

高通量 RNA-seq 技术开发巴旦木目的基因 SSR 标记

刘 景¹, 丁 健^{1*}, 韩 平¹, 王雪萍²

(1. 大连民族大学资源植物研究所, 辽宁 大连 116600; 2. 孙吴县特色产业研究中心, 黑龙江 黑河 164299)

摘要:为了开发适合于木本油料巴旦木目的性状基因 SSR 分子标记, 基于巴旦木叶片高通量 RNA-seq 数据, 共组装得到 41 849 个 unigenes, 其中 22 894 个获得功能注释; 利用 MISA 软件从 4 862 个 unigenes 中挖掘到 5 260 个 SSR 标记, 它们的主要重复基序为单核苷酸(占总 SSR 位点数的 14.30%)、二核苷酸(47.64%)和三核苷酸(31.35%)。二核苷酸重复基序中最多的重复类型是 AG/CT (22.83%), 三核苷酸重复基序中 AAG/CTT 重复类型最多(3.83%); 根据 unigenes 功能注释和 KEGG 途径分析结果, 筛选到 13 个含有 SSR 标记且与油脂合成、脂肪酸合成、种子大小与粒重等相关的目的基因, 并设计 48 个目的基因 SSR 标记引物; 以巴旦木叶片基因组 DNA 为模板验证 SSR 标记引物有效性, 其中 33 对引物可以获得清晰的目的条带。这为巴旦木种质的遗传多样性分析、分子辅助育种和性状关联分析等提供了有效的目的基因 SSR 标记。

关键词: 巴旦木; RNA-seq; 目的基因; SSR; 分子标记

中图分类号: S662.9

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2022)02-0042-06

Development of SSR Markers for Targeted Genes in Badam (*Amygdalus communis* L.) Based on High Throughput RNA-seq Technology

LIU Jing¹, DING Jian^{1*}, HAN Ping¹, WANG Xueping²

(1. Institute of Plant Resources, Dalian Minzu University, Dalian 116600; 2. Sunwu Characteristic Industry Research Center, Heihe 164299, China)

Abstract: To develop SSR markers for targeted genes in Badam (*Amygdalus communis* L.), this study was based on high-throughput RNA-seq data of Badam leaves, and 41,849 unigenes were assembled, of which 22,894 unigenes were annotated. A total of 5,260 SSR sites were detected from 4,862 unigenes by using MISA. The dominant repeat motifs were single nucleotides (14.30% of the total SSR sites), followed by dinucleotides (47.64%) and trinucleotides (31.35%). The most frequent type of dinucleotide repeat motif is AG/CT (22.83%), and AAG/CTT repeat type in the trinucleotide repeat motif is the most (3.83%). According to the unigene annotation and KEGG pathway analysis, 13 functional genes containing SSR markers associated with lipid synthesis, fatty acid synthesis, seed size and grain weight were discovered, 48 pairs of targeted gene SSR primers were designed. The validity of these SSR primers were verified using genomic DNA of Badam leaf, and 33 pairs of primers amplified the clear bands. These SSRs will provide effective targeted gene markers for genetic diversity analysis, molecular-assisted breeding and association analysis of fruit quality traits of Badam germplasm.

Key words: Badam (*Amygdalus communis* L.); RNA-seq; Targeted genes; SSR; Molecular marker

巴旦木(*Amygdalus communis* L.), 学名扁桃, 属蔷薇科(Roseaceae)桃属(*Amygdalus*)落叶乔木或灌

木, 是优良的木本油料和坚果树种^[1-2]。巴旦木果实富含脂肪、蛋白质、维生素和糖类等生物活性成分, 是世界上需求量巨大的坚果食品^[3]。全世界有 40 多个种, 我国主要有 6 个种, 它们主要分布在新疆喀什、阿图什及库尔勒等地区, 栽培面积超过 6 700 hm², 坚果年产量 5 万 t 以上^[1-4]。近年来, 随着不同巴旦木种质的推广种植和坚果消费量的日益增加, 导致市售巴旦木坚果品质良莠不齐, 急需进行种质亲缘关系和多样性分析, 为选育高品质丰产巴旦木种质提供科学依据。

收稿日期: 2019-11-04

基金项目: 大连民族大学创新创业训练计划(201812026342); 中央高校基本科研业务费大连民族大学学科团队项目(0919110127); 大连市科协高校创新联合体项目(大科协发【2019】20号)

作者简介: 刘 景(1997-), 女, 在读硕士, 主要从事植物遗传多样性研究。

通讯作者: 丁 健, 男, 博士, 副教授, E-mail: dingjian@dlnu.edu.cn

简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)标记是串联重复DNA序列,由重复单元中的1~6个核苷酸为重复单位组成^[5-6],具有共显性、位点特异性和稳定性等优点,已广泛用于遗传多样性分析、指纹图谱构建和性状连锁分析^[7],而且已成为加快果树育种进程的重要技术手段^[8-9]。基于转录组高通量测序(RNA-sequence)技术,可以低成本获得大量的 unigenes 和 SSR 数据,为开发植物性状相关目的基因 SSR 标记引物提供了高效方法^[10]。朱海生等^[11]利用 RNA-seq 技术开发了 18 对南瓜多态性 SSR 标记引物;另外,也应用于黑果枸杞、文冠果和红花等木本植物的 SSR 标记开发^[12-14]。虽然中国的巴旦木种质资源丰富,但仍未见利用 RNA-seq 技术开发巴旦木品质性状相关基因 SSR 分子标记方面的报道。本研究利用巴旦木叶片 RNA-seq 数据,开发与油脂合成、脂肪酸合成、种子大小和粒重等目标性状相关基因的 SSR 标记引物,这既为巴旦木种质遗传多样性分析提供有效的 SSR 分子标记,也为性状关联分析和高品质巴旦木种质选育提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

以选自新疆喀什基地的优良巴旦木为样株,采摘无病虫害的幼嫩叶片,一部分装入 RNA-EZ Reagents 组织 RNA 保存液(生工生物工程(上海)股份有限公司,货号 B644171)中,一部分装入有硅胶的自封袋中,运回大连民族大学资源植物研究所,分别用于测序和提取基因组 DNA。

1.2 巴旦木转录组测序及 SSR 分子标记开发

利用干冰储运巴旦木叶片至杭州联川生物技术股份有限公司进行转录组测序。利用 Illumina HiSeq 2000 平台,参照韩平等^[5]方法进行测序质量分析、unigenes 注释和 SSR 标记开发等。

1.3 基因组 DNA 提取

参照天根科技生物公司新型植物基因组 DNA 提取试剂盒(Cat.#DP305-03)说明书提取巴旦木叶片基因组 DNA,1% 琼脂糖凝胶电泳检测质量,使用 NanoDrop 2000 分光光度计检测浓度,然后储存在-20 °C 冰箱中备用。

1.4 PCR 反应体系

引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,以巴旦木叶片基因组 DNA 为模板验证引物有效性。PCR 反应体系为 20 μ L,包括 DNA 模板(20 ng/ μ L)2 μ L, 10 \times Taq buffer 2 μ L, dNTPs 0.4 μ L, 10

μ mol/L 浓度的正反向引物各 1 μ L, Taq DNA 聚合酶(2.5 U/ μ L)0.2 μ L, 灭菌超纯水补充剩余体积。

1.5 PCR 反应程序

PCR 反应程序:首先,94 °C 下预变性 4 min;然后,94 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,35 个循环;最后,72 °C 延伸 10 min 后,4 °C 保存备用。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测是否有目的扩增条带。

2 结果与分析

2.1 巴旦木转录组测序数据分析

巴旦木叶片转录组测序共获得 42 640 306 条 raw reads,Q20(过滤后的测序错误率与碱基数之比 \leq 1%)为 98.75%,GC(过滤后的碱基 G 和 C 数与碱基总数之比)为 46.26%,测序质量较高。利用 Trinity 组装获得 41 849 条 unigenes(>201 bp),N50 为 1 803 bp,分别在 Nr、GO、KEGG、Pfam 和 Swiss-Prot 数据库中注释到 19 107、17 244、9 245、16 016 和 14 272 个 unigenes,为后续目的基因 SSR 标记筛选提供基础数据。

2.2 巴旦木叶片转录 SSR 重复基元类型分析

利用 MISA 软件搜索和挖掘 SSR 标记,在所有组装到的 22 894 个巴旦木 unigenes 中发现了 4 862 个 unigenes 含有 5 260 个 SSR 位点,发生频率为 21.24%(含有 SSR 位点的 unigenes 占总 unigenes 的比值),511 条 unigenes 含有多个 SSR 位点。单核苷酸重复占总重复类型的 14.30%,二核苷酸重复类型占 47.64%,三核苷酸重复类型占 31.35%,四、五和六核苷酸重复类型分别占 1.58%、1.82% 和 3.31%(表 1、图 1)。5 260 个 SSR 位点中包含 360 种重复类型,单核苷酸重复有 3 种,二核苷酸重复有 10 种,三核苷酸重复有 60 种,四到六核苷酸重复共有 287 种。二核苷酸重复类型中的 AG/CT 重复基元最多(1 201 个,占总 SSR 重复的 22.83%),其次

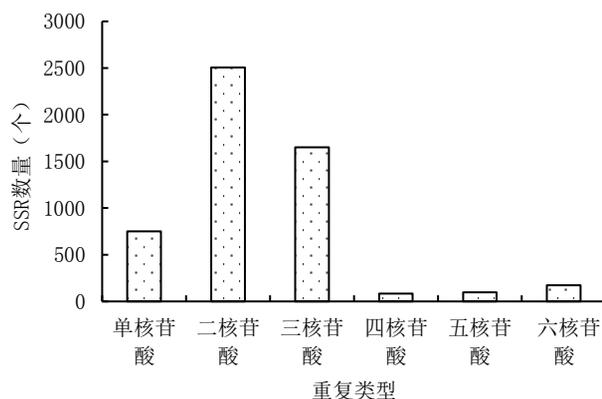


图 1 巴旦木不同类型 SSR 数目统计

表1 巴旦木 SSR 的重复类型、数量及分布频率

重复类型	重复次数										合计	百分比(%)
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	>12		
单核苷酸	-	-	-	-	-	-	-	-	235	517	752	14.30
二核苷酸	-	-	631	405	309	239	188	161	109	464	2 506	47.64
三核苷酸	-	880	401	194	97	26	23	14	6	7	1 649	31.35
四核苷酸	-	53	26	2	2	-	-	-	-	-	83	1.58
五核苷酸	76	15	4	-	-	1	-	-	-	-	96	1.82
六核苷酸	142	25	3	2	1	1	-	-	-	-	174	3.31
合计	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5 260	100.00

是 GA/TC(923 个, 占总 SSR 重复的 17.55%)。二核苷酸重复基元中, AG/CT 和 GA/TC 为主, 占二核苷酸总数的 84.76%。三核苷酸重复类型中 AAG/CTT、

AGA/TCT 和 GAA/TTC 重复基元最多, 分别占三核苷酸总数的 12.37%、10.01% 和 11.70%, 共占总 SSR 重复的 10.68%(表 2)。

表2 巴旦木转录组中 SSR 重复基元类型及频率分布

重复基元类型	重复基元	重复次数	占各类 SSR 重复百分比(%)	占总 SSR 重复的百分比(%)
单核苷酸	A/T	749	99.6	14.24
	AG/CT	1 201	47.9	22.83
二核苷酸	GA/TC	923	36.8	17.54
	AT	111	4.43	2.11
	TA	109	4.35	2.07
	AAG/TTC	204	12.4	3.88
	GAA/TTC	193	11.7	3.67
	AGA/TCT	165	10.0	3.14
三核苷酸	CAG/CTG	106	6.4	2.02
	TCA/TGA	84	5.1	1.60

2.3 巴旦木目的基因 SSR 标记开发

首先, 根据 KEGG 注释结果和相关文献报道^[5-7], 以调控巴旦木油脂和脂肪酸合成、种子大小和粒重等目的性状相关 unigenes 为目的基因, 搜索巴旦木转录组中已注释的 unigenes, 共发现以下目的基因: 与油脂合成相关基因: *WR11* (Wrinkled 1)、*Dof*(DNA binding with one finger)、*TCP* (teosinte branched cycloidea proliferating cell factor)、*GPAT* (glycerol-3-phosphate acyltransferase)、*DGATI* (diacylglycerol O-acyltransferase 1)、*PDAT*(phospholipids: diacylglycerol acyltransferase)、*LPCAT* (lysophosphatidylcholine-acyltransferase)、*LPP*(Lipoma preferred partner)、*GPDI*(glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1); 与脂肪酸合成相关基因: *FATB* (Falmityl-ACP thioesterase B)、*KCS*(3-ketoacyl-CoA

synthase)、*PPT* (palmitoyl-protein-thioesterase)、*IFA38* (immunofluorescence assay 38); 与种子大小和粒重相关基因: *ARF2* (auxinresponse factor 2)、*MYB* (myeloblastosis)、*AP2* (apetala2)、*S6PDH* (sorbitol-6-phosphate dehydrogenase); 与黄酮合成相关基因: *F3'H*(flavonoid 3'-hydroxylase)、*OMT*(O-methyl transferase); 与 VC 合成相关基因: *VTC2*(GDP-D-glucose phosphorylase)、*GLDH*(L-galactono- γ -lactob dehydrogenase)。

根据上述搜索到的巴旦木目的基因序列, 筛选含有 SSR 标记的 unigenes, 然后, 利用 Primer 5 软件设计了 48 对 SSR 引物。以巴旦木叶片基因组 DNA 为模板, 验证这些引物的有效性。扩增结果表明: 33 对引物(表 3)能清晰扩增出目标条带(图 2), 且符合预期扩增片段大小, 有效扩增效率为 68.75%。

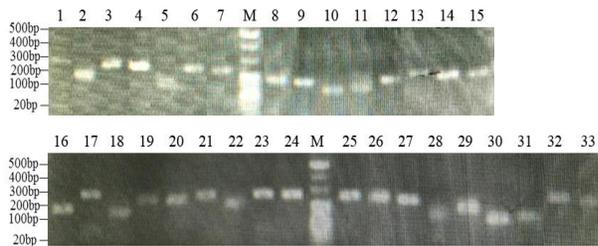
表3 巴旦木目的基因 SSR 标记引物

引物名称	Unigene ID	引物序列(5'-3')	SSR 类型	重复单元	扩增长度(bp)
FATB	TRINITY_DN12788_c3_g3	FP: TGTGCCCATTTGCTTCTGTAG RP: ACGTCTTGTCTTGCCAGTT	c	(TC)11g(CT)8	258
GPAT	TRINITY_DN12022_c1_g2	FP:TTCATTCAACCCACCTAGCC RP:CAGTGGGTGACACAAGGACT	P2	(CT)8	162
DGAT1	TRINITY_DN12242_c2_g1	FP:TCTCGAAATTTCTTGCTCCG RP:AAATCGCCATGAAATGGAAG	P2	(CT)25	246
PDAT1	TRINITY_DN11699_c0_g1	FP:GGCAGAGACAGTGCTCATCA RP:CCATAGGGAGGAAATTGCT	P3	(CAA)5	235
PDAT2	TRINITY_DN12090_c2_g1	FP:GGTGGTTCAAGGAAAAGGT RP:CCTTTCTTGCAGCTGTCCCTC	P3	(GGA)6	134
PDAT3	TRINITY_DN12676_c6_g1	FP:AAAACAAGCAAGCCAAAGGA RP:TAGCCGTTGAATTCTGGGAC	P2	(AG)7	225
LPP	TRINITY_DN2976_c0_g1	FP:CCTGCCACCTTAAAAATCGAA RP:TCAAACCCAGATCTATCGCC	P2	(CT)16	209
LPCAT	TRINITY_DN12442_c2_g2	FP:AACCCACTACTGATTGCGCT RP:ACTTCACACAACCTCGAAGCTC	P2	(GA)18	238
GPD1-2	TRINITY_DN11715_c0_g1	FP:GTGCATGTAAGTGGCTGTGC RP:CACCTTCTGTTTTGCCATT	P3	(GAA)8	205
PPT1	TRINITY_DN12893_c4_g1	FP:TTTTGGCTGGTCTCTCCTTC RP:CGTTGGGATAAGGTTTGTG	P1	(TCT)6	160
PPT2	TRINITY_DN2292_c0_g1	FP:CGATCCTCGACGGACTCTT RP:AAAGTTGCGCTCGATTGTCT	P2	(CT)18	200
IFA38	TRINITY_DN2839_c0_g1	FP:GTTTGGTGCAACGGATTAGG RP:ACGACTGCAGCTCAAGGAAT	P2	(T)12	212
KCS-2	TRINITY_DN1406_c0_g1	FP:TGTCTTTCAACTTTCTTGTCCC RP:CAATCAAACACAACAATATGTCA	P2	(CT)9	249
KCS-3	TRINITY_DN1406_c0_g1	FP:AATCCATGGCTTGAGTGCAT RP:CAGACCAAAAGCCAAAAGGA	P2	(TA)10	216
WRI1	TRINITY_DN12049_c0_g3	FP:ACATGCATTTGCATCTTCCA RP:TTCAGATGGGGAGTTTCAGG	p3	(TCT)6	210
Dof-1	TRINITY_DN10618_c1_g1	FP:GAGCCCTTGTATCCTTGAT RP:GCAGATACAAACCCATATGGTACA	P4	(TTTC)6	193
Dof-2	TRINITY_DN12232_c1_g1	FP:CACCAGCTGAACCCTAGCTC RP:GAAGACATCCGTACCCGCTA	P3	(AAT)7	265
Dof-4	TRINITY_DN12414_c9_g9	FP:TGAAGGTGGCTTGTCTTCA RP:TTGCAGCCAACGAGACTACA	P2	(GT)6	149
TCP-1	TRINITY_DN11943_c3_g1	FP:CAGAGGAGGTGATGGTGGAT RP:GGGTGCCAAAGATTGAAGAA	P3	(CAG)7	218
TCP-2	TRINITY_DN12226_c3_g1	FP:AAGTCATCACCAGCTCCACC RP:AAGCCAGCTTGAATTGAGA	P3	(AGG)7	205
TCP-3	TRINITY_DN13133_c4_g2	FP:TCTCTTTTGCCTCACCACCT RP:CCTTTCCCTTGTGGTCTGAA	P3	(CAC)5	217
F3'H	TRINITY_DN12547_c1_g1	FP:TGGCTGTGCATGAAAAAGTC RP:AAGATTGGGCCATAGGTGTG	P2	(TC)6	146
OMT	TRINITY_DN12743_c4_g2	FP:GACTTTAGTCACATTTTCTTCCCAA RP:AGATCTCAATTCAGCGACC	P1	(T)10	170
VTC2	TRINITY_DN12595_c7_g1	FP:TGGTGGTTCTGCTTCCTCTC RP:CCGCCCTCATCTTTCTGGTAA	P2	(AG)6	266

续表 3

引物名称	Unigene ID	引物序列(5'-3')	SSR类型	重复单元	扩增长度(bp)
GLDH	TRINITY_DN13045_c5_g1	FP:GGAAGGAGGAGCAGAGGAAG RP:AGGGCTGTGTAGCCCAAGTA	P3	(CCA)5	243
ARF-2	TRINITY_DN12366_c3_g4	FP:TTTCATCGAGCCAGTGTACG RP:CCAAAACCCAAAACCCCTTA	P2	(AG)24	185
AP2-1	TRINITY_DN10961_c0_g1	FP:CCACCACTGAAATAATGGGG RP:AGTCTCCGGTAAAACGTCA	P2	(CT)6	242
AP2-3	TRINITY_DN11938_c2_g8	FP:AGCCCAACAACCAAACTTG RP:TCTGATCAAGCCCCATTCTT	P3	(AGC)7	246
AP2-5	TRINITY_DN12049_c0_g3	FP:TAAACCCACCAAGCCTCATC RP:AGCTGCAGATTTCCCAACAG	P3	(TCT)6	248
MYB-2	TRINITY_DN12141_c2_g1	FP: ATGTGACGTCAACAGCAAGC RP:CCCAAAGTGCTGACTTGGTT	P2	(TC)7	235
MYB-3	TRINITY_DN12242_c2_g10	FP:TCGTTTGCACACTCGAAGAC RP:TGCATTAAGGATGCTGTGA	P3	(CAA)8	243
MYB-4	TRINITY_DN12349_c1_g1	FP:AGAAACCATCCTCAAGCTGC RP:CAACTTTTGGAGCTAGCTAATGA	P2	(CT)9	159
S6PDH	TRINITY_DN12117_c2_g3	FP:CACTGCAAATACTCATAACGAGA RP:TGATTGCGTTTAAGATGGCA	P2	(AG)9	199

注: SSR type P1: 单碱基 SSR; P2: 双碱基 SSR; P3: 三碱基 SSR



注: 1.FATB; 2.GPAT; 3.DGAT1; 4.PDAT-1; 5.PDAT-2; 6.PDAT-3; 7.LPCAT; 8.LPP; 9.GPD1-2; 10.PPT-1; 11.PPT-2; 12.IFA38; 13.KCS-2; 14.KCS-3; 15.WRL1; 16.Dof-1; 17.Dof-2; 18.Dof-4; 19.TCP-1; 20.TCP-2; 21.TCP-3; 22.ARF-2; 23.AP2-1; 24.AP2-3; 25.AP2-5; 26.MYB-2; 27.MYB-3; 28.MYB-4; 29.S6PDH; 30.F3'H; 31.OMT; 32.VTC2; 33.GLDH

图2 目的基因 SSR 引物电泳扩增产物

3 讨论

目前,已开发出多种植物分子标记技术,如随机扩增多态性DNA标记(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)、扩增片段长度多态性(Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)、限制性内切酶片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)、简单重复序列标记(Simple Sequence Repeats, SSR)和单核苷酸多态性标记(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)等^[15],这些分子标记中,SSR分子标记是共显性标记,具有多态性丰富、稳定可靠、简单经济等特点,且其条

带简单清晰,方便识别和统计^[16],其广泛分布于真核生物基因组中,可通过同源比对获得转录本差异,在植物遗传多样性分析、分子标记辅助选择育种中具有较高的应用价值,而RNA-seq高通量测序技术是目前高效低成本开发SSR标记的有效方法^[17-20]。安宗燕等^[21]用66对SSR引物区分了57个紫斑牡丹种质遗传关系,张晨等^[22]利用38对SSR引物分析171个新麦草单株种质的遗传多样性,另外在辣椒^[23]、紫苏^[24]、大豆^[25]、甘薯^[26]和红毛丹^[27]中也被广泛应用。

随着转录组测序技术的不断发展,促使许多无参考基因组物种(如巴旦木、牡丹、文冠果、沙棘等)的SSR标记得以开发和利用。在巴旦木转录组数据中,SSR重复以二核苷酸为主,其次为三核苷酸,与杜仲^[28]、皂荚^[29]、蜡梅^[30]的重复规律相一致;而与红豆杉^[31]、杉木^[32]、红松^[33]不同,这与不同物种遗传特性、进化程度、基因突变等因素有关。二核苷酸重复类型以AG/CT占据主导,三核苷酸重复类型最多的是GAA/TTC,这种重复类型的分布规律与杜仲、皂荚、蜡梅一致^[28-30],可见,这2种重复类型在不同植物物种中较保守。

关于巴旦木SSR分子标记方面的研究较少,且可用于遗传性状多样性分析的SSR分子标记非常有限。本研究基于巴旦木转录组数据,首次开发了33个与巴旦木油脂和脂肪酸合成、种子大

小、粒重等性状相关的目的基因SSR分子标记。这为巴旦木种质资源遗传多样性和性状关联分析提供了有效的SSR分子标记,也为巴旦木分子标记辅助育种提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 毛金梅,蒋江照,韩宏伟,等.我国巴旦木抗寒性研究进展[J].防护林科技,2016(9):57-60.
- [2] 毛金梅,王建友,刘凤兰,等.新疆不同品种巴旦木矿质养分含量与其外观品质的相关性分析[J].北方园艺,2015(19):14-18.
- [3] 尤努斯江·吐拉洪,马木提·库尔班,木妮热·依布拉音.巴旦木的营养保健作用研究进展[J].中国食物与营养,2008(10):56-58.
- [4] 刘凤兰,韩宏伟,毛金梅,等.不同品种巴旦木种仁在不同采收期粗脂肪含量及其油脂脂肪酸组成的比较[J].中国油脂,2018,43(6):104-107.
- [5] 韩 平,阮成江,丁 健,等.RNA-seq技术开发紫斑牡丹目的基因SSR标记[J].分子植物育种,2019,17(11):3665-3673.
- [6] McGregor C E, Lambert C A, Greyling M M. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques(RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm[J]. Euphytica,2000,113(2):135-144.
- [7] 丁 健,阮成江,吴茂宏,等.空心李RNA-seq SSR信息分析及分子标记开发[J].分子植物育种,2019,17(8):2579-2586.
- [8] 薛文君,宋 丽,王爱东,等.水稻品种选育中常用的分子标记概述[J].东北农业科学,2017,42(2):22-26.
- [9] Portis E, Nagy I, Sasvari Z, et al. The design of *Capsicum* spp. SSR assays via analysis of in silico DNA sequence, and their potential utility for genetic mapping[J]. Plant Science,2007,172:640-648.
- [10] Lakew B R, Henry J, Eglinton J, et al. SSR analysis of introgression of drought tolerance from the genome of *Hordeum spontaneum* into cultivated barley(*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*) [J]. Euphytica, 2013, 191: 231-243.
- [11] 朱海生,王 彬,叶新如,等.中国南瓜转录组SSR信息分析及其分子标记开发[J].中国细胞生物学学报,2019,41(3):468-475.
- [12] 尹 跃,安 巍,赵建华,等.黑果枸杞转录组SSR信息分析及分子标记开发[J].浙江农林大学学报,2019,36(2):422-428.
- [13] 董 旭,阮成江,刘祯悦,等.高通量RNA-seq技术开发文冠果目的基因SSR标记[J].分子植物育种,2019,17(9):2943-2949.
- [14] 覃 瑞,陈贤军,湛 蔚,等.红花EST-SSR分子标记开发与初步验证[J].西南民族大学学报(自然科学版),2019,45(2):146-154.
- [15] 刘海龙,白冬梅,宁 洽,等.花生吸水膨胀期耐低温性状QTL定位[J].东北农业科学,2019,44(5):5-11,47.
- [16] 马庆华,李京璟,赵天田,等.基于EST-SSR标记的平欧杂种榛品种鉴定[J].植物遗传资源学报,2017,18(5):952-959.
- [17] Der J P, Barker M S, Wickett N J, et al. De novo characterization of the gametophyte transcriptome in bracken fern. *Pteridium aquilinum* [J]. BMC Genomics, 2011, 12(1): 99.
- [18] 郭丽丽,李明月,郭大龙,等.不同品种群牡丹表型SSR标记的遗传多样性及聚类分析[J].上海农业学报,2018,34(2):43-49.
- [19] 周丽霞,曹红星.椰子种质资源遗传多样性的SSR分析[J].南方农业学报,2018,49(9):1683-1690.
- [20] 王茂芊,张泽旭,吴则东,等. SSR标记对甜菜抗褐斑病品种的聚类分析[J].中国农学通报,2018,34(33):91-95.
- [21] 安宗燕,唐 红,李婉茹.基于EST-SSR的紫斑牡丹品种遗传多样性分析[J].分子植物育种,2018,16(20):6744-6752.
- [22] 张 晨,云 岚,李 珍,等.新麦草种质的SSR遗传多样性及群体结构分析[J].植物遗传资源学报,2019,20(1):52-63.
- [23] 管俊娇,余志慧,杨晓洪,等. SSR标记在辣椒DUS测试中的应用研究[J].植物遗传资源学报,2019,20(2):396-405.
- [24] 温 贺,王仙萍,杨 森,等.紫苏SSR标记筛选及遗传关系分析[J].分子植物育种,2019,17(7):2285-2290.
- [25] 李志彬,刘 欣,曾 强,等.寒地粳稻指纹图谱的构建及聚类分析[J].东北农业科学,2017,42(4):15-19.
- [26] 董玲霞,苏一钧,戴习彬,等.基于SSR分子标记的甘薯地上部专用品种遗传多样性分析[J].江苏农业学报,2018,34(4):741-746.
- [27] 林兴娥,牛俊海,陈 莹,等.基于SSR标记的68份红毛丹种质资源DNA指纹图谱构建[J].热带作物学报,2019,40(4):708-714.
- [28] 黄海燕,杜红岩,乌云塔娜,等.基于杜仲转录组序列的SSR分子标记的开发[J].林业科学,2013,49(5):176-181.
- [29] 林富荣,邢俊连,孟艳琼,等.皂荚EST-SSR分子标记开发与评价[J].植物遗传资源学报,2017,18(1):148-154.
- [30] 李 响,杨 楠,赵凯歌,等.蜡梅转录组EST-SSR标记开发与引物筛选[J].北京林业大学学报,2013,35(S1):25-32.
- [31] 李炎林,杨星星,张家银,等.南方红豆杉转录组SSR挖掘及分子标记的研究[J].园艺学报,2014,41(4):735-745.
- [32] 文亚峰,韩文军,周 宏,等.杉木转录组SSR挖掘及EST-SSR标记规模化开发[J].林业科学,2015,51(11):40-49.
- [33] 张 振,张含国,莫 迟,等.红松转录组SSR分析及EST-SSR标记开发[J].林业科学,2015,51(8):114-120.

(责任编辑:刘洪霞)