

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2010.01114

小麦区试品系 DUS 测试的分子标记

王立新 常利芳** 李宏博 季伟 刘丽华 赵昌平*

北京市农林科学院 / 北京杂交小麦工程技术研究中心, 北京 100097

摘要: 为了确定测试小麦(*Triticum aestivum* L.)区试品系特异性、一致性、稳定性(DUS)的分子标记, 采用 156 个来自我国不同麦区的品种对 SSR、EST-SSR 和 AFLP-SCAR 标记的 1334 对引物进行筛选, 根据在染色体上分布均匀、多态性信息指数较高、带型清晰、不同等位变异的带型易于区分及 PCR 产物稳定的原则, 筛选出 105 对小麦品种 DUS 测试的分子标记引物, 包括 63 对 SSR 引物、21 对 EST-SSR 引物和 21 对 AFLP-SCAR 引物, 可以检测 122 个位点的 754 个等位变异, 平均每条染色体上被检测位点 5.8 个, 平均每个位点包含 7.2 个等位变异。根据 DUS 测试的需求、引物的染色体分布、PIC 值大小和带型特点, 将 105 对引物分为 21 对核心引物、29 对一级备用引物和 55 对二级备用引物。核心引物分辨力较高, 可以完成约 80%品系的特异性检测, 约 95%品系的种子纯度检测和约 60%品系的一致性、稳定性检测; 备用引物用于确定品系 DNA 位点纯合率和相似品种(系)之间的遗传相似系数, 以判断 DNA 指纹相同或相似的品种(系)之间的相似性和特异性, 评价核心标记中具有非纯位点的品系的 DNA 位点纯合度, 同时完成核心引物未能完成的少数品系的种子纯度检测。通过在 2006—2007、2007—2008、2008—2009 年度对 464 个冬小麦区试品系 DUS 测试中的应用, 证明 105 对引物具有很好的代表性和实用性, 可以完成 90%以上参试品系的 DUS 检测。

关键词: 小麦; DUS 测试; 分子标记; DNA 指纹

Molecular Markers for Estimating Distinctness, Uniformity, and Stability of Wheat Lines in Regional Trials

WANG Li-Xin, CHANG Li-Fang**, LI Hong-Bo, JI Wei, LIU Li-Hua, and ZHAO Chang-Ping*

Beijing Engineering and Technique Research Center for Hybrid Wheat / Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100097, China

Abstract: To determine the molecular markers for testing the distinctness, uniformity, and stability (DUS) of wheat (*Triticum aestivum* L.) lines in regional trials, 156 wheat cultivars were used to screen 1 334 pairs of primers of SSR, EST-SSR, and AFLP-SCAR markers. According to the even distribution of molecular markers on 21 wheat chromosomes, the higher polymorphism information content (PIC), the clear PCR bands, the easy discrimination of different alleles, and the stable PCR amplification, 105 pairs of primers, including 63 pairs of SSR primers, 21 pairs of EST-SSR primers, and 21 pairs of AFLP-SCAR primers, were selected for wheat cultivar (lines) DUS testing. A total of 754 alleles at 122 loci can be identified with 105 pairs of primers, with 5.8 loci per chromosome and 7.2 alleles per locus on average. The three kinds of molecular markers can amplify the DNA fragments that are inside/outside of genes and repetitive/non-repetitive sequences. The 105 pairs of primers were classified into 21 pairs of core primers and 84 pairs of standby primers based on their pattern definition, distribution on 21 chromosomes, and PIC value. The 21 core primers distributing on 21 chromosomes could determine the distinctness test for about 80% of total cultivars (lines), the seed purity test for 95%, and the uniformity and stability test for 60%. The 84 standby primers were used as the first grade (29 pairs) and the second grade (55 pairs) to the homozygous DNA locus ratio of lines with no-homozygous loci of core markers and the genetic similarities or the distinctness of similar cultivars (lines) pairs revealed by the core primers. At the same time, we determined the seed purity for the other 5% of lines. These 105 pairs of primers could finish DUS test for more than 90% of lines in the winter wheat regional trials in 3 cropping seasons from 2006 to 2009. Although less than 10% of lines should be evaluated in combination with phenotypic identification in the field, the effectiveness and efficiency of the 105 pairs of primers are satisfactory in bulk screening for wheat DUS test.

Keywords: Wheat; DUS; Molecular markers; DNA fingerprint

本研究由北京市农业育种基础研究创新平台项目 II (D08070500690801)和国家科技支撑计划项目(2006BAD01A02-4)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 赵昌平, E-mail: bjhw2003@yahoo.com.cn, Tel: 010-51503968

第一作者联系方式: E-mail: wanglx53@263.net, Tel: 010-51503966 **共同第一作者

Received(收稿日期): 2010-02-03; Accepted(接受日期): 2010-04-12.

植物新品种必须具备特异性、一致性和稳定性 (distinctness, uniformity, and stability, DUS), 才能获得品种权。现行的 DUS 测试依据国家标准考察品种的表型和主要农艺性状, 以此判断测试品种是否具备特异性、一致性和稳定性。自相关标准颁布以来, 在新品种 DUS 测试中起着重要作用。但因存在鉴定周期长、易受环境影响、测试性状多、工作量大等问题^[1], 无法适应大量品种的测试需求。而分子标记检测技术因具有测试周期短、不受环境影响和季节限制、供选择的标记数量多、可以进行高通量测试分析的优势, 已经逐步用于新品种鉴定、种子纯度及品种真实性检测^[2-5]。目前, 我国已颁布了采用分子标记技术鉴定玉米、水稻品种的农业行业标准, 但尚未颁布小麦的相关标准。本中心为建立小麦品种 DUS 测试的分子标记技术体系开展了各项研究^[4-9], 其中, 筛选一套具有较高多态性、代表性、稳定性的分子标记是建立这一体系的基础。

我国小麦品种 DUS 测试的国标《植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南——普通小麦》(GB/T19557.2-2004)规定: 在进行品种的特异性测试时, 被测试品种有 1 个质量性状或 2 个及 2 个以上数量性状与近似品种达到差异; 或 1 个数量性状与近似品种相差 2 个及 2 个以上代码, 即可判定测试品种与近似品种具有特异性。而在以分子标记为基础的测试体系中, 是以两品种 DNA 位点比对结果来判断品种间是否具有特异性的^[5,10-14], 因此要求检测品种特异性的核心标记应具有较高的分辨率和代表性, 最好能与表型性状之间有一定的相关性, 使检测结果最大程度的与田间特异性测试结果相吻合。但目前小麦主要表型性状和农艺性状的分子标记较少, 且多是显性标记, 多态性低, 只能作为品种特异性检测的辅助标记, 若要准确判断品种是否具有特异性则必须筛选分辨率较高的分子标记。

随着分子标记技术的发展, 多种类型的分子标记被开发应用, 但并非所有的分子标记都适用于品种 DUS 测试。为了使检测结果更加科学、准确, 必须筛选具有较高多态性、带型清晰、不同等位变异易于识别、重复性好、在各条染色体上均匀分布的分子标记, 且标记之间不可存在紧密连锁。在各种分子标记中, SSR (simple sequence repeats) 标记具有多态性高、呈共显性遗传、重复性好、成本低廉、实验周期短等优点, 是目前品种鉴定中应用最多的分子标记^[10-13]。EST-SSR (expressed sequence tags-

simple sequence repeats)是基因表达区域的 SSR 标记, 可以反映品种间基因序列的多样性^[14]。本中心自主开发的 AFLP-SCAR (amplified fragment length polymorphism-sequence characterized amplified region)标记^[15-16]带型清晰、特异性高、操作简便, 且弥补了 AFLP 标记的缺陷, 可以检测与 SSR 标记不同区域的 DNA 位点。为了更加全面、真实、快速地反映品种的基因型, 本研究通过对大量的 SSR、EST-SSR 和 AFLP-SCAR 标记的比较, 确定了一套在小麦染色体上均匀分布、PIC 值高、带型清晰、易于区别等位变异间带型差异、PCR 产物稳定的分子标记, 并在 2006—2007、2007—2008 年度国家冬小麦区试、2008—2009 年度国家、北京市、河北省冬小麦区试品系的 DUS 测试中应用, 证明了这套分子标记具有实用性和代表性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

小麦品种(系)共 759 个, 用于核心引物筛选的为 11 个系谱差异较大的作图群体亲本和 145 个来自我国不同麦区的审定品种, 其余 603 个分别是 2006—2007、2007—2008 年度国家冬小麦区域试验品系、2008—2009 年度国家、北京市、河北省冬小麦区域试验品系和近几年的审定品种, 用于核心引物的实用性验证。采用简化 CTAB 法^[6]提取小麦品种的基因组 DNA。

1.2 引物筛选及 PCR 扩增

选用分布于小麦全基因组的 1 334 对引物, 其中 SSR 引物 778 对、EST-SSR 引物 284 对和 AFLP-SCAR 引物 272 对(表 1)。所有引物均由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

PCR 反应体系 20 μL , 含 10 \times PCR buffer 2 μL , 10 mmol L⁻¹ dNTP 0.3 μL , 1.25 μmol 引物 4 μL , 2 U μL^{-1} *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL , 10 ng μL^{-1} 模板 DNA 6 μL , 超纯水 7.2 μL 。10 \times PCR buffer、dNTP 和 *Taq* DNA 聚合酶均购自北京鼎国生物技术有限责任公司。反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 35 或 45 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 10 $^{\circ}\text{C}$ 保存。根据引物选择不同退火温度(表 2)。PCR 产物经 6%聚丙烯酰胺变性凝胶电泳分离, 以 2 000 V 电压电泳 1.5~3.0 h。凝胶染色为简化硝酸银染色法^[6]。

首先用 11 个系谱差异较大的品种对所有引物

表1 引物类型及其来源
Table 1 The primer categories and their origins

引物类型 Primer type	引物系列 Primer series	引物对数 Primer pair	来源 Reference
SSR	BARC	122	Perry Cregan (USDA), http://www.scabusa.org
	CFA	28	Pierre Sourdille (INRA), http://wheat.pw.usda.gov
	CFD	99	Pierre Sourdille (INRA), http://wheat.pw.usda.gov
	DP	14	Li et al. [17]
	GDM	32	Pestsova et al. [18]
	GWM	204	Röder et al. [19]
	WMC	279	http://wheat.pw.usda.gov
EST-SSR	CNL	44	http://wheat.pw.usda.gov/itmi/est-ssr/cornell/
	CWEM	46	http://wheat.pw.usda.gov/itmi/est-ssr/
	CWM	31	Gao [20]
	KSUM	85	http://wheat.pw.usda.gov/itmi/est-ssr/cornell/
	SWES	47	Chen et al. [21]
	WES	31	Chen et al. [22]
AFLP-SCAR	BHW	272	Wang et al. [16]

进行初筛, 选出带型清晰、具有多态性的引物。入选引物用 48 个审定品种复筛, 除评价带型清晰度、多态性高低外, 重点考察不同等位变异的带型是否易于区分。入选引物用 145 个品种决选, 要求入选引物在染色体上分布均匀、带型清晰、不同等位变异的带型易于区分、PCR 产物稳定, 并且 SSR 引物的 $PIC > 0.5$, EST-SSR 和 AFLP-SCAR 引物的 $PIC > 0.3$, 最终确定一套引物。

1.3 扩增产物分析

采用 Wang 等^[7]的方法检测位点的各个等位变异, 并按带型编号。

$PIC = 1 - \sum f_i^2$, 其中 f_i 为 i 位点的基因频率^[23]。

按照 Nei 等^[23]的方法计算品种(系)间的相似系数。 $GS_{ij} = 2N_{ij}/(N_i + N_j)$ 。式中 N_{ij} 为两品种(系)相同带型的 DNA 位点数目, N_i 、 N_j 分别为 i 和 j 两品种(系)相比对的 DNA 位点总数。

按照 Wang 等^[9]的方法统计品种的非纯 DNA 位点, 计算 DNA 位点纯合率。DNA 位点纯合率(%) = (检测 DNA 位点总数 - 非纯 DNA 位点数) / 检测 DNA 位点总数 × 100%。

1.4 农艺性状的考察

按国标“植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南—普通小麦”(GB/T19557.2-2004)的方法, 每份材料考察 30~50 个单株的株高、株型、旗叶角度、旗叶长宽、茎叶蜡质、抽穗期、单株有效穗数、穗型、穗部蜡质、芒性、穗长、每穗小穗数、不孕小

穗数、每穗粒数、粒色、粒型、粒质和千粒重。

2 结果与分析

2.1 小麦区试品系 DUS 测试的分子标记

2.1.1 分子标记的筛选 利用 156 个小麦品种对 1 334 对引物进行筛选与评价, 筛选了 105 对作为小麦区试品系 DUS 测试的引物(表 2), 其中 Genomic-SSR 引物 63 对、EST-SSR 引物 21 对和 AFLP-SCAR 引物 21 对, 检测到 122 个 DNA 位点的 754 个等位变异, 平均每条染色体上被检测位点 5.8 个, 平均每个位点含有 7.2 个等位变异, 说明这套引物具有较好的鉴别能力。在检测到的 122 个 DNA 位点中, 除 17 个尚未定位外, 其余位点均匀分布在小麦 21 条染色体上, 且各个位点间不存在紧密连锁^[24]。大多数染色体上被检测位点为 3~6 个, 因有多位点引物之故, 少数染色体上被检测位点较多, 如 1A、1B、5B、7B 染色体上分别有 7、10、8、7 个位点。

在 105 对引物中, Genomic-SSR 引物的 PIC 值平均为 0.76, EST-SSR 和 AFLP-SCAR 引物的平均 PIC 值分别为 0.53 和 0.57(表 3)。与 Genomic-SSR 标记相比, EST-SSR 和 AFLP-SCAR 标记的分辨能力稍差, 但 EST-SSR 标记是基因转录区的重复序列 DNA, AFLP-SCAR 标记为非重复序列 DNA, 3 种标记相结合可以检测到小麦基因组不同区域的多态性。

105 对引物包括 95 对单位点引物和 10 对多位点引物。单位点引物的产物带型简单, 各种等位变

表 2 105 对引物的详细信息
Table 2 The detailed information of 105 pairs primers

引物 Primer	引物类型 Primer type	位点数目 Locus No.	染色体位置 Chromosomal location	等位变异 数目 Allele No.	PIC 值 PIC value	退火 温度 T_m (°C)	片段大小 Fragment size (bp)	引物级别 Primer level
cwm65	EST-SSR	1	1A	7	0.73	65	220-260	core
barc80	Genomic-SSR	1	1BL	6	0.65	65	100-125	core
cf72	Genomic-SSR	1	1DM	7	0.68	65	210-240	core
gwm294	Genomic-SSR	1	2AL	14	0.79	65	50-120	core
gwm429	Genomic-SSR	1	2BS	11	0.76	58	190-230	core
gwm261	Genomic-SSR	1	2DS	11	0.74	65	160-200	core
gwm155	Genomic-SSR	1	3AL	9	0.77	60	120-160	core
gwm285	Genomic-SSR	1	3BS	12	0.76	65	210-250	core
gdm72	Genomic-SSR	1	3DL	8	0.74	60	110-150	core
gwm610	Genomic-SSR	1	4AL	5	0.62	60	160-175	core
ksum62	EST-SSR	1	4B	8	0.82	65	160-220	core
barc91	Genomic-SSR	1	4DL	10	0.78	60	110-160	core
cwem40	EST-SSR	1	5A	9	0.79	58	110-180	core
gwm67	Genomic-SSR	1	5BS	7	0.66	60	70-100	core
cf729	Genomic-SSR	1	5DL	12	0.85	63	180-200	core
gwm334	Genomic-SSR	1	6AS	18	0.83	50	100-150	core
barc198	Genomic-SSR	1	6BL	11	0.75	65	110-160	core
cf76	Genomic-SSR	1	6DL	11	0.84	68	140-170	core
cfa2028	Genomic-SSR	1	7AS	7	0.61	65	220-240	core
gwm333	Genomic-SSR	1	7BL	6	0.67	63	About 150	core
gwm437	Genomic-SSR	1	7DL	13	0.67	50	90-140	core
bhw14	AFLP-SCAR	1	1A	2	0.35	63	81-84	1st-grade standby
cwm75	EST-SSR	1	1A	4	0.50	65	21-240	1st-grade standby
ksum182	EST-SSR	1	1A	4	0.53	65	About 185	1st-grade standby
cn1150	EST-SSR	1	1B	4	0.50	63	About 200	1st-grade standby
barc240	Genomic-SSR	1	1BL	8	0.70	63	240-280	1st-grade standby
cwm170	EST-SSR	1	1D	2	0.37	65	About 240	1st-grade standby
cwm334	EST-SSR	1	2A	3	0.53	65	175-180	1st-grade standby
wmc764	Genomic-SSR	1	2BS	7	0.81	65	130-180	1st-grade standby
ksum73	EST-SSR	1	2D	3	0.55	60	About 180	1st-grade standby
swes185	EST-SSR	1	3B	4	0.58	65	180-190	1st-grade standby
gwm566	Genomic-SSR	1	3BS	7	0.76	58	120-140	1st-grade standby
gwm161	Genomic-SSR	1	3DS	8	0.69	60	150-170	1st-grade standby
ksum134	EST-SSR	1	4A	2	0.36	65	250-280	1st-grade standby
wmc468	Genomic-SSR	1	4AL	12	0.84	60	130-170	1st-grade standby
bhw135	AFLP-SCAR	1	4B	2	0.46	60	About 180	1st-grade standby
gwm495	Genomic-SSR	1	4BL	9	0.75	65	150-180	1st-grade standby
cfa2155	Genomic-SSR	1	5AL	5	0.74	65	220-240	1st-grade standby

(续表 2)

引物 Primer	引物类型 Primer type	位点数目 Locus No.	染色体位置 Chromosomal location	等位变异 数目 Allele No.	PIC 值 PIC value	退火 温度 T_m (°C)	片段大小 Fragment size (bp)	引物级别 Primer level
wes26	EST-SSR	1	5B	2	0.38	65	160–175	1st-grade standby
cwm232	EST-SSR	1	5BL	2	0.36	65	About 185	1st-grade standby
cf8	Genomic-SSR	1	5DL	7	0.66	68	150–160	1st-grade standby
gwm570	Genomic-SSR	1	6AL	8	0.74	63	120–150	1st-grade standby
gwm325	Genomic-SSR	1	6DS	8	0.76	62	130–150	1st-grade standby
gwm469	Genomic-SSR	1	6DS	9	0.80	68	150–180	1st-grade standby
swes209	EST-SSR	1	7B	4	0.63	60	About 300	1st-grade standby
gwm297	Genomic-SSR	1	7BL	9	0.75	65	130–180	1st-grade standby
wmc702	Genomic-SSR	1	7DS	8	0.80	60	150–190	1st-grade standby
bhw15	AFLP-SCAR	1	unknown	3	0.61	63	115	1st-grade standby
bhw163	AFLP-SCAR	1	unknown	2	0.50	55	118	1st-grade standby
swes228	EST-SSR	1	unknown	3	0.30	65	130–145	1st-grade standby
cwm593	EST-SSR	1	1A	2	0.36	65	110–125	2nd-grade standby
barc17	Genomic-SSR	1	1AL	8	0.77	60	250–280	2nd-grade standby
barc28	Genomic-SSR	1	1AS	6	0.67	65	250–280	2nd-grade standby
bhw3	AFLP-SCAR	1	1B	2	0.49	63	54	2nd-grade standby
bhw36	AFLP-SCAR	1	1B	2	0.48	60	97	2nd-grade standby
bhw6	AFLP-SCAR	1	1B	2	0.50	58	67	2nd-grade standby
cn1105	EST-SSR	1	1B	2	0.37	60	110–140	2nd-grade standby
cn1134	EST-SSR	1	1B	6	0.76	65	200–250	2nd-grade standby
gwm268	Genomic-SSR	1	1BL	19	0.82	63	230–250	2nd-grade standby
bhw18	AFLP-SCAR	1	2A	4	0.48	55	151	2nd-grade standby
gwm339	Genomic-SSR	2	a: 2AS b: 2AS	a: 8 b: 7	0.82	50	130–170	2nd-grade standby
gwm120	Genomic-SSR	1	2BL	10	0.84	62	130–160	2nd-grade standby
barc168	Genomic-SSR	1	2DS	4	0.56	63	150–180	2nd-grade standby
gwm539	Genomic-SSR	1	2DS	13	0.83	58	130–170	2nd-grade standby
wmc532	Genomic-SSR	1	3AS	8	0.59	63	160–200	2nd-grade standby
bhw123	AFLP-SCAR	1	3B	2	0.32	55	134	2nd-grade standby
ksum29	EST-SSR	1	3B	4	0.20	65	180–200	2nd-grade standby
wmc326	Genomic-SSR	1	3BL	9	0.76	65	170–210	2nd-grade standby
gwm645	Genomic-SSR	1	3DL	12	0.89	60	135–170	2nd-grade standby
gwm160	Genomic-SSR	2	One: 4AL Another: unknown	a: 8 b: 4	a: 0.49 b: 0.52	60	170–200	2nd-grade standby
barc20	Genomic-SSR	1	4BL	6	0.74	68	180–210	2nd-grade standby
wmc349	Genomic-SSR	1	4BS	7	0.57	65	85–110	2nd-grade standby

(续表 2)

引物 Primer	引物类型 Primer type	位点数目 Locus No.	染色体位置 Chromosomal location	等位变异 数目 Allele No.	PIC 值 PIC value	退火 温度 T_m (°C)	片段大小 Fragment size (bp)	引物级别 Primer level
wmc457	Genomic-SSR	1	4DL	4	0.58	65	160–170	2nd-grade standby
wmc720	Genomic-SSR	1	4DS	13	0.81	60	100–140	2nd-grade standby
cwem44	EST-SSR	1	5A	4	0.74	58	50–70	2nd-grade standby
gwm304	Genomic-SSR	1	5AS	16	0.80	65	200–230	2nd-grade standby
bhw124	AFLP-SCAR	1	5B	2	0.33	60	76	2nd-grade standby
bhw129	AFLP-SCAR	1	5B	2	0.48	65	140	2nd-grade standby
barc59	Genomic-SSR	1	5BL	6	0.76	65	160–200	2nd-grade standby
barc21	Genomic-SSR	1	5BS	7	0.65	65	200–215	2nd-grade standby
barc4	Genomic-SSR	1	5BS	8	0.80	65	130–220	2nd-grade standby
gwm272	Genomic-SSR	2	One: 5DL Another: unknown	a: 5 b: 3	0.70	50	120–150	2nd-grade standby
bhw13	AFLP-SCAR	1	6A	2	0.47	63	52	2nd-grade standby
gwm169	Genomic-SSR	1	6AL	8	0.70	60	180–235	2nd-grade standby
gwm617	Genomic-SSR	1	6AL	11	0.76	65	100–180	2nd-grade standby
cn1138	EST-SSR	1	6B	10	0.85	65	180–250	2nd-grade standby
wmc494	Genomic-SSR	1	6BS	9	0.67	65	200–230	2nd-grade standby
wmc486	Genomic-SSR	1	6BS	6	0.71	65	195–215	2nd-grade standby
bhw20	AFLP-SCAR	1	7A	2	0.43	58	151	2nd-grade standby
barc174	Genomic-SSR	1	7AS	7	0.76	65	160–230	2nd-grade standby
wmc603	Genomic-SSR	1	7AL	10	0.74	65	90–120	2nd-grade standby
gwm344	Genomic-SSR	1	7BL	8	0.61	60	130–150	2nd-grade standby
gwm44	Genomic-SSR	1	7DS	12	0.84	63	160–210	2nd-grade standby
wmc506	Genomic-SSR	1	7DS	14	0.68	65	180–230	2nd-grade standby
cfid65	Genomic-SSR	4	a: 1D b: 1B c: unknown d: unknown	a: 8 b: 2 c: 2 d: 2	a: 0.70 b: 0.25 c: 0.23 d: 0.18	63	150–200	2nd-grade standby
gwm614	Genomic-SSR	2	a: 2BS b: 2AS	a: 8 b: 7	a: unknown b: 0.73	60	110–170	2nd-grade standby
wmc264	Genomic-SSR	2	a: 3AL b: unknown	a: 11 b: 2	a: 0.82 b: 0.49	68	120–150	2nd-grade standby
bhw120	AFLP-SCAR	3	a: 4A b: 4A c: 3D	a: 2 b: 3 c: 2	a: 0.39 b: unknown c: 0.5	60	130–160	2nd-grade standby
bhw17	AFLP-SCAR	3	a: 7B b: 7B c: 5D	a: 2 b: 2 c: 2	a: 0.43 b: 0.47 c: low	58	81	2nd-grade standby
bhw171	AFLP-SCAR	4	a: unknown b: 2B c: unknown d: 7B	a: 2 b: 2 c: 2 d: 2	a: 0.27 b: 0.50 c: 0.50 d: 0.16	58	110–155	2nd-grade standby
bhw11	AFLP-SCAR	1	unknown	2	0.32	65	101	2nd-grade standby
bhw137	AFLP-SCAR	1	unknown	2	0.36	58	211	2nd-grade standby
bhw138	AFLP-SCAR	1	unknown	2	0.48	55	118	2nd-grade standby
bhw162	AFLP-SCAR	3	unknown	a: 2 b: 2 c: 2	a: 0.26 b: 0.48 c: 0.46	65	About 115	2nd-grade standby
bhw19	AFLP-SCAR	1	unknown	2	0.45	58	92	2nd-grade standby

a、b、c 和 d 表示不同位点。a, b, c, and d denote different loci.

表 3 3 种分子标记的分辨能力
Table 3 Discrimination power of three types of molecular markers

引物类型 Primer type	引物对数 Primer pair	检测位点数 Locus number	检测等位变异数 Allele number	平均每条染色体被检测位点数 Tested locus number per chromosome	每对引物检测等位变异数 Allele number per primer	PIC 平均值 Average of PIC
Genomic-SSR	63	71	601	3.4	9.5	0.76
EST-SSR	21	21	89	1.0	4.2	0.53
AFLP-SCAR	21	30	64	1.4	3.0	0.57

异的带型差异容易区分, 部分引物可以进行多重电泳(图 1)。多位点引物的产物带型较复杂, 但一次 PCR 反应可以扩增多个位点的产物(图 2), 10 对引物可以检测 27 个 DNA 位点的多态性, 增加了被检测品种(系)的信息量。在 10 对多位点引物中, gwm334 为双位点引物, 但绝大多数品种 *Xgwm334a* 和 *Xgwm334b* 的位点纯合性检测结果相同, 证明这两个位点紧密连锁, 因此本文将 gwm334 作为单位点引物对待。双位点引物 gwm339 和 gwm272 在部分品种中扩增的两位点 DNA 片段长度接近, 带纹相互交叉不易分开, 本文暂按单位点计算其 PIC 值(表 2)。尽管这两对引物的带型有些不足, 但其多态性高, 带型清晰稳定, 且为满足 2 对引物所处染色体的检测位点数量, 因此选作二级备用引物。

2.1.2 分子标记的分级 根据小麦区试品系特异性、一致性、稳定性测试的需要, 以及引物的染色体分布、PIC 值和带型清晰度等因素, 将 105 对引物划分为核心、一级备用、二级备用 3 个等级(表 2)。

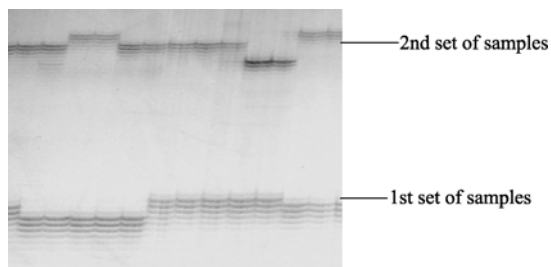


图 1 Genomic-SSR 引物 barc91 的 PCR 产物双重电泳图
Fig. 1 Electrophoretogram of two sets of PCR products amplified by genomic-SSR primer barc91

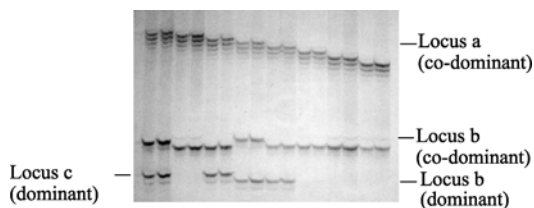


图 2 Genomic-SSR 引物 cfd65 四个位点的带型
Fig. 2 Four loci patterns of genomic-SSR primer cfd65

核心引物 21 对, 含 Genomic-SSR 引物 18 对和 EST-SSR 引物 3 对, 均为单位点引物, 分别位于 21 条染色体。本研究为 21 对核心引物各个等位变异的带型确定了编号、对照品种及带型图(表 4 和图 3), 为每个品种构建了 21 个位点的 DNA 指纹。一级备用引物 29 对, 含 Genomic-SSR 引物 13 对、EST-SSR 引物 12 对和 AFLP-SCAR 引物 4 对, 所扩增的产物均为单位点的共显性标记, 带型清晰、不同等位变异间的带型容易区分。二级备用引物 55 对, 含 Genomic-SSR 引物 32 对、EST-SSR 引物 6 对和 AFLP-SCAR 引物 17 对。核心引物以 Genomic-SSR 引物为主, PIC 值较高, 具有较强的分辨率, 备用引物中包含了较多 EST-SSR 和 AFLP-SCAR 引物, 分辨率低于核心引物(表 5)。

表 4 核心引物 gdm72 的等位变异带型编号及相应对照品种
Table 4 Pattern codes and control cultivars for each allele of the core primer gdm72

带型编号 Pattern code	对照 1 Control 1	对照 2 Control 2
06	晋麦 53 号 Jinmai 53	
08	西峰 20 Xifeng 20	
09	淮麦 18 Huaimai 18	淮麦 20 Huaimai 20
10	济麦 1 号 Jimai 1	周麦 16 Zhoumai 16
11	潍麦 8 号 Weimai 8	京花 1 号 Jinghua 1
12	徐州 25 Xuzhou 25	扬麦 9 号 Yangmai 9
13	洛旱 2 号 Luohan 2	京冬 8 号 Jingdong 8
14	泽优 1 号 Zeyou 1	济宁 13 Jining 13

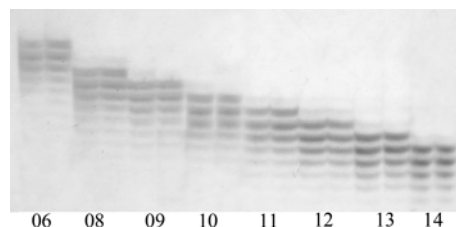


图 3 核心引物 gdm72 的等位变异带型图及编号
Fig. 3 Patterns and codes for each allele of the core primer gdm72

图中每两个泳道为一种带型, 图下方数字为各带型的编号。
Each two lanes are the same pattern. The number at the bottom is pattern code.

表 5 三个级别引物的分辨能力
Table 5 Discrimination power of three classes of primers

引物级别 Primer level	引物对数 Primer pair	检测位点数 Loci number	检测等位 变异数 Allele number	每对引物检测等位变异数 Allele number per primer	PIC 平均值 Average of PIC
核心引物 Core primers	21	21	202	9.6	0.74
一级备用引物 1st-grade standby primers	29	29	151	5.2	0.60
二级备用引物 2nd-grade standby primers	55	72	401	7.2	0.69
合计 Total	105	122	754	7.1	0.68

2.2 核心引物在小麦区试品系 DUS 检测中的作用

21 对核心引物作为检测品种(系)特异性、一致性和稳定性的首选引物, 主要用于: (1) 建立品种(系)的 DNA 指纹, 鉴定品种(系)的特异性及相似性; (2) 品种(系)种子纯度检测; (3) 筛查 DNA 位点纯合率较低的品种(系)。

2.2.1 品种(系)特异性检测 品种特异性检测是 DUS 测试中最重要的项目, 其目的在于判断参试品系的新颖性和筛查无特异性品系。在每年的区试品系中都会发现一些品系高度相像或与已审定品种相像, 如何从众多品种(系)中找出这些品系是区域试验的难点, 根据本中心的研究证明, 品种间遗传相似系数(GS)随着核心标记相似率的增加而提高, 品种间的相似程度随着 GS 的提高而提高; GS 小于 0.90 的品种间差异显著互为特异品种; GS 为 0.91~0.95 的大多数品种之间具有特异性, GS 大于 0.95 的品种之间多高度相似甚至无特异性(另文发表)。据此, 在国家区试中检出的 GS 大于 0.95 的品

种(系), 将于下一年度送往农业部 DUS 测试中心进行特异性测试。

2008—2009 年度利用核心标记为国家、北京市、河北省冬小麦区试 196 个品系构建了 DNA 指纹, 通过与小麦 DNA 指纹数据库中的品种比对, 筛查出区试品系与审定品种间或区试品系间指纹完全相同的品种(系) 31 对, 20 个位点相同的品种(系) 35 对, 19 个位点相同的品种(系) 18 对, 其余品种(系)间均有 2 个以上的位点不同。用 84 对备用引物为以上 84 对品种(系)和随机选取的 14 对相同位点为 18 的品种(系)进行位点比对, 综合核心引物和备用引物的比对结果计算每对品种(系)的 GS, 比较以上 98 对品种(系)的指纹相似水平与 GS 表明, 两品种(系)间指纹完全相同时, GS 大于 0.95 的可能性为 90.3%; 20 个位点相同时, 两品种(系)间 GS 大于 0.95 的可能性为 14.3%; 19 个位点相同时, 两品种(系)间 GS 大于 0.95 的可能性为 5.6%; 18 位点相同时, 两品种(系)的 GS 均小于 0.95 (表 6)。再次证明品种间 GS 随着核心标记相似率的增加而提高。

表 6 98 对品种(系)的指纹相似水平和遗传相似系数(GS)
Table 6 Fingerprint similarity and GS for 98 pair cultivars in 2008—2009

两品种(系)间指纹中 相同的位点数目 The same locus number of finger- prints between two cultivars (lines)	品种(系) 对数 Pair of culti- vars (lines)	GS 平均数 Average of GS	GS 范围 Range of GS	GS > 0.95 的品种 (系)对数 Pair of cultivars (lines) (GS > 0.95)	两品种(系)间 GS > 0.95 的可能性 Probability of GS > 0.95 between 2 cultivars (lines) (%)
21	31	0.97	0.92—1.00	28	90.3
20	35	0.93	0.88—0.99	5	14.3
19	18	0.92	0.88—0.97	1	5.6
18	14	0.90	0.83—0.94	0	0

GS: 遗传相似系数。GS: genetic similarity.

19~21 个核心标记相同的 84 对品种(系)中, 涉及区试品系 45 个, 占 196 个品系的 23%, 说明比对核心引物构建的指纹, 可在大量品系中为近 80% 的品系判定特异性, 并将相似或无特异性的品系锁定在较小的范围内。构建 DNA 指纹是一项精细而耗时

的工作, 且因多数区试品系将被淘汰, 没有必要构建更多位点的 DNA 指纹。21 个核心标记构建的 DNA 指纹, 主要用于为大多数品系确定特异性和筛查出指纹相似性较高的品系。在 19~21 个核心标记相同的品种(系)中, 均有 GS 大于 0.95 的可能, 需利

用备用引物进行更多位点比对, 以确定 $GS > 0.95$ 的品种(系)。

2.2.2 品种(系)一致性、稳定性检测 种子纯度和 DNA 位点纯合率是影响品种一致性的主要因素, 在 2006—2007、2007—2008、2008—2009 年度国家冬小麦区试品系的一致性测试中, 利用核心分子标记, 采用作者提出的方法^[5], 为 95%~100%的品系完成了种子纯度检测, 并锁定了其余品系中疑似杂株的单株。证明用核心引物可以完成绝大多数品系的纯度检测。对于少数尚不能下结论的品系, 可借助备用引物加以检测。

DNA 位点纯合率的高低既影响小麦品种的一致性, 还决定着品种的遗传稳定性^[9]; 因此可以根据 DNA 位点纯合率评价品种的遗传稳定性和一致性。DNA 位点纯合率高于 95%的绝大多数品种和 DNA 位点纯合率为 90%~95%的少数品种具备一致性和稳定

性; DNA 位点纯合率低于 90%的品种不具备一致性和稳定性^[9]。据此, DNA 位点纯合率低于 90%的国家区试品系将被停试 1 年。本研究比较了 2007—2008、2008—2009 年度国家冬小麦区试品系中 104 个品系的核心标记纯合位点数与相应品系的 DNA 位点纯合率, 结果表明, 品种 DNA 位点纯合率随着核心标记中纯合位点数的增加而提高(表 7)。21 个核心标记均为纯合位点的品系其位点纯合率均高于 95%; 具有 20 个纯合位点的品系中, 位点纯合率高于 95.0%的占 80.4%; 具有 19 个纯合位点的品系中, 位点纯合率高于 95.0%的占 65.2%; 纯合位点少于 19 的品系中, 只有约 10%的品系 DNA 位点纯合率高于 95.0%。参加区试的多数品系的 21 个核心标记均为纯合位点, 因此, 根据核心标记的纯合位点数目, 可以使大多数品种通过稳定性检测, 对于具有非纯位点的品系, 再借助备用引物确定其 DNA 位点纯合率。

表 7 核心标记中纯合位点数与品种 DNA 位点纯合率的关系

Table 7 Relationship between number of the homozygous DNA locus for the core markers and the homozygous DNA locus ratio of cultivars

核心标记中的 纯合位点数 Number of homozygous DNA locus of the core markers	品系 数目 Line number	DNA 位点纯合率 平均数 Average ratio of homo- zygous DNA locus (%)	位点纯合率 $\leq 95\%$ 的品系数目 Number of lines with homozygous DNA locus ratio $\leq 95\%$	位点纯合率 $> 95\%$ 的品系数目 Number of lines with homozygous DNA locus ratio $> 95\%$	位点纯合率 $> 95\%$ 的品系比例 Percentage of culti- vars with homozygous DNA locus ratio $>$ 95% (%)
< 19	24	89.3	22	2	9.1
19	23	95.1	8	15	65.2
20	46	96.2	9	37	80.4
21	11	97.3	0	11	100.0

品种的一致性由种子纯度和 DNA 位点纯合率所决定, DNA 位点纯合率又与品种的遗传稳定性紧密相关^[9], 参试的大多数品系均具备较高种子纯度和 DNA 位点纯合率, 用核心引物检测种子纯度和 DNA 位点纯合率, 可以完成约 60%品系的一致性、稳定性检测。

2.3 备用引物在小麦区试品系 DUS 检测中的作用

核心引物可完成大多数区试品系特异性、一致性和稳定性检测, 对于尚未有结果的部分品系需要采用 84 对备用引物进行检测。备用引物主要用于: (1) 为 19~21 个核心标记相同的品种(系)确定 GS , 筛查 $GS > 0.95$ 的品种(系); (2) 完成核心引物未确定的少数品系种子纯度检测; (3) 与核心引物一起共同完成品系 DNA 位点纯合率的检测。

2.3.1 品种(系)特异性检测 在 2008—2009 年

度国家冬小麦区试品系的特异性测试中, 检测到 DNA 指纹中 19~21 个位点相同的品种(系) 46 对。为了减少 DNA 位点比对的工作量, 首先采用一级备用引物完成每对品种(系)的 29 个 DNA 位点的比对, 综合 50 个位点的比对结果, 计算每对品种(系)的 GS 。21 对品种(系)的相同位点数目为 44~47, $GS > 0.95$ 。因 $GS > 0.95$ 的品种(系)将送往农业部 DUS 测试中心进行特异性测试, 为了获得更加准确的 GS , 还需采用二级备用引物比对这些品种(系)更多的 DNA 位点。2008—2009 年度国家冬小麦区试品系 139 个, 利用核心引物确定 113 个品系与其他品种(系)的 $GS > 0.95$, 占参试品系的 81.3%。启用一级备用引物后, 又在其余 26 个品系中确定 6 个品系与其他品种(系)的 $GS < 0.95$, 至此通过特异性检测的品系达到 85.6%。显示了一级备用引物在检测品种(系)特异

性方面的重要作用。

通过比对 21 对核心标记和 29 对一级备用标记, 2008—2009 年度国家冬小麦区试品系中仍有 25 对品种(系)的 $GS > 0.95$, 采用二级备用引物为上述 25 对 $GS > 0.95$ 的品种(系)比对了 70 个 DNA 位点, 综合核心、备用引物比对结果, 计算每对品种(系)的 GS , 在 25 对品种(系)中 11 对品种(系) $GS > 0.95$, 其中涉及 8 个参试品系, 至此 2008—2009 年度国家冬小麦区试的 139 个品系中, 127 个品系与其他品种(系) $GS > 0.95$, 占参试品系的 91.4%; 14 对品种(系) $GS > 0.95$, 涉及参试品系 12 个, 占参试品系的 8.6%。据此将 14 对 $GS > 0.95$ 的品种(系)送往农业部 DUS 测试中心进行特异性测试。通过连续 3 个年度的应用和检验, 证明利用 105 对引物可以为绝大多数区试品系完成特异性检测, 并锁定了少数相似性较高的品种(系)。

2.3.2 品种(系)一致性、稳定性检测 在 2008—2009 年度国家冬小麦区试一致性检测中, 利用核心引物在 41 个品系中检出 94 个杂株, 还有 7 个品系的 26 个单株尚不能确定是否为杂株, 为此, 增加 9 个 PIC 值较高的一级备用引物(cwm75、ksum182、cn1150、ksum73、bhw135、wes26、swes209、swes185 和 cwm334), 对 26 个单株共检测 30 个位点。某单株的 30 个被检测位点中有 2 个以上与测试品系其他单株基因型不同, 即可判断为杂株^[5], 结果在 26 个单株中确定 21 株为杂株。本中心从 407 个国家区试品系中检出 110 个品系混有杂株, 但多数品系种子纯度高于 95%, 少数品系较差。

种子纯度是影响品种一致性的因素之一, DNA 位点纯合率是另一重要因素。为了确定检测品种 DNA 位点纯合率的标记数目, 比较了表 2 中 89 对共显性引物与 50 对核心及一级备用引物对 15 个品系的检测结果, 两方案检测的品系 DNA 位点纯合率差异不显著($P=0.185$)。证明采用核心及一级备用引物, 足以完成小麦品种 DNA 位点纯合率的检测。在 2006—2007、2007—2008、2008—2009 年度国家冬小麦区试中, 作者利用核心引物在 116 个品系中检出非纯 DNA 位点, 再用一级备用引物检测了每个品系的 29 个 DNA 位点, 综合 50 个位点的结果, 计算 116 个品系的 DNA 位点纯合率, 其中 60 个品系的 DNA 位点纯合率高于 95%, 22 个品系的 DNA 位点纯合率为 90%~95%, 35 个品系的 DNA 位点纯合率低于 90%。据此判定, 前 60 个品系具备一致性和稳

定性, 后 35 个品系不具备一致性和稳定性, DNA 位点纯合率为 90%~95%的 22 个品系需进行田间试验, 以确定是否具备一致性和稳定性。在 3 个年度区域试验中, 采用 21 对核心引物和 29 对一级备用引物, 为 95%的品系判定了一致性和稳定性。

3 讨论

利用分子标记进行品种 DNA 指纹构建、品种鉴定或种子纯度鉴定的多数研究中仅采 Genomic-SSR 标记^[10-13]。为了保证选中的分子标记中有一定比例的基因内标记, 本研究筛选了 21 对 EST-SSR 引物和 21 对 AFLP-SCAR 引物。21 对 AFLP-SCAR 引物根据 19 个 AFLP 片段的 DNA 序列设计, 其中, 15 个为新发现的小麦 DNA 片段, 另 4 个片段与 GenBank 中 EST 片段高度同源, 同源性 96%, 证明 AFLP-SCAR 中有 EST。此外, Genomic-SSR 标记中也有一定比例的 EST-SSR。因此, 在 122 个位点中既有基因内标记也有基因外标记, 既有重复序列分子标记又有非重复序列分子标记, 与仅用一种分子标记构建 DNA 指纹的方法相比, 能够更加全面的反映品种的基因型。

利用分子标记进行小麦遗传多样性研究和筛选核心标记的报道已有不少^[17-18, 26-27], 品种的遗传多样性分析重在揭示品种间的亲缘关系及遗传基础, 在研究中只要品种间一个 DNA 位点的基因型不同, 便视为不同品种, 筛选核心引物的重要指标之一是可以区分更多的品种。而判断品种特异性是依据品种间农艺性状和表型的差异程度, 即使两品种有数个 DNA 位点的基因型不同, 只要农艺性状和表型无显著差异, 仍被视为无特异性, 所以作为小麦品种特异性检测的分子标记, 不仅应该可以区别尽可能多的特异性品种, 还应能从众多品种中筛查出高度相似的品种, 为此, 要求用于检测的分子标记应具有较好的代表性。在 2007 年颁布的农业行业标准中, 玉米新品种鉴定的 DNA 指纹方法选用了 20 对 Genomic-SSR 核心引物和 20 对候补引物, 水稻则选用了 12 对 Genomic-SSR 核心引物和 12 对候补引物。小麦是由 3 个基因组构成的异源六倍体, 基因组庞大(16 000 Mb), 3 个基因组之间同源性很强, 分子标记的数量和类型直接影响检测结果准确与否, 尤其对区试品系的相似性判断, 关系到保护已审定品种育种者的知识产权和被检品系育种者的名誉, 应具有法律的严肃性。因此本研究提出检测小麦特异性

采用3种分子标记的105对引物,其中21对核心引物、84对备用引物。虽然比玉米、水稻所用的引物多1~3倍,105对引物扩增的122位点的DNA长度仅为小麦基因组的数百万分之一,仍难免出现例外现象。在2007—2008年度国家冬小麦区域试验和2008—2009年度北京市冬小麦区域试验中,分别有1对GS>0.95的品种(系)在田间表现显著差异。然而,在小麦全基因组测序技术尚不能用于大量品种(系)DNA指纹比对的现实情况下,以一定数量的分子标记代表全基因组是切实可行的。经过在3个年度国家区试品系特异性测试中的应用,证明这套引物可以在大量品种中筛查出高度相似甚至无特异性的品种,与田间试验的吻合度为95%。

本研究所采用的Genomic-SSR和EST-SSR均为共显性标记,而多数AFLP-SCAR为显性标记,为了避免PCR反应失败等因素造成的无产物情况干扰阴性结果的判断,本文选用的AFLP-SCAR引物均可扩增多个片段,除品种间特异性片段外,还要有非特异性片段,非特异性片段存在于所有品种中,可以帮助判断PCR产物是否正常。

本研究为核心分子标记制定了等位变异的带型编号、图谱及代表品种,可以在不同实验室之间通用,以此构建的DNA指纹数据可相互比对。目前,作者已采用21对核心引物为我国近350份审定品种构建了DNA指纹数据库,并将在此基础上形成条形码,为审定品种建立身份证号。为此,在本中心建立的分子标记技术体系不发生技术性改变的情况下,21对核心引物不会更换,而备用引物将根据国内外分子标记的最新研究结果和特殊性状鉴定的需要进行适当调整,以提高分子标记检测结果与田间测试结果的吻合程度。

除了辅助小麦区试品系的DUS测试外,105对引物还可以用于品种的真实性检测,近年来,本中心协助育种单位、种子经营或管理部门多次甄别假冒品种。此外,本中心还利用这套引物构建了光温敏二系杂交小麦骨干亲本的DNA指纹数据库,分析了光温敏二系杂交小麦骨干亲本的遗传距离和群体结构^[28],并采用关联分析方法为小麦重要基因进行了定位^[29]。

4 结论

确定了105对小麦区试品系DUS测试的PCR引物,含63对Genomic-SSR引物、21对EST-SSR

引物和21对AFLP-SCAR引物,包括了基因内外以及DNA重复和非重复序列标记,具有较好的代表性。根据新品种DUS测试的需求及引物扩增产物的带型特点,将105对引物分为21对核心引物和84对备用引物,通过在2006—2007、2007—2008、2008—2009年度国家冬小麦区试品系检测中的应用,证明105对引物可以有效地辅助小麦新品种特异性、一致性和稳定性检测。

References

- [1] Dai J(戴剑), Li H-Y(李华勇), Ding K-M(丁奎敏), Hong D-L(洪德林). Current status and prospects on DUS testing technique system for new plant variety protection. *Seed* (种子), 2007, 26(9): 44-47 (in Chinese)
- [2] Liu P-W(刘平武), Zhou G-L(周国岭), Yang G-S(杨光圣), Fu T-D(傅廷栋). Fingerprints construction of hybrid parents in *brassic napus* and its utilization in hybrid purity test. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2005, 31(5): 640-646 (in Chinese with English abstract)
- [3] Wang J-F(王俊芳), Yang W-H(杨伟华), Kuang M(匡猛), Xu H-X(许红霞), Wang Y-Q(王延琴), Zhou D-Y(周大云), Feng X-A(冯新爱). Fingerprints construction of cotton varieties and seed identification. *China Cotton* (中国棉花), 2009, 36(3): 6-24 (in Chinese)
- [4] Shi H-B(石海波), Wang L-X(王立新), Li H-B(李宏博), Zhang F-T(张凤廷), Ma Q(马庆), Zhao C-P(赵昌平). Division of seeds motley and SSR loci impurity in wheat cultivar using SSR markers. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), 2006, 4(6): 513-519 (in Chinese with English abstract)
- [5] Wang L-X(王立新), Chang L-F(常利芳), Li H-B(李宏博), Ge L-L(葛玲玲), Xin A-H(信爱华), Gao S-Q(高世庆), Ji W(季伟), Sun H(孙辉), Zhao C-P(赵昌平). Method of testing wheat seeds purity by molecular markers. *J Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2009, 29(1): 1-8 (in Chinese with English abstract)
- [6] Ji W(季伟), Wang L-X(王立新), Sun H(孙辉), Wang M-Y(王茅雁), Zhao C-P(赵昌平). Predigestion of wheat SSR analysis protocol. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), 2007, 15(5): 907-908 (in Chinese with English abstract)
- [7] Wang L-X(王立新), Li H-B(李宏博), Ge L-L(葛玲玲), Sun H(孙辉), Yao J(姚骥), Qiu J(邱军), Zhao C-P(赵昌平). A new labeling method for wheat SSR patterns. *J Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2006, 26(4): 164-168 (in Chinese with English abstract)
- [8] Wang L-X(王立新), Li Y-F(李云伏), Chang L-F(常利芳), Huang L(黄岚), Li H-B(李宏博), Ge L-L(葛玲玲), Liu L-H(刘丽华), Yao J(姚骥), Zhao C-P(赵昌平). Method of ID constitution for wheat cultivars. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2007, 33(10): 1738-1740 (in Chinese with English abstract)

- [9] Wang L-X(王立新), Ji W(季伟), Li H-B(李宏博), Ge L-L(葛玲), Xin A-H(信爱华), Wang L-X(王丽霞), Chang L-F(常利芳), Zhao C-P(赵昌平). Estimating the uniformity and stability of wheat cultivars based on the homozygous DNA locus ratio. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2009, 35(12): 1–8 (in Chinese with English abstract)
- [10] Cheng B-Y(程本义), Shi Y-F(施勇峰), Shen W-F(沈伟峰), Zhuang J-Y(庄杰云), Yang S-H(杨仕华). Microsatellite marker-based analysis of rice varieties in national regional yield trial of southern china. *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), 2007, 21(1): 7–12 (in Chinese with English abstract)
- [11] Zhang J-Y(张金渝), Zhang J-H(张建华), Yang X-H(杨晓洪), Jin H(金航), Mi Y-H(米艳华), Xiao Z-W(肖植文), Kong L-M(孔令明), Xiao Q(肖卿). Building of SSR fingerprinting map of standard varieties on maize in DUS testing. *J Maize Sci* (玉米科学), 2006, 14(4): 47–52 (in Chinese with English abstract)
- [12] Lu G-Y(陆光远), Wu X-M(伍晓明), Zhang D-X(张冬晓), Liu F-L(刘凤兰), Chen B-Y(陈碧云), Gao G-Z(高桂珍), Xu K(许鲲). SSR-based evaluation of distinctness and uniformity of rapeseed (*Brassica napus* L.) varieties under Chinese national official field tests. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2008, 41(1): 32–42 (in Chinese with English abstract)
- [13] Wang F-G(王凤格), Zhao J-R(赵久然), Dai J-R(戴景瑞), Wang L(王璐), Yi H-M(易红梅), Guo J-L(郭景伦), Sun S-X(孙世贤), Liao Q(廖琴), Yang G-H(杨国航). Uniformity analysis of maize varieties by a set of SSR markers. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), 2007, 5(1): 95–104 (in Chinese with English abstract)
- [14] Li H-W(李宏伟), Gao L-F(高丽锋), Liu S-D(刘曙东), Jia J-Z(贾继增). Changes of gene diversity among Chinese wheat cultivars at different decades revealed by EST-SSRs. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), 2005, 25(1): 27–32 (in Chinese with English abstract)
- [15] Wang L-X(王立新), Chang L-F(常利芳), Huang L(黄岚), Wang X-W(王晓维), Zhao C-P(赵昌平). Sequence polymorphism of wheat AFLP fragments and conversion of AFLP marker to SCAR marker. *J Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2007, 27(6): 943–951 (in Chinese with English abstract)
- [16] Wang X-W(王晓维), Wang L-X(王立新), Chang L-F(常利芳), Wei J-M(魏建民), Zhao C-P(赵昌平). Exploitation and application of AFLP-SCAR markers. *J Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2008, 28(5): 738–744 (in Chinese with English abstract)
- [17] Li G-Y(李根英), Dreisigacker S, Warburton M L, Xia X-C(夏先春), He Z-H(何中虎), Sun Q-X(孙其信). Development of a fingerprinting database and assembling an SSR reference kit for genetic diversity analysis of wheat. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2006, 32(12): 1771–1778 (in Chinese with English abstract)
- [18] Pestsova E, Ganal M W, Röder M S. Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat. *Genome*, 2000, 43: 689–697
- [19] Röder M S, Korzun V, Wandehake K, Planschke J, Tixier M H, Leroy P, Ganal M W. A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 1998, 149: 2007–2023
- [20] Gao L-F(高丽锋). Molecular Markers of SSRs and SNPs Derived from ESTs and Their Application. Post-doctoral Work Report of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2003 (in Chinese)
- [21] Chen H-M(陈海梅), Li L-Z(李林志), Wei X-Y(卫宪云), Li S-S(李斯深), Lei T-D(雷天东), Hu H-Z(胡海州), Wang H-G(王洪刚), Zhang X-S(张宪省). Exploitation, chromosomal location and genetic mapping of EST-SSRs in wheat. *Chin Sci Bull* (科学通报), 2005, 50(20): 2208–2216 (in Chinese)
- [22] Chen J-F(陈军方), Ren Z-L(任正隆), Gao L-F(高丽锋), Jia J-Z(贾继增). Developing new SSR markers from EST of wheat. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2005, 31(2): 154–158 (in Chinese)
- [23] Nei M, Li W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76: 5269–5273
- [24] Li Y-Q(李艳秋), Su Z-F(苏志芳), Wang L-X(王立新), Ji W(季伟), Yao J(姚骥), Zhao C-P(赵昌平). Increasing density of wheat genetic linkage map with molecular makers. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2009, 35(5): 861–866 (in Chinese with English abstract)
- [25] Yang X-Q(杨新泉), Liu P(刘鹏), Han Z-F(韩宗福), Ni Z-F(倪中福), Liu W-Q(刘旺清), Sun Q-X(孙其信). Comparative analysis of genetic diversity revealed by genomic-SSR, EST-SSR and pedigree in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Acta Genet Sin* (遗传学报), 2005, 32(4): 406–416 (in Chinese with English abstract)
- [26] Chen X-H(陈先红), Xu L-Y(徐利远), Peng Z-S(彭正松), Du W-P(杜文平), Yu G-R(余桂蓉), Zhong C-S(钟昌松), Qu J-P(曲继鹏), Hu F-L(胡凤林). SSR analysis of genetic diversity for wheat cultivars (lines) in the southwest of China. *J Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2008, 28(1): 6–10 (in Chinese with English abstract)
- [27] Hao C-Y(郝晨阳), Dong Y-C(董玉琛), Wang L-F(王兰芬), You G-X(游光霞), Zhang H-N(张洪娜), Ge H-M(盖红梅), Jia J-Z(贾继增), Zhang X-Y(张学勇). Genetic diversity and construction of core collection in Chinese wheat genetic resources. *Chin Sci Bull* (科学通报), 2008, 53(8): 1518–1526 (in Chinese)
- [28] Liu L-H(刘丽华), Wang L-X(王立新), Zhao C-P(赵昌平), Yao J(姚骥), Zhang F-T(张凤廷), Zhang H(张华), Ye Z-J(叶志杰), Qin Z-L(秦志列), Zheng Y-L(郑用琏). Genetic diversity and alterations of population structure in restorers of dual cross-line hybrid wheat with thermo-photoperiod sensitive male sterile. *Chin J Biochem Mol Biol* (中国生物化学与分子生物学报), 2009, 25(9): 867–875 (in Chinese with English abstract)
- [29] Yao J, Wang L X, Liu L H, Zhao C P, Zheng Y L. Association mapping of agronomic traits on chromosome 2A of wheat. *Genetics*, 2009, 137: 67–75