

基于简化基因组技术的啤酒花栽培种和野生种 SNP 位点开发及遗传结构分析

赵亚琴¹, 樊丛照¹, 张际昭¹, 邱远金¹, 辛海量², 李晓瑾¹, 张本刚³, 王果平^{1*}

1. 新疆中药民族药研究所, 新疆 乌鲁木齐 830002

2. 第二军医大学, 上海 200433

3. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193

摘要: **目的** 为揭示新疆啤酒花 *Humulus lupulus* 野生与栽培个体间的遗传关系、遗传结构及野生资源的遗传潜力。**方法** 利用 SLAF-seq 简化基因组测序技术, 对新疆 20 个野生个体和 18 个栽培个体的 SNP 位点进行了开发与鉴定。利用系统发育分析、群体遗传结构分析和主成分分析 (principal component analysis, PCA) 等方法, 从基因组水平揭示了野生种与栽培种之间的遗传结构。**结果** 结果表明, 通过 SLAF-seq 测序共获得 863 228 个 SLAF 标签, 其中多态性 SLAF 标签有 443 922 个, 共获得 2 867 140 个 SNP 位点。系统发育分析表明, 野生个体和栽培个体整体上可各自分为 2 个聚类簇。总的 Shannon-Wiener 指数平均为 0.397, 其中野生个体为 0.455, 栽培个体为 0.398; 总的 Nei 多样性指数平均为 0.249, 其中野生个体为 0.293, 栽培个体为 0.250。AMOVA 分析表明, 啤酒花的主要遗传变异主要来源于群体间, 野生个体与栽培个体之间具有较大的遗传分化。**结论** 新疆分布的野生啤酒花个体与栽培个体之间存在较大的遗传分化, 但是野生啤酒花个体具有较高的遗传多样性, 说明新疆啤酒花的野生资源具有较高的遗传育种潜力。

关键词: 啤酒花; 简化基因组测序技术; SLAF-seq; 野生个体; 栽培个体; 遗传结构

中图分类号: R286.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)20-6365-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.20.027

SNP loci development and genetic structure of cultivated and wild individuals of *Humulus lupulus* using SLAF-seq

ZHAO Ya-qin¹, FAN Cong-zhao¹, ZHANG Ji-zhao¹, QIU Yuan-jin¹, XIN Hai-liang², LI Xiao-jin¹, ZHANG Ben-gang³, WANG Guo-ping¹

1. Xinjiang Institute of Chinese Materia Medica, Urumqi 830002, China

2. Second Military Medical University of Chinese People's Liberation Army, Shanghai 200433, China

3. Institute of Medicinal Plant Development, Beijing 100193, China

Abstract: Objective In order to uncover the genetic relationship and structure between wild and cultivated individuals and the genetic potential of wild resources of *Humulus lupulus* in Xinjiang Province. **Methods** A large number of SNP loci developed from 20 wild individuals and 18 cultivated individuals in Xinjiang were identified based on SALF-seq simplified genomic technology. From the filtered SNPs, the phylogenetic analysis, population genetic structure, and principal component analysis (PCA) were used to reveal the genetic structure between wild and cultivated species at the whole genome level. **Results** The results showed that 863 228 SLAF tags were obtained, including 443 922 polymorphic SLAF tags. Through sequence analysis, 2 867 140 SNPs were obtained. Phylogenetic analysis showed that the vast majority of wild individuals and cultivated individuals can be grouped into two categories. The average Shannon Wiener index of *H. lupulus* was 0.397, the wild group was 0.455, the cultivated group was 0.398; and the average Nei diversity index was 0.249, the wild group was 0.293, the cultivated group was 0.250. The AMOVA showed the main genetic variation of *H. lupulus* be observed between groups. **Conclusion** There is a large genetic differentiation between wild *H. lupulus* and cultivated species in Xinjiang, but the individual of wild *H. lupulus* has high genetic diversity, which indicates that the wild resources of *H. lupulus* in Xinjiang have high genetic breeding potential.

Key words: *Humulus lupulus* L.; simplified genome sequencing technology; SLAF-seq; wild species; cultivated species; genetic structure

收稿日期: 2021-02-06

基金项目: 国家自然科学基金地方联合基金资助项目 (U1603283); 自治区引进高层次人才天池计划 (2016, 张本刚)

作者简介: 赵亚琴 (1989—), 女, 硕士, 研究方向为药用植物资源开发与应用。Tel: 18599092396 E-mail: 836489660@qq.com

*通信作者: 王果平, 研究员, 主要从事植物资源与分类。E-mail: ping112_003@163.com

啤酒花 *Humulus lupulus* L. 隶属桑科 (Moraceae) 葎草属 *Humulus* L., 是新疆特色的药食同源植物, 其体内含有的树脂类、黄酮类、黄腐酚等化学成分具有抗病毒、抗氧化等药用价值, 同时啤酒花也是生产啤酒的基本原料, 在保持啤酒风味及延长啤酒保质期等方面发挥着重要的经济价值^[1-2]。野生啤酒花主要分布在新疆阿勒泰地区的额尔齐斯河及其分支流域, 如桦树森林公园、哈巴河、布尔津、塔城地区和伊犁地区^[3]。目前, 在全国各地均有商业化种植。新疆不仅是啤酒花的原产地之一, 也是我国啤酒花的主要产区, 但据调查, 目前新疆栽培种植的啤酒花主要是美国和日本引进的品种, 在生产上存在品种单一、病虫害严重等问题^[2]。为培育本土品种, 实现本地资源利用的最大化, 探究新疆野生资源的遗传多样性及其与外来品种之间的遗传差异性, 有助于了解新疆本地野生资源的遗传潜力, 为其遗传育种提供理论指导。目前对啤酒花遗传特性的研究相对较少^[5-6], 特别是对其遗传背景、新疆野生种与栽培种的关系等方面的研究, 野生资源遗传信息的缺乏也成为制约其遗传育种的瓶颈。有研究表明, 野生个体和栽培个体的遗传多样性在化学成分上存在明显差异。所以探究新疆野生啤酒花植物的遗传特征, 明晰栽培个体与野生个体之间的遗传背景及其遗传关系, 对培育地方品种、加强野生资源的利用具有重要意义。

随着高通量测序技术的快速发展, 基于第二代测序技术的简化基因组测序 specific-locus amplified fragment sequencing (SLAF-seq)、restriction-site associated DNA sequencing (RAD-seq)、genotyping by sequencing (GBS) 等推动了进化生物学的又一步快速发展^[7]。其中, SLAF-seq 是一种高通量、高分辨率的 SNPs 位点识别与分型技术, 是简化基因组测序的一次革命^[8-10]。SLAF-seq 技术利用生物信息学方法, 对目标物种的参考基因组进行系统分析, 设计一个合适的酶切方案, 构建 SLAF-seq 文库, 筛选出特异性长度片段, 再应用高通量测序技术获得高通量标签序列, 然后对数据分析, 获取满足要求的 SLAF 片段。这些片段可以充分代表全基因组的序列特征信息, 依据这些片段可以开发出大量的分子标记特别是单核苷酸多态 (SNP)^[11]。SLAF 测序技术具高通量、高精度、短周期等优点, 已经被运用于遗传定位、高密度遗传连锁图谱构建及不同个体间的多态性分析、系统进化和种质资源鉴定等领

域^[12-13]。本研究基于 SLAF-seq 测序技术以及获取在新疆同域分布的 20 个啤酒花的野生种及 18 个栽培个体的大量多态性 SLAF 标签, 进而开发特异性强、稳定性高的群体 SNP 位点。基于这些 SNP 位点从基因组水平明晰其野生种与栽培种之间的亲缘关系及遗传结构。旨在分析啤酒花不同个体间的遗传分化, 探讨啤酒花野生种与栽培种之间的亲缘关系, 为其野生资源育种提供科学依据。

1 材料

本研究在野生啤酒花集中分布区采集 20 个野生个体, 其中 7 份来源与阿勒泰地区, 5 份来源于塔城地区, 1 份来源于伊犁地区, 3 份来源于新源县, 4 份来源于昌吉地区; 18 个栽培个体主要来源于阿勒泰地区、昌吉地区、哈密市及南疆的焉耆县、沙雅县及喀什地区。经中国医学科学院药用植物研究所张本刚研究员鉴定为啤酒花 *H. lupulus* L.。采样过程中选择生长健壮、无病虫害的植株, 采集其幼嫩的叶片并记录经纬度, 采集的新鲜样品迅速用硅胶迅速干燥, 存放于 -80 °C 冰箱备用。

2 方法

2.1 基因组 DNA 制备

本实验采用 3×CTAB 法提取分布在 38 个地点啤酒花的总 DNA。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行电泳检测 DNA 的产量和质量, 确保所提取基因组 DNA 质量达到建库要求, 利用 Thermo 核酸检测仪 (Nanodrop 2000/2000c) 测定 DNA 的浓度^[14]。

2.2 酶切方案设计

根据已发布的啤酒花基因组信息 (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCA/000/831/365/GCA_000831365.1_hl_SW_version_1.0.fasta/GCA_000831365.1_hl_SW_version_1.0.fasta_genomic.fna.gz)。 (基因组大小 2.05 Gb, GC 含量 38.57%) 作为参考基因组, 组装出的基因组大小为 2.05 Gb, GC 含量为 38.57%。利用北京百迈客生物技术公司自主研发的酶切预测软件对参考基因组进行酶切预测, 最终选择 Rsa I 和 HaeIII 酶对基因组 DNA 酶切, 酶切片段长度在 364~414 bp 的序列定义为 SLAF 标签, SLAF 标签在基因组上基本分布均匀。最终获得酶切片段 (SLAF 标签) 数满足预期标签数^[15]。

2.3 测序及产出数据的质量分析

基于位于重复序列的酶切片段比例尽可能低, 酶切片段在基因组上尽量均匀分布, 酶切片段长度与实验体系吻合程度等原则设计酶切方案, 对检测

合格的各个地点的啤酒花个体基因组 DNA 分别进行酶切。对得到的酶切片段 (SLAF 标签) 进行 3' 端加 A 处理、连接 Dual-index 测序接头、PCR 扩增、纯化、混样、切胶选取目的片段, 文库质检合格后用 Illumina 测序平台进行测序。为评估酶切实验的准确性, 选用水稻日本晴 *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* 作为对照进行测序。对测序得到的原始数据进行识别、过滤、质检、评估等分析, 获取各个个体的序列 (reads)。

2.4 SLAF 标签和 SNP 标记的开发

利用 Dual-index^[16]对测序得到的原始数据进行识别, 得到不同个体的 reads 分离的等位基因。过滤测序 reads 的接头后, 进行测序质量和数据量的评估。通过 Control 数据评估 *RsaI* 和 *HaeIII* 酶的酶切效率, 以此判断实验过程的准确性和有效性。本试验测序产生 reads 来源于都是不同地点的啤酒花在同一限制性内切酶的作用下产生的长度相同或相近的酶切片段, 根据各个序列的相似度将 38 个个体的 reads 进行聚类, 聚类到一起的 reads 来源于同一个 SLAF 标签^[17-18]。同一 SLAF 标签在不同个体间的序列相似度远高于不同 SLAF 标签间的相似度; 在同一个 SLAF 标签中存在不同个体间序列的差异 (即有多态性), 即可定义为多态性 SLAF 标签。以每个 SLAF 标签中深度最高的序列类型作为参考序列开发全基因组范围的 SNP 标记, 对开发出的 SNP 根据完整性 > 0.5, MAF > 0.05 的标准进行筛选, 最后利用筛选出的具有代表性的高质量 SNP 进行遗传进化树分析^[19]、遗传结构分析^[20]和主成分分析 (principal component analysis, PCA)^[21]。

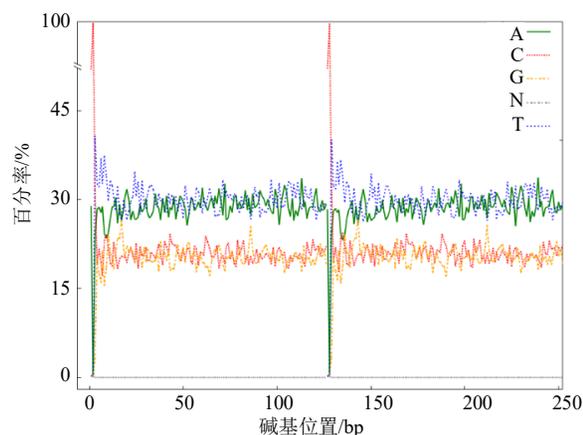
利用北京百迈客生物技术公司开发的软件计算遗传多样性, 利用 AMOVA 分析种群内、中群建和居群间的分子差异^[22]。

3 结果与分析

3.1 建库评估

SLAF-seq 测序 reads 为基因组 DNA 的酶切片段, 其碱基分布会受到酶切位点和 PCR 扩增的影响, 测序 reads 的前 2 个碱基会呈现与酶切位点一致的碱基分离, 后续碱基分布会呈现不同程度的波动 (图 1)。

结果表明本研究双端比对效率在 97.71%, 比对效率基本正常。酶切效率是评价简化基因组实验是否成功的一个关键指标。基因组上的复杂结构区域



绿色代表碱基 A, 蓝色代表碱基 T, 红色代表碱基 C, 橙色代表碱基 G, 灰色代表测序中识别不出的碱基 N
green represents A, blue represents T, red represents C, orange represents G, and gray represents not recognized N

图 1 啤酒花测序碱基分布

Fig. 1 Sequence distribution of *H. lupulus*

(如环状结构域、连续酶切位点等)、基因组 DNA 样品纯度较低、酶切时间不足等因素都可能影响限制性内切酶的活性, 导致部分酶切位点未被切开。通过统计测序 reads 插入片段中残留酶切位点的比例, 统计比例越高, 酶切效率越好。本实验中水稻日本晴数据的酶切效率为 89.92%, 双端比对效率为 97.71%, 酶切效率为 89.92%, 表明酶切反应及 SLAF 建库均为正常。

3.2 测序数据统计与评估

本研究采用读长 126 bp × 2 作为后续的数据评估和分析数据。测序质量值 (Q) 是评估高通量测序单碱基错误率的重要指标, 测序质量值越高对应的碱基测序错误率越低。如果某碱基测序出错的概率为 0.001, 则该碱基的质量值 Q 应该为 30 (Q_{30})。对 38 个地点个体的测序数据进行统计, 包括 reads 数量、 Q_{30} 和 GC 含量。测序平均 Q_{30} 为 93.42%, 平均 GC 含量为 42.53%。由于所测序列的 Q_{30} 数据较高, 表明碱基出错率很低, 测序结果可靠 (表 1)。

3.3 SLAF 标签与 SNP 标记的鉴定

通过序列分析, 从 38 个地点的啤酒花基因组中共获得了 863 228 个 SLAF 标签。标签的平均测序深度为 13.40 X, 其中, 多态性 SLAF 标签有 443 922 个, 共获得 2 867 140 个高质量的群体 SNP 标记 (表 2)。

3.4 系统发育分析

基于 2 867 140 个 SNP 位点对 38 个不同地点啤

表1 啤酒花测序质量 (Q_{30}) 及 GC 含量
Table 1 Content of Q_{30} and GC of *H. lupulus*

居群简称	个体来源	居群名称	总读取次数	GC/%	$Q_{30}/\%$
YAT	野生	新疆阿勒泰市桦林公园	6 388 241	41.06	93.59
YAT	野生	新疆阿勒泰市桦林公园	8 447 464	41.58	92.40
YCJ3	野生	新疆昌吉市军户农场	6 321 959	41.85	93.04
YEM1	野生	新疆额敏县	6 726 334	42.10	94.23
YEM2	野生	新疆额敏县	5 150 518	43.03	93.73
YFH1	野生	新疆福海县	5 193 486	43.10	93.44
YFH2	野生	新疆福海县	8 828 479	42.53	94.19
YFK2	野生	新疆阜康萨斯特	4 777 461	42.98	94.01
YFK3	野生	新疆阜康 222 团	6 497 500	43.18	94.28
YFK4	野生	新疆阜康 222 团	6 795 520	41.15	91.79
YHB	野生	新疆哈巴河县	7 515 397	40.72	92.43
YME	野生	新疆阿勒泰市云母二矿	5 875 612	41.92	94.08
YTC	野生	新疆塔城市	6 332 238	43.90	94.16
YTC1	野生	新疆新源县	4 954 352	43.95	93.96
YWQ	野生	新疆温泉县	4 229 818	43.06	93.05
YXY1	野生	新疆新源县	5 946 503	41.34	93.36
YXY2	野生	新疆新源县	5 973 561	41.26	91.94
YXY3	野生	新疆新源县	3 783 021	43.41	93.68
YYM	野生	新疆裕民县	4 786 474	41.18	93.63
YBJ	野生	新疆布尔津县	5 149 666	42.94	93.89
ZCJ1	栽培	新疆昌吉市	3 845 171	43.48	93.43
ZCJ2	栽培	新疆昌吉市	7 792 807	41.04	92.56
ZFK1	栽培	新疆阜康 222 团	4 376 372	42.76	94.12
ZHE	栽培	新疆农六师红旗农场	4 132 028	43.04	93.81
ZHF	栽培	新疆和丰县	3 793 650	43.14	93.61
ZHG	栽培	新疆霍尔果斯	3 360 185	43.52	93.62
ZHM	栽培	新疆哈密市	5 843 897	41.71	93.04
ZHY	栽培	新疆农六师红旗农场	4 192 015	43.05	93.78
ZJM	栽培	新疆吉木乃县	3 222 935	43.84	93.76
ZJS1	栽培	新疆吉木萨尔县	4 799 756	42.99	94.03
ZJS2	栽培	新疆吉木萨尔县	5 162 748	42.28	93.09
ZKS	栽培	新疆喀什市	6 479 727	41.67	93.46
ZMN	栽培	新疆玛纳斯县	7 498 075	42.69	93.41
ZQT	栽培	新疆奇台县	6 703 405	41.06	92.81
ZSW	栽培	新疆沙湾县	6 469 995	41.30	92.98
ZYM	栽培	新疆裕民县	7 065 707	42.00	93.65
ZYQ	栽培	新疆焉耆县	5 104 471	42.54	93.29
ZYS	栽培	新疆沙雅县	5 922 311	41.08	92.71

表2 啤酒花 SLAF 标签
Table 2 Label of SLAF of *H. lupulus*

居群简称	SLAF 数量	测序总深度	平均测序深度
YME	183 703	2 775 565	15.11
ZHQ	281 223	2 532 412	9.01
ZHE	288 244	2 647 442	9.18
ZJS2	282 187	3 314 051	11.74
ZSY	280 664	3 717 692	13.25
ZYQ	268 014	3 307 755	12.34
ZYM	308 399	4 517 124	14.65
ZHF	283 653	2 433 526	8.58
YBJ	244 043	3 029 822	12.42
YAG	246 172	4 002 946	16.26
ZCJ2	314 092	4 860 658	15.48
YTC1	210 423	2 428 325	11.54
ZFK1	274 767	2 792 330	10.16
YFK4	252 698	3 995 141	15.81
YFK3	280 078	4 236 983	15.13
YFK2	298 131	3 126 288	10.49
YCJ3	244 124	3 969 233	16.26
ZSW	302 688	4 065 748	13.43
ZHM	279 635	3 695 218	13.21
ZHG	272 456	2 123 532	7.79
ZCJ1	270 322	2 471 687	9.14
ZKS	303 924	4 090 880	13.46
ZQT	312 866	4 198 310	13.42
ZMN	291 303	4 877 324	16.74
YXY3	234 654	2 437 662	10.39
YHB	249 696	4 570 357	18.30
ZJS1	286 156	3 121 282	10.91
YXY1	230 494	3 727 464	16.17
YXY2	242 792	3 627 886	14.94
YEM1	245 110	4 183 933	17.07
YEM2	251 973	3 409 925	13.53
YYM	217 229	3 068 918	14.13
YWQ	237 260	2 678 577	11.29
YFH1	255 089	3 360 713	13.17
YFH2	259 617	5 729 079	22.07
YAT	279 016	5 208 257	18.67
YTC2	220 294	3 523 598	15.99
ZJM	254 924	2 067 255	8.11

酒花的野生种与栽培种进行系统发育分析, 结果表明 38 个啤酒花个体大致形成 2 个主要类群, 类群 I 包括阿勒泰地区、塔城地区、伊犁地区的 16 个野生个体, 类群 II 主要包括所有的栽培个体及阜康及昌

吉地区的 4 个野生种 (YFK2、YFK3、YCJ3、YFK4, 图 2)。聚类分析显示栽培个体与多数野生个体各自单独聚成一类, 表明栽培个体与野生个体之间的亲缘关系较远。

其中野生个体的 *Nei* 多样性指数 (0.293) 大于栽培个体 (0.250)。分子方差分析表明野生个体与栽培个体之间存在较大的遗传分化, 其遗传变异主要来源于野生个体与栽培个体之间。

4 讨论

简化基因组测序技术通过寻找合适的限制性内切酶来降低基因组的复杂程度, 可显著降低测序成本, 同时还能获得数量可观的基因组变异信息并且能有效地克服基因组复杂的问题, 已经被应用于多种植物的遗传变异研究上^[24-25]。基于 SALF-seq 简化基因组数据对啤酒花的 20 个野生个体及 18 个栽培个体的遗传结构分析表明, 野生个体与栽培个体整体上存在较明显的遗传分化, 但是在昌吉阜康区域的野生个体与栽培个体之间的遗传分化并不显著, 存在一定的基因交流。这可能与当地进行大范围的野生资源育种相关, 尤其是昌吉地区啤酒花种植面积可达 13.3 km²^[26], 大面积的栽培种植也增加了野生种之间的基因交流。

从聚类分析及 PCA 分析均表明, 绝大多数栽培个体与野生个体 (昌吉及阜康地区除外) 之间存在明显的遗传差异, 在 DNA 水平上单独聚类, 形成各自的遗传结构。其中个别野生个体与当地栽培个体具有较近的亲缘关系, 说明不同类群间, 尤其是利用野生资源育种的栽培个体和野生个体之间存在一定的基因交流。可见栽培种与野生种之间非绝对的生殖隔离, 可以通过杂交的方式获得变异植株, 实现啤酒花种质创新和遗传基础拓宽。利用遗传信息对新疆啤酒花的野生个体与栽培个体进行遗传多样性分析的报道较少, 原俊凤等^[5-6]利用分子标记技术对新疆 4 个野生居群的遗传多样性研究结果表明新疆的野生啤酒花居群具有很高的遗传多样性。本研究也发现新疆野生啤酒花个体的遗传多样性高于栽培个体, 丰富的遗传资源是野生啤酒花育种中不可或缺的宝贵资源, 同时也为新疆野生啤酒花资源的利用及本土品种的培育提供了一定的指导价值。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 刘景雪, 姜玉, 谢和辉, 等. 中药啤酒花药理作用的研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2019, 37(1): 5-8.
[2] 刘晓燕, 夏天爽, 董志敏, 等. 啤酒花抗骨质疏松的应用及展望 [J]. 药学实践杂志, 2020, 38(6): 492-495.
[3] 中国科学院 中国植物志编委会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 2010: 221.

[4] 刘玉梅. 新疆野生啤酒花的分析评价 [J]. 中国酿造, 2010, 29(3): 49-53.
[5] 原俊凤, 张霞, 王绍明. 新疆野生啤酒花群体遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 干旱区研究, 2006, 23(4): 562-567.
[6] 原俊凤. 新疆野生啤酒花遗传多样性研究 [D]. 石河子: 石河子大学, 2005.
[7] Narum S R, Buerkle C A, Davey J W, et al. Genotyping-by-sequencing in ecological and conservation genomics [J]. *Mol Ecol*, 2013, 22(11): 2841-2847.
[8] Pootakham W, Chanprasert J, Jomchai N, et al. Single nucleotide polymorphism marker development in the rubber tree, *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae) [J]. *Am J Bot*, 2011, 98(11): e337-e338.
[9] Ferguson M E, Hearne S J, Close T J, et al. Identification, validation and high-throughput genotyping of transcribed gene SNPs in cassava [J]. *Theor Appl Genet*, 2012, 124(4): 685-695.
[10] 胡亚亚, 刘兰服, 冀红柳, 等. 简化基因组测序技术研究进展 [J]. 江苏师范大学学报: 自然科学版, 2018, 36(4): 63-68.
[11] Sun X W, Liu D Y, Zhang X F, et al. SLAF-seq: An efficient method of large-scale de novo SNP discovery and genotyping using high-throughput sequencing [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58700.
[12] 苏文瑾, 赵宁, 雷剑, 等. 基于 SLAF-seq 技术的甘薯 SNP 位点开发 [J]. 中国农业科学, 2016, 49(1): 27-47.
[13] 段义忠, 王建武, 杜忠毓, 等. 基于 SLAF-seq 简化基因组技术的沙冬青 SNP 位点开发及遗传分析 [J]. 植物研究, 2018, 38(1): 141-147.
[14] Doyle J J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15.
[15] Davey J W, Cezard T, Fuentes-Utrilla P, et al. Special features of RAD Sequencing data: Implications for genotyping [J]. *Mol Ecol*, 2013, 22(11): 3151-3164.
[16] Kozich J J, Westcott S L, Baxter N T, et al. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(17): 5112-5120.
[17] Kent W J. BLAT: the BLAST-like alignment tool [J]. *Genome Res*, 2002, 12(4): 656-664.
[18] Geng X X, Jiang C H, Yang J, et al. Rapid identification of candidate genes for seed weight using the SLAF-seq method in *Brassica napus* [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147580.
[19] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum

- likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [20] Alexander D H, Novembre J, Lange K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals [J]. *Genome Res*, 2009, 19(9): 1655-1664.
- [21] de Hoon M J L, Imoto S, Nolan J, *et al*. Open source clustering software [J]. *Bioinform Oxf Engl*, 2004, 20(9): 1453-1454.
- [22] Noris G, Santana C, Herrán-Aguirre M, *et al*. Genetic diversity of great Dane breed using ten microsatellites: Impact of breeding control over the breeding line [J]. *OJGen*, 2014, 4(2): 78-86.
- [23] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Mol Biol Evol*, 1987, 4(4): 406-425.
- [24] 陶红霞. 基于 SLAF 标记的苹果遗传连锁图谱构建 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- [25] Li B, Tian L, Zhang J Y, *et al*. Construction of a high-density genetic map based on large-scale markers developed by specific length amplified fragment sequencing (SLAF-seq) and its application to QTL analysis for isoflavone content in *Glycine max* [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 1086.
- [26] 杨丽, 于琳. 奇台农场啤酒花产业发展问题及对策 [J]. *新疆农垦经济*, 2011(7): 28-31.

[责任编辑 时圣明]