

梨种质资源遗传多样性研究中的 AFLP 技术引物筛选

鲁凤娟

(中国环境管理干部学院,河北秦皇岛 066004)

摘要:对带有3个选择性核苷酸的EcoRI和MseI引物各8个所组成的64个引物组合进行筛选,选出了多态性高的引物10对用于正式扩增。所选出的引物组合共扩增出371个位点,其中多态性位点306个,占总位点数的82.5%,每个引物组合扩增的位点数变化在23~55个之间,平均37.1个。所筛选出的10个引物组合为梨属植物AFLP扩增多态性引物,可广泛用于梨属植物的AFLP扩增技术。中国梨属植物资源丰富,通过对AFLP多态性引物的筛选,为该技术在梨属种质资源中的应用提供参考。

关键词:梨;种质资源;AFLP;遗传多样性;引物筛选

中图分类号:S188

文献标志码:A

论文编号:2009-2284

Screening of Primers in Genetic Diversity Analysis of *Pyrus* Germplasm by AFLP

Lu Fengjuan

(Environmental Management College of China, Hebei Qinhuangdao 066004)

Abstract: Pairs with three selective nucleotides of EcoRI and MseI primers consisting of 64 primer combinations were screened, 10 pairs of primers were selected for high polymorphism used in the formal expansion. The selected primer combinations amplified a total of 371 sites, of which 306 polymorphic loci, accounting for 82.5% of the total site number for each primer combination amplified loci change in the 23 ~ 55, between an average of 37.1. The 10 selected primer combinations for AFLP *Pyrus* amplified polymorphic primers can be widely used in pear species of AFLP amplification. AFLP technique was applied on germplasm genetic diversity. It was abundant in *Pyrus* germplasm resources in China. It might be helpful for studying *Pyrus* germplasmic resources by screening of primers on AFLP.

Key words: *Pyrus*; germplasm; AFLP; genetic diversity; primers screening

0 引言

扩增片段长度多态性(AFLP)标记实际是RFLP和PCR相结合的一种产物,不需Southern杂交,它继承了RFLP的可靠性和PCR的方便性^[1]。

中国梨属植物种质资源的研究始于20世纪50年代,主要进行了形态学、细胞学和同功酶等方面的研究。这些研究都曾在梨属种质资源的品种鉴定、亲缘关系和分类研究中起过积极的作用^[2-7]。而且利用这些研究成果,形成了比较系统的梨属分类体系。然而,对日益增多的梨属植物,在众多的品种(类型)中,某些比较相似的性状,单用形态学方法就难以区分,且国内对梨属种质资源的研究较大田作物、蔬菜和其他果树种类在深度和系统性上尚有差距。

该研究将AFLP技术应用到梨属植物遗传多样性研究中,筛选高效率引物,旨在为梨种质资源遗传多样性研究提供基础。

1 材料与方法

供试材料取自中国农业科学院果树研究所国家梨种质资源圃(辽宁兴城)和河北农业大学标本园,共44个品种(见表1)。用健康植株新梢上的成熟叶片提取DNA, DNA提取采用CTAB法^[8]。

AFLP分析:参照鲁凤娟等的方法^[9]。带有3个选择性核苷酸的EcoRI和MseI引物各8个所组成的64个引物组合进行筛选。

结果记录:每个引物的扩增产物选稳定而清晰的条带作为统计数据。条带“有”记为“1”,“无”记为

基金项目:河北省自然科学基金(302240)。

第一作者简介:鲁凤娟,女,1978年出生,河北昌黎县人,讲师,硕士,研究方向:园艺与绿色食品。E-mail:lujuan0335@163.com。

收稿日期:2009-11-03,修回日期:2009-11-15。

表1 用于 AFLP 分析的 44 个梨属植物供试材料

| 编号 | 名称 | 编号 | 名称 | 编号 | 名称 |
|----|-------|----|-------|----|-------|
| 1 | 王子廿世纪 | 16 | 南果 | 31 | 天生伏 |
| 2 | 爱甘水 | 17 | 红南果 | 32 | 早熟甸甸 |
| 3 | 新星 | 18 | 小香水 | 33 | 爱宕 |
| 4 | 黄金 | 19 | 鸭梨 | 34 | 雪花 |
| 5 | 今村秋 | 20 | 晋县大鸭梨 | 35 | 晋酥 |
| 6 | 巴梨 | 21 | 赵县大鸭梨 | 36 | 秦丰 |
| 7 | 红巴梨 | 22 | 垂枝鸭梨 | 37 | 黄县长把 |
| 8 | 红茄 | 23 | 胎黄梨 | 38 | 柠檬黄 |
| 9 | 保利阿斯卡 | 24 | 金花梨 | 39 | 栖霞大香水 |
| 10 | 朱丽比恩 | 25 | 金花4号 | 40 | 黄酸梨 |
| 11 | 其力阿木提 | 26 | 苹果梨 | 41 | 二宫白 |
| 12 | 武威冰珠梨 | 27 | 苹香 | 42 | 铁头 |
| 13 | 花长把 | 28 | 锦香J | 43 | 京白 |
| 14 | 兰州长把 | 29 | 中梨1号 | 44 | 茄梨 |
| 15 | 库尔勒香梨 | 30 | 贵妃 | | |

表2 筛选引物的名称及其选择性碱基

| MseI 引物 | 选择性碱基 | EcoRI 引物 | 选择性碱基 |
|---------|-------|----------|-------|
| M1 | M-CAC | E1 | E-AAC |
| M2 | M-CAG | E2 | E-AAG |
| M3 | M-CAT | E3 | E-ACA |
| M4 | M-CTA | E4 | E-ACC |
| M5 | M-CTC | E5 | E-ACG |
| M6 | M-CTG | E6 | E-AGC |
| M7 | M-CTT | E7 | E-AGG |
| M8 | M-CCC | E8 | E-CGG |

“0”。最后将多态性统计数据输入计算机。

2 结果与分析

进行 AFLP 分析时,不同生物的基因组可以使用同一个引物组合,但对某一特定的基因组而言,不同引物组合的扩增效率是不同的。引物扩增效率的高低有它产生的多态性条带数决定。试验用鸭梨、巴梨、红巴梨、黄金梨和王子廿世纪对引物进行了初步筛选(部分引物筛选结果见图1)。选出了多态性高的引物组合 10 个用于正式扩增,这 10 个引物组合是 M₂/E₅、M₂/E₆、M₂/E₇、M₃/E₈、M₅/E₄、M₅/E₆、M₆/E₅、M₆/E₇、M₇/E₅、M₇/E₆(见表2)。

10 对引物共扩增出 371 个位点,其中多态性位点 306 个,占总位点数的 82.5%,每个引物组合扩增的位点数变化在 23~55 个之间,平均 37.1 个。引物组合 M₅/E₆

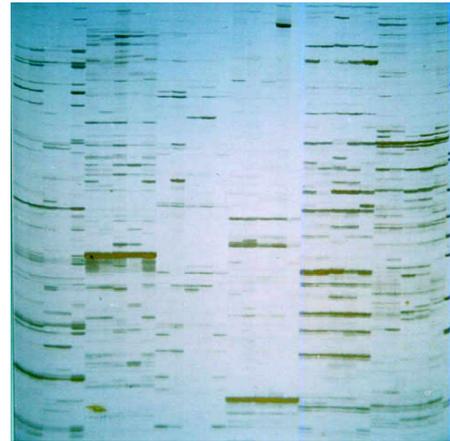


图1 部分引物筛选结果

扩增的位点数最多达 55 个,多态性位点也较多为 52 个;M₂/E₆引物组合扩增出的位点最少为 23 个。扩增的位点一般位于 50~650 bp 之间。在 10 对引物中,每个引物组合可以鉴定的品种数目不同。10 个引物组合的鉴定结果,从表中可以看出,引物对 M₇/E₅ 的鉴别效率最高,可以鉴别出全部供试品种;其次为 M₂/E₇ 可以鉴别出 42 个品种,鉴别品种数目最少的是 M₃/E₈ 和 M₅/E₄,只能鉴别 31 个品种,占总供试类型的 70.5%(见表3)。图2为引物组合 M₇/E₅ 对 44 个梨品种 的 AFLP 图谱。

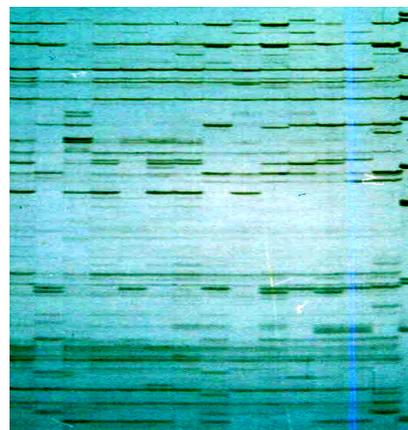
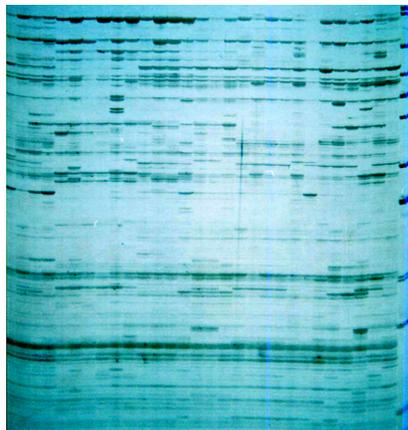


图2 引物组合 M7/E5 对 44 个梨品种的 AFLP 图谱

表3 10对引物在44个梨品种上的扩增结果

| 引物组合 | 总位点数 | 多态性位点数 | 多态性百分率/% | 可鉴别品种数 | 鉴别效率/% |
|-------|------|--------|----------|--------|--------|
| M2/E5 | 41 | 36 | 87.8 | 38 | 86.4 |
| M2/E6 | 23 | 17 | 73.9 | 33 | 75.0 |
| M2/E7 | 34 | 32 | 94.1 | 42 | 95.5 |
| M3/E8 | 28 | 22 | 78.6 | 31 | 70.5 |
| M5/E4 | 38 | 21 | 55.3 | 31 | 70.5 |
| M5/E6 | 55 | 52 | 94.5 | 38 | 86.4 |
| M6/E5 | 46 | 39 | 84.8 | 40 | 91.0 |
| M6/E7 | 24 | 23 | 95.8 | 38 | 86.4 |
| M7/E5 | 42 | 36 | 85.7 | 44 | 100 |
| M7/E6 | 40 | 28 | 70.0 | 40 | 91.0 |

3 讨论

用 AFLP 技术分析遗传多样性的报道很多,该技术是检测物种种质资源是否濒危的一个指标。多态性水平高,则表明物种种质资源丰富。该研究结果筛选出的引物多态性程度很高,达到82.5%。说明中国梨的遗传基础广泛,种质资源丰富,这与中国是世界梨属植物的起源中心之一,而且自然分布广泛有关。所筛选出的10个引物组合能够很好地扩增出供试44个类

型多态性差异,扩增出的条带多态性在55.3%~95.8%之间,鉴别效率介于70.5%~100%。

参考文献

- [1] Vos P. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(2): 4407-4414.
- [2] 王宇霖. 半个世纪以来我国梨果产业与科技发展的回顾[J]. *果树科学*, 1999, 16(4): 239-245.
- [3] 曹玉芬, 李树玲, 黄礼霖, 等. 我国梨种质资源研究概况及优良种质的综合评价[J]. *中国果树*, 2000 (4): 42-44.
- [4] 蒲富慎. 我国梨的种质资源和梨的育种[J]. *园艺学报*, 1979, 6(2): 69-75.
- [5] Challice J S, Westwood M N. Numerical taxonomic studies the genus *Pyrus* using both chemical and botanical characters[J]. *Soc*, 1973, 67: 121-148.
- [6] 姚宜轩, 许方. 我国梨属植物花粉形态观察[J]. *莱阳农学院学报*, 1990, 7(1): 1-8.
- [7] 黄礼霖, 李树玲. 我国梨品种染色体数目观察[J]. *中国果树*, 1986(1): 112-113.
- [8] 胡春根, 郝玉, 邓秀新, 等. RAPD 分析用的梨 DNA 提取方法[J]. *遗传*, 1998, 20(4): 31-33.
- [9] 鲁凤娟, 张玉星, 王国英, 等. 梨 AFLP 技术体系的摸索与建立[A]. 梨科研与生产进展(2)[C]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2003: 176-178.