

姜花属 SRAP-PCR 体系的优化与建立

高丽霞^{1,3}, 刘念^{2*}, 黄邦海³, 张伟⁴

(1. 中国科学院华南植物园, 广州 510650; 2. 仲恺农业技术学院, 广州 510225; 3. 广州市农业技术推广中心, 广州 510520; 4. 华南农业大学, 广州 510642)

摘要: 对姜花属的 SRAP-PCR 反应体系进行了 Mg 离子、dNTPs、Taq 酶、引物以及模板 DNA 浓度等方面的优化, 除 Mg 离子浓度外, 优化后的体系在其它各成分上, 与原始体系相比, 均显著降低了用量, 节约了成本。并用优化后的体系对姜科其它 14 个属进行了扩增, 均可得到良好的扩增效果, 而且揭示的多态性很高, 说明 SRAP 标记可以用来进行姜科各属内及属间分类和亲缘关系分析。

关键词: 姜花属; SRAP; 优化; 分类; 亲缘关系分析

中图分类号: Q949.71 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2008)05-0604-04

Optimization and formation SRAP system in *Hedychium*

GAO Li-Xia^{1,3}, LIU Nian^{2*}, HUANG Bang-Hai³, ZHANG Wei⁴

(1. *South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China*; 2. *Zhongkai University of Agriculture and Technology, Guangzhou 510225, China*; 3. *Guangzhou Agricultural Technology Extension Center, Guangzhou 510520, China*; 4. *South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China*)

Abstract: The system of SRAP in *Hedychium* was optimized including the concentration of Mg²⁺, dNTPs, TaqE, primers and DNA template etc. Compared with original system, this system reduced notably the consumption of all components except Mg²⁺. Amplified reactions of other fourteen genera in Zingiberaceae with this system appeared clear bands and high polymorphism. The result showed that SRAP maker can be used in taxonomy and genetic connection analysis of varieties, species or genera in Zingiberaceae.

Key words: *Hedychium*; SRAP; optimize; taxonomy; genetic connection analysis

姜花属(*Hedychium*)隶属于姜科(Zingiberaceae)的姜亚科姜花族(吴德邻, 1981), 是姜科中一个具有约 80 个种的属, 分布类型为热带亚洲至热带非洲(吴征镒, 1991)。中国国产的种类主要分布在西南至华南地区, 约有 29 种及 3 变种。姜花属植物是极受欢迎的园林绿化观赏植物, 全世界已培育出园艺品种近百个。在中国, 有关姜花属的研究工作甚少, 以致市场上姜花品种单一, 完全没有开发出其作为香型切花的巨大潜力。为加快姜花属的育种进程, 我们开始了其分子遗传学方面的研究, 以对香

气、色彩、花序苞片排列方式等重要性状的遗传规律进行研究定位。本文对姜花属的 SRAP-PCR 体系进行了优化, 为姜花属遗传连锁图谱构建、QTL 定位打下基础。

SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism, 相关序列扩增多态性) 技术由美国加州大学蔬菜作物系 Li & Quiros 于 2001 年提出。该标记通过一对引物对开放读码框(ORFs)进行扩增, 分为 17 个碱基的正向引物(F-primer)和 18 个碱基的反向引物(R-primer)。该标记的特点是: 多态性高, 产

收稿日期: 2006-12-25 修回日期: 2007-04-16

基金项目: 广东省科技攻关项目(2006B20201044)[Supported by Science and Technology Key Program of Guangdong Province (2006B20201044)]

作者简介: 高丽霞(1980-), 女, 山东泰安人, 博士, 主要从事园林植物的分子遗传学研究。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: liunian678@163.com)

率中等,重复性好,操作简单,在基因组中分布均匀,较易对扩增得到的目标片段进行测序,引物具有通用性,而且其正向引物可以与反向引物两两搭配组合,因此用少量的引物可组配得到多个引物对,提高了引物的使用效率,降低引物合成成本。此标记最早是在芸薑属作物(Li & Quiros, 2001)中开发利用,目前已在马铃薯、水稻、莴苣、花椰菜、油菜和大蒜等植物中使用,并且应用于遗传多样性分析、比较基因组学、图谱构建等方面(林忠旭等, 2003, 2004; Ferriol 等, 2003, 2004)。

本文在 Li & Quiros(2001)的反应体系的基础上,对 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、Taqase 浓度、模板 DNA 浓度、引物浓度进行了优化。并以建立的优化体系对姜花属的近缘属进行扩增,以期将该标记用于姜科分类与亲缘关系分析中。

1 材料与方法

1.1 材料

用于 SRAP 分析的姜科材料见表 1。

表 1 用于 SRAP 分析的姜科材料
Table 1 Materials of Zingiberaceae for SRAP analysis

种名 Species	属名 Genus	来源 Sources
峨嵋姜花 <i>Hedychium flavescens</i>	姜花属 <i>Hedychium</i>	云南
单叶姜 <i>Elettariopsis monophylla</i>	单叶姜属 <i>Elettariopsis</i>	华南植物园
茴香砂仁 <i>Etilingera yunnanensis</i>	茴香砂仁属 <i>Etilingera</i>	华南植物园
单叶拟豆蔻 <i>Elettariopsis monophylla</i>	拟豆蔻属 <i>Elettariopsis</i>	华南植物园
砂仁 <i>Amomum villosum</i>	豆蔻属 <i>Amomum</i>	华南植物园
艳山姜 <i>Alpinia zerumbet</i>	山姜属 <i>Alpinia</i>	广州市农业技术推广中心
生姜 <i>Zingiber officinale</i>	姜属 <i>Zingiber</i>	广州市农业技术推广中心
舞花姜 <i>Globba racemosa</i>	舞花姜属 <i>Globba</i>	华南植物园
土田七 <i>Stahlianthus involucratus</i>	土田七属 <i>Stahlianthus</i>	华南植物园
心叶凹唇姜 <i>Boesenbergia longiflora</i>	凹唇姜属 <i>Boesenbergia</i>	华南植物园
山奈 <i>Kaempferia galanga</i>	山奈属 <i>Kaempferia</i>	华南植物园
喙花姜 <i>Rhynchanthus beesianus</i>	喙花姜属 <i>Rhynchanthus</i>	云南昆明
闭鞘姜 <i>Costus speciosus</i>	闭鞘姜属 <i>Costus</i>	广州市农业技术推广中心
姜黄 <i>Curcuma longa</i>	姜黄属 <i>Curcuma</i>	广州市农业技术推广中心
黄花大苞姜 <i>Caulokaempferia coenobialis</i>	大苞姜属 <i>Caulokaempferia</i>	惠州市南昆山

表 2 SRAP 体系优化试验设计
Table 2 Design for SRAP system optimizing

不同水平 Level	1	2	3	4	5	6	7	8
Mg^{2+} 浓度 (mmol/L)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0
dNTPs 浓度 (mmol/L)	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30		
Taqase 浓度 (U/25 μ L)	0.5	1.0	1.25	1.5	2.0			
引物浓度 (pmol)	2.5	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20
DNA 模板用量 (ng)	15	30	45	60	75	90	105	120

1.2 试验方法

(1)DNA 提取方法:按 Murray & Thompson (1980)的 CTAB 法,并稍作改动。(2)SRAP 反应体系的优化试验:体系优化试验是以 Li & Quiros (2001)的反应体系为原始体系,分别对 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、Taqase 浓度、模板 DNA 浓度、引物浓度进行优化,具体如表 2 示。选用引物 ME-2

(TGAGTCCAAACCGGAGC)/EM-2(GACTGCG-TACGAATTTGC)(Li & Quiros, 2001),反应体积 25 μ L,在 PTC-200 热循环仪上进行。(3)属间扩增试验:选用引物 ME-5 (TGAGTCCAAACCG-GAAG)/EM-5(GACTGCGTACGAATTAAC)(Li & Quiros, 2001),其余同(2)。

2 结果与分析

2.1 Mg^{2+} 浓度对扩增体系的影响

Mg^{2+} 浓度对于 PCR 反映的成功与否关系密切,它与产物的特异性、产物的忠实性、引物二聚体的生成、酶活力以及产物的产量等诸多因素有关。对 0.5~4.0 mmol/L 的 Mg^{2+} 浓度进行对比。由图 1 可见, Mg^{2+} 浓度在 3.0~4.0 mmol/L 之间变化不大,低于 2.5 mmol/L 时,几乎无任何谱带。因此 Mg^{2+} 浓度应该不低于 3 mmol/L。

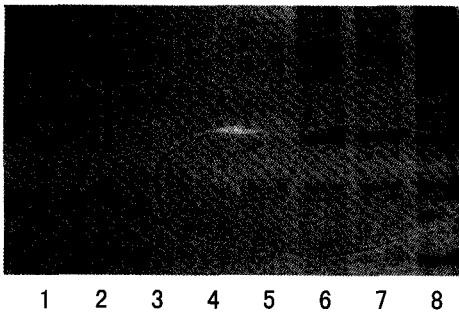


图1 不同 Mg^{2+} 浓度对 SRAP 扩增的影响
(ME-2/EM-2 扩增峨嵋姜花,下同)

Fig.1 Effect of different Mg^{2+} concentrations on the SRAP profiles

1~8. Mg^{2+} 浓度 Concentration(mM): 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0。

2.2 dNTPs 和 TaqE 浓度

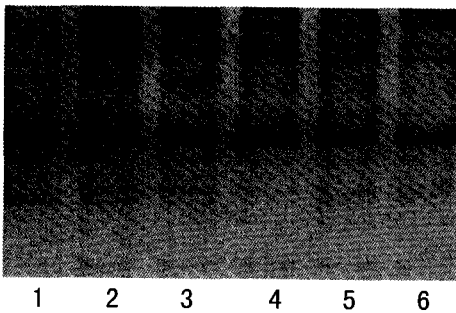


图2 不同 dNTPs 浓度对 SRAP 扩增的影响
Fig.2 Effect of different dNTPs concentrations on the SRAP profiles

1~6. dNTPs 浓度 Concentration(mM): 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30。

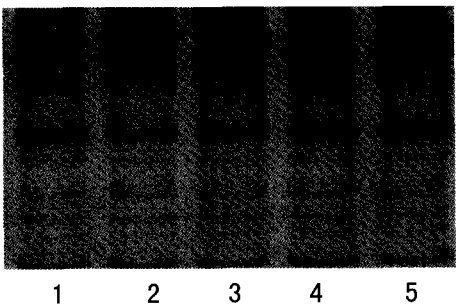


图3 不同 TaqE 浓度对 SRAP 扩增的影响
Fig.3 Effect of different TaqE concentrations on the SRAP profiles

1~5. TaqE 浓度 Concentration(mM): 0.5, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0。

2.3 引物浓度

dNTPs 浓度和 TaqE 浓度与 PCR 的产量以及产物的忠实性有关,由图 2、3 可见,dNTPs 从 0.05~0.30 mmol/L 对扩增产量影响不大,谱带一致;Taqase 用量在 0.5~2U/25 μ L 之间无差异。所以,dNTPs 浓度可选用 0.05 mmol/L, Taqase 可以用 0.5U/25 μ L。

由图 4 可见,引物用量大于 5pmol 时谱带较为清晰,7.5~20 pmol 之间的谱带无明显差异,2.5 pmol 用量时几乎无谱带,说明提高引物的用量可以提高产量,但是引物过多时会在反应过程中形成二聚体,应该设置引物浓度不低于 5 pmol。

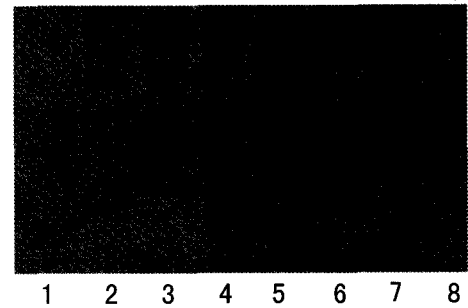


图4 不同引物浓度对 SRAP 扩增的影响
Fig.4 Effect of different primers concentrations on the SRAP profiles

1~8. 引物浓度 Primers concentration(pmole): 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20。

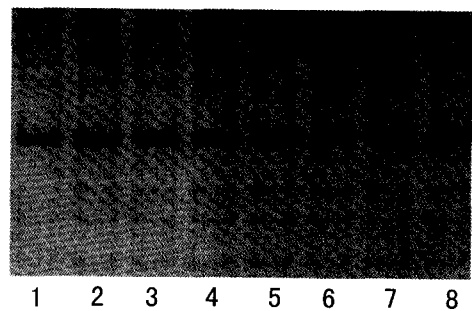


图5 不同 DNA 模板用量对 SRAP 的影响
Fig.5 Effect of different DNA template contents on the SRAP profiles

1~8. DNA 模板用量 DNA template (ng/25 μ L): 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120。

2.4 DNA 模板用量

为了找到适宜的 DNA 模板用量,对 15~120 ng/25 μ L 之间的不同 DNA 模板用量进行比较。从

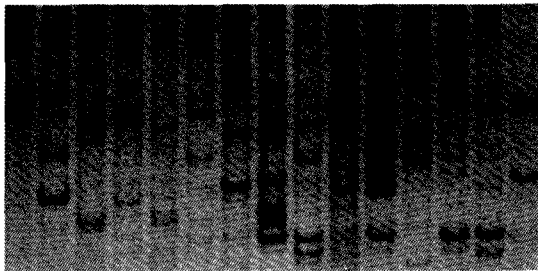
图 5 中可以看出在 15~120 ng/25 μ L 范围内,模板用量对扩增的影响不大。这便省却了样品量较大时测量 DNA 浓度这一琐碎步骤。

2.5 优化后的体系

综合以上结果,在保证扩增产量和特异性的基础上,为节约成本,优化后 25 μ L 反应体系见表 3。

表 3 优化前后的反应体系比较
Table 3 Comparison of optimized reaction system and former system

反应体系 reaction system	DNA 模板 DNA template (ng/25 μ L)	引物 Primer pairs (pmol)	Mg ²⁺ (mmol /L)	Taq 酶 Taqase (U)	dNTPs (mmol /L)
原始体系 Former system(Li & Quiros, 2001)	60	10	3	1	0.2
优化体系 Opti- mized system	15	5	3	0.5	0.05



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

图 6 利用引物 ME-5/EM-5 对姜科 15 个属的扩增结果
Fig. 6 Result of SRAP profiles to fifteen genus in Zingiberaceae based on primer ME-5/EM-5

1~15. 单叶姜; 茴香砂仁; 单叶拟豆蔻; 砂仁; 艳山姜; 生姜; 舞花姜; 土田七; 心叶凹唇姜; 山奈; 喙花姜; 闭鞘姜; 黄白姜花; 姜黄; 黄花大苞姜。

1~15. *Elettariopsis monophylla*, *Etilingera yunnanensis*, *Elettariopsis monophylla*, *Amomum villosum*, *Alpinia zerumbet*, *Zingiber officinale*, *Globba racemosa*, *Stahlianthus involucratum*, *Boesenbergia longiflora*, *Kaempferia galanga*, *Rhynchantus beesianus*, *Costus speciosus*, *Hedychium chrysoleucum*, *Curcuma longa*, *Caulokaempferia coenobialis*.

2.6 优化体系对不同属的扩增

利用优化后的体系对姜科十五个属进行扩增,其扩增结果如图 6 所示。都能获得较为清晰的谱带,而且揭示的多态性很高,说明 SRAP 标记可以用来进行姜科各属内、属间,乃至种间和种内的分类和亲缘关系分析。

3 讨论

姜花属乃至姜科中有大量具开发价值的花卉资源,由于尚未得到大多研究者的重视,致使美丽、幽香的姜花属花卉仍大都野生于丛林深处。姜花属植物的花期大都集中在夏秋季,有的种则在春节前后开花,前者弥补了夏秋季香型切花缺乏的现状,后者则为我国传统节日增加了喜庆。所以开展姜花属引种、育种工作对丰富我国香型切花种类具有重要意义。

为加快姜花属育种速度、提高育种水平,有必要将分子标记技术引入到姜花属育种工作中来。由于这方面的工作尚未开展,选择没有物种特异性的分子标记是可行的。SRAP 标记与 RAPD 相似,没有物种特异性,操作较简单,却有更好的重复性,是用来研究基因组未知的物种的理想手段;而且同一反应体系可在不同属间应用,因此该标记也是进行分类学研究的理想标记。

参考文献:

- 林忠旭,张献龙,聂以春,等. 2003. 棉花 SRAP 遗传连锁图构建[J]. 科学通报, (8): 1 676—1 679
- Ferriol M, Pico B, Nuez F. 2003. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers [J]. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, **107**: 271—282
- Ferriol M, Pico B, Pascual Fernandez de Cordova, et al. 2004. Molecular diversity of a germplasm collection of squash (*Cucurbita moschata*) determined by SRAP and AFLP marker [J]. *Crop Science*, **44**: 653—664
- 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 分离群体及遗传多样性评价中的适用性分析)[J]. *Acta Genet Sin(遗传学报)*, **31**(6): 622—626
- Li G, Quiros C F. 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]. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, **103**: 455—461
- Murray HG, Thompson WF. 1980. Rapid isolation of higher weight DNA. *Nucleic Acids Res*, **8**: 4 321
- Wu DL(吴德邻). 1994. Phytogeography of the Zingiberaceae(姜科植物地理)[J]. *J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报)*, **2**: 1—14
- Wu ZY(吴征镒). 1991 The areal-types of Chinese genera of seed plants(中国种子植物属的分布区类型)[J]. *Acta Bot Yunnan(云南植物研究)*, **Suppl. IV**: 112—115