

谢福春,曾现艳,程 瑶,等. 26 份海州常山种质资源遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(11):19-23.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.11.005

26 份海州常山种质资源遗传多样性的 AFLP 分析

谢福春¹,曾现艳²,程 瑶¹,张艳君³,秦 栋¹,王华田⁴

(1. 东北农业大学园艺园林学院,黑龙江哈尔滨 150030; 2. 烟台新海建筑设计有限责任公司,山东烟台 264000;
3. 哈尔滨理工大学荣成学院,山东荣成 264300; 4. 山东农业大学林学院,山东泰安 271018)

摘要:采用扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism,简称 AFLP)标记技术对来自国内主要分布区的 26 份海州常山(*Clerodendrum trichotomum* Thunb.)进行遗传多样性分析。从 64 对 AFLP 引物组合中,筛选出 8 对扩增条带清晰、多态性高的引物组合,8 对引物共扩增出 1 04 条条带,其中多态性条带 1 030 条,多态性条带比例为 98.85%,平均每对引物扩增出 128.75 条条带。结合 POPGENE 软件分析遗传多样性指数:等位基因数(N_a)为 1.562 5 个,有效等位基因数(N_e)为 1.226 0 个,Nei's 基因多样性(H)、香农信息指数(I)分别为 0.142 0、0.225 5;26 份海州常山间遗传相似系数在 0.285 1~0.690 9 之间,平均为 0.518;根据遗传相似性系数进行聚类分析,在遗传相似性系数 0.534 处切割时,可将 26 份海州常山划分为 7 大类,对其中第三大类在 0.57 处分 4 个亚群,聚类结果与资源的地理分布大致相符。以上结果表明,海州常山具有丰富的遗传多样性,这为今后海州常山的开发利用和资源保护提供了科学依据。

关键词:海州常山;种质资源;AFLP;遗传多样性

中图分类号: S722 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)11-0019-05

海州常山(*Clerodendrum trichotomum* Thunb.)是马鞭草科(Verbenaceae)大青属(*Clerodendrum*)落叶小乔木或灌木,在我国华北、华东、中南和西南各省(区、市)均有分布,常见于山丘陵、荒坡沟谷等地^[1]。海州常山具有花形别致,花、果观赏价值高且观赏期长的特点,被广泛应用于城市园林绿化中,同时由于该树种具有较强的抗盐、抗旱、耐涝等特性,是干旱瘠薄荒山及矿区废弃地植被恢复与重建、城市废弃地绿化、盐碱地绿化的优良树种。目前对于海州常山的研究多集中在繁育技术、抗逆性机制、花粉活力的测定及植物化学成分分析等方面^[2-6],而对其遗传多样性的研究相对较少。

扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism,简称 AFLP)分子标记技术是一项以 PCR 反应为基础的分子标记技术,具有 DNA 用量少、多态性水平高、检测位点多、分子识别率高等特点^[7-9],近年来被广泛应用于鸡冠花、银杏、珙桐和海棠等观赏植物的遗传多样性研究^[10-13]。本研究采用 DNA-AFLP 分子标记技术,对来自我国 15 个省(区、市)26 份种源的海州常山进行遗传多样性研究,从分子水平揭示我国海州常山种质资源的遗传多样性水平和遗传进化关系,为海州常山的良种选育和遗传变异性研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

根据中国数字植物标本馆、《中国植物志》及其他相关文献记载确定海州常山标本采集地点,结合标本采集地点的地理位置和主要气象因子(年均温、日照时数、无霜期、降水量),对海州常山种源分布进行区域划分,根据种源区划确定 15 个省(区、市),根据每个省(区、市)资源的分布情况,确定采集地点,共选取 26 个采集地点(表 1),所选采集地点基本覆盖了海州常山在国内的分布区域。采集的不同地区的海州常山种源种植于山东农业大学种质资源圃,本试验采集的幼嫩叶片均是来自不同地区的海州常山 3 年生萌蘖苗。

1.2 DNA 提取

每个种源从 5 个单株中各取 2 张幼嫩叶片混合取样 50 mg,利用改良的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法^[14]提取海州常山叶片基因组总 DNA,采用紫外分光光度计和 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测提取 DNA 的质量和浓度,将样品稀释到 50 $\mu\text{g/mL}$,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 AFLP 分析

参照 Vos 等的方法^[15],用 *EcoR* I + *Mse* I 内切酶组合对基因组 DNA 进行酶切,从 64 对 AFLP 引物中筛选出条带清晰、多态性高的 8 对引物组合(表 2)。预扩增总反应体系:酶切连接产物 2 μL ,Pre-AMPMix 1 μL ,dNTPs 1 μL ,10 \times PCR buffer 2.5 μL ,2.5 U/ μL *Taq* 0.5 μL ,ddH₂O 18 μL ,共 25 μL 。预扩增 PCR 程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 复性 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,循环 30 次;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。将 PCR 产物稀释 20 倍后作为选择性扩增模板,选择性扩增体系同上。PCR 扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,65 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 80 s,1 个循环,然后以每次循环复性温度逐级降低 0.7 $^{\circ}\text{C}$ 的梯度继续

收稿日期:2017-01-12

基金项目:国家“十二五”公益性行业重大科研专项子课题(编号:201104002-6)。

作者简介:谢福春(1981—),女,山东济宁人,博士研究生,实验师,主要从事森林遗传育种研究。E-mail:xf204309@163.com。

通信作者:王华田,博士,教授,主要从事森林生理生态和育种研究。

Tel:(0538)8242216;E-mail:wanght@sdau.edu.cn。

进行 12 个循环,变性和延伸条件同上,最后以 94 ℃ 30 s, 性 10 min 后用 4% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染法检测。56 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s,23 个循环结束。PCR 产物经 95 ℃ 变

表 1 海州常山采样地概况

编号	种源地	地理坐标	海拔 (m)	编号	种源地	地理坐标	海拔 (m)
C1	山西省太原市	37°25'N,112°34'E	800	C14	河南省栾川县	33°46'N,111°38'E	1 450
C2	山东省泰安市马套村	36°15'N,117°00'E	400	C15	江苏省连云港市	34°35'N,119°12'E	100
C3	河南省洛宁县	34°23'N,111°38'E	480	C16	山东省滕州市	34°43'N,117°19'E	60
C4	甘肃省天水市	34°34'N,105°43'E	1 300	C17	山东省巨野县	35°28'N,116°05'E	40
C5	山东省泰安市桃花峪	36°15'N,117°56'E	500	C18	辽宁省大连市	38°54'N,121°37'E	140
C6	山东省长清县	36°33'N,116°44'E	45	C19	广西临桂县	25°14'N,110°12'E	1200
C7	安徽省舒城县	31°27'N,116°56'E	25	C20	重庆市金佛山	29°01'N,107°11'E	1 570
C8	陕西省杨陵区	34°17'N,108°56'E	510	C21	贵州省望谟县	25°10'N,106°05'E	900
C9	山东省泰安市夏张镇	36°05'N,116°57'E	110	C22	江苏省南京市	32°03'N,118°50'E	300
C10	山东省肥城市	36°10'N,116°40'E	100	C23	北京市植物园	39°59'N,116°12'E	200
C11	湖北省神农架	37°17'N,110°40'E	1 500	C24	浙江省天目山	30°20'N,119°23'E	1 200
C12	河南省新县	31°38'N,114°52'E	650	C25	河南省西峡县	31°38'N,114°56'E	130
C13	山东省枣庄市	35°00'N,117°10'E	60	C26	云南省昭通市	27°44'N,103°58'E	1 100

表 2 海州常山荧光 AFLP 引物筛选中供试的 64 对引物组合

Mse I /EcoR I	1	2	3	4	5	6	7	8
1	AAC/CAA	AAC/CAC	AAC/CAG	AAC/CAT	AAC/CTA	AAC/CTC	AAC/CTG	AAC/CTT
2	AAG/CAA	AAG/CAC	AAG/CAG	AAG/CAT	AAG/CTA	AAG/CTC	AAG/CTG	AAG/CTT
3	ACA/CAA	ACA/CAC	ACA/CAG	ACA/CAT	ACA/CTA	ACA/CTC	ACA/CTG	ACA/CTT
4	ACT/CAA	ACT/CAC	ACT/CAG	ACT/CAT	ACT/CTA	ACT/CTC	ACT/CTG	ACT/CTT
5	ACC/CAA	ACC/CAC	ACC/CAG	ACC/CAT	ACC/CTA	ACC/CTC	ACC/CTG	ACC/CTT
6	ACG/CAA	ACG/CAC	ACG/CAG	ACG/CAT	ACG/CTA	ACG/CTC	ACG/CTG	ACG/CTT
7	AGC/CAA	AGC/CAC	AGC/CAG	AGC/CAT	AGC/CTA	AGC/CTC	AGC/CTG	AGC/CTT
8	AGG/CAA	AGG/CAC	AGG/CAG	AGG/CAT	AGG/CTA	AGG/CTC	AGG/CTG	AGG/CTT

1.4 数据分析

用 377DNA 自动检测仪扫描电泳胶图,用 Gene Scan3. 1 软件对电泳胶图进行数据提取,通过 Binthere 软件分析各片段大小。利用 Excel 2007 将原始数据中有带的换成“1”,无带的换成“0”,构建“01”矩阵。利用 POPGENE version1. 31 软件计算遗传多样性参数:多态带数(AP)和多态带百分率(P);观测等位基因数(N_s)、观测的有效等位基因数(N_e)、香农信息指数(I)、Nei's 基因多样性(H)。用 NTSYSpC - 2. 11F 软件进行数据分析。对原始矩阵用 Sim Qual 程序求 DICE 相

似系数矩阵,并获得相似系数矩阵。用 SHAN 程序中的非加权组平均法(unweighted pair - group method with arithmetic means,简称 UPGMA)方法进行聚类分析,并通过 Treeplot 模块生成聚类图(图 1)。

2 结果与分析

2.1 AFLP 扩增结果

从 64 对引物组合中筛选出 8 对谱带清晰、多态性高且稳定的引物组合,这 8 对引物扩增图谱显示电泳带数目丰富,分

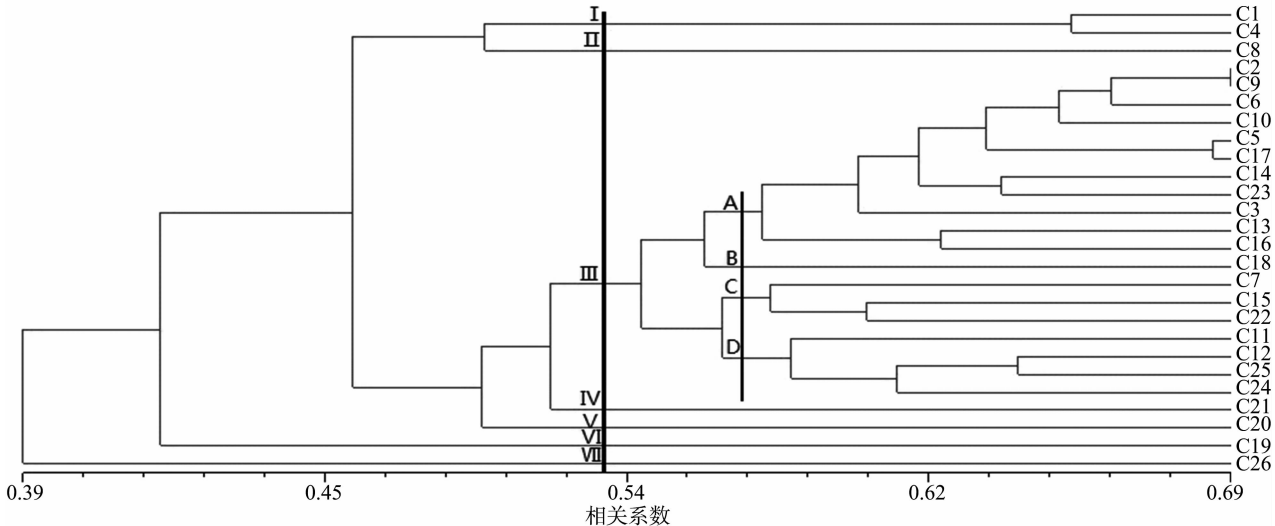


图1 26 份海州常山种质资源 AFLP 聚类结果

带清晰(图 2)。扩增片段的大小在 70~500 bp 之间,且分布相对均匀。8 对引物组合共扩增出 1 042 条条带,其中多态性条带 1 030 条,占比为 98.85%。不同引物组合扩增出的多态性条带总数范围在 115~148 条之间,平均为 128.75 条;不同引物组合平均多态性条带比例为 98.87%(表 3)。不同引物产生的条带数存在一定的差异,其中 E-ACA/M-CAG 引

物产生的条带最多,为 151 条,而 E-AGC/M-CAG 引物产生的条带最少,为 116 条。引物组合 E-AGC/M-CAG 和 E-AGG/M-CAA 扩增出的位点全部具有多态性,而引物组合 E-ACA/M-CAG 的多态性位点的比例最低,为 98.01%。以上分析表明,所选择的引物在海州常山种源间表现了较高的多态性。

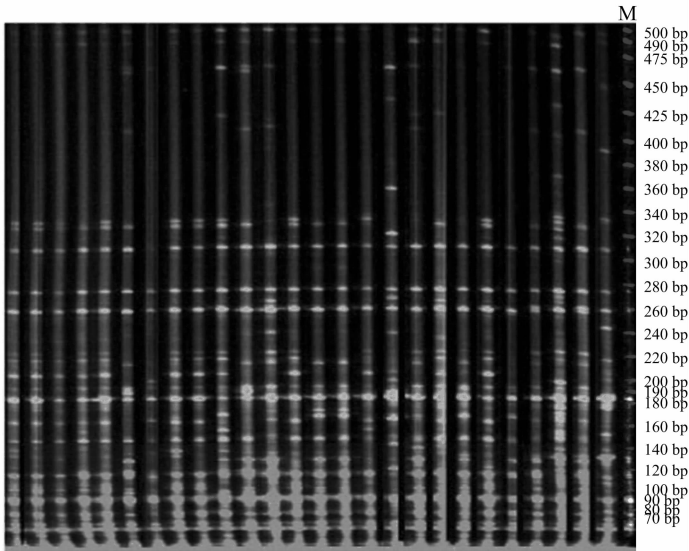


图2 引物 M-ACT/E-CTC 对 26 份海州常山种质资源的选择扩增性结果

表 3 AFLP 选择性扩增引物产生的条带多态性

引物组合	总条带数 (条)	多态性条带数 (条)	多态性比例 (%)
E-AAC/M-CAA	135	133	98.52
E-AAC/M-CAG	126	124	98.41
E-ACA/M-CAG	151	148	98.01
E-ACT/M-CTC	117	115	98.29
E-ACG/M-CAA	124	122	98.39
E-AGC/M-CAG	116	116	100.00
E-AGG/M-CAA	128	128	100.00
E-AGG/M-CTA	145	144	99.31
平均	130.25	128.75	98.85
总和	1 042	1 030	

采用 POPGENE 软件对不同引物组合对海州常山的遗传多样性进行分析。由表 4 可知:26 份海州常山种质资源平均观测等位基因数为 1.562 5 个,平均有效等位基因数为 1.226 0 个,平均 Nei's 基因多样性、平均香农信息指数分别为 0.142 0、0.225 5,以上数据显示,我国海州常山的多态性丰富,种源间的遗传多样性较高,存在丰富的变异。

2.2 不同海州常山种质资源的遗传相似性系数分析

采用 NTSYSpC 2.10 软件计算种质间遗传相似系数(表 5),结果显示,来自不同地区的 26 份海州常山的遗传相似系数在 0.285 1~0.690 9 之间,平均为 0.518 0。其中山东泰安马套村和泰安夏张镇 2 个种源间的相似系数最大(0.690 9),甘肃天水 and 云南昭通间的相似系数最低(0.285 1)。据统计,遗传相似系数在 0.400 0~0.600 0 之间的占种源总数的 81.58%;遗传相似系数小于 0.400 0 的占 7.69%;遗传相似系数大于 0.600 0 的占 10.46%。另外从相似系数矩阵可知:来自同一省份或者相近地域的种源之间相似系数较大,例如

表 4 基于不同引物组合的海州常山遗传多样性水平

引物组合	N_a	N_e	H	I
E-AAC/M-CAA	1.592 6	1.245 9	0.152 6A	0.240 7ABC
E-AAC/M-CAG	1.532 4	1.184 2	0.120 1B	0.195 7AD
E-ACA/M-CAG	1.634 3	1.246 2	0.154 2A	0.246 1CB
E-ACT/M-CTC	1.481 5	1.213 0	0.131 9AB	0.206 3ABD
E-ACG/M-CAA	1.523 1	1.226 4	0.140 7A	0.221 0ABDC
E-AGC/M-CAG	1.513 9	1.169 4	0.112 3B	0.184 7D
E-AGG/M-CAA	1.560 2	1.265 6	0.160 3A	0.247 6BC
E-AGG/M-CTA	1.662 0	1.257 0	0.163 7A	0.262 2C
平均	1.562 5	1.226 0	0.142 0	0.225 5

注:同列数据后标有不同大写字母表示在 0.01 水平上差异显著。

来自山东省、河南省、江苏省的种源之间相似系数偏高。由遗传相似系数分析可知,供试材料之间的遗传相似性与地理距离存在显著的相关性,地理距离越远,遗传相似性越小,遗传距离越大,基因间的交流越少。反之,遗传相似性越大,材料间的遗传距离越小,基因交流越频繁。

2.3 不同海州常山种质资源的聚类分析

根据相似性系数进行 UPGMA 聚类分析,在相似系数为 0.534 处可以将所有种源海州常山划分为 7 类(图 1):第一类包括 2 个种源,分别为山西太原和甘肃天水,第二类陕西杨凌单独为一类,第三类包括 19 份种质资源,在相似性系数 0.57 处切割。可将第三类群划分为 4 个亚群(A、B、C、D),A 亚群包括 11 个种源,其中在 11 份种源中,山东的占有 8 份,其他 3 份分别为山东省周边省份;B 亚区包括 1 份种源,为辽宁大连;C 亚区包括 3 份种源,分别为安徽舒城、江苏连云港、江苏南京;D 亚区包括 4 份种源,分别为湖北神农架、河南新

表 5 26 份海州常山种质资源间的相似系数

材料 代号	相似系数																									
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25	C26
C1	1.000 0																									
C2	0.569 5	1.000 0																								
C3	0.519 0	0.633 6	1.000 0																							
C4	0.651 0	0.559 8	0.488 3	1.000 0																						
C5	0.493 1	0.681 0	0.612 7	0.479 4	1.000 0																					
C6	0.471 6	0.681 0	0.618 8	0.489 7	0.612 5	1.000 0																				
C7	0.477 4	0.549 8	0.538 2	0.423 4	0.536 3	0.577 5	1.000 0																			
C8	0.533 6	0.555 1	0.577 5	0.473 2	0.497 0	0.478 2	0.479 4	1.000 0																		
C9	0.524 3	0.690 9	0.595	0.513 3	0.627 5	0.640 8	0.590 3	0.542 4	1.000 0																	
C10	0.506 4	0.621 6	0.616 2	0.481 1	0.601 5	0.633 6	0.548 0	0.530 6	0.688 5	1.000 0																
C11	0.411 0	0.469 4	0.496 6	0.355 1	0.490 6	0.538 0	0.534 2	0.465 5	0.479 1	0.491 1	1.000 0															
C12	0.437 9	0.532 6	0.578 6	0.387 7	0.541 1	0.555 4	0.581 3	0.496 3	0.563 1	0.552 3	0.557 7	1.000 0														
C13	0.436 5	0.568 0	0.550 1	0.401 7	0.569 4	0.540 0	0.596 4	0.474 7	0.621 1	0.552 3	0.545 2	0.570 5	1.000 0													
C14	0.456 2	0.616 2	0.559 0	0.446 8	0.593 3	0.651 9	0.569 0	0.496 4	0.654 5	0.611 0	0.546 9	0.562 9	0.609 8	1.000 0												
C15	0.453 2	0.556 0	0.588 2	0.420 1	0.531 1	0.556 0	0.583 6	0.496 2	0.564 9	0.560 8	0.506 6	0.583 9	0.579 0	0.574 8	1.000 0											
C16	0.484 4	0.576 9	0.557 0	0.410 3	0.567 0	0.5458	0.538 9	0.474 0	0.581 1	0.541 2	0.497 5	0.543 5	0.618 2	0.625 2	0.555 8	1.000 0										
C17	0.489 5	0.656 1	0.560 3	0.524 5	0.686 6	0.591 6	0.530 1	0.481 9	0.655 6	0.610 8	0.477 5	0.524 0	0.570 9	0.580 6	0.532 3	0.568 7	1.000 0									
C18	0.435 2	0.575 2	0.522 2	0.433 2	0.554 1	0.581 8	0.548 4	0.469 5	0.614 8	0.575 5	0.450 3	0.489 4	0.536 0	0.565 1	0.503 6	0.486 2	0.578 5	1.000 0								
C19	0.322 7	0.394 2	0.417 3	0.324 4	0.394 1	0.462 9	0.435 5	0.437 0	0.481 1	0.438 7	0.458 1	0.431 5	0.447 0	0.473 3	0.454 2	0.415 0	0.416 4	0.404 3	1.000 0							
C20	0.427 6	0.533 3	0.532 8	0.429 9	0.523 4	0.486 6	0.508 8	0.436 1	0.501 7	0.497 4	0.500 0	0.520 8	0.472 7	0.479 7	0.542 9	0.482 8	0.501 9	0.460 4	0.381 1	1.000 0						
C21	0.450 8	0.565 5	0.501 8	0.399 1	0.533 1	0.560 6	0.496 4	0.482 9	0.556 3	0.534 5	0.462	0.512 3	0.504 2	0.566 6	0.494 6	0.561 5	0.519 1	0.523 6	0.409 9	0.451 6	1.000 0					
C22	0.427 3	0.557 1	0.582 9	0.448 7	0.543 0	0.529 9	0.567 2	0.483 3	0.559 0	0.536 5	0.529 7	0.535 3	0.577 3	0.520 2	0.599 6	0.549 2	0.564 1	0.499 1	0.404 4	0.536	0.467 3	1.000 0				
C23	0.510 5	0.620 7	0.583 2	0.437 1	0.593 4	0.597 5	0.544 2	0.545 1	0.656 4	0.594 5	0.507 2	0.541 7	0.597 4	0.633 5	0.563 9	0.576 5	0.580 4	0.557 3	0.435 7	0.507 8	0.527 2	0.532 6	1.000 0			
C24	0.442	0.565 5	0.549 8	0.417 4	0.514 2	0.583 3	0.571 4	0.490 5	0.556 3	0.541 6	0.554 5	0.610 5	0.574 3	0.559 7	0.588 4	0.524 8	0.534 4	0.516 4	0.424 0	0.491 0	0.489 1	0.568 2	0.541 3	1.000 0		
C25	0.419 2	0.519 6	0.593 0	0.398 2	0.539 6	0.585 9	0.566 8	0.485 8	0.523 7	0.533 6	0.629 3	0.637 5	0.586 7	0.582 6	0.594 6	0.545 8	0.537 1	0.500 9	0.462 1	0.525 9	0.502 7	0.597 0	0.557 9	0.604 0	1.000 0	
C26	0.308 9	0.371 1	0.400 0	0.285 1	0.381 3	0.396 7	0.394 7	0.425 1	0.392 9	0.381 7	0.419 0	0.368 9	0.404 9	0.413 2	0.405 3	0.398 0	0.384 6	0.377 9	0.416 9	0.353 1	0.410 0	0.422 0	0.395 5	0.389 4	1.000 0	

县、河南西峡、浙江天目山。广西临桂县、云南昭通、重庆金佛山、贵州望谟这 4 个种源可能由于分别地处热带和亚热带的交界、热带、亚热带、亚热带,加上地理位置相差较大,在聚类图上分别单独聚为一类。

3 讨论

3.1 AFLP 标记的检测有效性及海州常山的遗传多样性分析

在植物遗传多样性研究中 AFLP 标记技术已在农作物、花卉、树木等植物中广泛应用^[16-18]。例如野生扁蓿豆^[19]、鸡冠花^[10]、枸杞^[20]、紫椴^[21]等植物遗传多样性的研究都采用 AFLP 标记技术。本研究筛选出 8 对 AFLP 引物对 26 份来自不同地理区域的海州常山进行扩增,共检测出 1 042 条带,其中多态性条带 1 030 条,多态性位点比例 98.85%。另由多样性参数可知: N_a 为 1.562 5 个, N_e 为 1.226 0 个, H 、 I 分别为 0.142 0、0.225 5,这与紫椴、甘蔗^[21-22]等作物的研究类似,表明 26 份海州常山种质间有丰富的遗传多样性,这为海州常山的资源开发利用奠定了基础。植物的遗传多样性水平与其生物学特性、环境、分布范围、花粉和种子传播方式等因素有关^[23],本试验中的 26 份种源遗传多样性丰富,可能是由于种源来自全国不同地区,这充分表明我国海州常山种质资源具有丰富的遗传基础。

3.2 国内主要分布区的海州常山亲缘关系分析

在来自不同地区的 26 份海州常山种质资源中,其相似系数在 0.285 1~0.690 9 之间,来自不同省份的海州常山种质资源间相似系数相对较小,这一趋势与对紫花苜蓿^[24]、白花泡桐^[25]、甘蔗^[22]种质资源间遗传相似系数的分析相似,可知来自不同省(区、市)的海州常山种质资源间的亲缘关系相对较远,基因交流较少。聚类分析表明,划分类群与地理起源明显相关,例如来自山东、河南、江苏各地区的种源多数聚为一类或者聚为一亚类,而来自地理距离较大的广西临桂县、云南昭通、重庆金佛山、贵州望谟这 4 个种源各自单独聚为一类,表明这 4 个种源与其他材料间的亲缘关系相对较远,具有相对独立的遗传特性。亲本间的亲缘关系在很大程度上决定着后代群体的选择范围,通常认为 2 个亲本遗传差异越大,后代分离范围就越广泛,获得优良个体的机会也就越多。从聚类分析可知,地理位置分布差异较大的几个海州常山种源可考虑作为杂交亲本,为海州常山今后育种提供科学依据。

由于对海州常山种质资源的多样性研究刚刚开始,本研究在海州常山种质资源多样性研究中存在一些不足,例如不同地区采样的数量不均,而且本试验只用了 AFLP 技术,简单重复序列标记(simple sequence repeats,简称 SSR)、相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism,简称 SRAP)等分子标记技术还未用于海州常山种质资源的遗传多样性的分析。下一步将采集样品较少地区的种质资源,并采用其他分子标记技术对其遗传多样性进行分析,寻找适宜该树种遗传多样性分析的分子标记技术,进一步确定海州常山不同地区种质资源的亲缘关系。

参考文献:

- [1] 郑万钧. 中国树木志[M]. 北京:中国林业出版社,2004:4796.
- [2] 林燕青,杨秀莲,王良桂. 海州常山花粉活力测定及其萌发条件

- [J]. 东北林业大学学报,2015,43(5):94-99.
- [3] 刘 军,曾德静,王 铨,等. 植物生长调节剂对海州常山硬枝扦插生根的影响[J]. 东北林业大学学报,2012,40(8):10-15.
- [4] 张 颖,杨 舸. 微波提取法优选海州常山叶总黄酮的提取工艺[J]. 北方园艺,2016(10):118-122.
- [5] 谢福春,陈才业,刘富强,等. 土壤盐胁迫对海州常山形态与气体交换特性的影响[J]. 浙江林学院学报,2009,26(2):176-181.
- [6] 谢福春,张文婷,王华田,等. 土壤盐胁迫对海州常山生理生化特性的影响[J]. 江西农业大学学报,2008,30(5):839-844.
- [7] Nei M, Kumar S. Molecular evolution and phylogenetics [M]. New York: Oxford University Press, 2000: 87-88.
- [8] 王玉山,邢世岩,唐海霞,等. 侧柏种源遗传多样性分析[J]. 林业科学,2011,47(7):91-96.
- [9] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京:化学工业出版社,2005:164.
- [10] 张西西,李 俊,赵正楠,等. 26 份鸡冠花遗传资源亲缘关系的 AFLP 分析[J]. 中国农业大学学报,2016,21(3):67-74.
- [11] 王 萱,刘晓静,邢世岩,等. 中国部分古银杏资源遗传多样性的 AFLP 分析及核心种质的构建[J]. 园艺学报,2016,43(2):249-260.
- [12] 李雪萍,李在留,贺春玲. 珙桐遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 园艺学报,2012,39(5):992-998.
- [13] 沈红香,赵天田,宋婷婷,等. 观赏海棠‘王族’自然杂交后代的遗传多样性分析[J]. 园艺学报,2011,38(11):2157-2168.
- [14] Doyle J J, Doule J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochem Bull, 1987, 19(1): 11-15.
- [15] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [16] 王晓醒,李淑娟,谢永丽,等. 梭罗草 AFLP 体系优化及指纹图谱构建[J]. 江苏农业科学,2017,45(16):37-41.
- [17] 高金秋,周建朝,王孝纯,等. 部分高抗低磷胁迫基因型甜菜 AFLP 指纹图谱的构建[J]. 江苏农业科学,2017,45(6):36-38.
- [18] 李建武,李灏德,文国宏,等. 马铃薯 *EcoR* I / *Mse* I 内酶切组合 AFLP 反应体系的优化与引物筛选[J]. 江苏农业科学,2017,45(15):25-29.
- [19] 李鸿雁,李志勇,辛 霞,等. 野生扁蓿豆种质资源 AFLP 遗传多样性的分析[J]. 植物遗传资源学报,2016,17(1):78-83.
- [20] 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.
- [21] 王东升,辛 红,邢世岩,等. 山东省紫椴遗传多样性 AFLP 分析[J]. 福建农林大学学报(自然科学版),2014,43(1):45-48.
- [22] 咎逢刚,应雄美,吴才文,等. 98 份甘蔗种质资源遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 中国农业科学,2015,48(5):1002-1010.
- [23] 王洪新,胡志昂. 植物的繁育系统、遗传结构和遗传多样性保护[J]. 生物多样性,1996,4(2):92-96.
- [24] 刘青松,陈立波,李志勇,等. 基因组 DNA 分子标记在紫花苜蓿遗传多样性研究中的应用[J]. 华北农学报,2013,28(增刊1):36-40.
- [25] 李海英,茹广欣,侯 婷,等. 12 个白花泡桐种源的遗传多样性分析[J]. 河南农业大学学报,2015,49(6):764-768.