

研究报告

Research Report

SRAP 分子标记在大豆抗豆卷叶螟研究中的应用

孙祖东[✉], 龙继凤[✉], 唐兴富[✉], 杨微[✉]

广西作物遗传改良生物技术重点实验室, 广西农业科学院经济作物研究所, 南宁, 530007

✉通讯作者: sunzudong@hotmail.com; ✉作者

分子植物育种, 2012 年, 第 10 卷, 第 16 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0016

收稿日期: 2012 年 03 月 01 日

接受日期: 2012 年 03 月 24 日

发表日期: 2012 年 04 月 30 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。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。

建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

孙祖东等, 2012, SRAP 分子标记在大豆抗豆卷叶螟研究中的应用, 分子植物育种(online) Vol.10 No.16 pp.1122-1126 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0016)

引用格式(英文):

Sun et al., 2012, Application of SRAP Marker in Soybean Resistance to Bean Pyralid (*Lamprosema indicata* Fabricius), Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.16 pp.1122-1126 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0016)

摘要 相关序列扩增多态性(SRAP)是一种新型的分子标记, 该标记操作简便, 具有高度共显性, 在基因组中分布均匀, 便于克隆测序目标片段, 可用于基因定位, 基因克隆, 遗传图谱构建等。SRAP 分子标记能成功应用到大豆作物研究中前提, 必需要建立起一个优良稳定有效的 SRAP-PCR 反应体系, 以便确定 SRAP 标记结果是有效可信的。本研究建立一个有效稳定优良的 SRAP-PCR 体系, 即 20 μL 的反应体系中各组分: Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L, 各 dNTP 的浓度 0.20 mol/L, *Taq* 酶为 1.5 U, 上下游引物的浓度均为 0.5 $\mu\text{mol/L}$, DNA 为 50 ng。本研究设计了 27 个正向引物, 40 个反向引物, 两两组合后有 1 080 对引物组合, 研究结果显示在 12 份抗感大豆材料具有多态性的引物组合有 516 对, 是所有引物组合的 47.8%, 在可扩增出产物的引物组合中占 60.6%。

关键词 大豆; 豆卷叶螟; 相关序列扩增多态性; 分子标记

Application of SRAP Marker in Soybean Resistance to Bean Pyralid (*Lamprosema indicata* Fabricius)

Sun Zudong[✉], Long Jifeng[✉], Tang Xingfu[✉], Yang Wei[✉]

Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Laboratory, Cash Crop Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, 530007

✉Corresponding author: sunzudong@hotmail.com; ✉ Authors

Abstract SRAP (Sequence-related Amplified Polymorphism) is a new technique for molecular marker. It is simple, highly codominant, dependable, distributed evenly in genome and easy to sequence the selected bands. This technique has been used in gene localization, gene cloning and the construction of genetic map and so on. In this study, SRAP-PCR reaction system and amplification procedure for soybean were established to ensure the reliability of SPAP marker. That is the basis for successfully applying SRAP marker into the research on soybean. PCR reaction was carried out in a total volume of 20 μL containing 2.0 mmol/L Mg^{2+} , 0.20 mmol/L dNTP, 1.5U *Taq* DNA polymerase, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ upstream and downstream primers and 50 ng template DNA. In this study, 27 forward primers and 40 reverse primers were designed. Totally 1 080 pairs of primers were generated in 12 varieties of soybean materials. Among them 516 pairs of primers are polymorphic and account for 47.8% of all the pairs of primers and 60.6% of the primer pairs which can amplify bands.

Keywords Soybean; Bean pyralid; SRAP; Molecular markers

研究背景

SRAP 即相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism), 是一种基于 PCR 反应的新型分子标记系统, 于 2001 年由美国加州大学蔬菜系 Li 与 Quios (2001)开发出来的, 也被称为 SBAP 即基于序列扩增多态性(sequence-based amplified polymorphism)。

这种新型分子标记系统(sequence-related amplified polymorphism)的分子标记引物由一段核心序列、“填充”序列和选择性碱基组成, 基因外显子中的 GC 含量高则启动子与内含子中的 AT 含量高, 引物就是根据这个理论进行设计的。

基于 PCR 的分子标记技术 SRAP, 通过对引物的独特设计来扩增 ORFs, 正反向引物的长度分别

为 17 bp, 18 bp, 正向引物用来扩增外显子, 反向引物特异扩增启动子区域、内含子区域。个体不同导致启动子、内含子和间隔区长度的不同, 从而产生了 SRAP 的多态性。SRAP 在对分子遗传图谱的构建、遗传多样性研究及种质资源的鉴定、作物起源与进化关系研究上以及作物目标性状连锁标记研究上都有广泛的应用(李严和张春庆, 2005; 柳李旺等, 2005)。

SRAP 的操作简便, 具有高度共显性, 遍布整个基因组, 在基因组中分布均匀, 便于克隆测序目标片段, 可用于基因定位、基因克隆、遗传图谱构建等。SRAP 标记最早是应用于芸薹属作物的研究, 随后被迅速应用到各种作物的研究中, 目前在水稻、油菜、番茄、棉花、马铃薯、大蒜、柑橘、辣椒、小麦、拟南芥等(林忠旭等, 2003; 王凤涛等 2009; 王刚等, 2004, 中国科学 C 辑, 34 (6): 510-516; 杜晓华等, 2006; 张丽等, 2007; 张安世等, 2010)作物研究中成功应用。本文将 SRAP 应用于大豆抗豆卷叶螟研究上。

1 结果与分析

1.1 Mg²⁺浓度对扩增反应的影响

试验设置 Mg²⁺在反应体系中的浓度梯度为五个: 1 mmol/L、1.5 mmol/L、2.0 mmol/L、2.5 mmol/L、3.0 mmol/L。反应产物经丙烯酰胺凝胶电泳分离后结果表明, 当 Mg²⁺浓度在 1.0 mmol/L~3.0 mmol/L 时, 均能扩增出产物。而当 Mg²⁺浓度在 1.0 mmol/L~2.0 mmol/L 时, 产物量多, 条带越来越清晰; 而 Mg²⁺浓度在 2.5 mmol/L~3.0 mmol/L 时, 产物量下降, 带型模糊。反应体系中 Mg²⁺浓度直接影响体系中 Taq 酶活性, 体系中 Mg²⁺不足则 Taq 酶活性不足, 反应产物少; 若体系 Mg²⁺过量, 则过量的 Mg²⁺会与 dNTP 络合, 反应产物同样会减少。因此, 本试验反应体系中 Mg²⁺浓度 2.0 mmol/L 时为最佳反应浓度。

1.2 dNTP 浓度对扩增反应的影响

dNTP 在反应体系中的浓度直接或间接影响扩增产物量得多少, 体系中 dNTP 不足, 扩增产物少, 而过多的 dNTP 则会与 Taq 酶竞争 Mg²⁺, 从而影响 Taq 酶的活性, Taq 酶活性降低则产物量减少。本试验设置各 dNTP 的浓度梯度为: 0.05 mmol/L、0.10 mmol/L、0.15 mmol/L、0.20 mmol/L、0.25 mmol/L。结果表明, 当体系中各 dNTP 的浓度从 0.05 mmol/L

~0.20 mmol/L 梯度上升时, 条带清晰明显; 当 dNTP 浓度达到 0.25 mmol/L 时反应产物量下降。因此在 dNTP 的浓度选择上, 本试验最佳浓度为 0.20 mmol/L。

1.3 Taq 酶浓度对扩增反应的影响

Taq 酶在 PCR 中起到关键作用。在反应中加入过多的 Taq 酶, 会产生非特异性扩增; 过少则直接导致产物量合成少。本试验设置的 Taq 酶梯度为: 0.5 U、1.0 U、1.5 U、2.0 U、2.5 U。由图 3 可见, 随着 Taq 酶的增加, 扩增产物量明显增多, 当 Taq 酶加入量达到 2.0 U 时出现了非特异性扩增, 且泳带拖尾现象明显。因此, 从本试验的结果可得出, 体系 20 μL 时, Taq 酶加入量为 1.5 U 时为反应最佳条件。

1.4 稳定性检验

由以上试验结果可知, 本研究建立大豆最优 SRAP-PCR 反应体系, 即 20 μL 的反应体系中各组分: Mg²⁺浓度为 2.0 mmol/L, dNTP 的浓度 0.20 mmol/L, Taq 酶为 1.5 U, 正、反向引物的浓度均为 0.5 μmol/L, DNA 为 50 ng。利用该体系对 12 份大豆对卷叶螟具有抗感性材料进行扩增, 经 6%聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离, 谱带清晰重复性好如图 1 所示。这说明该优化 SRAP 体系稳定可靠, 可用于研究大豆分子标记分析。

1.5 引物扩增多态性

反应体系经优化后, 以 12 份抗感大豆材料为模板, 用 27 个正向引物, 40 个反向引物的 1 080

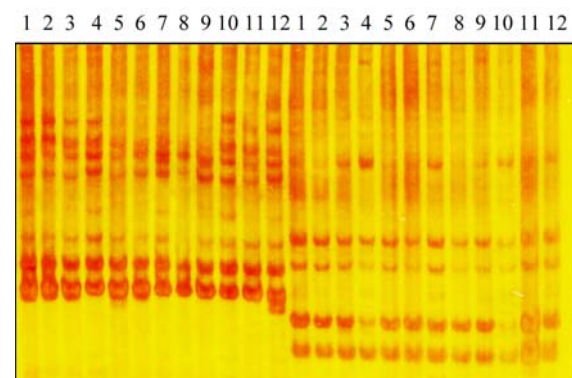


图 1 引物 Me19Em1 及 Me19Em2 扩增产物 SRAP 图谱
注: 1~12 分别为 12 个不同品种的大豆

Figure 1 SRAP finger print of 12 soybean varieties genenated by primers Me19-Em1 and Em19-Em2

Note: 1~12 standfor 12 varieties of soybean respectively

对引物组合进行扩增, PCR 扩增产物经凝胶电泳, 银染结果显示: 具有清晰条带的引物有 866 对, 占所有标记数的 80.2%; 其中具有多态性的引物为 516 对, 是所有引物组合的 47.8%, 在可扩增产物的引物组合中占 60.6%, 无法扩增产物的引物组合为 214 对, 占所有引物组合的 19.8%, 见表 1。

2 讨论

新型分子标记 SRAP 有很多特点, 如高多态性、好的重复性、高产率、操作方法简单、均匀分布于基因组中、扩增得到的目的片段测序容易、引物有一定的通用性, 而且其正反向引物可以相互搭配组合, 用少量引物能组合成多个引物对, 使引物的使用效率提高。SRAP 标记已在油菜、马铃薯、水稻、生菜、大蒜、苹果、樱桃、柑橘与芹菜等(Sun et al., 2007; Rahman et al., 2008; 王凤涛等, 2009; 林忠旭等, 2003; 杜晓华等, 2006; 张丽等, 2007; 张安世等, 2010; 王刚等, 2004, 中国科学 C 辑, 34 (6): 510-516) 作物的分子标记研究中, 广泛用于种质资源的鉴定评价、遗传图谱的构建、基因组的转录图谱绘制、重要性状的基因标记、基因克隆与标记测序。

目前, SRAP 标记在大豆中应用的报道还比较少。周春娥等使用 SRAP 标记进行了大豆种质多样性分析(周春娥等, 2012, 江苏农业科学, 40(1): 40-42)。王贤智等(2008)利用 SRAP 标记与 SSR、AFLP 标记对大豆重组自交系群体进行大豆多态性标记构建遗传连锁图谱, 其中 SRAP 标记的引物为 170 对, 亲本间有多态性条带的有 23 对, 获得了关于大豆含油量 QTL SRAP 分子标记 14 个。此外还获得了 2 个关于叶型和茸毛色的形态标记。但是该报道称 SRAP 标记应用于大豆扩增效果不理想, 重复性差。因此, 在大豆研究中应用 SRAP 标记需要进行反应体系的优化, 建立一个稳定优良有效的 SRAP-PCR 反应体系是十分必要的。

本研究中, 进行多次的体系优化, 在反应时间上也进行了多次的校正, 反复进行了稳定性与重复性试验, 最后获得了较理想的 SRAP-PCR 反应条件与反应体系, 即 20 μ L 的反应体系中各组分: Mg²⁺ 浓度为 2.0 mmol/L, 各 dNTP 的浓度 0.20 mmol/L, Taq 酶为 1.5 U, 引物浓度为 0.5 μ mol/L, DNA 为 50 ng。在引物筛选上, 用 27 条正向引物和 40 条反向引物组成 1 080 对引物组合, 经过筛选和验证, 获得 516

对具有多态性的引物组合, 这些引物组合可用于分子标记或进行遗传图谱的构建, SRAP 分子标记在大豆研究上应用少, 为以后的研究工作节时省力, 提高研究效率提供帮助。

3 材料与方法

3.1 实验材料

用于本研究的材料是经过多年鉴定, 对豆卷叶螟高抗的大豆品种牛黄豆, 栾川城关春小黑豆, 吴江青豆 3, 赶泰-2-2, 东兴青皮, 丰平黑豆和高感觉的大豆品种 Morsoy, Bethel, 皖 82-178, 大浪中团黄豆, 山东大豆, 河洲黄豆金龙黑豆, 那坡黑眼豆。

3.2 试验方法

3.2.1 总 DNA 的提取

在苗期随机选取新鲜叶片, 采用 CTAB 法提取总 DNA, 用 6% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, RNA/DNA 浓度电度测定仪-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

3.2.2 PCR 扩增引物

根据 SRAP 标记特性进行引物设计, 共设计有正向引物有 27 个, 反向引物有 40 个, 共组成 1 080 对 SRAP 引物组合, 见表 2, 所有引物均是由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

3.2.3 PCR 扩增

以丰平黑豆与 Bethel 为模板, 对 Mg²⁺、dNTP、Taq 酶、引物分别设置 5 个不同的浓度梯度, 进行 20 μ L PCR 反应体系扩增优化。反应过程: 预变性 94 $^{\circ}$ C 4 min, 变性 94 $^{\circ}$ C 50 s, 复性 35 $^{\circ}$ C 50 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环数是 5 个; 变性 94 $^{\circ}$ C 50 s, 退火 50 $^{\circ}$ C 50 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 35 循环, 循环后, 继续 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 产物保存于 4 $^{\circ}$ C。

3.2.4 产物检测

以丰平黑豆(抗)与 Bethel (感)等(孙组东等, 2005)为父母亲本作对照进行 SRAP 分析, 检测各引物组合进行 SRAP-PCR 的有效性。产物中加入 Loading Buffer 3.2 μ L, 电泳检测用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶, 200V 电压, 0.5 \times TBE 电泳缓冲液, 1 h 电泳, 银染显影后, 拍照保存。

作者贡献

孙组东是项目的构思者和负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改; 龙继凤、唐兴富、杨微是本实验

表 2 SRAP 引物序列
Table 2 sequences of SRAP

正向引物序列(5'-3')		反向引物序列(5'-3')	
Forward primer sequences (5'-3')		Reverse primer sequences (5'-3')	
me1	TGAGTCCAAACCGG ATA	em1	GACTGCGTACGAATT AAT
me2	TGAGTCCAAACCGG AGC	em2	GACTGCGTACGAATT TGC
me3	TGAGTCCAAACCGG AAT	em3	GACTGCGTACGAATT GAC
me4	TGAGTCCAAACCGG ACC	em4	GACTGCGTACGAATT TGA
me5	TGAGTCCAAACCGG AAG	em5	GACTGCGTACGAATT AAC
me6	TGAGTCCAAACCGG TAG	em6	GACTGCGTACGAATT GCA
me7	TGAGTCCAAACCGG TTG	em7	GACTGCGTACGAATT ATG
me8	TGAGTCCAAACCGG TGT	em8	GACTGCGTACGAATT AGC
me9	TGAGTCCAAACCGG TCA	em9	GACTGCGTACGAATT ACG
me10	TGAGTCCAAACCGG TAA	em10	GACTGCGTACGAATT TAG
me11	TGAGTCCAAACCGG TCC	em11	GACTGCGTACGAATT TCC
me12	TGAGTCCAAACCGG TGC	em12	GACTGCGTACGAATT GTC
me13	TGAGTCCAAACCGG CAT	em13	GACTGCGTACGAATT GGT
me14	TGAGTCCAAACCGG TCT	em14	GACTGCGTACGAATT CAG
me15	TGAGTCCAAACCGG AAA	em15	GACTGCGTACGAATT CTG
me16	TGAGTCCAAACCGG CTA	em16	GACTGCGTACGAATT CGC
me17	TGAGTCCAAACCGG AAC	em17	GACTGCGTACGAATT CCA
me18	TGAGTCCAAACCGG TGC	em18	GACTGCGTACGAATT CAA
me19	TGAGTCCAAACCGG CAG	em19	GACTGCGTACGAATT GAT
me20	TGAGTCCAAACCGG ACA	em20	GACTGCGTACGAATT CCT
me21	TGAGTCCAAACCGG ACT		
me22	TGAGTCCAAACCGG GTA		
me23	TGAGTCCAAACCGG ACG		
me24	TGAGTCCAAACCGG AGA		
me25	TGAGTCCAAACCGG GAC		
me26	TGAGTCCAAACCGG AGG		
me27	TGAGTCCAAACCGG GGT		

研究的执行人。龙继凤负责分子标记实验,与第一作者同等贡献;唐兴富负责田间试验;杨微参加田间试验,负责实验数据整理与分析。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(30871545),广西回国基金项目(桂科回 0832020)和广西农业科学院基本业务费项目(201004Z(基))共同资助。

参考文献

- Du X.H., Gong Z.H., Wang D.Y., and Yin Q.M., 2006, Genetic differences among well-performing inbred lines of hot pepper (*Capsicum annuum* L.), Xibei Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica), 26(12): 2445-2452 (杜晓华, 巩振辉, 王得元, 殷秋妙, 2006, 辣椒优良自交系间遗传差异的分子分析, 西北植物学报, 26(12): 2445-2452)

- Li G., and 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 <http://dx.doi.org/10.1007/s001220100570>
- Li Y., and Zhang C.Q., 2005, A molecular marker-SRAP technique optimization and application analysis, *Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 21(5): 108-112 (李严, 张春庆, 2005, 新型分子标记—SRAP 技术体系优化及应用前景分析, *中国农学通报*, 21(5): 108-112)
- Lin Z.X., Zhang X.L., Nie Y.C., He D.H., and Wu M.Q., 2003, Construction of SRAP genetic linkage map in cotton, *Kexue Tongbao (Chinese Science Bulletin)*, 8(15): 1676-1679 (林忠旭, 张献龙, 聂以春, 贺道华, 吴茂清, 2003, 棉花 SRAP 遗传连锁图构建, *科学通报*, 48(15): 1676-1679)
- Liu L.W., Gong Y.Q., Huang H., and Zhu X.W., 2005, Novel molecular marker systems—SRAP and TRAP and their application, *Yichuan (Hereditas)*, 26(s): 777-751 (柳李旺, 龚义勤, 黄浩, 朱献文, 2005, 新型分子标记—SRAP 与 TRAP 及其应用, *遗传*, 26(5): 777-781)
- Rahman M., Sun Z., McVetty P.B., and Li G., 2008, High throughput genome-specific and gene-specific molecular markers for erucic acid genes in *Brassica napus* (L.) for marker-assisted selection in plant breeding, *Theor. Appl. Genet.*, 117(6): 895-904 <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-008-0829-9> PMID:18633592
- Sun Z.D., Wang Z.N., Tu J.X., Zhang J.F., Yu F.Q., McVetty P.B., and Li G.Y., 2007, An ultradense genetic recombination map for *Brassica napus*, consisting of 13551 SRAP markers, *Theor. Appl. Genet.*, 114(8): 1305-1317 <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-006-0483-z> PMID:17426959
- Wang F.T., Lin R.M., Ouyang H.Y., and Xu S.C., 2009, The application of SRAP-PCR in genetic diversity study of Henan wheat cultivars, *Zhiwu Yichuan Ziyuan Xuebao (Journal Of Plant Genetic Resources)*, 10(4): 517-521 (王凤涛, 蔺瑞明, 欧阳宏雨, 徐世昌, 2009, 利用 SRAP 标记分析河南小麦栽培品种的遗传多样性, *植物遗传资源学报*, 10(4): 517-521)
- Wang X.Z., Zhou R., Zhang X.J., Shan Z.H., Sha A.H., Chen H.F., Qiu D.Z., Li P.W., and Zhou X.A., 2008, Map construction and QTL analysis of oil content in soybean, *Zhongguo Youliao Zuowu Xuebao (Chinese Journal of Oil Crop Sciences)*, 30(3): 272-278 (王贤智, 周蓉, 张晓娟, 单志慧, 沙爱华, 陈海峰, 邱德珍, 李培武, 周新安, 2008, 大豆遗传图谱的构建和含油量的 QTL 分析, *中国油料作物学报*, 30(3): 272-278)
- Zhang A.S., Xu J.W., Xin C.J., Zhang L.M., Xing Z.F., and Wei H.Y., 2010, Analysis of genetic diversity of new middle-late lines of japonica rice in henan province by srap, *Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 26(2): 50-54 (张安世, 徐九文, 辛长永, 张利民, 邢智峰, 韦慧彦, 2010, 河南省水稻中晚粳新品系遗传多样性的 SRAP 分析, *中国农学通报*, 26(2): 50-54)
- Zhang L., Jiang S.K., Zhang X.J., Li L., Guo Z.F., Ma H., Chen L.J., Wang X.Y., Xu Z.J., and Zhong M., 2007, Construction and analysis of a SRAP molecular genetic map of japonica rice (*Oryza sativa* L. sp. japonica), *Zhiwu Shenglixue Tongxun (Plant Physiology Communications)*, 43(3): 443-447 (张丽, 姜树坤, 张喜娟, 李丽, 郭志富, 马慧, 陈丽静, 王学英, 徐正进, 钟鸣, 2007, 粳稻 SRAP 分子标记遗传群的构建与分析, *植物生理学通讯*, 43(3): 443-447)