

钱丽华, 严建立, 吴晓疆, 等. 基于滇黄精转录组序列的 SSR 标记开发及其在黄精属资源分析中的应用[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(5): 1120-1131.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.05.004

基于滇黄精转录组序列的 SSR 标记开发及其在黄精属资源分析中的应用

钱丽华¹, 严建立¹, 吴晓疆², 阮松林¹, 尹舒雅¹, 崔海瑞²

(1. 杭州市农业科学研究院, 浙江 杭州 310024; 2. 浙江大学原子核农业科学研究所, 浙江 杭州 310058)

摘要: 本研究基于滇黄精转录组序列开发简单重复序列 (SSR) 标记并将其应用于黄精属资源分析。设计合成了 45 对 SSR 引物, 经 PCR 扩增验证, 选择其中 20 对 SSR 引物对 75 份黄精属资源进行分析。结果表明, 共在 46 416 个 Unigene 中检出含有二核苷酸~六核苷酸重复类型的 SSR 位点 60 238 个, 序列 SSR 发生频率为 22.78%, 平均分布距离约 7.07 kb; SSR 位点中的主导类型是二核苷酸和三核苷酸重复, 分别占 50.06% 和 34.89%。测试的 45 对 SSR 引物中有 34 对 (75.56%) 可扩增 SSR 条带。筛选的 20 对引物共扩增出 153 个条带, 多态率为 98.69%, 每对引物扩增条带 4.00~14.00 个, 平均 7.65 个, 不同 SSR 标记的多态性信息含量为 0.626~0.973, 平均为 0.870。75 份材料的等位基因数和遗传相似系数分别为 7.00~52.00 个和 0.531~0.941, 平均值分别为 24.65 个和 0.689, 显示出丰富的遗传多样性。基于 SSR 标记分析的聚类图显示, 在遗传相似系数 0.666 处可将供试材料分为 4 类, 较好地反映了供试材料的分类归属。此外, 还发现 5 份多花黄精材料具有特异性的 SSR 条带扩增或缺失, 可作为不同多花黄精材料鉴定的重要分子依据。本研究开发的 SSR 标记多态性较高, 能够有效揭示黄精属种质资源的遗传多样性, 对于丰富黄精分子标记种类、构建遗传图谱、促进种质资源的评价与育种应用、开展特定性状的辅助选择等研究都具有重要的意义。

关键词: 黄精; 转录组; SSR 标记开发; 资源分析

中图分类号: S567.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)05-1120-12

Development of simple sequence repeat (SSR) markers based on transcriptome sequences of *Polygonatum kingianum* and their application in analysis of *Polygonatum* germplasm resources

QIAN Li-hua¹, YAN Jian-li¹, WU Xiao-jiang², RUAN Song-lin¹, YIN Shu-ya¹, CUI Hai-rui²

(1. Hangzhou Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310024, China; 2. Institute of Nuclear-Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: In this study, simple sequence repeat (SSR) markers were developed based on transcriptome sequence data of *Polygonatum kingianum* and were utilized in germplasm resource analysis of *Polygonatum*. Forty-five pairs of SSR primers were designed and synthesized, then 20 of them were selected by PCR amplification verification test to analyse 75 *Polygonatum* resources. The results showed that, a total of 60 238 SSR loci including dinucleotide to hexanucleotide repeats were detected from

46 416 Unigenes in *P. kingianum* transcriptome, with an occurring frequency of 22.78% and an average distribution distance of 7.07 kb. Dinucleotide repeat and trinucleotide repeat were the dominant types, with frequencies of 50.06% and 34.89% of all SSRs, respectively. Among 45 pairs of SSR primers, 34 of them showed amplification ability, which

收稿日期: 2022-10-27

基金项目: 杭州市重点研发项目 (202002A03)

作者简介: 钱丽华 (1975-), 女, 浙江杭州人, 高级农艺师, 主要从事中药材生物技术和遗传育种研究。 (Tel) 0571-87093826; (E-mail) 358843884@qq.com

通讯作者: 崔海瑞, (E-mail) hrcui@zju.edu.cn

accounted for 75.56%. A total of 153 bands were amplified by the selected 20 pairs of primers, with a polymorphism rate of 98.69%. Each pair of primer could amplify 4.00–14.00 bands, with an average of 7.65 bands. The polymorphic information content varied from 0.626 to 0.973 for different SSR markers, with an average value of 0.870. Number of allele genes and genetic similarity coefficients of 75 materials were 7.00–52.00 and 0.531–0.941 respectively, and the average values were respectively 24.65 and 0.689, which displayed rich genetic diversity. A dendrogram constructed based on SSR markers showed that, the test materials could be classified into four cluster groups with the genetic similarity coefficient of 0.666, which presented a good reflection of affiliation in taxonomy of tested *Polygonatum* materials. In addition, five *P. cyrtoneuma* materials showed specific present or absent SSR bands, which could be used as important molecular basis for identification of different materials. The SSR markers developed in this study were highly polymorphic and could be used to effectively reveal the genetic diversity of the *Polygonatum* germplasm resources. The markers are of great significance for enriching molecular marker types, constructing genetic linkage map, promoting the evaluation and breeding application of germplasm resources, and carrying out assisted selection of specific traits in *Polygonatum*.

Key words: *Polygonatum*; transcriptome; simple sequence repeat (SSR) marker development; resource analysis

黄精是多年生草本植物,属百合科(Liliaceae)黄精属(*Polygonatum* Mill),全世界有70余种,主要分布于北半球,分布地包括中国、朝鲜半岛、俄罗斯、欧洲和北美等^[1]。滇黄精(*Polygonatum kingianum*)、黄精(*P. sibiricum*)和多花黄精(*P. cyrtoneuma*)的根茎统称为黄精,含有甾体皂苷类、多糖类、黄酮类、生物碱类等多种活性成分,在抗衰老、抗肿瘤、免疫调节、抗菌、抗病毒、降血糖血脂等方面具有重要的药用价值^[1-2],作为药食同源药材,黄精在保健品、食品、日化领域都有广泛应用。

种质资源的鉴定与科学评价是合理利用遗传资源和选育新品种的基础。中国黄精属种质资源有30余种^[3],传统的鉴别大多依据产地和形态,但因其植物形态上具有过渡性,生药学性状较相似,地理分布存在重叠性,种间也常伴有杂交现象而界限模糊,导致其分类和种的识别与鉴定十分困难,且存在争议^[4-6]。与传统鉴别方法相比,DNA分子鉴定技术可在基因组水平上揭示植物存在差异的内在遗传本质,因其客观性与准确性迅速成为传统中药鉴定的重要手段,并在黄精属植物中得到了应用^[7-8]。

简单重复序列(SSR)是指基因组中以几个核苷酸(一般1~6个)为基本单位的重复序列重复多次构成的一段DNA,其长度具有高度变异性,是建立多态性DNA标记的资源^[9],其种属特异性强,在品种鉴别和育种中应用很广^[10-11]。在黄精属植物研究中,基于生物素富集法^[12-13]、特异性长度扩增片段测序(SLAF-seq)^[14]、基因组测序^[15]、转录组测序^[16-17]等不同策略,已开发了一些SSR引物,分析了引物在黄精属植物间的可转移性^[12-13],并利用这

些SSR标记进行了指纹图谱构建^[16]和遗传多样性分析^[14-15]。这些研究为黄精属植物的准确鉴别和进一步开展新品种选育奠定了基础。

目前,黄精属植物能够利用的SSR标记数量较少,尚不能满足相关遗传研究与育种的实际需要^[14,17]。转录组测序技术是近年来新崛起的全面快速获取物种特定组织或器官在某状态下的所有转录本信息的研究方法,在药用植物研究中也得到了广泛应用^[18-20]。转录组测序获得的数据为SSR标记的开发提供了良好的基础。本研究对滇黄精转录组序列中的SSR位点与特征进行挖掘和分析,开发SSR标记并将其用于75份黄精属植物资源的分析,以为黄精属种质资源的合理利用与新品种选育提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试黄精属植物材料75份,均种植于杭州市农业科学研究院黄精资源圃。其中多花黄精53份、黄精17份、长梗黄精4份、川黄精1份(表1)。

1.2 基因组DNA提取

取黄精幼嫩叶片,洗净晾干后按每份100~200 mg放入1.5 ml离心管中,加液氮用组织研磨器(上海净信实业发展有限公司产品)在60 Hz频率下磨至粉末状,按DNA抽提试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司产品)操作说明书提取DNA,采用微量分光光度计(Thermo Scientific公司产品)测定DNA浓度,经1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA的质量和完整性,-15℃保存备用。

表 1 供试的 75 份黄精属材料信息

Table 1 Information of 75 accessions of *Polygonatum* germplasms resources

编号	物种	材料编号	采集地	材料类型
1	多花黄精	H-QDN-1	贵州省岑巩县注溪镇新田坳	野生种
2	多花黄精	H-QDN-2	贵州省岑巩县龙田镇代店村	野生种
3	多花黄精	H-QDN-3	贵州省岑巩县龙田镇路溪村	野生种
4	多花黄精	H-QDN-4	贵州省岑巩县天马镇杜麻村	野生种
5	多花黄精	H-QDN-5-2	贵州省岑巩县客楼镇丰坝村	野生种
6	黄精	H-QDN-6	贵州省天柱县蓝田镇坪寨村	野生种
7	黄精	H-QDN-7	贵州省天柱县凤城镇八甲村	野生种
8	多花黄精	H-QDN-12	贵州省锦屏县彦洞乡瑶白村	野生种
9	多花黄精	H-QDN-13	贵州省锦屏县固本乡美乐村	野生种
10	多花黄精	H-QDN-14	贵州省剑河县磻盘溪镇洞脚村	野生种
11	多花黄精	H-QDN-15	贵州省剑河县磻溪镇平坞村	野生种
12	多花黄精	H-QDN-16	贵州省剑河县久仰镇久丢村	野生种
13	多花黄精	H-QDN-17	贵州省剑河县太拥镇久仪村	野生种
14	多花黄精	H-QDN-18	贵州省黎平县大稼乡盘现村	野生种
15	多花黄精	H-QDN-19	贵州省黎平县高屯街道八舟村	野生种
16	多花黄精	H-QDN-20	贵州省黎平县德凤街道蒲洞村	野生种
17	多花黄精	H-QDN-21	贵州省黎平县顺化乡顺洞村	野生种
18	黄精	H-QDN-22	贵州省榕江县定威乡控乃村	野生种
19	黄精	H-QDN-23	贵州省榕江县定威乡定旦村	野生种
20	黄精	H-QDN-24	贵州省榕江县定威乡定旦村	野生种
21	黄精	H-QDN-25	贵州省榕江县八开镇常寨村	野生种
22	黄精	H-QDN-26	贵州省榕江县平阳乡归备村	野生种
23	多花黄精	H-QDN-28	贵州省榕江县塔石乡同流村	野生种
24	多花黄精	H-QDN-29	贵州省榕江县计划乡计怀村	野生种
25	多花黄精	H-QDN-30	贵州省榕江县计划乡摆吉村	野生种
26	多花黄精	H-QDN-31	贵州省从江县往洞镇信地村	野生种
27	多花黄精	H-QDN-32	贵州省从江县谷坪乡高余村	野生种
28	多花黄精	H-QDN-33	贵州省从江县高增乡占里村	野生种
29	多花黄精	H-QDN-34	贵州省从江县西山镇滚郎村	野生种
30	多花黄精	H-QDN-35	贵州省从江县翠里乡高华村	野生种
31	多花黄精	H-QDN-36	贵州省从江县西山镇拱仔村	野生种
32	多花黄精	H-QDN-38-2	贵州省丹寨县兴仁镇兴仁村	野生种
33	多花黄精	H-QDN-39-2	贵州省丹寨县兴仁镇中营村	野生种
34	多花黄精	H-QDN-40-2	贵州省丹寨县扬武镇联盟村	野生种
35	多花黄精	H-QDN-41-2	贵州省丹寨县扬武镇瓦厂村	野生种
36	多花黄精	H-QDN-43	贵州省三穗县滚马乡塘冲水库库区	野生种
37	多花黄精	H-QDN-44	贵州省岑巩县天星乡野牛山村	野生种
38	多花黄精	H-QDN-45	贵州省锦屏县平秋镇平秋村	野生种
39	多花黄精	H-QDN-46	贵州省黎平县德凤街道矮枳村	野生种
40	多花黄精	H-QDN-47	贵州省从江县谷坪乡归逗沟	野生种
41	多花黄精	H-QDN-48	贵州省剑河县岑松镇对门村	野生种
42	多花黄精	H-QDN-49	贵州省剑河县柳川镇公俄村	野生种
43	多花黄精	H-QDN-50	贵州省雷山县西江镇黄里村	野生种

续表 1 Continued 1

编号	物种	材料编号	采集地	材料类型
44	多花黄精	H-HZ-1	浙江省杭州市西山森林公园	野生种
45	多花黄精	H-HZ-2	浙江省杭州市西山森林公园	野生种
46	多花黄精	H-HZ-3	浙江省杭州市西山森林公园	野生种
47	多花黄精	H-HZ-4	浙江省杭州市西山森林公园	野生种
48	多花黄精	H-HZ-5	浙江省杭州市西山森林公园	野生种
49	多花黄精	H-HZ-6	浙江省杭州市西山白龙潭景区	野生种
50	多花黄精	H-CA-1	浙江省淳安县鲁家田村	野生种
51	多花黄精	H-CA-3	浙江省淳安县鲁家田村	人工栽培种
52	多花黄精	H-CA-4	浙江省淳安县左口乡	野生种
53	多花黄精	H-CA-4-2	浙江省淳安县左口乡	野生种
54	多花黄精	H-CA-4-3	浙江省淳安县左口乡	野生种
55	多花黄精	H-CA-6	浙江省淳安县临歧镇瑶山乡何家村	野生种
56	多花黄精	H-CA-7	浙江省淳安县临歧镇瑶山乡何家村	野生种
57	多花黄精	H-JD-1	浙江省杭州市建德市李家镇长林村	人工栽培种
58	多花黄精	H-FY-1	浙江省杭州市富阳区	人工栽培种
59	多花黄精	H-FY-2	浙江省杭州市富阳区万市镇	人工栽培种
60	多花黄精	H-LA-2	浙江省杭州市临安区太湖源镇	野生种
61	川黄精	H-JS-1	浙江省江山市御园珍稀植物开发公司	组培苗
62	黄精	H-QDN-5	贵州省岑巩县客楼镇丰坝村	野生种
63	黄精	H-QDN-8	贵州省天柱县高酿镇章寨村	野生种
64	黄精	H-QDN-9	贵州省天柱县社学街道溪口村	野生种
65	黄精	H-QDN-10	贵州省天柱县岔处镇鸡田村	野生种
66	黄精	H-QDN-37	贵州省从江县斗里乡马鞍村	野生种
67	黄精	H-QDN-38	贵州省丹寨县兴仁镇兴仁村	野生种
68	黄精	H-QDN-39	贵州省丹寨县兴仁镇中营村	野生种
69	黄精	H-QDN-40	贵州省丹寨县扬武镇联盟村	野生种
70	黄精	H-QDN-41	贵州省丹寨县扬武镇瓦厂村	野生种
71	黄精	H-LA-1	浙江省杭州市临安区太湖源镇	野生种
72	长梗黄精	H-CA-2	浙江省淳安县枫树林鲁家田村	野生种
73	长梗黄精	H-JD-2	浙江省杭州市建德市李家镇长林村	人工栽培种
74	长梗黄精	H-JD-3	浙江省杭州市建德市大同镇北坑源村	野生种
75	长梗黄精	H-LA-3	浙江省杭州市临安区太湖源镇	野生种

1.3 序列来源与 SSR 挖掘

从美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/474626>) 下载滇黄精 (*Polygonatum kingianum*) 鞭芽转录组测序后组装和拼接的 Unigene 序列, 共 203 772 条, 总长度约 426 Mb^[21]。利用 SS-RIT 软件对这些序列按二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸至六核苷酸重复分别不少于 6 次、5 次、4 次的要求进行 SSR 查找, 对查找出的 SSR 相关信息进行统计和分析。

1.4 SSR 引物设计与 PCR

根据 SSR 相关信息统计和分析结果, 参考重复基元的出现频率和重复次数, 选择部分 SSR 用 PRIMER 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) 设计引物, 引物由杭州擎科生物技术有限公司合成。

从参试样品中随机抽取 10 个样本, 将其 DNA 等量混合作为模板, 并对引物进行不同退火温度 (50~62 ℃) 的 PCR 测试。SSR-PCR 反应体系为: 含 7.5 μl 的 2×Taq Master Mix (北京百奥莱博科技有限公司产品)、1.0 μl DNA 模板 (约 50 ng)、上下游

引物各 0.5 μl (终浓度 0.4 $\mu\text{mol/L}$) 和 5.5 μl 的超纯水。PCR 循环条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 35 个循环, 每个循环 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 适宜温度退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min。对 75 份黄精资源分析时 PCR 扩增所采用的退火温度为 58 $^{\circ}\text{C}$ 。

混合模板测试引物时采用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳 (AGE) 检测有无扩增产物。黄精资源分析时采用 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测扩增产物, 进样量为 1 μl , 以 110~120 V 恒压电泳约 2.5 h, 银染检测, 扫描电泳图谱并保存。

1.5 扩增条带的统计与分析

对所扩增产物的电泳图谱进行条带数量记录 (有记作 1, 无记作 0), 生成原始数据矩阵。根据 Botstein 等^[22] 描述的方法计算多态性信息含量 (PIC 值)。采用 NTSYS-pc 2.10 软件分析数据, 利用 SIMQUAL 程序计算各黄精材料间的遗传相似系数, 用非加权成对算术平均法 (UPGMA) 进行聚类生成聚类图。

2 结果与分析

2.1 滇黄精转录组 SSR 的分布、频率及特征

对滇黄精 203 772 条 Unigene 序列搜索后发现 46 416 条序列含有 SSR 位点 (表 2)。其中 36 003 条序列只含 1 个 SSR 位点, 其他 10 413 条序列含有 2 个及以上的 SSR 位点, 个别序列所含 SSR 位点数高达 9 个。

表 2 含简单重复序列 (SSR) 位点的序列数分布

Table 2 Number distribution of sequences with different simple sequence repeat (SSR) loci

SSR 位点数 (个)	序列数 (条)
1	36 003
2	7 966
3	1 791
4	450
5	145
6	33
7	18
8	9
9	1

在滇黄精总长度约 426 Mb 的转录组序列中共检出 60 238 个 SSR 位点 (表 3), 平均约 7.07 kb 检测到 1 个 SSR, 序列发生频率 (含有 SSR 的序列数与序列总数之比) 为 22.78%, 出现频率 (SSR 总数与序

列总数之比) 为 29.56%。

表 3 滇黄精转录组简单重复序列 (SSR) 类型与频率

Table 3 Types and frequency of simple sequence repeat (SSR) in *Polygonatum kingianum* transcriptome

类型	数目	各核苷酸类型占比 (%)	各核苷酸类型出现频率 (%)
二核苷酸	30 153	50.06	14.80
三核苷酸	21 015	34.89	10.31
四核苷酸	4 111	6.82	2.02
五核苷酸	1 750	2.90	0.86
六核苷酸	3 209	5.33	1.57
总计	60 238	100.00	29.56

在检出的 SSR 重复类型中, 二核苷酸至六核苷酸重复均有出现, 但频率差异很大 (表 3)。其中二核苷酸和三核苷酸重复占主导地位, 出现频率分别为 14.80% 和 10.31%, 分别占总 SSR 的 50.06% 和 34.89%; 四核苷酸至六核苷酸重复数量较少, 出现频率分别为 2.02%、0.86% 和 1.57%, 分别占 SSR 总数的 6.82%、2.90% 和 5.33%。

滇黄精转录组序列中含有的 SSR 基元种类有 262 种, 各基元重复次数为 4~52 次, 基元越长, 重复次数越少 (表 4)。尽管四核苷酸至六核苷酸 SSR 发生频率较低, 但其基元的种类却较多, 占重复基元总数的 94.7%; 而占据主导地位的二核苷酸和三核苷酸重复基元种类则较少, 仅占重复基元总数的 5.3%。

表 4 滇黄精转录组中简单重复序列 (SSR) 的基元种类与重复次数

Table 4 Motif type and repeat times of simple sequence repeat (SSR) in *Polygonatum kingianum* transcriptome

类型	基元种类	重复次数	平均长度 (bp)
二核苷酸	4	6~52	18.29
三核苷酸	10	5~44	17.57
四核苷酸	28	4~12	17.33
五核苷酸	55	4~8	21.23
六核苷酸	165	4~13	26.09
合计	262		

在二核苷酸重复基元中, 出现频率较高的依次是 AG、AT、AC 和 CG, AG 和 AT 重复次数大多分布在 6~12, 而 AC 和 CG 则以 6~9 次重复为主 (表 5)。在三核苷酸重复基元中, 出现较多的 4 种基元依次是 AGG、AAG、AAT 和 ACG, 占三核苷酸 SSR 的比例

均在 13.0%以上,其他 6 种基元出现的频率较低,占三核苷酸 SSR 的比例为 4.7%~8.1%。所有三核苷酸重复基元均以 5~8 次重复为主,重复次数在 9 次及以上的只占约 3.2%。

表 5 滇黄精转录组中二核苷酸与三核苷酸简单重复序列 (SSR) 的基元与次数分布

Table 5 Motifs and number distribution of dinucleotide and trinucleotide simple sequence repeat (SSR) in *Polygonatum kingianum* transcriptome

基元	不同 SSR 重复次数的数目											
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	≥16
AG/CT	/	6 111	4 339	2 869	2 015	1 399	1 217	905	246	359	278	1 884
AT/AT	/	1 597	889	658	495	292	328	318	78	128	102	628
AC/GT	/	1 100	621	406	230	171	80	87	27	21	31	151
CG/CG	/	47	13	21	11	0	0	1	0	0	0	0
AGG/CCT	2 145	918	444	292	42	35	18	2	7	2	0	1
AAG/CTT	2 143	929	375	194	21	23	16	13	17	6	5	5
ACG/CGT	1 631	648	286	227	23	28	3	6	2	4	1	1
AAT/ATT	1 452	698	342	194	25	48	39	27	8	18	19	11
CCG/CGG	1 054	447	131	64	2	1	0	1	0	0	0	0
AGC/GCT	836	275	118	59	10	5	1	0	2	0	0	0
ATC/GAT	763	218	175	99	9	7	7	7	1	3	4	2
AAC/GTT	663	221	191	61	2	18	0	0	0	1	0	0
ACT/AGT	656	153	41	89	2	6	0	4	13	1	1	14
ACC/GGT	544	290	175	98	20	17	10	2	7	0	2	18
总计	11 887	13 652	8 140	5 331	2 907	2 050	1 719	1 373	408	543	443	2 715

2.2 SSR 引物筛选

根据滇黄精转录组序列中 SSR 的挖掘结果,设计合成了 45 对引物(表 6),并进行温度梯度 PCR 测试。经测试发现,11 对引物(PkSSR3、PkSSR12、PkSSR15、PkSSR16、PkSSR17、PkSSR19、PkSSR20、PkSSR34、

PkSSR38、PkSSR42、PkSSR45)无扩增产物,其余 34 对引物有扩增产物,可扩增引物约占 75.56%,其中 31 对引物扩增出了预期大小的条带,另外 3 对引物(PkSSR1、PkSSR13、PkSSR27)的扩增产物大小大于预期长度,图 1 是部分引物的扩增结果。

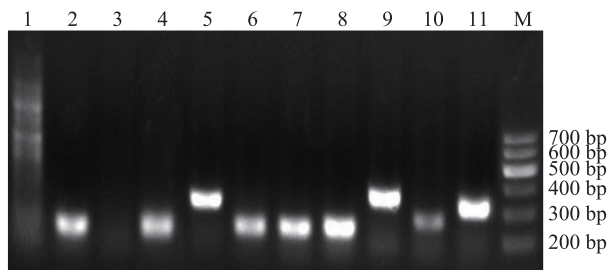
表 6 用于 PCR 验证的简单重复序列 (SSR) 引物

Table 6 Simple sequence repeat (SSR) primers for PCR validation

引物编号	SSR 基元	正向引物序列 (5'→3')	反向引物序列 (5'→3')	预期产物大小 (bp)
PkSSR1	AG	CGTGTGTGTGTTCTGTGTG	AGAGTCAGGATCTCTCTGTGA	140
PkSSR2	AG	GCGTGATGATTTGCCCATT	CGACACCCCGTCTCTCTA	82
PkSSR3	AG	TGAGTCAATGTATGTCCACATGC	ACAAATCCCTAAATCCCACACT	149
PkSSR4	AG	ACCACAAAAAGATCGCCGC	GACCGCAGCGACTAGACTG	120
PkSSR5	AG	ACAGGAGTTAGGGAGGTCAAAG	TCTTCCTCCATTTCTCTCACTT	199
PkSSR6	AG	TGTACACGTTCTCCTCGCG	TCCTCCTCTCGATCTCTTCTCTC	100
PkSSR7	AG	CAACAACAGCAAAAGCTAGGGT	CATCGTCGGTCTCCTCGTAAA	150
PkSSR8	CT	GCACAACACATGCTCCTCTTC	AGCTCCTCTGCCTCTCCAT	141
PkSSR9	CT	TGGTGGCAAATTCCAAAGCTC	GCATTGTCGGCATTTGGATGA	200
PkSSR10	CT	TGGCTGTGGCTTCTCAAGTT	TTGTTGTAAGGTGAGAGGGACC	149
PkSSR11	CT	AGCCAACTGACAGGACAACA	CTTGCTGAGCTCTAGGGGAG	159
PkSSR12	AT	ACCACCGGATCCTTCAAAAAAC	TCTGAATCAGCATAATGGCGATG	200
PkSSR13	AT	CAAGAAACACTCACTCACTCACC	TGCGAGCCATAGCAAATAGGA	197
PkSSR14	AT	GTTCTCAAGTCCGCTCCCAA	AGCTGGAGTTTCAATGGGAAAGA	149
PkSSR15	AT	GGCAGCCCAGTTAACCAAAAG	GGGAGGGGTCATGAAGAAACA	124

续表 6 Continued 6

引物编号	SSR 基元	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')	预期产物大小 (bp)
PkSSR16	GT	TGCTCGCAGGACCAAAAGAT	CGGTATCTCCTGCATGGCAA	166
PkSSR17	AAT	CGAGCATCAACAGACGCAAG	CCAAGGTTGATGATGACGGGA	136
PkSSR18	TGC	GCTGTTGCTGTGGTTGCATA	GTTACAGCAGCAGCAACAGC	98
PkSSR19	AGG	CGGACGCTACATTGGGATGA	ACTCAAGATCCAACCTCCCTTCC	89
PkSSR20	TGC	CACAGACGCATTCCAGAACG	ACTTCTCCGTCTATGAACCGG	96
PkSSR21	AGG	GGAGTCGTCGAAGTTGTGGT	CCCTGCCATCTCACCAACAT	99
PkSSR22	AGG	ACACTGCAACCATGATGAACAGA	ACCTCGTTTGGTTGGTTGCA	98
PkSSR23	CGT	TGCTCATGAGGGGAAAAGC	GAGGTTGAGAAAATTGCAGCCA	173
PkSSR24	CTT	ATTCGAGAGTCGGAATCGGG	TCCGGCTCATTTATTGGCTGA	117
PkSSR25	CTT	CGTCAGGGTCGACTTCGTAC	CGTGGTCGGAATGCTAATGC	95
PkSSR26	CTT	CGGACGATAGCGGTGAAGAT	GCGTTTGTGTTTCCTCCCA	143
PkSSR27	CCT	GGCCGAGGAACCATTGGA	CTTCCTCCTCCTCCTGCTCT	100
PkSSR28	AAAT	AGGACTAGTGGGACTGCACT	TCCTTTTCTTGTATCCGACCACT	114
PkSSR29	ATTT	TCCCAGTTGATACCATTTCTCCA	TGATTGATGGCTACGGCTGT	119
PkSSR30	AAAT	GCGAGAGAGTTTGGCTAGCA	ATCGTCCTTGTGGCACCTT	144
PkSSR31	CT	CGTCCATCTCCGACGTACAC	AGCAGCAGCAACCAGAAGAA	165
PkSSR32	ATTTT	CGCGCGTGTCCATTGTTTTA	CGGCTCCTGTAAACGTGTGTA	150
PkSSR33	GT	TGTGGGTAAGTGACTGGTGG	GTGTCCAACACGACAACTTTGA	148
PkSSR34	AT	ACACAAAACCCCAATATGCAA	GCAAATTGTTCTCGCTGT	148
PkSSR35	GT	GAACTTTAAGAACTGAGCAGCGA	ACGTTTGCTCTTCAAGGCATAAG	158
PkSSR36	AGG	GGAGAGATTAGCGGGTGCAG	ACCAAAATACCTCCACTGGATCC	148
PkSSR37	AT	CCCTTTTGTCTCGCATGCTT	AGCAGTTTAGGTACTGACAGTCA	145
PkSSR38	AG	GCAACTCACTGGCGAACATC	CACAAGACCCGTCTAGTGGT	148
PkSSR39	AAGTT	GATGGCGCCCAAAATCGAAG	AGCTTGGGTCTCATGTCGTATC	149
PkSSR40	AG	AGAGAGGGAGGGATGGAGAC	AGGAAGGGGAAAAGAGAGAGA	141
PkSSR41	AG	ACGGACGATCGATGCGTTC	GTGGAGACCTGTGCTACTTCT	149
PkSSR42	ACGTT	CCGCAACCATCATCTTCTCAG	CTGTAAGCCACTGGGGACG	149
PkSSR43	AGT	AAATTGTTTCGGCAGGCCAG	GGGATAGGATCTCCGAAAGTCAT	149
PkSSR44	AAAAT	ACATGAGTGCTCCCCAATT	AGTGCAACCCTCACAGACAAT	158
PkSSR45	AAAT	ACAGTCATACGGGCACTTCA	CCTGGCATCTGAACCTGCAA	158



1~11:引物 PkSSR1~PkSSR11 的扩增产物;M:DNA 分子标志物。
图 1 部分简单重复序列 (SSR) 引物在退火温度 58℃ 下扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果
Fig.1 Agarose gel electrophoresis result of PCR products from some simple sequence repeat (SSR) primer pairs at annealing temperature of 58℃

2.3 SSR 引物的多态性

选择其中条带清晰的 20 对 SSR 引物(表 7)对 75 份参试材料进行分析。20 对引物共扩增出 153 个条带,多态性条带 151 个,多态率为 98.69%。不同 SSR 的扩增条带数为 4.00~14.00 个,平均 7.65 个,多态性条带比率为 87.50%~100.00%。不同 SSR 标记分析所揭示的 75 份材料等位基因数为 7.00~52.00 个,平均 24.65 个。20 个 SSR 标记的 PIC 为 0.626~0.973,大多在 0.800 以上,平均值为 0.870。结果表明这些 SSR 标记的多态性较高,对不同材料具有较强的鉴别能力。

表 7 20 对引物的扩增与多态性

Table 7 Amplification and polymorphism of 20 primer pairs

引物编号	条带数 (个)	多态条带比率 (%)	等位基因数 (个)	PIC
PkSSR4	9	100.00	24	0.726
PkSSR5	4	100.00	7	0.626
PkSSR6	5	100.00	10	0.792
PkSSR7	4	100.00	13	0.865
PkSSR8	8	100.00	32	0.937
PkSSR10	8	100.00	21	0.900
PkSSR11	8	100.00	43	0.968
PkSSR18	10	100.00	52	0.973
PkSSR23	9	100.00	40	0.966
PkSSR24	6	100.00	17	0.864
PkSSR28	6	100.00	25	0.934
PkSSR30	8	87.50	26	0.919
PkSSR31	10	100.00	18	0.838
PkSSR33	7	100.00	16	0.722
PkSSR35	9	100.00	25	0.896
PkSSR36	14	92.86	30	0.905
PkSSR37	8	100.00	29	0.927
PkSSR39	8	100.00	34	0.947
PkSSR41	7	100.00	19	0.861
PkSSR43	5	100.00	12	0.831

PIC:多态性信息含量。

2.4 遗传多样性与亲缘关系聚类分析

采用 20 个 SSR 标记对 75 份黄精材料进行分析,发现有 5 份多花黄精材料出现特异性的 SSR 条带扩增或缺失(表 8)。其中 H-QDN-45 和 H-CA-1 具有特异性扩增条带,分别来自标记 *PkSSR31* 和 *PkSSR36*,而 H-QDN-49、H-QDN-43 和 H-HZ-4 这 3 份材料则表现为特异性条带缺失,缺失条带分别来自标记 *PkSSR5*、*PkSSR11*、*PkSSR41*。本试验中发现的这些特异性的 SSR 条带扩增和缺失可作为不同多花黄精材料鉴定的重要分子依据,也揭示了参试多花黄精材料遗传的特异性。

经聚类分析(图 2)发现:参试的 75 份材料的遗传相似系数为 0.531~0.941,大部分材料的遗传相似系数为 0.60~0.80,平均值约为 0.689。其中以多花黄精 H-CA-4(52 号)与 H-CA-4-2(53 号)间的遗传相似系数最高,这 2 个种源都来自淳安左口乡同一个采集点,因采集时发现两者叶片背部颜色有一定

差异而作为 2 个种源,实则为同一个种质,而多花黄精 H-QDN-38-2(32 号)与长梗黄精 H-LA-3(75 号)间遗传相似系数最低。从结果来看,笔者发现多数材料之间具有一定的遗传相似性,而少数材料之间遗传差异较大,且遗传相似系数变化范围较大,说明参试材料之间具有遗传多样性。

表 8 部分黄精材料显示的特异性条带

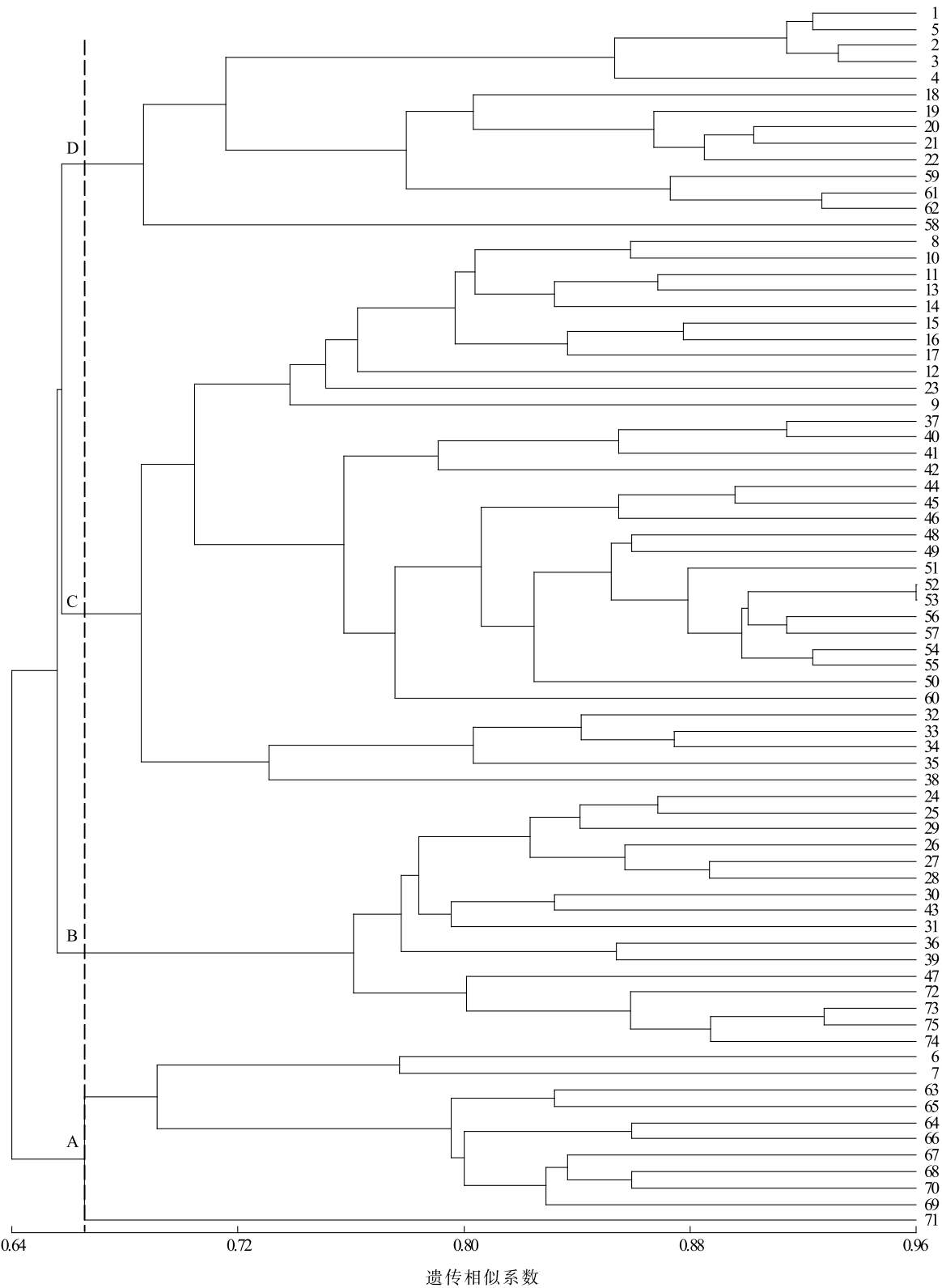
Table 8 Specific simple sequence repeat bands showed in some *Poligonatum* materials

条带类型	条带编号	材料编号
特异性扩增	PkSSR31-9	H-QDN-45
	PkSSR36-14	H-CA-1
特异性缺失	PkSSR5-1	H-QDN-49
	PkSSR11-1	H-QDN-43
	PkSSR11-2	H-QDN-43
	PkSSR41-3	H-HZ-4

在遗传相似系数约 0.666 处,可将参试材料划分为 4 个类群:A 和 C 均为单一种群,分别包含 11 份黄精和 34 份多花黄精,而 B 和 D 则为不同种混聚类群。其中,聚在 B 类的有 16 份材料,包括 12 份多花黄精和 4 份长梗黄精,长梗黄精在此类群中单独归入同一亚类;D 类有 14 份材料,包括 7 份多花黄精、6 份黄精和 1 份川黄精,且后两者也归入同一亚类。这一结果表明,聚类分析结果与种类归属符合度较好。

3 讨论与结论

前人研究结果表明,不同物种中 SSR 位点的分布和频率不同。造成这种差异的原因有三个:一是物种遗传基础特异性,有研究认为 SSR 出现频率随着物种基因组变大而越来越低,与物种单拷贝 DNA 百分比之间存在高度显著的正相关线性关系^[23];二是 SSR 搜索标准(SSR 重复类型及次数、长度等)不同,统计的 SSR 发生频率则相差较大;三是分析和统计的 SSR 序列数和类型等数据量不同。比如搜索的序列数可以从几千到几十万不等,统计的 SSR 类型也不尽相同,在党参^[24]、甘草^[25]、黄秦艽^[26]和厚朴^[27]中统计的 SSR 数据中包含单核苷酸重复,而在杜仲^[28]、多花黄精^[17]以及本研究中统计的 SSR 则未包含单核苷酸重复。本研究共在 46 416 条序列



材料编号同表 1。A、B、C、D 表示在遗传相似系数约 0.666 处划分的 4 个类群。
图 2 依据非加权成对算术平均法 (UPGMA) 建立的 75 份黄精种质的聚类图
Fig.2 Dendrogram constructed for 75 *Polygonatum* germplasm resources based on unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA)

中发现二核苷酸至六核苷酸 SSR 位点 60 238 个,序列发生频率 22.78%,平均分布频率约 1/7.07 kb。与模式植物水稻和拟南芥相比,滇黄精 SSR 发生频率和分布频率高于拟南芥,低于水稻^[29]。与其他药用植物相比,滇黄精序列 SSR 发生频率高于杜仲(2.9%)^[28]、丹参(3.79%)^[30]、人参(7.3%)^[31]和党参(12.22%)^[24],但低于甘草(60.10%)^[25]、黄秦艽(30.73%)^[26]和厚朴(52.75%)^[27],平均分布频率高于杜仲(1/26.13 kb)^[28]、丹参(1/12.74 kb)^[30],但低于人参(1/5.80 kb)^[31]、党参(1/4.52 kb)^[24]、甘草(1/3.23 kb)^[25]、黄秦艽(1/4.11 kb)^[26]和厚朴(1/3.43 kb)^[27]。与黄精属植物相比,滇黄精 SSR 发生频率远高于多花黄精(9.73%),但分布频率则略低于多花黄精(1/5.91 kb)^[17]。

不同植物中 SSR 优势重复基元的出现数量不同,这可能与其编码相应蛋白质时使用频率有关,比如拟南芥^[32]。理论上,在数量足够且无偏倚的情况下,单核苷酸至六核苷酸重复基元可能产生的种类分别有 2 种、4 种、10 种、33 种、102 种、350 种^[33]。本研究从滇黄精转录组中搜索出的 SSR 基元种类也较为丰富,共 262 种。二核苷酸和三核苷酸理论上的重复类型全部出现,但四核苷酸至六核苷酸只出现了理论上的一部分,说明滇黄精转录组中 SSR 也存在一定的偏倚性。在滇黄精转录组 SSR 中,二核苷酸和三核苷酸重复是主要类型,分别占总 SSR 的 50.06% 和 34.89%,这与多花黄精及大多数植物表达序列中 SSR 以二核苷酸、三核苷酸为主要类型相符^[29,34]。从滇黄精占主导地位的二核苷酸、三核苷酸重复基元种类来看,二核苷酸重复基元以 AG/CT 最多,GC/CG 最少,种类与多花黄精相近,但三核苷酸重复基元种类滇黄精比多花黄精多出 ACG/CGT 和 ACC/GGT 2 种基元,且主要的 2 种基元 AGG/CCT (2 145) 与 AAG/CTT (2 143) 数量基本相近,而多花黄精中 AGG/CCT 则比 AAG/CTT 高出 5.4%^[17],但均以 AGG/CCT 最多。而同样是单子叶植物的小麦中却以 AAC/GTT 居多,大麦、玉米、水稻和高粱则均以 CCG/CGG 为主要类型^[29]。

基于 NCBI 数据库中大量的表达或转录组序列

可开发多种类型的分子标记^[35-36],其中开发较多和应用广泛的是 SSR,也被称为 genic-SSR^[10,37]。由于来自已知表达的基因序列,所以能够更好地帮助挖掘植物重要性状连锁的基因,了解基因与表现型之间的联系^[38-39]。此外 genic-SSR 序列的两端单拷贝序列保守性较高,具有较好的可转移性^[35-36,40],可用于种内甚至是种间的遗传多样性评价。本研究中有 24.4% 的引物无扩增产物,这与多花黄精^[17]、油菜^[41]及茶树^[42]中的研究结果类似,这可能是滇黄精与多花黄精、长梗黄精、川黄精对应的序列存在差异导致引物同源性低、引物与模板不匹配或者跨越内含子等原因造成的。

目前基于转录组测序已对多花黄精和黄精开发了 genic-SSR 标记^[16-17],但数量有限且应用甚少。王世强等^[16]根据黄精转录组测序数据鉴定出黄精多糖代谢合成途径中关键酶基因的 SSR 位点,筛选出 12 对多态性丰富的 SSR 引物,并应用在 32 份野生黄精资源的遗传多样性分析中,*PIC* 平均为 0.46,SSR 标记聚类结果能揭示供试材料之间的亲缘关系。然而关于这 12 对引物的研究结果反映的只是不同材料多糖代谢的遗传差异,难以用来全面评估材料间的遗传多样性。陈友吾等^[17]通过对多花黄精转录组测序数据的分析,发现 SSR 位点出现频率高,重复单元类型丰富,在测试的 50 对 SSR 引物中,有 29 对(58%)扩增出符合预期的产物,但这些标记尚未应用于黄精属植物的资源分析,其多态性还有待实际研究去评判。本研究在明确滇黄精转录组测序数据中 SSR 位点信息和特征的基础上,测试了 45 对 SSR 引物,有 34 对(75.6%)具有扩增产物,并利用其中 20 对引物对黄精、多花黄精、长梗黄精及川黄精共 75 份资源进行了分析,发现所测试的引物具有较高的多态性,*PIC* 平均值达到 0.870。聚类结果能够反映参试材料的亲缘关系,与分类归属具有较好的吻合度。SSR 可扩增引物比率和 *PIC* 均高于上述 2 篇文献^[16-17]报道的结果,同时也证明根据滇黄精 Unigene 序列设计的 SSR 引物对黄精、多花黄精、长梗黄精及川黄精均具有可转移性。

综上,本研究基于滇黄精转录组序列开发的 SSR 标记,是对现有滇黄精转录组数据的进一步发

掘和利用;所建立的标记对于丰富黄精属植物分子标记类型、构建遗传图谱、促进资源的评价与育种应用、开展特定性状的辅助选择等都具有重要的意义。

参考文献:

- [1] ZHAO P, ZHAO C C, LI X, et al. The genus *Polygonatum*: a review of ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2018, 214:274-291.
- [2] 张 娇,王元忠,杨维泽,等. 黄精属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(10): 1989-2008.
- [3] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志(第 15 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1978: 58-82.
- [4] 王雨婷,刘婉滢,沈舶宁,等. 黄精的本草考证[J]. *中医药学报*, 2019, 47(3): 81-86.
- [5] 田启建,赵 致. 黄精属植物种类识别及资源分布研究[J]. *现代中药研究与实践*, 2007, 21(1): 18-21.
- [6] 魏晓楠,郝铁成,刘庆华,等. 中药鉴别方法与技术探究[J]. *中国野生植物资源*, 2018, 37(4): 65-69.
- [7] 龙炳宏,蒋向辉,宋 荣,等. DNA 条形码在黄精属药用植物鉴定与遗传多样性分析中的应用[J]. *植物科学学报*, 2022, 40(4): 533-543.
- [8] 石乃星,文国松,赵明富. 黄精属植物 DNA 分子鉴定技术应用研究进展[J]. *植物遗传资源学报*, 2021, 22(5): 1209-1218.
- [9] TAUTZ D. Hyper-variability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers[J]. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(16): 6463-6471.
- [10] 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.
- [11] KALIA R K, RAI M K, KALIA S, et al. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants[J]. *Euphytica*, 2011, 177(3): 309-334.
- [12] LIU T, CHENG W J, ZHOU S, et al. Eleven polymorphic microsatellite loci in *Polygonatum umfilipes* and cross—amplification in other congeneric species [J]. *Conservation Genetics Resources*, 2010, 2(S1): 77-79.
- [13] CHENG W J, LIU T T, WU H L, et al. Isolation and characterization of twelve polymorphic microsatellite loci in *Polygonatum cyrtotoma* and cross—species amplification[J]. *Conservation Genetics Resources*, 2010, 2: 105-107.
- [14] 朱 巧,邓 欣,张树冰,等. 黄精属 6 种植物的 SSR 遗传差异分析[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(14): 2935-2943.
- [15] WOOKJIN K, YUN-UI J, YOUNGMIN K, et al. Evaluation of genetic diversity of *Polygonatum* spp by the analysis of simple sequence repeat[J]. *Korean Herb Medicine Informations*, 2014, 2(2): 41-47.
- [16] 王世强,王立儒,刘 帅,等. 基于 SSR 标记的黄精品种(系) DNA 指纹图谱库构建[J]. *分子植物育种*, 2018, 16(6): 1878-1887.
- [17] 陈友吾,廖荣俊,叶碧欢,等. 多花黄精转录组 SSR 位点分析及分子标记开发[J]. *中草药*, 2020, 51(1): 182-189.
- [18] 赵振宇,王仕玉,郭凤根,等. 转录组测序及其在药用植物上的应用[J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(2): 820-825.
- [19] 刘厚伯,上官艳妮,潘胤池,等. RNA-Seq 在药用植物研究中的应用[J]. *中草药*, 2019, 50(21): 5346-5354.
- [20] 慧 芳,刘秀岩,李宗谕,等. 转录组测序技术在药用植物研究中的应用[J]. *中草药*, 2019, 50(24): 6149-6155.
- [21] WANG Y, LIU X, SU H, et al. The regulatory mechanism of chilling-induced dormancy transition from endo-dormancy to non-dormancy in *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl rhizome bud [J]. *Plant Molecular Biology*, 2019, 99: 205-217.
- [22] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *The American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314-331.
- [23] MORGANTE M, HANAFEY M, POWELL W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes [J]. *Nature Genetics*, 2000, 30: 194-200.
- [24] 王 东,曹玲亚,高建平. 党参转录组中 SSR 位点信息分析[J]. *中草药*, 2014, 45(16): 2390-2394.
- [25] LIU Y, ZHANG P, SONG M, et al. Transcriptome analysis and development of SSR molecular markers in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0143017.
- [26] WANG L, WANG Z, CHEN J, et al. De novo transcriptome assembly and development of novel microsatellite markers for the traditional Chinese medicinal herb, *Veratrum baillonii* Franch (Gentianaceae) [J]. *Evolutionary Bioinformatics*, 2015, 11(S1): 39-45.
- [27] 代 娇,时小东,顾雨熹,等. 厚朴转录组 SSR 标记的开发及功能分析 [J]. *中草药*, 2017, 48(7): 2726-2732.
- [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] 李永强,李宏伟,高丽锋,等. 基于表达序列标签的微卫星标记 (EST-SSRs) 研究进展[J]. *植物遗传资源学报*, 2004, 5(1): 91-95.
- [30] 邓科君,张 勇,熊丙全,等. 药用植物丹参 EST-SSR 标记的鉴定[J]. *药学学报*, 2009, 44(10): 1165-1172.
- [31] LI C F, ZHU Y J, XU G, et al. Transcriptome analysis reveals ginsenosides biosynthetic genes, microRNAs and simple sequence repeats in *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 204-205.
- [32] 范三红,郭嵩光,单丽伟,等. 拟南芥基因密码子偏爱性分析

- [J].生物化学与生物物理进展, 2003, 30(2): 221-225.
- [33] LA ROTA M, KANTETY R V, YU J K, et al. Nonrandom distribution and frequencies of genomic and EST-derived microsatellite markers in rice, wheat, and barley[J]. BMC Genomics, 2005, 6(23):23.
- [34] 姜春芽,廖 娇,徐小彪,等. 植物 EST-SSR 技术及其应用[J]. 分子植物育种,2009,7(1):125-129.
- [35] 李小白,崔海瑞,张明龙. EST 分子标记开发及在比较基因组学中的应用[J].生物多样性,2006, 14(6):541-547.
- [36] 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.
- [37] 李小白,金 凤,金 亮,等.利用建兰转录数据开发 genic-SSR 标记[J].农业生物技术学报,2014, 2(8): 1046-1056.
- [38] BOZHKO M, RIEGEL R, CHUBERT R, et al. A cyclophilin gene marker confirming geographical differentiation of Norway spruce populations and indicating viability response on excess soil-born salinity[J]. Molecular Ecology, 2003, 12(11): 3147-3155.
- [39] SCHUBERT R, STARCK G M, RIEGEL R. Development of EST-PCR markers and monitoring their intrapopulational genetic variation in *Piceaabies* (L.) Karst[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103(8): 1223-1231.
- [40] 忻 雅,崔海瑞,张明龙,等. 白菜 EST-SSR 标记的通用性[J]. 细胞生物学杂志, 2006, 28(2): 248-252.
- [41] 李小白,张明龙,崔海瑞. 油菜 EST-SSR 标记的建立[J].分子细胞生物学报,2007, 40(2): 137-144.
- [42] 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.

(责任编辑:陈海霞)