

DOI: 10.13332/j.1000-1522.20150033

# 油松胚珠转录组微卫星特征分析

安俊 郑彩霞 姚阳 陈彬丽

(北京林业大学生物科学与技术学院)

**摘要:**为利用微卫星分子标记技术进一步研究油松胚珠发育分子调控机制以及微卫星对油松胚珠发育的影响,本文以前期高通量测序结果为基础,用MISA软件对所获得的转录组数据进行SSR位点的发掘和分析,为后续研究提供重要信息资源和数据保障。得到的1412个SSR位点存在于1274条序列中,平均每2.15 kb出现一个SSR。油松胚珠转录组微卫星中存在87种重复基元,其中(A/T)<sub>n</sub>比例最高,约占45.89%;出现频率较高的重复类型是单核苷酸(46.88%)和三核苷酸(34.99%)重复。所得微卫星多为长度<20 bp的短重复序列,≥20 bp仅占总数的5.67%,重复序列出现频率与长度呈负相关。所得的SSR位点大部分位于非编码区,位于编码区的仅232个,有18个跨越了编码区和非编码区;编码区中占比例最高的是三核苷酸重复序列(105个,45.26%)。

**关键词:**油松;胚珠;转录组;微卫星

中图分类号:S718.3;S791.254 文献标志码:A 文章编号:1000-1522(2016)05-0077-07

AN Jun; ZHENG Cai-xia; YAO Yang; CHEN Bin-li. **Characterization of microsatellites of ovule transcriptome in *Pinus tabulaeformis*.** *Journal of Beijing Forestry University* (2016) **38** (5) 77-83 [Ch,43 ref.]

College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing, 100083, P. R. China.

In order to understand the molecular mechanism of regulating ovule development of *Pinus tabulaeformis* thoroughly and clarify the influence of microsatellites in ovule development, we used the program MISA to mine and analyze the high-throughput sequencing in earlier experiments to seek the microsatellites of transcriptome, in an attempt to provide significant information and data for deeper research. A total of 1412 SSRs were identified in 1274 unigenes with one SSR per 2.15 kb. Among 87 SSR repeat motifs of ovule transcriptome, (A/T)<sub>n</sub> was in the maximum proportion, accounting for 45.89%. Mononucleotide and trinucleotide repeats were the two more abundant in all repeat types, accounting for 46.88% and 34.99%, respectively. The microsatellites with length below 20 bp were in the majority and those over 20 bp amounted only 5.67%. It showed a negative relation between the frequency of occurrences and the length of microsatellites. Most of SSRs were in untranslated region, and only 232 SSRs were located in protein-coding regions, while 18 in both of them. Trinucleotide repeats were the richest in protein-coding regions (105, 45.26%).

**Key words** *Pinus tabulaeformis*; ovule; transcription; microsatellite

油松(*Pinus tabulaeformis*)分布广泛,耐寒耐旱,适应性强,有保持水土、涵养水源和净化环境的作用,是我国北方地区主要的造林绿化树种。油松种苗的市场需求量大,但目前油松种苗的无性繁殖技术尚不成熟,只能通过良种繁殖提供优质种子。然

而油松种子产量有限,种子园内还经常出现胚珠败育和球果空瘪等问题。早期的研究发现,辽宁兴城种子园中28号无性系的球果能正常生长,但雌配子体由于游离核有丝分裂不能继续而停止发育<sup>[1]</sup>。课题组从蛋白质和DNA水平对其败育原因展开了

收稿日期:2015-01-29 修回日期:2015-03-25

基金项目:国家自然科学基金项目(31170563)。

第一作者:安俊。主要研究方向:植物生长发育。Email:anjun070124110@126.com 地址:100083 北京市海淀区清华东路35号北京林业大学生物科学与技术学院。

责任作者:郑彩霞,教授,博士生导师。主要研究方向:植物生长发育的分子调控机制。Email:zhengcx@bjfu.edu.cn 地址:同上。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

研究,揭示了油松胚珠不育现象可能与蛋白质异常表达<sup>[2]</sup>与代谢紊乱<sup>[3]</sup>有关,而这可能是 DNA 水平上的变异导致的<sup>[4]</sup>。

基因的调控表达受到多种因素影响。近年来越来越多证据表明,微卫星序列参与了基因的表达调控<sup>[5-6]</sup>。微卫星(Microsatellite),也称为简单序列重复(Simple Sequence Repeat, SSR),具有共显性、多等位性、高多态性及高重复性等特性,符合孟德尔遗传规律且对基因组覆盖广,并有片段小、数量多等优点<sup>[7-8]</sup>,被广泛应用于植物保护<sup>[9]</sup>、种质资源分析<sup>[10-11]</sup>、物种遗传<sup>[12-13]</sup>、品种鉴定<sup>[14-15]</sup>、功能基因定位<sup>[16]</sup>等研究领域。基于转录组数据进行的微卫星分析步骤更简单<sup>[17]</sup>,且信息量大、通用性好、费用低。

本研究采用 MISA 软件,对前期利用高通量测序技术获得的油松胚珠转录组进行微卫星位点检索,并分析油松胚珠转录组微卫星的分布特征和组成,为最终揭示油松胚珠败育的分子调控机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据来源及材料

本实验基于前期实验获得油松胚珠转录组数据进行研究。转录组测序样本为辽宁兴城油松种子园中遗传背景相近的 28 号雌性不育系油松胚珠和 14 号可育系油松胚珠。依据前期研究结果及解剖观察,确定采样时期,分别在雌配子体游离核分裂的前期、中期和后期采集球果,共 6 个样本,剥取胚珠后锡箔纸包好,液氮速冻,放入 -80℃ 冰箱里保存。用“试剂盒提取法”分别提取 RNA,送北京百迈客生物科技有限公司进行高通量测序。测序后共获得 70 996 894 条 reads,拼接后共获得油松胚珠 2 919 098 条 contig,63 449 个 Unigene,总长度为 3 038 kb。

### 1.2 简单重复序列(SSR)的分析搜索

利用 Linux 操作平台下的 MISA 软件(MISA-Micro Satellite identification tool, MISA)搜索 Unigene 中的 SSR 位点,搜索参数分别设置为:单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸的最少重复次数分别为 10、6、5、5、5、5。复合 SSR 两个位点间最大间隔碱基数为(Maximal number of bases interrupting 2 SSRs in a compound microsatellite):100。使用 Getorf 软件对 Unigene 的编码区进行预测,然后根据预测的结果以及 SSR 的位点信息判断 SSR 的落点。

## 2 结果与分析

### 2.1 微卫星重复分布概况及重复基元的分布

利用 MISA 软件对转录组的 63 449 个 Unigene 序列进行分析,共得到 1 412 个 SSR 位点,分布在 1 274 条 Unigene 序列当中,包含 SSR 的序列发生频率为 2.01%,SSR 位点分布频率为 2.23%,其中发生频率是含有 SSR 的 Unigene 数量与总 Unigene 数量之比,分布频率是 SSR 的个数与总 Unigene 的数量比;序列拼接总长度为 3 038 kb,平均每 2.15 kb 出现一个 SSR 序列,SSR 的分布密度为 0.465 SSR/kb。

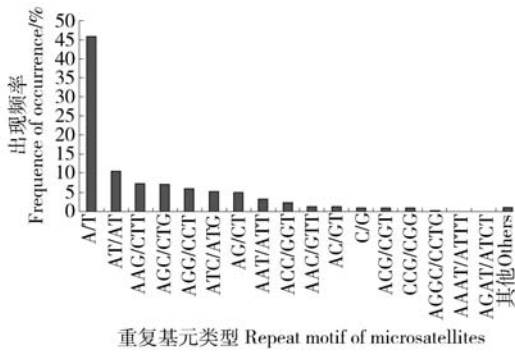
所得 1 412 个 SSR 位点共包含 87 种重复基元(motif)。其中(A/T)<sub>n</sub>、(AT/AT)<sub>n</sub>、(AAG/CTT)<sub>n</sub>、(AGGC/CCTG)<sub>n</sub>分别为单、二、三、四核苷酸重复基元中出现频率最多,在各自重复基元类型中所占比例分别为 97.89%、62.55%、21.05%、26.67%,6 种五核苷酸重复基元各出现 1 次,六核苷酸重复没有搜索到。在所有重复基元中,单核苷酸重复基元出现频率最高,为 46.88%,其次分别为 34.99% 的三核苷酸、16.64% 的二核苷酸、1.06% 的四核苷酸和 0.43% 的五核苷酸(表 1)。

表 1 油松胚珠转录组中不同微卫星中优势重复基元的出现频率

Tab. 1 Occurrence frequency of different microsatellites repeat motifs of ovule transcriptome in *Pinus tabulaeformis*

重复类型 Repeat type	数量 Number	频率 Frequency/ %	最多的重复基元 (数量和百分比) Maximum repeat motif (number and percentage)
单核苷酸 Mononucleotide	662	46.88	A/T (648, 97.89%)
二核苷酸 Dinucleotide	235	16.64	AT/AT (147, 62.55%)
三核苷酸 Trinucleotide	494	34.99	AAG/CTT (104, 21.05%)
四核苷酸 Tetranucleotide	15	1.06	AGGC/CCTG (4, 26.67%)
五核苷酸 Pentanucleotide	6	0.43	

在发现的 87 种重复基元中,单、二、三、四、五核苷酸重复基元分别有 4、11、53、13、6 种,其中出现频率最高的为(A/T)<sub>n</sub>(45.89%),其次是(AT/AT)<sub>n</sub>(10.41%)、(AAG/CTT)<sub>n</sub>(7.37%)、(AGC/CTG)<sub>n</sub>(7.29%)、(AGG/CCT)<sub>n</sub>(6.02%)等。并发现少量(CG/GC)的二核苷酸重复(0.07%)。不同类型重复基元分布情况见图 1。



重复基元类型 Repeat motif of microsatellites

其他表示频率为 0.07% (即仅出现 1 次) 的所有重复基元类型。  
Others: All of the motifs whose frequency is 0.07% (occured only once).

图1 油松胚珠转录组中不同重复基元类型的微卫星分布

Fig.1 Microsatellites distribution of different repeat motifs in ovule transcriptome of *Pinus tabulaeformis*

### 2.2 微卫星在编码区中的分布

油松胚珠转录组中共检测到 1 412 个 SSR 位点, 仅有 232 个位点存在于编码区, 位于非编码区的位点到达 1 162 个, 另有 18 个位点跨越了蛋白编码区和非编码区。在基因编码区中所占比例最高的是三核苷酸重复 (105, 45.26%), 其次是单核苷酸重复 (96, 41.38%)、二核苷酸重复 (28, 12.07%)。非编码区则是单碱基重复最多 (562, 48.36%), 随后是三碱基重复 (378, 32.53%)、二碱基重复 (205, 17.64%)。

### 2.3 微卫星的长度分布

油松胚珠转录组中 1 412 个微卫星的长度存在较显著的差异, 从 10 ~ 25 个碱基不等, 平均长度为 14.56 bp。图 2 展示了油松胚珠微卫星中不同长度重复序列的数量变化, 其中重复长度多小于 20 bp, 长度在 10 ~ 19 bp 的重复序列占总数的 94.33%, 长度在 20 bp 及以上仅占 5.67%。

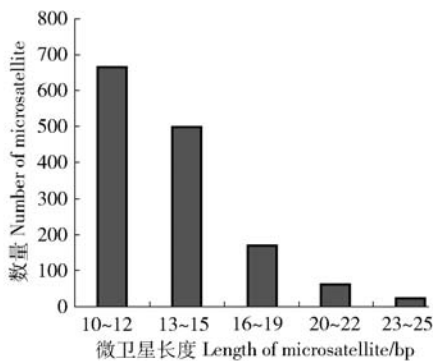
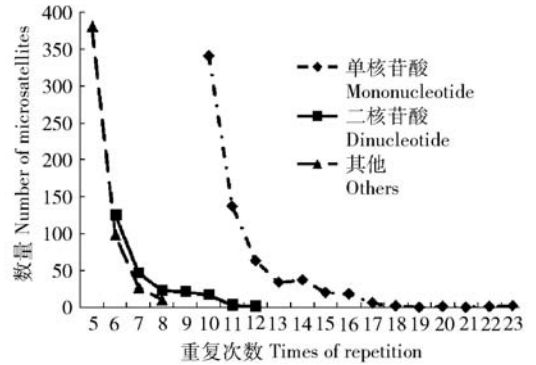


图2 油松胚珠转录组中微卫星的长度分布

Fig.2 Length distribution of microsatellites in ovule transcriptome of *Pinus tabulaeformis* Carr.

重复次数增加明显下降的趋势, 且重复次数越少, SSR 数量下降的速率越快。仅当单核苷酸重复由 13 次增加到 14 次、二核苷酸重复由 8 次增加到 9 次时, SSR 数量出现小幅增加。当单核苷酸重复次数达到 18 次、二核苷酸重复次数达到 11 次时, SSR 的下降速率降低并进入平台期; 三到六核苷酸重复次数仅仅为 5 ~ 8 次, 变化范围较小, 有明显的下降, 但未出现明显平台期。



其他表示三 ~ 六核苷酸重复 SSR 数量的总和。Others: The total of Tri-, Tetra-, Penta Hexa-nucleotide repeat quantities.

图3 油松胚珠转录组中 SSR 数量随重复次数的变化曲线  
Fig.3 Influence of repeat times on number of microsatellites in ovule transcriptome of *Pinus tabulaeformis*

### 2.4 微卫星序列表达水平分析

Weber<sup>[18]</sup> 早期的研究根据微卫星结构将微卫星分为单一型 SSR (Pure SSR)、复合型 SSR (Compound SSR) 和间隔型 SSR (Interrupted SSR)。油松胚珠转录组分别发现 5 个含复合型 SSR 和 23 个含间隔型 SSR 的 Unigene 序列, SSR 平均长度分别 32.20、72.52 bp, 表达水平 (RPKM) 平均值分别为 16.29、52.37。表 2 呈现了不同类型微卫星的 Unigene 表达水平均值及长度均值, 其中含复合型 SSR 的 Unigene 序列表达水平显著低于含单一型 SSR 的 Unigene 序列, 含间隔型 SSR 的 Unigene 序列则高于单一型 SSR。

## 3 结论与讨论

本研究基于课题组前期对油松胚珠转录组进行测序所得数据, 使用 MISA 软件对 63 449 条 Unigene 序列进行微卫星特征分析及 Getorf 软件对 Unigene 的编码区进行预测, 共发现 1 412 个微卫星位点, 分布在 1 274 条序列中, 其中 232 个位点位于编码区; SSR 的分布密度为 0.465 SSR/kb, 平均每 2.15 kb 出现一个 SSR, 不同物种间微卫星的出现频率不同且差异较大, 油松胚珠与草棉 (*Gossypium herbaceum*) (1SSR/2.4 kb)<sup>[19]</sup>、核桃 (*Juglans regia*)

图3 呈现了油松胚珠转录组中 SSR 的数量随



表2 油松胚珠转录组中 SSR 类型与长度对基因表达水平的影响

Tab.2 Effect of SSR type and length on the values of RPKM in ovule transcriptome of *Pinus tabulaeformis*

序列类型 Sequence type	表达水平均值 Mean of RPKM	SSR 长度均值 Mean of SSR size/bp
复合型 SSR Compound SSR	16.29	32.20
间隔型 SSR Interrupted SSR	52.37	72.52
单核苷酸重复 Mononucleotide repeats	50.25	11.21
二核苷酸重复 Dinucleotide repeats	34.71	13.91
三核苷酸重复 Trinucleotide repeats	42.47	16.10
四核苷酸重复 Tetranucleotide repeats	23.17	20.00
五核苷酸重复 Pentanucleotide repeats	29.55	25.00
总计 Total	44.64	14.56

注:RPKM 为表达水平。Note: RPKM means reads per ilo bases per million reads.

(1SSR/2.8 kb)<sup>[20]</sup> 相近。在油松胚珠转录组中包含 SSR 的 Unigene 序列约占总数的 2.01%, 发生频率远低于其他植物。一方面,这可能是由于物种特异性所引起的。松属 (*Pinus* spp.) 植物的起源相比其他植物更早,在长期进化过程中基因更加稳定,而广泛分布于基因组中的微卫星,与其他序列相比更活跃更易发生突变,因此物种本身稳定的特性可能是导致油松转录组中微卫星序列含量低于杨树 (*Populus* spp.) (15.3%)、桉树 (*Eucalyptus* spp.) (18.7%)、茶树花 (*Camellia sinensis*) (16.6%) 等<sup>[21-22]</sup> 的主要原因。另一种古老植物——红豆杉 (*Taxus Chinensis* var. *mairei*) 的转录组中微卫星出现频率也比较低(2.24%)<sup>[23]</sup>,银杏 (*Ginkgo biloba*) 稍高(5.09%)<sup>[24]</sup>。另一方面,数据量的大小、搜索条件的设定以及搜索软件的选择也可能对研究结果产生影响。

油松胚珠转录组微卫星种类较丰富,1~5 核苷酸重复类型都有出现,优势重复基元为单核苷酸重复,所占比例为 46.88%,其次为三核苷酸重复(34.99%)。而在基因编码区中三核苷酸重复约占 45.26%,比例超过单核苷酸,在所有重复类型中最高,表现出较高的富集水平。在生物长期进化过程中,三联体密码子选择作用对微卫星序列产生影响,

导致三、六核苷酸重复的富集,特别是在基因编码区中。与其他重复类型相比,三、六核苷酸突变对基因表达产物的影响较小,不会显著改变阅读框,这对物种的生存和延续更加有利,同时序列本身对三、六核苷酸容受性也优于其他,因此在长期选择过程中,三、六核苷酸更易在编码区中发生富集<sup>[21-22]</sup>,而起源更早的油松等植物在这方面尤为突出。王晓峰等<sup>[25]</sup>的研究发现马尾松 (*Pinus massoniana*) 转录组微卫星中所占比例最高的重复类型就是三核苷酸重复和六核苷酸重复。阎毛毛等<sup>[21]</sup>比对了松树、杨树和桉树的 EST 序列微卫星分布情况,发现松树三核苷酸重复在所有重复类型中所占比例达到 64.0%,三核苷酸重复的富集程度远高于桉树(48.2%)和杨树(45.2%)。当然,大量三、六核苷酸的富集对于生物体来说并不是没有意义的,Bai 等<sup>[26]</sup>认为三、六核苷酸重复比其他类型具有更广泛的功能,而关于人类基因组的研究已经发现微卫星三核苷酸重复与某些疾病的发生相关<sup>[27]</sup>。而三核苷酸重复对油松胚珠生长发育有什么意义,又是否对油松败育的发生产生了影响,这些还有待进一步研究。六核苷酸重复作为另一种易富集核苷酸类型,在多数植物中都可以找到,在有些植物中甚至是优势重复类型<sup>[23,28-29]</sup>,但是在油松胚珠中并没有发现,这可能是受到搜索条件中设定重复次数偏高的影响。目前大多数植物中微卫星重复类型都是以二、三核苷酸为主<sup>[29-30]</sup>,而单核苷酸成为油松胚珠转录组中优势重复基元可能也是受到搜索条件设定重复次数偏低的影响。目前对于微卫星搜索条件的设定并没有统一的标准,这也为不同物种微卫星研究、物种之间微卫星特征的比较带来不便。

不同物种和不同的重复类型,其优势碱基单元有所不同,这可能由于不同物种中相应的编码蛋白的使用频率不同而造成的。本研究油松胚珠中(A/T)<sub>n</sub>所占比例达到 45.89%,在所有碱基单元中所占比例最高;出现最多的二核苷酸和三核苷酸重复分别为(AT/AT)<sub>n</sub>和(AAG/CTT)<sub>n</sub>,这些与之前关于松属编码区微卫星特征分析结果相吻合<sup>[31]</sup>,与其他物种研究结果也相同<sup>[29,32-33]</sup>。(CG/GC)作为油松胚珠转录组中出现频率最低的重复基元之一(只出现 1 次),也和其他物种中一样十分稀少,表现出较强的偏倚性。少量的 CG 重复是维持 DNA 热力学稳定性不可或缺的,但基因组 DNA 中 CpG 岛的甲基化导致 CG 无法大量产生<sup>[34]</sup>。本研究在三、四、五核苷酸重复中分别发现 63、5、1 个 GC,也说明油松胚珠转录组中 GC 重复虽然少但不缺乏。

微卫星的重复次数和长度通常造成不同基因型

间广泛存在的多态性<sup>[35]</sup>,这是判断一种分子标记可用性的重要依据<sup>[36]</sup>,多数研究者认为复制过程中的滑动(Slippage)是引起这种多态性的原因<sup>[37]</sup>。在油松胚珠转录组中发现10~25 bp不等的重复序列,平均长度为14.56 bp,变化范围与云南松(*Pinus yunnanensis*)<sup>[38]</sup>相近(10~35 bp),但与杨树(10~156 bp)<sup>[39]</sup>、枣(*Ziziphus jujuba*) (10~577 bp)<sup>[28]</sup>相差较大,这也进一步证明松属植物基因组更加稳定。微卫星的长度变化影响着其位点失去和获得重复基元的活跃程度。Temnykh等<sup>[40]</sup>的研究将不同长度的微卫星序列分为了大于等于20 bp的第1类和大于12且小于20的第2类,比较后认为第2类微卫星不易发生变异,其表现为短重复序列偶尔会发生扩张但几率很小,因为在较短的模板上滑动错配发生的几率也比较小;长度为12 bp及以下的重复序列多态性更低。在Weber等<sup>[18]</sup>早期关于人类基因组微卫星研究的实验数据中也发现第1类SSR比第2类有更高的多态性,并已在许多生物体中得到证实。因此长度大于20 bp的微卫星重复序列被认为多态性较高且更有利用价值。油松胚珠转录组中,长度在12 bp及以下的低多态性重复序列占微卫星总数的47.24%,长度在12~20 bp之间的重复序列占47.09%,20 bp及以上的高多态性重复序列占5.67%,数量分别为667、665和80个。这也表明,随着微卫星长度的增加,其出现频率显著降低,这与已报道的茶树花<sup>[22]</sup>、桉树<sup>[41]</sup>等多数植物相同。Samadi等<sup>[42]</sup>通过模拟分析得出重复基元长度与选择压力的关系,认为重复基元越长,所受选择压力越大,则拷贝数越少,因此长度较短的微卫星变异速率较快,较长则相对稳定。因此,油松胚珠转录组中的单核苷酸重复表现最为活跃更易发生变异。Streelman等<sup>[43]</sup>在关于罗非鱼研究中还发现微卫星长度与基因表达强度相关,王丽鸳等<sup>[22]</sup>在茶树花转录组中也发现基因表达水平与微卫星长度呈负相关。在油松胚珠转录组中,我们试图寻找微卫星长度与表达水平RPKM的关系,但分析后并没有发现规律。这可能是由于本研究初始数据量相对较小,特别是复杂微卫星序列及四、五核苷酸重复的数量较低。

近年来,基因组学和生物信息学研究的不断深入以及测序技术的长足发展,推动着有关微卫星的研究逐渐兴起,微卫星分子标记技术的应用越来越广泛,目前已经发现微卫星序列对基因功能和不同物种基因差异的研究有着重要影响,但关于油松甚至裸子植物的微卫星研究仍在少数。本研究通过对前期获得的油松胚珠转录组数据进行微卫星位点的

搜索,并分析了微卫星的分布特征,这为下一步探索油松胚珠中的微卫星是否影响着胚珠发育、是否引起了可育系与不育系油松转录组之间的差异等问题提供重要信息资源和数据保障,也为油松胚珠微卫星分子标记及后续发育分子调控机制的深入研究奠定基础。

## 参 考 文 献

- [1] 李凤兰,沈熙环,李悦. 油松雌性不育无性系的发现及其原因分析[J]. 河北林学院学报,1992,7(2):93-98.  
LI F L, SHEN X H, LI Y. Discovery and analysis of female infertility of clone No. 28 in seed orchard of *Pinus tabulaeformis* Carr. [J]. Journal of Hebei Forestry College, 1992, 7(2): 93-98.
- [2] 丁坤善,郑彩霞,包仁艳. 油松雌性不育系的POD同工酶和蛋白质多肽分析[J]. 西北植物学报,2004,24(1):17-20.  
DING K S, ZHENG C X, BAO R Y. Analyses of peroxidase isozyme and protein polypeptides in female sterile *Pinus tabulaeformis* [J]. Acta Botanica Boreali - Occidentalia Sinica, 2004, 24(1): 17-20.
- [3] BAO R Y, ZHENG C X. Content changes of several endogenous plant hormones in female-sterile *Pinus tabulaeformis* Carr. [J]. Forestry Studies in China, 2005, 7(4): 16-19.
- [4] 李敏俐,郑彩霞. 油松雌性不育系(28号无性系)的RAPD分析[J]. 北京林业大学学报,2002,24(4):35-38.  
LI M L, ZHENG C X. RAPD analysis in female sterility (Clone 28) of *Pinus tabulaeformis* Carr. [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2002, 24(4): 35-38.
- [5] KASHI Y, KING D, SOLLER M. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation [J]. Trends in Genetics, 1997, 13(2): 74-78.
- [6] JEWELL E, ROBINSON A, SAVAGE D, et al. SSR primer and SSR taxonomy tree; biome SSR discovery [J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(Web Server): W656-W659.
- [7] POWELL W, MACHRAY G C, PROVAN J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats [J]. Trends in Plant Science, 1996, 1(7): 215-222.
- [8] 郭承亮,耿月明,王世才. 主要农作物品种鉴定方法要“新、老”结合[J]. 中国种业,2013(7):24-26.  
GUO C L, GENG Y M, WANG S C. Identification of main crops should combine new and old methods [J]. China Seed Industry, 2013(7): 24-26.
- [9] 李美琼,高浦新,朱友林,等. 微卫星(SSR)分子标记应用于濒危植物保护的研究进展[J]. 江西林业科技,2011(2):24-28.  
LI M Q, GAO P X, ZHU Y L, et al. Research progress of in cotton variety identification SSR molecular marker in protection of threatened plant [J]. Journal of Jiangxi Forestry Science and Technology, 2011(2): 24-28.
- [10] 田路明,曹玉芬,董星光,等. SSR分子标记在梨种质资源研究中的应用[J]. 生物学杂志,2013,30(6):91-94.  
TIAN L M, CAO Y F, DONG X G, et al. Application of SSR molecular marker in pear germplasm resources [J]. Journal of Biology, 2013, 30(6): 91-94.
- [11] HOU C, LI M, ZHANG Y, et al. Analysis of SSR fingerprints in

- introduced silkworm germplasm resources [J]. *Agricultural Sciences in China*, 2007, 6(5): 620-627.
- [12] KANTARTZI S K, UIHOA M, SACKS E, et al. Assessing genetic diversity in *Gossypium arboreum* L. cultivars using genomic and EST-derived microsatellites[J]. *Genetica*, 2009, 136: 141-147.
- [13] 周莉, 刘静霞, 桂建芳. 应用微卫星标记对雌核发育银鲫的遗传多样性初探[J]. *动物学研究*, 2001, 22(4): 257-264.
- ZHOU L, LIU J X, GUI J F. Exploration genetic diversity in *Carassius auratus* gibelio bloch of gynogenesis using microsatellites marker[J]. *Zoological Research*, 2001, 22(4): 257-264.
- [14] 施勇峰, 应杰政, 王磊, 等. 鉴定水稻品种的微卫星标记筛选[J]. *中国水稻科学*, 2005, 19(3): 195-201.
- SHI Y F, YING J Z, WANG L, et al. Screening SSR markers for rice variety identification[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2005, 19(3): 195-201.
- [15] RODER M S, WENDEHAKE K, KORZUN V, et al. Construction and analysis of a microsatellite - based database of European wheat varieties[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 106: 67-73.
- [16] 张琳琳. 功能基因中的微卫星序列[J]. *现代生物医学进展*, 2008, 8(9): 1783-1785.
- ZHANG L L. The development of the microsatellites in the functional genes [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2008, 8(9): 1783-1785.
- [17] 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.
- [18] WEBER J L. Informativeness of human (dC-dA)n. (dG-dT)n polymorphisms[J]. *Genomics*, 1990, 7: 524-530.
- [19] JENA S N, SRIVASTAVA A, RAI K M, et al. Development and characterization of genomic and expressed SSRs for levant cotton (*Gossypium herbaceum* L.) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2012, 124: 565-576.
- [20] 陈凌娜, 马庆国, 张俊佩, 等. 核桃 BES-SSR 的开发及在遗传多样性分析中的应用[J]. *北京林业大学学报*, 2014, 36(6): 24-29.
- CHEN L N, MA Q G, ZHANG J P, et al. Development of BAC-SSR markers in walnut and its application in genetic diversity analysis[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2014, 36(6): 24-29.
- [21] 阎毛毛, 戴晓港, 李淑娴, 等. 松树、杨树及桉树表达基因序列微卫星比对分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2011, 30(1): 103-109.
- YAN M M, DAI X G, LI S X, et al. Sequence analysis and comparison of EST-SSRs in pine, poplar and eucalyptus [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2011, 30(1): 103-109.
- [22] 王丽鸳, 韦康, 张成才, 等. 茶树花转录组微卫星分布特征[J]. *作物学报*, 2014, 40(1): 80-85.
- WANG L Y, WEI K, ZHANG C C, et al. Characterization of microsatellites in tea (*Camellia sinensis*) floral transcriptome[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2014, 40(1): 80-85.
- [23] 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. *mairiei* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2014, 41(4): 735-745.
- [24] 樊洪泓, 李廷春, 李正鹏, 等. 银杏 EST 序列中微卫星的分布特征[J]. *基因组学与应用生物学*, 2009, 28(5): 869-873.
- FAN H H, LI Y C, LI Z P, et al. Characteristics of EST-SSR distribution in ginkgo ESTs [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2009, 28(5): 869-873.
- [25] 王晓锋, 何卫龙, 蔡卫佳, 等. 马尾松转录组测序和分析[J]. *分子植物育种*, 2013, 11(3): 385-392.
- WANG X F, HE W L, CAI W J, et al. Analysis on transcriptome sequenced for *Pinus massoniana* [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2013, 11(3): 385-392.
- [26] BAI T D, XU L A, WANG Z R, et al. Characterization of masson pine (*Pinus massoniana* Lamb.) microsatellite DNA by 454 genome shotgun sequencing [J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2014, 10: 429-437.
- [27] REDDY P S, HOUSMAN D. The complex pathology of trinucleotide repeats [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 1997, 9(3): 364-372.
- [28] 马秋月, 戴晓港, 陈赢男, 等. 枣基因组的微卫星特征[J]. *林业科学*, 2013, 49(12): 81-87.
- MA Q Y, DAI X G, CHEN Y N, et al. Characterization of microsatellites in the genome of *Ziziphus jujuba* [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2013, 49(12): 81-87.
- [29] WU J, CAI C F, CHENG F Y, et al. Characterisation and development of EST-SSR markers in tree peony using transcriptome sequences [J]. *Molecular Breeding*, 2014, 34: 1853-1866.
- [30] WANG L X, ELBAIDOURI M, ABERNATHY B, et al. Distribution and analysis of SSR in mung bean (*Vigna radiata* L.) genome based on an SSR-enriched library [J]. *Molecular Breeding*, 2015, 35: 25-35.
- [31] 孔凡明, 王小龙, 陈赢男, 等. 松属编码区微卫星特征和相应基因功能分析[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2014, 38(2): 47-51.
- KONG F M, WANG X L, CHEN Y N, et al. Characterization of microsatellites in coding genes and functional analysis of these genes in pines [J]. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 2014, 38(2): 47-51.
- [32] 袁阳阳, 王青锋, 陈进明. 基于转录组测序信息的水生植物荇菜 SSR 标记开发[J]. *植物科学学报*, 2013, 31(5): 485-492.
- YUAN Y Y, WANG Q F, CHEN J M. Development of SSR markers in aquatic plant *Nymphoides peltata* (Menyanthaceae) based on information from transcriptome sequencing [J]. *Plant Science Journal*, 2013, 31(5): 485-492.
- [33] HENDRE P S, AGGARWAL R K. Development of genic and genomic SSR markers of robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre Ex A. Froehner) [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): 0113661.
- [34] SCHORDERET D F, GARTLER S M. Analysis of CpG suppression in methylated and nonmethylated species [J]. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America*, 1992, 89: 957-961.

- [35] 何平. 真核生物中的微卫星及其应用[J]. 遗传,1998,20(4):42-47.  
HE P. Abundance, polymorphism and applications of microsatellite in eukaryote[J]. Hereditas,1998,20(4):42-47.
- [36] 李小白,张明龙,崔海瑞. 油菜 EST 资源的 SSR 信息分析[J]. 中国油料作物学报,2007,29(1):20-25.  
LI X B,ZHANG M L,CUI H R. Analysis of SSR information in EST resource of oilseed rape[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences,2007,29(1):20-25.
- [37] SHAROPOVA N,FRANCKI M. Plant simple sequence repeats: distribution, variation, and effects on gene expression [J]. Genome,2008,51:79-90.
- [38] 许玉兰,白青松,张瑞丽,等. 云南松基因组微卫星富集文库的序列特征分析[J]. 生物技术,2014,24(4):62-66.  
XU Y L, BAI Q S, ZHANG R L, et al. Characteristics of microsatellite enrichment pool from *Pinus yunnanensis* genomic DNA[J]. Biotechnology,2014,24(4):62-66.
- [39] 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 Q Q, 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 (Natural Sciences Edition),2011,35(1):11-14.
- [40] TEMNYKH S, DECLERCK G, LUKASHOVA A, et al. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential[J]. Genome Research, 2001,11:1441-1452.
- [41] 李淑娴,张新叶,王英亚,等. 桉树 EST 序列中微卫星含量及相关特征[J]. 植物学报,2010,45(3):363-371.  
LI S X, ZHANG X Y, WANG Y Y, et al. Content and characteristics of microsatellites in eucalyptus EST sequences[J]. Chinese Bulletin of Botany,2010,45(3):363-371.
- [42] SAMADI S, ARTIGUEBIELLE E, ESTOUP A, et al. Density and variability of dinucleotide microsatellites in the parthenogenetic polyploid snail *Melanoides tuberculata* [J]. Molecular Ecology, 1998,7(9):1233-1236.
- [43] STREELMAN J T, KOCHER T D. Microsatellite variation associated with prolactin expression and growth of salt-challenged tilapia[J]. Physiol Genomics,2002,9:1-4.

(责任编辑 赵勃  
责任编辑委 林金星)