

鲤 TRAP 分子标记反应体系的建立与优化

曲疆奇^① 苏胜彦^② 董在杰^{①②*} 明俊超^① 梁政远^① 袁新华^{①②}

(^① 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081; ^② 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心
农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室 无锡 214081)

摘要: 针对鲤 (*Cyprinus carpio*) 这一主要水产养殖品种设计了靶位区域扩增多态性 (target region amplified polymorphism, TRAP) 分子标记的反应体系, 对影响 TRAP 反应体系的各参数, 包括 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、模板 DNA 和引物浓度进行了优化, 建立了适合鲤的、稳定、可重复的 TRAP-PCR 反应体系。在 15 μ l PCR 反应体系中, Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L、dNTPs 浓度为 0.35 mmol/L、两个随机引物浓度均为 3 pmol/L、固定引物浓度为 10 pmol/L、含 DNA 模板 60 ng、*Taq* DNA 聚合酶 1.0 U。鲤的 TRAP 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 4 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 35 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 53 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min, 1 个循环。这一优化体系的建立为今后进行鲤群体遗传多样性、种质鉴定、遗传连锁图谱及亲缘关系分析等方面的研究提供了新的分子标记。

关键词: 鲤; TRAP 标记; 体系; 优化

中图分类号: Q953 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2010) 03-72-07

Establishment and Optimization of Reaction System for TRAP Markers in Common Carp (*Cyprinus carpio*)

QU Jiang-Qi^① SU Sheng-Yan^② DONG Zai-Jie^{①②*} MING Jun-Chao^①
LIANG Zheng-Yuan^① YUAN Xin-Hua^{①②}

(^① Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081;

^② Key Open Laboratory of Genetic Breeding and Aquaculture Biology of Freshwater Fishes, Ministry of Agriculture; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: The reaction system for TRAP makers of Common Carp (*Cyprinus carpio*), one of the major cultured fishes, was designed. The factors of reaction system including Mg^{2+} , dNTPs, *Taq* DNA polymerase, DNA template and primer concentrations were optimized and a stable repeatable TRAP-PCR system for Common Carp was established. The PCR was performed with a final volume of 15 μ l reaction solution containing 1.5 mmol/L of Mg^{2+} , 0.35 mmol/L of dNTPs, 3 mmol/L of each unlabeled 700- and 800- arbitrary primers, 10 pmol/L of the fixed primer, 60 ng of DNA template and 1.0 U *Taq* DNA polymerase. The TRAP reaction program consisted of a pre-denaturing of template DNA at 94 $^{\circ}$ C for 4 min, followed by 5 cycles of denaturing at 94 $^{\circ}$ C for 45 s, annealing at 35 $^{\circ}$ C for 45 s, prolonging at 72 $^{\circ}$ C for 1 min, 35 cycles of denaturing at 94 $^{\circ}$ C for 45 s, annealing at 53 $^{\circ}$ C for 45 s, prolonging at 72 $^{\circ}$ C for 1 min, and a final prolonging at 72 $^{\circ}$ C for 10 min. This optimized TRAP-PCR reaction system provided a new molecular marker for the future study of genetic diversity, germplasm identification, genetic linkage map construction and relationship analysis in Common Carp.

基金项目 现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (No. nycytx-49), 国家“十一五”科技支撑计划项目专题 (No. 2006BAD01A1208), 农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室开放课题 (No. BZ2009-06);

* 通讯作者, E-mail: dongzj@ffrc.cn;

第一作者介绍 曲疆奇 男 硕士研究生; 研究方向: 鱼类遗传育种; E-mail: quqi20092009@163.com.

收稿日期: 2009-11-03 修回日期: 2009-12-22

Key words: Common Carp (*Cyprinus carpio*); TRAP markers; System; Optimization

鲤 (*Cyprinus carpio*) 是世界上养殖范围最广的重要经济鱼类, 在我国的淡水渔业生产中也占据着重要地位。我国鲤品种 (品系) 众多, 有着丰富的遗传资源, 构建鲤遗传连锁图谱将为研究鲤基因组结构、经济性状 QTL 定位和分子标记辅助育种 (marker-assisted selection, MAS) 提供有力工具。目前, 淡水经济鱼类遗传图谱构建的报道还较少, 遗传标记辅助育种研究还处于起步阶段。所以, 足够量遗传稳定、多态性高的分子标记的获得对于构建高密度遗传连锁图谱是至关重要的。

2003 年, 美国农业部北方作物科学实验室 Hu 与 Vick 开发了目标区域扩增多态性 (target region amplified polymorphism, TRAP) 或叫作靶位区域扩增多样性标记技术^[1]。TRAP 技术是一个基于 PCR 的标记技术, 它与 RAPD 技术一样操作简单、易于建立, 同时又具有重复性好、效率高、共显性高和测序容易等特点。TRAP 标记技术在大多数的情况下, 可在一个 PCR 中扩增出多达 50 个以上的可统计片段, 片段大小在 50 ~ 900 bp 之间, 产生出与 AFLP 技术相媲美的图谱。TRAP 技术是在向日葵 (*Helianthus annuus*) 中开发的^[1], 目前已成功应用于水稻 (*Oryza sativa*)、莴苣 (*Lactuca sativa*)、小麦 (*Triticum aestivum*)、油菜 (*Brassica napus*) 等作物的遗传图谱构建、重要性状分子标记筛选、种质资源多样性研究和标记辅助选择育种中^[2-6]。

目前在动物中, 仅在草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 上有 TRAP 应用的相关报道^[7-9]。本研究将这一新型分子标记运用到鲤遗传育种研究中, 设计了鲤 TRAP 标记的反应体系, 并对影响这一体系的 Mg^{2+} 、dNTPs、模板 DNA、Taq DNA 聚合酶及引物浓度等参数进行优化, 建立稳定的鲤 TRAP 标记反应体系, 为鲤的遗传学及育种研究提供一种新的分子标记。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 实验材料为荷包红鲤、黄河鲤、建鲤、兴国红鲤和黑龙江野鲤 5 个鲤群体 (表 1), 分别随机取 30 个个体, 采集鱼血, 提取其基因组 DNA 作为 TRAP-PCR 反应体系的模板 DNA。

表 1 实验鲤种类及其来源

Table 1 The varieties and their origins of Common Carp in the current study

种类 Variety	来源 Origin
荷包红鲤 <i>C. c. var. wuyuanensis</i>	江西省婺源县良种场
黄河鲤 <i>C. c. haematopterus</i>	河南郑州黄河鲤良种场
建鲤 <i>C. c. var. jian</i>	淡水渔业研究中心试验场
兴国红鲤 <i>C. c. var. singguonensis</i>	江西省兴国县良种场
黑龙江野鲤 <i>C. c. haematopterus</i>	黑龙江黑河市野鲤良种场

1.1.2 试剂和仪器 用于 TRAP-PCR 反应体系的 $10 \times$ PCR buffer、 Mg^{2+} 、dNTPs、Taq DNA 聚合酶均购自 Takara 宝生物工程 (大连) 有限公司; 100 bp DNA ladder 购自上海申能博彩生物科技有限公司; Takara 梯度 PCR 扩增仪由日本 Takara 公司生产; UVP GelDoc-ItTM Imaging System 由美国 UVP 凝胶成像系统公司生产。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 参照 Takara 全血基因组试剂盒说明进行 DNA 提取并检测 DNA 的质量和浓度。

1.2.2 引物筛选 依据 Hu 等^[1]固定引物设计原理设计了 4 个固定引物, 随机引物参照 Hu^[10]的 8 个随机引物 (表 2), 用荷包红鲤的模板对引物组合进行筛选。引物由南京力生生物技术公司合成。

1.2.3 DNA 扩增 参考 Hu 等^[1]的 PCR 反应程序, 略有改动。鲤的 TRAP 反应程序为: 94°C 4 min; 94°C 45 s, 35°C 45 s, 72°C 1 min, 5 个循环; 94°C 45 s, 53°C 45 s, 72°C 1 min, 35 个循环; 72°C 10 min, 4°C 保存。在 100 V 电压下 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 3 h, 用 GoldView 染料 (上海赛百盛生物科技有限公司) 染色 15 min, 在 UVP 凝胶成像系统照相并保存。

表 2 实验所用的 4 个固定引物和 8 个随机引物的序列

Table 2 Sequences of four fixed primers and eight arbitrary primers used in the current study

引物 Primer	序列 Sequence (5' - 3')
固定引物 Fixed primer	E1 ACTTGGCTTCTTTCTGC
	E2 TCAGTTGTCCAGGTGAAA
	E3 AGTGATTTCACACCAGCA
	E4 CTCACCATTCCAGAGGTT
随机引物 Arbitrary primer	Ga3-800 TCATCTCAAACCATCTACAC
	Ga5-800 GGAACCAAACACATGAAGA
	Odd26-700 CTATCTCTCGGGACCAAAC
	Sa12-700 TTCTAGGTAATCCAACAACA
	Trap03-700 CGTAGCCGGTCAATTATG
	Trap04-700 CGTAGTGATCGAATTCTG
	Trap13-800 GCGCGATGATAAATTATC
	Trap14-800 GTCGTACGTAGAATTCTT

1.3 鲤 TRAP-PCR 反应参数的优化 经过初步筛选 ,E1 + Sa12-700 + Ga5-800 引物组合用于 TRAP 反应参数的优化研究。参考 Hu 等^[1]反应体系 ,在保持体系中其他参数一致的条件下 ,针对其中一个进行优化 ,从而找到各个参数最佳反应量。用荷包红鲤 DNA 模板对 TRAP-PCR 体系中的 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、*Taq* DNA 聚合酶浓度、模板 DNA 浓度和引物浓度 5 个因素分别进行多水平的优化实验 ,以确定稳定的鲤 TRAP 标记反应体系参数。最后用 5 个鲤群体的基因组 DNA 进行验证。

2 结果

2.1 Mg^{2+} 浓度对鲤 TRAP 体系的影响 本实验中设置了 5 个 Mg^{2+} 浓度:1.0 mmol/L、1.5 mmol/L、2.0 mmol/L、2.5 mmol/L 和 3.0 mmol/L。从扩增效果上看 , Mg^{2+} 浓度为 1.0 mmol/L、1.5 mmol/L 时条带丰富且清晰 ,多态性好; Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L、3.0 mmol/L 时条带很弱;当浓度为 2.0 mmol/L 时条带比较细(图 1)。考虑反应各因素的综合作用 ,当 Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L 时扩增效果最好 ,条带清晰 ,带型丰富 ,多态性好。

2.2 dNTPs 浓度对鲤 TRAP 体系的影响 本

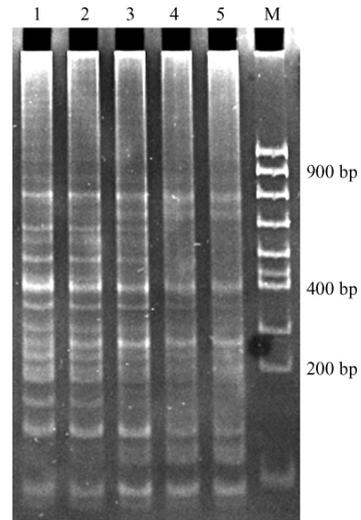


图 1 不同 Mg^{2+} 浓度下的荷包红鲤 TRAP 扩增效果

Fig. 1 The TRAP patterns of Purse Red Carp (*C. carpio* var. *wuyuanensis*)

based on different Mg^{2+} concentrations

M: 100 bp DNA 分子量标准; 1-5 泳道 Mg^{2+} 浓度: 1.0 mmol/L、1.5 mmol/L、2.0 mmol/L、2.5 mmol/L、3.0 mmol/L。

M: 100 bp DNA ladder; Mg^{2+} concentration of lane 1-5: 1.0 mmol/L, 1.5 mmol/L, 2.0 mmol/L, 2.5 mmol/L, 3.0 mmol/L.

实验中设置了 5 个 dNTPs 的浓度:0.2 mmol/L、0.25 mmol/L、0.3 mmol/L、0.35 mmol/L 和 0.4 mmol/L。从图 2 中可以看出 ,dNTPs 浓度 0.2 ~ 0.3 mmol/L 时 ,虽然条带逐渐清晰 ,但还是比较模糊;当浓度 0.35 mmol/L 和 0.4 mmol/L 时 ,条带清晰且丰富。考虑扩增效果和成本 ,确定 dNTPs 浓度 0.35 mmol/L 为最佳水平。

2.3 *Taq* DNA 聚合酶浓度对鲤 TRAP 体系的影响 本实验中设置了 5 个酶浓度:在 15 μ l 反应体系中分别含 *Taq* DNA 聚合酶 0.5 U、1.0 U、1.5 U、2.0 U 和 2.5 U。从图 3 可以看出 ,PCR 产物扩增条带都较清晰稳定且丰富。选择 *Taq* DNA 聚合酶时主要综合考虑扩增效果和成本 ,所以最后确定 *Taq* DNA 聚合酶浓度为 15 μ l 反应体系中含 1.0 U *Taq* DNA 聚合酶较为合适。

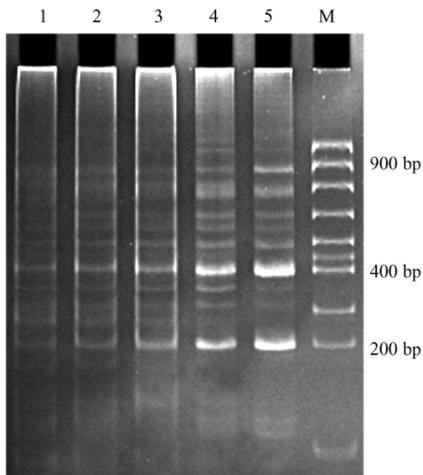


图2 不同 dNTPs 浓度下的荷包红鲤 TRAP 扩增效果

Fig.2 The TRAP patterns of Purse Red Carp based on different dNTPs concentrations

M: 100 bp DNA 分子量标准; 1~5 泳道 dNTPs 浓度: 0.2 mmol/L, 0.25 mmol/L, 0.3 mmol/L, 0.35 mmol/L, 0.4 mmol/L。

M: 100 bp DNA ladder; dNTPs concentration of lane 1-5: 0.2 mmol/L, 0.25 mmol/L, 0.3 mmol/L, 0.35 mmol/L, 0.4 mmol/L.

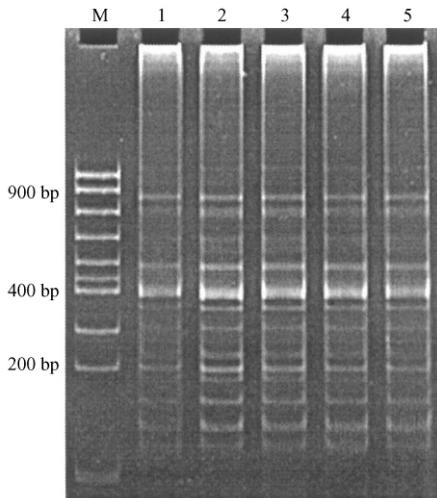


图3 不同 *Taq* DNA 聚合酶浓度下的荷包红鲤 TRAP 扩增效果

Fig.3 The TRAP patterns of Purse Red Carp based on different *Taq* DNA polymerase concentrations

M: 100 bp DNA 分子量标准; 1~5 泳道 *Taq* DNA 聚合酶的量: 0.5 U, 1.0 U, 1.5 U, 2.0 U, 2.5 U。

M: 100 bp DNA ladder; *Taq* DNA polymerase amount of lane 1-5: 0.5 U, 1.0 U, 1.5 U, 2.0 U, 2.5 U.

2.4 DNA 浓度对鲤 TRAP 体系的影响 本研究中设定 5 个梯度的模板 DNA 量: 在 15 μ l 体系中含有 30 ng、60 ng、90 ng、120 ng 和 150 ng 模板 DNA, 从扩增效果来看, 30 ~ 120 ng 模板 DNA 的扩增效果都无明显的差异, 条带都较清晰和稳定 (图 4)。这说明 TRAP 标记对模板 DNA 浓度的要求较宽, 最终确定 DNA 浓度为 60 ng。

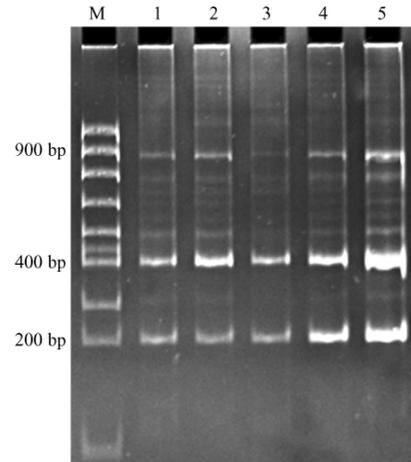


图4 不同 DNA 模板浓度下的荷包红鲤 TRAP 扩增效果

Fig.4 The TRAP patterns of Purse Red Carp based on different DNA template concentrations

M: 100 bp DNA 分子量标准; 1~5 泳道 DNA 模板的量: 30 ng, 60 ng, 90 ng, 120 ng, 150 ng。

M: 100 bp DNA ladder; DNA template amount of lane 1-5: 30 ng, 60 ng, 90 ng, 120 ng, 150 ng.

2.5 引物浓度对鲤 TRAP 体系的影响 参照 Hu 等^[1], 设定了固定引物浓度与随机引物浓度比值分别为: 100:3、30:1、10:1 和 10:6。从图 5 可见, 当引物浓度比为 100:3 时, 条带很少且不清晰, 但随着引物浓度比值的降低, 扩增条带逐渐清晰且丰富, 当引物浓度比值为 10:6 时, 条带清晰且丰富。

2.6 鲤 TRAP 反应体系的确定 以上述所确定的条件, 利用引物组合 E1 + Sa12-700 + Ga5-800 对 5 个不同群体鲤的 DNA 进行扩增, 以验证鲤 TRAP 扩增反应体系的效果。由扩增图

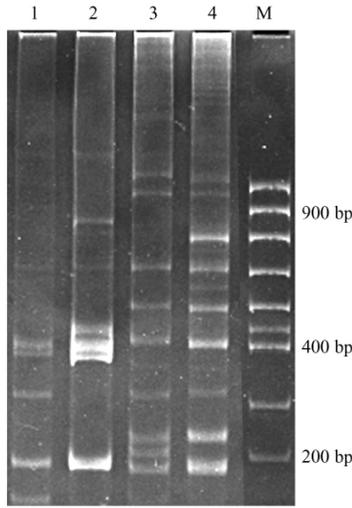


图 5 不同引物浓度下的荷包红鲤 TRAP 扩增效果
Fig. 5 The TRAP patterns of Purse Red Carp based on different primer concentrations

M: 100 bp DNA 分子量标准; 1~4 泳道固定引物浓度与随机引物浓度比值: 100:3; 30:1; 10:1; 10:6。
 M: 100 bp DNA ladder; Primer concentration ratio of lane 1~4: 100:3; 30:1; 10:1; 10:6.

(图 6)可以看出, 扩增条带多, 多态性和稳定性较好。

因此, 综合以上分析结果, 最终确定鲤

TRAP 标记最优扩增反应体系如下: 15 μl 反应总体系中, 含 60 ng 模板 DNA、1.5 μl 10 × PCR buffer、1.5 mmol/L Mg²⁺、0.35 mmol/L dNTPs、1.0 U *Taq* DNA 聚合酶, 两个随机引物浓度均为 3 pmol/L, 固定引物浓度 10 pmol/L, 固定引物与随机引物浓度比值为 10:6。

3 讨论

TRAP 标记的原理是利用生物信息工具和表达序列标签数据库信息, 对目标候选基因序列区进行扩增产生多态性分子标记。由于目前已获得许多物种基因组序列的丰富信息, 从而可以利用生物信息学工具和 NCBI 等生物信息数据库产生许多目标候选基因序列的 TRAP 多态性标记, 而且极易将性状与标记关联。分子标记重复性的好坏在某种程度上决定了一个分子标记的应用潜能, TRAP 技术使用了比 RAPD 更长的引物, 因而具有较好的重复性。它采用两个 18 个核苷酸引物, 一个为固定引物, 依据公用数据库中的靶 EST 序列设计; 另一个为随机引物, 是一段富含 GC 或 AT 核心区、可与内含子或外显子区配对的任意序列。Hu 等^[4]对莴苣的 53 个栽培品种和 45 株 RI 系及它们的

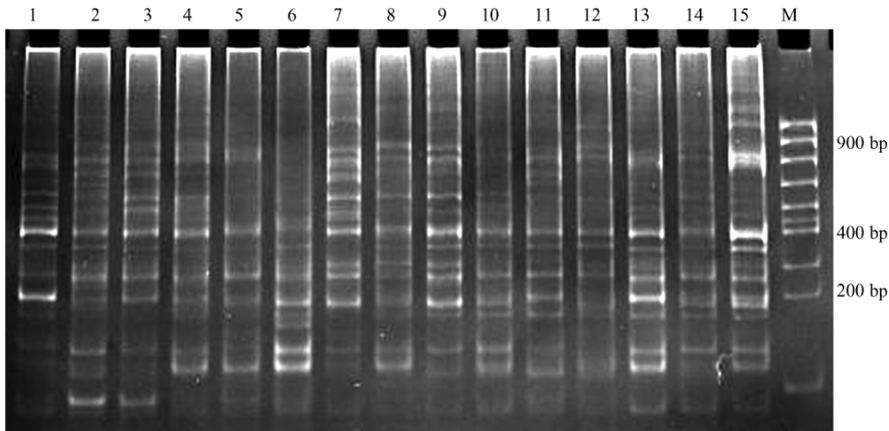


图 6 5 个不同鲤群体的 TRAP 扩增图

Fig. 6 The TRAP patterns of 5 different Common Carp (*Cyprinus carpio*) populations

M: 100 bp DNA 分子量标准; 1~3: 荷包红鲤; 4~6: 黄河鲤; 7~9: 建鲤; 10~12: 兴国红鲤; 13~15: 黑龙江野鲤。
 M: 100 bp DNA ladder; Lane 1~3: Purse Red Carp; Lane 4~6: Yellow River Carp; Lane 7~9: Jian Carp; Lane 10~12: Xingguo Red Carp; Lane 13~15: Heilongjiang Carp.

亲本扩增的结果显示,TRAP 标记具有很好的重复性。Hu 等^[11]对 38 份来自美国不同地区的菠菜 (*Spinacia oleracea*) 种质和 10 份商用的杂合体菠菜进行遗传多样性分析,12 对 TRAP 引物的组合共产生了 492 个片段,其中多态性条带有 96 条 (19.5%),且可以完全区分群体内 48 份样品,平均每对引物产生的遗传系数 (Dice) 是 57.5%。这个研究初步说明,TRAP 分子标记技术在遗传多态性的分析方面是一种高效的方法。另外,TRAP 标记能与其他类型的标记如 SARP、SSR、AFLP 等标记很好地整合,在构建遗传图谱、重要性状的分子标记、种质资源的多样性研究和标记辅助选择育种等研究中发挥着重要的作用^[12-14]。

本实验设计优化了鲤 TRAP 标记扩增体系,并对其中几个重要参数进行修正、优化。 Mg^{2+} 、dNTPs、引物和 *Taq* DNA 聚合酶都是 PCR 反应体系中重要的影响因素^[15-16]。 Mg^{2+} 是 *Taq* DNA 聚合酶的激活剂,同时又与 dNTP 和模板结合, Mg^{2+} 浓度过高,反应特异性降低,出现非特异扩增,浓度过低会降低 *Taq* DNA 聚合酶的活性,使反应产物减少。 Mg^{2+} 还影响引物与模板的结合效率、模板与 PCR 产物的解链稳定性及产物的特异性和引物二聚体的形成等。dNTPs 是 PCR 反应扩增的原料,必须达到一定的浓度才能满足要求,dNTPs 浓度过高会对扩增反应起到抑制作用,而浓度过低又会影响扩增产率。引物浓度较低时,降低与模板 DNA 结合效率,产物的产量就会受到影响。引物浓度偏高会引起错配和非特异性扩增,增加引物之间形成二聚体的机会。*Taq* DNA 聚合酶是 PCR 反应重要的影响因素,酶浓度过高会引起非特异性扩增,浓度过低则合成产物量减少^[16]。通过优化影响鲤 TRAP 体系各组分浓度,最终确立在 15 μ l PCR 反应体系中, Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L、dNTPs 浓度为 0.35 mmol/L、两个随机引物浓度均为 3 pmol/L、固定引物浓度为 10 pmol/L、含 DNA 模板 60 ng、*Taq* DNA 聚合酶 1.0 U。该反应体系在 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度和引物浓度上与草鱼 TRAP 体系^[7]均有不同,

尤其是在固定引物和随机引物的浓度及其比例上的差异较大,表明不同种鱼进行 TRAP-PCR 扩增时的反应体系可能是不相同的,不能简单地相互套用。草鱼和鲤虽然同属鲤科鱼类,但它们在基因组 DNA 含量上有较大的差异,草鱼的染色体数目 $2n = 48$,而鲤染色体数目 $2n = 100$ ^[17],这可能是造成两者在 TRAP-PCR 反应体系上有较大差别的原因。鲤 TRAP 反应体系 PCR 产物可统计片段大小大约在 50 ~ 900 bp 之间,而草鱼 PCR 产物可统计片段大小大约在 100 ~ 500 bp 之间^[7-8],依据 Hu 等^[1]的理论研究,这可能说明鲤比草鱼更适合使用 TRAP 标记进行相关方面的研究。通过引物浓度配比预实验,确定一条固定引物与两条随机引物浓度比值,运用这一反应体系,以 E1 + Sa12-700 + Ga5-800 为引物组合对 5 个群体的鲤 DNA 进行扩增,条带清晰稳定且丰富,多态性好。另外,本实验采用核酸染料 GoldView 染色方法对扩增产物进行检测,虽不及荧光标记放射自显影方法灵敏^[1],但相比银染方法^[7]检测灵敏度有所提高。

一般来说,扩增程序对扩增效果影响也较大^[16]。TRAP 反应条件采用复性变温法,开始 5 个循环采用非严谨退火温度,复性温度设为 35 $^{\circ}$ C,主要是考虑到低的复性温度能确保两个引物与靶 DNA 部分配对,允许一些错配,便于引物与靶 DNA 的结合,后 35 个循环采用严谨退火温度,复性温度升到 53 $^{\circ}$ C,保证了扩增产物的特异性,使得前 5 个循环的扩增产物可在余下循环中进行指数式扩增;如果复性温度在 40 个循环中都保持在 35 $^{\circ}$ C,则扩增片段重复性将很低。

TRAP 技术具有操作容易,重复性好,多态性丰富,效率高等特点,这一新的分子标记技术随着大规模测序技术的到来,必将具有广阔的应用前景。本实验通过优化影响 TRAP 体系扩增效果各组分因素 (Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、模板 DNA 和引物浓度),建立了稳定的鲤 TRAP 标记反应体系,为今后鲤种群遗传多样性研究和遗传图谱的构建提供了一种新的

分子标记。

参 考 文 献

- [1] Hu J ,Vick B A. TRAP (target region amplification polymorphism): a novel marker technique for plant genotyping. *Plant Molecular Biology Reporter* ,2003 ,21: 289 - 294.
- [2] 金梦阳 ,刘利列 ,付福友 ,等. 甘蓝型油菜 SRAP、SSR、AFLP 和 TRAP 标记遗传图谱构建. *分子植物育种* , 2006 4(4) :520 - 526.
- [3] Liu Z ,Anderson J A ,Hu J ,et al. A wheat intervarietal genetic linkage map based on microsatellite and target region amplified polymorphism markers and its utility for detecting quantitative trait loci. *Theoretical and Applied Genetics* 2005 ,111:782 - 794.
- [4] Hu J ,Ochoa O E ,Truco M J ,et al. Application of the TRAP technique to lettuce (*Lactuca sativa* L.) genotyping. *Euphytica* 2005 ,144:225 - 235.
- [5] Miklas P N ,Hu J ,Grunwald N J ,et al. Potential application of TRAP (targeted region amplified polymorphism) markers for mapping and tagging disease resistance traits in common bean. *Crop Science* 2006 46: 910 - 916.
- [6] 朱志凯 ,方良俊 ,招倩婷 ,等. 水稻 TRAP-PCR 反应体系优化与 P-糖蛋白基因片段的分析. *分子植物育种* , 2008 6(1) :65 - 70.
- [7] 张志伟 ,韩曜平 ,曹哲明. 草鱼 TRAP-PCR 反应体系的建立. *生物技术* 2006 ,16(2) :31 - 34.
- [8] 张志伟 ,曹哲明 ,周劲松 ,等. 不同种群草鱼遗传结构的 TRAP 分析. *农业生物技术学报* ,2006 ,14(4) : 517 - 521.
- [9] 曹哲明 ,张志伟 ,周劲松. TRAP 及 SSCP 检测草鱼微卫星序列多态性. *生物技术* 2005 5(6) :22 - 24.
- [10] Hu J. Defining the sunflower (*Helianthus annuus* L.) linkage group ends with the Arabidopsis-type telomere sequence repeat-derived markers. *Chromosome Research* , 2006 ,14:535 - 548.
- [11] Hu J ,Mou B Q ,Vick B A. Genetic diversity of 38 spinach (*Spinacia oleracea* L.) germplasm accessions and 10 commercial hybrids assessed by TRAP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 2007 54:1667 - 1674.
- [12] Hu J ,Vick B A ,Chen J F ,et al. Molecular mapping of a nuclear male-sterility gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) using TRAP and SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* 2006 ,113:122 - 127.
- [13] Chu G G ,Xu S S ,Faris J D ,et al. Whole genome mapping in a wheat doubled haploid population using SSRs and TRAPs and the identification of QTL for agronomic traits. *Molecular Breeding* 2008 22:251 - 266.
- [14] Yue B ,Vick B A ,Cai X ,et al. Genetic mapping for the Rf1 (fertility restoration) gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by SSR and TRAP markers. *Plant Breeding* , 2009 6:632 - 639.
- [15] 萨姆布鲁克 J ,拉塞尔 D W :黄培堂 ,等译. 分子克隆实验指南(3 版). 北京:科学出版社 ,2002:598 - 600.
- [16] 罗睿 ,郭建军. PCR 反应的动力学模拟和相关因素对扩增结果的影响. *贵州大学学报:自然科学版* ,2007 , 24(6) :653 - 660.
- [17] 李渝成 ,李康 ,周瞰. 十四种淡水鱼的 DNA 含量. *遗传学报* ,1993 ,10(5) :384 - 389.