

# 中国板栗 EST-SSR 分子标记 在栲树中的通用性分析

李春<sup>1,2</sup>, 孙晔<sup>1,3\*</sup>

(1. 中国科学院 华南植物园, 广州 510650; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049; 3. 中国科学院 华南植物园 植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广州 510650)

**摘要:** 简单重复序列也称为微卫星分子标记, 不仅在同属近缘种间具有良好的通用性, 甚至在近缘属间也具有一定的通用性。本研究利用壳斗科基因组信息数据库中公布的中国板栗 124 对多态的 EST-SSR 引物在栲树中进行跨属(栗属到栲属)通用性研究, 结果显示中国板栗 EST-SSR 引物在栲树中通用性和多态性分别为 42.7% 和 56.6%; 使用 19 对多态的 EST-SSR 引物对 4 个栲树自然居群的遗传多样性进行初步分析, 结果显示栲树自然居群具有较高的遗传多样性 ( $N_a=6.105$ ,  $H_o=0.563$ ,  $H_e=0.621$ )。这些引物为栲树群体遗传学的深入研究提供了有力工具。

**关键词:** 中国板栗; 栲树; EST-SSR; 通用性

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2012)03-0293-05

## Transferability analysis of EST-SSR markers of *Castanea mollissima* to *Castanopsis fargesii*

LI Chun<sup>1,2</sup>, SUN Ye<sup>1,3\*</sup>

(1. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

**Abstract:** Simple sequence repeats (SSR), also known as microsatellite molecular markers, have been cross-amplified successfully in closely related species of the same genus and even across genera within the same family. In the present study, 124 primer pairs of polymorphic EST-SSR originally developed from *Castanea mollissima* were cross-amplified in *Castanopsis fargesii*. Results indicated that 42.7% of *Castanea mollissima* EST-SSR primers were successfully cross-amplified in *Castanopsis fargesii* and 56.6% were polymorphic. The genetic diversity of 4 populations of *C. fargesii* were investigated with polymorphic EST-SSRs, preliminary results showed that *C. fargesii* possessed high levels of genetic diversity ( $N_a=6.105$ ,  $H_o=0.563$ ,  $H_e=0.621$ ). These polymorphic EST-SSR primers would provide a powerful tool for further investigation on population genetics of *C. fargesii*.

**Key words:** *Castanea mollissima*; *Castanopsis fargesii*; EST-SSR; transferability

简单重复序列 (Simple sequence repeats, SSR) 是一类广泛分布在真核生物基因组的编码区和非编

码区中, 由 1~6 个核苷酸的重复单元组成的串联重复序列 (Morgante & Olivieri, 1993), 它们被认为是

\* 收稿日期: 2011-12-28 修回日期: 2012-02-26

基金项目: 国家自然科学基金 (30871959, 31170512); 中国科学院生命科学领域基础前沿研究专项 (KSCX2-EW-J-28); 大科学装置工程项目 (2009-LSFGBOWS-01) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (30871959, 31170512); Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (KSCX2-EW-J-28); Large-Scale Scientific Facilities Research Project (2009-LSFGBOWS-01)]

作者简介: 李春 (1986-), 男 (苗), 湖南龙山人, 硕士研究生, 研究方向为保育遗传学, (E-mail) lcharry@qq.com。

\* 通讯作者: 孙晔, 男, 博士, 从事进化植物学研究, (E-mail) sun-ye@scib.ac.cn。

动植物研究中最强大、信息含量最丰富的一种分子标记,也称为微卫星分子标记(Peakall 等,1998)。在众多的分子标记中,微卫星分子标记以其多态性高、共显性遗传、广泛分布、模板 DNA 需求少等优点在遗传多样性和遗传作图研究中得以广泛应用(Estoup 等,1995; Gupta & Varshney, 2000; Liu 等,2000; Jarne & Lagoda, 1996; Powell 等,1996)。表达序列标签(expressed sequence tags, EST)来源于某一组织总 mRNA 所构建的 cDNA,是从一个随机选择的 cDNA 克隆进行 5'端或 3'端单一次测序获得的短的 cDNA 部分序列,代表一个完整基因的一小部分(Semagn 等,2010)。EST-SSR 就是基于 EST 序列开发的 SSR,与功能基因具有直接或者间接地联系,因此它与传统的基因组 SSR 相比,在适应性进化和关联遗传学分析等方面具有更为广阔的应用前景(Oetjen & Reusch, 2007; Varshney 等, 2005; Barbará 等,2007)。EST-SSR 的侧翼序列比较保守,因而引物在近缘种间可能具有通用性(Barbará 等,2007, Zane 等,2002)。杨彦伶等(2008)研究了杨树 SSR 标记在柳树中的通用性,包括 EST-SSR 标记和基因组标记,通用性分别为 54.2%和 10.4%。胥猛等(2008)研究了鹅掌楸 EST-SSR 引物的通用性,在同属的中国马褂木和同科不同属的白玉兰中的通用性分别为 85%和 54%。使用近缘种的 SSR 引物,省略了 SSR 序列测序和引物设计过程,具有快捷和经济的特点,在非模式物种的研究中运用广泛。

壳斗科基因组信息数据库(<http://www.fagaceae.org>)是美国为恢复受到栗疫病侵害而致濒的美洲栗种群而建立数据库,公布了大量的壳斗科植物特别是板栗和橡树的基因组数据信息,目前已公布中国板栗 847 952 个 EST 序列,其中 24 655 个含有 SSR 序列,3 226 个已设计 PCR 引物,其中 124 对引物已证实具有多态性。如此大量的 EST-SSR 序列为我国壳斗科植物遗传学研究提供大量的分子标记。中国板栗(*Castanea mollissima*)属于壳斗科栗属,栲属和栗属属于姊妹群,具有极密切的亲缘关系(李建强,1996)。本研究使用该数据库中已证实具有多态性的 124 对中国板栗 EST-SSR 标记,检测这些标记在栲树(*Castanopsis fargesii*)中的通用性,以期为栲树居群遗传学、适应性进化和物种形成等研究提供有力的工具。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究所用 4 个栲树居群均来自江西省(表 1)。每个居群随机选取 22-24 个个体,每两个个体间的距离大于 25 m。采集新鲜嫩叶用变色硅胶保存,使用改良的 CTAB 法提取植物基因组总 DNA(Sun 等,2010)。

表 1 栲树居群信息

Table 1 Samples of *Castanopsis fargesii* population

居群编号 Code	采样点 Location	纬度(N) Latitude	经度(E) Longitude	海拔(m) Altitude	个体数 Numbers
LS	庐山	29.522	115.901	239	24
DGS	大岗山	27.585	114.561	345	24
JGS	井冈山	26.533	114.192	528	22
JLS	九连山	24.532	114.462	646	24

### 1.2 EST-SSR 引物通用性和多态性分析

从壳斗科基因组数据库(<http://www.fagaceae.org>)下载中国板栗 EST-SSR 文件包(CCall\_v2\_ssrReport),包含了 3 226 条已经设计引物的 EST 序列,124 对已证实具有多态性。本实验选取这 124 对 EST-SSR 引物,由上海生物工程有限公司合成,在栲树居群中扩增并进行多态性分析。PCR 扩增反应体系为 10  $\mu$ L,包括:1  $\times$  Buffer (10 mmol/L Tris-HCl, pH8.3, 500 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>), 200  $\mu$ mol/L dNTP, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 正反向引物各 0.2 mmol/L, 0.4 U Taq DNA 聚合酶(上海申能博彩),约 20 ng DNA 模板。扩增程序:94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min;然后 94  $^{\circ}$ C 变性 45 s, 50~60  $^{\circ}$ C (引物退火温度见表 2)退火 45 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 35 个循环;最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物使用 6%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,后进行银染显色(Sanguinetti 等,1994)。先从 4 个居群中各取两个个体进行 EST-SSR 的预筛选实验。经检测有清晰条带出现,即确认该引物可以在栲树中有效扩增;如果 8 个个体扩增出来的条带为单态,将个体数适当增加,结果仍为单态即确认该引物在栲树中为单态引物。

### 1.3 栲树遗传多样性分析

引物筛选完成后,选择了 19 对多态引物进行荧光标记(表 2),对 4 个栲树居群进行基因分型。在开展多重荧光标记实验时,为了尽量保证分型的准确性,我们根据目的片段大小进行有效组合(最好保

表 2 19 对引物信息  
Table 2 Characteristics of 19 EST-SSR loci

引物编号 Primer code	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	荧光标记 Labelling dye	$T_m$	$N_a$	$N_e$	$H_o$	$H_e$	$FIS$
CC7378	CACTCTCTCCGGTCCATGAT AATGTGGCGAGTTCGGTAAC	TAMRA	57	4.000	2.043	0.479	0.510	0.068
CC704	CATCATGGCAGAACTCATC GAAGCAAGGCATGAGTGACA	HEX	56	3.000	1.066	0.043	0.062	0.321
CC5223	AGAAAAAGCACTGCCTCCAA AAGCATCAACCACAACACCA	ROX	60	2.000	1.973	0.500	0.493	-0.009
CC4323	TCGGTACAACCTTCTGGGTCC AGCCTCTTCTCCACAACGAA	FAM	60	6.000	3.891	0.691	0.743	0.075
CC42860	TTGTCCATAGCCAAAGCAAA GGCCATGAACTTAACCCAAA	HEX	59	5.000	2.023	0.468	0.506	0.080
CC41004	TGCATACATACCAACCCAG GGTCTTCTCCTCGCTCCTTT	ROX	60	12.000	7.690	0.681	0.870	0.222*
CC403	GAAGAAGTGTGAAGGCCG CACCATTCCAATTGGTGACA	TAMRA	57	9.000	3.560	0.677	0.719	0.063
CC3754	CAAAACCCAGAAGTCCAGA GTAGAGGCCACAGAGGCAAG	ROX	57	10.000	5.507	0.585	0.818	0.290*
CC33079	CTCTCCCGAGTCACGAAGAC CGAAACCTAGGAAGGAAGG	ROX	56	4.000	2.211	0.479	0.548	0.131
CC29846	GCCAGCAGCAATATCTGTGA ACTTCTCCAAAAGGCTGCAA	FAM	57	5.000	1.860	0.468	0.462	-0.007
CC 2448	ATTTCCCATGTGCTCAAACC GGCATTGGAGTTCACCTTGT	TAMRA	56	3.000	2.217	0.628	0.549	-0.138
CC 2091	TTTGCAAAAGATGTGGTGGA TACAAAGCCACCCTATTGGC	HEX	60	11.000	5.622	0.793	0.822	0.040
CC20303	AGTGGTGGTGTTTCCCAAAG AGAAGAGCTTCCTTCCCCTG	TAMRA	58	5.000	1.534	0.298	0.348	0.149
CC20223	GGCAATGCAGTGACAAAAGA AGCACTAGGGGTTTTCCGAT	ROX	57	7.000	5.151	0.606	0.806	0.253*
CC1944	TTCAGAAATCAGAGCAGCGA TCCACACCAAGAAATCCCTC	HEX	57	9.000	4.454	0.785	0.775	-0.007
CC19322	CAAAAGCCGAATGGTATAGA GTTGGAGAGAAGGAGCGTTG	ROX	55	5.000	2.796	0.710	0.642	-0.100
CC17354	CGAAAGGAGAGCAGGAAATG TCTCAACGCCTTCCTTTGTT	ROX	57	4.000	3.132	0.521	0.681	0.239*
CC14826	GAAACAACAGGCTCTGCCTC CTGGGAAAATCCGAACTCAA	HEX	57	5.000	2.668	0.641	0.625	-0.020
CC125	CCGTTCCTCACTCCTCAG CCCATTTGGATAAACAACACA	TAMRA	54	7.000	5.451	0.649	0.817	0.210*
平均值 Mean value				6.105	3.413	0.563	0.621	0.098

注： $T_m$  为退火温度； $N_a$  为观测等位基因； $N_e$  为有效等位基因； $H_o$  为观测杂合度； $H_e$  为期望杂合度； $FIS$  为固定指数；\* 显著偏离哈温平衡( $P < 0.05$ )。下同。

Note:  $T_m$ , anneal temperature;  $N_a$ , number of alleles;  $N_e$ , number of effective alleles;  $H_o$ , observed heterozygosity;  $H_e$ , expected heterozygosity;  $FIS$ , fixation index; \* significantly departed from Hardy-Weinberg( $P < 0.05$ ). The same below.

证不同荧光的目的片段有 50 bp 的间隔),减少引物间的相互影响。同时为了避免影子带(Stutter)可能产生的干扰,所以只选择了这 19 对带型非常清晰的引物进行了群体的基因分型。PCR 条件同上所述,PCR 产物使用 ABI377 测序仪电泳分离,内标使用 LIZ500。用 GeneMarker (<http://www.softgenet->

[ics.com/GeneMarker.html](http://www.softgenet-ics.com/GeneMarker.html)) 确定各位点上的等位基因;用 GenAlEx 6(Peakall & Smouse,2006)计算观测等位基因数( $N_a$ )、有效等位基因数( $N_e$ )、观测杂合度( $H_o$ )、期望杂合度( $H_e$ );用 FSTAT 2.9.3 (Goudet,2001)计算固定指数( $FIS$ ),并检测哈迪-温伯格平衡和连锁不平衡。

表 3 栲树居群遗传多样性  
Table 3 Population genetic diversity  
of *Castanopsis fargesii*

居群编号 Code	$N_a$	$N_e$	$H_o$	$H_e$	$FIS$
九连山 JLS	4.842	3.026	0.498	0.562	0.114
大岗山 DGS	4.939	3.094	0.516	0.569	-0.026
井冈山 JGS	5.094	3.202	0.541	0.597	0.026
庐山 LS	5.257	3.266	0.547	0.603	-0.006
平均 mean	5.033	3.147	0.526	0.583	0.027

## 2 研究结果

### 2.1 EST-SSR 引物的通用性和多态性

引物筛选实验结果表明在 124 对中国板栗 EST-SSR 引物中,有 53 对能在栲树上扩增出清晰的条带,其中 30 对具有多态性,23 对为单态引物,通用性(通用性=有效扩增引物数量÷引物总数×100%)和多态性(多态性=有效扩增的多态引物数量÷有效扩增引物数量×100%)分别为 42.7%和 56.6%。

### 2.2 栲树物种及居群遗传多样性

19 个位点共检测到 116 个等位基因,每个位点上等位基因数目为 2~12 个,平均 6.105;有效等位基因数( $N_e$ )为 1.066~7.690,平均 3.413;观测杂合度( $H_o$ )为 0.043~0.793,平均 0.563;期望杂合度( $H_e$ )为 0.062~0.870,平均 0.621;使用 Bonferoni 校正后,有 5 个位点显著偏离哈迪-温伯格平衡( $P < 0.05$ ),但未检测到连锁不平衡现象(Rice, 1989)(表 2)。

4 个居群的等位基因数( $N_a$ )为 4.842~5.257,平均 5.033;有效等位基因数( $N_e$ )为 3.026~3.266,平均 3.147;平均观测杂合度( $H_o$ )为 0.526,平均期望杂合度( $H_e$ )为 0.583。观测杂合度( $H_o$ )庐山居群最高,九连山居群最小;固定指数( $FIS$ )大岗山居群最小,九连山居群最高;4 个居群均符合哈迪-温伯格平衡(表 3)。

## 3 结论与讨论

SSR 标记的引物常在属内种间、以及亲缘关系较近的属间具有保守性,这一特点使得 SSR 标记可以在种间,甚至是属间可转移使用(Peakall 等, 1998)。与传统引物开发方法相比,SSR 引物在近

缘种属间的可转移性应用大大地降低了 SSR 引物的开发成本。Barbará 等(2007)统计了 1997~2006 年发表在 Molecular Ecology 和 Molecular Ecology Notes 等期刊上有关 SSR 引物的 64 篇文章,结果显示引物在种间通用性的高低与 2 个物种亲缘关系远近具有相关性,亲缘关系越近,引物的通用性越高。Ueno 等(2009)研究了栲属植物 *Castanopsis sieboldii* 的 16 对 EST-SSR 引物在水青冈属(*Fagus*)、柯属(*Lithocarpus*)、栗属(*Castanea*)和栎属(*Quercus*) 4 属 8 个种中的通用性,结果在 37.5%~87.5%之间。本研究在上述研究结果接近。124 对中国板栗引物中筛选得到 53 对(42.7%)引物能在栲树上有效扩增,其中 30 对(55.6%)具有多态性。

徐立安等(2001)利用核基因组 SSR 研究了福建省 4 个栲树居群的遗传多样性, $N_a = 9$ , $H_o = 0.69$ , $H_e = 0.65$ 。本研究利用 19 个 EST-SSR 标记揭示栲树具有较高的遗传多样性。在江西省的 4 个栲树居群中, $N_a = 6.105$ , $H_o = 0.563$ , $H_e = 0.621$ 。与徐立安等(2001)的研究结果相比,本研究中 EST-SSR 揭示的遗传多样性相对偏低。EST 是基因转录序列,因受到功能的约束而具有较强的保守性。已有研究证实一些木本树种如杨树和欧洲板栗中 EST-SSR 多态性较 Genomic-SSR 偏低(宋跃朋等, 2010; Martin 等, 2010)。更有证据表明 EST-SSR 具有功能上的重要性(Li 等, 2004; Roorkiwal & Sharmal, 2011)。

19 个 EST-SSR 位点中有 5 个位点偏离哈温平衡。经 FreeNA(Chapuis & Estoup 2007)检测,这 5 个位点的零等位基因频率偏高(数据未显示),因此可能是零等位基因频率偏高或者样本量偏少导致这些位点偏离了哈温平衡。

近年来,随着测序技术的发展及费用的降低,各个数据库公布的 EST 序列呈爆炸式增长。壳斗科植物基因组信息数据库公布的大量 EST 序列,为壳斗科植物的分子生物学研究提供了宝贵的资源。栲树是我国亚热带常绿阔叶林的建群种,广泛分布于我国长江以南各地,具有重要的经济与生态价值。我国栲树遗传多样性的研究有利于对栲树生物资源保护和合理的开发利用提供科学依据。本研究获得的 30 对多态的 EST-SSR 引物不仅为栲树居群遗传学研究提供了有力的工具,另外,由于 EST-SSR 是与功能基因直接或者间接相关的,本研究筛选得到的 EST-SSR 引物为栲树的适应性进化和物种形成

研究提供了合适的工具。

### 参考文献:

- Barbará T, Palma-Silva C, Paggi GM, *et al.* 2007. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations[J]. *Mol Ecol*, **16**(18):3 759—3 767
- Burnham CR. 1988. The restoration of the American chestnut: mendelian genetics may solve a problem that has resisted other approaches[J]. *Am Sci*, **76**(5):478—487
- Chapuis MP, Estoup A. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation[J]. *Mol Biol Evol*, **24**(3): 621—631
- Estoup A, Garnery L, Solignac M, *et al.* 1995. Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models[J]. *Genetics*, **140**(2):679—695
- Goudet J. 2001. FSTAT: A program to estimate and test gene diversities and fixation indices[R]. Version 2.9.3. From <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- Gupta PK, Varshney RK. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat[J]. *Euphytica*, **113**(3):163—185
- Jarne P, Lagoda P. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back[J]. *Trends Plant Sci*, **11**(10):424—429
- Li YC, Korol AB, Fahima T, *et al.* 2004. Microsatellites Within Genes: Structure, Function, and Evolution[J]. *Mol Biol Evol*, **21**(6):991—1 007
- Liu S, Cantrell RG, McCarty JC, *et al.* 2000. Simple Sequence Repeat-based assessment of genetic diversity in Cotton race stock accessions[J]. *Crop Sci*, **40**:1 459—1 469
- Li JQ(李建强). 1996. The origin and distribution of the family Fagaceae(山毛榉科植物的起源和地理分布)[J]. *Acta Phytotaxonom Sin*(植物分类学报), **34**(4): 376—396
- Li MF(李明芳), Zheng XQ(郑学勤). 2004. Research progress of methods of SSR primers development(开发 SSR 引物方法之研究动态)[J]. *Hereditas*(遗传), **26**(5):769—776
- Martin MA, Mattioni C, Cherubini M. 2010. Genetic diversity in European chestnut populations by means of genomic and genic microsatellite markers[J]. *Tree Genet Genomes*, **6**(5):735—744
- Morgante M, Olivieri AM. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics[J]. *Plant J*, **3**(1):175—182
- Oetjen K, Reusch TBH. 2007. Genome scans detect consistent divergent selection among subtidal vs. intertidal populations of the marine angiosperm *Zostera marina* [J]. *Mol Ecol*, **16**(24):5 156—5 157
- Peakall R, Gilmore S, Keys W, *et al.* 1998. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants[J]. *Mol Biol Evol*, **15**(10):1 275—1 287
- Peakall R, Smouse PE. 2006. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research[J]. *Mol Ecol Notes*, **6**(1):288—295
- Powell W, Machray GC, Provan J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeat[J]. *Trends Plant Sci*, **1**(7):215—222
- Raymond M, Rousset F. 1995. GENEPOP(version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism[J]. *J Hered*, **86**(3):248—249
- Rice WR. 1989. Analyzing tables of statistical tests[J]. *Evolution*, **43**(1):223—225
- Roorikwal M, Sharma PC. 2011. Mining functional microsatellites in legume unigenes[J]. *Biomed Inform*, **25**(11):490—498
- Sanguinetti CJ, Dias NE, Simpson AJ. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels [J]. *Biotechniques*, **17**(5):914—21
- Semagn K, Bjørnstad Å, Ndjiondjop MN. 2010. An overview of molecular marker methods for plants[J]. *Afr J Biotechnol*, **5**(25):2 540—2 568
- Song YP(宋跃朋), Jiang XB(江锡兵), Zhang M(张曼), *et al.* 2010. Genetic differences revealed by Genomic SSR and EST-SSR in poplar(杨树 Genomic-SSR 与 EST-SSR 分子标记遗传差异性分析)[J]. *J Beijing Fore Univ*(北京林业大学学报), **32**(5):1—7
- Sun Y, Wen XY, Huang HW. 2010. Population genetic differentiation of *Schisandra chinensis* and *S. sphenanthera* as revealed by ISSR analysis[J]. *Biochem Syst Ecol*, **1**(1):119—121
- Tautz D, Renz M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes[J]. *Nucl Acids Res*, **12**(10):4 127—4 138
- Ueno S, Aoki K, Tsumura Y. 2009. Generation of expressed sequence tags and development of microsatellite markers for *Castanopsis sieboldii* var. *sieboldii* (Fagaceae)[J]. *Ann For Sci*, **66**(5):509
- Varshney RK, Graner A, Sorrells ME. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications[J]. *Trends Plant Sci*, **23**(1):48—55
- Xu LA(徐立安), Li XJ(李新军), Pan HX(潘惠新), *et al.* 2001. Study on population genetic structure in *Castanopsis fargesii* with microsatellite markers(用 SSR 研究栲树群体遗传结构)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), **43**(3):409—412
- Xu M(胥猛), Li HG(李火根). 2008. Development and characterization of microsatellite markers from expressed sequence tags for *Liriodendron*(鹅掌楸 EST-SSR 引物开发及通用性分析)[J]. *Mol Plant Breed*(分子植物育种), **6**(3):615—618
- Yang YL(杨彦伶), Zhang YD(张亚东), Zhang XY(张新叶). 2008. Transferability analysis of *Populus* SSR markers in *Salix* (杨树 SSR 标记在柳树中的通用性分析)[J]. *Mol Plant Breed*(分子植物育种), **6**(6):1 134—1 138
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review[J]. *Mol Ecol*, **11**(1):1—16