

研究报告

Research Report

基于简化基因组测序开发垂穗披碱草(*Elymus nutans*) SSR 标记

刘瑞娟^{1,2} 路兴旺^{1,2} 窦全文^{1,3*}

1 中国科学院西北高原生物研究所, 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室, 西宁, 810008; 2 中国科学院大学, 北京, 100049; 3 中国科学院西北高原生物研究所, 青海省作物分子育种重点实验室, 西宁, 810008

* 通讯作者, douqw@nwiqb.cas.cn

摘要 垂穗披碱草为青藏高原重要生态草及优质多年生牧草。本研究中, 通过简化基因组测序技术筛选和鉴定得到了 14 个多态性的垂穗披碱草基因组 SSR 标记。14 个 SSR 标记在 24 个不同垂穗披碱草个体中等位基因数变化范围为 2~5, 平均每个位点的等位基因数为 2.9。近缘种扩增结果显示分别有 14 对和 9 对引物在老芒麦和鹅观草属物种中有目标产物扩增, 表明 14 个 SSR 标记中 5 个可能是 H 基因组特异性标记, 其余 9 个可能来自 St 组或 Y 组。这些新开发的 SSR 标记, 今后可应用于垂穗披碱草及其近缘种的遗传多样性研究等领域。同时就利用简化基因组测序技术开发 SSR 标记的效率进行了讨论。

关键词 垂穗披碱草, SSR, 简化基因组测序

Development of SSR Markers in *Elymus nutans* Based on Reduced-Representation Genome Sequencing

Liu Ruijuan^{1,2} Lu Xingwang^{1,2} Dou Quanwen^{1,3*}

1 Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, 810001; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049; 3 Key Laboratory of Crop Molecular Breeding, Qinghai Province, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, 810001

* Corresponding author, douqw@nwiqb.cas.cn

DOI: 10.13271/j.mpb.016.001888

Abstract *Elymus nutans* is an important perennial grass used both for ecological protection and forage in Qinghai-Tibet plateau. In this study, we isolated and characterized 14 novel polymorphic genomic simple sequence repeat (SSR) markers in *E. nutans* by Reduced-Representation Genome Sequencing (RRGS). The variation range of allele number of 14 SSR markers in 24 *E. nutans* individuals was between 2 and 5, with an average of 2.9 alleles per SSR. Amplification of relative species showed that 14 and 9 of the markers could be effectively amplified in *E. sibiricus* and *Roegneria* species, respectively. This result indicated that 5 of the 14 SSR markers might be H genome-specific markers, and the remaining 9 might be from St genome or Y genome. These newly developed polymorphic SSR markers could be used in the genetic diversity areas of *E. nutans* and its related species. And the efficiency of developing SSR markers using RRGS was also discussed.

Keywords *Elymus nutans*, SSR, Reduced-representation genome sequencing

垂穗披碱草(*Elymus nutans* Griseb.)为禾本科 1 000~5 000 m 地区(Lu, 1993)。作为青藏高原的建群种, 是草原和草甸的重要组成部分(陈默君和贾慎修, 2002), 已成为西北地区水土保持和植被恢复的重要

基金项目: 本研究由青海省自然科学基金项目(2015-ZJ-903)、青海省创新平台建设专项项目和青海省作物分子育种重点实验室(2017-ZJ-Y14)共同资助

引用格式: Liu R.J., Lu X.W., and Dou Q.W., 2018, Development of SSR markers in *Elymus nutans* based on reduced-representation genome sequencing, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding), 16(6): 1888-1894 (刘瑞娟, 路兴旺, 窦全文, 2018, 基于简化基因组测序开发垂穗披碱草(*Elymus nutans*) SSR 标记, 分子植物育种, 16(6): 1888-1894)

草种(陆光平和聂斌, 2002; 陈桂琛等, 2008)。另一方面, 由于其产量高适口性好是高原地区重要的优质牧草(陈默君和贾慎修, 2002; 闫志勇等, 2014)。此外, 作为麦类作物的野生近缘种, 垂穗披碱草具有抗病、抗虫→抗旱→耐寒和耐盐碱等优异基因, 是改良小麦和大麦品种的优良基因资源(闫志勇等, 2014)。

SSR (Simple Sequence Repeats) 即微卫星, 是分布于生物体基因组中的一段短串联重复序列, 由 1~6 个核苷酸的串联重复构成。SSR 标记作为第二代分子标记具有分布广、多态性高、显性共遗传和实验重复性好等优点(Tautz and Renz, 1984; Powell et al., 1996), 被广泛应用于种质资源遗传多样性研究、亲缘关系的比较和鉴定、物种的进化和系统发生、遗传连锁图谱的构建和 QTL 定位以及分子标记辅助选择育种等研究领域(Powell et al., 1996; 杨旭等, 2016)。在垂穗披碱草研究中, 利用 SSR 标记开展了遗传多样性研究、系统分类和种质鉴定等大量工作(严学兵等, 2008; 2009; 雷云霆和窦全文, 2012; 张成林等, 2016)。但是, 目前在垂穗披碱草中应用的 SSR 标记几乎都是来自其近缘种, 如小麦、老芒麦、大麦、犬草和阿拉斯加披碱草等物种中开发的(严学兵等, 2008; 2009; 雷云霆和窦全文, 2012; 陈仕勇等, 2015; 2016; 张成林等, 2016), 并未发现专门针对垂穗披碱草开发的 SSR 引物。

根据文献报道, SSR 标记开发主要有以下几种途径: (1) 传统方法, 通过基因组文库构建、阳性克隆筛选、测序及引物设计、PCR 扩增检测等技术路线实施来获得 SSR 标记(Rassmann et al., 1991)。该方法在许多作物的 SSR 标记开发中被广泛应用, 但存在开发效率低、工作量大等缺点。(2) 富集方法, 省去了传统法中文库构建和阳性克隆筛选环节。以其中代表性的 FIASCO 磁珠富集法为例, 理论上可以利用不同的 SSR 探针筛选将基因组中的 SSR 序列全部分离出来, 有效提高筛选 SSR 标记的效率(Zane et al., 2002)。(3) 高通量测序法, 随着高通量测序技术的发展, 产生了大量基因组与转录组数据, 通过对这些数据的分析, 从中找到 SSR 位点。如在甘薯、辣椒和茄子等植物中利用转录组数据分别筛选到了 1 621、17 319 和 8 316 个 EST-SSR 位点(Schafleitner et al., 2010; 刘峰等, 2012; 魏明明等, 2016)。在壁虎和棱果花中利用基因组数据分别获得了 12 和 27 对具有多态性的基因组 SSR 引物(Wei et al., 2015; Huang et al., 2017)。

本研究旨在利用二代测序中的 RAD (Restriction-site associated DNA)-Seq 简化基因组测序法开发 SSR 标记。RAD 即限制性内切位点相关 DNA, 是与

限制性核酸内切酶识别位点相邻的 DNA。RAD-Seq 是简化基因组测序方法中的一种, 由于其实验过程中引入了酶切, 只对酶切位点附近的 tag 进行测序, 因而能够降低基因组的复杂度, 大大降低测序量。同时, 由于在信息分析中采用 tag 同源聚类的方法进行标记寻找, 所以其不受参考基因组的限制, 可应用于没有参考基因组的物种(Miller et al., 2007)。在本项研究中我们将尝试利用 RAD-Seq 技术, 开发可供垂穗披碱草研究利用的 SSR 标记。

1 结果与分析

1.1 SSR 序列预测

通过 MISA 软件分析总共得到了 623 条 SSR 序列信息。其中, 没有发现复合重复基序的位点, 全部为单重复基序位点。重复基序碱基变化为 1~5 个碱基: 单碱基重复基序数量最多, 为 285 个, 达总数 45.7%, 重复次数 10~26; 其次为二碱基重复基序, 为 201 个, 占比 32.3%, 重复次数 5~14; 三碱基重复基序 124 个, 占比 19.9%, 重复次数 5~9; 四碱基重复基序 11 个, 占总数 1.8%, 重复次数 5~7; 五碱基重复基序 2 个, 占总数 0.03%, 重复次数 5~6。结果表明, 随着重复基序碱基数目的增加, 预测所得 SSR 序列数目呈显著下降趋势。除单碱基基序, 其他预测所得不同基序 SSR 的重复次数无显著差异。

预测所得 SSR 必须满足 SSR 两端均大于 50 bp, 才可以进行引物设计。经过此条件筛选, 确定 24.4% 的 SSR 序列(152 个)为有效 SSR 位点。在这 152 个位点中, 重复基序碱基变化为 1~4 个碱基: 单碱基重复基序为 70 个, 达总数 46.0%, 重复次数 10~22; 二碱基为 39 个, 占比 25.7%, 重复次数 6~14; 三碱基重复基序 39 个, 占比 25.7%, 重复次数 5~9; 四碱基重复基序 4 个, 占总数 2.6%, 重复次数 5~7。

在以上 152 个 SSR 位点中, 最终成功设计出引物的 SSR 位点有 139 个(91.4%)。其中, 重复基序碱基变化为 1~4 个碱基: 单碱基重复基序数量最多, 为 62 个, 达总数 44.6%, 重复次数 10~22, 序列长度范围 10~22 bp, 重复序列类型以 A 碱基为主, 占总数的 42.4%; 二碱基重复基序为 36 个, 占比 25.9%, 重复次数为 6~14, 序列长度范围 12~28 bp, 重复序列类型以 AC、AG 和 AT 为主, 频率分别为 10.1%、9.4%和 5.8%; 三碱基重复基序 37 个, 占比 26.6%, 重复次数 5~9, 序列长度范围 15~27 bp, 重复序列类型以 AAG、AAT、ATC、AAG、CCG 和 AAC 为主, 频率依次为 6.5%、5.7%、3.6%、2.9%、2.9%和 2.2%; 四碱基

重复基序 4 个,仅占总数 2.9%,重复次数 5~7,序列长度范围 20~28 bp,重复序列类型为 TTTC,TATA 和 CCAT,频率分别为 1.4%,0.7%和 0.7%。

1.2 SSR 验证

我们从 139 对引物中挑选出 90 对引物进行了多态性筛选和验证。扩增电泳结果显示,在这 90 对引物中有 36 对扩增条带无多态性,18 对扩增非特异性条带较多,15 对在部分材料中未扩增出目的带,7 对扩增效果不好。剔除以上,最终确定了 90 对中 14 对(15.6%)具有多态性的 SSR 引物(表 1)。在这 14 个 SSR 位点中,二碱基和三碱基重复基序各为 5 个,分别占待筛选二碱基重复基序位点数 13.9%和 13.5%;

四碱基重复基序 4 个,占待筛选四碱基重复基序位点数 100%。14 对引物 PCR 扩增产物片段大小在 105~182 bp 间,观察到的等位基因数为 2~5,平均每个位点的等位基因数为 2.9(表1)。

1.3 新开发 SSR 引物通用性验证

在垂穗披碱草近缘种老芒麦、垂穗鹅观草与 *E. longearistatus* 中进行新开发引物可转移性的验证。结果显示,新开发的 14 对垂穗披碱草 SSR 引物全部能在老芒麦中稳定的扩增出目的带,且观察到具有多态性(图 1A; 1B) 在垂穗鹅观草与 *Elymus longearistatus* 中,14 对 SSR 引物中有 9 对(64.3%)扩增出目的条带,5 对(En7, En54, En66, En70 和 En72)未扩增出目

表 1 垂穗披碱草中开发的 14 个 SSR 位点信息

Table 1 Characterization of the 14 SSR loci in *Elymus nutans*

标记 Locus	重复基序 Repetitive motif	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')	片段大小(bp) Fragment size (bp)	Ta (°C)	NA
En7	(TTTC) ₅	F: GCTTCAAGCTGGATCGAATCAAA R: CCTTGCAAATGGTGTAAAGCTTGA	120~135	57	3
En10	(CCAT) ₅	F: CATGAGAGAGTGAGGGGTAAACC R: CCTCCGCACAAATGTAGTAGCTTA	148~170	57	4
En18	(CTC) ₅	F: CATTGGAAGTCATAGCTCTGCGC R: TGACTTGATCATGACTCTAGTTC	105~115	55	3
En20	(TA) ₈	F: CGGAAGTGTGGGCAGAATAACTA R: CCGCGTGTGGCATTTTAAATTAT	145~165	57	3
En24	(GGC) ₆	F: AAAGCAAAGGGGAAACGGAATA R: CTTCTCCTCTGTCCACATCG	155~175	57	3
En27	(GAAA) ₅	F: AGACCAACAGTTTTGCAATATCA R: ATGCTGAAAAACATGCTCCGAAT	175~182	57	2
En33	(TATC) ₇	F: TCAATGTTTCTTCTACAAGACAAGC R: TGGCTCATGAATTTTTGCTCG	113~118	56	2
En36	(CT) ₁₁	F: ATCAGTAAATGCTGCATACCGGA R: AGCACTAGCATAGCATTCCATGT	150~160	57	3
En54	(GA) ₆	F: TTTGTTTGGTTTGTGTCCGGT R: AAACAAAACAAAATCGTGACGCGC	128~140	57	2
En64	(TAG) ₅	F: AGGCTTAATGGATTAAGGATGTGA R: TCAGTTTTTATTCGGTCTCACAA	134~145	55	3
En66	(AGA) ₅	F: GAACACTAGCAGTCCATCAATGC R: ACAGTTTTCACTCGAGGACAGAT	166~175	57	2
En70	(AT) ₆	F: TGAGCCTCGAAAGCCATTATCTT R: TTGTATAACCCAGCCACCCAAAT	137~145	57	3
En72	(TTG) ₉	F: CATAGGCGGAGTTTCACCTCTAG R: AGTAGATTTCCAGAAAGCAACAA	136~155	57	5
En76	(GT)	F: ATGTCAATTTATCTGTGTCTTT R: ACCAAAAACAAAAGCAAAAACCCAC	115~130	55	3

注: Ta: 退火温度; N_A: 等位基因数

Note: Ta: Annealing temperature; N_A: Number of alleles

的带(图 1A; 图 1B), 这 5 对引物有可能为垂穗披碱草 H 基因组特异性 SSR 标记引物。

2 讨论

垂穗披碱草为青藏高原建群种和优良的牧草, 垂穗披碱草在形态学(张建波等, 2009)、细胞学(Dou et al., 2017)、以及分子水平上(Chen et al., 2013)呈现广泛的遗传变异。通用性分子标记 ISSR 标记(Chen et al., 2009)、SRAP 标记(陈智华等, 2009)和 AFLP 标记(Yan et al., 2010)被广泛利用于垂穗披碱草遗传多样性评价、遗传结构分析等工作中。由于一些 SSR 标记在不同物种间具有保守特性, 垂穗披碱草近缘物种普通小麦、及其他披碱草中的部分 SSR 标记可被转移利用至垂穗披碱草中(严学兵等, 2009; Chen et al., 2013), 但是利用物种转移的 SSR 标记依然存在转移效率较低等缺点。同时, 垂穗披碱草为一异源六倍体物种(基因组组成为 StHY) 种间转移过来的 SSR 标记, 由于其较高的保守性, 很有可能在垂穗披碱草 St、H 和 Y 三个不同的部分同源基因组间都有扩增产物扩出, 容易对等位位点的多态性统计造成干扰, 因此基于垂穗披碱草基因组自身开发 SSR 标记, 对于更为精确分析垂穗披碱草的遗传变异是必须的。本项研究基于垂穗披碱草基因组自身开发得到的 14 对 SSR 引物, 在不同垂穗披碱草材料间扩增产物稳定、多态性高, 从扩增条带分析认为多数 SSR 标记产物应该来自于垂穗披碱草基因组中单一位点。进一步利用四倍体基因组 StH 和 StY 物种进行 SSR 转移扩增

证, 14 个 SSR 标记中 5 个可能是 H 基因组特异性标记。尽管四倍体 StH 基因组物种缺少 Y 基因组, 但是所有 14 对 SSR 标记在 StH 基因组中均有产物扩出。由于披碱草中 St 和 Y 基因组被认为具有很近的亲缘关系(Wang and Lu, 2014), 不能排除本研究中部分 SSR 标记有可能同时包含 St 和 Y 基因组部分同源位点。由于垂穗披碱草基因组异源六倍体特性, 进一步利用其二倍体(St 基因组)和四倍体(StH 和 StY 基因组物种)作为对照, 将开发出的基因组 SSR 分配至不同基因组, 将有助于我们在不同基因组水平上对垂穗披碱草的遗传变异做出更进一步的评价和分析。

本项研究中利用简化基因组测序分析得到 623 条 SSR 序列, 其中最终能够设计 SSR 引物的序列有 139 个(22.3%)。139 个位点中单碱基重复基序最多(42.4%), 四碱基重复基序最少(2.6%), 其余为二碱基和三碱基重复基序。选择 139 对引物中的 90 对引物, 筛选出 14 对(15.6%)多态性 SSR 序列, 其中无一条单碱基重复基序序列。利用磁珠富集法 Lei 等(2014) 从垂穗披碱草近缘种老芒麦基因组中富集得到 313 个可适合 SSR 引物设计的序列, 从中筛选得到了 53 对多态性 SSR (16.1%), 与本研究中从简化基因组测序技术筛选的效率相似。同时, 多态性评价表明从老芒麦基因组开发得到的 SSR 等位基因数变化范围为 2~5, 平均每个位点的等位基因数为 3.1, 这与垂穗披碱草中利用简化基因组测序得到的 SSR 等位基因数变化范围(2~5 个)和平均等位基因数(2.9)相近。这两种方法的比较表明, 利用简化基因组测序与磁珠富集法获得的基因组 SSR 标记在多态性高低上相近。虽然利用简化基因组测序从原初 SSR 序列到最终获得有用 SSR 序列的概率较低(约为 3.5%), 但是相对于磁珠富集法前期 SSR 序列的富集及文库构建等复杂、繁琐的实验操作流程, 基于简化基因组测序进行 SSR 开发仍不失为一种简洁、高效的方法。另外, 单碱基重复基序在本研究结果中占了大量的比例, 有些报道中认为 SSR 标记开发中的单碱基重复不能算作 SSR 重复序列, 在微卫星引物开发过程中这些单核苷酸重复序列是无用的, 应予以删除(Zane et al., 2002; 孙佳莹等, 2008)。因此, 研究初期从测序结果中剔除单碱基 SSR 序列, 可以显著提升 SSR 的筛选效率。

应用染色体荧光原位杂交技术对垂穗披碱草基因组利用部分 SSR 序列, 以及对主要基因组成员 H 基因组的所有二碱基和三碱基 SSR 序列的物理定位表明, 垂穗披碱草基因组含有的三碱基重复 SSR 丰度远高于二碱基重复 SSR (Dou et al., 2011; 2016), 三

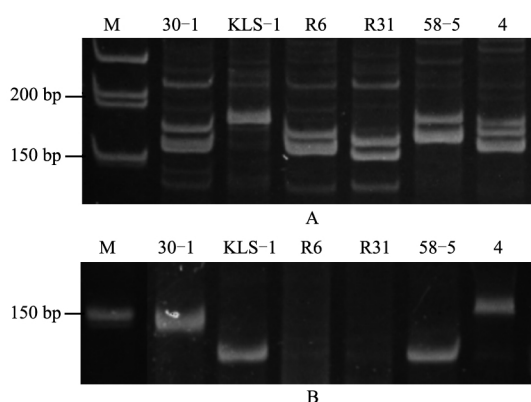


图 1 En24 与 En72 引物在垂穗披碱草及其近缘种的扩增条带注: 30-1 与 KLS-1 为垂穗披碱草; R6 与 R31 为鹅观草材料, 58-5 与 4 为老芒麦材料; M: DNA 分子标记

Figure 1 The amplification bands of primer En24 and En72 in *E. nutans* and its related species

Note: 30-1 and KLS-1 are *Elymus nutans*; R6 and R31 are *Roegneria nutans* and *E. longearistatus*, respectively; 58-5 and 4 are *E. sibiricus*; M: DNA Marker

碱基重复中以 AAC、ACT 和 CAT 为最高,二碱基重复中以 AC 含量为最高。但是,在本研究利用简化基因组测序获得的 SSR 位点中,二碱基重复基序的比例远高于三碱基重复基序。此外,二碱基和三碱基重复基序类型的出现频率与细胞遗传学检测结果也不尽一致。这表明,利用本研究中的技术方法,垂穗披碱草基因组中大量的 SSR 位点可能没有被检测到。利用 Roche-454 高通量测序技术对核桃(*Juglans regia*)基因组低覆盖测序结果进行 SSR 特征分析,结果显示六碱基重复 SSR 类型最多,占总数的 60.11%,其次为单碱基和四碱基类型(廖卓毅等, 2014)。考虑到 Roche-454 测序平台的读长约为 350 bp,核桃基因组中大量六碱基重复 SSR 的发现,既是基因组本身特征一种体现,也不能排除高长度测序技术在发掘多碱基重复序列方面的优势。本研究中采用的 Illumina HiSeq2000 平台其读长为 100+100 base/read,获得组装 Contig 大部分读长在 150~200 bases 间(Glenn, 2011)。推测本研究中单碱基和二碱基重复 SSR 占比很高,而大量多碱基重复序列未被充分发掘的主要原因可能是由于测序读长相对较短。因此对于像垂穗披碱草这种基因组庞大、结构复杂的物种进行 SSR 标记开发中采用简化基因组高通量测序时,利用读长更长的测序技术,结果将可能会更加理想。

3 材料与方法

3.1 试验材料

24 份垂穗披碱草材料采自青海不同区域(表 2),选取其中 5 个材料(12-8, 29-1, 30-1, 59-1 和 KLS-1)作为简化基因组 SSR 标记开发的基因组 DNA 材料。垂穗披碱草近缘物种垂穗鹅观草(*Roegneria nutans*)材料采自青海, *E. longearistatus* 材料来自美国国家植物种质资源库,产地伊朗,老芒麦(*E. sibiricus* L.)材料分别来自内蒙古与青海本地(表 2)。

3.2 基因组 DNA 的提取与检测

通过改良的 CTAB 法(Allen et al., 2006)对选取的 5 个垂穗披碱草材料的叶片混合进行了基因组 DNA 提取。提取的 DNA 浓度和质量用紫外分光光度计(Nanodrop 2000c, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)和 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

3.3 简化基因组测序

将提取检测合格的垂穗披碱草基因组 DNA 送至安诺优达基因科技(北京)有限公司进行高通量测序。经过限制性酶切→添加 P1 接头→混合样本→

表 2 试验材料来源

Table 2 Sources of plant materials

种名	基因组	编号	来源
Species	Genome	No.	Source
垂穗披碱草	StHY	1-5, 3-1, 12-4,	青海海北地区
<i>E. nutans</i>		12-8, 12-18	Haibei area, Qinghai, China
		6-1, 6-23, 8-4,	青海海南地区
		20-1, 20-4,	Hainan area, Qinghai,
		22-4, 22-5,	China
		29-1, 30-1, 30-	
		4, 32-13, 57-2,	
		60-1, 60-3	
		59-1, 59-4	青海海东地区
			Haidong area, Qinghai,
			China
		KLS-1, KLS-2,	青海海西地区
		KLS-3	Haixi area, Qinghai,
			China
垂穗鹅观草	StY	R6	青海互助
<i>R. nutans</i>			Huzhu, Qinghai,
			China
鹅观草		R31	伊朗
<i>E. longearis-</i>			Iran
<i>tatus</i>			
老芒麦	StH	58-5	青海祁连
<i>E. sibiricus</i>			Qilian, Qinghai, China
		4	内蒙古
			Inner Mongolia, China

DNA 打断→添加 P2 接头→选择性扩增 RAD tags 等二代测序的标准流程后,在 Illumina HiSeq2000 平台上进行测序。

3.4 SSR 位点信息分析

HiSeq 测序所得序列,经过样本拆分、去低质量、去接头等过程完成数据处理得到可信的目标序列,通过对目标序列的同源聚类及组装过滤后,得到最终组装拼接的 Contig。随后使用 MISA 软件对完全型且适宜作为标记的 SSR 进行预测。并对有效的 SSR 位点使用 Primer 3 软件进行引物设计。

3.5 SSR 引物 PCR 扩增及检测

25 μL PCR 反应体系如下:基因组 DNA 约 100 ng, 10 pmol/μL 正向引物和反向引物各 1 μL, 12.5 μL 2× Taq PCR Mastermix (天根)。PCR 反应程序如下:94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 55℃~57℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 此三个步骤依次循环 30 次, 72℃ 延伸

10 mim。用 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 PCR 产物。

作者贡献

刘瑞娟是本研究的实验设计和研究的执行人，并完成数据分析和论文初稿的写作；路兴旺参与试验结果分析，窦全文是项目的构思者及负责人，指导实验设计，数据分析，论文写作与修改，是本研究的责任作者。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由青海省自然科学基金项目(2015-ZJ-903)和青海省创新平台建设专项项目—青海省作物分子育种重点实验室(2017-ZJ-Y14)共同资助。

参考文献

- Allen G.C., Floresvergara M.A., Krasynanski S., Kumar S., and Thompson W.F., 2006, A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethyl ammonium bromide, *Nature Protocols*, 1(5): 2320-2325
- Chen G.C., Zhou G.Y., Sun J., Chen Z.G., and Lu X.F., 2008, Test study on the application of *Elymus nutans* to the vegetation restoration in the gravel-soil-taken field along Qinghai-Tibet Railway, *Zhongguo Tiedao Kexue* (China Railway Science), 29(5): 134-137 (陈桂琛, 周国英, 孙菁, 陈志国, 卢学峰, 2008, 采用垂穗披碱草恢复青藏铁路取土场植被的试验研究, *中国铁道科学*, 29(5): 134-137)
- Chen M.J., and Jia S.X., eds., 2002, *China forage plants*, China Agriculture Press, Beijing, China, pp.119-120 (陈默君, 贾慎修, 编著, 2002, *中国饲用植物*, 中国农业出版社, 中国, 北京, pp.119-120)
- Chen S.Y., Ma X., Zhang X.Q., and Chen Z.H., 2009, Genetic variation and geographical divergence in *Elymus nutans* Griseb., (Poaceae: Triticeae) from west China, *Biochemical Systematics and Ecology*, 37(6): 716-722
- Chen S.Y., Zhang X.Q., Ma X., and Huang L.K., 2013, Assessment of genetic diversity and differentiation of *Elymus nutans* indigenous to Qinghai-Tibet Plateau using simple sequence repeats markers, *Canadian Journal of Plant Science*, 93 (6): 1089-1096
- Chen S.Y., Chen Z.H., Ma X., Zhang X.Q., Zhu Y.Q., and Li S.D., 2015, Analysis on transferability of wheat SSR marker in *Elymus nutans* Griseb, *Xinan Minzu Daxue Xuebao* (Journal of Southwest University for Nationalities), 41(3): 265-269 (陈仕勇, 陈智华, 马啸, 张新全, 朱永群, 李世丹, 2015, 小麦 SSR 标记在垂穗披碱草中的通用性分析, *西南民族大学学报*, 41(3): 265-269)
- Chen S.Y., Ma X., Zhang X.Q., Chen Z.H., and Zhou K., 2016,

- The transferability of SSR and EST-SSR marker of different origins in *Elymus* and *Roegneria* in the Triticeae (Poaceae), *Caoye Xuebao* (Acta Prataculturae Sinica), 25(2): 132-140 (陈仕勇, 马啸, 张新全, 陈智华, 周凯, 2016, 不同来源 SSR 和 EST-SSR 在披碱草属和鹅观草属物种中的通用性分析, *草业学报*, 25(2): 132-140)
- Chen Z.H., Miao J.M., Zhong J.C., Ma X., Chen S.Y., and Zhang X.Q., 2009, Genetic diversity of wild *Elymus nutans* germplasm detected by SRAP markers, *Caoye Xuebao* (Acta Prataculturae Sinica), 18(5): 192-200 (陈智华, 苗佳敏, 钟金城, 马啸, 陈仕勇, 张新全, 2009, 野生垂穗披碱草种质遗传多样性的 SRAP 研究, *草业学报*, 18(5): 192-200)
- Dou Q.W., Zhang T.L., and Tsujimoto H., 2011, Physical mapping of repetitive sequences and genome analysis in six *Elymus* species by in situ hybridization, *Journal of Systematics and Evolution*, 49(4): 347-352
- Dou Q.W., Liu R.J., and Yu F., 2016, Chromosomal organization of repetitive DNAs in *Hordeum bogdanii* and *H. brevisubulatum*, *Comparative Cytogenetics*, 10(4): 465-481
- Dou Q.W., Yu F., Li Y., Zhao, Y.Y., and Liu R.J., 2017, High molecular karyotype variation revealed in indigenous *Elymus nutans* in the Qinghai Plateau, *Plant Diversity*, 39(3): 117-122
- Glenn T.C., 2011, Field guide to next-generation DNA sequencers, *Molecular Ecology Resources*, 11(5): 759-769
- Huang G.L., Liu H.J., Sun H.B., Liu Y., Zhou R.C., Liao W.B., and Fan Q., 2017, Development and characterization of 18 polymorphic SSR markers for *Barthea barthei* (Melastomataceae), *Applications in Plant Sciences*, 5(4): 1600149
- Lei Y.T., and Dou Q.W., 2012, Distinguishing *Elymus nutans* from *Elymus sibiricus* in Qinghai-Tibet using a SSR marker, *Caoye Kexue* (Pratacultural Science), 29(6): 937-942 (雷云霆, 窦全文, 2012, 青藏高原老芒麦和垂穗披碱草 SSR 分子标记鉴别, *草业科学*, 29(6): 937-942)
- Lei Y.T., Zhao Y.Y., Yu F., Li Y., and Dou Q.W., 2014, Development and characterization of 53 polymorphic genomic-SSR markers in Siberian wildrye (*Elymus sibiricus* L.), *Conservation Genetics Resources*, 6(4): 861-864
- Liao Z.Y., Ma Q.Y., Dai X.G., Zhang D.F., and Li S.X., 2014, Microsatellite characters in *Juglans regia* L. genome by high throughput sequencing technology, *Dongbei Linye Daxue Xuebao* (Journal of Northeast Forestry University), 42(2): 65-68 (廖卓毅, 马秋月, 戴晓港, 张得芳, 李淑娴, 2014, 利用高通量测序技术分析核桃基因组微卫星特征, *东北林业大学学报*, 42(2): 65-68)
- Liu F., Wang Y.S., Tian X.L., Mao Z.C., Zou X.X., and Xie B.Y., 2012, SSR Mining in pepper (*Capsicum annuum* L.) transcriptome and the polymorphism analysis, *Yuanyi Xuebao* (Acta Horticulturae Sinica), 39(1): 168-174 (刘峰, 王运生, 田雪亮, 茆振川, 邹学校, 谢丙炎, 2012, 辣椒转录组 SSR 挖掘及其多态性分析, *园艺学报*, 39(1): 168-174)

- Lu B.R., 1993, Meiotic studies of *Elymus nutans* and *E. jacquemontii* (Poaceae, Triticeae) and their hybrids with *Pseudoroegneria spicata* and seventeen *Elymus* species, *Plant Systematics and Evolution*, 186(3-4): 193-212
- Lu G.P., and Nie B., 2002, Field evaluation of *Elymus nutans* under alpine grassland conditions, *Caoye Kexue (Pratacultural Science)*, 19(9): 13-15 (陆光平, 聂斌, 2002, 垂穗披碱草利用价值评价, *草业科学*, 19(12): 13-15)
- Miller M.R., Dunham J.P., Amores A., Cresko W.A., and Johnson E.A., 2007, Rapid and cost-effective polymorphism identification and genotyping using restriction site associated DNA (RAD) markers, *Genome Research*, 17(2): 240-248
- Powell W., Machray G.C., and Provan J., 1996, Polymorphism revealed by simple sequence repeats, *Trends in Plant Science*, 1(7): 215-222
- Rassmann K., Schlötterer C., and Tautz D., 1991, Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting, *Electrophoresis*, 12(2-3): 113-118
- Schafleitner R., Tincopa L.R., Palomino O., Rossel G., Robles R. F., Alagon R., Rivera C., Quispe C., Rojas L., Pacheco J.A., Solis J., Cerna D., Kim J.Y., Hou J., and Simon R., 2010, A sweetpotato gene index established by de novo assembly of pyrosequencing and Sanger sequences and mining for gene-based microsatellite markers, *BMC Genomics*, 11(1): 604
- Sun J.Y., Xin D.W., Shan C.Y., Liu C.Y., Hu G.H., and Chen Q. S., 2008, Programming for SSR marker developing software SSR MINING 1.0, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 41(10): 3336-3342 (孙佳莹, 辛大伟, 单彩云, 刘春燕, 胡国华, 陈庆山, 2008, SSR 标记开发软件 SSR MINING 1.0 的编制, *中国农业科学*, 41(10): 3336-3342)
- Tautz D., and Renz M., 1984, Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes, *Nucleic Acids Research*, 12(10): 4127-4138
- Wang R.R.C., and Lu B.R., 2014, Biosystematics and evolutionary relationships of perennial triticeae species revealed by genomic analyses, *Journal of Systematics and Evolution*, 52(6): 697-705
- Wei L., Shao W.W., Zhou H.B., Ping J., Li L.M., and Zhang Y.P., 2015, Rapid microsatellite development in *Gekko japonicus* using sequenced restriction-site associated DNA markers, *Genetics and Molecular Research*, 14(4): 14119-14122
- Wei M.M., Chen Y.H., Liu F.Z., Zhang Y., and Lian Y., 2016, Development of SSR marker for eggplant with transcriptome sequencing data, *Zhiwu Yichuan Ziyuan Xuebao (Journal of Plant Genetic Resources)*, 17(6): 1082-1091 (魏明明, 陈钰辉, 刘福中, 张映, 连勇, 2016, 基于转录组测序的茄子 SSR 标记开发, *植物遗传资源学报*, 17(6): 1082-1091)
- Yan X.B., Wang K., Zhou H., Wang C.Z., and Guo Y.X., 2008, Evaluation of universality and efficacy of microsatellite markers amplified in *Elymus* taxa from China, *Caoye Xuebao (Acta Prataculturae Sinica)*, 17(6): 112-120 (严学兵, 王堃, 周禾, 王成章, 郭玉霞, 2008, 不同来源 SSR 标记在我国披碱草属植物的通用性和效率评价, *草业学报*, 17(6): 112-120)
- Yan X.B., Zhou H., Wang K., Wang C.Z., and Guo Y.X., 2009, The phylogenetic relationships between nine *Elymus* taxa from China based on three genetic markers, *Caoye Xuebao (Acta Prataculturae Sinica)*, 18(3): 74-85 (严学兵, 周禾, 王堃, 王成章, 郭玉霞, 2009, 我国 9 种披碱草属植物的系统学关系, *草业学报*, 18(3): 74-85)
- Yan X.B., Guo Y.X., Liu F.Y., Zhao C., Liu Q.L., and Lu B.R., 2010, Population structure affected by excess gene flow in self-pollinating *Elymus nutans* and *E. burchan-buddae* (Triticeae: Poaceae), *Popul. Ecol.*, 52(1): 233-241
- Yan Z.Y., Zhou Q.P., Liu W.H., Yan H.B., and Zhou G.E., 2014, Evaluation of agronomic characters and production performance of six *Elymus* germplasm from Qinghai-Tibet Plateau, *Caoye Kexue (Pratacultural Science)*, 31(1): 108-115 (闫志勇, 周青平, 刘文辉, 颜红波, 周改娥, 2014, 青藏高原 6 份披碱草属牧草农艺性状及生产性能评价, *草业科学*, 31(1): 108-115)
- Yang X., Liu F., Zhang Y., Cheng Y.F., Xue L.B., and Chen X. H., 2016, Study on the genetic diversity of eggplant germplasm with SSR markers, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 35(12): 3450-3457 (杨旭, 刘飞, 张宇, 成玉富, 薛林宝, 陈学好, 2016, 利用 SSR 标记研究茄子种质资源遗传多样性, *基因组学与应用生物学*, 35(12): 3450-3457)
- Zane L., Bargelloni L., and Patarnello T., 2002, Strategies for microsatellite isolation: a review, *Molecular Ecology*, 11(1): 1-16
- Zhang C.L., Guo Z.H., Zhang X.Q., Bai S.Q., Zhang C.B., Li P., and Ma X., 2016, Divergence of drooping wildrye (*Elymus nutans*) and siberian wildrye (*E. sibiricus*) by SSR marker, *Zhiwu Yichuan Ziyuan Xuebao (Journal of Plant Genetic Resources)*, 17(3): 416-422 (张成林, 郭志慧, 张新全, 白史且, 张昌兵, 李平, 马啸, 2016, 利用 SSR 标记对垂穗披碱草和老芒麦进行物种鉴定和遗传变异分析, *植物遗传资源学报*, 17(3): 416-422)
- Zhang J.B., Bai S.Q., Zhang X.Q., Ma X., Yan J.J., Zhang C.B., and You M.H., 2009, Study on ear characters of *Elymus nutans* griseb, in the northwestern plateau of Sichuan Province, *Sichuan Daxue Xuebao (Journal of Sichuan University)*, 46: 1505-1509 (张建波, 白史且, 张新全, 马啸, 鄢家俊, 张昌兵, 游明鸿, 2009, 川西北高原不同野生垂穗披碱草种群穗部形态研究, *四川大学学报*, 46(5): 1505-1509)