

SRAP 体系中苔藓植物遗传多样性 分析中的正交优化及初步应用

张安世, 张为民, 邢智峰, 刘永英, 辛泽华

(焦作师范高等专科学校生物系, 河南 焦作 454001)

摘要: 以黄灰藓为材料, 通过正交法优化 SRAP-PCR 反应条件, 并在此基础上对 11 种苔藓植物进行遗传多样性分析。结果表明: 苔藓植物 SRAP 反应(25 μ L 体系)的最佳条件为: 40 ng DNA 模板, 2.5 mmol/L Mg^{2+} , 0.3 mmol/L dNTP, 15 pmol 引物, 1.5 U Taq 酶。用 30 对引物组合进行筛选, 有 5 对引物组合扩增条带清晰, 重复性好, 共扩增出 65 条带, 其中多态性条带 63 条, 多态性比率为 96.9%。通过 SPSS11.5 分析软件对扩增结果进行聚类分析, 结果与形态学分类基本一致, 说明 SRAP 技术可用于苔藓植物的遗传多样性研究。
关键词: 苔藓; SRAP; 正交设计; 优化; 亲缘关系; 遗传多样性

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2010)03-0343-05

Optimization of orthogonal design and initial application in genetic diversity analysis for bryophytes in SRAP system

ZHANG An-Shi, ZHANG Wei-Min, XING Zhi-Feng,
LIU Yong-Ying, XIN Ze-Hua

(Department of Biology, Jiaozuo Teachers College, Jiaozuo 454001, China)

Abstract: An optimal protocol of SRAP-PCR was established by orthogonal method for *Hypnum pallescens*. Based on it, genetic diversity of 11 bryophyte species was analyzed in the present study. The results showed that the optimal protocol was accomplished in 25 μ L reaction volumes containing 40ng template DNA, 2.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.3 mmol/L dNTPs, 15 pmol/L SRAP primer and 1.5 unit Tag DNA polymerase. Five pairs of primers were selected from thirty ones to generate sixty-five DNA bands which were clear and repetitive, sixty-three of which were polymorphic. Polymorphic percentage was 96.9%. A dendrogram was established based on Hierarchical cluster analysis by SPSS 11.5, which was almost the same as morphological studies, showing that the SRAP technology could be used to analyze the genetic diversity of bryophytes.

Key words: bryophytes; SRAP; orthogonal design; optimization; phylogenetic relationship; genetic diversity

SRAP (Sequence-related amplified polymorphism, 序列相关扩增多态性) 是由 Li & Quiros (2001) 发展的一种新的分子标记技术。该技术的最大特点在于其独特的引物设计。他们针对基因外显

子中 GC 含量丰富而启动子和内含子中 AT 含量丰富的特点, 分别设计正向引物和反向引物, 从而实现开放阅读框(ORFs)的 PCR 扩增。因不同个体的启动子、内含子及间隔区的长度不等而产生多态性。

收稿日期: 2009-04-02 修回日期: 2009-08-27

基金项目: 河南省科技攻关项目(0624240019); 河南省教育厅自然科学研究计划项目(2008C180002)[Supported by the Key Technologies Research and Development Program of Henan Province(0624240019); The Science Study Project of Education Department of Henan Province(2008C180002)]

作者简介: 张安世(1965-), 男, 河南博爱人, 硕士, 副教授, 主要从事分子生物学研究, (E-mail) aszhang1212@163.com.

SRAP 分子标记技术以其简便、稳定、中等产率、在基因组中分布均匀等特点,已广泛用于图谱构建、比较基因组学、遗传多样性(Ferriol 等,2004;林忠旭等,2004)分析等。

苔藓植物是种数仅次于种子植物的高等植物,具有丰富的生物多样性,但苔藓的分子生物学研究一直很缓慢(施定基等,2001;车未艾等,2006)。近年来,国内已有多位学者在苔藓的分子生物学方面进行了研究(董文等,2004;侯义龙等,2005;沙伟等,2007,2008;王先平等,2003;王艇等,2000;闫苗苗等,2008),但尚未见有关苔藓植物 SRAP 分析的报道。本研究利用正交设计优化苔藓植物 SRAP-

PCR 反应条件,在此基础上对 11 种苔藓植物进行 SRAP 分析,旨在为苔藓植物的系统发育研究和分子标记图谱构建提供分子生物学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

供试苔藓均采自河南省云台山世界地质公园(表 1)。选取幼嫩茎叶,用塑料袋封装,然后装入冰盒保鲜,带回实验室后分别用自来水、超纯水漂洗 2 次除去尘渣等杂物,用吸水纸吸干后保存于 -80 °C 冰箱备用。

表 1 苔藓植物种类名称
Table 1 Name of bryophytes tested

编号 No.	种名 Species name	科名 Family name
1	鳞叶藓 <i>Taxiphyllum taxirameum</i>	灰藓科 Hypnaceae
2	金灰藓 <i>Pylaisiella polyantha</i>	灰藓科 Hypnaceae
3	黄灰藓 <i>Hypnum pallescens</i>	灰藓科 Hypnaceae
4	灰藓凹叶变种 <i>H. cupressi forme var. lacunosum</i>	灰藓科 Hypnaceae
5	大叶凤尾藓 <i>Fissidens grandifrons</i>	凤尾藓科 Fissidentaceae
6	多枝青藓 <i>Brachythecium fasciculirameum</i>	青藓科 Brachytheciaceae
7	弯叶青藓 <i>B. reflexum</i>	青藓科 Brachytheciaceae
8	牛角藓 <i>Cratoneuron filicinum</i>	柳叶藓科 Amblystegiaceae
9	小牛舌藓全缘亚种 <i>Anomodon minor ssp. integerrimus</i>	牛舌藓科 Anomodontaceae
10	拟溪边扭口藓 <i>Barbula subrivicola</i>	丛藓科 Pottiaceae
11	卷叶毛口藓 <i>Trichostomum involutum</i>	丛藓科 Pottiaceae

1.2 试剂和仪器

试剂: Taq DNA 聚合酶、dNTP 和引物购自上海生物工程技术服务有限公司;无 CTAB 缓冲液: 200 mmol/L Tris-HCl(pH8.0), 50 mmol/L EDTA (pH8.0), 250 mmol/L NaCl, 2% PVP; 2×CTAB: 2% CTAB, 100 mmol/L Tris-HCl(pH8.0), 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA (pH8.0)。仪器: 5804R 型冷冻离心机(Eppdoff), UV-1700(日本岛津)紫外分光光度计, PTC-200 PCR 仪, ChampGel-3220 凝胶成像系统。

1.3 总 DNA 的提取

采用改良 CTAB 法(张安世等,2009)提取苔藓植物的基因组 DNA。

1.4 SRAP 反应条件的优化

以黄灰藓提取的 DNA 为模板,用 SRAP 引物 Me5/em7,在 PTC-200 DNA Engine Cycler 上进行 SRAP 反应,反应体积为 25 μL。扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 33 °C 复性 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min, 循环 5 次; 94 °C 变性 1 min, 53 °C

复性 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min, 循环 35 次; 72 °C 延伸 7 min; 4 °C 保存。对 PCR 反应体系中的各组分设置不同的浓度梯度先进行单因素优化,在此基础上进行四因素三水平正交优化。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL 溴化乙锭)、1×TBE 缓冲液、3 V/cm 电场中电泳分离,在凝胶成像系统上观察拍照。

1.5 引物选择

选取 SRAP 引物,其中正向引物为 Me1, Me2, Me3, Me4, Me5, Me6; 反向引物为 em7, em8, em9, em10, em11。正向、反向引物两两组合,每个引物组合对 11 种苔藓植物进行 SRAP 扩增,从中选取多态性高、重复性好且 DNA 条带清晰的引物进行重复试验。

1.6 数据统计及聚类分析

每一个可辨别的 SRAP 扩增产物分别代表一个位点,在相同迁移率上出现的带计为 1,未出现的带计为 0,构建(0,1)原始矩阵,统计所得到的总扩增位点数,应用 SPSS 11.5 分析软件对供试材料间

SRAP 标记欧氏遗传距离,按 Average Linkage 法进行聚类分析,建立聚类树状图。

2 结果与分析

2.1 SRAP 反应体系的优化

2.1.1 单因素优化 设置模板 DNA 七个梯度:10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 ng; Mg^{2+} 浓度六个梯度: 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 mmol/L; dNTP 5 个梯度: 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mmol/L; 引物浓度 5 个梯度: 5, 10, 15, 20, 25 pmol; Taq DNA 聚合酶 5 个梯度: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 U。优化结果为 DNA: 40 ng; Mg^{2+} : 3.0 mmol/L; dNTP: 0.3 mmol/L; 引物: 15pmol; Taq 酶: 1.5 U。

表 2 SRAP-PCR 反应体系正交设计及扩增结果
Table 2 The orthogonal design for SRAP-PCR system and result of treatment

试验号 No.	A (Mg^{2+}) (mmol/L)	B (dNTP) (mmol/L)	C (引物) (pmol)	D (Taq 酶) (U)	直观评分
1	2.5	0.2	10	1.0	5
2	2.5	0.3	15	1.5	9
3	2.5	0.4	20	2.0	2
4	3.0	0.2	15	2.0	7
5	3.0	0.3	20	1.0	8
6	3.0	0.4	10	1.5	6
7	3.5	0.2	20	1.5	3
8	3.5	0.3	10	2.0	4
9	3.5	0.4	15	1.0	1
K_1	5.33	5.00	5.00	4.67	
K_2	7.00	7.00	5.67	6.00	
K_3	2.67	3.00	4.33	4.33	
R	4.33	4.00	1.34	1.67	

2.1.2 正交优化 为进一步研究各因素间的相关性,充分体现各因素不同水平间的交互作用,根据单因素试验结果,固定 DNA 为 40 ng,选取 Mg^{2+} 、dNTP、引物、Taq 酶 4 个因素做正交试验,每个因素取 3 个水平,按正交表 $L_9(3^4)$ 安排试验,参考刘晓静等(2008)方法,对 PCR 扩增依据条带的多少和强弱进行直观分析,即将 9 个处理中条带清晰度最高、数量最多、背景最低的记为 9 分,与此相反,最差的记为 1 分。正交试验安排及结果见表 2,正交试验的 SRAP-PCR 扩增结果见图 1(图 1-9 同表 2)。由表 2 可知,每个因素的各水平平均值 K 均以中间水平 K_2 为高,所以 SRAP 体系扩增的最佳条件为

$A_2B_2C_2D_2$,即 Mg^{2+} 浓度为 3.0 mmol/L; dNTP: 0.3 mmol/L; 引物: 15 pmol; Taq: 1.5 U。按极差 R 值大小决定因素的主次顺序为: $Mg^{2+} > dNTP > Taq 酶 > 引物$ 。

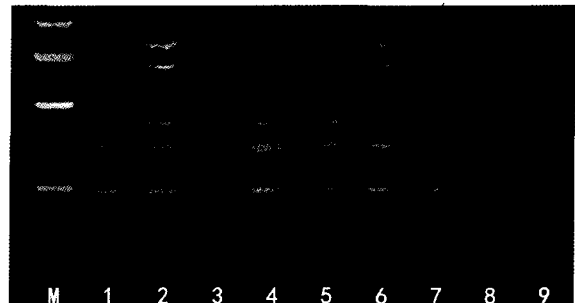


图 1 SRAP-PCR 反应体系正交设计扩增的结果
Fig. 1 The amplified result of orthogonal design for SRAP-PCR system

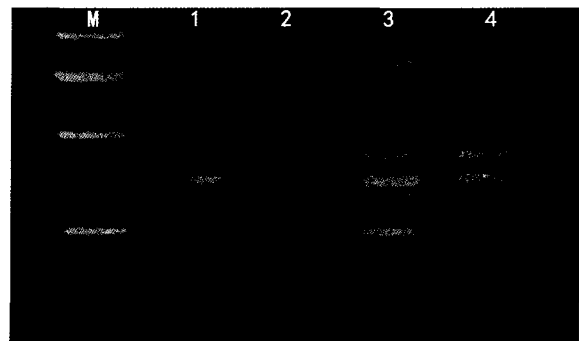


图 2 对比试验结果
Fig. 2 The result of comparing test

2.1.3 正交验证及对比试验 将正交最佳配比结果 $A_2B_2C_2D_2$ (第 1 泳道)及正交试验结果较好的 5 号(第 2 泳道)、4 号(第 3 泳道)和 2 号(第 4 泳道)作对比试验(图 2)。从图 2 看出,正交 4 号最好,但与 $A_2B_2C_2D_2$ 和正交 2 号相差不大,考虑到各试剂用量,特别是 Taq 酶的用量,正交 2 号显然要低,从图 1 和图 2 看出,正交 2 号的重复性较好,因此以原正交 2 号条件为最佳条件: Mg^{2+} : 2.5 mmol/L; dNTP: 0.3 mmol/L; 引物: 15 pmol; Taq: 1.5 U。

2.2 扩增产物的多态性分析

利用 11 个苔藓植物的 DNA 模板对 30 个引物组合进行筛选,其中有 5 个条带多且多态性好的引物被选出来,分别为 Me5/em7、Me5/em8、Me6/em11、Me5/em9、Me2/em10。5 个引物组合共扩增出 65 条带,其中多态性条带 63 条,占总条带数的 96.9%。SRAP 扩增结果见图 3(图中 1-11 同表 1)。由图 3 可

知,11种苔藓植物仅有2条相同带,说明扩增的多态性好,11种苔藓植物遗传性差异较大。

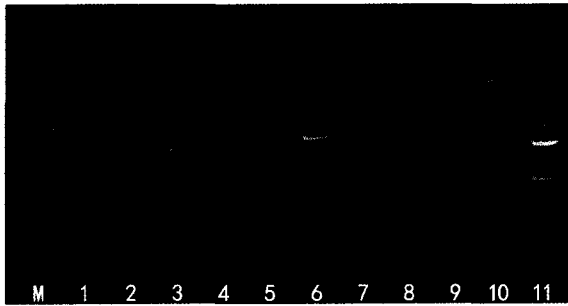


图3 引物 Me6/em11 对 11 种苔藓植物的扩增结果
Fig. 3 Result of SRAP amplification by primer Me6/em11 for 11 bryophytes

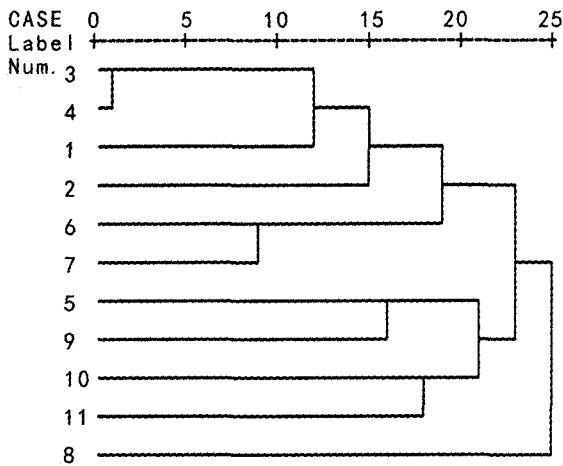


图4 11种苔藓植物的聚类树形图
Fig. 4 Dendrogram of 11 bryophytes using average linkage

2.3 聚类分析

将5个引物扩增后得到的二元数据应用SPSS 11.5软件进行分析,根据SRAP标记欧氏遗传距离,按Average Linkage法进行聚类分析,建立聚类树状图(图4)(图中1-11同表1)。从图4看出,灰藓科的鳞叶藓,金灰藓,黄灰藓和灰藓凹叶变种聚类在一起,青藓科的多枝青藓和弯叶青藓聚类在一起,丛藓科的卷叶毛口藓和拟溪边扭口藓聚类在一起。以上结果与形态学分类一致,特别是灰藓科的4种材料的聚类结果与形态学结果完全一致,说明SRAP技术可用于苔藓植物的遗传多样性研究。SRAP分析的聚类结果与传统的形态分类结果出现了一定的差异,这种差异主要表现在科以上植物种类之间。就供试的11种苔藓植物而言,按形态学分

类,凤尾藓科的大叶凤尾藓与丛藓科的卷叶毛口藓和拟溪边扭口藓亲缘关系更近,牛角藓属于柳叶藓科,小牛舌藓全缘亚种属于羽藓科,两者与青藓科的多枝青藓和弯叶青藓亲缘关系较为接近。大叶凤尾藓与小牛舌藓全缘亚种聚类在一起,牛角藓单独为一类。因此,SRAP分子标记得到的聚类图与传统的形态学分类并不完全相同。

3 讨论

3.1 SRAP反应体系的优化

以往的SRAP-PCR反应体系的优化研究多采用单因素分析方法(任羽等,2004;梁景霞等,2005;刘立军等,2006),但这种方法不能研究各因子不同水平间的交互作用。近年来在有关分子标记研究中有的采用了正交设计(杨旻等,2008;陈永胜等,2008;何庆元等,2008),但在具体分析方法上不尽相同。本试验先通过单因素优化为正交设计的各因素提供一个较为合适的水平,再通过正交优化得出各因素不同水平间的最佳配比,最后将正交结果与正交试验中几个试验组号较好的结果进行对比试验,综合比较,从而得出SRAP反应体系的最佳条件。影响PCR反应的因素很多,因此将正交结果与正交试验中扩增较好的几个组号进行对比试验很有必要。由于评分法依靠的是主观判断,所以无法避免主观因素在一定程度上对试验结果分析的影响。另外,不同的实验条件,如不同的厂家、不同批次的试剂,不同的仪器,不同的试验材料,都可能对试验结果产生影响。因此,在优化PCR反应体系的时,利用单因素递进试验和正交设计相结合的方法能弥补单一方法的缺陷,最大可能地减小各种因素的影响,这种方法看似繁琐,但结果较为可靠。

3.2 聚类分析

由于SRAP技术扩增的是基因的重要组成部分开放阅读框(ORFs),因而更能反映遗传资源的多样性(林忠旭等,2004)。本研究表明,采用SRAP方法得到的聚类分析结果与传统的形态分类结果基本一致。这不仅说明不同标记系统间的同一性,同时也说明SRAP分子标记技术可以较好地运用到苔藓植物的遗传多样性研究中。本研究结果还显示,通过SRAP分子标记得到的聚类图并不与传统的形态学分类结果完全相同,其主要原因可能是不同方法本身特点所造成的(区又君等,2008)。传统

的分类学主要是从形态学或表型性状上来监测遗传变异,易受环境及基因显隐性的影响,遗传表达有时不太稳定,且控制这几个形态特征的基因在整个基因组所占比例较小;SRAP 分析则是通过独特的引物设计优先扩增基因的开放阅读框(ORFs),更能反映基因组结合位点的多态性变化。由于形态学差异和分子水平的差异经受了不同的进化压力,单纯以形态形状或分子标记进行苔藓植物的亲缘关系分析,都有一定的局限性。因此,应该多种标记方法相互结合、相互印证,以期得出客观的结论。本试验利用 SRAP 技术对 11 种苔藓植物的遗传多样性进行了初步的探索,其结果显示,苔藓植物 SRAP 分析与形态分类的差异主要表现在科以上种类之间,由于所选材料有限,是否适用于其它的苔藓植物还有待于进一步的研究。

参考文献:

- Che WA(车未艾),Zhang TM(张铁明). 2006. Research advances in bryophyte phylogenetic research(DNA 序列在苔藓分子系统学研究中的应用)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报),26(6):1 277—1 281
- Chen YS(陈永胜),Hao WG(郝卫国),Zhu GL(朱国立),*et al.* 2008. Optimization of RAPD-PCR system with orthogonal design in castor(蓖麻 RAPD-PCR 反应体系的正交优化)[J]. *Chin Agric Sci Bull*(中国农学通报),24(3):172—175
- Dong W(董文),Li W(李卫),Guo GQ(郭光沁),*et al.* 2004. The moss *Physcomitrella patens*, a new model system for functional genomics(苔藓植物小立碗藓,功能基因组学研究新的模式系统)[J]. *Hereditas*(遗传),26(4):560—566
- Ferriol M,Plco B. 2004. Molecular diversity of a germplasm collection of squash(*Cucurbita moschata*) determined by SRAP and AFLP markers[J]. *Crop Sci*,44(2):653—664
- He QY(何庆元),Wang SH(王松华),Hu Q(胡琴),*et al.* 2008. Study on optimization and primers screening of RAPD reaction system for *Rhizobia*(苜蓿 RAPD 引物筛选及条件优化的研究)[J]. *J Anhui Sci Tech Univ*(安徽科技学院学报),22(2):17—21
- Hou YL(侯义龙),Cao T(曹同). 2005. Bryophytes and molecular markers technique(苔藓植物与分子生物学标记技术)[J]. *Chin J Ecol*(生态学杂志),24(1):85—87
- Liu LJ(刘立军),Meng ZQ(蒙祖庆),Xing XL(邢秀龙)*et al.* 2006. Optimization for SRAP reaction system in ramie(*Boehmeria nivea*)(苧麻基因组 SRAP 扩增体系的优化研究)[J]. *Mol Plant Breed*(分子植物育种),4(5):726—730
- Liang JX(梁景霞),Qi JM(祁建民),Wu WR(吴为人),*et al.* 2005. DNA extraction and the establishment of SRAP reaction system in tobacco(烟草 DNA 的提取与 SRAP 反应体系的建立)[J]. *Acta Tabacaria Sin*(中国烟草学报),11(4):33—38
- Li G,Quiros CF. 2001. 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*,103:455—461
- Liu XJ(刘晓静),Wang WQ(王文泉),Guo LF(郭凌飞). 2008. Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction system for *Alpinia oxyphylla*(益智 ISSR-PCR 反应体系建立与优化)[J]. *生物技术*,18(3):33—37
- Lin ZX(林忠旭),Zhang XL(张献龙),Nie YC(聂以春). 2004. Evaluation of application of a new molecular marker SRAP on analysis of F2 segregation population and genetic diversity in cotton(新型标记 SRAP 在棉花 F2 分离群体及银川多样性评价中的适用性分析)[J]. *Acta Genet Sin*(遗传学报),31(6):622—626
- Ou YJ(区又君),Wu Y(吴勇),Li JE(李加儿),*et al.* 2008. RAPD analysis of genetic difference among five species of group-er(5 种石斑鱼遗传差异的 RAPD 分析)[J]. *South China Fisheries Sci*(南方水产),4(2):56—62
- Ren Y(任羽),Wang DY(王得元),Zhang YD(张银东). 2004. Optimization of SRAP-PCR in hot pepper(*Capsicum annuum*)(辣椒 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化)[J]. *Molecular Plant Breeding*(分子植物育种),2(5):689—693
- Shi DJ(施定基),Ran L(冉亮),Ning Y(宁叶),*et al.* 2001. Some progress in molecular biology of bryophytes(苔藓分子生物学的一些进展)[J]. *Guizhong Sci*(贵州科学),19(4):1—5
- Sha W(沙伟),Shi S(师帅). 2008. Effects of choosing different tissues of *Racomitrium japonicum* on total RNA isolation and DDRT-PCR(东亚砂藓取材部位对提取其总 RNA 及 DDRT-PCR 的影响)[J]. *Guihaia*(广西植物),28(3):298—301
- Sha W(沙伟),Wang YL(王艳丽),Teng ZY(腾兆岩). 2007. The method study of extracting total RNA from *Grimmia pilifera* P. Beauv(毛尖紫萼藓总 RNA 提取方法的研究)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究),25(3):310—312
- Wang XP(王先平),Hu Y(胡勇),He YK(何奕昆). 2003. The research of gene targeting in moss(基因定点整合技术及其在苔藓研究中的进展)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报),20(2):137—143
- Wang T(王艇),Zhu JM(朱建明),Su YJ(苏应娟),*et al.* 2000. PCR-RFLP analysis of rbcL gene in some bryophyte(部分苔藓植物 rbcL 基因 PCR-RFLP 分析)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报),20(6):968—973
- Yang M(杨旻),Hu JY(胡继鹰),Chen KL(陈科力),*et al.* 2008. Optimization for RAPD-PCR reaction system of *Bupleurum chinense* DC. by comprehensive scoring method(综合评分法优化柴胡 RAPD-PCR 反应体系)[J]. *Chinese Trad Patent Med*(中成药),30(5):722—726
- Yan MM(闫苗苗),Wei GC(魏光成),Sha W(沙伟),*et al.* 2008. Study on extraction methods of bryophytes genomic RNA(藓类植物 RNA 提取方法的研究)[J]. *Guihaia*(广西植物),28(3):329—331
- Zhang AS(张安世),Xing ZF(邢智峰),Liu YY(刘永英),*et al.* 2009. Comparison and analysis on the different methods of DNA extration methods from bryophytes(苔藓植物 DNA 不同提取方法的比较分析)[J]. *Henan Sci*(河南科学),27(5):559—562