

石蒜 SRAP-PCR 扩增体系的建立与优化

袁菊红^{1,2}, 权俊萍¹, 胡绵好³, 孙 视¹, 彭 峰¹, 夏 冰^{1,①}

[1. 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;

2. 江西财经大学资源与环境管理学院, 江西 南昌 330032; 3. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 201101]

摘要: 以陕西产野生石蒜 [*Lycoris radiata* (L' Hér.) Herb.] 为材料, 通过单因子实验分别研究了模板 DNA、Mg²⁺、dNTPs、引物浓度及 Taq DNA 聚合酶用量对石蒜 SRAP 分子标记扩增体系的影响, 并对扩增体系进行了优化。优化后的反应体系总体积为 10 μL, 含 20 ng 模板 DNA、3.0 mmol · L⁻¹ Mg²⁺、0.20 mmol · L⁻¹ dNTPs、0.4 μmol · L⁻¹ 引物和 0.50 U Taq DNA 聚合酶。运用优化体系对 9 个石蒜居群的基因组 DNA 进行扩增, 获得的 DNA 条带清晰, 多态性比较丰富。说明 SRAP-PCR 可用于石蒜属植物的亲缘关系、系统演化、物种鉴别和遗传多样性等领域的研究。

关键词: 石蒜; SRAP-PCR; 扩增体系优化; 遗传多样性

中图分类号: S682.2⁺9; Q344⁺.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2007)04-0001-06

Establishment and optimization of SRAP-PCR amplification system for *Lycoris radiata* YUAN Junhong^{1,2}, QUAN Jun-ping¹, HU Mian-hao³, SUN Shi¹, PENG Feng¹, XIA Bing^{1,①} (1. Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Resource and Environment Management Institute, Jiangxi University of Finance and Economics, Nanchang 330032, China; 3. College of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201101, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2007, 16(4): 1-6

Abstract: Effects of concentrations of template DNA, Mg²⁺, dNTPs, primers and amount of Taq DNA polymerase on SRAP molecular marker amplification system of *Lycoris radiata* (L' Hér.) Herb. from Shaanxi Province were studied by monofactorial experiment, and amplification system was optimized, too. Total volume of optimal system is 10 μL, which contains 20 ng template DNA, 3.0 mmol · L⁻¹ Mg²⁺, 0.20 mmol · L⁻¹ dNTPs, 0.4 μmol · L⁻¹ primer and 0.50 U Taq DNA polymerase. By using this optimal system, genomic DNA of nine populations of *L. radiata* was amplified, and DNA bands were clear and had high polymorphism. It is concluded that SRAP-PCR can be used to research genetic relationship, systematic evolution, species identification and genetic diversity of *Lycoris* Herb. species.

Key words: *Lycoris radiata* (L' Hér.) Herb.; SRAP-PCR; optimization of amplification system; genetic diversity

石蒜 [*Lycoris radiata* (L' Hér.) Herb.] 为石蒜属 (*Lycoris* Herb.) 植物, 花呈鲜红或深红色, 花被片强烈皱缩反卷, 叶基生成丛, 狭带状, 深绿色, 主要分布在中国、日本和韩国, 中国资源最为丰富, 分布范围遍及 15 个省区。石蒜有 2 个变种, 一个为原变种石蒜 (*L. radiata* var. *radiata*), 体细胞染色体数为 33 或 22; 另一个变种为矮小石蒜 (*L. radiata* var. *pumila* Grey), 体细胞染色体数为 22^[1-3]。虽然石蒜及其变种的外部形态十分相似, 但在鳞茎大小、花被片宽窄及叶片长度和宽度等数量性状上仍存在较大差异, 它们的生长发育习性 (如盛花期和绿叶期) 也存在明显差异, 这些差异还普遍存在于石蒜的不

同居群间。因此, 在 DNA 水平上探讨石蒜居群间的差异及石蒜在数量性状和生长发育习性上的差异具有一定的学术意义。

SRAP 标记是基于 PCR 扩增的标记系统, 由 Li 和 Quiros 于 2001 年开发成功^[4], 用于扩增启动子或内含子与外显子之间的序列。由于不同生物或个

收稿日期: 2007-07-10

基金项目: 江苏省道地药材种质资源库建设项目 (BM2006104) 和江苏省植物迁地保护重点实验室开放基金资助项目 (KF2007001)

作者简介: 袁菊红 (1975-), 女, 湖南绥宁人, 博士, 主要从事植物种质资源评价、分子鉴别和遗传多样性等方面的研究。

① 通讯作者 E-mail: bingxia@mail.cnbg.net

体间的启动子或内含子与外显子之间的序列长度不同,因此它们的扩增条带存在丰富的多态性。前人的研究表明,RAPD 和 ISSR 分子标记能揭示石蒜居群间的遗传多态性^[5];凝集素基因、编码成熟酶基因(*matK*)以及 *atpB - rbcL* 间隔区序列分析结果也表明不同倍性和不同产地的石蒜存在一定的遗传差异^[6,7],但关于石蒜属植物 SRAP 分子标记的研究还未见报道。相关研究结果表明^[8-10],与 AFLP、RAPD、SSR 及 ISSR 标记相比,无论在多态性还是 DNA 差异与外部形态、进化历史相关性等方面,SRAP 标记均具有更高的优越性。

当前,作为新型的、理想的分子标记技术之一,SRAP 标记在观赏植物和药用植物研究中的应用还十分有限。因此,建立石蒜属植物的 SRAP - PCR 技术体系,并对反应体系的各影响因素进行优化,可为石蒜属植物的种间亲缘关系、物种鉴别、遗传多样性以及相关基因克隆研究提供技术支持,同时,也可作为观赏植物和药用植物的 SRAP 分子标记研究提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试的 9 个石蒜居群分别产自陕西城固、广东乐昌、广东坪石、广西雁山、广西全州、湖南宜章、湖南郴州、湖南临武和湖南衡山,于 2004 年至 2006 年挖取鳞茎并种植于江苏省·中国科学院植物研究所试验苗圃内。

实验用 PCR 扩增仪为 PE9700 型 PCR 仪;PCR 产物回收试剂盒购自北京莱博生物科技有限公司,10 × PCR buffer、MgCl₂、dNTPs 和 50 bp DNA Ladder (Marker)等均购自大连 Takara(宝)生物工程有限公司,*Taq* DNA 聚合酶购自上海申能博彩生物科技有限公司,SRAP 引物由上海英骏生物技术有限公司合成,引物名称及序列见表 1。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取及检测 每个居群选取 4 个单株进行 DNA 提取。选取幼嫩健康的石蒜叶片,采用改良的 CTAB 法与 PCR 产物纯化试剂盒结合法进行单株 DNA 提取。琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量后,稀释至所需浓度(约 20 ng · μL⁻¹), -20 °C 保存、备用。

1.2.2 SRAP - PCR 扩增体系的单因素实验 参照文献[11]和[12]的方法并稍加改动,建立基础的扩增反应体系。反应体系总体积为 20 μL,包括 10 × PCR buffer 2.0 μL,20 ng · μL⁻¹模板 DNA 2.0 μL,25 mmol · L⁻¹ MgCl₂ 2.5 μL,2.5 mmol · L⁻¹ dNTPs 2.0 μL,10 μmol · L⁻¹ 上下游引物各 1.0 μL,*Taq* DNA 聚合酶 1.0 U,用双蒸水补足至 20 μL。

表 1 用于石蒜不同居群 SRAP 扩增体系的引物及其序列
Table 1 Primers and sequences in SRAP amplification system for different populations of *Lycoris radiata* (L' Hér.) Herb.

上游引物 Forward primer	5'→3' 序列 5'→3' sequence	下游引物 Reverse primer	5'→3' 序列 5'→3' sequence
me1	TGAGTCCAAACCGGATA	em1	GACTGCGTACGAATTCAA
me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	em2	GACTGCGTACGAATFCTG
me3	TGAGTCCAAACCGGACC	em3	GACTGCGTACGAATTGAC
me4	TGAGTCCAAACCGGACA	em4	GACTGCGTACGAATTTGA
me5	TGAGTCCAAACCGGTGC	em5	GACTGCGTACGAATTAAC
me6	TGAGTCCAAACCGGAGA	em6	GACTGCGTACGAATTGCA
me7	TGAGTCCAAACCGGACC	em7	GACTGCGTACGAATTGAC

由于银染检测十分灵敏,所需 PCR 产物的量较少,故将反应体系总体积确定为 10 μL。选取扩增条带多而清晰、分布比较均匀的 me2 和 em5 引物组合对模板 DNA、Mg²⁺、dNTPs 及引物浓度和 *Taq* DNA 聚合酶用量 5 个因素分别进行单因子实验。模板 DNA 用量设 5、10、20、40 和 60 ng 5 个处理;Mg²⁺ 浓度设 1.5、2.0、2.5、3.0 和 3.5 mmol · L⁻¹ 5 个处理;dNTPs 浓度设 0.10、0.20、0.25、0.30 和 0.35 mmol · L⁻¹ 5 个处理;引物浓度设 0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 μmol · L⁻¹ 5 个处理;*Taq* DNA 聚合酶用量设 0.25、0.50、0.75 和 1.00 U 4 个处理。每个处理 2 次重复。

扩增程序为:94 °C 预变性 4 min;然后进行 5 个循环反应,反应条件为 94 °C 变性 1 min,37 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min;再进行 30 个循环反应,反应条件为 94 °C 变性 1 min,50 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min;最后于 72 °C 延伸 5 min。反应结束后,扩增产物于 4 °C 保存、备用。

取 4 μL 扩增产物,加入 2 μL Loading buffer,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'-亚甲基双丙烯酰胺体积比为 19:1)进行电泳。电泳缓冲液为 1 × TBE,220 V 稳压电泳 2~3 h,以 50 bp DNA Ladder 为 DNA 分子量标准 (Marker)。

电泳结束后,采用银染法进行染色,具体操作如下:用体积分数 10% 的无水乙醇和体积分数 0.5% 的冰醋酸混合液固定 12 min 后,用质量分数 0.2% 的 AgNO_3 溶液渗透 12 min,再用质量分数 0.002% 的硫代硫酸钠溶液漂洗 15~30 s,倒掉液体,用适量蒸馏水漂洗 20 s;加入质量分数 1.5% 的 NaOH 和体积分数 0.1% 的甲醛混合液显色 5~10 min,直至谱带清晰。自来水冲洗后,拍照保存。

1.2.3 SRAP-PCR 优化体系的确立和验证 根据上述单因子实验结果,以陕西城固产石蒜的 DNA 为模板,使用不同的上游引物和下游引物组合对 SRAP 标记引物进行筛选,确立最优的扩增体系,并按上述实验步骤,用 9 个居群 36 个石蒜单株的 DNA 对最优的 SRAP-PCR 扩增体系进行验证,从而进一步确证最优的石蒜 SRAP-PCR 扩增体系。

2 结果和分析

2.1 不同因素对石蒜 SRAP-PCR 扩增结果的影响

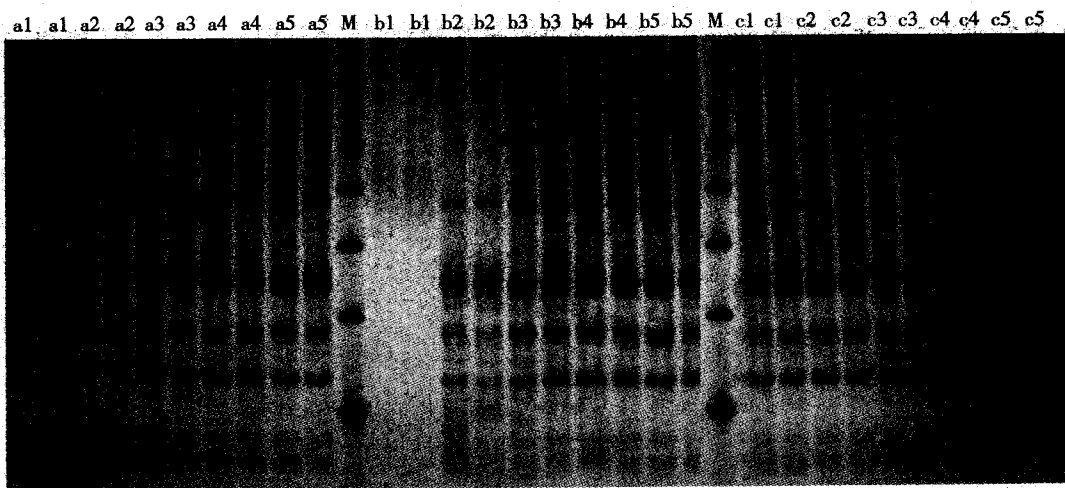
2.1.1 模板 DNA、 Mg^{2+} 和 dNTPs 浓度的影响 石蒜 SRAP 扩增体系中不同浓度模板 DNA、 Mg^{2+} 和 dNTPs 对扩增结果的影响见图 1。从图 1 可以看

出, Mg^{2+} 浓度对 SRAP 扩增结果的影响最明显。浓度过低,无扩增产物;浓度提高,扩增条带的丰度和亮度均增加;浓度超过 $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,扩增条带无明显变化。由于 Mg^{2+} 是酶的激活剂,浓度过高易产生非特异性扩增,因此,石蒜 SRAP 扩增反应体系的最佳 Mg^{2+} 浓度应为 $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

在 $0.10 \sim 0.35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内,dNTPs 浓度对 SRAP 扩增结果的影响不明显,只是在 dNTPs 浓度较低条件下扩增出的条带数量略少、亮度稍弱;dNTPs 浓度为 $0.20 \sim 0.30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,扩增结果几乎无差异。因此,从降低实验成本角度考虑,dNTPs 浓度应设定为 $0.20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

此外,模板浓度对 SRAP 扩增结果的影响也不明显,在 $5 \sim 60 \text{ ng}$ 模板 DNA 用量范围内,反应体系均能获得基本一致的扩增结果。因此,为确保扩增成功,优化后的石蒜 SRAP 扩增反应体系中的模板 DNA 用量应设定为 20 ng 。

2.1.2 引物浓度和 Taq DNA 聚合酶用量的影响 不同引物浓度和 Taq DNA 聚合酶用量对石蒜 SRAP 扩增结果的影响见图 2。由图 2 可以看出,引物浓度对 SRAP 扩增结果有一定影响。浓度较低,扩增条带的数量较少、亮度偏弱;浓度达 $0.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,扩增条带的亮度有一定增强;浓度达



M: 50 bp DNA Ladder; a1 - a5: 模板 DNA 用量分别为 5、10、20、40 和 60 ng The amount of template DNA is 5, 10, 20, 40 and 60 ng respectively; b1 - b5: Mg^{2+} 浓度分别为 1.5、2.0、2.5、3.0 和 3.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ The concentration of Mg^{2+} is 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 and 3.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively; c1 - c5: dNTPs 浓度分别为 0.10、0.20、0.25、0.30 和 0.35 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ The concentration of dNTPs is 0.10, 0.20, 0.25, 0.30 and 0.35 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively. 引物为 me2 和 em5 The primers are me2 and em5.

图 1 模板 DNA 用量及 Mg^{2+} 和 dNTPs 浓度对陕西产石蒜 SRAP 扩增结果的影响

Fig. 1 Effects of amount of template DNA and concentrations of Mg^{2+} and dNTPs on SRAP amplification results of *Lycoris radiata* (L' Hér.) Herb. from Shaanxi Province

0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上,非特异性条带数量增加。因此,石蒜 SRAP 扩增反应体系中的最佳引物浓度应为 0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

实验结果表明,随着 *Taq* DNA 聚合酶用量的增加,扩增出的非特异性条带数增多,凝胶背景的颜色加深(图 2)。因此,石蒜 SRAP 扩增反应体系中的 *Taq* DNA 聚合酶用量以 0.50 U 最适宜。

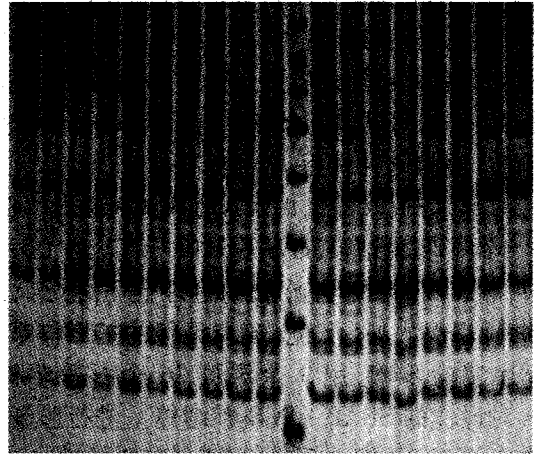
2.2 石蒜 SRAP-PCR 扩增体系的验证和确立

根据上述单因子实验的优化结果,利用 me2 和 em5、me1 和 em5 引物组合对 9 个石蒜居群 36 个单株的 DNA 进行扩增,以验证石蒜 SRAP-PCR 扩增反应体系的效果。结果表明,采用上述扩增条件,用 me2 和 em5、me1 和 em5 2 个引物组合对石蒜 9 个居群 DNA 的扩增结果相对较好,扩增图谱分别见图 3 和图 4。由图 3 可以看出,来源于广东的 2 个居群、广西雁山居群、湖南宜章和临武居群的扩增带型基本相同,而广西全州居群、湖南郴州和衡山居群及陕西城固居群的扩增带型基本一致。对比发现,相同扩增条件下,me1 和 em5 引物组合能扩增出更多的多态性条带(图 4),扩增结果能更全面地反映石蒜同一居群不同个体间的遗传多样性。

根据上述实验结果,并从实验结果的稳定性和减少实验成本的角度考虑,最终确立的石蒜 SRAP

标记最优扩增反应体系总体积为 10 μL , 含 1.0 μL 10 \times PCR buffer、1.2 μL 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 、0.8

d1 d1 d2 d2 d3 d3 d4 d4 d5 d5 M e1 e1 e2 e2 e3 e3 e4 e4

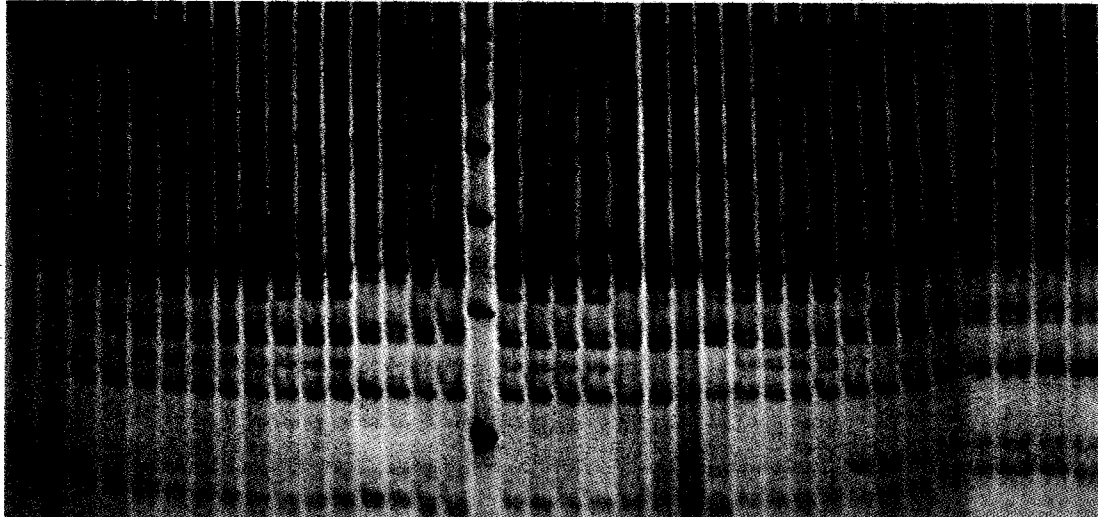


M: 50 bp DNA Ladder; d1 - d5: 引物浓度分别为 0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ The concentration of primer is 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively; e1 - e4: *Taq* DNA 聚合酶用量依次为 0.25、0.50、0.75 和 1.00 U The amount of *Taq* DNA polymerase is 0.25, 0.50, 0.75 and 1.00 U respectively. 引物为 me2 和 em5 The primers are me2 and em5.

图 2 引物浓度和 *Taq* DNA 聚合酶用量对陕西产石蒜 SRAP-PCR 扩增结果的影响

Fig. 2 Effects of concentration of primers and amount of *Taq* DNA polymerase on SRAP-PCR amplification results of *Lycoris radiata* (L' Hér.) Herb. from Shaanxi Province

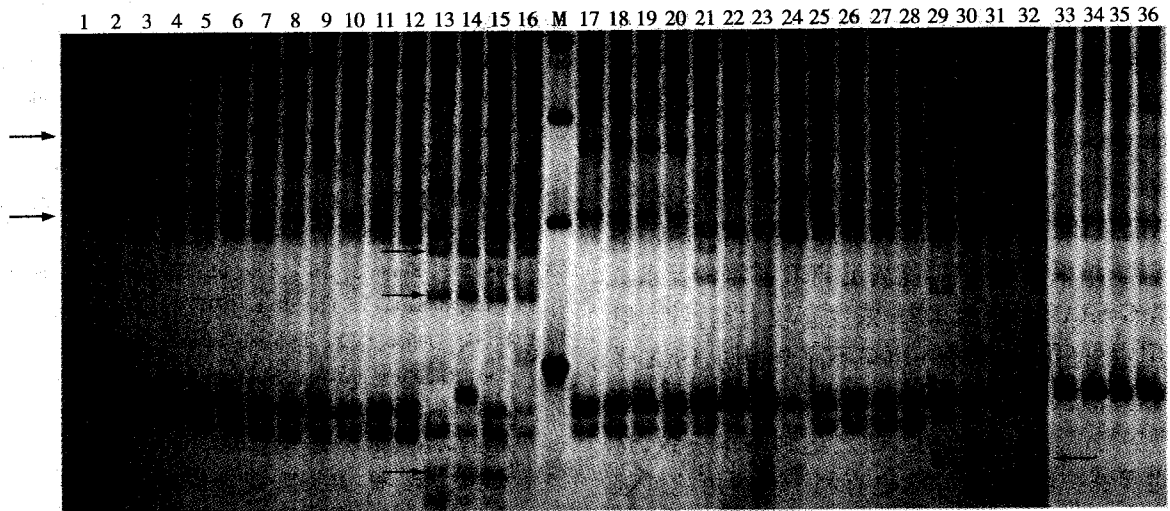
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 M 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36



1-4: 广东乐昌 Lechang of Guangdong Province; 5-8: 广东坪石 Pingshi of Guangdong Province; 9-12: 广西雁山 Yanshan of Guangxi Province; 13-16: 广西全州 Quanzhou of Guangxi Province; 17-20: 湖南宜章 Yizhang of Hu'nan Province; 21-24: 湖南郴州 Chenzhou of Hu'nan Province; 25-28: 湖南临武 Linwu of Hu'nan Province; 29-32: 湖南衡山 Hengshan of Hu'nan Province; 33-36: 陕西城固 Chenggu of Shaanxi Province; M: 50 bp DNA Ladder. 箭头所示为多态性条带 The arrows indicate the polymorphic bands.

图 3 引物组合 me2 和 em5 对不同居群石蒜的 SRAP-PCR 扩增图谱

Fig. 3 SRAP-PCR amplification profiles of different populations of *Lycoris radiata* (L' Hér.) Herb. with me2 and em5 primer combination



1-4: 广东乐昌 Lechang of Guangdong Province; 5-8: 广东坪石 Pingshi of Guangdong Province; 9-12: 广西雁山 Yanshan of Guangxi Province; 13-16: 广西全州 Quanzhou of Guangxi Province; 17-20: 湖南宜章 Yizhang of Hu'nan Province; 21-24: 湖南郴州 Chenzhou of Hu'nan Province; 25-28: 湖南临武 Linwu of Hu'nan Province; 29-32: 湖南衡山 Hengshan of Hu'nan Province; 33-36: 陕西城固 Chenggu of Shaanxi Province; M: 50 bp DNA Ladder. 箭头所示为多态性条带 The arrows indicate the polymorphic bands.

图4 引物组合 me1 和 em5 对不同居群石蒜的 SRAP-PCR 扩增图谱

Fig. 4 SRAP-PCR amplification profiles of different populations of *Lycoris radiata* (L' Hér.) Herb. with me1 and em5 primer combination

μL 2.5 mmol · L⁻¹ dNTPs、2.0 μmol · L⁻¹ 上游引物和下游引物各 2.0 μL 、1.0 μL 模板 DNA (20 ng · μL^{-1})、0.50 U *Taq* DNA 聚合酶, 双蒸水补足至 10 μL , 每管覆盖约 20 μL 石蜡油。

3 讨 论

3.1 影响石蒜 SRAP-PCR 扩增的因素分析

一般来说, DNA 质量、PCR 扩增体系和扩增程序等均能影响 PCR 扩增结果。由于作者在本实验中采用的 DNA 提取和纯化方法能保证获得高质量的 DNA, 因此, 在石蒜 SRAP-PCR 扩增反应体系中, DNA 质量并不是影响其扩增效果的重要因素, 而反应体系中各组分浓度对扩增结果的影响较大。在进行石蒜 SRAP 扩增反应体系的优化实验时发现, Mg²⁺ 浓度对扩增结果的影响最明显, 添加 3.0 mmol · L⁻¹ Mg²⁺, 反应体系的扩增效果最好, 该结果与李^平[12] 的研究结果相符。dNTPs 浓度对石蒜 SRAP 扩增结果影响不明显, 这与对柿 (*Diospyros kaki* Thunb.) [11] 和香菇 [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] [13] 等的研究结果相反。研究发现, 模板 DNA 浓度和 *Taq* DNA 聚合酶用量对石蒜 SRAP 扩增结果的影响均很小, 较低浓度的模板 DNA 就能满足石蒜

SRAP 扩增的需要, 该结果与小麦 (*Triticum aestivum* L.) [14] 和辣椒 (*Capsicum annum* L.) [15] 的 SRAP 扩增反应体系的优化结果类似, 但却与苧麻 (*Boehmeria nivea* L.) 自交系品种 [16] 的相关研究结果存在较大差异。可见, 不同种植物的 SRAP 扩增反应体系既有相同之处又有明显区别。

在经过优化的石蒜 SRAP-PCR 扩增反应体系中, Mg²⁺ 浓度为 3.0 mmol · L⁻¹, 高于石蒜 ISSR 和 RAPD [5] 扩增反应体系, 可能与 SRAP 标记采用成对引物有关, 说明同种植物不同分子标记扩增反应体系的最适扩增条件存在很大差异, 对不同标记的扩增反应体系进行优化是非常必要的。

一般来说, 扩增程序对 PCR 扩增效果的影响较大, 但由于 SRAP 引物具有通用性, 不同种植物所用的引物组合往往相同, 因此, 扩增程序对 SRAP-PCR 扩增结果的影响较小。目前, SRAP-PCR 反应体系中使用的扩增程序与 Li 和 Quiros [4] 的程序基本相同或稍加改良 [11, 16], 为了让上、下游引物与 DNA 模板能部分配对, 最初 5 个循环的退火温度较低, 一般设置在 33 °C ~ 36 °C; 同时, 为了提高引物扩增的特异性, 后 30 个循环反应的退火温度升高至 47 °C ~ 55 °C。在石蒜 SRAP-PCR 反应体系中, 前 5 个循环采用 37 °C 的退火温度, 后 30 个循环采用

50 ℃的退火温度,获得了较理想的扩增结果。在PCR过程中,大多数研究者设置30~45个循环,理论上来说,在能检测到清晰扩增条带的情况下,循环次数越少越好,过多的循环次数将导致一些非特异性产物的干扰,且发生错配的比例也会上升。本实验中作者采用30个循环,获得的扩增条带清晰、多态性丰富、结果稳定可靠,能满足PCR扩增的要求。

虽然SRAP对模板DNA浓度有较大宽容性,但由于不同样品提取的DNA得率不完全相同,DNA样品浓度存在较大差异,所以在PCR反应之前应检测并调整各样品的DNA浓度,使之达到基本一致,这样既能保证扩增的成功率,也有利于获得可比性强的结果。

3.2 SRAP-PCR扩增产物的检测方法比较

在SRAP分子标记中,一般采用聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染法对SRAP-PCR扩增产物进行检测,主要是因为聚丙烯酰胺凝胶的分辨率较高,且银染十分灵敏。本实验中,作者也采用该方法进行检测,但银染方法在李严^[12]所用方法的基础上有所改进,只在银染的固定时间上相同。本实验中不需要更换固定液,既简化了操作程序又节省了试剂用量;漂洗时,适当减少蒸馏水漂洗次数,以缩短脱色时间;显色时,降低了甲醛的浓度。经过上述改进,采用优化后的银染技术能获得很好的石蒜SRAP-PCR扩增图谱。另外,SRAP-PCR扩增产物在聚丙烯酰胺凝胶或琼脂糖凝胶上电泳后经溴化乙锭染色,也能获得较好的染色效果^[8,10,17]。由此看出,SRAP-PCR扩增产物的检测方法较多,研究者可根据各自的研究目的和研究对象等具体情况加以选择。

3.3 SRAP标记用于石蒜居群遗传多样性研究的可行性

利用优化后的SRAP-PCR扩增体系对来源于广东、广西、湖南及陕西9个石蒜居群的基因组DNA进行了扩增和检测,结果表明,石蒜不同居群的SRAP标记的多态性较为丰富,种内不同居群间存在明显的遗传差异,这些遗传差异与生物学特征(如叶宽、盛花期等)有一定关联性。此外,SRAP标记还能揭示居群内个体间的微小差异。因此,将SRAP标记用于石蒜居群遗传多样性研究是切实可行的,也可将其应用于石蒜属植物种间亲缘关系、物种鉴别和遗传多样性的研究。

参考文献:

- [1] Kurita S. Variation and evolution on the karyotype of *Lycoris*, Amaryllidaceae IV. Intraspecific variation and evolution in the karyotype of *L. radiata* (L' Hér.) Herb. and the origin of this triploid species[J]. Cytologia, 1987, 52: 137-149.
- [2] 邵建章, 杨积高, 张定成, 等. 二倍体石蒜在安徽发现[J]. 植物分类学报, 1994, 32(6): 549-552.
- [3] Hsu P S, Kurita S, Yu Z Z, et al. Synopsis of the genus *Lycoris* (Amaryllidaceae) [J]. SIDA, 1994, 16(2): 301-331.
- [4] 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]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 455-461.
- [5] 袁菊红, 孙 祝, 夏 冰, 等. 石蒜属植物遗传多样性的 ISSR 和 RAPD 标记比较研究[J]. 中草药, 2007, 38(10): 1555-1561.
- [6] Hayashi A, Saito T, Mukai Y, et al. Genetic variations in *Lycoris radiata* var. *radiata* in Japan [J]. Genes Genet Syst, 2005, 80: 199-212.
- [7] Hori T, Hayashi A, Sasanuma, et al. Genetic variations in the chloroplast genome and phylogenetic clustering of *Lycoris* species [J]. Genes Genet Syst, 2006, 81: 243-253.
- [8] Budak H, Shearman R C, Parmaksiz I, et al. Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buffalograsses based on phylogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs, and SRAPs [J]. Theor Appl Genet, 2004, 109: 280-288.
- [9] Riaz A, Potter D, Stephen M. Genotyping of peach and nectarine cultivars with SSR and SRAP molecular markers [J]. J Am Soc Hort Sci, 2004, 129: 204-211.
- [10] Ferriol M, Picó B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers [J]. Theor Appl Genet, 2003, 107: 271-282.
- [11] 郭大龙, 罗正荣. 部分柿属植物 SRAP-PCR 反应体系的优化 [J]. 果树学报, 2006, 23(1): 138-141.
- [12] 李 严, 张春庆. 新型分子标记——SRAP 技术体系优化及应用前景分析 [J]. 中国农学通报, 2005, 21(5): 108-112.
- [13] 付立忠, 魏海龙, 李海波, 等. 香菇 SRAP 扩增体系的建立与优化 [J]. 食用菌学报, 2006, 13(4): 10-15.
- [14] 王志朴, 杨文香, 刘大群, 等. 小麦基因组 SRAP 扩增体系的初步研究 [J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(3): 66-69.
- [15] 任 羽, 王得元, 张银东, 等. 辣椒 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. 分子植物育种, 2004, 2(5): 689-693.
- [16] 刘立军, 蒙祖庆, 邢秀龙, 等. 苧麻基因组 SRAP 扩增体系的优化研究 [J]. 分子植物育种, 2006, 4(5): 726-730.
- [17] Budak H, Shearman R C, Parmaksiz I, et al. Molecular characterization of buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers [J]. Theor Appl Genet, 2004, 108: 328-334.