

花苜蓿抗旱耐盐 EST-SSR 标记筛选

刘洁^{1,2}, 胡蝶^{1,2}, 楚海家¹, 闫娟^{1*}, 李建强^{1*}

(1. 中国科学院武汉植物园, 中国科学院特色农业重点实验室, 武汉 430074; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 为了给花苜蓿(*Medicago ruthenica* Trautv.)抗旱耐盐的生态适应性研究提供特异的遗传标记, 在已公布的 70 对鹰嘴豆抗旱耐盐 EST-SSR 标记中筛选出稳定性好、多态性高的 8 对引物, 并用这 8 对引物对挑选出的 11 个居群的 286 个个体进行扩增, 获得 111 个等位基因。平均等位基因数为 13.88; 平均观察杂合度为 0.497; 平均预期杂合度为 0.687; 多态信息含量从 0.313 到 0.883 不等, 平均值为 0.649。以上结果表明, 筛选出来的 8 个 EST-SSR 标记可以用于花苜蓿的遗传多样性分析, 而且遗传多样性处于较高水平。多态性丰富的 EST-SSR 引物适用于花苜蓿生态适应性进化分析, 对揭示花苜蓿抗旱耐盐基因型的遗传变异和地理分布格局以及探讨花苜蓿抗旱耐盐的适应性分化机制有重要意义。

关键词: 花苜蓿; EST-SSR 标记; 抗旱耐盐; 引物筛选

中图分类号: Q346⁺.7

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2013)05-0493-07

Screening of Drought- and Salinity-responsive EST-SSR Markers in *Medicago ruthenica* Trautv.

LIU Jie^{1,2}, HU Die^{1,2}, CHU Hai-Jia¹, YAN Juan^{1*}, LI Jian-Qiang^{1*}

(1. Key Laboratory of Plant Germplasm Enhancement and Specialty Agriculture, Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China; 2. University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China)

Abstract: To provide genetic markers for the study of ecological adaptability to responsive drought- and salinity-stress for *Medicago ruthenica* Trautv., we selected eight pairs of good polymorphism and high stability primers from 70 pairs of drought- and salinity-responsive EST-SSR markers published for chickpea. DNA sequences were amplified with eight pairs of SSR primers by SSR-PCR technique. One hundred and eleven alleles were detected, on average, 13.88 alleles were detected per site. The mean values of observed heterozygosity and expected heterozygosity were 0.497 and 0.687, respectively. Polymorphism information content value ranged from 0.313 to 0.883, and the mean value was 0.649. These results indicate that the eight EST-SSR markers can be used to estimate genetic diversity of *M. ruthenica*, and genetic diversity was at a high level. Polymorphism EST-SSR markers can be used to investigate ecological adaptive evolution. The results contribute to revealing the genetic variation of drought- and salt-tolerance genotypes and understanding the distribution pattern and ecological adaptation mechanism of *M. ruthenica* populations.

Key words: *Medicago ruthenica*; Drought- and salinity-responsive; EST-SSR marker; Primer screening

收稿日期: 2013-03-11, 修回日期: 2013-08-13。

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31000147)。

作者简介: 刘洁(1988-), 女, 硕士研究生, 研究方向为系统与进化植物学(E-mail: sunshine3231@163.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: yjcas@hotmail.com; lijq@wbpcas.cn)。

干旱和盐碱化是人类面临的世界性问题,也是制约作物和牧草产量的两个主要的环境因子。据统计,干旱导致的减产已超过因其它因素所造成减产的总和^[1]。据世界粮农组织和教科文组织的统计,全球有盐渍土壤约 9.5 亿 hm^2 , 占全球土地面积的 10%, 广泛分布于 100 多个国家和地区。在我国, 干旱半干旱地区占国土面积的 47%, 占总耕地面积的 51%^[2]; 特别在我国西北干旱半干旱地区, 随着水资源的日益短缺, 干旱和土壤盐碱化已成为该地区农牧业发展和生态环境的严重威胁。据第二次土壤普查统计, 我国盐渍土壤面积为 3500 万 hm^2 , 其中已开垦种植的盐渍土壤面积为 577 万 hm^2 , 尚有 1700 万 hm^2 左右的潜在盐渍化土壤^[3]。31.1% 的现有耕地受到盐碱危害, 严重影响作物的产量和品质。特别在我国的干旱半干旱地区, 随着水资源的日益短缺, 土壤干旱和盐碱化已成为该地区的农业发展和生态环境的严重威胁。因此, 在综合改良土地干旱、盐渍化问题的同时, 需要筛选和培育抗旱耐盐碱高产品种, 使这些土地得到合理利用。

花苜蓿 (*Medicago ruthenica* Trautv.) 是越年生、异交的草本植物, 具有抗旱、耐寒、耐盐碱、耐瘠薄等特点, 产草量高, 适口性好, 是一种营养价值较高的牧草。主要分布在我国东北、华北各地及甘肃、山东和四川; 蒙古、俄罗斯西伯利亚(远东地区)也有分布^[4]。花苜蓿生境多样化, 生长于草原、丘陵、河岸或砂砾质土壤的山坡旷野, 这些不同生境中水分、温度和土壤等生态环境因子的差异使花苜蓿形成各种独特且稳定的适应类群, 外部形态差异较大, 是我国苜蓿属植物中较有特色的一个物种。由于生态幅较广, 进化出多种适应于各自生境的生态型, 这些生态型对花苜蓿生态适应性的研究和遗传育种都具有重要意义。

苜蓿属植物中紫花苜蓿 (*Medicago sativa* Linn.) 是一种优质的多年生豆科牧草, 对我国畜牧业发展具有重要意义。然而, 经研究发现花苜蓿是苜蓿属中唯一可以适应干旱环境、极低降雨量的石质化环境和寒冷冬季的物种^[5], 且花苜蓿比紫花苜蓿具有更高的营养利用效率, 更适合低投入耕作系统^[6]。截至目前为止, 国内外对花苜蓿的抗性

基因鉴定的研究较少, 主要集中于表型特征评价, 生态特性分析等方面, 且数量少、取样范围较小, 未能从分子水平阐明其优良基因分布特征。

EST-SSR 标记是通过表达序列标签 (expressed sequence tag, EST) 中的简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 进行开发产生的一种遗传标记。新型的 EST-SSR 标记已成为重要农艺性状定位、基因作图、遗传多样性、比较基因组学研究的重要工具^[7]。目前基于 EST 数据的 SSR 标记已在一些植物如黄瓜 (*Cucumis sativus*)^[8]、截叶苜蓿 (*Medicago truncatula*)^[9]、小麦 (*Triticum aestivum*)^[10,11]、水稻 (*Oryza sativa*)^[12]、花生 (*Arachis hypogaea*)^[13]、葡萄 (*Vitis vinifera*)^[14]、棉花 (*Gossypium arboreum*)^[15]、黑麦草 (*Lolium perenne*)^[16] 等中已成功开发和应用。本实验所选择的 EST-SSR 是已被鉴定在其它豆科植物中与耐盐抗旱性状相关的分子标记, 具有针对性。本研究的目的在于筛选出适用于花苜蓿的抗旱耐盐 EST-SSR 引物, 为进一步揭示花苜蓿抗旱耐盐基因型的遗传变异和地理分布格局以及探讨花苜蓿抗旱耐盐的适应性分化的分子基础做准备。

1 材料与方法

1.1 实验材料

根据地理位置、生境条件, 从全国 23 个地点中挑选出花苜蓿 (*Medicago ruthenica* Trautv.) 11 个居群, 进行抗旱耐盐 EST-SSR 引物筛选工作。11 个居群分别是: 内蒙古自治区的满洲里 (MZL)、克什克腾旗 (KQ)、呼和浩特大青山 (HH)、达里湖 (DL) 居群; 四川省的茂县 (MX) 居群; 甘肃省的兴隆山 (XLS) 居群; 陕西省的南泥湾 (NN) 居群; 河北省的北戴河 (BDH) 居群; 山东省的济南 (JN) 居群; 辽宁省的彰武 (ZW) 居群; 吉林省的镇赉 (ZL) 居群 (见图 1)。这 11 个居群覆盖了花苜蓿在全国的分布范围, 各居群间有一定的地理距离。且各居群生境相差较大, 部分居群生境条件特殊, 属于干旱半干旱地区 (如克什克腾旗) 或是盐碱地 (如达里湖), 还有部分居群采样点土壤条件特殊, 属于沙质土壤 (如镇赉)。11 个居群的生境资料见表 1。

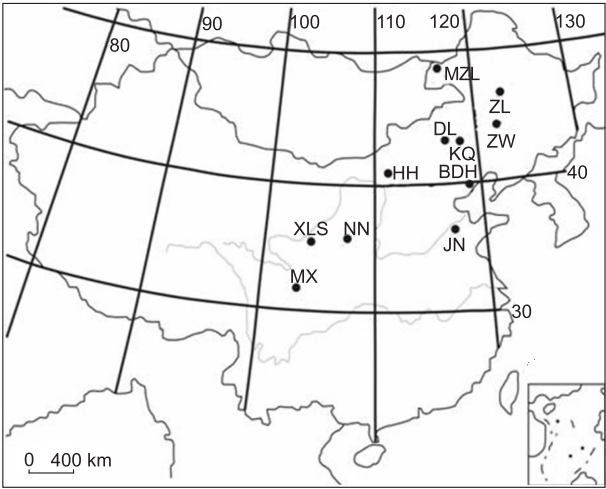


图 1 本研究 11 个居群分布图(居群编号见表 1)
Fig. 1 Locations of the 11 populations in present study
(Population code as listed in Table 1)

1.2 实验方法

1.2.1 PCR 扩增

目的片段的扩增通过聚合酶链式反应(PCR, polymerase chain reaction)在热循环仪上进行。PCR 反应体系总体积为 10 μ L, 其中包括 1 μ L 10~50 ng 的模板 DNA, 1 μ L 10 \times reaction buffer, 0.6 μ L MgCl₂ (25 mmol/L), 0.2 μ L dNTP (每种碱基浓度为 10 mmol/L), 正反向引物各 0.5 μ L (5 μ mol/L), 0.1 μ L *Taq* DNA 酶 (5 U/ μ L, invitrogen)。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 后延伸 8 min。

1.2.2 引物退火温度的确定

从鹰嘴豆(*Cicer arietinum* Linn.) 的抗旱耐盐

的 177 对 EST-SSR 标记^[17] 中随机选取 70 对引物进行订购合成, 配置成 100 μ mol 贮存液。取 10 μ L 贮存液配置成 5 μ mol 的引物溶液, 备用。实验中采用梯度扩增的方法分别确定各引物的退火温度。一般来说, 引物的退火温度范围在 50 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C 之间, 最初对于所有引物选取 54 $^{\circ}$ C 作为退火温度, 再根据扩增结果对各引物的退火温度进行调整, 以确定最适退火温度。

1.2.3 PCR 产物的电泳分离

PCR 产物的检测, 采用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳银染检测: 加入 3/4 体积的变性剂 (98% 甲酰胺, 10 mmol/L pH 8.0 EDTA, 0.05% 溴酚蓝和 0.05% 二甲苯腈), 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 取 3 μ L 样品在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶 (每 100 mL 凝胶溶液含 30% 丙烯酰胺溶液 20 mL, 5 \times TBE 溶液 20 mL, 10% 过硫酸铵溶液 0.7 mL, 四甲基乙二胺溶液 35 μ L) 上电泳, 电泳缓冲液为 1 \times TBE。电泳在六一电泳仪上进行, 功率恒定 55 W, 电泳时间根据目的片段大小而定。用 25 bp DNA 标记 (Promega, Madison, WI, USA) 作产物片段大小的对照标准。电泳结束后银染显色, 银染参照 Sanguinetti 等^[18] 的程序, 略加改动。

读带, 筛选多态性引物, 送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成荧光引物。

1.2.4 群体 SSR 扩增

依照以上 PCR 反应体系及反应程序, 对 11 个居群 286 个个体进行扩增, 送往生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行 STR (short tandem repeat) 分型。

表 1 11 个居群原产地和生境条件
Table 1 Locations and habitat characteristics of the 11 populations of *Medicago ruthenica*

居群编号 Population code	居群原产地 Population origin	纬度 Latitude	经度 Longitude	年均降水 (mm) Annual precipitation
MZL	内蒙古满洲里南山 Manzhouli, Inner Mongolia	117 $^{\circ}$ 27'	49 $^{\circ}$ 33'	304
KQ	内蒙古克什克腾旗 Hexigten Banner, Inner Mongolia	117 $^{\circ}$ 31'	43 $^{\circ}$ 15'	383
HH	内蒙古呼和浩特大青山 Daqingshan, Inner Mongolia	111 $^{\circ}$ 41'	40 $^{\circ}$ 54'	400
DL	内蒙古达里湖 Dali Nur, Inner Mongolia	116 $^{\circ}$ 47'	43 $^{\circ}$ 16'	110
MX	四川茂县 Maoxian, Sichuan	103 $^{\circ}$ 50'	31 $^{\circ}$ 41'	1087
XLS	甘肃兴隆山 Xinglongshan, Gansu	104 $^{\circ}$ 03'	35 $^{\circ}$ 47'	378
NN	陕西南泥湾 Nanniwan, Shaanxi	109 $^{\circ}$ 38'	36 $^{\circ}$ 19'	505
BDH	河北北戴河 Beidaihe, Hebei	119 $^{\circ}$ 27'	39 $^{\circ}$ 50'	653
JN	山东济南 Jinan, Shandong	117 $^{\circ}$ 02'	36 $^{\circ}$ 37'	674
ZW	辽宁彰武 Zhangwu, Liaoning	122 $^{\circ}$ 30'	42 $^{\circ}$ 31'	518
ZL	吉林镇赉 Zhenlai, Jilin	123 $^{\circ}$ 00'	46 $^{\circ}$ 06'	430

1.3 数据处理

利用 GeneMarker 1.5 软件对生工生物工程(上海)股份有限公司 STR 分型结果进行整理统计,统计主要带型,忽略弱杂带型,统计稳定且易于分辨条带。用 Cervus 3.0 软件^[19] 计算等位基因数目(number of alleles across all populations, A)、检测到的个体数(number of tested individuals, N)、观察纯合度(observed heterozygosity, H_o)和期望杂合度(expected heterozygosity, H_e),它们都是用来度量某一群体中特定基因座上等位基因纯合程度的指标^[20]。用多态信息含量(polymorphism information content, PIC)^[21]对标记基因多态性进行估计。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物退火温度的筛选

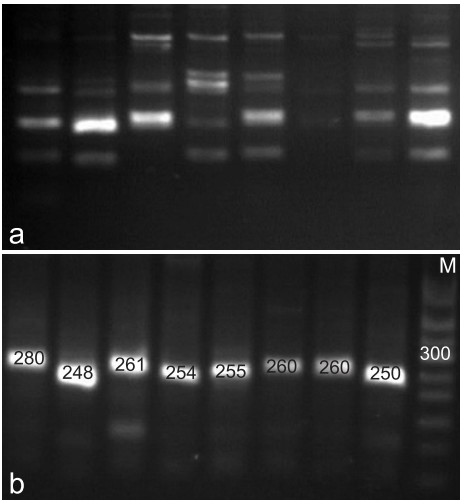
选取已公布的 177 对鹰嘴豆抗旱耐盐 EST-SSR 标记中的 70 对,按照参考文献^[17]中的反应体系和反应程序进行多态性检测,未得到如期效果。因此对确定所选引物的最适退火温度进行实验测定。

结果显示,当退火温度高于最适退火温度时,无法扩增出条带或是条带弱,扩增效果差。当退火温度低于最适退火温度时,扩增条带过多,特异性差,无法确定主带。所以将扩增出的条带清晰、主带明显的反应温度确定为该引物的最适退火温度。

从筛选出的标记 ICCeM0146 来看,在 54℃ 时,明显可见的条带多,主带不明显。所以对其退火温度进行逐步提高,分别在 55℃、56℃、57℃、58℃、59℃、60℃ 条件下进行扩增,结果以 59℃ 扩增效果最佳(见图 2)。反之,对于 54℃ 条件下,扩增产物弱或无的引物,应逐步降低其退火温度,以确定最佳反应条件。

2.2 多态性 SSR 引物的筛选

通过对 70 对引物的扩增筛选,其中 21 对引物可以扩增出 PCR 产物,并且有 12 对引物在随机选择的分别来自 8 个居群的 8 个个体间存在多态性。随后进行多次实验,选择扩增稳定、条带清晰的引物。最终筛选出 8 对引物,即: ICCeM0055、ICCeM0058、ICCeM0063、ICCeM0083、ICCeM0146、



M: DNA 标记。图中数字表示片段长度,单位为 bp。
M: DNA Marker. The numbers in the figure represent the length of fragment, unit is bp.

图 2 引物 ICCeM0146 在 54℃ (a) 和 59℃ (b) 的扩增结果

Fig. 2 Results of SSR-PCR amplification at different annealing temperature (54℃ (a) and 59℃ (b))

ICCeM0165、ICCeM0091、ICCeM0105(表 2)。

2.3 SSR 引物的扩增结果及多态信息

筛选出 8 对标记之后,分别用 FAM、HEX 两种荧光标记标定,送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行毛细电泳,利用软件 GeneMarker 1.5 读带, Cervus 3.0 软件进行各标记的等位基因频率分析,结果统计见表 3。8 个多态性 EST-SSR 标记在检测的 286 个个体中共获得 111 个等位基因。平均等位基因数为 13.88,平均观察杂合度为 0.497,平均预期杂合度为 0.687,多态信息含量从 0.313 到 0.883 不等,其中 ICCeM0083 最高,而 ICCeM0063 最低,平均值为 0.649。

3 讨论

EST-SSR 引物由于其来源于基因表达序列,且侧翼序列的保守程度和 SSR 进化的稳定性决定着同一种 EST-SSR 引物在不同物种间的通用性。40.7% 小麦的 EST-SSR 引物在大麦、燕麦、黑麦、水稻和玉米中具有通用性^[10]; 苇状羊茅(*Festuca arundinacea*) 的 EST-SSR 引物在水稻和小麦中的扩增率分别为 59% 和 71%^[22]。而在本实验 70 对引物中,只有 21 对扩增出产物,仅占 30%,通用

表 2 筛选出的 8 对多态性 EST-SSR 引物的详细信息
Table 2 Characterization of the eight polymorphic EST-SSR primers

引物编号 Primer code	引物序列 Primer sequence	退火温度(°C) Tm	重复类型 Motif	片段范围(bp) Expected size
ICCeM0055	GTGTGTGCAGCTGAAAAGGA AAGAGATGCGCCCATTGTAG	52	(TC)8TA(TC)20	180~210
ICCeM0058	AAACAAATGAATCAAATGGATAAACA GTTGGAAAGGGTTTTGGGAT	59	(AT)16	261~290
ICCeM0063	TTGTTGCAAAGCATCCTTCA GGAAATTGAGGGAAGAGGGA	50	(TC)12	230~260
ICCeM0083	GATGCTCGATCACTTCACGA TTCGCATATCGAGTTTTCCC	50	(AAG)6	210~251
ICCeM0146	TTTCAAGAAAGCCACCAAGC AAGGAAGTGATGAAGACAACGAA	59	(AT)9	240~260
ICCeM0165	ACCCATCAAAACCAACCAAA TCTGTAGCAGCAAATGCAGG	50	(ACC)6	170~180
ICCeM0091	TGAGGATATTGATCCCCCAA TCAAACATCGCCAACACAT	52	(TA)9	270~290
ICCeM0105	CTCCACCTTCAACCACGTTT GGAATGGAAGAAGAGAAGGGA	52	(AT)8	251~270

表 3 各标记的等位基因频率分析
Table 3 Allele frequency analysis of the eight loci

位点 Locus	等位基 因数 A	检测个 体数 N	观测杂 合度 H _O	预期杂 合度 H _E	多态信息 含量 PIC
ICCeM0055	20	271	0.528	0.683	0.638
ICCeM0058	20	265	0.581	0.807	0.784
ICCeM0063	4	286	0.378	0.364	0.313
ICCeM0083	25	260	0.654	0.894	0.883
ICCeM0146	16	270	0.444	0.783	0.754
ICCeM0165	8	285	0.411	0.664	0.608
ICCeM0091	9	280	0.454	0.660	0.605
ICCeM0105	9	283	0.523	0.639	0.604
Mean	13.88	275	0.4965	0.6867	0.6486

注：A，在所有居群中检测到的等位基因数；N，检测个体数；H_O，观察杂合度；H_E，预期杂合度；PIC，多态信息含量。

Notes: A, Number of alleles across all populations; N, Number of tested individuals; H_O, Observed heterozygosity; H_E, Expected heterozygosity; PIC, Polymorphism information content.

性偏低。除去随机选择的因素，没有对反应条件如实验试剂用量、扩增反应的循环数目等进行系统完善的调整，也对扩增结果产生了一定的影响。

EST-SSR 引物来自高度保守的 DNA 转录区，其揭示的多态性在理论上应低于基因组 SSR 标记，对于区分亲缘关系较近的基因型灵敏度不及基因组 SSR^[23,24]。然而，李鸿雁等^[25]利用 12 对 SSR 引物在内蒙古花苜蓿 4 个居群 148 份材料中共获得

66 个位点，平均等位基因数为 5.5，本研究中 8 对 EST-SSR 引物在 11 个居群的 286 个个体中共获得了 111 个位点，平均等位基因数目为 13.9，考虑到本研究中的实验样本数目是前者的二倍，粗略将其按照样本比例进行估算，两者平均等位基因近似。常玮等^[26]以 21 份大豆不同基因型的基因组 DNA 为模板分别选取 30 对多态性的 EST-SSR 引物和 30 对基因组 SSR 引物进行扩增，带型统计结果显示：大豆 EST-SSR 与基因组 SSR 在供试基因型间多态性指数均值分别为 0.55 和 0.44，二者揭示的多态性水平差异不大。研究表明，EST-SSR 在遗传多样性分析过程中同样可以真实地反应其遗传变异的水平。

平均预期杂合度可反映群体的遗传一致性的程度^[27]。平均预期杂合度越高，反映群体的遗传一致性就越低，其遗传多样性就越丰富。由本结果可知，ICCeM0063 的平均预期杂合度值最低，为 0.364，其余 7 个标记均具有较高的预期杂合度。多态信息含量是衡量微卫星 DNA 座位变异程度高低的重要指标。当某个微卫星标记的多态信息含量大于 0.5 时，表明该标记为高度多态位点；大于 0.25 且小于 0.5 时，为中度多态位点；小于 0.25 时，该座位为低度多态位点^[21]。本实验中，EST-SSR 标记除了 ICCeM0063 的多态信息量值为

0.313, 属于中度多态位点外, 其余 7 个标记属于高度多态位点。由上可知, 平均预期杂合度的结果与多态信息含量值得出的结果基本一致。本结果表明, 即使普遍认为 EST-SSR 标记的多态性较低, 但在本实验中 EST-SSR 标记具有较高的多态性, 一方面可能是因为本实验采用的是 STR 分型, 利用荧光引物进行仪器自动读带, 这相对于利用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行手工读带增加了准确率, 并提高了分辨率。另一方面, 本实验选取了花苜蓿的 11 个居群, 基本覆盖了花苜蓿在国内的分布范围, 并且考虑到了所选居群的生态环境因素, 使得各标记检测到的多态条带较多。由此表明筛选出来的 8 对 EST-SSR 标记在研究群体中呈现较高的多态性, 各标记在所选居群中具有较高水平的遗传多样性, 可以用于花苜蓿遗传多样性分析, 是苜蓿属 DNA 分子标记体系的一个重要补充。

4 结论

EST-SSR 处于基因编码区, 对 QTL 和基因精细定位具有重要作用, 可与基因数据库中已知序列比较, 获得一些与生物生长、发育、代谢、繁殖和衰老死亡等一系列生理生化过程相关的分子遗传信息, 是基因组 SSR 标记的补充。本实验中从近缘种鹰嘴豆^[18]已公布的 EST-SSR 标记中筛选了 8 个适用于花苜蓿的标记, 其与耐盐抗旱这一特性具有高度的相关性, 对于花苜蓿耐盐抗旱这一生态适应特征的进一步研究提供了有效的分子标记。

参考文献:

- [1] 汤章城. 植物对水分胁迫的反应和适应性: I. 抗性的一般概念和植物的抗涝性[J]. 植物生理学通讯, 1983(3): 24-29.
- [2] 王士谦. 玉米抗旱性研究进展[J]. 河北科技师范学院学报, 2005, 19(3): 76-80.
- [3] 俞仁培, 陈德明. 我国盐渍土资源及其开发利用[J]. 土壤通报, 1999, 30(4): 158-159.
- [4] 韦直, 黄以之. 中国植物志: 第 42 卷, 第 2 分册[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 318-320.
- [5] Balabaev G A. Yellow lucernes of Siberia, *Medicago ruthenica* (L.) Lebd. and *M. Platycarpus* (L.) Lebd. [J]. *Bull App Bot Genet Plant Breed Service*, 1934, 7: 113-123.
- [6] Campbell T A, Bao G, Xia Z L. Agronomic evaluation of *Medicago ruthenica* collected in Inner Mongolia[J]. *Crop Sci*, 1997, 37: 599-604.
- [7] Varshney R K, Graner A, Sorrells M E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications[J]. *Trends Biotechnol*, 2005, 23(1): 48-55.
- [8] Kong Q, Xiang C, Yu Z. Development of EST SSRs in *Cucumis sativus* from sequence database [J]. *Mol Ecol Resour*, 2006, 6(4): 1234-1236.
- [9] Eujay I, Sledge M K, Wang L, May G D, Chekhovskiy K, Zwonitzer J C, Mian M A R. *Medicago truncatula* EST-SSR reveal crossspecies genetic markers for *Medicago* spp. [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 108(3): 414-422.
- [10] Gupta P K, Rustgis S, Sharma S, Singh R, Kumar N, Balyan H S. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat[J]. *Mol Genet Genomics*, 2003, 270: 315-323.
- [11] Nicot N, Chiquet V, Gandon B, Amilhat L, Legeai F, Leroy P, Bernard M, Sourdille P. Study of simply sequence repeat (SSR) markers from wheat expressed sequence tags (ESTs)[J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 800-805.
- [12] Temnykh S, Park W D, Ayree N, Cartinhour S, Hauck N, Lipovich L, Cho Y G, Ishii T, McCouch S R. Mapping and genome organization of microsatellite sequence in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 697-712.
- [13] Liang X Q, Chen X P, Hong Y B, Liu H Y, Zhou G Y, Li S X, Guo B Z. Utility of EST-derived SSR in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) and *Arachis* wild species[J]. *BMC Plant Biol*, 2009, 9: 35.
- [14] Scott K D, Eggler P, Seaton G, Rossetto M, Ablett E M, Lee L S, Henry R J. Analysis of SSRs derived from grape ESTs[J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 723-726.
- [15] Han Z G, Guo W Z, Song X L, Zhang T Z. Genetic mapping of EST-derived microsatellites from the diploid *Gossypium arboreum* in allotetraploid cotton [J]. *Mol Genet Genomics*, 2004, 272: 308-327.

- [16] Bruno S, Torben A, Ursula F. Expressed sequence tag-derived microsatellite markers of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) [J]. *Mol Breed*, 2008, 21: 533–548.
- [17] Varshney R K, Hiremath P J, Lekha P, Kashiwagi J, Balaji J, Deokar A A, Vadez V, Xiao Y L, Srinivasan R, Gaur P M, Siddique K H M, Town C D, Hoisington D A. A comprehensive resource of drought- and salinity-responsive ESTs for gene discovery and marker development in chickpea (*Cicer arietinum* L.) [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10: 523.
- [18] Sanguinetti C J, Dias N E, Simpson A J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels [J]. *Biotechniques*, 1994, 17: 915–919.
- [19] Kalinowski S T, Taper M L, Marshall T C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment [J]. *Mol Ecol*, 2007, 16: 1099–1106.
- [20] Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism [J]. *J Hered*, 1995, 86 (3): 248–249.
- [21] Botstein D, White R L, Skolnick M C, Davis R W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *Am J Hum Genet*, 1980, 32(3): 314–331.
- [22] Saha M C, Mian M A R, Eujayl I, Zwonitzer J C, Wang L J, May G D. Tall fescue EST-SSR markers with transferability across several grass species [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 783–791.
- [23] Gao L F, Tang J, Li H, Jia J Z. Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches [J]. *Mol Breed*, 2003, 12: 245–261.
- [24] Gupta P K, Varsheney R K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat [J]. *Euphytica*, 2000, 113: 163–185.
- [25] 李鸿雁, 米福贵, 宁红梅, 师文贵, 赵成贵. 扁蓿豆遗传多样性的 SSR 分析 [J]. *中国草地学报*, 2008, 30(2): 34–38.
- [26] 常玮, 赵雪, 李侠, 邱波, 韩英鹏, 滕伟丽, 李文滨. 大豆 EST-SSR 标记开发及与 Genomic SSR 的比较研究 [J]. *中国油料作物学报*, 2009, 31(2): 149–156.
- [27] Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A. Introduction to Conservation Genetics [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2002: 29–62.

(责任编辑: 张 平)