

研究报告

A Letter

应用 SRAP 分子标记技术鉴定葡萄种间杂交后代

郭修武[✉], 张鹏翔[✉], 郭印山[✉], 刘镇东[✉], 李坤[✉], 李成祥[✉]

沈阳农业大学园艺学院, 沈阳, 110866

✉ 通讯作者: guoyinshan77@126.com; ✉ 作者

分子植物育种, 2011 年, 第 9 卷, 第 52 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0052

收稿日期: 2011 年 01 月 10 日

接受日期: 2011 年 04 月 18 日

发表日期: 2011 年 05 月 05 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放获取论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式:

郭修武等, 2011, 应用 SRAP 分子标记技术鉴定葡萄种间杂交后代, 分子植物育种 Vol.9 No.52 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0052)

摘要 对杂交后代进行杂种的真实性鉴定是杂交育种成功的前提。采用 SRAP 分子标记技术对葡萄种间杂交组合‘红地球×双优’的实生后代进行了杂种的真实性鉴定。筛选出 5 对能够扩增出父本特异条带的引物, 对 94 株杂交后代实生苗进行了分析, 结果表明: 94 株杂交后代中有 87 株出现了稳定、清晰的父本特异条带, 结合田间形态学分析, 确认为真杂种。

关键词 葡萄; SRAP 标记; 杂种鉴定

Authenticity Identification of Progenies from Interspecific Cross Red Globe (*Vitis vinifera*)×Shuangyou (*Vitis amurensis*) by SRAP Markers

Guo Xiuwu[✉], Zhang Pengxiang[✉], Guo Yinshan[✉], Liu Zhendong[✉], Li Kun[✉], Li Chengxiang[✉]

College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang, 110866, P.R. China

✉ Corresponding authors, guoyinshan77@126.com; ✉ Authors

Abstract Authenticity identification of interspecific cross progenies is necessary for the success of crossbreeding. The authenticity of 94 interspecific cross progenies from Red Globe×Shuangyou was identified by SRAP (Sequence—related Amplified Polymorphism) markers. Five paternal polymorphism primers were selected randomly between two parents by SRAP markers amplified and was applied to identify the authenticity of 94 progenies. The result showed that 87 progenies of 94 progenies were all identified to be true hybrids owing to their specific bands from male parent and morphological analysis of the field.

Keywords Grape; SRAP marker; Authenticity identification

研究背景

种间杂交是实现基因转移的重要途径, 葡萄育种中人工杂交育种是最常规同时也是最有效的手段之一。由于葡萄闭花受精的习性以及人工去雄套袋不及时, 杂交后代中可能存在部分的自交种或其它花粉的杂交种(贺普超, 1999; 孔庆山, 2004)。因此, 对杂交后代的真实性进行鉴定, 筛选出双亲杂交后代是进行目标品种选育和其他相关研究的基础和前提。对于植物杂交后代的鉴定, 前人多采用植株形态学、细胞学、同工酶学等方法。形态学鉴定的周期较长, 鉴定结果受环境变化影响较大; 细胞学鉴定程序繁琐, 技术水平要求较高, 且分辨率不高, 对于染色体短的和结构差异较小的个体难以准确鉴定(颜廷进和谭振新, 2004, 种子科技, 14(3):

153-155); 同工酶则由于酶种类限制不能反映全部的结构基因的信息, 使分析产生一定的偏差, 并且存在基因位点少, 多态性水平低等缺点(曾明和杨柏云, 2006)。与上述方法相比, DNA 分子标记技术具有很大的优越性: 快速准确, 多态性高, 直接以 DNA 形式表现, 不受外界环境、组织类别、发育时期等条件的影响, 因此近年来在多种植物的杂种鉴定中得到广泛的应用(柳李旺和侯喜林, 2004)。张开春等(张开春和李荣琪, 1997)采用 RAPD 技术鉴定出了平邑甜茶×扎矮 76 的有性后代, 马鸿翔等(马鸿翔和陈佩度, 2007)采用 RAPD 技术鉴定出东北草莓×风梨草莓的种间杂交后代, 鹿金颖等(2005)应用 AFLP 分子标记从冬枣自然授粉后代中鉴定出其中的冬枣×金丝小枣和冬枣×尖枣的杂交后代, 王跃进

等(1997)用 RAPD 标记鉴定了圆叶葡萄和真葡萄亚属间的远缘杂种。

相关序列多态性分析 (sequence-related amplified polymorphism, SRAP) 是一种基于 PCR 的分子标记技术, 由 Li 和 Quiros(2001)提出, 其基本原理是通过设计一对引物对 ORFs (openreading frames, 开放阅读框) 进行扩增, 因个体不同以及物种的内含子、启动子与间隔区长度不同而产生多态性。SRAP 技术具有简便、快速、稳定、多态性高, 在基因组中分布均匀, 不需预知物种的序列信息的特点。本研究采用 SRAP 技术对葡萄种间杂交组合‘红地球×双优’实生后代进行杂种的真实性检测, 为今后杂种群体的进一步利用奠定基础。

1 结果与分析

1.1 基因组 DNA 的检测

对双亲及 94 份杂交后代共 96 份材料的 DNA 浓度和质量进行检测, 经紫外分光光度计测定, 所提取 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 比值均介于 1.7 和 1.9 之间。琼脂糖检测结果表明, 提取的 DNA 为一条清晰完整的带, 与 λ DNA 的位置基本相同, 条带没有明显的拖尾, 无蛋白质和 RNA 污染。说明本试验提取的 DNA 完整, 纯度高, 符合本试验的要求(图 1)。

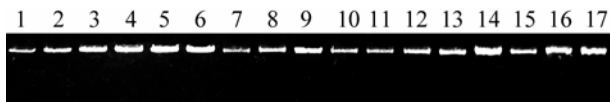


图 1 葡萄部分杂交后代基因组 DNA 电泳

注: 图中 1~3 号样品为 λ DNA, 从左到右分别为 100 ng, 150 ng, 200 ng; 4~17 为杂交后代

Figure 1 Electrophoresis of genomic DNA for some progenies
Note: Number 1~3 samples in the upper figure are λ DNA, from left to right are 100 ng, 150 ng, 200 ng; Number 4~17 were cross progenies

1.2 SRAP 引物组合的筛选

将 80 对引物组合在双亲中进行 SRAP-PCR 扩增, 有 20 对引物组合扩增条带丰富、清晰并出现了父本特异性条带(图 2), 这些引物都可以用于杂交后代的真实性鉴定。我们从中选取 5 对扩增条带较清晰容易分辨的引物, 即引物组合 Me1Em10-212, Me2Em4-87, Me2Em5-103, Me4Em6-175, Me8Em5-205 用于‘红地球×双优’杂交后代的鉴定。

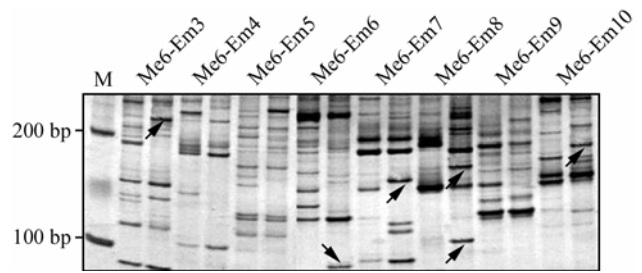


图 2 部分引物组合筛选的扩增结果

注: M: DNA marker; 每对引物组合的试验材料左边为母本红地球, 右为父本双优

Figure 2 Amplified results with some primer combinations
Note: M: DNA maker; The experimental materials were Red Globe grape and Shuangyou from left to right in each primer combinations

1.3 红地球×双优后代杂种鉴定

本研究中应用的 SRAP 标记多为显性标记, 符合孟德尔遗传规律。根据孟德尔的分离定律与自由组合定律, 理论上如果使用杂合的显性标记鉴定有性杂交后代的真实性, 应至少使用 5 个父本标记(如果引物可以获得多个父本标记, 引物数量就少于 5 个), 因为每个杂合显性标记只能鉴定出有性杂交后代的 50% 为真杂种, 鉴定概率为标记 I (50%) + 标记 II (25%) + 标记 III (12.5%) + 标记 IV (6.25%) + 标记 V 3.13% = 96.9%, 5 个标记便可将 F_1 代群体中 96.9% 的杂种鉴定出来(张开春和李荣琪, 1997)。本试验采用 5 对引物对两个亲本的杂交后代进行逐步鉴定, 首先用 Me8-Em5 引物对所有杂交后代进行鉴定, 共有 41 个后代具有父本特异带, 初步确认为真杂种; 然后用 Me1-Em10 引物对其余的 53 个后代再次鉴定, 其中有 33 个单株中具有父本特异带; 剩余的 20 株个体再用 Me4-Em6 引物进行鉴定, 有 7 个具有父本特异带; 用 Me2-Em5 引物对剩余的 13 个个体进行鉴定, 有 5 个具有父本特异带。最后对以上无父本特异带的 8 个后代用 Me2-Em4 引物进行鉴定, 8 个后代有 1 个能扩增出父本特征带。对于以上引物鉴定过的 7 个未出现父本特异带的后代, 用 Me6Em7 和 Me6Em3 引物进行鉴定, 结果均未出现父本特征带。综合所有引物的鉴定结果, 94 个单株中确认 87 个株为双亲真杂种。

为验证结果的准确性, 利用以上使用的 5 对引物分别对所有杂交后代进行重复鉴定, 鉴定结果与之前结果完全一致。图 3 为 Me8-Em5 引物组合在

‘红地球×双优’后代中的鉴定结果, 经重复试验, 结果可靠。对鉴定后的 87 株个体进行了田间形态学观察, 在叶片、枝条特征等方面表现出明显的父本特征, 表明这些单株为红地球×双优的种间杂种。

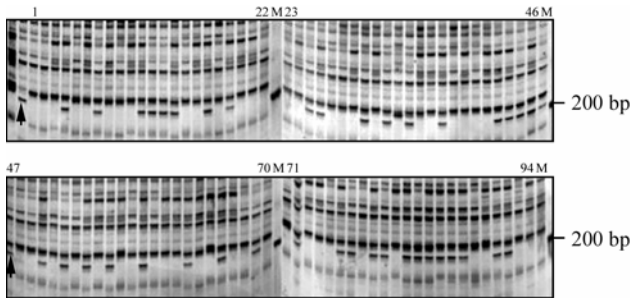


图3 引物组合 Me8eM5 对杂交后代的鉴定
注: 1~94 为杂交后代群体; 表示父本特异带
Figure 3 Identification of crossing progenies by primer combination Me8eM5
Note: Number 1~94 were cross progenies; Means Specific bands from male parent

2 讨论

由于杂交育种工作的长期性, 尤其在木本植物当中, 育种周期可长达十几年, 对杂交种后代的早期鉴定就显得尤为重要(钟准钦等, 2005)。常规的杂种鉴定方法有形态学鉴定、细胞学鉴定、孢粉学鉴定和同工酶鉴定等, 但由于材料本身的特点, 及技术方法中存在的问题, 使这些方法在实际的应用中受到很大的限制。与上述几种鉴定方法相比, DNA 分子标记具有标记数量巨大, 无器官、组织及发育特异性, 不受任何环境因素影响, 完全遵守简单的孟德尔式遗传且有体细胞稳定性等优点(郑成超和温孚江, 1997)。尤其是随着近年来分子标记技术和方法的飞速发展, 已经成为植物杂种鉴定研究的有效工具。Li 等(Li and Quiros, 2001)开发的 SRAP 分子标记技术, 针对基因组中的 ORF 区域进行扩增, 体现了物种间基因的多态性, 检测结果更能体现出个体间真实的亲缘关系。

由于 SRAP 标记或为显性标记或为共显性标记, 在双亲中进行引物筛选时无法判断具有父本特异带的位点的类型是纯和显性位点还是杂合显性位点。故需要结合 3~5 个 SRAP 标记进行综合分析。在后代中出现分离的父本特征带则可判断位点的基因型为 Aa, 全部后代显现父本特征带则为 AA。

如采用具有父本特征的纯和显性标记进行真假杂种鉴定, 只需要通过一对引物就可以对所有杂交后代的真实性进行鉴定(乔燕春和林顺权, 2010)。本试验中鉴定‘红地球×双优’种间杂种时采用了 5 个父本特异标记, 虽然这些标记均为杂合的显性标记, 但是由于 SRAP 标记的谱带丰富、多态性高的特点, 在杂种鉴定中很容易获得足够多的父本标记。

利用 SRAP 分子标记技术, 对葡萄‘红地球×双优’种间杂交组合的 94 株实生苗进行了早期杂种鉴定。从 80 对 SRAP 引物中筛选出 5 对具有父本特征带的引物, 共鉴定 94 株中的 87 株为真杂种。研究表明 SRAP 技术可有效的用于葡萄杂交后代的真实性鉴定及相关研究中。

3 材料与方法

3.1 试验材料

试验于 2009 年 6 月-2010 年 9 月在沈阳农业大学果树分子生物学实验室进行。试验材料为欧亚种葡萄(*Vitis vinifera*)品种‘红地球’、山葡萄(*Vitis amurensis*)品种‘双优’及其种间杂交实生后代的 94 个单株, 取自于沈阳农业大学葡萄资源圃。取幼嫩叶片于-80℃保存备用。

3.2 试验方法

3.2.1 基因组 DNA 的提取和检测

DNA 的提取采用 Hanania(2004)的改良 CTAB 法。经紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测浓度及质量后将样品浓度稀释至 $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 并于-20℃保存。

3.2.2 SRAP-PCR 扩增程序及扩增产物的检测

SRAP-PCR 扩增反应选用体系参照郭大龙等(2010)的研究方法并加以适当修改, 20 μL 体系包括模板 DNA 10 ng, Primer 浓度为 $0.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, dNTPs 浓度为 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Mg^{2+} 浓度为 $3.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Taq DNA 聚合酶为 2.0 U。

SRAP-PCR 扩增程序为: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 1 min, 35℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min, 5 个循环; 94℃变性 1 min, 50℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min, 35 个循环; 72℃最后延伸 10 min, 4℃保存。

扩增结束后, 扩增产物于 10%的聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离, 电泳结束后进行银染检测。

SRAP 引物组合的筛选 选取 8 条正向引物和 10 条反向引物共组合 80 对 SRAP 引物组合, 其序列见表 1。对父母本材料进行多态性 SRAP 引物组

合筛选, 从中选出扩增条带较清晰、带型较丰富且出现父本特异性条带的引物组合, 用于后代的真实性鉴定。

表 1 SRAP 引物序列

Table 1 Primer sequences used for SRAPA analysis

编号 Code	正向引物 Forward primers	编号 Code	反向引物 Reverse primers
Me1	5' -TGAGTCCAAACCGGATA-3'	Em1	5' -GACTGCGTACGAATTAAT-3'
Me2	5' -TGAGTCCAAACCGGAGC-3'	Em2	5' -GACTGCGTACGAATTTGC-3'
Me3	5' -TGAGTCCAAACCGGAAT-3'	Em3	5' -GACTGCGTACGAATTGAC-3'
Me4	5' -TGAGTCCAAACCGGACC-3'	Em4	5' -GACTGCGTACGAATTTGA-3'
Me5	5' -TGAGTCCAAACCGGAAG-3'	Em5	5' -GACTGCGTACGAATTAAC-3'
Me6	5' -TGAGTCCAAACCGGTAG-3'	Em6	5' -GACTGCGTACGAATTGCA-3'
Me7	5' -TGAGTCCAAACCGGTTG-3'	Em7	5' -GACTGCGTACGAATTATG-3'
Me8	5' -TGAGTCCAAACCGGTGT-3'	Em8	5' -GACTGCGTACGAATTAGC-3'
		Em9	5' -GACTGCGTACGAATTACG-3'
		Em10	5' -GACTGCGTACGAATTTAG-3'

作者贡献

郭修武和郭印山是本研究的试验设计人; 张鹏翔和刘镇东是试验研究的执行人; 张鹏翔, 刘镇东, 李坤完成数据分析, 张鹏翔, 刘镇东完成论文初稿的写作; 李成祥参与试验设计, 郭修武是项目的构思者及负责人, 郭印山指导试验设计, 数据分析及论文修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金项目(31000894)、国家现代农业产业技术体系建设专项基金项目(nycytx-30-ZP-08)、辽宁省科技厅重大科技攻关项目(200820403)、辽宁省教育厅科研项目(L2010492)和沈阳农业大学青年教师基金项目(20092005)共同资助。感谢沈阳农业大学郭修武教授与郭印山副研究员在本试验过程中的技术支持和有益建议以及刘镇东博士的大力协助。感谢课题组全体老师和同学的帮助。

参考文献

Guo D.L., Zhang J.Y., Li M., Zhang G.H., and Liu C.H., 2010, Optimization of SRAP-PCR system in grape and primers screening, *Jiyinzuxue yu Yingyongxue (Genomics and Applied Biology)*, 29(2): 379-384 (郭大龙, 张君玉, 李猛, 张国海, 刘崇怀, 2010, 葡萄 SRAP 反应体系优化及引物筛选, 基因组学与应用学, 29(2): 379-384)

Hanania U., Velcheva M., Sahar N., Perl A., 2004, An improved method for isolating high-quality DNA from *vitis vinifera* nuclei, *Plant Molecular Biology Reporter*, 22(2): 173-177

He P.C., eds., 1999, *Grape science*, China agriculture press,

Beijing, China, pp.324-348 (贺普超, 编著, 1999, 葡萄学, 中国农业出版社, 中国, 北京, pp.324-348)

Kong Q.S., eds., 2004, *Chinese Grape Biography*, China Agriculture Science and Technology Press, Beijing, China, pp.127-136(孔庆山, 编著, 2004, 中国葡萄志, 中国农业科学技术出版社, 中国, 北京, pp.127-136)

Li G., Quiros C.F., 2001, Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in brassica, *Theor. Appl. Genet.*, 103: 455-461

Liu L.W., Hou X.L., Gong Y.Q., Zhang Y.M., Wang K.R., and Zheng J.F., 2004, Application of molecular marker in variety identification and purity testing in vegetable crops, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)* 2(4): 563-568 (柳李旺, 侯喜林, 龚义勤, 张玉明, 王开荣, 郑军飞, 2004, 分子标记技术在蔬菜作物品种与纯度检测中的应用, 分子植物育种, 2(4): 563-568)

Lu J.Y., Mao Y.M., Shen L.Y., Peng S.Q., and Liu M., 2005, Application of AFLP markers for identification of hybrids from open pollinated dongzao (*Zizyphus jujuba* Mill.) Progenies, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 32(4): 680-683 (鹿金颖, 毛永民, 申莲英, 彭世琪, 刘敏, 2005, 用 AFLP 分子标记鉴定冬枣自然授粉实生后代杂种的研究, 园艺学报, 32(4): 680-683)

Ma H.X., Chen P.D., Yu G.H., and Ren L.J., 2007, Cytogenetics and RAPD analysis of interspecific hybrids from the cross of *fragaria mandschurica* staudt and *F. ananassa* duch,

Yuanyi Xuebao (*Acta Horticulturae Sinica*), 34(3): 597-604 (马鸿翔, 陈佩度, 余桂红, 任丽娟, 2007, 东北草莓×凤梨草莓种间杂种一代的细胞遗传学观察与 RAPD 分析, 园艺学报, 34(3): 597-604)

Qiao Y.C., Lin S.Q., He X.L., and Yang X.H., 2010, Identification of intraspecific and interspecific hybridizations in loquat (*Eriobotrya*) using rapid molecular markers, *Guoshu Xuebao* (*Journal of Fruit Science*), 27(3): 385-390 (乔燕春, 林顺权, 何小龙, 杨向晖, 普通枇杷种内和种间杂种苗的 RAPD 鉴定, 果树学报, 27(3): 385-390)

Wang Y.J., lamikanra O., Sehell L., and Lu J., 1997, Identification of hybrids derived from *Vitis rotundifolia* × *Vitis vinifera* by RAPD analysis, *Xibei Nongye Daxue Xuebao* (*Acta University Agriculture Boreali-occidentalis*), 25(3): 16-20 (王跃进, lamikanra, Sehell, 卢江, 1997, 用 RAPD 分析鉴定葡萄属远缘杂种, 西北农业大学学报, 25(3): 16-20)

Zeng M., and Yang B.Y., 2006, The application of isozyme technique in citrus studies, *Jiangxi Kexue* (*Jiangxi Science*), 24(1): 100-104 (曾明, 杨柏云, 2006, 同工酶技术在柑橘研究中的应用, 江西科学, 24(1): 100-104)

Zhang K.C., and Li R.Q., 1997, Sexual hybrid identification in apomictic “PingYiTianCha” seedlings using RAPD markers, *Nongye Shengwu Jishu Xuebao* (*Journal of Agriculture Biotechnology*), 5(4): 392-396 (张开春, 李荣琪, 1997, RAPD 技术鉴定无融合生殖型平邑甜茶的有性后代, 农业生物技术学报, 5(4): 392-396)

Zheng C.C., and Wen F.J., 1997, Application prospects of DNA molecular markers in identifying the purity of crop seeds, *Shandong Nongye Daxue Xuebao* (*Journal of Shandong Agricultural University*), 28(4): 499-505 (郑成超, 温孚江, 1997, DNA 分子标记技术与作物品种纯度鉴定, 山东农业大学学报, 28(4): 499-505)

Zhong H.Q., Li F.S., and Yang Q.H., 2005, A summary on sugarcane hybrid reliability identification, *Zhongguo Nongxue Tongbao* (*Chinese Agriculture Science Bulletin*), 21(6): 390-394 (钟淮钦, 李富生, 杨清辉, 2005, 甘蔗杂种真实性鉴定研究综述, 中国农学通报, 21(6): 390-394)



BioPublisher是一个致力于发表生物科学研究论文、开放取阅的出版平台

在BioPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://chinese.sophiapublisher.com>