

马铃薯钴⁶⁰辐照后代基因遗传变异的 AFLP 分析

廖华俊, 宁志怨, 董 玲, 江 芹, 李卫文, 张雪娇

(安徽省农业科学院园艺研究所, 合肥 230031)

安徽省属于马铃薯中原二季作区, 每年可以种植春、秋两季马铃薯, 但春马铃薯生长期前期低温后期高温阴雨, 而秋马铃薯生长期前期高温阴雨后期低温, 对马铃薯品种特性有着特殊的需求。目前我国马铃薯品种除了少数从国外引种, 其余绝大部分由北方马铃薯科研单位选育。由于南北地理和气候特点的巨大差异, 使得北方选育的马铃薯品种在安徽省种植期间品种抗逆性表现受到限制。另一方面, 大多数马铃薯品种在安徽不开花或花而不实, 因而不能开展正常的马铃薯杂交育种。因此, 采用物理方法进行诱变和系统选育是中原二季作区马铃薯品种选育的一种有效途径。

采用不同剂量的钴⁶⁰辐射线(10、20、30、50 和 80 Gy)对不同品种的马铃薯薯块(费乌瑞它、中薯 3 号、郑薯 6 号)分别进行辐照处理, 并对其 M₁ 变异后代进行生长期、品质、产量和抗逆性等性状筛选, 将筛选出具有目标农艺性状的马铃薯株系按单株进行收获, 并在 M₂ 代提取叶片 DNA, 进行分子生物学分析, 研究辐射诱变对马铃薯遗传变异的影响。

采用改良的 CTAB 法提取叶片 DNA: (1) 取马铃薯幼嫩叶片 3~4 片, 放入 2 mL 的离心管中, 加入液氮将其研成粉末状, 加入预热的 DNA 提取液, 混匀后于 65 °C 条件下水浴 40 min; (2) 加等体积的氯仿: 异戊醇 (24:1) 混合液, 上下颠倒混匀后, 在 9 800 r·min⁻¹ 离心 10~15 min; (3) 在上清液中加入等体积的预冷的异丙醇溶液后, 颠倒混匀直至析出絮状 DNA 沉淀; (4) 加入 70% 的乙醇溶液洗涤 DNA 和风干 DNA; (5) 加 TE 溶液溶解 DNA, 保存于 -20 °C 冰箱中备用。

AFLP 标记: 采用 *EcoR* I 和 *Mse* I 双酶切; 预扩增引物采用 E/M 核心引物, 扩增程序为 94 °C 3 min; 94 °C 30 s; 56 °C 1 min; 72 °C 1 min; 4 °C 保存, 共进行 20 个循环。反应结束后将反应液用 TE 缓冲液稀释 20 倍, 用作选择性扩增的模板; 选择性扩增采用 E 和 M 的选择性引物组合, 扩增程序为 94 °C 3 min; 94 °C 45 s; 65 °C 45 s (第 1 轮循环 65 °C, 第 2~12 轮循环每轮递减 0.7 °C, 第 13~36 轮循环保持在 56 °C), 共进行 36 个循环; 72 °C, 1 min; 4 °C 保存。PCR 产物用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 80 W 恒功率电泳 2 h, 银染后观察。

在 64 对选择性扩增引物中, 筛选出 10 对多态性较强、带型较好、分辨率较高的引物组合, 构建了马铃薯辐照后代的 AFLP 指纹图谱。通过辐照后代的 AFLP 指纹图谱可以将所筛选到的 40 个马铃薯优异株系全部区分开来, 说明马铃薯辐照后代基因变异显著, 采用物理诱变的方法来进行马铃薯育种是可行的。

关键词: 马铃薯; 诱变育种; AFLP 分析

中图分类号: S 532

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) S-2525-01