

5 种蔷薇遗传多态性的 AFLP 分析

苟本富 (重庆文理学院生命科学系, 重庆 402160)

摘要 [目的] 研究 AFLP 标记在蔷薇遗传多态性方面的应用和 5 种不同蔷薇品种的遗传背景。[方法] 应用 10 条人工设计的与接头序列相识别的 AFLP 选择性引物, 用 Pst I 酶切, 对 5 种蔷薇基因组 DNA 进行 AFLP 反应, 分析不同蔷薇间的遗传相似系数和遗传距离。[结果] 获得了 108 个 AFLP 标记, 单引物获得的标记数在 4~16, 5 种蔷薇的遗传相似系数为 0.824 (0.732~0.947), 遗传距离为 0.053~0.268。[结论] 该研究为评价蔷薇的遗传稳定性提供了相关的参数。

关键词 蔷薇; 遗传多态性; 遗传相似系数; AFLP

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)17-07143-02

AFLP Analysis of Genetic Polymorphism of Five Lines Rose

GOU Ben-fu (College of Life Science, Chongqing University of Arts and Sciences, Chongqing 402160)

Abstract [Objective] The research aimed to study the application of AFLP markers in detecting genetic polymorphic loci in 5 strains rose and their genetic background. [Method] Ten human-designed AFLP selective primers different from adaptor sequence were used, genomic DNA from 5 strains rose were restrictive by Pst I. And their Genetic similarity coefficient and genetic distance were studied. [Result] The 108 AFLP markers were obtained, and the obtaining marker numbers of individual primer were 4-16. The similarity index of population in five strains rose was 0.824 (0.732-0.947), and the genetic distance were 0.053-0.268. [Conclusion] AFLP technique was an effective method in genetic polymorphism monitoring of rose.

Key words Rose; Genetic polymorphism; Genetic similarity coefficient; AFLP(amplified fragment length polymorphism)

AFLP(amplified fragment length polymorphism)技术是 20 世纪 90 年代发展起来的一项 DNA 指纹新技术^[1-3]。它从原理上结合了 RFLP 和 RAPD 的优点, 通过对基因组 DNA 的限制性酶切片段进行选择扩增而显示多态性。在 AFLP 反应中, 酶切后的 DNA 片段被连上通用接头(Adapter)顺序作为 PCR 扩增的模板, 这样接头顺序及其邻近的酶切位点就成为扩增反应中引物的结合位点。选择性扩增的引物是在接头顺序和内切酶识别位点的基础上加一定数目(1~3 个)的选择性碱基, 只有那些与引物的选择性碱基严格配对的 DNA 片段才能被扩增出来, 扩增产物通过电泳而显示多态性。

AFLP 技术自 1995 年被报道以来, 以较好的稳定性和较高的多态检出率而受到分子生物学家的关注, 得到了广泛应用^[4-7]。而目前国内科研工作者在分子水平上对蔷薇的研究报道不多。陈向明等用 RAPD 方法对蔷薇属植物基因组 DNA 进行过遗传检测^[8]。苟本富等对 AFLP 技术检测蔷薇属植物基因组 DNA 遗传多样性进行了探索^[9]。但用 AFLP 技术对蔷薇属植物遗传背景进行深入研究的报道尚未见。为此, 笔者利用 AFLP 技术对 5 种蔷薇基因组 DNA 的遗传多态性进行检测, 旨在探讨利用 AFLP 技术研究蔷薇属植

物遗传背景的可行性, 为蔷薇属植物的遗传分化研究以及合理利用和保护提供新的科学方法和研究手段。

1 材料与方法

1.1 材料 粉团蔷薇(*R. multiflora* Thurb. var. *cathayensis*)、荷花蔷薇(*R. muctiflora* cv. *carnea* Thory)、七姊妹蔷薇(*R. rugose* Thunb. var. *platyphyll* Thory) 和华西蔷薇(*R. moyesii*) 4 种蔷薇品种的嫩枝, 采摘于渝西学院校园内; 硕苞蔷薇(*R. bracteata*) 的嫩枝由熊运海教授提供(从中国农业大学带回的枝条在重庆文理学院生物园经过 3 年的培育)。

仪器和试剂: 10×buffer, Taq 酶, Mg²⁺, 均为 Sangon 公司产品; dNTP 为德国 BM 公司产品; T₄ DNA 连接酶为 Premaga 公司产品; AFLP 接头与引物均由上海基康公司合成, 接头序列如下: 5'-GACGTGACGGCCGTCATGCA-3', 3'-GCACTGCCGCGCAGT-5'。根据接头序列设计出相应的 AFLP 引物, 引物表现为 3'-端具有 3 个选择碱基, 引物编号和序列见表 1。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取。每个蔷薇品种随机剪取 7~8 条幼嫩枝条, 采用《分子生物学实验指导》^[10]上的关于“植物基因组

表 1 AFLP 引物编号、序列及扩增蔷薇的遗传多样性参数
Table 1 Genetic diversity parameters of AFLP primer numbering, sequence and amplification rose

引物 Primer	序列 Sequence	GC 含量 GC content//%	扩增条带数 Number of amplified band//条	Np 多态位点数 Np polymorphism site number	多态位点比率 P Percentage of polymorphism site//%
1	GACGGCCGTCATGCAgagg	68	4~9	3	37.5
2	GACGGCCGTCATGCAgacc	68	5~13	4	36.4
3	GACGGCCGTCATGCAgacg	68	7~12	3	30.0
4	GACGGCCGTCATGCAgaca	63	4~10	3	37.5
5	GACGGCCGTCATGCAgaca	68	6~14	4	33.3
6	GACGGCCGTCATGCAgagat	63	7~16	6	42.9
7	GACGGCCGTCATGCAgagct	68	5~11	3	37.5
8	GACGGCCGTCATGCAgagac	68	4~13	2	22.2
9	GACGGCCGTCATGCAgagtc	68	7~14	3	25.0
10	GACGGCCGTCATGCAgagt	63	5~8	2	28.6

基金项目 重庆文理学院基金(2005SK38, 2007SK45)资助。

作者简介 苟本富(1968-), 男, 四川巴中人, 副教授, 从事应用分子生物学方面的研究。

收稿日期 2008-04-16

DNA 提取”的方法制备基因组 DNA。

1.2.2 AFLP 模板制备。基因组 DNA 的酶切和接头的连接在同一反应中进行。反应体系为 20 μl, 含基因组 DNA 0.2 μg,

接头 0.2 μg , Pst I 酶 20 U, T₄ DNA 连接酶 2 U, 1 mmol/L ATP。37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h; 20 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h 为 1 循环, 共 5 个循环; 70 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 10 min。之后, 用灭菌双蒸水将反应液稀释到 100 μl , 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2.3 PCR 反应。25 μl 的反应体系中含有 10 \times buffer 2.5 μl , Mg²⁺ 1.5 mmol/L, dNTP 200 $\mu\text{mol/L}$, 引物 100 ng, 模板 10 ng, Taq 酶 1 U。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 0.5 min; 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增产物用含溴化乙锭 (EB, 0.5 $\mu\text{g/ml}$) 的 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 紫外检测仪上观察, 拍照。

1.3 遗传多样性的评价

1.3.1 相似系数和遗传距离。统计各样品的 AFLP 标记数, 以“1, 0”分别表示扩增带的有无, 仅计算清晰和稳定的条带。任意 2 个个体遗传相似系数 (F) 亦即遗传相似度 (genetic similarity) 根据 Nei 等^[10] 的公式进行计算, 即:

$$F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$

式中, N_{xy} 为个体 x 和个体 y 共有片段数; N_x 为 x 个个体所扩增片段总数; N_y 为 y 个个体所扩增片段总数。F 值越大, 遗传变异程度越小, 因此任意 2 个个体间的遗传距离 (D) 可以根据 2 个个体间的相似系数 (F) 来计算, 即 $D = 1 - F$ 。根据遗传相似系数和遗传距离可以反映个体间亲缘关系的远近和遗传变异的大小。

1.3.2 多态位点的比率 P。计算公式为:

$$P = (k/n) \times 100\%$$

式中, k 为多态位点数; n 为检测位点总数。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的扩增结果 研究中所用的 10 条 AFLP 引物都扩增出了清晰的条带, 每条引物扩增条带的数目在 4~16 条, 共扩增出 108 条条带, 即检测了 5 种蔷薇的 108 个位点。每条引物的扩增结果在 5 种蔷薇品种间表现出不同程度的多态性 (图 1)。

表 2 个体间的片段相似性和遗传距离

Table 2 Fragment similarity and genetic distance between the individuals

品种 Cultivar	华西蔷薇 R. moyesii	粉团蔷薇 R. multiflora Thurb var. cathayensis	荷花蔷薇 R. muctiflora cv. carnea Thory	七姊妹蔷薇 R. rugose Thunb. var. platyphyll Thory	硕苞蔷薇 R. bracteata
华西蔷薇 R. moyesii		0.85	0.95	0.83	0.73
粉团蔷薇 R. multiflora Thurb var. cathayensis	0.15		0.91	0.82	0.81
荷花蔷薇 R. muctiflora cv. carnea Thory	0.05	0.09		0.87	0.79
七姊妹蔷薇 R. rugose Thunb. var. platyphyll Thory	0.17	0.18	0.13		0.76
硕苞蔷薇 R. bracteata	0.27	0.19	0.21	0.24	

注: 对角线片段相似性, 对角线以下为遗传距离。

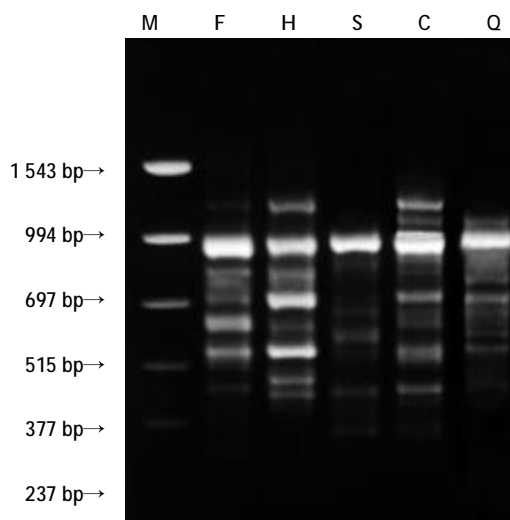
Note: Data above diagonal are fragment similarity, and those under diagonal are genetic distance.

最大为 0.268, 最小为 0.053 (表 2)。

3 结论与讨论

该研究用 AFLP 标记, 从 DNA 水平对 5 种蔷薇的遗传多样性进行分析, 得出相关的遗传多样性参数, 为准确评价遗传稳定性提供了参考。遗传相似系数 (F) 是评价遗传变异程度的可靠参数, F 值越大, 个体间的血缘关系越近, 遗传变异越小。该试验结果表明, 多态频率为 30.56%, DNA 指纹相似系数为 0.824。这说明 AFLP 技术用于蔷薇遗传多样性的研究是可行的, 且具有较高的灵敏度。

该研究标记适宜于对蔷薇基因组 DNA 的遗传检测, 这种高效的遗传检测技术必将对动物的遗传检测起到积极的



注: C 为华西蔷薇; F 为粉团蔷薇; H 为荷花蔷薇; Q 为七姊妹蔷薇; S 为硕苞蔷薇; M 为分子量标准 (PCR Marker)。

Note: C. R. moyesii; F. R. multiflora Thurb var. cathayensis; H. R. muctiflora cv. Carnea Thory; Q. R. rugose Thunb. Var. cv. platyphyll Thory; S. R. bracteata; M. Standard molecular weight (PCR Marker).

图 1 9 号引物扩增 5 种蔷薇的结果

Fig. 1 Result of five rose amplification by No. 9 primer

2.2 多态位点数及多态位点的比率分析 从表 1 可以看出, 不同引物扩增的多态性位点数与多态性位点数的比率不同。在所检测的 108 个位点中, 33 个位点具有多态性, 多态性位点比率为 30.56%, 其中, 引物 6 检测的多态位点比率最高达 42.90%, 引物 8 所检测多态位点比率最低为 22.2%。

2.3 品种间的相似系数和遗传距离分析 5 种蔷薇间的相似系数位于 0.732~0.947, 平均为 0.824 (表 2)。就单个引物来讲, 个体间的相似系数位于 0.716~0.953, 其中引物 6 的扩增结果在 5 种蔷薇间的相似系数最小为 0.732, 引物 8 的扩增结果在 5 种蔷薇间的相似系数最大为 0.947。根据相似系数, 可得到 5 种蔷薇间的遗传距离, 5 种蔷薇间的遗传距离

推动作用。AFLP 技术自创建以来, 在广泛应用的基础上不断改进。该研究所采用的 AFLP 技术在 Zabeau 和 Vos 的基础上进行了简化。经典的 AFLP 法需经过双酶切和 2 次选择性扩增, 而该试验采用单酶切, 且酶切和连接在同一反应体系中进行, 只进行 1 轮 PCR 扩增, 扩增产物经含 EB 的琼脂糖凝胶电泳检测而不是经放射性标记后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 因而该试验更加快捷、方便。陈洪等、万春玲等、吴丰春等和苟本富等都分别证明单酶切法同样可以得到可靠的检测结果^[12-15]。

硕苞蔷薇同其他 4 种蔷薇的遗传距离偏远, 且其他 4 种 (下转第 7209 页)

醛的能力下降。

用 spss14.0 统计分析软件对赤霉素施加与否吊兰吸收甲醛的量进行差异显著性分析。因数据不符合正态性,采用非参数检验,得到差异显著性水平为 $0.018 < 0.05$,因而统计差异性显著,说明赤霉素对吊兰吸收甲醛的能力有促进作用。

3 结论与讨论

由试验结果可以看出,通过合适浓度的赤霉素处理可以提高吊兰叶片吸收甲醛的能力,为利用赤霉素提高吊兰吸收甲醛能力来简便快捷地治理室内空气污染做出了初步的探索,但还存在一系列有待解决的问题:①前人的研究发现,植物不仅通过叶片吸收甲醛,植物根系协同共生微生物也是重要的吸收途径^[2],因而,赤霉素对吊兰根系吸收甲醛能力的影响也值得进一步的研究。②该试验直接用赤霉素溶液浸泡处理离体吊兰叶片,测定的是吊兰叶片吸收溶液中甲醛的能力。用这种方法得到的赤霉素最佳处理浓度可能与通过叶面喷雾提高吊兰植株吸收空气中甲醛的能力所需的浓度有一定的差异。③赤霉素对吊兰吸收甲醛能力的促进作用的持续时间还有待于进一步的测定。④该试验仅针对一种植物激素对吊兰吸收甲醛能力的作用进行了研究,使用多种植物生长调节剂协同作用有可能达到更明显的促进吊兰吸收甲醛能力的效果。因此,下一步可以通过实体试验来研究赤霉素对整株吊兰吸收空气中甲醛能力的影响,进一步验证试验结果并找到最佳喷雾浓度。另外,通过探究赤霉素与其他植物生长调节剂的协同作用,制备复合

(上接第 7144 页)

蔷薇的遗传距离均较近。这可能与它们分布在不同区域有关,因为硕苞蔷薇原产于日本,在中国农业大学经过培育后,又在渝西学院经过 3 年的培育,而其他 4 种蔷薇品种均产于本地。关于物种间亲缘关系的远近,常青等和任军等都发现与地理分布有关^[16-17]。即地缘较近的物种间有着较多的基因交流,亲缘关系较近,而地理分布中心区间隔较大的物种间基因交流较少,亲缘关系也较远。

遗传相似系数越高,群体的表型性状就越一致,其遗传就越稳定,高的遗传相似系数对于一个物种的优良性状至关重要。5 种蔷薇的遗传相似系数为 $0.732 \sim 0.947$,平均为 0.824 ,说明蔷薇品种间具有较丰富的遗传多态性。因此,应注意保种与开发利用相结合,通过品系繁育等途径,采用现代遗传育种原理与传统选育技术相结合的方法,培育出更多、更丰富的花型和花色的蔷薇品种或品系,以便更好地保存物种基因和满足人类的需要。

参考文献

- [1] 翁跃进. AFLP——一种 DNA 分子标记新技术[J]. 遗传, 1996, 18(6): 29-31.
- [2] 翁曼丽, 谢伟武, 伏健民. 新一代分子标记技术[J]. 应用与环境生物学报, 1996(4): 424-429.
- [3] VOS P, HOGERS R, BLEEKOR M. et al. AFLP a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23: 4407-4414.
- [4] 王峰峰, 张军丽, 王伯荪, 等. 厚壳桂种群在不同群落中的 AFLP 分

制剂来进一步提高吊兰吸收甲醛能力,该方面将有广阔的研究前景。

参考文献

- [1] WHO. The world health report 2002-Reducing risk, promoting health life[R]. France, 2002.
- [2] 张晓勇, 黄卫. 室内空气污染现状及控制研究[J]. 环境科学与管理, 2006, 31(6): 44-46.
- [3] 吴萍, 刘金洲. 室内空气甲醛污染危害及其控制措施[J]. 公共卫生与预防医学, 2006, 17(4): 59-60.
- [4] ZHANG L, CHOW T T, FONG K F. et al. Comparison of performances of displacement and mixing ventilations. Part II: indoor air quality[J]. International Journal of Refrigeration, 2005, 28(2): 288-305.
- [5] SONIA AGUDEO, ANA C POLO, MARYAEUTEA. et al. Removal of pollutants from indoor air using zeolite membranes [J]. Journal of Membranes Science, 2004, 240(1/2): 159-166.
- [6] 杨莉萍. 集中空调系统中光催化降解室内甲醛的研究[D]. 上海: 上海交通大学机械与工程学院, 2007.
- [7] MOOBEENCHANG, CHINCHINGLEE. Destruction of formaldehyde with dielectric barrier discharge plasma [J]. Environ Sci Technol, 1995, 29(1): 181-186.
- [8] HARTIG T, MANG M, EVANS G W. Restorative effects of natural environment experiences[J]. Environment and Behavior, 1991, 23(1): 3-26.
- [9] 殷飞. 观赏植物甲醛代谢途径的遗传工程[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2007.
- [10] 宋中邦. 提高植物甲醛代谢能力的遗传操作[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2007.
- [11] 袁高峰, 汪俏梅. 赤霉素信号转导研究进展[J]. 细胞生物学杂志, 2003, 25(2): 90-94.
- [12] 刘强, 陈荣, 邓瑜衡. 植物去除空气污染物机理研究进展[J]. 安全与环境工程, 2007, 14(1): 24-27.

析[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2000, 39(4): 125-127.

- [5] 陈万泉, 漆小泉, NIKS R E, 等. 利用 AFLP 遗传连锁图定位大麦苗期对叶病的部分抗性基因[J]. 遗传学报, 1999, 26(6): 690-694.
- [6] 何光华, 裴炎, 杨光伟, 等. 野败型杂交水稻恢复基因的 AFLP 标记研究[J]. 遗传学报, 2000, 27(4): 48-52.
- [7] KNORR C, CHENG H H, DODGSON J B. Application of AFLP markers to genome mapping in poultry [J]. J Anim Genet, 1999, 30(1): 28-35.
- [8] 陈向明, 郑国生, 孟丽. 玫瑰、月季、蔷薇等蔷薇属植物 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 2002, 29(1): 8-80.
- [9] 苟本富, 谢颖, 熊运海, 等. 应用 AFLP 技术对蔷薇进行遗传多样性研究的方法初探[J]. 西南农业学报, 2004, 17(3): 365-367.
- [10] 魏群, 崔丽华, 杨淑杰, 等. 分子生物学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 69-70.
- [11] NEI M, LI W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Pro Nat Acad Sci USA, 1979, 75: 213-219.
- [12] 陈洪, 朱立煌, 李冬梅, 等. 致病性念珠菌 DNA 的 AFLP 指纹图谱[J]. 科学通报, 1996(10): 935-938.
- [13] 万春玲, 朱玉芳, 谭远德, 等. AFLP 标记在研究家蚕遗传多态性方面的应用[J]. 生物技术, 1999, 9(5): 4-9.
- [14] 吴丰春, 魏鸿, 甘世权, 等. 贵州小香猪基因组 DNA 的 AFLP 检测研究[J]. 遗传, 2001, 23(5): 423-426.
- [15] 苟本富, 邹国林. 应用 AFLP 技术对同山羊种群进行遗传多样性检测的方法初探[J]. 氨基酸和生物资源, 2003, 25(2): 1-3.
- [16] 常青, 周开亚, 王义权, 等. 太湖猪遗传多样性和系统发生关系的 RAPD 分析[J]. 遗传学报, 1999, 26(5): 480-488.
- [17] 任军, 黄路生, 高军, 等. 赣中南花猪随机扩增多态 DNA 与群体遗传关系的研究[J]. 遗传, 2000, 22(2): 69-72.