

刘哲,许园园,苏小俊.萝卜抽薹相关SRAP分子标记筛选与分析[J].江苏农业科学,2016,44(8):74-76.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.020

# 萝卜抽薹相关SRAP分子标记筛选与分析

刘哲,许园园,苏小俊

(江苏省农业科学院蔬菜研究所,江苏南京 210014)

**摘要:**利用抽薹性状差异较大的晚抽薹萝卜品种L2和早抽薹萝卜品种E6配制杂交组合,构建F<sub>2</sub>群体。通过田间调查,选用极晚和极早抽薹单株分别构建晚抽池(BSA-1)和早抽池(BSA-2),用288对SRAP组合对两亲本进行PCR分析,共筛选出166对SRAP引物组合。通过2个基因池及基因池中各单株对筛选出的引物进行复筛,获得引物组合me3+em9,其在晚抽池中可扩增出多态性片段LB;对156株F<sub>2</sub>单株进行验证发现,LB与晚抽薹基因紧密连锁,其遗传距离为5.7 cM。

**关键词:**萝卜;晚抽薹;分子标记;遗传距离

**中图分类号:** Q943;S631.103 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0074-03

抽薹开花是农业生产上的一个重要现象,不仅对植物生殖器官的形成起关键作用,而且关系到植物的生物产量和产品品质。先期抽薹在十字花科作物栽培上是一个倍受关注的问题,不仅会降低十字花科作物的生物产量,而且会影响到产品的品质,晚抽薹是十字花科作物一个重要的育种目标<sup>[1]</sup>。生物技术的发展给作物遗传育种研究带来巨大变化,分子标记技术的应用是其中之一。分子标记具有位点丰富、多态性高、稳定可靠等特点,且检测不受时间和性状表达限制,可鉴别基因型的纯合或杂合。本研究利用与晚抽薹基因紧密连锁

的分子标记可以方便准确识别不同晚抽薹基因的特点,通过群体分离分析法(BSA)筛选出与晚抽薹萝卜基因紧密连锁的分子标记,以实现分子标记辅助育种,减少萝卜选育过程中对表型性状的依赖,从而大大提高萝卜的育种效率。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

萝卜晚抽薹品种L2,为韩国白玉春萝卜第9代自交系;早抽薹品种E6,为短叶13萝卜第10代自交系,均由江苏省农业科学院蔬菜研究所提供。将晚抽薹与早抽薹亲本进行杂交再自交,形成F<sub>2</sub>分离世代群体共计156株单株。引物由上海英俊进行合成;dNTPs、TaqDNA聚合酶等分子生物学试剂,均购于TaKaRa公司。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 DNA提取与检测** 试验于2014年在江苏省农业科学院园艺研究所高效园艺作物遗传改良重点实验室进行,基因组DNA提取采用改良的CTAB法。采用DYY-III-5型稳压稳流电泳仪,缓冲液为1.2% TAE,琼脂糖凝胶电泳检测,

收稿日期:2015-06-15

基金项目:“十二五”农村领域国家科技计划(编号:2012BAD02B01);江苏省科技支撑计划(编号:BE2013429);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(12)2006]。

作者简介:刘哲(1987—),男,山东曹县人,硕士,主要从事十字花科蔬菜遗传育种研究。E-mail:641509581@qq.com。

通信作者:苏小俊,博士,研究员,主要从事瓜类和十字花科蔬菜遗传育种研究。Tel:(025)84391259;E-mail:xiaojunsu@yahoo.com。

77.58%;白鹤芋植株再生转化最佳激素组合为0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA+0.5 mg/L GA<sub>3</sub>,植株再生率达88.56%,6-BA为植株再生转化的主要因素。

### 3.2 讨论

携带方便、价格便宜的小盆栽花卉颇受消费者的喜爱,市场的销售仍异常火爆<sup>[2]</sup>。小盆栽花卉生产在不断扩大,而白鹤芋正是众多小盆栽花卉中最具发展前景的花卉之一。为提高白鹤芋的繁殖速度,直接诱导体细胞胚胎,短期内高速繁殖白鹤芋种苗,是种苗繁育的有效途径。外植体选择对体细胞胚胎的诱导至关重要<sup>[3]</sup>,外植体的生长状态和细胞分裂程度决定了体细胞胚胎诱导的难易程度<sup>[4]</sup>,白鹤芋以花丝<sup>[5]</sup>和花序为外植体,其体胚的诱导较容易而且诱导率非常高,而以白鹤芋其他部位为外植体来诱导体胚的研究还未见报道。目前白鹤芋体细胞胚胎的研究中,花序细胞诱导发生部分还不是很清楚<sup>[6]</sup>,这有待进一步地深入研究。

## 参考文献:

- [1]于丽萍.花叶俱美的室内植物——白掌[J].绿化与生活,2002(2):28.
- [2]郭金凤.小盆栽产销两旺持续向好[N].中国花卉报,2007-10-18(3).
- [3]李一星,石晓峰,王建云,等.紫云英体细胞胚再生体系的建立[J].现代农业科技,2014(2):244-245.
- [4]Maheswaran G, Williams E G. Clonal propagation of *Trifolium pratense*, *T. resupinatum* and *T. subterraneum* by direct somatic embryo-genesis on cultured immature embryos[J]. Plant Cell Report, 1986, 5(3):165-168.
- [5]秦静远.白鹤芋花丝体细胞胚的诱导及快繁技术[J].中国农学通报,2005,21(9):67-69.
- [6]曹静,周丽依,邝哲师,等.白鹤芋花序体细胞胚胎发生及植株再生的研究[J].农业生物技术学报,1995,3(3):81-83.

电泳时电压 100 V (5 V/cm), 时间为 1 h。电泳结束, 在 FR-200 紫外可见分析装置上检测、照相, 记录结果。

1.2.2 SRAP 反应 采用优化的 SRAP 反应体系, SRAP 引物序列参考 Li 等信息<sup>[2-3]</sup>。PCR 反应体系 (10 μL) 为: 3.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L dNTPs, 0.3 μmol/L 上、下游引物, 0.6 U TaqDNA 聚合酶, 20 ng 模板 DNA。PCR 反应程序为 94 ℃ 变性 3 min; 94 ℃ 60 s, 35 ℃ 60 s, 72 ℃ 90 s, 5 个循环; 94 ℃ 60 s, 50 ℃ 60 s, 72 ℃ 90 s, 33 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物采用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 80 V 预电泳 30 min, 160 V 电泳 2.5 h。凝胶中含有 Arc : Bis 为 29 : 1 6.65 mL, 5 × TBE 5 mL, TEMED 20 μL, 10% AP 0.3 mL。1 × TBE 电泳缓冲液配方 (1 L) 为: 0.054 g Tris, 0.027 5 g 硼酸, 0.25 mol/L EDTA 0.04 mL, pH 值为 8.0。电泳结束, 采用 0.5% 冰醋酸、10% 乙醇固定 15 ~ 20 min, 0.2% AgNO<sub>3</sub> 溶液染色 12 ~ 15 min; 蒸馏水洗涤 2 次, 于含 1.5% NaOH、0.4% 甲醛、0.002% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 的显影液中显影, 白炽灯箱下观察拍照。

1.2.3 引物筛选 利用萝卜晚抽薹品种代号 L2 和早抽薹品种 E6 的 DNA 为模板, 从现有 288 对 SRAP 引物中筛选出双亲间存在多态性、条带清楚、易于识别、可以稳定扩增的引物; 基于抽薹性状表现型, 在 F<sub>2</sub> 群体中选取极早抽薹和极晚抽薹单株各 10 株, 构建早抽池 (BSA-1) 及晚抽池 (BSA-2), 待幼苗长至 5 叶 1 心时提取 DNA, 等量混合; 分别提取各单株基因组 DNA, 以早抽池、晚抽池及 2 个基因池中各单株 DNA 为模板, 对筛选出的多态性引物进行再次筛选, 寻找可能与目标基因连锁的标记; 用获得的 DNA 标记对 F<sub>2</sub> 群体进行标记。PCR 产物在 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳。

1.3 数据统计及连锁分析

用筛选到的具有多态性引物组合对待检测 F<sub>2</sub> 群体的 DNA 样品进行 PCR 扩增, 统计有差异、易于识别的多态性条带, 有带记为 1, 无带记为 0。田间调查时, 分别以 1、0 记录晚抽薹、早抽薹的植株; 根据引物扩增结果, 建立 SRAP 数据库; 使用 Joinmap 4.0 分析分子标记, 设最小 LOD 值为 3.0, 并用 Kosambi 函数将重组值转换成图距单位 (cM)。

2 结果与分析

2.1 DNA 检测结果

由图 1 可见, 本研究提取 DNA 凝胶电泳检测带型整齐一致, 无降解现象, 绝大多数 DNA 浓度介于 20 ~ 100 μg/mL。这表明所提取的 DNA 满足 SRAP 反应的需要。

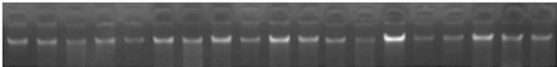
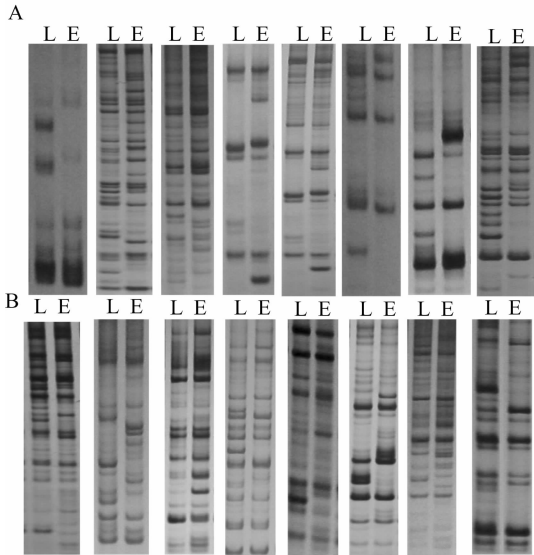


图1 部分萝卜单株基因组 DNA 的电泳图

2.2 SRAP 标记分析

结果表明, 从 288 对引物中共获得 116 对在双亲间可以稳定扩增出清晰条带、表现出多态性的引物组合, 多态率为 40.3%; 116 对引物的 PCR 产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳构建图谱, 共得到条带 285 条, 其中多态性条带为 66 条, 多态率为 23.2%, 每对引物扩增出的条带数量范围为 0 ~ 40, 多态性条带数量范围为 0 ~ 5, 说明早、晚抽薹的萝卜基因

组具有较为明显的差异性。因此, 利用 SRAP 可以在分子水平上对萝卜的早、晚抽薹基因组的差异进行相关鉴定研究。图 2 为扩增效果较好的 16 对引物组合的 SRAP 扩增图谱, 这 16 对引物组合为 me1 + em3、me1 + em7、me1 + em12、me1 + fc8、me1 + odd38、me3 + em9、me3 + fc2、me4 + em3、me4 + fc1、me4 + odd41、me7 + odd40、me7 + em7、me7 + fc8、me15 + em9、me15 + fc1、me15 + odd40, 每个引物的碱基序列见表 1。



L—晚抽薹亲本; E—早抽薹亲本

图2 16对 SRAP 引物在亲本间的多态性

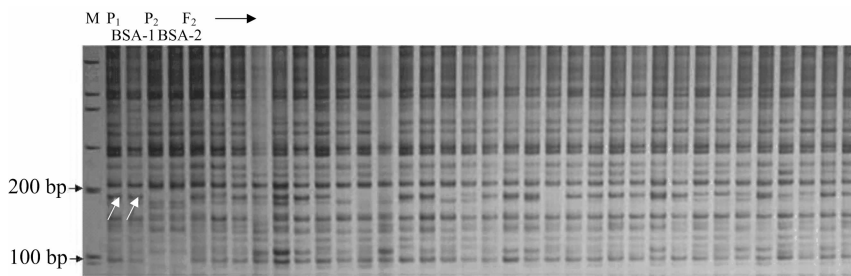
表 1 试验所用 SRAP 引物的碱基序列

引物名称	碱基序列 (5'→3')
me1	TGAGTCCAAACCGGATA
me3	TGAGTCCAAACCGGATG
me4	TGAGTCCAAACCGGACA
me7	TGAGTCCAAACCGGTAA
me15	TGAGTCCAAACCGGTCA
fc1	TCAAGGGCAGGTAAGAACAA
fc2	GTGCTTTACTGTTTGCTCC
fc8	AATCTTCCTCAGGTTCAGA
em3	GACTGCGTACGAATTGAC
em7	GACTGCGTACGAATTCAA
em9	GACTGCGTACGAATTCGA
em12	GACTGCGTACGAATTATG
odd38	CAGCAACACCAACAATCTC
odd40	CAGCAACACCAACAATCTC
odd41	AATGTCTTTGTTCAGCCAC
odd44	CCATCGTGCAATCTTTCTTC

对晚抽池、早抽池及 2 个基因池中各单株 DNA 为模板, 对筛选出的多态性引物进行再次筛选, 获得 1 对 SRAP 引物组合 me3 + em9, 在亲本和 DNA 池之间有相同、可重复的多态性片段。由图 3 可见, me3 + em9 对亲本和 DNA 池进行扩增, 其差异条带 LB 均出现在晚抽薹品种 L2 和晚抽薹池中, 产生的差异片段大小约为 190 bp。因此, 将 me3 + em9 确定为萝卜晚抽薹基因 SRAP 标记的候选引物。

2.3 SRAP 标记与早抽薹基因的连锁分析

利用 F<sub>2</sub> 分离群体中的单株 DNA 对候选引物组合 me3 +



图中箭头代表特异条带LB

图3 引物 me3+em9 在部分F<sub>2</sub>株系中的分离情况

em9 进一步验证,各标记在分离群体中并非表现为全有和全无的差别,有少数晚抽蔓萝卜单株未能扩增出差异常带,同样也有少数早抽蔓单株扩增产生差异条带。用 Joinmap 4.0 软件对分子标记进行分析得知,me3 + em9 与萝卜晚抽蔓基因紧密连锁,其遗传距离为 5.7 cM (图 4)。



图4 me3+em9 与萝卜晚抽蔓基因的遗传距离

### 3 结论与讨论

分子标记技术与其他分子生物学研究相比,具有简单快捷的优点。相关序列扩增多态性(SRAP)是 Li 等<sup>[2]</sup>发展的一种分子标记方法,具有简便、产率高、可显示大量的共显性标记、易从序列中得到分离条带等优点,已被广泛应用于图谱构建、比较基因组学、基因克隆和遗传多样性等研究<sup>[4-9]</sup>。Li 等在对羽衣甘蓝 × 花椰菜的 RI 系构建遗传图谱时,用 SRAP 成功标记了芥子油脱饱和基因 *BoGLSALK*,该基因在图谱 I 连锁群上距 SRAP133 标记为 1.4 cM<sup>[7]</sup>。另外,研究人员在中国白菜中发现了 1 个与雄性不育基因有关的 SRAP 标记,在油菜中筛选到 1 个与恢复基因连锁的 SRAP 标记,在芹菜中获得 1 个与病毒抗性基因紧密连锁的 SRAP 标记<sup>[10]</sup>。

抽蔓性状属于数量性状遗传,易受环境条件的限制影响。目前,利用分子标记技术对抽蔓性状的研究已有诸多报道。Ken 等通过甘蓝和青花菜的 F<sub>2</sub> 群体 RFLP 连锁图,鉴定出控制从种植至现蕾天数的主效基因位于第 2、第 7 连锁群上,从种植到现蕾的天数、现蕾到开花的天数这 2 个性状的许多标记位点密切相关。曹维荣等运用 RAPD 技术,采用混合分离群体法(BSA)对甘蓝迟抽蔓基因相连锁的分子标记进行研究,得到与甘蓝迟抽蔓基因相连锁的 RAPD 标记 NI-750,其连锁距离为 7.9 cM<sup>[11]</sup>。卓祖闯等运用 RAPD、SRAP、RSAP、SSR、SCAR 技术,采用 BSA 法对大白菜晚抽蔓基因紧密连锁的分子标记进行研究,分别获得 1 个晚抽蔓基因紧密连锁的 RAPD 标记和 RSAP 标记,同时获得 1 个与早抽蔓基因连锁的

SRAP 标记<sup>[12]</sup>。

本研究中,从 288 对引物中筛选获得 116 对可以在双亲间稳定扩增出清晰条带、表现出多态性的引物组合,多态率为 40.3%;将 116 对引物的 PCR 产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳构建图谱,共得到条带 285 条,其中多态性条带为 66 条,多态率为 23.2%,每对引物扩增出的条带数量范围为 0~40,多态性条带的数量范围为 0~5,得到与萝卜晚抽蔓基因紧密连锁的标记 1 个,其遗传距离为 5.7 cM。这为以后的萝卜晚抽蔓育种提供了理论基础。

### 参考文献:

- [1] 黄细松. 白菜开花时间相关基因的分子标记及春化相关基因的克隆和表达分析[D]. 杭州:浙江大学,2006.
- [2] 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): 455 - 461.
- [3] 张波. 不结球白菜晚抽蔓分子标记及抽蔓性遗传分析[D]. 南京:南京农业大学,2007.
- [4] 刘雅辉,闫红飞,杨文香,等. 小麦抗叶锈病基因 *Lr19* 的 SRAP 标记[J]. 华北农学报, 2007, 22 (4): 193 - 196.
- [5] 陈晖,陈美霞,陶爱芬,等. 长果种黄麻 SRAP 标记遗传连锁图谱的构建及 3 个质量性状基因定位[J]. 中国农业科学, 2011, 44 (12): 2422 - 2430.
- [6] Yeboah M X. A genetic linkage map of cucumber (*Cucumis sativus* L.) combining SRAP and ISSR markers [J]. African Journal of Biotechnology, 2007 (6): 2784 - 2791.
- [7] Li G, Gao M, Yang B, et al. Gene for gene alignment between the *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107 (1): 168 - 180.
- [8] Xu L, Wang L J, Gong Y Q, et al. Genetic linkage map construction and QTL mapping of cadmium accumulation in radish (*Raphanus sativus* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2012, 125 (4): 659 - 670.
- [9] 张冬菊,李世超,吴鹏夫,等. 基于表型和 SRAP 标记的切花菊品种遗传多样性分析[J]. 园艺学报, 2014, 41 (1): 118 - 130.
- [10] 柳李旺,龚义勤,黄浩,等. 新型分子标记 SRAP 与 TRAP 及其应用[J]. 遗传, 2004, 26 (5): 777 - 781.
- [11] 曹维荣,王超. 甘蓝迟抽蔓基因的 RAPD 标记[J]. 生物技术通报, 2007 (5): 167 - 169.
- [12] 卓祖闯,万恩梅,张鲁刚,等. 大白菜抽蔓性状的主基因 + 多基因遗传分析[J]. 西北植物学报, 2009, 29 (5): 923 - 928.