

文章编号:1001-7380(2016)06-0006-06

基于 EST-SSR 标记的欧洲红皮柳遗传变异分析

郑纪伟¹, 孙冲^{1,2}, 周洁¹, 何旭东^{1*}

(1. 江苏省林业科学研究院, 江苏 南京 211153; 2. 南京林业大学, 江苏 南京 210037)

摘要:利用 25 个柳树 EST-SSR 标记对欧洲红皮柳 18 个个体进行基因分型, 并通过标记多态性来检验个体间的遗传变异情况。结果表明: 25 个标记共检测到 100 条等位片段, 每个位点等位基因数从 1—12 个不等, 平均 4 个。其中 23 个标记表现为多态性, 其观测杂合度 (H_o) 变化范围为 0.055 5 到 1.0, 平均为 0.627 2; 期望杂合度 (H_e) 变化范围为 0.055 5 到 0.852 3, 平均为 0.567 8; 多态信息量 (PIC) 变化范围为 0.812 5 到 0.052 5, 平均值为 0.494 1。聚类分析显示, 在遗传相似度为 0.52 处, 欧洲红皮柳 18 个个体分为 2 组。该研究为欧洲红皮柳核心种质的收集与利用提供了理论依据。

关键词:欧洲红皮柳; 微卫星; 遗传变异; 亲缘关系

中图分类号:S792.12; Q754 **文献标志码:**A **doi:**10.3969/j.issn.1001-7380.2016.06.002

Analysis of genetic variation of *Salix purpurea* based on EST-SSR markers

ZHENG Ji-wei¹, SUN Chong^{1,2}, ZHOU Jie¹, HE Xu-dong^{1*}

(1. Jiangsu Academy of Forestry, Nanjing 211153, China; 2. Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: In this paper, 18 individuals of *Salix purpurea* were genotyped by 25 EST-SSR markers, and the genetic variations of these individuals were evaluated through marker polymorphism. The result showed that 100 alleles had been detected from 25 EST-SSR in total, of which 23 markers were polymorphic. The number of alleles ranged from 1 to 12, with an average of 4 alleles per locus. The observed heterozygosity (H_o), the expected heterozygosity (H_e) and the polymorphic information content (PIC) varied with locus from 0.055 5 to 1.0 (mean equals 0.627 2), 0.055 5 to 0.852 3 (mean equals 0.567 8) and 0.052 5 to 0.812 5 (mean equals 0.494 1) respectively. Two main groups were divided with the similarity coefficient of 0.52 by dendrogram analysis. This study could provide a theoretical basis for the collection and utility of *S. purpurea* core germplasm.

Key words: *S. purpurea*; SSR; Genetic variation; Genetic relationship

柳树是我国重要的园林绿化与速生用材树种^[1], 在欧美等发达国家还被广泛用于能源林建设^[2]。柳树种质资源的保存与利用, 对柳树遗传改良、品种选育、营林生产及保持生物多样性具有重要意义。江苏省林业科学研究院建有国家级柳树良种基地及种质资源保存圃, 收集并保存了全国范围内 40 多个自然种、2 000 多份资源, 以及来源于美国、英国等多个国家的 200 余份资源。随着样本数

量的不断增多, 种质资源的保存与评价也越发困难, 急需构建柳树种质资源核心库, 以实现种质资源的高效管理及遗传多样性的有效利用。

资源核心库的概念最早于 1984 年由 Frankel 提出, 它是种质资源库的一个代表性子集, 具有最小的遗传冗余, 样本有限但最大程度地保存了整个群体的遗传多样性及结构^[3]。核心种质构建的关键是准确地评价材料间的遗传差异以及合理的抽样

收稿日期: 2016-11-25; 修回日期: 2016-12-03

基金项目: 国家林业局 948 项目“高生物量灌木柳遗传资源及培育技术引进”(2012-4-38); 江苏省农业科技自主创新资金项目“观赏柳树新品种选育”[CX(14)2024]

作者简介: 郑纪伟(1986-), 男, 河南嵩县人, 硕士。主要从事植物学研究。

* 通信作者: 何旭东(1981-), 男, 江苏句容人, 副研究员, 博士。主要从事林木遗传育种研究。E-mail: hxd_519@163.com。

策略,而 SSR 标记由于其具有多态性高、稳定性好、多等位基因、共显性、数量丰富等优点^[4],已成为遗传多样性分析、亲缘关系鉴定、指纹图谱构建和分子标记辅助选择育种等方面研究的首选标记^[5-7]。目前,在玉米^[8]、水稻^[9]、甘蔗^[10]、辣椒^[11]、西瓜^[12]、白菜^[13]等作物上已广泛开展利用 EST-SSR 标记构建核心资源库的研究,而在林木上仅在核桃^[14]、山葡萄^[15]及美洲黑杨^[16]中有相关报道。

欧洲红皮柳 (*Salix purpurea* C. Wang et Ch. Y. Yang) 原产于欧洲,北美有栽植。作为林木遗传学研究的模式树种,欧洲红皮柳已完成全基因组测序 (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Spurpurea)。本研究选取前期开发的 25 个 EST-SSR 标记对欧洲红皮柳 18 个个体进行基因分型,通过重测序确认标记序列,并利用多态性的标记分析其遗传变异情况,旨在揭示欧洲红皮柳不同个体间的亲缘关系,为其后柳树种质资源核心库的构建提供理论依据与技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为江苏省林业科学研究院于 2012 年

从美国康奈尔大学的引进的欧洲红皮柳 18 个个体,编号依次为 94001, 94003, 94004, 94005, 94006, 94009, 94011, 94012, 94013, 94014, 94015, 95001, 95005, 95026, 95038, 95049, 95058 和 95071。采集地点为其种质资源圃内,采集当年生幼嫩的叶片,于 -70 °C 超低温冰箱中保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 采用改良 CTAB 法,具体步骤参照文献^[17]。

1.2.2 基因分型与重测序 基因分型与重测序中用到的 EST-SSR 引物来自郑纪伟^[18] 硕士论文,引物信息见表 1。基因分型采用荧光 dUTP 法,基因分型采用 10 μL 反应体系(见表 2),PCR 扩增程序采用 Touch-Down 程序:94 °C 预变性 4 min;94 °C 变性 30 s;T_m+10 °C—T_m 退火(每个循环降低 0.5 °C)30 s;72 °C 延伸 1 min(20 个循环);94 °C 变性 30 s;T_m 退火 30 s;72 °C 延伸 1 min(共 26 个循环);72 °C 延伸 10 min。重测序采用 20 μL 反应体系(见表 3),PCR 扩增程序为:94 °C 预变性 4 min;35 循环(94 °C 变性 30 s,T_m 复性 30 s,72 °C 延伸 1.5 min);72 °C 延伸 10 min;12 °C 保存。具体实验步骤参考文献^[19]。

表 1 25 对 EST-SSR 引物信息

引物名称	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')	SSR 位置
SSR006	GCTAAGCAAGCCAAACCAA	CTTCACCGTCACTCTCAGG	5'UTR
SSR013	AAGGCTCCACATCCGAGAA	TGCCACCGCTAGATTTC	5'UTR
SSR071	CCATAGTTGCAGGAGACAGG	GGCACCGCCATCTTCATA	CDS
SSR135	AACAAAGAAAGCAGCCACA	AGCAGGCAGAGCAACCATC	未知
SSR217	CACTGAAGAATGAGGAGGCA	GCTGGGTTTAAATGGATAGGC	未知
SSR268	CGGTCTGTGTTAGAATCCC	GCATTGGCATTACAGACCC	未知
SSR271	AACTTCATAGCCCATACACCTT	CCATCAACAACAACCCAAAC	CDS
SSR279	GCATTGTAGGCTTTCCTGTTT	GGTGCCCTGTGACCTTCTACG	未知
SSR290	ACAACCTTTGGCAAGTCATCC	CCACGGACTCCTCCATCTAAC	CDS
SSR330	GGGCAGAATCAGAAACAGG	TCCGCAACATTAGCATTACC	3'UTR
SSR386	CAAGCCACCTCAGCCACTA	ACGCTTCAGTGACCTGCTCC	未知
SSR394	TACTGCTACTACTCCACCTTCC	GACCGTCTTTGCTCCTACT	CDS
SSR398	GCCATCCATTCTCTACACC	TTGAGTGACGGTGATTCCAG	CDS
SSR489	CCTCAGAACCAGCCTCCACT	CAGCAGCAGGCTCTTATGG	CDS
SSR497	AGAGTCTGCCTTGGCTTGA	AGGAGGAGGATATTAGAGGGAT	未知
SSR507	TCACTTCCACCCGCATCA	AGACCCGAGGTTTCAGACAG	5'UTR
SSR529	GGAACAGAGCAGCCCTAAA	CGCAAAGACCCAGAAAGG	未知
SSR534	TAGGAAACGAAACAGGCAGAA	CCCTGTGGGAAGTTGGAG	5'UTR
SSR535	ATTTCCCATCCTTCTCTATC	TTGTCTCTGCCAGGTGTT	5'UTR
SSR550	ATGCCATTATGCAATCCAAC	TACTTACACCTCCAGGCTCAA	5'UTR
SSR562	CTCTTTGCTTCCACTCCA	GTGCCGTAATCTTCACTTCTT	5'UTR
SSR603	AGAACCAGCCTCCACTACCA	CTTCAGCAGCAGGCTTTAT	3'UTR
SSR616	CTGAATACAGCGAAACAAGCC	CACCACCTGAAGTCCCAAG	CDS
SSR630	ATTTCCCATCCTTCTCTATC	TTGTCTCTGCCAGGTGTT	3'UTR
SSR654	TTCAGACGCCCTTACTCCC	CTGAAGCAGTTGCCGTTG	CDS

表2 基因分型 10 μ L PCR 反应体系

Mg ²⁺ /mM	1.5	2.0	2.5
Buffer (10 \times 含 Mg ²⁺)	/	1 μ L	1 μ L
Buffer (10 \times 无 Mg ²⁺)/ μ L	1	/	/
dNTPs(10 mM each) / μ L	0.025	0.025	0.025
Taq (5 U/ μ L) / μ L	0.1	0.1	0.1
Mg ²⁺ (25 mM) / μ L	0.6	/	0.2
Primer(F+R) / μ L	1	1	1
DNA(5 ng) / μ L	1	1	1
超纯水/ μ L	6.275	6.875	6.675
总体积/ μ L	10	10	10

表3 重测序 20 μ L 反应体系

Mg ²⁺ /mM	1.5	2.0	2.5
Buffer (10 \times 含 Mg ²⁺)/ μ L	/	2	2
Buffer (10 \times 无 Mg ²⁺)/ μ L	2	/	/
dNTPs(10 mM each) / μ L	0.5	0.5	0.5
Taq (5 U/ μ L) / μ L	0.2	0.2	0.2
Mg ²⁺ (25 mM) / μ L	1.2	/	0.4
Primer(F+R) / μ L	2	2	2
DNA(5ng) / μ L	2	2	2
超纯水/ μ L	12.55	13.75	13.35
总体积/ μ L	20	20	20

1.2.3 数据分析 利用 DNAMAN version 5.2.2 (Lynnon Biosoft, Quebec, Canada)将重测序后生成的序列与其相对应的源 EST 序列进行比对。利用 MSA 软件^[20]统计对 18 个个体分型时每一个 EST-SSR 位点的多态性,包括等位基因数、期望杂合度(H_e)、观测杂合度(H_o)以及多态信息量(PIC)。多态信息含量是一个衡量位点多态性的重要指标,其计算公式为

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2, P_i \text{ 为 } i \text{ 位点的基因频率。}$$

将 EST-SSR 标记的等位基因转化成 0/1 矩阵并计算 SM 相似性系数,并利用 NTSYS-pc version 2.1 按 UPGMA^[21]方法对不同基因型的 18 个个体进行聚类。

2 结果与分析

2.1 标记多态性及杂合度

利用 25 个 EST-SSR 标记检验欧洲红皮柳 18 个个体的遗传变异情况。所有的标记均能扩增出清晰可辨的片段信号,共检测到 100 条等位片段,每个位点等位基因数从 1—12 个不等,平均 4 个(见

表 4)。其中,标记 SSR534 和 SSR616 没有多态性,其余 23 个(92%)标记具有多态性。图 1 显示了标记 SSR497 对欧洲红皮柳 18 个个体的分型结果,可见该位点在不同个体间有明显的等位变异。

观测杂合度(H_o)用来衡量标记的多样性。23 个多态性的 EST-SSR 标记其 H_o 变化范围从 0.055 5 到 1.0,平均为 0.627 2;期望杂合度(H_e)变化范围为 0.055 5 到 0.852 3,平均为 0.567 8。其中有 9 个标记的 H_o 比 H_e 低,说明检测到的一些纯合位点实际应该是杂合的,这些位点包含一个明显的等位基因和另一个无效等位基因(Null allele)。多态信息量(PIC)反映了每个标记的识别能力。这 23 个 EST-SSR 标记的 PIC 总体平均为 0.494 1,标记 SSR398 的 PIC 最高,为 0.812 5;标记 SSR271 的 PIC 最低,为 0.052 5。

2.2 位点变异分析

本研究选取部分引物的前项或后项,并以欧洲红皮柳不同个体为模板进行重测序,经与源 EST 序列比对,确认原先的 SSR 位点是否存在并检验位点在不同个体中的变异情况。图 2 显示了 SSR394 位点在欧洲红皮柳不同个体间的变异情况。由表 2 可知,源序列中标记 SSR394 的重复单位为 (CGT)₅。如图 2 所示,位点 SSR394 在不同个体间发生了不同程度的变异:(1)重复次数较源序列增多,变成 6 次、8 次;(2)相同重复次数的位点重复基元上存在单碱基变异,如个体 1 与个体 3 出现 SNP (Single Nucleotide Polymorphism,单核苷酸多态性)(G→A)变异位点;(3)不同重复次数的位点重复基元上也存在单碱基变异,如个体 1 与个体 2。

2.3 亲缘关系分析

欧洲红皮柳 18 个个体之间的遗传相似系数(G_s)范围在 0.438 5 到 1 之间,平均为 0.699 0。其中个体 95049 和 95058 的遗传差异最小,可能来自同一个家系;而个体 94001 和 94004 之间遗传差异最大($G_s=0.438 5$),说明两者亲缘关系最远。图 3 显示了 18 个欧洲红皮柳个体的聚类图。在遗传相似度为 0.52 处,18 个欧洲红皮柳个体分为 2 组:第一组只有 1 个个体 94001,剩余的 17 个个体为第二组。表明无性系 94001 与其他个体亲缘关系较远。

3 结论与讨论

非特异性的扩增能带来多余的 PCR 产物^[22],而引物是决定性因素^[23],对 EST-SSR 标记扩增产物

进行重测序,可以对原先期望位点以及序列的同源性进行确认,此外,个体内由 SSR 重复次数、INDEL (insertion-deletion,插入缺失标记)或 SNP 引起的等位基因变异都可以被检测到^[24]。本研究中序列

确认的方法也是采用了对 EST-SSR 基因组 PCR 扩增产物进行直接测序,并与源 EST 序列进行比对。此种方法可以剔除非特异性扩增的错误标记,避免等位基因的错误计算。

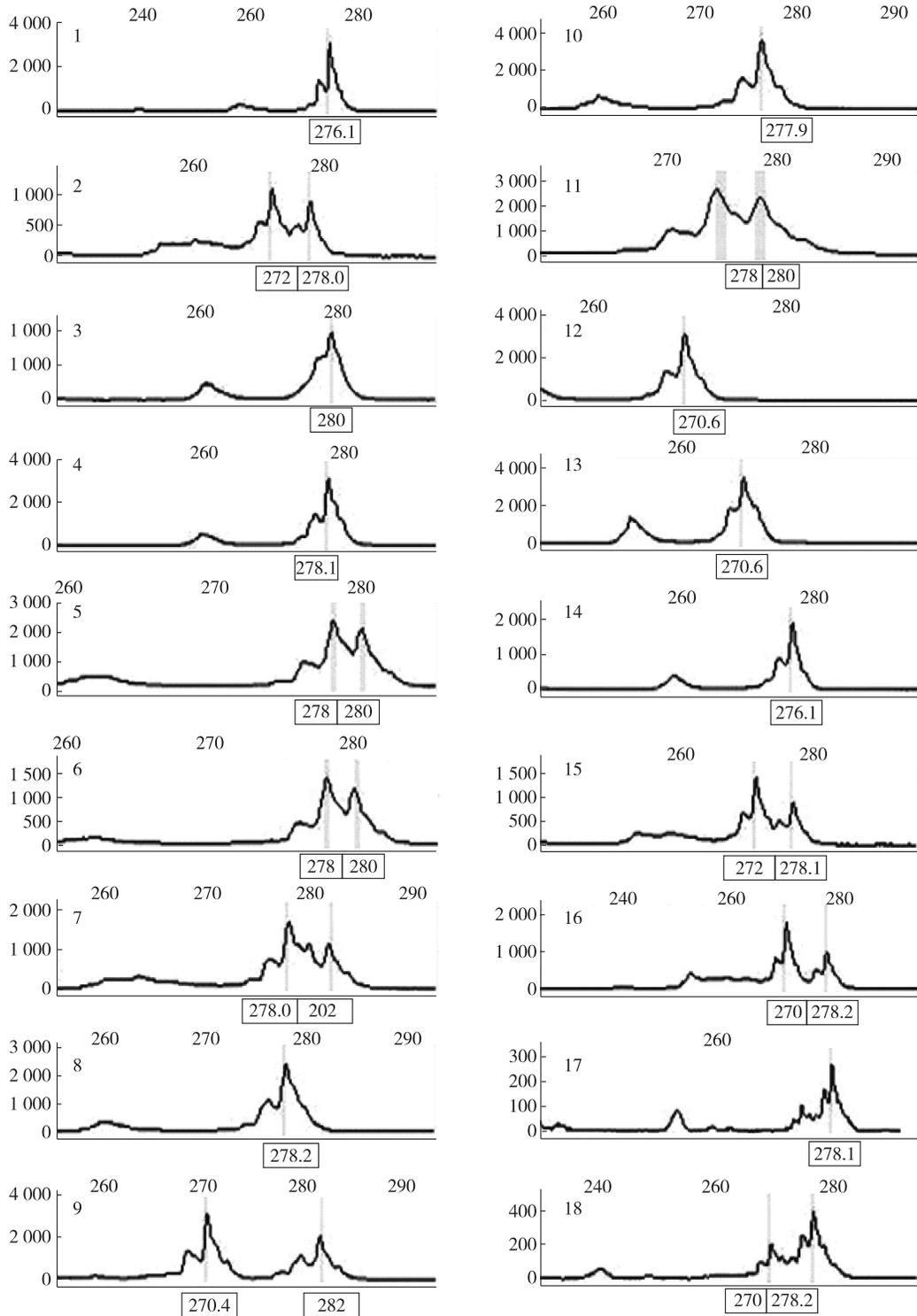
表 4 EST-SSR 标记的信息、等位基因、杂合度及 PIC 值

位点名称	重复基数及次数	等位基因数	等位片段长度	H_o	H_e	PIC
SSR006	(CATG) ₄	2	332-336	0.166 6	0.157 1	0.141 1
SSR013	(AAACA) ₄	2	216-222	1.000 0	0.515 1	0.375 0
SSR071	(AGA) ₅	2	230-233	0.444 4	0.488 8	0.362 3
SSR135	(GCA) ₆	5	367-379	0.777 7	0.763 4	0.698 5
SSR217	(GCT) ₇	7	152-179	1.000 0	0.750 7	0.697 7
SSR268	(TC) ₆	3	424-446	0.437 5	0.491 9	0.427 4
SSR271	(CTC) ₅	2	336-339	0.055 5	0.055 5	0.052 5
SSR279	(AG) ₇	5	315-341	0.470 5	0.650 6	0.579 3
SSR290	(TGACCA) ₄	5	315-369	0.777 7	0.692 0	0.617 3
SSR330	(GT) ₆	4	315-325	0.333 3	0.490 4	0.436 6
SSR386	(GA) ₆	4	401-411	0.176 4	0.511 5	0.453 6
SSR394	(CGT) ₅	4	420-429	0.500 0	0.426 9	0.389 6
SSR398	(ATT) ₅	12	234-386	0.833 3	0.852 3	0.812 5
SSR489	(TCA) ₅	3	224-242	0.833 3	0.603 1	0.517 3
SSR497	(TC) ₈	6	270-282	0.555 5	0.719 0	0.661 0
SSR507	(TCT) ₇	3	372-378	0.466 6	0.521 8	0.427 8
SSR529	(AG) ₁₀	4	236-244	1.000 0	0.615 8	0.515 8
SSR534	(GAA) ₇	1	346	0.000 0	0.000 0	0.000 0
SSR535	(CAC) ₇	4	260-269	1.000 0	0.581 6	0.465 4
SSR550	(TA) ₈	4	209-215	0.117 6	0.634 5	0.554 6
SSR562	(CAC) ₉	5	349-376	0.647 0	0.593 5	0.521 1
SSR603	(CTT) ₇	3	236-242	1.000 0	0.643 4	0.554 0
SSR616	(TGG) ₆	1	191	0.000 0	0.000 0	0.000 0
SSR630	(CAC) ₇	2	263-269	1.000 0	0.516 1	0.375 0
SSR654	(TCG) ₁₁	7	277-298	0.833 3	0.784 1	0.729 0
合计	-	100	-	-	-	-
平均值	-	4	-	0.627 2	0.567 8	0.494 1

本研究中所用的 EST-SSR 标记均为课题组前期利用垂柳和簸箕柳开发,在欧洲红皮柳上也表现出了非常高的通用性,这与前期研究结果一致^[18]。处于转录区的 EST-SSR 标记 DNA 序列更加的保守,因此多态性相比基因组 SSR 要低一些^[25]。本研究中各位点的等位基因数、 H_o 、 H_e 和 PIC 数值略低于 H_e 等^[26]的前期研究结果。他们利用 NCBI 中柳树基因组序列开发了 8 个 gSSR 标记,并用 14 个不

同钻石柳个体检测其多态性。同样,Berlin 等^[27]利用 38 对基因组 SSR 标记对蒿柳进行基因分型,结果显示,每个位点平均等位基因数为 13.46 个,平均观测杂合度为 0.55,平均期望杂合度为 0.62,基因组 SSR 标记的多态性较 EST 略高。

在育种过程中,通过亲本间遗传差异与子代表现或杂种优势的相关关系来预测杂种优势是较为有效的方法。Potts 等^[28]推测了一个亲本间能产生



横坐标为等位片段大小,纵坐标为荧光强度;1—18 分别为94001,94003,94004,94005,94006,94009,94011,94012,94013,94014,94015,95001,95005,95026,95038,95049,95058,95071

图1 标记SSR497对欧洲红皮柳18个个体分型结果

杂种优势的最佳遗传差异范围。本研究利用 EST-SSR 标记按 UPGMA 方法构建了 18 个不同基因型欧洲红皮柳的系统树,不同个体间表现出了不同水

平的遗传变异,这也为下一步种质资源核心库的构建提供了理论依据。

248 _____ 319
M GAGCAAACGCTCTGGGTGACGATTCGATGACGTCGTCGTCGTCGTCGAAAGCATCAACATCAATAGTAGGAG (CGT)5
1 GAGCAAACGCTCTGGGTGACGATTCGATGACGTCATCGTCGTCGTCGTCGAAAGCATCAACATCAATAGTAG (CGT)6
2 GAGCAAACGCTCTGGGTGACGATTCGATGACGTCATCGTCGTCGTCGTCGTCGAAAGCATCAACATCAA (CGT)8
3 GAGCAAACGCTCTGGGTGACGATTCGATGACGTCGTCGTCGTCGTCGTCGAAAGCATCAACATCAATAGTAG (CGT)6
15 GAGCAAACGCTCTGGGTGACGATTCGATGACGTCATCGTCGTCGTCGTCGTCGAAAGCATCAATATTAG (CGT)8

1,2,3,15 分别代表 94001,94003,94004,95058

图 2 标记 SSR394 在不同个体内位点变异情况

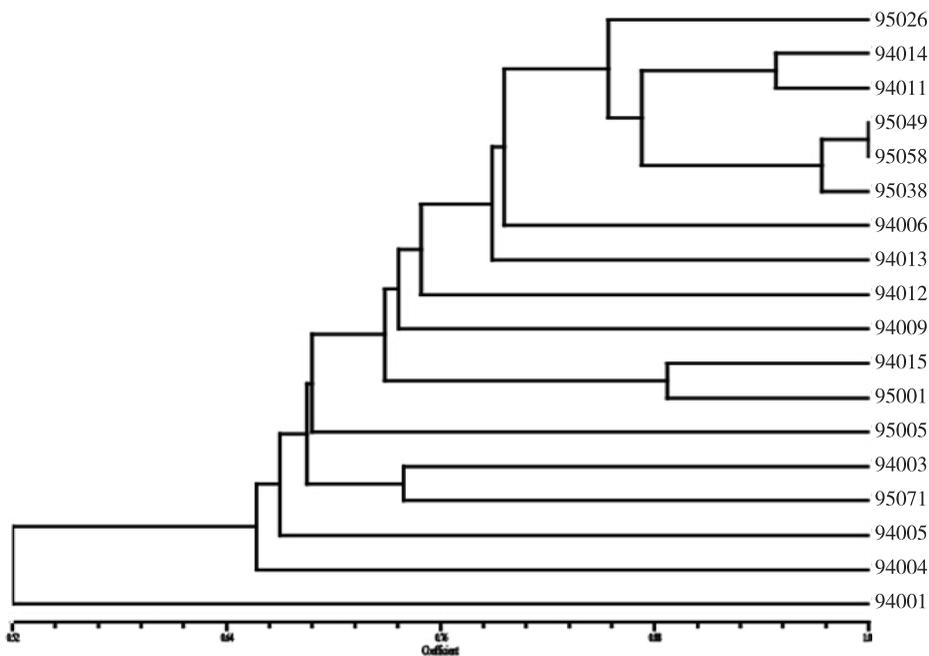


图 3 欧洲红皮柳 18 个个体聚类图

参考文献:

[1] 涂忠虞. 柳树育种与栽培[M]. 南京:江苏科学技术出版社, 1982.
[2] 王源秀, 徐立安, 黄敏仁. 柳树遗传学研究现状与前景[J]. 植物学通报, 2008, 25(2): 240-247.
[3] FRANKEL O H, BROWN A H D. Current plant genetic resources—A critical appraisal [C]// Genetics, New Frontiers : Proceedings of the XV International Congress of Genetics Genetics, New Delhi: Oxford and IBH Publishing Co., 1984.
[4] POWELL W, MACHRAY G C, PROVAN J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats [J]. Trends in Plant Science, 1996, 1(7): 215-222.
[5] LUO H, WANG X, ZHAN G, et al. Genome-wide analysis of simple sequence repeats and efficient development of polymorphic SSR markers based on whole genome re-sequencing of multiple isolates of the wheat stripe rust fungus [J]. Plos One, 2015, 10(6): 1-18.

[6] 陈仕勇, 马啸, 张新全, 等. 不同来源 SSR 和 EST-SSR 在披碱草属和鹅观草属物种中的通用性分析[J]. 草业学报, 2016, 25(2): 132-140.
[7] YANIV E, RAATS D, RONIN Y, et al. Valuation of marker-assisted selection for the stripe rust resistance gene Yr15, introgressed from wild emmer wheat [J]. Molecular Breeding, 2015, 35(1): 1-12.
[8] 王春梅, 任洪, 沈建华, 等. 贵州玉米种植资源遗传多样性及核心种质库构建[J]. 西南农业学报, 2016, 29(5): 1018-1022.
[9] 黎毛毛, 黄永兰, 余丽琴, 等. 利用 SSR 标记构建江西稻种资源核心种质库的研究[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(6): 952-957.
[10] 刘新龙, 刘洪博, 马丽, 等. 利用分子标记数据逐步聚类取样构建甘蔗杂交品种核心种质库[J]. 作物学报, 2014, 40(11): 1885-1894.

(下转第 37 页)

参考文献:

- [1] 周建夷,祝钦史.三要素施肥与笋用毛竹林产量构成因子的相关分析[J].竹类研究,1988,7(3):21-28.
- [2] UEDA K.Studies on the physiology of bamboo with references to practical application [J]. Bulletin of the Kyoto University, 1960 (30): 167.
- [3] 熊文愈,张献义.毛竹林丰产培育(施肥)试验[J].南林学报,1959,2(2):17-23.
- [4] 郭志坚,邹秀红,刘建斌,等.毛竹林施肥效果研究[J].林业科技开发,2005,19(6):32-34.
- [5] 洪顺山,胡炳堂,江业根.毛竹林施肥效应研究[J].林业科学研究,1992,5(4):372-378.
- [6] 陈建华,何正安,李定盈.毛竹施肥效果研究[J].竹子研究汇刊,2000,19(2):30-35.
- [7] 郭晓敏,陈广生,牛德奎,等.平衡施肥对毛竹笋产量的效应研究[J].江西农业大学学报,2003,25(1):48-53.
- [8] 郭晓敏,牛德奎,范方礼,等.平衡施肥毛竹林叶片营养与土壤肥力及产量的回归分析[J].林业科学,2007,43(增刊1):53-57.
- [9] 梁玖华,黄河,潘斌,等.叶面施肥对实生毛竹苗鞭笋生长与萌发的影响[J].经济林研究,2004,22(4):47-49.
- [10] 周早弘.毛竹鞭笋开发技术探究[J].湖南农业科学,2008(2):53-54.
- [11] 迟莹莹,鲁小珍,陈永江.北亚热带毛竹鞭笋高产培育研究[J].江苏林业科技,2011,38(2):4-6.
- [12] 马金德,陆媛媛,朱文强,等.黄腐酸钾型豆粕有机肥对毛竹林增产效应研究[J].世界竹藤通讯,2012,10(1):23-25.
- [13] 汪奎宏,何奇江,翁甫金,等.毛竹笋用丰产林地下鞭根系统调查分析[J].竹子研究汇刊,2000,19(1):38-43.
- [14] 汪奎宏,黄伯惠.中国毛竹[M].杭州:浙江科学技术出版社,1996.4.
- [15] 毛达民,陆媛媛,郑山水,等.鞭笋挖掘后毛竹竹鞭的生长规律[J].浙江农林大学学报,2011,28(5):833-836.
- [16] 周建夷,胡超宗,杨廉颇.笋用毛竹丰产林地下竹鞭的调查[J].竹子研究汇刊,1985,4(1):57-64.
- [17] 杨明,艾文胜,孟勇,等.毛竹林覆盖技术研究[J].湖南林业科技,2012,39(5):39-42.
- [18] 王波,汪奎宏,李琴,等.地面覆盖对毛竹生长影响的初步研究[J].世界竹藤通讯,2012,10(1):20-22.
- [19] systematic relationships [J]. University Kansas Science Bulletin, 1958, 28: 1409-1438.
- [22] CHA R S, THILLY W, G. Specificity, efficiency and fidelity of PCR [M]// DIEFFENBACH C W, DVEKALER G S. PCR primer: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Press, 1995: 37-52.
- [23] HE Q, MARJAMAKI M, SOINI H, et al. Primers are decisive for sensitivity of PCR [J]. BioTechniques, 1994, 17(1): 82-87.
- [24] STUDER B, JENAEN L B, FIIL A, et al. "Blind" mapping of genic DNA sequence polymorphisms in *Lolium perenne* L. by high resolution melting curve analysis [J]. Molecular Breeding, 2009, 24(2): 191-199.
- [25] ELLIS J R, BURKE J M. EST-SSRs as a resource for population genetic analyses [J]. Heredity, 2007, 99(2): 125-132.
- [26] HE X D, ZHENG J W, SERAPIGLIA M, et al. Development, characterization and cross-amplification of eight EST-derived microsatellites in *Salix* [J]. Silvae Genetica. 2014, 63(3): 113-115.
- [27] BERLIN S, TRYBUSH S O, FOGELQVIST J, et al. Genetic diversity, population structure and phenotypic variation in European *Salix viminalis* L. (Salicaceae) [J]. Tree Genetics & Genomes, 2014, 10(6): 1595-1610.
- [28] POTTS B M, POTTS W C, CAUVIN B. Inbreeding and inter-specific hybridization in *Eucalyptus gunnii* [J]. Silvae Genetica, 1987, 36(5-6): 194-199.

(上接第11页)

- [11] 何建文,韩世玉.基于SSR不同距离聚类与抽样方法构建辣椒核心种质库[J].西南农业学报,2015,28(5):2199-2204.
- [12] 石磊,王萍,杨静,等.籽用西瓜种质资源SSR分析及初级核心种质库构建[J].西北植物学报,2016,36(6):1125-1134.
- [13] 李丽,何伟明,马连平,等.用EST-SSR分子标记技术构建大白菜核心种质及指纹图谱库[J].基因组学与应用生物学,2009,28(1):76-88.
- [14] 袁海涛,董玉芝,王肇延.用最小距离逐步取样法构建野核桃核心种质[J].浙江农业科学,2012(7):972-974.
- [15] 吴子龙.山葡萄种质遗传多样性的SSR分析及核心种质初步构建[D].哈尔滨:东北林业大学,2007.
- [16] 倪茂磊,美洲黑杨遗传多样性分析及核心种质库构建[D].南京:南京林业大学,2011.
- [17] 郑纪伟,孙冲,周洁,等.柳树DNA提取改良方法研究[J].江苏林业科技,2014,41(6):4-6,58.
- [18] 郑纪伟.柳树转录组高通量测序及SSR标记开发研究[D].南京:南京林业大学,2013.
- [19] 孙冲.柳树EST-SSR标记多态性确认及其应用研究[D].南京:南京林业大学,2015.
- [20] SIBLY R M, MEADE A, BOXALL N, et al. The structure of interrupted human AC micro-satellites [J]. Molecular Biology Evolution, 2003, 20(3): 453-459.
- [21] SOKAL R R, MICHENER C D. A statistical method for evaluating