

研究报告

Research Report

菊芋 SRAP-PCR 反应体系优化及引物筛选

韩睿[✉], 赵孟良[✉], 马胜超[✉], 李莉[✉]

青海省农林科学院菊芋研发中心, 青海省蔬菜遗传与生理重点实验室, 西宁, 810016

✉通讯作者: yyslili@163.com; ✉作者

分子植物育种, 2012 年, 第 10 卷, 第 10 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0010

收稿日期: 2012 年 02 月 17 日

接受日期: 2012 年 03 月 06 日

发表日期: 2012 年 04 月 23 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

韩睿等, 2012, 菊芋 SRAP-PCR 反应体系优化及引物筛选, 分子植物育种(online) Vol.10 No.10 pp.1080-1086 (doi: 10.5376/mpb. cn.2012.10.0010)

引用格式(英文):

Han et al., 2012, Optimization of SRAP-PCR Reaction System and Selection of Primers for Jerusalem Artichoke, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.10 pp.1080-1086 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0010)

摘要 本研究以菊芋为材料, 通过单因子优化试验和 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计对影响 SRAP-PCR 扩增结果的重要参数进行探讨, 建立了适合菊芋 SRAP-PCR 分析的反应体系, 即 20 μ L 反应体系中含 10 \times PCR 扩增缓冲液, 2.5 mmol/L Mg^{2+} , 0.24 mmol/L dNTPs, 0.25 μ mol/L 正反引物, 0.8 U *Taq* DNA 聚合酶和 80 ng 模板 DNA。利用该优化体系进行稳定性检测, 并从 110 个 SRAP 引物组合中筛选出 100 个具有扩增条带清晰丰富且重复性好的引物组合和 22 个清晰且多态性高的引物组合, 表明该体系稳定可靠, 并且能够有效地用于菊芋种质资源鉴定及遗传多样性分析等研究。

关键词 菊芋; SRAP-PCR; 反应体系; 优化; 引物筛选

Optimization of SRAP-PCR Reaction System and Selection of Primers for Jerusalem Artichoke

Han Rui[✉], Zhao Mengliang[✉], Ma Shengchao[✉], Li Li[✉]

Research and Development Center of Jerusalem artichoke; Qinghai Provincial Laboratory of Vegetable Genetics and Physiology, Qinghai Academy of Agriculture and Forestry, Xining, 810016

✉Corresponding author: yyslili@163.com; ✉ Authors

Abstract In this research, the genome DNA of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) was used to be a template for establishing a suitable SRAP-PCR reaction system through optimizing the significant parameters in SRAP reaction. The optimizing methods were single factor test and orthogonal design. The result shows that the optimal PCR (20 μ L) mixture contains 10 \times PCR buffer, 2.5 mmol/L Mg^{2+} , 0.24 mmol/L dNTPs, 0.25 μ mol/L forward and reverse primers, 0.8 U *Taq* DNA polymerase and 80ng template DNA. After the system stability was tested, the 100 primer combinations which have clear, abundant and stable bands, and the 22 primer combinations which have highly polymorphic bands, were screened out from the total 110 primer combinations through the optimized system. This shows the optimized system is stable and reliable, and it can be effectively used for the germplasm identification and the analysis of genetic diversity in Jerusalem artichoke.

Keywords Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.); SRAP-PCR; Reaction system; Optimization; Primer screening

研究背景

菊芋(*Helianthus tuberosus* L.)俗称洋姜、鬼子姜, 为菊科向日葵属多年生草本植物。菊芋具有很强的生态适应性, 耐寒、耐旱、耐贫瘠、耐盐碱, 地下块茎和地上茎叶除了可做优良的饲料外, 块茎富含菊糖, 有特殊的保健和抗癌作用, 茎秆富含纤

维可以做成高密度纤维板(薛延丰等, 2006), 具有很高的推广应用和研究价值。目前国内外对菊芋的相关研究大多集中在新品种选育与生态治理(孔涛等, 2009)、食品加工(周正等, 2008)、栽培技术、生理生化基础(钟启文等, 2009; 黄高峰等, 2011)等方面, 在分子水平上对其种质资源进行遗传多样性的

研究尚未见报道。

相关序列扩增多态性(Sequence-related amplified polymorphism, SRAP)是一种新型的基于 PCR 的标记系统, 为显性标记, 是由美国加州大学 Li 与 Quiros 博士于 2001 年提出的(Li and Quiros, 2001)。它针对基因外显子 GC 含量丰富而启动子、内含子 AT 含量丰富的特点来设计引物对 ORFs (openreading frames)进行扩增, 具有简便稳定、重复性好、产率高、便于克隆目标片段等优点, 已广泛应用于图谱构建、遗传多样性分析等方面的研究, 得到了较满意的结果(张俊卫等, 2011; 李怀志等, 2011)。本研究通过对菊芋 SRAP-PCR 反应系统中的重要参数先后进行单因子和正交优化, 并通过稳定性检测, 成功建立其最佳反应体系, 同时为后续应用该分子标记技术开展菊芋种质资源遗传多样性等方面的研究奠定基础。

1 结果与分析

1.1 Mg^{2+} 浓度对 SRAP-PCR 的影响

Mg^{2+} 浓度显著影响着 SRAP 的扩增效率以及产物的量和特异性, 浓度过低会影响 PCR 扩增产量甚至导致扩增失败, 浓度过高则会降低 PCR 扩增的特异性。本试验通过比较 5 个 Mg^{2+} 浓度梯度发现不同浓度间扩增结果存在显著差异。由图 1 可见, 当 Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L 时, 扩增条带较弱; 当浓度等于或大于 3.0 mmol/L 时, 扩增条带较少且较弱; 当浓度在 2.0 mmol/L~2.5 mmol/L 之间时, 扩增条带较多, 谱带清晰, 且特异性条带和非特异性条带对比鲜明, 因此 Mg^{2+} 浓度范围应该选择大于等于 2.0 mmol/L 且小于 3.0 mmol/L。

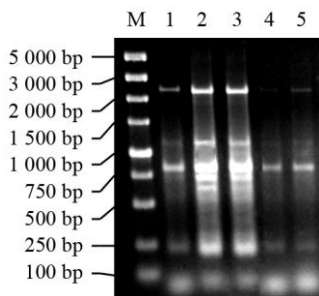


图 1 不同 Mg^{2+} 浓度的 SRAP 反应结果

注: M: DNA Marker DSTM 5000; 1~5: Mg^{2+} 浓度分别为 1.5 mmol/L、2.0 mmol/L、2.5 mmol/L、3.0 mmol/L、3.5 mmol/L
Figure 1 Results of SRAP at different Mg^{2+} concentrations
Note: M: DNA Marker DSTM 5000; 1~5: Mg^{2+} concentrations were 1.5 mmol/L、2.0 mmol/L、2.5 mmol/L、3.0 mmol/L、3.5 mmol/L respectively

1.2 dNTPs 浓度对 SRAP-PCR 的影响

dNTPs 作为 SRAP 扩增反应的原料, 显著影响合成效率和扩增的忠实性。由图 2 可见, 当 dNTPs 浓度为 0.1 mmol/L 时, 扩增产物谱带较弱; 当 dNTPs 浓度在 0.15 mmol/L~0.2 mmol/L 时, 扩增的条带完整, 且清晰明亮; 当 dNTPs 浓度高于 0.25 mmol/L 时, 扩增的效果明显减弱, 且随着浓度的增加, 特异性条带减少。因此 dNTPs 浓度范围应该在 0.15 mmol/L~0.25 mmol/L。

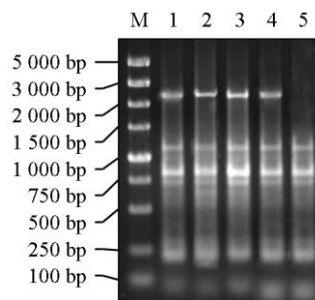


图 2 不同 dNTPs 浓度的 SRAP 反应结果

注: M: DNA Marker DSTM 5000; 1~5: dNTPs 浓度分别为 0.1 mmol/L、0.15 mmol/L、0.2 mmol/L、0.25 mmol/L、0.3 mmol/L
Figure 2 Results of SRAP at different dNTPs concentrations
Note: M: DNA Marker DSTM 5000; 1~5: dNTPs concentrations were 0.1 mmol/L、0.15 mmol/L、0.2 mmol/L、0.25 mmol/L、0.3 mmol/L respectively

1.3 引物浓度对 SRAP-PCR 的影响

引物是 PCR 特异性反应的关键, 在退火时与模板 DNA 结合, 启动 DNA 扩增。本试验采用相同的上、下游引物浓度, 当浓度为 0.1 μ mol/L 时, 扩增条带相对较弱; 随着引物浓度的增加, 条带渐清晰和稳定, 且扩增结果相差不大, 考虑到节约引物的用量, 故引物适宜的浓度范围为 0.2 μ mol/L~0.4 μ mol/L。(图 3)

1.4 Taq DNA 聚合酶对 SRAP-PCR 的影响

TaqDNA 聚合酶是 SRAP 扩增反应的重要参数。本试验中 Taq DNA 聚合酶浓度对扩增结果影响不大, 谱带的扩增效果较一致(图 4)。在用量为 1.25 U 时, 扩增条带最为清晰和明亮, 其余都有模糊现象, 分离界限不够清晰。因此从经济因素考虑, 可供选择的 Taq DNA 聚合酶适宜浓度范围为 0.5 U~1.25 U。

1.5 模板浓度对 SRAP-PCR 的影响

模板 DNA 浓度是制约扩增产量及特异性的一个因素, 选择适宜的模板量是保证扩增的重要前提。本试验通过比较不同模板浓度对扩增结果的影响, 结果显示: 在设定的 DNA 模板质量范围内, 都能扩出完

整条带(图 5), 但随着模板浓度的增加, 谱带逐渐清晰和明亮, 当浓度大于 80 ng 时, 扩增基本相同, 为节约模板, 我们选用模板浓度的范围为 40 ng~80 ng。

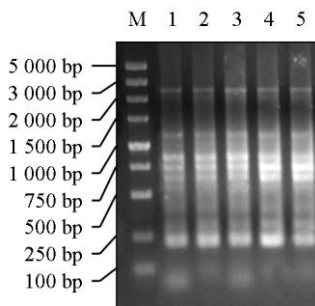


图 3 不同引物浓度的 SRAP 反应结果

注: M: DNA Marker DSTM 5000; 1~5: 引物浓度分别为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、0.3 $\mu\text{mol/L}$ 、0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、0.5 $\mu\text{mol/L}$
Figure 3 Results of SRAP at different primer concentrations
Note: M: DNA Marker DSTM 5000; 1~5: primer concentrations were 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、0.3 $\mu\text{mol/L}$ 、0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、0.5 $\mu\text{mol/L}$ respectively

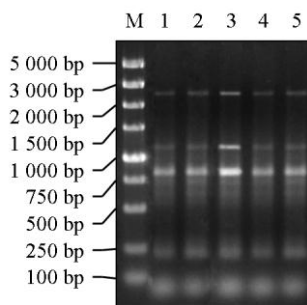


图 4 不同 *Taq* DNA 聚合酶浓度的 SRAP 反应结果

注: M: DNA Marker DSTM 5000; 1~5: *Taq* DNA 聚合酶浓度分别为 0.5 U、1.0 U、1.25 U、1.5 U、2.0 U
Figure 4 Results of SRAP at different *Taq* DNA polymerase concentrations
Note: M: DNA Marker DSTM 5000; 1~5: *Taq* DNA polymerase concentrations were 0.5 U、1.0 U、1.25 U、1.5 U、2.0 U respectively

1.6 PCR 正交试验设计的直观分析

按表 3 设计的 16 个处理以 me9 和 em1 组合作为引物, 对青芋 1 号菊芋基因组 DNA 进行 SRAP 扩增。从图 6 的电泳结果可以看出, 不同组合扩增的结果存在明显差异。13、14、15 和 16 处理扩增条带少且弱, 特异性条带缺失, 重复不一致, 可能由于这四个处理相比其它处理 Mg^{2+} 浓度较高所致。1、2 号处理扩增条带弱, 可能由于这两个体系中 PCR 主要因素的浓度都较低。4、5、6、8 和 9 号处理扩增条带有的很弱, 有的有不同程度的弥散现象, 也有的特异性条带缺失, 可能是这些组合由于正交设计各个因素梯度的不同, 其偏离最优组合比较远, 导

致扩增结果不显著。3、7 和 10 号处理两个重复不一致。11 和 12 号处理, 条带清晰明亮, 重复一致, 但 12 号处理特异性条带缺失, 可能是该处理相对 dNTPs 浓度过大所致。根据扩增谱带的特异性、数量、亮度的强弱和有无弥散现象进行综合性评价, 11 号处理扩增清晰度高、条带数多、且特异性条带和非特异性条带对比鲜明, 因此可以将其定为最优组合, 即 20 μL 反应体系中含 10 \times PCR 扩增缓冲液, 2.5 mmol/L Mg^{2+} , 0.24 mmol/L dNTPs, 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 正反引物, 0.8 U *Taq* DNA 聚合酶和 80 ng 模板 DNA。

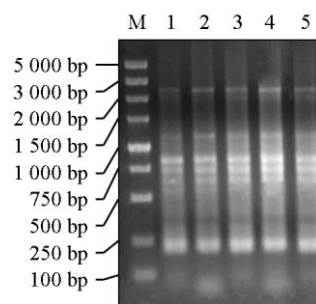


图 5 不同 DNA 浓度的 SRAP 反应结果

注: M: DNA Marker DSTM 5000; 1~5: DNA 浓度分别为 20 ng、40 ng、60 ng、80 ng、100 ng
Figure 5 Results of SRAP at different DNA concentrations
Note: M: DNA Marker DSTM 5000; 1~5: DNA concentrations were 20 ng、40 ng、60 ng、80 ng、100 ng respectively

1.7 稳定性检测

根据上述优化试验的最终结果, 以 me9/em1 引物组合对不同菊芋种质资源模板 DNA 进行 SRAP-PCR 扩增, 结果表明, 10 种菊芋材料均能扩增出清晰、多态性好的谱带(图 7)。同时, 以青芋 1 号菊芋 DNA 为模板随机选择 10 个 SRAP 引物组合进行扩增, 也得到了较好的指纹图谱(图 8)。由此可见, 优化确定的菊芋 SRAP-PCR 体系具有稳定可靠、重复性好、多态性较强等特点, 可用于菊芋种质资源的分子鉴定和遗传多样性分析等研究。

1.8 SRAP 引物筛选

以青芋 1 号、青芋 2 号及青芋 3 号菊芋 DNA 为模板, 利用优化的反应体系对表 2 设计的所有 SRAP 引物进行扩增。结果表明: 110 对引物组合均能扩增出条带, 其中 100 对扩增出的谱带清晰稳定且丰富, 所占比率为 90.91%, 说明 SRAP 分子标记有很强的适用性; 本试验共以 3 个菊芋 DNA 为模板能够筛选出 22 对具有多态性的引物组合, 多态率为 20%, 相对多态性较高。其中, 部分引物组合扩增结果见图 9。

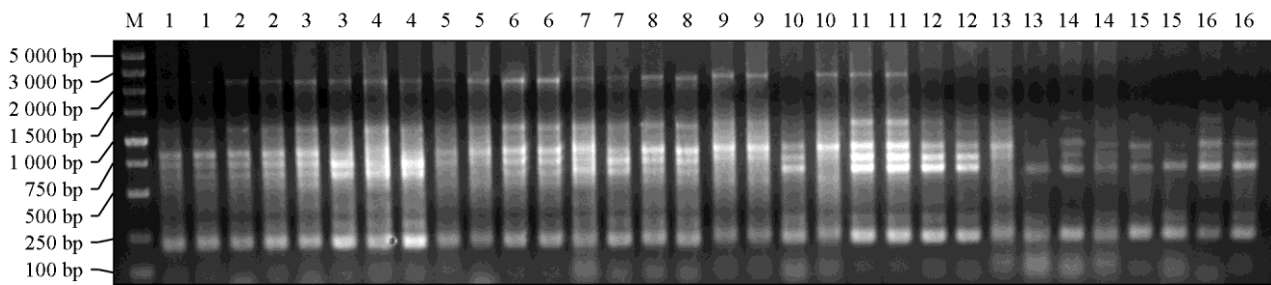


图 6 正交设计 SRAP-PCR 反应体系扩增结果
注: M: DNA Marker DSTM 5000; 1~16: 处理编号(表 3)

Figure 6 Results of SRAP-PCR by orthogonal design on amplification

Note: M: DNA Marker DSTM 5000; 1~16 are the treatment numbers, treatments as that showed in table 3

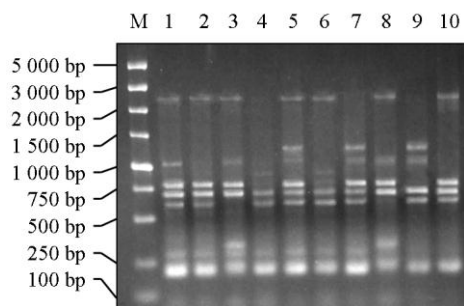


图 7 引物 me9/em1 对 10 个模板 DNA 的扩增结果
注: M: DNA Marker DSTM 5000; 1~10: 模板分别为 W12, W13, W16, W42, W43, W50, W54, W72, S150, S138
Figure 7 Amplification results of the 10 templates by me9/em1
Note: M: DNA Marker DSTM 5000; 1~10: DNA were W12, W13, W16, W42, W43, W50, W54, W72, S150, S138 respectively

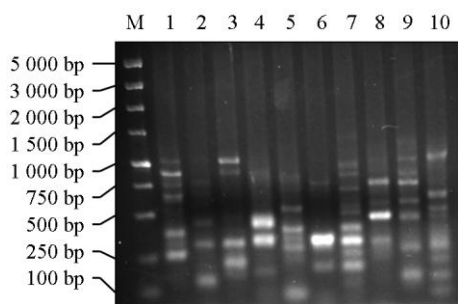


图 8 10 个 SRAP 引物组合的扩增结果
注: M: DNA Marker DSTM 5000; 1~10: 引物组合分别为 me5-em1, me5-em8, me6-em3, me7-em6, me7-em8, me9-em5, me9-em6, me9-em11, me10-em1, me10-em5
Figure 8 Application results of the ten random primers
Note: M: DNA Marker DSTM 5000; 1~10: primer pairs were me5-em1, me5-em8, me6-em3, me7-em6, me7-em8, me9-em5, me9-em6, me9-em11, me10-em1, me10-em5 respectively

2 讨论

影响 SRAP 扩增结果的因素有很多, 不同物种的反应条件各不相同, 因此, 应用 SRAP 标记时应该首先对其反应体系进行优化。国内有关

SRAP-PCR 反应体系优化的研究大多仍采用单因素试验方法, 需要进行多次梯度试验, 过程繁琐且不能兼顾到各因素间的交互作用(杨珺等, 2010; 李双双等, 2007)。为了提高分析的准确性, 并且获得清晰、稳定性好、重复性高的 SRAP-PCR 谱带, 本试验首先采用单因素方法确定各因素的浓度范围, 降低单个因素浓度对试验结果的影响, 再通过正交设计的方法, 对菊芋 SRAP-PCR 反应体系从 Mg²⁺、dNTPs、引物、Taq DNA 聚合酶及模板 5 种因素在 4 个水平上进行优化, 进一步降低各因素间互作效应对结果的干扰, 从而提高试验的精确性。

在菊芋 SRAP 体系优化的过程中, 发现 Mg²⁺、dNTPs 及模板 DNA 浓度会显著影响 SRAP 扩增效果, 而引物浓度和 Taq DNA 聚合酶浓度对扩增无显著影响, 优化时可以考虑经济因素等原因选择适宜的浓度。但本试验优化体系中各组分的用量与菊苣(罗燕等, 2010)、芦笋(盛文涛等, 2010)、苜蓿(刘立军等, 2006)等植物的用量均有不同, 这可能是由于不同植物所用试剂产地及基因组大小不同所致。通过优化, 本课题组成功建立了菊芋 SRAP-PCR 最佳反应体系, 即 20 uL 反应体系中含 10×PCR 扩增缓冲液, 2.5 mmol/L Mg²⁺, 0.24 mmol/L dNTPs, 0.25 umol/L 正反引物, 0.8 U TaqDNA 聚合酶和 80 ng 模板 DNA, 该体系在各菊芋材料和不同的引物组合中均表现出良好的稳定性、重复性及丰富的多态性。同时, 利用该体系进一步筛选出一批带型清晰、稳定性强且重复性好的 SRAP 引物对, 表明该优化体系能够满足菊芋 SRAP-PCR 扩增的要求, 同时也能很好的进行后续实验。目前, 本课题组正在利用该体系开展菊芋种质资源遗传多样性的研究, 已经获得了较好的研究结果。

3 材料与方法

3.1 材料

本试验选用的材料为“青芋 1 号”、“青芋 2 号”、“青芋 3 号”菊芋及相关菊芋种质资源, 种植于青

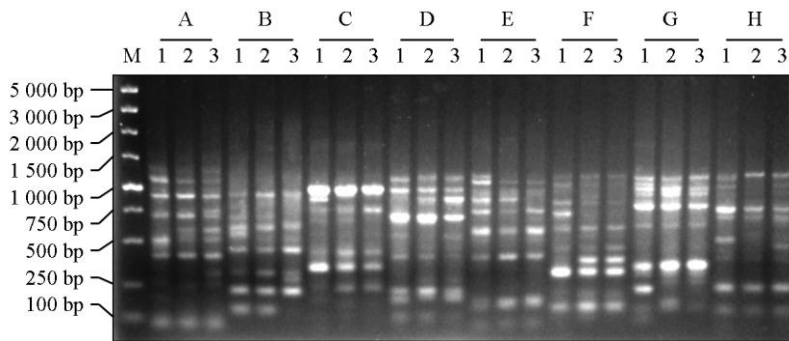


图9 部分引物组合扩增结果

注: M: DNA Marker DSTM 5000; 1~3: 模板分别为青芋 1 号, 青芋 2 号, 青芋 3 号; A~H: me1-em3, me1-em4, me1-em5, me1-em7, me1-em8, me1-em10, me2-em1, me2-em2

Figure 9 Amplification results of part primer combinations

Note: M: DNA Marker DSTM 5000; 1~3: DNA were Qingyu1, Qingyu2, Qingyu3; A~H: primer pairs were me1-em3, me1-em4, me1-em5, me1-em7, me1-em8, me1-em10, me2-em1, me2-em2 respectively

海省农林科学院园艺所菊芋资源圃。相关菊芋种质资源材料见表 1。

3.2 试剂

110 对 SRAP 引物参考 Li 等提出的原则设计合成, 具体序列见表 2, 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。Taq DNA 聚合酶及 dNTPs 购自北京全式金生物技术有限公司, DNA Marker 购自广州东盛生物科技有限公司。

3.3 DNA 提取

在研钵中加入少许石英砂和少许 PVP 干粉研磨 30 mg 硅胶干燥的菊芋叶片, 迅速移入装有已 65℃ 预热的 700 μL 2×CTAB 提取液(100 mmol/L Tris-HCl PH8.0, 20 mmol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl, 2% CTAB, 使用前加入 0.5% β-巯基乙醇)的 1.5 ml

离心管中, 充分混匀后于 65℃ 水浴保温 30 min, 不时将离心管上下颠倒摇匀。冷却至室温, 加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1), 颠倒混匀 10 min, 使内含物形成乳浊液, 10 000 r/min, 离心 10 min 取上清转入新的 1.5 ml 的离心管中, 再次加入等体积的氯仿/异戊醇抽一次。取上清加入 2/3 体积预冷的(-20℃)异丙醇, 于-20℃的冰箱中放置 30 min 或过夜。13 000 r/min, 离心 10 min 后倒出上清液收集沉淀, 加入 75% 的乙醇 500 μL 清洗沉淀, 10 000 r/min, 离心 6 min, 收集沉淀, 同样的方法再洗一遍后将沉淀于室温下自然风干, 加入 100 uL 的 TE 缓冲液(10 mmol/L, Tris-HCl, pH 8.0, 1.0 mmol/L EDTA)溶解 DNA, 用 2 μL RNaseA 于 37℃ 保温 30 min, 得到的 DNA 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 以 λ DNA HindIII 为标准, 检查所得 DNA 的分子量、含量、纯度及完整性, 作为母液 4℃ 或-20℃ 保存备用。

表 1 供试菊芋种质资源的名称及来源

Table 1 List of varieties and origin of Jerusalem artichoke

编号	名称	来源	编号	名称	来源
Number	Name	Origin	Number	Name	Origin
1	青芋 1 号	北京	8	W43	河南
	Qingyu 1	Beijing			Henan
2	青芋 2 号	山东	9	W50	湖南
	Qingyu 2	Shandong			Hunan
3	青芋 3 号	青海	10	W54	加拿大
	Qingyu 3	Qinghai			Canada
4	W12	北京	11	W72	辽宁
		Beijing			liaoning
5	W13	北京	12	S150	青海
		Beijing			Qinghai
6	W16	黑龙江	13	S138	青海
		Heilongjiang			Qinghai
7	W42	河南			
		Henan			

3.4 SRAP-PCR 基本反应体系及反应程序

20 μL PCR 反应体系包括: 10× 扩增缓冲液 2 μL; MgCl₂ (25mmol/L) 2 μL; dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μL; 引物(10 umol/L) 0.6 μL, 模板 DNA (50 ng/μL) 1 μL; DNA 聚合酶(2.5 U/L) 0.5 uL; 加入 ddH₂O 补齐到 20 μL。反应程序: 94℃ 预变性 5 min; 进入 5 个循环, 94℃ 变性 1 min, 35℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1 min; 再进入 35 个循环, 94℃ 变性 1 min, 50℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1 min; 然后 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。

3.5 SRAP-PCR 反应体系优化

3.5.1 单因素优化

在基本反应体系中分别将 Mg²⁺、dNTPs、引物、Taq DNA 聚合酶及模板 DNA 各因子浓度作如下调整: Mg²⁺ 浓度分别为 1.5 mmol/L、2.0 mmol/L、2.5 mmol/L、3.0 mmol/L 和 3.5 mmol/L; dNTPs 浓度分

别为 0.1 mmol/L、0.15 mmol/L、0.2 mmol/L、0.25 mmol/L 和 0.3 mmol/L; 引物用量分别为 0.1 μmol/L、0.2 μmol/L、0.3 μmol/L、0.4 μmol/L 和 0.5 μmol/L; *Tag* DNA 聚合酶用量分别为 0.5 U、1.0 U、1.25 U、1.5 U 和 2.0 U; 模板 DNA 用量分别为 20 ng、40 ng、60 ng、80 ng 和 100 ng, 从而进行单因子多水平试验。

3.5.2 正交试验设计

采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计, 按照表 3 的方案将 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、引物浓度、*Taq* DNA 聚合酶浓度以及 DNA 模板浓度进行正交组合。

根据表 3 配制 20 uL 总体积的 PCR 反应体系, 每管除表中的变化因素外还含有 2 ul $10 \times$ PCR buffer, 其余用 ddH₂O 补足 20 ul, 每处理设 2 次重复。PCR 反应结束后, 产物在 2.0% 琼脂糖凝胶中电泳, 经 EB 染色后, 凝胶成像系统进行拍照分析。

3.6 菊芋 SRAP-PCR 反应体系稳定性检测

利用优化的体系, 以 me9/em1 为引物选取 10 种菊芋 DNA 模板分别进行扩增, 并以“青芋 1 号”菊芋 DNA 为模板随机选择 10 种 SRAP 引物, 进行菊芋 SRAP-PCR 反应体系的稳定性检测。

表 2 SRAP 所用引物序列

Table 2 Primers sequence used in SRAP analysis

正向引物 Forward primers	序列 Sequence	反向引物 Reverse primers	序列 Sequence
me1	5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'	em1	5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3'
me2	5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'	em2	5'-GACTGCGTACGAATTTGC-3'
me3	5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'	em3	5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'
me4	5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'	em4	5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3'
me5	5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'	em5	5'-GACTGCGTACGAATTAAC-3'
me6	5'-TGAGTCCAAACCGGTAA-3'	em6	5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'
me7	5'-TGAGTCCAAACCGGTCC-3'	em7	5'-GACTGCGTACGAATTCAA-3'
me8	5'-TGAGTCCAAACCGGTGC-3'	em8	5'-GACTGCGTACGAATTCTG-3'
me9	5'-TAGGTCCAAACCGGTAG-3'	em9	5'-GACTGCGTACGAATTCGA-3'
me10	5'-TAGGTCCAAACCGGTGT-3'	em10	5'-GACTGCGTACGAATTCAG-3'
		em11	5'-GACTGCGTACGAATTCCA-3'

表 3 SRAP-PCR 反应体系的正交试验设计

Table 3 Factors in $L_{16}(4^5)$ orthogonal design and levels of SRAP-PCR amplification system

处理组合 Treatment	因素 Factors				
	Mg^{2+} (mmol/L)	dNTPs (mmol/L)	引物(μmol/L) Primer (μmol/L)	酶(U/20 uL) <i>Taq</i> DNA polymerase (U/20 uL)	模(ng) Template (ng)
1	2.0	0.16	0.25	0.6	50
2	2.0	0.2	0.3	0.8	60
3	2.0	0.24	0.35	1.0	70
4	2.0	0.28	0.4	1.2	80
5	2.25	0.16	0.3	1.0	80
6	2.25	0.2	0.25	1.2	70
7	2.25	0.24	0.4	0.6	60
8	2.25	0.28	0.35	0.8	50
9	2.5	0.16	0.35	1.2	60
10	2.5	0.2	0.4	1.0	50
11	2.5	0.24	0.25	0.8	80
12	2.5	0.28	0.3	0.6	70
13	2.75	0.16	0.4	0.8	70
14	2.75	0.2	0.35	0.6	80
15	2.75	0.24	0.3	1.2	50
16	2.75	0.28	0.25	1.0	60

作者贡献

韩睿、赵孟良、马胜超和李莉是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 韩睿、赵孟良及马胜超完成数据分析, 论文初稿的写作; 李莉参与实验设计, 试验结果分析, 指导论文修改; 韩睿是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家大宗蔬菜产业技术体系西宁综合试验站项目(CARS-25-G-49)资助。作者感谢青海省农林科学院菊芋研发中心各位老师在本实验过程中的帮助。

参考文献

- Huang G.F., Wang L.H., Fang Y.H., and Li L., 2011, Effects of drought stress on protective enzyme activity and membrane lipid peroxidation of leaf in *Helianthus tuberosus* L. seedling, *Xinan Nongye Xuebao* (Southwest China Journal of Agricultural Sciences), 24(2): 552-555 (黄高峰, 王丽慧, 方云花, 李莉, 2011, 干旱胁迫对菊芋苗期叶片保护酶活性及膜脂过氧化作用的影响, *西南农业学报*, 24(2): 552-555)
- Kong T., Wu X.Y., Liu L.L., and Yan H., 2009, Comparison study on growth rhythm and photosynthesis characteristics for two varieties of Jerusalem Artichoke in wind-sandy land, *Shanxi Nongye Kexue*, 37(7): 40-43, 47 (孔涛, 吴祥云, 刘玲玲, 闫晗, 2009, 风沙地 2 种菊芋生长节律及光合特性的比较研究, *山西农业科学*, 37(7): 40-43, 47)
- Li G., and Quiros C.F., 2001, Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica, *Theor. Appl. Genet.*, 103(2-3): 455-461 <http://dx.doi.org/10.1007/s001220100570>
- Li H.Z., Zhang J., Li X., and Chen H.Y., 2011, Genetic diversity analysis and fingerprinting of eggplant cultivars with SRAP markers, *Nanjing Nongye Daxue Xuebao* (Journal of Nanjing Agricultural University) 34(4): 18-22 (李怀志, 张峻, 李翔, 陈火英, 2011, 应用 SRAP 标记对茄子品种进行遗传多样性分析与指纹图谱构建, *南京农业大学学报*, 34(4): 18-22)
- Li S.S., Zhao R.H., Yan G.Q., and Hao G., Establishment & optimization of SRAP analysis system of potato genome, 2007, *Shanxi Shifan daxue Daxue Xuebao* (Journal of Shanxi Normal University), 21(4): 79-83 (李双双, 赵瑞华, 闫桂琴, 郜刚, 马铃薯基因组 SRAP 反应体系的建立和优化, 2007, *山西师范大学学报*, 21(4): 79-83)
- Liu L.J., Meng Z.Q., Xing X.L., and Peng D.X., 2006, Optimization for SRAP reaction system in ramie (*Boehmeria nivea* L. Guad), *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding), 4(5): 726-730 (刘立军, 蒙祖庆, 邢秀龙, 彭定祥, 2006, 苧麻基因组 SRAP 扩增体系的优化研究, *分子植物育种*, 4(5): 726-730)
- Luo Y., Bai S.Q., Peng Y., Zhang Y., and Ma X., 2010, Genetic diversity of cichorium intybus germplasm resources using sequence-related amplified polymorphism (SRAP) molecular markers. *Caoye Xuebao* (acta prataculturae sinica), 19(5): 139-147 (罗燕, 白史且, 彭燕, 张玉, 马啸, 2010, 菊苣种质资源遗传多样性的 SRAP 研究, *草业学报*, 19(5): 139-147)
- Sheng W.T., Zhou J.S., Tang Y.P., Luo S.S., and Chen G.Y., 2010, Optimization of SRAP reaction system and selection of primers for *Asparagus officinalis* L. *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding), 8(3): 612-618 (盛文涛, 周劲松, 汤泳萍, 罗绍春, 陈光宇, 2010, 芦笋 SRAP 反应体系优化及引物筛选, *分子植物育种*, 8(3): 612-618)
- Xue Y.F., Liu Z.P., Zheng Q.S., Chen M.D., Liu L., and Yan Y.N., 2006, Abating effect of calcium ion on seawater-stressed Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.), *Xibei Zhiwu Xuebao* (Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica), 26(6): 1267-1271 (薛延丰, 刘兆普, 郑青松, 陈铭达, 刘玲, 严一诺, 2006, 钙离子对菊芋海水胁迫的缓解效应研究, *西北植物学报*, 26(6): 1267-1271)
- Yang J., Ren Y., Yang G.S., and Yin J.M., Establishment and optimization of sequence-related amplified polymorphism system for Phalaenopsis, 2010, *Redai Nongye Kexue* (chinese journal of tropical agriculture, 30(3): 21-24) (杨珺, 任羽, 杨光穗, 尹俊梅, 2010, 蝴蝶兰 SRAP 反应体系的建立与优化, *热带农业科学*, 30(3): 21-24)
- Zhang J.W., Mao Q.S., and Bao M.Z., 2011, Analysis of genetic diversity among germplasm of *Prunus mume* Sieb. et Zucc. using SRAP markers, *Yuanyi Xuebao* (Acta Horticulturae Sinica), 38(1): 117-124 (张俊卫, 毛庆山, 包满珠, 2011, 梅遗传多样性的 SRAP 分析, *园艺学报*, 38(1): 117-124)
- Zhong Q.W., Liu S.Y., Wang L.H., Wang Y., and Li L., 2009, Absorption, accumulation and allocation of nitrogen, phosphorus and potassium of Jerusalem artichoke, *Zhiwu Yingyang Feiliao Xuebao* (Plant Nutrition and Fertilizer Science), 15(4): 948-952 (钟启文, 刘素英, 王丽慧, 王怡, 李莉, 2009, 菊芋氮、磷、钾吸收积累与分配特征研究, *植物营养与肥科学报*, 15(4): 948-952)
- Zhou Z., Cao H.L., Zhu Y., Li S.G., Bai X.F., Zhao X.M., and Du Y.G., 2008, *Xibei Nongye Xuebao* (Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica), 17(4): 297-301, 305 (周正, 曹海龙, 朱豫, 李曙光, 白雪芳, 赵小明, 杜昱光, 2008, 菊芋替代玉米发酵生产乙醇的初步研究, *西北农业学报*, 17(4): 297-301, 305)