

用 ISSR 标记分析甜荞栽培品种的遗传多样性

赵丽娟¹, 张宗文^{2*} (1. 甘肃省农业科学院生物技术研究所, 甘肃兰州 730070; 2. 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要 [目的] 研究用 ISSR 标记分析甜荞栽培品种的遗传多样性。[方法] 采用 ISSR 分子标记对来自 11 个省的 90 份甜荞种质的遗传多样性进行了分析。[结果] 19 条 ISSR 引物共扩增出 508 条条带, 平均 26.7 条; 其中多态性条带 462 条, 平均 24.3 条, 多态性带的百分率为 90.1%。Nei's 遗传相似系数在 0.67~0.95。UPGMA 聚类分析显示, 聚类结果与地理来源有较强的一致性, 来自辽宁、内蒙古、陕西、四川、甘肃等省的甜荞都是按来源各自聚为一类, 但是发现了几个特殊的类型, 即来自河北的甜荞 E、安徽的 82F 以及辽宁的辽荞 37 号均单独聚为一类。不同地区材料之间的多态性信息指数 (PIC) 差异较大, 其中, 辽宁的最高, 为 0.842, 内蒙古的最低, 为 0.633。[结论] 采用 ISSR 分析甜荞遗传多样性, 甜荞表现出丰富的多态性, 表明可以用 ISSR 标记对甜荞进行分子水平的鉴定和遗传多样性分析。

关键词 ISSR 标记; 甜荞; 栽培品种; 遗传多样性

中图分类号 S519 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)07-02878-05

Analysis on Genetic Diversity in Common Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Based on ISSR Markers

ZHAO Lijuan et al (Bio-technology Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070)

Abstract [Objective] The research aimed to study the genetic diversity in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) based on ISSR markers. [Method] The genetic diversity of 90 common buckwheat accessions was analyzed by using ISSR markers. [Result] With 19 ISSR primers, totally 508 bands were detected, among which 462 bands were polymorphic, and the average number of band per primer was 26.7. The Nei's similarity coefficient of 90 accessions ranged from 0.67 to 0.95. Cluster analysis based on ISSR data showed that the accessions could be categorized into 4 major groups and 3 individual genotypes. The "common buckwheat E" from Hebei, "82F" from Anhui and "Liaoqiao37" from Liaoning showed great genetic difference from other materials. There were obvious genetic difference among the landraces from Hebei, Anhui and Liaoning, and high similarity among cultivars collected from different provinces. The higher genetic variation was found among landraces from Liaoning followed by Anhui and Jiangxi, Mongolia was the lowest. [Conclusion] The study indicates that ISSR markers produced high polymorphism in common buckwheat. ISSR analysis can be used for the molecular evaluation and studies of genetic diversity of buckwheat germplasm.

Key words ISSR markers; Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench); Cultivar; Genetic diversity

荞麦属于蓼科 (Polygonaceae) 荞麦属 (*Fagopyrum* Mill.) 双子叶植物, 在世界上很多国家都有种植, 但主要分布在中国、俄罗斯、乌克兰、日本、加拿大等国家。全世界有荞麦属植物约 15 种, 我国有 10 种 1 变种^[1], 是种类最多的国家。荞麦属有 2 个栽培种, 分别为甜荞 (*F. esculentum* Moench) 和苦荞 [*F. tataricum* (L.) Gaertn.]。

研究发现, 荞麦具有独特的营养价值和食疗保健功能, 是药食同源作物, 已被营养学家誉为 21 世纪具有前途的绿色食品^[2]。近年来, 随着人们保健意识的增强和对农产品质量要求的提高, 荞麦作为高营养的保健食品越来越受到人们的重视。因此, 荞麦的种植、品质的改变及其制品的开发具有良好的发展前景。

近年来, 国内外学者利用等位酶技术^[3]、染色体计数技术^[4]、RAPD 技术^[5]、AFLP 技术^[6]、SSR^[6] 技术等对甜荞进行了分析, 但还未见有关甜荞的简单序列重复区间扩增多态性 (Inter-simple sequence repeats, ISSR) 分析方面的报道。ISSR 是由 Zietkiewicz 等于 1994 年提出的一种以 PCR (Polymerase chain reaction) 扩增为基础的分子标记技术^[7]。其基本原理是在 SSR 重复序列的 3 或 5 端锚定 1~4 个嘌呤或嘧啶碱基, 从而保证 ISSR 引物能够对 SSR 之间的 DNA 序列进行 PCR 扩增, 并对两侧具有反向排列 SSR 的一段 DNA 序列进行扩增。由于微卫星在基因组中广泛分布, 且等位变异特别丰富, 因而 ISSR 可以检测到高的多态性, 它揭示的多态性比 RFLP、RAPD、SSR 更多。现已广泛应用于种质资源鉴定、遗传作图、基因定位、遗传多样性、进化、系统发育、分子标记育种等方面。另外, ISSR 不像 SSR 具有物种特异性, 它可以和 RAPD

一样用于各类动植物的研究。只是 ISSR 对引物设计的要求与 RFLP、SSR、RAPD 不同, 但其产物多态性远比 RFLP、SSR、RAPD 更加丰富, 可以提供更多的关于基因组的信息, 而且比 RAPD 技术更加稳定可靠, 试验重复性更好^[8-9]。为此, 笔者用 ISSR 标记分析甜荞栽培品种的遗传多样性。

1 材料与方法

1.1 材料 试验材料共 90 份, 分别来自辽宁、内蒙古、山西、陕西、甘肃、四川、安徽、江西、贵州、云南、河北 11 个省, 这些材料均为地方品种。供试材料由中国农业科学院作物科学研究所种质资源库提供。材料名称及来源见表 1。

1.2 DNA 的提取与纯化 采用改良 CTAB 法提取 DNA^[10]。每个材料随机选取 20 个单株, 每株剪取 1 个新鲜幼嫩叶片混合, 在液氮条件下迅速研磨成粉末, 将粉末放入到 50 ml 的离心管中, 然后加入缓冲液 22.5 ml, 充分混匀。将离心管置于 65℃ 水浴锅中, 水浴 1.0~1.5 h, 每管加入等体积的氯仿-异戊醇 (24:1) 溶液, 混匀, 8 000 r/min 离心 20 min; 将上清液小心转移到新的离心管中, 每管加入等体积的氯仿-异戊醇 (24:1) 溶液, 混匀, 8 000 r/min 离心 20 min; 将上清液小心转移到新的离心管中, 加入等体积的预冷的异丙醇, 缓慢混匀, 挑出 DNA 后, 用 70% 的乙醇洗涤 DNA。将离心管置于室温使其干燥, 加入适量的 1×TE 溶解 DNA, 进行纯化后, 在 -20℃ 下保存备用。

1.3 ISSR 扩增与检测 从加拿大 British Columbia 大学生物技术实验室提供的 100 个引物中选择了 44 条, 另外根据前人对玉米的研究经验选取了 8 条引物^[11] (引物由上海生工合成) 结果从中选取了多态性较好的 19 条引物进行后续试验。引物名称见表 2。

1.4 ISSR 反应体系及程序 反应体系为 25 μl, 其中模板 DNA 60 ng, 引物 5 μmol/L 1.0 μl, 10×PCR buffer 2.5 μl, 10 mmol/L dNTPs 0.5 μl, Taq 酶 1U, ddH₂O 补足, 另加石蜡油覆

基金项目 国际植物遗传资源研究所 (IPGRI) 项目 (LOAAP004074)。
作者简介 赵丽娟 (1979-), 女, 河北行唐人, 硕士, 研究实习员, 从事种质资源研究。* 通讯作者, 博士, 研究员, E-mail: z.zhang@cgiar.org。
收稿日期 2008-12-11

表 1 供试材料名称、类型及来源地

Table 1 The name, types and origins of test materials

品种名称	类型	来源	品种名称	类型	来源
Cultivars name	Type	Origin	Cultivars name	Type	Origin
辽荞 31 号	地方品种	辽宁农业科学院	辽荞 35 号	地方品种	辽宁农业科学院
辽荞 32 号	地方品种	辽宁农业科学院	辽荞 36 号	地方品种	辽宁农业科学院
辽荞 33 号	地方品种	辽宁农业科学院	辽荞 37 号	地方品种	辽宁农业科学院
辽荞 34 号	地方品种	辽宁农业科学院	辽荞 38 号	地方品种	辽宁农业科学院
辽荞 39 号	地方品种	辽宁农业科学院	82-3-2 (82C)	地方品种	安徽濉溪双堆
辽荞 40 号	地方品种	辽宁农业科学院	82-6-2 (82D)	地方品种	安徽临泉
凉城荞麦	地方品种	内蒙古凉城	28-6-8 (82E)	地方品种	安徽临泉
兴和荞麦 A	地方品种	内蒙古兴和县	82-7-1 (82F)	地方品种	安徽庐江
兴和荞麦 B	地方品种	内蒙古兴和县	82-9-9 (82G)	地方品种	安徽凡昌
和林荞麦 A	地方品种	内蒙古和林县	82-9-10 (82H)	地方品种	安徽凡昌
和林荞麦 B	地方品种	内蒙古和林县	铅山荞麦 3	地方品种	江西港东乡
红花荞 A	地方品种	山西右玉	萍乡市荞麦	地方品种	江西东源乡
小三棱荞	地方品种	山西平鲁	丰城荞麦	地方品种	江西圳头乡
大三棱荞	地方品种	山西平鲁	德兴荞麦	地方品种	江西龙头山农牧场
小棱荞	地方品种	山西太原	钢鼓荞麦	地方品种	江西镇坪乡
三角狗头荞	地方品种	山西榆次	瑞金荞麦	地方品种	江西内石乡
荞麦	地方品种	陕西靖边	上饶荞麦 2	地方品种	江西上饶
灰小荞麦	地方品种	陕西靖边	会昌荞麦 2	地方品种	江西西江乡
老荞麦	地方品种	陕西宝鸡	高兴荞麦	地方品种	江西村前乡
紫花荞麦	地方品种	陕西宝鸡	玉山荞麦	地方品种	江西童坊乡
花麦	地方品种	陕西宁强	红花甜荞麦	地方品种	贵州威宁
春荞	地方品种	陕西宁强	白花荞麦 A	地方品种	贵州威宁
小米花荞	地方品种	陕西宁陕	白花荞麦 B	地方品种	贵州威宁
花荞 A	地方品种	陕西宁陕	白花荞麦 C	地方品种	贵州兴义
花荞 B	地方品种	陕西镇坪	花江荞麦 A	地方品种	贵州安顺
小荞麦	地方品种	甘肃敦煌	花江荞麦 B	地方品种	贵州安顺
甜荞 A	地方品种	甘肃安西	甜荞 C	地方品种	贵州贵阳
大荞	地方品种	甘肃成县	红花荞 C	地方品种	贵州遵义
米米荞	地方品种	甘肃成县	路南荞麦	地方品种	云南昆明路南县
甜荞 B	地方品种	甘肃平凉	巧家荞麦	地方品种	云南昭通巧家县
红花荞 B	地方品种	甘肃平凉	花荞 C	地方品种	云南怒江马吉
紫花荞 A	地方品种	甘肃宁县	小黑花荞	地方品种	云南维西
额齿	地方品种	四川喜得县则约乡	马街荞麦	地方品种	云南曲靖罗平县
额期	地方品种	四川喜得县深沟乡	洛河荞麦	地方品种	云南王涣市
细米荞	地方品种	四川木里县列瓦乡	华宁荞麦	地方品种	云南华宁
额其	地方品种	四川雷波县丁家平乡	花荞 D	地方品种	云南会泽
岩处	地方品种	四川德昌县大陆乡	绿春荞麦	地方品种	云南红河绿春县
呃处	地方品种	四川德昌县大平乡	黑褐色荞麦	地方品种	云南腾冲瑞滇
两河甜荞	地方品种	四川甘洛县两河乡	甜荞 D	地方品种	河北张北县
大花荞	地方品种	四川木里县博瓦乡	甜荞 E	地方品种	河北张北县
额楚	地方品种	四川金阳县红卫乡	甜荞 F	地方品种	河北张北县
82-1-1 (82A)	地方品种	安徽石台	甜荞 G	地方品种	河北张北县
82-3-1 (82B)	地方品种	安徽濉溪双堆	甜荞 H	地方品种	河北张北县
甜荞 I	地方品种	河北张北县	甜荞 K	地方品种	河北张北县
甜荞 J	地方品种	河北张北县	甜荞 L	地方品种	河北蔚县

表 2 引物序列及多态性比较

Table 2 The comparison of primer sequences and their polymorphism

引物	重复序列	位点数 个	多态性位点数 个	多态性位点百分率 PFB %	多态性信息指数
Primer	Repeated sequences	Number of loci	Number of polymorphic loci	Percentage of polymorphic loci	PIC
U808	(AG) ₈ C	40	39	97.5	0.913
U815	(CT) ₈ G	19	18	94.7	0.903
U818	VDV(CT) ₇	23	23	100.0	0.875
U834	(AG) ₈ YT	24	21	87.5	0.880
U840	(GA) ₈ YT	27	26	96.3	0.943
U842	(GA) ₈ YG	32	31	96.9	0.914
U845	(CT) ₈ RG	33	33	100.0	0.941
U852	(TC) ₈ RA	10	9	90.0	0.836
U857	(AC) ₈ YG	35	31	88.6	0.944
U886	VDV(CT) ₇	38	36	94.7	0.953
U888	BDB(CA) ₇	17	16	94.1	0.906
M01	(CA) ₆ R	29	18	62.1	0.927
M02	(CA) ₆ RY	16	16	100.0	0.920
M03	(CA) ₆ RG	35	32	91.4	0.935
M04	(GT) ₆ YR	47	47	100.0	0.957
M05	(GCT) ₄ Y	26	25	96.1	0.938
M06	(ACC) ₄ Y	19	4	21.0	0.833
M07	(ACC) ₄ G ₆ rGR	18	17	94.4	0.904
M08	(ACC) ₄ AY	20	20	100.0	0.922
合计 Total		508	462		0.913
平均 Average		26.7	24.3		

注:R=(A,G);Y=(C,T);B=(C,G,T)(i.e. not A);D=(A,G,T)(i.e. not C);V=(A,C,G)(i.e. not T)。

Note:R=(A,G);Y=(C,T);B=(C,G,T)(i.e. not A);D=(A,G,T)(i.e. not C);V=(A,C,G)(i.e. not T)。

盖。10 ×PCR buffer, MgCl₂, Taq 酶, dNTPs, 均购自天根生化科技。

反应程序为: 94 预变性 5 min; 94 变性 30 s, 52 退火 1 min, 72 延伸 2 min, 循环 47 次; 72 延伸 10 min, 4 下保存。在 PTC-100 PCR 仪上扩增。

1.5 PCR 产物凝胶电泳 扩增产物采用 5% 变性的聚丙烯酰胺凝胶检测。扩增样品中加入 4.5 μl 的 Loading buffer (0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯青 FF, 30% 甘油水溶液), 恒功率 80 W, 电泳 2 h 左右, 银染检测^[12]。

1.6 数据处理与分析 ISSR 是显性标记, 同一引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为有同源性, 电泳结果采取“0/1 赋值记带, 按照相同迁移带上有扩增带记为“1”, 无扩增带记为“0”, 缺失记为“9”的方法进行记录, 仅记录清晰、可重复的扩增带。用 NTSYS 2.1 软件中的 Jaccard 法计算品种的遗传相似系数, 用 UPGMA 法进行聚类分析, 绘制树状聚类图^[13]。

2 结果与分析

图 1 是 ISSR 扩增结果。19 条引物平均扩增出 26.7 条条带。其中, M04 扩增出来的带最多, 为 47.0 条; U852 扩增出的带最少, 为 10.0 条。在 19 条引物中, 多态性位点平均达到 24.3 个, 最多的也是 M04, 达到 47.0 个, 部分引物的位点多态性位点百分率达 100.0%, 平均多态性位点百分率达 90.1% (表 2), 表明 ISSR 扩增出来的甜荞 DNA 片断具有高度多态性。

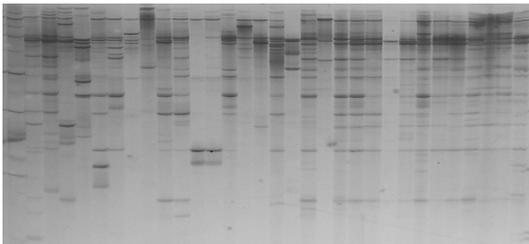


图 1 引物 M04 ISSR 甜荞扩增结果

Fig. 1 ISSR amplification results of common buckwheat with primer M04

根据 ISSR 数据统计, 90 份甜荞材料之间的遗传相似系数为 0.67~0.95, 材料的遗传差异较显著。采用 UPGMA 法产生的聚类图, 大部分材料被分成 4 大组, 其他材料形成了独立的特殊类型。

在 *Nei's* 遗传相似系数为 0.82 处, 大部分材料被分成 4 组。第 1 大组可分为 2 个小组, 第 1 小组的 16 份材料包括来自辽宁的 8 份、内蒙古的 5 份和山西的 3 份材料; 第 2 小组的 21 份材料包括来自陕西的 9 份、甘肃的 6 份和四川 6 份, 其中, 来自陕西的春荞和花荞 A 遗传相似系数达到了 0.95, 来自山西的大三棱荞和小棱荞材料单独聚类, 与这 2 个小组共同构成了第 1 大组。第 2 大组的 8 份材料包括来自四川的 3 份和安徽的 5 份, 来自辽宁的辽荞 36 号单独聚为一类。第 3 大组的 10 份材料包括来自安徽的 2 份, 其余 8 份全部来自江西, 来自安徽的 82B 与来自甘肃的红花荞 B 与前 3 大组聚为一类。第 4 大组主要分为 2 个小组: 首先, 来自江西的玉山荞麦和来自贵州的红花甜荞聚为一类, 与其他 2 个小组共同构成第 4 大组; 第 1 个小组的 15 份材料包括来自贵州的

7 份和来自云南的 8 份; 第 2 小组的 10 份材料包括来自云南的 2 份和来自河北的 8 份。另外, 发现了来自河北的甜荞 E、安徽的 82F 以及辽宁的辽荞 37 号这些单独聚为一类的特殊类型。

3 结论与讨论

杨淑达等应用 ISSR 技术研究了滇牡丹的 16 个自然居群和 1 个迁地保护居群的 511 个个体, 采用 10 个 ISSR 引物, 共检测到 92 个多态位点, 在物种水平上, 多态性位点百分率为 79.31%, 居群水平上的多态性位点百分率为 44.61%, 居群间的遗传分化系数达 0.434 9^[14]。这表明滇牡丹的遗传多样性水平较高, 居群间遗传分化较大。陶爱芬等用 17 个 ISSR 引物对 30 个红麻品种的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 共扩增出 149.0 条条带, 平均每个引物 8.76 条, 其中多态性条带共 97 条, 多态性条带比率为 65.1%^[15]。杨本超等应用 ISSR 标记对 24 种烤烟代表性种质进行了遗传多样性分析, 采用 10 个 ISSR 引物, 共检测到 208 条稳定性条带, 其中多态性条带为 141 条, 平均多态性比率为 67.79%^[16]。由于分析位点数及种质数均有差异, 不同研究结果之间很难直接进行比较^[17]。

王莉花等用 RAPD 研究云南野生荞麦资源的多样性和亲缘关系, 采用 19 个随机引物对 26 份材料进行分析, 共获得 162 条 DNA 扩增带, 其中多态性带 153 条, 多态性带的比率 94.4%, 平均每个引物可扩增出 8.53 条条带^[18]。该试验采用 19 条 ISSR 引物对 90 份甜荞进行了遗传多样性分析, 其中 90 份甜荞共扩增出 508 条条带, 平均每个引物 26.7 条, 多态性条带 462.0 条, 平均每个引物 24.3 条, 多态性位点百分率为 90.1%。缺失数据^[19]将导致遗传多样性指数的低估, 从扩增结果来看, 该研究检测的荞麦的平均等位变异数为甜荞 26.7 个, 比红麻 (8.76 个)、烤烟 (20.8 个)、玉米 (22.6 个)^[20]高。与 SSR 标记相比 [用 SSR 标记研究玉米 (21.7 个)^[21]、大豆 (21.4 个)^[22]也较高], 在分析甜荞种质资源遗传多样性时 ISSR 技术是适用的, 并且有一定的优越性。

根据 ISSR 聚类图可知, 大部分材料的遗传相似系数在 0.82 处, 说明材料间遗传变异较小, 有个别品种表现特殊, 如河北的甜荞 E、安徽的 82F 以及辽宁的辽荞 37 号均单独聚为一类, 说明这些材料与其他材料的亲缘关系较远, 可能有特殊的基因型, 建议对这些材料进一步研究。来自陕西的春荞和花荞 A 遗传相似系数达到 0.95, 这 2 份材料亲缘关系比较近, 很可能有共同的祖先。大部分材料的聚类结果与地理来源有一定的相关性, 地域特性比较明显。

Kump 等用 RAPD 技术评估了来自世界各地的甜荞麦居群及品种的遗传多样性, 结果显示甜荞麦居群间存在适度水平的多态性^[5]。Murai 等利用 RAPD 技术分析了来自世界各地的栽培甜荞麦居群, 结果表明中国南部地区栽培的甜荞麦居群表现出最高的遗传多态性, 并认为栽培荞麦沿 2 条主要路线散布^[23]。到目前为止, 还未见有关甜荞的 ISSR 分析的相关报道。该研究采用 ISSR 标记对来自我国 11 个省的 90 份栽培甜荞进行了分析, 采用 19 个引物共扩增出了 508 条条带, 其中多态性条带 462 条, 多态性带的比率达 90.1%。根据遗传相似系数, 利用 UPGMA 进行聚类分析, 结果表明栽培甜荞麦与地理来源有明显的一致性。

王丽侠利用 SSR 标记对中国栽培大豆的遗传多样性进行分析时发现,不同省以及不同性状群资源间的结果均说明,取样量会影响遗传多样性的比较结果。一般来说,取样量越大分析结果越准确。对不同来源的参试品种进行遗传多样性分析发现,辽宁资源具有最丰富的遗传变异,共扩增出 235 条多态性条带,多态性带的比率为 50.9%,来自内蒙古的品种扩增出 105 条多态性条带,多态性带的比率为 22.7%,是遗传变异最低的参试材料;来自辽宁的 10 个参试

品种的多态性信息指数最高 ($PIC = 0.842$),这可能与辽宁参试品种数目较多,并且有 1 个特殊的类型(辽荞 37 号)有关;来自安徽的 8 个参试品种的多态性信息指数 ($PIC = 0.835$) 位于第 2,这也可能与参试品种数目较多以及有 1 个特殊的类型使其多态性增加有关;来自内蒙古的 5 个参试品种的多态性信息指数最低 ($PIC = 0.633$),这可能与内蒙古的参试材料数目较少有关。

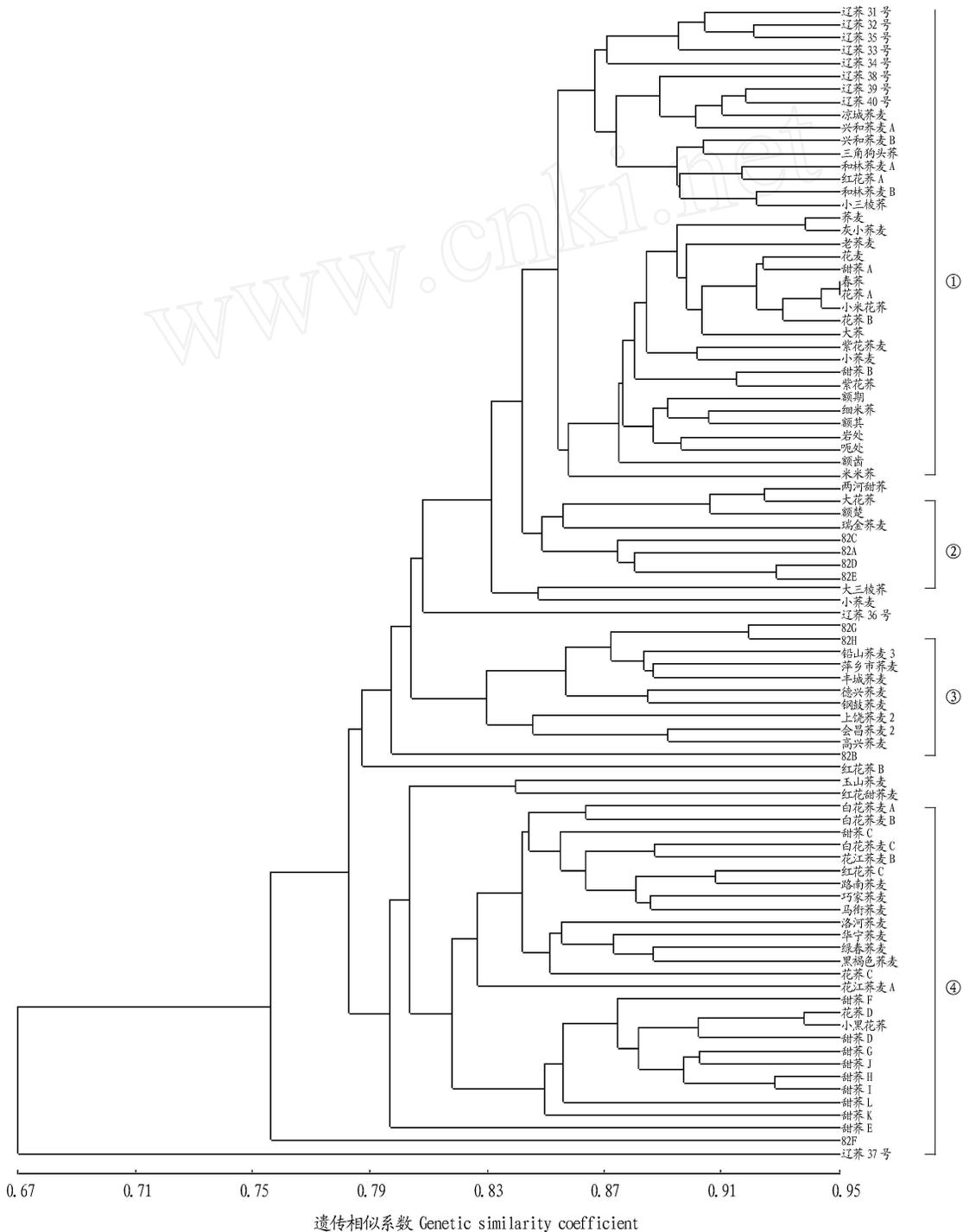


图 2 90 份甜荞的 ISSR 数据聚类树状图

Fig. 2 Dendrogram of 90 species of common buckwheat based on ISSR data

参考文献

[1] 李安仁. 中国植物志第二十五卷, 第一分册[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 108 - 117.

[2] 徐丽华, 潘宏, 赵英明. 荞麦——一种新兴的多用途作物[J]. 荞麦动态, 2000(1): 28 - 30.
 [3] OHMISHI O. Population genetics of cultivated common buckwheat, *Fagopyrum esculentum* Mench. . Allozyme variability in Nepali and koshmiron popula-

- tions[J]. Genet, 1985, 60: 293 - 305.
- [4] OHNISHI O, ASANO N. Genetic diversity of *Fagopyrum homotropicum*, a wild species related to common buckwheat [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 1999, 46: 389 - 398.
- [5] KLUMP B, JAVORNIK B. Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Mbench) populations by RAPD markers [J]. Plant Science, 1996, 114: 149 - 158.
- [6] IWATA H, IMON K, TSUMURA Y, et al. Genetic diversity among Japanese indigenous common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) cultivars as determined from amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeat markers and quantitative agronomic traits [J]. Genome, 2005, 48(3): 367 - 377.
- [7] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomica, 1994, 20: 176 - 183.
- [8] BLAIR M W, PANAUD O, MCCOUCH S R. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1999, 98: 780 - 792.
- [9] GILBERT J E, LEWIS R V, WILKINSON M J, et al. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections [J]. Theor Appl Genet, 1999, 98: 1125 - 1131.
- [10] SAGHAF-MAROOFF M A, SOLIMAN K M, JORGENSEN R A. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mitochondrial inheritance, chromosomal location, and population dynamics [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81(24): 8014 - 8018.
- [11] KANTETY R V, ZENG X, BENNETZEN J L, et al. Detection of high levels of polymorphism among dent and popcorn inbred lines using Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) amplification technique [J]. MNL, 1995, 69: 132 - 134.
- [12] BASSAM B J, CAETANO-ANOLLES G, GRESSHOFF P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels [J]. Anal Biochem, 1991, 196: 80 - 83.
- [13] ROHLF J. FONTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system [M]. NY: Version 1.7 Exeter Software Setauket, 1992.
- [14] 杨淑达, 施苏华, 龚洵, 等. 滇牡丹遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 生物多样性, 2005, 13(2): 105 - 111.
- [15] 陶爱芬, 祁建民, 李爱青, 等. 红麻优异种质资源遗传多样性与亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. 作物学报, 2005, 31(12): 1668 - 1671.
- [16] 杨本超, 肖炳光, 陈学军, 等. 基于 ISSR 标记的烤烟种质遗传多样性研究 [J]. 遗传, 2005, 27(5): 753 - 758.
- [17] MCKHANN H, CAMILLERI C, BERARD A, et al. Nested core collections maximizing genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* [J]. The plant J, 2004, 38: 193 - 202.
- [18] 王莉花, 殷富有, 刘继海, 等. 利用 RAPD 分析云南野生荞麦资源的多样性和亲缘关系 [J]. 荞麦动态, 2004(2): 7 - 15.
- [19] FRANCO J, CROSSA J, RIBAUT J M, et al. A method for combining molecular markers and phenotypic attributes for classifying plant genotypes [J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 944 - 952.
- [20] 程春明, 石云素, 宋燕春, 等. ISSR 分子标记技术在分析玉米自交系遗传关系研究中的适用性 [J]. 生物遗传资源学报, 2005, 6(2): 172 - 177.
- [21] LIU K, GOODMAN M, MUSE S, et al. Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites [J]. Genetics, 2003, 165(4): 2117 - 2128.
- [22] 王丽侠. 中国栽培大豆遗传多样性分析与核心种质构建 [C]. 北京: 中国农业科学院, 2005.
- [23] MURAI M, OHNISHI O. Population genetics of cultivated common buckwheat, *Fagopyrum esculentum* Mbench X. Diffusion routes revealed by RAPD markers [J]. Genes Genet Syst, 1996, 71: 211 - 218.
- [24] LI C Q, JIN H, GUO X F, et al. RFLP analysis of methanogens mcrA gene in rumen of cashmere goat [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(3): 49 - 52, 55.
- [25] YU J F, BAO F, HAN X L, et al. Establishment and optimization of ISSR-PCR system in *Tachidermus fasciatus heckel* [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(5): 37 - 39, 95.
- [26] 李瑞国, 高冬丽, 柴岩, 等. 苦荞资源农艺性状因子聚类分析 [J]. 干旱地区农业研究, 2007, 25(6): 80 - 84.

(上接第 2874 页)

灵敏的实验,引物对于一点点模板就能马上识别并进行复制,一旦初始的引物与模板结合并在第 1 个循环中复制出了目标基因,那么以后的循环就有了更多的模板。另外,聚合酶是一种高效率的酶,它对温度的变化比较迟钝,也就是说它可以在 30 次循环中反复的催化反应进行,所以说模板浓度 5 mg/ml 加入 1 μ l, DNA 聚合酶加入 0.25 μ l 已经足够。过多的引物加入,只会使得引物二聚体的生成更加容易。

原理上 DNA 的解链需要很大的能量,尤其是 N 蛋白的编码基因有 594 bp,且 GC 含量很高,所以在一开始的熔解温度上,选择了 95 $^{\circ}$ C,使得 DNA 能够成功地解链。随后在退火时,合适的温度使得引物能够特异性的与核酸两端相应的序列结合,避免引物自身或者是前、后端引物之间进行匹配,导致最后目标片段复制的特异性不好造成回收量的减少。对于 N 蛋白编码基因,退火温度为 55~60 $^{\circ}$ C 时对引物与模板的结合没有大的影响,但是 50 和 65 $^{\circ}$ C 就完全形成了引物二聚体,得不到痕量的目标 DNA。

由于 DNA 双链解链后,在退火时,引物寻找到相匹配的序列后与其结合,在 DNA 聚合酶的催化下,dNTP 与模板相互匹配,逐渐合成新的 DNA 单链。这时延伸的时间决定了单链 DNA 是否能完全合成。过短的时间会导致 594 bp 的单核

苷酸还没有合成完毕,反应就中止,这将导致回收量的减少。但是如果延伸时间过长,在单链 DNA 合成完毕后还有较长时间空闲,就会使聚合酶“无事生非”,导致核酸突变,这样的结果会导致蛋白在表达后发现氨基酸产生突变造成空间结构的改变或者蛋白功能的丧失。该试验结果表明,延伸时间在 60 s 时,效果最好,这与经验上认为聚合酶大约每秒合成 10 个单核苷酸的结论相符。

3 小结

从数据分析的结果可知,对于 N 蛋白编码基因进行 PCR 反应时,反应的延伸时间主要影响到 DNA 产物回收的量。在 PCR 反应过程中,有许许多多的因素影响试验结果的好坏,并且根据编码核酸的组成成分和大小长短,每种 DNA 所受到的牵制因素都不同,甚至是同一种 DNA 在进行不同次重复的试验时都会得到不同的结果。因此,该试验中,笔者尽量避免了由于试验操作的不规范带来的实验误差,比如在加样的时候,对于微量的样品都采用同一水平的加样方式等。

参考文献

- [1] HUANG Q L, YU L P, ANDREW M. Structure of the N-terminal RNA-binding Domain of the SARS CoV nucleocapsid protein [J]. Biochemistry, 2004, 43: 6059 - 6063.
- [2] J 萨姆布鲁克 D W 拉塞尔. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.