

陈春林, 田易萍, 陈林波, 等. 基于荧光标记的紫娟茶树转录组 EST-SSR 标记开发[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(4): 747-753.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.04.005

基于荧光标记的紫娟茶树转录组 EST-SSR 标记开发

陈春林, 田易萍, 陈林波, 邓少春, 徐丕忠, 李朝云

(云南省农业科学院茶叶研究所, 云南省茶学重点实验室, 云南 勐海 666201)

摘要: 为开发紫娟茶树转录组 EST-SSR 标记, 基于前期对紫娟茶树芽、第 2 叶、开面叶、成熟叶转录组高通量测序所得到的 242 757 条 Unigene 进行多态性分析与评价, 再利用荧光标记 PCR 技术, 规模化开发茶树 EST-SSR 标记。结果表明: 从紫娟茶树转录组中搜索得到 46 041 条 Unigene 含有 57 976 个 SSR 位点, 出现频率为 23.88%。EST-SSR 类型以一核苷酸、二核苷酸、三核苷酸重复为主, 占总 SSR 的 98.54%。设计合成 138 对荧光 SSR 引物, 采用荧光标记 PCR 技术对 4 个差异较大的茶树品种进行引物筛选, 其中 44 对引物得到高质量的 EST-SSR 标记位点。这些 EST-SSR 可用于茶树遗传多样性分析、分子育种等。

关键词: 茶树; 转录组; SSR; 荧光标记

中图分类号: S571.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2018)04-0747-07

EST-SSR marker development of Zijuan tea tree transcriptome based on the fluorescent labeling

CHEN Chun-lin, TIAN Yi-ping, CHEN Lin-bo, DENG Shao-chun, XU Pi-zhong, LI Chao-yun

(Tea Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Yunnan Key Laboratory of Tea Science, Menghai 666201, China)

Abstract: To develop the transcriptome EST-SSR markers of Zijuan tea tree, the polymorphism of 242 757 unigenes got by high-throughput sequencing based on the earlier-stage study of the bud, the second leaf, the leaves without bud and mature leaves of Zijuan tea tree was analyzed and evaluated, and then fluorescent tags PCR technology was used for scale development of tea tree EST-SSR markers. The results showed that 46 041 unigenes containing 57 976 simple sequence repeats(SSR) loci were obtained by searching from Zijuan tea plant transcriptomes with the frequency of 23.88%. The main repeat types of EST-SSR were mononucleotide, dinucleotide and trinucleotide accounted for 98.54% of total SSR. 138 pairs of fluorescent marker primers were designed and synthesized, then four different tea varieties were screened by using fluorescent marker PCR technology, 44 pairs of primers got high quality of EST-SSR markers loci. These EST-SSRs can be used for tea tree genetic analysis and molecular breeding.

Key words: tea tree; transcriptome; simple sequence repeats(SSR); fluorescent labeling

收稿日期: 2017-09-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(31560220, 31460216); 茶树生物学与资源利用国家重点实验室开放基金项目(SKLTOF20150105); 云南省人才培养计划项目(2015HB105); 云南省应用基础研究计划项目(2018FD130)

作者简介: 陈春林(1989-), 男, 云南禄丰人, 学士, 研究实习员, 主要从事茶树资源与品种改良研究。(E-mail) 805261945@qq.com

通讯作者: 陈林波, (E-mail) 184465295@qq.com

微卫星标记(Microsatellite), 又称短串联重复序列(Short tandem repeats, STR)或简单重复序列(Simple sequence repeats, SSR), 由少数几个核苷酸组成^[1-2]。利用 DNA 两端的保守性设计特异引物, 扩增位点的 DNA 序列, 通过电泳检测即可显示不同基因型个体在这个 SSR 位点上的多态性。SSR 在种内居群间及各植物间均存在高度的多态性, 且不同物种 SSR 序列在组成、长度、突变率及其在染色

体上的分布情况表现出高度的等位基因多样性^[3]。在传统方法中,对扩增后的等位微卫星采用聚丙烯酰胺凝胶电泳加放射显影或银染的方法进行检测,但此方法费时费力效率低。而现在,广泛采用的检测方法是毛细管电泳技术,其原理是利用 ABI 遗传分析仪对荧光标记的 DNA 片段进行检测,结合分子量内标进行 DNA 片段长度计算,使 SSR 分析变得高效快捷,结果也更加精确^[4]。

目前,微卫星标记广泛应用于粮食作物和经济作物品种选育、品种鉴定、遗传多样性分析、QTL 作图等方面^[5-10]。在茶树资源和应用开发过程中,SSR 标记起到非常重要的作用。金基强等^[11]率先对茶树 EST-SSR 进行了分析和分子标记的建立。姚明哲等^[12]利用 25 对 EST-SSR 引物对江北茶区的 45 份茶树初级核心种质的遗传多样性、遗传结构和亲缘关系进行了分析,但是受限于当时的测序技术,所得的 SSR 序列较少。茶树作为经济作物其利用价值主要在叶部,其遗传多样性和品质特性差异也主要在叶部,因而加大对茶树叶部特异性表达基因的 SSR 标记开发是未来茶树分子标记的研究方向。本研究选取的紫娟茶树,因其新嫩叶片呈现紫色,是较为稀有的品种,具有较高的研究价值。

茶树 [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] 是重要的叶用经济作物,其叶片中含有大量利于人体健康的次生代谢产物茶多酚、儿茶素、茶多糖、咖啡碱等化合物^[13]。茶叶具有抗心血管疾病^[14-19]、增强免疫功能^[20]、抗肿瘤^[21-22]、抗氧化等作用^[23]。但茶树分子遗传学研究基础薄弱,目前茶树分子研究所用的标记仍以 RAPD^[24]、ISSR^[25-26] 和 AFLP^[27] 等显性标记为主。为此,本研究基于陈林波等^[28]前期对紫娟茶树芽、第二叶、开面叶、成熟叶转录组高通量测序所得到的 242 757 条转录组序列 (Unigene) 进行多态性分析与评价,再利用荧光标记 PCR 技术,规模化开发茶树 EST-SSR 标记。

1 材料与方法

1.1 材料

选择云南省农业科学院茶叶研究所实验基地中形态差异较大的茶树品种紫娟(大叶种茶,叶片色泽为紫色)、佛香 2 号(大叶种茶与小叶种茶的杂交后代,叶片色泽为绿色)、福鼎大白茶(小叶种茶,叶片色泽为绿色)和国家大叶茶种质资源圃的紫芽茶

(大叶种茶,叶片色泽为紫红色)4,采集幼嫩叶片,并保存于-80℃的冰箱中。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取与检测 采用 CTAB 法提取茶树基因组 DNA,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 大小和完整性。用 ND2000 分光光度计分析 DNA 纯度和质量浓度,之后用 1×TE 缓冲液稀释基因组 DNA 至终质量浓度为 30 ng/μl,-20℃保存备用。

1.2.2 紫娟茶树转录组 SSR 位点的查找及 SSR 引物设计 对紫娟的芽、第二叶、开面叶和成熟叶的 242 757 条 Unigene,利用 MISA 软件^[29] 查找 SSR 位点。查找条件:一、二、三、四、五、六核苷酸的最小重复次数分别为 10、6、5、5、5、5 次。引物设计采用 Primer5 软件,荧光引物由北京阅微基因技术有限公司合成。

1.2.3 PCR 扩增与检测 PCR 反应体系 (15.0 μl):10×Buffer I 1.5 μl,2.5 mmol/L dNTP 1.2 μl,TP-M13 (5 mol/L) 0.8 μl,特异引物 (5 mol/L) 1.0 μl,TAKARA HS Taq 0.1 μl,DNA 1.2 μl,ddH₂O 9.2 μl。PCR 反应程序:95℃ 5 min;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 30 s,循环 30 次;72℃ 10 min。利用 3730 XL 测序仪对 PCR 产物进行测序。

2 结果与分析

2.1 紫娟茶树基因组 SSR 位点

采用 MISA 软件对紫娟茶树转录组 Unigene 进行 SSR 检测,对不同 SSR 类型在基因转录本的密度分布进行统计。结果(图 1)显示,从 242 757 条 Unigene 序列中发现 57 976 个 SSR 位点,分布在 46 041 个 Unigene 中,发生频率(含有 SSR 的 Unigene 数量与总 Unigene 数量之比)为 18.97%,其中单核苷酸重复单元 SSR 含量最多,占总数的 47.9%,其次为二核苷酸(37.3%)、三核苷酸(12.8%)、四核苷酸(1.2%)、五核苷酸(1.0%)、六核苷酸(1.3%)。

2.2 紫娟茶树基因组微卫星组成成分分析

紫娟茶树基因组微卫星每种重复单元包含不同种类型的重复碱基。单核苷酸重复 SSR 由 4 种不同重复碱基组成,以 A/T 为主,占单核苷酸重复的 98.00%;二核苷酸重复 SSR 组成类型有 4 种,AG/CT 最多(共 13 957 个,占比 72.80%),其次是 AT/AT(共 3 030 个,占比 15.82%);三核苷酸重复类型 10 种,AAG/CTT 最多(共 1 752 个,占比 26.79%),

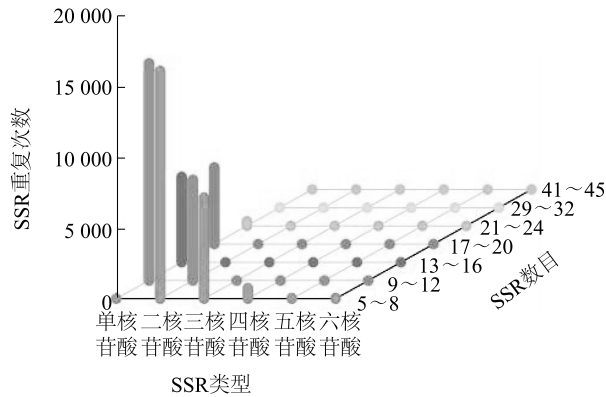


图1 紫娟茶树转录组 SSR 类型在基因转录本的密度分布图

Fig.1 Density distribution diagram of simple sequence repeats (SSR) type of Zijuan tea tree transcriptome in genetic transcript

其次是 ACC/GGT(共1 110种,占比 16.97%);四核苷酸重复类型 33 种,AAAT/ATTT 最多(共计 211 个,占比 33.60%),其次 AAAG/CTTT(共计 101 个,占比 16.08%);五核苷酸重复类型 46 种;六核苷酸重复类型 64 种(表 1)。

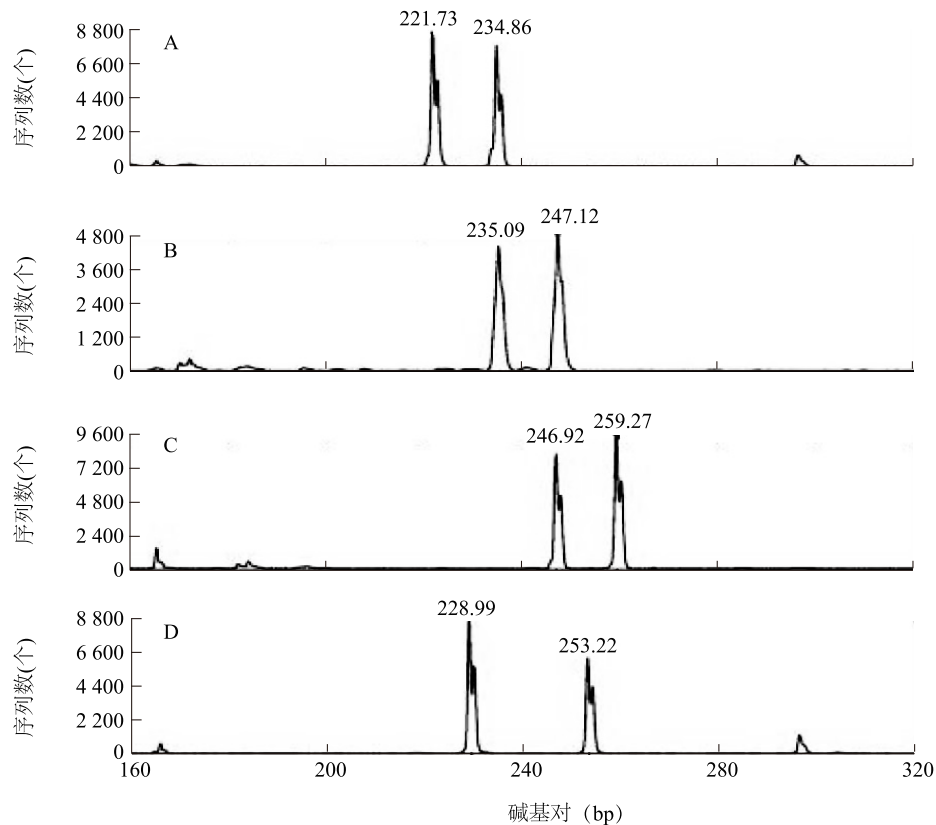
表 1 紫娟茶树转录组中 SSR 重复单元的分布特征

Table 1 Distribution of the SSR motifs in Zijuan tea tree transcriptome

重复单元长度	SSR 数量	百分比 (%)	主要重复单元
单核苷酸	24 853	48.45	A/T,C/G
二核苷酸	19 157	37.34	AG/TC、AT/TA
三核苷酸	6 541	12.75	AAG/CTT、ACC/GGT
四核苷酸	628	1.22	AAAT/ATTT、AAAG/CTTT
五核苷酸	55	0.11	AGATG/ATCTC、ATATC/ATATG
六核苷酸	64	0.13	CGCCAT/GCGGTA

2.3 茶树 SSR 位点多态性

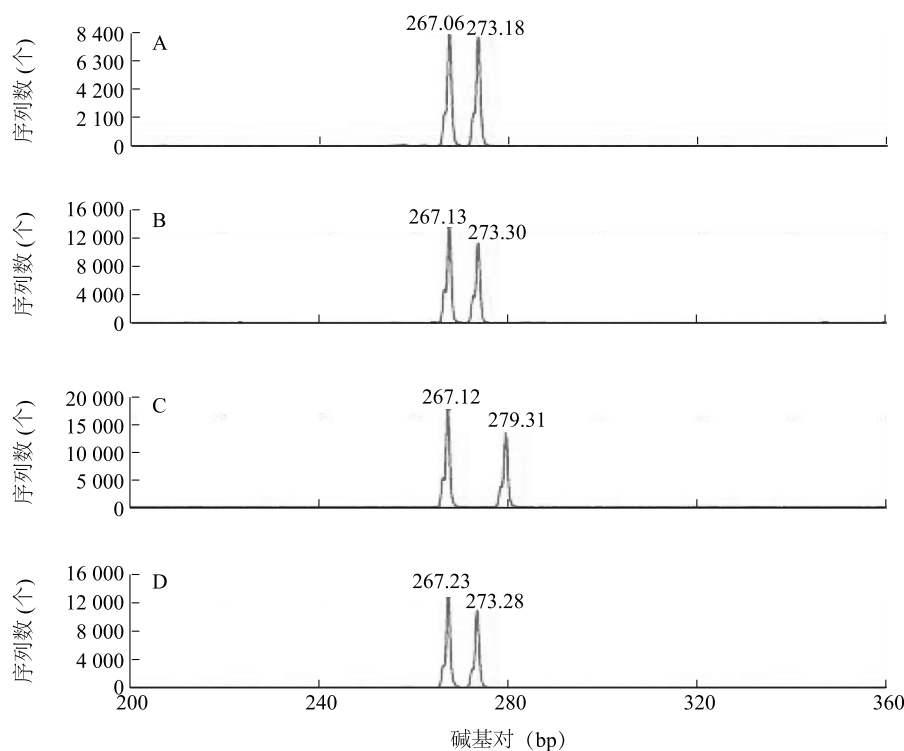
对含 SSR 位点的表达序列标签(EST)序列进行荧光标记引物设计,选择 4 份差异较大的茶树样品进行引物筛选。图 2、图 3 分别为引物 ZJ02、ZJ06 扩增 4 个模板的毛细管电泳图。采用 GeneMapper4.0 软件进行数据分析,结果表明合成的 136 对荧光标记引物中共有 44 对引物检测出多态性位点(表 2),占引物总数的 32.4%。



A:佛香 2 号;B:福鼎大白茶;C:紫娟;D:紫芽茶种质。

图 2 ZJ02 引物在不同茶树品种(种质)中检测出的简单重复序列(SSR)位点

Fig.2 SSR loci of primer ZJ02 detected in different tea varieties (germplasm)



A:佛香 2 号;B:福鼎大白茶;C:紫娟;D:紫芽茶种质。

图 3 ZJ06 引物在不同茶树品种(种质)中检测出的简单重复序列(SSR)位点

Fig.3 SSR loci of primer ZJ06 detected in different tea varieties (germplasm)

3 讨论

随着生物信息学的发展,越来越多的 SSR 标记被应用于植物遗传多样性分析中,而转录组数据是 SSR 标记开发的基础^[30]。袁阳阳等利用软件 MISA 对水生植物苔菜转录组测序所获得的 7 956 条 EST 序列进行分析,共检测出 12 319 个 EST-SSR 位点^[31]。郁永明等从红掌转录组中检测分析出 3 944 个 SSR 位点^[32]。除此之外,利用转录组进行 SSR 标记开发的植物还有杜仲^[33]、红松^[34]、杉木^[35]、棉花^[36]等。茶树是多年生作物,遗传背景复杂,目前已报道的茶树 SSR 标记数量仅有 1 000 余个,仍难以建立均匀分布茶树基因组的 SSR 标记体系,对 SSR 标记构建茶树分子图谱、品种鉴定、茶树种质资源遗传多样性研究的精确度造成严重影响^[37-38],在很大程度上制约了茶树 SSR 标记的利用。本研究对紫娟茶树的 242 757 条转录组序列进行 SSR 位点搜索,检测到 57 976 个 SSR 位点,其出现频率为 23.88%。在紫娟茶树转录组 EST 中,以一核苷酸、二核苷酸、三核苷酸重复类型占主导地位,占总 SSR 的比例为 98.54%,这与红掌 EST-SSR 类型较为一致。红掌中

同样也以一核苷酸、二核苷酸、三核苷酸重复为主,占总 SSR 的比例为 92.6%^[32];苔菜 EST-SSR 中,二核苷酸和三核苷酸重复单元是主导类型^[31],单核苷酸的占比较小,只有 5.41%,这与紫娟茶树的 SSR 序列有明显不同,紫娟茶树 EST-SSR 类型中,单核苷酸占比最大,达到 48.45%。

SSR 荧光标记毛细管电泳法是基于 DNA 测序仪为平台的检测方法,能区分大小相差 1~2 个碱基的片段,克服了银染法的不足,实现了数据收集和处理的自动化,具有快速、精确、高效、灵敏等技术优势^[34]。本研究设计 138 对荧光 SSR 引物,选用差异较大的 4 个茶树品种,筛选出高质量的 EST-SSR 标记位点引物 44 对,这 44 对 SSR 引物的开发为茶树遗传多样性分析、图谱构建等奠定了基础。由于技术的限制,EST-SSR 来自相对保守的功能基因序列,导致呈现多态性较低的特点,而且 SSR 分子标记不能有效区分长度相同或者长度相近的 SSR,对准确性和可靠性有一定影响,今后将增加多态性 SSR 引物数量,以及将 EST-SSR 与其他分子标记如 AFLP、SNP 等进行比较研究,来弥补 EST-SSR 标记本身多态性较低的问题。

表 2 紫娟茶树 44 对 EST-SSR 引物信息

Table 2 The information of 44 pairs of Zijuan tea tree EST-SSR primers

引物编号	引物序列 (5'→3')	重复单元	预期片段大小 (bp)	等位基因数	扩增片段大小 (bp)
ZJ02	TGATGCCATTTCGCACCAAA TGATGCCATTTCGCACCAAA	(AACCTT)9	243	6	221~259
ZJ05	ATCCCAACCCGTCGATGTTT CTTGCTCCGACCTCGATTCC	(TTGGGA)6	234	3	267~279
ZJ10	GCTGTGCTGAGTCTGTTCT GTCACCTCCAATGTCCCACA	(AATGGT)6	254	4	256~283
ZJ108	CTTCCACTGCGTTCAGAGGT CCACAGCAGCATCATCTCCT	(GAG)7	237	3	213~225
ZJ11	TTCTTCGTCGCTGCTCACTT GACTATCCCGCCAAAACCCA	(TGCTCT)5	176	4	250~268
ZJ114	GGTGAGACCTCCAATCCCCT AGACTGAGGCCTCAACAGGA	(CTA)7	223	3	240~246
ZJ115	CGTACCCACCTTCCTCTTC AAGGACGAGGCGTTGTAAGG	(CGT)7	277	3	288~292
ZJ118	ACACACTGTTGAAGGCCCAA AAGGCTTCAACAGTTCCCCC	(CCT)7	104	3	117~123
ZJ121	AGCCACCCACTGAAAAGCTT TGTCTAGGGAGGGTTGTGGT	(CAT)7	263	3	278~290
ZJ122	TTCTCAGTGTGTAAGGGGC ACCACCTGATGACAATCGATT	(CAT)7	243	4	208~273
ZJ131	GGGGTCACAAGCTCTCTCAG TCCACTGTCACCATCTTCGC	(ACC)7	165	4	171~181
ZJ133	GCCGCTTGATACTCCGATGA GCTCCATAGATCCACCACCG	(AAC)7	146	2	158~161
ZJ135	GCACCACACAAATCACCACC AAACCACAGGCTCCTCTTCG	(GA)7(GAT)5*	161	5	173~184
ZJ15	AGGTGATGCACTTGAGCTCC CCCTGAAATCGTATCCGGGG	(GCTGTG)5	181	3	187~199
ZJ22	TGAGGCAGTGCTTCACGAAT TGCTCAAGTGCCGCTGATTA	(AACTCG)5	245	3	247~260
ZJ23	CCTCCACACACTCTCTCG GTGGCTCTGGCTCATCATCA	(AGAGT)6	224	10	216~251
ZJ26	GACGGTGGAGCGATCTTAGG TCGGTGATTGACAAATTTTCCT- GT	(GTGCT)5	204	2	374~379
ZJ30	TCCGGAACAGCAAGAAACCC CTGCTCGGACTCGATATGGG	(GACCA)5	246	3	254~259
ZJ34	GGGGAGAAACTGAGTGGGTG CAAAAGAACGCAGCAGCCTT	(AGCAT)5	139	2	147~152
ZJ35	CGCTTCTCACACCCTCTCTC GTCATCTTCTTCGGGGCTCC	(AAACG)5	205	3	214~224
ZJ37	GTACACACCTCACTCTGCCC CAGAGTTGCTCGGAAGGAGG	(ATCA)7	270	3	284~289
ZJ41	TTCGACTTGGAAGAGGTGGC AAATCAAGCACCAGCCGAGA	(TGCT)6	110	4	110~127

续表 2 Continued 2

引物编号	引物序列 (5'→3')	重复单元	预期片段大小 (bp)	等位基因数	扩增片段大小 (bp)
ZJ42	AAATGGATCCCTGACCCACA TGGGAAATCTCAGGTGTGCA	(TGAC)6	257	2	274~278
ZJ45	GCGATTCCTCCACCCATCA CCATGATCCCAAAAGCAGCC	(TGTT)5	273	4	284~296
ZJ50	TAGTGCAGGCTTTGAGCGAA ACCCACCATTTTTCTTGGAAGA	(TCAC)5	244	3	257~269
ZJ53	GGTCTTAAGATCAGGGGCGG CACAAGGCAGAAGGAGCTGA	(TAGA)5	243	2	255~259
ZJ54	GCCTTATTTGTGGTGCCCC ACACAAGAATTGCCTGCAGC	(TACC)5	211	3	222~230
ZJ55	AGGCAGGGTAGTGCTAGTGA GCGGTTGGTAGGTAGATCGG	(GGTT)5	255	3	270~273
ZJ57	TCCTCCTTTCAACACGCACA CGTTGTTCCGATCGAGTTTCG	(GCTC)5	157	2	167~171
ZJ59	TTGGGGAGACATCGAAGCTG TGTACCCCAAGCCTCCCTAA	(GATT)5	154	2	166~170
ZJ65	CGATCCCTGGACATGGGATG GGATGTGTGATCATCATGAGCC	(CTTC)5	232	4	145~157
ZJ66	TTGGCGCTTGCTTTTTGTGT CACATACCTGAAGCTGGCCA	(CTGC)5	184	4	234~248
ZJ67	AGGACGAATGCAGGTTCAAG CACCCCACTCTCAAATCCC	(CTAT)5	184	5	196~216
ZJ69	AGGCCCTTCTCTCTGTCT TGTCTGCTGCATCGAACCT	(CAGA)5	132	4	265~354
ZJ70	CTTGCCCTGACTTGACGGAT AGGTCAAAATGGCGATGGCT	(CACG)5	230	2	111~115
ZJ71	AGCTGTTTGGTGGGTTGGAA TGCATTCATGTCTCCAAACAT- TCA	(CAAT)5	178	2	190~194
ZJ72	ACACATGCATCAAACTCGCA ACTGTAATATTTGGGGTA- CACGT	(CAAC)5	111	4	120~136
ZJ78	AGCAGTCCCAGCATCATTT AACATTGCCAAAGGAAGCG	(AGAC)5	183	2	193~201
ZJ79	GAGGCTGCTGGGTTTGATCT ACCAAACGGGGATACTGACT	(ACGA)5	273	2	233~237
ZJ80	ACAGATGGGAAGTGCATGTG GCCACAGTCTGTATGGCTT	(ACCA)5	230	3	241~248
ZJ82	GGTGTGGCTAGACCACAAT CAGTTGGTTCCAAGCCCAGA	(AATC)5	273	2	282~291
ZJ86	TCGATTTGCGACTGTGCTCA CCACGCCGATCACACTTTTC	(TAC)8	216	4	221~230
ZJ93	GCAACCGGGGTGAAATTTCC CGAGACCGCACGATAATCCA	(TTG)7	193	2	206~208
ZJ96	GACTGTTGTGGCTGTGCTG CGACTGCAATGGTGATGCAG	(TGC)7	142	4	143~155

参考文献:

- [1] MRAZEK J, GUO X, SHAH A. Simple sequence repeats prokaryotic ge-nomes mrazek[J]. PNAS,2007,104(20):8472-8477.
- [2] TOTH G, GASPARI Z. Microsatellites in different eukaryotic genomes Surevey and analysis[J]. Genome Research ,2000,10(7):967-981.
- [3] 敖日格乐,贾晓,葛台明. SSR 分子标记的开发策略概述[J]. 湖北民族学院学报,2009,27(4):462-467.
- [4] POWELL W, MACHRAY G C, PROVAN J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats[J]. Trends Plant Science, 1996, 1: 215-222.
- [5] 方先文,张云辉,肖西林,等. 基于重组自交系群体的水稻粒形 QTL 定位[J]. 江苏农业学报,2017,33(2):241-247.
- [6] 张振良,郝德荣,陈国清,等. SSR 标记在糯玉米品种鉴定上的应用[J]. 江苏农业科学,2016,44(6):104-106.
- [7] 李洋益,雷映霞,高刚,等. 应用 RAMP 标记分析国产姜黄属植物的遗传多样性[J]. 基因组学与应用生物学,2015,34(8):1778-1783.
- [8] 张洪源,谈杰,张敏,等. 茄子 SSR 多态性标记筛选及杂交种纯度鉴定[J]. 南方农业学报,2017,48(7):1148-1154.
- [9] 曹广英,吴琪,王云云,等. 利用 SSR 标记鉴定花生杂交 F₁ 代真假杂种[J]. 山东农业科学,2016,48(1):7-10,15.
- [10] 冯涛,刘娟,华夏雪. 利用 SSR、SRAP 分子标记鉴定桃早熟芽变[J]. 江苏农业科学,2017,45(6):42-44.
- [11] 金基强,崔海瑞,陈文岳,等. 茶树 EST-SSR 的信息分析与标记建立[J]. 茶叶科学,2006,26(1):17-23.
- [12] 姚明哲,刘振,陈亮,等. 利用 EST-SSR 分析江北茶区茶树资源的遗传多样性和遗传结构[J]. 茶叶科学,2009,29(3):243-250.
- [13] MA H J, MA H J, Li Q, et al. Effect of theaflavin on intracellular free calcium concentration in rat ventricular myocyte[J]. Chin Pharmacol Bull, 2009,25(8):1032-1035.
- [14] MA H J, MA H J, ZHANG J N, et al. Study of the aflavin on reducing intracellular free calcium concentration in ventricular myocytes in rats with ischemia /reperfusion injury[J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2009,18(25):3024-3029.
- [15] MA H J, MA H J, LIU Y, et al. Protective effect of the aflavin against ischemia / reperfusion injury in rat heart[J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2009,18(26):3159-3160.
- [16] 罗奕凡,禹双双,陈勤操,等. 茶黄素的生理功效研究进展[J]. 茶叶通讯,2015,42(4):3-8.
- [17] 李雅,李雅卓,冯慧平,等. 茶多酚对冠心病患者血清中 sCD146 和 sCD40 水平的影响[J]. 福建茶叶,2016,38(6):7.
- [18] 贾琳,张玉梅. 儿茶素代谢动力学研究进展[J]. 食品与药品,2016,18(3):209-218.
- [19] 郭海桥,丁阳平,周向东. 红茶提取物在炎性气道黏液高分泌中的作用[J]. 上海交通大学学报(医学版),2009,29(2):126-129.
- [20] 谭婷,刘武嫦,仇云龙,等. 茶叶对 IBD 肠道微生物菌群影响研究进展[J]. 茶叶通讯,2016,43(3):37-40.
- [21] 冯强,李毅,夏鹏程,等. 茶叶提取物抗肿瘤作用的最新研究进展[J]. 中国实用医药,2016,11(22):274-275.
- [22] 乔如颖,李明,郑新强,等. 茶叶及其儿茶素对乳腺癌的抑制作用[J]. 茶叶科学,2016,36(6):557-566.
- [23] 曲伟,王孟君,于海燕,等. 毛尖茶叶多糖及其结合物的抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发,2015,27(2):2010-2013.
- [24] 李慧,聂枫宁,黄亮,等. 分子标记在茶树种质资源遗传多样性分析中的应用研究[J]. 现代农村科技,2016(2):69-70.
- [25] 刘本英,李友勇,唐一春,等. 云南茶树资源遗传多样性与亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 作物学报,2010,36(3):391-400.
- [26] 吴清韩,庄东红,朱慧,等. 凤凰单丛茶树资源多样性的 ISSR 分析[J]. 热带作物学报,2015,36(3):499-503.
- [27] 侯渝嘉,常亚丽,何桥,等. 应用 AFLP 分子标记研究茶树品种新材料[J]. 西南农业学报,2015,28(2):514-518.
- [28] 陈林波,夏丽飞,周萌,等. 基于 RNA-Seq 技术的“紫娟”茶树转录组分析[J]. 分子植物育种,2015,13(10):2250-2255.
- [29] 王希,陈丽,赵春雷. 利用 MISA 工具对不同序列进行 SSR 标记位点挖掘的探讨[J]. 中国农学通报,2016,32(10):150-156.
- [30] 王丽鸳,姜燕华,段云裳,等. 茶树 EST-SSRs 分布特征及引物开发[J]. 植物遗传资源学报,2009,10(4):511-516.
- [31] 袁阳阳,王青峰,陈进明. 基于转录组测序信息的水生植物苦菜 SSR 标记开发[J]. 植物科学学报,2013,31(5):485-492.
- [32] 郁永明,田丹青,潘晓韵,等. 基于红掌转录组序列的 SSR 标记分析与开发[J]. 分子植物育种,2015,13(6):1349-1354.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] 程海亮,陆才瑞,邹长松,等. 基于 10 个棉花腺体相关材料转录组的 EST-SSR 标记开发[J]. 棉花学报,2015,27(1):1-8.
- [37] MA J Q, ZHOU Y H, MA C L, et al. Identification and characterization of 74 novel polymorphic EST-SSR markers in the tea plant, *Camellia sinensis* (Theaceae)[J]. Am J Bot, 2010, 97(12):153-156.
- [38] 段云裳,姜燕华,王丽鸳,等. 中国红、绿茶适制品种(系)遗传多样性与亲缘关系的 SSR 分析[J]. 中国农业科学,2011,44(1):100-109.

(责任编辑:张震林)