

无患子 SRAP-PCR 反应体系的优化

彭珠清¹, 范辉华², 刘 宝¹, 刘 燕¹, 李 静¹

(1. 福建农林大学 林学院, 福建 福州 350002; 2. 福建林业科学研究院, 福建 福州 350012)

摘要: 建立适合无患子 *Sapindus mukurossi* 的相关序列扩增多态性-聚合酶链式反应(SRAP-PCR)最佳反应体系, 为研究无患子种质资源的遗传多样性、亲缘关系及遗传改良等奠定基础。以南平产的无患子叶片为材料, 采用单因素法对体系中的 DNA 模板、镁离子、三磷酸碱基脱氧核苷酸(dNTPs), 引物和 *Taq* DNA 聚合酶等 5 因素进行优化。确立了适合无患子 SRAP 的最佳反应体系 (20 μ L): 1 $\times$ PCR 缓冲液, 50 ng 模板 DNA, 2.0 mmol $\cdot$ L⁻¹ 镁离子, 0.2 mmol $\cdot$ L⁻¹ dNTPs, 0.5 $\times$ 16.67 nkat (0.5 U) *Taq* DNA 聚合酶, 0.4 μ mol $\cdot$ L⁻¹ 引物。利用该体系对 12 份无患子种源材料进行 PCR 扩增, 获得了清晰、稳定的 DNA 谱带, 说明优化后的体系适宜无患子地理种源的遗传多样性分析。图 7 表 3 参 19

关键词: 林木育种学; 无患子; SRAP-PCR; 反应体系; 优化

中图分类号: S722.3

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2014)02-0322-07

Optimization of SRAP-PCR in *Sapindus mukurossi*

PENG Zhuqing¹, FAN Huihua², LIU Bao¹, LIU Yan¹, LI Jing¹

(1. Forestry College, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China; 2. Fujian Academy of Forestry, Fuzhou 350012, Fujian, China)

Abstract: Establish an optimal sequence-related amplified polymorphism (SRAP)-PCR reaction system was to lay the foundation of studying genetic diversity, relationship analysis and genetic improvement in *Sapindus mukurossi*. The leaves from Nanping, Fujian Province were as material. Five influence factors including template DNA, Mg²⁺, dNTPs, primers and *Taq* DNA polymerase were optimized with single factor method. The optimum reaction system by the volume of 20 μ L was established as follows: 1 $\times$ PCR buffer, 50 ng DNA template, 2.0 mmol $\cdot$ L⁻¹ Mg²⁺, 0.2 mmol $\cdot$ L⁻¹ dNTPs, 0.5 $\times$ 16.67 nkat *Taq* DNA polymerase and 0.4 μ mol $\cdot$ L⁻¹ primers. Using the optimization system, 12 different source materials of *Sapindus mukurossi* were detected a clear and stable results. It shows that the optimized SRAP-PCR system could be suitable for the genetic diversity analysis of *Sapindus mukurossi* geographical provenance. [Ch, 7 fig. 3 tab. 19 ref.]

Key words: forest tree breeding; *Sapindus mukurossi*; SRAP-PCR; reaction system; optimization

无患子 *Sapindus mukurossi* 属于无患子科 Sapindaceae 无患子属 *Sapindus*, 是一种非常有潜力的经济树种, 其果可以用来制作洗涤剂, 种仁能提取生物柴油, 树形美观, 可用于园林观赏等。日本、法国、中国台湾等对其蕴含的经济价值有一定的开发利用, 而中国大陆虽早在几百年前就已对其有初步利用, 但深度开发这方面却尚在起步阶段^[1-3]。目前, 对无患子的研究主要集中在生物学特性、繁殖技术^[14]、化学成分和分离提取技术及其利用价值的开发研究^[5-7]等方面, 而在分子生物学方面的研究报道不多^[8-9]。分子标记技术是研究种质资源遗传背景的重要手段, 2001 年美国加州大学蔬菜作物系 Li 与 Quiros 博士提出了一种新型的基于聚合酶链式反应(PCR)的标记方法的相关序列扩增多态性(sequence-related ampli-

收稿日期: 2013-05-05; 修回日期: 2013-09-23

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项(201104100)

作者简介: 彭珠清, 从事植物地理学研究。E-mail: 13489945975@126.com。通信作者: 范辉华, 教授级高级工程师, 从事森林培育学研究。E-mail: jofhh@163.com

fied polymorphism,SRAP) 标记方法^[8,10]。该标记通过独特的双引物设计对基因的 ORFs(open reading frames)的特定区域进行扩增。与其他分子标记相比,该方法具有简单高效、多态性高、重复性较好等特点,并已成功应用于多种蔬菜、经济树种的种质资源分析中^[5-7,11-13]。但在无患子的遗传多样性以及种质鉴定等方面还鲜见报道。为此,本研究以无患子叶片为材料,采用单因素优化的方法建立无患子 SRAP-PCR 的最佳反应体系,旨在为不同地理种源无患子的遗传多样性分析、亲缘关系鉴定、遗传图谱构建、遗传改良等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料来源

试验材料采于福建顺昌无患子种源收集区,共 12 个种源地 36 份种质材料。本优化试验以福建南平种源地的基因组 DNA 为试验材料。

1.2 主要试剂

试验中所用的三磷酸碱基脱氧核苷酸(dNTP)s, *Taq*DNA 酶,琼脂糖和 DNA 标记物均购自上海生工生物工程有限公司,其中 100 bp 标记物是加 DNA 梯度。所用的 SRAP 引物序列由上海生物工程(上海)股份有限公司合成,其序列参照 Li 等^[10]和 Ren 等^[14]的方法。

优化试验引物选用 me2-em7 组合,体系验证引物选用 me2-em7 和 me6-em1,序列具体如表 1。

1.3 无患子总 DNA 的提取

无患子总 DNA 提取采用改良的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法^[15-16]。DNA 的浓度和纯度,分别用质量浓度为 1%的琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计分析检测。样品稀释至 10 μg·L⁻¹后,置-20 ℃冰箱保存备用。

1.4 反应体系的优化

SRAP-PCR 基本反应体系:在 20.0 μL 总体积中,含 2.0 μL 10×PCR 缓冲液(free Mg²⁺),2.0 mmol·L⁻¹ 镁离子(Mg²⁺),0.2 mmol·L⁻¹ dNTPs,2.0×16.67 nkat(2.0 U) *Taq*DNA 聚合酶,正反引物各 0.5 μmol·L⁻¹,用双蒸水补足至 20 μL。

SRAP-PCR 扩增程序为:94 ℃预变性 3 min;94 ℃变性 1 min,35 ℃复性 1 min,72 ℃延伸 1 min;共 5 个循环。随后 94 ℃变性 1 min,50 ℃复性 1min,72 ℃延伸 1 min,共 35 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 仪为 ABI 梯度 PCR 仪。

本试验采用单因素法对反应体系进行优化,分别调整模板 DNA,镁离子,dNTPs,引物, *Taq*DNA 聚合酶各因子的用量(表 2)。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物名称	引物序列
me2	5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'
me6	5'-TGAGTCCAAACCGGTAA-3'
em1	5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3'
em7	5'-GACTGCGTACGAATTCAA-3'

说明:me2 和 me6 为正向引物;em1 和 em7 为反向引物。

表 2 反应体系各因子水平

Table 2 Reaction system in each factor level

水平	DNA 用量/ng	镁离子浓度/ (mmol·L ⁻¹)	dNTPs 浓度/ (mmol·L ⁻¹)	<i>Taq</i> DNA/ (×16.67 nkat)	引物浓度/ (μmol·L ⁻¹)
1	10	1.00	0.05	0.5	0.2
2	20	1.25	0.10	0.6	0.3
3	30	1.50	0.15	0.7	0.4
4	40	1.75	0.20	0.8	0.5
5	50	2.00	0.25	0.9	0.6
6	60	2.25	0.30	1.0	0.7
7	70	2.50	0.35	1.2	0.8
8	80	2.75	0.40	1.5	0.9
9	90	3.00	0.45	2.0	1.0
10	100				

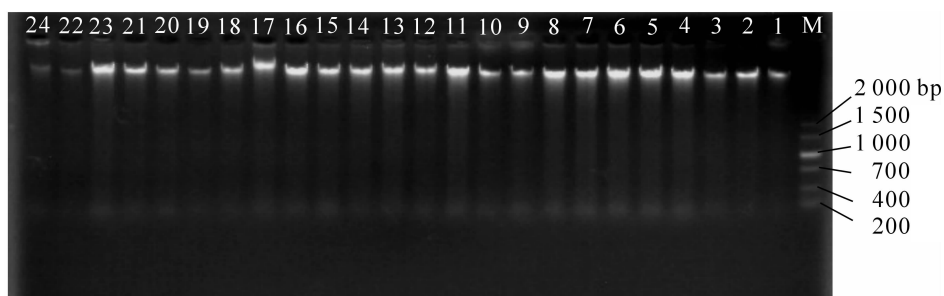
1.5 PCR 产物的检测

将 PCR 产物与上样缓冲液(5:1)混合后于质量分数为 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 用溴化乙锭(EB)染色后, 在凝胶成像系统(AlphaImager HP)上观察。

2 结果与分析

2.1 无患子基因组 DNA 检测

无患子叶片内富含多酚、多糖、蛋白质及其他次生代谢物质^[14], 操作时易发生褐变, 干扰 DNA 的提取, 这些物质若残留在 DNA 样品中将会严重影响 PCR 的效果, 导致 DNA 的酶切、扩增失败, 对后续试验研究的开展有很大的影响。本研究采用改良的 CTAB 法, 成功提取出质量较高的基因组 DNA, 条带较为清晰、完整、无拖尾, 符合 SRAP 分子标记对 DNA 质量的要求(图 1)。



M表示标记物, 泳道1~24分别表示各种源的DNA条带(相邻2个泳道为1个样本)。

图 1 不同无患子总 DNA 电泳检测图

Figure 1 Electrophoresis of total genomic DNA from 12 different *Sapindus mukurossi* provenances

经紫外分光光度计测定, 其 D_{260}/D_{280} 为 1.2~2.2(表 3), 经纯化均能达到 1.8 左右的比值。所有样品质量浓度均大于 $430 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 在 SRAP 分析中可获得较为清晰、稳定的扩增结果产物。

表 3 无患子总 DNA 浓度检测

Table 3 Concentration detection of total genomic DNA from 12 different *Sapindus mukurossi* provenances

序号	产地	D_{260}	D_{280}	D_{310}	D_{260}/D_{280}	DNA 质量浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	广西钦州	0.121	0.089	0.056	1.361	605.0
2	福建南平	0.149	0.116	0.081	1.285	745.0
3	福建清流	0.158	0.104	0.05	1.515	790.0
4	福建三明	0.319	0.157	0.008	2.030	1 595.0
5	福建漳州龙海	0.342	0.160	-0.006	2.134	1 710.0
6	福建顺昌高阳	0.219	0.119	0.026	1.834	1 095.0
7	浙江杭州	0.149	0.097	0.043	1.534	745.0
8	江西樟树	0.164	0.089	0.013	1.835	820.0
9	福建顺昌	0.086	0.043	0.002	1.983	430.0
10	印度	0.156	0.113	0.065	1.377	780.0
11	福建永安	0.130	0.088	0.045	1.486	650.0
12	印度(林科院)	0.118	0.085	0.046	1.379	590.0

2.2 模板 DNA 对 PCR 扩增的影响

本试验设定了 10 个用量梯度(10~100 ng), 研究不同模板 DNA 用量对 PCR 扩增的影响。模板 DNA 使用量在设定范围内, 都能扩增出几乎相同的清晰条带(图 2)。10 ng 时条带比较模糊; 70~100 ng 时, 条带较淡、呈波浪状, 20~60 ng 时主带比较清晰。DNA 较长时间保存会部分降解, 致使有效含量降低。考虑到试验时间较长, 为避免 DNA 降解对试验结果的影响, 最终选择 50 ng 作为模板优化用量。

2.3 镁离子浓度对 PCR 扩增的影响

镁离子浓度对 PCR 扩增影响较大。镁离子浓度过高时，*Taq*DNA 聚合酶催化非特异性扩增，降低反应的忠实性；反之，镁离子浓度过低时，则又会使 *Taq*DNA 聚合酶的活性下降，反应产物减少。当镁离子浓度为 1.00 mmol·L⁻¹ 时，未扩增出条带；当 Mg²⁺浓度为 1.25~1.75 mmol·L⁻¹ 时，条带模糊，出现缺失现象；当镁离子浓度为 2.00~2.50 mmol·L⁻¹ 时，扩增带型基本一致；当镁离子浓度增至 2.75, 3.00 mmol·L⁻¹ 时，条带呈弥散趋势(图 3)。高浓度镁离子易产生非特异性产物，为避免高浓度镁离子对后续试验的影响。本研究最终选择 2.00 mmol·L⁻¹ 作为镁离子的优化浓度。

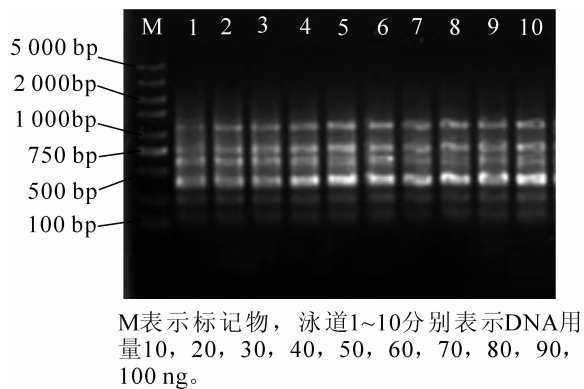


图 2 模板 DNA 用量对 PCR 扩增的影响
Figure 2 Effect of DNA template concentration on PCR amplification

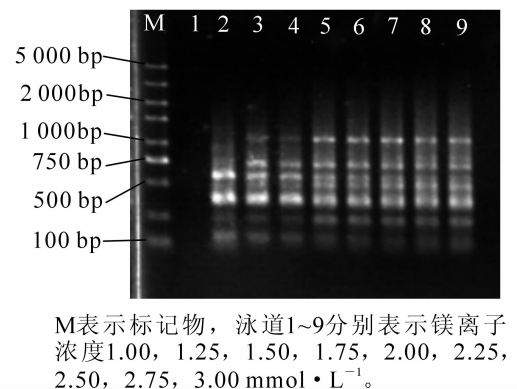


图 3 镁离子浓度对 PCR 扩增的影响
Figure 3 Effect of Mg²⁺ concentration on PCR amplification

2.4 dNTPs 浓度对 PCR 扩增的影响

dNTPs 对 SRAP-PCR 反应有极其重要的作用，dNTPs 浓度过高会增加 DNA 聚合酶的错配率，而浓度过低又会降低产量。dNTPs 浓度为 0.05~0.15 mmol·L⁻¹ 时，条带较少且模糊，0.20~0.25 mmol·L⁻¹ 时条带较为清晰，在 0.30~0.45 mmol·L⁻¹ 时条带又开始模糊，最终确定 0.20 mmol·L⁻¹ 为 dNTPs 的优化浓度(图 4)。

2.5 *Taq*DNA 聚合酶用量对 PCR 扩增的影响

*Taq*DNA 聚合酶的用量与反应体积、酶活性等因素有关。一般酶用量过多会使非特异性增加、弥散背景增强，用量过少则会降低产量，使条带不够明亮。当 *Taq*DNA 聚合酶用量为 0.5×16.67 nkat(0.5 U)和 1.0×16.67 nkat (1.0 U)时，条带均较多，但 0.5×16.67 nkat (0.5 U)时，条带亮度更佳；当 *Taq*DNA 聚合酶用量(0.6~0.9)×16.67 nkat(0.6~0.9 U)时，条带较少；当 *Taq*DNA 聚合酶用量为(1.2~2.0)×16.67 nkat(1.2~2.0 U)时，条带少(图 5)。综上，当 *Taq*DNA 聚合酶用量为 0.5×16.67 nkat(0.5 U)时，扩增效果最理想，以此作为 *Taq*DNA 聚合酶的优化用量。

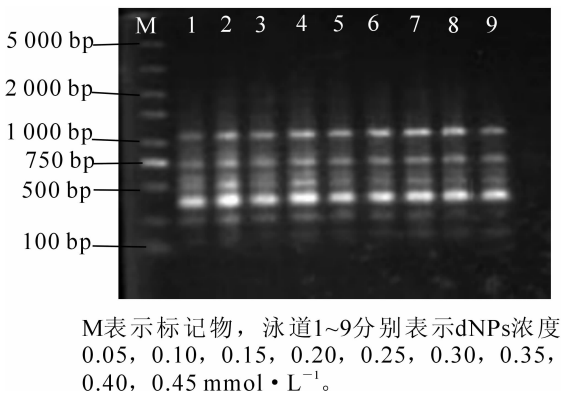


图 4 dNTPs 浓度对 PCR 扩增的影响
Figure 4 Effect of dNTPs concentration on PCR amplification

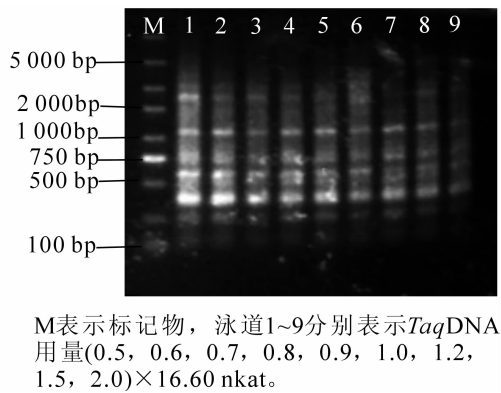


图 5 *Taq*DNA 用量对 PCR 扩增的影响
Figure 5 Effect of *Taq*DNA concentration on PCR amplification

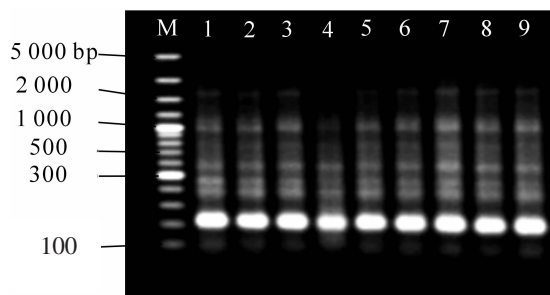
2.6 引物浓度对 PCR 扩增的影响

引物过多会产生引物二聚体, 引物过低则降低产量。在设定的引物浓度范围内, PCR 产物量基本相同(图 6)。当引物浓度为 $0.2\sim 0.4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 有较清晰、一致的条带, 且 $0.4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 条带较亮; 当引物浓度为 $0.5\sim 1.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 开始条带渐变弱, 扩增效果不佳, 均较模糊。综上, 选择 $0.4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为引物的优化浓度。

2.7 SRAP-PCR反应体系的确立

本研究用引物组合 m2e7 和 m6e1 在无患子材料中进行 SRAP-PCR 优化反应体系验证, 扩增结果比较稳定、条带清晰(图 7), 且引物组合 m6e1 扩增出的多态性条带较引物组合 m2e7 多, 表现出更高的多态性。由此说明, 该体系适宜无患子 SRAP-PCR 反应。

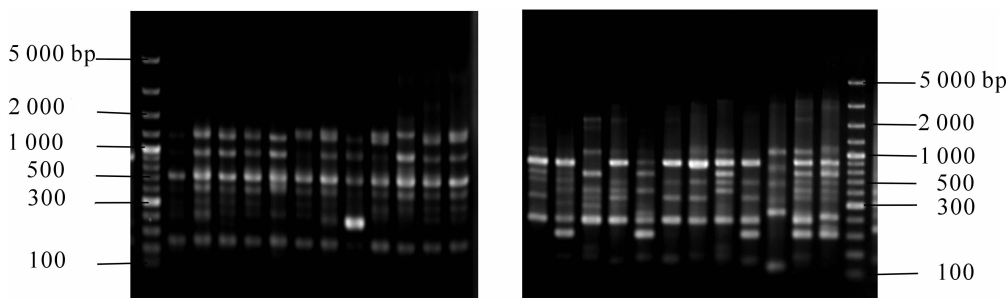
通过对反应体系的验证, 从结果的稳定性和经济性出发, 确立了适合无患子的 SRAP-PCR 反应体系为: 在 $20\ \mu\text{L}$ 反应体系中, 含模板 DNA 为 $50\ \text{ng}$, 镁离子 $2.0\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, dNTPs $0.2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, *Taq* DNA 聚合酶 $0.5\times 16.67\ \text{U}$ ($0.5\ \text{U}$), 引物 $0.4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。



M表示标记物, 泳道1~9分别表示引物浓度 $0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

图 6 引物浓度对 PCR 扩增的影响

Figure 6 Effect of primers concentration on PCR amplification



各泳道分别表示不同种源无患子材料的PCR产物检测结果。

图 7 优化体系验证图(左 m2e7, 右 m6e1)

Figure 7 Optimized system verification(left m2e7, right m6e1)

3 讨论

SRAP 标记是一种基于 PCR 的新型分子标记技术, 具有以下优点: ①有一套通用引物, 可任意搭配, 通过筛选获取适合引物对, 极大降低了引物合成费用。②反应条件相对固定, 试验重复性较好, 操作简易。因此, 在林木种质资源遗传多样性、品种鉴定等方面应用前景广阔^[17-19]。

SRAP-PCR 反应体系主要包含 5 个影响因素, 即 DNA 模板、镁离子、dNTPs、引物和 *Taq* DNA 聚合酶。各个因素用量不同, 将明显影响扩增效果, 进而影响 SRAP 分子标记的可靠性。高质量 DNA 的获取是 PCR 成功的根本性因素, DNA 中残留的蛋白、酚类等物质, 会抑制 DNA 聚合酶。本研究中, 采用改良的 CTAB 法提取了较高质量的 DNA, 符合 SRAP-PCR 反应要求。

PCR 混合物中, DNA 模板、引物和 dNTPs 的磷酸碱基均可与镁离子结合, 降低镁离子的实际浓度; 而对 *Taq* DNA 聚合酶起作用的是游离的镁离子, 因此, 镁离子加入量应高于 dNTPs^[13]。本试验中, 镁离子浓度比 dNTPs 高出 $1.8\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。PCR 扩增产物的大小是由引物限定的, 引物浓度过高, 不仅会促进非特异性产物的合成, 而且还会增加引物二聚体的形成, 本研究最终选择 $0.4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为引物的优化浓度。

本试验采用传统的单因素法, 确立了适合无患子的 SRAP-PCR 反应体系。利用该体系对 12 个种源地的无患子进行扩增, 得到了稳定清晰的条带, 效果良好, 说明优化后的体系适宜无患子种质资源的分

子标记分析, 但需对 SRAP 引物进行筛选。SRAP-PCR 优化体系的建立, 为 SRAP 分子标记在无患子地理种源多态性分析、遗传图谱构建、品种鉴定等方面打下良好的基础。

参考文献:

- [1] 黄素梅, 王敬文, 杜孟浩, 等. 无患子的研究现状及其开发利用[J]. 林业科技开发, 2009, **23**(6): 1 – 5.
HUANG Sumei, WANG Jingwen, DU Menghao, *et al.* Research Situation and Utilization of *Sapindus mukorossi* Gaerth. [J]. *China For Sci Technol*, 2009, **23**(6): 1 – 5.
- [2] 贾黎明, 孙操稳. 生物柴油树种无患子研究进展[J]. 中国农业大学学报, 2012, **17**(6): 191 – 196.
JIA Liming, SUN Caowen. Research progress of biodiesel tree *Sapindus mukorossi*[J]. *J China Agric Univ*, 2012, **17**(6): 191 – 196.
- [3] 姜翠翠, 叶新福, 卢新坤, 等. 无患子研究进展概述[J]. 福建农业学报, 2013, **28**(4): 405 – 411.
JIANG Cuicui, YE Xinfu, LU Xinkun, *et al.* Research progress on *Sapindus mukorossi*[J]. *Fujian J Agric Sci*, 2013, **28**(4): 405 – 411.
- [4] 林文荣. 无患子扦插繁殖试验研究[J]. 现代园艺, 2007(7): 9 – 10.
LIN Wenrong. Research cutting propagation of *Sapindus mukorossi* Gaerth. [J]. *Mod Hortic*, 2007(7): 9 – 10.
- [5] 乔燕春, 林顺权, 刘成明, 等. SRAP 分析体系的优化及在枇杷种质资源研究上的应用[J]. 果树学报, 2008, **25**(3): 348 – 352.
QIAO Yanchun, LIN Shunquan, LIU Chengming, *et al.* Optimization of SRAP analysis and its application in germplasm research of loquat (*Eriobotrya japonica*) [J]. *J Fruit Sci*, 2008, **25**(3): 348 – 352.
- [6] 刘丽娟, 刘灶长, 陈海荣, 等. SRAP 标记技术及其在蔬菜作物遗传多样性分析中的应用[J]. 中国农学通报, 2009, **25**(21): 43 – 48.
LIU Lijuan, LIU Zaochang, CHEN Hairong, *et al.* SRAP marker technique and its application in genetic diversity analyses of vegetable crops [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2009, **25**(21): 43 – 48.
- [7] 咎逢刚, 吴转娣, 曾淇, 等. 荔枝 SRAP-PCR 反应体系的优化[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, **28**(1): 132 – 136.
JIU Fenggang, WU Zhuandi, ZENG Qi, *et al.* Optimization of SRAP-PCR reaction system in litchi [J]. *Genomics Appl Biol*, 2009, **28**(1): 132 – 136.
- [8] MAHAR K S, RANA T S, RANADE S A. Molecular analyses of genetic variability in soap nut (*Sapindus mukurossi* Gaertn.) [J]. *Ind Crops Prod*, 2011, **34**(1): 1111 – 1118.
- [9] 洪莉, 柏明娥, 张加正, 等. 无患子种质资源多样性与亲缘关系的 ISSR 和 SRAP 分析[J]. 浙江农业科学, 2013(5): 556 – 568, 570.
HONG Li, BAI Ming'e, ZHANG Jiazheng, *et al.* Genetic diversity and relationship analysis of *Sapindus mukorossi* germplasm by ISSR and SRAP molecular markers [J]. *J Zhejiang Agric Sci*, 2013(5): 556 – 568, 570.
- [10] LI G, QUIROS C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. *TAG Theor Appl Gen*, 2001, **103**(2): 455 – 461.
- [11] 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.
- [12] 赵玉辉, 郭印山, 傅嘉欣, 等. 龙眼 SRAP 反应体系的建立和优化[J]. 中国农学通报, 2009, **25**(18): 409 – 412.
ZHAO Yuhui, GUO Yinshan, FU Jiaxin, *et al.* Establishment and optimization of SRAP reaction system in longan [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2009, **25**(18): 409 – 412.
- [13] 唐琴, 曾秀丽, 廖明安, 等. 大花黄牡丹遗传多样性的 SRAP 分析[J]. 林业科学, 2012, **48**(1): 70 – 76.
TANG Qin, ZENG Xiuli, LIAO Ming'an, *et al.* SRAP analysis of genetic diversity of *Paeonia ludlowii* in Tibet [J]. *Sci Silv Sin*, 2012, **48**(1): 70 – 76.
- [14] REN Na, LIU Jiajia, YANG Dongliang, *et al.* Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) marker as a new method for identification of endophytic fungi from *Taxus*[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2012, **28**(1): 215 – 221.
- [15] 刘成明, 梅曼彤. 无患子科果树植物 DNA 的高效提取及 RAPD 分析体系的优化[C]//中国园艺学会. 中国

- 园艺学会第 5 届青年学术讨论会论文集. 广州: [出版者不详], 2002: 297 – 302.
- [16] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 5 – 45.
- [17] 徐操, 赵宝华. SRAP 分子标记的研究进展及其应用[J]. 生命科学仪器, 2009, 7(4): 24 – 27.
XU Cao, ZHAO Baohua. The development and application of SRAP molecular markers [J]. *Life Sci Instrum*, 2009, 7(4): 24 – 27.
- [18] 林萍, 姚小华, 王开良, 等. 油茶长林系列优良无性系的 SRAP 分子鉴别及遗传分析[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(2): 272 – 279.
LIN Ping, YAO Xiaohua, WANG Kailiang, *et al.* Identification and genetic analysis of *Camellia oleifera* Changlin series superior clones by SRAP molecular marker [J]. *J Agric Biotechnol*, 2010, 18(2): 272 – 279.
- [19] AMAR M H, BISWAS M K, ZHANG Z, *et al.* Exploitation of SSR, SRAP and CAPS-SNP markers for genetic diversity of *Citrus* germplasm collection [J]. *Sci Hort*, 2011, 128(3): 220 – 227.

中国农民发展研讨会在浙江农林大学举行

2013 年 12 月 14 日至 15 日, 由国务院参事室、浙江农林大学、浙江省人民政府参事室、浙江省社会科学界联合会等共同主办的中国农民发展研讨会在浙江农林大学举行, 来自全国“三农”研究领域的领导、专家学者共 150 余人汇聚一堂, 共商中国农民发展问题。浙江农林大学党委书记宣勇致欢迎辞。

研讨会以总结中国改革开放以来的农村改革发展, 贯彻党的十八届三中全会精神为主题, 以全面深化农村改革、健全城乡发展一体化的体制机制、促进农民发展为主线, 重点围绕农业现代化、农村社会发展、新型城镇化与农民全面发展等方面, 聚焦农业经营体系、农村产权制度、城乡要素市场和社会治理体制等各项改革。

会议围绕推进城镇化与城乡发展、明晰集体产权、建立农民以土地等入股的公司制、推进村镇城镇化、赋予农民更多财产权利、改革乡村治理机制等议题展开研讨。与会专家认为, 农民问题是“三农”问题的核心, 农民发展是中国发展面临的最大课题。中国改革发展的实践经验表明, 只有充分调动农民的积极性, 充分尊重农民的首创精神, 坚持市场化改革取向, 循序渐进地推进农村改革和建设事业, 让作为最大群体的农民成为改革发展的主力军, 才能为实现全面建设小康社会的宏伟目标奠定坚实的基础。党的十八届三中全会为农民全面发展开辟了更广阔的前景, 中国的农村改革又一次站在了新的历史起点上, 需要进一步全面深化城乡综合配套改革、健全城乡发展一体化的体制机制。

浙江农林大学中国农民发展研究中心主任、浙江省人民政府参事顾益康介绍了中国农民“十大贡献”暨中国农民发展研究中心系列研究成果, 主要成果包括《改革开放 35 年农民对中国发展的十大贡献》《改革开放 35 年中国农民发展报告》《改革开放 35 年中国农民发展指数与区域评价报告》《改革开放 35 年浙江农民发展报告》和《我国西部地区百村发展报告》等。这些研究报告系统地分析了中国改革开放以来, 中国农业、农村和农民发展的历程、成就、经验和面临的新挑战, 提出了新时期进一步促进中国农民全面发展的路径与对策。