

刺梨转录组 SSR 信息分析及其分子标记开发

鄢秀芹, 鲁敏, 安华明*

(贵州大学农学院, 贵州省果树工程技术研究中心, 贵阳 550025)

摘要: 利用 MISA 软件筛选刺梨 (*Rosa roxburghii* Tratt) 转录组测序获得的 106 590 条 Unigene, 共检测出 21 711 个 SSR 位点, 分布于 18 155 条 Unigene 中, 出现频率为 20.37%, 平均分布距离为 1.68 kb。优势重复基序为三核苷酸、四核苷酸和二核苷酸, 分别占总 SSR 位点的 26.87%、26.77% 和 24.93%。AG/CT 与 AAG/CTT 分别是二核苷酸与三核苷酸的优势重复基元, 分别占总 SSR 重复类型的 17.80% 和 11.55%。以不同主导重复基元类型设计合成 42 对 SSR 引物, 并以刺梨及其他蔷薇属种质的基因组 DNA 为模板对其有效性及通用性进行初步验证, 筛选出具有清晰扩增产物的引物 23 对, 并且均在同属材料中通用。选取 16 份贵州刺梨资源对筛选出的引物进行多态性检测, 获得 12 对具有多态性的引物。以上结果表明, 刺梨转录组测序产生的 Unigene 信息可作为开发 SSR 标记的有效来源, 获得的大批量 SSR 标记可为刺梨及其近缘种的遗传多样性分析和遗传图谱构建提供更加丰富可靠的标记选择。

关键词: 刺梨; SSR; 转录组

中图分类号: S 661.9

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2015) 02-0341-09

Analysis on SSR Information in Transcriptome and Development of Molecular Markers in *Rosa roxburghii*

YAN Xiu-qin, LU Min, and AN Hua-ming*

(College of Agriculture, Guizhou University, Guizhou Engineering Research Center for Fruit Crops, Guiyang 550025, China)

Abstract: One hundred and six thousand five hundred and ninety unigenes from fruit transcriptome of *Rosa roxburghii* Tratt were screened using MISA software. A total of 21 711 SSRs that occurred in 18 155 unigenes were identified, and the frequency of these SSRs was 20.37% and mean distance was 1.68 kb in the unigenes. Trinucleotide, tetranucleotide and dinucleotide were major types, accounting for 26.87%, 26.77% and 24.93%, respectively. AG/CT, AAG/CTT were respectively most frequent motifs in dinucleotide and trinucleotide repeats, accounting for 17.80% and 11.55%, respectively. Using the Primer 3.0, 42 primers were designed and synthesized based on different dominant motifs types, and verified with *R. roxburghii* germplasms for validity and *Rosa* germplasms for transferability. The results showed that the products of 23 primers are clear and effective, 23 pairs could be transferable to *Rosa* germplasms and 12 pairs were polymorphic among the 16 *R. roxburghii* germplasms. The results indicated that the unigenes generated from transcriptome sequencing in *R. roxburghii* can be used as an effective source to

收稿日期: 2014-11-13; **修回日期:** 2015-01-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31360475); 贵州省重大科技专项项目 (黔科重大专项字 20136006-1); 贵州大学研究生创新基金项目 (研农 2014004)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: anhuaming@hotmail.com)

development SSR markers. The large quantities of SSR markers will provide more reliable markers for map structure, analysis of genetic polymorphism for *R. roxburghii* and its closely related species.

Key words: *Rosa roxburghii*; SSR; transcriptome

简单序列重复 (Simple sequence repeat, SSR) 是一类由 1~6 个碱基组成的基元串联重复而成的 DNA 序列 (Tautz, 1989)。根据 SSR 来源可分为基因组 SSR 和 EST-SSR。传统的基因组 SSR 标记开发费时、费力且成本高, 而 EST-SSR 标记不仅具有传统 SSR 标记多态性高、共显性与重复性好等特点, 更重要的是开发成本低; 而且由于 EST-SSR 来源于表达的基因组区域, 可直接反映相关基因的多样性, 在不同物种间也具有较好的通用性 (Powell et al., 1996)。近年来, 大量快速增长的 EST 数据已成为 SSR 的重要来源, 基于 EST 序列开发 SSR 标记在梨 (王西成 等, 2010; Zhang et al., 2014)、草莓 (董清华 等, 2011)、荔枝 (孙清明 等, 2011)、桃 (Vendramin et al., 2007)、核桃 (齐建勋 等, 2011)、猕猴桃 (徐小彪 等, 2010) 等多种果树中均有报道。

刺梨 (*Rosa roxburghii* Tratt) 为蔷薇科 (Rosaceae) 蔷薇属 (*Rosa*) 多年生灌木, 是中国特有的新兴果树。因其果实含有丰富的营养物质和药用保健成分, 特别是极高的维生素 C 含量而引起国内外的广泛关注 (樊卫国 等, 1997; 安华明 等, 2011), 并已成为贵州省重点发展的果树产业。贵州刺梨资源极其丰富, 但对于该物种的遗传多样性研究主要局限于 RAPD (文晓鹏 等, 2003a, 2003b, 2003c)、AFLP (Wen et al., 2004) 等通用的分子标记技术。与此同时, 至 2014 年 7 月, GenBank 中公布的刺梨 EST 序列仅有 160 余条, 不足以开发大批量的 SSR 标记。本研究基于前期工作中对刺梨果实转录组进行测序获得的数据, 开发大批量 EST-SSR 引物, 为利用 SSR 分子标记进行刺梨种质资源多样性、连锁图谱构建及亲缘关系研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 转录组数据来源

刺梨转录组数据来源于本课题组 2012 年对刺梨品种 ‘贵农 5 号’ 果实进行 Illumina 高通量深度测序的结果。测序时采取 3 个发育时期 (花后 20、60、100 d) 的刺梨果实, 提取 RNA 并等量混匀后委托华大基因公司进行 RNA-Seq 转录组测序, 并通过 De Novo 方法 (Grabherr et al., 2011) 组装得到 106 590 条 Unigene, 作为分析背景数据。

1.2 植物材料及其 DNA 提取

用于对所设计的引物进行筛选和可用性评价的材料为本课题组收集保存的 3 份刺梨 (‘贵农 5 号’ 和两份野生刺梨)、1 份无籽刺梨 (*R. sterilis* S. D. Shi) 和 1 份野蔷薇 (*R. multiflora* Thunb.)。

此外, 选取 ‘贵农 5 号’ 和 15 份野生刺梨资源对筛选出的引物进行多态性检测。

试验材料基因组 DNA 提取参照 Porebski 等 (1997) 的 CTAB 法。

1.3 转录组 SSR 位点鉴别及 SSR 引物设计

使用 MISA 程序 (<http://pgrc.ikp-gatersleben.de/misa>) 进行 SSR 位点搜索, 搜索标准为: 二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸最少重复次数分别为 6、4、3、3 和 3 次。

用 Primer 3.0 引物批量设计程序对含有 SSR 位点的 Unigene 序列设计引物, 并且 SSR 位点侧翼

序列长度 ≥ 50 bp。引物设计的主要参数为：(1) 退火温度 (T_m) 在 55 ~ 65 °C 之间，上、下游引物的 T_m 相差 ≤ 2 °C；(2) PCR 产物大小在 80 ~ 300 bp；(3) 引物长度在 18 ~ 28 bp 之间；(4) GC 含量在 40% ~ 60% 之间；尽量避免引物二级结构如发卡结构、二聚体、错配、引物二聚体的出现。对批量设计的 SSRs 引物对在 Unigene 库中进行 SSR 引物的 Blast 验证。

1.4 EST-SSR 引物筛选

随机选取 42 对 EST-SSR 引物交由上海英骏生物技术有限公司合成。选取 ‘贵农 5 号’ 和两份野生刺梨资源进行引物筛选。PCR 反应体系为 20 μ L，其中包括 2 \times Mix 10 μ L；10 μ mol \cdot L⁻¹ 的 Primer-F 及 Primer-R 各 0.5 μ L；ddH₂O 8 μ L；50 ng \cdot μ L⁻¹ 的 DNA 模板 1 μ L。扩增程序为 94 °C 预变性 3 min；然后进行 35 个循环，每个循环包括 94 °C 变性 40 s，55 °C 退火 40 s（退火温度因不同引物而异），72 °C 延伸 1 min；最后 72 °C 延伸 10 min。

扩增产物利用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶于北京六一仪器厂生产的 DYCZ-30C 型垂直电泳槽中电泳分离，120 V 电压下电泳 75 min。电泳后参照 Bassam 等 (1991) 的方法进行银染显色，BIO-RAD 凝胶成像系统拍照记录。

1.5 数据统计

用 SSR 出现频率和 SSR 平均分布距离来描述 EST-SSR。计算公式为：(1) SSR 出现频率， $f_c (\%) = c/n \times 100$ ， c 为搜索到的 SSR 数量， n 为无冗余 EST 数量；(2) SSR 平均分布距离， $f_n = N/c$ ， N 为无冗余 EST 数量的总碱基数。

2 结果与分析

2.1 转录组中 SSR 的分布及结构特点

通过对刺梨转录组的 106 590 条 Unigene (序列总长约 36 571.80 kb) 序列进行搜索，发现其中 18 155 条 Unigene 序列中含有 21 711 个 SSR 位点，其中 2 867 条 Unigene 含有两个或两个以上 EST-SSR 位点。总体上，SSR 发生频率为 20.37%，平均每 1.68 kb 出现 1 个 SSR。SSR 的类型丰富，二核苷酸至六核苷酸重复类型均存在。其中二、三和四核苷酸重复出现频率占优势，分别占总 SSR 的 24.93%、26.87% 和 26.77%；五核苷酸和六核苷酸重复类型数量较少，分别占总数的 12.52% 和 8.91% (表 1)。所有 SSR 中，以 3 次重复的 SSR 最多，占 40.81%，4 次重复的占 23.24%，6 次重复的占 10.06% (表 1)。

表 1 刺梨 EST-SSR 的类型、数量及分布频率
 Table 1 Type, number and frequency of EST-SSRs in *R. roxburghii*

重复基元长度 Repeat motif length	重复次数 Repeat number									总计 Total	百分比/% Percentage
	3	4	5	6	7	8	9	10	> 10		
二核苷酸 Di				1 617	1 107	994	914	631	150	5 413	24.93
三核苷酸 Tri		3 726	1 241	547	276	36	1		7	5 834	26.87
四核苷酸 Tetra	4 725	847	181	17	1	1	3	1	36	5 812	26.77
五核苷酸 Penta	2 353	341	12	2	3	2	3		1	2 717	12.52
六核苷酸 Hexa	1 782	131	8	2	1	2	3	4	2	1 935	8.91
总计 Total	8 860	5 045	1 442	2 185	1 388	1 035	924	636	196	21 711	100.00
百分比% Percentage	40.81	23.24	6.64	10.06	6.39	4.77	4.26	2.93	0.90		

刺梨转录组 SSR 重复单元的重复次数分布在 3 ~ 29 次之间, 其中 3 ~ 10 次重复的 SSR 位点有 21 515 个, 占总个数的 99.10%; 11 ~ 20 次重复的有 184 个, 占 0.85%; 20 次重复以上的有 12 个, 只占 0.05%。刺梨转录组 SSR 的长度从 12 ~ 112 bp 不等, 分布在 12 ~ 15 bp 的约有 14 769 个, 占整个 EST-SSR 的 68.02%; 16 ~ 20 bp 的有 6 237 个, 为 28.73%; 21 ~ 25 bp 的有 621 个, 为 2.86%; 长度大于 25 bp 的有 84 个, 为 0.39%。

2.2 转录组 SSR 基序重复类型和频率特征

从刺梨转录组 SSR 核苷酸基序类型来看, 其 21 711 个 SSR 位点包含 314 种重复基元, 二核苷酸至六核苷酸重复分别有 4、10、33、86、181 种; 从分布频率来看, 出现最多的基元是 AG/CT (3 865 个, 占 17.80%), 其次是 AAG/CTT (2 507 个, 占 11.55%) 和 AAAT/ATTT (1 918 个, 占 8.83%)。在二核苷酸重复基元中, 以 AG/CT、AC/GT 和 AT/AT 为主, 占二核苷酸总数的 99.83%。三碱基中以 AAG/CTT、AAT/ATT、AGG/CCT 最多, 分别占三核苷酸总数的 42.97%、17.21% 和 10.23%。二核苷酸和三核苷酸重复基元的类型及发生频率见表 2。四核苷酸中以 AAAT/ATTT 和 AAAG/CTTT 最多, 分别占四核苷酸总数的 33.00% 和 24.67%; 五核苷酸中以 AAAAT/ATTTT 和 AAAAG/CTTTT 出现频率最高, 分别占其总数的 30.77% 和 27.46%; 六核苷酸中出现频率最高的是 AAAAAT/ATTTTT 和 AAAAG/CTTTTT, 分别占其总数的 23.98% 和 22.02%。

表 2 刺梨 EST-SSR 中二碱基和三碱基重复基元的类型及频率

Table 2 Dinucleotide and trinucleotide EST-SSR repeat motifs and their frequency in ESTs of *R. roxburghii*

重复基元类型 Repeat motif length	重复次数 Repeat number								总计 Total	频率% Frequency
	4	5	6	7	8	9	10	> 10		
AC/GT			274	169	140	98	87	48	816	3.76
AG/CT			1 024	759	701	766	519	96	3 865	17.80
AT/AT			314	175	153	50	25	6	723	3.33
CG/CG			5	4					9	0.04
AAC/GTT	268	113	46	23	3				453	2.09
AAG/CTT	1 555	517	285	137	13				2 507	11.55
AAT/ATT	653	228	81	34	5			3	1 004	4.62
ACC/GGT	343	79	32	20	4	1			479	2.01
ACG/CGT	37	27	6		2				72	0.33
ACT/AGT	49	13	3	6	2				73	0.34
AGC/CTG	123	25	6	3				1	157	0.72
AGG/CCT	370	129	63	32	2				597	2.75
ATC/ATG	232	74	19	19	5			3	352	1.62
CCG/CGG	96	36	6	2					140	0.64
总计 Total	3 726	1 241	2 164	1 383	1 030	915	631	157	11 247	51.80
频率/% Frequency	17.16	5.72	9.97	6.37	4.74	4.21	2.91	0.72	51.80	

2.3 EST-SSR 引物的有效性及通用性检测

对含 SSR 位点的 18 155 条 EST 序列进行引物设计, 共设计了 11 185 对 SSR 位点特异引物。为了验证其引物的有效性, 随机挑选合成了 42 对 EST-SSR 引物, 包括二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸及六核苷酸重复基元的 SSR 位点。

以 3 份刺梨材料的基因组 DNA 为模板对这批引物进行 PCR 扩增、筛选。结果表明, 其中的 23

对引物 (表 3) 能产生理想的 PCR 产物, 有效扩增率为 54.76%。通过筛选得到的 23 对 SSR 引物, 在野蔷薇和无籽刺梨中均能有效扩增, 引物的转化率达到 100%, 说明其通用性很高。

表 3 23 对刺梨 SSR 引物信息
Table 3 Information of 23 pairs of primers developed from *R. roxburghii*

引物编号 Primer No.	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')	重复单元 Repeat motif	预期产物/ bp Expected size	扩增带数 Number of bands	多态性带数 Number of polymorphic bands	多态率/% Percentage of polymorphism
1	GGAGGGTTTGGTTTCACTCTTAT TAGGGTTAGGTTTCTCTCTGGG	AG (2*9)	153	5	3	60.00
2	TCAGATTTCTTGATACCCAAAG CGATGAGTTGAGTGTGTTGCTA	AC (2*8)	106	2	0	0
3	TGAGTCTTTGAATGATGAACAA ACCCGATAAGTAAACAATACGCAA	AT (2*6)	92	3	0	0
4	TTGTGGTTATAGTTCAGCCCCTA CAATCACGGAATCATAATTCA	CCT (3*5)	95	3	2	66.67
5	TATCTTACACGCATCTCTCAT GCCGCCTTTGATTTTATTATT	CCA (3*7)	140	1	0	0
6	AAGATTATGAGGTTTGGCGG GGATGGTGTGAGGATAGGATT	AAAT (4*5)	160	4	1	25.00
7	AATATACACGAACAACCATCG GGAACATGACCCCTTTCTTATT	CTACA (5*4)	147	2	2	100.00
8	CATCCTTATTTCTCTCCACG TAGTGTCTCGGTGATGTAGGGT	TTTCC (5*4)	155	3	0	0
9	TAACCACAGTTATTCATACGGCA CAGCAATCCTTCAAAGTTAGCAC	AG (2*8)	150	5	4	80.00
10	GAAAAATCTGGGAGTGATGTTG TGACTATGTAAGTGTGGACGCTC	CT (2*8)	121	3	0	0
11	ACCCATATCCCAAGAAAAGTCAT CCCCATTGAGAAAGAAAGAAAAG	CT (2*6)	141	6	0	0
12	GCTAATCTTCCATCTTCTTG TACCTCAAACACATACACAACGC	TG (2*6)	99	5	2	40.00
13	CCGACTCTTTCACAGTCAATCTC AAGCAGGAACCTTTCACCATTC	TG (2*7)	98	3	2	66.67
14	GTGGATGTGCAAATCTAATGGC GGAGGGAAGAAGTAGTGAAGAACA	CT (2*6)	152	2	1	50.00
15	CCCTATACAGAAAGTGTGTGCGT ACTCTAACTCTCCTCCTCCC	AG (2*6)	137	2	0	0
16	TTTGAGTGGGATTCAGATGATT AGTACAAGTATAGTACAATAGGGTTTG	AT (2*6)	124	2	1	50.00
17	GATGCTTTTCATTCTGCTTCAAC ATTTTACCCTACTCTGGGTGCT	TC (2*6)	123	1	0	0
18	GGAGCACAAAGATGAGTGGATAC AAACAGGCATAGATTGGCATAGA	TG (2*6)	136	2	0	0
19	ATTTGTTTTTCGTTTTTCTTCCC TTTGGTCATTCATCTTCTCCTC	CAT (3*5)	128	4	0	0
20	CAATGGAAGTGTTCACAAGAGTG CACAAGAAATATGAGCACAGAAGAA	CCT (3*5)	104	3	2	66.67
21	GAACAAACCAACACAAATCCT AAACAACCACCACAAACACACTT	TCT (3*6)	141	1	0	0
22	GAGTCATGTTGAATGATATTGGC TTTCTCTTTTCTTCTTTTCCC	TGGA (4*13)	131	2	1	50.00
23	CTGACAAAGCCCCTTCTCTAAT ATGTCGCTCTTACACCATTCC	CAAA (4*5)	142	3	2	66.67

图 1 为 6 对 SSR 引物在 3 份刺梨种质和两份蔷薇属植物中的扩增情况。

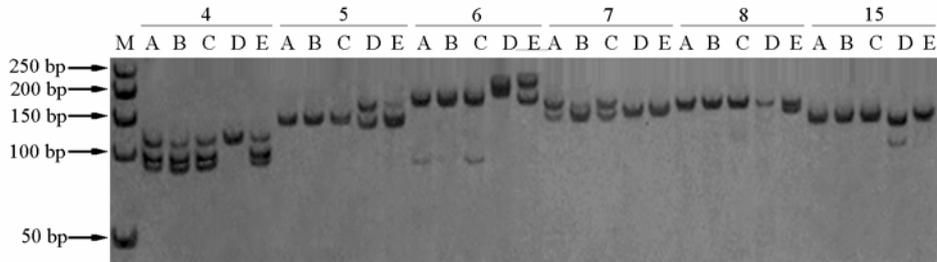


图 1 部分引物在 3 个刺梨 (A~C) 和野蔷薇 (D)、无籽刺梨 (E) 中的扩增
4~8 和 15 代表引物见表 3。

Fig. 1 Amplification of primer 4 - 8 and 15 showed in three species of *R. roxburghii* (A - C),
R. multiflora (D) and *R. sterilis* (E)
Representative primers 4 - 8 and 15 are shown in Table 3.

2.4 EST-SSR 标记的多态性

选取‘贵农 5 号’和 15 份野生刺梨资源利用 23 个有效 EST-SSR 引物进行扩增、多态性评价。结果表明, 12 对引物呈现出多态性, 占有有效引物的 52.17%。12 对引物共得到 39 条条带, 其中多态性片段 23 个, 每对引物平均产生 1.92 个多态性片段, 每对引物产生的多态性片段的数 1~4 不等。图 2 为引物 22 的扩增情况, 其它引物的扩增及多态性情况见表 3。

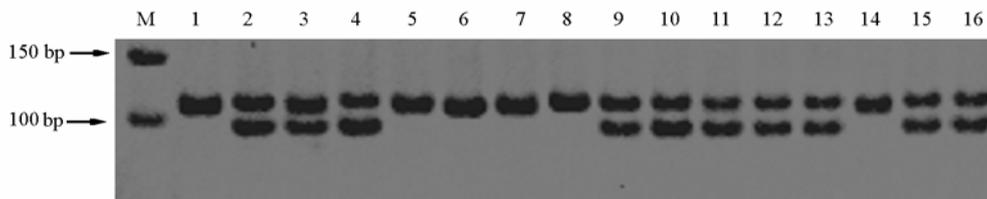


图 2 引物 22 在 16 个刺梨材料中的扩增
2: ‘贵农 5 号’; 1、3~16: 野生刺梨。

Fig. 2 Polymorphisms showed in 16 *R. roxburghii* germplasms by primer 22
2: *R. roxburghii* Tratt ‘Guinong 5’; 1, 3 - 16: Wild *R. roxburghii*.

3 讨论

随着新一代测序技术的飞速发展, 大量的 EST 序列被提交到公共数据库中, 成为开发 SSR 标记的可利用资源。迅速增多的 EST-SSR 也被广泛应用于遗传连锁图谱的构建、种质鉴定、遗传多样性及基因定位与克隆等 (程小毛和黄晓霞, 2011)。在本研究中对一个来自刺梨果实 cDNA 文库中的 106 590 条 Unigene 进行了 SSR 搜索, 得到了 21 711 个 SSR 位点, 出现频率为 20.37%, 这个比率高于茶的 14.70% (Wu et al., 2013)、腊梅的 12.35% (李响等, 2013)、红豆杉的 2.07% (李炎林等, 2014), 但稍低于柑橘的 21.74% (Jiang et al., 2006) 和萝卜的 23.79% (Wang et al., 2012)。出现这种情况的原因可能是物种间的真实 SSR 信息差异, 或由 SSR 查找程序所使用的软件、SSR

长度设定的标准、EST 数据库中的数据量及来源等方面的不同造成。随着 EST 数据库的容量不断增大, 各个物种间的 SSR 频率比较将有一个统一的标准。

从刺梨 SSR 结构来看, 三核苷酸 (26.87%) 出现频率最高, 略高于四核苷酸 (26.77%) 和二核苷酸 (24.93%)。这与前人对其他植物的研究表明三核苷酸是存在最广泛的重复元 (Kota et al., 2001; 孙清明 等, 2011) 相符。在二核苷酸重复基元中频率最高的是 AG/CT, 与胡杨 (Du et al., 2013)、芝麻 (Wei et al., 2011)、蔷薇科果树杏、桃 (Jung et al., 2005) 中的研究一致。最丰富的三核苷酸重复为 AAG/CTT, 这与 Morgante 等 (2002) 认为双子叶植物中三核苷酸主要重复类型是 AAG/CTT 的观点相符。

根据 18 155 条 EST 序列进行引物设计, 共设计了 11 185 对 SSR 位点特异引物。在合成的 42 对 SSR 引物中, 共有 23 对引物能够扩增出理想的 PCR 产物, 其有效扩增率为 53.76%。部分引物扩增失败的原因可能与引物位置或者质量有关。23 对引物中 12 对引物具有多态性, 占可扩增引物的 52.17%, 这个比率低于甜瓜的 73.3% (胡建斌和李建吾, 2009)、草莓的 85.71% (董清华 等, 2011), 但高于野三七的 50% (李翠婷 等, 2014) 和红豆杉的 38.71% (李炎林 等, 2014)。多态性的高低可能与材料数量及材料之间差异程度有关。从多态性潜能的角度考虑, 本研究中设计的 11 185 对 SSR 引物也具有较高的可用性, 用于刺梨遗传研究是可行的。

前人在蔷薇科植物 SSR 通用性方面做了研究, 如 Dirlwanger 等 (2002) 根据桃设计的 41 对 EST-SSR 引物在杏和甜樱桃中的有效扩增率分别为 100% 和 80.5%; 王彩虹等 (2005) 的研究结果表明, 6 对来自苹果基因组 SSR 引物除两对在杏上无相应大小范围的 SSR 扩增产物外, 其它 SSR 引物在蔷薇科 6 属 18 个种上都有清晰的 SSR 条带出现; 在杏中表现多态的 20 对 EST-SSR 引物有 90% 的引物在梅中也有扩增产物 (上官凌飞 等, 2011)。本研究中发现在对刺梨 DNA 能扩增出理想产物的 23 对引物中, 对 2 种蔷薇属植物完全可用, 通用率为 100%。SSR 侧翼序列的保守程度决定着 EST-SSR 的通用率, 说明所选取的 EST-SSR 侧翼序列的保守性较好。

下一步工作将扩大筛选范围, 所获得的大批量 SSR 引物将会为刺梨和其他蔷薇科植物的资源分类、分子标记辅助育种、遗传图谱构建等研究提供更多、更加专一有效的分子标记。

References

- An Hua-ming, Liu Ming, Yang Man, Fan Wei-guo. 2011. Analysis of main organic acid compositions in *Rosa roxburghii* Tratt. *Scientia Agricultura Sinica*, 44 (10): 2094 - 2100. (in Chinese)
- 安华明, 刘明, 杨曼, 樊卫国. 2011. 刺梨有机酸组分及抗坏血酸含量分析. *中国农业科学*, 44 (10): 2094 - 2100.
- Bassam B J, Caetano-Anolles G, Gresshoff P M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 196: 80 - 83.
- Cheng Xiao-mao, Huang Xiao-xia. 2011. Development and application of SSR markers in plants. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 27 (5): 304 - 307. (in Chinese)
- 程小毛, 黄晓霞. 2011. SSR 标记开发及其在植物中的应用. *中国农学通报*, 27 (5): 304 - 307.
- Dirlwanger E, Cosson P, Tavaud M, Aranzana J, Poizat C, Zanetto A, Arus P, Laigret F. 2002. Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 105 (1): 127 - 138.
- Dong Qing-hua, Wang Xi-cheng, Zhao Mi-zhen, Song Chang-nian, Ge An-jing, Wang Jing. 2011. Development of EST-derived SSR markers and their application in strawberry genetic diversity analysis. *Scientia Agricultura Sinica*, 44 (17): 3603 - 3612. (in Chinese)
- 董清华, 王西成, 赵密珍, 宋长年, 葛安静, 王静. 2011. 草莓 EST-SSR 标记开发及在品种遗传多样性分析中的应用. *中国农业科学*,

- 44 (17): 3603 - 3612.
- Du F K, Xu F, Qu H, Feng S S, Tang J J, Wu R L. 2013. Exploiting the transcriptome of Euphrates poplar, *Populus euphratica* (Salicaceae) to develop and characterize new EST-SSR markers and construct an EST-SSR database. *PLoS One*, 8: e61337.
- Fan Wei-guo, Xia Guang-li, Luo Ying-chun, Chen Xia-er, He Gang. 1997. Utilization of *Rosa roxburghii* resources and its developing strategy in Guizhou Province. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 10 (3): 109 - 115. (in Chinese)
- 樊卫国, 夏广理, 罗应春, 陈夏尔, 何刚. 1997. 贵州刺梨资源开发利用及对策. *西南农业学报*, 10 (3): 109 - 115.
- Grabherr M G, Haas B J, Yassour M, Levin J Z, Thompson D A, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q D, Chen Z H, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, Palma F D, Birren B W, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29: 644 - 652.
- Hu Jian-bin, Li Jian-wu. 2009. Information on EST-SSR loci in melon (*Cucumis melo* L.) and marker exploitation. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (4): 513 - 520. (in Chinese)
- 胡建斌, 李建吾. 2009. 甜瓜 EST-SSR 位点信息及标记开发. *园艺学报*, 36 (4): 513 - 520.
- Jiang Dong, Zhong Guang-yan, Hong Qi-bin. 2006. Analysis of microsatellites in citrus unigenes. *Acta Genetica Sinica*, 33 (4): 345 - 353.
- Jung S, Abbott A, Jesudurai C, Tomkins J, Main D. 2005. Frequency, type, distribution and annotation of simple sequence repeats in Rosaceae ESTs. *Functional Integrative Genomics*, (3): 136 - 143.
- Kota R, Varshney R K, Thiel T, Dehmer K J, Graner A. 2001. Generation and comparison of EST-derived SSRs and SNPs in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Hereditas*, 135 (2 - 3): 145 - 151.
- Li Cui-ting, Zhang Guang-hui, Ma Chun-hua, Meng Zhen-gui, Chen Jun-wen, Yang Sheng-chao. 2014. Analysis on SSR loci information in transcriptome of *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus* and its polymorphism. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 45 (10): 1468 - 1472. (in Chinese)
- 李翠婷, 张广辉, 马春花, 孟珍贵, 陈军文, 杨生超. 2014. 野三七转录组中 SSR 位点信息分析及其多态性研究. *中草药*, 45 (10): 1468 - 1472.
- Li Xiang, Yang Nan, Zhao Kai-ge, Chen Yu-xing, Tang Rui-jun, Chen Long-qing. 2013. Development and primer selection of EST-SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of *Chimonanthus praecox*. *Journal of Beijing Forestry University*, 35 (1): 25 - 32. (in Chinese)
- 李响, 杨楠, 赵凯歌, 陈玉星, 唐锐君, 陈龙清. 2013. 腊梅转录组 EST-SSR 标记开发与引物筛选. *北京林业大学学报*, 35 (1): 25 - 32.
- Li Yan-lin, Yang Xing-xing, Zhang Jia-yin, Huang San-wen, Xiong Xing-yao. 2014. Studies on SSR molecular markers based on transcriptome of *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (4): 735 - 745. (in Chinese)
- 李炎林, 杨星星, 张家银, 黄三文, 熊兴耀. 2014. 南方红豆杉转录组 SSR 挖掘及分子标记的研究. *园艺学报*, 41 (4): 735 - 745.
- Morgante M, Hanafey M, Powell W. 2002. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics*, 30: 194 - 200.
- Porebski S, Bailey G, Baum R B. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15 (1): 8 - 15.
- Powell W, Machray G C, Provan J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, 1 (7): 215 - 222.
- Qi Jian-xun, Hao Yan-bin, Zhu Yan, Wu Chun-lin, Wang Wei-xia, Leng Ping. 2011. Studies on germplasm of *Juglans* by EST-SSR markers. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (3): 441 - 448. (in Chinese)
- 齐建勋, 郝艳宾, 朱艳, 吴春林, 王维霞, 冷平. 2011. 核桃属种质资源的 EST-SSR 标记研究. *园艺学报*, 38 (3): 441 - 448.
- Shangguan Ling-fei, Li Xiao-ying, Ning Ning, Wang Yu-zhu, Zhang Zhen, Fang Jing-gui. 2011. Development of EST-SSR markers in apricot. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (1): 43 - 54. (in Chinese)
- 上官凌飞, 李晓颖, 宁宁, 王玉柱, 章镇, 房经贵. 2011. 杏 EST-SSR 标记的开发. *园艺学报*, 38 (1): 43 - 54.
- Sun Qing-ming, Ma Wen-chao, Ma Shuai-peng, Zhao Jun-sheng, Bai Li-jun, Chen Jie-zhen, Cai Chang-he, Xiang Xu, Ou Liang-xi. 2011. Characteristics of SSRs derived from ESTs and development of EST-SSR markers in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). *Scientia Agricultura Sinica*, 44 (19): 4037 - 4049. (in Chinese)

- 孙清明, 马文朝, 马帅鹏, 赵俊生, 白丽军, 陈洁珍, 蔡长河, 向旭, 欧良喜. 2011. 荔枝 EST 资源的 SSR 信息分析及 EST-SSR 标记开发. 中国农业科学, 44 (19): 4037 - 4049.
- Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequence as a general source of polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17: 6463 - 6471.
- Vendramin E, Dettori M T, Giovanazzi J, Micali S, Quarta R, Verde I. 2007. A set of EST-SSRs isolated from peach fruit transcriptome and their transportability across *Prunus* species. *Molecular Ecology Notes*, 7: 307 - 310.
- Wang Cai-hong, Tian Yi-ke, Zhao Jing. 2005. General application analysis of SSRs derived from apple (*Malus pumila*) on other species in Rosaceae. *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (3): 500 - 502. (in Chinese)
- 王彩虹, 田义轲, 赵静. 2005. 来自苹果的 SSRs 在蔷薇科植物资源上的通用性分析. 园艺学报, 32 (3): 500 - 502.
- Wang S F, Wang X F, He Q W, Liu X X, Xu W L, Li L B, Gao J W, Wang F D. 2012. Transcriptome analysis of the roots at early and late seedling stages using Illumina paired-end sequencing and development of EST-SSR markers in radish. *Plant Cell Reports*, 31: 1437 - 1447.
- Wang Xi-cheng, Jiang Shu-ling, ShangGuan Ling-fei, Cao Yu-fen, Qiao Yu-shan, Zhang Zhen, Fang Jing-gui. 2010. Development of EST-derived SSR markers for pear and evaluation of their application in pear genetic diversity analysis. *Scientia Agricultura Sinica*, 43 (24): 5079 - 5087. (in Chinese)
- 王西成, 姜淑苓, 上官凌飞, 曹玉芬, 乔玉山, 章镇, 房经贵. 2010. 梨 EST-SSR 标记的开发及其在梨品种遗传多样性分析中的应用评价. 中国农业科学, 43 (24): 5079 - 5087.
- Wei W L, Qi X Q, Wang L H, Zhang Y X, Hua W, Li D H, Lü H X, Zhang X R. 2011. Characterization of the sesame (*Sesamum indicum* L.) global transcriptome using Illumina paired-end sequencing and development of EST-SSR markers. *BMC Genomics*, 12: 451.
- Wen Xiao-peng, Deng Xiu-xin, Fan Wei-guo. 2003a. Identification of genotypes of cili as revealed by randomly amplified polymorphic DNA. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 22: 317 - 321. (in Chinese)
- 文晓鹏, 邓秀新, 樊卫国. 2003a. 刺梨主要基因型的 RAPD 鉴别. 山地农业生物学报, 22: 317 - 321.
- Wen X P, Pang X M, Deng X X. 2004. Characterization of genetic relationships of *Rosa roxburghii* Tratt and its relatives using morphological traits, RAPD and AFLP markers. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 79: 189 - 196.
- Wen Xiao-peng, Pang Xiao-ming, Deng Xiu-xin. 2003b. A comparative study of RAPD and morphological approaches to characterize relationships of *Rosa roxburghii* Tratt. and its relatives. *Acta Horticulturae Sinica*, 30: 204 - 206. (in Chinese)
- 文晓鹏, 庞晓明, 邓秀新. 2003b. 刺梨及部分近缘种形态学性状和 RAPD 标记分析. 园艺学报, 30: 204 - 206.
- Wen Xiao-peng, Pang Xiao-ming, Deng Xiu-xin. 2003c. Genetic diversity in wild accessions of *Rosa roxburghii* Tratt from four provinces as revealed by RAPD analysis. *Scientia Agricultura Sinica*, 115: 386 - 392. (in Chinese)
- 文晓鹏, 庞晓明, 邓秀新. 2003c. 不同自然分布区刺梨遗传多样性的 RAPD 分析. 中国农业科学, 115: 386 - 392.
- Wu H L, Chen D, Li J X, Yu B, Qiao X Y, Huang H L, He Y M. 2013. *De novo* characterization of leaf transcriptome using 454 sequencing and development of EST-SSR markers in tea (*Camellia sinensis*). *Plant Molecular Biology Reporter*, 31: 524 - 538.
- Xu Xiao-biao, Jiang Chun-ya, Liao Jiao, Gu Qing-qing, Liu Shan-jun, Chen Jin-yin. 2010. Screening of EST-SSR marker linked to dwarf character in *Actinidia chinensis* Planch. *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (4): 553 - 558. (in Chinese)
- 徐小彪, 姜春芽, 廖娇, 辜青青, 刘善军, 陈金印. 2010. 中华猕猴桃矮型性状 EST-SSR 连锁标记的筛选. 园艺学报, 37 (4): 553 - 558.
- Zhang M Y, Fan L, Liu Q Z, Song Y, Wei S W, Zhang S L, Wu J. 2014. A novel set of EST-derived SSR markers for pear and cross-species transferability in Rosaceae. *Plant Molecular Biology Reporter*, 32: 290 - 302.