

Establishment and Optimization of SRAP-PCR and Preliminary Analysis of Genomes in *Carthamus tinctorius* L.*

Lei Jiang¹, Yanjin Li, Benwen Liu¹, Tingting Tang¹, Hong Liu¹, Xingchu Yan², Rui Qin¹, Gang Li^{1#}

¹Engineering Research Centre for the Protection and Utilization of Bioresource in Ethnic Area of Southern China, South-Central University for Nationalities, Wuhan

²Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan
Email: whitejoker@vip.qq.com, #lg863@yahoo.com.cn

Received: Jan. 25th, 2013; revised: Feb. 10th, 2013; accepted: Feb. 20th, 2013

Copyright © 2013 Lei Jiang et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: Safflower is a traditional medicinal plant, and also a new kind of oil economic crops. In this paper, the SRAP technology was used to analysis 11 safflower varieties. A SRAP-DNA PCR amplification system was established and optimized. The reaction mixture system was decreased from 25 μ L to 10 μ L, which contained: Taq DNA polymerase 0.04 u/ μ L, dNTP 0.20 mM, primers 0.3 mM, MgCl₂ 2.0 mM, genomic DNA template 20 ng. In order to test the stability of SRAP-PCR system, the PCR amplification and polyacrylamide gel electrophoresis were used to analyse 11 safflower varieties with 35 primer pairs. 25 pairs of primers combination with polymorphism bands and 308 clear bands were obtained, 35 percent (109/308) bands were polymorphic. Therefore, the SRAP molecular marker system for safflower variety assessment was reliable. This research had put the foundation for genetic diversity research and molecular marker-assisted breeding of safflower.

Keywords: Safflower; SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism); Genome

红花(*Carthamus tinctorius* L.)SRAP 反应体系建立与优化及对 11 个红花品种基因组的初步分析*

江磊¹, 李彦锦¹, 刘本文¹, 唐婷婷¹, 刘虹¹, 严兴初², 覃瑞¹, 李刚^{1#}

¹中南民族大学南方少数民族地区生物资源保护与综合利用工程中心, 武汉

²中国农业科学院油料作物研究所, 武汉
Email: whitejoker@vip.qq.com, #lg863@yahoo.com.cn

收稿日期: 2013 年 1 月 25 日; 修回日期: 2013 年 2 月 10 日; 录用日期: 2013 年 2 月 20 日

摘要: 红花既是传统药用植物, 也是一种新型油料经济作物。本研究利用 SRAP 技术对来源于不同地区的 11 个红花品种进行了条带分析。建立了红花种内 SRAP-DNA 的 PCR 扩增体系并进行了优化, 进一步将最佳反应体系由 25 μ L 减至 10 μ L, 体系包括: Taq 酶浓度 0.04 u/ μ L, dNTP 浓度为 0.2 mM, 正反引物浓度为 0.3 mM, Mg²⁺浓度为 2.0 mM, DNA 模板为 20 ng。为检测该优化体系的稳定性, 选用了 35 对引物组合对 11 个分布于我国不同区域的红花品种进行 PCR 扩增和聚丙烯酰胺凝胶电泳, 筛选出 25 对具有多态性条带的引物组合, 获得了 308 条清晰的条带, 其中 109 条具有多态性, 比率为 35%, 说明用 SRAP 分子标记对于红花种内不同品种资源系统评估是完全可行的。红花 SRAP 反应体

*基金项目: 武陵山区原生态农副产品研发技术服务项目(HZY11043)。

#通讯作者。

系的建立为深入评价红花的遗传多样性、分子辅助育种等研究奠定了基础。

关键词: 红花; SRAP(序列扩增多态性); 基因组

1. 引言

红花(*Carthamus tinctorius* L.)为菊科红花属 1~2 年生植物,又名红蓝花、草红花、杜红花、刺红花等,具食用、药用、染料和饲料等广泛用途,喜温暖干燥气候,有较强的抗旱、抗寒、耐盐能力,不耐涝。原产埃及,现多栽培于中亚、东南亚及地中海地区。我国红花栽培历史悠久,早在汉代就有关于红花栽培和药用的记载^[1]。红花是具有巨大开发潜力的经济作物,红花籽油是高端食用油,号称“亚油酸之王”,长期服用有明显的降血压、降血脂等功效。目前我国红花种植主要集中在新疆、云南,河南、安徽等省份^[2]。近年来,由于红花的各种功效不断被发掘,红花的种植面积也不断扩大,影响红花品质的主要因素集中在花和籽的产量、红花籽的含油率以及无刺和抗倒伏等方面。

SRAP(Sequence-Related Amplified Polymorphism)是 Li 等(2001)^[3]在芸薹作物中建立并开发的一种新型分子标记技术。该技术利用正反引物检测开放阅读框(ORFs)区域,正向引物长为 17 bp,5'端开始前 10 bp 是一段填充序列,无任何特异性组成,接着是特异性序列 CCGG,随后的 3 个碱基为选择性碱基,正向引物对外显子区域进行扩增,反向引物的组成与正向引物类似,区别在于反向引物长 18 bp,填充序列长为 11 bp,接着是特异序列 AATT,3'端为 3 个 bp 的选择性碱基,反向引物对内含子区域和启动子区域进行扩增,在未知基因组序列的情况下对基因组进行 PCR 扩增。该标记相比 RAPD、AFLP、SSR 等常规分子标记而言,克服了成本高、技术繁杂以及 RAPD 的重复性差、SSR 引物设计需要预先知道序列信息的缺点,具有简便、中产率、高共显性、易于分离条带及测序、在基因组中分布均匀的优点^[4]。目前已经在棉花^[5,6]、马铃薯^[7]、辣椒^[8]、黄瓜^[9]、油菜^[10]、烟草^[11]、小麦^[12]、水稻^[13]等植物研究中得到越来越多的应用,并广泛应用于图谱构建、基因定位、遗传多样性以及比较基因组学等方面的研究。目前,国内对红花的研究主要集中在红花品种资源搜集以及某些品种的选育工作

^[14-17],也有部分利用分子标记对红花进行初步分析的研究^[18,19],关于红花的系统研究报道非常有限。鉴于此,本文拟建立并优化 SRAP 红花分析反应体系,对 11 个红花品种进行扩增,将产物进行聚丙烯酰胺凝胶检测,测试扩增产物多态性与稳定性。

2. 材料与方法

2.1. 材料

本研究采用的红花材料种植于中南民族大学温室,红花材料产地见表 1。苗期采取嫩叶,洗净并用吸水纸吸干,直接用于 DNA 提取或-80℃冰箱保存。

Taq 酶与 buffer 均购自 Fermentas 公司,dNTP 购自罗氏公司,引物为北京六合华大基因武汉分公司合成。

2.2. DNA 的提取

采用 CTAB 微量法提取红花全基因组 DNA。具体步骤如下:取红花嫩叶 1.0 g,液氮研磨成粉末转入 1.5 mL 离心管中;加入 12%CTAB,65℃水浴 1 h;加入等体积氯仿/异戊醇(24/1),振荡混匀 20 min;在室温下用 8000 rpm 的速度离心 20 min,取上清;再次加入等体积氯仿/异戊醇(24/1)抽提,振荡 20 min,室温下 8000 rpm 离心 20 min,取上清液;加入 2/3 体积异丙醇,混匀,室温下 8000 rpm 离心 10 min,去上清;用 500 μL 75%乙醇冲洗沉淀,8000 rpm 室温 10 min,去上清,充分干燥;加入 200 μL TE 溶解,-20℃保存

Table 1. The varieties and original field of safflower
表 1. 红花种名与产地

编号	红花种名	产地	编号	种名	产地
1	库车无刺	新疆	2	西昌红花	四川
3	南涧红花	云南	4	芮城红花	山西
5	西安红花	陕西	6	巨野无刺	山东
7	南溪红花	四川	8	巨野红花	山东
9	启东红花	江苏	10	鄱陵红花	河南
11	云红三号	云南			

备用。

2.3. 红花 DNA-SRAP PCR 扩增体系设计

2.3.1. 引物的选择

引物序列合成见表 2。

2.3.2. SRAP 扩增程序

根据 Li 和 Quiros^[3]的标准 PCR 并略做修改: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 35℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1.5 min, 循环 5 次; 94℃ 变性 1 min, 49℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1.5 min, 循环 35 次; 72℃ 延伸 10 min; 4℃ 保存。

2.3.3. SRAP-PCR 扩增体系的设计

扩增反应总体系设计为 10 μL, 其中设计 Taq 酶浓度(0.2 u、0.4 u、0.6 u), dNTP 浓度(0.1 mM、0.2 mM、0.3 mM), 引物浓度(0.3 mM、0.35 mM、0.4 mM)三因素三水平共 27 次的梯度实验(见表 3), Mg²⁺浓度(0.5 mM、0.8 mM、1.1 mM、1.4 mM、1.7 mM、2.0 mM、2.3 mM、2.6 mM、2.9 mM、3.2 mM)单因素十个水平的梯度实验。

3. 结果与分析

本研究采用 CTAB 微量法提取红花基因组 DNA,

Table 2. The sequence of the SRAP primer
表 2. SRAP 引物序列

上游引物	序列	下游引物	序列
Me1	TGA GTCCAAA CCGG AAA	Em1	GACTGCGTACG AA TT AAT
Me2	TGA GTCCAAA CCGG AAT	Em2	GACTGCGTACG AA TT AAC
Me3	TGA GTCCAAA CCGG AAC	Em3	GACTGCGTACG AA TT ATG
Me4	TGA GTCCAAA CCGG AAG	Em4	GACTGCGTACG AA TT ACG
Me5	TGA GTCCAAA CCGG ATA	Em5	GACTGCGTACG AA TT AGC
		Em6	GACTGCGTACG AA TT TAG
		Em7	GACTGCGTACG AA TT TGA

Table 3. The reaction concentrations of the Taq DNA polymerase, dNTPs and primers
表 3. Taq 酶、dNTPs 和引物浓度

编号	Taq 酶(u/μL)	dNTPs(mM)	引物(mM)	编号	Taq 酶(u/μL)	dNTPs(mM)	引物(mM)
1	0.02	0.1	0.3	15	0.04	0.2	0.4
2	0.02	0.1	0.35	16	0.04	0.3	0.3
3	0.02	0.1	0.4	17	0.04	0.3	0.35
4	0.02	0.2	0.3	18	0.04	0.3	0.4
5	0.02	0.2	0.35	19	0.06	0.1	0.3
6	0.02	0.2	0.4	20	0.06	0.1	0.35
7	0.02	0.3	0.3	21	0.06	0.1	0.4
8	0.02	0.3	0.35	22	0.06	0.2	0.3
9	0.02	0.3	0.4	23	0.06	0.2	0.35
10	0.04	0.1	0.3	24	0.06	0.2	0.4
11	0.04	0.1	0.35	25	0.06	0.3	0.3
12	0.04	0.1	0.4	26	0.06	0.3	0.35
13	0.04	0.2	0.3	27	0.06	0.3	0.4
14	0.04	0.2	0.35				

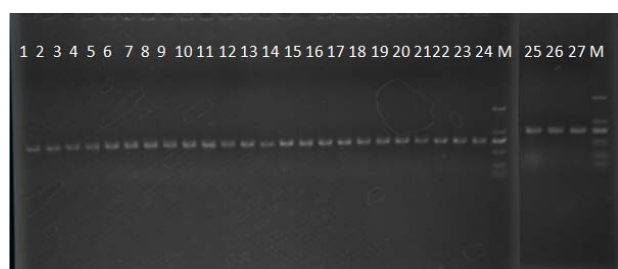
提取的产物足以满足 SRAP 反应的要求。参考已报道文献[20], 在实验中反应体系中加入模板 DNA 20 ng。

根据表 3 进行 Taq 酶、dNTPs、引物三因素浓度反应, 扩增产物经琼脂糖检测。据图 1 结果表明, Taq 酶浓度对扩增产物清晰度影响较大, 当 Taq 酶浓度为 0.02 u/μL 时扩增产物条带较弱。引物浓度在 0.3~0.4 mM 范围内, 并未产生引物二聚体, 浓度大小对产物条带影响不大。dNTPs 作为合成产物的原料需要足量来满足扩增反应的要求, 因此取 dNTPs 浓度为 0.2 mM。

因此根据产物稳定性及经济性原则, 选择图 1 第 13 号泳道, 确定 Taq 酶浓度为: 0.04 u/μL, dNTP 浓度为: 0.2 mM, 引物浓度为: 0.3 mM。

本研究对 Mg²⁺浓度进行了十个水平的梯度实验, 并将扩增产物进行琼脂糖凝胶检测。从图 2 中可以看出当 Mg²⁺浓度在 0.5 mM 时条带微弱, 而在浓度 > 2.6 mM 时条带会减弱。在 1.5 mM~2.6 mM 的范围内, 扩增无明显差异, 因此将 Mg²⁺浓度取 2.0 mM。

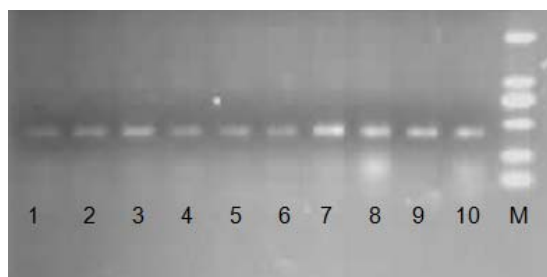
利用优化后的体系, 对 11 个红花品种进行 SRAP



M 为 maker: DL2000, 从上至下分别为 2000 bp、1000 bp、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp。

Figure 1. The reaction concentrations of the Taq DNA polymerase, dNTPs, and primers

图 1. Taq 酶、dNTP、引物三因素浓度对反应的影响



1~10 分别代表 Mg²⁺浓度为 0.5、0.8、1.1、1.4、1.7、2.0、2.3、2.6、2.9、3.2 (mM), M 为 maker: DL2000, 从上至下分别为 2000 bp、1000 bp、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp。

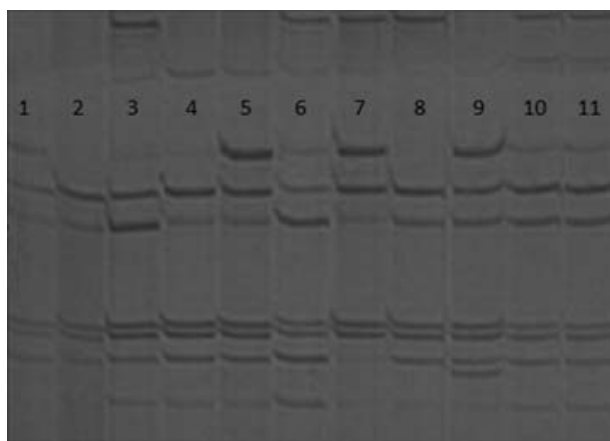
Figure 2. Effect of Mg²⁺ concentration to the SRAP reaction
图 2. Mg²⁺对 SRAP-PCR 反应的影响

反应, 扩增产物用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。图 3 结果显示, 优化体系扩增的效果比较理想, 谱带清晰, 多态性较好, 主带明显。重复试验, 进行稳定性检测。重复性较好, 表明该体系适用于红花 DNA-SRAP 反应。运用本体系, 选用 35 对引物组合进行 PCR 扩增和聚丙烯酰胺凝胶电泳, 筛选出 25 对具有多态性条带的引物组合, 获得了 308 条清晰的条带, 其中 109 条具有多态性, 比率为 35%(结果未列出)。

4. 讨论

在 SRAP 反应中想获得稳定、清晰的扩增产物, 则对模板的质量与纯度要求很高。DNA 的提取过程中要尽量去除蛋白质、RNA、多糖、色素和一些小分子物质^[21]。在 SRAP-PCR 反应体系中, Taq 酶浓度、引物浓度、dNTP 浓度、Mg²⁺浓度均对扩增效率均起着重要的影响, Taq 酶活性高度依赖 Mg²⁺, Mg²⁺浓度的过高或过低均会降低 Taq 酶活性, 从而导致扩增效率显著降低甚至没有产物。而 dNTPs 则是在复性及延伸过程中生产 DNA 片段的原料, 过高的 dNTPs 浓度会导致错误渗入, 过低会导致扩增产率下降。而引物浓度过低, 则会使引物与模板结合率下降, 引物浓度过高则会导致错配和非特异性扩增, 并会使引物之间形成引物二聚体^[22]。

本研究先进行 Taq 酶、dNTP、引物三个因素浓度的优化, 再对 Mg²⁺浓度进行确定, 最终确定最为优化的反应体系为: Taq 酶浓度 0.04 μ/μl, dNTP 浓度 0.2



1~11 为红花品种编号。

Figure 3. PAGE analysis of different Varieties of safflower with the selected reaction system(Primers Me4/Em6)

图 3. 利用优化的体系对不同品种红花进行 PAGE 分析(引物 Me4/Em6)

mM, 引物浓度 0.3 mM, Mg²⁺ 2.0 mM, DNA 模板量 20 ng, 体系总体积 10 μl。在本实验中, 由图 1 可以看出, Taq 酶浓度对反应影响较高, 当酶浓度过低时, 条带较弱。此前也有研究者使用 25 μl 体系^[23], 本研究中, 为了进一步提高 SRAP 用于红花品种资源评估的可行性, 我们采用了分布于全国不同区域的 11 个品种作为研究材料, 并且采用了更小的反应体系, 即 10 μl 系统, 目的是通过优化反应体系的建立, 在筛选特异性更强的检测引物, 同时提高检测灵敏性。根据图 3 的 PAGE 实验结果来看, 优化后的 PCR 体系能够扩增出良好清晰的条带。该引物组合 Me4Em6 扩增出 12 条带, 清晰条带 8 条, 具有多态性位点的条带有 4 条。

此前的报道^[22]在红花属使用了 30 对 SRAP 引物对 23 个红花品种和 2 个毛红花品种进行了分析, 得到 485 条条带, 多态性位点 274 个, 多态性比率 57%^[20]。本文主要是对红花种内的分布于不同地域的 11 个品种进行了研究, 35 对引物中筛选出来 25 对引物具有多态性条带, 得到 308 条清晰条带, 109 条条带具有多态性, 比率为 35%, 这说明在红花种内间的差异远远低于红花和毛红花种间的差异。SRAP 在其他品种应用时有过 90% 的多态性条带比率^[24], 本研究中红花种内多态性比率则为 35%, 多态性比率相对较低, 这可能由于红花在中国栽培历史较短, 并且共同引种于中亚地区的原因, 所以不同品种红花的亲缘关系很近, 导致变异位点较少, SRAP 在不同物种内的多态性比率差异明显, 应该是与植物基因组进化方式的多样性有关, 研究者应该根据具体实验分析确定其在种内应用的可行性。本研究中选用的仅仅是 35 对引物, 多态性比率就达到 35%, 其差异性足够区分不同品种, 说明 SRAP 对红花种内进行资源系统评估是完全可行的。目前, 对国内其他红花不同品种以及更多 SRAP 引物的筛选正在本实验室进行之中, 这为对我国目前众多红花品种间的亲缘关系、遗传背景、资源评估以及以后的选育工作提供了有利的工具。

参考文献 (References)

[1] 王岩军. 红花的组织培养及基因工程研究进展[J]. 新疆农业科学, 2008, S1: 237-241.

- [2] 杨玉霞, 吴卫, 郑有良. 红花研究进展[J]. 四川农业大学学报, 2004, 4: 365-369.
- [3] G. Li, C. F. Quiros. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 103: 455-461.
- [4] 杨迎花, 李先信, 曾柏全, 邓子牛. 新型分子标记 SRAP 的原理及其研究进展[J]. 湖南农业科学, 2009, 5: 15-17, 20.
- [5] 林忠旭, 张献龙, 聂以春, 贺道华, 吴茂清. 棉花 SRAP 遗传连锁图构建[J]. 科学通报, 2003, 15: 1676-1679.
- [6] 林忠旭, 张献龙, 聂以春. 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]. 遗传学报, 2004, 6: 622-626.
- [7] G. Li, M. Gao, B. Yang, et al. Gene for gene alignment between the Brassica and Arabidopsis genomes by direct transcriptome mapping. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107(1): 168-180.
- [8] 任羽, 王得元, 张银东, 李颖, 王恒明. 辣椒 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 分子植物育种, 2004, 5: 689-693.
- [9] 潘俊松, 王刚, 李效尊, 何欢乐, 吴爱忠, 蔡润. 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, 2: 41-46.
- [10] 李媛媛, 沈金雄, 王同华, 傅廷栋, 马朝芝. 利用 SRAP、SSR 和 AFLP 标记构建甘蓝型油菜遗传连锁图谱[J]. 中国农业科学, 2007, 6: 1118-1126.
- [11] 梁景霞, 祁建民, 吴为人, 周东新, 陈顺辉, 王涛, 陶爱芬. 烟草 DNA 的提取与 SRAP 反应体系的建立[J]. 中国烟草学报, 2005, 4: 33-38.
- [12] 武志朴, 杨文香, 刘大群, 张汀. 小麦基因组 SRAP 扩增体系的初步研究[J]. 河北农业大学学报, 2005, 3: 66-69.
- [13] 张吉贞, 马晓磊, 王效宁, 严小微, 云勇, 周辉. 水稻 SRAP-PCR 体系的建立与优化[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2008, S1: 421-425.
- [14] 张宗文. 红花品种资源的同工酶遗传多样性及分类研究[J]. 植物遗传资源科学, 2000, 1(4): 6-13.
- [15] 郭美丽, 张芝玉, 张汉明, 李红方, 苏中武. 不同栽培居群红花的孢粉特征、同工酶谱及化学成分含量[J]. 中国药学杂志, 1999, 11: 10-12.
- [16] 逯晓萍, 吕学理, 张众, 王四清. 油用红花数量性状的多元遗传分析[J]. 中国油料作物学报, 2004, 2: 40-43.
- [17] 郭美丽, 张芝玉, 张汉明, 苏中武. 不同产地红花药材的质量评价[J]. 中国中药杂志, 2000, 8: 21-23.
- [18] 岳庆妮, 葛娟, 王蕾, 张霞, 王绍明, 王建明. 新疆红花主要栽培品种遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 安徽农业科学, 2008, 33: 14417-14419, 14432.
- [19] 郭美丽, 姜伟, 张志珍, 张戈, 毛积芳, 殷明, 苏中武. 红花种质的随机扩增多态性 DNA 分子鉴定[J]. 第二军医大学学报, 2003, 10: 1116-1119.
- [20] S. Peng, N. Feng, M. Guo, et al. Genetic variation of *Carthamus tinctorius* L. and related species revealed by SRAP analysis. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2008, 36(7): 531-538.
- [21] 张安世, 邢智峰, 刘永英等. SRAP 分子标记及其应用[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(9): 2562-2563.
- [22] 张安世, 刘莹, 徐九文等. 北方粳稻 SRAP 反应体系的建立与优化[J]. 江苏农业科学, 2010, 2: 29-32. [J]. 药学服务与研究, 2009, 9(5): 348-351.
- [23] 彭飒, 郭美丽, 陈跃华等. 红花 SRAP 扩增体系的建立和优化[J]. 第二军医大学学报, 2006, 27(5): 544-547.
- [24] 杨美, 徐立铭, 刘艳玲. 莲 SRAP-PCR 反应体系的优化与建立[J]. 植物科学学报, 2012, 30(1): 85-91.