

## 菠萝 PARMS 反应体系的建立

高云飞<sup>1,3</sup>, 林文秋<sup>1,2\*</sup>, 吴青松<sup>1,2</sup>, 张秀梅<sup>1,2</sup>, 孙伟生<sup>1,2</sup>, 刘胜辉<sup>1,2</sup>, 姚艳丽<sup>1,2</sup>

1. 中国热带农业科学院南亚热带作物研究所, 广东湛江 524091; 2. 农业农村部热带果树生物学重点实验室, 广东湛江 524091; 3. 云南农业大学热带作物学院, 云南普洱 665099

**摘要:** 单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 广泛分布在植物的基因组中, 具有丰富的 DNA 变异形式。基于单核苷酸多态性开发的标记被认为是极具应用前景的分子标记。五引物扩增受阻突变体系 (Penta-primer amplification re-fractory mutation system, PARMS) 是一种基于单核苷酸多态性的新型基因分型技术, 具有通量高、准确性高、成本低和耗时短等优点。因此, 建立高效、简便可行的 PARMS 分型技术对菠萝种质资源的鉴定、基因定位的开展以及分子辅助选择育种体系的建立具有重要意义。本研究以 3 份表型差异显著的菠萝种质资源为材料, 基于 130 份菠萝种质资源的重测序数据分析结果, 设计特异引物 SNP31。结果显示, SNP31 可将菠萝种质资源进行较好地分型, 可用于后续反应体系的优化。为了建立适用于菠萝的 PARMS-SNP 分型体系, 对 PARMS 的反应体积、引物浓度、DNA 的提取方法和 DNA 浓度等参数进行优化。研究表明, 反应体积、引物浓度以及 DNA 的浓度均能影响基因型信号点的荧光信号值。在较大或较小的反应体积下基因型信号点的荧光信号值均降低, 最适的反应体积为 6  $\mu\text{L}$ 。随着引物和 DNA 浓度的增加, 基因型信号点的荧光信号值增加, 最佳的引物和 DNA 浓度分别为 100  $\mu\text{mol/L}$  和 25  $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。此外, 不同基因组 DNA 的提取方法均能对 3 份种质实现较好的 PARMS-SNP 分型。因此, PARMS-SNP 分型体系的最佳反应体系为: 反应总体积 6  $\mu\text{L}$ , DNA (25  $\text{ng}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , PARMS mix 3  $\mu\text{L}$ , Primer mix (100  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.45  $\mu\text{L}$ ,  $\text{ddH}_2\text{O}$  1.55  $\mu\text{L}$ 。利用 65 份菠萝种质资源验证该体系的准确性和稳定性, 获得了较好的 PARMS-SNP 分型结果。本研究建立的 PARMS-SNP 分型体系为开展菠萝种质资源遗传多样性分析、遗传图谱的构建、基因定位及分子标记辅助选择提供基础。

**关键词:** 菠萝; SNP; PARMS; 反应体系

中图分类号: S668.3 文献标识码: A

## Establishment of PARMS Reaction System for Pineapple (*Ananas comosus*. L)

GAO Yunfei<sup>1,3</sup>, LIN Wenqiu<sup>1,2\*</sup>, WU Qingsong<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiumei<sup>1,2</sup>, SUN Weisheng<sup>1,2</sup>, LIU Shenghui<sup>1,2</sup>, YAO Yanli<sup>1,2</sup>

1. South Subtropical Crop Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang, Guangdong 524091, China; 2. Laboratory of Tropical Fruit Biology, Ministry of Agriculture & Rural Affairs, Zhanjiang, Guangdong 524091, China; 3. College of Tropical Crops, Yunnan Agricultural University, Pu'er, Yunnan 665099, China

**Abstract:** Single nucleotide polymorphism (SNP) is widely distributed in plant genomes, which is one of the most abundant form of DNA variation. The molecular markers based on single nucleotide polymorphism are considered to be of great application prospect. Penta-primer amplification re-fractory mutation system (PARMS) is a kind of new genotyping system based on single nucleotide polymorphism (SNP) which has the advantages of high throughput, high accuracy, low cost and short time consuming. The establishment of the PARMS system of pineapple is significant in germplasm identification, gene mapping and marker-assisted selection of pineapple. In this study, three germplasms of

收稿日期 2022-04-24; 修回日期 2022-06-07

基金项目 国家重点研发计划项目 (No. 2019YFD1000505); 广东省基础与应用基础研究基金项目 (No. 2019A1515011088); 广东省现代农业产业技术体系创新团队建设专项 (No. 2022KJ109)。

作者简介 高云飞 (1999—), 男, 本科生, 研究方向: 菠萝生物技术; \*通信作者 (Corresponding author): 林文秋 (LIN Wenqiu), E-mail: linwenqiu1989@163.com。

significant difference in phenotypes were used as the materials. A specific primer SNP31 was designed based on the resequencing data of 130 germplasm resources. The result revealed SNP31 could effectively group the pineapple germplasm resources, and be used for the subsequent optimization of the system. Reaction volume, primer concentration, method of DNA extracting and template DNA amount were optimized. The results showed that reaction volume, primer concentration and template DNA amount could affect the fluorescence signal value of the genotype signal point. The fluorescence signal value of genotypic signal point decreased when the reaction volume was larger or smaller. The optimal reaction volume was 6  $\mu\text{L}$ . When the concentration of primer and template DNA increased, the fluorescence signal value of genotype signal point increased. The optimal concentration of primer and template DNA was 100  $\mu\text{mol/L}$  and 25  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , respectively. In addition, different methods of genomic DNA extraction could group well the PARMS-SNP for the three germplasms of pineapple. The optimal PARMS reaction system was as follows: total volume 6  $\mu\text{L}$ , containing 1  $\mu\text{L}$  template DNA (25  $\text{ng}$ ), 3  $\mu\text{L}$  PARMS mix (2 $\times$ ), 0.45  $\mu\text{L}$  primer mix (100  $\mu\text{mol/L}$ ) and 1.55  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O. With the optimal PARMS reaction system, high quality results of PARMS-SNP genotyping was produced on sixty-five pineapple germplasm resources, which indicated that the reaction system was accurate and stable. The establishment of the optimized PARMS genotyping system could provide a basis for the genetic diversity analysis, genetic linkage map construction, gene mapping and marker-assisted selection of pineapple in this study.

**Keywords:** pineapple; SNP; PARMS; reaction system

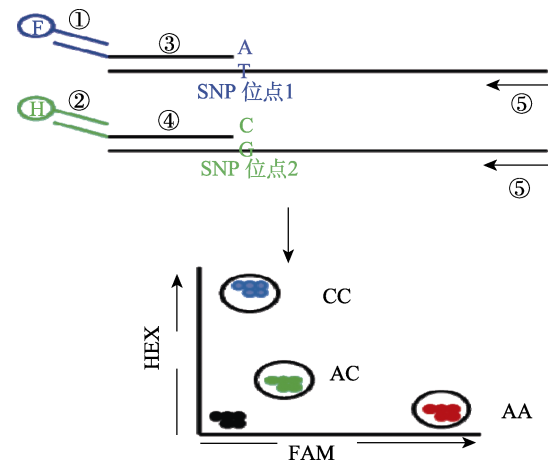
**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.02.001

DNA 分子标记是根据基因组中 DNA 片段差异来判断个体间遗传信息的差异。与传统表型性状选择相比, DNA 分子标记技术在基因或 DNA 水平上进行选择,可减少传统育种中的盲目性、选择效率低且易受环境条件影响等问题<sup>[1]</sup>。早期的分子标记技术主要包括 AFLP ( amplified fragment length polymorphism)、RFLP ( restriction fragment length polymorphism)、RAPD ( random amplified polymorphic)、SSR ( simple Sequence Repeats)、SNP ( single nucleotide polymorphisms) 等。但由于 AFLP、RAPD、SSR 等标记存在步骤繁琐、分型不稳定甚至是分型过多无法分辨以及非共显性等问题,使这些标记技术难以应用于育种工作中<sup>[2]</sup>。

随着高通量测序技术的快速发展,单核苷酸多态性 ( single nucleotide polymorphisms, SNP) 标记被广泛应用于植物中。SNP 广泛分布于植物基因组中,是最丰富的 DNA 变异形式<sup>[3-6]</sup>。基于 SNP 开发的标记是第 3 代的分子标记,被认为是极具应用前景的分子标记<sup>[7]</sup>。其主要技术有基因芯片技术 ( gene chips )<sup>[8]</sup>、直接测序法 ( direct sequencing )<sup>[9]</sup>、CAPS ( cleaved amplified polymorphic sequence )<sup>[10]</sup>、KASP ( kompetitive allele specific PCR )<sup>[11]</sup>和 PARMS ( penta-primer amplification refractory mutation system )<sup>[12]</sup>等。其中,基于等位基因特异扩增的 KASP 和 PARMS 分型技术是目前主流的分型方法,具有成本低、耗时短、准确性高和通量高等优点。PARMS 分型的特

点是在 ARMS-PCR 的基础上,增加了 2 条带有不同荧光的引物,经过与相同的反向引物的 PCR 扩增后,通过检测待测位点的荧光信号进行分型 ( 图 1 )<sup>[13]</sup>。在作物遗传图谱构建、基因定位、种质资源分析、分子标记辅助育种等方面广泛应用<sup>[12, 14]</sup>,但在果树上应用较少,仅在桃、葡萄等果树上得到应用<sup>[15-16]</sup>。

目前,菠萝上主要利用 SSR<sup>[17]</sup>、RAPD<sup>[18]</sup>、AFLP<sup>[19]</sup>、SRAP<sup>[20]</sup>和 CAPS<sup>[21]</sup>等分子标记进行遗



①FAM 荧光通用引物; ②HEX 荧光通用引物; ③SNP 位点 1 特异性扩增引物; ④SNP 位点 2 特异性扩增引物; ⑤标记位点的特异引物。

①Universal primer of FAM fluorescence; ②Universal primer of HEX fluorescence; ③Primer of SNP 1 specific amplification; ④Primer of SNP 2 specific amplification; ⑤Specific primers of labeled sites.

**图 1 PARMS SNP 检测原理**

Fig. 1 Fundamentals of PARMS SNP

传图谱构建及种质资源遗传多样性的分析。但 PARMs-SNP 分型技术在菠萝上的研究尚未见报道。本研究以 3 份表型差异较大的菠萝种质为材料, 分析反应体积、引物浓度和 DNA 模板用量等因素对 PARMs PCR 反应的影响, 以期建立适用于菠萝的 PARMs-SNP 分型体系, 为利用 PARMs-SNP 分型技术开展菠萝种质资源鉴定、遗传图谱的构建、基因的精细定位和分子标记辅助育种奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

本研究所用材料为农业农村部菠萝种质资源圃(湛江)保存的种质, 选择表型差异较大的 3 份种质 ‘Baro Rothchild’ ‘James Queen’ 和 ‘Maroochy’ 进行 PARMs 反应体系的优化, 65 份种质用于体系验证。

### 1.2 方 法

**1.2.1 引物设计** 根据 130 份菠萝种质资源重测序数据及其 SNP 位点信息, 利用 Primer Premier 5 软件设计引物, 命名为 SNP31, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。其上游引物序列(SNP31X、SNP31Y)分别为 5'-GAAGGTGACC-AAGTTCATGCTCGACGCGTTCAAAATTTAAA GCCT-3' 和 5'-GAAGGTTCGGAGTCAACGGATT-CGACGCGTTCAAAATTTAAAGCCC-3', 下游通用引物序列(SNP31C)为 5'-TCGTTTAATTTG-AATCAGTCAACAACA-3', 其中下划线和双下划线分别为 FAM 和 HEX 荧光标签序列。

**1.2.2 基因组 DNA 的提取** 采用改良的 CTAB 法<sup>[22]</sup>和快速提取法<sup>[23]</sup>提取 65 份种质的叶片总

DNA, 利用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量, NanoDropOne (Thermo Scientific 公司)检测 DNA 的浓度。

**1.2.3 PARMs 的基本反应体系** 反应体系为 10  $\mu\text{L}$ : 1  $\mu\text{L}$  DNA 模板(100 ng/ $\mu\text{L}$ ), 5  $\mu\text{L}$  PARMs mix (2 $\times$ ), 0.45  $\mu\text{L}$  混合引物, 3.55  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。引物混合物在配制 PCR 反应前预先混匀制备。

PARMs-PCR 扩增体系为 94 $^{\circ}\text{C}$  15 min; 94 $^{\circ}\text{C}$  20 s, 65 $^{\circ}\text{C}$  1 min (-0.7 $^{\circ}\text{C}$ /循环), 10 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$  20 s, 57 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 35 个循环; 35 $^{\circ}\text{C}$  1 min。利用 Applied Biosystems<sup>TM</sup> QuantStudio<sup>TM</sup> 6 读取扩增产物的终点信号, 使用其自带的软件进行 SNP 分型分析。其中, 连接 FAM 荧光标签序列的等位基因型聚合在 X 轴附近, 连接 HEX 荧光标签序列的等位基因型聚合在 Y 轴附近, 2 种等位基因的杂合型在中间显示。其分型结果通过基因型荧光信号点来判断, 荧光信号值越高, PARMs-SNP 分型结果越好。

**1.2.4 PARMs 反应体系的优化** 设置 4、6、8、10  $\mu\text{L}$  等 4 种反应体积, 其中 PARMs master mix (2 $\times$ ) 分别为 2、3、4、5  $\mu\text{L}$ , 100 ng/ $\mu\text{L}$  DNA 模板为 1  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{mol/L}$  引物混合物均为 0.15  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 分别为 0.55、1.55、2.55、3.55  $\mu\text{L}$  (表 1), 对反应体积进行优化。在此基础上进行引物浓度的优化, 具体为: 将 SNP31 的 3 条引物分别稀释成 25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  等 3 种浓度后, 进行 PARMs 反应。在 PARMs 反应体积和引物浓度优化的基础上, 将 ‘Baro Rothchild’ ‘James Queen’ ‘Maroochy’ 的 DNA 分别稀释成 100、50、25 ng/ $\mu\text{L}$  的浓度, 进行 DNA 的浓度优化。

**1.2.5 PARMs 反应体系的验证** 利用 65 份菠萝种质进行 PARMs 反应体系的验证。

表 1 PARMs 反应体积的设置  
Tab. 1 Paramater setting of PARMs reaction

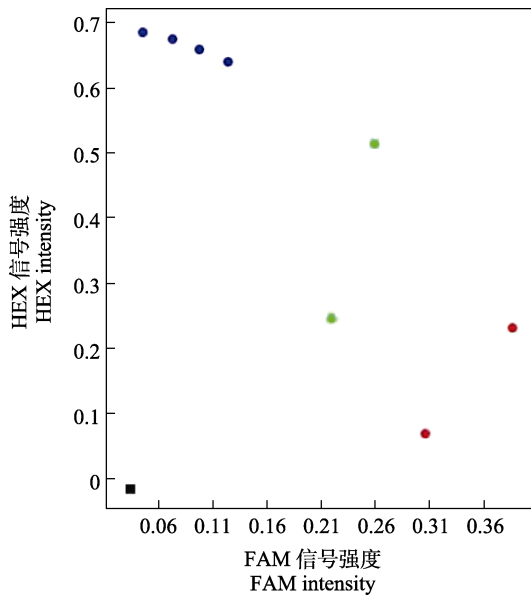
成分 Component	体积 1 Volume 1/ $\mu\text{L}$	体积 2 Volume 2/ $\mu\text{L}$	体积 3 Volume 3/ $\mu\text{L}$	体积 4 Volume 4/ $\mu\text{L}$
DNA 模板	1.00	1.00	1.00	1.00
PARMs mix (2 $\times$ )	2.00	3.00	4.00	5.00
混合引物	0.45	0.45	0.45	0.45
双蒸水	0.55	1.55	2.55	3.55
总体积	4.00	6.00	8.00	10.00

## 2 结果与分析

### 2.1 引物 SNP31 的 PARMs-SNP 分型结果

本研究在前期重测序的基础上, 根据 SNP 位点信息设计特异引物 SNP31, 该引物能够将 8 份菠萝种质区分开来(图 2)。其中, 2 份种质的基

因型为 C:C, 信号点为红色; 4 份种质的基因型为 T:T, 信号点为蓝色; 2 份种质的基因型为 T:C 或 C:T, 信号点为绿色。表明 SNP31 引物对 8 份种质的分型效果较好, 且阴性对照(NTC)位于原点附近, 可用于后续的实验。



坐标轴内每个点代表一个单株；■：阴性对照（NTC）。

The spots within the axis represent different single plant.

■: Negative control (NTC).

图 2 利用引物 SNP31 对 8 份种质进行 PRMS-SNP 分型

Fig. 2 PRMS-SNP genotyping of eight pineapple germplasm by SNP31 primer

## 2.2 不同反应体积对 PARMS-SNP 分型的影响

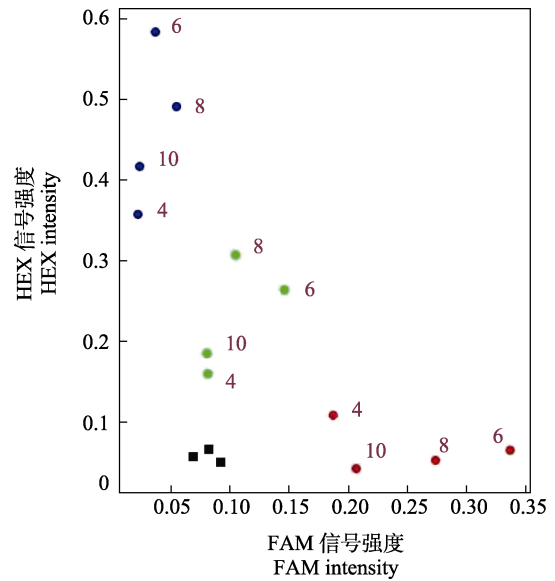
PARMS 反应体系中 Master mix 是决定反应成本的主要组成部分，反应体积减少则 Master mix 用量减少（表 1），可显著降低成本。因此，通过分析不同的反应体积对 PARMS-SNP 分型的影响，结果表明，反应体积影响基因型信号点的荧光信号值。4、6、8、10  $\mu\text{L}$  等 4 种反应体积，均实现了很好的基因分型。4  $\mu\text{L}$  的反应体积下，荧光信号值最低；6  $\mu\text{L}$  的反应体积下，荧光信号强度最强；8  $\mu\text{L}$  和 10  $\mu\text{L}$  的反应体系处于二者之间（图 3）。综合 PARMS-SNP 分型结果及成本，选择 6  $\mu\text{L}$  为最佳的反应体系。

## 2.3 引物浓度对 PARMS-SNP 分型的影响

在已优化的 PARMS 反应体系基础上，分析引物浓度对 PARMS-SNP 分型的影响。结果表明，在引物浓度为 25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  时均能较好地进行分型，但其浓度显著影响荧光值，荧光值随着引物浓度的增加而增强，浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$  分型效果最佳（图 4）。因此，选择 100  $\mu\text{mol/L}$  作为 6  $\mu\text{L}$  反应体积下的最优引物浓度。

## 2.4 DNA 提取方法及浓度对 PARMS-SNP 分型的影响

在已优化的反应体积和引物浓度的基础上，



坐标轴内每个点代表一个单株。■：阴性对照（NTC）；

●：Baro Rothchild；●：James Queen；●：Maroochy。

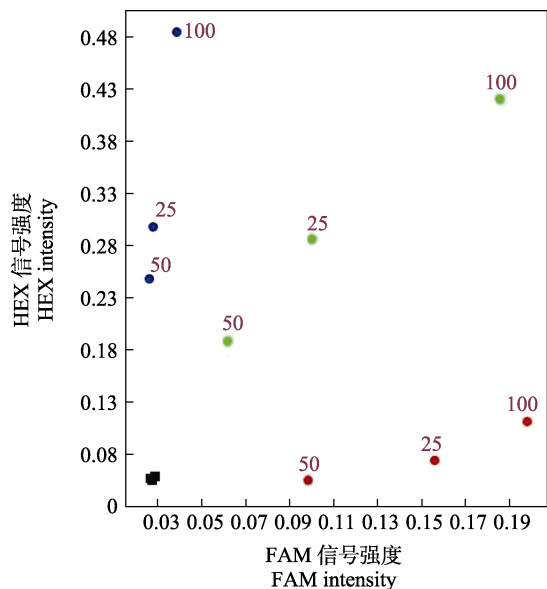
The spots within the axis represent different single plant.

■: Negative control (NTC); ●: Baro Rothchild; ●: James Queen;

●: Maroochy.

图 3 不同反应体积的 PARMS-SNP 分型结果

Fig. 3 Results of PARMS-SNP genotyping with different reaction volumsese



坐标轴内每个点代表一个单株。■：阴性对照（NTC）；

●：Baro Rothchild；●：James Queen；●：Maroochy。

The spots within the axis represent different single plant.

■: Negative control (NTC); ●: Baro Rothchild; ●: James Queen;

●: Maroochy.

图 4 不同引物浓度的 PARMS-SNP 分型结果

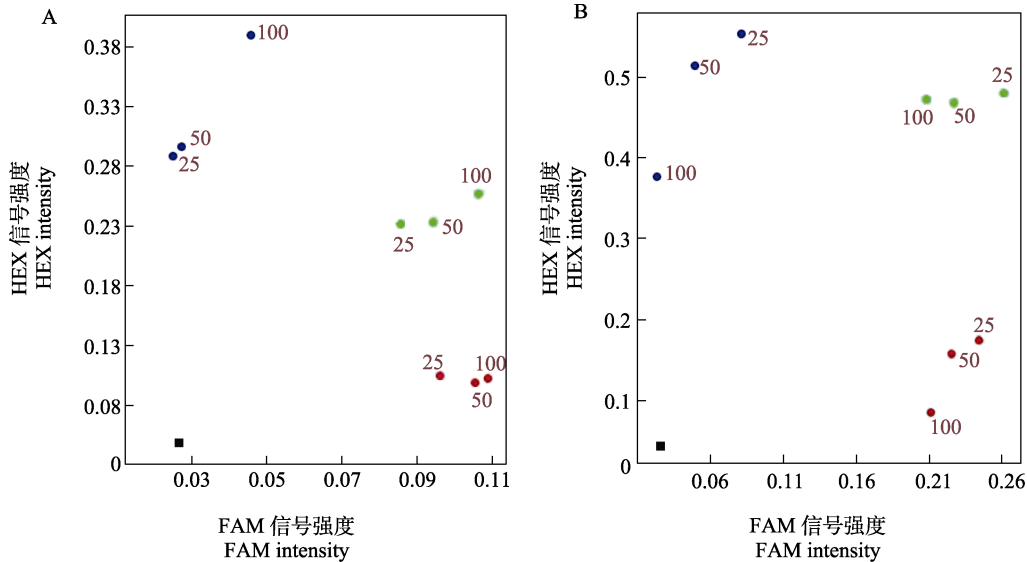
Fig. 4 Results of PARMS-SNP genotyping with different primer concentrations

为了节省时间、节约成本，本研究比较 CTAB 法和快速提取法提取菠萝叶片基因组 DNA 对

PARMS-SNP 分型的影响。结果表明，2 种提取方法均能对 3 份种质进行较好的 PARMs-SNP 分型（图 5）。

分析 DNA 浓度对 PARMs-SNP 分型的影响，结果表明，DNA 浓度对 PARMs-SNP 的分型影响较小。其中，以 CTAB 法提取的 DNA，100 ng 的

荧光信号最强，25 ng 和 50 ng 的荧光信号差异不显著（图 5A）；而以快速提取法提取的 DNA，稀释 100 倍的荧光信号最弱，25 倍的荧光信号最强（图 5B）。因此，CTAB 法提取的总 DNA，选择 100 ng 作为最优模板量，而快速提取法提取的总 DNA，以稀释 25 倍作为最优模板量。



坐标轴内每个点代表一个单株。■：阴性对照 (NTC)；●：Baro Rothchild；●：James Queen；●：Maroochy。  
The spots within the axis represent different single plant. ■：Negative control (NTC)；●：Baro Rothchild；●：James Queen；●：Maroochy.

图 5 不同 DNA 模板浓度的 PARMs-SNP 分型结果

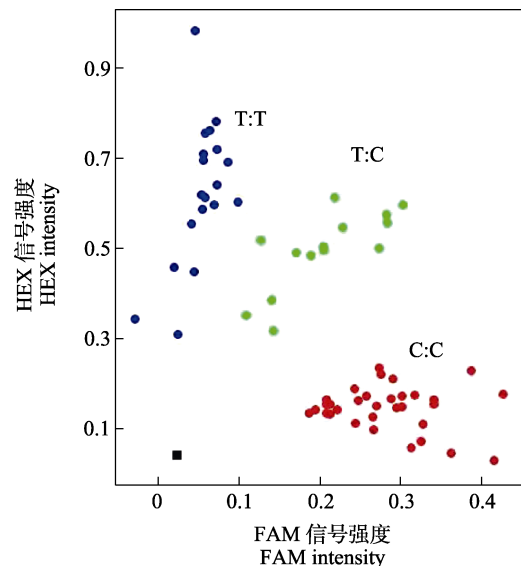
Fig. 5 Results of PARMs-SNP genotyping with different amount of DNA template

### 2.5 PARMs-SNP 优化体系稳定性的验证

根据以上优化结果，确定了适用于菠萝的最佳 PARMs 反应体系。总反应体积为 6  $\mu$ L，其中 DNA (25 ng) 1  $\mu$ L，PARMs mix 3  $\mu$ L，Primer mix (100  $\mu$ mol/L) 0.45  $\mu$ L，ddH<sub>2</sub>O 1.55  $\mu$ L。为验证该体系的稳定性，利用 SNP31 对 65 份菠萝种质进行分型。结果表明，利用该体系分型效果较好（图 6），19 份种质资源的基因型为 T:T，32 份种质资源的基因型为 C:C，14 份种质资源的基因型为 T:C 或 C:T，说明本研究建立的 PARMs-SNP 优化体系稳定可靠。

### 3 讨论

随着生物技术的发展，作物育种由传统的田间选择育种转向分子标记辅助育种<sup>[24]</sup>。然而早期的分子标记技术如依赖于电泳分析，耗时费力且效率低下，影响了其在育种中的应用<sup>[25]</sup>。基于 SNP 位点开发的分子标记技术，具有数量多、通量高、可视化好等优点，逐渐成为基因分型的主流技术，广泛应用于种质资源鉴定、分子标记辅助育



坐标轴内每个点代表一个单株；基因型为 C:C，信号点为红色；基因型为 T:T，信号点为蓝色；基因型为 T:C 或 C:T，信号点为绿色。

The spots within the axis represent different single plant; Genotype C:C, signal point is red; Genotype is T:T, signal point is blue; Genotype is T:C or C:T, signal point is green.

图 6 PARMs-SNP 反应体系的验证

Fig. 6 Confirmation of PARMs-SNP reaction system

种中<sup>[26-27]</sup>。本研究首次建立了菠萝 PARMS 体系并对其进行优化和验证, 获得稳定、可靠的 PARMS-SNP 分型体系, 为菠萝种质资源鉴定、QTL 定位和分子标记辅助育种提供技术支撑。

PARMS 技术受反应体积、引物浓度、DNA 模板用量等的影响。反应体积显著影响基因型信号点的荧光值, 大白菜的最适反应体积为 4  $\mu\text{L}$ <sup>[26]</sup>, 番茄的最小反应体积为 5  $\mu\text{L}$ <sup>[27]</sup>, 茄子的最小反应体积为 6  $\mu\text{L}$ <sup>[28]</sup>。本研究中, 6  $\mu\text{L}$  的反应体积最佳, 4  $\mu\text{L}$  和 10  $\mu\text{L}$  的反应体系荧光强度减弱, 表明反应体积影响 PCR 扩增的效果, 过高或过低的反应体积均对菠萝的 PARMS-SNP 分型有影响。那么, 反应体积如何影响 PCR 扩增结果? 杨双娟等<sup>[26]</sup>分析引物浓度、模板 DNA 的用量等发现, 反应体积是通过引物浓度的变化影响分型结果。而引物浓度是通过引物与 DNA 模板的匹配效率来影响 KASP 分型结果<sup>[29]</sup>。引物浓度过低可能会提前消耗殆尽, 导致 PCR 反应提前终止; 引物浓度过高容易发生非特异性扩增或形成引物二聚体, 从而抑制目标序列的扩增<sup>[30]</sup>。本研究中 100  $\mu\text{mol/L}$  的荧光信号值显著高于 25  $\mu\text{mol/L}$  和 50  $\mu\text{mol/L}$ , 表明引物浓度能够影响分型结果。DNA 模板是影响 PARMS-SNP 分型的重要因素, 适宜的 DNA 模板量是获得足量特异性扩增产物的前提, DNA 模板浓度过低时, 扩增产物较少甚至无扩增条带; 浓度过高时, 非特异性产物增加, 特异性扩增受到抑制<sup>[26-27]</sup>。本研究中 25~100 ng DNA 模板量均能产生较好的 PARMS-SNP 分型, 表明菠萝 PARMS-PCR 反应对模板 DNA 的浓度敏感度较小, 这一结论与杨双娟等<sup>[26]</sup>和肖熙鸥等<sup>[28]</sup>的结果一致。

传统 CTAB、DNA 提取试剂盒等方法提取 DNA 耗时长、成本高, 限制 PARMS 标记的应用。因此, 寻找一种适用于 PARMS 标记的快速提取菠萝基因组 DNA 的方法将有助于提高 PARMS-SNP 的分型效率。LU 等<sup>[12]</sup>发现原始的 DNA 裂解液不能对水稻、小麦、玉米和棉花等作物进行基因分型, 但稀释 5~30 倍的 DNA 裂解液能将水稻、小麦、玉米成功基因分型, 表明快速提取法获得的 DNA 提取液可用于 PARMS-SNP 分型, 但基因分型的荧光强度受稀释倍数的影响, 稀释 20 倍以上导致荧光强度下降。本研究结果表明, 以 CTAB 提取的 DNA 和快速提取 DNA 的稀释液为模板, 均能够完成菠萝的基因分型, 但快速提取法为模板的 PCR 反应, 荧光强度值随着稀释倍数的增加,

逐渐下降。可能原因是随着稀释倍数的增加, 稀释液里的模板 DNA 浓度下降, 导致扩增效率降低, 从而导致荧光值减弱。

## 4 结论

本研究通过对反应体积、引物浓度以及 DNA 模板用量等影响 PARMS PCR 的因素进行优化, 建立了菠萝 PARMS-SNP 分型体系, 其稳定性和可靠性得到了验证。该体系可用于菠萝种质资源的鉴定、QTL 定位和分子标记辅助选择等。

## 参考文献

- [1] 孙正文, 黄兴奇, 李维蛟, 钟巧芳, 余腾琼, 郭怡卿, 李定琴, 殷富有, 程在全. 分子标记技术及其在水稻基因定位上的应用[J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(1): 78-86. SUN Z W, HUANG X Q, LI W J, ZHONG Q F, YU T Q, GUO Y Q, LI D Q, YIN F Y, CHENG Z Q. Molecular marker technology and its application in the gene mapping of rice[J]. Genomics and Applied Biology, 2011, 30(1): 78-86. (in Chinese)
- [2] 廖秋石, 雷刚, 陈学军, 袁欣捷, 黄月琴, 周坤华, 方荣. 分子标记技术在茄子种质资源评价中的应用研究进展[J]. 江西农业学报, 2020, 32(8): 44-51. LIAO Q S, LEI G, CHEN X J, YUAN X J, HUANG Y Q, ZHOU K H, FANG R. Research progress in application of molecular marker techniques in germplasm resources evaluation of eggplant[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2020, 32(8): 44-51. (in Chinese)
- [3] PAUX E, SOURDILE P, MACKAY I, FEUILLET C. Sequence-based marker development in wheat: advances and applications to breeding[J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(5): 1071-1088.
- [4] 郭大龙, 李猛, 张国海, 郭明晓. 葡萄 SNP 标记的 CAPS 和 TSP 分析[J]. 园艺学报, 2013, 40(11): 2307-2315. GUO D L, LI M, ZHANG G H, GUO M X. CAPS and TSP analyses of grape SNP markers[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2013, 40(11): 2307-2315. (in Chinese)
- [5] LOU H J, DONG L L, ZHANG K P, WANG D W, ZHAO M L, LI Y W, RONG C W, QIN H J, ZHANG A M, DONG Z Y, WANG D W. High-throughput mining of e-genome-specific SNPs for characterizing *Thinopyrum elongatum* introgressions in common wheat[J]. Molecular Ecology Resources, 2017, 17(6): 1318-1329.
- [6] 刘磊, 邓学斌, 冯晶晶, 王静, 孙晓荣, 舒金帅, 李君明. 加工番茄 Ve-1、I-2、Mi-1 和 Pto 基因关联变异位点的挖掘[J]. 园艺学报, 2018, 45(6): 1089-1100. LIU L, DENG X B, FENG J J, WANG J, SUN X R, SHU J

- S, LI J M. Exploring variant sites associated with Ve-1, I-2, Mi-1 and Pto genes in processing tomato by genome-wide association analysis[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2018, 45(6): 1089-1100. (in Chinese)
- [7] 匡猛, 王延琴, 周大云, 马磊, 方丹, 徐双娇, 杨伟华, 魏守军, 马峙英. 基于单拷贝 SNP 标记的棉花杂交种纯度高通量检测技术[J]. *棉花学报*, 2016, 28(3): 227-233.  
KUANG M, WANG Y Q, ZHOU D Y, MA L, FANG D, XU S J, YANG W H, WEI S J, MA Z Y. High-throughput genotyping assay technology for cotton hybrid purity based on single-copy SNP markers[J]. *Cotton Science*, 2016, 28(3): 227-233. (in Chinese)
- [8] BARCHI L, PIETRELLA, VENTURINI L, MINIO A, TOPPINO L, AC-QUADRO A, ANDOLFO G, APREA G, AVANZATO C, BASSOLINO L, COMINO C, MOLIN A.D, FERRARINI A, MAOR L C, PORTIS E, REYES-C-HIN-WO S, RINALDI R, SALA T, SCAGLIONE D, SONAWANE P, TONONI P, ALMEKIAS-SIEGL E, ZAGO E, ERCOLANO M R, AHARONI A, DELLEDONNE M, GIULIANO G, LANTERI S, ROTINO G L. A chromosome-anchored eggplant genome sequence reveals key events in Solanaceae evolution[J]. *Scientific Reports*, 2019b, 9(1): 11769.
- [9] TARANTO F, D'AGOSTINO N, GRECO B. Genome-wide SNP discovery and population structure analysis in pepper (*Capsicum annuum*) using genotyping by sequencing[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 943.
- [10] SHIPRAET K, BASHISTHA K K, YONGSAM J, JIANG J Y, KIN H S, LEE G J. Internal transcribed spacer-based CAPS marker development for *Lilium hansonii* identification from wild *Lilium* native to Korea[J]. *Scientia Horticulturae*, 2018, 236: 52-59.
- [11] SEMAGN K, BABU R, HEARNE S, OLSEN M. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement[J]. *Molecular Breeding*, 2014, 33: 1-14.
- [12] LU J, HOU J, OUYANG Y D, LUO H, ZHAO J H, MAO C, HAN M, WANG L, XIAO J H, YANG Y Y, LI X. A direct PCR-based SNP marker-assisted selection system (D-MAS) for different crops[J]. *Molecular Breeding*, 2020, 40: 9.
- [13] 卿冬进, 刘开强, 杨燕宇, 高利军, 黄娟, 高菊, 戴高兴, 周维永, 梁海福, 邓国富. 基于 PARMS 技术的抗稻瘟病基因 *Pigm* 分子标记的开发[J]. *西南农业学报*, 2018, 31(8): 1617-1621.  
QING D J, LIU K Q, YANG Y Y, GAO L J, HUANG J, GAO J, DAI G X, ZHOU W Y, LIANG H F, DENG G F. Development of molecular marker of rice blast resistance gene *Pigm* on basis of PARMS technology[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 31(8): 1617-1621. (in Chinese)
- [14] WU J H, LIU S J, WANG Q L, ZENG Q D, MU J M, HUANG S, YU S Z, HAN D J, KANG Z S. Rapid identification of an adult plant stripe rust resistance gene in hexaploid wheat by high-throughput SNP array genotyping of pooled extremes[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2018, 131(1): 43-58.
- [15] 孟君仁, 曾文芳, 邓丽, 潘磊, 鲁振华, 崔国朝, 王志强, 牛良. 桃若干重要性状的 KASP 分子标记开发与应用[J]. *中国农业科学*, 2021, 54(15): 3295-3307.  
MENG J R, ZENG W F, DENG L, PAN L, LU Z H, CUI G C, WANG Z Q, NIU L. Development and application of KASP molecular markers of some important traits for peach[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, 54(15): 3295-3307. (in Chinese)
- [16] 王富强, 张建, 温常龙, 樊秀彩, 张颖, 孙磊, 刘崇怀, 姜建福. 基于 KASP 标记的葡萄品种鉴定[J]. *中国农业科学*, 2021, 54(13): 2830-2842.  
WANG F Q, ZHANG J, WEN C L, FAN X C, ZHANG Y, SUN L, LIU C H, JIANG J F. Identification of grape cultivars based on KASP markers[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, 54(13): 2830-2842.
- [17] WÖHRMANN T, WEISING K. In silico mining for simple sequence repeat loci in a pineapple expressed sequence tag database and cross-species amplification of EST-SSR markers across Bromeliaceae[J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 2011, 123: 635-647. (in Chinese)
- [18] 王健胜, 贺军虎, 陈华蕊, 陈业渊. 47 份菠萝种质遗传多样性的 RAPD 分析[J]. *热带作物学报*, 2015, 36(8): 1392-1397.  
WANG J S, HE J H, CHEN H R, CHEN Y Y. Genetic diversity analysis of forty seven pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr] germplasm with RAPD Marker[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2015, 36(8): 1392-1397.
- [19] KATO C Y, NAGAI C, MOORE P H, ZEE F, KIM M S, STEIGER D L, MING R. Intra-specific DNA polymorphism in pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] assessed by AFLP markers[J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2004, 51: 815-825. (in Chinese)
- [20] 窦美安, 邱文武, 吴青松, 孙伟生. 菠萝遗传多样性的 SRAP 分析[J]. *果树学报*, 2010, 27(6): 930-937.  
DOU M A, QIU W W, WU Q S, SUN W S. Genetic diversity analysis on pineapple by SRAP markers[J]. *Journal of Fruit Science*, 2010, 27(6): 930-937. (in Chinese)
- [21] CARLIER J D, SOUSA N H, SANTO T E, EECKENBRUGGE G C, LEITÃO J M. A genetic map of pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] including SCAR, CAPS, SSR

- and EST-SSR markers[J]. *Molecular Breeding*, 2012, 29: 245-260.
- [22] ZENG J, ZOU Y P, BAI J Y, ZHENG H S. Preparation of total DNA from "Recalcitrant Plant Taxa"[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2002, 44(6): 694-697.
- [23] 李琳, 罗淋淋, 罗光宇, 莫蓓莘, 刘琳. 一种植物基因组 DNA 快速提取方法的建立与评估[J]. *深圳大学学报理工报*, 2020, 37(1): 18.
- LI L, LUO L L, LUO G Y, MO B X, LIU L. Establishment and evaluation of a method for rapid extraction of plant genomic DNA[J]. *Journal of Shenzhen University Science and Engineering*, 2020, 37(1): 1-8. (in Chinese)
- [24] 吴昊, 陈涛, 姚姝, 张亚东, 朱镇, 赵庆勇, 周丽慧, 于新, 赵凌, 王才林. 分子标记辅助选择技术及其在水稻定向改良上的应用研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(2): 22-27.
- WU H, CHEN T, YAO S, ZHANG Y D, ZHU Z, ZHAO Q Y, ZHOU L H, YU X, ZHAO L, WANG C L. Molecular marker assisted selection and its application in rice directional improvement[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Science*, 2014, 42(2): 22-27. (in Chinese)
- [25] RASHEED A, HAO Y F, XIA X C, KHAN A, XU Y B, VARSHNEY R K, HE Z H. Crop breeding chips and genotyping platforms: progress, challenges, and perspectives[J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(8): 1047-1064. (in Chinese)
- [26] 杨双娟, 原玉香, 魏小春, 王志勇, 赵艳艳, 姚秋菊, 张晓伟. 大白菜 KASP 反应体系的优化与建立[J]. *园艺学报*, 2018, 45(12): 2442-2452.
- YANG S J, YUAN Y X, WEI X C, WANG Z Y, ZHAO Y Y, YAO Q J, ZHANG X W. Optimization and establishment of KASP reaction system for chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2018, 45(12): 2442-2452. (in Chinese)
- [27] 王鹏, 田哲娟, 康忱, 李亚栋, 王洪乐, 杨超沙, 邱光伟, 康亮, 范庆杰, 吴志明. 番茄 5 个抗病基因 KASP 分型技术体系的建立与应用[J]. *园艺学报*, 2021, 48 (11): 2211-2226.
- WANG P, TIAN Z J, KANG C, LI Y D, WANG H L, YANG C S, MANG G W, KANG L, FAN Q J, WU Z M. Establishment and application of a tomato KASP genotyping system based on five disease resistance genes[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2021, 48(11): 2211-2226. (in Chinese)
- [28] 肖熙鸥, 赵秋芳, 林文秋, 欧雄常, 冯恩友, 莫定鸣. 茄子 PARMS 反应体系的建立与优化[J]. *分子植物育种*, 2021, 19(18): 6074-6079.
- XIAO X O, ZHAO Q F, LIN W Q, OU X C, FENG E Y, MO D M. Optimization and establishment of PARMS reaction system for eggplant[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19(18): 6074-6079. (in Chinese)
- [29] 李永平, 康建坂, 林琿. 番茄 ISSR-PCR 反应体系的优化与验证[J]. *农学学报*, 2016, 6(3): 52-56.
- LI Y P, KANG J B, LIN H. Optimization and verification of ISSR-PCR reaction system for *Lycopersicon esculentum*[J]. *Journal of Agriculture*, 2016, 6(3): 52-56. (in Chinese)
- [30] 包金花, 杨恒山, 庄得凤, 斯日古楞, 陈晶, 何陈林, 李志军, 李旭新. 金莲花 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. *分子植物育种*, 2022, 20(1): 202-209.
- BAO J H, YANG H S, ZHUANG D F, SIRIGULENG, CHEN J, HE C L, LI Z J, LI X X. Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction system of *Trollius chinensis*[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2022, 20(1): 202-209. (in Chinese)