

• 方药研究 •

基于简单重复序列标记的药用梅品种的身份证构建

王 瑞¹, 欧金梅^{1,2}, 李 昕¹, 李肖莉¹, 张 伟^{1,2}, 方成武^{1,3}

(1. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230012; 2. 中药饮片制造新技术安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012; 3. 中药研究与开发安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012)

[摘要]目的 筛选一套适合中国药用梅品种鉴定标准的简单重复序列(simple sequence repeats, SSR), 用于构建药用梅品种 DNA 指纹身份证。方法 以 30 份药用梅农家种为材料, 从 180 对 SSR 引物中, 最终选取 16 对多态性较高、条带清晰且重复性好的 SSR 引物对 30 份药用梅农家种进行扩增。结果 30 份药用梅共扩增出 114 个等位基因, 平均等位基因数和多态信息含量分别为 7.12 和 0.69, 且在 16 个位点上识别两个具有相同基因型的随机个体的概率估计为 5.24×10^{-17} 。最终筛选出 4 对扩增稳定、多态性强的核心引物, 可将 30 个药用梅农家种进行有效区分, 建立药用梅种质资源 DNA 指纹身份证。结论 SSR 标记技术可以作为药用梅分子身份证构建的有效技术手段。

[关键词]药用梅; 指纹身份证; 简单重复序列

[中图分类号]R286.0 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2020.06.017

中药梅花与乌梅为蔷薇科梅 *Prunus mume* Sieb. et Zucc. 的干燥未成熟果实或未开放花蕾。乌梅药用敛肺涩肠、生津安蛔^{[1]79}, 食用开胃生津; 梅花疏肝和中、化痰散结^{[1]265}。梅作为药用、食用兼具观赏价值为一体的优良树种, 受到广泛关注。

梅起源于中国^[2], 栽培历史悠久, 资源丰富, 在

全国大部分地区均有分布, 其中四川、福建、云南、安徽等省份为药用梅的主产区^[3]。梅的栽培品种众多, 多以用途进行品种培育和分类, 常分为花梅、果梅、药用梅等品种^[3-4]。在药用梅的主产区, 盲目引种现象比较严重, 药用梅与果梅品种混杂, 导致药用梅种质混乱。品种在遗传物质上的变化, 导致植物在药材性状、产量和质量上均会出现明显的差异^[5-6], 从而造成中药疗效的不稳定。因此, 需建立能将不同种质有效区分的方法, 理清种源, 为药用梅的品种选育提供科学依据。

DNA 身份证是以 DNA 分子标记技术为基础, 通过电泳图谱将种质或品种进行彼此区分的数字串码, 目前已广泛应用于物种起源、种质鉴定和遗传图

基金项目:安徽高校自然科学研究重点项目(KJ2019A0479); 安徽省自然科学基金项目(2008085QH394); 安徽药食同源中药资源调查及薄荷蒸菜制作工艺与质量标准研究(RD18200072)

作者简介:王瑞(1993-), 男, 硕士研究生

通信作者:方成武(1961-), 男, 教授, cwfang1961@sina.com

measured; BCA kit was used to measure total protein in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and the abalone counter was used to calculate the number of white blood cells; HE staining was used to observe lung injury. ELISA was used to measure the content of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and interleukin-6 (IL-6) in lung tissue; related kits were used to measure the content of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in lung tissue; Western blot was used to measure the expression levels of nuclear factor-kappa B p65 (NF- κ B p65), pI κ B α , and Toll-like receptor 4 (TLR4) in lung tissue. **Results** Compared with the model group, the schisandrin B group had significant reductions in lung wet/dry mass ratio, total protein and number of white blood cells in BALF, pathological injury, and the content of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 ($P < 0.05$), as well as a significant reduction in MDA content, a significant increase in SOD content, and significant reductions in the expression of NF- κ B p65, pI κ B α , and TLR4 ($P < 0.05$). **Conclusion** In rats with sepsis and acute lung injury induced by LPS, schisandrin B can alleviate pathological injury of lung tissue and inhibit inflammatory response, oxidative stress response, and activation of the NF- κ B pathway.

[Key words] Schisandrin B; Lipopolysaccharide; Sepsis with acute lung injury; Nuclear factor-kappa B

谱构建等领域^[7-11]。简单重复序列(simple sequence repeats, SSR)、限制性内切酶片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)、单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)等已应用于梅的分类研究中^[12-14],其中 SSR 标记因其共显性遗传、多等位基因性质,已成为品种鉴定和 DNA 指纹图谱构建的重要途径^[15-17]。本研究利用 SSR 标记技术,采用 16 对 SSR 引物建立药用梅 30 个农家种的 DNA 分子身份证,通过计算不同品种间遗传相似系数对农家种间关系进行分类,为药用梅的品种鉴定和选育、中药质量控制方法的完善提供依据。

1 材料与方法

1.1 植物 研究材料采于 2018 年 4—7 月,收集 30 个药用梅农家种(见表 1),每个农家种采集 10 个体,共计 300 份样本,采集嫩叶用硅胶干燥后储存在-70 ℃超低温冰箱备用。样品经鉴定为梅*P. mume*,凭证标本保存在安徽中医药大学中药资源中心。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 30 份样品叶片采用改良十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)法^[18]提取总 DNA。经 1%琼脂糖凝胶电泳检测质量和浓度后,调整浓度为 50 ng/ μ L,保存于-20 ℃冰箱待用。

1.2.2 SSR 引物筛选和 PCR 扩增 本研究从前人研究^[13,19-20]中选取了 180 对 SSR 引物供筛选,最终选取 16 对多态性高、条带清晰且重复性好的 SSR 引物,见表 2。

运用 Fragment Analyzer™96 系统以及 16 对 SSR 引物对 30 份样品进行扩增。PCR 反应体系:模板 DNA 1 μ L,正反引物(10 mmol/L)各 0.5 μ L, MIX 酶 5 μ L,补加双蒸水 3 μ L,使总体系为 10 μ L。反应条件:95 ℃预变性 4 min,95 ℃变性 30 s,按表 2 温度退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,35 次循环,72 ℃延伸 6 min。

1.2.3 数据收集和分析 应用 PROSize™2.0 软件通过毛细管电泳的图谱选择清晰的多态性 DNA 条带进行评分。通常每个个体获得一个或两个片段用于一个 SSR 标记。尽管所选择的样品都是二倍体,但是对于某些个体,一些标记物扩增了两个以上的片段。基于几个标准仅收集了两个片段:选择较高的峰值,较高的 DNA 产物的浓度,以及在其他个体中发生的片段频率。使用 PowerMarker^[21] 版本计算等位基因数(effective number of allele, NA)、

表 1 30 份药用梅植物材料

编号	名称	采样地点
1	黑叶青竹梅	福建绍安县
2	绍安土白梅	福建绍安县
3	软蒂青梅	福建绍安县
4	绍安白梅	福建绍安县
5	梨叶青竹梅	福建上杭县
6	上杭青梅	福建上杭县
7	新贵梅	福建永泰县
8	龙眼梅	福建永泰县
9	单瓣杏梅	浙江杭州市
10	江梅	浙江杭州市
11	大叶青	浙江杭州市
12	上虞青梅	浙江绍兴市
13	歙县青梅	安徽歙县
14	绿萼梅	安徽歙县
15	黄梅	四川大邑县
16	大青梅	四川大邑县
17	南高	四川大邑县
18	桃梅	四川平武县
19	达州实生梅	四川达州
20	宝兴实生梅	四川宝兴
21	盐梅	云南洱源县
22	苦梅	云南洱源县
23	杏梅	云南丽江市
24	腾冲 2 号	云南丽江市
25	保山照水梅	云南丽江市
26	MHS40	云南丽江市
27	MSH14	云南丽江市
28	青丰	云南丽江市
29	宁蒗实生梅	云南宁蒗县
30	百色实生梅	广西百色市

最小等位基因频率(minor allele frequency, MAF)、观察杂合度(observed heterozygosity, HO)和多态信息含量(polymorphism information content, PIC)。使用 Nei 的遗传距离构建树状图,并由 MEGA7^[22]观察。为评估这些标记的指纹识别能力,计算同一性的概率(probability of identity, PI),使用 Genalex 6.5 对每个标记及其组合进行测试。PI 是两个具有相同基因型的随机个体的平均概率。PI 的计算公式: $PI=2(\sum P_i^2)^2-\sum P_i^4$ 。其中 P_i 表示一个位点上第 i 个等位基因的频率。对于多位点组合,假设所有位点独立分离 PI 被计算为单个位点 PI 的乘积。此外,还计算了同胞群体中 PI 值(probability of identity sibs, PIsibs),从一个种群中找到两个相同个体的总概率,并计算具有相同基因型的突变体。PIsibs 计算公式: $PIsibs=0.25+(0.5\sum P_i^2)+[0.5(\sum P_i^2)^2]-(0.25\sum P_i^4)$ 。其中 P_i 表示一个位点上第 i 个等位基因的频率。

表 2 筛选的 SSR 引物信息

引物名	引物序列(5'→3')	退火温度/℃
AG10	F:TGGCCTAACCACTCTAACCCCTA	57
	R:GACGTTGGGAGCTGGTAGAG	
AG5	F:AATGTACTTGGCAATGCATATGA	57
	R:CTGCCTTCTGCTCACACC	
AG8	F:CTGCTCTCACTCAACTCAATGC	55
	R:CTCCCTACCCCTCTGTATCTC	
PMSSR0002	F:GGCCAAGTACCAACAGTTTCT	57
	R:GTCTCTGCTATCTCAACCTT	
PMSSR0024	F:CATTCCGATACCTCGTCAAA	53
	R:CGCATGGTTTGTTATGCA	
PMSSR0027	F:GCTGAAAACCCCGACAAA	55
	R:GGTCCCCAGATCTAAATGA	
PMSSR0092	F:GATGTGAGAGATGGGTGTTGA	57
	R:GCGGTATAATGTCGGTTGA	
PMSSR0103	F:CCATACGCCAAGGTAAAGCA	53
	R:GCTTGGGGAAGATCCCAATGGA	
PMSSR0109	F:AGAACAAGTGGGCCAACAA	56
	R:GAGAGTACCACCAGCAACT	
PMSSR0302	F:GGATAAAAGGGGACTACGA	53
	R:CACGTGGCAGCACTAGGAA	
PMSSR0346	F:GAGGAACAGAGGATAACTTCA	53
	R:CTGTAAGTGGAGCTGAGCAAA	
PMSSR0515	F:CATTTCGTGGTCCTCAAGGT	55
	R:GGGTTCATAAATGGTCCTCA	
PMSSR0626	F:GGACACCTCAACTCCATGA	55
	R:CAAGACACAGCTAGCTTCGT	
PMSSR0643	F:GGAACACAGAGGAGGCAATA	55
	R:CCAATTCCCCACAGGAATGT	
PMSSR0645	F:GAGTGGAAGTACAGCGTCAT	55
	R:CAAGGCGGTCTTATCTTT	
PMSSR0546	F:GGCTGCCTACTTGCTTACT	55
	R:CTAGGGTTGAGGGCAAAC	

1.2.4 核心 SSR 标记选择 为获得可靠的核心 SSR 标记集,采用以下标准^[10]:①扩增产物明确,无非特异性扩增;②该标记多态性程度较高,PIC>0.5;③相邻等位基因片段大小差异大于 3 bp,以便通过凝胶电泳解析;④PI<0.2,使一些标记结合起来可以提供足够的判别能力。

2 结果

2.1 SSR 引物的多态性 使用 Fragment Analyzer™96 以及 16 对 SSR 标记鉴定 30 份药用梅农家品种。随后,计算这些标记的遗传特性,包括 NA、MAF、HO 和 PIC。见表 3。从 30 份药用梅种质 DNA 中共扩增出 114 个 SSR 等位基因。毛细管电泳检测系统检测到的等位基因数量从 4 个(PMSSR0302,PMSSR0346,PMSSR027)到 11 个

表 3 SSR 多态性引物的特征

Marker	MAF	NA	HO	PIC	PI	PIsibs
AG5	0.25	6.00	0.94	0.76	0.07	0.37
AG8	0.24	9.00	0.83	0.82	0.05	0.34
AG10	0.76	6.00	0.20	0.51	0.37	0.64
PMSSR02	0.26	6.00	0.94	0.76	0.07	0.37
PMSSR024	0.36	10.00	0.81	0.78	0.06	0.37
PMSSR027	0.58	4.00	0.46	0.55	0.21	0.50
PMSSR092	0.20	11.00	0.84	0.85	0.03	0.33
PMSSR0103	0.47	7.00	0.81	0.66	0.13	0.43
PMSSR0109	0.27	8.00	0.89	0.78	0.07	0.36
PMSSR0302	0.62	4.00	0.11	0.52	0.28	0.55
PMSSR0346	0.42	4.00	0.49	0.61	0.17	0.46
PMSSR0515	0.24	8.00	0.64	0.69	0.10	0.36
PMSSR0546	0.28	7.00	0.89	0.77	0.07	0.37
PMSSR0626	0.34	7.00	0.95	0.77	0.07	0.37
PMSSR0643	0.38	9.00	0.76	0.75	0.08	0.38
PMSSR0645	0.32	8.00	0.89	0.74	0.09	0.39
Mean	0.39	7.12	0.72	0.69	5.24e ⁻¹⁷	5.64e ⁻⁷

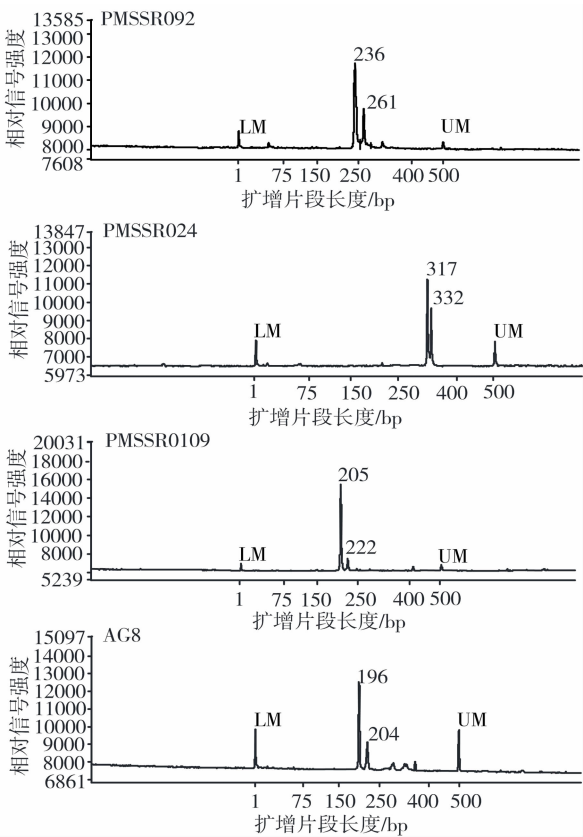
(PMSSR024),每个 SSR 引物对平均可以扩增出 7.12 个。每个标记的 MAF 范围为 0.20(PMSSR092)至 0.76(AG10),平均值为 0.39。HO 为 0.11(PMSSR0302)至 0.95(PMSSR0626),平均值为 0.72。PIC 值为 0.51(AG10)至 0.85(PMSSR092),平均值为 0.69。本研究筛选的 16 个 SSR 引物标记位点均为高度多态性位点,表明这些 SSR 位点具有丰富的遗传差异性,可以有效构建 30 份药用梅农家种的身份证。

2.2 药用梅 DNA 身份证的构建 为评价 16 对标记的指纹识别能力,计算 PI 和 PIsibs 两个关键统计量。每一个 SSR 标记的 PI 值在 0.03(PMSSR092)到 0.37(AG10)之间,平均值为 0.12。假设所有 SSR 标记位点独立分离,在所有 16 个位点上识别两个具有相同基因型的随机个体的概率估计为 5.24×10^{-17} 。PIsibs 从 0.33(PMSSR092)到 0.55(PMSSR302),平均值为 0.41,组合的 PIsibs 为 5.64×10^{-7} 。PI 和 PIsibs 值均极低,表明这些 SSR 标记组合具有良好的指纹识别能力。根据结果,共筛选出 4 对 SSR 标记作为核心引物,并提供了明确片段扩增,见表 4。因此,将毛细管电泳图谱上的在同一峰值处有带记为 1,无带记为 0,据此构建 30 个药用梅农家种 DNA 身份证,见表 5,部分引物毛细管电泳图谱见图 1。

2.3 系统发育树的构建 根据 Nei 遗传相似系数采用非加权算术平均连锁法(unweighted pair group method with arithmetic mean,UPGMA)进行聚类分析,如图 2 所示。在遗传相似系数为 0.66 时,

表 4 核心引物扩增片段长度

编号	PMSSR092	PMSSR0109	PMSSR024	AG8
1	231/250	220/229	299/299	226/240
2	228/237	214/233	296/302	225/225
3	229/235	222/228	297/301	189/223
4	215/225	207/218	297/308	199/227
5	228/241	220/224	295/307	189/191
6	229/233	214/224	295/306	215/222
7	224/248	208/231	297/310	191/208
8	227/230	215/221	310/323	205/221
9	228/247	217/222	297/302	190/204
10	232/256	222/228	297/312	208/221
11	232/237	228/232	296/307	—
12	225/236	216/227	298/312	208/229
13	207/207	223/226	299/313	203/208
14	206/206	217/224	294/306	224/226
15	206/206	222/242	295/306	198/223
16	206/227	222/241	295/307	198/218
17	206/206	222/240	295/306	216/237
18	229/251	205/220	296/306	197/244
19	236/261	205/222	317/332	196/204
20	227/249	221/228	285/309	203/214
21	226/248	205/222	296/318	197/226
22	227/249	217/217	287/290	197/226
23	228/251	206/218	291/300	208/240
24	229/237	208/216	287/299	198/240
25	207/230	222/227	291/291	201/223
26	207/229	215/225	288/303	220/227
27	207/229	206/225	285/297	220/227
28	227/261	217/235	286/297	203/223
29	207/229	231/227	291/307	207/227
30	229/252	205/227	286/298	220/242



注：最小标记片段(low marker, LM)；
最大标记片段(up marker, UM)

图 1 19 号样品的毛细管电泳峰图

可将 30 份药用梅分为 3 类。第一类由大青梅、达州实生梅、桃梅等 7 个品种组成，第二类由黑叶青竹梅、绍安土白梅、软蒂青梅和绍安白梅等 7 个品种组成，第三类由单瓣杏梅、大叶青、江梅、上虞青梅、歙县青梅等 16 个品种组成。

表 5 部分农家种的 DNA 身份证

No	PMSSR092	PMSSR0109	PMSSR024	AG8
	a b c d e f g h i j k	a b c d e f g h	a b c d e f g h i j	a b c d e f g h i
1	0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 0	0 1 0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 1 0 0 1
2	0 0 0 1 0 1 0 0 0 0 0	0 0 1 0 0 0 1 0	0 0 1 0 1 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 1 0 0 1
3	0 0 0 1 0 1 0 0 0 0 0	0 0 0 0 1 1 0 0	0 0 1 1 0 0 0 0 0 0	1 0 0 0 0 1 0 0 0
4	0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0	0 1 0 1 0 0 0 0	0 0 1 0 0 1 0 0 0 0	0 0 1 0 0 0 1 0 0
5	0 0 0 1 0 0 1 0 0 0 0	0 0 0 1 1 0 0 0	0 0 1 0 0 1 0 0 0 0	1 0 0 0 0 0 0 0 0
6	0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0	0 0 1 0 1 0 0 0	0 0 1 0 0 1 0 0 0 0	0 0 0 1 0 1 0 0 0
7	0 0 1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 1 0 0 1 0 0 0	0 0 0 1 0 1 0 0 0 0	1 0 0 1 0 0 0 0 0
8	0 0 0 1 1 0 0 0 0 0 0	0 0 1 0 1 0 0 0	0 0 0 0 0 1 0 0 1 0	0 0 0 1 0 1 0 0 0

3 讨论

3.1 药用梅 DNA 的身份证构建 目前,在产地多利用形态学特征对药用梅的种质进行鉴别,而对于跨地区引种和亲缘关系较近的药用梅品种则很难区分。SSR 分子标记构建的中药材 DNA 身份证可以有效区分近缘物种和农家种^[23]。本研究采用四川、云南和福建等主要产地的 30 份药用梅农家种,所构

建的 30 份农家种 DNA 身份证,可为药用梅的种质数据库的建设奠定基础。未来还将不断扩大种质资源数量和范围,进一步调整和优化 SSR 引物,最终构建完善药用梅的种质资源 DNA 指纹图谱库,为药用梅的种质鉴定提供准确、可靠的方法及溯源信息平台。

3.2 SSR引物多态性分析 SSR在植物遗传学和

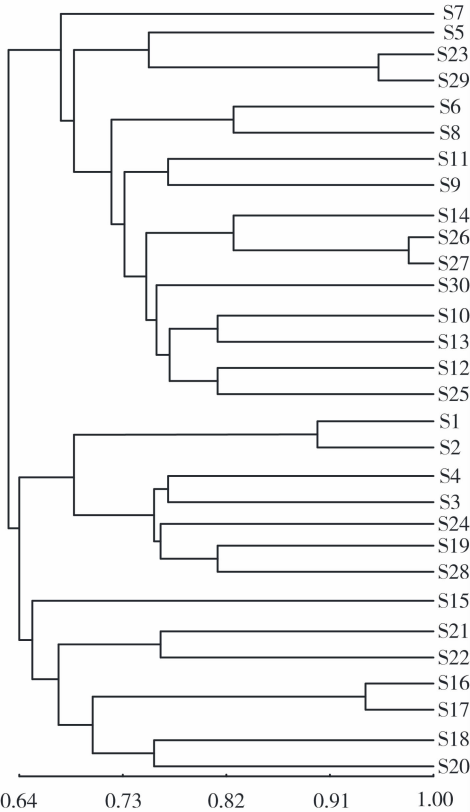


图 2 30 份药用梅农家种的聚类图

育种中发挥重要作用。然而,SSR 的有效性在很大程度上依赖于标记的质量、基因分型数据的准确性和所选择的植物材料。本研究从 180 对 SSR 引物中筛选出的 16 对标记在 30 份药用梅中具有较好的多态性。16 对 SSR 标记的 PI 值在 0.03(PMSSR092)到 0.37(AG10)之间,平均值为 0.181,在所有 16 个位点上识别两个具有相同基因型的随机个体的概率估计为 5.24×10^{-17} ,PI 为 0.000 1~0.01^[21-22],已足够鉴定大多数自然群体,表明这些 SSR 标记组合具有良好的指纹识别能力。每个标记平均有 7.12 个等位基因,平均 PIC 值为 0.69。平均 NA 和 PIC 值略高于前人研究结果^[19,24],原因可能是位于非转录区的某些 SSR 序列具有相对较低水平的序列保守性或者更高的突变性,或是因为毛细管电泳具有更高的分辨率,对于样品中高通量片段的分离、等位基因的鉴别具有特别优势。

3.3 系统发育树分析 本研究使用基因组 SSR 对 30 份药用梅农家种进行遗传多样性研究,其平均多态信息含量较高,表明药用梅的遗传多样性水平较高。基于 UPGMA 聚类图可以发现,样品可聚为三大支,相同来源的种质之间亲缘关系较为接近,如第三类中云南丽江的 26(MSH14)和 27(MSH13)样品,表明其遗传背景高度一致。第二类中的 1(黑叶青竹梅)、2(绍安土白梅)、3(软蒂青梅)和 4(绍安白

梅)聚为一类,因其产地相同,推测其具有相似的遗传背景。而 12(歙县青梅)和 13(临安青梅)与 3(上杭青梅)距离较远。其遗传一致性降低,可能与种质差异或引种后种质混乱导致遗传变异有关。目前,SSR 标记扩增的序列具体与药用梅的哪个性状相关联尚不清楚。且 SSR 标记的数字化具有局限性,不能反映一个药用梅品种的全部信息。因此,之后的研究应将 SSR 标记与植物的表现型相结合,以完善药用梅的品种鉴定技术体系,为药用梅的优良品种保护、溯源管理等提供理论依据。

4 结论

本研究是基于前人研究的 180 对 SSR 引物筛选出多态性高、稳定性好的 16 对 SSR 引物,并对 30 个药用梅的农家种进行 SSR 扩增分析,共检测到 114 个等位基因,平均 NA 为 7.12 个,平均 PIC 和 PI 信息指数分别为 0.69 和 5.24×10^{-17} 。最终确定引物 PMSSR092、PMSSR0109、PMSSR024 和 AG8 为核心引物,4 对引物组合可区分供试品种。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.

[2] 陈俊愉. 中国梅花的研究: I 梅之原产地与梅花栽培历史[J]. 园艺学报,1962,1(1):69-78.

[3] 陈俊愉. 中国梅花品种图志[M]. 北京:中国林业出版社,2010:22-40.

[4] 褚孟娜. 中国果树志[M]. 北京:中国林业出版社,2005:13-24.

[5] 朱凤洁,张山山,袁媛,等. 金银花种质资源 DNA 身份证构建及遗传相似性分析[J]. 中国中药杂志,2018,43(9):1825-1831.

[6] 周荣荣,周骏辉,南铁贵,等. 葛根 SSR 特征及江西粉葛 DNA 身份证的构建[J]. 中国中药杂志,2019,44(17):3615-3621.

[7] BHATTACHARJEE M, PRAKASH S H, ROY S, et al. SSR-based DNA fingerprinting of 18 elite Indian varieties of sesame (*Sesamum indicum* L.)[J]. Nucleus, 2020,63(1):67-73.

[8] NIE G, HUANG T, MA X, et al. Genetic variability evaluation and cultivar identification of tetraploid annual ryegrass using SSR markers[J]. Peer J, 2019,7:e7742.

[9] PARK J R, YANG W T, KWON Y S, et al. Assessment of the genetic diversity of rice germplasms characterized by black-purple and red pericarp color using simple sequence repeat markers[J]. Plants, 2019,8(11):471.

[10] TERUAKI S, GENKI S, HITOSHI K, et al. genetically independent tetranucleotide to hexanucleotide core motif SSR markers for identifying lentil edodes cul-

tivars[J]. *Mycobiology*,2019,47(4):446-472.

[11] MEKAPOGU M, KWON O K, HYUN D Y, et al. Identification of standard type cultivars in *Chrysanthemum*(*Dendranthema grandiflorum*) using SSR markers[J]. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*,2020,61(1):153-161.

[12] 余文霞,雷霄熙,袁媛,等. 铁皮石斛种质资源 DNA 身份证的构建及遗传相似性分析[J]. *中国实验方剂学杂志*,2019,25(1):16-21.

[13] 张建成,陈瑞丹,曲春苗,等. 梅花杂种鉴定中 SSR 分子标记引物的筛选[J]. *北京林业大学学报*,2012,34(S1):40-44.

[14] 明军. 梅花 DNA 指纹图谱的建立与研究[D]. 北京:北京林业大学,2002:65-72.

[15] 殷婧. 梅花品种资源核基因组 AFLP 及叶绿体基因组 SSR 研究[D]. 北京:北京林业大学,2006:15-22.

[16] 孙丽丹. 梅花遗传连锁图谱构建和表型性状 QTLs 分析[D]. 北京:北京林业大学,2013:5-77.

[17] 吴根松,张启翔,程汉武,等. 梅花 EST-SSR 与 Genomic-SSR 的比较研究[J]. *西北农业学报*,2011,20(10):120-125.

[18] 赵昶灵,郭维明,陈俊愉. 梅花基因组 DNA 提取的方法学研究[J]. *北京林业大学学报*,2004,26(S1):31-36.

[19] SUN L D, YANG W R, ZHANG Q X, et al. Genome-wide characterization and linkage mapping of simple sequence repeats in mei(*Prunus mume* Sieb. et Zucc.)[J]. *PLoS one*,2013,8(3):e59562.

[20] 张俊卫. 基于 ISSR,SRAP 和 SSR 标记的梅种质资源遗传多样性研究[D]. 武汉:华中农业大学,2010:60-80.

[21] 乔大河,郭燕,杨春,等. 贵州省主要栽培茶树品种指纹图谱构建与遗传结构分析[J]. *植物遗传资源学报*,2019,20(2):412-425.

[22] LIU S J, LIU H W, WU A L, et al. Construction of fingerprinting for tea plant (*Camellia sinensis*) accessions using new genomic SSR markers[J]. *Mol Breeding*,2017,37(8):93-104.

[23] 周骏辉,袁媛,黄璐琦. SSR 标记在中药材分子身份证体系构建中的应用[J]. *中国现代中药*,2016,18(10):1233-1236.

[24] 赵靓,罗燕杰,肖思文,等. 基于表型和 SSR 标记的梅花种质资源遗传多样性分析[J]. *分子植物育种*,2019,17(13):4458-4469.

(收稿日期:2020-07-14;编辑:张倩)

Construction of Identification Cards of Medicinal Plum Varieties Based on Simple Sequence Repeats Markers

WANG Rui¹, OU Jin-mei^{1,2}, LI Xin¹, LI Xiao-li¹, ZHANG Wei^{1,2}, FANG Cheng-wu^{1,3}
(1. *Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China*; 2. *Anhui Provincial Key Laboratory of New Manufacturing Technology for Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces, Anhui Hefei 230012, China*; 3. *Anhui Province Key Laboratory of Research & Development of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China*)

[Abstract] **Objective** To screen out a set of simple sequence repeats(SSR) molecular markers which is suitable for the identification criteria of medicinal plum varieties in China and can be used to construct the DNA fingerprint identification cards of medicinal plum varieties. **Methods** A total of 30 species of medicinal plum were selected, and among 180 pairs of SSR primers, 16 pairs with high polymorphism, clear bands, and good repeatability were selected for amplification. **Results** A total of 114 alleles were amplified in the 30 species of medicinal plum, and the average number of alleles and polymorphism information content were 7.12 and 0.69, respectively. The estimated probability was 5.24×10^{-17} for identifying two random individuals with the same genotype on 16 loci. Finally, 4 pairs of core primers with stable amplification and strong polymorphism were screened out, which effectively distinguished the 30 species of medicinal plum and could be used to establish the DNA fingerprint identification cards of medicinal plum germplasm resources. **Conclusion** SSR labeling technique can be used as an effective technique for constructing the molecular identification cards of medicinal plum. **[Key words]** Medicinal plum; Fingerprint identification; Simple Sequence Repeats