园艺学报，2015，42 (6)：1103－1111.
Acta Horticulturae Sinica
doi：10.16420/j.issn.0513-353x.2015-0046；http：//www. ahs. ac. cn

洋葱转录组 SSR 信息分析及其多态性研究

李满堂，张仕林，邓　鹏，侯喜林，王建军*

（南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室，农业部华东地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室，南京 210095）

摘　要：采用生物信息学方法分析洋葱（*Allium cepa* L.）转录组中的 SSR 位点信息，并设计简单重复序列（SSR）引物，以期为洋葱分子标记辅助育种提供有力工具。利用 MISA 工具筛选了洋葱转录组测序获得的 106 932 条 unigenes（84.04 Mb），并对其 SSR 位点信息进行了分析，共筛选得到 5 959 个 SSR 位点（占总 unigenes 的 5.10%），其发生频率为 1/14.1 kb。SSRs 位点中主导类型是以 AAG/CTT（占总 SSRs 的 10.20%）为主的三核苷酸重复，占总 SSRs 的 37.27%；其次是单、二核苷酸重复，其出现频率分别为 30.91%和 24.75%。利用 Primer5 共设计出 5 258 对 SSR 引物。随机选择 20 对引物进行 PCR 扩增，其中 12 对扩增出清晰可重复的条带，9 对在 24 个不同类型洋葱材料中表现出多态性。利用 UPGMA 作图，将 24 个洋葱材料分为 4 类。

关键词：洋葱；转录组；SSR；引物；多态性

中图分类号：S 633.2　　　　**文献标志码**：A　　　　**文章编号**：0513-353X（2015）06-1103-09

Analysis on SSR Information in Transcriptome of Onion and the Polymorphism

LI Man-tang，ZHANG Shi-lin，DENG Peng，HOU Xi-lin，and WANG Jian-jun*

（*State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement*，*Nanjing Agricultural University*，*Key Laboratory of Biology and Germplasm Enhancement of Horticultural Crops in East China*，*Ministry of Agriculture*，*Nanjing* 210095，*China*）

Abstract：Bioinformatics methods were used to analyze the onion（*Allium cepa* L.）transcriptome SSR loci information and designed simple sequence repeat（SSR）primers，so as to provide a powerful tool for screening onion molecular marker assisted breeding. Five thousand nine hundred and fifty-nine SSR loci（5.10%）were obtained from 106 932 unigenes（84.04 Mb）by using MISA software to screen the onion transcriptome sequencing，and its frequency was 1/14.1 kb. Trinucleotide repeat was the main type，accounted for as much as 37.27% of all SSRs. The AAG/CTT were the predominant repeat types（10.20%），followed by mononucleotide repeat motif（30.91%）and dinucleotide repeat motif（24.75%）. Five thousand two hundred and fifty-eight pairs of SSR primers were designed using Primer 5. Randomly 20 pairs of primers were selected for PCR amplification，12 amplified on clear and reproducible bands，9 in 24 different types showed polymorphism in onion material. Twenty-four onions plants were divided into 4 groups by UPGMA.

Key words：onion；transcriptome；SSR；primer；polymorphism

收稿日期：2015－02－12；**修回日期**：2015－04－23

基金项目：国家公益性行业（农业）科研专项（20090318）；扬州市农业科技攻关项目（YZ2014170）

* 通信作者 Author for correspondence（E-mail：wangjianjun@njau.edu.cn）

洋葱（*Allium cepa* L.）是中国主要的出口蔬菜之一（陈沁滨 等，2008），无论是栽培面积还是产量中国均居世界首位，然而当下生产上所用品种主要以引进国外杂交品种为主（翟亚辉 等，2013），这导致生产成本变高，增加了种植户的经济负担。因此加快育种进程，提高育种效率和质量，获得优良新品种，已经成为广大洋葱育种工作者的主要工作任务。

DNA 分子标记是鉴定种质资源遗传多样性的重要手段，也是一种重要的辅助育种方法，其标记类型有多种，例如限制性片段长度多态性（restriction fragment length polymorphism，RFLP）、简单重复序列（simple sequence repeat，SSR）以及单核苷酸的多态性（single nucleotide polymorphisms，SNP）等（黄映萍，2010；Li et al.，2014）。简单重复序列，又称微卫星 DNA（microsatellite DNA），是广泛存在于真核和原核生物基因组中的 1 ～ 6 个核苷酸串联重复单元，研究发现基因组中平均每 50 kb 就有 1 个 SSR（Kalia et al.，2011）。SSR 标记按来源分主要包括表达序列标签 SSR（EST-SSR）和基因组 SSR（g-SSR）（王东 等，2014）。EST-SSR 标记与 g-SSR 标记相比，因其源于基因的转录区，其多态性可能与基因功能直接相关（Eujayl et al.，2002），并且无需构建基因组文库、杂交、测序，因此，具有更高的通用性及转化率。在茄子（王利英 等，2012）、毛竹（董文娟，2011）、辣椒（刘峰 等，2012）、杜仲（朱晓敏 等，2013）、芝麻（岳文娣 等，2012）和野三七（李翠婷 等，2014）等园艺植物中通过 EST 信息开发 SSR 标记的方法均有报道。

许多学者用不同的分子标记方法对洋葱种质资源遗传多样性进行了研究。例如关绚丽等（2011）用 SSR 标记对包括长、中、短日照 3 类型共 63 份洋葱种质，崔成日等（2006）利用 RAPD 技术对 41 份洋葱种质，翟亚辉等（2013）利用 RAPD 和 SSR 技术对 37 份洋葱种质的遗传多样性进行了分析。本研究中对通过 Illumina 转录组测序（RNA-Seq）获得 106 932 条洋葱根、鳞茎及叶片的转录组序列，利用 MicroSAtellite（MISA）软件（Lu et al.，2013）进行大规模转录组 SSR 标记的搜索，分析其分布、组成特征，并进行初步可用性评价，以期为洋葱遗传图谱构建、遗传多样性分析、功能基因定位、比较作图以及分子标记辅助育种提供理论基础，从而提高洋葱育种效率。

1 材料与方法

1.1 材料及数据来源

24 个具有不同来源及表型特征（表皮颜色、辣味、球形）的洋葱材料（表 1）于 2013 年 9 月

表 1 洋葱 SSR 多态性分析材料

Table 1 List of accessions used in assessing the level of SSR in the species *Allium cepa*

序号 No.	名称或编号 Name or code	来源 Source	序号 No.	名称或编号 Name or code	来源 Source
1	886	韩国 South Korea	13	1206	日本 Japan
2	日本－夕井 Japanese-xijin	日本 Japan	14	W465	南京农业大学 NAU
3	葡萄牙 Portugal	葡萄牙 Portugal	15	428 白 428 White	南京农业大学 NAU
4	W470	连云港 Lianyungang，China	16	1223	北京蔬菜中心 BVRC
5	圣 1-16 Sheng 1-16	美国 America	17	圣 4 Sheng 4	美国 America
6	W209	新疆 Xinjiang，China	18	1208	日本 Japan
7	W462	韩国 South Korea	19	1215	南京农业大学 NAU
8	1205	日本 Japan	20	1201	日本 Japan
9	1219	南京农业大学 NAU	21	北京 565 Beijin 565	北京蔬菜中心 BVRC
10	1202	日本 Japan	22	红葱－3 Red-3	南京农业大学 NAU
11	1203	日本 Japan	23	1207	日本 Japan
12	W433	南京农业大学 NAU	24	白葱-2 White-2	澳大利亚 Australia

取自南京农业大学江浦园艺站，每个材料选 100 粒种子，大田播种，植株当长到第 5 片叶时，用天根公司 DNA 提取试剂盒提取幼叶 DNA，– 20 ℃保存备用。

转录组测序样本为取自南京农业大学江浦园艺站‘W470’洋葱未成熟时期的根、鳞茎和叶片，液氮速冻后送华大基因公司（深圳）进行转录组测序，共有 84.04 Mb 的数据量，包含 106 932 条 unigenes。

1.2　洋葱转录组 EST-SSR 的筛选

使用软件 MISA 对洋葱转录组中 unigene 的 cDNA 序列数据进行 SSR 位点分析，筛选的标准为：重复单元长度 2 ~ 6 bp，单核苷酸重复次数至少 12 次；二核苷酸重复次数至少 6 次以上；三、四核苷酸重复次数至少 5 次；五、六核苷酸重复次数至少 4 次。

1.3　洋葱 EST-SSR 引物设计及筛选

使用软件 Primer 5 对 SSR 重复单元前后的序列进行引物设计及评价，每条 SSR 产生 5 条引物。引物序列长度 12 ~ 25 bp，预计扩增产物长度 80 ~ 300 bp，GC 含量 40% ~ 70%，退火温度 55 ~ 65 ℃，上、下游引物的退火温度值相差不大于 5 ℃。尽量避免出现发卡结构、二聚体、错配和引物二聚体等（李翠婷　等，2014）。

将设计出的引物通过以下方式筛选：（1）引物不能存在 SSR；（2）将获得的引物比对到 unigene 序列，引物的 5′端允许有 3 个碱基的错配，3′端允许有 1 个碱基的错配；（3）去掉比对到不同 unigene 上的引物，筛选唯一匹配的引物（李珊　等，2010）。从中随机挑选 20 对 20 bp 以上的 2 ~ 6 不同重复单元核苷酸引物，由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.4　PCR 扩增

PCR 扩增反应体系 10 μL：Premix *Taq* 酶 5 μL（TaKaRa），10 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 上、下游引物各 0.5 μL，10 $ng \cdot \mu L^{-1}$ DNA 0.5 μL，ddH_2O 3.5 μL。PCR 反应热循环程序为：95 ℃变性 2 min；然后在 94 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s 下循环 28 次；72 ℃延伸 10 min；最后在 4 ℃条件下保存。特异性引物扩增后的产物用 1.5%琼脂糖检测，8%非变性聚丙烯酰胺凝胶检测，170 V 电压，95 min，银染显色。

采用人工读带的方法，将电泳图上可重复的清晰条带记为“1”，同一位置无带或不易分辨的弱带记为“0”，建立原始数据矩阵。利用软件 NTsys2.10e 按 UPGMA 进行聚类绘图。

2　结果与分析

2.1　洋葱转录组中的 SSR 位点的数量与分布

利用 MISA 工具对洋葱转录组的 106 932 条 unigenes 的 cDNA 序列进行搜索，共在 5 457 条 unigenes 中找到 5 959 个符合条件的 SSR，发生频率（含 SSR 的 unigene 数与总 unigene 数之比）为 5.10%，出现频率（检出 SSR 个数与总 unigene 数之比）为 5.57%。其中含 1 个 SSR 位点的 unigene 序列有 453 条，含复合型 SSR 位点的 unigene 序列有 201 条，平均 14.1 kb 就能发现 1 个 SSR 位点。

洋葱的转录组 SSR 种类较为丰富，各重复类型均有，但各种类型的出现频率有较大差异（表 2），主要集中在单、二和三核苷酸重复上，占总 SSR 的 92.93%。三核苷酸重复类型的数量最多，占 37.27%，其次是单核苷酸和二核苷酸重复类型，分别占 30.91%和 24.75%。四、五、六核苷酸重复类型的数量很少，只占到总 SSR 的 7.07%。

洋葱转录组中 SSR 位点的序列总长度为 52 708 bp，位点平均长度为 8.85 bp，单、二、三、四、五和六核苷酸类型 SSR 位点的平均长度（SSR 总长度与个数之比）分别为 15.08、7.21、5.61、5.21、4.14 以及 4.00 bp。洋葱转录组中 SSR 位点重复次数以 5 次（1 425）最多，占总 SSR 的 23.9%；其次为重复次数 6、7、4、8、9 和 10 次，SSR 位点个数分别为 1 221、645、296、249、125 和 66。统计 4 ~ 10 次重复的 SSR 位点共有 4 027 个，占 67.58%；11 ~ 24 次重复的 SSR 位点共有 1 932 个，占 32.42%。

表 2　洋葱转录组中鉴定的 EST-SSR 类型和出现频率

Table 2　Distribution of the SSR motifs *Allium cepa* transcriptome

重复类型 Repeat type	数量 Number	比例/% Proportion	出现频率/% Frequency	总长度/bp Total lenght	平均距离/kb Average distance
单核苷酸　Mononucleotide	1 842	30.91	1.72	27 777	45.6
二核苷酸　Dinucleotide repeat	1 475	24.75	1.38	10 638	57.0
三核苷酸　Trinucleotide repeat	2 221	37.27	2.08	12 461	37.8
四单核苷酸　Tetranucleotide repeat	110	1.85	0.10	573	764.0
五核苷酸　Pentanucleotide repeat	104	1.75	0.10	431	808.1
六核苷酸　Hexnucleotide repeat	207	3.47	0.19	828	406.0
总计　Total	5 959	100.00	5.57	52 708	14.1

2.2　EST-SSR 的特性

单核苷酸重复容易发生错配而测序失败（李翠婷　等，2014），因此本试验中不予选择。从洋葱 SSR 核苷酸基序类型（表 3）来看，单、二、三、四、五、六核苷酸的重复次数分别为 1 842、1 475、2 221、110、104 和 207。SSR 以三核苷酸重复基序为主要类型，占总 SSR 的 37.27%；在三核苷酸重复基序中又以 AAG/CTT 为主，占总 SSR 的 10.20%。其次是二核苷酸重复基序，其出现频率为 24.75%，以 6 ~ 9 次重复为主，其中以 AC/GT 最多，CG/CG 最少。四、五和六核苷酸重复基元类型较多，但数量较少，出现频率均较低。

表 3　洋葱转录组中 SSR 类型分布

Table 3　Distribution of SSR type in transcriptome of *Allium cepa*

基序 Motif	重复次数 Repeat number	基序 Motif	重复次数 Repeat number
单核苷酸 Mononucleotide	1 842	ACT/AGT	17
AC/GT	742	AGC/CTG	326
AG/CT	395	AGG/CTT	319
AT/AT	314	ATC/ATG	253
CG/CG	24	CCG/CGG	75
二核苷酸 Dinucleotide	1 475	三核苷酸 Trinucleotide	2 221
AAC/GTT	122	四单核苷酸 Tetranucleotide	110
AAG/CTT	608	五核苷酸 Pentanucleotide	104
AAT/ATT	219	六核苷酸 Hexnucleotide	207
ACC/GGT	152		
ACG/CGT	130		

2.3　洋葱转录组 SSR 的可用性评价

判断 SSR 分子标记可用性的重要依据之一是其多态性（李珊　等，2010）。SSR 的长度是影响其多态性高低的重要因素，当 SSR 长度≥ 20 bp 时多态性较高，12 ~ 20 bp 之间的多态性中等，< 12 bp 的多态性极低（Temnykh et al.，2001）。因此在本研究中将低于 12 bp 的 SSR 去掉。经过筛选的洋葱 EST-SSR 的总数为 5 759 个（长度在 12 ~ 158 bp），其中长度在 12 ~ 20 bp 的有 4 719 条（81.94%）；而长度在 20 bp 以上的达到 1 043 条（18.11%），其中 21 ~ 30 bp、31 ~ 40 bp、41 ~ 50 bp 以及 ≥ 51 bp 的分别为 875、58、34 以及 76 条，这类 SSR 具有较高多态性。

2.4　洋葱转录组 SSR 引物设计与筛选

为进一步在试验中利用筛选出的洋葱的 EST-SSR，对含 SSR 位点的 12 635 条 EST 序列进行引物设计，共设计了 SSR 位点特异引物 5 258 对，占总 SSR 位点的 41.61%。通过去除不符合条件的引物，最终筛选出适合的引物。其中 20 bp 以上 SSR 序列 691 对引物，占洋葱 SSR 位点特异引物总数的 13.1%。随机挑选 20 对 SSR 引物并使用洋葱品种‘866’的 DNA 进行扩增，验证引物的有效性。结果表明，12 对引物实现有效扩增（图 1 中的亮白条带），占 20 对 SSR 引物的 60%。

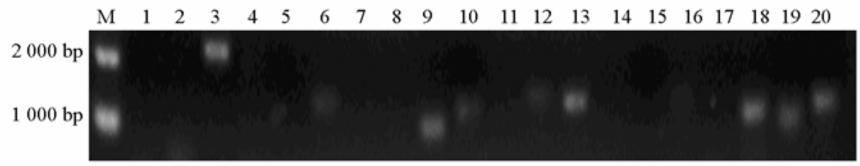

图 1　引物有效性扩增验证图

Fig. 1　Figure of effectiveness on primer amplification

M：Marker；1：CL4145.Contig6_All_748_3；2：CL9519.Contig1_All_1253_5；3：CL8229.Contig3_All_1137_2；4：CL4927.Contig2_All_820_4；5：CL3911.Contig1_All_718_1；6：CL3045.Contig3_All_611_4；7：CL8600.Contig2_All_1183_1；8：CL5606.Contig3_All_906_2；9：CL7222.Contig2_All_1023_2；10：CL1668.Contig2_All_441_1；11：CL13329.Contig1_All_1481_4；12：CL2139.Contig2_All_509_5；13：CL13646.Contig2_All_1501_1；14：CL12532.Contig3_All_1428_5；15：CL14231.Contig2_All_1528_4；16：CL14356.Contig2_All_1555_3；17：CL322.Contig3_All_95_3；18：CL12626.Contig3_All_1437_5；19：CL1044.Contig1_All_266_1；20：CL1064.Contig1_All_268_1.

2.5　多态性分析

利用以上 12 对引物在 24 个不同品种的洋葱材料进行多态性分析，其中 9 对（45%）存在多态性差异（表 4）。

表 4　PCR 筛选引物

Tabe 4　Filtering primers with PCR

来源 Source	SSR 类型 SSR motif	引物序列 Primer sequence	产物长度/bp Length of product
CL1044.Contig1_All_266_1	TGC(3*7)	F：CCTTAAGGGGAAGAAAGAAACAA R：CCCAACTCTCTTTCTTTGGAAGT	106
CL1064.Contig1_All_268_1	TG(2*11)	F：CGATTAATGAAAAGAACAAAAAGGA R：CGCGAAATCTCTAGCAAAAATAA	136
CL12626.Contig3_All_1437_5	CCA(3*8)	F：TCCTCCAAGGATGCCTACTCTAC R：CCTGTACATGTTCAATTTCACGA	125
CL13646.Contig2_All_1501_1	GTG(3*7)	F：GGCGTTTCTCTGGAAATAGAGAT R：CGTCCATATCCTTCATCACTGTC	151
CL14356.Contig2_All_1555_3	AGGTCG(6*4)	F：TTTGGTGGAAGATCTGACTATGG R：CCATTACCTCCGTTATCATCATC	155
CL2139.Contig2_All_509_5	ATCC(4*5)	F：AAAATTTATCAGAACTCCTCCGC R：GCTGACTCGATCACAACAAAAAT	160
CL3911.Contig1_All_718_1	CT(2*10)	F：TTCCTCTTCCTATTTAAAACCGC R：GATGCAGAGGTTGTTCTGTTTG	102
CL7222.Contig2_All_1023_2	AGG(3*7)	F：TGAAGAGGCACCAAAGTGTAAAT R：TATACCCCCACAAACATTGAATC	109
CL1668.Contig2_All_441_1	CTTTT(5*4)	F：TCAATGTGAGCACTCAGATCACT R：TATTCCCAACCAGAACAAGAAAA	141

CL1668.Contig2_All_441_1（图 2）和 CL1064.Contig1_All_268_1（图 3）在洋葱材料中扩增产物片段长度介于 200 ~ 100 bp 之间，与预期相符。

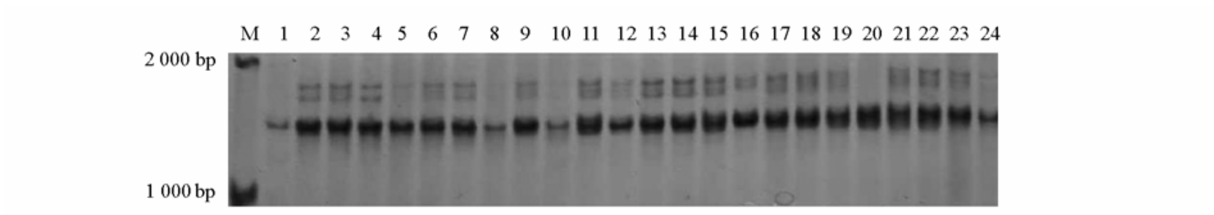

图 2　多态性引物 CL1668.Contig2_All_441_1 在不同洋葱材料中的扩增

M：Marker；品种编号名称见表 1。

Fig. 2　CL1668.Contig2_All_441_1PCR product of polymorphism of EST-SSR primers in different *Allium cepa* varieties

M：Marker；Code name are shown in Table 1.

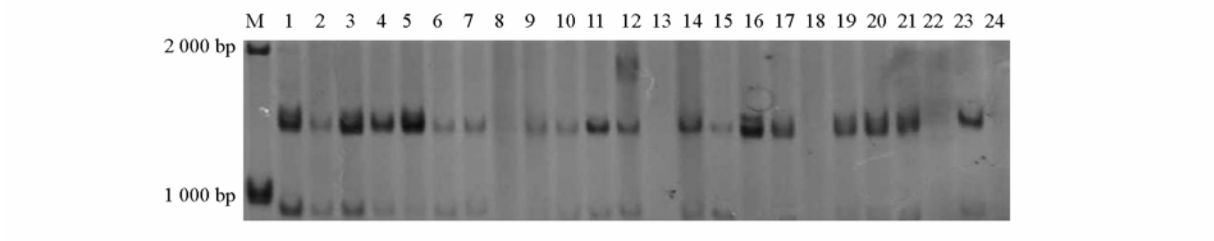

图 3　多态性引物 CL1064.Contig1_All_268_1 在不同洋葱材料中的扩增

M：Marker；品种编号名称见表 1。

Fig. 3　CL1064.Contig1-All_268_1PCR product of polymorphism of EST-SSR primers in different *Allium cepa* varieties

M：Marker；Code name are shown in Table 1.

利用 SSR 多态性对 24 份洋葱材料进行聚类分析，具体分为 4 类（图 4）。第Ⅰ类为以‘428 白’

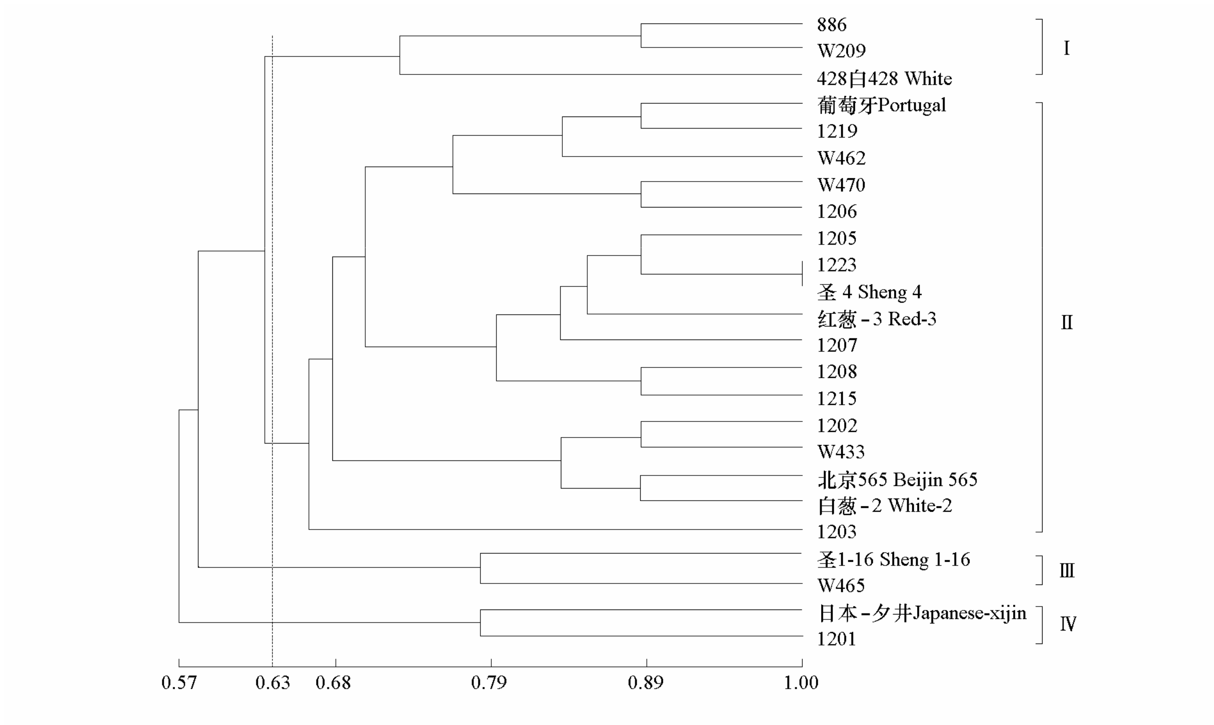

图 4　供试洋葱材料的 UPGMA 聚类图

Fig. 4　Dendrogram for tested *Allium cepa* plants by UPGMA

和‘866’为代表的白皮洋葱和黄皮洋葱易抽薹的材料，先期抽薹率高；第Ⅱ类以‘1203’、‘白葱 – 2’、‘红葱 – 3’以及‘W433’为代表，3 种皮色均有，其中‘1203’、‘白葱 – 2’是脱水用洋葱材料，干物质含量高，辣味浓，‘红葱 – 3’及‘W433’辣味较浓；第Ⅲ类以‘圣 1-16’和‘W465’为代表，为黄皮洋葱，均为早中熟丰产的材料；第Ⅳ类以‘日本 – 夕井’和‘1201’为代表，其特点是丰产耐贮。

3　讨论

近年来，随着高通量技术的发展、测序成本降低，测序数据几乎涵盖了特定组织和特定时期的所有转录本，尤其是缺乏基因组信息的物种，其转录组学的研究越来越广泛（李炎林 等，2014）。SSR 分子标记因其具有大量的等位差异，多态性十分丰富，目前已广泛应用于多种植物的遗传多样性研究中（Huang et al.，2009；Ma et al.，2009）。

本研究以‘W470’洋葱转录组序列信息进行了洋葱 EST-SSR 标记的开发，结果表明洋葱转录组中富含 SSR 位点，本研究从洋葱转录组中共搜索出 5 959 个 SSR，分布于 5 457 条 unigenes 上。SSR 出现频率为 5.57%，略高于红豆杉（2.24%）、大麦（3.4%）、水稻（4.7%），低于辣椒（7.83%）（Kantety et al.，2002；刘峰 等，2012；李炎林 等，2014），这可能是由于各物种在 GenBank 中的数据大小不同、计算标准的差异或者是物种间真实的 SSR 信息差异所致（黄海燕 等，2013）。多数植物 EST-SSR 中三核苷酸的出现频率最高（Liang et al.，2009），但主要的重复基元不同。在本研究中，洋葱以三核苷酸重复基序为主要类型，AAG/CTT 为其主要重复基元，这与辣椒（AAC/GTT）相同，但与水稻（AGG/TCC）、番茄（AAT/ATT）不同（Kantety et al.，2002；刘峰 等，2012），而在荔枝、杏、桃等蔷薇科植物中二核苷酸重复出现的频率最高，在南方红豆杉中以六核苷酸和三核苷酸为主要 SSR 重复基序（孙清明 等，2011；李炎林 等，2014）。这种差异可能与植物自身 EST-SSR 特点、数量以及 EST 数据来源等密切相关。

本研究经过筛选，洋葱 EST-SSR 的总数为 5 759 条，长度在 20 bp 以上的 SSR 达到 1 043 条（18.11%），从这 1 043 条 SSR 中随机挑选 20 对引物，首先使用洋葱品种‘866’的 DNA 检查引物的特异性，结果表明，12 对引物实现有效扩增，再用这 12 对引物在 24 个不同品种的洋葱材料进行多态性分析，其中 9 对存在多态性差异。这说明洋葱 EST 序列中 SSR 位点多，EST-SSR 扩增率较高，但是其多态性相对较低，主要源于其 DNA 转录序列的保守性（刘峰 等，2012）。此外，使用上述 9 对多态性差异引物对 24 个洋葱品种进行 UPGMA 聚类，被分为 4 类，比较准确的反映 24 个洋葱品种之间的差异。然而要充分了解洋葱种质资源之间的遗传信息和遗传关系，仍需更多的 SSR 标记。

本研究结果表明利用洋葱转录组数据开发的 SSR 标记具有实用性，由于目前洋葱能够利用的 SSR 标记数量极为有限，此类 SSR 标记为洋葱的分子标记辅助育种和功能基因的挖掘等奠定了基础。

References

Chen Qin-bin，Wang Jian-jun，Xue Ping，Niu Hai-jian，Li Ying，Yin De-xing. 2008. The onion germplasm resources and genetic breeding research progress. Chinese Vegetables，(1)：37 – 42. (in Chinese)

陈沁滨，王建军，薛　萍，牛海建，李　英，尹德兴. 2008. 洋葱种质资源与遗传育种研究进展. 中国蔬菜，(1)：37 – 42.

Cui Cheng-ri，Xu Qi-jiang，Cui Chong-shi，Li Jing-peng. 2006. An analysis of onion genetic diversity by PAPD. Acta Horticulturae Sinica，33 (4)：863 – 865. (in Chinese)

崔成日，徐启江，崔崇士，李景鹏. 2006. 洋葱 RAPD 遗传多样性分析. 园艺学报，33 (4)：863 – 865.

Dong Wen-juan. 2011. Multi-copy SSR markers and its utilization for analysis of genetic diversity in *Phyllostachys edulis*[M. D. Dissertation].

Hangzhou：Zhejiang A & F University. (in Chinese)

董文娟. 2011. 毛竹多拷贝 SSR 及其遗传多样性研究[硕士论文]. 杭州：浙江农林大学.

Eujayl I，Sorrells M，Banm M，Wolters P，Powell W. 2002. Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. Theor Appl Genet，104 (2)：399–407.

Guan Xuan-li，Tian Bao-hua，Liang Yi，Wang Yong-qin. 2011. The onion germplasm genetic diversity of SSR analysis. Journal of Molecular Plant Breeding，(9)：1418–1424. (in Chinese)

关绚丽，田保华，梁 毅，王永勤. 2011. 洋葱种质资源遗传多样性的 SSR 分析. 分子植物育种，(9)：1418–1424.

Huang Hai-yan，Du Hong-yan，Wuyun Ta-na，Liu Pan-feng. 2013 . Development of SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of *Eucommia ulmoides* . Scientia Silvae Sinicae，49 (5)：176–181. (in Chinese)

黄海燕，杜红岩，乌云塔娜，刘攀峰. 2013. 基于杜仲转录组序列的 SSR 分子标记的开发. 林业科学，49 (5)：176–181 .

Huang K H，Chiang T Y，Chui C T，Hsu T W，Ho C W. 2009. Isolation and characterization of microsatellite loci from a potential biofuel plant *Miscanthus sinensis*（Poaceae）. Conservation Genetics，10：1377–1380 .

Huang Ying-ping. 2010. Research progress of DNA molecular markers. Journal of Sun YAT-SEN University Graduate Student：Natural Science and Medicine Edition，31 (2)：27–36. (in Chinese)

黄映萍. 2010. DNA 分子标记研究进展. 中山大学研究生学刊：自然科学医学版，31 (2)：27–36 .

Kalia R K，Rai M K，Kalia S，Singh R，Dhawan A K. 2011. Microsatellite markers：An overview of the recent progress in plants. Euphytica，177 (3)：309–334.

Kantety R V，Rota M L，Matthews D E，Sorrells M E. 2002. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley，maize，rice，sorghum and wheat. Plant Mol Biol，48：501–510.

Li Cui-ting，Zhang Guang-hui，Ma Chun-hua，Men Zhen-gui，Chen Jun-wen，Yang Sheng-chao. 2014. Analysis on SSR loci information in transcriptome of *Panax vienamensis* var. *fuscidiscus* and its polymorphism. Chinese Traditional and Herbal Drugs，45 (5)：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 (5)：1468–1472.

Li Shan，Zhou Tian-hua，Zhao Gui-fang，Zhu Yun-guo，Cheng Zhou. 2010. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from *Saruma henryi*. Chinese Traditional and Herbal Drugs，41 (3)：464–468. (in Chinese)

李 珊，周天华，赵桂仿，朱云国，程 舟. 2010. 蹄香表达序列标签资源的 SSR 信息分析. 中草药，41 (3)：464–468.

Li Xi-mei，Gao Wen-hui，Guo Huan-le，Zhang Xian-long，Fang David-De，Lin Zhong-xu. 2014. Development of EST-based SNP and InDel markers and their utilization in tetraploid cotton genetic mapping. BMC Genomics，15：1046–1047.

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.

Liang X，Chen X，Hong Y，Liu H，Zhou G，Li S，Guo B. 2009. Utility of EST-derived SSR in cultivated peanut（*Arachis hypogaea* L.）and *Arachis* wild species. BMC Plant Biology，35：2723–2730.

Liu Feng，Wang Yun-sheng，Tian Xue-liang，Mao Zhen-chuang，Zhou Xue-xiao，Xie Bing-yan. 2012. SSR mining in pepper（*Capsicum annuum* L.）transcriptome and the polymorphism analysis. Acta Horticulturae Sinica，39 (1)：168–174. (in Chinese)

刘 峰，王运生，田雪亮，茆振川，邹学校，谢丙炎. 2012. 辣椒转录组 SSR 挖掘及其多态性分析. 园艺学报，39 (1)：168–174.

Lu X，Wang H X，Liu B Z，Xiang J H. 2013. Three EST-SSR markers associated with QTL for the growth of the clam *Meretrix meretrix* revealed by selective genotyping. Mar Biotechnol，15 (1)：16–25.

Ma K H，Kim N S，Lee G A，Lee S Y，Lee J K，Yi J Y，Park Y J，Kim T S，Gwag J G，Kwon S J. 2009. Development of SSR marker for studies of diversity in the genus *Fagopyrum*. Theoretical and Applied Genetics，119：1247–1254.

Sun Qing-ming，Ma Wen-chao，Ma Shuai-peng，Zhao Jun-sheng，Bai Li-jun，Chen Jie-zhen，Cai Chang-he，Xiaong 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.

Temnykh S，DeClerck G，Lukashova A，Lipovich L，Cartinhour S，McCouch S. 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice（*Oryza sativa* L.）. Genome Res，11：1441 – 1452.

Wang Dong，Cao Ling-ya，Gao Jian-ping. 2014. Data mining of simple sequence repeats in *Codonopsis pilosula* transcriptome. Chinese Traditional and Herbal Drugs，46 (8)：2390 – 2394. (in Chinese)
王　东，曹玲亚，高建平. 2014. 党参转录组中 SSR 位点信息分析. 中草药，46 (8)：2390 – 2394.

Wang Li-ying，Qiao Jun，Shi Yao，Wang Zhen-ying，Li Su-wen. 2012. Selection of SSR core primers and varietals purity identification in eggplant. Acta Agriculturae Boreali-Sinica，(4)：98 – 102. (in Chinese)
王利英，乔　军，石　瑶，王振英，李素文. 2012. 茄子 SSR 多态性引物的筛选及品种纯度鉴定. 华北农学报，(4)：98 – 102.

Yue Wen-di，Wei Li-bin，Zhang Ti-de，Li Chun，Miao Hong-mei，Zhang Hai-yang. 2012. Genetic diversity and population structure of germplasm resources in sesame（*Sesamum indicum* L.）by SSR markers. Acta Agronomica Sinica，38 (12)：2286 – 2296. (in Chinese)
岳文娣，魏利斌，张体德，李　春，苗红梅，张海洋. 2012. 芝麻种质资源 SSR 标记遗传多样性与群体结构分析. 作物学报，38 (12)：2286 – 2296.

Zhai Ya-hui，Ma Rong-li，Cheng Yan，Wu Hai-tao，Zhang Guang-xing. 2013. Genetic polymorphism of 37 onion germplasm resources as revealed by RAPDs and SSRs markers. Acta Agriculturae Boreali-Sinica，28 (6)：115 – 120. (in Chinese)
翟亚辉，马蓉丽，成　妍，吴海涛，张光星. 2013. 37 份洋葱遗传多样性的 RAPD 和 SSR 分析. 华北农学报，28 (6)：115 – 120.

Zhu Xiao-min，Wang Xian-yun，Cheng Long-can，Kang Xiang-yang，Wang Qin，Shu Qing-long，Zhang Liang-fu，Cao Cui-ping. 2013. Establishment of SSR-PCR reaction system and primers screening for *Eucommia ulmoides*. Journal of Anhui Agricultural University，40：378 – 382. (in Chinese)
朱晓敏，王弦云，陈龙灿，康向阳，王　勤，束庆龙，张良富，曹翠萍. 2013. 杜仲 SSR-PCR 反应体系建立及引物筛选. 安徽农业大学学报，40：378 – 382.