

## 基于 SSR 分子标记的杜仲遗传多样性体系建立

黄海燕<sup>1</sup>, 杜红岩<sup>1\*</sup>, 乌云塔娜<sup>2</sup>, 朱高浦<sup>1</sup>

(1. 中国林业科学研究院经济林研究开发中心,河南 郑州 450003; 2. 国家林业局经济林育种与栽培重点实验室,湖南 长沙 410004)

关键词:杜仲;种质资源;SSR-PCR 反应体系;引物筛选

中图分类号:S718.46

文献标识码:A

### Establishment of Genetic Diversity System of *Eucommia ulmoides* Based on SSR Molecular Markers

HUANG Hai-yan<sup>1</sup>, DU Hong-yan<sup>1</sup>, WUYUN Tana<sup>2</sup>, ZHU Gao-pu<sup>1</sup>

(1. Non-timber Forestry Research and Development Center, Chinese Academy of Forestry, Zhengzhou 450003, He'nan, China;

2. Key Laboratory of Non-wood Forest Products of State Forestry Administration, Changsha 410004, Hu'nan, China)

**Abstract:** In order to set up the genetic diversity system of *Eucommia ulmoides* Oliver based on SSR molecular markers, the establishment of SSR-PCR reaction system and screening out SSR marker primer showing high polymorphism were studied. A  $L_9(3^4)$  orthogonal design was performed to optimize the main factors of the SSR-PCR reaction system. The results indicated that the best SSR-PCR reaction system for *E. ulmoides* was DNA template 1  $\mu\text{L}$  ( $30 \sim 60 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ),  $2 \times \text{Taq PCR Master Mix}$  10  $\mu\text{L}$ , primer 1  $\mu\text{L}$  with the total volume of 25  $\mu\text{L}$ . The PCR reaction system had high stability and repeatability, the pairs of SSR primers with high polymorphism were gotten. The 8 *E. ulmoides* samples' DNA sequence was amplified with 13 pairs of SSR primers by SSR-PCR technique, 34 alleles were detected, 2.6 alleles were detected from per site on average. Each allele's effective number was 1.751 5, and the  $h$  value was 0.379 8, the average  $I$  value was 0.643 3. This study is helpful in using SSR molecular marker to analyze genetic diversity and genetic relationship in *E. ulmoides*.

**Key words:** *Eucommia ulmoides* Oliver; germplasm resources; optimization of SSR-PCR system; primer screening

杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliver)属杜仲科(Eucommiaceae),单科单属单种,为第四纪冰川侵袭后残留下的古老树种,仅存于中国,属国家二级保护植物<sup>[1-2]</sup>。杜仲的适应性极强,分布在我国亚热带至温带的27个省(市、区),美国、法国、日本、韩国等都有引种<sup>[1-2]</sup>。杜仲是我国特有的优质天然橡胶和中药资源,杜仲的皮、叶、雄花、果实等具有很高的药用价值及经济效益,尤其是杜仲富含天然橡胶—杜仲胶,是国家战略性储备资源<sup>[3-4]</sup>。杜仲的变异类型

丰富,有关研究表明其形态、结构甚至胚胎类型都表现出较高的多样性<sup>[5-10]</sup>,因此急需对该物种进行遗传学的研究。

近年来,DNA 标记技术已广泛用于植物遗传多样性研究,SSR 分子标记在林木的品种和亲缘关系鉴定等方面得到广泛应用<sup>[11-12]</sup>。目前对我国部分地区杜仲遗传多样性研究、构建优良杜仲品种指纹图谱、雌雄株鉴定、遗传连锁图谱的构建等研究也仅局限于 RAPD、AFLP、ISSR 等分子标记技术<sup>[13-18]</sup>。

收稿日期:2012-11-25

基金项目:国家林业公益性行业科研专项(201004029)、国家十二五科技支撑计划(2012BAD21B0502)

作者简介:黄海燕(1986—),女,河南嵩县人,硕士研究生。研究方向:杜仲育种;E-mail:huanghaiyan0709@163.com

\* 通讯作者:研究员,博士生导师。研究方向:杜仲育种栽培与综合利用。E-mail:dhy515@126.com

简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR), 主要是由 1~6 核苷酸的重复序列, 广泛存在于原核和真核生物中。和其他分子标记相比, SSR 标记具有多态性高、重复性高、共显性、易检测、操作简单、无放射、所用时间较短、覆盖面广等优点, 在植物遗传多样性研究中尤其受到青睐<sup>[12,19-20]</sup>。

SSR 标记尚未在杜仲的研究上应用, 关于杜仲 SSR 引物公布的也很少<sup>[21]</sup>, 因此需要加快引物开发速度。本研究利用 SSR 标记, 建立 SSR-PCR 反应体系, 并以 8 份杜仲为供试材料, 筛选合适的多态性引

物, 为杜仲的遗传多样性分析、亲缘关系研究等奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本研究引物筛选所用的 8 份杜仲样品于 2012 年 5 月取自中国林业科学研究院经济林研究开发中心杜仲基因库(表 1)。取其健壮、无病虫害的当年生杜仲嫩叶, 液氮速冻后保存于 -80℃ 冰箱中备用。

表 1 杜仲试验材料

| 名称      | 代表性类型         | 取样地   | 地理位置          |              |       |
|---------|---------------|-------|---------------|--------------|-------|
|         |               |       | 经度(E)         | 纬度(N)        | 海拔/m  |
| 10482X  | 大陆性季风气候区      | 江苏响水  | 119°80'22.7"  | 34°07'56.2"  | 7     |
| 10138C  | 温带季风性气候       | 北京    | 116°18'0.44"  | 39°59'2.76"  | 53    |
| 10595C  | 暖温带大陆性气候      | 河南郑州  | 113°41'37.95" | 34°46'23.84" | 96    |
| 10004C  | 亚热带区域         | 湖南江垭  | 110°77'23.5"  | 29°51'17.3"  | 159   |
| 10599C  | 暖温带大陆性气候      | 河南郑州  | 113°41'37.95" | 34°46'23.84" | 96    |
| 10585X  | 暖温带南缘向北亚热带过渡区 | 河南洛阳  | 112°25'14.16" | 34°39'56.25" | 159   |
| 10091C  | 中亚热带季风气候      | 江西南昌  | 115°50'8.32"  | 28°45'33.22" | 45    |
| 12001X* | 亚热带向温带过渡区     | 湖北神农架 | 110°10'46.7"  | 31°24'17.4"  | 1 163 |

注: \* 为湖北神农架发现一株树龄 200 多年的杜仲, 疑似为野生植株, 并推测湖北神农架可能为杜仲起源地之一<sup>[22]</sup>。

### 1.2 主要试剂和仪器

所用试剂 2 × Taq PCR Master Mix、新型植物基因组提取试剂盒 (TIANGEN)、琼脂糖、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵、溴酚蓝、DNA Marker、TEMED(四甲基乙二胺)、无水乙醇、剥离硅烷。

主要仪器: 琼脂糖凝胶电泳仪、聚丙烯凝胶电泳仪、凝胶成像系统、离心机、研钵、液氮罐、移液枪、0.5 mL 和 1.5 mL Eppendorf 离心管、-20℃ 冰箱、高压灭菌锅、烧杯、玻璃棒等。

### 1.3 实验方法

1.3.1 引物选择 所选用的引物分为两部分, 第一部分为从已发表的文献中查找到的 19 对引物<sup>[21]</sup>, 第二部分为本课题组自行开发的引物, 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3.2 DNA 提取与检测 DNA 的提取按购自北京天根生物有限公司的新型植物基因组提取试剂盒(离心柱型)说明书进行。取 DNA 样品 3 μL 与 1 μL 6 × Loading buffer 混匀后上样, 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量, 4 500 bp Marker 3 μL, 1 × TAE 电泳缓冲液, 110 V 电泳 30 min, 电泳结束后用上海复日 FR-980A 生物电泳图像分析系统观察照相, -20℃ 保存备用。

### 1.3.3 SSR-PCR 反应体系及反应条件优化

#### 1.3.3.1 SSR-PCR 反应体系的建立

用 2 × Taq PCR Master Mix (TIANGEN), 将 dNTPs、Taq 酶 和  $Mg^{2+}$  3 个因素作为整体, 综合评价其对杜仲 SSR-PCR 反应体系的影响。采用  $L_9(3^4)$  正交试验设计对 SSR-PCR 反应体系的主要影响因素 2 × Taq PCR Master Mix 用量、引物浓度、模板 DNA 浓度进行优化, 共 9 个处理(表 2、表 3), 每个处理重复 3 次, 反应的总体积为 25 μL, DNA 样品的浓度为 30 ~ 60 ng · μL<sup>-1</sup>, 引物浓度为 10 μmol · L<sup>-1</sup>, 并用 ddH<sub>2</sub>O 设一个对照, 用以检测体系是否有污染, 用引物 E. 35 对反应体系的优化。

SSP-PCR 的扩增程序为: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72℃ 总延伸 10 min; 4℃ 保存扩增产物。

表 2 杜仲 SSR-PCR 反应体系的因素水平

| 水平 | 因素     |            |     |
|----|--------|------------|-----|
|    | 模板 DNA | Master Mix | 引物  |
| 1  | 1.0    | 8          | 0.8 |
| 2  | 1.5    | 9          | 1.0 |
| 3  | 2.0    | 10         | 1.5 |

表3 [L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)] 正交试验设计表

| 编号 | 因素     |            |     |
|----|--------|------------|-----|
|    | 模板 DNA | Master Mix | 引物  |
| 1  | 1.0    | 8          | 0.8 |
| 2  | 1.0    | 9          | 1.0 |
| 3  | 1.0    | 10         | 1.5 |
| 4  | 1.5    | 10         | 0.8 |
| 5  | 1.5    | 8          | 1.0 |
| 6  | 1.5    | 9          | 1.5 |
| 7  | 2.0    | 9          | 0.8 |
| 8  | 2.0    | 10         | 1.0 |
| 9  | 2.0    | 8          | 1.5 |

1.3.3.2 SSR-PCR 产物检测

扩增出的 PCR 产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳在 120 V 电压下电泳 30 min,使用复日凝胶成像系统照相、分析,对有特异性条带的 PCR 产物再用 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳在 200 V 电压下电泳 2.5~4 h,电泳结束后用 400 mL 3 × Gelred(40 mL NaCl + 360 mL 1 × TBE + 120 μL Gelred) 染液浸泡凝胶,染色 1 h,再用复日凝胶成像系统照相、分析。

1.3.4 反应体系的验证和引物筛选 用优化的 SSR-PCR 反应体系,利用引物 E. 17 和 DZ64 对 24 个杜仲 DNA 样品为模板进行 SSR-PCR 扩增,检测反应体系的重复性及稳定性。利用优化的反应体系 8 个样品进行 SSR 引物筛选,筛选出的引物用于后期杜仲 SSR 分子标记遗传多样性分析。

1.3.5 SSR 数据分析 各引物对应扩增出的等位基因依据分子量按从大到小顺序进行编号。在相同迁移率位置上有条带记为 1,无条带记为 0,建立 0、1 矩阵,构建 SSR 引物扩增结果的数据库,用 POP-GENE 32 软件对数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 SSR-PCR 反应体系的直观分析

琼脂糖凝胶电泳结果显示:9 个处理 3 次重复的 27 个样品均得到目的条带,从电泳图(图 1)可以看出各个处理之间有一定的差异,并且同一处理的重复间差异较小,CK 为对照,说明反应体系无污染。9 个处理组合中 2、5、7 号处理效果较好,1、4、6 次之,第 3、8、9 号处理的扩增效果较差。

聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果更为精确将 9 个处理的扩增条带区分开(图 2),其结果与琼脂糖凝胶电泳结果较为一致,对比琼脂糖凝胶电泳,本实验选择 2 号处理组合为最优组合,即 25 μL 的反应体系:

Master Mix 10 μL,引物各 1 μL(浓度 0.4 μmol · L<sup>-1</sup>),模板 DNA 1 μL(30~60 ng · μL<sup>-1</sup>)。

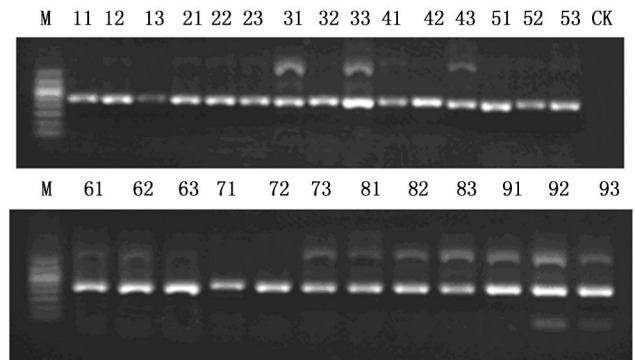


图1 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增效果

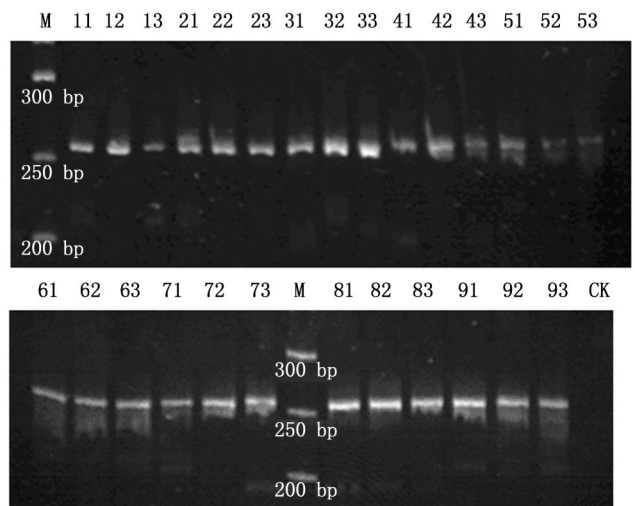
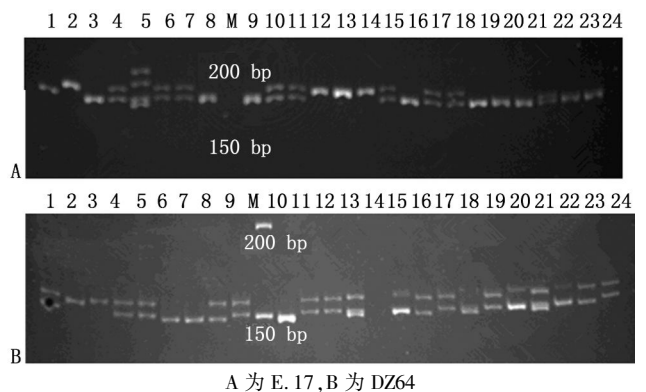


图2 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 PCR 扩增效果

2.2 SSR-PCR 优化体系的扩增检测

根据上述优化的 SSR-PCR 反应体系,随机选用引物 E. 17 和 DZ64 对 24 份杜仲样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳检测(图 3),所有引物均扩增出清晰、多态性高的条带,每个品种均扩增出清晰的条带,有效地反应出杜仲无性系间的多态性,建立的 SSR-PCR



A 为 E. 17, B 为 DZ64

图3 引物 E. 17 和 DZ64 对 24 个不同杜仲样品的聚丙烯酰胺凝胶电泳图

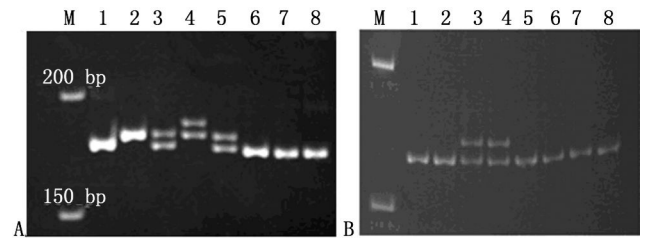
反应体系能够有效地用于杜仲遗传多样性分析、亲缘关系研究。

### 2.3 引物筛选

利用8份杜仲样品(表1)进行引物筛选,从50对引物中筛选出13对扩增稳定、重复性好、多态性高的引物,占引物数量的26%,用于下一步利用SSR分子标记研究杜仲的遗传多样性,引物信息见表4,部分引物扩增的PAGE效果图见图4。

### 2.4 引物多态性分析

筛选出的13对SSR引物在8份杜仲样品中检测到34个等位基因,平均每对SSR引物检测到2.6个等位基因。不同SSR引物检测到的等位基因数不等,其中EU33引物检测到的等位基因数最多为6个,



A为E.17, B为EU69

图4 引物扩增PAGE效果图

而大部分引物检测到的等位基因数为2个。产生片段差异最大的引物为EU12,PCR产物片段长度从167bp到201bp,产生片段差异最小的引物为EU29,PCR产物片段长度从122bp到128bp(表4)。

表4 杜仲SSR标记引物信息

| 引物名称  | 正向引物序列(5'-3')           | 反向引物序列(5'-3')              | T <sub>m</sub> 值/°C | 重复单元   | 产物大小/bp   |
|-------|-------------------------|----------------------------|---------------------|--------|-----------|
| E. 17 | GAGACGCCACACAAGTAAAT    | TGTCCAACAACCTGTATTGA       | 55                  | (CAG)9 | 177 ~ 187 |
| E. 19 | GAGTTAGCAAAAAGCCATGAT   | CAGACTCTTTGCGTTTGATT       | 55                  | (TC)7  | 198 ~ 210 |
| E. 29 | GGTGGAAATGATCTAAATGC    | TGCTGATACCCATTGTTTCAT      | 56                  | (GGA)4 | 185 ~ 198 |
| E. 35 | CCATACCATATGGAAAATCC    | TGAGGCTACTCTCCTCCAC        | 55                  | (CCT)7 | 234 ~ 261 |
| E. 37 | GGGAGCAGTTCACATTTTTA    | CTTCTCTTTTTGCTCCTTC        | 58                  | (CA)10 | 211 ~ 222 |
| EU12  | GGACAAATGCACCACCAAGA    | CATGCTACAAGTCACCAAAAGTAAGG | 60                  | (CA)11 | 167 ~ 201 |
| EU29  | ACCCATCAGCCATCCATTCC    | TTCCTAGTCCCGTGAAGCAG       | 60                  | (AGA)7 | 122 ~ 128 |
| EU33  | TGGACACGGAAACCAATAACA   | TCATCTCCTCCAGCCTTGAATA     | 59                  | (AG)12 | 104 ~ 123 |
| EU69  | CCTTACACCAACCGTCTCATA   | GGGACACTCGCACCTTGAC        | 60                  | (TCT)7 | 114 ~ 123 |
| EU91  | CCATCGCTCAATAATTCATCAGG | CCACTGCCTCCACCAACG         | 60                  | (AG)9  | 95 ~ 107  |
| EU96  | AGATTATGGTTTGCTGCTCTGTG | ATTGGTGTCAATGCTCCTTTCT     | 60                  | (GTT)8 | 206 ~ 222 |
| EU108 | GTTTGCTGCTCTGTGCATGTTG  | CATTGGTGTCAATGCTCCTTTCT    | 60                  | (GTT)8 | 196 ~ 221 |
| DZ64* | TTCCTAGAGAAATGCAACCA    | CCGGAAGAATGAAATACACTCA     | 56                  | (TG)9  | 139 ~ 156 |

注: \*引物DZ64是根据已发表的文献<sup>[21]</sup>中查找得到,其他引物都为本课题组开发的引物。

### 2.5 SSR位点分析

利用13对引物对8份杜仲样品进行SSR检测表明:各位点平均等位基因有效数分布在1.1327~2.8444之间,平均每个位点的等位基因有效数目为1.7515,Nei指数( $h$ )的分布范围在0.1172~0.6484之间,平均每个位点的 $h$ 值为0.3798。 $I = 1 - \sum P_i^2$ ,  $P_i$ 为产物条带的表型,平均每个位点的 $I$ 值为0.6433, $I$ 值最高的为EU33为1.3634, $I$ 值最低的为EU29为0.2338(表5)。

## 3 讨论

在杜仲的遗传多样性分析中先后有学者分别利用RAPD、AFLP、ISSR等分子标记方法对我国部分地区的杜仲进行遗传多样性分析<sup>[14,17,23]</sup>,而用SSR分子标记方法对我国的杜仲资源进行遗传多样性的研究还未见报道,已公布的杜仲SSR标记的引物

表5 各位点基因的多样性分析

| 位点名称  | 位点数 | 有效等位基因数( $ne$ ) | Nei's 基因多样性指数( $h$ ) | Shannon 信息指数( $I$ ) |
|-------|-----|-----------------|----------------------|---------------------|
| E. 17 | 3   | 2.0317          | 0.5078               | 0.8305              |
| E. 19 | 2   | 1.2800          | 0.2188               | 0.3768              |
| E. 29 | 2   | 1.2800          | 0.2188               | 0.3768              |
| E. 35 | 2   | 1.4382          | 0.3047               | 0.4826              |
| E. 37 | 3   | 2.2456          | 0.5547               | 0.8815              |
| EU12  | 3   | 1.6623          | 0.3984               | 0.7029              |
| EU29  | 2   | 1.1327          | 0.1172               | 0.2338              |
| EU33  | 6   | 2.7826          | 0.6406               | 1.3634              |
| EU69  | 2   | 1.2800          | 0.2188               | 0.3768              |
| EU91  | 2   | 1.7534          | 0.4297               | 0.6211              |
| EU96  | 2   | 1.6000          | 0.3750               | 0.5623              |
| EU108 | 2   | 1.4382          | 0.3047               | 0.4826              |
| DZ64  | 3   | 2.8444          | 0.6484               | 1.0717              |
| 平均    | 2.6 | 1.7515          | 0.3798               | 0.6433              |

仅有19对,这远远不能满足研究的需要。同时由于RAPD的重复性差、AFLP的操作复杂、ISSR多为显性,而SSR以共显性、重复性高、操作简单等优点在

植物的遗传多样性研究中广泛应用。

在本研究中,根据杜仲的花、果、叶色等表型性状、树龄及地理位置差异等选择实验材料,由此样本筛选出的 SSR 引物对杜仲遗传多样性分析及群体遗传学研究具有指导性意义。

PCR 反应体系的优化方法有很多种,常采用简单梯度试验的方法对每个因素的最佳水平进行摸索,其过程繁杂,且不能兼顾各因素之间的交互作用<sup>[24-25]</sup>。本文采用的正交试验设计的方法具有综合可比、均衡分散、效应明显、伸缩性强的特点<sup>[26]</sup>。通过琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳直观分析,得出杜仲 SSR-PCR 反应体系的最佳处理为 2 号处理。本文利用 Master Mix 可以将 Taq 酶、Mg<sup>2+</sup>、dNTPs 3 个因素作为整体,综合评价对 SSR-PCR 反应的影响,这样既增加了结果的精确性,同时又减少了工作量<sup>[27]</sup>。

利用此反应体系对 50 对杜仲 SSR 分子标记引物进行筛选,筛选出 13 对引物在 8 个样品中均扩增出特异条带,并且引物的多态性高、稳定性好,等位基因数在 2~6 个之间,平均每对引物检测到 2.6 个等位基因,所筛选出的引物能够满足下步研究的需要。

本研究建立了适合杜仲 SSR-PCR 的反应体系,筛选出 13 对具有多态性的引物,为杜仲的遗传多样性、群体遗传学、亲缘关系等研究奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] 杜红岩. 杜仲优质高产栽培[M]. 北京:中国林业出版社,1996: 1-20
- [2] 李芳东,杜红岩. 杜仲[M]. 北京:中国中医药出版社,2001: 232-256
- [3] 杜红岩. 我国的杜仲胶资源极其开发潜力与产业发展思路[J]. 经济林研究,2010,28(3):1-6
- [4] 杜红岩,李钦,李福海. 杜仲种仁桃叶珊瑚苷含量的测定及积累规律[J]. 林业科学研究,2009,22(5):744-746
- [5] 周志翔,王鹏程,徐永荣,等. 湖北省杜仲种质资源收集与繁殖保存研究[J]. 华中农业大学学报,1998,17(5):507-511
- [6] 沈作奎,彭诚. 杜仲不同地区不同种质间生长差异分析[J]. 特产研究,1999(4):9-11
- [7] 唐锡华. 杜仲孢子囊与配子体的发育形态[J]. 植物学报,1962, 10(1):29
- [8] 田兰馨. 杜仲胚胎学的研究[J]. 西北植物学报,1993,13(1): 30-35
- [9] 张檀,张康健,杨吉安,等. 杜仲酯酶同工酶地理递变及生长预测的研究[J]. 西北林学院学报,1993,8(4):20-23
- [10] 李林初,徐炳声. 我国八种特有植物的染色体观察[J]. 植物分类学报,1986,24(2):157
- [11] Kalia R K, Rai M K, Kalia S, et al. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants [J]. Euphytica,2011,177: 309-334
- [12] Agarwal M, Shrivastava N, Padh H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences[J]. Plant Cell Rep,2008,27:617-631
- [13] Xu W J, Wang B W, Cui K M. RAPD and SCAR markers linked to sex determination in *Eucommia ulmoides* Oliv [J]. Euphytica, 2004,136:233-238
- [14] 王瑗琦,黄璐琦,邵爱娟,等. 孑遗植物杜仲的遗传多样性 RAPD 分析和保护策略研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(19):1583-1586
- [15] 王宏. 杜仲优良品种(无性系)DNA 指纹图谱的构建[D]. 西安:西北农林科技大学,2007:15-19
- [16] 王大玮. 杜仲遗传连锁图谱构建及中药性状的分子标记[D]. 西安:西北农林科技大学,2011:10-14
- [17] Wu M Q, Chen S L, Wang M X, et al. An analysis of the genetic diversity and genetic structure of *Eucommia ulmoides* using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers[J]. African Journal of Biotechnology, 2011,10(84):19505-19513
- [18] Wang D W, Yu L, Li Z Q. Identification of a Male-Specific Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) and a Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) Marker in *Eucommia ulmoides* Oliv [J]. Int J Mol Sci, 2011, 12:857-864
- [19] 罗冉,吴委林,张畅,等. SSR 分子标记在作物遗传育种中的应用[J]. 基因组学与应用生物学,2010,29(1):137-143
- [20] Morgante M, Olivieri A M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics[J]. Plant J, 1993,13(1):175-182
- [21] Dend J Y, Li Y F, Huang H W. Development and characterization of microsatellite markers in *Eucommia ulmoides* Oliver (*Eucommiaceae*) [J]. Molecular Ecology Notes, 2006,6:496-498
- [22] 邓建云,李建强,黄宏文. 一株具有特异 AFLP 指纹图谱的杜仲古树[J]. 武汉植物学研究,2006,24(6):509-513
- [23] Yao X H, Deng J Y, Huang H W. Genetic diversity in *Eucommia ulmoides* (*Eucommiaceae*), an endangered traditional Chinese medicinal plant [J]. Conserv Genet, 2012, 13:1499-1507
- [24] 张龙进,白成科. 正交优化北重楼 ISSR-PCR 体系[J]. 植物研究,2011,31(1):105-108
- [25] 罗成,熊玉婷,顾蔚,等. 华中五味子 ISSR-PCR 反应体系优化及引物筛选[J]. 植物研究,2010,30(5):588-593
- [26] 盖钧镒. 试验统计方法[M]. 北京:中国农业出版社,2000:286-287
- [27] 梁玉琴,李芳东,傅建敏,等. 正交设计优化柿属植物 SSR-PCR 反应体系[J]. 经济林研究,2011,29(4):17-22