



研究报告

A Letter

4 种水仙种质资源的 ISSR 和 AFLP 遗传多样性分析

曾艳^{1,2}, 周永刚³, 卞黎霞⁴, 张冬梅¹, 鲁琳², 陆颖⁵

1 上海市园林科学研究所, 上海, 200232

2 四川农业大学林学院, 成都, 611130

3 武胜县街子工业园区管理委员会, 广元, 638404

4 崇明县林业站, 上海, 200232

5 崇明县公益林管理办公室, 上海, 202150

✉ 通讯作者: zdm0512@souhu.com ✉ 作者

分子植物育种, 2011 年, 第 9 卷, 第 105 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0105

收稿日期: 2011 年 08 月 29 日

接受日期: 2011 年 09 月 26 日

发表日期: 2011 年 09 月 29 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

曾艳等, 2011. 4 种水仙种质资源的 ISSR 和 AFLP 遗传多样性分析, 分子植物育种(online) Vol.9 No.105 pp.1759-1765 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0105)

引用格式(英文):

Zeng et al., 2011, 4 Kinds of Narcissus Germplasm Resources of ISSR and AFLP Analysis of Genetic Diversity, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.9 No.105 pp. 1759-1765 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0105)

摘要 本研究对水仙属(*Narcissus*)植物的简单序列重复(ISSR-PCR)和扩增片段长度多态性(AFLP)反应体系进行了优化, 确立了水仙属植物的 ISSR-PCR 和 AFLP 的最佳反应条件。利用 AFLP 和 ISSR 分子标记手段对崇明水仙、漳州水仙、状元水仙、洋水仙种质资源遗传多样性进行了检测。结果发现: AFLP 标记多态性高于 ISSR 标记, 但并没有发现有效揭示中国水仙种群间遗传变异的特异性标记; 中国水仙与洋水仙(GS 值分别为 0.880, 0.5128)亲缘关系较远。本文还推测导致崇明水仙与漳州水仙在形态上差异的原因是表型遗传, 由地理差异造成。状元水仙是漳州水仙或崇明水仙的变种尚未得到验证。

关键词 水仙属植物; ISSR 标记; AFLP 标记; 遗传变异

4 Kinds of Narcissus Germplasm Resources of ISSR and AFLP Analysis of Genetic Diversity

Zeng Yan^{1,2}, Zhou Yonggang³, Bian Lixia⁴, Zhang Dongmei¹, Lu Lin², Lu Ying⁵

1. Shanghai Landscape Gardening Research Institute, Shanghai, 200232, P.R., China

2. Sichuan Agricultural University, Chengdu, 611130, P.R., China

3. WuSheng County Street Industrial Park Management Committee, Guangyan, 638404, P.R., China

4. Chongming Forestry Station, Shanghai, 200232, P.R., China

5. Chongming Public Welfare Forest Management Office, Shanghai, 202150, P.R., China

✉ Corresponding author, zdm0512@souhu.com; ✉ Authors

Abstract We studied the optimization of *Narcissus* genus inter-simple sequence repeat (ISSR-PCR) and amplified fragment length polymorphism (AFLP) reaction system, and established the optimum reaction conditions. The germplasm resources genetic diversity of narcissus was tested using ISSR and AFLP molecular markers. The result discovered that the polymorphisms of the AFLP marker exceed that of the ISSR, but both of them cannot effectively reveal the genetic variation among populations, the genetic variation among individuals was tested too. Chinese narcissus with daffodils genetic relationship is far away. We predicted that the reason result in the morphological variation between Chongming narcissus and Zhangzhou narcissus was the phenotypic genetics caused by geography. We also speculated that the reason lead to the difference between Chongming narcissus and Zhangzhou narcissus in form is phenotypic genetic which is caused by geographic differences. It is still not verified that Zhuangyuan narcissus is variant from Zhangzhou or Chongming Narcissus.

Keywords Narcissus plants; ISSR marker; AFLP marker; Genetic variation

研究背景

水仙属(*Narcissus* Linn.)植物属石蒜科(*Amaryllidaceae*)多年生草本植物, 普遍为人知的包括漳州

水仙(Zhangzhou Narcissus)、崇明水仙(Chongming Narcissus)、普陀水仙(Putuo Narcissus)、平潭水仙(Pingtang Narcissus)、舟山水仙(Zhoushan Narcissus)

等, 统称为中国水仙(*Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* Roem.)。崇明水仙在崇明县已有 400 多年的栽培史, 具有花香幽雅、花期长等特点。早在二十世纪三十年代已销往上海、江苏等地, 是上海最具特色的传统品牌之一。关于漳州水仙和崇明水仙分类一直存在系同一种源的说法。相传古时, 一艘满载水仙球茎的漳州帆船在长江口翻沉, 几年后, 崇明人发现江滩上长满了好看的花, 就连根挖起移种到花圃。经过几代人精心培育, 育成了崇明水仙。洋水仙和中国水仙同为石蒜科水仙属的植物, 是水仙属的不同物种, 都是深受人们欢迎的花卉。正如她的名字“洋水仙”, 是漂洋过海从外国引进的品种, 本文提到的洋水仙主要是胡德山(*Narcissus* ‘Paricutin’ ‘Mount Hood’), 阳光光盘(*Narcissus* ‘Sun Disc’), 帕里库廷火山(*Narcissus* ‘Paricutin’)和塔希提(*Narcissus* ‘Tahiti’)。

目前, 有关水仙的研究多集中于组织培养以及染色研究等方向, 崇明水仙与漳州水仙的分类系统一直没有得到很好的定位, 多数定位为中国水仙的两大不同栽培类型, 品种也较为混乱。于是, 本实验旨在通过 ISSR-PCR 标记(王建波, 2002)及 AFLP 分子标记指纹图谱分析(蒋细旺和张启翔, 2006; 江梅等, 2006), 为确立 4 种水仙种源资源的起源提供分子依据。

1 结果与分析

1.1 ISSR-PCR 优化反应体系的建立

以崇明重瓣水仙 DNA 为模板, 从 100 个引物中扩增出 32 个有条带的引物。再利用崇明单瓣水仙、漳州单瓣水仙、漳州重瓣水仙、状元水仙、洋水仙对筛选出来的 32 个引物进行复选, 最后得到 23 对扩增出清晰条带的引物(表 1)。

综合单因素优化体系中各反应参数的浓度梯度试验, 确立的崇明水仙 ISSR-PCR 反应的适宜条件为: 20 μ L 反应体系中各参数的含量为模板 DNA 50 ng, Tag DNA 聚合酶 1 U, 引物浓度 0.5 μ mol/L, dNTPs 浓度 0.25 mmol/L, 10 \times PCR Buffer 3.5 μ L, 最佳退火温度为 56.8 $^{\circ}$ C。

通过单因素和正交设计对比发现, 采用正交设计优化的反应体系效果最好(图 1), 反应体系更稳定。该体系为: 20 μ L 反应体系中各参数的含量为模板 DNA 50 ng, TagDNA 聚合酶 1 U, 引物浓度 0.5 μ mol/L, dNTPs 浓度 0.3 mmol/L, 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, 最佳退火温度为 56.8 $^{\circ}$ C。

根据优化后的反应体系对每个水仙种群的 DNA 模板进行 ISSR-PCR 扩增, 每个引物可扩增出 3~11 条 DNA 片段, 平均 5 条。23 个引物共扩增出 115 条带, 其中 36 条具有多态性, 多态性比率为 31.3% (见表 1)。

表 1 23 个引物编号, 碱基序列和扩增结果

Table 1 Name of 23 primers, sequence and their amplification results

引物编号 Primer No.	碱基序列 Sequences	记录位点数 Records a points	多态性位点 polymorphic loci	引物编号 Primer No.	碱基序列 Sequences	记录位点数 Records a points	多态性位点 polymorphic loci
811	(GA) ₈ C	3	0	847	(CA) ₈ AGC	5	2
814	(CT) ₈ A	4	2	852	(TC) ₈ AGA	6	3
815	(CT) ₈ G	5	3	854	(TC) ₈ AGG	3	0
824	(TC) ₈ G	4	1	855	(AC) ₈ CTT	4	1
825	(AC) ₈ T	6	0	856	(AG) ₈ CTA	6	0
834	(AG) ₈ CTT	7	0	859	(TG) ₈ AGC	4	2
835	(AG) ₈ CTC	8	6	866	(CTC) ₆	3	0
836	(AG) ₈ CTA	7	2	880	GGA(GAG) ₂ AGGAGA	11	7
841	(GA) ₈ CTC	6	4	881	GGGTGGGGTGGGGTG	4	2
844	(CT) ₈ AGC	4	0	890	ACGACTACG(GT) ₇	3	0
845	(CT) ₈ AGG	4	0	899	CATGGTGTGGTCATTGTTCCA	5	1
846	(CA) ₈ AGT	3	0				
总计 Total		115	36	平均 Mean		5.0	1.57

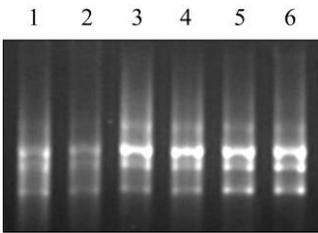


图 1 三种反应体系效果比较

注: 反应体系为 20 μL; 1, 2: 常规反应体系; 3, 4: 单因素优化反应体系; 5, 6: 正交设计优化反应体系

Figure 1 Effect comparison of three reaction systems

Note: Reaction system for 20 μL; 1, 2: Conventional reaction system; 3, 4: Single factor optimization reaction system; 5, 6: Orthogonal design optimization reaction system

1.2 AFLP 标记分析

试验从 64 对引物中筛选了多态性高、分辨力强、条带清晰的 8 对引物, 对崇明水仙、漳州水仙、状元水仙以及洋水仙进行了 AFLP 分析, 每对引物组合产生的条带数目不等(表 2), 共扩增得到 328 条清晰可统计的条带, 其中多态性条带 258 条, 多态性比率共计 78.7%; 平均每对引物扩增出条带 41 条, 具多态性的条带 32.25 条, 多态性比率变幅在 67.5%~88.1% 间; 其中, 引物 5-8 产生的条带最少, 共扩增 26 条; 引物 8-3 扩增出 49 条; 引物 5-1 在 445 bp、引物 8-1 在 155 bp、引物 8-3 在 278 bp 处对四种洋水仙(胡德山(*Narcissus* 'Paricutin' 'Mount Hood'), 阳光光盘(*Narcissus* 'Sun Disc'), 帕里库廷火山(*Narcissus* 'Paricutin'), 塔希提(*Narcissus* 'Tahiti')) 都扩增出特异性条带, 而在漳州水仙、崇明水仙、状元水仙种群均没有扩增出条带(图 2)。

表 2 AFLP 选择性扩增引物和扩增结果

Table 2 AFLP primer combinations and amplification

编号 Number	引物对 Primer pair	总带数 Total Number of Bands	多态性带数 Poly morphic Bands	多态性比率(%) Polymorphism (%)
5-1	E-ACA/M-CAA	42	37	88.1
5-3	E-ACA/M-CAG	46	36	78.3
5-4	E-ACA/M-CAT	38	31	81.6
5-8	E-ACA/M-CTT	26	19	73.1
8-1	E-ACG/M-CAA	46	38	82.6
8-3	E-ACG/M-CAG	49	38	77.6
8-4	E-ACG/M-CAT	40	27	67.5
8-8	E-ACG/M-CTT	41	32	78.0
总计 Total		328	258	78.7
平均 Average		41	32.25	78.7

1.3 遗传相似性分析

对 23 个 ISSR 引物产生的扩增片段进行统计计算出供试材料间的遗传相似系数(GS) (表 3), 分布在 0.847 8~0.979 9 之间, 平均值为 0.90。漳州单瓣水仙和漳州重瓣水仙 GS 值为 0.971 3, 崇明单瓣水仙和崇明重瓣水仙 GS 值高达 0.979 9, 崇明水仙和漳州水仙平均 GS 值为 0.965, 分析结果表明漳州水仙和崇明水仙之间的亲缘关系很近, 居群间的遗传分化较小; 状元水仙和漳州单瓣水仙的 GS 值为 0.972 1, 与漳州重瓣水仙的 GS 值为 0.953 3, 平均 GS 值为 0.962 7, 达到高度相似; 状元水仙和崇明单瓣水仙的 GS 值为 0.956 3, 与崇明重瓣水仙的 GS 值为 0.942 1, 平均为 0.949 2。洋水仙四个品种个体间平均遗传相似系数为 0.88, 表明洋水仙居群品种间遗传多样性较为丰富; 漳州水仙、崇明水仙、状元水仙三者间的平均 GS 值为 0.965, 表明它们之间的亲缘关系较近; 它们与洋水仙四个品种间的平均 GS 值为 0.87, 表明三种中国水仙与洋水仙的亲缘关系相对较远。

同样, 对 8 对 AFLP 引物的扩增片段进行统计, 计算出中国水仙与洋水仙的遗传相似系数(表 4)。种群间的遗传相似系数(GS)变幅为 0.261 3~0.633 5, 平均值为 0.508。如表 3 和表 4 所示, AFLP 标记结果与 ISSR 标记相似, 崇明水仙与漳州水仙亲缘较近, 漳州水仙、崇明水仙、状元水仙与洋水仙的亲缘关系远; 漳州单瓣水仙和重瓣水仙 GS 值为 0.633 5, 崇明单瓣水仙和崇明重瓣水仙 GS 值为 0.588 6, 崇明水仙和漳州水仙平均 GS 值为 0.615 7; 状元水仙

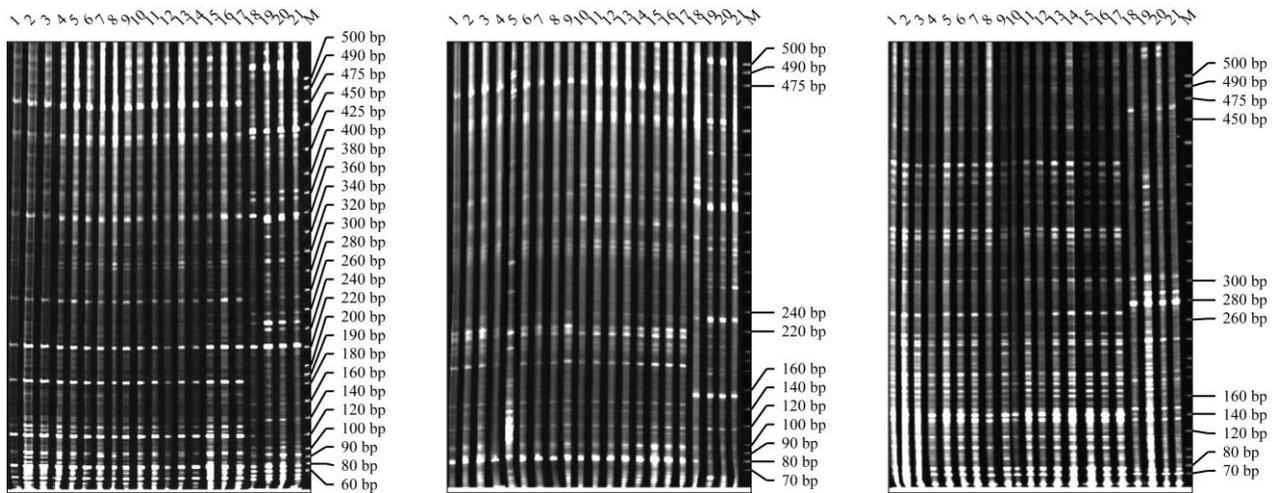


图 2 AFLP 引物 5-1, 8-1, 8-3 对 21 个样品的 PCR 扩增图

注: Marker: DGL2000 marker; 1~2: 漳州单瓣水仙; 3~6: 漳州重瓣水仙; 7~8: 状元水仙; 9~12: 崇明重瓣水仙; 13~17: 崇明单瓣水仙; 18~21 分别为胡德山, 阳光光盘, 帕里库廷火山, 塔希提; 由左往右为引物 5-1、8-1、8-3 (见表 2) 的扩增图; 图中圈注处出现特异性条带

Figure 2 The PCR amplification of 21 samples using primer 5-1, 8-1, 8-3

Note: Marker: DGL2000 marker; 1~2: Zhangzhou single narcissus, 3~6: Zhangzhou double narcissus, 7~8: Zhuangyuan narcissus, 9~12: Chongming double narcissus, 13~17: Chongming single narcissus, 18~21 is Narcissus 'Paricutin' 'Mount Hood', Narcissus 'Sun Disc', Narcissus 'Paricutin', Narcissus 'Tahiti', respectively; From left to right is the multiplies figure of primer 5-1, 8-1, 8-3 (see table 2); figures appear specific bands in circle note

表 3 样品间的 Nei 氏相似性系数矩阵(ISSR)

Table 3 Nei's similarity of coefficient matrix of samples (ISSR)

样品 samples	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	1.000 0								
2	0.971 3	1.000 0							
3	0.972 1	0.953 3	1.000 0						
4	0.968 9	0.967 2	0.942 1	1.000 0					
5	0.968 3	0.971 2	0.956 3	0.979 9	1.000 0				
6	0.878 3	0.865 4	0.876 7	0.882 1	0.857 8	1.000 0			
7	0.864 5	0.864 2	0.882 3	0.863 5	0.871 8	0.868 9	1.000 0		
8	0.852 3	0.877 8	0.853 6	0.874 7	0.853 3	0.862 2	0.871 8	1.000 0	
9	0.873 8	0.873 5	0.847 8	0.863 2	0.869 9	0.875 2	0.878 4	0.871 1	1.000 0

注: 1: 漳州单瓣水仙; 2: 漳州重瓣水仙; 3: 状元水仙; 4: 崇明重瓣水仙; 5: 崇明单瓣水仙; 6~9 分别为胡德山, 阳光光盘, 帕里库廷火山, 塔希提

Note: 1: Zhangzhou single narcissus; 2: Zhangzhou double narcissus; 3: Zhuangyuan narcissus; 4: Chongming double narcissus; 5: Chongming single narcissus; 6~9 is Narcissus 'Paricutin' 'Mount Hood', Narcissus 'Sun Disc', Narcissus 'Paricutin', Narcissus 'Tahiti', respectively

与漳州单瓣水仙、漳州重瓣水仙的 GS 值分别为 0.625 2、0.609 5; 状元水仙和崇明单瓣水仙的 GS 值为 0.565 0, 与崇明重瓣水仙的 GS 值为 0.614 4, 这表示状元水仙与漳州水仙、崇明重瓣水仙的亲缘关系相近; 洋水仙四个品种个体间平均遗传相似系数为 0.512 8; 供试 3 种中国水仙的平均 GS 值为

0.614 1, 洋水仙的平均 GS 值为 0.296 5。

2 结论与讨论

本实验利用 ISSR 分子标记和 AFLP 指纹图谱对中国水仙的崇明水仙、漳州水仙、状元水仙和洋水仙种群进行标记, 分别建立了水仙属植物的 ISSR 标记和 AFLP 优化反应体系, AFLP 标记多态性高

表 4 样品间的 Nei 氏相似性系数矩阵(AFLP)

Table 4 Nei's similarity of coefficient matrix of samples (AFLP)

样品 Samples	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	1.000 0								
2	0.633 5	1.000 0							
3	0.625 2	0.609 5	1.000 0						
4	0.576 3	0.579 1	0.565 0	1.000 0					
5	0.624 4	0.611 1	0.614 4	0.588 6	1.000 0				
6	0.292 6	0.321 1	0.292 0	0.317 3	0.303 5	1.000 0			
7	0.290 1	0.302 1	0.280 1	0.261 3	0.282 4	0.431 9	1.000 0		
8	0.298 9	0.325 3	0.300 1	0.298 0	0.315 4	0.477 6	0.533 0	1.000 0	
9	0.287 7	0.295 7	0.262 4	0.284 6	0.283 8	0.575 2	0.472 7	0.586 2	1.000 0

注: 1: 漳州单瓣水仙; 2: 漳州重瓣水仙; 3: 状元水仙; 4: 崇明重瓣水仙; 5: 崇明单瓣水仙; 6~9 分别为胡德山, 阳光光盘, 帕里库廷火山, 塔希提

Note: 1: Zhangzhou single narcissus; 2: Zhangzhou double narcissus; 3: Zhuangyuan narcissus; 4: Chongming double narcissus; 5: Chongming single narcissus; 6~9 is *Narcissus* 'Paricutin' 'Mount Hood', *Narcissus* 'Sun Disc', *Narcissus* 'Paricutin', *Narcissus* 'Tahiti', respectively

于 ISSR 标记。实验筛选出 23 个 ISSR 引物, 共扩增出 115 条带, 其中 36 条具有多态性, 多态性比率为 31.3%; 8 对 AFLP 引物共扩增得到 328 条清晰可统计的条带, 其中多态性条带 258 条, 多态性比率共计 78.7%。然而, 在两种标记中均没有找到有效的揭示中国水仙种群间遗传变异的特异性标记。利用这两种标记对水仙种群间的遗传差异进行分析, 结果一致, ISSR 得出的崇明水仙与漳州水仙遗传距离 0.003 5, AFLP 的结果是 0.384 3, 表明崇明水仙与漳州水仙亲缘关系很近, 在一定程度上印证了漳州水仙和崇明水仙同一起源的说法; 两种标记结果显示中国水仙与洋水仙(GS 值分别为 0.880, 0.512 8)亲缘关系较远。ISSR 标记与 AFLP 分析结果显示中国水仙的各种群间差异很小。一方面, 中国水仙为同源三倍体, 大多不育, 存在基因流障碍, 长期的无性繁殖以及不科学的人工选育, 从而导致了中国水仙种群间遗传多样性贫乏。中国水仙遗传多样性水平低的另一个原因是在长期的自然选择和栽培过程中, 其基因组 DNA 变异频率低, 很难发生自然突变形成新品种, 这是导致中国水仙品种稀少的根本原因。越来越多的研究表明, 物种遗传多样性贫乏是导致物种沦为濒危种的重要原因(Huang et al.,1998)。通过采用现代生物新技术, 如将崇明水仙与其它水仙品种进行体细胞杂交、体细胞融合、多倍体诱导, 或通过转基因手段将其它花色基因、抗逆基因转入崇明水仙等, 从而获得花期更长、花色多样、花型大、花枝多、抗逆性强的新品种,

是进一步对崇明水仙进行研究的目标。

Waddington (1957)曾经提出表观遗传学这一现象, 认为在 DNA 序列不发生变化的条件下, 基因表达发生的改变是可以遗传的, 这是环境因素和细胞内的遗传物质之间发生交互作用的结果(梁前进, 2007, 生物学通报, 42(10): 4-7)。现代研究发现, 表观遗传在植物适应环境变化的过程中起到了重要作用(王迪等, 2008), 在不同的环境压力下, 植物可能会发生复杂的表观遗传变化。当植物遇到环境压力时, 表观遗传的修饰程度会发生改变, 这种改变一部分是可以遗传的, 一部分会因为压力的去除而在同一代细胞中发生回复。这种现象也能解释崇明水仙和漳州水仙同一起源的说法。由于上百年的地理环境胁迫, 以及经历的不同的栽培方法, 使得崇明水仙和漳州水仙在表型上产生一些变异, 这种变异通过无性繁殖延续下来, 而 DNA 序列上并没有产生变化。表现为崇明水仙叶型较宽大, 鲜绿色, 商品球鳞茎小、少侧脚。而漳州水仙叶细长且窄, 深绿色, 多花枝, 鳞茎肥大, 多侧脚; 两者出芽时间、叶片形成时期及抽葶时间较一致; 而崇明水仙花期较漳州水仙略长, 且花大, 香味更浓烈。因此, 利用其它分子标记通过对中国水仙种群内更多个体的完整基因组的 DNA 进行比对, 找出特异标记对中国水仙种群进行分类定位还有待进一步深入。

3 材料与方法

3.1 试验材料

材料均为 3 年生的水仙种球, 由上海崇明百叶

水仙花专业合作社。分别是漳州单瓣水仙、漳州重瓣水仙、崇明重瓣水仙、崇明单瓣水仙、状元水仙、洋水仙。洋水仙包括 4 个品种: 胡德山(*Narcissus* ‘Paricutin’ ‘Mount Hood’), 阳光光盘(*Narcissus* ‘Sun Disc’), 帕里库廷火山(*Narcissus* ‘Paricutin’)和塔希提(*Narcissus* ‘Tahiti’)。

3.2 水仙总 DNA 提取

采用 CTAB 法(王慧超等, 2010), 0.8% 琼脂糖凝胶电泳上检测 DNA 质量, 在紫外可见分光光度计上测定 260 nm 和 280 nm 处的吸光值, 将符合实验要求的 DNA 样品稀释至 50 ng/μL 于 -20℃ 保存备用。

3.3 ISSR 反应体系优化

参照陈林姣(2006)提供的 20 μL ISSR 反应体系。PCR 扩增反应在 PTC-100TM 和 PTC-200TM 扩增仪上进行。以崇明重瓣水仙 DNA 为模板, 选择单一引物, 分别进行单因素优化和正交设计优化, 确定崇明水仙 ISSR-PCR 反应的最佳实验参数。

单因素优化分别设置了: 6 个 DNA 模板浓度(分别为 5 ng, 10 ng, 20 ng, 30 ng, 40 ng 和 50 ng)、6 个 Mg²⁺ 浓度(分别为 1.0 mmol/L, 1.5 mmol/L, 2.0 mmol/L, 2.5 mmol/L, 3.0 mmol/L 和 3.5 mmol/L)、6 个引物浓度(分别为 0.2 μmol/L, 0.3 μmol/L, 0.4 μmol/L, 0.5 μmol/L, 0.6 μmol/L 和 0.7 μmol/L)、6 个 Taq DNA 聚合酶浓度(分别为 0.4 U, 0.6 U, 0.8 U, 1.0 U, 1.2 U 和 1.4 U)、6 个 dNTPs 浓度(分别为 0.1 mmol/L, 0.15 mmol/L, 0.2 mmol/L, 0.25 mmol/L, 0.3 mmol/L 和 0.35 mmol/L); 比较它们对 ISSR 反应的影响, 均重复两次。此外, 实验在 40℃~60℃ 范围内设置了

12 个退火温度: 40.0℃、40.5℃、41.7℃、43.2℃、45.5℃、48.4℃、51.7℃、54.6℃、56.8℃、58.4℃、59.6℃ 和 60℃, 以筛选出最佳退火温度。

正交设计优化对 Mg²⁺ 浓度、dNTPs 浓度、Taq DNA 聚合酶浓度、引物浓度 4 个影响因素用 L9(3⁴) 正交表设计(表 5), 每个组合重复 2 次。

表 5 ISSR-PCR 优化因素水平表

Table 5 ISSR-PCR optimization factors

水平 Level	试验因素 Test factors			
	Mg ²⁺ (mmol/L)	DNTPs (mmol/L)	TagDNA polymerase (U)	Primer (μmol/L)
1	1.5	0.1	0.5	0.4
2	2.0	0.2	1.0	0.5
3	2.5	0.3	1.5	0.6

3.4 AFLP 分子标记

AFLP 酶切采用 *Mse* I 和 *Eco*R I 双酶切组合, 内切酶、T₄DNA 连接酶购自 NEB 公司。AFLP 接头、引物、Taq 酶购自北京鼎国生物技术公司。反应体系如表 6 所示。各反应完成后用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测产物。

3.5 数据处理

人工读取 ISSR、AFLP 电泳图, 在同一引物、同一位点处, 对扩增产生信号较强的、重复性较好的带记为“1”, 信号较弱、重复性较差的带或未出现带的记为“0”, 形成 0、1 矩阵。利用 NTSYS 统计软件对统计结果进行分析, 计算遗传相似系数(GS)。根据遗传相似系数对供试水仙进行分析。

表 6 AFLP 标记反应体系

Table 6 Reaction system of AFLP markers

酶切连接反应体系(20 μL) System of enzyme digestion and ligation (20 μL)		预扩增反应体系(25 μL) Reaction system of pre-amplification (25 μL)		选择性扩增反应体系(25 μL) Reaction system of selection amplification (25 μL)	
组分 Component	各成分体积(μl) Volume of component (μl)	组分 Component	各成分体积(μl) Volume of component (μl)	组分 Component	各成分体积(μl) Volume of component (μl)
DNA template	4	DNA template	2	The diluted sample amplification	2
Adapter	1	Pre-ampmix	1	<i>Mse</i> I primer	1
<i>Eco</i> R I / <i>Mse</i> I	2	dNTPs	1	<i>Eco</i> R I primer	1
10×Reaction Buffer	2.5	10×PCR Buffer	2.5	10×PCR Buffer	2.5
10 mmol/L ATP	2.5	<i>Taq</i> enzyme	0.5	dNTP	0.5
T ₄ Ligase	1	ddH ₂ O	18	<i>Taq</i> enzyme	0.5
ddH ₂ O	7			ddH ₂ O	17.5

作者贡献

曾艳、周永刚、张冬梅是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 曾艳完成数据分析, 论文初稿的写作, 周永刚参与实验设计, 试验结果分析; 张冬梅是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改; 卞黎霞、鲁琳、陆颖是项目的参与者。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究为重点科技攻关项目(编号: 10391901400)资助。作者感谢上海崇明百叶水仙花专业合作社在本实验过程中的材料支持和有益的建议。感谢两位匿名的同行评审人的评审建议和修改建议。本文中提到了我们实验中涉及的有关试剂供应商, 这并非我们为这些试剂供应商的产品和服务提供推荐或背书。

参考文献

- Chen L.J., 2006, Studies on Genetic Diversity of *Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* Roem and its Mechanism of Sterility, Ph.D. Thesis, Xiamen University, Supervisor: Tian H.Q., pp.24-26 (陈林姣, 2006, 中国水仙遗传多样性及其不育机理研究, 博士学位论文, 厦门大学, 导师: 田惠桥, pp. 24-26)
- Huang H., Dane F., and Kubisiak T.L., 1998, Allozyme and RAPD analysis of the genetic diversity and geographic variation in wild populations of the America chestnut *Castanea dentata* (Fagaceae), *Am. J. Bot.*, 85: 1013-1021
- Jiang M., Li X.M., Wen Q., and Ye J.S., 2006, AFLP molecular marker and its application on plants, *Jiangxi Linye Keji* (*Jiangxi Forestry Science and Technology*), 5: 41-44 (江梅, 李小梅, 温强, 叶金山, 2006, AFLP标记及其在植物中的应用, *江西林业科技*, 5: 41-44)
- Jiang X.W., and Zhang Q.X., 2006, AFLP molecular markers in the application of ornamental plants, *Caoye Kexue* (*Pratacultural Science*), 23(6): 92-98 (蒋细旺, 张启翔, 2006, AFLP分子标记技术在观赏植物中的应用, *草业科学*, 23(6): 92-98)
- Waddington C.H., ed, 1957, *The strategy of the genes*, Allen & Unwin, London, pp.1-32
- Wang D., Fu B.Y., and Zhang L.J., 2008, The Plant's Epigenetic Variation and Response to Environmental Stress, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (*Molecular Plant Breeding*), 6(3): 569-573 (王迪, 傅彬英, 张立军, 2008, 植物表观遗传变化与环境压力研究进展, *分子植物育种*, 6(3): 569-573)
- Wang H.C., Yang M., and Jiang B., 2010, Study on Extracting Total DNA from Stem Tumorous Mustard, *Zhongzi* (Seed), 29(2): 77-78 (王慧超, 杨敏, 江波, 2010, 茎瘤芥总DNA提取研究, *种子*, 29(2): 77-78)

- Wang J.B., 2002, ISSR Markers and their applications in plant genetics, *Yichuang* (*Hereditas*), 24(5): 613-616 (王建波, 2002, ISSR分子标记及其在植物遗传学研究中的应用, *遗传*, 24(5): 613-616)



5thPublisher是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5thPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>