

SRAP 体系优化及在胡枝子亲缘关系中的应用

骈瑞琪^{1,2}, 倪慧群^{1,3}, 欧阳昆唏², 李伟², 陈晓阳¹

(1 华南农业大学 林学院, 广东省森林植物种质创新与利用重点实验室, 广东 广州 510642;

2 北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083; 3 华南农业大学 科技处, 广东 广州 510642)

摘要:利用正交设计 $L_{16}(4^5)$ 对胡枝子 SRAP-PCR 反应体系的 5 种因素(模板、 Mg^{2+} 、dNTPs、引物、*Taq* 酶)在 4 个水平上进行优化试验, 筛选出各因素的最佳水平, 建立了胡枝子 SRAP-PCR 反应的最佳体系(25 μ L): 模板 DNA 40 ng, dNTPs 0.16 mmol/L, Mg^{2+} 1.5 mmol/L, *Taq* 酶 1.0 U, 引物 0.64 μ mol/L. 采用优化的扩增体系对 10 种胡枝子进行了 SRAP 分子标记分析. 筛选出的 10 对引物共扩增出 274 条带, 其中 244 条为多态性带, 占 89.01%. 平均每对 24 条. 多态性条带最多的是引物组合 Me21/Em1 和 Me6/Em9, 均达到 29 条. 10 种胡枝子种间遗传距离的变异幅度为 0.221~0.632. 聚类分析表明以 0.49 为阈值, 可以将 10 种胡枝子分为 4 大类.

关键词:胡枝子; SRAP; 优化; 亲缘关系

中图分类号: Q949.92; S541.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2011)03-0063-05

Optimization of SRAP System and Its Preliminary Application in Genetic Relationship Analysis of *Lespedeza*

PIAN Rui-qi^{1,2}; NI Hui-qun^{1,3}; OUYANG Kun-xi²; LI Wei²; CHEN Xiao-yang¹

(1 Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm, College of Forestry, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 College of Biological Science and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 3 Science and Technology Department, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;)

Abstract: Orthogonal design was used to optimize SRAP-PCR amplification system for *Lespedeza* in terms of five factors (*Taq* DNA polymerase, Mg^{2+} , DNA template, dNTPs and primer) from four levels. An optimal SRAP-PCR system for *Lespedeza* was obtained as 40 ng DNA template, 1.5 mmol/L Mg^{2+} , 1.0 U *Taq* DNA polymerase, 0.16 mmol/L dNTPs, 0.64 μ mol/L primer for 25 μ L reaction system. The phylogenetic relationship of 10 species of *Lespedeza* was investigated using SRAP technique. SRAP analysis produced 274 bands by using the 10 most informative primer pairs, 244 (89.01%) of which were polymorphic. Cluster analysis indicated that the 10 species of *Lespedeza* can be divided into four groups.

Key words: *Lespedeza*; SRAP; optimization; genetic relationship

胡枝子属 *Lespedeza* 是豆科 Leguminosae 蝶形花亚科 Papilionatae 中一个较大的属, 主要分布在亚洲、大洋洲、欧洲和北美洲的湿润、半湿润地区^[1]. 我国是胡枝子资源最为丰富的国家, 约有 26 种, 分布于除新疆以外的全国各省区^[2]. 该属大多数有耐旱、耐贫瘠、耐寒、耐酸、耐割和抗病虫等许多优良特性, 不仅可用于水土保持、改良土壤, 而且还具有较高的饲

用价值和药用价值, 此外还可用作薪炭林^[3]. 总的来看, 胡枝子属植物有较高的开发利用价值, 发展潜力巨大, 对其研究目前大多集中于生物生态学特性和栽培技术方面^[4-5], 而对于其遗传背景尚不清楚, 这给遗传育种及推广带来很大困难.

随着分子生物学技术的不断完善, 各种分子遗传标记技术被广泛用于区分近缘种之间的差异和揭

收稿日期: 2011-01-04

作者简介: 骈瑞琪(1981—), 男, 博士; 通信作者: 陈晓阳(1958—), 男, 教授, 博士, E-mail: xychen@scau.edu.cn

基金项目: “863” 国家高技术研究发展计划(2002AA241111); 木本豆科饲料植物胡枝子产业化示范项目(2006D90204004)

示物种的起源和进化规律中^[6]. 序列相关扩增多态性标记 (Sequence-related amplified polymorphism, SRAP) 是由 Li 等^[7] 开发出的一种新型的分子标记技术. 该技术针对基因外显子中 GC 含量丰富而启动子、内含子区 AT 含量丰富的特点来设计引物. 由于不同个体以及不同物种的内含子、间隔子间长度变化较大, 从而可产生丰富的多态性. 由于其操作简单, 可靠, 信息量高, 主要用于遗传多样性分析、种质鉴定、遗传连锁图的构建、基因连锁标记的寻找与基因定位和比较基因组学研究等研究领域^[7-10].

近年来, 已有 RAPD、ISSR 等分子标记用于胡枝子属亲缘关系的研究报道^[11-12], 但至今鲜有见到 SRAP 标记在胡枝子上应用的报道. 由于 SRAP 标记是基于 PCR 的分子技术, 因此, 影响 PCR 操作的模板、Mg²⁺、dNTP、Taq 聚合酶、引物浓度等诸因素均会对结果产生影响. 本试验中首先以二色胡枝子为材料, 建立并优化了胡枝子 SRAP 扩增反应体系, 并对引物进行筛选, 在此基础上对收集的 10 种胡枝子资源开展了亲缘关系研究, 旨在探索 SRAP 标记在胡枝子属植物种质资源研究上应用的可行性, 为进一步促进胡枝子资源的开发利用提供参考.

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料取自胡枝子种质资源收集圃, 每个编号选取 10 株材料(表 1). 该试验地位于北京市房山区窦店镇芦村, 北纬 39°30', 东经 115°25', 海拔 450 m, 年平均气温 11.6 °C, 夏季最高气温可达 40 °C, 最低气温 -15.5 °C, 无霜期 185 d, 年降雨量 677 mm, 属温带大陆性气候, 试验地土壤为淋溶褐土, 质地为粘壤土, 属中性, 为中等肥力水平.

表 1 用于胡枝子种间关系研究的试验材料

Tab. 1 Source materials for interspecific relationship of *Lespedeza* genus

编号	种名	来源	组别
1	绿叶胡枝子 <i>L. buergeri</i>	江西庐山	大胡枝子组
2	大叶胡枝子 <i>L. davidii</i>	江西庐山	大胡枝子组
3	短梗胡枝子 <i>L. cyrtobotrya</i>	河北平山	大胡枝子组
4	截叶胡枝子 <i>L. cuneata</i>	甘肃天水	胡枝子组
5	多花胡枝子 <i>L. floribunda</i>	河南嵩县	胡枝子组
6	绒毛胡枝子 <i>L. tomentosa</i>	北京房山	胡枝子组
7	二色胡枝子 <i>L. bicolor</i>	河北平山	大胡枝子组
8	美丽胡枝子 <i>L. formosa</i>	江西庐山	大胡枝子组
9	阴山胡枝子 <i>L. inschanica</i>	甘肃平凉	胡枝子组
10	牛枝子 <i>L. potaninii</i>	宁夏盐池	胡枝子组

用于 SRAP 反应的 Taq 酶、dNTP、Mg²⁺ 和 DNA marker DL2000 均为天根生物有限公司产品, PTC-200 型 PCR 仪为基因公司产品, Gel-Doc 凝胶成像系统为 Bio-rad 公司产品. SRAP 引物采用 Li 等^[7] 已发表的引物组合(表 2), 由上海生物工程有限公司合成.

表 2 用于胡枝子 SRAP 分析的引物序列

Tab. 2 Primers sequences used in SRAP analyses of *Lespedeza*

编号	正向序列	编号	反向序列
Me5	5'TGA GTA CAA ACC GG AAG 3'	Em1	5'GAC TGC GTA CGA ATT TGC 3'
Me6	5'TGA GTA CAA ACC GG TAA 3'	Em2	5'GAC TGC GTA CGA ATT TGC 3'
Me7	5'TGA GTA CAA ACC GG TCC 3'	Em3	5'GAC TGC GTA CGA ATT GAC 3'
Me14	5'TGA GTA CAA ACC GG AAC 3'	Em4	5'GAC TGC GTA CGA ATT TGA 3'
Me16	5'TGA GTA CAA ACC GG ATA 3'	Em5	5'GAC TGC GTA CGA ATT AAC 3'
Me19	5'TGA GTA CAA ACC GG TTG 3'	Em6	5'GAC TGC GTA CGA ATT GCA 3'
Me20	5'TGA GTA CAA ACC GG TGT 3'	Em7	5'GAC TGC GTA CGA ATT GAG 3'
Me21	5'TGA GTA CAA ACC GG TCA 3'	Em8	5'GAC TGC GTA CGA ATT GCC 3'
		Em9	5'GAC TGC GTA CGA ATT TCA 3'

1.2 DNA 提取与检测

于 2007 年 5 月底采集健康、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. 采用改进的 CTAB 法提取 DNA^[13]. 提取的 DNA 分别用 10 g · L⁻¹ 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度, 对照 DNA marker DL2000, 估计提取的基因组 DNA 的浓度. 另外用紫外分光光度仪检测其纯度, 放置于 -20 °C 冰箱中贮存备用.

1.3 SRAP 反应体系的建立和优化

1.3.1 SRAP 反应扩增程序 SRAP 反应所用的程序参考文献[7], 其反应程序为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 35 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 5 个循环; 94 °C 变性 1 min, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min. 反应结束后, 用 12 g · L⁻¹ 的琼脂糖凝胶电泳分离扩增产物.

1.3.2 SRAP 反应体系的建立 为了摸索适宜于胡枝子属植物的 SRAP 反应体系, 有必要对影响 SRAP 谱带的各因素诸如: 模板浓度、Mg²⁺ 浓度、dNTP 浓度、引物浓度、Taq 酶用量等进行试验, 确定可重复的、稳定的最佳反应体系.

本试验以二色胡枝子 DNA 为模板, Me6/Em3、Me5/Em3 引物组合进行正交试验, 筛选胡枝子 SRAP 反应的最佳体系. 采用正交设计 L₁₆(4⁵) 在 4 个水平上对以上 5 个因素进行试验, L₁₆(4⁵) 设计方案见表 3.

表3 SRAP反应的 $L_{16}(4^5)$ 正交设计表Tab.3 $L_{16}(4^5)$ orthogonal design for SRAP reaction

处理号	Taq 酶/U	$c(\text{Mg}^{2+})/$ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	$m(\text{DNA}$ 模板)/ng	$c(\text{dNTP})/$ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	$c(\text{引物})/$ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
1	1.0	0.5	10	0.08	0.30
2	1.0	1.0	20	0.12	0.48
3	1.0	1.5	40	0.16	0.64
4	1.0	2.0	80	0.20	0.80
5	1.5	0.5	20	0.16	0.80
6	1.5	1.0	10	0.20	0.64
7	1.5	1.5	80	0.08	0.48
8	1.5	2.0	40	0.12	0.30
9	2.0	0.5	40	0.20	0.48
10	2.0	1.0	80	0.16	0.30
11	2.0	1.5	10	0.12	0.80
12	2.0	2.0	20	0.08	0.64
13	2.5	0.5	80	0.12	0.64
14	2.5	1.0	40	0.08	0.80
15	2.5	1.5	20	0.20	0.30
16	2.5	2.0	10	0.16	0.48

1.4 PCR产物的检测

扩增产物先进行 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的琼脂糖凝胶电泳检测,对电泳检测 PCR 成功扩增的再采用 6% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶分离,120 V 电压预电泳 30 min,上样后用 100 V 恒压电泳 1.5 ~ 2.0 h 后银染.凝胶银染参考张军等^[14]的方法.

1.5 数据统计分析

以建立的最佳反应体系对 10 种胡枝子进行种间亲缘关系分析,将电泳图谱上清晰出现的条带记为“1”,同一位置没有条带的记为“0”,带型不清或数据缺失记为“-”,生成“0”和“1”组成的原始矩阵. SRAP 标记用引物组合表示,记录结果采用 NT-SYS 分析软件,采用 UPGMA 方法进行聚类,建立聚类图.

2 结果与分析

2.1 SRAP 正交试验的结果

按表 3 设计的 16 个处理进行 PCR 反应后,将得到的产物进行电泳,结果如图 1. 由图 1 可以看出,由于 Taq DNA 聚合酶、引物浓度、dNTP 和 Mg^{2+} 浓度 5 种影响因素组合不同,扩增的效果存在着明显差异,其中:以 3 号处理扩增的条带最为清晰、稳定;1、2 号处理的条带较暗且有缺失,可能是 Taq DNA 聚合酶用量少所致;4 号处理的条带很亮,但是有弥散现象,可能是 dNTP 和 Mg^{2+} 浓度过高,导致非特异性扩增;5、6、9、10 号处理的条带较少,可能与 Taq DNA 聚合酶用量过量有关;8 号处理的条带缺失,可能是 Mg^{2+}

浓度过高导致;7、11、12 号处理的条带弥散,可能与 Mg^{2+} 浓度或引物过量有关;14 号处理的条带少且弥散,可能与引物过量有关;15 号条带少,可能与 dNTP 过量有关;16 号处理,条带清晰且稳定,与 3 号处理类似,但是从经济的角度考虑,最终选择 3 号处理. Me5/Em3 引物组合的扩增结果与 Me6/Em3 的结果类似.

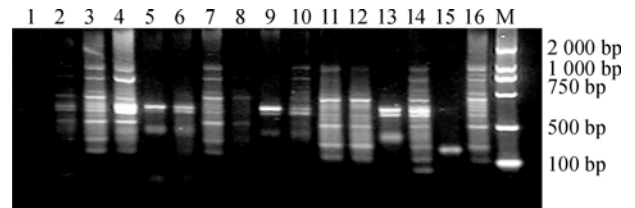


图1 引物 Me6/Em3 的 SRAP 正交试验扩增结果

Fig.1 Results of SRAP-PCR amplification by orthogonal design with primer Me6/Em3

依据正交试验的结果,确定出胡枝子 SRAP 反应的最佳体系 ($25 \mu\text{L}$): $10 \times \text{Buffer}$ $2.5 \mu\text{L}$, DNA 模板 40 ng , dNTP 0.16 mmol/L , Mg^{2+} 1.5 mmol/L , Taq 酶 1 U , 引物 $0.64 \mu\text{mol/L}$.

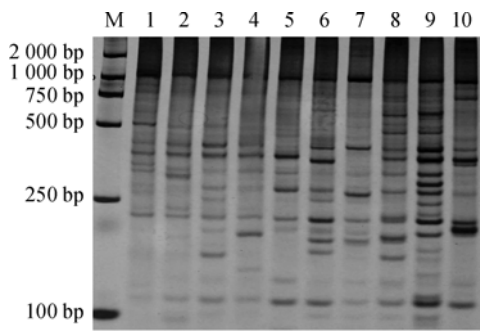
2.2 引物筛选及多态性分析

从 72 个引物组合中选取 10 对扩增较好的引物组合,对 10 种胡枝子开展分析,共扩增出 274 条带,其中 244 条为多态性条带,占条带总数的 89.01%. 每条引物扩增出 24 ~ 33 条 DNA 片段,平均 27 条. 其中多态性片段 20 ~ 29 个,平均 24 个. 产生多态性条带最多的是引物组合 Me21/Em1 和 Me6/Em9, 均达到 29 条. 表 4 列出了所选引物及每对引物扩增出的多态性条带数目. 图 2 显示了部分引物组合在胡枝子属种间扩增的结果.

表4 用于 SRAP 分析的引物组合及扩增产生的条带

Tab.4 Primer pairs chosen and numbers of SRAP fragment generated by them

引物组合	扩增带数/条	多态性带/条	多态性/ %
Me21/Em1	33	29	87.88
Me16/Em6	24	21	87.50
Me14/Em5	27	24	88.89
Me14/Em6	24	22	91.67
Em19/Me1	30	27	90.00
Me6/Em3	23	20	86.96
Me7/Em1	24	21	87.50
Me6/Em9	32	29	90.63
Em20/Me3	28	26	92.86
Me5/Em3	29	25	86.21
总计	274	244	
平均	27	24	89.01



M: DNA marker DL2000; 1: 绿叶胡枝子; 2: 大叶胡枝子; 3: 短梗胡枝子; 4: 截叶胡枝子; 5: 多花胡枝子; 6: 绒毛胡枝子; 7: 二色胡枝子; 8: 美丽胡枝子; 9: 阴山胡枝子; 10: 牛枝子。

图2 引物组合 Mel4/Em5 对不同种胡枝子的 PCR 扩增图谱
Fig.2 Amplified patterns for some samples via primer Mel4/Em5

2.3 胡枝子种间的遗传距离和聚类分析

对 SRAP 扩增谱带统计结果进行分析, 采用 NTSYS 软件计算出 10 个种之间的遗传距离 (表 5)。由表 5 中数据可知, 10 种胡枝子种间遗传距离的变异幅度为 0.221 ~ 0.632。其中大叶胡枝子和短梗胡枝子之间的遗传距离最近 (0.221)。而绿叶胡枝子和多花枝子间的遗传距离最远 (0.632)。

表 5 10 种胡枝子的遗传距离¹⁾

Tab.5 Marix of genetic distance for the 10 species of *Lespedeza*

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1										
2	0.432									
3	0.361	0.221								
4	0.530	0.534	0.528							
5	0.632	0.543	0.566	0.567						
6	0.486	0.584	0.577	0.415	0.496					
7	0.483	0.505	0.472	0.528	0.596	0.516				
8	0.466	0.318	0.408	0.522	0.467	0.554	0.338			
9	0.464	0.474	0.522	0.491	0.558	0.566	0.432	0.472		
10	0.490	0.512	0.577	0.532	0.600	0.565	0.467	0.494	0.088	

1) 1: 绿叶胡枝子; 2: 大叶胡枝子; 3: 短梗胡枝子; 4: 截叶胡枝子; 5: 多花胡枝子; 6: 绒毛胡枝子; 7: 二色胡枝子; 8: 美丽胡枝子; 9: 阴山胡枝子; 10: 牛枝子。

依据遗传距离, 采用 UPMGA 法进行聚类, 如图 3 所示: 以 0.49 为阈值, 可以将 10 种胡枝子分为四

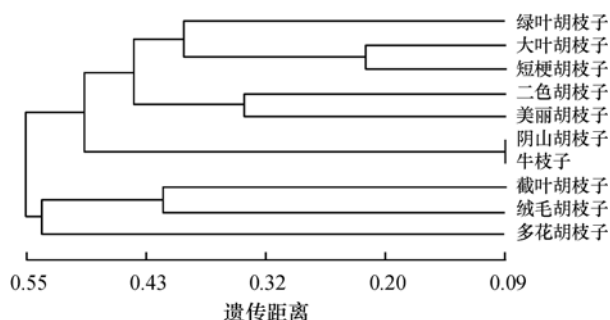


图3 基于遗传距离的 10 个胡枝子种间的聚类图 (UPMGA)

Fig.3 Dendrogram based on the genetic distance for 10 species of *Lespedeza*

大类, 阴山胡枝子和牛枝子首先聚为一类, 截叶胡枝子和绒毛胡枝子聚为一类, 多花胡枝子则单独为一支, 其余的 5 种胡枝子聚为一类。

3 讨论与结论

SRAP 标记是在总结已有的 DNA 分子标记优缺点的基础上开发的一种新型分子标记技术。由于它具有对 DNA 质量要求低, 多态性高, 产率中等, 重复性好, 操作简单, 引物具有通用性, 无须预先知道基因组序列等诸多优点, 已经在多种园艺植物研究中得到应用^[7]。SRAP 标记是一种基于 PCR 技术的分子标记, 扩增结果易受到反应条件的影响, 因此针对不同的材料需要进行反应体系优化。本研究中采用正交设计建立并优化了适合胡枝子的 SRAP 反应体系。25 μ L 反应体系包括 2.5 μ L 的 10 \times Buffer, DNA 模板 40 ng, dNTP 0.16 mmol/L, Mg^{2+} 1.5 mmol/L, *Taq* 酶 1 U, 引物 0.64 μ mol/L。此种结果有别于柿 *Diospyros kaki*^[15]、白木香 *Aquilaria sinensis*^[16]、茶 *Melaleuca alternifolia*^[17]、构树 *Broussonetia papyrifera*^[18]、白三叶 *Trifolium repens*^[19] 和杂花苜蓿 *Medicago varia*^[20] 等的 SRAP 反应体系, 原因是不同物种的基因组有很大差别, 所需的反应体系也有不同。

SRAP-PCR 体系优化的方法有多种, 以往多采用单因素分析方法^[21-23]。在 dNTP、*Taq* 酶、 Mg^{2+} 、引物、DNA 模板 5 种组分中, 逐一变化其中一种组分浓度而固定其余 4 种, 从中分析得到每一组分的最佳浓度, 最后组合成为最佳反应体系。虽然这种方法可以在短时间内就建立起反应体系, 但是对于各因子不同水平间的交互作用还是无法研究的。完全组合设计虽然可以考察 PCR 体系中各因子的相互作用, 得到的最佳反应体系也较稳定, 但要做大量的 PCR 扩增工作, 试验周期较长^[24]。例如本文如果采用 5 因素 4 水平的完全组合试验, 则有 1 024 个试验组合, 再加上必要的重复, 工作量是相当繁重的。相对于单因素设计和完全组合试验, 正交设计减少了许多处理组合, 节省了人力物力, 近年来在分子标记的研究中被广泛应用^[25-27]。

SRAP 标记技术已运用于多种植物的遗传多样性研究^[7, 17, 19], 是否适合于胡枝子属的相关研究却鲜见报道。本试验在体系优化的基础上, 筛选出 10 对多态性丰富的引物, 利用 SRAP 标记对 10 种胡枝子的遗传多样性进行了初步的探索。10 对引物组合共检测出 274 个位点, 其中多态性位点所占比率为 89.01%, 平均每对引物组合检测 24 个位点。可见

SRAP 标记运用于胡枝子属植物中,检测位点多,多态性丰富,适合于胡枝子属植物遗传多样性研究。

按照传统的形态学观点,多将胡枝子属植物分为2组:无闭锁花的为大胡枝子组,包括短梗胡枝子 *L. dauarica*、美丽胡枝子、二色胡枝子和大叶胡枝子等12种;有闭锁花的胡枝子组包括阴山胡枝子、达乌里胡枝子 *L. davurica*、截叶胡枝子、牛枝子、多花胡枝子等14种^[2]。本研究采用SRAP标记的聚类结果与传统分类基本一致,多花胡枝子与短梗胡枝子、二色胡枝子的亲缘关系相对较远,这也与赵杨等^[12]采用ISSR标记的研究结果类似。但是也与传统分类存在一定分歧,以往研究表明,阴山胡枝子、牛枝子隶属于胡枝子组,而本研究结果表明,二者与大胡枝子组植物的亲缘关系较近。究其原因可能是不同方法本身特点所造成的^[28],也有可能与所选材料数量有限相关,因此在今后的研究中应当收集更多的试验材料,采用多种标记进行验证,以期更加客观地反映胡枝子属物种间的亲缘关系。

参考文献:

- [1] CLEWELL A F. Evolutionary brinkmanship in *Lespedeza* [J]. *Am J Bot*,1966,53(6):631-632.
- [2] 李树刚. 中国植物志:第四十一卷[M]. 北京:科技出版社,1995:131-159.
- [3] 奚同行,林圣玉. 胡枝子的开发利用价值及发展前景[J]. *中国水土保持*,1995,4:42-43.
- [4] 徐泽荣. 野生截叶胡枝子生物学特性和经济性状的研究[J]. *草业学报*,1993,2(3):76-80.
- [5] 李延安,贾黎明,杨丽,等. 胡枝子应用价值及丰产栽培技术研究进展[J]. *河北林果研究*,2004,19(2):185-192.
- [6] AGARWAL M, SHRIVASTAVA N, PADH H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences[J]. *Plant Cell Reports*,2008,27(4):617-631.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] RIAZ A, LI G, QURESH Z, et al. Genetic diversity of oilseed *Brassica napus* inbred lines based on sequence-related amplified polymorphism and its relation to hybrid performance[J]. *Plant Breeding*,2001,120(5):411-415.
- [10] FERRIOL M, PIOÓ B, NUEZ F. Genetic diversity of a germplasm collection of cucurbita pepo using SRAP and AFLP markers [J]. *Theor Appl Genet*,2003,107(2):271-282.
- [11] 张吉宇,袁庆华,王彦荣,等. 胡枝子属植物野生居群遗传多样性 RAPD 分析[J]. *草地学报*,2006,14(3):214-217.
- [12] 赵杨,陈晓阳,王秀荣,等. 9种胡枝子亲缘关系的 ISSR 分析[J]. *吉林林业科技*,2006,35(3):1-4.
- [13] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochem Bull*,1987,19:11-15.
- [14] 张军,武耀廷,郭旺珍,等. 棉花微卫星标记的 PAGE 银染快速检测[J]. *棉花学报*,2000,12(5):267-269.
- [15] 郭大龙. 几种分子标记技术的建立及其在部分柿属植物亲缘关系研究中的应用[D]. 武汉:华中农业大学园艺林学学院,2006.
- [16] 邹枚伶,夏志强,吉家敏,等. 白木香 SRAP-PCR 反应体系的建立[J]. *基因组学与应用生物学*,2009,28(1):137-140.
- [17] 沈程文,黄意欢,黄建安,等. SRAP 标记体系优化及在茶树种质资源研究中的应用[J]. *经济林研究*,2009,27(3):1-6.
- [18] 刘志远,范卫红,沈世华. 构树 SRAP 分子标记[J]. *林业科学*,2009,45(12):54-58.
- [19] 张婧源,彭燕,罗燕,等. 不同产地白三叶种质遗传多样性的 SRAP 分析[J]. *草业学报*,2010,19(5):130-138.
- [20] 周良彬,卢欣石,赖黎丽. 杂花苜蓿 SRAP-PCR 反应体系的正交优化[J]. *草地学报*,2010,18(3):345-351.
- [21] 任羽,王得元,张银东. 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.
- [22] 李梅,侯喜林,郝日明. 桂花 SRAP-PCR 体系的确立及验证[J]. *植物资源与环境学报*,2009,18(2):15-21.
- [23] 周春娥,谷凤平,路淑霞,等. 怀地黄 SRAP 扩增体系的建立与引物的筛选[J]. *广西植物*,2010,30(2):256-260.
- [24] 谢运海,夏德安,姜静,等. 利用正交设计优化水曲柳 ISSR-PCR 反应体系[J]. *分子植物育种*,2005,3(3):445-450.
- [25] 何正文,刘运生,陈立华,等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件[J]. *湖南医科大学学报*,1998,23(4):403-404.
- [26] 李莉,彭建营,郑宝强. 枣 SRAP-PCR 体系的正交优化[J]. *农业生物技术学报*,2008,16(2):361-362.
- [27] 郑婷婷,林萍,王开良,等. 油茶 SRAP-PCR 反应体系的优化[J]. *林业科学研究*,2010,23(2):302-307.
- [28] 区又君,吴勇,李加儿,等. 5种石斑鱼遗传差异的 RAPD 分析[J]. *南方水产*,2008,4(2):56-62.