

一组新的小麦 EST-SSR 标记开发及其在遗传图谱构建中的应用

吕冰冰¹, 代 畅¹, 彭正松², YAMAMOTO Naoki¹, 吴一超¹, 魏淑红¹, 杨在君¹

(1. 西华师范大学 生命科学学院, 西南野生动植物资源保护教育部重点实验室, 四川 南充 637009;

2. 西昌学院 农业科学学院, 四川 西昌 615013)

摘要:为了丰富小麦功能分子标记的数量,为小麦功能基因的定位、比较基因组学、小麦起源和进化等方面的研究奠定基础。从前期利用小麦转录组数据鉴定出的 8 389 个 EST-SSR 序列中,随机选取 585 对引物得分大于 95 的标记进行分析,以川麦 42 和川农 16 杂交后自交获得的重组自交系群体为试验材料,利用新开发出的 EST-SSR 标记,并结合 SSR 标记和 SRAP 标记,构建了一张遗传图谱。结果表明,585 对 EST-SSR 引物中有 555 对能在亲本川麦 42 和川农 16 中扩增出稳定清晰的条带,引物有效性为 94.87%。其中有 44 对 EST-SSR 引物在川麦 42 和川农 16 中表现出明显的、稳定的多态性,多态性率为 7.93%。所构建的遗传图谱中含有本次新开发的 EST-SSR 标记的连锁群共 12 个,由 163 个标记组成,包括 17 个 EST-SSR 标记,73 个 SSR 标记和 73 个 SRAP 标记,覆盖小麦基因组长度 1 551.5 cM,相邻标记之间的平均距离为 13.11 cM。本研究丰富了小麦功能分子标记的数量,为小麦功能基因的定位、比较基因组学、小麦起源和进化等方面的研究奠定基础。

关键词:小麦;EST-SSR 标记;遗传图谱;RIL

中图分类号:Q37;S512.03 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2020)04-0057-07

doi:10.7668/hbxb.20191046



Development of a New Set of EST-SSR Markers and Their Application in Genetic Map Construction in Wheat

LÜ Bingbing¹, DAI Chang¹, PENG Zhengsong², YAMAMOTO Naoki¹,
WU Yichao¹, WEI Shuhong¹, YANG Zaijun¹

(1. Key Laboratory of Southwest China Wildlife Resources Conservation (Ministry of Education),
College of Life Science, China West Normal University, Nanchong 637009, China;

2. School of Agricultural Science, Xichang University, Xichang 615013, China)

Abstract: In order to enrich the number of wheat functional molecular markers, lay the foundation for the research of wheat functional gene location, comparative genomics, wheat origin and evolution. In previous studies, 8 389 potential EST-SSRs were identified from wheat transcriptome data. In the present study, 585 pairs of primers were randomly selected for further analysis from 8 389 EST-SSR primers with a primer score of more than 95 points. And a wheat genetic map for the recombinant inbred line population derived from Chuanmai 42 × Chuannong 16 was constructed using these newly developed EST-SSR markers and combined with SRAP markers and SSR markers. The results showed that 555 of the 585 pairs of primers were able to amplify the stable and clear bands in Chuanmai 42 and Chuannong 16, and the primer efficacy was 94.87%. Of these, 44 pairs of EST-SSRs exhibited obvious and stable polymorphisms in parents with a polymorphism rate of 7.93%. There were 12 linkage groups in the genetic map containing newly developed EST-SSR markers. And these 12 linkage groups were composed of 163 markers, including 17 EST-SSRs markers, 73 SSR markers, and 73 SRAP markers. The average distance between adjacent markers of 13.11 cM, and covering wheat genome length of 1 551.5 cM. This study enriched the number of func-

收稿日期:2020-05-18

基金项目:国家自然科学基金项目(31760425);西华师范大学英才基金项目(17YC355)

作者简介:吕冰冰(1996-),女,四川广元人,在读硕士,主要从事植物遗传学研究。

通讯作者:杨在君(1981-),男,四川仪陇人,教授,博士,主要从事小麦遗传育种研究。

tional molecular markers in wheat and laid the foundation for the study of wheat functional genes localization, comparative genomics, wheat origin and evolution.

Key words: Wheat; EST-SSR marker; Genetic map; RIL

微卫星 DNA (Microsatellites) 或称简单重复序列 (Simple sequence repeats, SSRs), 是一种广泛存在于原核生物和真核生物基因组中的串联重复序列, 其重复单元一般由 2~6 个核苷酸组成^[1]。与其他分子标记相比, SSR 标记具有分布随机、数量丰富、信息含量高、等位基因变异多、共显性遗传、稳定性好、操作简便优点, 目前已广泛应用于遗传图谱构建、分子标记辅助选择育种、遗传多样性分析和品种鉴定等领域^[2-4]。SSR 标记可以从保守程度较高的编码区获取, 也可以从非编码区获取^[5]。传统的基因组 SSR 标记开发相对耗时, 价格也比较昂贵。基于表达序列标签 (Expressed sequence tags, EST) 或 cDNA 序列开发的 SSR 标记被称为 EST-SSR 标记^[6], EST-SSR 标记是基于已有的 EST 或转录组等公共数据库资源开发, 省去了 SSR 引物开发过程中的克隆和测序步骤, 大幅度降低了开发成本^[3]。与传统的基因组 SSR 标记相比, EST-SSR 反映了蛋白质编码区的信息, 与基因的表达具有直接或间接的关系, 是功能基因的“绝对”的标记。因此, 这类标记对于功能基因分离、基因组比较作图和遗传图谱的构建具有更为重要的作用^[7-9]。

普通小麦 (*Triticum aestivum* L., $2n = 6x = 42$) 是世界上重要的粮食作物之一。目前利用 SSR 标记、SNP 标记和 SRAP 标记已构建了多张小麦的遗传图谱^[10-12], 这些标记也为小麦的分子标记辅助选择育种奠定了基础。尽管从已公布的小麦的 EST 数据库中开发了一些 EST-SSR 标记^[13-15], 但是与其他物种相比, 利用小麦的转录组数据开发 EST-SSR 标记还相对较少。西华师范大学西南野生动植物资源保护教育部重点实验室前期从小麦雄蕊同源转化为雌蕊突变体 (HTS-1) 的正常雌蕊 (P)、雌蕊化雄蕊 (PS) 和正常雄蕊 (S) 中获得了 40.88 G 的转录组数据, 并从这些数据中心挖掘出 8 389 条 EST-SSR 序列^[16]。本研究从 8 389 对 EST-SSR 引物中随机选取了 585 对得分大于 95 分的引物进行合成, 并在小麦中检测其有效性。以川麦 42 与川农 16 杂交并自交后的 RIL 群体为作图群体, 利用筛选出的 EST-SSR 标记, 结合本实验室前期筛选的小麦基因组 SSR 标记和 SRAP 标记构建了一张遗传图谱。本研究旨在丰富小麦功能分子标记的数量, 为小麦功能基因的定位、比较基因组学、小麦起源和进化等方面的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

川麦 42 与川农 16 杂交后再自交构建的重组自交系群体 (RILs), F_{14} (2018 年), 共 125 个家系, 该群体由四川省农业科学院的杨武云研究员馈赠。每一个家系种植 1 行, 行距 0.2 m, 株距 0.2 m, 常规大田水肥管理, 次年 3 月采集 3~4 片新鲜嫩叶, 液氮速冻后置于 -80°C 超低温冰箱中保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 利用植物 DNA 提取试剂盒 (兰博生物, 中国浙江) 提取川麦 42、川农 16 及其 RILs 家系幼叶的基因组 DNA。具体操作参照试剂盒的说明书进行。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性, Nanodrop 2000 微量紫外-可见分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度, 选择无降解、纯度高的 DNA 样品用于后续试验。

1.2.2 EST-SSR 位点筛选及引物设计 从本实验室前期利用转录组分析筛选的 8 389 个 SSR 位点中选取 585 个位点用于引物设计^[17], 选取原则为: 二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸的重复基元的重复次数分别大于或等于 10, 7, 5, 4, 3, SSR 位点大于或等于 20 bp, EST 序列长度大于 150 bp。利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 引物得分大于 95 分, 所有 EST-SSR 引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成。

1.2.3 PCR 扩增及引物筛选 利用川麦 42 和川农 16 的 DNA 对 585 对 EST-SSR 引物进行初步筛选。PCR 反应体系为 $10.0\ \mu\text{L}$; $2 \times \text{Taq Master Mix}$ $5\ \mu\text{L}$; $10\ \mu\text{mol/L}$ 的正向引物 (F) 和反向引物 (R) 各 $0.5\ \mu\text{L}$; $30 \sim 50\ \text{ng}/\mu\text{L}$ 的模板 DNA $1\ \mu\text{L}$; ddH₂O $3\ \mu\text{L}$ 。为减少非特异性扩展, 本试验采用 Touchdown PCR 程序: 95°C 预变性 3 min; 95°C 变性 30 s, 65°C 退火 60 s (每一循环减 1°C), 72°C 延伸 60 s, 共 10 个循环; 95°C 变性 30 s, $55 \sim 62^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s (引物的退火温度如表 1 所示), 72°C 延伸 60 s, 共 30 个循环, 72°C 继续延伸 5 min。首先, 采用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测是否扩增成功; 其次, 采用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳筛选具有多态性的引物; 最后选择多态性引物对 125 个 RIL 家系进行 PCR 扩增和聚丙烯酰胺凝胶电泳。

1.2.4 遗传图谱的构建 对聚丙烯酰胺凝胶电泳结果的带型进行统计,将与母本川麦 42 带谱一致的标记为“A”,与父本川农 16 带谱一致的表记为“B”,具有双亲带谱(杂合体)的标记为“H”,整合本实验室之前筛选的 SRAP 引物和 SSR 引物^[18],利用 Jionmap 4.0 软件构建遗传图谱,作图函数为 Kosambi,设置 LOD > 3.0,最大遗传距离为 50 cM,其他为默认参数。

2 结果与分析

2.1 引物有效性和多态性分析

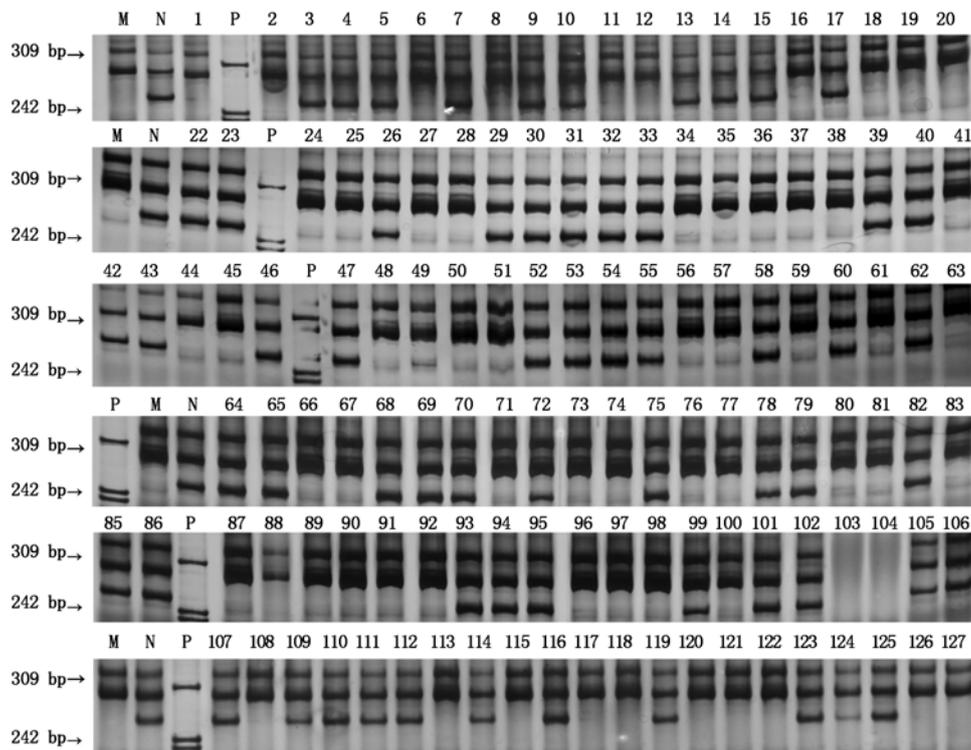
利用亲本川麦 42 与川农 16 对 585 对 EST-SSR 引物进行有效性检测,其中 555 对引物在双亲中能扩增出清晰、稳定的条带,其条带大小在 100 ~ 300 bp,有效性达 94.87%。其余 30 对被视为无效引物,其中 2 对引物的扩增条带太大(超过 500 bp),6 对引物的扩增条带小于 50 bp,22 对引物在双亲中均无扩增条带。555 对有效引物中有 69 对引物在川麦 42 和川农 16 中表现出多态性,占 12.43%。随机选取 20 个 RILs 单株进一步验证引物的多态性,结果有 44 对引物表现出清晰的、稳定的多态性条带,多态性率为 7.93%,*comp584* 引物扩增结果如图 1 所示。这些引物可作为小麦新的 EST-SSR 标记(部分引物序列如表 1 所示)。

2.2 标记偏分离分析

亲本之间具有多态性的 EST-SSR 标记的 2 种基因型在 RILs 作图群体中的比例应符合 1:1,对 44 个 EST-SSR 标记 2 种基因型在作图群体中的分布进行 χ^2 检验表明,在 0.05 水平上有 13 个标记表现为偏分离,占总的 EST-SSR 标记的 29.5%。在 13 个偏分离标记中有 12 个标记偏向川麦 42,仅 1 个偏向川农 16。

2.3 遗传图谱构建

利用上述 44 个 EST-SSR 标记扩增 RILs 群体的 125 个系,并整合本实验室前期的 SSR 标记和 SRAP 标记数据构建小麦遗传图谱。该图谱由 163 个标记组成,这些标记分布在 12 个连锁群上,其中新开发的 EST-SSR 标记 17 个,SSR 标记和 SRAP 标记各 73 个。这些标记覆盖小麦基因组长度 1 551.5 cM,相邻标记之间的平均距离为 13.11 cM(图 2)。其中位于 B 染色体组上标记最多,共 95 个,包括 SRAP 标记 43 个,SSR 标记 44 个,EST-SSR 标记 8 个,覆盖长度 707.4 cM;D 染色体组上标记最少,仅 11 个,包括 2 个 SRAP 标记,7 个 SSR 标记和 2 个 EST-SSR 标记,覆盖长度为 231.5 cM。新开发的 17 个 EST-SSR 标记在 1B 染色体上最多,有 4 个;其次是 1A 和 4A 染色体,各 2 个 EST-SSR 标记分布;在 2B、3A、3B、3D、4B、5A、5B、6A、6D 染色体上各有 1 个。在具有多态性的 EST-SSR 标记中能够定位到染色体上的标记为 38.6%(表 2)。



M. 川麦 42; N. 川农 16; P. pBR322 Marker; 缺少编号为 21 和 84 的株系。
M. Chuanmai 42; N. Chuannong 16; P. pBR322 Marker; Missing lines with numbers 21 and 84.

图 1 引物 *comp584* 扩增川麦 42 × 川农 16 重组自交系的聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 1 SDS-PAGE of RILs derived from Chuanmai 42 × Chuannong 16 amplified by *comp584* primers

表 1 位于遗传图谱上的 17 对 EST-SSR 引物特点

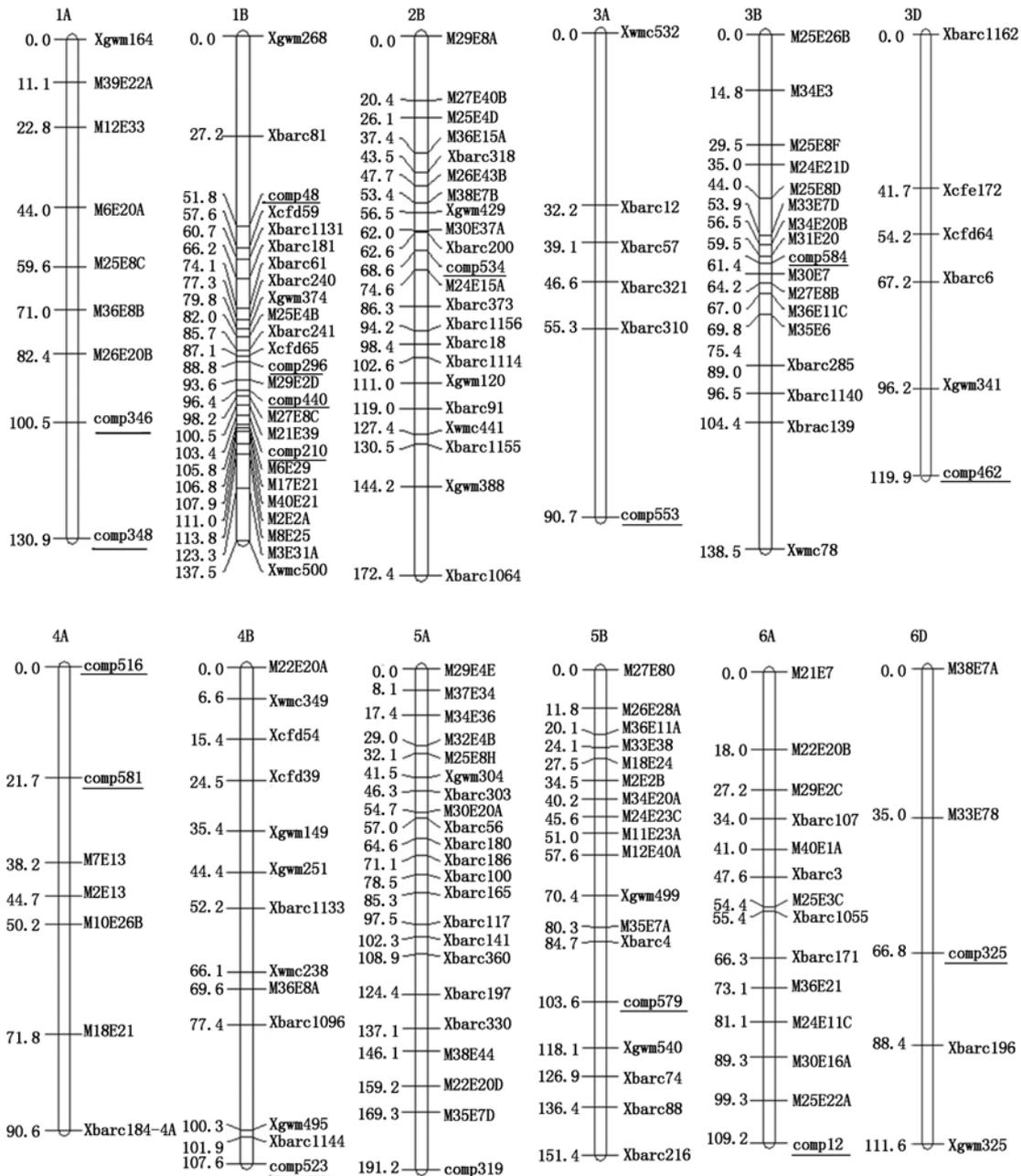
Tab.1 The characteristics of 17 pairs of EST-SSR primers on the genetic map

引物名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Primer sequences	重复单元 Repetitive unit	预期片段大小/bp Expected segment size	退火温度/°C Annealing temperature
comp12	F: GTTCTTCCTCAACTCCGCCA R: CACCAACTCCTTCCTCACCC	(TCG)7	256	59
comp48	F: CCGAGGTCCACCAGATCTG R: CACCTCACCGCCTCAGAAAG	(GCGA)5	213	60
comp210	F: TACACCGGCGAATTCAGTCC R: GAGGTAACAACCGGACAGGG	(ATCC)5	215	61
comp296	F: CCTGGTTGCTTGCTTGCTT R: ACATGGTGGATCTGCATGCA	(TGT)5	164	59
comp319	F: CATCAAGGTATCGGCCACCA R: CAGTCAGTCAGTCAGGCAGG	(AGC)6	176	60
comp325	F: CAACAAGAACAAGTGC GGCA R: ATCGGATCGGATCGGAGGAT	(CCGAC)5	170	60
comp346	F: CCCAACCAATCTCACTCACTGA R: TAACAAGAGGCCACAGCAGG	(GT)8	158	59
comp348	F: GCAAAGCCGCTCTTTTTCA R: AGACTGTCTCCCCTCACTC	(TA)6	198	59
comp440	F: GGTGACCATCCGCGATGTAT R: TCCCCTTGAATCCACAACGG	(CCG)5	235	61
comp462	F: CGGAAGGATCAGAGGCTCAG R: GCTCTGTGCGCATTACAAA	(AG)6	240	60
comp516	F: TTCATGCCCCAACGTCTCTC R: AAAGGCAGTAGCACCTCCAC	(GCC)5	256	58
comp523	F: CAGGTTGCTGTTGCTTGC R: GAATAGCCTTCGCCAGTCCA	(CGC)5	258	59
comp534	F: GATGCTCGCGCTCTCCATC R: TCGCACAGCCAAAACATTC	(CAAG)5	265	61
comp553	F: GAGCTAACAAACGGCGGTAGA R: CGGCAATCGGGATCTTCGTA	(TGC)5	272	58
comp579	F: AGCCGATCGGGTGA AACAT R: GATCGACCAAGCTCCACGAA	(GCG)5	280	60
comp581	F: CACCAAACGCTTCTFGGTGG R: CATCACCAAGCACTCCCTGAG	(GCG)5	270	61
comp584	F: CCCACATCTGACACGAACCA R: CGGCTGTCTGGCAATGAAT	(AT)6	280	61

表 2 分子标记在 12 条染色体上的分布

Tab.2 Distribution of molecular markers on the 12 chromosomes

基因组 Genome	染色体 Chromosome	EST-SSR 位点数 Number of EST-SSR loci	SRAP 位点数 Number of SRAP loci	SSR 位点数 Number of SSR loci	长度/cM Length	平均距离/cM Distance
A	1A	2	6	1	130.9	14.54
	3A	1	0	5	90.7	15.11
	4A	2	4	1	90.6	12.94
	5A	1	9	12	191.2	8.69
	6A	1	9	3	109.2	8.40
	小计	7	28	22	612.6	10.84
	B	1B	4	10	11	137.5
2B		1	8	13	172.4	7.84
3B		1	12	4	138.5	8.15
4B		1	2	10	107.6	8.28
5B		1	11	6	151.4	8.41
小计		8	43	44	707.4	7.45
D	3D	1	0	5	119.9	19.98
	6D	1	2	2	111.6	22.32
	小计	2	2	7	231.5	21.05



图距在染色体的左边, 标记名称在染色体的右边; 本研究新开发的 EST-SSR 标记加下划线。

Map distances are indicated on the left side of each chromosome, and the name of markers on the right side; The newly developed EST-SSR markers in this study were underlined.

图 2 EST-SSR 标记在遗传图谱上的位置

Fig. 2 Location of EST-SSR markers in genetic map

3 讨论与结论

利用诸如基因组文库筛选法、富集法、序列标签微卫星分析法 (STMP) 和选择性扩增微卫星分析法 (SAM) 等传统的 SSR 分子标记开发方法往往是一项耗时长且成本高的工作^[19]。随着二代测序技术的迅速崛起, 不仅测序错误率大幅度下降, 准确率提高, 且测序成本也极大降低, 这为 SSR 标记的开发奠定了基础。加之 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 为代表的公共数据库资源的开发共享, 使

得 EST 序列的查询更为方便, 这些都为 EST-SSR 标记的开发提供了广阔的前景。基于高通量测序平台的转录组测序技术 (RNA-Seq), 可获取样品在特定时间下特定组织所表达的转录本序列信息, 且不受参考基因组有无的影响, 因此, RNA-Seq 已成为发掘基因功能的重要手段之一。除此之外, RNA-Seq 技术也是挖掘 EST-SSR 标记的有效手段。目前, 我国学者在利用 EST 序列进行小麦 EST-SSR 标记的开发方面已取得较大的成就, 如 Gao 等^[20] 利用 71 495 条 EST 序列设计出 688 对 EST-SSR 引物, 其中 483

个引物对有扩增产物;陈军方等^[21]利用 ITEC 上公布的 10 380 条 EST 序列设计出 135 对 EST-SSR 引物,其中有效引物 82 对,并将 32 对引物定位到除 2D、4B 和 4D 外的 18 条小麦染色体上;潘海涛等^[3]利用 GenBank/dbEST 数据库中的 265 362 条小麦 EST 序列设计出 596 个 EST-SSR 引物对,选择其中 95 分以上的 194 个引物对进行 PCR 检测,结果表明,165 个引物对能扩增出稳定清晰的条带,并将其中的 23 个 EST-SSR 位点整合到已有的小麦遗传图谱上。本实验室的 Yang 等^[17]从小麦 HTS-1 突变体的 RNA-Seq 数据中鉴定出 8 389 个潜在的 SSR 序列,并进行了引物设计;对随机挑选出的 300 对 EST-SSR 引物进行鉴定,结果表明有 177 个引物对能扩增出稳定清晰的条带。上述 EST-SSR 标记可以作为小麦及其近缘物种的分子标记。本研究是在 Yang 等^[17]的基础上从 8 389 个 SSR 引物对中随机选取 585 对得分大于 95 分的 EST-SSR 引物进行合成,其中 555 对引物在川麦 42 和川农 16 中均能扩增出稳定清晰的条带,其大小在 50 ~ 300 bp,其有效性为 94.87%。

在 555 对有效引物中有 44 对 EST-SSR 引物在川麦 42 和川农 16 中表现出明显的、稳定的多态性,多态性率为 7.93%。其多态率显著低于 SRAP 标记和 SSR 标记^[18,22]。这主要是由于 EST-SSR 来源于表达序列,这些序列具有较高的保守性,但也正是由于这个原因使得 EST-SSR 标记成为一种有功能的分子标记^[23]。利用这 44 个 EST-SSR 标记,以川麦 42 与川农 16 杂交后并自交获得的 RILs 群体为作图群体,结合了本实验室前期的 SRAP 和 SSR 标记数据,构建了一张小麦遗传图谱。含有本次新开发的 EST-SSR 标记的连锁群共 12 个,这 12 个连锁群由 163 个标记组成,包括 EST-SSR 标记 17 个,SSR 标记和 SRAP 标记 73 个。覆盖小麦基因组长度 1 551.5 cM,相邻标记间的平均遗传距离为 13.11 cM。除 1B、1A 和 4A 染色体外,其余的 9 条染色体上仅 1 个 EST-SSR 标记分布,在具有多态性的 EST-SSR 标记中能够定位到染色体上的标记为 38.6%。普通小麦是异源六倍体,含有 A、B、D 3 个染色体组,其遗传图谱应包含 21 个连锁群,但本次利用 EST-SSR 标记构建的遗传图谱只包含了其中的 12 个连锁群。在 1D、2A、2D、4D、6B、7A、7B 和 7D 9 个连锁群上没有筛选到与之连锁的 EST-SSR 标记。这可能与 EST-SSR 标记本身的多态性较低和本试验筛选的标记数量偏少有关。因此,下一步应继续筛选和开发新的 EST-SSR 标记,不断完善和

丰富各连锁群上的分子标记。尝试将本研究获得的图谱与本试验之前构建的遗传图谱进行整合,但由于本次开发的标记数量偏少,且缺乏中间连锁标记,因此,只有极个别 EST-SSR 标记能整合。但本研究丰富了小麦 EST-SSR 标记的数目。而这些 EST-SSR 标记作为基因的一部分其信息含量高、保守性好、在物种间具有良好的通用性等优点^[22],因此,在功能基因的定位、比较基因组学和小麦起源和进化研究方面具有重要的价值。

参考文献:

- [1] Koelling J, Coles M C, Matthews P D, Schwekendiek A. Development of new microsatellite markers (SSRs) for *Humulus lupulus* [J]. *Molecular Breeding*, 2012, 30: 479 - 484. doi:10.1007/s11032-011-9637-z.
- [2] 胡文舜,陈秀萍,郑少泉. 龙眼 EST-SSR 标记开发及无患子科 5 个属种质遗传多样性分析[J]. 园艺学报, 2019, 46(7): 1359 - 1372. doi:10.16420/j.issn.0513-353x.2018-0753.
Hu W S, Chen X P, Zheng S Q. EST-SSR markers developed from *Dimocarpus longan* and their application in genetic diversity analysis of five genera of Sapindaceae[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2019, 46(7): 1359 - 1372.
- [3] 潘海涛,汪俊君,王盈盈,齐照良,李斯深. 小麦 EST-SSR 标记的开发和遗传作图[J]. 中国农业科学, 2010, 43(3): 452 - 461. doi:10.3864/j.issn.0578-1752.2010.03.002.
Pan H T, Wang J J, Wang Y Y, Qi Z L, Li S S. Development and mapping of EST-SSR markers in wheat[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(3): 452 - 461.
- [4] 许云峰,蒋方山,郭营,李瑞军,李斯深. EMS 诱导小麦品种烟农 15 突变体的鉴定和 EST-SSR 分析[J]. 核农学报, 2008, 22(4): 410 - 414.
Xu Y F, Jiang F S, Guo Y, Li R J, Li S S. Identification and EST-SSR analysis of mutants from wheat variety "Yannong 15" induced by EMS[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2008, 22(4): 410 - 414.
- [5] Sraphet S, Boonchanawiwat A, Thanyasiriwat T, Boonseng O, Tabata S, Sasamoto S, Shirasawa K, Isobe S, Lightfoot D A, Tangphatsornruang S, Triwitayakorn K. SSR and EST-SSR-based genetic linkage map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2011, 122(6): 1161 - 1170. doi:10.1007/s00122-010-1520-5.
- [6] Chen C X, Zhou P, Choi Y A, Huang S, Gmitter F G. Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 112(7): 1248 - 1257. doi:10.1007/s00122-006-0226-1.
- [7] Kalia R K, Rai M K, Kalia S, Singh R, Dhawan A K. Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants [J]. *Euphytica*, 2011, 177: 309 - 334. doi:10.1007/s10681-010-0286-9.
- [8] Parida S K, Kalia S K, Kaul S, Dalal V, Hemaprabha G, Selvi A, Pandit A, Singh A, Gaikwad K, Sharma T R, Srivastava P S, Singh N K, Mohapatra T. Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane [J]. *Theoretical and Applied Ge-*

- netics, 2009, 118: 327 – 338. doi: 10. 1007/s00122-008-0902-4.
- [9] Vašek J, Čížlová D, Melounová M, Svoboda P, Vejl P, Štikarová R, Vostrý L, Kuchtová P, Ovesná J. New EST-SSR markers for individual genotyping of opium poppy cultivars (*Papaver somniferum* L.) [J]. *Plants*, 2019, 9(1): 10 – 25. doi: 10. 3390/plants9010010.
- [10] Somers D J, Isaac P, Edwards K. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 109: 1105 – 1114. doi: 10. 1007/s00122-004-1740-7.
- [11] Yang Z J, Chen Z Y, Peng Z S, Yu Y, Liao M L, Wei S H. Development of a high-density linkage map and mapping of the three-pistil gene (*Pis1*) in wheat using GBS markers [J]. *BMC Genomics*, 2017, 18: 567. doi: 10. 1186/s12864-017-3960-7.
- [12] Yang Q, Yang Z J, Tang H F, Yu Y, Chen Z Y, Wei S H, Sun Q X, Peng Z S. High-density genetic map construction and mapping of the homologous transformation sterility gene (*hts*) in wheat using GBS markers [J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18: 301. doi: 10. 1186/s12870-018-1532-x.
- [13] Yu J K, Dake T M, Singh S, Benscher D, Li W L, Gill B, Sorrells M E. Development and mapping of EST-derived simple sequence repeat markers for hexaploid wheat [J]. *Genome*, 2004, 47(5): 805 – 818. doi: 10. 1139/g04-057.
- [14] Chen H M, Li L Z, Wei X Y, Li S S, Lei T D, Hu H Z, Wang H G, Zhang X S. Development, chromosome location and genetic mapping of EST-SSR markers in wheat [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2005, 50(20): 2328 – 2336. doi: 10. 1007/BF03183744.
- [15] Li L Z, Wang J J, Guo Y, Jiang F S, Xu Y F, Wang Y Y, Pan H T, Han G Z, Li R J, Li S S. Development of SSR markers from ESTs of gramineous species and their chromosome location on wheat [J]. *Progress in Natural Science*, 2008, 18(12): 1485 – 1490. doi: 10. 1016/j. pnsc. 2008. 05. 012.
- [16] Yang Z J, Peng Z S, Wei S H, Liao M L, Yu Y, Jang Z Y. Pistillody mutant reveals key insights into stamen and pistil development in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 211. doi: 10. 1186/s12864-015-1453-0.
- [17] Yang Z J, Peng Z S, Yang H. Identification of novel and useful EST-SSR markers from *de novo* transcriptome sequence of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2016, 15(1): 15017509. doi: 10. 4238/gmr. 15017509.
- [18] Zhao L B, Zhang L, Qu J P, Yu Y, Lu L, Peng Z S, Yang W Y, Wei S H, Yang J, Yang Z J. Novel fluorescent sequence-related amplified polymorphism (FSRAP) markers for the construction of a genetic linkage map of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Genetika*, 2017, 49(3): 1081 – 1093. doi: 10. 2298/GENSR1703081Z.
- [19] 邵阳, 范文, 黄连冬, 高继银, 李昕骥, 张文驹. 基于 RNA-Seq 的崇左金花茶 EST-SSR 标记开发 [J]. 复旦学报(自然科学版), 2015, 54(6): 761 – 767.
- Shao Y, Fan W, Huang L D, Gao J Y, Li X J, Zhang W J. Development of EST-SSR markers in *Camellia chuongtsoensis* based on RNA-Seq [J]. *Journal of Fudan University (Natural Science)*, 2015, 54(6): 761 – 767.
- [20] Gao L F, Jing R J, Huo N X, Li Y, Li X P, Zhou R H, Chang X P, Tang J F, Ma Z Y, Jia J Z. One hundred and one new microsatellite loci derived from ESTs (EST-SSRs) in bread wheat [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108: 1392 – 1400. doi: 10. 1007/s00122-003-1554-z.
- [21] 陈军方, 任正隆, 高丽锋, 贾继增. 从小麦 EST 序列中开发新的 SSR 引物 [J]. 作物学报, 2005, 31(2): 154 – 158. doi: 10. 3321/j. issn: 0496-3490. 2005. 02. 004.
- Chen J F, Ren Z L, Gao L F, Jia J Z. Developing new SSR markers from EST of wheat [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2005, 31(2): 154 – 158.
- [22] Tang Y L, Li J, Wu Y Q, Wei H T, Li C S, Yang W Y, Chen F. Identification of QTLs for yield-related traits in the recombinant inbred line population derived from the cross between a synthetic hexaploidy wheat-derived variety Chuanmai 42 and a Chinese elite variety Chuannong 16 [J]. *Agricultural Sciences in China*, 2011, 10(11): 1665 – 1680. doi: 10. 1016/S1671-2927(11)60165-X.
- [23] Sylvia S, Campbel L, Henderson K, Eujay J I, Hanafey M, Powell W, Wolters P. Development of EST-derived microsatellite markers for mapping and germplasm analysis in wheat [C]. San Diego, CA, Plant and Animal Genome VIII Conference, 2000.