

悬钩子属野生种和栽培种资源 SSR 引物筛选与评价

耿佳麒¹, 王宇航¹, 雷蕾¹, 孙海悦¹, 周强², 唐雪东^{1*}, 梁英海^{3*}

(1. 吉林农业大学, 吉林长春 130118; 2. 抚松县参茸植保有限责任公司, 吉林抚松 134504; 3. 吉林省农业科学院果树研究所, 吉林公主岭 136100)

摘要 [目的]分析悬钩子属植物的遗传多样性,研究现存悬钩子 SSR 引物的通用性。[方法]通过简单重复序列标记(SSR)用 12 份悬钩子属野生和栽培种类资源对 40 对引物进行筛选。[结果]共筛选出 8 对引物对全部 12 个样品扩增良好,多态性比率为 100%,可用于遗传多样性的分析。[结论]该试验筛选的 8 对引物可为下一步研究提供依据。

关键词 悬钩子;SSR 引物;筛选;评价**中图分类号** S663.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)06-0083-04**Screening and Evaluation of SSR Primers in Wild and Cultivated Species of *Rubus* L.****GENG Jia-qi, WANG Yu-hang, LEI Lei et al** (Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract [Objective] To analyze the genetic diversity of *Rubus* L. and study the universality of the existing SSR primers of *Rubus* L. [Method] Forty pairs of primers were screened from 12 wild and cultivated species of *Rubus* L. by simple repeated sequence marker (SSR). [Result] 8 pairs of primers were screened and amplified all 12 samples with a polymorphism ratio of 100%, which could be used for genetic diversity analysis. [Conclusion] The 8 pairs of primers in this experiment can provide the basis for further study.

Key words *Rubus* L.; SSR primers; Screening; Evaluation

悬钩子(*Rubus* L.)是多年生落叶灌木植物^[1],种类丰富,杂合度高,在寒带及温带地区均有分布。在我国,悬钩子属植物有 150 个种以上^[2]。悬钩子属栽培品种具有较高的经济价值和药用价值,其果实可用于鲜食、加工和医用^[3-4]。

随着果树分子生物技术快速发展,国内外学者在形态学、孢粉学、细胞学以及同工酶鉴定研究基础上,加大了对悬钩子属植物资源分子水平的研究^[4],应用分子标记分析了悬钩子属植物的遗传多样性^[5]。目前,已有利用 SSR 和 RAPD 分子标记分析悬钩子栽培种资源遗传多样性的报道^[6],但对悬钩子野生种资源的研究较少。

悬钩子属树莓属于第三代新兴小浆果^[7]。在农业供给侧结构性改革和生态建设背景下,有必要对我国蕴藏的大量悬钩子野生资源进行有效收集评价和开发利用,其遗传多样性研究是重要的基础工作。由于悬钩子属植物类型多样,杂合度高,可应用 SSR 分子标记开展相关研究。目前,悬钩子属植物 SSR 引物主要为苏格兰詹姆斯·赫顿研究所(<http://www.hutton.ac.uk/>)以及 Graham 等^[8]所开发引物,这些引物是否适用于我国野生悬钩子资源鲜见报道。该研究旨在筛选评价 Graham 等所开发引物,以供国内相关研究参考,并考察相同 SSR 引物在不同地缘分布资源间的通用性问题,以提出悬钩子属植物分子水平资源研究建议。

1 材料与方法**1.1 材料**

1.1.1 植物材料。植物材料有茅莓悬钩子、库页悬钩子、牛迭肚、绿叶悬钩子、黄树莓、黑树莓、欧洲莓、奥瑞斯 8 份资

源,以及于 2016 年于蛟河采集的野生资源牛迭肚(J-1-3)、牛迭肚(J-1-4)、牛迭肚(J-2-1)、牛迭肚(J-2-2)4 份,共 12 份材料(表 1)。取上述材料嫩叶,供提取基因组 DNA。

表 1 供试样品名称及来源**Table 1 The name and origin of tested samples**

样品编号 Samples code	名称 Name	拉丁名 Latin name	来源 Origin
1	茅莓悬钩子	<i>R. parvifolius</i> L.	吉林省农业科学院悬钩子资源圃
2	库页悬钩子	<i>R. sachalinensis</i> Levl.	吉林省农业科学院悬钩子资源圃
3	牛迭肚	<i>R. crataegifolius</i> Bunge	吉林省农业科学院悬钩子资源圃
4	绿叶悬钩子	<i>R. komarovi</i> Nakai	吉林省农业科学院悬钩子资源圃
5	牛迭肚(J-1-3)	<i>R. crataegifolius</i> Bunge	蛟河
6	牛迭肚(J-1-4)	<i>R. crataegifolius</i> Bunge	蛟河
7	牛迭肚(J-2-1)	<i>R. crataegifolius</i> Bunge	蛟河
8	牛迭肚(J-2-2)	<i>R. crataegifolius</i> Bunge	蛟河
9	黑树莓	<i>R. occidentalis</i> L.	沈阳农业大学树莓资源圃
10	黄树莓	<i>R. idaeus</i> L.	沈阳农业大学树莓资源圃
11	欧洲莓	<i>R. idaeus</i> L.	沈阳农业大学树莓资源圃
12	奥瑞斯	<i>R. idaeus</i> L.	沈阳农业大学树莓资源圃

1.1.2 药品。CTAB、Tris 碱、氯化钠、氢氧化钠、 β -巯基乙醇、无水乙醇、三氯甲烷、异戊醇、琼脂糖、甲叉丙烯酰胺、过硫酸铵、TEMED、*rTaq* 预混酶、超纯水。试验药品购于 TaKaRa 公司。

1.1.3 引物。SSR 引物为 Graham 等^[8]开发的 30 对引物和詹姆斯·赫顿研究所开发的 10 对引物,SSR 引物由金唯智公司合成。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取与检测。供试材料在液氮中研磨至粉末

基金项目 吉林省科技发展计划项目(20150307011NY,20150414047GH,20160203009NY);吉林省发改委产业技术与开发项目(2015Y060)。

作者简介 耿佳麒(1992—),女,吉林吉林人,硕士研究生,研究方向:果树栽培生理生态及栽培技术。*通讯作者:唐雪东,教授,硕士生导师,从事果树栽培生理生态及栽培技术研究;梁英海,副研究员,硕士生导师,从事果树种质资源与分子生物技术研究。

收稿日期 2017-12-13

状,加入离心管中,采用CTAB法^[9]提取12份样品的DNA,并用1%琼脂糖凝胶电泳检测其DNA质量,用超微量分光光度计检测DNA浓度与纯度,将条带清晰、质量良好的DNA稀释至20 ng/ μ L, -20℃冰箱中保存备用。

1.2.2 SSR-PCR扩增。PCR所采用的体系是经过优化的最适体系,退火温度为55℃。采用20 μ L反应体系: ddH₂O 11.2 μ L,上游引物0.8 μ L,下游引物0.8 μ L,模板DNA (DNA浓度为20 ng/ μ L) 3 μ L, *Taq* DNA聚合酶(5 U/L) 0.2 μ L, dNTP (10 mmol/L) 1.2 μ L, 10 × Buffer (含 Mg²⁺) 2 μ L。95℃预变性5 min; 95℃变性1 min, 55℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 共30个循环; 72℃延伸5 min; 4℃保存。

1.2.3 PCR产物检测。

1.2.3.1 琼脂糖凝胶电泳。PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测其扩增结果,将扩增出的条带清晰且多态性好的引物进行下一步聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

1.2.3.2 6%聚丙烯酰胺凝胶电泳。①清洗,用洗涤剂清洗玻璃板后蒸馏水冲洗干净,用无水乙醇清洁后晾干备用;②注胶,安装好玻璃板后,将1%琼脂糖凝胶注入玻璃板底部,密封玻璃板,注意不要有气泡;待凝胶凝固后,将配制好的聚丙烯酰胺凝胶定缓慢注入玻璃板空隙(注入过程应尽量避免气泡的产生),插入齿梳,避免齿梳周围产生气泡,静置50~60 min待凝胶凝固;③预电泳,凝胶凝固后,小心拔出齿梳,用电泳液冲洗胶孔;玻璃板内槽加满1 × TBE缓冲液,外槽缓冲液加至1/3体积即可,设置电压350 V,电流500 mA,预电泳60 min;④上样,按照样品:上样缓冲液=10:3比例混合,待预电泳结束后进行上样,电压240 V,电流500 mA,电泳90 min。

1.2.3.3 银染。电泳结束后,取下凹型玻璃板,将凝胶留在平板玻璃上。①清洗,清水冲洗胶面30 s,蒸馏水冲洗胶面30 s;②固定,固定液没过胶面,摇10~20 min;③洗胶,蒸馏水冲洗胶面2 min,冲洗2次,倾斜玻璃板沥水;④染色,硝酸银染色液没过胶面,摇6 min;⑤洗胶,蒸馏水冲洗凝胶10 s左右,冲洗2次,取出胶板,沥干;⑥显色,将胶板浸于提前预冷的500 mL显色液中,摇床摇至所有条带出现,即停止显色;⑦洗胶,蒸馏水冲洗胶板2 min;⑧固定,胶板完全浸于固定液,固定10 min,清洗干净后,沥干水再进行拍照和后续数据分析。

1.3 统计分析 根据聚丙烯酰胺凝胶电泳条带片段大小和SSR特异性条带特点,使用GEL-PRO软件,将同一引物相同片段大小SSR特异条带计为1,无条带记为0,扩增不良或非特异性条带不计入其中,形成0-1矩阵,并用Popgene 32软件,分析多态性位点百分比(PPB)、有效等位基因数(Ne)、Nei's指数(h)、Shannon指数(I)。

2 结果与分析

2.1 SSR引物筛选结果 利用40对(表2)SSR引物对12份供试材料进行SSR-PCR扩增,经电泳检测,共有8对SSR引物在12份资源中扩增出差异性强和多态性良好的产物(表2、图1、图2),分别为Rubus25a、Rubus110a、Rubus117a、Rubus119a、Rubus166b、Rubus167a、Rubus233a、Neb1G02,占总引物数的20%,多态性百分率为100%,这些引物可以在野生种和栽培种中扩增出条带。Rubus123a、Rubus194h、Neb1A10、Neb1J15、Neb1k24引物,仅在茅莓悬钩子、库页悬钩子、绿叶悬钩子中成功扩增出条带,但是对于牛迭肚悬钩子扩增效果较差(图3、4)。

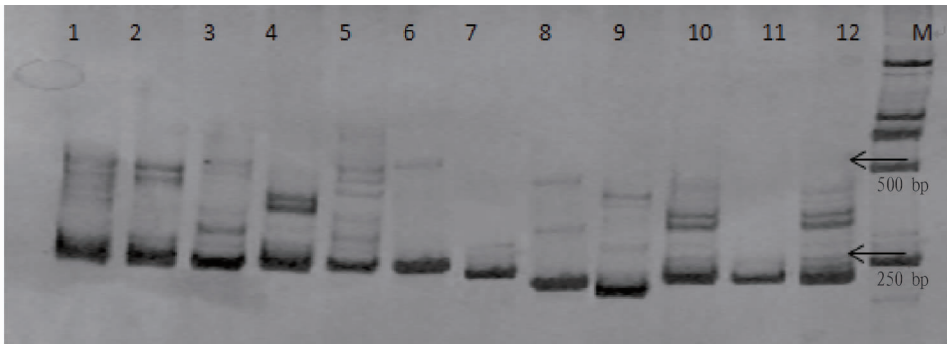
表2 40对引物名称及序列

Table 2 The names and sequences of 40 pairs of primers

引物编号 Primers code	引物名称 Primers name	5'-3'上游引物序列 5'-3'Upstream primer sequence	3'-5'下游引物序列 3'-5'Downstream primer sequence
1	Rubus2a	TGAGGGAAGAAGAGGCAAGA	CACGTGTGACCCAATGATA
2	Rubus12a	ATTCGCCGCTCAGAATAAT	AAGGTTTGTGACGGGAACAG
3	Rubus16a	TGTTGTACGTGTGGGCTTT	GGGTGTTTGCCAGTTTCAGT
4	Rubus19a	GCAGATCAATGAAAGCCATT	CGGATCCTCCAACCTTCAT
5	Rubus22a	TGTGGACGACCATAACTTGC	TCGGCATTTATACACACACACA
6	Rubus24a	ACACACGCACGTACAGCACT	GCGCAGTCAAGTGGACTTTT
7	Rubus25a	GCCAAAACACACGGTTATCTTG	CATTACCACACGCTTGATGC
8	Rubus26a	AACACCGGCTTCTAAGGTCT	GATCCTGGAAGCGATGAAA
9	Rubus35a	TTGGAAGCACAAAAGCGATA	GCGACAGCCAAAACAAAAGT
10	Rubus43a	TGCTAAAGTTTGTCTGCTGA	TGCAATGTAACCTGCGAGTGC
11	Rubus76a	CTCACCCGAAATGTTCAACC	GGCTAGGCCGAATGACTACA
12	Rubus98d	GGCTTCTCAATTTGCTGTGTC	TGATTTGAAATCGTGGCGTTA
13	Rubus102c	CCCCTCCCCTCTCTGTAGAT	TCATGTGCAAAACCCGTACAC
14	Rubus107a	GCCAGCACAAAACCTACA	TTTACCCTCAAGAAGAAAGC
15	Rubus110a	AAACAAAGGATAAAGTGGGAAG	TGTCAGTTGGAGGGAGAACA
16	Rubus110b	CAAACCCAAAACCTTCAAC	TGTGGCATGGCCTTTTAT
17	Rubus117a	CCAAGTGAACCTCATGCAC	ACTTTGCTCTGTTGCTCTGG
18	Rubus118b	CCGAAAACAAAAGGTCAAG	GGATTTCTGCAAAAGTGGAA
19	Rubus119a	GAGCAAAAACAAACAGATCAAA	CTCCAAGTAGTCACCGACGA
20	Rubus123a	CAGCAGCTAGCATTTTACTGGA	GCACCTCTCACCCATTTTCAT
21	Rubus126b	CCTGCATTTTCTGTATTTTGG	TCAGTTTCTTCCACGGTTA
22	Rubus145a	TGTCCAGCTTTCTGGTTTC	GGCATCTGTCCGGTAAAAAT
23	Rubus160a	TCCAAGTGGATTCTCCATC	TATGTGAGCTGGGCATGCT
24	Rubus166b	CCGCAAGGTTGTATCTCTAA	GCATGAGGGCATATAAAGG

续表 2

引物编号 Primers code	引物名称 Primers name	5' - 3'上游引物序列 5' - 3' Upstream primer sequence	3' - 5'下游引物序列 3' - 5' Downstream primer sequence
25	Rubus167a	AACCCTAAGCCAAGGACCAT	CACCACCCATGACAGTCAGA
26	Rubus194h	TGTGTTGTTCTCTGCAACCA	AGCCCTTACTTTTCCTGCAA
27	Rubus233a	TGCTGCTTTGTTGTTAATTTGTGC	GGTCAACAATCCTTGGATAATCA
28	Rubus228a	TGGACAGCTTTGTGCAGAGT	GCTTGTGTATCTCCATTGC
29	Rubus223a	TCTCTTGCATGTTGAGATTCTATT	TTAAGGCGTCTGGATAAGG
30	Rubus237b	CATGCTTGCATGATCACACCAC	TGAGCCATAAATTTAGAGGGATT
31	Neb1G02	TATTGGCGCTTCGTCTACCT	GAAGCAGCAATCTGCAACAA
32	Neb1D05	AGAACCACAAGCACCAATCC	CCTTGTCTGTGCAGTTTGA
33	Neb1N07b	TGAAGACCCCTTGATCTTG	TCACGAATCCTAAGCACAAACA
34	Neb1I07	CCCCGAACACAGCTTACAAC	CAAAGACTCGGGTGGAAAAG
35	Neb1A10	CCGTCTTCTTCTGCTCAACC	CGGAATCCCAAACCTTTCTC
36	Neb1H15	CCACCAAGCTTCTCCATTTC	AACGCACTTTTTGCAGCTTT
37	Neb1C15	TTCTTTCGAACTCGGTGAGG	GCTTTCGGAATAGCAAAATCC
38	Neb1J15	GGTGGCCTTCTTGAGAAAC	CTAGCACCGGAACCTTAGC
39	Neb1k24	TCATTTCATTGGCTTTGTCATCG	TAGGCAGCTTGCAGACTGTT
40	Neb1A21	CCTCGGGGTAGACGATCAC	CAAAGGCGTCCCTGTTC

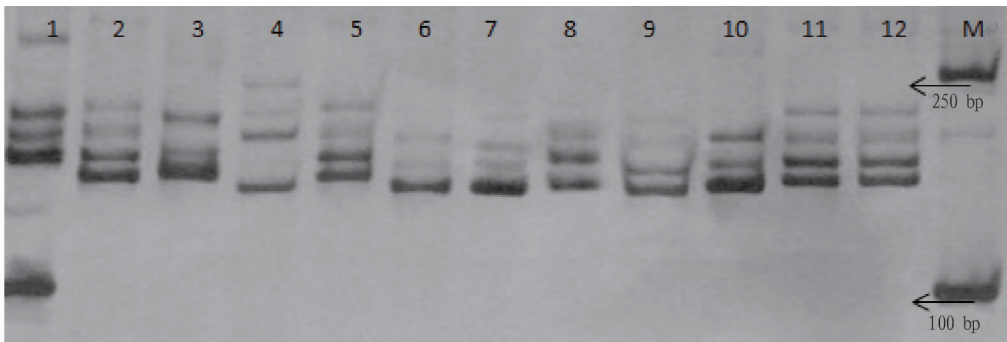


注:1 ~ 12 为样品编号;M. DL2000 Marker

Note:1 to 12 are samples code;M. DL2000 Marker

图 1 引物 Rubus110a 对 12 个样品扩增聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig. 1 Rubus110a primers were used to amplify by polyacrylamide gel electrophoresis maps of 12 samples



注:1 ~ 12 为样品编号;M. DL2000 Marker

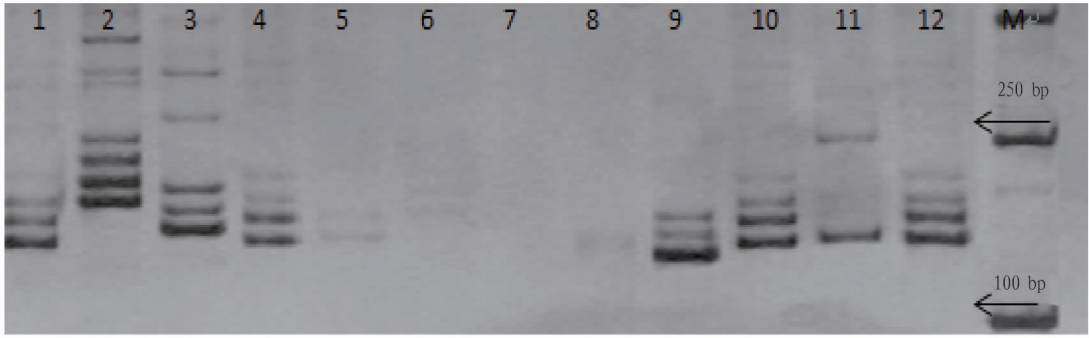
Note:1 to 12 are samples code;M. DL2000 Marker

图 2 引物 Rubus167a 对 12 个样品扩增聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig. 2 Rubus167a primers were used to amplify by polyacrylamide gel electrophoresis maps of 12 samples

2.2 引物多态性分析 所筛选出的 8 对引物共扩增出 142 条带,平均每个引物扩增出 17.75 条带。根据目的条带大小统计,每个引物最多扩增出 2 个位点,引物 Rubus110a 检测出的条带最多为 18 条,Rubus25a 检测出的条带最少为 12 条。全部引物的目的片段均为 100 ~ 250 bp,所统计的条带数目均在目的条带上下,片段大小差异不大。

2.3 SSR 位点分析 应用 Popgene32 软件分析 8 对 SSR 引物扩增获得的 0 - 1 矩阵数据,表明每个位点的有效等位基因数(N_e)在 1.600 0 ~ 1.976 7,平均等位基因数为 1.766 6。 N_e 's 基因多样性指数(h)分布在 0.267 2 ~ 0.494 0,平均每个位点的 N_e 's 指数为 0.399 8。所得到的 Shannon 指数(I)为 0.417 0 ~ 0.687 1,平均值为 0.579 1(表 3)。

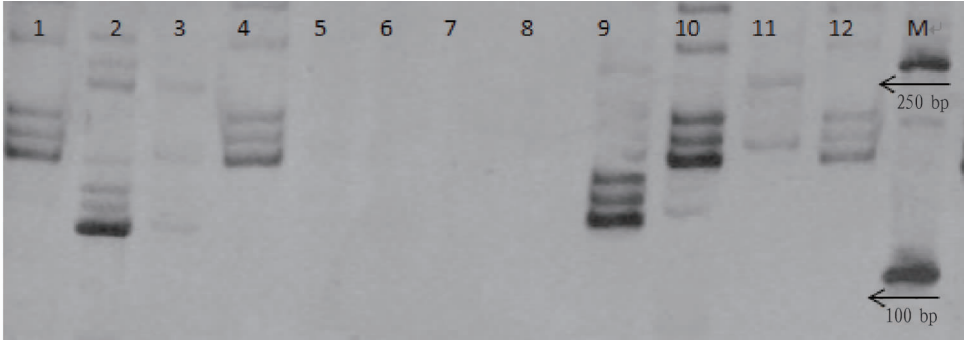


注:1~12为样品编号;M. DL2000 Marker

Note:1 to 12 are samples code;M. DL2000 Marker

图3 Rubus123a对12份样品全部扩增聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig.3 Rubus123a primers were used to amplify by polyacrylamide gel electrophoresis map of 12 samples



注:1~12为样品编号;M. DL2000 Marker

Note:1 to 12 are samples code;M. DL2000 Marker

图4 Rubus194h对12份样品全部扩增聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig.4 Rubus194h primers were used to amplify by polyacrylamide gel electrophoresis map of 12 samples

表3 8对引物位点数及基因多态性分析

Table 3 Analysis of site number and gene polymorphism of 8 pairs of primers

引物名称 Primers name	位点数 Site number	有效等位基因数 (Ne) Effective number of alleles (Ne)	Nei's 指数 (h) Nei's index (h)	Shannon 指数 (I) Shannon index (I)
Rubus25a	4	1.600 0	0.375 0	0.562 3
Rubus117a	4	1.677 7	0.372 3	0.546 4
Rubus167a	4	1.976 7	0.494 0	0.687 1
Rubus166b	5	1.448 1	0.267 2	0.417 0
Rubus110a	2	1.863 7	0.313 3	0.466 7
Rubus119a	3	1.696 9	0.410 7	0.601 0
Rubus233a	4	1.934 8	0.483 2	0.676 2
Neb1G02	4	1.933 2	0.481 2	0.663 0

3 讨论与结论

3.1 悬钩子属植物资源有待评价开发利用 我国大小兴安岭、长白山等地区蕴藏丰富的悬钩子属资源,但由于全球气候变化和人为活动频繁,树莓资源正在严重流失,需要有针对性地开展资源收集评价与开发利用工作,而利用分子标记技术开展分子水平资源研究具有重要意义。Graham 所开发的 SSR 引物在国内国外相关研究中应用广泛,用于遗传多样性^[10]、亲缘关系^[11]、遗传图谱构建^[8,12],但国外多数研究集中于栽培品种(品系),甚至只给出引物出处,未明确指明引物名称或序列,给相关研究带来被动局面;国内学者也应用这些引物开展相关分子标记研究^[13],亦主要研究树莓栽培

资源。该研究针对上述情况,评价筛选出 8 对 SSR 引物用于茅莓悬钩子、库页悬钩子、绿叶悬钩子、牛迭肚等资源 SSR-PCR 扩增,可为相关资源分子水平评价提供重要数据参考。

3.2 悬钩子属植物 SSR 引物通用性及开发利用 该研究考察了 Graham 等利用国外资源开发的引物在我国野生和栽培种中的通用性问题,在选用的 40 对 SSR 引物中仅筛选出 8 对引物用于全部供试材料,表明了不同地理分布栽培资源间,尤其栽培与野生资源间存在引物通用性,也表明了悬钩子属植物 SSR 序列进化保守性。

目前,SSR 分子标记技术已广泛用于果树遗传多样性、亲缘关系和遗传图谱构建研究^[14-17],应用价值较高。由于该研究仅在 7 个栽培和野生种共计 12 份资源上评价了供试引物,且仅获得 8 对可在全部材料成功扩增的引物,在引物数量和资源针对性上,不能满足未来对丰富悬钩子属资源收集保存评价利用工作的需要。在组学和大数据时代^[2,18-20],可利用新方法新技术,针对我国悬钩子属植物资源,开发利用分子标记,尤其是功能分子标记^[20],支撑和促进树莓等小浆果产业发展。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [2] 宋洪伟, 张冰冰, 梁英海, 等. 我国穗醋栗、树莓等小浆果资源研究与利用现状[J]. 吉林农业科学, 2011, 36(5): 56-58.

(下转第 141 页)

性回归得出以下方程 $y = 0.3555x_1 - 0.3961x_2 - 0.4594x_3 + 129.0575$ (y 代表小麦产量; x_1 代表活动积温; x_2 代表日照时数; x_3 代表降水量), 采用多元逐步回归法将三因素与产量进行拟合, 结果只有活动积温入选, 拟合方程为 $y = 0.73845 + 0.6743x_1$ (y 代表小麦产量; x_1 代表活动积温)。从以上分析结果可以看出, 与小麦产量关系最为密切的是活动积温, 活动积温多, 单位面积上的穗数多, 产量高; 反之, 单位面积上的穗数少, 产量则低。表明活动积温是影响小麦产量的主导因子。

3 结论与讨论

气候变暖对小麦生育期和产量产生了较大的影响。光照、气温和降水是影响农业生产的主要气象因子, 其通过各种直接和间接过程与小麦相互作用、相互影响。该研究发现, 气象因子变化使小麦的播种期、越冬期、成熟期呈推迟趋势, 分别推迟 1.0~3.0、0.7~4.4、0.7 d; 而返青期、拔节期和抽穗期呈提前趋势, 分别提前 2.9、0.6、2.1 d, 从而使小麦全生育期和越冬期缩短、灌浆期延长; 气候对小麦产量的影响呈加重趋势, 产量与活动积温呈正相关, 与降水量和日照时数呈负相关, 活动积温是形成小麦产量的主导因子。

有关小麦生育期气象因子的变化趋势很多专家已经做了相关研究, 并且观点与该研究结果一致, 曹倩等^[9] 研究指出, 冬小麦主产区近 50 年冬小麦生育期内积温呈明显的增加趋势, 黄淮麦区降水总的变化趋势不显著, 但不同区域与不同时段降水分布不均, 仍然是影响小麦生产的一大问题; 武建华等^[10] 研究发现, 商丘、驻马店、周口不同时间段的降水偏少或偏多均对小麦有一定的不利影响。在气象因子对小麦物候期的影响方面, 路欣等^[11] 研究发现, 商丘市受冬季积温增加的影响, 小麦的适播期也比以前推迟了 10~15 d; 成林等^[12] 分析发现, 河南省冬小麦全生育期长度呈缩短趋势, 与该研究的结论一致。在气象因子变化对小麦产量的影响

方面, 在黄淮海地区, 田展^[13] 分析发现在不考虑 CO₂ 直接肥效的情况下, 黄淮海农业区雨养小麦全面减产, 但是没有按照气象因子分开来评测。周林等^[14] 分析得出, 黄淮中部由于降水远小于小麦生育期的需水量, 气温升高加快了冬小麦的生长发育速率, 缩短了生育历程; 土壤水分适宜状态下, 适度升温有利于冬小麦生长及产量的提高; 但在土壤水分亏缺时, 温度升高使其叶面积指数增高, CO₂ 同化能力增强, 但加大了土壤蒸发, 使小麦生长中、后期水分亏缺加重, 小麦绿叶同化能力降低, 最终使产量下降, 说明光温水协调性对小麦产量影响的重要性。

参考文献

- [1] 张燕林. 中国未来粮食安全研究 [D]. 成都: 西南财经大学, 2010.
 - [2] 国家气候中心. 全球气候变化的最新科学事实和研究进展: IPCC 第一工作组第四次评估报告初步解读 [J]. 环境保护, 2007(11): 27-30.
 - [3] 张莉. 我国粮食物流发展问题研究 [D]. 大连: 大连海事大学, 2003.
 - [4] 汤勇华, 黄耀. 中国大陆主要粮食作物物力贡献率和基础产量的空间分布特征 [J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(5): 1070-1078.
 - [5] 年高磊. 豫鲁皖交界地区四个 CGN 群体种类和致病型鉴定及品种对淮阳群体的抗性评价 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2011.
 - [6] 孙倩. 气候变化背景下河南省冬小麦品种更新特征 [D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
 - [7] 王爱武. 商丘市农业可持续发展模式构建 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2008.
 - [8] 孙德营, 胡新, 孟昭昭, 等. 商丘地区气象因素与冬小麦生态、产量关系的研究 [J]. 河南农业科学, 1988(9): 6-8.
 - [9] 曹倩, 姚凤梅, 林而达, 等. 近 50 年冬小麦主产区农业气候资源变化特征分析 [J]. 中国农业气象, 2011, 32(2): 161-166.
 - [10] 武建华, 陈松, 陈英慧, 等. 驻马店市冬小麦主要气候特征及高产气象因素 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(6): 387-393.
 - [11] 路欣, 姜洋, 刘文新, 等. 商丘市气候变化对农业的影响及对策 [J]. 现代农业科技, 2009(23): 306.
 - [12] 成林, 薛昌颖, 李彤霄, 等. 河南省稻麦类作物对气候变化的响应 [J]. 气象与环境科学, 2010, 33(3): 6-10.
 - [13] 田展. 气候变化对黄淮海平原作物生产潜力影响研究 [D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2006.
 - [14] 周林, 王汉杰, 朱红伟. 气候变暖对黄淮海平原冬小麦生长及产量影响的数值模拟 [J]. 解放军理工大学学报(自然科学版), 2003, 4(2): 76-82.
- (上接第 86 页)
- [3] 李正涛. 树莓果酒发酵工艺研究 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(36): 20729-20731, 20758.
 - [4] 陈亮, 刘冉, 辛秀兰, 等. 果胶酶澄清红树莓果酒的研究 [J]. 食品研究与开发, 2014(7): 58-61.
 - [5] SCHNELL R J, KNIGHT R J Jr, SCHAFFER B. Genetic relationships among *Mangifera* spp. based on RAPD makers [J]. Acta horticulturae, 1993, 341: 86-92.
 - [6] 卞贵建. 树莓品质评价及其 RAPD 反应体系的建立与优化 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2005.
 - [7] 周懿. 长白山野生果树资源的调查 [J]. 东北林业大学学报, 2004, 32(1): 86-88.
 - [8] TAI T H, TANKSLEY D D. A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue [J]. Plant molecular biology reporter, 1990, 8(4): 227-303.
 - [9] TENG H, CHEN L, HUANG Q, et al. Ultrasonic-assisted extraction of raspberry seed oil and evaluation of its physicochemical properties, fatty acid compositions and antioxidant activities [J]. PLoS One, 2016, 11(4): 1-17.
 - [10] GRAHAM J, SMITH K, WOODHEAD M, et al. Development and use of simple sequence repeat SSR markers in *Rubus* species [J]. Molecular ecology notes, 2002, 2(3): 250-252.
 - [11] GRAHAM J, SMITH K, MACKENZIE K, et al. The construction of a genetic linkage map of red raspberry (*Rubus idaeus* subsp. *idaeus*) based on AFLPs, genomic-SSR and EST-SSR markers [J]. Theoretical & applied genetics, 2004, 109(4): 740-749.
 - [12] SARGENT D J, FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ F, RYS A, et al. Mapping of A₁ conferring resistance to the aphid *Amphorophora idaei* and *dw* (dwarfing habit) in red raspberry (*Rubus idaeus* L.) using AFLP and microsatellite markers [J]. BMC Plant Biology, 2007, 7(1): 1-9.
 - [13] 李媛媛. 树莓种质资源遗传多样性及创新研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2009.
 - [14] KOSTAMO K, TOLJAMO A, ANTONIUS K, et al. Morphological and molecular identification to secure cultivar maintenance and management of self-sterile *Rubus arcticus* [J]. Annals of botany, 2013, 111(4): 713-721.
 - [15] 李玲, 汤浩茹, 段娟, 等. 中国悬钩子属植物的分类鉴定与开发利用 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34(8): 1513-1516.
 - [16] 段娟, 汤浩茹, 王小蓉, 等. 遗传标记在树莓种类鉴定中的应用研究进展 [J]. 中国农学通报, 2006, 22(6): 57-61.
 - [17] 王学勇, 张均营. 树莓和黑莓的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(10): 5070-5073.
 - [18] 杨燕林, 唐开学, 和加卫, 等. 悬钩子属植物分子标记技术和基因组研究进展 [J]. 中国农学通报, 2008, 24(8): 93-98.
 - [19] 杨婷婷. 树莓的研究现状及开发利用 [J]. 四川林业科技, 2013, 34(3): 29-33.
 - [20] BUSHAKRA J M, LEWERS K S, STATON M E, et al. Developing expressed sequence tag libraries and the discovery of simple sequence repeat markers for two species of raspberry (*Rubus* L.) [J]. BMC Plant Biology, 2015, 15(1): 258.