

# SRAP 分子标记及其在蔬菜作物上的应用

赵光伟,徐志红,徐永阳

(中国农业科学院郑州果树研究所,郑州 450009)

**摘要:** SRAP(Sequence-Related Amplified Polymorphism)是一种基于 PCR 技术的新型分子标记,具有简便、产率中等、稳定、测序方便等优点。它利用独特的引物设计对 ORFs(open reading frames)进行扩增,其上引物长 17bp,下游引物长 18bp,分别对外显子和内含子进行扩增,因个体不同及内含子、启动子与间隔长度不等而产生多态性。该文在介绍 SRAP 标记技术和特点的同时,还对其在蔬菜作物遗传图谱构建、遗传多样性分析、比较基因组学、分子标记与基因定位等方面的应用进行了综述。

**关键词:** SRAP;分子标记;蔬菜;应用

**中图分类号:** S63      **文献标识码:** A

## SRAP Molecular Marker and its Applications to Vegetable Crops

Zhao Guangwei, Xu Zhihong, Xu Yongyang

(Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009)

**Abstract:** SRAP(Sequence-Related Amplified Polymorphism)is a new molecular marker based on PCR technique, which combines simplicity, reliability, moderate throughput ratio and facile sequencing of selected bands. ORFs was amplified through the special primer set. The forward primers of 17 bp and reverse primers of 18bp amplified exons and introns respectively. Polymorphism was produced since the variable introns, promoters and spacers among different individuals. The paper summarized SRAP molecular marker and its applications to genetic-map constructions, genetic diversity analysis, comparative genomic research, molecular marker and gene location of vegetable crops.

**Key words:** SRAP, molecular marker, vegetable, application

近年来,分子标记技术发展迅速,已被广泛应用于作物遗传图谱构建、基因定位与克隆、遗传多样性分析、分子标记辅助选择等诸多方面。目前,蔬菜作物中应用较多的分子标记主要有 RFLP、RAPD、AFLP、SSR。然而,它们在操作难易、结果可靠性等方面却存在着很大差异。RAPD 虽然方法简单,但稳定性差,不易重复。SSR 能够产生共显性标记,引物开发成本却很高,且费工费时<sup>[1]</sup>。AFLPs 因稳定性好、多态性比率高被广泛应用<sup>[2]</sup>。但是,其步骤相对复杂,需要经过 DNA 消化、连接、扩增等多步反应,各步的反应条件很难控制,并且出现假阳性机率较高。此外,AFLP 标记还容

易出现片段重叠,在测序和基因标记时,给片段回收工作带来了很大的麻烦<sup>[3]</sup>。这在一定程度上限制了它们的发展。2001年,美国加州大学的 Li 和 Quiros 发明了一种基于 PCR 的新型分子标记技术—SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism),又称为相关序列扩增多态性,兼具 AFLP 的多态性高、产率中等、重复性好和 RAPD 的操作简单等优点<sup>[4]</sup>。此外,利用 SRAP 进行分子标记测序方便,便于后续操作。

### 1 SRAP 标记的特点

#### 1.1 SRAP 标记的原理

该技术针对基因外显子富含 GC,内含子富含 AT

**基金项目:**“十一五”国家科技支撑计划课题“优质多抗专用西甜瓜育种技术研究及新品种选育”(2006BAD01A7)。

**第一作者简介:**赵光伟,男,1982年出生,硕士,研究方向:甜瓜生物技术,通信地址:450009 河南省郑州市航海东路南中国农业科学院郑州果树研究所,Email:zhaoguangwei@yeah.net。

**通讯作者:**徐永阳,男,1966年出生,硕士,研究员,长期从事甜瓜遗传育种工作,Tel:0371-65330530,0371-66827764,Email:xvyongyang@caas.net.cn。

**收稿日期:**2008-04-23,修回日期:2008-05-30。

的特点,进行特殊的引物设计。其中,上游引物对外显子进行特异扩增,下游引物对内含子区域和启动子区域进行特异扩增。因个体不同以及物种的内含子、启动子与间隔区长度不等而产生多态性。目前,该标记已被应用于遗传图谱构建、比较基因组学、遗传多样性分析、分子标记等多个研究领域。

### 1.2 引物设计

SRAP 是基于 PCR 的分子标记系统,应遵循引物设计的基本要求:不能产生二聚体和发夹结构,GC 含

正向引物:

me1: 5' -TGAGTCCAAACCGGATA -3'

me2: 5' -TGAGTCCAAACCGGAGC -3'

me3: 5' -TGAGTCCAAACCGGAAT -3'

me4: 5' -TGAGTCCAAACCGGACC -3'

me5: 5' -TGAGTCCAAACCGGAAG -3'

尽管 SRAP 引物可以通用,但不同的引物组合对扩增多态性影响很大。钱文成等<sup>[9]</sup>在利用 SRAP 检测黄瓜基因组多态性时发现,不同引物组合在亲本间多态性检测上存在很大差异。对于每个正向引物,在与不同的反向引物组合时,均能产生多态性条带,引物间产生多态性的组合数较为稳定;而对于每一个反向引物,在与不同的正向引物组合时,引物间产生多态性的组合数则存在较大差别。因此,在选择引物时,要尽可能的增加正向引物数。

### 1.3 SRAP 的 DNA 扩增

SRAP 进行 DNA 扩增时,前 5 个循环要求 94℃ 变性 1min,35℃ 退火 1min,72℃ 延伸 1min;后 35 个循环将退火温度提高到 50℃。降低第一次退火温度可以增强引物和模板的结合。第二次退火温度的提高保证了扩增产物的特异性,降低了非特异片段的比率。然而,不同物种或同一物种不同部位的材料扩增时对最适退火温度和退火时间的要求也有差异。有研究认为,复性时间和温度比变性温度和延伸时间对扩增效果影响大。

目前,大白菜<sup>[6]</sup>、甘蓝<sup>[7]</sup>、黄瓜<sup>[8]</sup>、番茄<sup>[9]</sup>、甜菜<sup>[10]</sup>、西瓜<sup>[11]</sup>的 SRAP 反应体系已经建立。在建立反应体系时,主要围绕 dNTP、模板、Taq 聚合酶、引物、Mg<sup>2+</sup> 浓度等影响因素进行研究。尽管他们在上说法不一。大多数学者都认为,dNTP、Taq 聚合酶、Mg<sup>2+</sup> 三者对扩增结果的影响都很大,不同的模板浓度扩增效果差别不大。进行 PCR 产物检测时,多数研究者选择 6%的非变性聚丙烯

量 35%~55%<sup>[9]</sup>。引物大小是决定实验成功与否的关键。Li 等<sup>[11]</sup>发现引物过短,虽然扩增条带丰富,但稳定性差;引物过长;放射自显影时背景较深。最终将最适引物长度确定为上游 17bp,下游 18bp。其中,上游引物 5' 端开始的 10 个碱基为填充序列,加上 CCGG 组成核心序列,3' 端为 3 个选择性碱基,进行外显子扩增。下游引物 5' 端的填充序列为 11 个碱基,加上 AATT 组成核心序列,3' 端也由 3 个选择性碱基组成,主要扩增内含子区域。下面是 Li 等开发的 SRAP 标准引物:

反向引物:

em1: 5' -GACTGCGTACGAATTAAT-3'

em2: 5' -GACTGCGTACGAATTTGC-3'

em3: 5' -GACTGCGTACGAATTGAC-3'

em4: 5' -GACTGCGTACGAATTTGA -3'

em5: 5' -GACTGCGTACGAATTAAC-3'

em6: 5' -GACTGCGTACGAATTGCA-3'

烯酰胺凝胶进行电泳。吴鑫等<sup>[12]</sup>建立柑桔 SRAP 分子标记体系时,通过比较 10%、8%、6%非变性聚丙烯酰胺凝胶的电泳结果,认为 SRAP-PCR 产物片段较小,10%非变性 PAGE 效果最好。在可检测到扩增片段的情况下,循环次数越少越好,过多的循环次数可导致一些非特异产物的干扰,发生错误的比例也上升。

## 2 SRAP 标记的应用

### 2.1 遗传图谱构建

分子遗传图谱是指以遗传标记(已知性状的基因或特定 DNA 序列)间重组频率为基础的染色体或基因内位点的相对位置的线性排列图。高密度分子遗传图谱的构建是遗传学、分子生物学研究中的一个重要领域,也是进行基因组测序、图位克隆、寻找与表型性状紧密连锁标记进行分子辅助育种的重要工具和理论依据<sup>[9]</sup>。但是,目前的分子标记技术构建的甜瓜遗传图谱密度还不够高。实验表明,RAPD、AFLP、SSR 标记数量有限,难以使遗传图谱达到饱和,在甜瓜分子遗传图谱构建中标记偏分离比率变异为 5.8%~19.8%<sup>[13-17]</sup>。因此,很多学者开始尝试利用新的标记技术,以期发现更多的分子标记来丰富现有的遗传图谱。

Li 等用 SRAP 技术对 86 个羽衣甘蓝×花椰菜的 RI 系作图,获得由 130 个 SRAP 标记和 120 个 AFLP 标记构成的遗传图谱,大约 20%的多态性 SRAP(26 个)标记为共显性分离<sup>[1]</sup>。潘俊松等以黄瓜的 2 个自交系 S06 与 S52 杂交产生的 F<sub>2</sub> 为作图群体,应用 SRAP 标记构建黄瓜连锁图谱,筛选出的 64 个多态性引物组

合共得到 108 个多态性条带,获得了由 77 个标记座位组成、覆盖 9 个连锁群、总长 1114.2 cM、标记平均间距 14.5 cM 的遗传图谱<sup>[18]</sup>。甜瓜遗传图谱构建起步较晚,标记间距相对较大。王建设等以中国甜瓜地方品种自交系 4G21(香瓜)和 3A832(哈密瓜)杂交产生的 114 个 F<sub>2</sub> 单株为材料,利用 29 对 SRAP 引物构建甜瓜分子遗传图谱,共产生 187 个多态性位点,其中 152 个位点组成 12 个连锁群,该图谱覆盖基因组长度 2077.1cM,平均图距 13.67cM,认为 SRAP 更适合构建甜瓜遗传图谱<sup>[19]</sup>。这也是世界上利用 SRAP 构建的第一张甜瓜分子遗传图谱。

为了提高图谱密度,同时便于将新的可利用的标记转移到其他作图群体上,国际葫芦科协会计划以 SSR 标记为锚定位点,利用西班牙、以色列、日本、美国、法国和中国构建的 6 个作图群体,将现有的甜瓜遗传图谱进行整合,最终形成一张整合的高密度图谱。

## 2.2 遗传多样性分析

遗传多样性分析是种质资源的收集、保存和有效利用的基础,也是进行种质资源保护和利用的前提,为研究物种起源、品种分类、亲本选配提供了理论依据。

2003 年, Ferriol 等利用 SRAP、AFLP 标记,选用西葫芦两个变种的 69 份代表性材料对遗传多样性进行分析,11 对 SRAP 引物共获得 88 条可重复条带,其中 64 条有多态性,占 72.7%,认为 SRAP 标记在反映形态学变异和进化历史方面提供的信息比 AFLP 更丰富<sup>[20]</sup>。2004 年, Ferriol 等利用该技术对南瓜 (*C. moschata*) 的 47 份材料进行遗传多样性分析,11 个 SRAP 引物组合共产生 148 个重复性条带,其中多态性条带为 98,占 66.2%,通过聚类分析将其划分为中美、南美、西班牙三个类群<sup>[21]</sup>。尽管,黄瓜和西瓜的遗传背景相对狭窄,但是李丽<sup>[22]</sup>和李严<sup>[10]</sup>的研究结果都证明了 SRAP 能够对亲缘关系较近的材料进行遗传多样性分析。李丽等利用 SRAP 分子标记技术对 35 份不同类型的黄瓜品种进行了指纹图谱遗传多态性分析,从 38 对引物组合中筛选出 3 个多态性高的引物组合,这 3 对引物扩增得到的图谱可将 35 份黄瓜品种完全分开<sup>[22]</sup>。李严等利用 25 个 SRAP 引物组合对生产上推广的 20 个西瓜杂交种进行遗传多态性分析时也显示了较高的多态性<sup>[10]</sup>。此外,该标记技术在甘薯<sup>[23]</sup>、大葱<sup>[24]</sup>、萝卜<sup>[25]</sup>等作物遗传多样性分析方面也被成功应用。可见,SRAP 标记技术可以作为遗传多样性分析的重要工具。

## 2.3 分子标记与基因定位

寻找与重要的农艺性状紧密连锁的分子标记并准确定位是进行遗传图谱构建、基因克隆、分子标记辅助选择(又称分子育种)的基础,也为图谱整合和品种改良提供了有益借鉴。目前,已经发现了一些与蔬菜作物重要农艺性状相连锁的分子标记,使利用分子标记进行辅助选择育种成为可能。但是,目前应用的 RFLP、RAPD、AFLP、SSR 等分子标记在应用过程中都表现出了一定的缺憾。因此,新标记技术的应用对于更好的进行分子标记和基因定位十分必要。

雷剑等利用群分法(Bulked Segregant Analysis, BSA),以两个马铃薯二倍体分离群体,105 个基因型为材料,利用 8 个正向引物和 11 个反向引物组成的 88 对 SRAP 引物组合,筛选获得了一个与马铃薯青枯病抗性紧密连锁的 SRAP 标记 M32。遗传连锁分析表明,该标记在 ED 群体和 CE 群体中与抗性位点之间的遗传距离分别为 10.2 cM 和 17.3 cM<sup>[26]</sup>。近年来,SRAP 在黄瓜特异性状的分子标记和基因定位上也被广泛应用,并取得了一定进展。王刚等以黄瓜的两个自交系 S06 与 S52 杂交产生的 F<sub>2</sub> 群体为材料,应用 SRAP 标记将侧枝性状基因定位在第 2 连锁群的 DC1GA18 与 ME11SA4B 之间,与两侧标记的距离分别为 9.6cM 和 10.8cM<sup>[27]</sup>,为进一步开展基因分离与克隆工作奠定了基础。邓思立等利用黄瓜雌雄异花同株自交系 S52 与两性花自交系 H34 杂交组合的 F<sub>2</sub> 代群体,运用 SRAP 技术,采用分离群体混合法(BSA)对单性花(M)基因进行定位,找到一个与 M 基因间距为 17.8 cM 的 SRAP 标记 ME23SA4,为黄瓜单性花分子辅助选择提供了依据<sup>[28]</sup>。可以看出,目前该技术主要侧重产量性状相关的分子标记上,抗病、抗逆性状基因的分子标记研究相对滞后。

## 2.4 比较基因组学

比较基因组学是利用某些基因组图谱和测序获得的信息推测其他生物基因组的基因数目、位置、功能、表达机制和物种进化的学科。拟南芥和水稻基因组全序列的获得使得在整个基因组水平下进行植物异同分析成为可能<sup>[29-32]</sup>。比较基因组学的发展与序列数据的积累密切相关,目前该学科已经成为研究生物基因组的最主要手段之一<sup>[33]</sup>。Li 等利用 SRAP 技术对甘蓝和拟南芥的同源性进行了基因比对,以甘蓝和花椰菜杂交双二倍体的 RNA 构建 cDNA 文库,发现 190 个 cDNA 多态性片段中有 169 个序列与拟南芥已知序列相

似。甘蓝基因组中的大量重复片段在拟南芥 1 号和 5 号染色体上也有发现, 2 号和 4 号染色体上却很少<sup>[30]</sup>。此外, 以 DNA 杂交为基础的技术如: RFLP (restriction fragment length polymorphism)、EST (expressed sequence tag), 物理图谱和遗传图谱被广泛应用于比较基因组学<sup>[34-39]</sup>。

### 3 讨论与展望

SRAP 作为一种新型的分子标记, 具有简便、稳定、中等产率、在基因组中分布均匀、测序方便、引物利用率高、成本较低等优点。此外, 该技术是对 ORFs (开放阅读框) 进行扩增, 对基因相对较少的着丝粒附近和端粒的扩增较少。因此, 结合可扩增这些区域的 SSR 标记, 便可获得覆盖全基因组的连锁图。目前, 该技术已经在马铃薯、水稻、生菜、油菜、大蒜、苹果、樱桃、柑橘、芹菜、芸薹属作物中成功应用<sup>[1]</sup>。Budak 等<sup>[40]</sup>利用 ISSR、SSR、RAPD 和 SRAP 标记的 30 条引物对 15 份野牛草的遗传多样性进行检测后, 认为 SRAP 是唯一能将 15 种基因型分开的分子标记, 更适合于检测亲缘关系比较近的栽培种之间的差别。Ferriol 等<sup>[21]</sup>认为 SRAP 能够提供比 AFLP、RAPD、SSR 更多的多态性和标记信息。王建设等<sup>[19]</sup>利用 SRAP 标记构建甜瓜遗传图谱时发现, SRAP 更适于构建遗传图谱。目前看来, 它是一种比较理想的分子标记系统<sup>[41]</sup>, 具有广阔的应用前景。

### 参考文献

- [1] 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. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 455-461.
- [2] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23:4407-4414.
- [3] Haanstra J P W, Wye C, Verbakel H, et al. An integrated high-density RFLP-AFLP map of tomato based on two *Lycopersicon esculentum* L. pennellii F2 populations. *Theor Appl Genet*, 1999,99:254-271.
- [4] Sun Zudong, Wang Zining, Tu Jinxing, et al. An ultradense genetic recombination map for *Brassica napus*, consisting of 13551 SRAP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007,114:1305-1317.
- [5] 钱文成,张桂华,陈飞雪,等.SRAP 在检测黄瓜基因组多态性中的特征. *遗传*,2006,28(11):1435-1439.
- [6] 杨琦,张鲁刚.大白菜 SRAP 反应体系的建立与优化. *西北农业学报*,2007,16(3):119-123.
- [7] 刘冲,葛才林,任云英,等.SRAP、ISSR 技术的优化及在甘蓝类植物种子鉴别中的应用. *生物工程学报*,2006,22(4):657-661.
- [8] 王振国,张海英,于广建,等.黄瓜 SRAP 反应体系的正交设计优化. *华北农学报*,2007,22 (4):112-115.
- [9] 王燕,龚义勤,赵统敏,等.番茄 SRAP-PCR 反应体系优化与品种分子鉴定. *南京农业大学学报*,2007,30(1): 23-29.
- [10] 王华忠,吴则东,韩英,等.甜菜 SRAP-PCR 反应体系的优化. *中国糖料*,2007,2:1-4.
- [11] 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. *中国农学通报*,2005,21,(5):108-112.
- [12] 吴鑫,雷天刚,何永睿,等.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*,2008,6(1):170-176.
- [13] Baudracco-Amas S, Pitrat M J.A genetic map of melon(*Cucumis melo* L.) with RFLP, RAPD, isozyme, disease resistance and morphological markers. *Theor Appl Genet*,1991,93(1-2):57-64.
- [14] Wang Y H, Thomas C E, Dean R A.A Genetic map of melon(*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) marks. *Theor Appl Genet*,1997,95(5):791-798.
- [15] Liou P C, Chang Y M, Hsu W S, et al. Construction of a linkage map in *Cucumis melo* L. using random amplified polymorphic DNA markers. *Acta Hort*,1998,461:123-131.
- [16] Oliver M, Garcia-Mas J, Cardus M, et al. Construction of a reference linkage map for melon. *Genome*,2001,44: 836-845.
- [17] Pé rin C, Hagen L S, Conto De V, et al. A reference map of *Cucumis melo* based on two recombinant inbred line populations. *Theor Appl Genet*,2002,104:1017-1034.
- [18] PAN J S H(潘俊松),WANG G(王 刚),LI X Z(李效尊).Construction of a cucumber genetic map with SRAP markers and location of the genes responsible for the first-flower-node trait in cucumber(*Cucumis sativus* L.). *Progress In Natural Science*,2005,15(5):407-413.
- [19] 王建设,姚建春,刘玲,等.利用中国香瓜与哈密瓜的 F2 群体构建 SRAP 连锁遗传图谱. *园艺学报*,2007,34 (1):135-140.
- [20] Ferriol M, Pico B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. *Theor Appl Genet*,2003,107:271-282.
- [21] Ferriol M, Pico B, Cordova de PF, et al. Molecular Diversity of a Germplasm Collection of Squash (*Cucurbita moschata*) Determined by SRAP and AFLP Markers. *Crop Science*,2004, 44: 653-664.
- [22] 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. *分子植物育种*,2006,4(5):702-708.
- [23] 郝玉民,郭兰,韩延闯,等.甘薯品种的 SRAP 遗传多样性分析. *武汉植物学研究*,2007,4:406-409.
- [24] 李慧兰,尹燕桦,张春庆,等.SRAP 在葱栽培品种遗传多样性研究中的适用性分析. *园艺学报*,2007,4: 929-934.
- [25] 赵丽萍,柳李旺,龚义勤,等.萝卜品种指纹图谱 SRAP 与 AFLP 分析. *植物研究*,2007,(6):49-55,76.
- [26] 雷剑,柳俊.一个与马铃薯青枯病抗性连锁的 SRAP 标记筛选. *中国马铃薯*,2006,20(3):150-153.
- [27] 王刚,潘俊松,李效尊,等.黄瓜 SRAP 遗传连锁图的构建及侧枝基因定位. *中国科学 C 辑(生命科学)*,2004,34(6):510-516.
- [28] 邓思立,潘俊松,何欢乐,等.黄瓜 M 基因连锁的 SRAP 分子标记. *上海交通大学学报(农业科学版)*,2006,24 (3):240-244.

- [29] Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2000,408:796-815.
- [30] Lan T H, DelMonte T A, Reischmann K P, et al. An EST-enriched comparative map of *Brassica oleracea* and *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res*, 2000,10:776-788.
- [31] Paterson AH, Bowers JE, Burow MD, et al. Comparative genomics of plant chromosomes[J]. *Plant Cell*, 2001, (2):1523-1539.
- [32] Chen M, Presting G, Barbazuk WB. An integrated physical and genetic map of the rice genome. *Plant Cell*, 2002,14:537-545.
- [33] 宋雪梅, 李宏斌, 杜立新. 比较基因组学及其应用. *生命的化学*, 2006,5:42-44.
- [34] Li G, Gao M, Yang B, et al. Gene for gene alignment between the *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003,107:168-180.
- [35] Cavell A, Lydiate D, Parkin IAP, et al. Collinearity between a 30-centimorgan segment of *Arabidopsis thaliana* chromosome 4 and duplicated regions within the *Brassica napus* genome. *Genome*, 1998,41: 62-69.
- [36] Neill CM, Bancroft I. Comparative physical mapping of segments of the genome of *Brassica oleracea* var. *alboglabra* that are homoeologous to sequenced regions of chromosomes 4 and 5 of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2000,23:233-243.
- [37] Draye X, Lin Y R, Qian X Y, et al. Toward integration of comparative genetic, physical, diversity, and cytomolecular maps for grasses and grains, using the sorghum genome as a foundation. *Plant Physiol*, 2001,125:1325-1341.
- [38] Fulton T M, Hoeven VRD, Eannetta N T, et al. Identification, analysis, and utilization of conserved ortholog set markers for comparative genomics in higher plants. *Plant Cell*, 2002,14:1457-1467.
- [39] Parkin IAP, Lydiate DJ, Trick M. Assessing the level of colinearity between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* for *Athaliana* chromosome 5. *Genome*, 2002,45:356-366.
- [40] Budak H, Searman R C, Parmeksiz I, et al. Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buffalograsses based on phylogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs, and SRAPs. *Theor. Appl. Genet*, 2004,109:280-288.
- [41] 柳李旺, 龚义勤, 黄号, 等. 新型分子标记—SRAP与TRAP及其应用. *遗传*, 2004,26(5):777-781.