

李建武,李灏德,文国宏,等. 马铃薯 *EcoR* I/*Mse* I 内切酶组合 AFLP 反应体系的优化与引物筛选[J]. 江苏农业科学,2017,45(15):25-29.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.15.006

# 马铃薯 *EcoR* I/*Mse* I 内切酶组合 AFLP 反应体系的优化与引物筛选

李建武<sup>1,2</sup>, 李灏德<sup>3</sup>, 文国宏<sup>1,2</sup>, 李高峰<sup>1,2</sup>, 马 胜<sup>1,2</sup>, 张 荣<sup>1,2</sup>, 贾小霞<sup>1,2</sup>, 齐恩芳<sup>1,2</sup>

(1. 甘肃省农业科学院马铃薯研究所,甘肃兰州 730070; 2. 农业部西北旱作马铃薯科学观测实验站,甘肃渭源 748201;

3. 甘肃农业大学生命科学技术学院,甘肃兰州 730070)

**摘要:**以 2 个马铃薯品种为材料,对 AFLP 反应过程中的关键因素(DNA 浓度、酶切体系、扩增体系等)进行了优化,旨在建立适合马铃薯的 *EcoR* I/*Mse* I 内切酶组合的 AFLP 反应体系和筛选扩增条带丰富的引物。结果发现,优化的马铃薯 AFLP 反应体系为 37 ℃ 酶切 4 h,37 ℃ 连接 4 h,连接产物稀释 10 倍用于预扩增,预扩增产物稀释 30 倍用于选择性扩增。利用建立的优化反应体系,以 10 个甘肃省主栽马铃薯品种为材料,从 256 对引物组合中筛选出 24 对扩增条带多、条带清晰、多态性好的引物组合。

**关键词:**马铃薯;AFLP;体系建立与优化;引物筛选

**中图分类号:** S532.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)15-0025-05

马铃薯作为甘肃省的第三大粮食作物,在全省农业和农村经济中占有重要的地位。作为马铃薯主产区,甘肃省马铃薯种植面积稳居全国第二,2014 年种植面积 70.8 万  $\text{hm}^2$ <sup>[1]</sup>,初步形成了高寒阴湿脱毒种薯繁育区、旱作雨养区中部高淀粉及菜用型、河西及沿黄灌区全粉及薯片(条)加工型、陇南天水早熟菜用型等四大优势生产区域。甘肃省开展马铃薯育种工作已有 40 多年,先后选育出陇薯系列、天薯系列、武薯系列、庄薯系列和甘农薯等 40 多个品种(系)<sup>[2]</sup>。

扩增片段长度多态性(amplified fragments length polymorphism, AFLP)技术是由荷兰科学家 Vos 等于 1995 年在 RFLP 和 RAPD 基础上建立起来的一种选择性扩增酶切片段的方法<sup>[3-4]</sup>。AFLP 具有多态性高、DNA 用量少、结果稳定性好的优点,在水稻、大豆、小麦、马铃薯、甘蔗、棉花等作物的种质资源遗传多样性分析、遗传图谱构建、QTL 定位研究、亲缘关系鉴定等研究中得到了广泛的应用<sup>[5-12]</sup>。

近年来,分子标记技术已经开始广泛应用到我国马铃薯种质资源的研究中,如应用 SRAP 技术开展了马铃薯遗传多态性研究<sup>[13-14]</sup>,利用 SSR 和 AFLP 技术开展马铃薯指纹图谱构建、遗传多样性、遗传图谱构建与 QTL 定位研究<sup>[15-20]</sup>。AFLP 作为目前多态性最为丰富的标记,针对甘肃省主栽马铃薯品种和种质资源方面的研究还未见报道,本研究在前人所用方法的基础上优化了马铃薯 AFLP 反应体系,旨在为马铃薯遗传多样性研究、遗传图谱构建、种质资源鉴定等奠定基础。

收稿日期:2016-04-06

基金项目:国家自然科学基金(编号:31160299);甘肃省青年科技基金(编号:1308RJYA047);甘肃省农业科学院农业科技创新专项(编号:2013GAAS43)。

作者简介:李建武(1978—),男,甘肃陇西人,硕士,助理研究员,研究方向为马铃薯遗传育种。E-mail:ljw0931@163.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以农业部西北旱作马铃薯科学观测实验站提供的马铃薯品种远杂 18 号和农天 1 号为材料,用于建立内切酶 *EcoR* I/*Mse* I 组合 AFLP 反应体系;以甘肃省主栽的新大坪、陇薯 5 号、陇薯 7 号、陇薯 8 号、陇薯 10 号、庄薯 3 号、青薯 9 号、大西洋、费乌瑞它、LK99 等 10 个马铃薯品种为材料筛选多态性较好的引物组合。

### 1.2 试剂

本研究采用的基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Mse* I 及 T4 DNA 连接酶均购自 NEB(北京)有限公司;2 × *Taq* Master Mix 购自凌科生物科技(上海)有限公司;AFLP 引物(表 1)由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

### 1.3 基因组 DNA 的提取及质量检测

采用试剂盒法提取马铃薯 DNA,取 1  $\mu\text{L}$  DNA 样品混合上样缓冲液后在 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳检测,以 DL2000 bp DNA Marker 做对照,电泳缓冲液为 1 × TBE Buffer,电泳结束 20 min 后,取出凝胶放入浓度 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 EB 的电泳缓冲液染色 15 min,取出凝胶后放置在美国 Bio-rad 伯乐 Gel Doc™ XR+ 成像系统观察拍照,确定提取的 DNA 质量和完整性。

### 1.4 AFLP 体系的建立

1.4.1 酶切体系 酶切连接分 2 步进行。以远杂 18 号的基因组 DNA 为模板,使用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Mse* I 组合对以上 DNA 样品进行双酶切。酶切体系为 20  $\mu\text{L}$ ,包括 10 × Buffer(含 BSA、ATP)2.0  $\mu\text{L}$ ,*EcoR* I (20 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.1 ~ 0.2  $\mu\text{L}$ ,*Mse* I (10 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.2 ~ 0.4  $\mu\text{L}$ ,基因组 DNA (100 ng/ $\mu\text{L}$ ) 3 ~ 6  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 11.63 ~ 14.70  $\mu\text{L}$ (表 2),混匀后 37 ℃ 水浴 2 ~ 6 h。酶切结束后在 68 ℃ 失活 20 min,酶切

表 1 用于马铃薯 AFLP 分析的限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Mse* I 接头及引物序列

限制性内切酶 与引物名称	<i>EcoR</i> I			<i>Mse</i> I		
	编号	核苷酸序列	引物序列	编号	核苷酸序列	引物序列
接头序列	E-aF		5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'	M-aF		5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
	E-aR		5'-AATTGGTACGCACTCTAC-3'	M-aR		5'-TACTCAGGACTCAT-3'
预扩增引物序列	E-A	E-A	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'	M-C	M-C	5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'
选择性引物序列	E1	E-AAA	5'-GACTGCGTACCAATTCAAA-3'	M1	M-CAA	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3'
	E2	E-AAC	5'-GACTGCGTACCAATTC AAC-3'	M2	M-CAC	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'
	E3	E-AAG	5'-GACTGCGTACCAATTC AAG-3'	M3	M-CAG	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'
	E4	E-AAT	5'-GACTGCGTACCAATTC AAT-3'	M4	M-CAT	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3'
	E5	E-ACA	5'-GACTGCGTACCAATTCACA-3'	M5	M-CCA	5'-GATGAGTCCTGAGTAACCA-3'
	E6	E-ACC	5'-GACTGCGTACCAATTCACC-3'	M6	M-CCC	5'-GATGAGTCCTGAGTAACCC-3'
	E7	E-ACG	5'-GACTGCGTACCAATTCACG-3'	M7	M-CCG	5'-GATGAGTCCTGAGTAACCG-3'
	E8	E-ACT	5'-GACTGCGTACCAATTC ACT-3'	M8	M-CCT	5'-GATGAGTCCTGAGTAACCT-3'
	E9	E-AGA	5'-GACTGCGTACCAATTCGA-3'	M9	M-CGA	5'-GATGAGTCCTGAGTAACGA-3'
	E10	E-AGC	5'-GACTGCGTACCAATTCAGC-3'	M10	M-CGC	5'-GATGAGTCCTGAGTAACGC-3'
	E11	E-AGG	5'-GACTGCGTACCAATTCAGG-3'	M11	M-CGG	5'-GATGAGTCCTGAGTAACGG-3'
	E12	E-AGT	5'-GACTGCGTACCAATTCAGT-3'	M12	M-CGT	5'-GATGAGTCCTGAGTAACGT-3'
	E13	E-ATA	5'-GACTGCGTACCAATTCATA-3'	M13	M-CTA	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTA-3'
	E14	E-ATC	5'-GACTGCGTACCAATTCATC-3'	M14	M-CTC	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTC-3'
	E15	E-ATG	5'-GACTGCGTACCAATTCATG-3'	M15	M-CTG	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTG-3'
	E16	E-ATT	5'-GACTGCGTACCAATTCATT-3'	M16	M-CTT	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTT-3'

表 2 酶切反应体系中限制性内切酶 *EcoR* I /*Mse* I 量与 DNA 浓度梯度

编号	酶切组分(μL)					
	<i>EcoR</i> I (20 U/μL)	<i>Mse</i> I (10 U/μL)	DNA(100 ng/μL)	10 × Buffer	ddH <sub>2</sub> O	总量
1	0.100	0.20	3.0	2	14.70	20
2	0.125	0.25	3.0	2	14.63	20
3	0.150	0.30	3.0	2	14.55	20
4	0.175	0.35	3.0	2	14.48	20
5	0.200	0.40	3.0	2	14.40	20
6	0.125	0.25	4.0	2	13.63	20
7	0.125	0.25	5.0	2	12.63	20
8	0.125	0.25	6.0	2	11.63	20

产物在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。期间对酶切反应体系中的限制性内切酶 *EcoR* I、*Mse* I 浓度、基因组 DNA 浓度、酶切时间进行梯度优化。

1.4.2 连接反应 连接反应液 10 μL;5 μmol/L *EcoR* I 退火接头 0.5 μL,50 μmol/L *Mse* I 退火接头 0.5 μL,T<sub>4</sub> DNA 连接酶(400 U/μL)0.5 μL,10 × Buffer 1 μL,ddH<sub>2</sub>O 7.5 μL,室温下混匀,加入到 10 μL 酶切产物中,连接体系共 20 μL,设 4 个处理,分别为 37 ℃ 4 h,37 ℃ 过夜,16 ℃ 4 h,16 ℃ 过夜。连接反应结束后,65 ℃ 下反应 10 min 使连接酶失活,连接产物在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,其余在 -20 ℃ 保存备用。

1.4.3 预扩增优化 将连接产物分别设置 6 个不同的稀释倍数(1 ×,5 ×,10 ×,15 ×,20 ×,30 ×)梯度,作为预扩增的模板,进行预扩增反应。预扩增反应体系 20 μL,组分为酶切连接产物 1.0 μL,2 × *Taq* Master Mix 预混液 10 μL,预扩增引物 E-A(50 μmol/L)1.0 μL,预扩增引物 M-C(50 μmol/L)1.0 μL,ddH<sub>2</sub>O 7.0 μL。混匀离心后按以下程序扩增:95 ℃ 3 min;95 ℃ 30 s,56 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,22 个循环;72 ℃ 10 min,10 ℃ 保存。预扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,其余在 -20 ℃ 保存用于选择性扩增。

1.4.4 选择性扩增优化 将预扩增产物设置 6 个不同的稀释倍数(10 ×,20 ×,30 ×,40 ×,50 ×,60 ×)梯度,作为选择性扩增模板,进行选择性扩增反应。选择性扩增反应体系 20 μL,组分为预扩增产物 2.0 μL,2 × *Taq* Master Mix 预混液 10 μL,选择性扩增引物 E-nnn(50 μmol/L)1.0 μL,预扩增引物 M-nnn(50 μmol/L)1.0 μL,ddH<sub>2</sub>O 6.0 μL,混匀离心后按以下程序扩增:95 ℃ 3 min;95 ℃ 30 s,65 ℃ 30 s(每个循环减低 0.7 ℃),72 ℃ 1 min,12 个循环;94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,23 个循环;72 ℃ 5 min,10 ℃ 保存。选择性扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳

取 10 μL 选择性扩增产物,加入 5 μL Loading Buffer,95 ℃ 变性 5 min 并迅速在冰浴中冷却后,在恒定功率 80 W、变性聚丙烯酰胺凝胶(60 mL 凝胶母液,300 μL 过硫酸铵,60 μL TEMED)中电泳 90 min。

1.6 银染及引物筛选

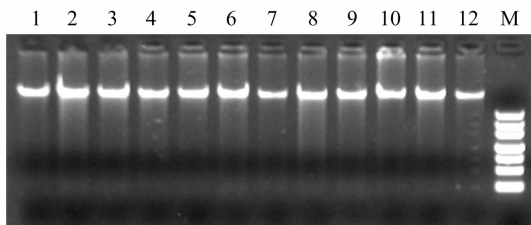
银染方法参照文献[21],具体步骤:将凝胶放置在 1 500 mL 的固定液中含 10% 乙醇,0.5% 乙酸)固定 5 min,转入含有 0.1% AgNO<sub>3</sub> 与 0.1% 甲醛的染色中染色 6 min;蒸

馏水漂洗 2 s;立即放入含 1% NaOH 与 0.2% 甲醛的显影液中轻轻摇晃显影至条带清晰。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组 DNA 提取

AFLP 标记对 DNA 的纯度及完整性要求较高,为了确保参试材料的基因组 DNA 纯度和完整性,本研究采取试剂盒法提取了 12 份马铃薯材料的基因组 DNA。经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测结果(图 1)表明,基因组 DNA 浓度较低,无拖尾现象,残留杂质少且完整性好,在纯度上完全能够满足 AFLP 分析的要求。

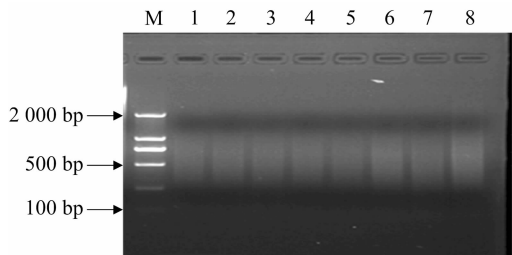


1-12—远杂 18 号、农天 1 号、陇薯 8 号、陇薯 5 号、陇薯 10 号、青薯 9 号、新大坪、陇薯 7 号、庄薯 3 号、大西洋、费乌瑞它、LK99; M—DL2000 marker

图1 12 个马铃薯基因组 DNA 样品在琼脂糖凝胶电泳结果

### 2.2 AFLP 体系优化

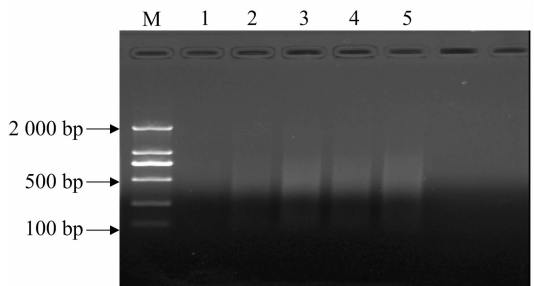
**2.2.1 酶切反应** 以品种远杂 18 号的基因组 DNA 为材料,使用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Mse* I 在 37 °C 进行双酶切反应 4 h,对限制性内切酶量与 DNA 浓度进行梯度筛选。酶切产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测结果(图 2)表明,不同限制性内切酶浓度对基因组 DNA 经限制性内切酶消化后片段大小集中在 100 ~ 1 000 bp 之间,弥散带分布均匀,表明酶切彻底,符合 AFLP 对酶切效果的要求,其中当 *EcoR* I、*Mse* I 分别为 0.125、0.25  $\mu$ L 时,DNA 浓度 400 ~ 600 ng 可满足酶切效果,确定 *EcoR* I (20 U/ $\mu$ L) 0.125  $\mu$ L、*Mse* I (10 U/ $\mu$ L) 0.25  $\mu$ L、DNA (100 ng/ $\mu$ L) 5  $\mu$ L 为酶切体系的反应浓度。



M—D2000 marker; 1~8 浓度梯度见表 2

图2 限制性内切酶量与 DNA 浓度对酶切效果的影响

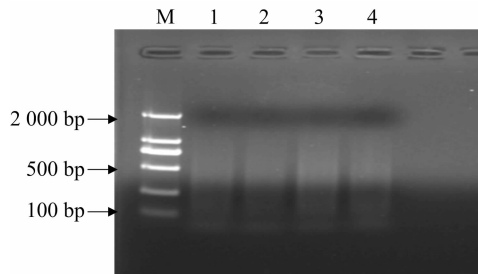
以远杂 18 号基因组 DNA 为材料,将 20  $\mu$ L 酶切体系 [*EcoR* I (20 U/ $\mu$ L) 0.125  $\mu$ L, *Mse* I (10 U/ $\mu$ L) 0.25  $\mu$ L, DNA (100 ng/ $\mu$ L) 5  $\mu$ L, 10  $\times$  Buffer 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 12.63  $\mu$ L] 放置在 37 °C 下,设置 2、3、4、5、6 h 等 5 个梯度下筛选酶切反应时间,酶切产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测结果(图 3)表明,酶切 3 ~ 5 h,产物弥散带分布均匀,且条带亮度较高,表明酶切产物丰富,符合 AFLP 对酶切效果的要求,确定 4 h 为适宜的酶切时间。



M—D2000 marker; 1~5—37 °C 下酶切 2、3、4、5、6 h 的酶切产物

图3 不同酶切时间对酶切效果的影响

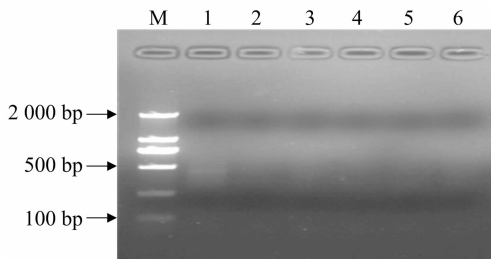
**2.2.2 连接反应** 经 *EcoR* I 2.5 U 和 *Mse* I 2.5 U 对 500 ng DNA 在 37 °C 下酶切 4 h 的产物为模板,在 10  $\mu$ L 酶切体系中加入 10  $\mu$ L 连接反应液,连接体系共 20  $\mu$ L,经不同温度和时间连接反应后,65 °C 下 10 min 使连接酶失活,连接产物在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测结果表明,4 个处理的连接产物均为弥散状,片段主要集中在 100 ~ 1 000 bp,符合 AFLP 反应要求,37 °C 连接 4 h 和过夜后片段浓度较低,亮度低,16 °C 连接 4 h 和过夜后,片段亮度高,连接效果较好,从缩短试验周期、节约时间角度考虑,确定酶切连接温度为 37 °C,时间为 4 h (图 4)。



M—Marker; 1~4—37 °C 4 h、37 °C 过夜、16 °C 4 h、16 °C 过夜

图4 不同温度和时间连接效果

**2.2.3 预扩增优化** 预扩增以远杂 18 号基因组 DNA 的酶切连接产物为模板,连接产物稀释倍数分别为 1、5、10、15、20、30 倍,同时以农天 1 号基因组 DNA 的酶切连接产物为重复。预扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测结果(图 5、图 6)表明,不同稀释倍数的模板即模板浓度对预扩增效果并无明显影响,不稀释时条带集中在 500 bp 附近,稀释 20 倍和 30 倍的模板扩增的条带不清晰,稀释 10 倍和 15 倍时条带清晰,因此选择稀释 10 倍为最佳稀释倍数。



M—DL2000 marker; 1~6—连接产物稀释 1、5、10、15、20、30 倍

图5 以远杂 18 号的 DNA 酶切连接产物为模板稀释倍数对预扩增结果的影响

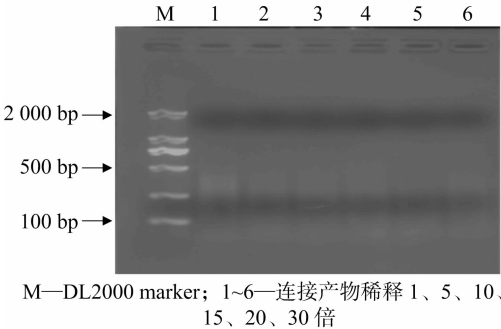


图6 以农天 1 号的 DNA 酶切连接产物模板稀释倍数对预扩增结果

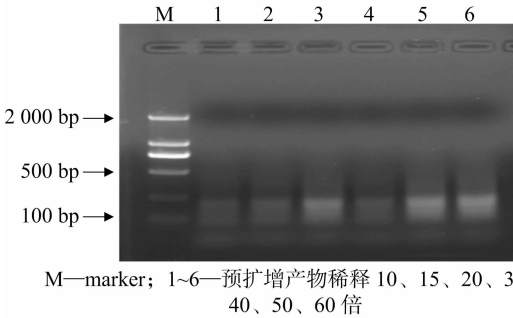


图7 以远杂 18 号的预扩增产物为模板稀释倍数对选择性扩增结果

2.2.3 选择性扩增优化 选择性扩增以远杂 18 号基因组 DNA 预扩增产物为模板,预扩增产物稀释倍数分别为 10、20、30、40、50、60 倍,同时以农天 1 号基因组 DNA 的预扩增产物为重复。预扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测结果(图 7、图 8)表明,不同稀释倍数的模板即模板浓度对预扩增效果并无明显影响,选择性扩增片段介于 100 ~ 500 bp 之间,均符合 AFLP 分析要求,稀释 10 倍、20 倍和 40 倍时的模板选择性扩增的条带不清晰,预扩增产物稀释 30 倍、50 倍和 60 倍时条带清晰,因此选择稀释 30 倍为最佳稀释倍数。

2.3 最佳 AFLP 体系的确定与引物筛选

为了验证所建立的马铃薯 AFLP 反应体系是否稳定,能否在各引物组合间普遍使用,试验以品种陇薯 7 号材料所建立的体系,对 12 个甘肃省主栽马铃薯品种对限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Mse* I 的引物 256 对组合进行了初步筛选。结果得到多态性均在 5 个以上的引物组合 70 对,多态性位点在 8 个以上的引物组合 24 对,分别为 E - ACT/M - CGC、E - ACA/M - CCT、E - ACA/M - CCC、E - ACA/M - CCA、E - ACA/M - CAT、E - ACA/M - CAG、E - ACA/M - CAC、E - AAC/M -

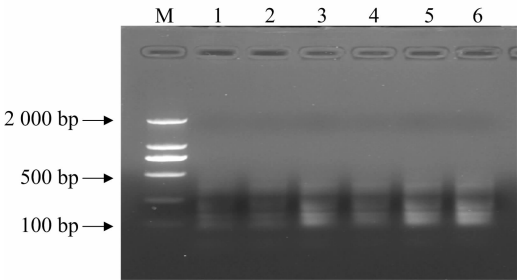
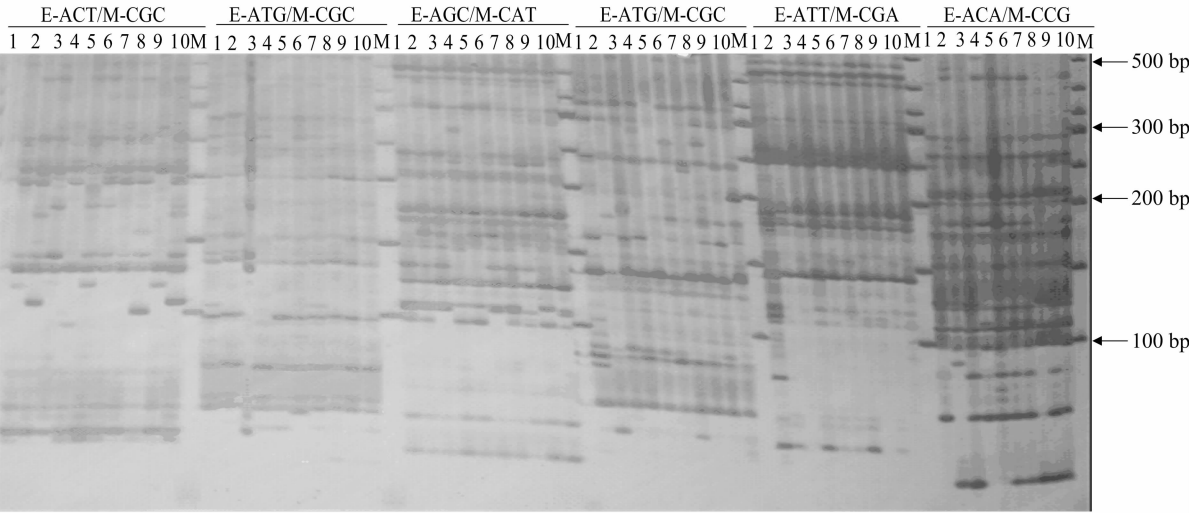


图8 以农天1号的预扩增产物为模板稀释倍数对选择性扩增结果

CCG、E - AAC/M - CGC、E - ATG/M - CGT、E - ATG/M - CGC、E - ATA/M - CGT、E - ATA/M - CGG、E - AGG/M - CGA、E - AGG/M - CCG、E - AGG/M - CCA、E - AGG/M - CAT、E - AGC/M - CAT、E - AGC/M - CAA、E - ATT/M - CCG、E - AAG/M - CGG、E - ACG/M - CCC、E - ACA/M - CCG、E - ATT/M - CGA(图 9)。



E-ACT/M-CGC、E-ATG/M-CGC、E-AGC/M-CAT、E-ATG/M-CGC、E-ATT/M-CGA、E-ACA/M-CCG 分别为 *EcoR* I 和 *Mse* I 的引物组合。1~10—陇薯8号、陇薯5号、陇薯10号、青薯9号、新大坪、陇薯7号、庄薯3号、大西洋、费乌瑞它、LK99；M—DL2000 marker

图9 *EcoR* I / *Mse* I 的 6 对引物组合对 10 个马铃薯品种的扩增效果

3 讨论

AFLP 标记技术操作流程复杂,涉及到的步骤多、影响因

素繁多,在实际的应用过程中容易出现问題,导致整个试验的失败。因此,在 DNA 提取、酶切、连接、预扩增、选择性扩增、凝胶电泳和银染分析的每个环节都必须满足技术要求,才能

得到最佳结果。

高质量的 DNA 是 AFLP 标记分析成功的关键。完整的基因组 DNA 能保证在后续的试验中获得整个基因组的多态性信息;高纯度的 DNA 能保证限制性内切酶酶切充分完全。本研究采用试剂盒法提取的马铃薯基因组 DNA 纯度较高、完整性较好,符合 AFLP 标记酶切反应对 DNA 质量的要求。

酶切过程是 AFLP 标记分析成功关键环节。酶切时间受到植物样本的基因组大小、序列以及所含的次生代谢产物影响<sup>[22]</sup>。本研究在 37 ℃ 下设置了 5 个时间处理,酶切时间过短时,基因组 DNA 酶切不完全,没有产生丰富的片段,不能真实地反映整个基因组信息;酶切 5.6 h 酶切效果与 4 h 的无明显差异,最终确定酶切时间为 4 h,既能保证酶切完全充分,也降低了酶切过量的可能性。

酶切后的 DNA 片段和接头连接后,酶切位点侧翼的保护性序列就发生了改变,内切酶 *EcoR* I 和 *Mse* I 就不能识别酶切位点<sup>[23]</sup>。酶切产物连接要充分,连接时间过短,人工接头与酶切片段不能完全连接上,会造成预扩增产物中缺少目的片段而使试验失败,本研究确定在 37 ℃ 连接 4 h。

预扩增反应在 AFLP 的整个反应体系起到承上启下的作用。酶切和连接成功与否,只能通过预扩增进行判断,预扩增不仅可以作为酶切和连接反应是否完全充分的标志,而且还直接影响到选择性扩增的结果,只有到预扩增能产生稳定的片段,才能说明连接反应成功且预扩增体系稳定。本研究将连接产物稀释 10 倍时预扩增产物产生较为稳定的弥散带,大小介于 100 ~ 1 000 bp 之间,且稳定性好,不需要对预扩增体系进一步优化。预扩增产物的稀释倍数对于选择性扩增的成败非常重要,稀释倍数太大导致带型模糊,难以辨别;稀释倍数太小显带很弱或显不出带,不利于条带的读取及多态性片段的检出。本研究将预扩增产物稀释 30 倍时,选择性扩增结果较好,带型清晰,稳定性好,便于读带和统计。

#### 4 结论

本研究选用限制性内切酶 *EcoR* I / *Mse* I 组合建立了马铃薯 AFLP 的最佳反应体系,即采用试剂盒法提取 DNA, 37 ℃ 酶切 4 h, 37 ℃ 连接 4 h,连接产物稀释 10 倍,预扩增产物稀释 30 倍作为选择性扩增的模板。通过建立的 AFLP 体系从 256 对引物组合中筛选出了 24 对扩增条带清晰、多态性好的引物组合。

#### 参考文献:

- [1] 赵 婧,赵贵宾,李 星,等. 甘肃省推进马铃薯主粮化行动的几点思考[J]. 中国马铃薯,2015,29(3):182-185.
- [2] 杨祁峰,岳 云,熊春蓉,等. 甘肃省马铃薯产业发展现状及思考[C]//2014 年中国马铃薯大会论文集. 哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社,2014:138-143.
- [3] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [4] Vantoai T T, Martin S S. Using AFLP markers to determine the

- genomic contribution of parents to populations[J]. Crop Science, 1997, 37(4): 1370-1373.
- [5] 张春庆,贾继增. 水稻 AFLP 指纹图谱的引物选择研究[J]. 中国农业科学, 2002, 35(7): 733-737.
- [6] 田松杰,石云素,宋燕春,等. 利用 AFLP 技术研究玉米及其野生近缘种的遗传关系[J]. 作物学报, 2004, 30(4): 354-359.
- [7] 王立新,常利芳,黄 岚,等. 小麦 AFLP 片段序列多态性分析和 AFLP-SCAR 标记的研究[J]. 麦类作物学报, 2007, 27(6): 943-951.
- [8] 秦伟伟,李永祥,李春辉,等. 基于高密度遗传图谱的玉米籽粒性状 QTL 定位[J]. 作物学报, 2015, 41(10): 1510-1518.
- [9] 李芳弟,王 舰,王 芳,等. 马铃薯种质遗传多样性分析的 AFLP 反应体系优化与引物筛选[J]. 分子植物育种, 2010(1): 179-185.
- [10] 王志伟,魏利民,谢晓美,等. 利用 AFLP 构建棉花遗传图谱及纤维品质性状 QTL 分析[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(7): 71-74.
- [11] 笕逢刚,应雄美,吴才文,等. 98 份甘蔗种质资源遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 中国农业科学, 2015, 48(5): 1002-1010.
- [12] 高 帆,宋 饼. 基于 AFLP 标记的苦养种质资源遗传多样性研究[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(5): 122-126.
- [13] 何风发,杨志平,张正圣,等. 马铃薯遗传资源多样性的 SRAP 分析[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(6): 1001-1005.
- [14] 赵光磊,张雅奎,吴凌娟,等. 黑龙江省主栽马铃薯品种遗传多样性的 SRAP 分析[J]. 西北农业学报, 2015, 24(2): 1-13.
- [15] 段艳凤,刘 杰,卞春松,等. 中国 88 个马铃薯审定品种 SSR 指纹图谱构建与遗传多样性分析[J]. 作物学报, 2009, 35(8): 1451-1457.
- [16] 单友蛟,刘 杰,卞春松,等. 马铃薯 SSR 遗传连锁图谱构建及 3 个重要农艺性状 QTLs 定位[J]. 中国蔬菜, 2010(18): 10-14.
- [17] 石 景,宋波涛,金开建,等. SSR 标记的彩色马铃薯遗传多样性分析及指纹图谱构建[J]. 农业生物技术学报, 2012, 20(4): 362-371.
- [18] Wang H X, Walla J A, Magnusson V A, et al. Construction of genetic linkage maps and QTL mapping for X-disease resistance in tetraploid chokecherry (*Prunus virginiana* L.) using SSR and AFLP markers[J]. Molecular Breeding, 2014, 34(1): 143-157.
- [19] D'hoop B B, Keizer P L, Paulo M J, et al. Identification of agronomically important QTL in tetraploid potato cultivars using a marker-trait association analysis[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2014, 127(3): 731-748.
- [20] Khan M A, Saravia D, Munive S, et al. Multiple QTLs linked to agro-morphological and physiological traits related to drought tolerance in potato[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2015, 33(5): 1286-1298.
- [21] 李建武,李 宁. SSR 标记变性聚丙烯酰胺凝胶快速银染方法的建立[J]. 中国马铃薯, 2015, 29(3): 136-140.
- [22] 孙凤梅,沈晓霞,沈宇峰,等. 薏苡 AFLP 体系的建立与优化[J]. 浙江农业学报, 2014, 26(1): 1-19.
- [23] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.