



中华人民共和国国家标准

GB/T 28660—2012

马铃薯种薯真实性和纯度鉴定 SSR 分子标记

Genuineness and purity verification of potato seed-tuber—
SSR molecular marker

2012-09-03 发布

2012-11-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国农作物种子标准化技术委员会(SAC/TC 37)归口。

本标准起草单位:云南师范大学薯类作物研究所、中国农科院蔬菜花卉研究所、东北农业大学农学院、华中农业大校园艺学院、黑龙江省农业科学院农业部脱毒马铃薯种薯质量监督检验测试中心、国际马铃薯中心(CIP)北京联络处。

本标准主要起草人:李灿辉、郝大海、金黎平、杨仕忠、管朝旭、黄三文、陈伊里、谢从华、白艳菊、谢开云。

马铃薯种薯真实性和纯度鉴定 SSR 分子标记

1 范围

本标准规定了 SSR 分子标记鉴定马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)品种的方法。
本标准适用于马铃薯种薯真实性和纯度的检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 18133 马铃薯脱毒种薯

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

简单序列重复 simple sequence repeat; SSR

基因组中由 1 个~6 个核苷酸组成的基本单位串联多次重复构成的 DNA 序列。

3.2

聚合酶链式反应 polymerase chain reaction; PCR

在耐热 DNA 聚合酶作用下,于体外快速大量特异性扩增特定 DNA 序列的方法。

4 仪器和试剂

4.1 仪器及用具

4.1.1 梯度 PCR 仪。

4.1.2 低温高速离心机。

4.1.3 电泳仪(满足 3 000 V 稳压)及配套电泳槽。

4.1.4 凝胶成像分析系统。

4.1.5 冰箱(−28 ℃~4 ℃)。

4.1.6 紫外/可见分光光度计。

4.1.7 电热恒温水浴锅(37℃、42℃、65℃和 95℃)。

4.1.8 制冰机。

4.1.9 涡旋仪。

4.1.10 高压灭菌器。

4.1.11 液氮罐。

4.1.12 酸度计(pH 计)。

4.1.13 脱色摇床。

- 4.1.14 微量移液器(0.5 μL ~10 μL 、10 μL ~100 μL 、100 μL ~1 000 μL)及配套的枪头。
4.1.15 其他用具:PCR管、量筒(100 mL~1 000 mL)、1.5 mL离心管和配套的研磨棒。

4.2 试剂

- 4.2.1 常用贮备液:见附录A。
4.2.2 DNA提取试剂:见附录B。
4.2.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂:见附录C。
4.2.4 银染试剂:见附录D。
4.2.5 SSR(简单重复序列)标记引物:见附录E。
4.2.6 Taq DNA聚合酶(Taq DNA polymerase)和配套的PCR缓冲液。
4.2.7 DNA Marker (50 bp、100 bp、150 bp、200 bp、250 bp、300 bp、350 bp、400 bp、500 bp)。
4.2.8 无DNA酶的RNA酶A(DNase-free RNase A, 10 mg/mL)。
4.2.9 β -巯基乙醇。
4.2.10 四甲基二乙胺(TEMED)。
4.2.11 异丙醇。
4.2.12 乙醇(70%、90%、95%)。
4.2.13 灭菌双蒸水(ddH₂O)。

5 供试材料

5.1 取样

按照GB 18133要求的方法,采集大田植株或块茎作为检测样品。

5.2 样品保存

选取适量样品,装入冻存管,液氮速冻,置冰箱(-20℃以下)中保存备用(有效保存期约6个月)。

6 程序

6.1 总DNA提取

- 6.1.1 称取100 mg样品,置于预冷1.5 mL离心管中,液氮冷冻下迅速研磨成细粉。依次加入700 μL 的两倍十六烷基三甲基溴化铵缓冲液(见表B.1)和2 μL 的 β -巯基乙醇,涡旋混匀。
6.1.2 置65℃水浴1 h,期间每隔10 min摇动混匀一次。
6.1.3 冰上冷却约10 min后,加入700 μL 的三氯甲烷:异戊醇(24:1)混合液(见表B.2),涡旋混合,轻缓颠倒混匀数次。12 000 r/min离心5 min。
6.1.4 吸取上层水相至新1.5 mL离心管中,加入等体积(400 μL ~500 μL)的预冷异丙醇。轻缓颠倒混匀,4℃冰箱静置30 min后,12 000 r/min离心15 min。
6.1.5 弃上清液。向离心管中加入70%乙醇1.0 mL,静置3 min后,12 000 r/min离心20 min。小心倒出70%乙醇,再加入90%乙醇1.0 mL,静置5 min后,12 000 r/min离心10 min,小心倒去乙醇。在干净的吸水纸上倒置离心管,自然干燥15 min。晾干的DNA,应为透明状。
6.1.6 加入100 μL 的1×TE缓冲液[将10倍三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸缓冲液(见表B.3)稀释10倍并灭菌]溶解DNA,再加入2 μL 的无DNA酶的RNA酶A(10 mg/mL)。37℃温浴1 h去除RNA。4℃冰箱放置备用。
6.1.7 取DNA提取液1 μL ~5 μL 于新的1.5 mL离心管中,加入1×TE缓冲液稀释至1.0 mL,混

匀后转入石英比色皿中,用紫外/可见分光光度计测定 OD_{260} 和 OD_{280} 下的光密度值。按式(1)计算提取液中 DNA 浓度,并检测质量(OD_{260}/OD_{280} 比值为 1.8 ~ 1.9 表明纯度较高)。

$$ds\ DNA = \frac{OD_{260} \times t \times 50}{1\ 000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$ds\ DNA$ ——双链 DNA 分子的含量,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

OD_{260} ——260 nm 下的光密度值;

t ——稀释倍数。

6.1.8 用 $1\times TE$ 缓冲液将所提取的总 DNA 稀释为 $50\ \text{ng}/\mu\text{L}$,根据每次用量分装,置 -20°C 冰箱保存备用。

6.2 PCR 反应

6.2.1 PCR 反应体系

在冰盘中或 4°C 条件下按表 1 所列成分和用量,顺序依次加入 PCR 管,准备 PCR 反应体系。

表 1 PCR 反应体系(供 1 个样品、1 对 SSR 引物检测, $25\ \mu\text{L}$)

成 分	用量/ μL
ddH ₂ O	16.1
$10\times$ PCR 缓冲液	2.5
dNTPs ($2.5\ \text{mmol/L}$,每一种)	2.0
正向引物 ($10\ \text{mmol/L}$)	1.0
反向引物 ($10\ \text{mmol/L}$)	1.0
Taq DNA 聚合酶 ($2.5\ \text{U}/\mu\text{L}$)	0.4
DNA 模板 ($50\ \text{ng}/\mu\text{L}$)	2.0
总体积	25.0

6.2.2 反应程序

按表 2 程序设置 PCR 反应流程。

表 2 PCR 反应程序

反应程序	时间	备注
94°C 预变性	5 min	
94°C 变性	1 min	
55°C 退火	1 min	不同 SSR 引物所需的退火温度见附录 E
72°C 延伸	1 min	
循环次数	35 次	变性→退火→延伸反应循环次数
72°C 延伸	5 min	
4°C 终止反应		

6.2.3 PCR 产物变性处理

PCR 结束后,于 25 μL 的反应体系中加入 7.0 μL 的上样缓冲液(见表 A.4),95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴变性处理 5 min 后,立即转入冰浴冷却,备用。

6.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

6.3.1 电泳玻璃板清洗

用洗涤剂仔细清洗电泳玻璃板(长板和短板),自来水漂洗干净,再用蒸馏水冲洗,斜置滤干,最后用 95%乙醇冲洗,并空置晾干。使用之前,再次用无水乙醇将玻璃板擦拭干净。

注:洗板时,长板和短板分别单独清洗,以避免相互污染。

6.3.2 电泳玻璃板处理

短板处理:用镜头纸蘸取适量 2% 剥离硅烷溶液(见表 C.1),均匀地涂布在短板上;5 min~10 min 后,喷施数毫升 95%乙醇,用干净的镜头纸擦去多余的 2%剥离硅烷;空置约 20 min,晾干。

长板处理:更换新手套,用镜头纸蘸取适量亲和硅烷溶液(见表 C.2),均匀涂布在长板上;4 min~5 min 后,用镜头纸蘸取 95%乙醇沿一定方向轻轻地擦拭;此后,再用 95%乙醇沿着与前次操作方向垂直的方向轻轻地擦拭,如此擦洗 3 次,以去除多余的亲和硅烷;空置约 20 min,晾干。

注:剥离硅烷和亲和硅烷均有剧毒,涂板处理时,需带手套操作,避免两种溶液相互污染。剥离硅烷溶液处理的目的是使短板容易与凝胶分离;亲和硅烷溶液处理的目的是使聚丙烯酰胺凝胶能很好地附着在长板上,不易剥离。

6.3.3 胶槽装配

将长板、短板和压条装配好,周边用胶带密封,用夹子夹紧,插入合适的梳子,以方便灌胶的倾斜角度放置,放在安全支架上。

6.3.4 灌胶

取 6.0%变性聚丙烯酰胺贮备液(见表 C.5)60 mL,加入 10%过硫酸铵贮备液(见表 C.4)300 μL ,四甲基乙二胺(TEMED) 60 μL ,轻轻混匀。轻缓抽出梳子,沿压条边缘轻缓地将混匀的凝胶溶液注入胶槽中,及时清除可能出现的气泡后,重新将梳子插入至适当位置。将胶板调至水平位置,室温下(20 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$)放置 2 h 以上,以便凝胶完全凝固。

6.3.5 预电泳

待凝胶完全凝固后,小心拔出梳子,并用 1 $\times$ TBE 缓冲液[将 10 倍三羟甲基氨基甲烷-硼酸-乙二胺四乙酸缓冲液(见表 A.3)稀释 10 倍]清洗和整理样品槽。去掉密封胶带,用吸水纸将玻璃板擦干,以防电泳时短路。将胶板装到电泳槽中,加入电泳缓冲液(1 $\times$ TBE 缓冲液),清除样品槽中的气泡,接通电源,以 70 W 的恒定功率预电泳 30 min。

6.3.6 电泳

预电泳结束后,用 1 $\times$ TBE 缓冲液仔细清洗和整理样品槽,去除预电泳扩散出的尿素。根据检测样品数量,分别于每个样品槽中加入已经变性处理的 PCR 产物 6 μL ~8 μL ;并在胶板的一侧或适当位置的样品槽中加入 4 μL 的 DNA Marker。以 70 W 恒定功率电泳 2 h~3 h,或电泳至上样缓冲液中示踪染料的第一条带迁移至胶板底端为止。

6.4 银染

6.4.1 固定/脱色

从电泳槽中取出胶槽,轻轻取下短板,将附着胶板的长板放入装有适量固定/脱色液(见表 D.1)的塑料方盒中,轻轻摇动 20 min~30 min,至胶板上示踪染料的色带全部退去为止。

6.4.2 漂洗

将胶板转入 dd H₂O 中漂洗 2 次~3 次,每次 2 min。取出胶板,滤去水分。

6.4.3 染色

将胶板转入硝酸银染色液(见表 D.2)中染色 30 min。

6.4.4 水洗

在 dd H₂O 中迅速漂洗 5 s~6 s。

6.4.5 显影

将胶板迅速转入预冷至 4℃ 的显影液(见表 D.3)中,轻轻摇动至胶板上预期产物条带(见表 E.1)清晰为止。

6.4.6 定影

待影像清晰后,将胶板迅速转入固定/脱色液(见表 D.1)中,停止显影。定影 3 min~5 min。

6.4.7 漂洗

将胶板转入 ddH₂O 中漂洗 2 次,每次 5 min。

6.4.8 成像

在白色透射光背景上观察和记录电泳结果,数码拍照;或用凝胶成像分析系统扫描记录和拍照。

7 结果记录和分析

7.1 SSR 标记结果记录

参照 DNA Marker 电泳结果或扫描结果,根据每对 SSR 引物从检测样品中扩增出的条带数及其分子量大小,按“有”对应条带记录为“1”、“无”对应条带记录为“0”的方法,仔细记录每对 SSR 引物的 PCR 扩增结果。建立 SSR 引物、检测样品及有无(1/0)对应扩增条带的数据库。

7.2 SSR 标记结果分析

利用相关统计分析软件,根据 Nei(1973)的遗传相似系数(Genetic Similarity, GS),按式(2)计算检测样品间的遗传相似性水平。采用非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means,UPGMA)进行聚类分析;绘制聚类分析结果图,显示 SSR 标记分析的直观结果。

$$GS = \frac{2N_{ij}}{N_i + N_j} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

式中:

GS ——遗传相似系数,%;

N_i ——第 i 个样品的扩增条带数;

N_j ——第 j 个样品的扩增条带数;

N_{ij} ——第 i 个样品和第 j 个样品共有的扩增条带数。

8 鉴定结果判定

8.1 种薯真实性鉴定

直接比较待测品种与标准品种样品的标记分析结果,如在本标准要求的 12 个 SSR 标记位点上,待测品种样品与标准品种样品之间不存在多态性条带,则判定为同一品种;如存在多态性条带,则判定为不同的品种。或根据聚类分析结果,如待测品种与标准品种样品间无 100% 的遗传相似性,则判定为不同样品,即判定为不同的品种。

8.2 种薯纯度检测

根据聚类分析结果,如在本标准要求的 12 个 SSR 标记位点上,所有检测样品间的遗传相似性为 100%,则判定为相同样品,即种薯纯度(P)为 100%。如达不到 100% 的遗传相似性水平,则根据有差异的检测样品数量(S)占总抽样检测样品数量(T)的百分比来判定种薯纯度。计算见式(3):

$$P = \left(1 - \frac{S}{T}\right) \times 100\% \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

P ——种薯纯度,%;

S ——有差异的检测样品数量;

T ——总抽样检测样品数量。

附 录 A
(规范性附录)
常用贮备液

表 A.1 至表 A.5 给出了常用的贮备液。

表 A.1 1.0 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸贮备液(Tris-HCl 贮备液)(pH8.0, 1 000 mL)

成分	用量	备 注
三羟甲基氨基甲烷(Tris 碱)	121.1 g	
灭菌双蒸水 (ddH ₂ O)	800 mL	
37%浓盐酸 (HCl)	~42 mL	用约 42 mL 浓盐酸调节 pH 至 8.0
最终体积	1 000 mL	用 ddH ₂ O 定容至 1 000 mL。灭菌后,室温保存

表 A.2 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸贮备液(EDTA 贮备液)(pH8.0, 1 000 mL)

成分	用量	备 注
乙二胺四乙酸二钠 (Na ₂ EDTA·2H ₂ O)	186.1 g	
灭菌双蒸水 (ddH ₂ O)	700 mL	
10 mol/L 氢氧化钠 (NaOH)	~50 mL	用约 50 mL 氢氧化钠调节 pH 至 8.0
最终体积	1 000 mL	用 ddH ₂ O 定容至 1 000 mL。灭菌后,室温保存

表 A.3 10 倍三羟甲基氨基甲烷-硼酸-乙二胺四乙酸缓冲液(10× TBE 缓冲液)(pH8.0, 1 000 mL)

成分	用量	备注
Tris 碱 (tris base)	108 g	
硼酸 (boric acid)	55 g	
0.5 mol/L EDTA (pH8.0)	37.25 mL	
灭菌双蒸水 (ddH ₂ O)	800 mL	用 ddH ₂ O 定容至 1 000 mL
最终体积	1 000 mL	灭菌后,室温保存

表 A.4 上样缓冲液(50 mL)

成分	用量	备 注
98%甲酰胺 (formamide)	47 mL	
0.2 mol/L EDTA (pH8.0)	2.5 mL	
溴酚蓝 (bromophenol)	0.25 g	也可用 5 mL ddH ₂ O 溶解后,按需要量加入
二甲苯青 (xylene cyanol)	0.25 g	
最终体积	50 mL	4 ℃ 冰箱保存

表 A.5 10 mg/mL 硫代硫酸钠贮备液(100 mL)

成分	用量	备 注
硫代硫酸钠 (sodium thiosulfate)	1 g	
灭菌双蒸水 (ddH ₂ O)	100 mL	
最终体积	100 mL	4 ℃ 冰箱保存

附 录 B
(规范性附录)
DNA 提取试剂

表 B.1 至表 B.3 给出了 DNA 提取试剂。

表 B.1 两倍十六烷基三甲基溴化铵缓冲液(2× CTAB 缓冲液,pH8.0,1 000 mL)

成分	用量	备 注
1.0 mol/L Tris-HCl (pH8.0)	100 mL	
0.5 mol/L EDTA (pH8.0)	40 mL	
氯化钠 (NaCl)	81.82 g	加入 600 mL ddH ₂ O 加热搅拌
十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)	20 g	
聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)	2 g	
灭菌双蒸水 (ddH ₂ O)		用 ddH ₂ O 定容至 1 000 mL
最终体积	1 000 mL	灭菌后,室温保存

表 B.2 三氯甲烷:异戊醇混合液(24:1,100 mL)

成分	用量	备 注
三氯甲烷 (chloroform)	96 mL	
异戊醇 (isoamylol)	4 mL	
最终体积	100 mL	临时配制

表 B.3 10 倍三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸缓冲液(10× TE 缓冲液,pH8.0,1 000 mL)

成分	用量	备 注
1.0 mol/L Tris-HCl (pH8.0)	100 mL	
0.5 mol/L EDTA (pH8.0)	20 mL	
灭菌双蒸水 (ddH ₂ O)	800 mL	用 ddH ₂ O 定容至 1 000 mL
最终体积	1 000 mL	灭菌后,室温保存

附录 C

(规范性附录)

变性聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂

表 C.1 至表 C.5 给出了变性聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂。

表 C.1 2% 剥离硅烷(repel silane)溶液(500 mL)

成分	用量	备 注
剥离硅烷(repel silane)	10 mL	
三氯甲烷(chloroform)	490 mL	
最终体积	500 mL	室温保存

表 C.2 亲和硅烷(binding silane)溶液

成分	用量	备 注
无水乙醇(ethanol)	3 mL	
亲和硅烷(binding silane)	10 μ L	
冰乙酸(glacial acetic acid)	10 μ L	
最终体积	3.02 mL	现配现用,约一块玻板的用量

表 C.3 6.0%变性聚丙烯酰胺贮备液(1 000 mL)

成分	用量	备 注
丙烯酰胺(acrylamide)	57 g	用 300 mL ddH ₂ O 加热溶解
甲叉双丙烯酰胺(bisacrylamide)	3 g	用 50 mL ddH ₂ O 溶解
尿素(urea)	420 g	用 500 mL ddH ₂ O 溶解
10 × TBE	50 mL	
灭菌双蒸水(ddH ₂ O)		用 ddH ₂ O 定容至 1 000 mL
最终体积	1 000 mL	过滤至铝铂纸包裹的棕色瓶中,4 ℃ 冰箱保存

表 C.4 10%过硫酸铵贮备液(10 mL)

成分	用量	备 注
过硫酸铵(ammonium persulfate)	1 g	
灭菌双蒸水(ddH ₂ O)	10 mL	
最终体积	10 mL	分装后-20 ℃ 保存,4 ℃ 解冻使用

表 C.5 6.0%变性聚丙烯酰胺贮备液(60 mL)

成分	用量	备 注
6.0%变性聚丙烯酰胺贮备液	60 mL	平衡至室温后,加入 TEMED 和过硫酸铵
四甲基乙二胺 (TEMED)	60 μ L	
10%过硫酸铵 (ammonium persulfate)	300 μ L	

附 录 D
(规范性附录)
银染试剂

表 D.1 至表 D.3 给出了银染试剂。

表 D.1 固定/脱色液(2 000 mL)

成分	用量	备注
冰乙酸 (glacial acetic acid)	200 mL	
灭菌双蒸水 (ddH ₂ O)	1 800 mL	
最终体积	2 000 mL	临时配制

表 D.2 硝酸银染色液(2 000 mL)

成分	用量	备 注
硝酸银 (AgNO ₃)	2 g	
37%甲醛 (formaldehyde)	3 mL	
灭菌双蒸水 (ddH ₂ O)		用 ddH ₂ O 定容至 2 000 mL
最终体积	2 000 mL	室温保存

表 D.3 显影液(2 000 mL)

成分	用量	备 注
无水碳酸钠 (Na ₂ CO ₃)	30 g	用前 5h 用 ddH ₂ O 溶解 Na ₂ CO ₃ , 4 ℃ 冰箱保存
37%甲醛 (formaldehyde)	3 mL	用前 5min 加入甲醛和硫代硫酸钠溶液
10 mg/mL 硫代硫酸钠 (sodium thio-sulfate)	400 μL	
灭菌双蒸水 (ddH ₂ O)		用 ddH ₂ O 定容至 2 000 mL
最终体积	2 000 mL	临时配制, 4 ℃ 冰箱保存

附 录 E
(规范性附录)
SSR(简单重复序列)标注引物

表 E.1 给出了 SSR(简单重复序列)标注引物。

表 E.1 SSR(简单重复序列)标记引物

引物名称	SSR 基序	引物序列 (5'→3')	退火温度/℃	染色 体	预期产 物/bp	标记位点/ 基因
STM1049	(ATA)6	F: CTACCAGTTTGTGATTGTGGTG R: AGGGACTTTAATTTGTTGGACG	57	I	184~254	STWIN12G 或 S023
STM2022	(CAA)3...(CAA)3	F: GCGTCAGCGATTTTCAGTACTA R: TTCAGTCAACTCCTGTTGCG	53	II	184~244	C112
STM1053	(TA)4(ATC)5	F: TCTCCCCATCTTAATGTTTC R: CAACACAGCATSCAGATCATC	53	III	168~184	STHMGR3
STM3023a	(GA)9(GA)8(GA)4	F: AAGCTGTTACTTGATTGCTGCA R: GTTCTGGCATTTCATCTAGAGA	50	IV	169~201	2A11
STPoAc 58	(TA)13	F: TTGATGAAAGGAATGCAGCTTGTG R: ACGTTAAAGAAGTGAGAGTACGAC	57	V	203~277	PoAc58
STM0019a	(AT)7(GT)10(AT)4 (GT)5(GC)4(GT)4	F: AATAGGTGTAAGTACTCTCAATG R: TTGAAGTAAAAGTCCTAGTATGTG	47	VI	155~241	PAC33
STM2013	(TCTA)6	F: TTCGGAATTACCCTCTGCC R: AAAAAAAGAACGCGCACG	55	VII	146~172	C337
STM1104	(TCT)5	F: TGATTCTCTTGCTACTGTAATCG R: CAAAGTGGTGTGAAGCTGTGA	57	VIII	164~185	STWAXYG28 或 S066
STM3012	(CT)4(CT)8	F: CAACTCAAACCAGAAGGCAAA R: GAGAAATGGGCACAAAAACA	57	IX	168~213	61D9
STM1106	(ATT)13	F: TCCAGCTGATTGGTTAGGTTG R: ATGCGAATCTACTCGTCATGG	55	X	131~197	STINV141
STM0037	(TC)5(AC)6AA(AC)7 (AT)4	F: AATTAACTTAGAAGATTAGTCTC R: ATTTGGTTGGGTATGATA	53	XI	75~125	PAC62
STM0030	Compound (GT/GC) (GT)8	F: AGAGATCGATGTAAAACACGT R: GTGGCATTTTGATGGATT	53	XII	122~191	PAC05

参 考 文 献

- [1] REID A, EM KERR. A rapid simple sequence repeat (SSR)-based identification method for potato cultivars. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 2007, 5: 7-13.
- [2] MOISAN-THIERY M, S MARHADOUR, MC KERLAN, et al. Potato cultivar identification using simple sequence repeats markers (SSR). *Potato Research*, 2005, 48: 191-200.
- [3] FEINGOLD S, J LLOYD, N NORERO, et al. Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theor Appl Genet*, 2005, 111: 456-466.
- [4] GHISLAIN M, SPOONER DM, RODRIGUEZ F, et al. Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 881-890.
- [5] JOSEPH JC, LM FRANK, DS DOUCHES. An applied fingerprinting system for cultivated potato using simple sequence repeats. *Am. J. of Potato Research*, 2004, 81: 243-250.
- [6] NORERO N, J MALLEVILLE, M HUARTE, et al. Cost efficient potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar identification by microsatellite amplification. *Potato Research*, 2002, 45: 131-138.
- [7] WULFF EG, TORRES S, GONZALEZ-VIGIL E. Protocol for DNA extraction from potato tubers. *Plant Mol Biol Rep*, 2002, 20: 187a-187e.
- [8] ASHKENAZI V, E CHANI, U LAVI, et al. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses. *Genome*, 2001, 44: 50-62.
- [9] GHISLAIN M, F Rodríguez, F Villamón, JNúñez, et al. Establishment of microsatellite assays for potato genetic identification. *CIP Program Report 1999-2000*, 2000: 167-174.
- [10] MCGREGOR CE, CA LAMBERT, MM GREYLING, et al. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP, and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica*, 2000, 113: 135-144.
- [11] MILBOURNE D, RC MEYER, AJ COLLINS, et al. Isolation, characterization and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Mol Gen Genet*, 1998, 259: 233-245.
- [12] SCHNEIDER K, DS DOUCHES. Assessment of PCR-based simple sequence repeats to fingerprint North American potato cultivars. *Am Potato J*, 1997, 74: 149-164.
- [13] PROVAN J, W POWELL, R WAUGH. Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theor Appl Genet*, 1996, 92: 1078-1084.
- [14] KAWCHUK LM, DR LYNCH, J THOMAS, et al. Characterization of *Solanum tuberosum* simple sequence repeats and application to potato cultivar identification. *Am Potato J*, 1996, 73: 325-335.
- [15] NEI M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *PNAS USA*, 1973, 70: 3321-3323.