



研究报告

Research Report

采用扩增片段长度多态性 (AFLP) 对青葙的分子变异的标记

Bamigbeghin B.J. , Olawuyi O.J. , Jonathan S.G. 

Genetics and Molecular Biology Unit, Department of Botany, University of Ibadan, Nigeria

 通讯作者: johnbamigbeghin@gmail.com;  作者

植物药与药理学杂志, 2016 年, 第 5 卷, 第 8 篇 doi: [10.5376/jpm.2016.05.0008](https://doi.org/10.5376/jpm.2016.05.0008)

收稿日期: 2015 年 10 月 14 日

接受日期: 2015 年 11 月 25 日

发表日期: 2016 年 06 月 16 日

本文首次发表在《Molecular Plant Breeding》(2016, Vol.7, No.26)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

Bamigbeghin 等, 2016, 采用扩增片段长度多态性(AFLP)对青葙的分子变异的标记, 植物药与药理学杂志(online) Vol.5 No.8 pp.1-5 (doi: [10.5376/jpm.2016.05.0008](https://doi.org/10.5376/jpm.2016.05.0008))




引用格式(英文):

Bamigbeghin et al., 2016, Molecular Variability of *Celosia argentea* Using Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Marker, Zhiwuyao Yu Yaolixue Zazhi (online) Vol.5 No.8 pp.1-5 (doi: [10.5376/jpm.2016.05.0008](https://doi.org/10.5376/jpm.2016.05.0008))



摘要 国家园艺研究所收集到的十基因型青葙种子分子变异(nihort)和国家遗传资源和生物技术中心(nacgrab)的胚质采用扩增片段长度多态性分析(AFLP)标记。检测到的 AFLP 引物组合 EcoRI +MseI 适配类型的种群在三个引物组合 *C. argentea* 的多态性。Powermarker 软件 V3.25 统计分析了从中提取的 DNA 区域的碎片。记录的总基因组 DNA 的基因组 DNA 片段的最高浓度为 13.30 微克和体积为 2217.592 微克, 基因型分别为 NG/TO/MAY/09/015 and NG/MA/MAY/09/015。变化是在片段的三个 AFLP 引物组合中大量的扩增片段观察得出。基因组 DNA 扩增片段的多态性信息含量(图)是多样的, 在 100 个碱基对中 DNA 大小为 89.1%, 而百分比基因多样性为 90%。AAC CAG 的引物序列组合产生的条带, 最高数量为 400, 扩增片段多态性条带分别为 40 条和 156 条。构建一个树状图揭示了三个集群组, 在集群 1 和 3 被划定为 4 种基因型, 而集群 2 有至少 2 种基因型。这项研究揭示了使用 AFLP 标记基因组变异 *C. argentea*。这可以促进 *C. argentea* 种质改良和扩大育种的遗传基础保护。

关键词 青葙, 扩增片段长度多态性(AFLP), 基因型, 聚类分析

Molecular Variability of *Celosia argentea* Using Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Marker

Bamigbeghin B.J. , Olawuyi O.J. , Jonathan S.G. 

Genetics and Molecular Biology Unit, Department of Botany, University of Ibadan, Nigeria

 Corresponding author, johnbamigbeghin@gmail.com;  Authors

Abstract The molecular variability of ten genotypes of *Celosia argentea* seeds collected from National Institute of Horticultural Research (NIHORT) and National Centre for Genetic Resources and Biotechnology (NACGRAB) germplasm were evaluated using the Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) marker. The polymorphism of *C. argentea* was detected within the population using primer mix of AFLP EcoRI+MseI adaptors type in three primer combinations. Power marker software V3.25 was statistically used to analyse the fragments from extracted DNA region. The highest concentrations of genomic DNA of 13.30 μ L and volume of 2 217.59 μ L for total genomic DNA were recorded for NG/TO/MAY/09/015 and NG/MA/MAY/09/015 genotypes respectively. Variations were observed in the number of fragments amplified by each of the three AFLP primers combinations. The polymorphic information content (PIC) of the amplified fragment of the genomic DNA was diverse at 89.1% for DNA size of 100 base pairs, while the percentage gene diversity was 90%. The primer sequence combination of AAC + CAG produced the highest number of bands, amplified fragments, and number of polymorphic bands of 400, 40, and 156.000 respectively. A dendrogram constructed revealed three cluster groups, in which clusters 1 and 3 were delineated into 4 genotypes each, while cluster 2 had the least with two genotypes. This study revealed variability among the genome of *C. argentea* using AFLP marker. This could promote improvement and conservation of *C. argentea* germplasm for broaden genetic basis of breeding program.

Keywords *Celosia argentea*; Amplified fragment length polymorphism (AFLP); Genotypes; Dendrogram

Celosia argentea L. 是一种广泛栽培的蔬菜作物, 作为一种传统食品存在在 Amaranthaceae 家族中(Denton, 2004)。这是通常被称为 Lagos 菠菜或 sokoyokota, 在约鲁巴语俗称是, “让丈夫胖并快乐着”(Grubben and Denton, 2004)。C. argentea 嫩叶收获播种后 5-7 周最有营养价值; 它包含水、能量、蛋白质、脂肪、碳水化合物、纤维、钙、磷、铁、维生素 A、C 和存在于一些蔬菜中含量较高的微量元素。再次, 叶中含有植酸和草



酸, 这使得它不适合新的消费(Ayodele and Olajide, 2011)。这些环境因素强烈影响着收成, 其中包括土壤肥力, 肥料的应用和年龄的植物(Denton, 2004)。在这一种群中检测到, 这种作物的遗传变异有表征性强变化快(olawuyi et al., 2016)。遗传基础和独特的特征, 可能会在作物的适应性, 生物多样性上被侵蚀, 在这方面还需要研究保护。因此, *C. argentea* 需要通过分子评价来确认。聚合酶链反应(PCR)的分子生物学技术在植物基因组分析中有很大的发展(Esayas and Bryngelsson, 2006)。他们的遗传研究比形态特征更可靠, 高效覆盖整个生物体的基因组。分子技术使分离和分析特定的基因, 使得提高对生物体基因组的理解, 产生基因图谱和基因治疗技术的进步成为可能。此外, 他们已经在系统发育研究和物种进化中使用 DNA 序列在操纵种群内的遗传变异发挥了至关重要的作用。最近, 扩增片段长度多态性(AFLP)标记的使用已成为公开大量的多态性标记的单反应的主要工具(VOS et al., 1995)。这为育种工作者促进植物改良, 利用分子遗传学地图进行标记辅助选择和位置克隆的一些字符方面都很有用。基于生物化学和分子分析的品种间亲缘关系的鉴定是遗传改良和品种亲本基因型杂交组合选择的基础。AFLP 标记被成功地用于分析在一些物种的遗传多样性如苋科中的巴西人参(Figueira et al., 2011), 帕尔默苋菜(Aman et al., 2013)和杂草苋(Wassom and Tranel, 2005)。然而, AFLP 标记的分子变异的信息是有限的。因此本研究旨在利用分子技术调查变异 *C. argentea*。

1 结果与分析

AFLP 分子标记揭示基于扩增片段多态信息含量 89.1%和基因多样性 90%中 *C. argentea* 基因型的遗传变异。育种材料的形态和产量性状的变异其根在生物体的基因组。这将确保在 *C. argentea* 改良种质资源的保护和开发策略。记录的总基因组 DNA 的基因组 DNA 的最高浓度为 13.30 微克和体积为 2 217.592 微克, 基因型分别为 NG/TO/MAY/09/015 和 NG/MA/MAY/09/015。这些基因型可推荐用于作物改良育种计划。这些基因型的杂交育种建议其所需性状的亲本系中的作物改良。另外, 引物序列和兼容性似乎无休止的挑战在分子水平的研究, 因此, 为作物研究其兼容性的引物组合可以记录和推荐的试点研究, 再在其它蔬菜作物分子评价进行试验研究。

2 讨论

纳米滴 DNA 量化提取 *C. argentea* 基因型在 260/280 ng/ μ L 中的发现(表 1)。NG/TO/MAY/09/015 基因组 DNA 的质量浓度的最高值有 13.30 μ L, 而总基因组 DNA 的浓度值为 376.12 μ L。虽然基因 NG/MA/MAY/09/015 产生的最大数量, 但质量较低, 而在 2.08 μ L 从 464.70 μ L 总体积的基因组 DNA 质量的最低记录为 NHGB/09/160。

表 1 从十份青苋提取的 DNA 浓度

Table 1 DNA concentration extracted from ten genotypes of *Celosia argentea*

SN ^a	Genotypes ^a	Total volume of extracted genomic DNA (μ L) ^a	DNA concentration (μ L) ^a
1 ^a	NHGB/01260 ^a	451.61 ^a	11.1 ^a
2 ^a	NG/MR/MAY/09/015 ^a	507.32 ^a	9.9 ^a
3 ^a	NG/TO/MAY/09/015 ^a	376.12 ^a	13.3 ^a
4 ^a	NG/SA/07/213 ^a	808.74 ^a	6.2 ^a
5 ^a	NG/MA/MAY/09/015 ^a	2217.59 ^a	2.3 ^a
6 ^a	NHGB/09/160 ^a	464.7 ^a	2.08 ^a
7 ^a	NIHORT/0001 ^a	1002.85 ^a	5 ^a
8 ^a	NG/MAY/09/015 ^a	397.93 ^a	12.6 ^a
9 ^a	NG/SA/07/213 ^a	1179.32 ^a	4.2 ^a
10 ^a	NG/AO/MAY/09/015 ^a	904.1 ^a	5.5 ^a
Mean ^a		831.00* ^a	7.22* ^a

对 *C. argentea* 基因组的多态性信息含量和放大模式(表 2)。记录的百分比基因多样性为 90%, 而在种群的多样性是不同的, 在 100 个碱基对的标准化的 DNA 大小有 89.1%。扩增片段数、多态性带数和带数的数量有差异。AAC CAG 的引物序列组合产生的条带数最高, 最高数量为 400, 扩增片段多态性条带分别为 40 条和 156 条。



表 2 青葙 DNA 序列的引物组合和多态性

Table 2 Primer combinations and polymorphism from DNA sequence of *Celosia*

Primer combination	Number of fragments amplified	Number of Polymorphic bands	of Gene diversity	Total number of bands	Polymorphic content (PIC)	information DNA standard size
AAC+CAG	40	156	0.9	400	0.8910*	100-base pair (bp)
AAC+CAA	39	94	0.9	390	0.8910*	100-base pair (bp)
AAC+CAC	38	140	0.9	380	0.8910*	100-base pair (bp)
Mean	39	130	0.9	390	0.891	

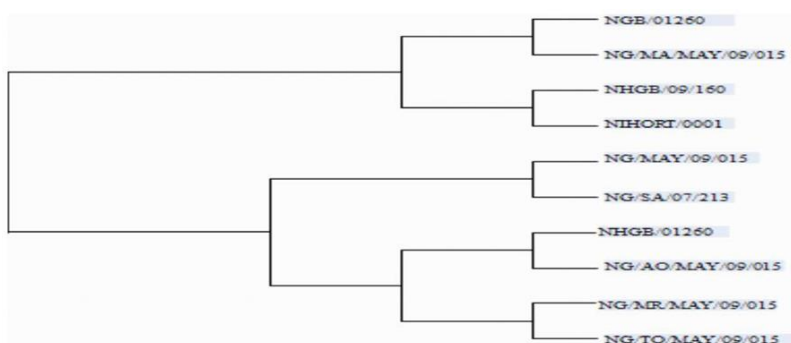


图1聚类树显示青葙基因型之间的遗传关系

Figure 1 Dendrogram tree showing the genetic relationship among genotypes of *Celosia argentea*

C. argentea 基因型进行了使用六种不同的引物组合与四种反应基因组 DNA 的优化反应(图 2)。在反应 1 后反应 3 产生最好的评价性的扩增条带。反应 1 中, G1, G4, G5 和 G10 是与其他基因型相比, 显示最为显著的条带。

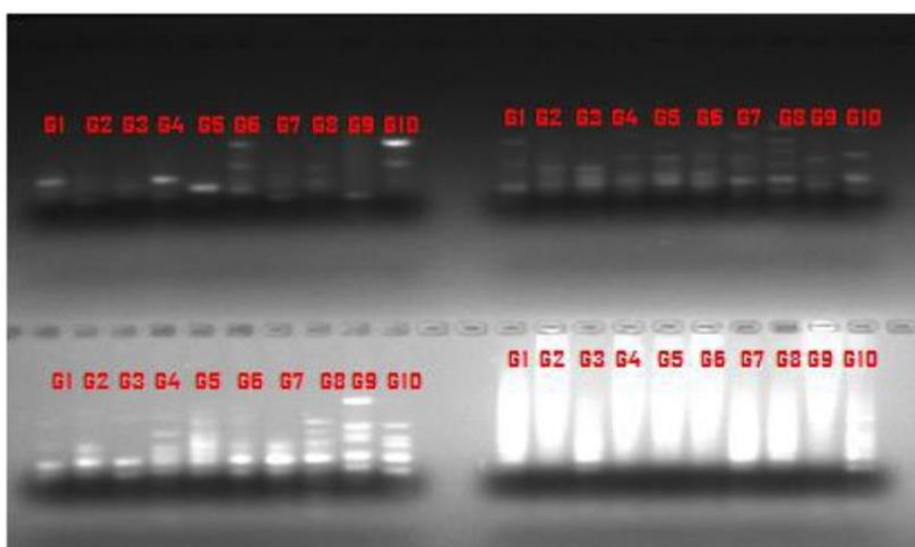


图 2 琼脂糖凝胶剖面的青葙基因的基因组 DNA 的优化

Figure 2 Agarose gel profile showing the optimization of genomic DNA of *Celosia argentea* genotypes

用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离 DNA 扩增片段, 在研究种群中发现了多态性(图 3)。引物的梯子, 就是 100 个碱基对, 在每个基因型中的三个引物组合标记的多态性带。引物组合 E-AAC+M-CAG 扩增, 产生的多态性条带数最多。



图3 AFLP PAGE产品揭示扩增片段多态性条带

注: AFLP:扩增片段长度多态性; PAGE:聚丙烯酰胺凝胶电泳

Figure 3 AFLP PAGE product revealing Amplified Fragments and Polymorphic Bands

Note: AFLP: Amplified Fragments Length Polymorphism; PAGE: Polyacrylamide Gel Electrophoresis

多态信息含量(PIC)*C. argentea* 89.1%表明该种群的变异存在于生物体的基因组同样被 Denton(2004)报道了。这表明, 在这种作物的改良之后, 这些基因型可能是有用的育种材料。聚类分析树状图表明, 集群团体由不同地理背景和广泛的适应性, 已被归因于群体遗传结构的基因型, 国内培育与发展中的选择历史与方法特点(Ganapathy et al., 2011; Olawuyi et al., 2015)。

3 材料与方法

3.1 *C. argentea* 种质资源收集

C. argentea 十基因来源于国家园艺研究所(nihort)和位于尼日利亚的伊巴丹市国家遗传资源和生物技术中心(nacgrab); NGB 01260, NG/MA/MAY/09/015, NHGB/09/160, NIHORT/0001, NG/MAY/09/015, NG/SA/07/213 和 NHGB/01260。

3.2 实验地点和种植程序

分子生物学研究在位于伊巴丹国际热带农业研究所生物科学实验室进行(IITA), 而田间试验在位于伊巴丹大学植物学研究农场进行。这些品种在育苗袋中培育两个星期, 随后新鲜的年轻的顶端叶被收集到冰袋运送到分子研究实验室。

3.3 DNA 提取

在年轻的顶端叶片提取采用 AFLP 技术评价十 *C. argentea* 基因型的遗传变异。从冰冻的叶组织中提取总DNA(50~100 毫克), 使用应用程序在 D2 生物技术 X-Tract。

3.4 DNA 量化和 AFLP 协议

在用 DNA 量化试剂盒测定 DNA 浓度在最终制备中的应用量化。纳米滴 DNA 量化显示吸收液比在 260/280 nm。这比率用于验证从植物样品中提取的总基因组 DNA 的质量和数量方面核酸的纯度。由 Vos 等人(1995)最初描述的 AFLP 协议。利用 AFLP 试剂盒进行各种商业组件。AFLP 引物; EcoRI 和 MseI 进行的研究(表 3)。

表 3 AFLP 引物组合和核苷酸序列

Table 3 AFLP primer combinations and nucleotide sequences

Primer combination	Nucleotide sequences
AAC+CAG	EcoRI-5'-GACTGCGTACCAATTCA-3' MseI-5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'
AAC+CAA	EcoRI-5'-GACTGCGTACCAATTCA-3' MseI-5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'
AAC+CAC	EcoRI-5'-GACTGCGTACCAATTCA-3' MseI-5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'

3.5 基因组 DNA 的消化和寡核苷酸适配器的结扎



通过限制性内切酶 EcoRI 和 MseI 与寡核苷酸接头结扎消化基因组 DNA 在一个单一的 11 μ L 中反应混合物。在每次使用前完成, 适配器对预加热 5 分钟到 95 $^{\circ}$ C, 然后缓慢冷却 10 分钟在 25 $^{\circ}$ C。混合室温度孵育过夜以室温完全消化模板 DNA。

3.6 DNA 的预选择 PCR 扩增

预选择性 PCR 扩增使用 Applied Biosystems AFLP 试剂盒进行。20 μ L 反应包含 4 μ L 稀释限制/连接 DNA 和 1 μ L 的 EcoRI 和 MseI AFLP 选择性引物 C 和 15 μ L AFLP 核心混合的混合物 16 μ L。对于预先选择性扩增 PCR 程序是: 72 $^{\circ}$ C 3 分钟, 其次是 20 个的重复周期: 94 $^{\circ}$ C 20 S, 56 $^{\circ}$ C 30 S, 72 $^{\circ}$ C 2 分钟, 最终以 60 $^{\circ}$ C 保持 30 分钟。

3.7 DNA 的选择性 PCR 扩增

对选择性扩增引物片段, 制备了用于识别的 EcoRI 和 MseI 适配器。片段是通过附加一个 D4 可视化, D3 或 D2 wellredTM染料各进行选择性扩增引物 5 端无 MseI 引物修饰。

3.7 用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 PCR 产物的 DNA 扩增片段的制备

一个 100 个碱基对(bp)的加载方案制备 DNA 大小标准标记 wellredTM染料 D1(约 100:1; Beckman Coulter 608082, 608098)。这个解决方案是由至少两分钟搅拌充分混合。30 μ L 等分的这种混合物是增加了选择性扩增产物 1.5 μ L 装入准备好的

3.7 数据的得分和 AFLP 产品分析

从三个引物组合和多态性带的总带进行了评分, 观察到的存在(1)或不存在(0)。此外, 聚类分析树状图是通过 PowerMarker V3.25 软件使用构造, 用 UPGMA 方法揭示亲缘关系遵循 Jaccard 的相似系数。

参考文献

- Aman C., Susana R.M., David L.J., Alan C.Y., James D.B., Carolina Z., Jared R.W., and Stanley C., 2013, Use of AFLP Markers to Assess Genetic Diversity in Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*) Populations from North Carolina and Georgia, *Weed Sci.*, 61(1): 136-145
<http://dx.doi.org/10.1614/WS-D-12-00053.1>
- Ayodele J.T., and Olajide O.S., 2011, Proximate and Amino Acid Composition of *Celosia argentea* Leaves, *J. Basic Appl. Sci.*, 19(1): 162-165
<http://dx.doi.org/10.4314/njbas.v19i1.69363>
- Denton O.A., 2004, *Celosia argentea* L. In: Grubben, G.J.H. & Denton, O.A. (Editors). PROTA 2, Vegetables/Légumes. PROTA, Wageningen Netherlands
- Esayas A., and Bryngelsson T., 2006, Inverse sequence-tagged repeat (ISTR) analysis of genetic variability in forest coffee (*Coffea Arabica* L.) from Ethiopia, *Genet. Resour. Crop Evol.*, 53: 721-728
<http://dx.doi.org/10.1007/s10722-004-5729-5>
- Figueira G.M., Bajay M.M., Silva C.M., Zucchi M.I., Monteiro M., and Rodrigues M.V., 2011, Development and characterization of microsatellite markers for *Hebanthe eriantha* (Amaranthaceae), *Am. J. Bot.*, 98(10): e282-3
<http://dx.doi.org/10.3732/ajb.1100180>
- Ganapathy K.N., Gnanesh B., Gowda N., Byre M., Venkatesha S.C., Gomashe S.S., and Mallikarjuna V.C., 2011, AFLP analysis in pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) revealed close relationship of cultivated genotypes with some of its wild relatives. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 58: 837-847
<http://dx.doi.org/10.1007/s10722-010-9621-1>
- Grubben G.J.H., and Denton O.A., 2004, Vegetables, Plant Resources of Tropical Africa 2 PROTA Foundation, Wageningen, Netherlands/Backhuys Publisher Leiden, Netherlands/CTA, Wageningen, Netherlands, pp.217-221
- Olawuyi O.J., Bamigbegbin B.J., and Bello O.B., 2016, Genetic variations on morphological and yields characters of *Celosia argentea* L. Germplasm, *J. Basic Appl. Sci. Int.*, 13(3): 160-169
- Olawuyi O.J., Bello O.B., Ntube C.V., and Akanmu A.O., 2015, Progress from Selection of Some Maize Cultivars' Response to Drought in the Derived Savanna of Nigeria, *J. Agric. Sci. AGRICVITA*, 37(1): 8-17
<http://dx.doi.org/10.17503/agrivita-2015-37-1-p008-017>
- Vos P.H., Rene B., Marjo R., Martin V.L., Theo H., Miranda F., Adrie P., Jerina P., Johan K.M., and Zabeau M., 1995, AFLP: A new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acids Res.*, 23(21): 4407-4414
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>
- Wassom J.J., and Tranel P.J., 2005, Amplified fragment length polymorphism-based genetic relationships among weedy *Amaranthus* species, *J. Hered.*, 96:410-416
<http://dx.doi.org/10.1093/jhered/esi065>