

山核桃 SSR 标记的初步开发

宋 双¹, 黄银芝¹, 董雷鸣¹, 黄有军¹, 曾燕如¹, 吴智敏²

(1. 浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300; 2. 浙江省龙泉市林业局, 浙江 龙泉 323700)

摘要: 基于山核桃 *Carya cathayensis* 脂肪代谢相关 cDNA 文库的部分测序结果, 发现 43 条 cDNA 序列具有简单重复序列 (SSR) 碱基重复特点, 用 Primer Premier 5 设计了 34 对表达序列标签-简单重复序列 (EST-SSR) 引物; 建立了适用于山核桃的 SSR 分析体系, 并用设计的 SSR 引物对天然群体山核桃 40 个样品进行了初步的应用性试验。结果表明: 34 对引物中有 4 对无扩增产物, 3 对引物的扩增产物超过了设计范围, 27 对引物在供试的 40 个山核桃材料中有较清晰且稳定的目标扩增产物, 其中有 18 对引物的扩增产生了 22 个多态性位点, 占总扩增位点数的 47.8%。将 SSR 标记分析结果与山核桃已有的显性标记分析结果进行比较, 发现 SSR 标记多态性位点的比例较高, 且能够区分显性纯合位点及显性杂合位点。结论: 设计开发山核桃的 EST-SSR 标记是可行有效的。图 2 表 3 参 36

关键词: 经济林学; EST-SSR; 山核桃; cDNA 文库

中图分类号: S664.1; S718.3

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2012)04-0626-08

Simple sequence repeat (SSR) markers in *Carya cathayensis*

SONG Shuang¹, HUANG Yin-zhi¹, DONG Lei-ming¹, HUANG You-jun¹, ZENG Yan-ru¹, WU Zhi-min²

(1. The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. Forest Enterprise of Longquan City, Longquan 323700, Zhejiang, China)

Abstract: Codominant markers are better than dominant ones in genetic studies for their ability to distinguish homozygotes and heterozygotes, but their development is usually costly. There has been no report on application of codominant markers to *Carya cathayensis* so far, but the cDNA library associated with fat metabolism in *Carya cathayensis* revealed 43 cDNA sequences characterized by base repeats of simple sequence repeat (SSR) markers, from which 34 pairs of expressed sequence tag (EST)-SSR primers were designed with Primer Premier 5. With an SSR protocol established, these SSR primers were used to analyze DNA of 40 *C. cathayensis* trees from a natural population in Lin'an of Zhejiang Province, which are at least 100 m apart from each other. A native PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) design was used to analyze the applicability of the SSR primers in *C. cathayensis*. Results showed four pairs of primers had no amplification product, three pairs had an amplification product beyond the pre-designed product length, and 27 pairs had clear and stable amplification products. From the 27 pairs, 18 pairs amplified 22 polymorphic loci accounting for 47.8% of the total loci amplified. Compared to other dominant markers (RAPD, ISSR, SRAP and AFLP) developed for *C. cathayensis*, the SSR markers were only high in the percentage of polymorphic loci. Thus, it would be feasible to develop EST-SSR markers in *C. cathayensis*. [Ch, 2 fig. 3 tab. 36 ref.]

Key words: cash forestry; expressed sequence tag-simple sequence repeat (EST-SSR); *Carya cathayensis*; cDNA library

收稿日期: 2011-08-31; 修回日期: 2012-01-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30771752); 浙江省自然科学基金资助项目(Y306373); 浙江农林大学研究生科研创新基金资助项目(2112010002)

作者简介: 宋双, 从事经济林培育与利用研究。E-mail: soshapple@126.com。通信作者: 曾燕如, 教授, 博士, 从事经济林培育与利用等研究。E-mail: yzeng@zafu.edu.cn

简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)是一类一般由 1~6 个碱基组成的基元重复串联而成的脱氧核糖核酸(DNA)序列^[1], 基元重复次数一般为 10~50, 同一类微卫星 DNA 可分布在基因组的不同位置上; 基因组中 SSR 多态性较丰富, 呈共显性遗传, 所以可提供的信息量较高, 结果稳定可靠^[2]。SSR 标记分为两大类, 即基因组 SSR (genomic SSR) 和表达序列标签 SSR (expression sequence tag-SSR, EST-SSR)。基因组 SSR 是基于基因组序列开发的, 采用构建基因组文库的方法, 开发耗时费力, 而且因为探针的缘故, 种类有一定的局限性; EST-SSR 是指存在于基因表达序列内的 SSR, 不包括存在于内含子及非表达调控区之中的 SSR^[3-4], 它基于 cDNA 文库的构建及 cDNA 测序。Scott 等^[5]从 5 000 条葡萄属 *Vitis* EST 中开发了 124 个 SSR。EST-SSR 标记不仅具有基因组 SSR 标记多态性高、共显性、重复性好的特点, 而且开发成本相对低廉, 在种属间具有良好的通用性^[6]。另外, 由于部分 EST-SSR 标记来自于基因的编码区, 所以更容易获得基因表达的信息, 可为功能基因的直接鉴定提供重要依据^[7]。目前, 该分子标记已被广泛应用于品种指纹鉴定^[8-9]、遗传连锁图谱构建^[10-11]、遗传多样性分析^[12-13]和分子标记辅助育种^[2,14-15], 在诸如小麦 *Triticum aestivum*^[16-17], 大豆 *Glycine max*^[18-19], 葡萄 *Vitis vinifera*^[5], 胡椒 *Lindera* sp.^[20], 白菜 *Brassica campestris*^[21], 水稻 *Oryza sativa*^[22], 猕猴桃 *Actinidia chinensis*^[23] 等植物中已成功开发了 EST-SSR 标记, 但尚无山核桃 *Carya cathayensis* EST-SSR 标记的报道。山核桃是浙江省重要的经济树种。近年来随着研究的深入, 已陆续在山核桃中建立了扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)^[24], 随机扩增多态 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)^[25], 微卫星间隔片段多态性(inter-simple sequence repeat, ISSR)^[26], 序列相关扩增多态性 SRAP(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)^[27] 标记分析体系, 并将它们应用于山核桃遗传研究。研究发现: 将这些标记应用于天然群体山核桃样品的分析, 多态性总是不丰富^[26-29]。这一方面与山核桃本身的遗传特性有关, 另一方面与分子标记本身的局限性有关。上述分子标记均为显性标记, 不能区分显性纯合位点与显性杂合位点, 尽管 SRAP 相对而言可显示部分共显性^[30-31]。因此, 有必要开发诸如 SSR 的山核桃共显性标记, 以深化山核桃的遗传研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 EST-SSR 引物设计的数据源 黄银芝等^[32]以山核桃果实油脂形成、转化、积累关键时期的果实为材料, 构建了一个滴度为 5.0×10^9 空斑形成单位(pfu)·mL⁻¹ 的山核桃脂肪代谢相关 cDNA 文库, 并对部分 cDNA 片段进行了克隆测序。以序列分析中发现的含有 SSR 碱基重复特点的序列作为 EST-SSR 引物设计的数据源。

1.1.2 供试山核桃 5 月, 山核桃幼叶充分展开后, 在山核桃产区采集 40 个单株的叶片, 各单株在同一地点彼此间至少相距 100 m。采样地点主要分布在山核桃主产区浙江省临安市的岛石、马啸、颊口、昌化、龙岗、横路、顺溪、湍口等地, 所有单株均为野生成年大树。

1.2 方法

1.2.1 EST-SSR 引物的设计 对含有 SSR 碱基重复特点的 cDNA 序列, 利用 Primer Premier 5 (<http://www.premierbiosoft.com/crm/jsp/com/pbi/crm/clientside/ProductList.jsp>) 进行引物设计。参照软件说明书设置引物设计参数: 产物长度为 100~300 bp; 引物长度为 18~25 bp; 退火温度为 45~65 °C, 且上下游引物的退火温度相差不大于 5 °C; 引物碱基(GC)为 40%~60%; 尽量避免引物二级结构的出现。

1.2.2 DNA 的提取 借鉴郭金剑^[29]建立的适用于山核桃叶片 DNA 的提取方法, 即改良十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取基因组 DNA。DNA 经吸光度值 $D(\lambda)$ 测定及电泳检测, 质量达到要求的稀释到 100 mg·L⁻¹ 用于 SSR 分析。

1.2.3 SSR 反应体系的优化 本研究在郭金剑^[29]建立的适用于山核桃的 SSR 反应体系的基础上, 根据实验中出现的现象, 对 DNA 模板用量及聚合酶链式反应(PCR)循环数进行优化, 得到山核桃 SSR 最佳反应体系。

1.2.4 扩增产物检测及 SSR 引物筛选 EST-SSR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。先取 3 个样品的 DNA 对引物进行粗筛, 即用优化的 SSR 反应与扩增体系扩增 DNA 后, 通过 10.0 g·L⁻¹ 的琼脂糖

凝胶电泳分离,检测引物是否有扩增产物。对有扩增产物的引物对,再用来自天然群体的40个山核桃单株样品进行扩增,扩增产物采用 $100.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 非变性聚丙烯酰胺凝胶,在 $1\times$ 三羟甲基甲烷-硼酸(TBE)电泳缓冲液中 150 V 恒压电泳 $1.5\sim 2.0\text{ h}$;电泳结束后,凝胶用蒸馏水清洗 1 min ;随后 $2.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硝酸银和体积分数为 10% 乙醇溶液固定银染 10 min ;再用蒸馏水漂洗 2 次, $2\text{ min}\cdot\text{次}^{-1}$,后在 $20.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠和体积分数为 0.4% 甲醛混合溶液中显色,最后清水漂洗凝胶,并在BIO-RAD GS800成像系统中拍照保存。

1.2.5 数据分析 由于SSR为共显性标记,可以区分显性纯合子和显性杂合子,因此电泳结果按照共显性标记的读带方法:若条带间距离在 20 bp 以内,则视为 1 个杂合位点,2条带分别读为A,B带;若 20 bp 以内只有 1 个条带,则视为纯合位点,读为AA或BB。

1.2.6 山核桃SSR标记与其它标记分析结果的比较 本课题组已建立了山核桃AFLP,RAPD,ISSR,SRAP标记分析体系。本研究将SSR开发的初步实验结果与其余4种标记体系分析的结果进行了比较。

2 结果与分析

2.1 EST-SSR引物的设计

从 $1\ 010$ 个测序的cDNA克隆中得到了 188 条非冗余序列,发现 43 个cDNA序列具有SSR碱基重复特点。利用Primer Premier 5进行引物设计,其中基于 9 个cDNA序列设计的引物达不到设置的引物参数要求。因此,最后共设计SSR引物 34 对(表1)。

表1 开发的山核桃SSR引物序列及在供试样品中检测到的总位点数

Table 1 Sequences of the SSR primers developed and the total loci detected in *Carya cathayensis*

引物编号	引物对序列(5'→3')	退火温度/°C	总位点数
SSR1*	GACAACCGAGCCGAGCAT/GTGCTATTATCCCAGGGC	57.5	
SSR2	ATGAGGGTTATGGAGGACA/TGCGATAAGTGGCATTAC	55.4	1
SSR3	ATGAGGGTTATGGAGGACA/GGTAGCCGGACAAACAGA	55.4	1
SSR4	ACGCTCCATCCGTAGTTG/GAGTCTCATTCGCCAAGC	57.3	1
SSR5*	GAAGGAGGAAGTGACGGATAT/CGAGCCCATCAGAAACTG	57.3	
SSR6**	AACCGCACCGAATCCCATAC/CAGGAGGCTCGCTGAGTGAAAAGTG	59.8	
SSR7**	GCATGAAGCTGGCGAGTA/CGACAACCGATGGAACCT	59.8	
SSR8	GCTCCAAGCGAAAAGTCAAGT/TCATAAACCAACGCCAAAAGA	53.7	3
SSR9*	GCGTCTTCGAGTCTATCC/CAACCTCCACAACAACATCA	55.7	
SSR10	CAAATCGAGCTGTGGTTC/GTACTCCTGCTTGCTCCTTA	55.4	1
SSR11	ATCTGGGCATAGGTAGCA/ATCGGAATAGTTCCTTTTCAT	51.6	1
SSR12	AGCCAATTCCATATCCCAAGC/GACATACCAAACGGTTCTGC	57.8	2
SSR13	CGCCTGTATGTCACCCTT/AGAGTCGCTTGGGTTTATC	55.4	2
SSR14	CAAACGACGGAGTCAACA/ACCCGAAGTGGTTCAAAT	52.7	3
SSR15**	GACCTTTGGGAGGCCATTG/GCGTTTGCTTGCGTGAGA	57.3	
SSR16	GCTTCGGCTTCTTCTGCA/GGATACCCGGAGTCTTACGT	57.3	1
SSR17	ACAACAAGCAATACACCCAA/CTAATCCAAGTAAGCCTCAA	53.7	1
SSR18	CAAATCAGTTCAGACTCCCCTC/AGTTCCTCGGTGCGTGTGTAGTAT	61.9	1
SSR19	CCCAAGATCCAGTACAACG/AATGCCACCGATTCTTG	52.1	2
SSR20	TGTTACGAGGATGATGAG/GGGAGAAGAAGAAGAAGA	52.7	1
SSR21	ATFGCTGTGGCACTGAG/ATGTCATCATCGGACTCTT	58.7	3
SSR22	GCCACTGAGTATTCCTTCC/TGTCATCATCGGACTCTTCA	55.7	2
SSR23	CTGTAACTGCAAAAAGACC/AGGCTATCTCATAACCACC	52.7	2

表 1 (续)

引物编号	引物对序列(5'→3')	退火温度/°C	总位点数
SSR24	TGCCTTCTCCAGCTCATG/CAACCCTAGCAATCTACGAC	57.3	1
SSR25*	TCGTTCACTGATTCCGGAGGT/CTTGTGGGAAGGTCTTTGGT	57.8	
SSR26	AAGTTTGGCTTTGTGAGG/ACAAACGGTATGGATCGC	52.7	2
SSR27	CTTTCCTGCCATACTCAC/ATCGTCTCTTTACATCC	52.7	2
SSR28	AAACCTTGGCATAAGTCATTTGAGAG/CTTGTCAACTTTGTTTGGGTGTC	58.7	1
SSR29	GCAAGGTAGCACCCAATT/ATCCCCTCATGCAGAAC	57.3	2
SSR30	ACAAGAAGAAGAAGCGAG/CTTCCTCTTTCTGCCTCT	52.7	2
SSR31	GAGAAGAAAGGAAAGTG/AGGTTGTCTTCCAGTAGG	52.7	1
SSR32	GCTTCGGCTTCTTCTGCA/GATGCCAAGCGATTTC	55.0	3
SSR33	GGGCAAAGCACAACTCC/TATCGGCGGTGTATCAGG	57.3	1
SSR34	ACTTCGGCTTCTTCTGCA/GAATACCCGGAGTCTTACGT	55.0	3

说明：* 表示无扩增产物的引物对；** 表示扩增产物大于 500 bp；未标注 * 的表示可用的山核桃 SSR 引物。

2.2 DNA 的提取

从供试样品中提取的基因组 DNA $D(\lambda)_{260}/D(\lambda)_{280}$ 都为 1.8~2.0，且 DNA 电泳条带明亮、清晰，纯度较高，可用于后续 SSR 分子标记的分析。

2.3 SSR 体系的优化

经过试验过程不断优化，最终 PCR 产物电泳的扩增条带清晰，无拖尾、条带很粗，确定 10.0 μL 的 PCR 反应体系为：10 \times 缓冲液 (buffer) 1.0 μL ，氯化镁 (MgCl_2) 1.0 μL ，三磷酸碱基脱氧核苷酸 (dNTP) 0.3 μL ，SSR 正反向引物(浓度为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各 0.5 μL ，*Taq* DNA 聚合酶 0.1 μL (上海申能博彩生物科技有限公司)，模板 DNA(100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.5 μL ，加无菌双蒸水(ddH₂O)至终体积 10.0 μL ；PCR 扩增条件为：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min；随后 30 个循环，每个循环 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，退火 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s；最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min，其中退火温度各引物对有所不同(表 1)。与郭金剑^[29]建立的山核桃 SSR 体系相比较，本实验反应体系中的缓冲液用量减少了 0.5 μL ，*Taq* DNA 聚合酶用量减少了 0.1 μL ，DNA 用量减少了 200 ng；郭金剑在其实验中使用了 30.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的琼脂糖凝胶，而在本实验中采用的是分辨率更佳的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)。因此，反应体系中一些组分的用量有所减少，而电泳结果更加清晰。

基于各 SSR 引物对在 3 个 DNA 样品中的扩增结果，在琼脂糖凝胶中对引物对进行了初步的筛选。34 对引物中有 4 对引物无扩增产物(图 1)。对有扩增产物的引物对，用 40 个样品进行 PCR 扩增，扩增产物采用非变性 PAGE 电泳，结果 30 对引物有扩增产物(图 2)，但其中 3 对引物的扩增产物在 500 bp

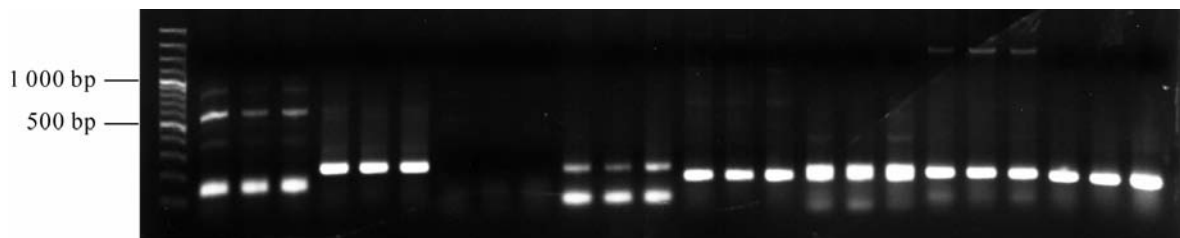


图 1 山核桃 SSR 引物初步筛选电泳图(部分)

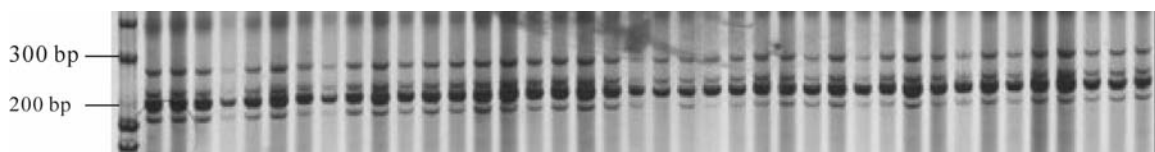
Figure 1 Preliminary screening of SSR primers in *Carya cathayensis* (partial)

图 2 山核桃 SSR 标记分析电泳图(部分; 引物对: SSR34)

Figure 2 Electrophorogram of SSR markers in *Carya cathayensis* (partial; primer pair: SSR34)

以上。按照引物设计的参数,预期的扩增产物为100~300 bp。因此,这3对引物的扩增属非特异性扩增。最终确认可用的SSR引物为27对(表1)。

此外,在可用的27对引物的扩增产物中,按照重复基元的种类划分,可将引物分为3种重复基元的引物,其中二核苷酸重复基元出现的频率最高,为66.7%;其次分别为三核苷酸和四核苷酸重复,它们分别占30%和3.3%。二碱基重复基元中出现频率较多的重复基元是(A/T)_n和(T/C)_n,它们各占二核苷酸重复基元引物的35%和45%(表2)。

表2 山核桃 EST-SSR 引物扩增产物的重复基元特性

Table 2 Repeat contigs of SSR primer-amplified products in *Carya cathayensis*

二核苷酸重复		三核苷酸重复		四核苷酸重复	
基元类型	所占比例/%	基元类型	所占比例/%	基元类型	所占比例/%
(AT) _n	23.3	(TGC) _n	10.0	(CATG) _n	3.3
(TC) _n	30.0	(CTC) _n	3.3		
(AG) _n	13.3	(ATT) _n	3.3		
		(TCT) _n	3.3		
		(AAT) _n	10.0		

2.4 SSR 标记与其他标记分析结果的比较

27对SSR引物对40个山核桃样品进行分析,共扩增得到46个位点,平均每对引物产生1.7个位点,其中杂合位点28个,占总位点数的60.9%;纯合位点18个,占位点数的39.1%。27对引物中有18对在供试样品中扩增出22个多态性位点,占总位点数的47.8%。

与本课题组建立或优化的山核桃其他分子标记^[28-29,33]相比较,SSR标记多态性位点的比例较高,且能够区分显性纯合位点及显性杂合位点外,但其余各指标均不如显性标记(表3)。SSR多态性产生的机制是因为DNA复制和修复过程中碱基的滑动、错配或减数分裂过程中姊妹染色单体的不均等交换^[34];山核桃EST-SSR标记检测的位点数为1~3个,远不如其他显性标记。当然,多态性分析反映的是物种的遗传多样性,与该物种的本质特性有关。因此,利用SSR分析研究遗传多样性时,为获得一定数量的多态位点用于遗传分析,通常所需的SSR引物较多。对山核桃而言,还需继续开发SSR引物。

表3 山核桃各种分子标记扩增结果的比较

Table 3 Comparison among the amplification results of various molecular markers in *Carya cathayensis*

标记名称	RAPD	ISSR	SRAP	SSR	AFLP
使用引物	16	17	15	27	11
获得多态的引物	12	9	9	18	8
扩增总位点数	121	143	173	46	
扩增位点数/引物	7.56	8.41	11.53	1.7	
多态性位点数	25	20	27	22	32
多态引物比例/%	75	52.94	60	66.67	72.72
多态性位点比例/%	20.66	13.99	15.61	47.83	
多态位点数/引物	1.56	1.18	1.80	0.81	2.91

3 讨论

Silva等^[35]通过研究甘蔗 *Saccharum sinensis* EST,设计了20对EST-SSR引物,并利用这些引物研究了甘蔗栽培种和甘蔗属 *Saccharum* 内种间的多态性,结果表明EST-SSR具有较高的种间保守性。鉴于SSR标记的共显性及种属特异性,其开发的成本往往较高,因涉及文库的构建及序列的测定。本研究基

于 cDNA 文库构建及部分测序结果, 开发了 27 对山核桃 EST-SSR 引物, 为后续 SSR 引物的进一步开发打下了实验基础。山核桃 SSR 标记的进一步开发, 可以在现有文库 cDNA 测序的基础上继续进行。此外, 黄有军^[36]以山核桃雌花成花过程的花芽 RNA 为材料, 结合 454 测序, 共获得了 1 575 个具有 SSR 碱基重复特点的序列。这些材料都可以作为山核桃 EST-SSR 标记进一步开发的数据源。

cDNA 为基因表达过程产生的 mRNA 反转录而来, 不含内含子序列。不同物种同一基因 cDNA 序列进行比对时或多或少具有一定的相似性。因此, 理论上基于 EST 序列开发的 SSR 引物对的通用性要优于基于基因组文库开发的 SSR 引物对, 尽管仍存在种属特异性的特点。本研究小组正在进行山核桃与美国山核桃 *Carya illinoensis* 正反交研究, 拟将从山核桃中开发的 EST-SSR 标记用于同属两物种正反交子代的分析, 进一步验证所开发标记的通用性。

本研究对山核桃 EST-SSR 标记进行了开发, 初步获得 27 对可用的 SSR 引物。研究的实验结果将为深入研究山核桃的遗传多样性、种质资源评价等奠定基础。

参考文献:

- [1] HAYDEN M J, SHARP P J. Sequence-tagged microsatellite profiling (STMP): a rapid technique for developing SSR markers [J]. *Nucl Acids Res*, 2001, **29**: e43.
- [2] HE C, POYSA V, YU K. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in determining relationships among *Lycopersicon esculentum* cultivars [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, **106** (2): 363 – 373.
- [3] SHARMA V, BHARDWAJ P, KUMAR R, *et al.* Identification and cross-species amplification of EST derived markers in different bamboo species [J]. *Conserv Genet*, 2009, **10**: 721 – 724.
- [4] 刘贯水. 毛竹 SSR 位点引物开发及部分竹种系统学分析[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2010.
LIU Guanshui. *Development of SSR Loci Primers in Phyllostachys heterocyclus var. pubescens (Mazel) Ohwi and Phylogenetic Analysis in Bamboo Species* [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2010.
- [5] SCOTT K D, EGGLETER P, SEATON G, *et al.* Analysis of SSRs derived from grape ESTs [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, **100** (5): 723 – 726.
- [6] CORDEIRO G M, CASU R, MCLNTYRE C L, *et al.* Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to erianthus and sorghum [J]. *Plant Sci*, 2001, **160**: 1115 – 1123.
- [7] 张智俊, 管雨, 杨丽, 等. 毛竹 EST 资源 SSR 标记分析与筛选[J]. 园艺学报, 2011, **38** (5): 989 – 996.
ZHANG Zhijun, GUAN Yu, YANG Li, *et al.* Analysis of SSRs information and development of SSR markers from moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) ESTs [J]. *Acta Hort Sin*, 2011, **38** (5): 989 – 996.
- [8] MARTIN H, JEROEN R V, ALBRECHT E, *et al.* Variation of DNA fingerprints among accessions within maize inbred lines and implications for identification of essentially derived varieties (II) genetic and technical sources of variation in AFLP data and comparison with SSR data [J]. *Mol Breed*, 2003, **12**: 97 – 106.
- [9] MAHMOOD A, BAENZIGER P S, BUDAK H, *et al.* The use of microsatellite markers for the detection of genetic similarity among winter bread wheat lines for chromosome 3A [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, **109** (7): 1494 – 1503.
- [10] PIQUEMAL J, CINQUIN E, COUTON F, *et al.* Construction of an oilseed rape (*Brassica napus* L.) genetic map with SSR markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2005, **111** (8): 1514 – 1523.
- [11] TAE-YOUNG H, TAKASHI S, MASAKAZU T. High-density integrated linkage map based on SSR markers in soybean [J]. *DNA Res*, 2009, **16**: 213 – 225.
- [12] ENOKI H, SATO H, KOINUMA K. SSR analysis of genetic diversity among maize inbred lines adapted to cold regions of Japan [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, **104** (8): 1270 – 1277.
- [13] ILPREET D, RIAR S, ACHIN S, *et al.* EST-SSR development from 5 *Lactuca* species and their use in studying genetic diversity among *L. serriola* biotypes [J]. *J Hered*, 2011, **102** (1): 17 – 28.
- [14] KIMURA T, SHI Yongzhong, SHODA M. Identification of Asian pear varieties by SSR analysis [J]. *Breed Sci*, 2002, **52**: 115 – 121.
- [15] EUJAYL I, SLEDGE M K, WANG L, *et al.* *Medicago truncatula* EST-SSRs reveal cross-species genetic markers for *Medicago* spp. [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, **108** (3): 414 – 422.

- [16] 陈海梅, 李林志, 卫宪云, 等. 小麦 EST-SSR 标记的开发、染色体定位和遗传作图[J]. 科学通报, 2005, **50** (20): 2208 – 2216.
CHEN Haimei, LI Linzhi, WEI Xianyun, *et al.* Development, chromosome mapping and mapping of EST-SSR markers in wheat [J]. *Chin Sci Bull*, 2005, **50** (20): 2208 – 2216.
- [17] 庄丽芳, 宋立晓, 冯祎, 等. 小麦 EST-SSR 标记的开发和染色体定位及其在追踪黑麦染色体中的应用[J]. 作物学报, 2008, **34** (6): 926 – 933.
ZHUANG Lifang, SONG Lixiao, FENG Wei, *et al.* Development and chromosome mapping of 81 new wheat EST-SSR markers and application for characterizing rye chromosomes added in wheat [J]. *Acta Agro Sin*, 2008, **34** (6): 926 – 933.
- [18] 常玮, 赵雪, 李侠, 等. 大豆 EST-SSR 标记开发及与 Genomic SSR 的比较研究[J]. 中国油料作物学报, 2009, **31** (2): 149 – 156.
CHANG Wei, ZHAO Xue, LI Xia, *et al.* Development of soybean EST-SSR marker and comparison with genomic SSR marker [J]. *Chin J Oil Crop Sci*, 2009, **31** (2): 149 – 156.
- [19] 洪彦彬, 陈小平, 刘海燕, 等. 源于大豆 EST 的花生属 *Arachis* 同源 SSR 标记的开发及利用 [J]. 作物学报, 2010, **36** (3): 410 – 421.
HONG Yanbin, CHEN Xiaoping, LIU Haiyan, *et al.* Development and utilization of orthologous SSR markers in arachis through soybean (*Glycine max*) EST [J]. *Acta Agr Sin*, 2010, **36** (3): 410 – 421.
- [20] YI G, LEE J M, LEE S, *et al.* Exploitation of pepper EST-SSRs and an SSR-based linkage map [J]. *Theor Appl Genet*, 2006, **114** (1): 113 – 130.
- [21] 忻雅, 崔海瑞, 卢美贞, 等. 白菜 EST-SSR 信息分析与标记的建立[J]. 园艺学报, 2006, **33** (3): 549 – 554.
XIN Ya, CUI Hairui, LU Meizhen, *et al.* Data mining for SSRs in ESTs and EST-SSR marker development in Chinese cabbage [J]. *Acta Hort Sin*, 2006, **33** (3): 549 – 554.
- [22] 朱宏波, 方宣钧, 杨仁崔. 利用水稻基因组序列数据开发 SSR 标记的方法[J]. 分子植物育种, 2003, **1** (2): 273 – 276.
ZHU Hongbo, FANG Xuanjun, YANG Rencui. Developing SSR markers using public rice genome sequence data [J]. *Mol Plant Breed*, 2003, **1** (2): 273 – 276.
- [23] FRASER L G, HARVEY C F, CROWHURST R N, *et al.* EST-derived microsatellites from *Actinidia* species and their potential for mapping [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, **108** (6): 1010 – 1016.
- [24] 郭金剑, 池伟, 赵鑫珠, 等. 山核桃 AFLP 实验技术体系的建立[J]. 浙江林学院学报, 2008, **25** (4): 532 – 537.
GUO Jinjian, CHI Wei, ZHAO Xinzhu, *et al.* An AFLP analysis system for *Carya cathayensis* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2008, **25** (4): 532 – 537.
- [25] 王正加, 黄坚钦, 郭传友, 等. 山核桃 RAPD 反应体系的优化[J]. 浙江林学院学报, 2003, **20** (4): 429 – 433.
WANG Zhengjia, HUANG Jianqin, GUO Chuanyou, *et al.* The optimal reaction system of RAPD in *Carya cathayensis* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2003, **20** (4): 429 – 433.
- [26] 沈林. 无融合生殖连锁分析模型: 美国山核桃×山核桃杂种的实例研究[D]. 临安: 浙江农林大学, 2010.
SHEN Lin. *A Model for Linkage Analysis with Apomixis: A Case Study for Pecan × Hickory Hybrids* [D]. Lin'an: Zhejiang A & F University, 2010.
- [27] 李元春. 基于分子标记的山核桃生殖特性研究[D]. 临安: 浙江农林大学, 2011.
LI Yuanchun. *Molecular Marker Analysis of Parents and Their Semi-sib Progenies for the Reproduction in Hickory* [D]. Lin'an: Zhejiang A & F University, 2011.
- [28] 沈林, 郭金剑, 李阳, 等. 基于 AFLP 分析的山核桃群体结构及遗传多样性[J]. 福建林业科技, 2009, **36** (4): 84 – 86.
SHEN Lin, GUO Jinjian, LI Yang, *et al.* Population structure and genetic diversity of *Carya cathayensis* revealed by AFLP analysis [J]. *J Fujian For Sci Technol* 2009, **36** (4): 84 – 86.
- [29] 郭金剑. 山核桃群体结构及多样性的研究[D]. 临安: 浙江农林大学, 2008.
GUO Jinjian. *Study of Population and Diversity in Carya cathayensis Sarg.* [D]. Lin'an: Zhejiang A & F University, 2008.
- [30] 张彤, 屈淑平, 崔崇士. 工业 SRAP 标记在蔬菜作物遗传育种中的应用[J]. 东北农业大学学报, 2009, **40** (1): 119 – 122.

- ZHANG Tong, QU Shuping, CUI Chongshi. Application of SRAP marker on genetics and breeding of vegetable crops [J]. *J Northeast Agric Univ*, 2009, **40** (1): 119 – 122.
- [31] 郭修武, 张鹏翔, 郭印山, 等. 应用 SRAP 分子标记技术鉴定葡萄种间杂交后代[J/OL]. 分子植物育种: 网络版, 2011, **9**: 1389 – 1393.
- GUO Xiuwu, ZHANG Pengxiang, GUO Yinshan, *et al.* Authenticity identification of progenies from interspecific cross red Globe (*Vitis vinifera*) × Shuangyou (*Vitis amurensis*) by SRAP markers [J]. *Fenzi Zhiwu Yuzhong*, 2011, **9**: 1389 – 1393.
- [32] 黄银芝, 周秦, 黄有军, 等. 山核桃脂肪代谢相关 cDNA 文库的构建[J]. 浙江农林大学学报, 2011, **28** (1): 80 – 85.
- HUANG Yinzi, ZHOU Qin, HUANG Youjun, *et al.* Construction of a fat metabolism-related cDNA library in *Carya cathayensis* [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2011, **28** (1): 80 – 85.
- [33] 李元春, 沈林, 曾燕如. 山核桃 SRAP 体系的建立及与 RAPD 和 ISSR 标记的比较[J]. 浙江农林大学学报, 2011, **28** (3): 505 – 512.
- LI Yuanchun, SHEN Lin, ZENG Yanru. Establishment of a SRAP analysis protocol in *Carya cathayensis* and a comparison among SRAP, RAPD, ISSR analysis protocols [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2011, **28** (3): 505 – 512.
- [34] POWELL W, MORGANTE M, ANDRE C, *et al.* The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis [J]. *Molr Breed*, 1996, **2**: 225 – 238.
- [35] SILVA A G. Preliminary analysis of microsatellite markers derived from sugarcane expressed sequence tags (ESTs) [J]. *DNA Seq*, 2004, **15** (1): 71 – 76.
- [36] 黄有军. 山核桃成花机理研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2010.
- HUANG Youjun. *Study on Mechanism of Floral Formation in Carya cathayensis* [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2010.