

赵雅楠,王 颖,张东杰,等. 小豆 SSR-PCR 反应体系优化及引物筛选[J]. 江苏农业科学,2017,45(11):33-37.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.11.009

# 小豆 SSR-PCR 反应体系优化及引物筛选

赵雅楠<sup>1</sup>, 王 颖<sup>1,2</sup>, 张东杰<sup>1</sup>, 姜 多<sup>1</sup>

(1. 黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江大庆 163319; 2. 国家杂粮工程技术研究中心, 黑龙江大庆 163319)

**摘要:**为探索适宜小豆 SSR-PCR 反应的最佳条件以筛选具有多态性的 SSR 引物,采用  $L_{16}(4^5)$  正交设计优化影响小豆 SSR-PCR 反应的 5 个因素 ( $Mg^{2+}$  浓度、dNTPs 浓度、*Taq* 用量、引物浓度、模板 DNA 用量),利用优化后的 SSR-PCR 体系,以 10 份小豆种质为模板,对 80 对小豆(50 对)和绿豆(30 对)的 SSR 引物进行多态性筛选,得出小豆 SSR-PCR 的最佳反应体系 (20  $\mu$ L):  $Mg^{2+}$  浓度 2.5 mmol/L, dNTPs 浓度 1.0 mmol/L, *Taq* 活性 1.5 U, 引物浓度 0.6  $\mu$ mol/L, 模板 DNA 用量 30 ng。利用优化后的体系在小豆和绿豆引物中筛选出 31 对条带清晰、多态性丰富、重复性好的 SSR 引物,有效扩增率为 38.75%。小豆 SSR-PCR 优化体系的建立及多态性引物的筛选为进一步开展小豆遗传育种研究奠定了基础,为小豆遗传多样性分析和遗传图谱库构建等研究提供了技术参数和理论依据。

**关键词:**小豆;绿豆;SSR-PCR;体系优化;引物筛选;有效扩增率;遗传育种

**中图分类号:** S521.03 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)11-0033-05

小豆 (*Vigna angularis*) 是豆科 (Leguminosae) 蝶形花亚科 (Papilionaceae) 菜豆族 (Phaseoleae) 豇豆属 (*Vigna*) 的栽培豆种,富含蛋白质、矿物质、粗纤维、维生素等营养元素及三萜皂苷、无机盐等有效成分,具有清热除湿、消肿解毒等功效,是一种深受欢迎的医食同源作物<sup>[1]</sup>。然而小豆一直被视为小宗作物,基础性研究相对比较薄弱,特别是分子标记技术研究相对滞后,在小豆遗传多样性分析、遗传育种及种质创新等研究领域面临着严峻的挑战。

简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR) 是一类以 1~6 个碱基为基元的串联重复 DNA 序列,广泛分布于植物基因组中<sup>[2]</sup>。SSR 分子标记因其多态性丰富、重复性好、操作简便等特点逐渐成为植物遗传分析中的重要标记技术之一,广泛应用于遗传图谱构建<sup>[3]</sup>、种质资源鉴定<sup>[4]</sup>、新品种选育<sup>[5]</sup>等研究中。目前,小豆 SSR 标记技术主要集中在 QTL 定位<sup>[6]</sup>、遗传多样性分析<sup>[7]</sup>等研究领域,而关于小豆 SSR-PCR 反应体系建立与优化及多态性引物筛选方面鲜有报道。本研究利用  $L_{16}(4^5)$  正交设计探究影响小豆 SSR-PCR 反应的 5 个因素 ( $Mg^{2+}$  浓度、dNTPs 浓度、*Taq* 活性、引物浓度、模板 DNA 用量)的最优条件,同时运用优化后的体系进行引物筛选,旨在建立高效、稳定的小豆 SSR-PCR 反应体系,为小豆遗传多样性分析、遗传育种及群体遗传学探究奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

收稿日期:2016-10-20

基金项目:农村领域国家科技支撑计划(编号:2012BAD34B02);黑龙江省应用技术与开发重大项目(编号:GA14B104);黑龙江省大庆市科技局创新项目(编号:sjh-2013-65)。

作者简介:赵雅楠(1993—),女,黑龙江大庆人,硕士研究生,主要从事农产品加工与贮藏等研究。E-mail:zyn658@163.com。

通信作者:张东杰,博士,教授,博士生导师,主要从事农产品加工与贮藏等研究。E-mail:byndzdj@126.com。

1.1.1 DNA 模板 SSR-PCR 体系优化及引物筛选所选用的 10 份小豆样品均由黑龙江八一农垦大学农学院提供,详细信息如表 1 所示。

表 1 10 份小豆模板 DNA 信息

序号	名称	来源
1	云津红	天津市
2	品金红	山西省
3	农安红	吉林省
4	小红豆	黑龙江省
5	红小豆	辽宁省
6	珍珠粒	黑龙江省
7	红花小豆	吉林省
8	大花脸	黑龙江省
9	大红袍	黑龙江省
10	宝清红	内蒙古自治区

1.1.2 SSR 引物 试验所选用的 80 对 SSR 引物主要来源于 2 个部分:从 NCBI 数据库公布的小豆 SSR 引物中选择 50 对进行合成,另外 30 对引物从小豆近缘作物绿豆 SSR 引物中选择并合成。选用引物 X57 (F:5'-CACACTTCAAGGAAC-CTCAAG-3', R:5'-GTAGGCAACCTCCATTGAAC-3') 为 PCR 扩增体系优化试验的固定引物。80 对引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.1.3 主要试剂及仪器 SSR-PCR 反应所用的  $Mg^{2+}$ 、dNTPs、*Taq*、Buffer、标准分子量(marker)及植物基因组 DNA 提取试剂盒(plant genomic DNA kit),均购自天根生化科技(北京)有限公司。TBD-3000 核酸蛋白检测仪,购自上海同田生物技术股份有限公司;ABI Veriti™ 96 孔梯度 PCR 仪,购自美国 Applied Biosystems 公司;DYCP-31BN 琼脂糖电泳槽,购自北京六一生物科技有限公司;Power Pac HC 电泳仪,购自美国 BIO-RAD 公司;Tanon-6200 凝胶成像系统,购自上海天能科技有限公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取及检测 每份材料取室温种植 10~15 d 的

植株嫩叶,液氮研磨成粉,试剂盒提取 DNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的提取质量,核酸检测仪检测模板 DNA 用量与纯度,然后将其稀释成 30 ng/μL,于 -20 ℃ 保存备用。

1.2.2 SSR-PCR 正交试验设计 采用  $L_{16}(4^5)$  正交设计探究  $Mg^{2+}$  浓度、dNTPs 浓度、*Taq* 活性、引物浓度及模板 DNA 用量的最佳水平。选择 X57 为固定引物,正交试验因素及水平如表 2 所示,设计方案如表 3 所示,除表中变化因素外,每组试验体系还含有 2 μL 10 × Buffer,用 ddH<sub>2</sub>O 补足 20 μL。

表 3 小豆 SSR-PCR  $L_{16}(4^5)$  正交试验设计

试验号	$Mg^{2+}$ 浓度 (mmol/L)	dNTPs 浓度 (mmol/L)	<i>Taq</i> 活性 (U)	引物浓度 (μmol/L)	模板 DNA 用量 (ng)
1	1.0	0.5	0.5	0.4	20
2	1.0	1.0	1.0	0.6	30
3	1.0	1.5	1.5	0.8	40
4	1.0	2.0	2.0	1.0	50
5	1.5	0.5	1.0	0.8	50
6	1.5	1.0	0.5	1.0	40
7	1.5	1.5	2.0	0.4	30
8	1.5	2.0	1.5	0.6	20
9	2.0	0.5	1.5	1.0	30
10	2.0	1.0	2.0	0.8	20
11	2.0	1.5	0.5	0.6	50
12	2.0	2.0	1.0	0.4	40
13	2.5	0.5	2.0	0.6	40
14	2.5	1.0	1.5	0.4	50
15	2.5	1.5	1.0	1.0	20
16	2.5	2.0	0.5	0.8	30

1.2.3 SSR-PCR 扩增及检测 PCR 扩增反应程序:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,51 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 40 个循环;72 ℃ 延伸 12 min,4 ℃ 保存。每个处理取 6 μL PCR 产物,与 6 × DNA Loading 按 6 : 1 体积比混匀后在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳,以 Low MW DNA marker - A 为对照,在成像系统中观察结果。

1.2.4 SSR 引物筛选 利用 B0000725 小豆样品及已优化的体系初筛来自小豆(50 对)和绿豆(30 对)的 80 对 SSR 引物,然后以 B0000326 等 10 份来自 4 个省份的小豆样品 DNA 为模板,用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳复筛成功扩增的引物,选择扩增条带清晰、多态性丰富的 SSR 引物用于后期小豆 SSR 分子标记遗传多样性等研究。

2 结果与分析

2.1 DNA 的提取

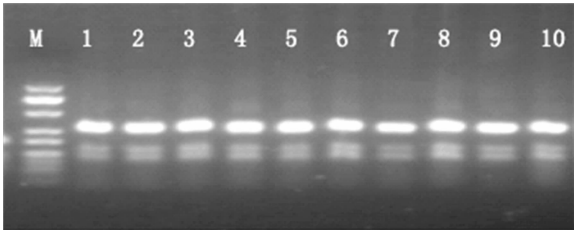
利用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (plant genomic DNA kit) 提取小豆的 DNA,  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值在 1.68 ~ 1.82 之间,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示条带清晰,无明显拖尾现象(图 1),表明模板 DNA 提取效果较好,浓度较高,可满足后续 SSR 分析需求。

2.2 SSR-PCR 正交试验结果直观分析

采用  $L_{16}(4^5)$  正交设计进行扩增,结果如图 2 所示,16 个处理均成功扩增,说明该正交设计中各因素的水平基本合理,没有偏离最适范围。平行比较 16 组处理可知,4、5、6、9、11、12 号处理扩增效果较差,条带较弱;2、3、8、10、13、14 号处理

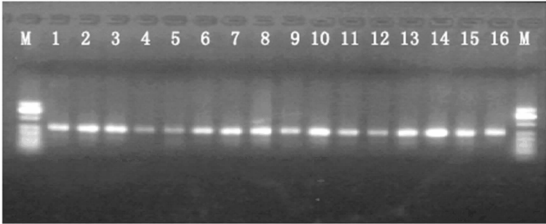
表 2 小豆 SSR-PCR 正交试验的因素和水平

水平	因素				
	$Mg^{2+}$ 浓度 (mmol/L)	dNTPs 浓度 (mmol/L)	<i>Taq</i> 活性 (U)	引物浓度 (μmol/L)	模板 DNA 用量 (ng)
1	1.0	0.5	0.5	0.4	20
2	1.5	1.0	1.0	0.6	30
3	2.0	1.5	1.5	0.8	40
4	2.5	2.0	2.0	1.0	50



M—标准分子量 marker; 1—天津市云津红; 2—山西省品金红; 3—吉林省农安红; 4—黑龙江省小红豆; 5—辽宁省红小豆; 6—黑龙江省珍珠粒; 7—吉林省红花小豆; 8—黑龙江省大花脸; 9—黑龙江省大红袍; 10—内蒙古省宝清红

图1 10 个小豆品种基因组 DNA 电泳检测结果



M—标准分子量 marker; 1~16 与表 3 中试验号——对应

图2 小豆 SSR-PCR 反应体系正交试验电泳检测结果

条带较好,其中条带最清晰、稳定性最好且杂带较少的是 14 号,赋值为 16,而条带最模糊,产量最少的是 4 号,赋值为 1。按照这种方法进行 2 次独立打分统计,取平均值,并求出各因素同一水平下的得分  $A_i$ 、平均值  $k_i$  及极差  $R$ ,  $k_i$  表示不同水

平下各因素对该体系的影响程度,  $k_i$  越大, 表示水平越好; 极差  $R$  值越大, 表示该因素对 PCR 体系的影响越大。由表 4 可知,  $Mg^{2+}$  浓度对 SSR-PCR 反应体系的影响最大, 其次是  $Taq$  活性, 其后依次是引物浓度、模板 DNA 用量, dNTPs 浓度影响最小。

### 2.3 SSR-PCR 正交试验方差分析

为减少试验误差, 增加结果的准确性, 弥补直观分析中极

表 4 SSR-PCR 正交试验极差分析结果

指标	$A_1$	$A_2$	$A_3$	$A_4$	$k_1$	$k_2$	$k_3$	$k_4$	$R$
$Mg^{2+}$ 浓度	32.0	32.0	22.5	49.0	8.000	8.000	5.625	12.250	6.625
dNTPs 浓度	31.5	42.0	33.0	29.0	7.875	10.500	8.250	7.250	3.250
$Taq$ 活性	28.5	23.5	47.0	36.5	7.125	5.875	11.750	9.125	5.875
引物浓度	35.5	41.5	38.5	20.0	8.875	10.375	9.625	5.000	5.375
模板 DNA 用量	40.0	40.5	31.0	24.0	10.000	10.125	7.750	6.000	4.125

表 5 SSR-PCR 反应体系正交设计方差分析结果

变异来源	Ⅲ型平方和	自由度	均方	$F$ 值	$P$ 值
$Mg^{2+}$ 浓度	181.094	16	60.365	9.242	0.001
dNTPs 浓度	56.594	3	18.865	2.888	0.101
$Taq$ 活性	152.844	3	50.948	7.801	0.002
引物浓度	123.844	3	41.281	6.321	0.003
模板 DNA 用量	91.094	3	30.365	4.640	0.015
误差	104.500	16	6.531		
总计	3 039.000	32			

### 2.4 不同水平下各因素对小豆 SSR-PCR 扩增的影响

2.4.1  $Mg^{2+}$  浓度对小豆 SSR-PCR 扩增的影响 作为  $Taq$  的辅助因子,  $Mg^{2+}$  主要通过影响  $Taq$  活性间接影响 SSR-PCR 扩增效果<sup>[8]</sup>。 $Mg^{2+}$  浓度过低会抑制  $Taq$  活性, 影响催化效果, 扩增条带较弱; 浓度过高则会增强  $Taq$  活性, 产生非特异性条带, 导致错配率增加。通过极差和方差分析可知,  $Mg^{2+}$  浓度对小豆 SSR-PCR 扩增的影响最大。由图 3 可知, 当  $Mg^{2+}$  浓度在 1.0 ~ 2.0 mmol/L 范围内时, 评分平均值逐渐降低, 扩增效果不佳; 当  $Mg^{2+}$  浓度在 2.0 ~ 2.5 mmol/L 时, 评分平均值逐渐增大, 并在 2.5 mmol/L 时达到最高值, 因此本试验选择最佳  $Mg^{2+}$  浓度为 2.5 mmol/L。

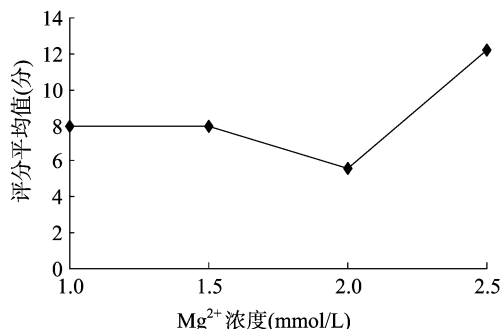


图3  $Mg^{2+}$  浓度对小豆 SSR-PCR 扩增的影响

2.4.2  $Taq$  活性对小豆 SSR-PCR 扩增的影响  $Taq$  在 SSR-PCR 反应中起催化作用, 是决定 PCR 扩增效果的正相关因素, 其活性受诸多因素的影响。作为对  $Mg^{2+}$  敏感的依赖性酶,  $Taq$  对扩增效果的影响主要表现在条带数量及亮度方面<sup>[9]</sup>。由图 4 可知,  $Taq$  活性与评分平均值的关系波动较大, 总体呈先下降后上升再下降的趋势, 在  $Taq$  活性为 1.5 U 时

差不能客观估计误差的不足, 本研究对试验结果进行方差分析, 结果如表 5 所示,  $Mg^{2+}$  浓度、 $Taq$  活性、引物浓度对反应体系的影响达到极显著水平 ( $P < 0.01$ ), 模板 DNA 用量对反应体系的影响达到显著水平 ( $P < 0.05$ ), 而 dNTPs 浓度对反应体系的影响未达到显著水平 ( $P > 0.05$ ), 这与极差分析结果一致, 充分说明误差对本试验的影响较小, 本试验结果准确、可靠。

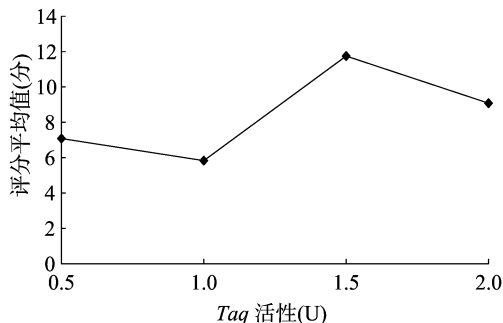


图4  $Taq$  活性对小豆 SSR-PCR 扩增的影响

评分达到最高, 因此本试验选择  $Taq$  最佳活性为 1.5 U。

2.4.3 引物浓度对小豆 SSR-PCR 扩增的影响 引物是决定 SSR-PCR 特异性的关键因素, 与模板 DNA 互补结合特异程度直接决定 PCR 产物的特异性, 引物浓度过高会增加引物二聚体的合成概率, 引发错配或非特异性扩增, 背景加深, 难以辨别特异性条带; 引物浓度过低则使扩增效率降低, 不能与模板 DNA 完全结合, 使扩增产物数量减少<sup>[10]</sup>。由图 5 可知, 引物浓度在 0.4 ~ 0.6  $\mu\text{mol/L}$  范围内时, 评分平均值逐渐上升, 当浓度大于 0.6  $\mu\text{mol/L}$  时, 评分平均值逐渐降低, 因此本试验选择 0.6  $\mu\text{mol/L}$  为最佳引物浓度。

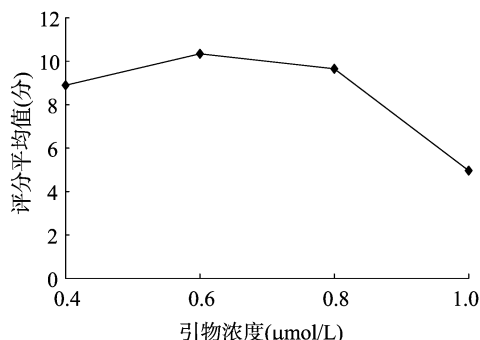


图5 引物浓度对小豆 SSR-PCR 扩增的影响

2.4.4 模板 DNA 用量对小豆 SSR-PCR 扩增的影响 充足的模板 DNA 是保证 SSR-PCR 扩增成功的基础, 模板 DNA 用量过高会影响  $Mg^{2+}$  发挥作用, 产生非特异性扩增, 甚至导致扩增失败; 用量过低则会降低扩增效率和产量, 出现条带太弱的情况。由图 6 可知, 当模板 DNA 用量在 20 ~ 30 ng 范围

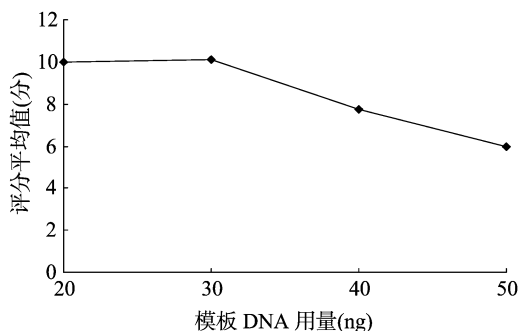


图6 模板 DNA 用量对小豆 SSR-PCR 扩增的影响

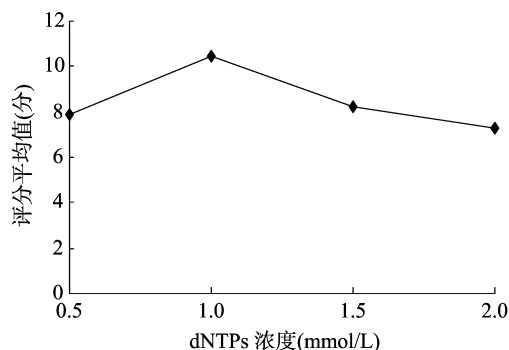


图7 dNTPs 浓度对小豆 SSR-PCR 扩增的影响

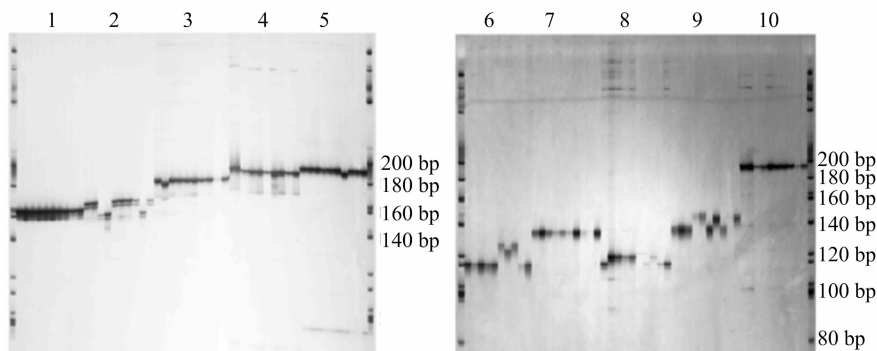
内时,评分平均值逐渐增大,当其浓度大于 30 ng 时,评分平均值呈下降趋势,因此选择 30 ng 为模板 DNA 的最佳用量。

**2.4.5 dNTPs 浓度对小豆 SSR-PCR 扩增的影响** dNTPs 是 SSR-PCR 反应的直接原料之一,dNTPs 浓度过高虽然可以提高反应速率,但会与 *Taq* 形成竞争关系,抑制其与  $Mg^{2+}$  结合,非特异性条带增多<sup>[11]</sup>;dNTPs 浓度较低则会使扩增条带减少。由图 7 可知,dNTPs 浓度在 0.5 ~ 2.0 mmol/L 范围内时,评分平均值呈先上升后下降的趋势,当 dNTPs 浓度为 1.0 mmol/L 时评分平均值达到最高水平,因此本试验选择

1.0 mmol/L 为 dNTPs 最佳浓度。

## 2.5 引物筛选

利用分别来自内蒙古自治区、黑龙江省、吉林省及辽宁省的 10 份不同小豆种质 DNA 及优化得到的反应体系对 80 对 SSR 引物进行多态性筛选,选择目标区域内条带清晰、多态性丰富、重复性好的核心引物用于后期小豆 SSR 研究。如图 8 所示,从 50 对小豆引物中筛选得到 22 对多态性引物,从 30 对绿豆引物中筛选得到 9 对多态性引物,共计 31 对,多态性比率为 38.75%。



1~5 分别为小豆引物 CEDG006、CEDG007、CEDG010、CEDG026、CEDG043;  
6~10 分别为绿豆引物 P3-135、P3-203、P3-765、P3-789、P3-835

图8 部分 SSR 引物筛选结果

## 3 讨论与结论

SSR 分子标记因其多态性丰富、可重复性强、操作简便等优点已成为遗传研究中比较成熟的标记技术之一,在作物基因标记、辅助育种、亲缘关系鉴定等研究中应用广泛<sup>[12]</sup>。而 PCR 反应是 SSR 标记中的重要环节,其中多个因素及各因素间的相互作用均会对 SSR 标记产生影响,PCR 扩增敏感性、特异性、产量等都可能因  $Mg^{2+}$  浓度、dNTPs 浓度、模板 DNA 用量、*Taq* 活性、引物浓度的不同而产生变化。因此,优化 SSR-PCR 体系,使反应中的各个因子达到最佳水平,并利用优化后的组合进行多态性引物筛选是基于 SSR 分子标记技术进行作物遗传育种研究的基础。

通常优化 SSR-PCR 体系都是采用单因素试验设计或正交试验设计。单因素分析处理较多,且不能兼顾各因素之间的相互作用,即在单因素试验中得到的各个因素的最佳水平组合扩增效果不一定最好。而正交试验设计是在全面试验中选择部分有代表性的处理组合,具有均衡分散性和整齐可比

性的特点,能够充分考虑各因素水平之间的交互作用,简单、便捷、高效,利用较少次数试验得到较佳的试验结果,可有效解决 SSR-PCR 优化所需试验量与实际可行试验次数之间的矛盾,利用有限的试验量全面掌握事物的内在规律是一种较理想的 SSR-PCR 优化途径<sup>[13]</sup>。本研究采用正交试验设计对影响小豆 SSR-PCR 反应的 5 个因素进行 4 个水平的优化,最终得到 SSR-PCR 的最佳反应条件:总体积 20  $\mu$ L,  $Mg^{2+}$  浓度为 2.5 mmol/L, dNTPs 浓度为 1.0 mmol/L, *Taq* 活性为 1.5 U,引物浓度为 0.6  $\mu$ mol/L,模板 DNA 用量为 30 ng,这与大豆<sup>[14]</sup>、芸豆<sup>[15]</sup>、水稻<sup>[16]</sup>、玉米<sup>[17]</sup>等作物已报道的 SSR-PCR 体系有所不同,说明 SSR-PCR 体系因物种不同而存在差异,在选用 PCR 试验方法时要根据实际情况进行调整,以形成适合物种研究的技术平台。此外,试验结果评价受一定主观因素的影响,建立一套客观、明确的评分标准有助于小豆 SSR-PCR 体系的准确建立和该优化方法的广泛应用,因此在接下来的试验中应对其进一步完善。

SSR-PCR 反应体系中,*Taq* 活性会对条带清晰度及数量

产生影响,而  $Mg^{2+}$  作为 *Taq* 的激活剂可调控其活性,进而影响扩增的特异性和忠实性。模板 DNA 用量过低会被杂带影响,用量过高则会产生拮抗作用,导致扩增失败。引物浓度会对反应的特异性及定位效果产生影响。dNTPs 则通过控制反应速率来影响 SSR-PCR 反应体系。由试验结果可知,  $Mg^{2+}$  浓度、dNTPs 浓度、*Taq* 活性、引物浓度、模板 DNA 用量对 SSR-PCR 体系有不同程度的影响,其中  $Mg^{2+}$  浓度、*Taq* 活性及引物浓度对反应体系的影响达到极显著水平 ( $P < 0.01$ ), DNA 模板用量对反应体系的影响达到显著水平 ( $P < 0.05$ ), 而 dNTPs 浓度对反应体系的影响未达到显著水平 ( $P > 0.05$ )。前人关于上述 5 个因素对 SSR-PCR 反应体系影响程度的排列顺序并不完全一致,表明各因素对反应体系的影响作用因物种的差异而不甚相同。王耀文等认为,引物浓度对苦荞 SSR-PCR 反应体系的影响最大<sup>[18]</sup>;而何仁锋等则认为,在药用菊花 SSR-PCR 反应体系中 *Taq* 活性是关键影响因素<sup>[19]</sup>;王志勇等对狗牙根 SSR-PCR 体系优化时发现,  $Mg^{2+}$  浓度对反应体系影响最大<sup>[20]</sup>;麦静等研究也发现,  $Mg^{2+}$  浓度和引物浓度对厚朴 SSR-PCR 体系影响达极显著水平<sup>[21]</sup>,本研究结果与之相似。同时本研究还发现,dNTPs 浓度对小豆 SSR-PCR 反应体系的影响不大,当 dNTPs 浓度为 0.5~2.0 mmol/L 时对反应影响不显著,这可能是因为 PCR 反应对 dNTPs 浓度的要求不高,满足反应需求即可。

SSR 引物一般分为根据物种序列自主开发和通用近缘作物引物 2 种途径。引物开发必须以基因组序列已知为前提,且操作繁琐、工作量较大、费用高,而近缘作物转移法为引物开发提供了新的思路。近缘作物间具有不同程度的基因同源性,因此 SSR 引物往往在不同作物间具有一定的通用性,将一种引物开发较成熟作物的 SSR 引物通用于其近缘作物来获得 SSR 位点的方法不仅可以减少工作量、降低费用,还可以为不同作物间遗传关系的研究提供理论依据<sup>[22]</sup>。本研究将 30 对绿豆 SSR 引物通用于小豆进行扩增,筛选得到 9 对适宜小豆 SSR 分析的引物,证明绿豆 SSR 引物适用于小豆,利用近缘物种间 SSR 引物具有通用性的特点进行遗传研究的思路是可取的,这既为小豆 SSR 多态性引物的筛选提供便利,同时也为小豆的遗传学研究奠定了基础。但本研究中获得的小豆 SSR 引物数量较少且多态性水平较低,不能满足后期小豆 SSR 标记研究的需要,因此在接下来的研究中要继续加强对小豆 SSR 引物筛选的工作,为小豆遗传育种、种质资源研究等夯实基础。

#### 参考文献:

- [1]于章龙,段欣,武晓娟,等. 红小豆功能特性及产品开发现状[J]. 食品工业科技,2011(1):360-363.
- [2]Ravi M, Geethanjali S, Sameeyafarheen F, et al. Molecular marker based genetic diversity analysis in rice (*Oryza sativa* L.) using RAPD and SSR markers[J]. Euphytica,2003,133(2):243-252.
- [3]Moncada M D, Tovar E, Montoya J C, et al. A genetic linkage map of coffee (*Coffea arabica* L.) and QTL for yield, plant height, and bean size[J]. Tree Genetics & Genomes,2015,12(1):1-17.
- [4]Utami D W. Development of SSR marker set to identify forty two indonesian soybean varieties[J]. ET Journal,2015,11(2):49-58.
- [5]Taeprayoon P, Tanya P, Sukha L, et al. Genetic background of three commercial oil palm breeding populations in Thailand revealed by SSR markers[J]. Australian Journal of Crop Science,2015,9(4):281-288.
- [6]Venkataramana P B, Gowda R, Somta P, et al. Mapping QTL for bruchid resistance in rice bean (*Vigna umbellata*) [J]. Euphytica, 2016,207(1):135-147.
- [7]Chen H L, Liu L P, Wang L X, et al. Development of SSR markers and assessment of genetic diversity of adzuki bean in the Chinese germplasm collection [J]. Molecular Breeding, 2015, 35 (10):1-14.
- [8]Ashkani S, Rafii M Y, Shabanimofrad M, et al. Multiplex SSR-PCR approaches for semi-automated genotyping and characterization of loci linked to blast disease resistance genes in rice [J]. Comptes Rendus Biologies,2015,338(11):709-722.
- [9]Chen S Q, Zheng X J, Cao H R, et al. A simple and efficient method for extraction of *Taq* DNA polymerase [J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2015, 18(5):355-358.
- [10]Arismendi N, Bruna A, Zapata N, et al. PCR-specific detection of recently described *Lotmaria passim* (Trypanosomatidae) in Chilean apiaries [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2016, 134:1.
- [11]Jaramillo M C, Martínezduarte R, Hüttener M, et al. Increasing PCR sensitivity by removal of polymerase inhibitors in environmental samples by using dielectrophoresis [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2013,43(10):297-303.
- [12]Shitta N S, Abberton M T, Adesoye A I, et al. Analysis of genetic diversity of African yam bean using SSR markers derived from cowpea [J]. Plant Genetic Resources - Characterization and Utilization, 2016,14(1):50-56.
- [13]Yang T T, Li - Qiang M U. Optimizing SSR-PCR system of *Panax ginseng* by orthogonal design [J]. Journal of Forestry Research, 2007,18(1):31-34.
- [14]苏辉,李志刚,宋书宏. 正交设计优化大豆 SSR-PCR 反应体系及引物筛选[J]. 华北农学报,2009,24(2):99-102.
- [15]陈明丽,王兰芬,薛仁凤,等. 基于普通菜豆基因组测序开发 SSR 标记[C]//中国作物学会 50 周年庆祝会暨 2011 年学术年会论文集. 北京:中国作物学会,2011.
- [16]Tanweer F A, Rafii M Y, Sijam K, et al. Identification of suitable segregating SSR markers for blast resistance in rice using inheritance and disease reaction analysis in backcross families[J]. Australasian Plant Pathology,2015,44(6):619-627.
- [17]Ho J C, Kresovich S, Lamkey K R. Extent and distribution of genetic variation in US maize [J]. Crop Science,2005,45(5):720-725.
- [18]王耀文,夏楠,韩瑞霞,等. 苦荞 SSR-PCR 反应体系的优化及引物筛选[J]. 贵州农业科学,2011,39(4):4-8.
- [19]何仁锋,冯尚国,陈喆,等. 药用菊花 SSR-PCR 反应体系优化及引物筛选[J]. 分子植物育种,2015(2):367-378.
- [20]王志勇,郭海林,刘建秀. 正交设计优化狗牙根 SSR-PCR 反应体系[J]. 分子植物育种,2007,5(增刊1):201-206.
- [21]麦静,杨志玲,杨旭,等. 濒危植物厚朴 SSR 引物筛选及反应体系优化[J]. 生态与农村环境学报,2015,31(4):600-607.
- [22]倪先林,赵甘霖,刘天朋,等. SSR 分子标记在糯高粱种质资源遗传多样性分析中的应用[J]. 江苏农业学报,2015,31(1):16-22.