

枸杞品种 SSR 荧光指纹图谱构建及遗传关系分析

尹 跃,安 巍,赵建华,李彦龙,樊云芳,曹有龙*

(宁夏农林科学院 国家枸杞工程技术研究中心,宁夏 银川 750002)

摘 要:以 12 个枸杞栽培品种为材料,利用 SSR 荧光标记进行 DNA 指纹图谱的构建和遗传关系分析。11 对 SSR 引物在 12 品种共检测到 34 个等位变异,平均每个位点为 3.1 个,位点平均有效等位变异数(N_e)、观测杂合度(H_o)、Shannon's 信息指数(I)和多态信息含量(PIC)分别为 2.025、0.439、0.776 和 0.391。其中 4 对引物 SF1、SF30、SF63 和 SF92 可区分所有供试品种,为品种鉴别提供依据。NTSYS-pc2.10 软件聚类表明,12 个枸杞品种遗传相似系数变化范围是 0.57~0.91,平均为 0.68,表明枸杞品种间存在着丰富的遗传多样性。SSR 荧光标记技术可以有效地用于枸杞品种资源指纹图谱构建及遗传关系研究。

关键词:枸杞;SSR;DNA 指纹图谱;遗传多样性

中图分类号:S567.19 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2017)01-0137-05

Fingerprinting and Genetic Diversity Analysis of Wolfberry Cultivars Using Fluorescence-labeled SSR Markers

YIN Yue,AN Wei,ZHAO Jian-hua,LI Yan-long,FAN Yun-fang,CAO You-long*

(Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences,National Wolfberry Engineering Research Center,Yinchuan,
Ningxia 750002,China)

Abstract: Twelve wolfberry cultivars were used as materials to establish DNA fingerprinting and analyzed genetic diversity with simple sequence repeat (SSR) fluorescent marker. A total of 34 alleles were detected by 11 SSR polymorphic markers, with an average of 3.1 alleles per locus. The values of N_e , H_o , I and PIC were 2.025, 0.439, 0.776, and 0.391, respectively. SF1, SF30, SF63, and SF92 could distinguish all the cultivars. NTSYS-pc 2.10 software was used to analyze genetic diversity of 12 wolfberry cultivars. The results indicated that genetic similarity coefficients of 12 cultivars ranged from 0.57 to 0.91 with an average of 0.68, which showed that there was abundant genetic diversity in wolfberry cultivars. Fluorescence-labeled SSR markers could effectively conduct fingerprinting and genetic diversity analysis for wolfberry cultivars.

Key words: wolfberry; SSR; DNA fingerprinting; genetic diversity

枸杞属(*Lycium*)种质资源丰富,栽培历史悠久,是我国重要“药食同源”型特色植物资源^[1]。近年来,我国的枸杞育种工作发展迅速,培育出了多个适宜鲜食新品种^[2-3]。目前,枸杞新品种选育主要采用传统的单株优选法,同时枸杞新品种种苗扩繁采用无性繁殖方式,极易造成同物异名和同名异物现

象。此外,枸杞品种遗传基础狭窄,品种之间形态差异越来越小,给枸杞新品种的鉴定和知识产权保护增加了困难。因此,有必要开展枸杞品种 DNA 指纹图谱构建及遗传多样性研究工作。

DNA 指纹图谱具有多位点性,高变异性和简单稳定的遗传性,具有巨大的实用价值,是鉴别品种、

收稿日期:2016-04-21 修回日期:2016-08-18

基金项目:国家“863”计划项目(2013AA102606-04);宁夏农业特色优势产业新品种选育专项(2013NYYZ0101);宁夏自然科学基金(NZ15123)。

作者简介:尹 跃,男,研究实习员,研究方向:枸杞分子标记辅助育种。E-mail:yueyin0112@aliyun.com

*通信作者:曹有龙,男,研究员,研究方向:枸杞生物技术育种。E-mail:youlongchk@163.com

品系的有力工具^[4]。SSR 标记具有共显性遗传,重复性好、多态性丰富和稳定性好等优点,已被广泛应用于苹果(*Malus*)^[5-6]、梨(*Pyrus*)^[7]、桂花(*Osmanthus fragrans*)^[8]、杨树(*Populus*)^[9-11]等植物品种指纹图谱构建及遗传多样性研究。在枸杞指纹图谱构建及遗传关系研究方面,邵千顺^[12]等用 4 对 SSR 引物构建了 17 份枸杞种质的 DNA 指纹图谱。胡秉芬^[13]等利用常规 SSR 标记对 17 份中美枸杞种质资源进行遗传多样性分析,20 对引物检测到 46 个等位变异,多态信息含量平均值为 0.377。

传统的 SSR 检测方法主要通过聚丙烯酰胺凝胶电泳和硝酸银染色,其缺点是不能获取扩增片段大小^[14]。本研究将毛细管电泳荧光测序技术^[15-16]

与传统的 SSR 检测技术相结合,旨在克服银染技术的缺点,实现数据高通量收集和自动化处理。建立 12 个枸杞品种 DNA 指纹图谱,并对其进行遗传关系分析,为枸杞品种的分子鉴定提供技术支持和品种选育提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试的 12 份枸杞栽培品种,全部是无性系品种(表 1),均来自宁夏农林科学院国家枸杞工程技术研究中心枸杞种质资源圃(38°38′49″N,106°9′10″E)。于 2015 年 4 月选取幼嫩叶片用于指纹图谱构建和遗传关系分析。

表 1 供试枸杞品种
Table 1 Wolfberry cultivars used in the study

| 编号 | 品种名称 | 食用部位及用途 | 果实形态特征 |
|----|---------|---------|--------------------------------------|
| 1 | 大麻叶 | 果实、药食兼用 | 鲜果实椭圆棒状形,先端钝尖或近截平,鲜果鲜红色 |
| 2 | 小麻叶 | 果实、药食兼用 | 鲜果实椭圆具有棱,果肉较厚,鲜果鲜红色 |
| 3 | 宁杞 1 号 | 果实、药食兼用 | 鲜果实椭圆柱状形,先端钝尖或圆,鲜果鲜红色 |
| 4 | 宁杞 2 号 | 果实、药食兼用 | 鲜果实梭形,先端具一渐尖,鲜果红色 |
| 5 | 宁杞 3 号 | 果实、药食兼用 | 鲜果实卵圆形,鲜果红色 |
| 6 | 宁杞 4 号 | 果实、药食兼用 | 鲜果实长,果径粗,具 8 棱(4 棱高 4 棱低),先端多钝尖 |
| 7 | 宁杞 5 号 | 果实、药食兼用 | 鲜果实腰部平直,果身多不具棱,先端钝圆,鲜果橙红色 |
| 8 | 宁杞 6 号 | 果实、药食兼用 | 鲜果实矩形,先端钝尖,果肉厚,鲜果红色 |
| 9 | 宁杞 7 号 | 果实、药食兼用 | 鲜果实椭圆柱状,多不具纵棱,先端钝尖,鲜果深红色 |
| 10 | 宁农杞 9 号 | 果实、药食兼用 | 鲜果椭圆形,果粒大,鲜果平均单果重 1.24~1.46 g,色泽鲜红发亮 |
| 11 | 蒙杞 1 号 | 果实、药食兼用 | 鲜果实长茄形,果实特大,鲜果红透亮 |
| 12 | 宁杞菜 1 号 | 叶片、药食兼用 | 丛状生长,生长量大,枝条每丛 5~15 条,枝长 50~100 cm |

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 参考 S. BEHROUZ^[17]等方法提取枸杞叶片基因组 DNA,用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,BioPhotometer 检测 DNA 浓度,并将工作液浓度调至 50 ng·μL⁻¹用于后续 PCR 扩增实验,-20℃保存备用。

1.2.2 引物来源与合成 本研究 SSR 引物是基于枸杞基因组测序结果基础上开发,国家枸杞工程技术研究中心李彦龙老师提供,由北京英俊生物公司合成。将筛选出的 11 对引物分别用 FAM(蓝色)和 HEX(绿色)2 种荧光集团修饰上游引物 5′端(表 2)。

1.2.3 PCR 扩增及其产物检测 采用 TP-M13-SSR 毛细管电泳荧光检测法进行 PCR 扩增和产物检测。PCR 扩增体系为 15 μL:其中含 10×PCR buffer(含 Mg²⁺)1.5 μL、50 ng 模板 DNA、0.2 mmol·L⁻¹ dNTPs、0.7 μmol·L⁻¹ 引物、0.27 μmol·L⁻¹ M13 引物和 0.75U Hot start Taq DNA Polymerase。扩增程序是:94℃ 5 min;94℃ 30 s、

57℃ 30 s、72℃ 30 s,共 30 个循环;94℃ 30 s、53℃ 30 s、72℃ 30 s、10 个循环;72℃ 5 min。

PCR 扩增产物自动荧光检测,在 96 孔板中每孔加入分子量内标和甲酰胺混合液(0.5:8.5)9 μL,PCR 产物 1.0 μL,95℃变性 3 min,用 ABI3730 进行自动荧光检测。

1.2.4 数据分析 利用 GeneMapper5.0 软件^[18]对原始数据进行分析,获取扩增片段大小,利用 Popgen32^[19]软件计算等位变异数(Number of alleles,A)、有效等位变异数(Effective number of alleles,Ne)、观测杂合度(Observed heterozygosity,HO)、Shannon’s 信息指数(Shannon’s information index,I)。利用 PowerMarker V 3.25^[20]软件计算位点多态信息含量(Polymorphism information content,PIC)的值。同时使用 NTSYSpc-2.10 软件^[21]计算遗传相似系数,即 $G_{sij} = a/(a+b+c)$, G_{sij} 是用来衡量 2 个个体 i 和 j 的遗传相似系数, a 为 2 个体共有的谱带数, b 和 c 为个体 i 和个体 j 各自的谱带数,最后运用 UPGMA 法进行聚类分析。

表 2 SSR 引物信息

Table 2 SSR primers

| 引物名称 | 引物序列(5'—3') | 荧光类型 | 退火温度/℃ |
|-------|---|------|--------|
| SF1 | F:TGTA ^u AAAACGACGGCCAGTGACACGAAATTTAAGAAAGTAGA R:CCCCTAAAGTACTAAAAGGACA | FAM | 60 |
| SF6 | F:TGTA ^u AAAACGACGGCCAGTTCCTTATTGATTATGCTTTGGAA R:GTTCCATTTTACTTGGCCCTTA | FAM | 60 |
| SF13 | F:TGTA ^u AAAACGACGGCCAGTCAGGGACAGAAACAAACTAGGA R:CATTCA ^u TCCTTCCACAAATCTTTA | FAM | 61 |
| SF26 | F:TGTA ^u AAAACGACGGCCAGTTGCCACCAATATAGAGTGTTC R:GCCCAATCTTACACCTCACAG | FAM | 63 |
| SF30 | F:TGTA ^u AAAACGACGGCCAGTTATTTCACGTTGCTCCAGAAAG R:ATCGCCCCCTGAATTAAAG | FAM | 62 |
| SF34 | F:TGTA ^u AAAACGACGGCCAGTTCATGCAAAATCAGACCACTAT R:TTACGATGTGGGATTTCAC | FAM | 60 |
| SF61 | F:TGTA ^u AAAACGACGGCCAGTTTGGAACCAATGCTAATGGAAG R:GGGACATCAGTTGGA ^u AATTAG | HEX | 61 |
| SF63 | F:TGTA ^u AAAACGACGGCCAGTTGAA ^u ACAAACAAAGAAAAAGC R:TCAAGGGGTTGTTAGATTCT | HEX | 57 |
| SF92 | F:TGTA ^u AAAACGACGGCCAGTCGGGTTTCTAATGGTACCTCTA R:TGACTCTACAAATTTGAA ^u AAACAA | HEX | 60 |
| SF107 | F:TGTA ^u AAAACGACGGCCAGTAAGGAAATAAGCAAACGCATG R:GGACATGACATCATCAGTCAA | HEX | 61 |

注:下划线部分序列为 5'端 M13 接头。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记多态性分析

11 对荧光引物在 12 个枸杞品种中共检测到 34 个等位变异,变化范围为 2~5 个,平均每个位点为 3.1 个;有效等位变异(N_e)变化范围为 1.087~3.470,平均为 2.025;观测杂合度(H_o)变化范围为 0.083~0.917,平均为 0.439;Shannon's 信息指数(I)变化范围 0.173~1.378,平均为 0.776;多态信息含量(PIC)变化范围 0.077~0.665,平均为 0.391(表 3);表明供试枸杞品种间具有丰富遗传多样性。

表 3 11 对枸杞 SSR 引物标记信息

| Table 3 Information of 11 wolfberry SSR markers | | | | | |
|---|-----------|---------------|-------------|--------------------|--------------|
| 引物名称 | 等位基因数 A | 有效等位基因数 N_e | 观测杂合度 H_o | Shannon's 信息指数 I | 多态信息含量 PIC |
| SF1 | 3 | 2.342 | 0.667 | 0.968 | 0.510 |
| SF6 | 2 | 1.385 | 0.333 | 0.451 | 0.239 |
| SF13 | 3 | 1.986 | 0.083 | 0.792 | 0.408 |
| SF26 | 2 | 1.600 | 0.500 | 0.562 | 0.305 |
| SF30 | 3 | 2.133 | 0.583 | 0.900 | 0.468 |
| SF34 | 2 | 1.087 | 0.083 | 0.173 | 0.077 |
| SF61 | 3 | 2.462 | 0.250 | 0.974 | 0.511 |
| SF63 | 5 | 3.470 | 0.917 | 1.378 | 0.665 |
| SF92 | 5 | 2.087 | 0.500 | 1.055 | 0.489 |
| SF95 | 2 | 1.087 | 0.083 | 0.173 | 0.077 |
| SF107 | 4 | 2.642 | 0.833 | 1.105 | 0.553 |
| 平均 | 3.1 | 2.025 | 0.439 | 0.776 | 0.391 |

2.2 品种指纹图谱构建与品种鉴定

利用筛选出 11 对稳定性好,多态性丰富的引物对 12 份样品进行扩增,获得不同枸杞品种在不同位点的等位变异的片段大小(表 4)及相对应的毛细管电泳图(图 1),其中引物 SF63 可区分 7 个枸杞品

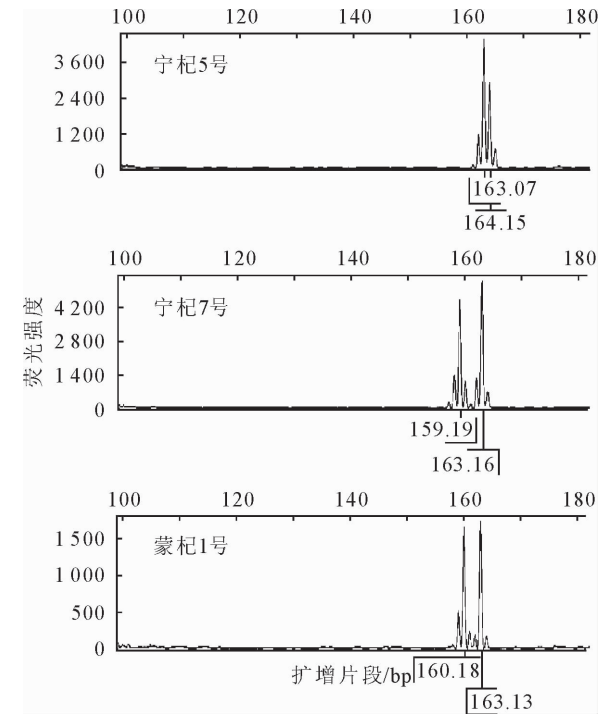


图 1 ‘宁杞 5 号’、‘宁杞 7 号’和‘蒙杞 1 号’
在位点 SF63 的 SSR 指纹图谱

Fig. 1 SSR fingerprints of Ningqi No. 5, Ningqi No. 7 and Mengqi No. 1 at SF63

种,另外 5 个品种需结合引物 SF1、SF30 和 SF92 可逐一区分开来。因此,利用 4 对核心引物可区分所有供试材料。12 个枸杞品种具有各自特定的 SSR 指纹图谱,在生产应用中为枸杞品种鉴定提供重要依据。

2.3 遗传相似性及聚类分析

采用 UPGMA 法,以 11 个荧光 SSR 引物扩增产物数据计算遗传相似系数进行聚类(图 2)。12 个枸杞品种遗传相似系数在 0.57~0.91 之间,平均为 0.68。以遗传相似系数 0.66 为阈值,将供试的 12 个枸杞品种可分为 3 类群。

第 I 大类包括 7 个品种:大麻叶、小麻叶、宁杞 1 号、宁杞 2 号、宁杞 3 号、宁杞 5 号和宁杞 7 号,其

中大麻叶与小麻叶、宁杞 5 号与宁杞 7 号遗传相似系数最大,均为 0.91,它们亲缘关系最近。大麻叶和小麻叶是宁夏栽培枸杞的传统当家品种,宁杞 1 号和宁杞 2 号是从大麻叶生产园选育,宁杞 5 号、宁杞 7 号是从宁杞 1 号生产园中选育。第 II 大类包括 4 个品种:宁杞 4 号、宁杞 6 号、宁农杞 9 号和蒙杞 1 号,其中宁农杞 9 号和蒙杞 1 号遗传相似系数最大为 0.88,亲缘关系最近。第 III 大类仅包括 1 个品种:宁杞菜 1 号,它是用宁杞 1 号与野生枸杞杂交选育,丛状生长,枝条生长量大,是一种营养保健叶用枸杞品种,其表型特征与果用品种差异较大。研究结果表明,聚类结果与其系谱来源比较吻合。

表 4 12 个枸杞品种在 11 个 SSR 位点的指纹数据
Table 4 Fingerprint data at 11 SSR loci of 12 wolfberry cultivars

| 品种名称 | SSR 位点/bp | | | | | | | | | | |
|---------|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | SF 1 | SF6 | SF13 | SF26 | SF30 | SF34 | SF61 | SF63 | SF92 | SF95 | SF107 |
| 大麻叶 | 254/255 | 176/177 | 177 | 175/177 | 171 | 172 | 161 | 163/164 | 152 | 151 | 144/147 |
| 小麻叶 | 255/255 | 176/177 | 177 | 175/177 | 171 | 172 | 161 | 159/163 | 152 | 151 | 144/147 |
| 宁杞 1 号 | 254/255 | 176 | 177 | 177 | 167/171 | 172 | 162 | 159/164 | 152/157 | 151 | 144/147 |
| 宁杞 2 号 | 254/255 | 176 | 177 | 177 | 171 | 172 | 162/165 | 163/164 | 138/152 | 151 | 144/147 |
| 宁杞 3 号 | 254 | 176 | 176 | 177 | 167/171 | 172 | 161 | 159/164 | 152/157 | 151 | 144/146 |
| 宁杞 4 号 | 253/254 | 176 | 176 | 175/177 | 167 | 162/172 | 162 | 159/160 | 152/157 | 151 | 147/147 |
| 宁杞 5 号 | 253/254 | 176/177 | 176 | 175/177 | 171 | 172 | 161 | 163/164 | 152 | 151 | 144/146 |
| 宁杞 6 号 | 253/254 | 176/176 | 176 | 177 | 167/169 | 172 | 162 | 163/164 | 152 | 151 | 144 |
| 宁杞 7 号 | 254 | 176/177 | 176 | 175/177 | 171 | 172 | 161 | 159/163 | 152 | 151 | 144/146 |
| 宁农杞 9 号 | 253/254 | 176 | 176 | 177 | 167/171 | 172 | 162/165 | 163 | 155/155 | 151 | 144/147 |
| 蒙杞 1 号 | 253/254 | 176 | 176 | 177 | 169/171 | 172 | 162/165 | 160/163 | 152/155 | 151 | 144/147 |
| 宁杞菜 1 号 | 254 | 176 | 174/176 | 175/177 | 167/169 | 172 | 161 | 163/167 | 149/152 | 148/151 | 136/144 |

注:表中数据表示每对引物对每份材料获得等位基因的片段长度。

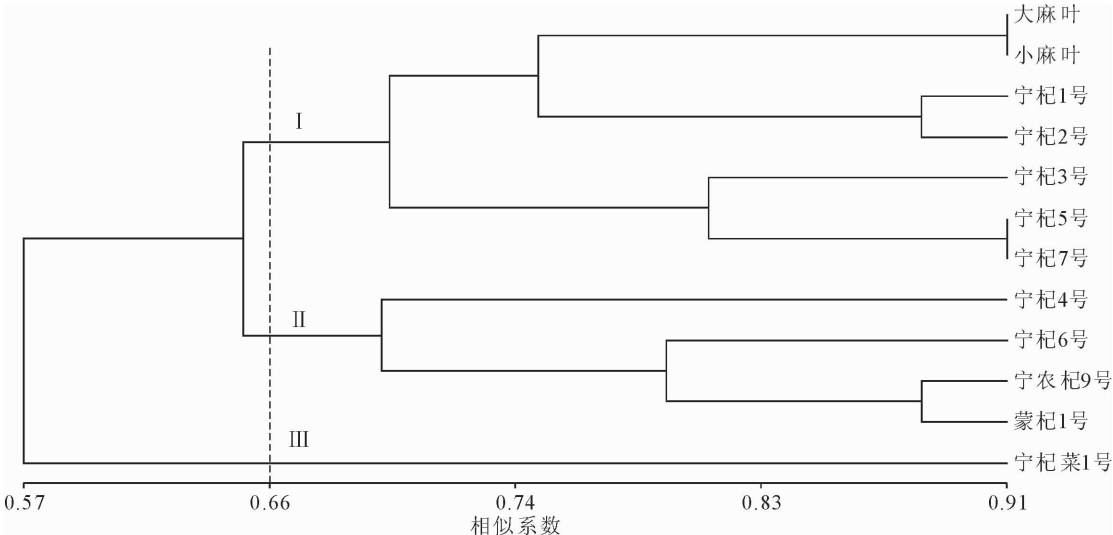


图 2 基于 SSR 标记的 12 个枸杞品种的聚类

Fig. 2 Dendrogram of 12 wolfberry cultivars based on SSR markers

3 结论与讨论

本研究在枸杞基因组测序结果基础上开发 124

对 SSR 引物,筛选得到 11 对稳定性好、多态性高的引物。采用荧光测序技术与 SSR 检测技术相结合,筛选出 11 对 SSR 荧光引物在 12 个枸杞品种共检

测到 34 个等位变异,平均每个位点为 3.1 个;引物多态信息含量(PIC)值变化范围在 0.077~0.665,平均为 0.391,表明供试品种间存在丰富遗传多样性;本研究计算 Shannon's 信息指数(*I*)平均值为 0.776,邵千顺^[12]等利用 15 对 SSR 引物对 17 份枸杞种质进行遗传多样性分析,10 个宁夏枸杞栽培品种的 Shannon's 信息指数(*I*)平均值为 0.313,说明 SSR 荧光标记检测法检测效率显著高于常规 SSR 检测法。

本研究采用引物组合法进行品种鉴定,利用 4 对引物可将 12 个品种区分开,建立供试品种指纹图谱。没有任何 1 对引物可以区分所用供试品种,这可能与本试验所用引物数量少有关。聚类分析中,12 个枸杞品种遗传相似系数在 0.57~0.91 之间,平均为 0.68。以遗传相似系数 0.66 为阈值,将供试的 12 个枸杞品种可分为 3 类群,第Ⅰ大类包括 7 个品种,第Ⅱ大类包括 4 个品种,第Ⅲ大类包括 1 个品种。本研究聚类结果与李彦龙^[22]等研究结果相一致,并与系谱来源相吻合。SSR 荧光标记技术可以有效地用于枸杞品种资源指纹图谱构建及遗传关系研究。

参考文献:

[1] AMAGASE H, FARNSWORTH N R. A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji) [J]. Food Research International, 2011, 44(7): 1702-1717.

[2] 秦垦,戴国礼,刘元恒,等. 鲜干两用枸杞新品种‘宁杞 5 号’[J]. 园艺学报, 2012, 39(10): 2099-2100.

QIN K, DAI G L, LIU Y H, *et al.* A new wolfberry cultivar ‘Ningqi 5’[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2012, 39(10): 2099-2100. (in Chinese)

[3] 秦垦,戴国礼,曹有龙,等. 制干用枸杞新品种‘宁杞 7 号’[J]. 园艺学报, 2012, 39(11): 2331-2332.

[4] KORIR N K, HAN J, SHANGGUAN L, *et al.* Plant variety and cultivar identification: advances and prospects [J]. Crit. Rev. Biotechnol., 2013, 33(2): 111-125.

[5] 王立新,张小军,史星云,等. 苹果栽培品种 SSR 指纹图谱的构建 [J]. 果树学报, 2012, 29(6): 971-977.

WANG L X, ZHANG X J, SHI X Y, *et al.* Establishment of SSR fingerprinting database on major apple (*Malus×domestica*) cultivars [J]. Journal of Fruit Science, 2012, 29(6): 971-977. (in Chinese)

[6] 高源,田路明,刘凤之,等. TP-M13-SSR 技术在梨遗传多样性研究中的应用 [J]. 果树学报, 2011, 28(3): 394-399.

[7] 高源,田路明,刘凤之,等. 利用 SSR 荧光标记构建 92 个梨品种指纹图谱 [J]. 园艺学报, 2012, 39(8): 1437-1446.

[8] 段一凡,王荣,梁丽丽,等. 桂花品种 SSR 荧光指纹图谱的构建 [J]. 南京林业大学学报:自然科学版, 2014(38): 1-5.

DUAN Y F, WANG R, LIANG L L, *et al.* Fingerprinting and identification of *Osmanthus fragrans* cultivas using fluorescence-labeled SSR makers [J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition, 2014(38): 1-5. (in Chinese)

[9] 贾会霞,姬慧娟,胡建军,等. 杨树新品种的 SSR 指纹图谱构建和倍性检测 [J]. 林业科学, 2015, 51(2): 69-79.

JIA H X, JI H J, HU J J, *et al.* Fingerprints of SSR markers and ploidy detection for new *Populus* varieties [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2015, 51(2): 69-79. (in Chinese)

[10] 刘春英,樊军锋,高建社,等. 杨树新杂种的 SSR 分析及鉴定 [J]. 西北林学院学报, 2013, 28(2): 70-73.

LIU C Y, FAN J F, GAO J S, *et al.* Simple sequence repeat analysis and identification of new *Populus* Hybride [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2013, 28(2): 70-73. (in Chinese)

[11] 樊蓉,樊军锋,李周岐. 9 个白杨品种 SSR 指纹图谱构建及遗传关系的研究 [J]. 西北林学院学报, 2015, 30(3): 76-80.

FAN R, FAN J F, LI Z Q. Fingerprinting and genetic relatedness of 9 varieties in *Populus* L. Sect. *Populus* using SSR markers [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2015, 30(3): 76-80. (in Chinese)

[12] 邵千顺,高磊,南雄雄,等. 利用 SSR 技术对十七份枸杞材料进行遗传多样性分析及标准指纹图谱构建 [J]. 北方园艺, 2015(12): 91-95.

[13] 胡秉芬,张宝琳,蔡国军,等. 十七份中美枸杞材料的 SSR 遗传多样性 [J]. 北方园艺, 2016(1): 90-94.

[14] 郝晨阳,王兰芬,贾继增,等. SSR 荧光标记和银染技术的比较分析 [J]. 作物学报, 2005, 31(2): 144-149.

[15] OETTING W S, LEE H K, FLANDERS D J, *et al.* Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers [J]. Genomic, 1995, 30(3): 450-458.

[16] SCHUELKE. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragements [J]. Nature Biothehnology, 2000, 18: 233-234.

[17] BEHROUZ S, SOHEILA M, MAHMOOD K. A modified CTAB method for isolation of DNA from mint plants [C]. Proceedings of The Fourth International Iran & Russia Conference, 2013: 391-395.

[18] RINEHART T A. AFLP analysis using GeneMapper® software and an Excel® macro that aligns and converts output to binary [J]. Biotechniques, 2004, 37(2): 186-187.

[19] YEH F C, BOYLE T J B. Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits [J]. Belgian Journal of Botany, 1997, 129-157.

[20] LIU K, MUSE S V. Power Marker: integrated analysis environment for genetic marker data [J]. Bioinformatics, 2005, 21(9): 2128-2129.

[21] ROHLF F J. NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system Version. 2. 02i [M]. Steauket, New York: Applied Biostatistics Inc, 1997.

[22] 李彦龙,樊云芳,戴国礼,等. 枸杞种质遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 770-773.