

EST-SSR 标记在木本植物中的开发和应用

林元震¹, 郭海², 刘纯鑫¹, 刘天颐¹, 黄少伟¹, 陈晓阳^{1,*}

¹华南农业大学林学院, 广州 510642; ²水利部水土保持植物开发管理中心, 北京 100038

Development and Application of EST-SSR Markers in Woody Plants

LIN Yuan-Zhen¹, GUO Hai², LIU Chun-Xin¹, LIU Tian-Yi¹, HUANG Shao-Wei¹, CHEN Xiao-Yang^{1,*}

¹College of Forestry, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; ²Plant Materials Center for Soil and Water Conservation, Ministry of Water Resources, Beijing 100038, China

摘要: 本文简述EST-SSR的开发策略, 重点就其在木本植物遗传研究中的遗传多样性分析、遗传连锁图谱构建、比较作图以及种质资源鉴定的应用现状和存在问题作介绍, 并对其应用前景作了展望。

关键词: 木本植物; EST-SSR; 遗传多样性; 遗传图谱; 种质资源鉴定

简单序列重复(simple sequence repeat, SSR), 也称微卫星(microsatellite), 是指以1~6个核苷酸为单位在基因组中多次串联重复的DNA序列(Akkaya等1992)。SSR标记与其它分子标记技术相比, 具有易检测、共显性遗传、重复性好、数量丰富和多态性高以及遍布整个基因组等优点, 因此在植物遗传研究的众多方面受到重视(Schlotterer 2004)。SSR可分为基因组SSR和EST-SSR。基因组SSR标记一般是经过基因组DNA文库构建、重复序列克隆的识别和筛选以及测序等实验流程获得, 开发过程繁琐、时间长、成本高, 而且效率低(Roder等1998)。此外, 基因组SSR往往具有物种特异性, 重复基序也限制在2~3个核苷酸, 从而极大地限制了基因组SSR的应用范围(Chen等2006)。近些年来, 随着植物基因组与功能基因组研究的发展, 大规模植物基因的测序产生了大量的EST序列, 并上传到核酸公共数据库, 而且EST的数量仍在与日俱增, 已成为开发EST-SSR的一种资源。EST序列开发的EST-SSR标记比与传统的基因组SSR标记有很多优点, 如: EST-SSR标记在物种间具有高通用性, 通常都代表着某种基因功能, 开发过程简单、成本低, 还可反映出转录区的差异(Pashley等2006)。所以其在植物遗传图谱构建、比较作图、种质遗传多样性评价和亲缘关系鉴定的研究中有很高的使用价值。

目前, EST-SSR的开发已在农作物中广泛应用, 在水稻、甘蔗、大麦、葡萄、苜蓿和小麦中已有报道(李卫国等2008), 而对于木本植物, 在杏(Decroocq等2003; Xu等2004)、猕猴桃(Fraser

等2004)、云杉(Rungis等2004)、火炬松(Liewlaksaneeyanawin等2004; 林元震等2009)、柑橘(Chen等2006)、咖啡树(Poncet等2006)、桉树(Yasodha等2008)、茶树(刘振等2008)、杨树(杨彦伶等2008)、白桦(王艳敏等2008)、鹅掌楸(胥猛和李火根2008)和橡胶树(Feng等2009)等物种中也有过报道。本文对EST-SSR在木本植物中的遗传图谱构建、种群多样性分析以及种质资源鉴定的应用现状和存在问题作介绍, 并对其应用前景作了展望。

1 EST-SSR标记的开发

(1) EST序列可来自实验室构建cDNA文库测序, 或者公共序列数据库, 后者的EST不仅量大, 而且可免费下载使用, 已成为开发EST-SSR的主要数据来源。(2) EST序列的预处理一般采用cross-match或Vecscreen软件, 去除载体序列、低质量EST序列后, 以Phrap和CAP3等软件进行聚类 and 拼接, 从而得到无冗余的EST数据和尽可能长的重叠序列。(3) EST-SSR搜索常用软件有SSRIT、MISA、SSR Finder和Repeat Masker等, 用这些软件可得到的信息有: ESTs的名称、重复碱基、重复次数、重复碱基在EST中开始和结束的位置。(4) EST-SSR的检测。根据SSR侧翼序列的保守

收稿 2009-10-23 修定 2009-11-23

资助 国家自然科学基金(30771759、30972388)、广东省自然科学基金团队项目(9351064201000002)和华南农业大学校长基金(2009X014)。

* 通讯作者(E-mail: xychen@scau.edu.cn; Tel: 020-85280001)。

性,采用 Primer 5 或 Oligo 设计引物,对研究材料进行 PCR 扩增,然后通过电泳或者测序等方法检测,并进行相关数据处理和分析。

2 EST-SSR标记在木本植物遗传育种研究中的应用

2.1 遗传连锁图谱的构建

遗传图谱的构建是遗传学研究的重要领域之一,也是研究种质资源、遗传育种及基因定位、克隆的基础。基因组 SSR 标记由于标记数量少、物种特异性强,很难获得高密度的遗传连锁图,而近年来 EST-SSR 技术的不断发展,EST-SSR 位点已整合到原有的遗传图谱中,为构建高密度的多标记复合图谱提供了有力的新技术手段。目前,EST-SSR 标记主要应用于构建大麦、小麦、水稻、黑麦、黑麦草等农作物的遗传图谱(Varshney 等 2005)。Han 等(2004)以种间回交 BC1 [(陆地棉 TM-1 × 海岛棉 Hai7124) × 陆地棉 TM-1] 为作图群体,在 554 对亚洲棉的 EST-SSRs 引物中,有 99 对引物检测到多态性,共扩增到 118 个位点,其中 112 个位点整合到原有棉花遗传图谱的 22 个连锁群上,这些位点不是随机地分布在棉花基因组上,有 72 个位点位于 A 基因组,另 37 个位点位于 D 基因组。Han 等(2006)进一步开发了 489 对 EST-SSR 引物,有 114 对引物在两个亲本之间检测到多态性,并用于作图群体的遗传图谱构建,该图谱整合所有新位点后,就使原有棉花遗传图谱增加至 907 个位点,获得了图距为 5 060 cM 的遗传图谱,标记间的平均间距为 5.6 cM。Silfverberg-Dilworth 等(2006)采用 148 个新的苹果 SSR 标记(包含 31 个 EST-SSR)和 8 个已知的苹果、梨和欧洲花楸 SSR 标记在苹果(*Malus × domestica* Borkh.)参考图谱基础上构建了复合遗传图谱,这些 SSR 标记给原参考图谱新增了 168 个位点。同时为建立全基因组作图有效方法,他们进一步发现了 86 个可靠性强和多态性高的 SSR 标记,这些 SSR 标记均匀分布在苹果基因组中,覆盖约为 85% 苹果基因组,标记间的平均间距为 15 cM。

功能基因图谱对于探讨基因组结构、功能与进化,以及进行基因克隆和分子标记辅助选择育种等研究都很重要。由于 EST-SSR 来源于基因组编码区,其与基因的功能可能密切相关,因此可以用于构建功能基因图谱。Guo 等(2007)以种间回交 BC1 [(陆地棉 TM-1 × 海岛棉 Hai7124) × 陆地棉 TM-1] 为作图群体,采用在两个亲本之间存在多态

性的雷蒙德氏棉 EST-SSR,构建了高密度的遗传图谱,其包含 1 790 个位点,分属于 26 个连锁群,连锁标记覆盖的基因组总长为 3 425.8 cM,标记间平均间距为 1.91 cM。其所含的 71.96% 标记位点具有相关基因功能,对 1 122 个 EST-SSR 位点相应的 975 条 EST 进行功能预测的结果表明,475 条 EST 与生物代谢过程、细胞组分和分子功能等有关,并找到一些与棉花纤维发育相关的重要功能基因,这对进一步开展棉花的基因组功能和改良其农艺性状等研究都有意义。

2.2 物种间的通用性和作图比较

近年来的研究表明,EST-SSR 比基因组 SSR 在物种间具有更高的通用性(Varshney 等 2005)。基因组 SSR 大多处于非编码序列区域,其侧翼序列往往具有明显的物种特异性,因此在不同物种间通用性较差(Chen 等 2006)。而 EST-SSR 侧翼序列往往在物种之间高度保守,因此从一种植物中开发的 EST-SSR 可通用于其它近缘物种,这不但可丰富标记数量,而且显著提高标记的利用价值,从而为植物功能基因组学和比较基因组学研究提供新的思路和方法(Pashley 等 2006)。Decroocq 等(2003)分别检测了杏(*Prunus armeniaca*)和葡萄(*Vitis vinifera*)的 EST-SSR 引物各自在蔷薇科和葡萄科内的转移性,分析结果发现亲缘关系越近,扩增条带质量就越好,多态性也越高。此外,葡萄 EST-SSR 引物在葡萄科内不同种属间的转移效率都较高,而杏 EST-SSR 引物的转移性仅适合于李亚属内近缘种。Vendramin 等(2007)从桃(*P. persica*)的中果皮 cDNA 文库序列中开发了 21 对 EST-SSR 引物,其中 18 对引物在 22 个桃基因型中均能有效扩增出条带,同时还发现这 18 对引物在李属(*Prunus*)的 6 个其它植物中均能扩增出预期条带,说明 EST-SSR 在李属近缘种植物之间具有高效的通用性。胥猛和李火根(2008)用 66 对表现多态的北美鹅掌楸(*Liriodendron tulipifera*) EST-SSR 引物,85% 在中国鹅掌楸(*Liriodendron chinense*)中有扩增,54% 在玉兰(*Magnolia denudata*)中有扩增,表明北美鹅掌楸 EST-SSR 引物在中国鹅掌楸以及玉兰物种之间具有较高的通用性。EST-SSR 标记在种内或种间的高通用性在棉花(Saha 等 2003)、松树(Liewlaksaneeyanawin 等 2004)、云杉(Rungis 等 2004)、咖啡树(Poncet 等 2006)、桉树(Yasodha 等 2008)、柑橘(Luro 等 2008)和橡胶树(Feng 等 2009)

等物种中也得到了证实。

EST-SSR在物种间的转移成功率与物种之间的亲缘远近有关,除了在近缘植物种间有较高的转移率以外,也有学者报道EST-SSR可在植物不同属间转移。杨彦伶等(2008)用杨树(*Populus*)的48对基因组SSR引物及48对EST-SSR引物对6个苏柳(*Salix*)品种进行了通用性分析的结果表明,杨树EST-SSR引物在柳树中的通用性达54.2%,而基因组SSR的通用性仅有10.4%。可见,杨树EST-SSR标记完全可以用于柳树群体或品种间的群传多样性分析,而且杨树EST-SSR对柳树的通用性明显高于基因组SSR。Feng等(2009)从橡胶树(*Hevea brasiliensis*)EST序列开发的EST-SSR引物中,随机挑选30对引物进行木薯(*Manihot utilissima*)、蓖麻(*Ricinus communis*)和余甘子(*Phyllanthus emblica*)等3种植物的属间转移扩增的成功率为73.3%,说明橡胶树EST-SSR完全可通用于木薯等3种属间植物。Gasic等(2009)研究苹果(*Malus × domestica*)的68对EST-SSR引物在蔷薇科中3个属14种植物中可转移性的结果表明,在所检测的14种植物中,扩增成功率在25%~59%之间,在属的水平上,对草莓的扩增转移率最高,可达49%。以上研究表明,EST-SSR在近缘或远缘物种之间均有较好的通用性,因此可以认为EST-SSR将在植物基因组比较作图、种质亲缘关系鉴定以及分子系统发育与进化中有巨大的应用潜力。

EST-SSR在物种间有高通用性,因此,在比较作图中表现出显著的优势。基因组比较作图是对相关物种通过共同的遗传标记进行物理或遗传作图,并分析这些标记在不同物种基因组中的分布特征,揭示不同物种基因组间的同源性和差异性,从而更好地了解不同物种的基因组结构和基因组进化历程(覃瑞等2004)。Chen等(2008)用甜橙(*Citrus sinensis*)和枳橙(*Poncirus trifoliata*)的杂交F1代,分离出141个具有多态性的甜橙EST-SSR标记,分别构建了甜橙775.8 cM和枳橙425.7 cM的遗传图谱。分析和比较这两张遗传图谱的结果显示,两个物种图谱中相应的连锁群之间有明显的共线性,为进一步研究甜橙近缘物种的比较作图奠定了基础。

2.3 种群遗传多样性的评价和种质资源的鉴定 遗传多样性是种群遗传结构特性的重要组成部分,是生态系统多样性和物种多样性的基础,也是物种对

环境适应性的体现,进行遗传多样性评价对有效保护、开发和利用种质资源都有极其重要的意义(朱振东和贾继增2003)。然而对于自然生态环境分布的野生植物,尤其是高大木本植物,其遗传背景往往是高度杂合,以往一般多采用RAPD、AFLP和ISSR等显性标记,但不能有效区分杂合体,从而直接影响了种群遗传多样性的准确评价(Ellis和Burke 2007)。基因组SSR虽然是共显性标记,但因其开发成本高而导致其应用受到很大限制。由于EST-SSR在物种间具有高通用性,通常又代表着某种基因功能,还可反映出转录区的差异,因此用EST-SSR分析种群遗传多样性时,有可能将某些外在形态性状、生理生化特征甚至某个特定的环境适应型与EST-SSR标记直接联系(Pashley等2006)。

Xu等(2004)在用21个EST-SSR和8个基因组SSR分析中国杏树和地中海杏树的系统发育中,共检测到112个多态位点,其中28个位点是中国杏树特有的,经聚类分析后,36份杏树划分为2个亚类,其中中国杏树和1个未知起源的品种聚为一个群,而其余起源于地中海的杏树则聚为另一个群。这说明中国杏树的进化历程有别于地中海杏树。Xie等(2006)采用基因组SSR和EST-SSR各8对分析了中国扁桃栽培品种(23个)、国际扁桃栽培品种(15个)、桃和杏的杂交种(2个)以及桃品种(3个)的遗传多样性的结果表明,EST-SSR平均每对引物扩增出7.8个等位基因,每个位点的观测杂合度(H_o)为0.678,略高于基因组SSR的扩增。聚类分析表明,中国品种和国际品种分别聚成单独的两个群,而桃和杏的杂交种与桃品种共同聚成第三个群,表明EST-SSR标记是分析植物亲缘关系的有效方法。刘振等(2008)采用31对EST-SSR引物分析60份西南茶区茶树遗传多样性和亲缘关系的结果显示,31对引物共检测到等位位点137个,遗传多态性信息含量(PIC)在0.09~0.85之间,观测杂合度(H_o)在0.07~0.94之间,说明西南茶区茶树资源的遗传多样性非常丰富,从而为茶树育种材料的选择、遗传起源鉴定和核心种质的分子验证等提供了新的功能标记和更科学的分析手段。

随着EST-SSR标记的不断开发、发展和应用,植物种质资源和品种鉴定的方法不断更新。金基强等(2007)采用EST-SSR分子标记技术对42个茶树进行品种资源分析,结果显示13对引物可扩增出

预期条带, 其中10对引物具有多态性, 平均PIC值为0.730, 共检测到84种等位基因型和74个等位变异, 并将42个茶树品种划分为3个亚类, 表明EST-SSR标记是分析茶树资源和品种鉴定的有效方法。Bassil和Postman(2009)采用梨属的10个EST-SSR对81个西洋梨(*Pyrus communis*)、13个沙梨(*P. pyrifolia*)和20个山梨(*P. ussuriensis*)进行品种鉴定, UPGMA聚类分析表明, 这114份梨属材料分为2个大类群, 其中81个西洋梨聚为欧洲梨大类群, 13个沙梨聚成小组再和20个山梨聚为亚洲梨大类群。聚类的结果与梨树来源共同的祖先、地理起源或成熟时间的事实相一致。说明高通用性的EST-SSR非常适合于分析梨树种质资源、鉴定品种以及寻找梨树嫁接失败的缘由。

3 结语

迄今, 木本植物EST-SSR的开发尚处于起始阶段, 其应用范围仍有限, 而且还存在一些不足: (1) EST-SSR标记与基因组SSR标记相比, 多态性较低, 对于基因型高度相似的辨别不如后者(Varshney等2005); (2) EST-SSR标记的开发只能限于那些已知具有大量高质量EST序列的物种(Varshney等2005); (3) EST-SSR预测软件以及引物设计软件存在一定的局限性, 因而也影响了EST-SSR标记的准确性(王艳敏等2008; Riju等2009)。

截止2009年10月2日, 美国国立生物技术信息中心(NCBI)的dbEST公共数据库中已有63 044 586条EST, 其中木本植物, 主要集中在松树(*Pinus*)、杨树(*Populus*)、橡胶(*Hevea*)、柑橘(*Citrus*)、桉树(*Eucalyptus*)、苹果(*Malus*)、杉树(*Picea*)、李树(*Prunus*)和梨树(*Pyrus*)等植物上。如此量大而丰富的EST序列, 不仅可以发现、分离新基因, 也可制备DNA芯片用于基因表达和比较基因组的研究, 而且还可开发分子标记(尤其是EST-SSR)用于遗传连锁图谱构建、基因定位等研究。木本植物EST-SSR研究起步较晚, 但进展相当迅速。有理由相信, 随着植物基因组学与功能基因组学的不断发展和研究的深入, 以及生物信息学的逐渐完善, 高通用性的EST-SSR必将在构建植物功能基因图谱、开展基因定位与克隆、研究比较基因组学、分析种质资源与鉴定品种、揭示植物基因型的环境适应性等问题中发挥更大和更多的作用。

参考文献

- 金基强, 崔海瑞, 龚晓春, 陈文岳, 忻雅(2007). 用EST-SSR标记对茶树种质资源的研究. 遗传, 29 (1): 103~108
- 李卫国, 常天俊, 龚红梅(2008). EST-SSR及其在植物基因组学中的应用. 生物技术, 4: 90~93
- 林元震, 郭海, 刘纯鑫, 黄少伟, 陈晓阳(2009). 火炬松热胁迫cDNA文库的EST-SSR预测. 华南农业大学学报, 30 (3): 41~44
- 刘振, 王新超, 赵丽萍, 姚明哲, 王平盛, 许玫, 唐一春, 陈亮(2008). 基于EST-SSR的西南茶区茶树资源遗传多样性和亲缘关系分析. 分子植物育种, 6 (1): 100~110
- 覃瑞, 宋发军, 宋运淳(2004). 植物基因组比较作图研究进展. 细胞生物学杂志, 26 (2): 157~161
- 王艳敏, 魏志刚, 杨传平(2008). 白桦EST-SSR信息分析与标记的开发. 林业科学, 44 (2): 78~64
- 胥猛, 李火根(2008). 鹅掌楸EST-SSR引物开发及通用性分析. 分子植物育种, 6 (3): 615~618
- 杨彦伶, 张亚东, 张新叶(2008). 杨树SSR标记在柳树中的通用性分析. 分子植物育种, 6 (6): 1134~1138
- 姚利华, 滕元文(2008). EST-SSR标记及其在果树研究中的应用. 果树学报, 25 (2): 219~222
- 朱振东, 贾继增(2003). 小麦SSR标记的发展及应用. 遗传, 25 (3): 355~360
- Akkaya M, Bhagwata A, Cregan B (1992). Length polymorphisms of simple repeat DNA in soybean. Genetics, 132: 1131~1139
- Bassil N, Postman JD (2009). Identification of European and Asian pears using EST-SSRs from *Pyrus*. Genet Resour Crop Ev, DOI 10.1007/s10722-009-9474-7
- Chen C, Zhou P, Choi YA, Huang S, Gmitter FG (2006). Mining and characterizing microsatellites from *Citrus* ESTs. Theor Appl Genet, 112: 1248~1257
- Chen CX, Bowman KD, Choi YA, Dang PM, Rao MN, Huang S, Soneji JR, McCollum TG, Gmitter FG (2008). EST-SSR genetic maps for *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. Tree Gen Genom, 4 (1): 1~10
- Decroocq V, Fave MG, Hagen L, Bordenave L, Decroocq S (2003). Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. Theor Appl Genet, 106: 912~922
- Ellis JR, Burke JM (2007). EST-SSRs as a resource for population genetic analyses. Heredity, 99: 125~132
- Feng SP, Li WG, Huang HS, Wang Y, Wu YT (2009). Development, characterization and cross-species/genera transferability of EST-SSR markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). Mol Breed, 23: 85~97
- Fraser LG, Harvey CF, Crowhurst RN, DeSilva HN (2004). EST-derived microsatellites from *Actinidia* species and their potential for mapping. Theor Appl Genet, 108: 1010~1016
- Gasic K, Han YP, Kertbundit S, Shulaev V, Iezzoni AF, Stover EW, Bell RL, Wisniewski ME, Korban SS (2009). Characteristics and transferability of new apple EST-derived SSRs to other *Rosaceae* species. Mol Breed, 23 (3): 397~411
- Guo WZ, Cai CP, Wang CB, Han ZG, Song XL, Wang K, Niu XW, Wang C, Lu KY, Shi B et al (2007). A microsatellite-based,

- gene-rich linkage map reveals genome structure, function and evolution in *Cossypium*. *Genetics*, 176: 527~541
- Han ZG, Guo WZ, Song XL, Zhang TZ (2004). Genetic mapping of EST-derived microsatellites from the diploid *Gossypium arboreum* in allotetraploid cotton. *Mol Gen Genom*, 272: 308~327
- Han ZG, Wang CB, Song XL, Guo WZ, Gou JY, Li CH, Chen XY, Zhang TZ (2006). Characteristics, development and mapping of *Gossypium hirsutum* derived EST-SSRs in allotetraploid cotton. *Theor Appl Genet*, 112: 430~439
- Liewlaksaneeyanawin C, Ritland CE, El-Kassaby YA, Ritland K (2004). Single-copy, species-transferable microsatellite markers developed from loblolly pine ESTs. *Theor Appl Genet*, 109: 361~369
- Luro FL, Costantino G, Terol J, Argout X, Allario T, Wincker P, Talon M, Ollitrault P, Morillon R (2008). Transferability of the EST-SSRs developed on *Nules clementine* (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other *Citrus* species and their effectiveness for genetic mapping. *BMC Genomics*, 9: 287
- Pashley CH, Ellis JR, McCauley DE, Burke JM (2006). EST databases as a source for molecular markers: lessons from *Helianthus*. *J Hered*, 97: 381~388
- Poncet V, Rondeau M, Tranchant C (2006). SSR mining in coffee tree EST databases: potential use of EST-SSRs as markers for the *Coffea* genus. *Mol Gen Genom*, 276: 436~449
- Riju A, Rajesh MK, Sherin PT, Chandrasekar A, Apshara SE, Arunachalam V (2009). Mining of expressed sequence tag libraries of cacao for microsatellite markers using five computational tools. *J Genet*, 88 (2): 217~225
- Roder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P, Ganal MW (1998). A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 149: 2007~2023
- Rungis D, Berube Y, Zhang J, Ralph S, Ritland CE, Ellis BE, Douglas C, Bohlmann J, Ritland K (2003). Robust simple sequence repeat markers for spruce (*Picea* spp.) from expressed sequence tags. *Theor Appl Genet*, 109: 1283~1294
- Saha S, Karaca M, Jenkins JN, Zipf AE, Reddy OU, Kantety RV (2003). Simple sequence repeats as useful resources to study transcribed genes of cotton. *Euphytica*, 130: 355~364
- Schlotterer C (2004). The evolution of molecular markers- just a matter of fashion. *Nat Rev Genet*, 5: 63~69
- Silfverberg-Dilworth E, Matasci CL, Van de Weg WE, Van Kaauwen MPW, Walser M, Kodde LP, Soglio V, Gianfranceschi L, Durel CE, Costa F et al (2006). Microsatellite markers spanning the apple (*Malus×domestica* Borkh.) genome. *Tree Gen Genom*, 2: 202~224
- Varshney RK, Graner A, Sorrells ME (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotech*, 23 (1): 48~55
- Vendramin E, Dettori MT, Giovinnazzi J, Quarta R, Verde I (2007). A set of EST-SSRs isolated from peach fruit transcriptome and their transportability across *Prunus* species. *Mol Ecol Notes*, 7 (2): 307~310
- Xie H, Sui Y, Chang FQ, Ma RC (2006). SSR allelic variation in almond (*Prunus dulcis* Mill.). *Theor Appl Genet*, 112: 366~372
- Xu Y, Ma RC, Xie H, Liu JT, Cao MQ (2004). Development of SSR markers for the phylogenetic analysis of almond trees from China and the Mediterranean region. *Genome*, 47 (6): 1091~1104
- Yasodha R, Sumathi R, Chezian P, Kavitha S, Ghosh M (2008). *Eucalyptus* microsatellites mined *in silico*: survey and evaluation. *J Genet*, 87 (1): 21~25