

·快讯 Short Communication·

美洲黑杨无性系 AFLP 指纹分析*

尹佟明 孙 晔 易能君 李新军 黄敏仁** 王明庠

(南京林业大学林木遗传与基因工程林业部重点实验室 南京 210037)

关键词 AFLP, 美洲黑杨, 指纹图谱

GENOME FINGERPRINTING ANALYSIS IN *POPULUS DELTOIDES* *

YIN Tong-Ming SUN Ye YI Neng-Jun LI Xin-Jun

HUANG Min-Ren** WANG Ming-Xiu

(Key Laboratory of Forest Tree Genetic Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037)

Abstract The appraisal of cultivar authenticity is a problem that needs to be settled in agricultural and forestry activities. AFLP is a novel, reliable and effective technique in DNA fingerprint. 42 clones of *Populus deltoides* Mash. were fingerprinted with the technique. AFLP technique can be widely used in the practical cultivar identification.

Key words AFLP, *Populus deltoides*, Fingerprinting map

1992年由 Zabeau 和 Vos 发明的扩增酶切片长度多态性 AFLP 标记技术(European patent, 0535 858A1, 1993-03-31),是目前国际上构建 DNA 指纹图谱的最新方法,AFLP 能检测到大量的基因位点,因而灵敏度高。选用不同的引物组合,即使亲缘关系很近的品种间的 DNA 差异也可检测出来^[1]。Lin 和 Ruo 用 AFLP 标记对不同生态型的拟南芥进行分析,得到多态性丰富、重复性好的 DNA 指纹图谱(AFLP™: A novel PCR-based assay for plant and Vacterial DNA fingerprinting. Life Technologies, Inc., 1995)。陈洪等^[2]利用该技术构建了 8 种致病性念珠菌的指纹图谱。AFLP 标记技术用途广泛^[3],并已获得欧洲专利局的专利。Vos 等^[4]已进行了一百多万次反应,充分证实了该项技术的可靠性。本研究对以 *Mse* I 和 *Eco*R I 酶切基因组 DNA 对 42 个美洲黑杨无性系的 AFLP 指纹进行了分析。

1 材料和方法

美洲黑杨(*Populus deltoides* Mash.)无性系样品取自南京林业大学杨树种质资源收集圃,每个无性系取休眠芽 3~4 个,剥掉鳞片,将幼嫩组织在酒精中漂洗,去除芽体内的粘液,然后将芽体吸干用于 DNA 提取。AFLP 实验过程参照 AFLP 分析系统 I 使用说明(AFLP™ Analysis System I Instruction Manual. GIBCORBL Co., 1995),实验中反应体系均等比缩减为 20 μ L。

2 结果和讨论

使用两个引物组合(E-ACA 和 M-CAG; E-AAC 和 M-ACT)构建了美洲黑杨 42 个无性系的 AFLP 指纹图谱。每个无性系的扩增谱带数都在 50 条以上,扩增片段大小在 0.3~1.5 kb 之间。由于这些材料亲缘关系较近,大多数多态谱带不仅对某一无性系特异,但就每一无性系而言,这些多态谱带构成了每一

* 国家自然科学基金重点项目资助。Supported by the Key Project of the National Natural Science Foundation of China.

** 通讯联系人。Author for correspondence.

收稿日期:1998-02-04 接受日期:1998-03-30

无性系的特征谱带组合。根据每一无性系的特征谱带组合,可以鉴别不同的无性系。图 1 为一个引物组合 E-ACA 和 M-CTG 的扩增指纹图。利用 SAS 统计软件对 42 个无性系进行了聚类分析,若利用一个引物组合(E-ACA 和 M-CTG)仍有 2 个无性系,即 447 与 225 具有相同的特征谱带组合而不能区分,但根据所用两个引物组合的多态谱带进行聚类,结果所有 42 个无性系都可以清楚地区分开来,结果见图 2。

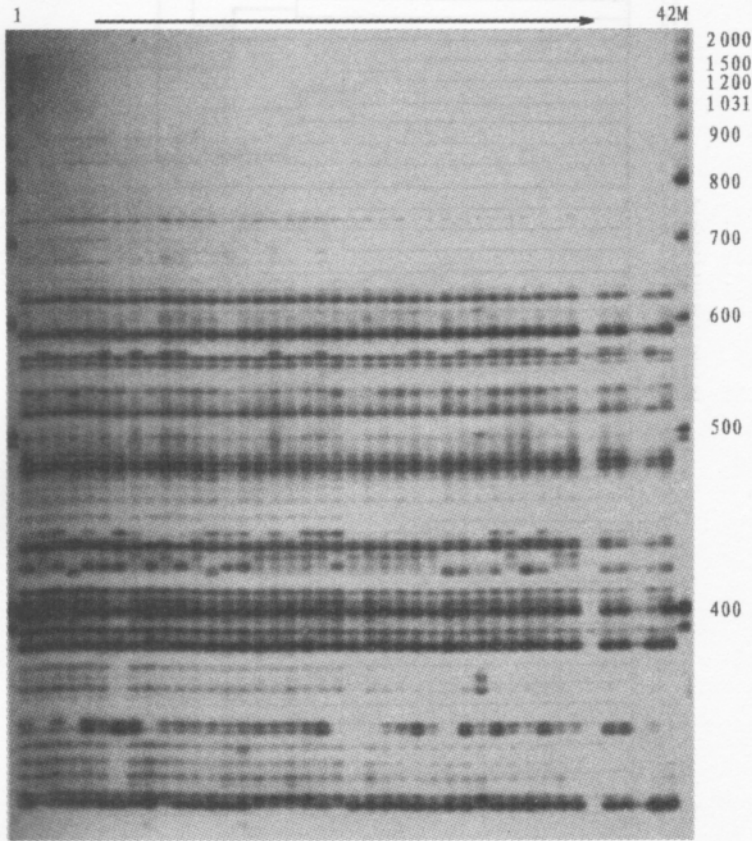


图 1 美洲黑杨 42 个无性系的 AFLP (E-ACA 和 M-CTG) 指纹图

Fig.1 AFLP fingerprinting map (E-ACA, M-CTG) of 42 clones of *Populus deltoides*

M. Molecular weight marker (100 bp marker, Prommega); 1 to 42. The clones No. in order: 13, 214, 45, 237, 239, 25, 669, 1, 20, 19, 120, 1381, 8, 95, 313, 2, 232, 26, 28, 220, 3201, 3121, 3016, 3907, 3804, 3101, 3244, 3264, 3814, 3801, 15, 339, 811, 177, 69, 375, 115, 447, 225, 797, 895, 600.

AFLP 标记可获得大量基因组信息,因而对于多态性的检测灵敏度极高,即使亲缘关系很近的个体,也比较容易找到差异,如无性系 177, 797, 447, 225, 895, 600 是来自于同一全同胞家系的材料,通过几个引物组合即可进行有效的区分。由于 AFLP 扩增谱带是随机扩增的产物,扩增谱带间基本上是相互独立的,从理论上讲,若有 n 个随机位点对 m 个随机样本进行鉴别,则这 m 个个体可以区分的概率为: $P = 1 - m(m-1) \cdot 2^{-1} \cdot (1/4^n)^{-1}$ 。如果有 100 条扩增谱带,鉴定精度为 0.99,那么 1.8×10^{29} 个体中才会有 2 个个体具有相同的谱带组合。但是所鉴定的品种间往往存在一定的亲缘关系,对于有亲缘关系的个体进行鉴别时,个体间两两不同的概率 $P = (1-\theta)^n$,其中 $1/4 \leq \theta \leq 1$ 。 $\theta = 1/4$ 时,即为品种间相互独立,不存在亲缘关系。 θ 越接近于 1,品种间的亲缘关系越近。 θ 与个体间共祖度和扩增位点间的连锁关系有关。由上式可以看出,随着多态谱带数的增加,鉴定的精度会不断提高。由上式还可以得出,扩增谱带数 $n = \lg(1-P)/\lg\theta$,所以当品种间亲缘关系非常近,即 θ 接近于 1 时,要区分 2 个个体,就需要大量的扩增谱带。在实际的鉴定工作中,我们可以根据所鉴定的材料,给 θ 赋一个先验值,从而根据要求的鉴定精度,

确定所需的扩增谱带数。

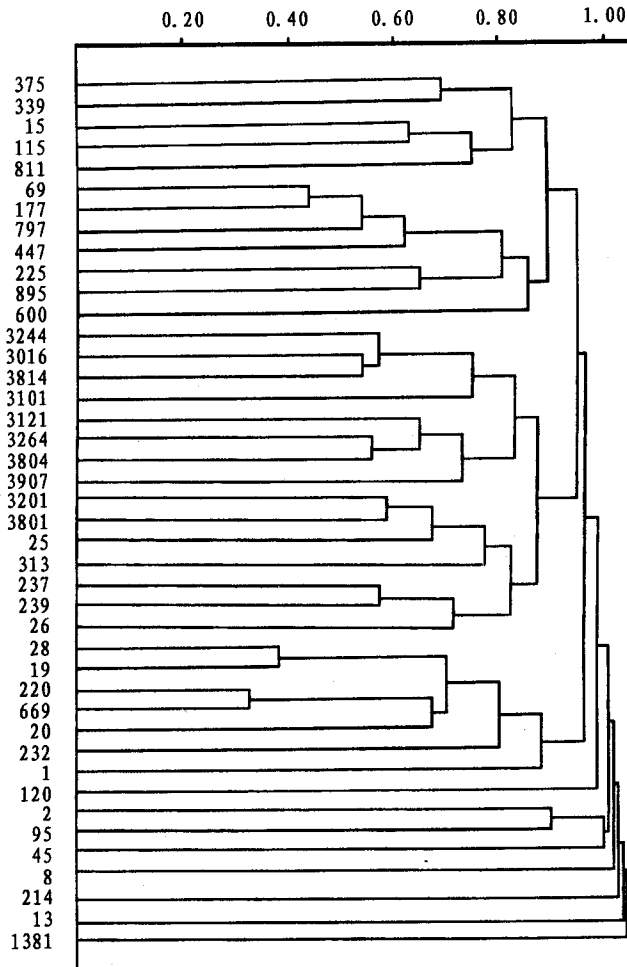


图 2 美洲黑杨 42 个无性系的聚类树状图
Fig.2 The phenogram of 42 clones of *Populus deltoides*

参 考 文 献

- 1 Yin Tong-Ming(尹佟明), Huang Ming-Ren(黄敏仁). The AFLP technique and its applications in plant breeding. *Progr Biotechnol* (生物工程进展), 1997, 17:6~11 (in Chinese)
- 2 Chen Hong(陈洪), Zhu Li-Huang(朱立煌), Li Dong-Mei(李冬梅), Chen Mei-Ling(陈美玲). The AFLP fingerprinting map of pathogenic *Candida* DNA. *Chin Sci Bull* (科学通报), 1996, 41:935~938 (in Chinese)
- 3 Herman J, Eck V, Van der Voot J P, Draaistra J, Van Zandvoort P, Van Enckevort E, Segers B, Peleman J, Jacobsen E, Helder J, Bakker J. The inheritance and chromosomal localization for AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Mol Breed*, 1995, 1:397~410
- 4 Vos P, Hogers R, Bleeker K, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res*, 1995, 23:4407~4414