

DOI: 10.11686/cyxb2024304

http://cyxb.magtech.com.cn

富贵, 刘玉萍, 苏旭, 等. 扇穗茅全长转录组 SSR 特征分析及分子标记开发. 草业学报, 2025, 34(7): 107—119.

FU Gui, LIU Yu-ping, SU Xu, *et al.* Analysis of SSR characterization in full-length transcriptome and development of SSR molecular markers for *Littledalea racemosa*. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(7): 107—119.

扇穗茅全长转录组 SSR 特征分析及分子标记开发

富贵^{1,2,4}, 刘玉萍^{3,4,5}, 苏旭^{3,4,5*}, 曲荣举³, 才让扎西³

(1. 青海师范大学地理科学学院, 青海 西宁 810008; 2. 青海民族大学生态环境与资源学院, 青海 西宁 810007; 3. 青海师范大学生命科学学院, 青海 西宁 810016; 4. 青海师范大学青海省青藏高原生物多样性形成机制与综合利用重点实验室, 青海 西宁 810008; 5. 青海师范大学高原科学与可持续发展研究院, 青海 西宁 810016)

摘要: 扇穗茅是青藏高原特有的一种具有重要生态和经济价值的禾本科草本植物, 开发稳定高效的微卫星(SSR)分子标记可为其遗传多样性、系统发育和物种分布格局等研究提供重要的技术手段。本研究基于 Pacbio 测序平台获得扇穗茅全长转录组 30624 条 Unigene 序列, 利用 MISA 软件搜索到 14089 个 SSR 重复序列, SSR 发生频率为 33.85%; 通过对 SSR 位点特征分析发现, SSR 位点包含 6 种核苷酸重复类型, 其中单、二、三核苷酸占有核苷酸类型的 97.35%, 为主要重复类型; 3 种主导基序类型中, 三核苷酸所形成的基元类型数目最多, 共检测到 10 个基元类型, 其中 CCG/CGG 基元类型占优, 共形成 1736 个 SSR 位点, 占三核苷酸总 SSR 位点的 31.32%; 随机挑选 12 个不同居群的扇穗茅样本对合成的 160 对引物进行 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳检测, 最终获得扩增稳定、具特异性的 15 对 SSR 引物。基于扇穗茅 27 个居群、81 个个体, 对 15 对 SSR 引物多态性进行了分析, 共扩增出 132 个观测等位基因, 平均每对引物扩增出 8.8 个观测等位基因, 有效等位基因数(N_e)、Shannon's 信息指数(I)、多态性信息含量(PIC)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)平均值分别为 4.7799、1.6959、0.7270、0.8575 和 0.7648。基于 Nei's 遗传距离利用 UPGMA 方法进行聚类分析, 结果表明, 扇穗茅居群间和居群内个体间存在明显的系统亲缘关系, 不同居群间遗传距离可能和地理距离相关。本研究开发的 15 对 SSR 引物遗传多样性丰富, 可为扇穗茅种质资源遗传变异研究提供更加有效的标记选择。

关键词: 扇穗茅; 转录组; SSR; 分子标记

Analysis of SSR characterization in full-length transcriptome and development of SSR molecular markers for *Littledalea racemosa*

FU Gui^{1,2,4}, LIU Yu-ping^{3,4,5}, SU Xu^{3,4,5*}, QU Rong-ju³, CAIRANG Zha-xi³

1. School of Geosciences, Qinghai Normal University, Xining 810008, China; 2. College of Ecological Environmental and Resources, Qinghai Minzu University, Xining 810007, China; 3. School of Life Sciences, Qinghai Normal University, Xining 810016, China; 4. Key Laboratory of Biodiversity Formation Mechanism and Comprehensive Utilization of the Qinghai-Tibet Plateau in Qinghai Province, Qinghai Normal University, Xining 810008, China; 5. Academy of Plateau Science and Sustainability, Qinghai Normal University, Xining 810016, China

Abstract: *Littledalea racemosa* is a herb with significant ecological and economic value belonging to the Poaceae family and endemic to Qinghai—Xizang Plateau. Identification of a suitable set of simple sequence repeat (SSR)

收稿日期: 2024-07-31; 改回日期: 2024-09-12

基金项目: 2023 年中央林业草原生态保护恢复资金野生动植物保护项目, 青海野生单子叶植物种质资源调查及其多样性评价项目(QHSY-2023-016)和青海民族大学 2024 年大学生创新创业训练计划项目(2024-DCXM-55)资助。

作者简介: 富贵(1987—), 男, 甘肃天水人, 副教授, 在读博士。E-mail: qhmdfg@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: xusu8527972@126.com

molecular markers offers an important technical means for studying genetic diversity, phylogenetics, and species distribution patterns. In this study, 14089 SSR sequences were obtained using MISA software from 30624 Unigene sequences derived from the *L. racemosa* full-length transcriptome with the Pacbio sequencing platform. The value of incidence of SSR was 33.85%. Analysis of SSR characteristics, indicated six types of SSR locus nucleotide repeats, with mono-nucleotide, di-nucleotide, and tri-nucleotide being the dominant repeat motifs and accounting for 97.35% of all nucleotide types. Among these three dominant motif types, tri-nucleotide SSRs were the most frequently encountered, with a total of 10 detected. The CCG/CGG motif type was most common and occurred at a total of 1736 SSR sites, accounting for 31.32% of the total SSR tri-nucleotide sites. Twelve samples of *L. racemosa* were selected randomly from different populations and used by PCR amplification and agarose gel electrophoresis examination for 160 pairs of primers, and 15 pairs of SSR primers with stable amplification and specificity were finally obtained. For these 15 pairs of SSR primers, polymorphism of 81 individuals from 27 populations was analyzed, and a total of 132 alleles could be amplified, with an average of 8.8 alleles amplified per primer pair. The effective allele number (N_e), Shannon information index (I), polymorphic information content (PIC), observed heterozygosity (H_o), and expected heterozygosity (H_e), were 4.7799, 1.6959, 0.7270, 0.8575, and 0.7648, respectively. Cluster analysis was conducted using the UPGMA method based on Nei's genetics distance, and the results showed that there were explicit genetic relationships among the populations and individuals within a population of *L. racemosa*. The genetic distance between different populations may be related to geographical distance. The 15 pairs of SSR primers developed in this study have rich genetic diversity, which can provide effective marker selection for genetic variation research in germplasm resources of *L. racemosa*.

Key words: *Littledalea racemosa*; transcriptome; SSR; molecular marker

扇穗茅(*Littledalea racemosa*)隶属于禾本科(Gramineae)雀麦族(Bromeae)扇穗茅属(*Littledalea*),主要分布于青藏高原地区海拔2900~5500 m的高山草坡、毗邻河谷边沙滩及灌丛草甸中^[1],它们以出色的耐寒、耐旱、抗病及抗风沙能力著称,能够在极端气候条件下很好地生长^[2]。扇穗茅属植物的多数种类,如扇穗茅和藏扇穗茅(*Littledalea tibetica*),拥有发达的根系,是防止土壤侵蚀和固定沙丘的关键植物。同时,因其具有较高的营养价值,成为高海拔地区畜牧业中可被选择的优质牧草。因此,扇穗茅现已成为农牧业禾草良种繁育的一种重要基因资源。

自Hooker^[3]在1896年建立扇穗茅属以来,关于扇穗茅的研究多有报道,早期主要集中于其属内分类地位的探究,如耿以礼^[4]、Tzvelev^[5]、吴征镒^[6]、卢生莲^[7]、刘亮等^[1]先后对扇穗茅属植物进行了一系列的分类学研究,对于属内物种间分类研究起到了极大的推动作用,最终确定了扇穗茅属包含4个物种,扇穗茅、藏扇穗茅、寡穗茅(*Littledalea przewalskyi*)和帕米尔扇穗茅(*Littledalea alaica*)。但周勇辉^[8]基于形态学和分子生物学最新研究将扇穗茅属原划分的4个物种合并成为2个物种,藏扇穗茅、帕米尔扇穗茅和扇穗茅合并,统一为一个物种扇穗茅,寡穗茅为另一物种。此后,刘玉萍等^[9]基于二代高通量测序平台,获取得到同属藏扇穗茅叶绿体基因组序列,并分析了叶绿体基因组基本特征,基于藏扇穗茅和禾本科其他植物叶绿体基因组序列构建的系统发育树显示,藏扇穗茅与早熟禾亚科(Pooideae)中小麦族(Triticeae)植物亲缘关系较近,该研究为后续探讨雀麦族(Bromeae)在整个禾本科中的系统位置和进化历史提供了重要依据。刘涛等^[10]基于野外采样数据,利用Biomod 2组合模型预测了扇穗茅属3个物种(寡穗茅、藏扇穗茅、扇穗茅)地理分布格局及限制因子,为扇穗茅属植物环境适应性和种群保护提供了理论依据。杨萍等^[11]首次报道了扇穗茅的染色体核型数目、特征和进化趋势,为今后进一步探明扇穗茅的系统进化关系提供了有力的细胞学证据。

简单序列重复(simple sequence repeats, SSR),又称微卫星,主要由短小的串联重复DNA序列组成^[12]。包含1至5个碱基的重复单元,因其重复单元内核苷酸组成多样性和重复次数的差异,导致了其长度的显著变化而在

个体水平呈现出变异性。SSR呈现出共显性特征,具有高度多态性和稳定性,且检测速度快,已被广泛应用于遗传图谱的绘制、种质资源遗传多样性的深入研究、遗传关系及分化的解析,以及群体结构的分析中^[13-16]。近年来,全基因组测序技术得到广泛应用,但基因组研究工作量大,gSSR位于基因编码区与非编码区,成本高、开发过程复杂,而转录组测序是获得生物组织或细胞几乎所有转录本的高通量测序技术^[17],利用生物信息学技术能够更加快速地从转录组数据中获得特异性DNA片段,基于转录组测序数据获得的SSR标记具有信息量大、通用性好且花费较低的优势。目前,通过转录组数据开发SSR引物已在多个植物研究中得到应用^[16]。三代全长转录组测序,是基于Pacbio三代测序平台进行的mRNA测序研究,无需打断和拼接,克服了传统二代测序的短板,从而能够揭示单个mRNA分子从5'到3'端的高质量转录全貌,展示全长转录本的全面信息。因此,通过全长转录组测序数据获得SSR位点,成了SSR分子标记开发的重要手段,为开展植物资源遗传多样性评价、遗传变异分析和育种提供了有效工具^[17]。

鉴于扇穗茅在生态、经济方面所展现出的独特价值,对其种质资源的深入研究与利用显得尤为重要。加之研究方法的局限性和单一性,其种间关系的研究一直存在争议,尤其是通过分子生物学手段进行扇穗茅属植物遗传变异分析的研究仍未见报道。近年来分子标记技术发展迅速,因此,本研究通过基于Pacbio平台全长转录组三代测序技术获得的扇穗茅全长转录组数据,分析了SSR在扇穗茅转录组中的分布规律、组成特征,并开发出了适用于扇穗茅群体研究的SSR分子标记,以期扇穗茅种质资源遗传多样性、物种鉴定及空间遗传结构等方面研究提供有效的技术手段,为其种质资源评价,系统进化及环境适应性策略研究提供科学依据,为后续扇穗茅属物种的开发和保护工作提供保障。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究用于转录组测序的扇穗茅样本于2021年6月采自青海省兴海县温泉乡(N 35°29'24", E 99°29'57", 海拔4163 m)。选取生长良好的单株,将其从土壤中连同根轻挖取出,利用无菌水清洗后,分别对其根茎叶组织进行采样,不同部位分别进行3次重复取样,样品迅速投放于液氮中进行冷冻保存,带回实验室进行RNA提取及测序。选取来自12个不同居群且地理距离分布较远的样本,进行总DNA提取,后续用于SSR引物初筛。选择27个天然分布的扇穗茅居群样本,每个居群选择3个个体,共计81个个体用于引物多态性分析。群体采样时,居群内个体之间的距离不能小于100 m,居群间分布距离不能小于100 km,居群间要有明显的河流、道路、山脉等天然地理屏障隔离。样本信息详见表1。

1.2 试验方法

1.2.1 全长转录组数据获取 利用Trizol法^[18]进行扇穗茅不同组织样品(根、茎、叶)总RNA的提取;检测合格后的RNA,利用SMARTer PCR cDNA Synthesis Kit合成cDNA双链,再用自动核酸收集系统BluePippin进行片段筛选,去除文库中小分子片段后对全长cDNA进行损伤修复,然后再对其末端进行修复,修复完成的片段进行SMRT哑铃型接头连接,同时,利用核酸外切酶对片段进行消化处理后得到文库;基于Pacbio Sequel平台对库检合格后的文库进行三代转录组测序,采用软件SMRTlink v6.0对下机数据进行过滤和处理,使用 $-\text{minLength}=50$ 参数,最终得到的Subreads即为有效数据;基于Iso-seq 3软件对三代全长转录组Subreads进行分析,最终得到一个高质量完整的一致性序列,最后通过去冗余软件cd-hit运行,得到最终转录组序列用于后续特征分析。

1.2.2 SSR标记检测与引物设计 采用MISA软件(<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa>)对不同核苷酸类型构成的SSR位点进行重复次数设置,单碱基、二碱基、三碱基、四碱基、五碱基和六碱基核苷酸按照10、6、5、5、5和5设置最少重复次数,然后对其转录本进行SSR检测。随机选择160个含不同重复次数SSR位点的Unigene,使用Primer Premier 5软件进行SSR引物设计,普通引物设置完成后,交送至北京六合华大基因科技有限公司进行引物合成。

表 1 供试材料及原产地详细信息

Table 1 Materials and detailed information of origins

居群编号 Population No.	样本数量 Sample size	采样地 Sampling location	纬度 Latitude (N)	经度 Longitude (E)	海拔 Altitude (m)
POP2	3	青海省兴海县 Xinghai County, Qinghai Province	35°20′32.5″	99°5′8.2″	4164
POP8	3	青海省玛沁县 Maqin County, Qinghai Province	34°32′58.1″	99°8′47.4″	4396
POP12	3	青海省玛多县 Maduo County, Qinghai Province	34°8′22.7″	97°40′25.8″	4727
POP13	3	青海省玛沁县 Maqin County, Qinghai Province	34°30′36″	99°9′0″	4353
POP20	3	青海省曲麻莱县 Qumalai County, Qinghai Province	34°9′1.3″	95°53′55.2″	4513
POP25	3	青海省曲麻莱县 Qumalai County, Qinghai Province	35°31′16.3″	93°54′47.8″	4625
POP62	3	青海省兴海县 Xinghai County, Qinghai Province	35°29′26.6″	99°29′57.3″	4455
POP65	3	青海省兴海县 Xinghai County, Qinghai Province	35°23′3.1″	99°18′2.4″	4377
POP66	3	青海省玛多县 Maduo County, Qinghai Province	35°20′49.8″	99°6′6.2″	4171
POP68	3	青海省玛多县 Maduo County, Qinghai Province	35°7′38.4″	99°4′2.3″	4200
POP69	3	青海省玛多县 Maduo County, Qinghai Province	35°5′51.6″	99°6′7.8″	4117
POP72	3	青海省玛沁县 Maqin County, Qinghai Province	34°23′54.0″	99°12′2.5″	4293
POP73	3	青海省玛沁县 Maqin County, Qinghai Province	34°30′13.1″	99°10′9.4″	4363
POP88	3	青海省曲麻莱县 Qumalai County, Qinghai Province	34°9′31.8″	95°55′14.0″	4582
POP95	3	西藏类乌齐县 Riwoqê County, Xizang	30°51′14.2″	96°37′19.0″	4552
POP101	3	青海省格尔木市 Geermu City, Qinghai Province	33°49′48.6″	92°20′2.6″	4613
POP104	3	青海省格尔木市 Geermu City, Qinghai Province	33°59′19.5″	92°20′46.4″	4655
POP106	3	青海省格尔木市 Geermu City, Qinghai Province	34°6′12.8″	92°21′34.0″	4740
POP111	3	青海省格尔木市 Geermu City, Qinghai Province	34°25′21.4″	92°43′23.4″	4568
POP115	3	青海省格尔木市 Geermu City, Qinghai Province	34°38′56.9″	92°53′52.3″	4829
POP118	3	青海省格尔木市 Geermu City, Qinghai Province	34°50′47.0″	92°56′56.1″	4623
POP119	3	青海省格尔木市 Geermu City, Qinghai Province	34°57′21.3″	92°57′9.9″	4558
POP120	3	青海省格尔木市 Geermu City, Qinghai Province	35°5′17.8″	93°1′32.9″	4690
POP122	3	青海省格尔木市 Geermu City, Qinghai Province	35°18′35.8″	93°17′42.6″	4536
POP125	3	青海省格尔木市 Geermu City, Qinghai Province	35°32′49.4″	93°57′24.3″	4628
POP126	3	青海省格尔木市 Geermu City, Qinghai Province	35°38′19.2″	94°4′9.4″	4772
POP127	3	青海省格尔木市 Geermu City, Qinghai Province	35°43′11.1″	94°6′57.3″	4468

1.2.3 DNA 提取及 SSR 引物筛选 本试验样本 DNA 提取均选择改良的 CTAB 法^[19]进行。随机挑选课题组收集的扇穗茅居群中 12 个样本 DNA 模板,基于设计好的 160 对 SSR 引物进行 PCR 扩增,其中,PCR 扩增反应体系各成分分别为 DNA 模板 50 ng·μL⁻¹ 1 μL、10×PCR buffer 2.5 μL、2 mmol·L⁻¹ dNTPs 2 μL、上下游引物各 1 μL、Taq DNA polymerase 0.25 μL、ddH₂O 17.25 μL,共计 25 μL。PCR 扩增反应程序依次为 94℃预变性 5 min; 然后进行 36 个循环程序即 94℃变性 30 s,51~65℃退火 30 s,72℃延伸 30 s;72℃延伸 5 min,4℃保存。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行筛选,对于无条带且重复性差的 SSR 引物进行剔除,保留条带单一,片段大小吻合的 SSR 引物进行下一步验证。

1.2.4 SSR 引物群体扩增及毛细管电泳检测 为进一步评价筛选出的 SSR 引物多态性丰富度和通用性,本研究挑选出扇穗茅 27 个分布区地理位置较远的居群,共 81 个个体进行群体 PCR 扩增试验,将筛出的多态性高、重复性好、具代表性的 15 对 SSR 进行荧光标记,然后基于荧光标记引物对上述 81 个扇穗茅个体进行 PCR 扩增,扩增完成后,对扩增产物先利用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,扩增条带完整且和目标片段一致的 PCR 产物送至金唯智(天津)生物科技有限公司进行毛细管电泳检测。

1.3 数据分析

利用软件 GeneMapper v5.0 读取毛细管电泳下机数据,对 SSR 扩增产物长度进行解析后得到峰图,峰图峰值大小代表片段长度;删除和过滤峰值信号太低和长度不符合要求且没有多态性的条带,判断峰图信息,保留扩增产物片段长度吻合、没有影子峰干扰且相同位点峰形接近的引物,即可作为一个标记;参考上述标准建立 SSR 原始数据矩阵,并对每个数据位点进行人工校正,最终获得样品等位基因数和基因型。利用 Excel 统计毛细管电泳 SSR 位点大小,并整理数据,加载 GenAlEx 6.5 软件^[20],进行数据格式转化;并采用 POPgene v1.32 软件^[21]进行以下群体遗传多样性参数计算,观测等位基因数 (observed number of alleles, N_a)、有效等位基因数 (effective number of alleles, N_e)、观测杂合度 (observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e)、Shannon's 信息指数 (Shannon's information index, I);利用 Cervus 3.0.7 软件^[22]计算引物多态性信息含量 (polymorphic information content, PIC);利用 Populations v1.2 软件,计算不同居群和不同个体 Nei's 遗传距离 (Nei's genetic distance, D_A)^[23],并通过 UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average) 算法绘制系统发生树,生成的进化树导出到 Figtree v1.4.2 软件进行显示和编辑。

2 结果与分析

2.1 扇穗茅转录组 SSR 位点检测及分布特征

基于三代转录组测序技术,通过对扇穗茅转录组测序后,最终获得共计 30624 条 Unigene 序列,序列总长度为 94880976 bp,平均长度为 3098 bp,转录组原始数据已提交到 NCBI 数据库 (SRA data: PRJNA1157427),通过 MISA 软件检索了所有转录组序列,共检测到 14089 个 SSR 重复序列,含有 SSR 位点的 Unigene 序列共有 10367 条,含 SSR 的 Unigene 数占总 Unigene 数的 33.85%、SSR 出现频率为 46.00% (SSR 位点总数/总 Unigene 数)、扇穗茅转录组 Unigene 序列上每 6734 bp 检测出一个 SSR 位点,2710 个 Unigene 序列分布有一个以上 SSR 位点,另外,还检测出 927 个复合型 SSR 位点 (表 2)。可见,扇穗茅转录组检测到的 SSR 位点数目较为丰富,且分布广泛。

表 2 转录组 SSR 位点分布信息描述

Table 2 The description of distribution information for SSR loci in transcriptome

统计项目 Statistical items	数目 Number
Unigene 数量 Number of Unigene	30624
Unigene 序列总长度 Total length of Unigene sequence (bp)	94880976
含 SSR 位点 Unigene 序列总数 Total number of Unigene sequence with SSR loci	10367
SSR 位点数 Number of SSR loci	14089
含 1 个以上 SSR 位点数的 Unigene The number of Unigene with more than 1 SSR loci	2710
复合型 SSR 位点数 Number of composite SSR loci	927
SSR 出现频率 The occurrence frequency of SSR loci (%)	46.01
SSR 发生频率 The incidence of SSR loci (%)	33.85

2.2 扇穗茅转录组 SSR 位点重复类型分析

对检索到的扇穗茅转录组 SSR 位点进行核苷酸重复类型分析,结果表明,SSR 位点重复类型丰富度较高,包含有单、二、三、四、五和六这 6 类核苷酸构成类型,各重复类型数目差异较大,其中单、二、三核苷酸重复数目明显高于四、五、六核苷酸数目 (表 3)。检测到单核苷酸重复类型 SSR 数目为 5196 个,占总 SSR 位点的 36.88%,总长度为 67040 bp,单核苷酸重复序列平均分布距离为 18.26 kb;二核苷酸重复序列为 2977 个,占总 SSR 位点的 21.13%;三核苷酸数量最多,为 5543 个,占总 SSR 位点的 39.34%,总长度为 31536 bp,三核苷酸平均每 17.12 kb 出现一个 SSR 位点;四至六核苷酸重复序列类型相较其他 3 种核苷酸出现数量较少,仅占总 SSR 位点的 2.65%,其中五、六核苷酸重复类型共有 104 次,占总 SSR 位点的 0.74%。此外,SSR 位点的出现频率因重复基元的不同表现出较大的差异性,检测到三核苷酸重复基元出现频率最高,每 100 条 Unigene 可检测到 SSR 位点数目为 18.10 个,六核苷酸重复基元 SSR 位点数量最少,1000 条 Unigenes 中仅检测到 1.7 个 SSR 位点出现。

表3 扇穗茅 SSR 位点重复类型分析

Table 3 Analysis of duplication types of SSR loci for *L. racemosa*

重复类型	数目	比例	频率	平均分布距离	总长度	平均长度
Repeat types	Number	Proportion (%)	Frequency (%)	Average distribution distance (kb)	Total length (bp)	Average length (bp)
单核苷酸 Mono-nucleotide	5196	36.88	16.97	18.26	67040	12.90
二核苷酸 Di-nucleotide	2977	21.13	9.72	31.87	25448	8.55
三核苷酸 Tri-nucleotide	5543	39.34	18.10	17.12	31536	5.69
四核苷酸 Tetra-nucleotide	269	1.91	0.88	352.73	1515	5.63
五核苷酸 Penta-nucleotide	53	0.38	0.17	1790.21	243	4.58
六核苷酸 Hexa-nucleotide	51	0.36	0.17	1860.41	312	6.12
总计 Total	14089	100.00	46.00	6.73	192100	13.63

2.3 扇穗茅转录组 SSR 基元类型分析

通过对扇穗茅 SSR 位点不同重复基元分析发现,转录组 SSR 中共包含 96 个重复基元类型(表 4),形成了 14089 个不同重复次数的 SSR 位点(表 3)。单核苷酸基元类型为两种,其中 A/T 基元占优,共形成 3829 个 SSR 位点(比例为 73.69%,频率为 12.50%);二核苷酸共包含 4 种基元类型,AG/CT 基元类型数目远高于其他几种

表4 SSR 位点基序类型分析

Table 4 Analysis of motif types of SSR loci

重复类型	基序类型	数量	比例	频率	重复类型	基序类型	数量	比例	频率
Repeat type	Motif type	Number	Proportion (%)	Frequency (%)	Repeat type	Motif type	Number	Proportion (%)	Frequency (%)
单核苷酸 Mono-nucleotide	A/T	3829	73.69	12.50	四核苷酸 Tetra-nucleotide	AACC/GGTT	11	4.09	0.04
	C/G	1367	26.31	4.46		ACTC/AGTG	11	4.09	0.04
二核苷酸 Di-nucleotide	AG/CT	1983	66.61	6.48		AGGC/CCTG	10	3.72	0.03
	AC/GT	603	20.26	1.97		CCCG/CGGG	10	3.72	0.03
	AT/AT	201	6.75	0.66		其他 Others (18)	76	28.25	0.25
	CG/CG	190	6.38	0.62	五核苷酸 Penta-nucleotide	AAACC/GGTTT	9	16.98	0.03
三核苷酸 Tri-nucleotide	CCG/CGG	1736	31.32	5.67		AAGAG/CTCTT	7	13.21	0.02
	AGC/CTG	1057	19.07	3.45		AGAGG/CCTCT	7	13.21	0.02
	AGG/CCT	1034	18.65	3.38		AGGGG/CCCCT	7	13.21	0.02
	ACC/GGT	468	8.44	1.53		CCCCG/CGGGG	7	13.21	0.02
	AAG/CTT	385	6.95	1.26		AACCC/GGGTT	3	5.66	0.01
	ACG/CGT	265	4.78	0.87		其他 Others (13)	13	24.53	0.04
	ATC/ATG	227	4.10	0.74	六核苷酸 Hexa-nucleotide	AGAGGG/CCCTCT	6	11.76	0.02
	AAC/GTT	223	4.02	0.73		AGCAGG/CCTGCT	5	9.80	0.02
	AAT/ATT	99	1.79	0.32		AAGCAG/CTGCTT	3	5.88	0.01
	ACT/AGT	49	0.88	0.16		ACCTCC/AGGTGG	3	5.88	0.01
四核苷酸 Tetra-nucleotide	AGGG/CCCT	33	12.27	0.11		AACAGC/CTGTTG	2	3.92	0.01
	ATCC/ATGG	25	9.29	0.08		AAGGAG/CCTTCT	2	3.92	0.01
	AAAG/CTTT	23	8.55	0.08		ACCGCC/CGGTGG	2	3.92	0.01
	ACAT/ATGT	21	7.81	0.07		AGGCGC/CCTGCG	2	3.92	0.01
	ACGC/CGTG	20	7.43	0.07		AGGGCG/CCCTCG	2	3.92	0.01
	AGAT/ATCT	15	5.58	0.05		AGGGGG/CCCCCT	2	3.92	0.01
	AAGG/CCTT	14	5.20	0.05		其他 Others (22)	22	43.14	0.07

类型,形成了1983个SSR位点(比例为66.61%,频率为6.48%);三核苷酸重复有10种基元类型,CCG/CGG基元类型数目最多,共形成1736个SSR位点(比例为31.32%,频率为5.67%),其次为AGC/CTG和AGG/CCT,且数目相当,分别形成1057(比例为19.07%,频率为3.45%)和1034个SSR位点(比例为18.65%,频率为3.38%),ACT/AGT三碱基基元仅构成49个SSR位点(比例为0.88%,频率为0.16%),为三核苷酸类型中形成SSR位点最少的基序类型;四核苷酸重复包含29种基元类型,其中AGGG/CCCT、ATCC/ATGG和AAAG/CTTT这3种基元类型形成的SSR位点数目较多,分别形成33(比例为12.27%,频率为0.11%)、25(比例为9.29%,频率为0.08%)和23(比例为8.55%,频率为0.08%)SSR位点;五核苷酸基元类型有19种,其中AAACC/GGTTT形成SSR位点较多,为9个(比例为16.98%,频率为0.03%),其次为AAGAG/CTCTT、AGAGG/CCTCT、AGGGG/CCCCT和CCCCG/CGGGG这4种基元类型,均形成7个SSR位点(比例为13.21%,频率为0.02%);六核苷酸基元类型为32种,形成SSR位点较多的基元类型为AGAGGG/CCCTCT和AGCAGG/CCTGCT,分别形成的SSR位点数为6(比例为11.76%,频率为0.02%)和5(比例为9.80%,频率为0.02%)。

2.4 扇穗茅转录组SSR筛选

基于扇穗茅转录组数据检测出的SSR位点,本研究前期共设计了160对引物,其中包含二核苷酸重复类型的引物12对,三核苷酸重复类型10对,四、五、六核苷酸重复类型引物数目分别为80、24、34。随机挑选6个来自不同居群的扇穗茅样本(表1)进行160对引物筛选,首先检测扩增产物有无条带,其次判断条带大小是否和目标片段大小吻合,总共获得45对片段大小范围符合要求的SSR引物,其余引物扩增不成功或有杂带,初筛扩增效率为28.13%;为验证引物的通用和扩增效率,进一步挑选扇穗茅不同居群12个个体基于初筛的45对SSR引物进行PCR扩增检测,最终筛选出能够稳定扩增、条带单一且具多态性的SSR引物15对(图1),包含有四核苷酸重复类型引物13对,五核苷酸重复类型2对(表5)。

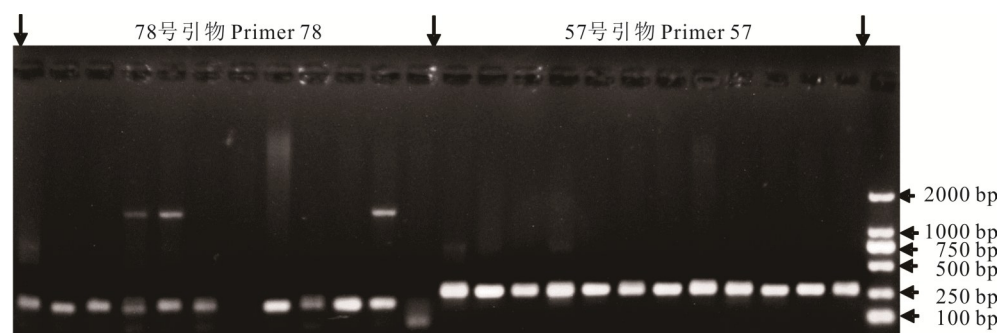


图1 2对SSR引物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis profiles of two primers pairs

2.5 扇穗茅转录组SSR引物多态性分析

基于筛选出的扇穗茅15对SSR引物,对27个天然分布的扇穗茅居群,共计81个样本PCR扩增产物进行毛细管电泳检测,81个个体均成功扩增,图2为78号引物在88号居群中3个个体扩增产物的毛细管电泳图。对15对引物基于27个扇穗茅群体扩增后的多态性进行了分析,如表6统计所示:15对引物在81个个体中总共扩增出132个观测等位基因,平均每对引物扩增出8.8个观测等位基因;有效等位基因数为1.9719~7.9152,平均值为4.7799;Shannon's信息指数(I)大小为0.9952~2.2747,平均值为1.6959;多态性信息含量(PIC)大小为0.4620~0.8610,平均值为0.7270,最大 PIC 值为78号引物(0.8610),表明该引物扩增片段具有丰富的多态性;计算得到观测杂合度(H_o)平均值大小为0.8575,不同引物变化范围为0.3793~1.0000;期望杂合度(H_e)为0.5015~0.8814,平均值为0.7648;15个SSR位点 H_e 平均值小于 H_o 平均值,该结果表明被检测的27个扇穗茅居群具有较高的杂合性。

表 5 15对扇穗茅多态性SSR引物信息

Table 5 Information of 15 pairs of polymorphic SSR primers developed for *L. racemosa*

引物 编号 NO.	重复基元 Repetition type	正向引物 Forward primer (5′-3′)	反向引物 Reverse primer (5′-3′)	产物大小 Product size (bp)	退火温度 Annealing tem- perature (°C)
SR57	(GTTGG) ₅	TGATGATTGGAGCGAGCGAAGT	GAGAAGCGAAAAAAGGGAGGC	291~318	57.5
SR78	(GTAG) ₅	GGGTCCTTTACCTGACTCCTC	CACCCAATCGCAAACAGC	163~247	56.5
SR87	(CAAT) ₅	TCCCGCAAGGAAAAAGAG	CAGCACAAACGAAAAATAAAAAATA	371~399	51.0
SR91	(GAGCCT) ₅	ATCGCCCGTGTCTCCTGTTTC	CGCAAGAAAACATCTCCACACAAGT	349~385	57.5
SR106	(GGTT) ₇	CAAAGTCGTGGGTCAGGTGTC	CCACAAGAACCAGCCAATACAAA	254~298	57.5
SR108	(TGTA) ₁₀	AGGCACAATAATAGCAAGCA	CAATCGCTAACGCTGACG	139~197	55.0
SR112	(GCCT) ₆	GCAGCCGCCGACTACCTACT	AAACCACCGCGAAGACAACA	233~261	59.5
SR119	(ATTT) ₅	GGACCTGACCATCCATCTAAACT	TCGTTCTCGGTCGCTTTGT	176~196	57.5
SR120	(CTAT) ₁₀	CGGCTGCTCTTGGTTGATG	CGGTTAGGTGGGCTGGTTC	202~254	60.5
SR121	(TGAC) ₆	GACAACGGAAATGTGCCTGAG	TGGGTGGAGTTCCCTTTAGTTT	229~281	57.5
SR125	(ACGC) ₉	GCCGTCGCCAGTTCATTC	CTGCCTGACTCCAAGAGGAAATA	265~301	59.5
SR127	(GTAT) ₅	GGGAATGGACAGATTGTTGA	GCTGACTGGTAACACGAAAGAAAA	148~192	60.5
SR129	(ACGC) ₉	GCCGTCGCCAGTTCATTC	CTGCCTGACTCCAAGAGGAAATA	266~302	59.5
SR130	(AGAT) ₅	CAGGTCCAGATGCCAAGC	GACAACAGAATACTACATTACCGG	255~279	57.5
SR131	(AGAT) ₅	GAACCCGCTCACTCTCTGAATGG	TCACCCAGACTTGGAAGCAAATA	422~516	59.5

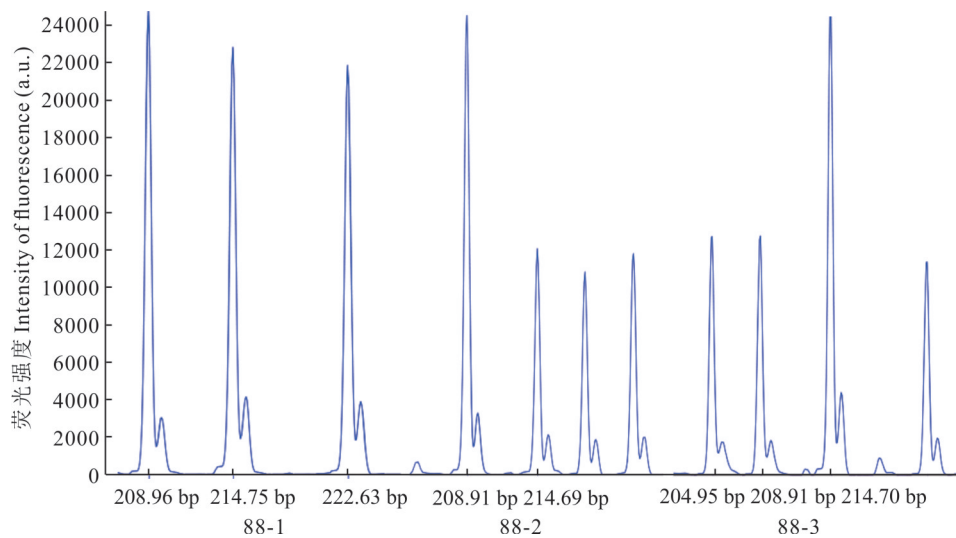


图 2 基于 78 号引物的 88 号居群 3 个样本毛细管电泳图

Fig. 2 The capillary electrophoresis spectrum diagram for three samples in 88 population based on 78 SSR primers

88-1、88-2 和 88-3 分别代表 88 号居群 3 个不同样本,横轴代表 3 个样本扩增片段长度。88-1, 88-2, and 88-3 represent three different samples in 88 population, respectively, and the horizontal axis represents the length of the amplified fragments of the three samples.

为进一步验证开发出的 15 对 SSR 引物在扇穗茅群体遗传学研究中的应用,基于 SSR 毛细管电泳检测结果,从个体和居群两个方面分析了参试样本之间的系统亲缘关系。利用 Populations v1.2 计算了 27 个居群 Nei's 遗传距离,27 个居群间 Nei's 遗传距离大小为 0.1506~1.6878,遗传距离较小的两个居群为 106 和 122,遗传距离较大的两个居群为 95 和 104。基于 Nei's 遗传距离利用 UPGMA 方法对 27 个扇穗茅居群和 81 个扇穗茅个体进行了聚类分析,研究结果表明,13、68 和 95 居群和其他居群没有表现出明显的系统亲缘关系,其余 24 个居群形成了 2 个大的分支结构,8 和 88 两个居群形成一个分支,其余 22 个居群形成另一姐妹分支并包含两个亚支(图 3A)。

95号居群的12个样本和72号居群的一个样本,而另一亚类形成两个单独类群,13号居群3个样本形成一个类群,其余65个个体聚类形成另一个类群。上述聚类结果表明扇穗茅居群和居群内个体间存在着明显的遗传变异。

3 讨论

SSR分子标记技术被认为是一种理想的分子标记,而基于SSR分子标记技术的群体遗传学研究为物种的遗传多样性、物种形成机制及系统发育等研究提供了有效的技术手段。高通量测序技术成本的降低和组装策略的不断完善使得全基因组、质体基因组和转录组等遗传信息的获取变得快捷而又方便,也为分子标记技术的开发提供了技术支撑。而基于全基因组、质体基因组、转录组和EST(expressed sequence tags)序列等开发SSR标记也成为目前公认的比较有效的SSR分子标记开发手段^[24-26]。转录组SSR位点位于基因编码区,多态性丰富,通用性较强,因此,利用转录组数据分析物种SSR位点信息,并进行分子标记开发是非常经济且高效的一种途径^[16]。

本研究基于Pacbio平台全长转录组三代测序技术获得了扇穗茅转录组序列,利用MISA软件对30624条Unigene序列进行SSR位点检索,搜索到14089个SSR重复序列,SSR发生频率为33.85%、出现频率为46.00%。尹航等^[27]对短麦大芒草(*Hordeum brevisubulatum*)转录组的214676条Unigene序列SSR位点进行了检索,共发现24877个SSR位点,SSR位点发生频率为11.59%;朱永群等^[28]对禾本科苏丹草(*Sorghum sudanense*)转录组SSR位点进行了检索,结果表明,SSR位点的发生频率为16.82%;毛轩睿等^[29]对沙鞭(*Psammochloa villosa*)3代全长转录组SSR位点检索发现,共获得93563个SSR重复序列,分布于56824条Unigenes上,发生频率为30.87%。与上述几种禾本科植物相比较发现,扇穗茅转录组序列中SSR位点发生频率相对较高,包含有较为丰富的SSR位点,可为其高效SSR分子标记开发提供较多的选择性。SSR位点发生频率在上述几种禾本科植物转录组上表现出明显的差异,物种本身基因结构固有差异可能是造成不同的主要原因,也不排除分析数据库大小、SSR检索工具及检索条件的参数设置等因素的影响^[30]。

检索到的扇穗茅转录组SSR位点包含有常见的6种核苷酸重复类型,各重复类型数目差异较大,所有重复类型中单、二、三核苷酸重复类型(36.88%、21.13%、39.34%)明显高于其他3种类型,六核苷酸数量最少(0.36%)。三核苷酸数目和单核苷酸相当,在3种主导基序类型中所占比例最高,为主要的基序类型。先前研究发现,大多数植物转录组中包含的SSR位点重复基元主要为单、二、三核苷酸重复,但这3种主要重复类型数量没有表现出规律的变化。朱永群等^[28]对禾本科苏丹草转录组SSR分析发现,单、二和三核苷酸重复分别占38.59%、19.18%和39.09%,本研究结果与其相似。而不同的是毛轩睿等^[29]对沙鞭转录组SSR基序研究发现,单核苷酸基序类型所占比例最高,且明显高于二、三核苷酸类型。尹跃等^[31]在黑果枸杞(*Lycium ruthenicum*)转录组SSR分析研究中也得出了与上述相同的结论。先前学者^[32-34]对3种唇形科植物紫苏(*Perilla frutescens*)、云南鼠尾草(*Salvia yunnanensis*)、丹参(*Salvia miltiorrhiza*)转录组SSR序列特征分析发现,SSR基序主导类型为一至三核苷酸重复,3种基序类型所形成SSR位点占比分别为92.58%、98.00%和98.85%,但与上述3种物种不同的是唇形科3种植物二核苷酸基序类型(紫苏46.76%、云南鼠尾草41.47%、丹参61.60%)所形成的SSR位点数高于其他两种类型。有研究表明,植物转录组SSR位点重复基元主要以短序列重复基元为主,不同物种SSR主导基序不同,这可能与基因组大小有关,单核苷酸重复类型在基因组较小的物种中占主导地位,多核苷酸重复类型可能在基因组较大的物种中占主导^[35]。

扇穗茅SSR位点转录组中共检测到96个重复基元类型,其中单核苷酸中A/T基元占优,共形成3829(比例为73.69%,频率为12.50%)个SSR位点,二核苷酸中AG/CT基元类型数目远高于其他几种类型,这一结论和大多数物种相一致^[36-37]。三核苷酸重复共检测到10种基元类型,其中CCG/CGG基元类型共形成1736个SSR位点(比例为31.32%,频率为5.67%),为三核苷酸基元类型中的主导类型,这一结论与沙鞭转录组SSR研究结果相同^[29]。同时,在禾本科植物如玉米(*Zea mays*)^[38]转录组中SSR研究发现,CCG/CGG也为三核苷酸重复优势基元,该结论也证实了前人^[39]研究,即大多数单子叶植物的SSR中二核苷酸和三核苷酸的优势重复基元分别为AG/CT和CCG/CGG。

本研究通过琼脂糖凝胶电泳对随机设计的160对SSR引物进行筛选,最终均获得多态性高、条带清晰的15

对 SSR 引物,筛选出有效性引物比率为 9.375%。未扩增成功的引物可能和 SSR 片段插入、SSR 位点变异及测序误差等因素有关^[40]。为进一步对 15 对引物的多态性和通用性进行探究,选用了来自 27 个不同扇穗茅居群共 81 个个体进行 SSR 分子标记遗传多样性分析,15 对引物在 81 个个体中共扩增出 132 个观测等位基因,平均每对引物扩增出 8.8 个观测等位基因;有效等位基因数为 1.9719~7.9152,平均值为 4.7799,扩增结果揭示出扇穗茅参试材料具有较高的遗传多样性,SSR 标记的平均期望杂合度低于平均观测杂合度,说明被检测的扇穗茅样本群体杂合性较高。多态性信息含量值(*PIC*)常被用于评估 SSR 引物多态性,当其值>0.50 时,该引物为高度多态性,0.25~0.50 时为中度多态性,小于 0.25 时为低度多态性^[41]。本研究所获得的 15 对 SSR 引物 *PIC* 值为 0.4620~0.8610,平均值为 0.7270,除 SR119 外,均大于 0.50,说明该 15 对 SSR 引物均表现出高度多态性。基于 Nei's 遗传距离利用 UPGMA 方法对 27 个扇穗茅居群 81 个扇穗茅个体进行了聚类分析,结果表明,13、68 和 95 居群和其他居群遗传距离较远,没有表现出明显的系统亲缘关系,8 和 88 两个居群形成一个分支,其余 22 个居群形成另一姐妹分支并包含两个亚支。从这两个亚支的居群构成来看,第一亚支大多数的居群主要来自位于格尔木东南方向的兴海县和玛多县,除第一亚支包含的两个居群(120,122)外,其余格尔木的居群均聚在一起成了第二亚支的主要组成成员。81 个扇穗茅个体的聚类 and 居群水平聚类基本表现出一致性,大部分同一居群的 3 个或者 2 个个体都聚在一个最小分类单元上,且不同居群之间亲缘关系和以居群为单位构建的聚类图基本吻合。部分居群内个体之间并没有严格按照居群来源形成单独分支而表现出较近的亲缘关系,如居群 72、101 和 106 等,说明部分扇穗茅相近居群间可能存在一定的基因交流,综合来看,整个居群和个体的聚类结果与样本栖息地的地理位置基本一致,居群之间、同一居群内个体存在明显的遗传变异。综上所述,本研究所筛选的 15 对 SSR 引物能较好地揭示出扇穗茅群体的遗传变异和系统亲缘关系,可为下一步研究青藏高原地区扇穗茅遗传多样性、系统发育、遗传结构和物种形成机制提供有力的候选标记。

4 结论

本研究基于 Pacbio 测序平台获得扇穗茅全长转录组序列,利用 MISA 软件搜索到 14089 个 SSR 重复序列,SSR 发生频率为 33.85%;SSR 位点包含 6 种核苷酸重复类型,其中以单、二、三核苷酸重复为主,占有核苷酸类型的 97.35%;三核苷酸基元类型数目最多,共检测到 10 个基元类型,其中 CCG/CGG 基元类型占优势,共形成 1736 个 SSR 位点,占三核苷酸总 SSR 位点的 31.32%;基于 15 对筛选出的具有多态性的 SSR 引物,扇穗茅 27 个居群 81 个个体共扩增出 132 个观测等位基因,平均每对引物扩增出 8.8 个观测等位基因;有效等位基因数(*Ne*)、Shannon's 信息指数(*I*)、多态性信息含量(*PIC*)、观测杂合度(*Ho*)和期望杂合度(*He*)平均值分别为 4.7799、1.6959、0.7270、0.8575 和 0.7648。UPGMA 聚类分析结果表明,扇穗茅居群间和居群内个体间存在明显的系统亲缘关系,不同居群间遗传距离可能和地理距离相关。本研究开发的 15 对 SSR 引物可为扇穗茅后期种质资源遗传变异方面的研究提供更加有效的分子标记。

参考文献 References:

- [1] Liu L, Guo B Z. Flora of China (Volume 9, Book 2). Beijing: Science Press, 2002: 377—380.
刘亮, 郭本兆. 中国植物志(第九卷第二分册). 北京: 科学出版社, 2002: 377—380.
- [2] Lyu T, Liu Y P, Zhou Y H, *et al.* Germplasm collection and taxonomic review of *Littledalea* (Poaceae) in the Qinghai—Tibet Plateau. Hubei Agricultural Sciences, 2018, 57(22): 11—13.
吕婷, 刘玉萍, 周勇辉, 等. 青藏高原扇穗茅属的分类现状及种质资源收集. 湖北农业科学, 2018, 57(22): 11—13.
- [3] Hooker J D. Flora of British India. London: L. Reeve & Co, 1897: 2472—2473.
- [4] Geng Y L. Illustration for main plants in China—Poaceae. Beijing: Science Press, 1959: 254—257.
耿以礼. 中国主要植物图说—禾本科. 北京: 科学出版社, 1959: 254—257.
- [5] Tzvelev N N. Planta Asiae centralium. Aedibus: Nauka, 1968: 173—174.
- [6] Wu Z Y. Flora of Xizang (Volume 5). Beijing: Science Press, 1987: 138—139.
吴征镒. 西藏植物志(第五卷). 北京: 科学出版社, 1987: 138—139.

- [7] Lu S L. *Littledalea*, flora of Qinghai (Volume 4). Xining: Qinghai People's Publishing House, 1999: 72–74.
卢生莲. 扇穗茅属, 青海植物志(第四卷). 西宁: 青海人民出版社, 1999: 72–74.
- [8] Zhou Y H. Species delimitation of *Littledalea* (Poaceae), an endemic genus from the Qinghai–Tibet Plateau. Xining: Qinghai Normal University, 2017.
周勇辉. 青藏高原特有属—扇穗茅属的物种界定研究. 西宁: 青海师范大学, 2017.
- [9] Liu Y P, Lyu T, Zhu D, *et al.* Sequencing and alignment analysis of the complete chloroplast genome of *Littledalea tibetica*, an endemic species from the Qinghai–Tibet Plateau. *Bulletin of Botanical Research*, 2018, 38(4): 518–525.
刘玉萍, 吕婷, 朱迪, 等. 青藏高原特有种—藏扇穗茅叶绿体基因组测序及序列分析. *植物研究*, 2018, 38(4): 518–525.
- [10] Liu T, Liu Y P, Lyu T, *et al.* Potential distribution of *Littledalea*, an endemic genus from the Qinghai–Tibet Plateau, predicted by Biomod 2 models. *Acta Agrestia Sinica*, 2020, 28(6): 1650–1656.
刘涛, 刘玉萍, 吕婷, 等. 基于 Biomod 2 组合模型预测青藏高原特有属扇穗茅属物种的潜在分布. *草地学报*, 2020, 28(6): 1650–1656.
- [11] Yang P, Su X, Liu Y P, *et al.* Chromosome number and karyotype analysis from different populations of *Littledalea racemosa*. *Acta Agrestia Sinica*, 2022, 30(7): 1712–1720.
杨萍, 苏旭, 刘玉萍, 等. 扇穗茅不同居群染色体数目及核型分析. *草地学报*, 2022, 30(7): 1712–1720.
- [12] Kalia R K, Rar M K, Kalia S, *et al.* Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 2011, 177(3): 309–334.
- [13] Gao T X, Cai Y L, Feng Y, *et al.* Genetic diversity and genetic structure of *Prunus pseudocerasus* populations from China as revealed by SSR markers. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, 43(6): 1148–1156.
高天翔, 蔡宇良, 冯瑛, 等. 中国樱桃 14 个自然居群遗传多样性和遗传结构的 SSR 评价. *园艺学报*, 2016, 43(6): 1148–1156.
- [14] Gao C C, Yan L P, Wu D J, *et al.* Analysis of the genetic diversity and population structure of *Fraxinus* spp. populations based on SSR markers. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 2023, 43(6): 69–78.
高铨铨, 燕丽萍, 吴德军, 等. 基于 SSR 标记的白蜡群体遗传多样性和群体结构分析. *中南林业科技大学学报*, 2023, 43(6): 69–78.
- [15] Yan R J, Schnabel K E, Rowden A A, *et al.* Population structure and genetic connectivity of squat lobsters (*Munida* Leach, 1820) associated with vulnerable marine ecosystems in the southwest Pacific Ocean. *Frontiers in Marine Science*, 2020, 6: 791.
- [16] Sun L J, He J J, Wang J, *et al.* Development of SSR markers based on full-length transcriptome sequencing and genetic diversity analysis of *Halogeton glomeratus*. *Acta Prataculturae Sinica*, 2022, 31(8): 199–210.
孙禄娟, 何建军, 汪军, 等. 基于全长转录组测序的盐生草 SSR 标记开发及其遗传多样性分析. *草业学报*, 2022, 31(8): 199–210.
- [17] Nie J R, Zhang W J, Zheng Y, *et al.* Advances in molecular markers and transcriptomics of *Hemarthria compressa*. *Journal of Grassland and Forage Science*, 2021(6): 1–8.
聂嘉荣, 张文浚, 郑燕, 等. 扁穗牛鞭草分子标记及转录组学研究进展. *草业与畜牧*, 2021(6): 1–8.
- [18] Gao J P, Wang D, Cao L Y, *et al.* Transcriptome sequencing of *Codonopsis pilosula* and identification of candidate genes involved in polysaccharide biosynthesis. *PLoS One*, 2015, 10(2): 117–134.
- [19] Porebski S, Bailey L G, Baum B R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1997, 15(1): 8–15.
- [20] Peakall R, Smouse P E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 2012, 28(19): 2537–2539.
- [21] Yeh F C, Yang R C, Boyle T, *et al.* POPGENE Version 1.32 Microsoft windows-based freeware for populations genetic analysis Version 1.31. Edmonton: University of Alberta, and Tim Boyle, Centre for International Forestry Research, 1999.
- [22] Kalinowski S T, Taper M L, Marshall T C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 2007, 16(5): 1099–1106.
- [23] Nei M F, Tajima F, Tateno Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *Journal of Molecular Evolution*, 1982, 19(2): 153–170.
- [24] Zhang X Y, Zhang X L, Li N, *et al.* Development and application of genomic SSR markers in *Rosa persica*. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 2024, 44(6): 186–194.
张雪云, 张晓龙, 李娜, 等. 单叶蔷薇基因组 SSR 标记开发与应用. *中南林业科技大学学报*, 2024, 44(6): 186–194.

- [25] Song Y, Zhang X R, He J X, *et al.* Genetic diversity analysis of *Sophora flavescens* Ait. germplasm resources based on cpSSR markers. *Crops*, 2023, 39(1): 30–37.
宋芸, 张鑫瑞, 贺嘉欣, 等. 基于叶绿体 SSR 分子标记的苦参种质资源遗传多样性分析. *作物杂志*, 2023, 39(1): 30–37.
- [26] Zhao Q J, Xie T, Hu Y Q, *et al.* Identification of *Alpinia officinarum* Hance cultivation types based on EST-SSR molecular markers. *Molecular Plant Breeding*, 2023, 21(2): 557–565.
赵全杰, 谢腾, 胡雨晴, 等. 基于 EST-SSR 分子标记技术的高良姜栽培类型的鉴别. *分子植物育种*, 2023, 21(2): 557–565.
- [27] Yin H, Li B, Zhang M Z, *et al.* Analysis of SSR sequence characteristics of *Hordeum brevisubulatum* transcriptome. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 8: 1–9.
尹航, 李冰, 张明智, 等. 短芒大麦草转录组 SSR 序列特征分析. *分子植物育种*, 2021, 8: 1–9.
- [28] Zhu Y Q, Peng D D, Lin C W, *et al.* Development of SSR markers based on transcriptome sequence and analysis of genetic diversity in *Sorghum sudanense*. *Acta Prataculturae Sinica*, 2018, 27(5): 178–189.
朱永群, 彭丹丹, 林超文, 等. 苏丹草转录组 SSR 分子标记开发及遗传多样性评价. *草业学报*, 2018, 27(5): 178–189.
- [29] Mao X R, Liu Y P, Su X, *et al.* Characteristics analysis of simple sequence repeat (SSR) loci in *Psammochloa villosa* (Poaceae) based on transcriptome data. *Acta Agrestia Sinica*, 2022, 30(8): 1990–2001.
毛轩睿, 刘玉萍, 苏旭, 等. 沙鞭转录组简单重复序列(SSR)位点特征分析. *草地学报*, 2022, 30(8): 1990–2001.
- [30] Fu G, Liu Y P, Su X. Analysis of SSR characteristics for *Elsholtzia densa* Benth. based on transcriptome data. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2021, 41(4): 654–663.
富贵, 刘玉萍, 苏旭. 基于转录组数据的密花香薷 SSR 位点特征分析. *西北植物学报*, 2021, 41(4): 654–663.
- [31] Yin Y, An W, Zhao J H, *et al.* SSR information in transcriptome and development of molecular markers in *Lycium ruthenicum*. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2019, 36(2): 422–428.
尹跃, 安巍, 赵建华, 等. 黑果枸杞转录组 SSR 信息分析及分子标记开发. *浙江农林大学学报*, 2019, 36(2): 422–428.
- [32] Zhang T Y, Song L, Shen Q. EST-SSR distribution characteristics and markers development of *Perilla frutescens*. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2017, 45(9): 114–118.
张天缘, 宋莉, 沈奇. 紫苏 EST-SSR 分布特征及标记开发. *贵州农业科学*, 2017, 45(9): 114–118.
- [33] Liu X L, Zhang A L, Zhao Y, *et al.* SSR information analysis and primers selecting for *Salvia yunnanensis*. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2017, 28(9): 2224–2225.
刘小莉, 张爱丽, 赵燕, 等. 云南鼠尾草 SSR 位点信息分析和引物初筛. *时珍国医国药*, 2017, 28(9): 2224–2225.
- [34] Liu X Y, Wei Y K, Li G B. Development and characterization of microsatellite markers for the east Asia *Salvia* group using transcriptome sequencing. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(22): 7445–7452.
刘欣雨, 魏宇昆, 李桂彬. 丹参转录组的微卫星位点(SSR)特征及属内通用引物的开发. *分子植物育种*, 2019, 17(22): 7445–7452.
- [35] Haydar K, Crysal M Y L, Wieland M. Survey of simple sequence repeats in completed fungal genomes. *Molecular Biology&Evolution*, 2005, 22(3): 639–649.
- [36] Shen X B, Zhu Y J, Xu G B. Distribution characteristics of SSR loci and development of molecular markers in *Taxus fauna*. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 2021, 41(4): 139–147.
申响保, 朱妍洁, 徐刚标. 密叶红豆杉 SSR 位点分布特征及分子标记开发. *中南林业科技大学学报*, 2021, 41(4): 139–147.
- [37] Zheng C Y. Development of SSR molecular markers and analyses of genetic diversity in *Xanthopappus subacaulis* (Asteraceae). Xining: Qinghai Normal University, 2023.
郑长远. 黄缨菊 SSR 分子标记开发及遗传多样性研究. 西宁: 青海师范大学, 2023.
- [38] Thiel T, Michalek W, Varshney R K, *et al.* Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 106(3): 411–422.
- [39] Kantety R V, LaRota M, Matthews D E, *et al.* Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Molecular Biology*, 2002, 48(5/6): 501–510.
- [40] Sun J J, Zhou T, Zhang R T, *et al.* Comparative transcriptomes and development of expressed sequence tag-simple sequence repeat markers for two closely related oak species. *Journal of Systematics and Evolution*, 2019, 57(5): 440–450.
- [41] Botstein D, White R L, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314.