

山核桃 AFLP 实验技术体系的建立

郭金剑¹, 池伟¹, 赵鑫珠², 王丽¹, 曾燕如¹, 张秋月³

(1. 浙江林学院 浙江省现代森林培育技术重点实验室, 浙江 临安 311300; 2. 浙江世界贸易中心 长乐实业有限公司, 浙江 临安 311300; 3. 浙江林学院 天则山核桃科技开发有限公司, 浙江 临安 311300)

摘要: 以充分展开的山核桃 *Carya cathayensis* 嫩叶为材料, 利用改良 CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)法与 CTAB 裂解-硅珠吸附法提取山核桃总 DNA, 对适合于山核桃叶片的 AFLP(扩增片段长度多态性)分析体系进行了摸索。结果表明: ①改良 CTAB 法适用于从山核桃叶中提取高质量的 DNA, 提取的 DNA 可用于 AFLP 的分析; ②采用 *EcoR* I/*Mse* 酶切组合, 酶切连接一步法与两步法的效果没有明显的差异, 但一步法操作更为简便; ③适合于山核桃叶 AFLP 分析的引物组合为 E-ACT + M-CAT, E-ACT + M-CTG, E-ACG + M-CAT, E-ACG + M-CTG。扩增产物经 60 g·L⁻¹ 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后进行银染, 条带信号强度一致性好, 条带分布均匀、清晰, 分辨率较高。图 6 表 3 参 17

关键词: 植物学; 山核桃; DNA 提取; 扩增片段长度多态性(AFLP)

中图分类号: S718.46 文献标志码: A 文章编号: 1000-5692(2008)04-0532-06

An AFLP analysis system for *Carya cathayensis*

GUO Jin-jian¹, CHI Wei¹, ZHAO Xin-zhu², WANG Li¹, ZENG Yan-ru¹, ZHANG Qiu-yue³

(1. The Key Laboratory for Modern Silvicultural Technology of Zhejiang Province, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. Changle Co. Ltd, Zhejiang World Trade Center, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 3. Tianze Science and Technology Development Co. Ltd. for Hickory, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: Total DNA was extracted from young, fully opened leaves of *Carya cathayensis* (hickory) by an improved cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) method and a CTAB-silicon method, based on which an amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis system for hickory was developed. An electrophoresis was used on the amplified products in a 6% denatured polyacrylamide gel, followed by silver staining, with clearly identified bands shown. Specifically: (1) the improved CTAB method was appropriate for DNA extraction from hickory leaves with extracted DNA qualified for AFLP analysis; (2) with a combination of *EcoR* and *Mse* for enzyme cutting, the results were the same for the one-step method combining enzyme cutting and adaptor ligation and the two-step method which separated them with the one-step method being much easier; and (3) there were four primer pairs suitable for this AFLP analysis, namely E-ACT + M-CAT, E-ACG + M-CAT, E-ACG + M-CAT, and E-ACG + M-ATG. [Ch, 6 fig 3 tab. 17 ref.]

Key words: botany; *Carya cathayensis*(hickory); extraction of DNA; amplified fragment length polymorphism (AFLP)

AFLP(amplified fragment length polymorphism, 扩增片段长度多态性)是一种检测 DNA 多态性的方法, 被称为“下一代分子标记”^[1], 是结合 RFLP(限制性长度多态性分析)和 PCR(聚合酶链式反应)

收稿日期: 2007-11-09; 修回日期: 2008-01-21

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y304416); 浙江省现代森林培育技术重点实验室开放基金资助项目(200503); 国家自然科学基金资助项目(30771752)

作者简介: 郭金剑, 硕士研究生, 从事林木生物技术研究。E-mail: Sunday3538@yahoo.com.cn。通信作者: 曾燕如, 教授, 博士, 从事林木生物技术研究。E-mail: yzeng@zjfc.edu.cn

技术优点的基因组 DNA 指纹技术。该技术具有重复性好, 检测的多态性丰富, 无需预先知道被分析基因组 DNA 序列信息等优点, 但对 DNA 模板的质量要求较高。AFLP 分析目前已广泛用于农作物、蔬菜、林木和果树等植物的种质资源与品种鉴定、遗传多样性分析、遗传图谱构建、基因定位和标记辅助育种等诸方面^[2-8]。山核桃 *Carya cathayensis* 为胡桃科 Juglandaceae 山核桃属 *Carya* 植物, 是我国特有的优质干果和木本油料树种^[9], 主要分布于浙皖交界处的天目山区。山核桃以其很高的经济和社会效益而被广泛栽培, 其潜在的营养价值和医疗保健功能日益受到国内外专家学者的关注。我国是山核桃原产地, 栽培历史悠久, 但至今仍无栽培品种, 对其研究尤其在分子水平上的研究甚少。目前, 美国已收集了部分山核桃种质, 针对山核桃的 RAPD (随机扩增多态 DNA) AFLP (扩增片段长度多态性) 标记的研究也刚刚开始^[10-12], 尚未见有关 AFLP 分析的报道。文章就山核桃的 AFLP 标记实验体系的建立进行了阐述, 为利用 AFLP 标记对山核桃进行分子生物学研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

试验所用的材料为山核桃优株的实生子代, 于 2002 年 10 月在浙江林学院实验苗圃实生繁殖而成。2006 年 4 月中旬从实生子代上采集已充分展开的幼嫩叶片, 将它们放入自封塑料袋后置于冰盒, 带回实验室后液氮速冻, 并放入超低温冰箱中保存待用。

1.2 DNA 提取

目前, 植物基因组 DNA 的提取有多种方法。山核桃因富含单宁, 适用于其他植物的 DNA 提取方法并不一定适用于山核桃。在查阅资料的基础上, 实验尝试了 2 种常见的提取植物基因组 DNA 的方法, 即 CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)裂解-硅珠吸附法及改良 CTAB 法^[13]。前者利用粉末状硅珠巨大的表面积来吸附基因组 DNA, 用 GuSCN 及乙醇进行漂洗; 而后者不需使用硅珠及 GuSCN, 但用乙醇来沉淀、漂洗基因组 DNA, 并用 RNase 消化 RNA。提取的 DNA 用 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖电泳检测, 并用蛋白质核酸分析仪(Beckman Coulter DU800)检测 OD_{260} 和 OD_{280} 值。

1.3 AFLP 分析体系

1.3.1 酶切与连接 参考其他物种的酶切连接体系^[13,14], 实验尝试了一步法(酶切与接头连接同时进行)及两步法(先进行酶切, 后连接接头)。选用了 EcoR I/Mse I 酶切组合, 实验中所用的接头序列混合后 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 温育 5 min, 并自然冷却至室温。

一步法中反应体系 $25.00 \text{ } \mu\text{L}$, 包括 500 ng 模板 DNA, $10 \times \text{NE Buffer 2}$, $100 \times \text{BSA}$ ($100.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), EcoR I ($333.4 \times 10^{-3} \text{ kat} \cdot \text{L}^{-1}$, New England Biolabs), Mse I ($166.7 \times 10^{-3} \text{ kat} \cdot \text{L}^{-1}$, New England Biolabs), EcoR I 接头 ($5.00 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), Mse I 接头 ($50.00 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) (表 1), T4 DNA 连接酶 ($83.35 \times 10^{-3} \text{ kat} \cdot \text{L}^{-1}$, Fermentas), $10 \times$ 连接缓冲液。混合液 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱 (Heraeus) 中酶切连接过夜。连接产物 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存待用。

表 1 接头及预扩引物序列

Table 1 Sequences of adapters and primers for preamplification

接头	序列(5'-3')	预扩引物	序列(5'-3')
EcoR I 接头	CTCGTAGACTGCGTACC	EcoR I	GACTGCGTACCAATTCA
	CTGACGCATGGTTAA	接头引物	
Mse I 接头	GACGATGAGTCCTGAG	Mse I	GATGAGTCCTGAGTA AC
	TACTCAGGACTCAT	接头引物	

两步法中酶切反应体系 $10.00 \text{ } \mu\text{L}$, 包括 200 ng DNA 模板, $10 \times \text{NE Buffer 2}$, EcoR I ($333.4 \times 10^{-3} \text{ kat} \cdot \text{L}^{-1}$, New England Biolabs), Mse I ($166.7 \times 10^{-3} \text{ kat} \cdot \text{L}^{-1}$, New England Biolabs), $100 \times \text{BSA}$ ($100.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱 (Heraeus) 中酶切 2 h。连接反应体系 $20 \text{ } \mu\text{L}$, 包括酶切后 DNA 片

段, T4 DNA 连接酶 ($83.35 \times 10^{-3} \text{ kat} \cdot \text{L}^{-1}$, Fermentas), EcoR 接头 ($5.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), Mse 接头 ($50.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) (表1), $10 \times$ 连接缓冲液及去离子水。20 恒温培养箱连接 2 h。

1.3.2 预扩增 PCR 预扩增体系 $30.00 \mu\text{L}$, 含酶切连接产物, EcoR 预扩增引物 ($0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), Mse 预扩增引物 ($0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) (表 1), $25.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$, $10 \times$ PCR 缓冲液, Taq 酶 ($83.35 \times 10^{-3} \text{ kat} \cdot \text{L}^{-1}$, 上海生工生物工程技术有限公司), $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ dNTP}$ (上海生工生物工程技术有限公司) 及水。预扩增在 Gene Amp PCR System 9 700 (applied biosystems) 上进行, 条件为 $95 \quad 1 \text{ min}$; $95 \quad 30 \text{ s}$, $56 \quad 1 \text{ min}$, $72 \quad 1 \text{ min}$, 30 个循环; $72 \quad 5 \text{ min}$; 4 保持。预扩增后, 取 $5.00 \mu\text{L}$ 预扩增产物在 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 琼脂糖凝胶上电泳检测预扩增的效果。

1.3.3 选择性扩增 实验借鉴前人成熟的 AFLP 选扩体系, 针对实验过程遇到的问题对原体系进行优化。原选择性扩增的反应体系 $20.00 \mu\text{L}$, 含稀释 10 倍后的预扩增产物, EcoR 引物 ($0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), Mse 引物 ($0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), dNTP ($10.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), $10 \times$ PCR 缓冲液, $25.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$, Taq 酶 ($83.34 \times 10^{-3} \text{ kat} \cdot \text{L}^{-1}$)。

MgCl_2 (氯化镁) 用量的确定: 原体系中除 MgCl_2 之外的其他试剂配比不变, 对 MgCl_2 的用量做梯度试验 (表 2)。

不同公司 Taq 聚合酶对选扩的影响: 确定 MgCl_2 用量以后, 在其他条件不变的情况下, 选用了 2 个公司 (公司 1 与公司 2) 生产的 Taq 聚合酶进行试验, 每公司酶的用量分别为 $16.67 \times 10^{-3} \text{ kat}$ 和 $41.67 \times 10^{-3} \text{ kat}$ 。

在实验中, 两选择性引物的碱基数均为 3。EcoR 引物及 Mse 引物各 8 个, 共 64 个组合 (表 3)。

表 2 MgCl_2 用量梯度试验

Table 2 A gradient test of the MgCl_2 concentrations

编号	$\text{MgCl}_2 / \mu\text{L}$	体系中 Mg^{2+} 终浓度 / ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
1	0.4	0.50
2	0.6	0.75
3	0.8	1.00
4	1.0	1.25
5	1.2	1.50
6	1.4	1.75
7	1.6	2.00
8	1.8	2.25
9	2.0	2.50

表 3 选择性扩增引物序列

Table 3 Sequences of primers for selective amplification

EcoR 引物	序列 (5' -3')	Mse 引物	序列 (5' -3')
E1	GACTGCGTACCAATTCAAC	M1	GATGAGTCCTGAGTAACAA
E2	GACTGCGTACCAATTCAAG	M2	GATGAGTCCTGAGTA ACAC
E3	GACTGCGTACCAATTCACA	M3	GATGAGTCCTGAGTAACAG
E4	GACTGCGTACCAATTCACT	M4	GATGAGTCCTGAGTAACAT
E5	GACTGCGTACCAATTCACC	M5	GATGAGTCCTGAGTA ACTA
E6	GACTGCGTACCAATTCACG	M6	GATGAGTCCTGAGTA ACTC
E7	GACTGCGTACCAATTCAGC	M7	GATGAGTCCTGAGTA ACTG
E8	GACTGCGTACCAATTCAGG	M8	GATGAGTCCTGAGTA ACTT

1.3.4 扩增产物的电泳分析 电泳用 $60.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 变性聚丙烯酰胺胶含 33.6 g 尿素, 16.00 mL $5 \times$ TBE, 12.00 mL Acr: Bis 储备液 (丙烯酰胺 38.0 g, 亚甲丙烯酰胺 2.0 g, 加水定容至 100.00 mL), 24.00 mL 双蒸水, 0.40 mL $100.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 过硫酸铵及 $40.00 \mu\text{L}$ TEMED (N' , N' , N' , N' -四甲基乙二胺)。胶凝固后恒功率 70 W 预电泳 30 min。选择性扩增产物与上样染料以 2:1 体积混合后 $95 \quad \text{变性} \quad 5 \text{ min}$, 立刻冰浴, 每个样品上样 $6 \mu\text{L}$ 。恒功率 70 W 电泳至溴酚蓝近胶底部。电泳结束后凝胶经体积分数为 10% 冰醋酸固定, AgNO_3 (硝酸银) 染色, 无水 Na_2CO_3 加甲醛及硫代硫酸钠显影。胶板自然干燥后拍照。

2 结果与分析

2.1 DNA 质量

试验用 2 种方法提取山核桃叶片基因组 DNA, 所得到的 DNA 的质量有所不同。CTAB 裂解-硅珠吸附法所得 DNA 数量不稳定, 有较多的 RNA, 且操作时间长而繁琐; 而改良 CTAB 法所得到的 DNA

条带清晰, 纯度较高。OD(光密度)值测定所得的结果也说明了这一点。改良 CTAB 法提取的山核桃叶 DNA OD_{260}/OD_{280} 比值为 1.7 ~ 2.0; CTAB 裂解-硅珠吸附法提取的 DNA OD_{260}/OD_{280} 比值为 1.3 ~ 1.7。这说明改良 CTAB 法能有效降低多酚、单宁和多糖等次生代谢物对 DNA 的污染而获得高质量的 DNA, 对富含单宁的山核桃叶片尤为如此, 提取的山核桃基因组 DNA 质量较好(图 1)。

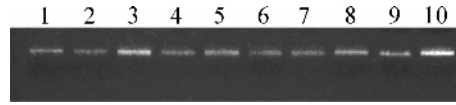


图 1 改良 CTAB 法提取部分山核桃叶样品 DNA 的电泳结果(所有 DNA 均为原液稀释 25 倍; 泳道 1~10 分别为不同样品)

Figure 1 Electrophoresed DNA (25 times diluted) extracted by the improved CTAB method (Lanes 1 to 10 were the different DNA samples)

2.2 酶切与接头连接

实验结果显示, 无论用一步法或者是两步法, 所得到的连接产物经 $10.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 琼脂糖电泳检测, 结果均显示 DNA 酶切充分, 2 种方法没有明显的差异。但由于一步法操作相对简单, 能更好地保证操作的可重复性, 故后续实验所采用的酶切连接产物均为一步法所得。

2.3 预扩增

实验用一个选择性碱基的引物对, 对一步法产生的酶切连接产物进行预扩增(图 2)。从预扩增产物的琼脂糖电泳结果来看, 扩增产物多集中在 1 000 bp 以下, 这样变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)的结果可以反映酶切的效果。

2.4 选择性扩增及扩增产物的电泳

采用预扩增产物稀释 10 倍作为选择性扩增的模板。

2.4.1 Mg^{2+} 浓度对 PCR 结果的影响 Mg^{2+} 主要是通过改变聚合酶的活性对 PCR 反应结果产生影响^[16]。经过进一步多重比较试验可知, 不同浓度水平的 Mg^{2+} 对 PCR 结果有影响, 表现在 1.25, 1.50, 1.75, 2.00 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水平间无显著差异, 这三者与 2.25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水平间均有显著差异。当 Mg^{2+} 浓度超过 2.25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 由于酶活性过高, 产生大量非特异性的弥散带, 从而产生很亮的背景。由图 3 可知 Mg^{2+} 浓度在 1.25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 反应结果均值是最高的。所以选 1.25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为本试验 Mg^{2+} 的最佳反应水平。

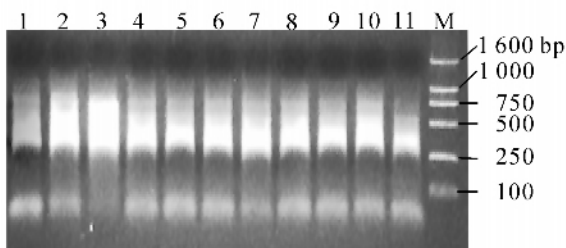


图 2 预扩产物的琼脂糖凝胶电泳检测

Figure 2 Preamplified products electrophoresed on the agarose gel

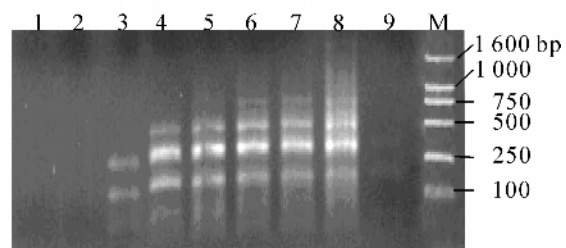


图 3 MgCl_2 浓度梯度试验(1~9 处理代号参见表 2)

Figure 3 A gradient test of the MgCl_2 concentrations (refer to Table 2 for numbering)

2.4.2 不同公司试剂对选扩的影响 实验选择了 2 个公司的浓度的聚合作对比, 并对酶用量做了简单的分析实验, 从图 4 可以看出, 在相同浓度的情况下, 公司 2 的效果优于公司 1。对于 2 种酶用量, $16.67 \times 10^{-3} \text{ kat}$ 和 $41.67 \times 10^{-3} \text{ kat}$ 的扩增效果都没有太大差别。由于实验材料多, 试剂使用量大, 出于节约目的, 后续实验中 Taq 酶的用量采用折中的方法, 即 20 μL 的反应体系选用 $25 \times 10^{-3} \text{ kat}$ 。

基于对 Mg^{2+} 浓度以及 Taq 酶的选择, 确定最终的选扩体系为: 稀释 10 倍的预扩引物 3.00 μL , EcoR 引物($0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.2 μL , Mse 引物($0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.60 μL , Taq 酶($83.35 \times 10^{-3} \text{ kat} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.30 μL , 10 \times PCR Buffer 2.0 μL , dNTP($10.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.30 μL , MgCl_2 ($25.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1.20 μL , 水补足至 20.00 μL 。PCR 体系为: 95 $^\circ\text{C}$ 1 min; 95 $^\circ\text{C}$ 30 s, 65 $^\circ\text{C}$ 40 s, 72 $^\circ\text{C}$ 1 min, 每循环一次退火温度降低 0.7 $^\circ\text{C}$, 共 13 个循环; 95 $^\circ\text{C}$ 30 s, 56 $^\circ\text{C}$ 40 s, 72 $^\circ\text{C}$ 1 min, 共 25 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 5 min; 4 $^\circ\text{C}$ 保持。由图 5 可以看出, 该优化后的体系可以满足 AFLP 的实验要求。

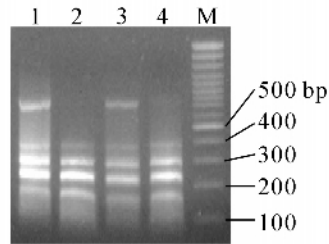


图4 不同厂家 Taq 酶同一样本选扩产物琼脂糖电泳图(泳道 1, 2 酶活力为 16.67×10^{-3} kat; 3, 4 为 41.67×10^{-3} kat; 泳道 1, 3 为公司 1 的酶; 泳道 2, 4 为公司 2 的酶)

Figure 4 Products selectively amplified by the Taq enzymes produced by different companies from the same sample and electrophoresized on the agarose gel (Lanes 1, 2 for the enzyme of 16.67×10^{-3} kat and Lanes 3, 4 for that of 41.67×10^{-3} kat; Lanes 1, 3 for the enzyme produced by Company 1 and Lanes 2, 4 for that by Company 2)

选择性扩增的产物在变性 PAGE 胶上电泳后进行银染。银染步骤繁琐且对每一步操作要求都很高。为保证最终的效果,选择性扩增产物的变性温度提高到 95°C , 时间为 5 min; 银染液、显影液预先配置, 其中显影液要低温处理。实验中发现, 显影液温度过高, 会导致背景颜色深, 分辨率差, 故显影液温度保持在 6°C 以下为宜。染色时间和显影时间是影响银染质量的关键, 染色时间过长则会加深背景的颜色, 显影时间过长也会导致背景加深, 条带相对模糊^[17]。图 6 为 2 个样品进行引物筛选的变性 PAGE 胶局部效果, 条带清晰, 分离度较好。

2.5 山核桃叶片 AFLP 分析之引物筛选

利用本研究建立的反应体系对选择性碱基数为 3 的引物组合 (表 3) 进行筛选, 从供试的 64 对引物组合筛选出四对适用于山核桃叶片 AFLP 分析的引物组合, 它们是 E-ACT + M-CAT, E-ACT + M-CTG, E-ACG + M-CAT, E-ACG + M-CTG。

3 讨论

AFLP 分析所用的 DNA 采用改良 CTAB 法提取, 在基本提取液中添加 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ PVP20, 在提取过程中将约 $20 \mu\text{L}$ β -巯基乙醇加入样品中, 可以较彻底地去除山核桃叶片中所含的多酚、多糖、单宁及配类等物质, 提取的山核桃叶片 DNA 纯度较高, 符合 AFLP 的分析要求。采用限制性内切酶 Mse I / EcoR I 双酶切组合, 一步法酶切连接过夜, 可以保证酶切充分完全。预扩增后将预扩增产物稀释 10 倍进行选择扩增, 扩增引物含有 3 个选择性碱基。既可确保一定数量的条带, 又能保证条带彼此分离; 如采用 1 个或 2 个选择性碱基, 则选择性扩增的产物量大, 难以保证条带清晰。为确保良好的 PCR 效果及实验的稳定性, 一旦确定了实验条件, 正式样品分析时均应使用固定厂家的试剂。选扩产物经 $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后进行银染。银染过程所需要的溶液如固定液、染色液、显色液等应当天事先配好待用, 其中染色液中的硝酸银要充分溶解, 显色液在使用前一定要保持

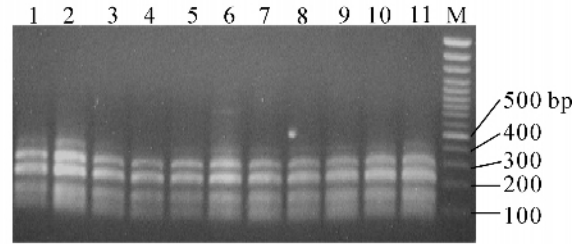


图5 选扩产物的琼脂糖凝胶电泳检测

Figure 5 Selectively amplified products electrophoresized in the agarose gel

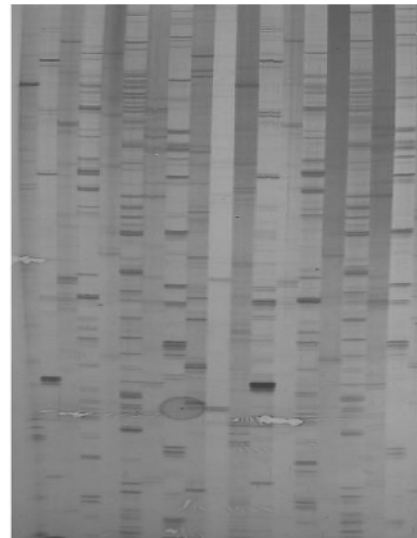


图6 选择性扩增产物变性 PAGE 胶的电泳结果 (局部)DNA 样品为编 14, 编 17; 引物组合为 E4/M4, E4/M7, E6/M4, E6/M7

Figure 6 Selectively amplified products electrophoresized in the denatured PAGE gel (partial)DNA samples were numbered 14 and 17; Primer pairs were E4/M4, E4/M7, E6/M4 and E6/M7

足够的低温, 以确保浅色的凝胶背景; 银染每一步操作的时间要求很严格, PCR 扩增良好时显影迅速且敏感, 应注意显影时间。

致谢: 本研究在进展过程中得到了王正加、郑炳松、黄有军等老师的指导, 在此一并表示感谢。

参考文献:

- [1] VOS P, HOGERS R, BLEEKER M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucl Acid Res, 1995, 23(21): 4 407 - 4 414.
- [2] DIRLEWANGERE, PRONIERV, PARVERYC, et al. Genetic linkage map of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] using morphological and molecular markers [J]. Theor Appl Genet, 1998, 97: 888 - 895.
- [3] ARANZANA M J, CARBO J, ARUSP. Using amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) to identify peach cultivars [J]. J Amer Soc Hort Sci, 2003, 128 (5): 672 - 677.
- [4] KANZAKI S, YONEMORI K, SATO A, et al. Analysis of genetic relationships among pollination-constant and non-as-tringent (PCNA) cultivars of persimmon from Japan and China using AFLP[J]. J Jpn Soc Hort Sci, 2000, 69 (6): 665 - 670.
- [5] XU M L, KORBAN S S. Saturation mapping of the apples cab resistance gene by using AFLP markers[J]. Theor Appl Genet, 2000, 101: 844 - 851.
- [6] ZHANG G X, CHEN J, WANG W J, et al. Amplified fragment length polymorphism(AFLP) molecular marker technique and its application in the studies of fruit trees [J]. J Agr Univ Hebei, 2003, 26 (Supplement): 60 - 63.
- [7] WANG C H, WANG Q, DAI H Y, et al. Cloning an AFLP marker of columnar gene(Co) of apple[J]. J Fruit Sci, 2001, 18 (4): 193 - 195.
- [8] ZOU Y P, GE S, WANG X D. Molecular Markers of Systematic and Evolutionary Botany[M]. Beijing: Science Press, 2001, 36 - 37.
- [9] 张若蕙, 路安民. 中国山核桃属研究[J]. 植物分类学报, 1979, 17 (2): 40 - 44.
- [10] 王正加, 黄坚钦, 郭传友, 等. 山核桃 RAPD 反应体系的优化[J]. 浙江林学院学报, 2003, 20 (4): 429 - 433.
- [11] 黄坚钦, 章滨森, 王正加, 等. 中国山核桃属植物中间亲缘关系 RAPD 分析[J]. 西南林学院学报, 2003, 23 (4): 1 - 3.
- [12] 张日清, 何方, 吕芳德, 等. 美国山核桃群体遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 经济林研究, 2001, 19 (2): 1 - 6.
- [13] 柯辉鹏, 李小丹, 梁红. 猕猴桃叶 DNA 的 AFLP 分析[J]. 生物技术通报, 2006(1): 65 - 68.
- [14] 孙晔. 利用 AFLP 分子标记构建美洲黑杨无性系指纹图谱[D]. 南京: 南京林业大学, 1998.
- [15] 郭传友, 黄坚钦, 王正加, 等. 山核桃基因组 DNA 提取方法的比较研究[J]. 福建林业科技, 2004, 31 (2): 12 - 15.
- [16] 张雷凡, 高燕会, 朱玉球, 等. 石蒜属植物种质资源 ISSR-PCR 反应体系的建立[J]. 浙江林学院学报, 2007, 24 (2): 156 - 161.
- [17] 石锐, 郭长虹. 聚丙烯酰胺凝胶中 DNA 的银染方法[J]. 生物技术, 1998(5): 41 - 48.