

新型分子标记 SRAP 及其应用

海 燕¹, 何 宁², 康明辉¹, 郭景战³, 马 瑞⁴

(1. 河南省农作物新品种重点实验室, 河南 郑州 450002; 2. 河南农业大学农学院, 河南 郑州 450002;

3. 杞县农业局, 河南 杞县 475200; 4. 周口市农业局, 河南 周口 466000)

摘要: SRAP 是由 Li 和 Quiros 发展的一种新型分子标记, 该标记利用一对引物对基因组 DNA 进行扩增, 又叫一步 PCR 法。它具有操作简便、高度共显性、遍布整个基因组、便于克隆测序目标片断等特点。已经在多种植物中得到应用, 在图谱构建、遗传多样性分析、基因克隆、比较基因组学中有广阔的应用前景。

关键词: SRAP; 分子标记; 图谱构建; 遗传多样性分析; 基因克隆; 应用前景

中图分类号: Q75 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2006)09-0009-04

分子标记是近年迅速发展起来的一种技术手段, 它的出现使人们对于基因的准确检测、目标基因的准确转移成为现实。自从 1974 年 Grodzicker 创立 RFLP 技术以来^[1], 已经有多种 DNA 分子标记被创立, 并在动、植物和微生物等学科中得到了广泛的应用, 取得了令人瞩目的进展。而 RAPD 和 AFLP 是具有典型代表性的 2 种分子标记的方法。

RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA), 即随机扩增的多态性 DNA 标记, 是由 Williams (1990) 和 Welsh (1990) 2 个小组的科学家建立的一种遗传标记^[2, 3]。其特点是不依赖种属特异性和基因组结构, 合成一套引物可以用于不同生物的基因组分析; 它基于 PCR 技术, 分析程序简单, 所需 DNA 的量少, 是一类显性的遗传标记。缺点是重复性较差^[4]。

AFLP 技术的优势是避免了分子杂交的复杂过程, 灵敏度高、快速、多态性强、DNA 的用量少, 与 RAPD 比较, 它的重复性得到极大提高, 且在一次实验中可以观察到大量的 DNA 多态性片段。其不足之处是操作时间长, 步骤多, 对实验技能及仪器设备的精密度要求很高^[4, 5]。而 SRAP 是由 Li 和 Quiros 发展的一种新型分子标记, 该标记利用一对引物对基因组 DNA 进行扩增, 又叫一步 PCR 法, 它综合了 RAPD 与 AFLP 的优点, 既具有 RAPD 标记的随机性和方便性, 又具有 AFLP 的多态性高、可靠性好,

重复性高的特点, 若利用荧光标记引物, 则可以处理大量的标本而成本不高。

1 SRAP 标记的技术特点

1.1 SRAP 标记的基本原理

SRAP 技术的基本原理是通过设计的引物对 ORFs (open reading frames) 进行扩增, 上游引物对外显子进行特异扩增。下游引物对内含子区域、启动子区域进行特异扩增。因个体不同以及物种的内含子、启动子与间隔区长度不等而产生多态性。该标记具有简便、稳定、产率高、便于克隆目标片段的特点, 并已被应用于图谱构建^[6, 7]、比较基因组学^[8]和遗传多样性分析^[9, 10]。

1.2 SRAP 引物的设计

SRAP 是利用 PCR 扩增为基础的分子标记系统。因此, 对于任何以 PCR 为基础的分子标记系统引物的一般设计要求, 如: 不能有二聚体、发卡结构、GC 含量为 40%~60% 等原则, 对 SRAP 的引物设计也同样适用。

SRAP 的引物组成是由正向引物 17 个碱基, 反向引物 18 个碱基组成, 总之 2 个引物的碱基数量不能相同。正向引物由 14 个碱基组成核心序列和 3' 端的 3 个选择碱基组成。核心序列组成是由从 5' 端开始的 10 个碱基的填充序列, 然后加上 CCGG。反向引物由 15 个碱基的核心序列和 3' 端的 3 个选择

收稿日期: 2006-02-27

基金项目: 河南省科技攻关项目 (0524020009)

作者简介: 海 燕 (1957-), 女, 河南郑州人, 副研究员, 主要从事小麦单倍体育种研究。

碱基组成。同正向引物的核心序列最大的不同是由 AATT 代替 CCGG。SRAP 引物的大小是成功扩增 SRAP 条带的关键环节。Li 和 Quiros 在建立 SRAP 系统时对引物的大小进行实验发现, 引物过短, 易产生多重条带, 而且扩增子不总是一致的, 带型分布的可重复性差; 过长, 在放射自显影时显示很强的背景; 结果发现, 最适的 SRAP 引物的大小在 17 ~ 18bp。下面列举的是一组标准的引物^[9]。

- 正向引物:
- me1: 5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'
 - me2: 5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'
 - me3: 5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'
 - me4: 5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'
 - me5: 5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'
- 反向引物:
- em 1: 5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3'
 - em2: 5'-GACTGCGTACGAATTTGC-3'
 - em3: 5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'
 - em4: 5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3'
 - em5: 5'-GACTGCGTACGAATTAAC-3'
 - em6: 5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'

1.3 SRAP 的 DNA 扩增和电泳

SRAP 进行 DNA 扩增时, 前 5 个循环需要 94℃变性 1min; 35℃退火 1min, 72℃延伸 1min。然后只将退火温度提高到 50℃再进行 35 个循环的扩增。任羽等^[10]对辣椒 SRAP 的 DNA 的扩增程序进行了优化: 前 5 个循环, 94℃预变性 5min, 94℃变性 1min, 35℃复性 1 min, 72℃延伸 1min; 后 35 个循环, 94℃变性 1min, 50℃复性 1 min, 72℃延伸 1 min, 最后 72℃延伸 10min; 25μl 反应体系中, 模板量为 15ng, Mg²⁺ 扩为 2.0 mmol/L。SRAP 扩增反应结束后, 扩增产物用变性的聚丙烯酰胺凝胶分离, 然后用放射自显影检测^[5]。林忠旭等^[10]用 SRAP 标记构建棉花遗传连锁图, 任羽等^[11]建立辣椒的 SRAP-PCR 反应体系时, 扩增产物用聚丙烯酰胺凝胶 (6%, 7 mol/L 尿素) 分离, 电泳后进行银染。

2 SRAP 标记的应用

SRAP 是一种新的分子标记技术, 公开应用的时间不长, 还未被应用到生物学研究的各个领域。但该标记具有独特的优点, 因此有着良好地应用前景。目前, SRAP 标记在植物遗传图谱构建^[9]、基因克隆^[6]、遗传多样性检测^[11, 9]、比较基因组学^[10]和

杂种优势预测等方面已得到了较为广泛的应用。

2.1 构建遗传图谱

基因图谱的构建是遗传学研究中的一个重要的领域, 是对基因组进行系统性研究的基础, 也是遗传育种的依据^[12]。长期以来, 科学家们希望利用遗传图谱和遗传标记来加速植物育种进程。但是现有的分子标记技术由于多种原因的限制很难作出高密度的遗传连锁图。而 SRAP 技术操作简单、稳定、多态性高, 适用于遗传作图。林忠旭等^[7]人应用 SRAP 标记和 MAPMAKER/EXP 3.0 构建了棉花分子遗传连锁图, 237 个标记进入 39 个连锁群 (LOD≥3.0), 总长 3 030.7 cM, 覆盖整个棉花基因组的 65.4%, 标记平均间距 12.79 cM, 在整个连锁群中, 标记分布比较均匀, 没有聚集现象。潘俊松^[13]等利用此技术和 Mapmaker 3.0 构建了黄瓜的遗传连锁图谱, 77 个标记位点进入 9 个连锁群 (LOD≥3.0), 总长 1 114.2 cM, 标记平均间距 14.5 cM, 标记均匀分布于整个连锁群。

Li 利用 collard×cauliflower 形成的 RIL 86 个群体, 构建了由 130 个 SRAP、120 个 AFLP 标记组成的遗传图谱。类似 AFLP 标记, SRAP 均匀分布平衡在 9 个重要连锁群上。高频率共显性与在基因组中均匀分布的特性将使其优于 AFLP 标记而成为一个构建遗传图谱的良好标记体系。

2.2 标定基因

标定基因对于后基因组学的研究和作物育种具有重要意义。育种工作的目的是实现品种改良, 品种改良的实质就是对目的基因进行选择并实现优异基因集成的过程。因而, 实现目的基因的快速定位, 提高其选择效率, 是加快育种进程的关键。Li 和 Quiros^[6]在对 RI 系构建遗传图谱时, 用此标记成功的标注了芥子油糖苷脱饱和基因 BoGLS-A LK, 该基因在图谱的 L1 连锁群上距 SRAP133 标记 1.4cM。Li 等(2003)在大白菜中也发现了一个与雄性不育基因有关的 SRAP 标记, 在油菜中筛选到一个与 Rf 连锁的 SRAP 标记, 在芹菜中获得一个与病毒抗性基因紧密连锁的 SRAP 标记。潘俊松^[13]等人利用此技术标定了黄瓜始位花节位性状控制基因在第 IX 连锁群上, 与两侧标记 DC1EM5 和 ME7EM2A 的距离分别为 10.3 cM 和 12.1 cM。

2.3 遗传多样性分析

各种各样的生物资源是地球上人类赖以生存的基础。然而, 由于人类活动的加剧, 引起了全球环境的迅速恶化。最大限度地保护生物多样性已成为国

际社会关注的热点^[14]。随着分子生物学的迅猛发展,近年来,多种 DNA 标记技术逐步应用于濒危物种的遗传多样性研究。已有研究表明,SRAP 比 AFLP 更能反映表型的多样性及进化历史^[9]。Riaz 等^[15]用 SRAP 技术鉴定油菜的保持系和恢复系的遗传多样性,通过计算相似系数和遗传距离,然后进行聚类分析,结果 10 个保持系和 12 个恢复系被划分为三大类群,只有保持系 PM5、PM9 落在这 3 个类群之外。几乎和传统的系谱分类一致。于拴仓^[16]采用 1 对 SRAP 引物对 10 个加工番茄品种进行了分子鉴别的研究,产生了 7 个多态性位点。Ferriol 等^[9]用此技术评价 69 份西葫芦的遗传多样性,将其分成 2 个亚种 8 个生态型,并用 AFLP 标记比较,发现 SRAP 在生态型变异性和生态型进化史上比 AFLP 更具有-致性。林忠旭^[10]用 SRAP 标记对 11 个陆地棉材料进行遗传多样性检测。30 个引物组合中,每个引物组合可检测到 30 个左右的等位基因。15 个引物组合(50%)具有多态性,产生 22 个多态性基因位点,显示了较高的引物多态性比率。潘庆华^[17]选择 27 个广东省地区特异性宗谱菌株,进行了基于 SRAP 标记的第 2 次分子指纹分析,结果发现,这些菌株具有丰富的遗传多样性。吴伟怀^[18]、胡铁柱^[19]等也利用 SRAP 标记对稻瘟病菌群体进行了研究。

2.4 植物基因组比较作图

比较作图就是利用共同的遗传标记(主要是分子标记、基因的 cDNA 克隆以及基因组克隆)对相关物种进行物理或遗传作图,比较这些标记在不同物种基因组中的分布情况,提示染色体或染色体片段上的同线性(Synteny)或共线性(Collinearity),从而对不同物种的基因组结构及基因组进化历程进行精确分析。比较作图的分子基础是物种间 DNA 序列尤其是编码序列的保守性。Li^[8]利用 SRAP 标记研究了甘蓝和拟南芥的基因组,发现染色体片断比整个染色体组更具有共线性,说明在进化上可能是由于染色体的倒位、缺失或插入造成的。于拴仓^[20]等利用 SRAP 标记技术对栽培番茄与秘鲁番茄种间杂种的 DNA 进行了指纹鉴定,分析亲本及杂交后代间的遗传差异性和相似性。

3 展望

对于任何一种分子标记技术,都有自己的特点。但是要成为理想分子标记,需要具备如下的条件(1)具有高的多态性;(2)共显性遗传,即利用分子标记

可鉴别二倍体中杂合和纯合的基因型;(3)能明确辨别等位基因;(4)遍布整个基因组;(5)除特殊位点的标记外,要求分子标记均匀分布于整个基因组;(6)选择中性(无基因多效性);(7)检测手段简单、快速;(8)开发成本和使用成本尽量低廉;(9)重复性较好^[21]。

SRAP 分子标记系统最早是在芸薹属作物开发出来的,它符合上面理想分子标记的大部分条件,目前看来,它是一种比较理想的分子标记系统。已在其他作物如马铃薯、水稻、生菜、油菜、大蒜、苹果、樱桃、柑橘与芹菜中也成功应用^[6,22]。在 SRAP 建立时,是利用同位素(³²P-ATP)标记对引物进行标记检测的^[6]。现在可以同时利用 3 种荧光物质对引物进行标记,实现了对 PCR 扩增产物分析的自动化。随着 DNA 提取技术和利用毛细管进行电泳的自动化发展,SRAP 技术在分子标记辅助育种中是最有可能被大规模进行实际应用的一种技术。

参考文献:

[1] BOSTEIN B, WHITE R L, SKOLNICK M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *Am J Hum Genet*, 1980, 31: 314—331.

[2] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18 (22): 6531—6535.

[3] Welsh J, Mc Clelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(24): 7213—7218.

[4] 宋育红. RAPD 与 AFLP 分子标记的研究应用进展 [J]. *三明高等专科学校学报*, 2003, 20(2): 57—61.

[5] 李珊, 赵桂仿. AFLP 分子标记及其应用[J]. *西北植物学报*, 2003, 23 (5): 830—836.

[6] 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.

[7] 林忠旭, 张献龙, 聂以春, 等. 棉花 SRAP 遗传连锁图构建[J]. *科学通报*, 2003, 48(15): 1676—1679.

[8] Li G, Gao M, Yang B, *et al.* Gene for gene alignment between the Brassica and Arabidopsis genomes by direct transcriptome mapping[J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107 (1): 168—180.

[9] Ferriol M, Pico B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of Cucurbita pepo using SRAP and AFLP markers[J]. *Heor Appl Gene*, 2003, 107: 271—282.

玉米抗旱性遗传育种研究进展

王金召, 韩燕丽, 贾耀军, 乔旭, 张明友, 刘软枝
(郑州市农林科学研究所, 河南 郑州 450005)

摘要: 介绍了玉米抗旱性遗传育种研究的进展情况, 并针对玉米抗旱育种目标、种质资源利用, 第 2 类性状的选择及分子标记技术在玉米抗旱性遗传育种方面的应用前景提出了一些看法。

关键词: 玉米; 抗旱性; 遗传; 育种

中图分类号: S513 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2006)09-0012-03

我国是世界上主要的干旱国家之一, 干旱半干旱土地约占国土面积的 47%, 其中干旱、半干旱耕地面积占耕地总面积的 51%。景蕊莲认为, 我国农业受干旱面积逐年增加, 每年因干旱损失粮食 700~800 亿 kg 以上^[1]。玉米是我国主要的粮食和饲料作物, 常年种植面积 2 400 万 hm², 玉米生产对我国粮食及畜牧业的发展起着非常重要的作用。胡瑞法对限制我国玉米生产发展的自然因素、技术因素和社会经济因素进行综合分析认为, 干旱是限制我国玉米生产发展和产量提高的第一要素。干旱对玉米产量影响达 20%~50%, 解决干旱问题可能的有效途径是科研活动, 同时指出, 通过选育抗旱性品种等途径完全有可能大幅度降低由于干旱造成的玉米产量损失^[2]。

1 玉米抗旱性遗传研究

玉米抗旱性是受多基因控制的数量性状已被认可。黎裕等认为, 抗旱性与产量是由 2 个不同的遗传网络控制的, 育种工作需要对 2 个遗传系统进行综合考虑^[3]。霍仕平认为, 在遗传行动上, 抗旱性主要表现为加性效应, 这就是说抗旱性是可以遗传的, 对其进行选择是有效的^[4]。王泽立等指出, 玉米基因型间存在着广泛的抗旱性遗传变异, 在不同水分梯度下玉米单株产量以加性效应为主^[5]。于海秋等研究表明, 产量性状在不同水分环境下的遗传特点存在一致性, 对其遗传改进和产量潜力的选择宜在无胁迫条件下进行, 以防止水分胁迫对玉米植株造成生长发育和生殖细胞双重胁迫而影响研究

收稿日期: 2006-03-23
作者简介: 王金召(1970-), 男, 河南宁陵人, 助理研究员, 本科, 主要从事玉米育种和栽培研究工作。

[10] 林忠旭, 张献龙, 聂以春. 新型标记 SRAP 在棉花 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.

[11] 任羽, 王得元, 张银东, 等. 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.

[12] 何风华. DNA 分子标记及其在植物遗传育种上的应用[J]. 生物学教学, 2004, 29(1): 8-9.

[13] 潘俊松, 王刚, 李效尊, 等. 黄瓜 SRAP 遗传连锁图的构建及始花节位的基因定位[J]. 自然科学通报, 2005, 15(2): 167-172.

[14] 季维智, 宿兵. 遗传多样性研究的原理与方法[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1999.

[15] A Riaz, G Li, Quresh Z. Genetic diversity of oilseed *Brassica napus* inbred lines based on sequence related amplified polymorphism (SRAP) and its relation to hybrid performance[J]. Plant Breeding, 2001, 120(5): 411-415.

[16] 于拴仓, 柴敏, 姜立纲. 10 个加工番茄品种的分子鉴别[J]. 西北农业学报, 2005, 14(1): 17-22.

[17] 潘庆华, 胡铁柱, 王玲, 等. 稻瘟病菌群体的分子遗传学研究(广东地区特异性宗谱菌株的分子指纹和致病型分析)[J]. 中国农业科学, 2004, 37(1): 57-64.

[18] 吴伟怀, 王玲, 程贯忠, 等. 稻瘟病菌群体的分子遗传学研究(广东省与云南省稻瘟病菌群体遗传及致病型结构的比较分析)[J]. 中国农业科学, 2004, 37(5): 675-680.

[19] 胡铁柱, 王玲, 蔡江桥, 等. 稻瘟病菌群体的分子遗传学研究(由 5 个亚群体组成的广东省稻瘟病菌群体遗传结构的分析)[J]. 中国农业科学, 2003, 36(12): 1476-1483.

[20] 于拴仓, 柴敏, 赵泓, 等. 栽培番茄与秘鲁番茄种间杂种的 DNA 指纹鉴定[J]. 分子植物育种, 2005, 3(1): 61-65.

[21] 刘玉勇. 分子标记及其应用[J]. 生物学教学, 2003, 28(5): 36.

[22] 柳李旺, 龚义勤, 黄浩, 等. 新型分子标记——SRAP 与 TRAP 及其应用[J]. 遗传, 2004, 26(5): 777-781.