

## AFLP 分子标记技术在浙蒲 2 号种子纯度快速鉴定中的应用

王玲平, 戴丹丽, 吴晓花, 汪宝根, 李国景\*

(浙江省农业科学院 蔬菜研究所, 浙江 杭州 310021)

**摘要:** 以瓠瓜杂种一代浙蒲 2 号及其父、母本和品系 J099 为材料, 建立了利用 AFLP 分子标记技术进行瓠瓜杂种纯度鉴定技术体系。从 64 对引物组合中筛选出了两对稳定扩增、多态性好、分辨率高的引物组合 E-ACC/M-CTA 和 E-ACC/M-CTT, 可有效区分父、母本和杂种一代, 适宜用于浙蒲 2 号种子纯度快速鉴定。

**关键词:** 瓠瓜; 杂交种; AFLP; 纯度鉴定

中图分类号: Q814; S642

文献标识码: A

文章编号: 1004-1524(2008)02-0084-04

### Application of AFLP markers in fast determination of seed purity in gourd, *Lagenaria siceraria* cv. Zhepu No. 2

WANG Ling-ping, DAI Dan-li, WU Xiao-hua, WANG Bao-gen, LI Guo-jing\*

(Institute of Vegetables, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

**Abstract:** A set of AFLP molecular marker techniques for determining hybrid seed purity of gourd, *Lagenaria siceraria* cv. Zhepu No. 2 was established by analysis of their hybrid generation, parents and a breeding line J099. Two pairs of primer combinations of E-ACC/M-CTA and E-ACC/M-CTT from 64 pairs were selected which produced steadily polymorphic bands. These two pairs of primer combinations can clearly distinguish their genetic relationship between hybrid generation and their parents, and can be used to determine the purity of the hybrid seed.

**Key words:** gourd; hybrid; AFLP; purity determination

瓠瓜 *Lagenaria siceraria* (Molina) Standl. (Syn. *L. leucantha* Rusby) 属葫芦科葫芦属一年生蔓性草本植物, 又名长瓜、蒲瓜、夜开花、葫芦等, 为我国的特色瓜类蔬菜之一, 以幼嫩果实供食用。近年来, 瓠瓜在我国长江流域及南方各省普遍栽培, 为效益农业的重要蔬菜作物之一。传统的依据形态学进行品种纯度鉴定大多依靠田间种植, 鉴定所需时间长、效率低, 常不能满足种子种苗产业化开发的需要。

随着国际植物新品种保护联盟(UPOV)以及《植物新品种保护条例》等有关育种者权利保护法规的颁布实施, 为保护品种选育者的知识产权, 减少假劣种子对农户造成损失, 应用分子标记技术进行品种真实性快速鉴定技术正备受关注<sup>[1~3]</sup>。在众多的 DNA 分子标记中由于 RAPD 技术提供的信息不够全面, 重复性差, 一般为显性标记, 不能鉴定杂合子<sup>[4,5]</sup>。而 AFLP 技术是通过选择性扩增基因组 DNA 的酶切片断而产生的多态性来分析鉴定不同品种, 与 RAPD 技术相比, 它具有多态性高、重复性好的特点, 已应用于哈密瓜、白菜等作物种子纯度鉴定<sup>[6,7]</sup>。

本研究旨在建立利用瓠瓜 AFLP 分子标记进行种子纯度快速鉴定的技术体系。

收稿日期: 2007-11-20

基金项目: 浙江省科技厅重大攻关项目(2005C12001)

作者简介: 王玲平(1975-), 女, 山西洪洞人, 博士, 主要从事蔬菜生理和分子育种研究。E-mail: zjqj2006@163.com

\* 通讯作者: 李国景, E-mail: Guojing\_li@yahoo.com.cn; Tel (Fax): 0571-86403050.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

供试材料瓠瓜杂种一代浙蒲 2 号及其父本 (G17-11-2)、母本 (G7-4-3) 和品系 J099 由浙江省农业科学院蔬菜研究所提供。AFLP 反应用试剂, Tris、硝酸银、尿素等生化试剂购自北京鼎国生物技术有限公司。EcoRI、MseI 内切酶购自上海生物工程技术有限公司。Tag 酶、dNTP 等购自 Promega 公司。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 瓠瓜总 DNA 的制备

参照 Murry 和 Thosmpson 等<sup>[8]</sup> 的 CTAB 法进行改良提取总 DNA。

#### 1.2.2 酶切连接

AFLP 实验分析主要参考 Vos 等<sup>[9]</sup> (1995) 的方法进行。EcoRI / MseI 酶切 25  $\mu$ l 体系包括 250 ng DNA 样品, 1.25 U 的 EcoRI, 2.5 U 的 MseI, 10 $\times$ Tango buffer<sup>TM</sup> 5.0  $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴 6 h 以上; 在酶切体系中加入 10 $\times$  ligation buffer 3.0  $\mu$ l, 5  $\mu$ mol/L 的 EcoRI 接头 0.5  $\mu$ l, 50  $\mu$ mol/L 的 MseI 接头 0.5  $\mu$ l, 2 U 的 T<sub>4</sub> 连接酶, 加水至 30  $\mu$ l, 20 $^{\circ}$ C 下连接过夜。

#### 1.2.3 预扩增

预扩体系 25  $\mu$ l。其中 17.4  $\mu$ l 的 dd H<sub>2</sub>O、2.5  $\mu$ l 连接后的 DNA 模板, 0.7  $\mu$ l 的 EcoRI 引物 (50 ng/ $\mu$ l), 0.7  $\mu$ l 的 MseI 引物 (50 ng/ $\mu$ l), 0.5  $\mu$ l 10 mmol/L 的 dNTPs, 10 $\times$  PCR reaction buffer (终浓度为 1 $\times$  Buffer) 2.5  $\mu$ l, 0.5  $\mu$ l 的 Taq Polymerase (2 U/ $\mu$ l), 0.2  $\mu$ l 125 mmol/L 的 MgCl<sub>2</sub> (终浓度为 2 mmol/L)。PCR 程序为 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 22 个循环; 产物 4 $^{\circ}$ C 保存用于选择性扩增。取 5  $\mu$ l 预扩产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳检测酶切连接以及预扩增效果。

#### 1.2.4 选择性扩增

将预扩产物稀释 50 倍用于选择性扩增。选扩反应体系为 20  $\mu$ l, 其中预扩稀释产物 (模板) 0.5  $\mu$ l, EcoRI 引物 5 ng, MseI 引物 30 ng, 10 mmol/L 的 dNTP 0.4  $\mu$ l, 10 $\times$  PCR reaction buffer 2.0  $\mu$ l, Taq DNA Polymerase 1 U。选扩 PCR 程序为 94 $^{\circ}$ C 变性 120 s, 然后是 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 64 $^{\circ}$ C 退

火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 共 13 个循环, 每个循环后退火温度降低 0.7 $^{\circ}$ C; 接下来是 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 共 28 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 420 s, PCR 产物 4 $^{\circ}$ C 保存。

#### 1.2.5 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

选择性扩增产物在 6% 的聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离。电泳缓冲液为 1 $\times$  TBE, 70 W 恒功率预电泳 30 min。取 5  $\mu$ l 变性 PCR 产物点样。70 W 恒功率电泳 1.5 h 左右, 电泳过程中胶面温度不超过 55 $^{\circ}$ C。

#### 1.2.6 银染

采用许绍斌等 (2002) 简易银染法<sup>[10]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 模板质量

获取高质量基因组 DNA 是 AFLP 分析成功的关键步骤之一。本试验基本按照 CTAB 法, 但在加入 2% CTAB 抽提缓冲液水浴 45 min 后, 加入等体积的氯仿 + 异戊醇 + 无水乙醇的混合液 (体积比为 24 : 1 : 6), 可有效去除色素等各类杂质。样品检测结果表明, DNA OD<sub>260</sub>/280 比值为 1.75 ~ 1.83, 带型整齐, 无明显降解, 符合 AFLP 分析对 DNA 模板质量的要求。

### 2.2 酶切和连接

基因组 DNA 酶切是否充分和 DNA 片断连接上接头都关系到 PCR 扩增效果, 直接影响最终指纹图谱的质量。预扩增结果可说明基因组 DNA 酶切连接的效果, 从而预测指纹图谱质量。从图 1 可见, DNA 酶切片断电泳后分散呈 smear 状, 扩增片段大多集中在 100 ~ 1000 bp, 说明酶切较完全, 接头连接效果好, 片断大小较合适。

### 2.3 多态性引物组合筛选

采用 64 对 AFLP 引物组合对双亲和 8 个 F<sub>1</sub> 代单株及品系 J099 进行选择扩增。EcoRI 引物所选用的选择性碱基为 AAC, AAG, ACA, ACT, ACC, ACG, AGC, AGG; MseI 引物所选用的选择性碱基为 CAA, CAC, CAG, CAT, CTA, CTC, CTG, CTT。用这 64 对引物组合共扩增出 1363 条带, 各引物组合间扩增条带数差异较大, 多的可扩增出 36 条, 少的仅有 11 条, 平均每对引物组合为 21.29 条; 表现多态性的引物组合共有 9 个, 多态

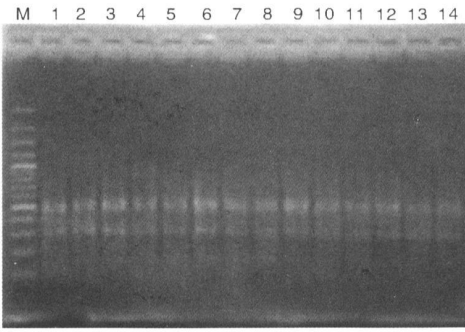


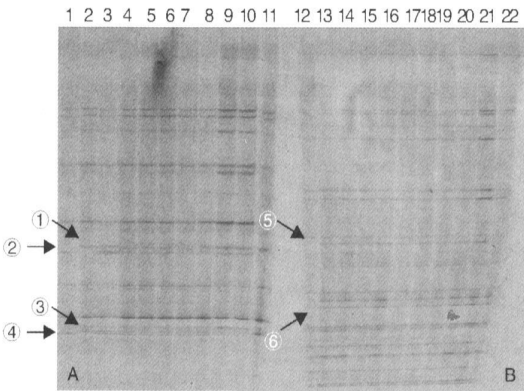
图 1 瓠瓜 AFLP 预扩增产物琼脂糖凝胶电泳图  
M:100 bp DNA Ladder marker; 1: 母本; 2: 父本; 3~12: 浙蒲 2 号; 13, 14: 品系 J099

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of AFLP pre-amplification products of gourd *Lagenaria siceraria*

性条带共 17 条, 其中 55 对引物组合未出现多态性条带。筛选出在杂交种、双亲中稳定表现多态性的引物组合两对: E-ACC/M-CTA, E-ACC/M-CIT.

### 2.4 差异条带与鉴定分析

图 2-A 显示引物对 E-ACC/M-CTA 对浙蒲 2 号一代杂种、父本和母本所产生的 4 个多态性标记 ①, ③ 处浙蒲 2 号和父本各有一条强扩增带, 片段大小分别约为 300 bp 和 150 bp, 母本在这两个位置上无扩增带; ②, ④ 片段大小与 ①, ③ 相差不大, 在浙蒲 2 号和母本上各有一条弱扩增带, 父本无扩增带。在这 4 个多态性标记位点上, 浙



A: 引物对 E-ACC/M-CTA 的扩增结果; B: 引物对 E-ACC/M-CIT 的扩增结果。1, 12: 母本; 2, 13: 父本; 3~10 和 14~21: 浙蒲 2 号; 11 和 22: 品系 J099

图 2 引物组合 E-ACC/M-CTA 和 E-ACC/M-CIT 的鉴定结果

Fig. 2 Identification of primer combinations of E-ACC/M-CTA and E-ACC/M-CIT. 1: female parent; 2: male parent; 3~12: Zhepu 2; 13, 14: line J1099

蒲 2 号兼具有父本和母本的带型, 而其父本和母本的带型则各有缺失, J099 有不同的扩增带。图 2-B 显示引物对 E-ACC/M-CIT 对浙蒲 2 号一代杂种及其父本和母本的多态性扩增, 浙蒲 2 号和父本在 ⑤ 和 ⑥ 处各有一条强扩增带, 片段大小分别约为 300 bp 和 150 bp, 母本无扩增带, 在这个扩增多态性位点上, 一代杂种也兼具有父本和母本的扩增带型。经重复检验表明, 应用这两对引物组合, 完全可区分浙蒲 2 号一代杂种、父本和母本, 特别是浙蒲 2 号一代杂种和母本的多态性条带明显, 可用作浙蒲 2 号种子纯度的快速鉴定。

### 3 讨论

依据形态学特征特性差异进行良种质量(真假杂种、纯度)检测是当前的主要手段。与传统的依据表型性状鉴定相比, 基于 DNA 水平差异的分子标记技术, 不受植株的生长时期限制, 鉴定快速, 并不受基因表达和环境条件的影响。自从 1974 年 Grodzicker 创立 RFLP 分子标记技术以来, DNA 分子标记技术得到了迅猛的发展, 十余种新型标记相继问世, 并在动物、植物和微生物等学科中得到了广泛的应用。近年来, AFLP, RAPD 和 SSR 等分子标记技术在国内已被用于鉴别不同品种之间在分子水平上的差异。

本研究选用的 AFLP 标记技术有着明显的优势: (1) 信息量大, 理论上 AFLP 标记技术能够产生无限多的标记数并且可以覆盖整个基因组, 能够在亲缘关系十分相近的材料中产生多态性, 是指纹图谱技术中多态性最丰富的一项技术。本研究中的父、母本材料亲缘关系均十分相近, 所以无多态性较差, 但其中两个引物组合显示了很好的多态性。(2) DNA 用量少, 对模板浓度变化不敏感, 易操作, 可靠性好, 重复性高。本研究所采用的单株均表现一致, 重复实验结果完全一致, 说明了这些多态性条带真实可靠。(3) 方便快捷, 具有通用性, 不需要预先知道基因组的信息<sup>[9]</sup>。

瓠瓜杂交制种时父、母本材料分开种植, 父本植株往往在授粉结束后即被拨除, 因此, 只要能正确区分杂种一代与母本, 即可达到鉴定真假

杂种的目的。本试验结果说明,应用引物组合对 E-ACC/M-CTA 和 E-ACC/M-CTT 进行扩增,浙蒲 2 号均具有明显区别于母本的特异条带,并兼具有父本和母本的带型,因此,这两个标记可以用作浙蒲 2 号杂交种的纯度快速鉴定中。但 AFLP 标记存在试验程序较复杂、试验对 DNA 的纯度和内切酶的质量要求严格、成本高等缺点。所以进一步的研究可以选出其中的一个或几个多态性标记,将其转化为简单快速、成本低、容易操作、特异性高的特异 PCR 标记,经过简单的 PCR 快速扩增来区分瓠瓜的杂种,而无需再经过播种栽培等一系列过程鉴定,达到生产上杂交种快速鉴定的目的,服务于产业化开发的需要。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 梅眉, 陆璐. DNA 分子标记技术在农作物种子质量检验中的应用[ J ]. 分子植物育种, 2005, 3(1): 129—134.
- [ 2 ] 李鸣, 谭裕模, 李杨瑞, 等. 甘蔗 (*Saccharum officinarum* L.) 品种遗传差异的 AFLP 分子标记分析[ J ]. 作物学报, 2004, 30(10): 1008—1013.
- [ 3 ] Staub JE, Dane F, Reitsma K, et al. The formation of test arrays and a core collection in cucumber using phenotypic and molecular marker data [ J ]. *J Am Soc Hortic Sci*, 2002, 127(4): 558—567.
- [ 4 ] 李丽, 郑晓鹰, Klocke E. 利用 RAPD 分子标记对番茄杂交种纯度的鉴定研究[ J ]. 广西植物, 2003, 23(2): 149—154.
- [ 5 ] McDonald MB. Genetic purity: from protein electrophoresis to RAPDs[ A ]. Loden HD, Wilkinson D. The fiftieth annual com & sorghum industry research conference 1995 [ C ]. Proceedings Chicago ILL, 1995. 256—271.
- [ 6 ] 翟文强, 田清震, 贾继增, 等. 哈密瓜杂交种纯度的 AFLP 指纹鉴定[ J ]. 园艺学报, 2002, 29(6): 587.
- [ 7 ] 李丽, 郑晓鹰. AFLP 分子标记应用于白菜品种鉴定[ J ]. 分子植物育种, 2006, 4(5): 685—689.
- [ 8 ] Muny HG, Thompson WF. Rapids isolation of high molecular weight plant DNA [ J ]. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8: 4321—4325.
- [ 9 ] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [ J ]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23: 4407—4414.
- [ 10 ] 许绍斌, 陶玉芬, 杨昭庆, 等. 简单快速的 DNA 银染和胶保存方法[ J ]. 遗传, 2002, 24(3): 335—336.

(责任编辑 陈华平)