

研究报告

A Letter

金花茶 SRAP-PCR 反应体系的优化与确立

李健^{1,2}, 蒋昌华^{1,2}, 张亚利^{1,2}, 刘昭^{1,2}, 赵晓峰^{1,2}, 胡永红^{1,2}

1. 上海植物园, 上海, 200231

2. 上海城市植物资源开发应用工程技术研究中心, 上海, 200231

✉ 通讯作者: lijian19812008@126.com; ✉ 作者

分子植物育种, 2011 年, 第 9 卷, 第 23 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0023

收稿日期: 2010 年 10 月 20 日

接受日期: 2011 年 02 月 18 日

发表日期: 2011 年 03 月 01 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放获取论文。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。

引用格式:

李健等, 2011, 金花茶 SRAP-PCR 反应体系的优化与确立, 分子植物育种 Vol.9 No.23 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0023)

摘要 本研究采用 $L_{16}(4^5)$ 正交实验设计, 对 SRAP-PCR 反应体系中 Mg^{2+} 、dNTPs 和引物浓度以及 *Taq* DNA 聚合酶和模板 DNA 用量等 5 个因素进行了优化, 并确立了适合金花茶(*Camellia nitidissima*) SRAP-PCR 的反应体系。金花茶的 SRAP-PCR 最佳反应体系为: 反应体系总体积 20 μ L, 含 1.50 mmol/L Mg^{2+} 、0.20 μ mol/L dNTPs、0.30 μ mol/L 引物、75 ng 模板 DNA、1.00 U *Taq* DNA 聚合酶及 1 \times PCR Buffer。各因素对金花茶基因组 DNA SRAP-PCR 扩增结果的影响程度不同, 其中 Mg^{2+} 浓度的影响最大, dNTPs 浓度的影响最小。通过对优化的 SRAP-PCR 反应体系进行验证, 获得了多态性丰富、条带清晰的扩增图谱, 表明所确立的金花茶 SRAP-PCR 反应体系稳定可靠。

关键词 金花茶; SRAP-PCR; 正交实验设计; 反应体系优化

Optimization and Establishment of SRAP-PCR Reaction System of *Camellia Nitidissima*

Li Jian^{1,2}, Jiang Changhua^{1,2}, Zhang Yali^{1,2}, Liu Zhao^{1,2}, Zhao Xiaofeng^{1,2}, Hu Yonghong^{1,2}

1. Shanghai Botanical Garden, Shanghai, 200231, P.R. China

2. Shanghai Engineering Research Center of Sustainable Plant Innovation, Shanghai, 200231, P.R. China

✉ Corresponding author, lijian19812008@126.com; ✉ Authors

Abstract By the orthogonal experiment design $L_{16}(4^5)$, five factors including Mg^{2+} concentration, dNTPs concentration, primer concentration, *Taq* DNA polymerase amount and template DNA amount in SRAP-PCR reaction system were optimized, and the optimization SRAP-PCR reaction system suitable for genomic DNA from *Camellia nitidissima* were also established. The optimal SRAP-PCR reaction system is as follows: total volume 20 μ L, containing 1.50 mmol/L Mg^{2+} , 0.20 μ mol/L dNTPs, 0.30 μ mol/L primer, 75 ng template DNA, 1.00 U *Taq* DNA polymerase and 1 \times PCR buffer. The effects of five factors on amplification result of SRAP-PCR are different in which, the effect of Mg^{2+} concentration is the greatest but that of dNTPs concentration is the least. The optimal SRAP-PCR reaction system is identified and the amplification pattern with rich polymorphism and clear band is obtained. It is concluded that this SRAP-PCR reaction system used for genomic DNA from *Camellia nitidissima* is steady and reliable.

Keywords *Camellia nitidissima*; SRAP-PCR; Orthogonal experiment design; Optimization of reaction system

研究背景

金花茶(*Camellia nitidissima* Chi)是山茶科(Theaceae)山茶属金花茶组植物, 为常绿灌木或小乔木。作为国家一级保护植物和稀有物种金花茶已列入中国植物红皮书(傅立国, 1992)和《国际生物多样性公约》附属 II 物种(黄付平, 2001)。金花茶花蜡质金黄、金瓣玉蕊, 它含有特殊的黄色遗传基因 KNA 在植物界十分罕见, 填补了园艺学家梦寐以求

的黄色系列茶花的空白(秦小明等, 2005)。因此金花茶是世界珍稀的观赏植物和种质资源, 被人们誉为“茶族皇后”和植物界的“大熊猫”。

邓桂英等(2000)对金花茶的杂交育种、染色体数目及核型分析、分类及其演化、孢粉学以及应用研究等方面的最新进展作了总结概述。但是金花茶的分子生物学研究相对滞后, 目前已报道的应用于金花茶的分子标记主要有 RAPD (施苏华等, 1998;

唐绍清等, 1998), ISSR (宾晓芸等, 2005) 和 AFLP (宾晓芸, 2005)。

相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)分子标记是一种基于 PCR 的新型标记,具有简便、快捷、稳定、高效、共显性高及在基因组中分布均匀等特点(Li et al., 2001)。该分子标记的引物设计简单,上、下游引物分别对外显子区域及内含子和启动子区域进行特异扩增,根据不同个体和物种的内含子、启动子及间隔区长度的不同而产生多态性,并且 17 bp 的正向引物、18 bp 的反向引物以及 50℃ 的退火温度保证了扩增结果的稳定性。迄今为止,SRAP 标记在观赏植物研究中的应用甚少,仅在石斛(樊洪泓等, 2006)、石蒜(袁菊红等, 2007)、百合(陈琼等, 2007)、牡丹(Han et al., 2008; Hao et al., 2008)、桂花(李梅等, 2009)和菊花(张飞等, 2009; Zhang et al., 2010)中有相关报道,在金花茶研究中尚未见报道。

由于不同的植物的 SRAP 最佳反应体系差别很大(刘立军等, 2006),甚至同一种植物在不同的试验条件下其研究结果都有差异(柴丹丹等, 2008)。因此,本研究以观赏植物金花茶基因组 DNA 为模板,探讨 SRAP-PCR 反应体系中 5 种因素对扩增的影响,以期获得金花茶 SRAP 扩增的最佳反应体系,为进一步利用 SRAP 标记技术开展金花茶种质资源遗传多样性研究、连锁遗传图谱构建和分子标记育种等方面将发挥重要作用。

1 结果与分析

1.1 金花茶基因组 DNA 的 SRAP-PCR 反应体系的正交实验

参照穆立蕾等(2006)的方法,对金花茶基因组 DNA 的 SRAP-PCR 反应体系中 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、*Taq* DNA 聚合酶用量、引物浓度和模板 DNA 用量等 5 个因素 4 个水平组合的正交实验结果进行统计分析,结果见表 1。由表 1 中的 R 值可以看出,对金花茶基因组 DNA 的 SRAP-PCR 扩增反应结果的影响由大到小依次为: Mg^{2+} 浓度、模板 DNA 用量、*Taq* DNA 聚合酶用量、引物浓度、dNTPs 浓度。从 k 值来看, Mg^{2+} 浓度为 1.50 mmol/L、dNTPs 浓度为 0.25 μ mol/L、引物浓度为 0.30 μ mol/L、*Taq* DNA 聚合酶用量为 1.0 U、模板 DNA 用量以 100 ng 时,扩增结果最好。

根据正交实验结果,初步确立金花茶基因组 DNA 的 SRAP-PCR 反应的适宜反应体系应含 1.50 mmol/L Mg^{2+} 、0.25 μ mol/L dNTPs、0.30 μ mol/L 引物、100 ng 模板 DNA 及 1.00 U *Taq* DNA 聚合酶。

采用不同的反应体系,金花茶基因组 DNA 的 SRAP-PCR 扩增电泳图谱见图 1。由图 1 可以看出,采用 dNTPs 浓度、 Mg^{2+} 浓度、引物浓度、*Taq* DNA 聚合酶用量以及模板 DNA 用量不同的 16 个反应体系,扩增结果存在差异。第 5、6、7、8、9、10、11、13 和 14 号反应体系的扩增效果较差,条带弱而且多态性较低,有弥散和拖尾现象;第 1、2、4、12 和 15 号反应体系的扩增条带虽然丰富,但是条带较弱;第 3 和 16 号反应体系的扩增结果不仅多态性好,且条带较清晰。综合比较条带强弱及多态性,初步选定将第 3 号反应体系(含 1.50 mmol/L Mg^{2+} 、0.20 μ mol/L dNTPs、0.40 μ mol/L 引物、75 ng 模板 DNA 及 1.50 U *Taq* DNA 聚合酶)作为金花茶基因组 DNA 的 SRAP-PCR 反应体系。

1.2 金花茶 SRAP-PCR 反应体系的确立

对表 1 的统计分析结果及图 1 的直观分析结果进行综合分析,结果显示,根据正交实验结果筛选出的金花茶基因组 DNA 的 SRAP-PCR 适宜反应体系与根据扩增图谱筛选出的第 3 号反应体系存在差异。综合考虑实验成本及扩增效果,最终确定金花茶基因组 DNA 的 SRAP-PCR 的最佳反应体系为:反应体系总体积 20 μ L,含 1.50 mmol/L Mg^{2+} 、0.20 μ mol/L dNTPs、0.30 μ mol/L 引物、75 ng 模板 DNA、1.00 U *Taq* DNA 聚合酶及 1 \times PCR Buffer。

1.3 金花茶 SRAP-PCR 反应体系的稳定性分析

应用上述最佳反应体系,随机选择 SRAP 引物组合 Me5-Em3,对随机选择的花花茶 10 个单株进行 SRAP-PCR 扩增,结果见图 2。由图 2 可以看出,引物组合对每份 DNA 样品均能扩增出多态性丰富、条带清晰的 DNA 片段,说明该 SRAP-PCR 反应体系稳定可靠,适用于金花茶基因组 DNA 的 SRAP-PCR 扩增反应。

2 讨论

SRAP-PCR 反应受反应条件和扩增程序变化等因素影响,此外,不同物种对反应条件的要求也存在一定的差异。因此,对金花茶基因组 DNA 的

表 1 金花茶基因组 DNA 的 SRAP-PCR 反应的正交实验设计及结果

Table 1 The design and result of orthogonal experiment of SRAP-PCR reaction system of genomic DNA from *Camellia nitidissima*

编号 Code	因素 Factors				
	Mg ²⁺ mmol/L	dNTPs μ mol/L	Taq DNA U	Primers μ mol/L	Template DNA ng
1	1.50	0.10	0.50	0.20	25
2	1.50	0.15	1.00	0.30	50
3	1.50	0.20	1.50	0.40	75
4	1.50	0.25	2.00	0.50	100
5	2.00	0.10	1.00	0.40	100
6	2.00	0.15	0.50	0.50	75
7	2.00	0.20	2.00	0.20	50
8	2.00	0.25	1.50	0.30	25
9	2.50	0.10	1.50	0.50	50
10	2.50	0.15	2.00	0.40	25
11	2.50	0.20	0.50	0.30	100
12	2.50	0.25	1.00	0.20	75
13	3.00	0.10	2.00	0.30	75
14	3.00	0.15	1.50	0.20	100
15	3.00	0.20	1.00	0.50	25
16	3.00	0.25	0.50	0.40	50
k1	5.43	4.50	4.83	4.83	4.83
k2	5.25	4.93	5.18	5.18	4.33
k3	4.33	4.83	5.00	4.93	4.93
k4	4.40	5.15	4.40	4.48	5.25
R	1.10	0.65	0.78	0.70	0.92

注: k 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; R 为某因子 k 值的极差

Note: k indicates the average amplified bands of a factor at a certain level in all the PCR reactions; R indicates the range of k value for a certain factor

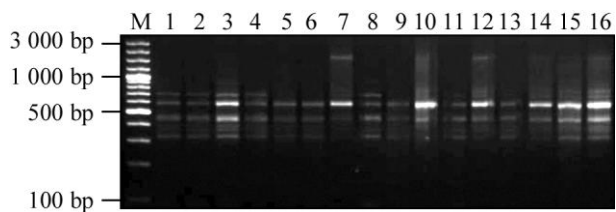


图 1 不同反应体系中金花茶基因组 DNA 的 SRAP-PCR 扩增图谱(引物组合 Me2-Em10)

注: M: 100 bp Plus DNA Ladder; 1-16: 反应体系编号

Figure 1 SRAP-PCR amplification pattern of genomic DNA from *Camellia nitidissima* in different reaction systems (primer combination Me2-Em10)

Note: M: 100 bp Plus DNA Ladder; 1-16: No of amplification systems

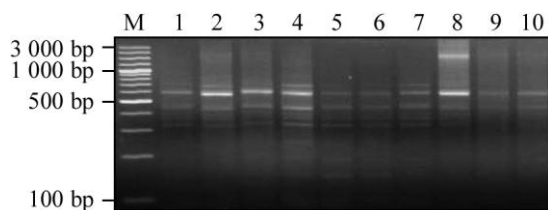


图2 金花茶基因组 DNA 的 SRAP-PCR 扩增图谱
注: M: 100 bp Plus DNA Ladder; 1-10: 10 个金花茶单株编号
Figure 2 SRAP-PCR amplification pattern of genomic DNA from *Camellia nitidissima*
Note: M: 100 bp Plus DNA Ladder; 1-10: No of 10 individuals of *Camellia nitidissima*

SRAP-PCR 反应条件进行优化是非常必要的。正交实验设计可以考察各因素之间的相互效应, 具有均衡分散、综合可比、伸缩灵活及效应明确的特点, 能迅速获得满意的试验结果, 而且试验规模小, 节省人力物力。所以利用正交实验设计对影响 SRAP-PCR 反应的主要因素进行筛选, 能较快地寻找到合适的反应参数, 避免单因素实验结果的不足。但在个别因素用量方面也存在一定差别, 可能由于正交设计中主要根据电泳条带的清晰度及条带数目判断依据带有一定的主观成分所致(邹小云, 2010)。

袁菊红等(2007)的研究结果表明, Mg^{2+} 浓度对石蒜 SRAP 扩增结果的影响最明显, 但 dNTPs 浓度对扩增结果影响不明显; 本研究结果和郭大龙等(2006)的研究结果一致, 而与张飞等(2009)和王艳青(2009)的研究结果存在差异, 这可能与研究物种的不同有一定的关系。在不同物种的 SRAP-PCR 反应体系中, 既有相似的影响因素, 也有各自特殊的反应条件, 因此, 应针对不同的研究对象设计不同的 SRAP-PCR 反应体系。本研究从经济有效的角度, 在对扩增图谱进行直观分析和对条带数目进行统计分析的基础上, 对最优反应体系参数做了适当的调整, 确定了金花茶基因组 DNA 的 SRAP-PCR 的最佳反应体系为: 反应体系总体积 20 μ L, 含 1.50 mmol/L Mg^{2+} 、0.20 μ mol/L dNTPs、0.30 μ mol/L 引物、75 ng 模板 DNA、1.00 U *Taq* DNA 聚合酶及 1 \times PCR Buffer。

对该体系的验证结果证明, 本研究建立的金花茶 SRAP-PCR 反应体系稳定、可靠, 这一优化的反

应体系为进一步利用 SRAP 分子标记技术对金花茶的资源鉴定、分类和分子遗传图谱的构建及基因定位奠定了良好的试验基础。

3 材料与方法

3.1 供试材料与试剂

供试材料为金花茶, 2010 年采自上海植物园山茶资源圃。

用于 SRAP 反应的引物等试剂均购自上海生物工程技术有限公司, 经初步筛选, 确定 Me2 (TGAGTCCAAACCGGAGC) 和 Em10 (GACTGCTACGAATTCAG) 作为此次正交试验的固定引物。

3.2 金花茶基因组 DNA 模板的提取与检测

取金花茶嫩叶采用 CTAB 微量法提取基因 DNA, 将基因组 DNA 和 Lambda DNA 用质量体积分数 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 以检测基因组 DNA 的纯度和浓度, 并用双蒸水稀释至 100 ng/ μ L, -20°C 保存备用。

3.3 SRAP-PCR 反应体系的正交实验设计

以金花茶的嫩叶为材料, 采用正交设计 $L_{16}(4^5)$ 进行试验, PCR 反应各因素水平见表 2。对 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、*Taq* DNA 酶用量、引物浓度和模板 DNA 用量进行 5 因素 4 水平正交实验, 3 次重复。

3.4 SRAP-PCR 扩增及检测

扩增程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 复性 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 8 个循环反应; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 复性 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 32 个循环反应; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增反应结束后, 分别加入 0.5 μ L 6 \times 溴酚蓝, 离心混匀后, 取 7 μ L 扩增产物用质量体积分数 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳, 凝胶中含 0.05% 的溴化乙锭 (EB)。电极缓冲液为 1 \times TAE, 电泳电压 5V/cm, 电泳时间 45 min, 电泳结束后, 在凝胶成像分析仪上观测并拍照。

3.5 SRAP-PCR 反应体系稳定性的检测

随机选取金花茶 10 个个体植株的基因组 DNA 作为模板, 选用引物组合 Me5-Em3, 按照上述 SRAP-PCR 扩增及检测方法, 对优化确定的金花茶基因组 DNA 的 SRAP-PCR 反应体系的稳定性进行检测。

表 2 PCR 反应的因素水平

Table 2 Factors and levers of PCR reaction

因素 Factors	水平(体系终浓度) Levels (final concentration)			
	1	2	3	4
Mg ²⁺ (mmol/L)	1.50	2.00	2.50	3.00
dNTPs (μmol/L)	0.10	0.15	0.20	0.25
Taq (U)	0.50	1.00	1.50	2.00
引物	0.20	0.30	0.40	0.50
Primer (μmol/L)				
模板	25	50	75	100
DNA template (ng)				

作者贡献

李健、蒋昌华和 张亚利是本研究的实验设计和实验研究的执行人;李健和蒋昌华完成数据分析,论文初稿的写作;刘焯和赵晓峰参与实验设计,试验结果分析;胡永红是项目负责人,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


本研究由上海市科技兴农重点攻关项目(2008D10-4号)资助。作者感谢浙江农业科学研究院萧山花卉研究所张飞博士在本实验过程中的实验建议和修改建议。

参考文献

- Bin X.Y., Tang S.Q., Zhou J.Y., Song H.T., and Li Z.Y., 2005, ISSR analysis on genetic diversity of *Camellia nitidissima* Chi (Theaceae) in China, Wuhan Zhiwuxue Yanjiu(Journal of Wuhan Botanical Research), 23(1): 20-26 (宾晓芸, 唐绍清, 周俊亚, 宋洪涛, 黎尊谊, 2005,金花茶遗传多样性的 ISSR 分析, 武汉植物学研究, 23(1): 20-26)
- Bin X.Y., 2005, Genetic diversity and population structure of *Camellia nitidissima* as revealed by ISSR, RAPD and AFLP markers, Thesis for M.S., Guangxi Normal University, Supervisor: Tang S.Q., pp.31-34 (宾晓芸, 2005,金花茶遗传多样性和居群遗传结构的 ISSR, RAPD 和 AFLP 分析, 硕士学位论文, 广西师范大学,导师: 唐绍清, pp.31-34)
- Chai D.D., Chen S.X., Meng H.W., Cheng Z.H., and Li Y.L., 2008, Establishment of SRAP-PCR reaction system on cucumber, Xibei Nongye Xuebao(Acta Agriculturae Borealioccidentalis Sinica), 17(3): 274-279 (柴丹丹, 陈书霞, 孟焕文, 程智慧, 李亚利, 2008, 黄瓜 SRAP-PCR 反应体系的建立, 西北农业学报, 17(3): 274-279)

- Chen Q., Mu D., and Yi M.F., 2007, Identification and genetic expressions of Lily hybrids obtained by different ploidy cross combinations, Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica), 34(6): 1477-1484 (陈琼, 穆鼎, 义鸣放, 2007, 不同倍性百合杂交后代的核型及分子标记鉴定, 园艺学报, 34 (6): 1477-1484)
- Deng G.Y., Yang Z.D., and Lu T.L., 2000, A brief review of research on yellow camellia in China, GuangXi Nongye Shengwu Kexue (Journal of Guangxi Agric.and Biol. Science), 19(2): 126-130 (邓桂英, 杨振德, 卢天玲, 2000, 我国金花茶研究概述, 广西农业生物科学, 19(2): 126-130)
- Fan H.H., Li Y.C., and Qiu J., 2006, Optimization of SRAP reaction system for plants of dendrobium, Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding), 4(6s): 153-156 (樊洪泓, 李廷春, 邱婧, 2006, 石斛属植物 SRAP 反应体系的建立与优化, 分子植物育种, 4(6s): 153-156)
- Fu L.G., 1992, China plant red data book: Rare and endangered plants, Beijing, Science Press, Beijing, China, pp.648-649 (傅立国, 1992, 中国植物红皮书-稀有濒危植物, 中国, 北京, 科学出版社, pp. 648-649)
- Guo D.L., and Luo Z.R., 2006, Optimization of SRAP -PCR in some Diospyros spp, Guoshu Xuebao (Journal of Fruit Science), 23 (1): 138-141 (郭大龙, 罗正荣, 2006, 部分柿属植物 SRAP-PCR 反应体系的优化, 果树学报, 23 (1): 138-141)
- Han X.Y., Wang L.S., and Shu Q.Y., 2008, Molecular characterization of tree peony germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers, Biochemical Genetics, 46: 162-179
- Hao Q., Liu Z.A., and Shu Q.Y., 2008, Studies on Paeonia cultivars and hybrids identification based on SRAP

- analysis, *Hereditas*, 145(1): 38-47
- Huang F.P., 2001, A study on phytocoenose type of *Camellia chrysantha* in Fangcheng country of Guangxi, China, *Guangxi Linye Kexue* (*Guangxi Forestry Science*), 30: 1 (黄付平, 2001, 防城金花茶植物群落类型的研究, 广西林业科学, 30: 1)
- Li G., 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: 455-461
- Li M., Hou X.L., and Hao R.M., 2009, Establishment and verification of SRAP-PCR of *Osmanthus fragrans*, *Zhiwu Ziyuan Yu Huanjing Xuebao* (*Journal of Plant Resources and Environment*), 18 (2): 15-21 (李梅, 侯喜林, 郝日明, 2009, 桂花 SRAP-PCR 体系的确立及验证, 植物资源与环境学报, 18 (2): 15-21)
- Liu L.J., Meng Z.Q., Xing X.L., and Peng D.X., 2006, Optimization for SRAP reaction system in ramie, *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)
- Mu L.Q., Liu Y.N., and Feng F.J., 2006, Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction system for *Tilia amurensis*, *Linye Kexue* (*Scientia Silvae Sinicae*), 42(6): 26-31 (穆立蕾, 刘赢男, 冯富娟, 2006, 紫椴 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化, 林业科学, 42 (6): 26-31)
- Qin X.M., Ning E.C., and Li J.Q., 2005, Development and utilization of new food resources of camellia chrysantha, *Guangxi Redai Nongye* (*Guangxi Tropical Agriculture*), 2: 20-22 (秦小明, 宁恩创, 李建强, 2005, 金花茶食品新资源的开发利用, 广西热带农业, 2: 20-22)
- Shi S.H., Tang S.Q., Chen Y.Q., Qu L.H., and Zhang H.D., 1998, Phylogenetic relationships among 11 yellow flowered *Camellia* species based on RAPD, *Zhiwu Fenlei Xuebao* (*Acta Phytotaxonomica Sinica*), 36 (4): 317-322, (施苏华, 唐绍清, 陈月琴, 屈良鹄, 张宏达, 1998, 11 种金花茶植物的 RAPD 分析及其系统学意义, 植物分类学报, 36(4): 317-322)
- Tang S.Q., Shi S.H., Chen Y.Q., Qu L.H., and Zhang H.D., 1998, Phylogenetic relationship of *Camellia nitidissima* Chi and its allied species based on Random Amplified Polymorphic DNA, *Zhongshan Daxue Xuebao* (*Acta Universitatis Sunyatseni*), 37(4): 28-32 (唐绍清, 施苏华, 陈月琴, 屈良鹄, 张宏达, 1998, 金花茶与近缘种的 RAPD 分析及分类学意义, 中山大学学报, 1998, 37(4): 28-32)
- Yuan J.H., Quan J.P., and Hu M.H., 2007, Establishment and optimization of SRAP reaction system of *Lycoris radiate*, *Zhiwu Ziyuan Yu Huanjing Xuebao* (*Journal of Plant Resources and Environment*), 16(4): 1-6 (袁菊红, 权俊萍, 胡绵好, 2007, 石蒜 SRAP-PCR 扩增体系的建立与优化, 植物资源与环境学报, 16 (4): 1-6)
- Zhang F., Chen F.D., Fang W.M., Li F.T., and Liu P.S., 2009, Optimization and establishment of SRAP-PCR reaction system of *Dendranthema grandiflorum*, *Zhiwu Ziyuan Yu Huanjing Xuebao* (*Journal of Plant Resources and Environment*), 18(3): 44-49 (张飞, 陈发棣, 房伟民, 李凤童, 刘浦生, 2009, 菊花 SRAP-PCR 反应体系的优化与确立, 植物资源与环境学报, 18(3): 44-49)
- Zhang F., Chen S.M., and Chen F.D., 2010, SRAP-based mapping and QTLs detection for inflorescence-related traits in *Chrysanthemum morifolium*, *Molecular Breeding*, DOI: 10.1007/s11032-010-9409-1
- Zou X.Y., Zou X.F., Chen L.L., and Song L.Q., 2010, Optimization for SRAP-PCR system of Peanut based on orthogonal design, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (*Molecular Plant Breeding*), 8(4): 822-826 (邹小云, 邹晓芬, 陈伦林, 宋来强, 2010, 花生 SRAP-PCR 反应体系的正交设计优化, 分子植物育种, 8(4): 822-826)

 5thPublisher是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5thPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>