

樱桃荧光 AFLP 反应体系优化及应用

田长平¹, 张福兴¹, 刘晓静², 张序¹, 孙庆田¹

(1. 烟台市农业科学研究院, 山东 烟台 265500; 2. 烟台市福山区果茶站, 山东 烟台 265500)

摘要:以 12 个甜樱桃品种和 4 个中国樱桃品种为试材, 对荧光 AFLP 分析过程中模板 DNA 的制备、酶切与连接、酶切连接产物的预扩增与选择性扩增、聚丙烯酰胺凝胶电泳等过程中易出现的问题及其解决方法进行了研究。结果表明:改良 CTAB 法提取甜樱桃嫩叶和老叶 DNA 效果均很好; 200 ng DNA 双酶切反应 4 h, 连接产物稀释 10 倍作为预扩增模板, 预扩增产物稀释 20 倍作为选择性扩增的模板; 筛选了 64 对引物, 其中 8 对扩增效果理想, 能够得到清晰、稳定的条带, 平均每对引物扩增条带为 40.6 条, 建立了樱桃 AFLP 分子标记技术体系; 该体系的建立为研究甜樱桃遗传多样性和标记重要农艺性状奠定了基础。

关键词:樱桃; 荧光 AFLP; 优化; 应用

中图分类号:S 662.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)14-0115-04

甜樱桃(*Cerasus avium* L.)起源于欧洲, 在中国已有

第一作者简介:田长平(1983-), 男, 农艺师, 现主要从事樱桃栽培与育种等研究工作。E-mail: wenjun8341@163.com.

责任作者:孙庆田(1964-), 男, 研究员, 现主要从事樱桃栽培与育种等研究工作。E-mail: qingtiansun@126.com.

基金项目:山东省现代农业产业技术体系水果创新团队建设专项基金资助项目(SDAIT-03-022-02); 国家公益性行业(农业)科研专项资助项目(200903019)。

收稿日期:2014-01-16

140 多年的栽培历史。尤其是近十年来, 樱桃产业在我国得到了迅速发展, 甚至成为一些地区的主导产业, 带动了经济的繁荣。但由于我国苗木繁育制度的不规范, 樱桃同名异物、同物异名等问题也日益突出, 由此引发的纠纷也逐渐增多。AFLP 分子标记技术具有多态性高、检测位点多、DNA 用量少的特点, 已在果树种质资源遗传多样性和亲缘关系分析、连锁图谱构建、基因定位、芽变鉴定等方面得到应用^[1-4]。

有不少学者已经对苹果^[5-7]、葡萄^[8]、荔枝^[9]等果树

Analyses of Sequence Variation and Genetic Diversity on 18S rDNA Regions of *Auricularia auricula-judae*

GUI Ming-ying¹, ZHAO Chun-yan¹, WU Su-rui¹, XIONG Yong², GUO Xiang¹

(1. Kunming Edible Fungi Institute, All China Federation of Supply and Marketing Cooperatives, Kunming, Yunnan 650221; 2. Key Laboratory of Ethnic Medicine Resource Chemistry/State Ethnic Affairs Commission and Ministry of Education, Yunnan University of Nationalities, Kunming, Yunnan 650500)

Abstract: Used PCR method to amplify 18S rDNA regions of *Auricularia auricula-judae*s and sequenced them, and then used Clustalx 2, MEGA 5.0 software to analyze sequenced results and predict RNA secondary structure. These results revealed the genetic diversity of five *Auricularia auricula-judae*s from Northeast China in order to provide reference for cultivation introduction and new variety breeding. The results showed the length of amplification regions was 1 700 bp. After removed ends of the poor quality area, the length of 18S rDNA sequences was 1 695 bp. The contents of (G+C) were 48.02~48.32%. There were 25 variable sites and 10 parsimony-informative sites in the whole analyzed sequence. The variable sites mainly concentrated in 88~107 bp. The phylogenetic tree (N-J) showed 5 *Auricularia auricula-judae*s clustered into a branch, and *Auricularia polytricha* gathered in another. The 18S rDNA regions homology of *Auricularia* was consistent with that of traditional taxonomy. Nucleotide sequence combined with secondary structure of 18S rDNA region may provide some molecular structure information for the classification of *Auricularia auricular-judae*s.

Key words: *Auricularia auricular-judae*; 18S rDNA; genetic diversity; secondary structure

采用 AFLP 分子标记技术用于果树新品种和变异材料的鉴定。但目前有关樱桃新品种和变异材料的鉴定采用荧光 AFLP 分子标记的研究尚鲜见报道,由于该技术涉及到 DNA 限制性内切酶的酶切与连接、PCR 扩增和聚丙烯酰胺凝胶电泳等步骤,许多因素会影响 AFLP 分析的效果,加之所用试剂比较昂贵,任何步骤的失误都会对试验造成巨大的损失。因此针对樱桃不同的品种反应条件进行摸索,以期建立完善的基于樱桃基因组荧光 AFLP 标记分析的技术体系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为“黑珍珠”、“红灯”、“斯帕克里”、“岱红”、“甜心”、“萨姆”、“意大利早红”、“斯太拉”、“佐藤锦”、“拉宾斯”、“红手球”和“那翁”等 12 个甜樱桃品种以及“莱阳矮樱桃”、“安丘小樱桃”、“大青叶”、“优选大青叶”4 个砧木品种,分别编号 1~16,均采自烟台市农业科学研究院樱桃种质资源圃,取 1 年生枝条上的新叶各 3~4 片,装入自封袋,变色硅胶干燥带回实验室进行 DNA 提取。体系的优化以“黑珍珠”和“红灯”为模板。

表 1

AFLP 分子标记选扩增引物序列

Table 1

The sequences of AFLP primer

EcoR I	引物序列 Sequences of primer	Mse I	引物序列 Sequences of primer
E1	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAAC-3'	M1	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACA A-3'
E2	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAAG-3'	M2	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACA C-3'
E3	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CACA-3'	M3	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACA G-3'
E4	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CACT-3'	M4	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACA T-3'
E5	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CACC-3'	M5	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACT A-3'
E6	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CACG-3'	M6	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACT C-3'
E7	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAGC-3'	M7	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACT G-3'
E8	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAGG-3'	M8	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACT T-3'

1.2.3 预扩增与选择性扩增 将连接产物分别稀释 5、10、20 倍作为预扩增的模板,将预扩增产物稀释 10、20、30 倍作为选择性扩增的模板预扩增、选择性扩增程序均参照 Vos 等^[1]进行。预扩增反应体系为 25 μ L:模板 DNA 2 μ L,预扩引物 1 μ L(50 ng/ μ L 每种),10 \times PCR Buffer 2.5 μ L,10 mmol/L dNTP 1 μ L,Taq 酶 0.5 μ L,ddH₂O 18 μ L。选择性扩增体系为 25 μ L:样品 2 μ L,10 \times PCR buffer 2.5 μ L,dNTP 0.5 μ L,EcoRI 引物和 MseI 引物各 1 μ L,Taq 酶 0.5 μ L,ddH₂O 17.5 μ L 补平体系。体系混匀后,离心 5 s。

1.2.4 凝胶电泳与染色 AFLP 选择性扩增产物的检测:取 2 μ L 选择性扩增产物样品及 0.2 μ L ROX 红色荧光标记 GeneScan™-500 内标,(含 50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、325、350、375、400、425、450、475、500 bp 荧光标记 DNA 片段)在 377 DNA 测序仪(ABI Prism 377 DNA)上,50 W 和最大 3 000 W 条件下,4%聚

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取及引物合成 采用 SDS 法和改良 CTAB 法^[3]提取樱桃 DNA,DNA 质量和浓度采用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计测定。引物设计参照 Vos 等^[1]序列,由上海生物工程有限公司合成,其序列具体如下:EcoR I 接头 1:5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3';EcoR I 接头 2:5'-AAT TGG TAC GCA GTC TAC-3';Mse I 接头 1:5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3';Mse I 接头 2:5'-TAC TCA GGA CTC AT-3';EcoR I 预扩增引物序列:5'-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3';Mse I 预扩增引物序列:5'-GAT GAG TCC TGA GTA AC-3'。选扩增引物序列如表 1 所示。

1.2.2 酶切与连接 采用 EcoR I 和 Mse I 限制性内切酶同时进行双酶切。20 μ L 酶切体系包含 DNA 4 μ L(50 ng/ μ L),Adapter 1 μ L(Mse I 接头 50 pmoles/ μ L 和 EcoR I 接头 5 pmoles/ μ L),Mse I 和 EcoR I 各 1 μ L,10 \times Reaction Buffer 2.5 μ L,10 mM ATP 2.5 μ L,T4 Ligase 1 μ L(3 U/ μ L),ddH₂O 7 μ L,混匀离心数秒,37℃ 保温 5 h,8℃ 保温 4 h,4℃ 过夜。用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测酶切连接产物。

丙烯酰胺凝胶电泳 2.4 h,自动采集电泳胶图。

1.3 数据分析

采用 Microsoft Excel 2003 和 NTsys 2.1 软件对数据进行统计与聚类分析。

2 结果与分析

2.1 甜樱桃基因组的提取

该研究采用 CTAB 法与 SDS 法提取甜樱桃 DNA。由图 1 可知,对于甜樱桃的新叶来说,CTAB 法和 SDS 法均能取得较高质量的 DNA(A_{260}/A_{280} 为 1.7~1.9);而对于老叶来说,CTAB 法提取的质量较高,而 SDS 法提取的老叶 DNA 纯度小于 1.7。

2.2 酶切、连接与预扩增

甜樱桃 DNA 经过 37℃ 酶切 5 h 后,取 10 μ L 经琼脂糖电泳检测,已经完全切开,酶切片段集中在 200~700 bp(图 2)。将连接产物稀释不同倍数作为预扩增的模板,经琼脂糖电泳检测发现(图 3),将“黑珍珠”与“红

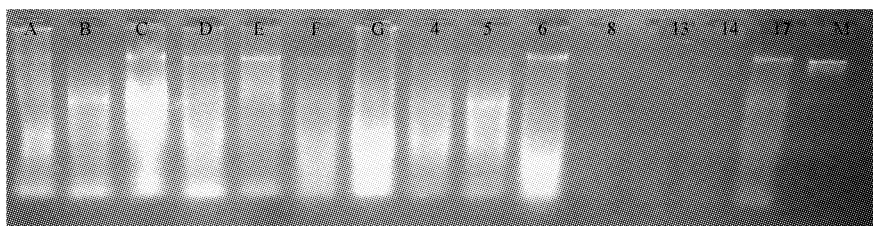


图1 CTAB法与SDS法提取甜樱桃DNA效果比较(A~G为采用CTAB法,4~17为采用SDS法)

Fig.1 The cherry DNA extracted by CTAB and SDS method (A~G by CTAB method,4~17 by SDS method)

注:4:“岱红”;5:“甜心”;6:“萨姆”;8:“斯太拉”;13:“莱阳矮樱桃”;14:“安丘小樱桃”;17:“黑珍珠”,A~G品种顺序同上;其中4,5,6和A,B,C采用的是新叶;8,13,14,17和D,E,F,G采用的是老叶;M:Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker。

灯”连接产物稀释10倍作为预扩增模板,PCR产物片段长度分布在200~1 000 bp,适合AFLP后续操作。“黑珍珠”、“红灯”连接产物稀释10倍和30倍作为预扩增模板,扩增片段弥散范围太大,不适合AFLP操作。所以对于甜樱桃来说,将预扩增产物稀释20倍作为选择性扩增的模板。

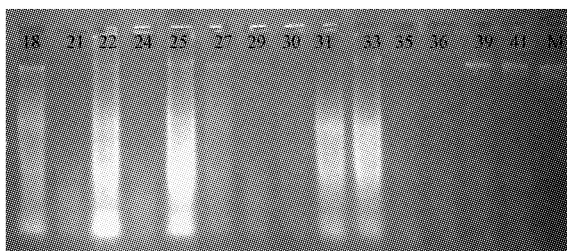


图2 樱桃DNA双酶切电泳图

Fig.2 The cherry DNA digested by EcoR I and Mse I

注:数字代码从左至右分别为“红灯”、“甜心”、“萨姆”、“斯太拉”、“佐藤锦”、“红手球”、“莱阳矮樱桃”、“安丘小樱桃”、“大青叶”、“黑珍珠”、“斯帕克里”、“岱红”、“意大利早红”和“佐藤锦”,M:DL 2 000 marker,下同。

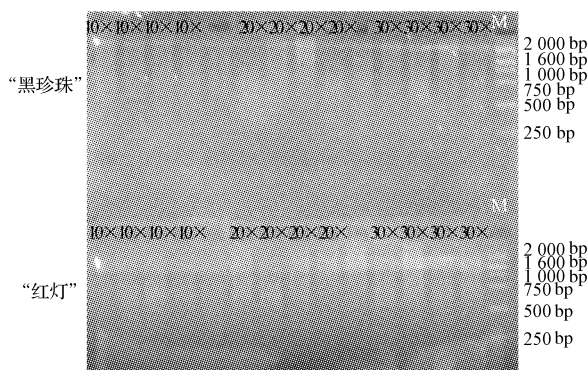


图3 预扩增电泳图

Fig.3 The pre-amplifying result with template diluted differently times

2.3 选择性引物筛选结果

该研究共选择了8个EcoR I与8个Mse I组合成64对引物,以甜樱桃品种“黑珍珠”与“红灯”为试材,筛选出8对多态性较好的引物组合(E_4-M_2 、 E_4-M_4 、 E_4-M_5 、

E_4-M_6 、 E_4-M_7 、 E_5-M_1 、 E_5-M_3 、 E_5-M_5),8对引物共扩增出1 336条可分辨的AFLP条带。平均每对引物扩增41条带。

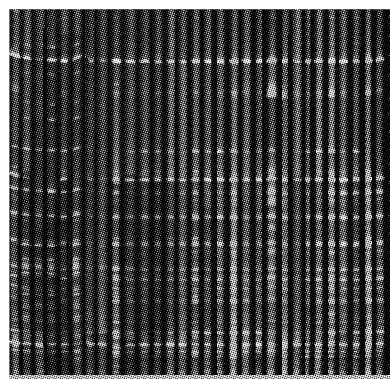


图4 利用荧光AFLP标记(引物 E_4-M_5)对樱桃基因组DNA扩增图谱

Fig.4 Fluorescent-AFLP amplified result of cheery genome (primer pair E_4-M_5)

注:扩增条带从左至右分别为1~16号和1~14号共计30个样本。

2.4 AFLP-PCR 优化体系的应用

为检测樱桃AFLP-PCR反应体系的效果,采用上述优化条件用8对引物对16个樱桃品种进行扩增。平均每对引物可以检测到40.6条带,片段大小为70~500 bp,其中引物 E_4-M_5 和 E_4-M_7 可扩增条带数最高,分别为47条和48.4条。

使用NTSYSpc 2.10软件,利用UPGMA聚类法对参试的12个甜樱桃品种和4个中国樱桃品种进行聚类分析,从图5可以看出,16个品种之间的相似系数为77%~88%。在相似系数为80%处展开,参试品种可分为2类:第I类全部由欧洲甜樱桃的12个品种组成,包括“红灯”、“黑珍珠”、“斯帕克里”、“岱红”、“甜心”、“萨姆”、“意大利早红”、“斯太拉”、“佐藤锦”、“拉宾斯”和“红手球”;第II类由4个中国樱桃品种组成,其中烟台地区常用砧木品种“大青叶”和烟台市果树所“优选大青叶”单独聚类,“安丘小樱桃”和“莱阳矮樱桃”单独聚类,表现出它们的亲缘关系更为接近,从而印证了该研究结果的可靠性。

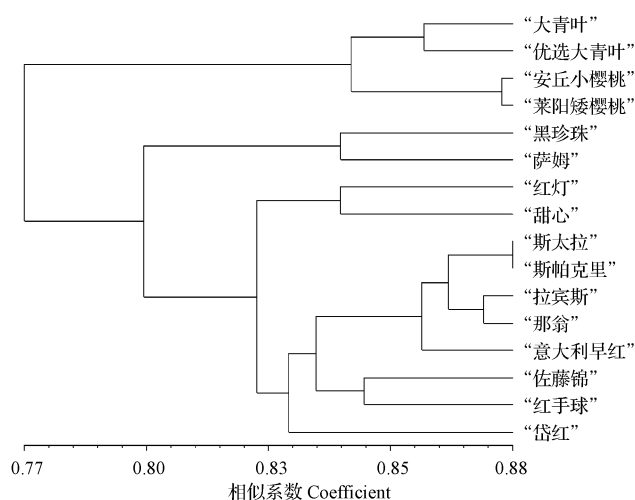


图5 16个樱桃品种基于8对引物组合的
荧光 AFLP 分析的 UPGMA 聚类图

Fig. 5 Dendrogram of 16 cherry cultivars based on fluorescent
AFLP analysis with eight pair primer combinations

3 讨论

AFLP已被证明是标记效率最高的分子标记技术^[10-11],但其技术操作复杂,影响因素很多,近几年随着荧光标记相关技术的发展,不同物种和品种间的特异性差异条带的发现更加准确。该研究建立了稳定、清晰的樱桃荧光 AFLP 技术体系,采用该优化条件对 16 个樱桃品种进行 AFLP 反应,经 4% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果表明,不同品种间 DNA 谱带多态性丰富,采用

8 对引物可以很好地把它们区分开来,平均每对引物可以检测到 40.6 条带,片段大小为 70~500 bp,其中引物 E₄-M₅ 和 E₄-M₇ 可扩增条带数最高。

参考文献

- [1] Vos P R, Hogers M, Reijans T. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(21): 4407-4141.
- [2] 雷新涛,王家保,徐雪荣,等. 杧果主要品种遗传多态性的 AFLP 标记研究[J]. 园艺学报, 2006, 33(4): 725-730.
- [3] Scott K D, Ablett E M, Lee L S, et al. AFLP markers distinguishing an early mutant of flame seedless grape[J]. Euphytica, 2000, 113: 245-249.
- [4] 廖振坤,张秋明,刘卫国,等. 利用 AFLP 鉴定柑橘变异[J]. 果树学报, 2006, 23(3): 486-488.
- [5] 祝军,王涛,赵玉军. 应用 AFLP 分子标记鉴定苹果品种[J]. 园艺学报, 2000, 27(2): 102-106.
- [6] Luis G, Luis C, Cristina M, et al. Comparing RAPD and AFLP analysis in discrimination and estimation of genetic similarities among apple (*Malus domestica* Borlh.) cultivars[J]. Euphytica, 2001, 119: 259-270.
- [7] 王彩虹,王倩,戴洪义. 苹果基因组 AFLP 分析的 DNA 模板的制备及技术体系的建立[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2001, 32(2): 197-200.
- [8] 鲍露,徐昌杰,江文彬,等. 葡萄 AFLP 技术体系建立及其在超藤与藤穗葡萄品种鉴别中的应用[J]. 果树学报, 2005, 22(4): 422-425.
- [9] 易干军,霍合强,蔡长河. 荔枝 AFLP 分析体系的建立[J]. 果树学报, 2002, 19(6): 361-364.
- [10] Huang J C, Sun M. A modified AFLP with fluorescence-labeled primers and auto moated DNA sequencer detection for efficient fingerprinting analysis in plants[J]. Biotechnol Techniques, 1999, 13: 277-278.
- [11] Krauss S L, Peakell R. An evaluation of the AFLP fingerprinting technique for the analysis of paternity in natural population of *Persoonia mollis* (Proteaceae)[J]. Australian Jour Bot, 1995, 46(3): 533-546.

Optimization and Application of Fluorescent-AFLP Analysis System on Cherry

TIAN Chang-ping¹, ZHANG Fu-xing¹, LIU Xiao-jing², ZHANG Xu¹, SUN Qing-tian¹

(1. Yantai Academy of Agricultural Sciences, Yantai, Shandong 265500; 2. Fushan Fruit and Tea Technology Station, Yantai, Shandong 265500)

Abstract: Taking 12 sweet cherry cultivars and 4 Chinese cherry cultivars as materials for establishing DNA-AFLP system. Several key factors affecting DNA-AFLP analysis such as DNA extraction, enzymes restriction, adaptor-ligation, pre-amplification and selective amplification were detected. The results indicated that CTAB method could be used for extracting ideal DNA from leaf of sweet cherry; 200 ng DNA was digested completely by EcoR I and Mse I for 4 h. ligation products were diluted to 10 times for pre-amplification template and pre-amplification products were diluted to 20 times for selective amplification. 64 pairs of primers were screened, of which 8 pairs could amplify clear, stable and satisfactory results an average of each primer band was 40.6. This study established a set of AFLP marker system for cherry, providing a foundation for studying genetic diversity and important agronomic traits.

Key words: cherry; fluorescent-AFLP; optimization; application