

AFLP 标记技术及其在花生上的应用研究

郭静佩¹, 王晓林², 周 鹏¹, 周延清^{1*}

(1. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007; 2. 驻马店农业科学研究所, 河南 驻马店 463000)

摘要: AFLP 是检测 DNA 多态性的一种分子标记技术。综述了该技术原理、方法、特点及其在花生遗传多样性、抗性相关分子标记、根瘤菌、指纹图谱等方面应用的研究进展。

关键词: AFLP; 分子标记; 花生; 应用

中图分类号: S565.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)02-0012-04

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Technique and Its Research Progress in Peanut

GUO Jing-pei¹, WANG Xiao-lin², ZHOU Peng¹, ZHOU Yan-qing^{1*}

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxing 453007, China;

2. Zhumadian Agricultural Sciences Institute, Zhumadian 463000, China)

Abstract: Amplified fragment length polymorphism (AFLP) is one of molecular marker techniques to detect DNA polymorphism. In this paper, the basic principle, characters and technical process of AFLP molecular marker were reviewed. Its applications in genetic diversity, resistance related marker, peanut rhizobia, fingerprinting and its prospect in peanut were also summarized.

Key words: AFLP; Molecular marker; Peanut; Application

花生是世界范围内广泛栽培的油料作物与经济作物,具有较高的经济价值、高含油量以及丰富的蛋白质,在世界 100 多个国家广泛种植。随着科学技术和经济的发展,国际资源交流和相互引种日益增多,资源的保护以及与资源有关的知识产权的保护逐渐受到人们的重视,相应的技术方法也随之产生。

扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP), 是 1993 年由荷兰科学家 Zabeau 等^[1] 发展起来的一种检测 DNA 多态性的方法。该方法结合了 RFLP (restriction fragment length polymorphism) 技术和 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 技术的特点, 既具有 PCR 的高效性、安全性和方便性的特点, 又具有 RFLP 可靠性好、重复性高的优点, 不需要了解基因组信息, 只需少量纯化的基因组 DNA 即可对整个基因组 DNA 酶切片段进行选择性的扩增, 适合于所有基因组的检测^[2]。它被广泛应用于各种生物方面

的研究。与其他农作物相比, AFLP 技术在花生上的研究范围和深度远远落后于其他农作物, 为此, 就 AFLP 分子标记技术的基本原理、技术流程、特点及其在花生领域的研究进行综述。

1 AFLP 的原理和技术流程

1.1 AFLP 技术的原理

AFLP 的基本原理是先利用限制性内切酶酶切基因组 DNA 产生不同大小的 DNA 片段, 然后在两端接上双链人工接头的酶切片段, 作为扩增反应的模板 DNA。接着用特定的引物 (人工接头的互补链) 进行预扩增, 随后进行选择性扩增, 最后通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离检测获得 DNA 扩增片段, 根据扩增片段长度的不同检测出多态性。利用一套特定的引物在未知 DNA 序列的情况下, 可在 1 次单个反应中检测大量片段。AFLP 扩增可获得在某一品种出现而在另一品种不出现的特定 DNA 谱

收稿日期: 2010-08-03

基金项目: 河南省基础与前沿技术研究计划项目 (092300410009)

作者简介: 郭静佩 (1984-), 女, 河南济源人, 在读硕士研究生, 研究方向: 微生物遗传。E-mail: guojingpei@126.com

* 通讯作者: 周延清 (1963-), 男, 河南邓州人, 教授, 博士, 主要从事作物和微生物遗传与育种研究。E-mail: 041020@htu.cn

带^[3]。因此,通过限制性酶切和 PCR 扩增后得到的 DNA 多态性可作为一种分子标记。

进行 AFLP 分析时,一般应用 2 种限制性内切酶对基因组 DNA 进行酶切,一种为低频剪切酶,识别位点为六碱基的内切酶;另一种为高频剪切酶,识别位点为四碱基的内切酶。双酶切产生的 DNA 片段长度一般小于 500 bp,在 AFLP 反应中可被优先扩增,扩增产物可被很好地分离,因此一般多采用稀有切点限制性内切酶与多切点限制性内切酶相搭配使用的双酶切^[4]。目前常用的 2 种酶是 4 个识别位点的 *Mse* I 和 6 个识别位点的 *Eco* R I。

AFLP 接头和引物都是由人工合成的双链核苷酸序列。AFLP 接头一般长 14~18 个碱基对,由 1 个核心序列和 1 个酶专化序列组成。常用的多为 *Eco* R I 和 *Mse* I 接头,接头、与接头相邻的酶切片段的碱基序列是引物的结合位点^[5]。AFLP 引物包括 3 部分:(1)5' 端的核心碱基序列;(2)限制性内切酶特定序列;(3)3' 端选择性碱基序列。由于引物的核心序列与接头部分相对应,因此,两者遵循相同的设计原则:(1)限制性片段与对应的接头连接应保证原限制性内切酶位点不得恢复;(2)具有合适的 G、C 含量,一般 G+C 的含量大于 50%;(3)接头不进行磷酸化,避免接头间自连接。

1.2 AFLP 分子标记技术流程

AFLP 反应程序主要包括模板 DNA 制备,酶切片段扩增及凝胶电泳分析 3 个步骤。

1.2.1 模板 DNA 制备 DNA 的酶切以及与人工合成的寡聚核苷酸接头连接。在进行 AFLP 分析时,首先要制备高分子量基因组 DNA,然后用限制性内切酶酶切(为了使酶切片段大小分布均匀,一般采用双酶酶切),DNA 酶切完成后,经加热使限制性内切酶失活,再把酶切片段连接到特定的接头上,形成扩增反应的模板。

1.2.2 选择性扩增酶切片段 一般酶切片段要经过连续 2 次 PCR 扩增。第 1 次 PCR 扩增为预扩增,一般用带 1 个选择性碱基的引物进行,第 2 次为选择性扩增,即预扩增反应的产物经过大量稀释后用作第 2 次扩增反应,所用引物 3' 端有 3 个选择性碱基。经两步扩增反应使产生的扩增结果更清楚、重复性更好。

1.2.3 扩增产物的凝胶电泳分析 选择性扩增产物一般在 5%~6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶上经过电泳分离,形成 DNA 指纹,凝胶经过干燥、放射性自显影后进行相应的产物检测。目前最常用的方法是银染检测法。

2 AFLP 技术的特点和不足之处

2.1 AFLP 技术的特点

2.1.1 样品用量少,检测效率高 AFLP 检测所需要的样品 DNA 量较少,通常为 0.5 μg。Ervera 等仅利用 2 个 AFLP 引物组合就揭示了从西班牙收集到的 67 个不同葡萄样品间的遗传相似性^[6]。

2.1.2 多态性高 在任何情况下,PCR 扩增都会产生大量反映生物个体内变异或非变异的条带。AFLP 标记具有比 RFLP、RAPD 标记经济、有效、可靠地揭示物种多态性水平的特点。李传友等^[7]将 AFLP 标记与 RFLP、RAPD 标记进行了比较,认为鉴别多态的功能顺序是 AFLP> RAPD> RFLP, AFLP 是 DNA 多态性检测的一项重要技术。

2.1.3 可靠性好,重复性高 PCR 反应中较高的退火温度和较长的引物可将扩增反应中的错误减少,使假阳性降低,可靠性增强。不断重复的 AFLP 反应显示出了其近乎完美的可重复性。Jones 等^[8]研究表明,在欧洲 8 个不同实验室对同种材料进行 AFLP 标记分析,其误差小于 0.6%,与微卫星标记的效果相近。

2.1.4 对模板浓度的变化不敏感 模板浓度在相差 1000 倍的范围内可得到基本一致的结果。只是模板浓度很低时,谱带强度较弱,有谱带发生缺失。

2.1.5 操作相对简便且样品适应性广 AFLP 技术不需要 Southern 杂交,不需要制备探针,且不需要预先知道被分析基因组 DNA 的序列信息,操作较简单,易于标准化和自动化。AFLP 技术适用于任何来源和各种复杂度的 DNA,如基因组 DNA、cDNA、质粒、某一个基因或基因片段,且不需要预知这些 DNA 的序列特征。用同样一套限制酶、接头和引物,可对各种生物的 DNA 进行分子遗传标记研究^[2]。

2.1.6 稳定的遗传性 AFLP 标记在后代中的遗传和分离中符合 Mendel 式遗传规律,种群中的 AFLP 标记位点遵循 Hardy-Weinberg 平衡。

2.1.7 分辨率高 理论上 AFLP 可产生无限多的标记数并可覆盖整个基因组,其中至少一些标记会存在变异区域,因此可以揭示任何生物有机体的十分细微的遗传差异。

2.2 AFLP 分子标记的不足

虽然 AFLP 具有多态性丰富、灵敏度高、稳定性好、可靠性高、不易受环境影响等优点,但也存在着一些缺点,如由于 AFLP 技术所用试剂昂贵,操作步骤多,任何步骤的失误均可导致整个试验失败。

AFLP 分析需要同位素或非同位素标记引物,因此在操作过程中必须具有特殊的防护措施以及配套的仪器设备。AFLP 对 DNA 纯度和内切酶的质量要求较高,基因组 DNA 酶切不完全会影响试验结果等。同时 AFLP 也存在着对模板反应迟钝、谱带可能发生错配与缺失等一系列问题。此外, AFLP 作为一项专利技术,受到专利权保护,使用成本比较高,还有资料表明,该方法在鉴别同源标记即等位基因时还有一定的难度,在对等位基因的精确定位中存在一定的局限性^[9]。

3 AFLP 在花生上的应用

3.1 遗传多样性研究

开展遗传多样性研究有利于正确制定植物资源收集保存策略,制定植物遗传多样性检验和分析方法。对花生育种工作者而言,种质资源的遗传多样性及其亲缘关系信息尤为重要。因此,研究人员对花生的遗传多样性进行了广泛而深入的研究。陈强等^[10]对 32 个来源于中国不同产地的花生品种进行了 AFLP 指纹图谱及相似性聚类分析。结果表明:所有供试花生品种的遗传相似性为 35%,在 45% 的相似性水平上分为 3 个群,表明中国花生品种存在遗传多态性。

Liezel^[11]采用 AFLP 分析评价了 21 个南非栽培花生基因组型的遗传多样性,并对使用的 2 种酶进行了比较,但 2 种酶组合都能有效检测密切相关的栽培花生内遗传多样性,并对使用的 2 种酶组合 *EcoRI* / *MseI* 和 *MluI* / *MseI* 进行了比较。结果表明,尽管 *EcoRI* / *MseI* 比 *MluI* / *MseI* 酶组合检测出更多的各个引物片段组合,分别为 67.8 个和 29.7 个,但是 2 种酶组合都能有效检测密切相关的栽培花生内遗传多样性。

夏友霖等^[12]对来自川渝地区的 2 个亚种 4 个类型的 43 份主要花生种质资源和主要推广品种的基因组 DNA 进行 AFLP 分析,120 对引物中每对引物扩增出 30~110 条带,平均约 60 条带。其中 54 对引物扩增后产生多态性带共 89 条,每对引物产生 1~6 条,平均每对引物产生 1.648 条差异条带。结果表明,川渝地区花生品种存在遗传多样性。

3.2 抗性相关分子标记研究

化学药剂对花生病害的防治效果并不理想。据报道,药剂防效一般在 60% 左右^[13-14]。种植抗病品种(系)仍是防治花生病害的有效方法。花生对黄曲霉菌侵染的抗性,是以种皮的特殊生化成分及种皮的完整性抵御黄曲霉菌的侵染与定殖,从而减低或

避免花生中的黄曲霉毒素污染。雷永等^[15]利用抗、感黄曲霉侵染的花生品种为亲本配制杂交组合“中花 5 号 × J11”,以其 F₂ 分离群体为研究材料,采用 AFLP 技术和 BSA 分析方法,获得了与花生曲霉菌侵染抗性连锁的 2 个分子标记,标记与抗性间的遗传距离分别为 8.8 cM 和 6.6 cM;并且利用获得的分子标记对抗、感黄曲霉的花生种质资源进行了分子鉴定。

姜慧芳等^[16]以栽培种花生 2 个亚种 4 个植物学类型的 31 份对青枯病具有不同抗性的种质为材料,通过 AFLP 和 SSR 技术分析了其 DNA 多样性,并与通过形态和种子品质性状揭示的表型多样性进行了比较。结果表明,不同类型的抗青枯病花生品种之间存在丰富的 DNA 多样性,SSR 揭示的品种间遗传距离大于 AFLP 揭示的品种间遗传距离,基于二者的聚类分析结果趋势一致,结合花生的植物学类型、地理来源和系谱分析,以 SSR 的聚类结果与表型性状的聚类结果更为吻合。

侯慧敏等^[17]利用抗、感锈病花生品种为亲本,配制了杂交组合远杂 9102 × ICGV86699,并利用 AFLP 技术和 BSA 法对其 F₂ 分离群体进行了分析。结果表明,ICGV86699 叶部均无夏孢子堆,表现为高抗,远杂 9102 发病较重,表现为高感。对该组合 F₂ 群体的 130 个单株进行抗性鉴定,叶部无夏孢子堆的植株为抗病,反之为感病。同时也获得了与锈病抗性连锁的 2 个分子标记,与抗性基因间的遗传距离分别为 10.90 cM 和 7.89 cM。根据抗性鉴定结果,经 χ^2 测验,锈病抗性符合 3 : 1 的分离比例。接着利用上面提到的分子标记对 F₃ 群体的 47 份材料进行验证,其中有 6 份抗病材料在 F₃ 群体发生了分离,抗感比例接近于 3 : 1,其余的 41 份材料没有发生分离。其中标记 M3L3-460 在 30 个抗性材料中均有带,而在 17 个感病材料中均没有带,分子标记与抗性的符合率达 100%。

3.3 构建花生指纹图谱

AFLP 标记是选择扩增基因组 DNA 酶切片段所产生的多态性,这种多态性是因扩增片段的长度不同而被检测出来的。AFLP 标记分辨率高,结果可靠,因而非常适合绘制品种的指纹图谱。

翁跃进等^[18]利用 AFLP 技术对从国际半干旱所(ICRISAT)引进的 9 份花生抗旱品种绘制指纹图谱,通过引物 E-ACA 和与之匹配的 M-CAG 和 M-CAT,在 300~6000 bp 的范围内共获得 1577 条 AFLP 扩增产物,每个品种有主带和次带至少 71 条,其中 10 条为多态性的条带。He 等^[19]利用

AFLP 技术对花生栽培种进行多态性鉴定, 64 对 AFLP 引物中有 28 对检测出 DNA 多态性。

3.4 花生根瘤菌研究

AFLP 技术在花生根瘤菌研究也有着广泛的应用。

3.4.1 花生根瘤菌竞争结瘤的研究 陈强等^[20] 以 5 株慢生型花生根瘤菌和天府 3 号花生为材料, 用 AFLP 技术研究了慢生型花生根瘤菌 Spr2-9、Spr3-3、Spr3-5、Spr4-5 和 Spr7-1 的遗传特性和竞争结瘤能力。结果显示, 传代次数对菌株的遗传性状无明显影响。将供试慢生型花生根瘤菌分别接种天府 3 号花生, 光照培养 30 d 后, 随机各取 4 个根瘤, 从根瘤中提取类菌体 DNA 进行 AFLP 分析, 各根瘤类菌体 DNA 的 AFLP 指纹图谱与该菌株纯培养物 AFLP 指纹相同。将 5 个菌株混合接种天府 3 号花生, 不同菌株的占瘤率存在差异, Spr3-3 和 Spr3-5 的竞争结瘤能力最强, 两菌株的占瘤率之和为 85.4%, Spr2-9 的竞争结瘤能力最差。

3.4.2 花生根瘤菌的遗传多样性 张小平等^[21] 采用 AFLP 分子标记技术, 对分离自中国、津巴布韦、以色列的 133 株慢生花生根瘤菌和 13 个代表菌株的 DNA 扩增长度多态性进行了分析, 并根据各供试菌株的遗传相似性进行了聚类分析。结果表明, 慢生花生根瘤菌的 AFLP 有很高的多态性, 每个菌株的谱带均与其他菌株完全不同, 这充分说明花生根瘤菌群体内存在的遗传多样性。

4 展望

AFLP 分子标记应用于花生方面的研究, 目前多集中于花生遗传多样性、构建花生指纹图谱等方面的研究^[22-23]。虽然花生的分子标记研究取得了一定的成果, 但还有许多方面工作有待深入研究。今后应重视应用有效的 AFLP 分子标记技术对花生属种质资源的亲源关系、分子标记辅助育种、遗传图谱构建以及优质、抗病等优良基因的发掘等方面的研究, 为花生的品种改良提供重要的理论依据。

参考文献:

[1] Vos P, Hongers R, Bleeker M, *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(21): 4407-4414.
[2] 王青山, 李葱葱. AFLP 分子标记技术及应用研究进[J]. *吉林农业科学*, 2005, 30(6): 29-33.
[3] Wan C L, Tan Y D. An improvemental ental method of

AFLP[J]. *Journal of Nanjing Normal University*, 1999, 22(2): 87-91.
[4] Powell W, Morgant E M, Andre C. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR markers for germplasm analysis[J]. *Molecular Breeding*, 1996, 2(3): 225-238.
[5] 王斌, 翁曼丽. AFLP 的原理及其应用[J]. *杂交水稻*, 2003(5): 27-30.
[6] 苟本富, 邹国林. AFLP 分子标记技术及其应用研究进展[J]. *渝西学院学报*, 2002, 15(1): 23-29.
[7] 李传友, 郑洪刚, 翁曼丽, 等. 光敏核不育水稻等位突变的 AFLP 分析[J]. *生物工程学报*, 2000, 16(1): 91-95.
[8] Jones C J, Edwards K J, Castaglion E S *et al.* Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a net work of European laboration[J]. *Molecular Breed*, 1997, 3: 381-390.
[9] Mueller U G, Wolfenbarger L L. AFLP genotyping and fingerprinting[J]. *Trends Ecol Evol*, 1999, 14(10): 389-394.
[10] 陈强, 张小平, 李登煜, 等. 我国主要花生品种的 AFLP 分析[J]. *应用与环境生物学报*, 2003, 9(2): 117-121.
[11] Liezel H. Genetic variation among Southem African cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes as revealed by AFLP analysis[J]. *Euphytica*, 2003, 133: 319-327.
[12] 夏友霖, 李加纳. 川渝地区花生品种遗传多样性分析[J]. *中国油料作物学报*, 2008, 30(3): 300-305.
[13] 杨兆森, 李有志. 陕西关中花生叶部病害的种类与防治[J]. *中国油料*, 1997, 19(2): 48-50.
[14] 吴献忠, 张卫, 李荣花, 等. 花生网斑病研究进展[J]. *莱阳农学院学报*, 2000, 17(4): 294-297.
[15] 雷永, 廖伯寿, 王圣玉, 等. 花生黄曲霉侵染抗性的 AFLP 标记[J]. *作物学报*, 2005, 31(10): 1349-1353.
[16] 姜慧芳, 廖伯寿. 抗青枯病花生种质的遗传多样性[J]. *作物学报*, 2006, 32(8): 1156-1165.
[17] 侯慧敏, 廖伯寿, 雷永, 等. 花生锈病抗性的 AFLP 标记[J]. *中国油料作物学报*, 2007, 29(2): 195-198.
[18] 翁越进, Gurtu S, Nigam S N. 花生 AFLP 指纹图谱[J]. *中国油料作物学报*, 1999, 21(1): 10-12.
[19] He G, Prakash C S. 用 DAF 和 AFLP 方法对花生栽培种作多态性鉴定[J]. 蔡骥业, 译. *花生科技*, 1998, 27(4): 35-37.
[20] 陈强, 张小平, 李登煜, 等. 慢生型花生根瘤菌 16S rRNA 分析[J]. *应用与环境生物学报*, 1999, 5(3): 315-319.
[21] 张小平, 陈强, 李登煜, 等. 用 AFLP 技术研究花生根瘤菌的遗传多样性[J]. *微生物学报*, 1999, 39(6): 483-488.
[22] 王传堂, 杨新道, 于翔, 等. DNA 分子标记技术在花生品种鉴定上的应用研究[J]. *华北农学报*, 2006, 21(增刊): 110-113.
[23] 李林, 李煦. 遗传标记及其在生物技术中的应用[J]. *现代农业科技*, 2010(10): 39-40.