

DOI:CNKI:61-1390/S.20110711.1718.008

网络出版时间:2011-07-11 17:18:00

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20110711.1718.008.html>

基于 SSR 和 SRAP 标记的苹果品种亲缘关系分析

巴巧瑞,赵政阳,高 华,王艳丽,孙 彪

(西北农林科技大学 园艺学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 **【目的】**用 SSR 和 SRAP 分子标记技术,分析苹果(*Malus domestica* Borkh.)重要栽培品种的亲缘关系,为苹果杂交育种亲本及组合的选配提供参考。**【方法】**用亲缘关系较近的金冠和秦冠筛选 SSR 和 SRAP 多态性引物,利用 SSR 和 SRAP 分子标记技术对 37 个苹果栽培品种进行遗传多样性和亲缘关系分析。**【结果】**筛选出了用于 37 个苹果主栽品种亲缘关系分析的 10 对 SSR 和 10 对 SRAP 引物,其分别产生 56 和 64 条扩增带,平均多态性比率分别为 61.09% 和 70.8%。根据 SSR+SRAP 分析结果,37 个苹果品种被聚为 6 大类。**【结论】**所选取的引物能够有效地揭示供试苹果品种的遗传多样性,并且苹果品种分类与传统系谱基本一致。

【关键词】 苹果;SSR;SRAP;遗传多样性;亲缘关系

【中图分类号】 S661.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)09-0123-06

Genetic relationship analysis of apple cultivars with SSR and SRAP markers

BA Qiao-rui,ZHAO Zheng-yang,GAO Hua,WANG Yan-li,SUN Biao

(College of Horticulture,Northwest A&F University,Yangling,Shaanxi 712100,China)

Abstract: **【Objective】** The study was done in order to select the proper parents in apple breeding. **【Method】** The genetic diversity and genetic relationship of 37 apple cultivars were studied with the SSR and SRAP markers. **【Result】** The results showed that 56 and 64 bands were obtained by SSR and SRAP markers amplified through 10 selected primers respectively. Polymorphic percentage was 61.09% and 70.8%. **【Conclusion】** Based on the SSR+SRAP results,the selected primers were effective in revealing genetic diversity of the tested varieties,and the apple cultivars could be classified into the six groups,which were similar to the traditional classification.

Key words: apple;SSR;SRAP;genetic diversity;genetic relationship

苹果是一个高度杂合的物种,其遗传背景十分复杂^[1],加之童期较长,导致杂交育种周期长、效率低,因此提高苹果育种效率的关键步骤之一就是选配适宜的亲本及组合。根据杂交优势理论^[2],种内亲本亲缘关系越远,其后代中出现优良个体的几率越大,越有利于提高育种效率。在常规育种中,育种者一般根据杂交亲本和 F₁ 代的性状比对进行亲本

的选配,但由于一个物种个体的表现型是基因型和环境因子共同作用的结果^[3],因此常规育种易受到环境的影响而造成偏差。

分子标记技术是一种在基因水平上对物种进行分析的方法,其能避免环境的影响,可更为真实地反映品种间的亲缘关系,从而为杂交育种中亲本的选配提供理论支持^[4]。目前,常用的 DNA 分子标记

* [收稿日期] 2011-02-15

[基金项目] 国家现代农业技术体系专项(ncytx-08-01-03);陕西省“13115”重大科技专项(2010ZDKG-69)

[作者简介] 巴巧瑞(1985—),女,甘肃兰州人,在读硕士,主要从事果树育种与生物技术研究。E-mail:baqiaorui@gmail.com

[通信作者] 赵政阳(1964—),男,陕西富平人,教授,博士生导师,主要从事果树育种与生物技术研究。

E-mail:zhaozy@nwsuaf.edu.cn

技术主要有 SSR、AFLP 和 SRAP 等,且在种质资源鉴定和遗传多样性分析等方面都有较广泛的应用^[5-6]。2 种标记联用进行遗传多样性分析的研究在国内外也都有报道^[7-9]。SSR 具有检测简便、重复性高、共显性遗传等特点^[10-11],是一种应用十分广泛的分子标记方法;而 SRAP 作为近年来新开发的一种分子标记技术,具有操作简便、多态性高、在基因组上分布均匀等优点^[12]。张春雨等^[13]利用 SRAP 技术研究了新疆野苹果的遗传多样性,提出了种质资源的保护策略;利用 SSR 技术,王爱德等^[14]、高源^[15]和高华等^[16]对苹果品种的遗传多样性进行了研究,徐兴兴等^[17]绘制了美国八号品种的指纹图谱,为苹果品种鉴定提供了理论依据。本研究综合运用 SSR 和 SRAP 分子标记技术,对苹果主要栽培

品种的亲缘关系进行分析,以期为苹果杂交育种时亲本的选配提供参考。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 试验材料 试验于 2009-09—2010-11 在西北农林科技大学园艺学院苹果遗传育种分子实验室进行。供试苹果品种共 37 个(表 1),均取自西北农林科技大学白水苹果试验站品种资源圃。春季取新梢嫩叶装入自封袋,然后保存在-40℃下备用。

1.1.2 试剂和仪器 试验所用 Taq Master Mix 和 DNA Marker 购自华大基因有限公司。PCR 仪为 ABI 生产的 Veriti 型。电泳系统为北京六一厂生产的 DYY-12 和 DYC-24F。

表 1 供试苹果品种及其亲本
Table 1 Apple cultivars used in study

编号 No.	品种 Variety	亲本 Parent	编号 No.	品种 Variety	亲本 Parent
1	金冠 Golden Delicious	自然实生 Unknown	20	国光 Ralls	自然实生 Unknown
2	秦阳 Qinyang	嘎啦实生 Seeding of Gala	21	红宝石 Hongbaoshi	国光×元帅 Ralls×Delicious
3	富士 Fuji	国光×元帅 Ralls×Delicious	22	北海道 9 号 HAC 9	富士×津轻 Fuji×Tsugaru
4	嘎啦 Gala	红基橙×金冠 Kidds Orange Red×Golden Delicious	23	恩派 Empire	旭×元帅 McIntosh×Delicious
5	乔纳金 Jonagold	金冠×红玉 Golden Delicious×Jonathan	24	王林 Orin	金冠×元帅 Golden Delicious×Delicious
6	萌 Kizashi	嘎啦×富士 Gala×Fuji	25	秋锦 Qiujin	国光×混合花粉 Ralls×Mixed pollen
7	皇家嘎啦 Royal Gala	嘎啦芽变 Sport of Gala	26	秦星 Qinxing	新红星×秦冠 Starkrimson×Qinguan
8	延光 Yanguang	金冠×元帅 Golden Delicious×Delicious	27	鸡冠 Jiguan	自然实生 Unknown
9	元帅 Delicious	自然实生 Unknown	28	秦冠 Qinguan	金冠×鸡冠 Golden Delicious×Jiguan
10	印度 Indo	自然实生 Unknown	29	锦红 Jinhong	红玉×鸡冠 Jonathan×Jiguan
11	粉红女士 Pinklady	金冠×威廉女士 Golden Delicious×Lady Williams	30	旭 McIntosh	自然实生 Unknown
12	丹霞 Danxia	金冠实生 Seeding of Golden Delicious	31	千秋 Senshu	东光×富士 Toko×Fuji
13	桔苹 Cox's orange	瑞布斯顿实生 Seeding of Ribston Pippin	32	红玉 Jonathan	可口香实生 Seeding of Esopus Spitzenbur
14	寒富 Hanfu	东光×富士 Toko×Fuji	33	惠 Megumi	国光×红玉 Ralls×Jonathan
15	东光 Toko	金冠×印度 Golden Delicious×Indo	34	岳帅 Yueshuai	金冠×红星 Gold Delicious×Starking
16	华冠 Huaguan	金冠×富士 Golden Delicious×Fuji	35	葵花 Kuihua	金冠×红星 Gold Delicious×Starking
17	世界一 Sekaiichi	元帅×金冠 Delicious×Golden Delicious	36	延风 Yanfeng	元帅×金冠 Delicious×Golden Delicious
18	陆奥 Mutsu	金冠×印度 Golden Delicious×Indo	37	新世界 Shinsekai	赤城×富士 Akagi×Fuji
19	新红星 Starkrimson	元帅芽变 Sport of Delicious			

1.2 方 法

1.2.1 模板 DNA 的制备 参照高华等^[16]的方法

提取参试苹果品种春季嫩叶的基因组 DNA,采用琼脂糖凝胶电泳检测其质量,用美国基因公司生产的

超微量紫外分光光度计 ND-2000 测定其质量浓度。将 DNA 样品稀释为 50 ng/ μ L 保存备用。

1.2.2 PCR 反应体系和扩增程序 SSR-PCR 反应体系: *Taq* Master Mix 10 μ L, 10 μ mol/L 引物 1 μ L, 50 ng/ μ L 模板 DNA 2 μ L, 用双蒸水补足体系到 20 μ L。SSR-PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 57 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

SRAP-PCR 反应体系参考张春雨等^[13]的方法并稍作改动: *Taq* Master Mix 13 μ L, 10 μ mol/L 引物 2 μ L, 50 ng/ μ L 模板 DNA 2 μ L, 用双蒸水补足体系到 25 μ L。SRAP-PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 35 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 51 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.2.3 引物筛选 本试验所用 34 对 SSR 引物^[14-15]和 12 条 SRAP 引物^[13]均由上海生工生物技术有限公司合成。利用亲缘关系较近的金冠和秦冠先分别对 34 对 SSR 引物、35 对 SRAP 引物进行筛选。

1.2.4 结果检测 扩增反应结束前 30 min, 对已制好的聚丙烯酰胺凝胶进行预电泳。扩增反应结束后, 取 5 μ L 反应产物点样, 250 V 恒压电泳 2.5 h。

表 2 2 种标记引物检测 37 个苹果品种的多态性结果

Table 2 Comparison of the number of polymorphism band between SSR and SRAP markers for 37 cultivars

引物 Primer	SSR			引物 Primer	SRAP		
	扩增条带总数 Total band	多态性条带数 Polymorphic band	多态性比率/% Percentage of polymorphic bands		扩增条带总数 Total band	多态性条带数 Polymorphic band	多态性比率/% Percentage of polymorphic bands
Hi12c02	9	7	78	Me1-em2	6	5	83
Hi02c07	5	3	60	Me1-em3	7	4	57
KA4b	3	2	67	Me2-em3	7	4	71
CH02c02	8	4	50	Me2-em4	6	3	50
CH04e02	9	4	44	Me2-em7	4	3	75
Hi05e07	4	2	50	Me3-em4	4	3	75
CH02d08	4	3	75	Me7-em4	6	6	100
CH05d04	4	3	75	Me8-em2	6	4	67
CH01g05	5	3	60	Me8-em7	10	8	80
CH05d03	5	4	80	Me8-em8	8	4	50
平均 Average	5.6	3.6	61.09	平均 Average	6.4	4.5	70.8

2.2 不同苹果品种的聚类分析

由图 2 可见, 37 个苹果品种的遗传相似系数为 0.51~0.83, 在遗传相似系数为 0.59 时, 可将 37 个苹果品种分为 I~VI 6 大类, 结果与传统系谱基本一致。

I 类包含 27 个苹果品种, 其又可细分为 A 和 B 2 个亚类, A 亚类是金冠和具有金冠血缘的品种, 包括金冠、陆奥、东光、华冠、乔纳金、延光、丹霞、秦阳、

电泳结束后, 银染检测^[18]。用筛选得到的 SSR 和 SRAP 引物分别对 37 个苹果品种的基因组 DNA 进行 PCR 扩增。

1.2.5 数据分析 统计多态性条带。记录电泳胶片中条带位置, 有带者赋值“1”, 无带者赋值“0”, 数据录入 Ntedit2. 20d 后获得数据文件, 采用生物统计软件 NTsyspc2. 20v 分别计算基于 SSR、SRAP 和 SSR+SRAP 的 Dice 系数, 然后采用 UPGMA 方法对数据进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 不同苹果品种的多态性分析

由表 2 可知, 10 对 SSR 引物在 37 个苹果品种中共检测出 56 个位点, 平均每对引物 5.6 个, 共扩增出 36 个多态性位点, 平均每对引物扩增多态性位点 3.6 个, 多态性比率平均为 61.09%; 10 对 SRAP 引物在 37 个苹果品种中共检测出 64 个位点, 平均每对引物 6.4 个, 共扩增出 45 个多态性位点, 平均每对引物扩增多态性位点 4.5 个, 多态性比率平均为 70.8%; SRAP 标记检测到的多态性位点数比 SSR 多, 平均每对引物多 0.9 个位点。其中, SSR 引物 Hi12c02 和 SRAP 引物 Me8-em7 的扩增结果见图 1。

王林、粉红女士、桔苹; B 亚类是元帅和具有元帅血缘的品种, 包括富士、国光、红宝石、北海道 9 号、元帅、新红星、秋锦、世界一、秦星、岳帅、葵花、惠、延风、新世界、寒富、千秋。其中, 世界一(元帅 $\times$ 金冠)、延风(元帅 $\times$ 金冠)被聚在元帅组; 延光(金冠 $\times$ 元帅)、王林(金冠 $\times$ 元帅)被聚在金冠组, 这 4 个苹果品种的亲本都是金冠和元帅, 但是分别与其母本聚在一组, 这可能是由于母性效应^[19]导致的结果。

陆奥和东光的亲本都是金冠和印度,陆奥、东光与金冠的遗传相似系数分别为 0.810 8,0.722 2,均大于其与印度的遗传相似系数(分别为 0.64,0.657 5),说明金冠与印度杂交后代受到金冠的影响较大。同样,华冠(金冠×富士)、王林(金冠×元帅)和金冠的

遗传相似系数也大于其与另一亲本的遗传相似系数,这说明金冠作为亲本时其遗传力较强。这与李育农^[20]根据表型性状推断出的结论一致。所以在苹果杂交育种中,组配亲本组合时应充分考虑金冠的这一特点。

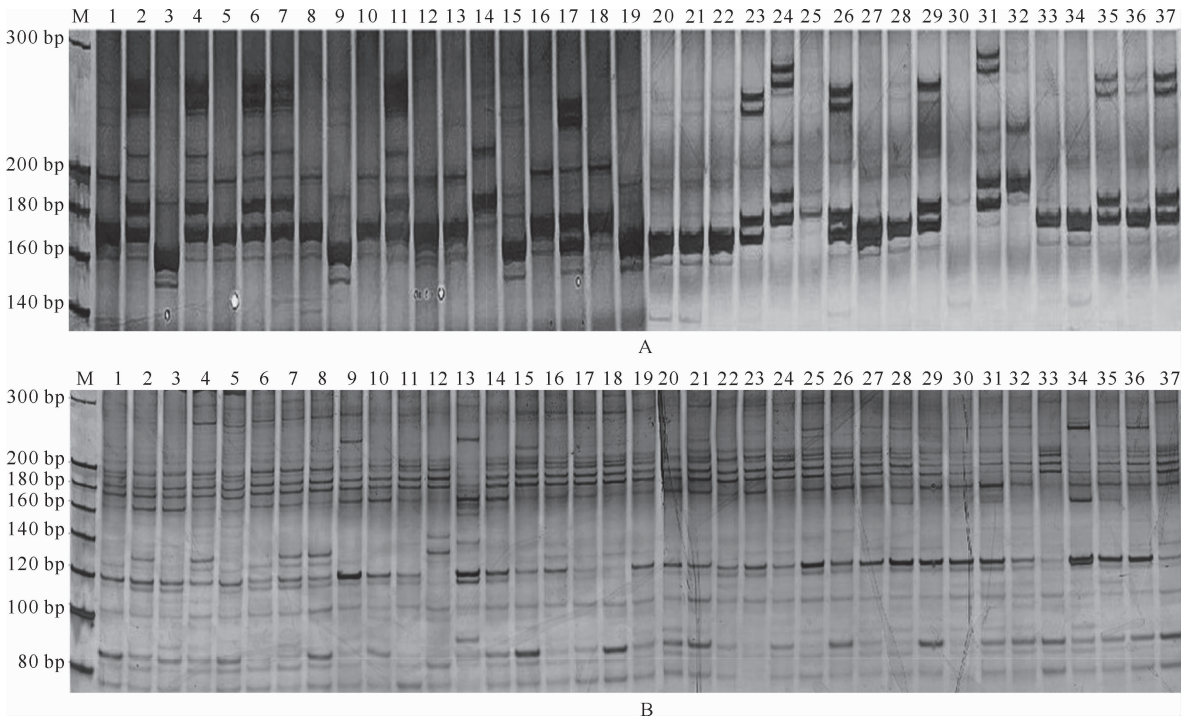


图 1 SSR 引物 Hi12c02(A)和 SRAP 引物 Me8-em7(B)的扩增条带

M. Gene Ruler™ 20 bp DNA ladder;1~37. 苹果品种编号,同表 1

Fig.1 Band patterns of SSR primer Hi12c02(A)and SRAP primer Me8-em7(B)

M. Gene Ruler™ 20 bp DNA ladder;1—37. Refers to the cultivars listed in table 1

Ⅱ类包含旭、恩派 2 个苹果品种。旭是一个源于加拿大的地方传统实生品种,与源于美国的传统实生品种金冠、元帅的地缘距离较远,其相互间的遗传背景差异较大(旭与金冠和元帅的遗传相似系数均为 0.529 4),所以自成一类。恩派和旭的遗传相似系数为 0.695 7,与元帅的为 0.579 7,表明恩派更多地继承了旭的遗传物质。说明旭和其他实生苹果品种的亲缘关系较远,组配杂交组合后超亲优势较强。

Ⅲ类包含嘎啦、皇家嘎啦、锦红、萌 4 个苹果品种。皇家嘎啦是嘎啦的芽变品种,其与嘎啦的遗传相似系数为 0.834 8。芽变是体细胞变异^[21],芽变个体与母株的绝大部分遗传物质相同,所以皇家嘎啦与嘎啦的遗传相似系数在本试验中最高。

Ⅳ类仅有印度 1 个苹果品种。根据文献记载,印度是日本从美国印第安纳州引进苗木时混入而被带到日本的^[22],其实性性状类似于青香蕉,推测是

青香蕉的芽变或者实生后代。而青香蕉是一个原产于美国的品种,所以印度的遗传背景与其他参试品种差异较大,被单独聚为一类。

Ⅴ类包含秦冠、鸡冠 2 个苹果品种,这 2 个品种聚为一类,说明秦冠更多地继承了其父本鸡冠的遗传物质。在表观性状上,秦冠的丰产性、抗病性等也更与其父本鸡冠相近。

Ⅵ类包含红玉 1 个苹果品种。红玉品种自成一类,这和王爱德等^[14]的结论一致。红玉是源自美国的传统实生品种,与本研究其他供试苹果品种亲缘关系较远,如与金冠、元帅的遗传相似系数分别仅为 0.562 5和 0.468 8,是本试验中的最低值。在杂交育种中,若以红玉作亲本选配其他优良苹果品种,有可能在后代群体中获得更多的优良个体。如以红玉和金冠杂交选育得到的苹果品种乔纳金兼具双亲特长,与祝光、鸡冠等古老品种杂交得到的品种伏红、锦红的各种性状都有加性效应^[20]。

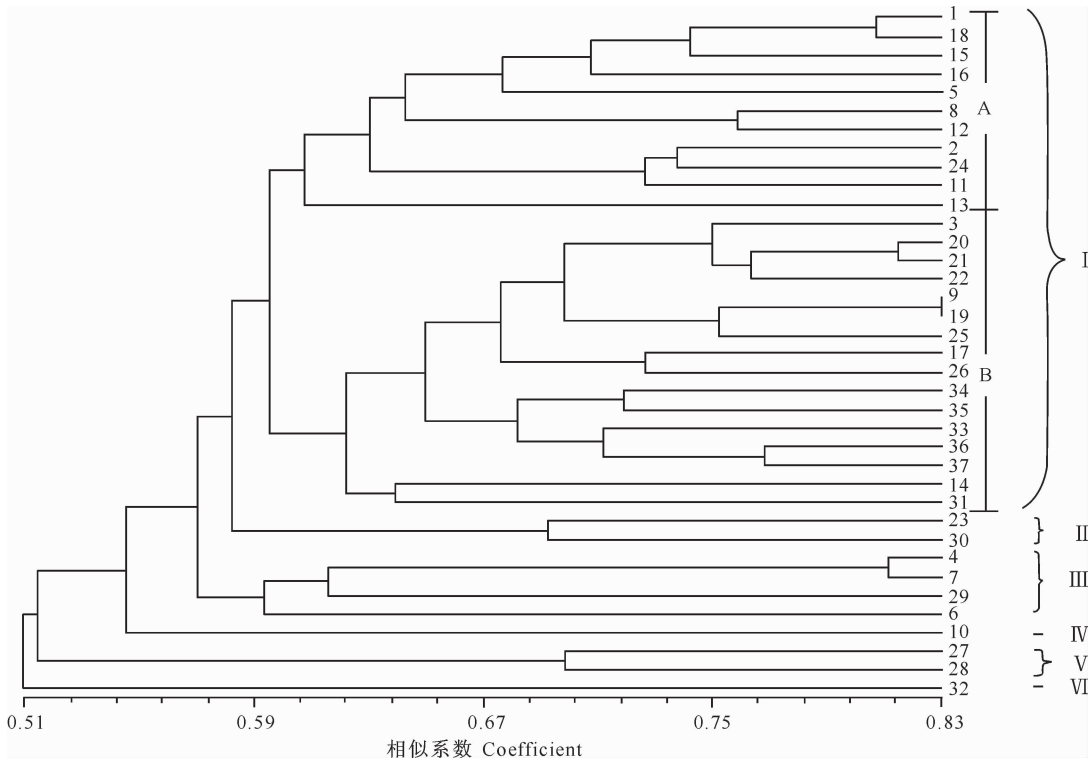


图 2 基于 SSR+SRAP 的 37 个苹果品种的 UPGMA 聚类分析

1~37 序号代表的苹果品种同表 1

Fig. 2 Dendrogram of 37 apple cultivars based on SSR+SRAP analysis
The number of 1—37 refers to the cultivars listed in table 1

3 讨 论

本试验同时采用 SSR 和 SRAP 2 种分子标记技术对 37 份苹果种质进行分析,结果显示,2 种标记均具有较高的多态性比率(61.09%和 70.8%),其中 SSR 多态性比率较王爱德等^[14]的低,这可能是由于本研究在引物筛选过程中,偏重于选择适于绘制指纹图谱的引物造成的,因此在今后的研究中,应该依据不同的试验目的有针对性地选择引物;SRAP 的多态性比率也较张春雨等^[13]的低,这可能是由于文献^[13]所用试验材料的遗传背景较宽,而本试验的供试品种大多数是金冠、元帅及含有二者血缘关系的苹果品种,遗传背景较窄造成的。

在进行系谱分析时,为了得到尽可能准确的亲缘关系进化图,将不同的分子标记数据综合起来进行亲缘关系的评价是可行而且必要的。综合多种标记数据的分析可以有效减少各自方法产生的误差^[23-24]。本试验以 SSR+SRAP 的聚类结果为主来解释苹果品种间的亲缘关系,进一步证明了不同的分子标记数据综合应用的可行性和有效性。但本试验联合 2 种分子标记对供试苹果品种进行分析时仍然出现了无血缘关系却被聚为一类的现象,如锦红

(红玉×鸡冠)和嘎啦系聚在一起,其原因一是所检测的位点不足,不能完全反映出整个苹果连锁群的复杂情况,导致系谱偏离;二是苹果的高度杂合导致亲缘关系较近的品种间产生复杂的遗传多样性。因此,利用 SSR 和 SRAP 标记进行苹果品种亲缘关系分析时,应进一步扩大引物范围,在此基础上进行筛选,再对所选标记进行联合分析,从而更加准确地反映品种间的亲缘关系。

4 结 论

对 37 个苹果品种进行 SSR 和 SRAP 分析,分别获得了 10 对多态性较好的引物,平均多态性比率分别为 61.09%和 70.8%。综合 SSR 和 SRAP 数据进行聚类分析,在遗传相似系数为 0.59 时,将 37 个供试苹果品种分为 6 大类,与传统系谱基本一致。

[参考文献]

[1] 束怀瑞. 苹果学 [M]. 北京:中国农业出版社,1999:37-39.
Shu H R. Apple science [M]. Beijing: China Agricultural Press,1999:37-39. (in Chinese)

[2] 沈德绪. 果树育种学 [M]. 北京:农业出版社,1992:89-90.
Shen D X. Fuit breeding [M]. Beijing: Agricultural Publishing House,1992:89-90. (in Chinese)

- [3] 徐晋麟. 现代遗传学原理 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 167-180.
Xu J L. Modern genetics [M]. Beijing: Science Press, 2000: 167-180. (in Chinese)
- [4] 王彩虹, 束怀瑞. 利用分子标记研究苹果资源与基因组的进展 [J]. 果树学报, 2001, 18(2): 33-38.
Wang C H, Shu H R. Development of the study in apple germplasm resources and genome by DNA molecular marker techniques [J]. Journal of Fruit Science, 2001, 18(2): 33-38. (in Chinese)
- [5] 姚玉新, 翟衡. 苹果基因组分子生物学研究进展 [J]. 果树学报, 2004, 21(6): 586-591.
Yao Y X, Zhai H. Review of molecular studies on apple genome [J]. Journal of Fruit Science, 2004, 21(6): 586-591. (in Chinese)
- [6] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 50-170.
Zhou Y Q. DNA molecular markers in plant study [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 50-170. (in Chinese)
- [7] 李永祥, 李斯深, 李立会, 等. 披碱草属 12 个物种遗传多样性的 ISSR 和 SSR 比较分析 [J]. 中国农业科学, 2005, 38(8): 1522-1527.
Li Y X, Li S S, Li L H, et al. Comparison of genetic diversity of twelve elymus species using ISSR and SSR markers [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2005, 38(8): 1522-1527. (in Chinese)
- [8] Powell W, Morgante M. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis [J]. Molecular Breeding, 1996, 2(3): 225-238.
- [9] Archak S, Gaikwad A B, Gautam D, et al. Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India [J]. Genome, 2003, 46(2): 362-369.
- [10] Budak H, Shearman R C, Parmaksiz I, et al. Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buffalo grasses based on pflo genetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs and SRAPs [J]. Theor Appl Genet, 2004, 109(1): 280-288.
- [11] Riaz A, Potter D, Stephen M. Genotyping of peach and nectarine cultivars with SSR and SRAP molecular markers [J]. Amer Soc Hort Sci, 2004, 129(3): 204-211.
- [12] Li G, Quiros C F. Sequence related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. Theor Appl Genet, 2001, 103(2): 455-461.
- [13] 张春雨, 陈学森, 林群, 等. 新疆野苹果群体遗传结构和遗传多样性的 SRAP 分析 [J]. 园艺学报, 2009, 36(1): 7-14.
Zhang C Y, Chen X S, Lin Q, et al. SRAP markers for population genetic structure and genetic diversity in *Malus sieversii* from Xinjiang, China [J]. Acta Horticulture Sinica, 2009, 36(1): 7-14. (in Chinese)
- [14] 王爱德, 李天忠, 许雪峰, 等. 苹果品种的 SSR 分析 [J]. 园艺学报, 2005, 32(5): 721-726.
Wang A D, Li T Z, Xu X F, et al. SSR analysis for apple cultivars [J]. Acta Horticulture Sinica, 2005, 32(5): 721-726. (in Chinese)
- [15] 高源. 苹果属种质资源亲缘关系和遗传多样性的 SSR 分析 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.
Gao Y. SSR analysis of phylogenetic relationship and genetic diversity for *Malus* Mill. Germplasm resources [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2007. (in Chinese)
- [16] 高华, 樊红科, 万怡震, 等. 苹果栽培品种的 SSR 鉴定及遗传多样性分析 [J]. 西北农业学报, 2011, 20(2): 153-158.
Gao H, Fan H K, Wan Y Z, et al. SSR analysis of genetic diversity of apple cultivars [J]. Acta Agricultural Boreali-Occidentalis Sinica, 2011, 20(2): 153-158. (in Chinese)
- [17] 徐兴兴, 杨敏生, 梁海永, 等. 苹果栽培品种的微卫星标记鉴定 [J]. 中国农学通报, 2007, 23(6): 414-417.
Xu X X, Yang M S, Liang H Y, et al. Identification of apple varieties with SSR molecular markers [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2007, 23(6): 414-417. (in Chinese)
- [18] Grpta P K, Varshner R K. The development and use of micro-satellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat [J]. Euphytica, 2000, 113(3): 163-185.
- [19] Shizuka Ohki, Claude Bigot. Analysis of shoot-forming capacity *in vitro* in two lines of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and their hybrids [J]. Plant and Cell Physiology, 1977, 19: 27-42.
- [20] 李育农. 苹果属植物种质资源研究 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 79-89.
Li Y N. Researches of germplasm resources of *Malus* Mill. [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2001: 79-89. (in Chinese)
- [21] 王爱德. 苹果品种纯度分子监测体系的建立及新品种纯度鉴别 [D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
Wang A D. Establishment of molecular detection system for cultivars purity and identification for new cultivars of apple (*Malus domestica* Borkh.) [D]. Beijing: China Agricultural University, 2005. (in Chinese)
- [22] 陆秋农, 贾定贤. 中国果树志: 苹果卷 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 中国林业出版社, 1999: 481.
Lu Q N, Jia D X. Chinese fruit: Apple [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Publishing House, China Forestry Publishing House, 1999: 481. (in Chinese)
- [23] Crouch J H, Crouch H K, Constandt H, et al. Comparison of PCR-based molecular marker analysis of Musa breeding populations [J]. Molecular Breeding, 1999, 5(3): 233-244.
- [24] 胡文舜, 郑少泉, 李韬, 等. 云南野生枇杷种质资源亲缘关系的鉴定与分类研究 [D]. 福建福州: 福建师范大学, 2006.
Hu W S, Zheng S Q, Li T, et al. Study on relationship identification and classification of Yunnan eriobotrya resource [D]. Fuzhou, Fujian: Fujian Normal University, 2006. (in Chinese)