

花生 AFLP 指纹图谱

翁跃进

Santosh Gurtu S N Nigam

(中国农业科学院作物品种资源研究所 北京 100081)

(ICRISAT, Patancheru 502 324, India)

摘要 AFLP 是一种以 PCR 为基础的 DNA 指纹图谱技术。利用 AFLP 技术对从国际旱干所 (ICRISAT) 引进的 9 份花生抗旱品种绘制指纹图谱, 通过引物 E-ACA 和与之匹配的 MCAG 和 M-CAT, 在 300~6000bp 的范围内共获得 1577 条 AFLP 扩增产物, 每个品种有主带和次带至少 71 条之多, 其中 10 条为多态性的带纹。

关键词 花生 AFLP 指纹图谱

花生 (*Arachis hypogaeae* L.) 以其较高的经济价值和高含油量以及丰富的蛋白质倍受人们重视, 在世界 100 多个国家内广泛种植 (Nigam et al 1997)。随着科技和经济发展, 国际资源交流和相互引种日益增多, 资源的保护以及与资源有关知识产权的保护逐渐受到人们的重视, 相应的技术方法也随之应运而生。AFLP (Amplified fragment length polymorphism) 国内译为扩增片段长度多态性, 是荷兰 Keygene 公司科学家发明创建的一种 DNA 分子标记新技术, 它结合了 RFLP (Restriction fragment length polymorphism) 技术和 RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA) 技术各自的优点, 既有 RFLP 的稳定性, 又有 RAPD 方便性, 具备了其它 DNA 分子标记技术所具有的特点, 多态性丰富、共显性表达、不受环境影响、无复等位效应, 而且还具有带纹丰富、采样量少、灵敏度高、快速高效等特殊优点。目前, 不仅在小麦、水稻、玉米、大豆、大麦、棉花和油菜等主要农作物上得以应用, 而且在蔬菜 (番茄、马铃薯、莴苣、胡椒、黄瓜、鹰嘴豆)、林木 (垂枝桦 *Betula pendula*、辐射松 *Pinus radiata*) 以及植物基因组研究的模式植物拟南芥上广泛应用^[1,2,5,6,9]。

本文首次报道 AFLP 技术在花生上利用, 以及花生引进品种指纹图谱的绘制。

1 材料和方法

9 份抗旱花生品种全部引自 ICRISAT, 除具有抗干旱的特点外, 其它主要特性见表 1。AFLP 引物采用 BIBCOBRL AFLP 系统 I 的试剂盒 (Cat. No. 10483-014)。

表 1 9 份花生品种的主要特性

Table 1 Performance of 9 Groundnut varieties

序号 No.	ICG 编号 ICG No.	主要特性 Characters
1	ICGV92209	感丛簇病毒病 Susceptible to rosette virus
2	Kadiri 3	低产 Low yield
3	ICGV86325	高产 High yield
4	ICGV88448	高 O/L 比 (4.1) High O/L ratio (4.1)
5	(JL24)	低 O/L 比 (0.97) Low O/L ratio (0.97)
6	(TMV10)	高含油量 (55%) High oil (55%)
7	ICG1171	低含油量 (45%) Low oil (45%)
8	ICGV93094	大粒 (130g/100 粒) High mass (130g/100 grain)
9	ICG4906	小粒 (16g/100 粒) Low mass (16g/100 grain)

利用 CTAB 方法提取花生幼嫩叶片 DNA。取样本 DNA 3 μ l, EcoR I/Mse I 混合酶切 37 $^{\circ}$ C 1h, 酶切片段与 EcoR I 和 Mse I 接头恒温水浴 18 $^{\circ}$ C 连接 1h, 每个反应用 TE buffer 稀释 10 倍, PCR 预扩增, 33p

标定引物,在 Taq 聚合酶的作用下,完成 94℃变性,30s56℃淬火,30s72℃延伸,60sPCR 扩增 36 个循环。PCR 产物 3μl 在含尿素的聚丙烯酰胺序列分析胶上电泳约 1h。将电泳后的凝胶转移吸附到滤纸上,另一面覆盖上保鲜膜,经干胶仪进行干胶处理。根据同位素的放射强度确定干胶在增感屏中感光 X 光片放射自显影的时间,数日后冲洗胶片,即获得 AFLP 指纹图谱。

2 结果和讨论

利用 BIBCOBRL AFLP 系统 I 的试剂盒与引物 E-ACA 匹配的引物 M-CAG 和 M-CAT,分析从国际半干旱所(ICRISAT)引进的 9 份抗旱的花生品种。在 300~6000bp 的范围内,共获得 1577 条 AFLP 扩增产物,其中引物 E-ACA 和 M-CAG 的扩增物最多 82 条,最少 71 条,平均每个品种有主带和次带 78 条。E-ACA 和 M-CAT 的扩增产物明显多于 E-ACA 和 M-CAG 的扩增产物,最多 99 条,最少 94 条,平均每个品种有主带和次带 97.2 条。每个品种至少有 10 条多态性的带纹(图 1 和表 2)。

AFLP 和其它 DNA 分子标记技术一样,在遗传学和育种学领域具有广泛的应用前景。例如遗传多样性的研究、构建遗传图谱、标定基因、辅助品种选择和鉴定品种绘制指纹图谱等方面。但目前由于 AFLP 技术比较新颖,又受到专利保护(欧洲专利号 EP 0 534 858 A1),所以其应用仅仅局限于荷兰、美国、德国和英国等少数发达国家的科研单位和高等学府从事非盈利性的研究,在我国 AFLP 技术的利用特别是对于品种保护方面的利用还是首例。

从试验结果不难看出 AFLP 技术优于其它分子标记的显著特点是具有丰富的带纹和多态性。利用这一特点,Faye^[5]仅用 1 个 AFLP 引物在玉米 2 个基因型中发现 30 条以上的多态性带纹。花生闭花受精,是严格的自花受粉植物,遗传基础比较纯合,尽管 AFLP 带纹比较丰富,但是品种间 AFLP 带纹的多态性比其它作物(小麦、棉花和玉米等)少得多。鉴于花生的这种情况,可以增加 AFLP 引物,或者增加酶切接头的碱基个数(通常为 3 个),都可以提高花生品种的多态性,获得较好的指纹效果。

表 2 9 个花生品种的 AFLP 带纹

Table 2. Separated number of bands by AFLP in 9 groundnut varieties

引物 Primers	M-CAG									M-CAT										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	均	10	11	12	13	14	15	16	17	18	均
E-ACA	78	80	78	71	82	77	79	80	77	78.0	98	97	94	98	99	98	96	96	99	97.2

AFLP 最适宜的应用范围(M. Zabeau 和 P. Vos 申请专利的关键)是利用 AFLP 技术鉴定品种的

E-ACA : M-CAG E-ACA : M-CAT

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

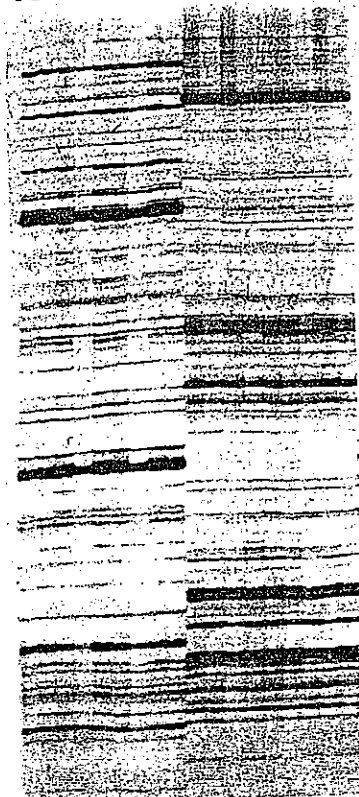


图 1 花生的 AFLP 指纹图谱

Fig 1 Fingerprinting of AFLP in groundnut 1~9 and 10~18 分别为引物 E-ACA, M-CAG 以及 E-ACA, M-CAT 的 AFLP AFLP of lane 1~9 and Lane 10~18 E-ACA primer paired with M-CAG and M-CAT, respectively

参考文献

- 1 Becker J et al. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Mol Gen Genet*, 1995, 249: 65~73
- 2 Thomas C M. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. *The Plant Journal*, 1995, 8(5): 785~794
- 3 Vos P et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(21): 4407~4414
- 4 GIBCOBRL. Instruction manual AFLP TM analysis system AFLP starter primer kit 1995
- 5 International plant genome conference III January, 1995 San Diego, USA
- 6 International plant genome conference IV January, 1996 San Diego, USA
- 7 Keygene. AFLP protocol for public release Version 2.0 March, 1994
- 8 Zabeau M, Vos P. European patent application publication number EP 0 534 858 A1, 1993
- 9 翁跃进. AFLP—一种 DNA 分子标记新技术. *遗传*, 1996, 18(6): 29~31
- 10 翁跃进. 花生属的分子标记. *中国油料*, 1996, 18(4): 78~80

Fingerprinting in groundnut using AFLP

Weng Yuejin

(Institute of Crop Germplasm Resources, CAAS, Beijing 100081)

Santosh Gurtu S N Ninam

(ICRISAT, Patancheru 502 324, India)

Abstract Amplified fragment length polymorphism (AFLP) is a novel PCR based DNA fingerprinting technique. With the combinations of E-ACA primer paired with M-CAG and M-CAT, respectively. Productions of 1577 segregating AFLP amplification in 9 groundnut (*Arachis hypogaea* L.) varieties from ICRISAT (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics) were identified. AFLP results generated more than 71 polymorphic bands, contained some major bands and some minor bands, ranging 300~6000 base pairs, from one pair of EcoR I primer and Mse I primer and up to 10 polymorphic bands can be detected with a single primer for each varieties on the denatured gel.

Key words Groundnut AFLP Fingerprinting

第三届中国国际农业科技年会 4 月在北京召开

由农业部和中国科学技术协会联合主办的中国国际农业科技年会,已连续举办了两届,主题分别为“畜牧业与畜产品加工”与“种子工程和农业发展”。第三届中国国际农业科技年会于 1999 年 4 月 13~16 日在北京国际会议中心召开,以“植物保护与植物营养”为主题,同时举办“国际植物保护与植物营养学术讨论会”和“国际植保产品与肥料博览会”,旨在紧密跟踪国际农业科技发展的主流趋势,探讨国际植物保护与植物营养领域的关键技术问题,促进和加强国内外相关领域的交流与合作。

第三届年会是我国植物保护与植物营养领域的一次盛会,也是国际植物保护和植物营养领域前沿理论、先进技术和优势产品在中国的首次展示。有关专家、学者及企业代表均可报名参加。

联系地址及单位: 100026 北京朝阳区麦子店街 20 号楼中国农学会 中国国际农业科技年会办公室
电话: 010-64194494 64194707 传真: 010-64194484 Email: bao@cav.net.cn