

美洲黑杨遗传差异的 SRAP 和 EST-SSR 分析

郭娟¹, 樊军锋^{1*}, 梁军²

(1 西北农林科技大学 林学院, 陕西杨陵 712100; 2 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091)

摘要: 采用 SRAP 和 EST-SSR 分子标记对美洲黑杨 I-69 及与其有亲缘关系的 4 个美洲黑杨品种进行遗传差异分析, 比较两种分子标记在遗传差异性分析中的适用性, 为美洲黑杨的鉴别提供准确的分子技术依据。结果表明: (1) 以 SRAP 标记筛选出 21 对引物组合, 共扩增出 287 条谱带, 多态性条带 209 条, 多态性比率 72.8%, 遗传相似系数为 0.548 1~0.769 2。(2) 以 EST-SSR 标记筛选出 17 对引物, 共扩增出 86 条谱带, 多态性条带 69 条, 多态性比率 80.2%, 遗传相似系数为 0.444 4~0.717 2。(3) 对 SRAP 和 EST-SSR 以及两者混合数据形成的 3 个遗传相似矩阵进行相关性分析结果显示, SRAP 和 EST-SSR 分别同综合数据之间呈显著相关($r=0.844\ 2$, $r=0.830\ 8$)。(4) 聚类分析发现, 两种分子标记的聚类结果有一定差异, SRAP 聚类结果同综合数据分析的结果一致, 说明 SRAP 标记更适用于杨树亲缘关系较近材料的遗传差异分析。

关键词: 美洲黑杨; SRAP; EST-SSR; 遗传差异

中图分类号: Q789

文献标志码: A

Genetic Difference Analysis of *Populus deltoides* Using SRAP and EST-SSR Markers

GUO Juan¹, FAN Junfeng^{1*}, LIANG Jun²

(1 College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 The Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, The Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: Both SRAP and EST-SSR markers were used to analysis genetic difference of 5 *Populus deltoides* varieties including *P. deltoides*, cv. 'Lux' (I-69/55) and 4 varieties related to it. (1) In SRAP analysis, 21 primer pairs were screened and 287 bands were amplified, of which 209 bands were polymorphic. The percentage of polymorphic bands was 72.8% and the genetic similarity coefficients ranged from 0.548 1 to 0.769 2. (2) In EST-SSR analysis, 17 primers were screened and 86 bands were amplified, among which 69 bands were polymorphic. The percentage of polymorphic bands was 80.2% and the genetic similarity coefficients ranged from 0.444 4 to 0.717 2. (3) The correlation of the genetic similarity matrix among the SRAP, EST-SSR and the combination data were different, of which the correlation between SRAP and the combination data ($r=0.844\ 2$), EST-SSR and the combination data ($r=0.830\ 8$) were significantly correlated. (4) Cluster analysis showed that there was difference between the genetic similarity assessed by SRAP and EST-SSR markers, but the results of SRAP and the combination data were consistent, which showed that SRAP markers were more effective in genetic difference analysis of close *Populus* lines.

Key words: *Populus deltoides*; SRAP; EST-SSR; genetic difference

收稿日期: 2013-06-07; 修改稿收到日期: 2013-07-16

基金项目: 国家“十二五”科技支撑专题(2012BAD01B03)

作者简介: 郭娟, 女, 硕士研究生, 主要从事林木遗传育种林业生物技术方面的研究。E-mail: guojuan1323344@163.com

* 通信作者: 樊军锋, 研究员, 主要从事林木遗传育种方面的研究。E-mail: fanjf28@163.com

遗传差异的分析与评价是杂种优势育种和杂交育种成功的基础,和传统的基于表现型的分析方法相比,基于 DNA 分子标记的分析技术更具优势^[1],其直接从 DNA 分子水平检测基因组的遗传变异,不受组织、发育时期及环境的影响,且信息量大、多态性高^[2]。近年来,多种分子标记已在杨树中广泛应用,如 RAPD^[3]、AFLP^[4]、SSR^[5]等,在这些标记中,基于 PCR 的 DNA 标记在实践中具有操作简便的优势^[1]。SRAP 又称相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism)是由 Li 和 Quiros 开发的以全基因组为靶标,检测开放阅读框与其上游的启动子或内含子之间序列多态性的一种新的分子标记技术^[6]。由于标记简便、快速、不需预知物种的序列信息,目前已应用于植物的遗传多样性分析、种质鉴定、遗传连锁图谱的构建和基因定位等多方面的研究^[7]。EST-SSR(expressed sequence tag based simple sequence repeat)又称基于表达序列标签微卫星,搜索 EST 中微卫星,根据微卫星两侧的已知序列来设计引物,扩增基因组中的外显子片段^[8]。它具有开发简单、快捷、信息量大、通用性好等优点。目前已在植物遗传图谱构建、比较作图和遗传多样性评价等方面广泛应用^[9-12]。SRAP 和 EST-SSR 分子标记在杨树中的研究较少,结合 SRAP 和 EST-SSR 两种分子标记研究杨树的遗传差异还未见报道。

美洲黑杨(*Populus deltoides*)种质资源丰富,树干通直,是黑杨派中最具栽培利用价值的树种^[13]。自上世纪 70 年代引入中国以后,杨树育种研究得到了迅速发展,但由于引进的无性系数量较少,遗传基础较窄^[14],杂交育种形成的品种或无性系间亲缘关系较近,在形态上难以区分。本试验采用 SRAP 和 EST-SSR 两种分子标记对美洲黑杨品

种进行遗传差异分析,比较两种分子标记在分析美洲黑杨品种的遗传差异性中的适用性及其分析效力,为美洲黑杨的鉴别提供科学、准确的分子依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

从西北农林科技大学渭河试验站(表 1)采集 5 个美洲黑杨品种的 1 年生枝条进行室内水培,待其发出嫩叶。

1.2 DNA 提取与检测

采用改良的 CTAB 法^[15-17]提取美洲黑杨嫩叶中的基因组 DNA。0.8%的琼脂糖凝胶电泳和核酸检测仪对基因组 DNA 进行浓度和纯度的检测,将 DNA 稀释到 50 ng/ μ L, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 SRAP 与 EST-SSR 分析

SRAP 引物序列参照王源秀等^[6],采用其中 9 条正向引物和 8 条反向引物(表 2),反应体系与程序参照谭碧玥等^[18]的方法。EST-SSR 引物序列参照张亚东等^[19]和宋跃朋等^[20],反应程序参照张亚东^[19]的方法,反应体系为 20 μ L,包括 2 \times Taq MasterMix(康为世纪)10 μ L,10 μ mol/L 的正反向引物各 1 μ L,模板 1 μ L(50 ng),RNase-Free Water 7 μ L。引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成。PCR 扩增产物用 8%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,采用银染法染色^[21],照相分析。

1.4 数据分析

利用人工读带法,电泳图上可重复的、清晰的条带记为“1”,同一位置无带或弱带记为“0”,建立原始数据矩阵。利用软件 NTSYS-pc2.1 计算各品种间的遗传相似系数(GS),然后采用 UPGMA 进行聚类分析,并构建树状聚类图。利用 TFPGA 软件对两种标记进行 Mantel 相关性检测。

表 1 试验材料
Table 1 List of experiment materials

品种 Variety	遗传背景 Genetic background	来源 Origin
I-69 杨 <i>P. deltoides</i> , cv. 'Lux'(I-69/55)	美洲黑杨 <i>P. deltoides</i>	意大利 Italy
陕林 3 号 <i>P. deltoides</i> , cl. 'SL-3'	I-69 杨(♀) \times 美洲黑杨(♂) <i>P. deltoides</i> , cv. 'Lux'(I-69/55)(♀) \times <i>P. deltoides</i> (♂)	陕西省林业科学研究院 Shaanxi Academy of Forestry
创新杨 1 号 <i>P. deltoides</i> , cl. Xinshiji-1	南抗 1 号(♀) \times 帝国杨(♂) <i>P. deltoides</i> , cl. Nankang-1(♀) \times <i>P. deltoides</i> , cv. Imperia-1(♂)	中国林业科学研究院 Chinese Academy of Forestry
南抗 1 号 <i>P. deltoides</i> , cl. Nankang-1	I-69 杨(♀) \times I-63 杨(♂) <i>P. deltoides</i> , cv. 'Lux'(I-69/55)(♀) \times <i>P. deltoides</i> , cv. 'Harvard'(I-63/51)(♂)	中国林业科学研究院 Chinese Academy of Forestry
北抗 1 号 <i>P. deltoides</i> , cl. Beikang-1(16-27/92)	南抗 1 号(♀) \times D175 杨(♂) <i>P. deltoides</i> , cl. Nankang-1(♀) \times <i>P. deltoides</i> , cl. 175(♂)	中国林业科学研究院 Chinese Academy of Forestry

表 2 鉴别美洲黑杨的 SRAP 引物
Table 2 SRAP primers for *P. deltoides* identification

正向引物 Forward primers		反向引物 Reverse primers	
名称 Name	序列 Sequence(5'-3')	名称 Name	序列 Sequence(5'-3')
ME1	TGAGTCCAAACCGGATA	EM2	GACTGCGTACGAATTTGC
ME2	TGAGTCCAAACCGGAGC	EM3	GACTGCGTACGAATTGAC
ME3	TGAGTCCAAACCGGAAT	EM4	GACTGCGTACGAATTTGA
ME4	TGAGTCCAAACCGGACC	EM6	GACTGCGTACGAATTGCA
ME8	TGAGTCCAAACCGGTGC	EM7	GACTGCGTACGAATTCAA
ME9	TGAGTCCAAACCGGTAG	EM14	GACTGCGTACGAATTGAG
ME10	TGAGTCCAAACCGGCAT	OD3	CCAAAACCTAAAACCAGGA
ME11	TGAGTCCAAACCGGTCT	SA4	TTCTTCTTCTGACACAAA
DC1	TAAACAATGGCTACTCAAG		

2 结果与分析

2.1 引物筛选及扩增多态性分析

选用‘I-69 杨’与‘北抗 1 号’对 72 对 SRAP 引物组合和 22 对 EST-SSR 引物进行扩增能力和扩增多态性筛选。SRAP 引物中,条带清晰、具有多态性的引物组合有 32 对;EST-SSR 引物中,条带清晰、具有多态性的引物有 17 对。筛选出的引物对 5 个品种进行 PCR 扩增,32 对 SRAP 引物中,21 对引物可以把 5 个美洲黑杨品种完全区分开,21 对引物组合共扩增出 287 条谱带,多态性条带 209 条,多态性比率 72.8%,每个引物扩增的条带在 6~21 条,平均为 13.7 条,扩增片段集中在 100~1 000 bp。图 1,A 为 ME9/SA4 和 ME9/EM3 的电泳图谱。17 对 EST-SSR 引物,共得到 86 条谱带,多态性条带 69 条,多态性比率 80.2%,每对引物扩增条带在 2~10 条,平均 5.1 条,扩增片段集中在 100~350

bp;图 1,B 为 HB-1 的电泳图谱,其中 5 对引物可以把 5 个美洲黑杨品种完全区分开。表 3 结果表明:SRAP 和 EST-SSR 分子标记都表现出较高的多态性,其中 SRAP 扩增出的多态性位点远多于 EST-SSR,但多态性比率略低于 EST-SSR。说明 SRAP 标记每对引物组合揭示的信息量较高。

2.2 遗传相似性分析

根据统计的条带建立 0,1 矩阵,利用 NT-SYSpC-2.1 计算出各品种间的遗传相似系数。基于 SRAP 的 5 个美洲黑杨品种之间的遗传相似系数在 0.548 1~0.769 2 之间,平均相似系数为 0.658 7,变幅为 0.221 1。基于 EST-SSR 的各品种间的遗传相似系数在 0.444 4~0.717 2 之间,平均相似系数为 0.580 8,变幅为 0.272 8。2 种分子标记结果均表明美洲黑杨品种间的遗传差异较小。可以看出,2 种标记的结果相近,但 SRAP 标记的遗传相似系数范围较 EST-SSR 的小。

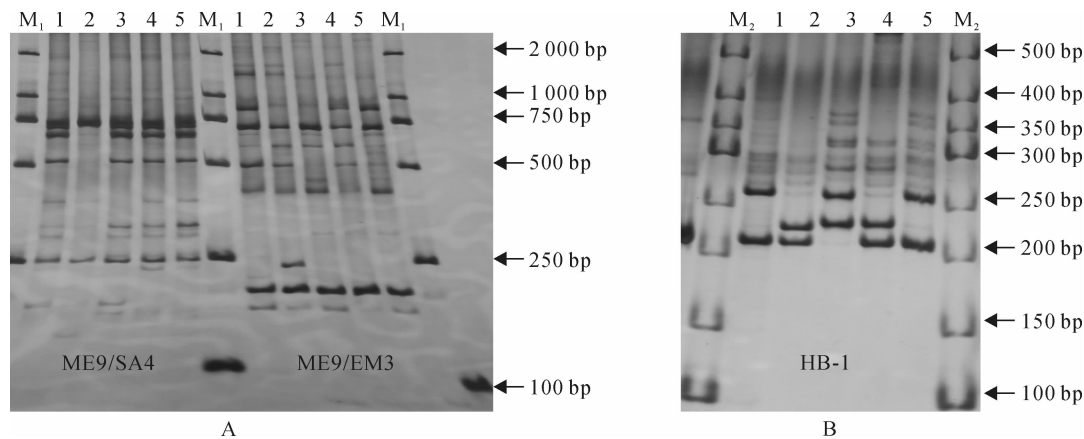


图 1 5 个美洲黑杨 SRAP(A)和 EST-SSR(B)扩增结果
M₁. DL2000;M₂. 50 bp ladder;1~5 编号同表 1

Fig. 1 Amplification results of 5 *P. deltoides* varieties with SRAP primers(A) and EST-SSR primers(B)
M₁. DL2000;M₂. 50 bp ladder;1~5 is the same as Table 1

2.3 品种聚类分析

按照 UPGMA 法进行聚类分析,绘制品种的树状图。基于 SRAP 聚类分析(图 2,A),当遗传相似系数为 0.59 时,分为两大类群,‘陕林 3 号’为类群 I,其余 4 个品种为类群 II。当阈值为 0.69 时,类群 II 又可以分为‘I-69 杨’、‘南抗 1 号’和‘创新杨 1 号’、‘北抗 1 号’两大亚类。基于 EST-SSR 聚类分析(图 2,B),当遗传相似系数为 0.55 时,分为两大类群,‘I-69 杨’、‘南抗 1 号’、‘陕林 3 号’为类群 I,‘创新杨 1 号’与‘北抗 1 号’为类群 II。基于 SRAP

和 EST-SSR 数据综合后的聚类分析,聚类结果与 SRAP 分析的结果是一致的(图 2,C)。结果显示,SRAP 和 EST-SSR 标记的聚类结果有一定的差异,表现为‘陕林 3 号’在 2 种分子标记中处于不同的类群,但‘创新杨 1 号’、‘北抗 1 号’的聚类结果在 2 种分子标记中具有有一致性。说明 2 种分子标记在亲缘关系较近的美洲黑杨品种之间的分析具有一定的可靠性,但 SRAP 标记可能具有更高的可信度。

2.4 SRAP 和 EST-SSR 标记相关性分析

利用TFPGA软件中的Mantel对SRAP和EST-

表 3 美洲黑杨 SRAP 和 EST-SSR 标记的多态性

Table 3 Amplification results of 5 *P. deltoides* varieties based on SRAP and EST-SSR markers

SRAP 引物对 Primer pair	SRAP 扩增 总条带数 Total No. of bands	SRAP 多态性 条带数 No. of polymorphic bands	SRAP 多态性比率 Rate of polymorphic bands/%	EST-SSR 引物对 Primer pair	EST-SSR 扩增总条带 Total No. of bands	EST-SSR 多态性条带数 No. of polymorphic bands	EST-SSR 多态性比率 Rate of polymorphic bands/%
ME3/EM4	6	4	66.6	HB-1	7	7	100.0
ME1/EM4	9	7	77.8	HB-3	5	5	100.0
DC1/OD3	10	7	70.0	HB-10	4	3	75.0
ME2/EM4	13	9	69.2	HB-11	10	10	100.0
ME3/EM3	14	14	100.0	HB-16	4	4	100.0
ME3/EM4	21	17	81.0	HB-28	3	1	33.3
ME3/EM6	13	8	61.5	HB-35	4	3	75.0
ME3/EM7	16	12	75.0	HB-36	4	1	25.0
ME3/EM14	18	11	61.1	HB-41	7	6	85.7
ME4/OD3	16	13	81.3	HB-45	3	3	100.0
ME4/SA4	17	11	64.7	ESTCU310401	4	3	75.0
ME4/EM4	16	7	43.8	ESTCU310140	6	5	83.3
ME8/EM2	11	7	63.6	ESTCU316835	4	3	75.0
ME8/EM3	11	10	90.9	ESTCU306954	8	8	100.0
ME8/EM4	13	8	61.5	ESTCU307135	6	3	50.0
ME8/EM7	17	9	52.9	ESTCU307757	2	2	100.0
ME8/EM6	13	10	76.9	ESTCU307720	5	2	40.0
ME9/SA4	12	10	83.3				
ME9/EM3	13	10	76.9				
ME9/EM7	14	12	85.7				
ME11/EM2	14	13	92.9				
总计 Total	287	209	72.8	总计 Total	86	69	80.2

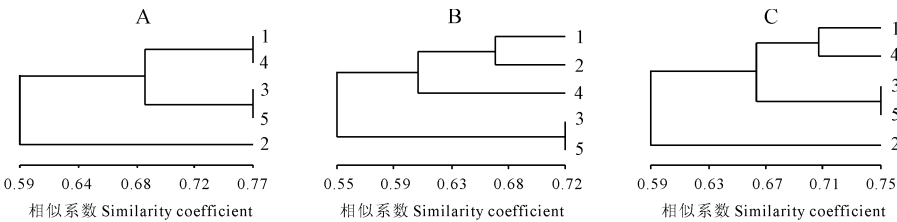


图 2 5 个美洲黑杨品种的 SRAP(A)、EST-SSR(B)和 SRAP+EST-SSR(C)的聚类树状图

1~5 编号同表 1

Fig. 2 Dendrogram of 5 *P. deltoides* varieties based on SRAP(A), EST-SSR(B) and SRAP+EST-SSR(C)

1~5 is the same as Table 1

SSR 标记的遗传相似系数矩阵进行相关性分析,并分别同两者的混合数据形成的遗传相似系数矩阵进行相关性分析。结果显示,SRAP 和 EST-SSR 标记对美洲黑杨品种的相似性分析的结果相关性不显著($r=0.403\ 0$, $P=0.08$);SRAP 标记和综合数据的分析结果相关性显著($r=0.844\ 2$, $P=0.03$);EST-SSR 标记和综合数据的分析结果相关性显著($r=0.830\ 8$, $P=0.01$),说明 SRAP 标记更接近综合数据的分析结果,因此推测 SRAP 标记更适于分析亲缘关系较近的美洲黑杨品种间的遗传差异。

3 讨 论

3.1 SRAP 和 EST-SSR 标记遗传检测效率的评价

本试验首次利用 SRAP 和 EST-SSR 2 种分子标记对陕西省内主栽的 5 个美洲黑杨品种进行遗传差异检测,品种间的遗传基础较窄,但 SRAP 表现出了较高的分析效率,每个引物组合检测到的位点(13.7)及多态性位点(9.95)均较高,是 EST-SSR 的 2.7 倍和 2.5 倍。本试验合成的 17 条 SRAP 引物,可以组合成 72 对引物,成本优势明显,而目前公布的杨树的 EST-SSR 引物数目相对较少且合成成本较高。所以,SRAP 标记在揭示不同品种间遗传差异性的性能要优于 EST-SSR。

3.2 SRAP 和 EST-SSR 聚类分析及其相关性

不同分子标记技术的比较已在多种作物中进行过,如于栓仓等^[22]利用 RAPD、RGA 和 SRAP 分子标记技术对 22 个番茄品种进行了分子鉴别研究,但目前杨树中报道很少。基于不同分子标记的相同材料之间遗传相似系数的相关性大小取决于这些分子标记所揭示的基因组多态性的特征^[23]。本试验

中,EST-SSR 的聚类结果与 SRAP 的聚类结果之间存在一定的差异,主要表现在‘陕林 3 号’处于不同的类群。而 SRAP 的聚类结果与综合分析的聚类结果是一致的,这与高建明^[15]的研究也是一致的。原因可能是 2 种分子标记的扩增产物虽都分布在基因组的转录区^[24],但揭示的多态性不同。EST-SSR 是通过筛选包含 SSR 的 EST 并根据微卫星序列两端保守的侧翼序列设计引物,对基因组编码区进行扩增,多态性主要基于微卫星重复序列数目的变化而产生的长度多态性^[9]。而 SRAP 是利用独特的引物设计对 ORFs 进行扩增,对内含子区域、启动子区域进行特异性扩增,因个体不同以及物种的内含子、启动子与间隔长度不等而产生多态性^[25]。也可能与多态性位点多少有关,EST-SSR 聚类是根据 69 个多态性位点进行的,而 SRAP 聚类是根据 209 个多态性位点进行的。研究表明,品种相似性分析的可靠性和准确性在很大程度上取决于所使用的标记数目的多少^[15]。从聚类结果可以看出,SRAP 标记更可靠,也可能与 SRAP 标记与相应性状的连锁更加紧密有关^[26]。

SRAP 和 EST-SSR 数据综合后的遗传相似系数矩阵分别与 SRAP、EST-SSR 的遗传相似系数矩阵进行 Mantel 检测,相关系数分别为 0.844 2 和 0.830 8,两两间匹配良好。又因为 SRAP 和 EST-SSR 标记揭示的基因组不同的位点信息,因此将两种标记结合起来可能会更加合理、准确地反映品种间的遗传差异。不同的分子标记之间并不相互排斥,也无法相互取代,不同标记间的相互补充和利用,能更好地揭示种质之间的遗传多样性^[22]。

参考文献:

- [1] DU X H(杜晓华),KONG ZH H(孔振辉),WANG D Y(王得元),*et al.* Genetic differences among well-performing inbred lines of hot pepper (*Capsicum annuum* L.)[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.* (西北植物学报),2006,**26**(12):2 445—2 452(in Chinese).
- [2] 宋红竹. 杨属 AFLP 遗传多样性研究和杨树品种分子指纹图谱研究[D]. 北京:中国林业科学研究院,2005.
- [3] CASTIGLIONE S,WANG G,DAMIANI G,*et al.* RAPD fingerprints for identification and for taxonomic studies of elite poplar (*Populus* spp.) clones[J]. *Theoretical and Applied Genetics*,1993,**87**(1—2):54—59.
- [4] FAOUZI B,BRUCE M,BILL S. Application of DNA markers for the identification and management of hybrid poplar accessions[J]. *Agroforestry System*,2003,**1**(59):53—59.
- [5] WEI Z ZH,DU Q ZH,ZHANG J F,*et al.* Genetic diversity and population structure in Chinese indigenous poplar (*Pupulus simonii*) population using microsatellite markers[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*,2013,**31**(3):620—632.
- [6] 王源秀. 响叶杨×银白杨遗传图谱构建及杨属图谱比较研究[D]. 南京:南京林业大学,2008.
- [7] WANG C Y(王从彦). Research progresses of SRAP application on plants in gennetic diversities[J]. *Biotechnology*(生物技术),2011,**21**

- (5):87—90(in Chinese).
- [8] YU J ZH(余继忠),HUANG H T(黄海涛),YAO M ZH(姚明哲),*et al.* Analysis of genetic diversity and relationship of half-sib tea cultivars related to fuding dabai and yunnan daye using EST-SSR markers[J]. *Journal of Tea Science*(茶叶科学),2010,**30**(3):184—190(in Chinese).
- [9] LI W G(李卫国),CHANG T J(常天俊),GONG H M(龚红梅),*et al.* Simple sequence repeats derived from expression sequence tags (EST-SSRs) and its application to plant genomics[J]. *Biotechnology*(生物技术),2008,**18**(4):90—93(in Chinese).
- [10] ZHANG K P,TIAN J C,ZHAO L,*et al.* Mapping QTLs with epistatic effects and QTL×environment interactions for plant height using a doubled haploid population in cultivated wheat[J]. *Journal of Genetics and Genomics*,2008,**35**(2):119—127.
- [11] HAN Z,WANG C,SONG X,*et al.* Characteristics,development and mapping of *Gossypium hirsutum* derived EST-SSRs in allotetraploid cotton[J]. *Theoretical and Applied Genetics*,2006,**112**(3):430—439.
- [12] TANGPHATSORNRUANG S,SRAPHET S,SINGH R,*et al.* Development of polymorphic markers from expressed sequence tags of *Manihot esculenta* Crantz[J]. *Molecular Ecology Resources*,2008,**8**(3):682—685.
- [13] MA J(马 骏). Introduction and cultivation management of *Populus deltoides*[J]. *Yunnan Forestry*(云南林业),2012,**33**(3):62—63(in Chinese).
- [14] LI SH F(李世峰),ZHANG B(张 博),CHEN Y(陈 英),*et al.* Analysis of genetic diversity of *Populus deltoides* germplasm by SSR [J]. *Journal of Nanjing Forestry University*(Nat. Sci. Edi.)(南京林业大学学报·自然科学版),2006,**30**(4):10—13(in Chinese).
- [15] 高建明. 杨属植物的 ISSR 与 AFLP 指纹分析及应用研究[D]. 天津:南开大学,2006.
- [16] CHEN Y(陈 艺),GUO J ZH(郭军站),LI H(李 辉),*et al.* Fingerprints construction of 15 fruit mulberry (*Morus* spp.) clone[J]. *Journal of Northwest Forestry University*(西北林学院学报),2011,**26**(6):62—65(in Chinese).
- [17] MA M(马 明),YANG K Q(杨克强),GUO Q R(郭起荣). Studies on genomic DNA extraction of forest species with improved CTAB method[J]. *Biotechnology*(生物技术),2007,**17**(3):36—38(in Chinese).
- [18] TAN B Y(谭碧玥),WANG Y X(王源秀),XU L A(徐立安). Establishment and optimization of SRAP-PCR reaction system of *Populus* [J]. *China Forestry Science and Technology*(林业科技开发),2009,**23**(2):25—29(in Chinese).
- [19] ZHANG Y D(张亚东),HU X Y(胡兴宜),SONG C W(宋丛文). Identification of *Populus varieties* from hubei province by EST-SSR marker[J]. *Molecular Plant Breeding*(分子植物育种),2009,**7**(1):105—109(in Chinese).
- [20] SONG Y P(宋跃鹏),JIANG X B(江锡兵),ZHANG M(张 曼),*et al.* Genetic differences revealed by genomic-SSR and EST-SSR in poplar[J]. *Journal of Beijing Forestry University*(北京林业大学学报),2010,**32**(5):1—7(in Chinese).
- [21] PANAUD O,CHEN X,MCCONCH S D. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa*) [J]. *Molecular and General Genetics*,1996,**252**(5):597—607.
- [22] YU SH C(于栓仓),CHAI M(柴 敏),JIANG L G(姜立刚). Varieties identification of tomato using molecular markers[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*(中国农学通报),2005,**21**(5):84—89(in Chinese).
- [23] ZOU Z ZH(邹自征),CHEN J H(陈建华),LUAN M B(栾明宝),*et al.* Genetic relationship of ramie germplasm revealed by RSAP, SRAP and SSR markers[J]. *Acta Agronomica Sinica*(作物学报),2012,**38**(5):840—847(in Chinese).
- [24] ZHANG P(张 鹏),ZHANG H Y(张海洋),GUO W ZH(郭旺珍),*et al.* Genetic diversity analysis of *Sesamum indicum* L. germplasms using SRAP and EST-SSR markers[J]. *Acta Agronomica Sinica*(作物学报),2007,**33**(10):1 696—1 702(in Chinese).
- [25] REN Y(任 羽),WANG D Y(王得元),ZHANG Y D(张银东). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP): a novel technique for molecular marker[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*(中国农学通报),2004,**20**(6):11—13(in Chinese).
- [26] GAI SH P(盖树鹏),GAI W L(盖伟玲),HUANG J Y(黄进勇),*et al.* Comparison of SSR and SRAP marker for varieties identification in maize (*Zea mays* L.) [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*(植物遗传资源学报),2011,**12**(3):468—472(in Chinese).