

黑果枸杞转录组 SSR 信息分析及分子标记开发

尹跃, 安巍, 赵建华, 王亚军, 樊云芳, 曹有龙

(宁夏农林科学院 国家枸杞工程技术研究中心, 宁夏 银川 750002)

摘要: 分析黑果枸杞 *Lycium ruthenicum* 转录组中简单重复序列(SSR)位点信息, 开发 SSR 分子标记。采用 MISA 软件在黑果枸杞转录组中共检测到 73 896 个 SSR 位点, 分布于 56 170 条单基因簇(unigenes)中, 出现频率为 26.36%, 平均分布距离为 3.55 kb。优势重复基序为单核苷酸、二核苷酸和三核苷酸, 分别占总 SSR 位点的 74.33%, 13.30% 和 11.81%; 共发现 84 种重复基序, 重复次数为 5~33 次, 其中出现频率最高的基序为 A/T, AG/CT, AT/AT, C/G 和 AAC/GTT。针对 SSR 位点设计了 12 674 对引物, 随机挑选 128 对引物进行多态性验证, 其中 74 对(57.8%)得到清晰的扩增产物; 用其中的 28 对高多态性引物对 24 份枸杞种质进行扩增, 共检测到等位基因 256 个, 平均为 9.1 个。平均主效等位基因频率、观察杂合度、期望杂合度和多态信息量分别为 0.432, 0.439, 0.712 和 0.678。以上结果表明: 基于黑果枸杞转录组测序得到的 Unigene 信息可作为开发 SSR 标记的有效来源, 获得的大批量 SSR 标记可为枸杞遗传多样性分析和遗传图谱构建提供可靠的标记选择。图 1 表 4 参 31

关键词: 林木育种学; 黑果枸杞; 转录组; 简单重复序列(SSR)

中图分类号: S722.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2019)02-0422-07

SSR information in transcriptome and development of molecular markers in *Lycium ruthenicum*

YIN Yue, AN Wei, ZHAO Jianhua, WANG Yajun, FAN Yunfang, CAO Youlong

(National Wolfberry Engineering Research Center, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan 750002, Ningxia, China)

Abstract: The objective was to analyze Simple Sequence Repeat (SSR) loci information and to develop SSR molecular markers in *Lycium ruthenicum* (wolfberry) for further analysis with genetic diversity. A total of 73 896 SSRs were identified in *L. ruthenicum* transcriptome by MISA software, and primer pairs were designed from the SSR loci by BatchPrimer 3 software. Results showed that distribution was in 56 170 unigenes with a frequency of 26.36% and an average density of one SSR per 3.55 kb. Among these SSR loci, the most abundant motifs were mononucleotide (74.33%), dinucleotide (13.30%), and trinucleotide (11.81%) repeat types. Among 73 896 SSR loci, 84 repeat motifs with iteration numbers from 5 to 33 were discovered. The most abundant repeat motifs were A/T, AG/CT, AT/AT, C/G, and AAC/GTT. A total of 12 674 primer pairs were designed from the SSR loci by BatchPrimer 3 software, and 128 primers pairs of randomly selected SSR were validated, of which 74 (57.8%) pairs of primers were able to produce Polymerase Chain Reaction (PCR) products. Among the 74 SSR loci, 28 high polymorphic SSR loci were used to amplify 24 accessions of wolfberry germplasm. A total of 256 alleles were detected for an average of 9.1. The average major allele frequency (0.432), observed heterozygosity (0.439), expected heterozygosity (0.712), and polymorphism information content (PIC) (0.678) were noted. Thus, the development of SSR markers based on the transcriptome of *L.*

收稿日期: 2018-03-14; 修回日期: 2018-09-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31760218); 一二三产业融合发展农业技术推广示范项目(YES-16-0405); 宁夏农林科学院科技创新先导资金项目(NKYZ-16-0405, NKYJ-17-17)

作者简介: 尹跃, 研究实习员, 从事枸杞分子标记辅助育种研究。E-mail: yueyin0112@aliyun.com。通信作者: 曹有龙, 研究员, 博士, 从事枸杞遗传育种研究。E-mail: youlongckh@163.com

ruthenicum could provide reliable marker selection for genetic diversity analysis and genetic map construction of wolfberry germplasm. [Ch, 1 fig. 4 tab. 31 ref.]

Key words: forest tree breeding; *Lycium ruthenicum*; transcriptome; SSR

黑果枸杞 *Lycium ruthenicum* 是茄科 Solanaceae 枸杞属 *Lycium* 植物, 主要分布在中国西北地区^[1], 野生种质资源非常丰富, 耐干旱耐盐碱; 其果实富含类黄酮、花青素、多糖、酚酸和脂肪酸等生物活性物质, 具有预防多种疾病的功效^[2], 深受消费者喜爱。目前, 对黑果枸杞果实活性物质的研究较多^[2-3]。也有研究利用扩增片段长度多态性(AFLP)^[4], 简单重复序列间扩增多态性(ISSR)^[5]和相关序列扩增多态性(SRAP)^[6]标记进行遗传多样性评价, 但鲜有利用简单重复序列(SSR)标记的报道。SSR 标记是基于生物基因组中由 1~6 个核苷酸组成的串联重复序列特性开发的分子标记, 具有多态性丰富、高通量检测、共显性遗传等优点, 已广泛应用遗传图谱构建、分子标记辅助育种、种质资源鉴定和遗传多样性分析等^[7-10]领域。由于缺乏基因组信息, 基于基因组测序开发黑果枸杞 SSR 标记成本高, 步骤繁琐^[11-12], SSR 标记在黑果枸杞种质资源研究中的应用受到限制。同时, 美国生物技术信息中心(NCBI)中公布的黑果枸杞表达序列标签(EST)极少, 除了 CHEN 等^[16]研究了基于盐胁迫下黑果枸杞转录组表达序列标签-简单重复序列(EST-SSR)标记开发之外, 基于转录组测序黑果枸杞 EST-SSR 标记开发尚未见报道。EST-SSR 来源于表达的基因组区域, 可直接反映相关基因多样性, 在不同物种间具有良好的通用性; 随着高通量测序技术和生物信息学方法快速发展, 基于转录组测序已开发刺梨 *Rosa roxburghii*, 中国樱桃 *Cerasus pseudocerasus*, 马铃薯 *Solanum tuberosum* 等^[13-15]多种植物的 SSR 标记。本研究以前期黑果枸杞抗旱转录组测序获得的数据为基础, 利用生物信息学方法批量开发 EST-SSR 标记, 并分析其分布特点、组成特征, 以期黑果枸杞种质资源遗传多样性分析研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 转录组数据来源

取 1 年生黑果枸杞持续干旱胁迫下的叶和根, 提取 RNA 后进行转录组测序(无参, HiSeq™2500, 北京诺禾致源生物信息科技有限公司), 共 12 个样本, 计 80 G 数据。利用 Trinity 等软件^[17]对测序的数据进行拼接和组装, 获得 213 058 条单基因簇(unigene)作为背景数据进行分析。

1.2 植物材料及 DNA 提取

用于 SSR 引物筛选及评价的 24 份枸杞种质资源(表 1)均来自宁夏农林科学院国家枸杞工程技术研究中心枸杞种质资源圃(38°38'49"N, 106°9'10"E)。利用天根试剂盒(DP5-02, 天根)提取基因组 DNA。

1.3 转录组 SSR 位点鉴别及引物设计

使用 MISA 软件(<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/misa.html>)搜索 Unigene 序列的 SSR 位点。搜索标准为: 重复单元长度 1~6 bp, 单核苷酸重复次数 ≥ 10 次, 二核苷酸重复次数 ≥ 6 次, 三、四、五、六核苷酸重复次数 ≥ 5 次, 复合型 SSR 位点碱基间隔 ≤ 100 bp。

采用 BatchPrimer 3 软件(<https://probes.pw.usda.gov/batchprimer3/>)对获得的 SSR 位点批量设计引物。引物设计参数为: 引物长度 18~27 bp(最佳 22 bp), GC 为 40%~70%(最适 50%), 退火温度为 50~60 °C(最适 55 °C), PCR 扩增产物长度为 100~300 bp, 其他参数为默认设置。

1.4 EST-SSR 引物筛选及验证

随机挑选 128 对引物, 在上游引物 5' 端添加 18 bp 的 M13 通用引物序列(TGTAACAACGACG-GCCAGT), 3' 端保持不变, 用 FAM 荧光基团修饰后, 由英潍捷基贸易有限公司合成。

PCR 扩增体系(15.0 μL): DNA 模板 1.0 μL, M13 通用荧光引物 0.1 μL, 上游引物和下游引物各 0.4 μL, 2×Taq PCR Master Mix 7.5 μL, 双蒸水 5.6 μL。PCR 扩增在 ABI-2720(应用生物系统公司, 美国)上进行。扩增程序为: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 60~45 °C 30 s, 72 °C 30 s, 15 个循环; 95 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s, 20 个循环; 72 °C 7 min。扩增产物经过 ABI3730XL DNA(应用生物系统公司, 美国)检测, 用 LIZ500 作为分子量内标。

表1 供试种质材料信息

Table 1 Information of twenty-four materials used in this study

序号	种质名称	果实颜色	序号	种质名称	果实颜色
1	‘宁杞1号’ <i>Lycium bararum</i> ‘Ningqi 1’	红色	13	黑果枸杞 <i>L. ruthenicum</i>	黑色
2	‘宁杞2号’ <i>L. bararum</i> ‘Ningqi 2’	红色	14	中国枸杞 <i>L. chinense</i>	红色
3	‘宁杞5号’ <i>L. bararum</i> ‘Ningqi 5’	红色	15	昌吉枸杞 <i>L. changjicum</i>	褐色
4	‘宁杞7号’ <i>L. bararum</i> ‘Ningqi 7’	红色	16	新疆枸杞 <i>L. dasystemum</i>	红色
5	‘宁杞菜1号’ <i>L. bararum</i> ‘Ningqicai 1’	红色	17	‘HGB’ <i>L. bararum</i> ‘HGB’	黄色
6	‘宁农杞1号’ <i>L. bararum</i> ‘Ningnongqi 1’	红色	18	SC-09(拉丁名未知)	红色
7	‘宁农杞2号’ <i>L. bararum</i> ‘Ningnongqi 2’	红色	19	HB-09(拉丁名未知)	红色
8	‘宁农杞3号’ <i>L. bararum</i> ‘Ningnongqi 3’	红色	20	DHG(拉丁名未知)	黄色
9	‘宁农杞9号’ <i>L. bararum</i> ‘Ningnongqi 9’	红色	21	AN-YN-01(拉丁名未知)	红色
10	‘蒙杞1号’ <i>L. bararum</i> ‘Mengqi 1’	红色	22	W-12-30(拉丁名未知)	黄色
11	‘蒙杞2号’ <i>L. bararum</i> ‘Mengqi 2’	红色	23	W-12-27(拉丁名未知)	黄色
12	‘天精3号’ (拉丁名未知)	红色	24	W-11-15(拉丁名未知)	黄色

说明: 1~12为栽培品种, 13~24为野生资源

1.5 数据分析

以SSR出现频率和SSR平均分布距离描述EST-SSR。公式如下:①SSR出现频率 $f_c=c/n \times 100\%$, 其中 c 为搜索到的SSR数量(个), n 为无余EST数量(个)。②SSR平均分布距离 $f_N=N/c$, 其中 N 为无余EST数量的总碱基数(个)。由GeneMapper 4.0软件获得扩增产物片段大小, 用DataFormater 2.7软件^[18]将数据转化为PowerMarker v3.25软件^[19]的输入格式, 计算等位基因数(number of alleles, N_A)、主效等位基因频率(major allele frequency, f_{MA})、期望杂合度(expected heterozygosity, H_E)、观察杂合度(observed heterozygosity, H_O)和多态信息量(polymorphism information content, C_{PI})。

2 结果与分析

2.1 黑果枸杞转录组中SSR位点的分布特点

利用MISA软件对黑果枸杞转录组测序获得的213 058条Unigene(序列总长度为262 643 598 bp)序列进行搜索, 发现其中56 170条Unigene序列中含有73 896个SSR位点, 其中13 611条Unigene含有2个或2个以上EST-SSR位点。总体上, SSR发生频率为26.36%, 平均3.55 kb出现1个SSR位点。SSR类型丰富, 单核苷酸至六核苷酸重复类型均存在; 单核苷酸、二核苷酸和三核苷酸重复出现频率占优势, 分别占总SSR的74.33%, 13.30%和11.81%; 四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复类型数量较少, 分别占总数的0.49%, 0.03%和0.04%(表2)。

表2 黑果枸杞转录组SSR数量、类型和频率

Table 2 Frequencies of the different SSR repeat motif types observed in the *Lycium ruthenicum* transcriptome

重复类型	不同重复次数下SSR数量/条							总数/条	百分比/%
	5	6	7	8	9	10	>10次		
单核苷酸						20 340	34 587	54 927	74.33
二核苷酸		3 661	2 116	1 502	1 282	970	298	9 829	13.30
三核苷酸	5 285	2 414	982	39	1	1	4	8 726	11.81
四核苷酸	317	32	5	2	1		3	360	0.49
五核苷酸	13	1	5	1			1	21	0.03
六核苷酸	16	9	2	2			4	33	0.04
总数	5 631	6 117	3 110	1 546	1 284	21 311	34 897	73 896	
百分比/%	7.62	8.28	4.21	2.09	1.74	28.84	47.22		100.00

2.2 转录组SSR基序重复类型和频率特征

从黑果枸杞转录组SSR核苷酸基序重复类型来看, 73 896个SSR位点共有84种重复基元, 单核苷酸至六核苷酸重复分别有2, 4, 10, 26, 18和24种。从出现的频率来看(表3): 占优势的前3种重复

单元类型是单核苷酸、二核苷酸和三核苷酸重复基元; 单核苷酸重复基元以 A/T 为主, 占该类型 SSR 位点总数的 95.64%; 二核苷酸主要以 AG/CT 为主, 占二核苷酸总数的 40.42%, 其次是 AT/AT, AC/GT 和 CG/CG, 分别所占比例为 35.37%, 23.74% 和 0.46%; 三核苷酸重复单元以 AAC/GTT, AAG/CTT, AAT/ATT, ATC/ATG 和 ACC/GGT 为主, 占有三核苷酸重复单元的 75.88%; 四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复单元类型较为分散, 出现频率相对较低, 仅为 0.56%。

表 3 黑果枸杞 EST-SSR 中重复基元的类型、数量及频率

Table 3 Number and frequencies of repeat motif types in *Lycium ruthenicum*

重复基序类型	数量/条	占该类型 SSR 比例/%	占总 SSR 比例/%	重复基序类型	数量/条	占该类型 SSR 比例/%	占总 SSR 比例/%
A/T	52 531	95.64	71.09	ACC/GGT	635	7.28	0.86
C/G	2 396	4.36	3.24	ACG/CGT	174	1.99	0.24
AC/GT	2 333	23.74	3.16	ACT/AGT	319	3.66	0.43
AG/CT	3 973	40.42	5.38	AGC/CTG	597	6.84	0.81
AT/AT	3 477	35.37	4.71	AGG/CCT	424	4.86	0.57
CG/CG	46	0.47	0.06	ATC/ATG	978	11.21	1.32
AAC/GTT	2 108	24.16	2.85	CCG/CGG	591	6.77	0.80
AAG/CTT	1 865	21.37	2.52	其他类型	414		0.56
AAT/ATT	1 035	11.86	1.40				

2.3 SSR 引物有效性及多态性检测

为检测所开发的 EST-SSR 标记的可用性, 对 56 170 条 Unigene 序列的 73 896 个 EST-SSR 位点设计引物, 共得到引物 12 674 对。随机挑选 128 对(包括二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸), 以表型性状差异较大的‘黑果枸杞’‘宁杞 1 号’‘宁杞菜 1 号’和‘中国枸杞’的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 其中 74 对引物能扩增出清晰的扩增产物, 引物扩增有效率为 57.8%; 其中 28 对引物具有多态性, 多态性引物占有有效引物的 37.8%。图 1 为引物 LM-02 对 4 份种质的基因型图。

2.4 SSR 位点遗传多样性分析

以筛选的 28 对多态性引物对 24 份枸杞种质作遗传多样性分析。共检测到等位基因 256 个, 各引物检测到的等位基因为 4~19 个, 平均为 9.1 个; 共检测到基因型数 303 个; 主效等位基因频率变化范围为 0.188~0.729, 平均值为 0.432; 观察杂合度为 0.167~0.833, 平均值为 0.439; 期望杂合度为 0.433~0.904, 平均值为 0.712, 多态信息量为 0.395~0.897, 平均值为 0.678。由 Botstein 理论^[20]判定(表 4), 在开发出的 28 个多态位点中有 24 个高度多态位点($C_{PI} \geq 0.5$), 4 个中度多态位点($0.25 \leq C_{PI} < 0.5$)。

3 讨论

本研究搜索了黑果枸杞的 213 058 条 Unigene 序列, 发现其中的 56 170 条中含有 73 896 个 SSR 位点, 发生频率为 26.36%; 高于中国樱桃 *Cerasus pseudocerasus* (15.62%)^[14], 马铃薯 *Solanum tuberosum* (3.43%)^[15], 夏蜡梅 *Sinocalycanthus chinensis* (21.25%)^[16], 马尾松 *Pinus massoniana* (4.69%)^[23] 和中间锦鸡儿 *Caragana intermedia* (14.78%)^[24], 低于蓝靛果忍冬 *Lonicera caerulea* var. *edulis* (32.51%)^[25], 山桐子 *Idesia polycarpa* (35.00%)^[26], 普通油茶 *Camellia oleifera* (39.67%)^[27] 和芙蓉李 *Prunus salicina* (54.51%)^[28]。可见, 不同物种转录组 SSR 位点的出现频率不同, 出现差异的原因除了物种本身差异, 还可能与分析数据库大小、SSR 挖掘工具及搜索条件有关^[13]。

从重复单元频率来看, 黑果枸杞转录组的 SSR 主要类型为单核苷酸重复基序(74.33%), 其次为二核苷酸重复(13.30%)和三核苷酸重复(11.81%)。研究发现: 多数植物中 EST-SSR 以二核苷酸和三核苷酸为主, 但主要的重复基序类型不同^[29]。推测原因可能与 SSR 搜索参数设置有关, 多数植物在进行 SSR 位点搜索时并未将单核苷酸重复设置为搜索对象^[13-14]。

本研究从 213 058 条 Unigene 序列中鉴定出 73 896 个 SSR 位点, 丰富了黑果枸杞 EST-SSR 标记的数量。为了进一步评估这些 EST-SSR 引物的质量, 从设计到的 12 674 对 EST-SSR 引物中随机挑选出 128 对引物, 54 对引物未能扩增出产物, 原因可能是扩增产物中存在大量内含子或引物设计不合理^[30-31];

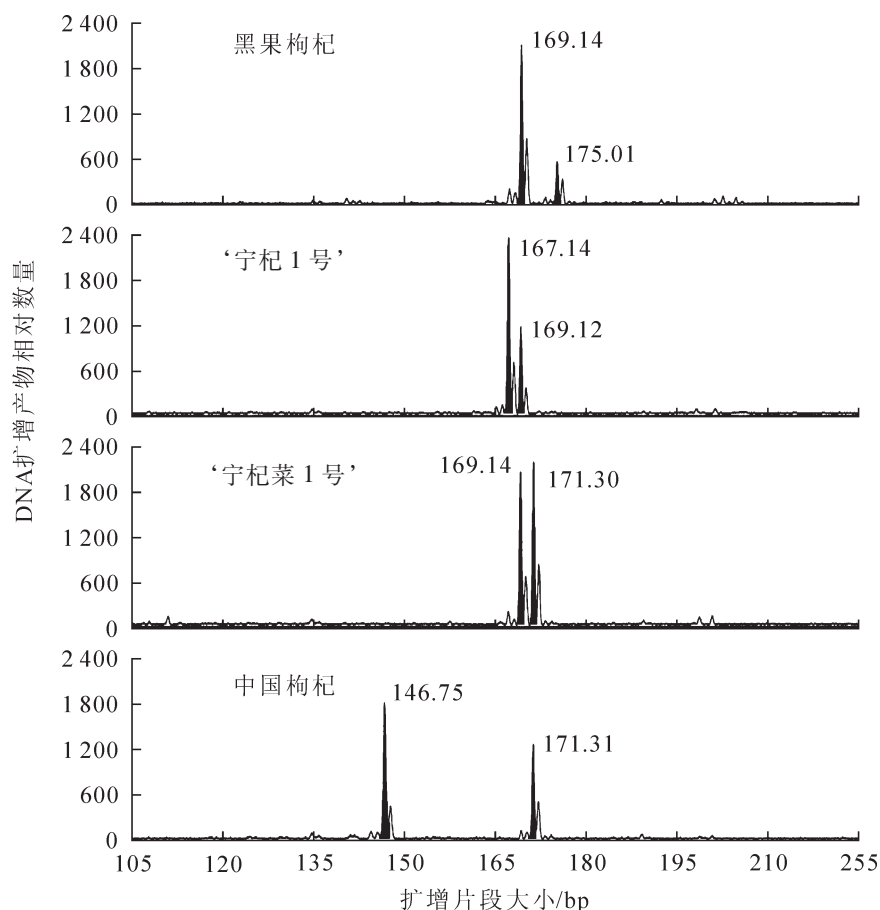


图1 4个样本在LM-02位点的基因型

Figure 1 Genotypes of 4 samples at LM-02 site

表4 28对EST-SSR引物对枸杞种质的遗传多样性检测

Table 4 Genetic diversity of 24 wolfberry germplasm revealed by 28 EST-SSR markers

引物名称	等位基因数	主效等位基因频率	期望杂合度	观察杂合度	多态信息量	引物名称	等位基因数	主效等位基因频率	期望杂合度	观察杂合度	多态信息量
LM-02	6	0.458	0.683	0.458	0.634	LM-61	10	0.479	0.722	0.167	0.699
LM-04	8	0.375	0.773	0.250	0.743	LM-64	11	0.438	0.769	0.667	0.753
LM-05	10	0.438	0.747	0.292	0.722	LM-68	7	0.354	0.724	0.333	0.680
LM-08	8	0.500	0.682	0.458	0.647	LM-71	9	0.396	0.760	0.458	0.730
LM-20	9	0.250	0.805	0.292	0.777	LM-75	7	0.521	0.586	0.250	0.508
LM-22	10	0.500	0.697	0.542	0.669	LM-86	6	0.583	0.602	0.292	0.560
LM-28	9	0.250	0.835	0.417	0.815	LM-96	7	0.417	0.745	0.667	0.712
LM-30	15	0.250	0.882	0.542	0.873	LM-99	11	0.333	0.819	0.375	0.800
LM-33	8	0.542	0.655	0.500	0.622	LM-101	5	0.667	0.481	0.458	0.414
LM-42	4	0.729	0.433	0.167	0.395	LM-110	15	0.250	0.876	0.708	0.865
LM-43	4	0.646	0.513	0.583	0.454	LM-111	19	0.188	0.904	0.542	0.897
LM-50	4	0.646	0.484	0.417	0.402	LM-112	7	0.500	0.591	0.250	0.511
LM-51	7	0.583	0.615	0.542	0.584	LM-114	12	0.313	0.832	0.292	0.814
LM-56	15	0.229	0.872	0.542	0.861	LM-125	13	0.271	0.854	0.833	0.840
						平均值	9.1	0.432	0.712	0.439	0.678

有74对引物成功扩增出产物，引物扩增有效性达57.8%，表明开发的引物质量较高，对后续黑果枸杞种质资源遗传多样性分析、品种鉴定、遗传图谱构建和分子标记辅助育种等均有应用价值。

4 参考文献

- [1] 韩丽娟, 叶英, 索有瑞. 黑果枸杞资源分布及其经济价值[J]. 中国野生植物资源, 2014, **33**(6): 55 – 57.
HAN Lijuan, YE Ying, SUO Yourui. The resource and economic value of *Lycium ruthenicum* Murray [J]. *Chin Wild Plant Res*, 2014, **33**(6): 55 – 57.
- [2] WANG Hanqing, LI Jiaoning, TAO Weiwei, et al. *Lycium ruthenicum* studies: molecular biology, phytochemistry and pharmacology [J]. *Food Chem*, 2018, **240**: 759 – 666.
- [3] WU Tao, LÜ Haiyang, WANG Fengzhong, et al. Characterization of polyphenols from *Lycium ruthenicum* fruit by U-PLC-Q-TOF/MS^E and their antioxidant activity in Caco-2 Cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, **64**(11): 2280 – 2288.
- [4] 王锦楠, 陈进福, 陈武生, 等. 柴达木地区野生黑果枸杞种群遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 植物生态学报, 2015, **39**(10): 1003 – 1011.
WANG Jinnan, CHEN Jinfu, CHEN Wusheng, et al. Population genetic diversity of wild *Lycium ruthenicum* in Qaidam inferred from AFLP markers [J]. *Chin J Plant Ecol*, 2015, **39**(10): 1003 – 1011.
- [5] 阿力同·其米克, 王青锋, 杨春锋, 等. 新疆产药用植物黑果枸杞遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 植物科学学报, 2013, **31**(5): 517 – 524.
ALITONG Qimike, WANG Qingfeng, YANG Chunfeng, et al. ISSR analysis on genetic diversity of medically important *Lycium ruthenicum* Murr. in Xinjiang [J]. *Plant Sci J*, 2013, **31**(5): 517 – 524.
- [6] LIU Zenggen, SHU Qingyan, WANG Lei, et al. Genetic diversity of the endangered and medically important *Lycium ruthenicum* Murr. revealed by sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2012, **45**: 86 – 97.
- [7] GUO Qi, GUO Lili, ZHANG Lin, et al. Construction of a genetic linkage map in tree peony (*Paeonia* Sect. *Moutan*) using simple sequence repeat (SSR) markers [J]. *Sci Hortic*, 2017, **219**: 294 – 301.
- [8] WANG Long, LI Xiugen, WANG Lei, et al. Construction of a high-density genetic linkage map in pear (*Pyrus communis* × *Pyrus pyrifolia* Nakai) using SSRs and SNPs developed by SLAF-seq [J]. *Sci Hortic*, 2017, **218**: 198 – 204.
- [9] SUNGIRAI M, BARON S, van der MERWE N A, et al. Population structure and genetic diversity of *Rhipicephalus microplus* in Zimbabwe [J]. *Acta Trop*, 2018, **180**: 42 – 46.
- [10] REBAA F, ABID G, AOUIDA M, et al. Genetic variability in Tunisian populations of faba bean (*Vicia faba* L. var. *major*) assessed by morphological and SSR markers [J]. *Physiol Mol Biol Plant*, 2017, **23**(2): 397 – 409.
- [11] LI Zhigang, CHEN Feng, HUANG Chunhua, et al. Genome-wide mapping and characterization of microsatellites in the swamp eel genome [J]. *Sci Rep*, 2017, **7**(1): 3157.
- [12] AMBREEN H, KUMAR S, VARIATH M T, et al. Development of genomic microsatellite markers in *Carthamus tinctorius* L. (safflower) using next generation sequencing and assessment of their cross-species transferability and utility for diversity analysis [J]. *PLoS One*, 2015, **10**(8): e0135443.
- [13] 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.
YAN Xiuqin, LU Min, AN Huaming. Analysis on SSR information in transcriptome and development of molecular markers in *Rosa roxburghii* [J]. *Acta Hortic Sin*, 2015, **42**(2): 341 – 349.
- [14] 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.
ZONG Yu, WANG Yue, ZHU Youyin, et al. Development and validation of SSR markers based on transcriptomic data of Chinese cherry (*Prunus pseudocerasus*) [J]. *Acta Hortic Sin*, 2016, **43**(8): 1566 – 1576.
- [15] 巩榴, 程永芳, 甘晓燕, 等. 马铃薯转录组 EST-SSR 挖掘及其多样性分析[J]. 分子植物育种, 2015, **13**(7): 1535 – 1544.
GONG Lei, CHENG Yongfang, GAN Xiaoyan, et al. Mining EST-SSR based on potato transcriptome and analyzing their polymorphism [J]. *Mol Plant Breed*, 2015, **13**(7): 1535 – 1544.
- [16] CHEN Jinhuan, ZHANG Dongzhi, ZHANG Chong, et al. Physiological characterization, transcriptomic profiling, and microsatellite marker mining of *Lycium ruthenicum* [J]. *J Zhejiang Univ-Sci B Biom Biotechnol*, 2017, **18**(11): 1002 – 1021.

- [17] GRABHERR M, HAAS B J, YASSOUR M, *et al.* Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, **29**(7): 644 – 652.
- [18] 樊文强, 盖红梅, 孙鑫, 等. SSR 数据格式转换软件 DataFormater[J]. 分子植物育种, 2016, **14**(1): 265 – 270.
FAN Wenqiang, GAI Hongmei, SUN Xin, *et al.* DataFormater, a software for SSR data formatting to development population genetic analysis [J]. *Mol Plant Breed*, 2016, **14**(1): 265 – 270.
- [19] LIU Kejun, MUSE S V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis [J]. *Bioinformatics*, 2005, **21**(9): 2128 – 2129.
- [20] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *Am J Human Genet*, 1980, **32**(3): 314 – 331.
- [21] 尹跃, 安巍, 赵建华, 等. 枸杞种质资源遗传多样性的 iPBS 分析[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2017, **46**(6): 612 – 617.
YIN Yue, AN Wei, ZHAO Jianhua, *et al.* Genetic diversity analysis of wolfberry germplasm using iPBS makers [J]. *J Fujian Agric For Univ Nat Sci Ed*, 2017, **46**(6): 612 – 617.
- [22] 黄耀辉, 张超, 周莉花, 等. 基于转录组序列的夏蜡梅 SSR 位点特征与引物开发[J]. 浙江农林大学学报, 2017, **34**(4): 589 – 596.
HUANG Yaohui, ZHANG Chao, ZHOU Lihua, *et al.* Development and primer screening of SSR markers based on transcriptome sequences in *Sinocalycanthus chinensis* [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2017, **34**(4): 589 – 596.
- [23] 梅利那, 范付华, 崔博文, 等. 基于马尾松转录组的 SSR 分子标记开发及种质鉴定[J]. 农业生物技术学报, 2017, **25**(6): 991 – 1002.
MEI Lina, FAN Fuhua, CUI Bowen, *et al.* Development of SSR molecular markers based on transcriptome sequences and germplasm identification in Masson pine (*Pinus massoniana*) [J]. *J Agric Biotechnol*, 2017, **25**(6): 991 – 1002.
- [24] 郑如玉, 刘坤, 杨杞, 等. 中间锦鸡儿干旱转录组 SSR 标记的开发及遗传多样性研究[J]. 分子植物育种, 2017, **15**(6): 2236 – 2243.
ZHENG Ruyu, LIU Kun, YANG Qi, *et al.* SSR marker development and the genetic diversity of *Caragana intermedia* in based on transcriptome under drought stress [J]. *Mol Plant Breed*, 2017, **15**(6): 2236 – 2243.
- [25] 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.
ZHANG Qingtian, LI Xiaoyan, YANG Yiming, *et al.* Analysis on SSR information in transcriptome and development of molecular markers in *Lonicera caerulea* [J]. *Acta Horti Sin*, 2016, **43**(3): 557 – 563.
- [26] 李娜, 姚民, 梅兰菊, 等. 基于山桐子转录组序列的 SSR 分子标记开发[J]. 应用与环境生物学报, 2017, **23**(5): 952 – 958.
LI Na, YAO Min, MEI Lanju, *et al.* Development of SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of *Ilex polycarpa* Maxim [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2017, **23**(5): 952 – 958.
- [27] 李海波, 王珊, 丁红梅, 等. 普通油茶转录组 EST-SSR 分子标记开发[J]. 植物生理学报, 2017, **53**(7): 1267 – 1278.
LI Haibo, WANG Shan, DING Hongmei, *et al.* Development of EST-SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of *Camellia oleifera* [J]. *Plant Physiol J*, 2017, **53**(7): 1267 – 1278.
- [28] 方智振, 叶新福, 周丹蓉, 等. ‘芙蓉李’转录组 SSR 信息分析与分子标记开发[J]. 果树学报, 2016, **33**(4): 416 – 424.
FANG Zhizhen, YE Xinfu, ZHOU Danrong, *et al.* Analysis on SSR information in ‘Furongli’ plum transcriptome and development of molecular markers in *Prunus salicina* Lindl. [J]. *J Fruit Sci*, 2016, **33**(4): 416 – 424.
- [29] ZHONG Ruichun, ZHOU Meili, ZHAO Chuanzhi, *et al.* SSR marker development from peanut gynophore transcriptome sequencing [J]. *Plant Breed*, 2016, **135**(1): 111 – 117.
- [30] LIU Touming, ZHU Siyuan, FU Lili, *et al.* Development and characterization of 1,827 expressed sequence tag-derived simple sequence repeat markers for ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaud) [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(4): e60346.
- [31] CLOUTIER S, NIU Zhixia, DATLA R, *et al.* Development and analysis of EST-SSRs for flax (*Linum usitatissimum* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2009, **119**(1): 53 – 63.