

长白山区野生膜荚黄芪种质资源的 SRAP 分析

王 萌¹, 王景然¹, 李德阳², 全雪丽¹, 吴松权¹

(1. 延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002; 2. 吉林省美城园林工程有限责任公司, 吉林 长春 130022)

摘 要:以野生膜荚黄芪的叶片为试材, 采用 SRAP 分子标记技术, 研究了长白山区野生膜荚黄芪种质资源的遗传多样性, 以期为膜荚黄芪种质资源的保存和优良品种的选育奠定基础。结果表明: 从 300 对引物组合中选出扩增产物条带多, 特征性强, 重复性明显的 16 对引物组合; 利用这些引物进行 PCR 扩增, 共得到 129 条条带, 其中多态性条带数为 95 条。聚类分析结果表明, 长白山区野生膜荚黄芪种质资源之间存在着丰富遗传差异。

关键词:膜荚黄芪; SRAP; 遗传差异; 种质资源

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)21-0094-04

黄芪属多年生豆科黄芪属草本植物, 是重要的补气常用中药之一, 能够祛邪扶正, 擅长补中益气, 具有固表止汗、利尿消肿的功效^[1-2]。《中国药典》2010 版规定黄芪为豆科黄芪属植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 与膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根^[3]。在吉林省, 黄芪主要分布在长白山区^[4]。膜荚黄芪即东北黄芪是长白山的道地药材, 多以野生黄芪为主, 是当地重要的药用植物资源之一^[5]。不过, 由于各种原因, 目前当地野生黄芪资源遭到严重破坏, 接近枯竭, 而栽培黄芪种质资源混杂^[6], 还没有形成稳定的品种。因此, 利用分子标记技术对长白山区野生膜荚黄芪种质资源的亲缘关系进行分析就显得尤为重要, 可为膜荚黄芪种质资源的保存、评价和引种栽培提供理论依据。

近些年, 随着分子生物技术的快速发展, 利用 DNA 分子标记技术开展物种遗传多样性研究取得长足的发展, 广泛用于亲缘关系, 基因定位等多个领域^[7]。SRAP (相关序列扩增多态性) 分子标记技术是基于 PCR 技术上发展起来的一种新型 DNA 标记系统^[8], 此技术在 2001 年由美国加州大学蔬菜系 LI 等^[9]在芸薹属作物开发出来, 该标记系统自诞生以来就被广泛的应用到马铃薯、水稻、生菜、苹果等各种植物的育种研究工作^[7-8, 10]。

SRAP 能够有效地构建遗传图谱, 常用于各种植物种质资源的亲缘关系分析, 具有操作简便、反应稳定、特异条带产率高、目标片段易克隆和标记分布均匀的特点^[11]。但是, SRAP 分子标记技术在膜荚黄芪种质资源中的应用尚鲜见报道。

该试验利用 SRAP 分子标记技术对长白山区野生膜荚黄芪种质资源的亲缘关系进行分析, 以期对膜荚黄芪种质资源的评价与保存、引种栽培和育种提供理论依据^[12]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以采自长白山 6 个不同地区的野生膜荚黄芪叶片为试验材料, 用液氮快速冷冻后保存于 -70 °C 冰箱, 其来源如表 1 所示。

表 1 样品编号及来源

Table 1	Samples and their origin	
编号 Number	类型 Type	产地来源 Origin
1	野生	长白山
2	野生	吉林和龙
3	野生	吉林安图
4	野生	吉林延吉
5	野生	吉林龙井开山
6	野生	吉林龙井白金

1.2 试验方法

1.2.1 黄芪总 DNA 的提取 采用改良的 CTAB 法^[15]提取总 DNA, 存于 -20 °C 冰箱中备用。通过核酸蛋白仪和琼脂糖凝胶电泳检测提取 DNA 的浓度和纯度。

1.2.2 引物合成 根据 LI 等^[9]发表的引物, 合成 10 个上游引物 (ME1 ~ ME10) 和 30 个下游引物 (EM1 ~ EM30) 进行组合, 共 300 对。

1.2.3 SRAP-PCR 反应体系及反应程序 参照金美玉

第一作者简介:王萌(1991-), 男, 山东临沂人, 硕士研究生, 研究方向为特种植物资源与生物技术。E-mail: 718213098@qq.com.

责任作者:吴松权(1972-), 男, 黑龙江鸡西人, 博士, 副教授, 现主要从事特种植物资源与生物技术等研究工作。E-mail: arswsq@ybu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21462044)。

收稿日期:2016-07-25

等^[14]、巩楠等^[15]的方法,反应体系为 DNA 2 μ L, 10 \times PCR buffer 2 μ L, 上游引物(2 μ mol \cdot L⁻¹)2 μ L, 下游引物(2 μ mol \cdot L⁻¹)2 μ L, dNTPs 2 μ L, Ex Taq 酶 0.4 μ L (1 U), 最后用去离子水补足至总体积为 20 μ L。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 7 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 35 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 70 s, 共 5 个循环; 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 50 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 70 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物用含有核酸染料的 3% 琼脂糖凝胶进行电泳, 用 Dolphin 凝胶成像仪器照相, 保存并记录。

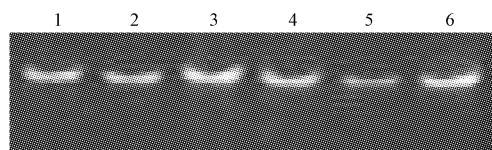
1.3 数据分析

根据 PCR 产物的电泳图谱, 采用杨浩^[16]的方法, 统计易于识别, 有差异, 条带亮度强的多态性条带。在大于 2 000 bp 的区域, 扩增条带少并且不易辨认, 故不记录, 长度在 100~2 000 bp 的扩增条带亮度强, 易辨认, 容易记录, 所以特异性条带多来自这一部分。小于 100 bp 的扩增条带多数因未完全分开, 有重合, 条带亮度较弱, 不容易辨认, 故也不予记录。在相同迁移位置有条带记为 1, 无条带记为 0, 制成 0-1 表, 建立 Excel 数据表格。采用 SPSS 分析软件中的欧氏距离 (Euclidean distance) 进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 膜荚黄芪总 DNA 的提取

提取的 DNA 质量高低决定着 SRAP 扩增产物的信息量是否完整, 因此获得未降解、完整的 DNA 十分重要。该研究提取的 DNA 样品经检测 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值在 1.9 左右, 经电泳没有发现其它的杂带 (图 1), 表明 DNA 的样品基本上无降解, 比较完整, 可以满足试验的需要。



注: 1. 长白山; 2. 和龙; 3. 安图; 4. 延吉; 5. 龙井开山; 6. 龙井白金。下同。

Note: 1. Changbai Mountain; 2. Helong; 3. Antu; 4. Yanji; 5. Longjing Kaishan; 6. Longjing Baijin. The same below.

图 1 野生膜荚黄芪总 DNA 电泳结果

Fig. 1 Total DNA electrophoresis result of wild *A. membranaceus*

2.2 PCR 扩增

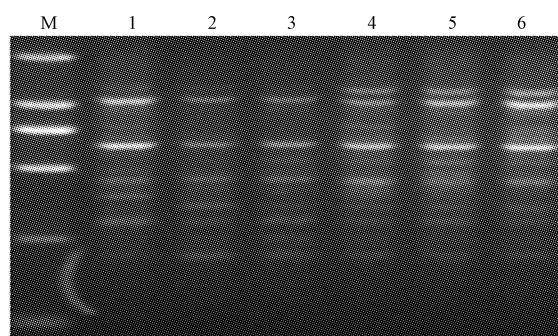
利用混合后的 DNA 池 (6 个地区) 对 300 对引物进行筛选, 选取扩增产物条带多, 亮度强, 具有特征性, 重复性好的引物组合, 共筛选出 16 对引物。用筛选出的 16 对引物分别对 6 个不同产地的野生膜荚黄芪进行 PCR 扩增, 共得到 129 条清晰的条带, 其中多态性的条带数为 95 条, 多态性比率为 73.6%, 平均每个引物组合

产生 5.94 条特异性的条带, 多态性比率范围为 50%~100%, 多态性比较高, 可以用于多态性分析 (表 2、图 2)。

表 2 筛选的引物组合及多态性带数

Table 2 Screened primers and number of polymorphic bands

编号 Number	引物组合 Primer combinations	总带数 Total bands	多态性带数 Polymorphic bands	多态性比率 Polymorphism rate/%
1	ME2+EM9	7	5	71.5
2	ME4+EM5	10	8	80.0
3	ME4+EM10	10	6	60.0
4	ME5+EM3	9	8	88.9
5	ME5+EM8	16	11	68.8
6	ME6+EM9	7	5	71.5
7	ME6+EM10	9	6	66.7
8	ME6+EM22	5	5	100.0
9	ME6+EM23	5	4	80.0
10	ME6+EM28	6	6	100.0
11	ME6+EM29	7	5	71.4
12	ME8+EM4	8	7	87.5
13	ME9+EM8	9	6	66.7
14	ME9+EM10	7	4	57.1
15	ME9+EM19	9	7	77.8
16	ME9+EM26	6	3	50.0



注: M. DNA 2 000 分子量标准。

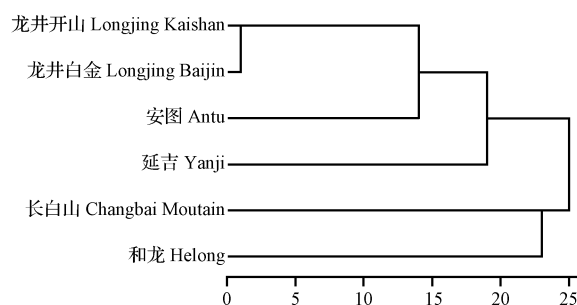
Note: M. DNA 2 000 Ladder.

图 2 引物 ME9+EM19 的 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification result of primers ME9+EM19

2.3 聚类分析结果

长白山不同地区野生黄芪种质资源的 SRAP 聚类分析结果如图 3 所示。根据 SPSS 软件分析得到的结



注: 图中数据为欧氏距离。

Note: Data are expressed as Euclidean distance.

图 3 膜荚黄芪 SRAP 聚类分析

Fig. 3 SRAP cluster analysis of *A. membranaceus*

果,以相对遗传距离 10 为临界值,可将 6 份野生黄芪种质资源分为 5 类,第一类包括龙井开山和龙井白金两地的种质资源,安图、和龙、长白山和延吉各自归为一类。

3 讨论与结论

该试验利用 SRAP 技术对长白山区野生膜荚黄芪种质资源的亲缘关系进行研究,结果显示,SRAP 标记在膜荚黄芪中也能表现出简便、稳定、条带清晰的特点,既克服了 RAPD 重复性差的缺点,又克服了 AFLP 技术复杂、成本昂贵的缺点,表明 SRAP 标记是一种适合膜荚黄芪亲缘关系研究的分子标记^[17]。

该研究中不同野生黄芪种质之间的多态性比率是 73.6%,其遗传多样性较高,说明了各个种质资源之间存在一定的遗传差异,主要表现在 SRAP 分子标记产生的次谱带。不同种群的膜荚黄芪主谱带基本是一致(图 2),说明它们之间有很大的相似性,并未发生太大的变异,属于同一物种;但是不同地区的膜荚黄芪在次谱带上存在着不同程度的差异,存在着特异性的条带,表明不同地区的膜荚黄芪存在丰富的遗传差异。而且,聚类分析结果也表明了 5 个地区采集的黄芪种质分为五大类,这也充分说明了长白山区野生膜荚黄芪种质之间存在着丰富的遗传差异。

另外,聚类分析结果也表明长白山区膜荚黄芪的亲缘关系遵循一定地域差异。地理位置上相对较远的种质资源在聚类分析图上一般是充分散开的,如龙井的种质资源和长白山的种质资源;同一个地区的种质资源大体上是聚在一起的,如龙井开山种质资源和龙井白金种质资源,这可能与两地的气温、光照时间、降水等环境条件明显相似有关。但是也不能完全的按照地理位置来判定它们的亲缘关系,如安图与和龙的黄芪种质,虽然两地都属于长白山地区,地理位置上非常接近,但在聚类图上却分为两大类,这可能与它们所处的生态小环境相差较大相关,使得不同种质逐渐适应当地的气温、光照、降水和海拔高度等。因此,地理位置和环境因素对长白山地区的野生膜荚黄芪种质资源遗传变异有重要的影响。

总之,长白山区野生膜荚黄芪种质按不同地区划分,而且存在着丰富的遗传差异,这将有利于膜荚黄芪的杂交育种,选育新品种。因此,今后应更广泛地收集

和保存长白山区野生膜荚黄芪资源就显得尤为重要,尤其是参考气候、土壤等环境因素收集。此外,这种不同种质资源之间 DNA 水平上的遗传差异,是否与不同种质之间存在着不同的基因或不同的基因表达方式相关,还有待进一步的研究。

参考文献

- [1] 卢彦琦,贺学礼. 黄芪研究现状[J]. 邯郸农业高等专科学校报,2004(4): 19-25.
- [2] 王树斌,全雪丽,周玉红,等. 膜荚黄芪子叶节植株再生体系的建立[J]. 北方园艺,2012(6):177-178.
- [3] 国家药典编委会.《中华人民共和国药典》[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:8.
- [4] 赵明,黄文哲. 中国黄芪属药用植物资源现状及分析[J]. 中国野生植物资源,2010,19(6):5-9.
- [5] 李淑芳. 中药黄芪药理作用研究进展[J]. 湖北中医杂志,2013(6): 73-75.
- [6] 赵明,黄文哲. 中国黄芪属药用植物资源现状及分析[J]. 中国野生植物资源,2000,19(6):5-9.
- [7] 毛伟,李培英,孙宗玖. 偃麦草 SRAP-PCR 反应体系优化[J]. 北方园艺,2015(2):91-97.
- [8] 柳李旺,龚义勤,黄浩,等. 新型分子标记:SRAP 与 TRAP 及其应用[J]. 遗传,2004,26(5):777-781.
- [9] 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 (2):455-461.
- [10] 赵英,黄国弟,付海天,等. 十二份枳椇种植亲缘关系的 SRAP 分析[J]. 北方园艺,2015(21):99-102.
- [11] 涂勋良. 36 个石榴品种的 SRAP 遗传多样性研究[D]. 雅安:四川农业大学,2012:3-5.
- [12] 潘祖桐. SRAP 和 RSAP 在侧耳属菌种亲缘关系分析中的研究[D]. 长春:吉林农业大学,2012.
- [13] 王珍,方宣钧. 植物 DNA 分离[J]. 分子植物育种,2003,1(2):281.
- [14] 金美玉,廉美兰,吴松权,等. 黄芪 SRAP 反应体系优化[J]. 江苏农业科学,2009(5):21-22.
- [15] 巩楠,石磊,甘晓燕,等. 冬枣 SRAP 扩增体系的优化[J]. 西北农业学报,2013,22(4):109-113.
- [16] 杨浩. 基于 SPSS 的聚类分析在行业统计数据中的应用[D]. 长春:吉林大学,2013.
- [17] BUDAK H, SHEARMAN R C, PARMAKSIZ I, et al. Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buffalo grasses based on phylogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs and SRAPs[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109:280-288.

SRAP Analysis of Germplasm Resources of Wild *Astragalus membranaceus* in Changbai Mountain

WANG Meng¹, WANG Jingran¹, LI Deyang², QUAN Xueli¹, WU Songquan¹

(1. Agricultural College, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002; 2. Landscape Engineering Limited Company of Meicheng of Jilin Province, Changchun, Jilin 130022)

番茄超氧化物歧化酶的生物信息学分析

郭 笑, 苑广信, 王曼力, 赵南晰, 李洪宇, 安丽萍

(北华大学 药学院, 吉林 吉林 132013)

摘 要:超氧化物歧化酶(SOD)是生物体内重要的抗氧化酶。以在 NCBI 数据库中注册的 7 种番茄 SOD 蛋白质为分析对象,利用生物信息学方法,分析了 SOD 蛋白质的理化性质、信号肽、糖基化位点、磷酸化修饰、一级和二级结构以及系统进化特点。结果表明:7 种蛋白质间的理化性质存在较大差异;氨基酸序列中不含信号肽,均不是分泌蛋白;不同类型的番茄 SOD 中所含糖基化以及潜在磷酸化位点数目不同;它们的氨基酸序列同源性较低,二级结构也存在较大差异;系统进化树可作为番茄 SOD 家族蛋白遗传分化研究的重要依据。该研究为深入开展 SOD 的酶学特征及植物抗氧化的分子机制研究提供重要的理论依据。

关键词:番茄;超氧化物歧化酶;生物信息学;抗氧化

中图分类号:S 641.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)21-0097-05

生物体长期暴露在有氧环境中均会受到如超氧化物、过氧化物及羟自由基等活性氧的损伤,导致细胞膜脂类过氧化、蛋白质变性、基因突变等^[1]。环境压力(如臭氧、土壤成分、干旱、寒冷等因素)对植物造成的损害也与氧自由基的产生和积累密切相关。为此植物体在长期进化过程中建立了一套完整的抗氧化体系(酶类和非酶类)^[2]。其中酶类主要包括超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶和谷胱甘肽硫转移酶等。它们协同作用保持活性氧在适度的水平,避免对细胞造成伤害。

第一作者简介:郭笑(1988-),女,博士,实验师,现主要从事基因工程产品制备等研究工作。E-mail:liguoxiao2697@126.com.

责任作者:安丽萍(1973-),女,博士,副教授,硕士生导师,现主要从事生物信息学分析与蛋白质纯化及结构等研究工作。E-mail:alp960@126.com.

基金项目:长白山药用动植物活性多肽研究与开发国家地方联合工程实验室资助项目(发改高技[2010]2455号);吉林省教育厅资助项目(吉教科合[2016]第75号)。

收稿日期:2016-07-25

超氧化物歧化酶(SOD)是生物体清除活性氧的重要酶类之一,被称为生物体抗氧化系统的第一道防线^[3]。该蛋白能促使超氧阴离子(O_2^-)发生歧化反应,即定名为超氧化物歧化酶,其广泛存在于各种微生物、动物和植物的根、茎、叶及果实等部位。SOD 还是一种含金属的抗氧化酶,根据其活性中心金属原子的不同被分为多种类型。植物中主要存在 3 种类型的 SOD: Cu-Zn SOD、Fe SOD 和 Mn SOD^[4]。其中 Cu-Zn SOD 主要位于细胞质和叶绿体中, Mn SOD 主要位于线粒体中, Fe SOD 主要位于叶绿体中^[5]。此外,除了细胞质、叶绿体及线粒体外, SOD 还在乙醛酸循环体和过氧化物酶体中^[6-7]。研究表明,植物的衰老与 SOD 联系密切。植物衰老期间 SOD 活性下降,活性氧增加,膜脂过氧化作用不断加强,当它积累到一定程度植物就会出现死亡^[8]。目前通过转 SOD 基因技术培育高抗逆作物已成为国内外 SOD 研究领域的热点之一。但是由于 SOD 种类繁多,选择合适的 SOD 类型进行研究与改造显得尤为重要。

番茄营养丰富、味道鲜美,是全世界最重要的果蔬之一,也是全世界栽培最为普遍的果菜之一。无论新鲜

Abstract: Taking leaves of wild *Astragalus membranaceus* as test materials, genetic diversity of germplasm resources of wild *A. membranaceus* in Changbai Mountain was studied by using SRAP molecular markers, in order to provide a foundation for preserving and breeding good varieties for *Astragalus membranaceus*. The results showed that 16 pairs of primers, which could produce more, characteristic and reproducible bands, were screened from 300 pairs of SRAP primers; these primers amplified 129 bands from which polymorphic bands were 95 bands. The cluster analysis disclosed that there were abundant genetic differences among the wild resources of *A. membranaceus* in Changbai Mountain, which was beneficial for cross-breeding of *A. membranaceus*.

Keywords: *Astragalus membranaceus*; SRAP; genetic diversity; germplasm