



文昌锥SRAPPCR体系优化及有效引物筛选

孙秀秀 陈加利 杨立荣 云勇 戚华沙 郑道君

Optimization of SRAP-PCR System and Screening of Effective Primers for *Castanopsis wenchangensis*

Sun Xiuxiu, Chen Jiali, Yang Lirong, Yun Yong, Qi Huasha, Zheng Daojun

引用本文:

孙秀秀, 陈加利, 杨立荣, 云勇, 戚华沙, 郑道君. 文昌锥SRAPPCR体系优化及有效引物筛选[J]. 西南林业大学学报, 2021, 41(1):39–46. doi: 10.11929/j.swfu.201909020

Sun Xiuxiu, Chen Jiali, Yang Lirong, Yun Yong, Qi Huasha, Zheng Daojun. Optimization of SRAPPCR System and Screening of Effective Primers for *Castanopsis wenchangensis*[J]. *Journal of Southwest Forestry University(Natural Science)*, 2021, 41(1):39–46. doi: 10.11929/j.swfu.201909020

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11929/j.swfu.201909020>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

华山松SRAP引物的筛选与验证

Selection and Validation of SRAP Primers in *Pinus armandii*

西南林业大学学报. 2020, 40(1): 22 <https://doi.org/10.11929/j.swfu.201904012>

思茅松SSR-PCR反应体系优化研究

Optimization of SSR-PCR Reaction System in *Pinus kesiya* var. *langbianensis*

西南林业大学学报. 2018, 38(5): 34 <https://doi.org/10.11929/j.issn.2095-1914.2018.05.006>

贵州南部野生兜兰SRAP遗传多样性分析

Genetic Diversity Analysis of Wild *Paphiopedilum* Species in the South of Guizhou

西南林业大学学报. 2017, 37(1): 10 <https://doi.org/10.11929/j.issn.2095-1914.2017.01.002>

速生型杉木SRAP遗传差异分析

Genetic Divergence of the Chinese Fir Fast-growing Genotypes Revealed by SRAP Markers

西南林业大学学报. 2017, 37(3): 14 <https://doi.org/10.11929/j.issn.2095-1914.2017.03.003>

农杆菌介导的白杨遗传优化体系研究

Optimization System of *Agrobacterium*-mediated Transformation of *Leuce*

西南林业大学学报. 2018, 38(4): 14 <https://doi.org/10.11929/j.issn.2095-1914.2018.04.003>

吡咯伯克霍尔德氏菌JK-SH007高GC基因PCR体系的扩增研究

Exploration of GC-rich Gene PCR System from *Burkholderia pyrocinia* JK-SH007

西南林业大学学报. 2017, 34(1): 130 <https://doi.org/10.11929/j.issn.2095-1914.2017.01.021>

DOI: 10.11929/j.swfu.201909020

引文格式: 孙秀秀, 陈加利, 杨立荣, 等. 文昌锥 SRAP-PCR 体系优化及有效引物筛选 [J]. 西南林业大学学报 (自然科学), 2021, 41(1): 39–46.

文昌锥 SRAP-PCR 体系优化及有效引物筛选

孙秀秀 陈加利 杨立荣 云 勇 戚华沙 郑道君

(海南省农业科学院热带园艺研究所, 海南省农业科学院海南省热带特种
经济植物种质资源创新利用重点实验室, 海南 海口 571100)

摘要: 通过单因素试验和正交试验相结合, 分析 DNA、引物、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶 4 种因素对文昌锥 SRAP-PCR 扩增结果的影响, 优化建立文昌锥 SRAP-PCR 体系。结果表明: 文昌锥基因组 DNA 浓度和 dNTPs 浓度过低或过高均扩增不出产物, 而引物浓度和 *Taq* 酶用量的增加能提高扩增效率。在适宜浓度范围内, 各个因素对文昌锥 SRAP-PCR 扩增影响大小依次为: 引物 = dNTPs > *Taq* 酶 > DNA; 最优反应体系为: 总体系为 20 μ L 时, DNA 20 ng, 引物 0.6 μ mol/L, dNTPs 0.15 mmol/L 和 *Taq* 酶 4 U。经验证, 该体系获得的扩增产物清晰、稳定; 筛选获得 45 对有效性引物组合多态性好, 可应用于 SRAP 分子标记技术在文昌锥资源研究。

关键词: 文昌锥; SRAP; 反应体系; 引物

中图分类号: S792.99

文献标志码: A

文章编号: 2095-1914(2021)01-0039-08

Optimization of SRAP-PCR System and Screening of Effective Primers for *Castanopsis wenchangensis*

Sun Xiuxiu, Chen Jiali, Yang Lirong, Yun Yong, Qi Huasha, Zheng Daojun

(Institute of Tropical Horticulture/Hainan Provincial Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of
Tropical Special Economic Plants, Hainan Academy of Agricultural Sciences, Haikou Hainan 571100, China)

Abstract: In order to optimize and establish the SRAP-PCR system for *Castanopsis wenchangensis*, the combination of single factor test and orthogonal test were used to analysis the effects of DNA, primers, dNTPs and *Taq* DNA polymerase on SRAP-PCR. The results showed that the genomic DNA concentration and dNTPs concentration were too low or too high to amplify the product, and the increase of primer concentration and *Taq* DNA polymerase could increase the amplification efficiency. Within the appropriate concentration range, the order of influence on the SRAP-PCR system for *C. wenchangensis* was: primer = dNTPs > *Taq* > DNA. The optimal reaction system was: when the total system was 20 μ L, the DNA 20 ng, the primer 0.6 μ mol/L, the dNTPs 0.15 mmol/L and *Taq* 4 U. It has been verified that the amplification products obtained by this system were clear and stable, 45 pairs of effective primer combination polymorphisms were obtained by screening, which can be applied to the research of SRAP molecular marker in *C. wenchangensis* resources.

Key words: *Castanopsis wenchangensis*; SRAP; reaction system; primer

收稿日期: 2019-09-05; 修回日期: 2019-12-17

基金项目: 海南省重点研发计划项目 (ZDYF2018076) 资助; 2019 年度海南省省属科研院所技术开发研究专项“热带特色经济植物种质资源收集、保存与评价”资助。

第 1 作者: 孙秀秀 (1993—), 女, 硕士。研究方向: 热带植物种质资源保护与创新利用。Email: 1374584038@qq.com。

通信作者: 郑道君 (1979—), 男, 副研究员, 硕士生导师。研究方向: 热带植物种质资源保护与创新利用。
Email: daojunzh@163.com。

文昌锥 (*Castanopsis wenchangensis*) 俗称“杠酸”“油酸”，属壳斗科锥属植物，是海南特有种，仅分布在海南岛东北部的文昌少数地区。野外调查结果发现，文昌锥现存种群仅有8个，个体数量不超过1000株且大部分为成年老树，属于海南特有极小种群，急需保护。文昌果实口感好，淀粉含量高（淀粉含量60%左右），营养价值丰富，是较好的淀粉植物，在海南北部，尤其是文昌和海口地区，食用历史悠久，市场销价在30元/kg，具有较好的特色产品开发潜力。文昌锥分布地为沙地且干旱，属常绿季雨林，该群落中还生长着许多地区特有锥属植物，如海南岛特有种海南锥、海南岛文昌北部特有植物琼北锥、波叶锥、平昌锥和毛果锥等极小种群^[1-2]，生态环境较为脆弱。文昌锥耐干旱贫瘠，根系发达，树木高大，是群落的优势种之一，对稳定群落结构和生态环境有重要作用。系统研究文昌锥种群生态学、生殖生态学、保护遗传学，对揭示文昌锥种群进化历史、有效保护该种群和种群恢复，以及稳定脆弱的海南岛东北部常绿季雨林生态具有重要意义，但目前还未见有文昌锥资源的研究报道。

相关序列扩增多态性（SRAP）是2001年由Li和Quiros开发的一种新型PCR标记技术。该标记通过独特的双引物设计扩增开放阅读框（ORFs）的特定区域，上游引物对外显子进行特异扩增，下游引物对内含子区域和启动子区域进行特异扩增，由于个体差异而产生多态性^[3]。该标记具有简便高效、重复性好、易测序、多态性高等特点。目前已成功地应用于植物种群遗传多样性与遗传结构分析^[4-7]、遗传图谱的构建^[8-9]、重要性状的标记^[10]以及相关基因的克隆等方面^[11]。但目前关于SRAP标记应用于壳斗科锥属植物资源的研究较少。

本研究拟采用单因素与正交试验相结合的方法对影响文昌锥SRAP标记反应体系的因素进行分析，率先优化建立文昌锥SRAP反应体系，筛选获得有效SRAP引物，为SRAP标记应用于文昌锥种群进化与保护遗传学研究提供参考，也为其本地区特有锥植物极小种群的相关研究提供技术借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料来源

供试材料为LFT-01、BC-02和BC-20，其中

LFT-01采自海南省文昌市公坡镇龙飞头文昌锥居群，BC-02和BC-20采自海南省文昌市昌洒镇宝彩村文昌锥居群。取健康叶片用硅胶干燥保存备用。

1.2 主要试剂和仪器

试验用的Taq DNA聚合酶、dNTPs、10×Taq Buffer（含Mg²⁺）、100 bp DNA Ladder Marker由南京诺唯赞生物技术有限公司提供，SRAP-PCR反应引物采用Li和Quiros^[3]设计的引物序列，由北京诺赛基因组研究中心有限公司合成。

1.3 基因组DNA的提取

采用FOREGENE试剂盒提取文昌锥的叶片DNA。紫外分光光度计检测基因组DNA的纯度和浓度，1%的琼脂糖凝胶电泳检测基因组DNA的质量，将叶片所获的基因组DNA样品浓度稀释到20 ng/μL备用。

1.4 SRAP-PCR反应程序设置

反应体系为20 μL，在PCR仪（Heal Force T960）上进行。初始反应为2×PCR buffer 2 μL，Taq DNA聚合酶2 U，dNTPs 0.25 mmol/L，引物浓度0.4 μmol/L和模板DNA 30 ng，用ddH₂O补足到20 μL。

反应程序为：94℃预变性5 min；94℃变性1 min，35℃退火1 min，72℃延伸1 min，5个循环；然后在94℃变性1 min，50℃退火1 min，72℃延伸1 min，35个循环；最后72℃延伸10 min。扩增产物放于4℃保存。

1.5 SRAP-PCR反应体系的优化与建立

1.5.1 单因素试验设计

以LFT-01基因组DNA为模板，选用引物组合Me8-Em2（Me8：TGAGTCCAAACCGGACC；Em2：GACTGCGTACGAATTTGC；退火温度：54℃），对影响SRAP-PCR的主要因素（DNA、引物、dNTPs、Taq DNA聚合酶）进行单因素实验（表1），保持其他因素不变的情况下变换一种因素进行扩增，筛选适宜的浓度范围用于正交试验。

1.5.2 正交试验设计

根据单因素试验结果，筛选出DNA、引物、dNTPs和Taq DNA聚合酶4个主要影响因素的适宜的浓度范围，进行L₁₆（4⁵）方案的正交试验，确立最优反应体系。利用参照郑道君等^[12-13]的直观分析法，根据扩增条带的清晰度和丰富度对每个组合的扩增结果进行打分，最优扩增结果的为16分，最差的为1分。分别进行2次独立计分，取2次的平均数。进行极差R值分析。

表 1 SRAP-PCR 单因素试验设计

Table 1 SRAP-PCR single factor test design

试验水平	模板DNA/ ng	引物/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	dNTPs/ ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Taq DNA 聚合酶/U	试验水平	模板DNA/ ng	引物/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	dNTPs/ ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Taq DNA 聚合酶/U
1	0	0.025	0.025	0.05	6	40	0.5	0.25	1.5
2	2.5	0.05	0.05	0.25	7	50	0.6	0.375	2.0
3	10	0.1	0.1	0.5	8	60	0.7	0.5	3.0
4	20	0.2	0.15	0.75	9	80	0.9	0.75	4.0
5	30	0.4	0.2	1.0	10	100	1.2	1.00	5.0

1.6 SRAP-PCR 有效引物筛选和反应体系验证

基于上述优化建立的反应条件，以 LFT-01 的基因组 DNA 为模板，对 100 对 SRAP 引物组合（正向引物 10 条，反向引物 10 条，正反引物相互

组合成 100 对引物）进行初选（表 2），从中选择扩增 3 条以上产物的引物用于进行多态性引物评价和反应体系稳定性验证。

表 2 SRAP 引物序列

Table 2 Primer sequences used in SRAP analysis

引物	正向引物 (5'-3')	引物	反向引物 (5'-3')
Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	Em2	GACTGCGTACGAATTTGC
Me3	TGAGTCCAAACCGGAAC	Em3	GACTGCGTACGAATTGAC
Me4	TGAGTCCAAACCGGAAA	Em4	GACTGCGTACGAATTACG
Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	Em5	GACTGCGTACGAATTAAC
Me6	TGAGTCCAAACCGGTAA	Em6	GACTGCGTACGAATTGCA
Me7	TGAGTCCAAACCGGTCC	Em7	GACTGCGTACGAATTTGA
Me8	TGAGTCCAAACCGGACC	Em8	GACTGCGTACGAATTCTG
Me9	TGAGTCCAAACCGGACG	Em9	GACTGCGTACGAATTCTGA
Me10	TGAGTCCAAACCGGACT	Em10	GACTGCGTACGAATTCTCAG

基于上述优化建立的反应条件，以 3 份地理距离相差较远的文昌锥资源（LFT-01、BC-02、BC-20）的基因组 DNA 为模板，以多态性比率（PPB）为主要评价标准，对初选获得的 SRAP 引物对进行多态性引物评价，并进行反应体系稳定性验证。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果与分析

2.1.1 DNA 用量对 SRAP-PCR 反应体系的影响

研究表明，文昌锥基因组 DNA 的浓度对 SRAP-PCR 扩增影响差异显著。

图 1 中，DNA 用量为 2.5 ~ 20 ng（泳道 2 ~

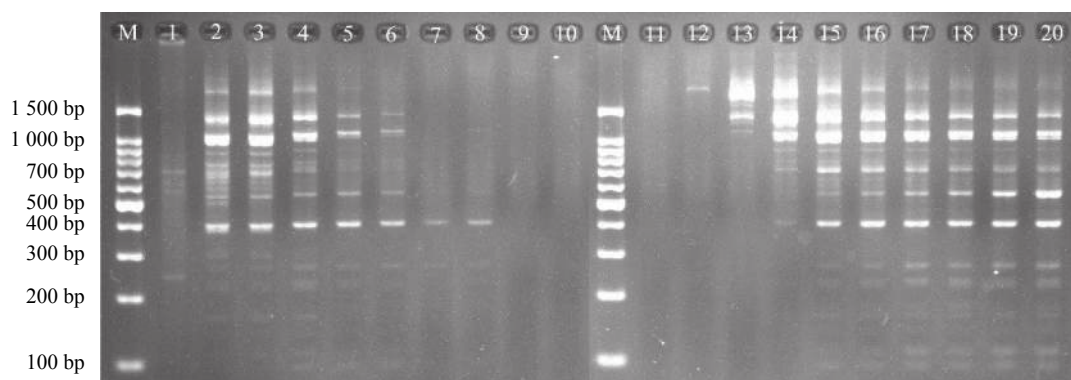
4）时扩增条带丰富且清晰稳定，而后随着 DNA 用量的增加，扩增强度和扩增条带等扩增效率方面逐渐下降，在 7 泳道和 8 泳道（DNA 用量 50 ng 和 60 ng）仅扩增获得 1 条 400 bp 的产物，在 9 泳道和 10 泳道（DNA 用量 80 ng 和 100 ng）没有扩增产物。可见，文昌锥基因组 DNA 的用量越多，对 SRAP 反应效率就越差。经初选，确定 2.5 ~ 20 ng 为 SRAP-PCR 的适宜 DNA 浓度范围，可用于正交试验。

2.1.2 引物浓度对 SRAP-PCR 反应体系的影响

不同引物浓度对文昌锥 SRAP-PCR 反应体系影响的结果如图 1 所示。在本试验设计的浓度范围内，随着引物浓度的增加，扩增产物从无到有，

其中,浓度为 $0.025\ \mu\text{mol/L}$ 时无扩增产物;当引物浓度为 $0.05\ \mu\text{mol/L}$ 时仅扩增一条大于 $1500\ \text{bp}$ 的产物;最终在 $0.6\ \mu\text{mol/L}$ 及以上浓度(泳道 17 ~

20) 时达到稳定,扩增条带多且条带清晰。因此,选择引物浓度范围 $0.6 \sim 1.2\ \mu\text{mol/L}$ 做为正交试验设计的适宜浓度。



M: 100 bp DNA marker; 1 ~ 10 表示 DNA 用量为 0、2.5、10、20、30、40、50、60、80、100 ng; 11 ~ 20 表示引物用量为 0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.5、0.6、0.7、0.9、1.2 $\mu\text{mol/L}$ 。

图 1 DNA 模板用量和引物浓度对 SRAP-PCR 反应体系的影响

Fig. 1 Effect of template DNA concentration and primer concentration on SRAP-PCR reaction system

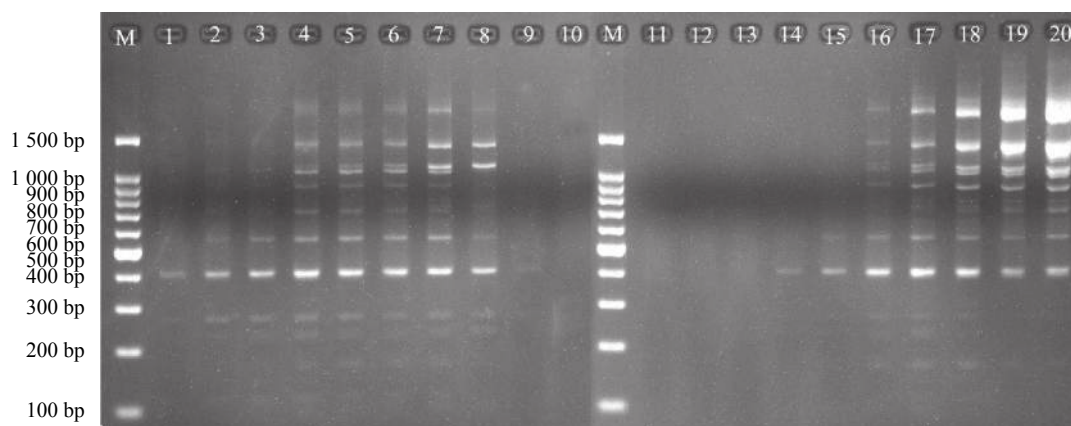
2.1.3 dNTPs 浓度对 SRAP-PCR 反应体系的影响

dNTPs 是 PCR 扩增反应的原料,其浓度直接影响 PCR 的扩增产物^[14-16]。在本试验中,dNTPs 浓度低于 $0.1\ \text{mmol/L}$ 及以下浓度时,扩增效率严重不足(泳道 1 ~ 3)。当浓度在 $0.15 \sim 0.375\ \text{mmol/L}$ 范围内时,扩增条带多且主带清晰;浓度等于 $0.5\ \text{mmol/L}$,扩增条带减少(泳道 8)。之后没有扩增产物。这可能是 dNTPs 浓度过高,影响了镁离子与 *Taq* DNA 聚合酶的结合效率。这与郑道君等^[13]、欧虹雅等^[16]的研究结果一致。可见, $0.15 \sim 0.375\ \text{mmol/L}$ 范围为正交试验设计的 dNTPs 适宜

浓度范围。

2.1.4 *Taq* DNA 聚合酶浓度对 SRAP-PCR 反应体系的影响

Taq DNA 聚合酶的活性和用量对 SRAP-PCR 扩增产物质量的影响较大。由图 2 可知,当 *Taq* DNA 聚合酶浓度低于 1 U,PCR 反应不完全,造成条带模糊甚至没有扩增产物;随着酶用量的增加,扩增条带逐渐增多并清晰,尤其是 *Taq* DNA 聚合酶浓度在 3 U 时效果最好;当高于 5 U 时,开始出现拖尾现象。因此,选择 *Taq* DNA 聚合酶 2 ~ 5 U 范围用于正交试验设计。



M 为 100 bp DNA marker; 1 ~ 10 表示 dNTP 用量为 0.025、0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.375、0.5、0.75、1.0 mmol/L ; 11 ~ 20 表示 *Taq* DNA 聚合酶用量为 0.05、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0 U。

图 2 dNTPs 浓度和 *Taq* 酶浓度对 SRAP-PCR 反应体系的影响

Fig. 2 Effect of dNTPs concentration and *Taq* DNA polymerase on SRAP-PCR reaction system

2.2 正交试验结果与分析

通过单因素实验确定适宜的 DNA 浓度，引物浓度，dNTPs 浓度和 *Taq* DNA 酶用量，用于文昌锥 SRAP-PCR L16 正交试验设计（表 3）。从扩增的结果（图 3）看，不同浓度的因素组合对文昌锥 SRAP-PCR 影响显著，有的扩增失败，有的扩增效率低，条带弱且少。

根据条带的清晰度、丰富度和条带的强弱对每个组合的扩增结果进行打分，16 个组合的分数依次为 3，7，6，5，1，13，14，11，1，1，16，12，6，10，1，9。组合 11 的分数最高，为最佳组合，其扩增条带总数为 23 条，其中包括强条带 13 条和弱条带 10 条；组合 5，9，10 和 15 无产物。因此，组合 11 是文昌锥 SRAP 的最佳反应组合，即总体积为 20 μ L，DNA 含量为 20 ng，引物浓度为 0.6 μ mol/L，dNTPs 浓度为 0.15 mmol/L，*Taq* DNA 聚合酶用量为 4 U。

正交试验统计分析结果表明（表 4），DNA 浓度，引物浓度，dNTPs 浓度和 *Taq* DNA 聚合酶用量对文昌锥 SRAP-PCR 的扩增影响程度不同。极差 *R* 值反应了每个因素对 PCR 扩增的影响程度，*R* 值越大，影响越显著。DNA，引物，dNTPs 和 *Taq* DNA 聚合酶的 *R* 值分别为 4.5，8，8，6.5，因此这 4 个因素对文昌锥 SRAP-PCR 扩增结果影响大小为：引物=dNTPs>*Taq* 酶>DNA。

表 3 SRAP-PCR 正交试验设计				
Table 3 SRAP-PCR orthogonal test design				
试验 编号	模板DNA/ ng	引物/ (μ mol·L ⁻¹)	dNTPs/ (mmol·L ⁻¹)	<i>Taq</i> DNA 聚合酶/U
1	2.5	0.6	0.15	2.0
2	2.5	0.7	0.2	3.0
3	2.5	0.9	0.25	4.0
4	2.5	1.2	0.375	5.0
5	10	1.2	0.375	2.0
6	10	0.9	0.25	3.0
7	10	0.7	0.2	4.0
8	10	0.6	0.15	5.0
9	20	0.9	0.25	2.0
10	20	1.2	0.375	3.0
11	20	0.6	0.15	4.0
12	20	0.7	0.2	5.0
13	30	0.7	0.2	2.0
14	30	0.6	0.15	3.0
15	30	1.2	0.375	4.0
16	30	0.9	0.25	5.0



M 表示 100 bp DNA marker；1 ~ 16 为试验编号。

图 3 不同正交试验组合的扩增结果

Fig. 3 Amplification results of different orthogonal test combinations

表 4 正交设计结果直观分析
Table 4 Visual analysis of orthogonal design results

结果	模板DNA	引物	dNTPs	Taq DNA聚合酶
K_1	21	40	40	11
K_2	39	39	39	31
K_3	30	29	29	37
K_4	26	8	8	37
k_1	5.25	10	10	2.75
k_2	9.75	9.75	9.75	7.75
k_3	7.5	7.25	7.25	9.25
k_4	6.5	2	2	9.25
R	4.5	8	8	6.5

注： K 表示某影响因素在不同水平下的分数； k 表示某影响因素在不同水平下的分数平均数；数字1~4分别代表某影响因素由低到高的4个水平。 R 表示极差，某影响因素在各个水平下分数平均数的最大值与最小值之差。

2.3 有效引物筛选及稳定性检验

采用已优化的反应体系，以 LFT-01 为模板，对 100 对 SRAP 引物进行初选，最终获得 70 对具有 3 条以上扩增产物的 SRAP 引物。以 3 份地理距离相差较远的文昌锥资源（LFT-01、BC-02、BC-20）的基因组 DNA 为模板，对 70 对初选引物进行多态性引物复选，以多态性百分率为主要标准（表 5），获得 45 对 SRAP 引物，扩增结果如图 4。这 45 对引物，多态性百分率在 50%~87%，其中 Me4-Em5 多态性最好。从图 4 的扩增效果看，基于最佳反应体系，45 对引物在 3 份文昌锥资源上的扩增效果均较好，扩增条带清晰，主带型稳定，表明该体系稳定可靠，可以应用于文昌锥 SRAP 分析。

表 5 经过复选后获得的 45 对 SRAP 引物组合扩增信息分析及最佳退火温度
Table 5 Amplification information analysis and optimal annealing temperature of 45 pairs of SRAP primer combinations obtained after re-selection

引物组合	总条带数	多态性比率/%	退火温度/℃	引物组合	总条带数	多态性比率/%	退火温度/℃
Me1-Em1	15	53.33	50	Me5-Em4	18	77.78	53
Me1-Em4	14	71.43	52	Me5-Em5	17	70.59	52
Me1-Em8	16	68.75	52	Me5-Em9	13	61.54	53
Me1-Em9	16	56.25	52	Me5-Em10	13	53.85	53
Me2-Em1	14	64.29	52	Me6-Em3	19	68.42	52
Me2-Em2	17	76.47	54	Me6-Em4	16	68.75	52
Me2-Em3	16	62.50	54	Me6-Em5	19	68.42	51
Me2-Em4	16	62.50	54	Me6-Em9	19	47.37	52
Me2-Em5	16	68.75	53	Me7-Em1	17	64.71	52
Me2-Em6	14	57.14	54	Me7-Em2	19	57.89	54
Me2-Em7	18	66.67	53	Me7-Em7	16	50.00	53
Me3-Em4	16	50.00	53	Me7-Em8	18	66.67	54
Me3-Em5	14	71.43	52	Me8-Em1	16	50.00	52
Me3-Em9	13	62.00	53	Me8-Em4	18	50.00	54
Me4-Em1	15	53.33	50	Me8-Em6	9	55.56	54
Me4-Em3	15	60.00	52	Me8-Em7	17	70.59	53
Me4-Em4	16	75.00	52	Me8-Em8	21	52.38	54
Me4-Em5	15	87.00	51	Me8-Em10	20	60.00	54
Me4-Em6	13	62.00	52	Me9-Em2	17	70.59	54
Me4-Em7	14	57.14	51	Me9-Em5	18	66.67	53
Me4-Em8	15	53.33	52	Me9-Em8	18	83.33	54
Me4-Em9	18	67.00	52	Me10-Em5	15	67.00	52
Me4-Em10	16	69.00	52				

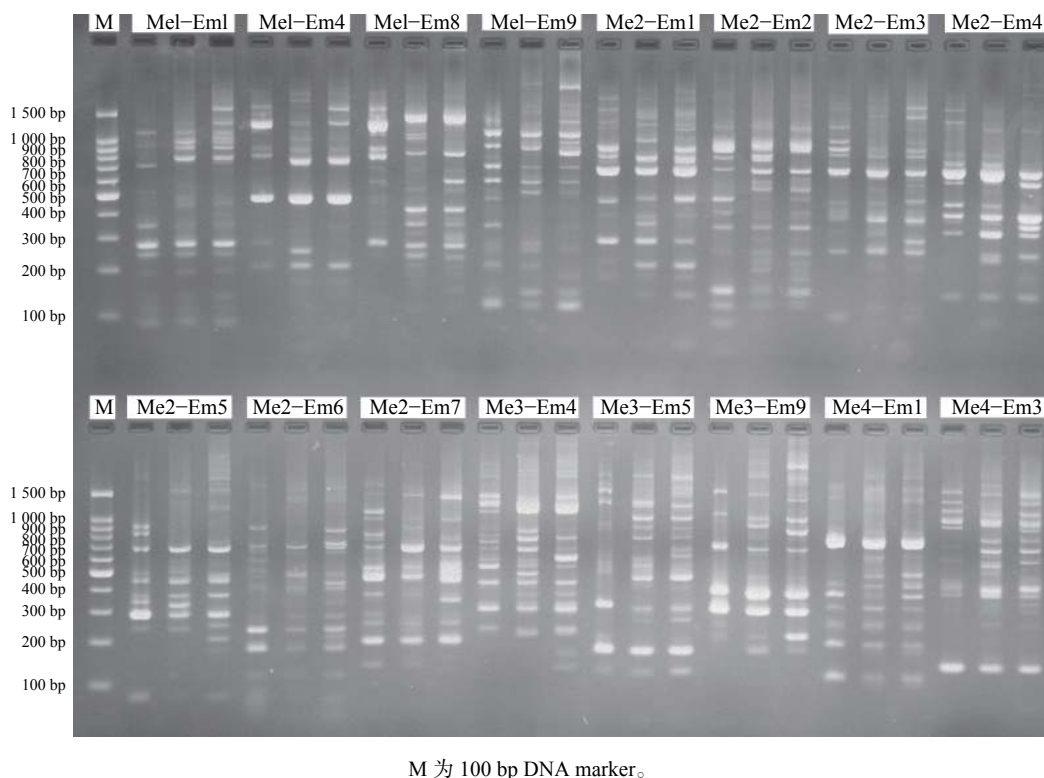


图 4 经过复选后获得的 45 对 SRAP 引物组合扩增结果

Fig. 4 Amplification results of 45 pairs of SRAP primers obtained after re-selection

3 结论与讨论

PCR 反应体系因植物材料的不同产生结果不同，DNA、引物、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶均会对扩增结果产生影响。单因素试验是保持其他影响因素不变的情况下，改变单一因素，忽视了各因子之间的相互影响^[17]。而正交试验不仅简单高效，还考虑了各个因素之间的相互作用，已被广泛应用于 PCR 体系优化^[18-19]。本研究在分析明确 DNA、引物、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶 4 个因子的单因素影响的基础上，选择适宜的浓度范围用于正交试验设计，为分析因素间的互交作用和确立最佳反应体系组合奠定基础。单因素试验结果表明，文昌锥的 DNA 浓度过高会严重阻碍到 SRAP-PCR 的扩增效率，这与海南龙血树 (*Dracaena cambodiana*)^[12]、鹧鸪茶 (*Mallotus furetianus*)^[19]、朱顶红 (*Hippeastrum rutilum*)^[20] 和红枫 (*Acer palmatum*)^[21] 等物种随着 DNA 浓度提高对 PCR 扩增效率影响不大，可能是文昌锥叶片细胞内含有 *Taq* DNA 聚合酶反应效率的抑制性物质较多引起，在以后的文昌锥 PCR 试验中要引起重视。

正交试验的直观分析表明，在适宜的浓度范

围内，对文昌锥 SRAP-PCR 影响最大的因子是引物和 dNTPs，*R* 值为 8；影响最小的因子为 DNA。这与在葛根 (*Pueraria* sp.)^[22] 和鹧鸪茶 (*Mallotus oblongifolius*)^[23] 中的研究结果基本一致。刘燕等^[15] 在海雀稗 (*Paspalum vaginatum*) SRAP-PCR 的优化体系试验中发现 dNTPs 最大的影响因子，最小的影响因子为 *Taq* 酶；李培等^[24] 对红椿 (*Toona ciliata*) 进行 SRAP 体系优化时，影响最小的因子是 DNA 浓度，但影响最大的因子是 *Taq* DNA 聚合酶的浓度。由此可知，不同植物的 SRAP-PCR 中，不同因素的影响程度也不尽相同，这可能是由于不同的植物 DNA 特性，以及 *Taq* 酶的活力不同造成的。

本研究通过单因素和正交试验分析，率先获得文昌锥 SRAP-PCR 最优体系：在 20 μ L 的总体系中，DNA 含量为 20 ng，引物浓度为 0.6 μ mol/L，dNTPs 浓度为 0.15 mmol/L，*Taq* DNA 聚合酶的含量 4 U。基于该反应体系，从 100 对引物中筛选出 45 对能扩增出条带清晰、多态性好的引物组合。经验证，该反应体系具有较好的稳定性，为 SRAP 分子标记技术应用于文昌锥，及其他壳斗科锥属植物资源研究打下良好的基础。

[参 考 文 献]

- [1] 符国媛. 我国热带锥类植物的大本营 [J]. 热带林业, 1997, 25(2): 38-39.
- [2] 杨小波, 龙文兴, 李东海, 等. 海南植物图志: 第7卷 [M]. 北京: 科学出版社, 2015: 50-63.
- [3] 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(2/3): 455-461.
- [4] Kumar J, Agrawal V. Assessment of genetic diversity, population structure and sex identification in dioecious crop, *Trichosanthes dioica* employing ISSR, SCoT and SRAP markers [J]. Heliyon, 2019, 5(3): e01346.
- [5] Wang D W, Shen B Q, Gong H D. Genetic diversity of Simao pine in China revealed by SRAP markers [J]. PeerJ, 2019, 7: e6529.
- [6] 董蒙蒙, 陈辉, 李颖林, 等. 基于 SRAP 的锥栗主栽农家品种遗传多样性分析 [J]. 森林与环境学报, 2017, 37(4): 429-434.
- [7] 井赵斌, 徐明, 雷玉山. 猕猴桃 SRAP-PCR 体系的建立及品种资源亲缘关系研究 [J]. 园艺学报, 2016, 43(2): 337-346.
- [8] 石秀兰, 陈平, 于得水, 等. 狼尾草属优质牧草 SRAP 遗传多样性分析与指纹图谱构建 [J]. 广东农业科学, 2018, 45(10): 55-60.
- [9] Mirajkar S J, Rai A N, Vaidya E R, et al. TRAP and SRAP molecular marker based profiling of radiation induced mutants of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) [J]. Plant Gene, 2017, 9: 64-70.
- [10] 丁泽婷, 尹晓畅, 唐燕琼, 等. 柱花草重要性状与 SSR、SRAP 分子标记的关联分析 [J]. 分子植物育种, 2017, 15(5): 1839-1845.
- [11] 马秀花, 唐道城, 唐楠. 万寿菊育性相关基因 SRAP 分子标记开发 [J]. 分子植物育种, 2019, 17(20): 6718-6723.
- [12] 郑道君, 谢良商, 张文, 等. 海南龙血树 RAPD-PCR 反应体系的优化 [J]. 广西植物, 2011, 31(1): 31-35, 86.
- [13] 郑道君, 谢良商, 曾建华, 等. 海南龙血树 ISSR-PCR 反应体系建立与有效引物筛选 [J]. 热带亚热带植物学报, 2011, 19(2): 177-183.
- [14] 王丹丹, 林辰壹, 马晓蓓, 等. 大蒜野生近缘种的 SRAP 反应体系建立和优化 [J]. 分子植物育种, 2018, 16(23): 7731-7739.
- [15] 刘燕, 汪毅, 马晶晶, 等. 海雀稗 SRAP-PCR 分子标记体系优化及引物筛选 [J]. 草地学报, 2016, 24(5): 1080-1086.
- [16] 欧虹雅, 韩冬苗, 黄兹宝, 等. 南药益智 SRAP-PCR 体系优化及引物筛选 [J]. 生物技术进展, 2018, 8(4): 338-344.
- [17] 邱帅, 丁信誉, 席梦利, 等. 东方百合 SRAP 体系优化及引物筛选 [J]. 南京林业大学学报 (自然科学版), 2013, 37(3): 6-10.
- [18] 江锡兵, 汤丹, 龚榜初, 等. 基于 SSR 标记的板栗地方品种遗传多样性与关联分析 [J]. 园艺学报, 2015, 42(12): 2478-2488.
- [19] 向晖, 袁德义, 范晓明, 等. 锥栗种质资源遗传多样性的 SRAP 分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2016, 17(6): 1072-1081.
- [20] 孙翊, 张永春, 殷丽青, 等. 朱顶红 SRAP-PCR 反应体系的建立和优化 [J]. 分子植物育种, 2017, 15(5): 1806-1813.
- [21] 刘巍, 陈罡, 颜廷武, 等. 美国红枫 SRAP 反应体系优化 [J]. 北方园艺, 2015(2): 79-83.
- [22] 尚小红, 严华兵, 曹升, 等. 葛根 SRAP-PCR 反应体系的优化及引物筛选 [J]. 分子植物育种, 2019, 17(16): 5368-5374.
- [23] 严武平, 李娟玲, 吴淑敏, 等. 鹧鸪茶 SRAP-PCR 反应体系优化技术 [J]. 分子植物育种, 2018, 16(10): 3252-3258.
- [24] 李培, 阙青敏, 王芳, 等. 红椿 SRAP 反应体系优化及引物筛选 [J]. 林业科学研究, 2017, 30(1): 10-17.

(责任编辑 张 坤)

