

AFLP 技术在马铃薯育种中的应用

邸 宏, 陈伊里*

(东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030)

摘 要: AFLP 技术因其高效、稳定而被广泛应用于多种作物, 本文详细阐述了 AFLP 技术的原理、特点及其在马铃薯育种中的应用, 主要包括遗传多样性分析, 构建高密度遗传连锁图, 基因定位及克隆, DNA 指纹图谱等。

关键词: AFLP; 马铃薯; 遗传多样性; DNA 指纹图谱

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1672-3635 (2004) 02-098-05

虽然传统育种学已建立了一套完整的选择程序, 并在农业生产上培育出了许多高产、优质、抗病的新品种, 然而周期长、工作效率低、品种退化严重仍是当今马铃薯育种中的主要困难。进入 80 年代, 随着分子生物学及分子克隆技术的发展和完善, 诞生了直接从 DNA 水平上进行遗传分析的分子标记。分子标记受环境因素影响小, 且数量大, 可以快速鉴别亲本之间的亲缘关系, 标记的数目多, 多态性高, 成为育种工作新的手段。AFLP 是继 RFLP、RAPD、SSR 之后近几年来发展最快的 DNA 分子标记技术, 因其快速、简便、高效, 在生命科学领域中得到广泛应用。

1 AFLP 原理及特点

AFLP 是 1993 年由荷兰科学家 Zabeau 和 Vos 建立起来的一种检测 DNA 多态性的新方法。这种方法已申请了欧洲专利 (Zabeau, 1993), 荷兰 Keygene 公司拥有该技术的专利。它的原理是利用一个由在基因组 DNA 中酶切位点稀有的内切酶 (识别位点一般有 6 个碱基) 和酶切位点丰富的内切酶 (识别位点一般有 4 个碱基) 的酶组合, 切割

植物基因组 DNA, 形成分子量大小不等的随机限制性片段, 将特定双链人工接头 (adapter) 连接在 DNA 片段的两端, 形成一个带接头的特异片段, 接头长度一般是 14~18 个核苷酸, 由核心顺序和内切酶位点特异序列组成, 接头与基因组 DNA 的酶切片段相连接作为 DNA 扩增的模板。根据 DNA 接头及酶切位点的碱基序列, 设计一系列 3' 末端含数个选择性碱基的 PCR 引物, 引物从 5'~3' 端依次为核心序列、酶切识别序列、3' 端选择碱基序列三部分。核心序列与人工接头互补, 选择核苷酸延伸到酶切片段区, 两端序列能与选择核苷酸配对的限制性酶切片段被扩增^[1]。扩增片段通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离检测, 用放射性同位素法、荧光法或银染法检测。

AFLP 标记是以 PCR 为基础的分子标记技术, 兼具 RFLP 和 RAPD 的优点, 被认为是迄今为止最有效的分子标记, 具有较高的可靠性和高效性, 具有共显性和显隐性特点, 多态性水平高, 检测位点多, 分子识别率最高, DNA 用量少。但同时也存在一些缺陷, 如对模板质量要求较高, 成本高, 要求有较高的技术水平等。AFLP 呈典型的孟德尔式遗传, 可以用于分析不同复杂程度的基因组 DNA 和克隆的片段。AFLP 是一种显性标记, 不能获得相关位点在遗传图谱上的位置信息, 如果 AFLP 位点能够定位在 RFLP 和 SSR 连锁图谱上, 那么 AFLP 将是最有效的分子标记。

收稿日期: 2004-02-09

作者简介: 邸宏 (1974-), 女, 黑龙江省双城市人, 现为东北

农业大学作物遗传育种专业在读博士生。
中国知网 <https://www.cnki.net>

* 通讯作者

目前 AFLP 技术因其突出的特点被广泛地应用于各种研究中, 如构建高密度遗传连锁图、目的基因的定位、遗传多样性及分类和进化的研究、品种、品系的 DNA 指纹图谱, 以及研究基因表达与调控, 辅助选择等^[2]。

2 AFLP 技术在马铃薯育种中的应用

2.1 遗传多样性分析

杂交育种是目前植物育种的重要技术, 而杂交亲本的选配是杂交育种的关键步骤。亲本选配必须考虑的一个重要因素是测定亲本的遗传距离, 确定其亲缘关系。由于植物受内外环境因素、数量性状遗传及显性、上位性等因素的制约, 利用形态特性进行分析的传统方法难免会出现偏差, 而且效率较低。分子标记由于受环境因素影响小, 且数量大, 因而可以快速鉴别亲本之间的亲缘关系。Milbourne 等^[3]利用 AFLP 技术分析了多种四倍体马铃薯栽培种的遗传关系。McGregor 等^[4]进行了 39 种马铃薯栽培种的 AFLP 分析, 鉴定其遗传多样性, 结果表明 AFLP 是研究遗传多样性效率很高的一种方法。AFLP 技术还被应用于马铃薯病原菌的研究。Knapova 等^[5]利用 AFLP 方法分析了 134 个晚疫病生理小种的表型和基因型结构。

2.2 高密度遗传连锁图谱的构建

遗传图谱的构建是对基因组系统研究的基础, 是植物遗传育种的依据。遗传图谱是基于具有不同性状的亲本及其后代的分离情况而构建的, 用传统方法构建一个包含一定数量基因的遗传图谱, 可能要进行许多杂交组合的观察分析, 并且不反应 DNA 水平基因的存在, 而是该基因表达产物的观察。传统的遗传图谱只存在于少数几种作物中, 基因间图距相对较远。由于分子标记是反映基因位点的多态性, 因此可以用来构建遗传图谱。自 1980 年 Bostein 等首次提出用于建立遗传连锁图谱的设想以来, Donis-Keiler 等建立了第一张人的 RFLP 图谱。目前已绘制了大多数农作物的遗传连锁图, 如水稻、玉米、马铃薯^[6~8]、大麦^[9]、大豆^[10]等。

由于 RFLP 只适合单或寡拷贝基因, 使用受到限制, 而 AFLP 能对整个基因组适应, 从而能广泛应用于构建分子图谱^[11]。AFLP 是目前为止作图效率最高的一种标记。典型的 AFLP 分析每次反应的产物经过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳可以检测的谱

带数在 50~100 条之间, 多态性好的酶切引物组合一次可以检测到 20 个以上的多态性。Van Eck 等^[1] (1995) 建立了二倍体马铃薯的高密度 AFLP 遗传连锁图谱。Roupe van der Voort 等^[12]利用 5 个远缘二倍体 *Solanum tuberosum* 绘制了包含 733 个 AFLP 标记位点的连锁图, 这些标记在染色体上的座位及使用的引物组合等信息公开发布在 <http://www.spq.wau/pv/aflp/catalog.htm>^[13]。

为避免四体遗传的复杂性^[14], 几乎所有的遗传图谱研究都是在二倍体水平进行的。但二倍体的缺陷是由于近交衰退而降低了育性和生活力, 因而采用高效的 AFLP 技术来克服四体遗传的不便, 重新引起了人们对马铃薯四倍体水平上进行遗传分析的兴趣^[15~17]。

2.3 基因标记及定位

分子标记还可以对某一特定 DNA 区域内的目标基因进行定位。研究表明用与目标质量性状基因紧密连锁的分子标记, 是进行质量性状选择的有效途径。根据样品的来源, 有两种常用的基因定位的方法。第一, 近等基因系法。近等基因系^[18]是由提供目标基因的供体亲本跟轮回亲本杂交, 并经多次回交, 多代对目标性状基因的选择而获得。该系除了目标基因外其余基因大部分同轮回亲本相同。这样就可以对轮回亲本和近等基因系的同工酶或者 DNA 进行多态性分析, 找出两基因组产物的差异, 并以此为标记, 利用遗传图谱, 就可以对目标性状基因定位。近等基因系是筛选质量性状分子标记的理想群体, 但因需多次回交耗时较长。第二, 分离群体分群分析法。这是 Michelmores 等^[19]1991 年建立起来的一种连锁标记分析方法。原理是依据目标性状将某一杂交组合分离世代群体分为两组, 产生两个混合的 DNA 样品池, 两池具有完全相对的性状, 在所选则的区域遗传上是相异的, 而在其它区域则是混合的。利用分子标记分析在两个混合池之间寻找有差异的分子标记, 该标记在遗传上可能与目标性状的基因座位相连锁。该方法需要的分离群体可在短时间内建立, 因此不需要长期的育种基础, 因此在各种作物的质量性状甚至是数量性状基因的定位研究中获得广泛的应用。

Meksem 等^[20]利用 F1 群体, 找到与马铃薯抗晚疫病紧密连锁的 AFLP 标记, 该标记位于 5 号染色体上。Bendahmane A 等^[21]利用 AFLP 标记定位

高抗 PVX 的 Rx 基因, 获得与目标基因相距 0.23 cM 的 AFLP 标记。

表现连续变异的数量性状, 受微效多基因控制, 受环境影响较大, 选择效果不好。随着分子标记技术的发展, 将复杂的数量性状分解为单一的遗传组分, 用单基因的效率来处理这些性状, 对数量性状基因位点 (QTL) 作图, 将数量性状基因绘制在连锁图上, 找到与其紧密连锁的分子标记。Bradshaw 等^[22]分析了囊线虫数量性状具有高水平抗性的两个四倍体亲本及 78 个杂交后代, 找到与双显性抗虫主基因的 QTL 紧密连锁的 AFLP 标记, 定位于二倍体 SSR 遗传图谱中的第 IV 号染色体上。利用 AFLP 技术, Ballvora 等 (1995) 将抗金线虫的主基因 Gro1 定位与 VII 号染色体。Roupe van der Voort 等^[23]将抗囊线虫的主基因 Gpa2 定位于 XII 号染色体上。Collins 等^[24]研究晚疫病抗性基因的 QTL。

2.4 基因克隆及表达调控

研究基因表达的传统方法是利用 cDNA 文库筛选和 Northern 杂交, 但这种方法不能同时比较发育的不同时期。利用 AFLP 衍生的 cDNA-AFLP 技术来研究基因表达, 可以获得满意的结果。利用 cDNA-AFLP 技术, Bachem 等^[25]克隆 Stsnap 基因, 该基因在 CaMV 35s 启动子的调控下反义表达, 影响细胞的形态建成, 并改变同化产物的转运, 如淀粉和可溶性糖在叶片中的积累。Bachem 等用同样的技术, 获得 CB12 基因, 该基因对薯块生长和植株形态建成中重要物质的新陈代谢起作用, Petters 等^[26]研究了马铃薯叶片中一个防御基因的表达与晚疫病菌浸染之间的关系。Law 等^[27]对薯块分生组织 DNA 进行 AFLP 分析, 研究 5'-CCGG-3' 序列甲基化程度的瞬时降低与休眠的关系。

2.5 种质鉴定及遗传背景分析

2.5.1 DNA 指纹图谱

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, 增加育种群体的杂合度, 保持育种群体的丰富多型性。对于马铃薯来说, 拓宽狭窄的遗传基础尤为重要。因为马铃薯四倍体的育种群体来源于 *S. tuberosum* 种, 并且有性杂交的频率相对于其他作物来说很低。长期以来判别作物品种主要依靠一些表型数据, 为克服常规形态鉴别技术的局限性, 也常使用同工酶和蛋白电泳技

术, 同工酶和蛋白是基因表达加工后产物, 仅是 DNA 全部多态性的一部分, 其特异性易受环境条件和发育阶段的影响, 因此远不及分子标记分析快速、准确、可靠。当品种间的差异较小时, 传统的检验方法就无法判别, 分子标记可以作为判别品种的新手段。利用稳定的 DNA 谱带, 可以绘制品种的指纹图谱, 提供种质的基因型, 该技术不受栽培条件影响, 可通过计算机进行系统管理, 从而达到认定和保护品种的目的。

分子标记所需 DNA 可以从植物体任何部位提取, 尤其可从幼苗中提取进行种质的鉴定分析, 克服了其他遗传标记随环境条件或组织发育阶段而异的缺陷。

AFLP 技术可在较短的时间内检测出大量的多态性标记, 因而很适合鉴定品种 DNA 指纹, 这是 AFLP 最适的应用范围, 也是 Zabeau 和 Vos^[28]申请专利的关键。AFLP 标记可以用于品种的鉴定^[29], 品种纯度的评估, 分离和鉴别遗传材料, 辅助选择, 可以快速鉴定目标基因, 鉴定体细胞杂种, 用于种质资源的保存以及分子生物学研究。Powell 等^[30]在种质研究中比较了 RFLP, RAPD, AFLP 和 SSR 四种分子标记, AFLP 的效率最高, 其缺点是对技术的要求较高, 成本较高。McGregor 等绘制了 39 种马铃薯栽培种的 RAPD, ISSR, AFLP 和 SSR 四种指纹图谱, 并对着四种分子标记方法进行了对比, AFLP 的效率最高, 多态性强, 一次反应获得的多态性条带最多。

2.5.2 野生资源的利用

掌握一个物种及其野生群体的遗传背景和分类学上的关系, 是保护和利用这些遗传资源的基础。遗传基础狭窄是制约马铃薯育种发展的主要因素, 因此具有广泛遗传多样性的野生种质资源的利用受到越来越多的关注。许多研究表明马铃薯野生种中含有抗病、高产、高淀粉等多种优良基因^[31]。利用 AFLP 技术 McGregor R 等分析野生马铃薯 *A. canlia* 的分类及种质上的丰富性, Kardolus 等^[32]对马铃薯野生种 *S. acaule* 进行分类学研究, 为这些野生资源的利用提供了分子方面的依据。Bryan 等^[33]采用 AFLP 技术将野生种马铃薯 *S. vernei* 中的抗胞囊线虫基因的 QTL 定位与第 V 连锁群。

随着马铃薯原生质体培养再生技术的发展, 1984 年 Barsby 等开始采用细胞融合技术利用马铃

薯的野生资源, 将野生种中的有利基因导入栽培品种中, 分子标记技术在体细胞杂种鉴定中应用的越来越广泛。Barone 等^[34]应用 AFLP 技术对 *S. commersonii* 和 *S. tuberosum* 的四倍体体细胞杂种进行分子鉴定, 提高了鉴定的效率和可信度。

3 展望

虽然 AFLP 技术在马铃薯的研究中得到广泛的应用, 但目前大多数的研究仍处于探索实验阶段, 真正大规模的应用于生产实践还需时日, 工作的重点仍是建立近饱和的 AFLP 遗传连锁图谱, 鉴定、克隆、利用与马铃薯高产、优质、抗病虫害、抗逆有关的基因, 加强对野生资源的研究利用。AFLP 标记具有广阔的应用前景, 与其他分子标记方法相比更高效, 更可靠, 将其与常规育种相结合, 必将对马铃薯的遗传育种研究产生巨大的推动作用。

参 考 文 献

- [1] Van Eck H J, J R Vandervoort, J Draaistra, et al. The inheritance and chromosomal localization of AFLP markers in non-inbred potato offspring. *Mol Breed*, 1995, 1: 397-410.
- [2] Treuren R Van. Efficiency of reduced primers selectivity and bulked DNA analysis for the rapid detection of AFLP polymorphisms in a range of crop species. *Euphytica*, 2001, 117: 27-37.
- [3] Milbourne D, R Meyer, J E Bradshaw, et al. Comparison of PCR-based markers systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Mol Breed*, 1997, 3: 127-136.
- [4] McGregor C E, M W Greyling, C A Lambert, et al. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato germplasm. *Euphytica*, 2000, 113: 135-144.
- [5] Knapova G, A Schlenzig, U Gisi, et al. Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerl. *Plant Pathology*, 2002, 51: 641-653.
- [6] Bonierbale M W, R L Plaisted, S D Tanksley. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics*, 1988, 120: 1095-1103.
- [7] Gebhardt C, E Ritter, A Barone, et al. RFLP maps of potato and their alignment with the homologous tomato genome. *Theor Appl Genet*, 1991, 83: 49-57.
- [8] Tanksley S D, M W Ganal, J P Prince, et al. High density molecular map of the tomato and potato genomes. *Genetics*, 1992, 132: 1141-1160.
- [9] Becker J, P Vos, M Kuiper, et al. Combined mapping of AFLP and RFLP in barley. *Mol Gen Genet*, 1995, 249: 65-73.
- [10] 中国知网, <http://www.cnki.net>. Identification of molecular markers in soybean; comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA mapping technique. *Plant Mol Biol Rep*, 1996, 14: 156-169.
- [11] Bachem Christian W B, B Horvath, L Trindade, et al. A potato tuber-expressed mRNA with homology to steroid dehydrogenases affects gibberellin levels and plant development. *The Plant Journal*, 2001, 25: 595-604.
- [12] Rouppe van der Voort JNAM, P Van Zandvoort, Eck HJ van, et al. Locus specificity of AFLP markers used to align genetic maps from different potato genotypes. *Mol Gen Genet*, 1997, 255: 438-447.
- [13] Rouppe van der Voort JNAM, Eck HJ van, J Draaistra, et al. An online catalogue of AFLP markers covering the potato genome. *Mol Breed*, 1998, 4: 73-77.
- [14] Jacobs JME, H J Van Eck, Arens PFP, et al. A genetic map of potato (*Solanum tuberosum*) integrating molecular markers, including transposons, and classified markers. *Theor Appl Genet*, 1995, 91: 289-300.
- [15] Brigneti G, Garcia-Mars J, D C Baulcombe. Molecular mapping of potato virus Y resistance gene Rysto in potato. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 198-203.
- [16] Li X, Eck HJ van, Rouppe van der Voort JNAM, et al. The R2 allele conferring resistance to *Phytophthora infestans* mapped on potato chromosome 4. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 1121-1128.
- [17] Meyer R C, D Milbourne, C A Hackett, et al. Linkage analysis in tetraploid potato and association of markers with quantitative resistance to late blight. *Mol Gen Genet*, 1998, 259: 150-160.
- [18] 徐云碧, 朱立煌. 分子数量遗传学 [M], 北京: 中国农业出版社 (近等基因系), 1994.
- [19] Michelmore R W, I Paran, R W Kesseli. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 9829-9832.
- [20] Meksem K, D Leister, J Peleman, et al. A high-resolution map of the vicinity of the R1 locus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers. *Mol Gen Genet*, 1995, 249: 74-81.
- [21] Bendahmane A, K Kanyuka, D C Baulcombe. High-resolution genetical and physical mapping of the Rx gene for extreme resistance to potato virus X in tetraploid potato. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 153-162.
- [22] Bradshaw J E, C A Hackett, R C Meyer, et al. Identification of AFLP and SSR markers associated with quantitative resistance to *Globodera pallida* (Stone) in tetraploid potato (*S. tuberosum* subsp. *tuberosum*) with a view to marker-assisted selection. *Theor Appl Genet*, 1997, 97: 202-210.
- [23] Rouppe van der Voort J, P Wolters, R Folkertsma, et al. Mapping of cyst nematode resistance locus Gpa2 in potato using a strategy based on comigrating AFLP markers. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 874-880.
- [24] Collins A, D Milbourne, L Ramsay, et al. QTL for field resistance to late blight in potato are strongly correlated with maturity and vigor. *Molecular Breeding*, 1999, 5: 387-399.
- [25] Bachem Christian W B, B Horvath, L Trindade, et al. Anti-

sense suppression of a potato St-SNAP homologue leads to alterations in cellular development and assimilate distribution. *Plant Molecular Biology*, 2000, 434: 473-482.

[26] Petters J, C Göbel, D Scheel, et al. A pathogen-Responsive cDNA from potato encodes a protein with homology to a phosphate starvation-Induced phosphatase. *Plant and Cell Physiology*, 2002, 43 (9): 1049-1053.

[27] Law R D, J C Suttle. Transient decreases in methylation at 5'-CCGG-3' sequences in potato (*Solanum tuberosum* L.) meristem DNA during progression of tubers through dormancy precede the resumption of sprout growth. *Plant Molecular Biology*, 2003, 51 (3): 437-447.

[28] Vos P, R Hogers, M Bleeker, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res*, 1995, 23: 4407-4414.

[29] Ulrich G Mueller, L L Wolfenbarger. AFLP genotyping and fingerprinting. *Tree*, 1999, 14: 389-394.

[30] Powell W, M Morgante, C Andre, et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR markers for germplasm analysis. *Mol Breed*, 1996, 2: 225-238.

[31] Huaman Z, R Hoekstra, J B Bamberg. The inter-genebank potato database and the dimensions of available wild potato germplasm. *Am J Potato Res*, 2000, 77: 353-362.

[32] Kardolus J P, Eck H J van, Berg R G van den. The potential of AFLPs in biosystematics; first application in *Solanum* taxonomy (*Solanaceae*). *Plant Syst Evol*, 1998, 210: 87-103.

[33] Bryan G, K Mclean, E Bradshaw, et al. Mapping QTLs for resistance to the cyst nematode *Globodera pallida* derived from the wild potato species *Solanum vernei*. *Theor Appl Genet*, 2002, 105: 68-77.

[34] Barone A, E Ritter, U Schachtschabel, et al. Evidence for tetrasomic inheritance in a tetraploid *Solanum commerson* (+) *S. tuberosum* somatic hybrid through the use of molecular markers. *Theor Appl Genet*, 2002, 104: 539-546.

关于征集 2005 年全国马铃薯学术年会会议论文的通知

为落实 2004 年全国马铃薯学术研讨会会议纪要精神, 活跃学术空气, 马铃薯专业委员会决定于 2005 年 8 月在黑龙江省齐齐哈尔市召开 2005 年全国马铃薯学术研讨会暨学术年会, 会议主题为: “马铃薯高新技术与产业化”。现开始征集论文, 具体要求如下:

- ①内容新颖, 文字简练, 数据可靠, 图表清晰。
- ②必须是反映近年来各地的科研、生产、开发方面的成果、信息。
- ③学术论文要求在 5000 字以内 (含图表), 一般论文 3000 字以内。
- ④除寄打字稿外, 有条件的需另寄软盘 1 份或发邮件。
- ⑤来稿一定写清第一作者简介: 包括性别、出生年、职务职称、研究方向等。
- ⑥信封右上角请写明“年会论文”字样。
- ⑦学术论文书写格式: 标题、作者姓名、单位、邮编、中文摘要、关键词、前言、材料与方法和结果与分析、结论与讨论、参考文献、英文摘要、英文关键词。一般论文可不写中英文摘要、关键词、参考文献等。

截稿日期: 2005 年 4 月 30 日

来稿请寄: 哈尔滨市东北农业大学《中国马铃薯》编辑部

邮 编: 150030

E-mail: potatobjb@neau.edu.cn

具体会议时间、地址另行通知。

中国作物学会马铃薯专业委员会