

# 莲 SRAP-PCR 反应体系的优化与建立

杨美, 徐立铭, 刘艳玲\*

(中国科学院水生植物与流域生态重点实验室, 中国科学院武汉植物园, 武汉 430074)

**摘要:** 以中国古代莲(*Nelumbo nucifera*)和美洲黄莲(*N. lutea*)为材料,利用单因素分析法对影响莲 SRAP-PCR 扩增效果的模板、 $Mg^{2+}$ 、dNTP、*Taq* DNA 聚合酶、引物浓度进行了探索和研究。获得了能稳定扩增莲基因组的 SRAP-PCR 最佳 10  $\mu$ L 反应体系:模板 DNA 浓度为 50 ng、1  $\mu$ L 10  $\times$  Buffer、 $MgCl_2$  浓度为 2 mmol/L、dNTPs 浓度为 0.2 mmol/L、*Taq* DNA 聚合酶浓度为 0.75 U、正反向引物浓度均为 0.8  $\mu$ mol/L。为检测该优化体系的稳定性,进一步选取 16 对引物组合对 88 份花莲核心种质进行 PCR 扩增,获得了 183 条清晰的谱带,其中 165 条具有多态性,比率为 90%,说明建立的莲 SRAP 反应体系是稳定可靠的。莲 SRAP-PCR 反应体系的优化和建立,为利用 SRAP 标记技术深入开展莲的遗传多样性评价、遗传连锁图构建和分子辅助育种等研究提供成熟的技术体系支撑。

**关键词:** 莲; SRAP; PCR 反应体系; 优化

中图分类号: S682.32

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2012)01-0085-07

## Optimization and Establishment of SRAP-PCR in Lotus

YANG Mei, XU Li-Ming, LIU Yan-Ling\*

(Key Laboratory of Aquatic Botany and Watershed Ecology, Wuhan Botanical Garden,  
Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China)

**Abstract:** We established an advanced SRAP-PCR reaction system for Chinese Antique Lotus and American Lotus using a single factor experiment with five impact factors, including DNA template,  $Mg^{2+}$ , dNTP mixture, *Taq* DNA polymerase and primer. The 10  $\mu$ L reaction mixture contained 50 ng of genomic DNA template, 1  $\mu$ L of 10  $\times$  Buffer, 2 mmol/L of  $MgCl_2$ , 0.20 mmol/L of dNTP, 0.75 U of *Taq* DNA polymerase, and 0.8  $\mu$ mol/L of primers. To test the stability of the optimized SRAP-PCR system, the PCR was further amplified in the core-collection of flower lotus with 88 cultivars using 16 primer pairs. A total of 183 clear bands were obtained throughout all materials, of which 165 (90%) bands were polymorphic. Therefore, the established SRAP reaction system for lotus was reliable. The results provided technical support for evaluating genetic diversity as well as constructing genetic linkage maps and molecular marker-assisted breeding of lotus.

**Key words:** Lotus; SRAP; PCR reaction system; Optimization

SRAP 标记(相关序列扩增多态性, Sequence Related Amplified Polymorphism)是 2001 年由美国加州大学作物系 Li 和 Quiros 博士从芸苔属作物中开发出来的一种新型分子标记技术<sup>[1]</sup>。它基于

基因中外显子富含 GC 而启动子、内含子富含 AT 的特点设计的正反两套引物,对开放阅读框架(ORFs)进行扩增,因不同物种、不同个体间的内含子、启动子及间隔区长度不等而产生多态性。SRAP

收稿日期: 2011-05-25, 修回日期: 2011-10-28。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30671474); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-EW-J-20)。

作者简介: 杨美(1981-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为莲的遗传育种与种质创新(E-mail: yangmei815815@wbpcas.cn)。

\* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: liuyanling@wbpcas.cn)。

分子标记具有简单、稳定、中等产率、高共显性、易于测序、在基因组中均匀分布等优点<sup>[2]</sup>,已被广泛应用于油菜、苹果、柑橘、樱桃、牡丹、马铃薯、芹菜等的遗传多样性分析<sup>[3,4]</sup>、DNA 指纹图谱<sup>[5]</sup>和遗传连锁图的构建<sup>[6]</sup>、基因定位和克隆<sup>[7,8]</sup>等研究中。

莲是被子植物中起源最早的植物之一,素有“活化石”之称。它在我国具有悠久的栽培历史,是重要的水生经济作物,集食用、药用、观赏于一身<sup>[9]</sup>。因其独特的经济、文化、观赏及分类学价值,已引起了人们的高度关注,在莲生长发育、生理学特性、品种鉴定及演化关系分析、系统分类、遗传多样性评估、遗传育种等方面开展了较为深入系统的研究<sup>[10-12]</sup>。其中在分子水平上评估莲种质资源的遗传多样性已成为研究热点之一,应用的 DNA 分子标记主要有 RAPD、ISSR、AFLP 和 SSR<sup>[12-21]</sup>。SRAP 作为一种新型标记,虽已在莲品种资源的多样性分析中得到初步应用<sup>[22,23]</sup>,但莲 SRAP-PCR 优化反应体系还未建立。SRAP 引物虽具有通用性<sup>[2]</sup>,但不同物种的 SRAP-PCR 反应体系各不相同,扩增效果也不相同<sup>[24-26]</sup>,目前在较多物种中已获得了优化的 SRAP-PCR 反应体系。因此本研究以中国古代莲(*Nelumbo nucifera*)和美洲黄莲(*N. lutea*)为材料,利用多对 SRAP 标记引物组合,对 PCR 反应体系中的模板、Mg<sup>2+</sup>、dNTP、*Taq* DNA 聚合酶、引物等因子设置单因素多水平梯度试验,探索与优化莲 SRAP-PCR 反应体系,为深入开展莲的遗传多样性、种质资源分析和遗传连锁图构建等研究提供成熟的技术体系支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为中国古代莲(*Nelumbo nucifera*,编号 CL)和美洲黄莲(*N. lutea*,编号 AL),栽植于中国科学院武汉植物园荷花保育池内,取未展开的幼嫩叶片提取基因组 DNA。

1.2 主要试剂

10 × *Taq* Buffer (不含 MgCl<sub>2</sub>), 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 5 U/μL *Taq* DNA 聚合酶为加拿大 Fermentas MBI 公司生产, 10 mmol/L dNTPs, DNA Marker 由天根生化科技有限公司生产。CTAB、Tris-

base、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵、TEMED 均为美国 Amresco 公司生产。SRAP 标记引物选自 Li 和 Quiros<sup>[1]</sup>,所选引物序列见表 1,由上海桑尼生物技术有限责任公司合成,稀释至 10 μmol/L 备用。

表 1 莲 SRAP-PCR 体系优化时所用引物序列  
Table 1 Primer sequences used in optimizing the SRAP-PCR reaction system in lotus

| 引物对<br>Pairs of primer |     | 序列(5' -3')<br>Sequence (5' -3') |
|------------------------|-----|---------------------------------|
| 1                      | me4 | TGAGTCCAAACCGGACC               |
|                        | em1 | GACTGCGTACGAATTAAT              |
| 2                      | me3 | TGAGTCCAAACCGGAAT               |
|                        | em2 | GACTGCGTACGAATTGTC              |
| 3                      | me3 | TGAGTCCAAACCGGAAT               |
|                        | em3 | GACTGCGTACGAATTGAC              |
| 4                      | me4 | TGAGTCCAAACCGGACC               |
|                        | em3 | GACTGCGTACGAATTGAC              |

1.3 莲基因组 DNA 提取与检测

采用改进的 CTAB 法<sup>[27]</sup>提取莲基因组 DNA。向磨碎后的叶片样品中加入 CTAB 提取缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl pH 值 8.0, 20 mmol/L EDTA pH 值 8.0, 1.4 mol/L NaCl, 2% CTAB, 1% PVP30, 1% β-巯基乙醇), 65℃水浴 1 h, 用氯仿:异戊醇(24:1)萃取和异丙醇沉淀后, 得到絮状 DNA 沉淀物, 经 70% 乙醇洗涤和室温干燥后, 用 50 μL 的 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 值 8.0)充分溶解, 并加 1 μL、10 mg/mL 的 RNase 去除 RNA。利用紫外分光光度计(美国 GE Ultrospec 1100 pro)和 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量和浓度, 并将其稀释成 20 ng/μL, 置于 -20℃ 冰箱保存备用。

1.4 SRAP 反应体系优化

PCR 反应体积为 10 μL, 基础反应体系为:模板 DNA 50 ng, dNTPs 0.2 mmol/L, 10 × Buffer 缓冲液 1 μL, MgCl<sub>2</sub> 2.0 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 0.5 U, 正反引物各 0.8 μmol/L。采用单因子试验设计, 设 DNA 模版、Mg<sup>2+</sup>、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、引物 5 个因子。在反应体系中其它成分不变的情况下, 将每个因子设置 4 个梯度(表 2)。

1.5 PCR 扩增

PCR 扩增是在 Bio - Rad MyCycler Thermal

表 2 莲 SRAP-PCR 体系优化时各因子和水平  
Table 2 Factor and levels designed in optimizing of SRAP-PCR reaction system in lotus

| 水平<br>Level | DNA 模板浓度<br>DNA template<br>(ng) | Mg <sup>2+</sup> 浓度<br>Mg <sup>2+</sup> concentration<br>(mmol/L) | dNTPs 浓度<br>dNTPs concentration<br>(mmol/L) | DNA 聚合酶浓度<br>DNA polymerase concentration<br>(U) | 引物浓度<br>Primer concentration<br>(μmol/L) |
|-------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------|
| 1           | 20                               | 1.0                                                               | 0.10                                        | 0.25                                             | 0.4                                      |
| 2           | 35                               | 1.5                                                               | 0.15                                        | 0.50                                             | 0.6                                      |
| 3           | 50                               | 2.0                                                               | 0.20                                        | 0.75                                             | 0.8                                      |
| 4           | 65                               | 2.5                                                               | 0.25                                        | 1.00                                             | 1.0                                      |

Cycler PCR 仪上进行,PCR 反应按照 Li 和 Quirós<sup>[1]</sup>的标准扩增程序,即: 94℃预变性 5 min;94℃变性 1 min,35℃复性 1 min,72℃延伸 1 min,5 个循环;94℃变性 1 min,50℃复性 1 min,72℃延伸 1 min,35 个循环;72℃延伸 10 min;4℃保存。

1.6 反应产物的检测

PCR 反应产物加 5 μL 的上样缓冲液,94℃变性 5 min 后,取样 4 μL 用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶,0.5 × TBE 缓冲液,70W 恒功率电泳 1.5 h。取下胶板后用 10% 冰醋酸固定 30 min,水洗 10 min 后用含 2 g/L AgNO<sub>3</sub> 和 0.15% 甲醛的水溶液银染 30 min,然后用显影液(3% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 0.15% 甲醛 + 0.01 mg/L 硫代硫酸钠)显色,最后将胶板放入 10% 冰醋酸终止显色反应。

2 结果分析

2.1 莲基因组 DNA 质量的检测

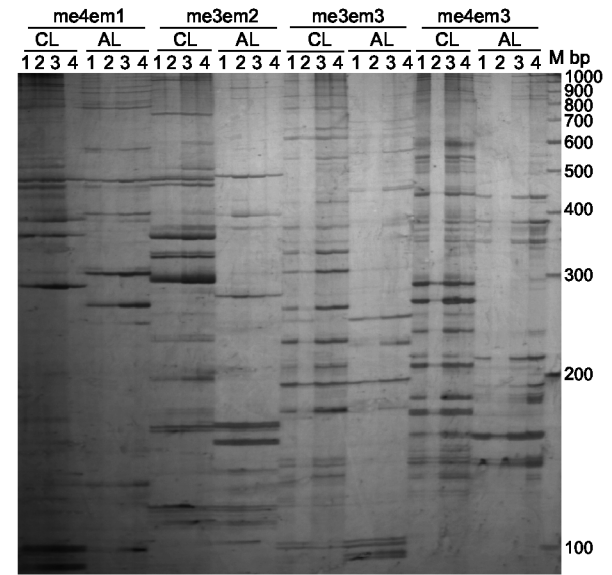
用 0.8% 琼脂糖胶电泳检测所提取莲基因组 DNA,结果显示两个莲材料的 DNA 条带清晰,无拖尾现象。紫外分光光度计检测两个材料的 DNA 在 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 比值为 1.958 和 1.932,在 A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> 比值为 1.883 和 1.834, DNA 浓度为 632 ng/μL 和 1129 ng/μL。说明所提取的莲基因组 DNA 质量较高,杂质较少,满足 SRAP 标记技术对 DNA 质量的要求。

2.2 各因子对 SRAP-PCR 反应结果的影响

2.2.1 模板

模板 DNA 浓度是制约扩增产量及特异性的一个因素,如模板浓度太低,无法扩增到特异性条带,带少;随着浓度增加,特异性条带逐渐增多,条带清晰;但模板浓度过高也会影响反应结果。在本试验中,模板 DNA 用量为 20 ng 时,所扩增条带较弱;35 ng 时,me4em1 和 me3em2 所扩增条带亮度有

所增强,带型比较清晰,但 me3em3 和 me4em3 的扩增效果比 20 ng DNA 用量时差,条带数目少且弱;模板 DNA 用量为 50 ng 和 65 ng 时,4 对引物的扩增效果均比前两种 DNA 模板用量的效果好,其中以模板为 50 ng 的扩增效果最好。通过比较 4 对引物在不同模板 DNA 用量下扩增的稳定性,确定最佳 DNA 用量为 50 ng(图 1)。



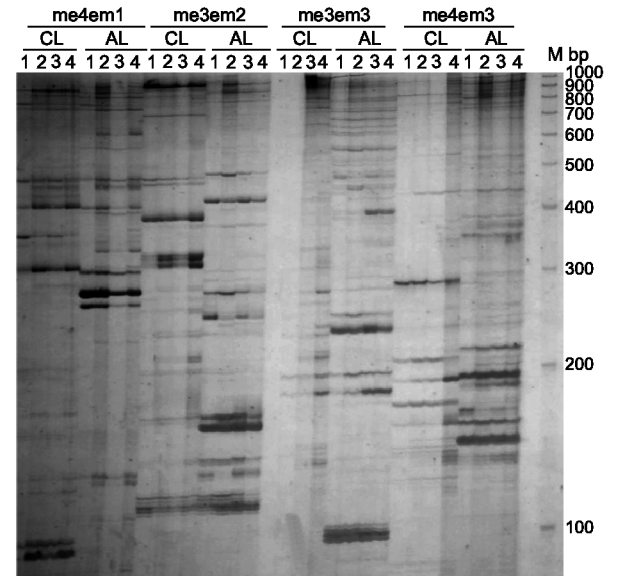
CL: 中国古代莲(Chinese Antique Lotus(*Nelumbo nucifera*)); AL: 美洲黄莲(America Lotus(*N. lutea*)); 1 = 20 ng, 2 = 35 ng, 3 = 50 ng, 4 = 65 ng, M = DNA marker.

图 1 不同模板 DNA 用量条件下 SRAP-PCR 扩增的结果  
Fig. 1 The SRAP-PCR results of different DNA template concentrations

2.2.2 Mg<sup>2+</sup>

Mg<sup>2+</sup> 是 *Taq* DNA 聚合酶的激活剂,Mg<sup>2+</sup> 不足时,酶的扩增效率较低;当 Mg<sup>2+</sup> 过量时,易导致非特异扩增产物的增加,因此反应中 Mg<sup>2+</sup> 浓度非常重要。从试验中可以看出,Mg<sup>2+</sup> 浓度为 1.0 mmol/L 时,扩增条带数目较少甚至无带(中国古代莲),带型清晰度不够。随着 Mg<sup>2+</sup> 浓度增加,扩增条带数目

增加,带型清晰度增加(图2)。不同引物的扩增效果受  $Mg^{2+}$  浓度变化影响的程度不一样,其中  $Mg^{2+}$  浓度变化对 me3em3 的影响最为明显。通过比较 4 对引物在不同  $Mg^{2+}$  浓度下扩增的稳定性,同时为了节约成本,确定最佳  $Mg^{2+}$  浓度为 2.0 mmol/L。



CL: 中国古代莲(Chinese Antique Lotus), AL: 美洲黄莲(America Lotus); 1 = 1.0 mmol/L, 2 = 1.5 mmol/L, 3 = 2.0 mmol/L; 4 = 2.5 mmol/L, M = DNA marker。

图2 不同  $Mg^{2+}$  浓度条件下 SRAP-PCR 扩增的结果  
Fig.2 The SRAP-PCR results of different  $Mg^{2+}$  concentrations

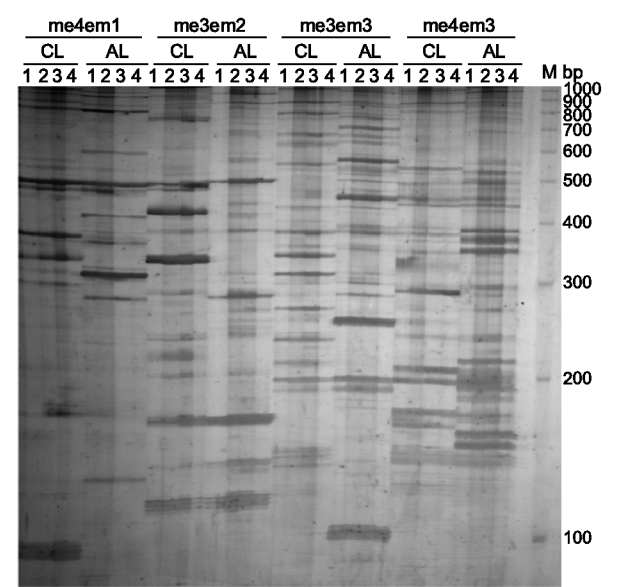
2.2.3 dNTPs

dNTP 既是 PCR 反应的底物,又与 *Taq* DNA 聚合酶竞争  $Mg^{2+}$ ,从而影响扩增效果。本试验 4 种 dNTP 的浓度中,在0.15 mmol/L 和0.20 mmol/L 时,扩增条带数目较多,且带型清晰,其中以 0.20 mmol/L 时效果最好;dNTP 的浓度过低或过高(0.10 mmol/L、0.25 mmol/L)时,PCR 扩增条带数目减少,亮度有所降低(图3)。4 对引物在各 dNTP 浓度下的扩增效果比较一致,因此确定最佳 dNTPs 浓度为 0.20 mmol/L。

2.2.4 *Taq* DNA 聚合酶

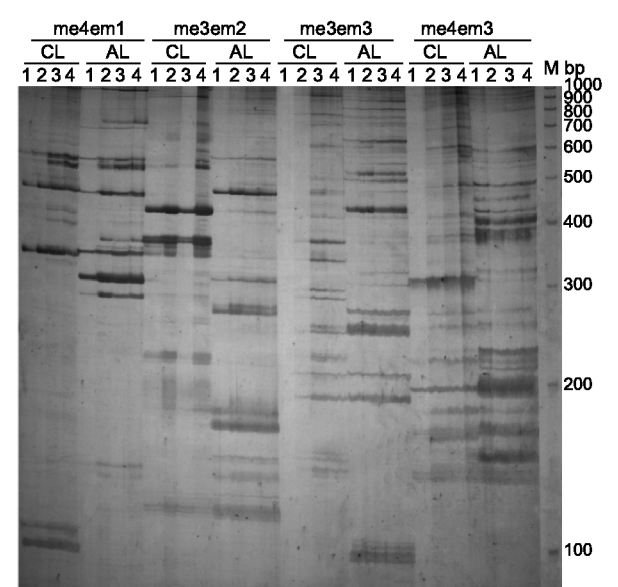
PCR 反应能否正常进行的核心因素是 *Taq* DNA 聚合酶。从本试验设置的 *Taq* 酶用量梯度可以看出,当体系中 *Taq* 聚合酶为 0.25 U 时,所扩增的条带相对较少,带型不清晰;当达到 0.50 U 和 0.75 U 时,条带增多,亮度增强,带型清晰稳定,尤其是 0.75U 时效果最佳;用量为 1.0 U 时,条带亮度

过强致使带型变得模糊(图4)。*Taq* 聚合酶的浓度变化对引物me3em3的影响最大,其次为me4em1



CL: 中国古代莲(Chinese Antique Lotus), AL: 美洲黄莲(America Lotus); 1 = 0.1 mmol/L, 2 = 0.15 mmol/L, 3 = 0.2 mmol/L, 4 = 0.25 mmol/L, M = DNA marker。

图3 不同 dNTPs 浓度条件下 SRAP-PCR 扩增的结果  
Fig.3 The SRAP-PCR results of different dNTPs concentrations



CL: 中国古代莲(Chinese Antique Lotus), AL: 美洲黄莲(America Lotus); 1 = 0.25 U, 2 = 0.5 U, 3 = 0.75 U, 4 = 1.0 U, M = DNA marker。

图4 不同 *Taq* DNA 聚合酶浓度条件下 SRAP-PCR 扩增的结果  
Fig.4 The SRAP-PCR results of different *Taq* DNA polymerase concentrations

和 me4em3,对 me3em2 的影响最小。综合比较 4 对引物的扩增效果,选择最佳 *Taq* DNA 聚合酶用量为 0.75 U。

2.2.5 引物

本试验所设置的引物浓度梯度 0.4、0.6、0.8、0.5、1.0  $\mu\text{mol/L}$  的扩增结果如图 5。4 种引物浓度下的 PCR 扩增效果相差不大,条带均比较清晰。但某些引物在 4 种浓度下的效果稍有差别,如 me3em2 在 0.4  $\mu\text{mol/L}$  时,对中国古代莲所扩增

的条带稍微有点弱;me3em3 在 0.6  $\mu\text{mol/L}$  时,对美洲黄莲所扩增带型比其它浓度下的稍浅些;me3em2 和 me3em3 在 1.0  $\mu\text{mol/L}$  时,对中国古代莲所得条带有一定的背景。综合比较 4 对引物的扩增效果,确定最合适的引物浓度为 0.8  $\mu\text{mol/L}$ 。

2.3 莲 SRAP-PCR 体系的确定

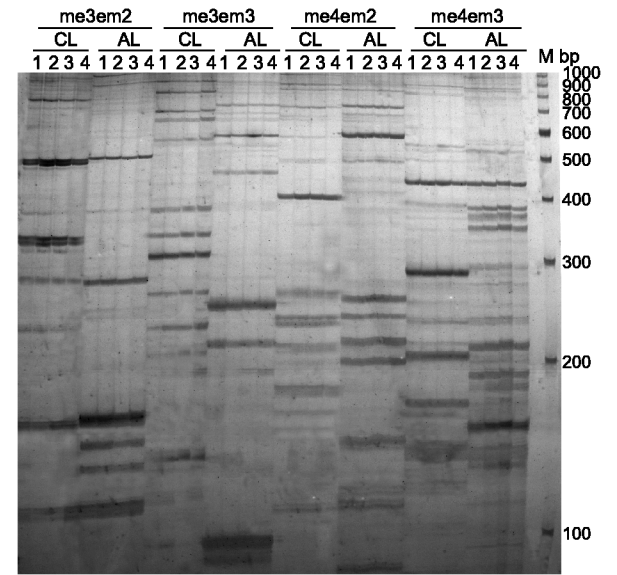
根据前面 PCR 反应体系各因子用量梯度的实验,得到莲 SRAP-PCR 最佳 10  $\mu\text{L}$  反应体系为: DNA 50 ng、 $\text{MgCl}_2$  2 mmol/L、dNTPs 0.2 mmol/L、*Taq* DNA 聚合酶 0.75 U、正反引物浓度均为 0.8  $\mu\text{mol/L}$ 。利用此体系 4 对引物组合均能扩增出清晰可见、产率较高的条带,获得较好的扩增效果。

2.4 莲 SRAP-PCR 体系的稳定性检测

为检测所确立的莲 SRAP-PCR 优化体系的稳定性,利用该优化体系对本实验室保存的 88 份花莲核心种质<sup>[28]</sup>进行了扩增。所选用的正向引物 (ME1-ME6) 和反向引物 (EM1-EM4) 组合的 16 对引物均有很好的扩增效果,获得了清晰稳定的谱带 (图 6)。经统计,16 对引物共获得 183 条清晰的谱带,其中 165 条具有多态性,比率为 90%。表明建立的 SRAP 反应体系稳定可靠,适用于莲种质资源的分子标记分析。

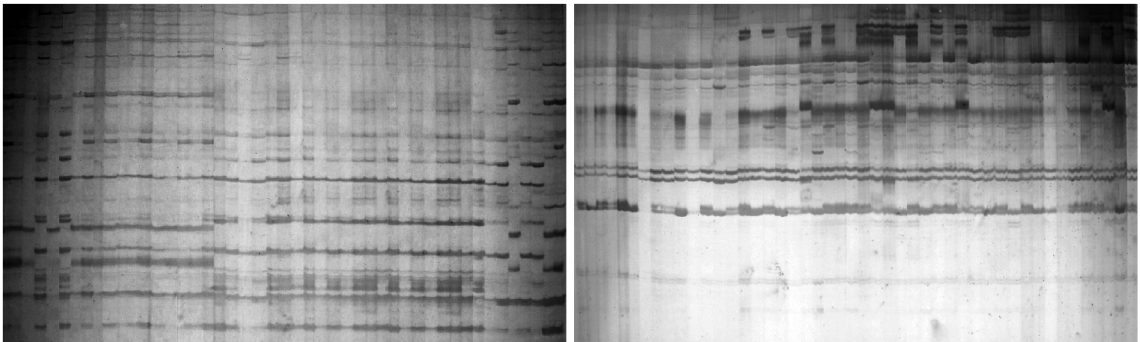
3 讨论

SRAP 分子标记技术具有操作简单、稳定、中等产率等特点,而且在基因组中分布均匀,引物具有通用性,适用于不同作物上的各种研究,目前已在数十



CL: 中国古代莲 (Chinese Antique Lotus), AL: 美洲黄莲 (America Lotus); 1 = 0.4  $\mu\text{mol/L}$ , 2 = 0.6  $\mu\text{mol/L}$ , 3 = 0.8  $\mu\text{mol/L}$ , 4 = 1.0  $\mu\text{mol/L}$ , M = DNA marker。

图 5 不同引物浓度条件下 SRAP-PCR 扩增的结果  
Fig. 5 The SRAP-PCR results of different primer concentrations



a: 所用引物组合为 me3em3; b: 所用引物组合为 me4em2。  
a: The primer pair used is me3em3; b: The primer pair used is me4em2.

图 6 优化的 SRAP-PCR 体系在花莲核心种质中的检测结果  
Fig. 6 Testing results of optimized SRAP-PCR system in the core-collection of flower lotus

种植物中应用<sup>[2-8,26]</sup>。SRAP 是基于 PCR 的分子标记技术,与其他 PCR 技术类似,扩增结果易受到反应体系和扩增程序的影响。优化 SRAP-PCR 反应的条件是获得可靠结果的关键。对众多植物的研究表明 SRAP-PCR 反应体系中模板浓度、dNTP 浓度、Mg<sup>2+</sup> 浓度、Taq DNA 聚合酶浓度、引物浓度的变化对扩增结果有着明显的影响<sup>[24-26]</sup>。

本试验对莲基因组 SRAP-PCR 反应体系中的这 5 种组分进行了单因素多水平梯度试验,以期探索与优化莲 SRAP-PCR 反应体系。研究发现这 5 个因子对扩增效果均有一定的影响,其中以 Taq DNA 聚合酶的影响最大,其次为 MgCl<sub>2</sub> 浓度,引物浓度的影响最小。各因子浓度的变化对不同引物扩增结果的影响存在一定差异,如 Taq DNA 聚合酶浓度变化对引物 me3em2 的影响不大,各浓度条件下均得到清晰稳定的条带;引物 me4em1 和 me4em3 的扩增效果随着 Taq DNA 聚合酶浓度增加,条带数目逐渐增加,亮度也增加;对引物 me3em3 的影响最大,从较少条带(美洲黄连)甚至无带(中国古代莲)逐渐增加到扩增出清晰、稳定的条带(图 4)。

通过比较 4 对引物组合在 2 个莲资源中的扩增效果,优化和确定了莲 SRAP-PCR 扩增的最佳 10 μL 反应体系为: DNA 50 ng、MgCl<sub>2</sub> 2 mmol/L、dNTPs 0.2 mmol/L、Taq DNA 聚合酶 0.75 U、正反向引物浓度均为 0.8 μmol/L,按照 Li 和 Quiros<sup>[1]</sup> 设计的程序“94℃预变性 5 min;94℃变性 1 min,35℃复性 1 min,72℃延伸 1 min,5 个循环;94℃变性 1 min,50℃复性 1 min,72℃延伸 1 min,35 个循环;72℃延伸 10 min;4℃保存”进行扩增可以得到较为满意的结果。为了检验该 SRAP-PCR 体系的稳定性,我们利用此体系对本实验室所构建的花莲核心种质资源<sup>[28]</sup>进行了分析,获得了清晰、重复性好的花莲核心种质 SRAP 指纹图谱(图 6)。

本研究优化的反应体系与标准 SRAP-PCR 反应体系及已报道的其它植物的反应体系存在一定的差异,这可能是不同物种间基因组 DNA 的差异造成的<sup>[24-26]</sup>。目前 RAPD、ISSR、SSR、AFLP 等分子标记在莲上已经成功应用<sup>[13-21]</sup>,而 SRAP 应用仍处于起步阶段<sup>[22,23]</sup>。本研究所确立的莲 SRAP-

PCR 反应体系对 SRAP 分子标记在莲上的运用有一定的指导意义。SRAP 分子标记以其独特的优势,在莲种质资源鉴定、遗传多样性分析、遗传图谱构建、基因定位等方面有广泛的应用前景。

## 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] 李建军, 刘志坚, 肖层林, 贺立伟. SRAP 技术在遗传的研究进展 [J]. *现代生物医学进展*, 2007, 7(5): 783-786.
- [3] Guo D L, Hou X G, Zhang J. Sequence-related amplified polymorphism analysis of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andrews) cultivars with different flower colours [J]. *J Hortic Sci Biotech*, 2009, 84: 131-136.
- [4] 郝玉民, 郭兰, 韩延闯, 刁英, 杨新笋, 胡中立. 甘薯品种的 SRAP 遗传多样性分析 [J]. *武汉植物学研究*, 2007, 25(4): 406-409.
- [5] 郑海燕, 粟建光, 戴志刚, 李燕, 陈基权, 龚友才. 红麻种质资源 SRAP 指纹图谱构建及遗传多样性分析 [J]. *湖北农业科学*, 2011, 50(2): 411-415.
- [6] Sun Z D, Wang Z N, Tu J X, Zhang J F, Yu F Q, McVetty P B E, Li G Y. An ultradense genetic recombination map for *Brassica napus*, consisting of 13551 SRAP markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2007, 114: 1305-1317.
- [7] 姜树坤, 张喜娟, 张丽. 水稻品种‘沈农 606’抗稻瘟病基因定位和连锁的 SRAP 片段分析 [J]. *植物生理学通讯*, 2007, 43(5): 852-856.
- [8] 马爱芬, 李加纳, 谌利, 钱伟, 付福友, 刘列钊. 甘蓝型油菜种皮色泽相关基因的 cDNA-SRAP 差异显示 [J]. *作物学报*, 2008, 34(3): 526-529.
- [9] 中国科学院武汉植物研究所. 中国莲 [M]. 北京: 科学出版社, 1987: 1-20.
- [10] 柯卫东, 李峰, 刘玉平. 中国莲资源及育种研究综述 (上) [J]. *长江蔬菜*, 2003(4): 5-9.
- [11] 柯卫东, 李峰, 刘玉平, 孙冰. 中国莲资源及育种研究综述 (下) [J]. *长江蔬菜*, 2003(5): 5-8.
- [12] 王芸, 刘玉平, 刘义满, 柯卫东. 分子标记技术在莲遗传多样性分析中的应用 [J]. *长江蔬菜*, 2009(16):

- 8-10.
- [13] 郭宏波,李双梅,柯卫东. 花莲种质资源的遗传多样性及品种间亲缘关系的探讨[J]. 武汉植物学研究, 2005, 23(5): 417-421.
- [14] Guo H B, Li S M, Peng J, Ke W D. Genetic diversity of *Nelumbo* accessions revealed by RAPD[J]. *Genet Resour Crop Ev*, 2007, 54: 741-748.
- [15] Chen Y Y, Zhou R C, Lin X D, Wu K Q, Qian X E, Huang S Z. ISSR analysis of genetic diversity in sacred lotus cultivars[J]. *Aquatic Botany*, 2008, 89: 311-316.
- [16] Han Y C, Teng C Z, Wahiti G R, Zhou M Q, Hu Z L, Song Y C. Mating system and genetic diversity in natural populations of *Nelumbo nucifera* (Nelumbonaceae) detected by ISSR markers[J]. *Plant Syst Evol*, 2009, 277: 13-20.
- [17] Han Y C, Teng C Z, Zhong S, Zhou M Q, Hu Z L, Song Y C. Genetic variation and clonal diversity in populations of *Nelumbo nucifera* (Nelumbonaceae) in central China detected by ISSR markers[J]. *Aquatic Botany*, 2007, 86: 69-75.
- [18] Li Z, Liu X Q, Gituru R W, Juntawong N, Zhou M Q, Chen L Q. Genetic diversity and classification of *Nelumbo* germplasm of different origins by RAPD and ISSR analysis[J]. *Sci Hortic*, 2010, 125: 724-732.
- [19] Fu J, Xiang Q Y, Zeng X B, Yang M, Wang Y, Liu Y L. Assessment of the genetic diversity and population structure of lotus cultivars grown in China by amplified fragment length polymorphism[J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 2011, 136: 339-349.
- [20] Kubo N, Hirai M, Kaneko A, Tanaka D, Kasumi K. Classification and diversity of sacred and American *Nelumbo* species: the genetic relationships of flowering lotus cultivars in Japan using SSR markers[J]. *Plant Genetic Resources-Charac*, 2009, 7: 260-270.
- [21] Pan L, Xia Q J, Quan Z W, Liu H G, Ke W D, Ding Y. Development of novel EST-SSRs from sacred lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) and their utilization for the genetic diversity analysis of *N. nucifera*[J]. *J Hered*, 2010, 101: 71-82.
- [22] 刘月光,滕永勇,潘辰,韩延闯,周明全,胡中立. 应用 SRAP 标记对莲藕资源的聚类分析[J]. 氨基酸和生物资源, 2006, 28(1): 29-32.
- [23] 瞿桢,魏英辉,李大威,肖丽舟,徐金星,谢克强,周明全,胡中立. 莲品种资源的 SRAP 遗传多样性分析[J]. 氨基酸和生物资源, 2008, 30(3): 21-25.
- [24] 胡小虎,刁英,郑兴飞,胡晖,余作平,胡中立. 能源植物芒的 SRAP 分子标记体系建立与优化[J]. 中国农学通报, 2010, 26(22): 58-61.
- [25] 冯健,王骞春,于世河,杨鹤,李秀玲,吴树成. 红松 SRAP-PCR 反应体系的优化[J]. 辽宁林业科技, 2010(6): 6-8.
- [26] 孙佳琦,梁建国,石少川,高亦珂,张启翔. SRAP 标记在观赏植物遗传育种中的应用[J]. 分子植物育种, 2010, 8(3): 577-588.
- [27] Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue[J]. *Focus*, 1990, 12: 13-15.
- [28] 杨美,付杰,向巧彦,刘艳玲. 利用 AFLP 分子标记技术构建花莲核心种质资源[J]. 中国农业科学, 2011, 44(15): 3193-3205.

(责任编辑: 王豫鄂)