从松属相关物种筛选红松微卫星标记及其种群遗传多样性分析*

张 悦[1,2] 易雪梅[1,2] 姬兰柱[1**]

([1]中国科学院沈阳应用生态研究所, 森林与土壤生态国家重点实验室, 沈阳 110016;[2]中国科学院大学, 北京 100049)

摘 要 近缘物种筛选法是获取微卫星引物的主要方法之一。利用松属植物 EST-SSRs 的种间通用性,从马尾松微卫星引物中筛选出红松 EST-SSR 标记,并与已有的红松基因组 SSR 标记进行对比分析。采集长白山露水河红松母树林 4 个种群的 248 个样本,分析种群遗传多样性。结果表明:马尾松与红松的种间通用率为 27.27%,松属内不同亚属物种间的种间通用性偏低;与红松基因组 SSRs 相比,EST-SSRs 的单位点等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)等遗传多样性参数均较低;用 2 组引物分析 4 个种群的遗传多样性,发现有效等位基因均能反映出不同种群遗传变异的趋势,基因多样性均能反映出遗传同一性的差异,说明两组引物都能准确地反映红松种群的遗传多态性水平,新筛选的 EST-SSRs 可以用于红松种群遗传多样性研究。

关键词 表达序列标签; 基因组微卫星; 种间通用性; 种群遗传学分析; 松属植物; 长白山

中图分类号 Q37 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2013)9-2307-07

Screening of *Pinus koraiensis* microsatellite makers from relative species of *Pinus* and analysis of population genetic diversity. ZHANG yue[1,2], YI Xue-mei[1,2], JI Lan-zhu[1**] ([1]*Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, State Key Laboratory of Forest and Soil Ecology, Shenyang* 110016, *China*; [2]*University of Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100049, *China*). *Chinese Journal of Ecology*, 2013, **32**(9): 2307-2313.

Abstract: Screening relative species SSRs is one of the main methods for obtaining microsatellite makers. Based on the interspecific transferability of *Pinus* EST-SSRs, this paper screened out the EST-SSRs of *Pinus koraiensis* from the microsatellite markers of *P. massoniana*, and analyzed the population genetic diversity with the known *Pinus* genomic SSRs and EST-SSRs. The results showed that the interspecific transfer rate between *P. massoniana* and *P. koraiensis* was 27.27%, and the transferability in *Pinus* subgenus was lower. As compared with genomic SSRs, the numbers of alleles (N_a), effective alleles (N_e), observed heterozygosity (H_o), and expected heterozygosity (H_e) of EST-SSRs were obviously lower. The genetic diversity analyses of four populations through two sets of markers indicated that the two sets of effective alleles could reflect the differences in the genetic variation trend between the four populations, and gene diversity could also reflect the differences in the genetic identity between the four populations, which demonstrated that the two groups of the markers could accurately reflect the genetic diversity levels of the four populations, and the newly screened EST-SSRs could be used to analyze the population genetic variation.

Key words: expressed sequence Taq (EST); genomic SSR; interspecific transferability; population genetics analysis; *Pinus* species; Changbai Mountains.

* 国家"十二五"科技支撑项目(2012BAD22B040101)资助。

** 通讯作者 E-mail: ji.lanzhu@iae.ac.cn

收稿日期: 2013-03-19 接受日期: 2013-05-09

红松(*Pinus koraiensis*)是中国长白山阔叶红松林的主要建群种。近百年来,历经3次过度采伐,大范围的原始阔叶红松林遭到破坏(Yu *et al.*, 2011)。红松已成为中国稀有物种,被列为国家二级保护植物(傅立国,1991)。了解濒危物种的种群遗传结构及遗传多样性水平是对该物种制定科学合理的保护措施的前提(王绍先等, 2008)。遗传多样性研究所采用的分子标记主要有显性(RAPD、ISSR、AFLP等)和共显性(SSR、RFLP、SNP等)两种(夏寒冰和卢宝荣, 2009)。

微卫星(microsatellites)(Litt and Luty, 1989),即简单序列重复(simple sequence repeats, SSRs)(Jacob *et al.*, 1991)是在原核和真核生物的基因组中广泛存在的,由短的重复单元(一般为1~6个碱基)组成的DNA串联重复序列(Zane *et al.*, 2002),具有高突变率、多等位基因、共显性遗传、可重复性、广泛的基因组覆盖率(包括细胞器基因组)、染色体特定位置、易于自动化和高通量的基因分型等特点(Parida *et al.*, 2009)。该标记在种群研究上表现了很大的潜力,为种群遗传学、遗传作图和分子育种提供广阔的应用前景(Gupta & Prasad, 2009;张军丽等, 2000)。目前,SSRs已成为研究植物遗传学和生态学方面优先选择的分子标记(Park *et al.*, 2009)。

获取微卫星引物的方法主要有筛选基因组文库法、微卫星富集法、数据库查找法和近缘物种筛选法等4种,采用什么样的方法开发分离微卫星引物,做到节约费用、省时高效是现在多数学者普遍关心的问题(孙波等, 2009)。目前,基于基因组文库法、微卫星富集法、数据库查找法等方法开发的红松SSR标记已有少量报道(邵丹等, 2007; Chen *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Sui *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2012),但现有微卫星标记数量仍然不足。通过EST数据库开发的近缘种微卫星标记筛选出红松微卫星标记的研究尚未见报道。

因此,本文旨在利用EST-SSR标记的种间通用性,筛选红松微卫星标记,分别用红松EST-SSR与已有基因组SSR标记分析红松种群遗传多样性,评价松属EST-SSR的种间转移效率,及未来开发近缘种/属的SSR标记的前景。

1 研究地区与研究方法

1.1 研究区概况

研究地在吉林省露水河林业局东升林场(42°24′N—42°49′N,127°29′E—128°02′E),位于长白山西北麓,平均海拔700 m;属于温带季风大陆性山地气候(李文华等,1981),年平均气温为3.6 ℃,最冷月(1月)平均气温为-15.6 ℃,最热月(7月)平均气温为19.7 ℃;年平均降水量约700 mm,其中7—9月达480~500 mm(许广山等,1980;程伯容等,1984)。土壤主要亚类有白浆暗棕壤、典型暗棕壤和暗色暗棕壤(苏东凯等, 2009)。地带性植被为阔叶红松林,分布于海拔500~1100 m的玄武岩台地上(代力民和邵国凡, 2005)。阔叶红松林群落类型以红松(*Pinus koraiensis*)、紫椴(*Tilia amurensis*)蒙古栎(*Quercus mongolica*)、水曲柳(*Fraxinus mandshurica*)和色木槭(*Acer mono*)等为主要建群种,林分结构复杂,多形成复层混交林(李文华等,1981)。

1.2 研究方法

1.2.1 样品采集 所有样本均于2011年6—9月采自吉林省白山市抚松县露水河东升林场。该林场在20世纪80年代左右遭受不同采伐强度的采伐干扰,选取未受采伐干扰的原始阔叶红松林(T_0)、15%择伐强度的天然林(T_1)、40%择伐强度的天然林(T_2)、皆伐后恢复起来的天然次生林(T_3)等4个群落,分别采集红松样本68、65、59、56,为避免近亲采集,单株相距百米以上,取当年生幼叶,0~4 ℃条件下带回实验室,-70 ℃保存。

1.2.2 DNA的提取与SSR引物筛选 采用上海生工生物工程技术有限公司的Ezup柱式植物基因组DNA抽提试剂盒(SK8262)(http://www.sangon.com/prodetail.aspx?code=SK8262),提取红松基因组DNA。以1%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量。用核酸测定仪测得浓度后,将样品浓度稀释到50 ng·μL^{-1},保存于-20 ℃备用。选择23对马尾松EST-SSR引物(刘公秉, 2009)进行实验,从中选取扩增条带清晰、多态性好、条带稳定的引物;同时从已开发的红松基因组SSR引物中(Yu *et al.*, 2012),筛选出适合本研究样品的引物,用于红松模板的PCR扩增。

1.2.3 SSR-PCR扩增 SSR-PCR扩增反应在PCR扩增仪(Bio-Rad)上进行。本实验采用的dNTPs、10×PCR缓冲液(含Mg^{2+})、Taq DNA聚合酶、DNA maker(500 bp)购自上海生工生物工程技术有限公司;引物由华大基因合成。

反应体系(20 μL)如下:2.0 μL 10×PCR缓冲液

(200 mmol · L^{-1} Tris-HCl, pH 8.4;2.5 mmol · L^{-1}; $MgCl_2$;500 mmol · L^{-1} KCl), 0.25 mmol · L^{-1} dNTPs,0.6 μmol · L^{-1}引物,0.5 U Taq DNA 多聚酶和 50 ng 模板 DNA,加 ddH_2O 水至 20 μL。

PCR 扩增程序如下: 94 ℃预变性 3 min;然后 94 ℃变性 30 s,45 ~ 55 ℃复性 30 s,72 ℃延伸 1 min,共计 35 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 扩增产物用 8% 非变性聚丙烯凝胶电泳检测。

1.2.4 数据分析　分析基因组 SSR 引物和 EST-SSR 引物扩增出的多态位点,以野外采集的全部红松个体为样本,计算每个位点的遗传多样性参数:等位基因数(N_a),观测杂合度(H_o),期望杂合度(H_e),有效等位基因数($N_e = 1/(1-H_e)$),固定指数($F = 1-(H_o/H_e)$),并对两组位点参数进行分析评价。分别用两组 SSR 位点,对分析 4 个红松天然种群的遗传多样性,评价不同来源的 SSR 引物在种群遗传多样性研究中的差别。采用软件 FSTAT 2.9.3.2(Goudet, 2002)和 POPGENE 1.31(Yeh *et al.*, 1999)计算遗传参数。

2　结果与分析

2.1　引物筛选与验证

选择已有的 23 对马尾松 EST-SSR(刘公秉, 2009)引物,对红松基因组 DNA 进行 PCR 扩增。结果表明,23 对引物中,6 对引物无扩结果;6 对引物没有扩增出与预期产物长度相符合的目的片段;8 对引物扩增出目的片段,但没有显示出多态性;3 对引物扩增出稳定的多态性目的片段,马尾松与红松间的种间转移率为 27.27%(3/11)。

Yu 等(2012)通过 FIASCO(fast isolation by AFLP sequences containing repeats)法构建红松基因组微卫星富集文库,分离出微卫星 DNA 序列,成功开发了 13 对多态性基因组 SSR 引物。本文随机选取 3 对引物,用于与 EST-SSR 引物进行对比分析,具体引物信息见表 1。

2.2　单位点遗传多样性参数

6 个多态性位点对 248 个红松样本进行 PCR 扩增,有效扩增样本数略有差别,样本容量差别不大,具体遗传多样性参数见表 2。由等位基因(N_a)可知,群体中基因组 SSR 基因座上平均等位基因数更多,在样本容量基本相当的条件下,反映的红松群体遗传多态性更高。由有效等位基因(N_e)可知,基因组 SSR 单位点平均有效等位基因数偏多,有效等位基因为纯合体频率的倒数,说明测得的群体中纯合体频率偏低,纯合体偏少。由观测杂合度(H_o)可知,基因组 SSR 单位点平均观测杂合度更高,说明由基因组 SSR 扩增得到的杂合体频率更高,群体遗传多态性均匀度更低。虽然多态性位点 EST-1、EST-3、G1 的等位基因数目相同,但由于它们的等位基因不同,等位基因的频率也不同,因此在相同群体得到的杂合度、有效等位基因也略有不同。

Nei(1973)提出采用期望杂合度(expected heterozygosity)或称基因多样性(gene diversity)(H_e),度量群体遗传多态性。基因组 SSR 的期望杂合度都高于 0.5,EST-SSR 的期望杂合度都低于 0.5,基因组 SSR 反映红松群体拥有更丰富的遗传多态性,群体的遗传同一性更低。相同种群不同 SSR 位点测得的基因多样性不同,是由于基因座上的复等位基因数目增加,导致群体内的基因多样性增加。2 组引物的单位点遗传多样性参数略有差异,但都可以用于种群遗传多样性分析。

表 1　3 对 EST-SSR 引物和 3 对红松基因组 SSR 引物信息
Table 1　Three EST-SSR primers and three genomic SSR primers of *Pinus koraiensis* information

引物	位点	引物序列(5'-3')	引物类型	重复单元	退火温度(℃)	预期片段(bp)	GenBank 序列号
36567_3796	EST-1	F:CTCCCGTCTATGACTATCC R:ATTATCGCACCAGCACTT	EST-SSRs	$(GCC)_9$	46	382	–
46196_7406	EST-2	F:AGCCTCACCATCTCATCT R:TCTGCCTTTATCCACATC	EST-SSRs	$(CACGGT)_5$	46	386	–
9193_167	EST-3	F:TCGCCTGGGCTTTGTCTG R:GCGGGTTGCATATTTGGTG	EST-SSRs	$(CTCAGC)_5$ $(CTCATC)_5$	55	356	–
P6	G1	F:TCAAATTACCAGACAATAA R:GAATTCGCCAATGAAATCA	genomic SSRs	$(TA)_3(GT)_{15}$	55	125	JQ429167
P66	G2	F:GCCACCTCCTAACCCTAAG R:ACCCATTTGTCGA ATCTAA	genomic SSRs	$(TA)_4(TG)_3$ $(T)_3(GT)_7$	57	159	JQ429224
P53	G3	F:ACTAGGAGGACAAGGGATT R:CCAGGTGGAAGGTGAGACT	genomic SSRs	$(GA)_{16}$	55	205	JQ429211

表2 6个多态性位点的遗传多样性参数

Table 2 Standard genetic diversity parameters of six polymorphism loci

位点	样本数(n)	等位基因(N_a)	有效等位基因(N_e)	观测杂合度(H_o)	期望杂合度(H_e)	固定指数(F)
EST-1	244	4.000	1.300	0.181	0.231	0.218 *
EST-2	216	2.000	1.531	0.449	0.347	-0.294_{ns}
EST-3	238	4.000	1.894	0.417	0.472	0.116 *
平均值		3.333	1.575	0.349	0.350	0.013
标准差		1.155	0.299	0.146	0.121	0.271
G1	222	4.000	2.145	0.381	0.534	0.287 *
G2	228	5.000	2.976	0.463	0.664	0.302 *
G3	242	6.000	3.745	0.611	0.733	0.166 *
平均值		5.000	2.955	0.485	0.643	0.252
标准差		1.000	0.800	0.117	0.101	0.075

F, 固定指数; * $P<0.05$, ns $P>0.05$。

2.3 种群遗传多样性

在露水河4个红松林群落中,共采集红松样本248个。分别用基因组SSR和EST-SSR分析种群遗传多样性。由图1可知,基因组SSR和EST-SSR的平均等位基因数(N_a)分别为4、4、4.67、4、3、3.33、3.33、2.67。在样本容量相当的情况下,两组引物的等位基因数量在4个种群中的变异趋势相同,均能反映受不同采伐强度干扰后,红松种群的遗传多态性变化趋势。40%择伐林内红松基因组SSR和EST-SSR的平均有效等位基因数(N_e)最多,表明该种群的纯合体频率最低,群体遗传变异增加的最多;而皆伐后恢复的天然林内红松有效等位基因最少,该种群的纯合体频率最高,群体遗传变异在4个种群中变化最少。

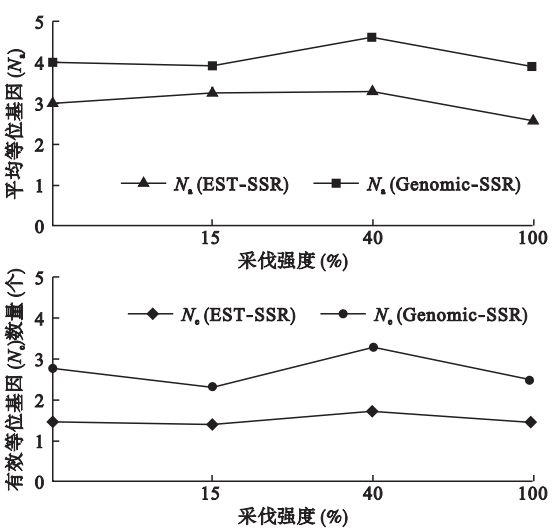


图1 基因组SSR和EST-SSR在4个种群中等位基因数和有效等位基因对比分析

Fig. 1 Comparison of N_a and N_e between genomic SSR and EST-SSR in four populations

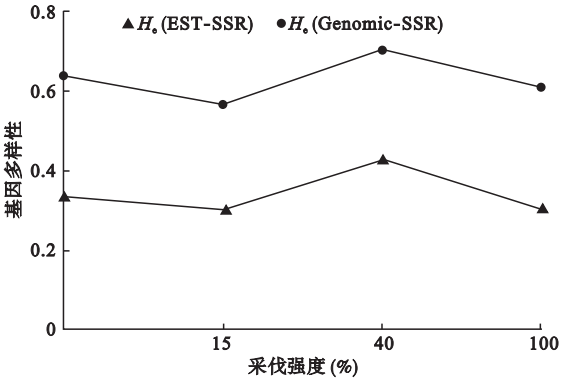


图2 基因组SSR和EST-SSR在4个种群中基因多样性对比分析

Fig. 2 Comparison of He between genomic SSR and EST-SSR in four populations

由图2可知,4个种群中,40%择伐林内红松基因组SSR和EST-SSR的平均基因多样性(H_e)最高,表明该种群的遗传同一性最低,种群适应性最强、生活力最旺盛;而15%择伐林内红松基因多样性比其他3个种群低,该种群的遗传同一性最高,种群适应性比其他3个种群差,生活力相对最弱。

以上结果表明,基因组SSR的等位基因数量、基因多样性和有效等位基因数均比EST-SSR的值高。由于采用复等位基因标记,不同的多态性位点的等位基因数量、等位基因频率、有效等位基因、杂合度都不同,不适合采用遗传多样性参数在群体中变异的真实度量。采用标记系统的因变量,即不同参数在群体中变异的趋势和范围,可以更好地度量群体的遗传多样性水平。基因组SSR和EST-SSR在4个种群中的遗传多样性参数的变异趋势基本相同,都可以很好地反映不同强度的采伐干扰后,红松种群遗传多样性的变化趋势,所以新开发的EST-SSR可以用于红松种群遗传多样性分析。

3 讨 论

3.1 种间通用性

本研究中,马尾松EST-SSR对红松种间转移率为27.27%,种间通用性偏低。Liewlaksaneeyanawin等(2004)从4种来源的火炬松序列(EST序列、未经筛选的基因组DNA、低拷贝的基因组DNA和甲基化的基因组DNA)开发微卫星标记,结果发现,8对EST-SSR引物在4个近缘种中均有扩增,另外3组微卫星标记的种间可转移率分别为29%、23%和30%。说明EST-SSR标记在近缘种的通用性最高,

基因组 SSR 的通用性明显偏低。

Shepherd 等(2002)将 8 对火炬松的 EST-SSR 引物对湿地松和加勒比松进行 PCR 扩增,8 对引物都可以扩增出目的片段,可扩增率为 100%,6 对引物有多态性产物,种间转移率为 75%。火炬松、湿地松、加勒比松、马尾松都属于油松亚属,红松属于白松亚属(宋湛谦,1998),说明引物在松属的亚属内转移率较高,而在亚属间的转移率较低。

Laosatit 等(2013)从麻风树属 EST 数据库开发出 163 对麻风树多态性引物,其在麻风树属内 4 个树种的种间的转移率为 75.56% ~85.19%,在蓖麻属的属间转移率为 26.67%。说明 EST-SSR 标记在亲缘关系近的物种间转移率高,在亲缘关系较远的种或属间转移率明显降低。

目前白松亚属的 EST-SSR 引物开发较少,油松亚属的 EST-SSR 引物比较丰富,尤其是松属模式树种——火炬松的 EST-SSR 标记的开发比较成熟,未来可以考虑从其他松树尤其是火炬松的 EST-SSR 引物开发红松微卫星标记。

3.2　遗传多样性对比

本研究表明,基因组 SSR 位点在红松群体中扩增得到的多态性等位基因数量高于 EST-SSR 位点,在杨树、小麦、水稻等物种的研究中也发现类似结果(Cho *et al.*, 2000;杨新泉等, 2005;张亚东等, 2011)。这是由于 EST-SSR 来源于高度保守的 DNA 转录区,保护性更强,所以其揭示的多态性在理论上应低于基因组 SSR。

基因多样性是不依赖于多态性任意值的定义,仅由群体中等位基因频率决定,因此可克服多态性百分比的某些不足,是度量群体遗传多态性的一个最适参数;杂合性程度能够反映树木的遗传多样性,而有效等位基因数反映了等位基因间的相互作用,比杂合度更好地度量群体遗传变异的增加(徐刚标,2009)。本研究中,两组微卫星位点测得的基因多样性随 4 个种群的变化趋势相同,揭示的种群遗传多态性变化水平相同;而两组有效等位基因在 4 个种群中的变异趋势一致,揭示的遗传变异趋势也一致。可见,虽然不同微卫星位点的遗传多样性参数绝对值不同,但都能有效揭示遗传多样性变异水平,因此可以采用因变量水平评价红松种群的遗传多样性差异。由马尾松 EST-SSR 引物开发的红松 EST-SSR 位点可用于红松种群遗传多样性研究。

3.3　不同开发方法的效率对比

Eillis 和 Burke(2007)、Craig 等(2011)研究发现,与建立基因组文库和直接从 EST 序列开发 SSR 标记相比,利用 EST-SSR 标记的种间通用性,从已有物种的引物开发近缘种 EST-SSR 标记的效率最高。

Varshney 等(2005)研究发现,在非重复 EST 序列中 SSR 的存在率仅为 2% ~5%,如果从数据库开发 SSR 标记,需要有足够的序列信息(ESTs)。截至 2012 年 5 月 1 日,NCBI 数据库中有红松 EST 序列 65 条,序列数据明显不足,开发红松 EST-SSR 标记受到限制,需要从松属 EST 序列中开发。刘公秉(2009)在 359521 条松属 EST 序列中检索到 15.8% 的非重复序列,而 SSR 在非重复序列中的存在率仅为 3.6%。Sui 等(2011)研究发现,18181 条红松 EST 序列中 SSRs 为 408 条(2.4%),从中选出 132 条序列设计 EST-SSR 引物,仅有 5 对引物在红松 DNA 样本扩增出多态性条带。直接从 EST 序列开发红松 SSR 引物效率不高。

FIASCO 法是分离微卫星 DNA 标记的一种非常有效且无需克隆与筛选的快捷方法(Zane *et al.*, 2002)。此方法省去了构建文库与筛选文库的过程,并且结合了 AFLP 的一些步骤,筛选微卫星位点的周期更短(孙波等, 2009)。Yu 等(2012)通过 FIASCO 法构建红松基因组微卫星富集文库,分离出微卫星 DNA 序列,成功开发了 43 对基因组 SSR 引物,其中有 13 对多态性引物,可用率为 30%,与数据库(ESTs)序列开发 SSR 引物相比,开发效率较高。

本研究中,马尾松 EST-SSR 引物对红松基因组 DNA 进行 PCR 扩增,筛选出 8 对红松 EST-SSR 引物,其中多态性引物为 3 对,可转移率为 27.27%,与前两种方法相比,从同属内开发引物的方法效率最高。

4　结　论

借鉴前人开发的 EST-SSR 标记,从松属相关树种的 EST-SSR 引物开发红松微卫星标记,是一种方便、快捷且比较廉价的方法,扩增产物的高质量和稳定性,以及种间通用性都提高了 EST-SSR 引物的应用价值。由于 EST-SSR 标记多态性较低,且集中在基因富集区,可与红松基因组 SSR 标记互补,应用

于基因组作图;EST-SSR 标记可以单独应用于种群遗传多样性研究;红松基因组 SSR 多态性较高,在指纹分析和品种鉴定方面的研究更有优势。未来可从松属模式树种——火炬松的 EST-SSR 标记筛选红松微卫星标记。

致谢 室内实验部分在中国科学院沈阳应用生态研究所的微生物资源与生态组完成,使用该组实验室的仪器和设备,在此感谢微生物资源与生态组的老师、工作人员和同学的帮助。

参考文献

程伯容, 许广山, 丁桂芳, 等. 1984. 长白山森林生态系统林下层及其养分含量的主要类型. 森林生态系统研究, **4**: 19-24.

代力民, 邵国凡. 2005. 森林经营决策: 理论与实践. 沈阳: 辽宁科学技术出版社.

傅立国. 1991. 中国植物红皮书. 北京市: 科学出版社.

李文华, 邓坤枚, 李 飞. 1981. 长白山主要生态系统生物量和初级生产力研究. 森林生态系统研究, **2**: 34-50 .

刘公秉. 2009. 从松树 EST 序列开发马尾松 SSR 引物(硕士学位论文). 南京: 南京林业大学.

邵 丹, 裴赢, 张恒庆. 2007. 凉水国家自然保护区天然红松种群遗传多样性在时间尺度上变化的 cpSSR 分析. 植物研究, **27**(4): 473-477.

宋湛谦. 1998. 中国松脂特征与松属分类. 北京: 中国林业出版社.

苏东凯, 谢小魁, 刘正纲, 等. 2009. 长白山次生白桦林数量特征. 东北林业大学学报, **37**(10): 1-4.

孙 波, 鲍毅新, 赵庆洋, 等. 2009. 微卫星位点获取方法的研究进展. 生态学杂志, **28**(10): 2130-2137.

徐刚标. 2009. 植物群体遗传学. 北京: 科学出版社.

许广山, 丁桂芳, 张玉华, 等. 1980. 长白山北坡主要森林系统土壤腐殖质及其特征的研究. 森林生态系统研究, **1**: 215-220.

王绍先, 王 飞, 刘成柏, 等. 2008. DNA 分子标记技术在濒危物种保护中的应用. 生态学杂志, **27**(2): 250-256.

夏寒冰, 卢宝荣. 2009. 共显性分子标记基因型数据转换为二元型数据的处理软件及其在研究种质资源遗传多样性中的意义. 植物遗传资源学报, **10**(1): 97-102.

杨新泉, 刘 鹏, 韩宗福, 等. 2005. 普通小麦 Genomic-SSR 和 EST-SSR 分子标记遗传差异及其与系谱遗传距离的比较研究. 遗传学报, **32**(4): 406-416.

张军丽, 王峥峰, 李鸣光, 等. 2000. 植物种群研究中的分子标记及其应用. 应用生态学报, **11**(4): 631-636.

张亚东, 彭 婵, 李振芳, 等. 2011. 基因组 SSR 与 EST-SSR 标记在杨树不同种间的遗传差异. 东北林业大学学报, **39**(12): 8-11.

Chen MM, Feng FJ, Sui X, *et al*. 2010. Construction of a framework map for *Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc. using SRAP, SSR and ISSR markers. *Trees: Structure and Function*, **24**: 685-693.

Cho YG, Ishii T, Temnykh S, *et al*. 2000. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetic*, **100**: 713-722.

Craig S, Surya S, Dennis L, *et al*. 2011. Microsatellite DNA in genomic survey sequences and UniGenes of loblolly pine. *Tree Genetics and Genomes*, **7**: 773-780.

Ellis JR, Burke JM. 2007. EST-SSRs as a resource for population genetic analyses. *Heredity*, **99**: 125-132.

Goudet J. 2002. FSTAT version 2.9.3.2: A computer package for PCs which estimates and tests gene diversities and differentiation statistics from codominant genetic makers. http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html.

Gupta S, Prasad M. 2009. Development and characterization of genic SSR markers in *Medicago truncatula* and their transferability in leguminous and non-leguminous species. *Genome*, **52**: 761-771.

Jacob HJ, Lindpaintner K, Lincoln SE, *et al*. 1991. Genetic-mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell*, **67**: 213-224.

Laosatit K, Tanya P, Saensuk C, *et al*. 2013. Development and characterization of EST-SSR markers from *Jatropha curcas* EST database and their transferability across *Jatropha*-related species/genus. *Biologia*, **68**: 41-47.

Li Y, Liang L, Ge XJ. 2010. Development of microsatellite loci for *Pinus koraiensis* (Pinaceae). *American Journal of Botany*, **97**: E39-E41.

Liewlaksaneeyanawin C, Ritland CE, El-Kassaby YA, *et al*. 2004. Single-copy, species-transferable microsatellite markers developed from loblolly pine ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*, **109**: 361-369.

Litt M, Luty JA. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by inbitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac-muscle actin gene. *The American Journal of Human Genetics*, **44**: 397-401.

Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **70**: 3321-3323.

Parida SK, Kalia SK, Kaul S, *et al*. 2009. Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. *Theoretical and Applied Genetics*, **118**: 327-338.

Park YJ, Lee JK, Kim NS. 2009. Simple sequence repeat polymorphisms (SSRPs) for evaluation of molecular diversity and germplasm classification of minor crops. *Molecules*,

14: 4546–4569.

Shepherd M, Cross M, Maguire TL, *et al*. 2002. Transpecific microsatellites for hard pines. *Theoretical and Applied Genetics*, **104**: 819–827.

Sui X, Feng FJ, Zhao D, *et al*. 2011. Development of *Pinus koraiensis* SSR primers based on EST-SSR information technology. *Advanced Material Research*, **183–185**: 259–266.

Varshney RK, Graner A, Sorrells ME. 2005. Genic microsatellite markers in plants: Features and applications. *Trends in Biotechnology*, **23**: 48–55.

Yeh FC, Yang RC, Boyle TJB. 1999. Popgene version 1.31, Microsoft windows-based freeware for population genetic analysis. Alberta, Canada: University of Alberta and Centre for International Forestry Research.

Yu DP, Zhou L, Zhou WM, *et al*. 2011. Forest management in Northeast China: History, problems, and challenges. *Environmental Management*, **48**: 1122–1135.

Yu JH, Chen CM, Tang ZH, *et al*. 2012. Isolation and characterization of 13 novel polymorphic microsatellite markers for *Pinus koraiensis* (Pinaceae). *American Journal of Botany*, **99**: E421–E424.

Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: A review. *Molecular Ecology*, **11**: 1–16.

作者简介　张　悦,女,1984 年生,博士研究生,主要从事森林生态研究。E-mail: zhangyue84219@163.com

责任编辑　张　敏