

## 花椒 cpSSR 标记开发及在种间、种内的通用性分析

李思巧<sup>1</sup>, 韦伊<sup>1</sup>, 刘洪好<sup>1</sup>, 张志东<sup>1</sup>, 张野<sup>1</sup>, 王丽华<sup>2</sup>, 刘玉林<sup>1</sup>

(1. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 四川省林业科学研究院 生物技术与良种研究所, 四川 成都 610081)

**摘要:** 叶绿体基因组为母系遗传, 保守性高, 因此叶绿体基因组中的简单序列重复(SSR)标记可在更高分类水平上进行种质资源鉴定和群体遗传结构分析。利用 TRF 软件和 SSR Hunter 软件相结合对花椒 *Zanthoxylum bungeanum* 叶绿体基因组中的 SSR 位点进行筛选。结果显示: 花椒叶绿体基因组中共有 144 个 SSR 位点, 位点间的平均分布距离为 1 100.00 bp。基于检测软件设置参数, SSR 重复类型主要集中在一、三核苷酸重复, 二者占 SSR 位点总数的 91.67%。此外, 随机设计合成 30 对 SSR 引物对 10 份花椒种质、5 份竹叶花椒 *Zanthoxylum armatum* 种质和 1 份日本花椒 *Zanthoxylum piperitum* 种质进行 PCR 扩增检测, 共筛选出 10 对多态性引物, 其中单核苷酸重复位点的多态性高于多核苷酸重复位点。本研究开发的叶绿体 SSR 标记可有效区分花椒、竹叶花椒和日本花椒, 但在花椒种内并未检测出多态性。表明花椒叶绿体基因组的 SSR 标记可用于花椒属 *Zanthoxylum* 不同种间的遗传多样性分析。图 2 表 3 参 19

**关键词:** 植物学; 花椒; 叶绿体基因组; 简单序列重复(SSR); 多态性分析

**中图分类号:** S565.9      **文献标志码:** A      **文章编号:** 2095-0756(2019)06-1241-06

## Development of chloroplast SSR markers of *Zanthoxylum bungeanum* and their generality for interspecies and intraspecies

LI Siqiao<sup>1</sup>, WEI Yi<sup>1</sup>, LIU Hongyu<sup>1</sup>, ZHANG Zhidong<sup>1</sup>, ZHANG Ye<sup>1</sup>, WANG Lihua<sup>2</sup>, LIU Yulin<sup>1</sup>

(1. College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China; 2. Institute of Biotechnology and Seed, Sichuan Academy of Forestry Science, Chengdu 610081, Sichuan, China)

**Abstract:** Simple sequence repeat (SSR) molecular markers in the chloroplast genome can be used for germplasm resource identification and population genetic structural analysis at a higher classification level due to the chloroplast genome being of maternal inheritance and high conservation. To screen and develop SSR markers which will be useful for genetic diversity analysis, fingerprinting and germplasms resource identification in the chloroplast genome of *Zanthoxylum bungeanum*, a traditional spice plant in China, TRF software and SSR Hunter were used to screen the mono-, di-, tri- and tetra-nucleotide repeat motifs and 16 germplasms of *Zanthoxylum* including 10 individuals of *Z. bungeanum*, 5 individuals of *Zanthoxylum armatum*, and 1 individual of *Zanthoxylum piperitum* were selected to test polymorphism of these detected loci. As a result, 144 SSR loci were identified with an average distribution distance of 1 100.00 bp in the chloroplast genome of *Z. bungeanum*. Based on parameters set by the detection software, mono-nucleotide and tri-nucleotide repeat motifs were the main repeat types accounting for 91.67% of the total. In addition, 30 SSR primer pairs were randomly designed and synthesized with 10 of them showing polymorphism. The polymorphic markers of mono-nucleotide repeat motifs were more than that of polynucleotide repeat motifs in this study. Furthermore, these

收稿日期: 2018-12-17; 修回日期: 2019-03-11

基金项目: 西北农林科技大学大学生创新性实验计划项目(国家级)(201710712023); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(2452015167); 国家林业局林业公益性行业科研专项(201304706)

作者简介: 李思巧, 从事林木遗传育种研究。E-mail: 2146341971@qq.com。通信作者: 刘玉林, 讲师, 博士, 从事经济林栽培与遗传育种研究。E-mail: lyl12504001@126.com

cpSSR markers could effectively divide *Z. bungeanum*, *Z. armatum*, and *Z. piperitum*, but no polymorphic marker was found in the 10 individuals of *Z. bungeanum*. Thus, cpSSR markers of *Z. bungeanum* could be used for genetic diversity analysis among different interspecies of *Zanthoxylum*. [Ch, 2 fig. 3 tab. 19 ref.]

**Key words:** botany; *Zanthoxylum bungeanum*; chloroplast genome; SSR; polymorphism analysis

简单序列重复(SSR)广泛分布于真核生物的核基因组, 叶绿体基因组以及线粒体基因组中, 常指一类以 1~6 个核苷酸为重复基元的串联重复 DNA 序列<sup>[1]</sup>。因其分布广泛、多态性高且共显性, SSR 标记被广泛开发和应用于种质资源鉴定与遗传多样性分析<sup>[2-3]</sup>。在植物中, 由于叶绿体基因组表现为母系遗传, 以半保留方式进行自我复制, 几乎不发生重组, 保守性远高于核基因组。因此, 叶绿体基因组中的 SSR 标记(chloroplast SSR, cpSSR)可在更高分类水平上进行种间、种内鉴定和遗传进化分析<sup>[4]</sup>。随着高通量测序技术的发展, 大量植物的叶绿体基因组被测序与公布, 相应的叶绿体 SSR 也得到了广泛的开发与应用<sup>[5-7]</sup>。花椒 *Zanthoxylum bungeanum* 是芸香科 Rutaceae 花椒属 *Zanthoxylum* 植物, 其果皮晒干后是中国传统的调味料和中草药。在市场上流通的花椒果皮主要来自于花椒 *Z. bungeanum*(又称红花椒或大红袍花椒)和竹叶花椒 *Z. armatum*(又称青花椒), 而在日本主要利用日本花椒 *Z. piperitum*(又称胡椒木或朝仓花椒)进行麻味物质和其他药用活性成分的提取分析<sup>[8]</sup>。在前人的研究中, 基于核基因组内部序列差异开发的 SCAR(sequence-related amplified polymorphism)标记<sup>[9]</sup>、ISSR(inter-SSR)标记<sup>[10]</sup>和 EST-SSR(expressed sequence tags-SSR)标记<sup>[11]</sup>等已利用到花椒属植物的遗传分析中, 而 cpSSR 标记在花椒属植物的开发与应用还未见报道。鉴于此, 本研究对花椒 cpSSR 位点进行筛选, 分析其分布特点并利用花椒、竹叶花椒和日本花椒种质资源开发多态性标记, 以期为花椒属植物的种质资源鉴定、遗传进化分析等提供可靠的标记资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 SSR 位点搜索与引物设计

基于本研究前期获得的花椒叶绿体基因组序列<sup>[12]</sup>, 利用 TRF(tandem repeats finder)在线软件(<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>)搜索单核苷酸重复序列, 设置重复数 $\geq 10$ 次; 利用 SSRHunter 软件<sup>[13]</sup>搜索核苷酸重复数位为 2, 3, 4, 5 的 SSR 位点, 对应重复数设置为 5, 3, 3, 3 次。合并 2 种软件的检测结果, 统计 1~5 bp 核苷酸重复所在花椒叶绿体基因组中的位置: 长单拷贝序列区(LSC)、短单拷贝序列区(SSC)和 2 个反向重复序列区(IR)。SSR 引物利用 Primer3 软件(<http://primer3.ut.ee>)设计。原则为: 扩增片段为 150~250 bp; 引物长度为 18~22 bp; 退火温度为 57~63 °C; GC 质量分数为 30%~55%。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

### 1.2 种质资源采集与 DNA 提取

本研究共选用 16 份花椒属种质资源进行 SSR 多态性的筛选, 其中包括来自中国四川省和重庆市的 5 份竹叶花椒种质资源和 1 份日本花椒种质资源(均采自四川省林业科学研究院生物技术与良种研究所花椒种质圃)以及来自四川、贵州、陕西、山东和山西等 5 个省的 10 份花椒种质资源(均采自西北农林科技大学凤县花椒试验示范站)进行多态性的筛选(表 1)。所有种质资源选取 3 株, 取鲜嫩叶片混合, 硅胶干燥, 常温保存备用。

供试种质资源全基因组 DNA 利用“植物全基因组 DNA 提取试剂盒(DP305)”(北京天根生物有限公司)提取, 质量分数为 1%琼脂糖结合紫外分光光度计检测 DNA 质量和浓度后稀释至 20 mg·L<sup>-1</sup>, 4 °C 保存备用。

### 1.3 PCR 扩增及数据统计分析

PCR 扩增体系为 20  $\mu$ L, 包括 10  $\mu$ L 2 $\times$  Taq Master Mix(南京诺唯赞生物科技有限公司), 模板 DNA (20 mg·L<sup>-1</sup>)5.0  $\mu$ L, 正、反向引物(2  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>)各 1.5  $\mu$ L, 双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)2.0  $\mu$ L。PCR 扩增程序为: 95 °C 预变性 5 min; 然后 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 8 min 后 4 °C 保存。取 1.5  $\mu$ L 的 PCR 扩增产物, 质量分数为 8%的聚丙烯酰胺凝胶电泳(恒定功率 100 W, 100 min)分离检测, 使用 pBR322 DNA/MspI Marker 作为标准分子量, 银染拍照保存。

表 1 供试 16 份花椒属种质资源来源地

Table 1 Origin of 16 germplasm of *Zanthoxylum*

种质资源名称	拉丁学名	来源地	种质资源名称	拉丁学名	来源地
‘重庆九叶青’	<i>Z. armatum</i> ‘Chongqingjiuyeqing’	重庆市江津区	‘凤县大红袍’	<i>Z. bungeanum</i> ‘Fengxiandahongpao’	陕西省宝鸡市
‘重庆荣昌无刺’	<i>Z. armatum</i> ‘Chongqingrongchangwuci’	重庆市荣昌区	‘狮子头’	<i>Z. bungeanum</i> ‘Shizitou’	陕西省韩城市
‘蓬溪青花椒’	<i>Z. armatum</i> ‘Pengxiqinghuajiao’	四川省遂宁市	‘韩城大红袍’	<i>Z. bungeanum</i> ‘Hanchengdahongpao’	陕西省韩城市
‘汉源葡萄青椒’	<i>Z. armatum</i> ‘Hanyuanputaoqingjiao’	四川省雅安市	‘党村无刺’	<i>Z. bungeanum</i> ‘Dangcunwuci’	陕西省韩城市
‘狗椒’	<i>Z. armatum</i> ‘Goujiao’	四川省雅安市	‘府谷花椒’	<i>Z. bungeanum</i> ‘Fuguhujiao’	陕西省榆林市
‘汉源大红袍’	<i>Z. bungeanum</i> ‘Hanyuandahongpao’	四川省雅安市	‘山东大红袍’	<i>Z. bungeanum</i> ‘Shandongdahongpao’	山东省临沂市
‘油花椒’	<i>Z. bungeanum</i> ‘Youhuajiao’	贵州省六盘水市	‘山西大红袍’	<i>Z. bungeanum</i> ‘Shanxidahongpao’	山西省永济市
‘素花椒’	<i>Z. bungeanum</i> ‘Suhujiao’	贵州省六盘水市	日本花椒	<i>Z. piperitum</i>	日本兵库县

根据电泳图像，统计扩增条带并构建 0~1 数据矩阵，即有共迁移条带记为 1，无条带则记为 0。利用 NTSYSpc-2.10 软件计算遗传相似系数，采用非加权配对算术平均法(UPGMA)进行遗传相似性聚类。

## 2 结果与分析

### 2.1 花椒叶绿体基因组中 SSR 的分布特点

花椒叶绿体基因组全长为 158 401 bp，共搜索出了 144 个 SSR 位点(图 1 和表 2)，即在花椒叶绿体基因组中平均每隔 1 100.00 bp 出现 1 个 SSR 位点。

根据 SSR 位点在花椒叶绿体基因组中的位置(图 1)可知：LSC 区分布 85 个 SSR 位点，占 SSR 总数的 59.03%，平均 1 010.56 bp 出现 1 个 SSR 位点；SSC 区分布 23 个 SSR 位点，占 SSR 总数的 15.97%，平均 765.65 bp 分布 1 个 SSR 位点；在 2 个 IR 区(IRA 和 IRB)，均分布 18 个反向重复的 SSR 位点，合计占 SSR 总数的 25.00%，平均 1 524.72 bp 分布 1 个 SSR 位点。

数量上，单核苷酸重复和三核苷酸重复分别有 62 和 70 个，两者占 SSR 总数的 91.67%，且在 LSC 区、SSC 区和 IR 区均有分布。二核苷酸重复和四核苷酸重复分别只有 5 个(3.47%)和 7 个(4.86%)，但二核苷酸重复仅分布于 SSC 区，而四核苷酸重复仅分布于 LSC 区。

重复次数上，单核苷酸重复次数多集中在 10~15 次，共 54 个位点，占单核苷酸重复总数的 87.10%，而重复数>15 次的共有 8 个位点；二核苷酸重复数集中在 5 次，三核苷酸和四核苷酸重复数集中在 3 次。根据重复基元类型，单核苷酸重复中 A/T 重复共 60 个，而 C/G 重复位点仅有 2 个；二核苷酸重复基元均为 AT/TA；AAG/CTT 和 AAT/ATT 为三核苷酸重复中的优势重复基元，均为 25 个，其余重复基元总计为 20 个；此外，AAAT 为四核苷酸重复中的优势重复基元(3 个)，其余重复基元总计为 4 个(表 2)。

### 2.2 多态性标记开发与通用性分析

根据 SSR 位点两侧序列，由 Primer3 软件设计了 30 对引物(命名为 YLT-01~YLT-30)并合成。其中，YLT-01~YLT-20 扩增片段包含的是 2 个及 2 个以上的核苷酸重复位点(YLT-01~YLT-12 位于 LSC；YLT-14~YLT-18 位于 SSC 区；YLT-13、19、20 位于 IR 区)，YLT-21~YLT-30 扩增片段包含的是单核苷酸重复位点(YLT-21~YLT-27 位于 LSC 区；YLT-30 位于 SSC 区；YLT-28、29 位于 IR 区)。

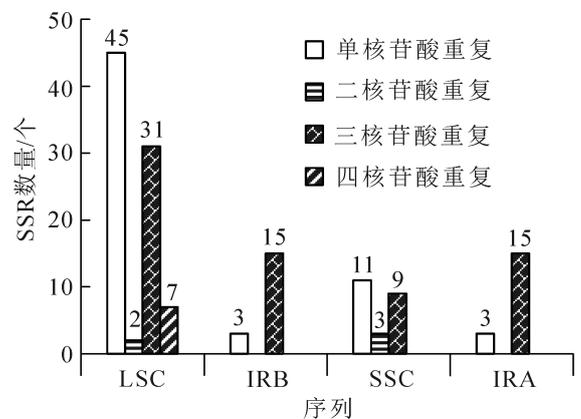


图 1 SSR 在花椒叶绿体基因组中的分布特点  
Figure 1 Distribution of SSRs in the chloroplast genome of *Zanthoxylum bungeanum*

LSC. 长单拷贝序列(1~85 898 bp)，IRB. 反向重复序列B(85 899~113 344 bp)，SSC. 短单拷贝序列(113 345~130 955 bp)，IRA. 反向重复序列A(130 956~158 401 bp)

表2 花椒 cpSSR 的重复类型与次数

Table 2 Repeat types and times of cpSSR in *Zanthoxylum bungeanum*

重复类型	重复单元	重复数/次						总计/次
		3	4	5	6	10~15	>15	
单核苷酸	A/T					52	8	60
	C/G					2	0	2
二核苷酸	AT/TA			4	1			5
三核苷酸	AAC/GTT	5						5
	AAG/CTT	22	3					25
	AAT/ATT	20	4	1				25
	ACC/GGT	2						2
	ACT/AGT	2						2
	AGC/CTG	4						4
	AGG/CCT	2						2
	ATC/ATG	5						5
	其他类型	4						4

经 PCR 扩增筛选, 30 对引物均能扩增出稳定的目的片段。其中, 10 对引物在供试种质中呈现多态性, 占筛选引物总数的 33.33%。如表 3 所示: 10 对引物共检测到 24 个等位基因。其中, YLT-26 包含 4 个等位基因, YLT-21 和 YLT-29 包含 3 个等位基因, 其余的 7 个位点(YLT-01, YLT-17, YLT-22, YLT-23, YLT-24, YLT-25 和 YLT-27)均检测出 2 个等位基因。在包含 2 个等位基因的 7 个位点中, YLT-01, YLT-17, YLT-24, YLT-25 和 YLT-27 能区分出日本花椒, 花椒与竹叶花椒为一类(扩增片段大小一致), 而 YLT-22 和 YLT-23 的扩增结果为: 10 份花椒种质同一带型, 竹叶花椒与日本花椒为同一带型; YLT-21 和 YLT-29 能将花椒、竹叶花椒和日本花椒区分开; YLT-26 不仅能区分出花椒、竹叶花椒和日本花椒 3 个花椒属的不同种, 且能区分出竹叶花椒种质中的狗椒。此外, 未检测到有标记在 10 份花椒种质呈现多态性(图 2)。

在设计 20 对包含 2 个及 2 个以上的核苷酸重复位点的引物中, 仅有 2 对引物表现出多态性; 而包含单核苷酸重复位点的 10 对引物中, 有 8 对引物呈现多态性, 多态性比例远高于包含多核苷酸重复的位点。

表3 多态性 SSR 引物的基本信息

Table 3 Characterizations of polymorphic SSR primers pairs

引物名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')	重复单元	SSR 区间位置/ bp	片段长度/ bp	等位基 因数/个
YLT-01	GAAGGGCGTCCATTGTCTAA	GAGGAAGCGGAAGCTCTTTT	(ATA) <sub>3</sub>	10 940~10 948	218	2
YLT-17	TGAGACATTCCCAAAATCCAA	GACCGAAGCTTTTTCGAACT	(TA) <sub>5</sub> ···(TA) <sub>6</sub>	122 229~122 258	177	2
YLT-21	CCGTGTCAACCAATAATCCA	ATCCGACTAGTTCCGGGTTC	(T) <sub>16</sub>	1 931~1 946	198	3
YLT-22	CCACAAATGCATTTCAGTTCC	CAGGCCCGACAGAATAAAAA	(A) <sub>13</sub>	7 436~7 448	177	2
YLT-23	GATFGGTTCCGGTTCCAAGAA	GGCAATTTGGCGAATAAAAA	(A) <sub>18</sub>	7 924~7 941	215	2
YLT-24	TCGCATTGTAGCGGGTATAG	TTTTCGAATTGACCCTTGGAT	(A) <sub>20</sub>	9 976~9 995	219	2
YLT-25	CATAGGTCATCGATTTCAGCA	AAGTCCAGACAAAGCACGGTA	(A) <sub>15</sub>	13 422~13 436	239	2
YLT-26	AACGGAAACGAAGCGATAAAA	ACGGGAATCCACCAAAAAGT	(A) <sub>16</sub>	28 499~28 514	248	4
YLT-27	ATCTGGGAACGGGGATTAAC	CCATCAGAACGGGAACGAAAT	(T) <sub>17</sub>	33 511~33 527	157	2
YLT-29	AGCCACTTGTACTGCGAATTT	ACGTGCGATTTCGATAAAAACC	(T) <sub>11</sub> ···(A) <sub>16</sub>	124 632~124 666	207	3

### 2.3 聚类分析

基于 10 个多态性标记的检测结果, 利用 NTSYSpc-2.10 软件对供试的 16 份花椒属种质进行 UPGMA 聚类分析。如图 2 所示: 在遗传相似系数阈值为 0.22 时, 可将 16 份花椒种质聚为 2 类, 即花椒和竹叶花椒为 1 类, 日本花椒为 1 类; 在遗传相似系数阈值为 0.59 时, 可将花椒和竹叶花椒分为 2 个小类;

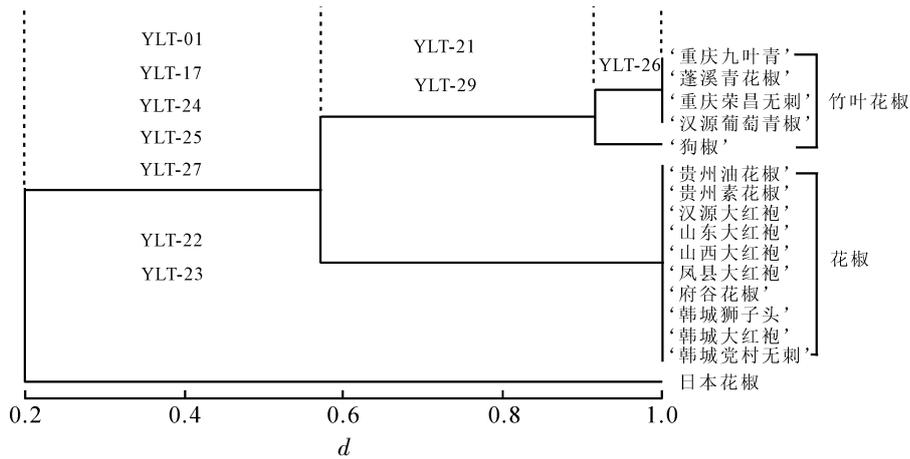


图 2 16 份花椒属种质的 UPGMA 聚类分析

Figure 2 Cluster diagram for 16 germplasm of *Zanthoxylum* by UPGMA method

而在遗传系数阈值为 0.91 时，可将竹叶花椒中的狗椒与其他 4 种竹叶花椒种质区分为 2 个小类。聚类结果与多态性标记的鉴定结果保持一致。

### 3 讨论

本研究在花椒的叶绿体基因组中共筛选到 144 个 SSR 位点，其中三核苷酸重复的数量要高于单核苷酸重复以及二核苷酸和四核苷酸重复的数量，与杨丽等<sup>[14]</sup>在麻竹 *Dendrocalamus latiflorus* 和绿竹 *Bambusa oldhamii* 叶绿体基因组中获得的 SSR 位点的规律一致，但与蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula*<sup>[15]</sup>，棉花 *Gossypium hirsutum*<sup>[16]</sup>和霍山石斛 *Dendrobium huoshanense*<sup>[17]</sup>等的叶绿体基因组中均以单核苷酸重复为主不同。原则上，碱基重复基元越多，越难形成 SSR 位点。本研究在三核苷酸重复次数的筛选上，选择重复数大于或等于 3 次的位点，而大于 3 次的重复位点仅占三核苷酸重复总数的 11.43%(8 个)。因此，本研究的三核苷酸重复数量多于单核苷酸重复是由软件参数设置不同引起。此外，花椒 cpSSR 在 LSC 和 SSC 区的分布密度要高于 IR 区。在花椒叶绿体基因组中，GC 质量分数在 LSC 区，SSC 区和 IR 区中分别为 36.87%，33.51%和 42.54%<sup>[12]</sup>。由于 GC 间有 3 个氢键相连，打破 GC 键所需的能量要高于 AT 间的 2 个氢键，因此更难造成碱基数量的增加或减少<sup>[18]</sup>。由此推断，花椒叶绿体基因组中 IR 区 SSR 位点相对稀疏的原因与 GC 质量分数相关。

叶绿体基因组由于保守性高，不涉及基因重组，因此，其中突变位点也更容易保留，基于叶绿体开发的 SSR 标记除了保留核基因组 SSR 标记的特点外，其可重复性也更高，在种质资源鉴定中也更具说服力<sup>[19]</sup>。在本研究获得的 10 个多态性引物中，有 2 对引物可以把本研究所选花椒属的 3 个种区分开，1 对引物可以将竹叶花椒种内的‘狗椒’区分出。然而，10 对多态性引物均未在 10 份花椒种质资源中表现出多态性。由此推断，相对于竹叶花椒，花椒种内的种质资源在叶绿体基因组进化上保守性更高。

本研究开发的花椒 cpSSR 可作为花椒属种间鉴定的有效标记，但要应用于种内鉴定，需进一步筛选种间多态性更高的 cpSSR 标记或利用 EST-SSR、核基因组 SSR(Genomic-SSR)等保守性相对较低的标记资源进行区分。

### 4 参考文献

[1] NAVASCUES M, EMERSON B C. Chloroplast microsatellites: measures of genetic diversity and the effect of homoplasy [J]. *Mol Ecol*, 2005, **14**(5): 1333 – 1341.

[2] 李军, 董彬, 张超, 等. 桂花 EST-SSR 引物开发及在品种鉴定中的应用[J]. *浙江农林大学学报*, 2018, **35** (2): 306 – 313.

LI Jun, DONG Bin, ZHANG Chao, et al. EST-SSR primers and their application in cultivar identification of *Osmanthus fragrans* [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2018, **35**(2): 306 – 313.

[3] WEN Mengfu, WANG Haiyan, XIA Zhiqiang, et al. Development of EST-SSR and genomic-SSR markers to assess genetic diversity in *Jatropha curcas* L. [J]. *BMC Res Notes*, 2010, **3**(1): 42.

- [4] 薛建华, 姜莉, 马晓林, 等. 莲品种 DNA 指纹图谱的构建[J]. 生物多样性, 2016, **24**(1): 3 – 11.  
XUE Jianhua, JIANG Li, MA Xiaolin, *et al.* Identification of lotus cultivars using DNA fingerprinting [J]. *Biodiversity Sci*, 2016, **24**(1): 3 – 11.
- [5] ASAF S, WAQAS M, KHAN A L, *et al.* The complete chloroplast genome of wild rice (*Oryza minuta*) and its comparison to related species [J]. *Front Plant Sci*, 2017, **8**: 304.
- [6] WANG Yanling, XIE Hongxian, YANG Yi, *et al.* Chloroplast and mitochondrial microsatellites for *Millettia pinnata* (Fabaceae) and cross-amplification in related species [J]. *Appl Plant Sci*, 2017, **5** (5): 1700034. doi: 10.3732/apps.1700034.
- [7] MOHAMMAD-PANAH N, SHABANIAN N, KHADIVI A, *et al.* Genetic structure of gall oak (*Quercus infectoria*) characterized by nuclear and chloroplast SSR markers [J]. *Tree Genet Genomes*, 2017, **13**(3): 70.
- [8] YAMAZAKI E, INAGAKI M, KURITA O, *et al.* Antioxidant activity of Japanese pepper (*Zanthoxylum piperitum* D C.) fruit [J]. *Food Chem*, 2007, **100**: 171 – 177.
- [9] FENG Shijing, YANG Tuxi, LIU Zhenshan, *et al.* Genetic diversity and relationships of wild and cultivated *Zanthoxylum* germplasms based on sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers [J]. *Genet Resour Crop Evol*, 2015, **62**: 1193 – 1204.
- [10] FENG Shijing, YANG Tuxi, LI Xiao, *et al.* Genetic relationships of Chinese prickly ash as revealed by ISSR markers [J]. *Biologia*, 2015, **70**(1): 45 – 51.
- [11] 侯丽秀, 魏安智, 王丽华, 等. 花椒转录组 SSR 信息分析及其分子标记开发[J]. 农业生物技术学报, 2018, **26**(7): 1226 – 1236.  
HOU Lixiu, WEI Anzhi, WANG Lihua, *et al.* Analysis of SSR loci and development of molecular markers in *Zanthoxylum bungeanum* transcriptome [J]. *J Agric Biotechnol*, 2018, **26**(7): 1226 – 1236.
- [12] LIU Yulin, WEI Anzhi. The complete chloroplast genome sequence of an economically important plant, *Zanthoxylum bungeanum* (Rutaceae) [J]. *Conserv Genet Resour*, 2016, **9**(1): 25 – 27.
- [13] 李强, 万建民. SSR Hunter, 一个本地化的 SSR 位点搜索软件的开发[J]. 遗传, 2005, **27**(5): 808 – 810.  
LI Qiang, WAN Jianmin. SSR Hunter: development of a local searching software for SSR sites [J]. *Hereditas*, 2005, **27**(5): 808 – 810.
- [14] 杨丽, 赵韩生, 彭镇华, 等. 竹子叶绿体基因组 SSR 分子标记的开发及其应用[J]. 热带亚热带植物学报, 2014, **22**(3): 263 – 269.  
YANG Li, ZHAO Hansheng, PENG Zhenhua, *et al.* Development and application of SSR molecular markers from the chloroplast genome of bamboo [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2014, **22**(3): 263 – 269.
- [15] 骈瑞琪, 李伟, 李娜, 等. 蒺藜苜蓿叶绿体微卫星分布规律的研究[J]. 安徽农业科学, 2008, **36**(9): 3531 – 3534.  
PIAN Ruiqi, LI Wei, LI Na, *et al.* Distribution of microsatellite from complete sequence of *Medicago truncatula* chloroplast DNA [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2008, **36**(9): 3531 – 3534.
- [16] 蔡小彦, 刘方, 周忠丽, 等. 棉花叶绿体基因组全序列微卫星分布规律研究[J]. 棉花学报, 2015, **27**(6): 570 – 575.  
CAI Xiaoyan, LIU Fang, ZHOU Zhongli, *et al.* Distribution of microsatellites from the complete sequence of *Gossypium hirsutum* chloroplast DNA [J]. *Cotton Sci*, 2015, **27**(6): 570 – 575.
- [17] 刘枫, 赵群, 戴军, 等. 霍山石斛 cpDNA 全序列微卫星分布及分子鉴别研究[J]. 中药材, 2016, **39**(12): 2720 – 2724.  
LIU Feng, ZHAO Qun, DAI Jun, *et al.* Microsatellite analysis of cpDNA in *Dendrobium huoshanense* and its molecular identification [J]. *J Chin Med Mater*, 2016, **39**(12): 2720 – 2724.
- [18] 童治军, 肖炳光. 3 种烟草基因组 SSR 位点信息分析和标记开发[J]. 西北植物学报, 2014, **34**(8): 1549 – 1558.  
TONG Zhijun, XIAO Bingguang. Survey of SSR loci information in three tobacco genomes and development of SSR markers [J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2014, **34**(8): 1549 – 1558.
- [19] PROVAN J, POWELL W, HOLLINGSWORTH P M. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution [J]. *Trends Ecol Evol*, 2001, **16**(3): 142 – 147.