

文章编号:1001-1498(2016)04-0565-06

红椿 SSR-PCR 体系建立和多态性引物筛选

湛欣, 鲁好君, 赵帅, 陈晓阳, 邓小梅*

(华南农业大学 林学与风景园林学院/广东省森林植物种质创新与利用重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要: [目的] 本研究旨在建立红椿 SSR-PCR 最佳反应体系, 并筛选适于红椿 SSR 分析的高多态性引物。 [方法] 通过 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计, 确立红椿 SSR-PCR 最佳反应体系; 利用优化后的体系对来自楝科植物的 135 对 SSR 引物, 在 6 个不同的红椿居群中进行扩增, 筛出能有效扩增的引物并进一步筛选出适于红椿的高多态性引物。 [结果] (1) 10 μL 基于荧光 dUTP 的 SSR-PCR 体系中包含: $10 \times \text{buffer}$ 1.0 μL , Taq 酶 ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.1 μL , MgCl_2 ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.8 μL , dNTP ($200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.025 μL , 荧光 dUTP ($1 \text{ nmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.01 μL , 引物 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.8 μL , DNA 模板 45 ng 剩余用 ddH_2O 补足; (2) 筛选出 29 对能有效扩增的引物, 复选后获得了 12 对适于红椿 SSR 分析的高多态性引物。 [结论] 建立了 SSR-PCR 最佳反应体系并筛选出高多态性引物, 为红椿的分子标记等遗传学研究提供了基础。

关键词: SSR; 红椿; 体系优化; 引物筛选

中图分类号: S792.99

文献标识码: A

Establishment and Primer Screening of SSR-PCR Reaction System for *Toona ciliata*

ZHAN Xin, LU Hao-jun, ZHAO Shuai, CHEN Xiao-yang, DENG Xiao-mei

(College of Forestry and Landscape Architecture/Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China)

Abstract: [Objective] To establish SSR-PCR reaction system, and screen high polymorphism primers for SSR analysis of *Toona ciliata*. [Method] The orthogonal design was employed to obtain the optimal SSR-PCR system of *T. ciliata*. Using optimized system of SSR-PCR, 135 pairs of SSR primers from Meliaceae plants were amplified in six populations. [Result] The optimal 10 μL reaction system contained 1.5 μL 30 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ Template DNA, 0.8 μL 10 $\text{umol} \cdot \text{L}^{-1}$ primers, 0.025 μL 10 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs, 0.8 μL 25 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mg^{2+} , 0.1 μL 5 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ taq DNA polymerase, 0.01 μL 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ F-dUTP, 1 μL 10 \times PCR buffer (Mg^{2+} free) and 5.765 μL ddH_2O . 12 primers with high polymorphism were selected among 29 primer combinations. [Conclusion] The optimal reaction system of SSR-PCR were established and high polymorphism primers were selected, which could be used in analysis of fingerprinting genetic diversity, molecular breeding and variety identification in *T. ciliata*.

Keywords: *Toona ciliata*; SSR-PCR; system optimization; primers screening

楝科 (Meliaceae) 香椿属 (*Toona*) 植物红椿 (*Toona ciliata*) 又名红楝子, 为落叶或近常绿乔木, 是国家二级重点保护野生植物。红椿木材材色红褐色、

花纹美丽, 素有“中国桃花心木”之称, 生长迅速、适应性强、分布广, 是珍贵的速生用材树种^[1-2]。但是, 红椿天然林自然更新缓慢, 人为破坏严重, 已濒

收稿日期: 2015-07-06

基金项目: 国家林业局公益性行业专项 (201004020)。

作者简介: 湛欣 (1988—), 男, 植物学硕士研究生; E-mail: zx0256@foxmail.com

* 通讯作者: 邓小梅 (1966—), 女, 教授, 博士, 主要从事林木遗传育种研究; E-mail: dxmei2006@scau.edu.cn

临灭绝,在广西、云南、贵州、江西、浙江等省均只剩少量零星分布的天然林^[3-4]。了解红椿遗传多样性,是了解其濒危原因、制定有效的保护措施和良种选育的基本前提。

微卫星标记是基于 DNA 长度多态性的检测技术,具有共显性、重复性好、多态性高等特点,已在遗传多样性检测、遗传图谱的构建、基因定位、分子标记辅助育种等研究领域得到了广泛的应用^[5-6]。刘军^[6-7]等利用改良的链亲和磁珠法设计并筛选了 8 对毛红椿 SSR 引物,对毛红椿遗传多样性进行了评价。但其开发的引物数量较少、多态性有限,经验证后仅有 4 对 SSR 引物在红椿群体中具备高的多态性,无法满足红椿进一步的指纹图谱构建及分子育种等工作。

本研究旨在建立红椿的 SSR-PCR 反应体系,并选适于红椿 SSR 分析高多态性引物。

1 材料和方法

1.1 试验材料

2013 年 5—10 月在安徽泾县、江西井冈山、湖北恩施、四川德昌、云南保山、广西西林 6 个红椿天然居群(表 1)分单株采集红椿大树中上部的成熟叶片。每个居群里随机选择 3 个单株叶片用于建立红椿的 SSR-PCR 反应体系及引物筛选。采到的新鲜叶片迅速用硅胶干燥后带回实验室,于 -80°C 低温冰箱保存。

1.2 引物及试剂

从已公布的桃花心木、毛红椿等楝科植物文献资料中选择 135 对 SSR 引物(表 2),由深圳华大基因科技服务有限公司合成。试验中 Taq 酶、dNTPs、 MgCl_2 、 $10\times\text{PCR Buffer}$ (Mg^{2+} free)均购自 TaKaRa 公司,荧光 dUTP 购自 Fermentas 公司。

1.3 红椿 DNA 的提取

采用 E. Z. N. A. TM HP Plant DNA kit 试剂盒(O-

mega)提取红椿叶片基因组 DNA,具体操作参考试剂盒说明书。利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,Thermo NANODROP 1000 核酸仪(Thermo 公司)测定 DNA 的 $A_{260/280}$ 、 $A_{260/230}$ 值及浓度,将各红椿样品 DNA 浓度调至 $30\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 作为工作液并置于 -20°C 冰箱中备用。

1.4 红椿 SSR-PCR 反应体系的优化

本试验采用基于荧光 dUTP 的 SSR-PCR 体系,使用低浓度 dNTP 和降落 PCR 程序^[7],在荧光 dUTP ($1\text{ nmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $0.01\mu\text{L}$,dNTP($200\text{ m mol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $0.025\mu\text{L}$ 的基础上建立红椿 SSR-PCR 反应体系,针对 Taq 酶、 Mg^{2+} 、引物和模板 DNA 等 4 个因素进行 $L_{16}(4^5)$ 正交试验,第 5 列作空白对照(表 2)。引物 TC17 为正交试验所用引物。 $10\mu\text{L}$ PCR 反应体系中,各组除添加不同处理外,还加入 $1\mu\text{L}$ $10\times\text{PCR Buffer}$,剩余用 ddH₂O 补足至 $10\mu\text{L}$ 。用 PCR 基因扩增仪(MyCycler, Bio-Red, Hercules)扩增,降落 PCR 反应程序为 94°C 预变性 4 min, 然后进行 19 个循环(94°C 变性 0.5 min, 66°C 退火 0.5 min, 退火温度每循环降低 0.5°C , 72°C 延伸 0.5 min), 再进行 26 个循环(94°C 变性 0.5 min, 56°C 退火 0.5 min, 72°C 延伸 0.5 min), 最后 72°C 延伸 10 min。

1.5 红椿 SSR 引物的筛选

利用优化后得到的最佳 PCR 体系,以待测的 6 个红椿居群(表 1)的叶片基因组 DNA 作为模板,将 135 对 SSR 引物(表 2)的扩增产物通过 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行有效引物筛选,再取有效引物的 PCR 产物 $2\mu\text{L}$,加 $7.8\mu\text{L}$ 超纯甲酰胺和 $0.2\mu\text{L}$ GS500 LIZ 内标混合均匀后 95°C 变性 5 min,并立即在 4°C 降温。变性后的 PCR 产物在 ABI 3130xl 遗传分析仪(ABI 公司)上进行分型,分型结果采用 GeneMapper 4.0 软件进行数据分析,以检测其多态性。

表 1 6 个红椿居群的地理位置和编号

居群	编号	纬度/N	经度/E	海拔/m	采样数/棵	采样时间
安徽泾县	JX	$30^{\circ}31'$	$118^{\circ}36'$	370	15	10 月
江西井冈山	JG	$26^{\circ}44'$	$114^{\circ}17'$	380	24	10 月
湖北恩施	ES	$30^{\circ}17'$	$109^{\circ}28'$	980	16	10 月
四川德昌	DC	$27^{\circ}24'$	$102^{\circ}10'$	1 300	27	7 月
云南保山	BS	$24^{\circ}59'$	$99^{\circ}01'$	1 401	24	5 月
广西西林	XL	$24^{\circ}29'$	$105^{\circ}50'$	800	25	6 月

表2 楝科植物 135 对 SSR 引物信息表

引物来源	引物/对	引用文献	编号
<i>Khaya senegalensis</i>	12	[8]	TC1 ~ TC12
<i>Carapa guianensis</i>	4	[9]	TC13 ~ TC16
<i>Toona ciliate. Var. pubescens</i>	18	[10]	TC17 ~ TC34
<i>Swietenia macrophylla</i>	5	[11]	TC35 ~ TC39
<i>Khaya senegalensis</i>	12	[12]	TC40 ~ TC51
<i>Cabralea canjerana</i>	8	[13]	TC52 ~ TC59
<i>Swietenia kumilis</i>	10	[14]	TC60 ~ TC69
<i>Azadirachta indica</i>	7	[15]	TC70 ~ TC76
<i>Cedrela odorata.</i>	9	[16]	TC77 ~ TC85
<i>Khaya senegalensis</i>	11	[17]	TC86 ~ TC96
Meliaceae family	4	[18]	TC97 ~ TC100
<i>Swietenia macrophylla</i>	9	[19]	TC101 ~ TC109
<i>Melia volkensii Gurke</i>	25	[20]	TC110 ~ TC124
<i>Guarea guidonia</i>	11	[21]	TC125 ~ TC135

表3 SSR-PCR 正交实验设计(L₁₆)

处理	因素			
	Taq 酶/ (U · μL ⁻¹)	引物/ (μmol · μL ⁻¹)	模板 DNA/ (ng · μL ⁻¹)	Mg ²⁺ / (mmol · μL ⁻¹)
1	0.05	0.4	1.5	1
2	0.05	0.6	3	1.5
3	0.05	0.8	4.5	2
4	0.05	1	6	2.5
5	0.075	0.4	3	2
6	0.075	0.6	1.5	2.5
7	0.075	0.8	6	1
8	0.075	1	4.5	1.5
9	0.1	0.4	4.5	2.5
10	0.1	0.6	6	2
11	0.1	0.8	1.5	1.5
12	0.1	1	3	1
13	0.125	0.4	6	1.5
14	0.125	0.6	4.5	1
15	0.125	0.8	3	2.5
16	0.125	1	1.5	2

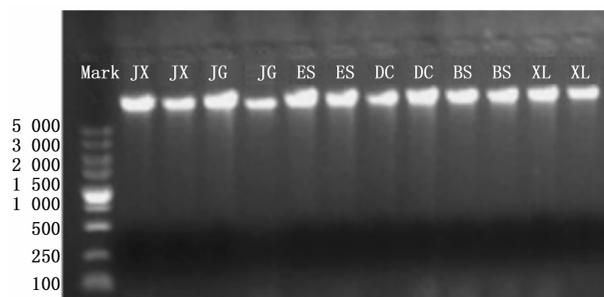
2 结果与分析

2.1 红椿基因组 DNA 的提取及质量检测

使用 E. Z. N. A.™ HP Plant DNA kit 试剂盒提取的红椿基因组 DNA 带型清晰、完整性好、浓度高、无杂带及拖尾现象,电泳结果如图 1。使用分光光度计检测其 A_{260/280} 比值均在 1.7 ~ 1.9 之间, A_{260/230} 值在 2.0 ~ 2.2, 证明所提取的 DNA 中蛋白质、糖及酚类物质的污染较低。所提 DNA 浓度在 150 ng · μL⁻¹ 以上, 经稀释至 30 ng · μL⁻¹ 后可满足 PCR 反应要求。

2.2 红椿 SSR-PCR 体系优化结果

正交试验的 SSR-PCR 产物琼脂糖电泳结果如图 2 所示, 16 个处理中 2#、3#、4#、5#、6#、8#、15#、16



注:各 DNA 样品编号见表 1;图左侧数字为条带大小,

例如 5 000 bp, 3 000 bp 等,下同。

图1 红椿 DNA 琼脂糖电泳检测。

#均有比较清晰的条带,清晰度依次为 4#、15#、3#、8#、2#、16#、10#、6#、5#、12#、9#;处理 1#、7#、14# 结果均无条带显示。以产物主带清楚度,非特异扩增为标准对结果进行打分评判,效果最好的计最高分 16 分,最差的计最低分 1 分,16 个处理依次打分为:1、12、14、16、7、8、1、10、5、8、3、5、3、1、15、9。对这 16 个组合的评分数据应用 SPSS 19.0 软件进行方差分析,根据 F 值的大小判断各因素对反应效果的影响程度依次为: Mg²⁺ > 引物 > Taq 酶 > DNA 浓度。由于处理 4 和处理 15 的 Taq 聚合酶或模板 DNA 用量过高,结合成本等因素考虑,最终确定处理 3 为最优反应体系,即 10 μL 基于荧光 dUTP 的 SSR-PCR 体系中包含 10 × buffer 1.0 μL, Taq Polymerase (5 U · μL⁻¹) 0.1 μL, MgCl₂ (25 mmol · μL⁻¹) 0.8 μL, dNTP (200 mmol · μL⁻¹) 0.025 μL, 荧光 dUTP (1 nmol · μL⁻¹) 0.01 μL, 引物 (10 mmol · L⁻¹) 0.8 μL, DNA 模板 45 ng, 剩余用 ddH₂O 补足。

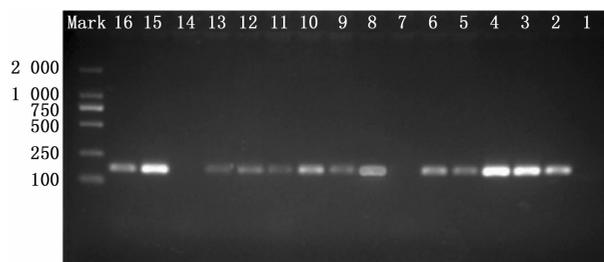


图2 红椿 SSR-PCR 正交试验电泳

表4 SSR-PCR 正交实验方差分析

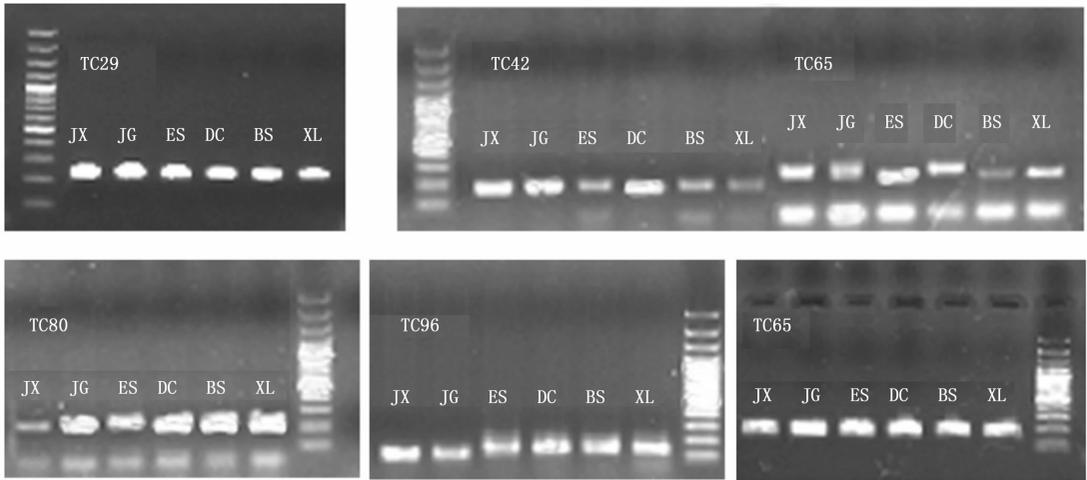
变异来源	自由度	方差	均方	F
模型	12	371.50	30.96	11.26*
Taq 酶	3	67.25	22.42	8.15
引物浓度	3	76.25	25.42	9.24*
DNA 浓度	3	41.25	13.75	5.00
Mg ²⁺ 浓度	3	186.75	62.25	22.64**
误差	3	8.25	2.75	
总计	27	751.25		
矫正总计	15	379.75		

注: ** 表示 p ≤ 0.01 差异极显著, * 表示 p ≤ 0.05 差异显著。

2.3 最佳优化体系在引物筛选中的应用

利用优化的 SSR-PCR 反应体系,以不同来源的 6 个居群的红椿叶片基因组 DNA 作为模板,对来自楝科不同植物的 135 对 SSR 引物进行筛选。扩增后产物先用 2% 琼脂糖电泳进行有效扩增的初筛

(图 3),筛选出能扩增出单一清晰的目标条带的有效引物。再取初筛后的引物 PCR 扩增产物,经变性后在 ABI 3130xl 遗传分析仪上进行分型(图 4),筛选具有多态性的引物,以此也证明该体系具有较好的稳定性和可重复性。



注:所用 maker 为 100 bp DNA ladder Maker,条带大小依次为:100 bp,200 bp,300 bp,400 bp,500 bp,600 bp,700 bp,800 bp,900 bp,1 000 bp,1 500 bp。

图 3 初筛后部分有效引物的琼脂糖电泳结果。

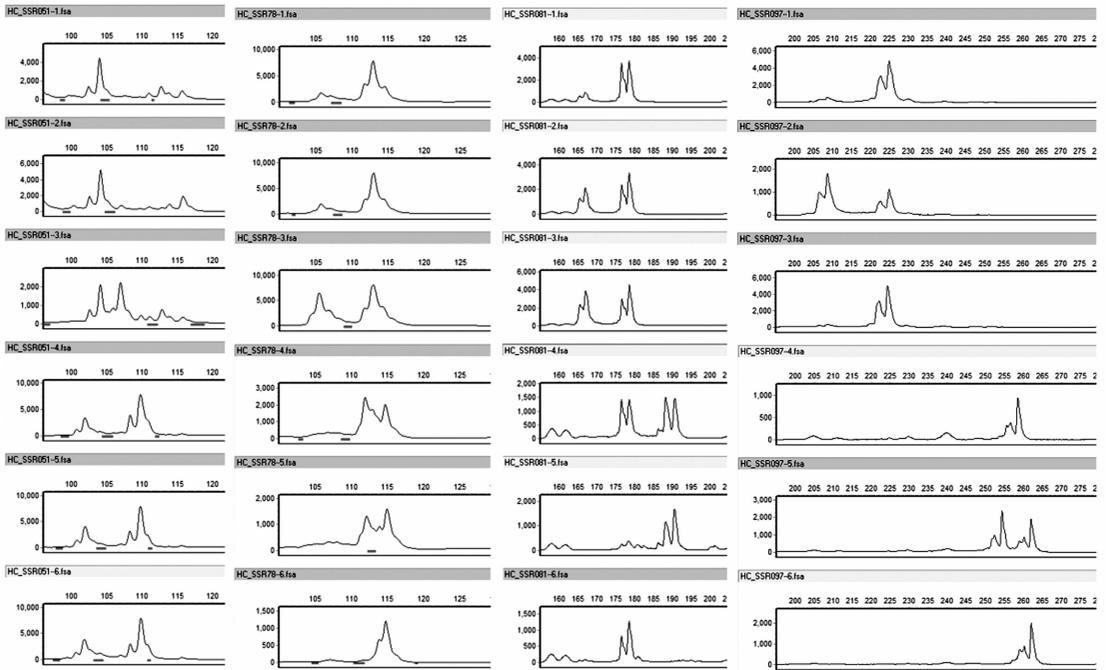


图 4 部分具有多态性的引物的电泳结果

经 2% 琼脂糖电泳进行有效扩增的初筛后,共获得引物 29 对,占引物总数的 21.5%。在遗传分析仪的分型结果中,共选出 12 对荧光信号峰值高、稳

定且具有丰富多态性的引物,其产生的多态性标记效率为 8.88%,占初筛引物的 41.4%。筛选出的 12 对引物具体情况如表 5。

表5 红椿基因组 12 个 SSR 位点的扩增引物

编号	上游引物	下游引物	重复单元	片段大小/bp
TC17	GTGGCGTAACAGACCAAAAC	CCAGAGATACTCCATTCCAG	(GA) _n	144 ~ 160
TC18	CACTTAGCCTGTAGCACTAG	CTTCACCAAACCTCATCTCTC	(CTCTT) _n	119 ~ 184
TC20	GAAACCAGCAGGCAGAGC	GAAGAAGGGTGAGCGAGA	(AG) _n	186 ~ 232
TC26	AAGCCAGTCAGCAACCTA	GATTAAGTAATATTTGGGTGGT	(GA) _n	295 ~ 331
TC29	ATGGATGAGTGTGCGATAGG	TGTGATGTAGGAGTCTGAAC	(TC) _n	231 ~ 273
TC51	ACAACCTTTTTACGTCCACCT	CATCATCTTCTTCTGTTACGG	(GCT) _n	101 ~ 119
TC78	CAAAGACCAAGATTGTATGC	ACTATGGGTGGCACAACACTAC	(GA) _n	105 ~ 127
TC81	GATCTCACCCACTGAAAAA	GCTCATATTTGAGAGGCATT	(GA) _n (AG) _n G(GA) _n	167 ~ 195
TC83	GAGTGAGAAGAAGATCGTGATAGC	GAGGTTTCGATCAGGTCTTGG	(GA) _n (CA) _n	145 ~ 177
TC97	GAGATACAGTTGGTGGTTAGAGG	TCTTCACCTGTTGCCTCTC	(CT) _n	208 ~ 284
TC98	TCATTTGGAATCTGGGTTCT	TTATTTTCGATCCCTTCGCTC	(T) _n	178 ~ 194
TC122	GTGCAGTGTCCATGTGAAG	GACATTTTCTCTGCAAGGTCA	(CA) _n	153 ~ 171

3 讨论

在 PCR 反应体系中加入荧光 dUTP 后,其与 dNTP 中的 dTTP 竞争结合到 PCR 产物中,再利用测序仪进行 SSR 自动分型是比较经济且高效准确的方法^[22],已成功应用于蜥蜴、三叶杨等多个物种的研究中^[23-25]。本研究采用低浓度 dNTP 和降落 PCR 程序来提高荧光信号和分型的准确性^[7],同时也有效减少了工作量。在此基础上对 PCR 扩增反应中的 Taq 酶、Mg²⁺、引物以及 DNA 模板量,利用正交试验设计进行了优化,得到一套能够稳定扩增且经济、可靠的基于荧光 dUTP 的 SSR-PCR 体系,为今后红椿遗传多样性分析及指纹图谱的构建等研究提供了有力的支持。通过琼脂糖凝胶电泳直观分析,得出红椿 SSR-PCR 反应体系的最佳处理为 3 号。正交试验方差分析表明,Mg²⁺ 对红椿 SSR-PCR 体系具有最大的影响,Mg²⁺ 是 Taq 聚合酶的激活剂,Mg²⁺ 浓度能直接影响反应的特异性和产率^[26],浓度过低,酶活力不够,会导致扩增产物减少,过高则非特异性扩增产物增多,因此在体系优化时需特别注意 Mg²⁺ 的用量。

SSR 是一种优秀的分子遗传标记,但 SSR 标记应用需根据物种已知 DNA 序列设计特异引物,才能进行 PCR 扩增。对于大多数物种而言,目前获得的基因组序列还非常有限或者根本没有^[27]。种间转移扩增是寻找 SSR 位点最简单最省时的方法之一^[28]。一般认为,SSR 引物在同科或更近物种间具有适用性^[5],引物可成功在物种间扩增且有相当高的多态性^[27]。本研究利用已公布的毛红椿、桃花心木等楝科植物的 135 对 SSR 引物,筛选出 12 对能在红椿中稳定扩增且具有高多态性的引物,但产生多

态性标记的效率比较低,仅为 8.88%,这应与本研究中选用的引物多来自楝科内香椿属外有关,与红椿有较远的亲缘关系。Yamamoto 等研究也表明属间可以共用 SSR 引物,但相对比较困难^[29]。因此在利用种间转移扩增寻找微卫星位点时,SSR 引物应尽量来自同属植物或密切相关的属间,以提高产生多态性标记的效率。

4 结论

本研究通过 L₁₆(4⁵) 正交试验设计,确立了红椿 SSR-PCR 最佳反应体系:10 μL 基于荧光 dUTP 的 SSR-PCR 体系中包含 10 × buffer 1.0 μL, Taq 酶(5 U · μL⁻¹) 0.1 μL, MgCl₂ (25 mmol · L⁻¹) 0.8 μL, dNTP(200 mmol · L⁻¹) 0.025 μL, 荧光 dUTP(1 nmol · μL⁻¹) 0.01 μL, 引物(10 mmol · L⁻¹) 0.8 μL, DNA 模板 45 ng, 剩余用 ddH₂O 补足;利用优化后的体系对来自楝科植物的 135 对 SSR 引物,在 6 个不同居群的红椿中进行扩增,筛选出 29 对能有效扩增的引物,复选后获得了 12 对适于红椿 SSR 分析的高多态性引物,为红椿后续分子标记等遗传学研究提供了基础。

参考文献:

- [1] 李志辉,李柏海,祁承经,等. 我国南方珍贵用材树种资源的重要性及其发展策略[J]. 中南林业科技大学学报. 2012, 32(11): 1-8.
- [2] 甘文峰,余林,叶金山,等. 珍贵用材树种毛红椿研究进展综述[J]. 江西林业科技. 2014(05): 33-37.
- [3] 黄红兰,张露,郭晓燕,等. 九连山毛红椿种群的结实特性及其生殖力[J]. 林业科学. 2013(07): 170-174.
- [4] 刘军,陈益泰,罗阳富,等. 毛红椿天然林群落结构特征研究[J]. 林业科学研究. 2010, 23(1): 93-97.
- [5] 李明芳,郑学勤. 开发 SSR 引物方法之研究动态[J]. 遗传.

- 2004, 26(5): 769–776.
- [6] 刘军, 陈益泰, 姜景民, 等. 毛红椿群体遗传结构的 SSR 分析[J]. 林业科学研究. 2009(01): 37–41.
- [7] Li F, Gan S. An Optimised Protocol for Fluorescent-dUTP Based SSR Genotyping and its Application to Genetic Mapping in *Eucalyptus*[J]. SILVAE GENETICA. 2011, 60(1): 18–25.
- [8] Lemes M R, Esashika T, Gaoue O G. Microsatellites for mahoganies: Twelve new loci for *Swietenia macrophylla* and its high transferability to *Khaya senegalensis* [J]. American Journal of Botany. 2011, 98(8): e207–e209.
- [9] Dayanandan S, Dole J, Bawa K. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae)[J]. Molecular Ecology. 1999, 8(10): 1585–1592.
- [10] Liu J, Jiang J M, Chen Y T. Genetic diversity of central and peripheral populations of *Toona ciliata* var. *pubescens*, an endangered tree species endemic to China[J]. Genet Mol Res. 2014, 13(2): 4579–4590.
- [11] Cespedes M, Gutierrez M V, Holbrook N M, et al. Restoration of genetic diversity in the dry forest tree *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) after pasture abandonment in Costa Rica[J]. Molecular Ecology. 2003, 12(12): 3201–3212.
- [12] Sexton G J, Frere C H, Dieters M J, et al. Development and characterization of microsatellite loci for *Khaya senegalensis* (Meliaceae) [J]. American Journal of Botany. 2010, 97(11): e111–e113.
- [13] Pereira M F, Bandeira L F, Blanco A J V, et al. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Cabralea canjerana* (Meliaceae) [J]. American Journal of Botany. 2010, 98(1): e10–e12.
- [14] White G, Powell W. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species [J]. Molecular Ecology. 1997, 6(9): 851–860.
- [15] Boontong C, Pandey M, Changtragoon S. Isolation and characterization of microsatellite markers in Indian neem (*Azadirachta indica* var. *indica* A. Juss) and cross-amplification in Thai neem (*A-indica* var. *siamensis* Valenton) [N]. 03/08/2013 (669–671).
- [16] Hernandez G, Buonamici A, Walker K. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Cedrela odorata*. (Meliaceae), a high value neotropical tree [J]. Conservation Genetics. 2008, 9(2): 457–459.
- [17] Karan M, Evans D S, Reilly D, et al. Rapid microsatellite marker development for African mahogany (*Khaya senegalensis*, Meliaceae) using next-generation sequencing and assessment of its intra-specific genetic diversity [J]. Molecular Ecology Resources. 2012, 1(2): 344–353.
- [18] White G, Powell W. Cross-species amplification of SSR loci in the Meliaceae family [J]. Molecular Ecology. 1997, 6(12): 1195–1197.
- [19] Lemes M, Brondani R, Grattapaglia D. Multiplexed Systems of Microsatellite Markers for Genetic Analysis of Mahogany, *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae), a Threatened Neotropical Timber Species [J]. Journal Of Heredity. 2002, 93(4): 287–291.
- [20] Hanaoka S, Muturi G M, Watanabe A. Isolation and characterization of microsatellite markers in *Melia volkensii* Gurke [J]. Conservation Genetics Resources. 2012, 4(2): 395–398.
- [21] De Lima P F, Ramos F N, Zucchi M I, et al. Development and characterization of microsatellite markers from *Guarea guidonia* (Meliaceae), a tree species from different habitats within the Brazilian Atlantic forest [J]. Conservation Genetics Resources. 2009, 1(1): 171–173.
- [22] Magnusson P K E, Wilander E, Gyllensten U. Analysis of loss of heterozygosity in microdissected tumor cells from cervical carcinoma using fluorescent dUTP labeling of PCR products [J]. Biotechniques. 1996, 21(5): 844–847.
- [23] Woolbright S A, Difazio S P, Yin T, et al. A dense linkage map of hybrid cottonwood (*Populus fremontii* x *P.-angustifolia*) contributes to long-term ecological research and comparison mapping in a model forest tree [J]. Heredity. 2008, 100(1): 59–70.
- [24] Busch J D, Benford R, Pearson T, et al. Development of polymorphic tetranucleotide microsatellites for pinyon jays (*Gymnorhinus cyanocephalus*) [J]. Conservation Genetics. 2009, 10(3): 689–691.
- [25] Macavoy E S, McGibbon L M, Sainsbury J P, et al. Genetic variation in island populations of tuatara (*Sphenodon* spp) inferred from microsatellite markers. [J]. Conservation Genetics. , 8(2): 305–318.
- [26] 徐阳, 陈金慧, 王颖, 等. 杉木 SSR-PCR 体系优化 [J]. 林业科技开发. 2014(01): 15–20.
- [27] 陈怀琼, 隋春, 魏建和. 植物 SSR 引物开发策略简述 [J]. 分子植物育种. 2009, 7(4): 845–851.
- [28] 曾庆国, 陈艺燕. 微卫星位点筛选方法综述 [J]. 生态科学. 2005(04): 368–372.
- [29] 王丽, 赵桂仿. 植物不同种属间共用微卫星引物的研究 [J]. 西北植物学报, 2005(08): 1540–1546.

(责任编辑:张 研)