

苦荞 SRAP 分子标记体系优化与遗传多样性分析

令狐斌¹ 侯思宇^{1,2,3*} 孙朝霞¹ 黄可盛¹ 路阳¹ 韩渊怀^{1,2,3} 许冬梅¹

(1. 山西农业大学 农学院, 山西 太谷 030801;

2. 山西农业大学 农业生物工程研究所, 山西 太谷 030801;

3. 山西省农业科学院 农业部黄土高原作物基因资源与种质创制重点实验室, 太原 030031)

摘要 通过正交试验设计, 比较苦荞序列相关多态性-聚合酶链式反应 (Sequence related amplified polymorphism-polymerase chain reaction, SRAP-PCR) 扩增反应体系的组合, 选出最佳扩增体系用于苦荞 SRAP 分子标记进行遗传多样性分析。其中最佳 SRAP-PCR 反应扩增体系为 *Taq* DNA 聚合酶 2 U、 Mg^{2+} 1.5 mmol/L、DNA 模板 75 ng、引物 0.5 μ mol/L。从 238 对 SRAP 引物组合中筛选出 20 对多态性较高的引物组合, 并对 15 个苦荞品种进行遗传多样性分析。结果表明: 20 对引物组合共扩增出 128 个位点, 其多态性信息量 (Polymorphism information content, PIC) 值在 0.66~0.95, 每对引物组合扩增位点为 7~13 个, 多态性比率平均值为 81.6%, 其中多态性信息量值为 0.95 的引物组合为 me7em11、me9em4 和 me12em8。基于 UPGMA 法聚类 ($GS=0.78$) 可将 15 个苦荞品种划分为 3 大类, 但这 3 类划分的品种没有明显的地域分布特征。

关键词 苦荞; SRAP-PCR; 正交试验设计; 遗传多样性

中图分类号 S 517

文章编号 1007-4333(2015)01-0037-07

文献标志码 A

Optimization of SRAP-PCR amplification system and its application in the analysis of genetic diversity in Tartary buckwheat

LINGHU Bin¹, HOU Si-yu^{1,2,3*}, SUN Zhao-xia¹, HUANG Ke-sheng¹, LU Yang¹,
HAN Yuan-huai^{1,2,3}, XU Dong-mei¹

(1. College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;

2. Institute of Agricultural Biotechnology, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;

3. Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement on Loess Plateau of Ministry of Agriculture, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China)

Abstract Through orthogonal experimental design, the optimum SRAP-PCR (Sequence related amplified polymorphism-polymerase chain reaction) amplification system was developed to estimate the genetic diversity by comparing the effect of four main PCR reaction components. The best SRAP-PCR amplification system comprised of 2 U *Taq* DNA polymerase, 1.5 mmol/L Mg^{2+} , 75 ng DNA template, 0.5 μ mol/L primer. Twenty pairs of primers from the 238 pairs of primer combinations were selected by PCR product polymorphism among 15 Tartary buckwheat cultivars. The results showed that 128 loci were amplified by 20 pairs of primer combinations. The polymorphism information content (PIC) values of these primer combinations were between 0.66 to 0.95. The amplified loci for each pair of primer combination were 7–13, and polymorphism average ratio was 81.6%. The information value for primer combination of me7em11, me9em4 and me12em8 was 0.95. The 15 Tartary buckwheat cultivars could be divided into three categories based on UPGMA ($GS=0.78$), but no obvious geographical distribution characteristics were observed. We optimized SRAP-PCR

收稿日期: 2014-05-06

基金项目: 国家自然科学基金 (NSFC:31301385); 山西省青年科技研究基金 (2011021032-1, 2011021032-3); 山西农业大学科技创新育种基金 (2010028); 高等学校科技创新项目 (2013115); 山西省高校重点学科建设专项资金

第一作者: 令狐斌, 硕士研究生, E-mail: linghuwenwu@163.com

通讯作者: 侯思宇, 副教授, 硕士生导师, 主要从事从杂粮分子育种研究, E-mail: bragren123@163.com

molecular marker system to analyze genetic diversity among 15 Tartary buckwheat cultivars. It laid the theoretical foundation for research on the germplasm resources of Tartary buckwheat.

Key words Tartary buckwheat; SRAP-PCR; orthogonal experimental design; genetic diversity

苦荞是蓼科双子叶植物,又名鞑靼荞麦(*Fagopyrum tataricum*),俗称苦荞。主要分布在长江以南的各省区,常年种植面积为40~60万 hm^2 ,在亚洲、欧洲及美洲一些国家的山区也有栽培^[1]。国际植物遗传资源研究所(International Plant Genetic Resources Institute, IPGRI)将荞麦归为“未被充分利用的作物”之一,由于苦荞独特的营养价值被认为是世界性的新兴作物。苦荞性喜阴湿冷凉,多种植于高山地域,在中国主要集中在黄土高原和云贵高原的山西、陕西、青海、甘肃、云南、贵州、四川、西藏及其毗邻的鄂西北和湘西的武陵山区^[2]。苦荞具有生育期短、耐瘠薄、抗病虫能力强和适应性广等特点,其中生物活性物质含量较高,包括芦丁、肌醇、硒和铜,具有显著的降血脂降血糖功能^[3],因此针对苦荞种质资源的遗传多样性、基因资源和生物活性物质的相关研究正在积极探索中。

大多学者认为中国是世界荞麦的起源中心和遗传多样性中心,其蕴涵的种质资源非常丰富。国家种植种质资源库(Chinese Crop Germplasm Information System, CGRIS)共收集荞麦种质2785份,其中苦荞879份,为苦荞种质资源及遗传育种提供了良好平台^[2]。早先已有学者^[4]基于等位酶电泳技术分析四川和云南当地共50个居群的遗传多样性和分化,测定其遗传多样性、基因杂合度、遗传距离和遗传一致度,认为金沙江流域是苦荞及其近缘种的分布中心。随着分子生物学的发展,针对荞麦种质遗传多样性的研究不断深入,分子标记已逐步取代传统标记方法(形态标记和同工酶标记等),成为荞麦种质资源鉴定及分子育种的重要手段。1998年, Jotaro等^[5]获得与甜荞 *Ho* 基因连锁的随机扩增多态性 DNA (Random amplified polymorphic DNA, RAPD) 标记。Konishi等^[6]利用微卫星(Simple sequence repeat, SSR)标记筛选 cDNA 文库中的1483个克隆,其中352个有单一扩增,后又利用扩增片段长度多态性(Amplified fragment length polymorphism, AFLP)技术将来源于云南、四川和西藏东部的甜荞进行遗传聚类,明确甜荞的起源为三江地区的野生荞麦。同年, Iwata等^[7]利

用 AFLP 和 SSR 标记对 19 个甜荞品种进行遗传多样性和农艺性状关联分析,并将不同生态型的品种进行聚类,发现同一生态型品种间差异较小,结果表明 4 个微卫星 SSR 标记与生态型品种间的农艺性状有显著相关性。张文英等^[8]利用序列相关多态性(Sequence-related amplified polymorphism, SRAP)标记分析来源于鄂西南地区的 28 份苦荞品种,根据遗传距离将这些材料分为 2 大类。最近,高帆等^[9]对 SSR 体系进行优化,并对收集的 50 份不同来源的苦荞品种进行 SSR 分析,开发出 2 对苦荞 SSR 分析的骨干引物,且 50 份苦荞可按遗传聚类划分为 5 个组群,但组群间没有明显的地域分布特征趋势。

SRAP 是一种基于 PCR 的分子标记技术,其引物设计原理是针对基因的 ORF 区、内含子间隔区和启动子区而设计的上下游随机引物,但其核心序列包含 14 个真核生物中保守的碱基序列,引物 3' 末端序列可设计为 3 或 4 个随机选择的核苷酸序列来增强引物的结合效率。由于该标记具有高效简便、共显性、可重复和便于测序克隆目标片段等特点,现广泛用于各种作物遗传多样性、遗传图谱、QTL 以及差异基因表达分析等方面的研究。

山西省特殊的地理环境使其发展杂粮作物成为当地的支柱产业,所以苦荞选育优良品种、种质资源鉴别以及引种等方面的研究为推动山西的苦荞产业具有积极意义。尽管苦荞研究中已有 SRAP 技术的相关报道^[8,10],但鉴别不同来源的苦荞品种以及开发适用性广、多态性强的苦荞 SRAP 引物具有十分重要的意义。本研究基于正交试验,优化 SRAP-PCR 反应体系,筛选用于鉴别不同地域来源的苦荞品种多态性引物,以期为进一步苦荞遗传资源的开发利用以及苦荞分子育种奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 苦荞品种

来源于 15 个地域的苦荞品种作为试验材料(表 1),每个地域选取 10 个单株苗期顶端幼嫩叶片作为 SRAP 分析的 DNA 模板材料,采用九江苦荞的 DNA 模板进行 SRAP 引物筛选及反应体系优化。

表 1 供试苦荞品种

Table 1 Different buckwheat cultivars

编号 No.	苦荞品种 Cultivars	产地 Origin	编号 No.	苦荞品种 Cultivars	产地 Origin
K1	九江苦荞	江西	K9	晋荞 2 号	山西
K2	黑丰 1 号	山西	K10	KQ08-01	贵州
K3	黔苦 4 号	贵州	K11	国外 2 号	不详
K4	西农 9940	陕西	K12	西苦 6-14	陕西
K5	兴苦 2 号	四川	K13	丽江苦荞	云南
K6	威苦 01-374	贵州	K14	迪庆苦荞	云南
K7	国外 4 号	不详	K15	凉苦 3 号	甘肃
K8	凉苦 4 号	甘肃			

1.2 SRAP-PCR 反应体系优化及引物筛选

参考孙朝霞等^[11]设计 SRAP 引物, 试验中筛选出有多态性的 SRAP 引物序列见表 2。选取筛选扩增稳定的引物(me9em1)进行反应体系优化。在 25 μ l PCR 反应体系中, 针对可能影响反应结果的因素: 引物、*Taq* DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 和 DNA 模板浓度, 采用 5 因素 4 个不同浓度水平 [$L_{16}(4)^5$] 设计 16 组正交试验(表 3)。PCR 反应扩增程序为: 94 $^{\circ}C$ 5 min; 起始 5 个循环 94 $^{\circ}C$ 30 s, 35 $^{\circ}C$ 1 min, 72 $^{\circ}C$ 1 min; 94 $^{\circ}C$ 30 s, 55 $^{\circ}C$ 1 min, 72 $^{\circ}C$ 1 min 循环 30 个; 72 $^{\circ}C$ 5 min。试验结果用 2% 琼脂糖凝胶电泳,

EB 染色, 凝胶成像仪 (Bio-rad, 美国) 扫描统计差异特征谱带。

根据上述体系优化结果进行 SRAP 引物筛选, 共获得多态性较高的引物 20 对, 引物对组合分别见表 2。在电泳图谱上, 清晰条带记为“1”, 同一位置上无条带记为“0”, 统计每对引物扩增总条带数和多态性条带数, 利用 Popgene 1.3 软件计算多态性信息量 (Polymorphism information content value, PIC 值), 根据遗传相似度, 采用 UPGMA 法, 利用 NTSYSpc Version 2.2 软件进行苦荞品种聚类分析。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences

正向引物 5'-3' Forward primers 5'-3'	反向引物 5'-3' Reverse primers 5'-3'
me3; TGAGTCCAAACCGGAAT	em1; GACTGCGTACGAATTAAT
me6; TGAGTCCAAACCGGTAG	em3; GACTGCGTACGAATTGAC
me7; TGAGTCCAAACCGGTTG	em4; GACTGCGTACGAATTTGA
me8; TGAGTCCAAACCGGTGT	em8; GACTGCGTACGAATTAGC
me9; TGAGTCCAAACCGGTCA	em9; GACTGCGTACGAATTACG
me10; TGAGTCCAAACCGGGAC	em10; GACTGCGTACGAATTTAG
me11; TGAGTCCAAACCGGGTA	em11; GACTGCGTACGAATTTCG
me12; TGAGTCCAA. ACCGGGGT	em12; GACTGCGTACGAATTGTC
	em13; GACTGCGTACGAATTGGT
	em14; GACTGCGTACGAATTCAG
	em15; GACTGCGTACGAATTCTG

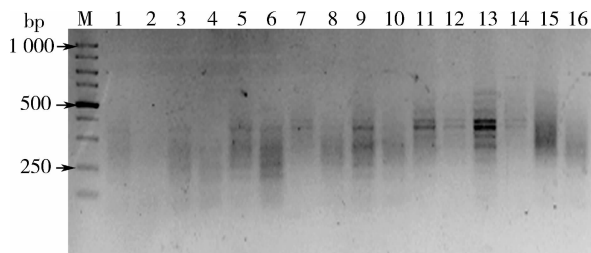
表3 正交试验设计 $[L_{16}(4)^5]$ Table 3 Orthogonal experimental design for $[L_{16}(4)^5]$

水平 Level	<i>Taq</i> 酶/U <i>Taq</i> enzyme	Mg^{2+} /(mmol/L)	引物浓度/ $(\mu\text{mol/L})$ Primer concentration	DNA 模板质量浓度/ $(\text{ng}/\mu\text{L})$ DNA template concentration
水平 1 Level 1	0.5	1.5	0.25	25
水平 2 Level 2	1.0	2.0	0.50	50
水平 3 Level 3	1.5	2.5	0.75	75
水平 4 Level 4	2.0	3.0	1.00	100

2 结果与分析

2.1 SRAP-PCR 体系优化

由图 1 所示,从左至右为 16 个正交试验组合,其中第 13 组合的 PCR 扩增条带清晰、分辨率好以及无非特异性产物。因此该组合主观效果判断打分为满分,其他组合参考该组合依次打分。根据正交试验设计所扩增结果进行主观效果评分统计方差分析,结果表明:*Taq* 酶用量是能否获得 PCR 成功扩增的关键因素。当 *Taq* 酶用量低于 1 U 时,很难得到清晰、锐利和特异的 PCR 扩增条带;当 *Taq* 酶浓度高于 1 U 时,有利于获得清晰且特异的扩增产物。同时 Mg^{2+} 浓度仅在 1.5 mmol/L 时,有清晰的扩增条带;高于这一浓度,虽可获得更多条带,但可能为非特异扩增条带故不可采用。引物浓度和 DNA 模板质量浓度分别为 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 时,能够获得清晰、锐利和易于分辨的扩增产物。根据正交试验设计获得组合筛选结果,最终得出 SRAP-PCR 最佳扩增体系为:2 U *Taq* 酶、1.5 mmol/L Mg^{2+} 、0.25 $\mu\text{mol/L}$ 引物和 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ DNA 模板。



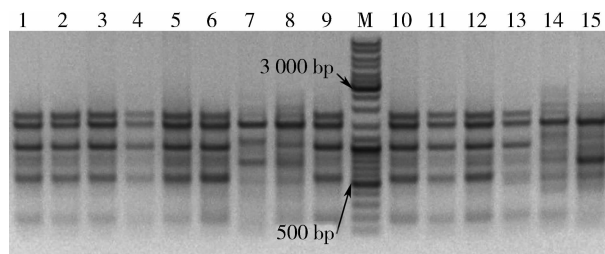
M 表示 DNA marker,1~16 表示正交试验设计组合编号。
M represents DNA marker,1-16 represent the number of orthogonal experimental combinations.

图 1 苦荞 SRAP 引物组合 me9em1 的正交试验电泳图谱

Fig. 1 Orthogonal experiment electrophoregram of a buckwheat primer combination me9em1

2.2 苦荞 SRAP 遗传多样性分析

238 对 SRAP 引物组合共筛选出 20 对扩增稳定多态性较好的引物(表 4),统计每对引物在 15 个品种中扩增总条带数及多态性条带数,并计算多态性比率及 PIC 值。结果显示,每对引物组合总条带数在 4~13 条,多态性比率平均值为 81.6%,说明这些引物可以较好地反映不同苦荞品种之间的差异。统计不同引物之间 PIC 值,可以看出 20 对引物组合 PIC 贡献值在 0.66~0.95,其中 me12em8 引物扩增总条带数(13 条)、多态性条带数(13 条)以及 PIC 值(0.95)均最高,该引物组合可以成为苦荞 SRAP 分子标记的骨干引物。图 2 所示代表性引物 me3em15 的扩增图谱。



M 表示 DNA marker;1~15 表示 15 份供试苦荞品种。
M represents DNA marker;1-15 represent 15 Tartary buckwheat cultivars

图 2 引物组合 me3em15 电泳图谱

Fig. 2 Primers combination me3em15 electrophoregram

2.3 基于 SRAP 分子标记的苦荞遗传多样性分析

供试的 15 份苦荞材料分别来自贵州(3 份)、甘肃(2 份)、四川(1 份)、云南(2 份)、陕西(2 份)、江西(1 份)和山西(2 份)7 个省份,以及国外未知来源材料(2 份)。15 个地域品种之间的遗传相似度为 0.48~0.92。采用 UPGMA 法进行聚类,当遗传相似度 $GS=0.78$ 时,可将 15 份苦荞材料分为 3 大类(1、2 和 3),其中第一大类又可分为 2 个亚类(1A 和 1B)。其中,87%的材料归为第一大类,西苦 6-14 为第二大类,丽江苦荞单独归为第三大类(图 3)。遗传

表 4 SRAP 引物组合扩增信息分析

Table 4 Analysis of the amplification with combined SRAP primers

引物组合 Primers combination	总条带数 Total number of bands	多态性条带数 Numbers of polymorphic bands	多态性比率/% Polymorphism	多态性信息量值 Value of PIC
me3em9	7	7	100	0.88
me3em14	6	4	66	0.84
me3em15	6	4	66	0.66
me6em12	10	8	80	0.91
me7em8	6	5	83	0.84
me7em10	6	6	100	0.86
me7em11	12	9	75	0.92
me7em12	9	7	77	0.90
me8em10	7	6	85	0.89
me9em1	7	6	85	0.81
me9em3	6	3	50	0.76
me9em4	11	10	90	0.92
me9em8	7	5	71	0.88
me10em13	8	7	87	0.89
me11em3	9	8	88	0.90
me11em10	10	8	80	0.91
me12em8	13	13	100	0.95
me12em9	4	3	75	0.74
me12em10	9	7	77	0.89
me12em13	9	8	88	0.90
合计 Total	162	134		
平均 Average	8.1	6.7	81.6	0.86

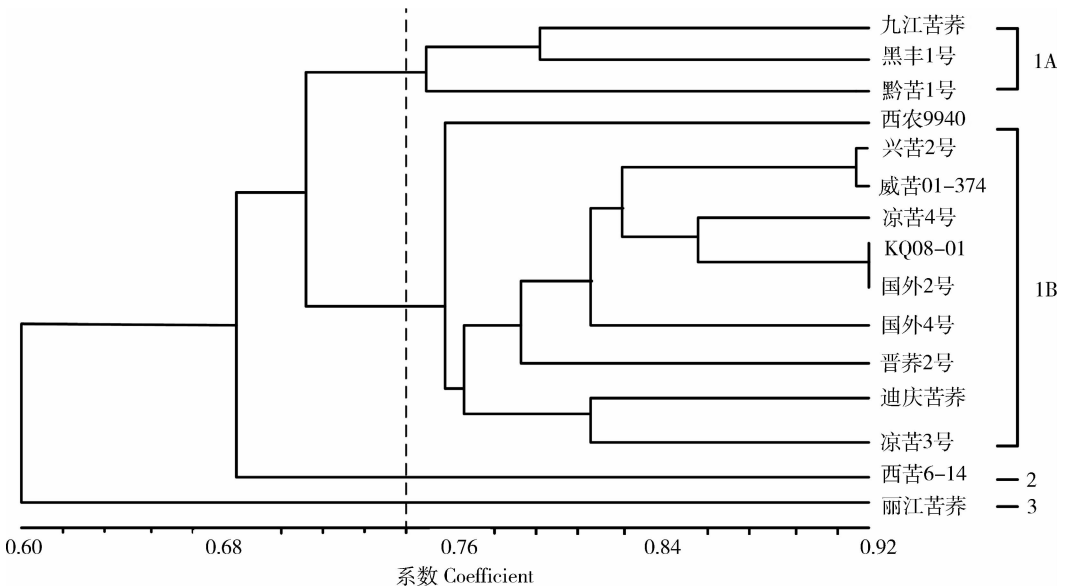


图 3 SRAP 标记的 15 份苦荞 UPGMA 聚类图

Fig. 3 UPGMA clustering figure of 15 buckweats SRAP marker

距离最近的为 KQ08-01 和国外 2 号,其遗传相似度为 0.92,由于国外 2 号未知来源,推测可能国外 2 号在贵州地区长期引种驯化,与当地品种的种子混杂导致无法区分。山西主栽品种黑丰 1 号和晋养 2 号与其他品种之间的遗传相似度为 0.50~0.78。而威苦 01-374 和兴苦 2 号之间的遗传相似度也较高,为 0.91。丽江苦荞与其他品种之间的遗传相似度较低,变幅为 0.48~0.69。

3 讨论

3.1 适用于苦荞 SRAP 分子标记的反应体系的建立

本研究针对可能影响 PCR 反应体系的 4 个因素 (*Taq* 酶、 Mg^{2+} 、模板和引物)进行正交试验统计分析,其中 *Taq* 酶量是决定 PCR 扩增成功的关键因素,而 Mg^{2+} 浓度是决定反应特异性的关键因素,其他模板和引物的浓度是 PCR 产物条带清晰的关键因素。陈万胜等^[12]在对烟草 SRAP 反应体系优化中认为 *Taq* 酶对 PCR 影响最大,确定 1 U 酶量为最佳用量。与夏楠等^[10]确定的苦荞 SRAP 最佳反应体系相比,本研究中 *Taq* 酶、DNA 模板和 dNTPs 用量略大,而 Mg^{2+} 用量一致。考虑到 SRAP 是随机引物扩增,较大的酶量及底物浓度,可获得更多的多态性条带。本研究 PCR 扩增结果均未出现引物二聚体现象,也进一步证明了所优化的 SRAP-PCR 扩增反应体系适用于苦荞 SRAP 分子标记。

3.2 不同来源苦荞品种的遗传多样性分析

本研究从 238 对引物组合中筛选获得多态性较好的引物组合 20 对,这些引物组合平均多态性比率为 81.6%,平均 PIC 值为 0.86,这一数据虽然低于高帆等^[9]获得的苦荞 SSR 标记(平均 PIC 值为 0.88),但远高于韩瑞霞等^[13]获得的苦荞 SSR 标记 PIC 值(0.36)。相比较张文英等^[8]从 120 对 SRAP 引物中筛选获得 23 对引物,本试验中获得的多态性引物数量虽然较少,但每一条引物扩增的多态性比率均较高,其中 me12em8 扩增 PIC 值为 0.95,可以很好地展现苦荞丰富的遗传多样性。并且通过本试验开发出了多态性比率和 PIC 值均较高的可用于苦荞 SRAP 分析的骨干引物(me7em11、me9em4 和 me12em8),为充分利用开发苦荞资源和完善苦荞遗传背景分析奠定了基础。

本研究基于 SRAP 技术分析了 15 个地域来源不同的苦荞品种,主要是集中在云贵高原和黄土高

原生态分布的苦荞品种(国审品种九江苦荞除外),而张文英等^[8]试验主要集中在湖北鄂西南地域的苦荞地方品种,并推断湖北鄂西南地域为苦荞的一个生态分布中心,因此不同的研究材料更加丰富了苦荞种质资源遗传多样性的研究结果。本研究的聚类结果揭示了来源于 7 个省份的苦荞遗传距离在 0.60~0.92,遗传距离变幅不明显,无法区分 KQ08-01 和国外 2 号的种质,而且不同省份之间苦荞品种聚类没有明显地域性。一方面这可能是由于苦荞起源于中国西南部和喜马拉雅山脉区域^[14],多年来经云贵种植驯化,引种至山西和陕西等地育成品种(如晋养 2 号和西农 9940),各地域品种之间保持相对稳定的遗传性状。另一方面苦荞花器小以及严格自交的授粉方式,使其进行杂交育种极其困难,目前只能通过系统选育或诱变育种获得优良稳定的遗传性状,以上原因是导致现今苦荞品种之间遗传多样性变异较小,品种间无明显地域特征的主要因素。但 87% 的材料聚为 1 个大类,也暗示这些品种之间的亲缘关系和遗传基因型相对保守稳定,以及相对较低的品种间基因交流。Budak 等^[15]曾利用 4 种分子技术内部简单重复序列(Inter-simple sequence repeat, ISSR)、SSR、RAPD 和 SRAP 揭示野牛草品种间的遗传多样性,发现其中 SRAP 位点最为丰富,在揭示遗传关系相近的品种上最为有效。高帆等^[9]利用 SSR 标记(这些标记来源于其他物种)鉴别 50 个苦荞品种,尽管标记的多态性以及适用性较好,聚类分析结果也未对这些品种有很好的地域划分,同时认为苦荞品种间遗传变异幅度较小。根据本试验结果,来源于陕西的品种西苦 6-14 和来源于云南丽江苦荞分别单独划分一类,与其他品种的亲缘关系较远,推测这 2 个品种可能为当地的农家驯化品种,其种质中蕴含的遗传基因资源可能为其他品种所没有,因此可将这 2 个品种作为丰富苦荞育种材料的优良遗传资源。本研究由于所分析的品种数量有限,同时 SRAP 分子标记的分析相对单一,如果想要从苦荞品种间获得更多、更准确的遗传多样性信息,除需增加更多的引物组合或者增加不同地域品种的数量,还要多种标记共同分析,以丰富标记位点。本研究初步揭示了 15 个苦荞品种间的遗传多样性信息,明确了 15 个苦荞品种的遗传背景。这些结果将为加强从不同地域中引种苦荞种质,扩大苦荞基因资源交流奠定基础,同时为苦荞分子标记辅助育种提供一定理论参考。

参 考 文 献

- [1] 赵刚, 陕方. 中国苦荞[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 4-7
- [2] 冯佰利, 姚爱华, 高金峰, 等. 中国荞麦优势区域布局与发展研究[J]. 中国农学通报, 2005, 21(3): 375-377
- [3] 林汝法, 柴岩, 廖琴, 等. 中国小杂粮[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2002: 51-52
- [4] 赵佐成, 周明德, 王中仁, 等. 中国苦荞麦及其近缘种的遗传多样性研究[J]. 遗传学报, 2002, 29(8): 723-734
- [5] Aii J, Nagano M, Penner G A, et al. Identification of RAPD markers linked to the Homostylar (Ho) gene in buckwheat [J]. Breeding Sci, 1998, 48(1): 59-62
- [6] Konishi T, Yasui Y, Ohnishi O, et al. Original birthplace of cultivated common buckwheat inferred from genetic relationships among cultivated populations and natural populations of wild common buckwheat revealed by AFLP analysis[J]. Genes Genet Syst, 2005, 80(2): 113-119
- [7] Iwata H, Imon K, Tsumura Y, et al. Genetic diversity among Japanese indigenous common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) cultivars as determined from amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeat markers and quantitative agronomic traits[J]. Genome, 2005, 48(3): 367-377
- [8] 张文英, 方正武, 王凯华. 苦荞地方品种 SRAP 标记遗传多样性分析[J]. 广东农业科学, 2012(11): 148-152
- [9] 高帆, 张宗文, 吴斌. 中国苦荞 SSR 分子标记体系构建及其在遗传多样性分析中的应用[J]. 中国农业科学, 2012, 45(6): 1042-1053
- [10] 夏楠, 王耀文, 韩瑞霞, 等. SRAP 分子标记用于苦荞分析中的条件优化[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(1): 44-48
- [11] 孙朝霞, 侯思宇, 赵娟, 等. 梨果实愈伤组织褐腐病菌感染过程 cDNA-SRAP 差异分析[J]. 植物生理学报, 2012, 48(2): 166-172
- [12] 陈万胜, 王元英, 罗成刚, 等. 利用正交设计优化烟草 SRAR 反应体系[J]. 分子植物育种, 2008, 6(1): 177-182
- [13] 韩瑞霞, 张宗文, 吴斌, 等. 苦荞 SSR 引物开发及其在遗传多样性分析中的应用[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(5): 759-764
- [14] Tsuji K, Ohnishi O. Origin of cultivated Tatar buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) revealed by RAPD analyses [J]. Genet Resour Crop Ev, 2000, 47(4): 431-438
- [15] Budak H, Shearman R C, Parmaksiz I, et al. Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buffalograsses based on phylogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs and SRAPs[J]. Theor Appl Genet, 2004, 109(2): 280-288

责任编辑: 袁文业