

网络出版日期:2017-06-05
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20170605.1728.024.html

TP-M13-SSR 技术在枸杞遗传多样性研究中的应用

樊云芳,尹 跃,安 巍,赵建华,李彦龙,王亚军,曹有龙
(宁夏农林科学院 国家枸杞工程技术研究中心,银川 750002)

摘 要 利用在 SSR 扩增产物检测过程中的一种基于荧光测序技术的高通量低成本分析技术体系 TP-M13-SSR 对 29 份枸杞种质资源进行遗传多样性研究。13 对引物共检测到 78 个等位基因,平均每个位点 6 个等位基因。群体平均的主等位基因频率(M_{AF})、有效等位基因数(N_E)、观测杂合度(H_O)、期望杂合度(H_E)、Shannon's 信息指数(I)和多态信息含量(PIC)分别为 0.625、2.684、0.401、0.514、1.103 和 0.487。聚类分析表明:29 份枸杞种质间相似系数为 0.66~0.97,平均相似系数为 0.81;供试材料可分为 5 大类 7 亚类。研究表明,供试材料的遗传相似性较高,遗传多样性较低。TP-M13-SSR 方法具有经济、灵敏、高效等优点,在枸杞遗传多样性研究中应用效果好。

关键词 枸杞;TP-M13-SSR;遗传多样性
中图分类号 S567.1⁺9 **文献标志码** A **文章编号** 1004-1389(2017)06-0890-07

枸杞 (*Lycium bararum* L.) 系茄科 (Solanaceae) 枸杞属 (*Lycium* L.), 全球约有 80 余种, 主要分布在南美洲南部、北美洲南部、非洲南部和欧亚大陆^[1]。中国枸杞属有 7 个种 3 个变种, 宁夏枸杞和中国枸杞分布最广泛, 宁夏枸杞主要分布在中国西北地区, 中国枸杞主要分布在中国华中、西南和东南地区^[2]。枸杞种质资源研究始于 20 世纪 50 年代, 细胞学、形态学、同工酶等方面的研究都在种质资源鉴定和亲缘关系研究中起积极作用^[3-4]。分子标记 (RAPD、AFLP、SSR) 等技术发展, 为种质资源研究提供了一条准确、高效、快捷的途径, 近年来也被逐渐应用到枸杞种质资源的上述研究中^[5-8], SSR 标记具有高多态性、重复性、稳定性等优点, 广泛应用于植物种质资源鉴定及亲缘关系等方面研究中。在用 SSR 方法进行枸杞遗传多样性研究中, 研究者主要采用银染技术^[9-10], 该技术存在难以读取扩增片段大小、试验过程耗时费力等缺点。

荧光测序技术在 SSR 扩增产物检测上的应用, 实现了数据收集和处理的自动化, 克服了银染法的不足。Oetting 等^[11]首次将一段 19 bp 的核

苷酸序列 (称为 Tailed primer, 即尾巴引物) 引入到短串联重复 (Short tandem repeat, STR) 标记体系中, 并与荧光分析技术和多重 PCR (Multiplex RCR) 技术结合。Schuelke^[12] 又用 M13 序列作为尾巴引物, 对该技术体系进行完善, 最终实现 SSR 技术与荧光自动测序技术的结合, 形成了一套低成本的基于荧光测序技术的 SSR 扩增产物检测体系, 即 TP-M13-SSR 技术。此技术已经被应用到苹果、杨树、桂花等树种遗传多样性分析、品种指纹图谱构建等^[13-16] 研究中。

本研究采用 TP-M13-SSR 毛细管电泳自动检测法对 29 份枸杞种质资源进行遗传多样性分析, 旨在从 DNA 水平上揭示枸杞种质资源的亲缘关系及遗传背景, 以为枸杞种质资源的开发与利用、品种选育及杂交育种提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

29 份枸杞种质资源分别来自宁夏、新疆、河北、四川、青海和云南 6 个省 (自治区) 的地方品种、栽培品种和野生种 (表 1)。均保存于国家枸

杞工程技术研究中心枸杞种质资源圃(38°38′49″ N,106°9′10″E)。

表 1 29 份枸杞种质资源名称及来源
Table 1 29 wolfberry germplasm and its sources

编号 No.	资源名称 Name		资源类型 Type		种名 Species		来源地 Origin	
1	大麻叶	Damaye	地方品种	Landrace	宁夏枸杞	<i>Lycium bararum</i> L.	宁夏	Ningxia
2	小麻叶	Xiaomaye	地方品种	Landrace	宁夏枸杞	<i>Lycium bararum</i> L.	宁夏	Ningxia
3	宁杞 1 号	Ningqi 1	栽培品种	Cultivar	宁夏枸杞	<i>Lycium bararum</i> L.	宁夏	Ningxia
4	宁杞 2 号	Ningqi 2	栽培品种	Cultivar	宁夏枸杞	<i>Lycium bararum</i> L.	宁夏	Ningxia
5	宁杞 3 号	Ningqi 3	栽培品种	Cultivar	宁夏枸杞	<i>Lycium bararum</i> L.	宁夏	Ningxia
6	宁杞 4 号	Ningqi 4	栽培品种	Cultivar	宁夏枸杞	<i>Lycium bararum</i> L.	宁夏	Ningxia
7	宁杞 5 号	Ningqi 5	栽培品种	Cultivar	宁夏枸杞	<i>Lycium bararum</i> L.	宁夏	Ningxia
8	宁杞 6 号	Ningqi 6	栽培品种	Cultivar	宁夏枸杞	<i>Lycium bararum</i> L.	宁夏	Ningxia
9	宁杞 7 号	Ningqi 7	栽培品种	Cultivar	宁夏枸杞	<i>Lycium bararum</i> L.	宁夏	Ningxia
10	宁农杞 9 号	Ningnongqi 9	栽培品种	Cultivar	宁夏枸杞	<i>Lycium bararum</i> L.	宁夏	Ningxia
11	蒙杞 1 号	Mengqi 1	栽培品种	Cultivar	宁夏枸杞	<i>Lycium bararum</i> L.	内蒙	Neimeng
12	宁杞菜 1 号	Ningqicai 1	栽培品种	Cultivar	宁夏枸杞	<i>Lycium bararum</i> L.	宁夏	Ningxia
13	白花	Baihua	地方品种	Landrace	宁夏枸杞	<i>Lycium bararum</i> L.	宁夏	Ningxia
14	黑果	Heiguo	野生种	Wild	黑果枸杞	<i>Lycium ruthenicum</i> Murr.	青海	Qinghai
15	中国	Zhongguo	野生种	Wild	中国枸杞	<i>Lycium chinense</i> Mill.	江苏	Jiangsu
16	北方	Beifang	野生种	Wild	北方枸杞	<i>Lycium chinense</i> Mill var. <i>potaninii</i>	河北	Hebei
17	云南	Yunnan	野生种	Wild	云南枸杞	<i>Lycium yunnanense</i> Kuang	云南	Yunnan
18	蔓生	Mansheng	野生种	Wild	不详	Unknown	云南	Yunnan
19	新疆	Xinjiang	野生种	Wild	新疆枸杞	<i>Lycium dasystemum</i> Pojark	新疆	Xinjiang
20	柱筒	Zhutong	野生种	Wild	柱筒枸杞	<i>Lycium cylindricum</i> Kuang	新疆	Xinjiang
21	截萼	Jiee	野生种	Wild	截萼枸杞	<i>Lycium truncatum</i> Y.C Wang	内蒙	Neimeng
22	CJ-09		野生种	Wild	不详	Unknown	新疆	Xinjiang
23	HB-09		野生种	Wild	不详	Unknown	河北	Hebei
24	SC-13		野生种	Wild	不详	Unknown	四川	Sichuan
25	AN-02		野生种	Wild	不详	Unknown	云南	Yunna
26	W-30		野生种	Wild	不详	Unknown	青海	Qinghai
27	W-27		野生种	Wild	不详	Unknown	青海	Qinghai
28	W-15		野生种	Wild	不详	Unknown	青海	Qinghai
29	W-31		野生种	Wild	不详	Unknown	青海	Qinghai

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 参照 Porebski 等^[17]方法提取枸杞基因组 DNA,用 80 g·L⁻¹琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白检测仪检测 DNA 质量和质量浓度,并用 ddH₂O 将母液质量浓度稀释至 50 ng·μL⁻¹,−20 ℃保存,备用。

1.2.2 引物合成 在 TP-M13 自动荧光检测系统中,用 3 条引物进行 PCR 扩增。第 1 条引物是把普通的 SSR 引物的正向引物分别和 M13 的反

向引物相连合成带有 M13 尾巴的引物,即 TP-M13 引物,第 2 条引物为正常的 SSR 反向引物,第 3 条引物是 5′端带有荧光标记的 M13 正向引物。选用 124 对普通 SSR 引物是从枸杞全基因组测序结果(未公布)中开发的,由国家枸杞工程技术研究中心李彦龙先生提供,TP-M13-SSR 引物和 5′端带有荧光标记的 M13 正向引物(表 2)均由美国 ABI 公司合成。

表 2 5'端带有荧光标记的 M13 正向引物序列

Table 2 M13 forward primer and sequence with fluorescent-labelled at 5' end

引物名称 Primer name	标记荧光 Fluorescent tags	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')
M13-B	6FAM TM	6FAM TM -TGTAACGACGCGCCAGT
M13-G	VIC TM	VIC TM -TGTAACGACGCGCCAGT

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 0.75 U Hot start Taq DNA Polymerase。扩增程序为:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,57 ℃变性 30 s,72 ℃延伸 30 s,30 个循环;94 ℃变性 30 s,53 ℃变性 30 s,72 ℃延伸 30 s,10 个循环;72 ℃延伸 5 min。

扩增产物的自动荧光检测,在 96 孔板中每孔加入分子质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。

1.3 数据分析

利用 GeneMapper 5.0 软件^[18]对原始数据进行分析,获得不同样品扩增片段长度。利用 Pop-gen32^[19]软件计算等位基因数(Number of alleles,*N_A*)、有效等位基因数(Effective number of alleles,*N_E*)、观测杂合度(Observed heterozygosi-

ty,*H_O*)、期望杂合度(Expected heterozygosity,*H_E*)、Shannon's 信息指数(Shannon's information index,*I*)。利用 PowerMarker V 3.25^[20]软件计算主等位基因频率(Major allele frequency,*M_{AF}*)和位点多态信息含量(Polymorphism information content,*PIC*)。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 个体共有条带数,*b*和*c*为个体*i*和个体*j*各自特有的多态性条带数,根据遗传相似性系数进行 UPGMA 聚类分析(unweighted pair group method analysis)。

2 结果与分析

2.1 TP-M13-SSR 引物筛选及条件优化

应用合成的 124 对 TP-M13-SSR 引物对遗传背景和表型性状差异较大的 4 份种质进行筛选,初步筛选出稳定性好、重复性好、PCR 条件相对稳定的 13 对引物(引物名称及序列见表 3)。其 PCR 条件优化后,用于 29 份枸杞种质资源遗传多样性研究。

表 3 SSR 引物信息

Table 3 SSR primers used in this study

引物名称 Primer name	正向引物序列(5'→3') Forward primer sequence(5'→3')	反向引物序列(5'→3') Reverse primer sequence(5'→3')	退火温度/℃ <i>T_m</i>
SF1	F:GACACGAAATTTAAGAAAGTAGA	R:CCCCTAAAGTACTAAAAGGACA	60
SF6	F:TCCTTATTGATTATGCTTTGGAA	R:GTTCCATTTTACTTGGCCCTTA	60
SF13	F:CAGGGACAGAAACAACTAGGA	R:CATTCACTCTCCACAAATCTTTA	61
SF26	F:TGCCACCAATATAGAGTGTTT	R:GCCCAATCTTACACCTCACAG	63
SF30	F:TATTTACAGTTGCTCCAGAAAG	R:ATCGCCCCCTGAATTAAG	62
SF32	F:TCCTTCACCTATGACAAAATCAA	R:TGGACTTATCCAATAATTTCTC	60
SF34	F:TCATGCAAAATCAGACCACTAT	R:TTACGATGTGGGATTTTAC	60
SF61	F:TTGGAACCAATGCTAATGGAAG	R:GGGACATCAGTTGGAATTAG	61
SF63	F:TGAAAACAAACAAAGAAAAGC	R:TCAAGGGGTGTGTAGATTCT	57
SF68	F:TTCCACCATTTTGCTACTCAA	R:AAGAGATTTTTAGCCGATTGA	58
SF73	F:TGAATATTTTATTACTTCCTCCGT	R:ACGAATAAGAGTAATGGCATTG	61
SF92	F:CGGGTTTCTAATGGTACCTCTA	R:TGACTCTACAAATTTGAAAAACAA	60
SF107	F:AAGGAAATAAGCAAACGCATG	R:GGACATGACATCATCAGTCAA	61

2.2 SSR 位点多态性分析

利用筛选出的 13 对引物对 29 份枸杞种质材料进行扩增,准确获得不同材料在不同位点的等位基因片段大小(图 1),共检测到 78 个等位基因

(表 4),变幅为 2~11 个,平均为 6 个;有效等位基因数(*N_E*)变幅为 1.035~5.861,平均为 2.684;主等位基因频率变幅为 0.276~0.983,平均为 0.625;观测杂合度(*H_O*)变幅为 0.034~

0.862,平均为 0.401;期望杂合度(H_E)变幅为 0.034~0.831,平均为 0.514;Shannon's 信息指数(I)变幅为 0.087~1.992,平均为 1.103;多态信息含量(PIC)值变幅为0.033~0.811,平均为 0.487;表明 29 份枸杞种质资源间存在丰富的遗传多样性。

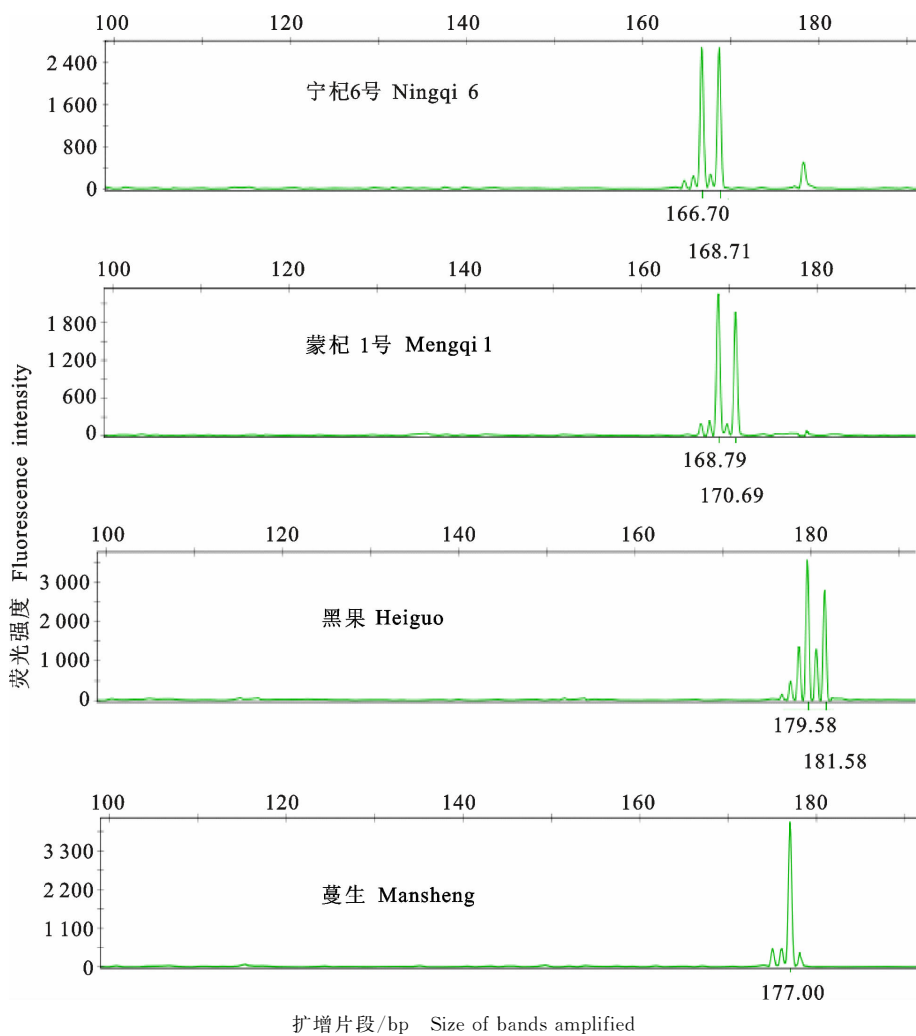


图 1 引物 SF30 在 4 份枸杞种质中的扩增图谱

Fig. 1 Polymorphic fingerprints detected by SF30 for four wolfberry germplasm

表 4 基于 13 对 SSR 引物对 29 份枸杞种质资源遗传多样性分析

Table 4 Genetic diversity of 29 wolfberry germplasm revealed by 13 SSR markers

引物名称 Primer name	N_A	N_E	M_{AF}	H_O	H_E	I	PIC
SF1	9	4.358	0.328	0.690	0.779	1.705	0.749
SF6	4	1.660	0.759	0.379	0.398	0.764	0.367
SF13	4	2.434	0.569	0.276	0.590	1.060	0.531
SF26	2	1.399	0.828	0.345	0.285	0.460	0.245
SF30	11	4.043	0.431	0.586	0.753	1.775	0.728
SF32	2	1.035	0.983	0.034	0.034	0.087	0.033
SF34	4	1.283	0.879	0.103	0.221	0.484	0.211
SF61	6	2.827	0.552	0.345	0.646	1.365	0.615
SF63	10	5.861	0.276	0.862	0.831	1.992	0.811
SF68	9	1.780	0.741	0.276	0.438	1.057	0.425
SF73	4	1.427	0.828	0.276	0.299	0.600	0.277
SF92	7	3.468	0.466	0.310	0.712	1.536	0.678
SF107	6	3.318	0.483	0.724	0.699	1.452	0.665
平均值 Mean	6	2.684	0.625	0.401	0.514	1.103	0.487

2.3 聚类分析

应用 NTSYS-pc 软件计算 13 对引物对 29 份种质遗传相似系数,采用 UPGMA 方法构建聚类图(图 2)。从图 2 可知,在遗传相似系数为 0.78 时,可将供试材料分为 5 个类群。第 I 大类包括 21 份种质,第 II 大类包括 4 份种质,第 III 大类包括 2 份种质,第 IV 大类和第 V 大类仅包括 1 份种质。

第 I 大类在遗传相似系数为 0.80 处分为 2 个亚类群 I-1 和 I-2, I-1 亚类在遗传相似系数为 0.84 处又分为 2 个亚亚类群 I-11 和 I-12, I-11 亚亚类群包括大麻叶、小麻叶、‘宁杞 1 号’和‘宁杞 2 号’4 份种质,其中‘宁杞 1 号’和‘宁杞

2 号’都是通过群体选优从大麻叶群体选育的, I-12 亚亚类群包括 8 个枸杞品种和 7 份野生种质,栽培品种与野生种质混合聚类在一起,表明栽培品种与野生种质有基因交流现象。

第 II 大类在遗传相似系数为 0.80 处分为 2 个亚类群 II-1 和 II-2, II-1 包括北方枸杞、HB-09 和 W-31 共 3 份种质,其中北方枸杞和 HB-09 的地理来源相同。

第 III、IV 和 V 大类在遗传相似系数为 0.80 处各包括 1 个亚类群,其中第 III 类群包括 2 份从云南引进野生种质云南枸杞和 AN-02,第 IV 类群仅有黑果枸杞 1 份种质,第 V 类群仅包括 CJ-09 1 份种质。

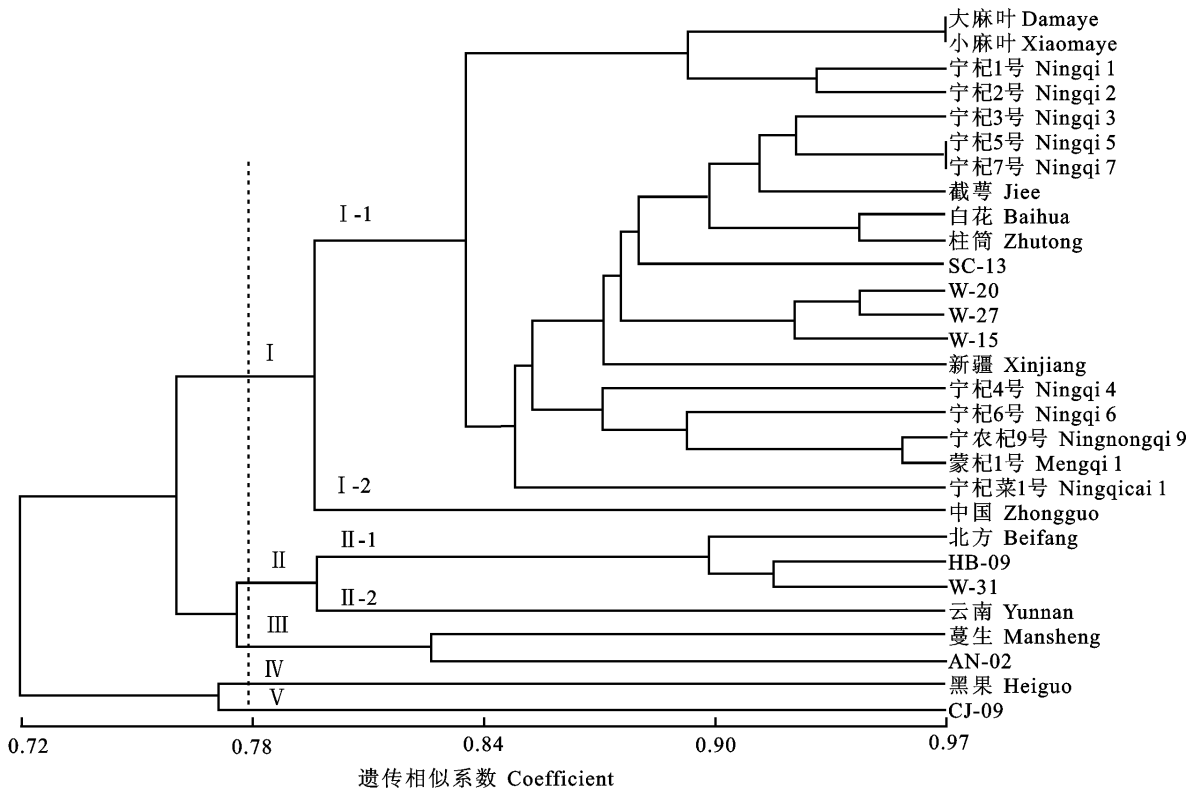


图 2 29 份枸杞种质资源的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 Dendrogram of cluster of 29 wolfberry germplasm analysis by UPGMA

3 讨论

3.1 TP-M13-SSR 自动荧光检测技术的优缺点

与基于普通 SSR 标记的种质资源遗传多样性方法相比,基于 SSR 荧光标记的种质资源遗传多样性研究结果更准确、效率更高,能区分大小相差 1 个碱基的片段。郝晨阳等^[22]应用 SSR 荧光标记分析技术和常规的 SSR 银染技术对小麦 451 份材料进行遗传多样分析,结果表明 SSR 荧光技

术比常规银染法在每个位点上多检测到 3 个等位基因,检测效率更高。程本义等^[23]建立水稻 SSR 荧光标记体系,结合常规 SSR 技术进行水稻品种 DNA 指纹鉴定,结果表明,SSR 荧光检测法可以准确读出扩增片段大小,检测效率明显高于普通 SSR 检测方法。但荧光标记毛细管电泳检测所需的 DNA 测序仪及配套试剂价格昂贵,一般实验室可能难以承受。

3.2 TP-M13-SSR 在枸杞种质资源遗传多样性研究中的应用

TP-M13 自动荧光检测系统具有精确、灵敏、高效等优点。自该技术问世以来,广泛用于植物种质资源遗传多样性及品种鉴定等方面的研究^[15-16]。本研究中,利用筛选出的 13 对 SSR 荧光引物对 29 份枸杞种质资源进行遗传多样性研究,聚类结果表明,供试材料亲缘关系较近,遗传基础狭窄,这符合材料遗传背景与地理来源的实际情况^[24],且部分种质聚类结果与 AFLP 标记聚类结果^[25]相一致,但与基于表型性状的聚类结果^[4]和常规 SSR 标记的聚类结果^[10]并不完全一致,其原因可能是表型性状检测水平和常规 SSR 的检测效率较低,说明 TP-M13-SSR 技术在枸杞种质资源遗传多样性研究中应用效果较好。

参考文献 Reference:

- [1] FUKUDA T, YOKOYAMA J, OHASHI H. Phylogeny and biogeography of the genus *Lycium* (Solanaceae): inferences from chloroplast DNA sequences [J]. *Molecular Phylogenetics Evolution*, 2001, 19(2): 246-258.
- [2] 董静洲, 杨俊军, 王 瑛. 我国枸杞属物种资源及国内外研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(18): 2020-2027. DONG J ZH, YANG J J, WANG Y. Resources of *Lycium* species and related research progress [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2008, 33(18): 2020-2027 (in Chinese with English abstract).
- [3] 侯 杰, 程广有. 3 种药用枸杞过氧化物同工酶遗传多样性研究 [J]. 北华大学(自然科学版), 2006, 7(7): 556-559. HOU J, CHENG G Y. On the genetic diversity of peroxidase isozymes of three medical species of *Lycium* genes [J]. *Journal of Beihua University (Natural Science Edition)*, 2006, 7(7): 556-559 (in Chinese with English abstract).
- [4] 袁海静, 安 巍, 李立会, 等. 中国枸杞种质资源主要形态学性状调查与聚类分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(4): 627-633. YUAN H J, AN W, LI L H, et al. The investigation and cluster analysis of main morphological characters for germplasm of Chinese wolfberry [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2013, 14(4): 627-633 (in Chinese with English abstract).
- [5] 尹 跃, 曹有龙, 陈晓静, 等. 枸杞 SRAP 反应体系建立和优化 [J]. 福建农林大学(自然科学版), 2013, 43(3): 297-301. YIN Y, CAO Y L, CHEN X J, et al. Establishment and optimization of SRAP-PCR reaction system in Chinese wolfberry [J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2013, 43(3): 297-301 (in Chinese with English abstract).
- [6] LIU Z, SHU Q, WANG L, et al. Genetic diversity of the endangered and medically important *Lycium ruthenicum* Murr. revealed by sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2012, 20(8): 86-97.
- [7] 王锦楠, 陈进福, 陈武生, 等. 柴达木地区野生黑果枸杞种群遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. 植物生态学报, 2015, 39(10): 1003-1011.
- [8] 阿力同·其米克, 王青峰, 杨春峰, 等. 新疆药用植物黑果枸杞遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 植物科学学报, 2013, 31(5): 517-524. Alitong · qimike, WANG Q F, YANG CH F, et al. ISSR analysis on genetic diversity of medicinally important *Lycium ruthenicum* Murr. in Xinjiang [J]. *Plant Science Journal*, 2013, 31(5): 517-524 (in Chinese with English abstract).
- [9] 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. HU B F, ZHANG B L, CAI G J, et al. Genetic diversity by SSR markers in seventeen Chinese and American *Lycium barbarum* L. [J]. *Northern Horticulture*, 2016(1): 90-94 (in Chinese with English abstract).
- [10] 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. SHAO Q SH, GAO L, NAN X X et al. Analysis of genetic diversity and construction of fingerprint of *Lycium barbarum* L. using SSR technology [J]. *Northern Horticulture*, 2015(12): 91-95 (in Chinese with English abstract).
- [11] 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]. *Genomics*, 1995(30): 450-458.
- [12] SCHUELKE. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments [J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(2): 233-234.
- [13] 高 源, 王 昆, 王大江, 等. 利用 TP-M13-SSR 标记构建苹果栽培品种的分子身份证 [J]. 园艺学报, 2016, 43(1): 25-37. GAO Y, WANG K, WANG D J, et al. Molecular ID establishment of apple cultivars by TP-M13-SSR [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, 43(1): 25-37 (in Chinese with English abstract).
- [14] 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 with English abstract).
- [15] 段一凡, 王贤荣, 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(增刊): 1-5. DUAN Y F, WANG X R, LIANG L L, et al. Fingerprinting and identification of *Osmanthus fragrans* cultivars using fluorescence-labeled SSR makers [J]. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition)*, 2014, 38(Supp): 1-5 (in Chinese with English abstract).
- [16] 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. GAO Y, TIAN L M, LIU F ZH, et al. TP-M13-SSR technique and its application in the analysis of genetic diversity for pear germplasm resources [J]. *Journal of Fruit Science*, 2011, 28(3): 394-399 (in Chinese with English abstract).
- [17] POREBSKI S, BAILEY L, BAUM B. Modification of a

- CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1997, 15(1): 8-15.
- [18] RINEHART T A. AFLP analysis using gene Mapper® 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 co-dominant and dominant markers and quantitative traits [J]. *Belgian Journal of Botany*, 1998, 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. 1 User Guide [M]. New York: Exeter Software, Setauket, 2000.
- [22] 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.
- HAO CH Y, WANG L F, JIA J Z *et al.* Comparison of fluorescence and silver-staining detection systems of microsatellite markers [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2005, 31(2): 144-149(in Chinese with English abstract).
- [23] 程本义, 夏俊辉, 龚俊义, 等. SSR 荧光标记毛细管电泳检测法在水稻 DNA 指纹鉴定中的应用 [J]. *中国水稻科学*, 2011, 25(6): 672-676.
- CHENG B Y, XIA J H, GONG J Y, *et al.* Application of capillary electrophoresis detection with fluorescent SSR markers in rice DNA fingerprint identification [J]. *China Journal Rice Science*, 2011, 25(6): 672-676 (in Chinese with English abstract).
- [24] 曹有龙, 巫鹏举. 中国枸杞种质资源 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2014: 86-134.
- CAO Y L, WU P J. Wolfberry Germplasm Resources in China [M]. Beijing: China Forestry Publishing Press, 2014: 86-134(in Chinese).
- [25] 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.
- LI Y L, FAN Y F, DAI G L, *et al.* Analysis of genetic diversity for wolfberry germplasms by AFLP technology [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2011, 42(4): 770-773(in Chinese with English abstract).

TP-M3-SSR Technique and Its Application in Analysis of Genetic Diversity of Wolfberry Germplasm Resources

FAN Yunfang, YIN Yue, AN Wei, ZHAO Jianhua, LI Yanlong,
WANG Yajun and CAO Youlong

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

Abstract An economical detection method for simple sequence repeat with tailed primer M13 (TP-M13-SSR) was used in genetic diversity analysis for 29 wolfberry germplasm. Thirteen pairs of SSR primers screened amplified 78 alleles with an average of six alleles per locus. The average of M_{AF} , N_E , H_O , H_E , I and PIC was 0.625, 2.684, 0.401, 0.514, 1.103 and 0.487, respectively. The similarity coefficients among 29 wolfberry germplasm ranged from 0.66 to 0.97, with average of 0.81. 29 wolfberry germplasm could be divide into five groups and seven subgroups. The results showed there was a low level of genetic diversity among 29 wolfberry germplasm. The method had the advantages of economy, sensitiveness and high efficiency, and it had been used in genetic diversity analysis of wolfberry successfully.

Key words Wolfberry; TP-M13-SSR; Genetic diversity

Received 2016-03-28 **Returned** 2016-05-10

Foundation item Ningxia Special Program of New Variety Breeding in Speical and Advantagous Industry in Agriculture (No. 2013NYYZ0101); the National Natural Science Foundation of China (No. 31060104, 31260351); the Natural Science Foundation of Ningxia (No. NZ15123); the Program of Technology Innovation of Ningxia Academy of Agricultural and Forestry Sciences (No. NKYJ-14-31, NKYZ-16-0405).

First author FAN Yunfang, female, associate researcher. Research area: molecular biology research of wolfberry. E-mail: majoriefyf@163.com

Corresponding author CAO Youlong, male, researcher, master supervisor. Research area: biotechnology breeding of wolfberry. E-mail: youlongchk@163.com