

红椿 SRAP 反应体系优化及引物筛选

李培¹, 阙青敏¹, 王芳¹, 李俊成¹, 朱芹², 廖柏勇¹, 陈晓阳^{1*}

(1. 华南农业大学林学与风景园林学院 广东省森林植物种质创新与利用重点实验室, 广东 广州 510642;

2. 嘉应学院, 广东 梅州 514015)

摘要: [目的] 优化相关序列扩增多态性(SRAP)体系内的不同组分, 建立适用于红椿 SRAP 分子标记的反应体系, 并进一步从 SRAP 引物组合中筛选出稳定、多态性好的引物组合, 为红椿遗传多样性研究奠定试验基础。[方法] 针对 SRAP-PCR 反应体系中 5 个因素各设置 8 个水平, 先利用单因素试验确定浓度梯度, 后在确定的梯度范围内选定 4 个水平, 按照正交试验 $L_{16}(4^5)$ 进行优化, 结合正交直观分析法和新复极差法对各因素进行优化筛选。[结果] 确定最优体系为总体积 25 μL , 模板 DNA 25 ng, 上下游引物各 0.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, *Taq* DNA 聚合酶 1U, Mg^{2+} 2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, dNTP 0.3 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。利用稳定的 SRAP-PCR 体系, 从 1 505 对 SRAP 引物组合中筛选出 30 对优质引物组合。[结论] 通过不同种源红椿基因组 DNA 的重复验证, 获得了稳定清晰、多态性较强的扩增条带, 表明所确定的最优体系稳定可靠, 适用性较强, 可用于不同种源红椿遗传多样性研究的后续实验。

关键词: 红椿; SRAP 分子标记; 反应体系; 引物筛选

中图分类号: S817.46

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2017)01-0010-08

Optimization and Primers Selection of SRAP-PCR System in *Toona ciliata* Roem.

LI Pei¹, QUE Qing-min¹, WANG Fang¹, LI Jun-cheng¹, ZHU Qin², LIAO Bo-yong¹, CHEN Xiao-yang¹

(1. Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm, College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China; 2. Jiaying University, Meizhou 514015, Guangdong, China)

Abstract: [Objective] To optimize the different components of sequence-related amplified polymorphism (SRAP) and to establish suitable SRAP-PCR system for *Toona ciliata* Roem., and to select high-stability polymorphic band SRAP primer combinations. [Method] The experiment basis for genetic diversity of *T. ciliate* was established. Five factors each with eight concentration levels were screened to the suitable concentration range in the PCR reaction system using single factor experiment. After that, four levels were selected in each range of the five factors. The orthogonal experiment of $L^{16}(4^5)$ was carried out for optimization. Combining with orthogonal design-direct analysis and SSR to optimize these factors and the optimized system was determined. [Result] The optimal SRAP-PCR system was established, containing 25 ng template DNA, 0.3 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ each dNTP, 0.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ each primer, 2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ each Mg^{2+} and 1 U *Taq* DNA polymerase in a total volume of 25 μL . 30 primer combinations were selected from 1 505 s using the stability of the PCR system. [Conclusion] Through repeated validations using DNA of different *T. ciliata* provenances, the clear polymorphic bands were obtained. The result showed that the optimal SRAP-PCR system can be used for the follow-up experiments on *T. ciliata* genetic diversity research in virtue

收稿日期: 2016-02-29

基金项目: 国家林业局林业公益性行业科研专项(201004020)。

作者简介: 李培, 博士, 主要研究方向: 林木遗传育种。电话: 15920837987。E-mail: lpei-meinv@163.com。地址: 广州市天河区五山路华南农业大学林学与风景园林学院 614, 邮编: 510642。

* 通讯作者: 陈晓阳, 博士, 教授。主要研究方向: 林木遗传育种。电话: 020-85280001。E-mail: zhb02226@163.com 地址: 广州市天河区五山路华南农业大学林学与风景园林学院 620, 邮编: 510642。

of its stable, reliable, and good applicability.

Keywords: *Toona ciliata* Roem. ; SRAP-PCR; reaction system; optimization

在林木遗传育种研究中,分子标记是使用最广泛的一种遗传标记类型,因其不受发育时期及环境或季节性的制约,被广泛地被运用于遗传多样性、分子遗传育种等研究中^[1-2]。SRAP(Sequence-related amplified polymorphism)即相关序列扩增多态性是一种新型分子标记技术,其基础来源于 PCR 扩增反应,通过对基因的开放阅读框(ORFs)中相对保守的外显子区域及变异丰富的内含子及启动子区域进行扩增,获得物种或个体之间的遗传差异与分化^[3-4]。该分子标记采用的是双引物设计,因其简便、高效、产率高等特点,使该标记成功地应用于遗传多样性分析、遗传图谱的构建等分子研究方面的分析^[5-8]。

红椿(*Toona ciliata* Roem),又名红楝子,是楝科(Meliaceae)香椿属(*Toona*)速生植物。该树种材质优良,纹理优美,由于其木材呈现红色,坚韧耐腐,常作为高档家具用材出口国际,开发潜力巨大,被誉为“中国桃花心木”^[9-10]。由于环境的变化、天然更新能力较差、过度的人为破坏及需求量的不断增加,红椿数量在持续减少,已成为珍贵的濒危树种,被列为国家Ⅱ级重点保护野生植物。红椿在印度、老挝、缅甸、泰国、巴基斯坦至澳大利亚东海岸也有天然分布^[11],并在世界多地进行了引种^[12]。在我国集中分布在华南、华中、华东及西南地区,呈零星或散点分布^[13]。一个物种生存或者适应环境,获得发展和进化的依靠前提是其自身所具有的遗传多样性^[14]。研究红椿的遗传多样性对其选择育种、遗传资源的保护具有重要的理论和实践意义。

本研究采用单因素试验及正交试验对 SRAP-PCR 体系中的 5 大因素,包括模板 DNA、引物、*Taq* DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 及 dNTP 进行优化,旨在确定最优的稳定反应体系,并从随机引物组合中筛选出能够扩增稳定、清晰且含有多态性条带的最优引物组合,为进一步开展红椿遗传多样性研究、种质资源鉴定及遗传育种奠定基础,提供技术支持。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

以不同种源红椿母树叶片作为试材,于采集地收集并利用硅胶迅速干燥,置于实验室 -80°C 冰箱用于后续 DNA 提取。用于引物筛选的种源包括云

南永仁、贵州望谟、四川会东、广东乐昌、江西宜丰、安徽黄山、福建南平及湖南城步。种源信息见表 1。

表 1 红椿 SRAP-PCR 体系优化试验材料
Table 1 Experimental material of *T. ciliata* for optimizing SRAP-PCR system

编号 No.	种源代码 provenance	省份 province	纬度 latitude/N	经度 longitude/E	海拔 altitude
P1	乐昌	广东	25°07'	113°20'	359
P2	黄山	安徽	30°16'	118°08'	499
P3	望谟	贵州	25°10'	106°05'	500
P4	永仁	云南	25°01'	101°32'	1 539
P5	宜丰	江西	27°19'	115°26'	337
P6	城步	湖南	27°14'	111°28'	737
P7	南平	福建	26°38'	118°10'	800
P8	会东	四川	27°23'	102°09'	1 862

1.2 试验方法

1.2.1 红椿基因组 DNA 的提取 取 100 mg 干燥叶片做样品,首先利用 CTAB free 溶液($0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, pH = 8.0)对样品进行低温洗涤,去除杂质^[15-16]。后采用 EZNA[®] High-Performance DNA Mini Ki 试剂盒提取红椿基因组 DNA。使用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳及超微量紫外分光光度计(Thermo NanoDrop 1000)进行检测。稀释至 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,样品置于 -20°C 下保存备用。

1.2.2 PCR 反应单因素浓度梯度确定 首先对反应体系的 5 大因素,即,模板 DNA、引物、*Taq* DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 及 dNTP 进行单因素试验。每个影响因素分别设置 8 个梯度。模板 DNA 浓度包括 0、25、50、60、70、80、90 和 100 ng;引物浓度包括 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 和 0.7 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; *Taq* DNA 聚合酶包括 0、0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75 和 2 U; Mg^{2+} 浓度包括 0、1、1.5、2、2.5、3、3.5 和 4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; dNTP 浓度梯度包括 0、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35 和 0.4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2.3 反应体系正交试验 进行单因素试验确定 5 大因素浓度范围后,在其范围内选定 4 个水平浓度梯度(表 2),采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计(表 3),共 16 个处理,每个处理选用不同种源 DNA 进行 2 次重复。根据所扩增出的电泳条带的多少、清晰度及背景颜色,对 16 个处理进行评分^[17-18]。最优的得 16 分,最差的得 1 分,两次重复取平均分为该处

理水平扩增结果的最终得分。后计算每个因素在不同水平下的平均得分,进行统计分析后获得极差。在某水平下某因素所参与的扩增反应所得到的扩增结果评分的总和用K值表示;R表示为极差,即,某试验因素在不同处理水平下所得到评分的最大平均值与最小平均值之差^[19]。红椿 SRAP 分子标记反应总体体系选用为 25 μL (均含有 2.5 μL 10 \times Buffer, 用重蒸水补齐体系),引物选用 M22(TGA GTA CAA ACC GG GTC)E27(GAC TGC GTA CGA ATT CCA)。

表2 正交试验各因子水平设计

Table 2 The design of factors and the levels for orthogonal experimental

因子 factor	水平 level			
	1	2	3	4
Taq 酶/U	1	1.25	1.5	1.75
$\text{Mg}^{2+}/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	1.5	2	2.5	3
dNTP/ $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	0.15	0.2	0.25	0.3
引物 Primer/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	0.2	0.3	0.4	0.5
DNA 模板/ng	25	50	75	100

表3 SRAP-PCR 正交试验设计 $[L_{16}(4^5)]$

Table 3 $L_{16}(4^5)$ orthogonal experimental of SRAP - PCR

处理 编号	Taq DNA 酶 /(U)	$\text{Mg}^{2+}/$ $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	dNTP/ $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	引物/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	DNA 模 板/ng
1	1	1.5	0.15	0.2	25
2	1	2	0.2	0.3	50
3	1	2.5	0.25	0.4	75
4	1	3	0.3	0.5	100
5	1.25	1.5	0.2	0.4	100
6	1.25	2	0.15	0.5	75
7	1.25	2.5	0.3	0.2	50
8	1.25	3	0.25	0.3	25
9	1.5	1.5	0.25	0.5	50
10	1.5	2	0.3	0.4	25
11	1.5	2.5	0.15	0.3	100
12	1.5	3	0.2	0.2	75
13	1.75	1.5	0.3	0.3	75
14	1.75	2	0.25	0.2	100
15	1.75	2.5	0.2	0.5	25
16	1.75	3	0.15	0.4	50

1.2.4 SRAP-PCR 扩增 SRAP 分子标记反应程序选用为 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 5 个循环(94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min); 35 个循环(94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 50 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min); 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。产物在 2% 的琼脂糖凝胶上进行分离,自动凝胶成像仪上照相保存,用于体系优化因素确定。

1.2.5 引物筛选 在确定最优稳定体系后,根据 SRAP 分子标记引物组合通用性的特点,查找其在各

物种研究中所发表的引物序列^[20-26],包括 43 个正向引物与 35 个反向引物,随机组合,共计 1 505 对引物组合对 8 份来源不同,地理距离差别较大的红椿基因组 DNA 进行引物筛选。PCR 扩增产物在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶上进行分离并通过银染染色检测。保鲜膜封胶,照相或制干胶保存。

采用遗传多样性信息含量(PIC)评价试验所选定引物组合评估能力。

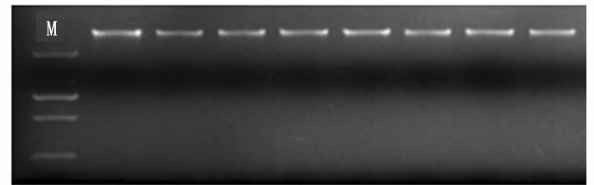
$$\text{PIC}_i = 2f_i(1 - f_i)$$

式中, PIC_i 为标记 i 的遗传多样性信息含量, f_i 为标记 i 出现条带的频率, $1 - f_i$ 是缺失条带的频率,一对引物的 PIC 为各个条带的平均值^[27]。

2 结果与分析

2.1 DNA 检测

经超微量紫外分光光度计检测可知,所提取的 DNA OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.7 ~ 1.9 之间, OD_{260}/OD_{230} 比值在 1.8 ~ 3.0 之间,说明 DNA 纯度较高。电泳结果表明(图 1),所提取的 DNA 均呈现一条清晰完整的主带,无拖尾和降解,无明显的 RNA 存在,并且 DNA 浓度较高,完整性好,可用于下游 SRAP 分析。



注: M: DL2000 marker

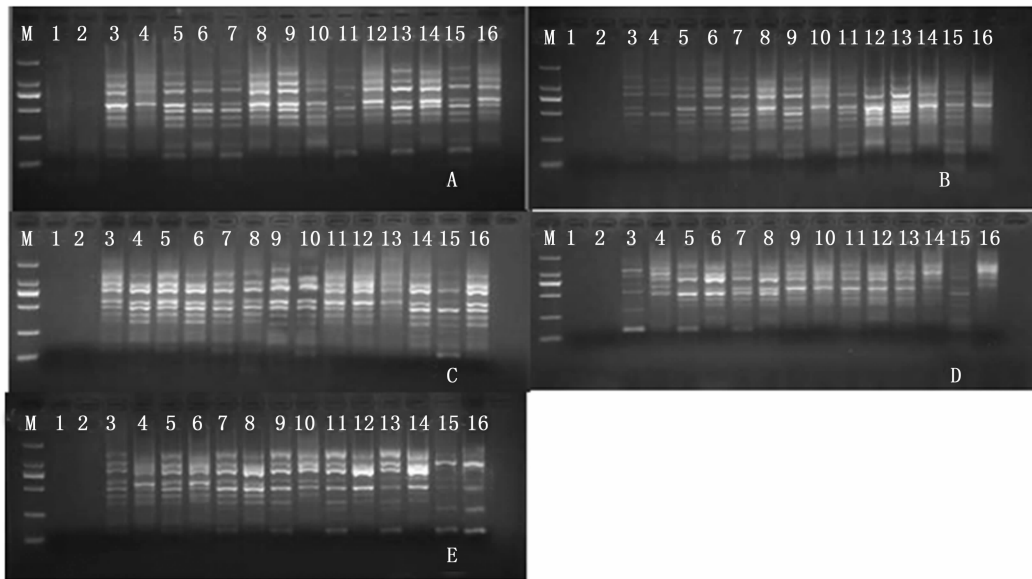
Note: M: DL2000 marker

图1 红椿 DNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose electrophoresis of genomic DNA from *T. ciliata*

2.2 单因素试验分析

因素浓度的优化主要目的是为了得到更加清晰、完整的条带,并且要尽可能地将多态性条带扩增出来。红椿 SRAP-PCR 单因素试验结果表明,5 大因素的浓度范围较大,25 μL 体系中,模板 DNA 浓度在 25 ~ 100 ng 范围内均可以扩增出清晰条带; 0.2 ~ 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物浓度,0.5 ~ 2 U Taq DNA 聚合酶,1 ~ 3 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mg^{2+} 浓度及 0.15 ~ 0.3 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP 浓度梯度均可扩增出多态性较大,清晰完整、效果较好的条带,所以将以上各因素的浓度作为正交试验的浓度范围进行设计。



注:图中 A、B、C、D、E 分别表示模板浓度(1~16 DNA 含量分别为 0、25、50、60、70、80、90 和 100 ng)、引物浓度(1~16 引物浓度分别为 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 和 0.7 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、Taq DNA 酶浓度(1~16 Taq 酶含量分别为 0、0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75 和 2 U)、 Mg^{2+} 浓度(1~16 Mg^{2+} 浓度分别为 0、1、1.5、2、2.5、3、3.5 和 4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)及 dNTP 浓度(1~16 dNTP 浓度分别为 0、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35 和 0.4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),每个梯度两个不同 DNA 模板重复。

Note: A, B, C, D, E is DNA concentration (1~16 is 0, 25, 50, 60, 70, 80, 90 and 100ng, respectively. Repeated twice), primer concentration (1~16 is 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 and 0.7 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Repeated twice), Taq polymerase (1~16 is 0, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75 and 2 U, respectively. Repeated twice), Mg^{2+} concentration (1~16 is 0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 and 4 mmol/L , respectively. Repeated twice), dNTP concentration respectively (1~16 is 0, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35 and 0.4 mmol/L , respectively. Repeated twice).

图2 因素浓度对 SRAP-PCR 扩增反应的影响

Fig. 2 The effect of factors concentration on SRAP analysis

2.3 正交试验各因素确定

在单因素试验所确定的 5 大因素的浓度范围内,选定 4 个水平的浓度梯度,根据 $L_{16}(4^5)$ 正交设计对 SRAP-PCR 进行体系优化。根据电泳结果首先进行直接主观性观察(图 3)。按照扩增条带的质量,包括扩增清晰度、条带亮度及条带数目等对各组合进行评分,两次重复取平均分(表 4)。

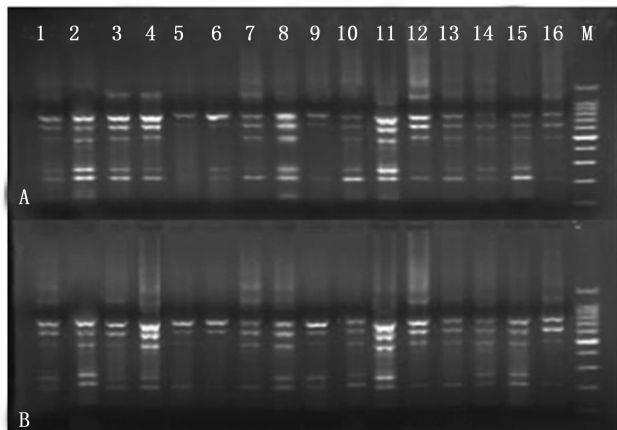


图3 SRAP 反应体系正交试验结果(A 与 B 为两个重复)

Fig. 3 Amplified pattern of SRAP-PCR based on orthogonal designs (A and B for two repeated trials)

表 4 不同处理得分情况表

Table 4 The result of range analysis for the factors

处理 treatment	重复 1 copy 1	重复 2 copy 2	均值 mean
1	6	7	6.5
2	15	14	14.5
3	13	13	13
4	14	15	14.5
5	1	2	1.5
6	2	1	1.5
7	9	9	9
8	12	12	12
9	3	3	3
10	11	11	11
11	16	16	16
12	10	10	10
13	7	6	6.5
14	5	5	5
15	8	8	8
16	4	4	4

最优条件及各因素影响力的大小由极差(R 值)的大小判断。R 值越大,证明某一因素在不同水平下对反应体系及扩增结果影响越显著。结果显示

(表5),在确定的4个水平内,模板DNA、引物、Taq DNA聚合酶、 Mg^{2+} 及dNTP 5大因素对扩增影响从

大到小依次排列为: Mg^{2+} > Taq DNA聚合酶 > 引物 > dNTP > 模板DNA浓度。

表5 各因素极差分析结果

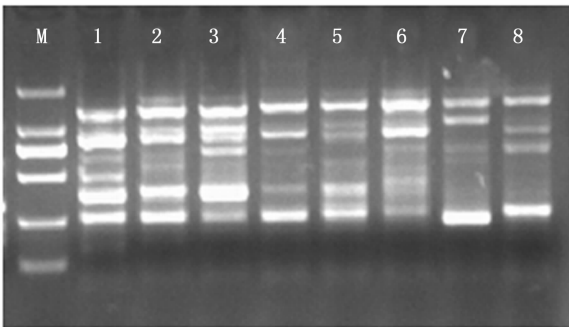
Table 5 The result of range analysis for the factors

水平 level	Taq DNA 聚合酶		Mg^{2+}		dNTP		引物 primer		模板DNA浓度 DNA concentration	
	总分 sum	平均分 mean	总分 sum	平均分 mean	总分 sum	平均分 mean	总分 sum	平均分 mean	总分 sum	平均分 mean
1	48.5	12.125	17.5	4.375	28	7	30.5	7.625	37.5	9.375
2	24	6	32	8	34	8.5	49	12.25	30.5	7.625
3	40	10	46	11.5	33	8.25	29.5	7.375	31	7.75
4	23.5	5.875	40.5	10.125	41	10.25	27	6.75	37	9.25
极差 range	25	6.25	28.5	7.125	13	3.25	22	5.5	7	1.75

各因素的某一水平影响反应体系的情况需要由K值确定,K值越大,因素所处当前水平PCR扩增效果越好。根据表4,选定各因素K值最大值时的浓度作为最优体系:其中模板DNA浓度为25 ng,引物浓度为 $0.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、Taq DNA聚合酶为1 U、 Mg^{2+} 浓度为 $2.5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 及dNTP浓度为 $0.3 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4 体系稳定性测定及引物筛选

利用以上确定的最优体系进行重复试验,确定体系的稳定性和适用性。利用8个不同种源的红椿基因组DNA进行检测。如图4所示,该体系扩增条带清晰可见,并且多态性高。证明所得到的优化SRAP-PCR体系稳定并且可靠,可有效地进行PCR扩增,适用性强,用于区别不同种源红椿之间的遗传差异,可用于后续试验。



注:M;DL2000 Marker,泳道1~8分别代表广东乐昌、安徽黄山、贵州望谟、云南永仁、江西宜丰、湖南城步、福建南平和四川会东

Note: M; DL2000 marker, 1~8 is Lechang, Huangshan, Wangmo, Yongren, Yifeng, Chengbu, Nanping, Huidong

图4 优化的SRAP-PCR体系对8份红椿DNA扩增结果

Fig. 4 Amplification results of 8 different *T. ciliata* DNA with the best SRAP-PCR

根据条带扩增的多态性及清晰度进行引物组合的确定。最终筛选出30对引物组合(表6),用于红椿遗传多样性测定及分析。30对引物对红椿30个

种源进行测定评估,各引物组合所扩增出的条带、多态性条带、多态位点百分率和每对引物的PIC见表。根据表中多态百分率和PIC值进行判定,引物组合

表6 30对SRAP引物的总条带数、多态性条带数、多态性比率及PIC值

Table 6 Total number of bands, polymorphic bands, polymorphism and polymorphic information content (PIC) obtained from 30 SRAP primer combinations

引物组合 primer	总条带数	多态性条带	多态百分率/%	PIC值
Me13Em8	22	15	68.18	0.37
Me14Em6	23	17	73.91	0.40
Me17Em21	27	21	77.78	0.38
Me19Em13	25	21	84.00	0.42
Me19Em15	26	23	88.46	0.42
Me19Em18	17	11	64.71	0.41
Me19Em27	25	21	84.00	0.41
Me22Em21	26	21	80.77	0.41
Me22Em27	28	20	71.43	0.41
Me23Em22	30	26	86.67	0.44
Me23Em31	28	21	75.00	0.41
Me27Em7	25	21	84.00	0.44
Me27Em18	40	31	77.5	0.39
Me27Em28	25	21	84.00	0.39
Me28Em18	36	27	75.00	0.40
Me31Em24	36	29	80.56	0.43
Me32Em17	28	20	71.43	0.43
Me32Em26	32	28	87.50	0.42
Me33Em27	23	11	47.83	0.35
Me34Em13	25	19	76.00	0.39
Me35Em13	27	15	55.56	0.42
Me35Em14	26	15	57.69	0.40
Me35Em32	27	14	51.85	0.45
Me38Em21	24	19	79.17	0.39
Me38Em24	29	21	72.41	0.42
Me38Em32	28	26	92.88	0.42
Me39Em32	19	18	94.74	0.43
Me40Em13	28	23	82.14	0.42
Me40Em22	21	15	71.43	0.33
Me43Em19	33	26	78.79	0.43
合计 Total	809	616		
平均值 Mean	26.97	20.53	75.85	0.41

Me35Em32(多态百分率为 94.74%), Me23Em22, Me27Em7, Me31Em24, Me32Em17, Me39Em32 和 Me43Em19(以上引物组合的 PIC 值(0.43, 排名均为 30 对引物组合的前三名)可作为红椿 SRAP 分子标记的优先骨干引物。

相比较琼脂糖凝胶的分离效果,6% 变性聚丙烯酰胺凝胶分离效果更好,银染染色检测条带清晰,分辨率高,更适合红椿 SRAP 分子标记的分析和鉴定。

3 讨论

本研究中所用试验材料均为多年生母树叶片,全部取自红椿天然林分,为野外获得。在运输过程中易受到 DNA 酶及酚类的影响,导致 DNA 的降解,而 DNA 的质量直接影响到 SRAP-PCR 反应。为避免或降低 DNA 降解情况发生,本研究利用硅胶进行叶片迅速干燥后尽快置于 -80°C 低温冰箱保存,减缓了叶片的氧化。红椿叶片中含有大量的酚类、糖类及次生代谢产物^[28],首先使用 CTAB free 溶液进行低温洗涤,可达到去除杂质的目的,后利用试剂盒提取法对 DNA 进行提取,纯化了 DNA 的质量。经检测,其 OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.7 ~ 1.9 之间,证明并无 RNA 的污染; OD_{260}/OD_{230} 比值在 1.8 ~ 3.0 之间,说明多糖及酚类物质得到有效去除,所得到的 DNA 纯度较高,在 SRAP 后续试验中可以有效的进行扩增,提高扩增效率。

SRAP 分子标记主要针对基因开放阅读框(ORFs)的特定区域进行扩增。上游引物长 17 bp,主要目标为基因中相对保守的外显子区域;下游引物长 18 bp,富含 AT-片段,对多态性较为丰富的内含子和启动子进行扩增,独特引物组合会因个体或物种所包含的内含子、启动子及间隔区间的不同而产生多态性^[6]。在反应体系优化过程中,SRAP-PCR 会因为不同的反应条件、反应程序及物种差异,会产生不同的扩增结果,体系中每一个因素的变化都会对导致扩增结果偏差^[29]。本研究首先利用单因素试验确定反应体系中 5 大因素的浓度范围,以减少盲目性^[30]。依据正交试验设计再次进行多因素多水平综合检测,充分发挥了正交试验的均衡分散、综合可比的特点,快速有效地明确各因素的组合关系^[31]。同时选择直接观察方法与新复极差法对扩增反应中各因素的影响作用及各因素最优浓度进行综合分析评估,削弱或避免了仅仅依靠主观判断的误差^[32]。本研究中,两次正交试验重复评分差别不

明显,此结果与陈丽君等^[33]对苦楝的研究结果一致,证明 SRAP-PCR 反应体系相对比较稳定。经新复极差法研究发现,5 大因素中 Mg^{2+} 的极差 R 最大,说明在体系中 Mg^{2+} 影响力最大。作为 *Taq* DNA 聚合酶的激活剂, Mg^{2+} 直接影响扩增过程中的酶活性。若体系中 Mg^{2+} 浓度过高,会直接导致非特异性扩增的发生,但为了保证正常激活酶活性,浓度不能过少,否则会得到不理想的扩增结果,影响扩增结果的准确性和重复性。在本研究中, Mg^{2+} 在体系中具有最重要的作用,后续的试验中一定要着重注意该因素的一致性。起到次要作用的因素为 *Taq* DNA 聚合酶。*Taq* DNA 酶浓度必须在一个合适范围内才能成功地扩增出特异性片段,浓度少,无法得到准确数量的扩增片段,浓度大,会扩增出多余的非特异性片段。引物的浓度同样是 PCR 扩增过程中的重要因素,若出现模板 DNA 无法与之配对,扩增失败的结果,则与浓度过低有关;产生非特异性性片段和形成引物二聚体,则可能是引物浓度过高造成的。dNTP 是 PCR 扩增反应的底物,若扩增产率降低或聚合酶渗入则与其有关;模板 DNA 是扩增反应的基础,但如果 DNA 质量较高,适量的浓度一般不会对扩增结果产生过多的影响^[34-35]。各物种所含基因的差异及 PCR 试验的外在条件,都会直接或间接的影响到扩增结果^[18],因此,不同的物种应具有独立稳定的反应条件及体系。

在进行引物能力评估时,可依据 PIC 值对引物进行初步判断。当 $\text{PIC} > 0.5$,表示该引物或引物组合所呈现的多态性最好,贡献率较高,可以最大程度的反应遗传多样性。当 $0.25 < \text{PIC} < 0.5$,或者 $\text{PIC} < 0.25$ 时,则分别说明该引物扩增得到的多态位点处于中等或较低水平^[36-37]。本研究中 30 对 SRAP 引物组合的 PIC 平均值为 0.41,说明 SRAP 分子标记的引物组合可以很好地反映引物的区分能力,能有效准确度地揭示红椿不同种源的遗传多样性。

针对含有大量次生代谢产物的母树叶片,本研究采用了有效的处理方法,保证了 DNA 的提取质量;采用多种检测手段进行 SRAP 分子标记体系优化,并获得最优反应体系,弥补了单一优化选择手段的不足,区别了各因素在体系中的影响作用。以上均为其他物种进行 DNA 提取及 SRAP 分子标记提供参考依据。

4 结 论

本研究成功地获得红椿 SRAP 分子标记的最优体系,体系如下:25 μL 体系中,模板 DNA 浓度为 25 ng,引物浓度为 0.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (正反引物浓度相同)、*Taq* DNA 聚合酶为 1 U、 Mg^{2+} 浓度为 2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 及 dNTP 浓度为 0.3 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 2.5 μL 10 \times Buffer,重蒸水补齐体系。通过不同种源红椿基因组 DNA 的重复验证,同样获得了稳定清晰、多态性较强的扩增条带,表明所确定的最优体系稳定可靠,适用性较强。利用最优体系进行红椿 SRAP 分子标记的引物筛选,从 1 505 对引物组合中筛选出 30 对多态性高,重复性强的引物组合,用于红椿后续遗传多样性研究中。

参 考 文 献:

- [1] Neil J, Helen O H T. Markers and mapping revisited: finding your gene[J]. *New Phytologist*, 2009, 183: 935 - 966.
- [2] Agarwal M, Shrivastava N, Padh H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences[J]. *Plant Cell Rep*, 2008(27): 617 - 631.
- [3] 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]. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 103(2): 455 - 461.
- [4] Sun S, Gao W, Lin S, *et al.* Analysis of genetic diversity in *Ganoderma* population with a novel molecular marker SRAP[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72(3): 537 - 543.
- [5] Feng N, Xue Q, Guo Q, *et al.* Genetic Diversity and Population Structure of *Celosia argentea* and Related Species Revealed by SRAP [J]. *Biochemical Genetics*, 2009, 47(7 - 8): 521 - 532.
- [6] Ren N, Liu J, Yang D, *et al.* Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) marker as a new method for identification of endophytic fungi from *Taxus*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(1): 215 - 221.
- [7] Yin Y, Liu Y, Li H, *et al.* Genetic diversity of *Pleurotus pulmonarius* revealed by RAPD, ISSR, and SRAP fingerprinting[J]. *Curr Microbiol*, 2014, 68(3): 397 - 403.
- [8] Youssef M, James A C, Rivera-Madrid R, *et al.* Musa genetic diversity revealed by SRAP and AFLP[J]. *Mol Biotechnol*, 2011, 47(3): 189 - 199.
- [9] Li P, Zhan X, Que Q, *et al.* Genetic Diversity and Population Structure of *Toona ciliata* Roem. Based on Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) Markers [J]. *Forests*, 2015, 6(4): 1094 - 1106.
- [10] 龙汉利,冯毅,向青,等. 四川盆周山地红椿生长特性研究[J]. *四川林业科技*, 2011(03): 37 - 41.
- [11] Boland D J. *Toona ciliata* M. Roemer. [M]. Wallingford: CAB International, 2000: 6472 - 6485.
- [12] Zacaroni A B, Pozza E A, Mansur T D O F, *et al.* Occurrence of *Phyllachora balansae* in *Toona ciliata* in Southern Minas Gerais State, Brazil. [J]. *Summa Phytopathologica*, 2013, 39(3): 219 - 221.
- [13] 刘均利,杨柳璐,刘青,等. 红椿的组织培养与植株再生[J]. *林业科技*, 2014(06): 1 - 5.
- [14] 文亚峰,韩文军,吴顺. 植物遗传多样性及其影响因素[J]. *中南林业科技大学学报*, 2010(12): 80 - 87.
- [15] Zeng J, Zou Y, Bai J, *et al.* Preparation of Total DNA from "Recalcitrant Plant Taxa" [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2002, 44(6): 694 - 697.
- [16] 李建光,李荣生,李发根,等. 蛇皮果基因组 DNA 提取及其 RAPD 条件优化[J]. *中南林业科技大学学报*, 2012(06): 110 - 114.
- [17] 令狐斌,侯思宇,孙朝霞,等. 苦荞 SRAP 分子标记体系优化与遗传多样性分析[J]. *中国农业大学学报*, 2015(01): 37 - 43.
- [18] 糜亚男,张水寒,蔡媛,等. 杜仲 SSR-PCR 反应体系的优化[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015(02): 1 - 6.
- [19] 武正前,李雪虎,梁剑平,等. 大青叶 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化研究[J]. *植物研究*, 2015(02): 310 - 314.
- [20] Alghamdi S, Al-Faifi S, Migdadi H, *et al.* Molecular Diversity Assessment Using Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP) Markers in *Vicia faba* L. [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(12): 16457 - 16471.
- [21] Aneja B, Yadav N R, Chawla V, *et al.* Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) molecular marker system and its applications in crop improvement[J]. *Molecular Breeding*, 2012, 30(4): 1635 - 1648.
- [22] Huang C, Liu G, Bai C, *et al.* Genetic Analysis of 430 Chinese *Cynodon dactylon* Accessions Using Sequence-Related Amplified Polymorphism Markers[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(10): 19134 - 19146.
- [23] Jing Z B, Wang X P, Cheng J M. Analysis of genetic diversity among Chinese wild *Vitis* species revealed with SSR and SRAP markers[J]. *Genet Mol Res*, 2013, 12(2): 1962 - 1973.
- [24] Mokhtari N, Rahimmalek M, Talebi M, *et al.* Assessment of genetic diversity among and within *Carthamus* species using sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers[J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2013, 299(7): 1285 - 1294.
- [25] Polat I, Kacar Y A, Yesiloglu T, *et al.* Molecular characterization of sour orange (*Citrus aurantium*) accessions and their relatives using SSR and SRAP markers[J]. *Genet Mol Res*, 2012, 11(3): 3267 - 3276.
- [26] 赵秀娟,宋建文,胡开林. 苦瓜种质遗传多样性的 SRAP 标记分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2013(01): 78 - 84.
- [27] Shen J, Jia X, Ni H, *et al.* AFLP analysis of genetic diversity of *Jatropha curcas* grown in Hainan, China [J]. *Trees*. 2010, 24(3): 455 - 462.
- [28] Brunt C, Read J, Sanson G D. Changes in resource concentration and defence during leaf development in a tough-leaved (*Nothofagus moorei*) and soft-leaved (*Toona ciliata*) species[J]. *Oecologia*,

- 2006, 148(4): 583-592.
- [29] 李芳芳,杨少宗,柳新红,等. 枫香树 DNA 提取及 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 河南农业大学学报, 2015(01): 46-51.
- [30] 刘明骞,陈丽君,欧阳昆晞,等. 剑豆 SRAP-PCR 反应体系的建立及优化[J]. 华南农业大学学报, 2015(01): 75-78.
- [31] 王 军,杨荣萍,洪明伟,等. 石榴 SPAR-PCR 反应体系的正交设计优化及验证[J]. 云南农业大学学报:自然科学, 2013(03): 376-379.
- [32] 刘萌芽,黄如葵,黄玉辉,等. 正交直观分析法和新复极差法优化苦瓜 SRAP 反应体系研究[J]. 北方园艺, 2014(05): 85-88.
- [33] 陈丽君,刘明骞,廖柏勇,等. 苦楝 SRAP-PCR 反应体系的建立及优化[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(3):104-108.
- [34] 陈 罡,关明东,叶景丰,等. 杨树 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 北方园艺, 2010(16): 132-134.
- [35] 何仁锋,冯尚国,陈 喆,等. 药用菊花 SSR-PCR 反应体系优化及引物筛选[J]. 分子植物育种, 2015(02): 367-378.
- [36] Wang B H, Zhu P, Yuan Y L, *et al.* Development of EST-SSR markers related to salt tolerance and their application in genetic diversity and evolution analysis in *Gossypium*[J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(2): 3732-3746.
- [37] Xie W, Zhang X, Cai H, *et al.* Genetic diversity analysis and transferability of cereal EST-SSR markers to orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.)[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2010, 38(4): 740-749.

(责任编辑:张 研)