

苕麻多胚苗遗传多样性的 SRAP 标记分析

温岚, 喻春明, 王延周, 陈平, 陈继康, 谭龙涛, 熊和平*

(中国农业科学院 麻类研究所, 湖南 长沙 410205)

摘要: 为分析苕麻多胚苗的遗传多样性,以靖西青麻和中苕 1 号杂交收获 F_1 代种子,从中筛选出 21 对双胚苗、3 株三胚苗和 1 株单胚苗,用 SRAP 标记对这些材料及其亲本进行遗传分析。结果表明:筛选出的 24 个引物组合共扩增出 159 个稳定的多态性条带,平均每个组合 6.8 个;48 份材料中成对遗传相似系数为 0.360~0.876,在遗传相似系数 0.51 处可将全部材料划分为 A、B、C、D 四类群,在遗传相似系数 0.586 处,A 类群又可以分为 I、II 和 III 3 个亚群;多胚苗与亲本没有出现扩增条带完全一致的情况,本研究中苕麻多胚材料与无融合生殖无关。

关键词: 苕麻;多胚苗;相关序列扩增多态性(SRAP);遗传多样性

中图分类号: S563.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)03-0243-05

Application of molecular marker SRAP on analysis of genetic diversity of polyembryonic ramie seedlings

WEN Lan, YU Chuen-ming, WANG Yan-zhou, CHEN Ping, CHEN Ji-kang, TAN Long-tao, XIONG He-ping*

(Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410205, China)

Abstract: To analyze the genetic diversity of polyembryonic ramie, 21 pairs of twin ramie seedlings, a bunch of tri-embryony seedlings and one normal seedling were screened out from the F_1 progenies of Jingxi qing and Zhongzhu No.1, and SRAP(sequence related amplified polymorphism)markers were applied in analyzing the genomes of polyembryonic ramie and their parents. The results showed that a total of 159 polymorphic bands were detected with an average of 6.8 polymorphic bands per primer pair. The genetic similarities of 48 materials ranged from 0.360 to 0.876. UPGMA cluster analysis showed that 48 materials were classified into four cluster groups with genetic similarity of 0.51 and group A was further classified into I, II and III sub-groups with genetic similarity of 0.586. There was no material showed total consistency in polymorphic bands with another, so the individuals had nothing to do with apomixis.

Key words: *Boehmeria nivea*; polyembryony; sequence related amplified polymorphism(SRAP); genetic diversity

熊和平等^[1]于 20 世纪 90 年代首次发现了苕麻的多胚现象,并筛选出了一系列多胚率高的自交和杂交品种,除了常见的双胚苗外,还有较少见的三胚苗。多胚苗不仅在苗位上呈现多态性,而且成苗后大小形态不一,只有特定起源的多胚苗材料在育种中才具有实用价值^[2];因此,在筛选和评价多胚苗材料时有必要探明多胚苗的来源。分子标记可从分子水平上研究双胚群体的遗传多样性。Li 等^[3]于 2001 年开发出了一种基于 PCR 的 SRAP (sequence

related amplified polymorphism)标记。该标记具有简便、高效、产率高、重复性好等特点,在作物育种上的表现优于 AFLP、ISSR 和 RAPD^[4-5]。SRAP 标记已成功应用于棉花、西瓜、甘蓝、甘薯、甜菜、樱桃等植物,苕麻的 SRAP 扩增体系已经过优化^[6]。笔者构建了一个以多胚苗为主体的群体,应用 SRAP 分子标记对其遗传多样性进行分析,初步揭示了该群体的遗传基础,以期苕麻品种选育、杂种优势利用提供参考。

收稿日期: 2011-03-18

基金项目: 农业部公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-018); 国家麻类产业技术体系苕麻育种岗位(CARS-19-E02)

作者简介: 温岚(1981—),女,重庆荣昌人,博士研究生,主要从事苕麻育种研究,wenlanok@gmail.com; *通信作者,ramiexhp@189.cn

1 材料与方法

1.1 材料

以国家种质资源苧麻圃中的靖西青麻(桂西南靖西县的地方栽培品种)为母本,以中苧1号(中国农业科学院麻类研究所培育的栽培品种)为父本进行杂交,收获 F_1 代杂交种,从中筛选多胚苗和单胚苗进行培养。本研究中所用的48份材料如下:母本(靖西青麻)、父本(中苧1号)、1株单胚苗(正常子代苗)、21对双胚苗和3株三胚苗(表1)。

表1 SRAP 标记的引物序列

Table 1 SRAP primers used in this study

引物名称	正向引物序列(5'-3')	引物名称	反向引物序列(5'-3')
Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	Em2	GACTGCGTACGAATTGAC
Me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	Em3	GACTGCGTACGAATTGAC
Me4	TGAGTCCAAACCGGACC	Em4	GACTGCGTACGAATTTGA
Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	Em5	GACTGCGTACGAATTAAC
Me6	TGAGTCCAAACCGGACA	Em6	GACTGCGTACGAATTGCA
Me7	TGAGTCCAAACCGGACG	Em7	GACTGCGTACGAATTCAC
Me8	TGAGTCCAAACCGGACT	Em8	GACTGCGTACGAATTCAG
Me9	TGAGTCCAAACCGGAGG	Em9	GACTGCGTACGAATTCAG
Me10	TGAGTCCAAACCGGAAA	Em10	GACTGCGTACGAATTCAT
Me11	TGAGTCCAAACCGGAAC	Em11	GACTGCGTACGAATTCTA
Me12	TGAGTCCAAACCGGAGA	Em12	GACTGCGTACGAATTCTC
Me13	TGAGTCCAAACCGGAAG	Em13	GACTGCGTACGAATTCTG
Me14	TGAGTCCAAACCGGTAG	Em14	GACTGCGTACGAATTCTT
Me15	TGAGTCCAAACCGGCAT	Em15	GACTGCGTACGAATTGAT
Me16	TGAGTCCTTTCCGGTAA	Em16	GACTGCGTACGAATTGTC
Me17	TGAGTCCTTTCCGGTCC		
Me18	TGAGTCCAAACCGGTTG		
Me19	GACCAGTAAACCGGATG		
Me20	TGAGTCCAAACCGGTGC		

1.3 多胚苗的获得

将杂交种子(F_1)置于灭菌后的湿润滤纸上,采用国产 PRX-1000B 型全自动人工气候箱培养,温度为 $28 \sim 30 \text{ }^\circ\text{C}$,相对湿度为60%,光照度为 $12\ 000 \text{ lx}$,72 h 后肉眼可见多胚苗。用尖嘴镊子挑出多胚苗,并移栽至灭菌后的湿润土壤中。移栽后环境条件不变。利用保鲜膜或玻璃盖等透光性好的材料保湿,待5叶期以后撤除,期间适时通风炼苗,使其逐渐适应自然环境,移栽后60 d 取叶片提取DNA。

1.4 SRAP 引物筛选

选择4个有代表性的材料(中苧1号、靖西青麻以及存在明显形态差异的一对双胚苗 T1 和 T2),通过正反向引物不同的组合方式,从320对SRAP引物组合中筛选多态性好(扩增条带数在4条以上)、

1.2 试剂和仪器

植物基因组DNA提取试剂盒、*Taq*酶、 $10\times Taq$ Buffer、dNTPs(2.5 mmol/L)、DNA marker III均购自北京天根生化公司。用BECKMAN DU800紫外分光光度计检测DNA的质量和浓度。PCR反应在BIO-RAD580BR上进行。用伯乐公司的Biosen SC 805凝胶成像仪记录电泳结果。SRAP引物由中国农业麻类研究所多年生麻类种质资源课题组提供,其中正向引物20条,反向引物16条,引物序列见表1。

扩增产物稳定、易于区分的引物组合。每对引物的扩增结果至少重复2次。

1.5 SRAP 反应体系及扩增程序

反应体系:PCR采用 $20 \mu\text{L}$ 反应体系,其中模板 $2 \mu\text{L}$ ($50 \text{ ng}/\mu\text{L}$),*Taq*酶 $0.4 \mu\text{L}$ ($2.5 \text{ U}/\mu\text{L}$), $10\times Taq$ Buffer $2 \mu\text{L}$,正向和反向引物各 $0.6 \mu\text{L}$ ($0.1 \text{ nm}/\mu\text{L}$),dNTPs $0.4 \mu\text{L}$ (2.5 mmol/L),补充ddH₂O至 $20 \mu\text{L}$ 。扩增程序: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性1 min; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性1 min, $36 \text{ }^\circ\text{C}$ 复性1 min, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸1 min,5个循环; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性1 min, $52 \text{ }^\circ\text{C}$ 复性1 min, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸1 min,30个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸6 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

1.6 扩增产物检测

扩增产物用2.0%的琼脂糖凝胶电泳检测,电压为 120 V ,电泳时间为20 min,用DNA marker 作

为标准相对分子质量对照，用 0.2% 溴化乙锭 (EB) 染色 5 min 后，照相并记录试验结果。

1.7 数据统计分析

仅统计有差异、易于识别的多态性条带。将在电泳图谱上清晰且可重复的条带记为“1”，同一位置上无条带的记为“0”，建立“0”和“1”组成的原始矩阵，以 Excel 5.0/95 工作簿格式保存。聚类图采用 Ntsys-PC2.10e 软件的 SHAN 程序和 UPGMA(非加权平均法)生成^[7-9]。利用软件中的 SimQual 程序计算遗传相似系数^[10-12]。

2 结果与分析

2.1 SRAP 引物筛选及扩增多态性

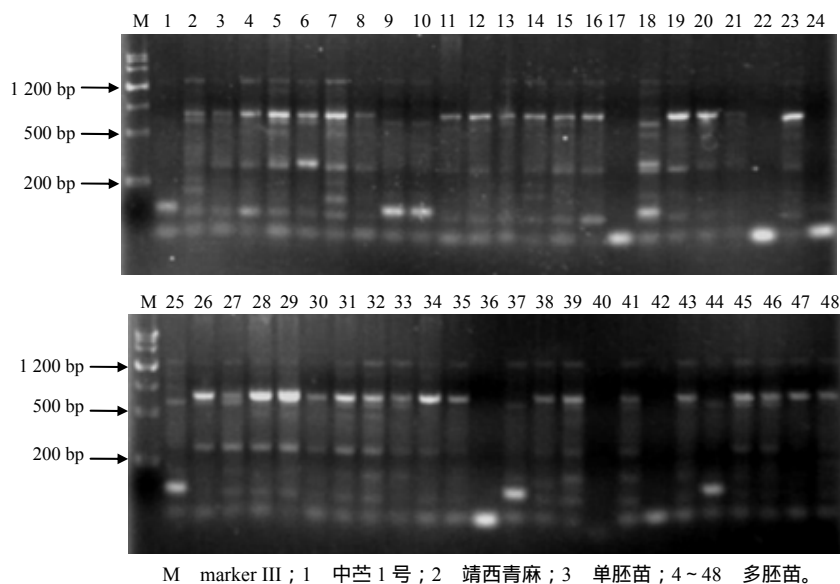
以亲本和一对双胚苗(T1 和 T2)为材料，从 320 个引物组合中共筛选出 24 对条带清晰、重复性好、多态性丰富的引物组合。利用 24 对引物组合对 48 份材料进行扩增(表 3)，共获得 251 条带，其中 159 条为稳定的多态性条带，占总条带数的 63%，显示了较高的多态性水平。扩增产物的大小为 100~1 200 bp。各引物组合扩增产生的条带数为 6~18 条，平均每个组合为 10.5 条；产生的多态性条带数为 3~14 条，平均为 6.8 条。

从图 1 可以看出，泳道 1(中苕 1 号)和泳道 2(靖西青麻)差异较大，泳道 31 和 32、45 和 46、47 和

48 各代表一对双胚苗，两两扩增结果基本一致，其余的多胚苗之间皆有不同程度的差异，引物 Em16-Me33 共扩增出 8 条具有多态性的条带，多态性比率为 67%。

表 3 24 对引物组合在 48 份材料中的扩增结果
Table 3 Amplification results for 48 experimented materials with 24 pairs SRAP primers

序号	引物组合	总带数/条	多态性	
			带数/条	比率/%
1	Em1-Me5	16	9	56
2	Em1-Me16	13	10	78
3	Em1-Me18	9	7	78
4	Em1-Me33	11	5	45
5	Em4-Me5	12	9	75
6	Em5-Me2	7	4	57
7	Em6-Me13	13	9	69
8	Em7-Me12	9	5	56
9	Em7-Me11	11	7	64
10	Em9-Me8	8	5	62
11	Em9-Me9	11	5	45
12	Em9-Me17	15	7	47
13	Em9-Me18	9	7	78
14	Em10-Me7	13	9	69
15	Em11-Me6	18	14	78
16	Em11-Me9	6	3	50
17	Em12-Me5	9	7	78
18	Em13-Me4	8	5	62
19	Em13-Me14	11	5	45
20	Em14-Me8	9	7	78
21	Em14-Me33	8	3	38
22	Em16-Me3	8	5	63
23	Em16-Me11	7	4	57
24	Em16-Me33	10	8	67



M marker III; 1 中苕 1 号; 2 靖西青麻; 3 单胚苗; 4~48 多胚苗。

图 1 引物组合 Em16-Me33 在 48 份材料中的扩增结果

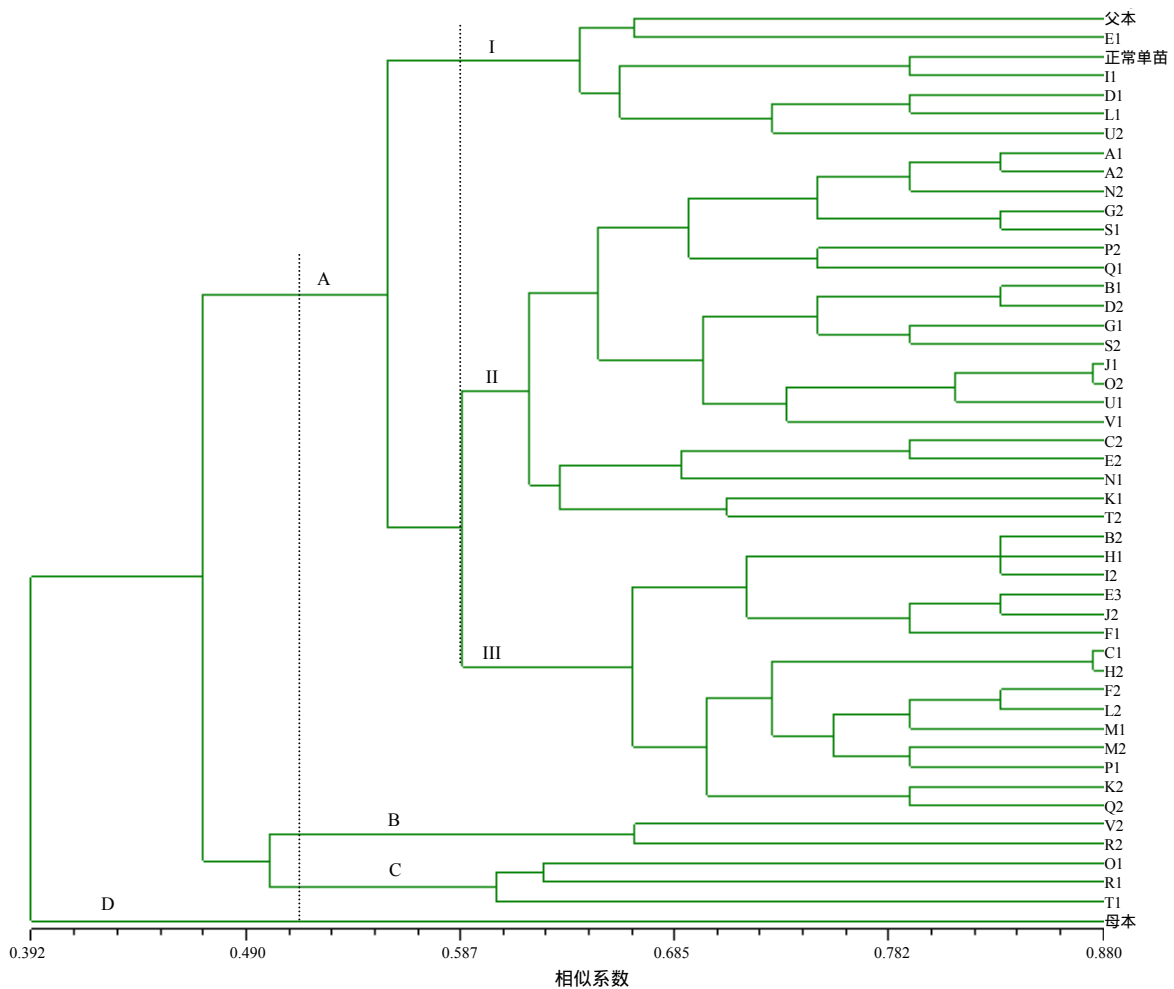
Fig.1 Amplification results in 48 materials with primer combination of Em16-Me33

2.2 48份材料之间的遗传相似系数

48份供试材料之间的遗传相似系数为0.360~0.876。J1和O2、C1和H2的遗传相似系数均高于0.860，其余样本的遗传相似系数均小于0.840。父本中苳1号和母本靖西青麻的遗传相似系数最小，为0.360，二者间亲缘关系最远，遗传相似性最低。

从图2可以看出，在遗传相似系数0.51处可将全部材料划分为A、B、C和D四类群，B群由V2和R2组成，C群由R1、T1和O1组成，D群只有母本靖西青麻。其他42份材料都集中在A群中，

在相似系数0.586处，可将A类群分为I、II和III3个亚类群，亚群I包含父本、E1、正常单胚苗、II、D1、L1和U2共7个材料。亚群II和亚群III包括了大部分双胚苗。亚群II包含了A1等20份材料，均为多胚苗，其中J1和O2的遗传相似性最高，遗传相似系数为0.876，该亚群的平均遗传相似系数为0.732。亚群III包含了B2等15份多胚苗，其中C1和H2的遗传相似较高，遗传相似系数为0.870，该亚群的平均遗传相似系数为0.765。



A₁、A₂示1对双胚苗，依次类推至V₁、V₂；E₁、E₂、E₃示3株3胚苗。

图2 48份供试材料基于SRAP遗传关系的聚类图

Fig.2 Dendrogram generated based on SRAP markers for 48 materials used in the experiment

3 结论与讨论

a.本研究以靖西青麻×中苳1号杂交收获F₁代种子，利用人工气候箱对F₁代种子进行培养，

从中筛选出21对双胚苗、3株三胚苗和1株单胚苗。利用320个SRAP引物组合对这些材料及其亲本进行遗传分析，建立了稳定的PCR扩增体系，并筛选出24个带型稳定、多态性高的引

物组合, 24 对引物组合扩增出的总条带数为 251, 其中 159 条为稳定的多态性条带。F₁ 中的 45 株多胚苗、1 株单胚苗及其亲本的遗传相似系数在 0.360~0.870, J1 和 O2、C1 和 H2 的遗传相似系数均高于 0.860, 其余样本的遗传相似系数均小于 0.840。中苕 1 号和靖西青麻的遗传相似系数最小, 为 0.360。全部材料可分为 A、B、C 和 D 四个类群, A 类群包含 3 个亚群, 表明供试材料遗传多样性较丰富。多胚苗与其亲本中没有出现扩增条带完全一致的情况, 因此本试验苕麻多胚材料不存在无融合生殖现象。

b. 本研究采用 SRAP 标记来分析苕麻多胚现象, 平均每个引物组合产生 6.8 个多态性带, 重复扩增产物稳定, 24 对引物共产生 159 条稳定的多态性条带, 占扩增总条带的 63%, 表明 SRAP 引物标记本群体多态性高, 可以用于遗传多样性分析。综合多胚苗形态与遗传相似系数分析, 发现遗传相似性最高的 J1 和 O2、C1 和 H2 在形态大小上相近; A1 和 A2, M1 和 M2 在双胚苗形态分类上属于双同型(即形态、大小相同的双胚苗)。

c. 由合子胚裂生产产生多胚, 是胚的数目增加的最简单途径, 虽然这种情况在裸子植物中常见, 但在被子植物中只偶尔发生^[13-14]。合子胚由精卵融合形成, 合子胚裂生形成的多胚在遗传组成上是相同的。从 SRAP 分子标记的结果来看, 本试验群体双胚苗和三胚苗不完全相同, 排除了由合子胚裂生产产生多胚的可能。由于胚囊内除了卵细胞受精产生的合子胚外, 胚还能从胚囊的其他部分产生, 据此推测该群体多胚苗为混生型, 即多胚由胚囊内不同类型细胞受精所形成。除卵细胞外, 最常见的多胚来源是助细胞受精成胚, 助细胞的受精能力往往与卵一样, 很容易形成胚, 其次是由胚囊中类卵细胞形成的多卵卵器, 胚囊内的另一类细胞反足细胞存在的时间较短, 反足细胞受精成胚的例子比较稀少, 仅在水稻中有少量报道^[15-16]; 因此, 本试验群体中的多胚可能为合子胚+助细胞受精成胚或合子胚+多卵卵器受精成胚 2 种类型。为明确该群体苕麻多胚的确切起源, 需借助胚胎学手段进一步研究。

参考文献:

- [1] 熊和平. 苕麻双胚苗的发现和培养[J]. 中国农业科学, 1991, 3(2): 58-61.
- [2] 江青贵. 水稻双胚材料 W3338-986 的胚胎发生和遗传研究[D]. 雅安: 四川农业大学农学院, 2007.
- [3] Li G, Quiros C F. Sequencerelated 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.
- [4] 方婷. 相关序列扩增多态(SRAP)及其在农作物遗传育种中的应用[J]. 武汉生物工程学院学报, 2009, 5(4): 305-308.
- [5] 徐美兰, 金正勋, 张海彬, 等. 7 个粳稻 SSR 和 SRAP 分子标记遗传距离比较及其与产量性状杂种优势的关系[J]. 分子植物育种, 2009, 7(6): 1084-1092.
- [6] 刘立军, 蒙祖庆, 彭定祥. 苕麻基因组 SRAP 扩增体系的优化研究[J]. 分子植物育种, 2006, 4(5): 726-730.
- [7] 李晓慧, 王从彦, 张四普, 等. 西瓜二倍体及同源多倍体 SRAP 多态性分析[J]. 分子植物育种, 2007, 5(6): 61-63.
- [8] Comlek, Simsek O, Boncuk M, et al. Genetic characterization of heat tolerant tomato (*Solanum lycopersicon*) genotypes by SRAP and RAPD markers[J]. Genet Mol Res, 2008, 9(4): 2263-2274.
- [9] 陈芸, 李冠, 王贤磊. 甜瓜种质资源遗传多样性的 SRAP 分析[J]. 2001, 32(7): 744-751.
- [10] 王长林, 郭巧生, 武玉妹. 明党参遗传多样性的 SRAP 分析[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(24): 3180-3183.
- [11] Li H, Ruan C J, Teixeira D S J. Associations of SRAP markers with dried-shrink disease resistance in a germplasm collection of sea buckthorn (*Hippophae* L.) [J]. Genome, 2010, 53(6): 447-457.
- [12] 冷春鸿, 陶正明, 吴志刚, 等. 不同产地温郁金遗传多样性的 SRAP 分析[J]. 中药材, 2009(10): 1507-1510.
- [13] Maheshwari P. An introduction to the embryology of angiosperms[M]. 陈机, 译. 北京: 科学出版社, 1981: 96-97.
- [14] 刘向东, 卢永根, 陈启锋. 多胚水稻品系 APIV 的多卵遗传行为分析[J]. 遗传, 1996, 18(5): 7-10.
- [15] 刘向东, 陈启锋, 李伟明. 作物多胚现象研究综述[J]. 福建农学院学报, 1992, 21(2): 147-156.
- [16] 黎垣庆, 袁隆平. 水稻(*Oryza sativa* L.) 双胚苗的遗传学研究[J]. 作物学报, 1990, 16(2): 138-142.

责任编辑: 杨盛强