

基于转录组的小豆 SSR 分子标记开发及其应用

徐晓丹, 冷 森, 张明媛, 柯希望, 殷丽华, 左豫虎

(黑龙江省作物-有害生物互作生物学及生态防控重点实验室, 国家杂粮工程技术研究中心,
黑龙江八一农垦大学, 黑龙江 大庆 163319)

摘要:为了开发小豆 SSR (Simple Sequence Repeats) 分子标记, 2019—2020 年, 利用微卫星识别工具 MISA 和软件 Primer 3 搜索小豆资源 QH1 转录组测序得到的 Unigene, 获得 3 045 个 SSR 分子标记, 通过对标记的重复基序特点分析, 发现标记的重复基序以单核苷酸重复、二核苷酸重复和三核苷酸重复为主, 分别占标记总数的 41.2%、26.4% 和 25.6%。利用可以锚定到小豆基因组并能成功设计引物的标记, 构建了包括 1 505 个 SSR 分子标记的物理图谱。从以上 1 505 个标记中, 随机选取分布于小豆 11 条染色体上的 132 个 SSR 标记进行有效性验证, 发现有效扩增的标记为 118 个, 有效率为 89.4%。通过多态性标记筛选, 获得 6 个多态性标记, 利用这 6 个标记对 36 份小豆品种进行聚类分析, 发现供试小豆材料可以分为 4 个类群。说明开发的 SSR 分子标记能够分析小豆的遗传背景差异, 为小豆种质资源鉴定、遗传多样性分析以及优良性状基因定位研究提供可用的分子标记。

关键词:小豆; 转录组; SSR; 分子标记

中图分类号:S521; S388 **文献标志码:**A

Development and application of SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of adzuki bean

XU Xiaodan, LENG Miao, ZHANG Mingyuan, KE Xiwang, YIN Lihua, ZUO Yuhu

(Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Crop-Pest Interaction Biology and Ecological Control, National Coarse Cereals Engineering Research Center, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China)

Abstract: To develop SSR (Simple Sequence Repeats) molecular markers for adzuki bean, MISA and Primer 3 were used to search Unigenes deriving from transcriptome sequencing of adzuki bean QH1 in 2019–2020, and 3 045 SSR markers were obtained. By analyzing the characteristics of repeated motifs of markers, it was found that mononucleotide, dinucleotide and trinucleotide were the main motifs, accounting for 41.2%, 26.4% and 25.6% of total markers, respectively. A physical map containing of 1 505 SSR markers was constructed using markers that was anchored to the genome of adzuki bean and successfully designed with primers. From the above 1 505 SSR markers, 132 SSR markers distributed on 11 chromosomes of adzuki bean were randomly selected for validation. 118 markers were effectively amplified with the efficiency of 89.4%. Six polymorphic markers were obtained through polymorphic marker screening, and the clustering analysis of 36 adzuki bean cultivars using these six markers revealed that the test materials were classified into four groups. This indicated that the developed SSR molecular markers were able to analyze the genetic background differences of adzuki bean and provide usable molecular markers for germplasm identification, genetic diversity analysis and gene mapping for good traits.

Keywords: adzuki bean; transcriptome; SSR; molecular markers

收稿日期:2022-01-24

修回日期:2022-05-18

基金项目:黑龙江省应用技术与开发计划(GA19B104);大庆市科学技术局指导项目(zd-2020-45);黑龙江八一农垦大学校启动计划(2031011068)

作者简介:徐晓丹(1983-),女,内蒙古兴安盟人,讲师,博士,主要研究方向为植物抗病基因定位。E-mail:xxdalice@163.com

冷森(1996-),男,黑龙江嫩江人,硕士研究生,研究方向为植物抗病基因定位。E-mail:1084624406@qq.com

通信作者:左豫虎(1965-),男,河南新郑人,教授,博士,主要从事病原寄主互作研究。E-mail:zuoyuhu@163.com

小豆 [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi], 俗名红小豆、赤豆等, 是一种重要的食用豆类作物, 起源于我国, 主要种植于中国、朝鲜和日本。近年来, 小豆的种质资源鉴定和育种研究工作获得了一定的成果, 根据统计, 1969—2019 年, 我国小豆育成品种共 137 份; 然而与保存的超过 5000 份的小豆种质资源相较, 我国的小豆种质资源尚未得到充分利用^[1]。小豆育种工作相对滞后, 究其原因, 是小豆基础研究不足, 特别是分子标记辅助育种的应用不够深入, 因此, 加强小豆基础研究, 建立小豆 DNA 分子数据库, 挖掘其育种潜力, 是当前深入推进小豆育种工作的一个有效途径。

分子标记是鉴定种质资源和分子标记辅助育种的重要手段, 而开发分子标记是小豆种质资源鉴定、创新和合理利用的第一步。在基于 DNA 的分子标记中, 简单重复序列 (Simple Sequence Repeats, SSR) 是一类由一定重复数目的重复单元 (一般为 1~6 个碱基) 组成的串联重复序列, 这种标记广泛存在于动植物基因组中。相对于其他分子标记, SSR 分子标记具有位点特异、复等位、共显性和分布广的优点, 在许多作物的遗传多样性研究、品种鉴定、基因定位和分子标记辅助育种工作中应用广泛^[2-5]。然而, SSR 分子标记在小豆研究上的应用较少, 只在遗传多样性和基因定位方面有少量应用^[6-11]。

SSR 分子标记应用于小豆研究的前提是开发大量的小豆 SSR 分子标记。而利用转录组测序技术可以获得大量序列信息用于分子标记开发。这一技术已经在粮食作物和经济作物中得到成熟运用^[12-14], 但在小豆及其近缘种作物上的应用却较少。例如, Verma 等^[15]利用转录组序列在兵豆 (*Lens culinaris* Medik.) 上开发了 SSR 分子标记, 并利用开发的标记分析了兵豆种质资源的遗传多样性; Raizada 等^[16]通过转录组测序开发了黑吉豆 (*Vigna mungo* var. *silvestris*) 的 SSR 分子标记。随着高通量测序技术的发展和运用, 小豆基因组已被破译^[17], 因此, 利用转录组测序技术开发小豆 SSR 分子标记更具可行性。

本研究以小豆转录组测序技术为基础, 鉴定小豆转录组数据库中的 SSR 分子标记, 从而了解小豆转录组的 SSR 特性。在此基础上, 从开发的 SSR 分子标记中, 选择部分标记对小豆资源进行聚类分析, 为小豆种质鉴定和资源合理利用奠定分子基础。同时, 也可对小豆分子标记辅助育种提供更丰富的标记来源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试小豆种质资源 36 份, 其中小豆种质‘QH1’用于转录组测序。所有小豆种质资源均保存于国家杂粮工程技术研究中心, 来源信息详见表 1。

1.2 转录组测序及 SSR 位点分析

在小豆资源‘QH1’单叶完全展开后, 取叶片组织用于提取 RNA, 随后进行转录组测序 (北京诺禾致源科技股份有限公司)。对转录组测序获得的 Unigene 进行过滤, 去掉小片段。利用软件 Primer 3.0 搜索过滤后序列的 SSR 位点, 并根据搜索出的 SSR 位点及其侧翼序列进行引物设计。

1.3 小豆基因组 DNA 提取

将用于小豆遗传背景分析的种质材料种植在直径 18 cm 的花盆中, 当小豆植株单叶完全展开时取叶片组织。每个品种在 5 株植株上各取 1 片叶子用于提取小豆基因组 DNA。DNA 提取参照 CTAB 法, 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测小豆基因组 DNA 的提取质量。

1.4 小豆 SSR 分子标记检验

为了检验开发的 SSR 分子标记的有效性, 从小豆每条染色体上均匀随机选取 12 个标记, 总计 132 个 SSR 分子标记, 合成引物。PCR 反应体系为 10 μ L, DNA 模板 1 μ L (80 ng), 上下游引物各 1 μ L (10 μ mol \cdot L⁻¹), 2 \times Taq PCR Master Mix 5 μ L, 补双蒸水至总体积 10 μ L。PCR 反应程序, 95 $^{\circ}$ C, 预变性 5 mins; 95 $^{\circ}$ C, 变性 30 s, 57 $^{\circ}$ C, 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C, 复性 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 延伸 10 mins。PCR 产物与 6 \times 上样缓冲液混合, 利用 DY CZ-30C 双板夹芯式垂直电泳仪 (北京六一仪器厂) 在 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离, 电泳后银染显影, 拍照记录带型。

1.5 小豆种质资源的聚类分析

以 36 份小豆种质的 DNA 为模板, 检测多态性 SSR 标记的带型。对聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果进行条带统计, 记录每个位点的等位基因情况, 记录基因型。利用软件 Popgen 32 和 MEGA 7.0.14 绘制进化树, 分析小豆种质资源的遗传背景。

2 结果与分析

2.1 SSR 分子标记类型特征及分布特点

转录组测序数据经过滤获得 37 362 760 bp 数据, 包括 26 857 个 reads。SSR 位点搜索, 共检测到 3 045 个 SSR 标记。SSR 标记的重复单元碱基数 1~

表 1 供试小豆种质资源

Table 1 Adzuki bean varieties for testing

序号 No.	品种 Variety	来源 Source
1	TL01	黑龙江省泰来县 Tailai County, Heilongjiang Province
2	TL02	黑龙江省泰来县 Tailai County, Heilongjiang Province
3	TL03	黑龙江省泰来县 Tailai County, Heilongjiang Province
4	TL04	黑龙江省泰来县 Tailai County, Heilongjiang Province
5	TL05	黑龙江省泰来县 Tailai County, Heilongjiang Province
6	TL06	黑龙江省泰来县 Tailai County, Heilongjiang Province
7	QH1	黑龙江省林甸县 Lindian County, Heilongjiang Province
8	QH3	黑龙江省林甸县 Lindian County, Heilongjiang Province
9	QH4	黑龙江省林甸县 Lindian County, Heilongjiang Province
10	QH5	黑龙江省林甸县 Lindian County, Heilongjiang Province
11	QH6	黑龙江省林甸县 Lindian County, Heilongjiang Province
12	LJ02	黑龙江省龙江县 Longjiang County, Heilongjiang Province
13	LJ03	黑龙江省龙江县 Longjiang County, Heilongjiang Province
14	GN01	黑龙江省甘南县 Gannan County, Heilongjiang Province
15	GN02	黑龙江省甘南县 Gannan County, Heilongjiang Province
16	GN03	黑龙江省甘南县 Gannan County, Heilongjiang Province
17	GN04	黑龙江省甘南县 Gannan County, Heilongjiang Province
18	红豆 XD04-07 Hongdou XD04-07	黑龙江省农业科学院 Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences
19	红豆 XD04-09 Hongdou XD04-09	黑龙江省农业科学院 Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences
20	品红 23129-1 Pinhong 23129-1	黑龙江省农业科学院 Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences
21	龙小豆 2 号 Longxiaodou 2	黑龙江省农业科学院 Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences
22	小丰 2 号 Xiaofeng 2	黑龙江省农业科学院 Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences
23	北 6 JN003 Bei6 JN003	辽宁省农业科学院 Liaoning Academy of Agricultural Sciences
24	吉林 373 Jilin 373	辽宁省农业科学院 Liaoning Academy of Agricultural Sciences
25	保 876-16 Bao 876-16	辽宁省农业科学院 Liaoning Academy of Agricultural Sciences
26	LZX066	辽宁省农业科学院 Liaoning Academy of Agricultural Sciences
27	辽 V5 LiaoV5	辽宁省农业科学院 Liaoning Academy of Agricultural Sciences
28	宝清红 Baoqinghong	辽宁省农业科学院 Liaoning Academy of Agricultural Sciences
29	保 876-16(2) Bao 876-16(2)	辽宁省农业科学院 Liaoning Academy of Agricultural Sciences
30	系选大红袍-1 Xixuandahongpao-1	辽宁省农业科学院 Liaoning Academy of Agricultural Sciences
31	北 4 NL8 Bei4 NL8	辽宁省农业科学院 Liaoning Academy of Agricultural Sciences
32	北 10 Bei10	辽宁省农业科学院 Liaoning Academy of Agricultural Sciences
33	北 12 B-1 Bei12 B-1	辽宁省农业科学院 Liaoning Academy of Agricultural Sciences
34	北 23 Bei23	辽宁省农业科学院 Liaoning Academy of Agricultural Sciences
35	保 M908-15 Bao M908-15	辽宁省农业科学院 Liaoning Academy of Agricultural Sciences
36	极早红小豆 Jihanzhongxiaodou	河北石家庄新星种业有限公司 Hebei Shijiazhuang Xinxing Seed Industry Co. LTD

6 所对应的标记数目分别为 1 256、803、779、32、9 和 14 个,另外,还有 152 个标记的重复单元为不同重复的组合(图 1,见 17 页)。从不同重复单元的 SSR 标记数量分布可以看出,小豆转录组的 SSR 标记主要重复单元为 1~3 个碱基,包括 41.2%的单核苷酸重复、26.4%的二核苷酸重复和 25.6%的三核苷酸重复,三者占比 93.2%。

将挖掘的 3 045 个 SSR 分子标记与小豆参考基因组(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_001723775.1)比对,1 986 个标记(65.2%)可以锚定到小豆染色体上,这些锚定到染色体上的标记中,1 505 个标记可成功设计引物。根据这 1 505 个标记的基因组位置信息,构建了包括 1 505 个 SSR 分子

标记的小豆物理图谱。

构建的物理图谱的标记间平均物理距离为 300 kb,各染色体上 SSR 分子标记的分布数量为 56~244 个,平均每条染色体分布标记数量为 137 个,其中,6 号染色体标记数量最多,8 号染色体标记分布数量最少。各染色体上的 SSR 标记数量分布虽然差别较大,但标记数量与染色体大小的变化曲线较为一致(图 2),说明构建的 SSR 分子标记物理图谱的标记分布较为均匀,各染色体上 SSR 标记数量的多少和染色体大小有关。

2.2 SSR 标记的有效性检验

从构建的 SSR 分子标记的物理图谱中,每条染色体随机选取 12 个 SSR 分子标记,总计 132 个标

记,委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成标记的扩增引物。引物合成后,以小豆资源“QH1”的DNA为模板进行PCR扩增,扩增产物在8%聚丙烯酰胺凝胶中电泳,发现共有118对引物可扩增出相应产物(图3),扩增产物大小为100~279 bp,引物扩增的有效率为89.4%。

2.3 小豆种质资源的聚类分析

为了验证开发的小豆SSR分子标记是否可以应用于小豆种质资源背景分析,经多态性筛选,获得

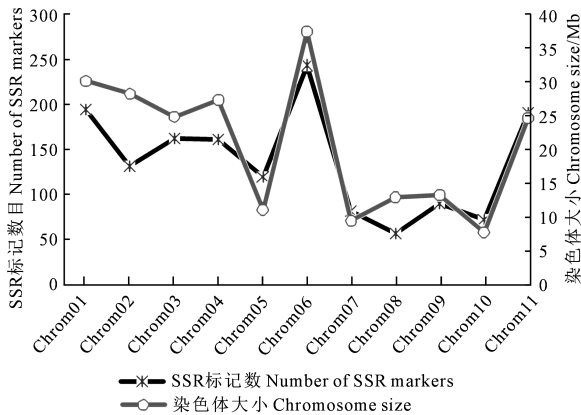


图2 SSR标记在染色体上的分布

Fig.2 Distribution of SSR markers on chromosomes

6个具有多态性的小豆SSR分子标记,包括标记*ByauVa0261*、*ByauVa0277*、*ByauVa0300*、*ByauVa0303*、*ByauVa0451*和*ByauVa1454*(表2),可以用于小豆种质资源的遗传背景分析。

将6个多态性SSR分子标记在36份小豆品种上进行分型(图4),检测到有效等位变异数为2~4个。利用软件Popgen32,构建小豆种质资源的进化树(图5),可以将供试小豆材料分为4组。Group 1包括13份小豆资源,其中,TL01、LZX066、QH5、LJ02、LJ03、GN01、GN02、红豆XD04-09、品红23129-1和GN03共10份资源的分型结果完全一致,说明这些小豆资源的遗传背景较为相近。Group 2包括18份小豆资源,其中,吉林373、保876-16、QH1、宝清红和龙小豆2号分型一致,红豆XD04-07、TL04和QH4分型一致,TL03和TL05分型一致,其余小豆资源间均有一定的分型差异。Group 3有4份小豆资源,包括QH6、保876-16(2)、小丰2号和极旱红小豆,资源间具有一定分型差异。Group 4包括1份小豆资源北6 JN003,该资源与其他资源遗传差异较大。

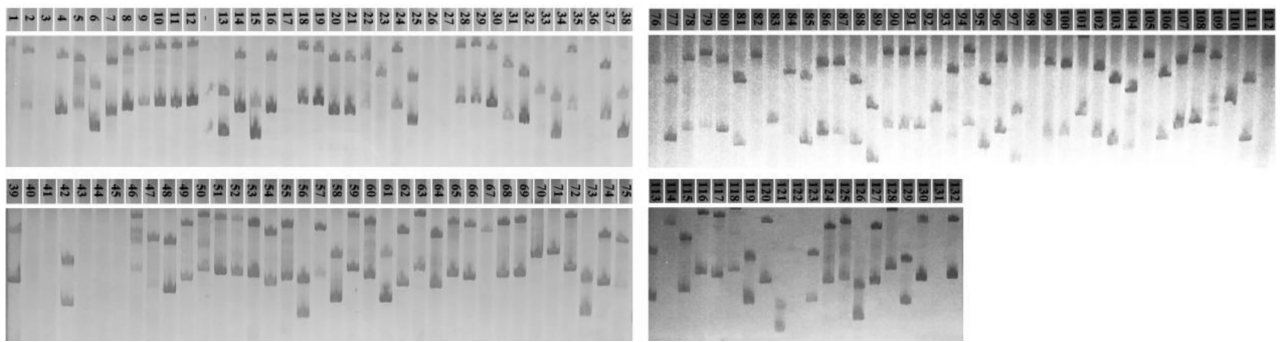


图3 132个SSR分子标记的有效性检验(数字为标记编号)

Fig.3 Validity of 132 SSR molecular markers (number refers to the number of markers)

表2 6个多态性SSR标记的引物

Table 2 Primers for 6 polymorphic SSR markers

标记 Marker	上游引物(5'-3') Upstream primer(5'-3')	下游引物(5'-3') Downstream primer(5'-3')
<i>ByauVa0261</i>	GTTGATTGGGATGAATGCT	GCAGGAATATGCCAGTAGTTACG
<i>ByauVa0277</i>	GGGAATCGCTGTGAGAGTGT	TTTCCAATCCTCGAATGAG
<i>ByauVa0300</i>	CAAACCATGTCTCAGCCACA	ATGCATGGCTTCTCCTCATC
<i>ByauVa0303</i>	CACCTCCTCCTTACCCTGA	CTGTGGGAGGACAAAGAAA
<i>ByauVa0451</i>	CCTTAATCAGATGAAGCAACA	CCACATGCGAGATGATGAGA
<i>ByauVa1454</i>	GGGCATTGTCTCTACCGTGT	TGCAGACTAACCCAGACG

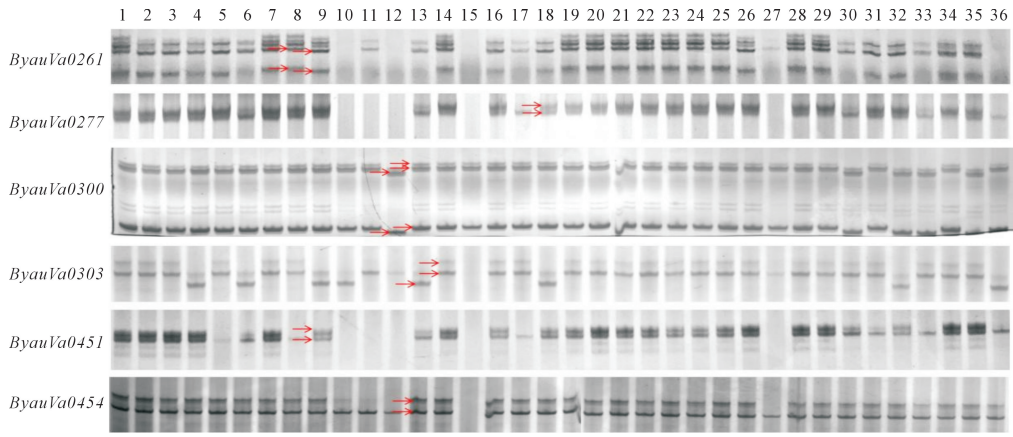


图 4 6 个 SSR 标记在 36 个小豆资源上的分型(左边为标记名称,红色箭头表示等位基因)

Fig.4 Genotyping of six SSR markers on 36 adzuki bean varieties (label name on the left, alleles indicated by red arrows)

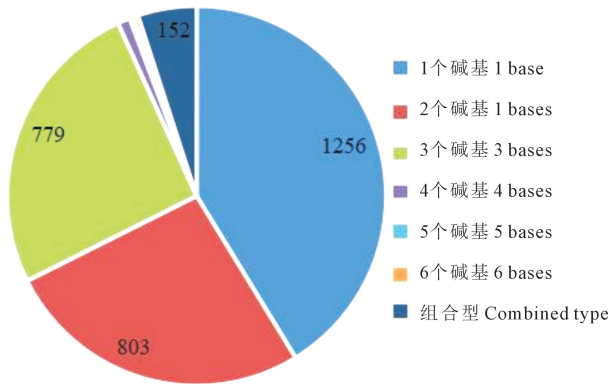


图 1 不同重复单元的 SSR 标记的数量分布

Fig.1 The number distribution of SSR markers with different repeat motif

3 讨论

SSR 分子标记在作物种质资源分析、基因定位等研究中应用较为广泛。转录组测序比基因组测序成本低,因此许多植物通过转录组测序开发了大量 SSR 分子标记。在豇豆属植物中,饭豆 (*Vigna umbellata* L.)、绿豆 (*Vigna radiate* L.)、黑豆 [*Vigna mungo* (L.) Hepper] 以及小豆,都通过转录组测序开发了 SSR 分子标记^[18-21]。Chen 等^[18]利用小豆转录组开发了 7 947 个 SSR 分子标记,其主要重复单元为单核苷酸、两核苷酸和三核苷酸重复。本研究利用小豆转录组测序数据开发了 3 045 个 SSR 分子标记,同样发现,小豆转录组水平获得的 SSR 分子标记的重复基序也为单核苷酸重复、二核苷酸重复和三核苷酸重复,分别占 SSR 标记总数的 41.2%、26.4%和 25.6%。此外,QH1 是一个较优秀的小豆抗锈病资源,利用该资源的转录组测序开发的 SSR 分子标记可以用于该资源的抗锈病基因挖掘。

研究利用 1 505 个可以锚定至染色体上并且能够设计引物的标记构建了较高密度的小豆 SSR 分子标记物理图谱,丰富了小豆 SSR 分子标记数据库。为了检验 SSR 分子标记的有效性,随机从小豆的 11 条染色体上选择 132 个 SSR 分子标记进行有效性检验,发现 118 个标记 (89.4%) 可以有效扩增出相应产物。这些标记将为小豆的种质资源鉴定、遗传背景研究以及优良性状基因定位提供技术支持。经过多态性筛选,获得 6 个多态性标记,利用其分析 36 份小豆种质资源的遗传背景,可以将小豆资源分为 4 个类群,说明这 16 个标记可以用于小豆的资源鉴定。

小豆种质资源分析中发现,Group 1 包括 13 份资源,10 份来源于黑龙江省,3 份来源于辽宁省,说明这一组的小豆资源以黑龙江省内小豆资源为主,

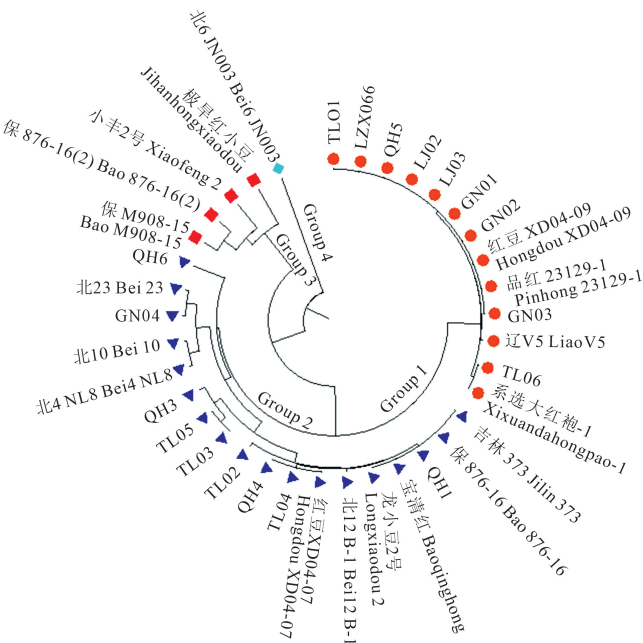


图 5 36 份小豆资源的聚类分析图

Fig.5 Cluster analysis of 36 adzuki bean varieties

与辽宁省的小豆资源有少量交流; Group 2 包括 18 份资源, 10 份来源于黑龙江省, 8 份来源于辽宁省, 说明这一组 2 个省份的小豆资源存在较广泛的交流; Group 3 的 4 份资源和 Group 4 的 1 份资源基因型较其他资源差异较大, 说明这些资源的遗传背景具有一定的独特性。

聚类分析发现小豆种质存在基因型相同名称不同的情况, Group 1 中有 10 份品种, 包括 TL01、LZX066、QH5、LJ02、LJ03、GN01、GN02、红豆 XD04-09、品红 23129-1 和 GN03, 它们的分型结果一致; Group 2 中, 吉林 373、保 876-16、QH1、宝清红和龙小豆 2 号分型一致, 红豆 XD04-07、TL04 和 QH4 分型一致, “TL03” 和 “TL05” 分型一致。这种结果出现的原因可能是多态性标记的数量较少, 对于遗传差异较小的种质, 研究中使用的 6 个标记不足以完全区分。因此, 有必要利用更多标记, 加强小豆种质资源遗传背景研究, 梳理小豆种质资源情况, 以加快小豆种质创建过程。

参考文献:

- [1] 颜军, 杨旭红, 王雨, 等. 我国小豆品种选育与新品种保护进展[J]. 种子, 2021, 40(4): 51-58.
YAN J, YANG X H, WANG Y, et al. Progress in variety breeding and new variety protection of Adzuki bean in China[J]. Seed, 2021, 40(4): 51-58.
- [2] LIANG Y S, YAN C, QIN X J, et al. Construction of three half-sib SSR linkage maps derived from overwintering cultivated rice and segregation distortion loci mapping[J]. Genome, 2020, 63(4): 239-251.
- [3] JLASSI I, BNEJDI F, SAADOUN M, et al. SSR markers and seed quality traits revealed genetic diversity in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) [J]. Molecular Biology Reports, 2021, 48(4): 3185-3193.
- [4] XU X D, FENG J, FAN J R, et al. Identification of the resistance gene to powdery mildew in Chinese wheat landrace Baiyuyantiao[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2018, 17(1): 37-45.
- [5] BLACKBURN A, SIDHU G, SCHILLINGER W F, et al. QTL mapping using GBS and SSR genotyping reveals genomic regions controlling wheat coleoptile length and seedling emergence[J]. Euphytica, 2021, 217(3): 45.
- [6] 宫慧慧, 谢华, 马荣才, 等. 利用 SSR 分析小豆种质遗传多样性[J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(5): 872-880.
GONG H H, XIE H, MA R C, et al. Genetic diversity assessment of azuki bean by SSR markers[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2008, 16(5): 872-880.
- [7] XU H X, JING T, TOMOOKA N, et al. Genetic diversity of the azuki bean (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi) gene pool as assessed by SSR markers[J]. Genome, 2008, 51(9): 728-738.
- [8] 王丽侠, 程须珍, 王素华, 等. 应用 SSR 标记对小豆种质资源的遗传多样性分析[J]. 作物学报, 2009, 35(10): 1858-1865.
WANG L X, CHENG X Z, WANG S H, et al. Genetic diversity of adzuki bean germplasm resources revealed by SSR markers[J]. Acta Agronomica Sinica, 2009, 35(10): 1858-1865.
- [9] 王丽侠, 程须珍, 王素华, 等. 利用 SSR 标记分析小豆种质资源的

- 遗传多样性[J]. 中国农业科学, 2009, 42(8): 2661-2666.
WANG L X, CHENG X Z, WANG S H, et al. Genetic diversity among adzuki bean germplasm revealed by SSR markers[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42(8): 2661-2666.
- [10] 赵波, 叶剑, 金文林, 等. 不同类型小豆种质 SSR 标记遗传多样性及性状关联分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44(4): 673-682.
ZHAO B, YE J, JIN W L, et al. Analysis on genetic diversity and trait association of different types of azuki bean (*Vigna angularis*) by SSR markers[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(4): 673-682.
 - [11] 骆晚侠, 张李, 杨凯, 等. 小豆 SSR 分子标记遗传连锁图谱构建[J]. 中国农业科学, 2013, 46(17): 3534-3544.
LUO W X, ZHANG L, YANG K, et al. Construction of genetic linkage map using SSR molecular markers in azuki bean (*Vigna angularis* Ohwi and Ohashi) [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(17): 3534-3544.
 - [12] WU P P, XIE J Z, HU J H, et al. Development of molecular markers linked to powdery mildew resistance gene *Pm4b* by combining SNP discovery from transcriptome sequencing data with bulked segregant analysis (BSR-Seq) in wheat [J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 95.
 - [13] 吕冰冰, 代畅, 彭正松, 等. 一组新的小麦 EST-SSR 标记开发及其在遗传图谱构建中的应用[J]. 华北农学报, 2020, 35(4): 57-63.
LV B B, DAI C, PENG Z S, et al. Development of a new set of EST-SSR markers and their application in genetic map construction in wheat [J]. Acta Agriculturae Boreali-sinica, 2020, 35(4): 57-63.
 - [14] 张倩倩, 袁泽科, 赵焕焕, 等. 基于转录组测序的水稻品种间 InDel 标记开发[J]. 分子植物育种, 2019, 17(16): 5334-5341.
ZHANG Q Q, YUAN Z K, ZHAO H H, et al. Development of InDel markers between rice cultivars based on transcriptome sequencing[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(16): 5334-5341.
 - [15] VERMA P, SHAH N, BHATIA S. Development of an expressed gene catalogue and molecular markers from *de novo* assembly of short sequence reads of the lentil (*Lens culinaris* Medik.) transcriptome [J]. Plant Biotechnology Journal, 2013, 11(7): 894-905.
 - [16] RAIZADA A, SOUFRAMANIAN J. Transcriptome sequencing, *de novo* assembly, characterisation of wild accession of blackgram (*Vigna mungo* var. *silvestris*) as a rich resource for development of molecular markers and validation of SNPs by high resolution melting (HRM) analysis[J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 358.
 - [17] YANG K, TIAN Z X, CHEN C H, et al. Genome sequencing of adzuki bean (*Vigna angularis*) provides insight into high starch and low fat accumulation and domestication[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(43): 13213-13218.
 - [18] CHEN H L, LIU L P, WANG L X, et al. Development and validation of EST-SSR markers from the transcriptome of adzuki bean (*Vigna angularis*) [J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0131939.
 - [19] CHEN H L, WANG L X, WANG S H, et al. Transcriptome sequencing of mung bean (*Vigna radiate* L.) genes and the identification of EST-SSR markers[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0120273.
 - [20] CHEN H L, CHEN X, TIAN J, et al. Development of Gene-Based SSR markers in rice bean (*Vigna umbellata* L.) based on transcriptome data[J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0151040.
 - [21] SOUFRAMANIAN J, REDDY K S, MANOJ P. *De novo* assembly, characterization of immature seed transcriptome and development of genic-SSR markers in black gram [*Vigna mungo* (L.) Hepper] [J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0128748.