

## 马蔺种质资源 AFLP 标记遗传多样性分析

牟少华<sup>1,2</sup>, 彭镇华<sup>2\*</sup>, 郅光发<sup>2</sup>, 孙振元<sup>2</sup>, 孙启祥<sup>2</sup>

(1. 国际竹藤网络中心, 北京 100102; 2. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

**摘要:** 利用 AFLP 技术, 选择 *EcoR* I / *Mes* I 这一酶切组合, 应用 18 对 *EcoR* I + 3 / *Mes* I + 3 引物组合进行选择性扩增, 检测 10 个马蔺种群的基因组 DNA 多态性。共扩增出 1 164 个遗传位点, 其中 752 个多态位点, 多态率为 65.11%。并通过 Jaccard 的方法将电泳带矩阵转化为遗传相似性系数矩阵, 进行 UPGMA 聚类分析。结果表明, 当取阈值为 0.74 时, 可以将 10 个种群分为 4 大类群。长春马蔺与其他种源的亲缘关系较远, 单独聚为一类; 宁夏固原、甘肃民勤、武威、北京、山东泰山 5 个种群亲缘关系较近, 聚为一类; 内蒙古太仆寺和西乌旗、新疆乌鲁木齐聚为一类; 河北涿洲马蔺种群单独聚为一类。马蔺群体间的亲缘关系远近与其所处的地理位置有很大的关系, 尤其与纬度因子的关系十分密切。

**关键词:** 马蔺; AFLP; 遗传多样性; 多态性

中图分类号: Q948.15

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2008)01-0095-04

### Genetic diversity of *Iris lactea* determined by AFLP marker

MU Shao-hua<sup>1,2</sup>, PENG Zhen-hua<sup>2</sup>, QIE Guang-fa<sup>2</sup>, SUN Zhen-yuan<sup>2</sup>, SUN Qi-xiang<sup>2</sup>

(1. International Center for Bamboo and Rattan, Beijing 100102;

2. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091)

**Abstract:** The AFLP (amplified fragment length polymorphism) technique was used to analyze genetic diversity of 10 different populations of *Iris lactea* collected from China. Genomic DNA was digested with *EcoR* I and *Mse* I enzymes and amplified with 18 pairs of *EcoR* I + 3 / *Mes* I + 3 Primers combinations. AFLP analysis produced 1 164 scoreable bands, of which 752 (65.11%) were polymorphic. Cluster Analysis was based on the UPGMA method. Populations in Changchun and Zhuozhou city showed a greater genetic variability and were separately classified into two groups. Populations in Guyuan, Minqin, Wuwei, Beijing and Taishan were classified into one group, and those in Taipu, Xiwuqi and Wulumuqi were in another group. The genetic relationships among the populations were related to their locations, especially to the latitude.

**Key words:** *Iris lactea*; AFLP; genetic diversity; polymorphism

马蔺 (*Iris lactea*) 是鸢尾科鸢尾属多年生草本宿根植物, 亦称马莲 (花、草)、马兰 (花)、紫蓝草、兰花草、箭秆风、山必博、蠡实、旱蒲等, 分布于我国东北、华北、西北等地<sup>[1]</sup>, 是一种优良的水保护坡观赏地被植物<sup>[2]</sup>。马蔺分布范围广, 生态类型复杂, 从不同地区引种的马蔺叶宽窄、长度有很大的差别, 花茎的长度、花高、花径方面差别也很大<sup>[3]</sup>。以往对

马蔺的研究主要集中于植物学特性、栽培繁殖、抗性以及细胞学等方面, 对其众多形态变异类型的遗传变异未见有研究<sup>[4]</sup>。本研究采用灵敏度高、重复性好、多态性丰富的 AFLP 技术, 对不同马蔺天然群体之间的遗传多样性进行分析, 以期初步揭示马蔺不同地理变异种的亲缘关系, 建立完整的马蔺系统发育理论奠定基础。

收稿日期: 2007-01-23

基金项目: 国家重大科技基础性工作专项 (2002DEA10009) 资助。

作者简介: 牟少华 (1976 -), 女, 博士, 助研。\* 通讯作者 (Corresponding author) E-mail: mush@icbr.ac.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2003年10月,分别对10个马蔺自然群体进行

叶片采集,每个群体随机选取20个单株,每株取一片幼嫩的完全展开叶,每个叶片取相同质量组成混合样作为一个样品。样品采集后立即放入液氮罐中冷藏。同时记录样地的立体条件(表1)。

表1 马蔺采样群体的立体条件

Table 1 Location of the natural populations investigated in *Iris lactea*

自然群体 Population	采集地 Collection places	经度(E) Longitude	纬度(N) Latitude	海拔/m Altitude	年均温/℃ Annual average temperature	年降水量/mm Annual precipitation
涿洲 Zhuzhou	河北涿州市郊	115°44'	39°35'	28	11.6	617
乌鲁木齐 Wulumuqi	新疆乌鲁木齐南山	87°20'	43°31'	2 718	5.0	165
太仆 Taipu	内蒙古沽源县太仆寺	114°51'	41°55'	1 460	1.2	416
西乌旗 Xiwuqi	内蒙古锡林郭勒西乌珠穆沁旗	117°36'	44°35'	997	1.0	345
长春 Changchun	吉林长春市郊	125°19'	43°45'	195	5.0	592
固原 Guyuan	宁夏固原市郊	106°15'	36°38'	1 648	6.1	492
民勤 Minqin	甘肃民勤沙生植物园	103°05'	38°34'	1 378	7.6	113
武威 Wuwei	甘肃武威市区西郊	101°49'	38°38'	1 535	7.8	191
泰山 Taishan	山东泰山玉皇顶	117°05'	36°12'	1 532	5.3	1 132
北京 Beijing	北京香山	116°25'	39°48'	76	11.6	634

表2 接头及引物序列

Table 2 Adapters and primer sequences

接头或引物 Adapter or primer	序列 Sequences
<i>EcoR</i> I Adapter	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CTGACGCATGGTTAA-5'
<i>Mse</i> I Adapter	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5'
<i>EcoR</i> I -00	5'-GACTGCGTACCAATTC-3'
<i>EcoR</i> I -33	5'-GACTGCGTACCAATTC AAG-3'
<i>EcoR</i> I -34	5'-GACTGCGTACCAATTC AAT-3'
<i>EcoR</i> I -44	5'-GACTGCGTACCAATTC ATC-3'
<i>EcoR</i> I -60	5'-GACTGCGTACCAATTC CTC-3'
<i>EcoR</i> I -63	5'-GACTGCGTACCAATTC GAA-3'
<i>EcoR</i> I -65	5'-GACTGCGTACCAATTC GAG-3'
<i>Mse</i> I-00	5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'
<i>Mse</i> I-31	5'-GATGAGTCCTGAGTAAAAA-3'
<i>Mse</i> I-33	5'-GATGAGTCCTGAGTAAAAG-3'
<i>Mse</i> I-34	5'-GATGAGTCCTGAGTAAAAT-3'
<i>Mse</i> I-44	5'-GATGAGTCCTGAGTAAATC-3'
<i>Mse</i> I-46	5'-GATGAGTCCTGAGTAAATT-3'
<i>Mse</i> I-47	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3'
<i>Mse</i> I-60	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTC-3'
<i>Mse</i> I-63	5'-GATGAGTCCTGAGTAAGAA-3'

接头和引物(表2)由上海博亚生物技术有限公司(BIOASIA)北京分公司合成。Promega Tag DNA polymerase、Promega dNTP 购于北京华绿渊生物技术公司; *Mse*I、*EcoR*I 和 T4 DNA ligase 为 New England

Biolabs 公司产品。全部室内试验于2004-2005年在中国林业科学研究院林业研究所国家林业局林木培育重点实验室完成。

### 1.2 方法

**1.2.1 DNA 提取** 总DNA提取采用CTAB方法<sup>[5]</sup>。DNA的浓度及质量用琼脂糖凝胶电泳估测和检查,最后稀释到50~100 ng·μL<sup>-1</sup>备用。

**1.2.2 AFLP 分析** 本研究AFLP分析的基本程序和 Vos 等<sup>[6]</sup>发明的方法基本相同,仅对体系进行了优化。采用 *EcoR* I / *Mse* I 酶切组合进行基因组限制性酶切。预扩增反应选用引物组合 *EcoR* I 00/ *Mse* I 00, 选择性扩增反应采用引物组合 *EcoR* I + 3/ *Mse* I + 3。PCR 扩增反应在 PCR 仪(Biometra T gradient)上进行。

**1.2.3 电泳** 选择性扩增产物经变性后在6%的变性聚丙烯酰胺序列分析胶上电泳分离,条件是85 W, 3 000 V, 恒功率电泳约90 min。电泳后采用 Tixeir 等<sup>[7]</sup>描述的银染检测方法进行 AFLP 指纹显色反应。

**1.2.4 数据分析** 选择清晰可辨的带,按带的有无构建二进制矩阵,通过 Jaccard 的方法将电泳带矩阵转化为遗传相似性系数矩阵。采用 F James Rohlf (2001) NTSYSpc2. 10e 软件计算相似性系数与遗传距离系数,用 SAHN Clustering 进行不加权成对算术平均法(UPGMA)聚类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 AFLP 指纹图谱

从 48 对引物组合中筛选出 22 对扩增较好的引物,再进行 2 次筛选。最后,确定 18 对扩增较整齐、多态性高的引物组合作为马蔺选择性扩增的引物(图 1)。18 对引物在马蔺 10 个样品基因组中共获得 1 164 条清晰的谱带,其中共有条带 404 条,这是马蔺的基本带;多态性带有 752 条,多态性带占总带数的 65.11%。不同种源马蔺都有特异性带或特异性缺失条带。



图 1 部分银染引物组合 (M47/E34、M63/E33 和 M63/E44) 电泳图谱

Figure 1 Patterns of silver-stained AFLP primer combinations selection (M47/E34, M63/E33 和 M63/E44)

### 2.2 遗传多样性参数

根据遗传相似性系数(GS)可以看出,10 个种群的 GS 在 0.69~0.87 之间,表现出丰富的遗传多样性。其中,长春马蔺种群与其他种群遗传差异最大,遗传相似系数最低,仅为 0.69~0.71;其次,河北涿洲种群与其他种群遗传变异也较大;宁夏固原、甘肃武威、民勤、北京和山东泰山马蔺遗传变异较小,遗传相似系数较高;乌鲁木齐马蔺与太仆寺镇鸢尾遗传变异最小,相似性系数为 0.87,它们与西乌旗马蔺的相似性系数约为 0.79。

### 2.3 聚类分析

根据聚类分析图(图 2),当取阈值为 0.74 时,可以将 10 个种群分为 4 大类群。长春马蔺与其他种源的亲缘关系较远,单独聚为一类;宁夏固原、甘肃民勤、武威、北京、山东泰山 5 个种群亲缘关系较近,聚为一类;内蒙古太仆寺和西乌旗、新疆乌鲁木

齐聚为一类;河北涿洲马蔺种群单独聚为一类。

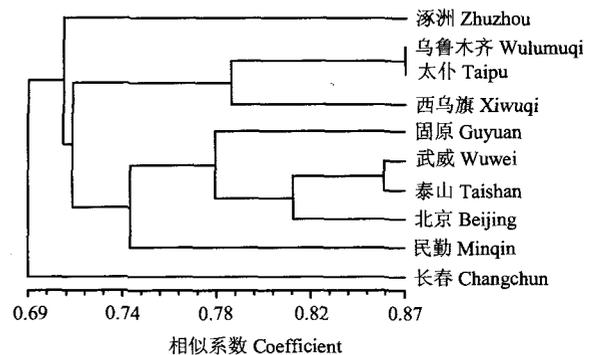


图 2 马蔺基于 SM 相似系数的 AFLP 谱带 UPGMA 聚类

Figure 2 The UPGMA dendrogram of *I. lactea* using SM coefficient

## 3 小结与讨论

### 3.1 AFLP 技术在马蔺遗传多样性研究中的应用

18 对 AFLP 引物分析结果表明,不同种源的马蔺多态性带占总带数的 65.11%,且都有特异性带或特异性缺失条带,这些谱带可以作为识别马蔺的分子标记。由此可见,马蔺与同属的黄菖蒲一样,遗传多样性程度很高<sup>[8]</sup>。天然群体的遗传变异是基因流和选择作用的综合结果。同种植物各个群体空间上的隔离、突变、环境因子造成的选择差、随机遗传漂变、基因流的隔离等都能导致群体基因结构的异质性,从而促进群体分化。在马蔺遗传多样性的检测中,AFLP 是非常有效的工具。

### 3.2 马蔺的亲缘关系分析

由于马蔺植物分布广泛且形态变异很大,如何有效地取样是系统位置和亲缘关系研究的关键。本研究虽然由于种种原因没有收集到我国分布的全部的马蔺样品,但样品来源覆盖了我国西北、华北以及华东地区,可以初步探讨在此范围内马蔺种源间的亲缘关系。在这 10 个马蔺种群中,长春和涿洲种群与其他种群亲缘关系较远,各自单独成为一类,其遗传变异的具体原因有待于进一步探讨。其余 8 个种群主要是以北纬 40° 为分界线聚成 2 类:低于北纬 40° 的宁夏固原、甘肃民勤、武威、北京、山东泰山 5 个种群亲缘关系较近,聚为一类;高于北纬 40° 的内蒙古太仆寺和西乌旗、新疆乌鲁木齐种群为一类。由此可见,马蔺群体间的亲缘关系远近与其所处的地理位置有很大的关系,尤其与纬度因子的关系十分密切。

另外,本试验 DNA 提取采用的是混合样品,它可以作为个体样品的代表,对整个居群的遗传多样性进行评价<sup>[9]</sup>。故本研究集中讨论的是各地理种群间的遗传变异,对种群内的变异有待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京:科学出版社,1985.
- [2] 孟林,张国芳,赵茂林. 水保护坡观赏优良地被植物—马蔺[J]. 农业新技术,2003(3):38.
- [3] 徐飞鹏,岳俊芳. 优良水保护坡观赏地被植物—马蔺的开发应用前景[J]. 内蒙古科技与经济,2003(12):54-55.
- [4] 牟少华,韩蕾,孙振元,等. 鸢尾属植物马蔺的研究现状与开发利用建议[J]. 莱阳农学院学报,2005,77(2):125-128.
- [5] Hamilton A J, Lyett G W. Antisense gene that inhibit synthesis of hormone ethylene in transgenic plants [J]. Nature, 1990, 6 281 (346): 284-287.
- [6] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP—a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21): 4 407-4 414.
- [7] Tixier M H, Sourdille R M, Leroy P, et al. Detection of wheat microsatellites using a non radioactive silver-nitrate staining method [J]. J Genet Breed, 1997, 51: 175-177.
- [8] Veerle L, Isabel R, Els C, et al. A Study of genetic variation in *Iris pseudacorus* populations using amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) [J]. Aquatic Botany, 2002, 73: 19-31.
- [9] 钱韦,葛颂,洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性 [J]. 植物学报, 2000, 42(7): 741-750.

## 本刊外聘编委 黎志康研究员

中国农业科学院农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程首席科学家、国际水稻研究所驻中国代表科学家和全球水稻分子育种协作网协调科学家。

专业特长:植物分子遗传学(基因定位、数量性状遗传作图、植物分子标记辅助育种、功能等位基因发掘和复杂农艺性状的功能基因组研究)及其在水稻育种、遗传和进化中的应用。国际动植物基因组年会植物分子育种分会的主持人,国际遗传学大会 Invited Speaker。是美国科学促进协会会员,美国遗传学学会会员,美国作物科学学会会员。

1974年10月—1977年9月就读于安徽农业大学,1980年9月—1983年8月在中国农业科学院学习,获硕士学位,1985年1月—1989年7月在美国加州大学戴维斯校区学习,获博士学位。1997年11月—2003年7月在国际水稻研究所遗传育种系任高级研究员,2003至今在中国农业科学院作物科学研究所工作,任水稻分子遗传和育种研究员。

在国外曾主持过8个项目的研究,总研究经费额达300多万美元。曾设计、策划并主持了有11个国家和31个研究所参加的“全球水稻分子育种计划”,取得了重大的进展。目前主持的在研项目包括来自美国洛克菲勒基金的项目2项、国际农业研究中心挑战计划1项,总研究经费额达170多万美元。此外还主持或承担国家科技部973、863和农业部948项目3项,总研究经费额达700万人民币。