

甘蓝品种‘争春’和‘寒光2号’的DNA指纹图谱构建

薄天岳^{1,2,*} 刘冲^{2,3} 葛才林³ 任云英¹ 陈锦秀¹ 杨晓锋^{1,2}

¹上海市农业科学院园艺研究所, 上海市国家蔬菜改良分中心, 上海 201106; ²上海市设施园艺技术重点实验室, 上海 201106; ³扬州大学农学院, 江苏扬州 225009

Establishment of DNA Fingerprinting on Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) Cultivars of ‘Zhengchun’ and ‘Hanguang 2’

BO Tian-Yue^{1,2,*}, LIU Chong^{2,3}, GE Cai-Lin³, REN Yun-Ying¹, CHEN Jin-Xiu¹, YANG Xiao-Feng^{1,2}

¹Horticultural Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai Sub-center of Chinese National Vegetable Improvement Center, Shanghai 201106, China; ²Shanghai Key Laboratory of Protected Horticultural Technology, Shanghai 201106, China; ³Agricultural College, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China

提要 用 SDS 法提取甘蓝(*Brassica oleracea* var. *capitata*)品种‘争春’、‘寒光2号’及其各自亲本的基因组 DNA, 通过 SRAP、RAPD 两种分子标记方法, 构建其 DNA 指纹图谱, 用于种子纯度鉴定。利用 30 对 SRAP 引物组合和 200 个 RAPD 随机引物, 以各品种及其亲本的基因组 DNA 为模板组进行筛选, 结果显示: 多数 SRAP 引物组合对模板组的扩增带型一致, 少数组合扩增出差异, 但未能找到具有互补差异的引物组合; 通过 RAPD 标记方法筛选出能鉴定 2 个品种纯度的引物分别为 S42、S103、S193 和 S42、S89、S151, 其中引物 S42 对 2 组材料均能扩增出特异的 RAPD 指纹图谱, 并将 RAPD 指纹图谱转变为相应的数字指纹。

关键词 甘蓝; 品种; SRAP; RAPD; DNA 指纹图谱

目前, 我国生产中推广应用的主栽甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *capitata*) 品种基本上为杂种一代。杂种一代能综合亲本的许多优良性状, 经济效益较好。但常发生的假杂种或种子混染现象会使种子纯度下降, 而导致生产蒙受损失。因此, 提高杂交种纯度是杂种优势利用研究领域的重要课题。在种子纯度鉴定技术中, 传统的形态鉴定方法耗时且成本高, 同工酶鉴定技术常受环境条件和植物发育阶段的制约, 而随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphism DNA, RAPD)、简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR)、扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 等分子标记技术, 通过比较杂交种与其双亲的扩增谱带, 就可实现品种纯度的快速鉴定, 省时、省工且可靠, 现已被广泛应用 (Hashiura 和 Sato 1993; 关荣霞等 2003; 蔡雪飞等 2004; 柳李旺等 2004a, b), 新近发展起来的分子标记技术——序列相关扩增多态性 (sequence-related amplified polymorphism, SRAP) 在蔬菜种子纯度鉴定中的应用尚未见有成功的报道。本文利用 SRAP、RAPD 技术构建了长江中下游地区甘蓝主栽品种‘争春’、‘寒光 2

号’与其各自亲本的 DNA 指纹图谱, 并取得了一些结果, 现报道如下。

材料与amp;方法

1 材料

材料为甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *capitata*) 品种‘争春’与‘寒光 2 号’及其各自亲本, 由上海市农业科学院园艺研究所提供。

2 试剂与仪器

实验所用的 PCR 试剂 (MgCl₂、PCR 缓冲液、dNTPs、Taq DNA 聚合酶、引物) 以及 SDS、Tris-HCl、EDTA、琼脂糖等均购自上海生工生物工程有限公司。

实验所用仪器为: Eppendorf 公司生产的 Mastercycler 5333 PCR 仪, BIO-RAD Laboratories 公司生产的 PowerPac Basic™ EN61010-1 电泳仪和 Gel Doc™ EQ 170-8060 凝胶成像仪。

收稿 2006-04-07 修定 2006-06-01

资助 上海市科委基础性研究计划 (03JC14060) 和上海市农业科技兴农重点攻关项目 (2004 年第 2-5 号)。

*E-mail: tybo@saas.sh.cn, Tel: 021-52630102

3 DNA的提取

DNA的提取参照王关林和方宏筠(1998)的方法,并略加改进。

4 PCR反应条件及电泳分析

RAPD扩增反应采用我们优化的甘蓝RAPD体系和扩增程序(刘冲等2005)。RAPD扩增产物电泳分析采用浓度为 $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的琼脂糖凝胶(含 $0.15\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ EB),电泳缓冲液为 $1\times\text{TAE}$,保持 90 V 恒压($4\sim 5\text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$)电泳 $1.5\sim 2\text{ h}$,凝胶成像仪成像分析。

SRAP扩增反应体系参照Li和Quiros(2001)的方法,总体积为 $20\text{ }\mu\text{L}$,其中含 $2.0\text{ }\mu\text{L}$ $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 、 $2.0\text{ }\mu\text{L}$ $10\times\text{PCR}$ 缓冲液、 $0.4\text{ }\mu\text{L}$ $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs、 $0.25\text{ }\mu\text{L}$ $5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Taq DNA聚合酶、 $10\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 上游和下游引物各 $1.5\text{ }\mu\text{L}$ 、 $3\text{ }\mu\text{L}$ $20\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 模板DNA,其余为灭菌双蒸水。扩增程序为 $95\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min ; $95\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 1 min , $35\text{ }^\circ\text{C}$ 复性 1 min , $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 1.5 min , 5个循环,复性温度升至 $48\text{ }^\circ\text{C}$ 再进行35个循环; $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 7 min 。扩增产物电泳分析操作同RAPD扩增产物电泳分析。

5 DNA指纹图谱的构建与验证

对人工配制的甘蓝品种‘争春’、‘寒光2号’及其各自亲本的DNA进行PCR扩增,筛选出能产生互补型特征谱带的引物,所获得的相应的电泳图即为指纹图谱。以此特异引物对制种基地生产的 F_1 代单株进行PCR扩增,并与田间实际种植的甘蓝假杂种鉴定结果进行一致性的验证。

实验结果

1 RAPD扩增结果

1.1 RAPD引物筛选 先以‘寒光2号’品种为模板DNA,对200个RAPD随机引物进行筛选,选出适用于甘蓝且扩增产物条带丰富的引物50个,再对杂交品种与其亲本DNA按母本、杂交种、父本顺序组成的2组材料分别进行PCR扩增。50个引物中,对2组材料扩增表现有弱带、特异型、偏父型、偏母型、互补型等谱带类型,各类引物数统计见表1。能对‘争春’、‘寒光2号’2组材料扩增出互补型谱带的引物分别为S42、S103、S193和S42、S89、S151。其中,引物S42对2个品种纯度鉴定均有效,其对‘争春’模板组扩增产生的互补特征片段大小约为

550与 $1\text{ }050\text{ bp}$,对‘寒光2号’模板组扩增产生的互补特征片段大小约为 300 、 600 与 875 bp (图1)。

表1 不同带型引物数

带型	引物数	
	‘争春’	‘寒光2号’
弱带	1	0
特异型	6	5
双亲型	29	26
父本型	6	9
母本型	5	7
互补型	3	3

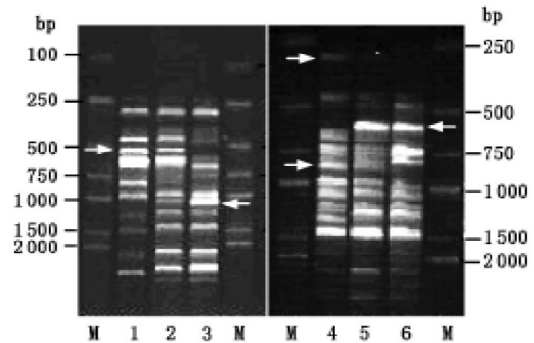


图1 引物S42构建的RAPD指纹图谱

M: DGL 2000 DNA标准; 1: ‘争春’母本; 2: ‘争春’; 3: ‘争春’父本; 4: ‘寒光2号’母本; 5: ‘寒光2号’; 6: ‘寒光2号’父本。箭头标出的为互补型特征片段。

1.2 数字指纹的建立 根据上述RAPD指纹图谱,以1和0分别代表某个等位基因位点扩增出的DNA条带的有和无,按照从上到下即由小片段向大片段的读带方向,将RAPD指纹图谱转换为由1和0组成的字符串,即构成数字指纹。为方便建立相应的数字指纹,可先依照RAPD指纹图谱绘制直观的线段示意图(图2),再根据示意图建立数字指纹(表2)。从表2可知,材料之间的差异可以通过字符串的排列顺序而得到清楚的表达。

2 RAPD引物S42的应用效果验证

为了验证S42特异引物在鉴定‘争春’、‘寒光2号’杂交种纯度上的效果,从制种基地生产的‘争春’和‘寒光2号’杂交种中各随机抽取35个单株,同时进行S42标记的分析和真假杂种的调查。结果利用S42标记分析查出的‘争

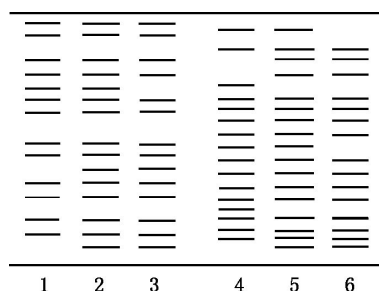


图2 RAPD 指纹图谱线段示意

1: ‘争春’母本; 2: ‘争春’; 3: ‘争春’父本; 4: ‘寒光2号’母本; 5: ‘寒光2号’; 6: ‘寒光2号’父本。

表2 RAPD 指纹图谱的数字指纹

材料	数字指纹
‘争春’母本	1111111110111110
‘争春’	1111111111111111
‘争春’父本	1111011111111111
‘寒光2号’母本	110011111111111110
‘寒光2号’	1111111111111101111
‘寒光2号’父本	01111111110111101111

‘争春’真杂种株为29株, 假杂种株为6株; ‘寒光2号’的真杂种株为27株, 假杂种株为8株。

这些数据与田间鉴定的结果相符, 说明采用S42标记进行‘争春’、‘寒光2号’杂交种纯度的鉴定是可行的。

3 SRAP 扩增

实验中共用SRAP引物11个, 其中, 正向引物5个($M_1 \sim M_5$), 反向引物6个($E_1 \sim E_6$), 正向引物各取一个随机组合得30对引物。用30对引物对‘争春’、‘寒光2号’2组模板材料进行PCR扩增, 结果表明: 引物 M_5 和 E_3 对2组模板扩增结果呈弱带; 引物 M_2 和 E_3 对‘争春’模板组扩增条带呈母本型(图3-a), 特征片段大小约为850 bp(图3中箭头所示, 下同); 引物 M_4 和 E_3 对‘争春’模板组扩增条带呈特异型(图3-b), 特征片段大小约为1500 bp; 引物 M_1 和 E_2 对‘寒光2号’模板组扩增条带呈父本型(图3-c), 特征片段大小约为800 bp; 引物 M_3 和 E_1 对‘寒光2号’模板组扩增条带呈母本型(图3-d), 特征片段大小约为400 bp; 其余引物扩增条带均呈双亲型, 显示品种和亲本之间的带型一致。因此, 未筛选出能对2个品种及其亲本扩增产生互补型特征谱带的引物组合。

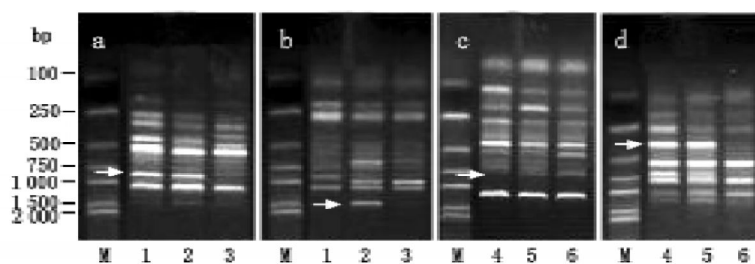


图3 SRAP 引物对‘争春’和‘寒光2号’模板组的扩增

M: DGL 2000 DNA 标准; 1: ‘争春’母本; 2: ‘争春’; 3: ‘争春’父本; 4: ‘寒光2号’母本; 5: ‘寒光2号’; 6: ‘寒光2号’父本。

讨 论

杂种优势的利用在蔬菜育种中具有重要地位, 而杂种优势的充分表现取决于种子的纯度, 因此, 研究简单、快捷的种子纯度鉴定的方法是必要的。采用分子标记技术构建DNA指纹图谱进行品种纯度的鉴定, 已有较多的应用。由于品种的DNA图谱有多种类型, 如双亲型、偏父型、偏母型、互补型、特异型和缺失型等, 其中,

互补型谱带是鉴定纯度最直观和可靠的。因此在构建指纹图谱时, 应寻找能扩增产生互补型特征谱带的引物。但在有些作物中很难寻找“互补型”引物, 针对这一问题, 有人提出用双引物, 即2个引物混合后扩增或2个引物的扩增产物混合后检测。前者的扩增过程远比单个引物复杂, 很难获得预期结果, 至今尚未有用此方法成功的报道; 后者则比较容易获得预期结果, 但结果的可靠性还需探讨。

近年来,多种分子标记技术被用于种子纯度鉴定。其中,RAPD技术需要的DNA量极少、操作简便,有关RAPD技术的稳定性和重复性问题,许多研究证明只要严格控制反应条件,重复结果是可以得到的。此项技术已被成功用于大白菜(宋顺华和郑晓鹰2000)、水稻(陈忠明等2003;黄亚红等2002)、油菜(蔡雪飞等2004)等多种作物的种子纯度鉴定,本文也证明RAPD技术用于甘蓝种子纯度的鉴定是可行的。SRAP系统是在芸薹属作物开发出来的一种新型分子标记技术,已经开发出多个正反向引物,此项技术已被成功用于白菜(Li和Quiros 2001)、小麦(Hu和Vick 2003)等作物,棉花中也有构建SRAP遗传连锁图(Li等2003)成功的报道。SRAP技术采用复性变温法:前5个循环复性温度为35℃,其主要原因是较低的复性温度能确保引物与靶DNA部分配对,随后的30~35个循环中可将复性温度提升至45~50℃,从而可保证前5个循环的扩增产物呈指数式增加。由于SRAP扩增多产生强带,很少出现条带重叠现象,引物又较长,故对目标片段的测序可通过相应引物直接进行,无需克隆,比RAPD和AFLP方便易行。本文中有时出现条带间模糊的现象,可能是DNA模板和引物用量的配比等因素未达最优化造成,是否如此,尚待探究。

参考文献

- 蔡雪飞, 赵云, 李江(2004). 甘蓝型杂交油菜“蜀杂9号”种子纯度的RAPD鉴定. 四川大学学报, 42 (4): 874~876
- 陈忠明, 王秀娥, 赵彦, 杨开晴(2003). 两优培九种子纯度的RAPD快速鉴定. 杂交水稻, 18 (4): 55~56
- 关荣霞, 刘燕, 刘章雄(2003). 利用SSR方法鉴定大豆品种纯度. 分子植物育种, 1 (3): 357~360
- 黄亚红, 方显出, 梁婉琪, 方平夷, 陈建秀, 张大兵(2002). 体细胞培养获得的水稻农艺性状突变种及其DNA RAPD分析. 植物生理学通讯, 38 (1): 30~32
- 刘冲, 薄天岳, 葛才林, 任云英, 陈锦秀(2005). 结球甘蓝RAPD反应条件的优化. 上海农业学报, 21 (3): 114~117
- 柳李旺, 龚义勤, 黄浩(2004a). 新型分子标记——SRAP与TRAP及其应用. 遗传, 26 (5): 777~781
- 柳李旺, 侯喜林, 龚义勤(2004b). 分子标记技术在蔬菜作物品种鉴定与纯度检测中的应用. 分子植物育种, 2 (4): 563~568
- 宋顺华, 郑晓鹰(2000). 利用RAPD标记纯度鉴定大白菜杂交种纯度的研究. 华北农学报, 15 (4): 35~39
- 王关林, 方宏筠(1998). 植物基因工程原理和技术. 北京: 科学出版社, 370~375
- Hashiura T, Sato T (1993). Determination of genetic purity of hybrid seeds in watermelon and tomato using RAPD. Jpn J Breeding, 43: 367~375
- Hu J, Vick BA (2003). Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. Plant Mol Biol Rep, 21: 289~294
- 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*. Thero Appl Genet, 103: 455~461
- Li Z, Zhang X, Nie Y, He D, Wu M (2003). Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP. Chin Sci Bull, 48 (19): 2063~2067

蔡雪飞, 赵云, 李江(2004). 甘蓝型杂交油菜“蜀杂9号”种子