

## 光皮桦 SSR 分子标记体系的建立

尤卫艳, 黄华宏, 程龙军, 童再康, 朱玉球

(浙江林学院 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300)

**摘要:** 采用十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)-硅珠法提取光皮桦 *Betula luminifera* 嫩叶 DNA, 利用近缘种日本白桦 *B. platyphylla* var. *japonica* 和欧洲白桦 *B. pendula* 的引物, 建立光皮桦简单重复序列标记 (SSR) 反应体系。在体系建立过程中, 采用单因素法分别对影响聚合酶链式反应 (PCR) 反应的因素进行分析。结果表明: 在 20  $\mu\text{L}$  反应体系中, 模板 DNA 用量、 $\text{Mg}^{2+}$  浓度、脱氧核糖核苷酸 (dNTPs) 浓度、引物浓度、*Taq* DNA 聚合酶用量分别为 60 ng, 1.500  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 0.175  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 2.500  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 1.0  $\times$  16.67 nkat 时结果最好; 引物退火温度比日本白桦扩增时提高 1  $^{\circ}\text{C}$  时效果佳。PCR 扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳后随机挑取其中 3 对引物扩增的多态性片段进行克隆测序, 对引物的通用性做进一步检验, 序列经比对后得到的与原物种序列相似度 (max ident 值) 均在 95.0% 以上。可见, 近缘种日本白桦和欧洲白桦的 SSR 引物可以在光皮桦上应用。图 7 表 2 参 17

**关键词:** 林木育种学; 光皮桦; 简单重复序列 (SSR) 分子标记

**中图分类号:** S722      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1000-5692(2010)03-0464-06

## An SSR molecular labeling technique system for *Betula luminifera*

YOU Wei-yan, HUANG Hua-hong, CHENG Long-jun, TONG Zai-kang, ZHU Yu-qiu

(School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

**Abstract:** To find the optimal simple sequence repeats (SSR) system for *Betula luminifera*, the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method was used to extract DNA from tender leaves, using the known primers from related species: *B. platyphylla* var. *japonica* and *B. pendula*. Then, one factor was changed at a time to optimize the polymerase chain reaction (PCR). Next, Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) was used to detect the amplified products with three primers' segments randomly selected from thirty-six pairs of primers and sequenced to further check the universality of the primer. Results showed that in a volume of 20  $\mu\text{L}$ , the optimal reaction system was 60 ng template DNA, 1.500  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Mg}^{2+}$ , 0.175  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP)s, 2.500  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  primer, and 1.0  $\times$  16.67 nkat *Taq* polymerase. Compared with *B. platyphylla* var. *japonica* and *B. pendula*, the optimal annealing temperature of the primer was 1 $^{\circ}\text{C}$  higher. The blast results from primer AF310851, AB084479, and AB084480 showed that the values of max ident were all above 95.0%. This indicated that the SSR primers of birch could be used with *B. luminifera*. [Ch, 7 fig. 2 tab. 17 ref.]

**Key words:** forest tree breeding; *Betula luminifera*; simple sequence repeats (SSR) marker

光皮桦 *Betula luminifera* 属桦木科 Betulaceae 桦木属 *Betula*<sup>[1]</sup>, 为中国特有优良用材树种, 天然分布于秦岭淮河流域以南的河南、四川、贵州、云南、安徽、湖北、湖南、广东、广西、江西、浙江、福建等 10 多个省(自治区)。其木材呈淡黄色或红褐色, 材质细腻坚韧, 切面光滑, 不挠不裂, 干燥性能良好, 广泛应用于航空、建筑、家具、造纸等各行业, 也可用于提取木醇和芳香油等物质。近年

收稿日期: 2009-05-18; 修回日期: 2009-09-07

基金项目: 浙江省重大科技专项(2008C02004-1)

作者简介: 尤卫艳, 从事植物分子遗传研究, E-mail: ywyl@163.com。通信作者: 童再康, 教授, 博士, 从事林木遗传育种等研究。E-mail: zktong@zjfc.edu.cn

来光皮桦人工造林发展迅速,有关光皮桦的研究也不断增多。在分子方面,谢一青等<sup>[2-3]</sup>通过对比和优化实验,建立光皮桦 DNA 提取及其随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 技术分析体系。同时陈伟<sup>[4]</sup>应用 RAPD 和简单序列重复区间扩增多态性(inter-simple sequence repeat, ISSR) 技术对福建省光皮桦天然群体的遗传多样性进行分析,发现 11 个群体明显分为两大类。童再康等<sup>[5]</sup>建立了光皮桦的扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP) 反应体系。简单重复序列<sup>[6]</sup>(simple sequence repeat, SSR)或者微卫星序列<sup>[7]</sup>(microsatellite, MS), 是一类由几个到十几个核苷酸串联重复组成的 DNA 序列。其长度一般在 100 bp 以下,广泛分布于生物体基因组的不同位置,由于重复次数不同及重复程度不完全造成的每个位点的多态性。微卫星序列两端多是相对保守的单拷贝序列,因此可以根据两端序列设计特异引物对基因组 DNA 进行 PCR 扩增,扩增片段的长度多态性可用作分子标记。SSR 标记具有共显性、高度重复性、高度丰富的多态性等优点,成为构建遗传连锁图谱<sup>[8]</sup>,研究群体遗传学<sup>[9]</sup>,进行分子标记辅助育种<sup>[10]</sup>,绘制品种指纹图谱<sup>[11]</sup>,检测品种纯度<sup>[12]</sup>等的理想工具。SSR 标记的众多优点使它成为最理想的分子标记之一。本研究利用近缘种的引物在光皮桦中进行扩增,建立光皮桦的 SSR 反应体系,为应用 SSR 分子标记对光皮桦群体进行研究奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

光皮桦材料来自浙江林学院智能温室,取正常生长的嫩叶,置-70℃冰柜保存备用。*Taq* DNA 聚合酶(83.35 mkat·L<sup>-1</sup>),脱氧核糖核苷酸 dNTPs(各 2.5 mol·L<sup>-1</sup>),氯化镁 MgCl<sub>2</sub> (25.0 mol·L<sup>-1</sup>)等试剂均购于由宝生物工程(大连)有限公司,引物由 GenScript 公司合成。

### 1.2 方 法

1.2.1 光皮桦 DNA 的提取和检测 本研究采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)-硅珠吸附法提取光皮桦叶片 DNA,用 NanoDrop 微量分光光度计(ND-1000)测定 DNA 的纯度和浓度。同时每个样品取 5 μL,加 1 μL 上样缓冲液混合后,于 10.00 g·L<sup>-1</sup> 琼脂糖凝胶(含 0.05 g·L<sup>-1</sup> 溴化乙锭)进行电泳检测,在凝胶成像系统(Gel DocTM, Bio-Rad)下观察并拍照。将样品稀释至 20.0 mg·L<sup>-1</sup>,置于-20℃下保存。

1.2.2 PCR 扩增及其产物检测 聚合酶链式反应(PCR)扩增在 ABI 9700 PCR 仪上进行。扩增程序为:94℃, 2 min; 94℃, 30 s; 51~60℃(各引物退火温度不同), 30 s; 72℃, 30 s(30 个循环); 72℃, 5 min。反应总体积为 20 μL。体系建立过程中,分别对 Mg<sup>2+</sup>浓度、dNTPs 浓度、*Taq* DNA 聚合酶浓度、引物浓度和模板 DNA 用量等设置不同的浓度梯度,以确定最佳反应体系。

PCR 产物经 15.00 g·L<sup>-1</sup> 琼脂糖凝胶电泳检测,在凝胶成像系统(Gel DocTM, Bio-Rad)上观察、拍照和分析。

#### 1.2.3 PCR 反应因素水平的确定

为了确定 PCR 反应中 5 个因素(模板 DNA 用量、dNTPs 浓度、Mg<sup>2+</sup>浓度、引物浓度、*Taq* DNA 聚合酶浓度)的水平,选用引物 AB084473 采用单因素法进行试验,实验重复 2 次)。PCR 反应的因素水平见表 1。

1.2.4 引物合成 SSR 引物的序列来源于近缘种日本白桦 *Betula platyphylla* var. *japonica*<sup>[13]</sup>和欧洲白桦 *B. pendula*<sup>[14]</sup>的 36 对 SSR 引物。

1.2.5 电泳检测 PCR 扩增产物在 80 g·L<sup>-1</sup> 聚丙烯酰胺凝胶上电泳检测,染色方法参照胥猛<sup>[15]</sup>等的

表 1 聚合酶链式反应的因素水平

Table 1 Factors and levels of PCR

水平	因素				
	模板/ng	dNTPs/(mmol·L <sup>-1</sup> )	Mg <sup>2+</sup> /(mmol·L <sup>-1</sup> )	引物/(mmol·L <sup>-1</sup> )	<i>Taq</i> 酶/nkat
1	100	0.250	2.25	3.00	2.0 × 16.67
2	80	0.225	2.00	2.50	1.5 × 16.67
3	60	0.200	1.75	2.00	1.0 × 16.67
4	40	0.175	1.50	1.50	0.8 × 16.67
5	20	0.150	1.25	1.00	0.5 × 16.67
6		0.125	1.00		

方法, 功率恒为 75 W, 电泳 1.0 ~ 1.5 h。

1.2.6 引物通用性研究 随机选取引物 AF310851, AB084479, AB084480 (GenBank accession number), PCR 扩增产物在 80.00 g·L<sup>-1</sup> 聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 参照李明芳<sup>[16]</sup>的方法, 割取多态性片段, 进行扩增。扩增后在琼脂糖上电泳检测, 用试剂盒回收扩增产物, 4 ℃连接过夜, 转入大肠杆菌 *Escherichia coli* 培养 12 h 以上, 如蓝白斑区别不明显, 4 ℃放置 1 h, 挑单克隆, 培养 8 h 进行菌液 PCR 检测, 测序。

## 2 结果和分析

### 2.1 不同 DNA 用量对 SSR 反应结果的影响

当其他条件一定 (0.200 mmol·L<sup>-1</sup>dNTPs, 1.50 mmol·L<sup>-1</sup>Mg<sup>2+</sup>, 2.50 mmol·L<sup>-1</sup>引物, 1 × 16.67 nkat *Taq* 酶), 由图 1 可知, 模板 DNA 用量为 20 或 40 ng 时, 扩增出的条带较弱; 而用量为 60 或 80 ng 时, 有较好的结果; 当用量为 100 ng 时, 扩增条带反而变弱, 可能是模板 DNA 浓度较大, 影响反应体系浓度, 进而影响 PCR 反应等因素造成的。为了节约试剂和减少非特异性条带的产生, 所以本实验选用的模板 DNA 用量为 60 ng。

### 2.2 不同 dNTPs 浓度对结果的影响

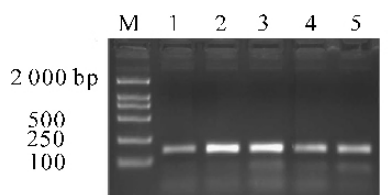
当其他条件一定(模板 DNA 用量为 60 ng, 1.50 mmol·L<sup>-1</sup>Mg<sup>2+</sup>, 2.50 mmol·L<sup>-1</sup>引物, 1 × 16.67 nkat *Taq* 酶), 6 个 dNTPs 浓度均可扩增出条带。图 2 显示, 当 dNTPs 浓度为 0.125 mmol·L<sup>-1</sup> 时, 扩增出的条带较弱; 而 dNTPs 浓度为 0.200, 0.175, 0.150 mmol·L<sup>-1</sup> 时, 有较好的结果; 当浓度为 0.250 和 0.225 mmol·L<sup>-1</sup> 时, 扩增条带反而变弱, 可能是扩增的片段较小, 当 dNTPs 浓度增大时扩增产物不随之增加造成的。体系选用 0.175 mmol·L<sup>-1</sup> 为 dNTPs 最终浓度。

### 2.3 不同 Mg<sup>2+</sup>浓度对结果的影响

当其他条件一定(模板 DNA 用量为 60 ng, 0.175 mmol·L<sup>-1</sup>dNTPs, 2.50 mmol·L<sup>-1</sup>引物, 1 × 16.67 nkat *Taq* 酶), Mg<sup>2+</sup>浓度对 PCR 反应有很大影响, Mg<sup>2+</sup>浓度过高容易引起非特异性扩增, 导致阳性克隆较多, 影响数据分析结果。当 Mg<sup>2+</sup>浓度为 1.00 和 1.25 mmol·L<sup>-1</sup> 时, 扩增条带很弱; 而 Mg<sup>2+</sup>浓度为 1.50 mmol·L<sup>-1</sup> 时, 有较好的结果; 当浓度为 1.75 mmol·L<sup>-1</sup> 时, 扩增主条带反而变弱; 当 Mg<sup>2+</sup>浓度为 2.00 和 2.25 mmol·L<sup>-1</sup> 时, 主条带亮度又增强, 可能此时已经在进行非特异片段的扩增(图 3)。所以选用 Mg<sup>2+</sup>最终浓度为 1.50 mmol·L<sup>-1</sup>。

### 2.4 不同引物浓度对结果的影响

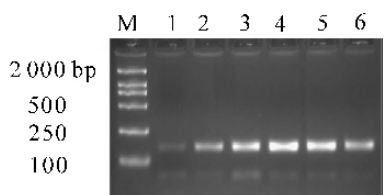
当其他条件一定(模板 DNA 用量为 60 ng, 0.175 mmol·L<sup>-1</sup>dNTPs, 1.50 mmol·L<sup>-1</sup>Mg<sup>2+</sup>, 1 × 16.67 nkat *Taq* 酶), 引物浓度为 1.00, 1.50, 2.00 mmol·L<sup>-1</sup> 时, 扩增的条带极其微弱, 几乎检测不到; 当引物浓度增加到 2.50 和 3.00 mmol·L<sup>-1</sup> 时, 条带亮度增高(图 4)。所以选用 2.50 mmol·L<sup>-1</sup> 为最终浓度。



M. DI2000 marker; 1~5. 表示 DNA 用量为 100, 80, 60, 40, 20 ng

图 1 DNA 用量对 SSR 反应结果的影响

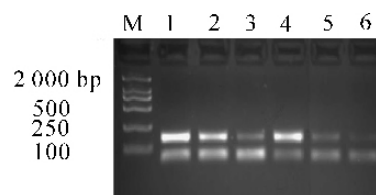
Figure 1 Effects of DNA dosages on result of SSR reaction



M. DI2000 marker; 1~6. 别表示 dNTPs 浓度为 0.250, 0.225, 0.200, 0.175, 0.150, 0.125 mmol·L<sup>-1</sup>

图 2 不同 dNTPs 浓度对 SSR 反应结果的影响

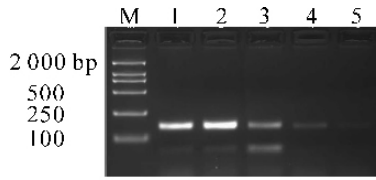
Figure 2 Effects of different dNTPs concentrations on result of SSR reaction



M. DI2000 marker; 1~6. 表示 Mg<sup>2+</sup> 浓度为 2.25, 2.00, 1.75, 1.50, 1.25, 1.00 mmol·L<sup>-1</sup>

图 3 不同 Mg<sup>2+</sup>浓度对 SSR 反应结果的影响

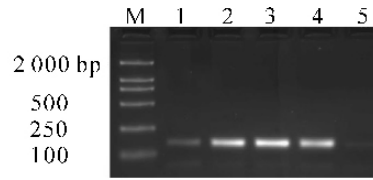
Figure 3 Effects of different Mg<sup>2+</sup> concentrations on result of SSR reaction



M. DI2000 marker; 1~5. 表示引物浓度为 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0 mmol·L<sup>-1</sup>

图 4 不同引物浓度对 SSR 反应结果的影响

Figure 4 Effects of different primers concentrations on result of SSR reaction



M. DI2000 marker; 1~5. 表示酶用量为 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0 × 16.67 nkat

图 5 不同酶用量对 SSR 反应结果的影响

Figure 5 Effects of different enzyme dosages on result of SSR reaction

### 2.5 不同酶用量对结果的影响

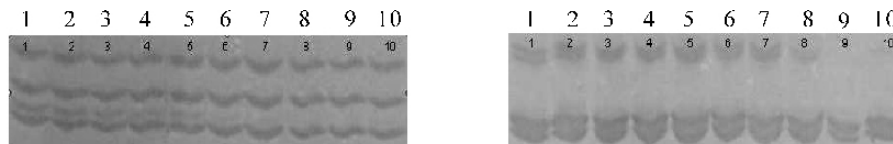
当其他条件一定(模板 DNA 用量为 60 ng, 0.175 mmol·L<sup>-1</sup>dNTPs, 1.50 mmol·L<sup>-1</sup>Mg<sup>2+</sup>, 2.50 mmol·L<sup>-1</sup>引物), *Taq* DNA 聚合酶用量是 PCR 反应中最为重要的影响因子之一。*Taq* DNA 聚合酶浓度高时, 极易产生非特异性扩增。如图 5 所示, 5 个处理均有扩增产物, 但当 *Taq* DNA 聚合酶浓度为 0.5 × 16.67 nkat 时, 扩增条带很弱; 浓度 0.8 × 16.67, 1.0 × 16.67, 1.5 × 16.67 nkat 时, 谱带亮且清晰; 2.0 × 16.67 时, 条带反而变弱。因此, 确定 *Taq* DNA 聚合酶适宜用量为 16.67 nkat。

### 2.6 退火温度的影响

退火温度的高低与 PCR 扩增特异性有显著的相关性, 而退火温度主要取决于引物的解链温度(melting temperature, *T<sub>m</sub>*)值、引物与模板的配对程度等因素。当温度较低时, 非特异性条带增加, 退火温度较高时, 条带变少(图 6)。所以体系选用的退火温度比在日本白桦(其引物退火温度为 56 °C)中提高了 1 °C。

### 2.7 欧洲白桦和日本白桦引物通用性检验

克隆序列经比对后, 与原物种序列相似度(max ident 值)都在 95%以上(表 2), 说明欧洲白桦和日



A. 引物 AF310847

B. 引物 AF310851

1~10 分别表示退火温度为 51.0, 51.2, 51.9, 53.0, 54.2, 55.4, 56.6, 57.8, 59.0, 60.1 °C

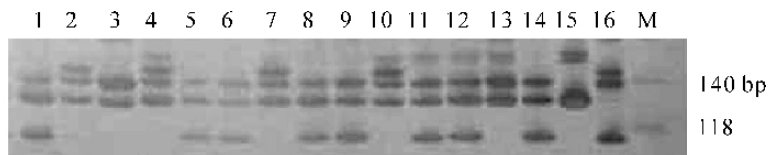
图 6 部分引物的在不同退火温度下扩增产物在 80 g·L<sup>-1</sup> 聚丙烯酰胺凝胶上电泳检测图

Figure 6 Amplified product of some pairs of primer at different annealing temperature detecting in 80 g·L<sup>-1</sup> PAGE

表 2 引物 AF310851, AB084479, AB084480 序列在 GeneBank 比对结果

Table 2 Blast results of AF310851, AB084479, AB084480 in GeneBank

引物号	光皮桦序列	引物来源	与原物种序列相似度/%
AF310851	TCTCCTTAGCTGGCAGCGACGCCCATGGCCGCCACCGCATCTCCGGAGCTCCCCAA	欧洲白桦 <i>Betula pendula</i>	98.0
	CACACTGCTGCTGAGTCCCCAGCATAGGACGCTCTCTCCCTCTCTCTCTCTGAAG		
	CAATTACAGTACTGAAAGAAAGAAAATAAAAAATAAAAAATATCAACAGAAGAAGG		
AB084480	TGAATTCTTTGAGGGTTTTATGAAGAAGGGA	日本白桦 <i>Betula platyphylla</i> var. <i>japonica</i>	95.0
	TTTAGCAGTTACTTTACTTTACTGTATCCAATGAATTATGAATATAGACAGAATGCTAA		
	GTATCCATGGAAAAGAACTGCACAATGAAATACTTAACCTGTGTGTGTGCGTGTG		
AB084479	TGCTGCAGAGAGAGAGAGCAGGAAAAAGGAGCAATACAGTACCCAGCACCAAA	日本白桦 <i>Betula platyphylla</i> var. <i>japonica</i>	96.0
	TGCCTGCTTTCCATTCGTACACATGTTTTGGGTGTGTGTGTGTGGTGTGTTGTTGGA		
	TGCTGAGAAAGCTAAGGAAAGTGGGAAGGAAAAGAGAGACTGGGAGTTTTCTAGAA		
AB084479	AAAGAAGTGAATGGAACCTTTGACTTAACCGGAA	日本白桦 <i>Betula platyphylla</i> var. <i>japonica</i>	96.0
	TTCCCGGTTAAGTCAAAGTTCACATCTCTTTTTCTAGAAAACCTCCACTCTCTCTT		
	TTCTTCCCACCTTTCTTAGCTTTCTCAGCATCCAAACAAACACCACACACACACA		
	CCCCAAAACATGTGTACGAATGGAAGCAGGCA		



M. DNA marker; 1 ~ 16. 16个光皮桦植株 DNA

图7 引物 AB084473 扩增产物在  $80 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  聚丙烯酰胺凝胶上电泳检测图

Figure 7 Amplified product of AB084473 detecting in  $80 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  PAGE

本白桦的引物可以应用于光皮桦。体系建立后用引物 AB084473 对光皮桦 16 个植株的 DNA 进行扩增, 得到较好的扩增结果(图 7)。

### 3 结论与讨论

通过单因素法确定了光皮桦 SSR 反应体系中模板 DNA 用量、 $\text{Mg}^{2+}$ 浓度、dNTPs 浓度、引物浓度、*Taq* DNA 聚合酶浓度, 建立光皮桦 SSR 反应体系。在体系建立过程中, 当各个因素水平较低或较高时, 条带都比较弱, 这与柳晓磊等<sup>[17]</sup>对椰子 *Cocos nucifera* 的研究结果一致。其中退火温度是影响 PCR 反应的重要因素之一, 实验结果表明: 较小的温度变化对最后的扩增结果影响不明显, 但较大的温度跨度, 影响扩增条带的多寡及其清晰程度。所选的 SSR 引物各解链温度值相差很大, 最大跨度达  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 特别需要对每一对引物进行梯度退火实验, 以期得到各引物最佳退火温度。

SSR 分子标记因具有诸多优点, 成为现代分子生物学最理想的标记之一, 但其昂贵的引物开发费用, 令人望而却步。而微卫星序列的又具有保守性, 使其引物在近缘中可以通用。同时在植物分类学上, 光皮桦、日本白桦和欧洲白桦同属于桦木科桦木属, 亲缘关系较近, 微卫星序列也趋于一致, 故日本白桦和欧洲白桦的 SSR 引物在光皮桦中应具有较高通用性。本研究结果也表明: 3 个随机选取的 SSR 引物在光皮桦中的扩增序列, 与原物种白桦的扩增序列经比对, 最大相似度值均达到 95.0% 以上。

#### 参考文献:

- [1] 郑万钧. 中国树木志: 第 2 卷[M]. 北京: 中国林业出版社, 1985: 2124 - 2131.
- [2] 谢一青, 李志真, 黄儒珠, 等. 光皮桦基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 浙江林学院学报, 2006, **23** (6): 664 - 668.  
XIE Yiqing, LI Zhizhen, HUANG Ruzhu, *et al.* Comparison of methods of extracting genomic DNA from *Betula luminifera* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2006, **23** (6): 664 - 668.
- [3] 谢一青, 黄儒珠, 李志真, 等. 光皮桦 RAPD 分析体系优化设计方案比较[J]. 福建林学院学报, 2006, **26** (1): 73 - 77.  
XIE Yiqing, HUANG Ruzhu, LI Zhizhen, *et al.* Comparison between single factor design and uniform design to optimize the reaction system for RAPD of *Betula luminifera* [J]. *J Fujian Coll For*, 2006, **26** (1): 73 - 77.
- [4] 陈伟. 光皮桦天然群体遗传多样性研究[J]. 北京林业大学学报, 2006, **28** (6): 28 - 34.  
CHEN Wei. Genetic diversity of the natural populations of *Betula luminifera* [J]. *J Beijing For Univ*, 2006, **28** (6): 28 - 34.
- [5] 尤卫艳, 黄华宏, 童再康, 等. 光皮桦 AFLP 分子标记体系的建立[J]. 生物技术, 2008, **18** (6): 42 - 45.  
YOU Weiyan, HUANG Huahong, TONG Zaikang, *et al.* Establishment of AFLP molecular labeling technique system for *Betula luminifera* [J]. *Biotechnology*, 2008, **18** (6): 42 - 45.
- [6] FRAGEAU C J, FOURNEY R M. DNA typing with short tandem repeat: A sensitive and accurate approach to human identification[J]. *Biotechniques*, 1993, **15**: 100 - 119.
- [7] SHARON D, ADATO A, MHAMEED S, *et al.* DNA fingerprint in plant using simple sequence repeat and minisatellite probes [J]. *HortScience*, 1995, **30** (1): 109 - 112.
- [8] 宋健, 韩明玉, 赵彩平, 等. 桃‘秦光 2 号’×‘曙光’F1 代 SSR 遗传连锁图谱的构建[J]. 西北植物学报, 2008, **28** (5): 895 - 900.  
SONG Jian, HAN Mingyu, ZHAO Caiping, *et al.* Construction of a general genetic linkage map for peach using a

- 'Qinguang 2' × 'Shuguang' F1 progeny by SSR markers [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2008, **28** (5): 895 – 900.
- [9] 徐小林, 徐立安, 黄敏仁, 等. 栓皮栎天然群体 SSR 遗传多样性研究[J]. 遗传, 2004, **26** (5): 683 – 688.  
XU Xiaolin, XU Li'an, HUAN Minren, *et al.* Genetic diversity of microsatellites (SSRs) of natural populations of *Quercus variabilis* [J]. *Hereditas*, 2004, **26** (5): 683 – 688.
- [10] 黄烈健, 苏晓华, 张香华. 与杨树木材密度、纤维性状相关的 SSR 分子标记[J]. 遗传学报, 2004, **31** (3): 299 – 304.  
HUANG Liejian, SU Xiaohua, ZHANG Xianghua, *et al.* SSR molecular markers related to wood density and fiber traits in poplar [J]. *Acta Gen Sin*, 2004, **31** (3): 299 – 304.
- [11] 艾呈祥, 张力思, 魏海蓉. 甜樱桃品种 SSR 指纹图谱数据库的建立[J]. 中国农学通报, 2007, **23** (5): 55 – 58.  
AI Chengxiang, ZHANG Lisi, WEI Hairong, *et al.* Construction of molecular fingerprinting database for sweet cherry using SSR markers [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2007, **23** (5): 55 – 58.
- [12] 李菊芬, 许玲, 马国斌. 应用 SSR 分子标记鉴定甜瓜杂交种纯度[J]. 农业生物技术学报, 2008, **16** (3): 494 – 500.  
LI Jufen, XU Ling, MA Guobin. Identification of melon hybrid purity by SSR markers [J]. *J Agric Biotechnol*, 2008, **16** (3): 494 – 500.
- [13] WU B, LIAN C, HOGETSU T. Development of microsatellite markers in white birch (*Betula platyphylla* var. *japonica*) [J]. *Mol Ecol Notes*, 2002, **2**: 413 – 415.
- [14] KULJU K K, PEKKINEN M, VARVIO S. Twenty-three microsatellite primer pairs for *Betula pendula* (Betulaceae) [J]. *Mol Ecol Notes*, 2004, **4**: 471 – 473.
- [15] 胥猛, 李火根. 鹅掌楸 EST-SSR 引物开发及通用性分析[J]. 分子植物育种, 2008, **6** (3): 615 – 618.  
XU Meng, LI Huogen. Development and characterization of microsatellite markers from expressed sequence tags for *Liriodendron* [J]. *Mol Plant Breed*, 2008, **6** (3): 615 – 618.
- [16] 李明芳. 荔枝 SSR 标记的研究及其对部分荔枝种质的遗传多样性[D]. 儋州: 华南热带农业大学, 2003.  
LI Mingfang. *Development of SSR Markers in Litchi chinensis and Application for Analysis of Genetic Diversity within Litchi Varieties* [D]. Danzhou: South China University of Tropical Agriculture, 2003.
- [17] 柳晓磊, 汤华, 李东栋, 等. 椰子 SSR 反应体系的建立和优化[J]. 华中农业大学学报, 2007, **26** (5): 676 – 679.  
LIU Xiaolei, TANG Hua, LI Dongdong, *et al.* Optimization and establishment of SSR analysis method in coconut [J]. *J Huazhong Agric Univ*, 2007, **26** (5): 676 – 679.