

基于 SSR 荧光标记的花果兼用梅遗传多样性分析和分子身份证构建

王梓煦¹, 周丹¹, 赵彦贝¹, 童宇航², 郑为军², 李庆卫^{1*}

1 北京林业大学 园林学院 林木资源高效生产全国重点实验室, 北京 100083

2 北京市绿地养护管理事务中心, 北京 102211

王梓煦, 周丹, 赵彦贝, 童宇航, 郑为军, 李庆卫. 基于 SSR 荧光标记的花果兼用梅遗传多样性分析和分子身份证构建[J]. 生物工程学报, 2025, 41(2): 639-656.

WANG Zixu, ZHOU Dan, ZHAO Yanbei, TONG Yuhang, ZHENG Weijun, LI Qingwei. Genetic diversity and molecular identity of *Prunus mume* with both ornamental and edible values based on fluorescence-labeled simple sequence repeat markers[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(2): 639-656.

摘要: 为了收集、鉴定、评价和创新花果兼用梅(*Prunus mume*)优良种质, 推动我国北方地区梅产业链的改造升级, 对花果兼用梅(*Prunus mume*)种质进行遗传多样性分析, 构建 DNA 分子身份证数据库, 本研究以河北省邢台 68 份花果兼用梅为材料, 采用多态性好、条带清晰、重复性好的 13 对简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)引物标记, 对其进行遗传多样性分析并构建供试样品的 DNA 分子身份证。基于遗传距离进行非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)聚类分析, 基于贝叶斯模型解析 68 份种质的遗传结构。结果表明, 13 对 SSR 引物共扩增到 124 个等位基因, 平均等位基因数(number of alleles, N_a)为 9.538 5, 等位基因频率(major allele frequency, MAF)为 0.369 3, 有效等位基因(number of effective alleles, N_e)为 4.483 5, Shannon 信息指数(Shannon genetic diversity index, I)为 1.712 4, Nei's 基因多样性指数(Nei's gene diversity index, H)为 0.763 7, 观测杂合度(observed heterozygosity, H_o)为 0.719 5, 而期望杂合度(expected heterozygosity, H_e)为 0.769 3, 平均多态信息含量(polymorphism information content, PIC)为 0.733 6, 平均遗传相似性系数(genetic similarity, GS)为 0.772 9, 表明所研究的花果兼用梅种质之间具有显著的遗传差异和丰富的遗传多样性。聚类分析将 68 份材料划分为 3 个类群, 平均遗传距离(genetic distance, GD)为 0.622 6。Structure 群体结构分析将供试材料分为 2 个种群。根据引物的多态性信息含量高低选择引物组合, 构建花果兼用梅种质区分需要的最少引物组合。本研究为花果兼用梅品种

资助项目: 国家重点研发计划(2020YFD1000500); 北京园林绿化增彩延绿科技创新工程(2019-KJC-02-10); 北京林业大学建设世界一流学科和特色发展引导专项资金项目(2019XKJS0324)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2020YFD1000500), the Beijing Landscaping Color Extension Green Science and Technology Innovation Project (2019-KJC-02-10), the Beijing Municipal Bureau of Landscape Architecture and the Special Funds Project for Building World-class Disciplines and Characteristic Development Guided by Beijing Forestry University (2019XKJS0324).

*Corresponding author. E-mail: lqw6809@bjfu.edu.cn

Received: 2024-08-22; Accepted: 2024-10-09; Published online: 2024-10-16

创新和产业升级及其园林应用和提高育种效率提供了理论依据。

关键词：梅；花果兼用；遗传多样性；简单重复序列荧光标记；分子身份证

Genetic diversity and molecular identity of *Prunus mume* with both ornamental and edible values based on fluorescence-labeled simple sequence repeat (SSR) markers

WANG Zixu¹, ZHOU Dan¹, ZHAO Yanbei¹, TONG Yuhang², ZHENG Weijun², LI Qingwei^{1*}

1 National Key Laboratory for Efficient Production of Forest Resources, School of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

2 Beijing Greenland Maintenance and Management Centre, Beijing 102211, China

Abstract: We studied the genetic diversity and established the DNA molecular identify for *Prunus mume* with both ornamental and edible values, aiming to collect, identify, evaluate, and breed new varieties of this plant and promote the upgrading of the *P. mume* industry chain in northern China. We employed 13 pairs of primers with good polymorphism, clear bands, and good repeatability to analyze the genetic diversity and establish the molecular identify of 68 germplasm accessions of *P. mume* with both ornamental and edible values from Xingtai, Hebei Province. We then employed the unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) to perform the cluster analysis based on genetic distance. After that, we analyzed the genetic structure of the 68 germplasm accessions based on a Bayesian model. The 13 pairs of SSR primers amplified a total of 124 alleles from 68 *P. mume* germplasm accessions, with the mean number of alleles (N_a) of 9.538 5, the minor allele frequency (MAF) of 0.369 3, the mean number of effective alleles (N_e) of 4.483 5, and the mean Shannon genetic diversity index (I) of 1.712 4. The mean Nei's gene diversity index (H) of 0.763 7, the mean observed heterozygosity (H_o) of 0.719 5, the mean expected heterozygosity (H_e) of 0.769 3, the mean polymorphism information content (PIC) of 0.733 6, and the mean genetic similarity (GS) of 0.772 9 suggested that there were significant genetic differences and rich genetic diversity among the studied *P. mume* germplasm accessions. The cluster analysis revealed that the 68 accessions were classified into three groups, with the mean genetic distance of 0.622 6. The population structure analysis classified the germplasm accessions into two populations. According to the PIC of primers, we selected primers for combination and constructed the combination with the fewest primers required for germplasm differentiation of *P. mume* with both ornamental and edible values. This study provides a theoretical basis for the innovation and industrial upgrading of *P. mume* with both ornamental and edible values in gardening and the improvement of breeding efficiency.

Keywords: *Prunus mume*; with both ornamental and edible values; genetic diversity; fluorescence-labeled simple sequence repeat (SSR) molecular marker; molecular identity

梅花(*Prunus mume* Sieb. et Zucc.)属蔷薇科李属,因其“香幽、色雅、韵胜、格高”,具有极高的文化、社会和经济价值,是我国北方地区冬春城市景观提升和产业发展的良好载体。根据用途,可将梅花分为花梅和果梅这 2 种类型,花梅是由果梅或野梅演化而来^[1]。在长期的生产实践中,逐渐形成了 196 个果梅(包括花果兼用)品种和 323 个花梅品种^[2]。近年来,花果兼用梅是定向遗传改良的重要方向之一^[3],梅花品种繁多、发展历史悠久、遗传背景复杂、遗传多样性丰富,值得深入挖掘其背后的优良基因。同时市场对优质梅品种的需求也日益旺盛。因此,推动优良梅种质资源的品种选育、资源保存和纯度鉴定,对促进梅花产业化发展具有重要意义。

简单序列重复序列(simple sequence repeat, SSR)是由于一种或多种重复类型的插入或缺失突变而显示出高度的长度多态性的短串联重复序列,具有共显性和高变异性以及准确快速检测等优点,被广泛用于植物遗传指纹分析、亲缘关系分析和群体遗传学等研究^[4-6]。DNA 身份证是利用二维码技术将种质资源的 DNA 片段转化为数字化形式,来代指不同品种在基因层面的差异,以提高品种鉴定效率^[7-8]。目前,利用 SSR 标记技术已经成功应用于百合(*Lilium brownii*)^[9]、芍药(*Paeonia lactiflora*)^[10]等观赏花卉的 DNA 分子身份证构建。分子标记在梅的品种分类、遗传变异、基因标记、亲缘关系分析中也得到了广泛的应用。李晓颖等^[11]利用随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)技术,对 16 个果梅品种进行了亲缘关系分析。王玉娟等^[12]采用改良的改良 RAPD-PCR 优化体系对花梅和果梅品种的遗传关系分析发现,花梅和果梅具有相近的亲缘关系,遗传背景相似,在形态特征上有所不同。侍婷等^[13]

利用 SSR 分子标记技术建立了果梅的核心种质。García-Gómez 等^[14]使用 SSR 分子标记技术对不同李属品种的基因型进行鉴定发现,品种、血统或地理来源可以作为基因型区分的依据。赵靓^[15]利用 SSR 分子标记构建了梅花种质资源的 DNA 指纹图谱。然而,现有的使用 SSR 分子标记技术对梅花种质资源遗传多样性分析和指纹图谱构建的研究大多集中在南方地区的花梅、果梅及近缘种,没有对北方地区花果兼用梅资源亲缘关系及 DNA 分子身份证构建等的系统研究。

本研究拟采用 SSR 荧光标记对河北邢台柏乡县太行梅园保存的 68 份花果兼用梅栽培品种资源开展遗传多样性分析,并构建其 DNA 分子身份证,以期挖掘邢台花果兼用梅种质资源间的遗传背景,为花果兼用梅产业的发展及其在市场的推广应用和品种资源的保护提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料及取样

供试的 68 株花果兼用梅成年单株采自河北邢台柏乡县太行梅园(东经 114°47'、北纬 37°37',海拔 40 m),属暖温带半干旱大陆性季风型气候,四季分明、日照充足。年平均气温 12.7 °C,平均年降水量 523 mm,是“南梅北移”和北京林业大学“试验示范基地”。园区现有耐寒梅花 3 万余株,名贵品种 210 多个,苗木长势良好(具体数据已提交国家微生物科学数据中心,编号:NMDCX0001719)。2024 年 5 月从健壮无病虫害的植株上采集 5-10 片嫩叶,做好标记后包入锡箔纸,迅速放入液氮,带回实验室保存于-80 °C 冰箱备用。

1.2 基因组 DNA 提取与引物筛选

采用改良 CTAB 法^[16]提取 DNA。梅 SSR

引物来源于国内外已发表的蔷薇科李属的相关文献, 根据文献初步确定了 121 对引物^[15,17-23]。SSR 引物序列由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。随机选取 8 个花果兼用梅的基因组 DNA 样品(样本编号为‘DB-6’ ‘LE-1’ ‘HGJYM7’ ‘HGJYM26’ ‘XM-10’ ‘XM-DFH’ ‘Meiren’ 和 ‘DB-9’)进行引物筛选。利用这 8 个样品和 121 对引物进行 PCR 扩增, 并由北京睿博兴科生物技术有限公司完成多态性检测, 最终筛选出 13 对能稳定扩增出清晰条带的引物, 并且使用 NCBI 网站的梅花数据库与已知序列进行比对, 得出序列在梅花基因组的具体位置, 13 对引物序列见表 1。

1.3 SSR-PCR 扩增反应

筛选到 13 对稳定的多态性引物后, 利用 SSR-PCR 反应体系对 68 个 DNA 样品进行 PCR 扩增。优化后的 PCR 扩增反应体系和反应程序参照 Nawaz 等^[24]的方法。将得到的 PCR 扩增

产物用毛细管电泳进行检测。

1.4 数据分析

利用 GeneMarker V2.2.0 读取 68 个样品的基因型数据, 获得 68 个花果兼用梅的 Excel 位点信息表和 PDF 峰图。将 Excel 格式的表格进行转码, 利用 DataFormater 软件转换数据格式^[25]。利用 PowerMarker v3.25 软件和 PopGene 32 软件计算观测等位基因数(number of alleles, N_a)、有效等位基因数(number of effective alleles, N_e)、Shannon 信息指数(Shannon genetic diversity index, I)、Nei's 基因多样性指数(Nei's gene diversity index, H)、期望杂合度(expected heterozygosity, H_e)、观测杂合度(observed heterozygosity, H_o)、等位基因频率(major allele frequency, MAF)、多态信息含量(polymorphism information content, PIC)和遗传距离(genetic distance, GD)的相关数据指标, 并基于遗传距离绘制非加权组平均法(unweighted pair-group

表 1 SSR 引物信息表

Table 1 SSR primers used in this study

Primer name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Product size (bp)	Localization of chromosomes
PaCITA19	GACAAATACAATCAAGAAGT GTCGC	GAACAGCTAGCCCCTTTGTCAT AC	124-148	NC_024130.1
Pchgms1-2	GGGTAAATATGCCCATTTGTGC AATC	GGATCATTGAACTACGTCAAT CCTC	185-195	NC_024130.1
Pchgms3	ACGGTATGTCCGTACTCTC CATG	CAACCTGTGATTGCTCCTATTA AAC	196-218	NC_024127.1
MA017a	AAGGCATATAGCGCAGGT	ATCTGAGGCCTTCAACACTT	143-161	NC_034016.1
BPPCT004	CTGAGTGATCCATTTGCAGG	AGGGCATCTAGACCTCATTGTT	187-205	NC_024130.1
BPPCT028	TCAAGTTAGCTGAGGATCGC	GAGCTTGCCTATGAGAAGACC	176-194	NC_024127.1
M6a	AGAAGGGCAAGCCCAAGTGC	TGCAAAGCCAGAGCCACAA	211-235	NC_024131.1
AG20	ACTTGCGTCACTGATGCCA	TCAGCAGCCAAAATGCCTAA	179-201	NC_024132.1
PMSSR0643	GGAAACAGAGGAGGCAATA	CCAATTCACAGGAATGT	253-267	NC_024127.1
AM288205	AGGAACCTTTGGCCATATGAAT GAT	GTTTGTGCAATAGTCCCATCA CTGC	166-220	NC_024127.1
aprigms24	ATCTGCTCTTTCCCTCACCT	GATTATCCCTCAACCCATCC	338-364	NC_024127.1
Pchgms1-1	GGGTAAATATGCCCATTTGTGC AATC	GGATCATTGAACTACGTGC	183-193	NC_024130.1
CPSCT26	TCTCACACGCTTTCGTCAAC	AAAAAGCCAAAAGGGGTTGT	196-216	NC_024133.1

method with arithmetic means, UPGMA)聚类分析树。利用 NTSYS 2.10e 软件计算遗传相似性系数(gene similarity, GS), 并使用 Origin 2021 软件绘制遗传系数相关性热图。使用 Structure 2.3.3 软件, 对 68 份花果兼用梅材料进行群体结构分析, 参数可参照 Nawaz 等^[24]的方法设置。参照 Evanno 等^[26]提出的 ΔK 值分析法来确定合适的 K 值, 并进行 K 值折线图和群体遗传结构图绘制。

根据每对标记扩增所有样品的不同带型, 按分子量从小到大用数字 1-9 依次表示, 超过 9 的用英文字母 A-Z 依次表示, 无条带用 0 表示, 最终将每个样品在每对引物上的扩增带型数据串联起来, 建立品种数字化的 DNA 分子身份证。并利用在线条形码生成器(<https://qr-batch.com/barcode.php>)和二维码在线生成技术(<https://cli.im/>)将对应字符串生成直观的条形码和可扫描的二维码 DNA 分子身份证^[9,27-28]。

2 结果与分析

2.1 梅基因组 DNA 提取及电泳检测结果

通过荧光 PCR 扩增和毛细管电泳检测, 获得 68 个花果兼用梅样品的各位点上等位基因片段大小(图 1)。根据得到的 68 份花果兼用梅 SSR 的扩增结果, 利用 PowerMarker 软件和 PopGene 软件计算出 13 对引物的多态性信息(表 2)。68 个样品中共检测到 124 个等位位点, 每个位点观测等位基因(N_a)平均为 9.538 4, 其中引物 PaCITA19 和 AM288205 最多(13), 引物 Pchgms1-1 和 Pchgms1-2 最少(5); 有效等位基因(N_e)在 2.788 9-6.312 6 之间, 平均为 4.483 5, 其中引物 PaCITA19 最多(6.312 6), 而引物 BPPCT004 最少(2.788 9); 从基因型来看, BPPCT004 和 BPPCT028 的等位基因频率最高, 均为 0.529 4, 说明两位点存在一定的关联性,

PaCITA19 的等位基因频率最低, 为 0.250 0; Shannon 信息指数(I)的范围在 1.337 7-2.097 6 之间, 平均为 1.712 4; Nei's 基因多样性指数(H)的变化范围为 0.641 4-0.841 6, 平均为 0.763 7; 观测杂合度(H_o)在 0.617 6-0.794 1 之间, 平均为 0.719 5, 而期望杂合度(H_e)在 0.736 8-0.847 8 之间, 均值为 0.769 3; 多态信息含量(PIC)的值在 0.595 0-0.824 0 之间, 均大于 0.500 0。因此, 13 对引物具有较高的 PIC 值, 能够满足供试的 68 份花果兼用梅材料的遗传变异研究。

2.2 不同引物组合对品种的区分

使用 13 对引物可以将 68 份花果兼用梅种质完全区分, 平均每对引物能区分 20.69 份种质, 13 对引物的扩增带型编码如表 3 所示。

虽然 13 对引物组合能区分 68 个种质, 但其中多态性信息含量最高的引物 PaCITA19 仅可区分出 28 份种质; 在此基础上, 基于多态性信息含量高低, 引入一个多态性信息含量较高的引物 Pchgms1-2 后, 又可筛选出 30 份种质(表 4)。按照此方法对剩余的引物进行递增筛选, 最终获得 67 份种质资源。其中, “LV1-215”和“LV-1”之间的差异位点数为 0, 因此被判定为疑似同一品种。根据引物的多态性信息含量高低依次区分品种是目前最有效的方法, 这不仅提高了区分效率, 还避免了使用 13 对引物对全部种质进行区分所带来的繁琐工作量。

2.3 遗传相似性系数

通过 SSR 标记分析发现, 68 份花果兼用梅供试材料间的遗传相似性系数(GS)的均值为 0.772 9(图 2)。其中‘LV-1’与‘LV1-215’遗传相似性系数为 1.000 0, 可能为疑同品种, ‘GF-22’和‘GF-21’的遗传相似系数最大(0.959 7), 说明这些种质亲缘关系最近。而‘Meiren’与‘YD-2’、‘GF-4’与‘LV-4’遗传相似系数最小(0.629 0), 表明‘Meiren’与‘YD-2’和‘GF-4’与‘LV-4’的亲缘关系

相对较远。此外, ‘DB-6’和‘HGJYM13’之间的遗传相似性系数大于 0.950 0, 说明这些种质之间遗传背景相差较小, 亲缘关系较近。68 份材料的遗传相似系数值大多分布在 0.700 0–0.800 0 之间(图 3), 占 67.95%, 相似系数大于 0.900 0 的占比最少, 为 0.87%, 这表明 68 份花果兼用梅材料整体上遗传相似度相对较高。

2.4 聚类分析

基于 Nei's 遗传距离, 利用 UPGMA 方法对 68 份花果兼用梅材料进行聚类分析, 结果表明, 68 份材料被划分为 3 大类群(图 4)。其中, 平均遗传距离(genetic distance, *GD*)为 0.622 6。第 I 类群以杏梅品种群居多, 第 II 类群以单瓣品种群为主, 第 III 类群以绿萼品种群居多。从聚

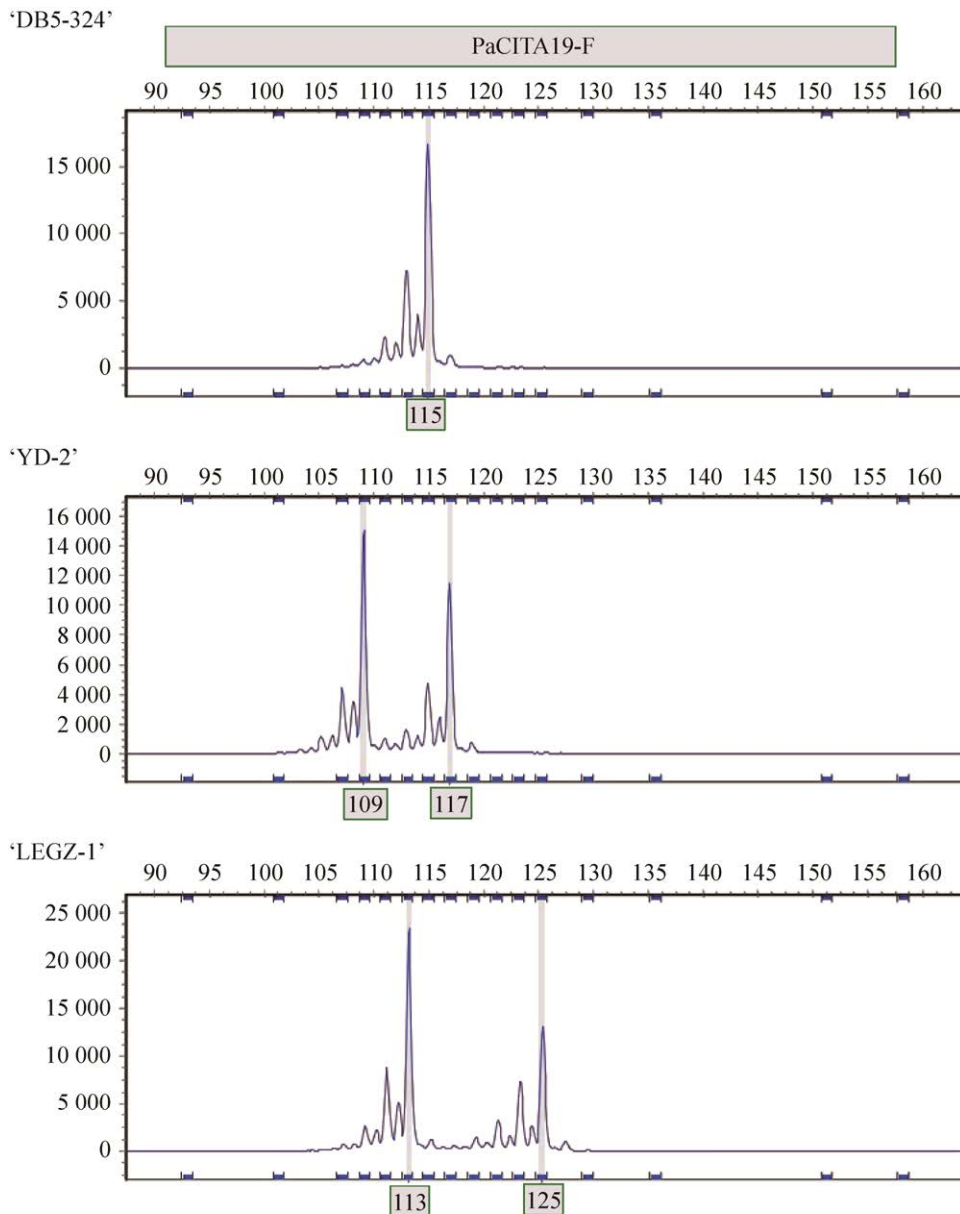


图 1 引物 PaCITA19 在样品 ‘DB5-324’ ‘YD-2’ ‘LEGZ-1’ 中的扩增结果

Figure 1 Amplification of samples ‘DB5-324’ ‘YD-2’ and ‘LEGZ-1’ using primer PaCITA19.

表 2 SSR 位点多态性信息表

Table 2 Polymorphism information of SSR loci

Primer name	<i>N_a</i>	<i>N_e</i>	<i>MAF</i>	<i>I</i>	<i>H</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>PIC</i>
PaCITA19	13	6.312 6	0.250 0	2.061 6	0.841 6	0.794 1	0.847 8	0.822 9
Pchgms1-2	5	4.121 2	0.294 1	1.465 2	0.757 4	0.735 3	0.763 0	0.714 6
Pchgms3	11	5.095 3	0.345 6	1.898 2	0.803 7	0.705 9	0.809 7	0.781 3
MA017a	11	4.619 4	0.382 4	1.845 5	0.783 5	0.794 1	0.789 3	0.759 8
BPPCT004	10	2.788 9	0.529 4	1.337 7	0.641 4	0.647 1	0.646 2	0.595 0
BPPCT028	9	2.970 8	0.529 4	1.440 0	0.663 4	0.705 9	0.668 3	0.630 1
M6a	8	3.723 0	0.411 8	1.538 4	0.731 4	0.750 0	0.736 8	0.692 9
AG20	11	5.213 1	0.301 5	1.856 5	0.808 2	0.779 4	0.814 2	0.782 9
PMSSR0643	9	3.767 0	0.455 9	1.666 3	0.734 5	0.632 4	0.740 0	0.708 3
AM288205	13	6.274 1	0.294 1	2.097 6	0.840 6	0.720 6	0.846 8	0.824 0
aprigms24	10	5.092 5	0.360 3	1.917 0	0.803 6	0.735 3	0.809 6	0.783 3
Pchgms1-1	5	4.121 2	0.294 1	1.465 2	0.757 4	0.735 3	0.763 0	0.714 6
CPSCT26	9	4.186 5	0.352 9	1.671 4	0.761 1	0.617 6	0.766 8	0.726 8
Mean±SD	9.538 5± 2.503 8	4.483 5± 1.097 4	0.369 3± 0.086 6	1.712 4± 0.251 0	0.763 7± 0.060 9	0.719 5± 0.057 7	0.769 3± 0.061 4	0.733 6± 0.066 2

类图可以发现, 花果兼用梅资源遗传距离分类并不严格按照“二元分类”法进行, 大多数同一品种类群的梅花遗传距离较近, 例如绿萼品种群‘LV1’和‘LV1-215’、单瓣品种群‘HGJYM8’和‘HGJYM11’、宫粉品种群‘GF-22’和‘GF-21’和杏梅品种群‘XM-11’和‘XM-18’等。也有部分不是同一品种类群的遗传关系较为相近, 例如玉蝶品种群的‘YD-2’和宫粉品种群的‘GF-25’, 单瓣品种群的‘HGJYM14’和玉蝶品种群的‘YD-1’, 单瓣品种群的‘DB-9’和宫粉品种群‘GF10-3’, 单瓣品种群‘DB-14’和绿萼品种群的‘LV-4’, 宫粉品种群的‘GF-29’和朱砂品种群的‘HGJYM28’, 玉蝶品种群‘YD-2’和宫粉品种群‘GF-25’, 跳枝品种群‘TZ-3’和宫粉品种群‘GF-7’。

2.5 种群结构

利用 Structure 软件对供试材料群体进行遗传结构分析^[29] (图 5), 结果显示, 当 $K=2$ 时, ΔK 出现明显的峰值, 因此, 供试材料分为 2 个亚群更为合理。同时, 68 份花果兼用梅材料的群体遗传结构见图 6, 表明大部分材料的遗传背景相对单一, 仅有极少量个体发生了

基因交流。

2.6 种质分子身份证编码

按多态性信息含量由大到小排列引物, 即 PaCITA19、AM288205、aprigms24 等, 将每对引物扩增出的等位基因片段组合进行编码。为保证编码的唯一性, 当编码小于 9 时使用 0–9, 当编码大于 9 时使用 A–Z, 而未扩增出等位基因的位置编码设为 0, 具体编码见表 5。依此类推。在上述字符串基础上, 加入材料的其他信息(统一编号、名称和来源等), 一并导入二维码在线生成器, 获得材料的二维码 DNA 分子身份证(图 7)。

3 讨论与结论

3.1 遗传多样性分析

SSR 标记技术可作为品种鉴定和分子身份证构建的首选标记^[30]。相关研究表明, 等位基因数越多对应位点的多态性程度越高, 且当多态性位点数量大于 70 个时, 该标记的多态信息比较可靠^[29], 多态性程度与研究材料、选用引物及选用引物的数量相关^[8]。本研究采用 SSR

表 3 13 对引物的扩增带型编号

Table 3 The code of different patterns in 13 pairs of primers

Number	PaCITA19	Pehgms1-2	Pehgms3	MA017a	BPPCT004	BPPCTO28	M6a	AG20	PMSSR0643	AM288205	aprigms24	Pehgms1-1	CPSCT26
1	101/107	166/166	175/181	116/142	170/170	156/156	181/207	163/163	229/229	146/156	310/326	165/165	178/180
2	101/109	166/172	175/195	122/122	170/176	156/162	189/189	163/169	235/235	146/160	320/322	165/171	178/182
3	107/113	166/174	175/201	122/130	170/186	156/166	189/199	163/171	235/239	146/164	320/326	165/173	178/184
4	107/119	166/176	175/205	122/132	170/188	156/168	189/201	163/173	235/241	146/168	320/328	165/175	178/186
5	109/109	172/172	181/195	122/134	170/206	156/172	189/219	163/175	235/243	154/154	320/330	171/171	180/180
6	109/113	172/174	181/199	122/140	170/216	156/174	190/199	163/177	235/245	154/156	320/332	171/173	180/182
7	109/115	172/176	181/203	124/134	176/186	156/176	190/219	163/181	235/247	154/160	320/336	171/175	180/184
8	109/117	172/178	181/205	124/140	178/186	158/168	194/201	167/169	235/249	154/164	322/322	171/177	180/198
9	109/119	174/174	183/193	124/142	178/188	162/168	199/199	169/169	239/239	154/174	322/326	173/173	180/202
A	109/135	174/176	183/195	126/140	178/202	164/174	199/201	169/175	239/241	154/176	322/328	173/175	182/182
B	113/113	174/178	189/195	130/130	186/188	166/166	199/207	169/177	239/243	154/180	322/334	173/177	182/184
C	113/115	176/176	193/195	130/134	186/192	166/168	199/219	169/181	239/245	156/164	322/346	175/175	182/186
D	113/117	176/178	193/205	132/132	186/200	166/172	201/201	169/185	239/247	156/174	326/326	175/177	182/192
E	113/119		195/195	132/134	188/188	166/174	201/207	173/177	239/251	160/180	326/328		184/184
F	113/123		195/199	132/140	188/216	168/174	201/219	175/175	241/245	164/164	326/330		184/186
G	113/125		195/203	134/134		172/174	207/207	175/177	241/247	164/168	326/332		184/188
H	113/129		195/205	134/136			219/219	175/181	243/243	164/174	326/334		184/198
I	115/115		197/197	134/140				175/185	243/245	164/176	326/346		186/186
J	115/117		197/199	134/142				175/195	247/247	164/178	328/328		186/188
K	115/119		197/203	138/140				177/177	249/249	164/180	328/332		192/198
L	117/117		197/205	140/140				177/181		172/198	328/334		198/198
M	117/119		199/199	140/142				181/181		174/174	328/346		
N	117/121		199/203					181/195		174/178	330/330		
O	119/125		203/203					185/187		174/180	330/334		
P	119/151									176/176	332/332		
Q	121/125									176/178	334/336		
R	121/151									178/180	334/346		
S	123/125									180/180			
T										180/194			

表 4 引物组合及区分种质的变化

Table 4 The change of primer combination and distinguished accessions

Primer combination	Germplasms can be distinguished	Subtotal	Total
PaCITA19	'HGJYM12' 'HGJYM13' 'HGJYM14' 'WSDG6' 'DB5-309' 'DB19-6' 'WSDG1' 'DB5-324' 'DB-2' 'DB-5-1' 'DB-1' 'DB1-258' 'DB-9-2' 'TZ-3' 'GF-16' 'GZ-1' 'LEGZ-1' 'YD-2' 'ZS-2' 'GF-4' 'GF-29' 'GF-5' 'XM-18' 'XM-10' 'XM-5' 'XM-11' 'XM-DFH' 'Meiren'	28	28
PaCITA19+Pchgmsl-2	'DB5-1' 'HGJYM10' 'DB-6' 'DB4-415' 'GF-1' 'GF-2' 'HGJYM3' 'YD-1' 'DB-5-2' 'DB-9' 'DB-4' 'DB5-5' 'HGJYM5' 'GF-13' 'GF-6' 'LV-4' 'GF-24' 'GF-7' 'DB-9-1' 'HGJYM6' 'GB10-3' 'GF-3' 'XM-6FH' 'HGJYM24' 'HGJYM28' 'GF2-2' 'HGJYM7' 'HGJYM8' 'HGJYM9' 'HGJYM11'	30	58
PaCITA19+Pchgmsl-2+ Pchgms3	'DB4-245' 'GF-25' 'DB-14' 'GF-21' 'LE1-215' 'DB4-4' 'HGJYM22' 'HGJYM26'	8	66
PaCITA19+Pchgmsl-2+ Pchgms3+MA017a		0	66
PaCITA19+Pchgmsl-2+ Pchgms3+MA017a+BP PCT004	'GF-22'	1	67

分子标记结合毛细管电泳技术进行花果兼用梅种质资源鉴定。13 对多态性引物共扩增出 124 个条带, 每个位点观测等位基因(N_a)平均为 9.538 4, 此结果远高于赵靛^[15]对梅花品种的研究结果: 24 对 SSR 引物共检测到 79 个等位基因, 平均等位基因数为 3.251 7, 也高于吴根松等^[19]对梅花的研究结果: 14 对 SSR 引物共得到 85 个等位基因, 平均等位基因数为 6 个, 与 Wang 等^[17]的采用梅花 16 个 SSR 引物共扩增出 142 个条带, 平均值为 8.86 个的研究结果相近, 低于 Hayashi 等^[18]的 14 个 SSR 引物对应平均等位基因数 11.1 个。说明 13 对 SSR 引物多态性较好, 能较好地反映材料的遗传多样性。等位基因数(N_a)、Shannon 多样性指数(I)和 Nei's 多样性指数(H)等可以作为评价分子水平遗传多样性的重要指标。花果兼用梅种质资源的 I 平均值为 1.712 4, 高于 14 对 SSR 引物对 12 个梅花个体的 I 值(1.528 0)^[19], 表明梅花大样本的遗传多样性显著高于小群体, 进一步证明了种质资源扩大收集范围的必要性。也高于赵靛^[15]使用 24 对

SSR 引物分析 148 个梅花品种遗传多样性中的 Shannon 多样性指数值(0.984 5)。 PIC 值是评估群体遗传多样性水平的重要指标之一, PIC 值的高低反映了 DNA 变异程度的高低, 若 $PIC > 0.5$ 、 $N_a \geq 5$, 表明该位点遗传变异程度高、选择余地大, 可利用这样的位点进行标记辅助选择^[31]。本研究获得的 PIC 平均值为 0.733 6 ($PIC > 0.500 0$), 高于所查找的 SSR 引物相关文献, 例如 Wang 等^[17]李属植物的 0.690 0, 吴根松等^[19]12 个梅花品种的 0.695 0, 张俊卫^[20]135 个梅花品种的 0.645 0, 赵靛^[15]148 个梅花品种的 0.502 1 和从睿等^[23]康定樱桃的 0.730 0, 说明本研究的引物很适合多态性评估。相比之前报道的用于梅花种质遗传多样性分析的 SRAP (sequence-related amplified polymorphism, SRAP)、ISSR (inter-simple sequence repeat, ISSR) 标记的 PIC 值(0.512 0, 0.671 2)要高^[20], 表明相较于其他标记技术而言, 这些 SSR 标记所在的基因序列在梅中多态性程度相对较高。与观测杂合度相比, 期望杂合度不受样本量影响, 可作为最适

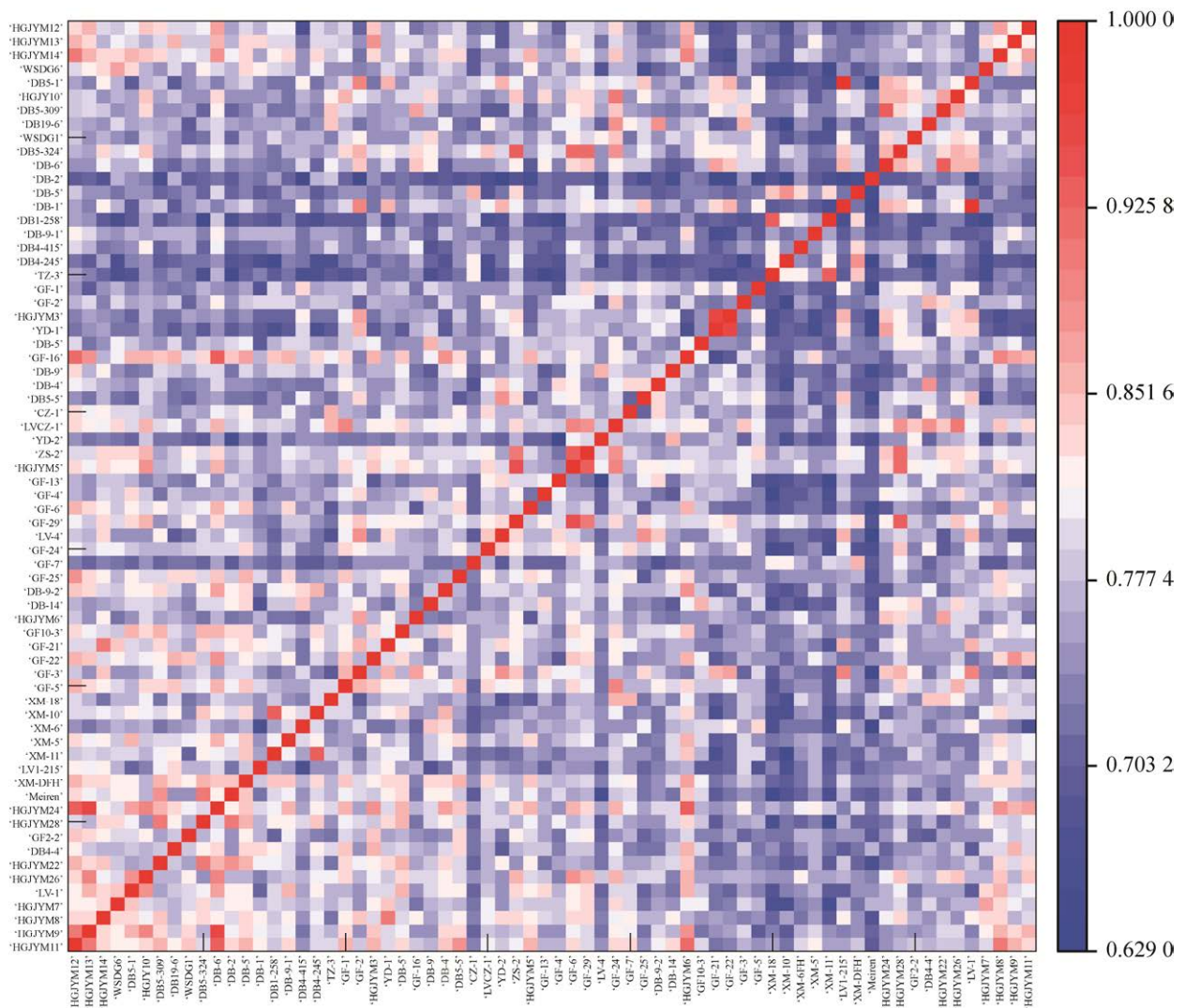


图 2 68 份供试材料的遗传相似系数热图

Figure 2 Heat map of genetic similarity coefficient of 68 tested materials.

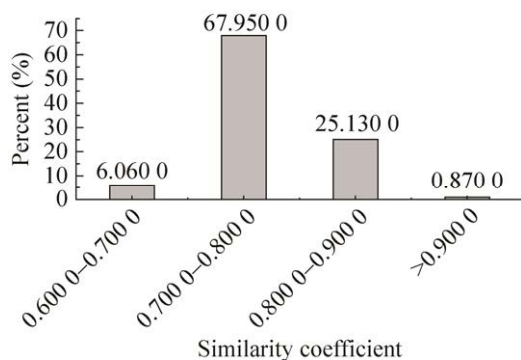


图 3 68 份供试材料的遗传相似系数

Figure 3 The genetic similarity coefficient of 68 tested materials.

遗传多样性指数来反映遗传一致性程度^[32]。本研究期望杂合度高达 0.769 3, 大于赵靛前期利用 23 对引物对 148 份梅花遗传多样性研究的 He 值(0.565 5)^[15], 说明供试材料遗传一致度高。此外, 遗传相似性系数平均为 0.772 9, 表明从群体来看, 花果兼用梅群体的亲缘关系相对较近, 遗传相似度较高。相关研究表明, 种群间遗传距离与地理距离之间呈正相关^[33]。供试材料的地理距离近, 遗传距离小, 遗传背景相似, 因此亲缘关系较近, 这与王梓煦等^[34]的

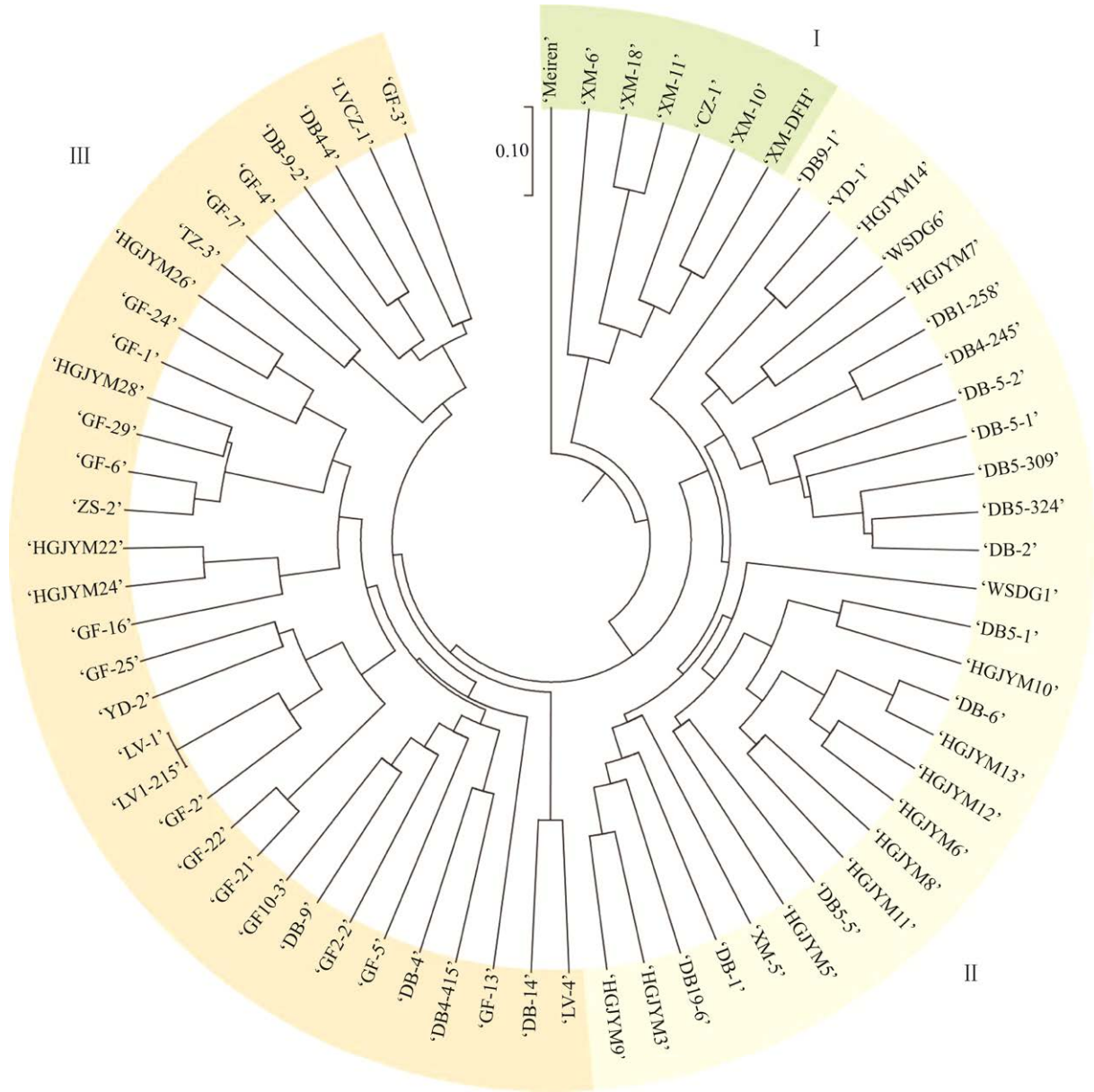


图 4 68 份供试材料的聚类分析图

Figure 4 Cluster dendrogram of 68 tested materials.

研究结论相似。

3.2 群体结构分析与聚类分析

本研究基于 Nei's 遗传距离利用 UPGMA 方法进行聚类分析，将 68 份花果兼用梅种质分为 3 大类，聚类结果和梅花品种分类体系并不完全一致，推测由于供试材料具有丰富的遗传多样性，易受环境条件和基因显隐性的影响，

遗传表达不稳定^[35]，导致部分表型性状发生变异，也可能是供试材料地理距离较近，不同品种种群梅花基因交流较为频繁，使得玉蝶品种群的 'YD-2' 出现了花瓣呈淡粉色的特征，玉蝶品种群的 'YD-1' 呈现单瓣性状，单瓣品种群的 'DB-14' 出现萼片绿色的性状，宫粉品种群的 'GF-6' 出现木质部呈红色的性状。同时发现玉

蝶型、宫粉型、绿萼型和部分单瓣型梅花之间较为混杂难以分类，这与殷婧^[36]、赵靛^[15]和卓孝康^[37]的研究结论一致，可能是杂交育种等人为干预的结果。本研究中，大部分杏梅品种群都可以被区分，只有‘XM-5’没有聚在同一类群，推测不同的杏梅品种是由梅和杏杂交而来，来源较为复杂，也可能是部分杏梅单株是实生苗，其祖先为混合来源。此外，本研究发现来自同一品种群同名的品种并没有聚在同一类，如‘DB-9-1’和‘DB-9-2’，这表明花果兼用梅品种可能存在换种现象。因此在今后的研究中可以使用形态学标记结合 SSR 分子标记技术的方法更精准地进行种质鉴定。

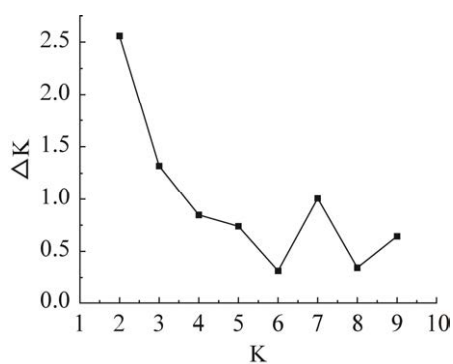


图 5 K 值曲线图

Figure 5 K value curve.

前期的研究将 $Q \geq 0.600$ 视为血缘相对比较单一， $Q < 0.600$ 视为具有混合来源^[38]。本研究

发现供试的 64 份材料遗传背景单一，基因分化程度有限，遗传变异可能多发生于群体内^[39]。一方面可能是由于这批种质多为栽培种、参与了大量人工驯化和改良利用，印证了聚类分析结果^[40]。另一方面梅花属虫媒的自花授粉植物，花粉传播距离低于风媒花，虽分布范围较广，但多呈片段化分布，致使花粉和种子难以大范围交流，阻碍其群体间的遗传分化，且群体间的基因交流频率，一定程度上影响了群体遗传结构^[32]。除部分单瓣品种群‘WSDG6’ ‘DB-14’ ‘DB4-415’和宫粉品种群‘GF-4’为混合种源外，再次印证了卓孝康^[37]的研究结论：单瓣品种群和宫粉品种群的遗传结构最为复杂，分散在其他各个品种群，遗传多样性在个体层面表现出较高的丰富度，这个结论与本研究得到的群体遗传结构简单，群体水平上遗传分化程度较低，个体水平上遗传变异丰富的结论相吻合^[41-42]。同时梅花作为我国具有 3 000 多年的栽培历史的木本植物，在漫长的自然进化和历史选择中会积累更多变异，产生更丰富的遗传多样性。前人对沙枣^[34]和伞花木^[43]的研究表明，遗传杂合度与遗传多样性呈正相关。本研究中遗传杂合度较高可能是由于梅花具有较强的萌蘖能力，有利于保持由变异、固定杂合以及有性繁殖而产生的杂合子。在后续的花果兼用梅选育工作中应重视单株优树选择和新种质的创制。



图 6 基于 SSR 标记的 68 份供试材料的群体遗传结构(K=2)

Figure 6 Population genetic structure of 68 tested materials based on SSR markers (K=2). Red: Subgroup 1; Green: Subgroup 2. The height of the colors indicates the proportion of each individual belonging to the respective group.

表 5 68 份种质分子身份编码

Table 5 Molecular identity code of 68 accessions

Germplasm name	Molecular ID	Germplasm name	Molecular ID
'HGJYM12'	MAEG16AH2S3A5	'GF-4'	E76E4439AJ47F
'HGJYM13'	LAGG1EAFDMDA5	'GF-6'	O3OI11422F936
'HGJYM14'	5CFI1BAC4FBC6	'GF-29'	S1OK11D22FD16
'WSDG6'	K7EM1CD22M37A	'LV-4'	93LKFGF366831
'DB5-1'	L8GG1CD938D85	'GF-24'	E9OM46A22FD9B
'HGJYM10'	L3GG4ED2EFD35	'GF-7'	873LE6DMHP975
'DB5-309'	7A5E16AG45QAA	'GF-25'	93674174AJ23B
'DB19-6'	F6AJ35912EO65	'DB-9-2'	9A1G4129BQ9A3
'WSDG1'	Q4EH19A7JED45	'DB-14'	9AL16567668A7
'DB5-324'	I75E15A628Q7B	'HGJYM6'	L6EE16A53B365
'DB-6'	L9GG16AF3MD95	'GF10-3'	E2DJ41FA2B52B
'DB-2'	J75E26DG48F7B	'GF-21'	64K7E559FD944
'DB-5'	67EH36A525P76	'GF-22'	64K74551FD94F
'DB-1'	CAFM35AOGRLA5	'GF-3'	E67K31A4ANE6C
'DB1-258'	86EF3DC525K6B	'GF-5'	A14845H15A31B
'DB-9-1'	N5IC12AM35J56	'XM-18'	P3M2C2GJ14R38
'DB4-415'	72D715C7CC32C	'XM-10'	11N5A11N2GR1K
'DB4-245'	86HE3DA12CK6B	'XM-6FH'	M3FBD14792I3H
'TZ-3'	D62MB6D7IID6G	'XM-5'	26F451EHJT169
'GF-1'	6AGJ46312KFAA	'XM-11'	R3J5C11J14I38
'GF-2'	64F7415K4K84C	'LV1-215'	64M846F6FC24A
'HGJYM3'	Q9EJ14D57ON96	'XM-DFH'	41N381BH23I1L
'YD-1'	8CFM33D64FBCA	'Meiren'	H6B17882KLM63
'DB-5'	7B5G11D628GB7	'HGJYM24'	B1G8B1FCFH91C
'GF-16'	B3FIB34L4KC3J	'HGJYM28'	G1NI41424FD1D
'DB-9'	C2C746CA68G22	'GF2-2'	E3H846C986A3C
'DB-4'	568G1GAG3C366	'DB4-4'	E61M41ABBQ96B
'DB5-5'	DDIG36972SHD5	'HGJYM22'	B3GKB1ACFHD3J
'CZ-1'	316697E521M18	'HGJYM26'	B3O9E6C24HD3E
'LVCZ-1'	G76I46443R976	'LV-1'	64M846F6FC24A
'YD-2'	9C67165EAJ8CA	'HGJYM7'	C7EA3DAD3H675
'ZS-2'	O1NG11224F915	'HGJYM8'	M9EE3FAC25396
'HGJYM5'	LC9E16A8376C5	'HGJYM9'	G6EI31DI7O765
'GF-13'	B8F7EFC24K98I	'HGJYM11'	N9ED4AA279Q95

3.3 核心引物的选择与分子身份证编码

基于最少引物鉴定最多种质的原则^[44], 本研究中任何一对单一引物均无法区分 68 个花果兼用梅, 依据 *PIC* 值从高到低的顺序, 从一对引物开始, 逐步增加引物对, 直到完全区分 68 个花果兼用梅种质为止。本研究选取 PaCITA19、Pchgmsl-2、Pchgms3、MA017a 和 BPPCT004

共 5 对引物成功构建了 68 个花果兼用梅种质的数字化指纹图谱, 有效地提高了花果兼用梅鉴定的效率和准确度, 可为今后的梅花分子身份证构建提供参考。赵靓^[15]运用了 SSR 标记技术对 23 对引物所形成的电泳图谱进行分析发现, 10 对引物的扩增结果组合起来能区分 148 份梅花种质资源。刘国彬等^[45]发现 13 个引

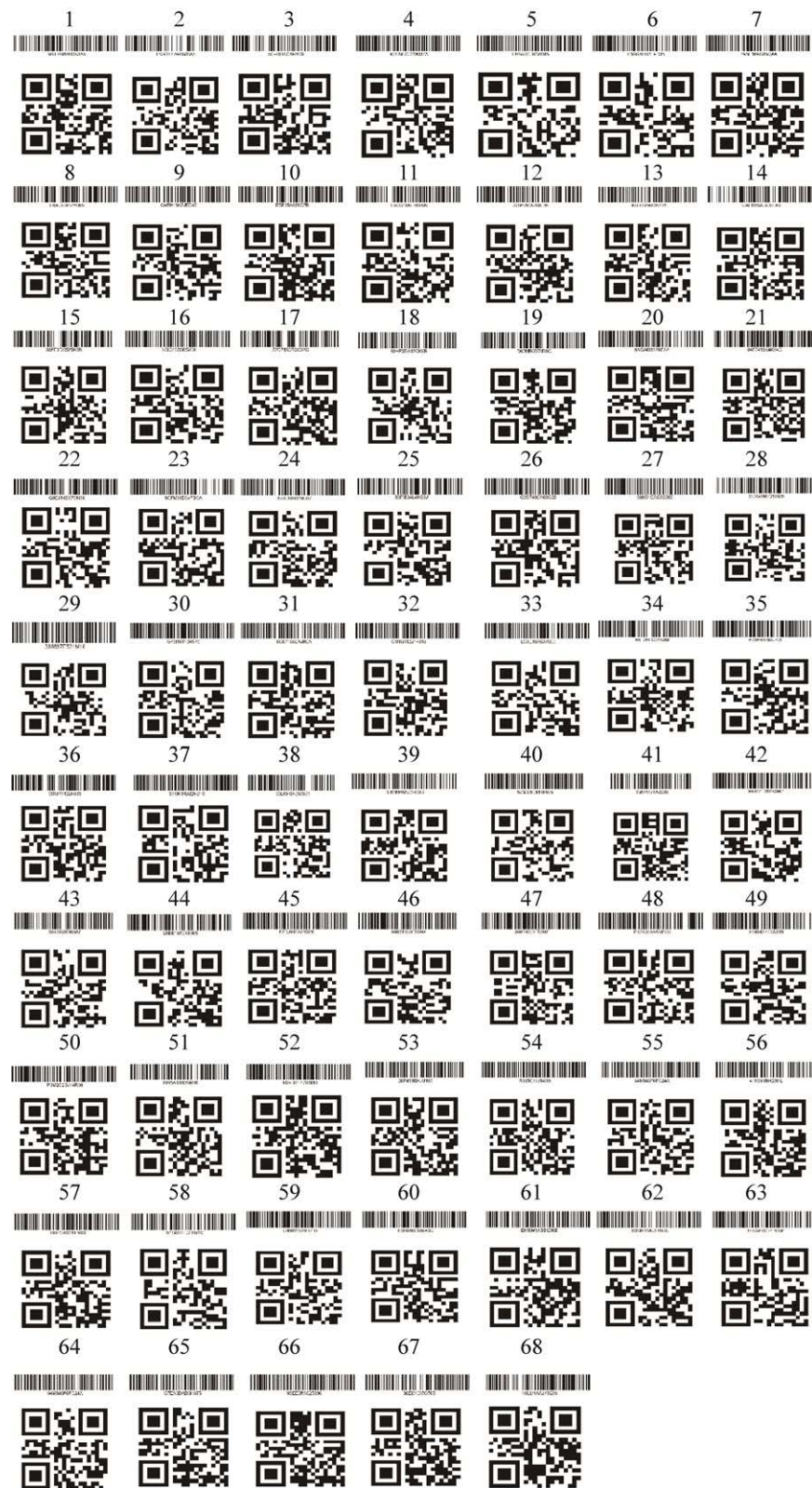


图 7 68 份种质的条形码与二维码身份证

Figure 7 Barcode and two-dimensional code ID cards of 68 accessions.

物对组合可完全区分亲缘关系不同的欧李种质。高源等^[46]利用6对引物可将供试的苹果栽培品种全部区分,区分率达到100%。秦宇等^[28]同样运用此方法,用来自山楂基因组的12对SSR标记构建了91份山楂种质资源的分子身份证。

以往对于梅花种质资源的研究均为利用SSR分子标记技术构建指纹图谱对梅花品种种质资源进行鉴定^[15],尚未见关于DNA分子身份证构建的研究。DNA指纹图谱和DNA分子身份证均为品种鉴定的有效工具,但是二者的概念却有所不同。指纹图谱通过对比电泳图谱中的差异来鉴定品种^[28,46-47],分子身份证是在指纹图谱的基础上运用不同的编码形式将其数字化,辅助以条形码或者二维码的形式,相较于指纹图谱,分子身份证能够通过计算机对各品种进行更加直观的自动比对,克服了人工比对的繁琐,可以应用于大规模的品种鉴定^[9,28,46]。

构建分子身份证的编码方法主要有3类,第1种是采用“0,1”二进制编码方式记录扩增条带的有无,例如冷宇鑫等^[30]的研究。部分研究在二进制的基础上采用十进制(0-9)统计扩增片段大小以获得材料的字符串分子身份证,例如薛亚鹏等^[48]对采用了十进制(0-9)构建了235份中国糜子核心种质的二维码DNA分子身份证。第2种是将每对引物对不同品种扩增条带分子量按从小到大的顺序依次编码为1-9,扩增条带编码超过9条时,将该类带型赋值为0。当引物扩增有2个等位基因时,按碱基数较小的条带编码进行赋值^[49-50]。第3种是根据每对引物对不同品种扩增片段对应的分子量大小,按从小到大依次编码为1-9,条带数超过9,则用A-Z、a-z依次表示,无扩增片段产生的引物位点则用0表示,同时在第2种方法基础上进行创新,结合二维码扫描技术形成条形

码、二维码等形式构建身份证^[9,27-28],第3种方法相较于第2种,一方面保证了分子身份证每1位上对应只有1位数,书写非常简洁,另一方面更为全面地反映了品种信息。本研究综合考虑了所研究物种个性以及统计的效率,选取了第3种方法构建了68份花果兼用梅的分子身份证,利用所筛选的13对引物理论上可区分1336个花果兼用梅品种,符合未来对梅花品种鉴定的需求。

REFERENCES

- [1] 陈俊愉. 中国梅花品种图志[M]. 北京: 中国林业出版社, 2010.
CHEN JY. Atlas of Plum Blossom Varieties in China[M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 2010 (in Chinese).
- [2] 褚孟娜. 中国果树志. 梅卷[M]. 北京: 中国林业出版社, 1999.
CHU MY. China Fruit Chi-Mei Juan[M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 1999 (in Chinese).
- [3] 李冉馨, 李彦, 王佳, 程堂仁, 张启翔, 吕英民. 花果兼用梅新品种选育研究[J]. 北京林业大学学报, 2012, 34(S1): 61-68.
LI RX, LI Y, WANG J, CHENG TR, ZHANG QX, LÜ YM. New cultivar breeding of *Prunus mume* for both ornamental value and fruit production[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2012, 34(Suppl1): 61-68 (in Chinese).
- [4] AHMAD A, WANG JD, PAN YB, SHARIF R, GAO SJ. Development and use of simple sequence repeats (SSRs) markers for sugarcane breeding and genetic studies[J]. Agronomy, 2018, 8(11): 260.
- [5] SATHISHKUMAR R, LAKSHMI PTV, ANNAMALAI A, ARUNACHALAM V. Mining of simple sequence repeats in the genome of *Gentianaceae*[J]. Pharmacognosy Research, 2011, 3(1): 19-29.
- [6] VIEIRA MLC, SANTINI L, DINIZ AL, MUNHOZ CD. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful[J]. Genetics and Molecular Biology, 2016, 39(3): 312-328.
- [7] BAI XQ, ZHANG SJ, WANG W, CHEN Y, ZHAO YQ, SHI FH, ZHU CC. Genetic relationships of 118 *Castanea* specific germplasm and construction of their molecular ID based on morphological characteristics and SSR markers[J]. Plants, 2023, 12(7): 1438.
- [8] 安苗, 王彤彤, 付逸婷, 夏俊俊, 彭锁堂, 段永红. 52个马铃薯遗传多样性分析及SSR分子身份证构建[J]. 生物技术通报, 2023, 39(12): 136-147.
AN M, WANG TT, FU YT, XIA JJ, PENG ST, DUAN

- YH. Genetic diversity analysis and molecular identity card construction by SSR markers of 52 *Solanum tuberosum* L. varieties (lines)[J]. Biotechnology Bulletin, 2023, 39(12): 136-147 (in Chinese).
- [9] 徐雷锋, 葛亮, 袁素霞, 任君芳, 袁迎迎, 李雅男, 刘春, 明军. 利用荧光标记 SSR 构建百合种质资源分子身份证[J]. 园艺学报, 2014, 41(10): 2055-2064. XU LF, GE L, YUAN SX, REN JF, YUAN YY, LI YN, LIU C, MING J. Using the fluorescent labeled SSR markers to establish molecular identity of Lily germplasms[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2014, 41(10): 2055-2064 (in Chinese).
- [10] 万映伶, 金亦佳, 刘爱青, 朱梦婷, 刘燕. 不同栽培地芍药品种资源遗传多样性的 SSR 分析比较[J]. 园艺学报, 2023, 50(4): 875-884. WAN YL, JIN YJ, LIU AQ, ZHU MT, LIU Y. Genetic diversity of Chinese herbaceous peony resources from various cultivation areas based on SSR markers[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2023, 50(4): 875-884 (in Chinese).
- [11] 李晓颖, 宋长年, 张彦苹, 王玉娟, 章镇, 房经贵. 果梅 RAPD 标记不同电泳指纹比较及扩增产物序列分析[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2010, 34(5): 29-33. LI XY, SONG CN, ZHANG YP, WANG YJ, ZHANG Z, FANG JG. Comparison of RAPD fingerprints of fruiting Mei generated by different electrophoresis and characterization of the amplified sequences[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2010, 34(5): 29-33 (in Chinese).
- [12] 王玉娟, 房经贵, 于华平, 汪诗珊, 李晓颖, 陈翔高. 基于改良 RAPD 标记的花梅与果梅品种的遗传关系分析[J]. 植物资源与环境学报, 2011, 20(2): 28-34. WANG YJ, FANG JG, YU HP, WANG SS, LI XY, CHEN XG. Analysis of genetic relationship of flowering and fruiting Mei cultivars based on modified RAPD marker[J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2011, 20(2): 28-34 (in Chinese).
- [13] 侍婷, 张其林, 高志红, 章镇, 庄维兵. 2 个果梅品种雌蕊分化进程及相关生化指标分析[J]. 植物资源与环境学报, 2011, 20(4): 35-41. SHI T, ZHANG QL, GAO ZH, ZHANG Z, ZHUANG WB. Analyses on pistil differentiation process and related biochemical indexes of two cultivars of *Prunus mume*[J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2011, 20(4): 35-41 (in Chinese).
- [14] GARCÍA-GÓMEZ B, RAZI M, SALAZAR JA, PRUDENCIO AS, RUIZ D, DONDINI L, MARTÍNEZ-GÓMEZ P. Comparative analysis of SSR markers developed in exon, intron, and intergenic regions and distributed in regions controlling fruit quality traits in *Prunus* species: genetic diversity and association studies[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2018, 36(1): 23-35.
- [15] 赵靓. 基于 SSR 标记的梅花遗传多样性分析与杂交育种[D]. 北京: 北京林业大学, 2019.
- ZHAO L. Genetic diversity analysis and hybrid breeding of *Prunus mume* based on SSR markers[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2019 (in Chinese).
- [16] LI JL, WANG S, YU J, WANG L, ZHOU SL. A modified CTAB protocol for plant DNA extraction[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2013, 48(1): 72-78.
- [17] WANG R, LI X, ZHANG W, OU JM, FANG CW, SONG QQ, ZHOU HY. SSR analysis and fingerprint construction to evaluate the genetic diversity of medicinal plum varieties[J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2022, 31(1): 1-11.
- [18] HAYASHI K, SHIMAZU K, YAEGAKI H, YAMAGUCHI M, IKETANI H, YAMAMOTO T. Genetic diversity in fruiting and flower-ornamental Japanese apricot (*Prunus mume*) germplasms assessed by SSR markers[J]. Breeding Science, 2008, 58(4): 401-410.
- [19] 吴根松, 孙丽丹, 张启翔, 潘会堂, 蔡明. 基于近缘物种 SSR 引物和 EST-SSR 序列的梅花 SSR 引物开发[J]. 北京林业大学学报, 2011, 33(5): 103-108. WU GS, SUN LD, ZHANG QX, PAN HT, CAI M. Development of Mei flower's SSR primers from closely related species' SSR and EST-SSR[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2011, 33(5): 103-108 (in Chinese).
- [20] 张俊卫. 基于 ISSR、SRAP 和 SSR 标记的梅种质资源遗传多样性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010. ZHANG JW. Genetic diversity of plum germplasm resources based on ISSR, SRAP and SSR markers[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2010 (in Chinese).
- [21] 高志红. 果梅核心种质的构建与分子标记的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2003. GAO ZH. Construction of core germplasm of *Prunus mume* and study on molecular markers[D]. Beijing: China Agricultural University, 2003 (in Chinese).
- [22] 樊晓梅. 利用 SSR 鉴定观赏桃种质资源亲缘关系的研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2013. FAN XM. Study on genetic relationship of ornamental peach germplasm resources by SSR[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [23] 从睿, 张开文, 伊贤贵, 李蒙, 王贤荣. 基于 SSR 标记的 201 份康定樱桃种质资源 DNA 指纹图谱构建[J]. 分子植物育种, 2020, 18(20): 6776-6784. CONG R, ZHANG KW, YI XG, LI M, WANG XR. Construction of DNA fingerprinting with SSR markers for 201 Kangding cherry (*Cerasus tatsienensis*) accessions[J]. Molecular Plant Breeding, 2020, 18(20): 6776-6784 (in Chinese).
- [24] NAWAZ MA, KRUTOVSKY KV, MUELLER M, GAILING O, KHAN AA, BUERKERT A, WIEHLE M. Morphological and genetic diversity of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) in the karakoram mountains of northern Pakistan[J]. Diversity, 2018, 10(3): 76.

- [25] 樊文强, 盖红梅, 孙鑫, 杨爱国, 张忠锋, 任民. SSR 数据格式转换软件 DataFormater[J]. 分子植物育种, 2016, 14(1): 265-270.
FAN WQ, GAI HM, SUN X, YANG AG, ZHANG ZF, REN M. Dataformater, a software for SSR data formatting to develop population genetics analysis[J]. Molecular Plant Breeding, 2016, 14(1): 265-270 (in Chinese).
- [26] EVANNO G, REGNAUT S, GOUDET J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study[J]. Molecular Ecology, 2005, 14(8): 2611-2620.
- [27] 吴仕蔓, 娄兵海, 陈传武, 唐艳, 邓崇岭, 武晓晓. 应用 SSR 荧光标记法构建 22 个柚类品种的分子身份证[J]. 果树学报, 2023, 40(4): 605-614.
WU SM, LOU BH, CHEN CW, TANG Y, DENG CL, WU XX. Establishment of molecular identity of 22 pomelo varieties using fluorescent labeled SSR markers[J]. Journal of Fruit Science, 2023, 40(4): 605-614 (in Chinese).
- [28] 秦宇, 郭荣琨, 农惠兰, 王燕, 崔凯, 董宁光. 利用 SSR 荧光标记构建山楂种质分子身份证[J]. 园艺学报, 2024, 51(6): 1227-1240.
QIN Y, GUO RK, NONG HL, WANG Y, DONG NG. Using the fluorescent labeled SSR markers to establish molecular identity of main hawthorn varieties and hawthorn related species[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2024, 51(6): 1227-1240 (in Chinese).
- [29] 李文秀, 李进良, 贺军军, 张华林, 罗萍, 魏滢, 赵美婷. 基于 SSR 标记的砂仁种质资源遗传多样性与群体结构分析[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(17): 4618-4626.
LI WX, LI JL, HE JJ, ZHANG HL, LUO P, WEI Y, ZHAO MT. Genetic diversity and population structure of germplasm resources of *Amomum villosum* based on SSR markers[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2022, 47(17): 4618-4626 (in Chinese).
- [30] 冷宇鑫, 闵义, 付阳云, 周奎, 何颖, 文晓鹏. 贵州荞麦重要种质的遗传多样性分析及分子身份证构建[J]. 华中农业大学学报, 2024: 1-10.
LENG YX, MIN Y, FU YY, ZHOU K, HE Y, WEN XP. Genetic diversity and ID construction of important buckwheat germplasm in Guizhou Province based on SSR markers[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2024: 1-10 (in Chinese).
- [31] 毕宁宁, 侯立娜, 王天琪, 阮坤非, 张静菊, 刘忠华. 基于转录组测序的玫瑰及其近缘种遗传多样性分析与指纹图谱构建[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2024(9): 1-15.
BI NN, HOU LN, WANG TQ, RUAN KF, ZHANG JJ, LIU ZH. Genetic diversity analysis and fingerprint construction of *Rosa rugosa* and its related species based on transcriptome sequencing[J]. Journal of Northwest A&F University(Natural Sciences. Edition), 2024(9): 1-15 (in Chinese).
- [32] 张俊红, 王洋, 周生财, 吴小林, 吴仁超, 杨琪, 张毓婷, 童再康. 闽楠群体遗传结构分析与核心种质库构建[J]. 林业科学, 2024, 60(1): 68-79.
ZHANG JH, WANG Y, ZHOU SC, WU XL, WU RC, YANG Q, ZHANG YT, TONG ZK. Genetic structure analysis and core germplasm collection construction of *Phoebe bournei* populations[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2024, 60(1): 68-79 (in Chinese).
- [33] 徐刚标, 吴雪琴, 蒋桂雄, 胡尚力, 刘雄盛, 肖玉菲, 郝博博. 濒危植物观光木遗传多样性及遗传结构分析[J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(2): 255-261.
XU GB, WU XQ, JIANG GX, HU SL, LIU XS, XIAO YF, HAO BB. Genetic diversity and population structure of an endangered species: *Tsoongiodendron odorum* Chun[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2014, 15(2): 255-261 (in Chinese).
- [34] 王梓煦, 曾郅涵, 秦孝天, 李子航, 童宇航, 刘克林, 李庆卫. 基于 SSR 分子标记的沙枣遗传多样性分析和指纹图谱构建[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3530-3547.
WANG ZX, ZENG ZH, QIN XT, LI ZH, TONG YH, LIU KL, LI QW. Genetic diversity analysis and fingerprinting of *Elaeagnus angustifolia* based on SSR molecular marker[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3530-3547 (in Chinese).
- [35] 王彩云, 张翔宇, 成忠均, 武新玲, 柳敏, 周茂嫦, 周雪. 基于表型性状及 SSR 标记的天麻种质资源遗传多样性分析[J]. 中药材, 2024, 47(2): 281-289.
WANG CY, ZHANG XY, CHENG ZJ, WU XL, LIU M, ZHOU MC, ZHOU X. Genetic diversity analysis of *Gastrodia elata* germplasm resources based on phenotypic traits and SSR markers[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2024, 47(2): 281-289 (in Chinese).
- [36] 殷婧. 梅花品种资源核基因组 AFLP 及叶绿体基因组 SSR 研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2006.
YIN J. Study on AFLP of nuclear genome and SSR of chloroplast genome of plum blossom variety resources[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2006 (in Chinese).
- [37] 卓孝康. 基于全基因组关联与 QTL 作图解析梅花垂枝性状遗传变异[D]. 北京: 北京林业大学, 2020.
ZHUO XK. Dissection of genetic variation underlying weeping traits in *Prunus mume* Sieb. et Zucc. based on genome-wide association study and QTL mapping[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2020 (in Chinese).
- [38] 卞华, 申晴, 韦海燕, 蒋亚君, 丁西朋, 白昌军. 基于 SSR 标记的桂花草种质资源遗传多样性与群体结构分析[J]. 草业科学, 2019, 36(3): 729-743.
BIAN H, SHEN Q, WEI HY, JIANG YJ, DING XP, BAI CJ. Genetic diversity and population structure analysis of *Stylosanthes* germplasm resources based on SSR markers[J]. Pratacultural Science, 2019, 36(3): 729-743 (in Chinese).
- [39] 陈璇, 郭蓉, 万睿璇, 许艳萍, 张庆滢, 郭孟璧, 郭鸿彦, 杨明. 云南省 5 个雌雄异株工业大麻群体遗传结构评价[J]. 分子植物育种, 2015, 13(9): 2069-2075.

- CHEN X, GUO R, WAN RX, XU YP, ZHANG QY, GUO MB, GUO HY, YANG M. Genetic structure of five dioecious industrial hemp varieties in Yunnan[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2015, 13(9): 2069-2075 (in Chinese).
- [40] 危文亮, 张艳欣, 吕海霞, 王林海, 黎冬华, 张秀荣. 芝麻资源群体结构及含油量关联分析[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(10): 1895-1903.
- WEI WL, ZHANG YX, LÜ HX, WANG LH, LI DH, ZHANG XR. Population structure and association analysis of oil content in a diverse set of Chinese sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(10): 1895-1903 (in Chinese).
- [41] SALENTIJN EMJ, ZHANG QY, AMADUCCI S, YANG M, TRINDADE LM. New developments in fiber hemp (*Cannabis sativa* L.) breeding[J]. *Industrial Crops and Products*, 2015, 68: 32-41.
- [42] 刘加能, 程秋如, 潘登浪, 李炜芳, 彭小芸, 周若茹, 周丽霞, 曾宪海, 刘子凡. 基于 SSR 标记的油棕遗传多样性及群体遗传结构分析[J/OL]. *中国油脂*, [2025-01-22]. <https://doi.org/10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.230668>.
- LIU JN, CHENG QR, PAN DL, LI WF, PENG XY, ZHOU RR, ZHOU LX, ZENG XH, LIU ZF. Analysis of genetic diversity and population genetic structure in oil palm based on SSR markers[J/OL]. *China Oils and Fats*, [2025-01-22]. <https://doi.org/10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.230668> (in Chinese).
- [43] 朱红艳, 康明, 叶其刚, 黄宏文. 雌雄异株稀有植物伞花木(*Eurycorymbus caraleriei*)自然居群的等位酶遗传多样性研究[J]. *武汉植物学研究*, 2005, 23(4): 310-318.
- ZHU HY, KANG M, YE QG, HUANG HW. Allozymic genetic diversity in *Eurycorymbus caraleriei* (levl.) rehd. et hand.-mazz., an endemic and dioecious tree in China[J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2005, 23(4): 310-318 (in Chinese).
- [44] UDDIN N, ALI N, NISAR M, LIU MJ, LIU ZG, MUHAMMAD N, RAHMAN IU. SSR-based population structure, molecular diversity and identity cards of *Ziziphus* species from Pakistan and China[J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2021, 68(6): 2391-2409.
- [45] 刘国彬, 姚砚武, 曹均. 利用荧光 SSR 标记构建欧李种质分子身份证[J]. *东北林业大学学报*, 2022, 50(10): 10-17.
- LIU GB, YAO YW, CAO J. Establishment of molecular identity for *Cerasus humilis* germplasm using fluorescently labeled SSR[J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2022, 50(10): 10-17 (in Chinese).
- [46] 高源, 刘凤之, 王昆, 王大江, 龚欣, 刘立军. 苹果部分种质资源分子身份证的构建[J]. *中国农业科学*, 2015, 48(19): 3887-3898.
- GAO Y, LIU FZ, WANG K, WANG DJ, GONG X, LIU LJ. Establishment of molecular ID for some apple germplasm resources[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(19): 3887-3898 (in Chinese).
- [47] 高运来, 朱荣胜, 刘春燕, 李文福, 蒋洪蔚, 李灿东, 姚丙晨, 胡国华, 陈庆山. 黑龙江部分大豆品种分子 ID 的构建[J]. *作物学报*, 2009, 35(2): 211-218.
- GAO YL, ZHU RS, LIU CY, LI WF, JIANG HW, LI CD, YAO BC, HU GH, CHEN QS. Establishment of molecular ID in soybean varieties in Heilongjiang, China[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2009, 35(2): 211-218 (in Chinese).
- [48] 薛亚鹏, 丁艺冰, 王宇卓, 王晓丹, 曹晓宁, Santra Dipak K, 陈凌, 乔治军, 王瑞云. 基于荧光 SSR 构建中国糜子核心种质 DNA 分子身份证[J]. *中国农业科学*, 2023, 56(12): 2249-2261.
- XUE YP, DING YB, WANG YZ, WANG XD, CAO XN, SANTRA DK, CHEN L, QIAO ZJ, WANG RY. Construction of DNA molecular identity card of core germplasm of broomcorn millet in China based on fluorescence SSR[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2023, 56(12): 2249-2261 (in Chinese).
- [49] 陈昌文, 曹珂, 王力荣, 朱更瑞, 方伟超. 中国桃主要品种资源及其野生近缘种的分子身份证构建[J]. *中国农业科学*, 2011, 44(10): 2081-2093.
- CHEN CW, CAO K, WANG LR, ZHU GR, FANG WC. Molecular ID establishment of main China peach varieties and peach related species[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(10): 2081-2093 (in Chinese).
- [50] 尹跃, 赵建华, 安巍, 李彦龙, 何军, 曹有龙. 利用 SSR 标记构建枸杞品种分子身份证[J]. *生物技术通报*, 2018, 34(9): 195-201.
- YIN Y, ZHAO JH, AN W, LI YL, HE J, CAO YL. Establishment of molecular identity for wolfberry cultivars based on SSR markers[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2018, 34(9): 195-201 (in Chinese).