

杜仲 SSR-PCR 反应体系建立及引物筛选

朱晓敏¹, 王弦云¹, 陈龙灿¹, 康向阳², 王勤¹, 束庆龙¹, 张良富¹, 曹翠萍^{1*}

(1. 安徽农业大学林学与园林学院, 合肥 230036; 2. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要:

SSR-PCR (10 μmol·L⁻¹) 0.2 μL,
Taq DNA (5 U·μL⁻¹) 0.1 μL dNTP (10 mmol·L⁻¹) 0.2 μL DNA 5 10 ng·μL⁻¹ 1.0 μL Mg²⁺ (25 mmol·L⁻¹)
0.6 μL 10×PCR 1.0 μL HPLC 6.7 μL 10.0 μL 3

关键词:

PCR

中图分类号: S727.34

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)03-0387-06

Establishment of SSR-PCR reaction system and primers screening for *Eucommia ulmoides*

ZHU Xiao-min¹, WANG Xian-yun¹, CHEN Long-can¹, KANG Xiang-yang²,
WANG Qin¹, SHU Qin-long¹, ZHANG Liang-fu¹, CAO Cui-ping¹

(1. School of Forestry Landscape Architecture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083)

Abstract: To provide theoretic and technical support for molecular assessment of genetic diversity in germ-plasm resources of *Eucommia ulmoides*, simple sequence repeat-polymerase chain reaction (SSR-PCR) system was established through orthogonal test and optimized through single factor experiment. The results showed that the optimal SSR-PCR reaction system was a volume of 10.0 μL containing forward- and reversed-primer (10 μmol·L⁻¹) 0.2 μL, respectively, Taq DNA polymerase (5 U·μL⁻¹) 0.1 μL, dNTP (10 mmol·L⁻¹) 0.2 μL, DNA (5-10 ng·μL⁻¹) 1.0 μL, Mg²⁺ (25 mmol·L⁻¹) 0.6 μL, 10 × PCR buffer 1.0 μL and HPLC water 6.7 μL. Three SSR polymorphic primer pairs were selected. The results proved the limited transferability of SSR primers between distantly related species, revealed the genetic diversity of *E. ulmoides* preliminarily, and exhibited the advantages of SSRs for the investigation of genetic diversity.

Key words: *Eucommia ulmoides*; SSRs; PCR reaction system; primer screening; genetic diversity

杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliv.) 为杜仲科 (Eucommiaceae) 杜仲属木本植物 ($2n = 2x = 34$), 是我国特有的第 3 纪孑遗植物。杜仲在我国分布区域很广, 包括甘肃、陕西、山西、福建、广东、广西、浙江、四川、云南、安徽、湖北、湖南、江西、河南、贵州 15 个省区^[1-2]。杜仲全身皆是宝, 杜仲皮为我国传统的中药材, 可补肝肾、强筋骨、安胎、降压; 杜仲叶可开发成营养保健品; 同时从皮和叶

中提炼的杜仲胶, 是制造各种电器尤其是海底电缆上好的绝缘材料; 杜仲籽油为很好的药食同源食物; 木材也是制作家具、农具的良好建筑材料; 杜仲对土壤要求不严格, 是很好的绿化树种, 因此杜仲的综合开发利用前景广阔^[3-6]。

SSR (simple sequence repeats) 即简单序列重复, 亦称微卫星 (microsatellite) DNA, 是建立在 PCR 基础上的第 2 代分子标记。其主要以 1~6

收稿日期: 2012-12-04

基金项目: 安徽高校省级自然科学基金重点项目 (KJ2011A115) 资助。

作者简介: 朱晓敏, 女, 硕士研究生。

* 通信作者: 曹翠萍, 女, 教授。E-mail: cuipingcao@163.com

个碱基组成的基元串联重复而成^[7], 如(A)_n、(TAT)_n、和(GATA)_n等。同一类微卫星DNA可分布在基因组的不同位置上, 长度一般小于200 bp。由于重复次数不同, 而造成了每个位点多态性^[8-9]。鉴于SSR具有共显性、高度重复性、高度丰富的多态性等优点, 因此是构建遗传连锁图谱^[10-11]、检测遗传多样性^[12], 分析亲缘关系^[13]等研究理想工具。

国内外科研工作者在杜仲的育苗、生理生化、药理学等方面做了大量的研究工作。我国近年来有关杜仲遗传学方面的研究逐渐有了报道, 如杜仲的核型分析^[14], 染色体的诱导加倍^[15-18], 以及基因克隆^[19]等。一些分子标记技术在杜仲研究上也已得到应用, 如RAPD^[20]和AFLP^[21]用于杜仲性别鉴定, RAPD^[22]以及AFLP和cpSSR用于杜仲遗传多样性研究^[23-24]。目前杜仲SSR分子标记的开发也有报道^[25], 但更多的杜仲SSR标记还有待开发。本研究旨在尝试建立和优化较为经济的杜仲SSR-PCR扩增反应体系, 以方便各实验室间的交流, 同时筛选出杜仲SSR引物, 为杜仲的遗传多样性研究奠定理论和技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料来自安徽省巢湖市庐江县汤池镇杜仲散生植株, 选取健康树16株, 每个样本树相距10 m以上。从每株样本树木采集嫩叶, 将灰尘脏物擦拭干净, 编号, 与硅胶装入塑料袋中, 带回实验室并保存于-70℃冰箱。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 从每个样本取20~50 mg冷冻叶片, 采用试剂盒DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, 德国)提取杜仲基因组DNA, 取5.0 μL抽提产物, 在浓度为0.8%琼脂糖凝胶上电泳30 min,

经EB染色后在紫外灯下拍照检测是否有DNA条带(图1)。利用微量分光光度计NanoDrop ND-1000检测DNA质量, 其浓度为70 ng/μL, 纯度OD值(A₂₆₀/A₂₈₀)为1.9, 然后将DNA按1:100稀释, 置于-20℃冰箱保存。

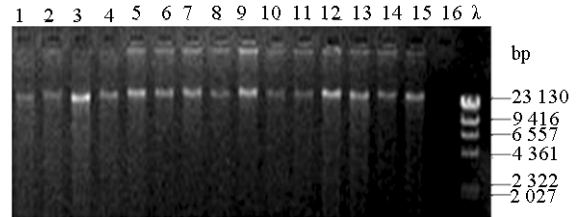


图1 杜仲基因组DNA

Figure 1 Genomic DNA of *E. ulmoides*

1.2.2 SSR-PCR

SSR-PCR反应体系受多因素及其因素间互作的影响, 本试验将正交试验设计和单因素试验设计相结合, 确定杜仲最适SSR-PCR反应体系。首先将影响PCR反应的引物、Taq酶、dNTP、模板DNA以及Mg²⁺的用量进行五因素四水平的正交试验设计(表1和表2), 并对正交试验设计表2中的各个反应体系分别进行测试比较, 找出扩增效果较好的反应体系, 试验分别采用16个样本树木的DNA为模板。然后利用初选得到的较适的反应体系进行单因素优化试验, 即依次改进5因素中各个因素的用量, 其他4个因素用量固定不变, 确定各个因素的最适用量, 最终达到优化PCR反应体系的目的, 单因素试验采用1号和2号样本树木的DNA为模板。由于杜仲是单科属种植物, 在杜仲科内没有近缘种, 所以本试验利用建立的SSR-PCR反应体系, 拟从Sharma等^[26]和Zhao等^[27]为茶开发的SSR引物中, 筛选出适用于杜仲的SSR引物, 各引物筛选试验分别重复3次。

表1 杜仲SSR-PCR反应体系的正交设计因素水平

Table 1 Factors and levels of SSR-PCR system of *E. ulmoides* for orthogonal design

水平 Level	因素 Factor				
	Primer (10 μmol·L ⁻¹)	Taq-polymerase (5 U·μL ⁻¹)	dNTP (10 mmol·L ⁻¹)	DNA (5-10 ng·μL ⁻¹)	Mg ²⁺ (25 mmol·L ⁻¹)
1	0.10	0.05	0.10	0.50	0.40
2	0.20	0.10	0.20	1.00	0.60
3	0.30	0.15	0.30	1.50	0.80
4	0.40	0.20	0.40	2.00	1.00

注: 表中各因素变量单位为μL。下同。

Note: The variable unit of all the factors in the table is used as μL. The same below.

PCR反应总体积为10.0 μL, 包括表2和表3中的正反向引物、Taq DNA聚合酶、dNTP、模板DNA

和Mg²⁺, 此外, 各个反应管中还加有10×PCR缓冲液1.0 μL, 总体积不足10.0 μL时, 用HPLC超纯

水补齐。PCR 反应在 BIO-RAD PCR 仪 (S1000TM Thermal Cycler) 上进行, 扩增程序参照 Deng 等^[25] 并略作调整, 94℃ 预变性 4 min; 35 个循环: 94℃ 变性 50 s, 55℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 1.5 min; 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物先在 1.5% 琼脂糖凝胶、100 V 电压和 TAE 缓冲液条件下电泳 30 min, 经 EB 染色, 紫外灯下拍照, 检测扩增效果。将理想的 PCR 产物, 在 4.5% 变性聚丙烯酰胺凝胶、1×

TBE 缓冲液、电源功率 50 W 条件下电泳 90 min, 然后经 0.1% 硝酸银染色, 拍照保存以供分析。

试验采用的分子量标准为 Trans2KTM Plus, 购自北京全式金生物技术有限公司 (TransGen Biotech), 其他试剂均购自上海生物工程技术有限公司 (Sangon), SSR-PCR 正交试验所用引物为 Sharma 等^[26] 为茶开发的引物 TUGMS11, 由 Sangon 公司合成, 引物序列见表 3。

表 2 杜仲 SSR-PCR 反应的正交试验设计[L₁₆(4⁵)]
Table 2 Orthogonal design of SSR-PCR [L₁₆(4⁵)] for *E. ulmoides*

水平 Level	因素 Factor				
	Primer (10 μmol·L ⁻¹)	Taq-polymerase (5 U·μL ⁻¹)	dNTP (10 mmol·L ⁻¹)	DNA (5-10 ng·μL ⁻¹)	Mg ²⁺ (25 mmol·L ⁻¹)
1	0.10	0.05	0.10	0.50	0.40
2	0.20	0.10	0.20	1.00	0.40
3	0.30	0.15	0.30	1.50	0.40
4	0.40	0.20	0.40	2.00	0.40
5	0.20	0.15	0.10	2.00	0.60
6	0.10	0.20	0.20	1.50	0.60
7	0.40	0.05	0.30	1.00	0.60
8	0.30	0.10	0.40	0.50	0.60
9	0.30	0.20	0.10	1.00	0.80
10	0.40	0.15	0.20	0.50	0.80
11	0.10	0.10	0.30	2.00	0.80
12	0.20	0.05	0.40	1.50	0.80
13	0.30	0.10	0.10	1.50	1.00
14	0.40	0.05	0.20	2.00	1.00
15	0.20	0.20	0.30	0.50	1.00
16	0.10	0.15	0.40	1.00	1.00

表 3 SSR 引物、序列及本研究发现的杜仲等位基因
Table 3 SSR primers, sequences and revealed alleles in *E. ulmoides*

引物 Primer ID	引物序列 (5'-3') Primer sequences	重复基序 Repeat motif	退火温度(T _m)/℃ Annealing temperature	等位基因数 Number of alleles	片段长度/bp Size range
TUGMS11 ^[26]	F: GGGGAGTGTGTTTGAATA R: TGTAGGGTCTTTGAGGCAG	(GA) ₂₂	55.0	5	100~200
228 ^[27]	F: GAATCAGTGAATAAAGCGTGTA R: TGAAGTGGCGGCGGAAGA	(CT) ₉	57.0	8	200~300
641 ^[27]	F: CAAGCAATACATACACACA R: AACAGAGCATACCCAGAAG	(AGAGA) ₃	56.0	3	125~200

2 结果与分析

2.1 SSR-PCR 基本反应体系的建立

通过对表 2 中的 16 个反应体系分别进行测试, 各个反应体系的扩增结果具有明显的差异, 其中反应体系 2 的扩增谱带较清晰, 非特异性条带相对较少 (图 2), 因此, 将其确定为较合适的反应体系。

2.2 SSR-PCR 反应体系的优化

2.2.1

引物用量过少则无法进行有效扩增, 条带弱且弥散, 用量过多会引起错配和扩增出非特异性产物, 甚至容易形成引物二聚体, 削弱靶序列的扩增效率。对 4 种引物用量 (0.10、0.20、0.30 和 0.40 μL) 测试, 发现扩增效果差别不大, 0.10 μL 时扩增条带相对较弱, 所以确定最适引物用量为 0.20 μL (图 3)。

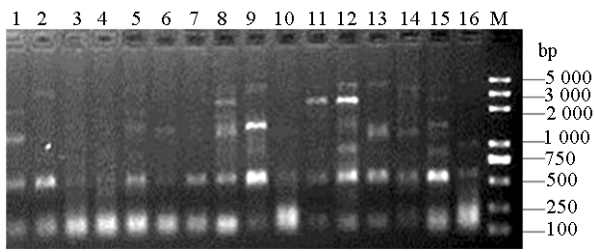


图 2 杜仲 SSR-PCR 正交试验反应体系 2 琼脂糖凝胶电泳结果

Figure 2 SSR-PCR results of system 2 in orthogonal experimental design for *E. ulmoides* on agarose gel

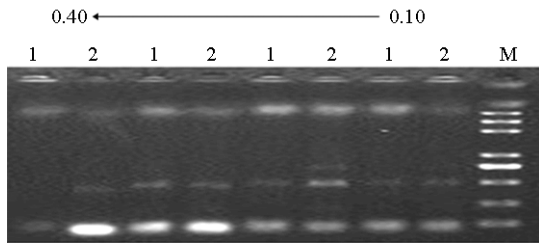


图 3 引物用量对 SSR-PCR 反应的影响

Figure 3 Effects of single primer concentrations on SSR-PCR

2.2.2 *Taq* DNA

Taq DNA 聚合酶

用量过少则引起扩增量不足, 过多会导致非特异性产物增加。试验对 *Taq* DNA 聚合酶用量的 4 个梯度即 0.05、0.10、0.15 和 0.20 μL 进行测试, 结果显示用量为 0.05、0.20 μL 时, 无明显扩增条带, 0.10 和 0.15 μL 时, 扩增出较清晰条带, 从经济角度考虑确定 0.10 μL 为最适用量 (图 4)。

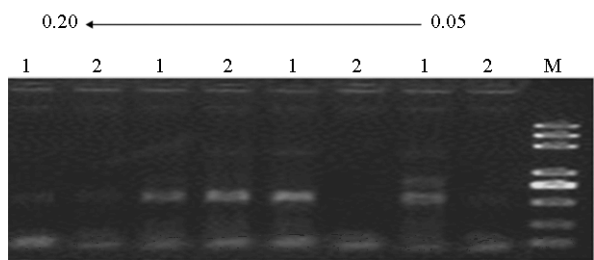


图 4 *Taq* 酶用量对 SSR-PCR 反应的影响

Figure 4 Effects of *Taq* polymerase concentrations on SSR-PCR

2.2.3 dNTP

dNTP 作为 PCR 反应的原材料,

用量过少时, 扩增效率低, 条带弱, dNTP 用量过多时, 会与 Mg^{2+} 形成稳定的螯合物, 进而间接地降低 *Taq* 酶的聚合效率, 产生弥散条带。对 dNTP 不同水平的用量 (0.10、0.20、0.30 和 0.40 μL) 测试, 发现在 0.10 μL 和 0.40 μL 时, 无明显扩增条带, 用量为 0.20 和 0.30 μL 时, 均有清晰条带, 故选择 0.20 μL 作为最适用量 (图 5)。

2.2.4 DNA

DNA 用量过少, 则扩

增产物少, 用量过多, 则会导致非特异性扩增。用 4 种模板 DNA 用量 (0.50、1.00、1.50 和 2.00 μL) 进行 SSR 扩增, 0.50 μL 时无明显扩增条带, 随着 DNA 用量的增加, 均能扩增出清晰条带, 但非特异性条带也增多, 因此确定 1.00 μL 为最适模板 DNA 用量 (图 6)。

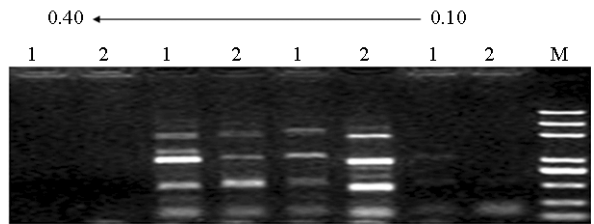


图 5 dNTP 用量对 SSR-PCR 反应的影响

Figure 5 Effects of dNTP concentrations on SSR-PCR

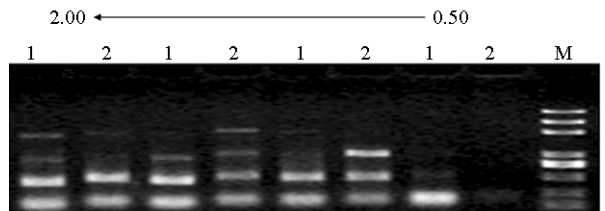


图 6 模板 DNA 用量对 SSR-PCR 反应的影响

Figure 6 Effects of DNA concentrations on SSR-PCR

2.2.5 Mg^{2+}

Mg^{2+} 作为 *Taq* 酶的激活剂,

其用量影响 DNA 聚合酶的聚合效率, 进而影响扩增产物的特异性及真实性。过少的 Mg^{2+} 会降低扩增效率, 过多的 Mg^{2+} 会引发酶催化非特异性条带的扩增。本试验设置 4 个 Mg^{2+} 梯度 (0.40、0.60、0.80 和 1.00 μL), 当 Mg^{2+} 用量递增时, 条带由弱变强, 当用量为 0.60 和 0.80 μL 时条带较清晰, 且非特异性条带较少, 二者扩增效果差别不大, 但从经济角度确定最适 Mg^{2+} 用量为 0.60 μL (图 7)。

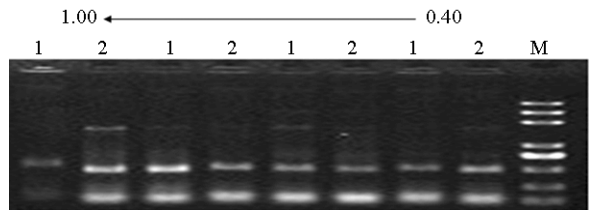


图 7 Mg^{2+} 用量对 SSR-PCR 反应的影响

Figure 7 Effects of Mg^{2+} concentrations on SSR-PCR

综合上述结果, 杜仲 SSR-PCR 最佳反应体系为: 正反向引物各为 0.2 μL ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), *Taq* DNA 聚合酶 ($5 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 0.1 μL , dNTP ($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.2 μL , 模板 DNA ($5\sim 10 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 1.0 μL , Mg^{2+} (25

mmol·L⁻¹) 0.6 μL, 10×PCR 缓冲液 1.0 μL, HPLC 超纯水 6.7 μL, 总体积 10.0 μL。将 PCR 产物分别进行琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 拍照如图 8 和图 9 所示。

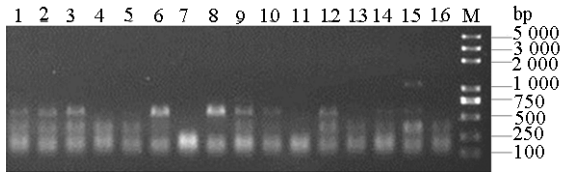


图 8 杜仲 SSR-PCR 琼脂糖凝胶电泳图谱(引物 TUGMS11^[26])
Figure 8 Patterns of SSR-PCR for *E. ulmoides* using primer TUGMS11^[26] on agarose gel

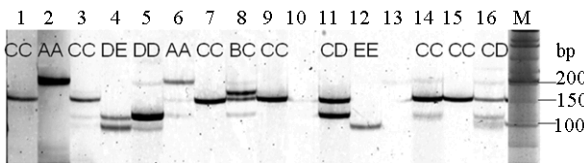


图 9 杜仲 SSR-PCR 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱(引物 TUGMS11^[26])
Figure 9 Patterns of SSR-PCR for *E. ulmoides* using primer TUGMS11^[26] on PAAG

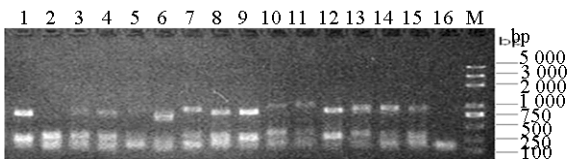


图 10 杜仲 SSR-PCR 琼脂糖凝胶电泳图谱(引物 228^[27])
Figure 10 Patterns of SSR-PCR for *E. ulmoides* using primer 228^[27] on agarose gel

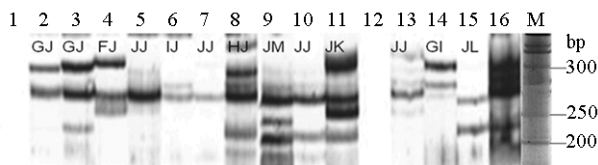


图 11 杜仲 SSR-PCR 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱(引物 228^[27])
Figure 11 Patterns of SSR-PCR for *E. ulmoides* using primer 228^[27] on PAAG

2.3 SSR 引物筛选

利用上述已建立和优化的 SSR-PCR 反应体系, 从 Zhao 等^[27] 为茶开发的 SSR 引物中筛选出了另外 2 对呈现多态性的有效引物, 即 228 和 641 (表 3), 进一步利用这 2 对引物对 16 份杜仲基因组 DNA 进行 SSR-PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳结果和聚丙烯酰胺凝胶电泳结果见图 10~图 13。

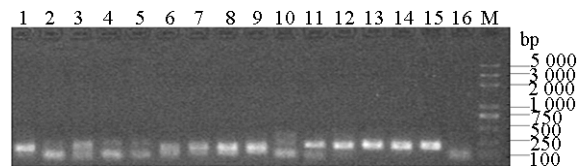


图 12 杜仲 SSR-PCR 琼脂糖凝胶电泳图谱(引物 641^[27])
Figure 12 Patterns of SSR-PCR for *E. ulmoides* using primer 641^[27] on agarose gel

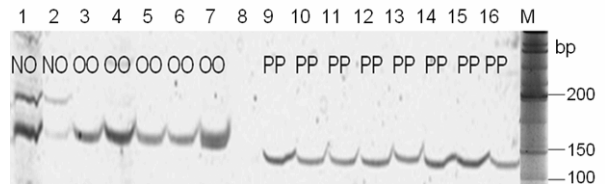


图 13 杜仲 SSR-PCR 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱(引物 641^[27])
Figure 13 Patterns of SSR-PCR for *E. ulmoides* using primer 641^[27] on PAAG

3 小结与讨论

由试验可知, SSR-PCR 反应受多种因素以及因素间互作的影响, 将正交试验和单因素试验相结合, 可以实现各因素水平间的最优组合。此外, 应用不同 SSR 引物扩增时, 还需对退火温度进行梯度试验。

本试验运用已筛选出的 3 对微卫星引物, 在对 16 份杜仲样本的微卫星位点进行扩增后, 共发现了 16 个等位基因 (表 3)。引物 TUGMS11^[26]: 基因 A、B、C、D 和 E; 引物 228^[27]: F、G、H、I、J、K、L 和 M; 引物 641^[27]: N、O 和 P; 7 种纯合基因型, 即 AA、CC、DD、EE、JJ、OO 和 PP; 12 种杂合基因型, 即 BC、CD、DE、GJ、GI、FJ、HJ、IJ、JK、JL、JM 和 NO。试验结果初步揭示了杜仲的遗传多样性, 证明了微卫星标记在遗传多样性研究上的优越性。

杜仲属于单科属种植物, 与茶 (*C. sinensis*) 亲缘关系较远, 虽然微卫星广泛分布于真核生物基因组中, 但微卫星位点在不同物种间保守性较差^[28], 本试验从前人对茶开发出的 39 对微卫星引物中, 只筛选出了 3 对适用于杜仲的多态性有效引物, 说明微卫星引物在不同物种间的通用性受物种间亲缘关系远近的影响。因此, 若构建了杜仲基因组文库, 可据此筛选出微卫星序列, 并进行特异性引物设计, 将为开发杜仲微卫星标记带来很大帮助, 并可节省时间和资源。

参考文献:

- [1] 张康健. 杜仲[M]. 北京: 中国林业出版社, 1990.
- [2] 张康健. 中国杜仲研究[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1992.
- [3] 马希汉, 张康健. 中国杜仲近代认识史上的四次飞跃[J]. 中成药, 2011, 33(8): 1393-1396.
- [4] 高桥周七. 杜仲中的抗衰老作用及机理[C]//张康健, 苏印泉. 首届国际杜仲学术会文集. 北京: 中国林业出版社, 1999: 159.
- [5] 杜红岩, 谢碧霞, 邵松梅. 杜仲胶的研究进展与发展前景[J]. 中南林学院学报, 2003, 23(4): 95-99.
- [6] 辛欣, 范青生, 罗眼科, 等. 杜仲籽油可食用性研究[J]. 中国油脂, 2007, 32(4): 15-19.
- [7] Tautz D. Hypervariability of simple sequence as a general source of polymorphic DNA markers[J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17(16): 6463-6471.
- [8] Akkaya M S, Bhagwata A A, Cregan P B. Length polymorphisms of simple repeat DNA in soybean[J]. Genetics, 1992, 132(4): 131-1139.
- [9] Wang Z, Weber J L, Zhong G, et al. Survey of plant short tandem repeats[J]. Theor Appl Genet, 1994, 88(1): 1-6.
- [10] Zhang Y, Sledge M K, Bouton J H. Genome mapping of white clover (*Tri folium repens* L.) and comparative analysis within the Trifolieae using cross-species SSR markers[J]. Theor Appl Genet, 2007, 114(8): 1367-1378.
- [11] Tsukazaki H, Yamashita K, Yaguchi S, et al. Construction of SSR-based chromosome map in bunching onion (*Allium Wstulosum*)[J]. Theor Appl Genet, 2008, 117(8): 1213-1223.
- [12] Lokko Y, Dixon A, Offei S, et al. Assessment of genetic diversity among African cassava *Manihot esculenta* Grantz accessions resistant to the cassava mosaic virus disease using SSR markers[J]. Genet Resour Crop Ev, 2006, 53(7): 1441-1453.
- [13] Zhang P, Dreisigacker S, Buerkert A, et al. Genetic diversity and relationships of wheat landraces from Oman investigated with SSR markers[J]. Genet Resour Crop Ev, 2006, 53(7): 1351-1360.
- [14] 张延东, 何丽霞, 李睿, 等. 杜仲 *Eucommia ulmoides* 的核型分析[J]. 甘肃林业科技, 2008, 33(3): 1-4.
- [15] 高鹏, 林威, 康向阳. 秋水仙碱诱导杜仲花粉染色体加倍的研究[J]. 北京林业大学学报, 2004, 26(4): 39-42.
- [16] 王跃华. 杜仲种子的多倍体诱导研究[J]. 亚太传统医药, 2006(8): 73-76.
- [17] 张焕玲, 李俊红, 李周岐. 秋水仙素处理杜仲种子诱导多倍体的研究[J]. 西北林学院学报, 2008, 23(1): 78-81.
- [18] 张海凤, 郭宝林, 张成合, 等. 杜仲四倍体的诱导与鉴定[J]. 园艺学报, 2008, 35(7): 1047-1052.
- [19] Jiang J H, Kai Y, Cao X Y, et al. Molecular Cloning of a HMG-CoA Reductase Gene from *Eucommia ulmoides* Oliver[J]. Biosci Rep, 2006, 26(2): 171-181.
- [20] Xu W J, Wang B W, Cui K M. RAPD and SCAR markers linked to sex determination in *Eucommia ulmoides* Oliv.[J]. Euphytica, 2004, 136(3): 233-238.
- [21] Wang D W, Li Y, Li Z Q. Identification of a male-specific amplified fragment length polymorphism (AFLP) and a sequence characterized amplified region (SCAR) marker in *Eucommia ulmoides* Oliv.[J]. Int J Mol Sci, 2011, 12(1): 857-864.
- [22] 王瑗琦, 黄璐琦, 邵爱娟, 等. 子遗植物杜仲的遗传多样性 RAPD 分析和保护策略研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(19): 1583-1586.
- [23] 邓建云, 李建强, 黄宏文. 一株具有特异 AFLP 指纹图谱的杜仲古树[J]. 武汉植物学研究, 2006, 24(6): 509-513.
- [24] Yao X H, Deng J Y, Huang H W. Genetic diversity in *Eucommia ulmoides* (Eucommiaceae), an endangered traditional Chinese medicinal plant[J]. Conserv Genet, 2012, DOI 10.1007/s10592-012-0393-3.
- [25] Deng J Y, Liu Y F, Huang H W. Development and characterization of microsatellite markers in *Eucommia ulmoides* Oliver (Eucommiaceae)[J]. Mol Ecol, 2006, 6(2): 496-498.
- [26] Sharma R K, Bhardwaj P, Negi R, et al. Identification, characterization and utilization of unigene derived microsatellite markers in tea (*Camellia sinensis* L.)[J/OL]. BMC Plant Biology, 2009, 9: 53. <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/9/53>.
- [27] Zhao L P, Liu Z, Chen L, et al. Generation and characterization of 24 novel EST derived microsatellites from tea plant (*Camellia sinensis*) and cross-species amplification in its closely related species and varieties[J]. Conserv Genet, 2008, 9(5): 1327-1331.
- [28] 杨进. SSR 标记技术在植物遗传多样性研究上的应用[J]. 农业生物技术科学, 2006, 22 (7): 90-94.