

## AFLP 在芒果品种鉴定中的应用

房经贵, 乔玉山, 章 镇

(南京农业大学园艺学院, 江苏南京 210095)

**摘 要:** 利用 AFLP 分子标记技术对 16 个芒果 (*Mangifera indica* L.) 品种以及 7 个芒果砧木材料进行了初步研究, 6 对 AFLP 选择性引物共产生 204 条清晰谱带。同时利用品种间共有谱带率 (Band-sharing) 对某些品种间的遗传关系进行了分析。16 个栽培品种间的平均共有谱带率为 83%, 变异幅度为 70%~94%, 7 个砧木间的平均共有谱带率则为 80%, 变异幅度为 53%~96%。

**关键词:** 芒果; AFLP; 品种鉴定

**中图分类号:** Q75 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2001)03-0281-03

## Application of AFLP in the cultivar identification of mango

FANG Jing-gui, QIAO Yu-shan, ZHANG Zhen

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** AFLP was first used to study 16 mango cultivars and 7 mango rootstocks, and 6 AFLP selective primer pairs devoted 204 clear bands. The genetic relationships of some mango cultivar pairs and those of some mango rootstock pairs were studied by their Band Sharing. The Band Sharing average of the mango cultivars was 83%, and their variant range was 70%~94%. For the rootstocks, the Band Sharing average and the variant range were 80% and 53%~96%, respectively.

**Key words:** Mango; AFLP; cultivar identification

尽管形态性状标记与同工酶等均可用于果树的品种鉴定与标记辅助选择等<sup>[1-4]</sup>, 然而这些标记的不足 (如标记数量有限、多态性水平低等), 往往限制了它们的应用。而正是由于 DNA 分子标记在这些方面所表现出的优势<sup>[5]</sup>, 使其应用为果树遗传育种学开辟了崭新的研究和应用领域。它有助于直接从分子水平上了解果树品种间的差异, 也使育种过程更直观, 目的性更强, 对于选择合适的杂交组合以保持或获得更好的重组优良品种显得极为有效与准确。

芒果是热带重要果树树种之一, 为进一步开展芒

果分子遗传学的研究, 加快 DNA 分子标记技术在芒果育种实践中的利用, 达到育种水平的提高, 人们已成功地将 RAPD (随机扩增多态 DNA)、SSR (简单序列重复) 技术应用于芒果的遗传关系、品种鉴定等方面的研究<sup>[6,7]</sup>, 这不仅提供了进一步利用某些芒果品种材料的理论依据, 而且建立了新的技术系统及获得了应用这些技术的经验。尽管如此, 利用 AFLP (扩增片段长度多态性) 技术对芒果的研究报道尚不多。由于 AFLP 技术具有可同时多位点进行检测、重复性好、信息量大、符合孟德尔遗传的特点, 因此, 开展

收稿日期: 2000-05-30

作者简介: 房经贵 (1968-), 博士, 副教授, 主要从事果树学研究。

基金项目: 国家留学基金资助项目 (G200002)

AFLP 技术在芒果领域的应用,对于芒果分子遗传学的深入研究将具有积极的推动作用。根据杂种优势显性假说和超显性假说的基本点是参与杂交的双亲具备一定的遗传差异的理论<sup>[9]</sup>,结合实际研究工作的需要,我们首次利用 AFLP 技术有针对性地对部分芒果栽培品种以及砧木材料彼此间的遗传关系进行了尝试性研究,以期为芒果遗传关系、品种鉴定提供更多的方法,同时也为进一步构建芒果品种的杂种优势群提供一定的理论准备。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

研究中所用的 16 个芒果品种为: Austin、Carabao Haden、Irvin、Edward、Keitt、Langra、Kensington、Mabruka、Manzanillo、Maya、Navmi、Palmer、Tango、Shelly、Tommy; 7 个砧木材料为: Gamera 1、Colombo Kidney、Gamera 3、Gamera 4、Sabre、7/32、13/1。取其嫩叶供提取叶片基因组 DNA 所用。

### 1.2 方 法

1.2.1 DNA 提取 参照 Murray 和 Thompson 方法<sup>[9]</sup>。

1.2.2 AFLP 技术 参照 Vos 和 Hogers 法<sup>[10]</sup>。具体技术路线、所用的接头、引物等如同以前的研究报告<sup>[11]</sup>。本实验中共随机选用了 6 对 AFLP 选择性引物: E-AAG/M-CTG、E-AGG/M-CAT、E-AAC/M-CTG、E-AAG/M-CAT、E-AAC/M-CTA、E-ACC/M-CAC,其中 E、M 分别表示 EcoRI 与 MseI 引物的共同序列;E、M 后的 3 个碱基为选择性碱基。

1.2.3 资料分析 随机选取了 14 对芒果品种组合和 6 对砧木组合的 AFLP 标记资料进行分析。在统计标记资料时,为确保准确性与可靠性,只计清晰谱带。共有谱带率(BS - Band sharing)的计算公式<sup>[12]</sup>为:

$$BS = \frac{2N_{ab}}{N_a + N_b}$$

$N_{ab}$ 表示 A 与 B 两品种的共同谱带数量, $N_a$ 、 $N_b$ 则分别表示 A 与 B 两品种各自的总谱带数。

## 2 结果与分析

### 2.1 AFLP 技术的效果

本实验选用 6 对 AFLP 选择性引物对 16 个芒果品种及 7 个砧木材料进行的 AFLP 分析,都得到了清晰的指纹,并且所有品种表现出多态性,这从引物组合(E-AAG/M-CAT)的指纹(图 1)情况得到反映,说明了 AFLP 技术在芒果品种鉴定中的可行性。6 对

引物共获得了 204 条清晰谱带。



图 1 十六个芒果品种 的 AFLP 指纹图谱  
Fig.1 The AFLP fingerprinting of 16 mango cultivars

### 2.2 AFLP 指纹的分析

2.2.1 十六个芒果品种的分析 根据 6 对引物的指纹情况以及研究所需,在确保差异最大的 2 个品种(Mabruka、Edward)和差异最小的 2 个品种(Maya、Keitt)被选择的前提下,又随机选择了 12 个品种组合进行比较。14 对芒果品种间 BS 值大小的分析结果(表 1)表明,这些芒果品种间 BS 大小的变化范围为 70%~94%,平均为 83%。其中,Mabruka 与 Edward 的 BS 为 70%;Maya 与 Keitt 间的 BS 则为 94%。根据以往的报道,应该说 BS 越大则其遗传关系越近,而 BS 越小则遗传关系越远。遗传差异大的品种更适于作为育种亲本材料。该实验结果证明了 AFLP 筛选芒果亲本的有效性。

2.2.2 砧木材料的分析 根据实际研究的需要,从 7 个芒果砧木材料中选择了 6 对进行 BS 值大小的分析,其结果(表 2):BS 的变化范围为 53%~96%,平均值为 80%。其中 Sabre 与 7/32 的 BS 值最低,为

53%, 而 13/1 与 Sabre 的 BS 值最高, 为 96%。与前面 16 个芒果品种的分析结果相比, 芒果砧木材料 BS 的变化范围较大, BS 平均值较小, 表明芒果砧木材料的亲缘关系偏远, 进行遗传改良的潜力更大。

表 1 14 对芒果品种(共 16 个品种)间的共有谱带率  
Table 1 Band-Sharing values of 14 pairs of mango cultivars(16 mango cultivars)

品种组合 Cultivar pairs		总带数 Average of bands		共有带数 Common bands	共有谱带率 Band sharing
A	B	A	B		
Maya	Keitt	37	33	33	0.94
Haden	Maya	35	37	31	0.86
Palmer	Haden	30	35	29	0.89
Irvin	Palmer	37	30	30	0.89
Kensington	T. Attkins	38	37	32	0.85
Manzanillo	Kensington	37	38	30	0.80
Austin	Manzanillo	35	37	31	0.86
Edward	Austin	31	35	30	0.90
Carabao	Edward	33	31	24	0.70
Mabruka	Carabao	35	33	27	0.70
Langra	Mabruka	32	35	27	0.80
Naomi	Langra	32	32	25	0.78
Shelly	Naomi	38	32	30	0.86
Tango	Shelly	30	38	28	0.82
平均 Average		34		29	0.83

表 2 六对芒果砧木(7 种砧木)间的共有谱带率  
Table 2 Band-Sharing values among six pairs of mango rootstocks(7 various rootstocks)

砧木组合 Rootstocks pairs		总带数 Average of bands		共有带数 Common bands	共有谱带率 Band sharing
A	B	A	B		
Gomera 1	Gomera 3	27	30	27	0.94
Gomera 3	Gomera 4	30	26	23	0.82
Gomera 4	13/1	26	30	20	0.71
13/1	Sabre	30	24	13	0.96
Sabre	7/32	24	28	14	0.53
7/32	C. Kidney	28	34	26	0.54
平均 Average		28		20	0.80

### 3 讨 论

由于受方法本身某些因素、技术条件、环境等的影响<sup>[11]</sup>, 形态学、同工酶技术、RAPD 标记对芒果品种进行鉴定的结果尚存在不少的歧义问题, 从而影响到对芒果材料的进一步利用与研究。AFLP 技术的应用有望能解决芒果品种鉴定中某些遗留的问题。本实验的成功尝试为此提供了可靠的技术方法。

杂种优势与育种亲本间的遗传距离有关, 遗传距离越大, 则杂种优势的效果越明显。迄今, 已有很多利用 DNA 标记来辅助亲本选择以提高后代杂种优势的报道, 如 Dunnington 等<sup>[12]</sup>和 Hillel 等<sup>[14]</sup>利用 DNA

指纹资料计算个体或品种间的 BS, 以此估计它们之间的遗传距离, 作为育种亲本选择的参考。本研究的初步分析结果表明, 不同芒果栽培品种间及砧木间 AFLP 指纹的 BS 值存在明显差异, 因此, 有望借此分析路线和分析资料进行芒果杂交优势群的构建以及辅助杂交亲本的选择。

### 参考文献:

- [1] Lavi U, Cregan P C, Schaap T, *et al.* Application of DNA markers for identification and breeding of perennial fruit trees[J]. *Plant Breeding Reviews*, 1993, 7:195-226.
- [2] Singh L B. Mango, In: F. P. Ferwerda and F. Wit (eds). *Outlines of perennial crop breeding in the tropics* [C]. Veenman and Zonen, Wageningen, Netherlands. 1969. 309-327.
- [3] Degani C, El-Batsri R, Gazit S. Enzyme polymorphism in mango [J]. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 1990, 115: 844-847.
- [4] Degani C, Cohen M, El-Batsri R, *et al.* PGI Isozyme diversity and its genetic control in mango[J]. *Hort Science*, 1992, 27(3):252-254.
- [5] 房经贵, 刘大钧, 马正强. DNA 指纹技术在果树育种中的应用[J]. *中国农学通报*, 1999, 15(6):49-52.
- [6] Adato A D, Sharon U, Lavi J, *et al.* Application of DNA fingerprints for identification and genetic analyses of mango (*Mangifera indica*) genotypes [J]. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 1995, 120:259-264.
- [7] Schnell R J, Ronning C M, Knight R J, Jr. Identification of cultivars and validation of genetic relationships in *Mangifera indica* L. Using RAPD markers[J]. *Theor. Appl. Genet.* 1995, 90:269-274.
- [8] 许明辉, 马继琼, 刘广田. 烟草品种间同工酶遗传距离与杂种优势关系的研究[J]. *农业生物技术学报*, 1999, 7(2):117-122.
- [9] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. *Nucl. Acids Res.* 1980, 8: 4321-4325.
- [10] Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucl. Acids Res.* 1995, 23: 4407-4414.
- [11] 房经贵, 刘大钧, 章 镇, 等. 两个芒果品种 AFLP 指纹图谱[J]. *南京农业大学学报*, 1999, 22(2):27-29.

(下转第 286 页 Continue on page 286)

### 2.3 纯度鉴定

2.3.1 紫外光谱法 辣椒素样品和标准品的紫外光谱特征及文献值<sup>[5]</sup>见表3,结果和标准品及文献值基本一致。

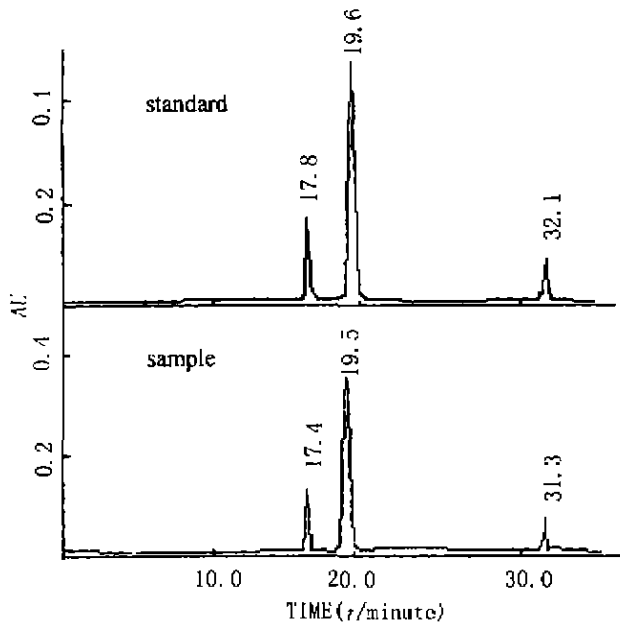


图2 辣椒素的HPLC图谱

Fig. 2 HPLC of capsaicin

(从左至右3个峰分别为降二氢辣椒素、辣椒素和二氢辣椒素)

Peaks(left to right): nordihydrocapsaicin, capsaicin and dihydrocapsaicin

2.3.2 HPLC法 经柱层析和结晶纯化的辣椒素样

品,HPLC保留时间与标准品及文献值<sup>[7]</sup>一致(图2),样品中辣椒素的含量为标准品的94.6%,可满足药用辣椒素的纯度要求。

### 参考文献:

- (1) 李军霞. 辣椒素与P物质[M]. 国外医学皮肤病学分册[C]. 1993, 9(3):160-162.
- (2) M Fitzgerald. Capsaicin and sensory neurons-a review [J]. *Pain*, 1983, 15:109-130.
- (3) 高蓝, 李浩明. 辣椒素及其在医药中的应用[J]. 中国药理学杂志, 1995, 30(4):244-246.
- (4) A C Geoffrey, E Oscar. Capsaicin; Identification, Nomenclature, and pharmacotherapy[J]. *The Annals of Pharmacotherapy*, 1993, 27:330-336.
- (5) L S Neil, R Mark, C Harold. A highyield method for the extraction and purification of capsaicin[J]. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, 25(6):1419-1420.
- (6) Paprika Oleoresin. Specification for identify and purity of certain food additives[J]. *FAO Food and Nutrition Paper*, 1990, 49, JECFA, 52-56.
- (7) Sticher O, Soldatif F. Hochleistungsflussigkeit-chromatographische trennung und quantitative bestimmung von capsaicin, dihydrocapsaicin nordihydrocapsaicin und homodihydrocapsaicin in naturlichen capsaicinoid-gemischen und fractus capsaiici[J]. *J. Chromatogr.*, 1978, 166:221-231.

(上接第283页 Continue from page 283)

- (12) Dunnington E A, Gal O, Siegel P B, et al. Deoxyribonucleic acid fingerprint comparisons between selected populations of chickens [J]. *Poultry Sci.* 1991, 70: 463-467.
- (13) Lakshminarayana S. Mango, In: S. Nagy and P E,

Shaw (eds), *Tropical and subtropical fruits*[C], VI, West port, Conn, 1980, 184-257.

- (14) Hillel J, Schaap T, Haberfeld A, et al. DNA fingerprints applied to gene introgression in breeding programs[J]. *Genetics*, 1990, 124:783-789.