



SSR 和 AFLP 技术鉴定棉花遗传资源的比较研究

Comparison of Identification for Cotton Genetic Resources

Using SSR and AFLP Markers

王省芬, 马峙英*, 张桂寅, 温小杰, 李喜焕

(河北农业大学, 河北省作物种质资源重点实验室, 河北保定 071001)

选用 58 个陆地棉抗枯、黄萎病品种, 采用 SSR 和 AFLP 技术对棉花品种资源进行鉴定, 并对两种标记方法加以比较, 探讨两种方法的应用效果, 为分子标记技术在棉花种质资源研究上的进一步应用提供理论依据。

材料, 其中国外品种 4 个, 国内品种 54 个, 50 年代 2 个, 60 年代 6 个, 70 年代 12 个, 80 年代 13 个, 90 年代 17 个, 分别来自河北、河南、山东、山西等 13 个省及中国农业科学院植物保护研究所、棉花研究所(表 1)。所有供试材料均由中国农业科学院棉花研究所国家棉花中期种质库和河北农业大学棉花遗传育种研究室提供, 在河北农业大学枯、黄萎病圃进行抗病性鉴定和自交繁殖。

1 材料和方法

1.1 供试材料

选用 58 个陆地棉抗枯、黄萎病品种作为试验

表 1 供试品种名称

Table 1 Varieties used

编号 品种名称	编号 品种名称	编号 品种名称	编号 品种名称	编号 品种名称	编号 品种名称
1 陕 3619	11 塔什干 1 号	21 豫棉 8 号	31 陕棉 10	41 新棉 33B	51 陕棉 9 号
2 86-4	12 冀棉 7 号	22 冀棉 20	32 新陆中 3 号	42 86-1	52 晋棉 26
3 湘棉 16	13 冀棉 1 号	23 中 8010	33 川 52-128	43 辽棉 12	53 协作 1 号
4 鲁无 401	14 冀棉 3 号	24 豫棉 10	34 中棉所 20	44 钱江 9 号	54 皖棉 11
5 川 57-681	15 豫棉 4 号	25 陕 401	35 中 3474	45 苏棉 6 号	55 川 414
6 中棉所 12	16 中棉所 9 号	26 冀植 17	36 中棉所 23	46 泗棉 3 号	56 鄂抗 1 号
7 Auburn623RNR	17 中 8004	27 苏棉 7 号	37 鲁 1024	47 鄂抗 3 号	57 川 73-27
8 Coker100-wilt	18 陕 1155	28 GK1	38 豫 2067	48 辽棉 7 号	58 抗病洞庭棉
9 绵无 4176	19 鲁棉 12	29 晋棉 14	39 豫棉 22 号	49 盐棉 48	
10 晋棉 18	20 晋棉 8 号	30 冀棉 14	40 鲁棉 11	50 苏棉 8 号	

1.2 试验方法

1.2.1 棉花基因组 DNA 提取。采用 CTAB 法提取棉花基因组 DNA, 利用 BECKMAN DU800 进行 DNA 纯度及浓度检测, 通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进一步确定其浓度和质量。

1.2.2 AFLP 和 SSR 反应体系与程序。SSR 反应体系总体积为 10 μ L; 模板 DNA(20 ng \cdot μ L⁻¹) 2 μ L; 10 \times PCR buffer(含 Mg²⁺) 1 μ L; 2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 0.8 μ L; Forward Primer(10 ng \cdot μ L⁻¹) 0.35 μ L; Reverse Primer(10 ng \cdot μ L⁻¹) 0.35 μ L; Taq DNA 聚合酶(5 U \cdot μ L⁻¹) 0.16 μ L; ddH₂O 5.34 μ L。SSR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 3

min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保温。扩增后的样品与 5 μ L Loading buffer 混合, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 立即转移至冰上, 用于电泳。采用垂直板变性聚丙烯酰胺凝胶法对 SSR 和 AFLP 扩增产物进行电泳。

1.2.3 结果与分析。对扩增产物的电泳结果采用“0-1”系统记录谱标记位置, 观察扩增标记的有无, 有标记为“1”, 无标记为“0”。利用 SPSS(11.5 版)分析软件进行数据处理分析。58 个品种作为研究的样本单元, DNA 标记作为变量(分类性状), 计算两品种之间的欧氏距离。

2 结果与分析

2.1 SSR与AFLP引物筛选

本试验从已发表的分布于棉花基因组中11条染色体上的37对SSR引物中共筛选出22对多态性较高的引物,并分布在9个以BNL TM-1×3-79为作图群体获得的连锁群中。利用EcoRI和MseI标记有3个选择性核苷酸的引物各10个,组成100个AFLP引物组合进行筛选,共筛选出20个标记分布均匀、多态性高的引物组合。

2.2 两种标记方法对供试品种鉴定信息获取量比较

利用具有多态性的SSR和AFLP引物对58个品种进行扩增(表2)。22对SSR引物共扩增

出254个多态性标记;引物BNL3408和BNL3649具有最高多态性标记数,为19个,引物BNL3599扩增出的多态性标记最少,只有6个;不足10个多态性标记的引物共6对,有10个品种对10对引物表现出特异性标记。20个AFLP引物组合共扩增出195个多态性标记;E35/M59具有最高多态性标记数(29个),E38/M50只有2个多态性标记;不足10个多态性标记的引物共11个,有23个品种对15对引物表现出特异性标记。比较两种标记方法的扩增结果,SSR获得的总标记数远远少于AFLP,但多态性标记的数量并不低于AFLP,表现出较高的多态性。统计每对引物中具有特异性标记的品种数,AFLP揭示的特异性位点较多。

表2 SSR和AFLP标记对58个品种扩增结果的比较

Table2 The comparison of SSR and AFLP markers amplification in 58 cottons

参数	SSR标记	AFLP标记	参数	SSR标记	AFLP标记
引物对数	22	20	特异性标记引物数	10	15
多态性标记数	254	195	表现特异标记品种数	10	23
平均多态性标记数	11.55	9.75	单引物最高鉴别品种数	44	22
最高多态性标记数	19	29	鉴别品种数	56	50

2.3 SSR和AFLP标记对供试品种鉴别效率比较

从表2可知,用SSR标记方法只有2个品种没有被鉴别开,单引物最高鉴别品种数为44个,每对引物平均可以鉴别11.4个品种,每个品种平均具有4.3个鉴别引物;而用AFLP标记方法有8个品种不能被鉴别开,单引物最高鉴别品种数为22个,每个引物组合平均可以鉴别7.3个品种,每个品种平均具有2.5个鉴别引物组合,说明SSR标

记的鉴别效率高于AFLP标记。每个供试品种基于两种方法所具有的鉴别引物个数(图1)。

从总的趋势看,每个品种所具有的SSR鉴别引物个数多于AFLP鉴别引物。对于品种而言,在两种方法中被鉴别的能力也不尽相同,一些品种具有相近的SSR和AFLP鉴别引物数,如品种塔什干1号均具有较多的鉴别引物,SSR鉴别引物有9个,AFLP鉴别引物为8个,品种陕401具

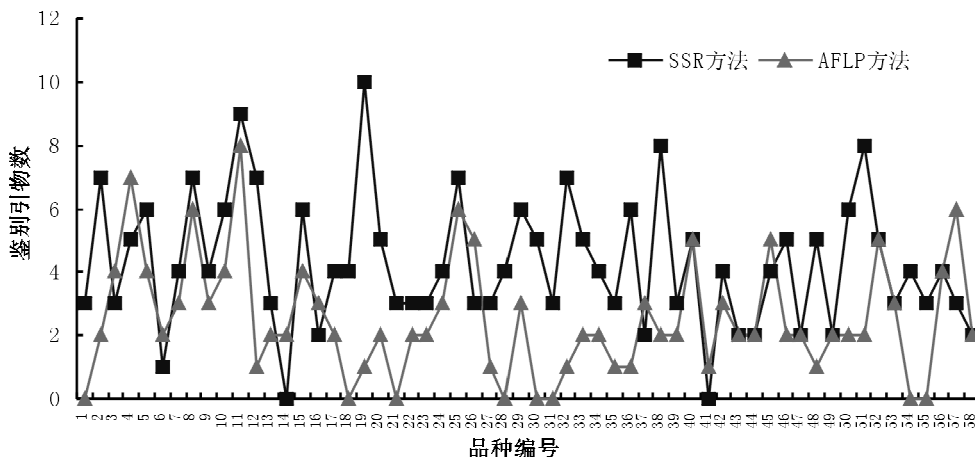


图1 供试品种具有的SSR和AFLP鉴别引物数比较

Fig. 1 The comparison of identification primer numbers for each variety between AFLP and SSR markers

有 7 个 SSR 鉴别引物和 6 个 AFLP 鉴别引物;而有些品种 SSR 鉴别引物数与 AFLP 鉴别引物数相差较大,如鲁棉 12 具有 10 个 SSR 鉴别引物,而 AFLP 鉴别引物只有 1 个,川 73-27 具有 6 个 AFLP 鉴别引物和 3 个 SSR 鉴别引物。

3 结论与讨论

SSR 是散在分布于真核生物基因组中的简单重复序列,主要集中在非编码区。研究表明,除着丝粒和端粒区以外,染色体的其它区域也广泛分布有微卫星位点,在基因组中均匀分布。由于重复序列的碱基组成和重复数目的变化极大,所以多态性很高,该技术检测的是一个单一的多等位基因位点,为共显性,结果重复性高。而 AFLP 技术是对基因组限制性内切酶片的选择性扩增,检测的多态性是酶切位点的变化或酶切片段 DNA 序列的变异,AFLP 的大多数扩增片段与基因组的单一位置相对应,遗传上为显性或共显性,结果可靠稳定,灵敏度高,但多态性不如 SSR。

本研究将 AFLP 和 SSR 两种分子标记对我

国陆地棉抗枯、黄萎病品种的遗传多样性分析结果进行了比较,在扩增的多态性标记数和鉴别品种效率上,SSR 标记优于 AFLP 标记,两者结合能鉴别全部供试品种。但在某些方面,AFLP 标记的表现要优于 SSR 标记,如 AFLP 最高多态性标记 29 个,SSR 为 19 个;具有特异性标记的 AFLP 引物组合共 15 个,占 75%,表现特异标记的品种 23 个,而具有特异性标记的 SSR 引物只有 10 对,占 45%,表现特异标记的品种 10 个。从总的多态性分析,SSR 标记高于 AFLP 标记,这与 Mackill 等人的研究结果相似。

由于 SSR 不具编码功能,在生物进化过程中不受选择压力的限制,突变率高,对变异反应非常敏感,所以易受到趋同变异引起的平行演化程度的影响,从而给物种间亲缘关系的评估标记带来误差,而 AFLP 检测的多态性位点多,选用不同的引物组合能检测出亲缘关系很近的 DNA 间极细微的差别,灵敏度高,这一点在本试验中也得到体现。 ●