

濒危植物华木莲核基因组微卫星引物开发研究*

熊敏¹, 王静¹, 张志荣³, 张志勇^{1,2**}

(1 江西农业大学 亚热带生物多样性实验室, 江西 南昌 330045; 2 中国科学院植物研究所系统与进化植物学国家重点实验室, 北京 100093; 3 中国科学院昆明植物研究所, 中国西南野生生物种质资源库, 云南 昆明 650201)

摘要: 华木莲 (*Sinomanglietia glauca*) 是在江西宜春和湖南永顺发现的一种珍稀植物。为进一步探讨华木莲群体遗传学特征, 本研究采用 FIASCO 法 (fast isolation by AFLP sequences containing repeats) 开发了七对华木莲微卫星引物, 选取华木莲 4 个野生居群 16 个样品对每个位点进行多态性初步检测。结果发现, 七个微卫星位点的等位基因数目 (N_A) 为 2~7 个, 观测杂合度 (H_O) 0.079~0.989, 期望杂合度 (H_E) 0.187~0.600。另外, 使用九个华木莲近缘种对七对引物进行通用性检测, 发现这些引物在醉香含笑中通用性最低 (28.5%), 在观光木中通用性最高 (85.7%)。本文开发的多态性微卫星标记将用于华木莲的繁育系统、群体遗传学等研究, 同时也将用于木兰科其它近缘种的群体遗传学研究。

关键词: 华木莲; 微卫星; 分子标记; 通用性

中图分类号: Q 78

文献标识码: A

文章编号: 2095-0845(2011)05-535-05

The Development of Nuclear Microsatellite Markers for an Endangered Plant, *Sinomanglietia glauca* (Magnoliaceae)

XIONG Min¹, WANG Jing¹, ZHANG Zhi-Rong³, ZHANG Zhi-Yong^{1,2**}

(1 Laboratory of Subtropical Biodiversity, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2 Key State Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China;

3 China Germplasm Bank of Wild Species/Key Laboratory of Biodiversity and Biogeography, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China)

Abstract: *Sinomanglietia glauca* is an endangered species found in Yichun of Jiangxi Province and Yongshun of Hunan Province. To further explore its population genetic characteristics, we developed seven microsatellite markers from *S. glauca* using a FIASCO (fast isolation by AFLP sequences containing repeats) method. The number of alleles (N_A) ranged from two to seven in 16 samples of four wild populations. The ranges of observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities were 0.079–0.989 and 0.187–0.600, respectively. The transferability of the seven microsatellite loci was tested upon nine related species of *S. glauca* within Magnoliaceae. Among which, two (28.5%, *Michelia macclurei*) to six (85.7%, *Tsoongiodendron odorum*) loci were successfully amplified. These polymorphic microsatellite markers could be used to decipher the genetic structure, breeding system and population history of *S. glauca* as well as other relatives within Magnoliaceae.

Key words: *Sinomanglietia glauca*; Microsatellite; Molecular marker; Transferability

微卫星 DNA (microsatellite DNA) 是一类由少数几个核苷酸 (1~6 个) 组成的串联重复序列, 在真核生物核基因组中广泛分布。由于其具有多态性高、共显性、重复性好、易于分析等突

* 基金项目: 江西省自然科学基金项目 (2009GZ0016); 系统与进化植物学国家重点实验室开放课题; 国家自然科学基金 (30760016)

** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: pinus-rubus@163.com

收稿日期: 2011-01-07, 2011-03-03 接受发表

作者简介: 熊敏 (1987-) 女, 硕士生, 主要从事保护遗传学研究。E-mail: xmin_87@163.com

出特点(邹喻萃等, 2001), 自发现以后, 很快成为一种极具价值的遗传标记(Weber和May, 1989), 广泛应用于居群遗传分析、濒危植物的保育遗传与管理(Kettle等, 2008)、数量性状QTL定位、分子辅助育种等研究领域(Lian等, 2003)。但基于PCR和电泳检测的微卫星标记需要预先知道微卫星位点两侧的DNA序列, 用于设计PCR引物, 这一缺点使得微卫星标记的应用受到限制。近年来, 随着微卫星位点分离技术的不断改善, 尤其FIASCO法(fast isolation by AFLP sequences containing repeats)的引入, 通过构建微卫星文库和克隆测序获得微卫星两侧序列变得越来越容易, 微卫星标记得以在大批物种中开发出来(Zane等, 2002)。

华木莲(*Sinomanglietia glauca* Z. X. Yu et Q. Y. Zheng)是俞志雄等(1994), 发表的木兰科单种属植物, 具有重大的研究价值和极高的利用价值, 被国内外植物学者广泛关注。吴征镒等(2004), 在《中国被子植物科属综论》中专门提及该植物在木兰科系统演化中的重要地位。华木莲最初仅在江西宜春明月山发现, 种群数量非常有限, 1999年被列为我国一级保护植物(国家林业局和农业部令, 1999)。2003年, 我国林业工作者在湖南永顺县武陵山调查时发现较大面积的华木莲(侯伯鑫等, 2006)。即使如此, 华木莲的分布区仍然十分狭窄。

华木莲发表以后, 俞志雄等对其进行了深入研究, 研究内容涉及细胞学、解剖学、生态学、群体遗传学、胚胎学等方面(肖德兴和张津平, 1998; 俞志雄和李志强, 1999; 俞志雄等, 1999; 郭起荣等, 2003; 肖德兴和俞志雄, 2004; 裘利洪等, 2004), 这些研究为华木莲的保护和合理利用提供了重要的理论基础。遗传多样性是物种长期生存和进化的基础, 华木莲的遗传多样性和

遗传结构也同样受到多位学者的关注。林新春等(2003)和廖文芳等(2004)利用遗传标记RAPD和ISSR对华木莲宜春居群的遗传多样性和遗传结构进行了初步研究, 发现宜春华木莲遗传多样性较低。Zhang等(2009)也利用叶绿体PCR-SSCP标记对江西宜春和湖南永顺两个地区的居群进行了研究, 结果表明湖南和江西的群体是两个完全不同的进化显著单元(Evolutionarily Significant Units, ESUs)。这些研究为华木莲遗传多样性和进化潜力的保护提供了重要的理论基础。但是, 三个研究团队采用的分子标记都存在一些问题, 如RAPD和ISSR都为显性标记且重复性不高, 而叶绿体PCR-SSCP进化速率较低, 不能揭示群体内的遗传变异。为了进一步揭示华木莲可能存在的遗传学风险, 如近交和近交衰退、生境片段化造成的低水平基因流等, 需要采用共显性的、变异量较大的分子标记(如微卫星标记, SSR)。本研究采用了FIASCO(fast isolation by AFLP sequences containing repeats)法筛选华木莲微卫星引物, 为探讨上述问题提供一套有效的分子标记。

1 材料与方法

1.1 材料

研究材料采自4个野生华木莲群体(表1), 每个居群选4个个体, 共16个个体。所有样品采集后用硅胶迅速干燥, 带回实验室, 保存于-20℃冰箱内备用。通用性检测选取9个华木莲近缘种(表2), 材料均取自江西农业大学校园。所有样品凭证标本均保存于江西农业大学亚热带生物多样性实验室。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA的提取 总DNA从硅胶干燥的叶片中提取, 采用CTAB法(Doyle和Doyle, 1987)并略加改进。

1.2.2 酶切并与Mse I接头连接 用内切酶Mse I酶切基因组DNA, 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 切下200~800 bp

表1 华木莲四个野生居群的地理分布和取样数量

Table 1 Geographic location and sample size of four wild populations of *Sinomanglietia glauca*

代号 Code	采集地点 Location	样品数 Number	纬度 Latitude (N)	经度 Longitude (E)	海拔 Altitude /m
YP	湖南省永顺县朗溪乡云盘村大汗溶深湾	4	28°57.121'	110°17.398'	674
XX	湖南省永顺县小溪乡鲁家组柴里	4	28°52.051'	110°15.473'	660
MP	江西省宜春市洪江乡洪江村木梓组曲尺河	4	27°35.654'	114°21.059'	718
YJ	江西省宜春市玉金山	4	27°34.367'	114°19.276'	720

大小的片段。酶切后的产物连接, PCR 仪内 37℃, 2 h 或 21℃ 过夜连接, 65℃ 失活 10 min。

1.2.3 连接产物预扩增 用连有接头的 DNA 片段作为模板, *MseI*-N primer 作为引物, 进行 PCR 扩增 (BIO-ER), 反应程序为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 1 min; 53℃ 1 min; 72℃ 1 min; 14 个循环; 72℃ 7 min, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 探针杂交与磁珠富集微卫星序列 上述扩增产物 3 份分别与 (AG)₁₅/(AC)₁₅/(AAG)₁₂ 生物素探针进行杂交。杂交过程中平衡磁珠。在杂交产物中加入处理好的磁珠 (Promega) 温育, 然后用磁力柱 (Promega) 吸附, 多次洗涤后, 加入 50 μL TE 溶液在 95℃ 水浴中洗脱磁珠两次, 留上清液 (里面含有所需 DNA)。沉降 DNA, 用 *MseI*-N 引物进行扩增, 扩增产物使用 UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒 (上海生工) 纯化。

1.2.5 克隆测序 将纯化产物连接到 pGEN-T 载体 (Promega) 上转入到大肠杆菌感受态细胞 (Tiangen) 中。挑取阳性克隆进行测序分析。DNA 序列用 SSRHunter 软件对其进行搜索 (Li 和 Wan, 2005), 筛选出含微卫星的序列。然后用 Oligo 6.0 软件在微卫星两翼设计引物。

1.2.6 检测所设计的引物并对反应条件进行优化 从 4 个野生华木莲群体中每个居群随机选取 4 个个体, 对设计出的引物进行扩增, PCR 反应体系为 20 μL: 2×PCR Mix (Tiangen) 10 μL, primer R & F (5 μmol · L⁻¹) 1 μL, 总 DNA (20 ng) 1 μL, 加水至 20 μL。反应程序: 94℃ 5 min; 94℃ 40 s; 54~67℃ 40 s; 72℃ 50 s, 35 个循环; 72℃ 10 min。PCR 扩增产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

1.2.7 引物通用性检测 以华木莲的 9 个近缘种 (表 2) 为实验材料对筛选出来的 SSR 引物进行 PCR 扩增, 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测扩增产物。

1.3 数据分析

采用 GenALEX V.6.3 软件 (Peakall 和 Smouse, 2006) 计算每个位点的等位基因数目 (N_A)、观测杂合度 (H_O)、期望杂合度 (H_E)。利用 GENEPOP V.3.4 软件 (Raymond 和 Rousset, 1995) 来计算 28 个居群-位点组合是否偏离哈迪温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) 以及每个位点对是否连锁不平衡 (Linkage disequilibrium, LD), 用序列化的 Bonferroni (Sequential bonferroni correction) 校正显著性水平 (Rice, 1989)。

2 结果及分析

本次实验从富集微卫星文库中挑选了 187 个阳性克隆 (白色菌斑) 进行测序, 得到了 104 (55.6%) 条含有非同源微卫星序列。其中 86 条序列可以用来设计引物, 另外 18 条序列由于重复

序列前后的序列太短, 不能用来设计引物。选择 58 个重复序列重复次数多的位点进行引物合成, 并进一步检测其扩增结果。最终筛选出 7 对多态性较高的引物。7 对微卫星引物在 16 个个体中共检测到 28 个等位基因, 每个位点的等位基因数目 (N_A) 为 2~7 个, 平均 4 个; 观测杂合度 (H_O) 为 0.079~0.989, 平均 0.515, 期望杂合度 (H_E) 为 0.187~0.600, 平均 0.408 (表 3)。哈迪温伯格平衡 (HWE) 检测显示在 28 个居群-位点组合中有 12 个偏离 HWE ($P<0.05$)。在整个居群水平上对每个微卫星位点对进行连锁不平衡 (LD) 检测结果表明, 21 个位点对中有 14 对是显著不平衡的 ($P<0.05$)。但是经过 Bonferroni 校正后, 0.05 的显著度被校正到 0.0024, 21 个位点对中只有 9 对为显著不平衡 (SSR1 和 SSR65, SSR1 和 SSR74, SSR1 和 SSR215, SSR65 和 SSR215, SSR74 和 SSR215, SSR1 和 L78, SSR65 和 L78, SSR74 和 L78, SSR215 和 L78)。

我们用 9 个华木莲近缘种对开发出来的 7 对华木莲微卫星引物进行通用性检测。结果表明, 这 7 对引物在醉含笑中通用性最低 (2 对, 28.5%), 在观光木中通用性最高 (6 对, 85.7%) (表 2), 在其它物种中能扩增的引物为 3~5 对。

3 讨论

微卫星具有多态性高、共显性、重复性好、易于分析等突出特点, 被认为是群体遗传学研究的理想标记 (邹喻苹等, 2001)。随着越来越多的微卫星标记问世, 微卫星标记技术已经在各研究领域得到广泛应用。传统的基因组文库法得到微卫星阳性克隆的比率很低 (2%~3%)。FIASCO 法是一种高效、省时省力、成本较低微卫星标记开发方法, 这种方法一经公布便得到广泛应用。目前, 木兰科中已有少数植物采用 FIASCO 开发微卫星引物, 如星花木兰 (*Magnolia stellata*, Setsuko 等, 2005)、鹅掌楸 (*Liriodendron chinense*, Yao 等, 2008)、显脉含笑 (*Michelia coriacea*, Zhao 等, 2009)、巴东木莲 (*Manglietia patungensis*, 邢冲等, 2010)、深山含笑 (*Michelia maudiae*, Sun 等, 2010) 等。本研究以高效的 FIASCO 法从濒危植物华木莲中筛选出 7 对重复性好、多态性高的微卫星引物, 为这一濒

表2 华木莲7对微卫星引物在近缘种中的通用性检测结果

Table 2 Cross-species amplification using seven microsatellite primer pairs developed for *Sinomanglietia glauca*

种名 Species	引物 Primer						
	SSR1	SSR65	SSR74	SSR215	L76	L78	L82
白玉兰 <i>Magnolia denudata</i>	-	-	-	-	+	+	+
天女花 <i>Magnolia sieboldii</i>	+	+	+	-	+	-	+
巴东木莲 <i>Manglietia patungensis</i>	-	+	+	-	+	+	-
乳源木莲 <i>Manglietia yuyuanensis</i>	-	+	+	-	+	-	-
含笑 <i>Michelia figo</i>	+	+	-	+	+	-	+
醉香含笑 <i>Michelia macclurei</i>	-	-	-	-	+	-	+
鹅掌楸 <i>Liriodendron chinense</i>	+	+	-	-	-	+	+
观光木 <i>Tsoongiodendron odorum</i>	+	+	-	+	+	+	+
乐东拟单性木兰 <i>Parakmeria lotungensis</i>	+	+	-	-	+	-	+

‘+’表示在目的区域有扩增，‘-’表示没有扩增

‘+’ denotes amplification of a band in the expected size and ‘-’ denotes no amplification

表3 开发出的7对华木莲微卫星引物

Table 3 Characteristics of seven microsatellite loci developed for *Sinomanglietia glauca*

位点 Locus	重复单元 Repeat motif	引物 (5'-3') Primer Sequence (5'-3')	Ta/°C	片段长度 Size range/bp	等位基因数 N_A	期望杂合度 H_E	观测杂合度 H_O
SSR1	(AC)18	F: CCCGATTTGAACAACATTGA R: AAAGTTGCGATTTTGGGAGA	59	181	5	0.600	0.989
SSR65	(GT)11	F: TTCTATTTGAGGGCATTGG R: TGGGCTTATTACAATCATTTTATCC	62	133	4	0.299	0.212
SSR74	(AC)18	F: CTTCGAAACCCTTCAACGAA R: AAAGTTGCGATTTTGGGAGA	62	142	6	0.596	0.989
SSR215	(CT)15	F: TCAAGAGAGGGATGCCCTAA R: ATCGGCAAAGTGCATAGAG	67	257	7	0.457	0.233
L76	(AG)11	F: CCTTAAACCACCTCATTCCC R: TTGAAATGGGTTGTGTAGCC	64	181	2	0.187	0.079
L78	(AG)13	F: GAGTAAGAAATGAAGACGCTCG R: AGTAACAAGCCAATCAGGAGG	66.5	282	2	0.223	0.222
L82	(CT)21	F: CTGAGTAACTTAAGCGGTCTTCAC R: GTCCTGAGTAAGGTGGGCTT	54	241	2	0.491	0.881

危物种的群体遗传学研究奠定了坚实的基础。

通用性检测结果表明，华木莲7对微卫星引物在近缘种中扩增效率较低，一般为3~5对，最低只有2对(28.5%，醉香含笑)，最高也才6对(85.7%，观光木)。Isagi等(1999)对日本厚朴(*Magnolia obovata*)进行微卫星引物开发，11对微卫星引物在同属种星花木兰(*Magnolia stellata*)、皱叶玉兰(*Magnolia praecocissima*)、日本毛木兰(*Magnolia salicifolia*)中全部都有扩增，通用性较低的也有6对(54.5%，荷花玉兰 *Magnolia grandiflora*)。总体上高于华木莲微卫星引物在近缘种中的通用性。微卫星跨越物种的通用程度与种间亲缘关系有关(邹喻苹等, 2001)。华木莲形态特殊，其落叶的特性以及聚合果沿果轴蒴

果状开裂等特征明显区别于近缘的木莲属，最初以单种属的形式发表(俞志雄等, 1994)。虽然其属级地位尚存在一些争论(郑庆衍, 1996)，但华木莲是木兰科中一个较为特殊的分支应该没有疑问(吴征镒等, 2004)。因此，华木莲中开发出来的微卫星引物在木兰科其它物种中通用性较低，可能在一定程度上反映其系统位置的孤立性。

微卫星引物的开发程序比较复杂、工作量大、成本较高。如果一套引物能够在不同物种中应用，显然可以节省很多人力物力。虽然华木莲微卫星引物在近缘种中总体通用性较低，但在一些物种，如观光木中通用性较高，本研究所开发的华木莲微卫星引物对这些近缘种的群体遗传学研究将起到一定推动作用。

致谢 江西农业大学国土资源与环境学院研究生田野, 园林与艺术学院本科生罗意、孟庆霖、胡苑、徐琴在实验方面给予帮助。

〔参 考 文 献〕

- 吴征镒, 路安民, 汤彦承, 2004. 中国被子植物科属综论 [M]. 北京: 科学出版社, 59
- 邹喻苹, 葛颂, 王晓东, 2001. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 科学出版社
- 国家林业局, 农业部令 (第 4 号), 1999. 国家重点保护野生植物名录 (第一批) [R].
- Doyle JJ, Doyle JL, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochemical Bulletin*, **19**: 11—15
- Guo QL (郭起荣), Yu ZX (俞志雄), Shi JM (施建敏), 2003. A physio-ecological study on photosynthesis of *Sinomanglietia glauca* and two species in *Manglietia* BI. [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis* (江西农业大学学报), **25**: 645—651
- Hou BJ (侯伯鑫), Yi H (易宏), Lin F (林峰) *et al.*, 2006. Investigation on resource of *Manglietia deciduas* of Yongshun county in Hunan [J]. *Hunan Forestry Science & Technology* (湖南林业科技), **33**: 7—10
- Isagi Y, Kanazashi T, Suzuki W *et al.*, 1999. Polymorphic microsatellite DNA markers for *Magnolia obovata* Thunb. and their utility in related species [J]. *Molecular Ecology*, **8**: 698
- Kettle CJ, Ennos RA, Jaffré T *et al.*, 2008. Cryptic genetic bottlenecks during restoration of an endangered tropical conifer [J]. *Biological Conservation*, **141**: 1953—1961
- Li Q, Wan JM, 2005. SSRHunter: Development of a local searching software for SSR sites [J]. *Hereditas*, **27**: 808
- Lian C, Oishi R, Miyashita N *et al.*, 2003. Genetic structure and reproduction dynamics of *Salix reini* during primary succession on Mount Fuji, as revealed by nuclear and chloroplast microsatellite analysis [J]. *Molecular Ecology*, **12**: 609—618
- Liao WF (廖文芳), Xia NH (夏念和), Deng YF (邓云飞) *et al.*, 2004. Study on genetic diversity of *Manglietia decidua* (Magnoliaceae) [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **26**: 58—64
- Lin XC (林新春), Yu ZX (俞志雄), Qiu LH (裘利洪) *et al.*, 2003. Studies on genetic diversity of endangered *Sinomanglietia glauca* (Magnoliaceae) [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis* (江西农业大学学报), **25**: 805—810
- Peakall ROD, Smouse PE, 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research [J]. *Molecular Ecology Notes*, **6**: 288—295
- Qiu LH (裘利洪), Yu ZX (俞志雄), Shi JM (施建敏) *et al.*, 2004. Studies on interspecific association of communities with *Sinomanglietia glauca* [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis* (江西农业大学学报), **26**: 25—30
- Raymond M, Rousset F, 1995. GENEPOP (Version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenism [J]. *Journal of Heredity*, **86**: 248
- Rice WR, 1989. Analyzing tables of statistical tests [J]. *Evolution*, **43**: 223—225
- Setsuko S, Ueno S, Tsumura Y *et al.*, 2005. Development of microsatellite markers in *Magnolia stellata* (Magnoliaceae), a threatened Japanese tree [J]. *Conservation Genetics*, **6**: 317—320
- Sun Y, Liu YF, Wang J *et al.*, 2010. Ten polymorphic microsatellite markers in *Michelia maudiae* (Magnoliaceae) [J]. *American Journal of Botany*, **97**: e157
- Weber JL, May PE, 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction [J]. *American Journal of Human Genetics*, **44**: 388
- Xiao DX (肖德兴), Zhang JP (张津平), 1998. Karyotype analysis of *Sinomanglietia glauca* Z. X. Yu *et al.* Zheng [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis* (江西农业大学学报), **20**: 56—59
- Xiao DX (肖德兴), Yu ZX (俞志雄), 2004. Anther development in *Sinomanglietia glauca* (Magnoliaceae) [J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany* (热带亚热带植物学报), **12**: 309—312
- Xing C (邢冲), Yao XH (姚小洪), Huang HW (黄宏文), 2010. Preliminary studies on the isolation of microsatellite loci of *Manglietia patungensis* (Magnoliaceae) [J]. *Journal of Wuhan Botanical Research* (武汉植物学研究), **28**: 76—80
- Yao XH, Zhang JJ, Ye QG *et al.*, 2008. Characterization of 14 novel microsatellite loci in the endangered *Liriodendron chinense* (Magnoliaceae) and cross-species amplification in closely related taxa [J]. *Conservation Genetics*, **9**: 483—485
- Yu ZX (俞志雄), 1994. *Sinomanglietia*—A new genus of Magnoliaceae from China [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis* (江西农业大学学报), **16**: 202—204
- Yu ZX (俞志雄), Li ZQ (李志强), 1999. Comparative anatomy of syncarpous axis of three species in Magnoliaceae [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis* (江西农业大学学报), **21**: 87—90
- Yu ZX (俞志雄), Liao J (廖军), Lin XC (林新春) *et al.*, 1999. Ecological studies on communities of *Sinomanglietia glauca* Z. X. Yu *et al.* Zheng [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis* (江西农业大学学报), **21**: 213—217
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T, 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review [J]. *Molecular Ecology*, **11**: 1—16
- Zhang ZR, Luo LC, Wu D *et al.*, 2009. Two genetically distinct units of *Sinomanglietia glauca* (Magnoliaceae) detected by chloroplast PCR-SSCP [J]. *Journal of Systematics and Evolution*, **47**: 110—114
- Zhao XF, Sun WB, Yang JB *et al.*, 2009. Isolation and characterization of 12 microsatellite loci for *Michelia coriacea* (Magnoliaceae), a critically endangered endemic to Southeast Yunnan, China [J]. *Conservation Genetics*, **10**: 1583—1585
- Zhen QY (郑庆衍), 1996. A new specific name of Magnoliaceae [J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报), **33**: 180—182