

分子标记技术在牧草遗传多样性上的研究进展

胡豆豆,熊小文,欧阳克蕙*

(江西农业大学 动物科学与技术学院,江西 南昌 330045)

摘要: 随着分子生物学技术的飞速发展,牧草遗传多样性的研究已从宏观走向微观,进一步深入到分子水平。介绍了分子遗传标记的定义及分类,综述了 RAPD、SSR、ISSR、SRAP、SNPs 等分子标记技术在牧草遗传多样性研究中的应用情况,在此基础上分析了分子标记技术在牧草研究中存在的问题,并对今后发展方向作了展望。

关键词: 牧草; 分子标记; 遗传多样性

中图分类号: S816.5⁺3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)11-0009-05

Progress and Prospect of Molecular Markers in Genetic Diversity of Forage

HU Dou-dou, XIONG Xiao-wen, OUYANG Ke-hui*

(College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: Accompanying with the rapid development of molecular biology, the study on forage genetic diversity has developed deeper into molecular genetic markers from macroscopic to microscopic levels in recent years. This paper introduces the definition and classification of molecular markers, and analyzes the application of five kinds of molecular genetic markers, including RAPD, SSR, ISSR, SRAP and SNPs, in forage genetic diversity. The problems and main directions of researches on forage in China are also discussed in this paper.

Key words: forage; molecular markers; genetic diversity

我国是世界上牧草遗传多样性最丰富的国家之一,不仅盛产温带、亚热带和热带草种,而且还拥有许多具有特殊生态价值和经济价值的旱生、超旱生及耐寒、耐盐碱草种,如沙打旺、骆驼刺、碱茅等。然而,随着人类活动对环境影响的增强,一些优良牧草种和种群的生存环境受到威胁,其遗传多样性正在消失^[1],加紧并深入研究牧草遗传多样性迫在眉睫。牧草遗传多样性的研究手段与方法,分别经历了形态学标记、细胞学标记、生化标记和分子标记4个发展阶段。随着人们研究水平的不断提高,对研究精细程度的要求也越来越高。鉴于前3种标记在技术水平上的局限性,如表型易受外部环境和发育状况

的影响、标记位点较少、没有真正涉及遗传物质本身等,人们开始更多地关注分子标记技术在牧草遗传多样性上的应用。为此,综述了分子标记技术在牧草遗传多样性上的研究进展,旨在为该领域的科研工作提供借鉴与参考。

1 分子标记的概念与分类

分子标记是指能够在全基因组水平上代表其差异的特定 DNA 片段^[2]。与传统的遗传标记相比,分子标记广泛分布于各种组织之中,多态性异常丰富而且不受基因多效性和环境因素的影响。目前可用于牧草遗传多样性研究的分子标记有很多,根据

收稿日期:2012-06-08

基金项目:国家科技支撑计划项目(2012BAD14B00);江西省科技厅科技支撑计划项目(2010BNA07400)

作者简介:胡豆豆(1988-),男,湖北仙桃人,在读硕士研究生,研究方向:牧草资源与利用。E-mail: kevinhdd@163.com

*通讯作者:欧阳克蕙(1974-),江西万安人,副教授,硕士生导师,主要从事动物营养与牧草资源利用研究。

E-mail: ouyangkehui@sina.com

特点可将其粗略分为 8 个大类^[2-4]。

表 1 用于牧草遗传多样性研究的分子标记

分类依据	分子标记名称
基于 DNA 分子杂交	RFLP、VNTR
基于随机引物	RAPD、AP-PCR、DAF
基于特异引物	SSR、ISSR、SRAP、SCAR、SPAR、SSCP
基于限制性酶切和 PCR	AFLP、CAPS
基于 DNA 芯片	SNPs
基于反转录转座子	RBIP、REMAP、IRAP
基于 RNA	cDNA-SSCP、RAP-PCR、cDNA-AFLP
基于细胞器 DNA	C-SSR、Mt-SSR

注: RFLP. 限制性片段长度多态性; VNTR. 数目可变串联重复多态性; RAPD. 随机扩增多态性 DNA; AP-PCR. 任意引物 PCR; DAF. DNA 扩增指纹印迹; SSR. 简单重复序列; ISSR. 区间简单重复序列; SRAP. 序列相关扩增多态性; SCAR. 序列特异性扩增区; SPAR. 单引物扩增反应; SSCP. DNA 单链构象多态性; AFLP. 扩增片段长度多态性; CAPS. 酶切扩增多态性序列; SNPs. 单核苷酸多态性; RBIP. 反转录转座子插入多态性; REMAP. 反转座子微卫星扩增多态性; IRAP. 区间反转录转座子扩增多态性; RAP-PCR. 随机引物 PCR 的 RNA 指纹图谱; C-SSR. 叶绿体微卫星; Mt-SSR. 线粒体微卫星。

2 分子标记技术在牧草遗传多样性研究中的应用

自 20 世纪 70 年代以来,随着分子生物学的飞速发展,分子标记技术被逐渐应用到牧草遗传多样性的研究中。如 Brummer 等^[5]和 Echt 等^[6]就利用 RFLP 分子标记技术对苜蓿(*Medicago*)的 DNA 多态性进行了分析。但由于 RFLP 标记操作繁琐、费时费力、成本较高且多态性不是很高,近年来催生了新一代的分子标记。新一代的分子标记正向如下方向发展:多态性高;在基因组中稳定分布;组织和 DNA 等试验材料用量少;测定简便、快捷;可重复性高;价格合适。目前用于牧草遗传多样性研究的分子标记主要有 RAPD、SSR、ISSR、SRAP 和 SNPs 等。

2.1 RAPD 标记

RAPD 标记是 1990 年在 PCR 基础上建立起来的一种分子标记技术^[7],采用引物为 10 bp 左右的寡核苷酸随机序列来揭示研究对象的多态性。这种技术具有多态性较高、DNA 用量少、操作简单、成本较低的优点,其不足之处在于对反应条件敏感、重复性低、属显性标记、不能区分纯合子和杂合子。

RAPD 标记技术最早应用于苜蓿分子标记、种质鉴定和遗传多样性研究^[8],是现今人们最常用的成熟技术。这种标记技术可以有效检测出种群的遗传多态性,在披碱草(*Elymus*)^[9]、决明草(*Cassia-nae*)^[10]、狼尾草(*Pennisetum*)^[11]、三叶草(*Trifolium*)^[12]、雀麦(*Bromus*)^[13]、针茅(*Stipa*)^[14]以及羊

茅(*Festuca*)^[15]的遗传多样性研究中均有应用。Ulloa 等^[12]运用 RAPD 标记研究了 20 个来自智利、阿根廷、乌拉圭和瑞士的红三叶(*Trifolium pratense* L.)繁育品系和栽培品种的遗传多样性,结果检测到了高水平多态性。Fedorenko 等^[16]评估了俄罗斯奥涅加湖岛上草地羊茅(*Festuca pratensis* Huds.)的遗传多样性,检测了 3 个种群的 64 个 RAPD 位点的变异性,多态位点的百分率为 30.2%。这表明对于异花受粉的植物来说,遗传多样性还是比较低的。另外,也有研究利用 RAPD 标记揭示种群内和种群间的遗传差异。姜健等^[17]利用 RAPD 技术分析了 25 个紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)耐盐品种的遗传结构和遗传多样性,结果表明,采用单株 DNA 样品比采用混合 DNA 样品能更好地揭示紫花苜蓿品种内和品种间的遗传变异水平。苗佳敏等^[9]使用 RAPD 和 SRAP 标记技术对采自我国青藏高原和新疆地区的 64 份垂穗披碱草(*Elymus nutans* Griseb.)进行遗传多样性分析,发现垂穗披碱草的遗传变异主要存在于种群间^[9]。Zhao 等^[14]用 RAPD 标记技术测定了内蒙古锡林郭勒草原上 5 个大针茅(*Stipa grandis*)种群的遗传变异,分析表明,其大部分的变异也发生在种群内。

2.2 SSR 标记

SSR 标记又称微卫星标记,是一段简单重复的 DNA 序列,包含了 1~5 个核苷酸的串联重复,在绝大多数真核生物基因组中均有分布^[18]。由于 SSR 两端多是保守的单拷贝序列,因此,可以根据其两端的序列设计特异引物,通过 PCR 扩增和电泳分析来获得其长度多态性^[19]。SSR 标记的优点在于多态信息量大、属共显性标记、可以区分纯合子和杂合子、分布广泛、重复性好、DNA 用量少、操作简便,缺点是开发设计引物工作量大、费用较高。

SSR 分子标记技术可以检测出很高的多态性,在黑麦草(*Lolium*)^[20]、鸭茅(*Dactylis*)^[21]、披碱草^[22]、苜蓿^[23]等牧草的遗传多样性研究中都有应用。Julie 等^[24]利用 SSR 标记技术对来自欧洲、北美、南美、澳大利亚和新西兰的 16 个白三叶(*Trifolium repens* L.)优质栽培品种进行了遗传多样性评估。结果表明,86.5%的遗传变异存在于种群内,12.8%的遗传变异存在于种群间。同样地,李鸿雁等^[25]应用 SSR 分子标记对内蒙古野生扁蓿豆(*Medicago ruthenica* L.)4 个地理种群进行的遗传多样性研究也表明,内蒙古野生扁蓿豆有丰富的遗传多样性,而且种群内变异明显高于种群间变异。Mengoni 等^[26]应用 SSR 和 RAPD 标记对来自意大利

利和埃及的紫花苜蓿种质资源的研究结果与一般情况不同,他们的结果表明,苜蓿种群内和种群间都存在着较大的遗传变异。鄢家俊等^[22]基于 SSR 和 SRAP 分子标记分析了青藏高原东南缘 8 个老芒麦 (*Elymus sibiricus* L.) 自然居群的遗传变异状况,结果表明,青藏高原老芒麦在群体水平上的遗传多样性较低,而在物种水平上显示出较高的遗传多样性。该项研究中使用了更多的 SSR 引物,多态位点百分比为 86.88%,高于 Zhang 等^[27]和 Gaudett 等^[28]分别用 RAPD 分子标记对该属另外 2 个种 *Elymus alakanus* 和 *Elymus trachycaulus* 所测得的平均多态位点百分比(49.5%、67.4%)。因此推测,在这项技术的实际应用过程中,增加引物的数量和材料来源可能会提高检测的多态性。

2.3 ISSR 标记

ISSR 最早是由 Zietkiewicz 等^[29]在 1994 年开发出来的一种 DNA 标记技术。该技术以在 3' 端或 5' 端加锚的微卫星 DNA 为引物来扩增 ISSR DNA 序列,以期增加它们的特异性^[30]。除此以外,其他操作与 RAPD 和 SSR 十分相似。虽然 ISSR 标记继承并结合了 RAPD 和 SSR 的优点,多态性高、大多数情况下属共显性标记、DNA 用量少、操作简单、成本不高,但是不易确定 PCR 扩增的反应条件。

这种分析技术所检测到的遗传多态性高,常应用于鸭茅^[31]、雀麦^[32]、早熟禾 (*Poa*)^[33]、苜蓿^[34]、柱花草 (*Stylosanthes*)^[35] 和红豆草 (*Onobrychis*)^[36] 等牧草的遗传多样性研究。田青松等^[32]对来自国内外 96 份雀麦属材料的遗传多样性的 ISSR 分析和唐燕琼等^[35]对 48 份柱花草属种质的遗传多样性的 ISSR 分析,都表明了这种分析技术可检测到牧草种质丰富的遗传变异,而且变异发生在所研究种质的种群内。赵桂琴等^[33]利用 ISSR 对 6 种早熟禾属种质材料进行了遗传多样性分析,结果表明,早熟禾属种群间存在丰富的遗传多样性。另外,通过用 ISSR 标记对牧草种质资源遗传多样性的分析,可以确定种间的亲缘关系,能够为杂交育种亲本选择组配提供有价值的分子水平上的信息^[37]。

由于在使用 ISSR 技术的过程中不易确定各个种 PCR 扩增的最适条件,因此,也有相关研究人员对部分牧草的 ISSR-PCR 扩增体系进行了优化,以期开展遗传多样性等相关研究工作做准备。如隋晓青等^[38]优化并确立了克氏针茅 (*Stipa krylovii*) ISSR-PCR 反应体系中的各种成分,建议在建立某一具体物种的反应体系时,要对不同引物的退火温度逐一筛选。王方等^[39]确定了冰草 [*Agropy-*

ron cristatum (L.) Gaertn.] ISSR-PCR 扩增体系的主要参数,发现退火温度对扩增结果好坏具有明显的影响。沈紫微等^[36]采用正交设计法建立了红豆草 (*Onobrychis viciaefolia* Scop) 的 ISSR 最佳反应体系。

2.4 SRAP 标记

Li 等^[40]在 2001 年提出了 SRAP 标记的概念。其特点在于它是利用富含 AT 或 GC 的引物对来对开放阅读框 (ORFs) 进行扩增,用于检测多态性。作为一种比较新的分子标记技术,SRAP 集高多态性、高重复性、中等产率和操作简单等优点于一身,不足之处在于它并非完全的共显性标记。

SRAP 技术多应用于粮食、水果和蔬菜等作物的遗传多样性研究,近年来开始应用于牧草种质资源遗传多样性分析,如苜蓿^[41]、黑麦草^[42]、三叶草^[43]、牛鞭草 (*Hemarthria*)^[44]、披碱草^[45] 等,并表现了它的优越性。张伟丽等^[46]利用 SRAP 对 9 份柱花草种质材料进行了遗传多样性分析,结果显示,其多态性比率高达 97.36%,表明柱花草属植物存在着丰富的遗传变异,与 RAPD 和 ISSR 在柱花草属植物遗传多样性方面的研究结果相吻合。张宇等^[47]对 31 份紫花苜蓿和黄花苜蓿 (*Medicago falcata* L.) 的 SRAP 分析和周良彬等^[48]对来自我国新疆、哈萨克斯坦、波兰等地区的 31 份杂花苜蓿 (*Medicago varia* Martyn.) 种质进行的 SRAP 分析均表明,对于同样材料,SRAP 技术要优于 RAPD 或 SSR 分析技术。然而, Majid 等^[49]对 48 份来自伊朗的 4 个栽培紫花苜蓿种进行了 SRAP 分析,结果却发现每个种的遗传多态性平均值比用 SSR 标记所测的值低。这说明遗传多态性除了与所使用的标记类型外,可能还与对材料的研究方法有关。

2.5 SNPs 标记

SNPs 是指在染色体基因组水平上单个核苷酸变异引起的 DNA 序列的多态性^[50]。在基因组中 SNP 的数量很大,其突变率大约为 10^{-9} 左右。由这种方式产生的单碱基突变形成许多双等位型标记物^[51]。例如,在玉米基因组中,平均每 60~120 个碱基对就有 1 个 SNP^[52];在拟南芥基因组中,平均每 1400 个碱基对就有 1 个 SNP^[53]。由于 SNPs 标记具有标记数目多、密度大、稳定性高和检测与分析都能达到自动化等特点,使其成为了新一代的分子标记。但是,目前 SNPs 标记主要应用于玉米^[54]、大豆^[55]、小麦^[56] 等作物,在牧草遗传多样性研究中的应用还比较少。

3 问题与展望

从目前来看,分子标记技术在牧草遗传多样性的研究上已取得了很大的成绩,但是,在具体应用方面还存在着几个问题:(1)运用在牧草遗传多样性研究中的分子标记还十分有限,远不如在农作物等方面的丰富;(2)鉴于牧草染色体倍性复杂,在不同种甚至同一种内种质材料之间染色体数目也不尽相同,要选择理想的分子标记十分困难;(3)标记的稳定性、揭示多态性的准确度、试验的成本以及数据分析的能力都需要更多的考虑。对于这些问题,一些学者使用了不同类型的分子标记组合来研究牧草的遗传多样性^[7,24]。另外,随着科技的不断进步,势必会有分析效率更高、成本更低、普遍性更广泛的分子标记甚至是一些全新的技术、方法问世。目前,分子标记在我国牧草遗传多样性上的研究比较落后,因此,必须借鉴国外先进技术和经验,借鉴植物基因工程方面取得的研究成果,尽快加强有关牧草分子生物学及生物技术的基础研究和应用研究,增加科研投入,促进我国草业科学的快速发展。

参考文献:

- [1] 严学兵,王成章,郭玉霞.我国牧草种质资源保存、利用与保护[J].草业科学,2008,25(12):85-92.
- [2] 郝炯,渠云芳.分子标记在作物育种中的应用[J].山西农业科学,2009,37(1):81-85.
- [3] Kumar P, Gupta V K, Mista A K, et al. Potential of molecular markers in plant biotechnology [J]. Plant Qmics Journal, 2009, 2: 141-162.
- [4] 孙正文,黄兴奇,李维蛟,等.分子标记技术及其在水稻基因定位上的应用[J].基因组学与应用生物学,2011,30(1):78-86.
- [5] Brummer E, Bouton J H, Kochert G. RFLP variation in diploid and tetraploid alfalfa [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1991, 83: 89-96.
- [6] Echt C S, Erdahl L A, McCoy T J. Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa [J]. Genome, 1992, 35: 457-463.
- [7] 杨瑞环,哈玉洁,王全. RAPD 技术及其在农作物遗传育种中的应用[J].天津农业科学,1999,5(4):13-16.
- [8] 刘荣霞,于林清,张宇,等.利用 RAPD 标记对不同秋眠级苜蓿种质的聚类 and 评价[J].草地学报,2010,18(1):108-114.
- [9] 苗佳敏,张新全,陈智华,等.青藏高原和新疆地区垂穗披碱草种质的 SRAP 及 RAPD 分析[J].草地学报,2011,19(2):306-316.
- [10] Laxmikanta A, Arup K M, Pratap C P. Separation of the genera in the subtribe *Cassiinae* (Leguminosae: Caesalpinioideae) using molecular markers [J]. Acta Botanica Brasiliica, 2011, 25: 223-233.
- [11] 解新明,卢小良.利用 RAPD 标记分析狼尾草属牧草品种间的遗传关系[J].草业学报,2005,14(2):52-56.
- [12] Ulloa O, Ortega F, Campos H. Analysis of genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) breeding populations as revealed by RAPD genetic markers [J]. Genome, 2003, 46: 529-535.
- [13] 张凤霞,王铁娟,王照兰,等.12个无芒雀麦种群遗传多样性的 RAPD 分析[J].中国草地学报,2011,33(2):25-30.
- [14] Zhao N X, Gao Y B, Wang J L. Population structure and genetic diversity of *Stipa grandis* P. Smirn, a dominant species in the typical steppe of northern China [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2008, 36: 1-10.
- [15] 李惠英,姜燕宏,胡涛,等.中国高羊茅种质资源遗传多样性的 RAPD 分析[J].草业学报,2010,19(6):208-214.
- [16] Fedorenko O M, Gritskikh M V, Malysheva I E, et al. Genetic diversity of insular natural populations of *Festuca pratensis* Huds.; RAPD analysis [J]. Russian Journal of Genetic, 2009, 45: 1287-1291.
- [17] 姜健,杨宝灵,夏彤,等.紫花苜蓿耐盐种质资源的遗传多样性分析[J].草业学报,2011,20(5):119-125.
- [18] Powell W, Machray G C, Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats [J]. Trends in Plant Science, 1996, 1: 215-222.
- [19] 蒋彩虹,王元英,孙玉合. SSR 和 ISSR 标记技术应用进展[J].中国烟草科学,2007,28(2):1-5.
- [20] Francis M K, John C Z, Rouf M A, et al. Microsatellite markers and genetic diversity assessment in *Lolium temulentum* [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2008, 55: 105-114.
- [21] 谢文刚,张新全,陈永霞.鸭茅杂交种的 SSR 分子标记鉴定及其遗传变异分析[J].草业学报,2010,19(2):212-217.
- [22] 鄢家俊,白史且,张新全,等.青藏高原东南缘老芒麦自然居群遗传多样性的 SRAP 和 SSR 分析[J].草业学报,2010,19(4):122-134.
- [23] 苏东,周延林,于林清,等.利用 SSR 分析中国北方野生黄花苜蓿种群的遗传多样性[J].中国草地学报,2010,32(5):85-90.
- [24] Julie G, Mark P D, Eline V Z, et al. Assessment of genetic diversity in cultivars of white clover (*Trifolium repens* L.) detected by SSR polymorphisms [J]. Genome, 2006, 49: 919-930.
- [25] 李鸿雁,米福贵,宁红梅.扁蓿豆遗传多样性的 SSR 分析[J].中国草地学报,2008,30(2):34-38.
- [26] Mengoni A, Gori A, Bazzicalupo M. Use of RAPD and microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfalfa, *Medicago sativa* [J]. Plant Breeding, 2000, 119: 311-

- 318.
- [27] Zhang X Q, Salomon B, Bothmer R V. Application of random amplified polymorphic DNA markers to evaluate intraspecific genetic variation in the *Elymus alaskanus* complex (Poaceae) [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2002, 49: 397-407.
- [28] Gaudett M, Salomon B, Sun G. Molecular variation and population structure in *Elymus trachycaulus* and comparison with its morphologically similar *E. Alaskanus* [J]. Plant Systematics and Evolution, 2005, 250: 81-92.
- [29] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20: 176-183.
- [30] Joshi S P, Ranjekar P K, Gupta V S. Molecular markers in plant genome analysis [J]. Current Science, 1999, 77: 230-240.
- [31] 曾兵, 张新全, 范彦, 等. 鸭茅种质资源遗传多样性的 ISSR 研究 [J]. 遗传, 2006, 28(9): 1093-1100.
- [32] 田青松, 韩冰, 杨劫, 等. 96 份雀麦属材料遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中国草地学报, 2010, 32(1): 18-25.
- [33] 赵桂琴, 刘欢, 刘美. ISSR 标记的早熟禾遗传多样性分析 [J]. 草地学报, 2011, 19(5): 781-786.
- [34] Touil L, Guesmi F, Fares K, et al. Genetic diversity of some mediterranean populations of the cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.) using ISSR markers [J]. Biotechnology, 2008, 7: 808-812.
- [35] 唐燕琼, 胡新文, 郭建春, 等. 柱花草种质遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 草业学报, 2009, 18(1): 57-64.
- [36] 沈紫微, 陈本建, 康俊梅, 等. 红豆草 ISSR 体系优化及其在航天诱变种质鉴定中的应用 [J]. 草业科学, 2010, 27(12): 65-72.
- [37] 李红, 李波, 赵洪波, 等. 苜蓿种质资源遗传关系的 ISSR 分析 [J]. 草地学报, 2012, 20(1): 96-101.
- [38] 隋晓青, 王堃. 克氏针茅 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. 草业学报, 2008, 17(3): 71-78.
- [39] 王方, 袁庆华. 冰草 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. 草地学报, 2009, 19(3): 354-357.
- [40] 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]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103: 455-461.
- [41] 何庆元, 吴萍, 张晓红, 等. 不同秋眠性苜蓿 SRAP 体系优化及遗传多样性分析 [J]. 草业学报, 2011, 20(2): 201-209.
- [42] 季杨, 张新全, 马啸, 等. 多花黑麦草品种(系)间杂交及其杂种后代 SRAP 遗传分析 [J]. 草业学报, 2009, 18(4): 260-265.
- [43] 李润芳, 惠荣奎, 邓瑞宁, 等. 三叶草遗传多样性的 SRAP 分析 [J]. 草业科学, 2010, 27(12): 53-57.
- [44] 范彦, 徐远东, 蒋安, 等. 中国西南区扁穗牛鞭草种质遗传多样性的 SRAP 分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(1): 63-70.
- [45] 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.
- [46] 张伟丽, 刘凤民, 刘艾. 柱花草 SRAP-PCR 体系优化及其遗传多样性分析 [J]. 草业学报, 2011, 20(4): 159-168.
- [47] 张宇, 于林清, 慈忠玲. 利用 SRAP 标记研究紫花苜蓿和黄花苜蓿种质资源遗传多样性 [J]. 中国草地学报, 2012, 34(1): 72-76.
- [48] 周良彬, 卢欣石, 王铁梅, 等. 杂花苜蓿种质 SRAP 标记遗传多样性研究 [J]. 草地学报, 2010, 18(4): 544-549.
- [49] Majid T, Zahra H, Mehdi R. Genetic diversity and population structure of four iranian Alfalfa populations revealed by sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers [J]. Journal of Crop Science and Biotechnology, 2011, 14: 173-178.
- [50] 毛培胜, 王新国, 黄莺, 等. 分子标记技术在牧草遗传多样性研究中的应用 [C] // 中国草协会. 2009 中国草原发展论坛论文集. 北京: 农业部草原监理中心出版社, 2009: 515-518.
- [51] 关荣霞. 大豆重要农艺性状的 QTL 定位及中国大豆与日本大豆的遗传多样性分析 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2004.
- [52] Ada C, Katherine S C, Mark J, et al. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines [J]. BMC Genetics, 2002, 3: 1-14.
- [53] Stephan O, Korbinian S, Richard M C, et al. Sequencing of natural strains of *Arabidopsis thaliana* with short reads [J]. Genome Research, 2008, 18: 2024-2033.
- [54] Van I D, Melchinger A E, Lebreton C, et al. Population structure and genetic diversity in a commercial maize breeding program assessed with SSR and SNP markers [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 120: 1289-1299.
- [55] Andres J C, Martha C C, Matthew W B. SNP marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2011, 123: 827-845.
- [56] Kanazin V, Talbert H, See D, et al. Discovery and assay of single-nucleotide polymorphisms in barley (*Hordeum vulgare*) [J]. Plant Molecular Biology, 2002, 48: 529-537.