



洋桔梗品种遗传多样性的 AFLP 分析

王瑞鑫, 韦银凤, 李琳, 付晓佳, 李爽, 陈崇顺*

(南京师范大学 生命科学院/江苏省生物多样性与生物技术重点实验室, 南京 210023)

摘要: 该研究以洋桔梗(*Eustoma grandiflorum*) 2 个品种‘玛丽艾基粉色’和‘圣剑白底紫边’为试材, 提取叶片 DNA, 经过 *Eco*R I / *Mse* I 双酶切、连接、预扩增、选择性扩增, 建立了洋桔梗的 AFLP 最佳反应体系; 并以 64 个常用引物组合进行扩增, 得到 154 个多态性条带, 从中筛选出扩增条带较多且多态性较好的 4 个引物组合(*E*-ACA/*M*-CTC, *E*-ACC/*M*-CAC, *E*-AGC/*M*-CTT, *E*-ACT/*M*-CAG), 其多态位点百分率均值为 24.36%。利用上述 4 个引物组合, 以最佳反应体系为基础, 构建了 7 个常见洋桔梗品种的 AFLP 指纹图谱, 统计 7 个品种各 4 个引物组合在 1 000~300 bp 区间 7 个区段的扩增条带, 并将各个品种的 AFLP 指纹图谱转换成各品种 4 组 7 位数构成的 28 位特异数字指纹, 极大地方便了种质比较及鉴定; 7 个品种间的遗传相似系数介于 0.683 5~0.860 8 之间, 平均值为 0.774 6。研究结果为进一步进行洋桔梗的种质研究及利用奠定了基础。

关键词: 洋桔梗; AFLP; 最佳反应体系; 引物筛选; 指纹图谱; 特异数字指纹; 遗传相似系数

中图分类号: Q789

文献标志码: A

AFLP Analysis of Genetic Diversity among Cultivars in *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.

WANG Ruixin, WEI Yin Feng, LI Lin, FU Xiaojia, LI Shuang, CHEN Chongshun*

(Jiangsu Key Laboratory of Biodiversity and Biotechnology, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: Taking *Eustoma grandiflorum* cultivars ‘Double Mariachi Pink’ and ‘Excalibur Blue Picotee’ as experimental material, we extracted genomic DNA from the leaves. The optimized AFLP reaction system was established, after *Eco*R I / *Mse* I double enzyme digestion, ligation, pre-amplification and selective amplification. 154 polymorphic bands were acquired with 64 primer combinations commonly used, from which 4 selective amplification primer combinations(*E*-ACA/*M*-CTC, *E*-ACC/*M*-CAC, *E*-AGC/*M*-CTT, *E*-ACT/*M*-CAG) with more polymorphic amplified bands were selected. The average percentage of polymorphic bands was 24.36%. Using the 4 selective amplification primer combinations, through the optimized reaction system, the AFLP fingerprints of 7 common *E. grandiflorum* cultivars were constructed. Subsequently, the AFLP fingerprints were transformed into the specific digital fingerprints of 28 digits, based on the counting of the amplified bands in the 7 sections of 1 000~300 bp interval of the 4 primer combinations, greatly facilitating the comparison and identification of the germplasm. The genetic similarity coefficient between the cultivars ranged 0.683 5~0.860 8, and the average value was 0.774 6. The results of that study have laid an important foundation for the further research on *E. grandiflorum*.

Key words: *Eustoma grandiflorum*; AFLP; optimized AFLP reaction system; primer selection; fingerprint; specific digital fingerprint; genetic similarity

收稿日期: 2014-02-26; 修改稿收到日期: 2014-04-29

基金项目: 国家基础科学人才培养基金(J1103507)

作者简介: 王瑞鑫(1990—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事植物生物技术与分子生物学研究。E-mail: wangruixin90@126.com

* 通信作者: 陈崇顺, 博士, 硕士生导师, 主要从事植物生物技术与分子生物学研究。E-mail: chenrongshun@njnu.edu.cn

洋桔梗 [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.] 又名草原龙胆, 是龙胆科草原龙胆属多年生宿根草本花卉, 生产上常作一、二年生栽培^[1]。洋桔梗原产于美洲, 花姿高雅秀丽, 妩媚动人, 插花效果好, 瓶插寿命长, 现作为国际流行的切花品种广泛种植^[2-3]。但洋桔梗未开花时, 不同品种的形态特征很相似; 同时, 缺少能够区别不同种质的有效方法, 给生产应用等带来诸多不便。因此, 进行洋桔梗品种遗传多样性及种质鉴定研究是十分必要的。

AFLP (amplified fragment length polymorphism, 扩增片段长度多态性) 技术是由 Vos 等^[4]在 RFLP 和 RAPD 基础上发展起来的一种选择性扩增限制性酶切片段的方法^[5-6], 其实验过程包括酶切、连接、预扩增、选择性扩增、变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染等。它是对全基因组进行多态性分析的一种分子标记技术^[7-8], 既克服了 RFLP 技术复杂、RAPD 稳定性差的缺点, 同时又兼二者之长, 具有多态性好、稳定性高等特点^[9]。目前, 其已广泛应用于物种多样性研究^[10-13]、物种进化分析、品种鉴定^[14]、遗传图谱构建^[15]等多个方面。

本研究首先以本实验室保存的洋桔梗‘玛丽艾基粉色’和‘圣剑白底紫边’2 个品种为试材, 优化 AFLP 的主要反应条件, 建立最佳反应体系; 然后对 64 个常用引物组合^[16]进行筛选; 再利用筛选出的扩增条带较多且多态性较好的引物组合, 以最佳反应体系为基础, 构建‘玛丽艾基粉色’、‘圣剑白底紫边’、‘玛丽艾基绿色’、‘露西塔 1 白底粉边’、‘露西塔 2 白色’、‘雪莱香槟色’和‘维纳斯粉色’7 个常见洋桔梗品种的 AFLP 指纹图谱, 转化为特异数字指纹、进行品种间遗传相似系数比较等遗传多样性分析, 为进一步对洋桔梗的种质研究利用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

7 个常见洋桔梗品种: ‘玛丽艾基粉色’、‘圣剑白底紫边’、‘玛丽艾基绿色’、‘露西塔 1 白底粉边’、‘露西塔 2 白色’、‘雪莱香槟色’和‘维纳斯粉色’购于昆明缤纷园艺有限公司及南京市花卉商店。

1.2 叶片基因组 DNA 提取及检测

取洋桔梗新鲜叶片 100 mg, 在研钵中加入液氮充分研磨成细粉, 利用植物基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取基因组 DNA, 在 4 °C 下保存备用。

对提取的 DNA 进行检测: 取 5 μ L DNA, 加入 1 μ L 6 $\times$ Loading buffer, 进行 1% 的琼脂糖凝胶水

平电泳; 取 2 μ L DNA, 用超微量分光光度计 OD-2000 测定浓度, 根据 A_{260}/A_{280} 的比值判断 DNA 纯度^[17]。对符合要求的样品用 ddH₂O 稀释至 30 ng/ μ L, 在 4 °C 下保存备用。

1.3 酶切及连接

1.3.1 基因组 DNA 的 *EcoR* I / *Mse* I 双酶切 双酶切采用 20.0 μ L 反应体系, 为确定适合基因组 DNA 的酶切时间和酶切温度, 本研究设置 3 h、6 h、9 h、12 h 等 4 个酶切时间梯度和 3 U、4 U、5 U 等 3 个酶量梯度^[18]。体系为 DNA 模板 5 μ L (约 150 ng), *EcoR* I (10 U/ μ L) 0.3 μ L/0.4 μ L/0.5 μ L, *Mse* I (10 U/ μ L) 0.3 μ L/0.4 μ L/0.5 μ L, 10 $\times$ buffer Tango 5 μ L, 用 ddH₂O 补足至 20.0 μ L。置于恒温水浴锅中 37 °C 分别酶切 3 h、6 h、9 h、12 h。然后置于 65 °C 水浴 20 min 终止反应, 冰浴待用。进行 1% 琼脂糖凝胶水平电泳, 检查酶切效果。

1.3.2 酶切片段与接头的连接 *EcoR* I 接头序列为 5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3' 和 3'-CCA-TGCGTCAGATGCTC-5', *Mse* I 接头序列为 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 和 3'-TACTCAGGA-CTCAT-5'。连接采用 20.0 μ L 反应体系, *EcoR* I 接头 (5 μ mol/L) 1 μ L, *Mse* I 接头 (50 μ mol/L) 1 μ L, T₄ DNA Ligase (10 U/ μ L) 1 μ L, 10 $\times$ T₄ DNA Ligase buffer 2 μ L, 酶切的 DNA 10 μ L, 用 ddH₂O 补足至 20.0 μ L。设置 25 °C 和 37 °C 2 个连接温度, 6 和 12 h 2 个连接时间进行连接。对连接产物进行预扩增后, 根据电泳结果筛选最佳连接条件。

1.4 预扩增及其产物检测

将连接产物用 ddH₂O 稀释 0 倍、5 倍、10 倍分别用于预扩增。采用 25.0 μ L 体系, 连接产物 3 μ L, 50 μ mol/L *EcoR* I 引物 (5'-GACTGCGTAC-CAATTCA-3') 1 μ L, 50 μ mol/L *Mse* I 引物 (5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3') 1 μ L, 10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L, 25 μ mol/L MgCl₂ 1.5 μ L, 25 μ mol/L dNTPs 0.2 μ L, 5 U/ μ L *Taq* DNA 聚合酶 0.4 μ L, 用 ddH₂O 补足至 25.0 μ L。预扩增程序为 94 °C 变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保温。在反应结束后, 取 5 μ L 预扩增产物, 进行 1% 琼脂糖凝胶水平电泳, 检查扩增效果。

1.5 选择性扩增

1.5.1 选择性扩增反应 将预扩增产物用 ddH₂O 稀释 15 倍用于选择性扩增。选择性扩增引物为 8 条 *EcoR* I (*EcoR* I + AAC/AAG/ACA/ACT/

ACC/AGG/AGC/ACG)引物和 8 条 *Mse* I (*Mse* I + CAA/CAC/CAG/CAT/CTA/CTC/CTG/CTT) 引物,共 64 个引物组合。采用 25.0 μ L 体系,预扩增产物 3 μ L,*Eco*R I 引物(50 μ mol/L)1 μ L,*Mse* I 引物(50 μ mol/L)1 μ L,10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L,*MgCl*₂(25 μ mol/L)1.5 μ L,dNTPs(25 μ mol/L)0.2 μ L,*Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.4 μ L,用 ddH₂O 补足至 25.0 μ L。选择性扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 变性 2 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,65 $^{\circ}$ C 退火(每个循环结束后退火温度降低 0.7 $^{\circ}$ C)30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,13 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,56 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,23 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 20 min,4 $^{\circ}$ C 保温^[18]。

1.5.2 扩增产物的检测 利用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,检测扩增产物,70 W 恒功率预电泳 40 min,使整个胶板温度均匀(50 $^{\circ}$ C 左右)。将选择性扩增产物与 Loading buffer(98% 去离子甲酰胺,10 mmol/L EDTA,0.25% 溴酚蓝和二甲苯青)按体积比 1:1 混合,95 $^{\circ}$ C 变性 5 min,冰浴待用。每个泳道加样 5 μ L,60 W 恒功率电泳,电泳结束后通过银染检测扩增产物^[19]。

1.6 引物的筛选

胶板干燥后及时记录,将电泳图谱上清晰且可重复出现的条带记为“1”,同一位置没有条带的记为“0”,生成“0”和“1”组成的原始矩阵。根据扩增条带数量和多态性筛选引物,确定较优引物组合。

1.7 AFLP 指纹图谱的构建、特异数字指纹的转换及遗传相似系数的计算

采用上述最佳反应条件及筛选出的引物组合,进行扩增、电泳,构建 AFLP 指纹图谱。对聚丙烯酰胺凝胶电泳的银染结果进行拍照,并且只统计能够清晰分辨的条带^[20]。统计各品种 4 个引物组合在 1 000~300 bp 区间 7 个区段的扩增条带,将各品种 AFLP 指纹图谱转换成各品种由 28 位数构成的特异数字指纹。

将上述“0”、“1”原始矩阵数据输入 NTSYS 2.10 软件,计算各品种间的遗传相似系数。

2 结果与分析

2.1 AFLP 最佳反应体系的建立及引物的筛选

基因组 DNA 提取的样品电泳结果显示:提取得到的基因组 DNA 长度在 15 000 bp 左右,条带整齐清晰(图 1),用 OD-2000 测得所提取 DNA 的浓度,根据 A_{260}/A_{280} 比值判断其纯度,符合 AFLP 试验下游操作的要求。对酶切条件的处理,得到最佳

条件为酶切时间 6 h、酶量 4 U。在对不同条件下连接产物预扩增后发现,在 25 $^{\circ}$ C、连接 12 h 时,获得的条带最亮(图 2)。连接产物用于预扩增时,3 个稀释倍数均能得到预扩增产物,其中连接产物不稀释时,条带最亮,预扩增效果最好。对试验过程的不同条件探索后,建立的 AFLP 最佳反应体系如下:

(1)酶切体系 DNA(30 ng/ μ L) 5 μ L,*Eco*R I (10 U/ μ L)0.4 μ L,*Mse* I (10 U/ μ L)0.4 μ L,10 $\times$ buffer Tango 5 μ L,用 ddH₂O 补足至 20.0 μ L。酶切时间 6 h,酶切温度 37 $^{\circ}$ C。

(2)连接体系 酶切产物 10 μ L,*Eco*R I 接头(5 μ mol/L)1 μ L,*Mse* I 接头(50 μ mol/L)1 μ L,*T*₄ DNA Ligase(10 U/ μ L)1 μ L,10 $\times$ *T*₄ DNA Ligase buffer 2 μ L,用 ddH₂O 补足至 20.0 μ L。连接时间 12 h,连接温度 25 $^{\circ}$ C。

(3)预扩增体系 连接产物 3 μ L,*Eco*R I 引物(50 μ mol/L)1 μ L,*Mse* I 引物(50 μ mol/L)1 μ L,10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L,*MgCl*₂(25 μ mol/L)1.5 μ L,dNTPs(25 μ mol/L)0.2 μ L,*Taq* DNA 聚合酶(5

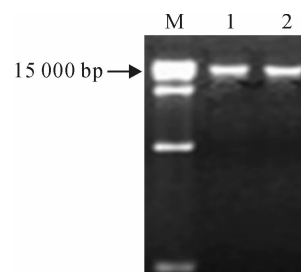


图 1 基因组 DNA 的凝胶电泳

M. DL15000;1. 玛丽艾基粉色;2. 圣剑白底紫边

Fig. 1 Gel electrophoresis of genomic DNA

M. DL15000;1. Double Mariachi Pink;

2. Excalibur Blue Picotee

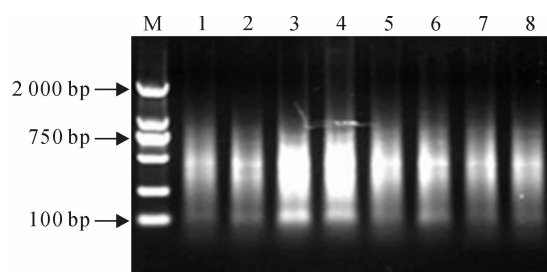


图 2 不同连接条件下预扩增产物的凝胶电泳检测

M. DL2000;1,2. 25 $^{\circ}$ C, 6 h;3,4. 25 $^{\circ}$ C, 12 h;5,6. 37 $^{\circ}$ C, 6 h;7,8. 37 $^{\circ}$ C, 12 h;1,3,5,7. 玛丽艾基粉色;2,4,6,8. 圣剑白底紫边

Fig. 2 Pre-amplification patterns of different ligations

M. DL2000;1,2. 25 $^{\circ}$ C, 6 h;3,4. 25 $^{\circ}$ C, 12 h;5,6. 37 $^{\circ}$ C, 6 h;

7,8. 37 $^{\circ}$ C, 12 h;1,3,5,7. Double Mariachi Pink;

2,4,6,8. Excalibur Blue Picotee

U/ μ L)0.4 μ L,用 ddH₂O 补足至 25.0 μ L。

(4)选择性扩增体系 预扩增产物(稀释 15 倍)3 μ L,*Eco*R I 引物(50 μ mol/L)1 μ L,*Mse* I 引物(50 μ mol/L)1 μ L,10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L,MgCl₂ (25 μ mol/L)1.5 μ L,dNTPs(25 μ mol/L)0.2 μ L,*Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.4 μ L,用 ddH₂O 补足至 25.0 μ L。

64 个引物组合选择性扩增结果表明,64 个引物组合均能对 2 个品种‘玛丽艾基粉色’和‘圣剑白底紫边’进行扩增。分析电泳图谱,共获得 154 个多态性条带;筛选出多态性较好和扩增条带较多的 4 个引物组合,分别为*E*-ACA/*M*-CTC、*E*-ACC/*M*-CAC、

E-AGC/*M*-CTT 和 *E*-ACT/*M*-CAG,其平均多态位点百分率为 24.36%。

2.2 AFLP 指纹图谱的构建、特异数字指纹的转换及遗传相似系数的计算

采用上述最佳反应条件及筛选出的 4 个引物组合,进行扩增、电泳,获得了 7 个洋桔梗品种清晰的 AFLP 指纹图谱(图 3)。统计指纹图谱中各个品种 4 个引物组合在 1 000~300 bp 区间 7 个区段的扩增条带,将各个品种的 AFLP 指纹图谱转换成各个品种 4 个引物组合各 7 个区段共 28 位数构成的特异数字指纹(表 1)。利用 NTSYS 2.10 软件计算出 7 个品种间的遗传相似系数(表 2)在 0.683 5~

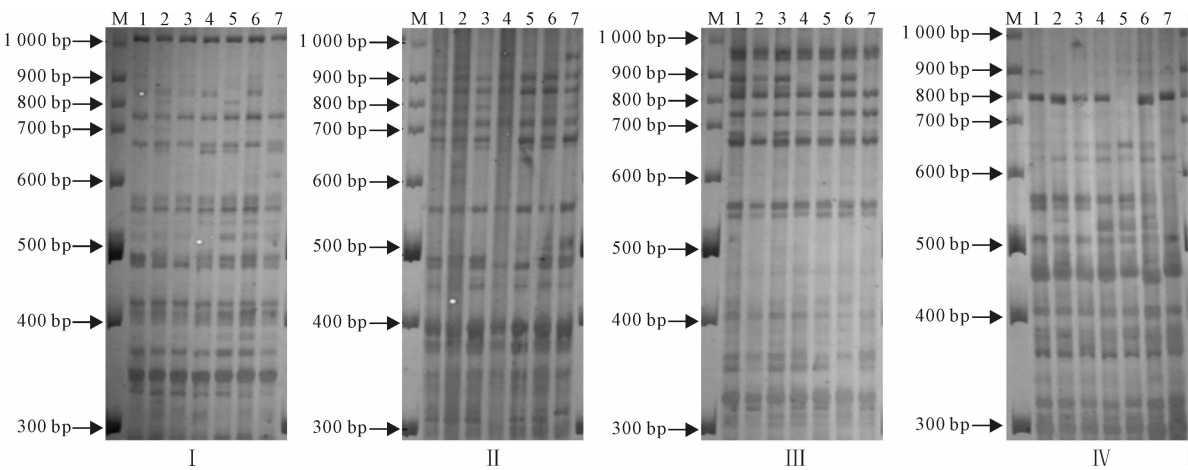


图 3 7 个洋桔梗品种 4 个引物组合的 AFLP 指纹图谱

M. DL1000;1. 玛丽艾基粉色;2. 玛丽艾基绿色;3. 圣剑白底紫边;4. 露西塔 1 白底粉边;5. 露西塔 2 白色;
6. 雪莱香槟色;7. 维纳斯粉色; I、II、III、IV 分别为 *E*-ACA/*M*-CTC, *E*-ACC/*M*-CAC, *E*-AGC/*M*-CTT, *E*-ACT/*M*-CAG

Fig. 3 The fingerprints of 7 cultivars

M. DL1000;1. Double Mariachi Pink;2. Mariachi Lime Green;3. Excalibur Blue Picotee;4. Rosita Pink Picotee;
5. Rosita 2 White;6. Cremony Orange;7. Venus Pink; I, II, III, IV. Different primer combinations

E-ACA/*M*-CTC, *E*-ACC/*M*-CAC, *E*-AGC/*M*-CTT, *E*-ACT/*M*-CAG

表 1 4 个 AFLP 引物组合构建的 7 个品种的特异数字指纹

Table 1 DNA digital fingerprints of 7 cultivars established by 4 AFLP primer combinations

品种 Cultivar	引物组合 Primer combination			
	<i>E</i> -ACA/ <i>M</i> -CTC	<i>E</i> -ACC/ <i>M</i> -CAC	<i>E</i> -AGC/ <i>M</i> -CTT	<i>E</i> -ACT/ <i>M</i> -CAG
玛丽艾基粉色 Double Mariachi Pink	1211445	1222134	2212324	0111336
玛丽艾基绿色 Mariachi Lime Green	1123445	1222113	2211213	0011435
圣剑白底紫边 Excalibur Blue Picotee	1111345	0222134	2212225	0012324
露西塔 1 粉边 Rosita Pink Picotee	1112345	0210003	2112226	0112335
露西塔 2 白色 Rosita 2 White	1023446	0222124	2212226	0102435
雪莱香槟色 Cremony Orange	1212446	0222234	2212222	0112436
维纳斯粉色 Venus Pink	1113344	1222334	2112224	0111136

注:‘xxxxxxx’ 7 位数字,从左至右依次代表扩增产物在 1 000~901 bp、900~801 bp、800~701 bp、700~601 bp、600~501 bp、500~401 bp、400~300 bp 共 7 个区段内的条带数量。

Note: ‘xxxxxxx’ 7 digits: from left to right, the band numbers of the amplified products in the 7 sections: 1 000~901 bp, 900~801 bp, 800~701 bp, 700~601 bp, 600~501 bp, 500~401 bp, 400~300 bp.

表 2 不同品种间的遗传相似系数

Table 2 The genetic similarity coefficients among different cultivars

样品名称 Cultivar	玛丽艾基粉色 Double Mariachi Pink	玛丽艾基绿色 Mariachi Lime Green	圣剑白底紫边 Excalibur Blue Picotee	露西塔 1 粉边 Rosita Pink Picotee	露西塔 2 白色 Rosita 2 White	雪莱香槟色 Cremony Orange	维纳斯粉色 Venus Pink
玛丽艾基粉色 Double Mariachi Pink	—						
玛丽艾基绿色 Mariachi Lime Green	0.797 5	—					
圣剑白底紫边 Excalibur Blue Picotee	0.860 8	0.759 5	—				
露西塔 1 粉边 Rosita Pink Picotee	0.746 8	0.721 5	0.759 5	—			
露西塔 2 白色 Rosita 2 White	0.810 1	0.784 8	0.822 8	0.810 1	—		
雪莱香槟色 Cremony Orange	0.860 8	0.784 8	0.797 5	0.734 2	0.822 8	—	
维纳斯粉色 Venus Pink	0.784 8	0.683 5	0.696 2	0.734 1	0.721 5	0.772 2	—

0.860 8之间,平均值为 0.774 6。

3 讨 论

AFLP、RAPD 和 ISSR 是 3 种常用于物种多样性研究、种质鉴定和遗传图谱构建的分子标记技术。至今,已有许多同时使用这 3 种分子标记的比较研究,如 Zhang 等^[21]进行关于菊花遗传连锁图谱的研究中,根据得到的连锁图谱发现,RAPD 和 ISSR 多态性水平比 AFLP 高,但是 AFLP 扩增的有效条带总数比 RAPD 和 ISSR 高很多;Reunova 等^[22]关于高丽参遗传变异的研究中发现,虽然 AFLP、RAPD 和 ISSR 检测出的种群分化水平均较低,但是在检测高丽参遗传变异时,AFLP 检测出更高的遗传变异水平;Badfar-Chaleshtori 等^[23]有关冠花贝母种群遗传多样性研究表明,这 3 种方法均能检测出基因组中 DNA 序列的多态性,AFLP 技术检测出多态 DNA 标记达 99.5%,而 ISSR、RAPD 则分别是 80.53%与 83.2%,AFLP 比 ISSR、RAPD 更有效。此前,本实验室建立了洋桔梗 ISSR 最佳反应体系,并进行了相关遗传多样性分析^[24]。利用该 ISSR 分子标记成功检测出了受试的 4 个洋桔梗品种之间、同一品种 F₁ 代及 F₂ 代之间的遗传多样性,但未能检测出同一品种 F₁ 代不同株系之间等的遗传多样性。本研究以洋桔梗 AFLP 最佳反应体系及筛选出的 4 个最适引物组合,构建了受试的 7 个洋桔梗品种多态性好、稳定性高的 AFLP 指纹图谱,有效检测出了受试的 7 个洋桔梗品种间的遗传多样性。本研究结果为进一步进行洋桔梗的种质研究及利用奠定了重要基础。

为方便种质比较、鉴定,本研究还统计了该

AFLP 指纹图谱中各个品种 4 个引物组合(*E*-ACA/*M*-CTC、*E*-ACC/*M*-CAC、*E*-AGC/*M*-CTT 和 *E*-ACT/*M*-CAG)在 1 000~300 bp 区间 7 个区段的扩增条带,进一步将各个品种的 AFLP 指纹图谱转换成各个品种 4 个引物组合各 7 个区段共 28 位数构成的特异数字指纹(‘玛丽艾基粉色’的特异数字指纹为 1211445、1222134、2212324、0111336;‘玛丽艾基绿色’的特异数字指纹为 1123445、1222113、2211213、0011435)。根据不同品种等的特异数字指纹,直接比较它们的特异数字指纹差异,即可很容易地将它们加以区分、鉴定。与甘蔗^[20]、西瓜^[25]的相关研究比较,本研究得到的特异数字指纹更加具体明确,且该特异数字指纹是以扩增条带(不是差异条带)为基础构建的。因此,其可不以与其它种质比较为条件而独立构建。

有许多不同分类地位植物之间遗传相似系数的研究,如番石榴属^[26]的两个种之间的遗传相似系数在 0.28~0.98 之间,黑麦属^[27]的 12 个种与亚种之间的遗传相似系数在 0.49~0.79 之间,沙特阿拉伯枣椰树^[28]的 10 个品种之间的遗传相似系数在 0.63~0.84 之间。同属的种与种、同属的种与亚种、同种不同品种之间的遗传相似系数变幅范围越来越小,遗传差异越来越小。本研究利用 NTSYS 2.10 软件计算出 7 个洋桔梗品种间的遗传相似系数在 0.683 5~0.860 8 之间,遗传相似系数变化幅度较小,品种间遗传差异较小。

在本研究的基础上,可深入探究 AFLP 分子标记方法的敏感性,建立洋桔梗更多种质的特异指纹数据库,进一步开展更多洋桔梗(不同品种间及同一品种 F₁ 代株间等)遗传多样性分析及种质鉴定研究。

参考文献:

[1] LI ZH Y(李竹英),WU J(吴 军). Study on germination of different varieties of *Eustoma grandiflorum*[J]. *Northern Horticulture* (北方

- 园艺), 2011, (19): 63–65 (in Chinese).
- [2] OHKI T, KAJIHARA H, MAOKA T. First report of *Moroccan pepper virus* on lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) in Japan[J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2014, **80**(1): 90–93.
 - [3] ZHONG B(钟波). Study on key technology of production tissue culture seedling of *Eustoma grandiflorum*[J]. *Northern Horticulture* (北方园艺), 2012, (16): 90–92 (in Chinese).
 - [4] 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.
 - [5] VAN T T, PENG J, MARTIN S K. Using AFLP markers to determine the genomic contribution of parents to populations[J]. *Crop Science*, 1997, **37**(4): 1 370–1 373.
 - [6] ROA A, MAYA M, DUQUE M, et al. AFLP analysis of relationships among cassava and other *Manihot* species[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, **95**(5–6): 741–750.
 - [7] KARP A. The new genetic era: will it help us in managing genetic diversity?[J]. *International Plant Genetic Resources Institute*, 2002, (6): 43–56.
 - [8] WANG F, LI F D, WANG J. Genetic diversity of Chinese and CIP potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm assessed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers[J]. *Potato Research*, 2013, **56**(3): 167–178.
 - [9] LIN H(林鸿), LIU S X(刘三峡), TAO Q L(陶秋莲), et al. An analysis of 23 *Iris* L. germplasm based on molecular markers[J]. *Journal of Wuhan University* (Nat. Sci. Ed.) (武汉大学学报·理学版), 2012, **58**(4): 332–336 (in Chinese).
 - [10] PETE L, JAIME M, SAMUEL M, et al. Population variation of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in the Western Hemisphere [J]. *Journal of Insect Science*, 2007, **7**(5): 1–10.
 - [11] KRUMM J T, HUNT T E, SKODA S R, et al. Genetic variability of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, suggests gene flow between populations in the midwestern united states[J]. *Journal of Insect Science*, 2008, (8): 1–12.
 - [12] ALAMALAKALA L, SKODA S R, FOSTER J E, et al. Amplified fragment length polymorphism used for inter- and intraspecific differentiation of screwworms (Diptera: Calliphoridae) [J]. *Bulletin of Entomological Research*, 2009, **99**(2): 139–149.
 - [13] ALBRECHT M, KNEELAND KM, LINDROTH E, et al. Genetic diversity and relatedness of the mangrove *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae) using amplified fragment polymorphism (AFLP) among locations in Florida, USA and the Caribbean [J]. *Journal of Coastal Conservation*, 2013, **17**(3): 483–491.
 - [14] 陈树文, 苏少范. 农田杂草识别与防除新技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007: 2–8.
 - [15] ZHAO L H(赵丽华), LI M Y(李名扬), WANG X L(王先磊). Genetic diversity and genetic relationship of pomegranate (*Punica granatum*) in Sichuan and Yunnan evaluated by AFLP markers[J]. *Scientia Silvae Sinicae* (林业科学), 2010, **46**(11): 168–173 (in Chinese).
 - [16] GUO X B(郭新波), ZANG G G(臧巩固), ZHAO L N(赵立宁), et al. Establishment of AFLP reaction system in *Boehme riaticrispis* (Hance) Makino [J]. *Journal of Northwest A&F University* (Nat. Sci. Ed.) (西北农林科技大学学报·自然科学版), 2008, **36**(6): 41–47 (in Chinese).
 - [17] 郑成木, 张汉尧. 植物分子标记原理与方法[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2002: 111.
 - [18] DAI X G(戴晓港), JU J T(渠纪腾), FENG K(冯凯), et al. Establishment of AFLP reaction system for *Salix integra* and primer selection [J]. *Journal of Southwest Forestry University* (西南林业大学学报), 2012, **32**(1): 17–24 (in Chinese).
 - [19] CHANF CH R(常楚瑞), WANG X L(王晓丽), LONG Q D(龙庆德). The research of silver staining in AFLP of *Gastrodia elata* Blume [J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials* (中药材), 2006, **29**(2): 126–128 (in Chinese).
 - [20] LI M(李鸣), TAN Y M(谭裕模), LI Y R(李杨瑞), et al. AFLP molecular analysis of genetic difference between cultivars in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) [J]. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2004, **30**(10): 1 008–1 013 (in Chinese).
 - [21] ZHANG F, CHEN S, CHEN F, et al. A preliminary genetic linkage map of chrysanthemum (*Chrysanthemum mori folium*) cultivars using RAPD, ISSR and AFLP markers[J]. *Scientia*, 2010, **125**(3): 422–428.
 - [22] REUNOVA G D, KATS I L, MUZORAK T I, et al. Polymorphism of RAPD, ISSR and AFLP markers of the panax ginseng CA Meyer (Araliaceae) genome [J]. *Russian Journal of Genetics*, 2010, **46**(8): 938–947.
 - [23] BADFAR-CHALESHTORI S, SHIRAN B, KOHGARD M, et al. Assessment of genetic diversity and structure of Imperial Crown (*Fritillaria imperialis* L.) populations in the Zagros region of Iran using AFLP, ISSR and RAPD markers and implications for its conservation [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2012, **42**(6): 35–48.
 - [24] MA W Y(马文晔), CHEN CH SH(陈崇顺), et al. Establishment of optimal ISSR reaction system and genetic diversity detection among cultivars for *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences* (江苏农业科学), 2010, **38**(1): 43–46 (in Chinese).
 - [25] CHE K P, XU Y, LIANG CH Y, et al. AFLP fingerprint and SCAR marker of watermelon core collection [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2003, **45**(6): 731–735.
 - [26] CORREA LC, SANTOS CAF, LIMA GPP, et al. Genetic similarity among accessions of Guava and Brazilian Guava *aracazeiros* based on AFLP markers [J]. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 2011, **33**(3): 859–867.
 - [27] ĆWIKLINSKA A, BRODA Z, BOCIANOWSKI J, et al. The usefulness of RAPD and AFLP markers for determining genetic similarity in rye (*Secale* L.) species and subspecies [J]. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 2010, **52**(1): 19–25.
 - [28] JAMAL S M S, SALAH A A, SAMEERA B, et al. Characterization of ten date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars from Saudi Arabia using AFLP and ISSR markers [J]. *Comptes Rendus Biologies*, 2014, **337**(1): 6–18.