

# 十六份姜花属花卉种质的 SRAP 分子标记指纹图谱构建

胡 秀<sup>1</sup>, 高丽霞<sup>2</sup>, 刘 念<sup>1</sup>, 寇亚平<sup>3</sup>, 熊友华<sup>1</sup>, 黄邦海<sup>3</sup>

(1. 仲恺农业工程学院, 广东 广州 510225; 2. 河池学院, 广西 河池 546300; 3. 广州市农业技术推广中心, 广东 广州 510520)

**摘 要:**姜花属花卉种质来源广泛, 包括栽培种、栽培品种及新育成品系等, 从形态上常难以鉴定。该研究在全面收集姜花属主要花卉种质的基础上, 采用 SRAP 分子标记方法, 从多态性较好的 12 对引物中筛选出 2 对引物, 构建了 16 份姜花属常见花卉种质的分子标记指纹图谱。结果表明: 采用 SRAP 分子标记方法, 条带清晰、结果稳定、重复性高, 可用于姜花属花卉种质的快速、准确的鉴定。

**关键词:**姜花属; 花卉种质; SRAP 分子标记; 指纹图谱构建

**中图分类号:**Q 946-33 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)10-0114-04

姜花属(*Hedychium*)隶属姜科(Zingiberaceae), 是国内外新兴的花卉种类之一, 常见的花卉种质包括栽培种、栽培品种、新育成品系等多种来源<sup>[1]</sup>。育成姜花属花卉品种的国家包括欧美、日本和泰国等多个国家, 姜花属花卉种质的流动随着各国的交流不断增强。由于世界上没有姜花属花卉登记的权威机构, 很多品种无法考证其来源, 而姜花属植物形态鉴定较为困难, 这为进一步的姜花属花卉品种的育种工作带来了障碍。现今, 在姜花属花卉育种上, 一方面要积极的收集活体种质及相关文献资料进行形态分类和鉴定, 另一方面结合形态鉴定进行分子标记指纹图谱的构建将有助于种质的鉴定。

DNA 指纹图谱(DNA fingerprint)是指某一品种具有的区别于其它品种的特异 DNA 片段, 其表现方式为一系列电泳图谱的差异。DNA 分子标记绘制的品种指纹图谱像人的指纹一样具有个体特异性, 能快速、准确鉴定品种或品系。目前广泛应用的主要包括限制性片段长度多态性(RFLP)<sup>[2]</sup>、随机扩增长度多态性(RAPD)<sup>[3-4]</sup>、特征序列扩增标记(SCAR)<sup>[5]</sup>、扩增片段长度多态性(AFLP)<sup>[6]</sup>、简单重复序列(ISSR)<sup>[7]</sup>、单核苷

酸多态性(SNPs)<sup>[8]</sup>、相关序列扩增多态性(SRAP)等<sup>[9]</sup>。SRAP 标记操作简便, 重复性好, 多态性高, 是一种高效的分子标记方法, 已经在不同的植物上用于遗传图谱的构建、基因定位、遗传多样性研究<sup>[10-12]</sup>。近年来, SRAP 标记已经被用于一些植物品种的分子标记指纹图谱构建<sup>[13]</sup>。迄今为止, 国内外没有任何关于姜花属植物分子标记指纹图谱构建的报道。课题组自 2006 年开始, 搜集了包括美国、泰国在内的主要姜花属花卉种质, 并与广州市农业推广中心合作育成了 2 个新的品系。该试验拟采用 SRAP 分子标记的方法构建常见姜花属花卉种质的分子标记指纹图谱, 为姜花属花卉种质的分类和鉴定提供辅助依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

材料及来源见表 1。

### 1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 基因组 DNA 提取方法, 参照 Murray 和 Thompson<sup>[14]</sup>的方法。0.8% 琼脂糖凝胶中电泳检测, Vilber Lourmat CN 1500 凝胶成像系统下拍照, 核酸蛋白测定仪(Nucleic Acid/Protein Analyzer, Beckman Coulter DU730)测其浓度。

1.2.2 引物选择 在高丽霞等<sup>[15]</sup>引物选择的基础上, 选择其中多态性好的 12 对引物进行进一步筛选, 引物序列见表 2, 12 对引物组合见表 3。

**第一作者简介:**胡秀(1976-), 女, 博士, 讲师, 现从事姜科花卉育种工作。E-mail: huxiu76@yahoo.com.cn。

**责任作者:**刘念(1957-), 男, 教授, 现从事姜科植物资源研究工作。E-mail: liunian678@163.com。

**收稿日期:**2011-03-18

表 1 材料来源

编号	材料	来源	凭证标本
1	金粉 1 号 <i>Hedychium</i> 'Jinfen 1'	金姜花与粉姜花的杂交后代(新品系)	胡 219(IBSC)
2	金姜花 <i>H.</i> 'Jin'	香港栽培品种	胡 220(IBSC)
3	粉姜花 <i>H.</i> 'Fen'	由金姜花自交后代选育	胡 221(IBSC)
4	黄金 1 号 <i>H.</i> 'Huangjin 1'	白姜花与粉姜花的杂交后代(新品系)	胡 222(IBSC)
5	白姜花 <i>H. coronarium</i> J. König	广东本地栽培种	胡 223(IBSC)
6	泰国 2 号 <i>H.</i> 'Tailand 2'	泰国栽培品种	胡 224(IBSC)
7	泰国 1 号 <i>H.</i> 'Tailand 1'	泰国栽培品种	胡 225(IBSC)
8	<i>H.</i> 'T 1'	泰国栽培品种	胡 226(IBSC)
9	<i>H.</i> 'T 2'	泰国栽培品种	胡 227(IBSC)
10	圆瓣姜花 <i>H. forrestii</i> Diel	云南昆明农户栽培(国内栽培种)	胡 125(IBSC)
11	峨眉姜花 <i>H. flavescens</i> Carey ex Rosc.	四川峨眉山(栽培种,四川、云南常见栽培)	胡 044(IBSC)
12	黄姜花 <i>H. flavum</i> Roxb.	广西田林(栽培种,育种亲本)	胡 066(IBSC)
13	凤平白姜花 <i>H.</i> 'Fengping'	云南路西农户栽培(国内栽培类型)	胡 150(IBSC)
14	无丝姜花 <i>H. wardii</i> C. E. C. Fisch	云南六库(栽培种,育种亲本)	胡 083(IBSC)
15	红丝姜花 <i>H. gardnerianum</i> Rosc.	云南福贡(栽培种,育种亲本)	胡 090(IBSC)
16	红姜花 <i>H. coccineum</i> Buch.-Ham. ex Sm.	云南腾冲(栽培种,育种亲本)	胡 092(IBSC)

表 2 引物的序列

引物	类型	序列(5'-3')	引物	类型	序列(5'-3')
F2	Forward	TGA GTC CAA ACC GGA GC	R1	Reverse	GAC TGC GTA CGA ATT AAT
F9	Forward	TGA GTC CAA ACC GGA GG	R2	Reverse	GAC TGC GTA CGA ATT TGC
F10	Forward	TGA GTC CAA ACC GGA AA	R6	Reverse	GAC TGC GTA CGA ATT GCA
F13	Forward	CGA ATC TTA GCC GGA TA	R9	Reverse	GAC TCC GTA CGA ATT CAG
			R13	Reverse	GAC TGC GTA CGA ATT CTG
			R17	Reverse	GAC TGC GTA CGA ATT GAG
			R20	Reverse	GAC ACC GTA CGA ATT GAC

1.2.3 DNA 扩增和检测 PCR 反应体系同高丽霞等<sup>[15]</sup>。PCR 扩增采用 Thermo P× 2 PCR 仪。扩增产物经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,凝胶浓度为 8%,电泳缓冲液为 1×TBE,稳压 250 V 室温电泳。凝胶银染参考张天真等<sup>[16]</sup>的方法,银染后的凝胶用 Vilber Lourmat CN-1500 凝胶成像仪拍摄保存。DNA 扩增和检测 3 次重复。

1.3 指纹图谱构建的方法

银染后的凝胶利用 Vilber Lourmat 凝胶成像仪拍摄保存后,Bandscan 分析软件读带,重复读 2 次,电泳图谱的每 1 条带记为 1 个位点。同一位点有带记为“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 12 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。采用 infinity capture 图像分析软件确定各多态性片段的大小,在所选引物对下某材料在这些多态性片段位点产生的“0”或“1”的顺序组合即为该材料的指纹图谱。

2 结果与分析

2.1 引物组合及其多态性

12 对引物共产生 120 条多态性条带,平均每对引物产生 10 条多态性条带(表 3),具有较高的多态性。

表 3 引物组合及多态性条带

引物组合	F2R4	F9R2	F9R6	F9R1	F9R1	F9R2	F10R	F10R	F10R	F13R	F13R	F13R
				3	7	0	1	2	9	6	13	20
多态性条带的数目	6	10	9	15	12	11	14	10	5	5	10	13

2.2 分子标记指纹图谱的构建

在 12 对引物中,没有能将所有材料分开的单对引物。试验选出了 2 对可以区分所有材料的引物组合

F9R13 和 F13R13,选取的多态性片段分别如图 1、2 所示。选取的多态性片段条带清晰,可重复性高,其片段大小及 16 份材料的 DNA 指纹序列见表 4。每份材料的

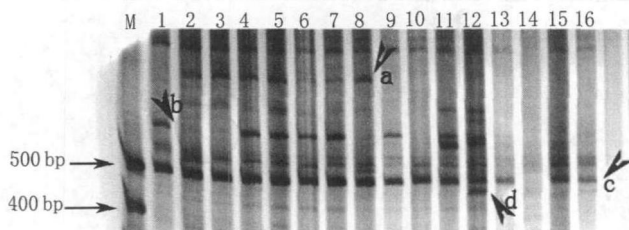


图1 引物 F9R13 对 16 份材料的扩增结果

注:箭头所指的为多态性条带,M 为 marker。(下同)。

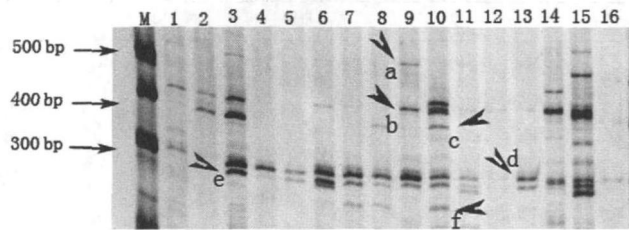


图2 引物 F13R13 对 16 份材料的扩增结果

表 4 2 对引物中用于指纹图谱构建的多态性片段大小及 16 份材料的 DNA 指纹序列

多态性片段	片段大小/bp	材料编号及其 DNA 指纹序列															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
F9R13-a	728	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
F9R13-b	589	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
F9R13-c	496	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
F9R13-d	463	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
F13R13-a	528	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
F13R13-b	374	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0
F13R13-c	351	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
F13R13-d	285	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
F13R13-e	270	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0
F13R13-f	247	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0

DNA 序列为其独有,可用于种质的分类和鉴定。

### 3 结论与讨论

#### 3.1 SRAP 分子标记用于指纹图谱构建的优势

目前用于构建 DNA 指纹图谱的分子标记中,RAPD 对 PCR 反应条件敏感,可靠性不够,RFLP 和 AFLP 则操作繁琐,SSR 技术因其稳定性好、可靠性高、操作较简便被认为是理想的选择,可是对于尚未有 SSR 引物开发出来的姜花属植物,需要首先完成引物的筛选再进行图谱构建<sup>[13]</sup>。SRAP 分子标记用于指纹图谱构建具有多态性高的特点<sup>[13]</sup>,在该研究中,采用 SRAP 分子标记方法,仅用 2 对引物就将亲缘关系很近的材料完全区分开来,如金粉 1 号 *Hedychium* 'Jinfen 1' 是金姜花 *H.* 'Jin' 和粉姜花 *H.* 'Fen' 的杂交后代,而粉姜花 *H.* 'Fen' 本身就是由金姜花 *H.* 'Jin' 自交选育而成。另外,从该试验还可看到,SRAP 分子标记还有稳定性、重复性好,操作简单、快速、成本低廉的特点,在一个条件完备的实验室,SRAP 分子标记只需 2 d 即可完成。

#### 3.2 SRAP 分子标记指纹图谱在姜花属花卉种质鉴定中的作用

姜花属植物属下的种的分类的性状主要基于苞片的形状、花冠管、花冠、唇瓣、侧生退化雄蕊、雄蕊等的形状大小、颜色等<sup>[17]</sup>,这些性状往往只有开花的时候才能见到,并且常难以区分。种下品种之间在形态上的差异

就更加难以辨别。另外,品种之间的差异往往还表现在如产量、植株的直立性、抗病性等形态上不能直接反映的方面。该研究是在全面收集姜花属主要花卉种质的基础上进行的,所构建的 SRAP 分子标记指纹图谱中,每一种材料都具有自己独特的条码,可对姜花属花卉种质进行快速、准确的鉴定。

#### 参考文献

- [1] Branney T M E. Hardy gingers: including *Hedychium*, *Roscoea* and *Zingiber*[M]. London: Timber Press, 2005.
- [2] Wolff K, Zitzewitz E, Horstra H. Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1995, 91: 439-447.
- [3] Hu J, Quirs C F. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers [J]. Plant Cell Rep, 1991(10): 505-511.
- [4] Wilde J, Waugh R, Powell W. Genetic fingerprinting of Theobroma clones using randomly amplified polymorphic DNA markers [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1992, 83: 871-877.
- [5] Rocio B, Remedios C, Francisco M C, et al. Identification of Olive-tree cultivars with SCAR markers [J]. Euphytica, 2002, 129: 33-41.
- [6] Herman L, Petr K. AFLP fingerprinting of sesame (*Seadamum indicum* L.) cultivars: identification, genetic relationship and comparison of AFLP informativeness parameters [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2007, 54: 1437-1446.
- [7] Arnau G, Lallemand J, Bourgoin M. Fast and reliable strawberry cultivar identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification [J]. Euphytica, 2002, 129: 69-79.

- [8] Shirasawa K, Shiokai S, Yamaguchi M, et al. Dot-blot-SNP analysis for practical plant breeding and cultivar identification in rice [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 113: 147-155.
- [9] Liu L W, Zhao L P, Gong Y Q, et al. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of late-bolting radish cultivars with RAPID, ISSR and SRAP markers [J]. Scientia Horticulturae, 2008, 116: 240-247.
- [10] Ferriol M, Pico B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of Cucurbita pepo using SRAP and AFLP markers [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107: 271-282.
- [11] Riaz A, Potrter D, Stephen M. Genotyping of peach and nectarine cultivars with SSR and SRAP molecular markers [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2004, 129: 204-211.
- [12] Guo D L, Luo Z R. Genetic relationships of some PCNA persimmons (*Diospyros kaki* Thunb.) from China and Japan revealed by SRAP analysis [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2006, 53: 1597-1603.
- [13] Qiao L X, Liu H Y, Guo B T, et al. Molecular identification of 16 *Porphyra* lines using sequence-related amplified polymorphism markers [J]. Aquatic Botany, 2007, 87: 203-208.
- [14] Murray H G, Thompson W F. Rapid isolation of higher weight DNA [J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8(19): 4321-4326.
- [15] 高丽霞, 胡秀, 刘念, 等. 中国姜花属基于 SRAP 分子标记的聚类分析 [J]. 植物分类学报, 2008, 46: 899-905.
- [16] 张天真, 郭旺珍, 武耀廷, 等. 棉花微卫星标记的 PAGE/银染快速检测 [J]. 棉花学报, 2000, 12: 267-269.
- [17] Wu T L, Chen S J. Zingiberaceae. In: Wu Z Y, and Raven P H, eds. Flora of China [M]. Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2000, 24: 322-377.

## SRAP Fingerprint Construction of Sixteen *Hedychium* Ornamental Germplasms

HU Xiu<sup>1</sup>, GAO Li-xia<sup>2</sup>, LIU Nian<sup>1</sup>, KOU Ya-ping<sup>1</sup>, XIONG You-hua<sup>1</sup>, HUANG Bang-hai<sup>3</sup>

(1. Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225; 2. Hechi University, Hechi, Guangxi 546300; 3. Agricultural Technology Extension Center, Guangzhou, Guangdong 510520)

**Abstract:** With a wide range of origin, ornamental *Hedychium* germplasms including cultivated species, varieties and new breeding materials are morphology difficult to identify. In this study, on the basis of thorough collecting of ornamental *Hedychium* germplasms, two pair of primer with total of eleven bands were selected from twelve primers to construct SRAP DNA fingerprint. The results showed that, through the SRAP fingerprint construction method, the polymorphic bands were clear, repeatedly, and could be used for the identification of *Hedychium* ornamental germplasm exactly and quickly.

**Key words:** *Hedychium*; ornamental germplasm; SRAP; fingerprint

## 如何让茄种快速脱粒

种茄量大,天气不稳定时,常规人工掏洗,费工费时劳动量大,用洗衣机脱粒可大大降低劳动强度。此法不影响种子正常发芽性状,不浪费种子,回收率高。种子表面干净,色正,光泽度明显提高,商品外观性状优良。

**选果切片** 选择无病虫、后熟过的完整种果横向切片,厚约 1.8 cm。应随切随用,避免积压腐烂使种子变色。

**开机脱离** 洗衣机开机,采用强洗水翻滚后,加入无泥土污染的种果切片 10~13 kg,脱粒 15~20 min。绝大部分切片破碎,种子与果肉分离开后,即可关机。

**种子漂洗** 把机内混合物舀入盆内,加水冲稀搅拌,沉淀片刻后,用竹具捞掉上面无籽果肉碎块,慢慢倒出悬混水,留下种子。反复漂洗干净。然后,将洗净的湿种子装入布袋内扎口,甩干多余水分,在干净的草席子上及时晾晒,勤搅多翻,使种子含水量达到标准干度。