# EST-SSR标记在谷类作物中的通用性研究进展

赵雅楠[1],王　颖[1,2],张东杰[1,*],沈　琰[1],杨义杰[1]
(1.黑龙江八一农垦大学食品学院,黑龙江大庆 163319;
2.国家杂粮工程技术研究中心,黑龙江大庆 163319)

**摘　要**:EST-SSR 标记是基于表达序列标签(Express Sequence Tags,EST)开发简单重复序列(Simple Sequence Repeats,SSR)的一种与功能基因直接相关的新型分子标记技术,因其在不同作物间具有较好的通用性而被广泛应用于作物基因组学研究。不同谷类作物间 EST-SSR 的通用性可降低引物开发成本、提高效率,为遗传研究较薄弱的作物奠定基础。文章概括介绍了 EST-SSR 标记,对其在不同谷类作物间及相比较于 G-SSR 标记的通用性情况进行简单归类分析,评述了 EST-SSR 标记的不足及其优化措施,以期利用 EST-SSR 高通用性的特点推动谷类作物基因组学的发展。

**关键词**:EST-SSR,谷类作物,通用性

## Research progress in transferability of EST-SSR makers in grain crops

ZHAO Ya-nan[1],WANG Ying[1,2],ZHANG Dong-jie[1,*],SHEN Yan[1],YANG Yi-jie[1]
(1.College of Food Science,Heilongjiang Bayi Agricultural Universitiy,Daqing 163319,China;
2.National Coarse Cereals Engineering Research Center,Daqing 163319,China)

**Abstract**:EST-SSR is a new molecule marking technology to exploit Simple Sequence Repeats(SSR) based on Express Sequence Tags(EST).It was widely used in the study of crop genomics because of its good transferability in different crops. The transferability of EST-SSR in different grain crops could cut the costs of primers development and improve efficiency.It could lay the foundation of the crops that genetic studies are weak.EST-SSR makers and its transferability in different grain crops compared with G-SSR were introduced in this paper.The disadvantages and improvements in order to accelerate the development of crop genomics by using the high transferability of EST-SSR were reviewed.

**Key words**:EST-SSR;grain crops;transferability
**中图分类号**:TS201.1　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1002-0306(2016)21-0357-06
doi:10.13386/j.issn1002-0306.2016.21.061

谷类作物是农业生产中最重要的粮食作物,不仅为人体提供大部分热能和蛋白质,还提供多种人体所需的营养物质,是人类生存的重要储备粮食。随着人们生活水平、健康意识及膳食结构水平的不断提高,国内外市场对谷物及谷物加工食品的需求量逐渐上升,使我国在谷物育种、谷类食品加工等方面快速发展,取得了卓越成就[1]。目前,大豆[2]、小麦[3]、大麦[4]等大宗谷类作物已完成了遗传连锁图谱的构建,并对一些重要的农艺性状如抗性[5]、株高[6]等进行了 QTL 定位,育成了多批高产优质多抗的新品种,在谷物食品生产加工中发挥重要作用。He[7]等在面包焙烤加工研究中发现面筋强度、淀粉含量是影响面包品质的重要因素,提出在选择小麦原料时要考虑筛选含有高低分子量谷蛋白亚基和硬度基因 Pinb-D1b 的培育品种,而用于制作面条的品种则要求含有 Wx-B1 缺失基因及可标记低含量多酚氧化酶活性的 STS 标记以保证面条硬度适宜、颜色白亮。可见,谷物食品加工业与谷物育种工作息息相关,对未来谷物育种方向具有一定的指导作用。

表达序列标签(express sequence tags,EST)是一段在 cDNA 文库中随机克隆的长度在 150~500 bp 的表达序列,可以代表某一生物体的某个组织在特定

**收稿日期**:2016-06-02
**作者简介**:赵雅楠(1993-),女,硕士研究生,研究方向:农产品加工及贮藏工程,E-mail:zyn658@163.com。
*通讯作者:张东杰(1966-),男,博士,教授,研究方向:农产品加工及贮藏工程,E-mail:byndzdj@126.com。
**基金项目**:“十二五”农村领域国家科技计划项目(2012BAD34B02);黑龙江省应用技术与开发重大项目(GA14B104)。

时空条件下的一个表达基因。简单重复序列(Simple Sequence Repeat,SSR)是一类由1~6个碱基组成的基元串联重复的DNA序列,在基因组中广泛存在[8]。而表达序列标签微卫星(EST-SSR)是一种在EST范围内开发SSR的新型分子标记技术,与传统SSR分子标记相比具有费用低、耗时短的优点,可避免测序、建库等繁琐步骤[9]。同时,EST是具有表达功能的DNA序列,仅占整个基因组的2%左右,可以忽略其余98%的"junk DNA",直接获得基因表达的信息,在很大程度上缩小了基因的筛选范围,真正实现高效、经济、简便[10-11]。此外,由于EST来自编码区,其保守性远远高于来自非编码区的DNA序列,因此EST-SSR标记在种属、甚至是远缘作物之间具有较好的通用性[12]。EST-SSR标记的通用性分析,既为一些遗传研究较落后的作物,提供了开展现代基因组学研究的基本分析工具,促进种间遗传信息的借鉴、交流,也有助于研究近缘种间的遗传演化规律等。本文从EST-SSR标记在不同种属间谷类作物的通用性进行论述,同时相较于G-SSR(Genomic-SSR)标记通用性情况进行分析,并对其今后在基因组研究中的深入利用进行了讨论和展望,以期为EST-SSR标记开展遗传多样性分析、基因定位等研究人员提供参考。

## 1 EST-SSR标记

EST是指mRNA逆转录成cDNA,利用噬菌体或质粒作为载体,形成cDNA文库后,大规模的在cDNA文库中随机挑选克隆,对3′端或5′端进行一步法测序,形成的一段大小在150~500 bp、具有特异性的DNA片段,可以反映出mRNA的部分信息。尽管不同作物EST中SSR的分布频率各不相同,但研究表明,8%的EST序列中存在SSR,其中近半数可以成功设计引物,EST-SSR标记则是根据这一特点在EST中筛选含有SSR的序列,根据序列两端侧翼具有高度保守性的特点为其设计引物,经PCR扩增和凝胶电泳检测,将得到的EST序列与数据库中的已知资源进行blast比对,判断其可能代表的功能或信息[13]。EST技术的不断成熟使其在不同物种间的应用也更加广泛和深入,随着DNA测序技术的不断发展,EST资源数据库不断充实,可以根据需求直接获取,但并非所有的EST-SSR都可以成功设计引物。首先要利用SSR筛选软件在EST数据库中进行可利用性筛选,通过拼接和聚类将质优、无冗余的EST留下。通常根据核苷酸的核心序列重复次数选择,如二核苷酸,n≥10,三核苷酸,n≥7等,需要注意的是,不同软件的筛选条件和计算标准各不相同,在设计筛选参数时一定要宽严适中,否则会导致SSR不精准或拼接错误。为提高数据的准确性,在筛选SSR时可以将几种软件结合使用,相互验证筛选结果。EST-SSR的引物设计一般遵循以下原则:引物长度在20 bp左右,(C+G)含量尽量控制在50%,SSR两端距3′端或5′端20 bp以上,且3'端末尾不能是T或A等[14]。

近些年,随着EST-SSR技术的不断发展,其应用领域及研究内容也不断拓展,在谷类作物品质性状评价、果实营养成分研究中应用广泛,为谷类作物营养物质合成分子机制研究及品质改良提供理论依据和技术支持。姜鹏[15]等基于SSR分子标记技术发现了一些与"宁麦9号"低蛋白质含量、低面筋强度等优质性状相关联的等位变异;林延慧[16]等构建了包括18个连锁群的大豆分子连锁图谱,得到4个与大豆蛋白质含量相关的QTL;梁慧珍[17]等对与大豆异黄酮、脂肪及蛋白质含量相关的基因进行定位,共检测到23个与上述重要品质性状相关的QTL并准确定位到各连锁群,同时在相关性研究中发现大豆中蛋白质含量分别与异黄酮及脂肪含量呈极显著负相关,为进一步明确大豆中各营养成分关联关系及大豆优质品质性状在染色体的具体位置及效应提供重要价值,对促进大豆品质性状优化具有重要意义;张晓娜[18]等利用179对SSR引物构建了水稻遗传连锁图谱,得到4个能够控制糙米中维生素E含量的QTL;刘克琦[19]利用SSR技术对水稻中维生素A含量与水稻米色性状关联关系进行研究,发现水稻中维生素A性状由至少两对独立显性基因控制,而与米色没有直接关系,为水稻中维生素种类及合成机制研究及富含维生素水稻品种的选育与推广奠定基础。禾谷类作物中的维生素、蛋白质、脂肪等都是重要的品质性状,EST-SSR标记技术可通过寻找影响各品质性状含量的QTL,明确谷类作物中部分EST-SSR序列特征及与营养成分的关联性,利用克隆、杂交等手段将传统谷类作物进行品质改良,最终实现作物品质优化,突出各谷类作物功能特性使其满足人们在日常摄食过程中对营养物质的需求。

## 2 EST-SSR标记在不同谷类作物间的通用性分析

随着测序技术的不断发展,各种作物EST序列的开发数量急剧上升,发掘未知EST-SSR位点,揭示更多基因信息成为分子生物学研究的重要目标。但由于部分谷类作物的分子标记研究起步较晚,已知的EST序列数量较少,遗传研究基础相对薄弱,因此,近缘物种转移法逐渐成为发展EST-SSR标记的有效方法[20]。几种谷类作物EST-SSR的通用性情况见表1。同一种属作物间,EST-SSR侧翼序列具有高度的保守性和相似性,因此,一套EST-SSR引物可以通用于同一种属间的不同作物,一部分引物能够扩增出清晰的条带,甚至具有很好的多态性,特别是近缘作物之间,亲缘关系越近,同源序列越多,扩增效果越好。EST-SSR在不同谷类作物间具有良好的通用性,将一种已研究成熟作物中开发出的EST-SSR引物通用于其他作物,可降低开发成本、提高效率、扩充EST数据资源、促进不同作物间基因信息的交流、推动作物基因组学发展。

### 2.1 EST-SSR标记在种间不同谷类作物的通用性分析

近些年,EST数量呈指数级快速增长,为作物EST-SSR的开发提供了广阔空间。张体付[23]等随机挑选了119对藜麦EST-SSR引物,对4个同属不同

表1 几种谷类作物 EST-SSR 的通用性情况
Table 1 The transferability of EST-SSR in different crops

| EST-SSR 源作物 | 可转移作物 | 参考文献 |
|---|---|---|
| 绿豆 *Vigna radiata(Linn.) Wilczek* | 菜豆,豇豆,小豆,饭豆 *Phaseolus vulgaris Linn, Vigna unguiculata(Linn.) Walp, Vigna angularis, Lablab purpureus(Linn.) Sweet* | [21] |
| 甘蔗 *Saccharum officinarum* | 甘蔗属,禾谷类 *Sugarcane, Cereals* | [22] |
| 藜麦 *Chenopodium quinoa* | 苍白茎藜,台湾藜,杖藜 *Chenopodium pallidicaule, Chenopodium formosanum, Chenopodium giganteum* | [23] |
| 小麦 *Triticum aestivum L* | 水稻、玉米、大麦 *Oryza sativa, Zea mays L, Hordeum vulgare L* | [24] |

种藜麦资源的研究表明通用性比率为 55.9%。李晓岚[25]等利用 40 对乌拉尔甘草引物构建了 4 种、22 份甘草属材料的 EST-SSR 指纹图谱,并对其进行聚类分析,发现有效扩增率为 100%,其中 15 对引物可产生多态性条带,共获得 59 个等位基因,多态性比率为 89.4%。郭红媛[26]等利用 40 对燕麦 EST-SSR 引物分析了另外 15 份燕麦种质资源的遗传多样性,共获得 89 个等位基因,对其进行聚类分析,在相似系数为 0.93 时可将其分为 3 类。进一步利用上述 40 对 EST-SSR 引物鉴定 31 份遗传信息不明确的燕麦种质资源的基因组倍性,发现应试种质中可能存在新的燕麦资源。以上数据表明,谷类作物种间基因同源性较高,EST-SSR 标记在谷类作物种间具有良好的适应性和通用性,得到的引物与传统途径开发的 EST-SSR 标记一样,均可应用于遗传研究中,在谷类作物种间亲缘关系分析、指纹图谱数据构建、种质资源鉴定、基因组鉴定等方面发挥重要作用。

## 2.2 EST-SSR 标记在属间不同谷类作物的通用性分析

EST-SSR 不仅可以通用于同属间近缘作物,在许多不同属作物间也具有一定的转移性。宿俊吉[27]将 351 对小麦 EST-SSR 引物通用于四倍体冰草中,其中 314 对引物能成功扩增,通用性比率高达 89.5%。龚亚明[28]等设计了 163 对豌豆 EST-SSR 引物,以 26 份蚕豆为模板验证其通用性,发现其中 99 对可产生有效扩增,通用性比率为 61%,其中 36 对引物具有多态性,平均等位基因数为 4.1,平均 PIC 值达 0.48,聚类分析显示可将应试的 26 份蚕豆资源划分成两大类。Varshney 等[29]选取了 165 对大麦 EST-SSR 引物验证其在小麦、黑麦以及水稻中的通用性,发现通用率分别为 78.2%、75.2%、42.4%,且在各应试品种的扩增产物中均检测出不同程度的多态性片段。EST-SSR 标记在不同属谷类作物间具有一定的通用性,这极大丰富了谷类作物的 SSR 标记信息,在一定程度上缓解了部分谷类作物 SSR 引物数量少、多态性低的现状,同时得到的多态性引物在谷类作物的遗传多样性分析、聚类分析、属间资源亲缘关系验证等研究中具有较好的适用性,特别是对于一些研究进步晚、开发标记数量少的谷类作物,利用近缘作物转移法将一些开发成熟作物的 EST-SSR 标记进行通用,在节约开发成本的同时可以加强属间作物的基因交流,丰富基因信息,对其他近缘作物的分子标记开发起到借鉴作用,为其基因组信息开发提供新的思路与途径。

EST-SSR 序列的通用性在不同作物间各不相同,其通用性高低在一定程度上受二者遗传关系的影响。SahaP[30]等将 145 对高羊茅 EST-SSR 引物通用于黑麦草、草甸羊茅、小麦及水稻中,通用性比率分别为 86%、83%、71%、59%,表明通用性比率与应试品种和高羊茅的亲缘关系远近相关。EST-SSR 翼序列的保守程度与作物亲缘关系远近相关,亲缘关系越近,序列同源性越高,其引物通用性越好,一般来讲,同属(族)不同种作物间的通用性高于同科不同属间作物的通用性[31]。钟敏[32]研究绿豆 SSR 引物与其同属作物豇豆(50%)与小豆(73.3%)间的通用性明显高于陈明丽[33]研究的菜豆 SSR 引物在豇豆(43.9%)与小豆(38.2%)间的通用性。徐磊[34]将禾本科高粱 EST-SSR 引物通用于其同属作物割手密中,通用性为 70%,而李宏伟[35]将禾本科小麦的 597 对 EST-SSR 引物通用于其同科不同属作物玉米中,仅有 393 对引物成功扩增,通用率为 65.8%。此外,EST-SSR 引物在亲缘关系较远的物种间也具有通用性。Savadi[36]、Backiyarani[37]等发现高粱、芭蕉的 EST-SSR 引物在花生(39%)、姜目(58%)中均具有一定的通用性。谷类作物间 EST-SSR 标记通用性研究为一些遗传研究基础较薄弱的作物提供了新思路,初步实现了 EST-SSR 标记的资源共享,充分利用了近缘作物间基因具有一定同源性的特点。与此同时,EST 来源于编码区,是对作物基因内部变异的直接评价,可以直接将标记与性状或生理生化特征相联系,为后续的基因定位等研究提供重要参考。

# 3 G-SSR 标记与 EST-SSR 标记的通用性比较分析

SSR 标记具有数量丰富、重复性好等特点,是一种比较成熟的分子标记技术,按照 SSR 来源可分为 Genomic-SSR 和 EST-SSR,二者在谷类作物间具有不同程度的通用性。文明富[38]等将 419 对木薯 EST-SSR 引物和 182 对 G-SSR 引物通用于麻疯树和橡胶树中,其 EST-SSR 引物和 G-SSR 引物在麻疯树的通用性比率分别为 55.85% 和 37.36%,在橡胶树中的

通用性比率分别为38.9%和26.37%，木薯EST-SSR引物在麻疯树和橡胶树中的通用性明显高于其G-SSR引物。Yu[39]等将47对水稻EST-SSR引物和41对G-SSR引物分别通用于中国芒中，其中24对EST-SSR引物和17对G-SSR引物成功扩增，通用性比率分别为51%和41%，说明水稻SSR引物可通用于芒属作物中，且其EST-SSR引物的通用性明显高于G-SSR引物。丁西朋等[40]以4份柱花草为模板，探究103对G-SSR引物和117对EST-SSR引物的通用性情况。其中93对G-SSR引物可在至少一份供试材料中发生有效扩增，其中44对可以在4种供试材料中同时发生扩增，通用性比率为42.7%，117对EST-SSR引物中，98对是有效引物，其中81对可在4种供试材料中同时发生扩增，通用性比率为69.2%。Chandra等[41]也对柱花草的20对EST-SSR引物和21对G-SSR引物的通用性进行分析，发现EST-SSR标记的通用性比率高达86%，而G-SSR标记仅为45%，表明柱花草EST-SSR的通用性高于G-SSR。

G-SSR与EST-SSR的来源序列不同导致其引物通用性及多态性情况存在差异。G-SSR来源于基因间序列，而EST-SSR来源于转录区域。作为基因的一部分，EST-SSR中包含一些控制植物基本生理生化代谢、与其生命过程息息相关的基因。为缩小其后代与亲本的遗传差异，更好的保留亲本优良特性，这部分基因在物种间往往具有较好的稳定性，不易突变，在生物进化过程中表现出的序列同源性和共线性更明显[42-43]。因此，相较于G-SSR，EST-SSR位点在遗传过程中更稳定，EST-SSR标记的通用性也普遍高于G-SSR标记。微卫星的多态性主要由于其复制过程中发生的滑动或染色单体的不等交换等原因产生的，主要表现为其核心重复单元种类及重复次数在同一物种的不同基因位点上迥然不同，而这部分多态性很有可能通过内含子表现出来，由于G-SSR与EST-SSR的序列来源不同，EST-SSR中不含有内含子，当用G-SSR引物扩增模板DNA时，很有可能将内含子扩增出，表现出的多态性一部分来源于内含子，而并不仅仅是微卫星的。此外，在生物进化过程中，作物的部分基因会受到搭载效应的影响，承受强选择作用使其在群体中的遗传多样性降低，搭载效应在对作物生命休戚相关性状的选择中比较明显，而对其它性状选择引起的选择牵连效应较小[44-46]。因此，搭载效应可能使EST的多态性降低，一些关键性状出现杂合变异的物种被淘汰，而EST序列来自编码区，控制作物性状，部分非关键性状发生变异的作物却能在生物进化和自然选择过程中保留下来[47]。因此，EST-SSR引物的多态性普遍低于G-SSR。

综上所述，谷类作物EST-SSR标记的通用性普遍高于G-SSR，而多态性则普遍低于G-SSR。但也存在特殊情况，贺润丽等[48]分别选取66对大豆G-SSR引物和43对EST-SSR引物通用于6种不同来源的黄芪中，通用比率分别为31.82%和76.74%，多态性比率分别为18.18%和53.49%，表明经过筛选的大豆G-SSR和EST-SSR均可通用于黄芪中，且EST-SSR的通用性比率和多态性比率均高于G-SSR。程雪妮[49]等将小麦的203对SSR引物和46对EST-SSR引物通用于无雀麦芒中，其中137对(67.49%)SSR引物和30对(65.22%)EST-SSR引物成功扩增，表明小麦G-SSR和EST-SSR在无芒雀麦中都具有一定的通用性，但是G-SSR标记的通用性高于EST-SSR，这与前人的研究结果正好相反。出现这种现象可能因为所选取的EST-SSR标记数量较少，不能准确、全面的反映出作物的基因组信息。此外，还可能与所选取EST-SSR标记的来源有关。研究证明，来源于3′UTR和5′UTR的EST-SSR标记的多态性非常好，远远高于其它来源于编码区的序列，可能其中部分EST-SSR标记来源于其基因的3′UTR和5′UTR，故而其整体多态性比率升高。SSR多态性高低是决定其是否能成为有效遗传标记的关键，尽管EST-SSR的通用性较高，但其多态性较低仍是阻碍其应用于基因组学研究中的一块短板。EST-SSR固有的高保守性特点使EST-SSR引物开发之后的多态性筛选、核心引物确定等工作难度较大，因此，在选择EST-SSR标记时要充分考虑其多态性情况。在选择EST-SSR标记时要参考其所在位置，尽可能选择靠近高变异区的。同时，可以借鉴切割扩增多态性的方法，将没有表现出多态性的扩增产物回收，利用限制性内切酶处理，进一步分析片段内部差异。此外，还可以提升检测手段，使用分辨率更高的毛细管荧光电泳技术等。

## 4 讨论与展望

作为人类重要的粮食作物，谷物籽粒不仅为人类提供极重要的营养物质，还可以作为原料生产主副食品，促进谷物及其食品加工业的发展。近些年，谷物因其特殊的营养品质及药用价值已成为人们理想的健康食品，但由于一些小宗谷类作物的研究还不够透彻，在育种及生产加工方面仍存在很多问题亟待解决，因此，要不断拓展谷物研究领域，加强谷物中蛋白质、维生素、纤维素等营养品质性状的研究，将分子标记技术与谷物育种有机结合，进行谷物育种实用性转化，对谷物功能特性成分及作用机理进行深入研究，发掘谷物潜在特性，推动谷物及其食品加工业的发展，加强谷物的市场竞争力。

EST-SSR作为一种新型分子标记技术，在具备一般分子标记技术特点的同时还具有一些特殊优势，已经在基因组学研究中起到重要作用，但也仍存在一定的缺陷。其一，开发EST时需要对3′端或5′端进行一步法测序，在这一过程中很容易出现测序错误，进而会影响EST数据库的准确性。研究发现，EST数据库中只有97%是精确的，错误数据会在判断EST代表哪种基因功能或信息时产生影响；其二，在EST序列中筛选SSR位点时，由于选用软件及参数设置的差异性和局限性，导致测序成本、效率及准确性均受到影响；其三，由于不同生物体的不同组织在不同时空条件下的基因表达频率不同，导致cDNA文库中的mRNA丰度各不相同，高丰度的EST一般

具有冗余性,不利于提取,而低丰度的基因往往具有特异性,有很高的研究价值;其四,由于 EST 来源于编码区,开发出的 EST-SSR 只能反映作物转录区序列的差异,而对于一些调控序列、内含子等位于非编码区的信息差异则不能体现出来。为克服上述缺点,可从以下四个方面进行优化。第一,提高 cDNA 文库质量。在构建 cDNA 文库时,要尽可能的选取质量高、代表性强的材料,如在不同发育阶段和环境条件下取不同器官的组织,这样可以包含更多的基因信息。第二,利用减法杂交技术有效实现目的基因序列的富集,大幅度减少高丰度非特异性 cDNA,提高低丰度 cDNA 所占比例。第三,进行特异性筛选以降低冗余性 EST 对测序的影响。第四,在对 EST 数据库中的 SSR 进行可用性筛选时,可以将几种筛选软件有机结合,相互验证筛选结果以提高准确性。

EST-SSR 标记起步虽晚,但发展迅猛,随着 EST -SSR 技术的不断发展,EST 数据库逐渐丰富,EST-SSR 标记在谷类作物间的通用性应用已成为作物基因发掘、亲缘关系鉴定、遗传多样性分析等研究的可靠根据,目前已经在禾谷类、豆菽类等谷类作物中广泛应用,在降低引物开发成本、提高研发效率等方面的优势十分显著。对不同谷类作物间 EST-SSR 标记通用性进行分析,将会快速推进种属内不同作物基因结构和相关功能信息的开发,能够使不同科属作物间的基因研究成果相互交叉,形成合力,共同促进谷类作物基因组学的发展。

## 参考文献

[1]王昊龙,韩俊杰,李森森,等.功能标记的开发及在禾谷类作物中的应用[J].核农学报,2014,28(11):1963-1971.

[2]蒋恩君,张君,姚丹,等.大豆遗传连锁图谱研究进展[J].大豆科学,2013,32(3):420-424.

[3]王霖.小麦遗传连锁图谱构建及主要农艺和品质性状 QTL 定位[D].泰安:山东农业大学,2012.

[4]郭蕾蕾.大麦分子遗传图谱构建及其主要农艺性状和功能成分的 QTL 定位[D].雅安:四川农业大学,2012.

[5]段灿星,朱振东,孙素丽,等.中国食用豆抗性育种研究进展[J].中国农业科学,2013,46(22):4633-4645.

[6]郑德波,杨小红,李建生,等.基于 SNP 标记的玉米株高及穗位高 QTL 定位[J].作物学报,2013(3):549-556.

[7]He Z H, Yang J, Zhang Y, et al. Pan bread and dry white Chinese noodle quality in Chinese winter wheats. Euphytica, 2004,139:257-267

[8]He X D, Zheng J W, Zhou J, et al. Characterization and comparison of EST-SSRs in Salix, Populus, and Eucalyptus. Tree Genetics and Genomes,2015,11(1):1614-2942.

[9]Xu P, Wu X H, Wang B G, et al. A SNP and SSR Based Genetic Map of Asparagus Bean (Vigna. unguiculata ssp. sesquipedialis) and Comparison with the Broader Species. Plos One,2011,6(1):121-123.

[10]Nagaraja R R, Madhusudhana R, Murali S, et al. Characterization, development and mapping of Unigene-derived microsatellite markers in sorghum[Sorghum bicolor(L.) Moench]. Molecular Breeding,2012,29(3):543-564.

[11]Wu H B, Luo S B, Luo J N, et al. Development and Application of EST-SSR Markers in Vegetable Crop. China Vegetables,2012.

[12]Lai P S, Ho W S, Pang S L. Development, Characterization and Cross-species Transferability of Expressed Sequence Tag-simple Sequence Repeat (EST-SSR) Markers Derived from Kelampayan Tree Transcriptome. Biotechnology, 2013, 12(6): 225-235.

[13]Parekh M J, Kumar S, Zala H N, et al. Development and validation of novel fiber relevant dbEST-SSR markers and their utility in revealing genetic diversity in diploid cotton(Gossypium herbaceum and G.arboreum)[J].Industrial Crops & Products,. 2015,83:620-629

[14]Wen Y, Lu X P, Ren R, et al. Development of EST-SSR marker and genetic diversity analysis in Sorghum bicolor × Sorghum sudanenes.[J].Hereditas,2013,35(2):225-232.

[15]姜朋,张平平,张旭,等.弱筋小麦宁麦9号及其衍生系的蛋白质含量遗传多样性及关联分析[J].作物学报,2015,41(12):1828-1835.

[16]林延慧,张丽娟,李伟,等.大豆蛋白质含量的 QTL 定位[J].大豆科学,2010,29(2):207-209.

[17]梁慧珍,余永亮,杨红旗,等.大豆产量及主要农艺性状 QTL 的上位性互作和环境互作分析[J].作物学报,2014,40(1):37-44.

[18]张晓娜,王令强,高冠军,等.水稻糙米中维生素 E 相关 QTL 分析[J].分子植物育种,2014(2):206-212.

[19]刘克琦.含维生素 A 功能稻的选育及遗传分析[D].南昌:江西农业大学,2011

[20]Botta R, Marinoni D T. Frontiers in silico mining, characterization and cross-species transferability of EST-SSR markers for European hazelnut (Corylus avellana L.)[J]. Molecular Breeding,2015,35(1):1-14.

[21]Tangphatsornruang S, Somta P, Uthaipaisanwong P, et al. Characterization of microsatellites and gene contents from genome shotgun sequences of mungbean(Vigna radiata(L.) Wilczek)[J]. Bmc Plant Biology,2009,9(4):137.

[22]Singh R K, Jena S N, Suhail K, et al. Development, cross-species/genera transferability of novel EST-SSR markers and their utility in revealing population structure and genetic diversity in sugarcane[J].Gene,2013,524(2):309-29.

[23]张体付,戚维聪,顾闽峰,等.藜麦 EST-SSR 的开发及通用性分析[J].作物学报,2016,04:492-500.

[24]Tang J, Gao L, Cao Y, et al. Homologous analysis of SSR-ESTs and transferability of wheat SSR-EST markers across barley, rice and maize[J].Euphytica,2006,151(1):87-93.

[25]李晓岚,陆嘉惠,谢良碧,等.4 种甘草属植物 EST-SSR 引物开发及其亲缘关系分析.西北植物学报,2015,35(3): 480-485.

[26]郭红媛,贾举庆,张仙红,等.燕麦 EST-SSR 标记的开发和利用[J].植物科学学报,2014(3):240-250.

[27]宿俊吉,柴守诚,刘伟华,等.普通小麦 SSR 和 EST-SSR 引物对冰草通用性的比较分析[J].西北植物学报,2007,27(7):1311-1316.

[28]龚亚明,徐盛春,毛伟华,等.豌豆 EST-SSR 标记在蚕豆中的通用性与应用[J].浙江大学学报:农业与生命科学版,

2011,05:479-484.
[29] Varshney R K, Sigmund R, Borner A, et al.Interspecific transferability and comparative mapping of barley EST-SSR markers in wheat, rye and rice[J].Plant Sci, 2005, 168:195-202.
[30] Saha M C, Mian M A R, Eujayl I, et al.Tall fescue EST-SSR markers with transferability across several grass species[J].Theor Appl Genet, 2004, 109:783-791.
[31] Yu J K, Dake T M, Singh S, et al.Development and mapping of EST-derived simple sequence repeat markers forhexaploid wheat.Genome, 2004, 47(5):805-818.
[32]钟敏,程须珍,王丽侠,等.绿豆基因组SSR引物在豇豆属作物中的通用性.作物学报,2012,38(2):223-230.
[33]陈明丽,王兰芬,武晶,等.普通菜豆基因组SSR标记开发及在豇豆和小豆中的通用性分析.作物学报,2014,40(5):924-933.
[34]徐磊,邢淑莲,姚艳丽,等.高粱SSR和EST-SSR标记在割手密中的通用性分析.中国农学通报,2015,31(27):164-171.
[35]李宏伟,刘曙东,高丽锋,等 小麦EST-SSRs的通用性研究.植物遗传资源学报,2003,4(3):252-255.
[36] Savadi S B, Fakrudin B, Nadaf H L, et al.Transferability of Sorghum Genic Microsatellite Markers to Peanut.American Journal of Plant[J].Sciences, 2012, 03(9):1169-1180.
[37] Backiyarani S, Uma S, Varatharj P, et al.Mining of EST-SSR markers of Musa and their transferability studies among the members of order the Zingiberales[J].Applied Biochemistry & Biotechnology, 2012, 169(1):228-238.
[38]文明富,陈新,王海燕,等.木薯基因组SSR和EST-SSR在麻疯树和橡胶树中的通用性分析.作物学报,2011,37(1):74-78.
[39] Yu J Y, Hua Z, Zhu T T, et al.Transferability of rice SSR markers to Miscanthus sinensis, a potential biofuel crop.Euphytica [J].2013, 191(3):455-468.
[40]丁西朋,罗小燕,邵辰光,等.Genomic-SSR和EST-SSR在柱花草种间的遗传差异.广东农业科学,2015,42(14):106-113.
[41] Chandra A, Tiwari K K, Nagaich D, et al.Development and characterization of microsatellite markers from tropical forage Stylosanthes species and analysis of genetic variability and cross-species transferability[J].Genome, 2011, 54(12):1016-1028.
[42] Wang X W, Kaga ATomooka N, Vaughan D A. The development of SSR markers by a new method in plants and their application to gene flow studies in azuki bean[Vigna angularis (Willd.) Ohwi &amp Ohashi].Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109(2):352-360.
[43] Gupta S K, Gopalakrishna T. Devolopment of unigene-derived SSR markers in cowpea (Vigna unguiculate) and their transferability to other Vigna species [J]. Genome, 2010, 53: 508-523.
[44]张学勇,童依,游光霞,等.选择牵连效应分析:发掘重要基因的新思路.中国农业科学,2006,39(8):1526-2535.
[45] Acuna C V, Fernandez P, Villalba P V, et al. Discovery, validation, and in silico functional characterization of EST-SSR markers in Eucalyptus globulus [J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2012, 8(2):289-301.
[46] Tariq S, Hisato O, Makoto K, et al. Development of SSR-based sorghum (Sorghum bicolor (L.) Moench) diversity research set of germplasm and its evaluation by morphological traits. Genet Resour Crop Evol[J].Genetic Resources & Crop Evolution, 2009, 56(6):809-827.
[47] Peng J H, Lapitan N L. Characterization of EST-derived microsatellites in the w heat genome and development of eSSR markers[J].Funct Integ r Genomics, 2005, 5:80-96.
[48]贺润丽,樊杰,平莉莉,等.大豆基因组SSR和EST-SSR在黄芪中的通用性分析.分子植物育种,2015,13(5):994-998.
[49]程雪妮,王颖,庞玉辉,等.小麦SSR和EST-SSR引物对无芒雀麦的通用性分析.植物科学学报,2014,32(1):27-33.

(上接第356页)
健,2008,23(8):1161-1164.
[3] Citra N, Mattar, Yah-Shih, Chan, Yap-Seng, Chong. Breastfeeding: it's an important gift[J].Obstetrics & Gynecology, 2003, 102(6):3-4.
[4]古桂雄,戴耀华.儿童保健(“十二五”规划教材)[M].北京:清华大学出版社,2011:106-115.
[5] Jiang M, Foster E M, Gibson-Davis C M.Breastfeeding and the child cognitive outcomes: a propensity score matching approach[J]. Maternal & Child Health Journal, 2011, 15(8): 1296-1307.
[6] Keim S A, Daniels J L, Siega-Riz A M, et al. Breastfeeding and long-chain polyunsaturated fatty acid intake in the first 4 post-natal months and infant cognitive development: an observational study[J].Maternal & Child Nutrition, 2012, 8(4):471-482.
[7] Morrow A L.Human milk composition: nutrients and bioactive factors[J]. Clinics of North America, 2013, 60(1):49-74.
[8] Chung M Y. Factors affecting human milk composition[J]. Pediatrics & Neonatology, 2014, 55(6):421-422.
[9]鲁慧峰.影响母乳成分变化的因素分析[J].中国乳业,2010(11):48-50.
[10]王静.母乳营养成分纵向调查及其影响因素[D].苏州:苏州大学,2015:8-56.
[11]柏丹丹.母乳营养成分含量的测定[D].苏州:苏州大学,2013:10-51.
[12]王洁民.不同分娩方式对初乳分泌及初乳中sIgA含量的影响[J].中国热带医学,2012,12(12):1519-1521.
[13] Masako F, Eric R, Yun-Jia L, et al. In poor families, mothers' milk is richer for daughters than sons: a test of Trivers-Willard hypothesis in agropastoral settlements in Northern Kenya [J]. American Journal of Physical Anthropology, 2012, 149(1): 52-59.
[14]江慧芸,陈红慧,乳母膳食调节及其意义[J].广西医药,2009,31(1):110-111.