

梨果皮转录组 SSR 位点信息分析

薛华柏, 杨 健, 王 龙, 王苏珂, 苏艳丽, 张慧蓉, 刘 月, 李秀根*

(中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009)

摘 要:【目的】基于‘满天红’×‘红香酥’杂交组合红皮单株果实转色期果皮混合样品和同期绿皮单株果皮混合样品的转录组数据, 开发 SSR 分子标记, 为梨遗传研究和基因定位奠定基础。【方法】利用 MISA 软件对基因序列进行搜索, 查找 SSR 序列。利用 Primer 3 软件设计引物, 并利用标记所在 scaffold 信息为成功设计引物的 SSR 位点标注所在连锁群及其遗传位置参考信息。【结果】23 863 个基因中有 2 972 个基因序列, 共含有 3 555 个 SSR, 占鉴定基因总数的 12.45%。在 1~6 碱基重复基元的 SSR 中, 三碱基重复类型出现频率最高, 占总 SSR 数量的 63.09%; 其次为二碱基和单碱基重复类型, 分别占 20.14% 和 15.22%。单碱基和二碱基重复类型基元中, 分别以 A/T (87.80%) 和 AG/CT (84.64%) 为主; 三碱基类型中, AGG/CCT 数量虽然最多, 但仅占该类型数量的 23.00%。4~6 碱基重复中, 各类型数量均不多。基因 GO 功能分类发现: 2 972 个含有 SSR 位点的梨果皮转录组基因被富集到 3 个 Ontology 类别的 2 644 个 GO Term 中, Biological process 涉及的 GO Term 最多, 为 1 512 个。共 2 911 个 SSR 位点 (81.88%) 被成功设计了引物, 其中 864 个 2~6 碱基类型 SSR 位点被成功归集到 17 条连锁群。【结论】从梨果皮转录组基因序列数据中成功鉴定了 SSR 并开发了引物, 可以为梨品种指纹图谱构建、遗传多样性研究和分子标记辅助选择育种等研究提供更多的标记。

关键词: 梨; RNA-Seq; 转录组; SSR

中图分类号: S661.2

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2018)Suppl.-055-06

Analysis of SSR information in pear peel transcriptome

XUE Huabai, YANG Jian, WANG Long, WANG Suke, SU Yanli, ZHANG Huirong, LIU Yue, LI Xiu-gen*

(Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, Henan, China)

Abstract: 【Objective】Pear (*Pyrus* spp.) is an economically important fruit tree worldwide. The number of SSR markers is still quite limited for sake of the increasing needs of researchers. In this study, the SSR molecular markers were developed for pear genetic research and gene mapping based on the transcriptome data of the mixed fruit peel samples of ‘Mantianhong’ × ‘Hongxiangsu’ hybrid. 【Methods】The MISA software was used to search for the gene sequence to find out the SSR sequence. The primers were designed using Primer 3 software, and the reference information of the genetic position of the SSR loci, from which the primers were successfully designed, was defined by using the scaffold information containing the SSR markers. 【Results】Among 23 863 genes, 2 972 gene sequences contained 3 555 SSRs, accounting for 12.45% of the total number of identified genes. In the SSR of 1-6 base motifs, the 3 base motif types appeared most frequently, accounting for 63.09% of the total number of the SSRs, followed by the 2 base and the single base motif types, accounting for 20.14% and 15.22%, respectively. Among the 1 and 2 base motif types, A/T (87.80 %) and AG/CT (84.64%) were dominant; among the 3 base motif types, the number of AGG/CCT was the largest, only accounting for 23.00%. Among the 4-6 base motifs, the number of each type was small. Gene GO functional classification

收稿日期: 2018-11-05 接受日期: 2018-12-10

基金项目: 兵团重点领域科技攻关项目 (2018AB035); 现代农业 (梨) 产业技术体系 (CARS-28); 河南省科技攻关项目 (172102110244)

作者简介: 薛华柏, 男, 博士, 副研究员, 研究方向为梨遗传育种与分子生物学。Tel: 0371-65330967, E-mail: xuehuabai@caas.cn

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 0371-65330967, E-mail: lixiugen@caas.cn

showed that 2 972 pear fruit peel transcriptome genes containing SSR loci were enriched into 2 644 GO Term in 3 ontology categories, and the biological processes ontology categories included the most GO terminology (1 512). A total of 2 911 primer pairs of the SSR loci (81.88%) were successfully designed, among which 864 SSR loci (2-6 base motif types) were successfully pooled into 17 linkage groups. **【Conclusion】**SSRs were successfully identified from the transcriptome gene sequence data of pear peel and the primers were developed, which can provide markers for researches on pear fingerprint construction, genetic diversity and molecular marker-assisted breeding.

Key words: *Pyrus*; RNA-Seq; Transcriptome; SSR

梨是蔷薇科(Rosaceae)梨属(*Pyrus*)多年生落叶果树树种^[1],在世界范围内广泛栽培,其果实甜美多汁,具有较高的营养和药用价值^[2-3]。我国是梨第一大生产国,2016年梨的生产面积和产量分别为111.27万hm²和1 870万t(国家统计局网站数据, <http://data.stats.gov.cn/search.htm?s=%E6%A2%A8>),均占世界的70%以上(联合国粮农组织网站数据, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>)。

简单重复序列(simple sequence repeats, SSR)也称微卫星(Microsatellites),由1~6个核苷酸组成的基序序列(motif)串联重复而成,其侧翼序列通常具有较高的保守性^[4-5]。SSR在基因组中广泛分布,具有较高的多态性,且呈共显性遗传^[6],被广泛应用于梨遗传连锁图构建^[7-8]、遗传多样性分析^[9-10]以及品种和杂种鉴定^[11-15]等方面。

SSR可分为genomic SSR和genic SSR, genomic SSR通常从富含SSR的基因组文库或随机基因组序列获得,而genic SSR则来源于转录组或EST序列的编码区^[16]。与genomic SSR标记相比,genic SSR标记被认为与农艺性状基因座相关,因而对分子标记辅助选择(MAS)更有利用价值。在梨上,已经有研究者利用EST序列和转录组序列数据,开发了一些genic SSR标记^[17-18],为梨属植物种质资源研究和遗传分析奠定了一定的基础。笔者利用梨果皮转录组序列进行SSR位点鉴定、引物设计,并对与SSR位点相关的基因进行注释,同时根据已发表的梨高密度遗传图谱确定SSR标记所在的连锁群信息,为相关研究提供更多的梨genic SSR标记。

1 材料和方法

1.1 材料

梨果皮转录组数据为笔者课题组2016年委托北京诺禾致源科技股份有限公司采用Illumina HiSeq平台测序获得。用于转录组测序的材料为

‘满天红’×‘红香酥’杂交组合红皮单株果实转色期果皮混合样品和同时期绿皮单株果皮的混合样品。样品共4份,红皮混样和绿皮混样各2份,每份样品由3棵不同单株的果皮等量混合而成,组成4份样品的单株各不相同。样品果实采自中国农业科学院郑州果树研究所新乡综合试验基地梨育种圃。果皮在液氮中研磨后用于提取RNA,检测合格的RNA暂存于-80℃超低温冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 SSR鉴定 SSR基元鉴定采用MISA软件(<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/misa.html>)进行。单碱基、二碱基、三碱基、四碱基、五碱基和六碱基重复类型的SSR基元最低重复次数分别设定为10、6、5、5、5、5次。

1.2.2 GO分析 含有SSR位点的基因GO富集分析委托北京诺禾致源科技股份有限公司采用GOseq软件^[19]完成。GO二级分类柱状图利用免费在线数据分析平台OmicShare tools提供的动态GO富集分析工具(<http://www.omicshare.com/tools/home/report/goenrich.html>)进行绘制。

1.2.3 引物设计 SSR引物利用Primer 3软件^[20]进行设计,参数设置如下:引物长度范围18~28 bp,最优引物长度为20 bp;PCR产物长度为100~300 bp;熔解温度(T_m)55~65℃,最优熔链温度为60℃,正、反向引物间的T_m值最大差异为1℃。

1.2.4 SSR位点归集到连锁群 成功设计了引物的SSR位点所在的连锁及其遗传位置信息参考Xue等^[2]的方法,根据其所在scaffold与Wu等^[8]构建的遗传图谱连锁群间的对应关系进行推断,以便为标记实际利用提供参考和便利。

2 结果与分析

2.1 梨果皮转录组中SSR的分布及特点

转录组测序共鉴定出23 863个基因。利用MI-

SA 软件对这些基因的序列进行搜索,发现其中 2 972 个基因序列含有 SSR 序列,占鉴定基因总数的 12.45%,其中 428 个基因序列中含有 2 个以上的 SSR。这些基因序列中总共含有 3 555 个 SSR,其中 234 个(6.58%)呈现复合 SSR 形式。如表 1 所示,在

单碱基至六碱基 6 种重复类型的 SSR 中,三碱基重复类型出现频率最高,占总 SSR 数量的 63.09%,其次为二碱基重复类型和单碱基重复类型,分别占总 SSR 数量的 20.14%和 15.22%,而其余 3 种重复类型分别仅占总 SSR 数量的不到 1%。同种碱基重复类

表 1 梨果皮转录组 SSR 不同基序长度和重复次数的数量分布

Table 1 Distribution of SSR with different motif types and repeat numbers in pear skin transcriptome

基序长度 Motif length/bp	重复 Repeats												总计 Total	比例 Ratio/%
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	≥16		
1	0	0	0	0	0	224	98	55	41	26	14	83	541	15.22
2	0	198	119	77	58	50	26	26	33	26	8	95	716	20.14
3	1 343	484	199	95	51	31	23	6	4	2	2	3	2 243	63.09
4	9	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0.42
5	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0.20
6	28	0	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	33	0.93
总计 Total	1 385	686	324	175	109	305	147	87	78	54	24	181	3 555	
比例 Ratio/%	38.96	19.30	9.11	4.92	3.07	8.58	4.14	2.45	2.19	1.52	0.68	5.08		

型的 SSR 随着重复次数的增加,数量呈下降趋势。

2.2 梨果皮转录组 SSR 基序重复类型和频率特征

从梨果皮转录组 SSR 碱基重复单元类型来看,3 555 个 SSR 位点共包含 51 种重复单元,单碱基、二碱基、三碱基、四碱基、五碱基、六碱基重复类型各有 2、4、10、7、5 和 23 种。从分布频率(表 2)来看,出现最多的基元是二碱基类型的 AG/CT,有 606 个,占 SSR 总量的 17.05%;其次是三碱基类型的 AGG/CCT,有 516 个,占 SSR 总量的 14.51%。单碱基类型

的 A/T(475 个,13.36%),以及三碱基类型的 AAG/CTT(451 个,12.69%)、ACC/GGT(353 个,9.93%)和 AGC/CTG(338 个,9.51%)数量也比较多。单碱基重复基元类型中,以 A/T 为主,占该类型数量的 87.80%;二碱基重复基元中,以 AG/CT 为主,占该类型数量的 84.64%;三碱基类型中,AGG/CCT 数量虽然最多,但并不占有数量上的绝对多数,仅占该类型数量的 23.00%。4~6 碱基重复中,各类型数量均不多。

表 2 梨果皮转录组 SSR 基序类型分布

Table 2 The distribution of types of SSR in pear skin transcriptome

SSR 基元 SSR motif	数量 Number	SSR 基元 SSR motif	数量 Number	SSR 基元 SSR motif	数量 Number
A/T	475	AATC/ATTG	1	AACGCC/CGTTGG	1
C/G	66	ACAT/ATGT	2	AAGCAG/CTGCTT	1
AC/GT	67	ACTC/AGTG	2	AAGGAG/CCTTCT	5
AG/CT	606	AGCC/CTGG	1	AAGTAG/ACTTCT	1
AT/AT	42	AGGG/CCCT	5	AAGTCC/ACTTGG	1
CG/CG	1	ATCG/ATCG	1	AATCCC/ATTGGG	1
AAC/GTT	116	AATCC/ATTGG	3	AATCTC/AGATTG	1
AAG/CTT	451	AATTC/AATTG	1	AATGCC/ATTGGC	1
AAT/ATT	28	ACGGG/CCCGT	1	AATGGG/ATTCCC	2
ACC/GGT	353	AGAGG/CCTCT	1	ACAGAG/CTCTGT	1
ACG/CGT	94	AGGAT/ATCCT	1	ACCAGC/CTGGTG	1
ACT/AGT	25	AAACGG/CCGTTT	1	ACCATC/ATGGTG	3
AGC/CTG	338	AAAGCC/CTTTGG	1	ACCGAG/CGGTCT	1
AGG/CCT	516	AACAGC/CTGTTG	1	ACCTCC/AGGTGG	4
ATC/ATG	207	AACAGG/CCTGTT	1	ACCTGC/AGGTGC	1
CCG/CGG	115	AACCCC/GGGGTT	1	ACTCCC/AGTGGG	1
AAAG/CTTT	3	AACCTC/AGGTTG	1	AGGCAT/ATGCTT	1

2.3 GO功能注释

在获得每个基因的GO注释信息后,使用WE-
GO对所有基因进行GO功能分类。2 972个含有
SSR位点的梨果皮转录组基因被富集到3个Ontology
类别的2 644个GO Term中(图1)。3类Ontology
中,Biological process涉及的GO Term最多,有1 512
个(57.19%);其次是Molecular function,涉及到767
个GO Term(29.01%);Cellular component涉及的

GO Term最少,仅有366个(13.84%)。Molecular
function富集到最多的基因,有1 861个;其次是Bio-
logical process,富集到1 475个基因;Cellular compo-
nent富集到的基因最少,有1 028个。在2 644个
GO Term中,Binding(1 403)、Cellular process(1
218)、Metabolic process(1 101)、Organic substance
metabolic process(948)、Catalytic activity(923)、Pri-
mary metabolic process(914)等富集的基因较多,均

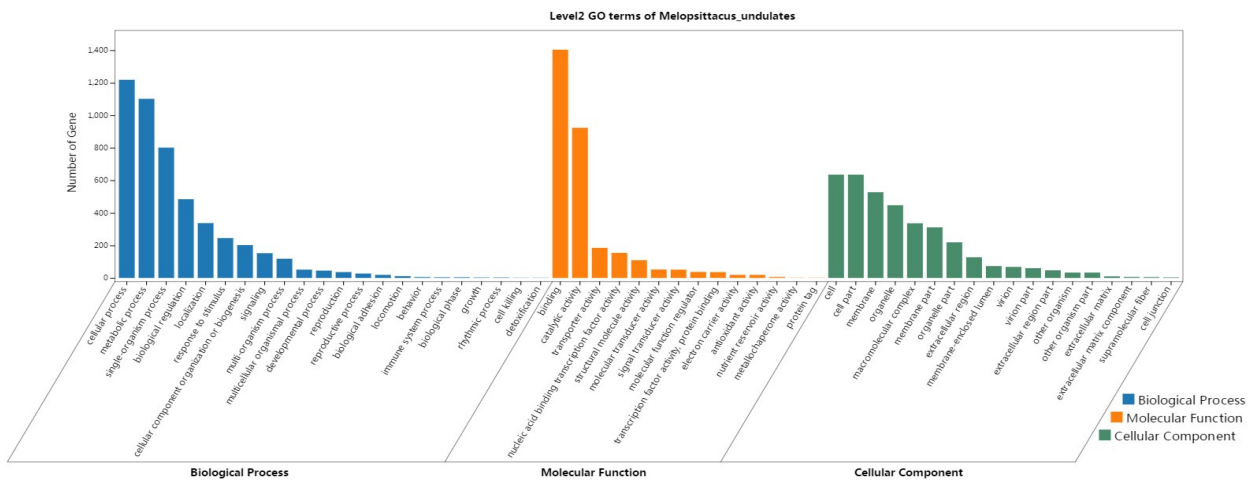


图1 包含SSR序列的基因GO二级分类图

Fig. 1 GO Terms of genes containing SSRs

超过了900个。

2.4 SSR引物设计

应用Primer 3软件对3 555个SSR位点进行引
物设计,其中2 911个SSR位点成功设计了引物,占
所有引物位点的81.88%,另外644个SSR位点的引
物设计失败。在成功设计引物的SSR中,以扩增产
物为三碱基重复类型的为多,为1 932个,占设计成
功位点数的66.37%,其次为二碱基和单碱基重复类
型,为525、408个,分别占18.04%和14.02%;剩下
的四碱基、五碱基和六碱基类型数量较少,分别只有
12、6和28个。

2.5 SSR标记归集到连锁群

根据SSR标记所在scaffold与相应连锁群的对应
关系,2 911个成功设计引物的SSR位点中有908
个被成功归集到17条连锁群,另外2 003个SSR位
点因为所在scaffold没有与17条连锁群建立对应关
系未能归集到相应的连锁群中(表3)。归集到连锁
群的标记,以第五连锁群(LG15)为多,有105个;其
次为LG10、LG6、LG2和LG3,均有70个以上的SSR

位点;归集到LG7上面的SSR位点数量最少,仅有7
个。标记在连锁群上的位置范围和连锁群上标记的

表3 SSR标记在不同连锁群上的数量分布

Table 3 Distribution of SSR marker numbers in different linkage groups

连锁群 Linkage group	标记数量 Marker number	标记参考位置范围 Range of reference map position/cM
LG1	49	0.0~112.4
LG2	71	0.0~130.3
LG3	72	0.9~149.8
LG4	34	0.0~66.4
LG5	66	1.2~161.4
LG6	72	0.0~118.0
LG7	7	25.0~67.7
LG8	49	0.0~103.3
LG9	64	0.2~112.6
LG10	73	0.0~129.8
LG11	54	0.0~120.9
LG12	46	2.6~127.7
LG13	47	3.7~104.1
LG14	36	0.0~128.8
LG15	105	0.0~174.2
LG16	33	11.2~128.9
LG17	30	10.3~142.3
未知 Unknown	2 003	零值 Null

数量不存在明显的相关关系,但归集标记数量最多的 LG15 上的标记位置范围也最大,达到 174.2 cM,而归集标记数量最少的 LG7 上标记的位置范围最小,为 42.7 cM。

3 讨论

Xue 等^[21]对‘砀山酥梨’全基因组 SSR 进行了搜索并设计了相应的引物,总共鉴定出了 156 396 个 SSR,其中 98 939 个是单碱基重复类型,占砀山酥梨全基因组 SSR 的 63.26%,然后是二碱基和三碱基重复类型的 SSR,分别占砀山酥梨全基因组 SSR 的 26.56%和 7.54%,四碱基、五碱基和六碱基重复类型总共占比不到 3%。Yue 等^[17]对酥梨芽转录组数据进行分析,从 116 282 条 unigene 中鉴定出 8 375 个 2~6 碱基类型的 SSR,其中二碱基和三碱基类型的分别占鉴定 SSR 总数的 65.11%和 32.81%,各基元重复类型的 SSR 数量分布与 Xue 等^[21]揭示的酥梨全基因组 SSR 分布情况接近。Zhou 等^[18]从黄花梨果皮转录组 75 764 条 unigene 数据中鉴定 SSR,10 622 个 SSR 中 2~6 碱基重复类型所占比例分别为 55.87%、24.45%、1.37%、2.03%和 1.78%,总体上与 Xue 等^[21]和 Yue 等^[17]的结果一致,但是单碱基重复类型所占比例(14.49%)明显与基因组存在较大的差异。本研究中,单碱基重复类型 SSR 所占比例为 15.22%,与 Zhou 等^[18]的结果类似,可能说明梨转录组 SSR 与基因组 SSR 间在单碱基重复类型分布上存在差异。此外,本研究中二、三碱基重复类型的 SSR 分别占 20.14%和 63.09%,其分布比例与 Yue 等^[17]和 Zhou 等^[18]的结果存在较大差异,这可能是由于材料间的差异造成的。

位置信息在 SSR 分子标记实际应用中能够指导使用者根据需要对标记进行选择^[22],是 SSR 标记信息的重要组成部分。过去,在没有已组装基因组序列做参考的情况下,从基因组 DNA 序列或 EST 序列、转录组序列中开发的 SSR 标记,无法确定其在基因组中的物理位置^[17-18],并且需要通过连锁分析才能确定上图标记的遗传位置信息^[7-8]。随着新测序技术的快速发展,越来越多的作物开始了转录组测序和基因组序列组装^[23-24]。利用组装的基因组序列开展全基因组范围内 SSR 标记开发的努力越来越多,开发的 SSR 标记也多被标注了物理位置信息^[21,25-27],其中多数是 scaffold 水平的位置信息,仅有少数是更具

参考价值的染色体水平的位置信息^[27]。而许多从转录组 Unigene 序列开发的 SSR,甚至连 scaffold 水平的位置信息也没有标注^[17-18]。在梨上,Xue 等^[21]开发了全基因组的 SSR 标记,并通过建立 SSR 所在 scaffold 与其上 SNP 标记遗传位置间的关联,标注了 SSR 标记所在的连锁群信息及其遗传位置参考信息。本研究利用 Xue 等^[21]建立的方法,顺利建立了梨果皮转录组 SSR 标记的遗传位置参考信息,可以为 SSR 标记的精细利用提供便利。

参考文献 References:

- [1] POTTER D, ERIKSSON T, EVANS R C, OH S, SMEDMARK J E E, MORGAN D R, KERR M, ROBERTSON K R, ARSENAULT M, DICKINSON T A. Phylogeny and classification of Rosaceae[J]. *Plant Systematics & Evolution*, 2007, 266(1/2): 5-43.
- [2] XUE H, SHI T, WANG F, ZHOU H, YANG J, WANG L, WANG S, SU Y, ZHANG Z, QIAO Y, LI X. Interval mapping for red/green skin color in Asian pears using a modified QTL-seq method[J]. *Horticulture Research*, 2017, 4: 17053.
- [3] XUE H, WANG S, YAO J L, ZHANG X, YANG J, WANG L, SU Y, CHEN L, ZHANG H, LI X. The genetic locus underlying red foliage and fruit skin traits is mapped to the same location in the two pear bud mutants ‘Red Zaosu’ and ‘Max Red Bartlett’ [J]. *Hereditas*, 2018, 155(1): 25.
- [4] GURARIE R, COHEN C J, EITAN Y, SHELEF L, HALLERMAN E M, KASHI Y. Simple sequence repeats in *Escherichia coli*: abundance, distribution, composition, and polymorphism [J]. *Genome Research*, 2000, 10(1): 62-71.
- [5] TAUTZ D, RENZ M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 1984, 12(10): 4127-4138.
- [6] 薛华柏,乔玉山,许宽勇,章镇. 磁珠富集法分离小黄花李基因组微卫星 DNA 片段[J]. *西北植物学报*, 2006, 26(7):1320-1325. XUE Huabai, QIAO Yushan, XU Kuanyong, ZHANG Zhen. DNA fragment isolation of genomic microsatellite in *Prunus salicina* by magnetosphere[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2006, 26(7): 1320-1325.
- [7] CHEN H, SONG Y, LI L T, KHAN M A, LI X G, KORBAN S S, WU J, ZHANG S L. Construction of a high-density simple sequence repeat consensus genetic map for pear (*Pyrus* spp.) [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2014, 33(2): 316-325.
- [8] WU J, LI L T, LI M, KHAN M A, LI X G, CHEN H, YIN H, ZHANG S L. High-density genetic linkage map construction and identification of fruit-related QTLs in pear using SNP and SSR markers[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(20): 5771-5781.
- [9] BAO L, CHEN K, ZHANG D, LI X, TENG Y. An assessment of

- genetic variability and relationships within Asian pears based on AFLP (amplified fragment length polymorphism) markers[J]. *Scientia Horticulturae*, 2008, 116(4): 374-380.
- [10] SONG Y, FAN L, CHEN H, ZHANG M, MA Q, ZHANG S, WU J. Identifying genetic diversity and a preliminary core collection of *Pyrus pyrifolia* cultivars by a genome-wide set of SSR markers[J]. *Scientia Horticulturae*, 2014, 167: 5-16.
- [11] SAWAMURA Y, SAITO T, TAKADA N, YAMAMOTO T, KIMURA T, HAYASHI T, Kotobuki K. Identification of parentage of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) 'Housui' [J]. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 2004, 73(6): 511-518.
- [12] 薛华柏, 王芳芳, 王磊, 杨健, 王龙, 王苏珂, 苏艳丽, 乔玉山, 李秀根. '满天红' × '红香酥' 杂种鉴定及遗传变异 Genic-SSR 分析[J]. *果树学报*, 2017, 34(8): 925-934.
- XUE Huabai, WANG Fangfang, WANG Lei, YANG Jian, WANG Long, WANG Suke, SU Yanli, QIAO Yushan, LI Xiugen. Identification of the hybrids and analysis of genetic variation of a pear progeny derived from crossing between 'Mantianhong' and 'Hongxiangsu' by Genic-SSR[J]. *Journal of Fruit Science*, 2017, 34(8): 925-934.
- [13] 薛华柏, 杨健, 王龙, 王苏珂, 张慧蓉, 乔玉山, 章镇, 李秀根. 29 个梨品种 SSR 特征指纹数据表的构建[J]. *果树学报*, 2015, 32(6): 1028-1035.
- XUE Huabai, YANG Jian, WANG Long, WANG Suke, ZHANG Huirong, QIAO Yushan, ZHANG Zhen, LI Xiugen. Construction of SSR characteristic fingerprinting data table for 29 pear cultivars[J]. *Journal of Fruit Science*, 2015, 32(6): 1028-1035.
- [14] 薛华柏, 赵瑞娟, 王磊, 杨健, 王龙, 王苏珂, 苏艳丽, 李秀根. 梨品种 SSR 特征指纹图谱与分子身份证构建[J]. *中国南方果树*, 2018, 47(s1): 42-49.
- XUE Huabai, ZHAO Ruijuan, WANG Lei, YANG Jian, WANG Long, WANG Suke, SU Yanli, LI Xiugen. Construction of SSR characteristic fingerprinting data table and molecular ID for pear cultivars [J]. *South China Fruits*, 2018, 47(s1): 42-49.
- [15] 赵瑞娟, 薛华柏, 王磊, 温晶晶, 杨健, 王龙, 王苏珂, 苏艳丽, 李秀根. 梨属植物 SSR 分子标记核心引物的筛选及其聚类分析[J]. *果树学报*, 2017, 34(10): 1229-1238.
- ZHAO Ruijuan, XUE Huabai, WANG Lei, WEN Jingjing, YANG Jian, WANG Long, WANG Suke, SU Yanli, LI Xiugen. Core primers screening for SSR markers and cluster analysis in the plants of *Pyrus* spp. [J]. *Journal of Fruit Science*, 2017, 34(10): 1229-1238.
- [16] VARSHNEY R K, GRANER A, SORRELLS M E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications[J]. *Trends in Biotechnology*, 2005, 23(1): 48-55.
- [17] YUE X Y, LIU G Q, ZONG Y, TENG Y W, CAI D Y. Development of genic SSR markers from transcriptome sequencing of pear buds[J]. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2014, 15(4): 303-312.
- [18] ZHOU H, CAI B H, LU Z Q, GAO Z H, QIAO Y S. Development, characterization, and annotation of potential simple sequence repeats by transcriptome sequencing in pears (*Pyrus pyrifolia Nakai*) [J]. *Genetics and molecular research*, 2016, 15(3): 15038683.
- [19] YOUNG M D, WAKEFIELD M J, SMYTH G K, OSHLACK A. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias[J]. *Genome Biology*, 2010, 11(2): R14.
- [20] KORESSAAR T, REMM M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(10): 1289-1291.
- [21] XUE H, ZHANG P, SHI T, YANG J, WANG L, WANG S, SU Y, ZHANG H, QIAO Y, LI X. Genome-wide characterization of simple sequence repeats in *Pyrus bretschneideri* and their application in an analysis of genetic diversity in pear[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 473.
- [22] 陈昌文, 曹珂, 王力荣, 朱更瑞, 方伟超. 中国桃主要品种资源及其野生近缘种的分子身份证构建[J]. *中国农业科学*, 2011, 44(10): 2081-2093.
- CHEN Changwen, CAO Ke, WANG Lirong, ZHU Gengrui, FANG Weichao. Molecular ID establishment of main China peach varieties and peach related species[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(10): 2081-2093.
- [23] WU J, WANG Z, SHI Z, ZHANG S, MING R, ZHU S, KHAN M A, TAO S, KORBAN S S, WANG H, …… , ZHANG S. The genome of the pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) [J]. *Genome Research*, 2013, 23(2): 396-408.
- [24] DACCORD N, CELTON J M, LINSMITH G, BECKER C, CHOISNE N, SCHIJLEN E, VAN DE GEEST H, BIANCO L, MICHELETTI D, VELASCO R, …… , BUCHER E. High-quality de novo assembly of the apple genome and methylome dynamics of early fruit development[J]. *Nature Genetics*, 2017, 49(7): 1099-1106.
- [25] CAVAGNARO P F, SENALIK D A, YANG L, SIMON P W, HARKINS T T, KODIRA C D, HUANG S, WENG Y. Genome-wide characterization of simple sequence repeats in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. *Bmc Genomics*, 2010, 11(1): 1-18.
- [26] TAHERI S, LEE T A, YUSOP M R, HANAFI M M, SAHEBI M, AZIZI P, SHAMSHIRI R R. Mining and development of novel SSR markers using next generation sequencing (NGS) data in plants[J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 399.
- [27] PORTIS E, LANTERI S, BARCHI L, PORTIS F, VALENTE L, TOPPINO L, ROTINO G L, ACQUADRO A. Comprehensive characterization of simple sequence repeats in eggplant (*Solanum melongena* L.) genome and construction of a web resource [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 401.