

# 蓝莓 SRAP-PCR 反应体系的建立和优化及其遗传多样性分析

傅冰<sup>1</sup>, 洪震<sup>1</sup>, 刘跃钧<sup>2</sup>, 潘芝梅<sup>1</sup>

(1. 丽水职业技术学院 环境工程分院, 浙江 丽水 323000; 2. 丽水市林业科学研究院, 浙江 丽水 323000)

**摘要:**以 9 个品种蓝莓为试材, 采用  $L_{16}(4^5)$  正交实验设计建立和优化了蓝莓 SRAP-PCR 反应体系, 并利用该体系分析了供试蓝莓品种之间的遗传多样性。结果表明: 蓝莓 SRAP-PCR 反应的最佳体系 (20  $\mu$ L) 为:  $MgCl_2$  2.5 mmol/L、dNTPs 100  $\mu$ mol/L、*Taq* DNA 聚合酶 0.8 U、引物 0.2  $\mu$ mol/L、DNA 40 ng、 $1\times$  Reaction Buffer; 9 个品种蓝莓的遗传相似性系数分布于 0.1818~1.0000 之间, 平均遗传相似性系数为 0.6359, 存在较高的遗传多样性。基于 UPGMA 的聚类分析将供试材料分成 4 个类群, 主坐标分析同样将供试材料分成 4 个类群, 二者结果一致。

**关键词:** 蓝莓; SRAP-PCR; 优化; 遗传多样性

**中图分类号:** S 663.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2013)17-0095-05

蓝莓 (*Vaccinium* spp.) 属杜鹃花科越桔属 (*Vaccinium*) 浆果类灌木<sup>[1]</sup>, 又称蓝浆果或越桔。蓝莓的栽培史不足百年, 但是其果实富含多种微量元素及维生素, 具有增强免疫、延缓衰老、增强心脏功能、明目及抗癌等独特功效, 被国际粮农组织列为人类五大健康食品之一<sup>[2-3]</sup>。蓝莓由于其独特的口味及营养价值, 倍受消费者青睐, 然而蓝莓产量仅能满足市场需求的 40%~50%, 市场潜力巨大。目前, 蓝莓的主要产销地集中在欧美, 国内不管是在技术上还是种植规模上都要远落后于欧美等蓝莓生产国。因此, 有必要进一步加强对蓝莓引种、选育、种植、贮运加工技术、营养成分等诸多方面的研究。

相关序列多态性 (SRAP) 是近年来发展起来的一种新型分子标记系统, 具有简便、稳定、中等产率、高共显性、易于测序等优点。其在植物图谱构建、遗传多样性评价、基因定位和比较基因组学等方面均已成功应用。不同分子标记技术在蓝莓中也有一定的应用, SRAP、RAPD、SSR 等多种分子标记技术在反应体系优化、遗传多样性分析、亲缘关系鉴定、指纹图谱建立等方面均有报道<sup>[1,4-5]</sup>。

**第一作者简介:** 傅冰 (1982-), 男, 浙江松阳人, 硕士, 讲师, 现主要从事生物化学与分子生物学等研究工作。E-mail: 41891514@qq.com.

**责任作者:** 洪震 (1969-), 男, 浙江丽水人, 副教授, 现主要从事植物开发利用等研究工作。

**收稿日期:** 2013-04-09

该试验拟通过正交实验建立适合蓝莓的 SRAP-PCR 反应体系, 并对 9 个品种蓝莓的遗传多样性进行分析比较, 以期为后期良种选育、栽培育种、分子标记辅助育种等研究提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试 9 个品种蓝莓均采集于丽水职业技术学院蓝莓基地, 分别为“夏普兰”、“云雾”、“精华”、“梯芙蓝”、“园蓝”、“芭尔德温”、“粉蓝”、“奥尼尔”和“杰兔”, 依次编号为 1~9, 由丽水职业技术学院潘芝梅教授提供。采集鲜嫩叶片, 液氮速冻后置于 -70℃ 超低温冰箱保存。

SRAP 引物编号及序列见表 1, 由北京全式金生物技术有限公司合成。

表 1 引物序列

引物编号	正向引物序列
Me1	TGAGTCCAAACCGGATA
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC
Me3	TGAGTCCAAACCGGAAT
Me4	TGAGTCCAAACCGGACC
Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG
Me6	TGAGTCCAAACCGGTAA
Me7	TGAGTCCAAACCGGTCC
Me8	TGAGTCCAAACCGGTGC
Me9	TGAGTCCAAACCGGTCA

续表 1

编号	反向引物序列	编号	反向引物序列
Em1	GACTGCGACGAATTAAT	Em2	GACTGCGACGAATTTGC
Em3	GACTGCGACGAATTGAC	Em4	GACTGCGACGAATTTGA
Em5	GACTGCGACGAATTAAC	Em6	GACTGCGACGAATTGCA
Em7	GACTGCGACGAATTCAA	Em8	GACTGCGACGAATTAGC
Em9	GACTGCGACGAATTACG	Em10	GACTGCGACGAATTTAG
Em11	GACTGCGACGAATTTTCG	Em12	GACTGCGACGAATTGTC
Em13	GACTGCGACGAATTGGT	Em14	GACTGCGACGAATTCAG
Em15	GACTGCGACGAATTCTG	Em16	GACTGCGACGAATTCGG
Em17	GACTGCGACGAATTCCA	Em18	GACTGCGACGAATTTCC

## 1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 用 OMEGA 公司 Plant DNA Mini Kit 试剂盒抽提叶片组织的基因组 DNA。配制 0.8% 的琼脂糖胶电泳检测基因组 DNA 的大小和完整性,并用 UV-1700 紫外分光光计(SHIMADZU Corporation, Japan)测定基因组 DNA 的浓度和质量。

1.2.2 SRAP-PCR 反应体系及程序 SRAP-PCR 反应体系及参数参照杨云等<sup>[6]</sup>、杨晓东等<sup>[7]</sup>以及孙祖霞等<sup>[8]</sup>的研究,初步确定反应体系。影响 PCR 结果的因素主要为:引物、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、模板 DNA、 $Mg^{2+}$ ,设计 5 因素 4 水平正交实验(表 2),建立适用于蓝莓的 SRAP-PCR 反应体系。PCR 反应程序为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 60 s,35℃ 退火 60 s,72℃ 延伸 90 s,5 个循环;94℃ 变性 60 s,50℃ 退火 60 s,72℃ 延伸 90 s,35 个循环;72℃ 延伸 10 min;4℃ 保存。

1.2.3 SARP 引物筛选 以“园蓝”基因组 DNA 为模板,随机引物组合,进行引物筛选。

表 2 SRAP-PCR 正交设计

编号	$MgCl_2$ /mmol · L <sup>-1</sup>	dNTPs /μmol · L <sup>-1</sup>	因素和水平		引物 /μmol · L <sup>-1</sup>	模板 DNA /ng
			<i>Taq</i> DNA 聚合酶/U			
1	1.0	100	0.2		0.2	20
2	1.0	200	0.4		0.4	40
3	1.0	300	0.6		0.6	60
4	1.0	400	0.8		0.8	80
5	1.5	100	0.4		0.6	80
6	1.5	200	0.2		0.8	60
7	1.5	300	0.8		0.2	40
8	1.5	400	0.6		0.4	20
9	2.0	100	0.6		0.8	40
10	2.0	200	0.8		0.6	20
11	2.0	300	0.2		0.4	80
12	2.0	400	0.4		0.2	60
13	2.5	100	0.8		0.4	60
14	2.5	200	0.6		0.2	80
15	2.5	300	0.4		0.8	20
16	2.5	400	0.2		0.6	40

1.2.4 电泳及染色 将筛选得到的引物分别以所有供试蓝莓基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应。待反应结束后,进行琼脂糖电泳,用 Dolphin-DOC Plus 凝胶成像系统(Wealtec)进行分析,并记录数据。DNA 标准分子量为 Marker III(北京全式金生物技术有限公司)。

## 1.3 数据分析

用 Dolphin-DOC Plus 凝胶成像系统自带软件结合人工方法读带,SRAP-PCR 扩增电泳图谱的每一条清晰且能重复出现的带,均为 1 个分子标记(Marker),代表 1 个引物结合位点。在相同的迁移位置上,有带以 1 记,无带以 0 记。用 NTSYS-pc2.10e 分析软件计算遗传相似性系数,同时用 UPGMA(Unweighted pair-group method analysis)进行聚类分析,构建聚类图。

## 2 结果与分析

### 2.1 正交实验结果

按照重复性、清晰度、条带多少等遗传多样性的分析要求评分,最佳组合记 16 分,最差组合记 1 分。根据统计的分数计算  $K_i$  值(同一水平下的分值之和)、计算  $k_i$  值(同一因素水平下的平均值)和  $R$  值(同一因素不同水平间均值的极差)。由表 3 可知,各因素对蓝莓 SRAP-PCR 反应影响大小顺序为:dNTPs>*Taq* DNA 聚合酶> $MgCl_2$ >引物>模板 DNA。正交实验的结果与电泳结果(图 1)对比显示,统计分析结果与第 13 组体系比较接近,在引物及 DNA 的用量上有差异。其中,引物浓度、DNA 用量分别在 0.2 μmol/L 及 40 ng 时  $k_i$  最高,反应水平最高。引物浓度关系到扩增产物的质量,引物过少扩增量不足,浓度过大引起非特异性扩增或产生引物二聚体。DNA 是 PCR 反应的模板,其含量制约扩增产量及特异性的,有较宽的浓度选择范围,太少时无扩增谱带,浓度过高可能会造成非特异性扩增或弥散。最终确定蓝莓 SRAP-PCR 的最佳体系为: $MgCl_2$  2.5 mmol/L、dNTPs 100 μmol/L、*Taq* DNA 聚合酶 0.8 U、引物 0.2 μmol/L、DNA 40 ng、1×Reaction Buffer。

表 3 正交实验分析表

编号	$MgCl_2$	dNTPs	<i>Taq</i> DNA 聚合酶	引物	模板 DNA
$k_1$	4.75	8.50	3.50	6.75	5.00
$k_2$	3.00	6.50	3.75	3.50	6.00
$k_3$	4.50	2.75	4.00	5.50	4.50
$k_4$	7.25	1.75	8.25	3.75	4.00
$R$	4.25	6.75	4.75	3.25	2.00



图 1 正交实验电泳图

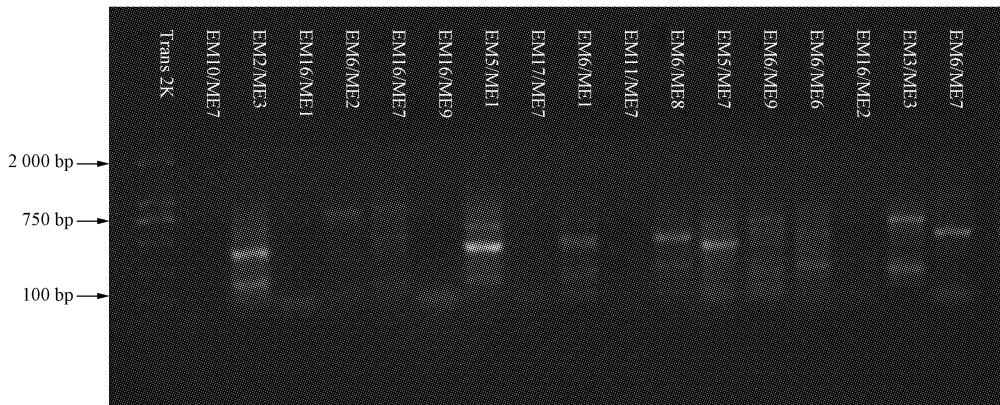


图 2 “园蓝”基因组 DNA 为模板的引物筛选电泳图

2.2 引物筛选及多态性分析

以“园蓝”基因组 DNA 为模板,验证最佳反应体系,同时筛选 SRAP 引物组合。引物筛选的标准为能够扩增出清晰的条带、稳定性高和多态性好的引物组合。由

图 2 可知,筛选出 EM2/ME3、EM16/ME7、EM5/ME1、EM6/ME1、EM6/ME8、EM5/ME7、EM6/ME9、EM6/ME6、EM3/ME3 共 9 个较好的引物组合,且获得丰富的条带,多态性比率较高,说明该 PCR 体系可以应用到蓝莓基因组 DNA 的 SRAP-PCR 反应中。9 种引物组合 PCR 后经 3.5% 丙烯酰胺凝胶电泳,共扩增出 98 个条带,其中多态性条带为 68 条,多态性比率为 69.4% (表 4)。最终选择多态性比率最高的 EM6/ME9 组合(多态性比率为 96.00%)为 SRAP-PCR 反应引物,分析 9 个品种蓝莓之间的遗传多样性,EM6/ME9 引物组合的 3.5% 丙烯酰胺凝胶电泳结果见图 3。

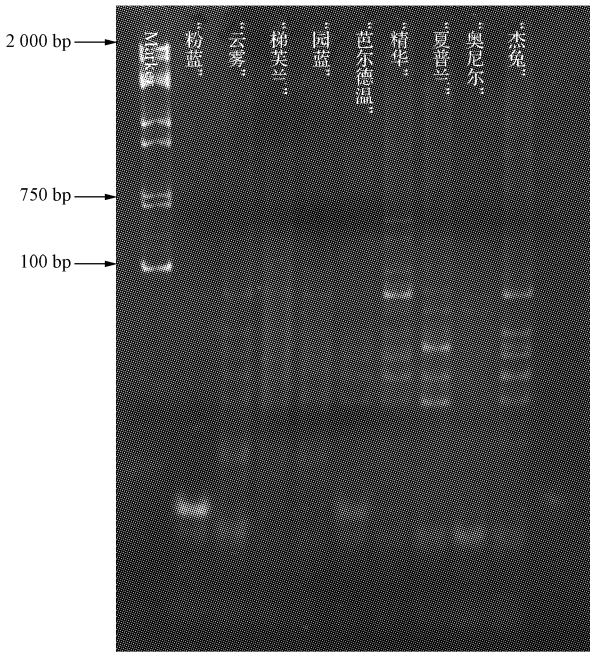


图 3 EM6/ME9 3.5% 丙烯酰胺凝胶电泳图

表 4 9 个引物组合的扩增结果

引物组合	扩增带数/条	多态性条带/条	多态性比率/%
EM2/ME3	7	4	57.14
EM16/ME7	7	5	71.43
EM5/ME1	9	5	55.56
EM6/ME1	9	6	66.67
EM6/ME8	8	5	62.50
EM5/ME7	13	8	61.54
EM6/ME9	25	24	96.00
EM6/ME6	12	7	58.33
EM3/ME3	8	4	50.00
平均	10.89	7.56	69.40

### 2.3 蓝莓种质资源相似性系数分析

从表 5 可以看出,9 个品种蓝莓的遗传相似性系数分布于 0.1818~1.0000 之间,平均遗传相似性系数为

表 5 9 个品种蓝莓的 Jaccard 相似性系数矩阵

品种名称	“粉蓝”	“云雾”	“梯芙兰”	“园蓝”	“芭尔德温”	“精华”	“夏普兰”	“奥尼尔”	“杰兔”
“粉蓝”	1.0000								
“云雾”	0.3333	1.0000							
“梯芙兰”	0.3333	1.0000	1.0000						
“园蓝”	0.3077	0.9474	0.9474	1.0000					
“芭尔德温”	0.3636	0.8235	0.8235	0.7778	1.0000				
“精华”	0.1905	0.5926	0.5926	0.6429	0.5385	1.0000			
“夏普兰”	0.2105	0.6400	0.6400	0.6154	0.5833	0.8235	1.0000		
“奥尼尔”	0.6667	0.3333	0.3333	0.3077	0.1818	0.2857	0.3158	1.0000	
“杰兔”	0.2000	0.6154	0.6154	0.6667	0.5600	0.8000	0.7879	0.2000	1.0000

### 2.4 蓝莓种质资源的 UPGMA 聚类分析结果

基于 Jaccard 遗传相似系数的 UPGMA 聚类图(图 4)显示,9 个品种蓝莓被划分为两大类群:其中“粉蓝”、“奥尼尔”、“云雾”、“梯芙兰”、“园蓝”、“芭尔德温”聚成类群 I;“精华”、“夏普兰”、“杰兔”聚成类群 II。类群 I

又可以细分成 2 个小的类群,其中,“粉蓝”和“奥尼尔”为 1 个类群;“云雾”、“梯芙兰”、“园蓝”及“芭尔德温”为另 1 个类群。类群 II 同样也可细分成 2 个小的类群,分别为“精华”、“夏普兰”1 个类群;“杰兔”为另 1 个类群。

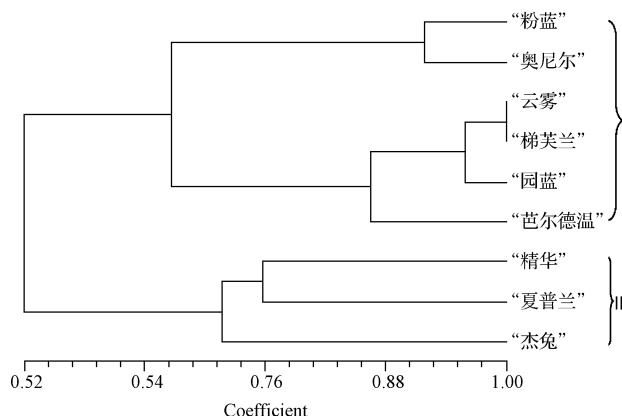


图 4 9 个品种蓝莓的 UPGMA 聚类图

### 2.5 蓝莓种质资源的主坐标分析

主坐标分析以 9 个品种蓝莓的遗传相似性系数为基础,产生的二维以及三维图分别见图 5、6。9 个品种蓝莓在第 1、2 主坐标二维图排序中分成 4 个类群,第 1 个类群为“奥尼尔”、“粉蓝”;第 2 个类群为“芭尔德温”、“梯芙兰”、“云雾”、“园蓝”;第 3 个类群为“精华”、“夏普兰”;第 4 个类群为“杰兔”。9 个品种蓝莓在第 1、2、3 主坐标三维图排序结果与二维图一致。不难发现,主坐标分析结果与聚类分析结果完全一致,但主坐标分析可以从不同方向、不同层面更加直观的显示各品种之间的亲缘关系。

### 3 讨论

1974 年 Grodzicker 等创立了限制性片段长度多态性(RFLP)技术,首创了第 1 代 DNA 分子标记,如今 DNA 分子标记已经发展到几十种,广泛应用于遗传育

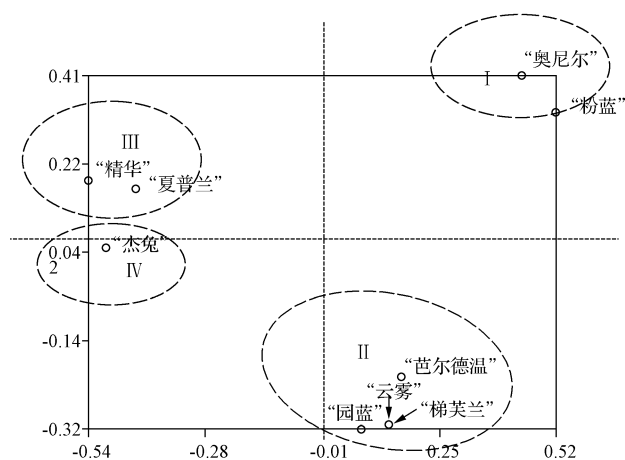


图 5 基于 SRAP-PCR 数据获得的 9 个品种蓝莓的前 2 个主坐标的二维图



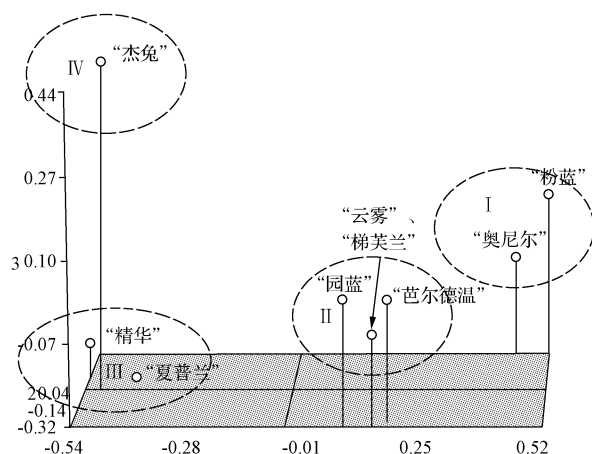


图6 基于SRAP-PCR数据获得的9个品种蓝莓的前3个主坐标的三维图

种、基因定位、亲缘关系鉴定、基因库构建等多方面。常用的分子标记技术有 RFLP、SSR、ISSR、RAPD、STS、SNP 等,不同分子标记技术的原理及优缺点有所区别,需根据研究的需要选择不同的分子标记技术。

崔建民等<sup>[5]</sup>优化了适合蓝莓的 SSR 反应体系:在 20  $\mu\text{L}$  反应体系中,  $\text{Mg}^{2+}$  2.0 mmol/L, dNTPs 0.20 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 0.5 U, 引物浓度 0.8  $\mu\text{mol/L}$ , DNA 模板 1.5 ng/ $\mu\text{L}$ 。王程等<sup>[4]</sup>利用 RAPD 标记分析了长白山蓝莓的遗传多样性及亲缘关系,表明长白山蓝莓的遗传多样性较低,野生蓝莓和栽培蓝莓之间的遗传变异不大,遗传因素在蓝莓形态变异上的作用小于环境因素。尹德洁<sup>[1]</sup>调查了大兴安岭地区野生蓝莓分布,并建立了适合蓝莓的 SRAP-PCR 反

应体系,模板 DNA 浓度 120 ng、引物浓度 0.40  $\mu\text{mol/L}$ ,  $2\times Taq$  PCR Master Mix 10  $\mu\text{L}$ ,剩余体积用去离子水补足;最佳 PCR 扩增程序的退火温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ ;研究发现供试的蓝莓样品在遗传相似系数 0.57 处,分为三大类群:栽培蓝莓品种、野生蓝莓、红豆越橘。通过研究分析,聚类结果与杂交系谱以及品种类型存在一定的相关性<sup>[1]</sup>。

该研究与尹德洁<sup>[1]</sup>在 SRAP-PCR 反应体系上的研究结果有一定的差异,可能是由于 DNA 提取质量及不同公司合成的引物浓度上存在差异。该研究中“杰兔”、“园蓝”、“芭尔德温”、“精华”、“梯芙兰”均为兔眼品种,聚类分析结果显示“芭尔德温”、“园蓝”、“梯芙兰”聚到 1 个类群,与“杰兔”及“精华”的亲缘关系较远,造成结果不一致的原因可能是环境因素或者引种混乱引起。

#### 参考文献

- [1] 尹德洁. 蓝莓野生资源和 SRAP 遗传多样性研究[D]. 北京:北京林业大学,2012.
- [2] 黄春辉,夏思进,曲雪艳,等. 蓝莓的栽培利用现状与发展前景[J]. 现代园艺,2011(6):41-43.
- [3] 茨韦特科夫·约旦,赵燕丽,王春,等. 引进国外蓝莓品种的组织培养及快繁技术研究[J]. 黑龙江农业科学,2011(6):6-8.
- [4] 王程,罗军,田志杰,等. 利用 RAPD 标记分析长白山越橘的遗传多样性及亲缘关系[J]. 吉林医药学院学报,2009,30(2):73-75.
- [5] 崔建民,杨忠,邹荣任,等. 越橘 SSR 反应体系的优化[J]. 吉林农业大学学报,2009,31(5):506-511.
- [6] 杨云,孟慧,吴翼,等. 降香黄檀 SRAP 分子标记的引物筛选[J]. 江西农业学报,2011,23(3):29-31.
- [7] 杨晓东,郭立国,徐立功. SRAP 在大白菜遗传多样性分析实验中的应用[J]. 中国园艺文摘,2010(10):16-18.
- [8] 孙祖霞,刘兆磊,陈素梅,等. 荷花 SRAP-PCR 反应体系的优化与确立[J]. 南京农业大学学报,2011,34(6):53-58.

## Optimization and Establishment of SRAP-PCR Reaction System of *Vaccinium* ssp. and Analysis of the Genetic Diversity

FU Bing<sup>1</sup>, HONG Zhen<sup>1</sup>, LIU Yue-jun<sup>2</sup>, PAN Zhi-mei<sup>1</sup>

(1. Branch of Environment Engineering, Lishui Vocational and Technical College, Lishui, Zhejiang 323000; 2. Lishui Forestry Institute of Zhejiang, Lishui, Zhejiang 323000)

**Abstract:** Taking 9 varieties of blueberry as material, the SRAP-PCR reaction system of *Vaccinium* ssp. was established and optimized by  $L_{16}(4^5)$  orthogonal experimental design. The genetic diversity of them was analyzed by the optimal reaction system. The results showed that the optimal and stable SRAP-PCR system was as follows: 2.5 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$ , 100  $\mu\text{mol/L}$  dNTPs, 0.8 U *Taq* polymerase, 0.2  $\mu\text{mol/L}$  primers and 40 ng DNA template,  $1\times$  Reaction Buffer, within total 20  $\mu\text{L}$  reaction solution. The GS coefficients among the 9 varieties of blueberry were ranged from 0.1818 to 1.0000 with an average of 0.6359, this suggested that the genetic variation was high. These varieties were divided into four groups on the UPGMA dendrogram constructed from GS coefficients, and also divided into four groups by the method of principal coordinates analysis. The UPGMA and GS coefficients results was the same.

**Key words:** blueberry; SRAP-PCR; optimization; genetic diversity