

技术与方法 **Techniques and Methods****番茄耐低温相关基因的 SRAP 标记筛选**郭彩杰<sup>1</sup>, 侯丽霞<sup>2,\*</sup>, 崔娜<sup>1,\*</sup>, 韩明利<sup>1</sup><sup>1</sup>沈阳农业大学生物科学技术学院, 沈阳 110161; <sup>2</sup>山东省农科院蔬菜研究所, 山东省设施蔬菜生物学重点实验室, 国家蔬菜改良中心山东分中心, 济南 250100

**摘要:** 以番茄耐低温和不耐低温基因组 DNA 为材料进行 SRAP 分析, 共筛选了 225 对 SRAP 引物, 其中 27 对引物在两池之间表现差异, 经测序只有 Me2Em5 扩增出与番茄耐低温相关的差异性片段, 大小约为 273 bp, 该片段仅在耐低温植株中稳定扩增。经 Blast 分析比对, 该片段与已报道的 PEG 和低温诱导后在沙冬青幼苗中表达基因的 cDNA 片段同源。根据差异片段序列设计特异引物, 将 M2E5-273 标记成功转化为更稳定的 SCAR 标记。

**关键词:** 番茄; 耐低温; SRAP; 分子标记

**Identification of the Specific SRAP Marker Associated with Cold Resistance of Tamoto**GUO Cai-Jie<sup>1</sup>, HOU Li-Xia<sup>2,\*</sup>, CUI Na<sup>1,\*</sup>, HAN Ming-Li<sup>1</sup><sup>1</sup>Biological Science and Technology College, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; <sup>2</sup>Institute of Vegetables, Shandong Academy of Agricultural Science, Key Laboratory for Biology of Greenhouse Vegetable of Shandong Province, National Center for Vegetable Improvement (Shandong), Jinan 250100, China

**Abstract:** SRAP (sequence-related amplified polymorphism) was used to analyze the genome DNA of cold-resistance tomato and normal tomato. Total 225 pairs of SRAP primers were used. The amplification of twenty-seven primers was polymorphic in the two lines. Only the Me2Em5 primer had fragment that was highly homologous with cold-resistance plant testing. And a 273-bp specific band M2E5-273 was detected in cold-resistance tomato but not in normal tomato. Analysis of the sequence showed that this fragment was highly homologous with *Ammopiptanthus mongolicus* seedling PEG and cold-induced transcript-derived fragment. After cloning and sequencing, specific primers were designed to transform the SRAP marker to more stable SCAR marker, which was named M2E5-273.

**Key words:** tomato; cold-resistance; SRAP; molecular marker

番茄是一种起源于热带的喜温蔬菜作物(李书德 1995)。多数番茄品种在温度低于 10 °C 时生长发育受阻, 当温度低于 6 °C 时表现明显的冷害症状 (Geisenberg 和 Stewart 1986)。低温胁迫下, 对番茄的生长、光合作用和酶活性都有不同程度的影响, 严重的损害了番茄的产量和品质。近些年来, 国内外将现代生物技术应用用于番茄耐低温的育种中, 将传统的育种方法与现代生物技术相结合, 使具有耐低温的番茄品种不断在生产中应用。

序列相关扩增多态性(sequence related amplified polymorphism, SRAP)又称为基于序列扩增多态性(sequence based amplified polymorphism, SBAP), 是一种基于 PCR 的分子标记, 它具有简便、中等产量、重复性好、高共显性、易分离条带及易

测序等优点, 尤其它可以检测基因的可译读码框 (ORFs) 区域, 从而提高了扩增结果与表现型的相关性。现已广泛应用于植物重要性状标记中(柳李旺等 2004)。利用 SRAP 分子标记技术标记番茄耐低温相关基因还鲜见报道。本研究利用 SRAP 分子标记技术, 标记番茄芽期耐低温相关的基因, 为番茄耐低温育种提供优秀的标记, 加速育种进程, 实现育种目标的可靠性。

收稿 2010-09-13 修定 2010-11-03

资助 国家“863”计划项目(2006AA100108-3-1)和辽宁省教育厅科学技术研究项目(2008623)。

\* 共同通讯作者(E-mail: houlix2006@126.com, Tel: 0531-83179184; E-mail: syaua@163.com, Tel: 024-88487163)。

## 材料与方法

### 1 试验材料

构建遗传群体,利用番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)耐低温株系 Lucky  $F_8$  和不耐低温株系番青获得杂交  $F_1$  代,  $F_1$  代自交获得  $F_2$  群体。材料由山东省农科院蔬菜研究所提供。

### 2 耐低温池和不耐低温池的建立

取番茄  $F_2$  代种子, 28 °C 光照培养箱预培养 36 h, 然后放入 11 °C 恒温培养箱内(Majid 1999; 赵福宽等 2001; 王孝宣等 1996; Gemel 和 Saczynska 1989), 每 24 h 挑选一次, 能够萌发的种子为耐低温番茄群体, 不萌发的为不耐低温番茄群体。将两类型种子分别播种于山东省农科院蔬菜研究所温室穴盘, 获得健壮幼苗。

### 3 DNA 提取

从耐低温群体和不耐低温群体中各选择 90 株健康单株, 4~5 叶期时, 每株取健康无病害嫩叶, 洗净后用快捷性植物基因组 DNA 提取试剂盒提取番茄 DNA, 用紫外分光光度计测定浓度并稀释至 15 ng· $\mu\text{L}^{-1}$ , 存放于 -20 °C 备用。

### 4 SRAP 分析

参照 Li 和 Quiros (2001)、陈涛(2007)、陈峰等(2007)、Ferriol 等(2003)和林忠旭等(2003)方法

进行 SRAP 引物设计, 由上海生物工程有限公司合成, 引物及序列见表 1。

20  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系: 2×Taq PCR MasterMix 10  $\mu\text{L}$ ; 正反向引物各 1  $\mu\text{L}$ ; 模板 1  $\mu\text{L}$  (15 ng· $\mu\text{L}^{-1}$ ), ddH<sub>2</sub>O 补足 20  $\mu\text{L}$ 。程序: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 35 °C 1 min, 72 °C 1 min, 5 个循环; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保存。扩增产物在 6% 变性 PAGE 凝胶上分离, 银染法显带。2×Taq PCR MasterMix 和 DNA 提取试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司; 6% PAGE 胶购自上海生物工程有限公司。

### 5 差异性片段回收、测序及 SCAR 转化

在变性聚丙烯酰胺凝胶胶板(银染法)干燥后, 滴 10  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O, 10 min 后, 用灭菌干净刀片切下差异性片段, 放入 1.5 mL EP 管中, 加入 20  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O, 95 °C 水浴锅中加热 10 min, 作为 PCR 模板, 4 °C 备用。取 2.5  $\mu\text{L}$  上清液做模板, 再扩增的引物和反应条件和原来相同, 配制 50  $\mu\text{L}$  的反应体系。50  $\mu\text{L}$  PCR 产物点入 1.5% 琼脂糖上检测, 扩增出与原来大小相同的片段, 用胶回收试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司)回收条带, 连接到 PMD-18T 上, 转化大肠杆菌并测序。利用 DNAMAN 去载体序列后进行分析及 Blast 相似性比较。根据 SRAP 扩增的差异条带序列, 利用 Primer5.0 设计特异引物。

表 1 SRAP 引物序列

Table 1 The primer sequences used in SRAP reaction

编号	正向引物(5' → 3')	编号	反向引物(5' → 3')
Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	Em2	GACTGCGTACGAATTTGC
Me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	Em3	GACTGCGTACGAATTGAC
Me4	TGAGTCCAAACCGGACC	Em4	GACTGCGTACGAATTTGA
Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	Em5	GACTGCGTACGAATTAAC
Me6	TGAGTCCTTTCCGGTAA	Em6	GACTGCGTACGAATTGCA
Me7	TGAGTCCAAACCGGTAG	Em7	GACTGCGTACGAATTCAA
Me8	TGAGTCCAAACCGGAAC	Em8	GACTGCGTACGAATTCTG
Me9	TGAGTCCAAACCGGAGT	Em9	GACTGCGTACGAATTCGA
Me10	TGAGTCCAAACCGGTCC	Em10	GACTGCGTACGAATTCAG
Me11	TGAGTCCAAACCGGTGC	Em11	GACTGCGTACGAATTCCA
Me12	TGAGTCCAAACCGGATG	Em12	GACTGCGTACGAATTATG
Me13	TGAGTCCAAACCGGACA	Em13	GACTGCGTACGAATTGTC
Me14	TGAGTCCAAACCGGTTG	Em14	GACTGCGTACGAATTACG
Me15	TGAGTCCAAACCGGTGT	Em15	GACTGCGTACGAATTAAG

## 6 SCAR 标记的 PCR 扩增和群体验证分析

特异 PCR 扩增的反应体系总体积 20  $\mu\text{L}$  包括: 模板 DNA 为 15 ng、引物浓度 0.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  浓度 1.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、dNTPs 浓度 0.2  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、Taq DNA 聚合酶 0.5 U。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 8 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 56  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 29 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。先对基因池进行验证, 然后对耐低温池和不耐低温池进行单株 DNA 验证。电泳产物进行琼脂糖

凝胶成像观察分析。

## 实验结果

### 1 引物筛选

用 225 对 SRAP 引物对番茄耐低温基因池和不耐低温基因池 DNA 进行引物筛选, 大部分引物在两系间扩增图谱相同, 表明两系间具有基本相同的基因组 DNA 序列, 但有 27 对引物在耐低温 DNA 池中表现出差异, 部分 SRAP 引物筛选如图 1。

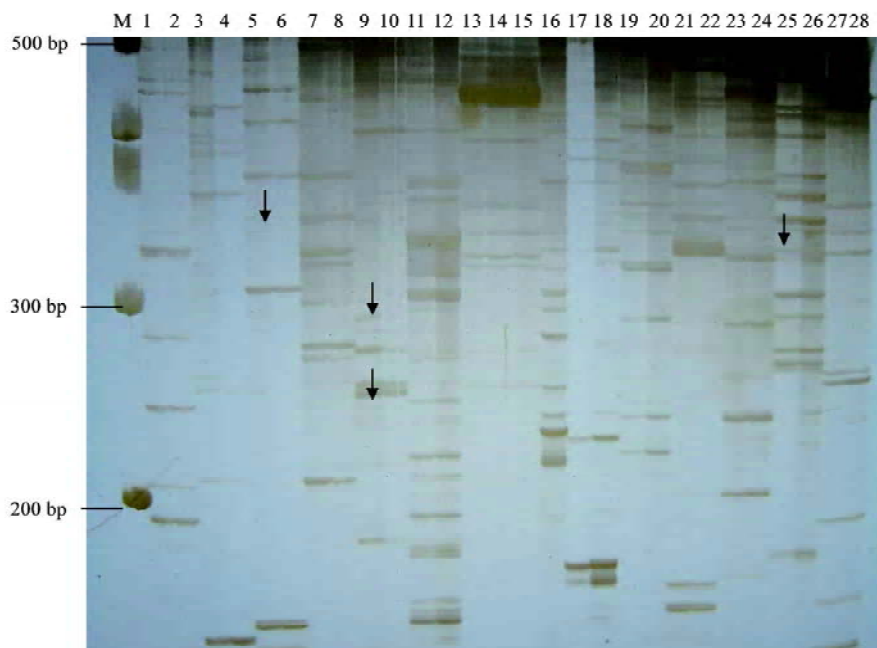


图 1 部分 SRAP 引物筛选

Fig.1 Part of Screened SRAP primers

单数条带为耐低温基因池 DNA; 双数条带为不耐低温基因池 DNA。箭头示有差异的带。

### 2 特异片段测序和序列分析

回收由 27 对引物扩增的差异性片段, 测序结果表明引物 Me2Em5 扩增的差异性片段与番茄耐

低温基因有关, 片段大小为 273 bp (图 2)。经 Blast 比较分析, 该片段与已报道的 PEG 和低温诱导后在沙冬青 (*Ammopiptanthus mongolicus*) 幼苗中表达基

```
GACTGCGTACGAATTAACCCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGT
GGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATGCGGGAATT
CTTAGCGTGTGGGCTTCCGTGGTGACCCGACGAGCTTCTGACTTTTGTGCTAACGGG
GGACAGAGAGCATGGGGACACGTCATTGCCATCATCTGGACTCGAGCGCTTGCTGCT
GTGGGAATACGTAAAGAGCCCCTTGTGCTCCGGTTTGGACTCAA
```

图 2 差异片段序列

Fig.2 The sequences of specific DNA bands

序列中带下划线的 35 个碱基为对应的上游引物与下游引物序列。

因的 cDNA (GenBank 登录号为 GO355492) 的序列相似性为 97%, e 值为  $4e-67$ 。

### 3 SRAP 标记的 SCAR 转化

根据差异目的片段序列, 设计特异引物: 上游引物为 5' CACAAGGGGCTCTTTACGT 3', 下游引物为 5' TAAAGGGAACAAAAGCTGGAG 3'。首先

在耐低温池和不耐低温池进行 PCR 扩增, 获得差异后对耐低温和不耐低温池中各 15 个单株逐个进行扩增。该引物在耐低温池中稳定扩增出一条特异条带(图 3), 在 200~300 bp 之间, 与设计的片段大小一致, 而不耐低温池单株中均没有扩增出相应的条带(图略), 表明已成功将该 SRAP 标记转化为

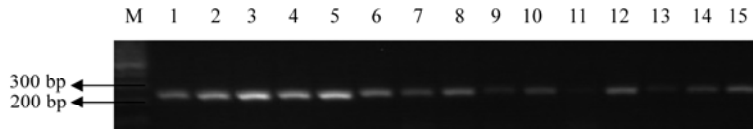


图 3 SCRA 引物在耐低温池单株中的 SCRA 扩增

Fig.3 The amplified profiles by SCAR primer in cold-resistanced tomato  
M: 100 bp DNA Ladder DL1500.

SCAR 标记。

为了分析该标记与耐低温的遗传图距, 进一步用 90 株耐低温单株和 90 株不耐低温单株进行琼脂糖凝胶电泳分析, 在 180 株单株组成的群体中没有发现交换单株, 表明该标记与耐低温基因紧密连锁。

## 讨 论

番茄的耐低温是复杂的数量性状, 由多个基因控制, 也受环境因素的影响。对番茄的耐低温研究中大部分集中在生理指标的测定上, 如超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛的含量、可溶性糖的含量、叶绿素的含量等(张渝洁 2008)。近年来, 对于番茄耐低温性状的选择正在由传统的表型选择向 DNA 分子水平的基因选择发展。黄锡志等(2001)利用 RFLP 分子标记构建了番茄的基因连锁图, 把 2 个抗冷性基因和 3 个番茄种子发芽期抗冷性相关的基因在基因连锁图上进行了明确的定位。赵福宽等(2002)以番茄耐冷性基因系为试材, 采用 RAPD 分子标记技术, 从 280 个随机引物中筛选出一个在两池间具有多态性的引物 OPF14, 证明了该引物扩增出的特异性片段是一个与番茄耐冷性相连锁的 RAPD 标记。

SRAP 分子标记具有简便、高共显性、易于分离条带和易测序等优点, 最初应用于芸苔属植物油菜中, 现在已广泛的应用于粳稻(张丽等 2007)、棉花、马铃薯、柑橘、大蒜、辣椒、黄瓜、

芹菜、拟南芥、小麦等的植物研究中(徐操和赵宝华 2009), 也有在杨树中应用研究(刘艳萍等 2008)。本研究利用 SRAP 分子标记, 建立了番茄发芽期耐低温和不耐低温池, 从 225 对引物中筛选出 27 对有差异的特异性片段, 经过回收、连接载体、转化和测序后, 得到一对引物 Me2Em5, 其扩增出的特异片段与 PEG 和低温诱导后在沙冬青幼苗中表达基因的 cDNA 片段的基因片段同源, 相似值为 97%。目前做番茄耐低温的 DNA 水平的试验较少, 在低温诱导过程中的方法也不尽相同, 而本试验的试材在处理的方法与低温诱导沙冬青有相似之处, 测序片段在 NCBI 上的比对结果与沙冬青相似值也较高。

由于 SRAP 分子标记的不稳定性, 易受外界环境影响, 根据测序的结果, 设计稳定的 SCAR 引物, 用 SCAR 引物进行了基因池单株验证。耐低温池单株琼脂糖凝胶电泳验证时, 由于提取 DNA 浓度存在差异, 大倍数稀释后由于个别模板量不足存在亮度稍有模糊的现象, 耐低温的基因池中的单株 DNA 都在 200~300 bp 中扩增出片段, 不耐低温基因池单株中无此片段, 经过群体验证后, 没有发现交换单株, 表明该标记与耐低温基因紧密连锁, 成功的转化成 SCAR 标记。这为番茄耐低温种子发芽的分子标记建立了更稳定、更为简便、更易快速的操作, 既为番茄耐低温育种提供优秀的标记, 又为加速育种进程、实现育种目标的可靠性提供理论基础。

## 参考文献

- 陈峰, 张洁夫, 陈松, 顾慧, 戚存扣(2007). 甘蓝型油菜隐性核不育基因的 SPAP 标记. 江苏农业学报, 23 (4): 283~288
- 陈涛(2007). 甘蔗突变体 SRAP 分子标记研究[硕士论文]. 南宁: 广西大学, 17~18
- 黄锡志, 寿森炎, 廖乾生(2001). 转基因番茄研究进展. 北方园艺, (3): 29~31
- 李树德(1995). 中国主要蔬菜抗病育种进展. 北京: 科学出版社, 229~232
- 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
- 刘艳萍, 郭志富, 刘玉东, 姜树坤, 张丽(2008). 应用 SRAP 标记分析新疆地区主要杨属树种的遗传多样性. 植物生理学通讯, 44 (2): 225~228
- 柳李旺, 龚义勤, 黄浩, 朱献文(2004). 新型分子标记 SRAP 与 TRAP 及其应用. 遗传, 26 (5): 777~781
- 王孝宣, 李树德, 东惠茹, 高振华, 载善书(1996). 低温胁迫对番茄苗期和开花期若干性状的影响. 园艺学报, 23 (4): 349~354
- 徐操, 赵宝华(2009). SRAP 分子标记的研究进展及其应用. 生命科学仪器, 7 (4): 25~27
- 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
- 张渝洁(2008). 番茄在低温弱光下生理特性的变化研究. 北方园艺, (3): 38~39
- 赵福宽, 高遐虹, 程继鸿(2002). 番茄抗冷育种研究进展. 北京农学院学报, 17 (4): 96~99
- 赵福宽, 杨瑞, 林成, 高遐虹, 程继鸿(2001). 番茄杂交及回交后代耐冷性分析. 长江蔬菜, (2): 28~29
- Ferriol M, Pico B, Nuez F (2003). Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. Theor Appl Genet, 107 (2): 271~282
- Geisenberg C, Stewarst K (1986). Field crop management. In: Atherton JG, Rudich J (eds). The Tomato Crop: A Scientific Basis for Improvement. London: Chapman and Hall, 511~517
- Gemel J, Saczynska V (1989). Composition of non-esterified fatty acids in chloroplasts of closely related chill-sensitive plants. Phytochemistry, 28: 1813~1816
- Li G, Quiros CF (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: 445~461
- Majid RF (1999). Genetics of salt and cold tolerance in tomato: quantitative analysis and QTL mapping. Plant Biotechnol, 16 (1): 55~64