

4 种甘草属植物 EST-SSR 引物 开发及其亲缘关系分析

李晓岚¹, 陆嘉惠^{1,2,3*}, 谢良碧¹, 张爱霞¹, 陈晓翠¹, 李学禹³

(1 石河子大学 生命科学学院, 新疆石河子 832003; 2 新疆生产建设兵团绿洲生态农业重点实验室, 新疆石河子 832003; 3 石河子大学 甘草研究所, 新疆石河子 832003)

摘要:通过乌拉尔甘草表达序列标签(EST)数据库查找甘草属的 SSR 位点, 并利用 Primer 3.0 软件在线设计 EST-SSR 引物, 对来自甘草属 4 个种 22 份材料的 EST-SSR 指纹图谱特征和聚类结果进行分析, 为探讨甘草属种间亲缘关系和疑难种的分类地位提供分子依据。结果显示: (1) 去掉冗余序列后共得到 441 条 EST 序列, 获得 504 个 SSR 位点, 其中二核苷酸为重复单元的序列最多为 350 个, 占 69.44%, 重复类型中以 TC/AT、TA/AG 形式的微卫星最为丰富。 (2) 设计的 40 对 EST-SSR 引物, 均能扩增出清晰条带, 其中 15 对引物具有多态性, 在 22 份甘草属植物材料中共获得等位基因 59 个, 平均每对引物检测到 3.93 个等位基因位点, 扩增产物多态性比率为 89.44%, 能很好地表征甘草属种间的等位基因差异。 (3) 引物 Primer 64 对 4 种甘草属植物均能扩增出特异性条带, 黄甘草在 180 和 220 bp 2 个位点分别与光果甘草、胀果甘草基因共享, 具有杂交种特征。 (4) 聚类分析表明, 当相似性系数为 0.82 时, 22 份材料被划分为四组(与经典分类结果一致), 第一组为内蒙古杭锦旗分布的乌拉尔甘草; 第二组为新疆巴楚分布的光果甘草、黄甘草; 第三组为新疆石河子分布的胀果甘草、黄甘草; 第四组为新疆石河子分布的乌拉尔甘草; 不同居群的黄甘草遗传分化较大, 可能与同域分布亲本种的差异及种间的渐渗杂交有关。研究表明, 开发的 15 对 EST-SSR 引物在甘草属内具有很好的适用性, 可以为该属的种间亲缘关系和种内遗传分化研究及物种鉴定提供分子依据。

关键词:甘草属; EST; SSR; 亲缘关系

中图分类号: Q789

文献标志码: A

Development of EST-SSR Primers and Genetic Relationship Analysis in Four *Glycyrrhiza* L. Species

LI Xiaolan¹, LU Jiahui^{1,2,3*}, XIE Liangbi¹, ZHANG Aixia¹, CHEN Xiaocui¹, LI Xueyu³

(1 College of Life Science, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China; 2 The Key Oasis Eco-Agriculture Laboratory of Xinjiang Production and Construction Group, Xinjiang 832003, China; 3 Institute of Licorice in Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China)

Abstract: The *Glycyrrhiza* L. SSRs were searched in the expressed sequence tag (EST) database of *Glycyrrhiza uralensis*, and the EST-SSR primers were designed by Primer 3.0 online software. The EST-SSR fingerprint characteristics and cluster trees of four species were then analyzed to discuss the interspecific relationships among species and taxonomic status of the doubtful species. (1) Total 504 SSRs were identified from 441 EST sequences. There were 350 dinucleotide repeat sequences with 69.44% frequency, show-

收稿日期: 2014-11-23; 修改稿收到日期: 2015-03-06

基金项目: 国家自然科学基金(31260042)

作者简介: 李晓岚(1988—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事药用植物资源研究。E-mail: lixiaolan19880404@163.com

* 通信作者: 陆嘉惠, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事药用植物资源研究。E-mail: jiahui@shzu.edu.cn

ing the dominant types in the SSRs. Both TC/AT and TA/AG types were abundant among dinucleotide repeat sequences. (2) The distinct bands were produced in PCR amplifications for all 40 random selected EST-SSR primers. The polymorphic bands were observed in 15 primers, a total of 59 alleles in the 22 materials of the *Glycyrrhiza* L. were observed, which appeared to be 89.44% polymorphic among these 15 primers with an average of 3.93 alleles per primers. (3) The primer 64 could amplify specific bands in 4 species. *G. eurycarpa* had the same alleles as that of *G. inflata* at 180 bp site and that of *G. grabra* at 220 bp site, showing the hybrid characteristics. (4) The cluster analysis of SSR data showed that when similarity coefficient was 0.82, 22 materials from 4 species were clustered into 4 groups; *G. uralensis* in Hangjingqi, Neimenggu; *G. eurycarpa* and *G. grabra* in Bachu, Xinjiang; *G. eurycarpa* and *G. inflata* in Shihezi, Xinjiang; *G. uralensis* in Shihezi, Xinjiang. This cluster was in accord with the classical taxonomy. However, there was fairly large genetic differentiation in different populations of *G. eurycarpa*. It may be caused by the differentiation of sympatric parent species or introgressive hybridization. These results indicates that 15 primers is suitable for EST-SSR analysis of *Glycyrrhiza* L.. It would be useful for species identification and study of genetic variation and species relationship of *Glycyrrhiza* L..

Key words: *Glycyrrhiza* L.; EST; SSR; genetic relationship

豆科 (Leguminosae) 甘草属 (*Glycyrrhiza* L.) 植物全世界约 20 种, 主要产地在中亚、北美及东欧, 尤以中亚及地中海沿岸为分布中心。中国甘草属植物集中分布于东北、华北和西北各省区, 而以新疆、内蒙古、宁夏和甘肃为中心产区^[1-2]。甘草属植物为重要的野生药用植物资源, 种内、种间遗传变异复杂, 属下种的亲缘关系和分类鉴定一直存在争议^[3-4], 给甘草属植物资源的研究带来混乱。Hayashi 等曾对甘草属一些中间类型植物叶中的黄酮成分进行分析, 发现与原种有差异, 提取 DNA 和 PCR 扩增及测序结果提示, 中间物可能起源于不同母系株^[5]。目前, 有关甘草属植物分类学和遗传多样性研究主要集中在系统学^[6]、细胞学^[7]、等位酶^[8]等方面, 应用分子标记方法有关于 RAPD、AFLP 等标记的报道^[9-10], 在甘草属的种间亲缘关系及系统演化研究方面取得了一定进展。但由于甘草属植物种间的自然杂交现象^[11-13], 自然杂交种的存在使属内一些种的种间界限模糊, 种的分类地位仍有待商榷^[3,8]。植物 SSR 标记多态性丰富、稳定性突出, 是进行属、种等分类单元研究的重要分子标记, 并能通过共显性的标记进行亲本分析^[14], EST-SSR 标记具有开发效率高、成本低的特点, 是 SSR 标记的重要来源, 因其来自基因编码区, 更易获得基因表达的信息, 因而能够反映出功能遗传多样性, 与某些生理生化特征和形态特征相关联^[14]。目前已经应用在鹅掌楸^[14]、苹果^[15]、葡萄^[16]等物种的遗传多样性分析、遗传图谱构建、亲本分析和系统演化研究等领域。尽管国内已有关于甘草属的乌拉尔甘草的 ESR 资源的 SSR 信息分析^[17], 但将 EST-SSR 用于

属内不同种的 SSR 遗传多样性分析, 解决甘草属内的系统分类难题尚未见报道。

本实验以来自甘草属 4 个种的 22 份材料为试料, 通过对乌拉尔甘草 EST 数据库中的 SSR 分布进行查找和信息分析, 发掘 SSR 位点, 开发和筛选适合于甘草属遗传多样性和亲本分析的 EST-SSR 引物; 同时对 22 份材料的 EST-SSR 指纹图谱特征和聚类结果进行种间的亲缘关系、遗传多样性初步分析, 为甘草属内种间关系及疑似杂交种的分类地位研究提供分子依据。

1 材料和方法

1.1 材 料

供试材料为 22 份分别来自石河子大学甘草资源圃引种和石河子郊区野生的甘草材料 (表 1), 每株采其幼嫩叶片, 使用变色硅胶室温干燥后, 置于 4℃ 冰箱保存备用。

表 1 实验材料及其原产地		
Table 1 Experimental materials and their origin		
编号 Code	种名 Species name	原产地 Origin
1~4	乌拉尔甘草 <i>G. uralensis</i> Fisch.	内蒙古杭锦旗 Hangjingqi, Neimenggu
5~8	乌拉尔甘草 <i>G. uralensis</i> Fisch.	新疆石河子 Shihezi, Xinjiang
9~12	光果甘草 <i>G. glabra</i> L.	新疆巴楚 Bachu, Xinjiang
13~16	胀果甘草 <i>G. inflata</i> Bat.	新疆石河子 Shihezi, Xinjiang
17~19	黄甘草 <i>G. eurycarpa</i> P. C. Li.	新疆巴楚 Bachu, Xinjiang
20~22	黄甘草 <i>G. eurycarpa</i> P. C. Li.	新疆石河子 Shihezi, Xinjiang

1.2 方 法

1.2.1 总 DNA 提取及检测 采用改良后的 CTAB 法提取总 DNA^[18], 使用 Thermo Scientific Nano-Drop 2000 Spectrophotometers 测定 DNA 浓度后, 最终用 0.1 TE 稀释至 25 ng/ μ L 后低温(-20 °C)保存备用。

1.2.2 序列搜索及 SSR 位点查找 登陆美国 NCBI(National Center for Biotechnology Information, 美国国家生物技术信息中心)数据库, 以 *Glycyrrhiza* 为关键词搜索 EST 序列, 得到 55 942 乌拉尔甘草 EST, 从中下载了 4 600 条乌拉尔甘草 EST 序列。为进一步利用乌拉尔甘草 EST 建立 SSR 标记, 剔除长度过短的序列(小于 150 bp)和低质量的序列后, 对余下的 441 条序列利用 SSRIT 在线软件(<http://archive.gramene.org/db/markers/ssr-tool>)查找 SSR, 参数设定最大重复基元碱基数为 decamer, 最小重复次数为 5。

1.2.3 EST-SSR 引物设计 利用 Primer 3.0 在线(<http://www.simgene.com/Primer3>)引物设计软件设计 PCR 引物, 共设计了 40 对 EST-SSR 引物。引物设计原则: 引物长度为 18~24 bp, 最适为 20 bp; T_m 值为 50 °C~60 °C, 上下游引物的 T_m 值相差不大于 5 °C; GC 含量为 40%~60%, 最适为 50%; PCR 扩增产物大小为 100~300 bp; SSR 位点的开始和结束位置距离 5' 和 3' 端均不少于 30 bp; 引物采用位于 SSR 上游和下游各 150 个碱基范围内的序列; 避免引物二级结构以及 6 个连续碱基配对的出现。设计完成后, 送往生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.4 SSR-PCR 扩增及检测 EST-SSR PCR 反应在 Eppendorf Mastercycler nexus PCR 仪上进行。分析所使用的 PCR 反应总体积为 20.0 μ L, 其中包括 2 \times Taq PCR Master Mix(购自天根生化科技(北京)有限公司)10 μ L, 正反向引物(10 μ mol/L)各 0.8 μ L, 模板 DNA(25 ng/ μ L)1.0 μ L。针对不同引物设置了不同的退火温度, 最后确定 PCR 最适反应程序如下: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。

1.2.5 琼脂糖凝胶电泳检测及引物筛选 由于 2% 琼脂糖凝胶与 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果基本一致, 并且琼脂糖凝胶电泳较聚丙烯酰胺凝胶电泳检测方便快捷^[19-20], 故本实验采用 5% 的琼脂糖凝胶电泳进行电泳检测, Marker 为 20 bp Lad-

der(购自广州东盛生物科技有限公司)。电泳结束后, 在紫外检测仪上观察, 在凝胶成像系统中照相并保存图像。

1.2.6 数据处理 采用人工读带的方法, 将电泳图上可重复的、清晰的条带按照微卫星基因片段大小和位点进行统计, 同一位点出现的为“1”, 同一位置无条带或不易分辨的弱带计为“0”, 建立原始数据矩阵输入 NTSYS 3.0, 计算样品间的简单遗传相似系数, 按非加权算数平均数聚类(UPGMA)方法构建 SSR 聚类图。

2 结果与分析

2.1 乌拉尔甘草 EST-SSR 序列总体特征

从 4 600 条乌拉尔甘草 EST 序列中搜索到 446 条含 SSR 的 EST, 占搜索序列的 9.70%, 去除小于 150 bp 长度的序列后有 441 条达到筛选条件, 共查找到 504 个 SSR。表 2 显示, 在所有可用的 EST-SSR 中, 共有 63 类重复基元, 二至六核苷酸重复基元均存在, 其中以二核苷酸为重复基元(10 种)出现的频率最高, 占 64.75%(350 条), 三核苷酸重复基元(37 种)占 26.98%(136 条)、四核苷酸重复基元(12 种)占 2.78%(14 条)五核苷酸重复基元(2 种)占 0.40%(2 条)、六核苷酸重复基元(2 种)占 0.40%(2 条)。二核苷酸重复基元类型中以 TC/AT 形式的微卫星最为丰富, 分别占 18.29% 和 18.00%, 其次为 TA/AG, 分别占 17.43% 和 13.71%。

2.2 引物筛选结果

利用引物设计软件共设计了 40 对 EST-SSR 引物, 以 4 种 22 份甘草属植物 DNA 为模板对引物进行筛选, 40 对 EST-SSR 引物均能扩增出清晰条带, 有效扩增率为 100%, 其中 15 对引物能扩增出多态

表 2 乌拉尔甘草 EST 序列中不同长度重复单元微卫星所占百分比

Table 2 The proportions of microsatellites consisted of different repeat motif lengths in the EST sequences of *G. uralensis* Fisch.

重复类型 Repeat type	重复种类 Repeat motif type	数量 Number	百分比 Proportion/%
二核苷酸 Dinucleotide	10	350	64.75
三核苷酸 Trinucleotide	37	136	26.98
四核苷酸 Tetranucleotide	12	14	2.78
五核苷酸 Pentanucleotide	2	2	0.40
六核苷酸 Hexanucleotide	2	2	0.40
全部 SSR Total SSR	63	504	10.96
全部 EST Total EST		4 600	

性条带,多态性引物扩增率为 37.5%,多态性引物序列信息见表 3。

2.3 EST-SSR 扩增产物多态性分析

15 对引物对 22 份甘草属植物基因组 DNA 进行扩增共得到等位基因 59 个,等位位点数的变化从 1 到 10 不等,平均每对引物检测到 3.93 个等位基因位点,各引物扩增带的多态性比率分布在 50%~100%(表 3),平均扩增产物多态性比率为 89.44%。

图 1 为引物 Primer 64 对 4 种甘草属植物 22 份材料的扩增结果,该图显示 4 种甘草属植物都有其特异的扩增条带,且不同居群的乌拉尔甘草具有不同特异性带,不同居群的黄甘草亦具有不同扩增条带;新疆巴楚分布的黄甘草与同域分布的光果甘草在 180 bp 左右处有共有带,而新疆石河子分布的黄甘草与同域分布的胀果甘草在 220 bp 处有共有带,说明黄甘草在 180 和 220 bp 这两个位点分别与光果甘草、胀果甘草基因共享。

2.4 聚类结果分析

用 Nei 方法计算得到的相似系数矩阵,经非加权算数平均聚类(UPGMA)方法建立甘草属植物 SSR 聚类图。由聚类图可知(图 2),当相似性系数为 0.82 时,22 份材料被划分为 4 组:{1~4},{9,11,12,17,18,19},{10,13,14,15,16,20,21,22},{5~8}。第一组为内蒙古杭锦旗分布的乌拉尔甘草;第二组为新疆巴楚分布的光果甘草和黄甘草;第三组为新疆石河子分布的胀果甘草、黄甘草;第四组为新疆石河子分布的乌拉尔甘草。同一物种同一居群的不同个体聚为一组,不同物种分支,说明了基于 SSR 标记的 4 种甘草属植物遗传分化结果与经典分类是一致的,所开发的 SSR 引物和建立的 SSR 标记体系是可信的。不同居群的黄甘草被分为 2 组,其种内的遗传距离大于与其同域分布的其他种的遗传距离,这说明不同居群的黄甘草存在较大遗传差异,其遗传分化模式值得探讨。

表 3 15 对甘草属 EST-SSR 引物信息
Table 3 Information of 15 EST-SSR primers in *Glycyrrhiza*

引物名称 Primer name	重复单元 Repeat motif	预计扩增产物 片段大小 Expected size/bp	多态性条带数量 No. of polymorphic bands	扩增条带数 No. of bands	多态率 Percentage of p polymorphism/%
Primer 17	(AAC) ₅	201	5	5	100.00
Primer 18	(AAC) ₇	290	6	6	100.00
Primer 20	(AAT) ₆	199	1	2	50.00
Primer 23	(AGA) ₅	269	3	3	100.00
Primer 26	(ATA) ₉	122	4	4	100.00
Primer 28	(CA) ₅	146	2	4	50.00
Primer 30	(CAG) ₅	170	4	4	100.00
Primer 31	(CAG) ₆	298	4	4	100.00
Primer 58	(TTC) ₁₁	195	10	10	100.00
Primer 61	(TGC) ₅	167	3	4	75.00
Primer 64	(GT) ₁₀	206	6	6	100.00
Primer 65	(TC) ₈	211	4	4	100.00
Primer 66	(TC) ₁₁	270	2	3	66.67
Primer 68	(AGT) ₁₀	126	4	4	100.00
Primer 70	(AAC) ₅	119	5	5	100.00

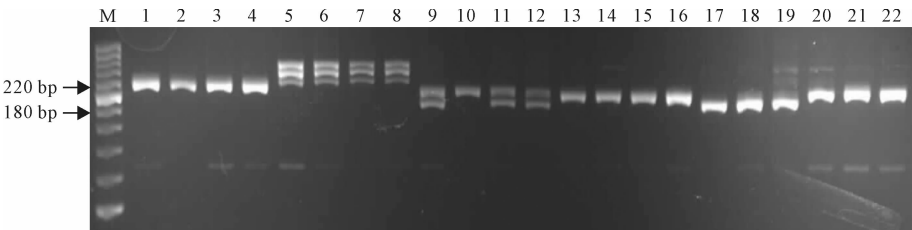


图 1 引物 Primer 64 在 4 种甘草属植物的 SSR 多态扩增图谱
M. Marker 20 bp ladder;1~8. 乌拉尔甘草;9~12. 光果甘草;13~16. 胀果甘草;17~22. 黄甘草
Fig. 1 Polymorphisms showed in four *Glycyrrhiza* species by Primer 64
M. Marker 20 bp ladder;1—8. *G. uralensis* Fisch.;9—12. *G. glabra* L.;13—16. *G. inflata* Bat.;17—22. *G. eurycarpa* P. C. Li.

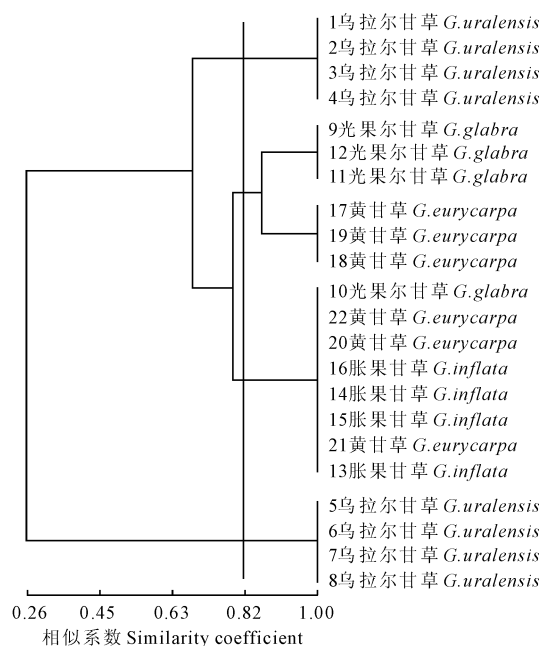


图2 基于 SSR 标记的 4 种甘草属
植物遗传分化聚类图

Fig. 2 Cluster result of four *Glycyrrhiza* L.
species based on SSR markers

3 讨论

Varshney 等^[21] 和 Eujayl 等^[22] 认为大多数植物的 EST-SSR 以三核苷酸和二核苷酸重复基元为主要类型,多数单子叶植物和双子叶植物以三核苷酸重复基元为主。但本研究发现乌拉尔甘草 EST-SSR 以二核苷酸重复基元数目最多,占 64.75%,三核苷酸占 26.98%,这与芝麻^[23],砂梨^[24],蒺藜苜蓿^[25] 等植物 EST-SSR 特征研究具有相似结论。这可能与本研究设定的 SSR 查找参数重复序列长度 ≥ 20 bp 有关,因为较低的重复序列长度会增加某一类型核苷酸重复基元的数量,进而影响出现频率最多的重复核苷酸的结果^[17]。本研究还发现乌拉尔甘草 EST-SSR 中核苷酸碱基重复类型有 63 种,其中二核苷酸碱基重复类型有 10 种,以 TC/AT 形式的微卫星最为丰富,其次为 TA/AG。三核苷酸碱基重复类型有 37 种,占全部类型的 58.73%,重复基元以 AAC/TCT/GAA 为主,除 TCT 重复外,其他两种主要的三核苷酸重复也出现在豆科的蒺藜苜蓿^[25] 和大豆^[26] 中。

本研究共设计了 40 对甘草属 EST-SSR 引物,并对 22 份甘草属植物材料进行扩增。结果发现 40

对引物均有扩增产物,引物有效扩增效率为 100%,其中 15 对引物具有多态性,占可扩增引物的 37.50%。尽管可扩增出多态性的 EST-SSR 引物比例低,但是这 15 对 EST-SSR 引物扩增出的产物多态性率为 89.44%,能很好地表征甘草属内种间的等位基因差异。基于等位基因差异建立的 SSR 遗传分化聚类图也能较好地地区分甘草属的 4 个不同物种,说明筛选出的这 15 对 EST-SSR 引物在甘草属内具有很好的适用性,可以为该属的种间亲缘关系和种内遗传分化研究及物种鉴定提供分子依据。

黄甘草一直是甘草属植物有争议的种,张鹏云^[27] 认为黄甘草是胀果甘草与乌拉尔甘草的天然杂交种。在自然环境中,黄甘草与光果甘草、胀果甘草、乌拉尔甘草的形态性状有过渡和重叠现象,分布区也有交叉重叠^[9]。在叶表皮形态^[7]、核型、等位酶、杂交试验分析中,黄甘草为较进化类型,亦具有丰富的遗传多样性^[8],与胀果甘草、乌拉尔甘草杂交亲和指数高^[13],SSR 指纹图谱显示新疆巴楚黄甘草与同域分布的光果甘草在 180 bp 左右处有共有带,而新疆石河子的黄甘草与同域分布的胀果甘草、乌拉尔甘草在 220 bp 处有共有带,说明黄甘草在 180 bp、220 bp 的位点分别与光果甘草,胀果甘草和乌拉尔甘草基因共享,不同居群的黄甘草遗传特性可能会因同域分布的亲本种不同,而出现不同的 SSR 扩增带,但亲本分析还有待进行多样本的 SSR 标记。本研究结果显示,黄甘草可能是胀果甘草与乌拉尔甘草的杂交种,或者胀果甘草与光果甘草的杂交种。1998 年的《亚洲中部植物》(第 8 册第 1 分册)将黄甘草作为胀果甘草的异名处理^[3]。本研究中,SSR 多态扩增图谱和聚类分析均表明 2 个居群的黄甘草与胀果甘草遗传差异较大,这与 RAPD 的研究结果一致^[9],将其归并胀果甘草是不合理的,这将会掩盖其特有的遗传背景,失去有价值的性状。SSR 聚类结果显示新疆巴楚分布的黄甘草与同域分布的光果甘草单独聚为一支,亲缘关系最近;而新疆石河子分布的黄甘草则与胀果甘草聚为一支,亲缘关系最近。黄甘草这种种内遗传差异大于种间的现象,表明不同居群的黄甘草遗传背景的差异,极有可能是由于与同域分布的亲本种反复渐渗回交而导致的基因向某一亲本融合造成的,有的可能趋向于母本,有的则表现为父本倾向,其渐渗杂交的机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 崔鸿宾,李佩琼.中国植物志(第42卷第2分册)[M].北京:科学出版社,1998:168—174.
- [2] WEI SH L(魏胜利). Studies on geographical variation and provenance selection of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. [J]. *Acta Agronomica Sinica*(作物学报),2008,**34**(12):2 077—2 084(in Chinese).
- [3] YANG CH Y(杨昌友). Degeneris *Glycyrrhiza* L. (Fabaceae) Notaev neosystematicae[J]. *Bulletin of Botanical Research*(植物研究),1999,**19**(3):246—248(in Chinese).
- [4] MENG L,ZHU X Y. The identity of *Glycyrrhiza korshinskyi* Grig. and *G. eglandulosa* X. Y. Li. (Leguminosae)[J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica*,2007,**45**(1):94—97.
- [5] HAYASHI H,HATTORI S,INOUE K,*et al.* Field survey of *Glycyrrhiza* plants in central Asia(1). Characterization of *G. uralensis*,*G. glabra* and the putative intermediate collected in Kazakhstan[J]. *Biol. Pharm Bull.*,2003,**26**(6):867—871.
- [6] LI X Y(李学禹). A study of the system and new taxa of genus *Glycyrrhiza*[J]. *Bulletin of Botanical Research*(植物研究),1993,**13**(1):13—43(in Chinese).
- [7] LU J H(陆嘉惠),LI X Y(李学禹),ZHOU L L(周玲玲),*et al.* Characters of leaf epidermis and their systematic significance in *Glycyrrhiza*[J]. *Acta Botanica Yunnanica*(云南植物研究),2005,**27**(5):525—533(in Chinese).
- [8] 马 森. 胀果甘草复合体的演化[D]. 新疆石河子:石河子大学,1997.
- [9] LU J H(陆嘉惠),LI X Y(李学禹),MA M(马 森),*et al.* Analysis and classifion of *Glycyrrhiza* L. plants in China by RAPD[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*(西北植物学报),2006,**26**(3):527—531(in Chinese).
- [10] GE SH J(葛淑俊),LI G M(李广敏),MA ZH Y(马峙英),*et al.* Analysis on genetic diversity of wild population of Licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) with AFLP markers[J]. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学),2009,**42**(1):47—54(in Chinese).
- [11] ZHANG X L(张新玲),LI X Y(李学禹),WEI L J(魏灵基),*et al.* The interspecific hybridization of *Glycyrrhiza* in Xinjiang[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*(西北植物学报),1998,**18**(1):132—136(in Chinese).
- [12] TIAN R W(田润炜),LU J H(陆嘉惠),XIE L B(谢良碧),*et al.* Effect of flowering mode and pollination on reproductive success and the relationship between *Glycyrrhiza glabra* L. and *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*(西北植物学报),2012,**32**(10):2 004—2 008(in Chinese).
- [13] XIE L B(谢良碧),LU J H(陆嘉惠),LI X L(李晓岚),*et al.* The cross compatibility and hybrid seed vigor among three *Glycyrrhiza* species[J]. *Plant Diversity and Resources*(植物分类与资源学报),2014,**36**(3):342—348(in Chinese).
- [14] 张红莲. 利用 SSR 分子标记探测鹅掌楸种间渐渗杂交[D]. 南京:南京林业大学,2009.
- [15] SHONG SH W(宋尚伟),ZHANG H T(张恒涛),*et al.* Development of apple EST-SSR primers and phylogenetic analysis of some cultivars[J]. *Journal of Fruit Science*(果树学报),2013,**30**(4):509—515(in Chinese).
- [16] WANG J(王 娟),TAO Y H(陶永焕),SONG SH W(宋尚伟). Development of EST-SSR primers and cluster anlaysis of some cultivars in grape[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*(华北农学报),2014,**29**(2):121—126(in Chinese).
- [17] LIU Y(刘 越),HUANG Y H(黄怡鹤),SUN H B(孙洪波),*et al.* Analysis of SSR information in EST resource of *Glycyrrhiza uralensis*[J]. *Liaoning Journal of Traditonal Chinese*(辽宁中医杂志),2012,**39**(3):398—401(in Chinese).
- [18] LU J H(陆嘉惠),LI X Y(李学禹),MA M(马 森),*et al.* Study on DNA extraction methods of *Glycyrrhiza*[J]. *Biotechnology*(生物技术),2006,**16**(3):45—47(in Chinese).
- [19] LI Y(李 勇),NIU Y CH(牛永春). Optimization of SSR amplification system and agarose gel electrophoresis of amplificons[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*(华北农学报),2009,**24**(6):174—177(in Chinese).
- [20] CHEN ZH H(陈志辉),YOU X M(游小妹),LIN ZH H(林郑和),*et al.* Screening of tea polymorphic primer of SSR molecular markers [J]. *Tea Communication*(茶叶通讯),2013,**40**(4):3—5,13(in Chinese).
- [21] VARSHNEY R K,GRANER A,SORRELLS M E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications[J]. *Trends in Biotechnology*,2005,**23**(1):48—55.
- [22] EUJAYL I,SLEDGE M K,WANG L,*et al.* Medicagotruncatula EST-SSRs reveals cross-species gentic markers for *Medicago* spp[J]. *Theor. Appl. Genet.*,2004,**108**(3):414—422.
- [23] WEI L B(魏利斌),ZHANG H Y(张海洋),ZHENG Y ZH(郑永战),*et al.* Development and utilization of EST-derived microsatellites in Sesame(*Sesamum indicum* L.)[J]. *Acta Agronomica Sinica*(作物学报),2008,**34**(12):2 077—2 084(in Chinese).
- [24] CUI H R(崔海荣),LIU J Y(刘金义),TONG ZH G(佟兆国),*et al.* Development and application of EST-SSRs in Sand Pear[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*(西北植物学报),2010,**30**(8):1 551—1 556(in Chinese).
- [25] TU D P(屠德鹏),WEI ZH W(魏臻武),WU Z N(武自念),*et al.* Distribution characteristics and marker exploitation of EST-SSRs in *Medicago truncatula*[J]. *Pratacultural Science*(草业科学),2011,**28**(5):746—752(in Chinese).
- [26] CHANG W(常 玮),ZHAO X(赵 雪),LI X(李 侠),*et al.* Development of soybean EST-SSR marker and comparison with genomic SSR marker[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*(中国油料作物学报),2009,**31**(2):149—156(in Chinese).
- [27] ZHANG P Y(张鹏云),PENG Z X(彭泽祥). Resources in Northwest China-Licorice[J]. *Journal of Lanzhou University*(Nat. Sci. Edi.) (兰州大学学报·自然科学版),1960,**6**(1):7—8(in Chinese).

(编辑:宋亚珍)