

研究报告

A Letter

柽柳 EST-SSRs 标记开发与群体检测

张如华[✉], 李锐[✉], 赵景奎[✉], 徐立安[✉]

南京林业大学, 林木遗传与生物技术省部共建教育部重点实验室, 南京, 210037

✉ 通讯作者: laxu@njfu.edu.cn ✉ 作者

分子植物育种, 2011年, 第9卷, 第38篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0038

收稿日期: 2010年11月18日

接受日期: 2011年02月28日

发表日期: 2011年04月02日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式:

张如华等, 2011, 柽柳 EST-SSRs 标记开发与群体检测, 分子植物育种 Vol.9 No.38 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0038)

摘要 利用柽柳属植物 22 712 条 EST 序列拼接得到 9 439 条无冗余独立基因序列。其中 202 条独立基因序列中发现有 206 个 EST-SSR 位点, SSR 发生频率为 2.14%。二核苷酸和三核苷酸重复为柽柳属植物 EST-SSR 的主要重复类型, 分别占 33.01% 和 40.29%。通过 PRIMER5.0 软件设计了引物 164 对, 随机合成 75 对, 在柽柳中有 40 对引物能扩增出清晰条带, 其中 14 对具有多态性, 多态比率为 35%。说明从柽柳属植物 EST 中开发 SSR 标记是行之有效的。以 14 对引物对 5 个柽柳天然群体进行了遗传多样性检测, 结果表明, 开发的 SSR 标记能较好地揭示柽柳群体遗传多样性和区分群体间的差异性。这些标记也能成为其它柽柳遗传分析的良好工具。

关键词 EST-SSR 标记; 柽柳属植物; 柽柳; 群体检测

Development and Population Detection of Microsatellite Markers from Expressed Sequence Tags for *Tamarix* spp.

Zhang Ruhua[✉], Li Rui[✉], Zhao Jingkui[✉], Xu Li'an[✉]

Nanjing Forestry University, Key Laboratory of Forest Genetics & Biotechnology, Ministry of Education, Nanjing, 210037, P.R. China

✉ Corresponding author, laxu@njfu.edu.cn; ✉ Authors

Abstract 9 439 Unigenes were obtained from 22 712 *Tamarix* spp. ESTs. 206 SSRs were distributed in 202 Unigenes, which accounts for 2.14% of the total number of unigenes. Dinucleotide and trinucleotide repeats were the dominant types among the obtained unigenes, accounting for 33.01% and 40.29%, respectively. 164 primer pairs were designed by PRIMER5.0 and 75 primer pairs were synthesized. Among them, 40 primer pairs amplified DNA fragments and 14 primer pairs were polymorphic in *T. chinensis* accounting for 35%. It was showed that it is an effective and feasible way to develop EST-SSR markers from EST in *T. chinensis*. Genetic diversity of 5 populations were detected with these primer pairs, and the results indicated that population genetic diversity and differences among populations can be revealed well with these EST-SSR markers in *T. chinensis*. And they can become a good tool in other genetic analyses of *Tamarix* spp.

Keywords EST-SSR marker; *Tamarix* spp.; *Tamarix chinensis*; Population detection

研究背景

微卫星(又称简单重复序列(simple sequence repeats, SSR))标记具有共显性、多态性丰富、重复性好等优点, 是遗传图谱构建、基因定位、亲缘关系鉴定、比较基因组等, 尤其是遗传多样性研究的理想标记。近些年来, 随着基因组研究的发展, 通过寻找EST序列中的重复序列开发SSR标记已成为最主要途径之一(Eujayl et al., 2002)。与传统的基因组 SSR 标记相比, 通过 EST 序列开发的 SSR (EST-SSR) 标记有很多优点, 包括在近缘种间具有

高通用性, 且开发过程简单、成本低, 通常还与某种基因功能有关, 还可反映出转录区的差异等(Pashley et al., 2006)。

柽柳科(Tamaricaceae)柽柳属(*Tamarix* L.)植物共90余种, 其中, 我国有18种2变种。柽柳属植物种间极易发生杂交而形成复杂的多型现象, 柽柳属植物的种内遗传变异及扩散机制、种间天然杂交及基因渐渗等已成为目前国内外研究的热点。柽柳(*T. chinensis* Lour.)是我国该属分布最广的种, 除新疆、西藏、海南等省区外的我国大部分地区有分布, 常

见于草地、滩涂、海滨沙地。柽柳适应性广, 既抗旱、抗病虫害, 又耐盐碱、耐水湿, 且生长快, 又具有较高的观赏价值。柽柳枝条可供编织篮、筐、篓等各种容器和工艺品; 树皮、嫩枝叶为中药材, 又是牛、马、羊的理想饲料; 幼枝、树(根)皮可提取栲胶。由于柽柳的生态价值和经济价值, 将在我国广大地区, 尤其是盐碱地的造林绿化发挥十分重要的作用。有关柽柳的研究, 尤其是遗传学方面的研究较为薄弱, 如遗传多样性的研究仅见利用RAPD标记对黄河三角洲三个群体进行了初步研究(赵景奎等, 2008)。本研究旨在通过搜索柽柳属植物EST中的重复序列, 开发适用于柽柳遗传研究的通用性EST-SSRs标记, 并以开发的标记对柽柳不同区域的5个群体进行遗传多样性检测, 为柽柳乃至柽柳属其它树种的遗传多样性等方面的研究提供优良的分子工具。

1 结果与分析

1.1 柽柳属植物EST-SSRs分布分析

从NCBI数据库共获得22 715条柽柳属植物EST序列, 其中刚毛柽柳(*T. hispida* Willd.) 17 401条, 紫杆柽柳(*T. androssowii* Litv.) 4 756条, 多枝柽柳(*T. ramosissima* Ledeb.) 347条, 白花柽柳(*T. albiflorum*) 208条。通过序列拼接, 共得到独立基因序列9 439条, 其中单序列(singletons) 5 712条, 重叠群(contigs) 3 727条。本研究利用SSRIT在线工具仅对2-6核苷酸重复类型的精确型SSR——指不间断的, 且单一的重复类型(Weber, 1990)。进行检索分析, 从中发掘出分布于202条精确型基序中的206个EST-SSR位点, SSR发生频率(含有SSR位点的独立基因序列与总独立基因序列数目之比)为2.14%, 平均分布距离为54.99 kb, 其中198条EST含有1个SSR, 4条EST含有2个SSR。EST具体分布情况见表1。

本研究共得到76种EST-SSR重复基序, 在所检索的柽柳属植物EST-SSR中, 二核苷酸和三核苷酸重复是主要的重复类型, 分别占33.01%、40.29%, 共有5种二核苷酸重复基序, 其中主要为4种, 而三核苷酸重复基序类型很多, 达25种, 但各类型所占比例较小, 最多为AAT/TTA, 占7.28% (表2)。四次以上核苷酸重复占比例逐步减少, 依次为12.62%、7.28%、6.79%, 除TTTA出现两次外, 其各基序类型只出现一次。

表1 柽柳属主要植物的EST-SSRs分布特点

Table 1 Characteristics of EST-SSRs distribution

| 参数 Parameter | 数值 Value |
|--|-------------|
| EST 总数 Total number of EST | 22712 |
| 拼接得到的 Unigene 总数 Total number of splicing | 9439 |
| 各植物含有 SSR 的 EST 总数 Total number of motif | 202 |
| 刚毛柽柳基序 Motif of <i>T. hispida</i> | 152 |
| 紫杆柽柳基序 Motif of <i>T. androssowii</i> | 46 |
| 多枝柽柳基序 Motif of <i>T. ramosissima</i> | 4 |
| 含 1 个 SSR 位点基序 Including one SSR loci | 198 |
| 含 2 个 SSR 位点基序 Including tow SSR loci | 4 |

1.2 EST-SSR标记的多态性

根据引物设计原则, 含SSR的202条EST中共设计了引物164对, 随机选取75对进行了引物合成, 其中40对引物在柽柳能扩增出清晰的产物, 且片段的大小与预期一致。提取的绝大多数柽柳DNA质量较高, 可满足PCR实验需要。经检测, 有14对引物在柽柳群体中表现出多态(图1为第6号引物的部分群体扩增结果)。表现多态的SSR主要为二核苷酸重复和三核苷酸重复(各有5对引物), 占总数的70%以上, 而四、五及六核苷酸重复明显较少(分别占1对, 1对和2对)。14对引物在6个柽柳天然群体中扩增出了最多6个等位条带, 最少3个等位条带(表3)。

1.3 以EST-SSR标记揭示的柽柳群体变异

以14对引物对5个柽柳天然群体的遗传多样性分析表明, 5个群体实际杂合度从0.459 8至0.565 6, 期望杂合度从0.556 3至0.581 6, Nei基因多样性指数的变化范围为0.549 3~0.569 5, 按照Nei的基因多样性指数对5个群体由高到低排序为: 浙江慈溪群、山东河口、山东垦利、浙江余姚、浙江海盐。5个群体间的遗传距离在0.027 7~0.137 4之间, 遗传相似系数在0.871 6~0.972 6 (表4)。根据开发的SSR标记检测结果, 利用UPGMA聚类法能很好地将不同空间距离的群体区分开来, 可在遗传距离为0.078

表 2 柽柳属植物 EST-SSR 主要类型及频率

Table 2 Main types and frequency of EST-SSR in *Tamarix* spp.

| 重复单元核苷酸数 Nucleotide Number of repeat | 重复序列 SSR motif | SSRS 数量 Number of SSR | | 总数 Total | 出现频率(%) Frequency (%) |
|---|-------------------|--------------------------|----|-------------|--------------------------|
| 二核苷酸 Dinucleotide | AC\TG | 3 | 3 | 6 | 2.42 |
| | AG\TC | 10 | 9 | 19 | 9.22 |
| | AT\TA | 11 | 13 | 24 | 11.65 |
| | CT\GA | 11 | 7 | 18 | 8.73 |
| 三核苷酸 Trinucleotide | CTC\GAG | 3 | 2 | 5 | 2.42 |
| | AAT\TTA | 6 | 9 | 15 | 7.28 |
| | ACG\TGC | 1 | 2 | 3 | 1.45 |
| | AGA\TCT | 1 | 2 | 3 | 1.45 |
| | AGG\TCC | 2 | 3 | 5 | 2.42 |
| | ATA\TAT | 2 | 4 | 6 | 2.91 |
| | ATT\TAA | 2 | 2 | 4 | 1.94 |
| | CTT\GAA | 3 | 2 | 5 | 2.42 |
| | GGC\GCC | 1 | 3 | 4 | 1.94 |
| | AAG | | | 6 | 2.91 |
| | TGG | | | 4 | 1.94 |
| ATG | | | 3 | 1.45 | |

表 3 柽柳中 14 个 EST-SSRs 引物的扩增特性

Table 3 The characteristics of 14 EST-SSRs primer amplification in *T. chinensis* L.

| 引物号/登录号 No./Accession No. | 引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3') | 重复单元 Repeat motif | 预计片段大小(bp) Expected size (bp) | 等位基 因 A | 实际杂合 度 Ho | 期望杂合 度 He |
|------------------------------|---|-----------------------|----------------------------------|---------------|-----------------|-----------------|
| Estssr-1/CF199044 | F:GGGTGGACGACTTGGC R:CGTGCGTGCGTATCAA | (ATT) ₆ | 170 | 3 | 0.6256 | 0.6952 |
| Estssr-2/EH051607 | F:AACCACCGATACATACAGA R:TGACAAATGACCTCCAAG | (ATCT) ₅ | 235 | 6 | 0.6986 | 0.7469 |
| Estssr-3/EH053495 | F:GCGGTGCTTCCTTCATCT R:CAAATGGGAGTGATGATGG | (TCC) ₆ | 205 | 5 | 0.4429 | 0.4241 |
| Estssr4/CV790971 | F:GGGCAATGTTTCCGATTC R:AGGCGACTGTAGCCAAGC | (ATGAAA) ₄ | 290 | 5 | 0.6256 | 0.6184 |
| Estssr-5/EG967460 | F:CATTTAGGACGAAACGAA R:CACGAGTGGCTTGACAGA | (TC) ₉ | 187 | 3 | 0.3516 | 0.5008 |
| Estssr-6/AB298390 | F:GTCCGTCGCTCTTGATTT R:GGTGATTGAAGCCATGTAT | (AC) ₉ | 189 | 6 | 0.6575 | 0.7840 |
| Estssr-7/EH051950 | F:CCAAATCCATCTTTCTC R:CCTCTTCCAATCTGCT | (AAT) ₇ | 248 | 3 | 0.3740 | 0.4029 |
| Estssr-8/EH050298 | F:TACCACGAGCAAACCAA R:GCGACTGTAGCCAAGC | (TGAAGA) ₃ | 232 | 4 | 0.4566 | 0.5601 |
| Estssr-9/EG973825 | F:TATCTCCATCCCAACAGT R:CGGCACGAGGCGGATA | (AT) ₉ | 270 | 5 | 0.6256 | 0.6964 |
| Estssr-10/EH056738 | F:ATAGGCGAATGGGTAC R:GTCTCAGCCAATGGAG | (ATT) ₇ | 190 | 5 | 0.6986 | 0.7458 |
| Estssr-11/EH048358 | F:GCCCTTTCTAACCATC R:GTCCAGAGGAGCAACC | (AC) ₈ | 354 | 5 | 0.4429 | 0.4252 |
| Estssr-12/EH056853 | F:ACTGACTGAACGTGGCG R:GGCTGCGGCTTCTACT | (AAT) ₇ | 320 | 4 | 0.6256 | 0.6173 |
| Estssr-13/CF199807 | F:TAACAATCGCAATCCT R:AACTGTAATGACCCACA | (ATTAC) ₄ | 410 | 6 | 0.3516 | 0.5060 |
| Estssr-14/CV795002 | F:TACAGGGAGAACATAGGG R:CGAGAAGGGAGGACAG | (AG) ₁₃ | 259 | 3 | 0.6575 | 0.7820 |

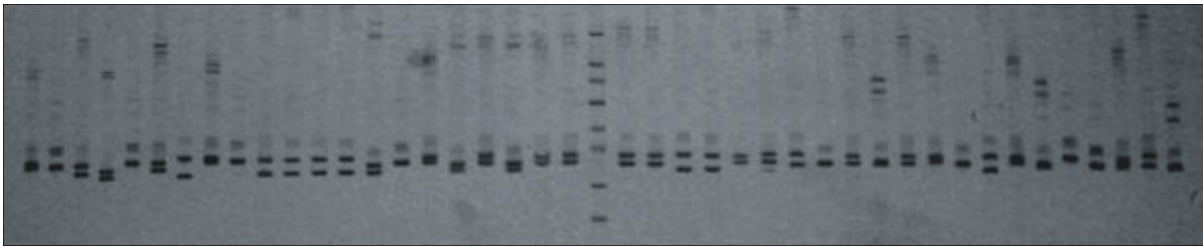


图1 引物Estssr-6对部分浙江慈溪群体的扩增

Figure 1 SSR amplification profiles for genomic DNA of ZCX population of *T. chinensis* L.

表4 柾柳群体的遗传距离(I)和遗传相似度(D)

Table 4 Nei's unbiased (1978) measures of genetic identity and genetic distance

| 群体名称及编号 Pop ID | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 浙江慈溪(CIXI.Z) | **** | 0.9726 | 0.9069 | 0.8904 | 0.8716 |
| Zhejiangcixi (CIXI.Z) | | **** | 0.9382 | 0.8840 | 0.8941 |
| 浙江海盐(HAIYAN.Z) | 0.0277 | | **** | 0.8847 | 0.8921 |
| Zhejianghaiyan (HAIYAN.Z) | | 0.0638 | | **** | 0.9487 |
| 浙江余姚(YUYAO.Z) | 0.0977 | 0.1233 | 0.1225 | | **** |
| Zhejiangyuyao (YUYAO.Z) | | | | 0.0527 | |
| 山东东营河口(HEKOU.S) | 0.1161 | 0.1120 | 0.1142 | | |
| Shandongdongyinghekou (HEKOU.S) | | | | | |
| 山东东营垦利(KENLI.S) | 0.1374 | | | | |
| Shandongdongyingkenli (KENLI.S) | | | | | |

注: 右上为遗传相似度(I); 左下为遗传距离(D)

Note: Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal)

处将不同群体分成A、B两组, A组来自山东, B组来自浙江(图2)。

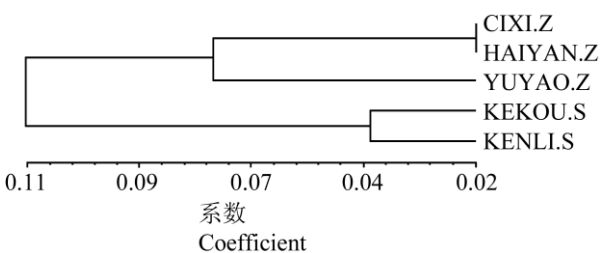


图2 柾柳群体的Nei无偏遗传距离UPGMA聚类结果

Figure 2 Dendrogram generated by UPGMA analysis of 6 populations of *T. chinensis* L. based on Nei's unbiased genetic identity

2讨论

2.1柾柳属植物EST-SSR的分布及特点

与其它植物相比, 柾柳EST序列中含有SSR的比例及SSR的基序组成既有共性, 也有特异性。从柾柳属植物EST拼接的9 439条独立基因序列中, 共发现202条EST有精确SSR, SSR的发生频率为

2.14%, 在其它植物的研究中也得到相似的结果(Cordeiro et al., 2001)。柾柳属植物EST-SSR的主体是二、三核苷酸, 这点与大部分植物类似(Cardle et al., 2000; Kota et al., 2001)。其中三核苷酸重复类型最多, 占总量的40.29%, 多于二核苷酸重复, 这与小麦、葡萄、咖啡、柑橘、苜蓿、棉花等植物中分布相似(安泽伟等, 2009)。对许多植物的研究发现, 在EST-SSR中, 二核苷酸基序中以AG/TC为最多(安泽伟等, 2009; Holton et al., 2002), 而本研究的结果表明, 柾柳的基序分布有所不同, 是以AT/TA为最多(11.65%), 其次才是AG/TC (9.22%)。在柾柳中未发现CG/GC重复单元, 而在许多植物中也有相似的结果——该重复单元很少或不存在(Holton et al., 2002)。与油菜、黄瓜、柑橘、橡胶树等植物中主要为三核苷酸重复类型CTT/GAA有所不同, 柾柳三核苷酸占优势的种类为AAT/TTA, 占总EST-SSR的7.28%, 不过CTT/GAA也是柾柳中较多的三核苷酸重复类型(占2.42%)。

2.2 EST-SSR标记的多态性、通用性及应用

Brown等(2001)利用火炬松的90个EST开发的标记,对松属单维管束亚属与双维管束亚属和松科的花旗松进行了比较作图研究,结果表明89%、49%和22%的EST引物可以从双维管束亚属、单维管束亚属及花旗松中实现扩增。通过75对引物对来自柽柳的5个天然群体进行的检测,其中的40对可以扩增出产物,占53%,14对引物在检测的群体中表现出较好的多态,说明SSR标记的通用性在柽柳属植物中与其它植物中相似。群体检测的结果表明,Nei基因多样性指数都在0.5以上,根据遗传距离能很好地区分不同群体,聚类结果与柽柳群体的空间分布较为一致(表4,图2)。随着更多柽柳群体EST-SSR标记检测结果的获得,将对柽柳遗传多样性及群体遗传结构有更加全面的认识。相对于RAPD等显性标记(赵景奎等,2008),开发的SSR标记能获得更为丰富的群体内、群体间遗传变异信息,即能检测出群体内更多的遗传多样性,同时更容易区分群体间的

差异性,故可作为进行群体遗传学研究的理想工具之一。由于通过EST序列开发SSR标记是最经济、快速和有效的方法之一,对那些研究基础比较薄弱的物种,通过利用其它研究基础较好物种(一般认为同属及近缘属中)的EST序列,开发种属之间的通用EST-SSR标记是可行的。本研究开发的引物也可直接应用于柽柳遗传学其它方面的研究。随着柽柳属植物研究的深入,相信将有更多的EST-SSR标记可开发利用。

3材料和方法

3.1材料与试剂

试验材料采自山东河口、垦利,浙江余姚、海盐、慈溪的5个柽柳天然群体。群体内取样个体之间的空间距离在50米以上,每个群体采集50株左右生长良好个体的穗条,穗条扦插繁殖成无性系保存在苗圃内,视样品DNA提取质量的好坏,最终确定群体检测用各群体个体数量见表5。

表5 柽柳采集地情况

Table 5 The geographical information of 5 natural colonies of *T. chinensis* L.

| 群体名称及编号 Pop ID | 经度/纬度 Latitude /Longitude | 林分状况 Stand Status | 取样个体数 Samples |
|---------------------------------|------------------------------|-----------------------|------------------|
| 浙江慈溪(CIXI.Z) | 121°45'30" 111° | 天然林 Natural forest | 51 |
| Zhejiangcixi (CIXI.Z) | | | |
| 浙江海盐(HAIYAN.Z) | 120°50'30" 125° | 天然林 Natural forest | 40 |
| Zhejianghaiyan (HAIYAN.Z) | | | |
| 浙江余姚(YUYAO.Z) | 121°6'29" 128° | 天然林 Natural forest | 43 |
| Zhejiangyuyao (YUYAO.Z) | | | |
| 山东东营河口(HEKOU.S) | 118°50'38" 107° | 天然林 Natural forest | 30 |
| Shandongdongyinghekou (HEKOU.S) | | | |
| 山东东营垦利(KENLI.S) | 119°02'37" 148° | 天然林 Natural forest | 38 |
| Shandongdongyingkenli (KENLI.S) | | | |

试验所用Taq酶、dNTPs、Marker等试剂均购自天根(Tiangen)生化科技公司,设计的引物由上海英骏(Invitrogen)生物技术有限公司合成。PCR所用仪器为PE9600(ABI公司),PCR产物电泳在DYCZ-32型电泳槽(北京六一仪器厂)中电泳分离。

3.2方法

3.2.1 DNA提取

采用改良的CTAB硅珠吸附法(Doyle and Doyle, 1990)以柽柳叶提取基因组总DNA。

3.2.2 EST重复序列的获得

从NCBI数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>)收集柽柳属植物EST序列,对EST序列采用vecscreen在线工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>)去除载体序列后,经Phrap软件拼接,得到无冗余独立基因(Unigene)序列,对所得的独立基因序列采用SSRIT (simple sequence repeat identification tool)在线工具(<http://acorn.cshl.org/db/searches/ssrtool>)进行SSR检索。要求SSR长度不少于18~22核苷酸,如二核苷酸重复不少于9次,四核苷酸重复不少于5次,六核苷酸重复

不少于3次等, 检索含有精确SSR基序(motif)。

3.2.3 EST-SSR引物设计

采用PRIMER5.0软件对串联重复长度大于18 bp的重复序列进行SSR引物设计。引物设计的要求为: 扩增产物长度100 bp~500 bp; 引物长度18 bp~24 bp, 各距重复序列不少于20 bp, GC含量40%~60%, 退火温度 T_m 值50°C~62°C, 且上下游引物的 T_m 值相差不大于5°C; 尽量避免引二聚体、发夹结构、错配等。

3.2.4 PCR扩增及产物检测

以柾柳总DNA为模板, PCR反应体系为10 μ L, 其中含10 \times PCR缓冲液1 μ L, Mg^{2+} 1.25 mmol/L, dNTPs 1.25 mmol/L, 上下游引物各0.5 μ mol/L, *Taq* 聚合酶1.25 U (5 U/ μ L), DNA 20 ng左右。PCR反应程序的变性温度为94°C (预变性5 min, 变性30s), 退火(30s)温度采用Touch-down方式(从60°C到49.9°C, 每循环降0.7°C), 72°C延伸(30s), 14个循环; 再进入退火温度为50°C的15循环(延伸为1 min)。采用8%聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离, 产物经银染后对各位点进行判读。

3.2.5 数据处理

按共显性标记处理数据, 依次按照电泳条带的DNA长度从小到大顺序以A、B、C、D、E...编号统计结果。运用POPGEN32软件(Yeh et al., 1997)进行群体分析, 主要参数有等位基因数目(A)、实际杂合度(H_0)、期望杂合度(H_e)、基因多样性(h)及Nei无偏遗传距离(Nei and Li, 1979), 并利用NTSYS2.1软件(Rohlf, 2002)对遗传距离采用UPGMA法构建聚类图。

作者贡献

张如华 李锐 赵景奎是本研究的执行人, 包括实验操作、数据分析及论文初稿的写作等; 徐立安为项目的构思者及负责人, 指导实验设计、数据分析、论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由江苏省高技术研究项目(BG2005319)资助。感谢南京林业大学温强、白天道、王仲伟博士生, 曹牧硕士等在群体样本采集、实验及数据分析中提供的大力帮助。

参考文献

An Z.W., Zhao Y.H., Cheng H., Li W.G., and Huang H.S., 2009, Development and application of EST-SSR markers in

- hevea brasiliensis Muell. Arg., Yichuan (Hereditas), 31(3): 311-319 (安泽伟, 赵彦宏, 程汉, 李维国, 黄华孙, 2009, 橡胶树 EST-SSR 标记的开发与应用, 遗传, 31(3): 311-319)
- Brown G.R., Kadel III E.E., Bassoni D.L., Kiehne K.L., Temesgen B., van Buijtenen J.P., Sewell M.M., Marshall K.A., and Neale D.B., 2001, Anchored reference loci in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) for integrating pine genomics, *Genetics*, 159: 799-809
- Cardle I., Ramsay L., Milbourne D., Macaulay M., Marshall D., and Waugh R., 2000, Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants, *Genetics*, 156: 847-854
- Carter M.J., and Milton I.D., 1993, An inexpensive and simple method for DNA purification on silica particles, *Nucleic Acids Res.*, 21: 1044
- Doyle J.J., and Doyle J.L., 1990, Isolation of plant DNA from fresh tissue, *Focus*, 12: 13-15
- Eujayl I., Sorrells M.E., Baum M., Wolters P., and Powell W., 2002, Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat, *Theor Appl Genet*, 104: 399-407
- Kota R., Varshney R.K., Thiel T., Dehmer K.J., and Graner A., 2001, Generation and comparison of EST-derived SSRs and SNPs in Barley (*Hordeum vulgare* L.), *Hereditas*, 135(2-3): 145-151
- Nei M., and Li W.H., 1979, Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76: 5269-5273
- Pashley C.H., Ellis J.R., McCauley D.E., and Burke J.M., 2006, EST databases as a source for molecular markers: Lessons from *Helianthus*, *J. Hered.*, 97: 381-388
- Rohlf F.J., 1997, NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, ver. 2.02. Exeter Ltd, Setauket, NY, USA
- Weber J.L., 1990, Informativeness of human (dC-dA)n-(dG-dT)n polymorphisms, *Genomics*, 7(4): 524-530
- Yeh F.C., Yang R.C., and Boyle T.B.J., 1997, POPGENE version 1.31. Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada
- Zhao J.K., Xu L.A., Xie H.F., Zhao D.Y., and Huang M.R., 2008, RAPD analysis of population genetic diversity of tamarix chinensis in yellow river delt, Nanjing Linye Daxue (*Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*), 32(5): 56-60 (赵景奎, 徐立安, 解荷峰, 赵大勇, 黄敏仁, 2008, 黄河三角洲柾柳群体遗传多样性RAPD分析, 南京林业大学学报(自然科学版), 32(5): 56-60)