植物学通报 *Chinese Bulletin of Botany* 2008, **25** (4): 449–454, www.chinbullbotany.com

·实验简报·

AFLP引物组合数量对准确研究竹子系统关系的影响

李潞滨[1], 郭晓军[2], 彭镇华[1], 刘贯水[1], 袁洪水[2], 朱宝成[2], 杨凯[3*]

[1] 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091; [2] 河北农业大学生命科学学院, 保定 071001

[3] 北京农学院农业应用新技术北京市重点实验室, 北京 102206

摘要 利用AFLP技术对26个竹子种类进行了多样性分析, 以探索引物组合数量对准确研究竹子类群系统关系的影响。实验共随机选取10对AFLP引物, 并对所得10组AFLP标记数据随机组合后进行Nei氏遗传距离/UPGMA聚类分析。每对AFLP引物扩增数据为一组, 随着用于聚类统计的AFLP标记数据随机组合数量的增加, 26个竹子种类的聚类关系趋向一致。这提示我们, 在系统学研究中, 足够数量的引物组合是获得供试材料间准确聚类关系的基础, 应采用对各AFLP引物组合数据随机累加后进行聚类分析的方法, 以聚类关系为标准来确定用于分析供试品种的最少引物组合数量。

关键词 AFLP, 竹子, 亲缘关系, 引物组合

李潞滨, 郭晓军, 彭镇华, 刘贯水, 袁洪水, 朱宝成, 杨凯 (2008). AFLP引物组合数量对准确研究竹子系统关系的影响. 植物学通报 **25**, 449–454.

竹子系禾本科(Gramineae)多年生植物。我国是世界上最主要的产竹国, 无论是竹子的种类、面积、蓄积量, 还是竹材、竹笋的产量都位居世界首位。我国竹子种类共有 39 属 500 余种, 竹林总面积约 4.20×10^6 hm^2。竹类很少开花, 更少结果, 而花是竹亚科分属及属以下分类等级的主要依据。竹类植物很少开花的特性使得传统上依据生殖器官对禾本科植物进行分类的方法在竹亚科中有时难以实现, 而且依据外部形态分类易受环境因素及个体发育情况的影响, 其准确和可靠性都会受到不同程度的限制, 特别是在对形态上相似的竹种进行鉴定时更显不足。所以竹子的分类一直是分类学研究中的一大难题(赵奇僧和汤庚国, 1993)。

近年来分子标记技术的快速发展为研究系统进化提供了新的手段, 尤其是AFLP (amplified fragment length polymorphism) 分子标记技术在 DNA 水平检测多态性位点上, 具有稳定性高、重复性好和多态性高等特点, 而且不受外界环境因素的影响, 已被广泛应用于多种植物的研究(Zhu et al., 1999; 祝军等, 2000; 易干军等, 2003b)。在利用 AFLP 技术进行植物种间和品种间的系统学分析时, 文献报道选用的引物组合数量各不相同。本研究利用 AFLP 技术对 26 种竹子进行了亲缘关系分析, 以聚类关系为标准探索了引物组合的数量对准确研究竹子系统关系的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料采自中国林业科学院北京良乡竹藤资源圃, 共 26 种, 其中刚竹属(*Phyllostachys* Sieb. et Zucc.)竹种 23 种, 苦竹属(*Pleioblastus* Nakai)竹种 2 种, 唐竹属(*Sinobambusa* Makino ex Nakai)竹种 1 种(表 1)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

采用改进的 SDS 法(Dellaporta et al., 1983)从竹子叶片提取 DNA; 用 Beckman 紫外可见分光光度计(萨姆布鲁克和拉塞尔, 2002)测定DNA样品浓度; 再用0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 检测后样品置于

收稿日期: 2007-11-09; **接受日期**: 2008-03-18
基金项目: 国家948项目(No.2004-4-60)
* **通讯作者**。E-mail: yangkai8978@126.com

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t27-405

4°C 冰箱备用。

1.2.2 AFLP 分析

AFLP 分析参照 Vos 等(1995)的方法。使用 *Eco*RI 和 *Mse*I 2 种限制性内切酶, 37°C 酶切 3 小时, 16°C 连接 1.5-3 小时; AFLP 预扩增采用 E00/M00 引物组合, 将预扩增产物稀释 20 倍作为选择性扩增 DNA 模板; 选择性扩增采用(E+3)/(M+3)引物组合, 其中 E 和 M 分别表示 *Eco*RI 和 *Mse*I 引物的共同序列, E 的共同序列为 5'-GACTGCGTACCAATTC-3', M 的共同序列为 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'。引物序列和组合见表 2。

1.2.3 数据处理

利用生物学统计软件 NTSYS-pc 2.10e 对数据进行分析处理。以 0 和 1 的方式记录电泳图谱中条带位置, 有条带的赋值 1, 无条带的赋值 0。数据录入 NTedit 1.2 后获得每对引物 AFLP 标记数据, AFLP 标记数据按引物对顺序依次累加, 分别得到 1 对至 10 对引物的 AFLP 标记的数据文件。以 neighbor-joining (NJ) 距离为基础, 采用 UPGMA 软件对数据进行聚类分析。

多态性比率 =(多态性 AFLP 条带数 / 总 AFLP 条带数)×100%。

表 1 实验材料

Table 1 The bamboo species tested in the experiment

No.	Scientific name
1	*Phyllostachys platyglossa* Z. P. Wang et Z. H. Yu
2	*Ph. fimbriligula* Wen
3	*Ph. parvifolia* C. D. Chu et H. Y. Chou
4	*Ph. glauca* McClure
5	*Ph. nuda* McClure f. localis C.P. Wang et Z.H.Yu
6	*Ph. heteroclada* Oliver
7	*Ph. sulphurea* (Carr.) A. et C. Riv. cv. Viridis R. A. Young
8	*Ph. incarnata* Wen
9	*Ph. pubescens* Mazel ex H. de leh. cv. *Taokiang* W. C. Lin
10	*Ph. bambusoides* Siebold et Zucc.
11	*Pleioblastus maculosoides* Wen
12	*Ph. aureosulcata* McClure f. *pekinensis* J. L. Lu
13	*Pl. amarus* (Keng) Keng f.
14	*Ph. iridescins* C.Y.Yao et S.Y. Chen
15	*Ph. vivax* McClure f. *huanwenzhu* J. L. Lu
16	*Ph. propinqua* McClure
17	*Ph. arcane* McClure
18	*Ph. angusta* McClure
19	*Ph. prominens* W. Y. Xiong
20	*Ph. viridis* (Young) McClure cv. *houzeau* McClure
21	*Ph. heteroclada* Oliver
22	*Sinobambusa tootsik* (Sieb.) Makino
23	*Ph. heterocycla* (Carr.) Mitford cv. *heterocycla*
24	*Ph. concava* Z. H.Yu et C. P. Wang
25	*Ph. glauca* McClure
26	*Ph. dulcis* McClure

2 结果与分析

2.1 AFLP扩增结果

随机选取 10 对 AFLP 引物组合对试材进行分析(表 2)。10 对引物组合共扩增出 733 个条带, 其中多态性条带 641 条, 多态率为 87.45%(图 1)。多态率最高的引物组合为 M-GCG/E-CTA, 多态率最低的引物组合为 M-CAC/E-AGG。

2.2 聚类分析

利用 NTSYS-pc 2.10e 软件, 将每对引物组合得到的 AFLP 数据随机组合得到的 AFLP 标记数据文件进行聚类分析, 以 neighbor-joining (NJ)距离为基础, 采用 UPGMA 软件对数据进行聚类分析。

按实验进程, 当供试材料用 8 对 AFLP 引物组合进行分析时, 将其中 7 对引物组合数据进行随机组合聚类

表 2 10 对 AFLP 引物选择性扩增结果

Table 2 The results of amplification using the selected 10 pairs of primers

No.	Primer combinations	Polymorphic bands	Total numbers of AFLP bands	Polymorphism (%)
1	M-AGC/E-CAC	56	62	90.32
2	M-CAA/E-AGA	56	66	84.85
3	M-CAC/E-AGG	63	82	76.83
4	M-CTA/E-CAT	100	103	90.09
5	M-CTT/E-CTT	57	67	85.07
6	M-GCG/E-CTA	100	105	95.23
7	M-AGA/E-CAG	39	47	82.98
8	M-GCT/E-CTC	66	80	82.50
9	M-CTA/E-GCG	50	58	86.20
10	M-GCA/E-GCC	53	63	84.13
Total		641	733	87.45

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t27-405

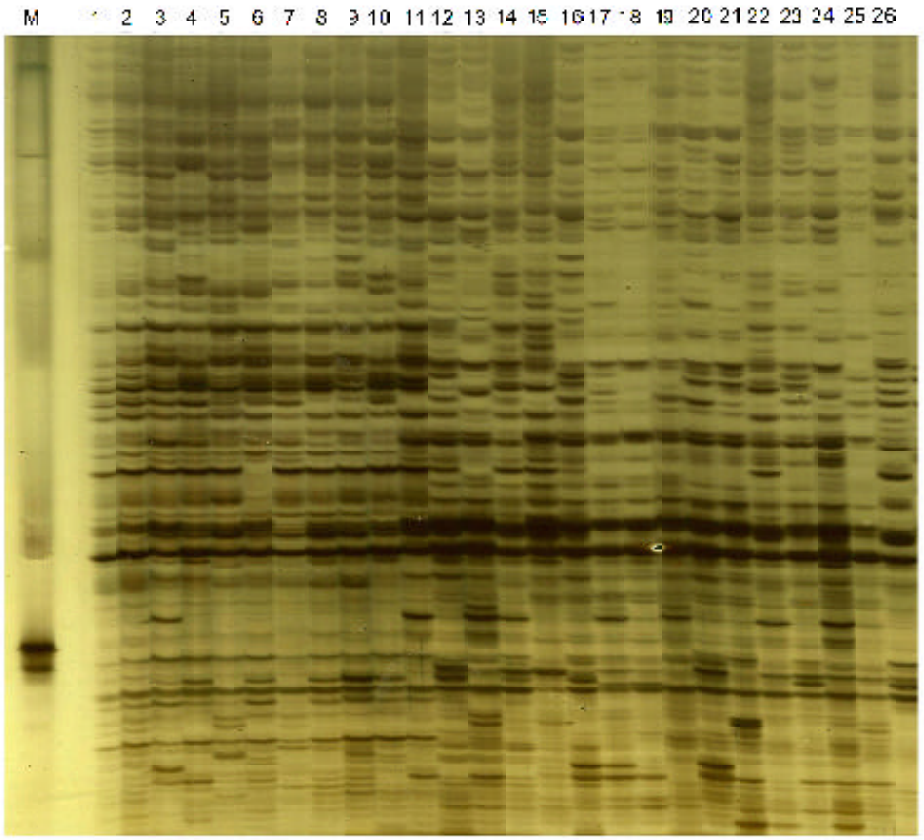


图1 扩增产物在5%聚丙烯酰胺凝胶电泳后银染结果

引物组合: M-CTA/E-CAT; 1-26：**竹种编号**(**见表** 1)； M: DNA **分子标记**

Figure 1 The silver stained results of selective amplification reaction in 5% denaturing polyacrylamide gel

The primer combinations: M-CTA/E-CAT; 1-26: Code for bamboo materials (see Table 1); M: DNA markers

分析，共得到 8 **种聚类结果均不同于** 8 **对引物组合聚类分析结果，分别有** 5-6 **个品种出现差异；当供试材料用** 9 **对引物组合进行**AFLP **分析时，将其中**8**对引物组合数据进行随机组合聚类分析，共得到**9**个聚类结果，其中**5**种聚类结果与** 9 **对引物组合聚类结果相同，有** 2-5 **个品种出现差异；当供试材料用** 10 **对引物组合进行** AFLP **分析时，将其中**9**对引物组合数据进行随机组合聚类分析，共得到** 10 **个聚类结果，其中** 9 **种聚类结果与** 10 **对引物组合聚类结果相同，有** 2 **个品种出现差异。限于篇幅本文仅列出最后统计结果(图** 2A-J，**图** 3)。

3 讨论

在利用AFLP**技术进行植物多样性和系统进化的研究中，研究者依各自研究目的不同采用的引物组合数量是不一样的(表** 3)。**如果仅从区分品种的角度，由于** AFLP **技术的高效性，研究者仅用少数几对引物就可达到研究目的。**Cervera **等**(1998)**对来自西班牙的** 67 **个葡萄品种进行了** AFLP **分析，仅用** 2 **对引物就发现基因型相同的品种可能有不同的品种名，而相同品种名可能有不同的基因型，从而很好地解决了同名异物和同物异名的问题。**Tignon **等**(2000)**应用** AFLP **技术鉴别苹果品种，采用** 1 **对**AFLP **引物组合产生了** 52 **个多态性标记，能够鉴别** 28 **个待测苹果品种。本研究也得出相似的结果，依据**AFLP **指纹图谱仅用**1**对引物组合就能区分出全部**26**个竹种的差异。**

在植物系统进化研究中，由于 AFLP **引物** 5'**端核心部分与接头互补，而引物** 3' **端加** 1-3 **个选择性碱基，在进行**AFLP-PCR**扩增的时候，上下游引物对模板序列都有一定的选择，所以** AFLP **是一种半随机的**PCR **扩增。尽管** AFLP **技术检测的位点数较多，但是这种选择性导致在进行系统学研究过程中，对基因组**DNA**酶切片段的**

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t27-405

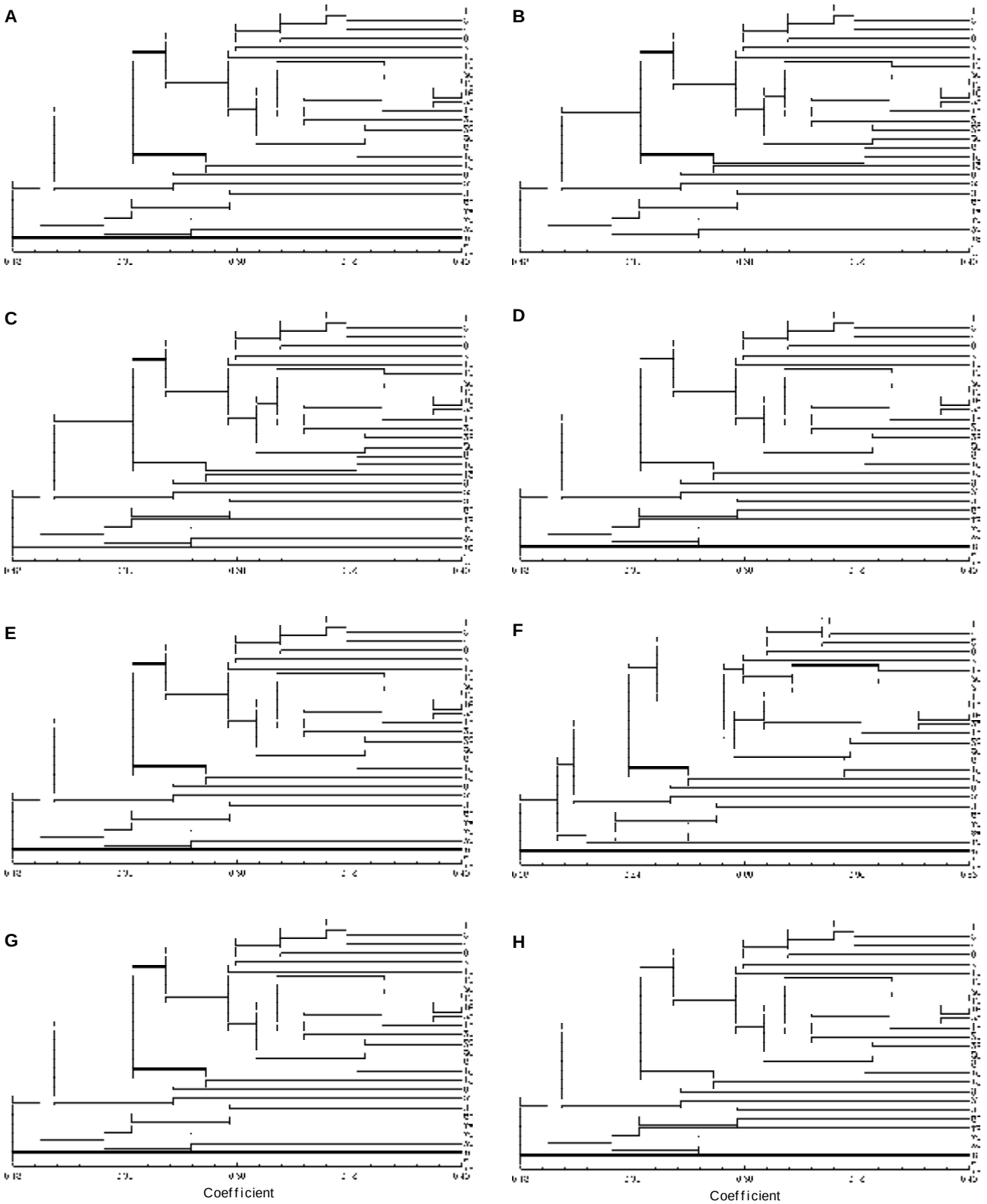


图 2
Figure 2

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t27-405

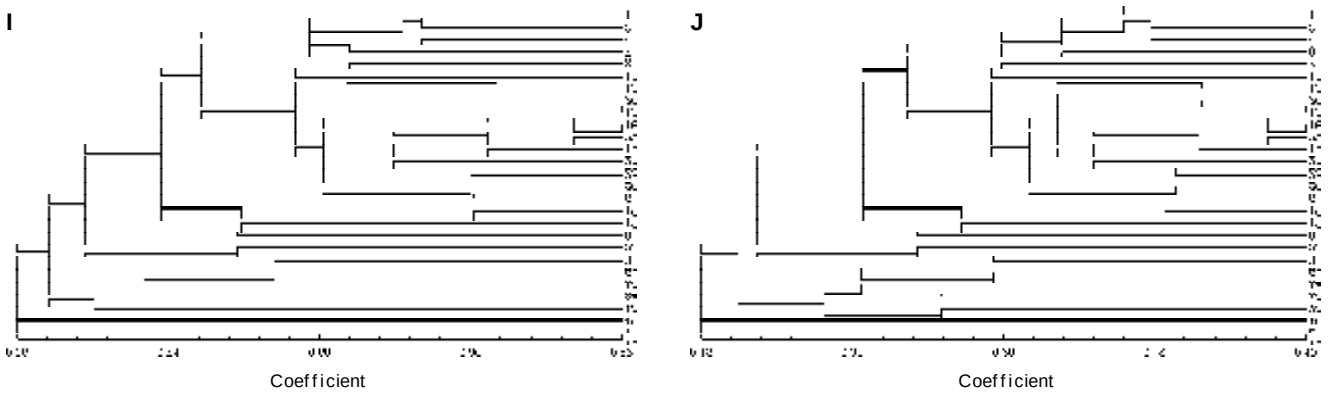


图2 10对引物AFLP分析时9对引物组合数据随机组合的聚类分析结果 (1-26: 竹种编号(见表1))

Figure 2 The system cluster dendrogram of 9 combinated pairs of AFLP primers w hich gathered randomly from 10 pairs of AFLP data (1-26: Code for bamboo materials (see Table 1))

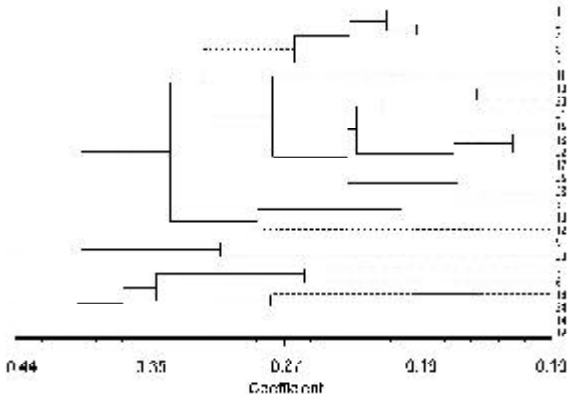


图3 10对引物系统聚类图(1-26: 竹种编号(见表1))

Figure 3 The system cluster dendrogram of 10 pairs of AFLP primers data (1-26: Code for bamboo materials (see Table 1))

表3 不同植物种间和品种间系统学分析所采用的引物组合数量

Table 3 The quantity of primer combinations which are adopted in the genealogy analysis of different plant varieties or species

Plants	Quantity of primer combination (pairs)	Reference
Litchi chinensis Sonn.	3	易干军等, 2003a
Ginkgo bilob L.	8	Wang et al., 2006
Cymbidium hookerianum Rchb. f.	9	朱根发等, 2007
Fragaia ananassa Duch.	10	张运涛等, 2006
Pinellia Tenore	13	成玉等, 2006
Wild Chinese orchids in Yunnan province	16	张俊祥等, 2006

一部分进行了选择性分析, 即对基因组的检测是半随机的选择性扫描。尽管这对遗传背景比较接近的品种影响很小, 但在研究遗传背景差异较大的品种时, 可导致很大的偏差, 所以仅用少数几对引物的数据进行分析必将导致分析结果出现偏差。在本研究利用AFLP 技术探讨竹类植物系统关系的过程中, 确定遗传背景十分接近的品种间的亲缘关系需要的引物组合数量很少, 仅用1对引物就可确定黄纹竹和早园竹间的亲缘关系, 即使将检测的引物组合数量增加到10对, NJ距离也仅有0.05的差异; 而其它品种的亲缘关系要达到一定的引物对数量时才能确定下来。从本研究的结果看, 随着随机选取的AFLP引物组合数量的增加, 供试竹种的聚类关系逐渐趋于一致。

在以系统学关系分析为目的的研究中, 应采用尽可能多的不同引物组合分析供试竹种(样品), 尤其是对竹类这种基因组较大的植物, 更应该采用尽可能多的引物组合进行分析。但在实验设计过程中, 很难确定应该使用多少个引物组合才能准确确定样品间的亲缘关系, 同时增加过多的引物组合将会使实验费用增加。因此在实验过程中应将不同AFLP引物组合扩增的标记数据随机累加分析, 当达到增加引物组合数而样品间聚类关系不变时, 进一步增加引物组合数量将对聚类关系影响很小。因此建议采用这种方法来研究物种间的亲缘关系。

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t27-405

参考文献

成玉, 陈成彬, 薛梅, 陈力 (2006). 应用AFLP技术探讨半夏属五个种的亲缘关系. 云南植物研究 **28**, 559-564.

易干军, 霍合强, 陈大成, 黄自然, 蔡长河, 邱燕萍 (2003a). 荔枝品种亲缘关系的AFLP分析. 园艺学报 **30**, 399-403.

易干军, 谭卫萍, 霍合强, 张秋明, 李建光 (2003b). 龙眼品种(系)遗传多样性及亲缘关系的AFLP分析. 园艺学报 **30**, 272-276.

张俊祥, 李枝林, 范成明, 程少丽, 赵明富, 何月秋 (2006). 云南野生兰属主要种间亲缘关系的AFLP分析. 园艺学报 **33**, 1141-1144.

张运涛, 冯志广, 李天忠, 董静, 王桂霞, 张开春, 韩振海 (2006). 草莓品种亲缘关系的AFLP分子标记分析. 园艺学报 **33**, 1199-1202.

赵奇僧, 汤庚国 (1993). 中国竹子分类的现状和问题. 南京林业大学学报(自然科学版) **17**(4), 1-8.

朱根发, 李冬梅, 郭振飞 (2007). 大花蕙兰遗传多样性及亲缘关系的AFLP分析. 园艺学报 **34**, 417-424.

祝军, 王涛, 李光晨, 赵玉军, 张文, 周爱琴 (2000). 苹果AFLP分析体系的建立. 中国农业大学学报 **5**(3), 63-67.

萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW (黄培堂等译) (2002). 分子克隆实验指南(第3版). 北京: 科学出版社. pp. 385-396.

Cervera MT, Cabezas JA, Sancha JC, Martknez TF, Martknez-Zapater JM (1998). Application of AFLP to the characterization of grape *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). *Theor Appl Genet* **97**, 51-59.

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983). A plant DNA mini preparation version. *Plant Mol Biol Rep* **1**, 19-21.

Tignon M, Kettmann R, Watillon B (2000). AFLP use for the identification of apple cultivars and mutants. *Acta Hortic* **521**, 219-226.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Paleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* **23**, 4407-4414.

Wang L, Xing SY, Yang KQ, Wang ZH, Guo YY, Shu HR (2006). Genetic relationships of ornamental cultivars of *Ginkgo biloba* analyzed by AFLP techniques. *J Genet Genomics* **33**, 1020-1026.

Zhu SL, Monti LM, Avitabile A, Rao R (1999). Evaluation of genetic diversity in chinese soybean germplasm by AFLP. *Noticiario De Recursos Fitogeneticos (ITALIA)* **119**, 10-14.

Effect of the Quantity of AFLP Primer Combinations on Accurately Identifying Bamboo Genetic Relationships

Lubin Li[1], Xiaojun Guo[2], Zhenhua Peng[1], Guanshui Liu[1], Hongshui Yuan[2], Baocheng Zhu[2], Kai Yang[3*]

[1]Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; [2]College of Life Sciences, Agriculture University of Hebei, Baoding 071001, China; [3]Beijing Key Laboratory of New Technology in Agriculture Application, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China

Abstract To investigate the effect of the quantity of primer combinations on identifying genetic relationships among bamboo species accurately, we analyzed the diversity of 26 bamboo species with amplified fragment length polymorphism (AFLP). We selected 10 pairs of AFLP primer, and the 10 primer combinations of AFLP markers were analyzed by Nei's genetic distance/unweighted pair group method analysis (UPGMA). Each pair of primers resulted in a group designation, and the relations among the 26 species were confirmed consistently with an increased number of random combinations of AFLP markers used as a clustering statistic. For study of phylogenetics, a sufficient quantity of primer combinations can reveal exact clustering relations. The method of accumulating random combinations of AFLP primers and clustering analysis was applied, and the least number of combinations for testing breeding was confirmed by clustering relations.

Key words AFLP, bamboo, genetic relationships, primer combinations

Li LB, Guo XJ, Peng ZH, Liu GS, Yuan HS, Zhu BC, Yang K (2008). Effect of the quantity of AFLP primer combinations on accurately identifying bamboo genetic relationships. *Chin Bull Bot* **25**, 449–454.

* Author for correspondence. E-mail: yangkai8978@126.com

(责任编辑: 孙冬花)

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t27-405