

桂花 SRAP-PCR 体系的确立及验证

李梅^{1,2}, 侯喜林^{1,①}, 郝日明³

[1. 南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095;

2. 江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏 南京 210014; 3. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095]

摘要: 以桂花 [*Osmanthus fragrans* (Thunb.) Lour.] 品种‘早银桂’的总 DNA 为模板, 对 SRAP-PCR 扩增体系中的模板 DNA 用量, Mg^{2+} 、 $dNTPs$ 和引物浓度以及 *Taq* DNA 聚合酶用量进行单因子实验, 确立了适合桂花总 DNA 的 SRAP-PCR 反应体系; 反应体系总体积 10 μL , 包括 30 ng 模板 DNA、 $2.5 \text{ mmol} \cdot L^{-1} Mg^{2+}$ 、 $0.20 \text{ mmol} \cdot L^{-1} dNTPs$ 、 $0.4 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ 上下游引物和 0.75 U *Taq* DNA 聚合酶及 $1 \times$ PCR buffer。采用 SRAP 引物组合 pm21-em8, 以 78 个桂花品种的总 DNA 为样品, 对优化的 SRAP-PCR 反应体系进行初步验证, 共扩增出 632 条带, 多态性条带百分率 75.32%; 扩增位点 15 个, 多态性位点百分率为 86.67%。运用优化的 SRAP-PCR 体系, 使用筛选出的 18 对 SRAP 引物组合对 88 个桂花品种、1 个桂花野生种以及 2 个外类群[柃树 *O. heterophyllus* (G. Don) P. S. Green 和华东木犀 *O. cooperi* Hemsl.] 的总 DNA 进行扩增, 共扩增出 296 个位点, 其中多态性位点 248 个, 多态性位点百分率为 83.78%。实验结果显示, 运用优化的 SRAP-PCR 反应体系获得的 DNA 条带清晰、扩增结果稳定、多态性较丰富; SRAP 分子标记可用于桂花遗传多样性、品种资源鉴定、亲缘关系以及系统进化等方面的研究。

关键词: 桂花; SRAP-PCR; 扩增体系; 优化; 验证; 遗传多样性

中图分类号: Q523+.8; Q946-33 文献标志码: A 文章编号: 1004-0978(2009)02-0015-07

Establishment and verification of SRAP-PCR amplification system for *Osmanthus fragrans* LI Mei^{1,2}, HOU Xi-lin^{1,①}, HAO Ri-ming³ (1. State Key Laboratory of Crop and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China; 3. Horticultural College, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2009, **18**(2): 15-21

Abstract: Single factor experiments on amounts of template DNA and *Taq* DNA polymerase, concentrations of Mg^{2+} , $dNTPs$, primers in SRAP-PCR system were performed with total DNA from *Osmanthus fragrans* ‘Zao Yingui’ to establish optimal SRAP-PCR amplification system. The 10 μL system contains 30 ng template DNA, $2.5 \text{ mmol} \cdot L^{-1} Mg^{2+}$, $0.20 \text{ mmol} \cdot L^{-1} dNTPs$, $0.4 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ each primer, 0.75 U *Taq* DNA polymerase and $1 \times$ PCR buffer. Using total DNA from seventy-eight cultivars of *O. fragrans* as samples, preliminary verification of the optimal SRAP-PCR system was carried using primer combination pm21-em8, and 632 bands and 15 sites are got and percentage of polymorphic bands is 75.32% and the percentage of polymorphic sites is 86.67%. Total DNA from eighty-eight cultivars, one wild species of *O. fragrans* and two outgroups [*O. heterophyllus* (G. Don) P. S. Green and *O. cooperi* Hemsl.] were amplified by the optimal system using selected 18 pairs of primer combinations, and 296 sites are got, in which 248 sites are polymorphic and the percentage of polymorphic sites is 83.78%. The results indicate that the amplified DNA bands using the optimal SRAP-PCR system are clear and the polymorphism is high. The optimal SRAP-PCR amplification system can be used in researches of genetic diversity, cultivar identification, genetic relationship and phylogeny of *O. fragrans*.

Key words: *Osmanthus fragrans* (Thunb.) Lour.; SRAP-PCR; amplification system; optimization; verification; genetic diversity

收稿日期: 2008-12-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30771761)

作者简介: 李梅(1968—), 女, 湖南长沙人, 博士研究生, 高级实验师, 主要从事植物园科普教育及观赏植物研究工作。

①通讯作者 E-mail: hxl@njau.edu.cn

桂花〔*Osmanthus fragrans* (Thunb.) Lour.〕为木犀科(Oleaceae)木犀属(*Osmanthus* Lour.)常绿乔木,是中国十大传统名花之一。桂花栽培历史悠久、分布广泛、四季常绿、花香馥郁,具有很高的观赏价值,而且其花、果、根、茎、叶及木材都有广泛的实用价值,是优良的重要花木,也是极富民族特色的常绿观赏树种。中国是全世界桂花品种资源的分布中心,在长期的演化过程中,在自然选择和人工选择的双重作用下,桂花形成了丰富的变异类型,拥有众多的品种,截止至2008年,共记载有166个桂花品种。根据不同品种的形态性状和演化规律,可将桂花归为四季桂、银桂、金桂和丹桂4个品种群^[1]。桂花品种演化与亲缘关系研究是桂花遗传多样性研究的基础,也是桂花研究中最重要基础领域,不但具有重要的学术意义,而且对桂花的栽培、育种以及园林应用具有重要的指导意义^[2]。

SRAP是一种基于PCR的新型分子标记^[3],该技术针对基因外显子里GC含量丰富而启动子内含子里AT含量丰富的特点来设计引物进行扩增,因不同个体的内含子、启动子与间隔区长度不等而产生多态性。SRAP分子标记具有简便、产率高、可显示大量的共显性标记、易从序列中得到分离的条带等优势^[4],主要用于种质资源鉴定评价、遗传图谱构建、重要性状基因标记与基因克隆等方面^[5-12]。尽管RAPD、ISSR、AFLP等分子标记已用于桂花品种分类等方面的研究^[13-15],但由于适宜的桂花SRAP-PCR反应体系尚未建立,因此SRAP分子标记还未能用于桂花品种的相关研究中。鉴于此,在保证扩增特异性和产量的基础上,作者对桂花SRAP-PCR反应体系中的模板DNA用量, Mg^{2+} 、dNTPs和引物浓度及Taq DNA聚合酶用量5个因子进行了优选实验,并进行了初步应用和比较,从中筛选出适宜的SRAP-PCR反应体系,为今后利用SRAP-PCR分子标记技术进行桂花遗传多样性、品种资源鉴定、进化及系统发育等方面的研究提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验样品 供试样品共91份。包括桂花品种88个,分别采自江苏无锡梅园、浙江杭州植物园、浙江杭州满陇、浙江杭州少儿公园、浙江杭州浙江宾

馆、江苏南京梅花山、江苏南京林业大学、江苏南京灵谷寺及江苏南京中山植物园;桂花野生种1个,采自湖南浏阳周洛;2个外类群为木犀属的柃树〔*O. heterophyllus* (G. Don) P. S. Green〕和华东木犀(*O. cooperi* Hemsl.),分别采自江苏南京梅花山和江苏南京中山植物园。

1~8号品种隶属于四季桂品种群(*O. fragrans* ‘Asiaticus’ Group),包含‘大叶佛顶珠’(‘Daye Fodingzhu’),‘日香桂’(‘Rixiang Gui’),‘月桂’(‘Yuegui’),‘小叶四季桂’(‘Xiaoye Sijigui’),‘四季桂’(‘Sijigui’),‘冬香白’(‘Dongxiang Bai’),‘天香台阁’(‘Tianxiang Taige’)和‘橙黄四季桂’(‘Chenghuang Sijigui’)8个品种。

9~48号隶属于银桂品种群(*O. fragrans* ‘Albus’ Group),包含‘籽银桂’(‘Zi Yingui’),‘桃叶齿银桂’(‘Taoye Chi Yin’),‘齿叶银桂’(‘Chiye Yin’),‘银粟’(‘Yinsu’),‘大叶银桂’(‘Daye Yin’),‘竹叶银桂’(‘Zhuye Yin’),‘早银桂’(‘Zao Yingui’),‘矩叶银桂’(‘Juye Yin’),‘狭叶晚银桂’(‘Xiaye Wan Yin’),‘串银球’(‘Chuan Yinqiu’),‘米花籽银桂’(‘Mihua Zi Yin’),‘多芽银桂’(‘Duoya Yin’),‘银星’(‘Yinxing’),‘柳叶桂’(‘Liuye Gui’),‘白洁’(‘Baijie’),‘宽叶籽银桂’(‘Kuanye Zi Yin’),‘晚花白’(‘Wanhua Bai’),‘多裂银桂’(‘Duolie Yin’),‘庐州黄’(‘Luzhou Huang’),‘厚瓣银桂’(‘Houban Yin’),‘短柄籽银桂’(‘Duanbing Zi Yin’),‘多瓣籽银桂’(‘Duoban Zi Yin’),‘赤苞黄’(‘Chibao Huang’),‘小叶苏桂’(‘Xiaoye Sugui’),‘五瓣银桂’(‘Wuban Yin’),‘早黄’(‘Zao Huang’),‘梨蕊’(‘Lirui’),‘九龙桂’(‘Jiulong Gui’),‘银铃’(‘Yinling’),‘银十字’(‘Yinshizi’),‘白碧’(‘Baibi’),‘紫梗籽银桂’(‘Zigeng Zi Yin’),‘阔叶早银桂’(‘Kuoye Zao Yin’),‘晚银桂’(‘Wan Yingui’),‘青尖’(‘Qingjian’),‘紫梗’(‘Zigeng’),‘玉玲珑’(‘Yu Linglong’),‘大花早银桂’(‘Dahua Zao Yin’),‘西子银桂’(‘Xizi Yin’)和‘玉帘银丝’(‘Yulian Yinsi’)40个品种。

49~70号隶属于金桂品种群(*O. fragrans* ‘Luteus’ Group),包含‘大叶籽金桂’(‘Daye Zi Jin’),‘大叶黄’(‘Daye Huang’),‘金狮桂’(‘Jinshi Gui’),‘桃叶黄’(‘Taoye Huang’),‘波叶

金桂(‘Boye Jingui’)、‘晚金桂’(‘Wan Jingui’)、‘金盏碧珠’(‘Jinshan Bizhu’)、‘橙黄金桂’(‘Chenghuang Jingui’)、‘秋月’(‘Qiuyue’)、‘垂花金桂’(‘Chuihua Jin’)、‘圆瓣籽金’(‘Yuanban Zi Jin’)、‘小金铃’(‘Xiao Jinling’)、‘圆瓣金桂’(‘Yuanban Jingui’)、‘墨叶金桂’(‘Moye Jin’)、‘早金桂’(‘Zao Jingui’)、‘潢川金桂’(‘Huangchuan Jingui’)、‘万点金’(‘Wandian Jin’)、‘早籽黄’(‘Zao Zi Huang’)、‘杭州黄’(‘Hangzhou Huang’)、‘晚馨’(‘Wanxin’)、‘大花金桂’(‘Dahua Jingui’)和‘长柄金桂’(‘Changbing Jingui’)22个品种。

71~88号隶属于丹桂品种群(*O. fragrans* ‘Aurantiacus’ Group),包含‘球橙’(‘Qiu Cheng’)、‘火炼金丹’(‘Huolian Jindan’)、‘朱砂丹桂’(‘Zhusha Dangui’)、‘鄂橙’(‘E Cheng’)、‘墨叶丹桂’(‘Moye Dan’)、‘醉肌红’(‘Zuiji Hong’)、‘红十字’(‘Hong Shizi’)、‘银丹’(‘Yin Dan’)、‘齿丹桂’(‘Chi Dangui’)、‘果丹’(‘Guodan’)、‘杭州丹桂’(‘Hangzhou Dan’)、‘柳叶红’(‘Liuye Hong’)、‘硬叶丹桂’(‘Yingye Dangui’)、‘籽丹桂’(‘Zi Dangui’)、‘晚霞’(‘Wanxia’)、‘雄黄桂’(‘Xionghuang’)、‘浦城丹桂’(‘Pucheng Dan’)和‘丹红翠珠’(‘Danhong Cuizhu’)18个品种。

分别于2007年和2008年的3月底至4月初采集健康、幼嫩的叶片,迅速置于变色硅胶中,充分干燥后密封,室温下保存、备用。

1.1.2 试剂和仪器 实验用 *d*NTPs mixture、10×PCR buffer、*Taq* DNA 聚合酶和 DNA marker 均购自 Takara 公司,引物由南京金思特科技有限公司合成;新型快速植物基因组 DNA 提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司。主要仪器有:Master CYC PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad)、Centrifuge 5810R 高速冷冻离心机(Eppendorf)、JY600C 电泳仪(北京君意公司)和 JS-300 凝胶成像系统(上海培清科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 的提取及检测 采用改良的 CTAB 法结合快速植物基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)提取各植物样品的总 DNA,用质量体积分数 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳,检测总 DNA 的纯度及含量。以 λ DNA 浓度为参照,将提取的各样品的总 DNA 用 TE 溶液稀释至 20~30 ng· μ L⁻¹,存放于

-20℃冰箱中备用。

1.2.2 SRAP-PCR 反应条件的筛选 选择桂花品种‘早银桂’的总 DNA 为实验样品进行 SRAP-PCR 反应条件的摸索。基础扩增体系为:反应体系总体积 10 μ L,包括 20 ng· μ L⁻¹模板 DNA 1.0 μ L、10×PCR buffer 1.0 μ L、25 mmol·L⁻¹MgCl₂ 1.2 μ L、2.5 mmol·L⁻¹*d*NTPs 0.8 μ L、10 μ mol·L⁻¹上下游引物各 0.5 μ L、5 U· μ L⁻¹ *Taq* DNA 聚合酶 0.15 μ L,双蒸水 4.85 μ L。

参照文献[3]和[16]合成引物序列并组合形成 213 对引物,用上述基础扩增体系从中初步筛选出扩增条带丰富、清晰、分布较均匀的引物组合 96 对,并选取引物组合 pm21-em8,对模板 DNA 用量, Mg²⁺、*d*NTPs 和上下游引物浓度及 *Taq* DNA 聚合酶用量 5 个因素进行单因子多水平实验,以便优化基础反应体系。在 10 μ L 总反应体系中,模板 DNA 用量分别设置 80、50、30、20 和 5 ng 5 个梯度; Mg²⁺ 终浓度分别设置 1.5、2.0、2.5、3.0 和 3.5 mmol·L⁻¹ 5 个梯度;*d*NTPs 终浓度分别设置 0.10、0.20、0.25、0.30 和 0.35 mmol·L⁻¹ 5 个梯度;引物终浓度分别设置 0.2、0.3、0.4、0.5 和 0.6 μ mol·L⁻¹ 5 个梯度;*Taq* DNA 聚合酶的用量分别设置为 0.50、0.75、1.00 和 1.25 U 4 个梯度。为保证扩增结果的稳定性,每个梯度设 2 个重复。

PCR 扩增程序为:94℃预变性 5 min;94℃变性 1 min,35℃退火 1 min,72℃延伸 1.5 min,5 个循环;94℃变性 1 min,50℃退火 1 min,72℃延伸 1.5 min,33 个循环;72℃延伸 7 min。将反应产物置于 4℃条件下保存。

1.2.3 扩增产物的检测 以 100 bp DNA ladder 为 DNA 分子量标准(Marker),采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳与银染法对 SRAP-PCR 扩增产物进行检测。吸取扩增产物 3.5 μ L,加入 2 μ L 混有 loading buffer 的溴酚蓝,用质量分数 8.0% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺和 N,N'-甲叉双丙烯酰胺的质量比为 19:1)进行电泳,电泳缓冲液为 1×TBE,150 V 稳压电泳 1.5~2.0 h,至溴酚蓝移到凝胶底部时结束电泳。

电泳结束后,采用银染法^[11]染色。用体积分数 10% 的乙醇和体积分数 0.5% 的冰乙酸将凝胶固定 12~15 min,用质量分数 0.2% 的硝酸银水溶液渗透 10~12 min,适量蒸馏水漂洗 2 次后,用质量体积分

数1%的硫代硫酸钠渗透30 s,倒掉液体后,用质量体积分数1.5%的NaOH和体积分数0.4%的甲醛混合液显色,直至谱带清晰为止,最后将凝胶置于凝胶成像系统上进行观察和拍照。

1.2.4 SRAP优化体系的验证 用优化的SRAP-PCR体系,以引物组合pm21-em8对78个桂花品种进行扩增,以验证优化体系的优劣;再用建立的SRAP-PCR优化体系对初步筛选出的96对SRAP引物进行筛选,选择扩增结果较好的18对引物对供试的88个桂花品种、1个桂花野生种和2个外类群进行SRAP-PCR标记分析。

1.3 数据统计与分析

SRAP为显性标记,每对SRAP引物检测1个位点,视每条多态性条带为1个等位基因,记录100~800 bp范围内条带的有无,有带记为“1”,无带记为“0”。采用Excel软件对获得的相关数据进行分析。

2 结果和分析

2.1 不同因素对桂花SRAP-PCR反应的影响

根据预实验结果,选择扩增效果较好的SRAP引物组合pm21-em8,以桂花品种‘早银桂’的总DNA为实验样品,针对模板DNA用量, Mg^{2+} 、dNTPs

和引物浓度以及Taq DNA聚合酶用量进行单因子实验,结果见图1。

由图1可见,模板DNA用量过低时条带不清晰,而30~80 ng模板DNA对桂花的SRAP-PCR扩增结果无较大影响。为了避免高浓度模板DNA引起的特异性扩增,将桂花SRAP-PCR扩增体系中模板DNA的适宜用量确定为30 ng。

Mg^{2+} 浓度对扩增结果的影响最明显,浓度低时,条带较少或偏弱;随着 Mg^{2+} 浓度增加,条带的丰度和亮度均增加。在2.0~3.0 mmol·L⁻¹ Mg^{2+} 浓度范围内,桂花SRAP-PCR扩增结果变化不大。由于 Mg^{2+} 是酶的激活剂,浓度太高易产生非特异性扩增,因而,确定桂花SRAP-PCR扩增体系中 Mg^{2+} 的适宜浓度为2.5 mmol·L⁻¹。

由图1可见,在0.20~0.35 mmol·L⁻¹范围内,dNTPs浓度对桂花SRAP-PCR反应结果几乎无影响,从成本角度考虑,在桂花SRAP-PCR扩增体系中添加0.20 mmol·L⁻¹ dNTPs即可。

引物浓度对桂花SRAP-PCR扩增结果有一定的影响,浓度低时条带较少或不清晰;在0.3~0.6 μmol·L⁻¹范围内,引物浓度对扩增结果没有显著影响,从实验成本角度考虑,桂花SRAP-PCR反应体系中引物的适宜浓度为0.4 μmol·L⁻¹。

M: 100 bp 分子量标准 100 bp DNA ladder; a1-a10: 模板DNA用量分别为80、50、30、20和5 ng The amount of template DNA is 80, 50, 30, 20 and 5 ng, respectively; b1-b10: Mg^{2+} 浓度分别为1.5、2.0、2.5、3.0和3.5 mmol·L⁻¹ The Mg^{2+} concentration is 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 and 3.5 mmol·L⁻¹, respectively; c1-c10: dNTPs浓度分别为0.10、0.20、0.25、0.30和0.35 mmol·L⁻¹ The dNTPs concentration is 0.10, 0.20, 0.25, 0.30 and 0.35 mmol·L⁻¹, respectively; d1-d10: 引物浓度分别为0.2、0.3、0.4、0.5和0.6 μmol·L⁻¹ The primer concentration is 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 and 0.6 μmol·L⁻¹, respectively; e1-e8: Taq DNA聚合酶用量分别为0.50、0.75、1.00和1.25 U The amount of Taq DNA polymerase is 0.50, 0.75, 1.00 and 1.25 U, respectively.

图1 不同反应条件下桂花品种‘早银桂’总DNA的SRAP-PCR扩增图谱(引物组合pm21-em8)
Fig. 1 SRAP-PCR amplification pattern of total DNA from *Osmanthus fragrans* ‘Zao Yingui’ under different reaction conditions (primer combination pm21-em8)

Taq DNA 聚合酶在 0.50 ~ 1.25 U 范围内对桂花 SRAP-PCR 扩增结果影响不明显,从实验成本角度考虑,确定 0.75 U 为桂花 SRAP-PCR 反应体系中 *Taq* DNA 聚合酶的适宜用量。

综合以上结果,初步确定桂花 SRAP-PCR 扩增体系为:在 10 μ L 反应体系中,包含 30 ng 模板 DNA、2.5 mmol \cdot L⁻¹ Mg²⁺、0.20 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs、0.4 μ mol \cdot L⁻¹ 上下游引物、0.75 U *Taq* DNA 聚合酶和 1 \times PCR buffer,双蒸水补足至 10 μ L。

2.2 桂花 SRAP-PCR 反应体系的验证结果

采用上述桂花 SRAP-PCR 优化反应体系,以引物组合 pm21-em8 对 78 个桂花品种进行扩增,以验证该反应体系的效果,结果见图 2。由图 2 可见,从 78 个桂花品种的总 DNA 中共扩增出 632 条清晰条

带,其中多态性条带 476 条,多态性条带百分率为 75.32%;共扩增出 15 个位点,其中多态性位点 13 个,多态性位点百分率为 86.67%。

2.3 不同引物组合的 SRAP-PCR 扩增结果

利用优化的 SRAP-PCR 扩增体系对初步筛选的 96 对引物组合进行扩增,从中筛选出扩增条带清晰、扩增结果稳定、多态性丰富的 18 对引物组合,用于 91 份样品(包括 88 个桂花品种、1 个桂花野生种和 2 个木犀属外类群)的 SRAP-PCR 扩增,取得了较好的扩增结果,实验结果见表 1。由表 1 可见,18 对引物组合共扩增出 296 个位点,其中多态性位点 248 个,多态性位点百分率 83.78%;每对引物组合产生 12 ~ 21 个位点,平均每对引物组合产生 16.4 个位点。

M: 100 bp 分子量标准 100 bp DNA ladder; 1-2: 四季桂品种 Cultivars of *O. fragrans* 'Asiaticus' Group; 3-42: 银桂品种 Cultivars of *O. fragrans* 'Albus' Group; 43-64: 金桂品种 Cultivars of *O. fragrans* 'Luteus' Group; 65-78: 丹桂品种 Cultivars of *O. fragrans* 'Aurantiacus' Group. 箭头所示为多态性条带 The arrows indicate the polymorphic bands.

图 2 SRAP 引物组合 pm21-em8 对 78 个桂花品种总 DNA 的 SRAP-PCR 扩增图谱
Fig. 2 SRAP-PCR amplification pattern of total DNA from seventy-eight cultivars of *Osmanthus fragrans* (Thunb.) Lour. using SRAP primer combination pm21-em8

3 讨 论

3.1 桂花 SRAP-PCR 扩增的影响因素分析

通常扩增程序会对 PCR 结果产生较大影响,但由于 SRAP 引物具有通用性,即不同作物可以采用相同的引物组合,因此,扩增程序对扩增结果的影响不大。目前,SRAP-PCR 反应体系中使用的扩增程

序与 Li 等的程序^[3]基本相同或稍加调整。前 5 个循环退火温度较低,设为 35 $^{\circ}$ C,主要是考虑到较低的退火温度能确保 2 个引物与靶 DNA 部分配对;在随后的 33 个循环中退火温度升至 50 $^{\circ}$ C,可保证前 5 个循环的扩增产物在余下的循环中进行指数式扩增;如果退火温度在 38 个循环中都保持在 35 $^{\circ}$ C,则扩增片段重复性将很低。在 SRAP-PCR 过程中,一般研究者采用 30 ~ 35 个循环,而本实验采用 33 个

表 1 SRAP 引物组合的序列及 89 个桂花样品及 2 个外类群总 DNA 的 SRAP-PCR 扩增结果¹⁾Table 1 Sequences of SRAP primer combinations and the SRAP-PCR amplification result of total DNA from eighty-nine samples of *Osmanthus fragrans* (Thunb.) Lour. and two outgroups¹⁾

| 引物组合 Primer combination | 引物序列(5'→3') Sequence of primer(5'→3') | 位点总数 Total number of site | 多态性位点数 Number of polymorphic site | 多态性位点百分率/% Percentage of polymorphic site |
|----------------------------|---|------------------------------|--------------------------------------|--|
| me1-em2 | TGAGTCCAAACCGGATA GACTGCGTACGAATTCTGC | 15 | 12 | 80.00 |
| me1-em3 | TGAGTCCAAACCGGATA GACTGCGTACGAATTCGAC | 12 | 10 | 83.33 |
| me1-em8 | TGAGTCCAAACCGGATA GACTCGATAGCAATTCAC | 20 | 17 | 85.00 |
| me2-em10 | TGA TCCAAACCGGAGC GACTGCGTACGAATTCAG | 19 | 17 | 89.47 |
| me4-em2 | TGAGTCCAAACCGGACA GACTGCGTACGAATTCTGC | 12 | 10 | 83.33 |
| me6-em1 | GACTGCGTAGAATTGCA GACTGCGTACGAATTATT | 21 | 19 | 90.48 |
| me6-em5 | GACTGCGTAGAATTGCA GACTGCGTACGAATTC AAC | 17 | 13 | 76.47 |
| ga4-em6 | CTAACGCTCTGCCTGATG GACTGCGTACGAATTCCAA | 18 | 14 | 77.78 |
| ga4-em7 | CTAACGCTCTGCCTGATG GACTGCGTACGAATTC AA | 17 | 15 | 88.24 |
| ga4-em9 | CTAACGCTCTGCCTGATG GACTGCGTACGAATTCGA | 20 | 17 | 85.00 |
| ga18-em6 | GGCTTGAACGAGTACTGA GACTGCGTACGAATTCCAA | 17 | 13 | 76.47 |
| ga40-em1 | CCTCTTACGAATATGAATGA GACTGCGTACGAATTATT | 18 | 16 | 88.89 |
| odd58-em3 | CTAAAACCAGGAAGTGAGAA GACTGCGTACGAATTCGAC | 12 | 9 | 75.00 |
| odd58-em10 | CTAAAACCAGGAAGTGAGAA GACTGCGTACGAATTCAG | 15 | 14 | 93.33 |
| pm15-em6 | TGACGGCGAACAATCTCC GACTGCGTACGAATTCCAA | 12 | 9 | 75.00 |
| pm17-em10 | ACCTGCCGCCATCTTCG GACTGCGTACGAATTCAG | 15 | 13 | 86.67 |
| sa15-em10 | CTTGTTTGACACATGCTTTG GACTGCGTACGAATTCAG | 18 | 15 | 83.34 |
| sa17-em7 | ATAAGAATCAGCAGAGGCAT GACTGCGTACGAATTC AA | 18 | 16 | 88.89 |
| 合计 Total | | 296 | 248 | 83.78 |

¹⁾ 2 个外类群为柃树和华东木犀 Two outgroups are *Osmanthus heterophyllus* (G. Don) P. S. Green and *O. cooperi* Hemsl.

循环,获得的扩增条带清晰、扩增结果稳定、多态性较丰富,能满足 PCR 扩增的要求。

影响 SRAP 扩增效果的技术环节主要包括 DNA 提取、扩增体系和扩增产物的检测。由于本实验采用的 DNA 提取方法能够确保获得高质量的 DNA,因此,DNA 质量不是影响扩增结果的主要因素,而 SRAP-PCR 扩增体系中的各因子对不同物种扩增结果的特异性、稳定性及重复性有较大影响,因此针

对特定物种对扩增体系进行优化十分必要。通过对桂花品种‘早银桂’总 DNA 的 SRAP-PCR 扩增体系的优化,初步得出以下结论:

1) 在模板 DNA 用量, Mg^{2+} 、 $dNTPs$ 和引物浓度以及 *Taq* DNA 聚合酶用量 5 个因子中, Mg^{2+} 浓度对桂花 SRAP-PCR 扩增结果稳定性的影响最大,浓度低时,条带较少或偏弱;随着浓度增加,条带的丰度和亮度增加;浓度过高,又容易产生非特异性扩增。

优化实验结果表明, Mg^{2+} 浓度为 $2.5 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 时, 扩增效果最好, 该结果与百里香属 (*Thymus* L.) 植物 SRAP-PCR 的扩增体系^[12]一致。

2) *dNTPs* 是 PCR 反应的原料, 浓度过低, 将影响 PCR 产物的产量; 浓度过高, 将与 *Taq* DNA 聚合酶竞争 Mg^{2+} , 使反应体系中的游离 Mg^{2+} 减少, 造成 *Taq* DNA 聚合酶活性降低, 最终导致 PCR 产量降低^[17]。实验结果表明, *dNTPs* 浓度对桂花 SRAP-PCR 扩增结果影响不大, 这与石蒜 [*Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb.] 和百里香属植物 SRAP-PCR 扩增体系的研究结果^[11-12]一致, 但与柿 (*Diospyros kaki* Thunb.) 的 SRAP-PCR 扩增体系^[9]不一致。

3) *Taq* DNA 聚合酶用量和模板 DNA 用量对桂花 SRAP-PCR 扩增结果影响不大。模板 DNA 用量在 $30 \sim 80 \text{ ng}$ 范围内对 SRAP-PCR 扩增结果没有明显的影响, 但是在进行不同样品的大批量扩增时, 有必要保持模板 DNA 浓度相对一致, 否则也会对扩增结果的稳定性造成较大影响。

4) 在 PCR 扩增体系中, 引物浓度必须适量。当引物浓度偏低时扩增条带数目少或不清晰, 浓度过高又会促使引物引导合成非特异性产物及引物二聚体, 并与靶序列竞争 *Taq* DNA 聚合酶及 *dNTPs*, 从而导致靶序列扩增量降低及扩增条带错误^[18]。

3.2 SRAP 分子标记用于桂花遗传多样性研究的可行性及优点

利用 SRAP-PCR 优化体系对 88 个桂花品种、1 个桂花野生种以及 2 个同属外类群的总 DNA 进行扩增和检测, 结果表明, SRAP 标记能揭示桂花不同品种群及不同品种间较丰富的多态性, 表明桂花不同品种群间存在明显的遗传差异且品种间也存在微小差异。因此, SRAP 标记不但可用于桂花遗传多样性的研究分析, 还可用于桂花品种资源鉴定、亲缘关系及系统进化等方面的研究。

参考文献:

[1] 向其柏, 刘玉莲. 中国桂花品种图志[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2008.

[2] 臧德奎, 向其柏, 刘玉莲, 等. 中国桂花的研究历史、现状与桂花品种国际登录[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(4): 49-53.

[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 Applied Genetics*, 2001, 103: 455-461.

[4] 任羽, 王得元, 张银东. 相关序列扩增多态性(SRAP): 一种新的分子标记技术[J]. 中国农学通报, 2004, 20(6): 11-13, 22.

[5] 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.

[6] Lin Z X, Zhang X L, Nie Y C. Evaluation of application of a new molecular marker SRAP on analysis of F2 segregation population and genetic diversity in cotton[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(6): 622-626.

[7] Ferriol M, Picó B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers[J]. *Theoretical Applied Genetics*, 2003, 107: 271-282.

[8] Budak H, Shearman R C, Parmaksiz I, et al. Molecular characterization of Buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers [J]. *Theoretical Applied Genetics*, 2004, 108: 328-334.

[9] Guo D L, Luo Z R. Genetic relationships of some PCNA per-simmons (*Diospyros kaki* Thunb.) from China and Japan revealed by SRAP analysis [J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2006, 53: 1597-1603.

[10] 王建设, 姚建春, 刘玲, 等. 利用中国香瓜与哈密瓜的 F₂ 群体构建 SRAP 连锁遗传图谱[J]. 园艺学报, 2007, 34(1): 135-140.

[11] 袁菊红, 权俊萍, 胡绵好, 等. 石蒜 SRAP-PCR 扩增体系的建立与优化[J]. 植物资源与环境学报, 2007, 16(4): 1-6.

[12] 权俊萍, 袁菊红, 穆红梅, 等. 百里香属植物 ISSR-PCR 及 SRAP-PCR 体系的确立及优化[J]. 植物资源与环境学报, 2008, 17(2): 1-8.

[13] 尚富德, 伊艳杰, 张彤. 河南 17 个桂花品种的 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 2004, 31(5): 685-687.

[14] 邱英雄, 胡绍庆, 陈跃磊, 等. ISSR-PCR 技术在桂花品种分类研究中的应用[J]. 园艺学报, 2004, 31(4): 529-532.

[15] 韩远记, 董美芳, 袁王俊, 等. 部分桂花栽培品种的 AFLP 分析[J]. 园艺学报, 2008, 35(1): 137-142.

[16] Sun Z D, Wang Z N, Tu J X, et al. An ultradense genetic recombination map for *Brassica napus*, consisting of 13551 SRAP markers [J]. *Theoretical Applied Genetics*, 2007, 114: 1305-1317.

[17] 林萍, 张含国, 谢运海. 正交设计优化落叶松 ISSR-PCR 反应体系[J]. 生物技术, 2005, 15(5): 34-37.

[18] 邹喻苹, 葛頌, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 36-90.