

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2007)05-0266-06

马铃薯品种遗传多样性的RAPD和AFLP标记分析

李凤云¹, 盛万民¹, 刘昭军², 田国奎¹, 李庆全¹, 王立春¹

(1. 黑龙江省农业科学院马铃薯研究所, 黑龙江 克山 161606; 2. 黑龙江省农业科学院生物技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: 利用 RAPD 和 AFLP 分子标记技术对 19 份马铃薯品种进行了遗传多样性分析。试验表明: 在 RAPD 分析中, 19 份马铃薯品种的遗传距离介于 0.1707~0.7222 之间, 平均值为 0.3917; AFLP 分析表明, 19 份材料的遗传距离介于 0.2091~0.7679 之间, 平均值为 0.4811。两种方法均适于马铃薯品种遗传多样性分析, 其中 RAPD 简便、快速、成本低, 较适用于分析马铃薯品种亲缘关系, 指导育种实践, 而 AFLP 技术具有很高的分辨率, 更适于进行马铃薯品种鉴定。

关键词: 马铃薯; RAPD; AFLP; 聚类分析; 遗传多样性

马铃薯育种中亲本的选择至关重要, 既要求亲本携带目标性状或目的基因, 又要扩大亲本间的遗传差异, 分子标记技术的发展, 为从 DNA 水平上检测品种及品系间的遗传差异提供了有利工具。RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) 即随机扩增多态性 DNA 技术, 该技术简单成熟。AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 是一种新型 DNA 分子标记技术, 它是通过对基因组限制性酶切片段进行选择性地扩增而揭示多态性的, 自问世以来, 很快在多种蔬菜作物重要性状的标记、遗传图谱的构建等方面得到广泛应用^[1-3]。

本研究用 RAPD 和 AFLP 技术对 19 份马铃薯品种进行遗传多样性分析, 明确品种间的亲缘关系, 为在马铃薯育种中有效地利用两种分子标记技术辅助育种及准确评价种质资源遗传多样性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

选用克新 1~19 号系列马铃薯品种的脱毒试管苗为供试材料(表1)。

收稿日期: 2007-05-20

基金项目: 黑龙江省农业科学院科研计划项目“多抗高产专用马铃薯种质资源创新技术研究与应用”。

作者简介: 李凤云(1972-), 女, 助理研究员, 主要从事马铃薯试管苗脱毒快繁, 马铃薯品质分析和马铃薯生物技术的研究。

表 1 RAPD 和 AFLP 分析所用的马铃薯品种

名称	克新系列马铃薯品种的亲本	
	母本	父本
克新 1 号	374-128a	Epoka
克新 2 号	Mira	Epoka
克新 3 号	Mira	Katahdin
克新 4 号	Anemone	Katahdin
克新 5 号	Anemone	Katahdin
克新 6 号	S41956	96-56
克新 7 号	克新 2 号	292-20
克新 8 号	克新 4 号	克新 6 号
克新 9 号	克 731	292-20
克新 10 号	CIP378177	Epoka
克新 11 号	CIP378176	Epoka
克新 12 号	Dorita	Dorita
克新 13 号	Mira	Mira
克新 14 号	S16-1-1-14-1-3-6-(5)	A-11-1-8-(9)
克新 15 号	Belmont	呼 8342-36
克新 16 号	北方红	克 BP9601 系 4X-2X 杂种 四倍体)
克新 17 号	F81109	B5141-6
克新 18 号	Epoka	374-128
克新 19 号	克新 2 号	KSP92-1

1.2 RAPD 分析的试验方法

按照 CTAB 大量法并略加改进提取 DNA, 将各材料的 DNA 浓度调整至 20 ng· μL^{-1} , 随机引物(购于上海生工生物技术公司) 1 000 个, 初步筛选出 45 个进行 DNA 扩增, Taq DNA 聚合酶是 Promega 公司生产的, 反应体系为 25 μL , PCR 扩增在 TC-

XP- G 型 PCR 扩增仪上完成, 反应程序为: 94 4 min, 94 30 s, 37 40 s, 72 60 s, 扩增 40 个循环, 最后 72 10 min。PCR 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳分离, 电泳缓冲液采用 1 ×TAE, 恒压 100 V, 电泳 30 min, 电泳结束后在 Chemidoc XRS System 成像系统中成像以供分析。

1.3 AFLP 分析的试验方法

按照 CTAB 大量法并略加改进提取 DNA, 采用 EcoR 和 Mse 双酶切组合, 酶切和连接一步完成, 反应体系为 25 μL。(接头及引物由上海生工生物技术公司合成), 预扩采用 E+1/M+1 引物组合, 反应体系为 20 μL。选扩采用 E+2/M+3 和 E+3/M+3 引物组合, 反应体系为 20 μL。PCR 扩增在 TC- XP- G 型 PCR 扩增仪上完成。AFLP 选扩产物 95 °C, 变性 5 min。在 6% 聚丙烯酰胺变性凝胶上电泳分离, 电泳缓冲液采用 1 ×TBE, 恒压 1 000 V, 电泳 2.5~3.0 h, 电泳结束后采用银染方法显影以供分析。

1.4 数据统计及遗传多样性分析

谱带按 0/1 系统记录, 有带的记为“1”, 无带的记为“0”。记录结果采用 NTSYS 分析软件分析遗传距离, 采用 UPGMA 方法进行聚类, 建立聚类树状图。

2 结果与分析

2.1 RAPD 和 AFLP 分析揭示的多态性

2.1.1 RAPD 分析

从 45 个随机引物中选出重复性好、多态性强、条带清晰稳定的 7 个引物进行扩增, 扩增结果见表 2。7 个引物共扩增出 52 条带, 多态性条带为 43 条, 多态性比率为 76.7%。平均每个引物扩增出 7.42 条带, 多态性条带平均为 6.14 条。不同引物扩增的多态比率分布于 66.7%~100% 之间。不同引物扩增的条带数介于 4~9 条, S114 和 S112 扩增的条带最多均为 9 条。

2.1.2 AFLP 分析

用 30 对引物组合对 19 个马铃薯品种进行 PCR 扩增, 从中筛选出谱带清晰并呈现多态性的有效引物共 7 对, 然后对这 7 对引物 PCR 扩增的谱带进行分析(表 3)。7 对引物组合共扩增出 495 条带, 每对 AFLP 引物组合扩增出 54~90 条带, 平

均为 70.71 条带, 其中多态性条带有 302 条, 平均为 43.14 条带。而 E11M48 扩增的条带数最多, 为 90 条, E38M48 扩增的条带最少, 为 54 条。E13M49 引物组合扩增的多态比率最高, 为 70.67%, 所揭示的遗传多样性最丰富, E35M48 引物组合扩增的多态比率最低, 为 51.67%, 7 个引物组合平均多态比率为 60.49%。说明不同引物组合扩增效果差别较大, 不同引物组合扩增出的谱带差异反应出不同品种间的遗传差异, 在进行遗传多样性研究中应选用多态性高的引物组合。

表 2 RAPD 随机引物的扩增结果

RAPD 引物名称	序列	条带总数	多态条带	多态比率 (%)
S85	5 - CTG AGA CGG A - 3	8	8	100
S114	5 - ACC AGG TTG G - 3	9	9	100
S112	5 - ACG CGC ATG T - 3	9	7	77.8
S111	5 - CTT CCG CAG T - 3	8	6	75
S113	5 - GAC GCC ACA C - 3	4	3	75
S118	5 - GAA TCG GCC A - 3	8	6	75
S126	5 - GGG AAT TCG G - 3	6	4	66.7
总计		52	43	—
平均		7.42	6.14	76.7

表 3 7 个 AFLP 引物组合的扩增结果

AFLP 引物组合	条带总数	多态条带	多态比率 (%)
E11M48	90	60	66.67
E39M48	80	48	60.00
E13M49	75	53	70.67
E11M49	71	37	52.11
E13M61	65	41	63.08
E35M48	60	31	51.67
E38M48	54	32	59.26
总计	495	302	—
平均	70.71	43.14	60.49

2.2 RAPD 和 AFLP 标记的遗传距离分析

2.2.1 RAPD 分析

19 份马铃薯品种的遗传距离介于 0.1707~0.7222 之间, 平均值为 0.3917(见表 4)。其中克新 4 号和克新 5 号的遗传距离最小, 为 0.1707, 这两个品种为同一父母本育成的姊妹系, 因此亲缘关系最近, 说明 RAPD 分析的可靠性。克新 8 号和克新 19 号的遗传距离最大, 亲缘关系最远, 为 0.7222, 这可能由于克新 19 号的父本 KSP92-1 含有新型栽

培种和富利亚薯的血缘, 与其它品种遗传差异较大, 且该品种是采用种间杂交和 2n 配子技术育成, 说明采用先进的育种技术和育种材料可以扩大品种间的遗传差异。

表 4 19 份马铃薯品种 RAPD 分析的遗传距离

品种	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
1	0.0000																			
2	0.2778	0.0000																		
3	0.4737	0.2105	0.0000																	
4	0.2857	0.2381	0.2727	0.0000																
5	0.3714	0.2571	0.2973	0.1707	0.0000															
6	0.5000	0.3125	0.4706	0.4211	0.4194	0.0000														
7	0.3684	0.2632	0.3000	0.2727	0.2973	0.2941	0.0000													
8	0.4545	0.3333	0.3714	0.3846	0.4375	0.3793	0.3714	0.0000												
9	0.2941	0.2353	0.3333	0.4000	0.4545	0.4000	0.3333	0.3548	0.0000											
10	0.3529	0.3529	0.4444	0.4500	0.4545	0.4000	0.3889	0.3548	0.2500	0.0000										
11	0.3333	0.2308	0.3659	0.2889	0.3684	0.4286	0.2683	0.3333	0.3514	0.4054	0.0000									
12	0.3846	0.3333	0.3171	0.3333	0.4211	0.4286	0.2195	0.3889	0.2973	0.4054	0.2381	0.0000								
13	0.4211	0.3684	0.4000	0.3182	0.2973	0.4706	0.3000	0.6571	0.3889	0.5000	0.3659	0.2683	0.0000							
14	0.2973	0.2973	0.3846	0.3488	0.4444	0.3939	0.3333	0.4118	0.3143	0.4286	0.2500	0.2000	0.3333	0.0000						
15	0.4146	0.4146	0.4419	0.3617	0.3500	0.5135	0.3953	0.5263	0.4359	0.4872	0.3636	0.3182	0.2558	0.4286	0.0000					
16	0.4000	0.3000	0.4286	0.3913	0.3846	0.3889	0.3333	0.5676	0.3684	0.4737	0.3023	0.3488	0.2857	0.3659	0.2444	0.0000				
17	0.3125	0.3125	0.5294	0.3158	0.2903	0.4286	0.2941	0.5862	0.3333	0.5333	0.3143	0.4286	0.2941	0.3939	0.4054	0.2222	0.0000			
18	0.3333	0.2308	0.3171	0.2444	0.3158	0.3714	0.2195	0.3333	0.2432	0.3514	0.1905	0.1905	0.2195	0.3000	0.3636	0.3023	0.2571	0.0000		
19	0.5897	0.5897	0.5610	0.5111	0.5263	0.6000	0.4634	0.7222	0.6261	0.5135	0.4762	0.4286	0.4146	0.5000	0.3636	0.3953	0.5429	0.4762	0.0000	

注: 1-19 代表克新 1-19 号马铃薯品种 (下同)

2.2.2 AFLP 分析

19 份马铃薯品种间的遗传距离介于 0.2091 ~ 0.7679 之间, 平均值为 0.4811 (见表 5)。其中克新 4 号和克新 5 号的遗传距离最小, 为 0.2091, 说明 AFLP 分析的可靠性。克新 7 号和克新 10 号的遗传距离最大, 为 0.7679。克新 7 号是由克山马铃薯研究所育成的克新 2 号和中农所育成的 292-20 (多子白) 杂交育成, 克新 10 号是利用国际马铃薯中心材料 CIP 与波兰材料 Epoka 杂交育成, 两品种虽然都有 Epoka 的血缘, 但可能是由于 CIP378177 (含新型栽培种血缘) 与 292-20 亲缘关系较远造成的, 说明 CIP 资源和新型栽培种的引入可以扩大品种间的遗传差异。

2.3 RAPD 和 AFLP 标记检测的遗传多样性比较

试验表明, AFLP 标记检测位点数和多态性位点数显著高于 RAPD 标记, 平均每个引物组合检测到 70.71 个位点, 其中多态性位点 43.14 个。而

RAPD 标记平均每个引物只检测到 7.42 个, 其中多态性位点 6.14 个。RAPD 标记获得的 19 个马铃薯品种的平均遗传距离为 0.3917, 小于 AFLP 标记获得的平均遗传距离值 0.4811, 两种标记的遗传距离的相关系数为 0.3408。两种标记方法检测的遗传多样性差异的原因, 主要是由于两种方法原理不同, 即检测的基因组位点不同, 所用的引物不同。

另外, 本研究所使用的引物数量较少, 所检测的基因组位有限, 也是造成二种分析方法结论出现偏差的原因。

2.4 RAPD 和 AFLP 标记的聚类分析的比较

用 UPGMA 方法对 19 份品种进行聚类, 构建出树状图, 以 RAPD 标记进行聚类 (图 1)。当相似系数为 0.53 时, 19 个品种被划分为三大类群, 克新 6 号和克新 8 号聚成一类, 克新 19 号单独为一类, 其余品种聚在一起。以 AFLP 标记进行聚类 (图 2)。当相似系数为 0.39 时, 19 份品种被划分为三

大类群, 与 RAPD 标记的聚类结果相同, 证明本试验的结果真实、可靠。从亚类的划分上, RAPD 和 AFLP 的聚类结果不完全相同, RAPD 标记在相似系数为 0.42 时, 可分为三个亚类, AFLP 标记在相似系数为 0.3 时, 也可分为三个亚类, 只有克新 2 号、克新 3 号、克新 9 号、克新 10 号、克新 13

号、克新 14 号不处在相同亚类中, 其余品种都处在相同亚类中, 亚类的聚类结果相似度为 62.5%。由于两种标记方法的原理差异和马铃薯遗传组成的复杂性使聚类分析结果有所差异, 但都从分子水平证明, 克新系列马铃薯品种的遗传基础有所拓宽。

表 5 19 份马铃薯品种 AFLP 分析的遗传距离

品种	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
1	0.0000																			
2	0.2538	0.0000																		
3	0.3333	0.3340	0.0000																	
4	0.4187	0.4053	0.3710	0.0000																
5	0.3903	0.3577	0.2294	0.2091	0.0000															
6	0.5085	0.7667	0.4023	0.4409	0.4555	0.0000														
7	0.4053	0.3929	0.3252	0.2250	0.3404	0.5348	0.0000													
8	0.4247	0.3333	0.4978	0.4319	0.4125	0.3432	0.4878	0.0000												
9	0.3333	0.4191	0.4830	0.2963	0.6128	0.3333	0.3072	0.4473	0.0000											
10	0.4955	0.6609	0.5077	0.4000	0.2336	0.4176	0.7679	0.3967	0.5308	0.0000										
11	0.3941	0.4034	0.4475	0.3157	0.3692	0.6927	0.5075	0.4409	0.5079	0.5727	0.0000									
12	0.3333	0.4000	0.3143	0.3504	0.3826	0.3903	0.4137	0.5929	0.4607	0.6000	0.3215	0.0000								
13	0.4469	0.3333	0.3632	0.2130	0.4795	0.4263	0.4437	0.5465	0.3281	0.5143	0.3294	0.3667	0.0000							
14	0.5343	0.4981	0.3696	0.3586	0.4220	0.4750	0.5500	0.6529	0.4043	0.5743	0.5091	0.4431	0.4008	0.0000						
15	0.4763	0.4196	0.3294	0.5818	0.3143	0.4556	0.3456	0.3333	0.5122	0.6710	0.5269	0.5478	0.3795	0.5373	0.0000					
16	0.5737	0.4010	0.5043	0.5897	0.3034	0.5375	0.6000	0.5510	0.3043	0.5212	0.3909	0.5397	0.4195	0.4419	0.5542	0.0000				
17	0.4585	0.5273	0.3787	0.4382	0.3136	0.4398	0.5969	0.5578	0.3311	0.4000	0.5479	0.5188	0.4692	0.5061	0.5320	0.4145	0.0000			
18	0.5978	0.4608	0.4211	0.2455	0.2607	0.5222	0.3930	0.5375	0.5028	0.5084	0.4885	0.5348	0.3308	0.4712	0.3679	0.5525	0.4520	0.0000		
19	0.6000	0.5784	0.5721	0.6333	0.5780	0.6030	0.6286	0.4699	0.5519	0.6810	0.4852	0.6391	0.6191	0.5474	0.4584	0.5684	0.6137	0.6933	0.0000	

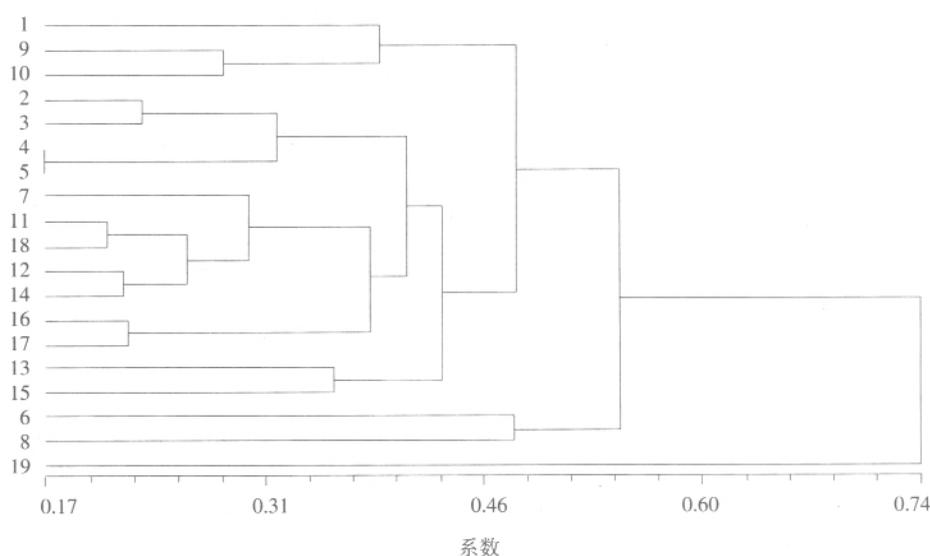


图 1 19 份马铃薯品种 RAPD 标记的 UPGMA 聚类图

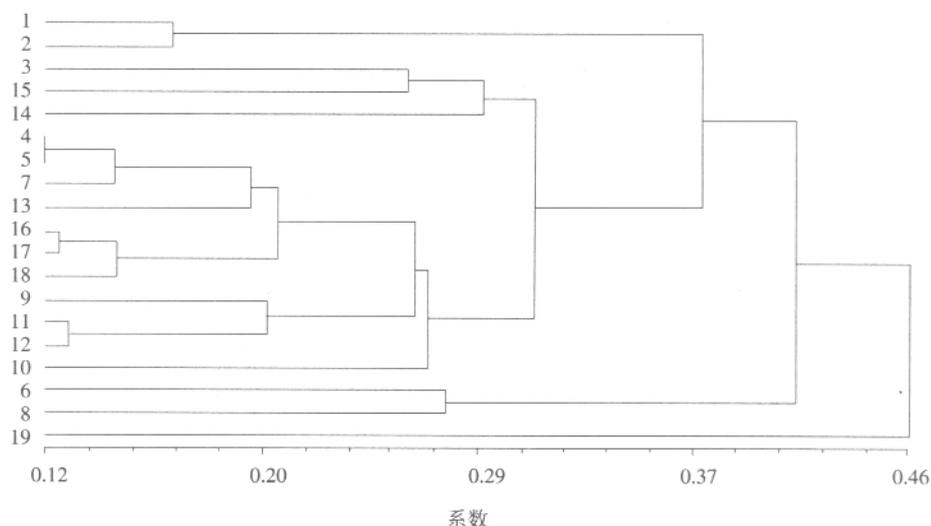


图 2 19 份马铃薯品种 AFLP 标记的 UPGMA 聚类图

3 讨 论

在作物育种中, 选择遗传差异丰富的亲本进行杂交可以拓宽遗传基础, 对于马铃薯来说, 拓宽狭窄的遗传基础尤为重要。本试验利用 RAPD 和 AFLP 分子标记技术对 19 份克新系列马铃薯品种进行了遗传多样性分析。试验表明: 两种方法均适于马铃薯品种遗传多样性分析, 其中 RAPD 简便、快速、成本低, 较适用于分析马铃薯品种亲缘关系, 指导育种实践, 而 AFLP 标记检测多态性的能力远高于 RAPD 标记, 表明 AFLP 技术具有很高的分辨率, 更适于进行马铃薯品种鉴定, 这与段会军等^[4]和王斌等^[5]等的研究结果一致。但 AFLP 技术流程长, 难度较大, 成本较高, 对试验人员的技术要求较高, 使其在生产实践中大规模应用受到限制。

本研究从分子水平证明克新系列马铃薯遗传基础有所拓宽, 这与邱宏等^[6]的研究结果不太一致。从选育时间上看, 克新 1~6 号是 1958~1965 年间, 主要利用从美国、德国和波兰引进的品种杂交育成的, 克新 7~9 号是 1970~1976 年, 主要利用育成品种杂交育成, 此时遗传基础狭窄。从引入 CIP、新型栽培种和野生种材料, 引入加拿大、日本、白俄罗斯等国的材料, 我国各所育成的优良的品种和品系材料, 使马铃薯的遗传基础有很大的拓

宽, 这点从本试验中可以得到证明。马铃薯遗传理论和高效育种技术的研究取得的重大进展, 也可拓宽马铃薯的遗传基础, 如: 克新 19 号是采用种间杂交和 $2n$ 配子技术育成, 克新 16 号是采用倍性育种技术育成, AFLP 分子标记辅助育种技术的应用, 可进一步开发和利用马铃薯品种, 也可加快种质资源的筛选和创新, 为培育马铃薯新品种提供物质基础。

[参 考 文 献]

- [1] Zhu J, Gale M D, Quarrie S, et al. AFLP marker for the study of rice biodiversity [J]. Theor Appl Genet, 1998, 96: 602-611.
- [2] Becker J, Vos P, Kuiper M, et al. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley [J]. Mol Gen Genet, 1995, 249: 65-73.
- [3] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. A new concept for DNA[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23: 4407-4414.
- [4] 段会军, 马峙英, 张彩英, 等. 西瓜品种间亲缘关系的 AFLP 分析[J]. 河北农业大学学报, 2007, 30(1): 27-30.
- [5] 王斌, 李传友, 郑洪刚. 水稻的 AFLP 研究初报—反应条件的优化及对温敏不育等位突变系的分析 [J]. 植物学报, 1999, 41(5): 502-507.
- [6] 邱宏, 陈伊里, 金黎平. RAPD 和 AFLP 标记分析中国马铃薯主要品种的遗传多样性[J]. 作物学报, 2006, 32(6): 899-904.

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2007)05-0271-04

马铃薯匍匐茎生长不同阶段淀粉酶活力比较研究

姚新灵, 李卓亚, 柳金凤, 贾惠萍, 丁海麦, 狄建军

(宁夏大学生命科学学院, 宁夏 银川 750021)

摘要: 测定匍匐茎内淀粉酶活力是否存在及其变化是鉴定马铃薯匍匐茎内是否有淀粉合成发生的途径之一。本研究以不同成熟期马铃薯品种、不同生长时期匍匐茎为试验材料, 测定其淀粉酶活力。数据分析表明: 早熟品种匍匐茎较早表现较高淀粉酶的活性, 其后随着匍匐茎的生长逐渐平稳或下降, 晚熟品种匍匐茎较晚出现淀粉酶的活性, 其后随着匍匐茎的生长逐渐升高; 就同一成熟期品种而言, 从匍匐茎基部至顶端其淀粉酶活力逐渐上升; 研究结果表明, 匍匐茎生长期间其内部存在淀粉的生物合成, 不同成熟期品种匍匐茎生长不同时期和不同部位淀粉酶活力存在差异。

关键词: 匍匐茎; 淀粉酶活力; 生长阶段; 马铃薯

马铃薯淀粉因其直链淀粉含量低、直链和支链分子聚合度高, 被广泛应用于食品、建筑、石油开

采和其它领域^[1]。马铃薯块茎发育有匍匐茎发生、块茎膨大和淀粉积累三个重要过程。大量研究已表明, 匍匐茎伸长与块茎膨大密切相关, 又受不同外界条件和激素调控的影响, 同时块茎淀粉含量的高低与叶片、匍匐茎等器官的形态解剖结构、生理代谢指标等均有着密切的关系^[2]。蒙美莲^[3]研究指出,

收稿日期: 2007-03-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30160010)

作者简介: 姚新灵(1963-), 男, 副教授, 硕士生导师, 主要从事生物化学与分子生物学研究。

Genetic Diversity of Potato Cultivars Revealed by RAPD and AFLP Markers

Li Fengyun¹, Sheng Wanmin¹, Liu Zhaojun², Tian Guokui¹, Li Qingquan¹, Wang Lichun¹

(1. Potato Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Keshan, Heilongjiang 161606, China;

2. Biology Research Center, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China)

Abstract: The RAPD and AFLP were used to study the genetic diversity of 19 potato cultivars. In RAPD, the genetic distance of 19 potato cultivars was between 0.1707-0.7222, with average value being 0.3917. AFLP analysis indicated that the genetic distance of 19 potato cultivars was between 0.2091-0.7679, with average value being 0.4811. The two methods are both suitable to analyze the genetic diversity of potato cultivars. However, RAPD is more preferred to analyze the sibship of potato cultivars due to its simple technique and low cost. This study also demonstrates that AFLP finger printing has higher resolution and the AFLP is more suitable to reveal the difference of potato cultivars.

Key Words: potato; RAPD; AFLP; cluster analysis; genetic diversity