

影响梨 AFLP 技术体系关键因素研究

鲁凤娟^{1,2}, 张玉星¹ (1. 河北农业大学, 河北保定071001; 2. 中国环境管理干部学院, 河北秦皇岛066004)

摘要 探讨了影响梨扩增片段长度多态性(AFLP)技术体系的关键因素,建立了梨的AFLP标准技术体系,指出DNA的提取、酶的用量和酶切时间、聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染程序等都对标准技术体系产生不同程度的影响。

关键词 AFLP技术体系; 关键因素

中图分类号 S661.2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)30-13059-01

Study on the Key Influencing Factors of Pear AFLP Technical System

LU Feng-juan et al (Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071001)

Abstract The key influencing factors of pear AFLP system were discussed. Pear AFLP standard technical system was established. It was pointed out that the DNA extraction, enzyme dosage, enzyme digestion time, polyacrylamide gel electrophoresis, silver dye procedure and so on had different influencing degrees on the standard technical system.

Key words AFLP technical system; Key factors

扩增片段长度多态性(AFLP)技术是20世纪90年代发展起来的一种新型的分子标记技术,它是间隔区扩增(RFLP)和基因扩增(PCR)相结合的分析技术,具有稳定、重复性好、多态性丰富、DNA用量少等特点^[1]。因此,AFLP技术自问世以来已被广泛应用于生物多样性研究、品种鉴定、分子遗传图谱构建和基因定位等领域。目前,AFLP技术已用于多种作物的研究,如水稻^[2]、大麦^[3]等。果树上的研究也有报道,如猕猴桃^[4]、苹果^[5]、枣^[6]和香蕉^[7]等。但在梨上国内外的相关报道还很少。因此,笔者对影响梨AFLP技术体系的关键因素进行了研究。

1 影响梨 AFLP 技术体系的关键因素

1.1 DNA的提取 在提取DNA的过程中,从叶片中提取DNA的方法很多,但梨叶片中富含酚类、多糖、胶类等物质。所以在提取DNA时,应尽量除去这些物质。提取DNA时,酚虽然能有效地使蛋白质变性,但不能完全抑制RNA酶的活性,而且它还能溶解带有长Poly(A)段的RNA分子,使用酚氯仿(1:1)混合液可解决这一问题。继而用氯仿/异戊醇(24:1)抽提可除去核酸酶制品中的痕量酚。异丙醇的挥发性比乙醇低,因而更难除去。此外,使用异丙醇时,蔗糖或NaCl等溶质更容易与DNA共沉淀。一般乙醇沉淀效果较好,且用乙醇沉淀下来的DNA易溶于TE(pH值为8.0)这样离子强度低的缓冲液中。试验中利用CTAB法提取DNA,在提取过程中发现成熟叶片中多糖和酚类等次生物质含量比幼嫩叶片多,因此在提取过程中抗氧化剂的浓度应加以调整,以保证得到高质量的DNA。

1.2 酶的用量和酶切时间 在酶切和连接中,酶的用量和时间的掌握很重要。限制性内切酶和T₄DNA连接酶的价格昂贵,因而探索出最适的用量是必要的。找到最适的酶切时间既可以使酶切彻底又可以提高工作效率,而在连接过程中一般可以将该步反应安排在晚上,这样不仅能使连接反应时间充分,还能最大限度地利用仪器设备以提高工作效率。如果条件允许,可将酶切与连接在PCR仪上进行,因为PCR仪

能精确控温,效果更佳。

1.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳 聚丙烯酰胺凝胶的质量是关键因素(笔者试验使用的丙烯酰胺为日本进口产品,TEMED和甲叉双丙烯酰胺购自Sigma公司)。脲素质量不好不能使样品DNA变性,造成带型拖尾,条带模糊分不开。在灌胶时要避免出现气泡,因为胶中的气泡会使胶面出现凹坑,造成点样时渗样或电泳的条带变形。

1.4 银染程序 在染色过程中,AgNO₃一定要充分搅匀后再将玻璃板放入,否则会使银颗粒不均匀潜入胶中,导致背景杂乱而影响结果统计。此外,显影时间要掌握好,主要带纹出现后立即定影,时间过长会造成背景加深和一些弱带出现,而时间过短会使一些主带不能完全显现出来,两者均会影响结果统计。显影液不能过凉,过凉会使显带时间过长,导致背景过深。另外,在染色过程中冲洗时间过短会造成胶背景发黄,颜色过深;冲洗时间过长则可能导致“白板”。

2 梨 AFLP 技术体系的建立

2.1 酶切体系 总体积为20 μl,包括:DNA(150 ng/μl) 3 μl, ddH₂O 14.35 μl, NEB buffer 2.2 μl, BSA 0.2 μl, EcoRI(20 U/μl) 0.15 μl, Mcl(10 U/μl) 0.3 μl, 37 °C 酶切5 h, 10 °C 保温。

2.2 连接体系 酶切完成的DNA样品中加入5 μl如下反应液: ddH₂O 0.2 μl, T₄ buffer 0.5 μl, Mcl Adapter(10 pmol/μl) 1 μl, EcoRI Adapter(100 pmol/μl) 1 μl, ATP(10 mmol/L) 1.8 μl, T₄ ligase(3 U/μl) 0.5 μl, 37 °C 连接5 h, 10 °C 保温。

2.3 预扩体系 将连接产物用1×TE稀释10倍用于预扩,总体积20 μl: 稀释后DNA 5 μl, ddH₂O 10.1 μl, 10×PCR buffer 2 μl, dNTP 1.6 μl, MOO 0.6 μl, EOO 0.6 μl, Taq 0.1 μl。预扩程序: 95 °C 2 min; 95 °C 30 s; 56 °C 30 s; 72 °C 1 min; 转到步骤 3, 30个循环; 10 °C 保温。

2.4 选扩体系 将预扩产物稀释5倍进行选扩,总体积为20 μl: 稀释后DNA 5 μl, ddH₂O 9.45 μl, 10×PCR buffer 2 μl, dNTP 1.8 μl, Mcl primer 0.8 μl, EcoRI primer 0.8 μl, Taq 0.15 μl。选扩程序: 95 °C 2 min; 95 °C 50 s; 65 °C (每循环降低0.7 °C) 40 s; 72 °C 1 min; 进入步骤 4, 13个循环; 95 °C 50 s; 56 °C 40 s; 72 °C 1 min; 进入步骤 5, 31个循环; 10 °C 保温。

作者简介 鲁凤娟(1978-),女,河北昌黎人,硕士,讲师,从事园艺与绿色食品研究。

收稿日期 2008-07-23

(下转第13070页)

将细胞膜热稳定性作为高温逼熟生理指标,对高产、稳定性好的早籼稻F₂进行高温胁迫,选择生理特性好的优良单株,通过花药培养进行纯合选优,成功育成3个耐高温优良早籼稻新品种^[43]。

6 研究展望

随着温室效应的影响,气温不断升高,高温热害对水稻生产的影响越来越严重,因此开展水稻耐热性研究迫在眉睫。应用分子辅助育种技术结合生理育种等其他育种手段,培育更多更好的耐热性新品种是当前的一大重要任务。

今后应从以下几个方面开展水稻耐热性研究:进行水稻幼穗分化期、抽穗开花期以及灌浆成熟期的耐热性生理机制研究;进行水稻耐热性遗传机制研究;建立完善的水稻耐热性评价方法和体系;利用耐热性QTL标记进行分子辅助育种,定位、克隆水稻耐热性基因;筛选优良的水稻耐热性种质资源,培育优良的耐高温品种。

参考文献

- [1] 张桂莲,陈立云,雷东阳,等.水稻耐热性研究进展[J].杂交水稻,2005,20(1):1-5.
- [2] 夏明元,戚华雄.高温热害对四个不育系配制的杂交组合结实率的影响[J].湖北农业科学,2004(2):21-22.
- [3] 杨惠成,黄仲青,蒋之坝,等.2003年安徽早中稻花期热害及防御技术[J].安徽农业科学,2004,32(1):3-4.
- [4] MACHILL DJ, COFFMAN WR, RUTGER J N. Pollen shedding and combining ability for high temperature tolerance in rice[J]. Crop Sci, 1982, 22:730-733.
- [5] 王才林,仲维功.高温对水稻结实率的影响及其防御对策[J].江苏农业科学,2004(1):15-18.
- [6] 方先文,汤陵华,王艳平.水稻孕穗期耐热种质资源的初步筛选[J].植物遗传资源学报,2006,7(3):342-344.
- [7] PENG S B, HUANG J L, SHEEHY J E, et al. Rice yields decline with high temperature from global warming[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 2004, 101(27):9971-9975.
- [8] MORTA S, YONEMARU J, TAKANASHI J. Grain growth and endosperm cell size under high night temperatures in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Annals of Botany, 2005, 95:695-701.
- [9] SATAKE T, YOSHIDA S. High temperature induced sterility in indica rice at flowering[J]. Japanese Journal of Crop Science, 1978, 47:6-17.
- [10] 中国科学院上海植物生理研究所人工气候室.高温对早稻开花结实影响及其防治[J].植物学报,1977,19(12):126-130.
- [11] 王士梅,朱启升,杨前进,等.安徽省杂交中稻主导品种丰产性及耐高温特性研究[J].安徽农业科学,2007,35(5):1317-1318,1330.
- [12] 森谷国男.水稻高温胁迫抗性遗传育种研究概况[J].杂交水稻,1992(1):47-48.
- [13] 黄英金,张宏玉,郭进耀,等.水稻耐高温逼熟的生理机制及育种应用研究初报[J].科学技术与工程,2004,4(8):655-658.
- [14] 黎用朝,李小湘.影响稻米品质的遗传和环境因素研究进展[J].中国水稻科学,1998,12(S1):58-62.
- [15] 孟亚丽,周治国.结实期温度与稻米品质的关系[J].中国水稻科学,1997,11(1):51-54.
- [16] 李林,沙国栋.水稻灌浆期温光因子对稻米品质的影响[J].中国农业气象,1989,10(3):33-38.
- [17] 程方民,张蒿午,吴永常.灌浆结实期温度对稻米垩白形成的影响[J].西北农业大学学报,1996,5(2):31-34.
- [18] ZHONG L J, CHENG F M, WEN X, et al. The deterioration of eating and cooking quality caused by high temperature during grain filling in early season indica rice cultivars[J]. Agronomy and Crop Science, 2005, 191:218-225.
- [19] 盛婧,陶红娟,陈留根.灌浆结实期不同时段温度对水稻结实与稻米品质的影响[J].中国水稻科学,2007,21(4):396-402.
- [20] 唐湘如,余铁桥.灌浆结实期温度对稻米品质及其生理生化特性的影响[J].湖南农学院学报,1991,17(1):1-8.
- [21] WEIS E, BERRY J A. Harts and high temperature stress[J]. Symp Soc Exp Bd, 1988, 42:329-346.
- [22] 张桂莲,陈立云,张顺堂,等.抽穗开花期高温对水稻剑叶理化特性的影响[J].中国水稻科学,2007,40(7):1345-1352.
- [23] 黄英金,罗永锋,黄兴作,等.水稻灌浆耐热性的品种间差异及其与剑叶光合特性和内源多胺的关系[J].中国水稻科学,1999,13(4):205-210.
- [24] 彭文博,王向阳,赵会杰,等.不同光温条件对小麦旗叶生理特性及粒重的影响[J].植物生理学通讯,1992,28(6):421-423.
- [25] 郑小林,董任瑞.水稻热激反应的研究I.幼苗叶片的膜透性和游离脯氨酸含量的变化[J].湖南农业大学学报,1997,23(2):351-354.
- [26] 朱雪梅,柯永培,邵继荣,等.高温胁迫对重穗型水稻品种叶片活性氧代谢的影响[J].种子,2005,24(3):25-28.
- [27] 李敏,马均,王贺正,等.水稻开花期高温胁迫条件下生理生化特性的变化及其与品种耐热性的关系[J].杂交水稻,2007,22(6):62-66.
- [28] 叶陈亮,柯玉琴,陈伟.大白菜耐热性的生理研究.叶片水分和蛋白质代谢与耐热性[J].福建农业大学学报,1996,25(4):490-493.
- [29] 任昌福,陈安和,刘保国.高温影响杂交水稻开花结实的生理生化基础[J].西南农业大学学报,1990,12(5):440-443.
- [30] 刘奇华,蔡建,李天.水稻籽粒中的淀粉合成关键酶及其与籽粒灌浆和稻米品质的关系[J].植物生理学通讯,2006,42(6):1211-1216.
- [31] 李天,刘奇华,大杉立,等.灌浆结实期高温对水稻籽粒蔗糖及降解酶活性的影响[J].中国水稻科学,2006,20(6):626-630.
- [32] CRAUFURD P Q, JAGADISH S V, WHEELER T R, et al. Heat tolerance at flowering [Z]. Abstract, an international workshop on "Good rice for a warmer world", 2007.
- [33] ZHU C L, XIAO Y H, WANG C M, et al. Mapping QTL for heat tolerance at grain filling stage in rice [J]. Rice Science, 2005, 12(1):33-38.
- [34] 曹立勇,朱军,赵松涛,等.水稻籼粳交DH群体耐热性QTLs定位[J].农业生物技术学报,2002,10(3):210-214.
- [35] 曹立勇,赵建根,占小登,等.水稻耐热性的QTL定位及耐热性与光合速率的相关性[J].中国水稻科学,2003,17(3):223-227.
- [36] 陈庆全.水稻抽穗开花期耐热性和重要农艺性状的遗传基础研究[M].武汉:华中农业大学图书馆,2007.
- [37] NOVER L. The heat stress response as part of the plant stress network: An overview with six tables [C] // CHERRY J H. NATO ASI series on biochemical and cellular mechanisms of stress tolerance in plants. Springer, Berlin New York, 1994:3-45.
- [38] UTAKO YAMANOUCHI, MSAHIRO YANO, LIN H X, et al. A rice spotted leaf gene, *Spl7*, encodes a heat stress transcription factor protein [J]. PNAS, 2002, 99(11):7530-7535.
- [39] IRRR. Annual report for 1977-1983 [Z]. Los Banos, Philippines, 1978-1984.
- [40] REDO E D, LAZA MA, MANGBAS NL. Breeding rice for adaptation and tolerance to high temperature [Z]. Abstract, An International Workshop on "Good Rice for a Warmer World", Wihan, China, 2007.
- [41] 汤圣祥,闵绍楷.水稻品种改良技术讲座(9)——耐逆性育种[J].中国稻米,1998(3):1-2.
- [42] 李太贵,沈波.水稻品种开花期抗热性鉴定研究[J].作物品种资源,1995(1):34-35.
- [43] 黄英金,张宏玉,李长生,等.水稻耐高温逼熟的生理机制及育种应用研究初报[J].科学技术与工程,2004,4(8):655-658.

(上接第13059页)

3 小结

该体系对于促进梨分子辅助育种及遗传连锁图谱的构建等方面具有重要意义。

参考文献

- [1] VOS P, HOEGERS R, BLEEKER M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21):4407-4414.
- [2] CHO Y G, BLAIR MW, PANAUD O, et al. Cloning and mapping of variety specific rice genomic DNA sequence: Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) from silver-stained polyacrylamide gels [J]. Genome, 1996, 39:373-378.
- [3] Q X, HINDOUT P. Development of AFLP markers in barley [J]. Molecular and General Genetics, 1997, 254(3):330-336.
- [4] 张潞生,李传友.猕猴桃雌雄性别AFLP鉴别中DNA模板的制备[J].果树科学,1999,16(3):171-175.
- [5] 祝军.应用AFLP分子标记鉴定苹果品种[J].园艺学报,2000,27(2):102-106.
- [6] 宋婉.中国枣优良品种DNA指纹图谱的研究[D].北京:北京林业大学,1999.
- [7] 于晓英.香蕉种质资源的扩增片段长度多态性鉴定与分类[J].湖南农业大学学报,2002,28(3):206-209.