

我国紫薇属植物 AFLP 分子标记体系的优化

顾翠花¹, 王守先², 张启翔³

(1. 北京林业大学 园林学院, 北京 100083; 2. 浙江林学院 信息工程学院, 浙江 临安 311300;

3. 北京林业大学 国家花卉工程技术中心, 北京 100083)

摘要: 以采自广西、云南和河南等地的紫薇属 *Lagerstroemia* 植物紫薇 *L. indica*, 南紫薇 *L. subcostata*, 福建紫薇 *L. limii* 和桂林紫薇 *L. guilinensis* 叶片为材料, 利用改良 CTAB (十六烷基三甲基溴化铵) 法提取叶片基因组 DNA, 获得了高质量的紫薇叶片 DNA, 并以其基因组 DNA 为模板进行了酶切连接, 利用酶切连接的产物稀释一定倍数作为预扩增的模板, 最后以稀释一定倍数的预扩增产物进行选择性的扩增, 进行紫薇和南紫薇的 AFLP (扩增片段长度多态性) 银染反应体系的优化。AFLP 体系中每一步反应都设置了不同的反应体系, 采用了 160 对引物作为初选引物, 筛选出了 10 对适合紫薇基因组扩增的引物。结果表明, 适宜紫薇基因组扩增的最佳酶切、预扩增和选择性扩增体系为: 酶切连接体系 1; 预扩体系 3; 选扩体系 3, 反应体系中 Mg^{2+} 质量浓度为 $1.2 \times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时扩增效果较好。图 1 表 7 参 20

关键词: 植物学; 紫薇; DNA 提取; AFLP; 分子标记

中图分类号: S718.4

文献标志码: A

文章编号: 1000-5692(2008)03-0298-06

Optimization of AFLP molecular marker system in *Lagerstroemia* plants in China

GU Cui-hua¹, WANG Shou-xian², ZHANG Qi-xiang³

(1. College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. School of

Information Engineering, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 3. State Flower

Engineering Center, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: This study dealt with optimization of amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis based on the high quality DNA extracted by the improved cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) method from the leaves of *Lagerstroemia indica*, *L. subcostata*, *L. limii* and *L. guilinensis* which were gathered in Guangxi, Yunnan and Henan Province. And their DNA were used as the template to carry on restriction-ligase reaction, then the product was diluted the certain multiple as template to take pre-amplification, finally the product was diluted and used as template to carry on selective amplification, and the best system of restriction-ligase reaction, pre-amplification and silver staining suit for *L. indica* had been optimized. In the AFLP system each step of response had established different reacting system. The 10 pairs of primer suit for *L. indica* were selected from 160 pairs of elementary primer. The result indicated that, the best systems suitable for the *Lagerstroemia* gene group were as follows: restriction-ligase reaction system 1; pre-amplification system 3; selective amplification system 3, in reacting system the best Mg^{2+} concentration was $1.2 \times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$. [Ch, 1 fig. 7 tab. 20 ref.]

Key words: botany; *Lagerstroemia*; DNA extraction; amplified fragment length polymorphism (AFLP); molecular marker

紫薇 *Lagerstroemia* spp. 是我国夏季主要的观花小乔木^[1], 枝干光滑, 枝条柔软, 花色艳丽多彩, 花朵繁茂, 且在群花凋谢时开放, 花期长约 3 个月, 有时甚至达 5 个月, 正大量地应用于园林绿化

收稿日期: 2007-04-09; 修回日期: 2007-10-09

基金项目: “十一五” 国家科技攻关计划项目(2004BA525B11)

作者简介: 顾翠花, 博士研究生, 从事园林植物遗传育种研究。E-mail: gchwsx11@126.com。通信作者: 张启翔, 教授, 博士生导师, 从事园林植物遗传育种研究。E-mail: zqx@bjfu.edu.cn

中^[2]。但其分子方面的研究在我国才刚刚起步, 利用 AFLP (扩增片段长度多态性) 技术对紫薇的研究还不成熟。笔者拟主要对紫薇 AFLP 反应体系进行优化, 以期为后续进一步的紫薇基因研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

紫薇属植物样品采自广西、云南和河南等地, 包括紫薇 *Lagerstroemia indica*, 南紫薇 *L. subcostata*, 福建紫薇 *L. limii* 和桂林紫薇 *L. guilinensis*, 于 2006 年 6–8 月取幼嫩叶片放置在 10 倍于其体积的硅胶中干燥后, 置室温保存备用, 或用冰盒保存后迅速放到 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中, 实验时取出。

1.2 方法

1.2.1 紫薇模板 DNA 的制备 实验采用 3 种方法提取紫薇 DNA, 其中 CTAB (十六烷基三甲基溴化铵) 法和 SDS (十二烷基磺酸钠) 法分别参照文献[3]和文献[4]进行操作。改良 CTAB 法具体操作步骤如下: ①在研钵中加入干燥叶片, 研磨成粉末状, 分装到 $2 \times 10^{-3}\text{ L}$ 离心管中, 分别加入 $7 \times 10^{-4}\text{ L}$ CTAB $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预热, 缓冲液与 $7 \times 10^{-6}\text{ L}$ β -巯基乙醇充分混匀。② $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h 冷却后加入 $7 \times 10^{-4}\text{ L}$ 25:24:1 = 酚: 氯仿: 异戊醇, 混匀, 静置 15 min, $1.3 \times 10^4\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 $5 \times 10^{-4}\text{ L}$ 。在上清液中加入 $5 \times 10^{-4}\text{ L}$ 24:1 = 氯仿: 异戊醇, 混匀, 静置 15 min, $1.3 \times 10^4\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 $3 \times 10^{-4}\text{ L}$, 加入预冷异丙醇 $2 \times 10^{-4}\text{ L}$ 混匀。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min 以上沉淀 DNA。 $1.3 \times 10^4\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清后用体积分数为 70% 乙醇洗涤沉淀 3 次, 烘干, 让异丙醇和乙醇挥发干净。③加入 $1 \times 10^{-4}\text{ L}$ ddH₂O (含 $1 \times 10^{-11}\text{ L}$ RNase) 溶解 DNA, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h 去除 RNA。④加入 $1 \times 10^{-4}\text{ L}$ 24:1 = 氯仿: 异戊醇去除残存蛋白和 RNA 酶, $1.3 \times 10^4\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 $8 \times 10^{-5}\text{ L}$ 加入 $1.5 \times 10^{-9}\text{ L}$ 有 $1 \times 10^{-4}\text{ L}$ 预冷异丙醇的离心管中混匀, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min 沉淀 DNA, $1.3 \times 10^4\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清液, 用无水乙醇洗涤沉淀 2 次, 吹干 DNA, 让异丙醇和乙醇挥发干净。⑤加入 $5 \times 10^{-5}\text{ L}$ ddH₂O 溶解 DNA, 经检测后将它 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存或放入 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 待用。

1.2.2 DNA 浓度与质量测定 用 BioRAD Smartspec MT 3000 紫外分光光度仪测定样品光密度值, 以 $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶检测 DNA 主带质量: $5 \times 10^{-6}\text{ L}$ DNA 样品 + $1 \times 10^{-6}\text{ L}$ 溴酚蓝上样缓冲液, 加样于含溴化乙锭 (EB) 凝胶上 80 V 恒压下电泳 30~40 min, 在紫外凝胶成像系统下观察摄像^[5]。

1.2.3 酶切连接 实验采用 *Mse*I 和 *Eco*RI 等 2 种限制性内切酶进行双酶切, 然后用 T₄ DNA 连接酶, 将 *Mse*I 和 *Eco*RI 接头与酶切片断连接起来, 酶切连接一步在 PCR 仪上 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 3 h 完成。构建成预扩增模板 DNA, 该模板可用于扩增反应。该实验采用 4 种酶切连接体系, 每个酶切连接反应体系为 $5 \times 10^{-5}\text{ L}$ (表 1)。

表 1 酶切连接体系

Table 1 Systems of restriction-ligase reaction

反应成分	体系 1	体系 2	体系 3	体系 4
模板 DNA ($1 \times 10^{-10} \sim 5 \times 10^{-10}\text{ kg}$) /L	5.00×10^{-6}	5.00×10^{-6}	5.00×10^{-6}	5.00×10^{-6}
$1.667 \times 10^{-5}\text{ kat}$ <i>Eco</i> RI/L	0.50	0.25	0.50	0.25
$1.667 \times 10^{-5}\text{ kat}$ <i>Mse</i> I/L	0.50	0.25	0.50	0.25
$5 \times 10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ <i>Eco</i> RI adaptor/L	1.00×10^{-6}	1.00×10^{-6}	1.00×10^{-6}	1.00×10^{-6}
$5 \times 10^{-5}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ <i>Mse</i> I adaptor/L	1.00×10^{-5}	1.00×10^{-5}	1.00×10^{-5}	1.00×10^{-5}
$10\text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP/L	1.00×10^{-6}	1.00×10^{-6}	1.00×10^{-6}	1.00×10^{-6}
$10 \times \text{NEB buffer 2}$ 缓冲液/L	5.00×10^{-6}	5.00×10^{-6}	5.00×10^{-6}	5.00×10^{-6}
$16.67 \times 10^{-9}\text{ kat}$ T ₄ DNA 连接酶/L	1.00×10^{-6}	1.00×10^{-6}	0.50×10^{-6}	0.50×10^{-6}
$1 \times 10^{-5}\text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA/L	0.25×10^{-6}	0.25×10^{-6}	0.25×10^{-6}	0.25×10^{-6}
ddH ₂ O /L	34.75×10^{-6}	35.25×10^{-6}	35.25×10^{-6}	35.25×10^{-6}

1.2.4 预扩增 由于 Mg^{2+} 能与 dNTPs (三碳酸脒氧核糖核苷酸) 结合而影响 PCR (聚合酶链式反应) 反应液中游离的 Mg^{2+} 质量浓度^[6], 因而 MgCl_2 质量浓度在不同反应体系中应适当调整, 优化质量浓度。一般反应中 Mg^{2+} 质量浓度至少应比 dNTP 总质量浓度高 $0.5 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[7]。为了探讨紫薇的最佳预扩增体系, 本实验预扩体系 (每个预扩增反应体系为 $2 \times 10^{-5} \text{ L}$) 有 4 种方案(表 2)。

表 2 预扩增体系方案
Table 2 Systems of pre-amplification

反应成分	体系 1	体系 2	体系 3	体系 4
酶切连接后模板 DNA/L	5.0×10^{-6}	5.0×10^{-6}	5.0×10^{-6}	5.0×10^{-6}
$5 \times 10^{-5} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ <i>Eco</i> RI primer/L	0.6×10^{-6}	0.6×10^{-6}	0.6×10^{-6}	0.6×10^{-6}
$5 \times 10^{-5} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ <i>Mse</i> I primer/L	0.6×10^{-6}	0.6×10^{-6}	0.6×10^{-6}	0.6×10^{-6}
$10^{-5} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs/L	0.4×10^{-6}	0.4×10^{-6}	0.4×10^{-6}	0.4×10^{-6}
$2.5 \times 10^{-7} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Mg}^{2+} / \text{L}$	1.0×10^{-6}	1.1×10^{-6}	1.2×10^{-6}	1.3×10^{-6}
$10 \times \text{PCR buffer/L}$	2.0×10^{-6}	2.0×10^{-6}	2.0×10^{-6}	2.0×10^{-6}
$9.165 \times 10^{-11} \text{ kat Taq polymerase/L}$	0.2×10^{-6}	0.2×10^{-6}	0.2×10^{-6}	0.2×10^{-6}
ddH ₂ O/L	10.2×10^{-6}	10.1×10^{-6}	10.0×10^{-6}	9.9×10^{-6}

说明: 预扩增 PCR 反应程序: 94 ℃, 30 s; 56 ℃, 30 s; 72 ℃, 60 s, 共 24 个循环。

1.2.5 选择性扩增 本实验的选扩体系 (每个选扩反应体系为 $2 \times 10^{-5} \text{ L}$) 也采用 4 种方案(表 3)。

表 3 选扩体系方案
Table 3 Systems of selective amplification

反应成分	体系 1	体系 2	体系 3	体系 4
预扩产物 10 倍稀释模板/L	5.0×10^{-6}	5.0×10^{-6}	5.0×10^{-6}	5.0×10^{-6}
$5 \times 10^{-5} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ <i>Mse</i> I primer/L	1.0×10^{-6}	1.0×10^{-6}	1.0×10^{-6}	1.0×10^{-6}
$5 \times 10^{-5} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ <i>Eco</i> RI primer/L	1.0×10^{-6}	1.0×10^{-6}	1.0×10^{-6}	1.0×10^{-6}
$10^{-5} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs/L	0.4×10^{-6}	0.4×10^{-6}	0.4×10^{-6}	0.4×10^{-6}
$2.5 \times 10^{-7} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Mg}^{2+} / \text{L}$	1.0×10^{-6}	1.1×10^{-6}	1.2×10^{-6}	1.3×10^{-6}
$10 \times \text{PCR buffer/L}$	2.0×10^{-6}	2.0×10^{-6}	2.0×10^{-6}	2.0×10^{-6}
$9.165 \times 10^{-11} \text{ kat Taq polymerase/L}$	0.2×10^{-6}	0.2×10^{-6}	0.2×10^{-6}	0.2×10^{-6}
ddH ₂ O/L	9.4×10^{-6}	9.3×10^{-6}	9.2×10^{-6}	9.1×10^{-6}

说明: 选择性扩增 PCR 反应程序: 梯度 PCR (12 个循环): 94 ℃, 变性 30 s; 65 ~ 56 ℃, 退火 30 s, 每个循环降温 0.7 ℃; 72 ℃, 延伸 60 s; 接着进行下列 24 个循环: 94 ℃, 变性 30 s; 56 ℃, 退火 30 s; 72 ℃, 延伸 60 s。

1.2.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染检测 反应结束后在 $2 \times 10^{-5} \text{ L}$ 反应体系中加入 $5 \times 10^{-6} \text{ L}$ 加样缓冲液, 95 ℃ 变性 8 min 后迅速放于冰上, 然后置于 -20 ℃ 用于电泳检测。本实验采用聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染进行检测。银染后的胶板晾干后在 X 线胶片灯下观察, 选择那些条带清晰、易计数的引物作为 AFLP 反应的适宜引物^[8]。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取结果与检测

实验采用 3 种方法均能提取紫薇基因组 DNA。但从表 4 和图 1 可以看出, 采用改良 CTAB 法提取的紫薇基因组 DNA, 其光密度值 A_{260} /光密度值 A_{280} 比值为 1.8 左右, 表明蛋白质等杂质去除较干净,

DNA 纯度较高；用 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶检测，提取的 DNA 不含 RNA，无降解，点样孔干净，纯度符合 AFLP 分析要求。SDS 法和 CTAB 法所获得的 DNA，光密度值 A_{260} /光密度值 A_{280} 偏低，DNA 样品受蛋白污染较严重，电泳结果为点样孔发亮，CTAB 法提取的 DNA 有轻微降解^[9]。作者认为，改良 CTAB 法最适合紫薇基因组提取。采用改良 CTAB 法对 4 个紫薇种的成熟叶和嫩叶进行了 DNA 提取，琼脂糖凝胶结果表明嫩叶提取 DNA 质量和纯度明显高于成熟叶。由方差分析结果(表 5)和 LSD 法多重比较结果(表 6)可以看出，改良的 CTAB 法达 0.05 的显著水平，因此，此法效果明显优于其他 2 种方法。

表 4 不同提取方法所得紫薇 DNA 检测结果显著性差异分析

Table 4 The significance testing results of *Lagerstroemia* spp. leaves by different methods of DNA extraction

样品	改良 CTAB 法 DNA 质量 浓度/ ($\text{kg}\cdot\text{L}^{-1}$)	CTAB 法 DNA 质量 浓度/ ($\text{kg}\cdot\text{L}^{-1}$)	SDS 法 DNA 质量 浓度/ ($\text{kg}\cdot\text{L}^{-1}$)
紫薇	3.068×10^{-3}	2.152×10^{-3}	2.626×10^{-3}
南紫薇	5.569×10^{-3}	4.042×10^{-3}	2.348×10^{-3}
福建紫薇	1.872×10^{-3}	2.712×10^{-3}	3.016×10^{-3}
桂林紫薇	2.380×10^{-3}	3.006×10^{-3}	4.979×10^{-3}

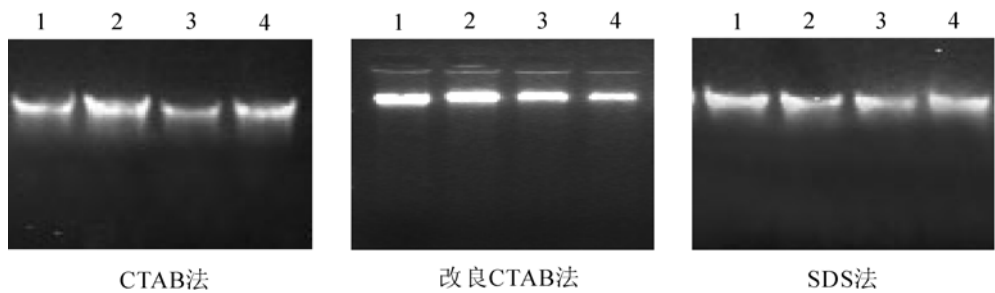


图 1 不同提取方法提取紫薇 DNA 的琼脂糖凝胶电泳结果

Figure 1 DNA electropherograms of different methods of *Lagerstroemia* spp. DNA extraction

表 5 3 种方法得到的 DNA 检测结果方差分析表

Table 5 Table of variance analysis of results by three methods

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著水平
处理间	7.028 5	2	3.514 2	4.308	0.048 7
处理内	7.341 1	9	0.815 7		
总变异	14.369 6	11			

表 6 LSD 法多重比较 3 种提取方法

Table 6 The LSD law multiple comparison of three methods

处理	均值	5% 显著水平	1% 极显著水平
CTAB 法	4.158	a	A
改良 CTAB 法	2.978	ab	A
SDS 法	2.306	b	A

2.2 紫薇 AFLP 最佳反应体系的建立

酶切连接是否完全直接影响实验结果的正确性^[10]，非完全酶切必然造成相应指纹片断的缺失，得出不完整的片断信息导致失真，同时也会使大片段增多不便于数带。酶切时间也不能过长，否则会出现 DNA 部分降解，造成小片段过多^[11]。因此，本实验采用了 4 种方案来对酶切反应体系进行优化，酶切连接产物经凝胶电泳检测可知体系 1 的效果较好，在凝胶上呈现均匀弥散。

预扩增：这一步所用引物不带选择性碱基，通过扩增达到富集 DNA 的目的，同时通过预扩增产物检测酶切连接效果^[12]。如果前几步反应完全，则预扩增后 DNA 片断多，在胶上可以看到长而均匀的条带；若扩增片断少，且集中分布于较小的碱基数值范围内，则说明限制性双酶切不完全^[13]。这样的预扩增产物不适合进行下一步反应。因此，本实验亦采用 4 种方案来探讨适于紫薇预扩增的最佳

反应体系。预扩增产物经凝胶电泳检测发现体系3的效果较好。

选择性扩增：这一步反应与预扩增一样，所不同的是选用的引物带有1~3个选择碱基。该步骤的影响因子均与一般PCR反应相同，其中 Mg^{2+} 的质量浓度和 Taq 酶的质量和浓度是最主要的影响因子^[14]。本实验对最适于紫薇扩增的 Mg^{2+} 质量浓度进行了摸索，发现 Mg^{2+} 质量浓度为 $1.2 \times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时扩增效果较好。

2.3 AFLP 引物筛选分析

AFLP技术与RAPD技术一样用的是通用型引物，但不是所有引物组合都能很好地扩增并且多态性高，不同引物组合对扩增条带有明显影响^[15]。因此，具体到某一材料，应根据基因组的具体情况筛选选择性引物组合^[16]。

由于缺乏有关紫薇基因组信息资料，所以选用了如下引物筛选策略：“2+2”，“2+3”，“3+2”和“3+3”，每个引物组合都选择若干对。选择紫薇和南紫薇为试材筛选引物，共筛选引物组合160对，以确定合适引物。从160对AFLP引物中筛选出10对多态性较高，带型质量较好，分辨率较高的引物。其引物序号分别为：M64E94，M23E46，M23E47，M24E46，M24E75，M25E46，M25E47，M41E47和M41E94，M64E46（表7）。由引物筛选结果可知，“2+2”引物组合条带较少，多态性不丰富，“3+3”和“3+2”引物组合产生条带较多，不利于统计，而“2+3”的引物组合产生的条带粗细适中，多态性强分辨率高且条带分布均匀。因此本实验主要选取具有2个选择性核苷酸与3个选择性核苷酸的引物组合。从引物筛选实验中还可看出，预扩增产物稀释倍数（本实验设置了0，5，10，20倍4个稀释梯度）对选择性扩增没有太大影响。

3 讨论

AFLP技术结合了RFLP（限制性片段长度多态性）和RAPD（随机扩增多态性DNA）技术的优点^[17]，它既有RFLP的高度稳定性，又具有RAPD的多态性高的特点^[18]，这两个突出特点在本实验中得到充分验证，但AFLP操作过程繁琐，所用药品和仪器较多，每一步反应都密切相关，其中DNA提取这步是整个实验关键所在^[19]。紫薇叶片含糖相对较多，这在某种程度上增加了紫薇叶片DNA的提取难度。由于北京现无紫薇种质资源圃，从外地采样再带回北京的叶片其DNA提取的质量稍差于新鲜叶片，因此，采用何种方法提取DNA把这种差别降到最小，是紫薇DNA提取的关键。本实验在提取DNA的过程中，采用2次抽提来充分去除直接影响扩增中 Taq 酶活性的氯仿和异戊醇等物质，在去除RNA后，增加一次抽提，以去除残存的RNA酶蛋白，保证DNA的高纯度。

多态性和稳定性好的引物是决定扩增成败的关键^[20]，尤其是种内的扩增，因为种内的个体除自然变异外基因型没有太大差异，所以没有多态性强、稳定性好的引物很难区别个体内的差异，需要在大量引物中筛选才能得到理想结果。本实验采用160对引物作初选引物，筛选出10对适合紫薇基因组扩增的引物，同时又摸索出适宜紫薇基因扩增的最佳酶切、预扩增和选扩体系，所有这些工作都为今后进行紫薇品种分子鉴定和紫薇野生居群遗传多样性分析提供了有益资料。

表7 引物序列与扩增结果

Table 7 Sequences and amplification results of twenty primers

引物序号	选择碱基	扩增位点/ 个	多态性位点/ 个	多态性位点 比例/%
64-94	GAC-TTT	47	28	59.5
23-46	TA-ATT	40	22	55.0
23-47	TA-CAA	32	20	63.6
24-46	TC-CAA	44	27	61.3
24-75	TC-GTA	52	31	59.6
25-46	TG-ATT	41	24	59.1
25-47	TG-CAA	39	23	57.8
41-47	AGG-CAA	56	31	54.9
41-94	AGG-TTT	34	21	61.7
64-46	GAC-ATT	38	21	55.3

参考文献：

- [1] 陈俊愉. 中国花卉品种分类学[M]. 北京：中国林业出版社，2001：162 – 171.
- [2] 张启翔. 紫薇品种分类及其在园林中的应用[J]. 北京林业大学学报，1991，**13** (4)：57 – 66.
- [3] TAI T H, TANKSEY D D. Rapid isolation of total DNA from dehydrated plant tissue [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1990, **8** (4)：229 – 303.
- [4] PICH C. Schubert method for isolation of DNA form plants with a high content of polyphenolies [J]. *Nucleic Res*, 1993, **21** (14)：3 328 – 3 332.
- [5] 祝军, 王涛, 赵玉军, 等. 应用 AFLP 分子标记鉴定苹果品种[J]. 园艺学报, 2000, **27** (2)：102 – 106.
- [6] 明军. 梅花 DNA 指纹图谱的建立与研究[D]. 北京：北京林业大学，2002.
- [7] 张军丽, 王峥峰, 王伯荪, 等. 鹤山人工林大叶相思种群遗传结构的 AFLP 分析[J]. 应用生态学报, 2001, **12** (4)：491 – 495.
- [8] 段会军, 马峙英, 张彩英, 等. 西瓜品种间亲缘关系的 AFLP 分析[J]. 河北农业大学学报, 2007, **30** (1)：27 – 30.
- [9] 邹喻苹, 葛颂. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京：科学出版社，2001：190 – 192.
- [10] 孙德岭, 赵前程, 宋文芹, 等. 白菜类蔬菜亲缘关系的 AFLP 分析[J]. 园艺学报, 2001, **28** (4)：331 – 335.
- [11] 周春玲, 戴思兰. 菊属部分植物的 AFLP 分析[J]. 北京林业大学学报, 2002, **24** (5 – 6)：71 – 76.
- [12] 李鸣, 谭裕模, 李杨瑞, 等. 甘蔗品种遗传差异的 AFLP 分子标记分析[J]. 作物学报, 2004, **30** (10)：1 008 – 1 013.
- [13] 施修杰, 张治明. 紫薇种质资源的数量研究[J]. 植物引种驯化集刊, 1997 (11)：81 – 93.
- [14] 唐绍清, 杜林方, 王燕. 山茶属金花茶组金花茶系的 AFLP 分析[J]. 武汉植物学研究, 2004, **22** (1)：44 – 48.
- [15] 田清震. 中国野生大与栽培大豆 AFLP 指纹分析[D]. 南京：南京农业大学，2000.
- [16] 王金刚, 车代弟, 沈能展. 唐菖蒲 RAPD 分析体系的优化研究[J]. 齐齐哈尔大学学报, 2002, **18** (1)：38 – 41.
- [17] 王晓梅, 宋文芹, 刘松, 等. 利用 AFLP 技术筛选与银杏性别相关的分子标记[J]. 南开大学学报：自然科学版, 2001, **34** (1)：5 – 9.
- [18] 袁涛. 中国牡丹部分种与品种(群)亲缘关系的研究[D]. 北京：北京林业大学，1998.
- [19] 张德强, 毛白杨. 遗传连锁图谱的构建及重要性状的分子标记[D]. 北京：北京林业大学，2002.
- [20] 龚俊杰. 猕猴桃属植物 AFLP 分析及其系统发育关系的研究[D]. 武汉：华中农业大学，2003.