

芸薹属 SSR 引物在甘蓝分子育种中通用性的研究

刘 海 霞^{1,2}, 顾 建 明¹, 康 俊 根²

(1. 甘肃农业大学 农学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 国家蔬菜工程技术研究中心, 北京 100097)

摘 要:利用 SSR 技术对甘蓝进行分子生物学研究, 对影响其扩增效果的指标 Mg^{2+} 和 dNTP 进行筛选优化, 获得了适宜甘蓝(C 基因组)SSR 的 PCR 条件。将已公布的在芸薹属不同作物上开发的 78 对引物运用于随机筛选的 3 株甘蓝材料上。结果表明:在 78 对芸薹属引物中, 11 对引物在 3 株甘蓝材料上表现良好的差异性, 5 对引物则表现无差异但是所得条带清晰。试验结果为进一步开展甘蓝分子育种奠定了基础。

关键词:芸薹属; 甘蓝; SSR

中图分类号:S 635. 03. 6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)03-0115-04

简单重复序列(Simple Sequence Repeats, SSR)也称微卫星, 其基因组中座位两侧的 DNA 序列是相对保守的单拷贝序列, 经扩增变异丰富的串联重复序列而获得其长度多态性^[1-2]。除着丝粒及端粒区域外, SSR 位点广泛分布在真核生物染色体上, 具有多态性高、稳定性强、操作简便、DNA 用量少、表现为共显性孟德尔遗传等特点^[3-5], 已经广泛用于基因定位、多态性分析、图谱构建、数量性状基因位点(QTLs)分析、种质资源的保存与利用等诸多方面, 是目前最有应用价值和应用最广泛的分子标记技术之一^[6-8]。

芸薹属作物 SSR 标记的丰度, 表达特征和可用性已有大量报道。他们的研究表明, 很多 SSR 标记在芸薹属的大多作物中是不可通用的。然而, 其中一些甘蓝型油菜 SSR 侧翼引物在芸薹属中的 A 和 C 基因组中却是可通用的^[9]。

目前 SSR 开发在芸薹属作物中开发较多的引物是在甘蓝型油菜序列中开发的, Plieske and Struss (2000)鉴定和开发出了很多甘蓝型油菜(*Brassica napus*, AACC)的 SSR 标记, 并已经成功应用于图谱构建等工作, 近年来随着白菜基因组测序及大量序列信息的公布, 从 A 基因组或 AC 基因组序列设计的 SSR 引物越来越多, 将这些 A 基因组、B 基因组、AC 基因组序列的引物应用于甘蓝(C 基因组), 将可以补充甘蓝 SSR 引物的

不足, 为甘蓝分子育种提供更多有效的 SSR 引物^[10]。

该研究收集整理了目前网上公布的 78 对芸薹属不同作物中开发出的 SSR 引物, 利用随机选择的甘蓝种质资源, 探索这些引物在甘蓝(C 基因组)中的通用性, 筛选出在甘蓝上扩增效果良好的引物。并优化这些引物在甘蓝(C 基因组)应用的 SSR 体系, 从而补充甘蓝 SSR 引物的不足, 为开展甘蓝 SSR 分子标记辅助育种提供有用的信息。

1 材料与方法

1.1 基因组 DNA 提取

CTAB 法提取基因组 DNA。试验所用的甘蓝(*B. oleracea* var. *capitata*)种质资源来源于北京市农林科学院甘蓝课题组。1.5 mL 离心管加入离心管盖大小新鲜叶片 1~2 片, 加入 250 μ L CTAB 缓冲液, 用尖头玻棒轻轻研磨, 然后再加入 250 μ L CTAB 混匀。65 $^{\circ}$ C 水浴 1 h (根据作物种类不同适当调整)。置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱或室温冷却至 15 $^{\circ}$ C 以下。加入 250 μ L 24:1 氯仿/异戊醇, 上下混匀 5 min, 保证样品与氯仿充分混和。13 000 rpm 离心 10 min。取上清液 200 μ L, 加入预先加好 200 μ L 异丙醇的 1.5 mL 离心管中, 轻轻上下颠倒混匀。4 $^{\circ}$ C 冰箱静置 30 min 以上。13 000 rpm 离心 10 min, 弃上清液。吹干 DNA, 让异丙醇挥发干净。加入 100 μ L ddH₂O (含 1 μ L 10 mg/mL 的 RNase)溶解 DNA。37 $^{\circ}$ C 水浴或室温 1 h 去除 RNA。

1.2 引物

78 对引物名称及来源见表 1, 引物序列参见相关芸薹属生物信息库(<http://www.brassica.info/>)中公开的数据。

1.3 PCR 扩增体系的优化

Mg^{2+} 浓度梯度设置 6 个处理, 分别是 1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2 μ L; dNTP 浓度梯度为 1.0、1.2、1.4、1.6、

第一作者简介:刘海霞(1984-), 女, 硕士, 现主要从事设施园艺研究。

通讯作者:顾建明(1970-), 男, 博士, 教授, 现主要从事蔬菜栽培生理方面研究工作。E-mail: xiejianming@gsau.edu.cn。

基金项目:国家“863”计划资助项目(2006AA100108); 国家“十一五”科技支撑计划资助项目(2009BADB8B03)。

收稿日期:2009-10-09

1.8、2.0 μL 。

每个反应体系 20 μL , 含模板 DNA 3 μL , 25 mM Mg^{2+} (1.2~2.2) μL , $10\times$ buffer 2 μL , 2.5 mM dNTP (1.0~2.0) μL , 5 U/ μL Taq 酶 0.2 μL , 正反向引物各 1.0 μL 。PCR 扩增程序为热启动 94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min, 15 个循环: 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 63 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 每循环降低 0.7 $^{\circ}\text{C}$, 接 23 个循环: 94 $^{\circ}\text{C}$ 0.5 min, 56 $^{\circ}\text{C}$ 0.5 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 接 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 接 end 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4 电泳分析

扩增完毕后 加入变性上样缓冲液 7 μL (98% 甲酰胺、10 mM EDTA、0.25% 溴酚兰), 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 然后立即置于冰上冷却, 取 6 μL 点样于 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶上, 在 70 W 恒功率下电泳 2.5 h, 电泳采用北京

君意电泳设备有限公司的 JY-CX2A 测序电泳仪, 电泳结束后采用银染法显带照相并进一步分析。

2 结果与分析

2.1 筛选出适宜甘蓝 SSR 的 PCR 体系

由于不同引物退火温度不同, 通常情况下, 需根据每一引物设计不同的 PCR 程序, 不利于进行大规模分子育种, 因此该试验利用 Touchdown PCR 体系, 并筛选在此通用 PCR 体系下不同的 Mg^{2+} 和 dNTP 组合, 从而选出优化的通用性甘蓝 SSR 反应体系, 为进一步利用大量 SSR 引物进行甘蓝分子育种奠定基础, 比如, 当 Mg^{2+} 为 1.2 μL 时, 条带清晰度低, 随着浓度的逐渐提高, 至 Mg^{2+} 达 1.8 μL 时, 条带达到最清晰, 再高时特异性降低, 有杂带出现; dNTP 为 1.6 μL 时最佳, 扩增效果较好。

表 1 引物及条带统计

引物名称	引物来源	扩增出条带数 (等位点点数)	引物名称	引物来源	扩增出条带数 (等位点点数)
0111B05	oleracea	1	Ra2E07	rapa	0
0113D02A	oleracea	0	Ra2A10	rapa	0
0112G04	oleraceu	0	Na10D03	napus	3
0113C12	oleraceu	0	Na12C07	napus	0
0112D02	oleracea	3	Na14G02	napus	0
0110D03	oleracea	0	Na10F06	napus	无差异条带清晰
0109A03	oleracea	0	Na12D09	napus	0
0113E08	oleracea	3	Na10C01	napus	无差异条带清晰
0110B08	oleraceu	0	Na14E02	napus	0
0110E06	oleraceu	0	Na14F11	napus	2
0110D01	oleracea	0	Na10E02	napus	0
0110B06	oleracea	0	Na14G06	napus	0
0110F09	oleraceu	0	Na10C03	napus	0
0110B11	oleraceu	0	Na14H11	napus	无差异条带清晰
0110A05	oleracea	0	Na12E03	napus	0
0112B05	oleraceu	0	Na10A09	napus	0
0112F11	oleracea	0	Na14E11	napus	0
0111A02	oleraceu	3	Na12C06	napus	0
0111B03	oleracea	0	Na14D07	napus	无差异条带清晰
0112E03	oleracea	0	Na12E02	napus	0
0112F02	oleraceu	0	Na12A07	napus	0
Ra3C04	rapa	1	Na10B04	napus	0
Ra3D02B	rapa	2	Na10D09	napus	0
Ra2A04	rapa	0	Na12A01	napus	0
Ra2E01	rapa	0	Na12A08	napus	0
Ra3H10	rapa	0	Na12D04	napus	0
Ra2E12	rapa	3	Na12A02	napus	0
Ra2G08	rapa	0	Na10G06	napus	0
Ra2F04	rapa	0	Na12E06	napus	0
Ra3H09	rapa	1	Ni3H07	nigra	0
Ra3D04	rapa	0	Ni4H04	nigra	0
Ra3E05	rapa	0	Ni2C12	nigra	0
Ra2G09	rapa	0	Ni4A07	nigra	0
Ra2A01	rapa	2	Ni3G04	nigra	0
Ra1F06	rapa	0	Ni4E08	nigra	0
Ra2A05	rapa	0	Ni4D09	nigra	0
Ra2E03	rapa	0	Ni2D08	nigra	0
Ra2D01	rapa	0	Ni2F02	nigra	0
Ra2A11	rapa	0	Ni4A03	nigra	无差异条带清晰

2.2 78 个引物在甘蓝中扩增效果分析

在选用的 78 对 SSR 引物(表 1)中,在甘蓝上表现出多态性差异的引物有 11 对;条带清晰无差异的引物有 5 对。来源于甘蓝的引物有 21 对,占有引物的 27%,在 3 株材料上表现差异的引物有 4 对,占差异引物的 36%;其中引物 0111B05 有 1 个等位位点;0112D02、0113E08、0111A02 有 3 个等位位点。来源于白菜(A 基因组)的引物 20 对,占有引物的 26%,在 3 株材料上表现差异的引物有 5 对,占差异引物的 46%;其中 Ra3C04、Ra3H09 有 1 个等位位点;Ra3D02B、Ra2A01 有 2 个等位位点;Ra2E12 有 3 个等位位点。来源于甘蓝型油菜的引物有 27 对,占有引物的 35%,在 3 株材料上表现差异的引物有 2 对,占差异引物的 18%,Na14F11 有 2 个等位位点;Na10D03 有 3 个等位位点;无差异但是条带清晰的引物有 4 对,分别为 Na10F06、Na10C01、Na14H11、Na14D07。来源于黑芥(B 基因组)的引物有 10 对,占有引物的 12%,在 3 株材料上表现差异的引物有 0 对,无差异条带清晰的引物 1 对;Ni4A03。

2.3 在供试结球甘蓝种质资源中多态性分析

来源于甘蓝与来源于白菜的 SSR 引物在供试甘蓝材料中特异性高,说明这些 SSR 引物在结球甘蓝中多态性丰富,来源于甘蓝型油菜与来源于黑芥的 SSR 引物在供试甘蓝材料中特异性低。说明这些引物在现有的 3 个材料中无多态性,但也可能在其它材料中多态性也能丰富。

3 讨论

该试验通过将芸薹属 78 对引物应用于 3 株甘蓝材料,优化了甘蓝(C 基因组)SSR 通用体系:总体系 20 μ L,含模板 DNA 3 μ L,25 mM Mg^{2+} 1.8 μ L,10xbuffer 2 μ L,2.5mM dNTP 1.6 μ L,5 U/ μ L Taq 酶 0.2 μ L,正反向引物各 1.0 μ L。PCR 扩增程序为热启动 94℃ 4 minutes,15 个循环:94℃ 1 min,63℃ 1 min,72℃ 1 min,,每循环降低 0.7℃,接 23 个循环:94℃ 0.5 min,56℃ 0.5 min,72℃ 1 min,,接 72℃ 10 minutes,接 end 4℃ 保存。

78 对引物中来源于甘蓝的引物有 21 对,占有引物的 27%,在供试甘蓝材料上可扩增出清晰条带的有 4 对,占有 78 对引物的 5%;来源于白菜的引物 20 对,占有引物的 26%,在供试甘蓝材料上表现差异的引物有 5 对,占有引物的 6%;来源于甘蓝型油菜的引物有 27 对,占有引物的 35%,在供试甘蓝材料上表现差

异的引物有 2 对,占有引物的 3%,无差异但是条带清晰的引物有 4 对;来源于黑芥的引物有 10 对,占有引物的 12%,可扩增出清晰条带的有 0 对,无差异条带清晰的引物 1 对。综上,利用优化的通用 SSR 体系,试验得到 11 对在甘蓝(C 基因组)上多态性丰富的引物,占 78 对引物的 14%,有的有多态性说明这些 SSR 引物在结球甘蓝中多态性丰富,而另外一些无多态性,说明这些引物在现有的 3 个材料中无多态性,但也可能在其它材料中多态性丰富。

芸薹属作物中,来源于大白菜(A 基因组)的 SSR 引物扩增效率最高,分析原因可能是大白菜 A 基因组与结球甘蓝 C 基因组具有较高同源性所致。来源于黑芥(B 基因组)的 SSR 引物扩增效率最低,可能是黑芥 B 基因组与结球甘蓝 C 基因组具有较低同源性所致,但是在甘蓝材料上也是可用的。该试验结果表明 A、B 基因组设计的 SSR 引物部分可以在甘蓝(C 基因组)中扩增出清晰条带。多态性较低与试验只用了 3 个结球甘蓝自交系为试材有关,这为利用芸薹属 SSR 引物序列进行甘蓝分子育种及遗传分析提供了参考依据。

参考文献

- [1] 黄国庆,郭加沅,肖国樱. SSR 标记在水稻遗传育种中的应用[J]. 江西农业学报,2007(4):20-22.
- [2] 王红梅,张正英,陈玉梁. SSR 标记技术及其在植物遗传学中的应用[J]. 西北师范大学学报(自然科学版),2003(1):113-118.
- [3] 杨东娟,马瑞君. SSR 分子标记在作物遗传多样性研究中的应用现状[J]. 甘肃科技,2007(8):99-102.
- [4] 张书芬,傅廷栋,马朝芝,等. 3 种分子标记分析油菜品种间的多态性效率比较[J]. 中国油料作物学报,2005(6):19-23.
- [5] 蒋彩虹,王元英,孙玉合. SSR 和 ISSR 标记技术应用进展[J]. 中国烟草科学,2007(2):1-5.
- [6] Powell W, Machray G C, Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats[J]. Trends Plant Science,1996(1):215-222.
- [7] 万平,刘大钧. SRS 标记与植物遗传育种研究(综述)[J]. 安徽农业大学学报,1998,25(1):92-95.
- [8] 刘艳芝,张敬敏,徐宝连,等. 分子标记技术在蔬菜遗传育种及种质资源中的应用[J]. 长江蔬菜,2008(1):34-37.
- [9] Saal B, Plieske J, Hu2 C F, Quiros3 and D. Struss1 TAG Microsatellite markers for genome analysis in Brassica. II. Assignment of rapeseed microsatellites to the A and C genomes and genetic mapping in Brassica oleracea L. 2001,102:695-699.
- [10] Si Y J, Liu S B, Wang. Cytological Identification and SSR Analysis of Wheat-Thinopyrum Intermedium Lines with Resistance to Powdery Mildew[J]. Journal of Plant Genetic Resources,2006,7(4):404-408.

General Use of Brassica SSR Primers in Cabbage Molecular Breeding

LIU Hai-xia^{1,2}, XIE Jian-ming¹, KANG Jun-gen²

(1. Gansu Agricultural University, Lan zhou, Gansu 730070; Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100097)

果梅离体繁殖技术研究

谭志刚¹, 陈红¹, 张绿萍², 程秀枝¹

(1. 贵州大学喀斯特山地果树资源研究所, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州省果树科学研究所, 贵州 贵阳 550100)

摘要:以优选果梅黔荔1号单株为材料, 对外植体灭菌时间、腋芽启动和增殖培养进行了研究。结果表明:以0.1% HgCl₂消毒8 min效果最好, 其存活率为75%;适合腋芽启动培养的基本培养基是WPM;最有利于腋芽启动和增殖的培养基是WPM+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L GA₃, 有效增殖系数高达1.51。

关键词:果梅;腋芽;离体繁殖;生长调节剂

中图分类号:S 662.403.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)03-0118-03

果梅为蔷薇科李属(*Prunus* L.)植物, 亦称酸梅、梅子, 是我国特产果树。梅果对人体具有解毒、净血、杀菌的功能, 且是生理碱性食品, 故被誉为“健康食品”^[1]。同时果梅可作为水土保持的先锋树种。传统的果梅繁育主要是通过扦插、嫁接等无性繁殖方式进行, 繁育周期长, 且受季节限制, 而组织培养具有繁育速度快, 不受季节和气候等因素的影响, 可以获得基因型、长势一致的优良种苗。同时, 组织培养还可以对现有的特色果梅

种质资源进行离体保存。目前, 果梅离体培养的研究工作进展缓慢, 仅有果梅胚培养的相关报道^[2]。为此, 该试验对果梅外植体灭菌和腋芽启动培养作了相关研究, 以为进一步建立和完善果梅组织培养繁殖体系提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以优选果梅黔荔1号单株为材料。

1.2 试验方法

1.2.1 不同灭菌时间比较 取带腋芽的枝条, 切成0.5~1 cm左右带芽茎段, 在流水中冲洗2~4 h, 用0.1% HgCl₂灭菌, 分别处理4、6、8、10 min, 然后用无菌水冲洗4次, 接种在培养基中, 每个处理接种10瓶, 每瓶2个外植体, 重复3次。7 d后, 统计外植体污染率、15 d后统计存活率和死亡率, 因污染而造成的死亡计入污染率中。

1.2.2 基本培养基的筛选 以WPM、1/2WPM、MS、1/2MS为基本培养基, 添加1.0 mg/L 6-BA、0.2 mg/L NAA, 从中筛选出最佳的基本培养基。每处理接种10瓶, 每瓶3个带芽茎段, 重复3次。

第一作者简介:谭志刚(1979-), 男, 河南周口人, 在读硕士, 研究方向为果树生物技术。E-mail: tanzhigang213@163.com。

通讯作者:陈红(1975-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事生物技术与园艺植物遗传育种研究工作。E-mail: chenh96@yahoo.com.cn。

基金项目:贵州省科技攻关资助项目(黔科合NY字[2007]3039号);贵州省省长基金资助项目(黔省专合字2007-18号);贵州省果树学科科技创新人才团队建设资助项目(黔科合人才团队[2008]88007号);贵州省特色农业产业人才培养基地建设资助项目;贵州省果树工程技术研究中心建设资助项目(黔科合农G字[2007]4001号)。

收稿日期:2009-10-09

Abstract: During the study of molecular biology research in cabbage by using SSR technology, The first step was to explore much more SSR primers suitable to cabbage(C genome) and screen the optimized the PCR appropriate PCR conditions. In present study, we collected 78 pairs of SSR primers developed in different *Brassica* crops and explored the general use of these primer sets in cabbage with 3 random selected materials. Results showed that 11 among them had difference, and 5 pairs of primers showed no difference but had clear bands.

Key words: *Brassica*; cabbage; SSR