

SCoT 分子标记在割手密遗传图谱构建中的应用

罗 霆^{1,2,3,4}, 杨海霞¹, 岑华飞¹, 刘许辉¹, 高轶静^{2,3,4}, 段维兴^{2,4},
张荣华², 刘昔辉⁵, 宋焕忠^{3,4}, 黄玉新^{2,3,4}, 张革民^{2,3,5}

(¹ 广西大学农学院, 南宁 530005; ² 广西农业科学院甘蔗研究所, 南宁 530005; ³ 广西甘蔗遗传改良重点实验室, 南宁 530005;
⁴ 农业部广西甘蔗生物技术与遗传改良重点实验室, 南宁 530005; ⁵ 广西农业科学院科技处, 南宁 530005)

摘要:以割手密 GX85-30 × GX87-16 的杂交后代为材料, 应用目标起始密码子多态性(SCoT)分子标记对杂交后代进行杂种鉴定, 获得由 157 个单株组成的 F₁ 杂种群, 同时对比 SCoT、AFLP 和 SSR 分子标记在割手密基因组多态性分析和获得分离标记的效果, 证实 SCoT 在扩增 DNA 多态性上优于 SSR 分子标记, 在获取分离标记上优于 AFLP 分子标记, 验证了 SCoT 分子标记技术在割手密遗传分析中的应用效果, 为割手密遗传分析和遗传图谱构建提供了一种新型高效的目的基因分子标记技术。

关键词: 割手密; SCoT 分子标记; 分离标记; 遗传图谱构建; 遗传分析

Application of SCoT Molecular Marker in Construction of Molecular Genetic Linkage Map of *Saccharum spontaneum* L.

LUO Ting^{1,2,3,4}, YANG Hai-xia¹, CEN Hua-fei¹, LIU Xu-hui¹, GAO Yi-jing^{2,3,4}, DUAN Wei-xing^{2,4},
ZHANG Rong-hua², LIU Xi-hui⁵, SONG Huan-zhong^{3,4}, HUANG Yu-xin^{2,3,4}, ZHANG Ge-min^{2,3,5}

(¹ Agricultural College, Guangxi University, Nanning 530005; ² Sugarcane Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530005; ³ Guangxi Key Laboratory of Sugarcane Genetic Improvement, Nanning 530005; ⁴ Guangxi Key Laboratory for Sugarcane Biotechnology and Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Nanning 530005; ⁵ Division of Science and Technology, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530005)

Abstract: To assess the effectiveness of the new SCoT molecular marking technique in *Saccharum spontaneum* L., 157 offsprings of the crosses between *Saccharum spontaneum* (GX85-30) and *Saccharum spontaneum* (GX87-16) were analyzed by SSR, AFLP, and SCoT molecular marking technique respectively. Comparatively, SCoT molecular marking technique was better than SSR molecular marking technique in amplification of polymorphic DNA, and had better segregation marker than AFLP molecular marking technique. These results demonstrated that SCoT molecular marking technique had potential application prospects in genetic analysis and genetic linkage map construction of *Saccharum spontaneum* L.

Key words: *Saccharum spontaneum* L.; SCoT molecular marking; segregation marker; construction of molecular genetic linkage map; genetic analysis

甘蔗是重要的糖料和经济作物之一, 经过数十年的“高贵化”选育, 育种基因库的有益基因已聚集到现有甘蔗品种中, 遗传背景变狭窄。利用野生资源拓宽育种基因库被认为是甘蔗育种获得新突破最

收稿日期: 2012-08-07 修回日期: 2012-10-23 网络出版日期: 2013-06-07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130607.1741.026.html>

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30860150, 30971837, 31101195); 广西自然科学基金项目 (2010GXNSFD013034, 2010GXNSFB013027, 2011GXNSFF018002, 2012GXNSFBA053036); 广西农业科学院科技发展基金项目 (桂农科 2011JM06); 广西农科院基本科研业务专项项目 (桂农科 2011YT04, 桂农科 2012YZ16, 桂农科 2012YM14); 广西甘蔗研究所基本科研业务专项项目 (G2009010)

第一作者研究方向为甘蔗育种及种质创新研究。E-mail: seafair@163.com

杨海霞为并列第一作者, 研究方向为植物学及植物资源与利用。E-mail: yanghai01@qq.com

通信作者: 张革民, 研究员, 研究方向为甘蔗育种及种质创新研究。E-mail: zhanggm68@gxaas.net

有效的途径^[1-2]。割手密是甘蔗近缘属野生种质,具有变异类型多、遗传多样性丰富^[3-4]、抗逆性强、适应性广、多蘖、宿根性强等优良特性^[4-6]。20 世纪 80 年代前后,各甘蔗育种机构利用割手密育成赣蔗 95-108^[5]、ROC16、ROC24^[6] 等优良品种和一大批 BC₂ 育种中间材料,揭示割手密具有很高的育种利用价值。目前国内外对割手密及甘蔗近缘属的亲缘关系和育种利用的研究报道,集中在对甘蔗进行种间杂交、分子标记辅助选育上^[7-10]。应用的分子标记方法主要是 SSR^[11-12]、AFLP、ISSR、RAPD^[13-15]、SRAP 等,揭示了甘蔗栽培种遗传背景狭窄,但在重要性状基因定位上效率较低,难以真实反映材料在抗性、蔗糖分等重要功能性状上的遗传变异。J. Da Silva 等^[16]和 S. M. Al-Janabi 等^[17] 分别利用 RFLP 和 RAPD 技术构建了包含 442 个单剂量标记 64 个连锁群和 279 个单剂量标记 42 个连锁群的割手密遗传图谱,但未能达到重要性状精细定位的要求。目前 AFLP 是作图效率最高的一种标记,多态性丰富,但此技术最大的缺陷是成本高、操作复杂、不易掌握。SSR 标记作为一种共显性标记,具有其他标记无法比拟的优点,在割手密遗传多样性分析^[18]、真伪杂种鉴定^[19] 等方面已经得到应用,研究表明 SSR 标记能在割手密杂交后代间检测到丰富的多态性,可用于割手密的遗传分析,但由于 SSR 标记的开发成本也较高,目前 SSR 标记的数量尚难以满足精细遗传作图的需要。寻找或建立一种低成本、快速简单的新型分子标记技术十分必要。近年来,目的基因标记和功能性分子标记越来越受到研究者的重视,由于其可能与目的基因紧密连锁或直接作为目的基因的一部分,能通过对某个分子标记的筛选实现对性状的筛选,从而大大降低育种的盲目性^[20-23]。目标起始密码子多态性(SCoT, start codon targeted polymorphism)分子标记技术由 B. C. Y. Collard 等^[24] 在 2009 年开发,是一种基于翻译起始位点的目的基因标记技术,具有操作简单、重复性好等特点,其根据 ATG 翻译起始位点侧翼保守序列来设计单引物,扩增产生偏向候选功能基因区显性多态性标记,扩增产物可以用简单的琼脂糖分离检测,该分子标记技术已被应用于水稻^[24]、花生^[25]、龙眼^[26] 和甘蔗栽培种的基因差异表达研究^[27]。

迄今,SCoT 标记技术尚未见在割手密中应用的报道,本研究通过研究 SCoT 标记技术在割手密杂交后代杂种真实性鉴定、多态性位点扩增和与 SSR、AFLP 标记相比获得多态性和分离标记的效率,旨

在验证 SCoT 分子标记技术在割手密遗传分析中应用的可行性并建立割手密 SCoT 标记技术体系,为割手密的研究提供新型分子标记技术,为开展割手密遗传分析、高密度图谱构建和重要性状精细定位奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以割手密 GX85-30 为母本(♀),割手密 GX87-16 为父本(♂),人工授粉。在杂交温室杂交后严格套袋隔离,至成熟后收获花穗。获得后代材料 245 个。

1.2 基因组 DNA 的提取

取幼嫩叶片 1 g,参照黄东亮等^[28] 的方法提取和纯化割手密基因组 DNA。

1.3 SCoT-PCR 体系

从 71 条 SCoT 引物中筛选出 52 条扩增效果好的引物进行试验。52 条引物中 12 条(已在双子叶花生上得到验证)来自文献[20],其余 40 条根据 B. C. Y. Collard 等^[24] 报道的 SCoT 引物设计原则设计。反应体系和程序参照熊发前等^[23] 的方法,并略有改动。总体积 20 μL 的 SCoT-PCR 反应体系含 ddH₂O 14.4 μL , 10 \times PCR buffer (Mg²⁺) 2 μL , 10 mmol/L dNTPs 0.4 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 单引物 2 μL , 5 U/L *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μL , 基因组 DNA 50 ng。反应条件是 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 50 $^{\circ}\text{C}$ (统一温度) 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。扩增产物与荧光染料混合点样,经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离,在 Pharmacia Biotech 凝胶成像系统观察和拍照。

1.4 SSR-PCR 体系和 AFLP-PCR 体系

SSR 引物来自参考文献[29], SSR-PCR 反应体系程序按照 S. K. Parida 等^[30] 的方法; AFLP 引物来自参考文献[31], AFLP-PCR 体系和程序根据刘新龙等^[32] 的方法进行。

1.5 杂交后代真实性鉴定

筛选出父母本间具有特征性条带的引物对杂交后代进行真实性鉴定。杂种扩增结果中具有双亲特征条带的即为真杂种,只有母本特征条带而无父本特征带的后代为假杂种或自交种。

1.6 数据分析

根据亲本与后代扩增的电泳图谱,选择群体后代呈现分离的标记统计,按同一位置有带记为 H,无带记为 A,缺失记为“-”。使用 χ^2 检测所有标记的

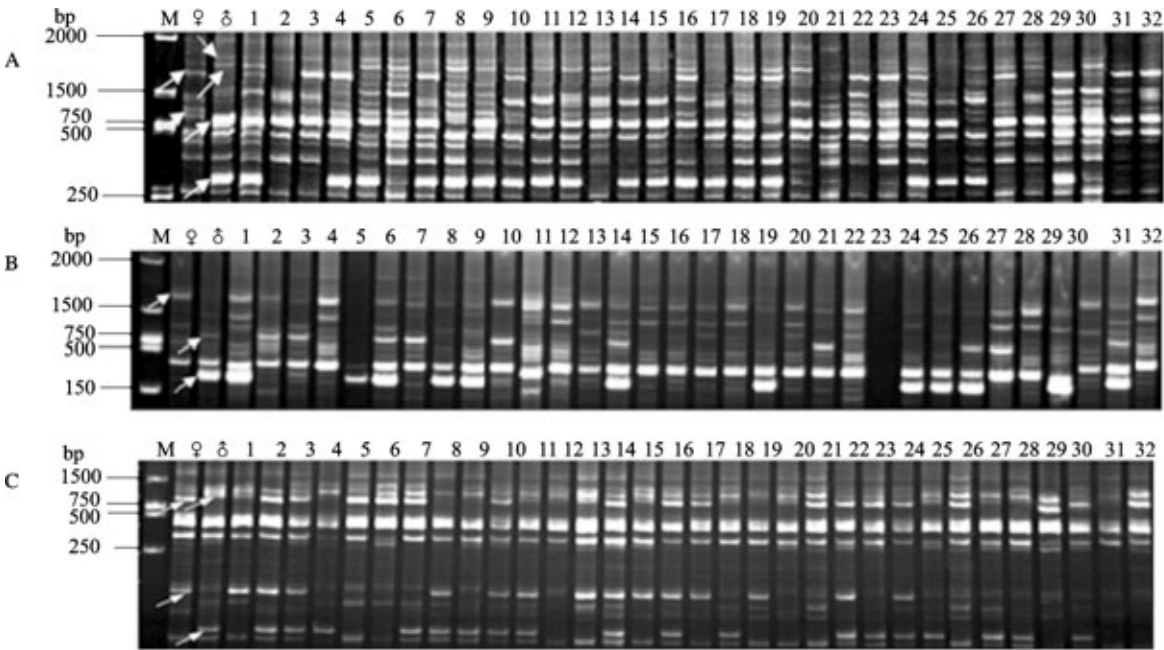
分离比例,分离比例 1:1(双亲间多态带)或 3:1(双亲间共有带)为单剂量标记,分离比例 11:3(双亲间多态带)为双剂量标记^[33-35]。

2 结果与分析

2.1 SCoT 标记杂种真实性

筛选出 5 条具有双亲特征条带的 SCoT 引物,利用这 5 条引物对 245 个后代材料进行鉴定,其中 88 个材料不具备父母本的特征条带,鉴定为自交种

或假杂种;其余 157 个材料同时具有双亲的特征条带,鉴定为真杂种,构成 F₁ 杂种群。如图 1A 所示,样品 1 具有约 1700 bp、1750 bp、750 bp、380 bp 大小的父本特征带和约 750 bp、380 bp 大小的母本特征带;图 1B 中,样品 1 分别在约 300 bp 和 1600 bp 处具有父母本特征带;同时在图 1C 中,样品 1 还具有约 120 bp 和 850 bp 大小的父本特征带和约 150 bp 大小的母本特征带。SCoT 标记鉴定确认样品 1 为真杂种。



白色箭头指示双亲特征条带

White arrows show the characteristic bands. A;SCoT1,B;SCoT33,C;SCoT71, ♀:Female line GX85-30, ♂:Male line GX87-16, the same as below

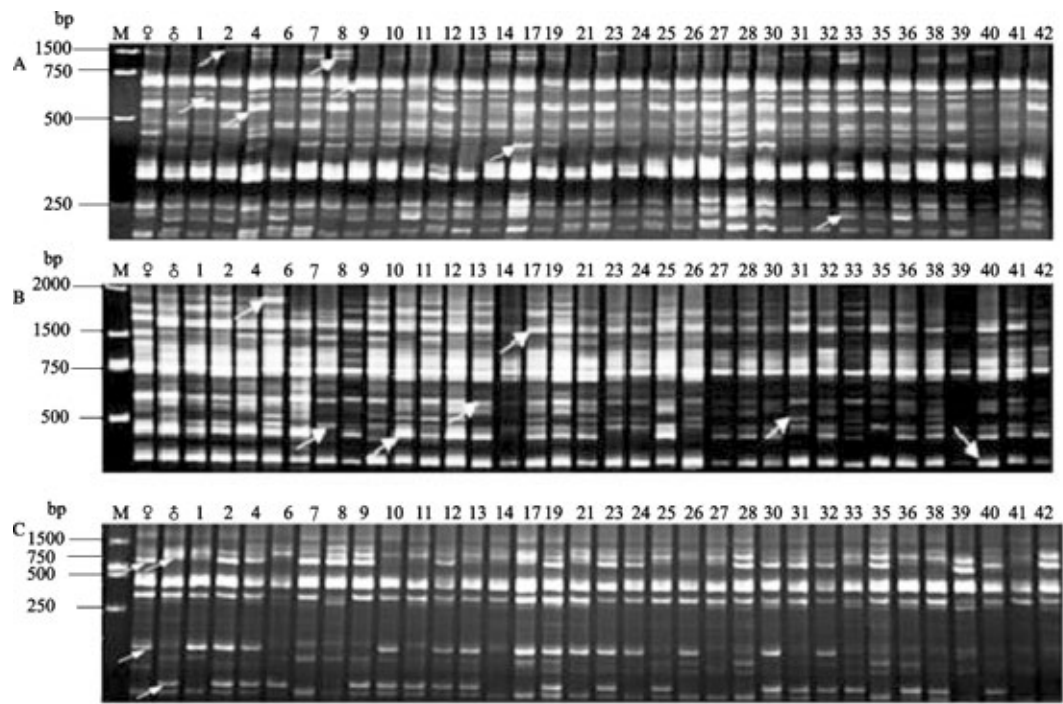
图 1 SCoT 引物鉴定图谱

Fig.1 SCoT fingerprints amplified with some primers for F₁ population

2.2 扩增产物的多态性

2.2.1 SCoT 扩增产物的多态性 从 71 条引物中筛选出扩增结果稳定、条带清晰和有多态性的引物 52 条。每条引物能在每个 DNA 样品中扩增出 0 ~ 58 条带(图 2),片段大小在 100 ~ 1800 bp 之间,在供试样品中检测到位点 1626 个,其中多态性位点 1185 个,多态性比率达到 72.87%,每条引物的多态性变幅为 19.11% ~ 100%,多态性最高的是引物 SCoT29,达到 100%,多态性最低的是引物 SCoT17 和 SCoT34,均为 14.23%;每条引物检测的位点数为 4 ~ 58 个,平均位点数为 31.27 个,其中多态性位点 1 ~ 58 个,平均为 22.78 个(表 2)。总位点数和多态性位点数最多的都是引物 SCoT29。

2.2.2 SCoT、SSR 和 AFLP 标记的多态性对比分析 参试的 SCoT、SSR 和 AFLP 引物都能在 157 个割手密杂交后代中获得多态性条带,其中多态性最丰富的是 AFLP 引物,其平均条带数、平均多态性条带数和多态性条带比率分别为 81.73 条、76.36 条和 93.44%(图 3);多态性最低的是 SSR 引物,其平均条带数、平均多态性条带数和多态性条带比率分别为 20.00 条、6.20 条和 31.00%(图 4)。SCoT 引物扩增的条带数目和多态性条带数介于 AFLP 和 SSR 引物之间,同时 SCoT 引物扩增出的条带大小范围最大,在 100 ~ 1800 bp 之间都能获得清晰的条带,而 SSR 引物和 AFLP 引物扩增条带范围较小,分别介于 50 ~ 750 bp 和 50 ~ 720 bp 之间(表 1)。

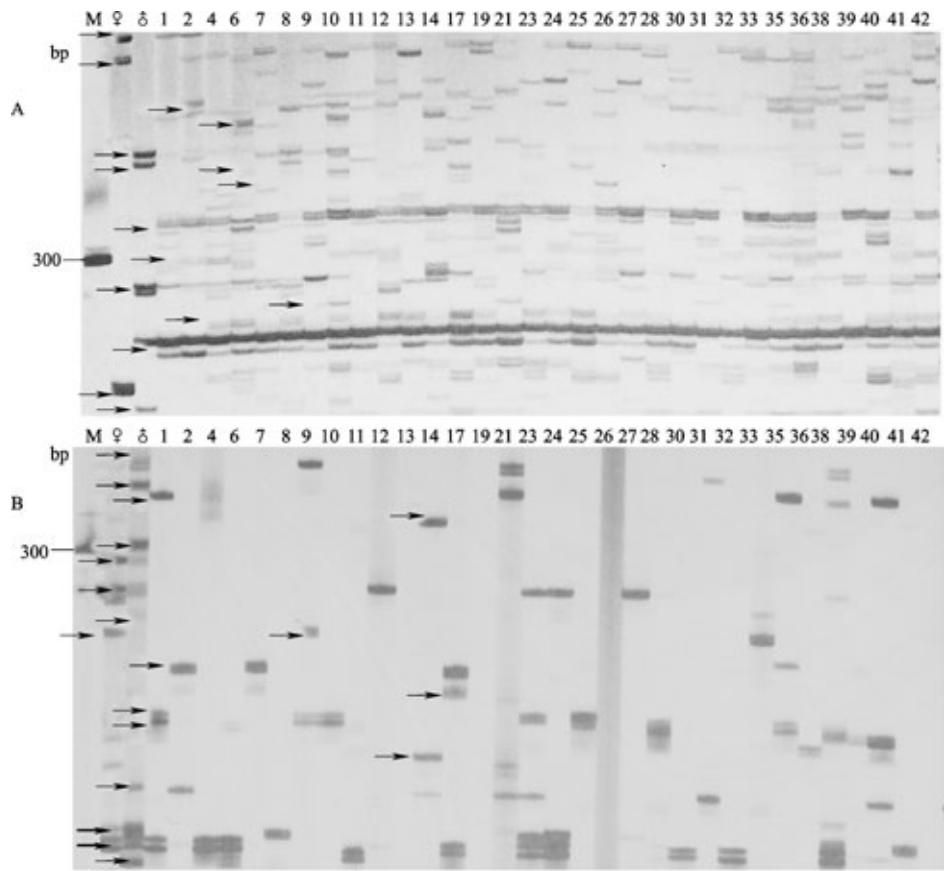


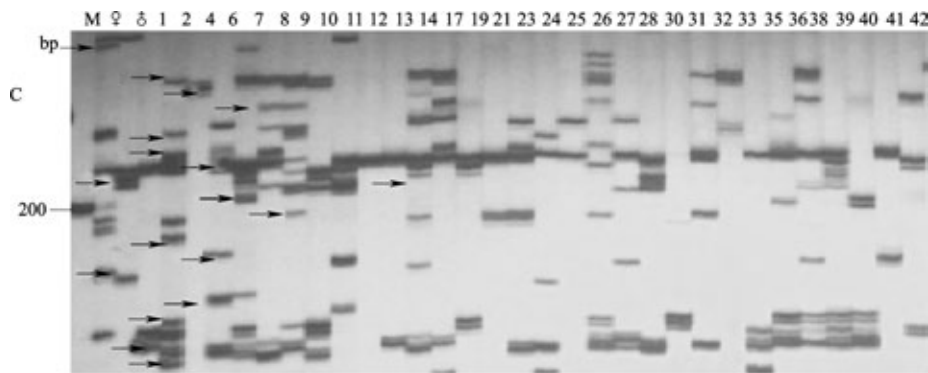
白色箭头指示多态性条带

White arrows show the polymorphic bands. A;SCoT13,B;SCoT50,C;SCoT66

图2 3条 SCoT 引物在割手密杂交后代的扩增图谱

Fig. 2 Banding patterns for SCoT marker analysis in the F₁ population using three primers

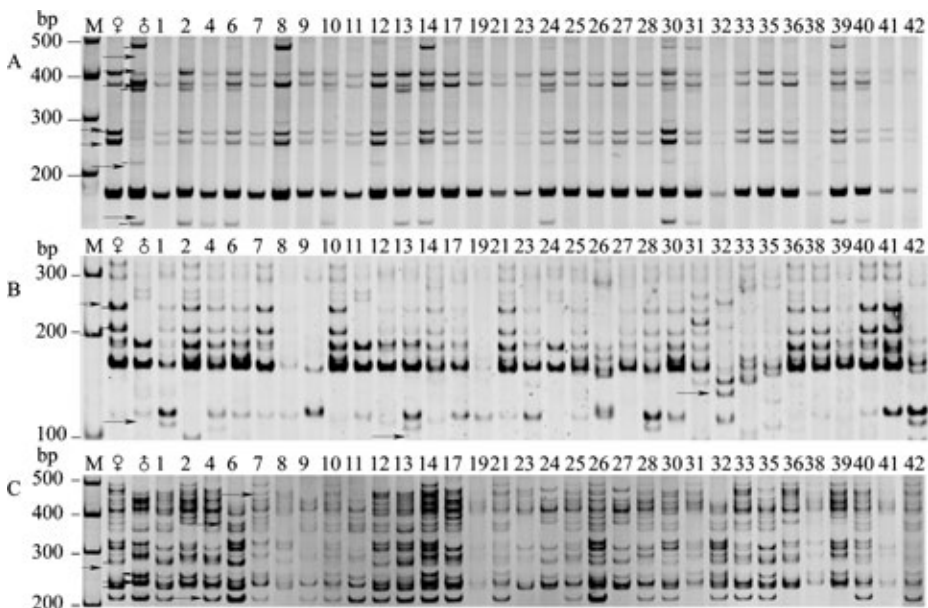




黑色箭头指示多态性条带 Black arrows show the polymorphic bands. A;E3M1,B;E5M2,C;E6M4

图3 3对AFLP引物在割手密杂交后代的扩增图谱

Fig. 3 Banding patterns for AFLP marker analysis in the F₁ population using three primers



黑色箭头指示多态性条带 Black arrows show the polymorphic bands. A;mSSCIR32,B;mSSCIR43,C;mSSCIR48

图4 3对SSR引物在割手密杂交后代的扩增图谱

Fig. 4 Banding patterns for SSR marker analysis in the F₁ population using three primers

表1 割手密杂交后代 SCoT、SSR 和 AFLP 标记的多态性对比分析

Table 1 Genetic diversity analysis for amplified bands of F₁ population by SCoT,SSR,and AFLP primers

标记类型 Markers	参试引物数 No. of primer	总条带数 No. of total band	平均条带数 Average No. of bands	多态性条带数目 No. of polymorphic band	平均多态性条带数 Average No. of polymorph bands	条带大小(bp) Band size	多态性条带比率(%) Polymorphic bands
SCoT	52	1626	31. 27	1185	22. 79	100 ~ 1800	72. 87
SSR	60	1200	20. 00	372	6. 20	50 ~ 750	31. 00
AFLP	11	899	81. 73	840	76. 36	50 ~ 720	93. 44

2.3 获得分离标记的效率

从 52 条 SCoT 引物、60 对 SSR 引物和 11 对 AFLP 引物中共获得 1500 个分离标记,使用 χ^2 检测,F₁ 群体共有 664 个单剂量标记,99 个双剂量标

记,合计占总标记数的 50.9% ,偏分离标记 763 个。比较单双剂量标记比例的数值得出 3 种引物获得的单双剂量标记的效率依次为 SCoT > AFLP > SSR,获得单剂量分子标记的效率依次为 SCoT > AFLP >

SSR,偏分离标记比例最高的是 SSR 引物,达到 66.2%;最低的是 SCoT 引物,为 25.0%。总体来说虽然每种引物的数量不等,但从单双剂量标记比例来

表 2 杂交后代群体 SCoT、SSR 和 AFLP 标记统计结果

Table 2 Statistical result of SCoT,SSR,and AFLP markers in F₁ population

标记类型	标记数	单剂量标记	双剂量标记	单双剂量标记比例(%)	偏分离标记	偏分离标记比例(%)
Marker	Marker number	SDM(1:1&3:1)	DDM(11:3)	Rate of SDM to DDM	DM	Rate of DM
SCoT	452	312	27	75.0	140	25.0
SSR	373	107	19	33.8	246	66.2
AFLP	675	245	53	44.1	377	55.9

SDM:Single dose marker,DDM:Double dose marker,DM:Distorted marker

3 讨论

本研究将 SCoT 标记技术应用于割手密杂交后代的杂种鉴定、DNA 多态性分析和遗传图谱构建中与 SSR 和 AFLP 标记技术对比获得有效单双剂量分子标记的效率,为割手密种质资源分类鉴定、保护和利用、高密度遗传连锁图谱构建、分子标记辅助育种、基因定位和克隆等研究提供一种新的分子标记技术。

本研究使用 12 条在双子叶花生上得到验证的 SCoT 引物对割手密杂交后代进行扩增,获得丰富的多态性,说明 SCoT 标记在基因组水平上有多个结合位点,可在不同物种间共用。同时 SCoT 单引物在 PCR 反应中同时充当上下游引物的角色,SCoT 引物扩增发生在一个基因中的第 1 个外显子中或是跨越相邻的内含子进行,使得那些较近而又反向结合的引物结合位点之间的片段得以有效扩增,因此产生相当丰富的多态性。

AFLP 是目前公认的作图效率最高的分子标记技术,获得有效构图标记的效率一般在 40% ~ 60%之间^[32-36],本研究中为 44.1%,明显高于 SSR 分子标记,而且扩增到的多态性条带也相当丰富,但在参试的割手密 F₁群体中,SCoT 标记有更高的作图效率,其获得有效构图标记的比例达到 75.0%,说明 SCoT 分子标记在构建割手密高密度遗传图谱上有很大的应用潜力。同时,SCoT 标记引物利用功能基因保守序列开发,其本身就位于目的基因内部,避免了基因标记定位或 QTL 作图建立的特定 DNA 标记,即使与目标基因紧密连锁,却常常会因为目的基因与标记之间可能发生重组而影响目标性状选择的准确性,使标记与目标基因之间仍然存在一定的遗传距离的情况。

构建分子标记遗传连锁图谱是性状基因定位及

看,获得有效构图标记的最多的是 SCoT 引物,最少的是 SSR 引物,说明 SCoT 引物在参试的 157 份割手密杂交后代中获得有效构图标记的效率最高(表 2)。

分子标记辅助选择育种的基础^[37]。由于多倍体作物的基因型复杂,后代群体基因组成和结构不清楚,其统计分析远复杂于二倍体作物,导致目前多倍体作物的分子遗传连锁图谱研究落后^[38]。而甘蔗及割手密都属于更为复杂的多倍体,基因组血缘组成高度复杂,染色体数量庞大,很难判断分离群体的类型和基因分离模式,因此分子遗传连锁图谱构建必须考虑所有的分离标记模式。目前已构建的甘蔗遗传图谱标记之间遗传距离还很大^[34,39-40],都属于极度不饱和图谱。使用大量分子标记构建的 R570^[40]和 Q165^[34]图谱,遗传距离分别达到了 5849 cM 和 9058.3 cM,仅覆盖了甘蔗基因组的一半左右。要获得满足精细定位和图位克隆需求的高密度遗传图谱还需要通过分子标记手段获得大量的分离标记。在本研究中 SCoT 分子标记在割手密杂交后代中表现出高效的分离标记获得效率,并在扩增 DNA 多态性上优于 SSR 分子标记,在获取分离标记上优于 AFLP 分子标记,揭示 SCoT 分子标记技术在割手密遗传分析和遗传图谱构建中的应用前景,为割手密及其他多倍体植物遗传图谱构建提供了一种高效的目的基因分子标记,值得进一步尝试和探索。

参考文献

[1] 张木清,王华忠,白晨. 糖料作物遗传改良与高效育种[M]. 北京:中国农业出版社,2005:453-455

[2] Tew T L. World sugarcane variety census-Year 2000[C]. UK: Sugar Cane International,2003:12-18

[3] 李奇伟. 现代甘蔗改良技术[M]. 广州:华南理工大学出版社,2000:15-17

[4] 陈如凯. 现代甘蔗育种的理论与实践[M]. 北京:中国农业出版社,2003:281-442

[5] 邓海华,张琼. 我国大陆近年育成甘蔗品种的亲本分析[J]. 广东农业科学,2006(12):7-10

[6] Chang Y S. Agronomic traits of three sugarcane varieties with one-

- eighth wild cane genetic base[J]. Taiwan Sugar, 2002, 49(2): 4-7
- [7] 刘少谋, 符成, 陈勇生. 近十年海南甘蔗育种场斑茅后代回交利用研究[J]. 甘蔗糖业, 2007(2): 1-6
- [8] Cordeiro G M, Pan Y B, Henry R J. Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm[J]. Plant Sci, 2003, 165(1): 181-189
- [9] 张革民, 杨荣仲, 刘海斌, 等. 割手密主要数量性状的主成分及聚类分析[J]. 西南农业学报, 2006, 19(6): 1127-1131
- [10] 张革民, 廖江雄, 黄宏套, 等. 广西高糖割手密遗传多样性的表型分析和 RAPD 分析[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2007, 29(8): 83-88
- [11] 桃联安, 楚连璧, 经艳芬, 等. 云南割手密 82-114 种间杂交后代 SSR 分子标记鉴定[J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(1): 132-135
- [12] 陆鑫, 毛钧, 刘洪博, 等. 甘蔗野生种滇蔗茅种质创新利用研究 I. 甘蔗与滇蔗茅远缘杂交 F_1 群体构建与 SSR 分子标记鉴定[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(2): 163-166
- [13] 曾华宗, 郑成木, 朱稳, 等. 甘蔗种质间亲缘关系及特异标记的 RAPD 分析[J]. 植物遗传资源学报, 2003, 4(2): 99-103
- [14] 李富生, 林位夫, 何顺长. 甘蔗杂种的染色体和 RAPD 鉴定研究[J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(1): 48-52
- [15] 王英, 陈守俊, 朱相成, 等. 80 份甘蔗种质 RAMP 标记遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(4): 525-532
- [16] Da Silva J, Honeycutt R J, Burnquist W, et al. *Saccharum spontaneum* L. 'SES 208' genetic linkage map combining RFLP-and PCR-based markers[J]. Mol Breeding, 1995, 1(2): 165-179
- [17] Al-Janabi S M, Honeycutt R J, McClelland M, et al. A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L. SES 208[J]. Genetics, 1993, 134(4): 1249-1260
- [18] 刘昔辉, 方锋学, 高轶静, 等. 斑茅割手密杂种后代真实性鉴定及遗传分析[J]. 作物学报, 2012, 38(5): 914-920
- [19] 高轶静, 方锋学, 刘昔辉, 等. 甘蔗与斑茅割手密复合体杂交后代的分子标记鉴定[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(5): 912-916
- [20] Andersen J R, Lübberstedt T. Functional markers in plants[J]. Trends Plant Sci, 2003, 8(11): 554-560
- [21] 陆才瑞, 喻树迅, 于雯雯, 等. 功能型分子标记 (ISAP) 的开发及评价[J]. 遗传, 2008, 30(9): 115-124
- [22] 杨景华, 王士伟, 刘训言, 等. 高等植物功能性分子标记的开发与利用[J]. 中国农业科学, 2008, 41(11): 3429-3436
- [23] 熊发前, 唐荣华, 陈忠良, 等. 目标起始密码子多态性 (SCoT): 一种基于翻译起始位点的目的基因标记新技术[J]. 分子植物育种, 2009, 7(3): 635-638
- [24] Collard B C Y, Mackill D J. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants[J]. Plant Mol Biol Rep, 2009, 27(1): 86-93
- [25] 熊发前, 蒋菁, 钟瑞春, 等. 目标起始密码子多态性 (SCoT) 分子标记技术在花生属中的应用[J]. 作物学报, 2010, 36(12): 2055-2061
- [26] 陈虎, 何新华, 罗聪, 等. 龙眼 24 个品种的 SCoT 遗传多样性分析[J]. 园艺学报, 2010, 37(10): 1651-1654
- [27] 吴建明, 李杨瑞, 王爱勤, 等. 赤霉素诱导甘蔗节间伸长基因的 cDNA-SCoT 差异表达分析[J]. 作物学报, 2010, 36(11): 1883-1890
- [28] 黄东亮, 覃肖良, 廖青, 等. 高质量甘蔗基因组 DNA 的简便快速提取方法研究[J]. 生物技术通报, 2010(5): 101-106
- [29] Cordeiro G M, Taylor G O, Henry R J. Characterisation of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* sp.), a highly polyploid species[J]. Plant Sci, 2000, 155(2): 161-168
- [30] Parida S K, Kalia S K, Kaul S, et al. Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane[J]. TAG, 2009, 118(2): 327-338
- [31] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(21): 4407-4414
- [32] 刘新龙, 蔡青, 毕艳, 等. 中国滇蔗茅种质资源遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 作物学报, 2009, 35(2): 262-269
- [33] Aitken K S, Jackson P A, McIntyre C L. A combination of AFLP and SSR markers provides extensive map coverage and identification of homo(eo) logous linkage groups in a sugarcane cultivar [J]. TAG, 2005, 110(5): 789-801
- [34] Hoarau J Y, Offmann B, D Hont A, et al. Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.). I. Genome mapping with AFLP markers[J]. TAG, 2001, 103(1): 84-97
- [35] Wu K K, Burnquist W, Sorrells M E, et al. The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments[J]. TAG, 1992, 83(3): 294-300
- [36] Raina S N, Rani V, Kojima T, et al. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species[J]. Genome, 2001, 44(5): 763-772
- [37] 肖炳光, 徐照丽, 陈学军, 等. 利用 DH 群体构建烤烟分子标记遗传连锁图[J]. 中国烟草学报, 2006, 12(4): 35-40
- [38] Ripol M I, Churchill G A, Da Silva J, et al. Statistical aspects of genetic mapping in autopolyploids [J]. Gene, 1999, 235(1): 31-41
- [39] D'Hont A, Grivet L, Feldmann P, et al. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics[J]. Mol Gen Genet, 1996, 250(4): 405-413
- [40] Grivet L, Arruda P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop[J]. Curr Opin Plant Biol, 2002, 5(2): 122-127