

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

邵千顺¹, 高磊¹, 南雄雄¹, 徐美隆², 李永华¹, 王锦秀¹

(1. 西北特色经济林栽培与利用国家地方联合工程研究中心, 宁夏 银川 750004; 2. 国家林业局枸杞工程技术研究中心, 宁夏林业研究所, 宁夏 银川 750004)

摘要:以 17 个枸杞资源为试材, 采用简单重复序列 (Simple Sequence Repeat, SSR) 技术, 研究宁夏枸杞系列品种和其它枸杞种/品种及野生类型的遗传多样性和指纹图谱。结果表明: 以 15 对 SSR 引物对 17 份枸杞种质扩增获得 109 个位点, 其中 91 个多态性位点, 多态性比例 83.4%; 17 个种质平均多样性指数 H 为 0.1943, Shannon 信息指数 I 为 0.3108; 10 个宁夏枸杞栽培品种的 Nei's 多样性指数 H 为 0.0962, Shannon 信息指数 I 为 0.1537; 7 个野生种质的 Nei's 多样性指数 H 为 0.2004, Shannon 信息指数 I 为 0.3130, 说明非栽培枸杞的多样性比栽培品种的多样性更丰富。以其中 4 对引物构建了 17 个枸杞种质的 DNA 指纹图谱。该研究结果为枸杞品种鉴定、遗传图谱构建等奠定了技术基础。

关键词:枸杞; SSR; 遗传多样性; 指纹图谱

中图分类号: S 567.1⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2015)12-0091-05

枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 属茄科枸杞属落叶灌木, 是一种药食同源植物。枸杞属植物全球约 80 种, 主要分布在南美洲南部和北美洲南部。中国分布有宁夏枸杞 (*Lycium barbarum* L.)、枸杞 (*Lycium chinense* Mill)、黑果枸杞 (*Lycium ruthenicum* Murr)、新疆枸杞 (*Lycium dasystemum* Pojark)、截萼枸杞 (*L. truncatum* Y. C Wang)、柱筒枸杞 (*L. cylindricum* Kuang)、云南枸杞 (*L. yunnanense* Kuang) 7 个种和黄果枸杞 (*L. barbarum* L var. *auranticarpum*)、北方枸杞 (*L. chinense* Mill var. *Potaninii*)、红枝枸杞 (*L. dasystemum* Park var. *ruori-caulium*) 3 个变种^[1-3], 主要分布在宁夏、内蒙古、甘肃、青海和新疆等省和自治区。宁夏地区分布的枸杞有宁夏枸杞、黑果枸杞、截萼枸杞 3 个种和黄果枸杞 1 个变种^[8]。目前枸杞的栽培品种较多, 但以宁夏枸杞系列品种为主。宁夏枸杞分布地域较广、繁殖方式多样, 使得品种间的亲缘关系模糊不清, 给品种选育中亲本的选择带来了很大的麻烦。因此, 有必要对枸杞的遗传多样性进行分析, 为杂交育种和种质保护提供依据。同时由于部分品种在形态上极为接近, 或同一品种在不同地区皆有栽

培, 存在“同名异物”、“同物异名”现象, 使枸杞品种鉴定存在一定困难。DNA 指纹图谱为这一难题的解决提供了可靠的技术支撑。

目前, 国内外学者已采用多种手段对枸杞种质资源进行了遗传多样性分析, 也初步进行了枸杞 DNA 指纹图谱构建方面的研究。袁海静等^[4]主要从形态学方面对 31 份枸杞种质资源进行了遗传多样性分析。尚杰等^[5]利用 RAPD 技术对宁杞 1 号、宁杞 2 号、宁杞 3 号和宁杞 4 号 4 个宁夏枸杞栽培品种及 3 个宁夏野生枸杞进行了遗传多样性分析; Zhang 等^[6]收集了 6 种枸杞属植物, 其中 2 个正品, 4 个混淆品种, 运用 RAPD 技术进行分析, 获得了枸杞属不同种的特异性 DNA 指纹图谱, 从而将它们准确区别。严奉坤等^[7-8]利用 RAPD 技术对枸杞属植物基因组 DNA 指纹图谱进行分析并对同一品种不同产地宁夏枸杞 DNA 指纹图谱特征进行了研究。但目前还没有完整的关于宁夏枸杞系列品种亲缘关系分析的报道, 也没有利用 SSR 分子标记构建枸杞指纹图谱的报道。

SSR 分子标记是建立在 PCR 反应基础上的一种新型遗传标记, 其特点是位点多态性相对较高, 技术简便, 共显性, 在作物的遗传作图、基因定位及遗传差异研究中得到了广泛使用。但是, 目前尚鲜见将该技术应用于枸杞遗传多样性分析及指纹图谱构建的报道。该研究采用 SSR 技术对宁夏枸杞系列品种和其它枸杞种/品种

第一作者简介:邵千顺(1986-), 硕士, 助理研究员, 研究方向为分子遗传育种。E-mail: shaoqianshun@126.com.

基金项目: 农业科技成果转化资金资助项目(2012GB300478)。

收稿日期: 2015-01-22

及野生类型进行遗传多样性和指纹图谱构建,以期为枸杞品种分类、种质鉴定、保护和杂交育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

该研究所用试验材料(表1)取自宁夏森森科技园枸杞种质资源圃。17份供试材料均为2012年引自青海、甘肃及宁夏等地,其中宁杞6号^[9]、宁杞8号和宁杞9号^[10]为宁夏林业研究所选育的枸杞新品种。

表1 试验材料编号及名称

Table 1 Number and names of the materials

编号 No.	名称 Name	拉丁名 Latin name	来源 Source
1	宁杞1号 Ningqi 1	<i>Lycium barbarum</i> Linn	宁夏
2	宁杞3号 Ningqi 3	<i>Lycium barbarum</i> Linn	宁夏
3	宁杞4号 Ningqi 4	<i>Lycium barbarum</i> Linn	宁夏
4	宁杞5号 Ningqi 5	<i>Lycium barbarum</i> Linn	宁夏
5	宁杞6号 Ningqi 6	<i>Lycium barbarum</i> Linn	宁夏
6	宁杞7号 Ningqi 7	<i>Lycium barbarum</i> Linn	宁夏
7	宁杞8号 Ningqi 8	<i>Lycium barbarum</i> Linn	宁夏
8	宁杞9号 Ningqi 9	<i>Lycium barbarum</i> Linn	宁夏
9	河北枸杞 Hebei wolfberry		河北
10	黄果枸杞 Yellow fruit wolfberry	<i>Lycium barbarum</i> Linn.	
11	黑果枸杞 Black fruit wolfberry	<i>Lycium dasystemum</i> Pojark	甘肃瓜洲
12	中科绿川1号 Zhongkelyuchuan 1	<i>Lycium barbarum</i> Linn	武汉植物园
13	宁杞201401 Ningqi 201401	<i>Lycium barbarum</i> Linn	宁夏
14	韩国枸杞 Korea wolfberry		韩国
15	宁夏野生枸杞 Ningxia wild wolfberry		宁夏
16	精杞3号 Jingqi 3	<i>Lycium barbarum</i> Linn	新疆林科院
17	新疆黑果 Xinjiang black fruit wolfberry	<i>Lycium dasystemum</i> Pojark	新疆林科院

1.2 试验方法

1.2.1 基因组DNA提取 采用Zhang等^[11]改良的CTAB法提取枸杞叶片基因组DNA。

1.2.2 SSR-PCR分析 SSR引物参照GenBank公开序列设计,由华大基因合成,上下游引物搭配形成100对引物组合,从中筛选出扩增条带丰富、清晰、稳定的37对引物组合用于正式扩增。PCR反应体系为10 μL,其中包括10×PCR buffer 1.67 μL,2.5 U/μL dNTP 0.23 μL,2.5 U/μL Taq 酶 0.25 μL,正反引物各1.0 μL,模板1.0 μL,ddH₂O补充至10 μL。PCR扩增程序为:94℃预变性5 min;94℃变性30 s;55℃退火30 s;72℃延伸1 min;进行35个循环;72℃延伸5 min;4℃保存。PCR产物采用10%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离(恒压200 V,电泳50 min),利用银染法进行染色。

1.3 数据分析

根据电泳结果,凝胶相同迁移率位置上,有条带的记为“1”,无条带的记为“0”,构成“0,1”矩阵。采用POPGENE 1.31软件计算每对SSR引物的多态性位点数、多态性位点百分率、Nei's遗传多样性指数(H)和Shannon信息指数(I),并利用NTSYS pc version2.2软件

计算遗传相似度并进行UPGMA聚类;根据电泳检测结果,筛选出可以鉴别所有品种的引物,利用曹永生等^[12]的指纹图谱自动识别系统Gel2.0构建枸杞品种指纹图谱。

2 结果与分析

2.1 SSR引物多态性分析

用宁杞1号、宁杞8号、河北枸杞、黑果枸杞、黄果枸杞5个表型差异明显的、多态性高的材料筛选了100对SSR引物,获得15对多态性引物(表2),多态性引物比例15%。15对多态性引物共扩增出109个位点,其中91个多态性位点。平均每对引物扩增出7个位点,其中6个多态性位点。引物SM0042扩增的多态性位点最少,为50%;引物SM0039、SM0078、SM0105、SM0115的多态性位点百分率达100.0%。

表2 研究所用部分引物碱基序列及多态性

Table 2 Sequences of the primers and their polymorphism

名称 Name	方向 Orientation	序列 Sequence	总位点 Total loci/个	多态性位点 Polymorphic site	多态性比例 Polymorphic rate/%
SM0027	F	AGCTTCACTACAGGAGGGGA	7	4	57.1
	R	GAAGCAATGAAGCAGACCAA			
SM0039	F	CAGCTCTGGCATTACAAAGT	6	6	100
	R	GTTCAATAGCCTCAACGCCT			
SM0032	F	CGAATCTCGTACTGCTCAA	4	2	50
	R	AGGCCTCTTTGAACAGCTTC			
SM0042	F	CACGTAATTTCCACAATCCA	2	1	50
	R	CTCTCCATCTCCGCTCTTTC			
SM0072	F	CGTGAACCATCGAGTCTTTG	9	8	88.9
	R	ACGTGGACTCGCATTTAGG			
SM0078	F	CGTGAACCATCGAGTCTTTG	4	4	100
	R	ACGTGGACTCGCATTTAGG			
SM0097	F	AGGAGAAGTTTACACGGGAC	5	3	60
	R	TGCCTGTGTATCCACCTATG			
SM0105	F	CCCTCTCTTCTCTCTTCT	6	6	100
	R	AGAATCCCCAGAAATTCGAG			
SM0112	F	TCTTCTCTTCTTCTCTCCA	8	7	87.5
	R	CGTCCACATACACAGCAACA			
SM0115	F	ATGCATCAGCCTATGGGTTT	8	8	100
	R	CCCTTGGGATAGATGAACA			
SM0118	F	TAGGCAAGCAGACAATGGAA	6	5	83.3
	R	GCATGTCTCTACATACACTGCTA			
SM0120	F	GACTGCTTGGTGATGGAAGA	13	10	76.9
	R	TCAACAGCAGGACCATTTGTT			
SM0137	F	TGTGCTCTATATGCTCCG	14	13	92.9
	R	TGAACCTCATGGTACCGAAA			
SM0138	F	TGGAGGAAAGCAAAGTGAGA	12	10	83.3
	R	CCCAAAATTAAAGGGGCA			
SM0148	F	TCTGAGGAGTGTATGCGGAG	5	4	80
	R	AAATTGCAATGTCCCACT			

注:F;正向引物,R;反向引物。

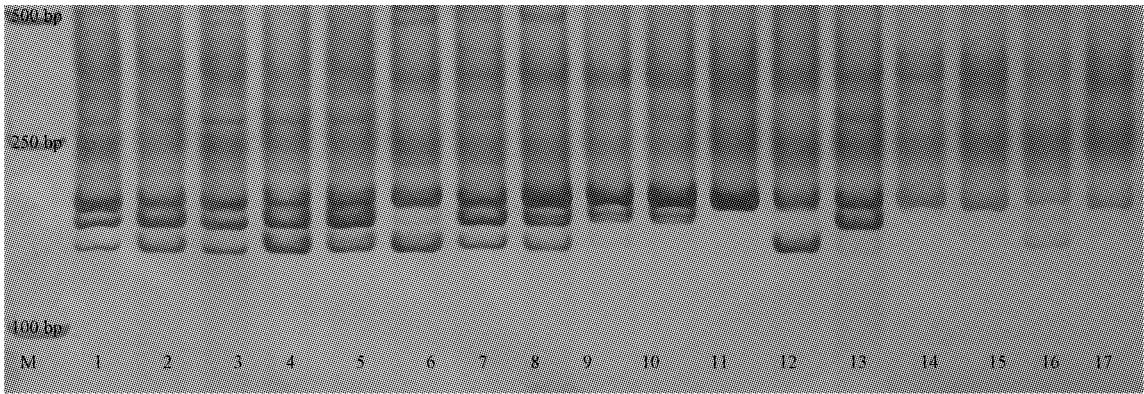
Note:F;Forward primer,R;Reverse primer.

2.2 枸杞种质遗传多样性

从图1引物SM0148扩增效果可以看出,扩增结果清晰,多态性较高。109个位点分子量从200 bp到1 000 bp,

利用 NTSYS pc version2.2 软件计算相似系数矩阵列于表 3,各种质间相似度在 0.55~0.98,平均为 79.5%。利用 POPGENE2.1 软件计算各位点的 Nei' s 多样性指数 H 和 Shannon 信息指数 I,17 个种质平均多样性指数 H 为 0.1943,Shannon 信息指数 I 为 0.3108;计算 10 个宁

夏枸杞栽培品种的 Nei' s 多样性指数 H 为 0.0962,Shannon 信息指数 I 为 0.1537;7 个非栽培种质的 Nei' s 多样性指数 H 为 0.2004,Shannon 信息指数 I 为 0.3130。可见,非栽培品种比宁夏枸杞栽培品种的遗传多样性更丰富。



注:M;DNA Marker(2 000 bp),1~17:同表 1。
Note:M;DNA Marker(2 000 bp),1-17:the same as table 1.

图 1 引物 SM0148 扩增结果

Fig. 1 The amplification result of SM0148

表 3

17 个枸杞种质相似性度系数

Table 3

Coefficient of similarity degree of 17 Chinese wolfberry germplasm

	宁杞 1 号 Ningqi 1	宁杞 3 号 Ningqi 3	宁杞 4 号 Ningqi 4	宁杞 5 号 Ningqi 5	宁杞 6 号 Ningqi 6	宁杞 7 号 Ningqi 7	宁杞 8 号 Ningqi 8	宁杞 9 号 Ningqi 9	河北 枸杞 Hebei wolfberry	黄果枸杞 Yellow fruit wolfberry	甘肃黑果 Black fruit wolfberry	中科绿 川 1 号 Zhongke lyuchuan 1	宁杞 201401 Ningqi 201401	韩国 枸杞 Korea Wolfberry	宁夏野 生枸杞 Ningxia wild wolfberry	精杞 3 号 Jingqi 3	新疆黑果 Xinjiang black fruit wolfberry
宁杞 1 号 Ningqi 1	1.00																
宁杞 3 号 Ningqi 3	0.86	1.00															
宁杞 4 号 Ningqi 4	0.95	0.83	1.00														
宁杞 5 号 Ningqi 5	0.94	0.83	0.94	1.00													
宁杞 6 号 Ningqi 6	0.97	0.87	0.96	0.94	1.00												
宁杞 7 号 Ningqi 7	0.89	0.88	0.86	0.86	0.88	1.00											
宁杞 8 号 Ningqi 8	0.94	0.83	0.98	0.96	0.96	0.86	1.00										
宁杞 9 号 Ningqi 9	0.89	0.79	0.88	0.84	0.90	0.80	0.86	1.00									
河北枸杞 Hebei wolfberry	0.78	0.68	0.77	0.75	0.81	0.71	0.77	0.87	1.00								
黄果枸杞 Yellow fruit wolfberry	0.84	0.71	0.83	0.83	0.83	0.75	0.83	0.84	0.83	1.00							
甘肃黑果 Black fruit wolfberry	0.62	0.56	0.60	0.61	0.63	0.62	0.61	0.59	0.59	0.56	1.00						
中科绿川 1 号 Zhongke lyuchuan 1	0.88	0.78	0.85	0.85	0.89	0.81	0.85	0.86	0.79	0.83	0.61	1.00					
宁杞 201401 Ningqi 201401	0.90	0.80	0.87	0.87	0.89	0.83	0.87	0.88	0.81	0.83	0.63	0.85	1.00				
韩国枸杞 Korea Wolfberry	0.69	0.55	0.68	0.68	0.68	0.63	0.68	0.71	0.71	0.72	0.62	0.68	0.70	1.00			
宁夏野生枸杞 Ningxia wild wolfberry	0.78	0.68	0.75	0.79	0.77	0.71	0.77	0.74	0.67	0.73	0.64	0.77	0.83	0.71	1.00		
精杞 3 号 Jingqi 3	0.92	0.82	0.91	0.93	0.93	0.86	0.93	0.86	0.77	0.82	0.61	0.85	0.89	0.68	0.81	1.00	
新疆黑果 Xinjiang black fruit wolfberry	0.76	0.72	0.75	0.79	0.77	0.74	0.77	0.71	0.65	0.70	0.75	0.75	0.77	0.71	0.82	0.79	1.00

2.3 聚类分析

运用 NTSYS pc version2.2 软件进行所有品种的 UPGMA 聚类(图 2),在相似系数 0.78 处做一结合线 L₁,可将 17 个枸杞种质聚为 4 个类群:第 1 类包括 13 个种质,即宁杞 4 号、宁杞 8 号、宁杞 5 号、宁杞 1 号、宁杞 6

号、精杞 3 号、宁杞 201401、宁杞 9 号、中科绿川 1 号、宁杞 3 号和宁杞 7 号、河北枸杞和黄果枸杞,除河北枸杞和黄果枸杞外,其它品种都为宁夏枸杞栽培品种;第 2 类包括宁夏野生枸杞和新疆黑果 2 个材料;韩国枸杞和甘肃黑果各成 1 类。

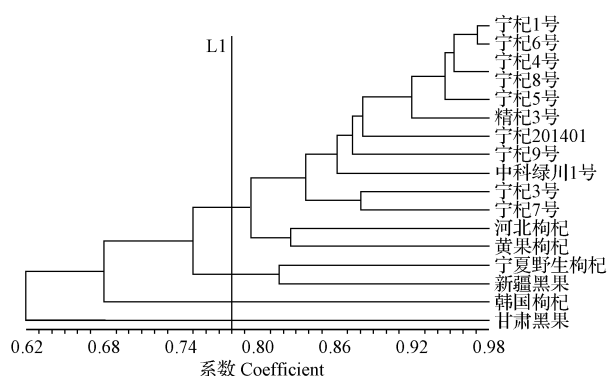
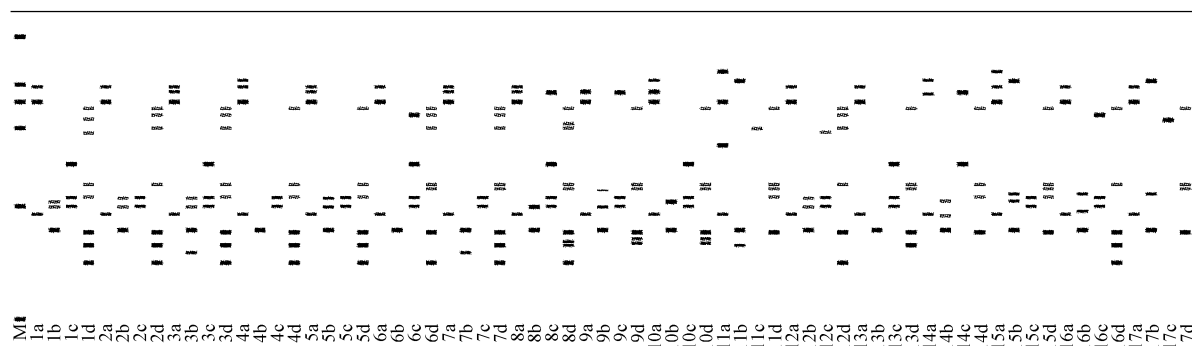


图2 17个枸杞种质 UPGMA 聚类树状图

Fig.2 UPGMA clustering tree of 17 Chinese wolfberry germplasm



注:M;DNA marker(2 000 bp);a;SM0027,b;SM0072,c;SM0115;1~17;同表1。

Note:M;DNA marker(2 000 bp);a;SM0027,b;SM0072,c;SM0115;1~17;the same as table 1.

图3 17个枸杞种质标准指纹图谱

Fig.3 The fingerprint of 17 Chinese wolfberry germplasm

3 讨论

从研究结果看出,野生枸杞间的遗传多样性较宁夏栽培枸杞丰富,在其它植物中也存在野生品种比栽培品种遗传多样性更丰富的现象^[13-14]。这可能是在长期进化过程中,宁夏枸杞栽培品种通过不断人工选育,淘汰了自然变异中的不利于生产的类型,从而使不同栽培品种之间基因型类似;而野生型枸杞在不断的接受不同基因型的花粉,不停的杂交重组,同时环境的影响也增加了基因突变的可能。从枸杞产业长远发展的角度来看,以后枸杞育种中应多引进非宁夏枸杞种质材料,丰富枸杞基因库,以防止宁夏枸杞在长期选育中过多近亲繁殖而导致品质退化的问题。

该研究利用 15 对 SSR 引物对 17 个样品扩增获得的 109 个位点进行 UPGMA 聚类。在 0.78 处做一结合线 L₁,河北枸杞和黄果枸杞与宁夏枸杞聚为一类,说明河北枸杞和黄果枸杞与宁夏枸杞亲缘关系较近。河北枸杞又称河北血杞,是 200 年前引自宁夏中宁县的枸杞^[15],因此,它可能具有宁夏枸杞的遗传基因;黄果枸杞是宁夏枸杞的变种^[1-3],与宁夏枸杞亲缘关系较近。宁

2.4 枸杞品种标准指纹图谱构建

根据引物扩增产物中多态性条带的稳定性,筛选出 3 对多态性丰富的 SSR 引物用于构建枸杞 DNA 标准指纹图谱,即 SM0027、SM0072、SM0115 和 SM0148,这 4 对引物组合可将 17 个枸杞材料鉴别开。用 Photoshop CS5 对丙烯酰胺凝胶电泳图片进行清晰化处理,减少噪点对电泳条带的影响。然后利用 Gel2.0 软件对处理后的凝胶图片进行识别处理,以 Marker 2000(天根公司生产)为参照,构建 17 个枸杞种质的标准指纹图谱(图 3)。在进行品种鉴定时,利用这 3 对引物对检测样品进行 PCR 扩增,电泳检测,得到的胶图经 Gel2.0 自动识别后与标准图谱进行比对,即可鉴定出被检样品的品种。

夏生枸杞是引自贺兰山东麓的野生型枸杞,其与新疆黑果聚为一类。从遗传相似系数看出,宁夏野生枸杞与宁杞 201401 的遗传相似度为 0.83,与宁夏枸杞其它品种平均相似系数为 0.75,而与新疆黑果的相似系数为 0.82;从表型看,该野生枸杞除果实为红色外,其它表型性状(多刺、叶片肥厚、无叶柄、丛生型等)均与黑果枸杞相似,因此,宁夏野生枸杞可能是黑果枸杞与宁夏枸杞的杂交种。

为防止品种侵权,保护育种者和农民的合法权益,越来越多的植物都已构建了 DNA 指纹图谱,如板栗^[16]、菊花^[17]、柑橘^[18]、棉花^[19]、玉米^[20]和玫瑰^[21]等。枸杞作为宁夏甚至西北地区的特色经济林木,是当地农民收入的主要来源。但是目前品种较多,且品种间相似性较高,导致市场混乱,很多不法分子常常将其它枸杞充当宁夏枸杞卖给消费者,严重损害宁夏枸杞品牌及消费者合法权益。因此构建枸杞指纹图谱,保护宁夏枸杞品种是当务之急。但是目前已开发的标记类型^[22]较多,需要选择一种更适合构建枸杞指纹图谱的标记类型。魏玉清等^[23]利用 RAPD 构建了宁杞 1 号指纹图谱,Littm^[24]利用 RAPD 技术对甘肃枸杞进行 DNA 指纹图谱分析。

RAPD 属显性标记,存在共迁移问题,且稳定性差。SSR 分子标记又称微卫星^[25]是由 1~4 个碱基组成的重复序列,在真核生物基因组中普遍存在,表现为共显性标记,它已经成为研究种质资源遗传多样性,基因作图,亲子鉴定的首选标记^[26]。目前尚鲜见以 SSR 分子标记构建枸杞指纹图谱的报道。该研究采用 SSR 分子标记构建了包括宁杞 1 号在内的 17 个枸杞种质材料 DNA 指纹图谱,对未来鉴定枸杞品种纯度和真实性、构建遗传连锁图谱、QTL 定位等方面的研究中具有重要意义。

参考文献

- [1] 路安民. 中国枸杞属的分类[M]. 银川:宁夏人民出版社,1999.
- [2] 钟肇元. 枸杞高产栽培技术[M]. 北京:金盾出版社,2005.
- [3] 秦国峰. 枸杞是我国重要的经济植物资源[M]. 银川:宁夏人民出版社,1982.
- [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.
- [5] 尚洁,李收,张靠稳. 宁夏枸杞遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 植物研究,2010(1):116-119.
- [6] Zhang Y B, Leung H W, Yeung H W, et al. Differentiation of *Lycium barbarum* from its related *Lycium* species using random amplified polymorphic DNA[J]. *Planta Medica*, 2001, 67(4):379-381.
- [7] 严奉坤,许兴,魏玉清,等. 枸杞基因组 DNA 提取及指纹图谱分析[J]. 时珍国医国药,2007,18(1):46-48.
- [8] 严奉坤,许兴,杨亚亚,等. 同一品种不同产地宁夏枸杞 DNA 指纹图谱特征研究[J]. 时珍国医国药,2007,18(10):2385-2386.
- [9] 王娅丽,王锦秀,常红宇. 鲜食枸杞新品种“宁杞 6 号”[J]. 园艺学报,2011,38(5):1015-1016.
- [10] 李健,王锦秀. 无籽枸杞新品种选育研究[J]. 西北植物学报,2001,21(3):446-450.
- [11] Zhang Z S, Xiao Y H, Luo M, et al. Construction of a genetic linkage map and QTL analysis of fiber-related traits in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. *Euphytica*, 2005, 144:91-99.
- [12] 曹永生,孔繁胜,王宇生. 基于图象处理的种质资源指纹图谱分析[EB/OL]. 中国作物种质信息网. <http://icgr.caas.net.cn/training/forum/>, 基于图象处理的种质资源指纹图谱分析. html.
- [13] 丁艳来,赵团结,盖钧镒. 中国野生大豆的遗传多样性和生态特异性分析[J]. 生物多样性,2008,16(2):133-142.
- [14] 李瑞芬,李聪. 沙打旺种质资源遗传多样性 RAPD 分析[J]. 草地学报,2001,9(3):171-175.
- [15] 河北枸杞主产地-巨鹿县[EB/OL]. 产地网. <http://www.chandi.cn/chandi/detail/37.html>.
- [16] 高捍东,黄宝龙. 板栗主要栽培品种的分子鉴别[J]. 林业科学,2001,37(1):64-71.
- [17] 缪恒彬,陈发棣,赵宏波,等. 应用 ISSR 对 25 个小菊品种进行遗传多样性分析及指纹图谱构建[J]. 中国农业科学,2008(11):3735-3740.
- [18] 雷天刚,何永睿,吴鑫,等. 柑橘栽培品种(系)DNA 指纹图谱库的构建[J]. 中国农业科学,2009,42(8):2852-2861.
- [19] 潘兆娥,王希文,孙君灵,等. 中棉所 48 的 SSR 数字指纹图谱的构建[J]. 中国农学通报,2010(7):31-35.
- [20] 李丽华,魏昕,潘光堂. 20 个骨干玉米自交系的 SSR 指纹图谱构建[J]. 西南农业学报,2008,20(6):1172-1175.
- [21] 徐宗大,赵兰勇,张玲,等. 玫瑰 SRAP 遗传多样性分析与品种指纹图谱构建[J]. 中国农业科学,2011,44(8):1662-1669.
- [22] 关强,张月学,徐香玲,等. DNA 分子标记的研究进展及几种新型分子标记技术[J]. 黑龙江农业科学,2008(1):102-104.
- [23] 魏玉清,许兴,王璞. 不同地区主要栽培宁夏枸杞品种的 RAPD 分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2007(1):91-95.
- [24] Litt M. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of dinucleotide repeats within the cardiac muscle actin gene[J]. *Am J Hum Gene*, 1998, 44:397-401.
- [25] 郝晨阳,王兰芬,张学勇,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.
- [26] 李晓辉,李新海,张世煌,等. 玉米杂交种 DNA 指纹图谱及其在亲子鉴定中的应用[J]. 作物学报,2005(3):1-8.

Analysis of Genetic Diversity and Construction of Fingerprint of *Lycium barbarum* L. Using SSR Technology

SHAO Qian-shun¹, GAO Lei¹, NAN Xiong-xiong¹, XU Mei-long², LI Yong-hua¹, WANG Jin-xiu¹

(1. Combined National and Provincial Center of Engineering and Research for Cultivation and Utilization of Northwestem Special Economical Forestry, Yinchuan, Ningxia 750004; 2. Wolfberry Engineering and Technology Research Center of State Forestry Administration, Ningxia Forestry Institute, Yinchuan, Ningxia 750004)

Abstract: Genetic diversity of Ningxia wolfberry series varieties and other Chinese wolfberry species/varieties and wild type were analyzed using Simple Repeat sequences (SSR) technology with 17 wolfberry germplasm, also their fingerprint map was constructed for the first time. The results showed that 17 Chinese wolfberry germplasm was checked with 15 pairs of SSR primers, and 91 polymorphic loci of 109 loci were obtained, the proportion of polymorphism was 83.4%; the average diversity index *H* of 17 germplasm was 0.1943, the Shannon information index *I* was 0.3108; the Nei's diversity index *H* of 10 ningxia wolfberry cultivars was 0.0962, the Shannon information index *I* was 0.1537; the Nei's diversity index *H* of 7 wild germplasm was 0.2004, Shannon information index *I* was 0.3130. It's proved that the diversity of the not cultivated wolfberry was richer than that of cultivated varieties. The fingerprint map of 17 Chinese wolfberry germplasm was constructed with four pairs of primers. Our study laid a solid foundation for the identification of Chinese wolfberry species and the construction of genetic map.

Keywords: *Lycium barbarum* L.; SSR; genetic diversity; fingerprint map