

简化基因组测序技术在观赏植物中的应用研究进展

熊 燕^{1,2}, 张金柱^{1,*}, 董 婕¹, 王 力¹, 高 鹏¹, 姜 琬¹, 车代弟^{1,*}

(¹东北农业大学园艺园林学院, 哈尔滨 150030; ²黑龙江省科学院自然与生态研究所, 哈尔滨 150040)

摘 要: 简化基因组测序 (Reduced-representation Genome Sequencing, RRGs) 是在二代高通量测序技术上, 通过限制性内切酶对基因组进行打断, 对基因组特定区域进行高通量测序, 得到大量遗传多态性标签序列, 进而展现整个基因组序列特征的技术。该方法建库过程简单, 费用较低, 能有效降低基因组复杂度。目前简化基因组测序已广泛应用在观赏植物分子标记开发、群体遗传及系统发生学、高密度遗传图谱构建、数量性状定位等研究中。综述了简化基因组测序技术原理及其在观赏植物中的研究进展, 并讨论了研究中所存在的问题及其发展前景进行了展望。

关键词: 简化基因组测序; 观赏植物; 高通量测序; SNP

中图分类号: S 68

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2020) 06-1194-09

A Review of Reduced-representation Genome Sequencing Technique and Its Applications in Ornamental Plants

XIONG Yan^{1,2}, ZHANG Jinzhu^{1,*}, DONG Jie¹, WANG Li¹, GAO Peng¹, JIANG Wan¹, and CHE Daidi^{1,*}

(¹College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; ²Institute of Natural Resources and Ecology, Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin 150040, China)

Abstract: Reduced-representation Genome Sequencing (RRGS) was based on the second-generation high-throughput sequencing technology in which the genome was interrupted by restriction endonuclease and a large number of genetic polymorphism tag sequences were obtained by high-throughput sequencing of specific regions of the genome, and then revealing the characteristics of the entire Genome sequence. This method has the advantages of simple process of library building, cost-effective, and can effectively reduce the complexity of genome. At present, RRGs has been widely used in the development of molecular markers, population genetics and phylogeny, construction of high-density genetic map and quantitative characteristics localization of ornamental plants. In this paper, the technical principle of RRGs and its research progress in ornamental plants were reviewed, the problems and development prospects were also discussed.

Keywords: reduced-representation genome sequencing; ornamental plant; high-throughput sequencing; SNP

收稿日期: 2019-11-04; 修回日期: 2020-04-16

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (QC2017025); 东北农业大学“学术骨干”基金项目; 黑龙江省院所基本应用技术研究专项 (ZNBZ2019ZR04)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: daidiche@163.com, jinzhuzhang@neau.edu.cn)

1954年, Whitfield (1954) 基于核苷酸双螺旋结构发明了以化学降解法为基础的 DNA 测序, 由此拉开了测序技术的序幕, 但由于其技术繁琐、成本高昂, 并没有广泛应用; 1977年, 基于 PCR 技术的 Sanger 测序成为第一代测序技术的代表, 但其通量小、成本高, 应用也受到制约; 2005年, Margulies 等 (2005) 在 Nature 发表了基于焦磷酸测序 (Pyrosequencing) 方法的 Roche/454 焦磷酸测序, 开启了二代测序 (Next-generation sequencing, NGS) 即高通量测序的时代; 随后又相继出现了 Illumina/Solexa 聚合酶合成测序和 ABI/SOLiD 连接酶测序等测序技术 (Ansorge, 2009)。二代测序与一代相比, 并不会刻意的对某些同源位点进行基于 PCR 的扩增, 而是通过试验处理将整个基因组打断, 再对打断后形成的 DNA 片段进行富集测序, 序列数据大, 所需费用也更低, 能更全面而快捷地满足生命科学相关领域研究的需要。高通量测序已经全面应用于基因组、简化基因组及转录组和蛋白质交互作用的研究当中。

Luikart 等 (2003) 设想通过发掘数以百计的简单且可靠的多态性标记来覆盖整个基因组, 而二代测序技术的出现使这一设想成为可能。目前, 以纳米孔单分子测序为基础的第三代测序已逐渐发展起来 (Rhoads & Au, 2015)。简化基因组测序 (Reduced-representation Genome Sequencing, RRGs) 是在二代高通量测序技术上, 通过酶切降低基因组复杂度的一种测序技术。简化基因组测序通过限制性内切酶对基因组进行打断, 对基因组特定区域进行高通量测序, 得到大量遗传多态性标签序列, 进而展现整个基因组序列特征 (Miller et al., 2007)。目前简化基因组测序技术已经成功应用于植物的标记开发、高密度遗传图谱构建、重要性状 QTL 定位、群体遗传学、系统演化及全基因组辅助测序等研究领域 (Barchi et al., 2012; Jia et al., 2013)。简化基因组测序技术已广泛应用于大田作物和蔬菜中。2011年, Pfender 等 (2011) 首次将简化基因组测序技术应用于观赏植物黑麦草 (*Lolium perenne*) 中, 近年来简化基因组测序技术在观赏植物中的应用逐渐增加。本文总结了简化基因组测序技术分类及在观赏植物分子标记、群体遗传、图谱构建、QTL 定位等方面的最新研究成果, 为简化基因组测序技术在观赏植物中的应用提供科学数据。

1 简化基因组测序技术种类和发展

1.1 技术种类

从 Miller 等 (2007) 提出简化基因组测序开始, 出现了众多的方法, 但其本质都是对基因组进行酶切并对酶切片段进行测序。Davey 等 (2011) 对简化代表库测序 RRLs (Reduced-representation library sequencing)、基于限制性酶切位点的 DNA 测序的 RAD-seq (Restriction-site-associated DNA sequencing)、低覆盖度的基因分型测序 GBS (Genotyping by sequencing) 等 3 种经典的简化基因组测序进行了比较, 之后相继衍生和开发出各具特点的一系列测序技术, 如 2b-RAD、SLAF 等。限制性内切酶酶切作为所有测序技术的共同点和起点, 通过对酶切片段进行测序降低了基因组的复杂程度, 这些测序方法在分子标记开发、图谱构建、QTL 定位等领域应用广泛。而每种简化基因组测序技术在酶切方式、内切酶类型、标签的添加等方面存在着差异 (表 1)。

1.2 RRLs 简化代表库测序技术

RRLs 最早应用于人类基因组 SNP 图谱构建 (Alshuler et al., 2000)。van Tassel 等 (2008) 基于二代测序技术对 RRLs 进行了系统阐述。首先对基因组 DNA 进行酶切, 而后把所有样品片段全部混合, 选择 300 ~ 700 bp 片段, 连接测序接头, 上机测序。相比其他测序方法其步骤少, 但早期的

RRLs 测序没有对不同样品加上不同“标签”(barcode), 只能对整个群体进行估计。

表 1 不同简化基因组测序技术的比较
Table 1 Comparison of different reduced-representation genome sequencing

方法 Method	酶切方式 Enzyme digestion mode	复杂度降低方式 Complexity reduction method	标签 Bar-code	参考基因组 Reference genome	优点 Advantage	不足 Disadvantage	适用范围 Scope of application
RRLs	单酶切 Single enzyme digestion	片段长度选择 Fragment length selection	无 No	无 No	步骤少 Less steps	无标签, 无法区分单个样品 No label to distinguish individual samples	SNP 开发, 性状关联, 遗传多样性分析 SNP development, characteristics association, genetic diversity analysis
sd-RAD	单酶切 Single enzyme digestion	机械打断 Mechanical interruption	有 Yes	无 No	标记数多, 对 read-2 进行 <i>de novo</i> 拼接可得较长片段 The number of tags is large. <i>de novo</i> splicing of read-2 can get longer fragments	建库步骤复杂, 成本高 Complex steps of database building and costly.	高密度遗传图谱构建 Construction of high density genetic map
ddRAD	双酶切 Double enzyme digestion	电泳切胶 Gel electrophoresis	有 Yes	无 No	初始 DNA 量低, 建库成本低 Low initial DNA content and low cost of library construction	片段数相对较少 The number of fragments is relatively small	遗传图谱构建, 群体遗传学 Construction of genetic map, population genetics
2bRAD	II B 型单酶切 Type II B Single enzyme digestion	无 Nothing	有 Yes	有 Yes	片段长度一致, 可用接头调节标记密度 The length of fragments is the same, and the marker density can be adjusted by joints	片段长度短, 受重复序列影响, 不适合杂合和复杂基因组 The length of fragments is short. It is not suitable for heterozygous and complex genomes due to repeated sequences	需有参考基因组 Reference genome is required
sd-GBS	单酶切 Single enzyme digestion	PCR 特异性选择 PCR specific selection	有 Yes	无 No	片段选择简单, 建库步骤少, 操作简便 Fragments selection is simple, the steps of library building are few, and the operation is simple	标记数少, 缺失率高 Low number of markers and high missing rate	遗传图谱构建, 群体遗传学 Construction of genetic map, population genetics
ddGBS	双酶切 Double enzyme digestion	电泳切胶 Gel electrophoresis	有 Yes	无 No	初始 DNA 量低, 建库成本低且标记分布均匀 DNA content is low initial, fragments selection is simple and the distribution of markers is uniform	片段数相对较少 The number of fragments is relatively small	遗传图谱构建, 群体遗传学 Construction of genetic map, population genetics
SLAF	双酶切 Double enzyme digestion	电泳切胶 Gel electrophoresis	有 Yes	无 No	片段长度一致, 标记数多, 可以根据不同物种及目的个性化设计标记开发方案 Fragment length is consistent, and the number of markers are large. The development scheme of markers can be designed individually according to different species and purposes	非特异性接头使降解的短 DNA 片段被误用 Non-specific joint misuse degraded short DNA fragments	SNP 开发, 遗传图谱构建, 群体遗传学 SNP development, genetic map construction, population genetics

Nielsen 等 (2011) 改进了早期 RRLs 技术, 针对得到的基因片段, 若存在高质量参考基因组, 则将片段和基因组进行比对, 进而找到 SNP 标记; 若不存在高质量参考基因组, 需要对测序片段进行从头拼接, 而后对拼接片段进行序列比对, 筛选 SNP。

1.3 RAD-seq 简化基因组测序技术

RAD 标记由 Miller 等 (2007) 提出, Baird 等 (2008) 对高通量 RAD 测序技术进行了最初的描述。利用限制性内切酶对基因组 DNA 进行酶切, 在酶切后的片段上加 P1 接头, 混池, 选择 300 ~ 700 bp 的片段随机打断, 再次打断的 DNA 片段无论有无 P1 接头均连接 Y 型 P2 接头, 对片段进行 PCR 扩增。由于 P2 特殊的 Y 型结构, 使得既有 P1 接头又有 P2 接头的 DNA 序列可以扩增。最后将筛选出来的片段上机测序。这里的 RAD-seq 是基于单酶切的 sd-RAD (single digest-RAD)。

随着简化基因组不断发展, Peterson 等 (2012) 改进衍生出 dd-RAD (doubledigest-RAD), 即双酶切 RAD。采用两种酶对基因组 DNA 进行酶切, 通过切胶进行频段选择, 且在同一酶切位点处收集的片段长度一致, 但相比 sd-RAD 获得的片段较少。

2b-RAD 由 Wang 等 (2012) 提出, 其特点是应用 II B 型限制性内切酶能在识别位点的上游和下游位点分别切段, 且片段长度一致, 并通过对拟南芥的基因型分析, 验证了该方法的准确性。但片段过短, 易受到重复干扰, 不利于 SNP 的开发, 因此 2b-RAD 多建议使用在有参考基因组的物种上。

1.4 GBS 简化基因组测序技术

Elshire 等 (2011) 提出基于测序进行基因分型的 GBS 测序技术。其主要技术流程为利用限制性内切酶打断基因组, 随后将两类 GBS 接头——标签接头和普通接头连接到基因片段上, 生成的片段两端接头分为标签接头与普通接头、标签接头与标签接头、普通接头与普通接头; 将连接后的片段混合, 在 Illumina 测序平台进行扩增, 只有两端为“标签接头与普通接头”的片段可以扩增并测序。

GBS 方法采用单酶切对基因组进行 DNA 酶切, 利用 PCR 进行片段大小选择, 对不同的样品加上不同的条码, 可对大量样品进行建库, 简化了建库步骤。dd-GBS (doubledigest-GBS) 即双酶切 GBS, 在基因组上分布的更加均匀, 与 2b-RAD 相似, 采用两种酶对基因组进行酶切, 建库样品数量比 2b-RAD 少, 虽然对基因组覆盖相对降低, 但是测序成本相对较低。

1.5 SLAF 简化基因组测序技术

SLAF 采用双酶切和双 barcode 接头, 由 Sun 等 (2013) 提出。首先通过生物信息对基因组进行试验方案的系统设计, 筛选特异长度 DNA 片段; 其次通过 96 孔板操作, 给每个样品酶切加一级接头, 混合后加二级接头, 构建 SLAF 测序文库; 最后通过高通量测序的方式获得多于 10 万个序列, 进而通过软件分析比对, 获得多态性标签, 在多态性 SLAF 标签上开发大量特异性 SNP 位点。

SLAF 是简化基因组测序的一次革命, 片段长度一致, 一般在 30 ~ 50 bp, 并且在上图标记前, 会利用生物信息学的方法对限制性内切酶进行筛选, 选择最适合的进行酶切; 测序深度的提升可以保证基因分型的准确性; 且上图标记数量多、标记质量高 (Wang et al., 2015; 魏庆镇, 2016)。

2 简化基因组测序技术在观赏植物中的应用

2.1 在分子标记开发和野生资源保护上的应用

观赏植物中大部分遗传背景复杂, 缺少基因组数据支撑, 且部分野生资源由于其生境狭窄且受

到人为干扰,种群规模日益缩小,通过开发分子标记对其遗传背景及种质资源进行研究是行之有效的方法。通过简化基因组测序技术不依赖基因组序列信息,可进行高通量标记开发。

在野生资源保护方面,王久利等(2017)将 RAD-seq 应用于兼具观赏和药用价值的珍贵花卉异型花(*Sinoswer tiatetraptera*)的 SSR 标记开发中,通过对 4 个不同居群中随机选择的个体进行混合用于 RAD-seq,用 SSR search 软件甄别所得序列中的 SSR,得到了双端各有至少 100 bp 的 SSR 位点 5 844 个,且用 4 个异型花居群的 32 个个体检测引物的可用性和多态性,10 个随机引物中有 4 个成功扩增并表现出多态性。鹅掌楸 [*Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sargent] 为木兰科濒危植物,目前已开发的可锚定野生鹅掌楸的标记十分有限。陆叶等(2019)以北美鹅掌楸(*L. tulipifera* Linn.)和鹅掌楸的杂交 F₁ 代和两个亲本为材料,用限制性内切酶 *EcoR* I 构建了 RAD 文库,共鉴定到 22 019 个 SNP 位点,其中 194 个 SNP 变异类型得到了验证。周晓君等(2019)同样通过 RAD-seq 对河南特有物种灵宝杜鹃(*Rhododendron henanense* subsp. *lingbaoense*)进行了标记开发,为其保护与可持续利用提供有力支持。

贾清香(2018)通过对野鸢尾(*Iris dichotoma* Pall.)的 4 个花色变异种和射干(*Belamcanda chinensis* L.)进行 RAD-seq 测序,共识别出了 31 014 个 SNP 和 16 012 个 SSR,并进行了各品种的同源性比对,为其育种研究和亲缘鉴定发挥了重要作用。在椭圆叶花锚(*Halenia elliptica* D. Don)、垂穗披碱草(*Elymus nutans*)、向日葵(*Helianthus annuus* L.)等观赏植物上均有应用简化基因组测序技术进行了开发标记的研究(刘瑞娟等,2018;马宇等,2018;王久利等,2018)。

2.2 在群体遗传及系统发生学上的应用

观赏植物种源关系复杂,多为植物种间频繁的自然杂交而来,因此给观赏植物的科学分类与鉴定都带了很大的困难。

Wang 等(2017)应用 RAD-seq 对北美箭竹族的 36 个种进行了分类学和系统发育关系研究,共获得 1 100 万条 reads,构建了巨大的数据库,RAD-seq 系统发育共分成 8 个地理分支,在很大程度上与形态学上的分类一致。郭燕等(2019)应用 GBS 技术对贵州久安 5 个地理位置的 100 份古茶树资源间遗传关系进行了研究,结果表明其中 4 个地理位置的古茶树资源可能存在相同的遗传背景。乔大河等(2019)也对贵州省主要栽培茶树品种应用 GBS 技术进行了遗传结构的分析,得到贵州前期茶树育种来源以福鼎大白茶及云南地方种质资源为主的结论。

杜鹃属植物有重要的观赏价值,但中国杜鹃花类群复杂,分类与物种界定方面研究并不十分清晰。李云飞等(2019)应用 RAD 高通量测序技术对 85 份杜鹃属资源的分类进行研究,获得 620 371 个 SNP 位点,同时基于 PCA、Structure 聚类及系统发育树的分析结果,支持了目前在亚属水平的形态学分类,而获得的大量 SNP 位点可区分杜鹃花亚属和组内的大部分物种。综上所述,简化基因组测序技术在观赏植物复杂类群分类与物种界定方面具有可行性。

2.3 在遗传图谱构建上的应用

最早将简化基因组测序技术应用在观赏植物上的是 Pfender (2011)对黑麦草(*Lolium perenne*)两个亲本和 188 个子代进行 RAD-seq,构建了第 1 张黑麦草的 RAD 高密度遗传图谱。之后简化基因组测序技术在观赏植物高密度遗传图谱构建上的应用越来越多,成为了观赏植物图谱构建行之有效的方法之一(表 2)。

表 2 简化基因组测序在观赏植物遗传连锁图谱构建及 QTL 定位的应用
Table2 Application of RRGs in linkage genetic map construction and QTL localization in ornamental plants

物种 Species	群体类型及大小 Popula- tion type and size	标记类型 Type	标记位点数 Number of markers	遗传图谱 Genetic map					QTL 定位 Quantitative trait loci	参考文 献 Refer- ence
				连锁群 Linkage group	总长/cM Total map length	平均图距/ cM Average inter-locus distance	母本/ cM Female	父本/ cM Male		
黑麦草 <i>Lolium perenne</i> L.	188 F ₁	SSR, STS, RAD	1 156 (母本 Female), 1 216 (父本 Male)	7			738	721	抗茎锈病 Stem rust resistance	Pfender et al., 2011
茶树 <i>Camellia sinensis</i>	148 F ₁	SLAF	6 448	15	3 965	1				Ma et al., 2015
梅花 <i>Prunus mume</i> Sieb.	387 F ₁	SLAF	8 007	8	1 550.62	0.195			垂枝性状 Weeping trait	Zhang et al., 2015
牡丹 <i>Paeonia</i> Sect. Moutan	195 F ₁	SLAF	1 189	5	920.67	0.774			枝、叶、花和果实相关性 状 Stem trait, leaf trait, flower trait and fruit trait	Cai et al., 2015
柳 <i>Salix matsudana</i>	200 F ₁	SLAF	6 737	38	5 497.45	0.82				Zhang et al., 2016
桂花 <i>Osmanthus fragrans</i> Lour.	129 F ₁	SLAF	14 189	23	2 962.46	0.21				He et al., 2017
石斛 <i>Dendrobium nobile</i> Lindl.	111 F ₁	SLAF	8 573	19	2 737.49	0.32			茎总多糖含量 Stem total polysaccharide content	Lu et al., 2018

Zhang 等 (2015) 等以梅花 (*Prunus mume*) 的 ‘六瓣’ 和 ‘粉台垂枝’ 杂交 F₁ 群体作为作图群体, 得到包含了 8 007 个 SLAF 标记的高密度遗传连锁图谱, 平均距离为 0.195 cM。相较于梅花前期应用 AFLP 和 SSR 标记构建的遗传图谱, 应用 SLAF 在标记数量及标记精度上均有了相当大的提升 (赵新宇, 2011; 孙丽丹, 2013)。为加快梅花分子育种进程, 相关观赏性状的定位及揭示性状调控机制提供了重要的理论基础。Cai 等 (2015) 应用 SLAF 测序对中国传统名花的牡丹 (*Paeonia* Sect. Moutan) 进行高密度遗传图谱的构建, 建立了总图距为 920.67 cM, 平均图距为 0.774 cM 的第一张牡丹高密度遗传图谱。目前观赏植物中柳 (*Salix matsudana*)、桂花 (*Osmanthus fragrans* Lour.) 及石斛 (*Dendrobium nobile* Lindl.) 等均通过简化基因组测序技术构建了高密度遗传图谱, 为观赏植物图谱密度的加密、性状定位及遗传育种奠定了科学基础 (Ma et al., 2015; Zhang et al., 2016; He et al., 2017; Lu et al., 2018)。

2.4 在 QTL 定位上的应用

简化基因组测序技术为 QTL 定位提供了新的方法 (表 2)。Zhang 等 (2015) 以直立型梅花 ‘六瓣’ 和垂枝型梅花 ‘粉台垂枝’ 为亲本, 利用 SLAF 测序技术, 将梅花垂枝性状相关的 QTL 定位在了第 7 连锁群上 69.63 ~ 75.52 cM 区域, 预测了 9 个与枝条木质化相关的结构基因及 9 个转录调控基因均与梅花垂枝性状紧密相关。蔡长福 (2015) 以 ‘凤丹白’ 和中原牡丹 ‘红乔’ 为杂交亲本, 利用 SLAF 测序, 对牡丹的 27 个数量性状进行了 QTL 分析, 共得到 49 个 QTL, 可解释表型变异的 8.3% ~ 71.9%。

简化基因组测序技术对于观赏植物抗病基因及代谢相关基因调控方面均具有重要意义。Pfender 等 (2011) 利用 RAD-seq 对黑麦草锈病相关基因进行了定位, 通过抗感锈病及易感锈病亲本的杂交, 最终在第 1、6、7 连锁群上定位了 3 个抗锈病相关 QTL。Lu 等 (2018) 以细茎石斛 (*Dendrobium moniliforme*) 为母本, 铁皮石斛 (*D. officinale*) 为父本, 应用 SLAF 标记定位了与茎总多糖含量 (STPC) 相关的 5 个 QTL, 为多糖代谢相关基因的挖掘及其他药用植物相关性状的定位奠定基础。

3 问题与展望

简化基因组测序技术在建库分析过程中会引入数据偏差, 过滤掉部分数据。检测和修正偏差的方法和软件的开发非常重要, 目前针对各种模型的分析工具及数据的可视化操作还有待进一步加强。此外, 在观赏植物遗传图谱构建中, 由于材料遗传背景较复杂, 大都采用拟测交 F₁ 群体进行测序, 也限制了所构建遗传图谱的进一步应用。因此应根据研究目的、群体材料的不同, 选择有针对性的测序。

随着二代测序技术的发展, 测序成本越来越低, 简化基因组测序因其性能强大、操作简单、周期短、价格低廉、不需参考基因组等优点被广泛应用于植物分子标记开发、群体遗传、图谱构建与 QTL 定位等研究领域。目前, 随着简化基因组测序的不断发展, 简化基因组测序技术在观赏植物中的研究也在不断深入, 特别对无参考基因组、基因组比较复杂的观赏植物而言, 提供了有效的研究方法, 并取得了一些显著性成果。在观赏植物分子育种研究中将转录组数据与简化基因组测序相结合, 可以显著提高基因定位效率。

References

- Altshuler D, Pollara V J, Cowles C R, Etten W J V, Baldwin J, Linton L, Lander E S. 2000. An SNP map of the human genome generated by reduced representation shotgun sequencing. *Nature*, 407 (6803): 513 – 516.
- Ansorge W J. 2009. Next-generation DNA sequencing techniques. *N Biotechnol*, 25 (4): 195 – 203.
- Baird N A, Etter P D, Atwood T S, Currey M C, Shiver A L, Lewis Z A, Johnson E A. 2008. Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS ONE*, 3 (10): e3376.
- Barchi L, Lanteri S, Portis E, Valè G, Volante A, Pulcini L, Ciriaci T, Acciarri N, Barbierato V, Toppino L, Rotino G L. 2012. A RAD tag derived marker based eggplant linkage map and the location of QTLs determining anthocyanin pigmentation. *PLoS ONE*, 7 (8): e43740.
- Cai C F, Cheng F Y, Wu J, Zhong Y, Liu G. 2015. The first high-density genetic map construction in tree peony (*Paeonia* Sect. *Moutan*) using genotyping by specific-locus amplified fragment sequencing. *PLoS ONE*, 10 (5): e0128584.
- Cai Chang-fu. 2015. High-density genetic linkage map construction and QTLs analyses for phenotypic traits in tree peony [Ph. D. Dissertation]. Beijing: Beijing Forestry University. (in Chinese)
- 蔡长福. 2015. 牡丹高密度遗传图谱构建及重要性状 QTL 分析 [博士论文]. 北京: 北京林业大学.
- Davey J W, Hohenlohe P A, Etter P D, Boone J Q, Catchen J M, Blaxter M L. 2011. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*, 12 (7): 499.
- Elshire R J, Glaubitz J C, Sun Q, Poland J A, Kawamoto K, Buckler E S, Mitchell S E, A Robust. 2011. Simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE*, 6 (5): e19379.
- Guo Yan, Qiao Da-he, Yang Chun, Li Yan, Chen Zheng-wu, Chen Juan. 2019. Genetic diversity of old tea plant resources in Jiu'an City of Guizhou Province, using genome-wide SNP. *Journal of Plant Genetic Resources*, 20 (1): 26 – 36. (in Chinese)
- 郭燕, 乔大河, 杨春, 李燕, 陈正武, 陈娟. 2019. 基于全基因组 SNP 的贵州久安古树茶遗传关系分析. *植物遗传资源学报*, 20 (1): 26 – 36.
- He Y, Yuan W, Dong M, Han Y, Shang F. 2017. The first genetic map in sweet osmanthus (*Osmanthus fragrans* Lour.) using specific locus amplified

- fragment sequencing. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1621.
- Jia J, Zhao S C, Kong X Y, Li Y R, Zhao G Y, He W M, Ap-pels R D, Pfeifer M, Tao Y, Zhang X Y, Jing R L, Zhang C, Ma Y Z, Gao L F, Gao C, Spannagl M, Mayer K F X, Li D, Pan S K, Zheng F Y, Hu Q, Xia X C, Li J W, Liang Q S, Chen J, Wicker T, Gou C Y, Kuang H H, He G Y, Luo Y D, Keller B, Xia Q J, Lu P, Wang J Y, Zou H F, Zhang R Z, Xu J Y, Gao J L, Middleton C, Quan Z W, Liu G M, Wang J, Yang H M, Liu X, He Z H, Mao L, Wang J. 2013. *Aegilops tauschii* draft genome sequence reveals a gene repertoire for wheat adaptation. *Nature*, 496: 91 - 95.
- Jia Qing-xiang. 2018. Characteristics of SSR and SNP in *I. dichotoma* and *I. domestica* using RAD sequencing [Ph. D. Dissertation]. Shenyang: Shenyang Agricultural University. (in Chinese)
- 贾清香. 2018. 基于 RAD 测序的野鸢尾和射干的 SSR 及 SNP 特征分析 [博士论文]. 沈阳: 沈阳农业大学.
- Li Yun-fei, Li Shi-ming, Jin Xin, Cheng Shu, Wang Song-bo, Hou Jun-liang, Liu Jia-jin, Duan Xiao-xia, Ma Hong, Ma Yong-peng, Zhang Geng-yun. 2019. Phylogenomic analysis of 85 *Rhododendron* species in China based on RAD sequencing. *Forest Research*, 32 (3): 1 - 8. (in Chinese)
- 李云飞, 李世明, 金鑫, 程书, 王松波, 侯军亮, 刘家劲, 段肖霞, 马宏, 马永鹏, 张耕耘. 2019. 基于 RAD 高通量测序探讨中国 85 种杜鹃花属植物的分类. *林业科学研究*, 32 (3): 1 - 8.
- Liu Rui-juan, Lu Xing-wang, Dou Quan-wen. 2018. Development of SSR markers in *Elymus nutans* based on reduced-representation genome sequencing. *Molecular Plant Breeding*, 16 (6): 1888 - 1894. (in Chinese)
- 刘瑞娟, 路兴旺, 窦全文. 2018. 基于简化基因组测序开发垂穗披碱草 (*Elymus nutans*) SSR 标记. *分子植物育种*, 16 (6): 1888 - 1894.
- Lu J J, Liu Y Y, Xu J, Mei Z W, Shi Y J, Liu P L, He J B, Wang X T, Meng Y J, Feng S G, Shen C J, Wang H Z. 2018. High-density genetic map construction and stem total polysaccharide content-related qtl exploration for chinese endemic *Dendrobium* (Orchidaceae). *Frontiers in Plant Science*, 9: 398.
- Lu Ye, Long Xiao-fei, Wang Peng-kai, Chen Jin-hui, Shi Ji-sen. 2019. Development of genomic SNP markers based on RAD-seq and genome data in *Liriodendron*. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 43 (4): 1 - 7. (in Chinese)
- 陆叶, 龙晓飞, 王鹏凯, 陈金慧, 施季森. 2019. 基于 RAD-seq 技术的鹅掌楸基因组 SNP 标记开发. *南京林业大学学报 (自然科学版)*, 43 (4): 1 - 7.
- Luikart G, England P R, Tallmon D, Jordan S, Taberlet P. 2003. The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nature Reviews Genetics*, 4 (12): 981 - 994.
- Ma J Q, Huang L, Ma C L, Jin J Q, Li C F, Wang R K, Zheng H K, Yao M Z, Chen L. 2015. Large-scale SNP discovery and genotyping for constructing a high-density genetic map of tea plant using specific-locus amplified fragment sequencing (SLAF-seq). *PLoS ONE*, 10 (6): e0128798.
- Ma Yu, Yu Hai-feng, Hou Jian-hua, Shi Yu, Wen Rui, Li Zhen. 2018. SNP Marker development and utilization of sunflower based on SLAF-seq technology. *Molecular Plant Breeding*, 16 (18): 5994 - 6000. (in Chinese)
- 马宇, 于海峰, 侯建华, 石煜, 温蕊, 李振. 2018. 基于 SLAF-seq 技术的向日葵 SNP 标记开发与利用. *分子植物育种*, 16 (18): 5994 - 6000.
- Margulies M, Egholm M, Altman W E, Attiya S, Bader J S, Bemben L A, Berka J, Braverman M S, Chen Y J, Chen Z T, Dewell S B, Du L, Fierro J M, Gomes X V, Godwin B C, He W, Helgesen S, Ho C H, Ho C H, Irzyk G P, Jando S C, Alenquer M L I, Jarvie T P, Jirage K B, Kim J B, Knight J R, Lanza J R, Leamon J H, Lefkowitz S M, Lei M, Li J, Lohman K L, Lu H, Makhijani V B, McDade K E, McKenna M P, Myers E W, Nickerson E, Nobile J R, Plant R, Puc B P, Ronan M T, Roth G T, Sarkis G J, Simons J F, Simpson John W, Srinivasan M, Tartaro K R, Tomasz A, Vogt K A, Volkmer G A, Wang S H, Wang Y, Weiner M P, Yu P G, Begley R F, Rothberg J M. 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437 (7057): 376 - 380.
- Miller M R, Dunham J P, Amores A, Cresko W A, Johnson E A. 2007. Rapid and cost-effective polymorphism identification and genotyping using restriction site (RAD) markers. *Genome Res*, 17: 240 - 248.
- Nielsen R, Paul J S, Albrechtsen A, Song Y S. 2011. Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. *Nature Reviews Genetics*, 12 (6): 443 - 451.
- Peterson B K, Weber J N, Kay E H, Fisher H S, Hoekstra H E. 2012. Double digest RADseq: an inexpensive method for *de novo* SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS ONE*, 7 (5): e37135.
- Pfender W F, Saha M C, Johnson E A, Slabaugh M B. 2011. Mapping with RAD (restriction-site associated DNA) markers to rapidly identify QTL

- for stem rust resistance in *Lolium perenne*. *Theoretical & Applied Genetics*, 122 (8): 1467 – 1480.
- Qiao Da-he, Guo Yan, Yang Chun, Li Yan, Chen Juan, Chen Zheng-wu. 2019. Fingerprinting construction and genetic structure analysis of the main cultivated tea varieties in Guizhou Province. *Journal of Plant Genetic Resources*, 20 (2): 412 – 425. (in Chinese)
- 乔大河, 郭燕, 杨春, 李燕, 陈娟, 陈正武. 2019. 贵州省主要栽培茶树品种指纹图谱构建与遗传结构分析. *植物遗传资源学报*, 20 (2): 412 – 425.
- Rhoads A, Au K F. 2015. PacBio sequencing and its applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 13 (5): 278 – 289.
- Sun Li-dan. 2013. Genetic linkage map construction and QTLs analyses for phenotypic traits of Mei [Ph. D. Dissertation]. Beijing: Beijing Forestry University. (in Chinese)
- 孙丽丹. 2013. 梅花遗传连锁图谱构建和表型性状 QTLs 分析 [博士论文]. 北京: 北京林业大学.
- Sun X W, Liu D Y, Zhang X F, Li W, Liu H, Hong W, Jiang C, Guan N, Ma C, Zeng H, Xu C, Song J, Huang L, Wang C, Shi J, Wang R, Zheng X, Lu C, Wang X, Zheng H. 2013. SLAF-seq: an efficient method of large-scale de novo SNP discovery and genotyping using high-throughput sequencing. *PLoS ONE*, 8 (3): e58700.
- van Tassel C P, Smith T P, Matukumalli L K, Smith T P L, Matukumalli L K, Taylor J F, Schnabel R D, Lawley C T, Haudenschild C D, Moore S S, Warren W C, Sonstegard T S. 2008. SNP discovery and allele frequency estimation by deep sequencing of reduced representation libraries. *Nature Methods*, 5 (3): 247 – 252.
- Wang Jiu-li, Chen Shi-long, Xing Rui, Song Xiang-jie, Zhu Ming-xing, Zhang Fa-qi. 2018. Simplified genome SSR information and development of SSR primers of *Halenia elliptica* (Gentianaceae). *Bulletin of Botanical Research*, 38 (2): 292 – 297. (in Chinese)
- 王久利, 陈世龙, 邢睿, 宋相杰, 朱明星, 张发起. 2018. 椭圆叶花锚简化基因组的 SSR 信息分析及 SSR 引物开发. *植物研究*, 38 (2): 292 – 297.
- Wang Jiu-li, Zhu Ming-xing, Xu Ming-hang, Chen Shi-long, Zhang Fa-qi. 2017. Analysis on SSR in *Sinoswertia tetraptera* base on RAD-seq. *Bulletin of Botanical Research*, 37 (3): 447 – 452. (in Chinese)
- 王久利, 朱明星, 徐明行, 陈世龙, 张发起. 2017. 基于 RAD-seq 技术的异型花 SSR 信息分析. *植物研究*, 37 (3): 447 – 452.
- Wang S, Meyer E, McKay J K, Matz M V. 2012. 2b-RAD: a simple and flexible method for genome-wide genotyping. *Nature Methods*, 9 (8): 808.
- Wang W, Zhang T, Zhang G, Wang J, Han K, Wang Y, Zhang Y. 2015. Genome-wide association study of antibody level response to NDV and IBV in Jinghai yellow chicken based on SLAF-seq technology. *Journal of Applied Genetics*, 56 (4): 555.
- Wang X, Ye X, Zhao L, Li D, Guo Z, Zhuang H. 2017. Genome-wide rad sequencing data provide unprecedented resolution of the phylogeny of temperate bamboos (*Poaceae bambusoideae*). *Scientific Reports*, 7 (1), 11546.
- Wei Qing-zhen. 2016. QTL mapping and candidate gene screening of fruit length in cucumber [Ph. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Agricultural University. (in Chinese)
- 魏庆镇. 2016. 黄瓜果实长度性状 QTL 定位及候选基因筛选 [博士论文]. 南京: 南京农业大学.
- Whitfeld P R. 1954. A method for the determination of nucleotide sequence in polyribonucleotides. *Biochem J*, 58 (3): 390 – 396.
- Zhang J, Yuan H, Li M, Li Y J, Wang Y, Ma X J, Zhang Y, Tan F, Wu R L. 2016. A high-density genetic map of tetraploid *Salix matsudana* using specific length amplified fragment sequencing (SLAF-seq). *PLoS ONE*, 11 (6): e0157777.
- Zhang J, Zhang Q, Cheng T, Yang W, Pan H, Zhong J, Huang L, Liu E. 2015. High-density genetic map construction and identification of a locus controlling weeping trait in an ornamental woody plant (*Prunus mume* Sieb. et Zucc). *DNA Research*, 22 (3): 183.
- Zhao Xin-yu. 2011. The development of SSR primers and preliminary construction of frame genetic linkage map of Mei flower [M. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 赵新宇. 2011. SSR 引物开发及梅花分子框架遗传图谱的构建 [硕士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Zhou Xiao-jun, Wang Hailiang, Li Fang-ling, Zhang Kai, Wang Yu-na, Ya Hui-yuan. 2019. Development of polymorphic SSR markers in *Rhododendron henanense* subsp. *lingbaoense* based on RAD-seq. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 27 (1): 55 – 62. (in Chinese)
- 周晓君, 王海亮, 李方玲, 张凯, 王俞娜, 押辉远. 2019. 基于 RAD-seq 技术开发灵宝杜鹃多态性 SSR 标记. *农业生物技术学报*, 27 (1): 55 – 62.