

与甜椒隐性细胞核雄性不育基因紧密连锁的 SRAP 分子标记的研究

严慧玲¹, 范妍芹¹, 严立斌¹, 赵付江¹, 周龙海²

(1. 河北省农林科学院 经济作物研究所, 河北 石家庄 050051; 2. 河北省邯郸市林业局, 河北 邯郸 056001)

摘要: 以甜椒隐性细胞核雄性不育两用系 AB91 为材料, 采用混合集群分析法 (BSA) 构建了不育池与可育池。利用 SRAP 分子标记技术, 筛选了 225 对 SRAP 引物组合及 1 393 对 *EcoR* I 和 *Mse* I 引物组合, 获得了与隐性核不育基因连锁的 2 个 SRAP 标记: E37M39、E44M93, 片段长度约为 200 bp 和 500 bp, 与育性基因的遗传距离为 6 cm 和 12 cm。

关键词: 甜椒; 两用系 AB91; 隐性核不育基因; SRAP 标记

中图分类号: S641.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)04-0042-04

SRAP Markers Linked to Recessive Genic Male Sterile Gene in Sweet Pepper (*Capsicum annuum* L.)

YAN Hui-ling¹, FAN Yan-qin¹, YAN Li-bin¹, ZHAO Fu-jiang¹, ZHOU Long-hai²

(1. Institute of Economic Crops, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China; 2. Handan Forestry Office, Handan 056001, China)

Abstract: SRAP biotechnology combining with bulked segregation analysis (BSA) was used to identify the molecular markers linked to recessive genic male sterile gene in a dual purpose line AB91 of *Capsicum annuum* L. A total number of 256 SRAP primer combinations and 1 393 *EcoR* I -*Mse* I primer combinations were used, and two SRAP markers E37M39 and E44M93 were identified to be linked to the recessive genic male sterile gene. The length was about 200 bp and 500 bp, and the genic distance was 6 cm and 12 cm respectively.

Key words: Sweet pepper; Dual purpose line AB91; Recessive genic male sterile gene; SRAP marker

杂种优势的利用为甜椒种子生产创造了巨大的经济效益, 而甜椒一般是采用自交系通过人工去雄生产杂交种子。由于甜椒花蕾较小, 人工蕾期去雄、授粉等操作难度大, 工序复杂, 造成杂交种生产成本低, 且杂交种子的纯度无法保证。研究和利用甜椒雄性不育系生产杂交种子可以有效的解决这一难题。

细胞核雄性不育两用系 AB91 由河北省农林科学院经济作物研究所选育, 其群体分别有 50% 的不育株和 50% 的可育株, 且不育性状由一对隐性核不育基因控制并可以稳定遗传。该两用系用于杂交制种时可以根据花器标记性状在花期拔除可育株, 但在苗期无法识别不育株, 这样在杂种生产中得多种植一倍的秧苗。寻找与雄性不育基因紧密连锁的分子标记, 利用分子标记辅助选择技术可以在苗期对

不育株进行早期鉴别, 减少定植株数, 也可不育基因的转育和不育基因克隆创造条件。相关序列扩增多态性 (Sequence-related amplified polymorphism, SRAP) 是一种新型的基于 PCR 的标记技术^[1]。该标记具有简便、稳定、中等产率、便于克隆测序目标片段的特点, 且引物易于获得, 成本低廉, 优于 RFLP、RAPD、SSR 和 AFLP 等传统分子标记方法。目前, 该标记技术已用于多种植物的遗传图谱构建、比较基因组学和遗传多样性分析等^[2-11]。

本研究以雄性不育两用系 AB91 为试材, 筛选与隐性核不育基因紧密连锁的 SRAP 分子标记, 旨在为加快甜椒隐性核不育材料的转育及利用创造条件。

收稿日期: 2011-05-14

基金项目: 国家“863”计划项目 (2006AA100108); 国家科技支撑计划项目 (2008BADB1B04); 河北省科技支撑计划项目 (11220102D-4)

作者简介: 严慧玲 (1978-), 女, 湖北武汉人, 助理研究员, 博士, 主要从事蔬菜育种方面的研究。

通讯作者: 范妍芹 (1961-), 女, 山西围留人, 研究员, 主要从事蔬菜育种方面的研究。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料为甜椒细胞核雄性不育两用系 AB91, 其不育株基因型为 *msms*, 可育株基因型为 *MSms*、*MSMS*; 利用两用系 AB91 群体中的不育株与父本自交系杂交后自交 F_2 群体, 于初花期逐株调查群体中各单株的育性并挂牌标记。

1.2 甜椒总 DNA 的提取

取植株上部的嫩叶, 采用 CTAB 小量提取法^[12]提取两用系 AB91 及自交 F_2 群体各单株的总 DNA。用 1.5 mL Eppendorf 管盖扣取相同大小的新鲜叶片, 加入 650 μ L CTAB 提取缓冲液, 研磨 3 min 至叶片粉碎; 65 $^{\circ}$ C 水浴 1 h; 冷至室温, 加入 650 μ L 的氯仿: 异戊醇 (24:1), 上下轻轻颠倒混匀 10 min; 13 000 r/min 离心 10 min; 吸取上清液 400 μ L, 放入预先加好 700 μ L 冷无水乙醇的 1.5 mL 离心管中, 轻轻上下颠倒混匀, 13 000 r/min 离心 10 min; 弃上清液, 加入 1 mL 75% 乙醇清洗 DNA 沉淀, 室温放置 5 ~ 10 min, 13 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液; 加入 100 μ L 0.1 \times TE (内含 1.5 μ L 10 mg/mL RNaseA), 混匀, 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h; 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量和浓度。

1.3 SRAP 标记

SRAP 引物采用 Wang 等^[13]发表的引物, 225 对 SRAP 标准引物在上海生物工程技术服务有限公司合成。PCR 反应体系参照任羽等^[14]的报道, 并根据试验条件进行适当优化。PCR 体系为: DNA 模板 30 ng、引物各 30 ng、0.2 mmol/L dNTPs、1 \times PCR Buffer、2 mmol/L $MgCl_2$ 、1U *Taq* 酶, 总体积为 20 μ L, 不足部分用 ddH_2O 补充。PCR 扩增在 Biometra T-Gradient PCR 仪上进行, 程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 35 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 50 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 8 $^{\circ}$ C 保存。电泳系统采用北京君意的测序电泳槽, 扩增产物用 6% 的变性聚丙烯酰胺胶电泳检测, 70 W 恒功率电泳 90 min, 电泳后银染观察。在本研究中, 除了筛选 225 对 SRAP 标准引物外; 还采用 *EcoR* I 和 *Mse* I 引物随机组合, 使用 SRAP 的扩增程序进行标记筛选。

1.4 混合集群分析 (BSA) 集团的构建及群体分析

根据初花期育性调查结果, 选取 20 个可育单株和 20 个不育单株, 各取 10 株将它们的总 DNA 等量混合, 构建两个不育池和两个可育池: F1、F2、S1、

S2。利用引物组合对 4 个 DNA 池进行 PCR 扩增, 存在多态性的引物经多次检验后, 再对建池单株进行 PCR 扩增和电泳检测, 计算遗传距离。用自交 F_2 群体对筛选获得的 SRAP 标记进行准确率验证。

1.5 遗传距离分析

用获得的 SRAP 标记, 对建池单株的育性表型和分子标记的有无进行分析, 统计数据, 利用 Map Maker 3.0 计算遗传连锁距离。

2 结果与分析

2.1 甜椒 AB91 两用系及自交 F_2 群体育性调查统计

田间种植甜椒 AB91 两用系和自交 F_2 分离群体分别 84, 140 株, 开花后观察植株育性。经调查 AB91 两用系群体中, 可育株 40 株, 不育株 44 株, 可育株与不育株分离比例符合 1:1 的理论值 ($\chi^2 = 0.428 < \chi_{0.05, 1}^2 = 3.84$)。经调查自交 F_2 群体中, 可育株 97 株, 不育株 43 株, 可育株与不育株分离比例符合 3:1 的理论值 ($\chi^2 = 1.208 < \chi_{0.05, 1}^2 = 3.84$)。

2.2 引物筛选结果

利用构建的 4 个可育与不育 DNA 池进行了 PCR 扩增, 共筛选了 225 对 SRAP 标准引物、1 393 对 *EcoR* I 和 *Mse* I 引物组合。获得 2 个与甜椒隐性核不育基因连锁的 SRAP 标记: E37M39 (200 bp 左右)、E44M93 (约 500 bp)。E37M39 标记在不育池中有特异带, 而在可育池中无特异带; E44M93 标记在可育池中有特异带, 而在不育池中无特异带。

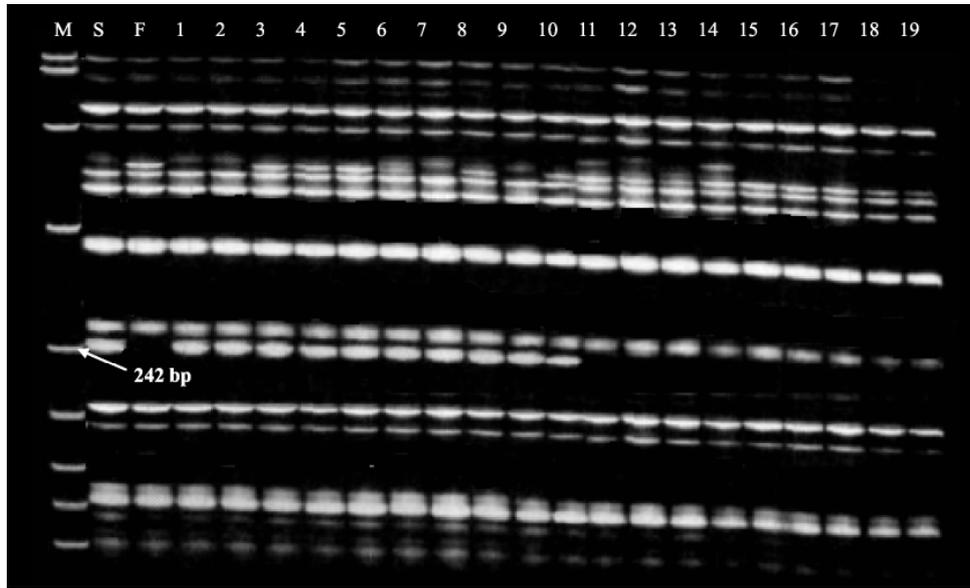
2.3 多态性标记的验证及连锁距离的确定

通过对建池群体 84 个单株的验证, E37M39 标记在绝大多数不育单株中出现特异条带, 在大部分可育单株中没有出现该标记 (图 1)。不育有此标记: 不育无此标记: 可育有此标记: 可育无此标记的比值为 41:3:2:38。E44M93 标记在绝大多数可育单株中有特异带, 而在大部分不育单株中无特异带 (图 2)。可育有此标记: 可育无此标记: 不育有此标记: 不育无此标记 = 36:4:6:38。

利用 JoinMap3.0 软件分析, E37M39 标记、E44M93 标记与隐性核不育基因 *ms* 的连锁距离分别为 6, 12 cM, 连锁较为紧密。

2.4 SRAP 标记在自交 F_2 群体中的验证

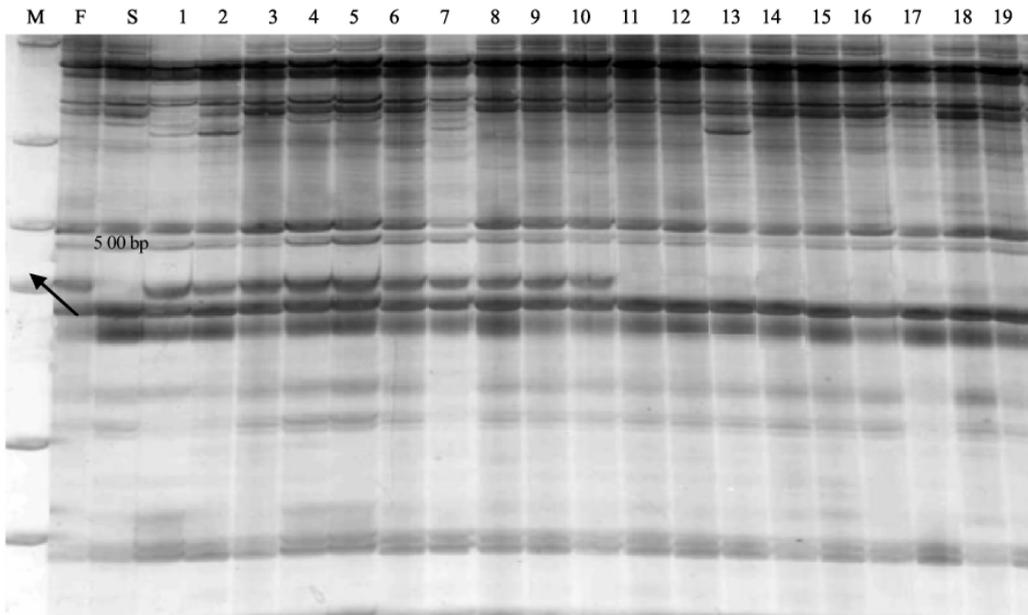
通过田间鉴定, 在包含 140 个单株的 F_2 群体中有 97 个可育株, 43 个不育株, 提取各个单株的 DNA 用于检测 SRAP 标记 E37M39、E44M93 标记的有效性。E37M39 标记在 37 个不育株中有带, 94 个可育株中无带, 准确率达 93.57%; E44M93 标记在 35 个不育株中无带, 89 个可育株中有带, 准确率为 88.57%。



S. 不育池;F. 可育池;1~10. 不育单株;11~19. 可育单株;M. pUC18 DNA/*Msp* I 分子量标准;箭头表示不育单株出现的特异带。
S. Sterile pool;F. Fertile pool;1-10. Sterile plants;11-19. Fertile pool;M. pUC18DNA/*Msp* I Marker. The arrow shows the specific band from the sterile plant.

图1 E37M39 标记在部分 AB91 单株中的验证

Fig.1 Validation of E37M39 in some AB91 plants



F. 可育池;S. 不育池;1~10. 可育单株;11~19. 不育单株;M. 分子量标准;箭头表示可育单株出现的特异带。
F. Fertile pool;S. Sterile pool;1-10. Fertile plants;11-19. Sterile pool;M. Marker. The arrow shows the specific band from the fertile plant.

图2 E44M93 标记在部分 AB91 单株中的验证

Fig.2 Validation of E44M93 in some AB91 plants

3 讨论

细胞核雄性不育两用系 AB91 由河北省农林科学院经济作物研究所选育,其育性由一对隐性核不育基因控制,对该不育源已从雄性不育遗传机制^[15]、细胞学^[16]、生理生化^[17]等方面进行了研究,而分子生物学方面的研究尚未涉及。本研究获得了 2 个与不育基因连锁的 SRAP 标记,E37M39 标记与

不育基因相引向存在,E44M93 标记与不育基因相斥向存在。这两个标记在群体验证中的符合率达 88% 因此可利用这两个标记在苗期找到含有目标基因的个体,对不育株进行早期鉴别,在杂交种子生产中减少定植株数,降低成本,还可加快育种进程,缩短育种年限,提高育种效率。

SRAP 标记是由 Li 和 Quiros 发展的一种新的分子标记技术。他们针对基因外显子中 GC 含量丰富

而启动子、内含子里 AT 含量丰富的特点来设计引物进行 PCR 扩增,因不同个体的内含子、启动子与间隔区长度不等而产生多态性。

本研究为了拓宽 SRAP 引物的来源,除了使用已公开发表的 225 对 SRAP 标准引物外,还采用 *EcoR* I 和 *Mse* I 引物随机组合,用 SRAP 反应体系及扩增程序进行扩增。结果发现,这些 PCR 产物在 6% 的变性聚丙烯酰胺胶上也可清楚地统计 100 ~ 400 bp 的电泳条带。这与张新梅等^[18]在甘蓝研究上的结果一致。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Ferriol M, Pico B, Nuez F. Genetic diversity of method for extraction of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 271 - 282.
- [3] Budak H, Shearman R C, Parmaksiz I, et al. Molecular characterization of buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108: 328 - 334.
- [4] 陈 锋, 张洁夫, 陈 松, 等. 甘蓝型油菜隐性核不育基因的 SRAP 标记 [J]. *江苏农业学报*, 2007, 23 (4): 283 - 288.
- [5] 赵 娟. 辣椒分子连锁图谱的构建及抗黄瓜花叶病毒 QTL 定位 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2009.
- [6] 原玉香, 张晓伟, 孙日飞, 等. 大白菜遗传图谱的构建及与染色体关联分析 [J]. *华北农学报*, 2010, 25 (3): 80 - 86.
- [7] 赵胜杰, 刘文革, 阎志红, 等. 西瓜种质资源遗传差异的 SRAP 和 EST-SSR 分析 [J]. *华北农学报*, 2010, 25 (3): 76 - 79.
- [8] 郭大龙, 侯小改, 张 静, 等. 牡丹 SRAP 反应体系的建立及正交设计优化 [J]. *河南农业科学*, 2008 (12): 110 - 113.
- [9] 伊艳杰, 胡 楠, 刘红颜, 等. 小麦抗白粉病基因 SRAP 标记的鉴定及序列分析 [J]. *河南农业科学*, 2007 (3): 60 - 62.
- [10] 郝晓芬, 王节之, 王根全, 等. 利用 AFLP 技术对谷子光敏雄性不育基因进行分子标记 [J]. *山西农业科学*, 2009, 37 (11): 3 - 5, 10.
- [11] 张福耀, 钱章强. 关于西非高粱细胞质中含有 A₂ 雄性不育可育基因的论证 [J]. *山西农业科学*, 1995, 23 (3): 7 - 8.
- [12] Murray H G, Thompson W F. Rapid isolation of higher weight DNA [J]. *Nuel Acids Res*, 1980, 8: 4321.
- [13] Wang G, Pan J S, Li X Z, et al. Construction of a cucumber genetic linkage map with SRAP markers and location of the genes for lateral branch traits [J]. *Science in China: Series C Life Sciences*, 2005, 48 (3): 213 - 220.
- [14] 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.
- [15] 范妍芹, 刘 云, 严立斌. 甜椒雄性不育系 AB₉₁ 的遗传特性及杂优利用研究 [J]. *河北农业科学*, 2004, 8 (4): 26 - 29.
- [16] 罗双霞, 范妍芹, 申书兴, 等. 甜椒雄性不育两用系小孢子发育的显微观察 [J]. *华北农学报*, 2006, 21 (2): 99 - 103.
- [17] 李运朝, 范妍芹, 郭 锋, 等. 甜椒雄性不育两用系 AB₉₁ 不育株与可育株花药同工酶分析 [J]. *植物遗传资源学报*, 2007, 8 (1): 102 - 105.
- [18] 张新梅, 武 剑, 郭蔼光, 等. 甘蓝显性雄性不育基因 CDMs399-3 紧密连锁的分子标记 [J]. *中国农业科学*, 2009, 42 (11): 3980 - 3986.