

# 番木瓜SCoT反应体系建立及引物筛选

杨祥燕<sup>1</sup>, 蔡元保<sup>1\*</sup>, 郭凌飞<sup>2</sup>, 周全光<sup>1</sup>, 陈豪军<sup>1</sup>, 孙光明<sup>3</sup>

(1. 广西亚热带作物研究所, 南宁 530001; 2. 厦门市农业机械监理所, 福建 厦门 361009; 3. 中国热带农业科学院南亚热带作物研究所, 广东 湛江 524091)

**摘要:** 采用单因素试验方法对番木瓜(*Carica papaya* L.) SCoT-PCR 反应体系进行了优化, 并对引物进行了筛选。结果表明, 在 20  $\mu$ L 的番木瓜 SCoT-PCR 反应体系中, 包含 2.0 mmol L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup>, 0.3 mmol L<sup>-1</sup> dNTPs, 0.8  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> 引物, 30 mg L<sup>-1</sup> 模板 DNA 和 1.0 U *Taq* 聚合酶。运用该体系对不同引物和 22 个番木瓜品种进行验证, 扩增的稳定性、可靠性良好, 且分辨率较高, 同时筛选出多态性丰富的 5 条引物和 5 对引物组合。因此, 优化的番木瓜 SCoT-PCR 反应体系可用于种质鉴定和遗传多样性分析。

**关键词:** 番木瓜; SCoT; 单因素试验; 体系优化; 引物筛选

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2012.06.007

## Establishment of SCoT Amplification System and Primer Selection for *Carica papaya*

YANG Xiang-yan<sup>1</sup>, CAI Yuan-bao<sup>1\*</sup>, GUO Ling-fei<sup>2</sup>, ZHOU Quan-guang<sup>1</sup>, CHEN Hao-jun<sup>1</sup>, SUN Guang-ming<sup>3</sup>

(1. Guangxi Subtropical Crops Research Institute, Nanning 530001, China; 2. Xiamen Supervision Department of Agricultural Machinery, Xiamen 361009, China; 3. South Subtropical Crops Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang 524091, China)

**Abstract:** The SCoT-PCR system for *Carica papaya* was optimized by using single factor experiment method, such as Mg<sup>2+</sup>, dNTPs, primer, *Taq* polymerase and DNA template, and the SCoT primers were selected with optimized system. The results showed that the optimum concentrations for *Carica papaya* SCoT-PCR amplification were 2.0 mmol L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup>, 0.3 mmol L<sup>-1</sup> dNTPs, 0.8  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> primer, 1.0 U *Taq* polymerase, and 30 mg L<sup>-1</sup> template DNA in total 20  $\mu$ L reaction system, respectively. The optimum SCoT-PCR system was tested on 22 varieties of *Carica papaya* by different SCoT primers, obtaining steady, reliable and high resolution bands. Five primers and five pairs of primer combination were selected with abundant polymorphism. It was suggested that the optimum SCoT-PCR system and polymorphism primers could be used in the germplasm identification and genetic diversity analysis of *Carica papaya*.

**Key words:** *Carica papaya*; SCoT; Single factor experiment; Optimization of system; Selection of primer

目标起始密码子多态性分子标记(Start codon targeted polymorphism, SCoT)是Collard和Mackill<sup>[1]</sup>于2009年在水稻(*Oryza sativa*)上提出的一种基于单引物扩增反应的新型分子标记。该标记根据植物基因中ATG翻译起始位点侧翼序列的保守性,

设计单引物并对基因组进行扩增,产生偏向候选功能基因区显性多态性标记。具有操作简单、成本低廉、多态性高、引物通用、可获得丰富的遗传信息等诸多优点,已成功应用于水稻<sup>[1]</sup>、花生(*Arachis hypogaea*)<sup>[2]</sup>、甘蔗(*Saccharum* sp.)<sup>[3]</sup>等常见农作物

收稿日期: 2011-12-20 接受日期: 2012-02-17

基金项目: 广西壮族自治区直属公益性科研院所基本科研业务费专项(桂热研 201006)资助

作者简介: 杨祥燕,女,硕士,助理研究员,主要从事果树栽培学研究。E-mail: yangxiangyan84412@126.com

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: caiyuanbao205@163.com

中,而且在园艺植物遗传多样性研究中也较为广泛应用,如芒果(*Mangifera indica*)<sup>[4]</sup>、龙眼(*Dimocarpus longan*)<sup>[5]</sup>、柑橘(*Citrus reticulata*)<sup>[6]</sup>等。

番木瓜(*Carica papaya* L.)是一种优质的热带、亚热带果树,其种质资源的研究常滞后于育种实践。这导致番木瓜种质资源不能被有效利用,在杂交亲本选配上存在较大的盲目性。应用分子标记对番木瓜种质资源进行系统分析,可以大大地提高其育种的效率。目前,国外应用分子标记对番木瓜种质资源的研究已开展了大量的工作<sup>[7-9]</sup>,在国内分子标记主要应用于番木瓜性别鉴定<sup>[10-12]</sup>、基因差异表达分析<sup>[13]</sup>以及部分品种遗传多样性分析<sup>[14]</sup>。但其种质资源的遗传多样性研究尚未满足目前国内番木瓜育种工作的需要。SCoT 标记具有独特的优点,能有效地产生与性状相关的标记,将有利于番木瓜分子辅助育种,但该标记在番木瓜中的应用还未见报道。已有的研究表明<sup>[7-9,14]</sup>,番木瓜栽培品种间的亲缘关系非常接近,随机引物难以区分品种间的差异。因此,筛选出多态性丰富的引物将为 SCoT 标记在番木瓜中的广泛应用奠定良好的基础。本文采用单因素试验方法优化了番木瓜 SCoT-PCR 反应体系,首次建立适合于番木瓜的 SCoT-PCR 反应体系,并进行了单双引物相结合的引物筛选,为番木瓜的种质资源遗传多样性评价、指纹图谱构建、分子标记辅助选择育种和遗传改良等研究提供可靠的技术支持。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试材料番木瓜(*Carica papaya* L.)品种 22 份,分别是‘穗中红 48 号’、‘美中红’、‘桂热 1 号’、‘桂热 2 号’、‘日升’、‘白皮日升’、‘万顷沙’、‘红铃’、‘红铃 2 号’、‘台农 1 号’、‘穗黄’、‘红妃’、‘蓝茎’、‘圆优’、‘红日 1 号’、‘庞博 1 号’、‘庞博 2 号’、‘庞博 3 号’、‘新世纪’、‘风云’、‘兴农矮 48-2 号’和‘夏威夷’。其中‘蓝茎’品种用于 SCoT-PCR 反应体系的优化,风云品种用于检验该反应体系对不同引物(组合)的稳定性和可靠性。以上材料均取自广西亚热带作物研究所番木瓜种质资源圃,选取健康植株上的无病虫害幼嫩叶片,液氮速冻后于 -70℃ 保存。

### 1.2 基因组DNA提取

采用 CTAB 法<sup>[15]</sup>提取番木瓜基因组 DNA,用

1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量;用 Biophotometre 型核酸蛋白仪检测其浓度,稀释至 20 mg L<sup>-1</sup>,置于 -20℃ 保存备用。

### 1.3 SCoT-PCR 扩增

SCoT 引物参考 Collard 和 Mackill<sup>[1]</sup>的方法设计,分别用 SC1~SC60 表示,均由上海生工合成。SCoT-PCR 扩增程序为:94℃ 预变性 5 min;然后 94℃ 变性 1 min, 50℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 90 s,共 35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。扩增结束后,每管产物加入 3 μL 上样缓冲液,混匀后取 5 μL 扩增产物,在含有核酸染料的 1.8% 琼脂糖凝胶中电泳,电极缓冲液为 0.5 × TBE,电压小于 5 V cm<sup>-1</sup>,电泳结束后,于凝胶成像系统上检测并拍照。

### 1.4 SCoT-PCR 体系优化

用番木瓜蓝茎品种 DNA 为模板,以 SC2 作为扩增引物,将 Mg<sup>2+</sup>、dNTPs、引物、DNA 模板、*Taq* 聚合酶等 5 种影响因素各设置 5 个水平(表 1),采用单因素设计对番木瓜 SCoT-PCR 反应体系进行优化。当进行某一因素水平试验时,其它因素取第 3 个水平,以筛选每一因素的最佳浓度,最后组合成为最佳反应体系。dNTPs 和 *Taq* 聚合酶均购自天根生化科技(北京)有限公司。SCoT-PCR 反应体系总体积为 20 μL,不足用 ddH<sub>2</sub>O 补足。单因素试验重复 2 次,以确定 SCoT-PCR 最适的反应体系。

表 1 番木瓜 SCoT-PCR 反应体系中的因素水平

Table 1 Factor design of SCoT-PCR system for *Carica papaya*

因素 Factor	水平 Level				
Mg <sup>2+</sup> (mmol L <sup>-1</sup> )	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
dNTPs (mmol L <sup>-1</sup> )	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
引物 Primer (μmol L <sup>-1</sup> )	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
DNA (mg L <sup>-1</sup> )	10	20	30	40	50
<i>Taq</i> polymerase (U)	0.25	0.50	1.00	1.50	2.00

### 1.5 SCoT-PCR 优化体系验证

根据所确定的 SCoT-PCR 最适反应体系,选择 15 条 SCoT 引物和 15 对 SCoT 引物组合,以番木瓜‘风云’品种的 DNA 为模板分别进行 PCR 扩增,以验证该最适反应体系的稳定性和可靠性。同样,在该反应体系下,选用引物 SC3 和引物组合 SC3+SC20 分别对 22 份番木瓜材料进行 PCR 扩增,从而进一步确证最适的番木瓜 SCoT-PCR 扩增体系。

### 1.6 多态性SCoT引物筛选

根据 SCoT-PCR 最适反应体系,用 6 个形态差异较大的番木瓜品种对 60 条 SCoT 引物和 40 对 SCoT 随机引物组合进行筛选,筛选出扩增条带清晰且重复性和多态性良好的引物和引物组合,并记录每个引物(组合)扩增出的重复性强且清晰的总扩增条带和多态性条带,模糊不清的条带不予记录;在每个相同基因位点上将清晰且可重复出现的条带记为 1,同一位置没有条带记为 0。按照 Botstein 公式计算多态信息含量  $PIC = 1 - \sum P_i^2$ ,式中  $P_i$  表示第  $i$  种基因型出现的频率<sup>[16]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 单因素的影响

从图 1 可见,随着  $Mg^{2+}$  浓度的增高,扩增谱带的数量及亮度呈上升趋势;当  $Mg^{2+}$  浓度为  $2.0 \text{ mmol L}^{-1}$  时,其扩增谱带最明亮、清晰、数目最多;而  $Mg^{2+}$  浓度超过  $2.0 \text{ mmol L}^{-1}$  时,扩增谱带减少,且条带模糊。因此,选择  $2.0 \text{ mmol L}^{-1}$  为  $Mg^{2+}$  最适浓度。

dNTPs 浓度在  $0.1\sim 0.2 \text{ mmol L}^{-1}$  时,扩增的谱

带较少,在  $0.3\sim 0.5 \text{ mmol L}^{-1}$  时,扩增出的谱带很相似,谱带明亮、清晰、数目多,从节约成本考虑,选择  $0.3 \text{ mmol L}^{-1}$  为最适浓度。

引物浓度为  $0.2 \mu\text{mol L}^{-1}$  和  $1.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,谱带都比较少且模糊;其余 3 个浓度扩增的谱带数量多且亮度较好,以  $0.8 \mu\text{mol L}^{-1}$  的扩增效果最佳。因此,选择  $0.8 \mu\text{mol L}^{-1}$  为最适浓度。

模板 DNA 浓度为  $10 \text{ mg L}^{-1}$  时,扩增不完全,条带较少;当浓度为  $20 \text{ mg L}^{-1}$  时,扩增谱带清晰度明显增加,条带也明显增多;浓度为  $30\sim 50 \text{ mg L}^{-1}$  时,扩增效率最高,所得谱带清晰易辨,而且无明显差异。本着经济高效的原则,选择  $30 \text{ mg L}^{-1}$  为引物最适浓度。

随着 *Taq* 聚合酶浓度的提高,条带亮度增加,同时也出现模糊拖影。浓度为  $1.0\sim 2.0 \text{ U}$  时均能成功扩增,但以浓度为  $1.0 \text{ U}$  的条带明亮清晰,无模糊拖影现象,故选择  $1.0 \text{ U}$  为最适 *Taq* 聚合酶浓度。

由此可见,在总体积为  $20 \mu\text{L}$  的最适番木瓜 SCoT-PCR 反应体系中,包含  $2.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$ ,  $0.3 \text{ mmol L}^{-1}$  dNTPs,  $0.8 \mu\text{mol L}^{-1}$  引物,  $30 \text{ mg L}^{-1}$  模板 DNA 和  $1.0 \text{ U}$  *Taq* 聚合酶。

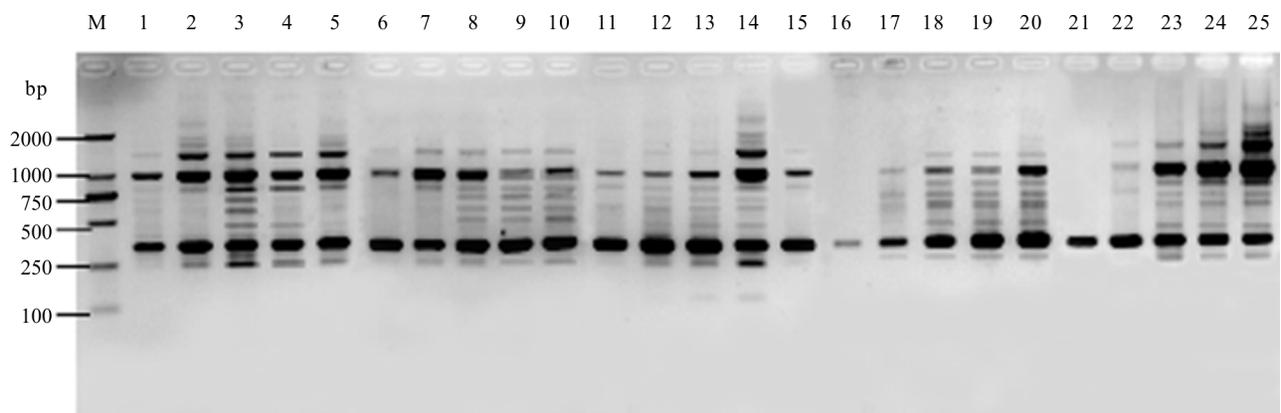


图 1 影响因素对 SCoT 反应的影响。M: DL 2000 marker; 1~5:  $1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$ ; 6~10:  $0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 \text{ mmol L}^{-1}$  dNTPs; 11~15:  $0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 \mu\text{mol L}^{-1}$  引物; 16~20:  $10, 20, 30, 40, 50 \text{ mg L}^{-1}$  模板 DNA; 21~25:  $0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 \text{ U}$  *Taq* 聚合酶。  
Fig. 1 Effects of factor concentration on SCoT reaction. M: DL 2000 marker; 1~5:  $1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$ ; 6~10:  $0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 \text{ mmol L}^{-1}$  dNTPs; 11~15:  $0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 \mu\text{mol L}^{-1}$  primer; 16~20:  $10, 20, 30, 40, 50 \text{ mg L}^{-1}$  template DNA; 21~25:  $0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 \text{ U}$  *Taq* polymerase, respectively.

### 2.2 SCoT-PCR反应体系验证

#### 2.2.1 在不同引物和引物组合中的稳定性和可靠性

以番木瓜风云品种的 DNA 为模板,选择 15 条 SCoT 引物和 15 对 SCoT 引物组合应用优化后的 SCoT-PCR 反应体系分别进行 PCR 扩增。从图 2

和图 3 可见,该反应体系在不同引物和引物组合中的扩增效果良好,扩增图谱清晰明亮,分辨率较高,说明获得的 SCoT-PCR 反应体系稳定可靠,扩增效果良好。

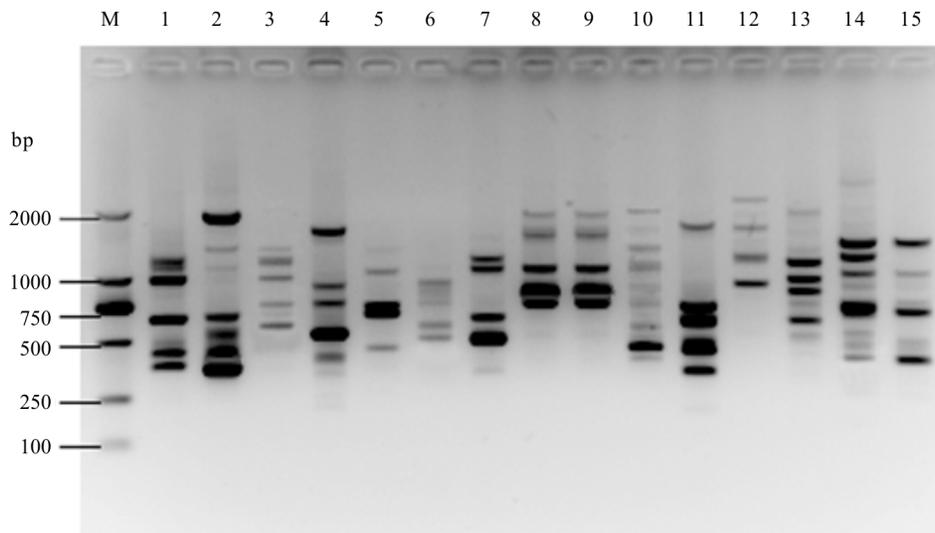


图2 15条SCoT引物对番木瓜的SCoT-PCR扩增。M: DL 2000 marker; 1~15分别为引物SC2、SC4、SC11、SC14、SC19、SC22、SC23、SC27、SC28、SC36、SC38、SC41、SC55、SC57和SC60。

Fig. 2 SCoT-PCR amplification of *Carica papaya* by 15 primers. M: DL 2000 marker; 1~15 present primer SC2, SC4, SC11, SC14, SC19, SC22, SC23, SC27, SC28, SC36, SC38, SC41, SC55, SC57 and SC604, respectively.

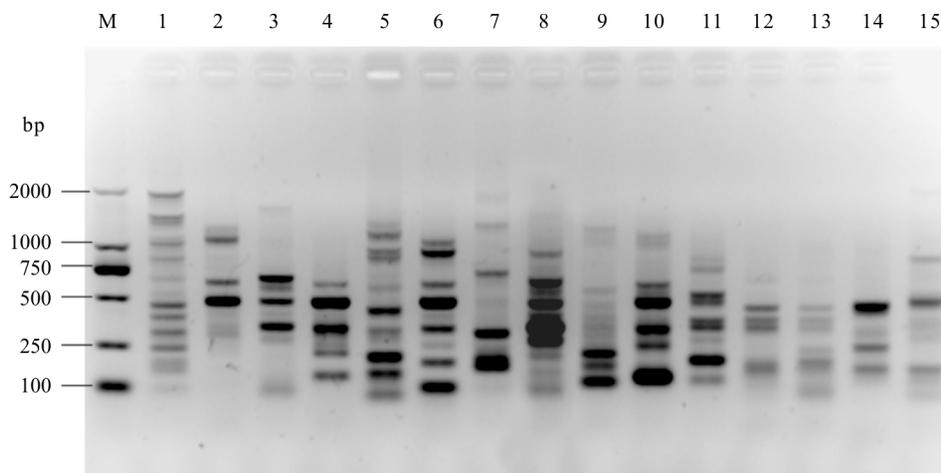


图3 15对SCoT引物组合对番木瓜的SCoT-PCR扩增。M: DL 2000 marker; 1~15分别为引物组合SC4+SC20、SC20+SC23、SC23+SC55、SC22+SC23、SC39+SC55、SC23+SC39、SC4+SC39、SC23+SC59、SC20+SC36、SC23+SC36、SC36+SC55、SC3+SC19、SC2+SC59、SC13+SC15和SC4+SC55。

Fig. 3 SCoT-PCR amplification of *Carica papaya* by 15 primer combinations. M: DL 2000 marker; 1~15 present primer combination SC4+SC20, SC20+SC23, SC23+SC55, SC22+SC23, SC39+SC55, SC23+SC39, SC4+SC39, SC23+SC59, SC20+SC36, SC23+SC36, SC36+SC55, SC3+SC19, SC2+SC59, SC13+SC15 and SC4+SC55, respectively.

### 2.2.2 在22份番木瓜种质中的稳定性和可靠性

以SC3和SC3+SC20为引物,用优化的反应体系分别对22个番木瓜种质进行SCoT-PCR扩增(图4)。结果表明该反应体系对不同番木瓜种质中的扩增效果良好,其扩增条带清晰,分辨率较高,多态性好,而且引物组合SC3+SC20扩增条带的多态性比单引物SC3更为丰富,说明优化体系具有良好的稳定性、可靠性,以及较高的分辨率,适用于番木

瓜SCoT-PCR分析。

### 2.3 多态性SCoT引物筛选

本研究采用所优化的最佳体系对引物进行了筛选(表2)。结果表明:(1)筛选出多态性丰富的5条引物和5对引物组合,这些引物扩增出107条条带,平均每个引物(组合)扩增出10.7条;具有多态性的条带有72条,平均每个引物(组合)扩增出7.2

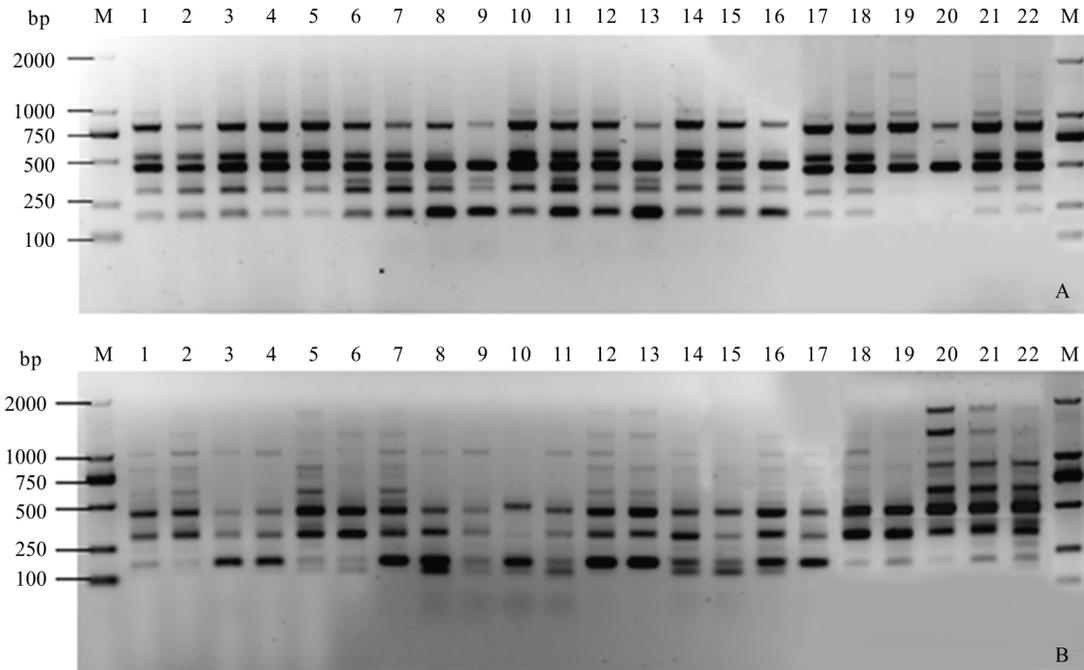


图4 引物 SC3 (A)和引物组合 SC3+SC20 (B)对番木瓜的 SCoT-PCR 扩增。M: DL 2000 marker; 1~22 分别为‘穗中红 48 号’, ‘美中红’, ‘桂热 1 号’, ‘桂热 2 号’, ‘日升’, ‘白皮日升’, ‘万顷沙’, ‘红铃’, ‘红铃 2 号’, ‘台农 1 号’, ‘穗黄’, ‘红妃’, ‘蓝茎’, ‘圆优’, ‘红日 1 号’, ‘庞博 1 号’, ‘庞博 2 号’, ‘庞博 3 号’, ‘新世纪’, ‘风云’, ‘兴农矮 48-2 号’和‘夏威夷’。

Fig. 4 SCoT-PCR amplification of *Carica papaya* germplasm by primer SC3 (A) and primer combination SC3+SC20 (B). M: DL 2000 marker; 1–22 present ‘Suizhonghong 48’, ‘Meizhonghong’, ‘Guire 1’, ‘Guire 2’, ‘Risheng’, ‘Baipirisheng’, ‘Wanqinsha’, ‘Hongling’, ‘Hongling 2’, ‘Tainong 1’, ‘Suihuang’, ‘Hongfei’, ‘Lanjing’, ‘Yuanyou’, ‘Hongri 1’, ‘Panbo 1’, ‘Panbo 2’, ‘Panbo 3’, ‘Xinshiji’, ‘Fengyun’, ‘Xinnongai 48-2’, and ‘Xiaweiyi’, respectively.

表 2 SCoT 引物在番木瓜中扩增出的多态性

Table 2 Polymorphism in *Carica papaya* by SCoT primers

引物 Primer	总扩增条带数 Total bands	多态性条带数 Polymorphic bands	多态性百分率 % of polymorphic	多态性信息含量 Polymorphism information content (PIC)
SC3	8	5	62.50	0.61
SC23	10	6	60.00	0.65
SC46	10	5	50.00	0.61
SC59	14	8	57.14	0.80
SC60	10	5	50.00	0.51
SC3+SC20	11	9	81.82	0.79
SC4+SC23	11	8	72.72	0.75
SC19+SC36	11	10	90.91	0.74
SC20+SC23	10	8	80.00	0.76
SC23+SC55	12	8	66.67	0.53
平均数 Mean	10.7	7.2	67.18	0.68

条多态性条带。(2) 这些多态性引物的多态性百分率为 50.00%~90.91%, 平均每个引物(组合)的多态性百分率为 67.18%, 整体上 5 对引物组合的多态性百分率比 5 条单引物高, 其中引物组合 SC19+SC36 的多态性百分率最高, 为 90.91%, 其次是引物组合

SC3+SC20 和 SC20+SC23。(3) 这些多态性引物的多态性信息含量 PIC 为 0.51~0.80, 平均每个引物(组合)的 PIC 为 0.68, 5 对引物组合的平均 PIC 比 5 条单引物稍高, 其中引物 SC59 的 PIC 最高, 为 0.80。

### 3 讨论

SCoT 标记是基于 PCR 技术用单引物扩增反应的新型分子标记,受反应条件和扩增程序以及物种的影响。从本试验结果来看,不同组合的反应体系对 SCoT-PCR 扩增结果的影响很大。可见,对番木瓜的 SCoT-PCR 反应条件进行优化是非常必要的。

Mg<sup>2+</sup> 对 PCR 扩增的特异性和产量有显著的影响。本试验中选择 2.0 mmol L<sup>-1</sup> 为 Mg<sup>2+</sup> 最适浓度,大于和小于这个浓度,扩增谱带数目明显减少,清晰度和明亮度明显降低。而且不同浓度下的差异明显,说明 5 个主要影响因素之中, Mg<sup>2+</sup> 浓度对扩增谱带的影响尤为明显。这与张君玉等<sup>[17]</sup>和韩国辉等<sup>[18]</sup>的研究结论基本一致。

除 Mg<sup>2+</sup> 外, dNTPs、引物、模板 DNA、Taq 聚合酶的浓度均影响 PCR 扩增效率。本试验结果表明, dNTPs 浓度和引物浓度虽在实验范围内均能扩增出明亮清晰的条带,但 dNTPs 浓度太低,谱带数目明显减少,而引物浓度过低和过高的扩增效果都不甚满意。随着模板 DNA 浓度和 Taq 聚合酶浓度的提高,扩增条带变化不大,但模板 DNA 浓度不应太低,否则易导致扩增失败。Taq 聚合酶浓度过高,出现条带弥散现象。因此, dNTPs、引物、模板 DNA、Taq 聚合酶 4 个影响因素在特定的浓度范围内,对扩增产物影响都不大。这与陈虎<sup>[19]</sup>等用单因素方法优化龙眼 SCoT-PCR 扩增体系的结论一致。

对于同种标记,不同物种对各个影响因素的要求不同,所以在做标记前,应对各主要影响因素和反应程序进行调整,以建立适合该物种的反应体系。本试验没有对 SCoT-PCR 反应程序进行优化,而是选用了初始程序。结果表明,利用初始程序也能得到很好的效果。

目前,应用分子标记对番木瓜种质资源的遗传多样性研究的结果表明,番木瓜栽培品种间的亲缘关系非常接近<sup>[7-9,14]</sup>。这导致常规的特征引物法不能很好地鉴定出品种间的差异。本研究结果表明,引物组合的多态性百分率和 PIC 都比应用特征引物法的单引物高。可见,引物组合法可克服特征引物法的缺点,可以将亲缘关系较近的品种区分开来,大大地提高了鉴别效率。PIC 能反映出某一个遗传标记所包含的或所能提供的遗传信息的容量,当 PIC > 0.5 时,该座位为高度多态性座位<sup>[20]</sup>。

本试验经引物筛选获得 5 条引物和 5 对引物组合的平均 PIC 为 0.68,属于高度多态性引物;而且平均多态性百分率为 67.18%。这些多态性引物将为番木瓜种质鉴定、遗传多样性分析、遗传图谱构建等应用奠定良好基础。

### 参考文献

- [1] 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.
- [2] Xiong F Q, Jiang J, Zhong R C, et al. Application of SCoT molecular marker in genus *Arachis* [J]. *Acta Agron Sin*, 2010, 36(12): 2055–2061.  
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.
- [3] Wu J M, Li Y R, Wang A Q, et al. Differential expression of gibberellin-induced genes for stalk elongation of sugarcane analyzed with cDNA-Scot [J]. *Acta Agron Sin*, 2010, 36(11): 1883–1890.  
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.
- [4] Luo C, He X H, Chen H, et al. Analysis of diversity and relationships among mango cultivars using start codon targeted (SCoT) markers [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2010, 38(6): 1176–1184.
- [5] Chen H, He X H, Luo C, et al. Analysis on the genetic diversity of 24 longan (*Dimocarpus longan*) accessions by SCoT markers [J]. *Acta Hort Sin*, 2010, 37(10): 1651–1654.  
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.
- [6] Han G H, Xiang S Q, Wang W X, et al. Establishment and application of SCoT molecular marker system for *Citrus* [J]. *Acta Hort Sin*, 2011, 38(7): 1243–1250.  
韩国辉, 向素琼, 汪卫星, 等. 柑橘 SCoT 分子标记技术体系的建立及其在遗传分析中的应用 [J]. *园艺学报*, 2011, 38(7): 1243–1250.
- [7] Stiles J I, Lemme C, Sondur S, et al. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars [J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 85(6/7): 697–701.
- [8] Jobin-Decor M P, Gramam G C, Henry R J, et al. RAPD and isozyme analysis of genetic relationships between *Carica papaya* and wild relatives [J]. *Genet Resour Crop Evol*, 1997, 44(5): 471–477.
- [9] Kim M S, Moore P H, Zee F, et al. Genetic diversity of *Carica papaya* as revealed by AFLP markers [J]. *Genome*, 2002, 45(3): 503–512.

- [10] Zhou G H, Li H P, Zhang S G, et al. RAPD markers for hermaphrodite gene in papaya [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2001, 9(3): 190–193.  
周国辉, 李华平, 张曙光, 等. 番木瓜两性基因的RAPD标记 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2001, 9(3): 190–193.
- [11] He Y S, Shen W T, Li X Y, et al. Rapid identification of papaya sex type by multiplex polymerase chain reaction [J]. *Chin J Trop Crops*, 2008, 29(3): 347–351.  
何尧声, 沈文涛, 黎小瑛, 等. 利用多重PCR技术快速鉴定番木瓜性别 [J]. *热带作物学报*, 2008, 29(3): 347–351.
- [12] Guo X, Zhang Y, Liu Z Y. Development of sex linked AFLP-derived SCAR markers in *Cairca papaya* [J]. *Sci Agri Sin*, 2009, 42(3): 967–973.  
郭霞, 张艳, 刘志勇. 番木瓜性别连锁的AFLP及其SCAR标记的建立 [J]. *中国农业科学*, 2009, 42(3): 967–973.
- [13] Shen Y H, Chen X J, Lu B G, et al. cDNA-AFLP analysis and cloning of fruit ripening-related genes from papaya [J]. *Acta Hort Sin*, 2011, 38(6): 1081–1088.  
申艳红, 陈晓静, 卢秉国, 等. 番木瓜果实成熟相关基因的cDNA-AFLP分析及克隆 [J]. *园艺学报*, 2011, 38(6): 1081–1088.
- [14] Huang J C, Ren C X, Li L, et al. RAPD analysis of 17 papaya cultivars/lines [J]. *J SW Univ (Nat Sci)*, 2007, 29(6): 91–94.  
黄建昌, 任朝兴, 李凌, 等. 17个番木瓜品种(系)的RAPD分析 [J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2007, 29(6): 91–94.
- [15] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19(1): 11–15.
- [16] Anderson J A, Churchill G A, Autrique J E, et al. Optimizing parental selection for genetic linkage maps [J]. *Genome*, 1993, 36(1): 181–186.
- [17] Zhang J Y, Guo D L, Gong Y, et al. Optimization of start codon targeted polymorphism PCR (SCoT-PCR) system in *Vitis vinifera* [J]. *J Fruit Sci*, 2011, 28(2): 209–214.  
张君玉, 郭大龙, 龚莹, 等. 葡萄目标起始密码子多态性反应体系的优化 [J]. *果树学报*, 2011, 28(2): 209–214.
- [18] Han G H, Wang W X, Xiang S Q, et al. Establishment and optimization of SCoT system in polyploidy loquats [J]. *J Fruit Sci*, 2011, 28(3): 433–437.  
韩国辉, 汪卫星, 向素琼, 等. 多倍体枇杷SCoT分析体系的建立与优化 [J]. *果树学报*, 2011, 28(3): 433–437.
- [19] Chen H, He X H, Luo C, et al. The optimization of SCoT-PCR system of longan (*Dimocarpus longan*) [J]. *Genom Appl Biol*, 2009, 28(5): 970–974.  
陈虎, 何新华, 罗聪, 等. 龙眼SCoT-PCR反应体系的优化 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2009, 28(5): 970–974.
- [20] Vanhala T, Tuiskula-Haavisto M, Elo K, et al. Evaluation of genetic variability and genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers [J]. *Poult Sci*, 1998, 77(6): 783–790.