

符亚茹,李少珂,姚卫杰,等. 西藏砂生槐 EST-SSR 引物开发及多态性检测[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):78-81.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.023

西藏砂生槐 EST-SSR 引物开发及多态性检测

符亚茹,李少珂,姚卫杰,李慧娥

(西藏大学农牧学院,西藏林芝 860000)

摘要:砂生槐为青藏高原特有灌木种,具有重要生态价值。开发多态 EST-SSR 引物对其居群遗传多样性研究及保护策略的制定具有重要意义。利用 SciRoKo v3.4 软件对前期获得的砂生槐转录组中 146 943 个转录本进行扫描共发现 9 428 个 SSR 位点。转录本中的微卫星种类十分丰富,其中以三核苷酸和五核苷酸重复最多,分别占 SSR 总位点数的 33.32% 和 21.70%,重复次数主要集中在 3~9 次重复。其中 (AG/CT)_n、(GA/TC)_n、(GAA/TTC)_n、(AAAAT/ATTTT)_n 重复基序最多,占总重复基序的 4.50%、4.34%、3.13% 和 2.44%。本研究中设计 130 对 EST-SSR 引物,有 80 对扩增出预期大小条带,经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,最终有 11 对具有较高多态性,且对于 30 个模板得到的位点平均等位基因数为 2.9;观测杂合度 (HO) 和期望杂合度 (HE) 平均值分别为 0.423 9 和 0.336 4。

关键词:砂生槐;转录本;EST-SSR;多态性;引物

中图分类号: S718.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0078-04

砂生槐 [*Sophora moorcroftiana* (Benth.) Benth. ex Baker] 为青藏高原特有豆科槐属矮灌木。主要分布在青藏高原海拔 2 800~4 400 m 的西藏“两江两河”(雅鲁藏布江、拉萨河、年楚河)河谷宽谷段的沙质地上,在雅鲁藏布江宽河谷形成大片群落^[1]。该树种为青藏高原干旱河谷半固定沙地上的先锋灌丛植物^[2]。由于其极强的抗旱、防风固沙特点,目前已成

为青藏高原人工造林先锋树种,具有重要的生态价值。但由于砂生槐分布区的过度放牧及薪炭过度樵采等人干扰,导致青藏高原独有的砂生槐种群严重退化,甚至一些种群正逐步消失,为此对砂生槐的保护迫在眉睫。

基于遗传学与分子生物学的植物遗传多样性研究为资源保护提供了新的理论指导。分子标记是遗传多样性研究的重要手段之一,常用 DNA 分子标记中简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR)^[3] 又称微卫星 (microsatellite)^[4],因其具有共显性分离、重复性强、DNA 样本用量少、位点专一且多态性高等优点^[5],已广泛运用于植物遗传多样性分析中^[6-9]。本实验室前期已经获取了砂生槐的转录组数据 (GenBank 登录号: SRP041237)^[10],这为成功开发砂生槐多态 EST-SSR 引物提供了前提,本研究则基于此转录组数据开发用于分析

收稿日期:2014-12-19

基金项目:国家自然科学基金 (编号:31260189);西藏特色农牧资源研发协同创新中心建设——高原生态。

作者简介:符亚茹 (1988—),女,陕西西安人,硕士研究生,主要从事高原植物分子生态研究。E-mail: fuyaruxw@126.com。

通信作者:李慧娥,博士,副教授,主要从事高原植物分子生物学研究。E-mail: lihuiesha@126.com。

6-BA 0.50 mg/L 处理的培养基有少数愈伤组织出现先分化出根的现象,可能是由于 6-BA/NAA 的比值较低,促使根器官先发生。

本次试验采用的植物生长调节剂有 6-BA、NAA、2,4-D 3 种。试验结果表明,在初代培养中,适当添加 6-BA、NAA、2,4-D 可以有效促进芽的萌动和愈伤组织的诱导。其中 2,4-D 对愈伤组织的诱导有着明显的促进作用,但用量过高会产生毒害作用,使形态畸变,诱导率降低。在继代培养中 6-BA 对不定芽的增殖有较好的促进效果,但在试验观察中发现高浓度的 6-BA 培养基中长期培养会出现较多玻璃化现象。在生根培养中,NAA 的运用有利于植株根系萌动,当 NAA 浓度较高时,形成的根粗壮,根毛较多;当 NAA 浓度较低时,形成的根细长,数量较多、根毛较少。

在本试验中,出现了叶片诱导时出愈率较高,但愈伤组织增殖系数不高、分化较少的现象,即使愈伤组织能分化出少量芽,也会因培养时间过长无营养而生长缓慢甚至死掉。分析原因,一方面可能是初代培养使用的激素浓度不当,虽然出愈率较高,但所诱导的愈伤组织大多数是比较致密的愈伤组织,

很少有粗颗粒状突起,难以增殖分化成芽;另一方面可能是由于植物本身的生理状态和遗传特性等因素造成的愈伤组织生长情况不佳^[6];此外,光照、温度等培养条件不适宜都可能是造成愈伤组织难分化成芽及分化的芽不易成活的因素。具体的愈伤组织分化成苗较难的原因还有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 马毓泉. 内蒙古植物志 [M]. 呼和浩特:内蒙古人民出版社, 1989:568-571.
- [2] 刘占磊,黄丛林,张秀海,等. 甘菊遗传转化再生体系的建立 [J]. 安徽农业科学,2009,37(14):6328-6329,6334.
- [3] 续九如,黄智慧. 林业试验设计 [M]. 北京:中国林业出版社, 1995:8-9.
- [4] 陈鹏彦. 朝鲜野菊再生系统建立的研究 [D]. 大连:辽宁师范大学,2010:24-25.
- [5] 李永文,刘新波,黄海帆,等. 植物组织培养技术 [M]. 北京:北京大学出版社,2007:45-47.
- [6] 崔丽华. 植物生长调节物质对组织培养中不定芽不定根的作用 [J]. 辽宁师专学报:自然科学版,2000(2):97-99.

砂生槐遗传多样性的多态 EST-SSR 引物。

1 材料与方法

1.1 试验材料

来自于青藏高原不同分布区的共 30 个砂生槐单株用于多态 SSR 引物开发。

1.2 总 DNA 提取和检测

取砂生槐叶片 0.3 g, 采用改良无液氮 CTAB 法^[11]提取总 DNA。琼脂糖凝胶和微量紫外分光光度计 (NanoDrop 2000 C, 美国) 对其浓度和纯度进行精确检测, -20 ℃ 保存备用。

1.3 SSR 引物来源及引物设计

用高通量 Illumina 2 代测序技术对砂生槐 RNA 样本进行测序, 得到 clean data 数据。再利用 CLC Genomics Workbench v6.5 (CLC Bio, Denmark) 软件对高通量数据进行拼接分析, 最后用 SciRoKo 3.4^[12] 软件对转录组所有转录本进行 SSR 位点扫描。从中选取三重重复基元最终设计并合成 130 对 SSR 引物用于多态引物筛选。

利用 Primer Premier 6.0 软件, 对含有 SSR 位点的 EST 序列进行引物设计, 设定标准为: GC 含量 40% ~ 60%, 退火温度 55 ~ 60 ℃, 引物长度范围 17 ~ 25 bp, 扩展片段长度 110 ~ 200 bp。

1.4 PCR 扩增及电泳检测

PCR 扩增体系为 20 μL: 上下游引物各 1 μL, DNA 模板 3 μL (10 ng/μL), PCR 扩增 Mix (康为世纪生物科技有限公司, 北京) 10 μL, 超纯水 5 μL。PCR 扩增条件为: 94 ℃ 预变性 4 min; 95 ℃ 变性 30 s, 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 40 s, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min。

用浓度为 2% 的琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行检查, 查看是否有预期大小扩增产物。然后对能扩增出条带的产物进行 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测^[13], 以 10 bp DNA maker

(广州东盛) 作为分子量标准, 电泳后银染^[14]染色, 在凝胶成像系统 (GBOX-F3-E, 英国) 对条带进行扫描分析, 并照相保存。

1.5 数据处理和分析

根据扩增产物条带的迁移率, 对照分子量标准分别统计每个位点等位基因片段长度, 获得数据矩阵。用软件 PowerMarker v3.0^[15] 对每个位点等位基因数 (N_A)、观测杂合度 (H_0) 和期望杂合度 (H_E)、连锁平衡 (LD) 和哈温平衡 (HWE) 进行检测及评价。

2 结果与分析

2.1 砂生槐转录组 SSR 位点扫描

用 SciRoKo 3.4 软件默认参数对 146 943 个砂生槐转录本进行扫描共发现 9 428 个 SSR 位点, 其 SSR 数量、类型及频率见表 1, SSR 中主要重复基元的类型及频率见表 2。由表 1、表 2 可知, SSR 种类丰富, 且不同类型 SSR 出现频率不同, 除单核苷酸外, 其他核苷酸重复所占总 SSR 比例从 12.61% 到 33.32%; 以三、五核苷酸重复为主, 分别占 SSR 总数的 33.32% 和 21.70%; 其他类型所占比例相对较小, 其中四核苷酸最少; 重复次数主要集中在 3 ~ 9 次重复。从不同 SSR 基元出现频率来看 (表 2), 二核苷酸中以 (AG/CT)_n 和 (GA/TC)_n 为主, 所占其重复基元的比例分别为 33.41% 和 32.23%; 三核苷酸种类丰富, 其中以 (GAA/TTC)_n、(AAG/CTT)_n 和 (AGA/TCT)_n 最多, 分别占其重复基元的 11.94%、7.61%、7.49%, 其他较少; 四核苷酸中以 (AAAT/ATTT)_n 最多, 占 13.05%; 另外五、六核苷酸分别以 (AAAAT/ATTTT)_n 和 (AAAAAT/ATTTTT)_n 最多; 占总重复基元的主要重复基元类型是 AG/CT (4.50%)、GA/TC (4.34%)、GAA/TTC (3.13%) 和 AAAAT/ATTTT (2.44%)。基于此扫描结果根据 SSR 位点侧翼序列共设计并合成 130 对引物供筛选。

表 1 砂生槐 EST-SSR 的类型、数量及分布频率

| 重复类型 | 重复次数 | | | | | | | | | | | | | 总计 | 百分比 (%) |
|---------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|---------|
| | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | ≥15 | | |
| 二核苷酸 | | — | — | — | — | 362 | 263 | 280 | 228 | 79 | 7 | 21 | 29 | 1 269 | 17.11 |
| 三核苷酸 | | — | 849 | 705 | 491 | 223 | 80 | 50 | 33 | 14 | 11 | 3 | 12 | 2 471 | 33.32 |
| 四核苷酸 | | 538 | 257 | 96 | 18 | 15 | 4 | 2 | 5 | — | — | — | — | 935 | 12.61 |
| 五核苷酸 | 1 073 | 394 | 102 | 30 | 6 | 2 | 1 | — | — | 1 | — | — | — | 1 609 | 21.70 |
| 六核苷酸 | 586 | 407 | 97 | 24 | 10 | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 | — | — | — | 1 132 | 15.26 |
| 总计 | 1 659 | 1 339 | 1 305 | 855 | 525 | 605 | 350 | 333 | 267 | 95 | 18 | 24 | 41 | 7 416 | |
| 百分比 (%) | 22.37 | 18.06 | 17.60 | 11.53 | 7.08 | 8.16 | 4.72 | 4.49 | 3.60 | 1.28 | 0.24 | 0.32 | 0.55 | | |

注: 二、三、四、五、六核苷酸重复类型的 EST-SSR 最小重复次数标准分别是 8、5、4、3、3 次。

2.2 扩增产物长度差异的 SSR 引物

首先用 130 对引物对 2 个来自不同分布区的砂生槐 DNA 模板进行 PCR 预扩增, 2% 琼脂糖凝胶电泳结果显示其中 80 对引物扩增出预期大小条带 (图 1)。用此 80 对引物对 30 个不同分布区的模板进行扩增的 PCR 产物经 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 (图 2), 最终有 41 对引物对不同模板的扩增显示出差异, 其中有 19 对差异变化较大, 其引物信息见表 3。

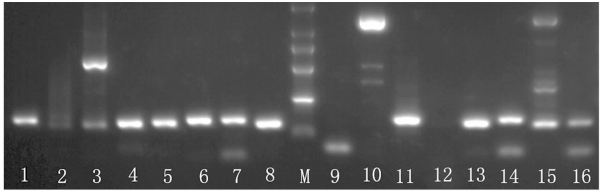
2.3 多态 SSR 引物筛选

用 PowerMarker 3.0 软件对表 3 中 19 个 SSR 位点进行分

析, 结果表明, 其中 8 个 SSR 位点分析结果偏离哈温平衡达极显著水平。因此, 最终筛选 11 个多态 SSR 位点, 其等位基因数 (N_A)、观测杂合度 (H_0) 和期望杂合度 (H_E)、连锁平衡及哈温平衡分析结果见表 4。11 对引物对应 SSR 位点等位基因数从 2 (Sm69, Sm82, Sm101 和 Sm127) 至 5 (Sm85), 平均等位基因数为每位点 2.9。观测杂合度从 0.212 8 (Sm122) 至 0.570 6 (Sm85), 期望杂合度从 0.133 3 (Sm122) 至 0.700 0 (Sm24), 平均值分别为 0.423 9 和 0.336 4。对期望杂合度指标, 按从小到大顺序对各位点排序: Sm122 < Sm85 < Sm50 < Sm82 < Sm112 < Sm127 < Sm101 < Sm95 < Sm69 < Sm77 < Sm24。经过

表 2 砂生槐 EST-SSR 中主要重复基元的类型及频率

| 重复类型 | 主要重复基元类型 | 占各类重复基元比例(%) | 占总重复基元比例(%) |
|------|---------------|--------------|-------------|
| 二核苷酸 | AG/CT | 33.41 | 4.50 |
| | GA/TC | 32.23 | 4.34 |
| 三核苷酸 | GAA/TTC | 11.94 | 3.13 |
| | AAG/CTT | 7.61 | 1.99 |
| | AGA/TCT | 7.49 | 1.96 |
| | CAA/TTG | 6.03 | 1.58 |
| | TCA/TGA | 5.63 | 1.47 |
| | ATG/CAT | 5.00 | 1.31 |
| | ATC/GAT | 4.65 | 1.22 |
| | CCA/TGG | 4.65 | 1.22 |
| | AAC/GTT | 4.41 | 1.16 |
| | AAT/ATT | 4.13 | 1.08 |
| | AAAT/ATTT | 13.05 | 1.29 |
| 四核苷酸 | GAAA/TTTC | 8.13 | 0.81 |
| | TAAA/TTTA | 7.91 | 0.78 |
| | AAAG/CTTT | 6.63 | 0.70 |
| | AAAA/TTTT | 14.30 | 2.44 |
| 五核苷酸 | TAAAA/TTTTA | 5.47 | 0.93 |
| | AAAAG/CTTTT | 4.10 | 0.70 |
| | ATAAA/TTTAT | 3.17 | 0.54 |
| | AAAAAT/ATTTTT | 5.48 | 0.66 |
| 六核苷酸 | TAAAAA/TTTTTA | 3.27 | 0.39 |
| | AAAATA/TATTTT | 2.74 | 0.33 |
| | AAAAAG/CTTTTT | 2.12 | 0.25 |



M 代表分子量标准 marker; 1~16 代表部分 EST-SSR 引物

图1 部分砂生槐 EST-SSR 引物 PCR 预扩增产物电泳结果



M 代表分子量标准 marker; 1~30 代表样本模板

图2 部分引物在不同分布区样本间的扩增多态性

FDR 检测^[16],其中 3 个位点 (Sm85、Sm95、Sm122) 显示偏离哈温平衡(不显著)。因此,这 11 对筛选出的多态 SSR 引物可用于下一步砂生槐遗传多样性分析。

3 讨论与结论

对于缺乏基因组信息的物种来说,欲开发应用于遗传多样性的多态 SSR 引物成本高、耗时长。基于高通量转录组数据开发多态 EST-SSR 引物具有开发成本低、操作简便、信息量大等优势而被广泛应用^[17]。砂生槐因其分布范围狭窄、分布地交通不便等原因一直没有相关基因组序列被公开报道,本研究基于实验室前期获得的转录组数据,设计的 SSR 引物

表 3 砂生槐扩增产物长度差异的 EST-SSR 引物

| 位点 | 引物序列(5'→3') | 重复基元 | 退火温度(℃) | 预期大小(bp) | 条带范围(bp) |
|-------|--|---|---------|----------|----------|
| Sm2 | F:CGGAAGCAGCGGTGGCT;R: GTTCTTGGATCCAGCTGGT | (AAC) ₅ | 55 | 139 | 137~148 |
| Sm8 | F:GGGGATTCTCTGTATCAG;R: GACATGGGATCCGCGAAG | (ATC) ₅ | 55 | 162 | 152~162 |
| Sm24 | F:CCGACGTCATAACGAGG;R: GGGCGCATCATATGGAGG | (ATG) ₃ 、ACG(ATG) ₃ | 56 | 146 | 140~146 |
| Sm25 | F:GACTGATAACTCCCCAGAG;R: CATAGCCAAGAGTCCATAAC | (AGG) ₆ | 55 | 173 | 172~181 |
| Sm33 | F:GACAAGGGAGGTGGGCG;R: GCAACGGCGATGTTGTC | (AGA) ₅ | 55 | 140 | 134~146 |
| Sm39 | F:CTGCTTCTGGTAAGAAATGG;R: GTGAATATGCTCACGTCC | (TGG) ₅ | 55 | 153 | 153~159 |
| Sm50 | F:GGTCATTTTACTCCCTAGAC;R: CAACACAATACCTTCTTCC | (TTC) ₃ 、TTG(TTC) ₃ | 56 | 158 | 149~158 |
| Sm69 | F:CCTCTCCTAATATCCCTCC;R: CGGAATCTAGAATGATGAAAC | (TCT) ₅ | 56 | 150 | 147~150 |
| Sm72 | F:CTCAGCGGACATACCAATC;R: CTGTGCGCCACCAGCAGC | (GCC) ₅ | 56 | 130 | 127~133 |
| Sm77 | F:GAATACTTGCTCGTCTTTGG;R: GGAGGCAGTGAGGGCTG | (TTA) ₅ | 57 | 140 | 140~146 |
| Sm82 | F:GCAAAGGGTTGGGTGTGG;R: GATTTCCTCCACTTATGAGG | (AGA) ₆ | 57 | 142 | 139~142 |
| Sm85 | F:CCCTTAACTAATTATATCCC;R: CGACACTGGTTCCTACTAC | (GAT) ₆ | 56 | 170 | 170~185 |
| Sm95 | F:CAAAAGGGTCACCAGCAAAA;R: GTAGCTCCCAATTCTCTCTC | (GAT) ₅ | 56 | 140 | 134~140 |
| Sm97 | F:GACACATAACCATTCCTTC;R: GTTGATTATGCTTTTCTGAGG | (ACA) ₅ | 55 | 137 | 134~140 |
| Sm101 | F:CTTCTTTGCTTCCCATCC;R: GGGGAAATGGCCATGGTG | (TAC) ₅ | 57 | 168 | 168~171 |
| Sm110 | F:CAGGTTCAATCCGCTGCC;R: CGGCCGAGGCAGGAGC | (CCG) ₇ | 56 | 157 | 139~175 |
| Sm112 | F:GGCGAAGAGGATCTGAGG;R: GGCCACCAATAGGGTCTC | (GTT) ₆ | 56 | 178 | 175~181 |
| Sm122 | F:CTGTGATGGCAATCTCCAC;R: CGGATCGGGAGATTGGAG | (TTC) ₆ | 56 | 148 | 148~154 |
| Sm127 | F:GCTAACTTTGGTCTTCCCC;R: GCTTAGGGTTCTGCTCATC | (TCC) ₅ | 56 | 140 | 140~143 |

中 61.5% 能在基因组 DNA 上扩增出预期大小条带,未成功扩增的引物可能是由于:2 条引物被内含子隔开;引物位置恰好位于内含子或外显子剪切点;EST 片段发生了变化等而导致无法有效扩增。

砂生槐高通量转录组中微卫星的种类非常丰富,从单核

苷酸到六核苷酸都具有丰富的类型,其中以三核苷酸和五核苷酸重复为主,分别占 SSR 总数的 33.32% 和 21.70%,目前在大多数物种如豌豆^[18]、苹果^[19]、红豆杉^[20]、杜仲^[21] 等中,研究发现二核苷酸和三核苷酸是最常见的转录组 SSR 重复基序类型。主要重复基元的比较分析表明,二核苷酸中的

表 4 11 对砂生槐多态 EST-SSR 位点信息

| 位点 | N_A | H_0 | H_E | $P(Seq - Bon)$ |
|-------|-------|---------|---------|------------------|
| Sm24 | 3 | 0.509 4 | 0.700 0 | 0.039 0(0.007 3) |
| Sm50 | 3 | 0.235 0 | 0.266 7 | 1.000 0(0.050 0) |
| Sm69 | 2 | 0.444 4 | 0.400 0 | 0.702 0(0.025 3) |
| Sm77 | 3 | 0.539 4 | 0.500 0 | 0.144 0(0.012 7) |
| Sm82 | 2 | 0.497 8 | 0.266 7 | 0.007 0(0.006 4) |
| Sm85 | 5 | 0.570 6 | 0.233 3 | 0.000 0(0.004 6) |
| Sm95 | 4 | 0.501 7 | 0.366 7 | 0.002 0(0.005 1) |
| Sm101 | 2 | 0.432 8 | 0.300 0 | 0.097 0(0.010 2) |
| Sm112 | 3 | 0.399 4 | 0.266 7 | 0.087 0(0.008 5) |
| Sm122 | 3 | 0.212 8 | 0.133 3 | 0.004 0(0.005 7) |
| Sm127 | 2 | 0.320 0 | 0.266 7 | 0.303 0(0.017 0) |
| Mean | 2.9 | 0.423 9 | 0.336 4 | |

注:本表中所筛选的 11 个 SSR 位点为表 3 中加粗位点。

AG/CT 重复,三核苷酸中的 GAA/TTC 重复,四核苷酸中的 AAAT/ATTT 重复和五核苷酸中的 AAAAT/ATTTT 重复在各类重复基元中所占比例最大,六核苷酸各重复类型所占的比例都较低,这与桑树^[23]较为相似。EST-SSR 发生频率和密度、重复基元类型在不同物种间存在较大差异,这可能与物种基因组组成、转录组测序方法、数据量大小、微卫星搜索标准等不同有较大的关系。物种三核苷酸基序数量较多可能是对自然选择机制的一种积极响应,这对物种的生存竞争具有重要意义,且三核苷酸基序的 SSR 位点具有转高的遗传变异^[22],因此本研究主要选取三核苷酸基序的 SSR 位点设计引物进行分析。

对不同植物种类 SSR 位点分析结果显示,每个 SSR 位点的平均等位基因数约为 10.0,期望杂合度约为 0.61^[24],本研究中,80 对砂生槐 EST-SSR 严格控制分析结果后,最终有 11 对引物显示出较高的多态性。在这 11 个位点中尽管 Sm24 和 Sm77 位点的遗传多样性相对于其他位点来说较高,但多数位点平均等位基因数和期望杂合度都低于上述平均值,这可能是因为文献所列这 2 项指标的平均值仅基于部分物种所得引起的偏差及砂生槐分布范围狭窄所致。

综上,利用砂生槐转录组数据开发多态 EST-SSR 引物是可行的,同时最终筛选出的这 11 对多态 EST-SSR 引物可以用于后期砂生槐天然居群遗传多样性分析、核心种质库构建、分子标记辅助育种、功能基因挖掘等研究中。

参考文献:

- [1] 吴征镒. 西藏植物志:第二卷[M]. 北京:科学出版社,1985:716-717.
- [2] 赵文智. 砂生槐沙生适应性初步研究[J]. 植物生态学报,1998,22(4):92-97.
- [3] Tautz D, Trick M, Dover G A. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation[J]. Nature, 1986, 322(680):652-656.
- [4] Litt M, Luty J A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene[J]. American Journal of Human Genetics, 1989, 44(3):397-408.

- [5] 艾先涛, 梁亚军, 沙红, 等. 新疆自育陆地棉品种 SSR 遗传多样性分析[J]. 作物学报, 2014, 40(2):369-379.
- [6] 孙清明, 马帅鹏, 马文朝, 等. 荔枝两个 F₁ 杂交群体的 EST-SSR 鉴定及多样性分析[J]. 分子植物育种, 2014, 12(1):87-95.
- [7] 王静, 王旗, 徐璟琨, 等. SSR 和 EST-SSR 技术在小麦锈菌研究中的应用[J]. 河北农业科学, 2014, 18(3):63-66.
- [8] Rumeu B, Sosa P A, Nogales M, et al. Development and characterization of 13 SSR markers for an endangered insular juniper (*Juniperus cedrus* Webb & Berth.) [J]. Conservation Genetics Resources, 2013, 5(2):457-459.
- [9] Mishima K, Hirao T, Watanabe A, et al. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Thuopsis dolabrata* var. *hondai* (Cupressaceae) [J]. American Journal of Botany, 2012, 99(8):E317-E319.
- [10] Li H E, Yao W J, Fu Y R, et al. *De novo* assembly and discovery of genes that are involved in drought tolerance in Tibetan *Sophora moorcroftiana* [J]. PLoS One, 2015, 10(1):e111054.
- [11] 张剑侠. 中国野生葡萄抗病基因标记及辅助育种应用研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2006.
- [12] Kofler R, Schloetterer C, Lelley T. SciRoKo: a new tool for whole genome microsatellite search and investigation [J]. Bioinformatics, 2007, 23(13):1683-1685.
- [13] 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京:科学出版社, 2002:418-424.
- [14] 王西平. 中国葡萄属野生种抗白粉病基因克隆与序列分析[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2004.
- [15] Liu Kejun, Muse S V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis [J]. Bioinformatics, 2005, 21(9):2128-2129.
- [16] Moran M D. Arguments for rejecting the sequential Bonferroni in ecological studies [J]. Oikos, 2003, 100(2):403-405.
- [17] 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, 740.
- [18] Mishra R K, Gangadhar B H, Nookaraju A, et al. Development of EST-derived SSR markers in pea (*Pisum sativum*) and their potential utility for genetic mapping and transferability [J]. Plant Breeding, 2012, 131(1):118-124.
- [19] Azad M K, Nasiri J, Abdollahi H. Genetic diversity of selected iranian quinces using SSRs from apples and pears [J]. Biochemical Genetics, 2013, 51(5/6):426-442.
- [20] 吴琼, 段小群, 陈旭, 等. 基于高通量测序的红豆杉 EST-SSRs 标记研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(24):3728-3733.
- [21] 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.
- [22] Blanca J, Canizares J, Roig C, et al. Transcriptome characterization and high throughput SSRs and SNPs discovery in *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae) [J]. BMC Genomics, 2011, 12(1):104-108.
- [23] 高丽霞. 桑树 EST-SSR 引物开发[J]. 南方农业学报, 2013, 44(8):1254-1257.
- [24] Nybom H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants [J]. Molecular Ecology, 2004, 13(5):1143-1155.