

向日葵 *Pst* I 和 *Mse* I 内切酶组合 AFLP 标记体系的建立及引物筛选

张永虎,侯建华,吕品,于志贤

内蒙古农业大学农学院,呼和浩特 010018

摘要 为建立并优化适合向日葵的 *Pst* I 和 *Mse* I 组合的 AFLP 技术体系,为下一步构建遗传连锁图谱及开展分子标记辅助育种奠定基础,对向日葵基因组 DNA 提取方法、酶切连接体系和选择性扩增程序的影响因素进行优化,并对适合向日葵 AFLP 分析的引物组合进行筛选。结果表明,模板 DNA 的提取采用改进 CTAB 法,酶切连接采用一步法反应 14 h,在选择性扩增体系 20 μ L 中, Mg^{2+} 和 dNTP 浓度分别为 2 mmol/L 和 0.3 mmol/L,选扩引物的浓度为 0.6 mmol/L,预扩增产物最适稀释倍数为 30 倍。同时筛选出了稳定且多态性丰富的 48 对适合向日葵 AFLP 分析的引物组合。

关键词 向日葵;AFLP;体系建立及优化;引物筛选

中图分类号 S565.903

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2014.36.009

Primer Screening and Establishment of AFLP Marked System of *Pst* I and *Mse* I Endonuclease Combination in Sunflower

ZHANG Yonghu, HOU Jianhua, LÜ Pin, YU Zhixian

Agricultural College, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China

Abstract To provide technical support for construction of genetic linkage map and molecular markers assisted breeding of sunflower, an optimized AFLP reaction system using double-digestion of *Pst* I and *Mse* I endonuclease has been established. The extraction method of genomic DNA, the DNA digestion and ligation system and several key factors affecting the PCR selective amplification are optimized. In addition, the primer combination which suits for analysis of AFLP is also screened in sunflower. The results show that the high quality of genomic DNA as PCR template can be extracted with the improved CTAB method, and that the DNA digestion and ligation can be used as a one-step process with the reaction time of 14 hours. In the optimized selection amplification system of total volume of 20 μ L, the Mg^{2+} concentration is 2 mmol/L, dNTPs concentration is 0.3 mmol/L, the primers concentration is 0.6 mmol/L and the products of pre-amplification for selective amplification are diluted to 30 times. Moreover, 48 pairs stable and polymorphisms primer have been selected for AFLP analysis in sunflower.

Keywords sunflower; AFLP; establishment and optimization of the system; screening of primer pairs

向日葵 (*Helianthus annuus* L.) 属菊科 (Compositae) 1 年生草本植物,原产美洲,是世界第 2 大油料作物,中国第 4 大油料作物。由于向日葵具有抗旱、耐盐碱等特性,主要种植在西北、华北、东北的干旱和半干旱地区。向日葵作为一种经济作物,在改善中国西部地区生态环境、调整农业产业结构、

提高农民收益等方面具有重要作用^[1]。

扩增片段长度多态性 (amplified fragments length polymorphism, AFLP),是由荷兰科学家 Zabeau 和 Vos^[2]于 1993 年建立起来的一种新的分子标记技术。AFLP 由于具有多态性高、DNA 用量少、结果稳定性好等优点,在水稻、大豆、小

收稿日期:2014-05-26;修回日期:2014-10-15

基金项目:国家自然科学基金项目(31160288);内蒙古自然科学基金重点项目(2010ZD06)

作者简介:张永虎,博士研究生,研究方向为作物抗性遗传改良,电子邮箱:zhangyonghu0815@126.com;侯建华(通信作者),教授,研究方向为作物抗逆性状的遗传改良,电子邮箱:Houjh68@163.com

引用格式:张永虎,侯建华,吕品,等.向日葵 *Pst* I 和 *Mse* I 内切酶组合 AFLP 标记体系的建立及引物筛选[J].科技导报,2014,32(36):59-64.

麦、蚕豆、花生、燕麦等作物的种质资源遗传多样性研究、遗传图谱构建、基因标定、QTL定位分析、杂种优势预测等研究中得到了广泛的应用^[3-10]。截止目前,已有多种分子标记在向日葵研究中成功应用,如限制性内切酶片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)^[11]、简单重复序列(simple sequence repeats, SSR)^[12]、相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)^[13]等。应用 AFLP 标记,刘杰等^[14]鉴定了向日葵品种纯度, Mokrani 等^[15]构建出遗传图谱,黄先群等^[16]定位了体细胞胚胎发生率 QTL,所采用的酶切组合均为 *EcoR* I-*Mse* I。赵会彦等^[17]在油菜粒色性状研究中 AFLP 标记采用 *Pst* I 和 *Mse* I 组合,并转换为 SCAR 标记。杨娟等^[18]红花的 cDNA-AFLP 内切酶选择研究中,发现 *Pst* I 和 *Mse* I 内切酶组合酶切位点在基因组上分布分散,且具有更高的多态性。向日葵 AFLP 标记应用中还未见采用 *Pst* I-*Mse* I 组合的报道。

本研究在参考国内外相关文献的基础上,对影响 AFLP

标记的因素进行优化,建立适合向日葵 AFLP 标记的 *Pst* I-*Mse* I 组合反应体系,并应用优化体系筛选出标记向日葵材料的引物,旨在丰富向日葵 AFLP 标记的酶切组合,为 AFLP 标记在向日葵种质资源鉴定、遗传多样性分析、遗传图谱构建等方面的研究奠定技术基础。

1 材料和方法

1.1 材料

研究用向日葵为内蒙古农牧业科学院提供的自选系 K55 和 K58。自选系 K55 用于建立内切酶 *Pst* I 和 *Mse* I 组合 AFLP 反应体系,自选系 K55 和 K58 用于筛选引物。

1.2 试剂

研究用限制性内切酶 *Pst* I 和 *Mse* I 及 T4 DNA 连接酶均购自纽英伦生物技术(北京)有限公司; Mg^{2+} 、dNTPs、Taq DNA 聚合酶及 10×Buffer 均购于上海生物工程技术有限公司, AFLP 引物(表 1)由北京擎科生物技术有限公司合成。

表 1 用于向日葵 AFLP 分析的限制性内切酶接头及引物序列

Table 1 Adapters and primers sequences used in the AFLP analysis of sunflower

引物名称	序列	
	<i>Pst</i> I	<i>Mse</i> I
接头序列	top: 5'-CTC GTA GAC TGC GTA CA-3'	top: 5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3'
	bottom: 3'-TGC ACA TCT GAC GCA TGT-5'	bottom: 5'-TAC TCA GGA CTC AT-3'
预扩增引物	5'-GAC TGC GTA CAT GCA G-3'(P0)	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A-3'(M0)
选择性扩引物	P-GCT: 5'-GACTGCGTACATGCAGGCT-3'	M-GA: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAGA-3'
	P-GCC: 5'-GACTGCGTACATGCAGGCC-3'	M-GT: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAGT-3'
	P-CGA: 5'-GACTGCGTACATGCAGCGA-3'	M-GC: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAGC-3'
	P-CGT: 5'-GACTGCGTACATGCAGCGT-3'	M-GG: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAGG-3'
	P-CGC: 5'-GACTGCGTACATGCAGCGC-3'	M-TA: 5'-GATGAGTCCTGAGTAATA-3'
	P-GAT: 5'-GACTGCGTACATGCAGGAT-3'	M-TT: 5'-GATGAGTCCTGAGTAATT-3'
	P-CAC: 5'-GACTGCGTACATGCAGCAC-3'	M-TC: 5'-GATGAGTCCTGAGTAATC-3'
	P-CAT: 5'-GACTGCGTACATGCAGCAT-3'	M-TG: 5'-GATGAGTCCTGAGTAATG-3'
	P-CAG: 5'-GACTGCGTACATGCAGCAG-3'	M-AT: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAAT-3'
	P-TAG: 5'-GACTGCGTACATGCAGTAG-3'	

1.3 DNA 提取与检测

参照陈昆松^[19]改良 CTAB 法提取 DNA 并加以改进,经氯仿:异戊醇(体积比 24:1)抽提 2 次后,再用 1.5 倍 1×CTAB 沉淀 1 次 DNA,提高 DNA 的纯度。取 4 μL DNA 溶液用含 0.01% 核酸染料的 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳检测,以 2000 bp DNA Marker 作对照,电泳缓冲液为 1×TBE Buffer。电泳 20 min 后,取出胶板用 Biometra UVIdoc 凝胶成像系统仪照相,初步确定 DNA 的提取质量。

1.4 AFLP 体系的建立

1.4.1 酶切连接

酶切连接采用一步法。酶切片段和接头连接后,酶切位点侧翼的保护性序列已改变,不能被 *Pst* I 和 *Mse* I 内切酶识别^[20],本试验中同时进行酶切和连接,既简化了试验步骤,还保证了反应体系的准确性,确保试验结果准确。酶切连接体系总体积为 20 μL,包括 10×Buffer(NEB Buffer2) 2.0 μL,BSA (10 mg/mL) 0.2 μL,ATP (10 mmol/L) 0.4 μL, *Mse* I adapter

(50 pmol/ μL) 0.4 μL , *Pst* I adapter(5 pmol/ μL) 0.6 μL , *Mse* I (10 U/ μL) 0.5 μL , *Pst* I(20 U/ μL) 0.3 μL , T4 连接酶(350 U/ μL) 0.3 μL , 基因组 DNA(100~200 ng/ μL) 2.0 μL , ddH₂O 13.3 μL , 混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴。

以 K55 为实验材料,对酶切连接时间进行优化,设 5 个时间梯度(8、10、12、14、16 h)。酶切连接后用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4.2 预扩增

预扩增体系 20 μL , 组分为 10 \times PCR Buffer 2.0 μL , dNTP (2.5 mmol/L Each) 1.8 μL , Mg²⁺(50 mmol/L) 1.0 μL , 预扩增引物 M0(10 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μL , 预扩增引物 P0(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.6 μL , Taq-polymerase(5 U/ μL) 0.12 μL , 酶切连接产物 2.0 μL , ddH₂O 11.48 μL , 混匀离心后按以下程序扩增:94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min;

94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 80 s, 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。预扩增产物-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存用于选择性扩增。

1.4.3 选择性扩增优化

为获得清晰稳定的条带,参照徐微^[13]的方法对主要影响扩增效果的 Mg²⁺、dNTP、引物及模板浓度进行优化。

以 K55 为材料,对于 Mg²⁺和 dNTP 浓度,试验采用正交设计(表 2);引物浓度梯度分别设置为 0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mmol/L;模板浓度即预扩产物稀释倍数设置为 10、20、30、40、50 倍,分别进行单因素实验。选择性扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 30 s(每个循环降低 0.7 $^{\circ}\text{C}$), 72 $^{\circ}\text{C}$ 80 s, 12 个循环;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 80 s, 25 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,综合实验结果确定最佳选择性扩增体系。

表 2 Mg²⁺和 dNTP 正交试验设计

Table 2 Mg²⁺and dNTP orthogonal experiment design

序号	Mg ²⁺ /(mmol·L ⁻¹)	dNTP/(mmol·L ⁻¹)	序号	Mg ²⁺ /(mmol·L ⁻¹)	dNTP/(mmol·L ⁻¹)	序号	Mg ²⁺ /(mmol·L ⁻¹)	dNTP/(mmol·L ⁻¹)
1	1.6	0.20	4	2	0.20	7	2.4	0.20
2	1.6	0.25	5	2	0.25	8	2.4	0.25
3	1.6	0.30	6	2	0.30	9	2.4	0.30

1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳

20 μL 选择性扩增产物,加入 5 μL Loading Buffer, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min 后,在恒定功率 70 W、聚丙烯酰胺凝胶(60 mL 60 g/L PAGE 胶, 300 μL 100 g/L APS, 60 μL TEMED)中电泳 90 min。

1.6 银染及引物筛选

银染参照 Bassam 等^[21]提出的方法并加以改进,具体步骤:将凝胶置于 2000 mL 固定液(体积比为 20:1:180 的乙醇-冰乙酸-蒸馏水混合液)中固定 15 min;放入含 0.25% AgNO₃ 的银染液中轻轻摇动 15 min;蒸馏水速漂小于 30 s;立即放入显影液(60 g 氢氧化钠+8 mL 370 g/L 甲醛溶于 2 L 蒸馏水)中,显影至谱带清晰。

2 结果与分析

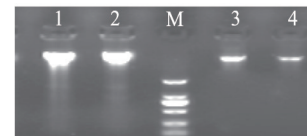
2.1 DNA 提取

AFLP 分析对 DNA 的纯度及完整性要求均较高,为确保基因组 DNA 的完整性和纯度,本研究对 CTAB 提取方法作了改良,采用氯仿-异戊醇抽提后又用 1 \times CTAB 进行 1 次沉淀。1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果表明(图 1),基因组 DNA 经 CTAB 多沉淀 1 次,虽然浓度有所降低,但杂质残留少且完整性好,在纯度上能够满足 AFLP 分析的要求。

2.2 AFLP 体系优化

2.2.1 酶切连接时间

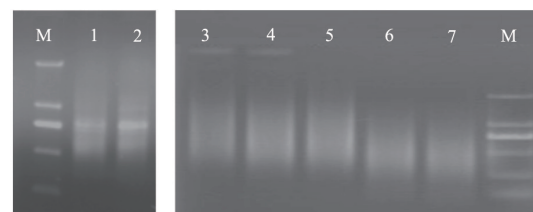
使用 *EcoR* I 和 *Mse* I 内切酶组合,酶切连接后在 750 bp 处有明显主带(图 2(a)),*Pst* I 和 *Mse* I 内切酶组合的酶切连



1,2—CTAB 法提取的 DNA;3,4—改良 CTAB 法提取的 DNA; Marker 从上到下依次为 2000、1000、750、500、200 和 100 bp

图 1 沉淀次数对基因组 DNA 纯度的影响
Fig. 1 Effects of precipitation time on genome DNA purity

接产物为弥散状。大多数情况下增加内切酶的量可缩短酶切时间,但随着内切酶用量的增加研究成本也会增加。本研究确定酶切体系中的 *Pst* I 和 *Mse* I 内切酶的用量分别为 6 和 5 U。



(a) E/M 组合酶切连接电泳结果 (b) P/M 组合酶切连接电泳结果

1—12 h;2—14 h;3—8 h;4—10 h;5—12 h;6—14 h;7—16 h; Marker 从上到下依次为 2000、1000、750、500、200 和 100 bp

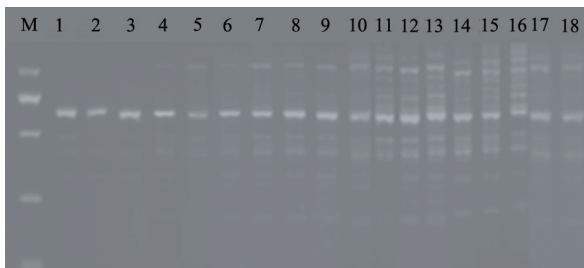
图 2 两种内切酶组合酶切连接电泳结果

Fig 2 Electrophoresis results of two kinds of incision enzyme combination after the cutting

确定内切酶 *Mse* I、*Pst* I 和 T4 连接酶用量分别为 5、6 和 105 U, 探索最佳酶切连接时间。研究表明(图 2(b)), 基因组 DNA 37°C 酶切 8 和 10 h 仍有残留, 12 h 后无残留 DNA, 但酶切片段稍大; 14 和 16 h 后片段主要集中在 100~1000 bp, 符合 AFLP 反应要求, 从缩短实验周期、节约时间角度考虑, 确定酶切连接时间为 14 h。

2.2.2 Mg^{2+} 和 dNTP 浓度

Mg^{2+} 是 Taq 酶的激活剂, dNTP 是 PCR 反应的原料。在反应体系中 dNTP 可与 Mg^{2+} 相互结合而互相影响 PCR 的效果, 故对 Mg^{2+} 和 dNTP 浓度进行二因素正交试验, 探索出最优的 dNTP 和 Mg^{2+} 组合。通过 3% 琼脂糖凝胶电泳检测各个组合下的扩增效果, 结果见图 3。



1, 2— Mg^{2+} 1.6 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L; 3, 4— Mg^{2+} 1.6 mmol/L, dNTP 0.25 mmol/L; 5, 6— Mg^{2+} 1.6 mmol/L, dNTP 0.3 mmol/L; 7, 8— Mg^{2+} 2 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L; 9, 10— Mg^{2+} 2 mmol/L, dNTP 0.25 mmol/L; 11, 12— Mg^{2+} 2 mmol/L, dNTP 0.3 mmol/L; 13, 14— Mg^{2+} 2.4 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L; 15, 16— Mg^{2+} 2.4 mmol/L, dNTP 0.25 mmol/L; 17, 18— Mg^{2+} 2.4 mmol/L, dNTP 0.3 mmol/L; Marker 从上到下依次为 1000、750、500、200 和 100 bp

图 3 Mg^{2+} 和 dNTP 浓度对选择性扩增的影响
Fig. 3 Effects of Mg^{2+} and dNTP in different concentrations on selective amplification

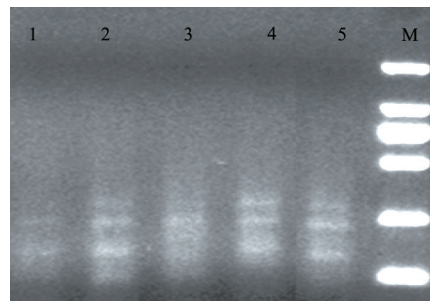
9 组扩增体系(表 2)设 2 个重复, 相邻泳道为 1 个组合, 每个组合的扩增效果不同。 Mg^{2+} 从 1.6 mmol/L 增至 2.0 mmol/L 扩增条带变亮; 增至 2.4 mmol/L 扩增效果反而变差, 带型模糊。固定 Mg^{2+} 浓度, 随着 dNTP 由 0.2 mmol/L 增至 0.3 mmol/L, 条带清晰度逐渐改善, 在 0.3 mmol/L 时能够稳定地扩增出清晰的条带, 符合 AFLP 的要求。因此确定体系中 Mg^{2+} 和 dNTP 浓度分别为 2 mmol/L 和 0.3 mmol/L 为最优浓度组合。

2.2.3 引物浓度

引物浓度也是影响扩增效果的主要因素之一, 实验设 5 个引物浓度梯度: 0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mmol/L, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 4 所示。从图 4 可以看出, 引物浓度从 0.3 mmol/L 递增到 0.6 mmol/L, 扩增条带逐渐变亮, 说明适量增加引物浓度可提高扩增效率, 但增加到 0.7 mmol/L, 扩增效果无显著改善, 因此确定选扩引物的浓度为 0.6 mmol/L。

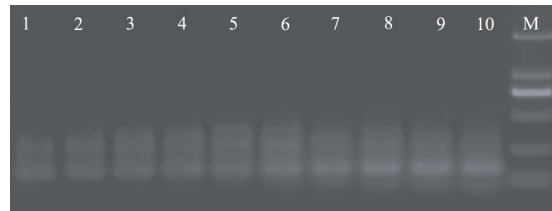
2.2.4 选择性扩增模板浓度

选择性扩增以预扩增产物为模板, 预扩增产物稀释倍数分别为 10、20、30、40、50 倍, 每组 2 个重复, 电泳结果如图 5。



1—0.3 mmol/L; 2—0.4 mmol/L; 3—0.5 mmol/L; 4—0.6 mmol/L; 5—0.7 mmol/L; Marker 从上到下依次为 2000、1000、750、500、200 和 100 bp

图 4 引物浓度对选择性扩增效果的影响
Fig. 4 Effects of primers concentration on selective amplification



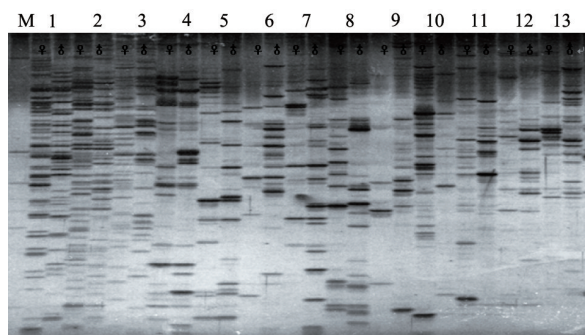
1, 2—10 倍; 3, 4—20 倍; 5, 6—30 倍; 7, 8—40 倍; 9, 10—50 倍; Marker 从上到下依次为 2000、1000、750、500、200 和 100 bp

图 5 预扩产物稀释倍数对选择性扩增的影响
Fig. 5 Effects of dilution ratios of pre-amplification products on selective amplification

由图 5 可见, 不同稀释倍数的模板即模板浓度对扩增效果并无显著影响, 但稀释 10 倍和 50 倍的模板扩增的条带不清晰, 预扩产物稀释 30 倍条带最清晰。

2.3 最佳反应体系的确定及引物筛选

为了验证所建立的向日葵 AFLP 反应体系是否稳定, 能否在引物组间普遍使用, 实验以 K55 和 K58 材料验证所建立的体系, 对 90 对 *Pst* I 和 *Mse* I 的引物组合进行初步筛选。结果得到多态位点均在 6 个以上的引物 48 对, 分别为 P-GCT/M-GT、P-GCT/M-GC、P-GCT/M-TA、P-GCC/M-GA、P-GCC/M-GT、P-GCC/M-GC、P-GCC/M-TA、P-GCC/M-TG、P-CGA/M-GA、P-CGA/M-GT、P-CGA/M-GC、P-CGA/M-TA、P-CGT/M-GG、P-CGT/M-GG、P-CGT/M-GA、P-CGT/M-GA、P-CGT/M-GT、P-CGT/M-GC、P-CGT/M-TA、P-CGT/M-TG、P-CGC/M-GG、P-CGC/M-GG、P-CGC/M-GT、P-CGC/M-GC、P-CGC/M-TA、P-CGC/M-TA、P-CGC/M-TT、P-CGC/M-TG、P-GAT/M-GT、P-GAT/M-TA、P-CAC/M-GG、P-CAC/M-GA、P-CAC/M-GT、P-CAC/M-GC、P-CAC/M-TA、P-CAC/M-TG、P-CAT/M-GG、P-CAT/M-GG、P-CAT/M-GA、P-CAT/M-TA、P-CAT/M-TT、P-CAG/M-GT、P-CAT/M-GC、P-CAT/M-TA、P-CAT/M-TG、P-TAG/M-GT、P-TAG/M-TA、P-TAG/M-TG (图 6)。



1—P-GCT/M-GT; 2—P-GCT/M-GC; 3—P-GCT/M-TA;
4—P-GCC/M-GA; 5—P-GCC/M-GT; 6—P-GCC/M-GC;
7—P-GCC/M-TA; 8—P-GCC/M-TG; 9—P-CGA/M-GA;
10—P-CGA/M-GT; 11—P-CGA/M-GC; 12—P-CGA/M-TA;
13—P-CGT/M-GG; Marker 从上到下依次为 800、700、600、500、
400、300、200 和 100 bp; ♀ 为自选系 K55; ♂ 为自选系 K58

图6 13对引物组合对自选系K55和K58的扩增效果

Fig. 6 Amplification effects of self-selection K55 and K58 on 13 pairs of primers

3 讨论

AFLP标记技术涉及到的步骤多、影响因素也较多,在实际的操作中容易出现的问题,导致扩增失败。因此,从DNA提取、酶切连接、PCR到电泳、银染,每个环节都必须满足分析技术要求,才能得到最佳的分析结果。

提取高质量的基因组DNA是AFLP标记实验成功的关键。向日葵叶片中酚类含量较高,容易造成提取的DNA中酚类含量较高,这样会干扰内切酶与模板的结合,导致酶切不充分。因此,本研究采用改进CTAB法提取DNA,即采用氯仿-异戊醇代替酚氯仿抽提。由于氯仿-异戊醇易溶于乙醇,容易去除,克服了由于酚等的残留带来的酶切上的困难^[21]。向日葵基因组较大,对机械剪切敏感,因此抽提次数过多会打碎DNA,本研究在2次抽提后再用1×CTAB沉淀1次,既保证了蛋白等杂质的去除,又尽量减少DNA的断裂。此外,在提取过程中加液时沿管壁缓慢加入,也可减少DNA的物理剪切。

酶切连接也是AFLP标记成功的关键环节之一。大多数内切酶的最适温度都是37℃,而连接酶一般在较宽温度范围内都具有活性,说明酶切连接可以同时进行,不受温度影响。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*Pst* I和*Mse* I就不能识别酶切位点^[20]。刘秀菊等^[23]在蚕豆AFLP分析中用“一步法”可完成酶切-连接,即连接反应可在37℃进行。本研究选用的*Mse* I和*Pst* I的最适温度为37℃,酶切连接也选用一步法,可以使2种内切酶和连接酶都能在最适温度下充分反应。这样既简化了分析步骤,又减少多个步骤衔接中出现的错误,保证了反应体系的准确性,分析结果较理想。连接成功与否不能直

接检测,只有通过预扩增进行判断。如果预扩增有稳定产物,则说明连接成功。本研究预扩增得到稳定的产物,且产物弥散在200~750 bp之间,表明所用的预扩增体系达到要求,因此不需再做优化。

利用AFLP标记分析基因组,选择合适的内切酶很重要,一般使用的限制性内切酶有两类,一类是识别位点为4碱基的高频剪切酶(frequent cutter),如*Mse* I和*Taq* I;另一类是识别位点为6碱基的低频剪切酶(rare cutter),如*Pst* I、*EcoR* I、*Sac* I和*Apa* I等。由于*Mse* I内切酶相对于其他内切酶而言,可产生较小且分布均匀的片段,是一种理想的多切点酶,考虑到本研究供试材料向日葵的基因组较大(约 1.8×10^9 bp),故选择了该内切酶,另一种内切酶选择了侧翼保护碱基序列比较短的*Pst* I内切酶^[24,25]。不同的内切酶对碱基修饰的敏感程度不同,检测位点在染色体上的分布范围也存在很大的差异。*EcoR* I对甲基化胞嘧啶比较敏感,着丝粒附近的碱基序列富含甲基化胞嘧啶,*EcoR* I-*Mse* I的检测位点主要集中在着丝粒附近,而*Pst* I对甲基化胞嘧啶不敏感,*Pst* I-*Mse* I检测位点在整个基因组的分布比较均匀^[24]。本研究使用*EcoR* I-*Mse* I组合进行酶切,效果不理想,检测酶切连接产物在750 bp处有明显的主带,酶切片段大小差异不大,多态性不高;而*Pst* I-*Mse* I酶切连接产物在100~1000 bp呈弥散状分布,选择性扩增产物凝胶电泳检测,条带清晰,且多态性高,这与杨娟等^[18]在红花上的研究结果相似,故以*Pst* I-*Mse* I组合为酶切手段。AFLP分子标记技术对模板DNA的浓度不敏感^[19,24,26],但选择性扩增模板DNA浓度太大时,易发生拖尾现象,带型模糊,影响分辨率;太小时,显带很弱或显不出带,影响统计分析。本研究中酶切连接产物的浓度适宜,不需要稀释就可以直接进行预扩增,但预扩产物需稀释30倍后用于选择性扩增,这样既保证了拥有足够的DNA模板,又得到了清晰的电泳图谱。

4 结论

选用*Pst* I-*Mse* I组合建立了向日葵AFLP-PCR的最佳反应体系。即采用改良CTAB法提取DNA,酶切连接一步法时间是14 h,预扩产物稀释30倍作为选择性扩增的模板,选择性扩增中 Mg^{2+} 和dNTP浓度分别为2 mmol/L和0.3 mmol/L、选扩引物浓度为0.6 mmol/L时效果最好。使用建立的体系从90对引物组合中筛选出了48对扩增条带清晰、多态性好的引物组合。

参考文献(References)

- [1] 曾云. 向日葵在中国的传播及其影响[J]. 古今农业, 2005(1): 71-79.
Zeng Yun. The spread of sunflower and its influence in China[J]. Ancient and Modern Agriculture, 2005(1): 71-79.
- [2] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [3] 翁跃进. AFLP——一种DNA分子标记新技术[J]. 遗传, 1996, 18(6):

- 29-31.
- Weng Yuejin. AFLP: A novel technique for DNA molecular marker[J]. *Hereditas*, 1996, 18(6): 29-31.
- [4] 蔡健. 应用 AFLP 技术检测水稻遗传多样性的研究[J]. *中国农学通报*, 2002, 18(4): 1-6.
- Cai Jian. Application of AFLP markers to genetic diversity studies of rice[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2002, 18(4): 1-6.
- [5] 田清震, 盖均镹, 喻德跃, 等. 我国野生大豆与栽培大豆 AFLP 指纹图谱研究[J]. *中国农业科学*, 2001, 34(5): 456-468.
- Tian Qingzhen, Gai Junyi, Yu Deyue, et al. AFLP fingerprint analysis of *G. soja* and *G. max* in China[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2001, 34(5): 456-468.
- [6] 郝晨阳, 王兰芬, 董玉琛, 等. 我国西北春麦区小麦育成品种遗传多样性的 AFLP 分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2003, 4(4): 285-291.
- Hao Chenyang, Wang Lanfen, Dong Yuchen, et al. Genetic diversity of wheat varieties released in northwest spring wheat region revealed by AFLP[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2003, 4(4): 285-291.
- [7] 张镛, 丁毅. 基于 AFLP 标记的中国西藏近缘野生大麦遗传多样性分析[J]. *遗传*, 2007, 29(6): 725-730.
- Zhang Di, Ding Yi. Genetic diversity of wild close relatives of barley in Tibet of China revealed by AFLP[J]. *Hereditas*, 2007, 29(6): 725-730.
- [8] 刘秀菊, 任俊云, 宗绪晓. 蚕豆 AFLP 技术体系的建立与优化[J]. *植物遗传资源学报*, 2007, 8(2): 153-158.
- Liu Xiujun, Ren Junyun, Zong Xuxiao, et al. Establishment and optimization of AFLP for faba bean[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2007, 8(2): 153-158.
- [9] 彭文舫, 姜慧芳, 任小平, 等. 花生 AFLP 遗传图谱构建及青枯病抗性 QTL 分析[J]. *华北农学报*, 2010, 25(6): 81-86.
- Peng Wenfang, Jiang Hui Fang, Ren Xiaoping, et al. Construction of AFLP genetic linkage map and detection of QTLs for bacteria wilt resistance in peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2010, 25(6): 81-86.
- [10] 徐微, 张宗文, 吴斌. 裸燕麦 AFLP 反应体系的优化[J]. *植物遗传资源学报*, 2009, 10(2): 190-194.
- Xu Wei, Zhang Zongwen, Wu Bin. Optimization of AFLP reaction system in *avena nuda*[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2009, 10(2): 190-194.
- [11] Gentzbittel L, Vear F, Zhang Y X, et al. Development of a consensus linkage RFLP map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.)[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 90(7-8): 1079-1086.
- [12] 黄先群, Genzbitelle L, Fabre F, 等. SSR 分子标记丰富向日葵 (*Helianthus annuus* L.) 遗传图谱的研究[J]. *西南农业学报*, 2012, 25(3): 1031-1038.
- Huang Xianqun, Genzbitell L, Fabre F, et al. Indication of genetic linkage map for sunflower by SSR markers[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 25(3): 1031-1038.
- [13] 于志贤, 侯建华. 油菜 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(33): 296-301.
- Yu Zhixian, Hou Jianhua. Establishment and optimization of SRAP-PCR reaction in sunflower[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29(33): 296-301.
- [14] 刘杰, 刘公社, 齐冬梅, 等. 向日葵品种鉴定和纯度分析的 AFLP 研究[J]. *植物学通报*, 2002, 19(4): 444-451.
- Liu Jie, Liu Gongshe, Qi Dongmei, et al. Study on AFLP markers used in identification and genetic purity test of sunflower (*Helianthus annuus* L.)[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2002, 19(4): 444-451.
- [15] Mokrani L, Gentzbittel L, Azanza F, et al. Mapping and analysis of quantitative trait loci for grain oil content and agronomic traits using AFLP and SSR in sunflower (*Helianthus annuus* L.)[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 106: 149-156.
- [16] 黄先群, Fabre F, 刘竹梓, 等. 向日葵体细胞胚的 QTL 分析及标记辅助选择[J]. *中国油料作物学报*, 2013, 35(5): 524-532.
- Huang Xianqun, Fabre F, Liu Zhuzi, et al. Analysis of somatic embryogenesis QTL and marker-assisted in sunflower (*Helianthus annuus* L.)[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2013, 35(5): 524-532.
- [17] 赵会彦, 肖麓, 杜德志. 青海大黄油菜粒色性状 AFLP 标记的筛选和 SCAR 标记转化[J]. *中国油料作物学报*, 2013, 35(5): 476-483.
- Zhao Huiyan, Xiao Lu, Du Dezhi. AFLP and SCAR markers for seed colour in rape dahuang (*Brassica rapa* L.)[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2013, 35(5): 476-483.
- [18] 杨娟, 郭美丽. 红花 cDNA-AFLP 限制性内切酶的选择及银染体系的建立[J]. *药学实践杂志*, 2009, 27(6): 421-425.
- Yang Juan, Guo Meili. Choice of restriction endonuclease and establishment of silver-staining method in cDNA-AFLP system for *carthamus tinctorius*[J]. *Journal of Pharmaceutical Practice*, 2009, 27(6): 421-425.
- [19] 陈昆松, 李方, 徐昌杰, 等. 改良 CTAB 法用于多年生植物组织基因组 DNA 的大量提取[J]. *遗传*, 2004, 26(4): 529-531.
- Chen Kunsong, Li Fang, Xu Changjie, et al. An efficient macro-method of genomic DNA isolation from *actinidia chinensis* leaves[J]. *Hereditas*, 2004, 26(4): 529-531.
- [20] 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: 162-181.
- Zhou Yanqing. The application of DNA molecular markers in plant research[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 162-181.
- [21] Bassam B J, Caetano-anolles G, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels[J]. *Analytical Biochemistry*, 1991, 196(1): 80-83.
- [22] 王景雪, 孙毅, 高武军. 一种简便实用的植物总 DNA 提取方法[J]. *山西大学学报: 自然科学版*, 2000, 23(3): 271-272.
- Wang Jingxue, Sun Yi, Gao Wujun. A simple of practical method for extracting plant total DNA[J]. *Journal of Shanxi University: Science & Technology Edition*, 2000, 23(3): 271-272.
- [23] 刘秀菊, 任俊云, 宗绪晓, 等. 蚕豆 AFLP 技术体系的建立与优化[J]. *植物遗传资源学报*, 2007, 8(2): 153-158.
- Liu Xiujun, Ren Junyun, Zong Xuxiao, et al. Establishment and optimization of AFLP for faba bean[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2007, 8(2): 153-158.
- [24] Barrett B A, Kidwell K K. AFLP-based genetic diversity assessment among wheat cultivars from the Pacific Northwest[J]. *Crop Science*, 1998, 38(5): 1261-1271.
- [25] Mirostow T. A simplified AFLP method for fingerprinting of common wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars[J]. *Journal of Applied Genetics*, 2002, 43(2): 131-143.
- [26] Wu Y, Huang Y, Tauer C G, et al. Genetic diversity of sorghum accessions resistant to greenbugs as assessed with AFLP markers[J]. *Genome*, 2006, 49(2): 43-149.

(责任编辑 王媛媛)