

## 大青属植物通用性 SSR 引物筛选及应用

邓绍勇, 温 强, 李康琴, 叶金山, 朱培林\*

江西省林业科学院, 江西 南昌 330032

**摘要:** 目的 获得在大青属 *Clerodendrum* L. 主要树种间具有较好通用性的 SSR 标记, 并构建 DNA 指纹图谱用于该属重要民族药用植物近缘种的分子甄别和遗传学研究。方法 选用 2 种大青属植物伊豆大青 *C. izuinsulare* 和海州常山 *C. trichotomum* 的 19 对 SSR 引物, 对大青属 9 个种共 9 个样本进行扩增检测。结果 17 对引物在广布种大青中有扩增产物, 通用率最高 (89.5%), 另有 7 对引物在所有样本中有扩增产物, 通用率为 36.8%。采用多态性较好的 6 对 SSR 引物构建 9 个种的 DNA 指纹图谱, 其中引物 CI140 可鉴定除白花灯笼和尖齿臭茉莉之外的 7 个种, 该引物与 CI107、CI132、CI143 和 CT042 两两组合可鉴别所有 9 个种; 利用遗传距离进行 UPGMA 聚类, 结果显示腋序系白花灯笼单独成一组, 海通和大青成一组, 其他聚类分组结果与其形态分类存在一定差别。结论 近缘种间共用 SSR 引物是开发大青属植物 SSR 标记行之有效的方法, 可为大青属植物分子标记资源的使用提供参考。

**关键词:** 大青属; SSR; 通用性; 遗传距离; 分子标记

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)22-3317-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.22.019

## Screening and application of SSR primers in plants of *Clerodendrum* L.

DENG Shao-yong, WEN Qiang, LI Kang-qin, YE Jin-shan, ZHU Pei-lin

Forest Academy of Jiangxi Province, Nanchang 330032, China

**Abstract: Objective** In order to obtain SSR primers which has good universality among the main tree species of *Clerodendrum* L., and then molecular screening of DNA fingerprints was used in closely related species and genetic research of these ethnical medicinal resources. **Methods** An experiment was conducted to study the transferability of 19 pairs of SSR primers developed from *C. izuinsulare* and *C. trichotomum* and amplified in nine samples from nine species of *Clerodendrum* L. **Results** Seventeen pairs of 19 primers had the amplification products in *C. cyrtophyllum*, a cosmopolitan species, the transferability ratio was the highest (89.5%). Seven pairs of primers were successfully amplified in all samples of *Clerodendrum* L. species, and the transferability ratio was 36.8%. Six pairs of polymorphism SSR primers were used to construct the DNA fingerprints of nine *Clerodendrum* L. species. In the primers, the CI140 identified seven *Clerodendrum* L. species except *C. fortunatum* and *C. lindleyi*. Coupled with CI132, CT042, CI107, or CI143, they identified all of the nine *Clerodendrum* L. species. Then, the genetic distances were used to generate a UPGMA tree. The results showed that *C. fortunatum*, belonging to Ser. *Axilliflorae schauer*, formed a cluster, and *C. mandarinorum* and *C. cyrtophyllum* formed another cluster, while the clusters of the others were difference from the shape classifications. **Conclusion** The experiment proves a good way to develop *Clerodendrum* L. SSR primers from other related species. This study provides the important reference for the use of molecular markers of *Clerodendrum* L.

**Key words:** *Clerodendrum* L.; SSR; transferability; genetic distance; molecular markers

唇形科 (Lamiaceae) 大青属 *Clerodendrum* L. 植物约 400 种, 主要分布于热带和亚热带, 少数分布于温带地区<sup>[1-3]</sup>, 中国产 33 种, 大多分布于西南、华南地区<sup>[4]</sup>。在中国, 大青属植物多为民族药用植物, 具有清热解毒、祛风除湿、活血散瘀、降压、抗

镇痛等功效, 常用于治疗感冒高热、风湿性关节炎、跌打损伤、高血压、痈疽、疔疮等疾病<sup>[5-6]</sup>。在赣、湘、鄂、浙、粤等省民间广泛使用的大青叶, 原植物为大青 *C. cyrtophyllum* Turcz., 具明显抗炎作用<sup>[7]</sup>。此外该属植物很多种的花型奇特, 作为观赏植物

收稿日期: 2014-06-15

基金项目: 江西省科技支撑项目 (20142BBF60031); 江西省林业科学院青年培养项目 (2011521201)

作者简介: 邓绍勇 (1982—), 男, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为植物资源学。Tel: (0791)83833803 E-mail: dsy1982cn@aliyun.com

\*通信作者 朱培林 (1964—), 男, 研究员。Tel: (0791)83833803 E-mail: yczpl@126.com

驯化栽培的有灰毛大青 *C. canescens* Wall.、重瓣臭茉莉 *C. chinense* (Osbeck) Mabb.、垂茉莉 *C. wallichii* Merr.、海州常山 *C. trichotomum* Thunb.、臭牡丹 *C. bungei* Steud. 等<sup>[8-10]</sup>，从国外引进栽培的有龙吐珠 *C. thomsoniae* Balf. f.、红萼龙吐珠 *C. speciosum* W. Bull.、烟火树 *C. quadriloculare* (Blanco) Merr.、艳棘桐 *C. splendens* G. Don 等<sup>[11-12]</sup>。可见该属植物作为观赏及重要的中药材资源，具有巨大的开发潜力。

目前，中药资源开发利用普遍存在混淆品和伪品影响药材品质的问题，而大青属很多植物种间外观形态差异不显著，同样存在仅通过营养器官难以区分的难点。随着现代分子生物学的发展，DNA 分子标记技术在药用植物真伪鉴定、品种分类及优良种质选育等方面有着很好的应用前景。一方面利用该技术可揭示药用植物“道地性”可能存在的遗传变异规律，从而指导道地性药材的科学栽培、繁育与采集；另一方面，将分子标记技术所揭示的大分子多态性与小分子药用成分分布规律紧密结合起来，也可指导药用成分的方便、快速、正确的寻找与开发利用<sup>[13]</sup>。在众多分子标记中，SSR (simple sequence repeat) 标记由于其稳定性、共显性遗传、

多态性高、分析简单等优点，作为一种重要的分子标记技术，已广泛应用于 DNA 指纹识别、遗传多样性分析、遗传图谱的构建等遗传学研究。SSR 标记的获取一般需要大量的 DNA 序列作为基础，然而普遍认为 SSR 引物在近缘种间具有一定的通用性<sup>[14-16]</sup>，因此，对遗传学研究基础较弱的物种，近缘物种转移法已成为一种简便快速获得 SSR 标记的有效方法。本研究旨在充分利用已经报道的伊豆大青 *C. izuinsulare* 和海州常山 *C. trichotomum* 2 种植物的 SSR 引物<sup>[17]</sup>，在国内大青属几个主要种中筛选具有通用性的 SSR 标记，通过建立在 SSR 标记基础上的 DNA 指纹识别技术，寻找稳定高效的大青属近缘物种的分子鉴别手段。

### 1 材料及总 DNA 的获得

材料为大青属的 9 个本土树种，样品均为野生异地保存于江西省林业科学院中药圃的植物资源，经江西省林业科学院朱培林研究员鉴定确认，采集幼嫩梢叶置于冰壶内带回实验室备用，树种产地信息见表 1。总 DNA 提取采用 SDS 法<sup>[18-19]</sup>，各树种随机选取 5 个单株相同浓度的 DNA 样品等量混合，作为代表该树种的 DNA 样本<sup>[20-21]</sup>。

表 1 材料

Table 1 Experimental materials

编号	植物	产地	海拔 / m	地理位置
1	白花灯笼 <i>C. fortunatum</i>	江西省安远县	590	东经 115° 北纬 25°
2	棘桐 <i>C. japonicum</i>	江西省全南县	318	东经 114° 北纬 24°
3	臭牡丹 <i>C. bungei</i>	江西省明月山	499	东经 114° 北纬 27°
4	大青 <i>C. cyrtophyllum</i>	江西省南昌市	50	东经 115° 北纬 28°
5	海通 <i>C. mandarinorum</i>	江西省铜拔山	413	东经 118° 北纬 28°
6	海州常山 <i>C. trichotomum</i>	江西省武功山	747	东经 114° 北纬 27°
7	尖齿臭茉莉 <i>C. lindleyi</i>	江西省南昌市	322	东经 115° 北纬 28°
8	浙江大青 <i>C. kaichianum</i>	江西省武夷山	981	东经 117° 北纬 27°
9	灰毛大青 <i>C. canescens</i>	江西省信丰县	431	东经 115° 北纬 25°

## 2 方法

### 2.1 SSR-PCR 扩增及产物检测

10 μL PCR 反应体系包含：1×缓冲液，Mg<sup>2+</sup> 2.5 mmol/L，dNTPs 0.2 mmol/L，引物 2.5 pmol，Taq 酶 1 U，DNA 10~20 ng。筛选引物的 PCR 扩增反应程序采用 Touch-down PCR：94 °C 3 min；94 °C 30 s，60 °C 30 s，72 °C 30 s，20 个循环；再进入 94 °C 30 s，50 °C 30 s，70 °C 30 s，20 个循环；最后 72 °C 延伸 10 min。种间 PCR 扩增程序：94 °C 2 min；94

°C 30 s，退火 30 s (不同引物退火温度不同)，72 °C 60 s，30 循环；72 °C 10 min。SSR-PCR 产物采用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

### 2.2 数据统计和处理

采用在相同迁移率位置上有带记为“1”，无带记为“0”的读带方法，建立原始数据库，并用 Popgene 3.2 分析软件对统计数据进行遗传分析<sup>[22]</sup>，从而获得各物种间遗传距离和相似性系数矩阵。选用遗传距离数据矩阵利用 NTSYS-pc 2.1 软件

按不加权成组配对法 (UPGMA) 进行聚类分析<sup>[23]</sup>, 建立亲缘关系树状图。

### 3 结果与分析

#### 3.1 SSR 引物的通用性比较

本研究所用 SSR 引物中由伊豆大青 *C. izuinsulare* 开发的有 10 对, 由海州常山开发的为 9 对, 共 19 对<sup>[17]</sup>。经 PCR 扩增检测, 不同树种和这些引物的扩增成功率存在一定差异 (表 2), 其中 17 对引物均可在广布种大青中扩增出清晰稳定的带型, 比率最大为

89.5%, 而臭牡丹能扩增比率最小, 为 57.9%, 其他大部分种能扩增比率为 75% 左右。有 7 对引物能够在所有供试大青属植物中扩增出清晰稳定的带型, 占所用引物的 36.8%, 扩增等位基因数为 3~5 个 (表 3)。7 对引物中, 引物 CT040、CT042 具通用性, 海州常山的引物通用比率为 22.2%, 其他 5 对引物来自伊豆大青 *C. izuinsulare*, 其引物通用比率为 50%。7 对引物中引物 CT040 表现为单态性, 其他 6 对引物多态性较好, 部分引物的电泳图见图 1。

表 2 9 种大青属植物的扩增结果

Table 2 Results of cross-species amplification of nine species from *Clerodendrum* L.

引物	白灯笼	赧桐	臭牡丹	大青	海通	海州常山	尖齿臭茉莉	浙江大青	灰毛大青
CI107	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CI111	-	-	-	+	-	+	-	-	-
CI124	+	-	-	+	-	-	-	-	-
CI127	-	+	-	+	-	-	-	-	+
CI132	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CI140	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CI141	+	+	+	+	+	+	-	+	+
CI142	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CI143	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CI144	+	-	-	-	-	-	-	-	+
CT021	+	+	+	+	+	-	+	+	+
CT024	-	+	-	+	+	+	+	+	+
CT026	+	+	-	+	+	+	+	+	+
CT028	+	+	-	+	+	+	+	-	-
CT031	+	+	-	+	+	+	+	+	+
CT040	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CT041	+	+	+	-	+	-	+	+	+
CT042	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CT043	+	-	+	+	+	+	+	+	+

“+”表示有扩增结果, “-”表示没有扩增结果

“+” indicates successful amplification of PCR product, “-” indicates non-successful amplification of PCR product

表 3 通用性的引物

Table 3 Transferability microsatellite primers

引物	重复序列	序列 (5'-3')	退火温度 / °C	大小 / bp	等位基因数
CT040	(TC) <sub>6</sub> (AG) <sub>6</sub>	反向 ACACACACACACAGAGAGAGAG 正向 GTCCTACTTCTGCAGGTTTG	56	130~145	3
CT042	(TC) <sub>6</sub> (AC) <sub>4</sub>	反向 TCTCTCTCTCACACACACAC 正向 ATTGGGCTGCCTGTCAAACCTGG	56	95~105	4
CI107	(TC) <sub>6</sub> (AC) <sub>5</sub>	正向 TCTCTCTCTCACACACACAC 正向 CATA CGCAGTCAGTTCTTC	55	135~150	3
CI132	(TC) <sub>6</sub> (AC) <sub>5</sub>	反向 TCTCTCTCTCACACACACAC 正向 CCTCAACAACCAATCAAGA	56	110~120	4
CI140	(TC) <sub>6</sub> (AG) <sub>8</sub>	正向 ACACACACACACAGAGAGAGAG 反向 CAGTATACCGAGGAGGGTTT	60	175~195	5
CI142	(TC) <sub>6</sub> (AC) <sub>5</sub>	正向 TCTCTCTCTCACACACACAC 反向 TGTTCTTGTCAAACATACC	58	100~115	4
CI143	(TC) <sub>6</sub> (AC) <sub>10</sub>	正向 TCTCTCTCTCACACACACAC 反向 ACAACTGTTATGGAACCTCACG	52	105~115	5

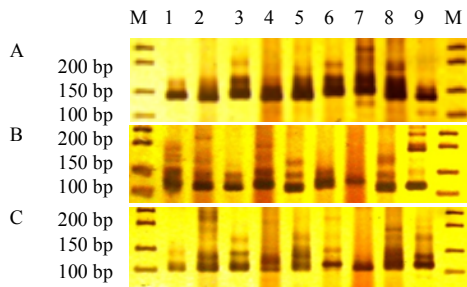


图 1 引物 CI107 (A)、CI132 (B)、CI142 (C) 在 9 种大青属植物 DNA 样品中的扩增结果

Fig. 1 Banding patterns of SSR marker CI107 (A), CI132 (B), and CI142 (C) amplified on DNA sample of nine *Clerodendrum* L. species

### 3.2 大青属种间遗传关系分析

由表 3 中 6 对有多态性的引物对 9 个大青属树种供试样品 PCR 扩增结果 (图 1) 建立原始数据库, 采用 Popgene 3.2 软件统计数据, 9 个种的 Shannon's 多样性指数为 1.152 3, Nei's 基因多样性为 0.266 9, 9 种大青属植物的遗传距离在 0.239 8~1.892 6, 相似系数在 0.150 7~0.786 8 (表 4), 白花灯笼和赧桐间遗传距离最大, 为 1.892 6; 大青和海通之间的遗传距离最小, 为 0.239 8。

以遗传距离矩阵为分析对象, 利用 NTSYS-pc 2.1 软件按不加加权成组配对法 (UPGMA) 进行聚类分析, 建立大青属 9 个树种间的亲缘关系树状图 (图 2)。

表 4 根据 SSR 分析的大青属 9 个种间的遗传距离 (下) 和相似系数 (上)

Table 4 Genetic distance (down) and genetic similarity (up) of nine species of *Clerodendrum* L. based on SSR analysis

植物	白花灯笼	赧桐	臭牡丹	大青	海通	海州常山	尖齿臭茉莉	浙江大青	灰毛大青
白花灯笼	—	0.150 7	0.352 8	0.280 0	0.368 9	0.220 7	0.223 3	0.357 1	0.325 9
赧桐	1.892 6	—	0.649 3	0.580 2	0.321 6	0.372 7	0.556 2	0.738 0	0.536 7
臭牡丹	1.041 9	0.431 9	—	0.358 9	0.235 3	0.429 1	0.452 1	0.590 5	0.554 4
大青	1.273 0	0.544 4	1.024 7	—	0.786 8	0.599 7	0.609 1	0.409 9	0.344 4
海通	0.997 1	1.134 3	1.446 8	0.239 8	—	0.373 9	0.425 5	0.379 4	0.241 6
海州常山	1.510 8	0.987 1	0.846 1	0.511 3	0.983 7	—	0.679 0	0.470 6	0.578 1
尖齿臭茉莉	1.499 3	0.586 7	0.793 8	0.495 8	0.854 4	0.387 2	—	0.610 3	0.701 8
浙江大青	1.029 7	0.303 8	0.526 7	0.891 8	0.969 2	0.753 8	0.493 9	—	0.530 0
灰毛大青	1.121 1	0.622 2	0.589 9	1.066 1	1.420 6	0.548 0	0.354 1	0.634 8	—

矩阵右上角为相似系数, 左下角为遗传距离

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

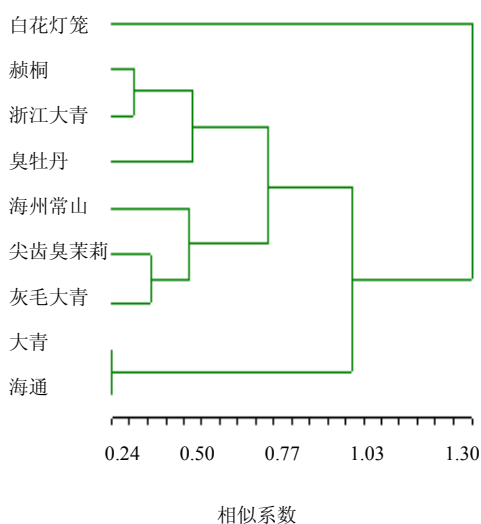


图 2 基于 SSR 标记的 9 个大青属树种 UPGMA 系统树

Fig. 2 UPGMA dendrogram of nine wild species of *Clerodendrum* L. based on SSR markers

从聚类结果来看, 遗传距离等于 0.50 时可将 9 个树种分为 4 个组, 海通和大青显示最近的亲缘关系组成一组, 臭牡丹、赧桐和浙江大青聚成一组, 海州常山、尖齿臭茉莉和灰毛大青聚成另一组, 而白花灯笼自成一组。

### 3.3 DNA 指纹识别分析

SSR 标记构建的指纹图谱可作为大青属种间区别的参考。根据多态引物扩增的电泳结果, 以 6 个 SSR 标记构建大青属 9 个树种的指纹图谱, 由表 5 可见, 引物 CI140 多态性最为丰富, 可一次性鉴定除白花灯笼与尖齿臭茉莉之外的 7 个树种, 此外引物 CI132 与 CT042 可分别一次性将白花灯笼与其他树种区分开, 而引物 CI107 和 CI143 可各自将尖齿臭茉莉和其他树种区别开, 故可用以上 5 对引物进行两两组合将所有供试的 9 个树种区分开。

表 5 大青属部分种 6 个 SSR 标记的指纹图谱

Table 5 Six SSR fingerprints of some wild species in *Clerodendrum* L.

种名	相同迁移带迹标识					
	CI107	CI132	CT042	CI140	CI142	CI143
白花灯笼	001	1000	1000	00001	0010	00100
赧桐	010	0100	0100	00100	0001	00001
臭牡丹	010	0010	0100	01001	0010	10001
大青	001	0100	0010	10100	0101	00001
海通	001	0001	0010	11000	0001	00101
海州常山	010	0010	0010	00101	0100	01100
尖齿臭茉莉	100	0100	0100	00001	0001	10010
浙江大青	001	0010	0100	01010	0001	00100
灰毛大青	010	0010	1010	00001	0001	01000

#### 4 讨论

SSR 引物的通用性在一定程度上依赖于近缘物种之间 SSR 侧翼序列的保守性和进化过程中 SSR 的稳定性。SSR 两端的侧翼序列在生物的基因组中特别是在亲缘关系比较近的种间具有不同程度的保守性,许多研究表明微卫星侧翼序列在属内种间和亲缘关系较近的属间是相当保守的,且表现出亲缘关系越近其通用性越高<sup>[24]</sup>。本研究使用的 19 对引物都是通过磁珠富集法开发的 gSSR 标记<sup>[17]</sup>,共有 7 对有通用性,属内不同种间通用性比率为 36.8%,通用性比率相对较高,从另一个侧面也能反映供试树种亲缘关系较近。另外,分子标记 SSR 普遍存在侧翼序列保守的现象,在属内不同种间引物通用性仍有较大差别<sup>[25]</sup>。总之,来至日本伊豆群岛的特有种 *C. izuinsulare* 开发的引物中虽然有 5 对能在 9 个树种中得到很好的扩增,而海州常山所开发引物仅有 2 对具有很好的通用性,但对两者不具通用性的引物进行比较,相比由海州常山所开发引物能在 9 个树种的大部分种得到扩增,由 *C. izuinsulare* 开发的 5 对不具通用性引物,只在极个别供试树种间得以扩增,仅通过本实验还不足以判断上述 2 树种引物的通用性高低。此外,由海州常山开发的标记 CT021 和 CT041 在本实验用本种个体尚未能扩增出条带,有待今后通过更多的本种个体来验证以上 2 对引物是否可用。

供试 9 种大青属植物在属下等级分属于腋序系 *Ser. Axilliflorae schauer* (白花灯笼)、密序系 *Ser. Densiflora schauer* (灰毛大青、尖齿臭茉莉、臭牡丹)、疏序系 *Ser. Paniculata schauer* (海州常山、浙

江大青、海通)、鳞叶系 *Ser. Squamata schauer* (赧桐)和垂序系 *Ser. Penduliflorae schauer* (大青)<sup>[4]</sup>。Yuan 等<sup>[26]</sup>使用 4 个进化速率较快的叶绿体 DNA 区域 *trnT-L*、*trnL-F*、*trnD-T*、*trnS-fM* 研究了大青属产自亚洲的 16 个种和 1 个亚种的系统发育关系,密序系形态很接近的臭牡丹和尖齿臭茉莉 2 个种聚类在一起,但也将密序系灰毛大青和垂序系大青聚类在一起,将腋序系白花灯笼和疏序系海州常山聚类在一起。可见,大青属属下等级的分子系统研究和其形态学分类存在一定差距。本研究中,利用 Nei's 遗传距离进行 UPGMA 聚类,分析结果能很好地把属于腋序系的白花灯笼和其他种区分开,显示该种与其他系树种有较远的亲缘关系,而垂序系的大青属于灌木,它和疏序系属于高大乔木的海通聚到了一起,遗传距离为 0.239 5,表现出最为接近的亲缘关系;同时,属于密序系的灰毛大青和尖齿臭茉莉也聚集在一起,但属于疏序系的海州常山和它们显示关系较近,这与海州常山和灰毛大青都有宿萼宽大且变成鲜红色的表型特点一致;此外,属于疏序系的浙江大青和鳞叶系的赧桐(其花序也是属于疏序)聚到了一起。总之,采用 CI107、CI132、CI140、CI143 和 CT042 标记进行两两组合均可将所有供试的 9 个树种区分开,研究结果为今后森林药材的甄别奠定了技术基础,而由于受供试样品个体数、物种数及引物数量等的限制,本研究基于 SSR 的大青属属内种间亲缘关系分析仅能反应部分物种的种间关系,其中分子数据与形态分类差别最大的是疏序系,初步分析作为属下等级它很可能不是个自然类群。

## 参考文献

- [1] 梁汉兴, 彭 华. 广义马鞭草科花器官发生研究 [J]. 植物学报, 2001, 43(7): 673-679.
- [2] Dorothy A S, Rogier P J K, Richard G O. Phylogenetic relationships between *Clerodendrum* L. (Lamiaceae) and other *Ajugoid* genera inferred from nuclear and chloroplast DNA sequence data [J]. *Mol Phylog Evol*, 2004, 32(1): 39-45.
- [3] 杨金宏, 孔卫青. 基于 rbcL 和 matK 序列探讨马鞭草科部分植物的系统学位置 [J]. 热带亚热带植物学报, 2013, 21(2): 116-122.
- [4] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 65 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1982.
- [5] 敏 如, 星 炜. 中国民族药志要 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005.
- [6] 刘时乔, 周福军, 高 贤, 等. 大青属常见药用植物的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(6): 469-473.
- [7] 吴明美, 王利勤, 华 燕. 大青属植物的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 化学工程与装备, 2011, 42(4): 112-116.
- [8] 郝洪波. 优良的园林植物臭牡丹 [J]. 中国花卉盆景, 2008, 30(10): 16.
- [9] 庄茂长. 奇特可爱的怪花—海州常山 [J]. 园林, 1995, 30(5): 9.
- [10] 邓绍勇, 朱培林, 贺义昌, 等. 基于 logistic 模型的灰毛大青播种苗生长规律 [J]. 林业科技开发, 2013, 27(4): 58-60.
- [11] 兑宝峰. 栩栩如生的龙吐珠 [J]. 花木盆景, 2001, 30(11): 27.
- [12] 杨 勇, 赖永超, 刘 楠, 等. 艳桢桐的生态生物学特征 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(19): 1004.
- [13] 傅荣昭, 邵鹏柱, 高文远, 等. DNA 分子标记技术及其在药用植物研究上的应用前景 [J]. 生物工程进展, 1998, 18(4): 14-17.
- [14] 胥 猛, 李火根. 鹅掌楸 EST-SSR 引物开发及通用性分析 [J]. 分子植物育种, 2008, 6(3): 615-618.
- [15] Selvadurai D, Bawa K S, Rick K. Conservation of microsatellites among tropical trees (Leguminosae) [J]. *Am J Bot*, 1997, 84(12): 1658.
- [16] Claire A, Maurizio R, Jody M, et al. The application of SSRs characterized for grape (*Vitis vinifera*) to conservation studies in Vitaceae [J]. *Am J Bot*, 2002, 89(1): 22-28.
- [17] Leiko M, Shingo K, Masami H, et al. Development of nuclear SSRs for the insular shrub *Clerodendrum L. izuinsulare* (Verbenaceae) and the widespread *C. trichotomum* [J]. *Am J Bot*, 2011, 98(11): 333-336.
- [18] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis [J]. *Nucl Acids Res*, 1991, 19(6): 1349.
- [19] 顾红雅. 植物分子生物学: 实验手册 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1998.
- [20] 王铁固, 陈彦惠, 吴连成, 等. 利用若干单株混合提取 DNA 方法进行玉米群体 SSR 的分析 [J]. 华北农学报, 2005, 20(1): 6-11.
- [21] 罗永聪. 多花黑麦草品种 (系) 农艺性状综合评价及 SSR 指纹图谱构建 [D]. 成都: 四川农业大学, 2013.
- [22] Yeh F C, Boyle T J B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits [J]. *Belg J Bot*, 1997, 129(10): 157-159.
- [23] Yao Q R, Zhao C Z, Wang W Q. Analysis of genetic relationship of Hainan Litchi germplasm resources by SSR marker [J]. *Bull Bot Res*, 2009, 29(5): 628-632.
- [24] 钟 敏, 程须珍, 王丽侠, 等. 绿豆基因组 SSR 引物在豇豆属作物中的通用性 [J]. 作物学报, 2012, 38(2): 223-230.
- [25] Gong L, Stift G, Kofler R, et al. Microsatellites for the genus *Cucurbita* and an SSR-based genetic linkage map of *Cucurbita pepo* L [J]. *Theoret Appl Genet*, 2008, 117(1): 37-48.
- [26] Yuan Y W, Mabberley D J, Dorothy A S, et al. Further disintegration and redefinition of *Clerodendrum* L. (Lamiaceae): implications for the understanding of the evolution of an intriguing breeding strategy [J]. *Taxon*, 2010, 59(1): 125-133.