

结缕草属植物 SRAP-PCR 体系的建立和优化

薛丹丹^{1,2}, 郑轶琦², 王志勇², 郭海林², 陈宣², 刘建秀^{2*}

(1. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省中国科学院植物研究所, 江苏 南京 210014)

摘要:以 SDS 法提取的结缕草属植物叶片 DNA 为模板, 分别采用单因子试验和正交设计试验 2 种方法, 对影响结缕草属植物 SRAP-PCR 的 Mg^{2+} 、dNTP、引物、Taq DNA 聚合酶和模板 DNA 五个因素进行优化试验。单因子试验分别研究各因素在多水平条件下对 SRAP-PCR 反应体系的影响, 得到最佳反应条件。正交设计采用 $L_{16}(4^5)$ 方案, 综合考虑各因素间的相互作用, 通过直观分析法获得各影响因素的最佳反应水平。根据 4 对引物对 6 份结缕草属植物材料扩增结果的验证比较, 2 种方法所获得的最佳反应体系存在一定的差异。通过综合比较和分析 2 种方法的优化体系扩增出的条带数、多态性条带数及多态性比率, 最终建立了结缕草属植物 SRAP-PCR 的最佳反应体系: Mg^{2+} 2.00 mmol/L、dNTP 220 μ mol/L、引物 0.20 μ mol/L、Taq DNA 聚合酶 0.50 U、模板 DNA 60 ng、2 μ L $10\times$ buffer, 总体积为 20 μ L。这一优化体系的建立为今后利用 SRAP 标记技术进行结缕草属植物遗传多样性、种质鉴定、遗传连锁图谱及亲缘关系分析等方面的研究提供了科学的依据。

关键词:结缕草属植物; SRAP 标记; 单因子试验; 正交设计; 体系优化

中图分类号: S543⁺.901; Q946-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5759(2008)06-0093-09

* 结缕草属 (*Zoysia*) 为禾本科画眉草亚科的多年生草本植物, 是一种优良的暖季型草坪草, 广泛分布于太平洋西岸和北岸沿海地区, 主要分布于亚洲, 在澳洲等温暖地区亦有分布。目前一般认为结缕草属植物分为 11 个种和若干变种、变形。我国有 5 种, 2 变种, 1 变型, 5 种分别为大穗结缕草 (*Z. macrostachya*)、中华结缕草 (*Z. sinica*)、日本结缕草 (*Z. japonica*)、沟叶结缕草 (*Z. matrella*)、细叶结缕草 (*Z. tenuifolia*), 2 变种为长花结缕草 (*Z. sinica* var. *nipponica*) 和青结缕草 (*Z. japonica* var. *pollida*), 1 变型为大穗日本结缕草 (*Z. japonica* f. *macrostachya*)^[1,2]。结缕草属植物具有发达的地下茎和匍匐茎, 耐旱、耐寒、耐盐碱, 病虫害较少, 弹性和耐磨性较强, 是国内外公认的典型的环保型草坪草, 可广泛应用于观赏草坪、休憩草坪、运动草坪以及保土草坪上。

近年来随着分子生物学和生化技术的不断发展, 分子标记技术在草坪草研究中的应用也越来越广泛。在结缕草属植物的研究中, RFLP (restriction fragment length polymorphism, 限制片段长度多态性)^[3]、RAPD (random amplified polymorphic DNA, 随机扩增多态性 DNA)^[4~7]、SSR (simple sequence repeats, DNA 简单序列重复)^[8,9]、AFLP (amplified restriction fragment polymorphism, 扩增片段长度多态性)^[10~12]、ISSR (inter-simple sequence repeat, 简单序列重复区间扩增)^[13,14] 标记在亲缘关系鉴定^[4]、遗传分析^[5~7,12,14]、指纹图谱^[8,13] 及遗传连锁图谱^[3,9~11]、体系优化^[15] 等应用中均有报道。这些标记虽使草坪草分子标记技术得到了突飞猛进的发展, 但各有优缺点。一种基于 PCR (polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应) 的新型分子标记技术——SRAP (sequence-related amplified polymorphism, 相关序列扩增多态性) 标记^[16] 的发明和应用弥补了以上分子标记的不足且具备了它们的优点。SRAP 标记是根据基因外显子中丰富的 GC (鸟嘌呤、胞嘧啶) 含量和内含子、启动子中丰富的 TA (腺嘌呤、胸腺嘧啶) 含量的特点, 利用独特的引物设计对 ORFs (open reading frames, 开放阅读框架) 进行扩增, 因不同个体间的外显子、内含子和启动子的不同而产生多态性。SRAP 标记简单、稳定可靠、重复性好、多态性高、在基因组中分布均匀、引物非特异性等优点使其在多种植物中得到广泛的应用, 目前已在水稻 (*Oryza sativa*)^[17]、小麦 (*Triticum aestivum*)^[18]、玉米 (*Zea mays*)^[19]、甘薯 (*Dioscorea esculenta*)^[20]、棉花 (*Gossypium*

* 收稿日期: 2007-12-24; 改回日期: 2008-03-07

基金项目: 江苏省科技攻关项目 (BE2006339), 国家自然科学基金项目 (30571307) 和江苏省高技术项目 (BG2006320) 资助。

作者简介: 薛丹丹 (1982-), 女, 河南济源人, 硕士。E-mail: yz129@163.com

* 通讯作者。E-mail: turfunit@yahoo.com.cn

hirsutum)^[21]、油菜(*Brassica campestris*)^[22]、黄瓜(*Cucumis sativus*)^[23]、野牛草(*Buchloe dactyloides*)^[24,25]等植物中使用,主要应用遗传多样性、指纹图谱、纯度鉴定、资源亲缘关系分析、连锁图谱构建、基因定位、比较基因组学研究等领域。目前在草坪草的研究中,SRAP 分子标记技术应用的相关报道甚少。

PCR 反应体系优化的方法主要有单因子试验和正交设计试验。单因子试验是通过研究 PCR 反应中的各影响因素的影响情况,获得各自的最适条件,通过各因素的组合建立 PCR 的最佳反应体系。目前,该方法已普遍应用于不同标记的 PCR 体系优化。正交设计试验是由何正文等^[26]最先提出用于 PCR 体系优化中的,该方法综合考虑 PCR 反应体系中各因素的相互作用,并可以快速找到最佳的反应条件,获得满意的优化体系并且可以缩短试验时间和成本。目前,这 2 种方法同时在 PCR 体系优化中的应用较少,仅在紫椴(*Tilia amurensi*)^[27]的 ISSR-PCR 优化中有相关报道,而在 SRAP-PCR 反应体系中尚未见到相关文章。

本研究首次利用单因子试验和正交设计 2 种方法对结缕草属植物 SRAP 体系中的 Mg^{2+} 、dNTP、引物浓度、Taq 酶及模板 DNA 浓度进行优化,试图建立起一个能够稳定扩增、条带清晰、多态性高的体系,并通过比较 2 种优化方法,以期筛选出较为理想的优化体系,从而建立结缕草属植物 SRAP-PCR 的最佳反应体系,为以后 PCR 反应体系的优化提供一定的参考。同时,该研究也将为 SRAP 标记在进行结缕草属植物种源鉴定、遗传多样性、指纹图谱、连锁图谱及基因定位等方面的研究提供较为可靠的技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为结缕草属植物结缕草、中华结缕草、沟叶结缕草的 3 个种 5 份种源和 1 份杂交后代(表 1),均取自江苏省中国科学院植物研究所草业中心种质资源圃(北纬 32°02',东经 118°28',海拔 30~40 m)。其中 Z31-3 用于体系优化,其他材料用作体系验证。

表 1 试验材料的名称和来源

Table 1 Names and sources of experimental materials

编号 Code	种名 Species	来源 Sources	北纬 Latitude	东经 Longitude
Z022	日本结缕草 <i>Z. japonica</i>	山东胶州湾 Jiaozhouwan, Shandong province	36°26'	120°00'
Z068	中华结缕草 <i>Z. sinica</i>	安徽南陵 Nanling, Anhui province	30°54'	118°10'
Z105	中华结缕草 <i>Z. sinica</i>	山东烟台 Yantai, Shandong province	37°30'	121°24'
Z119	日本结缕草 <i>Z. japonica</i>	江苏响水 Xiangshui, Jiangsu province	34°12'	119°34'
Z123	沟叶结缕草 <i>Z. matrella</i>	美国引进 America	—	—
Z31-3	日本结缕草×细叶结缕草 <i>Z. japonica</i> × <i>Z. tenuifolia</i>	日本结缕草(江西)和细叶结缕草(南京)的杂交后代 Hybrid of <i>Z. japonica</i> (Jiangxi) and <i>Z. tenuifolia</i> (Nanjing)	—	—

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取和检测 材料 DNA 的提取采用 SDS 法(sodium dodecyl sulfate,十二烷基磺酸钠),并稍做修改。采用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的质量和浓度(电泳仪为 DYCP-34 型,电泳槽为 DYY-5 型)。电泳结束后,在自动凝胶图像分析仪(上海培清科技有限公司 JS-380)上观测,确定 DNA 浓度并拍照。最后将样品 DNA 浓度稀释到 50 ng/ μ L 并于 -20℃ 保存。

1.2.2 SRAP-PCR 单因子试验 对 SRAP-PCR 体系中的 5 个因素分别进行多水平的优化,其中 Mg^{2+} 有 10 个水平梯度、dNTP 和 DNA 有 9 个浓度梯度、Taq DNA 聚合酶和引物 2 因素在 8 个水平上筛选,方案如表 2。SRAP 引物购自上海博亚生物技术有限公司,dNTP 和 Taq DNA 聚合酶购自南京申能博彩公司,DNA marker 购自南京 TaKaRa 公司。

1.2.3 SRAP-PCR 反应体系正交设计 采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计,对 Mg^{2+} 、dNTP、引物、Taq DNA 聚合酶、DNA 进行 5 因素 4 水平筛选,方案如表 3 和 4。

表 2 SRAP-PCR 体系单因子试验

Table 2 Single factor test of SRAP-PCR system

因素 Factors	水平 Levels									
Mg ²⁺ (mmol/L)	0.25	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50	1.75	2.00	2.50	3.00
引物 Primer (μ mol/L)	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40		
Taq DNA 聚合酶 Taq DNA polymerase (U)	0.25	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50	1.75	2.00		
dNTP (μ mol/L)	150	180	200	220	240	260	280	300	320	
DNA (ng)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	

表 3 SRAP-PCR 体系的因素-水平

Table 3 Factors and levels of SRAP-PCR system

水平 Levels	因素 Factors					
	Mg ²⁺ (mmol/L)	dNTP (μ mol/L)	引物 Primer (μ mol/L)	Taq DNA 聚合酶 Taq DNA polymerase (U)	DNA (ng)	
1	1.25	200	0.10	0.50	30	
2	1.50	220	0.15	0.75	40	
3	1.75	240	0.20	1.00	50	
4	2.00	260	0.25	1.50	60	

表 4 SRAP-PCR [L₁₆(4⁵)] 正交试验设计Table 4 [L₁₆(4⁵)] Orthogonal design for SRAP-PCR

编号 Note	因素 Factors					
	Mg ²⁺ (mmol/L)	dNTP (μ mol/L)	引物 Primer (μ mol/L)	Taq DNA 聚合酶 Taq DNA polymerase (U)	DNA (ng)	
1	1.25	200	0.10	0.50	30	
2	1.25	220	0.15	0.75	40	
3	1.25	240	0.20	1.00	50	
4	1.25	260	0.25	1.50	60	
5	1.50	200	0.15	1.00	60	
6	1.50	220	0.10	1.50	50	
7	1.50	240	0.25	0.50	40	
8	1.50	260	0.20	0.75	30	
9	1.75	200	0.20	1.50	40	
10	1.75	220	0.25	1.00	30	
11	1.75	240	0.10	0.75	60	
12	1.75	260	0.15	0.50	50	
13	2.00	200	0.25	0.75	50	
14	2.00	220	0.20	0.50	60	
15	2.00	240	0.15	1.50	30	
16	2.00	260	0.10	1.00	40	

1.2.4 SRAP-PCR 扩增程序及扩增产物的检测 SRAP-PCR 扩增程序为:94℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 1 min,37℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 10 s,5 个循环;94℃ 变性 1 min,50℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 10 s,35 个循环;循环结束后,72℃ 延伸 7 min,4℃ 保存。扩增反应在英国 TECHNE 公司的 TC-412 型 PCR 仪上进行。

扩增结束后,在扩增产物中加入 2 μL 6 \times loading Buffer 缓冲液混匀,上样于 10% 的聚丙烯酰胺凝胶进行分离(电泳仪为 DYY-8B 型,电泳槽为 JY-SCZ6 型),电泳结束后快速银染检测。

1.2.5 SRAP 引物组合的筛选 在体系优化前,先用 Mg^{2+} 1.50 mmol/L、dNTP 285 $\mu\text{mol/L}$ 、引物 0.15 $\mu\text{mol/L}$ 、Taq DNA 酶 1.0 U、DNA 50 ng 体系进行引物的初步筛选,用于筛选的模板 DNA 为 Z31-3 和 Z123。引物为 5 条正向引物和 10 条反向引物,共组合成 50 对 SRAP 引物,其序列见表 5。筛选出较好的引物组合之一 Me5+Em7 用于体系优化。

2 结果与分析

2.1 参试材料基因组 DNA 的检测结果

对 6 份材料的 DNA 浓度和质量进行检测,结果表明,参试材料的基因组 DNA 质量和浓度都较好,满足本试验的要求(图 1)。

2.2 SRAP-PCR 单因子试验扩增结果分析

2.2.1 Mg^{2+} 浓度对 SRAP 体系的影响 Mg^{2+} 是 PCR 反应体系中的重要影响因子之一。 Mg^{2+} 浓度对 PCR 扩增效率和特异性都有影响,它是 Taq 酶的激活剂,影响 Taq 酶的活性,同时又与 dNTP 和模板结合,降低了酶活性所需要的游离 Mg^{2+} 的量。 Mg^{2+} 过多会增加产量,但会出现非特异扩增;过少会降低 Taq 酶的活性,使反应产物减少。因此 SRAP-PCR 反应体系中 Mg^{2+} 浓度就显得很重要。在该体系中 Mg^{2+} 有 10 个浓度梯度(图 2A)。 Mg^{2+} 浓度为 0.25~1.25 mmol/L(泳道 1~5)几乎无扩增产物,当浓度为 1.50 mmol/L 时仅有 2 条很弱的条带;随着浓度的逐渐升高,扩增条带逐渐丰富且清晰,1.75 mmol/L 的多态性好但条带比较细,说明该浓度较低,扩增产物的量较少,当 Mg^{2+} 浓度为 2.00, 2.50 和 3.00 mmol/L 时,3 个水平的扩增结果无显著差异,综合比较, Mg^{2+} 浓度为 2.00 mmol/L 时扩增效果最好,条带清晰,带型丰富,多态性好。

表 5 SRAP 引物序列

Table 5 Primer sequences used for SRAP analysis

编号 Code	正向引物 Forward primers	编号 Code	反向引物 Reverse primers
Me1	5' -TGAGTCCAAACCGGATA-3'	Em1	5' -GACTGCGTACGAATTCAA-3'
Me2	5' -TGAGTCCAAACCGGAGC-3'	Em2	5' -GACTGCGTACGAATTCTG-3'
Me3	5' -TGAGTCCAAACCGGACC-3'	Em3	5' -GACTGCGTACGAATTGAC-3'
Me4	5' -TGAGTCCAAACCGGACA-3'	Em4	5' -GACTGCGTACGAATTTGA-3'
Me5	5' -TGAGTCCAAACCGGTGC-3'	Em5	5' -GACTGCGTACGAATTAAC-3'
		Em6	5' -GACTGCGTACGAATTGCA-3'
		Em7	5' -GACTGCGTACGAATTGAG-3'
		Em8	5' -GACTGCGTACGAATTGCC-3'
		Em9	5' -GACTGCGTACGAATTTCA-3'
		Em10	5' -GACTGCGTACGAATTCAT-3'

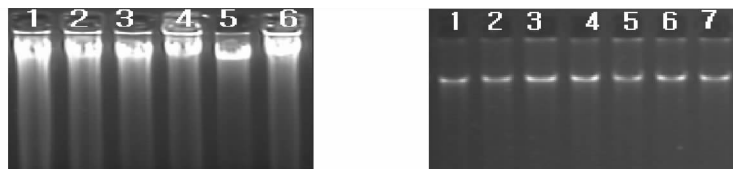


图 1 参试材料 DNA 原液(左)及稀释为 50 ng/ μL (右)的 DNA 电泳检测

Fig. 1 Electrophoresis of genomic DNA(left) and its 50 ng/ μL dilution(right) of experimental material

图中编号 1~6 分别为材料 Z022、Z068、Z105、Z119、Z123、Z31-3, 编号 7 为 λDNA

Number 1~6 refer to Z022, Z068, Z105, Z119, Z123, Z31-3, 7 refers to λDNA

2.2.2 dNTP 浓度对 SRAP 体系的影响 高浓度的 dNTPs 会对 PCR 扩增反应起到抑制作用,而浓度过低又会影响扩增产率。本研究在其他条件不变的前提下设定 9 个 dNTPs 浓度梯度(图 2B)。在浓度为 150,180 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 时条带清晰,220 和 240 $\mu\text{mol/L}$ 条带减少,仅 1 条。浓度超过 240 $\mu\text{mol/L}$ 扩增条带有所增加但比较模糊。经比较在 20 μL 体系中 dNTP 浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时扩增条带清晰且丰富。

2.2.3 引物浓度对 SRAP 体系的影响 引物浓度会影响 PCR 扩增的特异性。较高的引物浓度会导致非特异性产物扩增;过低则影响扩增效果。本研究设置 8 个引物浓度梯度(图 2C)。浓度为 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 时条带少且不清,说明扩增产率低,浓度为 0.10~0.40 $\mu\text{mol/L}$ 时随浓度的逐渐增加,扩增条带也逐渐清晰且稳定。为节省起见,本研究采用在 20 μL 体系中加入 0.15 $\mu\text{mol/L}$ 引物的设计。

2.2.4 Taq DNA 聚合酶浓度对 SRAP 体系的影响 Taq DNA 酶浓度过低不能扩增,浓度太高产生非特异性扩增。选择 Taq DNA 聚合酶浓度时主要考虑到扩增效果和成本。本研究设定 8 个 Taq DNA 聚合酶浓度梯度(图 2D),Taq DNA 聚合酶为 0.25 U 时扩增产物少,条带少;0.50,0.75 和 1.25 U 的条带增加且较清晰;1.00 U 的条带丰富且清晰;1.50,1.75 和 2.00 U 虽条带丰富但稍弱。综合考虑其扩增效果和成本,本体系确定 Taq DNA 聚合酶浓度为 1.00 U。

2.2.5 DNA 浓度对 SRAP 体系的影响 在本研究中设定了 9 个 DNA 浓度梯度(图 2E),除了 DNA 浓度为 10 和 20 ng 时扩增条带少且有非特异带出现外,30~90 ng 的扩增结果都无太大的差异,条带都较清晰和稳定。这说明 SRAP 标记对模板 DNA 浓度的范围要求较宽,经过比较和综合考虑,最后确定 DNA 浓度为 50 ng。

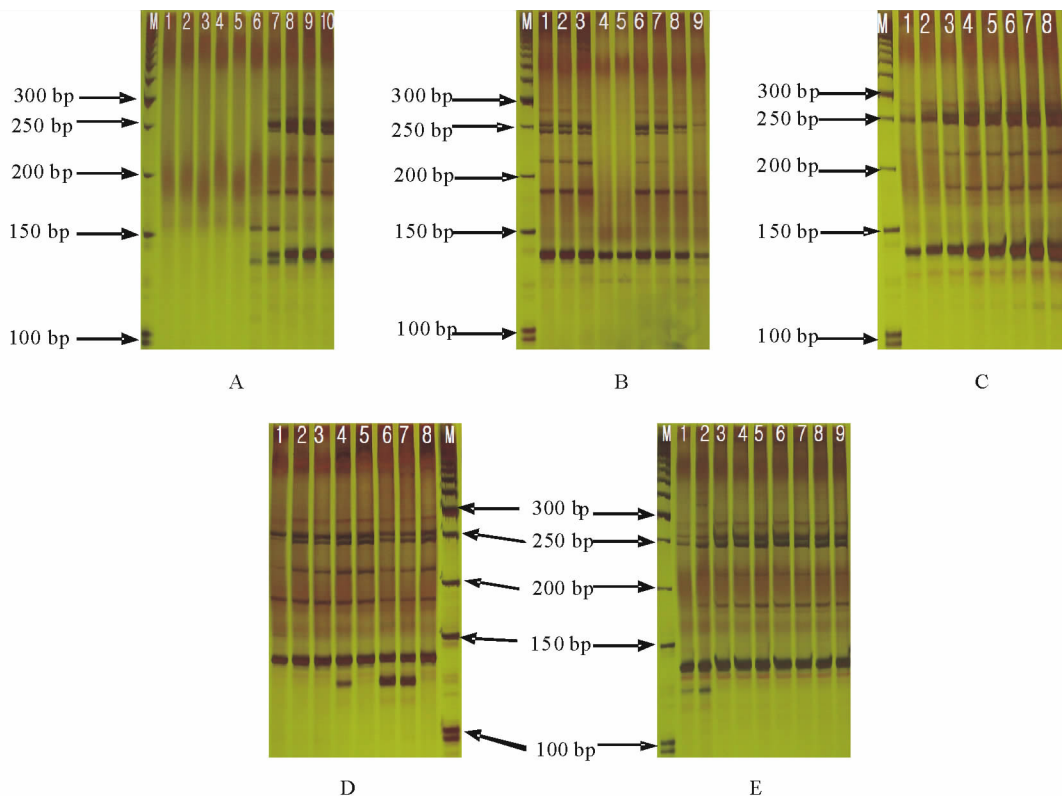


图 2 不同浓度水平 Mg^{2+} 、dNTPs、引物、Taq DNA 聚合酶和 DNA 的 SRAP-PCR 电泳图谱

Fig. 2 SRAP-PCR with different concentration of Mg^{2+} 、dNTPs、primers、Taq DNA polymerase and DNA

M: Mark; A: 1~10 泳道分别为 Mg^{2+} 浓度 Mg^{2+} concentrations from lane 1 to 10 are 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.00, 2.50, 3.00 mmol/L; B: 1~9 泳道分别为 dNTP 浓度 dNTP concentrations from lane 1 to 9 are 150, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320 $\mu\text{mol/L}$; C: 1~8 泳道分别为引物浓度 Primer concentrations from lane 1 to 8 are 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40 $\mu\text{mol/L}$; D: 1~8 泳道分别为 Taq DNA 聚合酶浓度 Taq DNA polymerase concentrations from lane 1 to 8 are 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.00 U; E: 1~9 泳道分别为 DNA 浓度 DNA concentrations from lane 1 to 9 are 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ng

2.3 SRAP-PCR 正交设计试验结果分析

结缕草 SRAP-PCR 体系优化的正交试验 16 个组合的扩增结果如图 3 所示。参照何正文等^[26]的方法,对扩增结果进行直观分析,依据谱带的强弱及杂带的多少,将 16 个处理结果划分为 16 个评分等级以便统计分析,从 1~16 泳道依次计分为 6, 1, 8, 2, 3, 9, 4, 7, 5, 16, 11, 10, 13, 14, 15 和 12。得分最高的 10 和 15 组合因有杂带,不宜采用;得分较高的 13 和 14 组合带型清晰,亮度高,且杂带少,扩增效果最好;但比较分析 2 个组合不同组分浓度差异,组合 13 的 20 μL 反应体系中 Taq DNA 聚合酶的用量为 0.75 U,而组合 14 为 0.50 U,综合考虑试验的效果和成本,最终选择第 14 组合为结缕草基因组 SRAP-PCR 的最佳反应体系,即 20 μL 反应体系中含有 Mg^{2+} 2.00 mmol/L、dNTP 220 $\mu\text{mol/L}$ 、引物 0.20 $\mu\text{mol/L}$ 、Taq DNA 聚合酶 0.50 U、DNA 60 ng。

根据穆立蓄等^[27]的方法,对正交设计试验中的各组分浓度组合进行分析(表 6)。其中 K 值表示各因素同一水平下的试验值之和; k 值代表每一因素水平下的平均值; R 值为极差,即各因素在不同水平下的最大平均值与最小平均值之差。极差 R 值的大小反应了影响因子对反应体系结果的影响大小, R 值越大,影响越显著。在选定的 4 个水平范围内, Mg^{2+} 、dNTP、引物、Taq DNA 聚合酶和模板 DNA 五个因素对结果的影响由大到小依次为: $\text{Mg}^{2+} > \text{DNA} > \text{dNTP} > \text{引物} > \text{Taq DNA 聚合酶}$ 。 k 值反应了影响因素各水平对反应体系的影响情况, k 值越大,反应水平越好。 Mg^{2+} 以水平 4 好,dNTP 以水平 2 好,引物以水平 1 好,Taq DNA 聚合酶以水平 3 好,DNA 以水平 1 好(表 6)。这五因素的最佳反应体系为: Mg^{2+} 2.00 mmol/L、dNTP 220 $\mu\text{mol/L}$ 、引物 0.10 $\mu\text{mol/L}$ 、Taq DNA 聚合酶 1.00 U,模板 DNA 30 ng。此最佳水平组合没有在正交设计表中出现,但与直观分析中分值最高的 10 组合最接近,仅 Mg^{2+} 和引物浓度不同;其次和 14, 15 组合较接近。该结果与直观分析的结果基本一致,进一步确定组合 14 为最优组合体系。

2.4 2 种方法反应体系的验证结果

根据以上 2 种方法的最佳优化体系,用 4 对引物 Me1+Em2、Me2+Em3、Me4+Em3、Me1+Em8, 6 份材料(Z31-3、Z119、Z123、Z022、Z068、Z105)对两体系进行验证,两体系的扩增结果如图 4 所示。经直观比较,2 个优化反应体系差别不是很大,都能扩增出清晰丰富、特异性高且具有很好稳定性的条带。为了更好地验证 2 种方法

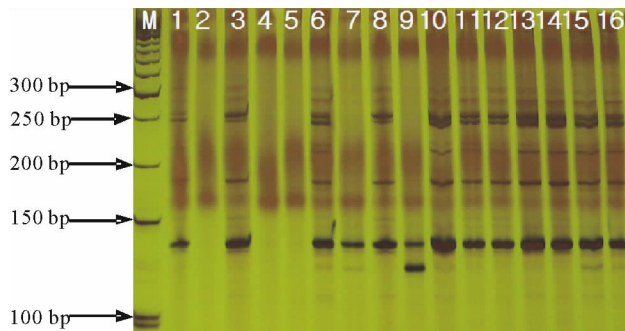


图 3 SRAP-PCR 体系正交试验设计扩增结果

Fig. 3 Amplified results of SRAP-PCR orthogonal design diagram

1~16 为处理编号,见表 4

1-16 are treatment code, shown in table 4; M: Mark

表 6 正交试验结果的统计分析

Table 6 Statistic result of the orthogonal design

结果 Results	Mg^{2+} (mmol/L)	dNTP ($\mu\text{mol/L}$)	引物 Primer ($\mu\text{mol/L}$)	Taq DNA 聚合酶 Taq DNA polymerase (U)	DNA (ng)
K_1	17.00	27.00	38.00	34.00	44.00
K_2	23.00	40.00	29.00	32.00	22.00
K_3	42.00	38.00	34.00	39.00	40.00
K_4	54.00	31.00	35.00	31.00	30.00
k_1	4.25	6.75	9.50	8.50	11.00
k_2	5.75	10.00	7.25	8.00	5.50
k_3	10.50	9.50	8.50	9.75	10.00
k_4	13.50	7.75	8.75	7.75	7.50
R	9.25	3.25	2.25	2.00	5.50

所得出的 2 种反应体系,本试验通过 4 对引物组合对 6 份结缕草属植物材料所扩增出的条带数和多态性进行比较(表 7)。结果表明,1)在这 4 对引物组合中,正交设计试验的扩增条带数大多多于或等同于单因子试验,仅引物组合 6 的条带数比单因子试验少 1 条,但其多态性比率(66.7%)却高于单因子试验(57.1%)。2)正交设计试验扩增出的多态性条带数都多于或等同于单因子试验。3)在 2 种方法的多态性比率的比较中,正交设计试验中仅引物组合 14 的比率(44.4%)稍低于单因子试验(50.0%),其他 3 对引物组合的多态性比率均高于单因子试验。

因此,最终确定本研究的最佳优化体系为正交设计试验的反应体系即 Mg^{2+} 2.00 mmol/L、dNTP 220 μ mol/L、引物 0.20 μ mol/L、Taq DNA 酶 0.50 U、模板 DNA 60 ng、2 μ L 10 \times buffer。在 4 对不同引物的扩增条件下,6 份结缕草属植物材料都在分子水平上表现出明显的多态性差异,多态性位点数目多,表明该体系可以有效地反应出结缕草属种源和后代间的差异,同时也可以对不同结缕草属植物的基因组进行 SRAP 扩增。

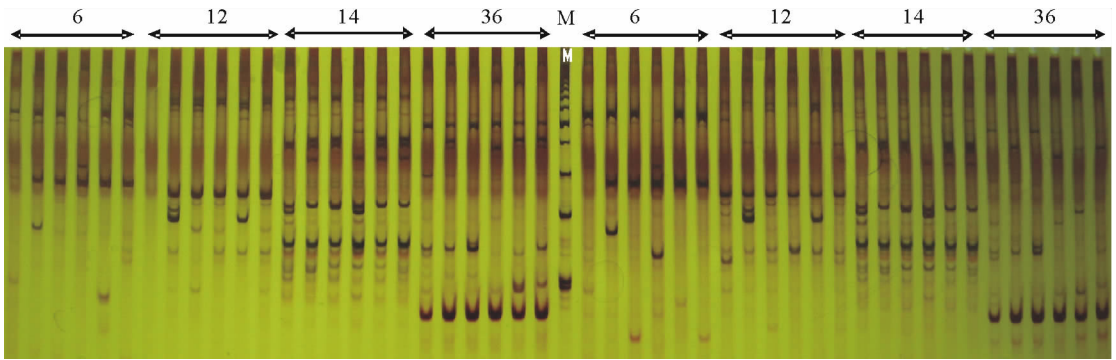


图 4 2 种不同方法的优化反应体系比较结果

Fig. 4 Comparative results of two different methods in optimized system

M:Mark;4 对引物 Four pairs of primers;Me1+Em2、Me2+Em3、Me4+Em3、Me1+Em8;6 份材料依次 Six *Zoysia* materials are:Z31-3、Z119、Z123、Z022、Z068、Z105;Mark 的左边为单因素—多水平体系,右边为正交试验设计体系 Left of Mark is single—multi levels system; Right of Mark is orthogonal design system

表 7 2 种不同方法的优化体系中 4 对引物组合的扩增结果多态性比较

Table 7 Polymorphism compare of the result amplified by four primer combinations with two different methods in optimized system

引物组合 Primer combination	单因子试验 Single factor test			正交设计试验 Orthogonal design test		
	扩增条带数 Number of bands	多态性条带数 Number of polymorphic bands	多态性比率 Polymorphism rate (%)	扩增条带数 Number of bands	多态性条带数 Number of polymorphic bands	多态性比率 Polymorphism rate (%)
Me1+Em2	7	4	57.1	6	4	66.7
Me2+Em3	7	3	42.9	8	5	62.5
Me4+Em3	8	4	50.0	9	4	44.4
Me1+Em8	8	4	50.0	8	7	87.5

3 讨论

3.1 单因子试验和正交试验在结缕草属植物 SRAP-PCR 体系优化中的应用

本研究针对目前 2 种主要的 PCR 体系优化方法对结缕草属植物的 SRAP 反应体系进行了优化,结果发现二者扩增结果存在的差异较小。单因子试验通过 Mg^{2+} 、dNTPs、引物、Taq DNA 聚合酶、DNA 等因素的多个水平来确定各因素的最佳扩增结果,从而使各因素的最佳水平组合起来得到 SRAP 优化体系,但该方法在优化各因

素的水平时都要逐一变化其中一种因素浓度而固定其余 4 种,当变化一种因素的浓度时,固定的其余 4 种因素的浓度往往靠经验或参考相近物种考虑,这样既不能考察 PCR 体系中各组分的交互作用,也不能完全保证各组分最佳的组合就是最佳反应体系,且完成时间较长,成本较高。正交设计试验通过各因素的相互作用得到最佳优化体系,与单因素试验相比,能通过直观分析法,快速获得满意的试验结果,减少处理组合,节约时间,减少工作量也降低了试验经费。但也有学者指出该方法存在一定的局限性,如对试验结果的评价带有主观性,打分的次序会直接影响分析结果,也不能很好地估计误差^[27]。本研究中 2 种方法得到的各因素最佳水平不完全相同,这可能与 2 种方法的优缺点有关。因此,今后 PCR 扩增条件及结果的客观评价体系的建立将是 PCR 反应体系优化的重要依据,也将会更好地促进正交试验设计的应用。

3.2 结缕草属 SRAP-PCR 优化体系的建立

在 PCR 反应体系中各个影响因素之间都相互作用,影响最大的是体系中的 Mg^{2+} 、dNTP、引物的浓度^[28,29]。本研究的正交设计试验中各因素对反应体系的影响大小为: $Mg^{2+} > DNA > dNTP > 引物 > Taq DNA$ 聚合酶,此结果表明结缕草属植物 SRAP-PCR 反应体系中各因素的影响作用与前人的结果基本一致。本研究通过单因子试验和正交设计试验对结缕草属植物 SRAP-PCR 反应体系进行优化后,得到的最佳反应体系为: Mg^{2+} 2.00 mmol/L、dNTP 220 μ mol/L、引物 0.20 μ mol/L、Taq DNA 聚合酶 0.50 U、模板 DNA 60 ng、2 μ L 10 \times buffer,总体积为 20 μ L。此最佳体系与标准 PCR 及他人的研究在各因素的浓度方面存在差异,这可能是由于不同植物的基因组和标记类型不同造成的^[27]。该反应体系的成功建立为今后 SRAP 标记在结缕草属植物的种源鉴定、遗传多样性分析、指纹图谱及遗传图谱构建等方面的广泛应用奠定了重要基础,也促进了分子标记技术在草业遗传育种和分子生物学研究中的进程。

参考文献:

- [1] 董厚德, 宫莉君. 中国结缕草生态学及其资源开发与应用[M]. 北京: 中国林业版, 2001. 1-8.
- [2] 刘建秀, 刘永东, 贺善安, 等. 中国暖季型草坪植物多样性和地理分布[J]. 草地学报, 1998, 5(1): 43-47.
- [3] Yaneshita M, Kaneko S, Sasakuma T. Allotetraploidy of *Zoysia* species with $2n=40$ based on RFLP genetic map[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1999, 98: 751-756.
- [4] Choi J, Ahn B J, Yang G M, et al. Classification of zoysiagrasses (*Zoysia* spp.) native to the southwest coastal regions of Korea using RAPDs[J]. Journal of the Korean Society for Horticultural Science, 1997, 38(6): 789-795.
- [5] 李亚, 佟海英. 中华结缕草遗传分化的 RAPD 分析[J]. 广西植物, 2004, 24(4): 345-349.
- [6] 田志宏, 邱永福, 严寒, 等. 用 RAPD 标记分析高羊茅的遗传多样性[J]. 草业学报, 2007, 16(1): 58-63.
- [7] 蒿若超, 张月学, 唐凤兰. 利用 RAPD 分子标记研究苜蓿种质资源遗传多样性[J]. 草业科学, 2007, 24(8): 69-73.
- [8] 郭海林, 刘建秀, 高鹤, 等. 结缕草属优良品系 SSR 指纹图谱的构建[J]. 草业学报, 2007, 16(2): 53-59.
- [9] Cai H W, Inoue M, Yuyama N, et al. Isolation, characterization and mapping of simple sequence repeat markers in zoysiagrass (*Zoysia* spp.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 112: 158-166.
- [10] Ebina M, Kobayashi M, Kasuga S, et al. An AFLP based genome map of zoysiagrass [A]. Plant and Animal Genome VII Conference [C]. San Diego, CA, USA, 1999. 17-21.
- [11] Cai H W, Inoue M, Yuyama N, et al. An AFLP based linkage map of zoysiagrass (*Zoysia japonica*) [J]. Plant Breeding, 2004, 123: 543-548.
- [12] 黄占兵, 金洪. 结缕草遗传多样性及 AFLP 应用研究进展[J]. 内蒙古农业大学学报, 2003, 24(3): 119-124.
- [13] 胡雪华, 何亚丽, 安渊, 等. 上海结缕草 JD-1 和结缕草属几种主要坪用草种的 ISSR 指纹分析[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2005, 23(2): 163-167.
- [14] 范彦, 李芳, 张新全, 等. 扁穗牛鞭草种质遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 草业学报, 2007, 16(4): 76-81.
- [15] 陈福, 范彦, 秦华. 扁穗牛鞭草 RAPD 影响因素的研究[J]. 草业科学, 2006, 23(9): 28-32.
- [16] 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]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103: 455-461.
- [17] 李建军, 肖层林, 刘志坚, 等. 陆两优 996 种子纯度的 SRAP 指纹图谱鉴定[J]. 中国农学通报, 2007, 23(6): 112-114.

- [18] 伊艳杰, 胡楠, 刘红彦, 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.
- [19] 姜树坤, 马慧, 刘君, 等. 利用 SRAP 标记分析玉米遗传多样性[J]. 分子植物育种, 2007, 5(3): 412-416.
- [20] 吴洁, 谭文芳, 何俊蓉, 等. 甘薯 SRAP 连锁图构建淀粉含量 QTL 检测[J]. 分子植物育种, 2005, 3(6): 841-845.
- [21] Lin Z, He D, Zhang X. Linkage map construction and mapping QTL for cotton fibre quality using SRAP, SSR and RAPD[J]. Plant Breeding, 2005, 124: 180-187.
- [22] 文雁成, 王汉中, 沈金雄, 等. 用 SRAP 标记分析中国甘蓝型油菜品种的遗传多样性和遗传基础[J]. 中国农业科学, 2006, 39(2): 246-256.
- [23] 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]. 自然科学进展, 2005, 15(2): 167-172.
- [24] Budak H, Shearman R C, Parmaksiz I, *et al.* Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buffalograsses based on phylogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs and SRAPs[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109(2): 280-288.
- [25] 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(2): 328-334.
- [26] 何正文, 刘运生, 陈立华, 等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件[J]. 湖南医科大学学报, 1998, 23(4): 403-404.
- [27] 穆立蕾, 刘赢男, 冯富娟, 等. 紫椴 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 林业科学, 2006, 42(6): 26-31.
- [28] 连莲, 魏志刚, 杨传平. 白桦 AFLP 体系的建立及优化[J]. 东北林业大学学报, 2007, 35(5): 1-4, 9.
- [29] 王燕, 龚义勤, 赵统敏, 等. 番茄 SRAP-PCR 体系优化和品种分子鉴定[J]. 南京农业大学学报, 2007, 30(1): 23-29.

Establishment and optimization of SRAP-PCR reaction system for *Zoysia*

XUE Dan-dan^{1,2}, ZHENG Yi-qi², WANG Zhi-yong², GUO Hai-lin², CHEN Xuan², LIU Jian-xiu²

(1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: Genetic DNA of *Zoysia* extracted by the SDS method was used as a template. The major factors of SRAP, such as concentrations of Mg^{2+} , dNTPs, primers, Taq DNA polymerase, and DNA template, were optimized in this study by single factor tests and orthogonal design of five factors at four levels. In single factor tests, the impacts of the SRAP-PCR system were studied for each factor at various levels. In the orthogonal design test, the components of SRAP were considered comprehensively, and a suitable level of each factor was obtained by the intuitional analysis method. Comparing results of four primers and six materials validation, a few differences were found in the amplified electrophoresis of two reaction systems. A comprehensive and deep analysis of the bands, polymorphic bands and polymorphism rate in the two amplified results resulted in an optimized SRAP-PCR system for *Zoysia* being established; Mg^{2+} 2.0 mmol/L, dNTP 220 μ mol/L, primer 0.2 μ mol/L, Taq DNA polymerase 0.5 U, DNA template 60 ng, $10\times$ buffer 2 μ L in the 20 μ L volume reaction. The optimized SRAP-PCR reaction system showed that SRAP markers could be widely used for genetic diversity, germplasm identification, construction of genetic linkage maps and relative analysis in *Zoysia*.

Key words: *Zoysia*; SRAP markers; single factor test; orthogonal design; optimized system