

基于高通量测序的怒江红山茶微卫星位点特征分析

王大玮^{1 2} 周凡^{1 2} 沈兵琪^{1 2} 王连春^{1 2*}

(1. 西南林业大学云南省高校林木遗传改良与繁育重点实验室, 昆明 650224; 2. 西南山地森林保育与利用省部共建教育部重点实验室, 昆明 650224)

摘要 以怒江红山茶叶片为材料, 采用 Illumina Hiseq 2000 平台测序, 共获得 140 996 条无冗余的序列, 进行 SSR 位点搜索后, 得到 32 696 个 SSR 位点, 出现频率为 23.2%。所搜索的 SSR 以二核苷酸重复类型最多, 三核苷酸和单核苷酸次之, 四、五、六核苷酸重复类型较少 (< 1%)。单核苷酸重复类型中以 A/T 基元较丰富 (10.92%); 二核苷酸中 AG/CT 基元出现频率最大, 达到 49.72%, AT/AT 基元和 AC/GT 基元所占比例相差不多, 而 CG/CG 基元所占比例最少, 为 0.07%。三核苷酸重复类型中 AAG/CTT 最多, ACC/GGT、ATC/ATG 和 AGG/CCT 基元次之, CCG/GGC、ACT/AGT 和 ACG/CGT 基元较低, 都小于 1%。四、五、六核苷酸类型中各重复基元均较少。在怒江红山茶转录组中, 微卫星的数量随着对应的重复类型、重复次数的增加而降低, 也随重复区段碱基长度的增加而降低。

关键词 怒江红山茶 转录组 微卫星 高通量测序

中图分类号 S685.14 文献标志码 A doi:10.7525/j.issn.1673-5102.2019.01.018

Characteristics of Microsatellite in *Camellia saluenensis* by High-throughput Sequencing

WANG Da-Wei^{1 2} ZHOU Fan^{1 2} SHEN Bing-Qi^{1 2} WANG Lian-Chun^{1 2*}

(1. Key Laboratory for Forest Genetic and Tree Improvement & Propagation in Universities of Yunnan Province, Southwest Forestry University, Kunming 650224; 2. Key Laboratory for Forest Resource Conservation and Utilization in the Southwest Mountains of China, Southwest Forestry University, Kunming 650224)

Abstract Leaves sample of *Camellia saluenensis* Stapf ex Bean was sequenced with high-throughput sequencing technology (Illumina Hiseq 2000). In total 140 996 transcripts of *C. saluenensis* were screened using MISA software. The 32 696 SSRs were identified, and the frequency of SSR was 23.2% and mean distribution density was dinucleotide 32.02 kB. The di-nucleotide repeats were the highest, followed by tri-nucleotide and mononucleotide repeat types. The tetra-nucleotide, penta-nucleotide and hexa-nucleotide were all less than 1%. Among the mononucleotide repeats, the A/T repeats motifs were the highest frequency (10.92%). AG/CT was the most frequent repeat motifs in di-nucleotide repeats (49.72%), followed by AT/AT and AC/GT. CG/CG were minimum. AAG/CTT repeats motifs was the highest in tri-nucleotide followed by ACC/GGT, ATC/ATG and AGG/CCT, while CCG/GGC, ACT/AGT and ACG/CGT were lowest (< 1%). The repeat motifs were very few in tetra-nucleotide, penta-nucleotide and hexa-nucleotide and had no obvious differences. The microsatellite number in *C. saluenensis* decreased with the increased number of repeats and length of repeats.

Key words *Camellia saluenensis* Stapf ex Bean; Transcriptome; microsatellite; high-throughput sequencing

基金项目: 云南省高校林木遗传改良与繁育重点实验室开放基金 (2017011)

第一作者简介: 王大玮 (1980—), 男, 博士, 讲师, 主要从事林木遗传育种研究。

* 通信作者 E-mail: kaixianlc@126.com

收稿日期: 2018-08-31

Foundation item: Open fund of Key Laboratory for Forest Genetic and Tree Improvement & Propagation in Universities of Yunnan Province (2017011)

First author introduction: WANG Da-Wei (1980—), male, Doctor, lecturer, major is forestry genetic breeding.

* Corresponding author E-mail: kaixianlc@126.com

Received date: 2018-08-31

怒江红山茶(*Camellia saluenensis* Stapf ex Bean.)为山茶科(Theaceae)山茶属(*Camellia*)滇山茶系植物,是腾冲红花油茶的近缘种^[1],主要分布在云南各地、四川西南和贵州西北部^[2]。其根系发达,耐瘠薄,四季常绿,花色鲜艳,有较高的观赏价值^[3];其种子富含优良油脂,是有发展前景的木本油料经济树种^[4]。目前该树种仍处于野生状态,对其研究主要集中在资源调查^[1]、优良单株选择^[3]、繁殖技术^[5-6]、经济性状和有效成份分析等方面^[2,4,7],而分子水平的研究未见报道。

微卫星标记已经广泛应用于遗传连锁图谱构建^[8-10]、遗传多样性分析^[11-13]、指纹图谱构建^[14]等研究领域。目前微卫星引物开发的方法有多种,较常用的有文库法^[15-16],近缘种开发法^[17-18],高通量测序法^[19-21],这些方法各有利弊^[22]。文库法因实验过程繁杂、效率低,目前已经很少利用此法进行开发^[23]。利用现有的近缘种微卫星引物开发同属不同物种的通用性微卫星引物也是一种较实用的引物开发方法^[24]。但 SSR 引物在同属不同种植物中的扩增效率差异较大^[25],而且需要通过大量实验来进行筛选^[26]。随着测序技术的发展,高通量测序技术凭借其大量全面的微卫星序列数据显著提高了 SSR 开发效率和通量^[25],近年来通过转录组测序开发 SSR 标记已经成为微卫星标记开发的主流途径^[27-28]。尽管山茶属植物的 SSR 引物已经开发^[29-30],但高通量测序法更加高效快捷,所以我们选择利用转录组测序技术对怒江红山茶的 SSR 引物进行开发。转录组微卫星分布特征分析为 SSR 标记的开发及应用提供了支持^[31-32]。本研究在对怒江红山茶进行转录组测序的基础上,搜寻和分析微卫星位点,并对怒江红山茶转录组中的 SSR 位点信息的分布及其序列特征进行分析,为其 SSR 标记的开发、遗传多样性、亲缘关系分析等研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及测序

在云南省红河州石屏县异龙镇放羊冲村(23°53'51"、102°46'21",海拔 1 746 m)采集怒江红山茶植株当年生幼嫩叶片,液氮保存,采用改良的 CTAB-LiCl 法提取总 RNA^[33],送至北京华诺时代科技有限公司,利用 Illumina HiSeq 2000 平台进行测序,建库测序及拼接参照云南松转录组测序流程进行^[34]。

1.2 SSR 位点的搜索与统计

利用 MISA 软件对转录组数据中 SSR 位点进行检索,搜索对象为 1~6 个核苷酸重复序列,搜索标准为:单核苷酸重复至少 10 次、二至四核苷酸重复至少 5 次、五和六核苷酸重复至少 4 次。然后再用 Excel 软件统计 SSR 的数量、出现频率、分布距离与密度、重复类型、基元组成、重复区段长度变化等,分析怒江红山茶转录组 SSR 的分布特征。

2 结果与分析

2.1 怒江红山茶转录组微卫星序列的分布丰度与距离

组装共获得怒江红山茶转录组 140 996 条无冗余的序列,总长 97 501 954 nt,平均长度 692 nt,其中聚类的有 43 173 条,单独的有 97 823 条。按照标准搜索 1~6 bp 的 SSR,共搜索到 32 696 个 SSR 位点,出现频率为 23.2%,分布平均距离为 32.02 kb,即平均 32.02 kb 出现一个 SSR 位点。

2.2 怒江红山茶转录组微卫星序列的重复单元类型分析

在怒江红山茶转录组中,SSR 类型比较丰富,对 1~6 bp 的 SSR 重复单元类型进行统计(表 1),重复单元类型以二核苷酸为主,其次是三核苷酸和单核苷酸,四、五、六核苷酸的重复单元较低,但是五核苷酸的重复单元类型高于四核苷酸和六核苷酸的重复单元(图 1)。若在不考虑单核苷酸的情况下,二、三核苷酸占总数的 92.70%,四核苷酸重复最少。各重复单元类型的出现频率和 SSR 分布的平均距离也均有差别(图 1)。其中二核苷酸 SSR 比例及频率最高(59.50%,13.80%),SSR 分布的平均距离最小(53.81 kb);四核苷酸 SSR 比例及频率最低(1.29%,0.30%),SSR 分布的平均距离最大(2 486.74 kb)。各重复单元类型的 SSR 数量和出现频率的变化规律为:二核苷酸 > 三核苷酸 > 单核苷酸 > 五核苷酸 > 六核苷酸 > 四核苷酸;不同重复类型核苷酸的平均距离各不相同,依次为:二核苷酸 < 三核苷酸 < 单核苷酸 < 五核苷酸 < 六核苷酸 < 四核苷酸,可以看出 SSR 位点的出现频率或数量越高,其平均距离就越小,分布密度就越大。

2.3 怒江红山茶转录组微卫星序列的重复基元碱基组成

不同核苷酸重复类型的重复基元所占的比例

差异较大。其中单核苷酸的重复类型中以 A/T 基元居多,占 10.92%,而 C/G 较少,仅占总数的 2.56%。二核苷酸重复类型中各基元所占比例差距较大,其中 AG/CT 基元所占比例最大,达到 49.72%,基本占了一半;AT/AT 基元和 AC/GT 基元所占比例相差不多,分别为 5.12% 和 4.59%;CG/CG 基元所占比例最少,为 0.07%,其基元所占比例顺序依次为 AG/CT > AT/AT > AC/GT > CG/CG;三核苷酸重复类型中 AAG/CTT 基元所占比例较多,为 5.56%,其次是 ACC/GGT 基元,ATC/ATG 基元和 AGG/CCT 基元,所占比例分别为 3.66%,3.00% 和 2.47%,AAC/GTT 基元,AAT/ATT 基元和 AGC/CTG 基元所占比例相差不多,分别为 1.95%,1.23% 和 1.15%,而以 CCG/GGC 基元,ACT/AGT 基元和 ACG/CGT 基元所占比例较低,都小于1%(表 2,图 2)。四、五、六核苷酸中各重复基元出现的频率均较低,所以未对其进行分析。

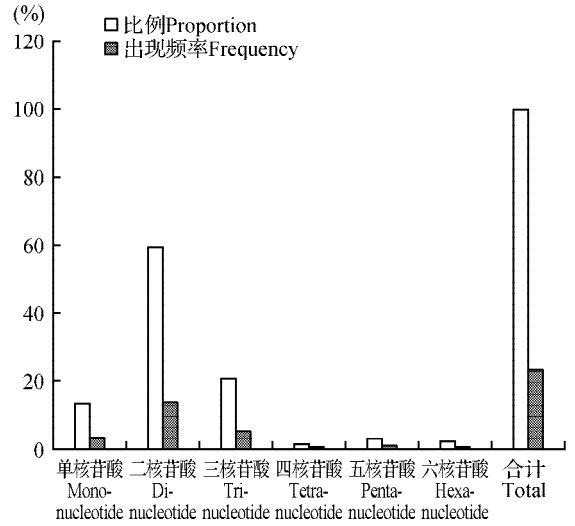


图 1 怒江红山茶转录组 SSR 各重复单元类型的比例及出现频率

Fig. 1 The proportions and frequency of each type of repeats in *C. saluenensis* Stapf ex Bean. transcriptome

表 1 怒江红山茶转录组 SSR 位点的分布

Table 1 The distribution of SSR repeat types in *C. saluenensis* transcriptome

重复类型 Repeat type	SSR 数量 SSR number	比例 Proportion(%)	出现频率 Frequency(%)	分布的平均距离 Mean distance(bp)	平均长度 Mean Length(bp)	分布密度 Distribution density (个 · Mb ⁻¹)
单核苷酸 Mono-nucleotide	4 409	13.48	3.13	237.45	16.82	6.37
二核苷酸 Di-nucleotide	19 455	59.50	13.80	53.81	15.66	28.11
三核苷酸 Tri-nucleotide	6 767	20.70	4.80	154.71	16.97	9.79
四核苷酸 Tetra-nucleotide	421	1.29	0.30	2 486.74	20.67	0.61
五核苷酸 Penta-nucleotide	915	2.80	0.65	1 144.17	20.27	1.33
六核苷酸 Hexa-nucleotide	729	2.23	0.52	1 436.10	36.00	1.05
合计 Total	32 696	100.00	23.20	32.02	13.55	47.26

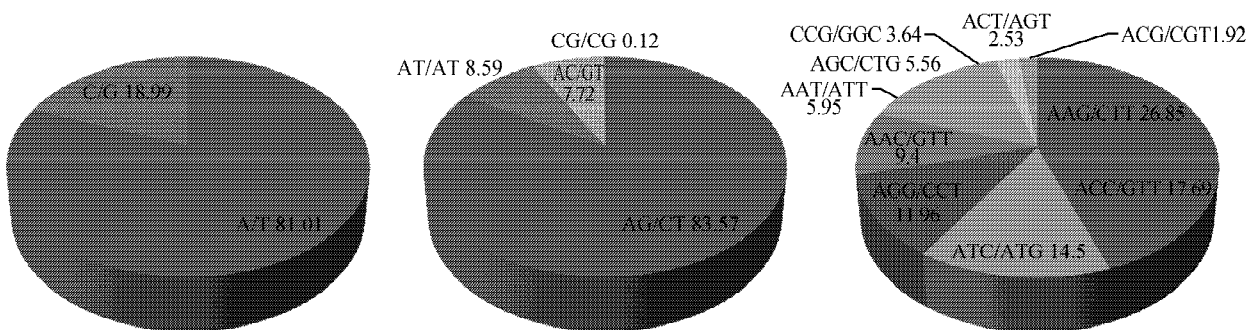


图 2 怒江红山茶转录组 SSR 各重复基元及其比例

Fig. 2 Motif proportions of each type of repeats in *C. saluenensis* transcriptome

表 2 怒江红山茶转录组 SSR 各重复基元及其比例

Table 2 The relative percentage of SSR repeat motif in

C. saluenensis Stapf ex Bean. transcriptome

重复类型 Repeat type	重复基元 Repeat motif	数量 Number	比例 Proportion (%)	各重复类型比例 Proportion of each repeat type(%)
单核苷酸 Mononucleotide	A/T	3571	10.92	81.01
	C/G	838	2.56	18.99
	小计 Total	4 409	13.48	100.00
二核苷酸 Dinucleotide	AG/CT	16 258	49.72	83.57
	AT/AT	1 672	5.12	8.59
	AC/GT	1 502	4.59	7.72
	CG/CG	23	0.07	0.12
	小计 Total	19 455	59.50	100.00
	三核苷酸 Trinucleotide	AAG/CTT	1 817	5.56
ACC/GTT		1 197	3.66	17.69
ATC/ATG		981	3.00	14.50
AGG/CCT		809	2.47	11.96
AAC/GTT		636	1.95	9.40
AAT/ATT		403	1.23	5.95
AGC/CTG		377	1.15	5.56
CCG/GGC		246	0.76	3.64
ACT/AGT		171	0.52	2.53
ACG/CGT		130	0.40	1.92
小计 Total		6 767	20.70	100.00

2.4 怒江红山茶转录组微卫星序列的基元重复次数

怒江红山茶转录组序列中各重复类型的重复次数差异较大(图 2),其中主要的微卫星序列为二核苷酸重复(59.50%),其次为三核苷酸重复(20.70%)和单核苷酸重复(13.48%),四、五、六核苷酸重复序列较少,仅占 6.32%(图 3,表 3)。其重复次数波动于 4~23 次,总体表现为重复次数随重复单元中核苷酸数量的增加而减少,其中单核苷酸重复 12~23 次,二核苷酸重复 6~12 次,三核苷酸重复 5~10 次,其余核苷酸重复 4~6 次,不同核苷酸重复类型主导的重复次数也不相同。SSR 的出现频率随重复次数的增加而降低;与此同时,随着 SSR 重复类型碱基数的增加,重复次数减少。当重复次数大于 12 次后,SSR 出现的频率明显下降,只有单核苷酸类型还有 SSR 出现,其他核苷酸类型已经没有 SSR 的出现(图 2,表 3)。总体来看,SSR 的重复次数以 4~10 次最多,占 85.50%,11~15 次的占 9.06%,重复次数在 15 次以上的不足 5.5%(图 4),表现为随着重复次数的增加,SSR 数量呈降低的趋势。

表 3 怒江红山茶转录组微卫星序列的各重复次数及数量

Table 3 Number and number of repetitions of microsatellite sequences in *C. saluenensis* transcriptome

重复次数 Repeat time	单核苷酸 Mononucleotide	二核苷酸 Dinucleotide	三核苷酸 Trinucleotide	四核苷酸 Tetranucleotide	五核苷酸 Pentanucleotide	六核苷酸 Hexanucleotide
4	0	0	0	0	865	729
5	0	0	3 586	350	50	0
6	0	4 665	1 978	71	0	0
7	0	3 645	1 127	0	0	0
8	0	4 178	74	0	0	0
9	0	4 590	0	0	0	0
10	0	2 044	2	0	0	0
11	0	325	0	0	0	0
12	1 116	8	0	0	0	0
13	678	0	0	0	0	0
14	477	0	0	0	0	0
15	358	0	0	0	0	0
16	262	0	0	0	0	0
17	261	0	0	0	0	0
18	262	0	0	0	0	0
19	312	0	0	0	0	0
20	307	0	0	0	0	0
21	252	0	0	0	0	0
22	93	0	0	0	0	0
23	31	0	0	0	0	0
总计 Total	4 409	19 455	6 767	421	915	729

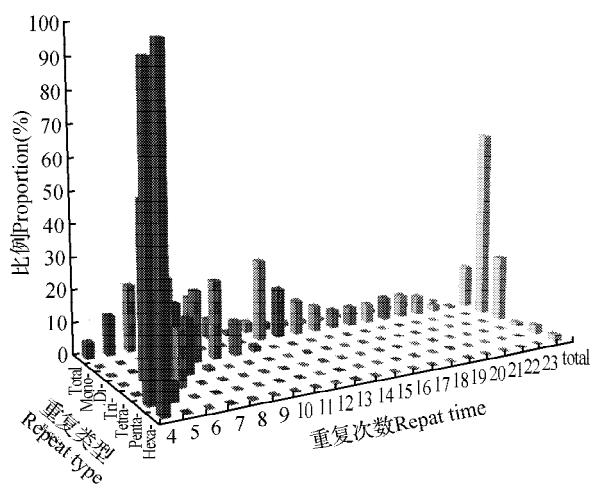


图 3 思茅松转录组各微卫星重复类型重复次数分布频率

Fig. 3 Frequency of SSR repeat types for the various number of repeats in *C. saluenensis* transcriptome

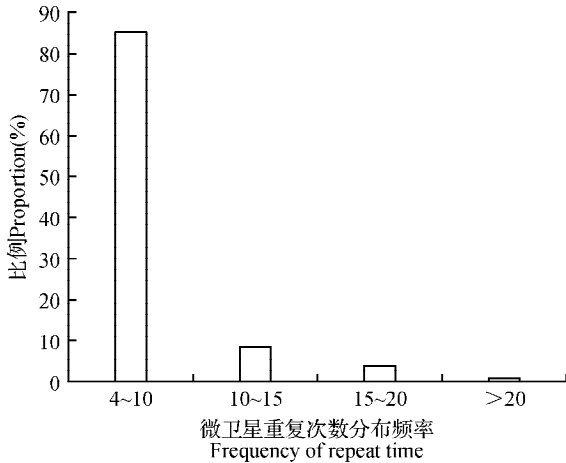


图4 怒江红山茶转录组微卫星重复次数分布频率

Fig. 4 Distribution frequency of microsatellite repeats in *C. saluenensis* Stapf ex Bean

2.5 怒江红山茶转录组微卫星序列长度分布

怒江红山茶转录组 SSR 重复片段的长度波动于 10 ~ 25 bp (图 5)。单核苷酸的重复类型的长度变化在 10 ~ 23 bp, 平均长度为 16.82 bp; 二核苷酸的重复类型的长度变化在 12 ~ 24 bp, 平均长度为 15.66 bp; 三核苷酸重复类型的长度变化于 15 ~ 30 bp, 平均长度为 18.35 bp; 四核苷酸的重复类型的长度变化在 20 ~ 24 bp, 平均长度为 20.67 bp; 五核苷酸的重复类型的长度变化在 20 ~ 25 bp, 平均长度为 20.27 bp; 六核苷酸的重复类型的长度均为 36 bp (表 2)。综合来看, 各重复区段碱基片段长度变化表现为随着重复类型碱基数的增加, 片段的平均长度也基本随之增加, 即从单核苷酸至六核苷酸, 除了二核苷酸片段的平均长度较一核苷酸减小, 其他整体呈递增的趋势。

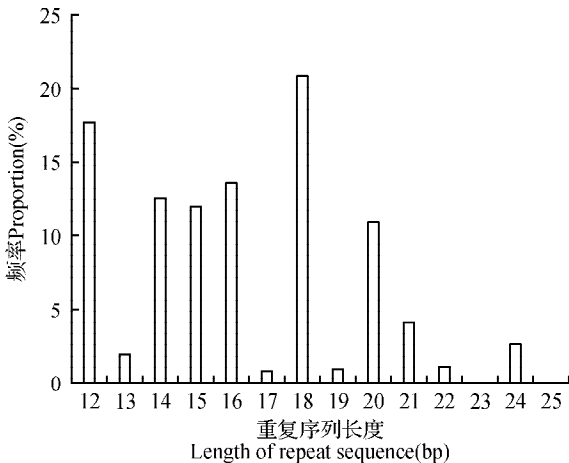


图5 怒江红山茶转录组 SSR 重复序列长度的分布频率

Fig. 5 Frequency of repeat sequence length in *C. saluenensis* transcriptome

3 讨论

通过对怒江红山茶进行转录组测序, 共得到 140 996 条无冗余的序列, 经过 SSR 位点检索, 获得 32 696 个 SSR 位点, 出现频率为 23.2%。相较于山茶属短柱茶 (*Camellia brevistyla*)、浙江红山茶 (*Camellia chekiangoleosa*) 和普通油茶 (*Camellia oleifera*)^[35-36] 而言, 怒江红山茶的 SSR 分布及发生频率较高, 这可能与物种间 SSR 的分布、搜索的标准及数据库的大小有关^[32], 也可能与含有微卫星的基因表达丰度有关^[23, 37]。

怒江红山茶转录组序列所得到的 SSR 种类较为丰富, 单核苷酸到六核苷酸类型都有重复, 其中二核苷酸重复类型最多, 所占比例达到 59.50%, 这与其近缘种普通油茶、短柱茶、浙江红山茶的研究相似, 均以二核苷酸为主要的重复类型^[35-36]。就近年来林木微卫星的研究报道来看, 模式植物杨树^[38]的重复类型以三核苷酸为主, 思茅松 (*Pinus kesiya* var. *langbianensis*)^[32]、红松 (*Pinus koraiensis*)^[39]的重复类型则以单核苷酸居多。这种占优势的重复类型在不同植物中有所差异, 但都以二核苷酸和三核苷酸重复类型居多^[40]。通常认为, 低级重复单元重复类型所占比例越高, 则该物种的进化水平越高, 而高级重复单元出现频率较高, 暗示着其进化时间较短或变异频率较低^[41-42]。怒江红山茶以二核苷酸重复所占比例最多, 意味着它可能具有较久远的进化历史或者拥有较高的变异频率。相较而言, 四碱基到六碱基重复类型较少, 并且随着重复单元碱基数的增加, SSR 的出现频率升高, 即六碱基 SSR 类型较多。而在油茶^[35]基因组序列分析中, 六碱基的重复类型最少, 这可能与检索标准、物种间 SSR 分布有关。但在云南松的研究中, 也发现六碱基较四、五碱基多的情况, 这可能与密码子以三碱基为一个单元有关, 造成了三碱基位移^[43]。

不同核苷酸重复类型的重复单元所占的比例差异较大。本研究中, 二核苷酸重复类型以 AG/CT 单元占多数, 三核苷酸重复类型以 AAG/CTT、ACC/GGT 和 ATC/ATG 单元较多, 与油茶^[35-36]和山茶属茶树 (*Camellia sinensis*) EST 序列微卫星的分布特征相似^[44-45]。Li 等^[46]也认为植物微卫星中最主要的三核苷酸重复单元是 AAG 重复, 但在对油茶基因组序列的研究中三核苷酸重复类型则以 AAT 最多^[35-36], 初步推断这可能与检索标准和

基因库的大小有关。此外,怒江红山茶中还发现了 23 个 CG/CG 单元和 246 个 CCG/CGG 重复单元,这在双子叶植物中是比较少见的,其含量也远高于大多数植物,但其含量与已经报道过的山茶属植物相似。在杨树基因组微卫星的研究中 SSR 的 GC 含量与微卫星的功能密切相关^[47],这也进一步证明怒江红山茶转录组 SSR 具有较高的特异性,但与其相关的功能还有待进一步研究。

微卫星位点的多态性主要是因为重复类型、碱基数以及基元重复次数不同而形成序列长度多态性^[48],一般重复次数越多,变异性越大,其多态性潜力越高^[49]。从重复类型来看,除单碱基外,怒江红山茶转录组 SSR 的丰度随各对应重复类型碱基数的增加而减少,并且二、三碱基微卫星的丰度明显高于其他类型,这在油茶^[35]、浙江红山茶^[36]、云南松(*Pinus yunnanensis*)^[34]等其他研究中也出现过类似报道。因此,这种特征并不是怒江红山茶所特有的。从基元的重复次数来看,怒江红山茶微卫星数量随着重复次数增加呈递减趋势,重复次数为 4~23 次,其中六核苷酸重复微卫星理论多态性最低,而单核苷酸以及二核苷酸重复微卫星理论多态性最高。在一定程度上说明单碱基及二碱基在整个怒江红山茶转录组中变异最为活跃,这也表明了利用具有高度遗传多样性的单碱基或二碱基的 SSR 作为标记,开发怒江红山茶的 SSR 标记是可行的。

总体来看,怒江红山茶微卫星序列特征的分析表明其挖掘的 32 696 个 SSR 位点出现频率较高、分布距离较近、重复类型以及重复基元较为丰富,具有较高的多态性,基于这些序列设计的引物具有高多态性的潜力,可为怒江红山茶 SSR 引物的开发奠定基础,且获取的怒江红山茶微卫星序列较为完整,由此开发获得的 SSR 标记对于其与山茶属植物以及其他近源种的研究都具有一定的价值。

参 考 文 献

1. 韦子荣,谢胤.腾冲县怒江红山茶种质资源调查与保护开发[J].林业调查规划,2014,39(6):77-79,83.
Wei Z R,Xie Y. Germplasm resource survey of *Camellia saluenensis* and its conservation and development in Tengchong County[J]. Forest Inventory and Planning, 2014, 39(6):77-79,83.
2. 刘云,阙欢,王连春,等.怒江山茶籽油主要理化成分分析[J].粮食与油脂,2012,25(3):33-34.
Liu Y,Kan H,Wang L C, et al. Analysis on main physical

- and chemical composition of *Camellia saluenensis* stapf ex bean seed oil[J]. Cereals & Oils, 2012, 25(3):33-34.
3. 叶红莲,王连春.多指标综合选择野生怒江红山茶优良单株[J].中南林业科技大学学报,2016,36(6):66-69,74.
Ye H L,Wang L C. A comprehensive selection superior individual of wild *Camellia saluenensis* with multiple indices[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2016, 36(6):66-69,74.
4. 杨冰,霍达,袁丛军,等.怒江红山茶果实成熟后期的脂肪酸变化研究[J].绿色科技,2016(5):6-8.
Yang B,Huo D,Yuan C J, et al. The variation of fatty acid composition of *Camellia saluenensis* stapf ex bean at late stage of maturity[J]. Journal of Green Science and Technology, 2016(5):6-8.
5. 罗芳,王连春,尹增华,等.怒江山茶与白花油茶不同嫁接组合苗根系生长特性对比[J].安徽农业科学,2013,41(1):191-194.
Luo F,Wang L C,Yin Z H, et al. Root character comparison among different grafting seedlings of *Camellia saluenensis* and *Camellia oleifera*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2013, 41(1):191-194.
6. 王国祥,楚永兴.怒江山茶种子育苗技术[J].中国园艺文摘,2013(6):171-172.
Wang G X,Chu Y X. Nujiang *Camellia* seed breeding technology[J]. Chinese Horticulture Abstracts, 2013(6):171-172.
7. 杨春鹏.怒江红山茶的化学成分研究[D].昆明:云南中医学院,2016.
Yang C P. Study on chemical constituents of Nujiang red *Camellia*[D]. Kunming:Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, 2016.
8. Li Y,Wang D W,Li Z Q, et al. A molecular genetic linkage map of *Eucommia ulmoides* and quantitative trait loci (QTL) analysis for growth traits[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(2):2053-2074.
9. Sraphet S,Ponsit T,Suksee N, et al. Genetic linkage map of cassava(*Manihot esculenta* Crantz) based on rubber tree and cassava simple sequence repeat markers[J]. Journal of Crop Improvement, 2016, 30(5):552-561.
10. Wu J,Li L T,Li M, et al. High-density genetic linkage map construction and identification of fruit-related QTLs in pear using SNP and SSR markers[J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(20):5771-5781.
11. Liu S Y,Feuerstein U,Luesink W, et al. DarT,SNP, and SSR analyses of genetic diversity in *Lolium perenne* L. using bulk sampling[J]. BMC Genetics, 2018, 19:10.
12. Yang H S,Li X P,Liu D J, et al. Genetic diversity and population structure of the endangered medicinal plant *Phellodendron amurense* in China revealed by SSR markers

- [J]. Biochemical Systematics and Ecology ,2016 ,66 :286 -292.
13. Kherwar D ,Usha K ,Mithra S V A ,et al. Microsatellite (SSR) marker assisted assessment of population structure and genetic diversity for morpho-physiological traits in guava(*Psidium guajava* L.) [J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 2018 ,27(3) :287 -292.
 14. Meng Y S ,Zhao N ,Li H ,et al. SSR fingerprinting of 203 sweetpotato(*Ipomoea batatas*(L.) Lam.) varieties[J]. Journal of Integrative Agriculture 2018 ,17(1) :86 -93.
 15. 王久利 雷淑芸 陈世龙 等. 基于磁珠富集法开发并筛选四川红景天的微卫星标记[J]. 广西植物 ,2017 ,37(3) :342 -347.
Wang J L ,Lei S Y ,Chen S L ,et al. Development and screening of SSR markers in *Rhodiola alsia* with magnetic beads method[J]. Guihaia 2017 ,37(3) :342 -347.
 16. 叶占洋 王兆山 李云晓 等. 中国特有濒危植物翅果油树的 SSR 引物开发及特性(英文) [J]. 西北植物学报 ,2016 ,36(2) :274 -279.
Ye Z Y ,Wang Z S ,Li Y X ,et al. Development and characterization of microsatellite markers in the *Elaeagnus mollis* Diels [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica ,2016 ,36(2) :274 -279.
 17. Wang L X ,Chen H L ,Bai P ,et al. The transferability and polymorphism of mung bean SSR markers in rice bean germplasm [J]. Molecular Breeding 2015 ,35(2) :77.
 18. 蔡年辉 许玉兰 王大玮 等. 思茅松 EST-SSR 标记在几种松属植物中的通用性分析[J]. 西南林业大学学报 ,2017 ,37(4) :8 -14.
Cai N H ,Xu Y L ,Wang D W ,et al. The transferability analysis of *Pinus kesiya* var. *langbianensis* EST-SSR markers to several Pine species[J]. Journal of Southwest Forestry University 2017 ,37(4) :8 -14.
 19. 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.
Huang H Y ,Du H Y ,Wuyun T N ,et al. Development of SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of *Eucommia ulmoides*[J]. Scientia Silvae Sinicae 2013 ,49(5) :176 -181.
 20. 李炎林 杨星星 张家银 等. 南方红豆杉转录组 SSR 挖掘及分子标记的研究[J]. 园艺学报 2014 ,41(4) :735 -745.
Li Y L ,Yang X X ,Zhang J Y ,et al. Studies on SSR Molecular Markers Based on Transcriptome of *Taxus chinensis* var. *mairei*[J]. Acta Horticulturae Sinica ,2014 ,41(4) :735 -745.
 21. 阮婧媛 王兵益 欧阳志勤 等. 极度濒危植物巧家五针松基因组微卫星特征分析[J]. 植物研究 2016 ,36(5) :775 -781.
Ruan Z Y ,Wang B Y ,Ouyang Z Q ,et al. Characterization of microsatellites in genome of *Pinus squamata* a critically endangered species in the world[J]. Bulletin of Botanical Research 2016 ,36(5) :775 -781.
 22. 李明芳 郑学勤. 开发 SSR 引物方法之研究动态[J]. 遗传 2005 ,26(5) :769 -776.
Li M F ,Zheng X Q. Research progress of methods of SSR primers development[J]. Hereditas 2005 ,26(5) :769 -776.
 23. 程小毛 黄晓霞. SSR 标记开发及其在植物中的应用[J]. 中国农学通报 2011 ,27(5) :304 -307.
Cheng X M ,Huang X X. Development and application of SSR markers in plants[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin 2011 ,27(5) :304 -307.
 24. 石晓蒙 温强 曹牧 等. 基于近缘种微卫星引物的栓皮栎 SSR 标记开发及群体检测[J]. 分子植物育种 2017 ,15(2) :633 -639.
Shi X M ,Wen Q ,Cao M ,et al. Transferability analysis and genetic diversity of SSR markers in relative *Quercus* L. species to *Quercus variabilis*[J]. Molecular Plant Breeding ,2017 ,15(2) :633 -639.
 25. 饶龙兵 杨汉波 郭洪英 等. 基于桉木属转录组测序的 SSR 分子标记的开发[J]. 林业科学研究 2016 ,29(6) :875 -882.
Rao L B ,Yang H B ,Guo H Y ,et al. Development of SSR molecular markers based on transcriptome sequences of *Alnus*[J]. Forest Research 2016 ,29(6) :875 -882.
 26. 殷亚茹. 杨树和柳树微卫星特征分析及通用引物开发[D]. 南京 南京林业大学 2017.
Yin Y R. Characterization of microsatellites in poplar and willow and development of their universal primers[D]. Nanjing :Nanjing forestry University 2017.
 27. 贺圆 王兵益 廖声熙 等. 云南松基因组微卫星序列特征分析[J]. 西北林学院学报 2017 ,32(3) :104 -107.
He Y ,Wang B Y ,Liao S X ,et al. Characteristic analysis of microsatellites of *Pinus yunnanensis*[J]. Journal of Northwest Forestry University 2017 ,32(3) :104 -107.
 28. Cai N H ,Xu Y L ,Wang D W ,et al. Identification and characterization of microsatellite markers in *Pinus kesiya* var. *langbianensis*(Pinaceae) [J]. Applications in Plant Sciences 2017 ,5(2) :1600126.
 29. Liu S R ,An Y L ,Li F D ,et al. Genome-wide identification of simple sequence repeats and development of polymorphic SSR markers for genetic studies in tea plant(*Camellia sinensis*) [J]. Molecular Breeding 2018 ,38(5) :59.
 30. Sharma R K ,Bhardwaj P ,Negi R ,et al. Identification , characterization and utilization of unigene derived microsatellite markers in tea(*Camellia sinensis* L.) [J]. BMC Plant Biology 2009 ,9 :53.
 31. 魏琦琦 林青 贾宝光 等. 枣转录组序列的微卫星特征分析[J]. 中南林业科技大学学报 2015 ,35(6) :93 -97.

- Wei Q Q, Lin Q, Jia B G, et al. Microsatellites characteristics of transcriptomic sequences from *Ziziphus jujuba* cv. 'Zhongqiusucui' [J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology 2015, 35(6): 93-97.
32. 邓丽丽, 李德龙, 蔡年辉, 等. 基于高通量测序的思茅松微卫星位点的特征分析 [J]. 中南林业科技大学学报, 2016, 36(10): 72-77, 93.
Deng L L, Li D L, Cai N H, et al. Characteristic analysis of microsatellite in *Pinus kesiya* var. *langbianensis* by using high-throughput sequencing [J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology 2016, 36(10): 72-77, 93.
33. 李德龙, 周军, 王大玮, 等. 苹果 NAC 转录因子的克隆与全基因组生物信息学分析 [J]. 基因组学与应用生物学 2017, 36(6): 2507-2517.
Li D L, Zhou J, Wang D W, et al. Cloning and whole genomes bioinformatics analysis of NAC transcription factor genes in apple [J]. Genomics and Applied Biology 2017, 36(6): 2507-2517.
34. 蔡年辉, 许玉兰, 徐杨, 等. 云南松转录组 SSR 的分布及其序列特征 [J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2015, 37(5): 770-778.
Cai N H, Xu Y L, Xu Y, et al. The distribution and characteristics of SSR in transcriptome of *Pinus yunnanensis* [J]. Journal of Yunnan University 2015, 37(5): 770-778.
35. 温强, 徐林初, 江香梅, 等. 基于 454 测序的油茶 DNA 序列微卫星观察与分析 [J]. 林业科学 2013, 49(8): 43-50.
Wen Q, Xu L C, Jiang X M, et al. Survey and analysis of microsatellites from DNA sequences in *Camellia* species using 454 pyrosequencing [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2013, 49(8): 43-50.
36. 史洁, 尹佟明, 管宏伟, 等. 油茶基因组微卫星特征分析 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2012, 36(2): 47-51.
Shi J, Yin T M, Guan H W, et al. Characteristic analysis of microsatellites of *Camellia* spp. [J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Science Edition 2012, 36(2): 47-51.
37. 徐宁迎, Thomsen H, Reinsch N, 等. 利用微卫星进行奶牛数量性状基因位点定位的研究 [J]. 遗传学报 2000, 27(9): 772-776.
Xu N Y, Thomsen H, Reinsch N, et al. Study of mapping QTLs for milk traits on the German dairy cattle [J]. Acta Genetica Sinica 2000, 27(9): 772-776.
38. 刘菁菁, 戴晓港, 王洁, 等. 杨树微卫星序列对基因表达频率的影响及表达序列中微卫星特征的分析 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2011, 35(1): 11-14.
Liu J J, Dai X G, Wang J, et al. Effect of microsatellites on gene expression level and characteristics of expressed SSRs in poplars [J]. Journal of Nanjing Forestry University: Nat-
ural Science Edition 2011, 35(1): 11-14.
39. 张振, 张含国, 莫迟, 等. 红松转录组 SSR 分析及 EST-SSR 标记开发 [J]. 林业科学 2015, 51(8): 114-120.
Zhang Z, Zhang H G, Mo C, et al. Transcriptome sequencing analysis and development of EST-SSR markers for *Pinus koraiensis* [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2015, 51(8): 114-120.
40. Aggarwal R K, Hendre P S, Varshney R K, et al. Identification, characterization and utilization of EST-derived genic microsatellite markers for genome analyses of coffee and related species [J]. Theoretical and Applied Genetics 2007, 114(2): 359.
41. Tóth G, Gáspári Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis [J]. Genome Research 2000, 10(7): 967-981.
42. Harr B, Schlötterer C. Long microsatellite alleles in *Drosophila melanogaster* have a downward mutation bias and short persistence times, which cause their genome-wide underrepresentation [J]. Genetics, 2000, 155(3): 1213-1220.
43. Metzgar D, Bytof J, Wills C. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA [J]. Genome Research 2000, 10(1): 72-80.
44. 金基强, 崔海瑞, 龚晓春, 等. 用 EST-SSR 标记对茶树种质资源的研究 [J]. 遗传 2007, 29(1): 103-108.
Jin J Q, Cui H R, Gong X C, et al. Studies on tea plants (*Camellia sinensis*) germplasm using EST-SSR marker [J]. Hereditas (Beijing) 2007, 29(1): 103-108.
45. Sharma H, Kumar R, Sharma V, et al. Identification and cross-species transferability of 112 novel unigene-derived microsatellite markers in tea (*Camellia sinensis*) [J]. American Journal of Botany 2011, 98(6): 133-138.
46. Li Y C, Korol A B, Fahima T, et al. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution [J]. Molecular Biology and Evolution 2004, 21(6): 991-1007.
47. Li SX, Yin T M. Map and analysis of microsatellites in the genome of *Populus*: the first sequenced perennial plant [J]. Science in China Series C: Life Sciences, 2007, 50(5): 690-699.
48. 王森, 张震, 姜倪皓, 等. 半夏转录组中的 SSR 位点信息分析 [J]. 中药材 2014, 37(9): 1566-1569.
Wang S, Zhang Z, Jiang N H, et al. SSR information in transcriptome of *Pinellia ternata* [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials 2014, 37(9): 1566-1569.
49. 雷淑芸, 高庆波, 付鹏程, 等. 基于 Solexa 高通量测序的唐古特红景天 (*Rhodiola algida*) 微卫星信息分析 [J]. 植物研究 2014, 34(6): 829-834.
Lei S Y, Gao Q B, Fu P C, et al. Analysis on microsatellites in *Rhodiola algida* based on solexa sequencing [J]. Bulletin of Botanical Research 2014, 34(6): 829-834.