

贺丹, 吴芳芳, 张佼蕊, 等. 牡丹转录组 SSR 信息分析及其分子标记开发[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(6): 1428-1433.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.06.023

牡丹转录组 SSR 信息分析及其分子标记开发

贺丹^{1,2}, 吴芳芳¹, 张佼蕊¹, 谢栋博¹, 李小康³, 刘艺平¹, 栗燕¹, 何松林^{1,2}

(1. 河南农业大学林学院, 河南 郑州 450002; 2. 河南科技学院园艺园林学院, 河南 新乡 453000; 3. 郑州市植物园, 河南 郑州 450002)

摘要: 利用 Misa 软件对牡丹转录组数据进行 SSR 信息分析和分子标记开发, 并通过 PCR 扩增进行引物多态性分析。结果显示, 对牡丹转录组测序获得的 131 265 条 Unigene 进行筛选, 共获得 44 181 个 SSR 位点, 分布于 38 316 条 Unigene 中, SSR 的发生频率和平均分布距离分别为 29.19% 和 2.23 kb。单核苷酸、二核苷酸和三核苷酸为优势重复类型, 分别占 SSR 总数的 75.19%、15.02% 和 6.88%。依据转录组中的 SSR 信息序列, 随机合成 60 对引物在 16 份牡丹品种中进行多态性扩增, 其中 15 对引物表现出多态性, 各个位点的等位基因数为 4~13 个, 平均等位基因数 8.13 个, 观测杂合度 (H_o)、期望杂合度 (H_e)、香农多样性指数 (I)、多态信息含量 (PIC) 的平均值分别是 0.757 8、0.790 3、1.718 6 和 0.730 8。

关键词: 牡丹; 转录组; SSR; 多态性

中图分类号: S685.11

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2019)06-1428-06

Analysis of SSR information in transcriptome and development of molecular markers in *Paeonia suffruticosa*

HE Dan^{1,2}, WU Fang-fang¹, ZHANG Jiao-rui¹, XIE Dong-bo¹, LI Xiao-kang³, LIU Yi-ping¹, LI Yan¹, HE Song-lin^{1,2}

(1. College of Forestry, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. College of Horticulture Landscape Architecture, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453000, China; 3. Zhengzhou Botanical Garden, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In this study, the Misa software was used to analyze the simple sequence repeat (SSR) information of the peony transcriptome data and develop the molecular markers. The primer polymorphism was analyzed by PCR amplification. The results showed that 131 265 unigenes were obtained from transcriptome sequencing. The 44 181 SSRs included mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, and hexanucleotide motifs, which located in 38 316 unigenes were identified. The occurrence frequency and mean distribution distance of SSRs were 29.19% and 2.23 kb, respectively. The major repeat motifs were mononucleotide, dinucleotide and trinucleotide, which accounted for 75.19%, 15.02% and 6.88%, respectively. Sixty pairs of randomly chosen SSR primers were synthesized and amplified in sixteen *Paeonia suffruticosa* samples. From these, fifteen pairs of polymorphic SSRs were characterized. The number of alleles at each locus ranged from four to thirteen, which was

averagely 8.13 per locus. The average values of observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), Shannon polymorphism index (I) and polymorphism information content (PIC) were 0.757 8, 0.790 3, 1.718 6 and 0.730 8, respectively.

Key words: *Paeonia suffruticosa*; transcriptome; simple sequence repeat (SSR); polymorphism

收稿日期: 2019-04-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31600568); 河南农业大学科技创新基金项目 (KJCX2015A03); 河南农业大学博士启动基金项目 (30600408); 河南省科技攻关项目 (192102110062)

作者简介: 贺丹 (1983-), 女, 河南新乡人, 博士, 讲师, 主要从事园林植物育种研究。 (E-mail) dandan990111@163.com

通讯作者: 何松林, (E-mail) hsl213@yeah.net

牡丹(*Paeonia suffruticosa*)为芍药科芍药属的二倍体植物,是中国传统十大名花之一,具有很高的观赏和经济价值。牡丹原产于中国,至今约有2 000多年的栽培和育种历史,其育种经历了长期的引种驯化、人工杂交及实生选育等发展阶段,现已选育出一系列具有花色丰富、花期长、抗性强等特点的新品种^[1-2]。

SSR (Simple sequence repeat) 分子标记分布于整个基因组,是由1~6个核苷酸基本单位重复多次构成的DNA序列。与传统的标记方法相比,SSR分子标记可以直接反映遗传物质及其表达产物的遗传变异,具有数量丰富、稳定性强、多态性高、共显性、操作简单易学等特点^[3-4]。目前,已广泛应用于种质资源遗传多样性、栽培品种起源、品种分类与鉴定、杂种鉴定及分子标记辅助育种等方面^[5-9]。此外,EST-SSR引物通用性较高,可以在亲缘关系较近的物种中通用。牡丹具有丰富的EST资源,安宗燕等^[10]用15对引物对57份紫斑牡丹品种的遗传多样性进行分析,结果表明15对EST-SSR标记引物共扩增出65个多态性位点,多态信息含量(PIC)在0.132至0.838之间,平均为0.618,表明受试的57份紫斑牡丹品种具有丰富的遗传多样性。蔡健等^[11]从80对来源于牡丹的EST-SSR标记中筛选出52对多态性引物对31个芍药品种的亲缘关系进行分析,结果显示31个芍药品种分为6类,基于分子标记的聚类分析结果与系谱分析结果基本一致。

本研究以牡丹转录组序列为基础,筛选并开发EST-SSR标记,利用筛选出的多态性SSR引物对牡丹种质资源进行遗传多样性分析,以期深入研究牡丹种质资源鉴定和分子标记辅助育种等提供更多的标记资源。

1 材料与方法

1.1 转录组测序

供试母本芍药品种粉玉奴与父本牡丹品种凤丹白均引自山东省菏泽市,于2011年栽植于河南农业大学苗圃基地,植株生长良好,可以正常开花结实。自交组合粉玉奴×粉玉奴,杂交组合粉玉奴×凤丹白。依据前期荧光显微观察确定杂交障碍发生的时间,授粉后24 h取未授粉(作为对照)、自交、杂交的柱头用液氮速冻并提取RNA供转录组测序。试验材料总RNA的提取参照Cheng等^[12]的方法进行。牡丹转录

组测序委托华大基因股份有限公司完成,使用BGISEQ-500平台进行测序,一共测得98.82 Gb数据。过滤掉低质量、接头污染以及未知碱基N含量过高的reads,获得clean reads。采用Trinity进行denovo组装得到131 256条Unigene作为分析背景数据。

1.2 SSR位点鉴别及引物设计

利用MISA(Microsatellite, <http://pgsc.ipk-gatersleben.de/misa/>)软件进行SSR位点搜索,以单核苷酸至六核苷酸最少重复次数分别为12、6、5、5、4和4次为标准进行搜索。使用Primer3.0(<http://bioinfo.ut.ee/primer3>)软件对每一条含有SSR位点的Unigenes序列进行引物设计,软件参数选默认值。随机选取其中的60对引物,委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成,用于引物多态性和通用性分析。

1.3 引物筛选及PCR扩增

从合成的60对引物中筛选出重复性、稳定性较好的15对引物用于PCR扩增。15对SSR引物的上游序列5'端加上引物M13。

用于引物筛选和检测引物多态性的16份牡丹材料(表1)采自河南省郑州市植物园,选择生长健壮、无病虫害的植株,每个品种采取3个芽鳞,处理之后放到-80℃冰箱,以备DNA的提取。使用上海生工生物工程有限公司商用DNA提取试剂盒提取16份牡丹芽鳞样品的总DNA,操作参照产品说明书进行。提取的DNA利用Nanodrop 2000超显微分光光度计(美国赛默飞公司)检测纯度后稀释至50 ng/μl用于PCR反应。

SSR荧光引物反应体系总体积为10 μl,含5.00 μl 2×Power Taq PCR MasterMix(北京百泰克生物技术公司)、2.00 μl DNA模板(50 ng/μl)、M13荧光标记0.15 μl Forward primer(10 ng/μl)、0.30 μl Reverse primer(10 ng/μl)、2.55 μl ddH₂O。扩增程序为:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,退火30 s(根据各引物的退火温度50~65℃),72℃延伸40 s,40个循环,最终72℃延伸10 min。

1.4 数据处理

利用Genographer软件将各峰值的位置与其泳道中的Sizemarker内标进行比较,读取SSR标记片段大小。采用Popgene32软件统计分析每对引物扩增位点等位基因数、多态性信息量等参数。用PIC_CALC软件计算各标记的多态性信息含量。

表 1 供试牡丹名称、株型、花型、花色

Table 1 The name of cultivar, plant size, flower pattern and colours of *Paeonia suffruticosa* in this study

编号	名称	株型	花型	花色
1	花王	灌木	菊花型	浅粉色
2	黑绣球	灌木	绣球型	黑色
3	烟龙紫珠盘	灌木	皇冠型	墨紫色
4	赵粉	灌木	皇冠型	粉色
5	朝衣	灌木	千层台阁型	紫红色
6	洛阳红	灌木	蔷薇型	紫红色
7	青龙卧墨池	灌木	托桂型	浅墨紫色
8	豆绿	灌木	皇冠型或绣球型	黄绿色
9	姚皇	灌木	皇冠型	淡绿色
10	满江红	灌木	菊花型	红色
11	凤丹白	灌木	单瓣型	白色
12	太阳	灌木	荷花型	火红色
13	绣桃红	灌木	楼子台阁型	粉红色
14	乌龙捧盛	灌木	千层台阁型	紫红色
15	紫斑	灌木	单瓣型	白色
16	百紫园	灌木	菊花型	浅紫色

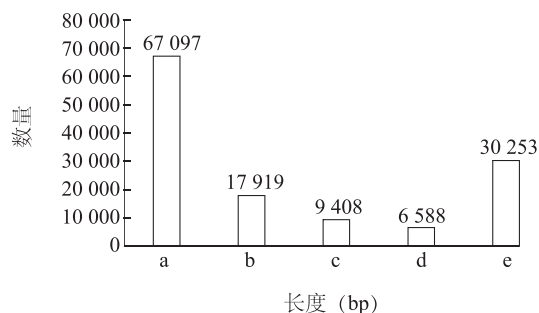
2 结果与分析

2.1 牡丹转录组 Unigene 长度分布

牡丹转录组测序后,进行序列组装并去冗余后得到 131 265 条 Unigene,测序序列总长 98 693 005 bp,Unigene 平均长度为 751 bp,N50 值为 1 356 bp,GC 含量为 41.17%。Unigene 多集中在 200 bp 至 400 bp 之间,共 67 097 条,占 Unigene 总数的 51.12%;大于 1 000 bp 的 Unigene 数为 30 253,占 Unigene 总数的 23.05%(图 1)。

2.2 牡丹转录组 SSR 的分布及结构特点

利用 Misa 软件对牡丹转录组测序获得的 131 265 条 Unigene 进行筛选,共获得 44 181 个 SSR 位点,分布于 38 316 条 Unigene 中。SSR 的发生频率为 29.19%,分布频率为 33.66%,平均 2.23 kb 有 1 个 SSR 位点。由表 2 可见,牡丹不同类型的 SSR 重复次数出现的频率有较大差异。单核苷酸重复是所有 SSR 位点的优势重复类型,共有 33 219 个,占 SSR 总数的 75.19%;二核苷酸和三核苷酸重复类型的 SSR 位点数量分别是 6 638 (15.02%) 和 3 041



a: 200~400; b: 401~600; c: 601~800; d: 801~1 000; e: >1 000。

图 1 牡丹转录组 Unigenes 的长度分布

Fig.1 Length distribution of unigenes in the peony transcriptome

(6.88%),显著多于四核苷酸(180,0.41%)、五核苷酸(431,0.98%)和六核苷酸(672,1.52%)重复类型的 SSR 位点。

牡丹转录组 SSR 重复单元的重复次数为 4~49 次,单核苷酸重复单元的重复次数在 10 次以上居多,二核苷酸重复的次数主要为 6~8 次。三核苷酸和六核苷酸重复单元中,5、6 次重复所占比例最大,分别占 4.93% 和 6.67%;其次是 7 次和 8 次,分别占总 SSR 的 3.47% 和 2.26%。牡丹转录组中不同类型 SSR 位点分布频率与其比例一致,单核苷酸重复类型分布频率最高,达 25.31%;其次为二核苷酸和三核苷酸重复类型,四核苷酸重复类型分布频率最低,仅为 0.14%。

2.3 牡丹 SSR 标记多态性分析

利用 60 对 SSR 引物对 16 份牡丹品种进行扩增,筛选出 15 对多态性较高的 SSR 引物(表 3),共扩增出 122 个等位基因,多态性位点的等位基因数为 4~13 个,平均等位基因数为 8.1 个。由表 4 可知,引物 SSR5 扩增的等位基因最多(13 条),引物 SSR15 只能扩增出 4 个等位基因。POPgene 分析结果显示,各 SSR 标记扩增出的有效等位基因数平均值为 4.875 2,变化范围为 1.890 8~8.258 1;观测杂合度和期望杂合度的平均值分别是 0.757 8 和 0.790 3,变化范围分别为 0.461 5~1.000 0 和 0.487 4~0.939 4;香农多样性指数平均值为 1.718 6,变化范围为 0.891 9~2.333 6。各 SSR 标记的多态信息含量(PIC)平均值为 0.730 8,变化范围为 0.432 4~0.868 6,其中 SSR5 的 PIC 值最高。这表明受试的 16 份牡丹品种具有丰富的遗传多样性,所选用的 15 对 SSR 引物具有较高的多态性,可以有效地用于牡丹多样性分析。

表 2 牡丹转录组中不同 EST-SSR 的数量、类型以及频率

Table 2 The number, type and frequency of different EST-SSR types in *Paeonia suffruticosa* transcriptome

SSR 类型	重复次数								总数	比例 (%)	分布频率 (%)
	4	5	6	7	8	9	10	>10			
单核苷酸								33 219	33 219	75.19	25.31
二核苷酸			2 211	1 228	871	552	347	1 429	6 638	15.02	5.06
三核苷酸		1 885	657	292	117	21	29	28	3 041	6.88	2.32
四核苷酸		141	32	1		2	2	2	180	0.41	0.14
五核苷酸	348	71	8	3	1				431	0.98	0.33
六核苷酸	527	83	41	8	8	3	2		672	1.52	0.51
总数	875	2 180	2 949	1 532	997	578	380	34 690	44 181		33.66

表 3 15 对 SSR 引物序列

Table 3 Information of fifteen pairs of SSR primers

引物	引物序列 (5'→3')	DNA 熔解温度 (T_m) (°C)	重复单元 (数量)	预期产物大小 (bp)
SSR1	F: CAAGATCAATAAGCTTCTGTCCG	53.3	GGA (18)	160
	R: AATGATCAGGCGAGTTAGAGAGA	54.8		
SSR2	F: CAAGGGACGTTCTACTAAGAGCA	56.2	GAA (15)	157
	R: GTCAACCAGATACTTGACGAACC	55.5		
SSR3	F: AATAATCAATTCGAATATCGCCC	50.2	AT (20)	160
	R: AGAGAAATTTTACCACTCGACCA	53.2		
SSR4	F: CAACGTGTATTGGGTATCGAAGT	54.5	GGT (18)	153
	R: GGTAAAAGAGATTACTGCCACCA	54.4		
SSR5	F: TAAAGATGGCATCCTCCAATAAC	51.9	AG (12)	160
	R: GTTTGTTGAAAGAACTCGATGG	52.0		
SSR6	F: ATATAAGCTTGTCTATGCTCCTG	54.7	CAA (15)	152
	R: TTTTCTGTTGTTGTTGCGATT	50.6		
SSR7	F: ACGACTAATATTCGTGGCTAAA	53.1	ATA (15)	160
	R: TATGTTTGCATTTAGATTGTGG	50.9		
SSR8	F: AATACATCTTACCCGGAACCA	53.4	GTG (15)	160
	R: AGTTTCAATGCTAGAGACGCTCA	55.6		
SSR9	F: TAAACAAAACCTCTGGAGCTCTG	54.5	GA (14)	160
	R: TGCTGGCTTGCTAAAGACTAAAG	54.8		
SSR10	F: ATTTATTTAGATGGCGTGAGAA	51.1	TTC (15)	160
	R: CATCTCTTTATTCATGTGAGCTCCT	54.0		
SSR11	F: CGTCTTTGAAGATTCAATCAACC	51.6	AAC (21)	160
	R: CCGAATTGGATTACCTTGTCTT	52.5		
SSR12	F: TGAGTTTCTACAAGTAGCCCTCG	56.2	TC (14)	160
	R: CTCGAAAATTGTAAATGGGTGTG	51.9		
SSR13	F: CTCAACCATTTTCTCACCCTTC	53.7	TCT (15)	160
	R: TCACAATCCAAGCATGTGTTAAA	52.1		
SSR14	F: TGAAAATGACTTGGCTTGAATCT	51.9	TA (12)	160
	R: TAACTATTTGCAAGTGGCAGAGC	55.3		
SSR15	F: TTTTAAGGATGATCGTTTGTTC	50.3	TCT (15)	160
	R: ACTATCTCTTGGCTCGTCTGCTC	58.4		

表 4 15 对 SSR 多态性引物的多样性

Table 4 Diversity of fifteen pairs of polymorphic SSR primers

引物	等位基因数 (N_a)	有效等位基因数 (N_e)	观测杂合度 (H_o)	期望杂合度 (H_e)	香农多样性指数 (I)	多态性信息含量 (PIC)
SSR1	6	2.526 3	0.750 0	0.630 4	1.245 5	0.593 8
SSR2	8	4.205 6	0.866 7	0.788 5	1.663 4	0.728 3
SSR3	9	6.250 0	0.933 3	0.869 0	1.991 3	0.821 6
SSR4	7	4.122 0	0.538 5	0.787 7	1.624 3	0.722 1
SSR5	13	8.258 1	0.625 0	0.907 3	2.333 6	0.868 6
SSR6	8	3.947 4	1.000 0	0.772 4	1.650 4	0.713 3
SSR7	11	7.111 1	0.937 5	0.887 1	2.148 5	0.844 6
SSR8	5	2.652 8	0.812 5	0.643 1	1.168 5	0.557 4
SSR9	12	4.063 5	0.937 5	0.778 2	1.817 2	0.721 2
SSR10	9	6.145 5	0.846 2	0.870 8	1.959 0	0.817 0
SSR11	8	5.728 8	0.461 5	0.858 5	1.915 4	0.805 7
SSR12	7	4.285 7	0.600 0	0.793 1	1.628 4	0.733 3
SSR13	6	4.740 7	0.625 0	0.841 7	1.646 2	0.756 6
SSR14	9	7.200 0	0.833 3	0.939 4	2.094 7	0.846 8
SSR15	4	1.890 8	0.600 0	0.487 4	0.891 9	0.432 4
平均值	8.133 3	4.875 2	0.757 8	0.790 3	1.718 6	0.730 8

3 讨论

目前 SSR 分子标记在芍药属中的应用越来越广泛。一方面,芍药属资源丰富,品种繁多,只通过形态学辨认非常困难,利用 SSR 分子标记可以在芍药属及其杂种后代群体间进行鉴定,确定它们之间的亲缘关系和遗传多样性。另一方面,芍药属杂交育种越来越趋向于具体化、多样化,利用分子标记技术与表型结合,可以为牡丹育种提供更精确的种质资源,提高育种效率。本研究获得的芍药属转录组序列中 SSR 位点较丰富,在 38 316 条 Unigene 中共检测到 44 181 个 SSR 位点,平均每 2.23 kb 就有 1 个 SSR 位点,发生频率为 29.19%,高于花椒^[13]的 16.31%、云锦杜鹃^[14]的 20.58%、刺梨^[15]的 20.37%、紫娟茶树^[16]的 23.88%,但明显低于南美洲南瓜^[17]的 37.68%、蓝靛果忍冬^[18]的 32.51% 和杜仲^[19]的 33.99%。这种差异可能是由于物种间的基因不同,或由 SSR 查找程序所使用的软件、搜寻 SSR 的标准不同以及 EST 数据库中的数据信息量等方面的不同造成。随着 EST 数据库的容量不断更新,各个物种间的 SSR 频率将有统一的比较标准。

研究发现,芍药属转录组的 SSR 位点中的重复基序类型存在严重的偏倚性,单核苷酸至六核苷酸基序的重复类型都有出现,其中单核苷酸、二核苷酸和三核苷酸基序重复类型为主要的重复类型,占 SSR 总数的 97.09%,而四核苷酸至六核苷酸基序重复类型很少,仅

占 SSR 总数的 2.91%。这些高级基元的偏倚性可能是由于高级基元 SSR 自身长度的限制^[20-21]。除单核苷酸以外,二核苷酸出现频率最高(15.02%),三核苷酸出现频率次之(6.88%),这一结果与红掌、蝴蝶兰、樱桃等类似^[22-24]。而在榧树^[25]、万寿菊^[26]等植物的转录组中,三核苷酸重复类型占主导位置。这表明不同植物在重复类型方面并没有明显特定的规律,不同植物基因组在进化过程中经历的不同时间都有可能对其造成影响^[27]。

本研究以筛选获得的 60 对引物进行 PCR 扩增,其中有 15 对引物能够扩增出理想的 PCR 产物,部分引物扩增失败的原因可能与引物质量或者设计的特异性不佳有关。研究中发现 3 对引物的扩增产物与预计目标产物大小不同,这可能是扩增片段中存在缺失或插入突变引起的^[28-30]。 PIC 是评价分子标记多态性的主要指标,当引物的 PIC 值越高,表示其多态性就越好。本研究开发获得的 15 对多态性引物,除引物 SSR15 引物为中度多态性外,其他均属于高度多态性。同时,15 对引物的平均观察杂合度和期望杂合度分别为 0.757 8 和 0.790 3,平均香农多样性指数为 1.718 6。于海萍^[31]采用 12 对 SSR 引物在 48 份牡丹样本中扩增出 42 条多态性条带,平均每个位点的等位基因数为 3.5 个,平均观察杂合度和期望杂合度分别为 0.785 和 0.541,平均香农多样性指数为 0.906。张嘉^[32]采用 29 对 SSR 引物在 261 份芍药种

质中共检测到 272 个 SSR 等位点,平均每对引物为 9.38 个,平均观察杂合度和期望杂合度分别为 0.522 和 0.638,平均香农多样性指数为 1.362,与本研究结果有一定差别,这可能与牡丹品种的遗传背景等不同有关。随着样本量的增大,更多的多态性 SSR 位点可能被发掘,而高度多态性位点的数量可能也会增加。

本研究通过对芍药属转录组测序结果的分析发现,芍药属转录组 SSR 的出现频率高,并且类型丰富。从引物设计和多态性潜能的角度考虑,这些开发的 SSR 具有较高的可用性。因此,本研究结果为牡丹遗传多样性分析、分子标记辅助选择育种等工作奠定了一定的理论基础,同时为芍药属植物的遗传改良及亲缘关系研究提供了可靠的分子标记来源。

参考文献:

- [1] 蔡长福. 牡丹高密度遗传图谱构建及重要性状 QTL 分析[D]. 北京:北京林业大学,2015.
- [2] 贺丹,解梦珺,吕博雅,等. 牡丹与芍药的授粉亲和性表现及其生理机制分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2017,45(10):129-136.
- [3] ACUÑA C V, FERNANDEZ P, VILLALBA P V, et al. Discovery, validation, and in silico functional characterization of EST-SSR markers in *Eucalyptus globulus* [J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2012, 8(2):289-301.
- [4] 苏聪聪,金燕,徐丰,等. 利用 SSR 分子标记鉴定刺葡萄 F₁ 代杂种[J]. 江苏农业科学, 2018,46(17):35-38.
- [5] 程云清,张丽娜,赵永斌,等. 平欧杂交榛转录组中 SSR 信息分析和引物筛选[J]. 园艺学报, 2018,45(1):139-148.
- [6] 姜福星,魏丕伟,寇亚平,等. 台湾金线莲转录组特性研究[J]. 分子植物育种, 2015,13(12):2743-2753.
- [7] 傅鸿妃,吕晓茜,陈建瑛,等. 辣椒种质表型性状与 SSR 分子标记的遗传多样性分析[J]. 核农学报, 2018, 32(7):67-77.
- [8] 郭栋梁,王静,韩冬梅,等. 龙眼顶芽转录组简单重复序列(SSR)标记信息分析及分子标记开发[J]. 植物生理学报, 2018,54(5):176-184.
- [9] 苏一钧,王娇,霍恺森,等. 甘薯引进种 SSR 遗传多样性分析[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(5):984-997.
- [10] 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.
- [11] 蔡健,祝旋,谢实龙,等. 利用 EST-SSR 标记和形态性状检测 31 个芍药品种的遗传多样性[J]. 华北农学报, 2016,31(S1):92-96.
- [12] CHENG Y, LIU J, ZHANG H, et al. Transcriptome analysis and gene expression profiling of abortive and developing ovules during fruit development in hazelnut [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10(4):e0122072.
- [13] 邓阳川,向丽,苏燕燕,等. 基于转录组测序的花椒属物种 EST-SSR 标记开发[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2019,47(4):0019-0027.
- [14] 杨彬,许蔷薇,牛明月,等. 云锦杜鹃转录组 SSR 分析及其分子标记开发[J]. 核农学报, 2018,32(12):53-63.
- [15] 鄢秀芹,鲁敏,安华明. 刺梨转录组 SSR 信息分析及其分子标记开发[J]. 园艺学报, 2015,42(2):341-349.
- [16] 陈春林,田一萍,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.
- [17] 朱海生,黄丽芳,王彬,等. 美洲南瓜转录组 SSR 信息分析及其分子标记开发[J]. 中国细胞生物学学报, 2018,40(1):99-107.
- [18] 张庆田,李晓艳,杨义明,等. 蓝靛果忍冬转录组 SSR 信息分析及其分子标记开发[J]. 园艺学报, 2016,43(3):557-563.
- [19] 林开勤,李岩,赵德刚. 杜仲转录组 SSR 发掘及标记开发[J]. 分子植物育种, 2016,14(6):1548-1558.
- [20] 李小白,向林,罗洁,等. 转录组测序(RNA-seq)策略及其数据在分子标记开发上的应用[J]. 中国细胞生物学学报, 2013,35(5):720-726.
- [21] 李小白,张明龙,崔海瑞. 油菜 EST 资源的 SSR 信息分析[J]. 中国油料作物学报, 2007,29(1):20-25.
- [22] 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.
- [23] 张水明,陈程,龚凌燕,等. 蝴蝶兰 EST 资源 SSR 标记分析与开发[J]. 园艺学报, 2012,39(6):1191-1198.
- [24] 宗宇,王月,朱友银,等. 基于中国樱桃转录组的 SSR 分子标记开发与鉴定[J]. 园艺学报, 2016,43(8):1566-1576.
- [25] 张敏,周彩红,陈焘,等. 榧树转录组 SSR 信息分析及其分子标记开发[J]. 果树学报, 2017,34(10):1258-1265.
- [26] 张华丽,丛日晨,王茂良,等. 基于万寿菊转录组测序的 SSR 标记开发[J]. 园艺学报, 2018, 45(1):159-167.
- [27] VARSHNEY R K, GRANER A, SORRELLS M E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications[J]. *Trends in Biotechnology*, 2005, 23(1):48-55.
- [28] SAHA M C, COOPER J D, MIAN M A, et al. Tall fescue genomic SSR markers: development and transferability across multiple grass species[J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 2006, 113(8):1449-1458.
- [29] SAHA M C, MIAN M A R, EUJAYL I, et al. Tall fescue EST-SSR markers with transferability across several grass species[J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 2004, 109(4):783-791.
- [30] ZHENG X, CHENG P, YING D, et al. Development of microsatellite markers by transcriptome sequencing in two species of *Amorophyllus* (Araceae) [J]. *Bmc Genomics*, 2013,14(1):490-490.
- [31] 于海萍. 牡丹 SSR 分子标记的开发及其在亲缘关系分析中的应用[D]. 北京:北京林业大学,2013.
- [32] 张嘉. 基于 SSR 的中国芍药品种分子身份证构建及观赏性状关联分析[D]. 北京:北京林业大学, 2016.

(责任编辑:张震林)