

DOI: 10.1360/yc-007-0103

用 EST-SSR 标记对茶树种质资源的研究

金基强¹, 崔海瑞¹, 龚晓春¹, 陈文岳², 忻雅²

1. 浙江大学原子核农业科学研究所, 杭州 310029;
2. 杭州市农业科学院, 杭州 310024

摘要: 采用 16 对 EST-SSR 引物对 42 份茶树品种资源进行了分析。在这些引物中, 有 13 对可扩增出清晰条带, 其中 10 对引物具有多态性, 占 76.9%。各多态性引物的 PIC 值变化范围为 0.522~0.866, 平均 PIC 值为 0.730。10 对多态性引物共检测到 84 种等位基因型和 74 个等位变异, 每对引物可检测到基因型和等位基因数分别为 4~12 和 3~10 种。42 份供试材料间遗传距离为 0.074~0.667, 平均遗传距离为 0.363, 说明本实验所测试的材料具有较广的遗传变异。在相似系数为 0.55 的水平可将这些材料聚为 3 类, 多数材料包含在第一类中。本研究表明, 利用 EST-SSR 标记进行茶树资源评价是有效的。

关键词: 茶树; EST-SSR 标记; 种质资源分析

Studies on tea plants (*Camellia sinensis*) germplasms using EST-SSR marker

JIN Ji-Qiang¹, CUI Hai-Rui¹, GONG Xiao-Chun¹, CHEN Wen-Yue², XIN Ya²

1. Institute of Nuclear and Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;
2. Hangzhou Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310024, China

Abstract: Forty two tea varieties were analyzed by using 16 SSR primer sets derived from tea ESTs in this study, and 13 of the primer sets produced clear bands and 10 of them showed polymorphism, accounting for 76.9%. The PIC (polymorphism information content) for each polymorphic primer set varied from 0.522 to 0.866, with a average about 0.73. Totally 84 Genotypes and 74 alleles were detected in all materials by 10 polymorphic markers, with the range from 4 to 12 and from 3 to 10 for each polymorphic primer set, respectively. The genetic distance among 42 tea varieties varied from 0.074 to 0.667, averagely 0.363, suggesting that the materials used in the experiment possess a broad genetic variation. Based on the similarity coefficient about 0.55, all the tea varieties tested could be classified into 3 groups and most of them were in first group. The results of this study proved that the EST-SSR marker is very effective in evaluation of tea germplasms.

Keywords: Tea plants; EST-SSR marker; germplasms evaluation

茶树起源于我国, 是我国重要的经济作物之一, 有着悠久的栽培历史, 且地域分布广泛, 资源丰富。采用分子标记对茶树种质资源进行鉴定和分析, 对

茶树的遗传研究和品种改良具有重要意义。目前, 已有多种分子标记应用于茶树遗传育种研究^[1~3], 其中主要是随机扩增长度多态性DNA(random am-

收稿日期: 2006-01-10; 修回日期: 2006-03-22

基金项目: 杭州市农业科学院资助项目(编号: I20504), 浙江大学第八期大学生科研训练项目(编号: SRTPO52) [Supported by the Grant from Hangzhou Academy of Agricultural Sciences (No. I20504) and the 8th Student Research Training Program of Zhejiang University (No. SRTPO52)]

作者简介: 金基强(1983—), 男, 河南信阳人, 硕士研究生, 研究方向: 植物分子遗传。E-mail: xyjq2000@yahoo.com.cn

通讯作者: 崔海瑞(1963—), 男, 安徽怀远人, 博士, 研究员, 研究方向: 植物诱变遗传与分子改良。Tel:0571-86971405; E-mail: hrcui@zju.edu.cn

plified polymorphic DNA, RAPD)和扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphic, AFLP)标记等。RAPD标记虽技术简单、费用低,但它是显性标记,稳定性差,且多态性水平较低;而AFLP标记虽部分是共显性标记,多态性水平也高,但技术难度和费用都较大,对DNA质量要求也较高。简单序列重复(simple sequence repeat, SSR)亦称微卫星(microsatellite),与其他分子标记相比,具有多态性高、多等位性、共显性、可重复性高、数量丰富和对基因组有很好的覆盖性等特点^[4]。根据建立SSR标记的序列性质不同,SSR标记可分为基因组SSR(genomic SSR, gSSR)和表达序列(expressed sequence tag SSR, EST-SSR)等。与传统开发基因组来源的SSR相比,从EST数据库中直接电子筛选获得SSR^[5]和建立EST-SSR标记要经济得多。此外,由于EST-SSR来源于表达的基因组区域^[5],可直接反映相关基因的多样性;已有的研究还表明其具有很好的通用性^[6,7]。但在茶树资源研究中,还没有利用EST-SSR标记的报道。本文报道我们应用EST-SSR标记对42份茶树种质资源分析的结果。

1 材料和方法

1.1 植物材料与模板 DNA 的提取

本实验共用了42个茶树品种(表1)。从浙江大学茶学系实验茶园采集幼嫩叶片,以改良的CTAB法^[8](提取液中添加0.5%维生素C和2%聚乙烯吡咯烷酮)提取DNA。

1.2 茶树 EST-SSR 标记的来源

从NCBI共下载了2114条茶树EST。首先使用软件Staden Package对它们进行聚类和拼接,共获得1,632个一致性序列(consensus),再去掉该软件未能剔除的poly(A)_n。利用RepeatMasker程序(<http://repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>),对1632条EST中所含有的SSR进行了查找。再用PRIMER3(http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)设计了PCR引物。本研究以其中的16对引物(编号P01~P16,具体信息见表2)对42个茶树品种进行扩增,引物由上海Sangon公司合成。

1.3 EST-SSR 的扩增与检测

PCR反应在25 μL的体积中进行,含PCR缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 40 mmol/L KCl, 0.08% NP-40, pH=9.0)、50~80 ng的模板DNA、1 U Taq聚合酶,上、下游引物各0.5 μmol/L、dNTP 200 μmol/L和MgCl₂ 2.0 mmol/L。整个反应过程在PCR Express-96 (HYBAID)上进行,循环条件是:94 预变性4分钟;然后35个循环,每个循环包括94 变性45 s,合适温度(通过温度梯度实验确定,并尽可能提高复性温度以增加特异性)复性60秒,72 延伸1 min 15 s;最后于72 延伸7 min。复性温度低于50 仍无产物出现,则认为该引物不能扩增。PCR产物经10%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,硝酸银染色法检测。以50 bp DNA Marker(上海Sangon公司)为参照,计算扩增产物的分子量。

表 1 实验所用材料

Table 1 Materials tested in the experiment

编号 Code	品种名称 Variety	编号 Code	品种名称 Variety	编号 Code	品种名称 Variety
1	安徽9号 Anhui 9	15	寒绿 Hanlv	29	安吉白茶 Anji-baicha
2	龙井43 Longjing 43	16	政和大白 Zhenghe-dabai	30	紫笋 Zisun
3	浙农25 Zhenong 25	17	毛蟹 Maoxie	31	蕻北 Shubei
4	迎霜 Yingshuang	18	安徽1号 Anhui 1	32	祁门长叶 Keemen-changye
5	鸠坑 Jiukeng	19	浙农113 Zhenong 113	33	福鼎大白 Fuding-dabai
6	碧云 Biyun	20	玉兰 Yulan	34	红芽佛手 Hongya-foshou
7	浙农12 Zhenong 12	21	香菇寮白茶 Xiangguliao-baihao	35	本山 Benshan
8	菊花春 Juhuachun	22	乌牛早 Wuniuzao	36	龙井长叶 Longjing-changye
9	平云 Pingyun	23	青心奇兰 Qingxin-qilan	37	肖奇种 Xiaoqizhong
10	大叶乌龙 Daye-wulong	24	浙农21 Zhenong 21	38	凤凰水仙 Fenghuang-shuixian
11	黄叶早 Huangyezao	25	早黄茶 Zaohuangcha	39	劲峰 Jinfeng
12	竹枝春 Zhuzhichun	26	浙农139 Zhenong 139	40	潇湘红 Xiaoxianghong 21-3
13	紫芽种 Ziyazhong	27	水古茶 Shuiguocha	41	慢奇兰 Manqilan
14	藤茶 Tengcha	28	梅占 Meizhan	42	云旗 Yunqi

表 2 16 对 EST-SSR 引物的扩增情况

Table 2 Amplification results of 16 EST-SSR primer pairs

引物编号 Primer code	重复单元 Repeat motif	产物大小(bp) Product size(bp)	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	复性温度 T_m ()
P01	(TC) ₁₅	174~220	GGAGCATTGAAGCGAGAAAT	ACGCTTCGAGTACTCCCTGA	53
P02	(A) ₂₉	265, 420	GTTGTCGCTGGTGTCTTTGA	AATTGGCAGTGAGCTCGAA	63
P03	(ATG) ₁₀	140~163	GCGTCGTCCCTTCTTTCTAA	GGGCAGCCATAACCACTACT	57
P04	(TAA) ₁₂	157, 174	AAGGGGCTCTATGGGTCAAG	TGTGTAACCTGCCAAGACCA	61
P05	(TC) ₁₄	307, 357	GGGGGAGCTTACAAAGAGTCA	AACACCCAATCCTTTTGCAC	59
P06	(TTC) ₁₀	126~150	CAGGGTTGCAAGAAGTACCG	ATCAACCGTATGGGCAAAAAG	57
P07	AG-rich, 90 bp	111~154	GGGGGAACAACGAACAGAT	TCTCTGAGGGCTTCGATCAT	56
P08	(TG) ₁₂ (AG) ₁₄	239~354	ACCTCGAAGCTGCATTCTGT	ACAATCATTGCCACCACATC	53
P09	(A) ₃₀	/	TCGTATGCATGTTTGTGTGG	ATCGCAATTTCGCTACGTCT	50~60
P10	(TC) ₁₅	235~248	GCTGCCGCTCTTCTTAAAGTG	CGCAAATCTCCAACAGACC	62
P11	T-rich, 145 bp	/	CGACCCTCTTCTCACCAG	TACCCATTCCCTTCTTTGC	50~60
P12	(TG) ₈ (AG) ₁₀	139~197	TGGATTCCACCCAGAGTCC	CCACCGACTCGATGACATAA	64
P13	(GGAAA) ₁₁	184~231	TAGCTCGCACACAACACCAC	TCCAACGACACACTCTCTGC	61
P14	(AG) ₁₄	138~184	GGGAGAACCAACCCAGTCTAT	CCCAATCCGCTGTAGTAGGA	62
P15	CT-rich, 156 bp	346~398	GGGACAGAACAGAGGAGAGA	CGAGTCGTACCACCTCAACC	61
P16	(TC) ₁₅	/	TTGGGGAAGAAGATGTGGAG	GGCAGGTACCAGAGGTCAAT	50~60

1.4 统计分析

假设每对引物仅检测一个含有SSR的位点, 则每条多态性带可视为一个等位基因, 有带记为“1”, 无带记为“0”, 生成矩阵, 采用Nei和Li公式^[9]计算各材料间的遗传相似系数(GS_{ij})和遗传距离(GD_{ij}), $GS_{ij}=2a/2a+b+c$, $GD_{ij}=1-GS_{ij}$, 其中 a 为第 i 个材料和第 j 个材料共有的条带数, b 和 c 分别为第 i 个材料和第 j 个材料各自的特有条带数。利用NTSYS-pc 2.10 软件对数据进行分析, 以不加权重对算术平均法(UPGMA)对材料进行聚类作图。

根据Botstein等^[10]报道的方法计算多态信息含量(PIC , polymorphism information content)值, $PIC=$

$$1 - \sum_{i=1}^n X_i^2, X_i \text{ 表示第 } i \text{ 种基因型出现的频率。}$$

2 结果与分析

2.1 茶树不同 EST-SSR 引物的扩增情况

利用 16 对引物对 42 份材料进行分析, 发现 3 对引物(P09、P11、P16)扩增不出产物, 其他 13 对引物都有较清晰的扩增条带, 这 16 对引物的扩增情况具体见表 2。其中 10 对引物表现出多态性, 多态性引物比例为 62.5%, 多态性引物占有效引物比例为 76.9%, 图 1 为引物 P03 在对不同材料所显示出的多态性。

2.2 茶树不同 EST-SSR 引物的多态性及其揭示的遗传多样性

用具有清晰扩增条带的 13 对引物进一步对 42 份茶树材料的遗传多样性进行了分析。其中, 有 3 对引物 P02、P04 和 P05 的扩增产物在 42 个材料间都无差异, 即无多态性, 各自只能检测到 1 个等位基因和显示 1 种基因型。其他 10 对引物的扩增产物在不同材料间具有明显的多态性, 共检测出 74 个等位变异和 84 种基因型, 但每对引物所揭示的等位基因数、基因型数及其多态性信息含量明显不同(表 3)。

每对多态性引物所检测的等位基因数变化于 3~10 之间, 平均为 7.4 个, 其中以引物 P10 的 3 个等位基因数最少, 而 P13、P14 检测出等位基因数则多达 10 个; 各对引物所揭示的基因型数在也有很大差异(4~12), 以 P10 显示的基因型最少, P14 最多; 所有多态性引物的 PIC 值都大于 0.5, 而 P07、P12 和 P14 的 PIC 值还大于 0.8, 平均 PIC 值高达 0.73。 PIC 可反映引物区分材料的能力, 它不仅与基因型的数目有关, 而且与各种基因型的频率有关。在实验中我们观察到, 利用某些引物分析时, 表现为某种特定基因型的材料只有 1 个, 例如, 浙农 12 在 P03、浙农 12 和竹枝春在 P06、浙农 25 和大叶乌龙在 P15 的扩增产物谱带上都是唯一的。尽管本实验所用的

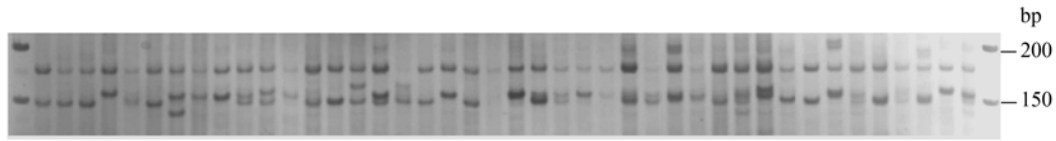


图 1 引物 P03 对 42 份茶树材料的 PCR 扩增显示出的多态性

最左和最右边泳道为 marker, 其他为不同茶树样品, 顺序(左起)同表 1。

Fig. 1 Polymorphisms showed in 42 varieties of tea by primers P03

The far left- and right- lanes show the marker, others are different tea samples and the order (left to right) is as list in Table 1.

表 3 10 对多态性 EST-SSR 引物的等位基因数、基因型数和多态性信息含量

Table 3 The Number of alleles and number of genotypes and PIC of the 10 EST-SSR primer pairs with polymorphism

引物编号 Primer code	等位基因数 Number of alleles	基因型数 Number of genotypes	多态信息含量 PIC	引物编号 Primer code	等位基因数 Number of alleles	基因型数 Number of genotypes	多态信息含量 PIC
P01	7	7	0.743	P10	3	4	0.667
P03	5	8	0.758	P12	9	11	0.815
P06	9	11	0.751	P13	10	8	0.597
P07	7	9	0.804	P14	10	12	0.866
P08	8	7	0.774	P15	6	7	0.522

EST-SSR 引物数不是很多, 但这 10 对引物测出的基因型丰富, 可区分全部材料, 说明 EST-SSR 标记具有较高的鉴别能力, 可被用为一种很好的品种鉴定手段。

根据利用这 13 对引物扩增产物的电泳带型, 计算出的 42 份供试材料间平均遗传距离为 0.363, 但变化范围较大, 为 0.074~0.667, 进一步表明了实验所用材料具有较丰富的遗传多样性。

2.3 不同茶树品种资源的聚类分析

根据材料间的相似系数采用 UPGMA 算法对 42 份材料进行聚类(图 2)。这 42 份材料在遗传相似系数为 0.55 的水平上可聚为 A、B、C 3 类, 其中鸠坑被单独聚在 A 类, B 类也仅有 5 个品种, 而绝大多数的材料(36 个)被聚在 C 类中。C 类在遗传相似系数为 0.64 的水平上又可分为 3 个亚类, 其中亚类 a 和亚类 b 分别包含 25 和 9 个品种, 而亚类 c 只包含菊

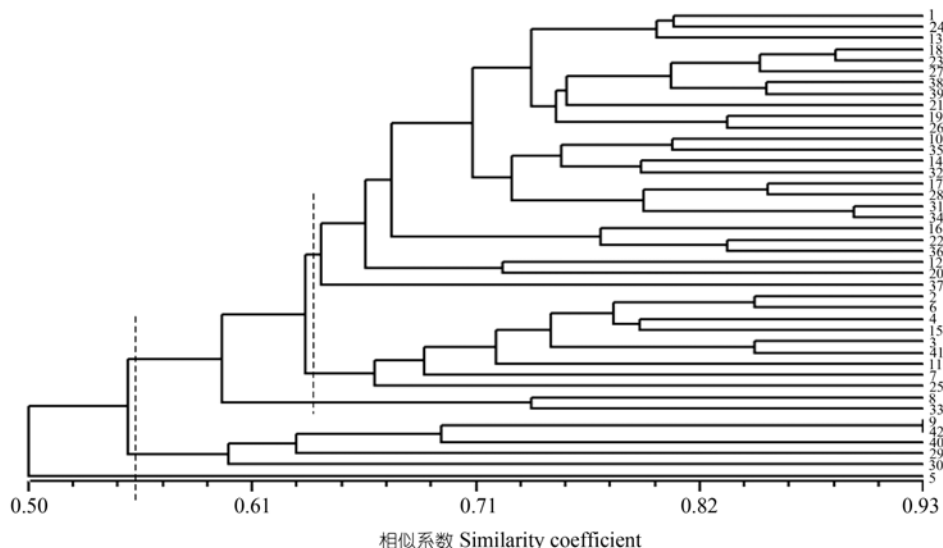


图 2 采用 UPGMA 法依据 EST-SSR 标记遗传相似性系数对 42 个茶树品种的聚类图(NTSYS-pc)

Fig. 2 Dendrogram of 42 tea cultivars generated by EST-SSR marker based on genetic similarity using UPGMA

花春和福鼎大白两个品种。

3 讨论

本实验中,茶树的EST-SSR标记表现出很好的多态性(76.9%),但低于黄福平等^[11]以AFLP对乌龙茶的多态性(92.0%),也低于金惠淑等^[12]和陈亮等^[13]以RAPD的对茶树资源研究的多态性(分别为84.3%和94.2%),稍高于陈海军等^[14]的以RAPD研究结果(74.2%),可能是因为EST-SSR来源于较保守的表达区域的缘故。与其他物种如高羊毛^[6]、大麦^[15]、苜蓿^[16]等相比,茶树具有较高的多态性。除因我们研究的材料具有很好的遗传多样性,也可能是因为我们最初都选用SSR重复次数较高的EST来设计引物,增大了引物在不同材料间出现多态性的可能,提高了EST-SSR标记在资源分析中的效率。我们在实验中使用了低复杂重复的SSR,结果表明它们有着很好的多态性,同样是有效的,这对于茶树这样的生物数据库中EST数量较少的物种来说,大大提高了EST的利用价值和扩大了标记的数量。上述的引物虽以严格的标准设计合成,但仍有3对引物不能扩增出产物,原因主要可能有^[5]:(1)引物的序列落在两个外显子上;(2)两引物间有一长的内含子,扩增不出产物。

本实验首次把EST-SSR标记用于茶树遗传资源研究,结果证明这种新型标记对茶树资源分析是有效的,可基本真实反映实验所用不同茶树材料的遗传变异情况,如:浙农113和浙农139系谱相同,且来源于同一个育种单位,二者间的遗传距离与其他材料间的遗传距离相比最小;多数来自福建安溪的茶树品种毛蟹、大叶乌龙、红芽佛手、本山、梅占、青心奇兰被聚在C类中的a亚类,而鸠坑与其他中国茶树品种遗传距离较远,这与金惠淑等^[11]以RAPD对茶树的研究结果相似;安吉白茶和潇湘红21-3也与多数品种的遗传距离较远。但同时也发现有些具有相同系谱的品种,并没有相互聚在最近的位置。如由云南大叶种单株选种育成的浙农12、浙农21、浙农25,虽相互间的遗传相似性系数都在0.7以上,但却被聚在两个亚类里。杂交F₁代育成的品种可能有更大的变异,如迎霜、劲峰、浙农113和浙农139等4个品种都是福鼎大白茶和云南大叶种自然杂交的后代,但它们间的遗传相似性系数变化是0.638~0.833;而另两个品种碧云和菊花春遗传相似性系数只有0.593,分别聚在A类的b亚类和c亚类中。这些

与系谱的偏差主要可能是因为茶树是异花受粉作物,长时期内进行着天然杂交,以致目前的茶树群体无论是栽培的还是野生的,都存在极端杂合的本性^[17],所以同一种群内有着一定的遗传变异,而两个不同品种的杂交后代既可能即存在父母本的差异,又可能存在分离产生的差异。罗军武等^[18]研究发现,双亲的RAPD谱带在F₁代出现分离现象,表明茶树是一个杂合体。杨新泉等^[19]用gSSR和EST-SSR对普通小麦的研究中也出现了相同系谱的两个材料遗传距离较远的情况,说明异花受粉植物后代可能仍有较大的遗传变异。另一方面,本实验所用引物不够多,所能检测的位点较少,也可能会使对各材料的遗传变异的估算发生偏离。

本研究所用的茶树品种主要是来自于浙江和福建两省,但EST-SSR标记对它们的研究结果是遗传距离变化范围为0.074~0.667,平均遗传距离为0.363,变化的范围稍大于金惠淑等^[12]和陈亮等^[13]用RAPD对茶树种质资源的研究结果,但亲缘关系较近的材料要小于用RAPD估算得出的值,可能是因为EST与基因组序列相比较为保守。但本实验的研究结果证明了浙江和福建两个产茶大省具有较丰富的茶树资源,也进一步说明了作为茶树起源地的中国,茶树拥有的广泛的遗传背景。本研究中,平均PIC值较现已报道的其他物种高^[5],也说明我们所分析的材料有着丰富的遗传多样性。

目前,已有多种植物如大麦、黑麦、甘蔗、小麦、水稻、高羊毛、猕猴桃、葡萄、棉花、甘蔗、黑麦草、云杉等植物的EST-SSR标记已被用于遗传作图、遗传多样性、通用性、比较作图等研究^[4]。本实验结果也证明了茶树EST-SSR标记对分析茶树资源和品种鉴定是完全有效可行的。而随着研究的深入,数据库中将会出现越来越多的茶树EST,将可从中开发出更多EST-SSR标记,必将加速和促进茶树EST资源的开发利用、绘制遗传图谱、实现特定性状的辅助选择和比较基因组学等方面的研究。

参考文献(References):

- [1] WANG Li-Yuan, CHENG Hao, ZHOU Jian. Advances on DNA molecular markers and gene-engineering in tea plants. *J Tea Sci*, 2004, 24(1): 12-17.
王丽鸳, 成浩, 周健. 茶树DNA分子标记及基因工程研究进展. *茶叶科学*, 2004, 24(1): 12-17.
- [2] YAO Ming-Zhe, CHEN Liang. The application of molecular marker in genetics and breeding of tea (*Camellia*

- Sinensis*). *Biotechnol Bull*, 2003(5): 27—30.
- 姚明哲, 陈亮. 分子标记在茶树遗传育种上的应用. *生物技术通报*, 2003(5): 27—30.
- [3] LIANG Hui-Ling, LIANG Yue-Rong. The principle and application of plant molecular marker and the of in genetics and breeding of tea(*Camellia Sinensis*). *J Tea*, 2003, 29(4): 191—194.
- 梁慧玲, 梁月荣. 植物分子标记技术原理及其在茶树育种中的应用. *茶叶*, 2003, 29(4): 191—194.
- [4] Powell W, Machray GC, Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Science*, 1996, 1:215—222.
- [5] Varshney RK, Graner A, Sorrells ME. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *TRENDS in Biotechnol*, 2005, 23(1): 48—55. [\[DOI\]](#)
- [6] Saha MC, Mian MA, Eujayl I, Zwonitzer JC, Wang LJ, May GD. Tall fescue EST-SSR markers with transferability across several grass species. *Theor Appl Genet*, 2004, 109, 783—791. [\[DOI\]](#)
- [7] Gao LF, Jing RL, Huo NX, Li Y, Li XP, Zhou RH, Chang XP, Tang JF, Ma ZY, Jia JZ. One hundred and one new microsatellite loci derived from ESTs (EST-SSRs) in bread wheat. *Theor Appl Genet*, 2004, 108, 1392—1400. [\[DOI\]](#)
- [8] FU Rong-Zhao, SUN Yong-Ru, JIA Shi-Rong. *Plant Genetic Transformation*. Beijing: China Science and Technology Press, 1994, 131—136.
- 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣. *植物遗传转化技术手册*. 北京: 中国科学技术出版社, 1994, 131—136.
- [9] Nei M, Li WH. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci*, 1979, 76: 5269—5273.
- [10] Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 1980, 32: 314—331.
- [11] HUANG Fu-Ping, LIANG Yue-Rong, LU Jian-Liang, CHEN Rong-Bing, Mamati GE, SUN Qing-Lei. Evaluation of genetic diversity in Oolong tea germplasms by AFLP finger printing. *J Tea Sci*, 2004, 24(3), 183—189.
- 黄福平, 梁月荣, 陆建良, 陈荣冰, Mamati GE, 孙庆磊. 乌龙茶种质资源种群遗传多样性 AFLP 评价. *茶叶科学*, 2004, 24(3), 183—189.
- [12] KIM Hyesuk, LIANG Yue-Rong, LU Jian-Liang. Comparative study on genomic DNA diversity between Korean and Chinese tea cultivars by RAPD technique. *J Tea Sci*, 2001, 21(2): 103—107.
- 金惠淑, 梁月荣, 陆建良. 中、韩两国主要茶树品种基因组 DNA 多态性比较研究. *茶叶科学*, 2001, 21(2): 103—107.
- [13] CHEN Liang, YANG Ya-Jun, YU Fu-Lian. Genetic diversity, relationship and molecular discrimination of elite tea germplasms (*Camellia sinensis* L O. Kuntze) revealed by RAPD markers. *Mol Plant Breeding*, 2004, 2(3), 385—390.
- 陈亮, 杨亚军, 虞富莲. 应用 RAPD 标记进行茶树优异种质遗传多态性、亲缘关系分析与分子鉴别. *分子植物育种*, 2004, 2(3), 385—390.
- [14] CHEN Hai-Jun, ZHAO Dong, LIU Zu-Sheng. Molecular identification of partial elite tea varieties cultivated in Zhejiang province by RAPD. *J Tea*, 2002, 28(4): 197—198.
- 陈海军, 赵东, 刘祖生. 浙江部分茶树良种的 RAPD 分子鉴定. *茶叶*, 2002, 28(4): 197—198.
- [15] Thiel T, Michalek RK, Varshney A G. Exploiting EST databases for the development of cDNA derived microsatellite markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet*, 2003, 106, 411—422.
- [16] Barrett B, Griffiths A, Schreiber M, Ellison N, Mercer C, Bouton J, Ong B, Forster J, Sawbridge T, Spangenberg G, Bryan D. Woodfield. A microsatellite map of white clover. *Theor Appl Genet*, 2004, 109, 596—608.
- [17] Hunan Agricultural College. *Tea Breeding Sciences* (2ed edition). Beijing: China Agriculture Press, 1999, 12.
- 湖南农学院. *茶树育种学*(第二版). 北京: 中国农业出版社, 1999, 12.
- [18] LUO Jun-Wu, SHI Zho-Peng, LI Jia-Xian, SHEN Cheng-Wen, HUANG Yi-Huan, GONG Zhi-Hua. Study on the application of RAPD technique to parentage identification of tea plant. *J Hunan Agricultural University(Natural Sciences)*, 2002, 28(6), 502—505.
- 罗军武, 施兆鹏, 李家贤, 沈程文, 黄意欢, 龚志华. RAPD 分子标记技术在茶树亲子鉴定中的应用. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2002, 28(6), 502—505.
- [19] YANG Xin-Quan, LIU Peng, HAN Zong-Fu, NI Zhong-Fu, LIU Wang-Qing, SUN Qi-Xin. Comparative analysis of genetic diversity revealed by genomic-SSR, EST-SSR and pedigree in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Acta Genetica Sinica*, 2005, 32(4): 406—416.
- 杨新泉, 刘鹏, 韩宗福, 倪中福, 刘旺清, 孙其信. 普通小麦 Genomic-SSR 和 EST-SSR 分子标记遗传差异及其与系谱遗传距离的比较研究. *遗传学报*, 2005, 32(4): 406—416.