

西洋杜鹃 SRAP 体系优化及遗传多样性分析

吴月燕¹, 陶巧静^{1,2}, 李波^{1,2}, 许丹叶¹

(1. 浙江万里学院 生物与环境学院, 浙江宁波 315100; 2. 浙江大学 农业与生物技术学院, 浙江杭州 310058)

摘要: 以西洋杜鹃 *Rhododendron hybridum* 功能叶片为试验材料, 采用改良的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取西洋杜鹃基因组 DNA, 并且运用 $L_{16}(4^4)$ 正交试验设计, 在 4 个水平上对影响西洋杜鹃相关序列扩增多态性(SRAP)反应的镁离子(Mg^{2+})浓度、*Taq* 酶用量、三磷酸碱基脱氧核苷酸(dNTPs)浓度、引物浓度等 4 个因素进行了优化, 确立了一套适用于西洋杜鹃的稳定可靠、重复性强的 SRAP-PCR 反应体系。实验发现, 其最佳反应体系(20.0 μ L)为: Mg^{2+} 浓度 1.750 mmol·L⁻¹, dNTPs 浓度 0.175 mmol·L⁻¹, *Taq* 酶 1.500×16.67 nkat, 引物 0.200 μ mol·L⁻¹。利用该优化体系对 24 个西洋杜鹃花品种进行遗传多样性分析。从 88 对 SRAP 引物中筛选出 10 对扩增清晰且多态性高的引物, 共扩增出 217 条带, 其中多态性条带 212 条, 多态性比率达 97.35%。24 个杜鹃品种的遗传相似系数变化范围为 0.591~0.708, 算术平均数的非加权配对算术平均法(UPGMA)聚类分析结果显示: 在相似系数为 0.590 处将 24 个供试品种分为 2 个类群, 在相似系数为 0.623 处又可分为 2 个亚群, 说明该优化体系可应用于西洋杜鹃花品种鉴定及遗传多样性的研究。图 3 表 6 参 19

关键词: 植物学; 西洋杜鹃; 遗传多样性; SRAP-PCR; 正交设计; 体系优化; 聚类分析

中图分类号: Q946; S685.21 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2013)06-0844-08

An optimal SRAP-PCR system of *Rhododendron hybridum* and its genetic diversity analysis with SRAP marker

WU Yueyan¹, TAO Qiaojing^{1,2}, LI Bo^{1,2}, XU Danye¹

(1. College of Biology and Environment, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, Zhejiang, China; 2. College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China)

Abstract: In order to find the optimal sequence-related amplified polymorphism (SRAP)-PCR system of *Rhododendron hybridum* and analyse its genetic diversity, the functional leaves of *Rhododendron hybridum* were used to extract its genome DNA, using an improved cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) method. Concentrations of Mg^{2+} , *Taq* polymerase, dNTPs and primer, which maybe affect the SRAP-PCR reactions, were optimized by $L_{16}(4^4)$ orthogonal design experiments to establish the SRAP molecular marker system in *Rhododendron hybridum*. Then, an optimal, stable and repeatable SRAP-polymerase chain reaction (PCR) of 20.0 μ L containing 1.750 mmol·L⁻¹ Mg^{2+} , 0.175 mmol·L⁻¹ dNTPs, 1.500×16.67 nkat *Taq* polymerase, and 0.200 μ mol·L⁻¹ primer was established. Finally, genetic diversity and relationships of 24 *Rhododendron hybridum* cultivars were analyzed using an Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) cluster analysis with this optimized system. Results revealed 10 highly polymorphic and stable primer pairs selected from 88 pairs of SRAP primers with a total of 217 bands being detected from these 10 primer pairs. Of the detected bands, 212 were polymorphic (a 97.35% average) having a genetic similarity coefficient ranging from 0.591 to 0.708. The cluster analysis divided the 24 cultivars into two groups at a 0.590 similarity level, and these were further delineated into two sub-groups at a 0.623 similarity level. These results

收稿日期: 2012-11-14; 修回日期: 2013-05-22

基金项目: 浙江省重大科技专项重点农业项目(2009C12092); 宁波市科技创新创业重点项目(2010C92021)

作者简介: 吴月燕, 教授, 从事园艺植物生理生化与遗传育种研究。E-mail: wyy2000@zjwu.edu.cn

demonstrated that this optimized SRAP-PCR system can be applied to cultivars identification and genetic diversity research on *Rhododendron hybridum*. [Ch, 3 fig. 6 tab. 19 ref.]

Key words: botany; *Rhododendron hybridum*; genetic diversity; SRAP-PCR; orthogonal design; system optimization; cluster analysis

西洋杜鹃 *Rhododendron hybridum* 简称西鹃, 别称比利时杜鹃, 是由皋月杜鹃 *Rhododendron indicum*, 映山红 *Rhododendron simsii* 及毛白杜鹃 *Rhododendron mucronatum* 等反复杂交选育而成的杂交种^[1], 具有株型矮小, 树冠紧密, 花色丰富等特点, 在中国大都为盆栽^[2]。由于西洋杜鹃来自种间杂交, 类型多, 形态特征丰富多样, 不同生境(居群)间变异相差较大, 品种之间的鉴别有一定困难, 如果仅仅依据形态特征分类会引起很大争议, 会引起分类类群变更频繁^[3]。目前, 国内外主要对西洋杜鹃的化学活性成分、形态、观赏、种植、栽培管理等方面进行了研究, 国外在分子水平方面的研究多见于分子连锁图的构建、不同环境的群居分析以及耐寒基因研究和转基因研究^[4-5], 而国内则较少。相关序列扩增多态性分子标记(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)是由美国加州大学蔬菜作物系 Li 等^[6]在 2001 年首次正式提出的一种基于聚合酶链反应(PCR)的新型分子标记技术。该标记具有多态性高, 信息量丰富, 操作简便, 重复性好和成本低等特点。SRAP 分子标记系统最早在芸薹属 *Brassica* 作物开发出来^[6], 目前已在水稻 *Oryza sativa*, 番茄 *Solanum lycopersicum*, 棉花 *Gossypium* spp., 黄瓜 *Cucumis sativus* 和柿属 *Diospyros* 等多种植物中成功扩增^[7-9], 并应用于遗传图谱构建、比较基因组学、遗传多样性分析^[10-12]。SRAP 标记扩增结果易受镁离子(Mg^{2+})浓度、三磷酸碱基脱氧核苷酸(dNTPs)浓度、*Taq* 酶用量、引物浓度和模板 DNA 浓度等因子的影响, 且不同物种的反应体系也不相同。本研究利用正交试验设计, 对西洋杜鹃 SRAP 反应体系中的 Mg^{2+} 浓度、引物浓度、*Taq* 酶用量以及 dNTPs 浓度等主要影响因素进行了优化分析, 建立了适合于西洋杜鹃的 SRAP-PCR 最佳反应体系, 并利用筛选的引物对 24 个西洋杜鹃品种进行了遗传多样性分析, 从分子水平上探讨这些品种的遗传多样性, 对西洋杜鹃种质资源的鉴定、利用及其育种实践等具有一定的参考价值, 以期为西洋杜鹃品种的分子鉴定及连锁遗传图谱构建奠定基础, 为育种开发提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料及试剂

以‘霸王红’‘紫金冠’‘白佳人’等 24 个西洋杜鹃品种为试验材料(表 1), 材料来源于浙江省宁波市北仑区柴桥镇杜鹃花基地, 生长年龄均为 2 a。用于 SRAP-PCR 反应的 Mg^{2+} , *Taq* 酶, dNTPs 和 DL5000, DNA Marker 均购于上海生工生物工程有限公司, 引物委托上海生工合成。

表 1 供试西洋杜鹃材料

Table 1 Tested materials of *Rhododendron hybridum*

编号	品种名称	编号	品种名称	编号	品种名称	编号	品种名称
1	‘霸王红’	7	‘荒狮子’	13	‘玉女’	19	‘银边牡丹’
2	‘紫金冠’	8	‘五宝绿珠’	14	‘十二乙皇’	20	‘汉堡 1 号’
3	‘绿牡丹’	9	‘粉天惠’	15	‘昔兰’	21	‘星光’
4	‘鲜红宝石’	10	‘双花红’	16	‘白佳人’	22	‘四海波’
5	‘荷兰粉皇后’	11	‘西德一号’	17	‘美人笑’	23	‘肯特’
6	‘红双喜’	12	‘玉翠锦’	18	‘丹麦红’	24	‘杨梅红’

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取及检验 取各西洋杜鹃品种枝条上端的较幼嫩叶片, 采用改良的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法^[13]提取其基因组 DNA。10.0 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳(1×TBE)检测 DNA 提取质量, 紫外分光光度计检测其浓度和纯度, 并稀释到 50 mg·L⁻¹, -20 ℃保存备用。

1.2.2 SRAP-PCR 反应体系的优化 为了确定 PCR 反应中 4 个主要因素(Mg^{2+} , dNTPs, *Taq* 酶和引物)

的最佳水平,以2年生的盆景西洋杜鹃花‘美人笑’为材料,me5和em7为引物组合,采用正交设计 $L_{16}(4^4)$ 进行试验^[14],选择4个因素,浓度水平为4个·因素⁻¹(表2),共16个处理组合(表3)。试验设3次重复,总反应体系为20.0 μ L,其中模板DNA量为1.5 μ L,10×PCR缓冲液(不含Mg²⁺)2.0 μ L,不足部分用双蒸水补齐。反应程序^[6]为:94 °C预变性5 min;94 °C变性1 min,37 °C复性1 min,72 °C延伸1 min,5个循环;94 °C变性1 min,57 °C复性1 min,72 °C延伸1 min,35个循环;最后72 °C延伸10 min。PCR产物使用10.0 g·L⁻¹琼脂糖凝胶电泳检测。

表2 PCR反应的各因素水平

Table 2 Levels of parameters for PCR reaction

水平	Mg ²⁺ /(mmol·L ⁻¹)	dNTPs/(mmol·L ⁻¹)	Taq酶/(×16.67 nkat)	引物/(\mu mol·L ⁻¹)
1	1.50	0.150	1.00	0.20
2	1.75	0.175	1.50	0.30
3	2.00	0.200	2.00	0.40
4	2.25	0.225	2.50	0.50

表3 SRAP-PCR正交实验设计及结果统计

Table 3 Orthogonal design and results statistic of SRAP-PCR

处理	Mg ²⁺ /(mmol·L ⁻¹)	dNTPs/(mmol·L ⁻¹)	Taq酶/(×16.67 nkat)	引物/(\mu mol·L ⁻¹)	清晰条带数(3次平均)
1	1.50	0.150	1.00	0.20	5
2	1.50	0.175	1.50	0.30	6
3	1.50	0.200	2.00	0.40	5
4	1.50	0.225	2.50	0.50	4
5	1.75	0.150	1.50	0.40	6
6	1.75	0.175	1.00	0.50	5
7	1.75	0.200	2.50	0.20	8
8	1.75	0.225	2.00	0.30	5
9	2.00	0.150	2.00	0.50	5
10	2.00	0.175	2.50	0.40	6
11	2.00	0.200	1.00	0.30	2
12	2.00	0.225	1.50	0.20	6
13	2.25	0.150	2.50	0.30	3
14	2.25	0.175	2.00	0.20	3
15	2.25	0.200	1.50	0.50	4
16	2.25	0.225	1.00	0.40	2

1.2.3 SRAP多态性引物筛选 选择形态差异明显,具有代表性且SRAP结果好的3个西洋杜鹃品种(‘霸王红’‘紫金冠’‘白佳人’)提取的DNA为模板,对SRAP引物组合进行筛选,从中选出带型清晰、重复性高、多态性较好的引物。

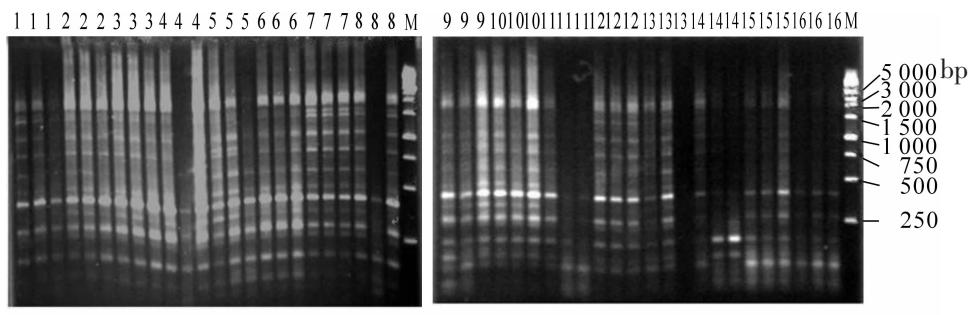
1.2.4 SRAP数据处理与统计 对供试的24份材料扩增的电泳谱带总数和多态性带的数目进行统计,将SRAP扩增产物每个条带视为1个位点,具有相同迁移率的条带视为同一条带。胶上相同迁移率的条带均来自同一位点上的同一等位基因,用数字1和0分别表示供试材料某一等位基因的有无,即根据各多态性引物扩增条带的有无分别赋值,有记为1,无记为0,建立“1-0”数据库。利用NTsys 2.1软件进行Jaccard(J)遗传相似性系数分析。在此基础上,利用非加权配对算术平均法(unweight pairgroup method using arithmetic averages, UPGMA)建立所有供试品种的聚类树状图^[15]。

2 结果与分析

2.1 SRAP-PCR反应体系优化结果

根据正交设计表进行SRAP-PCR反应,所得PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,电泳结果如图1,记录

清晰条带数(表3)。



1~16 为 16 个处理组合, 重复 3 次·处理⁻¹, M 为标记物, 引物组合 me5-em7

图 1 西洋杜鹃 SRAP-PCR 正交试验结果

Figure 1 Result of *Rhododendron hybridum* SRAP-PCR by orthogonal design

2.1.1 正交试验结果直观分析 对正交试验结果进行直观分析, 由图 1 显示, 16 个处理均可以扩增出条带, 但是不同的组合, 由于各因素的浓度不同, 各处理间存在着较明显的差异。处理 11, 处理 13, 处理 14, 处理 16 扩增效果较差, 扩增出的条带数较少, 通过比较发现, 这 4 个处理中 Mg^{2+} 浓度均较高, 说明 Mg^{2+} 浓度不宜过高。处理 2, 处理 3, 处理 7, 处理 8, 处理 10, 处理 12 扩增效果较好, 以处理 7 为最好, 扩增条带最多, 亮度最高, 且条带清晰, 因此初步确定处理 7 为西洋杜鹃 SRAP-PCR 较佳的反应体系。

2.1.2 正交试验结果统计分析 对各组浓度搭配的正交试验结果进行了直观统计分析(表4)。 T 值代表为某因素在某水平下的得分之和; K 值代表某因素在某水平下的得分平均值, 而 R 值为该因素的极差, 即该因素在不同水平下得分的最大、最小平均值之差。 R 值越大, 说明该因素对实验结果影响越大, 即该因素的作用就越大。由表 4 知: 4 个因素对试验的影响程度大小依次为 *Taq* 酶用量 > Mg^{2+} 浓度 > 引物浓度 > dNTPs 浓度。 K 值反映了因素各水平对反应体系的影响情况, K 值越大, 反应水平就越好。从表看出, Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度及 *Taq* 酶均以水平 2 最好, 引物浓度以水平 1 最好, 即 Mg^{2+} 1.75 mmol·L⁻¹, dNTPs 0.175 mmol·L⁻¹, *Taq* 酶为 1.50×16.67 nkat, 引物 0.20 μ mol·L⁻¹ 的组合为最好, 且 10×缓冲液的定值量为 2.0 μ L, 基因组 DNA 定值为 1.5 μ L, 双蒸水补足至 20.0 μ L, 将此组合作为西洋杜鹃 SRAP-PCR 反应的最佳体系。

表 4 正交试验结果分析

Table 4 Analysis of orthogonal experiment results

项目	Mg^{2+}	dNTPs	<i>Taq</i> 酶	引物
T_1	22	18	14	21
T_2	22	20	25	18
T_3	17	17	17	17
T_4	12	18	17	17
K_1	5.50	4.50	3.50	5.25
K_2	5.50	5.00	6.25	4.50
K_3	4.25	4.25	4.25	4.25
K_4	3.00	4.50	4.25	4.25
R (极差)	2.50	0.75	2.75	1.00

2.2 SRAP 多态性分析

从 88 对 SRAP 引物(表 5)中共筛选出 10 对多态性好、条带清晰的引物(me3-em8, me4-em2, me4-em4, me5-em7, me5-em10, me6-em1, me6-em7, me7-em1, me8-em5 和 me8-em7)。将筛选到的 10 条引物用于 SRAP-PCR 反应, 图 2 为 me7-em1 引物组合对 24 个西洋杜鹃品种的扩增结果。经统计分析可知, 10 条引物共扩增出 217 条带, 其中多态性条带 212 条, 平均多态性位点百分率为 97.35%(表 6)。单条引物之间的扩增结果存在一定的差异, 最少 14 条, 最多有 25 条, 平均带数为 21.2 条。引物扩增

长度为500~5 000 bp, 其中以750~3 000 bp居多。可见, SRAP在杜鹃种植资源里的多态性位点较多, 也表明杜鹃的遗传多样性较为丰富。

表5 SRAP引物序列

Table 5 Primer sequences used for SRAP analysis

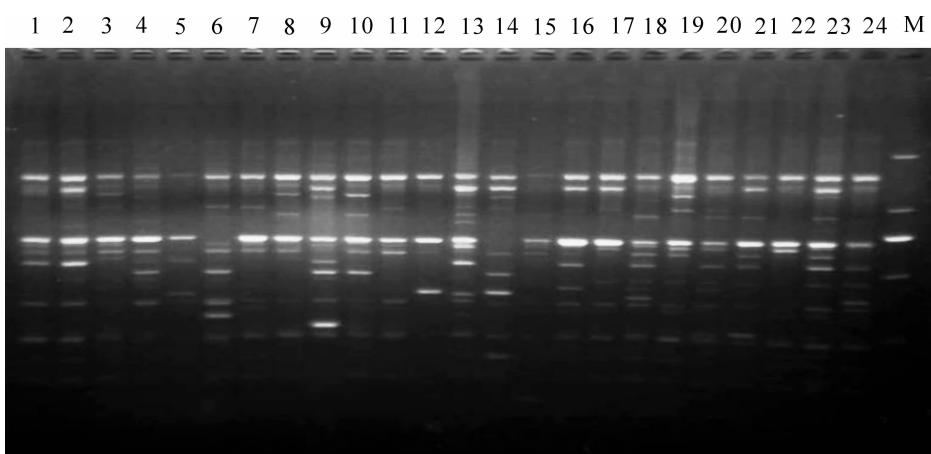
引物名称	引物序列5'→3'	引物名称	引物序列5'→3'
me1	TGAGTCCAACCGGATA	em1	GACTGCGTACGAATTAAT
me2	TGAGTCCAACCGGAGC	em2	GACTGCGTACGAATTGCG
me3	TGAGTCCAACCGGAAT	em3	GACTGCGTACGAATTGAC
me4	TGAGTCCAACCGGACC	em4	GACTGCGTACGAATTGTA
me5	TGAGTCCAACCGGAAG	em5	GACTGCGTACGAATTAAC
me6	TGAGTCCAACCGGTAA	em6	GACTGCGTACGAATTGCA
me7	TGAGTCCAACCGGTCC	em7	GACTGCGTACGAATTCAA
me8	TGAGTCCAACCGGTGC	em8	GACTGCGTACGAATTCTG
		em9	GACTGCGTACGAATTCGA
		em10	GACTGCGTACGAATTTCAG
		em11	GACTGCGTACGAATTCCA

表6 10对SRAP引物组合及其扩增结果

Table 6 10 SRAP primer combinations and the results of amplification

引物组合	扩增总带数	多态性条带数	多态性位点百分率/%
me3-em8	20	19	95.00
me4-em2	25	24	96.00
me4-em4	14	13	92.86
me5-em7	22	22	100.00
me5-em10	23	23	100.00
me6-em1	24	24	100.00
me6-em7	25	25	100.00
me7-em1	25	25	100.00
me8-em5	18	17	94.44
me8-em7	21	20	95.24
总计	217	212	97.69
平均	21.7	21.2	97.35

说明: 统计方法见试验方法 1.2.4 SRAP 数据处理与统计。



1~24为24个西洋杜鹃花品种, M为标记物

图2 引物组合me7-em1对24个西洋杜鹃品种的SRAP扩增结果

Figure 2 Result of SRAP-PCR for 24 *Rhododendron hybrida* varieties using primer combination me7-em1

2.3 西洋杜鹃遗传相似性及聚类分析

根据 PCR 产物电泳结果, 记录扩增位点建立数据矩阵, 利用 NTsys 2.10e 软件计算 24 个品种间的遗传相似性指数。24 个杜鹃品种的遗传相似系数变化范围为 0.591~0.708。在这些杜鹃品种中, ‘绿牡丹’和‘美人笑’的遗传相似系数最小, 为 0.182, ‘紫金冠’和‘粉天惠’以及‘荷兰粉皇后’和‘杨梅红’的遗传相似系数最大, 达到 0.783 和 0.782, 大多数品种的相似系数为 0.590~0.800。遗传相似系数越大, 表示亲缘关系越近, 相似系数小说明种质间遗传变异较大, 多态性较高。

基于遗传相似系数, 利用 UPGMA 方法对 24 份供试材料进行聚类分析(图 3)。聚类结果显示, 在相似系数为 0.590 处将 24 个供试品种分为 2 个类群, 第 1 类包含 2 个品种, 在相似系数为 0.623 处又可分为 2 个亚群, 第 1 亚群包括‘霸王红’‘汶堡一号’‘星光’‘四海波’‘肯特’‘丹麦红’‘紫金冠’‘粉天惠’‘玉女’‘荒狮子’‘五宝绿珠’‘玉翠锦’‘西德 1 号’, 第 2 亚群包括鲜‘红宝石’‘红双喜’‘十二乙皇’‘荷兰粉皇后’‘杨梅红’‘昔兰’‘白佳人’‘双花红’和‘银边牡丹’。该聚类分析表明, 不同西洋杜鹃品种间遗传差异明显, 这可能与西洋杜鹃是由皋月杜鹃、映山红及毛白杜鹃等反复杂交选育而成的杂交种从而导致其遗传背景复杂有关。不同类群内的品种表明它们具有相同的最原始的杂交亲本, 且由于后面亲本及杂交次数不同又逐次形成了不同的品种, 这可由聚类图中明显看出。同时, 由于西洋杜鹃遗传复杂导致命名混乱, 常会出现重名现象。结果中‘汶堡一号’和‘星光’2 个品种不能区分开, 其有可能是同种异名, 但需要进一步验证。

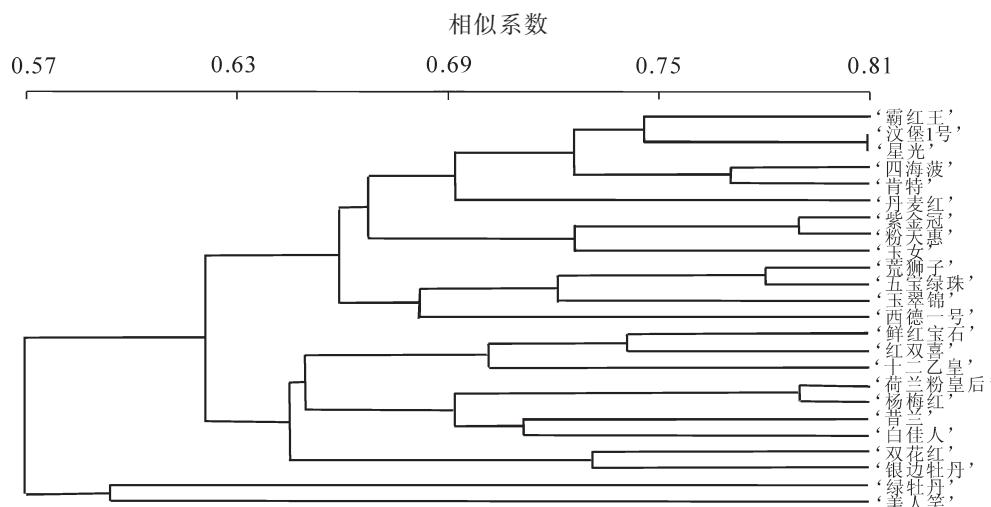


图 3 基于 SRAP-PCR 的 24 个西洋杜鹃品种的聚类树

Figure 3 Cluster analysis of 24 *Rhododendron hybridum* cultivars based on SRAP-PCR

3 结论与讨论

作为新发展起来的一种遗传标记形式, SRAP 分子标记技术, 将扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)和随机扩增多态性 DNA 标记(random amplified polymorphic DNA, RAPD)两者的优势有机结合在一起, 高频率共显性明显优于 AFLP, 且比 AFLP, RAPD 和简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)等方法更能反映出表型的多样性及进化历史^[16-17]。同时 SRAP 技术弥补了常用分子标记技术的一些不足, 如 RAPD 技术稳定性和重复性差; AFLP 成本较高、操作复杂; SSR 检测位点少, 成本高, 因此, SRAP 标记技术是目前一种较理想的分子标记技术, 具有广泛的前景。

本实验所采用 SRAP 标记进行正交设计试验不但可以弥补其他标记技术的不足之处, 也避免了进行单因素试验获得的信息量少和完全组合设计工作量大的缺点, 此方法完全可用于 SRAP-PCR 反应体系的优选和建立, 但此方法具有局限性, 即科研工作者目前一般是根据电泳条带的数量和清晰度来判断试验结果的优劣, 因此这种判断带有一定的主观性。

有关 SRAP 反应体系和程序的优化在很多植物中均有报道, 但是不同的植物, 所用的试验方法以及所需的扩增条件也不一样, 会影响 SRAP 的图谱。该试验采用了 $L_{16}(4^4)$ 正交设计, 共对 16 个反应组合

进行了扩增, 考察了4种组分4种浓度的综合影响, 通过统计分析和检测验证, 迅速筛选出稳定、重复性好的SRAP反应体系, 且该体系可以很好地用于种间聚类分析, 适用于西洋杜鹃的遗传多样性分析。且得知在本试验中 *Taq* 酶对PCR反应的影响最大, dNTPs影响最小。这与袁菊红等^[18]对石蒜 *Lycoris radiata* SRAP反应的影响为Mg²⁺最明显, dNTPs最不明显的研究结果有所不同, 表明不同植物间的SRAP-PCR反应体系存在明显差异。同苏家乐等^[19]报道的20.0 μL杜鹃花属SRAP反应体系相比较, 本体系dNTPs和引物浓度等都有所减少, 大大降低了试验成本, 因此, 本研究优化的20.0 μL反应体系更为经济高效, 可广泛应用于西洋杜鹃的SRAP-PCR反应。

本研究应用SRAP分子标记技术对24个西洋杜鹃品种的遗传多样性进行研究, 10对引物扩增出217条清晰的用于多样性分析的谱带, 其中多态性条带就有212条, 多态性比率为97.35%。这一方面说明了西洋杜鹃不同品种间存在着丰富的遗传变异, 为西洋杜鹃优良品系选育、开发和利用提供了空间; 同时也说明了SRAP分子标记技术在西洋杜鹃遗传多样性研究中有较高的检出效率, 这对西洋杜鹃品种的鉴定、利用及其育种实践等具有一定的参考价值。总之, 本试验为今后利用SRAP标记对西洋杜鹃花品种的分子鉴别、多样性研究等奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] 刘燕, 陈训. 西洋杜鹃叶片离体培养及植株再生[J]. 种子, 2008, 27(11): 46–49.
LIU Yan, CHEN Xun. Induction of callus from leaf explants of *Rhododendron hybridum* and its regeneration [J]. *Seed*, 2008, 27(11): 46–49.
- [2] 贾军. 比利时杜鹃研究进展[J]. 园艺学报, 2001, 28(增刊1): 693–699.
JIA Jun. Recent advance in belgium azaleas study[J]. *Acta Hortic Sin*, 2001, 28(suppl 1): 693–699.
- [3] 郑宇, 何有天, 陈凌艳, 等. 西洋杜鹃ISSR-PCR反应体系的建立及优化[J]. 福建林学院学报, 2011, 31(2): 126–130.
ZHENG Yu, HE Youtian, CHEN Lingyan, et al. Establishment and optimization of ISSR-PCR system of *Rhododendron hybridum*[J]. *J Fujian Coll For*, 2011, 31(2): 126–130.
- [4] MARIAN C O, KREBS S L, ARORA R. Dehydrin variability among *Rhododendron* species: a 25-kDa dehydrin is conserved and associated with cold acclimation across diverse species [J]. *New Phytol*, 2004, 161(3): 773–780.
- [5] WOLF P G, DOCHE B, GIELLY L. Genetic structure of *Rhododendron ferrugineum* at a wide range of spatial scales [J]. *J Heredity*, 2004, 95(4): 301–308.
- [6] LI G, QUIROS C F. Sequence-related amp lified polymorphisim(SRAP), a new marker system based on simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. *Thero Appl Genet*, 2001, 103: 455–461.
- [7] 林忠旭, 张献龙, 聂以春, 等. 棉花SRAP遗传连锁图构建[J]. 科学通报, 2003, 48(5): 1676–1679.
LIN Zhongxu, ZHANG Xianlong, NIE Yichun, et al. Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP [J]. *Chin Sci Bull*, 2003, 48(15): 1676–1679.
- [8] 李丽, 郑晓鹰, 柳李旺. 用SRAP标记分析黄瓜品种遗传多样性及鉴定品种[J]. 分子植物育种, 2006, 4(5): 702–708.
LI Li, ZHENG Xiaoying, LIU Liwang. analysis of genetic diversity and identification of *Cucumber* varieties by SRAP [J]. *Mol Plant Breed*, 2006, 4(5): 702–708.
- [9] 郭大龙, 罗正荣. 部分柿属植物SRAP-PCR反应体系的优化[J]. 果树学报, 2006, 23(1): 138–141.
GUO Dalong, LUO Zhengrong. Optimization of SRAP-PCR in some *Diospyros* spp.[J]. *J Fruit Sci*, 2006, 23(1): 138–141.
- [10] 柳李旺, 龚义勤, 黄浩, 等. 新型分子标记SRAP与TRAP及其应用[J]. 遗传, 2004, 26(5): 777–781.
LIU Liwang, GONG Yiqin, HUANG Hao, et al. Novel molecular marker systems: SRAP and TRAP and their application [J]. *Hereditas*, 2004, 26(5): 777–781.
- [11] LI G, GAO M, YANG B, et al. Gene for gene alignment between the *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping[J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107(1): 168–180.
- [12] 眭逢刚, 吴转娣, 曾淇, 等. 荔枝种质遗传多样性的SRAP分析[J]. 分子植物育种, 2009, 7(3): 562–568.
ZAN Fenggang, WU Zhuandi, ZENG Qi, et al. Genetic diversity analysis of litchi germplasm by SRAP markers

- [J]. *Mol Plant Breed*, 2009, **7**(3): 562 – 568.
- [13] 赵喜华, 张乐华, 王曼莹. 杜鹃属基因组 DNA 提取及 RAPD 的检定[J]. 生物技术, 2005, **15**(5): 43 – 45.
ZHAO Xihua, ZHANG Lehua, WANG Manying. Extraction of genomic DNA from *Rhododendron* and its RAPD examination[J]. *Biotechnology*, 2005, **15**(5): 43 – 45.
- [14] 徐宗大, 赵兰勇, 杨志莹. 利用正交试验优化玫瑰 SRAP-PCR 反应体系[J]. 中国农学通报, 2010, **26**(11): 215 – 217.
XU Zongda, ZHAO Lanyong, YANG Zhiying. Optimization for SRAP-PCR system of *Rosa rugosa* based on orthogonal design [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2010, **26**(11): 215 – 217.
- [15] 陈智华, 苗佳敏, 钟金城, 等. 野生垂穗披碱草种质遗传多样性的 SRAP 研究[J]. 草业学报, 2009, **18**(5): 192 – 200.
CHEN Zhihua, MIAO Jiamin, ZHONG Jincheng, et al. Genetic diversity of wild *Elymus nutans* germplasm detected by SRAP markers [J]. *Acta Pratac Sin*, 2009, **18**(5): 192 – 200.
- [16] FERRIOL M, PICO B, NUEZ F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, **107**(2): 271 – 282.
- [17] 李严, 张春庆. 新型分子标记: SRAP 技术体系优化及应用前景分析[J]. 中国农学通报, 2005, **21**(5): 108 – 112.
LI Yan, ZHANG Chunqing. A molecular marker: SRAP technique optimization and application analysis [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2005, **21**(5): 108 – 112.
- [18] 袁菊红, 权俊萍, 胡绵好, 等. 石蒜SRAP-PCR 扩增体系的建立与优化[J]. 植物资源与环境学报, 2007, **16**(4): 1 – 6.
YUAN Juhong, QUAN Junping, HU Mianhao, et al. Establishment and optimization of SRAP-PCR amplification system for *Lycoris radiata* [J]. *J Plant Resour Environ*, 2007, **16**(4): 1 – 6.
- [19] 苏家乐, 刘晓宏, 刘晓青, 等. 杜鹃花属植物 SRAP-PCR 反应体系的优化及其应用[J]. 江苏农业学报, 2010, **26**(6): 1352 – 1356.
SU Jiale, LIU Xiaohong, LIU Xiaoqing, et al. Optimization of SRAP-PCR reaction system in *Rhododendron* and its application [J]. *Jiangsu J Agric Sci*, 2010, **26**(6): 1352 – 1356.