



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. glabra* 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 Hangjinqi, Neimenggu; *G. eurycarpa* and *G. glabra* 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份材料为试样,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 Hangjinqi, 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/μL后低温(-20℃)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/ssrtool>)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/Primer 3>)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℃~60℃, 上下游引物的T_m值相差不大于5℃; 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 μL, 其中包括2×Taq PCR Master Mix(购自天根生化科技(北京)有限公司)10 μL, 正反向引物(10 μmol/L)各0.8 μL, 模板DNA(25 ng/μL)1.0 μL。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℃预变性4 min, 94℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸45 s, 35个循环, 72℃延伸10 min, 4℃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速^[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 Ladder(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/bp 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 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.

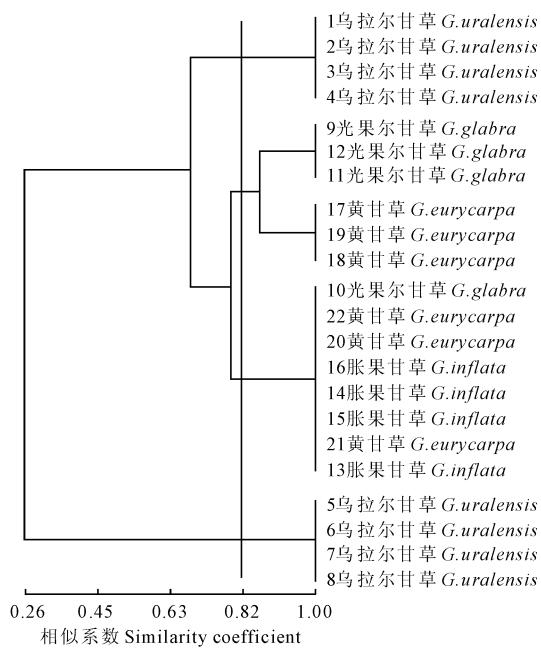


图 2 基于 SSR 标记的 4 种甘草属植物遗传分化聚类图

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], 蕺藜苜蓿^[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). Degerenesis *Glycyrrhizal* L. (Fabaceae) Notaev neosystematiae[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 classification 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 analysis 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 Traditional 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 amplicons[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 generic 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)