

## 技术主题

## Technology Feature

# 刺槐 SRAP-PCR 反应体系优化及引物筛选

袁存权<sup>1</sup>, 李允菲<sup>1</sup>, 杨妮娜<sup>1</sup>, 戴丽<sup>1</sup>, 胡瑞阳<sup>1</sup>, 孙鹏<sup>1</sup>, 李云<sup>1</sup>, 荀守华<sup>2</sup>

1. 林木育种国家工程实验室, 林木、花卉遗传育种教育部重点实验室, 国家林业局树木花卉育种与生物工程重点开放实验室, 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京, 100083

2. 山东省林业科学研究院, 济南, 250014

✉ 通讯作者: [yunli63@163.com](mailto:yunli63@163.com) ✉ 作者

分子植物育种, 2011年, 第9卷, 第25篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0025

收稿日期: 2011年01月06日

接受日期: 2011年02月28日

发表日期: 2011年03月04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。

引用格式:

袁存权等, 2011, 刺槐 SRAP-PCR 反应体系优化及引物筛选, 分子植物育种 Vol.9 No.25 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0025)

**摘要** 利用  $L_{16}(4^5)$  正交试验设计结合单因素试验对刺槐 SRAP-PCR 反应体系中的主要成分进行优化, 建立了一套适用于刺槐的 SRAP-PCR 反应体系。优化的 25  $\mu$ L SRAP-PCR 反应体系中各主要组分的最适含量为:  $Mg^{2+}$  2.5 mmol/L, dNTPs 0.2 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 1.5 U, primer 0.3  $\mu$ mol/L, 模板 DNA 30 ng。用 8 份刺槐不同材料 DNA 验证优化体系, 结果显示, 反应体系的稳定性和可靠性较好。利用优化的 SRAP-PCR 反应体系, 从 169 对 SRAP 引物组合中筛选出扩增条带清晰, 重复性好以及多态性丰富的引物 35 对。这一优化体系的建立将为利用 SRAP 标记技术进行刺槐种质资源遗传多样性分析、指纹图谱构建以及刺槐分子标记辅助育种研究奠定基础。

**关键词** 刺槐; SRAP-PCR; 体系优化; 引物筛选

## Optimization of SRAP-PCR Reaction System and Selection of Primers for *Robinia pseudoacacia* L.

Yuan Cunquan<sup>1</sup>, Li Yunfei<sup>1</sup>, Yang Nina<sup>1</sup>, Dai Li<sup>1</sup>, Hu Ruiyang<sup>1</sup>, Sun Peng<sup>1</sup>, Li Yun<sup>1</sup>, Xun Shouhua<sup>2</sup>

1. National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants, Ministry of Education, The Tree and Ornamental Plant Breeding and Biotechnology Laboratory of State Forestry Administration, College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing, 100083, P.R. China

2. Shandong Provincial Academy of Forestry, Jinan Shandong, 250014, P.R. China

✉ Corresponding author, [yunli63@163.com](mailto:yunli63@163.com); ✉ Authors

**Abstract** To construct the optimum SRAP-PCR reaction system of *Robinia pseudoacacia* L.,  $L_{16}(4^5)$  orthogonal experimental design combined with single factor test were used. The results showed that the optimal reaction system was 25  $\mu$ L total reaction system containing 2.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 0.2 mmol/L dNTPs, 1.5 U *Taq* DNA polymerase, 0.3  $\mu$ mol/L each primer and 30 ng temple DNA. Using 8 *Robinia pseudoacacia* L materials to test this optimized SRAP system, the results showed that the established system not only steady but also reliable. 35 primer pairs which had clear, reproducible banding patterns and good polymorphism were selected from 169 SRAP primer pair combinations based on their stable amplification. This work is a foundation for applying SRAP markers to evaluation of genetic diversity, construction of fingerprinting and molecular marker assisted breeding for the *Robinia pseudoacacia* L.

**Keywords** *Robinia pseudoacacia* L.; SRAP-PCR; Optimization of system; Selection of Primers

## 研究背景

刺槐(*Robinia pseudoacacia* L.), 属蝶形花科(Fabaceae)或豆科(Leguminosae)蝶形花亚科(Papilionoideae)刺槐属(*Robinia* L.)落叶乔木, 是一种良好的用材、水土保持、防风固沙、土壤改良和绿化树种, 此外还是一种优良的木本蜜源树种和高蛋白饲料树种, 其适生范围广、耐低温、耐干旱瘠薄、耐盐碱,

因而被广泛引种种植。刺槐于1898年引入我国, 目前已逐步演化为我国的一个乡土树种(Huo et al., 2009)。

序列扩增相关多态性SRAP (sequence-related amplified polymorphism)是由Li和Quiros发明的一种新型分子标记技术, 主要对开放阅读框进行扩增, 正向和反向引物分别由17和18个碱基组成。具有在基因组中分布均匀, 多态性高, 产率中等, 操作简

单, 重复性好, 以及引物具有通用性等优点(Li and Quiros, 2001)。在林木中国内外学者利用SRAP标记技术进行了包括体系优化、遗传多样性分析、杂种鉴定、遗传连锁图谱构建以及QTL分析等在内的大量工作, 物种涉及杨树(Wang et al., 2010)、柑橘(Osman et al., 2010; 吴鑫等, 2008)、红松(Chen et al., 2010)、糖槭(Sreedhar et al., 2008; 2009)、芭蕉(Muhammad et al., 2010)、美国脐橙(An et al., 2008)、菠萝(邱文武等, 2008)、龙眼(赵玉辉等, 2009)、落羽杉属树木(於朝广等, 2009)、葡萄(郭大龙等, 2010)、荔枝(咎逢刚等, 2009)、甘薯(吴洁等, 2005; 李爱贤等, 2008)等。

目前, 对于刺槐树种而言, 开发的可供利用的SSR引物仅为21条(Lian et al., 2002, 2004; Kentaro et al., 2008), 因而很难满足实际需要, 而AFLP技术尽管引物具有通用性, 但是其操作复杂, 且成本较高, 这些因素极大地限制了刺槐分子标记辅助育种工作的开展。本研究采用正交试验设计同时结合单因素试验对刺槐SRAP-PCR反应体系中各主要成分( $Mg^{2+}$ , dNTPs, *Taq* DNA聚合酶, primer浓度和模板DNA量)进行优化, 在此基础上利用优化的刺槐SRAP-PCR体系进行引物筛选, 最终建立了适合刺槐的SRAP-PCR反应体系。为利用SRAP标记技术进行刺槐种质资源遗传多样性分析、指纹图谱构建以及刺槐分子标记辅助育种研究奠定了基础。

## 1 结果与分析

### 1.1 正交试验设计筛选

以普通二倍体刺槐DNA为模板, 利用me13/em1引物组合对正交试验设计各组合反应体系进行扩增(见图1)。从图中可以看出, 由于 $Mg^{2+}$ 、dNTPs、*Taq* DNA聚合酶、primer以及模板DNA浓度组合的不同, 扩增结果之间表现出明显的差异。其中组合1、2、3、4、6、8、11、12、16无扩增条带或者扩增条带较弱, 分析1、2、3、4组合,  $Mg^{2+}$ 处于最低浓度1.5 mmol/L, 而其它因素处在不同的水平, 组合6和8  $Mg^{2+}$ 浓度也处于相对较低水平2.0 mmol/L, 组合6、11、16的*Taq* DNA聚合酶处于最低水平0.5 U, 组合12的primer浓度处于最低水平0.1  $\mu$ mol/L。组合7和14虽然扩增出了条带, 但条带数目较少。组合9、10、13、15均扩增出了较为清晰地条带, 而在这些组合中dNTPs和DNA模板各个浓度梯度

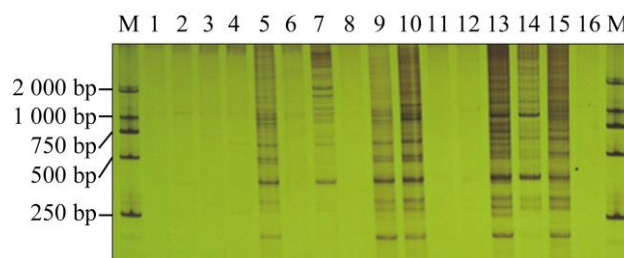


图1 SRAP-PCR正交试验设计电泳

注: M: DL2000 DNA Marker; 编号1-16分别对应表3中各处理组合

Figure 1 Electrophoresis result of SRAP-PCR orthogonal design

Note: M: DL2000 DNA marker; Number 1 to 16 refers to each treatment combinations in table 3

均有,  $Mg^{2+}$ 和*Taq* DNA聚合酶量处于较高水平。

综合上述结果来看,  $Mg^{2+}$ 和*Taq* DNA聚合酶量为影响刺槐SRAP-PCR的关键因素, 低浓度的 $Mg^{2+}$ 和*Taq* DNA聚合酶量不利于扩增, 在保证基本扩增的前提下, dNTPs和DNA模板浓度并不是影响PCR的关键因素。

根据对扩增条带数目多少、清晰度、背景强弱等进行综合评价, 初步筛选出组合9和10为最优组合, 其次为组合15, 13。

综合分析初步确定基本反应体系为 $Mg^{2+}$  2.5 mmol/L, dNTPs 0.2 mmol/L, *Taq* DNA聚合酶 1.5 U, primer 0.4  $\mu$ mol/L, 模板DNA 30 ng。

### 1.2 单因素实验

利用正交试验设计得出的基本反应体系, 以普通二倍体刺槐DNA为模板, 在保持其它因素不变的情况下依次变换单一因素, 利用me2/em5引物组合进行扩增(见图2)。从图中可以看出, 随着 $Mg^{2+}$ 浓度的增长, 扩增产物在不断增加, 当 $Mg^{2+}$ 浓度达到2.5 mmol/L时, 扩增条带基本稳定, 从经济角度考虑结合正交试验结果, 选择 $Mg^{2+}$ 浓度为2.5 mmol/L。

当dNTPs浓度为0.1和0.2 mmol/L时, 扩增条带清晰且数目较多, 随着dNTPs浓度的增加, 扩增条带数目和清晰度逐渐下降。考虑到dNTPs浓度过低将会降低扩增产物量和扩增稳定性, 结合正交试验结果选择dNTPs浓度为0.2 mmol/L。

当*Taq* DNA聚合酶量为0.5~1.0 U时, 扩增条带数目较少, 且不清晰, 当*Taq* DNA聚合酶量为1.5~2.0 U时, 扩增条带数目较多且清晰稳定, 但是*Taq* DNA

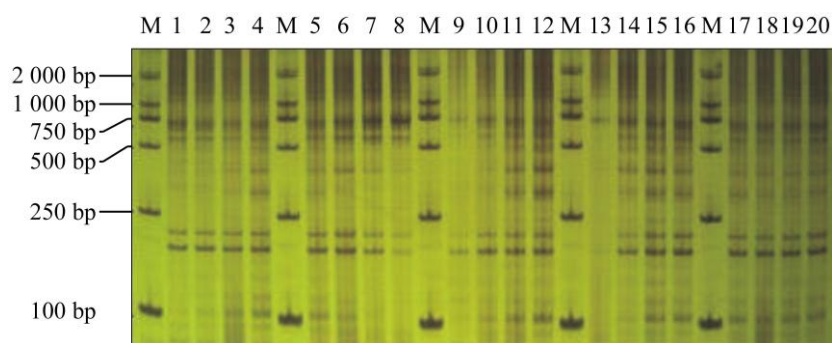


图2 基本反应体系中各组分不同浓度对SRAP-PCR反应的影响

注: M: DL2000 DNA Marker; 1-4:  $Mg^{2+}$ 浓度; 5-8: dNTPs浓度; 9-12: *Taq* DNA聚合酶量; 13-16: primer浓度; 17-20: DNA模板浓度; 各组分浓度见表2

Figure 2 Effect of each component concentrations of SRAP-PCR patterns in basic reaction system

Note: M: DL2000 DNA marker; 1-4:  $Mg^{2+}$  concentration; 5-8: dNTPs concentration; 9-12: *Taq* DNA polymerase concentration; 13-16: primer concentration; 17-20: DNA template; The reaction concentration are showed in table 2

聚合酶量为2.0 U时,背景较深,因此,选择*Taq* DNA聚合酶量为1.5 U。

当primer浓度为0.1~0.2  $\mu\text{mol/L}$ 时,扩增条带数目较少且亮度较低,随着浓度的增加,扩增条带数目和清晰度均提高,但0.3  $\mu\text{mol/L}$ 和0.4  $\mu\text{mol/L}$ 扩增结果无明显差别,考虑到引物浓度过高容易产生引物二聚体和从经济角度考虑,选择primer浓度为0.3  $\mu\text{mol/L}$ 。

4个DNA模板浓度均扩增出了较为清晰的条带,且条带之间无显著差别,考虑到过低浓度的模板DNA量容易造成扩增条带数目减少,而过高浓度的DNA量则容易造成非特异性扩增产物的出现,选择模板DNA量为30 ng。

综合考虑上述因素,最终确定25  $\mu\text{L}$  SRAP-PCR反应总体系中各主要组分的最优组合为:  $Mg^{2+}$  2.5 mmol/L, dNTPs 0.2 mmol/L, *Taq* DNA聚合酶 1.5 U, primer 0.3  $\mu\text{mol/L}$ , 模板DNA 30 ng。

### 1.3 优化反应体系的验证及引物筛选

利用优化的刺槐SRAP-PCR反应体系,以航天诱变刺槐根部和叶片DNA、3个刺槐品种DNA和3份普通二倍体刺槐单株材料DNA为模板,选用引物组合em4/me9进行SRAP-PCR优化体系验证(见图3)。从图中可以看出,各品种均扩增出了清晰稳定且多态性较为丰富的条带。表明优化后的反应体系适合于刺槐的SRAP-PCR反应。

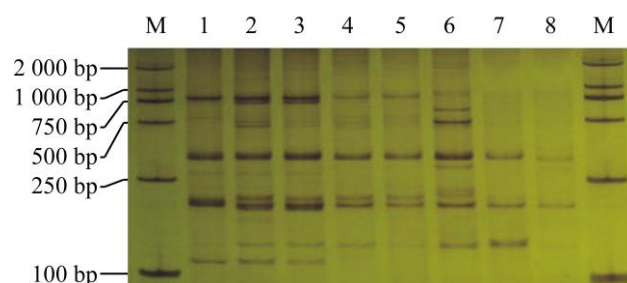


图3 引物em4/me9对8份刺槐材料DNA的PCR扩增

注: M: DL2000 DNA Marker; 1: 普通二倍体刺槐单株1; 2: 航天诱变刺槐根DNA样品; 3: 航天诱变刺槐叶片DNA样品; 4: 普通二倍体刺槐单株2; 5: 普通二倍体刺槐单株3; 6: 二季红花槐; 7: 箭杆1号; 8: 鲁刺9号

Figure 3 PCR amplifications of 8 *Robinia pseudoacacia* L. DNA template by primer em4/me9

Note: M: DL2000 DNA marker; 1: individual plant 1; 2: DNA from the roots of space mutagenesis of *Robinia pseudoacacia* L.; 3: DNA from the leaves of space mutagenesis of *Robinia pseudoacacia* L.; 4: individual plant 2; 5: individual plant 3; 6: *Robinia hispida* L.; 7: Jiangnan 1; 8: Luci 9

利用优化的刺槐SRAP-PCR反应体系对169个引物组合进行初步筛选和重复筛选,最终获得条带清晰、稳定、重复性好以及多态性丰富的引物组合35个。具体引物组合为: em1/me3、em1/me6、em1/me10、em2/me4、em2/me5、em2/me6、em2/me9、em2/me11、em3/me1、em3/me4、em3/me9、em3/me10、em3/me13、em4/me5、em4/me9、em4/me10、em4/me11、em4/me12、em4/me13、em5/me5、em5/me6、em5/me9、em5/me10、em5/me12、em5/me13、em6/me4、em6/me6、em6/

me10、em6/me11、em6/me12、em6/me13、em9/me11、em9/me13、em11/me11、em12/me11。

## 2 讨论

对于刺槐的遗传多样性研究、亲缘关系分析以及种质资源鉴定等方面目前可供利用的分子标记主要有RAPD、ISSR、AFLP、SSR, 与SRAP分子标记相比, RAPD的重复性和可靠性较低; AFLP步骤繁琐、成本较高, 且不能区分显隐性状; ISSR是基于SSR引物序列的一种分子标记, 需要花费大量成本来开发引物; SSR虽然稳定性较高, 操作简单, 为一种可靠的共显性标记, 但是其需要花费高成本来开发大量的特异性引物, 在刺槐树种中, 目前开发的可供利用的SSR引物仅为21条, 因而很难满足实际需要。由于SRAP分子标记不需要已知序列信息, 引物具有通用性, 且上下游引物可相互配对组合, 多数SRAP标记在基因组中分布均匀, 为一种共显性标记, 因此在刺槐的相关分子生物学研究等方面将会体现出较大的价值(孙佳琦等, 2010)。

本研究通过正交试验设计结合单因素设计对刺槐SRAP-PCR反应体系进行优化, 既利用了正交试验设计考虑各组间相互影响和有效降低工作量的优点, 同时利用了单因素试验简单快捷的优点, 使优化获得的体系更加准确, 通过单因素试验得到的结果与正交试验得到的最优组合基本吻合。优化获得的刺槐SRAP-PCR反应体系为25  $\mu$ L总体系中各主要组分为:  $Mg^{2+}$  2.5 mmol/L, dNTPs 0.2 mmol/L, *Taq* DNA聚合酶1.5 U, primer 0.3  $\mu$ mol/L, 模板DNA 30 ng。郭大龙等(2010)采用同样的方法对葡萄SRAP-PCR反应体系进行了优化, 刘龙洲等(2009)、王燕青和季孔庶等(2009)、邹小云等(2010)、於朝广和殷云龙等(2009)、陈万胜等(2008)采用正交试验设计分别对甜瓜、牡丹、花生、落羽杉属树木、烟草SRAP-PCR体系进行了优化, 均得到了适合于各自材料的最佳SRAP-PCR体系, 表明利用这种方法进行体系优化是有效地。

本研究优化获得的SRAP-PCR最佳反应体系经验证结果稳定、可靠, 在此基础上筛选获得了适合于刺槐的扩增条带清晰, 重复性好以及多态性丰富的引物35对, 这将为利用SRAP分子标记开展刺槐遗传多样性分析、指纹图谱构建、分子标记辅助育种以及基因克隆等研究工作奠定基础。

## 3 材料与方法

### 3.1 供试材料

本实验选用普通二倍体刺槐为体系优化材料, 采自北京市延庆县米家堡苗圃。利用刺槐品种二季红花槐、箭杆1号、鲁刺9号, 航天诱变刺槐, 以及普通二倍体刺槐不同单株材料3份(单株材料1, 2, 3)来验证优化后的反应体系, 其中二季红花槐、箭杆1号、鲁刺9号采自山东临沂费县大青山林场, 航天诱变刺槐(经实践八号育种卫星搭载返地后种植获得的实生苗)采自北京市延庆县风沙源苗圃, 普通二倍体刺槐单株材料采自北京市延庆县米家堡苗圃。

### 3.2 实验试剂

DNA聚合酶、dNTPs、DL2000 DNA Marker等分别购自Promega、Biodee、TaKaRa公司, SRAP引物根据Li等(Li and Quiros, 2001)提出的原则设计, 由上海捷瑞生物工程有限公司合成, 具体序列信息见表1。

### 3.3 基因组DNA提取

采集刺槐幼嫩叶片和根, 利用天根生化科技(北京)有限公司的新型植物基因组DNA提取试剂盒依照操作指南进行基因组DNA提取。提取到的DNA采用琼脂糖凝胶电泳和NanoVue超微量分光光度计检测完整性和质量。

### 3.4 SRAP-PCR反应条件

SRAP-PCR扩增采用如下程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 35 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 5个循环; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 50 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 35个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min, 10 $^{\circ}$ C保存。扩增产物在8%的聚丙烯酰胺凝胶电泳中电泳, 银染检测并用数码相机照相。

### 3.5 SRAP-PCR反应体系优化

刺槐SRAP-PCR反应体系优化正交试验设计所用引物组合为me13/em1, 单因素试验所用引物组合为me2/em5。先利用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计进行5因素4水平的筛选分析, 因素水平及正交试验设计见表2和表3。在初步筛选获得较优组合的基础上进行单因素试验, 基本反应体系为25  $\mu$ L总反应体系中包含 $Mg^{2+}$  2.5 mmol/L, dNTPs 0.2 mmol/L, *Taq* DNA聚合酶1.5 U, primer 0.4  $\mu$ mol/L, 模板DNA 30 ng, 保持其它因素不变的情况下依次变换单一因素, 筛选

表 1 SRAP 引物序列信息

Table 1 The primer sequences used in SRAP analysis

编号 Serial No.	正向引物(5'-3') Forward primers (5'-3')	编号 Serial No.	反向引物(5'-3') Reverse primers (5'-3')
Me1	TGA GTC CAA ACC GGA TA	Em1	GAC TGC GTA CGA ATT AAT
Me2	TGA GTC CAA ACC GGA GC	Em2	GAC TGC GTA CGA ATT TGC
Me3	TGA GTC CAA ACC GGA AT	Em3	GAC TGC GTA CGA ATT GAC
Me4	TGA GTC CAA ACC GGA CC	Em4	GAC TGC GTA CGA ATT TGA
Me5	TGA GTC CAA ACC GGA AG	Em5	GAC TGC GTA CGA ATT AAC
Me6	TGA GTC CAA ACC GGA CA	Em6	GAC TGC GTA CGA ATT GCA
Me7	TGA GTC CAA ACC GGA CG	Em7	GAC TGC GTA CGA ATT CAA
Me8	TGA GTC CAA ACC GGA CT	Em8	GAC TGC GTA CGA ATT CAC
Me9	TGA GTC CAA ACC GGA GG	Em9	GAC TGC GTA CGA ATT CAG
Me10	TGA GTC CAA ACC GGA AA	Em10	GAC TGC GTA CGA ATT CAT
Me11	TGA GTC CAA ACC GGA AC	Em11	GAC TGC GTA CGA ATT CTA
Me12	TGA GTC CAA ACC GGA GA	Em12	GAC TGC GTA CGA ATT CTC
Me13	TGA GTC CAA ACC GGA AG	Em13	GAC TGC GTA CGA ATT CTG

表 2 SRAP-PCR 优化反应中的各因素水平

Table 2 Each factors and levels of SRAP-PCR optimization reaction

水平 Level	镁离子(mmol/L) Mg <sup>2+</sup> (mmol/L)	脱氧核苷酸(mmol/L) dNTPs (mmol/L)	Taq 聚合酶(U/25 μL) Taq DNA polymerase (U/25 μL)	引物(μmol/L) Primer (μmol/L)	DNA 模板(ng/25 μL) DNA template (ng/25 μL)
1	1.5	0.1	0.5	0.1	10.0
2	2.0	0.2	1.0	0.2	30.0
3	2.5	0.3	1.5	0.3	50.0
4	3.0	0.4	2.0	0.4	70.0

表3 SRAP-PCR反应中各因素水平的L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>)正交试验设计Table 3 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>) orthogonal design of each factors and levels of SRAP-PCR reaction

编号 Serial No.	镁离子(mmol/L) Mg <sup>2+</sup> (mmol/L)	脱氧核苷酸(mmol/L) dNTPs (mmol/L)	Taq 聚合酶(U/25 μL) Taq DNA polymerase (U/25 μL)	引物(μmol/L) Primer (μmol/L)	DNA 模板(ng/25 μL) DNA template (ng/25 μL)
1	1.5	0.1	0.5	0.1	10.0
2	1.5	0.2	1.0	0.2	30.0
3	1.5	0.3	1.5	0.3	50.0
4	1.5	0.4	2.0	0.4	70.0
5	2.0	0.1	1.0	0.3	70.0
6	2.0	0.2	0.5	0.4	50.0
7	2.0	0.3	2.0	0.1	30.0
8	2.0	0.4	1.5	0.2	10.0
9	2.5	0.1	1.5	0.4	30.0
10	2.5	0.2	2.0	0.3	10.0
11	2.5	0.3	0.5	0.2	70.0
12	2.5	0.4	1.0	0.1	50.0
13	3.0	0.1	2.0	0.2	50.0
14	3.0	0.2	1.5	0.1	70.0
15	3.0	0.3	1.0	0.4	10.0
16	3.0	0.4	0.5	0.3	30.0

最优反应参数。

### 3.6 反应体系验证

利用优化的刺槐SRAP-PCR反应体系, 选用引物组合em4/me9对3个刺槐品种(二期红花槐, 箭杆1号, 鲁刺9号)、航天诱变刺槐根部和叶片基因组DNA和普通二倍体刺槐材料3份(材料1, 2, 3)进行SRAP-PCR扩增, 以验证优化后的反应体系的稳定性及可靠性。

### 3.7 引物筛选

以普通二倍体刺槐为材料, 利用优化的刺槐SRAP-PCR反应体系, 对169个引物组合进行初步筛选, 获得条带清晰、稳定、重复性好的引物组合, 在此基础上以3个刺槐品种(二期红花槐, 箭杆1号, 鲁刺9号)为材料, 对初步筛选获得的引物组合进行重复筛选, 获得条带清晰、稳定、重复性好以及多态性丰富的引物组合。

### 作者贡献

袁存权是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 袁存权完成数据分析, 论文初稿的写作; 李允菲、杨妮娜、戴丽参与实验设计和实验结果的处理和分析; 胡瑞阳、孙鹏参与了实验材料的采集和样品处理工作; 荀守华参与了山东临沂费县大青山林场部分刺槐实验材料的采集工作; 李云是项目的负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者均阅读并同意论文最终文本。

### 致谢

本研究由饲料型刺槐多倍体品种选育及产业化关键技术研究(201104013)项目资助。

### 参考文献

An H.J., Jin S.B., Kang B.C., and Park H.G., 2008, Production of Somatic Hybrids between Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu*) and Navel Orange (*Citrus sinensis*) by Protoplast Fusion, *Journal of Plant Biology*, 51(3): 186-191

Chen M.M., Feng F.J., Sui X., Li M.H., Zhao D., and Han S.J., 2010, Construction of a framework map for *Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc. using SRAP, SSR and ISSR markers, *Trees*, 24: 685-693

Chen W.S., Wang Y.Y., Luo C.G., Yang A.G., Jiang C.H., and Fan J.Y., 2008, Optimization for SRAP-PCR System of Tobacco Based on Orthogonal Design, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 6(1): 177-182 (陈万胜, 王元英, 罗成刚, 杨爱国, 蒋彩虹, 范静苑, 2008,

利用正交设计优化烟草SRAP反应体系, 分子植物育种, 6(1): 177-182)

- Guo D.L., Zhang J.Y., Li M., Zhang G.H., and Liu C.H., 2010, Optimization of SRAP-PCR System in *Grape* and Primers Screening, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 29(2): 379-384 (郭大龙, 张君玉, 李猛, 张国海, 刘崇怀, 2010, 葡萄SRAP反应体系优化及引物筛选, 基因组学与应用生物学, 29(2): 379-384)
- Huo X.M., Han H.W., Zhang J., and Yang M.S., 2009, Genetic diversity of *Robinia pseudoacacia* populations in China detected by AFLP markers, *Frontiers of Agriculture in China*, 3(3): 337-345
- Kentaro M., Tomonori H., Shougo U., Atsushi W., and Katsuhiko T., 2008, Isolation and characterization of microsatellite markers from *Robinia pseudoacacia* L., *Permanent Genetic Resources Note*, 850-852
- Li A.X., Wang Q.M., Hou F.Y., Zhang H.Y., and Zhang L.M., 2008, Two SRAP markers linked to sweetpotato stem nematode resistance gene in sweet potato, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 6(6): 1204-1208 (李爱贤, 王庆美, 侯夫云, 张海燕, 张立明, 2008, 利用SRAP技术获得与抗甘薯茎线虫病基因相关的分子标记, 分子植物育种, 6(6): 1204-1208)
- 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: 455-461
- Lian C., and Hogetsu T., 2002, Development of microsatellite markers in black locust (*Robinia pseudoacacia*) using a dual-suppression-PCR technique, *Molecular Ecology Notes*, 2: 211-213
- Lian C.L., Ryuya Oishi., Naoya Miyashita., and Hogetsu Taizo., 2004, High somatic instability of a microsatellite locus in a clonal tree, *Robinia pseudoacacia*, *Theor. Appl. Genet.*, 108: 836-841
- Liu L.Z., Zhu W.M., Chen Y.Y., and Zhang Y.P., 2009, Establishment and Optimization for SRAP-PCR System of *Muskmelon*, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 7(5): 1045-1047 (刘龙洲, 朱为民, 陈幼源, 张永平, 2009, 甜瓜SRAP-PCR体系的建立与优化, 分子植物育种, 7(5): 1045-1047)
- Muhammad Y., Andrew C.J., Renata R.M., Rodomiro O., and Rosa Mari'a E.G.M., 2010, Musa Genetic Diversity Revealed by SRAP and AFLP, *Mol. Biotechnol.*, 47(3): 189-199

- Osman G., Aydin U., Ihsan C., Ubeyit S., and Ercan C., 2010, A new citrus linkage map based on SRAP, SSR, ISSR, POGP, RGA and RAPD markers, *Euphytica*, 173: 265-277
- Qiu W.W., Sun W.S., and Dou M.A., 2008, Optimization of srap system in pineapple, *Shengwu Jishu (Biotechnology)*, 18(1): 39-42 (邱文武, 孙伟生, 窦美安, 2008, 菠萝 SRAP 反应体系的建立及优化, *生物技术*, 18(1): 39-42)
- Sreedhar A., Collins A.K., John C.V., and Kenneth A.G., 2008, Linkage mapping and genome analysis in a *Saccharum* interspecific cross using AFLP, SRAP and TRAP markers, *Euphytica*, 164: 37-51
- Sreedhar A., Collins A.K., John C.V., and Kenneth A.G., 2009, Identification of molecular markers associated with sugar-related traits in a *Saccharum* interspecific cross, *Euphytica*, 167: 127-142
- Sun J.Q., Liang J.G., Shi S.C., Gao Y.K., and Zhang Q.X., 2010, Applications of SRAP Marker in Genetic Breeding of Ornamental Plant, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 8(3): 577-588 (孙佳琦, 梁建国, 石少川, 高亦珂, 张启翔, 2010, SRAP 标记在观赏植物遗传育种中的应用, *分子植物育种*, 8(3): 577-588)
- Wang Y.Q., and Ji K.S., 2009, Optimization for SRAP-PCR system of *Paeonia suffruticosa* based on orthogonal design, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 7(1): 199-203 (王燕青, 季孔庶, 2009, 利用正交设计优化牡丹 SRAP-PCR 反应体系, *分子植物育种*, 7(1): 199-203)
- Wang Y.X., Sun X.Y., Tan B.Y., Zhang B., Xu L.A., Huang M.R., and Wang M.X., 2010, A genetic linkage map of *Populus adenopoda* Maxim. × *P. alba* L. hybrid based on SSR and SRAP markers, *Euphytica*, 173: 193-205
- Wu J., Tan W.F., He J.R., Pu Z.G., Wang D.Y., Zhang Z.S., Zhan F.F., and Yan W.Z., 2005, Construction of SRAP linkage map and QTL mapping for starch content in sweet potato, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 3(6): 841-845 (吴洁, 谭文芳, 何俊蓉, 蒲志刚, 王大一, 张正圣, 詹付凤, 阎文昭, 2005, 甘薯 SRAP 连锁图构建淀粉含量 QTL 检测, *分子植物育种*, 3(6): 841-845)
- Wu X., Lei T.G., He Y.R., Liu X.F., Xu L.Z., Peng A.H., and Chen S.C., 2008, Establishment and optimization of srap and issr marker system in citrus, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 6(1): 170-176 (吴鑫, 雷天刚, 何永睿, 刘小丰, 许兰珍, 彭爱红, 陈善春, 2008, 柑桔 SRAP 和 ISSR 分子标记技术体系的建立与优化, *分子植物育种*, 6(1): 170-176)
- Yu C.G., and Yin Y.L., 2009, Extraction of genomic dna and optimization of srap reaction system in *taxodium* plants, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 28(1): 109-114 (於朝广, 殷云龙, 2009, 落羽杉属树木基因组总 DNA 的提取及 SRAP 反应体系的优化, *基因组学与应用生物学*, 28(1): 109-114)
- Zan F.G., Wu Z.D., Zeng Q., Zhang H.Y., Li M.F., and Zheng X.Q., 2009, Genetic diversity analysis of *litchi* germplasm by srap markers, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 7(3): 562-568 (咎逢刚, 吴转娣, 曾淇, 张惠云, 李明芳, 郑学勤, 2009, 荔枝种质遗传多样性的 SRAP 分析, *分子植物育种*, 7(3): 562-568)
- Zhao Y.H., Guo Y.S., Fu J.X., Zhou J., Huang S.S., and Liu C.M., 2009, Establishment and optimization of srap reaction system in longan, *Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 25(18): 409-412 (赵玉辉, 郭印山, 傅嘉欣, 周佳, 黄穗生, 刘成明, 2009, 龙眼 SRAP 反应体系的建立和优化, *中国农学通报*, 25(18): 409-412)
- 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)



5<sup>th</sup>Publisher是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5<sup>th</sup>Publisher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>