

高金秋,周建朝,王孝纯,等. 部分高抗低磷胁迫基因型甜菜 AFLP 指纹图谱的构建[J]. 江苏农业科学,2017,45(6):36-38.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.06.007

部分高抗低磷胁迫基因型甜菜 AFLP 指纹图谱的构建

高金秋^{1,2}, 周建朝², 王孝纯², 王艳², 沈萍²

(1. 白城师范学院, 吉林白城 137000; 2. 黑龙江大学农作物研究院, 黑龙江哈尔滨 150080)

摘要:利用 K-均值法和 AFLP 指纹图谱方法,对 40 个甜菜品种进行筛选和研究。结果表明,40 个甜菜品种可分为高抗低磷胁迫、低抗低磷胁迫和中抗低磷胁迫 3 大类。其中高抗低磷品种有 6 个、低抗低磷品种 12 个、中抗低磷品种 22 个。利用 64 对引物组合对引物及扩增条带数进行 K-值聚类分析,筛选出 E-ACC/M-CTT、E-ACG/M-CAA、E-ACG/M-CTA、E-ACG/M-CTT、E-AGC/M-CAG、E-AGC/M-CTA、E-AGC/M-CTT、E-ACT/M-CTT、E-AAG/M-CTT 9 对适合高抗低磷胁迫基因型甜菜特异引物,并扩增出 72 个差异条带。以上研究结果为更好地鉴定甜菜品种提供了参考依据。

关键词:甜菜;聚类分析;AFLP;指纹图谱

中图分类号:S566.301

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2017)06-0036-03

甜菜(*Beta vulgaris*),别称藜菜,二年生草本,是除甘蔗外的主要糖源。近年来,很多研究都致力于发掘植物对磷的吸收、利用潜能,如小麦^[1]、玉米^[2]、大豆^[3]等。研究认为多项作物在受低磷胁迫时,会促进根、根表面积以及侧根形态指数的扩大^[4]。由于目前对甜菜品种的培育较多,利用指纹图谱对多个品种的鉴定及筛选有着显著意义。常用的 SSR^[5]、RAPD^[6]方法的检测位点有限,难以对品种大量鉴别,因此选用 AFLP 这种更可靠、更高效的方法构建指纹图谱。目前,对甜菜的研究大多集中于形态学中,但对于高抗低磷这类可广泛应用市场品种鉴定的指纹图谱少有报道。本研究将对 40 个甜菜品种进行聚类分析,选出高抗低磷的甜菜品种,并对其

进行 AFLP 指纹图谱构建,为我国甜菜品种种质的鉴别提供依据,为更广泛地应用提供有力的理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验于 2010 年 9 月至 2011 年 6 月在黑龙江大学进行。通过对 40 个品种的甜菜种子进行常规育苗,培养至子叶完全展开,获得 40 个子叶完全展开的甜菜品种作为试验对象。试验采用的甜菜品种及来源见表 1。

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计 对 40 个品种的甜菜苗用半倍 Hoagland 营养液培养,并用浓度为 100 μmol/L 的高磷对 30 株苗进行处理,对另外 30 株用浓度为 1 μmol/L 进行低磷处理,并在出现真叶时进行数据采集。

DNA 提取:称取 0.1 g 粉末样品,加入 CTAB 提取液^[7]混匀,65 ℃水浴 30 min;加入 10 μL 10 mg/L 的 RNaseA,37 ℃水浴 20 min;加入 500 μL“酚:三氯甲烷:异戊醇=25:24:1”混合液混匀;12 000 r/min 离心 10 min;取上清液 700 μL 加入等体积的“三氯甲烷:异戊醇=24:1”混匀;12 000 r/min 离

收稿日期:2016-01-20

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设项目(编号:CARS-210306);国家自然科学基金(编号:31371686、30471111);黑龙江大学科研计划。

作者简介:高金秋(1976—),女,山东单县人,硕士,讲师,主要从事植物生物技术方面研究。E-mail:wawa760824@126.com。

通信作者:周建朝,博士,研究员,主要从事植物营养与施肥技术的研究。E-mail:zhou88767@126.com。

[18] Xia X, Xie Z. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution[J]. Journal of Heredity, 2001, 92(4): 371-373.

[19] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.

[20] Meyer A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes[J]. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, 1993, 2: 1-38.

[21] Desalle R T, Freedman T, Prager E M, et al. Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila* [J]. Journal of Molecular Evolution, 1987, 26(1/2): 157-164.

[22] Grant W, Bowen B W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation[J]. Journal of Heredity, 1998, 89

(5): 415-426.

[23] 杜启艳, 常重杰. DNA 条形码在鉴定物种中的应用[J]. 生物学教学, 2010, 35(12): 60-61.

[24] Anderson E. Introgressive hybridization[M]. New York: John Wiley and Sons, 1949.

[25] Simon P, Dupuis R, Costentin J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions[J]. Behavioural Brain Research, 1994, 61(1): 59-64.

[26] Vences M, Thomas M, Bonett R M, et al. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 2005, 360(1462): 1859-1868.

[27] 唐伟. 姚江水系中华鳖种质特征研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.

表 1 甜菜品种名称及来源

编号	品种	来源	编号	品种	来源
1	KWS0149	呼兰甜菜种质库	21	KWS9440	呼兰甜菜种质库
2	KWS0467	呼兰甜菜种质库	22	KWS9441	呼兰甜菜种质库
3	KWS0468	呼兰甜菜种质库	23	KWS9442	呼兰甜菜种质库
4	KWS0469	呼兰甜菜种质库	24	KWS9146	呼兰甜菜种质库
5	KWS4125	呼兰甜菜种质库	25	KWS9147	呼兰甜菜种质库
6	KWS4167	呼兰甜菜种质库	26	BETA064	呼兰甜菜种质库
7	KWS5145	呼兰甜菜种质库	27	BETA065	呼兰甜菜种质库
8	KWS5440	呼兰甜菜种质库	28	BETA796	呼兰甜菜种质库
9	KWS6165	呼兰甜菜种质库	29	BETA855	呼兰甜菜种质库
10	KWS6166	呼兰甜菜种质库	30	BETA866	呼兰甜菜种质库
11	KWS6167	呼兰甜菜种质库	31	BETA957	呼兰甜菜种质库
12	KWS6573	呼兰甜菜种质库	32	BETA6872	呼兰甜菜种质库
13	KWS7106	呼兰甜菜种质库	33	兰 19	呼兰甜菜种质库
14	KWS7194	呼兰甜菜种质库	34	兰 45	呼兰甜菜种质库
15	KWS8119	呼兰甜菜种质库	35	兰 71	呼兰甜菜种质库
16	KWS8120	呼兰甜菜种质库	36	兰 85	呼兰甜菜种质库
17	KWS8126	呼兰甜菜种质库	37	SM-412	呼兰甜菜种质库
18	KWS8138	呼兰甜菜种质库	38	ZD206	呼兰甜菜种质库
19	KWS8412	呼兰甜菜种质库	39	KWS6574	呼兰甜菜种质库
20	KWS9143	呼兰甜菜种质库	40	F04-8FS	呼兰甜菜种质库

心 10 min;取上清液 500 μL 加入 1 000 μL 与 -20 ℃ 预冷的无水乙醇混匀;12 000 r/min 离心 10 min;弃去上清液,加入 50 μL TE,1% 琼脂糖电泳检测,于 -20 ℃ 保存。

酶切连接 25 μL 体系:7 μL AFLP-Water,2.5 μL 10 × Reaction buffer,1 μL Adapter,2 μL *EcoR* I/*Mse* I (4 U/μL),1 μL T4 Ligase(3 U/μL),2.5 μL 10 mmol/L ATP,4 μL DNA 模板(浓度 50 ng/μL),混匀离心,37 ℃ 保温 5 h,4 ℃ 过夜。

预扩增 25 μL 体系:18.5 μL AFLP-Water,2.5 μL 10 × PCR buffer,1 μL Pre-ampmix,0.5 μL dNTPs,0.5 μL *Taq* 酶(2 U/μL)。混匀后进行扩增,反应条件为 94 ℃ 2 min;94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 80 s,循环 30 轮;72 ℃ 5 min。

选择性 PCR:DNA(预扩增产物稀释 20 倍)。17.5 μL AFLP-Water,2.5 μL 10 × PCR buffer,0.5 μL *Taq* 酶(2 U/μL),0.5 μL dNTPs,1 μL *EcoR* I 引物,1 μL *Mse* I 引物,2 μL 模板 DNA,总计 25 μL 体系。混匀离心,反应条件为 94 ℃ 2 min;94 ℃ 30 s,65 ℃ 30 s,72 ℃ 80 s,循环退火温度递减 0.7 ℃ 扩增 15 轮,按 94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 80 s 扩增 23 轮;72 ℃ 5 min。

选择性扩增产物与甲酰胺上样液(98% 甲酰胺,10 mmol/L EDTA、0.25% 溴酚蓝)按 8:3 比例混合,95 ℃ 变性 8 min,然后立即冰浴。7 μL 上样,以电压 70 V 电泳 1 h。按照 Ceatano-Anolles 等的方法^[8]染色。

1.2.2 测定指标及方法 采收前进行叶绿素含量测定,并测定烘干前后叶片、叶柄和根的质量。当长至 2 对真叶时,计算磷胁迫指数,计算公式为磷胁迫指数=低磷产量/高磷产量。

1.2.3 统计分析 对所获得的数据运用 SPSS 17.0 进行分析,采用 K-均值法将品种分类。

2 结果与分析

2.1 高抗低磷胁迫品种的筛选结果

通过对甜菜苗的培养和磷处理,获得甜菜生物量碱胁迫

指数。由于选取参考因子不同,会造成品种分类结果不同。因此,结合前人的研究结果,本研究选用全株干质量胁迫指数作为选取因子,采用 K-均值法将上述品种分类。对基础数据进行分类处理,将 40 个品种分为 3 大类:高抗低磷胁迫类、低抗低磷胁迫类、中抗低磷胁迫类。K 均值分类结果:高抗低磷胁迫品种 6 个(编号为 3、4、13、16、37、40),低抗低磷胁迫品种 12 个(编号为 2、6、11、18、19、21、22、23、25、26、29、38),剩余 22 个品种均为中抗低磷胁迫品种(表 2)。

表 2 甜菜生物量碱胁迫指数聚类分析结果

编号	全株干质量胁迫指数	距离	聚类	类别
1	0.14	0.010	1	中抗低磷胁迫类
5	0.11	0.000	1	
7	0.13	0.015	1	
8	0.15	0.005	1	
9	0.13	0.016	1	
10	0.14	0.017	1	
12	0.15	0.006	1	
14	0.13	0.002	1	
15	0.17	0.030	1	
17	0.15	0.035	1	
20	0.13	0.003	1	
24	0.15	0.008	1	
27	0.12	0.015	1	
28	0.14	0.029	1	
30	0.15	0.018	1	
31	0.14	0.016	1	
32	0.11	0.019	1	
33	0.14	0.030	1	
34	0.12	0.016	1	
35	0.13	0.030	1	
36	0.15	0.003	1	
39	0.13	0.017	1	
2	0.14	0.035	2	低抗低磷胁迫类
6	0.09	0.016	2	
11	0.12	0.030	2	
18	0.13	0.014	2	
19	0.09	0.034	2	
21	0.13	0.009	2	
22	0.13	0.026	2	
23	0.12	0.004	2	
25	0.12	0.024	2	
26	0.11	0.019	2	
29	0.10	0.013	2	
3	0.15	0.002	3	高抗低磷胁迫类
4	0.17	0.033	3	
13	0.18	0.006	3	
16	0.18	0.033	3	
37	0.16	0.005	3	
40	0.23	0.009	3	

2.2 AFLP 指纹图谱的构建结果

根据各 8 种 *EcoR* I 引物和 *Mse* I 引物,形成 64 对引物组合,对高抗低磷胁迫和低抗低磷胁迫品种基因池进行选扩。根据统计结果,得出高抗低磷比低抗低磷基因池多出的差异条带数(表 3)。对引物及扩增条带数进行 K-值聚类分析,

表 3 引物及扩增条带数

引物	差异条带数	引物	差异条带数	引物	差异条带数
E - ACC/M - CAC	3	E - AGC/M - CAA	4	E - ACA/M - CTT	3
E - ACC/M - CAG	2	E - AGC/M - CAC	2	E - ACA/M - CTG	2
E - ACC/M - CAT	4	<i>E - AGC/M - CAG</i>	6	E - ACA/M - CTC	2
E - ACC/M - CTC	2	E - AGC/M - CAT	3	E - ACA/M - CAT	2
<i>E - ACC/M - CTT</i>	8	<i>E - AGC/M - CTA</i>	11	E - ACA/M - CAA	5
<i>E - ACG/M - CAA</i>	7	E - AGC/M - CTC	4	<i>E - AAG/M - CTT</i>	7
E - ACG/M - CAC	2	E - AGC/M - CTG	3	E - AAG/M - CTG	1
E - ACG/M - CAG	5	<i>E - AGC/M - CTT</i>	7	E - AAG/M - CTC	2
E - ACG/M - CAT	4	<i>E - ACT/M - CTT</i>	7	E - AAG/M - CAT	2
<i>E - ACG/M - CTA</i>	11	E - ACT/M - CTG	3	E - AAC/M - CTG	4
E - ACG/M - CTC	1	E - ACT/M - CTC	1	E - AAC/M - CTC	1
<i>E - ACG/M - CTT</i>	8	E - ACT/M - CAA	4		

筛选出 9 对适合高抗低磷胁迫基因型甜菜的特异引物(表 3 中以斜体表示),共扩增出 72 个差异条带。

3 讨论和结论

3.1 影响 AFLP 体系的因素

高纯度的 DNA 是 AFLP 体系构建成功的基础。如果模板 DNA 存在其他杂质,如多糖、蛋白质等,均会降低限制性内切酶的活性,导致酶切不完全。在电泳显色后,这种杂质会使胶板上部条带过密,中下部条带过稀,无法反应真实的 DNA 信息,甚至会无法进行下一步试验。基于 DNA 纯度的重要性,可通过改良 CTAB 提取法,减少试验步骤,更高效快速地提取样品;本试验操作过程中也发现,在提取过程中,可提前加入 RNaseA,较在 TE 后加入干扰更少。由于酶切 DNA 的用量和浓度会影响酶切的效果及基因的检测,因此对 DNA 的浓度要有效控制。在高抗低磷甜菜品种 AFLP 体系的试验过程中,发现模板 DNA 浓度在 100 倍范围内,对扩增条带数没有影响,而当浓度继续升高时,由于干扰物的增多,也会导致扩增条带的缺失现象。在试验进行到酶切、连接步骤时,应确保在 37℃ 下进行,反应时间应多于 3 h。一旦酶切-连接时间过短,就会造成酶切不完全,连接不充分,影响预扩增效果。同时,在预扩产物稀释过程中,适宜稀释浓度在 20~50 倍之间,稀释倍数过高对谱带颜色较深,反之则谱带颜色较浅,均不清晰。

3.2 高抗低磷甜菜品种 AFLP 图谱的研究意义

AFLP 指纹图谱具有稳定性高、适用性强等优点。本研究应用 E - ACC/M - CTT、E - ACG/M - CAA、E - ACG/M - CTA、E - ACG/M - CTT、E - AGC/M - CAG、E - AGC/M - CTA、E - AGC/M - CTT、E - ACT/M - CTT 及 E - AAG/M - CTT 引物构建 6 个高抗低磷甜菜品种的 AFLP 指纹图谱对引物扩增出 72 个差异条带。利用 AFLP 构建的指纹图谱,可以有效地保护优质甜菜品种的育种,为品种鉴定和应用提供更有力的技术保障。

在实际应用中,应注意试验条件的严格性,最大程度上减小误差,规划完善试验操作^[9]。在对谱带条纹鉴别处理中,对其量化及标准化的处理需借助计算机进行。目前,已经有

此类分析软件,虽然缺少鉴定功能,但可用于研究电泳图谱及谱带条纹的灰度级等特征^[10]。在这些方面的研究还有很多提升的空间。同时,在指纹图谱以外还可以结合一些显性的形态特征进行,如对皮色、直径、长度等方面的标记,用以鉴别甜菜种质资源,有效提高检验的效率。甜菜是除甘蔗外的主要糖分来源,现在甜菜糖约占世界糖产量的 40%,对高抗低磷甜菜品种的选育及 AFLP 图谱的构建为甜菜的大量培育及应用提供了有意义的理论根据。

参考文献:

[1] 李慧明,高志强,张永清,等. 不同基因型春小麦根系对低磷胁迫的生物学响应[J]. 山西农业大学学报(自然科学版),2006,26(2):138-140.

[2] 梁秀兰,林英春,年海,等. 低磷胁迫对不同基因型玉米主要生理生化特性的影响[J]. 作物学报,2005,31(5):667-669.

[3] Borkert C M, Barber S A. Effect of supplying P to a portion of the soybean root system on root growth and P up take kinetics[J]. Journal of Plant Nutrition,1983,6(10):895-910.

[4] 李海波,夏铭,吴平. 低磷胁迫对水稻苗期侧根生长及养分吸收的影响[J]. 植物学报,2001,43(11):1154-1160.

[5] Diwan N P, Cregan B. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean[J]. Thero Appl Genet,1997,95(5):723-733.

[6] Zhang J H, McDonald M B, Sweeney P M. Soybean cultivar identification using RAPD[J]. Seed Science and Technology,1996(24):589-592.

[7] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8(19):4321-4325.

[8] Caetano A G, Bassam B J, Gresshoff P M. DNA Silver staining[J]. Biotechnological Advance,1997,15(1):175.

[9] 田清震,盖钧镒,喻德跃,等. 大豆 DNA 扩增片段长度多态性(AFLP)研究[J]. 大豆科学,2000,19(3):210-217.

[10] Jerry E S, Hmichael G. A robust high-sensitivity algorithm for automated detection of proteins in two dimensional electrophores gels [J]. Computer Applications in the Biosciences,1993,9(2):68-74.