植物遗传资源学报 2019，20（6）：1494-1505
Journal of Plant Genetic Resources DOI：10.13430/j.cnki.jpgr.20190702001

# 普通菜豆 SSR 分子标记鉴定体系的建立及应用

陈　琼[1]，王兰芬[2]，唐　浩[3]，邓　超[3]，马莹雪[3]，刘玉兵[1]，赵艳杰[3]，冯艳芳[3]，韩瑞玺[3]，刘明月[1]
（[1] 湖南农业大学园艺园林学院，长沙 410128；[2] 中国农业科学院作物科学研究所 / 农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程，北京 100081；[3] 农业农村部科技发展中心，北京 100122）

**摘要：**为了保护育种家合法权益、规范种业市场、提高种子市场监管效率等，本研究拟建立一套普通菜豆品种 SSR 分子标记鉴定体系。首先，遴选 12 个产地不同、植物学形态差异较大的普通菜豆品种，通过聚丙烯酰胺凝胶电泳筛选出 120 对多态性高、条带清晰的 SSR 引物；然后，利用荧光毛细管电泳技术对筛选出的引物多态性在 96 个普通菜豆品种中进一步检测，最终获得在菜豆基因组上均匀分布、多态性高、峰型稳定的 33 对 SSR 核心引物。在此基础上，依据扩增片段长度和荧光标记颜色对核心引物进行分组，并设置参照品种以校正不同实验批次和平台之间的误差，建立了基于 SSR 标记的品种鉴定体系。同时，构建了包含申请品种、保护品种、主栽品种和地方品系在内的 161 个普通菜豆品种的指纹数据库。这套核心引物能够将其中的 140 个品种区分开，遗传相似系数平均值为 0.33，表明这些品种遗传多样性较丰富；未区分开的 21 个品种在产地、父母本、植物学性状等方面极其相似，但能通过部分性状加以区分，表明该套核心引物在辅助近似品种筛选方面非常有效。本研究建立的基于 SSR 分子标记的普通菜豆品种鉴定体系将为其真实性鉴定及 DUS 测试近似品种辅助筛选提供有力支撑。

**关键词：**普通菜豆；SSR 分子标记；品种鉴定；DUS 测试；近似品种筛选

# Establishment and Application of SSR Molecular Marker Identification System for Common Bean（*Phaseolus vulgaris* L.）

CHEN Qiong[1], WANG Lan-fen[2], TANG Hao[3], DENG Chao[3], MA Ying-xue[3], LIU Yu-bing[1], ZHAO Yan-jie[3], FENG Yan-fang[3], HAN Rui-xi[3], LIU Ming-yue[1]
（[1]*College of Horticulture and Landscape*, *Hunan Agricultural University*, *Changsha 410128*; [2]*Institute of Crop Science*, *Chinese Academy of Agricultural Sciences/ National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement*, *Beijing 100081*; [3]*Development Center of Science and Technology*, *Ministry of Agriculture and Rural Affairs*, *Beijing 100122*）

**Abstract:** In recent years, the new varieties breeding of common bean has been developing rapidly, and the number of new varieties and applications for Plant Variety Protection（PVP）has been increasing.In order to protect the legitimate rights and interests of breeders, regulate the seed market and improve the efficiency of the seed market supervision, this study intends to establish common bean identification system based on a set of SSR molecular markers.Firstly, 12 common bean varieties with different origins and botanical morphology were selected, and 120 SSR markers with high polymorphism and clear bands were screened by polyacrylamide gel electrophoresis.Then, 33 SSR core markers with even distribution, high polymorphism and stable peak pattern were obtained in 96 common bean varieties by fluorescence capillary electrophoresis.On this basis, the core markers were grouped according to the length of amplified fragments and the color of fluorescent markers,

**收稿日期：**2019-07-02　　**修回日期：**2019-08-06　　**网络出版日期：**2019-08-22
URL：http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190702001
第一作者研究方向为蔬菜生物技术，E-mail : 963040939@qq.com
通信作者：刘明月，研究方向为设施园艺，E-mail : 13908462154@126.com
韩瑞玺，研究方向为蔬菜 DUS 测试审查及 DNA 分子技术应用，E-mail: wudifeixue007@163.com
**基金项目：**农业行业标准制订和修订；国家自然科学基金 (31772325)；湖南省自然科学基金 (2017JJ2118)
**Foundation project:** Establishment and Revision of Agricultural Industry Standards, The National Natural Science Foundation of China (31772325), The Hunan Natural Science Foundation (2017JJ2118)

and reference varieties were set to correct the errors between different experimental batches and platforms.A variety identification system based on SSR markers was thus established.Meanwhile, a fingerprint database was constructed for 161 common beans for which plant variety protection was applied or which are protected varieties or dominant varieties or landraces.140 varieties can be distinguished by the set of core markers, and the average genetic similarity coefficient is 0.33, showing a high genetic diversity of those varieties.21 varieties that are not distinguished share high similarities in terms of origin, parentage and botanical characters, but they could still be recognized by some traits.The result indicates that the set of core markers are effective in aiding screening of similar varieties.The identification system of common bean based on SSR molecular markers established in this study will provide strong support for variety identification and for assisting selection of similar varieties in DUS tests.

**Key words:** common bean; SSR molecular marker; variety identification; DUS test ; similar varieties selection

普通菜豆（*Phaseolus vulgaris* L.）作为我国主要食用豆类之一，在国内有 600 余年的栽培历史和丰富的种质资源[1]。近年来，随着普通菜豆种质资源的不断挖掘和利用，我国新选育出的品种数量持续上升，新品种权申请数量也逐年增加。同时，普通菜豆为严格的自花授粉植物，常规品种易于繁种，市场上常出现品种混杂现象。由于普通菜豆的表型性状复杂，受环境影响较大，要通过常规的田间表型性状在短时间内完成准确的品种鉴定存在一定的困难。因此，建立一套可靠的鉴定体系对于规范普通菜豆种子市场、保障普通菜豆产业健康发展显得尤为迫切。

分子标记技术能够在一定程度上揭示不同品种基因层面的差异，因此可以作为一种快速的品种鉴定辅助手段。简单重复序列（SSR，Simple Sequence Repeat）因具有共显性、多态性高、结果稳定和重复性好等优点，国际种子联盟（ISF）将其作为品种鉴定的辅助手段。目前，SSR 标记在水稻[2]、棉花[3]、玉米[4]、马铃薯[5]、甘蓝[6]、小豆[7]、葡萄[8]、菠菜[9]、梨[10]、西瓜[11]等作物的品种鉴定和种质资源遗传分析中已经得到了广泛的应用。与其他分子标记相比，SSR 标记在普通菜豆基因组中的分布更为广泛[12]，近年来也一直作为普通菜豆遗传研究的首选标记，目前已经有学者基于 SSR 开展了普通菜豆遗传多样性分析和品种鉴定工作。张赤红等[13]利用 SSR 标记对 377 份普通菜豆种质资源进行了评价；Francesco 等[14]通过荧光 SSR 标记对 78 个哥伦比亚收集到的普通菜豆品种进行了遗传多样性和群体结构分析；Giseli 等[15]用 18 对 SSR 分子标记成功分析了 109 个巴西普通菜豆的遗传多样性；Gioia 等[16]通过相关研究确认了 SSR 标记在研究 192 个普通菜豆高级品种之间遗传变异性和关系上有效性；杨义杰等[17]研究了不同 SSR 检测技术在菜豆品种遗传多样性上的应用。张东杰等[18]公开了一种基于 SSR 分子标记构建菜豆指纹图谱的方法，利用 8 对核心引物通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳能够区分 36 个菜豆品种。

在普通菜豆遗传多样性和品种鉴定相关研究中，SSR 检测方法仍以聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）为主，该方法存在着操作复杂，试剂毒性较大等缺点[19]，而且检测结果需要人工判读，难以保证鉴定结果的准确性。基于基因测序平台开发的荧光毛细管电泳技术，具有较高的灵敏性，操作简便，数据读取过程自动化，在设定参照品种后，能够有效避免平台之间出现的误差，是一项高效准确的品种鉴定方式。目前已经在荧光毛细管电泳的基础上建立了玉米、水稻、大豆、小麦[20]、大白菜[21]、柑橘[22]、花生[23]等作物的高效品种鉴定体系和 SSR 指纹数据库。

DUS 测试即植物新品种的特异性（distinctness）、一致性（uniformity）和稳定性（stability）测试，为品种权保护、品种真实性和纯度鉴定等方面提供了重要技术支撑。在 DUS 测试中，近似品种选择的正确与否，将直接影响到申请品种的特异性判定和品种权确权。目前，常采用的近似品种筛选方法以植物表型数据作为主要依据，该方法往往会受到环境和测试成本等因素限制。基于 SSR 标记构建品种指纹数据库，建立基于遗传距离的近似品种辅助筛选方法可以有效提高筛选效率和准确性，减少 DUS 测试前期工作量[24-25]。国际植物新品种保护联盟（UPOV）也建立了相应的应用模型，将 SSR 标记应用于已知品种库管理，提高近似品种筛选效率。目

前，已经在玉米、高粱和小麦等作物的近似品种辅助筛选上得到了初步应用[26-27]。

为了进一步规范市场秩序，保护相关育种单位和科研人员的合法权益，亟需建立高效菜豆品种鉴定体系。本研究拟筛选出在染色体上均匀分布的SSR核心引物，建立完善的鉴定体系，并建立当前市场上主要普通菜豆品种的SSR指纹数据库，为菜豆品种真实性快速鉴定以及辅助DUS测试近似品种筛选提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

收集普通菜豆品种共161份（表1），其中143份由中国农业科学院作物科学研究所种质库提供，8份由江苏省农业科学院提供，10份由哈尔滨市农业科学院提供。

**表1 本研究中使用的普通菜豆品种**

**Table 1 The common bean varieties used in this study**

| 编号 No. | 品种 Variety | 来源 Origin | 编号 No. | 品种 Variety | 来源 Origin | 编号 No. | 品种 Variety | 来源 Origin |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 紫红四季豆 | 中国云南 | 36 | L208 | 中国山东 | 71 | 西育22 | 中国甘肃 |
| 2 | 紫花腰子豆 | 中国云南 | 37 | L209 | 中国山东 | 72 | 赤青108 | 中国内蒙古 |
| 3 | 品芸优资4338 | 国外 | 38 | L210 | 中国山东 | 73 | 新芸4号 | 中国新疆 |
| 4 | 旱绿地豆 | 国外 | 39 | L213 | 中国山东 | 74 | 新芸5号 | 中国新疆 |
| 5 | L007 | 中国山东 | 40 | 新四通1号 | 中国山东 | 75 | 新芸6号 | 中国新疆 |
| 6 | L756 | 中国黑龙江 | 41 | L184 | 中国黑龙江 | 76 | 苏16-47 | 中国江苏 |
| 7 | 张芸一号 | 中国河北 | 42 | L754 | 中国黑龙江 | 77 | 苏菜11-23 | 中国江苏 |
| 8 | 毕芸1号 | 中国贵州 | 43 | L755 | 中国黑龙江 | 78 | 皋研豆1号 | 中国江苏 |
| 9 | 西安秋紫架豆 | 中国陕西 | 44 | 盛丰 | 中国黑龙江 | 79 | 苏菜豆1号 | 中国江苏 |
| 10 | 阿芸2号 | 中国新疆 | 45 | 品芸1号 | 中国黑龙江 | 80 | 苏菜豆3号 | 中国江苏 |
| 11 | 超级九粒白 | 中国山东 | 46 | 芸丰2号 | 中国黑龙江 | 81 | 苏春秋红菜豆 | 中国江苏 |
| 12 | 连农紫芸1号 | 中国辽宁 | 47 | 奶花芸豆 | 中国黑龙江 | 82 | 花生豆 | 中国云南 |
| 13 | L014 | 中国北京 | 48 | 龙饭豆1号 | 中国黑龙江 | 83 | 齐头豆 | 中国云南 |
| 14 | 早无筋架豆 | 中国北京 | 49 | 龙芸豆5号 | 中国黑龙江 | 84 | 黄粒四季豆 | 中国云南 |
| 15 | 品芸2号 | 中国北京 | 50 | 龙芸豆9号 | 中国黑龙江 | 85 | 细白羊角豆 | 中国云南 |
| 16 | 中蔬菜豆1号 | 中国北京 | 51 | 龙芸豆11号 | 中国黑龙江 | 86 | 白色腰子豆 | 中国云南 |
| 17 | 中蔬菜豆3号 | 中国北京 | 52 | 龙芸豆13 | 中国黑龙江 | 87 | L046 | 美国 |
| 18 | 中蔬菜豆4号 | 中国北京 | 53 | 龙芸豆16 | 中国黑龙江 | 88 | 碧丰 | 荷兰 |
| 19 | 中蔬菜豆6号 | 中国北京 | 54 | 龙270270 | 中国黑龙江 | 89 | 供给者 | 美国 |
| 20 | L183 | 中国河北 | 55 | 龙270704 | 中国黑龙江 | 90 | 龙23-001NR | 美国 |
| 21 | 芸资2号 | 中国河北 | 56 | 龙270705 | 中国黑龙江 | 91 | 北京小黑芸豆 | 国外 |
| 22 | 芸资3号 | 中国河北 | 57 | 龙270709 | 中国黑龙江 | 92 | 品芸优资G0470 | 国外 |
| 23 | 芸资4号 | 中国河北 | 58 | 红冠 | 中国黑龙江 | 93 | 品芸优资4422 | 国外 |
| 24 | 中杂芸15 | 中国河北 | 59 | 翠冠 | 中国黑龙江 | 94 | 青皮 | 未知 |
| 25 | 坝上红芸豆 | 中国河北 | 60 | 紫冠 | 中国黑龙江 | 95 | 白丰 | 未知 |
| 26 | 津豆三号 | 中国天津 | 61 | 红金钩 | 中国黑龙江 | 96 | 瑞丰 | 未知 |
| 27 | 英良U2架豆 | 中国天津 | 62 | 哈菜豆9号 | 中国黑龙江 | 97 | 日本白 | 未知 |
| 28 | 英良U4架豆 | 中国天津 | 63 | 哈菜豆17号 | 中国黑龙江 | 98 | 矮金钩 | 未知 |
| 29 | 英良U8架豆 | 中国天津 | 64 | 吉芸1号 | 中国吉林 | 99 | 雀蛋豆 | 中国云南 |
| 30 | 英良大盛四号 | 中国天津 | 65 | 大紫袍架豆 | 中国辽宁 | 100 | 红花皮 | 未知 |
| 31 | 瑞雪168架豆 | 中国天津 | 66 | 春秋紫架豆 | 中国辽宁 | 101 | 黑挤豆 | 未知 |
| 32 | 良选2号地豆王 | 中国天津 | 67 | 老来少架豆 | 中国辽宁 | 102 | 长青1号 | 未知 |
| 33 | 四季白玉988架豆 | 中国天津 | 68 | 连农无筋2号 | 中国辽宁 | 103 | 黄籽豆角 | 未知 |
| 34 | L008 | 中国山东 | 69 | 大连特嫩1号 | 中国辽宁 | 104 | 红发女孩 | 未知 |
| 35 | L207 | 中国山东 | 70 | 851-923-7 | 未知 | 105 | 紫角地豆 | 未知 |

表 1（续）

| 编号 No. | 品种 Variety | 来源 Origin | 编号 No. | 品种 Variety | 来源 Origin | 编号 No. | 品种 Variety | 来源 Origin |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 106 | 日本花脸豆 | 未知 | 125 | 连农特嫩 5 号 | 中国辽宁 | 144 | 矮花皮 | 未知 |
| 107 | 品芸红芸豆 | 国外 | 126 | 连农玉丰架豆 | 中国辽宁 | 145 | 紫豆角 | 未知 |
| 108 | 秋紫豆锅里变 | 未知 | 127 | 苏 81-6 | 中国江苏 | 146 | 黑芸豆 | 未知 |
| 109 | 中蔬菜豆 2 号 | 中国北京 | 128 | 苏菜 016-2 | 中国江苏 | 147 | 将军油豆 | 中国黑龙江 |
| 110 | 中蔬菜豆 5 号 | 中国北京 | 129 | 苏菜 16-27 | 中国江苏 | 148 | 巨丰油豆 | 未知 |
| 111 | 双丰 2 号 | 中国天津 | 130 | 苏 16-46 | 中国江苏 | 149 | 宽荚白莲 | 未知 |
| 112 | L214 | 中国山东 | 131 | 苏 16-117 | 中国江苏 | 150 | 白花架豆 | 国外 |
| 113 | 龙 270240 | 中国黑龙江 | 132 | 苏菜 16-143 | 中国江苏 | 151 | 亮秋油豆 | 未知 |
| 114 | 龙 270267 | 中国黑龙江 | 133 | 苏菜豆 2 号 | 中国江苏 | 152 | 七寸大弯 | 未知 |
| 115 | 龙 270280 | 中国黑龙江 | 134 | 86-2 | 未知 | 153 | 中白芸豆 | 未知 |
| 116 | 龙 22-0579 | 中国黑龙江 | 135 | 351 | 未知 | 154 | 双丰三号 | 中国天津 |
| 117 | 龙芸豆 6 号 | 中国黑龙江 | 136 | GY20-3-1 | 未知 | 155 | 红花白荚 | 未知 |
| 118 | 龙芸豆 14 | 中国黑龙江 | 137 | CG-BB-18 | 未知 | 156 | 意选 1 号 | 未知 |
| 119 | 龙芸豆 15 | 中国黑龙江 | 138 | 飞歌 99 | 未知 | 157 | 大家花雀蛋 | 未知 |
| 120 | 哈菜豆 5 号 | 中国黑龙江 | 139 | 丰产豆 | 未知 | 158 | 双阳大花皮 | 未知 |
| 121 | 哈菜豆 10 号 | 中国黑龙江 | 140 | 白羊角 | 未知 | 159 | 超长四季豆 | 未知 |
| 122 | 哈菜豆 15 号 | 中国黑龙江 | 141 | 红豆宽 | 未知 | 160 | 黄金架油豆 | 未知 |
| 123 | 长农菜豆 3 号 | 中国吉林 | 142 | 红肾豆 | 未知 | 161 | 蒙阴秋不老梅豆 | 未知 |
| 124 | 长农菜豆 8 号 | 中国吉林 | 143 | 黄金钩 | 未知 | | | |

### 1.2　DNA 提取

每个品种取 20 株幼苗的幼嫩叶片混匀，液氮冷冻后采用 CTAB 法[28]提取基因组总 DNA。用 200 μL 超纯水溶解 DNA，经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量和完整性后，Nano Drop 1000 微量分光光度仪（Thermo Fisher Scientific 公司）检测 DNA 浓度，并稀释至 20 ng/μL，于 −20 ℃冰箱保存备用。

### 1.3　SSR 引物

300 对 SSR 引物序列由中国农业科学院作物科学研究所提供，经初步筛选后的引物根据扩增片段长度分别在上游引物 5′端标记 6-FAM、HEX、ROX、TAMRA 荧光染料中的一种。普通引物在上海生工生物工程技术服务有限公司合成，荧光引物由英潍捷基（上海）贸易有限公司合成。

### 1.4　PCR 扩增反应

PCR 反应体系共 20 μL，其中包括 DNA 稀释液 2 μL、SSR 上下游引物（浓度 0.25 μmol/L）各 0.5 μL、2 × PCR 反应混合液 10 μL 和 7 μL 超纯水。PCR 程序为：95 ℃ 5 min；95 ℃ 40 s，54 ℃ 45 s，72 ℃ 40 s，共 35 个循环；72 ℃ 10 min，4 ℃保存。

### 1.5　扩增产物检测

普通 PCR 产物进行 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳，在 70 W 恒定功率下电泳 1.5~2 h 后用硝酸银染色法[29]检测扩增产物，晾干后置于凝胶透射灯上观察、拍照、记录并分析。

荧光标记引物的扩增产物稀释后混合，取 1 μL 混合产物稀释液加入深孔板，每孔加入 0.1 μL LIZ500 和 8.9 μL 的去离子甲酰胺，混匀后 95 ℃变性 5 min，冷却后利用 ABI3730 基因分析仪进行片段分析。用 Date Collection 3.0 收集原始数据，通过 SSR Analyser（V1.2.6）分析所得数据[30]。

### 1.6　数据分析

通过 Power Marker V 3.25[31]计算引物的 PIC（Polymorphism Information Content）值，对引物多态性进行评价；对所得的 SSR 指纹数据基于 Nei′s 遗传距离，通过邻接法进行聚类分析，构建树状聚类图。

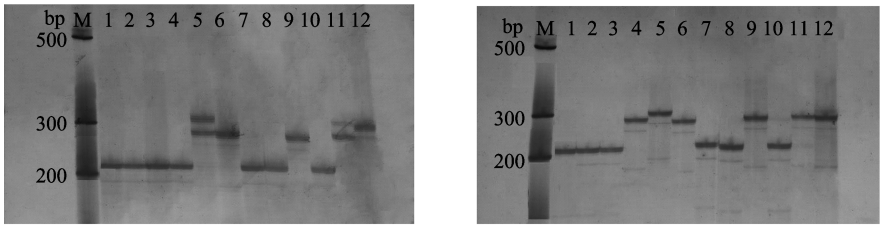
### 1.7　核心引物与表型性状分类结果相关性分析

搜集核心引物未区分品种的相关资料，将未明确原产地、父母本、植物学性状等背景的 7 个菜豆品种进行田间 DUS 测试。选取 1 对差异位点为 1 的品种作对照，进一步验证核心引物筛选近似品种的有效性。试验在农业农村部植物新品种测试（北京）分中心廊坊基地进行，9 个菜豆品种于 2019 年 3 月 20 日播种，出苗后按照《植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南　菜豆》（NY/T 2427-2013）中规定的方法进行记录和测量，统计品种间植物学性状的差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 核心引物筛选

选取12个来源于不同产地、植物学性状差异大的普通菜豆品种用于引物的初步筛选。利用300对引物对这12个品种进行PCR扩增，扩增产物通过6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测，对引物的扩增稳定性及多态性进行分析，筛选出120对条带清晰、多态性高和扩增稳定的引物。图1为引物CBS58和CBS131在12个品种中的扩增产物电泳检测结果。




M：250 bp DNA Marker；图中编号1~12分别与表1中品种序号对应

M：250 bp DNA Marker，Numbers 1-12 in the figure correspond to the varieties number in Table 1

**图1 引物CBS58（a）和CBS131（b）在12个菜豆品种中扩增产物的多态性**

**Fig.1 The polymorphism of primers CBS58（a）and CBS131（b）in 12 common bean varieties**

初步筛选得到的120对引物根据其扩增片段长度选取6-FAM、ROX、TAMRA、HEX中的一种荧光染料在上游引物的5′端进行荧光标记，利用合成的荧光引物对96个品种（表1，编号为13~108）进行扩增，扩增产物稀释后在ABI 3730基因分析仪上进行片段分析，根据峰图简单易读取、多态性高、扩增定性高、染色体上分布均匀的原则，最终确定了33对核心引物用于建立菜豆高通量品种鉴定体系。这些引物的*PIC*值在0.34~0.834之间，平均为0.63。按照*PIC*值在0.25~0.50之间为中度多态性，大于0.50为高多态性为标准[32]，33对核心引物中有27对*PIC*大于0.5，表明核心引物的多态性较高。其中引物CBS250的*PIC*值最高，为0.834。图2为引物CBS250在6个菜豆品种中检测到的等位变异。

### 2.2 构建品种鉴定体系及SSR指纹数据库

为了提高检测效率，根据荧光标记颜色和等位变异范围将核心引物分为8组（表2），对161个菜豆品种进行检测，统计33对引物等位变异大小数据，对原始数据取整为等位变异命名，并为所有引物的等位变异选取参照品种，详见http：//doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190702001附表1，以矫正不同试验批次和仪器间的误差，保证各批次和不同检验平台间菜豆指纹SSR指纹采集的准确性和一致性[21]。33对核心引物在161个菜豆品种中共检测到237个等位变异，每个引物的等位变异数为3~20个，平均为7.2个，其中CBS206引物检测到的等位变异数最多，为20个。

### 2.3 核心引物鉴别效率分析

为了验证核心引物区分品种的准确性和效率，对核心引物在161个品种中等位基因的频率及遗传多样性进行分析。结果表明：33对核心引物能够将140个品种区分开，品种间的遗传距离在0.009~1.00之间，平均值为0.667。聚类分析将供试菜豆品种分为4个类群（图3），第Ⅰ类群包含35个品种，其中以中国东北（黑龙江、吉林、辽宁）和西北地区（新疆、甘肃）的品种为主；第Ⅱ类群有30个品种，其中大部分为中国东北地区品种，另外包含了部分中国西南地区（云南、贵州）菜豆品种；第Ⅲ类群涵盖的品种较多，共包含78个品种，其中以中国华东（江苏）和华北（河北、北京、天津等）居多，同时也包含了少量中国东北地区和国外引进的品种；第Ⅳ类群包含的品种以中国国东北地区的为主。从聚类结果看，西北和西南地区品种分布在3个类群中，东北地区的菜豆品种在4个类群中均有分布，表明这3个地区的品种遗传多样性较高。其中，来源于辽宁省的菜豆品种只分布在第Ⅲ类群中，而其他3个类群中的东北品种均来源于黑龙江。此外，从美国、荷兰、英国等地引进的国外品种遗传多样性较为丰富，在4个类群中均有分布。同时，黑龙江省农业科学院和哈尔滨市农业科学院选育的系列品种聚类结果表明（图4），同一育种单位使用相同父母本选育出的品种遗传距离更近，被优先聚在一起，而不同育种单位选育的品种间差异较大、多样性较好。聚类结果表明：核心引物具备较高的鉴别力度，能将亲缘关系较远的品种区分开，将亲缘关系较近的品种聚在一起。

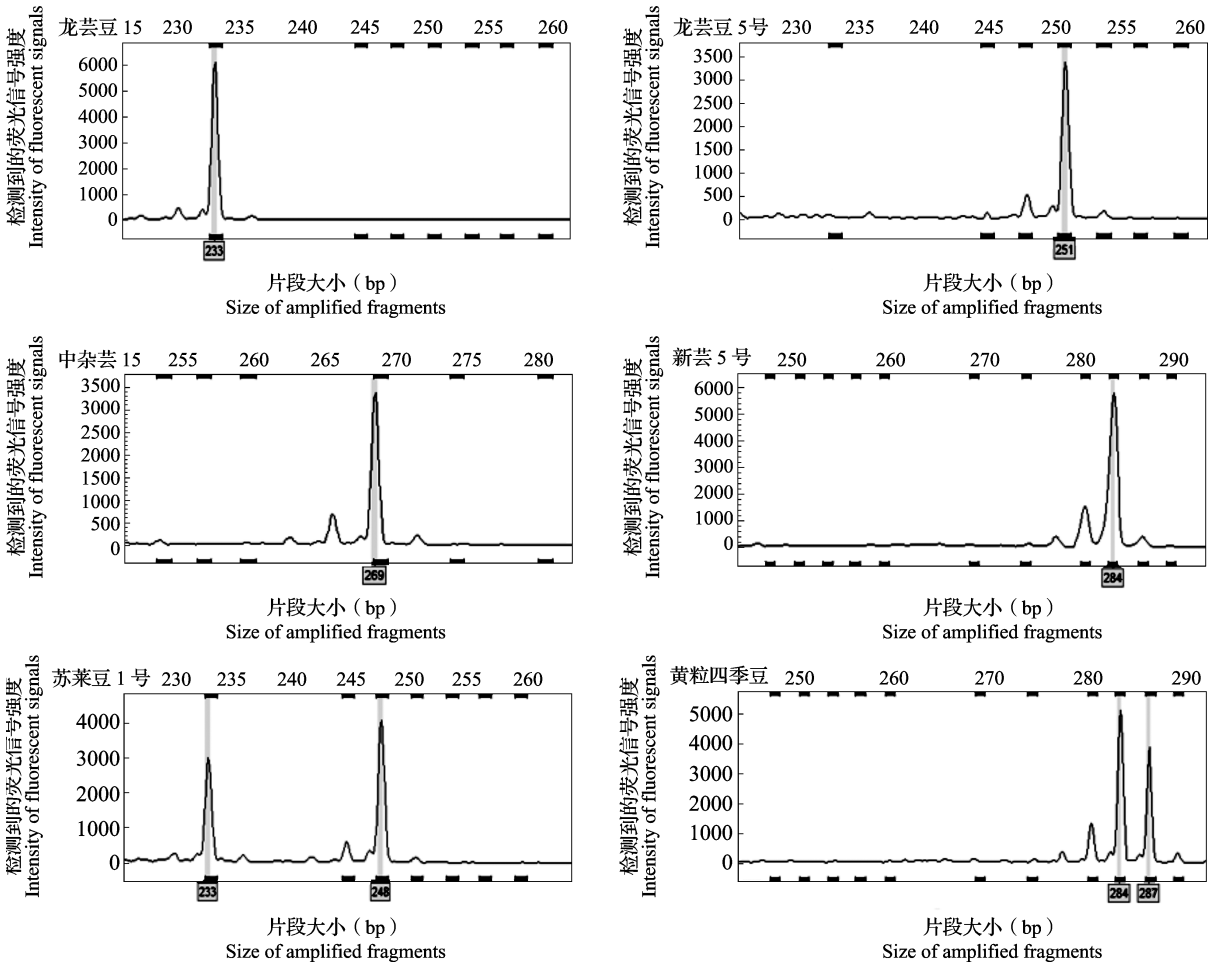



**图 2　引物 CBS250 在 6 个品种中检测到的等位变异**

**Fig.2　Polymorphism of primer CBS250 in 6 common bean varieties**

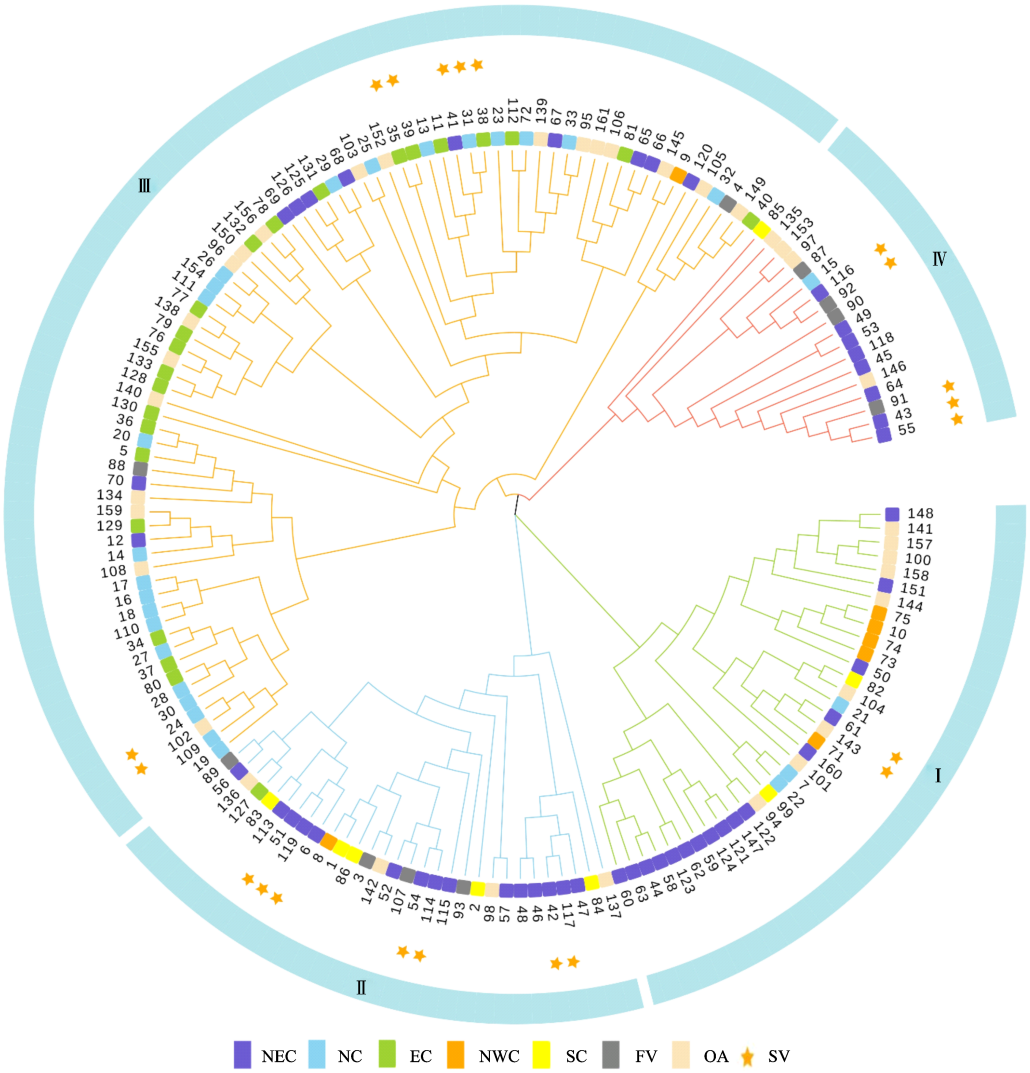
**表 2　33 个菜豆核心引物分组**

**Table 2　Grouping of 33 primer labeled by fluorescence**

| 组<br>Group | 6-FAM 标记引物<br>6-FAM labeled marker | TAMRA 标记引物<br>TAMRA labeled marker | ROX 标记引物<br>ROX labeled marker | HEX 标记引物<br>HEX labeled marker |
|---|---|---|---|---|
| 1 | P11S164（162~184） | | CBS323（211~226） | CBS106（151~205） |
| | | | CBS374（242~269） | |
| 2 | CBS41（280~320） | CBS242（188~209） | CBS187（257~275） | CBS149（220~232） |
| 3 | CBS2（183~201） | CBS131（269~311） | CBS345（216~258） | CBS206（190~283） |
| 4 | P11S3（170~174） | CBS402（223~232） | CBS178（180~225） | CBS28（247~259） |
| | | | CBS302（270~303） | |
| 5 | CBS286（194~233） | CBS219（245~272） | | CBS91（159~213） |
| | | | | CBS267（227~245） |
| 6 | CBS364（223~247） | CBS383（203~209） | CBS162（162~270） | CBS343（220~271） |
| 7 | CBS83（195~248） | CBS11（186~220） | CBS287（248~292） | CBS58（233~290） |
| 8 | CBS250（233~290） | | CBS221（171~199） | CBS42（176~245） |
| | | | CBS138（242~252） | |

表中为根据引物扩增片段长度和荧光标记颜色进行的分组；括号内为等位变异的大小范围，单位为 bp

The table shows the grouping based on the length of amplified fragment and the color of fluorescent marker, the number in brackets indicates the range of alleles, the unit is bp




图中编号 1~161 分别与表 1 中品种序号对应；NEC：中国东北地区品种；NC：中国华北地区品种；EC：华东地区品种；NWC：中国西北地区品种；SC：中国西南地区品种；FV：国外引进品种；OA：中国其他地区品种；SV：遗传相似系数为 1 的品种

Numbers 1-161 in the figure correspond to the variety numbers in Table 1, NEC: Northeast China, NC: North China, EC: East China, NWC: Northwest China, SC: Southwest China, F V: Foreign varieties, OA: Other areas varieties in China, SV: Varieties with a genetic similarity coefficient of 1

**图 3 161 个菜豆品种基于 Nei′s 距离聚类图**

**Fig.3 Dendrogram of 161 varieties of common bean based on Nei′s genetic distance**

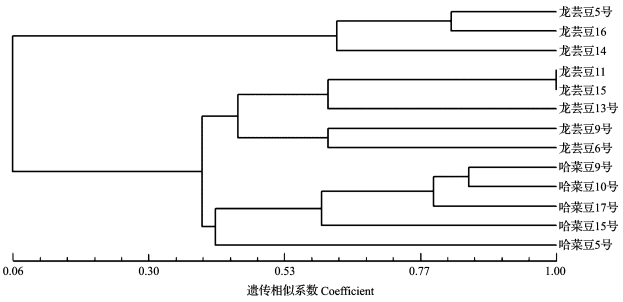



**图 4 黑龙江省农业科学院和哈尔滨市农业科学院育成品种遗传多样性分析**

**Fig.4 Genetic diversity analysis of varieties bred by Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences and Harbin Academy of Agricultural Sciences**

### 2.4 菜豆品种 SSR 指纹数据库在辅助 DUS 测试近似品种筛选上的应用研究

早无筋架豆、津豆三号、盛丰和龙芸豆 5 号为近几年已获得新品种保护权的 4 个菜豆品种，为了探索利用品种间遗传距离辅助筛选 DUS 测试近似品种的可行性，进一步对这 4 个品种及其近似品种的遗传多样性进行了分析（图 5）。在遗传相似系数为 0.33 时 8 个品种被分为 3 个类群，4 个授权品种间的遗传相似度为 0.091~0.515，平均值为 0.268，表明品种间遗传距离较远。4 个授权品种与其近似品种的遗传相似度较高，平均值为 0.674，其中授权品种盛丰和其近似品种将军油豆的遗传相似系数为

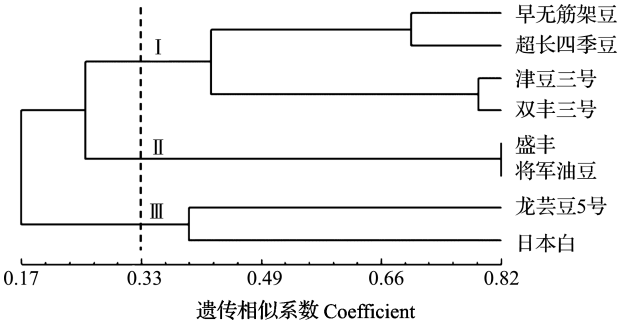



**图 5　4 个授权品种及其近似品种的遗传多样性分析**

**Fig.5　Analysis of genetic diversity of 4 protected varieties and their similar varieties**

0.818。DUS 测试结果表明，这 2 个品种的植物学性状也十分相似，仅在开花期、花翼瓣颜色、荚末端性状等性状上存在明显差异；授权品种津豆三号和其近似品种双丰三号植株和叶片性状完全相同，仅在荚的宽度、荚基色强度以及豆荚纵切面弯曲度等性状上存在明显差异。以上表明，利用已知品种表型数据库筛选近似品种与通过 SSR 指纹数据库筛选近似品种的结果是一致的。

### 2.5　核心引物与表型性状分类结果相关性分析

33 对核心引物未区分的品种共 21 个，其中可将遗传相似系数为 1 的品种分为 9 组（表 3），组内的品种间差异位点为 0，可能为相同或极近似品种。为了进一步验证核心引物的鉴别效率，对这 21 个品种的遗传背景进行分析，其中 14 个品种的分组中存在产地相同、育种单位相同或具有相同父母本等现象，这可能是遗传距离比较接近的原因。例如，品芸优资 G0470、龙 22-0579 和品芸 2 号均来源于黑龙江，且株高、叶片性状、花色、豆荚性状、籽粒性状都极其相似，仅在结荚习性和种皮光泽度等方面存在差异；龙 270267 和龙 270270 也来自黑龙江，为具有相同的父母本、植物学性状极其相似的姊妹系品种[33]。

**表 3　21 个高遗传相似度品种分组**

**Table 3　Groups of 21 high genetic similarity varieties**

| 品种 Variety | 分组 Group | 品种 Variety | 分组 Group | 品种 Variety | 分组 Group | 品种 Variety | 分组 Group |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 龙 270270 | | 龙芸豆 15 | | 龙 270704 | 9 | L184 |
| | 龙 270267 | 4 | L207 | | 北京小黑芸豆 | | L210 |
| 2 | L754 | | L213 | 7 | 龙 22-0579 | | 瑞雪 168 架豆 |
| | 龙芸豆 6 号 | 5 | 红金钩 | | 品芸优资 G0470 | | |
| 3 | L756 | | 黄金钩 | 8 | 长青 1 号 | | |
| | 龙芸豆 11 | 6 | L755 | | 中杂芸 15 | | |

组内品种间遗传相似系数为 1

The genetic similarity coefficient among varieties in each group is 1

对 7 个未明确植物学性状的品种进行 DUS 测试，同时选取了盛丰和哈菜豆 17 号这一对差异位点为 1 的品种作为对照（表 4），这些品种间虽极为相似，但仍可以通过部分性状区分。盛丰和哈菜豆 17 号的差异位点数为 1，植物学性状差异较大，在抽蔓期、花瓣颜色、豆荚性状等方面存在明显差异；瑞雪 168 架豆与 L184 在开花期、叶片绿色程度、荚喙弯曲程度等性状上存在明显差异，而 L210 的叶片绿色程度、顶生小叶大小和开花期等与瑞雪 168 架豆存在差异，顶生小叶形状和荚横切面形状等又能将其与 L184 区分开；中杂芸 15 和长青 1 号在抽蔓始期和豆荚弯曲度和荚末端形状方面存在明显差异；与红金钩相比，黄金钩不能开花结荚，表明其进行生殖生长对环境条件的要求与红金钩不一致。这一结果表明，该套核心引物对普通菜豆分类结果与表型性状分类结果类似，同时验证了基于遗传距离辅助筛选 DUS 测试近似品种的有效性。

## 3　讨论

### 3.1　核心引物有效性评价

为了保证筛选出的引物具备高覆盖性和广泛的适应性，本试验用于筛选核心引物的品种充分考虑到了地域环境因素，所用品种原产地包含了中国 14 个主产省、自治区，同时选用了部分国外引进品种。最终筛选出多态性高、扩增稳定，覆盖了全部染色体的 33 对核心引物。这些引物的 *PIC* 平均值为 0.63，有 27 对引物 *PIC* 值大于 0.5，具备高度多态性。利用该套核心引物具有较高的鉴别效率，可以将 140 个品种完全区分开，分类结果与植物学分类结果一致。其中来源于东北、西南和西北的普通菜豆品种在多个类群均有分布，具有较高的遗传多样性。可能是因为近几年各菜豆主产区间优质种质资源交

**表4 9个高遗传相似度菜豆品种植物学性状对比**

**Table 4 Comparison of botanical traits of 9 common bean varieties with high genetic similarity**

| 性状 Trait | 盛丰 Shengfeng | 哈菜豆17号 Hacaidou No.17 | 瑞雪168架豆 Ruixue168 jiadou | L184 | L210 | 中杂芸15 Zhongzayun15 | 长青1号 Changqing No.1 | 红金钩 Hongjingou | 黄金钩 Huangjingou |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 抽蔓始期(月·日) Sprouting period | 4·22 | 5·6 | 4·28 | 4·28 | 4·28 | 4·24 | 4·20 | 4·24 | 4·30 |
| 叶片绿色程度 Blade greenness | 中到深 | 中到深 | 浅 | 浅到中 | 中 | 深 | 深 | 中 | 浅到中 |
| 叶片凹凸程度 Blade roughness | 中 | 中 | 中 | 中 | 弱到中 | 中到强 | 中到强 | 弱到中 | 弱到中 |
| 顶生小叶大小 Terminal leaflet size | 中到大 | 中到大 | 中 | 小到中 | 小到中 | 大 | 大 | 中 | 中 |
| 顶生小叶形状 Terminal leaflet shape | 菱形 | 菱形 | 三角形 | 三角形 | 菱形 | 菱形 | 菱形 | 三角形 | 三角形 |
| 开花期(月·日) Flowering period | 5·5 | 5·6 | 5·9 | 5·13 | 5·13 | 5·4 | 5·4 | 5·17 | / |
| 花旗瓣颜色 Citiulus color | 粉色 | 粉白色 | 粉白色 | 粉白色 | 粉白色 | 白色 | 白色 | 粉白色 | / |
| 花翼瓣颜色 Wing color | 粉白色 | 粉色 | 白色 | 白色 | 白色 | 白色 | 白色 | 白色 | / |
| 荚基色强度 Colour intensity of pod | 中 | 中 | 浅 | 浅 | 浅 | 中 | 中 | 浅 | / |
| 荚斑纹 Pod pattern | 有 | 有 | 无 | 无 | 无 | 无 | 无 | 有 | / |
| 荚斑纹色 Pod pattern color | 红色 | 红色 | / | / | / | / | / | 红色 | / |
| 荚斑纹色强度 Pod pattern color intensity | 弱到中 | 极弱或无 | / | / | / | / | / | 强 | / |
| 荚腹缝线纤维 Pod abdominal suture | 无 | 无 | 有 | 有 | 有 | 无 | 无 | 无 | / |
| 荚弯曲度 Pod curvature | 无或极弱 | 弱 | 弱 | 弱 | 弱 | 中 | 弱 | 弱 | / |
| 荚末端形状 Pod terminal shape | 尖至钝 | 尖至钝 | 尖至钝 | 尖至钝 | 尖至钝 | 尖 | 尖至钝 | 尖至钝 | / |
| 荚喙弯曲程度 Curvature of beak | 弱 | 弱 | 弱 | 弱到中 | 弱到中 | 中 | 中 | 无 | / |
| 荚横切面形状 Pod transverse shape | 卵圆形 | 卵圆形 | 卵圆形 | 心形 | 卵圆形 | 心形 | 心形 | 卵圆形 | / |
| 荚质地类型 Pod texture type | 硬荚 | 硬荚 | 硬荚 | 硬荚 | 硬荚 | 软荚 | 软荚 | 软荚 | / |

/: 未观测到相关数据 /: No relevant data observed

流的加强,育成的品种逐渐具备较丰富的遗传背景;此外,同一育种单位在选育新品种的过程中往往会重复使用相同亲本,因而出现了同系列品种遗传相似性较高的现象。

本研究中有21个普通菜豆品种两两之间或3个品种之间的差异位点为0,遗传上表现为相同或极近似。其原因可能有:普通菜豆对温度光照等条件敏感,为了适应各地不同的生态环境,在自然选择效应下,同一产地的品种遗传多样性逐渐减少,形成了具备不同遗传背景的地域品种群;受气候条件和地理区域的阻碍,我国早期不同地区间种质资源遗传缺乏交流;部分育种者缺乏对种质的遗传多样性和遗传关系的认识,根据长期育种经验和当地市场需求形成了对目标性状的选择偏好性,反复利用固定的亲本进行育种,育成品种的遗传背景日趋狭窄,在长期自然选择和人工选育的压力下普通菜豆品种

在其分子水平上遗传多样性更是进一步降低[34]，当所选择的分子标记未覆盖在变异位点时，即表现为分子层面的相同或者极近似品种，需要通过植物学性状等其他手段才能将其区分开。

### 3.2　SSR 分子标记在菜豆品种鉴定和 DUS 测试近似品种辅助筛选中的应用

SSR 分子标记是目前在品种鉴定和近似品种筛选上应用较多的分子标记，水稻、玉米、大豆、小麦、大麦、高粱等植物的品种鉴定技术规程 SSR 分子标记法的农业行业标准已经发布并实施，为品种真实性检测和辅助筛选近似品种提供了强有力的技术保障。本研究确定的 33 对核心引物能够将亲缘关系较远的品种区分开，可以辅助品种的快速鉴定。

在 DUS 测试中，选择正确的近似品种对特异性的判定极其关键。利用表型性状筛选方法容易受不同环境下采集的数据差异影响。尤其是在已知品种的表型性状数据库未建立时极容易出现近似品种选择不当等问题[35]，影响 DUS 测试的结果。已有研究证明，基于 SSR 分子标记的品种 DNA 指纹数据库可以作为一项有效的近似品种筛选手段[36-38]。本研究调查了 21 个遗传相似度高的普通菜豆品种植物学性状，这些遗传距离为 0 的品种之间在植物学性状上也较为相似，但仍可以通过部分性状将其区分开。这一结果表明，本研究确定的核心引物对普通菜豆的遗传多样性分析结果与形态学分类结果具有一定的相关性和一致性；对授权品种及其近似品种遗传多样性分析的结果也进一步验证了核心引物在近似品种筛选中的有效性。因此，基于 33 对核心引物建立的菜豆品种 DNA 指纹数据库可以应用于辅助 DUS 测试近似品种筛选，解决由申请人对现有品种的了解程度和占有量有限[39]、现有表型数据库中品种量不足带来的近似品种选择不当问题。

尽管有部分学者对 SSR 分子标记与形态特征之间的关联性进行了分析，并且在水稻[40]、棉花[41]、大麦[42]、大豆[43]、番茄[44]等作物上发现了一些与农艺性状、品质性状和抗病性存在关联的标记，但作物的植物学性状多为数量性状，受微效多基因控制[45]。目前 SSR 标记和植物学性状之间尚未建立明确的关联，分子标记差异往往只代表了品种为相同或不同的概率，当差异位点低于一定阈值时，特别是那些遗传背景极为接近的品种，只有通过田间 DUS 测试才能明确最终的表型差异。

**参考文献**


[1] 郑卓杰 . 中国食用豆类学 . 北京：中国农业出版社，1997：220-237
Zheng Z J.Chinese edible legume science，Beijing：China Agriculture Press，1997：220-237

[2] 邓宏中 . 基于 SSR 标记的中国水稻地方品种与选育品种遗传多样性研究 . 北京：中国农业科学院，2015
Deng H Z.Study on genetic diversity of Chinese landrace and improved rice varieties by SSR.Beijing：Chinese Academy of Agricultural Sciences，2015

[3] 王欣怡，艾先涛，王俊铎，梁亚军，龚照龙，郑巨云，郭江平，买买提・莫明，李雪源 . 利用 SSR 快速鉴定棉花品种真实性和纯度 . 作物学报，2017，43（10）：1565-1572
Wang X Y，Ai X T，Wang J D，Liang Y J，Gong Z L，Zheng J Y，Guo J P，Mamat M M，Li X Y.Rapid identification system of purity and authenticity in cotton varieties by SSR markers.Acta Agronomica Sinica，2017，43（10）：1565-1572

[4] 王凤格，田红丽，赵久然，王璐，易红梅，宋伟，高玉倩，杨国航 . 中国 328 个玉米品种（组合）SSR 标记遗传多样性分析 . 中国农业科学，2014，47（5）：856-864
Wang F G，Tian H L，Zhao J R，Wang L，Yi H M，Song W，Gao Y Q，Yang G H.Genetic diversity analysis of 328 maize varieties（hybridized combinations）using SSR markers.Scientia Agricultura Sinica，2014，47（5）：856-864

[5] 李国彬，王伟伟，史聪仙，白瑾琏，李灿辉，唐唯 . 云南省马铃薯品种资源鉴定及分子指纹图谱的建立 . 分子植物育种，2019，17（14）：4679-4691
Li G B，Wang W W，Shi C X，Bai J L，Li C H，Tang W.Identification of potato variety resources and construction of molecular fingerprinting in Yunnan.Molecular Plant Breeding，2019，17（14）：4679-4691

[6] 王庆彪，张扬勇，庄木，杨丽梅，刘玉梅，吕红豪，方智远 . 中国 50 个甘蓝代表品种 EST-SSR 指纹图谱的构建 . 中国农业科学，2014，47（1）：111-121
Wang Q B，Zhang Y Y，Zhuang M，Yang L M，Liu Y M，Lv H H，Fang Z Y.EST-SSR fingerprinting of fifty cabbage representative varieties from China.Scientia Agricultura Sinica，2014，47（1）：111-121

[7] 骆晚侠，张李，杨凯，李奕松，赵波，李明，万平 . 小豆 SSR 分子标记遗传连锁图谱构建 . 中国农业科学，2013，46（17）：3534-3544
Luo W X，Zhang L，Yang K，Li Y S，Zhao B，Li M，Wan P.Construction of genetic linkage map using SSR molecular markers in azuki bean（*Vigna angularis* Ohwi and Ohashi）.Scientia Agricultura Sinica，2013，46（17）：3534-3544

[8] 苏聪聪，金燕，徐丰，白描，石雪晖，杨国顺，钟晓红，刘昆玉，陈恒，李含晰 . 利用 SSR 分子标记鉴定刺葡萄 $F_1$ 代杂种 . 江苏农业科学：2018，46（17）：35-38
Su C C，Jin Y，Xu F，Bai M，Shi X H，Yang G S，Zhong X H，Liu K Y，Chen H，Li H X.Identification of $F_1$ hybrids of *Vitis davidii* Foex using SSR molecular markers.Jiangsu Agricultural Sciences，2018，46（17）：35-38

[9] 赵瑞丽，陈中钐，高山，许端祥，林碧英 . 菠菜种质资源 SSR 指纹图谱构建和遗传多样性分析 . 分子植物育种，2019，17（12）：4112-4118
Zhao R L，Chen Z S，Gao S，Xu D X，Lin B Y.The fingerprints

construction and genetic diversity analysis of *Spinacia* using SSR Markers.Molecular Plant Breeding, 2019, 17(12): 4112-4118

[10] 张小双. 中国北方梨种质荧光标记SSR分子身份证的构建和亲缘关系分析. 北京: 中国农业科学院, 2018
Zhang X S.Molecular identification establishment and genetic relationship analysis of pear accession in northern China using the fluorescent-labeled SSR markers.Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018

[11] 孙波,邹甜,王志伟,吴琪,杨红波,王兴辉,孙小武. 利用SSR技术鉴定西瓜品种纯度. 中国瓜菜, 2018, 31(6): 16-19
Sun B, Zou T, Wang Z W, Wu Q, Yang H B, Wang X H, Sun X W.Identification of watermelon varieties purity using SSR markers.China Cucurbits and Vegetables, 2018, 31(6): 16-19

[12] Blair M W, Giraldo M C, Buendía H F, Tovar E, Duque M C, Beebe S.Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.).Theoretical and Applied Genetics, 2006, 113: 100-109

[13] 张赤红,王述民. 利用SSR标记评价普通菜豆种质遗传多样性. 作物学报, 2005, 31(5): 619-627
Zhang C H, Wang S M.The genetic diversity assessment of common bean germplasm resources by using SSR markers.Acta Agronomica Sinica, 2005, 31(5): 619-627

[14] Francesco M, Maria L, Antonio L, Agostino S, Monica B, Maria R A, Francesco S.Genetic diversity and population structure of a common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) collection from Calabria (Italy).Genetic Resources and Crop Evolution, 2013, 60(3): 839-852

[15] Giseli V, Maria C G V, Julio C F E, Leonel D M, Noimilto N A M.Population structure and genetic diversity of common bean accessions from Brazil.Plant Molecular Biology Reporter.2018, 36: 897-906

[16] Gioia T, Logozzo G, Marzario S, Spagnoletti Z P, Gepts P.Evolution of SSR diversity from wild types to U.S.advanced cultivars in the Andean and Mesoamerican domestications of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.).PloS One, 2019, 14(1): e0211342

[17] 杨义杰,王颖,张东杰,沈琰,张桂芳,赵雅楠. 不同SSR标记检测技术在芸豆品种的遗传多样分析中的应用. 黑龙江八一农垦大学学报, 2017, 29(6): 1-5
Yang Y J, Wang Y, Zhang D J, Shen Y, Zhang G F, Zhao Y N.Application of different SSR markers detection technology on genetic diversity analysis of common bean varieties.Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2017, 29(6): 1-5

[18] 张东杰,王颖,杨义杰,沈琰,孙大庆,赵雅楠. 一种基于SSR分子标记构建菜豆指纹图谱的方法及应用. 中国, 105420368A. 2019-07-05
Zhang D J, Wang Y, Yang Y J, Shen Y, Sun D Q, Zhao Y N.Method and application of constructing fingerprint of common bean based on SSR molecular marker.CN105420368A.2019-07-05

[19] 朱岩芳. 作物品种分子标记鉴定及指纹图谱构建研究. 杭州: 浙江大学, 2013
Zhu Y F.Research on cultivar identification and DNA fingerpringting of crops based on molecular markers.Hangzhou: Zhejiang University, 2013

[20] 郑永胜,张晗,王东建,孙加梅,王雪梅,段丽丽,李华,王玮,李汝玉. 基于荧光检测技术的小麦品种SSR鉴定体系的建立. 中国农业科学, 2014, 47(19): 3725-3735
Zheng Y S, Zhang H, Wang D J, Sun J M, Wang X M, Duan L L, Li H, Wang W, Li R Y.Development of a wheat variety identification system based on fluorescently labeled SSR markers.Scientia Agricultura Sinica, 2014, 47(19): 3725-3735

[21] 张晗,王东建,孙加梅,郑永胜,姚凤霞,许金芳,宋国安,段丽丽,李华,王雪梅,李汝玉. 大白菜高通量SSR标记鉴定体系的建立和应用. 植物遗传资源学报, 2014, 15(4): 815-823
Zhang H, Wang D J, Sun J M, Zheng Y S, Yao F X, Xu J F, Song G A, Duan L L, Li H, Wang X M, Li R Y.Development and application of a high-throughput Chinese cabbage DNA profiling system based on SSR markers.Journal of Plant Genetic Resources, 2014, 15(4): 815-823

[22] 李益,马先锋,唐浩,李娜,江东,龙桂友,李大志,牛英,韩瑞玺,邓子牛. 柑橘品种鉴定的SSR标记开发和指纹图谱库构建. 中国农业科学, 2018, 51(15): 149-159
Li Y, Ma X F, Tang H, Li N, Jiang D, Long G Y, Li D Z, Niu Y, Han R X, Deng Z N.SSR markers screening for identification of citrus cultivar and construction of DNA fingerprinting library. Scientia Agricultura Sinica, 2018, 51(15): 149-159

[23] 任小平,郑艳丽,黄莉,陈玉宁,周小静,陈伟刚,雷永,晏立英,万丽云,廖伯寿,姜慧芳. 花生SSR核心引物筛选及育成品种DNA指纹图谱构建. 中国油料作物学报, 2016, 38(5): 563-571
Ren X P, Zheng Y L, Huang L, Chen Y N, Zhou X J, Chen W G, Lei Y, Yan L Y, Wan L Y, Liao B S, Jiang H F.Selection of core SSR markers and identification of fingerprint on peanut cultivars.Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2016, 38(5): 563-571

[24] 韩瑞玺,张晗,赵艳杰,马莹雪,李汝玉,唐浩.DNA分子标记技术在DUS测试中的应用探讨. 中国种业, 2019(2): 43-45
Han R X, Zhang H, Zhao Y J, Ma Y X, Li R Y, Tang H.Application of DNA molecular marking technology in DUS Test.China Seed Industry, 2019(2): 43-45

[25] 王红娟,林清,蒋晓英,白文钦,官玲,吴红. 植物新品种DUS测试中近似品种的筛选方法. 热带农业科学, 2018, 38(10): 36-41
Wang H J, Lin Q, Jiang X Y, Bai W Q, Guan L, Wu H.Screening approach for similar varieties in the DUS testing of new plant varieties.Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2018, 38(10): 36-41

[26] 周青利. 玉米标准DNA指纹库构建方案在多作物中的通用性研究. 郑州: 河南农业大学, 2017
Zhou Q L.A study on the versatility of maize standard DNA fingerprinting database in multi crops.Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2017

[27] 郑永胜,张晗,王雪梅,王东建,孙加梅,王穆穆,王晖,王玮,李华,段丽丽,李汝玉. 小麦DUS测试已知品种DNA指纹数据库构建及其应用. 植物遗传资源学报, 2019, 20(4): 845-853
Zheng Y S, Zhang H, Wang X M, Wang D J, Sun J M, Wang M M, Wang H, Wang W, Li H, Duan L L, Li R Y.Construction of DNA profile database of wheat reference varieties and its application in wheat DUS test.Journal of Plant Genetic Resources, 2019, 20(4): 845-853

[28] Doyle J J, Doyle J I.Isolation of plant DNA from fresh tissue.

Focus，1990，12：149-151

[29] 鲍思元 .DNA 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的实验教学改进 . 实验科学与技术，2015，13（2）：122-124
Bao S Y.Improvement of DNA denaturing polyacrylamide gel electrophoresis in experiment teaching.Experiment Science and Technology，2015，13（2）：122-124

[30] 王凤格，李欣，杨扬，易红梅，江彬，张宪晨，霍永学，朱丽，葛建镕，王蕊，任洁，王璐，田红丽，赵久然 . 植物品种 SSR 指纹分析专用软件 SSR Analyser 的研发 . 中国农业科学，2018，51（12）：2248-2262
Wang F G，Li X，Yang Y，Yi H M，Jiang B，Zhang X C，Huo Y X，Zhu L，Ge J R，Wang R，Ren J，Wang L，Tian H L，Zhao J R.SSR Analyser：A special software suitable for SSR fingerprinting of plant varieties.Scientia Agricultura Sinica，2018，51（12）：2248-2262

[31] Liu K，Muse S V.PowerMarker：An integrated analysis environment for genetic marker analysis.Bioinformatics，2005，21：2128-2129

[32] Botstein D，White R L，Skolnick M，Davis R W.Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms.American Journal of Human Genetics，1980，32（3）：314

[33] 程须珍，王述民 . 中国食用豆类品种志 . 北京：中国农业科学技术出版社，2009：271-286
Cheng X Z，Wang S M.Chinese legumes variety pictorial. Beijing：China Agriculture Science and Technology Press，2009 271-286

[34] 张赤红 . 普通菜豆种质资源遗传多样性与分类研究 . 北京：中国农业科学院，2004
Zhang C H.Assessment and classification of genetic diversity on common bean（*Phaseolus vulgaris* L.）.Beijing：Chinese Academy of Agricultural Sciences，2004

[35] 赵雅楠，王颖，张东杰 . 辽宁地区绿豆品种 SSR 指纹图谱构建及品种鉴定 . 食品科学，2018，39（6）：284-290
Zhao Y N，Wang Y，Zhang D J.Establishment of simple sequence repeat fingerprint for identification of mungbean varieties（*Vigna radiate* L.）grown in Liaoning.Food Science，2018，39（6）：284-290

[36] 赖运平，张浙峰，王丽容，何巧林，黄维藻，张新明，堵苑苑，余毅 . 利用 SSR 标记筛选 DUS 测试中甘蓝型油菜近似品种 . 分子植物育种，2013，11（2）：174-184
Lai Y P，Zhang Z F，Wang L R，He Q L，Huang W Z，Zhang X M，Du Y Y，Yu Y.Screening similar varieties of rapeseed（*Brassica napus* L.）in DUS testing using SSR markers. Molecular Plant Breeding，2013，11（2）：174-184

[37] 管俊娇，余志慧，杨晓洪，王江民，张鹏，黄清梅，张建华 .SSR 标记在辣椒 DUS 测试中的应用 . 植物遗传资源学报，2019，20（2）：396-405
Guan J J，Yu Z H，Yang X H，Wang J M，Zhang P，Huang Q M，Zhang J H.Testing the usability of SSR markers in pepper（*Capsicum*）DUS testing.Journal of Plant Genetic Resources，2019，20（2）：396-405

[38] 雷蕾 . 普通菜豆核心种质遗传结构及多样性研究 . 北京：中国农业科学院，2018
Lei L.Population structure and genetic diversity of a core collection of common beans（*Phaseolus vulgaris* L.）.Beijing：Chinese Academy of Agricultural Sciences，2018

[39] 陈红 . 申请植物新品种权时如何选择近似品种和陈述理由 . 中国种业，2017（12）：5-7
Chen H.How to choose the approximate variety and state the reason when applying for the new plant variety right.China Seed Industry，2017（12）：5-7

[40] 陈氏秋江，党小景，刘强明，赵凯铭，王卉，洪德林 . 水稻籽粒性状的 SSR 关联分析 . 中国水稻科学，2014，28（3）：243-257
Tran T T G，Dang X J，Liu Q M，Zhao K M，Wang H，Hong D L.Association analysis of rice grain traits with SSR markers. Chinese Journal of Rice Science，2014，28（3）：243-257

[41] 王娟，董承光，刘丽，孔宪辉，王旭文，余渝 . 陆地棉主要产量相关性状的 SSR 标记关联分析 . 植物遗传资源学报，2017，18（4）：720-727
Wang J，Dong C G，Liu L，Kong X H，Wang X W，Yu Y.Association analysis of yield-related traits with SSR markers in upland cotton（*Gossypium hirsutum*）.Journal of Plant Genetic Resources，2017，18（4）：720-727

[42] 司二静，张宇，汪军成，孟亚雄，李葆春，马小乐，尚勋武，王化俊 . 大麦农艺性状与 SSR 标记的关联分析 . 作物学报，2015，41（7）：1064-1072
Si E J，Zhang Y，Wang J C，Meng Y X，Li B C，Ma X L，Shang X W，Wang H J.Association analysis between SSR markers and agronomic traits in barley.Acta Agronomica Sinica，2015，41（7）：1064-1072

[43] 杨凯敏，李贵全，郭数进，乔玲 . 大豆自然群体 SSR 标记遗传多样性及其与农艺性状的关联分析 . 核农学报，2014，28（9）：1576-1584
Yang K M，Li G Q，Guo S J，Qiao L.Genetic diversity and association analysis of agronomic traits with SSR in a natural population of soybean cultivars.Journal of Nuclear Agricultural Sciences，2014，28（9）：1576-1584

[44] 黄静，王苓，江卫，叶仕伦 . 番茄 SSR 遗传多样性及其品质性状的关联分析 . 西南农业学报，2017，30（8）：1867-1871
Huang J，Wang L，Jiang W，Ye S L.Genetic diversity of tomato revealed by SSR markers and its association with quality traits. Southwest China Journal of Agricultural Sciences，2017，30（8）：1867-1871

[45] 刘洪，徐振江，饶得花，鲁清，李少雄，刘海燕，陈小平，梁炫强，洪彦彬 . 基于形态学性状和 SSR 标记的花生品种遗传多样性分析和特异性鉴定 . 作物学报，2019，45（1）：26-36
Liu H，Xu Z J，Rao D H，Lu Q，Li S X，Liu H Y，Chen X P，Liang X Q，Hong Y B.Genetic diversity analysis and distinctness identification of peanut cultivars based on morphological traits and SSR markers.Acta Agronomica Sinica，2019，45（1）：26-36