

山核桃 SRAP 体系的建立及与 RAPD 和 ISSR 标记的比较

李元春, 沈 林, 曾燕如

(浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300)

摘要: 以山核桃 *Carya cathayensis* 基因组 DNA 为模板, 对聚合酶链式反应(PCR)体系各组分进行了梯度实验, 优化出条带清晰、重复性好的相关序列扩增多态性聚合酶链式反应 (SRAP-PCR) 扩增体系, 并筛选了引物。该体系 (25.00 μL) 为: $1 \times$ 缓冲液 0.20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 脱氧核糖核苷酸(dNTPs), 0.20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物, 2.00 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 镁离子(Mg^{2+}), 33.34 nkat *Taq* DNA 聚合酶, 0.80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 基因组 DNA (以上均为终浓度)。反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 35 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 反应时间比其他体系缩短了一半。从 100 对引物中筛选出了适用于山核桃的引物 15 对。在山核桃中, 随机扩增多态性 DNA(RAPD), 简单序列重复区间(ISSR), SRAP 等 3 种标记, 以 SRAP 标记每对引物扩增的位点数及每对引物扩增的多态性位点数为多, 但 SRAP 多态性引物的比例、多态性位点比例居于另 2 种标记之间。在山核桃研究中可以考虑使用 SRAP 及 RAPD 标记。图 6 表 4 参 28

关键词: 经济林学; 山核桃; 相关序列扩增多态性(SRAP); 随机扩增多态性 DNA(RAPD); 简单序列重复区间(ISSR)
中图分类号: S664.1; S718.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2011)03-0505-08

Establishment of a SRAP analysis protocol in *Carya cathayensis* and a comparison among SRAP, RAPD, ISSR analysis protocols

LI Yuan-chun, SHEN Lin, ZENG Yan-ru

(The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: In order to have a good molecular marker to reflect inherent genetic characteristics of Lin'an hickory (*Carya cathayensis*), the genomic DNA extracted from hickory leaves was used to optimize parameters (constituents) included in a sequence-related amplified polymorphism-polymerase chain reaction (SRAP-PCR) protocol run under the following conditions: pre-denaturing at 94 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min; 5 cycles, each of which denatured at 94 $^{\circ}\text{C}$ for 30 s and annealed at 35 $^{\circ}\text{C}$ for 30 s with an extension at 72 $^{\circ}\text{C}$ for 2 min; 30 cycles, each of which denatured at 94 $^{\circ}\text{C}$ for 30 s and annealed at 50 $^{\circ}\text{C}$ for 30 s with an extension at 72 $^{\circ}\text{C}$ for 2 min; and a final extension at 72 $^{\circ}\text{C}$ for 8 min. Then, 15 pairs of primers out of 100 pairs were screened for SRAP analysis and a comparison was made among SRAP, random amplified polymorphic DNA (RAPD), and inter-simple sequence repeat (ISSR). The optimized (SRAP-PCR) protocol was as follows: a total volume of 25.00 μL containing $1 \times$ buffer, 0.20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs (deoxynucleotide triphosphates), 0.20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ primers, 2.00 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mg^{2+} , 33.34 nkat *Taq* DNA polymerase, and 0.80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ genomic DNA (all at a final concentration). On the average, SRAP, compared to RAPD and ISSR, had the most loci and polymorphic loci amplified by each pair of primers, but SRAP percentages for both polymorphic primer pairs and polymorphic loci were between RAPD and ISSR. The optimized SRAP-PCR reduced the reaction time by half compared with the former protocols. It has been shown that both SRAP and RAPD should be considered when

收稿日期: 2010-08-19; 修回日期: 2010-12-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30771752)

作者简介: 李元春, 从事经济林培育与利用研究。E-mail: biobar@126.com。通信作者: 曾燕如, 教授, 博士, 从事经济林培育和利用研究。E-mail: yrzeng@zafu.edu.cn

studying hickory. [Ch, 6 fig. 4 tab. 28 ref.]

Key words: cash forestry; *Carya cathayensis* (hickory); sequence-related amplified polymorphism (SRAP); random amplified polymorphic DNA (RAPD); inter-simple sequence repeat (ISSR)

相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)是美国加州大学 Li 等^[1]于 2001 年提出的基于聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)的分子标记,其引物设计基于内含子和外显子分别具有的一些共性序列。SRAP-PCR 反应体系使用双引物,即 17 个碱基的正向引物(F-primer)和 18 个碱基的反向引物(R-primer)。正向引物含有一段 14 碱基的核心序列,其 5'端前 10 个碱基为“填充”序列,无任何特异性,其后为 CCGG 序列,3'端 3 个选择性碱基与相同的核心序列组合成一套正向引物。外显子一般处于富含 GC 的区域。正向引物中使用“CCGG”序列的目的是使之能特异结合开放阅读框(ORF)中的外显子。反向引物的组成与正向引物类似,但“填充”序列后连接的为 AATT, AATT 序列后为 3 个选择性碱基。富含 AT 的序列通常见于启动子和内含子中。反向引物 3'端的 AATT 旨在特异结合富含 AT 的区域。SRAP 引物这样的设计使得有可能扩增出基于内含子与外显子的 SRAP 多态性标记。Ferriol 等^[2]对西葫芦 *Cucurbita pepo* 2 变种 69 个类型的遗传多样性进行了 SRAP 分析,11 个 SRAP 引物组合共获得了 88 个可重复的位点,平均每个引物扩增出了 8 个位点,其中 64 个位点具有多态性,多态性比例为 72.7%。山核桃 *Carya cathayensis* 是浙江省重要的经济树种,目前种下无品种,多为实生繁殖。以往对它开展的分子标记研究主要集中在随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD),扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)等显性标记上^[3-5],结果显示无论是天然群体样品还是半同胞样品,其多态性水平较低。共显性简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)标记具有种属特异性。杨树 *Populus* 的研究表明,SSR 引物在不同的杨树种间是高度保守的^[6],可应用于不同的杨树种研究。山核桃与美国山核桃 *Carya illinoensis* 为同属植物。美国人从美国山核桃中开发出了 19 对 SSR 标记引物^[7],但郭金剑^[8]将美国山核桃中的 SSR 引物用于山核桃 DNA 分析,结果显示美国山核桃中开发的 SSR 标记不适用于山核桃。SRAP 的多态性产生于 2 个方面:①由于小的插入与缺失导致片段大小改变,而产生共显性标记;②核苷酸改变影响引物的结合位点,导致显性标记产生。该标记已经在其他物种的研究中广为使用,但尚未见在山核桃研究中应用。本研究以来自天然群体的山核桃 DNA 为样品,建立了山核桃 SRAP 分析体系,并就 SRAP, RAPD 和 ISSR 等 3 种标记分析的多态性进行了比较,以期从标记的角度来阐述针对山核桃反映其遗传多样性的能力,为山核桃 DNA 水平的深入研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

实验材料山核桃叶片采自山核桃产区浙江省临安市昌化镇正值盛果期的成年山核桃林,山核桃树彼此间相隔 50 m 以上。山核桃 × 美国山核桃杂种的叶片采自沈林培养的杂种苗。

1.2 试剂

参考 Li^[1]等和 Ferriol 等^[2]的方法,由上海生工生物工程技术有限公司合成 SRAP, RAPD 和 ISSR 引物,并提供脱氧核糖苷酸(dNTPs)及引物(Fermentas); *Taq* 酶购自上海申能博彩生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 DNA 的提取 DNA 的提取参照 Xu 等^[9]的方法稍加改进,并用 10.00 g·L⁻¹ 的 RNase 对所提取的 DNA 进行(37 °C)RNA 消化。使用 ND-1 000(NanoDrop)及 8.00 g·kg⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量浓度及质量,根据测定结果将 DNA 稀释到 10.00 mg·L⁻¹ 备用。

1.3.2 SRAP-PCR 体系的优化 参照以往 AFLP 标记、ISSR(inter-simple sequence repeat)标记体系优化的程序,先优化 PCR 体系,随后再筛选引物^[5-10]。PCR 扩增反应在 PTC-200(MJ Research)上进行。就 SRAP-PCR,以 Guo 等^[11]的 SRAP 扩增体系(25.00 μL: 1 × 缓冲液, 0.20 mmol·L⁻¹ dNTPs, 0.30 μmol·L⁻¹ 引物, 2.50 mmol·L⁻¹ 镁离子(Mg²⁺), 16.67 nkat *Taq* DNA 聚合酶, 1.20 mg·L⁻¹ 基因组 DNA(浓度均为终浓度)与扩增条件(94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 35 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 5 个循环; 94

℃变性 1 min, 50 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 2 min, 30 个循环; 72 ℃延伸 8 min, 4 ℃保存) 为基础, 在几个有扩增产物的引物对中, 采用 F1(TGAGTCCAAACCGGATA)/R1(GACTGCGTACGAATTAAT)引物组合, 参照张彤等^[12]、柳李旺等^[13]、赵伟光等^[14]的综述及郭大龙等^[15]针对柿树属 *Diospyros* 植物优化 SRAP-PCR 的过程, 依次对镁离子(Mg²⁺), 引物, dNTPs, *Taq* DNA 聚合酶和山核桃基因组 DNA 等实验参数的反应终浓度进行优化。根据微量移液枪操作的便利性, 将每一个 PCR 反应参数均设 12 个反应终浓度(表 1)。一个参数的最佳浓度确定后, 固定该浓度, 优化下一个参数浓度, 最后优化 PCR 扩增条件。扩增产物在 20.00 g·kg⁻¹ 琼脂糖凝胶上电泳, 溴化乙锭(EB)染色, AlphaImager HP(Alpha Innotech)成像系统成像保存。在优化 SRAP 体系的基础上, 从 Li 等^[1]的 10 个正向引物、10 个反向引物共 100 对组合中筛选引物。

表 1 实验参数(终浓度)设置

Table 1 Parameters (final concentration) tested in the experiment

Mg ²⁺ /(mmol·L ⁻¹)	引物/(μmo·L ⁻¹)	dNTPs/(μmo·L ⁻¹)	<i>Taq</i> DNA 聚合酶/(nkat)	基因组 DNA/(mg·L ⁻¹)
0.50	0.04	0.04	0.25 × 16.67	0.20
1.00	0.08	0.08	0.50 × 16.67	0.40
1.50	0.12	0.12	0.75 × 16.67	0.60
2.00	0.16	0.16	1.00 × 16.67	0.80
2.50	0.20	0.20	1.25 × 16.67	1.00
3.00	0.24	0.24	1.50 × 16.67	1.20
3.50	0.28	0.28	1.75 × 16.67	1.40
4.00	0.32	0.32	2.00 × 16.67	1.60
4.50	0.36	0.36	2.25 × 16.67	1.80
5.00	0.40	0.4	2.50 × 16.67	2.00
5.50	0.44	0.44	2.75 × 16.67	2.20
6.00	0.48	0.48	3.00 × 16.67	2.40

1.3.3 SRAP, RAPD 和 ISSR 标记的比较 王正加等^[4]建立了山核桃 RAPD 分析体系, 沈林在此基础上对退火温度及 DNA 模板用量进行了优化。本研究采用沈林优化过的 RAPD 体系[PCR 反应总体积为20.00 μL, 包括 10 × 缓冲液 2.00 μL, 25.00 mmol·L⁻¹ 镁离子 (Mg²⁺)1.76 μL, 2.50 mmol·L⁻¹ dNTP 1.20 μL, 15.00 μmol·L⁻¹ RAPD 引物 0.50 μL, 模板 DNA15.00 ng, *Taq* DNA 聚合酶 16.67 nkat; PCR 反应条件为 94 ℃预变性 2 min, 然后进入 40 个 PCR 循环, 每个循环 94 ℃变性 30 s, 35.2 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 90 s; 最后 72 ℃延伸 7 min]及沈林建立的山核桃 ISSR 分析体系[总体积为 20.00 μL, 包括 10 × 缓冲液 2.00 μL, 25.00 mmol·L⁻¹ 镁离子(Mg²⁺)1.30 μL, 2.50 mmol·L⁻¹ dNTP 2.00 μL, 10.00 μmol·L⁻¹ ISSR 引物 0.70 μL, 模板 DNA 15.00 ng, 16.67 nkat *Taq* DNA 聚合酶; 反应条件为 94 ℃预变性 2 min, 然后进入 35 个 PCR 循环, 每个循环 94 ℃变性30 s, 退火 45 s(退火温度因引物而异), 72 ℃延伸 90 s; 最后 72 ℃延伸 7 min^[16], 对来自天然群体的山核桃及山核桃 × 美国山核桃子代 DNA 进行了分子标记分析, 并对分析结果进行了比较。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的提取

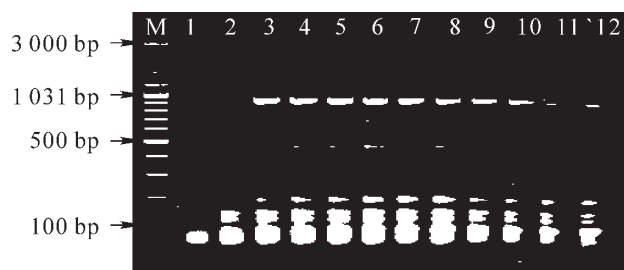
采用 Xu 等^[9]的方法提取的山核桃基因组 DNA 色素类物质少, $D(\lambda)_{260}/D(\lambda)_{280}$ 值在 1.8 左右, 可用于后续的分析。

2.2 SRAP-PCR 体系的优化

2.2.1 镁离子浓度 镁离子(Mg²⁺)是维持 DNA 聚合酶活性的重要辅因子^[17], 在 PCR 中通过影响*Taq* 酶

活性而间接影响 PCR 扩增^[18], 它还能与反应液中的 dNTPs、模板 DNA 及引物结合, 影响引物与模板的结合效率、模板与 PCR 产物的解链温度以及产物的特异性和引物二聚体的形成^[19]。本研究镁离子(Mg^{2+}) $1.50 \sim 4.50 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 浓度均可以扩增出清晰的条带。经过重复实验确定 $2.00 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 为最优浓度(图1)。

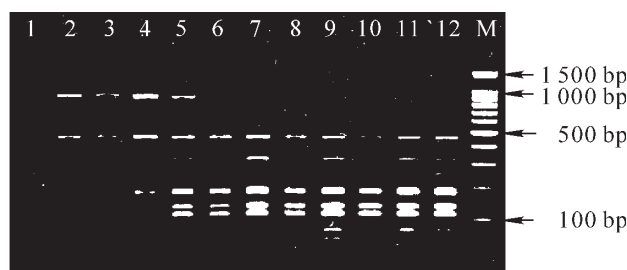
2.2.2 引物浓度 引物与基因组 DNA 模板退火时启动 PCR 的进行。引物浓度在 $0.04 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ 时 PCR 扩增很弱; 当引物浓度超过 $0.24 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ 以后, 小片段 DNA 得到了扩增, 但大片段扩增效果明显减弱, 显示引物没有得到充分的利用。因此, 确定 $0.20 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ 为引物的最优浓度(图2)。



泳道M为标记, 泳道1~12为 Mg^{2+} 的反应终浓度

图1 镁离子(Mg^{2+})浓度对山核桃 SRAP-PCR 的影响

Figure 1 Effect of Mg^{2+} concentration on the hickory genomic DNA's SRAP-PCR



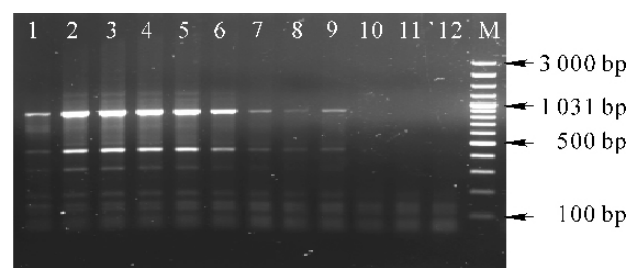
泳道1~12为引物的反应终浓度, 泳道M为标记

图2 引物浓度对山核桃 SRAP-PCR 的影响

Figure 2 Effect of primer concentration on the hickory genomic DNA's SRAP-PCR

2.2.3 dNTPs 浓度 dNTPs 是 PCR 反应的原料, 低浓度 dNTPs PCR 扩增效果很弱, 高浓度的 dNTPs 会螯合镁离子(Mg^{2+})而反馈抑制 DNA 聚合酶的活性^[20]。实验结果显示: 在 dNTPs 浓度 $0.04 \sim 0.20 \text{ mmol}$ 泳道 1~12 为引物的反应终浓度; 泳道 M 都可以扩展出清晰的条带, 确定 0.20 mmol 泳道 1~12 为引物的反应终浓度; 泳道 M 为最优浓度(图3)。

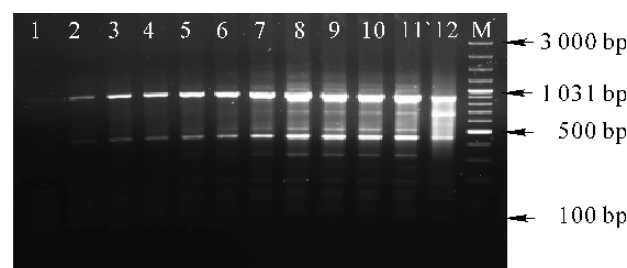
2.2.4 Taq 酶浓度 由图4可知, 当 Taq DNA Polymerase 为 $0.25 \times 16.67 \text{ nkat}$ 时几乎没有扩增产物; 随



泳道1~12为dNTPs反应的终浓度, 泳道M为标记

图3 dNTPs 浓度对山核桃 SRAP-PCR 的影响

Figure 3 Effect of dNTP concentration on the hickory genomic DNA's SRAP-PCR



泳道1~12为Taq酶反应的终浓度, 泳道M为标记

图4 Taq DNA 聚合酶浓度对山核桃SRAP-PCR 的影响

Figure 4 Effect of Taq DNA polymerase concentration on the hickory genomic DNA's SRAP-PCR

着浓度的增大, 当浓度达 $1.75 \times 16.67 \text{ nkat}$ 时, 500 bp 以下及 900 bp 以上的扩增产物逐渐增多; 当浓度达 $3.00 \times 16.67 \text{ nkat}$ 时, 扩增产物又呈弥散状而模糊不清。从实验结果以及经济的角度出发, 确定 $2.00 \times 16.67 \text{ nkat}$ 为最佳浓度。

2.2.5 模板质量浓度 PCR 对模板质量要求较高。本实验中, 低质量浓度 DNA 扩增效果很差, 当超过 $1.40 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 时, PCR 反应的扩增产物逐渐减少。本研究确定模板 DNA 为 $0.80 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 时扩增效果最好(图5)。



泳道M为标记, 泳道1~12为DNA模板反应终质量浓度

图5 山核桃基因组 DNA 质量浓度对 SRAP-PCR 的影响

Figure 5 Effect of genomic DNA concentration on SRAP-PCR

2.2.6 SRAP-PCR 反应条件的优化 按照 Guo 等^[21]的方法，完成一个 SRAP 反应约需 3.0 h，时间较长。我们将 SRAP 反应条件中 2 个循环每一个循环的变性及退火时间各减少一半至 30 s，并将 PCR 结果与前述反应条件的 PCR 结果进行比较，发现变性及退火时间各减少一半并不影响 PCR 结果，而整个 PCR 时间缩短至 1.5 h 左右。利用优化后的山核桃 SRAP 体系以及扩增条件对山核桃基因组 DNA 进行扩增的效果见图 6。

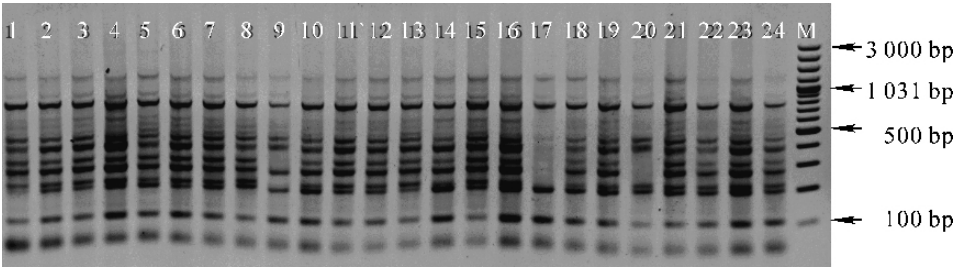


图 6 优化后的 SRAP 体系山核桃 DNA PCR 扩增产物的电泳图(引物组合 F4/R1)
Figure 6 Electrophoresis of PCR products amplified with an optimized SRAP protocol in hickory (primer pair F4/R1)

2.2.7 山核桃 SRAP-PCR 引物的筛选 利用优优化后的山核桃 SRAP 体系，从 100 对 SRAP 引物组合中筛选出了 15 对扩增性强，条带清晰，适合于山核桃的引物对(表 2)。

表 2 经过筛选的山核桃 SRAP 引物对

Table 2 Primer pairs screened for hickory

引物对		序列(5' - 3')	
F1/R1	TGAGTCCAAACCGGATA/GACTGCGTACGAATTAAT	F4/R3	TGAGTCCAAACCGGACC/GACTGCGTACGAATTGAC
F1/R3	TGAGTCCAAACCGGATA/GACTGCGTACGAATTGAC	F6/R8	TGAGTCCAAACCGGTAA/GACTGCGTACGAATTCTG
F1/R4	TGAGTCCAAACCGGATA/GACTGCGTACGAATTTGA	F7/R2	TGAGTCCAAACCGGTCC/GACTGCGTACGAATTTGC
F1/R10	TGAGTCCAAACCGGATA/GACTGCGTACGAATTCCA	F7/R4	TGAGTCCAAACCGGTCC/GACTGCGTACGAATTTGA
F2/R6	TGAGTCCAAACCGGAGC/GACTGCGTACGAATTGCA	F8/R4	TGAGTCCAAACCGGTGC/GACTGCGTACGAATTTGA
F2/R7	TGAGTCCAAACCGGAGC/GACTGCGTACGAATTCAA	F8/R10	TGAGTCCAAACCGGTGC/GACTGCGTACGAATTCCA
F2/R8	TGAGTCCAAACCGGAGC/GACTGCGTACGAATTCTG	F9/R2	TGAGTCCAAACCGGTGT/GACTGCGTACGAATTTGC
F4/R1	TGAGTCCAAACCGGACC/GACTGCGTACGAATTAAT		

2.3 SRAP 与 RAPD 和 ISSR 分子标记的比较

以 10 个来自天然群体的山核桃样品基因组 DNA 为材料，用 SRAP，RAPD 和 ISSR 等 3 种分子标记进行 PCR 扩增，统计 3 种分子标记的扩增结果(表 3)。从研究结果来看：3 种标记扩增产物中，SRAP 标记每对引物扩增的多态性位点数最多，其次为 RAPD 与 ISSR 标记，且两者相差不大；多态引物的比例及多态性位点的比例以 RAPD 标记最高，随后为 SRAP 和 ISSR 标记，但每对引物所获得的多态位点数以 SRAP 标记为多，随后为 RAPD 与 ISSR 标记。

表 3 3 种分子标记天然群体山核桃样品扩增结果统计

Table 3 Statistical PCR results of samples from a natural population amplified with three kinds of molecular markers

标记名称	使用引物/个	获得多态的引物/个	扩增总位点数/个	扩增位点数/引物	多态性位点数/个	多态引物比例/%	多态性位点比例/%	多态位点数/引物
RAPD	16	12	121	7.56	25	75.00	20.66	1.56
ISSR	17	9	143	8.41	20	52.94	13.99	1.18
SRAP	15	9	173	11.53	27	60.00	15.61	1.80

以山核桃为母本，美国山核桃为父本，20 株杂交苗的基因组 DNA 为材料进行 3 种标记的分析，扩

增结果表明：每对引物扩增的位点数以 RAPD 为多，ISSR 及 SRAP 相近，正好与山核桃 DNA 的实验结果相反，但均以 ISSR 标记居中；多态性引物的比例及多态性位点的比例与来自天然群体山核桃 DNA 的样品分析结果类似，其中多态性位点的比例以 RAPD 标记最高，随后为 SRAP 和 ISSR 标记，分别达 27.6%，26.2% 和 17.0%，且 SRAP 与 RAPD 的结果相差不大(表 4)，但从每对引物扩增的多态位点数来讲，以 RAPD 标记为多，其次为 SRAP 及 ISSR 标记。

表 4 3 种分子标记山核桃 × 美国山核桃全同胞子代样品扩增结果统计

Table 4 Statistical PCR results in the full-sib progeny of hickory × pecan amplified with three kinds of molecular markers

标记名称	使用引物/个	获得多态的引物/个	扩增总位点数/个	扩增位点数/引物	多态性位点数/个	多态引物比例/%	多态性位点比例/%	多态位点数/引物
RAPD	23	21	225	9.78	62	91.30	27.60	2.70
ISSR	29	17	171	5.90	29	58.60	17.00	1.00
SRAP	15	10	84	5.60	22	66.70	26.20	1.47

3 讨论

SRAP 技术是一种基于 PCR 反应的分子标记技术，PCR 扩增效果与其他分子标记一样，受诸多因素的影响，不同的材料其扩增体系及反应条件一般都有所不同，这与不同材料基因组大小、所提取 DNA 的纯度、以及 PCR 仪的型号及工作状态有关。对于山核桃基因组 DNA 来说，研究结果确定的 SRAP-PCR 反应体系是：1 × 缓冲液，0.20 mmol·L⁻¹ dNTPs，0.20 μmol·L⁻¹ 引物，2.00 mmol·L⁻¹ 镁离子(Mg²⁺)，33.34 nkat *Taq* DNA 聚合酶，0.80 mg·L⁻¹ 基因组 DNA(均为反应终浓度)；反应条件是：94 ℃预变性 5 min，94 ℃变性 30 s，35℃退火 30 s，72 ℃延伸 2 min，5 个循环；94 ℃变性 30 s，50 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 2 min，30 个循环；72 ℃延伸 8 min，4 ℃保存。

Budak 等^[21]在水牛草 *Buchloe dactyloides* 中比较了 SSR，RAPD，ISSR 和 SRAP 等 4 种分子标记，结果发现 RAPD 与 SRAP 的相似性指数高度相关，而 RAPD 与 SSR 之间的斯皮尔曼等级相关系数极低，SSR 与 ISSR 之间的斯皮尔曼等级相关系数较高。这意味着 RAPD 与 SRAP 标记之间有很好的 consistency。水牛草是一个异花授粉、高度杂合的物种，有着丰富多样的遗传背景。在此情况下，很难观察到不同标记技术间高水平的相似性。Degani 等^[22]用 AFLP 及 RAPD 标记研究了草莓 *Fragaria ananassa* 品种间的多态性，发现 RAPD 标记数据获得的近亲系数要好于 AFLP 标记数据获得的近亲系数，且标记间没有相关性。沈林等^[23]利用 AFLP 标记对山核桃天然群体 100 个单株进行分析，使用 11 对引物共产生 32 个多态性位点，平均每对引物产生的多态位点数 2.91 个，结果说明山核桃 DNA 多态性水平低；并从连锁不平衡的角度研究，发现山核桃天然群体的遗传多样性为低至中等水平。王正加^[24]利用 AFLP 对山核桃进行分析也得到了类似的结果。对于遗传多样性水平不高的山核桃来讲，不同标记技术间的比较更能反映标记本身体现不同个体间遗传多样性的能力。

我们的研究表明：在山核桃中，RAPD，ISSR 和 SRAP 等 3 种标记以 SRAP 标记每对引物扩增的位点数及每对引物扩增的多态性位点数为多，尽管其产生多态位点的引物比例及产生多态性位点的比例居中，次于 RAPD。与 RAPD 相比，其正向和反向引物的碱基数分别是 17 和 18，要远远多于 RAPD 的 10 个碱基数，所以 SRAP 在 PCR 扩增中的特异性相对更好，结果也更可靠。从每对引物产生的多态性位点数来讲，与 AFLP 相比，AFLP 要优于 SRAP^[23]。对基因组背景不清楚的林木来说，共显性的标记开发不多，对简单、廉价显性标记技术的依赖性还很强^[25]，不断有相关的研究论文发表^[26-28]。在所有 4 种分子标记中，相比 AFLP 操作的复杂性，RAPD，ISSR 和 SRAP 标记的操作要简单得多，且 SRAP 可显示大量的共显性^[12]，在山核桃研究中可以考虑使用 SRAP 并结合 RAPD 标记。

参考文献：

- [1] 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.

- [2] FERRIOL M, PICO B, NUEZ F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP marker [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, **107**: 271 – 282.
- [3] 郭传友, 黄坚钦, 王正加, 等. 山核桃种质资源遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 激光生物学报, 2007, **16** (4): 405 – 410.
- GUO Chuanyou, HUANG Jianqin, WANG Zhengjia, *et al.* RAPD Analysis on the genetic diversity of *Carya cathayensis* germplasm resources [J]. *Acta Laser Biol Sin*, 2007, **16** (4): 405 – 410.
- [4] 王正加, 黄坚钦, 郭传友, 等. 山核桃 RAPD 反应体系的优化[J]. 浙江林学院学报, 2003, **20** (4): 429 – 433.
- WANG Zhengjia, HUANG Jianqin, GUO Chuanyou, *et al.* The optimal reaction system of RAPD in *Carya cathayensis* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2003, **20** (4): 429 – 433.
- [5] 郭金剑, 池伟, 赵鑫珠, 等. 山核桃 AFLP 实验技术体系的建立[J]. 浙江林学院学报, 2008, **25** (4): 532 – 537.
- GUO Jinjian, CHI Wei, ZHAO Xinzhu, *et al.* An AFLP analysis system for *Carya cathayensis* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2008, **25** (4): 532 – 537.
- [6] YIN T M, DiFAZIO S P, TUSKAN G A, *et al.* A high density consensus map established for comparative mapping and genome assembly in *Populus* by SSR markers [C/OL]. International Poplar Symposium IV Nanjing, China, 2006. [2010-07-11]http: //www.docin.com/p-19720818.html.
- [7] GRAUKE L J, IQBAL M J, REDDY A S. Developing microsatellite DNA markers in pecan [J]. *J Amer Hort Sci*, 2003, **128** (3): 374 – 380.
- [8] 郭金剑. 山核桃群体结构及多样性的研究[D]. 临安: 浙江农林大学, 2008.
- GUO Jinjian. *Study of Population Structure and Diversity in Carya cathayensis* Sarg [D]. Lin'an: Zhejiang A & F University, 2008.
- [9] XU Qiang, WEN Xiaopeng, DENG Xiuxin. A simple protocol for isolating genomic DNA from chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt) for RFLP and PCR analyses [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2004, **22**: 301 – 301.
- [10] 叶生月, 陈钢, 张慧, 等. 香榧 ISSR-PCR 扩增条件的优化和引物筛选[J]. 浙江林学院学报, 2010, **27** (1): 87 – 92.
- YE Shengyue, CHEN Gang, ZHANG Hui, *et al.* Optimization of an ISSR-PCR system and primer screening for *Torreya grandis* ‘Merrillii’ [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2010, **27** (1): 87 – 92.
- [11] GUO Dalong, LUO Zhengrong. Genetic relationships of some PCNA persimmons (*Diospyros kaki* Thunb.) from China and Japan revealed by SRAP analysis [J]. *Genet Resour Crop Evol*, 2006, **53**: 1597 – 1603.
- [12] 张彤, 屈淑平, 崔崇士. SRAP 标记在蔬菜作物遗传育种中的应用[J]. 东北农业大学学报, 2009, **40** (1): 119 – 122.
- ZHANG Tong, QU Shuping, CUI Chongshi. Application of SRAP marker on genetics and breeding of vegetable crops [J]. *J Northeast Agric Univ*, 2009, **40** (1): 119 – 122.
- [13] 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): 77 – 781.
- LIU Liwang, GONG Yiqin, HUANG Hao, *et al.* Novel molecular marker systems SRAP and TRAP and their application [J]. *Heredity*, 2004, **26** (5): 777 – 781.
- [14] 赵光伟, 徐志杰, 徐永阳. SRAP 分子标记及其在蔬菜作物上的应用[J]. 中国农学通报, 2008, **24** (8): 69 – 72.
- ZHAO Guangwei, XU Zhijie, XU Yongyang. SRAP molecular marker and its applications to vegetable crops [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2008, **24** (8): 69 – 72.
- [15] 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.
- GUO Dalong, LUO Zhengrong. Optimization of SRAP-PCR in some *Diospyros* spp.[J]. *J Fruit Sci*, 2006, **23** (1): 138 – 141.
- [16] 沈林. 无融合生殖连锁分析模型: 美国山核桃 × 山核桃杂种的实例研究[D]. 临安: 浙江农林大学, 2010.
- SHEN Lin. *A Model for Linkage Analysis with Apomixis: A Case Study for Pecan × Hickory Hybrids* [D]. Lin'an: Zhejiang A & F University, 2010.
- [17] 李雅轩, 赵昕. 遗传学综合实验[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 172 – 173.
- [18] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [19] 林万明, 扬瑞馥, 黄尚志, 等. PCR 技术操作和应用指南[M]. 北京: 人民军医出版社, 1993.

- [20] 郑景生, 吕蓓. PCR 技术及实用方法[J]. 分子植物育种, 2003, **1** (3): 381 – 394.
ZHENG Jinsheng, LÜ Bei. PCR technique and its practical methods [J]. *Mol Plant Breed*, 2003, **1** (3): 381 – 394.
- [21] BUDAK H, SHEARMAN R C, PARMAKSIZ I, *et al.* Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buf falograsses based on phylogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs, and SRAPs [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, **109**: 280 – 288.
- [22] DEGANI C, ROWLAND LJ, SAUNDERS J A, *et al.* A comparison of genetic relationship measures in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) based on AFLPs, RAPDs, and pedigree data [J]. *Euphytica*, 2001, **117**: 1 – 12.
- [23] 沈林, 郭金剑, 李阳, 等. 基于 AFLP 分析的山核桃群体结构及遗传多样性[J]. 福建林业科技, 2009, **36** (4): 84 – 86.
SHEN Lin, GUO Jinjian, LI Yang, *et al.* Population structure and genetic diversity of *Carya cathayensis* revealed by AFLP analysis [J]. *J Fujian For Sci Technol*, 2009, **36** (4): 84 – 86.
- [24] 王正加. 山核桃分子标记与成花基因 *CcLFY* 及其启动子克隆的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2006.
WANG Zhengjia. *Molecular Marker Analysis and Flora Gene CcLFY and Its Promoter Cloning of Carya cathayensis* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2006: 45 – 66.
- [25] LI Yanchun, LI Yang, WU Song, *et al.* Estimation of multilocus linkage disequilibria in diploid populations with dominant markers [J]. *Genetics*, 2007, **176**: 1811 – 1821.
- [26] MILLER A J, SCHAAL B A. Domestication and the distribution of genetic variation in wild and cultivated populations of the mesoamerican fruit tree *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae)[J]. *Mol Ecol*, 2006, **15**: 1467 – 1480.
- [27] KREMER A, CARON H, CAVERS S, *et al.* Monitoring genetic diversity in tropical trees with multilocus dominant markers [J]. *Heredity*, 2005, **95**: 274 – 280.
- [28] HOLSINGER K E, LEWIS P O, DEY D K. A bayesian approach to inferring population structure from dominant markers [J]. *Mol Ecol*, 2002, **11** (7): 1157 – 1164.