

冯涛,刘娟,华夏雪.利用 SSR、SRAP 分子标记鉴定桃早熟芽变[J].江苏农业科学,2017,45(6):42-44.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.06.009

# 利用 SSR、SRAP 分子标记鉴定桃早熟芽变

冯涛,刘娟,华夏雪

(天津农学院园艺园林学院,天津 300384)

**摘要:**以桃品种小白桃及其早熟芽变品种津柳早红为材料,利用 SSR、SRAP 分子标记技术,分别使用 17 对 SSR 引物、12 条 SRAP 引物,对小白桃、津柳早红基因组 DNA 进行特异扩增,探讨桃成熟期芽变机制。结果表明,UDP96-008、CPPCT 022、BPPCT 028、UDP98-411、UDP96-99 等 5 个 SSR 标记具有多态性,并将它们分别定位在 1、2、3、6 号染色体;SRAP 标记中 me1/em5、me2/em1、me2/em5、me3/em2、me3/em6、me5/em5、me5/em6、me6/em2 具有多态性。SSR、SRAP 标记可以用于桃成熟期芽变的鉴定。

**关键词:**桃;芽变;果实成熟期;SSR;SRAP

**中图分类号:** S662.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)06-0042-03

芽变是果树常见现象,早在公元 1059 年,我国宋朝的《荔枝谱》中就对荔枝的芽变有所描述。芽变选种作为新品种选育的手段,开始于 20 世纪初期。与杂交育种相比,果树芽变选种具有多种优势,如育种周期短,进程快,这对于育种周期长的果树来说意义重大。同时,芽变选种一般是以主栽品种作为资源材料,即芽变的选择是在对主栽品种性状修饰的基础上进行的,因此更容易获得优良品种(品系)。

传统的芽变鉴定主要通过形态学的观察比较,但在有些情况下,芽变和饰变的形状特征非常相似,仅通过形态学观察无法准确判断。现代生物化学技术,如同工酶标记、细胞学技术、分子标记技术已经用于果树芽变鉴定,有一些成功的试验报道<sup>[1]</sup>。简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)是其中一类现代生物化学技术,也称微卫星 DNA,其串联重复的核心序列为 1~6 bp,其中最常见的是双核苷酸重复,即(CA)<sub>n</sub>、(TG)<sub>n</sub>每个微卫星 DNA 的核心序列结构相同,重复单位数量是 10~60 个,其高度多态性主要来源于串联数量的不同。SSR 标记具有多态性高、重复性好、共显性等优点,因此在园艺作物种质遗传多样性和亲缘关系研究方面应用较多。

相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)是一种新型的基于 PCR 扩增的分子标记技术,针对基因外显子里 GC 含量丰富、启动子和内含子里 AT 含量丰富的特点来设计引物进行扩增。正向引物(F-primer)含 17 个碱基,5'端的 10 bp 是一段非特异性的填充序列,接着是 CCGG 序列,这 14 bp 组成核心序列,最后是 3'端的 3 个选择性碱基,对外显子进行扩增。反向引物含 18 个碱基,

在 5'端前 11 个是填充序列,和紧接的 AATT 组成核心序列,3'端是 3 个选择性碱基,对内含子区域和启动子区域进行扩增,由于不同个体及物种的内含子、启动子与间隔序列变异很大,所以产生多态性扩增产物。SRAP 无需任何序列信息,而且多态性高、重复性好。

桃(*Prunus persica*)原产我国,是世界第三大落叶果树,有 4 000 多年栽培历史,我国有 800 多个品种桃。桃树在自然栽培条件下具有较高频率的芽变,目前发现桃芽变品种中约有 60% 属于成熟期芽变。因此本研究选择桃这种代表性的树种研究芽变机制,为芽变选种提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究选用桃品种是小白桃及其早熟芽变品种津柳早红,取自天津学香果蔬有限公司。津柳早红桃是 2004 年在天津市地方品种小白桃上发现的早熟芽变。该品种成熟早,在天津市 6 月上旬成熟;着色好,果面 90% 着鲜红色;果个大,平均单果质量 129 g,最大单果质量 205 g;肉质细、硬溶质。津柳早红桃在 2014 年 6 月通过天津市农作物新品种审定委员会审定。

### 1.2 基因组 DNA 提取

采用北京艾德莱生物科技有限公司的 Easyspin RNA 提取试剂盒,提取小白桃、津柳早红基因组 DNA,用 RNA 酶 I 消化去除 RNA,用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度,用微量紫外分光光度计检测 DNA 浓度。

### 1.3 SSR 鉴定

使用 17 对 SSR 引物对进行扩增,标记名称分别为 BPPCT001、BPPCT009、BPPCT015、BPPCT016、BPPCT020、BPPCT028、BPPCT030、CPDCT008、CPPCT013、CPPCT022、CPDCT025、CPPCT030、UDP98-411、UDP96-099、UDP97-401、UDP96-008、CDDCT045<sup>[2]</sup>。PCR 反应体系包括 10 ng DNA 模板、1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.15 mmol/L dNTPs、0.55 μmol/L 引物、1.0 U *Taq* DNA 聚合酶、1 × PCR buffer,反应总体积为 10 μL。扩增程序:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 1 min、53 ℃ 1 min、72 ℃ 1 min,共 35 个循环;72 ℃ 8 min。

收稿日期:2016-01-07

基金项目:天津市应用基础与前沿技术研究计划一般项目(编号:14JCYBJC30100);天津市科技型中小企业技术创新资金(编号:14ZXCXC00063);天津市高等学校科技发展基金(编号:20130617);国家大学生创新创业训练计划(编号:201410061007);天津市“131”创新型人才培养工程;天津市高校优秀青年教师资助计划。

作者简介:冯涛(1978—),男,山东鄄城人,博士,副教授,主要从事果树种质资源和生物技术育种研究。E-mail:tkfg@163.com。

用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测获得的扩增产物,利用凝胶成像仪拍照。

1.4 SRAP 鉴定

使用的 SRAP 引物包括 me1、me2、me3、me4、me5、me6、em1、em2、em3、em4、em5、em6。

反应体系同“1.3”。SRAP 标记扩增程序:SRAP 反应程序共 40 个循环,94 ℃ 预变性 5 min;前 5 个循环:94 ℃ 变性 1 min,35 ℃ 复性 1 min,72 ℃ 延伸 1 min;后 35 个循环:94 ℃ 变性 1 min,50 ℃ 复性 1 min,72 ℃ 延伸 1 min;循环结束后 72 ℃ 延伸 10 min。

用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测获得的扩增产物,利用凝胶成像仪拍照。

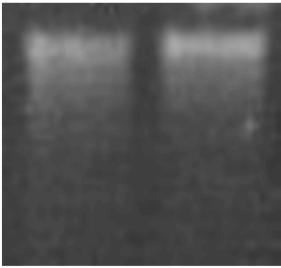
1.5 SSR 差异序列的基因组定位

在 GDR 数据库 (<http://www.rosaceae.org/peach/genome>) 查询多态性 SSR 标记在桃基因组图谱中的位置。

2 结果与分析

2.1 DNA 纯度、浓度检测结果

采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳在凝胶成像系统中拍照。由图 1 可见,电泳条带较亮,表明 DNA 纯度较高,杂质很少;另外未见 RNA 条带,微量紫外分光光度计检测结果表明浓度、纯度较高(表 1)。



左为小白桃,右为津柳早红  
图1 小白桃、津柳早红基因组 DNA 电泳

表 1 用 NanoDrop 2000 软件测得的 DNA 浓度、纯度

品种	DNA 浓度 (ng/μL)	DNA 纯度	
		260 nm/280 nm	260 nm/230 nm
津柳早红	141.6	1.93	2.01
小白桃	142.4	1.91	1.87

2.2 SSR 标记鉴别芽变品种

从 17 对引物中筛选出 5 对扩增效率高、重复性好、对 2 个供试品种扩增产物有差异条带的引物,分别为 BPPCT001、CPDCT008、BPPCT009、BPPCT020、UDP98-411。BPPCT001、BPPCT020、UDP98-411 在 2 个供试品种中都获得 1 条扩增产物,但条带长度不同;而 CPDCT008、BPPCT009 在 2 个供试品种中获得 2 条扩增产物条带(图 2)。

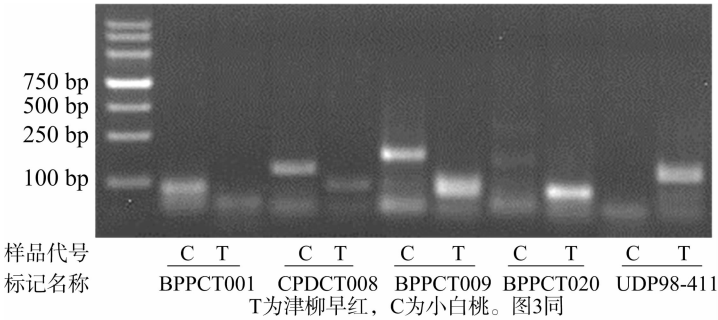


图2 多态性 SSR 标记电泳

2.3 差异性 SSR 标记在基因组中的位置

通过查询 GDR 数据库,得到差异性 SSR 标记在基因组中的位置信息。除了 UDD-411 在数据库中没有定位信息外,其他 SSR 标记分别位于 1、2、3、6 号染色体(表 2)。

表 2 差异性 SSR 标记在基因组中的位置

标记名称	物种	染色体	起始位置 (bp)	结束位置 (bp)
BPPCT001	桃 ( <i>Prunus persica</i> )	2	16134154	
BPPCT009	桃 ( <i>Prunus persica</i> )	6	11863113	
BPPCT020	桃 ( <i>Prunus persica</i> )	1	33281268	33281752
CPDCT008	扁桃 ( <i>Prunus amygdalus</i> )	3	10023959	10024546

2.4 SRAP 标记鉴别芽变品种

筛选出来多态性高、重复性好的引物对分别是 me1/em5、me2/em1、me2/em5、me3/em2、me3/em6、me5/em5、me5/em6、me6/em2,用于小白桃、津柳早红基因组 DNA 差异检测。

由图 3 可见,选取的这 8 对引物都可以获得清晰的扩增条带。me1/em5 组以小白桃基因组 DNA 为模板未获得扩增条带,以津柳早红基因组 DNA 为模板获得 2 条扩增条带,其中 1 条在 400 ~ 500 bp 之间,另 1 条在 900 ~ 1 000 bp 之间;

me2/em1 组以小白桃基因组 DNA、津柳早红基因组 DNA 为模板获得了 1 条长度相同的扩增条带,在 750 bp 左右,但以津柳早红基因组 DNA 为模板还获得 1 条长度约 250 bp 的扩增条带;me2/em5 在 2 个模板中都获得 1 条长度在 400 ~ 500 bp 之间的扩增产物,但以津柳早红基因组 DNA 为模板另获得 2 条长度分别为 500 ~ 600 bp、750 bp 左右的扩增产物;me3/em2 组在 2 个模板中都获得多条扩增产物;me3/em6 组在 2 个模板中都获得 1 条长度在 1 000 ~ 1 200 bp 之间的扩增产物,但以津柳早红基因组 DNA 为模板另获得 3 条长度分别为 750、1 500、2 000 bp 左右的扩增产物;me5/em5 组在 2 个模板获得了 3 个相同的扩增产物,但是以小白桃基因组 DNA 为模板另获得 1 条 100 ~ 200 bp 之间的扩增产物;me5/em6 组以小白桃基因组 DNA 为模板多获得 1 条扩增条带;me6/em2 组以小白桃基因组 DNA 为模板未获得扩增产物,以津柳早红基因组 DNA 为模板获得 2 条扩增条带,长度分别是 600 ~ 750 bp、1 000 bp 左右。

3 结论与讨论

最早用于果树芽变的分子标记技术是 RAPD<sup>[3-5]</sup>,但是

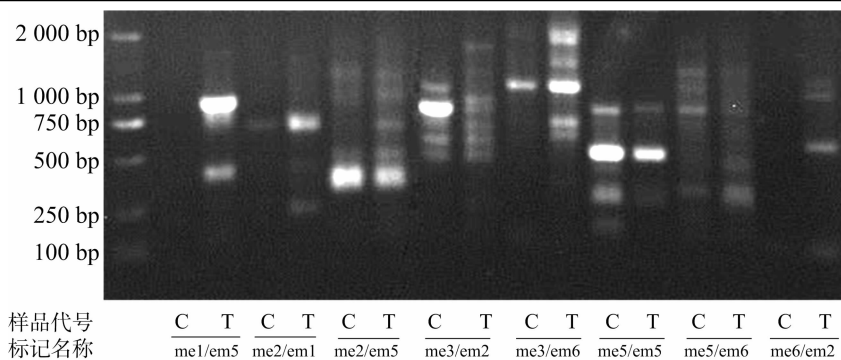


图3 多态性 SRAP 标记电泳

由于 RAPD 标记本身重复性差,造成结果可靠性不高。AFLP 标记成功鉴定果树芽变的报道较多。刘永忠以奉节 72-1 脐橙及其晚熟芽变品种奉节晚橙为材料,采用 cDNA-AFLP 技术分析了 2 个品种的果实在成熟过程中转录水平的表达,发现有 34 对引物出现差异带,通过测序和序列比对 (Blastx) 分析表明,表达差异片段主要与信号转导、转录因子、成熟衰老、抗逆性、核糖体蛋白、DNA 复制等有关<sup>[6]</sup>。张小军以六月酥及其对照早酥梨为材料,运用 AFLP 标记对梨极早熟性进行分析,对差异片段克隆及测序发现,与 DNA 聚合酶 I、叶绿体基因、NADH 脱氢酶的表达调控有关<sup>[7]</sup>。何建华对嘎拉苹果早熟芽变和原品种进行 AFLP 分析,发现 3 条多态性带,芽变与原品种之间的遗传相似系数为 0.999 5,遗传距离为 0.000 5<sup>[8]</sup>。许森等利用 AFLP 技术,对鄂柑一号椪柑的 3 个少核芽变及其母株进行分子鉴定,其中 9 对引物可扩增出多态性条带,认为鄂柑一号椪柑的少核芽变由遗传物质改变引起<sup>[9]</sup>。

SSR 标记成功鉴定果树芽变的报道很少,而且还有失败的试验报道。孙淑霞等利用 ISSR、SSR 标记,对北京 28 号桃芽变株系进行分子鉴定,认为 3 株疑似芽变株系很可能是由对照芽变而来,标记 CPPCT022、BPPCT023 可能是其变异位点<sup>[10]</sup>。刘永忠利用 SSR、AFLP 鉴定奉节 72-1 脐橙及其晚熟芽变品种奉节晚橙,未发现差异<sup>[6]</sup>。本研究使用 17 对 SSR 引物,对小白桃及其早熟芽变品种津柳早红基因组 DNA 进行特异性扩增,找到了 UDP96-008、CPPCT 022、BPPCT 028、UDP98-411、UDP96-99 等 5 个多态性标记;然后进一步利用生物信息学方法进行基因组定位。

利用 SRAP 进行芽变鉴定和机理研究报道也很少,既有成功区别芽变的报道,也有无法区分的报道。齐丹等采用 SRAP 分子标记对辽宁省绥中县地方梨品种秋白梨、绥中谢花甜、水红宵、粉红宵、洋红宵及 8 个秋白梨可能变异单株进行遗传多样性和亲缘关系分析,认为 SRAP 技术可有效地应用于梨品种及芽变鉴定、遗传多样性及亲缘关系研究<sup>[11]</sup>。张四普等利用优化的 SRAP-PCR 反应体系,对红花石榴母株上的白花变异枝进行了鉴定分析,结果表明白花变异枝条的产生可能与母株 DNA 片段缺失有关<sup>[12]</sup>。秦贺兰等通过 SRAP 技术对小菊粉色花芽变与黄色花对照进行了 DNA 多态性分析,结果表明芽变品种与对照在遗传背景上高度一致<sup>[13]</sup>。陈巍等通过 SRAP 标记对 13 份浙南柚类地方资源和琯溪蜜柚的芽变进行遗传多样性分析鉴定,结果表明 15 份材

料间检测到的 SRAP 位点多态性不高,不同引物组合可将 11 个基因型完全分开<sup>[14]</sup>。阳志慧以纽荷尔脐橙为材料,利用 SRAP 技术研究其变异株系的主要性状,结果表明长红脐橙与湘科号脐橙母子代的差异都不大<sup>[15]</sup>。本研究使用 36 对 SRAP 引物,对小白桃及其早熟芽变品种津柳早红基因组 DNA 进行特异性扩增,找到 8 对多态性条带,显示桃芽变是基因组 DNA 序列发生了变化。

#### 参考文献:

- [1] 侯佳贤,崔 龙,高玉江. 果树芽变育种研究进展[C]. 中国园艺学会第七届青年学术讨论会论文集. 山东泰安:中国园艺学会,山东省园艺学会,山东农业大学,2006.
- [2] 陆苏珊,俞明亮,马瑞娟,等. 硬肉桃品种群 SSR 标记的遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报,2010,11(3):374-379.
- [3] 金勇丰,张祖洲,陈大明,等. 桃早熟芽变品种大观一号的 RAPD 分析及其特异片段的克隆[J]. 果树科学,1998,15(2):103-106.
- [4] 王西平,王跃进,张剑侠,等. 葡萄早熟芽变品种“早生高墨”的 RAPD 分析[J]. 西北植物学报,2003,23(3):473-476.
- [5] 宁允叶,熊庆娥,曾伟光,等. 红阳猕猴桃全红芽变系的 RAPD 分析[J]. 园艺学报,2003,30(5):511-513.
- [6] 刘永忠. 脐橙 (*Citrus sinensis* Osbeck) 晚熟芽变性状形成机理研究[D]. 武汉:华中农业大学,2006.
- [7] 张小军. 梨极早熟突变体的 AFLP 分析[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2009.
- [8] 何建华. 嘎拉早熟芽变的分子鉴定及其主要生理特性研究[D]. 保定:河北农业大学,2012.
- [9] 许 森,蒋迎春,孙中海,等. 鄂柑一号椪柑少核芽变的 AFLP 分析[J]. 湖北农业科学,2011,50(17):3556-3559.
- [10] 孙淑霞,陈 栋,李 靖,等. 北京 28 号桃芽变株系的 ISSR 和 SSR 鉴定[J]. 果树学报,2012,29(1):24-28.
- [11] 齐 丹,郑灵芝,曹玉芬,等. 辽宁绥中地方梨种质的 SRAP 分析[J]. 中国果树,2013(2):14-16.
- [12] 张四普,汪良驹,吕中伟. 石榴叶片 SRAP 体系优化及其在白花芽变鉴定中的应用[J]. 西北植物学报,2010,30(5):911-917.
- [13] 秦贺兰,曹 靖,姚士才,等. 小菊花色芽变品系的 SRAP 鉴定[J]. 北方园艺,2010(2):111-113.
- [14] 陈 巍,郭秀珠,黄品湖,等. 浙南柚类地方资源遗传多样性分析和鉴定[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(4):643-646.
- [15] 阳志慧. 纽荷尔脐橙变异株系主要性状及 SRAP 分析研究[D]. 长沙:中南大学,2009.