

基于全长转录组信息的枸杞 SSR 标记开发

秦英之¹, 车佳航¹, 尹跃², 饶书培¹, 安巍², 戴国礼², 陈金焕¹

(¹北京林业大学生物科学与技术学院/林木、花卉育种生物工程国家林业和草原局重点实验室, 北京 100083;

²宁夏农林科学院枸杞科学研究所, 银川 750002)

摘要: 枸杞是茄科枸杞属的重要经济植物, 广泛分布于我国西北地区, 环境适应性强。本研究分析了枸杞基因组中 SSR 的分布特征, 并基于宁杞 1 号全长转录组开发 SSR 分子标记, 对 28 个枸杞种质进行遗传多样性分析和亲缘关系分析。用 MISA 软件搜索全长转录组中 SSR 位点, 设计并筛选多态性好的 SSR 引物, 对 206 对引物经过毛细管电泳筛选后最终选出 23 对引物对 28 个不同分布区的枸杞种质进行遗传多样性分析, 遗传相似系数用非加权组平均法 (UPGMA) 聚类。23 对引物共扩增得到 240 个等位基因, 每个位点的等位基因数范围为 4~17, Shannon 信息指数范围为 1.177~2.487, 期望杂合度和观测杂合度的范围分别为 0.635~0.909 和 0.250~0.964, *PIC* 的范围是 0.580~0.902。遗传距离聚类分析显示 28 份枸杞种质在遗传相似系数为 0.71 时被分为 4 类, 宁夏枸杞为 I 类, 中国枸杞为 II 类, 黑果枸杞为 III 类, IV 类中只有中国枸杞种的枸杞岛种质。利用全长转录组序列可以高质量实现枸杞 SSR 标记开发, 新开发的 23 对引物后续可用于枸杞种质遗传多样性分析和分子标记辅助育种工作。

关键词: 枸杞; 全长转录组; SSR 标记; 种质鉴定; 遗传多样性评价

SSR Marker Development of *Lycium* Germplasm Based on Full-length Transcriptome Information

QIN Ying-zhi¹, CHE Jia-hang¹, YIN Yue², RAO Shu-pe¹, AN Wei², DAI Guo-li², CHEN Jin-huan¹

(¹College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University/Key Laboratory of Forest and Flower Breeding

Biological Engineering, National Forestry and Grassland Administration, Beijing 100083; ²The Wolfberry

Sciences Research Institute, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Science, Yinchuan 750002)

Abstract: *Lycium* is an important economic genus belonging to solanaceae. It is widely distributed in Northwest China and highly adaptable to the environment. In this study, SSR markers were developed based on the full-length transcriptome of *Lycium* variety Ningqi 1, followed by genotyping of 28 *Lycium* germplasm using a subset of polymorphic SSR markers. SSR loci were *in silico* identified using MISA software and subjected for primer pickup. Twenty-three SSR markers selected from 206 pairs of primers were used for genotyping and analyzing the genetic diversity of *Lycium barbarum* germplasm from 28 different distribution regions. Genetic coefficients were clustered by unweighted group average (UPGMA) method. A total of 240 alleles were amplified using 23 SSR markers with 4 to 17 alleles at each locus. Shannon information ranges from 1.177 to 2.487. The expected and observed heterozygosity ranged from 0.635 to 0.909 and 0.250 to 0.964, respectively, *PIC* ranged from 0.58 to 0.902. The genetic distance clustering analysis suggested four groups in 28 *Lycium* germplasm

收稿日期: 2022-03-30 修回日期: 2022-05-05 网络出版日期: 2022-05-24

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220330004>

第一作者研究方向为经济林育种和林木逆境分子机制, E-mail: qyz6138@bjfu.edu.cn

通信作者: 陈金焕, 研究方向为经济林育种和林木逆境分子机制, E-mail: chenjh@bjfu.edu.cn

基金项目: 国家林业和草原局林业行业标准制定 (2020-LY-063); 宁夏回族自治区农业育种专项项目 (2018NYYZ01-05); 宁夏回族自治区重点研发技术项目 (2021BEF02005)

Foundation projects: National Forestry and Grassland Administration Forestry Industry Standards Formulation (2020-LY-063); Special Project of Agricultural Breeding in Ningxia Hui Autonomous Region (2018NYYZ01-05); Key Research and Development Technology Project of Ningxia Hui Autonomous Region (2021BEF02005)

(similarity coefficient=0.71)。The *Lycium barbarum* L. belonged to group I, the *Lycium chinense* Mill. belonged to group II, the *Lycium ruthenicum* Murr. belonged to group III, in group IV there were only Chinese wolfberry island germplasm which belonged to. *Lycium chinense* Mill. The total length transcriptomic sequence of Ningqi 1 could be used to develop SSR markers. Collectively, the full-length transcriptome sequences of *Lycium* are of interest to develop SSR markers, and these newly-developed SSR markers can be used for genetic diversity analysis of *Lycium* germplasm and molecular marker assisted breeding.

Key words: *Lycium*; full-length transcriptome; SSR markers; germplasm identification; evaluation of genetic diversity

枸杞是茄科(Solanaceae)茄族(Solaneae)枸杞亚族(Lyciinae)枸杞属(*Lycium*)落叶小乔木或落叶灌木的统称^[1],是茄科中具有重要经济价值的属^[2]。枸杞在我国分布广泛,环境适应性极强^[3],具有免疫调节、抗肿瘤^[4]、保护生殖健康^[5]、抗抑郁^[6]和抗疲劳等功能^[7]。中国是世界上枸杞生产大国,近年来全国枸杞种植面积已达 133333.333 hm²,干果总产量 32 万吨以上,均居世界第一。《中国植物志》记载中国枸杞属野生分布有 7 种 3 变种,包括宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)及其变种黄果枸杞(*Lycium barbarum* var. *auranticarpum* K. F. Ching)、中国枸杞(*Lycium chinense* Mill.)及其变种北方枸杞(*Lycium chinense* var. *potaninii* (Pojark.) A. M. Lu)、截萼枸杞(*Lycium truncatum* Y. C. Wang)、新疆枸杞(*Lycium dasystemum* Pojark.)及其变种红枝枸杞(*Lycium dasystemum* var. *rubricaulium* A. M. Lu)、黑果枸杞(*Lycium ruthenicum* Murr.)、柱筒枸杞(*Lycium cylindricum* Kuang et A. M. Lu)、云南枸杞(*Lycium yunnanense* Kuang et A. M. Lu)等。根据果实颜色又可分为红果枸杞、黄果枸杞和黑果枸杞。我国枸杞人工栽培品种是由自然变异选择的突变单株^[8],通过无性扦插扩大繁殖^[9]。多年的驯化和品种选育栽培已经引起枸杞遗传多样性的明显下降^[10],枸杞品种选育主要采用群体选优方式,使得核心骨干亲本反复利用,品种间形态差异变小。目前枸杞种苗市场上品系区分多依靠经验丰富的鉴定人员根据表型特征进行区分,准确性和稳定性不能保证,常因品系不纯和分辨错误引起纠纷,引入高效准确的分子标记鉴定方法迫在眉睫。近年 SSR 标记在枸杞属中的应用已经逐步展开,如尹跃等^[11]以 16 个枸杞品种为材料,利用 SSR 标记构建枸杞分子身份证;李重等^[12]用 10 对引物准确、高效鉴定出宁夏枸杞的 7 个栽培品种;任重等^[13]使用黑果枸杞转录组开发 20 对引物在 30 份枸杞材料中共扩增得到 121 条条带,对枸杞的遗传多样性进行分析与评价。近年

来 SSR 引物开发主要集中在黑果枸杞,已发表的红果枸杞 SSR 引物覆盖种质不全,不能满足现有需求,随着测序技术发展,利用全长转录组可以更高效的开发 SSR 引物。

简单重复序列标记(SSR, simple sequence repeat)是一种基于串联重复序列两侧的保守序列设计引物,分析扩增产物长度多态性的分子标记^[14]。该标记重复性好、多态性丰富、通用性高^[15-17],近年来广泛应用于植物种质资源鉴定、遗传多样性分析和指纹图谱构建等领域^[18]。基因组中庞大数量的 SSR 存在于编码区、非编码区和调控区^[19]。基于转录组数据开发的 SSR,更偏重于基因编码区域,其 SSR 多态性与性状的连锁将更加可靠^[20]。基于 PacBio 平台的全长转录组测序方面的研究近年来成为基因组学领域中的重要研究方向之一^[21]。全长转录组测序技术在植物的研究中已得到广泛的应用^[22],与传统 RNA-seq 相比,全长转录组平均读长可达到 2500~3000 bp,可构建高质量的参考序列文库,获得具有更高可信度的差异表达分析和数据发掘结果^[23],可获取更加准确的 SSR 位点信息^[24-25]。

为建立全面准确的枸杞 SSR 信息,本研究基于宁杞 1 号全长转录组测序结果,获得一批高质量 SSR 位点标记,同时选取分布区和生境差异大,果实颜色为红色、黑色和黄色的 28 个枸杞种质资源,进行亲缘关系分析;使用宁夏枸杞基因组数据将引物精确定位于染色体上,对以宁杞系列的果用红果枸杞为代表的宁夏枸杞、天精系列和广东系列的叶用红果枸杞为代表的中国枸杞和黑果枸杞等多个枸杞种质资源进行遗传分析,探讨了本研究结果在枸杞属植物中的研究价值,为枸杞属植物的亲缘关系和枸杞种质资源的品种鉴定提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取 3 株无病虫害的宁杞 1 号无性系组培苗

的根、茎、叶进行混样后送交北京百迈克公司,用 PacBio RS 系统(Pacific Biosciences, 美国)进行全长转录组测序和分析,组装出转录本信息。用于引物筛选和遗传多样性分析的 28 份枸杞种质,均来自宁夏农林科学院国家枸杞工程技术研究中心枸杞种质资源圃(表 1)。其中 23 份果实红色、3 份果实

黑色、2 份果实黄色,17 份是审定和生产中推广的品种,11 份为野生资源。2020 年 7 月每份种质随机选择 6 株无性繁殖个体分别取幼嫩且无病虫害叶片,将叶片置于冻存管中迅速放入液氮中速冻,样品保存于 -80 ℃超低温冰箱中,后续进行 DNA 提取。

表 1 28 个供试枸杞种质材料
Table 1 Information of 28 *Lycium* germplasm materials

序号 No.	材料名称 Material name	果实颜色 Fruit color	认审定编号 Identification and approval number	序号 No.	材料名称 Material name	果实颜色 Fruit color	认审定编号 Identification and approval number
1	宁杞菜 1 号	红色	科技成果宁科成登字 2002022	15	大麻叶	红色	—
2	宁杞 1 号	红色	科技成果宁科成登字 1987	16	天精 5 号	红色	—
3	宁杞 2 号	红色	科技成果宁科成登字 1987	17	天精 8 号	红色	—
4	宁杞 3 号	红色	良种审定宁 S-SC-LB-001-2010	18	中科绿川 1 号	红色	国 S-SV-LB-022-2011
5	宁杞 4 号	红色	良种审定宁 S-SC-LB-001-2005	19	黑果 1 号	黑色	—
6	宁杞 5 号	红色	良种审定宁 S-SC-LB-001-2009	20	黑果 5 号	黑色	—
7	宁杞 6 号	红色	良种审定宁 S-SC-LB-008-2010	21	黑果 7 号	黑色	—
8	宁杞 7 号	红色	良种审定宁 S-SC-LB-009-2010	22	大叶子黄	黄色	—
9	宁杞 8 号	红色	良种审定宁 S-SC-LB-001-2015	23	5 号黄	黄色	—
10	宁杞 9 号	红色	良种审定宁 S-SV-LB-017-2015	24	广东圆叶	红色	—
11	宁杞 10 号	红色	良种审定宁 R-SC-LB-001-2017	25	广东尖叶	红色	—
12	宁农杞 9 号	红色	良种审定宁 S-SC-LB-001-2014	26	广东无性系	红色	—
13	天精 3 号	红色	—	27	枸杞岛野生资源	红色	—
14	精杞 4 号	红色	良种审定新 -S-SC-LB-018-2014	28	q3-6	红色	—

— : 无认审定编号的种质资源
— : Germplasm resources without approval number

1.2 DNA 提取

使用高效植物基因组 DNA 提取试剂盒(DP350)(天根生化科技(北京)有限公司,德国)和多糖多酚植物基因组 DNA 提取试剂盒(DP360)(天根生化科技(北京)有限公司,德国)提取 28 份种质基因组总 DNA。用 Nanodrop 2000(赛默飞,美国)检测 DNA 样品的纯度和浓度,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。

1.3 SSR 引物设计

宁杞 1 号全长转录组测序结果共获得 41739 个全长 CDS 序列,利用基于 perl 语言脚本 MISA 插件(MicroSatellite identification tool)^[26]对转录本序列分析,得到 12737 个 SSR 信息。利用 Primer PREMIER5.0(Premier 公司,加拿大)设计出 206 对引物进行合成,上游引物 5' 端添加 M13 接头通用引物序列(TGTAAAACGACGGCCAGT),荧光引

物由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。

1.4 PCR 扩增及毛细管电泳分析

PCR 反应体系为 2×TSINGKE Master Mix(Blue)(擎科生物科技有限公司,北京)7.5 μL, DNA1.5 μL(25 ng/μL),上游引物 0.06 μL(10 μmol/L),下游引物 0.24 μL(10 μmol/L), ddH₂O 5.4 μL, M13F 上游引物序列结合的荧光标记物 0.3 μL(10 μmol/L)。荧光标记物根据预测片段长度添加,片段长度小于 134 bp 用 FAM 荧光染料标记,片段长度介于 134~154 bp 之间用 HEX 荧光染料标记,片段长度介于 155~240 bp 之间用 TAMRA 荧光染料标记,片段长度大于 240 bp 用 ROX 荧光染料标记。PCR 扩增程序是预变性 95 ℃ 5 min; 变性: 94 ℃ 30 s, 53~60 ℃(退火温度由下游引物温度确定)30 s, 延伸: 72 ℃ 30 s, 30 次循环; 变性: 94 ℃ 30 s, 退火: 53 ℃ 30 s, 延伸: 72 ℃ 30 s, 10 次循环; 72 ℃再延伸 10 min。

利用北京睿博兴科生物技术有限公司的毛细管电泳仪 ABI3730XL DNA Analyzer(赛默飞,美国)对 PCR 扩增产物进行检测,得到 FASTA 文件格式的毛细管电泳原始数据。

1.5 数据统计与分析

用 GeneMakerV2.2.0 软件对毛细管电泳获得的 SSR 片段长度进行整理分析,对每对引物在枸杞种质中的等位位点信息进行统计。使用 TBtools 软件^[27]将引物定位于染色体上。使用 GeneAlex 6.5 软件^[28]分析平均等位基因数(N_a , number of average allele)、有效等位基因数(N_e , number of effective allele)、Shannon 信息指数(I , shannon's diversity index)、观测杂合度(H_o , observed heterozygosity)和期望杂合度(H_e , expected heterozygosity)。多态性信息量(PIC , polymorphism information content)使用 Cervus3.0 软件进行计算。使用 NTsys pc2.10e 软件计算遗传相似系数,并用非加权算术平均值聚类法(UPGMA, unweighted pair-group method with arithmetic means)对遗传系数进行聚类分析,绘制 28 个枸杞种质亲缘关系树状图。

2 结果与分析

2.1 枸杞全长转录组和基因组 SSR 位点数量及类型

对去冗余后的宁杞 1 号转录本序列利用 perl 语言中 MISA 插件检索和分析 SSR,筛选 500 bp

以上的转录本,25681 条序列检索后发现 8810 条序列包含 12737 个 SSR 位点。宁杞 1 号全长转录组拥有丰富的 SSR 类型,共检测出 6 种类型的 SSR:单核苷酸(Mono nucleotide)、双核苷酸(Di nucleotide)、三核苷酸(Tri nucleotide)、四核苷酸(Tetra nucleotide)、五核苷酸(Penta nucleotide)和六核苷酸(Hexa nucleotide)。6 种类型虽均有出现,但是单核苷酸、双核苷酸和三核苷酸占有重复类型的 99.03%。单核苷酸重复数量最多有 7946 个,占全部重复类型的 62.39%;双核苷酸和三核苷酸重复分别有 2116 个和 2551 个,占全部重复类型的 16.61% 和 20.03%;四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复数量较少,占比均不超过 1%(表 2)。

宁杞 1 号是宁夏枸杞种植物,宁夏枸杞基因组^[2]于 2021 年正式发布,宁夏枸杞完整 12 条染色体由宁杞 1 号单倍体采用单倍体测序的方式获得。对 GCA 格式的宁夏枸杞基因组用 MISA 插件对基因组 SSR 进行检索和分析,共检测出 6 种类型的 SSR 共 715647 个,其中单核苷酸、双核苷酸和三核苷酸占有重复类型的 98.97%,四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复数量最少,占比均不超过 1%(表 2)。全长转录组和基因组中单核苷酸重复 SSR 的比例相近,全长转录组中双核苷酸重复的比例比基因组中双核苷酸重复低 10.90%,全长转录组中 SSR 三核苷酸以上重复的比例比基因组 SSR 高 11.07%。

表 2 不同重复基序的 SSR 位点在宁杞 1 号全长转录组和宁夏枸杞基因组中的分布

Table 2 Distribution of SSR sites with different repeat motifs in Ningqi 1 transcriptome and *Lycium barbarum* genome

重复类型 Repeat type	宁杞 1 号全长转录组 Ningqi 1 transcriptome		宁夏枸杞基因组 <i>Lycium barbarum</i> genome	
	SSR 数量 Number of SSR	占总 SSR 比例(%) Proportion in total SSR	SSR 数量 Number of SSR	占总 SSR 比例(%) Proportion in total SSR
单核苷酸 SSR Mono nucleotide	7946	62.39	447315	62.50
双核苷酸 SSR Di nucleotide	2116	16.61	196847	27.51
三核苷酸 SSR Tri nucleotide	2551	20.03	64095	8.96
四核苷酸 SSR Tetra nucleotide	77	0.60	4414	0.62
五核苷酸 SSR Penta nucleotide	17	0.13	1939	0.27
六核苷酸 SSR Hexa nucleotide	30	0.24	1037	0.14
总计 Total	12737	100	715647	100

2.2 枸杞全长转录组和基因组 SSR 基序重复类型和频率特征

宁杞 1 号全长转录组 SSR 核苷酸序列类型以单核苷酸 A/T 出现频率最高,重复 7604 个,占 SSR 位点总数的 59.70%;在双核苷酸重复中,AG/CT 重复 1251 次占 SSR 位点总数的 9.82%;在三核苷酸重复

中 AAG/CTT 是最主要的重复基元,共有 692 次重复,占 SSR 位点总数的 5.43%;以上 3 种重复基元类型是宁杞 1 号全长转录组 SSR 重复基元的最主要类型,占全部 SSR 位点的 74.95%。四核苷酸中 AAAG/CTTT 重复有 28 个,占总 SSR 位点的 0.22%;五、六核苷酸基元种类所占比例较小(表 3)。

表 3 宁杞 1 号全长转录组和宁夏枸杞基因组 SSR 重复基元类型及数量
Table 3 Type and number of SSR repeat units in full-length transcriptome of Ningqi 1 and *Lycium barbarum* genome

重复类型 Repeat type	宁杞 1 号全长转录组 Ningqi 1 transcriptome				宁夏枸杞基因组 <i>Lycium barbarum</i> genome			
	基元种类数 Number of motif type	重复基元 Pepeat motif	数目 Number	比例 (%) Percentage	基元种类数 Number of motif type	重复基元 Pepeat motif	数目 Number	比例 (%) Percentage
单核苷酸 Mono nucleotide	2	A/T	7604	59.70	2	A/T	391082	54.65
		C/G	342	2.69		C/G	56233	7.86
双核苷酸 Di nucleotide	3	AC/GT	402	3.16	4	AT/AT	144105	20.14
		AG/CT	1251	9.82		AC/GT	29996	4.19
		AT/AT	463	3.64		AG/CT	22237	3.11
						CG/CG	509	0.07
三核苷酸 Tri nucleotide	10	AAC/GTT	473	3.71	10	AAC/GTT	22139	3.09
		AAG/CTT	692	5.43		AAT/ATT	20731	2.90
		AAT/ATT	289	2.27		ATC/ATG	8250	1.15
		其他类型	1097	8.61		其他类型	12975	1.81
四核苷酸 Tetra nucleotide	11	AAAC/GTTT	13	0.10	26	ACAT/ATGT	1509	0.21
		AAAG/CTTT	28	0.22		AAAT/ATTT	1406	0.20
		AAAT/ATTT	17	0.13		AAAG/CTTT	690	0.10
		其他类型	19	0.15		其他类型	809	0.11
五核苷酸 Penta nucleotide	10	AAAAC/GTTTT	2	0.02	61	ATATC/ATATG	855	0.12
		AAAAG/CTTTT	3	0.02		AATTC/AATTG	293	0.04
		AAATC/ATTTG	1	0.01		AAAAT/ATTTT	153	0.02
		其他类型	11	0.09		其他类型	638	0.09
六核苷酸 Hexa nucleotide	20	AAAAAG/CTTTTT	1	0.01	117	ACATAT/ATATGT	303	0.04
		AAACAC/GTGTTT	1	0.01		AATATG/ATATTC	59	0.01
		AAAGAG/CTCTTT	1	0.01		AAGCCG/CGGCTT	37	0.01
		其他类型	27	0.21		其他类型	638	0.09

比例是每个重复基元数目除以重复基元总数计算得来
The proportion is calculated by the ratio of the number of each repeat motif to the total number of repeat motif

宁夏枸杞基因组 SSR 核苷酸序列类型中单核苷酸 A/T 重复占 SSR 位点总数的 54.65%,共有 391082 次;在双核苷酸重复中,AT/AT 重复 144105 次,占 SSR 位点总数的 20.14%;在三核苷酸重复中 AAC/GTT 有 22139 次重复,占 SSR 位点总数的 3.09%;以上 3 种重复基元类型是宁夏枸杞基因组 SSR 重复基元的最主要类型,占全部 SSR 位点的 77.88%。四核苷酸中 ACAT/ATGT 重复有 1509 个,占总 SSR 位点的 0.21%,五、六核苷酸基元种类所占比例较小(表 3)。

2.3 枸杞 SSR 引物筛选及种质区分

通过全长转录组分析,利用 PREMIER5.0 生成 206 对不同重复基元的引物。根据形态学差异、果实颜色差异、种植用途和分布范围,选择宁杞菜 1 号、宁杞 10 号、天精 3 号、中科绿川 1 号、精杞 4 号、广东尖叶、大叶子黄和黑果 1 号 8 个种质用

206 对引物进行 PCR 扩增,扩增产物用毛细管电泳检测,选择峰值差异大的 27 对引物。用筛选出的 27 对引物对 28 个枸杞种质 DNA 进行 PCR 扩增,最终筛选出多态性好的 23 对引物进行后续试验分析(表 4)。23 对引物中包括 1 对双核苷酸引物、1 对四核苷酸引物、1 对六核苷酸引物和 20 对三核苷酸引物。

本研究使用 TBtools 软件的 BLAST 功能,根据 Score 和 E-value 数值,将试验中开发的 23 对引物精确定位于染色体上。结果显示,23 对引物覆盖了除 Lbchr01、Lbchr09 和 Lbchr11 外的 9 条染色体,占全部染色体的 75%(表 4)。其中 Lbchr03 和 Lbchr04 两条染色体上分别定位了 5 对 SSR 引物,Lbchr06 染色体上定位了 4 对 SSR 引物,Lbchr02、Lbchr08 和 Lbchr12 染色体上定位了 2 对 SSR 引物,Lbchr05、Lbchr07 和 Lbchr10 分别定位 1 对 SSR 引物。

表 4 基于 28 份枸杞种质开发的 23 个多态性 SSR 标记的信息

Table 4 Information of 23 polymorphic SSR markers based on 28 *Lycium* germplasms

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	重复基元 SSR motif	退火温 度 (°C) Annealing temperature	预测大小 (bp) Expected size	染色体定位 Chromosome localization	参照品种序号 Reference No.of variety
LBSSR1474	F: CACTCTCAGCAGTCACAGCA R: TGGTGCAGCAGTCCAACAAT	(CAG)8	55	212	Lbchr04	7、11、19、20、21、24、25
LBSSR21443	F: ACGTCACCATGGAAGCTGAA R: AGGCAGGAGAAATGGTGGTT	(CAC)8	55	141	Lbchr03	22、28
LBSSR1690	F: AATGATGGCCGTGATGTGGT R: TTCTTACCAGCCAGACGTC	(GAA)8	57	264	Lbchr06	2、9、18、20、22、24、26、28
LBSSR1156	F: ACACGGTATGACTTGCTGCA R: AGCACCTGAAGAAGAAGCCC	(AAG)6	57	177	Lbchr03	13、17、28
LBSSR1866	F: GCCATGCTCCTCACTTTCCT R: CCCAGGTGCAGCAATCAGTA	(TTC)15	57	250	Lbchr03	9、10、11、25、26、27
LBSSR29	F: TTCAACCCCATCGTCGATCC R: ATCATCATCCTCACCACCGC	(ATA)6	57	268	Lbchr06	1、7、9、11、12、13、18
LBSSR7914	F: GGAAGAAATGGTGGCTCGA R: TTGTTGATCGGGAGGAACGG	(TCT)13	57	264	Lbchr06	9、10、18、19、20、21
LBSSR7735	F: CGGAAGTGAAGGCCATGC R: GCTTACCGCGGACATGAACT	(TAC)7	57	280	Lbchr10	13、22、25
LBSSR40	F: CCCGAACCCGCCGTAATAAT R: GACGACGACACCATAGCTGA	(GAT)11	57	241	Lbchr08	13、25
LBSSR20799	F: CACCACCATGACTTCTCTCC R: TTGACCATAAAGCCCTCCCC	(AAC)9	57	262	Lbchr04	7、9、18
LBSSR1895	F: AGGAAGGCATAGAACAAGCAGA R: GGAGCTGACCCGAATATCCG	(AAG)14	59	208	Lbchr05	1、3、7、9、10、12、14、22、 24、25、27
LBSSR501	F: AGTAGCCCTCAAACCTCTCT R: GATCGATCTTGGTCCGGGTC	(CAA)5	59	186	Lbchr07	9、26、27
LBSSR0076	F: ACAATCAAAGCTTGAATAGCTC R: CGTCGCTAAATTGCTCATAACT	(AAG)22	53	152	Lbchr08	1、2、3、7、10、11、12、14、 15、18、19、22、24、25、28
LBSSR0297	F: TGCTGCAGAGACAACATTAGG R: TTCTTATCTCCCATTCATCCAGT	(AG)11	54	131	Lbchr12	6、13、19、20、21、22、23、 26、28
LBSSR0338	F: AAGATTGGGGAAGACGACG R: CATGGCAGCATATTAGCGAAG	(GAA)13	56	129	Lbchr03	2、3、6、7、8、10、11、14、 15、18、20、21、22、23
LBSSR0277	F: AGGAAATTCGTCCAAACAAGAC R: TGGTATCAGAAGCCGATCATAG	(ATT)14	56	141	Lbchr06	1、2、4、7、10、14、18、22、26
LBSSR0543	F: GTCAGGTCTGCGTACACTCTACC R: GGCCTCAGAAATCTCTTTATCAG	(GTT)12	56	146	Lbchr02	1、7、10、12、13、18、19、 20、22、25、27
LBSSR0010	F: CGAGAGGCTACCAGACACTAGG R: TCTCCAATATGTTGTACTCCGCT	(TTTC)11	56	141	Lbchr12	7、12、13、14、18、19、21、 22、24、25、27
LBSSR0421	F: ATCCACCCCATACATACTCATC R: GTTGCAACTAAAGGAGTTGTCCA	(TTC)13	56	146	Lbchr04	9、10、11、12、14、18、22、25
LBSSR0426	F: TAGGGAACCTGATATATGCGG R: CGCCACACCATCTATCTCTG	(TTG)11	57	144	Lbchr04	3、11、12
LBSSR0270	F: AGGAGTCAGGTCTGCGTACACT R: CGAGGTATTTACTCCAGTTGGTG	(GTT)14	57	143	Lbchr02	1、3、4、5、10、17、18、19、 21、24、26
LBSSR0512	F: CCCATACATACTCATCACCTCTGC R: GTTGTCACAAACAACACACAGTGC	(TTC)13	57	124	Lbchr04	1、2、9、11、12、14、18、22、 25、26
LBSSR0363	F: GTAGTAACCACGCCGATTGC R: CTGAGGTGGATACACTACGCG	(GCCTGT)12	60	157	Lbchr03	7、10、12、14、22

F: 上游引物; R: 下游引物; 括号内字母为重复基元序列, 括号外数字表示软件预测重复基元的重复次数; 品种序号同表 1; 下同

F: Forward primer; R: Reverse primer; The letters in the brackets are the sequence of SSR motif, and the numbers outside the brackets indicate the repetition times of SSR motif predicted by the software; The serial number of the variety is the same as that in Table 1; The same as below

使用 GeneMakerV2.2.0 软件对毛细管电泳获得的 SSR 片段长度(图 1)进行整理后获得每对引物能够区分的对应参照品种。其中有 7 对引物可以区分 10 个以上的种质,其中 LBSSR0076 可以区分 15 个种

质, LBSSR0338 可以区分 14 个种质, LBSSR1895、LBSSR0543、LBSSR0010 和 LBSSR0270 可以区分 11 个种质;有 9 对引物可以鉴定 5~9 个种质;7 对引物可以鉴定 3 个以下的种质。

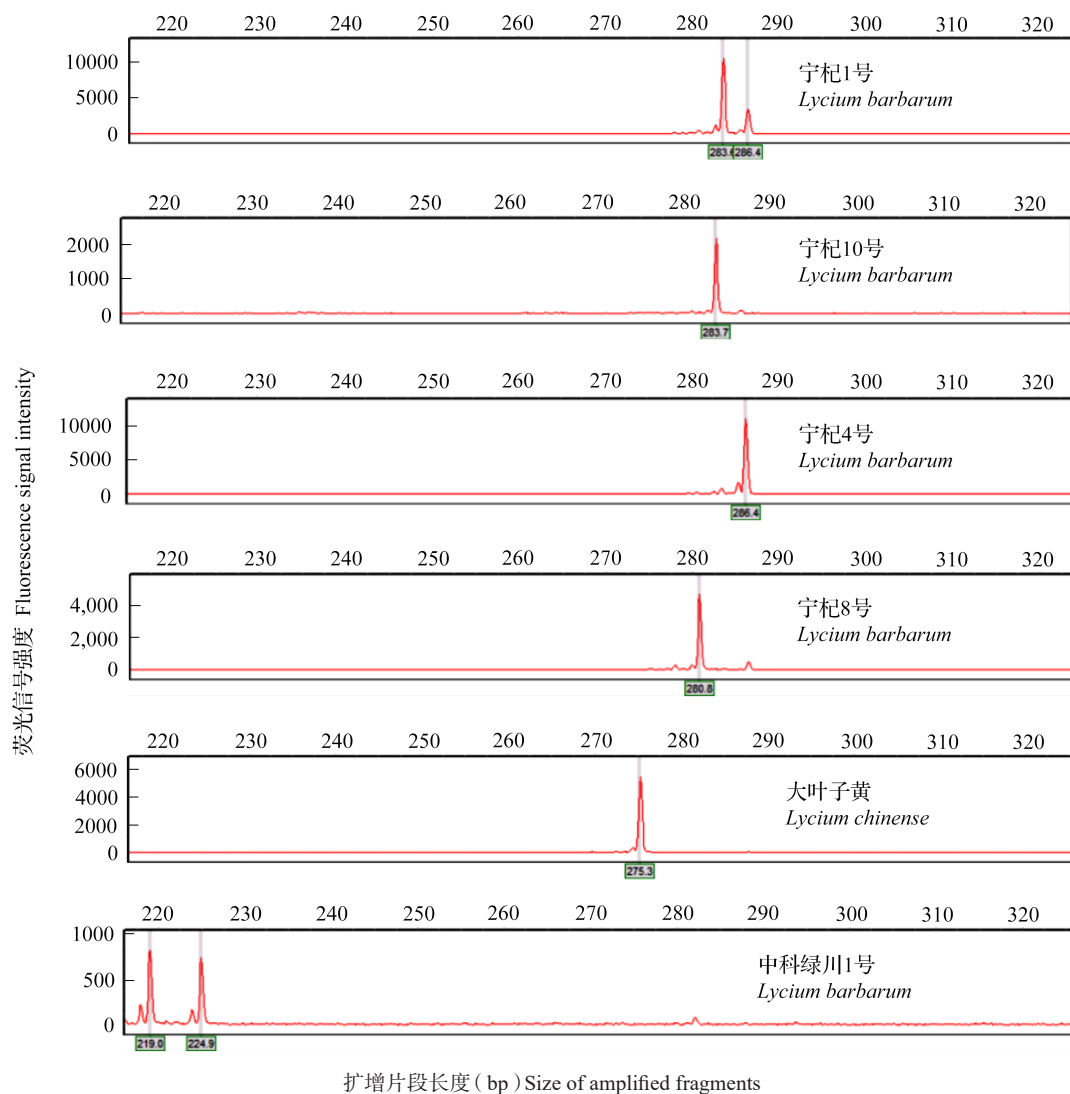


图 1 引物 LBSSR29 在 6 个枸杞种质中检测到的等位变异

Fig.1 Different alleles detected in 6 *Lycium* germplasm by primer LBSSR29

2.4 SSR 遗传多样性分析

统计各枸杞种质 6 个单株 23 对 SSR 引物的扩增片段大小(图 1)并对毛细管电泳结果取整,取整后 28 份种质得到 240 个等位基因(表 5),每个位点的平均等位基因数范围为 4~17,均值为 10。Shannon 信息指数最大值为 2.487,最小值为 1.177,均值为 1.876。期望杂合度和观测杂合度的范围分别为 0.635~0.909 和 0.250~0.964,均值分别为 0.795 和 0.575。多态信息量的范围是 0.586~0.902,对 23 个位点均表现为高多态($PIC > 0.5$),平均多态信息含量(PIC)为 0.771。综上所述,本次试验选择

的引物多态性较好。

如图 2 所示,28 个枸杞种质的遗传相似系数在 0.42~0.92 之间,平均为 0.69(图 2)。本试验选取的宁杞系列种质间遗传相似系数在 0.73~0.92 之间,说明宁杞系列种质间的亲缘关系较近。宁夏枸杞现有推广种植品种大都基于大麻叶茨园选出,因此宁杞系列品系与大麻叶的遗传相似系数均在 0.78 以上。3 个黑果枸杞间的遗传相似系数在 0.79~0.83 之间,亲缘关系较近,可能是相近地区收集的野生种质。通过遗传系数对 28 份枸杞种质进行 UPGMA 聚类分析(图 3),在遗传相似系数 0.71 时,28 份种质可以聚为 4 类。

表 5 23 对 SSR 标记在 28 份枸杞种质资源中遗传多样性

Table 5 Genetic diversity of 23 pairs of SSR markers in 28 *Lycium* germplasm

引物名称	平均等位基因数	有效等位基因数	Shannon 信息指数	观测杂合度	期望杂合度	多态性信息量
Primer name	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>I</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>PIC</i>
LBSSR1474	9	4.052	1.700	0.464	0.753	0.721
LBSSR21443	8	3.701	1.518	0.333	0.730	0.685
LBSSR1690	9	3.748	1.683	0.407	0.733	0.709
LBSSR1156	8	4.153	1.718	0.280	0.759	0.734
LBSSR1866	9	4.709	1.742	0.750	0.788	0.757
LBSSR29	11	3.654	1.754	0.259	0.726	0.706
LBSSR7914	9	4.600	1.745	0.609	0.783	0.751
LBSSR7735	7	4.181	1.594	0.393	0.761	0.725
LBSSR40	4	2.736	1.177	0.250	0.635	0.586
LBSSR20799	10	5.807	1.939	0.714	0.828	0.806
LBSSR1895	14	7.193	2.242	0.571	0.861	0.847
LBSSR501	7	5.302	1.801	0.462	0.811	0.787
LBSSR0076	9	7.024	2.041	0.708	0.858	0.841
LBSSR0297	8	5.829	1.887	0.607	0.828	0.806
LBSSR0338	14	10.965	2.487	0.679	0.909	0.902
LBSSR0277	17	7.439	2.414	0.667	0.866	0.856
LBSSR0543	12	4.429	1.868	0.607	0.774	0.749
LBSSR0010	11	4.960	1.894	0.520	0.798	0.773
LBSSR0421	14	6.938	2.221	0.893	0.856	0.841
LBSSR0426	8	3.488	1.492	0.741	0.713	0.670
LBSSR0270	12	5.586	2.072	0.630	0.821	0.805
LBSSR0512	12	8.615	2.276	0.964	0.884	0.873
LBSSR0363	8	5.600	1.883	0.714	0.821	0.800
平均值 Average	10	5.422	1.876	0.575	0.795	0.771

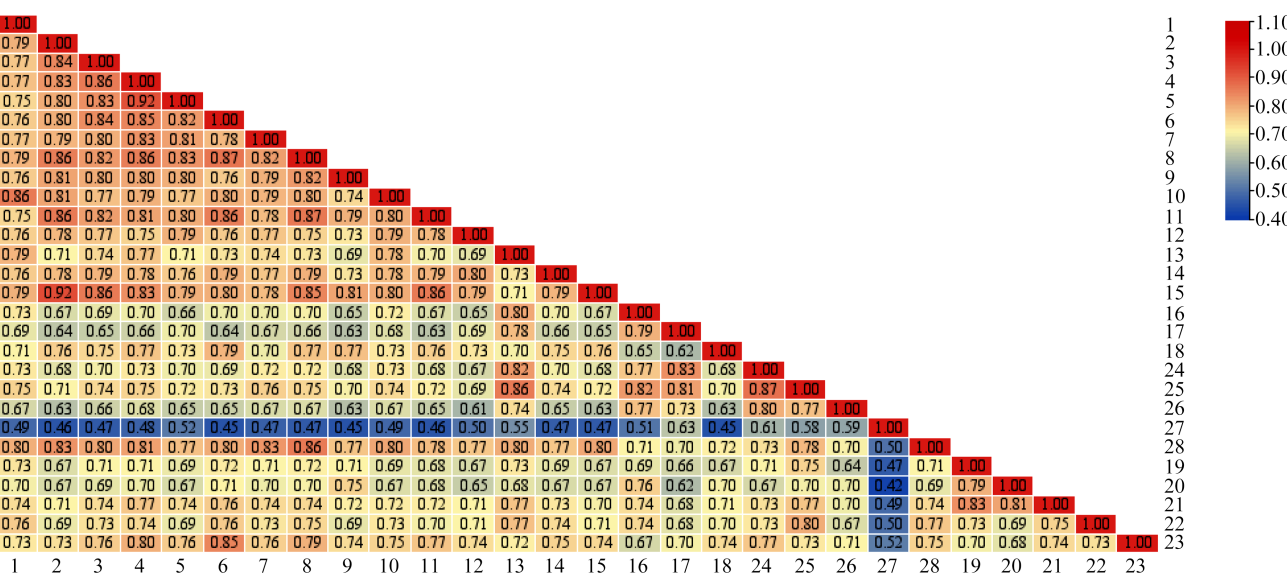


图 2 28 种枸杞种质遗传相似系数

Fig.2 Genetic coefficients of 28 *Lycium* germplasm

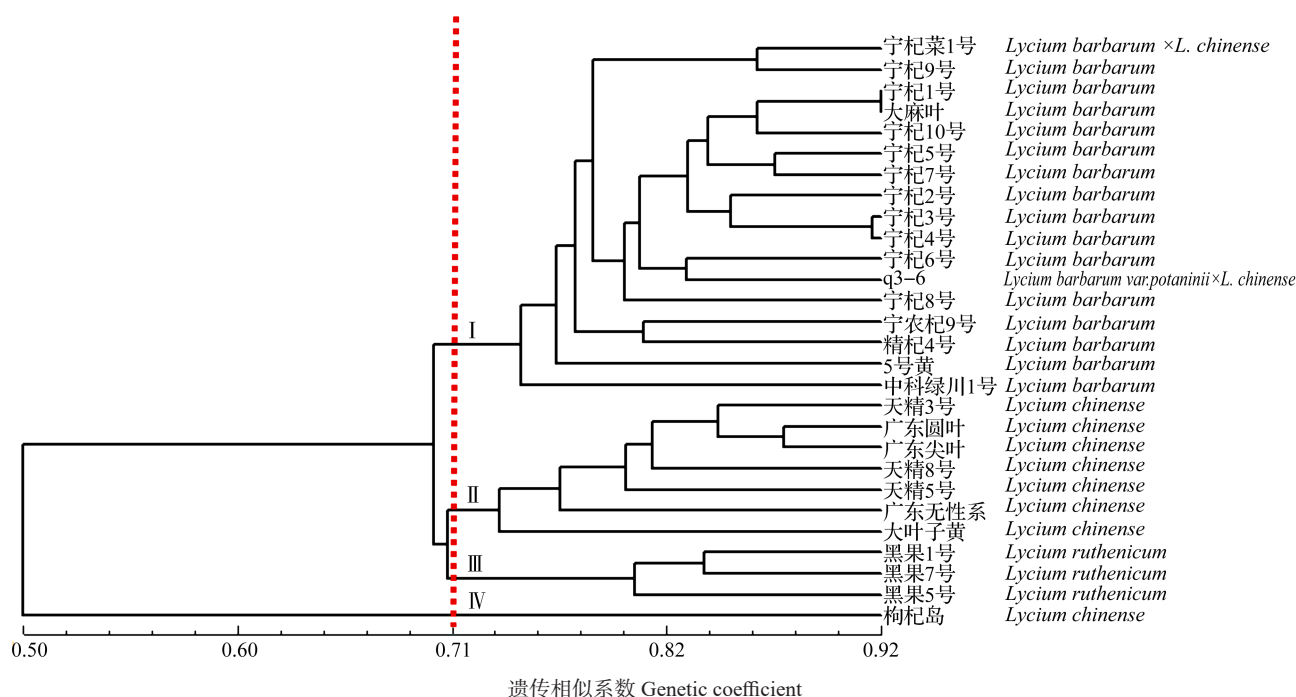


图3 28种枸杞种质遗传距离 UPGMA 聚类分析

Fig.3 UPGMA cluster analysis of genetic distance of 28 *Lycium* germplasm

I类是宁夏枸杞种及其杂交种,此类中主要是果用红果枸杞,且多为种植面积较多的品种或良种。II类是中国枸杞种,包括天精系列和广东枸杞种的叶用红果枸杞,叶片大且薄容易感染白粉病。III类中仅有黑果枸杞种,3个黑果枸杞种质叶片形态有较为明显的差异。IV类中只有中国枸杞种的枸杞岛种质,遗传相似度热图中枸杞岛种质与其他种质的相似程度均较低。28份枸杞种质间的遗传相似系数和遗传距离的聚类分析,可为将来枸杞杂交育种选择亲本搭配提供理论依据。

3 讨论

全长转录组测序(Iso-Seq, isoform sequencing)技术又称单分子实时测序技术,是基于PacBio平台进行的三代全长转录本测序^[29],具有超长读长、无需模板扩增等特点^[22,30-31],与传统RNA-seq相比,全长转录本测序可构建较高质量的参考序列文库,并获得更高可信度的差异表达分析^[23]。本研究利用该技术平台对宁杞1号3株无性系根、茎、叶进行混样后进行了全长转录本测序,测序后获得Circular consensus (CCS) 640797条,校正与去冗余分析后得到22849条高质量转录本序列。共发现有12737个SSR序列,说明SSR序列在枸杞基因组中广泛分布,这与枸杞全基因组分析结果相同^[2]。与单核苷酸和双核苷酸重复的SSR标记相比,三核苷酸到

六核苷酸的SSR标记更容易检测到等位基因长度的差异。本研究23对SSR引物中双核苷酸以上的SSR标记共有22个,三核苷酸重复的SSR标记共有20对占86.96%,且多态性远高于现有枸杞属SSR引物。全长转录组SSR位点信息与基因组相比,单核苷酸、双核苷酸和三核苷酸占比均为90%以上,而四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复数量较少,占比均不超过1%。在三核苷酸重复中,全长转录组SSR以AAG/CTT为最主要的重复单元,占SSR位点总数的5.43%;而宁夏枸杞基因组SSR则以22139次重复的AAC/GTT为最多重复单元;三核苷酸SSR标记可对枸杞种质进行很好的鉴别。

本研究用23对引物共扩增得到240个等位基因,分布在全部枸杞基因组9条染色体上,基因组覆盖率达75%,每个位点的等位基因数范围为4~17,均值为10。高于甘晓燕等^[32]每对引物平均产生5.6条扩增带和樊云芳等^[33]检测到的78个等位基因。*PIC*可代表SSR位点的变异程度,是评估SSR标记鉴别能力的重要指标^[34]。Botsein等^[35]提出*PIC* > 0.5时,该位点表现为高度基因座位变异。本研究*PIC*的范围是0.580~0.902,均值为0.771,高于之前研究者们获得的枸杞SSR标记*PIC*平均值(分别是0.450、0.487和0.391)^[32-33,36]。

植物遗传多样性研究是植物种质资源保护及开发利用的基础。SSR标记可以有效地揭示林木的

遗传多样性^[37], 结合相关分析、聚类分析等数量遗传分析手段, 可以对不同亲缘物种进行分类^[38]。通常杂交亲本间的遗传差异会影响子代的杂种优势, 对优良种质的遗传多样性评价可以对亲本选配、后代遗传变异程度及杂种优势水平预测提供指导^[39]。28 种枸杞种质遗传距离聚类分析中 I 类聚类结果包含了全部宁杞系列种质, 与 Chen 等^[40]和樊云芳等^[33]的结果基本一致, 这一类别均为宁夏枸杞及其杂交子代。这类中宁杞 1 号、宁杞 2 号、宁杞 3 号、宁杞 4 号、宁杞 5 号、宁杞 7 号、宁杞 10 号均来自宁夏产区的农家种及其子代, 宁杞 6 号、宁杞 8 号和宁农杞 9 号是来自于内蒙古自治区的农家种, 值得注意的是作为杂交品种的宁杞菜 1 号 (*Lycium barbarum* × *L. chinense*) 和杂交品系 q3-6 (*Lycium chinense* var. *potaninii* × *L. barbarum*) 在聚类分析中与宁夏枸杞更为接近。II 类包括天精系列和广东系列种质, 叶形与其他类相比叶面积大且柔软, 叶片厚度较薄、枝条柔软呈匍匐型, 这类型枸杞主要作为叶用枸杞^[41], 且均为中国枸杞 (*Lycium chinense*)。天精 3 号、天精 5 号和天精 8 号均由河北科技师范学院选育^[42-43]; 作为传统叶用的宁杞菜 1 号和宁杞 9 号^[44]与宁杞系列的亲缘关系更为相近。黑果 1 号、黑果 7 号和黑果 5 号为 III 类, 这类均为黑果枸杞 (*Lycium ruthenicum*), 与任重等^[45]和黄兴发^[46]等的发现黑果枸杞与红果枸杞的亲缘关系较远相同。由图 3 可知, IV 类中仅有的枸杞岛种质与 II 类中的天精 8 号、广东圆叶、广东尖叶和广东无性系亲缘更为相近, 与 I 类中的宁杞系列亲缘关系较远, 且该种质为中国枸杞。本研究所用的两种黄果枸杞, 5 号黄被分为 I 类, 而大叶子黄被分为 II 类, 从形态学观察可发现 5 号黄与宁杞系列表型相近, 大叶子黄与广东系列种质形态更为相近, 极有可能是这两类的变种, 可作为研究红果枸杞果实颜色差异的材料, 说明果实黄色的变异性状在宁夏枸杞和中国枸杞中均有产生。枸杞新品种大多是通过杂交的方式进行选育, 将杂交后获得的种子培育成实生苗无性繁殖后进行测定, 最终筛选出优良品种。杂交的亲本材料遗传背景窄、亲缘关系近, 会影响杂交子代之间的遗传基础使杂交优势不突出。因此本研究对了解枸杞种质的遗传基础、杂交亲本组合选配以及优新品种选育具有重要指导意义。

本研究通过对宁杞 1 号全长转录组数据设计 206 对 SSR 引物, 最终筛选出 23 对更高多态性的 SSR 引物并定位于染色体上, 建立了基于毛细管电

泳技术的 28 个枸杞种质 SSR 分子标记鉴定体系。此外基于样本特异的表型特征, 结合相应的基因注释, 对于枸杞种质资源的保存和利用提供重要指导。通过 28 份枸杞种质遗传多样性分析, 结果显示宁杞系列品种的遗传相似度较高, 与天精系列品种和广东系列种质从表型到遗传系数均差异较大。本研究发现枸杞岛种质与宁杞系列种质和中国枸杞种质遗传相似系数均较低, 可作为丰富宁杞系列种质遗传多样性的候选种质资源。

致谢: 感谢宁夏农林科学院枸杞科学研究所秦垦老师提供的种质信息及帮助。

参考文献

- [1] 钱丹, 纪瑞峰, 郭威, 黄璐琦. 中国枸杞属种间亲缘关系和栽培枸杞起源研究进展. 中国中药杂志, 2017, 42(17): 3282-3285
Qian D, Ji R F, Guo W, Huang L Q. Advances in research on relationships among *Lycium* species and origin of cultivated *Lycium* in China. China Journal of Chinese Materia Medica, 2017, 42(17): 3282-3285
- [2] Cao Y, Li Y, Fan Y, Li Z, Yoshida K, Wang J, Ma X, Wang N, Mitsuda N, Kotake T, Ishimizu T, Tsai K, Niu S, Zhang D, Sun W, Luo Q, Zhao J, Yin Y, Zhang B, Wang J, Qin K, An W, He J, Dai G, Wang Y, Shi Z, Jiao E, Wu P, Liu X, Liu B, Liao X, Jiang Y, Yu X, Hao Y, Xu X, Zou S, Li M, Hsiao Y, Lin Y, Liang C, Chen Y, Wu W, Lu H, Lan S, Wang Z, Zhao X, Zhong W, Yeh C, Tsai W, van de Peer Y, Liu Z. Wolfberry genomes and the evolution of *Lycium* (Solanaceae). Communications Biology, 2021, 4(1): 671
- [3] 朱秀苗, 吴学明, 祝静静, 王郁, 廉海霞. 青藏高原东北部野生北方枸杞资源及开发利用前景. 中国野生植物资源, 2008(2): 37-39
Zhu X M, Wu X M, Zhu J J, Wang Y, Lian H X. Wild *Lycium barbarum* resources and its development and utilization prospect in the northeast of Qinghai Tibet Plateau. Chinese Wild Plant Resources, 2008(2): 37-39
- [4] Chiang Y, Chao J C J. Olive oil combined with *Lycium barbarum* polysaccharides attenuates liver apoptosis and inflammation induced by carbon tetrachloride in rats. Journal of Functional Foods, 2018, 48: 329-336
- [5] Tang Z, Sun D, Qian C, Chen Q, Duan S, Sun S. *Lycium barbarum* polysaccharide alleviates nonylphenol exposure induced testicular injury in juvenile zebrafish. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 104(A): 618-623
- [6] Fu Y, Peng Y, Huang X, Yang Y, Huang L, Xi Y, Hu Z, Lin S, So K, Ren C. *Lycium barbarum* polysaccharide-glycoprotein preventative treatment ameliorates aversive. Neural Regeneration Research, 2021, 16(3): 543-549
- [7] Cai H, Yang X, Cai Q, Ren B, Qiu H, Yao Z. *Lycium barbarum* L. Polysaccharide (LBP) reduces glucose uptake via down-regulation of SGLT-1 in Caco2 Cell. Molecules, 2017, 22(2): 341
- [8] 王益民, 张宝琳. 我国枸杞属物种资源及发展对策. 世界林业研究, 2021, 34(3): 107-111
Wang Y M, Zhang B L. Species resources of *Lycium* L.

- in China and their development strategies. *World Forestry Research*, 2021, 34(3): 107-111
- [9] 钟铨元, 秦垦, 洪凤英, 闫亚美. 宁夏枸杞主要农艺性状与产量的相关性分析. *宁夏农林科技*, 2008(3): 35-36
Zhong S Y, Qin K, Hong F Y, Yan Y M. Correlation analysis between main agronomic characters and yield of *Lycium barbarum* in Ningxia. *Ningxia Journal of Agriculture and Forestry Science and Technology*, 2008(3): 35-36
- [10] 余意, 王凌, 孙嘉惠, 钟文浩, 张藤, 郭兰萍, 袁庆军. 基于微卫星群体遗传学的栽培枸杞遗传多样性和遗传结构评价. *中国中药杂志*, 2020, 45(4): 838-845
Yu Y, Wang L, Sun J H, Zhong W H, Zhang T, Guo L P, Yuan Q J. Genetic diversity and genetic structure evaluation of cultivated Chinese wolfberry (*Lycium barbarum*) based on microsatellite population genetics. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2020, 45(4): 838-845
- [11] 尹跃, 赵建华, 安巍, 李彦龙, 何军, 曹有龙. 利用 SSR 标记构建枸杞品种分子身份证. *生物技术通报*, 2018, 34(9): 195-201
Yin Y, Zhao J H, An W, Li Y L, He J, Cao Y L. Establishment of molecular identity for wolfberry cultivars based on SSR Markers. *Biotechnology Bulletin*, 2018, 34(9): 195-201
- [12] 李重, 胡伟明, 杨天顺, 潘丽珠, 胡忠庆, 陈立松, 王瑛. 用于枸杞品种鉴定的多重 EST-SSR 标记的建立. *分子植物育种*, 2017, 15(10): 4066-4070
Li Z, Hu W M, Yang T S, Pan L Z, Hu Z Q, Chen L S, Wang Y. Establishment of multiple EST-SSR markers for identification of Goji cultivars. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15(10): 4066-4070
- [13] 任重, 汪贵斌, 杨晓明, 郭起荣, 范雪娇, 任钢. 基于 SSR 分子标记的枸杞遗传多样性研究. *经济林研究*, 2020, 38(3): 95-103
Ren Z, Wang G B, Yang X M, Guo Q R, Fan X J, Ren G. Genetic diversity of Chinese wolfberry (*Lycium ruthenicum* L.) based on SSR molecular markers. *Non-Wood Forest Research*, 2020, 38(3): 95-103
- [14] 杨梦婷, 黄洲, 干建平, 徐君驰, 庞基良. SSR 分子标记的研究进展. *杭州师范大学学报: 自然科学版*, 2019, 18(4): 429-436
Yang M T, Huang Z, Gan J P, Xu J C, Pang J L. Research progress of SSR molecular markers. *Journal of Hangzhou Normal University: Natural Science Edition*, 2019, 18(4): 429-436
- [15] 翟书伟, 邓婷婷, 曹云泉, 陈奇, 汤盈盈, 袁宝童, 汪保华. 基于 SSR 标记的 26 份棉花材料的遗传多样性分析. *种子*, 2020, 39(10): 67-72
Zhai S W, Deng T T, Cao Y Q, Chen Q, Tang Y Y, Yuan B T, Wang B H. Genetic diversity analysis of 26 cotton cultivars based on SSR markers. *Seed*, 2020, 39(10): 67-72
- [16] 杨雄, 杨宁, 袁启华, 赵贵娟, 李国雷, 贾黎明, 陈仲. 白皮松 EST-SSR 分子标记的开发及应用. *北京林业大学学报*, 2021, 43(7): 1-11
Yang X, Yang N, Yuan Q H, Zhao G J, Li G L, Jia L M, Chen Z. Development and application of EST-SSR molecular markers in *Pinus bungeana*. *Journal of Beijing Forestry University*, 2021, 43(7): 1-11
- [17] 孙梦涵, 邢宝, 崔宏亮, 周帮伟, 张琴萍, 任贵兴, 秦培友. 藜麦种质资源遗传多样性 SSR 标记分析. *植物遗传资源学报*, 2021, 22(3): 625-637
Sun M H, Xing B, Cui H L, Zhou B W, Zhang Q P, Ren G X, Qin P Y. Genetic diversity analysis of quinoa by SSR Markers. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, 22(3): 625-637
- [18] 卓蕾, 向成丽, 肖杰, 叶媛丽. SSR 标记在植物种质资源鉴定的应用进展. *现代园艺*, 2021, 44(15): 9-11
Zhuo L, Xiang C L, Xiao J, Ye Y L. Application progress of SSR markers in plant germplasm resources identification. *Contemporary Horticulture*, 2021, 44(15): 9-11
- [19] 虞杭, 张得芳, 樊光辉, 王占林. 枸杞转录组 SSR 分布特征分析及其与基因组 SSR 分布特征的比较. *江苏农业科学*, 2018, 46(14): 24-27
Yu H, Zhang D F, Fan G H, Wang Z L. Analysis of SSR distribution characteristics of transcriptome in *Lycium barbarum* and its comparison with genomic SSR distribution characteristics. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2018, 46(14): 24-27
- [20] 王娟娟, 赵明, 韩雨威, 吴蒙蒙, 刘瑞振, 沈超, 祁哲晨. 微卫星 DNA 标记开发技术进展及其在经济植物研究中的应用. *生命科学研究*, 2016, 20(3): 260-266
Wang J J, Zhao M, Han Y W, Wu M M, Liu R Z, Shen C, Qi Z C. Advances in development of microsatellite DNA markers and their applications in economic plant research. *Life Science Research*, 2016, 20(3): 260-266
- [21] 任毅鹏, 张佳庆, 孙瑜, 吴振峰, 阮吉寿, 贺秉军, 刘国卿, 高山, 卜文俊. 基于 PacBio 平台的全长转录组测序. *科学通报*, 2016, 61(11): 1250-1254
Ren Y P, Zhang J Q, Sun Y, Wu Z F, Ruan J S, He B J, Liu G Q, Gao S, Bu W J. Full length transcriptome sequencing based on pacbio platform. *Chinese Science Bulletin*, 2016, 61(11): 1250-1254
- [22] 赵陆滢, 曹绍玉, 龙云树, 张应华, 许俊强. 全长转录组测序在植物中的应用研究进展. *植物遗传资源学报*, 2019, 20(6): 1390-1398
Zhao L Y, Cao S Y, Long Y S, Zhang Y H, Xu J Q. Applications and research progresses of Full-length Transcriptome Sequencing in plants. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(6): 1390-1398
- [23] 王瑞娴, 李川. 全长转录组测序技术在非模式植物转录组学研究中的应用. *分子植物育种*, 2019, 17(2): 502-508
Wang R X, Li C. Application of Full-length Transcriptome Sequencing in non-model plant transcriptome research. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(2): 502-508
- [24] 王芬, 木仁, 张雯, 马媛, 郭治友, 崔宝禄, 李静. 基于第三代纳米孔测序技术的茶树全长转录组分析. *福建农业学报*, 2021, 36(10): 1177-1186
Wang F, Mu R, Zhang W, Ma Y, Guo Z Y, Cui B L, Li J. Full-length Transcriptomes of tea obtained by Oxford Nanopore technology. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2021, 36(10): 1177-1186
- [25] 李安. 青环海蛇抗炎活性肽 Hydrostatin-SN10 的靶点拮抗机制及基于三代测序的青环海蛇多组学研究. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2021
Li A. Study on the Target-antagonizing mechanism of the SeaSnake anti-inflammatory peptide Hydrostatin-SN10 and the multi-omics of hydrophis cyanocinctus based on Third-generation Sequencing. Shanghai: Naval Medical University, 2021
- [26] 王希, 陈丽, 赵春雷. 利用 MISA 工具对不同序列类型进行 SSR 标记位点挖掘的探讨. *中国农学通报*, 2016, 32(10): 150-156
Wang X, Chen L, Zhao C L. Mining SSR molecular marker sites with MISA tool for different types of sequences. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2016, 32(10): 150-156

- [27] Chen C, Chen H, Zhang Y, Thomas H R, Frank M H, He Y, Xia R. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular Plant*, 2020, 13 (8): 1194-1202
- [28] 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
- [29] 张咏祀, 刘小红. 基于全长转录组测序的水杉 SSR 序列分析. *分子植物育种*, 2019, 17 (23): 7817-7821
Zhang Y S, Liu X H. Analysis on SSR sequences based on Full-length Transcriptome Sequencing in metasequoia glyptostroboides. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17 (23): 7817-7821
- [30] Grabherr M G, Haas B J, Yassour M, Levin J Z, Thompson D A, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, Chen Z, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Birren B W, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 2011, 29 (7): 130-144
- [31] Wall P K, Leebens-Mack J, Chanderbali A S, Barakat A, Wolcott E, Liang H, Landherr L, Tomsho L P, Hu Y, Carlson J E, Ma H, Schuster S C, Soltis D E, Soltis P S, Altman N, DePamphilis C W. Comparison of next generation sequencing technologies for transcriptome characterization. *BMC Genomics*, 2009, 10: 347
- [32] 甘晓燕, 郭玉琴, 巩楠, 陈虞超, 聂峰杰, 张丽, 宋玉霞. 24 份枸杞种质资源 SSR 遗传多样性分析. *分子植物育种*, 2020, 18 (5): 1697-1701
Gan X Y, Guo Y Q, Gong L, Chen Y C, Nie F J, Zhang L, Song Y X. Study on genetic diversity of 24 germplasm resources of *Lycium barbarum* L. by SSR markers. *Molecular Plant Breeding*, 2020, 18 (5): 1697-1701
- [33] 樊云芳, 尹跃, 安巍, 赵建华, 李彦龙, 王亚军, 曹有龙. TP-M13-SSR 技术在枸杞遗传多样性研究中的应用. *西北农业学报*, 2017, 26 (6): 890-896
Fan Y F, Yin Y, An W, Zhao J H, Li Y L, Wang Y J, Cao Y L. Application of tp-m13-ssr technology in the study of genetic diversity of *Lycium barbarum*. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2017, 26 (6): 890-896
- [34] 赵盼, 栗丹阳, 马锦林, 梁文汇, 庞晓明, 龙萃, 马婧怡, 郭惠红. 油料树种千年桐的 SSR 标记开发、遗传多样性与群体结构分析. *北京林业大学学报*, 2021, 43 (11): 50-61
Zhao P, Li D Y, Ma J L, Liang W H, Pang X M, Long C, Ma J Y, Guo H H. SSR marker development, genetic diversity and population structure analysis in oil tree species *Vernicia montana*. *Journal of Beijing Forestry University*, 2021, 43 (11): 50-61
- [35] Botstein D, White R L, Skolnick M, Davis R W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32 (3): 314-331
- [36] 尹跃, 安巍, 赵建华, 李彦龙, 樊云芳, 曹有龙. 枸杞品种 SSR 荧光指纹图谱构建及遗传关系分析. *西北林学院学报*, 2017, 32 (1): 137-141
Yin Y, An W, Zhao J H, Li Y L, Fan Y F, Cao Y L. Fingerprinting and genetic diversity analysis of wolfberry cultivars using fluorescence-labeled SSR markers. *Journal of Northwest Forestry University*, 2017, 32 (1): 137-141
- [37] 杨玉玲, 马祥庆, 张木清. ISSR 分子标记及其在树木遗传育种研究中的应用. *亚热带农业研究*, 2006 (1): 18-24
Yang Y L, Ma X Q, Zhang M Q. ISSR molecular marker and its application to the research on genetic breeding of trees. *Subtropical Agriculture Research*, 2006 (1): 18-24
- [38] 罗冉, 吴委林, 张旸, 李玉花. SSR 分子标记在作物遗传育种中的应用. *基因组学与应用生物学*, 2010, 29 (1): 137-143
Luo R, Wu W L, Zhang Y, Li Y H. SSR marker and its application to crop genetics and breeding. *Genomics and Applied Biology*, 2010, 29 (1): 137-143
- [39] 高翔, 庞红喜, 裴阿卫. 分子标记技术在植物遗传多样性研究中的应用. *河南农业大学学报*, 2002 (4): 356-359
Gao X, Pang H X, Pei A W. Application of molecular marker techniques in the plant genetic diversity study. *Journal of Henan Agricultural University*, 2002 (4): 356-359
- [40] Chen C, Xu M, Wang C, Qiao G, Wang W, Tan Z, Wu T, Zhang Z. Characterization of the *Lycium barbarum* fruit transcriptome and development of EST-SSR markers. *PLoS ONE*, 2017, 12 (11): e0187738
- [41] 李永华, 杨柳, 南雄雄, 王娅丽, 黄占明. 不同叶用枸杞新品种营养成分及产量的对比. *江苏农业科学*, 2021, 49 (13): 113-116
Li Y H, Yang L, Nan X X, Wang Y L, Huang Z M. Comparison of nutritional components and yield of new *Lycium barbarum* varieties for different leaves. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2021, 49 (13): 113-116
- [42] 王凤宝, 付金锋, 董立峰, 王伟伟. 多倍体菜用枸杞新品种天精 3 号选育. *核农学报*, 2013, 27 (6): 723-730
Wang F B, Fu J F, Dong L F, Wang W W. Breeding of a new polyploid medlar variety Tianjing 3. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2013, 27 (6): 723-730
- [43] 王凤宝. 高产、优质、抗病菜用枸杞新品种“天精 8 号”选育及应用. (2020-11-11) [2022-03-30]. <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?dbname=SNAD&filename=SNAD000001848866>
Wang F B. Breeding and application of a new medlar variety “Tianjing 8” with high yield, high quality and disease resistance. (2020-11-11) [2022-03-30]. <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?dbname=SNAD&filename=SNAD000001848866>
- [44] 南雄雄, 王锦秀, 刘思洋, 王娅丽, 王立英, 黄占明, 赵健, 李健. 叶用枸杞新品种“宁杞 9 号”. *园艺学报*, 2015, 42 (4): 811-812
Nan X X, Wang J X, Liu S Y, Wang Y L, Wang L Y, Huang Z M, Zhao J, Li J. A new wolfberry cultivar for leaf utilization “Ningqi 9”. *Acta Horticulturae Sinica*, 2015, 42 (4): 811-812
- [45] 任重, 汪贵斌, 杨晓明, 郭起荣, 范雪娇, 任钢. 基于 SSR 分子标记的枸杞遗传多样性研究. *经济林研究*, 2020, 38 (3): 95-103
Ren Z, Wang G B, Yang X M, Guo Q R, Fan X J, Ren G. Genetic diversity of Chinese wolfberry (*Lycium ruthenicum* L.) based on SSR molecular markers. *Non-Wood Forest Research*, 2020, 38 (3): 95-103
- [46] 黄兴发, 尹跃, 赵建华, 姚佳依, 秦小雅, 汪淑芬, 曹有龙, 战祥强. 黑果枸杞基因组 SSR 标记开发及遗传多样性分析. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2021, 49 (1): 126-135
Huang X F, Yin Y, Zhao J H, Yao J Y, Qin X Y, Wang S F, Cao Y L, Zhan X Q. Development of genomic SSR markers and genetic diversity analysis of *Lycium ruthenicum* Murr.. *Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition*, 2021, 49 (1): 126-135