

# 野生和栽培桔梗种质遗传多样性的 SRAP 研究

吴松权, 于亚彬, 严 一字, 金东淳, 吴基日

(延边大学 农学院, 吉林 龙井 133400)

**摘 要:**采用 SRAP 分子标记技术, 对 8 份野生和 8 份栽培桔梗种质资源进行遗传多样性研究, 旨在为桔梗的遗传育种提供理论依据。结果表明: 12 对随机引物组合共扩增出 109 条谱带, 平均每对引物组合扩增出 9.1 条谱带, 其中扩增出 80 条多态性谱带, 平均每对引物组合扩增出 6.7 条多态性谱带, 多态率为 73.4%, 显示出了较高的多态性。试验中 SRAP 数据的遗传相似系数范围为 0.56~0.88, 并以遗传相似系数 0.56 为标准, 将 16 份桔梗种质资源分为野生桔梗和栽培桔梗二大类群。

**关键词:**桔梗; 遗传多样性; SRAP 标记

**中图分类号:** S 567.23<sup>+</sup>9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2010)12—0132—04

桔梗在植物分类学上属于桔梗科桔梗属, 别名绿花根、铃铛花、包袱花、道拉基(朝鲜语)等。李时珍在《本草纲目》一书中说“此草之根结实而梗直, 故名桔梗”。桔梗既是一种资源植物又是一种药、食、观赏兼用的经济植物<sup>[1]</sup>。《中华人民共和国药典》2000 年版(一部)规定, 正品桔梗为桔梗科的桔梗(*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC)<sup>[2]</sup>。桔梗根为常用中草药, 它含有桔梗皂甙, 水解产生的桔梗甙元为三萜酸的混合物, 还含有桔梗酸 A、B、C 和菊糖、桔梗糖等。药用桔梗性中、味苦, 有宣肺、散寒、祛痰、利咽、排脓等功效<sup>[3]</sup>。

SRAP(Sequence-related amplified polymorphism)是 2001 年由 Li 和 Quiros 开发的一种新型分子标记方法<sup>[4]</sup>, 其引物是基于外显子富含 GC, 而启动子、内含子富含 AT 的特点而设计的, SRAP 具有操作简便迅速、成本低、可靠性好、重复性高、高稳定性等特点, 适合进行基因定位、克隆、遗传图谱构建及遗传多样性分析等研究。目前, 对于 SRAP 技术在植物中的应用报道较少<sup>[5-7]</sup>。该试验利用 SRAP 标记技术对 8 份野生和 8 份栽培桔梗种质资源进行遗传多样性研究, 旨在为野生桔梗的保护和利用以及桔梗的遗传育种提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 材料 8 份野生桔梗和 8 份栽培桔梗种质资源

第一作者简介: 吴松权(1972-), 男, 黑龙江鸡西人, 博士, 副教授, 现主要从事中草药的遗传育种研究工作。  
通讯作者: 严一字(1964-), 女, 博士, 副教授, 现主要从事中草药的遗传育种研究工作。E-mail: yiziyan@yahoo.com.cn。  
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30660016)。  
收稿日期: 2010-02-10

(表 1), 材料种植在延边大学农学院桔梗试验田, 苗期从每个种质资源中随机取 10 株, 并取下幼嫩叶片混合后, 迅速装入塑料封口袋中密封, 保存于-70℃低温冰箱中, 用于提取 DNA。

表 1 供试桔梗种质资源名称及来源		
序号	材料名	材料来源
Ys-1	凤林野生	吉林延吉市凤林村地头边
Ys-2	春阳野生 1	吉林汪清县春阳镇周边山岗
Ys-3	春阳野生 2	吉林汪清县春阳镇水库周边
Ys-4	春化野生	吉林浑春市春化镇周边山岗
Ys-5	石国野生	吉林和龙东城镇石国村周边
Ys-6	南湖野生	吉林龙井三合镇南湖村周边
Ys-7	宁安野生	黑龙江宁安镜泊乡周边山岗
Ys-8	桃沟野生	陕西省商洛学院赠送
Zp-1	三成紫花	吉林龙井三成村桔梗地采种
Zp-2	龙井当地	吉林龙井智新乡种子商店购入
Zp-3	韩国咸阳	韩国留学生带回
Zp-4	亳州无叉	安徽亳州绿洲公司购买
Zp-5	吉林特产	原吉林特产专科学校赠送
Zp-6	宁安桔梗	吉林汪清药材种子商店购入
Zp-7	商州桔梗	陕西省商洛学院赠送
Zp-8	安图桔梗	吉林安图万宝乡桔梗地采种

注: Ys 为野生桔梗, Zp 为栽培桔梗, 下同。

1.1.2 试剂 琼脂糖、CTAB、EDTA、dNTP、MgCl<sub>2</sub>、Taq DNA 聚合酶、Tris、10× Buffer 配套缓冲液、引物、β-巯基乙醇等。以上药品均由上海华美生物工程公司购入。

1.1.3 仪器 凝胶成像系统、紫外分光光度计(U-3010)、三恒多用电泳仪(北京六一仪器)、台式离心机(HERMLE2383K)、PCR 仪(PCR System9700)、超低温冰箱等。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 模板的制备与定量 基因组总 DNA 的提

取,采用改进的CTAB 法<sup>[8]</sup>。

1.2.2 PCR 反应体系 20  $\mu$ L 反应体系中,模板 DNA 20 ng,引物 0.8  $\mu$ mol/L, dNTP 150  $\mu$ mol/L, MgCl<sub>2</sub> 2.0 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 1 unit, 10 $\times$  Buffer 2.0  $\mu$ L。

1.2.3 PCR 扩增条件 采用复性变温法。反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 35 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 50 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1.2.4 PCR 产物的检测 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶 (含 0.5  $\mu$ g/mL 的溴化乙锭), 在 100 V 恒电压条件下电泳, 紫外凝胶成像系统观察结果并照相。

1.2.5 引物的筛选 把 16 份桔梗的 DNA 混合做 1 个基因池, 从 300 对随机引物组合中筛选出 12 对多态性谱带较多的引物组合 (图 1) 进行 SRAP 分析, 所筛选的引物组合及每一引物的碱基序列见表 2。

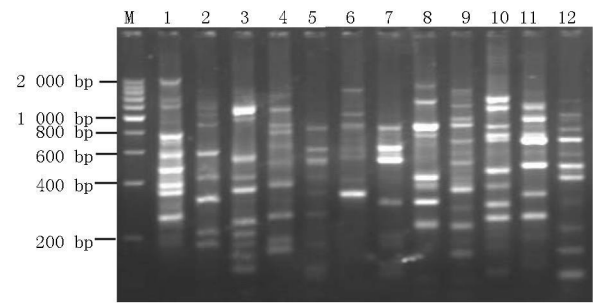


图 1 被筛选的引物组合所扩增的谱带

注:图 1 中 M 为标准分子量标记 阿拉伯数字为 12 对引物组合的序号。

表 2 被筛选的引物组合及每一引物的碱基序列		
序号	上游引物 (5'→3')	下游引物 (3'→5')
1	me2 TGA GTC CAA ACC GGA GC	en6 GAC TGC GTA CGA ATT GCA
2	me2 TGA GTC CAA ACC GGA GC	em10 TGT GGT CCG CAA ATT TAG
3	me4 TGA GTC CAA ACC GGA CA	en4 GAC TGC GTA CGA ATT TGA
4	me4 TGA GTC CAA ACC GGA CA	em10 TGT GGT CCG CAA ATT TAG
5	me4 TGA GTC CAA ACC GGA CA	em19 GAC TGC GTA CGA ATT ATT
6	me4 TGA GTC CAA ACC GGA CA	em20 GAC TGC GTA CGA ATT GAC
7	me5 TGA GTC CAA ACC GGG AT	en6 GAC TGC GTA CGA ATT GCA
8	me5 TGA GTC CAA ACC GGG AT	em8 GAC TGC GTA CGA ATT CTG
9	me7 TGA GTC CAA ACC GGT AA	em24 GAC TGC GTA CGA ATT AAC
10	me9 TTC AGG GTG GCC GGA TG	en7 GAC TGC GTA CGA ATT ATG
11	me10 TGG GGA CAA CCC GGC TT	en7 GAC TGC GTA CGA ATT ATG
12	me10 TGG GGA CAA CCC GGC TT	em8 GAC TGC GTA CGA ATT CTG

1.2.6 数据的处理和分析 将电泳图谱上清晰且可重复出现的条带记为“1”, 同一位置没有条带的记为“0”, 由此生成“0”和“1”原始矩阵。统计每个引物扩增的总带数和多态性带数。数据采用非加权算术平均对数法 (UP-MGA 法) 进行聚类分析, 建立样品间的亲缘关系树状图。

2 结果与分析

2.1 SRAP 扩增的结果

被筛选出的 12 对引物组合扩增出的总谱带数、多态性谱带数及多态性比率见表 3。12 对引物组合共扩增出 109 条谱带, 其中 80 条为多态性谱带, 多态性谱带百分率为 73.4%, 平均每对引物组合扩增出 9.1 条谱带, 其中多态性谱带为 6.7 条。不同引物组合扩增出的总谱带数和多态性谱带数的差异较大, 谱带数最多的引物组合是 me4/em10, 共扩增出了 15 条谱带; 谱带数最少的引物组合是 me2/em10 和 me4/em4, 仅有 7 条谱带。多态性谱带数最多的引物组合是 me4/em10 和 me5/em6, 多态性谱带率达到 84.6%; 多态性谱带数最少的引物组合是 me4/em4, 多态性谱带率仅为 57.1%。图 2 即为 me5/em8 引物组合对 16 份桔梗种质资源的 SRAP 扩增结果。

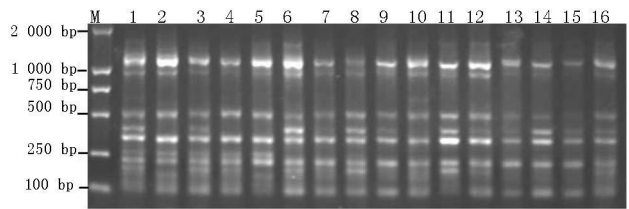


图 2 me5/em8 引物组合的扩增结果

注:图 2 M 为标准分子量标记; 1~8 号为野生桔梗; 9~16 号为栽培桔梗。

表 3 桔梗 SRAP 标记的多态性				
序号	引物对	扩增总谱带数/条	多态性谱带数/条	多态性比率/%
1	me2/en6	10	5	50.0
2	me2/em10	7	6	85.7
3	me4/en4	7	4	57.1
4	me4/em10	15	11	73.3
5	me4/em19	9	5	55.6
6	me4/em20	9	5	55.6
7	me5/en6	13	11	84.6
8	me5/en8	13	8	61.5
9	me7/em24	9	4	44.4
10	me9/en7	9	6	66.7
11	me10/en7	11	7	63.6
12	me10/em8	10	8	80.0
总和		109	80	73.4

2.2 聚类分析

12 对引物组合对 16 份桔梗种质资源进行 SRAP 分析, 共获得 408 个标记位点, 图 3 为用 UPMGA 法建立 16 份桔梗种质资源的亲缘关系的树状图。16 份种质资源以遗传相似系数 0.56 为标准聚类的二大类群, 第 I 类群为野生桔梗, 第 II 类群为栽培桔梗。总体来看, 野生桔梗内多数种质资源间的遗传相似系数大于栽培桔梗内各种质资源间的遗传相似系数, 也就是说, 野生桔梗内多数种质资源间的亲缘关系比栽培桔梗内各种质资

源间的亲缘关系近。

第Ⅰ类群中的 8 份野生桔梗以遗传相似系数大约 0.75 为标准可聚类为 3 个亚类, H1 只包括 1 份种质资源, 即凤林野生桔梗, 与其它野生桔梗间的遗传相似系数最小; H2 包括 3 份种质资源, 即春阳野生桔梗 1、春阳野生桔梗 2 和春化野生桔梗; H3 包括 4 份种质资源, 即石国野生桔梗、宁安野生桔梗、南湖野生桔梗、桃沟野生桔梗。

第Ⅱ类群中的 8 份栽培种质资源以遗传距离大约 0.69 为标准可聚类为 4 个亚类, H1 包括 2 份种质资源, 即三成紫花和龙井当地; H2 包括 3 份种质资源, 即亳州无叉、吉林特产和安图桔梗; H3 只包括 2 份种质资源, 即韩国咸阳和宁安桔梗; H4 只包括 1 份种质资源, 即商州桔梗, 与其它栽培桔梗间的遗传相似系数最小。

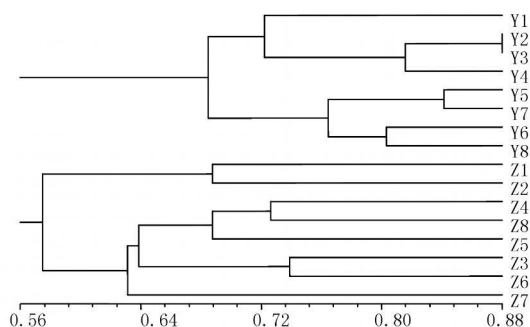


图 3 16 份桔梗种质资源的 UPGMA 聚类分析树状图  
注 Y1~Y8 为野生桔梗 Z1~Z8 为栽培桔梗

### 3 讨论与小结

#### 3.1 SRAP 标记

该试验得到的 SRAP 标记结果表明, 12 对引物组合可在 8 份野生桔梗和 8 份栽培桔梗基因组 DNA 的 109 位点扩增出谱带, 多态性谱带比率为 73.4%, 从分子水平证明了桔梗种质资源之间遗传多样性较为丰富。试验中, 桔梗种质资源的 SRAP 标记表现出较高的多态性 (73.4%), 严一字等<sup>[9-10]</sup>用 RAPD 技术量化栽培桔梗遗传变异程度的多态性 (多态率分别为 49.05% 和 46.6%)。由此可见, SRAP 技术比 RAPD 技术更能有效地反映桔梗种质资源间的遗传多样性。

#### 3.2 聚类分析

该试验供试的 16 份桔梗种质资源以遗传相似系数 0.56 为标准聚类为野生桔梗和栽培桔梗二大类群, 且多数野生桔梗之间的遗传相似系数大于栽培桔梗之间的遗传相似系数, 说明多数野生桔梗资源间亲缘关系比栽培桔梗近。这可能与供试材料的来源有关, 试验中供试的野生桔梗除桃沟野生 (来自黄土高原) 外都来源于长白山区, 而栽培桔梗来源于吉林、陕西、安徽、黑龙江以及韩国, 来源比较广, 所以变异更广。

试验中野生桔梗间的聚类有的与采样地间的距离有关, 有的与采样地的生态类型有关, 有的与二者无关。比如 H2 的 3 份种质资源采样地间距离比较近, 其中春阳野生桔梗 1 和春阳野生桔梗 2 几乎在同 1 个地方采样, 只不过春阳野生桔梗 1 在山岗的石头缝中采样, 春阳野生桔梗 2 在山脚下的小水库边采样, 在聚类图上表现完全相同; H3 的石国野生桔梗和宁安野生桔梗, 1 个采样在吉林省的和龙市, 1 个采样在黑龙江省的宁安县, 这 2 个地方虽然距离很远, 但采样地的生态类型基本相同; H4 的南湖野生桔梗和桃沟野生桔梗, 1 个在吉林省龙井市的图们江边采样, 1 个在陕西省的黄土高原采样, 这 2 个地方的距离遥远且生态类型也完全不同, 产生这种现象的原因可能是野生桔梗在进化过程中发生相同的基因突变, 且该突变能较好地适应当地的环境, 这个变异基因各自得到保存。在野生桔梗中与其它种源遗传相似系数最小的是在延吉市郊区撂荒地中采样的凤林野生, 这是否与人们的负向选择有关。因为离城市近, 人们经常采花或挖根, 采花或挖根的时候都挑选大的, 而小的幸存并繁殖后代。

栽培桔梗间的聚类有的与种植地域有关, 有的与种植的地域无关, 比如 H1 的三成紫花和龙井都是当地龙井市内种植的种源, 很可能与最初种子来源相同; H4 的商州桔梗是种植在黄土高原的种源, 与其它栽培种源间的相似系数最小; H3 的韩国咸阳和宁安桔梗、H2 的亳州无叉、吉林特产和安图桔梗的聚类与种植的地域无关, 产生这种现象的原因有待深入探讨, 也可能与栽培桔梗种子的流通活跃有关。

#### 参考文献

- [1] 刘德军, 冯维希. 桔梗 [M]. 中国中医药出版社, 2001: 1-10.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2000: 249-250.
- [3] 中国药材公司编著. 中国常用中药材 [M]. 北京: 科学出版社, 1995: 421.
- [4] 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: 455-461.
- [5] 赵光伟, 徐志红, 徐永阳. SRAP 分子标记及其在蔬菜作物上的应用 [J]. 国农学报, 2008, 24(8): 69-73.
- [6] 乔燕春, 林顺权, 刘成明, 等. SRAP 分析体系的优化及在枇杷种质资源研究上的应用 [J]. 果树学报, 2008, 25(3): 348-352.
- [7] 林忠旭, 张献龙, 聂以春. 新型标记 SRAP 棉花 F2 分离群体及遗传多样性评价中的适用性分析 [J]. 遗传学报, 2004, 31(6): 622-626.
- [8] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 16-17.
- [9] 严一字, 吴基日, 孙丽娜. 桔梗种质资源的 RAPD 分析 [J]. 安徽农业科学, 2006, 16: 3908-3910.
- [10] 严一字, 吴基日. 利用 RAPD 标记分析东亚地区桔梗的亲缘关系 [J]. 植物研究, 2007, 27(3): 308-312.

# 携带黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因的双元载体构建

律凤霞

(牡丹江师范学院 生命科学与技术学院, 黑龙江 牡丹江 157012)

**摘要:**以黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因为目的基因,以大肠杆菌 DH5 $\alpha$  为表达载体体外操作寄主菌,农杆菌 LBA 4404 为最终双元载体寄主菌。将 RT-PCR 获得的目 的基因片段连接到 pMD18-T simple Vectoer 上,冻融法转化到大肠杆菌扩繁后,经限制性核酸内切酶酶切插入表达载体适宜酶切位点上,重组质粒 DNA 经冻融法转化到只含辅助质粒的根癌农杆菌中得到工程菌,完成含目的基因的双元载体构建,为培育抗 CMV 病毒的番茄品种打下基础。

**关键词:** 黄瓜花叶病毒; 外壳蛋白基因; 双元载体; 载体构建

中图分类号: S 436.421.1<sup>+</sup>9 文献标识码: A 文章编号: 1001—0009(2010)12—0135—03

番茄病毒病是番茄的主要病害之一,发生普遍,危害严重。其中黄瓜花叶病毒(CMV)为番茄病毒病的第一大病原病毒。近年来,番茄栽培面积和产量都在不断的增加,番茄罹患病毒病常使生产遭受重大损失,我国南北各番茄产区均有发病,其发病率轻者为 30%左右,重病区高达 70%,严重时可使整个地区失收,成为威胁番茄生产的主要病害。实践证明:防治病毒病最有效的方法是通过培育抗病品种,抗病毒病育种成为消除番茄病毒病威胁的主要策略。我国的番茄抗病育种虽然起

步较晚,但也取得了显著成绩,无论理论上还是实践上都有明显进步。先后育成了一系列优良的抗病品种,而传统的育种艰苦费时,同时抗性基因常与不良农艺性状和低品质基因紧密连锁或产生基因多效性,从而大大限制了育种工作的进展。与之相比,基因工程育种具有明显的优越性,为培育抗病毒病的新品种开辟了途径。

该试验以黄瓜花叶病毒外壳蛋白(CMV-cp)基因为目的基因,以大肠杆菌 DH5 $\alpha$  为中间载体体外操作寄主菌,以农杆菌 LBA4404 为最终双元载体寄主菌。经反转录 PCR 获得目的基因,通过数次限制性内切酶酶切 DNA 连接酶连接完成目的基因向表达载体的定点插入,重组质粒经冻融法转化到只含辅助质粒的根癌农杆菌中得到工程菌,完成双元载体构建,为培育抗病毒番茄品种打下基础。

**作者简介:** 律凤霞(1967-),女,硕士,副教授,研究方向为分子生物学抗病育种。  
**基金项目:** 牡丹江市科技局科技资助项目(G2009n2015)。  
**收稿日期:** 2010-02-10

## SRAP Examination of Genetic Dicersity of the Wild *Playtcodon grandiflourus* and the Cultivation *Playtcodon grandiflourus*

WU Song-quan, YU Ya-bin, YAN Yi-zi, JIN Dong-chun, WU Ji-ri  
(Agricultural College of Yanbian University, Longjing, Jilin 133400)

**Abstract:** Sequence related amplified polymorphis(SRAP)molecular markers were used to detect the genetic diversity of 8 samples of the wild *Playtcodon grandiflourus* and 8 samples of the cultivation *Playtcodon grandiflourus*. The purpose of provide the basis for breedong of *Playtcodon grandiflourus*. The results showed that Twelve primer pairs produced 109 bands, veraged 9.1 bands per primenr pair, and produced 80 polymorphic bands, veraged 6.7 polymorphic bands per primenr pair, showed a higher rate of polymorphic(73.4%). The SRAP data obtained genetic similarity coefficient range 0.56~0.88, the results showed that the 16 samples of *Platycondon grandiflorum* DC. were clustered into the wild *Playtcodon grandiflourus* and the cultivation *Playtcodon grandiflourus*. two groups at genetic distance 0.56.

**Key words:** *Playtcodon grandiflourus*; genetic diversity; sequence related amplified polymorphis(SRAP)mark