

# 利用 AFLP 分子标记鉴定苹果砧木

韩 蕾<sup>1</sup>, 徐继忠<sup>1</sup>, 李振侠<sup>2</sup>, 孙叶红<sup>1</sup>, 张 媛<sup>1</sup>, 邵建柱<sup>1</sup>

(1. 河北农业大学 园艺学院, 河北 保定 071001; 2. 河北科技大学 生物科学与工程学院生物科学系, 河北 石家庄 050018)

**摘要:** 利用 AFLP 分子标记技术, 对 30 个苹果砧木进行研究。从 64 对引物组合中筛选出 3 对多态性高、分辨能力强的引物用于扩增, 共获得 199 条带, 其中多态性带 176 条, 多态性率为 88.4%。扩增结果显示, 3 对引物组合在 12 个砧木中扩增出特征带, 且每对引物组合均能将所有砧木鉴别开, 表明 AFLP 技术用于苹果砧木鉴定的效率很高。通过聚类, 对供试砧木的遗传关系进行分析, 为中国优良苹果砧木资源的进一步收集和利用提供科学依据。

**关键词:** 苹果砧木; 鉴定; AFLP

**中图分类号:** S661.01 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2008)06-0171-05

## Identification of Apple Rootstocks with AFLP Molecular Markers

HAN Lei<sup>1</sup>, XU Ji-zhong<sup>1</sup>, LI Zhen-xia<sup>2</sup>, SUN Ye-hong<sup>1</sup>, ZHANG Yuan<sup>1</sup>, SHAO Jian-zhu<sup>1</sup>

(1. College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

2. Department of Life Science, College of Bioscience and Bioengineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China)

**Abstract:** Thirty apple rootstocks were subjected to AFLP analysis. Three primer combinations with high polymorphism and powerful distinctiveness selected from 64 primer combinations produced 199 fragments, of which 176 were polymorphic with a polymorphism percentage of 88.4%. The results showed that characteristic bands were amplified from 12 rootstocks, and any of the three primer combinations could identify all the rootstocks. AFLP was proved to be a very reliable method to identify apple rootstocks. The genetic relationship of the apple rootstocks was analyzed by clustered analysis, which provided the scientific basis for further collection and the use of the Chinese fine rootstock resources.

**Key words:** Apple rootstock; Identification; AFLP

苹果砧木类型鉴定是苹果种质资源学研究的重要内容和苹果砧木育种的重要基础。由于苹果砧木育种所使用的亲本材料越来越多地集中在少数优良家系, 使得所选育的新砧木类型在更多的性状上更加相似, 因此利用形态学等传统的鉴定方法难以有效区分和鉴别。而应用 AFLP、SSR 等方法, 可以较准确地对苹果砧木进行亲缘关系分析和遗传图谱的构建<sup>[1-4]</sup>。AFLP 较 SSR 检测位点多, 是迄今为止最有效的分子标记方法<sup>[5]</sup>。

AFLP 技术的基本原理是通过基因组 DNA 的限制性酶切片段进行选择性地扩增揭示其多态性, 从而鉴定不同品种<sup>[5,6]</sup>。近年来, AFLP 技术广泛应用于果树资源的研究<sup>[7-15]</sup>。本试验应用 AFLP 技术绘

制了我国苹果生产中的 30 个苹果砧木的 DNA 指纹图谱, 并根据该指纹图谱进行基因型鉴定和遗传关系分析, 旨在探索该技术在苹果砧木鉴定上的高效性, 以期为新砧木的鉴定、保护和利用提供借鉴。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试 30 个苹果 (*Malus pumila* Mill) 砧木见表 1。试材采自河北农业大学西校区标本园。

### 1.2 方法

1.2.1 模板 DNA 的制备 应用 CTAB (十六烷基三甲基溴化铵) 法<sup>[16]</sup> 并有所改进, 从试材鲜叶中提取基因组 DNA。经检测合格后, 将 DNA 稀释至 150

收稿日期: 2008-09-02

基金项目: 河北省科技厅资助项目 (04220111D)

作者简介: 韩 蕾 (1981-), 女, 河北三河人, 硕士, 主要从事果树结实生理与分子生物学研究。

通讯作者: 邵建柱 (1970-), 男, 河北晋州人, 副教授, 博士, 主要从事果树生物技术研究。

ng/ $\mu$ L,备用。DNA 450 ng, *Eco*R I 和 *Mse* I 各 3 U, 10  $\times$ Tango buffer  
1.2.2 酶切 每个反应总体积为 20  $\mu$ L,其中包括: 2.0  $\mu$ L。37 保温 5 h。

表 1 供试的苹果砧木

Tab.1 Apple rootstocks used in this study

编号 No.	砧木 Rootstocks	来源 Origin	编号 No.	砧木 Rootstocks	来源 Origin
1	CG24	M8 自然实生苗	16	MM106	君袖 Spy $\times$ M1
2	CX3	M9 $\times$ 山定子	17	M26	M9 $\times$ M16
3	78-48	M9 自然实生苗	18	JM7	圆叶海棠 $\times$ M9
4	内蒙古 11 号	内蒙古选育	19	SHA8-11	国光 $\times$ 河南海棠
5	未知 1	SH 系	20	助列涅特	俄罗斯选育
6	M7	道生苹果	21	GM256	黄海棠 $\times$ M5
7	75-9-5	M9 自然实生苗	22	SH9	国光 $\times$ 河南海棠
8	P59	M9 $\times$ 安托诺夫卡	23	SH28	国光 $\times$ 河南海棠
9	珠美海棠	三叶海棠 $\times$ 毛山荆子	24	SH29	国光 $\times$ 河南海棠
10	荷兰海棠	国外引进	25	SH38	国光 $\times$ 河南海棠
11	Mark	M9 自然实生苗	26	SH40	国光 $\times$ 河南海棠
12	J11	金冠 $\times$ M9	27	未知 2	SH 系
13	M9	乐园苹果	28	S19	河南海棠
14	MD001	牡丹江选育	29	SH18	国光 $\times$ 河南海棠
15	雪球	国外引进	30	P22	M9 $\times$ 安托诺夫卡

1.2.3 连接 酶切后,每个 DNA 样品加入 5  $\mu$ L 连接混合液: *Eco*R I 接头 5 pmol, *Mse* I 接头 50 pmol, ATP 18 nmol, *T*<sub>4</sub> ligase 1.5 U, *T*<sub>4</sub> Buffer 0.5  $\mu$ L。37 保温 12 h。

1.2.4 预扩增 取 5  $\mu$ L 连接稀释后的 DNA 样品,各加入 15  $\mu$ L 预扩增混合液: EOO 和 MOO 各 30 ng, 10  $\times$ PCR Buffer(含  $Mg^{2+}$ ) 2.0  $\mu$ L, *Taq* 酶 0.5 U, dNTP (2.5 mmol/L) 1.6  $\mu$ L。混匀后,在 PCR 仪上扩增:首先 95 预变性 2 min,然后 95 30 s,56 30 s,72 60 s,共 30 个循环,最后 72 10 min。

1.2.5 选择性扩增 取 5  $\mu$ L 预扩增稀释混合液,各加入 15  $\mu$ L 选择性扩增混合液: 10  $\times$ PCR Buffer(含  $Mg^{2+}$ ) 2.0  $\mu$ L, dNTP (2.5 mmol/L) 1.8  $\mu$ L, *Taq* 酶 0.75 U, *Eco* R I 引物、*Mse* I 引物各 40 ng。混匀后,按如下 PCR 程序扩增:首先 95 预变性 2 min,然后 95 50 s,65 40 s(每循环降低 0.7  $^{\circ}$ ),72 60 s,13 个循环后变为:95 50 s,56 40 s,72 60 s,31 个循环,最后 72 10 min。扩增产物各加入 10  $\mu$ L Loading Buffer,混匀后,95 变性 10 min 后,立刻用冰浴冷却,待用。

1.2.6 电泳、成像 用 6.0 %的聚丙烯酰胺胶 60 mL 加入 10 %过硫酸铵 300  $\mu$ L 和 TEMED 60  $\mu$ L 制胶。用 DYY-12 电泳系统 80 W 恒功率电泳 2 h。然后取下胶板固定、脱色、银染<sup>[17,18]</sup>、显影。

1.2.7 数据分析 AFLP 扩增产物以 0,1 统计,将电泳图谱同一位置上的条带视为一个性状,有带记为“1”,无带记为“0”。采用 NTSYSpc2.1 软件对统计结果进行分析,用其中的 Similarity 程序计算相似系数;用 SAHN 程序和 UPGMA 法(Unweighted pair group

method arithmetic averages 不加权重组算术平均数法)进行聚类分析,并通过 Tree plot 模块生成聚类图(Phenogram)。

1.2.8 多态性分析 多态性位点百分率:多态性位点百分率(P)是反映群体遗传多样性的一个重要指标,对某一位点而言,当变异个体频率大于 0.01 时,则此位点即为多态性位点。

$P = (k/n) \times 100\%$ ,其中 k 是多态性位点数目,n 为所测位点总数。

2 结果与分析

2.1 AFLP 多态性分析

以亲缘关系最近的 SH 系砧木为试材,采用“3 + 3”引物组合方式,从 64 对 AFLP 引物中筛选出 3 对多态性较高、带型质量较好、分辨率较高的引物组合用于 AFLP 分析。图 1 为引物组合 M-CTG/ E-ACG 的 AFLP 电泳图谱。

表 2 为筛选出的 3 对引物对 30 个苹果砧木基因型的扩增结果。结果表明,3 对引物组合在供试材料中共扩增出 199 条带,其中多态性条带 176 条,多态性率为 88.4 %,平均每对引物组合扩增位点 66 个,3 对引物对 30 个苹果砧木的区分率均达 100 %。

2.2 砧木特征带及基因型鉴定

本试验筛选出的每对引物组合均能在不同的砧木上产生不同的带型。在供试的所有砧木中有 12 个砧木扩增出特征带(表 3),其他供试材料可以采用二歧分类法确定各自在该 AFLP 图谱中的差异带,根据各自的特征带或差异带可以区分供试的 30 个苹果砧木。筛选出的 3 对引物组合均能将所有砧

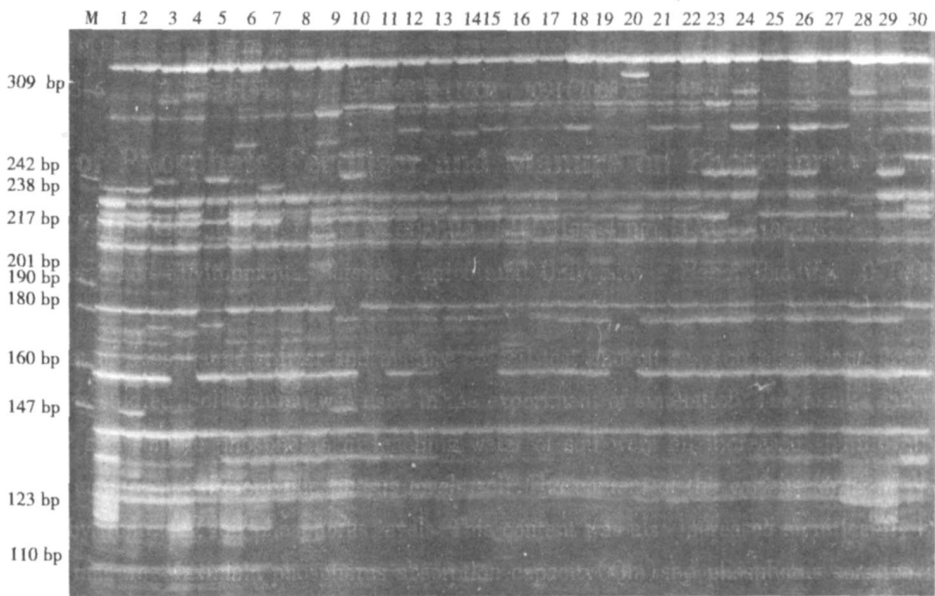
木鉴别开,由此可见,AFLP 技术可以高效准确地对苹果砧木进行鉴定。

根据本试验绘制的 30 个砧木的 AFLP 指纹图谱,鉴定田间 2 个未知种类,即未知 1 和未知 2。不同引物扩增结果表明,未知 2 与 SH38 强带一致,只有少数弱带有差异,由此可判断未知 2 是 SH38,原

因可能是无性系个体间的微小变异造成(图 1)。而未知 1 通过带型分析,与供试的 SH 系基因型均有较大差异,但从聚类图看,未知 1 与 SH 系聚为一组,可以推断出未知 1 为 SH 系的另外一个类型,但因缺乏样品的基因型而无法鉴定。

表 2 筛选出的 AFLP 引物对 30 个供试苹果砧木基因型的扩增结果

Tab.2 Amplified results of 30 apple rootstock genotypes with selected AFLP primers					
引物对 Primer pairs	选择性碱基 Selective base	总条带数 Total bands	多态性条带 Polymorphic bands	多态性百分率/% Polymorphic percentage	区分百分率/% Identified rate
M61-LE4	M-CTG/ E-ATA	83	74	89.2	100
M61- E37	M-CTG/ E-ACG	58	52	89.7	100
M74-LE7	M-CCC/ E-ATG	58	50	86.2	100
总计 Total		199	176	88.4	100



1 ~ 30 的砧木名详见表 1。 Names of 1 - 30 are elaborated in Tab. 1.

图 1 引物组合 M-CTG/ E-ACG 的 AFLP 电泳图谱

Fig.1 AFLP profile by primer combination M-CTG/ E-ACG

表 3 12 个砧木的特征带及特征带大小

Tab.3 12 rootstocks with characteristic bands and base pairs of the bands			
砧木 Rootstock	特征带数量 Number of characteristic bands	表现为“存在”的特征带/ bp Characteristic bands represent present	表现为“缺失”的 特征带/ bp Characteristic bands represent absent
P59	1	M61LE4-340	
珠美海棠	6	M61LE4-203 M61LE4-128 M61LE4-125 M61LE4-86	M61LE4-123 M61E37-108
荷兰海棠	7	M61LE4-282 M61LE4-270 M61LE4-227 M61LE4-170 M61LE4-70 M61E37-154	M61E37-181
MD001	3	M61LE4-202 M61LE4-140 M74LE7-237	
雪球	2	M61E37-107 M61E37-65	
MM106	2	M61LE4-265 M61LE4-71	
M26	1	M61E37-161	
JM7	1	M61LE4-260	

续表 3

砧木 Rootstock	特征带数量 Number of characteristic bands	表现为“存在”的特征带/ bp Characteristic bands represent present	表现为“缺失”的 特征带/ bp Characteristic bands represent absent
助列涅特	9	M61LE4-82 M61LE4-75 M61LE4-72 M61E37-319 M74LE7-162 M74LE7-125 M74LE7-100	M61LE4-197 M74LE7-225
S19	5	M61E37-227 M74LE7-137	M61E37-230 M61E37-128 M61E37-75
78-48	2	M61E37-198 M74LE7-120	
SH28	1	M74LE7-170	

2.3 聚类分析

对 AFLP 统计结果进行聚类分析,得到亲缘关系树状图(图 2)。聚类结果表明,供试的 30 个苹果砧木的相似系数的变化范围为 0.70~0.97。在相似系数为 0.81 处可将供试砧木分成 8 组:第一组包括 CG24、M7、75-9-5、CX3、P59、78-48、Mark、M26、M9、J11、P22 和 MM106,由表 1 可知,它们大部分都有 M9 的血统,亲缘关系较近,而 CG24、MM106 分别含有

M8 和 M1 的血统,因此也与具有 M9 血统的苹果种聚为一组。第二组包括 SH 系的 9 个类型,它们来自同一父母本,亲缘关系较近,被紧紧聚在了一起。另外荷兰海棠、珠美海棠、内蒙古 11 号、MD001 和 S19 各自成一组,雪球和助列涅特为一组,其中荷兰海棠、珠美海棠、雪球和助列涅特它们分属不同的种,亲缘关系较远。总之,该聚类分析的结果与供试砧木已知的系谱基本上一致。

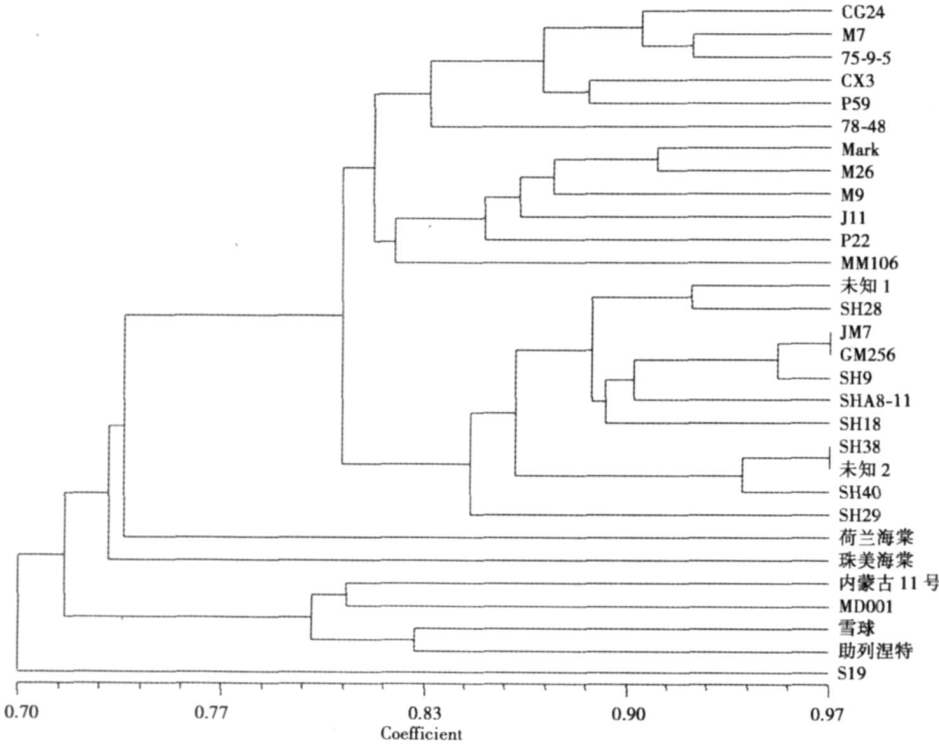


图 2 聚类树状图

Fig.2 Dendrogram

3 讨论

3.1 AFLP 用于苹果砧木鉴定的高效性

分子标记技术是从 DNA 分子水平的差异来鉴定区分品种,不会因环境影响而变化,尤其 AFLP 技术可以检测的多态性位点多,重复性好,结果稳定,鉴别准确,效率高,无需复杂的分子生物学研究背

景,因而被公认为园艺作物建立指纹图谱效率最高的标记。

本试验结果表明,筛选出的 3 对引物组合均能将供试的 30 个苹果砧木鉴别开,这 3 对引物多态性高,区分能力强,是目前苹果砧木检测和多态性分析效率较高的引物,对苹果无性系砧木真实性和纯度检测以及进一步的分子标记研究有较高的应用价

值。由此可见,运用 AHP 分子标记,选用较少效率高的引物组合,可在短时间内对大量样品进行分析。

### 3.2 亲缘关系分析

祝军等<sup>[1]</sup>利用 AHP 绘制了 5 个苹果矮化砧木的 AHP 指纹图谱,其中有 4 个砧木与本试验相同,亲缘关系一致。王涛等<sup>[2]</sup>利用 AHP 分子标记构建了 20 个苹果砧木亲缘关系树状图,其中有 7 个种类与本试验相同,聚类位置也一致。此结果证明了 AHP 分子标记技术比其他分子标记具有更好的重复性、可靠性。本试验聚类结果同时也从分子水平验证了有相同亲本的杂交子代的亲缘关系:如 SH 系,自成一小组,亲缘关系较近,与蒲娜娜等<sup>[3]</sup>报道的一致,但是其中的个别类型聚类位置有差异,结果有待进一步验证。

由此可见,利用 AHP 技术对苹果砧木进行分类,基本上反映了砧木类型间的亲缘关系。同一组中亲缘关系比较近,不同组中亲缘关系相差较远。证实了 AHP 分子标记技术在苹果砧木的亲缘关系研究中确实是高效、可靠的工具。

但是从聚类结果看,还存在不同来源砧木归入同一类群或相近来源砧木归到不同类群的现象:如 S19 是从河南海棠筛选出来的一个类型,SH 系是国光和河南海棠的杂交后代,二者亲缘关系相对较近,却未归到一组。而 JM7 为圆叶海棠 ×M9,GM256 为黄海棠 ×M5,二者都有 M 系血统,理论上应与第一组聚为一类,但却归到了 SH 系一组,这些原因有待进一步的探讨。

### 参考文献:

- [1] 祝 军,周爱琴,李光晨,等. 苹果 M 系矮化砧木 AHP 指纹图谱的构建与分析[J]. 农业生物技术学报,2000,8 (1):59 - 62.
- [2] 王 涛,祝 军,李光晨,等. 苹果砧木亲缘关系 AHP 分析[J]. 中国农业科学,2001,34(3):256 - 259.
- [3] 蒲娜娜,杜国强,李明媛,等. 7 种 SH 系苹果砧木的 AHP 分析[J]. 中国农学通报,2007,23(6):141 - 144.
- [4] Oraguzie N C, Yamamoto T, Soejima J, et al. DNA fingerprinting of apple (*Malus* spp.) rootstocks using Simple Sequence Repeats [J]. Plant Breeding, 2005, 124 (2): 197 - 202.
- [5] Vos P, Hogers R, Bleeder M, et al. AHP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23 (21): 4407 - 4414.
- [6] 贾继增. 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种[J]. 中国农业科学, 1996, 29(4): 1 - 10.
- [7] 祝 军,王 涛,赵玉军,等. 应用 AHP 分子标记鉴定苹果品种[J]. 园艺学报, 2000, 27(2): 102 - 106.
- [8] Tignon M, Kettmann R. AHP: use for the identification of apple cultivars and mutants [J]. Acta Hort, 2000, 521: 219 - 226.
- [9] 王 斐,林盛华,方成泉,等. 梨新品种及其亲本的 AHP 分析[J]. 园艺学报, 2007, 34(4): 847 - 852.
- [10] Aranzana M J, Carbo J, Arus P. Using amplified fragment length polymorphisms (AHPs) to identify peach cultivars [J]. J Amer Soc Hort Sci, 2003, 128(5): 672 - 677.
- [11] Khalil Kashkush, Fang Jing-gui, Eli Tomer, et al. Cultivar identification and genetic map of mango [J]. Euphytica, 2001, 122(1): 129 - 136.
- [12] 雷新涛,王家宝,徐雪荣,等. 芒果主要品种遗传多态性的 AHP 标记研究[J]. 园艺学报, 2006, 33(4): 725 - 730.
- [13] Cervera M T, Cabezas J A, Sancha J C, et al. Application of AHP to the characterization of grape *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain) [J]. Theor Appl Genet, 1998, 97: 51 - 59.
- [14] 张运涛,冯志广,李天忠,等. 草莓品种亲缘关系的 AHP 分子标记分析[J]. 园艺学报, 2006, 33(6): 1199 - 1202.
- [15] 王永康,田建保,王永勤,等. 枣树品种品系的 AHP 分析[J]. 果树学报, 2007, 24(2): 146 - 150.
- [16] 熊光明,梁国鲁,阎 勇,等. 适于 AHP 分析用的柑橘 DNA 提取方法[J]. 果树学报, 2002, 19(4): 267 - 268.
- [17] 石 锐,郭长虹. 聚丙烯酰胺凝胶中 DNA 的银染方法[J]. 生物技术, 1998, 5: 46 - 48.
- [18] 张 丽. 早美酥 × 红香酥 F<sub>1</sub> 代群体分子遗传图谱的构建[D]. 保定:河北农业大学, 2006: 15 - 17.