

玉米骨干自交系 AFLP 指纹图谱鉴定*

高世斌¹, 李晚忱¹, 荣廷昭¹, 陈永燕²

(1. 四川农业大学 玉米研究所, 四川 雅安 625014; 2. 中国科学院 昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

摘要: 用引物组合 EcoRI-AGG/MseI CAA 对我国 19 个玉米骨干自交系进行 AFLP 指纹图谱, 平均对每个自交系扩增出近 70 条带, 其中近 40 条带具有多态性, Mo17、A318、ES21 分别有自己的特征带。结果表明, 利用 AFLP 标记总 DNA, 能够从基因组上明确区分玉米自交系, 可以用于玉米自交系种质鉴定。

关键词: AFLP; 玉米; 自交系; 指纹图谱

中图分类号: S513.032 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2650(2001)02-0126-03

种质鉴定是玉米自交系利用和知识产权保护的技术依据。目前, 我国的种质鉴定以形态性状为上, 参考同工酶和种子贮藏蛋白电泳图谱。形态性状的表现受环境影响, 鉴定工作量大、周期长、受季节限制, 而且我国尚未制定出统一的鉴定标准。同工酶和种子贮藏蛋白的多态性不够丰富, 难以区分为数众多且系谱复杂的自交系。此外, 同工酶存在组织和器官特异性, 取材有严格的一致性要求, 所以鉴定结果不够稳定, 一般只适用于亲缘关系较远的自交系^[1-5]。

近年来, RFLP、RAPD 等 DNA 分子标记技术被应用于玉米自交系种质鉴定, 直接从基因组上鉴定自交系间的遗传差异, 克服了鉴定时间、生长周期的限制和环境条件的影响^[3,6,7]。但是, RFLP 的多态性低, 所标记的遗传信息有限, 需要大量的 DNA 模板, 而且操作复杂。而 RAPD 对反应条件又较敏感, 重复性差。Zabeau 和 Vos(1992)发明的 AFLP 技术, 克服了 RFLP 和 RAPD 的缺点, 具有多态性高、稳定性好等优点。美国先锋种子子公司用 AFLP 技术, 鉴定本公司选育的玉米自交系和杂交种, 建立详细的 DNA 指纹档案^[6]。

本研究利用 AFLP 标记技术对我国生产上常用的 19 个玉米自交系, 建立 DNA 指纹图谱, 其详细研究结果作如下报道。

1 材料和方法

1.1 材料

选用我国推广面积较大或新近选育的 19 个玉米自交系, 见表 1。

1.2 总 DNA 提取

用套袋自交多代的种子发芽, 取 1g 幼嫩叶片加液氮迅速研磨成粉末, 转移到 1.5mL 的离心管, 加

表 1 自交系的编号及名称

Table 1 The number and name of 19 maize inbred lines

编号	自交系	编号	自交系
1	178	11	C8605-2
2	Mo17	12	7884-7
3	丹 340	13	中自 01
4	掖 478	14	中 451
5	掖 52106	15	黄野四
6	获唐黄	16	48-2
7	黄早四	17	A318
8	黄 C	18	R08
9	综 31	19	ES21
10	P138		

预热的 4×CTAB(100mL 含 pH8.0 的 1mol/L tris-HCl 10mL, 5mol/L NaCl 28mL, 0.5mol/L EDTA 5mL, CTAB 4g, 0.2% 巯基乙醇, 1g PVP, 1g Na₂SO₃)1.0mL 混匀, 在 60℃ 水浴中保温 40min, 每 10min 混匀 1 次。随后以 10000r/min 离心 5min, 转上清液至另一离心管加等体积氯仿, 上下颠倒混匀约 10min, 10000r/min 离心 5min, 取上清液转管, 重复 2~3 次。最后将所得的上清液加 2/3 体积的异丙醇沉淀, 得 DNA 絮状沉淀, 挑取或离心贴壁得 DNA 沉淀, 用 70% 的乙醇洗 3 次, 无水乙醇洗 1 次, 风干, 用适量的 TE 溶解。

1.3 AFLP 分析

用美国 Perkin-Elmer 公司生产的 AFLP 试剂盒, 对 DNA 样品进行酶切-连接、预扩增、选择性扩增, 每一步骤的产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。其中, 预扩增的 PCR 条件为: 72℃, 2min 预变性; 94℃ 20s, 56℃ 30s, 72℃ 2min 反应 20 个循环; 60℃ 30min; 4℃ 保存。选择性扩增为梯度 PCR, 条件为: 94℃ 2min 预变性; 94℃ 20s, 66℃ (每一循环降低 1℃) 30s, 72℃ 2min 反应 10 个循环; 94℃

• 收稿日期: 2001-01-03

基金项目: 四川省教育厅自然科学基金预研项目资助。

本文为第一作者硕士论文的部分内容。

20s, 56℃ 30s, 72℃ 2min 反应 20 个循环; 60℃ 30min, 4℃ 保存。选择性扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳后用银染法检测。

2 结果与分析

2.1 AFLP 的多态性

选择性扩增时, 从 EcoRI 引物 EcoRI - AAC、EcoRI - AAG、EcoRI - ACA、EcoRI - ACC、EcoRI - ACG、EcoRI - ACT、EcoRI - AGC、EcoRI - AGG 和

MseI 引物 MseI - CAA、MseI - CAC、MseI - CAG、MseI - CAT、MseI - CTA、MseI - CTC、MseI - CTG、MseI - CTT, 共 8 对引物 64 种组合中, 筛选出 1 个引物组合 EcoRI - AGG/MseI - CAA, 对所有 19 个自交系进行选择性的扩增。平均每个自交系扩增出近 70 条带, 其中 20 条为所有自交系所共有。不同自交系之间的扩增条带相互之间存在差异, 多态性达 57.1%, 比较充分地揭示了参试 19 个自交系的遗传差异(图 1)。

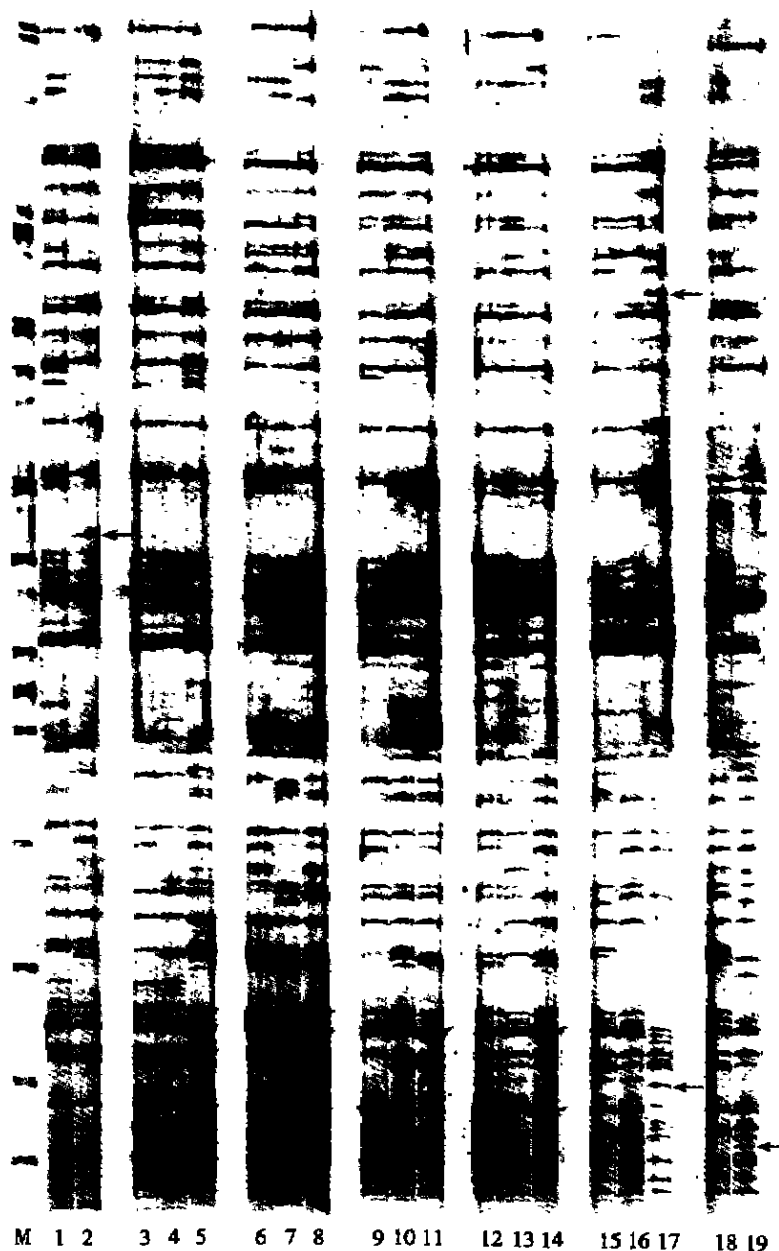


图 1 引物组合 EcoRI - AGG/MseI - CAA 选择性扩增的 AFLP 图谱
(数字为材料代号, M 为 Marker, 箭头所指为特征带)

Fig 1 Profile of the products selectively amplified with primer combination EcoRI - AGG/MseI - CAA
(Figuer stands for the material and M stands for marker)

2.2 特征条带

从电泳图谱可以看出,除了多态性带以外,部分自交系还存在一些明显的单态性带。例如,(2)Mo17 在 450bp 处有 1 条特征带,(17)A318 在 800bp 和 300bp 处有两条特征带,(19)ES21 在 1000bp 处有 1 条特征带(图 1 箭头所示)。这些特征条带可能代表这 4 个自交系的遗传背景与其他自交系有某种特殊的差异。Mo17 是美国引进自交系,属于兰卡斯特杂种优势群,A318 选自热带种质群体 Suwan-1,ES21 选自四川省地方品种邻水大肚肚。

3 讨论

3.1 AFLP 技术要点

AFLP 对模板浓度不敏感,我们在做预扩增和选择性扩增时不同自交系间 DNA 样品浓度相差数百倍,但扩增结果却相差不大,与 Vos 等^[8]的报道一致。但是,在 AFLP 的 4 个主要步骤中,前面的酶切-连接和预扩增两步较为重要,为保证后续步骤顺利进行,最好每做一步都对产物进行琼脂糖凝胶电泳检查,以免造成不必要的浪费。

3.2 关于玉米自交系的鉴定

本研究的结果表明,AFLP 标记能够充分揭示玉米自交系间存在的遗传差异,准确区分系谱关系十分复杂的不同自交系。譬如,黄早四与黄野四亲缘关系十分接近,形态性状相似,又同属于塘四平头

杂种优势群,仅用 1 对引物就能将其明确区分。可见,AFLP 技术具有形态性状鉴定、同工酶和种子贮藏蛋白电泳鉴定,以及其他 DNA 分子标记鉴定无法比拟的优点。随着专利试剂的降价和技术的普及,AFLP 指纹图谱可能成为玉米自交系种质鉴定的 1 种优选方法。

参考文献:

- [1] P G Righetti, Gianazza E, Viotti A, et al. Heterogeneity of storage proteins in maize[J]. *Planta*, 1977, 136: 115-123.
- [2] P Argos, Pedersen K, Marks M D, et al. A structural model for maize zein proteins[J]. *J Bio Chemistry*, 1982, 257(17): 9984-9990.
- [3] 余建华,廖树华,宋同明,等. 到玉米杂交种、自交系鉴定技术的研究进展(综述)[J]. *中国农业大学学报*, 1998, 3(1): 68-74.
- [4] J L Hamrick. Genetic variation and longevity[M]. New York: Columbia Univ. Press, 1978: 84-107.
- [5] M M Goodman, Stuber C W. Genetic identification of lines and crosses using isoenzyme electrophoresis[J]. *Annu Corn and Sorghum Conf Proc Washington D C: America Seed Trade Association*, 1980, 35: 10-31.
- [6] J S C Smith, Smith O S. Restriction fragment length polymorphisms can differentiate among U S maize hybrids[J]. *Crop Sci*, 1991, 31: 893-899.
- [7] 张超良,孙世孟,金德敏,等. RAPD 技术在 12 个玉米骨干自交系快速鉴定中的应用[J]. *作物学报*, 1998, 24(6): 718-722.
- [8] P Vos, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(21): 4407-4414.

Identification of Elite Maize Inbred Lines by AFLP Fingerprinting

GAO Shi-bin¹, LI Wan-chen¹, RONG Ting-zhao¹, CHEN Yong-Yan²

(1. Maize Research Institute, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, Sichuan, China; 2 Kunming Plant Research Institute, Chinese Academy of Science, Kunming 650204, Yunnan, China)

Abstract: AFLP fingerprintings of nineteen elite maize inbreds were analysed with primer combination EcoRI-AGG/MseI-CAA. Each inbred is amplified about 70 bandings, 57.1% of which performed polymorphisms and Mo17, A318, ES21 have unique bandings respectively. The result shows that maize inbreds can be completely distinguished on genome by AFLP markers. This technique is to be applied to germplasm identification of maize inbreds.

Key words: AFLP; MAIZE; INBRED; FINGERPRINTING.

(本文审稿潘光堂)