10 份大豆材料相互之间至少存在 1 个 DHPLC 图谱类型的差异。同时,DHPLC 对序列变异的高灵敏性检测,暗示 DHPLC 分析系统亦可用于大豆品种纯合度的测定。

3 结论与讨论

目前常用的分子标记技术,一般是建立在凝胶电泳基础上对多个个体进行分析,步骤比较繁琐,且由于凝胶电泳分辨率的限制,难以区分一些差异较小的 DNA 片段^[26]。相比 SSR 等一些分子标记,SNP 在基因组中分布更广泛、数量大,且遗传稳定性相对较高。然而 SNPs 的二态性也使它可提供的信息量要小于其它分子标记^[27]。研究认为综合一段序列内多个 SNP 位点的多态性信息可以弥补单个 SNP 多态性不高的缺陷^[28];应用于品种鉴定时,3 ~ 4 个 SNP 与 1 个 SSR 标记的鉴定力相当^[29]。基于 DHPLC 图谱的谱型差异,DHPLC 技术可实现对多个 SNP 位点的分型鉴定^[19]。本研究利用 DHPLC 技术在 SNP 多位点检测上的技术优势,探讨了其在大豆品种鉴定上可行性。

由于大豆多为连续自交后的品种,是基因纯合型的种质资源,为了区别不同纯系的基因型,本研究通过在样本中加入参比 DNA,构建了不同大豆品种基因型鉴定的 DHPLC 检测方法。分析片段的筛选和柱温的优化对 DHPLC 检测灵敏度具有重要影响。通过软件分析筛选出的 3 条目标分析片段具有单一的解链域,有利于在一个温度下对整条序列上不同区域的变异位点进行全面检测。温度是分离异源双链和同源双链的关键技术参数。温度过高会导致无序列变异的样本产生肩峰,影响基因型的判断,温度过低会降低 DHPLC 的敏感性,致使部分序列变异不能检出,只有在最佳工作温度下 DHPLC 才能检测出不同的基因型。本研究通过对基因纯合型样本的预检测和 DHPLC 参数优化,筛选获得 3 条目标片段 DHPLC 分析的工作温度。通过测序证实,在优化的工作温度下,DHPLC 可检出所有混合样本中的序列变异,即时只有 1 个碱基的变异也能从 DHPLC 图谱上进行区别,敏感性达 100%。同时基于 3 条 DNA 片段的 DHPLC 图谱的多态性,获得了 10 份大豆品种的特征性 DHPLC 图谱,证明了 DHPLC 技术在大豆鉴定应用上的可行性和可靠性。

DHPLC 平台摆脱了电泳分型的瓶颈,并提高了检测的自动化水平,且技术方法简单,分辨率好,在品种鉴定方面将具有良好的应用前景。由于不同 DNA 片段的遗传多态性水平不同,其产生 DHPLC 图谱的多态性也存在区别。通过筛选更多具有高多态性水平的 DNA 序列作为 DHPLC 目标分析片

段,可对我国目前具有广泛应用价值的大豆育成品种以及野生大豆资源进行鉴定分析,获得不同大豆品种的 DHPLC 指纹图谱。由于 DHPLC 可以有效区分基因纯合型和杂和型样本,因此也可利用 DHPLC 技术对大豆育成品种的纯合度进行分析,检测育成品种的基因稳定性,为品种选育及审定提供依据。

参考文献

[1] Henry R J. Plant Genotyping: The DNA fingerprinting of plants [M]. Wallingford: CABI, 2001.

[2] Phillips R L, Vasil I K. DNA-based markers in plants [M]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001.

[3] Mundewadikar D M, Deshmukh P R. Genetic variability and diversity studies in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using RAPD marker[J]. International Journal of Scientific and Research Publications, 2014, 4(9):1-4.

[4] Singh R K, Bhatia V S, Sanjeev Yadav, et al. Identification of genetically diverse genotypes for photoperiod insensitivity in soybean using RAPD markers[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2008, 14(4): 369-375.

[5] Keim P, Beavis W, Schupp J, et al. Evaluation of soybean RFLP marker diversity in adapted germplasm[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1992, 85:205-212.

[6] Mudibu J, Nkongolo K K C, Mehes-Smith M, et al. Genetic analysis of a soybean genetic pool using ISSR marker: Effect of gamma radiation on genetic variability[J]. International Journal of Plant Breeding and Genetics, 2011, 5(3):235-245.

[7] Ram K S, Virendra S B, Bhat K V, et al. SSR and AFLP based genetic diversity of soybean germplasm differing in photoperiod sensitivity[J]. Genetics and Molecular Biology, 2010, 33(2): 319-324.

[8] Yuan C P, Lu W G, Liu Z X, et al. SSR analysis of new developed soybean lines resistant to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe) Race 4[J]. Acta Agronomica Sinica, 2008, 34(10):1858-1864.

[9] Flint-Garcia S A, Thuillet A C, Yu J, et al. Maize association population: A high-resolution platform for quantitative trait locus dissection[J]. The Plant Journal, 2005, 44:1054-1064.

[10] Simko I, Haynes K G, Ewing E E, et al. Mapping genes for resistance to *Verticillium albo-atrum* in tetraploid and diploid potato populations using haplotype association tests and genetic linkage analysis[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2004, 271(5): 522-531.

[11] Szalma S J, Buckler E S, Snook M E, et al. Association analysis of candidate genes for maysin and chlorogenic acid accumulation in maize silks[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 110(7):1324-1333.

[12] Diego Lijavetzky, José Antonio Cabezas, Ana Ibáñez, et al. High throughput SNP discovery and genotyping in grapevine (*Vitis vinifera* L.) by combining a re-sequencing approach and SNPlex technology[J]. BMC Genomics, 2007, 8:424.

[13] José A C, Ibáñez J, Lijavetzky D, et al. A 48 SNP set for grapevine cultivar identification [J]. BMC Plant Biology, 2011, 11:153.

- [14] Zhu Y L, Song Q J, Hyten D L, et al. Single-nucleotide polymorphisms in soybean[J]. *Genetics*, 2003, 163:1123-1134.
- [15] Wu X L, Ren C W, Joshi T, et al. SNP discovery by high-throughput sequencing in soybean[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11:469.
- [16] Song Q J, Hyten L D, Jia G F, et al. Development and evaluation of SoySNP50K, a high-density genotyping array for soybean[J]. *Plos one*, 2013, 8(1): e54985.
- [17] Wagner T, Stoppa-Lyonnet D, Fleischmann E, et al. Denaturing high-performance liquid chromatography detects reliably BRCA 1 and BRCA 2 mutations[J]. *Genomics*, 1999, 62:369-376.
- [18] Gross E, Arnold N, Goette J, et al. A comparison of BRCA 1 mutation analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC[J]. *Human Genetics*, 1999, 105: 72-78.
- [19] Li Q, Li L Y, Huang S W, et al. Rapid genotyping of known mutations and polymorphisms in β -globin gene based on the DHPLC profile patterns of homoduplexes and heteroduplexes[J]. *Clinical Biochemistry*, 2008, 41:681-687.
- [20] Takashima H, Boerkoel C F, Lupski J R. Screening for mutations in a genetically heterogeneous disorder: DHPLC versus DNA sequence for mutation detection in multiple genes causing Charcot-Marie-Tooth neuropathy[J]. *Genetics in Medicine*, 2001, 3(5): 335-342.
- [21] Pazaitou-Panayiotou K, Kaprara A, Sarika L, et al. Efficient testing of the RET gene by DHPLC analysis for MEN 2 syndrome in a cohort of patients [J]. *Anticancer Research*, 2005, 25: 2091-2096.
- [22] Nairz K, Stocker H, Schindelholz B, et al. High-resolution SNP mapping by denaturing HPLC[J]. *PNAS*, 2002, 99(16):10575-10580.
- [23] Kota R, Wolf M, Michalek W, et al. Application of denaturing high-performance liquid chromatography for mapping of single nucleotide polymorphisms in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Genome*, 2001, 44: 523-528.
- [24] 王关林,方宏筠. 植物基因工程原理和技术[M]. 北京: 科学出版社,1998:600-601. (Wang G L, Fang H J. Principle and technology of plant genetic engineering [M]. Beijing: Science Press,1998:600-601.
- [25] Raja K, Markus W, Wolfgang M, et al. Application of denaturing high-performance liquid chromatography for mapping of single nucleotide polymorphisms in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Genome*, 2001, 44: 523-528.
- [26] 唐立群,肖层林,王伟平. SNP 分子标记的研究及其应用进展[J]. 中国农学通报, 2012,28(12):154-158. (Tang L Q, Xiao C L, Wang W P. Research and application progress of SNP markers[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(12):154-158.)
- [27] Hamblin M T, Warburton M L, Buckler E S. Empirical comparison of simple sequence repeats and single nucleotide polymorphisms in assessment of maize diversity and relatedness [J]. *PlosOne*, 2007, 2:e1367.
- [28] Yan J B, Yang X H, Shah T, et al. High-throughput SNP genotyping with the GoldenGate assay in maize[J]. *Molecular Breeding*, 2010, 25(3): 441-451.
- [29] José A C, Ibáñez J, Lijavetzky D, et al. A 48 SNP set for grapevine cultivar identification [J]. *BMC Plant Biology*, 2011, 11:153.

欢迎订阅 2016 年《作物学报》

《作物学报》是中国科学技术协会主管、中国作物学会和中国农业科学院作物科学研究所共同主办、科学出版社出版的有关作物科学的学术期刊。前身可追溯到 1919 年创办的《中华农学会丛刊》。主要刊载农作物遗传育种、耕作栽培、生理生化、种质资源以及与作物生产有关的生物技术、生物数学等学科基础理论或实践应用性的原始研究论文、专题评述和研究简报等。办刊宗旨是报道本领域最新研究动态和成果,为繁荣我国作物科学研究、促进国内外学术交流、加速中国农业现代化建设服务。读者对象是从事农作物科学研究的科技工作者、大专院校师生和具有同等水平的专业人士。

《作物学报》从 2006 ~ 2015 年连续 10 年获“中国科协精品科技期刊工程项目(B 类、学术质量建设和 TOP50)”资助。从 2002 年起连续 13 年被中国科技信息研究所授予“百种中国杰出学术期刊”称号。2013 年被新闻出版广电总局评为“百强科技期刊”,2011 年获“第二届中国出版政府奖期刊奖提名奖”,2005 年获“第三届全国期刊奖提名奖”。2008,2011 和 2014 年被中国科学技术信息研究所授予“中国精品科技期刊”称号。2012,2013 和 2014 年被 CNKI 评为“中国最具国际影响力学术期刊”。2009 年被中国期刊协会和中国出版科学研究所授予“新中国 60 年有影响力的期刊”称号。据北京大学图书馆编著的《中文核心期刊要目总览》(2004,2008 和 2011 年版)登载,《作物学报》被列在“农学、农作物类核心期刊表”的首位。据 2014 年 9 月中国科学技术信息研究所发布的 2014 年版《中国科技期刊引证报告-核心版》登载,《作物学报》的“综合评价总分”达 99.2 分,位列 1 989 种中国科技核心期刊的首位。

《作物学报》为月刊,每期 160 页,定价 60.00 元/册,全年 720.00 元。可通过全国各地邮局订阅,国际连续出版物号:ISSN 0496-3490, CN 11-1809/S, 邮发代号:82-336。也可向编辑部直接订购。

地址:北京市海淀区中关村南大街 12 号,中国农业科学院作物科学研究所《作物学报》编辑部(邮编 100081)

电话:010-82108548; 传真:010-82105793; 网址: <http://zwxb.chinacrops.org/>; E-mail: zwxb301@caas.cn。