

木薯 MNP 标记在品种鉴定中的应用

万人静^{1,2}, 李琼³, 周新成⁴, 李论^{1,2}, 李甜甜^{1,2}, 周俊飞^{1,2}, 李莎^{5,6}, 彭海^{1,2}, 章伟雄^{2,7}, 方治伟^{1,2*}

1. 江汉大学生命科学学院, 湖北武汉 430056; 2. 江汉大学系统生物学研究院, 湖北武汉 430056; 3. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 海南海口 571101; 4. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101; 5. 三峡工程鱼类资源保护湖北省重点实验室, 湖北宜昌 443100; 6. 中国长江三峡集团有限公司中华鲟研究所, 湖北宜昌 443100; 7. 香港理工大学医疗科技及资讯学系, 中国香港 100872

摘要: MNP (multiple nucleotide polymorphism, MNP) 是随着分子标记技术的发展而产生的一种新型分子标记技术。靶向测序基因型技术 (genotyping by target sequencing, GBTS) 在一个扩增子内仅扩增一个 SNP 位点, MNP 基于 GBTS 可在一个扩增子内同时扩增多个 SNP 位点。该技术具有成本低、检测效率高、应用灵活、适应性广等特点, MNP 标记可用于育种过程的鉴定。为了建立快速、精准、高效的木薯品种鉴定方法, 筛选适用于木薯品种鉴定的 MNP 分子标记, 本研究在全基因组范围内筛选高多态性区域并设计引物, 最终在全基因组范围内获得 623 个木薯 MNP 标记位点, 并利用 28 个木薯品种对木薯 MNP 标记进行评价。结果表明, MNP 标记分型重现性高达 100%。MNP 标记位点在 28 个木薯品种中检出 (4.07±1.68) 种等位基因型, 最多具有 12 种等位基因型。对所有木薯品种进行两两比较时, 99.47% (376/378) 的品种对间的差异大于 46%, 比例在 0.3%~81.0% 之间, 均值为 71.78%。相较于 SNP, MNP 具有更好的品种区分能力。综上所述, 本研究所开发的木薯 MNP 分子标记具有较高的重现性、多态性和品种区分能力, 可广泛用于木薯的种质资源多样性、新品种培育及品种鉴定等研究。

关键词: 木薯; 分子标记; MNP; 品种鉴定

中图分类号: S667.9 文献标识码: A

Application of Cassava MNP Markers in Variety Identification

WAN Renjing^{1,2}, LI Qiong³, ZHOU Xincheng⁴, LI Lun^{1,2}, LI Tiantian^{1,2}, ZHOU Junfei^{1,2}, LI Sha^{5,6}, PENG Hai^{1,2}, ZHANG Weixiong^{2,7}, FANG Zhiwei^{1,2*}

1. School of Life Science, Jiangnan University, Wuhan, Hubei 430056, China; 2. Institute for Systems Biology, Jiangnan University, Wuhan, Hubei 430056, China; 3. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 4. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 5. Hubei Key Laboratory of Three Gorges Project for Conservation of Fishes, Yichang, Hubei 443100, China; 6. Chinese Sturgeon Research Institute, China Three Gorges Corporation, Yichang, Hubei 443100, China; 7. Faculty of Health and Social Sciences, The Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong 100872, China

Abstract: MNP (multiple nucleotide polymorphism, MNP) is a new molecular marker technology emerged with the development of molecular marker technology. While genotyping by target sequencing (GBTS) amplifies only one SNP site in one amplicon, MNP can amplify multiple SNP sites simultaneously in one amplicon based on GBTS. This technology has the features of low cost, high detection efficiency, flexible application and wide adaptability. Compared with SNP, MNP has better ability to differentiate varieties. In order to establish a rapid, accurate and efficient method for cassava variety identification and to screen MNP molecular markers suitable for cassava variety identification, this

收稿日期 2022-11-02; 修回日期 2022-12-22

基金项目 国家重点研发计划项目 (No. 2018YFD1000505); 海南省重点研发计划科技合作方向项目 (No. ZDYF2020208); 三峡工程鱼类资源保护湖北省重点实验室开放课题项目 (No. 2021041—ZHX)。

作者简介 万人静 (1991—), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 植物品种身份鉴定新技术的开发与应用。*通信作者 (Corresponding author): 方治伟 (FANG Zhiwei), E-mail: fangzhiwei1126@126.com。

study screened highly polymorphic regions and designed primers in the whole genome range, and finally obtained 623 cassava MNP marker loci in the whole genome range, the cassava MNP markers were evaluated using 28 cassava varieties. The results showed that the MNP marker typing reproducibility was up to 100%. 4.07±1.68 alleles were detected in 28 cassava varieties, with a maximum of 12 alleles. When all cassava varieties were compared one by a one, 99.47% (376/378) of the differences between pairs were greater than 46%, with the proportion ranging from 0.3% to 81.0%, with a mean value of 71.78%. Meanwhile, MNP markers can be used for identification in the breeding process. In conclusion, the cassava MNP molecular markers developed in this study have high reproducibility, polymorphism and variety differentiation ability, and could be widely used for research on germplasm diversity, new variety breeding and variety identification of cassava.

Keywords: cassava; molecular marker; MNP; variety identification

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.12.007

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 又名树薯, 为大戟科 (Euphorbiaceae) 木薯属 (*Manihot*), 在热带、亚热带地区广泛栽植。木薯是全球三大薯类作物之一, 也是第六大粮食作物, 享有“淀粉之王”的盛誉^[1]。木薯的用途非常广泛, 一方面木薯可作为优质杂粮, 世界上有近 8 亿人以木薯为粮食^[2]; 另一方面, 木薯还可以被加工成不同的工业产品, 例如淀粉和酒精^[3], 是发展潜力巨大的能源植物。

木薯为异花授粉植物, 基因型高度杂合^[4], 倍性复杂, 制约了传统分子标记的开发和应用。在以往的研究中, 应用于木薯的分子标记技术主要有相关序列扩增多态性 (sequence-related amplified polymorphism, SRAP)^[5-6]、简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR)^[7-11]、扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP)^[12-13]、目标起始密码子多态性 (start codon targeted polymorphism, SCoT)^[14]、单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP)^[8,15-16]。这些分子标记技术在分子标记的多态性、检测的标记数量以及检测效率等一个或多个方面存在不足。如凝胶电泳是 AFLP 和 SSR 最常用的检测方法, 这种方法难以大规模、高通量地应用于大量样品的检测和分型; 虽然最近也有将高通量测序技术用于 SSR 的高通量检测和分型的报道, 但是受到 DNA 聚合酶滑脱的影响, SSR 在杂交种和多倍体物种的准确分型仍然是一个难点^[17]。SNP 是另一个目前最常用的分子标记之一, 由于 SNP 多是二态性的, 因此单个标记位点多态性不高, 需要检测大量 SNP 位点弥补这一缺陷。目前主要检测手段有高通量测序和芯片法 2 种, 这 2 种方法在检测成本和检测结果的重现性和准确性上尚有待提高。一段基因组区域内由多个 SNP 位点共同组合为一个标记的新型分子标记技术, 即 MNP

标记技术, 提高了单分子标记的多态性; 利用扩增子测序方法在提高测序深度的同时又降低测序成本, 实现了准确性和效益的双赢。该技术已形成国标并用于水稻、玉米、棉花等 16 种作物的品种鉴定。目前尚没有 MNP 标记技术在木薯中的研究和报道。本研究在木薯全基因组范围内筛选 MNP 分子标记位点, 并利用收集到的 28 个木薯品种对开发的木薯 MNP 标记进行评价。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的 28 份木薯栽培品种均来自中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 品种名称以及编号见表 1。

1.2 方法

1.2.1 MNP 位点开发 基于前期收集的 241 份木薯材料的 SNP 信息, 在全基因组范围内筛选 MNP 标记位点。首先通过 Bowtie 2 软件将 241 份木薯的全基因组数据比对到木薯的参考基因组 *Mesoculenta_305_v6* (下载地址为 ftp://cassavabase.org/Manihot_v6.1/) 上, 比对参数全部采用默认值。比对完成后, 采用 samtools sort 软件对比对结果排序并转存为 bam 格式文件, 通过 “-@ 6-m 2G” 参数设定排序时使用 6 个线程, 内存指定用 2 Gb。利用 samtools mpile 软件鉴定出所有的 SNP 位点, 参数设置为默认数值。获得全部的 SNP 位点后, 通过窗口平移的方式在全基因组范围内寻找候选的标记位点。具体操作为: 选定一个 125 bp 的基因组区域, 统计该区域内的 SNP 的数量, 以及该区域对 241 份木薯的区分度 (discriminative power, DP)。区分度的计算方法为 $DP=n/N$, n 指所有材料两两比较时可以区分的样品对数, N 指的是比较的总样品对数。若该区域含有 ≥ 3 个

表 1 28 份木薯品种编号及名称
Tab. 1 Number and name of 28 cassava varieties

编号 No.	名称 Name	编号 No.	名称 Name	编号 No.	名称 Name
P1	SC5	P11	新选 048	P21	马来 4 号
P2	SC6	P12	桂热 4 号	P22	印尼种
P3	SC11	P13	桂热 5 号	P23	贵州 1 号
P4	SC12	P14	SC101(面包)	P24	瑞士 N13
P5	SC13	P15	泰国种	P25	巴西 5 号(无叶柄)
P6	SC205	P16	琼中 1 号	P26	巴西 10 号
P7	SC124	P17	南植 188	P27	18R
P8	SC60608	P18	南植 199	P28	BRA183
P9	SC8013	P19	花叶木薯		
P10	SC8002	P20	广西 2 号		

SNP 位点,且区分度 >0.2 ,则该区域作为候选 MNP 标记位点。然后向前滑动 20 bp,重新计算上述指标。对所有获得候选 MNP 标记位点进行物种特异性检查,保留物种特异性最好的作为最终的 MNP 标记位点。MNP 引物由石家庄博瑞迪生物技术有限公司合成。

1.2.2 基因组 DNA 的提取与纯化 将每个品种进行至少 10 个单株叶片混合取样并用液氮充分研磨成粉末后采用 CTAB 法抽提基因组 DNA。利用核酸定量仪 Qubit 检测 DNA 浓度,琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。

1.2.3 多重 PCR 扩增与文库构建 通过两轮 PCR 扩增的方法构建高通量测序文库。第一轮为多重 PCR 扩增,目的是富集目标片段,其扩增体系为:引物混合物 4 μL (10 $\mu\text{mol/L}$),DNA 模板(20~200 ng) x μL , GenoPlexs 3 \times T Master Mix 10 μL , ddH₂O (16- x) μL 。PCR 反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 4 min,循环 15 次;72 $^{\circ}\text{C}$ 最后延伸 10 min,10 $^{\circ}\text{C}$ 保温结束反应。使用磁珠对 PCR 产物进行纯化,方法参照说明书。第二轮 PCR 目的对 PCR 产物添加测序接头,其扩增体系为:接头引物 F (5 $\mu\text{mol/L}$) 2 μL ,接头引物 R (5 $\mu\text{mol/L}$) 2 μL ,DNA 模板(第一轮 PCR 纯化产物) 16 μL , GenoPlexs 3 \times T Master Mix 10 μL 。PCR 反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,70 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,循环 8 次;72 $^{\circ}\text{C}$ 最后延伸 5 min,10 $^{\circ}\text{C}$ 保温结束反应。用 Qubit 检测文库浓度,用琼脂糖凝胶检测文库质量。正常文库浓度在 10 ng/ μL 以上,且电泳条带单一,大小在 300 bp 左右。采用 NovaSeq 6000 进行双末端测序,单端读长为 150 bp,测序由诺禾

致源生物信息科技有限公司完成。

1.2.4 测序片段比对与 MNP 标记分型 测序片段比对、MNP 标记分型与样品间比较参见 FANG 等^[18]的方法,其具体流程简述如下:对于每一个样品的测序数据,首先利用 Bowtie 2 (version 2.1.0) 软件将测序片段比对到参考基因组上。对于每个 MNP 位点,统计该位点上检测到的所有等位基因型以及支持该等位基因型的测序片段数目,即该等位基因型的丰度。丰度最高的等位基因型是该位点的主等位基因型。若主等位基因型的丰度大于 20,则认为该位点成功检出。与主等位基因型的丰度比值大于 0.2 的其他等位基因型均记为可信等位基因型。对于每一个 MNP 位点,若 2 个样品间的等位基因型相同,则认为这 2 个样品在该 MNP 标记位点无差异。若同一 MNP 标记位点在 2 次重复中的分型结果无差异,则认为该位点分型结果可重现。重现率 $R=m/M$, m 指不可重现的 MNP 标记位点总数, M 指重复间比较的 MNP 的标记位点总数。准确性 $A=1-(1-R)/2$ 。采用 perl 脚本统计每个 MNP 位点的等位基因型数、群体内杂合子所占比率 (observed heterozygosity, H_o) 以及区分度。为了全面与 SNP 技术进行比较,利用 bcftools (Version 1.5) 工具从测序数据中获取每个样品的 SNP 标记分型结果。分别基于 MNP 和 SNP 分型结果,两两比较样品间,统计共同检出位点以及差异位点数 (基因型存在差异的位点)。

2 结果与分析

2.1 木薯 MNP 位点筛选

利用已公布的 241 份木薯的 SNP 信息,成功设计出 623 个 MNP 标记位点。如图 1A 所示,所

设计的位点均匀分布在 18 个染色体上(图 1A)。MNP 标记长度范围在 186~274 bp 之间(图 1B),绝大多数位点(427 个)的长度位于 270~274 bp 之间。每个 MNP 位点包含 2~26 个高频 SNP (MAF>5%, 平均 9.06 个, 图 1C)。

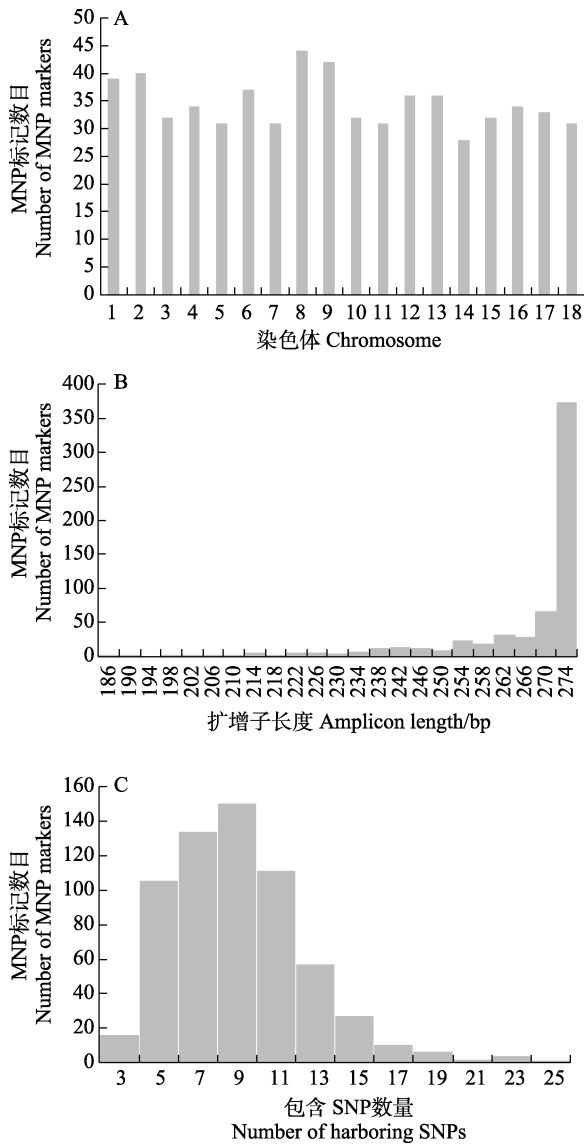


图 1 木薯 MNP 的基本特征

Fig. 1 Characteristics cassava MNP markers

2.2 木薯 MNP 位点的准确性和重现性分析

28 个样品的 56 个文库共获得 11.5 Gb 测序数据, 获得 31 422 个 MNP 标记分型结果, 平均每个 MNP 标记有 900.68 倍的覆盖深度。为了评估 MNP 标记法在木薯中的准确性和重现性, 分别比较了每份木薯样品的重复实验检测结果(表 2)。共 15 644 个 MNP 标记位点在 2 次重复中均检出, 其中可重现的位点 15 644 个, 重现性为 100%,

分型准确性为 100%。

2.3 木薯 MNP 位点的多态性和品种区分能力

在 28 份木薯品种中, 每个 MNP 标记位点检出的等位基因型数目在 1~12 之间, 平均检出 (4.07 ± 1.68) 种等位基因型, 其中 237 个位点含有 5 种以上等位基因型(图 2)。在本研究中, MNP 位点的观测杂合率 (H_o) 在 0~96.43% 之间, 平均值为 50.61%, 较高的杂合率显示本次检测样本的遗传背景较为广泛。

为了评估 MNP 标记对木薯样品的区分能力, 将样品进行两两比较, 统计两两样品间分型结果有差异的 MNP 标记位点比例, 如图 3 所示。在本次供试的 28 个品种中, 任意 2 个品种间的差异位点比例在 0.3%~81.0% 之间(均值为 71.78%), 99.47% (376/378) 的品种对间的差异大于 46%; 单个 MNP 标记的平均区分度为 0.68, 其中 5 个位点(MSH0091、MSH0338、MSH0470、MSH0498 和 MSH0557)具有极高区分度, 能将 95% 以上的样本区分开。

2.4 MNP 标记用于木薯育种过程鉴定

我国的木薯品种主要通过引进国外品种或地方资源进行杂交选育获得。如木薯品种 SC5 是通过 SC8013 和 ZM8625 的杂交后代选育而成^[19]。比较两样品的 MNP 分型结果发现, SC5 和 SC8013 共同检出 534 个位点, 其中 532 个位点(99.63%)具有相同的等位基因型, 这与已知的品种培育过程一致。

2.5 基于 SNP 标记的重现性和品种区分能力

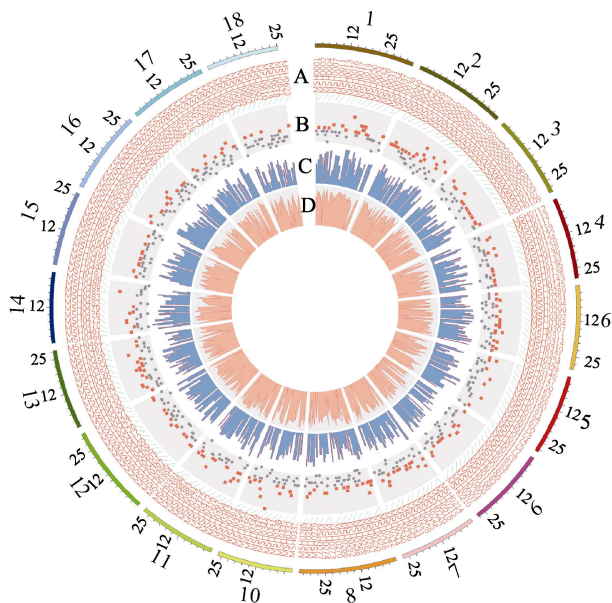
为了比较 SNP 技术在本次供试木薯品种间的区分能力, 从扩增子测序数据中获取每个样品的 SNP 标记分型结果, 28 个木薯品种共检出 6189 个 SNP 位点; 基于这些 SNP 位点比较重复实验中同一样品分型结果的一致性, 以及不同样品间的差异位点比例。如图 4 所示, 相同样品 2 次重复之间的差异可达 2.23%~5.34%, 整体分子标记的重现率为 96.53%; 不同样品的 SNP 差异位点比例在 2.72%~50.05% 之间, 平均值为 43.19%。

3 讨论

本研究首次在木薯中进行 MNP 分子标记技术的开发, 获得了 623 个 MNP 标记位点。这些位点均匀分布在木薯的 18 条染色体上, 因而理论上可以用于表征全基因组水平上的遗传特征。基于 28 个木薯品种的评价结果表明, 这批分子标记

表 2 28 份木薯样品 MNP 标记方法的准确性和重现性
Tab. 2 Accuracy and reproducibility of MNP method in 28 cassava samples

编号 No.	共同检出位点数 Number of common MNPs of both replicates	等位基因型差异位点数 Number of MNPs with different genotypes be- tween replicates	等位基因 型重现性 Reproducibil- ity/%	编号 No.	共同检出位点数 Number of common detected MNPs of both replicates	等位基因型差异位点数 Number of MNPs with different genotypes be- tween replicates	等位基因 型重现性 Reproducibil- ity/%
P1	573	0	100	P15	573	0	100
P2	581	0	100	P16	568	0	100
P3	573	0	100	P17	583	0	100
P4	573	0	100	P18	566	0	100
P5	592	0	100	P19	581	0	100
P6	582	0	100	P20	577	0	100
P7	582	0	100	P21	576	0	100
P8	570	0	100	P22	566	0	100
P9	476	0	100	P23	576	0	100
P10	570	0	100	P24	590	0	100
P11	588	0	100	P25	575	0	100
P12	568	0	100	P26	573	0	100
P13	590	0	100	P27	575	0	100
P14	174	0	100	P28	573	0	100



A: 位点名称; B: 等位基因型数目, 红色代表 5 以上;
C: 杂合率; D: 区分度。
A: MNP ID; B: Number of alleles (Na) per MNP, red indicates Na>5; C: Heterozygosity; D: Discriminative power (DP).

图 2 木薯 MNP 位点在 28 个木薯样本上的遗传特性
Fig. 2 Genetic characteristics of cassava MNP markers in 28 cultivars

位点具有较高的多态性和品种区分能力, 且分型结果达到了 100% 重现, 是非常理想的分子标记技术。从多态性来看, 单个 MNP 标记最高有 12 种等位基因型, 平均 4.07 个, 这与目前已经报道的小麦的单个 SSR 的等位基因型数量相当^[19-20]。从

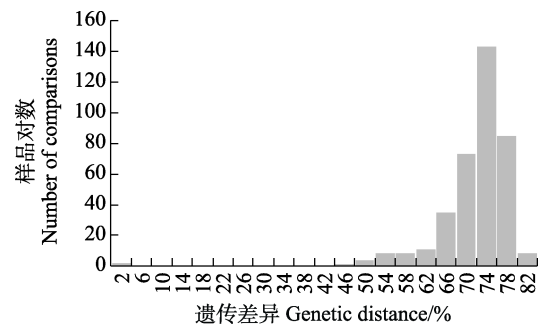


图 3 MNP 位点在 28 个木薯样品中的遗传差异分布
Fig. 3 Distribution of genetic distance between 28 cassava samples

区分度看, 平均每个 MNP 标记位点可以区分 68% 的品种对, 5 个潜在的核心位点可以区分 95% 的品种对; 整体来看, 任意 2 个木薯品种间平均有 71.78% 的位点分型结果有差异, 实现了品种间高度区分。相较而言, 基于 SNP 标记的分型, 任意 2 个木薯品种间平均差异仅为 43.19%。从重现性来看, MNP 分子标记技术的重现性达到了 100%, 远高于 SSR 和 SNP 的重现性^[21-22]。由此可见, 相较于传统分子标记技术, MNP 标记技术在分子标记的多态性、分型结果重现性以及品种区分能力等指标表现出了良好的综合性能。同时, 采用多重 PCR 扩增和高通量测序相结合的方法实现 MNP 标记分型, 提高了 MNP 标记技术高通量、大规模的快速、准确分型的能力, 在提高测序深

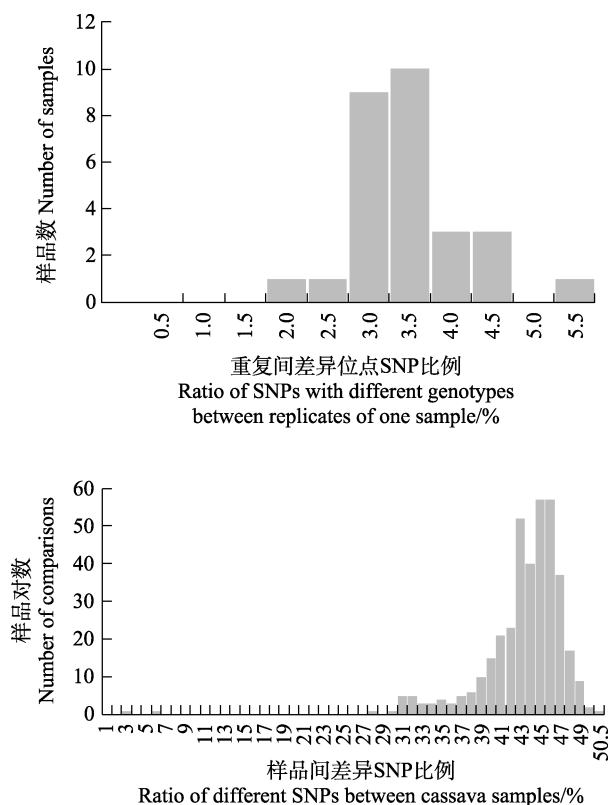


图 4 基于 SNP 分型差异比例分布

Fig. 4 Distribution of discordant SNP ratio

度的同时又降低测序成本，实现了准确性和效益的双赢。

除了基础理论研究外，遗传分子标记技术在生产实践中也有大量的应用场景，如对不同种质资源和栽培品种的区分、对冒牌种子和侵权品种、实质性派生品种的判定等。这些应用场景往往与品种的管理和执法相关，因此要求分子标记技术必须具有极高的分型准确性和重现性以及检测位点多、品种区分能力强。然而，对于木薯这种倍性复杂以及高度杂合的物种，传统的分子标记开发难度大，可用的标记位点数量少，检测的准确性难以满足应用需求。本研究中开发的 MNP 分子标记技术有效解决了上述问题，具备用于木薯品种真实性鉴定和实质性派生品种鉴定的能力，可为木薯品种选育、打假与维权以及品种权保护提供重要技术支撑。

参考文献

- [1] 曹升, 尚小红, 陈会鲜, 陆柳英, 肖亮, 曾文丹, 李恒锐, 黄丹宁, 严华兵. 广西地方面包木薯种质资源调查及表型性状分析和品质评价[J]. 西南农业学报, 2021, 34(11): 2318-2325.
- [2] 罗春芳, 杨龙, 欧珍贵, 罗亚红, 饶萍, 卢加举. 23 份木薯种质资源在贵州的形态多样性分析与评价[J]. 江西农业学报, 2021, 33(5): 24-30.
- [3] 段钢, 许宏贤, 阮振华, SHETTY J. 新鲜木薯直接转化生产乙醇[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(3): 413-417.
- [4] 严华兵, 叶剑秋, 李开绵. 中国木薯育种研究进展[J]. 中国农学通报, 2015, 31(15): 63-70.
- [5] 齐兰, 王文泉, 张振文, 叶剑秋, 李开绵. 利用 SRAP 标记构建 18 个木薯品种的 DNA 指纹图谱[J]. 作物学报, 2010, 36(10): 1642-1648.
- [6] 夏志强, 邹枚伶, 王文泉. 木薯 SRAP 扩增体系的建立与优化[J]. 中国农学通报, 2008(9): 457-460.
- [7] FREGENE M A, SUAREZ M, MKUMBIRA J, KULEMBEKA H, NDEDYA E, KULAYA A, MITCHEL S, GULLBERG U, ROSLING H, DIXON A G, DEAN R, KRESOVICH S. Simple sequence repeat marker diversity in cassava landraces: genetic diversity and differentiation in an asexually propagated crop[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107(6): 1083-93.
- [8] OLSEN K M. SNPs, SSRs and inferences on cassava's origin[J]. Plant Molecular Biology, 2004, 56(4): 517-26.
- [9] 彭靖茹, 马增风, 黎萍, 甘志勇, 苏文潘, 黄惠芳. 木薯种质资源遗传多态性 SSR 分子标记的研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(6): 58-62.
- CAO S, SHANG X X, CHEN H X, LU L Y, XIAO L, ZENG W D, LI H R, HUANG D N, YAN H B. Investigation and collection of local Bread-cassava germplasm resources in Guangxi and their phenotypic trait analysis and quality evaluation[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2021, 34(11): 2318-2325. (in Chinese)
- LUO C F, YANG L, OU Z G, LUO Y H, RAO P, LU J J. Analysis and evaluation of morphological diversity of 23 cassava germplasm resources in Guizhou[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2021, 33(5): 24-30. (in Chinese)
- DUAN G, XU H X, RUAN Z H, SHETTY J. Direct conversion of fresh cassava root to ethanol[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2009, 28(3): 413-417. (in Chinese)
- YAN H B, YE J Q, LI K J. Progress of cassava breeding in China[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(15): 63-70. (in Chinese)
- QI L, WANG W Q, ZHANG Z W, YE J Q, LI K M. DNA fingerprinting analysis of 18 cassava varieties using sequence-related amplified polymorphism markers[J]. Acta Agronomica Sinica, 2010, 36(10): 1642-1648. (in Chinese)
- XIA Z Q, ZOU M L, WANG W Q. Optimization of SRAP reaction system in cassava[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008(9): 457-460. (in Chinese)
- PENG J R, MA Z F, LI P, GAN Z Y, SU W P, HUANG H F.

- Genetic polymorphism of Cassava germplasm SSR molecular markers[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(6): 58-62. (in Chinese)
- [10] 王明, 肖鑫辉, 安飞飞, 万仲卿, 应东山, 王琴飞, 张如莲, 李开绵, 叶剑秋. 利用 SSR 标记分析木薯遗传多样性[J]. 热带农业科学, 2015, 35(11): 38-44.
WANG M, XIAO X H, AN F F, WAN Z Q, YING D S, WANG Q F, ZHANG R L, LI K M, YE J Q. Genetic diversity of cassava germplasm revealed by SSR markers[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2015, 35(11): 38-44. (in Chinese)
- [11] 韦祖生, 夏志强, 李开绵, 王文泉. 木薯种质库遗传多样性的 EST-SSR 标记[J]. 热带作物学报, 2008(3): 304-309.
WEI Z S, XIA Z Q, LI K M, WANG W Q. Analysis of genetic diversity of cassava genepool by EST-SSR markers[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2008(3): 304-309. (in Chinese)
- [12] 张振文, 姚庆群, 许瑞丽, 李开绵. 我国主要木薯品种 AFLP 多态性分析[J]. 西南农业学报, 2010, 23(5): 1606-1609.
ZHANG Z W, YAO Q Q, XU R L, LI K M. Genetic diversity analysis by AFLP for cassava in China[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2010, 23(5): 1606-1609. (in Chinese)
- [13] 夏秀忠, 冯斗, 覃艳. AFLP 对广西主栽木薯品种的遗传多态性分析[J]. 西南农业学报, 2005(6): 818-821.
XIA X Z, FENG D, QIN Y. AFLP analysis of genetic diversity within and among Guangxi main cassava cultivars[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2005(6): 818-821. (in Chinese)
- [14] 周慧文, 单建伟, 冯斗, 严华兵. SCoT 分子标记技术在木薯遗传多样性分析中的应用[J]. 热带作物学报, 2015, 36(8): 1440-1444.
ZHOU H W, SHAN J W, FENG D, YAN H B. Application of SCoT molecular marker in the genetic diversity analysis of cassava[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2015, 36(8): 1440-1444. (in Chinese)
- [15] 孙倩, 邹枚伶, 张辰笈, 江思容, Eder Jorge de Oliveira, 张圣奎, 夏志强, 王文泉, 李有志. 基于 SNP 和 InDel 标记的巴西木薯遗传多样性与群体遗传结构分析[J]. 作物学报, 2021, 47(1): 42-49.
SUN Q, ZOU M L, ZHANG C J, JIANG S R, JORGE DE OLIVEIRA E, ZHANG S K, XIA Z Q, WANG W Q, LI Y Z. Genetic diversity and population structure analysis by SNP and InDel markers of cassava in Brazil[J]. Acta Agronomica Sinica, 2021, 47(1): 42-49. (in Chinese)
- [16] XIA Z Q, ZOU M L, ZHANG S K, FENG B X, WANG W Q. AFSM sequencing approach: a simple and rapid method for genome-wide SNP and methylation site discovery and genetic mapping[J]. Scientific Reports, 2014, 4: 7300.
- [17] LI L, FANG Z W, ZHOU J F, CHEN H, HU Z F, GAO L F, CHEN L H, REN S, MA H Y, LU L, ZHANG W X, PENG H. An accurate and efficient method for large-scale SSR genotyping and applications[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(10): e88.
- [18] FANG Z, LI L, ZHOU J, YOU A Q, GAO L F, LI T T, CHEN H, HAN R X, CUI Y H, CHEN L H, XIAO H F, ZHANG J, XU N, FU X Q, ZHANG J N, LI X T, MA A J, ZHANG W X, PENG H. Multiple nucleotide polymorphism DNA markers for the accurate evaluation of genetic variations[J]. BioRxiv, DOI: 10.1101/2021.03.09.434561.
- [19] TAN X Y, GU B, LI X X, XIE C F, CHEN L, ZHANG B J. Effect of growth period on the multi-scale structure and physicochemical properties of cassava starch[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 101: 9-15.
- [20] 杨德光, 翁跃进, 董玉琛, 魏湜, 胡正. 部分耐盐小麦品种(系)SSR 位点遗传多样性研究[J]. 植物遗传资源学报, 2005(1): 9-14.
YANG D G, WENG Y J, DONG Y C, WEI S, HU Z. Genetic diversity of some salt-tolerant wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars detected by SSR markers[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2005(1): 9-14. (in Chinese)
- [21] 王凤格, 杨扬, 易红梅, 赵久然, 任洁, 王璐, 葛建镛, 江彬, 张宪晨, 田红丽, 侯振华. 中国玉米审定品种标准 SSR 指纹库的构建[J]. 中国农业科学, 2017, 50(1): 1-14.
WANG F G, YANG Y, YI H M, ZHAO J R, REN J, WANG L, GE J R, JIANG B, ZHANG X C, TIAN H L, HOU Z H. Construction of an SSR-Based standard fingerprint database for corn variety authorized in China[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 5(1): 1-14. (in Chinese)
- [22] FANG L, WANG Q, HU Y, JIA Y H, CHEN J D, LIU B L, ZHANG Z Y, GUAN X Y, CHEN S Q, ZHOU B L, MEI G F, SUN J L, PAN Z E, HE S P, XIAO S H, SHI W J, GONG W F, LIU J G, MA J, CAI C P, ZHU X F, GUO W ZH, DU X M, ZHANG T Z. Genomic analyses in cotton identify signatures of selection and loci associated with fiber quality and yield traits[J]. Nature Genetics, 2017, 49(7): 1089-1098.