

新思路、新技术、新方法
Novel Thinking & Technology

利用 SSR 标记鉴定柚和杂柑品种

雷天刚^{1,2,3} 何永睿^{1,2,3} 吴鑫² 刘小丰^{1,2,3} 许兰珍^{1,2,3} 彭爱红^{1,2,3} 陈善春^{1,2,3}

1 中国农业科学院柑桔研究所,重庆,400712 2 西南大学柑桔研究所,重庆,400712 3 国家柑桔品种改良中心,重庆,400712
通讯作者, scchen2004@vip.sina.com

摘要 采用 SSR 技术,从 105 对柑桔 SSR 引物中,筛选出 10 对在柑桔大类品种间多态性位点丰富、带型清晰、重复性好的 SSR 引物。利用其中 5 对 SSR 引物对 5 个柚和 7 个杂柑品种 DNA 进行 PCR 分析,共扩增出 35 条谱带,其中 27 条谱带呈现多态性,引物多态性带纹比例均在 60% 以上。扩增片断的大小集中在 100 bp~500 bp 之间。分别针对柚和杂柑品种筛选出两个高效的引物组合 (SSR17、SSR15、SSR16、SSR12 与 SSR17、SSR18、SSR16) 利用这两组引物成功构建出了我国主推的 5 个柚和 7 个杂柑品种的特征指纹图谱。并应用指纹图谱自动识别软件 Gel 2.0 对各品种指纹图谱进行识别,建立了相应品种的特征指纹模式图谱库。
关键词 柚,杂柑,SSR,品种鉴定,指纹图谱

Identification of Pummelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) and Hybrid Citrus Cultivars using SSR Molecular Markers

Lei Tiangang^{1,2,3} He Yongrui^{1,2,3} Wu Xin² Liu Xiaofeng^{1,2,3} Xu Lanzhen^{1,2,3} Peng Aihong^{1,2,3} Chen Shanchun^{1,2,3*}

1 Citrus Research Institute, CAAS, Chongqing, 400712; 2 Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing, 400712; 3 National Citrus Cultivar Improvement Center of China, Chongqing, 400712
*Corresponding author, scchen2004@vip.sina.com

Abstract Simple sequence repeat (SSR) was used to construct the fingerprinting of mainly cultivars of pummelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) and hybrid citrus in China. A total of ten primer pairs with stable and repeatable polymorphism that can identify closely related citrus cultivars were screened out from 105 SSR primer pairs. In this paper, five pummelo and seven hybrid citrus cultivars were analyzed by using five of these SSR markers. As a result, a total of 35 bands were detected, 27 of which were polymorphic. The polymorphic rate of each primer pair was beyond 60%. The bands range in size was from 100 bp to 500 bp. The fingerprinting of five pummelo and seven hybrid citrus cultivars was constructed by using two particularly high efficiency primer groups (SSR17, SSR15, SSR16, SSR12 and SSR17, SSR18, SSR16) respectively. Furthermore, the mode fingerprinting database of citrus cultivars was established by fingerprint analysis system-Gel 2.0.

Keywords Pummelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck), Hybrid citrus, SSR, Cultivar identification, Fingerprinting

种苗遗传真实性是柑桔苗木质量的核心指标,其质量的好坏直接影响到柑桔生产的质量、产量和农民的种植效益。传统的柑桔品种鉴定方法主要有:形态学标记和同工酶标记两种。柑桔种苗形态上可作为品种鉴定的特征标记数量有限,很多亲缘关系相近品种间的差异仅从果实上体现出来,而且柑桔的形态特征受环境影响较大(Fang et al., 1998)。同工酶作为一种生化标记曾被应用于柑桔种质的鉴定研

究 (Rahman and Nito, 1994; Protopapadakis and Panikolaus, 1999)。研究发现同工酶标记在杂交柑桔品种间的差异很明显,却很难鉴别由突变选系育成的品种(Rahman et al., 2001; Herrero et al., 1996)。且同工酶具有组织和器官特异性,使取材受到严格限制,从而限制了其应用。目前,广泛使用的 DNA 分子标记反映了生物个体间 DNA 水平上的遗传差异,具有位点丰富、多态性高、不受环境和发育阶段的影响

基金项目 科技部科研院所社会公益研究专项(2004DIB45147) 重庆市科技攻关重点项目(CSTC, 2006AB1009)

及检测快速等优点。近年来,一些常用的分子标记技术已被广泛应用于柑桔品种的分类鉴定研究,如利用 RFLP 标记对柑桔品种进行分类鉴定(Roose, 1988),利用 RAPD 鉴定柑桔嵌合体(Sugawara and Oowada, 1995)和柠檬栽培品种(Deng et al., 1995),利用 ISSR 鉴定近缘柑桔品种(Fang and Roose, 1997),利用 AFLP 构建枳属特异种质的指纹图谱等(庞晓明等 2003)。其中,SSR 技术因具有操作简单、多态性信息含量高、重复性好等诸多优点,已被广泛应用于水稻(于永红等 2001;张彦等 2006;薛灿辉等, 2005)、玉米(李晓辉等 2003)、苹果(王爱德等 2005)、甜瓜(艾程祥等 2006)等作物的品种鉴定研究。本文应用 SSR 技术,构建了我国主推柚和杂柑品种的指纹图谱,旨在建立一种快速、准确的柑桔品种鉴定方法,以期为今后柑桔产业化中种苗纯度和真实性鉴定提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

沙田柚(*C. grandis* (L.) Osbeck 'Shatinyu')、琯溪蜜柚(*C. grandis* (L.) Osbeck 'Guanximiyu')、晚白(*C. grandis* (L.) Osbeck 'Wanbaiyu')、强德勒(*C. grandis* (L.) Osbeck 'Chandler')、梁平柚(*C. grandis* (L.) Osbeck 'Langpinyu') 5 个柚品种和不知火(*C. sinensis* × *C. unshiu* Marcov) × *C. reticulata* Ponkan 'Buzhihuo')、少核默科特(*C. sinensis* × *C. reticulata* 'Murcott')、清见(*C. sinensis* × *C. unshiu* Marcov 'Qingjian')、诺瓦(*C. reticulata* × *C. grandis* (L.) Osbeck 'Nova')、天草((*C. sinensis* × *C. unshiu* Marcov) × *C. reticulata*) 'Tiancao'、阳香(*C. sinensis* × *C. unshiu* Marcov × *C. reticulata* Ponkan 'Yangxiang')、津之香((*C. sinensis* × *C. unshiu* Marcov) × *C. unshiu* Marcov) 'Jinzhixiang') 7 个杂柑品种均由中国农科院柑桔研究所“国家果树种质(重庆)柑桔圃”提供。

1.2 柑桔基因组 DNA 的提取

取幼嫩的叶片 0.2 g 于 1.5 mL 离心管中,于液氮中研磨成粉末,然后加入 600 μ L CTAB buffer(2% CTAB, 1.4 mol/L NaCl, 0.02 mmol/L EDTA, 0.1 mol/L Tris-HCl, 3% PVP, 2% β -巯基乙醇)充分混匀,65 $^{\circ}$ C 水浴 30 min,其间轻轻振荡 2~3 次。水浴后取出样品加入等体积酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提 15 min;室温下 12000 r/min 离心 10 min。取上清加入等体积氯仿/异戊醇(24:1)抽提 15 min,再次以 12000 r/min 离

心 10 min。取上清加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc(pH 5.2) 和 2/3 体积的异丙醇,混匀后于 -20 $^{\circ}$ C 下静置 10 min。6000 r/min 离心 5 min,倒弃水溶液,75% 的酒精洗涤沉淀 2~3 次。利用真空干燥机风干 DNA,加入 100 μ L ddH₂O 溶解 DNA。经琼脂糖电泳及分光光度计检测后放入 -20 $^{\circ}$ C 储存备用。

1.3 SSR 分析

SSR 分析在国家柑桔品种改良中心完成。SSR 引物根据江东(江东等 2006)、Kijas 等(1997)、Chen 等(2006)报道的序列以及利用 SSR 搜索软件 Misa 从柑桔 EST 数据库中搜寻到的 SSR 而设计,由上海生工合成,PAGE 纯化。PCR 扩增仪为德国 Biometra 公司生产的 Tgradient 型扩增仪。PCR 反应试剂均购于宝生物工程(大连)有限公司。SSR 反应条件经过优化确定为 25 μ L 体系含基因组 DNA 200 ng, Tris-HCl 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, MgCl₂ 1.67 mmol/L, dNTP 0.20 mmol/L, 引物各 0.20 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶 0.8 U。PCR 程序是 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55~60 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物于 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳。采用银染显色:用 10% 酒精+0.5% HAC 固定 2 次,每次 6 min,0.2% AgNO₃ 溶液渗透 12 min;单蒸馏水漂洗 2 次,每次 65s,加显色液(1.0% NaOH+0.4% 甲醛)于摇床上摇晃 2~4 min,至谱带清晰时停止显色。记录及照相。

应用曹永生等编制的指纹图谱自动识别系统 Gel 2.0 识别各品种的谱带,以 DL2000 DNA Marker 作参照,根据迁移率大小确定各扩增片段的分子量,建立各品种的指纹图谱数据库。重新取样验证各品种特征指纹图谱的准确性。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物的筛选

以甜橙、柚、宽皮柑桔(杂柑、椪柑、温州蜜柑)和柠檬的代表品种对 SSR 引物进行初步筛选,从 105 对引物中筛选出 10 对多态性丰富、谱带清晰、重复性好的 SSR 引物。将这 10 对引物作为柑桔品种鉴定的核心引物。利用其中 5 对 SSR 引物(见表 1)对 5 个柚品种和 7 个杂柑共 12 个品种进行 PCR 扩增,共扩增出 35 条谱带,其中多态性谱带 27 条,引物多态性带纹比例均在 60% 以上,扩增片段的大小集中在 100 bp~500 bp 之间。之后分别针对柚和杂柑品种特征

指纹进行分析,筛选出两个高效的引物组合(SSR17、SSR15、SSR16、SSR12 和 SSR17、SSR18、SSR16),利用这两组引物能够快速地将柚和杂柑品种鉴别出来。

2.2 柚 SSR 指纹图谱

利用筛选的 4 对 SSR 引物(SSR17、SSR15、SSR16、SSR12)初步构建了沙田柚、琯溪蜜柚、晚白柚、强德勒、梁平柚的指纹图谱(如图 1)。仅就这 5 个柚品种而言,选择 SSR12、SSR16 或 SSR12、SSR17 的引物组合均能把上述各柚品种鉴别出。为了尽量避免与其它柑桔品种具有相同的指纹而对将来鉴定工作的干扰,利用了 4 对 SSR 引物共同构建出上述 5 个柚品种的指纹图谱。4 对 SSR 引物在 5 个柚品种中共扩增出 20 条多态性谱带。利用这些谱带能够准确快速地将上述柚品种鉴别出来。

表 1 5 对 SSR 引物在 12 个品种中的扩增结果

Table 1 Amplified results of 12 citrus cultivars by five SSR primer pairs

引物名称 Primer Name	序列(5' 3') Sequence(5' 3')	总带数目 Total bands	多态性带 Polymorphic bands	多态性带比例 Polymorphic Rate(%)
SSR12	AAAGGGAAAGCCCTAATCTCA CTTCCTCTTGCGGAGTGTC	9	9	100
SSR15	GCTTTTCGATCCCTCCACATA GATCCCTACAATCCTTGGTCC	9	6	66.7
SSR16	AGTGAAGTGTCCATTGGATTTTCG GTGTTGAATCCCGACCTTCTACC	5	4	80
SSR17	TTCATTTGGAACAAAACCCAATTC GCTGCTAATCACAGCATCAAGAGA	7	5	71.4
SSR18	CCTCAGCTCTAGCAAAGCACATT AGAGGCTATAGATCGTGGATGCAG	5	3	60

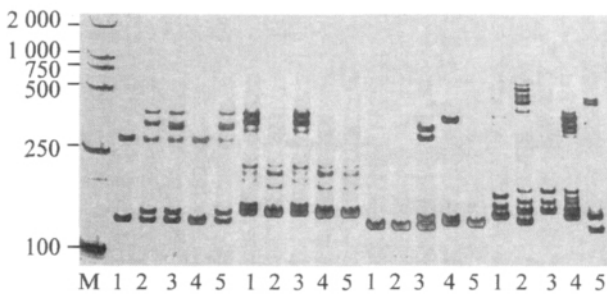


图 1 5 个柚品种的 SSR 指纹图谱

注 M. DL2000 DNA marker. 1. 沙田柚 2. 琯溪蜜柚 3. 晚白柚 4. 强德勒 5. 梁平柚。所对应的 4 对引物依次为 SSR17, SSR15, SSR16, SSR12

Figure 1 The fingerprinting of five Pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) cultivars

Note: 1. Shatianyou Pomelo, 2. Guanximiyu Pomelo, 3. Wanbaiyou Pomelo, 4. Chandler Pomelo, 5. Liangpinyou Pomelo. Four SSR primer pairs are SSR17, SSR15, SSR16 and SSR12

2.3 杂柑 SSR 指纹图谱

利用 SSR17、SSR18、SSR16 这 3 对 SSR 引物初步构建了杂柑主推品种不知火、少核默科特、清见、诺瓦、天草、阳香、津之香的特征指纹图谱(如图 2 和图 3)。3 对 SSR 引物在 7 个杂柑品种中共产生了 10 条多态性谱带。其中 SSR17 号引物在清见和天草中都扩增特异谱带,能够一次性将其鉴别出来,其余品种需通过组合引物的方式鉴别。

2.4 柑桔品种指纹模式图谱库的建立

根据上述各柑桔品种的特征指纹图谱,应用曹永生等编写的指纹图谱自动识别系统 Gel 2.0 对各品种的指纹进行识别处理,建立相应品种的指纹模式图谱数据库。以 DNA Marker DL 2000 作参照,根

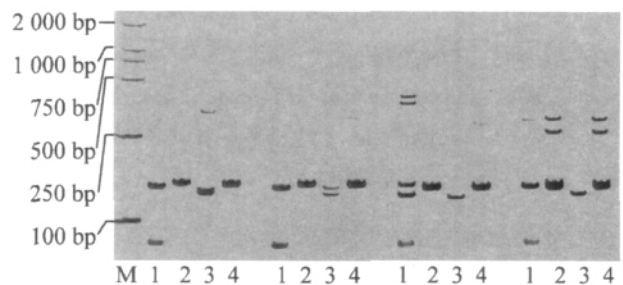


图 2 4 个杂柑品种 SSR 指纹图谱

注 M. DL2000 DNA marker. 每个品种的指纹图谱均由 3 对引物构成,品种依次为不知火、少核默科特、清见、诺瓦。图中编号:1. SSR17, 2 和 4. SSR18, 3. SSR16

Figure 2 The fingerprinting of four hybrid citrus cultivars

Note: M. DL2000 DNA marker, The fingerprinting of each hybrid citrus cultivars (Buzhihuo, Murcott, Qingjian and Nova) was made up of 3 primer pairs (1. SSR17, 2 and 4. SSR18, 3. SSR16)

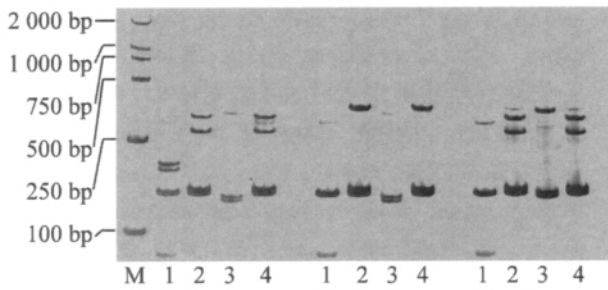


图 3 3 个杂柑品种 SSR 指纹图谱

注 :M. DL2000 DNA marker. 各编号对应的引物名称同图 2, 3 个杂柑品种依次为天草、阳香、津之香。

Figure 3 The fingerprinting of three hybrid citrus cultivars

Note: M. DL2000 DNA markers; Pimername sameas fig.2; Three cultivars are Tiancao, Yangxiang, Jinzixiang respectively

据谱带数目、相对迁移率大小绘制出每条谱带的相对位置, 构建出柑桔品种标准指纹模式图。图 4 即为 5 个柚和 7 个杂柑品种的标准指纹模式图谱。所建立的指纹图谱库可以将指纹模式转换成图形模式图和数字模式图。该库可以继续添加其它品种的指纹图谱, 品种之间可相互比对。待检测的样品只要将电泳图谱识别后通过比对就能得知是否为某个品种。

为了验证该指纹模式图谱的准确性, 我们利用特征引物对不同栽培地点的相应品种进行扩增, 得到的指纹图谱经自动识别系统 Gel 2.0 识别后进行比对, 检索出的品种名与实际吻合。

3 讨论

苗木市场上销售“假树苗”的现象层出不穷, 给广大农户和地方政府带来巨大的经济损失。为了减少农民不必要的经济损失和维护社会的发展, 建立一套准确、快速鉴定苗木的方法就非常有必要。目前, 已经建立 DNA 指纹图谱数据库的果树有苹果、梨、桃、葡萄、樱桃等。本研究利用 SSR 标记对柑桔品种进行鉴定, 结果表明 SSR 标记对柚及杂柑品种都有很好的区分效果。5 对引物就能够检测出 27 多态性谱带, 多态性谱带比例较高。而且重复性很好, 所选引物做了 2 次以上重复, 均能得到相同的指纹图谱。另外, 选取不同栽培地点的相应品种对指纹图谱进行了验证, 结果显示, 所得到的指纹图谱与构建的特征指纹图谱能够相吻合。这说明采用无性繁殖种苗的柑桔, 利用 SSR 标记鉴定其种苗纯度和真实性是可行的。

虽然 SSR 技术具有操作简单、重复性好等诸多优点, 但在实际操作中 SSR 技术也存在一些影响因素。首先, 对基于 PCR 的 SSR 技术而言, DNA 质量



图 4 5 个柚品种和 7 个杂柑品种标准指纹模式图谱

注 :图中 M :DNA Marker DL2000. 01, 06, 11, 16 :沙田柚 ;02, 07, 12, 17 :涪溪蜜柚 ;03, 08, 13, 18 :晚白柚 ;04, 09, 14, 19 :强德勒 ;05, 10, 15, 20 :梁平柚 ;21, 28, 35 :不知火 ;22, 29, 36 :核默科特 ;23, 30, 37 :清见 ;24, 31, 38 :诺瓦 ;25, 32, 39 :天草 ;26, 33, 40 :阳香 ;27, 34, 41 :津之香

Figure 4 The standard mode fingerprinting of five Pummelo(Citrus grandis Osbeck) and seven Hybrid citrus cultivars

Note: M. DNA markerDL2000. 01, 06, 11, 16: Shatianyou Pome-lo; 02, 07, 12, 17: Guanximiyou Pome-lo; 03, 08, 13, 18: Wan-baiyou Pome-lo; 04, 09, 14, 19: Chandler Pome-lo; 05, 10, 15, 20: Liangpinyou Pome-lo; 21, 28, 35: Buzhihuo; 22, 29, 36: Murcot; 23, 30, 37: Qingjian; 24, 31, 38: Nova; 25, 32, 39: Tiancao; 26, 33, 40: Yangxiang; 27, 34, 41: Jinzhixiang

的好坏对 PCR 扩增有一定的影响。质量差的 DNA 可导致扩增效果较差、带型不稳定、染色形成较深的背景等现象。柑桔叶片是多酚、多糖含量较高的材料,要快速地提取出高质量的 DNA 采用合适的方法就很重要。其次,SSR 标记也存在扩增出非特异性带或扩增效果差的情况。要克服这个问题,应尽量减少引物的反复冻溶;同时对 PCR 反应条件进行优化,提高反应的特异性。另外,控制好染色过程的各环节,也是减少非特异性带的出现的有力保证。经过对 SSR 标记技术的优化,已成功建立了一套准确、快速鉴定柚和杂柑品种的方法。

参考文献

- Ai C.X., Yu X.M., Ma G.B., and Liu Q.Z., Establishment of fingerprinting for melon hybrids by SSR markers. *Guoshu Xuebao (Journal of Fruit Science)*, 2006, 23(3): 415-419 (艾程祥, 余贤美, 马国斌, 刘庆忠, 2006, 甜瓜杂交种 SSR 指纹图谱的构建, *果树学报*, 23(3): 415-419)
- Chen C.X., Zhou P., Choi Y.A., Huang S., and Gmitter Jr.F.G., 2006, Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs, *Theor. Appl. Genet.*, 112(7): 1195-1204
- Deng Z.N., Gentile A., Nicolosi E., Vardi A., and Tribulato E., 1995, Identification of in vivo and in vitro lemon mutants by RAPD markers, *J Hort. Sci.*, 70: 117-125
- Fang D.Q., Krueger R.R., and Roose M.L., 1998, Phylogentic relationships among selected Citrus germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers, *J. Am. Soc. Hort.*, 123(4): 612-617
- Fang D.Q., and Roose M.L., 1997, Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers, *Theor. Appl. Genet.*, 95(3): 408-417
- Guilfort P., Prakash S., Zhu J.M., Rikkerink E., Gardiner S., Bassett H., and Forster R., 1997, Microsatellites in *Malus domestica*(apple): abundance polymorphism and cultivar identification, *Theor. Appl. Genet.*, 94(2): 249-254
- Herrero R., Asins M.J., Carbonell E. A., and Navarro L., 1996, Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae, I. Intraspecies and intragenus genetic variability, *Theor. Appl. Genet.*, 92(5): 599-609
- Jiang D., Zhong G.Y., and Hong Q.B., 2006, Analysis of microsatellites in citrus unigenes, *Yichuan Xuebao (Acta Genetica Sinica)*, 33(4):235-353 (江东, 钟广炎, 洪棋斌, 2006, 柑橘 EST-SSR 分子标记分析, *遗传学报*, 33(4): 345-353)
- Kijas J.M.H., Thomas M.R., Fowler J.C.S, and Roose M.L., 1997, Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of Citrus, *Theor. Appl. Genet.*, 94(5): 701-706
- Li X.H., Li X.H., Li W.H., Wang Z.H., Ma F.M., Yuan L.X., and Zhang S.H., 2003, Application of SSR markers in hybrid seed purity test of maize, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 29(1): 63-68 (李晓辉, 李新海, 李文华, 王振华, 马凤鸣, 袁力行, 张世煌, 2003, SSR 标记技术在玉米杂交种种子纯度测定中的应用, *作物学报*, 29(1): 63-68)
- Pang X.M., Deng X.X., and Hu C.G., 2003, Construction of AFLP fingerprint of 36 poncirus accessions, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 30(4): 394-398 (庞晓明, 邓秀新, 胡春根, 2003, 枳属 36 份特异种质的 AFLP 指纹图谱构建与分析, *园艺学报*, 30(4): 394-398)
- Protopapadakis E., and Papanikolaou X., 1999, Use of four isozymic systems in lemon and lemon-like citrus cultivars to detect their genetic diversity, *J. Hort. Sci. Biotech*, 74 (1): 26-29
- Rahman M.M., and Nito N., 1994, Phylogenetic relationships among the "true citrus fruit trees" by glutamate oxaloacetate transaminase isozymes analysis, *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.*, 62: 755-760
- Rahman M.M., Nito N., and Isshiki S., 2001, Cultivar identification of 'Yuzu'(Citrus junos Sieb. Ex Tanaka) and related acid citrus by leaf isozymes, *Sci. Hort.*, 87(3): 191-198.
- Roose M.L., 1988, Isozymes and DNA restriction fragment length polymorphisms in citrus breeding and systematics, In: Goren R, Mendel K (eds) *Proc 6th Int Citrus Congr. Balaban Publishers, Rehovot, Israel*, vol 1, pp 155-165
- Sugawara K., and Oowada A., 1995, Identification of Citrus chimeras by RAPD analysis. *Hort. Sci.*, 30: 1276-1278
- Wang A.D., Li T.Z., Xu X.F., and Han Z.H., 2005, SSR analysis for apple cultivars, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 32 (5): 875-877 (王爱德, 李天忠, 许雪峰, 韩振海, 2005, 苹果品种的 SSR 分析, *园艺学报*, 32(5): 875-877)
- Xue C.H., Zhu K.Y., Chen Z.W., and Zhan Q.C., 2005, Studies on identification and factuality of jingyou207 series using SSR marker, *Hunan Nongye Kexue (Hunan Agricultural Sciences)*, 5: 6-8 (薛灿辉, 朱克永, 陈祖武, 詹庆才, 2005, 利用微卫星标记鉴定金优 207 杂种纯度技术研究, *湖南农业科学*, 5: 6-8)
- Yu Y.H., Li Y.H., Ma R.R., Wang X.Y., Hu G.C, Si H.M, Fu Y. P., and Sun Z.X., 2001, Establishment of fingerprint map of Ning 2A with simple sequence repeat markers, *Zhongguo Shuidao Kexue (Chinese J Rice Sci.)*, 15(3): 215-217 (于永红, 李云海, 马荣荣, 王晓燕, 胡国成, 斯华敏, 傅亚萍, 孙宗修, 2001, 用微卫星 DNA 标记建立宁 2A 的指纹图谱, *中国水稻科学*, 15(3): 215-217)
- Zhang Y., Guo S.W., He B., and Gao D.Y., 2006, Construction of molecular fingerprinting database for hybrid rice using SSR markers, *Jiangsu Nongye Kexue (Jiangsu J. of Agr. Sci.)*, 22 (2): 181-183 (张彦, 郭士伟, 何冰, 高东迎, 2006, 利用 SSR 标记建立杂交水稻分子指纹图谱数据库, *江苏农业学报*, 22(2): 181-183)