

# AFLP 技术在蔬菜作物遗传育种研究上的应用

范丙友<sup>1</sup>, 刘玉梅<sup>1</sup>, 高水平<sup>2</sup>

(1. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; 2. 北京林业大学园林学院, 北京 100083)

**摘要:** 综述了 AFLP 技术在蔬菜作物遗传图谱构建、遗传多样性和物种亲缘关系分析、重要基因的定位、基因的表达调控研究、蔬菜作物品种(系)的指纹图谱构建和杂种纯度鉴定、分子标记辅助选择等研究领域上的应用。并对该技术在蔬菜作物遗传育种研究上的应用前景进行了探讨。

**关键词:** AFLP; 蔬菜作物; 遗传育种; 应用

**中图分类号:** S63; S603.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2004)02-0050-02

AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism, 扩增片段长度多态性)技术是由 Zabeau 发明, 并由 Vos 发展起来的一种选择性扩增长度多态性片段的新型分子标记<sup>[1]</sup>。这种方法由于结合了 RFLP 和 PCR 的优点, 具有比 RFLP 和 RAPD 标记更大的优越性。随着 AFLP 技术的发展, 该技术已广泛应用于蔬菜作物的遗传图谱构建、遗传多样性和物种亲缘关系分析、重要基因的定位、基因的表达调控研究、蔬菜作物品种(系)的指纹图谱构建及杂种纯度鉴定、分子标记辅助选择等研究领域。

## 1 遗传图谱的构建

遗传图谱的构建是蔬菜作物遗传研究的重要内容之一, 利用遗传标记能加速蔬菜作物的育种进程。但目前大部分构建的蔬菜作物的遗传图谱密度不高, 因此迫切需要构建重要蔬菜作物高密度的遗传图谱。高密度的蔬菜作物的遗传图谱在蔬菜作物的育种中有十分重要的意义。利用一个与目的基因紧密连锁的分子标记, 就可以根据标记有效地选择目的基因; 高密度遗传图谱的构建对于图谱定位克隆十分重要, 可以为染色体步行提供起始点; 完全被分子标记覆盖的高密度遗传图谱对检测 QTL(Quantitative Traits Loci, 数量性状位点)是十分必要的。

Voorrips 等以甘蓝×青花菜的 DH 系(Doubled Haploid, 双单倍体)为作图群体, 利用筛选出的 92 个 AFLP 和 RFLP 标记, 构建了甘蓝的遗传图谱, 该图谱覆盖 615cM, 包含 12 个连锁群<sup>[2]</sup>。Ben 等以灯笼型辣椒品种 Maor 与印度小果辣椒品系 Perennial 构建的 F<sub>2</sub> 群体为作图群体, 将 177 个标记(AFLP、RAPD、RFLP 和形态学标记)构建出辣椒(*Capsicum annuum*)的遗传图谱<sup>[3]</sup>。卢刚利用白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *Chinensis*)×芜菁(*B. campestris* L. ssp. *Rapifera*)杂交建立的 F<sub>2</sub> 分离群体, 构建了含 131 个 AFLP 和 RAPD 遗传标记, 覆盖 1810.9cM 的白菜的遗传图谱<sup>[4]</sup>。Sebastian 等将基于不同作图群体的两张结球甘蓝的遗传图谱整合成一张遗传图谱, 该图谱共包括 535 个 AFLP 和 RFLP 标记, 覆盖 582cM, 包含 9 个连锁群。Luo 等运用 AFLP 标记和 SSR 标记对同源四倍体马铃薯的遗传图谱构建进行了研究, 其遗传图谱构建步骤为: 获得双亲及其全同胞子代的共显性或显性标记以鉴定双亲和子代的基因型; 聚类分析将标记分成连锁群; MLE 法(Maximum Likelihood Estimation, 最大似然值

法)估计相位、重组频率; 用 EM 算法(Expectation Maximization Algorithm, 最大期望值法)计算出同一连锁群中各个标记的 LOD(优势对数值)值; 对标记进行排序, 估计标记之间的距离; 重新建立连锁相位。

## 2 遗传多样性和物种亲缘关系

采用 AFLP 技术检测到的蔬菜作物基因组 DNA 水平上的差异, 是进行蔬菜作物种质准确鉴定和保存研究、蔬菜作物物种起源与进化关系分析、蔬菜作物杂交亲本的选择的准确依据。McGregor 等利用 AFLP 技术, 对保存在荷兰遗传资源中心(Center for Genetic Resources the Netherlands)的 314 份 *Acaulia* 组马铃薯进行了多态性检测。试验表明: AFLP 技术是验证 *Acaulia* 组马铃薯表型分类和鉴定种质冗余度的一种有效方法。黄瓜是遗传基础狭窄的一种蔬菜作物, 采用 RAPD 标记技术印证了这一观点。顾兴芳等利用 AFLP 技术对黄瓜种质进行了亲缘关系研究, 结果认为: AFLP 技术的多态性高, 利用该技术对黄瓜进行遗传多样性和物种亲缘关系分析是完全可行的。Lefebvre 等利用 AFLP 技术估测了 47 个辣椒自交系的遗传距离, 并将它们分为 5 个不同的变异种, 这种分类方法与依据农艺性状进行的分类结果一致。孙德岭等也采用 AFLP 技术对白菜类蔬菜作物、花椰菜类蔬菜作物进行了亲缘关系的分析。

## 3 重要基因的定位

图谱定位克隆是分离功能未知基因的一种重要技术, 其基本前提是基因定位。以紧密连锁的分子标记为起点, 通过染色体步行, 最终克隆目标基因。所以要克隆基因, 必须鉴别与目的基因紧密连锁的分子标记。

### 3.1 质量性状的定位

Colwyn 等采用 BSA 法(分群分离分析)找到了三个与番茄抗性基因 Cf-9 紧密连锁的 AFLP 标记, 并将其定位在番茄第 1 条染色体短臂上。张峰等利用 AFLP 标记方法在一对花椰菜抗、感黑腐病的近等基因系中筛选到四个与抗黑腐病性状、一个与感黑腐病性状连锁的 DNA 分子标记。为这些抗性基因的最终克隆提供了可能性。

### 3.2 数量性状的定位

蔬菜作物的大多数经济性状是数量性状, 如产量、熟性、品质、抗逆性和某些抗病性等。研究数量性状的遗传, 进行基因定位和效应估计, 对蔬菜作物数量性状的遗传改良至关重要。Voorrips 等发现两个位点 pb-3 和 pb-4 与甘蓝根肿病(*Plasmodiophora brassicae*)抗性有关, 其加性效应占亲本差异

\* 欧盟项目和北京市自然科学基金项目(5002010)、国家 863 资助项目  
收稿日期: 2003-12-02

的 68%, 占株系平均遗传方差的 60%, 还发现了两个微效 QTL<sup>[2]</sup>。Ben 等采用区间作图法以 LOD(Log of Odds, 优势对数值)值 3.0 为极限值对辣椒的多个性状进行了 QTL 分析。检测到一个主效 QTL, 能解释果形(果长与果径之比)表现型 60% 的变异, 该位点位于 3 号染色体上。发现辣椒果径、果重、果皮厚度、茎粗等性状的 QTL 通常位于相似的染色体区域。辣椒的几个 QTL 与控制番茄同一性状的 QTL 在染色体上的位置相似, 表明这些 QTL 在两个种之间可能属于定向进化同源基因<sup>[3]</sup>。另外, Ben 等还对辣椒 CMV 抗性基因进行了 QTL 分析, 检测到 4 个 QTL。在栽培种马铃薯中, 黑胫病和块茎软腐病是两种重要的细菌性病害, 均由 *Erwinia* 种病原菌引起。现有品种中的抗性不足以抵抗该病原菌。通过远源杂交, 由野生型马铃薯 *S. chacoense* 和 *S. yunasense* 向栽培种马铃薯导入了能对 *Erwinia carotovora* ssp. *Atroseptica* 产生多抗性的基因。Zimnoch-Guzowska 构建了马铃薯的 F1 群体, 检测到块茎对 Eca 的抗性位于 10 条染色体上, 其中效应最大的 QTL 被定位于 1 号染色体上。叶片对 Eca 的抗性液也分散于 10 条染色体上。Ghislain 等对马铃薯晚疫病抗性基因进行了 QTL 定位, 在 7 号染色体和 12 号染色体上检测到两个重要的 QTL, 分别占亲本差异的 16% 和 43%。郑晓鹰等将大白菜耐热品种 177 和热敏感品种 276 进行杂交, 从杂交后代中获得遗传性稳定的重组近交系群体, 采用 AFLP 技术并结合 RAPD 和同工酶方法鉴定了与大白菜耐热数量性状相关的遗传标记, 单因子方差分析和多元线性回归分析检测到了 9 个与耐热性 QTL 紧密连锁的分子标记, 包括 5 个 AFLP 标记, 3 个 RAPD 标记, 1 个 PGM(磷酸变位酶)同工酶标记, 这 9 个标记对耐热性遗传的贡献率为 46.7%, 分布在 5 个连锁群上。郜刚等运用 AFLP 标记技术对马铃薯青枯病抗性基因进行了定位。卢刚等采用区间作图法对白菜地上部主要农艺性状进行了 QTL 分析, 发现与叶型、叶柄形状、株高等 8 个重要农艺性状连锁的 24 个 QTL 位点, 各性状 QTL 的数目在 1—5 个之间, 各位点间存在一定的相互关系<sup>[4]</sup>。

#### 4 基因表达调控研究

最近有报道利用 AFLP 衍生的 cDNA-AFLP 技术来进行基因的表达调控研究。Bachem 等采用 cDNA-AFLP 技术得到了 1 个马铃薯块茎特异转录的片段 TDF511, 它与马铃薯块茎的形成过程紧密相关。在马铃薯体外培养时, 当生长培养基中加入赤霉素则块茎的形成受到抑制, 并使 TDF511 延迟表达。用 TDF511 作为探针分离出了相应的 cDNA。该 cDNA 的氨基酸序列与番茄的类固醇脱氢酶及玉米的 Ts2 基因高度同源。利用反义技术将该 cDNA 基因反向置于 CaMV 35S 启动子后并转化马铃薯。转基因植株内具有生物学活性的赤霉素及其前体含量增高。这说明 AFLP 研究基因表达是非常有效的方法, 可同时比较植物发育的不同时期并分离某些重要基因。

#### 5 品种(系)指纹图谱构建及杂种鉴定

名特优蔬菜作物品种(系)的指纹图谱构建, 可以在 DNA 水平上对表型相近的蔬菜作物品种(系)进行可靠的鉴定, 这对于保护育种者和种植者的权益都有重要意义。Zheng 等运用 AFLP 等技术对 21 个大白菜品种进行了鉴定。结果显示: 在大白菜的 AFLP 带型中, 有 83% 为多态性带, 与其他鉴定方法相比, AFLP 是用于鉴定大白菜品种的最强有力方法。田雷等应用 AFLP 技术对大白菜指纹图谱的构建、大白菜品种真实性及杂种纯度进行了研究。表明在鉴定像大白菜这类

亲缘关系较近, 遗传背景较窄的蔬菜作物品种上 AFLP 技术较其它技术具有更大的优势。

#### 6 MAS(分子标记辅助选择)

蔬菜作物品种改良是通过携带理想性状的育种材料与需改良的品种杂交, 再经过选择而获得的。在蔬菜作物回交选择育种过程中, 亲本基因组对于子代的品种种质贡献是不同的。借助 AFLP 标记可以对育种材料从 DNA 水平上进行选择, 从而达到作物产量、品质和抗性等综合性状的高效改良。辣椒 Pvr4 抗性基因高抗 PVY(马铃薯 Y 病毒)的三个生理小种及 PcpMoV(辣椒斑点病毒)。为了在育种中利用该抗性基因, Caranta 等采用 BSA 法, 获得了与该基因紧密连锁的 AFLP 标记, 并将该标记转化成了仅通过 PCR 反应就可以对子代进行检测的 CAPS(Cleaved Amplified Polymorphic Sequence, 酶切扩增多态性序列)标记。Jemoen 等获得了马铃薯抗根结线虫的 AFLP 标记并将该标记转换成了特异性的 SCAR(Sequenced Characterized Amplified Regions, 特异序列扩增区)标记, 它将更加有利于该抗性基因在分子标记育种辅助选择中的应用。

#### 7 其他应用研究

Wurff 等基于传统的 AFLP 技术, 提出一种新型的指纹图谱构建技术, 即 TE-AFLP(Three Endonuclease-AFLP, 三种内切酶-AFLP)技术。Brugmans 采用 cDNA-AFLP 技术对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和马铃薯(*Solanum tuberosum*)分离群体的转录本进行了研究。结果发现不同表现型的子代之间的转录本的差异随机分散于整个染色体, 并不聚集于染色体的某一特定区域, 可以作为遗传标记。李凌等采用 cDNA-AFLP 技术对花椰菜黄花和白花的两个近等基因系进行了研究, 找到了一条差异带, 经过 Northern 点杂交检测, 发现此谱带为白花株系特有的谱带。

#### 8 应用前景

AFLP 是基于 PCR 的方法, 结合荧光标记技术, 很容易实现检测的自动化, 在一次实验中可产生大量的多态性片段。AFLP 标记不干扰 RFLP、RAPD 标记, 可以将 AFLP 图谱与 RFLP、RAPD 图谱相结整合成一张图谱。随着 AFLP 的发展, 以该技术为依托, 结合其他标记技术, 一定可以构建大多数重要蔬菜作物高度饱和的遗传图谱。以 AFLP 标记为起点, 通过染色体步行必将克隆许多功能未知的基因。利用 AFLP 技术可检测到重要蔬菜作物的园艺学性状的 QTL。一旦 AFLP 技术与现有的育种程序结合起来, 育种进程必将大大加快, AFLP 技术很可能成为商业育种中快速取得经济效益的一种辅助技术。在蔬菜作物遗传多样性、基因表达、杂种优势预测等方面 AFLP 技术也将发挥越来越重要的作用。

#### 参考文献:

- [1] Zabeau M, Vos P. Selective restriction fragment amplification, A general method for DNA fingerprints[M]. European Patent Application Publ. 1993.
- [2] Voorrips R. E., Jongenius M. C., Kanne H. J. Mapping Of two genes for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in a population of doubled haploid lines of *Brassica oleracea* by means of RFLP and AFLP markers[J]. Theor. Appl. Genet. 1997, 94(1): 75~82.
- [3] Chaim A. B., Paran L., Grube R. C. et al. QTL mapping of fruit-related traits in Pepper (*Capsicum annuum*). Theor. Appl. Genet. 2001, 102(6~7): 1016~1028.
- [4] 卢刚, 曹家树, 陈杭等. 白菜几个重要性状的 QTL 分析[J]. 中国农业科学, 2002, 35(8): 969~974.