

# 版纳甜龙竹 DNA 提取方法及 AFLP 反应体系建立研究

杨清<sup>1,2</sup> 苏光荣<sup>3</sup> 韩蕾<sup>4</sup> 王正良<sup>1</sup> 孙启祥<sup>4</sup> 彭镇华<sup>4</sup>

(1. 中国科学院 西双版纳热带植物园, 云南 勐腊 666303; 2. 国际竹藤网络中心, 中国林业科学研究院 研究生院, 北京 100091; 3. 云南省景洪市林业局, 云南 景洪 666100; 4. 中国林业科学研究院 林研所, 北京 100091)

**摘要:** 用改进的 CTAB 法, 在提取液中加入 2% PVP (V/V) 和 2%  $\beta$ -巯基乙醇, 提取到了高质量的基因组 DNA,  $OD_{260}/OD_{280}$  在 1.7~1.9 之间, 蛋白质、多酚类、色素、RNA 等去除较彻底, 适于 AFLP 分析。通过对版纳甜龙竹 DNA 提取、酶切连接、预扩增、选择性扩增等试验过程中各关键因素的比较研究, 建立了优化的 AFLP 分子标记体系, 得到了清晰的 AFLP 银染指纹图谱, 试验结果重复性好。从 64 对 *Mse* I 和 *Pst* I 引物中筛选出 8 对扩增效果好的引物, 利用筛选出 8 对引物对 30 份材料进行分析, 共扩增出 256 条多态性带, 获得 32 490 个扩增位点, 有 13 289 个位点具有多态性, 平均每对引物获得 4 061.25 个扩增位点, 其中具有多态性的位点为 1 661.125 个, 平均多态检出率为 40.90%。8 对引物组合对版纳甜龙竹 30 个个体的区分率达到 100%。表明 AFLP 用于版纳甜龙竹种内不同材料间的遗传多样性分析是可行的。

**关键词:** 版纳甜龙竹; DNA 提取; AFLP; 影响因素

中图分类号: S795.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)增刊-0032-06

## Study on Genomic DNA Extraction Method and AFLP Amplification Reaction System of *D. hamiltonii* Nees et Arn. ex Munro

YANG Qing<sup>1,2</sup>, SU Guang-rong<sup>3</sup>, HAN Lei<sup>4</sup>, WANG Zheng-liang<sup>1</sup>, SUN Qi-xiang<sup>4</sup>, PENG Zhen-hua<sup>4</sup>

(1. Xishuangbanna Tropical Botanic Gardens, Chinese Academy of Science, Menglun 666303, China;

2. Graduate School of International Centre for Bamboo and Rattan & Chinese Academy of Forestry,

Beijing 100091, China; 3. Forestry Department of Jinghong City in Xishuangbanna,

Jinghong 666100, China; 4. Forestry Institute of Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

**Abstract:** The study on extraction of DNA with improved CTAB (cetyl-trimethyl-ammonium bromide) method from *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. ex Munro. It showed that CTAB buffer supplemented with 2% PVP (poly vinyl pyrrolidone) and 2%  $\beta$ -Mercaptoethanol was suitable for the genomic DNA extraction of *D. hamiltonii* Nees et Arn. ex Munro, with  $OD_{260}/OD_{280}$  value of 1.7-1.9, representing high purity of the extracted DNA and the complete elimination of protein, phenol, pigment and RNA. Thus the improved CTAB method was approved suitable for further AFLP analysis of *D. hamiltonii*. Some key factors affecting DNA extraction, restriction-ligase reaction, pre-amplification and amplification processes were studied and an optimized AFLP reaction system of *D. hamiltonii* was established. With this AFLP reaction system, clear DNA electrophoresis fingerprints of *D. hamiltonii* were obtained, and the reproducibility was high. Eight primer combinations were filtrated from sixty and four pair with *Mse* I and *Pst* I, 8 primer combinations with stable amplification and rich polymorphism for AFLP were screened, 256 DNA bands were amplified by eight pairs of AFLP primers and 40.90% polymorphic bands per pair of primer were produced on average, which had 32 490 distinct and strong amplification bands with a bright background and 13 289 of them were polymorphic bands from 30 individuals of *D. hamiltonii*, we can entirely distinguish 30 individuals by 8

收稿日期: 2010-04-04

基金项目: 中科院方向知识创新项目“热带优质笋材竹种筛选评价与开发利用”; 国家科技部基础条件平台项目(2004DKA30400-05-01-02)

作者简介: 杨清(1969-), 男, 重庆忠县人, 副研究员, 博士, 主要从事植物遗传多样性研究与森林培育工作。

通讯简介: 孙启祥(1967-), 男, 安徽巢湖人, 研究员, 博士, 主要从事森林培育与生物多样性保护研究。

primer combinations ,which indicates that A FLP markers are useful for genetic analysis of *D. hamiltonii*

**Key words:** *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. ex Munro; DNA extraction; AFLP; Influential factor

版纳甜龙竹 (*Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. ex Munro) 属禾本科 (Gramineae) 竹亚科 (Bambusoideae) 牡竹属 (*Dendrocalamus*)<sup>[1-2]</sup>,是集笋用、材用、观赏于一身的极具开发利用价值的优良笋材竹种<sup>[3-7]</sup>,是世界上有名的三大甜龙竹之一。作为热带地区重要的优质笋材,在东南亚国家和我国西双版纳、思茅等地的民间已广泛栽培。经过多种生态环境条件的驯化和人工选择培养,已形成了丰富多彩的遗传资源。关于版纳甜龙竹多样性及亲缘关系的研究,国内外研究报道几乎没有。

AFLP (Amplified fragment length polymorphisms) 是一种新的 DNA 分子标记技术,结合了 RFLP 的专一性和 RAPD 技术的优点,具有高效、快速、稳定、可靠等特点<sup>[8-13]</sup>。已广泛用于植物种质鉴定、遗传图谱构建、目的基因定位、遗传多样性分析等方面研究<sup>[14-22]</sup>。在很多竹类植物的遗传分化研究中也得到了应用<sup>[23-24]</sup>。但是,由于 AFLP 技术

要求高,过程复杂,针对不同的植物往往需作一些技术上的改进,因而试验体系的建立成为遗传多样性研究的首要任务。本研究以版纳甜龙竹为材料,探讨了 AFLP 分子标记各个步骤的影响因素,并对 AFLP 反应体系各关键因素进行优化,建立版纳甜龙竹 AFLP 反应体系,为进一步研究版纳甜龙竹遗传多样性、亲缘关系及遗传分化,对种源区划、种质资源收集保存与遗传改良也具有一定的借鉴意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

根据文献调研与实地考察,共收集了版纳甜龙竹 (*D. hamiltonii*) 材料 30 份(中国各地 29 份,印度 1 份)。样品的采集按群体取样的方法进行,每个群体至少相隔 50 km 以上,每个群体各取 10 株个体的新鲜叶片,采无病虫害的幼嫩叶片,以 5 倍量的变色硅胶(青岛海洋化工有限公司)在 12 h 内快速干燥。

表 1 AFLP 接头和引物序列

Tab. 1 The adapters and primers sequence in the AFLP experiment

DNA 接头和引物 Adapters and primer	核苷酸序列 Sequence of the nucleotide acid	备注 Remark
<i>EcoR</i> I 接头 1 <i>EcoR</i> I adapter 1	5' > CTC GTA GAC TGC GTA CC < 3'	连接接头
<i>EcoR</i> I 接头 2 <i>EcoR</i> I adapter 2	5' > AAT TGG TAC GCA GTC TAC < 3'	连接接头
<i>Mse</i> I 接头 1 <i>Mse</i> I adapter 1	5' > GAC GAT GAG TCC TGA G < 3'	连接接头
<i>Mse</i> I 接头 2 <i>Mse</i> I adapter 2	5' > TAC TCA GGA CTC AT < 3'	连接接头
<i>EcoR</i> I 引物 <i>EcoR</i> I primer		
<i>EcoR</i> I 预扩增引物 <i>EcoR</i> I primer in pre-amplification	5' > GAC TGC GTA CCA ATT CA < 3'	预扩增
E-AAC	5-GACTGCGTACCAATTC AAC-3	选择性扩增
E-AAG	5-GACTGCGTACCAATTC AAG-3	选择性扩增
E-ACA	5-GACTGCGTACCAATTC ACA-3	选择性扩增
E-ACT	5-GACTGCGTACCAATTC ACT-3	选择性扩增
E-ACC	5-GACTGCGTACCAATTC ACC-3	选择性扩增
E-ACG	5-GACTGCGTACCAATTC ACG-3	选择性扩增
	5-GACTGCGTACCAATTC AGC-3	选择性扩增
	5-GACTGCGTACCAATTC AGG-3	选择性扩增
<i>Mse</i> I 引物 <i>Mse</i> I primer		
<i>Mse</i> I 预扩增引物 <i>Mse</i> I primer in pre-amplification	5' > GAT GAG TCC TGA GTA A C < 3'	预扩增
M-CAA	5-GAT GAG TCC TGA GTA ACAA-3	选择性扩增
M-CAC	5-GAT GAG TCC TGA GTA ACAC-3	选择性扩增
M-CAG	5-GAT GAG TCC TGA GTA ACAG-3	选择性扩增
M-CAT	5-GAT GAG TCC TGA GTA ACAT-3	选择性扩增
M-CTA	5-GAT GAG TCC TGA GTA ACTA-3	选择性扩增
M-CTC	5-GAT GAG TCC TGA GTA ACTC-3	选择性扩增
M-CTG	5-GAT GAG TCC TGA GTA ACTG-3	选择性扩增
M-CTT	5-GAT GAG TCC TGA GTA ACTT-3	选择性扩增

所用主要试剂: *Pst* I 接头、*Mse* I 接头及引物均由北京鼎国生物技术有限公司合成(接头与引物序列见表 1)。*Pst* I、*Mse* I 内切酶、*Taq* 酶、dNTP、

DI2000 marker、T4 连接酶均来源于北京鼎国生物技术有限公司。

所用主要仪器设备有: UV2550 型紫外分光光

度仪(日本岛津公司);离心机(Sigma 3K-30型); PTC-200PCR仪(MJ公司); Power/PAC Basic电泳仪、Power/PAC-3000电泳仪(BIO. RAD公司); Gene Amp PCR System 9600(Perkin Elmer, USA); Sigma 3K18型低温冷冻离心机(Sigma, USA); 测序仪ABI PRISM 377 sequencer等。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 DNA提取及质量检测

1.2.1.1 DNA提取 根据邹喻苹<sup>[25 26]</sup>的CTAB法作了改良,采用改进的CTAB裂解-硅珠吸附法,提取总DNA。主要是在2×CTAB提取缓冲液中加入60 μL 2% PVP (Polyvinylpyrrolidone, 聚乙烯吡咯烷酮)、2% β-巯基乙醇(β-Mercaptoethanol, BME),其

他方法都一样。

1.2.1.2 检测DNA质量 采用0.8%琼脂糖凝胶电泳和紫外吸收法。取15 μL DNA样品加入超纯水稀释100倍,用紫外分光光度计检测,并根据 $A_{260}/A_{280}$ 和 $A_{260}/A_{230}$ 比值判断DNA纯度,根据 $A_{260}$ 值计算DNA浓度[DNA浓度(μg/mL) = 50 ×  $A_{260}$  × 稀释倍数]和DNA得率[DNA得率(μg/g) = DNA浓度 × 体叶片量(g)]。

1.2.2 AFLP反应体系得建立与优化 版纳甜龙竹AFLP反应体系得建立参照Vos等<sup>[12]</sup>的方法,并对各关键影响因素进行优化。酶切和连接使用北京鼎国生物技术有限公司FISH AFLP试剂盒。各体系见表2。

表2 AFLP反应体系

Tab. 2 The Systems of AFLP Reaction

酶切连接体系 Digestion & Ligation	预扩增体系 Pre-amplification	选择扩增体系 Selective Amplification
4 μL DNA (50 ng/μL)	2 μL 酶切连接模板	2 μL 预扩增稀释样品
2.5 μL 10 × Reaction Buffer	1 μL Pre-ampmix	2.5 μL 10 × PCR buffer
2.5 μL 10 mmol/L ATP	1 μL dNTPs	0.5 μL dNTPS
1 μL T4 Ligase	2.5 μL 10 × PCR buffer	1 μL <i>EcoR</i> I primer
1 μL Adapter	0.5 μL <i>Taq</i> DNA polymerase	1 μL <i>Mse</i> I primer
2 μL <i>EcoR</i> I/ <i>Mse</i> I		0.5 μL <i>Taq</i>
7 μL AFLP-Water	补足 dd H 18 μL	补足 dd H 17.5 μL
总体积 20 μL	总体积 25 μL	总体积 25 μL

### 1.2.3 AFLP关键步骤的优化

1.2.3.1 模板DNA的获得 将改进的CTAB法提取的版纳甜龙竹DNA用1×TE稀释并标定到50 ng/μL作为模板,比较不同模板浓度(50, 100, 150, 200, 250, 300 ng)对AFLP反应的影响。分别提取3次,用于后续的AFLP流程以检验版纳甜龙竹AFLP标记体系的重复性。

1.2.3.2 限制性酶切和连接 采用*Pst* I和*Mse* I双酶切模板DNA,酶切连接分两步进行。双酶切反应体系按北京鼎国生物技术有限公司的内切酶产品说明设计,酶切时间设3, 4.5, 6, 7.5 h共4个处理,分析不同的酶切时间对酶切效果的影响。在PCR仪上37℃酶切后,80℃灭活酶20 min以终止反应;然后用加入接头连接液,16℃连接过夜。酶切产物用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测,5 V/cm电泳30 min。酶切、连接体系见表2。

1.2.3.3 预扩增 预扩增体系见表2。将酶切连接产物稀释10倍作为预扩增模板,采用2组DNA样品从64对*EcoR* I + A/*Mse* I + C引物组合,选择性扩增采用*EcoR* I + 3/*Mse* I + 3引物组合,筛选出扩增图谱清晰的8对进行选择扩增反应(表2)。PCR扩增程序为:94℃ 2 min, 1个循环;94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 80 s, 72℃ 5 min, PCR扩增循环30轮;4℃保存。

预扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,5 V/cm电泳30 min。本试验采用带有1个选择性碱基的引物来进行预扩增。*EcoR* I的碱基序列为5'-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3', *Mse* I的碱基序列为5'-GAT GAG TCC TGAGTA AC-3'。连接完后的DNA稀释浓度设了5倍、10倍、20倍和50倍4个梯度,比较不同倍数对预扩增的影响。

1.2.3.4 选择性扩增 选扩体系见表2。将预扩产物1:20稀释,作为选扩模板,用以上的反应条件,筛选了64对AFLP扩增引物组合。按下列参数在Gene Amp PCR System 9600(Perkin Elmer, USA)上进行PCR循环:94℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 80 s;以后每轮循环温度递减0.7℃,扩增12轮;最后按下列参数扩增23轮:94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 80 s; 4℃保存。

1.2.3.5 AFLP扩增产物的银染检测 本研究采用荧光标记引物扩增产物在自动测序仪上扫描鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA提取及检测结果

利用SDS法和传统CTAB法直接提取版纳甜龙竹DNA,其氯仿抽提后样液颜色为棕褐色或棕黄色,杂质含量较多,以这两种方法提取的总DNA为模版,进行PCR扩增,不能得到清晰的条带,说明SDS法和

传统 CTAB 法不适宜版纳甜龙竹 DNA 提取。本试验对原 CTAB 法进行了改良: 在提取液中加入 2% PVP (V/V)、2% 的  $\beta$ -巯基乙醇, 在裂解液中加入 20  $\mu$ L 3 mol/L NaAC,  $-20^{\circ}\text{C}$  沉淀 1 h。紫外分光光度法检测表明, 用改进的 CTAB 法, 得到的 DNA 量多色浅, 电泳结果显示提取的 DNA 较完整(图 1), 所提取基因组 DNA 主带清晰, 无降解, 无 RNA, 样品间均匀。新鲜叶片的 DNA 得率在 72 ~ 100  $\mu\text{g/g}$ , 表明该法能较完全地去除蛋白质、酚类及多糖类等杂质, 提取时残留的氯仿、乙醇、无机盐等小分子也基本去除, 即 DNA 纯度符合质量标准, 已达到 AFLP 分析下游操作的要求。所提取的版纳甜龙竹 DNA  $A_{260}/A_{280}$  在 1.7 ~ 1.9 范围内。

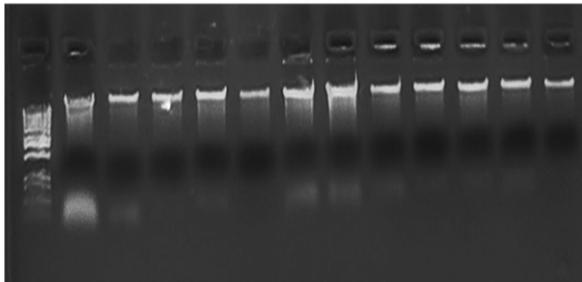


图 1 改良 CTAB 法提取版纳甜龙竹的总 DNA 电泳检测

Fig. 1 The electrophoresis of genomic DNA of

*D. hamiltonii* by modified CTAB extraction

## 2.2 AFLP 体系得建立与优化结果

2.2.1 模版 DNA 的准备 本试验所设置的 50 ~ 300 ng 6 个版纳甜龙竹 DNA 模板浓度, 均能得到清晰的 AFLP 图谱, 表明版纳甜龙竹 AFLP 体系对 50 ~ 300 ng 范围内的模板 DNA 浓度变化不敏感。

2.2.2 酶切与连接 本试验采用 *Pst* I 与 *Mse* I 限制性内切酶双酶切, 酶切产物在凝胶上呈现出连续的大小不同的 DNA 片段, 表明 DNA 能被 *Pst* I 与 *Mse* I 彻底消化。对设置的 5 个酶切时间进行分析, 结果发现 3 h 酶切 DNA 主带未消失, 酶切不完全; 4.5 h 部分酶切片断较大, 酶切也不完全; 6, 7.5 h 酶切完全, 片断大小在 400 bp, 符合 AFLP 酶切的技术要求。考虑到试验效率问题, 采用 6 h 作为酶切时间比较适宜。

2.2.3 预扩增 预扩增产物的电泳结果表明, 预扩增片段范围较大, 一般在 100 ~ 750 bp, 扩增信号较强, 各样品间相对一致, 表明基因组 DNA 的提取和酶切连接操作符合要求。稀释 10 倍到 50 倍都能得到选择性扩增产物, 稀释 20 倍的 DNA 与稀释 10 倍、50 倍差异不大, 以稀释 20 倍扩增效果最好, 稀释 50 倍时扩增产物条带电泳检测亮度较弱。

2.2.4 选择性扩增反应体系得筛选 通过对影响选择性扩增反应的关键因素 ( $\text{Mg}^{2+}$  浓度、dNTP 浓度、

*Taq* 酶浓度、引物浓度、预扩增产物用量) 进行对比研究, 筛选出 20  $\mu$ L 选择性扩增体系中各关键因素的最适用量为: 2.5 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$ 、0.8 mmol/L dNTP、1 U *Taq*、0.5  $\mu\text{mol/L}$  引物、1.5  $\mu\text{L}$  预扩增稀释 20 倍 DNA, 选择性扩增产物稀释 10 倍后, 在 ABI 377 (ABI PRISM 377 sequencer) 型自动测序仪上经 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 得到了清晰、多态性好的电泳谱带。

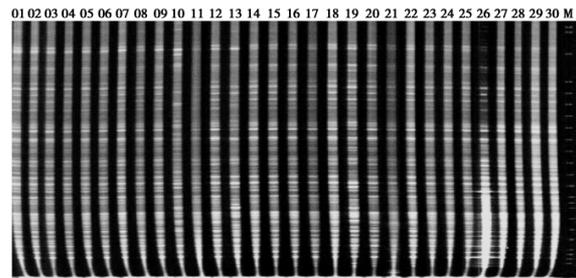


图 2 引物 E-AAC/M-CTA 在 30 份版纳甜龙竹种质资源的扩增图谱

Fig. 2 AFLP amplification patterns in 30 *D. hamiltonii* materials by primer E-AAC/M-CTA

表 3 版纳甜龙竹种质资源 AFLP 分析所选用的引物组合及其扩增结果

Tab. 3 The amplification results of AFLP primer combination in *D. hamiltonii* Samples

引物 Primer combination	扩增位点数 No. of amplified loci	多态位点数 No. of polymorphic loci	多态位点的比例/% Ratio of polymorphic loci
E-ACT/M-CTC 6-6	3 600	1 377	38.25
E-ACC / M-CTA 7-5	4 050	1 549	38.25
E-ACC / M-CAG 7-3	4 200	1 531	36.45
E-ACA / M-CAT5-4	4 260	1 730	40.61
E-ACA / M-CTT5-8	4 050	1 830	45.18
E-ACT / M-CAC6-2	4 470	1 657	37.07
E-ACT / M-CTT 6-8	4 320	2 049	47.43
E-ACT / M-CTG6-7	3 540	1 566	44.24
总计 Total	32 490	13 289	40.90

注: E. *EcoR* I; M. *Mse* I.

2.2.5 引物对的筛选及重复性试验 通过观察比较不同引物扩增位点的数量和带的清晰度, 从 64 对 E-3/M-3 引物组合中选出扩增带纹丰富、清晰, 且多态性位点百分比比较高的引物组合 8 对, 分别是 E-AAC/M-CAC、E-AGC/M-CAA、E-ACT/M-CTC、E-ACT/M-CTC、E-ACT/M-CTC、E-ACT/M-CTC、E-ACT/M-CTC、E-ACT/M-CTC。并利用这 8 对引物对 30 个 DNA 样品进行了 PCR 扩增, 图 2 为引物 E-AAC/M-CTA 在 30 份版纳甜龙竹材料的扩增图谱。根据数据统计分析结果显示 8 对引物扩增出的位点数比较接近, 在 3 540 ~ 4 470 之间, 扩增位点数最多的是引物 E-ACT / M-CAC, 为 4 470 点; 扩增位点数最少的是引物 E-

ACT / M-CTG, 为 3 540 点。多态性检出率最高的是引物 E-ACT / M-CTT, 获得 2 049 个多态性位点, 多态率达到 47.43%; 多态性检出率最低是引物 E-ACC / M-CTA 和 E-ACT/M-CTC, 为 38.25%。8 对引物在 30 份材料中共获得 32 490 个扩增位点, 有 13 289 个位点具有多态性, 平均每对引物获得 4 061.25 个扩增位点, 其中具有多态性的位点为 1 661.125 个, 平均多态检出率为 40.90%。8 对引物组合对版纳甜龙竹 30 个个体的区分率达到 100%。这也表明版纳甜龙竹遗传背景的复杂性, 另一方面也表现出各变异类型的共同性。这为后续的不同地理种群版纳甜龙竹 AFLP 分析奠定了基础。

### 3 讨论

由于 AFLP 分析对供试 DNA 的要求高, 所以提取高质量、高纯度的 DNA 是 AFLP 分析成功的关键之一。传统的 CTAB 法不适宜版纳甜龙竹 DNA 提取, 其氯仿抽提后样液颜色为棕褐色或棕黄色, 提取的 DNA 纯度不够, 所含色素和酚类物质较多, 这些色素类物质和氧化后的酚类物质与 DNA 共价结合, 使 DNA 带棕色或褐色, 在反应体系中抑制了 DNA 特殊片段的扩增反应。针对版纳甜龙竹色素和酚类物质较多的特点, 在 CTAB 提取液中添加较高浓度的 PVP40(V/V) 和  $\beta$ -巯基乙醇, 能够有效地去除多酚类、色素等物质的影响, 提高 DNA 的纯度。进一步的 AFLP 分析证明, 用改进的 CTAB 法, 在提取缓冲液中加入 2% PVP40(V/V) 和 2%  $\beta$ -巯基乙醇所提取的 DNA 符合 AFLP 分析要求, 条带丰富, 多态性高。

版纳甜龙竹 AFLP 分析过程中的影响因素较多, 除对模板 DNA 的质量要求较高外, 引物的筛选、酶切连接与预扩增反应体系、选择性扩增反应体系中各关键影响因素的浓度都很关键。DNA 模板的质量和浓度是影响 AFLP 扩增结果的一个重要因子。本试验表明版纳甜龙竹 AFLP 扩增对模板 DNA 浓度要求不高。在香蕉等植物中, 也同样发现 AFLP 对模板浓度不敏感<sup>[17]</sup>。

酶切时间是双酶切时易忽视的问题, 但却是酶切成败的关键。不同的植物酶切时间变化很大, 从 2 ~ 14 h<sup>[17, 18]</sup>。在版纳甜龙竹中, 用 6 h 的酶切时间, 酶切充分, 得到多态性较高的指纹图谱。同时, 预扩增是检验酶切和连接效果的必要手段。在苹果 AFLP 研究中, 预扩增片段范围较宽, 约 50 ~ 1 500 bp<sup>[16]</sup>, 与之相比, 版纳甜龙竹的范围略小, 约为 50 ~ 500 bp, 这可能是版纳甜龙竹基因组中含有较少的引物识别位点所致。

国内外许多学者曾利用同工酶标记、限制性片段长度多态性 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP)、随机扩增多态性 DNA (Random amplified polymorphic DNA, RAPD) 等分子标记技术进行竹类植物研究比较多, 并取得了一些丰硕的成果<sup>[9, 11, 14]</sup>。但主要是研究竹类植物种间和属间的遗传多样性和系统演化关系<sup>[9, 14, 27]</sup>, 而研究竹类植物种下水平的遗传多样性并不多见。本试验首先对 AFLP 流程进行了优化, 并建立了有效的版纳甜龙竹 AFLP 分子标记体系, 为版纳甜龙竹分子水平的研究奠定了基础, 采用 8 对引物组合酶切版纳甜龙竹基因组 DNA 的 AFLP 技术适合于研究版纳甜龙竹种下水平的亲缘关系和遗传多样性, 为其遗传多样性、种源区划及其种质资源收集保存提供实验方法和理论依据。

致谢: 本试验得到北京鼎国生物技术有限公司的大力支持, 特此致谢。

#### 参考文献:

- [1] 耿平介, 王正平. 中国植物志第九卷第一分册 [M]. 北京: 科学出版社, 1996: 196 - 197.
- [2] 李延辉. 西双版纳高等植物名录 [M]. 昆明: 云南民族出版社, 1996: 205 - 206.
- [3] 李金泽. 西双版纳甜龙竹: 托起绿色经济新希望 [J]. 生态经济, 2003(12): 77 - 79.
- [4] Sundriyal M, Sundriyal R C. Wild edible plants of the Sikkim Himalaya: Marketing value addition and implications for management [J]. Economic Botany, 2004, 58(2): 300 - 315.
- [5] Bhatt B P, Singh K, Singh Alka. Nutritional values of some commercial edible bamboo species of the North Eastern Himalayan region [J]. India Journal of Bamboo and Rattan, 2005, 4(2): 111 - 124.
- [6] 杜凡. 云南重要经济竹种特性及其生产中存在问题 [J]. 西南林学院学报, 2003, 23(2): 26 - 30.
- [7] 杨清, 苏光荣, 许丛恒, 等. 版纳甜龙竹化学成分与制浆性能研究 [J]. 中华纸业, 2007, 28(6): 83 - 86.
- [8] Doyle J J. DNA protocols for plants—CTAB total DNA isolation [M] // Hewitt G M, Johnston. A Molecular Technique in Taxonomy. Berlin, Springer-Verlag, 1991: 283 - 293.
- [9] Friar E, Kocheva G. Bamboo germplasm screening with nuclear restriction fragment length polymorphisms [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1991, 182: 697 - 703.
- [10] Smith J J, Scottemig J S, Leadbetter J R. Characterization of random amplified polymorphic DNA (RAPD) products from *Xanthomonas campestris* and some comments on the use of RAPD products in phylogenetic analysis [J]. Mol Phylogenet Evol, 1994, 3: 135 - 145.
- [11] Becket J. Combined mapping of AFLP markers in barley

- [J]. *Mol Gen Genet* ,1995 249: 65 - 73.
- [12] Vos P ,Hogers R ,Bleeker M *et al.* AFLP—a new technique for DNA-fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Res* ,23: 4407 - 4414.
- [13] 邹喻苹 ,汪小全 ,雷一丁 等. 几种濒危植物及其近缘类群总 DNA 的提取与鉴定 [J]. *植物学报* ,1994 36( 7) : 528 - 533.
- [14] Friar E ,Kochea G. A study of genetic variation and evolution of *PhyHostaehys* ( Bambusoideae: Poaceae) using nuclear restriction fragment length polymorphisms [J]. *Theoretical and Applied Genetics* ,1994 89: 265 - 270.
- [15] 房经贵 ,刘大钧 ,章 镇. 两个芒果品种的 AFLP 指纹图谱 [J]. *南京农业大学学报* ,1999 22( 2) : 25 - 27.
- [16] 祝 军 ,王 涛 ,李光晨 等. 苹果 AFLP 分析体系的建立 [J]. *中国农业大学学报* 2000 5( 3) : 63 - 67.
- [17] 易干军 ,于晓英 ,霍合强 等. 香蕉种质资源的 AFLP 鉴别与分类中 DNA 模板的制备 [J] ,*果树学报* ,2001 ,18( 6) : 345 - 348.
- [18] 赵 宏 ,王省芬 ,张桂寅 等. 棉花 AFLP 技术体系的摸索与建立 [J]. *河北农业大学学报* 2002 25( 1) : 1 - 4.
- [19] 高文娜 ,陈万权 ,王中康. AFLP 双酶切和连接方法探讨 [J]. *植物保护* 2003 29( 6) : 35 - 40
- [20] 候义龙 ,曹 同 ,蔡丽娜 等. 苔藓植物 DNA 提取方法研究 [J]. *广西植物* 2003 23( 5) : 425 - 428
- [21] 刘 勇 ,孙中海 ,刘德春 等. 柚类种质资源 AFLP 与 SSR 遗传多样性分析 [J]. *中国农业科学* ,2005 ,38( 11) : 2308 - 2315.
- [22] Zhang L ,Huang B B ,Kai G Y ,Guo M L. Analysis of intranspecific variation of Chinese *Carthamus tinctorius* L. using AFLP marker [J]. *Acta Pharmaceut Sin* ,2006 ,41( 1) : 91 - 96.
- [23] Trevor R H ,Stephen A R ,Grainne N C *et al.* A Comparison of ITS Nuclear rDNA Sequence Data and AFLP Markers for Phylogenetic Studies in *Phyllostachys* ( Bambusoideae ,Poaceae) [J]. *Journal of Plant Research* 2000 ,113( 3) : 259 - 269.
- [24] Koen G ,Johan G ,Hilde P *et al.* Somatic embryogenesis from mature *Bambusa balcooa* Roxburgh as basis for mass production of elite forestry bamboos [J]. *Plant Cell ,Tissue and Organ Culture* 2007 91( 2) : 115 - 123.
- [25] 邹喻苹 ,葛 颂 ,王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 科学出版社 2001: 16 - 17.
- [26] Doyle J J and Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull Bot So. Amer* ,1987 ,19: 11 - 15.
- [27] 张汉尧 ,刘小珍 ,龚秀会 等. 竹子 DNA 提取方法改良及 ITS-RFLP 分析的初步研究 [J]. *江西林业科技* 2006( 3) : 3 - 5.