

向日葵锈菌夏孢子转录组微卫星特征分析

景 岚,赵诗慧,王 妍,郭丹丹

(内蒙古农业大学农学院,内蒙古 呼和浩特,010019)

摘要:为大规模开发有效的向日葵锈菌 SSR 标记,根据向日葵锈菌转录组数据,使用 Ubuntu 12.04 LTS 系统的 Perl 操作平台 MISA 软件对向日葵锈菌转录组序列进行高通量微卫星 SSR 位点发掘。在 15 946 条转录本中发现 20 861 个 SSR,平均 3.97kb 出现一个 SSR。共发现 244 种碱基重复模式,(A/T)_n 所占比例最高,达到 88.24%。在 42 610 条注释成功的向日葵锈菌 unigene 中,含有 SSR 的序列 14 069 条,共发现 18 100 个 SSR 位点,其中位于编码区 1 057 个,出现频率为 0.382 2 SSR/kb,非编码区为 0.300 1 SSR/kb;其中以单核苷重复基序为主导,共有 19 046 条,占总 SSR 的 59.5%;其次是三碱基微卫星(804,占 3.86%)。大部分微卫星长度小于 20bp,长度大于 20bp 的仅占 7.37%。研究结果显示,微卫星与基因平均表达水平存在关联,含微卫星基因的平均表达水平低于不含微卫星基因的平均表达水平。包含 SSR 的 15 946 条 unigene 中只有 5 863 个 unigene 获得了 GO 分类号,被注释到分子功能、生物进程、细胞组分三大本体。通过生物信息学软件得到的转录组 SSR 标记位点可用于后续向日葵锈菌遗传多样性研究,而且对其他非模式生物或新物种 SSR 标记开发也具有重要的参考作用。

关键词:向日葵锈菌;转录组;微卫星特征

中图分类号:S435.655 文献标识码:A 文章编号:1007-9084(2016)06-0824-07

Characterization of microsatellites in *Puccinia helianthi* transcriptome

JING Lan, ZHAO Shi-hui, WANG Yan, GUO Dan-dan

(College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, China)

Abstract: To develop SSR markers of *Puccinia helianthi* in large scale, microsatellites or simple sequence repeats (SSRs) in *Puccinia helianthi* Schw. were characterized based on transcriptome data using MISA software (2010) of Perl platform in Ubuntu 12.04 LTS system. A total of 20 861 simple SSRs were discovered from 15 946 sequences. SSRs appeared in 3.97kb interval on average. Among all 244 SSR motifs, the most frequent motifs were (A/T)_n, which accounted for 88.24%. 18 100 SSRs occurred in 14 069 unigenes from a total of 42 610, which were annotated via BLAST querying against current database. Only 1 057 SSRs occurred in open reading frame of these sequences. The average SSRs density of non-coding regions was 0.300 1 SSRs per 1kb, compared to 0.382 2 SSRs per 1kb in coding regions. The average SSR density was 1 SSR per 3.97kb of unigene sequences. The mono-nucleotide repeat motifs of SSRs were the most common in open reading frame regions (19 046, 59.5%), followed by tri-nucleotide repeats (804, 3.86%). SSRs length below 20bp had the highest proportion (92.63%). Results showed that SSRs and the expression level of genes was related. Genes expression level containing SSRs was lower than those not containing microsatellites. Only 5 863 of 15 946 unigenes containing SSRs were annotated to biological process, molecular function and cellular component with GO classification. Large amount of SSR markers found from transcriptome data could be used for subsequent genetic diversity research of sunflower rust pathogen. Moreover, it would promote SSR marker development in other species and non-model organisms.

Key words: *Puccinia helianthi* Schw.; Transcriptome; Microsatellites

微卫星 (microsatellite) 或称简单重复序列 SSR (simple sequence repeat, SSRs), 是真核生物基因组中的高度重复序列, 是由 1~6 个碱基对组成的串联重复序列^[1,2]。根据早期的研究, 可将 SSR 划分为三种类型, 单纯型 SSR (pure SSR)、复合型 SSR (compound repeats) 和间隔型 SSR (interrupted SSR)^[3]。单纯型 SSR 只包含一种基元的重复, 复合型包含两种或多种基元重复, 间隔型重复基元中间存在一定数量无规律碱基。SSR 具有共显性、可重复性好且大量分布于基因组等优点^[4], 虽然早期在开发 SSR 标记的过程中涉及大量筛选、克隆及测序的工作^[5], 但仍常被用做物种遗传研究中的分子标记。近些年来, 随着商业化高通量测序技术的发展, 生物信息学在生命科学研究中扮演越来越重要的角色, 大量序列数据的获得促进了 SSR 分子标记的开发并使其变得更为容易。在植物当中, 辣椒、杉木、大麦等多种植物基因组转录组已经进行了 SSR 位点数据挖掘^[6-8]。

向日葵锈病 (*Puccinia helianthi* Schw.) 是油料作物向日葵上的重要病害之一, 在北美、欧洲向日葵产区尤为严重。近年来, 随着我国向日葵种植面积的不增长, 该病害日趋加重。向日葵锈菌在向日葵上可先后产生性孢子、锈孢子、夏孢子、冬孢子和担孢子, 以完成其复杂的生活史^[9]。向日葵锈菌通过多次无性繁殖产生双核夏孢子进行传播^[10], 该病害主要通过种植抗病品种进行防治, 但该病菌可以通过有性或准性生殖产生新的致病类型^[11], 使品种抗性丧失, 造成病害流行。通过近十年来的不懈努力, 本研究小组在向日葵抗锈机制、形态解剖学、诱导抗性等方面^[12,13] 开展了大量工作。随着分子生物学的兴起, 研究热点转入分子水平, 分子标记作为有力的新手段必将应用于向日葵锈菌系谱、群体进化及遗传多样性研究等方面。本研究小组曾使用 RAPD 标记对向日葵锈菌进行群体进化及遗传多样性分析^[14]。近些年来, SSR 技术越来越广泛地应用于真菌领域, 如镰刀菌 (*Fusarium graminearum*)^[15]、稻瘟菌 (*Magnaporthe grisea*)^[16]、黑粉菌 (*Ustilago maydis*)^[17]、大豆疫霉 (*Phytophthora sojae*)^[18]、灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)^[19] 的多态性及快速鉴定研究中。

本研究利用新一代的高通量 Illumina 测序技术获得的向日葵锈菌全转录组数据, 通过生物信息学软件进行大规模转录组 SSR 标记的发掘, 同时对其组成、分布及特征进行分析, 为开发 SSR 遗传多样性引物、遗传图谱的构建、目标基因的标定、指纹图

谱绘制等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料及数据来源

取向日葵锈菌 330 小种夏孢子萌发不同时期 (0h, 4h, 8h) 的 RNA 样品, 送北京博奥公司利用 Illumina2500 进行转录组测序, 测序结果使用 Trinity 软件进行从头组装, 共获得 386 417 962 个 clean reads, 其测序碱基数量为 39.03Gbp, 拼接获得的向日葵锈菌转录本 59 409 个。测序原始数据已经上传至美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 的 SRA 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>), 数据接收号为 SRP059519。

1.2 SSR 的挖掘

主要利用 Ubuntu 12.04 LTS 系统的 Perl 操作平台 MISA (MIcroSAteellite) 软件包从向日葵锈菌转录本中挖掘 SSR 数据, 以单核苷酸基元出现最少 10 次, 二核苷酸出现最少 9 次、三核苷酸出现最少 7 次, 三、四、五、六核苷酸重复基元最少出现 5 次为标准, 将生成的文本文件导入到 R 软件, 分析锈菌的 SSR 类型、数目、分布及出现频率。

1.3 ORF 预测及含 SSR 序列基因表达水平分析

通过本地化的 Blast 比对, 将拼接获得的 59 409 向日葵锈菌转录本按 Nt (E-value < 10^{-5})、Nr (E-value < 10^{-5})、Swiss - Prot (E-value < 10^{-10})、KEGG (E-value < 10^{-10})、COG (E-value < 10^{-10}) 和 GO (E-value < 10^{-10}) 顺序进行相似性搜索, 根据同源相似性排序确定 unigene 的序列方向。采用 ORF Finding 软件预测 ORF 区。使用 RPKM 法 (reads per kilobases per millionreads)^[20], 对含有 SSR 的 unigene 表达量进行计算。

1.4 含 SSR unigene 功能注释

根据 NCBI 蛋白质数据库 Nr, 使用 Blast X 软件获取含有 SSR unigene 的功能注释信息, 比对参数 E-value < 10^{-5} 。再使用 Blast2GO 软件, 取得其 GO 分类号, 然后通过 WEGO (<http://wego.genomics.org.cn/cgi-bin/wego/index.pl>) 程序对 GO 注释结果进行分类, 分析其分布及特征。

2 结果与分析

2.1 重复基元的频率及分布

利用 MISA 软件分析 59 409 条向日葵锈菌 unigene 序列的 SSR 特征, 转录本拼接总长度为 8 282 kb, 包含 SSR 的序列有 15 946 条, 共 20 861 个 SSR,

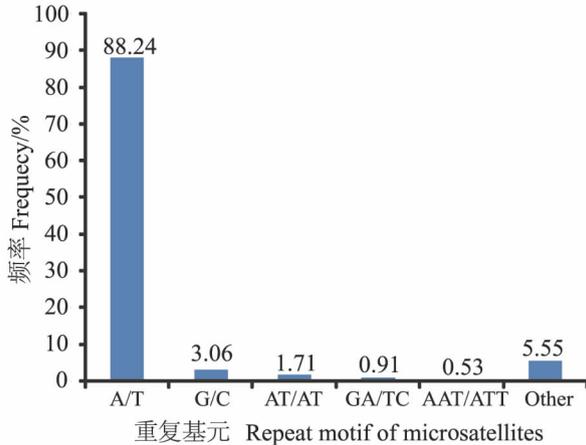
包含 SSR 的 unigene 15 946 条占全部 unigene 的 35.11%, SSR 出现频率为 0.252 SSR/kb, 平均间隔 3.97kb 出现一个 SSR 序列。包含 SSR 序列的总长度为 279.85kb, 占整个向日葵锈菌转录本总长度的 3.38%。在 20 816 条完美型 SSR 中共出现 244 种重复基元(motif)模式。其中,单、二、三、四、五和六碱基重复基元出现频率最多的分别是 (A/T)_n、

(AT/AT)_n、(AAT/ATT)_n、(TTTG/CAAA)_n、(TTTTTC)_n 和 (ATCCT)_n, 它们在各自重复基元类型中的比例分别是 96.64%、56.22%、13.06%、15.07%、13.33% 和 50.00%。从基序类型来看,向日葵锈菌转录组中以单核苷 A/T 和 G/C 重复基序为主要类型 (19 046, 91.30%), 其次分别为三、二、四、六和五核苷酸重复基元(表 1)。

表 1 不同重复基元(motif)微卫星在向日葵锈菌夏孢子转录组中出现的频率
Table 1 Frequencies of different repeat types of SSRs in *P. helianthi* transcriptome

重复基元类型 Repeat type	数量 Number	频率 Frequency/%	最多的重复基元(数量和百分比) Maximum repeat motif(number and percentage)
单核苷酸 Mono-repeats	19 046	91.30	A/T(18 407, 96.64%)
二核苷酸 Bi-repeats	635	3.04	AT/TA(357, 56.22%)
三核苷酸 Tri-repeats	804	3.86	AAT/ATT(105, 13.06%)
四核苷酸 Tetra-repeat	345	1.65	AAAT/ATTT(52, 15.07%)
五核苷酸 Penta-repeat	15	0.07	TTTTTC(2, 13.33%)
六核苷酸 Hex-repeat	16	0.07	ATCCT(8, 50%)

在发现的 244 种碱基重复模式中,所占比例最高的是 (A/T)_n (88.24%), 其次是 (G/C)_n (3.06%)、(AT/AT)_n (1.71%)、(GA/TC)_n (0.91%) 和 (AAT/ATT)_n (0.53%), 其余碱基在总含量中比例小于 0.50%。不同类型重复基元的 SSR 分布见图 1。并未发现含有 (CG/CG) 的二核苷酸重复。



注: Others 包含其他频率小于 0.50% 的全部重复基元类型
Note: The sum of repeat motifs with frequency below 0.50% is included in others

图 1 不同类型重复基元(motif)的微卫星分布(考虑到碱基互补作用)

Fig. 1 Distribution and frequency of different SSR motifs in *P. helianthi*

2.2 SSR 长度特征

微卫星长度从 10bp 到 86bp 不等,平均长 26.8 bp(单碱基重复 10 次以上的结果),存在显著变异,变异主要在 SSR 数量上。微卫星长度从 10bp 上升到 20bp 过程中,微卫星数量急剧减少;微卫星从 20bp 到 86bp 逐渐延长的过程中,数量下降相对较为缓慢(图 2)。可能原因是,变异速率较快的序列

(长度 ≤ 20bp) 在向日葵锈菌微卫星中占极大比例,变异速率较慢的微卫星(长度 > 20bp) 仅占微卫星总数的 7.37%。复合 SSR 的长度最大值为 337bp。为了分析向日葵锈菌微卫星的出现频率与微卫星的长度间的相关关系,利用 SPSS 软件进行 Person 相关性分析,相关系数为 -0.497,呈显著负相关。表 2 可以看出,碱基重复次数增加,碱基数量随之减少。二碱基重复在重复 12 次时 SSR 数量出现了上升情况。三碱基中,7 次重复数量最多,有 687 条;四碱基 5 次重复数量最多有 280 条;五碱基 5 次重复最多有 10 条;六碱基 10 次重复最多,有 9 条。

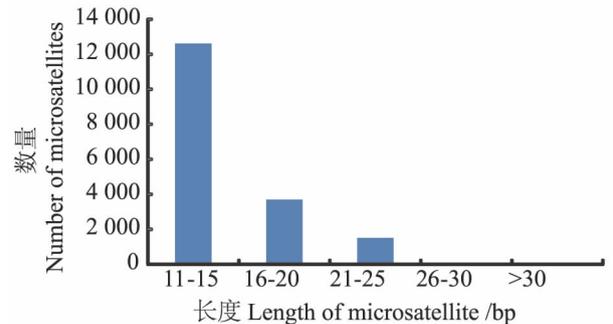


图 2 向日葵锈菌转录组中微卫星的长度分布

Fig. 2 Length distribution of SSRs in *P. helianthi* transcriptome

2.3 SSR 位置及含 SSR 序列基因表达水平分析

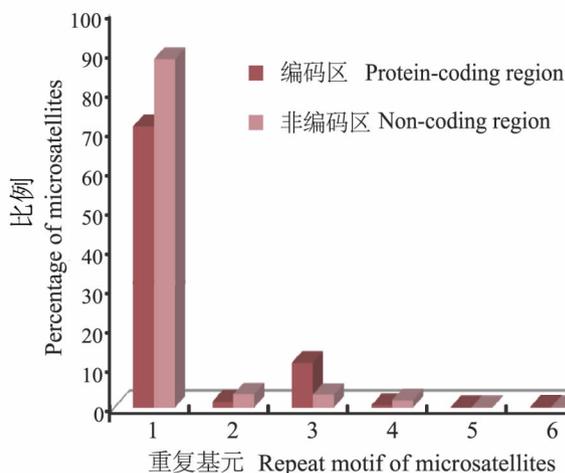
向日葵锈菌转录组中,有 42 610 条 unigene 序列功能注释成功,总长度为 75 328 725bp,其中蛋白编码区(CDS)序列长度 35 034 363bp,占 46.51%。包含 SSR 注释成功的有 14 069 条序列,含 18 100 个 SSR 位点,其中位于编码区的 SSR 仅为 1 057 个。SSR 在向日葵锈菌转录组的基因编码区出现频率为 0.382 2 SSR/kb,在非编码区为 0.300 1 SSR/kb。

单碱基重复类型的微卫星(842, 79.66%)在基因编码区中出现频率最高, 其次是三碱基重复(190, 17.98%)。而 SSR 位点在向日葵锈菌转录组序列

的非蛋白编码区中单碱基(15 582, 91.43%)的数量最多, 其次是二碱基(568, 3.33%)和三碱基(550, 3.23%)(图3)。

表2 不同基元 SSR 重复次数变化
Table 2 Repeat number of different SSRs motifs

重复次数 Repeat	基序类型 Motif type					
	单核苷酸 Mono-repeat	二核苷酸 Bi-repeat	三核苷酸 Tri-repeat	四核苷酸 Tetra-repeat	五核苷酸 Penta-repeat	六核苷酸 Hex-repeat
5				282	10	4
6				58	1	
7			689	1		2
8			111	1		
9		240	1	2	1	0
10	6 295	181	1		1	9
11	3 173	92	2			
12	2 296	120			1	
13	1 590					
14	1 330			1		1
15	932				1	
16	876					
17	567					
18	488	2				
19	593					
20	470					
21	316					
22	66					
23	45					
24	9					
总计 Total	19 046	635	804	345	15	16



注:横坐标1-6分别代表单碱基重复、二碱基重复、三碱基重复、四碱基重复、五碱基重复和六碱基重复

Note: 1-6 denote mono-repeat, bi-repeat, tri-repeat, tetra-repeat, penta-repeat and hex-repeat respectively

图3 在编码区与非编码区不同基元(motif)SSR数量比例
Fig. 3 Percentage of SSRs motifs in coding regions and non-coding regions

在59 409条转录组序列中,含微卫星的表达序列占序列总数的比例为26.84%。比较含微卫星的unigene的平均RPKM值与不含微卫星基因的平均RPKM值,含SSR基因的平均RPKM值(12.47)低

于不含SSR基因RPKM平均值(12.73)。根据Weber对微卫星的分类^[3],分别计算了单纯型SSR、复合型SSR和间隔型SSR的基因平均表达水平。含有复合SSR和间隔SSR序列的平均RPKM值分别为10.95、12.65,含有单纯型SSR的序列的平均RPKM值为12.44(表3)。Person分析表明,SSR长度与基因表达水平RPKM呈极显著负相关,相关系数

表3 SSR类型与长度与基因表达水平的关系
Table 3 Effects of SSRs types and size on RPKM

序列类型 Sequence type	RPKM 平均值 Average value of RPKM	SSR 长度 Size of SSR/bp
不含 SSR 序列 Without SSR sequence	12.73	
含有复合型 SSR With compound SSR	10.95	36.80
含有间隔型 SSR With interrupted SSR	12.65	81.52
单核苷酸 Mono-repeats	12.52	12.66
二核苷酸 Bi-repeats	12.44	20.34
三核苷酸 Tri-repeats	11.65	21.46
四核苷酸 Tetra-repeats	9.91	20.93
五核苷酸 Penta-repeats	9.37	34.00
六核苷酸 Hex-repeats	9.57	51.75

-0.007 7。间隔 SSR 平均长度为 81.52bp,复合 SSR 的平均长度为 36.80bp。

2.4 含 SSR 的转录本的 GO 注释

通过对含 SSR 的 unigene 进行 GO 注释,可以全面描述向日葵锈菌中含 SSR 基因和基因产物的属性。使用 Blast2GO 软件,进行含 SSR 的 unigene 的 GO 注释,取得其 GO 分类号,15 946 条 unigene 中只有 5 863 个 unigene 得到了相应的 GO 分类号,为

36.8%,63.2% 不能成功注释。使用在线工具 WEGO 对含有 SSR 序列的 5 863 条 unigene 对应的 GO 号进行分类,得到其基因功能分布(图 4)。其中 5 260 条被注释为分子功能,1 702 条被注释为生物过程,3 908 条被注释为细胞组分。多数被注释到代谢过程(metabolic process,52.7%)、结合功能(binding,46.3%)、细胞过程(cellular process,46.8%)和催化活性(catalytic activity,37.0%)中。

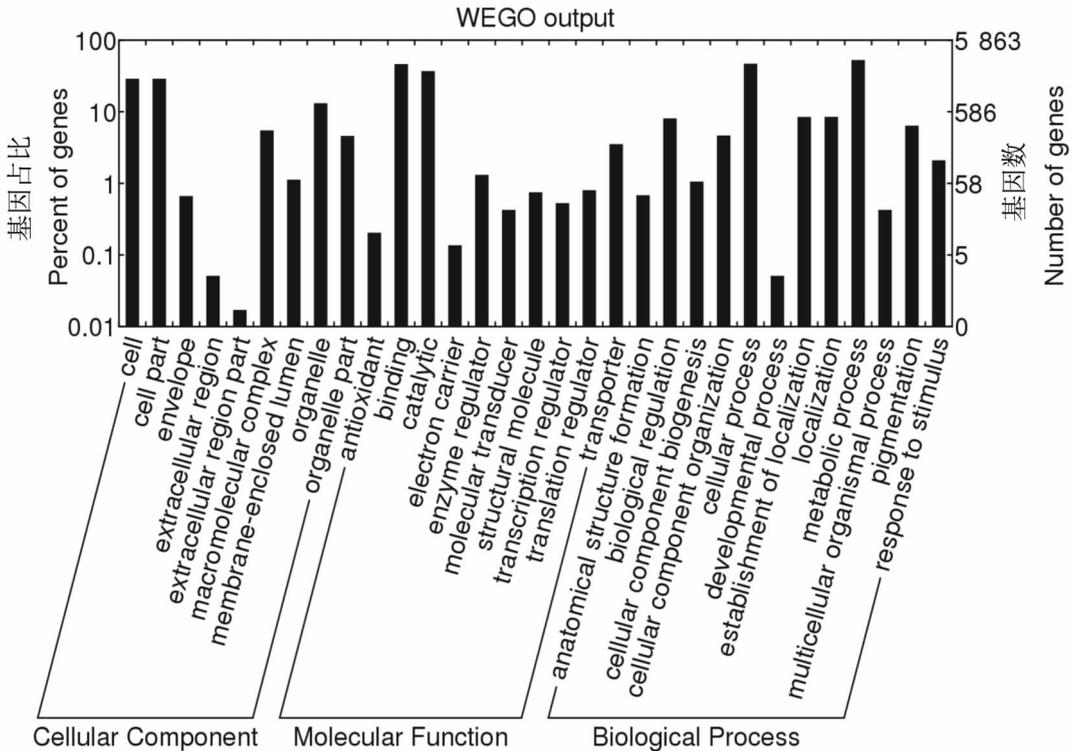


图 4 向日葵锈菌转录组中含 SSR 的 unigene 的 GO 分类

Fig. 4 Gene Ontology (GO) annotation of sequences containing SSRs in *P. helianthi* transcriptome

3 讨论

本研究分析了 59 409 条向日葵锈菌的 unigene 序列,共发现 20 861 个微卫星,分布在 15 946 条序列中,包含 SSR 的序列出现频率为 35.11%,SSR 的出现频率为 0.252 SSR/kb,平均相隔 3.977kb 出现一个 SSR 序列。向日葵锈菌转录组微卫星序列在非编码区数量较多,转录组编码区序列所含微卫星数量远低于基因非编码区,但编码区与非编码区的 SSR 的分布频率差异并不显著(0.382 2/0.300 1)。

单核苷酸重复在向日葵锈菌转录组的 SSR 基因编码区和非编码区都为主导序列,三碱基重复次之。刘林等^[21]在小麦条锈菌(*Puccinia striiformis* f. sp. tritici)7 368 条 EST 序列中,共发现包含 SSR 序列 2 642 条,单核苷酸重复占总重复类型的 92.04%,其次三个核苷酸重复(5.2%);连玲丽^[22]

在丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)基因组的 SSR 研究中发现单核苷酸重复(最小长度大于 15bp)占绝对优势;李成云^[16]研究数据显示,在整个稻瘟病(*M. grisea*)的基因组中,共有 16 398 个 SSR,数量最多的单碱基重复 4 392 个,其次三碱基重复 3 586 个;但是根据李志芳等研究^[23],在黑白轮枝菌(*Verticillium albo-atrum*)基因组中,设定单碱基重复最少 16 次以上,发现三碱基重复在所有重复类型中数量最多,绝大多数微卫星分布在基因间区和内含子区;王士臻研究发现^[24],在孢堆黑粉菌(*Sporisorium reilianum*)的基因组第 1、2、3 条染色体中,设定单核苷酸重复 16 次以上,发现三碱基重复所占比例最大;樊颖伦^[25]在水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)基因组研究中,单碱基重复最小长度设定大于 15bp,发现 6 碱基重复,3 碱基重复占绝对优势。多个研究结果显示,单碱基重复一般占的

比例较大。各物种间 SSR 数据差异可能是由物种间真实 SSR 差异或由 SSR 查找所使用的软件不同、长度设定的标准不同、数据库中的数据来源及容量等方面的不同造成的。本文中 SSR 长度设定大于 10bp, 小麦条锈病菌^[21]、镰刀菌^[15]、稻瘟菌^[16]和黑粉菌^[17]设定大于 15bp; 本文是基于转录组进行数据搜索, 小麦锈菌是基于 EST 数据搜索, 镰刀菌、稻瘟病菌和玉米黑粉病菌则是基于基因组进行搜索。随着基因组、转录组数据库的容量不断增大, 各个物种间的 SSR 频率比较将有一个统一的标准。

除单碱基外, 三碱基重复在编码区具有明显优势。研究表明三碱基重复在基因编码区中的重复类型占较高比例^[26,27], 这可能是受密码子为三联体的影响。非三倍数重复类型的重复次数的改变易导致阅读框移码突变, 使翻译出的多肽链氨基酸序列发生巨变, 生物性状发生改变。由于三碱基和六碱基重复单元重复次数的变化对基因读码框改变较小, 基因表达产物所受影响相对较小, 所以编码区序列对三碱基及六碱基微卫星重复有较好的容受性, 在选择作用下, 会导致三碱基及六碱基微卫星的富集。这一现象也说明了三碱基重复在基因组基因编码区得以保存的机制。

人们已逐渐认识到 SSR 并不是基因组上的垃圾 DNA (junk DNA)。SSR 的多态性为适应性进化起到了积极的作用, 是物种产生适应性遗传变异的重要来源^[28]。首先, SSR 位点并非随机分布, 其次, SSR 标记的位置及含量具有一定的偏向性。SSR 部分位点会受到正向或负向的选择压力^[29,30], 在真核生物基因组中, 在内含子和基因间隔区微卫星含量丰富, 而 ORF 区微卫星的含量显著降低。这是由于微卫星序列较易发生变异, 其重复数量的增减可能造成蛋白质结构和功能的改变, 从而导致个体表型的差异。这种改变要经过自然选择的筛选才能被长期稳定地保存在种群中。因此, 在选择压力作用下, 微卫星在编码区发生频率比其他基因组区域低。本文研究发现, 在向日葵锈菌转录本中, SSR 在非编码区的密度要显著高于编码区。Person 结果显示, 微卫星与基因整体表达水平具有相关关系, 含微卫星序列基因的整体表达水平低于不含有微卫星序列基因的整体表达水平, 含复杂型微卫星序列的基因整体表达水平最低。一些研究也表明, 含有微卫星的基因总体表达水平低于不含微卫星基因总体表达水平^[31]。含微卫星的基因降低基因表达水平可以规避部分选择压力, 有利于相应基因在基因组中的保存^[32]。

本研究利用 GO 数据库对 5 863 个 unigene 进行功能分类获得具体的功能分类信息。由于 GO 库现有容量有限, 使得一些基因注释信息尚不完全。本研究中有 10 086 条向日葵锈菌夏孢子转录本未能获得注释, 这些序列可能是一些非编码的 RNA 序列, 或是因其长度较短不包含蛋白质功能域信息, 有可能是目前公共数据库中的基因信息还不够多, 也有可能是特有的一些新基因。

真核生物(包括植物病原真菌)基因组中存在可观的 DNA 重复序列, 其与生物基因组的进化密切相关^[33]。这种散布的中度重复序列为病菌的群体生物学和流行病学研究提供了重要的遗传标记。向日葵锈菌转录组 SSR 具有数量大、频率高、类型丰富等特点; 从多态性潜能的角度考虑, 搜索到的这些 SSR 将为进一步开发新的向日葵锈菌功能基因标记奠定基础, 也可用于遗传图谱构建、目标性状基因定位、遗传多样性分析等研究。

参考文献:

- [1] Powell W, Machray G C, Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats[J]. Trends Plant Science, 1996, 1(7): 215 - 222.
- [2] Morgante M, Olivieri A M. PCR - amplified microsatellites as markers in plant genetics[J]. The Plant Journal, 1993, 3(1): 175 - 182.
- [3] Weber J L. Informativeness of human (dc - dA)n · (dG - dT)n polymorphisms[J]. Genomics, 1990, 7(4): 524 - 530.
- [4] Toth G, Gaspari Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis[J]. Genome Research, 2000, 10(7): 967 - 981.
- [5] Queller D C, Strassmann J E, Hughes C R. Microsatellites and kinship[J]. Trends Ecol Evol, 1993, 8(8): 285 - 288.
- [6] 刘 峰, 王运生, 田雪亮, 等. 辣椒转录组 SSR 挖掘及其多态性分析[J]. 园艺学报, 2012(1): 168 - 174.
- [7] 徐 阳, 陈金慧, 李 亚, 等. 杉木 EST - SSR 与基因组 SSR 引物开发[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2014(1): 9 - 14.
- [8] Tang J F, Gao L F, Cao Y S, et al. Homologous analysis of SSR - ESTs and transferability of wheat SSR - EST markers across barley, rice and maize[J]. Euphytica, 2006(1): 87 - 93.
- [9] Gulya T J, Rashid K Y, Masirevic S M. Sunflower diseases[A]. Schneiter A A. Sunflower technology and production. Agronomy 35[C]. Sunflower Technology & Production, 1997. 263 - 379.

- [10] Middleton K J, Obst N R. Sunflower rust reduces yield [J]. Australian Plant Pathology Society Newsletter, 1972,1(3):18.
- [11] Caten C E. Parasexual processes in fungi[A]. Gull K, Oliver S G. The fungal nucleus[C]. Academic Press: London. 1981,191-214.
- [12] 景 岚,王丽芳,康 俊,等. 向日葵品种对锈病抗性的组织学和超微结构研究[J]. 中国油料作物学报, 2013,35(3):313-316.
- [13] 李凌欣. 寡糖诱导向日葵抗锈病信号转导途径的初步研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2010.
- [14] 徐 鑫. 向日葵锈病菌的种内群体分化及 SCAR 标记[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2012.
- [15] 李成云,李进斌,刘 林,等. 禾谷镰刀菌和稻瘟病菌基因组中的微卫星序列比较[J]. 植物保护学报, 2005,32(3):252-255.
- [16] 李成云,李进斌,周晓罡,等. 稻瘟病菌基因组中微卫星序列的频率和分布[J]. 中国水稻科学,2004,18(3):269-273.
- [17] 李成云,李进斌,周晓罡,等. 玉米黑粉病菌基因组中的微卫星序列的组成和分布[A]. 中国植物病理学会学术年会论文集[C]. 2004. 18-25.
- [18] 徐静静. 大豆疫霉分子检测及 SSR 标记的开发[D]. 北京:中国农业科学院,2008.
- [19] 余文贵,董友磊,赵丽萍,等. 灰霉病菌 SSR 遗传多样性分析[J]. 江苏农业科学,2011,39(4):18-20.
- [20] Wagner G P, Kin K, Lynch V J. Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data:RPKM measure is inconsistent among samples[J]. Theory in Biosciences, 2012,131(4):281-285
- [21] 刘 林,胡艳玲,杨 静,等. 小麦条锈菌 EST 序列中微卫星的频率和分布[J]. 云南农业大学学报,2011,26(2):173-176.
- [22] 连玲丽,洪旭鸿,郑璐平,等. 丁香假单胞菌基因组内简单重复序列的比较分析[J]. 四川农业大学学报, 2012,30(2):150-155.
- [23] 李志芳,冯自力,赵丽红,等. 黑白轮枝菌基因组中微卫星的频率和分布[J]. 棉花学报,2013,25(2):135-141.
- [24] 王士臻. 玉米丝黑穗病菌 SSR 分子标记开发及其应用研究[D]. 太谷:山西农业大学,2014.
- [25] 樊颖伦,吕山花,刘立科. 水稻白叶枯病菌基因组简单重复序列分析[J]. 安徽农业科学,2009,37(20):9387-9390.
- [26] 潘海涛,汪俊君,王盈盈,等. 小麦 EST-SSR 标记的开发和遗传作图[J]. 中国农业科学,2010,43(3):452-461.
- [27] Schlotterer C, Tautz D. Slippage synthesis of simple sequence DNA [J]. Nucleic Acids Research, 1992, 20(2):211-215.
- [28] Bhargava A, Fuentes F F. Mutational dynamics of microsatellites [J]. Molecular Biotechnology, 2010,44(3):250-266.
- [29] Li Y C, Korol A B, Fahima T, et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review [J]. Molecular Ecology, 2002,11(12):2453-2465.
- [30] 李 敏,刘国庆,蔡 禄. 可变剪接与蛋白质结构多样性[J]. 生物物理学报,2015,31(1):65-75.
- [31] Li X, Shangguan L, Song C, et al. Analysis of expressed sequence tags from *Prunus mume* flower and fruit and development of simple sequence repeat markers [J]. BMC Genetics, 2010,11(28):66.
- [32] Gonthier P, Sillo F, Lagostina E, et al. Selection processes in simple sequence repeats suggest a correlation with their genomic location: insights from a fungal model system [J]. BMC Genomics, 2015, 16(1):1-12.
- [33] Anderson P A, Tyler B M, Pryor A. Genome complexity of the maize rust fungus, *Puccinia sorghi* [J]. Experimental Mycology, 1992,16(4):302-307.

(责任编辑:郭学兰)