

# 运用 SRAP 分子标记对胡麻杂交种纯度的鉴定研究

李闻娟, 齐燕妮, 王利民, 党 照, 赵 玮, 张建平

(甘肃省农业科学院作物研究所, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 以胡麻杂交种陇杂 1 号、陇杂 2 号及其父母本自交系为试材, 从 9 对引物中筛选出 2 对 M10/E3 和 M2/E5 分别进行 SRAP 分析。结果表明, 在陇杂 1 号母本 1S 和父本 873 中均能扩增出至少 1 条特征带。陇杂 1 号与父母本相比均有差异带, 陇杂 2 号中产生双亲互补带型。这 2 对引物均可应用于陇杂 1 号和陇杂 2 号的纯度鉴定。

**关键词:** 胡麻; 杂交种; SRAP 分子标记; 纯度鉴定

**中图分类号:** S565.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2019)09-0059-04

[doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2019.09.014](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1463.2019.09.014)

胡麻 (*Linum usitatissimum*) 是油用亚麻的俗称, 是中国北方重要的油料作物之一, 属于亚麻科亚麻属<sup>[1-3]</sup>。目前, 亚麻杂交种纯度主要依靠田间种植鉴定法, 但田间形态学观察鉴定生长周期长, 易受环境和人

为因素的影响, 结果往往不准确<sup>[4]</sup>。分子标记技术的发展为杂交种纯度鉴定提供了新的方法。相关序列扩增多态性(SRAP, Sequence-related amplified polymorphism)是一种新型的基于 PCR 的分子标记技术, 由 Li

**收稿日期:** 2019-08-28

**基金项目:** 国家自然科学基金(31460388); 国家特色油料产业技术体系(CARS-14-1-05)。

**作者简介:** 李闻娟(1982—), 女, 山西闻喜人, 助理研究员, 硕士, 主要从事胡麻遗传育种工作。

Email: liwenjuan@gsagr.ac.cn。

- [3] 万素梅. 不同施肥水平苜蓿生产性能研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2004.
- [4] 温 洋. 磷钾营养对紫花苜蓿产量和品质的影响及相关机理研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2005.
- [5] 郭正刚, 王锁民, 张自和. 紫花苜蓿品种间根系发育过程分析[J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(4): 367-371.
- [6] 张金霞, 乔红霞, 刘雨田. 水分和添加剂对紫花苜蓿青贮品质的影响[J]. 草业科学, 2014, 31(4): 766-770.
- [7] 张怀山. 甘肃省苜蓿草产业的品种布局初探 [J]. 内蒙古草业, 2009, 21(4): 5-7.
- [8] 晁德林, 王俊梅. 甘肃苜蓿产业化存在的主要问题和发展趋势[J]. 草业学报, 2011, 28(2): 327-330.
- [9] 岳彦红, 齐 晓, 王彦荣, 等. 35 个 10 龄紫花苜蓿品种的持久性比较 [J]. 草业学报, 2014, 23(1): 58-64.
- [10] 孙万斌, 马晖玲, 侯向阳, 等. 20 个紫花苜蓿品种在甘肃两个地区的生产性能及营养价值综合评价[J]. 草业学报, 2017, 26(3): 161-174.
- [11] 韩 路, 贾志宽, 韩清芳, 等. 苜蓿种质资源特性的灰色关联度分析与评价 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2003, 31(3): 59-64.
- [12] 徐春明. 不同苜蓿品种生长特性分析及评价 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2003.
- [13] 郭海明, 于 磊, 林祥群. 新疆北疆绿洲区 4 个紫花苜蓿品种生产性能比较[J]. 草业学报, 2009, 26(7): 72-76.
- [14] 祁 娟, 闫伟红, 徐长林, 等. 披碱草属野生种质材料在干旱与半干旱区适应性评价 [J]. 中国草地学报, 2013, 35(4): 40-46.
- [15] 康俊梅, 杨青川, 郭文山, 等. 北京地区 10 个紫花苜蓿引进品种的生产性能研究[J]. 中国草地学报, 2010, 32(6): 5-10.

(本文责编: 陈 珩)

等<sup>[5]</sup>提出,采用独特的引物设计对开放阅读框(open reading frames)进行扩增,由于不同物种间和个体间以及内含子、启动子与间隔长度不等而产生多态性。与 AFLP(扩增片段长度多态性)、SSR(简单重复序列标记)、RAPD(随机扩增多态性DNA标记)等分子标记相比,SRAP具有操作简单,成本低等优点,已被广泛的应用于植物遗传图谱构建、遗传多样性分析及品种鉴定等领域<sup>[6]</sup>。目前应用 SRAP 分子标记对胡麻杂交种进行纯度检验的报道较少。我们筛选出 9 对多态性好的 SRAP 引物对胡麻品种陇杂 1 号和陇杂 2 号以及父母本进行扩增,通过 SRAP 分子标记的鉴定,以提高胡麻杂交种纯度检测的准确性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

供试胡麻品种陇杂 1 号、陇杂 2 号及其父母本均由甘肃省农业科学院作物研究所胡麻课题组提供。

### 1.2 引物和试剂

SRAP 引物由北京金唯智生物技术有限公司合成(见表 1),所用  $Mg^{2+}$ 、Taq 酶、dNTPs 和 Buffer 均购自天根生物技术有限公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 DNA 的提取 胡麻基因组 DNA 提取采用改良 CTAB 法<sup>[7]</sup>。单株采摘亚麻幼嫩叶片提取 DNA, 然后进行 DNA 溶液浓度与纯

度检测,稀释为 30 ng/ $\mu$ L,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下保存。

1.3.2 SRAP-PCR 扩增的反应条件 PCR 扩增反应的总体积为 25  $\mu$ L: 体系包含 10  $\times$  PCR Buffer 2  $\mu$ L、25 mmol/L  $Mg^{2+}$  2  $\mu$ L、2.5 mmol/L dNTPs 3  $\mu$ L、2.5 U Taq 酶 0.5  $\mu$ L、30 ng/ $\mu$ L 模板 DNA 2  $\mu$ L 以及 25 ng/ $\mu$ L 引物各 1  $\mu$ L, 其余用 ddH<sub>2</sub>O 补足。

相应 PCR 扩增程序: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 S, 34.5  $^{\circ}\text{C}$  退火 20 S, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 60 S, 共 5 个循环; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 S, 50  $^{\circ}\text{C}$  退火 20 S, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 60 S, 共 38 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

1.3.3 扩增产物电泳 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。每孔上样量定为 6.0  $\mu$ L, 电压 100 V (4 V/cm) 电泳 60 min, 电极缓冲液为 1  $\times$  TBE。0.05% EB 染色, 紫外凝胶成像系统下观察、照相和分析。用 100 bp DNA Marker 作为分子量的标准。

## 2 结果与分析

### 2.1 SRAP 多态性分子标记分析

通过图 1 可以看出,筛选出的 9 对引物分别在 2 个胡麻杂交种和父母本之间存在扩增条带的多态性。M10/E7 扩增的条带数为 11 条,多态性比率为 18%; M10/E3 扩增条带数为 13 条,多态性比率为 31%; M1/E9 扩增的条带数为 11 条,多态性比率为 18%; M4/E3 扩增的条带数为 13 条,多态性比率为 46%; M3/E2 扩增的条带数为 9 条,多态

表 1 已筛选 9 对 SRAP 引物序列信息

引物编号	正向引物(5'-3')	引物编号	反向引物(5'-3')
Me10	TGA GTC CAA ACC GGA AA	Em7	GAC TGC GTA CGA ATT CAA
Me1	TGA GTC CAA ACC GGA TA	Em9	GAC TGC GTA CGA ATT CAG
Me10	TGA GTC CAA ACC GGA AA	Em3	GAC TGC GTA CGA ATT GAC
Me4	TGA GTC CAA ACC GGA CC	Em3	GAC TGC GTA CGA ATT GAC
Me3	TGA GTC CAA ACC GGA AT	Em2	GAC TGC GTA CGA ATT TGC
Me3	TGA GTC CAA ACC GGA AT	Em16	GAC TGC GTA CGA ATT CGG
Me2	TGA GTC CAA ACC GGA GC	Em5	GAC TGC GTA CGA ATT AAC
Me6	TGA GTC CAA ACC GGA CA	Em6	GAC TGC GTA CGA ATT GCA
Me3	TGA GTC CAA ACC GGA AT	Em10	GAC TGC GTA CGA ATT CAT

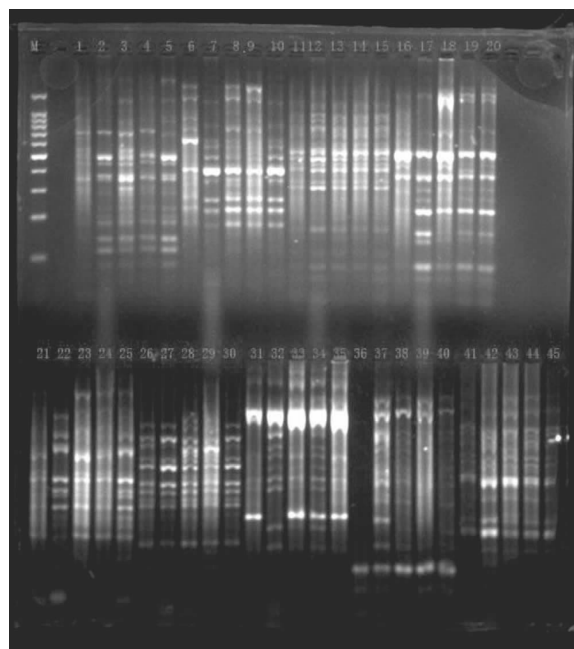


图 1 9 对引物对陇杂 1 号、陇杂 2 号及其父母本自交系的 SRAP 检测结果

性比率为 33%；M3/E16 扩增的条带数为 11 条，多态性比率为 18%；M2/E5 扩增的条带数为 9 条，多态性比率为 67%；M6/E6 扩增的条带数为 9 条，多态性比率为 33%；M3/E10 扩增的条带数为 10 条，多态性比率为 40%；平均每个引物组合扩增的清晰条带数为 11 条，多态性比率为 34%。从这 9 对 SRAP 引物中筛选出 2 对引物 M10/E3 和 M2/E5，在父母本扩增中出现差异条带，在杂交种与其父母本扩增中均有差异条带，且条带清晰明亮，重复性高。可用于 2 个胡麻杂交种和其父母本之间扩增。

## 2.2 引物筛选结果

用引物 M10/E3 对陇杂 1 号、陇杂 2 号及其父母本自交系的 SRAP 检测结果(图 2)表明，在母本 1S 中扩增出 1 条特征带，此特征带能将母本与父本和杂交种区分开。父本 873 中扩增出 2 条特征带，此特征带能与

杂交种区分开。杂交种陇杂 1 号与父母本相比都有差异带。用引物 M2/E5 对陇杂 1 号、陇杂 2 号及其父母本自交系的 SRAP 检测结果(图 3)表明，在母本 1S 中扩增出 1 条特征带，在父本陇 10 中扩增出 1 条特征带，在杂交种陇杂 2 号中产生双亲互补带型。因此，这 2 对引物可应用于陇杂 1 号和陇杂 2 号的杂交种纯度鉴定。

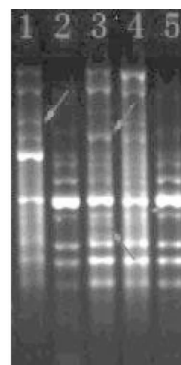


图 2 引物 M10/E3 对陇杂 1 号及其父母本自交系的 SRAP 检测结果

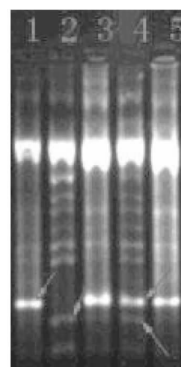


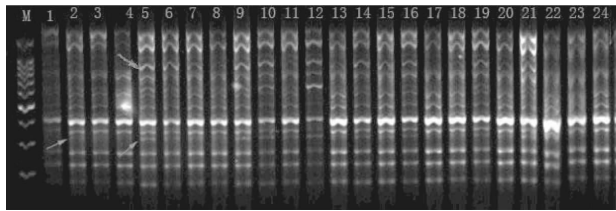
图 3 引物 M2/E5 对陇杂 2 号及其父母本自交系的 SRAP 检测结果

## 2.3 纯度鉴定

通过用引物 M10/E3 对陇杂 1 号 20 粒种子的 SRAP 电泳检测结果(图 4)可以看出，陇杂 1 号与父母本均有特征带。陇杂 1 号 F<sub>1</sub> 代杂交种种子为 20 粒，其中样品 17、22、23、24 均未检测出特征带，因此，杂交种纯度为 80%。用引物 M2/E5 对陇杂 2 号 20

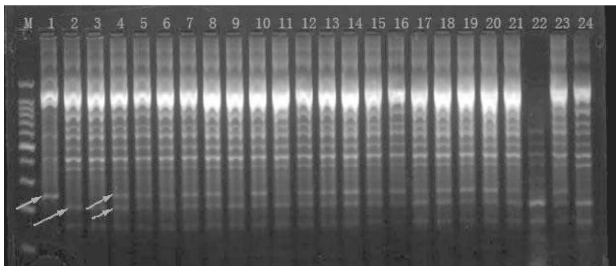


粒种子的 SRAP 电泳检测结果(图5)可以看出,陇杂 2 号产生双亲互补带型, F<sub>1</sub> 代杂交种种子总数为 20 粒,其中有双亲互补带型的有 18 个,与父本带型相同的是 9、11、24,杂交种纯度为 85.7%。SRAP 鉴定结果与田间种植鉴定结果基本一致,说明运用 SRAP 分子标记检测胡麻杂交种纯度鉴定可行。



M: Marker; 1-2: 母本 1S; 3-4: 父本 873; 5-24: 陇杂 1 号 F<sub>1</sub>

图 4 引物 M10/E3 对陇杂 1 号及其父母本自交系的 SRAP 检测结果



M: Marker; 1: 母本 1S; 2-3: 父本 95005; 4-24: 陇杂 2 号 F<sub>1</sub>

图 5 引物 M2/E5 对陇杂 2 号及其父母本自交系的 SRAP 检测结果

### 3 小结与讨论

从 9 对引物中筛选出 2 对 M10/E3 和 M2/E5,分别对胡麻品种陇杂 1 号、陇杂 2 号及其父母本自交系进行 SRAP 分析。结果显示,在母本 1S 和父本 873 中均能扩增出至少 1 条特征带。杂交种陇杂 1 号与父母本相比均有差异带,杂交种陇杂 2 号产生双亲互补带型。这 2 对引物均可应用于陇杂 1 号和陇杂 2 号的杂交种纯度鉴定。

分子标记技术已经越来越广泛地被应用到种子纯度鉴定中<sup>[8]</sup>,SRAP 通过聚合酶链式反应,对基因的启动子、外显子和内含子

进行扩增,与 SSR、RFLP、RAPD、AFLP 等分子标记技术相比有很大优势<sup>[9]</sup>,但是在采集材料和提取 DNA 的时要注意避免交叉污染,才能保证检测结果的准确性。

### 参考文献:

- [1] 杜彦斌,王立军,张金,等.胡麻新品种天亚 11 号选育报告[J].甘肃农业科技,2018(2):24-26.
- [2] 李闻娟.胡麻  $\Delta 9$  硬脂酰 ACP 脱氢酶(SAD2) 基因的表达分析[J].甘肃农业科技,2018(10):13-16.
- [3] 杨丽,祁双桔,王宗胜,等.11 个胡麻品种在平凉旱地引种初报[J].甘肃农业科技,2016(11):56-58.
- [4] 赵欣欣,赵晓东,王奇,等.利用 SRAP 标记快速检测西瓜杂交种子纯度[J].新疆农业科学 2017,54(9):1621-1626.
- [5] LI G, QUIROS C F. Sequence-related amplified polymorphism(SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. Theor. Appl. Genet., 2001, 103(3): 455-461.
- [6] 石紫薇,梁妍,姜婷婷,等.正交设计优化青蒿 SRAP-PCR 反应体系及引物筛选[J/OL].分子植物育种,2019(6):1-16[2019-08-26].http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20190621.1045.002.html.
- [7] KIDWELL K K, OSBORN T C. Simple plant DNA isolation procedures [M]// Beckman J S, Osborn T C (Eds.). Plant genomes: Methods for genetic and physical mapping. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1992: 1-13.
- [8] 杨晓琴,祝水金.种子质量控制现状与对策[J].种子,2005,24(8):99-100.
- [9] 田筑萍,唐容,吴有祥,等.利用 SSR 指纹图谱技术对杂交油菜种质鉴定的研究[J].种子,2008,27(6):69-71.

(本文责编:陈伟)