

袁卫明,宋虎卫,杨益花,等. 枇杷 SRAP 标记体系优化及对枇杷矮化杂交种的鉴定[J]. 江苏农业科学,2015,43(12):36-40.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.010

# 枇杷 SRAP 标记体系优化及对枇杷矮化杂交种的鉴定

袁卫明<sup>1</sup>, 宋虎卫<sup>2</sup>, 杨益花<sup>1</sup>, 王化坤<sup>1</sup>, 张云峰<sup>2</sup>

(1. 苏州农业职业技术学院, 江苏苏州 2150082;

2. 淮阴师范学院生命科学院/江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室, 江苏淮安 223300)

**摘要:**通过单因素分析试验对枇杷 SRAP 扩增程序中退火温度和扩增体系中 4 个主要因子 DNA、dNTPs、*Taq* 酶及 Primers 含量进行优化,在此基础上对枇杷矮化杂交种 861 品系的真实性及其与 8 个白沙枇杷品种间亲缘远近关系进行了 SRAP 标记鉴定与分析。结果发现:(1)优化后的枇杷 SRAP 体系(15  $\mu$ L)为:1.5  $\mu$ L 10  $\times$  PCR buffer( $Mg^{2+}$  plus), 9.9  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 36 ng DNA, 1.2  $\mu$ L 2.5 mmol/L dNTPs, 0.48  $\mu$ L 10  $\mu$ mol/L 上下游 Primer, 0.24  $\mu$ L 2.5 U/ $\mu$ L *Taq* 酶; SRAP 后 35 个循环中退火温度优化为 50  $^{\circ}$ C (引物  $T_m > 48$   $^{\circ}$ C 时)或 45  $^{\circ}$ C (引物  $T_m < 48$   $^{\circ}$ C 时)复性 1 min。(2)6 对 SRAP 引物在矮化杂种 861 品系中均扩增出父本特异带,表明其为真实杂种。(3)杂种 861 品系与 8 个白沙枇杷品种可被划分为 3 大类群(由近及远):5 个江苏枇杷资源品种群(包含杂种 861 及其父本)、浙江栽培品种宁海白和实生冠玉类群(3 个品种)。以上结果表明,优化后的 SRAP 体系能良好适用于枇杷杂种鉴定和亲缘关系分类等枇杷分子辅助育种工作。

**关键词:**枇杷;SRAP 标记;体系优化;矮化杂种;鉴定

**中图分类号:** S667.303 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)12-0036-05

枇杷 (*Eriobotrya japonica* Lindl.) 系蔷薇科苹果亚科 (Mloideae) 枇杷属 (*Eriobotrya*) 常绿乔木果树,果实营养丰富,并具有止咳、抗癌等药用价值,栽培经济价值高。我国是枇杷的起源地,种质资源丰富,原产于我国的枇杷属植物有 21 个大种类<sup>[1-2]</sup>,我国培育的枇杷栽培品种已超过 100 种<sup>[3]</sup>。然而,目前我国枇杷栽培品种仍以大或中冠乔化稀植树体为主,缺少矮化密植品种,易导致管理不便,产量、品质和效益降低,

以及难以适应设施栽培等现实问题。我们经过多年的实践探索,从半矮化枇杷双亲品种甜种与白玉杂交的 F<sub>1</sub> 代植株在性状分离后,通过形态学鉴定获得了矮化性状突出、稳定的枇杷杂交株系 861。进一步利用分子标记技术对枇杷矮化杂交种真实性进行分子水平鉴定及评价,是加快枇杷矮化育种进程的必需工作。目前,RAPD、SSR 等分子标记技术已在桃<sup>[4]</sup>、梨<sup>[5]</sup>、杨梅<sup>[6]</sup>、香橙<sup>[7]</sup>、李<sup>[8]</sup>、石榴<sup>[9]</sup>等果树品种遗传多样性与亲缘关系评价、杂交后代鉴定等育种工作方面进行了应用。

相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)是 2001 年由美国加州大学蔬菜系 Li 和 Quirós 发明的一种基于 PCR 反应的分子标记技术,具有简便、快速高效、共显性、产率高、重复性好、多态性丰富、成本低及无需预知物种序列信息等众多优点<sup>[10-12]</sup>。SRAP 标记克

收稿日期:2014-11-21

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项(编号:201003073);江苏省科技支撑计划(编号:BE2010322);江苏省自然科学基金(编号:BK2011316)。

作者简介:袁卫明(1964—),男,江苏苏州人,研究员,主要从事枇杷栽培育种与技术推广工作。E-mail: ywm357@163.com。

提取。

## 参考文献:

- [1] 李小芳,罗庆洪,任文. 延胡索炮制前后生物碱含量测定及镇痛作用的对比研究[J]. 湖南中医药导报,2001,7(5):253-255.
- [2] 张玲,李海,李秀娟,等. HPLC 法测定元胡及配伍药对中元胡索乙素的含量[J]. 兰州大学学报:医学版,2007,2(2):48-51.
- [3] 徐建中,孙乙铭,俞旭平,等. 鲜元胡一体化加工炮制技术研究[J]. 中国中药杂志,2011,18(18):2484-2488.
- [4] 赵妹华,王富德,张世革,等. 提取纯化植物 DNA 的方法比较[J]. 国外农学:杂粮作物,1998,18(2):35-38.
- [5] 王冠明,韩烈保,马秀杰,等. 麦冬基因组 DNA 提取方法研究[J]. 生物技术通报,2010(6):100-106.
- [6] 黄东亮,覃肖良,廖青,等. 高质量甘蔗基因组 DNA 的简便快速提取方法研究[J]. 生物技术通报,2010(5):101-106.

- [7] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochemical Bulletin, 1987, 19: 11-15.
- [8] 王关林,方宏筠. 植物基因工程[M]. 2 版. 北京:科学出版社, 2002:742-743.
- [9] 王镜岩,朱圣庚,徐长发. 生物化学[M]. 3 版. 北京:高等教育出版社,2002:507-508.
- [10] 朱玉贤,李毅,郑晓峰. 现代分子生物学[M]. 3 版. 北京:高等教育出版社,2007:172-173.
- [11] 吴娟,吴金平. 水稻基因组 DNA 微量提取[J]. 生物学杂志, 2007,24(4):55-57.
- [12] 郝朝运,刘鹏,郭卫东,等. 忍冬科部分植物 DNA 提取方法的研究[J]. 浙江师范大学学报:自然科学版,2006,29(1):92-98.
- [13] Sanbrook J. 分子克隆实验指南[M]. 北京:化工出版社,2005.
- [14] 应站明,应正河,潘伟华. 桫欏科植物 DNA 提取方法研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(8):3922-3924.

服了 RAPD 标记的重复性差、AFLP 标记的繁琐昂贵、ISSR 属显性标记的不足<sup>[13-14]</sup>。SSR 标记也以多态性高、重复性好、共显性等优点获得高度公认,但其高效引物的开发依赖于物种基因组序列(枇杷基因组尚未测序),而且 SSR 标记位点与目标基因相距一般较远,对性状预测准确性降低<sup>[15]</sup>。SRAP 标记主要针对开放阅读框(ORFs)进行扩增(上游引物针对外显子区域,下游引物针对内含子、启动子区域进行扩增),因物种、个体的内含子、启动子及间隔区长度不同而产生多态性<sup>[16]</sup>,且引物设计无需预知物种基因组序列<sup>[12]</sup>。SRAP 技术目前已广泛应用于植物遗传多样性分类、遗传图谱构建、亲缘关系分析、品种指纹图谱鉴别、杂交后代与种子纯度鉴定、目标基因定位等分子标记辅助育种方面<sup>[13-15,17]</sup>。

SRAP 最佳反应体系与植物种类有关<sup>[13,17-18]</sup>,前人在苹果<sup>[10]</sup>、葡萄<sup>[17]</sup>、三华李<sup>[18]</sup>、柑橘<sup>[19]</sup>、柿<sup>[20]</sup>、澳洲坚果<sup>[21]</sup>、核桃<sup>[22]</sup>等果树上进行了 SRAP 体系优化,乔燕春等以西班牙枇杷品种 Javierin 为试材进行了 SRAP 体系优化,但多次实践发现其在实生冠玉、丰玉等国内某些枇杷品种扩增中并不能获得良好条带<sup>[11]</sup>。本研究通过单因素分析试验,以我国枇杷品种为材料,先对枇杷 SRAP 技术体系进行优化,然后应用其对枇杷矮化杂交种真实性及其与 8 个枇杷品种遗传多样性与亲缘关系进行分析,为枇杷矮化杂交育种和品种指纹图谱的建立提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用的枇杷品种(系)来自江苏省太湖常绿果树技术推广中心(苏州)江苏省枇杷种质资源圃,包括半矮化双亲品种白玉(母本)与甜种(父本)及其 F<sub>1</sub> 代杂交种 861 品系,5 个江苏枇杷资源品种:实生冠玉、冠玉、美玉、丰玉、青种,1 个浙江资源品种宁海白,共 9 个均为白沙系统枇杷品种(系)。初

夏采集幼叶,置于冰盒即刻带回实验室,用自来水洗净叶面灰尘及绒毛后晾干,供提取 DNA 用。

SRAP 扩增试剂 *Taq* 酶与 10 × PCR buffer (Mg<sup>2+</sup> Plus)、dNTPs 购自广东东盛生物科技有限公司(国产),DNA 提取及电泳相关试剂 CTAB、PVP K-30、琼脂糖、Marker D2000、乙醇、氯仿、异戊醇、KCl 等均购自北京天根(TIANGEN)生化科技有限公司。SRAP 引物来源于发明人 Li 和 Quiros 报道的引物库<sup>[10]</sup>:反向引物 me1~9,正向引物 em1~11,随意组合后进行多态性引物对筛选,引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取 称取各枇杷品种(系)幼叶 2.0 g,置于研钵中加入液氮,快速研磨至细粉,采用改良 CTAB 法提取枇杷基因组 DNA<sup>[23]</sup>。将所有品种 DNA 浓度定量到 30 ng/μL,取 1 μL 加入 5 μL 6 × Loading buffer 混匀,0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 SRAP 退火温度试验 在 Li 和 Quiros 发明的 SRAP 扩增程序<sup>[10]</sup>基础上,根据引物 *T<sub>m</sub>* 分布范围设置 3 个不同退火温度:50、47、45 ℃,其余保持不变,即全程序为:94 ℃ 预变性 5 min,先 5 个循环(94 ℃ 1 min,35 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min),再 35 个循环(94 ℃ 变性 1 min,不同退火温度 1 min,72 ℃ 1 min),最后 72 ℃ 延伸 10 min。在同一台 GeneAmp PCR® System 9700 扩增仪上进行,用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色 20 min 后在 Bio-rad 凝胶成像系统中检测条带,用 Quantity One 4.6 软件分析图像。

1.2.3 SRAP 反应体系参数的优化 采用单因素梯度变化分析法对 SRAP 反应体系中 4 种主要参数 DNA 模板、dNTPs、Primers、*Taq* 酶的含量进行水平设计(表 1)。SRAP 反应总体积为 15 μL,以丰玉与实生冠玉各 50% DNA 混合样为模板进行试验。

表 1 枇杷 SRAP 反应体系中 4 种主要参数用量水平设计

可变因素	DNA(30 ng/μL)	dNTPs(2.5 mmol/μL)	Primers(10 μmol/μL)	<i>Taq</i> 酶(2.5 U/μL)
试验水平	0.6、1.2、2.0、3.2 μL	0.96、1.2、1.44、1.68 μL	0.36、0.48、0.60、0.72 μL	0.48、0.60、0.72、0.84 U
固定因素	1.5 μL 10 × PCR buffer, 1.2 μL dNTPs,0.48 μL Primers,0.24 μL <i>Taq</i> 酶	1.5 μL 10 × PCR buffer, 1.2 μL DNA,0.48 μL Primers,0.24 μL <i>Taq</i> 酶	1.5 μL 10 × PCR buffer, 1.2 μL dNTPs,1.2 μL DNA, 0.24 μL <i>Taq</i> 酶	1.5 μL 10 × PCR buffer, 1.2 μL dNTPs,0.48 μL Primers,1.2 μL DNA

注:SRAP 反应总体积为 15 μL。

1.2.4 SRAP 对枇杷矮化杂种真实性的鉴定 以枇杷矮化杂交种 861 品系及其父本(甜种)、母本(白玉)分离的 DNA 为材料,应用优化后的枇杷 SRAP 标记体系,用筛选出的具有多态性的 16 对引物组合进行 SRAP 扩增,2.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。杂种真伪性判断标准是看杂种 SRAP 图谱中是否存在父本特征带,若有则确定为父母本真实杂交后代<sup>[12,24]</sup>。

1.2.5 SRAP 对枇杷矮化杂种与其他 8 个枇杷品种间聚类分析 以枇杷矮化杂交种 861 品系及其双亲品种白玉(母本)与甜种(父本)、5 个江苏枇杷资源品种(实生冠玉、冠玉、美玉、丰玉、青种)和 1 个浙江品种(宁海白)分离的 DNA 为材料,应用优化后的枇杷 SRAP 标记体系用 16 对引物进行扩增和电泳检测(条件同上),筛选出能区分开 9 个品种(系)的 SRAP 多态性图谱。根据电泳图谱中条带的有无转化成[0,1]矩阵,利用 NTSYS-PC 2.10 e 软件计算相似系数,并根据

相似性系数 SM 矩阵采用 UPGMA 法聚类分析,构建遗传多样性树状图,分析 9 个品种(系)间亲缘远近关系。

2 结果与分析

2.1 枇杷 SRAP 退火温度的选择

退火温度是影响 PCR 扩增产物片段(带)数量及特异性的关键因素。Li 和 Quiros 提供的 SRAP-PCR 引物库<sup>[10]</sup>中正、反向引物(me1~9 和 em1~11) *T<sub>m</sub>* 值分布在 45.1~51.8 ℃ 范围内,差异度较大,因此根据引物 *T<sub>m</sub>* 组合情况分区优化退火温度是有效开展枇杷 SRAP 辅助育种工作的必要前提。当采用较低 *T<sub>m</sub>* 值引物组合 em4/me5 (*T<sub>m</sub>* 分别为 46.1、48.7 ℃)进行 SRAP 扩增时,在设置的 3 个退火温度中,以 45 ℃ 复性时条带较多且明晰,50 ℃ 效果次之,而 47 ℃ 时几乎无扩增产物(图 1);当以较高 *T<sub>m</sub>* 值引物组合 em10/me5 (*T<sub>m</sub>*

分别为 48.1、50.2 ℃) 进行 SRAP 扩增时,退火温度则以 50 ℃ 时条带丰度和质量最好,47 ℃ 次之,而 45 ℃ 结果最差(图 1-B)。用上述 2 组引物进行 SRAP 重复试验后条带结果也稳定。我们选取的 2 对多态性引物  $T_m$  值基本代表了 Li 和 Quiros 的 SRAP 引物库<sup>[10]</sup>  $T_m$  范围(45.1~51.8 ℃),因此 SRAP 在枇杷上扩增的适宜退火温度为:当引物对中  $T_m$  最低值 >48 ℃ 时,以 50 ℃ 退火效果最好,而当引物对中  $T_m$  最低值 <48 ℃ 时,则以 45 ℃ 为退火温度较适宜。

2.2 枇杷 SRAP 模板 DNA 和 Taq 酶含量的优化

在枇杷 DNA 含量筛选试验中,SRAP 检测结果表明:18、36 ng DNA 含量扩增谱中主带强亮和弱带数量多,而 60、96 ng DNA 含量几乎没有扩增出弱带(图 2-A),所以选取 36 ng DNA 模板用量进行后续扩增。

在 Taq DNA 聚合酶含量筛选试验中,SRAP 结果表明:在 15 μL 体系中,加入 0.60、0.72、0.84 U 的 Taq DNA 聚合酶含量均扩增出了相一致的较多条带,但相比之下,以 0.60 U Taq 聚合酶扩增的主带最强(图 2-B),而 0.48 U Taq 聚合酶几乎未扩增出弱带。从节约角度综合考虑,选择 0.60 U Taq 聚合酶

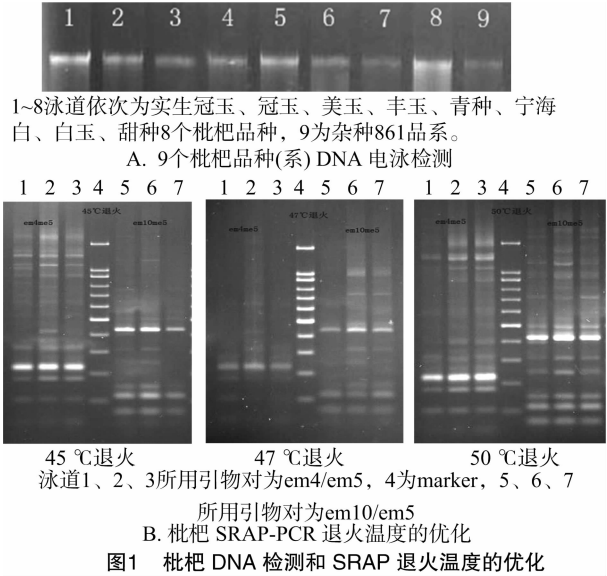
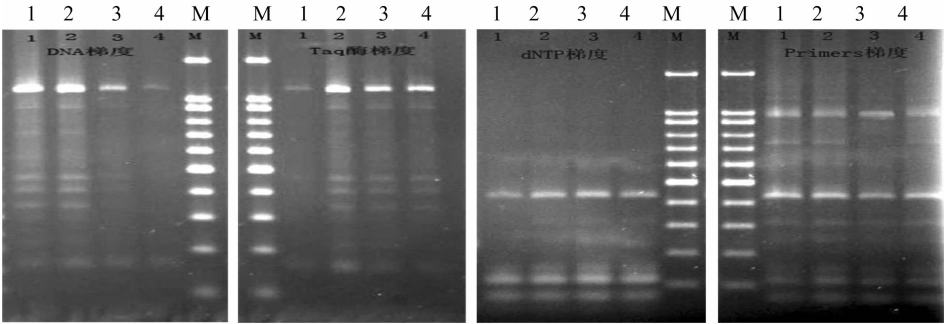


图1 枇杷 DNA 检测和 SRAP 退火温度的优化

进行枇杷 SRAP 扩增。



A. DNA梯度(em9/me3) B. Taq酶梯度(em9/me3) C. dNTPs梯度(em4/me5) D. Primers梯度(em10/me5)

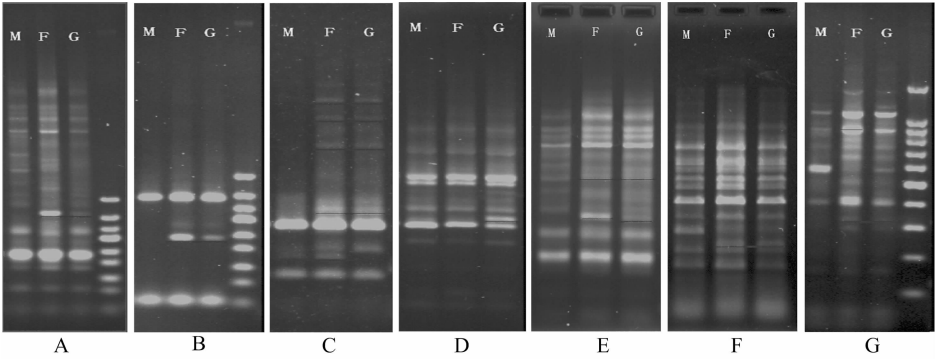
1~4泳道分别对应于表1中各参数从低到高的变化值, M为DL2000 marker。

图2 枇杷 SRAP 反应体系 4 个主要参数优化电泳检测

2.3 枇杷 SRAP 扩增 dNTPs 和 Primers 含量的优化

在枇杷 dNTPs 含量筛选试验中,SRAP 检测结果表明:加入 1.20、1.44 μL dNTPs (2.5 mmol/μL) 时扩增的主带较强

(15 μL 体系),而 0.96、1.68 μL dNTPs 用量扩增的主带较弱(图 3-C)。从节约角度考虑,选取 1.20 μL dNTPs 体积用量进行枇杷 SRAP 扩增。



M—母本, F—父本, G—杂交后代861, A—G图SRAP所用引物对依次为em3/me5、Em5/me6、em10/me7、em11/me2、em4/me5、em8/me6、em9/me3。

图3 多对 SRAP 引物对枇杷矮化杂种 861 植株真实性的鉴定

在 10 μmol/μL Primers (引物) 含量筛选试验中,SRAP 检测结果表明:0.36、0.48 μL Primers 体积用量扩增的主带较强,弱带能显现(图 2-D),而 0.60、0.72 μL Primers 扩增使有些弱带消失,因此,选取 0.48 μL Primers 体积用量进行枇

杷 SRAP 扩增。

2.4 SRAP 标记技术对枇杷矮化杂交后代真实性的鉴定

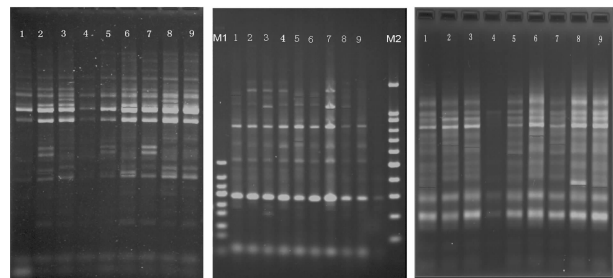
应用优化后的枇杷 SRAP 技术体系,对半矮化双亲枇杷品种白玉(母本)与甜种(父本)杂交 F<sub>1</sub> 代中 1 株具有矮化形

态学特征的宝贵株系 861 进行分子标记鉴定,结果表明,em3/me5、em5/me6、em10/me7、em4/me5、em8/me6、em9/me3 等 6 对引物在矮化杂种 861 植株中扩增出了父本特异带,即父本特有而母本缺失带(图 3-A、B、C、E、F、G)。判断杂交后代真实性的标准,目前最根本的看法是杂交株中出现父本特征带<sup>[12,16,24]</sup>,若杂种中只具有母本特异带则被认为是母本自花授粉形成的自交后代,即假杂种<sup>[12]</sup>。因此,6 对引物都扩增出父本特征带,这充分表明矮化杂种 861 为父母本的真实杂交后代。

此外,引物对 em11/me2 和 em10/me7 在杂种 861 株系中分别产生了 1 条创新带,即父母本中都不具有的带(图 3-D),以及 1 条缺失带,即父母本中共有的带消失(图 3-C),这种情况表明杂交种 861 株系中 DNA 获得了双亲遗传之外的变异<sup>[25]</sup>。

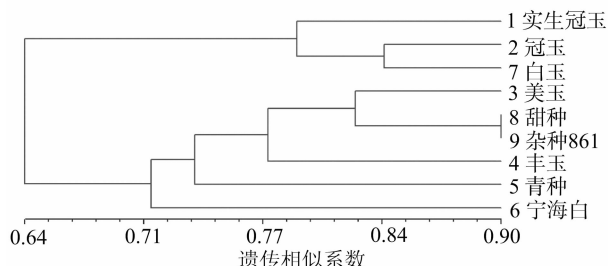
## 2.5 SRAP 标记对枇杷矮化杂种与其他白沙枇杷品种聚类分析

从 16 对 SRAP 引物组合中筛选出 3 对多态性丰富的引物对,即 em9/me3、em6/me6、em4/me5 能将 9 个枇杷品种(系)完全区分开(图 4-A),3 对引物共扩增出 41 个多态性位点,平均每对引物扩增出 13.6 个位点,说明优化后的 SRAP 体系具有高产率和良好的多态区分性,完全适用于枇杷遗传育种研究。



A1. 引物em9/me3 A2. 引物em6/me6 A3. 引物em4/me5  
图 A1 和 A3 中 1~9 泳道枇杷品种(系)顺序为实生冠玉、冠玉、美玉、丰玉、青种、宁海白、白玉、甜种、杂种 861; 图 A2 中 1~9 枇杷品种(系)顺序为实生冠玉、冠玉、美玉、青种、宁海白、白玉、甜种、杂种 861、丰玉, 分子量标准 M1 为 DL 1 000 bp, M2 为 DL 2 000 bp。

A. 3对引物对 8 个枇杷品种及矮化杂种的 SRAP 扩增结果



B. SRAP 标记对 9 个枇杷品种(系)的聚类树状图(多态性引物组合为 Em9/me3+em6/me6+em4/me5)。

图4 SRAP 标记对矮化杂种 861 与 8 个枇杷品种的聚类结果

聚类分析结果表明,杂种 861 品系与 8 个白沙系统枇杷品种间,在遗传相似系数为 0.741 处可被划分为 3 大类群(图 4-B):第 I 大类群包括杂种 861 品系与其父本在内的 5 个江苏枇杷资源品种群,其中矮化杂种 861 与其父本甜种优先并列聚在一起,体现出二者高度近亲遗传关系,然后它们依次

与美玉、丰玉和青种江苏枇杷栽培品种聚在一起;第 II 类只有宁海白品种,为浙江枇杷种质资源培育的栽培品种,表现出与第 I 类群江苏枇杷种质资源培育的 5 个栽培品种亲缘关系相距较远;第 III 类群包括实生冠玉、冠玉和白玉(母本)3 个品种,皆由江苏枇杷资源实生选种而来,暂称为实生冠玉类群,其中白玉与冠玉 2 个栽培品种优先聚在一起,然后才与实生冠玉聚在一起,具有形态学分类合理性。从本 SRAP 标记聚类结果可以看出,杂交亲本中母本白玉(第 III 类群)与父本甜种(第 I 类群)的亲缘关系相距较远(遗传距离为 0.548),符合杂交亲本间亲缘关系相距较远的一个基本原则。上述 SRAP 聚类分析结果与 9 个枇杷品种(系)基于叶片、果实等形态学分类结果基本上一致。

## 3 讨论

### 3.1 枇杷 SRAP 标记技术体系的优化

SRAP 最佳反应体系与植物种类有关<sup>[13,17-18,26-27]</sup>,还受选购的 PCR 试剂及 PCR 仪影响。前人在苹果<sup>[10]</sup>、葡萄<sup>[17]</sup>、三华李<sup>[18]</sup>、柑橘<sup>[19]</sup>、柿<sup>[20]</sup>、澳洲坚果<sup>[21]</sup>、核桃<sup>[22]</sup>等果树上均进行了相应 SRAP 体系优化。乔燕春等<sup>[11]</sup>2008 年以西班牙枇杷品种 Javierin 为试材进行了 SRAP 体系优化,但实践发现其在国内某些枇杷品种(如本试验中的实生冠玉、丰玉品种)扩增中并未获得良好条带,因此,根据物种进行 SRAP 体系的优化是获得良好研究结果的先决条件。

SRAP 反应体系中不同关键因子对扩增产物的影响机理是不同的。DNA 模板含量制约 SRAP 扩增产物的得率和特异性,DNA 含量过高会增加非特异性产物,影响结果可靠性;而含量过少时分子碰撞概率减小致扩增不稳定或产物量不足、弱带过多或无条带<sup>[28-29]</sup>。dNTPs 为 DNA 合成提供核苷酸来源,影响 SRAP 扩增产物量,其浓度过高会导致核苷酸的错误掺入形成假带,过低则降低 DNA 合成效率导致条带数量减少甚至多态性消失<sup>[30]</sup>。Primers 浓度过高会加剧非特异性扩增和错配使伪带增多,过低则降低扩增产物量形成大量弱带或丢带<sup>[29-30]</sup>。Taq 酶用量直接影响 SRAP 多态性扩增产率和结果的稳定重现性,用量过大易产生非特异产物条带,过小则限制扩增效率使产物量减少<sup>[28-30]</sup>。Taq 酶质量也是决定 SRAP 扩增产物比率的关键因素,本试验采购的 Taq 酶为国产中等质量,虽然有些检测结果显示存在模糊的弱带现象,但并不影响得出枇杷杂种鉴定和聚类分析结论的合理性。因此,本试验确立的枇杷 SRAP 优化技术体系,对我国枇杷分子遗传研究与辅助育种有着重要应用价值。

### 3.2 SRAP 标记在枇杷矮化杂种鉴定及聚类分析中的应用

SRAP 标记是 Li 和 Quiros 在总结 RAPD、AFLP、SSR 等分子标记优缺点的基础上开发的一种基于 PCR 反应的分子标记技术<sup>[10]</sup>,方兴未艾。利用 SRAP 标记进行杂种鉴定,不仅操作方便、省时省钱,而且结果客观可信。SRAP 对杂种真实性的判断标准,目前比较公认的依据是杂种中是否有扩增出父本特征带,即具有父本特异带的杂交后代判断为真杂种<sup>[3,12,24]</sup>,若只具有母本特征带,则很可能是通过母本自花授粉形成的自交后代,判断为假杂种<sup>[3,24]</sup>,这在假结缕草<sup>[12]</sup>、结缕草<sup>[16]</sup>杂种及苦瓜<sup>[31]</sup>种子纯度鉴定方面都进行了应用。本试验中有 6 对 SRAP 引物在枇杷矮化杂种 861 株系中都扩增

出父本(甜种)的特征带,因此可以充分判断其为矮化真杂种,这对我国枇杷矮化新品种培育具有重要意义。另外,有 2 对引物在枇杷杂种 861 株系中还各产生了 1 条创新带(图 3-D)和 1 条缺失带(图 3-C),说明杂种株系中 DNA 发生了部分序列的变异,这也可能是导致其产生矮化性状的分子机理之一,需要做进一步的遗传变异筛选研究。在 SRAP 对小麦与野燕麦远缘杂交后代的鉴定<sup>[25]</sup>和枇杷杂交后代 RAPD 鉴定<sup>[3]</sup>结果中,也出现了新带型或缺失带,乔燕春等直接将只具有新带型的杂交种枇杷判断为真杂种<sup>[3]</sup>。我们认为杂种株中若含有创新带或缺失带,还应同时具有父本特征带,才能可靠地判断为真杂种。

在应用 SRAP 对矮化杂种 861 品系及其双亲与其他 6 个枇杷品种间遗传多样性与亲缘关系聚类分析中,这 9 个同属白沙系统的枇杷品种(系)总体上可被划分为 3 大类群:5 个江苏枇杷品种(系)群、浙江宁海白种群和实生冠玉类品种群,这与它们基于叶片、果实等形态学特征划分类别基本上相一致,体现出 SRAP 标记的客观、高效性。在 5 个江苏枇杷品种(系)群中,杂种 861 与其父本甜种首先并列聚在一起,真实反映了二者矮化特征高度相似的近亲关系,而母本白玉聚在实生冠玉类群,与父本甜种之间遗传距离(0.548)较大,符合杂交亲本选配基本原则之一。另外,浙江枇杷种质资源选育的宁海白品种与江苏枇杷种质资源选育的 8 个品种(系)划分为不同类群也是比较合理的,体现了白沙枇杷系统内不同地区种质资源的遗传背景差异性。在这 9 个品种(系)中,除杂种 861 是白玉与甜种通过有性杂交方式选育外,冠玉、白玉、甜种、宁海白等其他 8 个白沙枇杷品种都是经过实生变异选种方式产生,而且这 8 个品种的亲本系谱来源都不详。本研究利用优化后 SRAP 标记对枇杷矮化杂交种真实性的鉴定和分析其与其他白沙系统枇杷品种间亲缘关系的成果,将对我国枇杷新品种培育具有重要参考价值。

#### 参考文献:

- [1] 林顺权,杨向晖,刘成明,等. 中国枇杷属植物的自然地理分布[J]. 园艺学报,2004,31(5):569-573.
- [2] 董燕妮,邓琼仙,王永清. 我国枇杷种质资源与育种的研究进展[J]. 亚热带农业研究,2008,4(2):91-96.
- [3] 乔燕春,林顺权,何小龙,等. 普通枇杷种内和种间杂种苗的 RAPD 鉴定[J]. 果树学报,2010,27(3):385-390.
- [4] 史红丽,韩明玉,赵彩平. 桃遗传多样性的 SRAP 和 SSR 标记分析[J]. 华北农学报,2009,24(6):187-192.
- [5] 玉苏甫·阿不力提甫,阿依古丽·铁木儿,罗淑萍,等. 用 SRAP 分子标记分析新疆梨栽培品种遗传多样性[J]. 新疆农业大学学报,2013,36(5):377-382.
- [6] 林旗华,钟秋珍,张泽煌. 18 份杨梅种质资源遗传多样性的 SRAP 分析[J]. 热带作物学报,2013,34(9):1667-1671.
- [7] 杨海健,周心智,弓亚林,等. 川渝地区香橙资源遗传多样性及亲缘关系研究[J]. 果树学报,2014,31(4):544-550.
- [8] 刘雨,廖明安,邱丽娜,等. 李亲缘关系 SRAP 分析[J]. 热带作物学报,2014,35(5):904-908.
- [9] 张四普,汪良驹,曹尚银,等. 23 个石榴基因型遗传多样性的 SRAP 分析[J]. 果树学报,2008,25(5):655-660.
- [10] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction; its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103(2/3):455-461.
- [11] 乔燕春,林顺权,刘成明,等. SRAP 分析体系的优化及在枇杷种质资源研究上的应用[J]. 果树学报,2008,25(3):348-352.
- [12] 郑铁琦,宗俊勤,薛丹丹,等. SRAP 分子标记在假俭草杂交后代真实性鉴定中的应用[J]. 草地学报,2009,17(2):135-140.
- [13] 刘丽华,马小军,孙晶晶,等. 罗汉果 SRAP 反应体系的建立与优化[J]. 广西植物,2009(6):894-898.
- [14] 卢丽芳,朱海生,温庆放,等. 南瓜 SRAP 反应体系的建立与优化[J]. 福建农业学报,2014,29(1):40-46.
- [15] 陆才瑞,喻树迅,于雯雯,等. 功能型分子标记 (ISAP) 的开发及评价[J]. 遗传,2008,30(9):1207-1216.
- [16] 陈宣,郭海林,薛丹丹,等. 结缕草属植物杂交后代的 SRAP 分子标记鉴定[J]. 分子植物育种,2008,6(6):1233-1238.
- [17] 苑炜,朱瑜,代培红,等. 葡萄种质资源 SRAP-PCR 反应体系的建立及优化[J]. 新疆农业科学,2014,51(7):1227-1231.
- [18] 谢志亮,刘成明,吴振旺,等. 三华李 SRAP 反应体系的建立与优化[J]. 浙江农业学报,2013,25(5):1002-1006.
- [19] 吴鑫,雷天刚,何永睿,等. 柑桔 SRAP 和 ISSR 分子标记技术体系的建立与优化[J]. 分子植物育种,2008,6(1):170-176.
- [20] 郭大龙,罗正荣. 部分柿属植物 SRAP-PCR 反应体系的优化[J]. 果树学报,2006,23(1):138-141.
- [21] 郭凌飞,邹明宏,杜丽清,等. 均匀设计优化澳洲坚果 SRAP 反应体系[J]. 果树学报,2008,25(2):250-253.
- [22] 马明,杨克强,刘晓菊,等. 核桃 (*Juglans regia*) SRAP 标记反应体系建立的研究[J]. 山东农业大学学报:自然科学版,2007,38(2):189-192.
- [23] 刘月学,杨向晖,林顺权,等. 枇杷属植物基因组 DNA 提取方法的改进及其应用[J]. 果树学报,2005,22(2):182-185.
- [24] Ilbi H. RAPD markers assisted varietal identification and genetic purity test in pepper, *Capsicum annum* [J]. Scientia Horticulturae, 2003, 97(3/4):211-218.
- [25] 耿广东,张素勤,贾开家,等. 提莫菲维小麦与葡萄牙野燕麦远缘杂交后代的 SRAP 分析[J]. 华北农学报,2010,25(1):110-112.
- [26] 刘雅辉,王秀萍,鲁雪林,等. 26 份棉花耐盐相关种质资源遗传多样性 SRAP 分析[J]. 江苏农业学报,2014,30(1):219-221.
- [27] 魏博,汪元超,王大玮,等. 思茅松 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):27-30.
- [28] 曹亚,李官成,邓锡云. 实用分子生物学操作指南[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:132-134.
- [29] 任羽,王得元,张银东,等. 辣椒 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 分子植物育种,2004,2(5):689-693.
- [30] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning[M]. 2nd ed. Beijing: Science Publication, 2002:680-681.
- [31] 张少平,张玉灿,张伟光,等. RAPD 及 SRAP 两种分子标记技术对苦瓜杂交种纯度的鉴定分析[J]. 生物技术进展,2014(4):286-291.