

鸡冠花诱变选育系和栽培选育系的 SRAP 分子鉴定

刘小飞, 廖飞雄, 刘晓荣, 刘金梅, 于波

(广东省农业科学院 花卉研究所, 广东省园林花卉种质创新综合利用重点实验室, 广东 广州 510640)

摘 要:以冠状鸡冠花“早水鸡冠”及其诱变选育系、羽状鸡冠印度系列中的 2 个品种为试材, 应用 SRAP 分子标记技术分析其遗传多样性。结果表明:从 64 对引物组合中筛选出双引物组合 me6/g38, 具有遗传多态性, 可在分子水平上区分这 6 种供试材料。NTSYS-pc 聚类分析 (UPGMA) 构建了 SRAP 分子图谱, “早水鸡冠”及源自其的卫星搭载处理后经多代选择的 3 个诱变选育系可聚为一类, 2 个印度系品种聚为一类, 表明 SRAP 可用于鸡冠花品种资源鉴定与遗传多样性分析。

关键词:鸡冠花; SRAP; 指纹图谱

中图分类号:S 681.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)07-0128-03

鸡冠花(*Celosia cristata* L.) 属苋科青葙属(*Celosia*) 1 a 生草本植物, 具有较高的观赏价值, 是重要的露地花坛花卉及品质优良的切花、干花材料^[1], 也具有很高的药用和食用价值^[2-4]。鸡冠花的观赏应用在中国已有悠久的历史, 特别是近几年已成为南亚热带地区最重要的景观草花。但在中国基本上没有开展观冠花的品种培育, 栽培和应用的品种十分单调, 退化极为严重^[5], 目前栽培和观赏应用的品种主要是引入品种。近几年已有相关杂交和诱变选育的报道^[6-9]。利用分子标记技术进行遗传分析、品种鉴定等, 可以提高育种效率, 缩短育种周期, 跟踪与性状变异相关的基因, 已广泛应用于现代育种技术之中。SRAP 即相关序列扩增多态性 (Sequence-related amplified polymorphism), 是一种新型的遗传标记系统, 具有多态性高、重复性好、在基因组中分布均匀、引物通用性强等优点^[10]。目前开始运用于作物的遗传多样性和品种鉴定研究、遗传连锁图谱构建以及性状标记等方面^[11-14]。鸡冠花分子标记指纹图谱构建的报道较少, 近年也有应用 SRAP 进行遗传多样性和种群分析的相关报道^[15]。

该试验以传统鸡冠花品种及其空间诱变选择系、栽培应用广泛引入凤尾鸡冠印度品种为材料, 拟筛选出具

多态性的引物组合, 构建 SRAP 分子标记指纹图谱, 探讨应用这一分子标记进行鸡冠花遗传分析和种质鉴定的可能, 为鸡冠花遗传育种提供依据和新的技术途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料及来源见表 1。其中, “早水鸡冠”(*Celosia cristata* ‘Zaoshuijiguan’, 以下简称为“WT”) 为广东当地栽培的传统品种, “151-1”、“359-5-2”、“359-30”系“早水鸡冠”经返回式卫星搭载处理后经多代选择的稳定变异系^[9, 16]。“印度红”和“印度黄”为现广泛栽培的由美国公司选育的凤尾鸡冠的 2 个品种, 由广州市三力园艺有限公司提供。种子播种于泥炭基质中, 20~30 d 左右上盆栽培, 取幼嫩叶片提取 DNA 进行分子标记分析。

表 1 供试材料

编号	材料	来源地
1	“印度红” <i>Celosia plumose</i> ‘Indian Red’	美国选育
2	“印度黄” <i>Celosia plumose</i> ‘Indian Yellow’	美国选育
3	“359-5-2” Mutant line	卫星搭载核系
4	“早水鸡冠” <i>Celosia cristata</i> ‘Zaoshuijiguan’	地产传统品种
5	“151-1” Mutant line	卫星搭载核系
6	“359-30” Mutant line	卫星搭载核系

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取 采用 Liu 等^[17] 改良的 CTAB-氯仿-异戊醇法, 单株取嫩叶提取基因组 DNA。各取 DNA 样品原液 2 μ L 并稀释至 100 μ L, 用 ddH₂O 作为空白对照, 校正零点, 于核酸蛋白分析仪上测定 OD₂₆₀、OD₂₈₀、OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的值。OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.8 左右, 表明提取的 DNA 纯度较好, 可用于后续的分析, 若大于 1.9 说明含有 RNA, 小于 1.6 则表示有蛋白质和酚等杂质的存在。DNA 的琼脂糖检测的方法如下: 用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测提取的 DNA 样品质量, 取上述 DNA 原液

第一作者简介:刘小飞(1984-), 男, 硕士, 研究实习员, 现主要从事花卉分子标记辅助育种等研究工作。E-mail: lxf6996@yahoo.com.cn.

责任作者:廖飞雄(1963-), 男, 博士, 研究员, 硕士生导师, 现主要从事观赏园艺植物生物技术和育种及产业化技术研究等工作。E-mail: fxliao@msn.com.

基金项目:广州市科技支撑计划资助项目(10A81081197)。

收稿日期:2012-12-17

2 μL , Loading Buffer 1 μL , 上样量 3 μL 。

1.2.2 引物的设计 试验所设计和选择的引物序列见表 2。正向引物与反向引物随机组合形成共 64 对引物对。

表 2 引物的序列

正向引物	序列(5'-3')	反向引物	序列(5'-3')
me1	TGAGTCCAAACCGGATA	em1	GACTGCGTACGAATTAAT
me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	em2	GACTGCGTACGAATTAGC
me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	em3	GACTGCGTACGAATTGAC
me4	TGAGTCCAAACCGGACC	em4	GACTGCGTACGAATTTAC
me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	em5	GACTGCGTACGAATTAAAC
me6	TGAGTCCAAACCGGTAA	em6	GACTGCGTACGAATTGCA
me7	TGAGTCCAAACCGGTCC	g2	TTGAACTGGCAGAAAGGGT
me8	TGAGTCCAAACCGGTGC	g38	CCTCTTCTTTAGCCGTTGA

1.2.3 DNA 扩增和检测 在 25 μL SRAP-PCR 体系中含 2.5 mM 的 dNTPs 2.5 μL , 2.5 U *Taq* DNA 聚合酶, 上下游引物(浓度为 10 mM)各 0.75 μL , 模板 DNA 10 ng, 用 ddH₂O 调整体系使终体积为 25 μL 。反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 6 个循环, 随后的 32 个循环复性温度提高到 46 $^{\circ}\text{C}$, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 10 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 指纹图谱构建方法 凝胶经凝胶成像系统拍摄保存后, 根据电泳条带结果进行赋值, 电泳图谱的每 1 条带记为 1 个位点。同一点位有带记为“1”, 无带记为“0”, 建立数据库。在将所有供试材料完全区分的条件下, 在 64 对引物中选用尽可能少的引物对组合及多态性片段用于指纹图谱构建。在所引物对下供试材料在这些多态性片段位点产生的“1”或“0”的顺序组合即为该材料的指纹图谱。

1.2.5 聚类分析 使用 NTSYSpc2.10e 软件根据遗传一致度用 UPGMA^[18] 方法进行聚类, 分析各品种之间的遗传关系。

2 结果与分析

2.1 SRAP 分子图谱构建

在 64 对引物组合中, me6/g38 引物组合在供试的 6 份分析材料中, 均出现了不同的 DNA 扩增条带, 表现出了 SRAP 分子标记的多态性, 可以将供试材料在分子水平上全部区分开来(图 1)。

选取条带清晰, 可重复性高多态性片段, 进行标记, 6 份材料的 SRAP 分子标记扩增的 DNA 片段及指纹序列见表 3。从表 3 可以看出, 每份材料均有其独有的 DNA 序列, 可用于种质的分类和鉴定。

2.2 分子标记的聚类分析

将表 3 中的 DNA 指纹序列结果进行聚类分析(UPGMA)。由图 2 可知, 在相似系数 0.36 处可将 6 份材料分为 2 支, 1 支为“早水鸡冠”与其选育系, 另 1 支为印度品种系; 在相似系数 0.86 处, “印度红”与“印度黄”

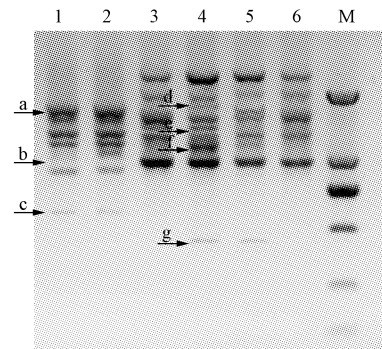


图 1 引物 me6/g38 对 6 份材料的扩增结果

注: M; Marker; a~g: 多态性条带。

表 3 me6/g38a 引物组合用于指纹图谱构建的多态性片段及 6 份材料的 DNA 指纹序列

多态性片段	材料及 DNA 植物序列					
	“印度红”	“印度黄”	“359-5-2”	“WT”	“151-1”	“359-30”
me6/g38a	1	1	0	0	1	0
me6/g38b	1	0	0	0	0	0
me6/g38c	1	1	0	0	0	0
me6/g38d	0	0	0	1	0	0
me6/g38e	0	0	1	1	0	1
me6/g38f	0	0	1	1	1	0
me6/g38g	0	0	0	1	1	0

聚为 1 支, 在“早水鸡冠”这 1 分支中, 从同一变异株系 359 的中分离出选育系的“359-5-2”和“359-30”聚为 1 支, 而性状表现差异较大的另一选育系“151-1”在这一级分支上另行分支。

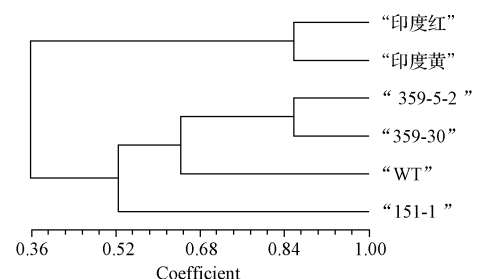


图 2 6 份材料多态性条带聚类分析结果

3 讨论

试验所用的 64 对引物分别位于基因组外显子和内含子上, 其中 1 个引物对 me6/g38 在供试的 6 份鸡冠花材料中均扩增出了特异性条带, 表明可以从鸡冠花中筛选出多态性 SRAP 分子标记, 可用于品种特异性和遗传分析。试验的结果从分子水平上证实所选育出的品系是遗传上所产生的变异, 具有其遗传的特异性。但从试验结果来看, 产生多态性条带的引物对比例较低, 因此, 在引物的设计或选择上需要更多的试验。由于该试验中采用的是琼脂糖凝胶电泳的方法, 所分离的多态性条带比较少是否与此方法有关也值得分析。

6 份供试材料分别来自 2 个不同的遗传来源: “印度

红”、“印度黄”是凤尾鸡冠同一选择系中的 2 个品种,穗状冠;而其它材料则为传统冠状鸡冠品种的不同变异。me6/g38 引物组合多态性聚类分析,可以将不同来源和冠形、冠色等表型相近的材料很好地区分出来,同时,也将同一性状变异株系聚合在一起。在较高的相似度上可将全部品种或品系区分出来。这一遗传分析的结果与材料的遗传同源性、性状分离来源具高度的一致性,表明利用 SRAP 分子标记可以给每个品种一个特异性的身份,构建其品种的指纹图谱,从而可以快速、准确地进行种质鉴定。

参考文献

- [1] 陈俊愉,程绪珂. 中国花经[M]. 上海:上海文化出版社,1990:265.
- [2] Hase K, Basnet P, Kadota S, et al. Immuno stimulating activity of Celosian, an antihepatotoxic polysaccharide isolated from *Celosia argentea* [J]. Planta Med, 1997, 63: 216-219.
- [3] Hayakawa Y, Fujii H, Hase K, et al. Antimetastatic and immunomodulating properties of the water extract from *Celosia argentea* seeds [J]. BiolPharm Bull, 1998, 21: 1154-1159.
- [4] Tadao A. Amino acids[M]. Japan: The Japan essential amino acids association. Incorporated, 1987: 13-18.
- [5] 姚悦梅,毛忠良,潘永飞,等. 播种期对不同品种鸡冠花观赏性及结实性的影响[J]. 江西农业学报, 2009, 21(10): 54-56.
- [6] 姜一凡,徐维杰,廖飞雄,等. 花卉空间诱变效应及育种研究进展[J]. 中国农学通报, 2007, 23(8): 339-342.
- [7] 夏瑾华. 新型鸡冠花的品种选育及其遗传学研究[D]. 武汉:湖北大学, 2004.
- [8] 张继业,钟仙龙,李锡珍,等. ⁶⁰Co- γ 射线辐射鸡冠花种子对其发芽率及幼苗生长的影响[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(4): 620-720.
- [9] 张孟锦,廖飞雄,王碧青,等. 卫星搭载处理对鸡冠花 SP1 代种子萌发及生长发育的影响[J]. 广东农业科学, 2006(4): 37-39.
- [10] 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.
- [11] 王燕,龚义勤,赵统敏,等. 番茄 SRAP-PCR 体系优化与品种分子鉴定[J]. 南京农业大学学报, 2007, 30(1): 23-29.
- [12] 任羽,王得元,张银东. 辣椒 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 分子植物育种, 2004, 2(5): 689-693.
- [13] 吴洁,谭文芳,何俊蓉. 甘薯 SRAP 连锁图构建淀粉含量 QTL 检测[J]. 分子植物育种, 2005, 3(6): 841-845.
- [14] 李严,张庆春. 西瓜杂交种遗传多样性的 SRAP 标记分析[J]. 园艺学报, 2005, 32(4): 643-647.
- [15] Feng N, Xue Q, Guo Q H, et al. Genetic diversity and population structure of *Celosia argentea* and related species revealed by SRAP[J]. Biochem Genet, 2009, 47: 521-532.
- [16] 姜一凡. 卫星搭载鸡冠花后代的生物学效应及株系筛选[D]. 南昌:江西农业大学, 2008.
- [17] Liu L, Guo W, Zhu X, et al. Inheritance and fine mapping of fertility restoration for cytoplasmic male sterility in *Gossypium hirsutum* L.[J]. Theor Appl Genet, 2003, 106: 461-469.
- [18] Sneath P H A, Sokal R R. Numerical taxonomy [C]. Freeman, San Francisco, CA, 1973.

Genetic Identification of *Celosia* Mutant and Select Lines Using Sequence-related Amplified Polymorphism, SRAP

LIU Xiao-fei, LIAO Fei-xiong, LIU Xiao-rong, LIU Jin-mei, YU Bo

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Ornamental Plant Germplasm Innovation and Utilization, Institute of Floricultural Research, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640)

Abstract: Taking *Celosia cristata* ‘Zaoshuijiguan’ and its three selected lines from the mutants, two cultivars from *C. plumos* ‘Indian’ as materials, the genetic diversity using Sequence-related Amplified Polymorphism (SRAP) were studied. The results showed that one primer pairs me6/g38 from 64 primer pairs amplified stable polymorphism among the 6 varieties with 7 amplifications. All the 6 lines tested could be identified each other by the fingerprint map constituted using the amplifications from me6/g38. The results of Cluster analysis (UPGMA) based on this fingerprint map showed ‘Zaoshuijiguan’ and three mutation lines, which were carried by satellite and cultured for generation, could clustered into a group at coefficient 0.52, while two Indian lines were clustered into a groups at coefficient 0.84. It indicated that SRAP would be a potential molecular marker tool in germplasm identification and genetic diversity analysis of *celosia*.

Key words: *Celosia cristata*; SRAP; fingerprint