



研究报告

Research Report

凤丹 SRAP-PCR 反应体系的优化

李健^{1,2}, 胡永红², 秦俊¹, 韩继刚², 刘焯², 蒲立栋¹, 奉树成¹

1. 上海植物园, 上海, 200231

2. 中国科学院上海辰山植物科学研究中心, 上海辰山植物园, 上海, 201602

✉ 通讯作者: 846058770@qq.com; ✉ 作者

分子植物育种, 2014 年, 第 12 卷, 第 1 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2014.12.0001

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。

引用格式(中文):

李健等, 2014, 凤丹 SRAP-PCR 反应体系的优化, 分子植物育种(online), 12(1): 1001-1007 (doi: 10.5376/mpb.cn.2014.12.0001)

引用格式(英文):

Li et al., 2014, Optimization of SRAP-PCR Reaction System of *Paeonia ostii*, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding), 12(1): 1001-1007 (doi: 10.5376/mpb.cn.2014.12.0001)

摘要 本研究采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计, 结合单因子试验对‘凤丹’SRAP 反应体系中的 5 个主要因素进行了优化, 并确立了‘凤丹’(*Paeonia ostii*) SRAP-PCR 的最佳反应体系。‘凤丹’的 SRAP-PCR 最佳反应体系为: 反应体系总体积 20 μ L, 含 1.000 U Taq 聚合酶浓度, 60 ng 模板 DNA, 1.500 mmol/L Mg^{2+} , 0.250 mmol/L dNTPs, 0.500 μ mol/L 引物及 10 \times PCR Buffer。通过优化的 SRAP-PCR 反应体系共筛选了 120 对多态性丰富、条带清晰的引物组合, 为牡丹图谱的构建奠定了基础。

关键词 ‘凤丹’; SRAP-PCR; 正交实验设计; 反应体系优化

Optimization of SRAP-PCR Reaction System of *Paeonia ostii*

Li Jian^{1,2}, Hu Yonghong², Qin Jun¹, Han Jigang², Liu Zhao², Pu Lidong¹, Feng Shucheng¹

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

2. Shanghai Chenshan Plant Science Research Center, Chinese Academy of Sciences, Shanghai Chenshan Botanical Garden, Shanghai, 201602, P.R. China

✉ Corresponding author, 846058770@qq.com; ✉ Authors

Abstract In this research, the orthogonal experiment design $L_{16}(4^5)$ combing with single factor experiment were used to optimize the five major factors in *Paeonia ostii* SRAP reaction system, and the optimized SRAP-PCR reaction system for *Paeonia ostii* was also established. The optimal SRAP-PCR reaction system was as follows: total volume 20 μ L, containing 1.000 U Taq DNA polymerase, 60 ng template DNA, 1.500 mmol/L Mg^{2+} , 0.250 mmol/L dNTPs, 0.500 μ mol/L primer, and 10 \times PCR buffer. 120 primer pairs with rich polymorphisms and clear bands were screened by the optimal SRAP-PCR reaction system, which will provide the basis for the construction of genetic linkage map for *Paeonia ostii*.

Keywords *Paeonia ostii*; SRAP-PCR; Orthogonal experiment design; Optimization of reaction system

研究背景

牡丹归芍药科(Paeoniaceae)芍药属(Paeonia)牡丹组(Sect. Mutan DC), 一直以来都是作为中国特产的重要观赏植物和药用植物而广为人知, 并得到人们的喜爱。近年来, 牡丹籽油提取和成分分析的研究发现, 牡丹籽具有较高的出油率, 牡丹籽油具有较高的营养价值, 特别是其亚麻酸含量远远高出了

目前主要的食用植物油(邓瑞雪等, 2010; 李凯等, 2012)。因此, 牡丹有望成为集观赏价值、药用价值和油用价值为一身的重要经济植物。中国牡丹主要有中原、西北、江南和西北四大品种群, 而江南牡丹品种群中的‘凤丹’系列, 是以杨山牡丹(*Paeonia ostii*)为主发展演化而来的品种(李嘉珏等, 2011), 具有适应性强, 对土壤条件要求不高, 栽培管理相对粗放, 且结实率较高的特点, 成为目前国内主要的药用和油用栽培牡丹品种。

近十多年来, RAPD、SSR、ISSR、AFLP 和 SRAP 等分子标记技术已逐渐应用于牡丹种质资源分类鉴定(Hosoki et al., 1997; 索志立, 2008)、亲

收稿日期: 2014 年 01 月 07 日

接受日期: 2014 年 01 月 08 日

发表日期: 2014 年 02 月 25 日

基金项目: 本研究由上海市科学技术委员会和上海市绿化局(11ZR1436100, 11391901101, F122431)资助



缘关系研究(孟丽和郑国生, 2004; 苏雪等, 2006; 侯小改等, 2006)、遗传多样性研究(龚洵等, 2003; 杨淑达等, 2005; Yuan et al., 2012)、指纹图谱构建(朱红霞, 2004)及杂种鉴定(Yuan et al., 2010; 索志立等, 2004; 2005; 吴蕊等, 2011; 王佳等, 2006)。

SRAP 标记已在观赏植物遗传多样性和遗传图谱构建研究中得到广泛应用, 如在石斛(樊洪泓等, 2006)、石蒜(袁菊红等, 2007)、百合(陈琼等, 2007)、桂花(李梅等, 2009)、菊花(张飞等, 2009; Zhang et al., 2010)、安祖花(于翠等, 2012)、莲(杨美等, 2012)中都有相关报道。目前 SRAP 已经应用于牡丹品种的分类与杂交新品系鉴定(Han et al., 2008; 郝青等, 2008)。

本课题组已经以‘凤丹’为母本, 配制了多种的杂交组合, 获得了不同的杂交群体, 所以本实验以‘凤丹’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‘凤

丹’ SRAP 的最优反应体系, 为今后课题组进行牡丹连锁遗传图谱构建以及遗传多样性研究提供技术支撑。

1 结果与分析

1.1 ‘凤丹’ SRAP-PCR 反应体系的正交试验

‘凤丹’的 SRAP 反应体系中 5 因素 4 水平组合的正交试验(表 1)。优化后“凤丹”的 SRAP-PCR 反应体系扩增结果(图 1): 其中组合 1 没有扩增出条带; 组合 2、5、6、8、9、10、13、15 扩增效果较差, 谱带弱且多态性低; 组合 7、12、14 扩增出的谱带多态性较高, 但谱带强度和主带较差; 组合 3、4、11、16 扩增的结果最好。所以我们进行单因子试验优化体系: 0.500 U Taq 酶, 60 ng 模板 DNA, 3.000 mmol/L Mg²⁺, 0.250 mmol/L dNTPs, 0.400 μmol/L 引物(组合 16)。

表 1 ‘凤丹’ SRAP-PCR 反应体系的正交试验设计表 L₁₆(4⁵)

Table 1 L₁₆(4⁵) orthogonal design diagram for SRAP-PCR reaction system in *paeonia ostii*

编号 Code	因素 Factors				
	Mg ²⁺ (mmol/L)	dNTPs (mmol/L)	Taq DNA (U)	引物(μmol/L) Primers (μmol/L)	模板 DNA (ng) Template DNA (ng)
1	1.500	0.100	0.500	0.200	30
2	1.500	0.150	1.000	0.300	60
3	1.500	0.200	1.500	0.400	90
4	1.500	0.250	2.000	0.500	120
5	2.000	0.100	1.000	0.400	120
6	2.000	0.150	0.500	0.500	90
7	2.000	0.200	2.000	0.200	60
8	2.000	0.250	1.500	0.300	30
9	2.500	0.100	1.500	0.500	60
10	2.500	0.150	2.000	0.400	30
11	2.500	0.200	0.500	0.300	120
12	2.500	0.250	1.000	0.200	90
13	3.000	0.100	2.000	0.300	90
14	3.000	0.150	1.500	0.200	120
15	3.000	0.200	1.000	0.500	30
16	3.000	0.250	0.500	0.400	60

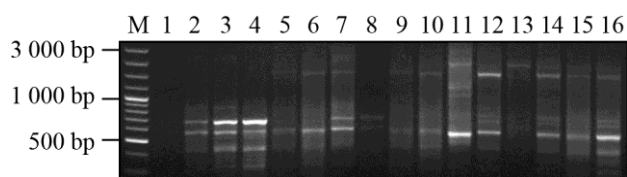


图 1 不同反应体系中‘凤丹’基因组 DNA 的 SRAP-PCR 扩增结果(引物: Me2-Em10)

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

Figure 1 SRAP-PCR amplification results of genomic DNA from *paeonia ostii* in different reaction systems (primer: Me2-Em10)

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

1.2 ‘凤丹’ SRAP 反应体系的优化

1.2.1 不同 Mg^{2+} 浓度对 SRAP 扩增的影响

Mg^{2+} 通过调节 *Taq* 聚合酶的活性影响 PCR 扩增结果, Mg^{2+} 浓度为 2.000 mmol/L、2.500 mmol/L 和 3.000 mmol/L 时条带较少、较弱且条带不清晰; 浓度为 1.500 mmol/L 时达到较好的扩增效果(图 2)。

1.2.2 不同 dNTP 浓度对 SRAP 扩增的影响

比较了 0.100 mmol/L、0.150 mmol/L、0.200 mmol/L、0.250 mmol/L dNTP 浓度对扩增结果的影响, 结果表明: 在各 dNTP 浓度下, 都能扩增出条带, 但 dNTP 浓度较低(0.100 mmol/L, 0.150 mmol/L)时, 扩增条带少, 且条带较弱。dNTP 浓度以 0.250 mmol/L 较为适宜, 条带稳定且清晰(图 2)。

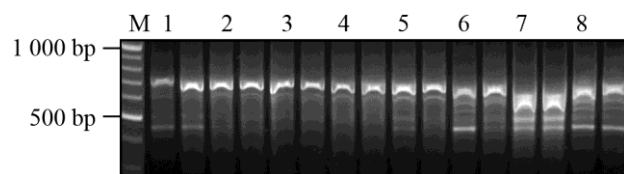


图 2 不同 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度的 SRAP 扩增结果

注: M: 100 bp Plus DNA Ladder; 1~4: Mg^{2+} 浓度分别为 1.500 mmol/L, 2.000 mmol/L, 2.500 mmol/L, 3.000 mmol/L; 5~8: dNTPs 浓度分别为 0.100 mmol/L, 0.150 mmol/L, 0.200 mmol/L, 0.250 mmol/L, 每个处理重复 2 次

Figure 2 The amplification results of SRAP with different concentrations of Mg^{2+} and dNTP

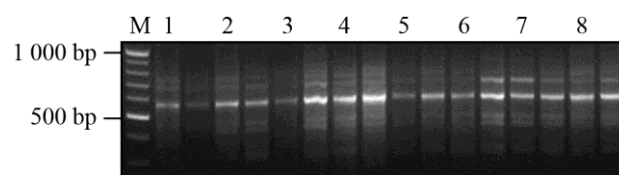
Note: M: 100 bp Plus DNA Ladder; 1~4: The Mg^{2+} concentrations are 1.250 mmol/L, 1.875 mmol/L, 2.500 mmol/L, 3.125 mmol/L respectively; 5~8: The dNTP concentrations are 0.100 mmol/L, 0.150 mmol/L, 0.200 mmol/L, 0.250 mmol/L, respectively, with 2 replicates

1.2.3 不同引物浓度对 SRAP 扩增的影响

引物浓度对牡丹扩增结果影响也较大, 在引物浓度为 0.200 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.300 $\mu\text{mol/L}$ 时扩增条带较少且不清晰; 在 0.400 $\mu\text{mol/L}$ 时条带也较弱; 在 0.500 $\mu\text{mol/L}$ 时扩增效果最好(图 3)。

1.2.4 不同模板 DNA 浓度对 SRAP 扩增的影响

模板 DNA 浓度不能太低, 反应体系中模板 DNA 在 30 ng 时得不到有效扩增; 在 60 ng 时条带清晰, 多态性高; 而大于 90 ng 时条带反而较弱(图 3)。



注: M: 100 bp Plus DNA Ladder; 1~4: 引物浓度分别为 0.200 $\mu\text{mol/L}$, 0.300 $\mu\text{mol/L}$, 0.400 $\mu\text{mol/L}$, 0.500 $\mu\text{mol/L}$; 5~8: 模板 DNA 浓度分别为 30 ng, 60 ng, 90 ng, 120 ng, 每个处理重复 2 次

Figure 3 The amplification results of SRAP with different concentrations of primers and template DNA

Note: M: 100 bp Plus DNA Ladder; 1~4: The primers concentrations are 0.200 $\mu\text{mol/L}$, 0.300 $\mu\text{mol/L}$, 0.400 $\mu\text{mol/L}$, 0.500 $\mu\text{mol/L}$ respectively; 5~8: The template DNA concentrations are 30 ng, 60 ng, 90 ng, 120 ng, respectively, with 2 replicates

1.2.5 不同 *Taq* 酶浓度对 SRAP 扩增的影响

在 20 μL 反应体系中, 使用 0.500 U、1.000 U、1.500 U、2.000 U 的 *Taq* DNA 聚合酶均能扩增出条带, 0.500 U 用量时扩增的条带较弱, 而 1.500 U、2.000 U 用量时非特异性扩增多, 背景不清, 1.000 U 的用量较好, 条带清楚(图 4)。

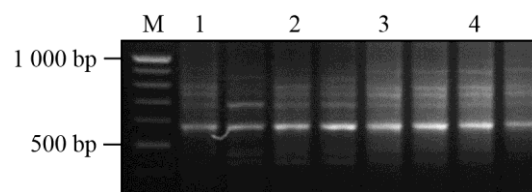


图 4 不同 *Taq* 酶浓度的 SRAP 扩增结果

注: M: 100 bp Plus DNA Ladder; 1~4: *Taq* 酶浓度分别为 0.500 U, 1.000 U, 1.500 U, 2.000 U, 每个处理重复 2 次

Figure 4 The amplification results of SRAP with different concentrations of *Taq* polymerase

Note: M: 100 bp Plus DNA Ladder; 1~4: The *Taq* Polymerase concentrations are 0.500 U, 1.000 U, 1.500 U, 2.000 U, respectively, with 2 replicates



从上述实验结果中筛选牡丹 SRAP 的优化反应体系为：总体积为 20 μL ，Taq 聚合酶浓度为 1.000 U；模板 DNA 浓度为 60 ng； Mg^{2+} 浓度为 1.500 mmol/L；dNTPs 浓度为 0.250 $\mu\text{mol/L}$ ；引物浓度为 0.500 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.3 ‘凤丹’ SRAP-PCR 反应引物筛选

通过优化后的反应体系，对 500 对引物组合进行扩增，从中筛选出 120 对多态性好，且谱带清晰的引物组合用于后续实验，扩增结果(图 5)。

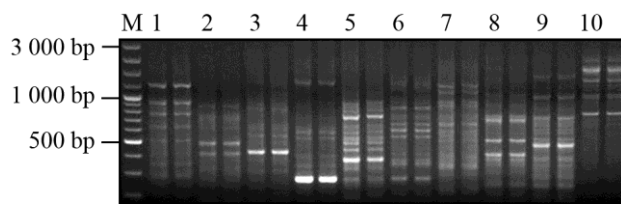


图 5 SRAP 引物筛选的扩增结果(引物: Me23/ Em11-Em20)

注: M: 100 bp Plus DNA Ladder; Me23: 正向引物; 1~10:

Em11-Em20, 反向引物, 每个处理重复 2 次

Figure 5 The amplification results of SRAP primers screening (primers: Me23/ Em11-Em20)

Note: M: 100 bp Plus DNA Ladder; Me23: Forward primer; 1~10: Em11-Em20, Reverse primers, with 2 replicates

2 讨论

基于 PCR 反应开发的 SRAP 分子标记同样受到反应条件和扩增程序变化及物种不同的影响，而利用正交试验方法能考察各因素之间的相互效应，避免单因素实验结果的不足，从而迅速获得满意的试验结果(邹小云等, 2010)。因此，在构建牡丹遗传图谱前进行‘凤丹’的 SRAP-PCR 反应体系的优化是非常必要的。

我们在牡丹 SRAP-PCR 正交试验的基础上，分别进行单因子优化试验，研究发现五个因素对

SRAP 扩增结果的影响具有差异，影响最显著的因素是 Mg^{2+} 浓度，其次是引物浓度，这与苏美和和赵兰勇(2012)的试验结果不同，推测可能是因为所用牡丹材料的差异导致的结果。

我们结合单因子优化实验最终确定了‘凤丹’的 SRAP-PCR 最佳反应体系为：反应体系总体积 20 μL ，含 10 \times PCR Buffer， Mg^{2+} 1.500 mmol/L，dNTPs 0.250 $\mu\text{mol/L}$ 、引物 0.500 $\mu\text{mol/L}$ 、模板 DNA 60 ng、Taq DNA 聚合酶 1.000 U。利用优化后的 SRAP-PCR 反应体系，我们筛选出了 120 对多态性好、谱带清晰的引物，这将为今后开展牡丹的遗传多样性、油用和观赏牡丹遗传连锁图谱构建以及新品种的鉴定等方面的研究奠定了基础。

3 材料与方法

3.1 供试材料与试剂

供试材料为保存于上海植物园科研中心牡丹苗圃的江南牡丹品种‘凤丹’。实验用的 Taq DNA 聚合酶、dNTPs 以及 100 bp DNA marker 购自 TaKaRa 公司，用于 SRAP 反应的引物等试剂均购自上海生工生物工程技术有限公司，经初步筛选，确定 Me2 (TGA GTC CAA ACC GGA GC)和 Em10 (GAC TGC GTA CGA ATT CAG)作为此次正交试验的固定引物。

3.2 ‘凤丹’基因组 DNA 提取

采用改良 CTAB 法提取‘凤丹’嫩叶的 DNA，琼脂糖凝胶电泳(1.0%)检测后，利用分光光度计(NANODROP2000C)检测基因组 DNA 的纯度和浓度，最后将 DNA 稀释至 60 ng/ μL ，保存在-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

3.3 反应体系正交试验

采用正交设计 $L_{16}(4^5)$ 进行试验，反应组合(表 2)，并进行 3 次重复。

表 2 SRAP-PCR 反应的主要影响因子浓度梯度

Table 2 Factors and levels of SRAP-PCR reaction

水平 Level	Mg^{2+} (mmol/L)	dNTPs (mmol/L)	Taq (酶) Polymerase (U)	引物($\mu\text{mol/L}$) Primers ($\mu\text{mol/L}$)	模板 DNA(ng) Template DNA (ng)
1	1.500	0.100	0.500	0.200	30
2	2.000	0.150	1.000	0.300	60
3	2.500	0.200	1.500	0.400	90
4	3.000	0.250	2.000	0.500	120

3.4 SRAP-PCR 扩增程序

‘凤丹’ SRAP-PCR 的扩增程序参照 Li 和 Qurios (2001) 的标准程序并做出调整: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 40 s, 37℃ 复性 50 s, 72℃ 延伸 1.5 min, 8 个循环反应; 94℃ 变性 40 s, 50℃ 复性 50 s, 72℃ 延伸 1.5 min, 32 个循环反应; 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。

3.5 SRAP-PCR 反应体系单因子试验

在其它反应条件不变的情况下, 研究了 20 μL 反应体系中不同浓度 Mg²⁺, dNTPs, Taq DNA 聚合酶, 引物以及模板 DNA 浓度(表 2)对 SRAP 扩增的影响。引物同上, 试验设 2 次重复。

3.6 SRAP-PCR 多态性引物的筛选

在正交试验结果分析的基础上, 从正向引物 (Me)25 个和反向引物 (Em)20 个共 500 对引物组合中, 筛选适合江南牡丹 ‘凤丹’ 的引物。所用 PCR 扩增体系为正交设计所得出的最佳体系。

作者贡献

李健、胡永红、秦俊和蒲立栋是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 李健和胡永红完成数据分析, 论文初稿的写作; 韩继刚、刘焯、蒲立栋参与实验设计, 试验结果分析; 秦树成指导实验设计, 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

本研究由上海市科学技术委员会和上海市绿化局(11ZR1436100, 11391901101, F122431)资助。

参考文献

- Chen Q., Mu D., Yi M.F., Ming J., and Liu C., 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, 明军, 刘春, 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 R.X., Liu Z., Qin L.L., Wang L., Liu X.Q., and Liu P., 2010, Optimization of supercritical CO₂ extraction and analysis of chemical composition of peony seed oil, *Shipin Kexue (Food Science)*, 31(10): 142-145 (邓瑞雪,

刘振, 秦琳琳, 王莉, 刘雪琴, 刘普, 2010, 超临界 CO₂ 流体提取洛阳牡丹籽油工艺研究, *食品科学*, 31(10): 142-145)

- Fan H.H., Li T.C., Qiu J., Lin Y., and Cai Y.P., 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, 林毅, 蔡永萍, 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)
- Gong X., Pan Y.Z., and Yang Z.Y., 2003, The diversities and value of present situation of *Paeonia delavayi*, *Xibei Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica)*, 23(2):218-223 (龚洵, 潘跃芝, 杨志云, 2003, 滇牡丹的多样性和现状评估, *西北植物学报*, 23(2): 218-223)
- Han X. Y., Wang L.S., Shu Q.Y., Liu Z.G., Xu S.X., and Tetsumura T., 2008, Molecular characterization of tree peony germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers, *Biochemical Genetics*, 46: 162-179 <http://dx.doi.org/10.1007/s10528-007-9140-8>
- Hao Q., Liu Z.A., Shu Q.Y., Wang L.S., and Chen F.F., 2008, Identification of intersectional hybrid between Section Moutan and Section Paeonia found in China for the first time, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 35(6): 853-858 (郝青, 刘政安, 舒庆艳, 王亮生, 陈富飞, 2008, 中国首例芍药牡丹远缘杂交种的发现及鉴定, *园艺学报*, 35(6): 853-858)
- Hosoki T., Kimura D., Hasegawa R., Nagasako T., Nishimoto K., Ohta K., Sugiyama M., and Haruki K., 1997, Comparative study of Chinese tree peony cultivars by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis, *Scientia Horticulturae*, 70(1): 67-72 [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4238\(97\)00021-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4238(97)00021-6)
- Hou X.G., Yin W.L., Li J.J., and Wang H.F., 2006, Phylogenetic relationship of dwarf tree peony cultivars by AFLP analysis, *Beijing Linye Daxue Xuebao (Journal of Beijing Forestry University)*, 28(5): 73-77 (侯小改, 尹伟伦, 李嘉珏, 王华芳, 2006, 牡丹矮化品种亲缘关系的 AFLP 分析, *北京林业大学学报*, 28(5): 73-77)
- Li G., and Qurios 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*, *theoretical and applied genetics*, 103(2-3): 455-461
- Li J.J., Zhang X.F., Zhao X.Q., eds., 2011, *Tree peony of China*, Encyclopedia of China Publishing House, Beijing, China, pp.252 (李嘉珏, 张西方, 赵孝庆, 主编, 2011, 中国牡丹, 中国大百科全书出版社, 中国, 北京, pp.252)
- Li K., Zhou N., and Li H.Y., 2012, Composition and function



- research of peony flowers and peony seeds, Shipin Yanjiu Yu Kaifa (Food Research and Development), 33(3): 228-230 (李凯, 周宁, 李赫宇, 2012, 牡丹花、牡丹籽成分与功能研究进展, 食品研究与开发, 33(3): 228-230)
- Li M., Hou X.L., and Hao R.M., 2009, Establishment and verification of SRAP-PCR amplification system for *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)
- Meng L., and Zheng G.S., 2004, Phylogenetic relationship analysis among Chinese wild species and cultivars of *Paeonia* sect. *Moutan* using RAPD markers, Linye Kexue (Scientia Silvae Sinicae), 40(5): 110-115 (孟丽, 郑国生, 2004, 部分野生与栽培牡丹种质资源亲缘关系的RAPD研究, 林业科学, 40(5): 110-115)
- Su M.H., and Zhao L.Y., 2012, Optimization for SRAP-PCR System in *Paeonia suffruticosa* hybrids selection of primers, Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin), 28(19): 189-193 (苏美和, 赵兰勇, 2012, 牡丹杂交品系 SRAP-PCR 反应体系优化及引物筛选, 中国农学通报, 28(19): 189-193)
- Su X., Zhang H., Dong L.N., Zhang J.Q., Zhu X.T., and Sun K., 2006, RAPD classification and identification of *Paeonia rockii* varieties planted in Gansu Province, Xibei Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica), 26(4): 696-701 (苏雪, 张辉, 董莉娜, 张建清, 朱学泰, 孙坤, 2006, 应用 RAPD 技术对甘肃栽培牡丹品种的分类鉴定研究, 西北植物学报, 26(4): 696-701)
- Suo Z.L., 2008, An approach to identification of cultivated peony varieties in genus *Paeonia* L. using DNA ISSR molecular marker technique, Shengwu Jishu Tongbao (Biotechnology Bulletin), (S): 109-112 (索志立, 2008, 利用 DNA ISSR 分子标记技术对芍药属植物栽培品种的分类鉴定方法, 生物技术通报, (S): 109-112)
- Suo Z.L., Zhang H.J., Zhang Z.M., Chen F.F., and Chen F.H., 2005, DNA molecular evidences of the hybrids between *Paeonia rockii* and *P.suffruticosa* based on ISSR markers, Yunnan Zhiwu Yanjiu (Acta Botanica Yunnanica), 27(1): 42-48 (索志立, 张会金, 张治明, 陈富飞, 陈富慧, 2005, 紫斑牡丹与牡丹种间杂交后代的 DNA 分子证据, 云南植物研究, 27(1): 42-48)
- Suo Z.L., Zhou S.L., Zhang H.J., and Zhang Z.M., 2004, DNA molecular evidences of the inter-specific hybrids between *Paeonia ostii* and *P. suffruticosa* based on ISSR markers, Linye Kexue Yanjiu (Forest Research), 17(6): 700-705 (索志立, 周世良, 张会金, 张治明, 2004, 杨山牡丹和牡丹种间杂交后代的 DNA 分子证据, 林业科学研究, 17(6): 700-705)
- Wang J., Hu Y.H., and Zhang Q.X., 2006, Study on optimization for ISSR reaction system of peony with orthogonal design, Anhui Nongye Kexue (Journal of Anhui Agricultural Science), 34(24): 6465-6466, 6484 (王佳, 胡永红, 张启翔, 2006, 牡丹 ISSR-PCR 反应体系正交优化设计, 安徽农业科学, 34(24): 6465-6466, 6484)
- Wu R., Zhang X.X., Xue J.Q., Mu D., and Shi Y.T., 2011, Early identification of the descendents from distant hybridization of *Paeonia delavayi* by morphological and ISSR markers, Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica), 38(12): 2325-2332 (吴蕊, 张秀新, 薛璟祺, 穆鼎, 石颜通, 2011, 紫牡丹远缘杂交后代幼苗的形态标记和 ISSR 标记鉴定, 园艺学报, 38(12): 2325-2332)
- Yang M., Xu L.M., and Liu Y.L., 2012, Optimization and establishment of SRAP-PCR in Lotus, Zhiwu Kexue Xuebao (Plant Science Journal), 30(1): 85-91 (杨美, 徐立铭, 刘艳玲, 2012, 莲 SRAP-PCR 反应体系的优化与建立, 植物科学学报, 30(1): 85-91)
- Yang S.D., Shi S.H., Gong X., and Zhou R.C., 2005, Genetic diversity of *Paeonia delavayi* as revealed by ISSRs, Shengwu Duoyangxing (Biodiversity Science), 13(2): 105-111 (杨淑达, 施苏华, 龚洵, 周仁超, 2005, 滇牡丹遗传多样性的 ISSR 分析, 生物多样性, 13(2): 105-111)
- Yu C., Jin M.Y., Zhang B.Z., Ming J., Yuan S.X., Wang Z., Chu L.H., and Liu C., 2012, Genetic linkage map of *Anthurium andraeanum* based on SRAP molecular markers, Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica), 39(6): 1151-1158 (于翠, 金茂勇, 张宝珠, 明军, 袁素霞, 王钊, 储丽红, 刘春, 2012, 基于 SRAP 分子标记的安祖花遗传连锁图谱的构建, 园艺学报, 39(6): 1151-1158)
- Yuan J. H., Cheng F.Y., and Zhou S.L., 2010, Hybrid origin of *Paeonia xyananensis* revealed by microsatellite markers, chloroplast gene sequences, and morphological characteristics, International Journal of Plant Sciences, 171(4): 409-420
<http://dx.doi.org/10.1086/651228>
- Yuan J.H., Cheng F.Y., and Zhou S.L., 2012, Genetic structure of the tree peony (*Paeonia rockii*) and the Qinling mountains as a geographic barrier driving the fragmentation of a large population, Plos One, 7(4): e34955
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0034955>
- Yuan J.H., Quan J.P., Hu M.H., Sun S., Peng F., and Xia B., 2007, Establishment and optimization of SRAP-PCR

- amplification system for *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, 孙视, 彭峰, 夏冰, 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., Chen F.D., Fang W.M., Chen Y., and Li F.T., 2010, SRAP-based mapping and QTL detection for inflorescence-related traits in *Chrysanthemum (Dendranthema morifolium)*, *Molecular Breeding*, 27(1): 11-23
<http://dx.doi.org/10.1007/s11032-010-9409-1>
- Zhu H.X., 2004, Preliminary study on DNA fingerprinting of peony cultivars, Thesis for M.S., Beijing Forestry University, Supervisor: Yuan T., pp.53-54 (朱红霞, 2004, 牡丹、芍药品种 DNA 指纹图谱绘制的初步研究, 硕士学位论文, 北京林业大学, 导师: 袁涛, pp.53-54)
- Zou X.Y., Zou X.F., Chen L.L., Li S.Y., Zhang J.M., Chen Z.C., 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, 李书宇, 张建模, 陈志才, 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)