

# 西藏光核桃 SRAP-PCR 反应体系的优化和引物筛选

谭江平<sup>1</sup>, 曾秀丽<sup>2,3</sup>, 廖明安<sup>1</sup>, 邱利娜<sup>1</sup>, 王玉霞<sup>2</sup>, 次仁卓嘎<sup>2</sup>

(1. 四川农业大学 园艺学院, 四川 雅安 625014; 2. 西藏自治区农牧科学院 蔬菜研究所, 西藏 拉萨 850030;

3. 四川农业大学 玉米研究所, 四川 雅安 625014)

**摘要:**以西藏 12 份光核桃种质为试材, 采用正交设计, 从 dNTPs、 $Mg^{2+}$ 、引物、模板 DNA 和 Taq DNA 聚合酶 5 种因素 5 个水平来优化 SRAP-PCR 反应体系, 并对引物进行了筛选。结果表明: 光核桃 25  $\mu$ L 的 SRAP 反应体系的最佳组分包括 2.5  $\mu$ L 10 $\times$  buffer, 0.35 mmol/L dNTPs, 1.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.4  $\mu$ mol/L 引物, 20 ng 模板 DNA 和 2.5 U Taq DNA 聚合酶。各因素对扩增反应结果均有不同影响, 其中以 dNTPs 浓度影响最大, 模板 DNA 的影响最小。应用该体系从 40 个引物组合中共筛选出扩增条带清晰、多态性丰富的 SRAP 引物组合 23 个。这一体系的建立及多态性引物组合的筛选为利用 SRAP 标记技术进行光核桃遗传多样性研究提供了依据。

**关键词:**光核桃; SRAP; 正交设计; 体系优化; 引物筛选

**中图分类号:**S 664.1(275) **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)02-0139-05

光核桃(*Amygdalus mira* (Koehne) Yü et Lu)又名西藏桃, 属蔷薇科(Rosaceae)桃属(*Amygdalus*)落叶乔木, 主产西藏, 是西藏野生果树种质资源分布最广的树种之一。其类型繁多, 依据果核形状可分为光滑型、浅沟型和深沟型。树体高大, 寿命可达千余年, 是国内外罕见的桃种质资源的“活化石群”<sup>[1]</sup>。西藏光核桃集中分布在雅鲁藏布江河谷及其支流帕隆藏布和尼洋河流域, 海拔 2 000~3 500 m, 林芝、米林、朗县、加查、波密等地大量散生或者聚集。一般分布在沿河谷两旁的阶地村庄, 呈连片带状分布; 长势良好, 年产量 500 万 kg 左右<sup>[2]</sup>。

SRAP(Sequence-related amplified polymorphism, 相关序列扩增多态性)是一种基于 PCR 的新型标记, 由美国加州大学作物系 Li 等<sup>[3]</sup>于 2001 年在研究芸薹作物时研发。它独特的引物设计使其可检测基因的可阅读框(ORF)区域, 是一种无需任何序列信息即可直接 PCR 扩增的新型分子标记技术, 它既克服了 RAPD 重复性差的缺点, 又克服了 AFLP 技术复杂和成本昂贵的缺点, 以其操作简便迅速、成本低、可靠性好、重复性高、易于测序等特点迅速被接受。目前此项技术已成功应用于植

物遗传图谱构建<sup>[3-4]</sup>、作物遗传多样性分析<sup>[5-6]</sup>、基因定位<sup>[3]</sup>及比较基因组学<sup>[7]</sup>等方面; 涉及到的果树种类有石榴<sup>[6]</sup>、荔枝<sup>[8]</sup>、梨<sup>[9]</sup>、柑桔<sup>[10]</sup>和枇杷<sup>[11]</sup>等。该研究以西藏光核桃为材料, 利用正交实验设计对 SRAP 反应体系进行优化, 在获得最佳扩增效果的基础上进行引物组合的多态性筛选, 拟为 SRAP 标记在光核桃遗传图谱构建、遗传多样性评价、基因组学及亲缘关系分析等方面的研究提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料光核桃共 12 份(表 1), 于 2009 年 5~6 月选取健康植株上的无病叶片, 样品来源地见表 1, 每个样品尽可能按体现生态和形态上的多样性原则采集, 单株为 1 个样品, 硅胶干燥, 密封保存备用。其中 P-101 用于体系优化, P-101 和 P-201 用于引物筛选。

表 1 供试材料的名称与来源

序号	编号	来源	序号	编号	来源
1	P-101	拉萨市	7	P-331	波密县
2	P-201	左贡县	8	P-401	八宿县
3	P-211	亚东县	9	P-411	芒康县
4	P-301	林芝县	10	P-421	芒康县
5	P-311	察隅县	11	P-431	芒康县
6	P-321	察隅县	12	P-441	芒康县

### 1.2 试验方法

1.2.1 光核桃总 DNA 提取和浓度检测 光核桃总 DNA 提取采用改良 CTAB 法<sup>[12]</sup>进行, 所提取的基因组 DNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测质量, 用 Eppendorf 公司生产的 Bio-Photometer 核酸检测仪检测 DNA 浓度与纯度, 并将其稀释为 10 ng/ $\mu$ L, 在 -20 $^{\circ}$ C 冰柜中保存备用。

**第一作者简介:**谭江平(1986-), 女, 在读硕士, 研究方向为园艺植物生长发育与调控。E-mail: tanjiangping@126.com。

**通讯作者:**廖明安(1957-), 男, 博士, 教授, 研究方向为园艺植物生长发育与调控。E-mail: lman@sicau.edu.cn。

**基金项目:**西藏自治区科技厅杰出青年科学计划基金资助项目(藏科发 2009(162)号); 四川农业大学博士后基金资助项目。

**收稿日期:**2010-11-19

1.2.2 PCR 反应因素水平的确定及正交表的设计 为了确定 PCR 反应中 5 个因素(*Taq* DNA 聚合酶、 $Mg^{2+}$ 、模板 DNA、dNTPs、引物)的最佳水平,采用正交设计  $L_{25}(5^6)$  在 5 个水平上进行试验,2 次重复。因素水平及设计方案见表 2。用于 SRAP-PCR 反应的 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、 $Mg^{2+}$  和标准分子量(Marker) DL 2 000 均购于天根生化科技(北京)有限公司。SRAP 引物采用 Li 等<sup>[3]</sup> 发表的引物及在此基础上通过改变引物 3'端 3 个选择性碱基合成 10 条正向引物,10 条反向引物,由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2.3 PCR 扩增 PCR 反应总体积为 25  $\mu$ L,按表 2 的编号顺序加入 *Taq* 酶、 $Mg^{2+}$ 、模板 DNA、dNTPs 和引物

(所用引物组合为 Me5+Em5),10 $\times$ buffer 2.5  $\mu$ L,用双蒸水补足。在 BIO-RAD Gene Cyclor PCR 仪上进行扩增,反应程序参考 Li 等的方法进行,并对延伸时间略做修改;即 SRAP 采用 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,35 $^{\circ}$ C 复性 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,5 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,50 $^{\circ}$ C 复性 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min,4 $^{\circ}$ C 保持。扩增结束后,每管产物加入 3  $\mu$ L 上样缓冲液 6 $\times$  Loading buffer(0.05%二甲苯青 FF,0.05%溴酚蓝,36%甘油,30 mmol/L EDTA),混匀后取 6  $\mu$ L 扩增产物用 2%琼脂糖凝胶在 0.5 $\times$ TBE 中电泳,电压小于 5 V/cm,电泳结束后经 EB 染色,于 SYNGE-NE 凝胶成像系统上观察和记录(图 1)。

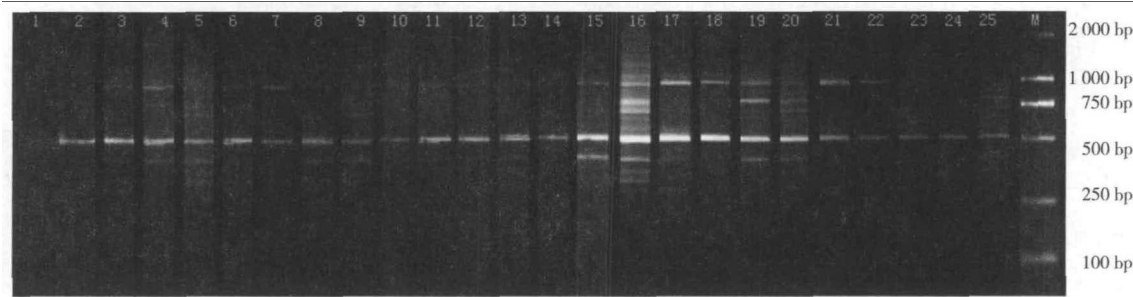


图 1 正交设计 SRAP-PCR 产物电泳结果

注:M;Marker DL2000;1~25 见表 2。

表 2 PCR 反应的因素水平  $L_{25}(5^6)$  正交实验设计

因素及水平					
编号	dNTPs 浓度 /mmol $\cdot$ L $^{-1}$	$Mg^{2+}$ 浓度 /mmol $\cdot$ L $^{-1}$	引物 / $\mu$ mol $\cdot$ L $^{-1}$	模板 DNA /ng $\cdot$ (25 $\mu$ L) $^{-1}$	<i>Taq</i> DNA 聚合酶 /U $\cdot$ (25 $\mu$ L) $^{-1}$
1	1(0.20)	1(1.50)	1(0.10)	1(10.00)	1(0.50)
2	1(0.20)	2(2.00)	2(0.20)	2(20.00)	2(1.00)
3	1(0.20)	3(2.50)	3(0.30)	3(30.00)	3(1.50)
4	1(0.20)	4(3.00)	4(0.40)	4(40.00)	4(2.00)
5	1(0.20)	5(3.50)	5(0.50)	5(50.00)	5(2.50)
6	2(0.25)	1(1.50)	2(0.20)	3(30.00)	4(2.00)
7	2(0.25)	2(2.00)	3(0.30)	4(40.00)	5(2.50)
8	2(0.25)	3(2.50)	4(0.40)	5(50.00)	1(0.50)
9	2(0.25)	4(3.00)	5(0.50)	1(10.00)	2(1.00)
10	2(0.25)	5(3.50)	1(0.10)	2(20.00)	3(1.50)
11	3(0.30)	1(1.50)	3(0.30)	5(50.00)	2(1.00)
12	3(0.30)	2(2.00)	4(0.40)	1(10.00)	3(1.50)
13	3(0.30)	3(2.50)	5(0.50)	2(20.00)	4(2.00)
14	3(0.30)	4(3.00)	1(0.10)	3(30.00)	5(2.50)
15	3(0.30)	5(3.50)	2(0.20)	4(40.00)	1(0.50)
16	4(0.35)	1(1.50)	4(0.40)	2(20.00)	5(2.50)
17	4(0.35)	2(2.00)	5(0.50)	3(30.00)	1(0.50)
18	4(0.35)	3(2.50)	1(0.10)	4(40.00)	2(1.00)
19	4(0.35)	4(3.00)	2(0.20)	5(50.00)	3(1.50)
20	4(0.35)	5(3.50)	3(0.30)	1(10.00)	4(2.00)
21	5(0.40)	1(1.50)	5(0.50)	4(40.00)	3(1.50)
22	5(0.40)	2(2.00)	1(0.10)	5(50.00)	4(2.00)
23	5(0.40)	3(2.50)	2(0.20)	1(10.00)	5(2.50)
24	5(0.40)	4(3.00)	3(0.30)	2(20.00)	1(0.50)
25	5(0.40)	5(3.50)	4(0.40)	3(30.00)	2(1.00)

1.2.4 多态性 SRAP 引物组合的筛选 根据上述试验结果确定的 SRAP-PCR 最佳反应体系,随机选取 10 条正向引物及 10 条反向引物组合成 40 个 SRAP 引物组合(表 3、4),对 2 份光核桃材料(P-101 和 P-201)进行多态性 SRAP 引物组合的筛选。

表 3 SRAP 引物序列

正向引物 物编号	序列(5'~3')	反向引物 物编号	序列(5'~3')
Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	Em1	GACTGCGTACGAATTAAC
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	Em2	GACTGCGTACGAATTAAT
Me3	TGAGTCCAAACCGGAGG	Em3	GACTGCGTACGAATTGAC
Me4	TGAGTCCAAACCGGACG	Em4	GACTGCGTACGAATTGCA
Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	Em5	GACTGCGTACGAATTTGA
Me6	TGAGTCCAAACCGGAGA	Em6	GACTGCGTACGAATTATT
Me7	TGAGTCCAAACCGGACC	Em7	GACTGCGTACGAATTCAG
Me8	TGAGTCCAAACCGGTAG	Em8	GACTGCGTACGAATTTGC
Me9	TGAGTCCAAACCGGAAT	Em9	GACTGCGTACGAATTCAG
Me10	TGAGTCCAAACCGGTCA	Em10	GACTGCGTACGAATTGCT

表 4 待筛选的 40 个 SRAP 引物组合

编号	引物组合	编号	引物组合	编号	引物组合	编号	引物组合
1	Me1+Em1	11	Me3+Em7	21	Me6+Em3	31	Me8+Em6
2	Me1+Em2	12	Me3+Em9	22	Me6+Em6	32	Me8+Em10
3	Me1+Em3	13	Me4+Em3	23	Me6+Em8	33	Me9+Em1
4	Me1+Em4	14	Me4+Em4	24	Me6+Em10	34	Me9+Em5
5	Me2+Em2	15	Me4+Em7	25	Me7+Em3	35	Me9+Em8
6	Me2+Em7	16	Me4+Em10	26	Me7+Em4	36	Me9+Em9
7	Me2+Em8	17	Me5+Em5	27	Me7+Em6	37	Me10+Em1
8	Me2+Em9	18	Me5+Em6	28	Me7+Em10	38	Me10+Em4
9	Me3+Em1	19	Me5+Em8	29	Me8+Em2	39	Me10+Em5
10	Me3+Em2	20	Me5+Em9	30	Me8+Em3	40	Me10+Em7

## 2 结果与分析

### 2.1 SRAP-PCR 正交实验设计的扩增结果分析

2.1.1 直观分析法评分 由图 1 可知,按何正文等<sup>[13]</sup>的方法进行评分,以条带数量丰富、清晰度高、背景低的原则,3 人各自依次给 25 个处理打分,最佳产物记为 25 分,与此相反,最差的记为 1 分,取 3 人打分的平均值为各处理的最终得分。1~25 编号的得分依次为:1、2、7、17、20、8、11、14、21、4、9、10、13、3、22、25、18、16、19、24、15、12、6、5、23;重复电泳的得分依次为:8、14、18、23、2、13、19、6、15、12、17、24、21、3、4、25、22、10、11、16、7、5、1、9、20。2 次电泳均是 16 组合得分最高,扩增带数最多,带型清晰,亮度高,且杂带少,扩增效果最好。

2.1.2 各因素对 PCR 反应影响的差异分析 将上述处理和评分结果用统计软件 DPS 进行方差分析,结果见表 5。由  $F$  值可知,引物浓度对反应结果影响最大, $Mg^{2+}$  浓度的影响最小,各因素水平的变化对 PCR 反应的影响从大到小依次为:引物、dNTPs、 $Taq$  酶、模板 DNA、 $Mg^{2+}$ 。除  $Mg^{2+}$  和模板 DNA 水平间的差异未达到显著水平,其它因素水平间的差异均达到极显著水平。

表 5 PCR 各反应因素的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	$F$ 值	$P$
dNTPs	2 233.4000	4	558.3500	5.1560**	0.0507
$Mg^{2+}$	260.4000	4	65.1000	0.2270	0.9123
引物	3 924.4000	4	981.1000	6.9430**	0.0284
模板 DNA	275.0000	4	68.7500	0.2570	0.8937
$Taq$ 酶	1 052.4000	4	263.1000	3.3350**	0.1094

注:\*\*表示 0.01 水平差异显著。

2.1.3 因素内各水平对 PCR 结果的影响 为确定因素内水平对 PCR 结果的影响,参照张丽等<sup>[14]</sup>的方法,对各组分浓度组合的正交实验结果进行统计分析(表 6),其中  $T$  值代表某水平下某因子参与反应所产生的扩增条带的总和; $X$  值代表某因子在某水平参与反应所产生的扩增条带的平均值。 $X$  值同时反应了影响因素各水平对反应体系的影响情况, $X$  值越大,反应水平越好,从  $X$  值结果来看,dNTPs 以水平 4 好,引物以水平 4 好, $Mg^{2+}$  以水平 5 好,模板 DNA 以水平 2 好, $Taq$  DNA 聚合酶以水平 5 好,即 dNTPs 0.35 mmol/L、引物 0.40  $\mu$ mol/L、 $Mg^{2+}$  3.5 mmol/L、模板 DNA 20 ng、 $Taq$  DNA 聚合酶 2.5 U。该组合与直观分析得出的最高得分组合 16 最接近,仅  $Mg^{2+}$  浓度有差异,其他各组分浓度均一致。该结果与直观分析得出的结果一致,进一步确定组合 16 为最佳组合。

表 6 正交实验结果的统计分析

项目	dNTPs	$Mg^{2+}$	引物	模板 DNA	$Taq$ DNA 聚合酶
T1	12.0	21.0	9.0	20.0	19.0
T2	17.0	14.0	18.0	21.0	21.0
T3	16.0	14.0	17.0	19.0	16.0
T4	35.0	17.0	31.0	18.0	17.0
T5	18.0	32.0	23.0	20.0	25.0
X1	2.4	4.2	1.8	4.0	3.8
X2	3.4	2.8	3.6	4.2	4.2
X3	3.2	2.8	3.4	3.8	3.2
X4	7.0	3.4	6.2	3.6	3.4
X5	3.6	6.4	4.6	4.0	5.0

### 2.2 反应体系的验证及多态性引物组合的筛选

综合上述结果,最终确定光核桃最佳的 SRAP 反应体系,在 25  $\mu$ L 的反应体系中,包括 2.5  $\mu$ L 10 $\times$ buffer, 0.35 mmol/L dNTPs, 1.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.4  $\mu$ mol/L 引物, 20 ng 模板 DNA 和 2.5U  $Taq$  DNA 聚合酶。应用该反应体系,随机组合 40 个 SRAP 引物组合对 2 份光核桃材料进行了 SRAP 扩增见图 2。结果表明,①在筛选的 40 个引物组合中,30 个引物组合扩增得到清晰稳定的谱带,占总数的 75%,表明该反应体系具有较好的稳定性;在有扩增产物的 30 个引物组合中有 23 个引物组合扩增出多态性条带,占总数的 57.5%。②23 个具有多态性的引物组合扩增出的条带总数为 144 个,平均每个引物组合扩增出 6.3 个;具有多态性的条带有 80 个,占总条带数的 55.6%,平均每个引物组合扩增出的多态性条带为 3.5 个。③不同引物组合检测到的多态性位点数目存在很大差异,变异幅度为 1~8,其中引物组合 Me1+Em2 检测到的多态性位点数目最多为 8 个,其次为组合 Me3+Em7 和 Me4+Em10 为 6 个,3 个引物组合(Me2+Em2、Me5+Em5 和 Me10+Em1)检测到的多态性位点最少,只有 1 个(表 7)。

表 7 23 个多态性引物组合的扩增结果

引物组合	扩增带数	多态性带数	多态性比率/%	引物组合	扩增带数	多态性带数	多态性比率/%
Me1+Em1	6	5	83.3	Me4+Em10	7	6	85.7
Me1+Em2	10	8	80.0	Me5+Em5	6	1	16.7
Me1+Em4	7	5	71.4	Me5+Em6	4	2	50.0
Me2+Em2	3	1	33.3	Me6+Em6	6	2	33.3
Me2+Em7	7	4	57.1	Me6+Em10	6	3	50.0
Me2+Em9	4	3	75.0	Me7+Em3	9	3	33.3
Me3+Em1	5	5	100.0	Me7+Em6	5	3	60.0
Me3+Em2	2	2	100.0	Me8+Em3	11	3	27.3
Me3+Em7	8	6	75.0	Me8+Em10	4	3	75.0
Me3+Em9	7	4	57.1	Me10+Em1	5	1	20.0
Me4+Em4	7	3	42.9	Me10+Em7	7	2	28.6
Me4+Em7	8	5	62.5				

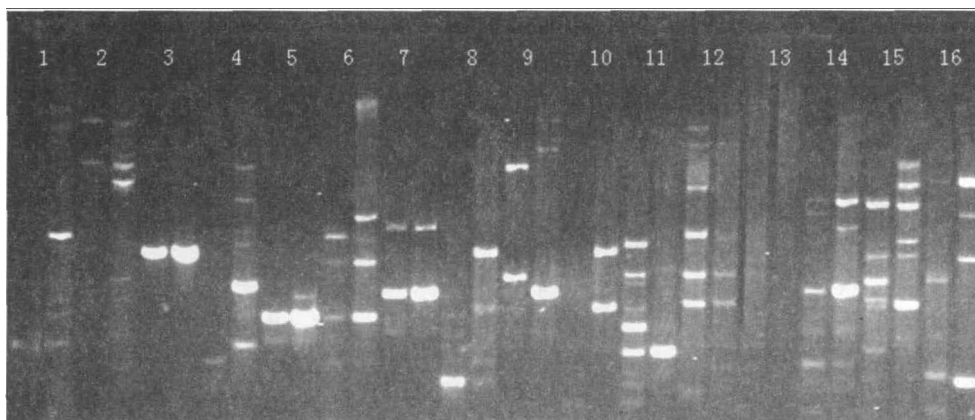


图2 优化的 SRAP-PCR 反应体系在部分引物组合中的扩增结果

注:1~16:引物组合见表4;试验材料是 P-101 和 P-201 从左至右的每个引物组合。

### 3 讨论

在 PCR 反应体系中各个因素间都会发生相互作用,如 *Taq* DNA 聚合酶是  $Mg^{2+}$  依赖型酶,受  $Mg^{2+}$  浓度的影响,而  $Mg^{2+}$  的最终反应浓度还受体系中其它因素,尤其是 dNTP 的影响,当 dNTP 浓度较高时,会对  $Mg^{2+}$  产生拮抗作用,从而使实际反应中的  $Mg^{2+}$  浓度下降,而正交实验设计进行 PCR 反应体系优化的方法可以综合考察各因素之间的互作,所以更适合于 PCR 反应体系的优化。同时各个因素对反应体系试验结果的影响大小也有差异,该试验结果表明引物浓度是 PCR 反应体系最大的影响因素, $Mg^{2+}$  影响最小,这与前人研究结果<sup>[15-16]</sup> 不一致。出现这样的差异主要原因是反应体系 DNA 的物种差异,且各因素设定的水平及正交表有差异。因此不能判定 SRAP-PCR 反应体系最大的影响因素。

在对 SRAP 与其他分子标记的比较研究中,Ferrio 等<sup>[5]</sup> 应用 SRAP 和 AFLP 标记对观赏南瓜种植资源进行了遗传多样性分析,结果表明,SRAP 标记与 AFLP 标记所检测的遗传多样性较一致,且 SRAP 标记提供的信息比 AFLP 标记更接近于外部性状的变异和历史演变的结果。Budak 等<sup>[17]</sup> 利用 SRAP、RAPD、SSR 和 ISSR 4 种标记系统分析野牛草遗传多样性,研究结果证实,SRAP 多态性丰富,适合应用于野牛草近缘栽培种遗传多样性研究。该试验采用 40 个引物组合对 2 份光核桃材料进行引物筛选,其结果表明 23 个引物组合具有多态性,共得到 144 个条带,其中多态性条带为 80 个,比率为 55.6%。结果表明,SRAP 应用于光核桃同样具有丰富的多态性,同时也验证了琼脂糖在 SRAP 分析中的有效性,否定了琼脂糖不适合进行 SRAP 检测的说法。

该试验利用正交实验设计对光核桃 SRAP-PCR 反应体系进行优化,得到的最佳反应体系为:2.5  $\mu$ L 10×

buffer,0.35 mmol/L dNTPs,1.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ ,0.4  $\mu$ mol/L 引物,20 ng 模板 DNA 和 2.5 U *Taq* DNA 聚合酶,总体积为 25  $\mu$ L。该反应体系及 23 个多态性引物组合可用于光核桃的种源鉴定、遗传多样性分析、优良性状标记和遗传图谱构建等方面。

### 参考文献

- [1] 宗学普,段玉春.光核桃的分布及其类型初探[M].西藏作物品种资源考察文集.北京:中国农业科技出版社,1987:184-185.
- [2] 蔡长河,钟明,黄炳雄,等.西藏野桃资源及其综合加工利用[J].广东农业科学,1997(6):25-26.
- [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]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 455-461.
- [4] 曹珂,王力荣,朱更瑞,等.桃遗传图谱的构建及两个花性状的分子标记[J].园艺学报,2009,36(2):179-186.
- [5] 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.
- [6] 张四普,汪良驹,曹尚银,等.23 个石榴基因型遗传多样性的 SRAP 分析[J].果树学报,2008,25(5):655-660.
- [7] Li G, Gao M, Yang B, et al. Gene for gene alignment between the Brassica and Arabidopsis genomes by direct transcriptome mapping[J]. Theor Appl Genet, 2003, 107: 168-180.
- [8] 曾逢刚,吴转娣,曾淇,等.荔枝种质遗传多样性的 SRAP 分析[J].分子植物育种,2009,7(3):562-568.
- [9] 董星光,樊丽,王志刚,等.梨 SRAP 体系的正交优化研究[J].江苏农业科学,2009(2):51-53.
- [10] 吴鑫,雷天刚,何永睿,等.柑桔 SRAP 和 ISSR 分子标记技术体系的建立与优化[J].分子植物育种,2008,6(1):170-176.
- [11] 乔燕春,林顺权,刘成明,等. SRAP 分析体系的优化及在枇杷种质资源研究上的应用[J].果树学报,2008,25(3):348-352.
- [12] 闫苗苗,魏光,潘效红,等.一种适用于动物与植物总 DNA 提取的方法—改良 CTAB 法[J].安徽农业科学,2008,36(20):8488-8558.
- [13] 何正文,刘云生,陈立华,等.正交实验直观分析法优化 PCR 条件[J].湖南医科大学学报,1998,23(4):403-404.

- [14] 张丽,周兰英,肖千文,等. 正交试验设计在建立杜鹃花 RAPD-PCR 反应体系中的应用[J]. 北方园艺,2007(5):124-126.
- [15] 郑铁琦,王志勇,郭海林,等. 正交设计优化假俭草 SRAP-PCR 反应体系及引物筛选[J]. 草业学报,2008,17(4):110-117.
- [16] 陈万胜,王元英,罗成刚,等. 利用正交设计优化烟草 SRAP 反应体系 [J]. 分子植物育种,2008,6(1):177-182.
- [17] 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]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109:280-288.

## Optimization for SRAP-PCR System and Selection of Primers on *Prunus mira* Koehne from Tibet

TAN Jiang-ping<sup>1</sup>, ZENG Xiu-li<sup>2,3</sup>, LIAO Ming-an<sup>1</sup>, QIU Li-na<sup>1</sup>, WANG Yu-xia<sup>2</sup>, CIREN Zhuo-ga<sup>2</sup>

(1. Horticulture of College, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014; 2. Institute of Vegetables, Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Lasa, Tibet 850030; 3. Maize Research Institute, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014)

**Abstract:** The orthogonal design was used to optimize the sequence-related amplified polymorphism (SRAP) reaction system for *Prunus mira* Koehne, which involved 5 factors, i. e. dNTPs,  $Mg^{2+}$ , primer, template DNA and *Taq* DNA polymerase, each at 5 levels, and primers were screened. The results showed that an optimal 25  $\mu$ L reaction system of SRAP for *Prunus mira* Koehne included 2.5  $\mu$ L  $10\times$  buffer, 0.35 mmol/L dNTPs, 1.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.4  $\mu$ mol/L primer, 20 ng template DNA and 2.5 U *Taq* DNA polymerase. Each factor had a different effect on the results of PCR. Concentration of dNTPs had the greatest effect and template DNA had the least effect. At the same time, 23 primer combinations were selected with the optimized system among 40 primer combinations, which had abundant polymorphism bands. The optimized SRAP-PCR system and polymorphism primer combinations could be applied, to molecular genetics research of *Prunus mira* Koehne.

**Key words:** *Prunus mira* Koehne; SRAP; orthogonal design; optimization of system; selection of primers

## 冬季大棚菜农药使用注意事项

- 1 不要活水配药 因为活水中杂质多,用其配药易堵塞喷雾器的喷头,同时还会破坏药液悬浮性而产生沉淀。
- 2 不要随意加大水量 过量加水会使农药的浓度降低。喷洒在作物上只留下极少量的农药,不足以将害虫杀死,而且有些农药甚至会完全失效。过量加水还会造成农药的流失,导致环境污染。配制农药时,要按使用浓度范围,严格控制加水量。
- 3 不要随意加大农药用量 农药在获准生产销售之前,都要经过严格的田间药效试验,然后确定用药量、用药时间、施药次数等实际使用数据。因此,按照使用说明书上规定的用量施药,即能达到防治效果。
- 4 不宜在开花期喷施农药 农作物开花期,其组织幼嫩,抗逆能力弱,容易发生药害,因而喷药时必须避开花期。
- 5 不宜在采收前喷施农药 一般高效剧毒农药残留期限 60 d 左右,高效低毒农药残留期为 15 d 左右。因此,在蔬菜采收前要禁止施药,以免发生食物中毒。