

王立博,张 婷,王敬力,等. 油茶内生真菌 DNA 提取及 SRAP 反应体系的建立[J]. 江苏农业科学,2013,41(12):37-40.

油茶内生真菌 DNA 提取及 SRAP 反应体系的建立

王立博,张 婷,王敬力,易庆平

(荆楚理工学院生物工程学院,湖北荆门 448000)

摘要:采用改良的 CTAB 法提取油茶内生真菌基因组 DNA,并以油茶内生真菌基因组 DNA 为材料,对影响 SRAP 反应条件的因素进行探索。结果表明,在 30 μL 反应体系中,5 种成分的适宜量分别是 Mg^{2+} 1.8 mmol/L、dNTPs 145 $\mu\text{mol/L}$ 、引物 0.22 $\mu\text{mol/L}$ 、模板 DNA 65 ng、*Taq* DNA 聚合酶 2.0 U。建立的 SRAP-PCR 反应体系为 SRAP 分子标记在油茶内生真菌遗传多样性研究中的应用提供了基础。

关键词:内生真菌;油茶;SRAP;PCR 反应体系

中图分类号: Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)12-0037-04

内生真菌(endophytic fungi)是指生活史中的一部分或全部阶段生活于健康植物的各种组织部位及器官内部的真菌微生物,一般不引起植物体病害,可通过组织学方法等证明其为内生,常见于植物的茎、叶以及芽等组织^[1-2]。目前对植物内生真菌研究较多的是药用植物和农作物等方面,如红豆杉、匙叶翼首草、虎杖、麻黄、水稻等^[3-10]。

序列相关扩增多态性(sequence related amplified polymorphism,SRAP)是一种新型的基于 PCR 的标记技术,它不需要

知道任何基因的序列信息即可进行 PCR 扩增,克服了 RAPD、SSR、AFLP 等标记技术重复性差、成本高的缺点,具有操作简便、标记位点分布均匀、标记稳定性好、重复性好等优点^[11-13],有学者用 SRAP 分子标记技术对喜树内生真菌进行了研究^[14],但至今未见 SRAP 分子标记技术应用于油茶内生真菌研究中的报道。因此,本研究以油茶内生真菌为材料,提取基因组 DNA,建立适合于油茶内生真菌的 SRAP 反应体系,以期 SRAP 标记技术应用于油茶内生真菌遗传多样性及基因标记的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

1.1.1 材料 试验材料为周希等筛选的油茶内生真菌^[15]。随机选取 15 种,在液体培养基内培养 4 d 获得油茶内生真菌菌丝体。

收稿日期:2013-05-15

基金项目:湖北省教育厅项目(编号:Q20134301);荆楚理工学院校级科研项目(编号:ZR201001)。

作者简介:王立博(1988—),男,河南洛阳人,主要从事食品科学与工程研究。E-mail:volley_ball@163.com。

通信作者:张 婷,硕士,讲师,主要从事生化与分子生物学研究。E-mail:ztxianyun@126.com。

的热点,也是彻底解决自交不亲和的机制的关键所在。

参考文献:

- [1] Stone J L. Molecular mechanisms underlying the break down of gametophytic self-incompatibility[J]. Rev Biol, 2002, 77(1): 17-32.
- [2] Sophia L S, Daphne R G. The molecular biology of self-incompatibility systems in flowering plants[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2001, 67(2): 93-114.
- [3] Javier S, María H. Identification of self-incompatibility alleles in pear cultivars(*Pyrus communis* L.)[J]. Euphytica, 2004, 128(3): 325-331.
- [4] Silvia Z, Paola T, Wim B, et al. S-Allele characterization in self-incompatible pear(*Pyrus communis* L.)[J]. Sex Plant Reprod, 2002, 15(3): 153-158.
- [5] Norioka N, Ohnishi Y, Norioka S, et al. Nucleotide sequences of cDNAs encoding S_2 - and S_4 -RNases (D49527 and D49528 for EM-BL) from Japanese pear(*Pyrus pyrifolia* Nakai) (PGR95-020)[J]. Plant Physiol, 1995, 108: 1343.
- [6] Ishimizu T, Shinkawa T, Sakiyama F, et al. Primary structural features of rosaceous S-RNases associated with gametophytic self-incom-

patibility[J]. Plant Molecular Biology, 1998, 37(6): 931-941.

- [7] Castillo C, Takasaki T, Saito T, et al. Cloning of the S_8 -RNase (S_8 -allele) of Japanese Pear(*Pyrus pyrifolia* Nakai)[J]. Plant Biotechnology, 2002, 19(1): 1-6.
- [8] Takasaki T, Okada K, Castillo C, et al. Sequence of the S_9 -RNase cDNA and PCR-RFLP system for discriminating S_1 - to S_9 -allele in Japanese pear[J]. Euphytica, 2004, 135(2): 157-167.
- [9] Hoy-Taek K, Yutaka H, Hyun-jung K, et al. The presence of a new S-RNase allele(S_{10}) in Asian pear(*Pyrus pyrifolia* (Burm; Nakai))[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2006, 53(7): 1375-1383.
- [10] Raspe O, Kohn J R. Population structure at the S-locus of *Sorbus aucuparia* L. (Rosaceae: Maloideae)[J]. Molecular Ecology, 2007, 16(6): 1315-1325.
- [11] Cornish E C, Pettitt J M, Boning I, et al. Developmentally controlled expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca* L. Nature, 1987, 326: 99-102.
- [12] Sassa H, Nishio T, Kowiyama Y, et al. Self-incompatibility (S) alleles of the rosaceae encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily[J]. Molecular & General Genetics, 1996, 250(5): 547-557.

1.1.2 试剂 dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶等,购自大连宝生物工程有 限公司;引物 ME2 (5′ - TGAGTCCAAACCGGAGC - 3′)、EM2 (5′ - GACTGCGTACGAATTTGC - 3′),由上海生工 生物技术有 限公司合成;琼脂糖、CTAB、三氯甲烷、异戊醇、异 丙醇、乙醇等均 为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 将菌丝体过滤烘干后,于研钵中 加少量灭菌石英砂冰浴研磨,参照任艳利等的方法^[16]提取基 因组 DNA。经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的提取质量,稀 释到所需浓度后,-20 ℃ 贮存备用。

1.2.2 单因素优化方案 采用单因素试验对影响扩增的 Mg^{2+} 、模板 DNA、引物、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶分别设置了 5 种梯度处理(表 1)。

表 1 SRAP-PCR 扩增的相关因子梯度设置

Mg^{2+} 浓度 (mmol/L)	dNTPs 浓度 (μ mol/L)	引物浓度 (μ mol/L)	模板 DNA 量 (ng)	<i>Taq</i> DNA 聚合 酶量(U)
1.2	55	0.18	35	1.0
1.4	85	0.20	65	1.5
1.6	115	0.22	95	2.0
1.8	145	0.24	125	2.5
2.0	175	0.26	155	3.0

1.2.3 正交优化设计 为了探讨相关因子间的互作效应,在 单因素试验的基础上设计 SRAP 反应体系正交试验的因素和 水平(表 2)。采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计,对 Mg^{2+} 浓度、 dNTPs 浓度、引物浓度、*Taq* DNA 聚合酶量进行 5 因素 4 水平 优化试验,共 16 个处理(表 3)。

表 2 SRAP-PCR 反应体系正交试验的因素和水平

水平	因素				
	Mg^{2+} 浓度 (mmol/L)	dNTPs 浓度 (μ mol/L)	引物浓度 (μ mol/L)	模板 DNA 量 (ng)	<i>Taq</i> DNA 聚合 酶量(U)
1	1.4	55	0.20	65	1.0
2	1.6	85	0.22	95	1.5
3	1.8	115	0.24	125	2.0
4	2.0	145	0.26	155	2.5

1.2.4 SRAP-PCR 扩增 扩增反应采用复性变温法。反应 程序:96 ℃ 预变性 5 min;96 ℃ 变性 30 s,35 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s,5 个循环;96 ℃ 变性 30 s,48 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s,30 个循环;循环结束后 72 ℃ 延伸 7 min^[17], 随后 20 ℃ 保存。

1.2.5 电泳检测 PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检 测:用 DL2000 Marker 作为标准分子量参照物,恒压 80 V 电 泳约 1 h,之后用 EB 染色 5 min 左右,冲洗 4 min,于凝胶成像 分析系统拍照保存。

1.2.6 反应体系的验证 根据确定的最优试验方案,对另外 14 种内生真菌的基因组 DNA 进行扩增,由试验结果确定该 反应体系的可行性及稳定性。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取结果

由图 1 可明显看出每条泳道上有均匀 DNA 条带,虽然结 果有部分扩散现象,但足以说明提取效果符合 PCR 扩增要求。

表 3 SRAP-PCR 反应正交试验设计

处理	Mg^{2+} 浓度 (mmol/L)	dNTPs 浓度 (μ mol/L)	引物浓度 (μ mol/L)	模板 DNA (ng)	<i>Taq</i> DNA 聚合酶(U)
1	1.4	55	0.20	65	1.0
2	1.4	85	0.22	95	1.5
3	1.4	115	0.24	125	2.0
4	1.4	145	0.26	155	2.5
5	1.6	55	0.22	125	2.5
6	1.6	85	0.20	155	2.0
7	1.6	115	0.26	65	1.5
8	1.6	145	0.24	95	1.0
9	1.8	55	0.24	155	1.5
10	1.8	85	0.26	125	1.0
11	1.8	115	0.20	95	2.5
12	1.8	145	0.22	65	2.0
13	2.0	55	0.26	95	2.0
14	2.0	85	0.24	65	2.5
15	2.0	115	0.22	155	1.0
16	2.0	145	0.20	125	1.5

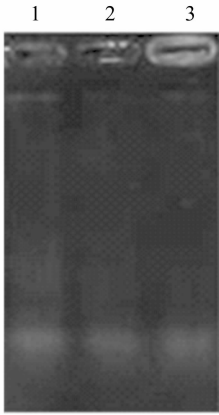
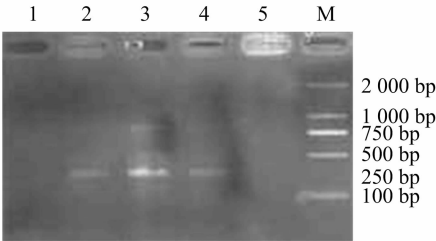


图1 油茶内生真菌基因组DNA

2.2 单因素优化试验结果

2.2.1 Mg^{2+} 浓度对 PCR 扩增的影响 Mg^{2+} 浓度对 *Taq* DNA 聚合酶活性有较大影响,如图 2 所示, Mg^{2+} 浓度为 1.4 ~ 1.6 mmol/L 时,随着 Mg^{2+} 浓度升高,*Taq* DNA 聚合酶活性增大,条带越来越明显。当 Mg^{2+} 浓度大于 1.6 mmol/L 时,*Taq* DNA 聚合酶活性受 Mg^{2+} 浓度升高的抑制,条带变暗。当 Mg^{2+} 浓度升高至 2.0 mmol/L 时,无特异性扩增条带。因此 本试验中 Mg^{2+} 最佳浓度为 1.6 mmol/L。

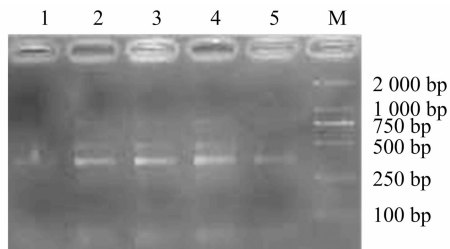


1~5泳道 Mg^{2+} 浓度分别为1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 mmol/L; M为DL2000 marker

图2 Mg^{2+} 浓度对 SRAP-PCR 的影响

2.2.2 dNTPs 浓度对 PCR 扩增的影响 如图 3 所示,dNTPs

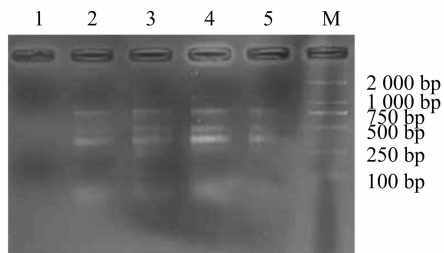
作为扩增的底物,直接影响产物的产量、特异性及合成。本试验中当 dNTPs 浓度为 $55\ \mu\text{mol/L}$ 时有 1 条亮带, dNTPs 浓度为 85 、 $115\ \mu\text{mol/L}$ 时均有扩增条带且亮度基本相同, 浓度 $145\ \mu\text{mol/L}$ 时条带较亮, 浓度 $175\ \mu\text{mol/L}$ 时条带变弱。因此, 从经济因素考虑, dNTPs 的最佳浓度选用 $85\ \mu\text{mol/L}$ 。



1~5泳道dNTPs浓度分别为55、85、115、145、175 $\mu\text{mol/L}$;
M为DL2000 marker

图3 dNTPs浓度对SRAP-PCR扩增的影响

2.2.3 模板量对 PCR 扩增的影响 如图 4 所示, 模板量在 $65\sim 145\ \text{ng}$ 时均有扩增条带出现, 当模板量为 $125\ \text{ng}$ 时获得了较清晰的扩增条带, 模板量小于 $125\ \text{ng}$ 或大于 $125\ \text{ng}$ 时, 扩增条带较模糊, 因此本试验中模板的最佳用量为 $125\ \text{ng}$ 。

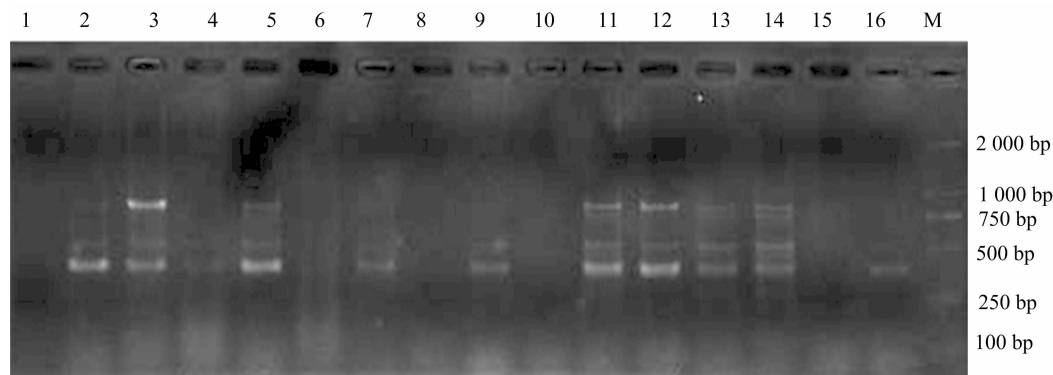


1~5泳道模板量分别为35、65、95、125、145 ng;
M为DL2000 marker

图4 模板量对SRAP-PCR扩增的影响

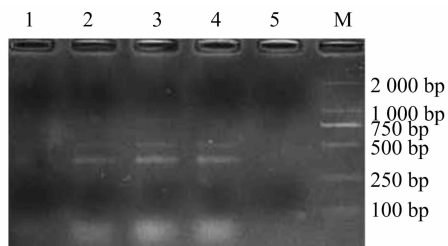
2.2.4 引物浓度对 PCR 扩增的影响 如图 5 所示, 引物浓度为 $0.26\ \mu\text{mol/L}$ 时, 没有扩增条带; 引物浓度为 0.22 、 $0.24\ \mu\text{mol/L}$ 时, 有明显的扩增条带, 且基本一致; 引物浓度为 0.18 、 $0.20\ \mu\text{mol/L}$ 时, 条带较模糊。因此本试验确定最优的引物浓度为 $0.22\ \mu\text{mol/L}$ 。

2.2.5 *Taq* DNA 聚合酶用量对 PCR 扩增的影响 *Taq* DNA 聚合酶活性的高低影响着 PCR 反应的进程与产物的产量。



M—DL2000 marker

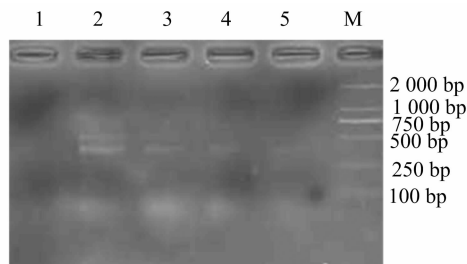
图7 正交优化试验各组扩增结果



1~5泳道引物浓度分别为0.18、0.20、0.22、0.24、
 $0.26\ \mu\text{mol/L}$; M为DL2000 marker

图5 引物浓度对SRAP-PCR的影响

如图 6 所示, *Taq* DNA 聚合酶用量为 $1.5\ \text{U}$ 时, 扩增条带最好; *Taq* DNA 聚合酶用量大于 $1.5\ \text{U}$ 时, 条带逐渐变暗; *Taq* DNA 聚合酶用量为 1.0 、 $3.0\ \text{U}$ 时, 基本没有扩增条带。因此本试验 *Taq* DNA 聚合酶最佳用量为 $1.5\ \text{U}$ 。



1~5泳道*Taq* DNA聚合酶用量分别为1.0、1.5、2.0、2.5、
 $3.0\ \text{U}$; M为DL2000 marker

图6 *Taq* DNA聚合酶用量对SRAP-PCR扩增影响

2.3 正交试验结果

如图 7 所示, $L_{16}(4^5)$ 正交试验中 1、8、10、15 号无条带出现, 其他各组均有条带出现; 4、6 号条带很不明显; 2、7、9、16 号均为 2 条带, 且条带分子量偏小, 2 号低分子量条带较亮; 3、5、11、12、13、14 号扩增出 3~4 条带, 且条带较为明显。3 号大分子量条带较明亮, 5 号小分子量条带较明亮, 而大分子量条带较弱且有弥散现象。13、14 号虽然有 4 条带, 但都为弱带。11、12 号条带明亮, 大分子量条带与小分子量条带均为亮带, 且 12 号更为明亮。因此最优处理组为 12 号, 其因素组合为 $1.8\ \text{mmol/L}\ \text{Mg}^{2+}$ 、 $145\ \mu\text{mol/L}$ dNTPs、 $0.22\ \mu\text{mol/L}$ 引物、 $65\ \text{ng}$ 模板、 $2.0\ \text{U}$ *Taq* DNA 聚合酶。

2.4 SRAP 反应体系最优处理的验证

对 14 组样品采用正交试验最优处理进行验证,结果(图

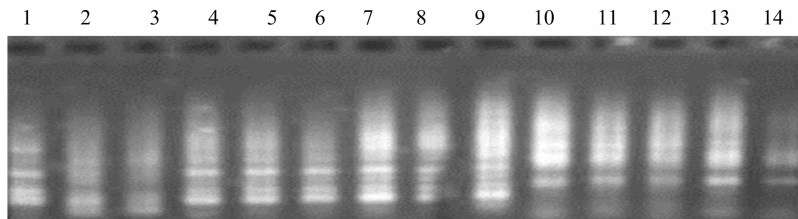


图8 SRAP反应体系最优处理验证结果

3 结论

SRAP 分子标记是在 PCR 扩增的基础上,通过独特的引物设计,利用基因外显子 G、C 含量丰富及启动子和内含子 A、T 含量丰富的特点设计 2 条引物,对基因的开放阅读框架(open reading frames, ORFs)进行扩增。上游引物长 17 bp,扩增外显子区域;下游引物长 18 bp,扩增内含子区域和启动子区域。不同基因的内含子、启动子与间隔区长度不同,因而产生多态性。该标记具有简便、稳定的特点,产率高、便于克隆目标片段。

SRAP 标记技术一般用于种群遗传多样性分析,分析中会涉及到大量的样品,因此必须先对少数样品进行反应条件的摸索,才能保证后续大量扩增的顺利进行。本研究中运用单因素试验和正交试验设计方法,对油茶内生真菌 SRAP 反应体系进行优化,得到最优反应条件为 1.8 mmol/L Mg^{2+} 、145 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs、0.22 $\mu\text{mol/L}$ 引物、65 ng 模板、2.0 U *Taq* DNA 聚合酶。

Taq DNA 聚合酶用量和 Mg^{2+} 浓度对扩增效果影响很大, *Taq* DNA 聚合酶活性的高低影响着 PCR 反应的进程以及产物的产量。*Taq* DNA 聚合酶浓度过低会出现产物不稳定或没有产物,过高会引起非特异性扩增,出现弥散现象。 Mg^{2+} 是 *Taq* DNA 聚合酶的激活剂,其浓度影响合成的可靠性及酶的活性,还影响引物与模板的结合效率。 Mg^{2+} 浓度过低时,会使 *Taq* DNA 聚合酶的作用效率低; Mg^{2+} 浓度过高,易生成非特异性扩增产物^[18]。

dNTPs 浓度及引物浓度对扩增效果影响也很大。当 dNTPs 浓度过低时,会与 Mg^{2+} 结合,降低 Mg^{2+} 浓度,进而影响聚合酶活性,降低产物产量;当 dNTPs 浓度过高时,除能与 Mg^{2+} 结合外,还能抑制 Mg^{2+} 活性,加速反应,出现非特异性扩增,影响扩增结果。

SRAP 标记技术比较多地应用于植物遗传多样性研究中,而在内生真菌多样性分析中报道较少。本试验所得出的 SRAP 反应体系优化方案,经验证基本可以得到稳定、可靠的扩增效果,从而证明了本试验的可靠性,为 SRAP 技术在油茶内生真菌的后续研究奠定基础。

参考文献:

[1] 易晓华. 植物内生真菌多样性研究进展[J]. 安徽农业科学,

2009, 37(28):13468-13469.

[2] 李明. 植物内生真菌[J]. 生物学教学, 2003, 28(5):1-3.

[3] Kumar S, Kaushik N. Endophytic fungi isolated from oil-seed crop *Jatropha curcas* produces oil and exhibit antifungal activity[J]. PLoS One, 2013, 8(2):1-8.

[4] Rajala T, Velmala S M, Tuomivirta T, et al. Endophyte communities vary in the needles of Norway spruce clones[J]. Fungal Biology, 2013, 117(3):182-190.

[5] 李昆太, 彭卫福, 周佳, 等. 一株产紫杉醇的南方红豆杉内生真菌的分离与鉴定[J]. 江西农业大学学报, 2013, 35(1):184-188.

[6] 张格杰, 何建清, 岳海梅. 匙叶翼首草内生真菌的分离鉴定及其抗菌活性[J]. 西北农业学报, 2013, 22(3):194-198.

[7] 肖军, 肇莹, 杨涛, 等. 内生真菌发酵产物对水稻氮肥利用率的影响[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(1):72-75.

[8] 彭浩, 陈文强, 邓百万, 等. 1 株产白藜芦醇及白藜芦醇苷虎杖内生真菌的分离鉴定[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(8):342-345.

[9] 李端, 郭利伟, 刘瑞, 等. 1 株产麻黄碱内生真菌的筛选[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(9):316-318.

[10] 姜晓宇, 高菊生, 徐凤花, 等. 水稻种子内生细菌多样性及其分泌植物生长素能力的测定[J]. 微生物学报, 2013, 53(3):269-275.

[11] 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.

[12] 王晓露, 郭先锋, 孙宪芝, 等. SRAP 标记在园艺植物研究中的应用[J]. 山东农业大学学报:自然科学版, 2009, 40(4):650-654.

[13] 顾慧, 陈新军, 付三雄, 等. SRAP 标记预测甘蓝型油菜常规品种间杂种优势[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(6):169-171.

[14] 李霞, 刘佳佳, 陈建华, 等. 产喜树碱喜树内生真菌的筛选及喜树内生真菌的 SRAP 分析[J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(7):60-64.

[15] 周希, 张婷, 张苗, 等. 油茶内生真菌的分离[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(16):8958-8959.

[16] 任艳利, 腊萍, 张相峰, 等. 改良 CTAB 法提取薰衣草基因组 DNA 研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(22):13292-13293, 13320.

[17] 张婷, 吕明治, 董妍玲, 等. 油茶 SRAP-PCR 反应体系的建立与引物筛选[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(17):8882-8885.

[18] 梁任繁, 王益奎, 李文嘉, 等. 茄子 ISSR-PCR 反应体系优化及验证[J]. 中国蔬菜, 2010(24):48-52.