

# 川贝母转录组中 SSR 位点信息分析

张婕<sup>1,2</sup>, 李西文<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102488)

**[摘要]** **目的:**通过分析川贝母转录组简单重复序列标记(SSR)信息,为其分子标记辅助育种及种质资源保护提供技术支撑。**方法:**采用 Illumina HiSeq2000 技术平台对川贝母鳞茎及叶片进行高通量测序,采用 MISA 对 Unigene 进行 SSR 位点分析。**结果:**从转录组得到 44 973 条,Unigene 中共检测到 3 817 个 SSR 位点,分布于 3 367 条 Unigene 序列中,出现频率为 8.49%,平均每 10.37 kb 序列出现 1 个 SSR 位点。其中重复类型最多的为三核苷酸和二核苷酸,所占比例分别为 56.51% 和 27.06%。三核苷酸重复基序 CCG/CGG 所占比率最大,其次为二核苷酸重复基序 AG/CT。6 种 SSR 重复类型的重复次数主要集中于 4~12 次,24.55% SSR 的序列长度 > 20 bp。**结论:**川贝母 SSR 位点出现频率较高,类型丰富,多态性较高,为其遗传多样性分析和遗传图谱构建及分子辅助育种提供了丰富的候选分子标记。

**[关键词]** 川贝母; 转录组; 简单重复序列标记(SSR); 多态性

**[中图分类号]** R931.5;R282;R927;Q94-3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)18-0030-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181313

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180412.0846.001.html>

**[网络出版时间]** 2018-04-12 10:30

## Simple Sequence Repeats Information Analysis in *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* Transcriptome

ZHANG Jie<sup>1,2</sup>, LI Xi-wen<sup>1\*</sup>

(1. *Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;*  
2. *School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China*)

**[Abstract]** **Objective:** To provide powerful tools for molecular marker-assisted breeding and resources protection by analyzing the simple sequence repeat (SSR) information in the transcriptome of *Fritillariae Cirrhosae Bulbus*. **Method:** The Illumina HiSeq2000 technology platform was used for high throughput sequencing of the bulbs and leaves of *Fritillariae Cirrhosae Bulbus*, and MISA software was used for SSR loci analysis of Unigene. **Result:** 3 817 SSR loci were found in a total of 44 973 unigenes obtained from the transcriptome, distributing in 3 367 unigenes in the examined sequences. Frequency of occurrence for SSRs was 8.49%, and the density of distribution was 1/10.37 kb on average. Tri-nucleotide and di-nucleotid repeats were predominated with an occurrence frequency of 56.51% and 27.06%, respectively. CCG/CGG of Tri-nucleotide was the most frequent one among all the repeat types, followed by AG/CT of di-nucleotid repeats. The number of SSR repeats was mainly between 4-12 times, and the sequence length of 24.55% SSR was higher than 20 bp. **Conclusion:** The SSR loci in the transcriptome of *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* show high frequency, rich types, and high polymorphism, which will might be applied in the study on the candidate gene mining and marker-assisted breeding.

**[Key words]** *Fritillariae Cirrhosae Bulbus*; transcriptome; simple sequence repeat (SSR); polymorphism

**[收稿日期]** 20180116(009)

**[基金项目]** 科学技术部国家科技计划港澳台合作专项(2015DFM30030);中国中医科学院重点专项(ZZ10-007)

**[第一作者]** 张婕,硕士,从事中药鉴定研究,E-mail:1617992953@qq.com

**[通信作者]** \*李西文,博士,副研究员,从事中药资源及鉴定研究,E-mail:xwli@icmm.ac.cn

川贝母具有清热润肺、化痰止咳、散结消痈之功效。用于肺热燥咳、干咳少痰、阴虚劳嗽、痰中带血等,具有“止咳圣药”之称<sup>[1]</sup>,是中医处方和中成药生产中常用的名贵药材。据不完全统计,全国以川贝母为原料生产的中成药达 100 种以上,尤其是川贝枇杷露、川贝止咳糖浆、蛇胆川贝液等制剂<sup>[2]</sup>,是出口贝母药材的主要品种之一。川贝母已被列为国家三级保护物种<sup>[3]</sup>,并且来源物种被《国家重点保护野生药材物种名录》收载,但由于其生长条件苛刻,自然生长率低,再加上长期的人为滥采滥挖,野生资源已经濒临枯竭,难以满足临床的需要,因此急需加强对川贝母的种质资源和优良品种选育研究。目前对于川贝母化学成分、药理作用、组织培养等方面的研究报道较多,但对其种质资源多样性、遗传背景及分子标记辅助育种等方面的研究较少。

简单重复序列标记 (simple sequence repeats, SSR),又称为短串联重复序列和微卫星标记,是一类由几个核苷酸(1~5 个)为重复单位组成的长达几十个核苷酸的重复序列,长度较短,且广泛均匀分布于真核生物基因组中<sup>[4]</sup>。由于在不同物种中 SSR 重复单位的核苷酸以及重复次数不完全相同,造成了 SSR 长度的高度变异性,突变情况也有所不同,在染色体上分布存在差异,形成等位基因多样性的现象<sup>[5]</sup>。SSR 分子标记具有高度重复性、丰富的多态性、共显性、高度可靠性等优点,广泛应用于研究遗传图谱、辅助育种、分子标记筛选、品种纯度鉴定及基因定位等方面<sup>[6]</sup>。范建光等<sup>[7]</sup>建立了西瓜 DUS 测试指南标准品种的 SSR 指纹图谱,可为西瓜遗传背景分析提供指导;匡猛等<sup>[8]</sup>基于 SSR 标记进行了 8 个省份 32 份棉花品种的遗传多样性研究,发现棉花品种间亲缘关系与地理来源具有一定相关性;石星星等<sup>[9]</sup>对 4 个批次结球甘蓝杂交种与对照品种(即真实性)进行鉴定,并对某一批次杂交种进行纯度鉴定,研究结果可为利用 SSR 进行甘蓝杂交种真伪及纯度鉴定提供指导。

在全基因组序列水平分析 SSR 位点可全面获取分子标记多态性<sup>[10]</sup>,如人参全基因组精细图谱的构建发现了 60% 的重复序列<sup>[11]</sup>。但贝母属的基因组超过了 100 Gb,应用目前技术进行如此大的基因组组装拼接仍然是一项艰难的工程。转录组测序是研究大基因组物种遗传信息的有效方法,并且转录组主要为基因编码区信息,利用转录组数据来研究其种质资源遗传多样性及分子标记育种等是个很好

的选择。目前 SSR 标记研究在箭叶淫羊藿<sup>[12]</sup>、梔子<sup>[13]</sup>、黄秦艽<sup>[14]</sup>、杜仲<sup>[15]</sup>、党参<sup>[16]</sup>等药用植物已有较多论文发表,但基于转录组学的川贝母 SSR 分子标记研究鲜有报道。本研究基于 HiSeq2000 测序平台对川贝母进行转录组学研究,分析 SSR 位点并设计引物,以期川贝母多态性研究提供参考。

## 1 材料

样品于 2017 年 6 月川贝母盛花期采自四川省康定县新都桥镇,经中国中医科学院中药研究所陈士林研究员鉴定为百合科贝母属植物川贝母 *Fritillaria cirrhosa*。

## 2 方法

**2.1 RNA 提取及测序** 将采集的川贝母鳞茎、叶片用双蒸水清洗干净,然后将鳞茎切成薄片,与叶片迅速放在 -80 ℃ 液氮速冻进行研磨。本实验使用多糖多酚植物总 RNA 快速提取试剂盒(离心柱型)(中国百泰克)进行川贝母鳞茎、叶片总 RNA 的提取。将提取的符合建库要求的 RNA 送北京博云华康公司利用 Illumina HiSeq2000 型测序仪进行测序。

**2.2 SSR 检测** 本研究使用 MISA v1.0 (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa>)<sup>[17]</sup> 对 Unigene 进行 SSR 检测,对应的各个 Unit size 的最少重复数分别为以单核苷酸为重复单位时,其重复数至少为 12 次才可被检测到;以双核苷酸为重复单位时,其最少重复数为 6;以三核苷酸为重复单位时,其重复数至少为 5;以四核苷酸为重复单位时,其重复数至少为 5;以五核苷酸为重复单位时,其重复数至少为 4;以六核苷酸为重复单位时,其重复数至少为 4。

**2.3 SSR 引物设计** SSR 在基因组上的位置不尽相同,但是其两端序列多是保守的单拷贝序列,因此根据 SSR 两端互补序列来设计引物,通过 PCR 反应扩增出含有 SSR 位点的片段。由于重复单位的串联重复次数不同,因而能够用 PCR 的方法扩增出不同长度的 PCR 产物,将得到的产物进行凝胶电泳,即可显示 SSR 位点的长度多态性。本研究采用 Primer3 v2.3.7 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3>)<sup>[18]</sup> 对检测到的 SSR 进行引物设计,并针对预测到的每一个 SSR 位点分别设计了 5 组引物。主要引物设置参数为引物长度 18~28 bp(最佳长度 23 bp),产物大小 80~160,80~240,80~300 bp,退火温度 55~65 ℃(最佳退火温度 60 ℃)。

## 3 结果与分析

**3.1 Denovo 组装** 川贝母鳞茎、叶片转录组测序

共获得 44 973 条 Unigene 序列, 序列总长度 39 578 621 bp, 平均长度 880 bp, N50 为 1 316 bp,

GC 含量为 49.44%, 表明测序结果良好, 符合后续分析要求。结果见表 1。

表 1 川贝母鳞茎和叶片测序

Table 1 Sequencing data quality in transcriptome of *Fritillaria cirrhosa*

样本名	总 Unigene/个	总长度/bp	平均长度/bp	N50/bp	N70/bp	N90/bp	GC/%
BM-LJ	36 002	27 947 763	776	1 133	716	342	50.25
BM-YP	36 660	32 440 528	884	1 314	864	391	48.89
All-Unigene	44 973	39 578 621	880	1 316	859	390	49.44

注: N50. 用于衡量组装的连续性, 数值越大说明组装效果越好, 计算方法为按 Unigene 长度从大到小排序后逐个累加至所有转录本总长度的 50% 时, 最后一个累加的数值大小即为 N50; N70, N90. 类似 N50; GC. Unigene 的 GC 碱基的含量。

**3.2 SSR 位点频率和分布密度** 转录组测序得到的 Unigene 中总共检测到 3 817 个 SSR 位点, 分布于 3 367 条序列中, SSR 发生频率(含有 SSR 的 Unigene 序列数/总 Unigene 序列数)为 7.49%。364 条 Unigene 序列发现不止 1 个 SSR 位点。结果见表 2。检测得到的 SSR 位点出现频率(检测到的 SSR 位点数目/总 Unigene 数目)为 8.49%。出现频率最多的为一至三核苷酸重复, 占有检测到的 SSR 的 94.55%, 其中三核苷酸为 2 157, 56.51%, 其次为二核苷酸 1 033, 27.06%, 单核苷酸 419, 10.98%。四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸重复很少, 分别为 14, 36, 158, 总共不到 6%。SSR 分布密度为平均每 10.37 kb 序列出现 1 个 SSR 位点。见表 3。

表 2 川贝母转录组 Unigene 序列中检测到的 SSR 统计

Table 2 Description of SSR in transcriptome of *Fritillaria cirrhosa*

项目	数值/个
Unigene 序列数目	44 973
检测到的 SSR 数目	3 817
含 SSR 位点的 Unigene 序列数目	3 367
含多个 SSR 位点的 Unigene 序列数目	364
含复合型 SSR 的序列数目	236

表 3 川贝母转录组不同 SSR 重复类型分布情况

Table 3 Sequence features of different SSR repeat unit in transcriptome of *Fritillaria cirrhosa*

重复类型	SSR 数目	占比/%	频率/%	平均距离/kb
单核苷酸	419	10.98	0.93	94.46
双核苷酸	1 033	27.06	2.30	38.31
三核苷酸	2 157	56.51	4.80	18.35
四核苷酸	14	0.37	0.03	2 827.04
五核苷酸	36	0.94	0.08	1 099.41
六核苷酸	158	4.14	0.35	250.50

**3.3 川贝母转录组 SSR 基序类型** 在川贝母转录组检测到的 3 817 个 SSR 位点中发现共有 207 种重复基序, 在考虑互补序列的情况下, 一至六核苷酸重复分别有 2, 4, 10, 8, 16, 55 种类型。见表 4。其中三核苷酸重复基序 CCG/CGG 所占比率最大, 达到发现总 SSR 位点的 28.53%。其次为二核苷酸重复基序 AG/CT 和单核苷酸重复基序 A/T, 所占比率分别为 21.33% 和 8.70%。在三核苷酸中 CCG/CGG 有着显著占比, 接着是 AGG/CCT (8.59%), AGC/CTG (5.66%), ACC/GGT (4.17%)。二核苷酸中 AG/CT 为最大重复基序, 其次为 AT/AT (4.61%), 剩余所占比率都不到 1%。其余四、五、六核苷酸重复基序类型丰富, 但所占比率都很少。见表 4。

**3.4 SSR 重复次数及基序长度** 不同遗传材料重复次数的可变性, 导致了 SSR 长度的高度可变性, 这一变异性正是 SSR 标记产生的基础<sup>[19]</sup>。根据本研究川贝母转录组不同 SSR 核苷酸重复类型及其重复次数的统计, 见表 5。分析表明, 检测到 6 种重复类型的 SSR 重复次数主要集中于 4~12 次, 高于 12 次以上的重复次数所占比例很小。其中 5 次重复所占比例最大 (1 378, 36.10%), 接着是 6 次重复 (860, 22.53%), 7 次重复 (424, 11.11%), 8 次重复 (213, 5.58%), 4 次重复 (154, 4.03%)。

SSR 位点长度的变异是引起其多态性的主要原因<sup>[20]</sup>, 不同的长度表示 SSR 多态性的不同程度。川贝母 SSR 长度分布见表 6, 可以看出 2 880 个 SSR 位点分布在长度 12~20 bp, 占 75.45%, 处于这个长度区间的 SSR 具有中等多态性; 其次 586 个 SSR 位点分布在长度 21~30 bp, 占 15.35%, 这类 SSR 具有较高等多态性; 长度 >30 bp 的 SSR 位点有 351 个, 占 9.20%, 这类 SSR 具有更高等多态性。

**3.5 SSR 引物设计** 尽管微卫星 DNA 分布于整个

表 4 川贝母转录组中不同 SSR 重复类型的基序类型统计

Table 4 Constitute of different length motif in transcriptome of *Fritillaria cirrhosa*

核苷酸	重复类型	总计/个	占比/%	
单核	A/T	332	8.70	
	C/G	87	2.28	
双核	AG/CT	814	21.33	
	AT/AT	176	4.61	
	AC/GT	37	0.97	
	CG/CG	6	0.16	
	CCG/CGG	1 089	28.53	
三核	AGG/CCT	328	8.59	
	AGC/CTG	216	5.66	
	ACC/GGT	159	4.17	
	AAG/CTT	140	3.67	
	ATC/ATG	92	2.41	
	ACG/CGT	65	1.70	
	AAT/ATT	41	1.07	
	AAC/GTT	20	0.52	
	ACT/AGT	7	0.18	
	四核	AAGG/CCTT	4	0.10
		AAAG/CTTT	2	0.05
		AAAT/ATTT	2	0.05
		ACAT/ATGT	2	0.05
剩余 4 种四核苷酸		4	0.10	
五核	AGCTC/AGCTG	8	0.21	
	AAAAT/ATTTT	5	0.13	
	AGAGG/CCTCT	5	0.13	
	AAGAG/CTCTT	3	0.08	
	AACAG/CTGTT	2	0.05	
	ACCCG/CGGGT	2	0.05	
	CCCCG/CGGGG	2	0.05	
	剩余 9 种五核苷酸	9	0.24	
六核	ACCGCC/CGGTGG	23	0.60	
	AACCCT/AGGGTT	14	0.37	
	ACGGCG/CCGTCG	12	0.31	
	AAGAGG/CCTCTT	6	0.16	
	AGCCGG/CCGGCT	6	0.16	
	剩余 50 种六核苷酸	97	2.54	

基因组的不同位置,但其两端序列多是保守的单拷贝序列,因此可以根据这两端的序列设计一对特异引物,通过 PCR 技术将其间的核心微卫星 DNA 扩增出来,利用电泳分析技术就可获得其长度多态性,

表 5 不同 SSR 重复类型的重复次数统计

Table 5 Distribution of SSR with different repeat units and repeat numbers in transcriptome of *Fritillaria cirrhosa*

重复数/次	核苷酸重复类型/个						占比/%
	单核苷酸	二核苷酸	三核苷酸	四核苷酸	五核苷酸	六核苷酸	
4	0	0	0	0	32	122	4.03
5	0	0	1 348	12	2	16	36.10
6	0	384	460	1	1	14	22.53
7	0	226	197	0	0	1	11.11
8	0	108	101	0	1	3	5.58
9	0	66	18	1	0	0	2.23
10	0	56	12	0	0	0	1.78
11	0	36	2	0	0	0	1.00
12	89	33	7	0	0	0	3.38
13	49	6	5	0	0	0	1.57
14	30	7	1	0	0	0	1.00
15	39	14	0	0	0	1	1.41
16	33	5	0	0	0	0	1.00
17	43	15	1	0	0	1	1.57
18 ~ 105	136	77	5	0	0	0	5.71

表 6 不同长度范围 SSR 数量统计

Table 6 Distribution of SSR length in transcriptome of *Fritillaria cirrhosa*

SSR 长度分布/bp	SSR 数目/个	所占比例/%
12 ~ 20	2 880	75.45
21 ~ 30	586	15.35
31 ~ 40	116	3.04
41 ~ 50	72	1.89
> 50	163	4.27

即 SSR 标记。本研究对筛选出的川贝母 SSR 设计引物,每条序列设计 5 条,共获得 1 281 条序列 6 405 对引物。如果引物序列出现 3 次以上重复序列(2 ~ 6 bp),则过滤掉;再进一步把引物序列比对组装结果,如果比对上其他的组装序列,则过滤掉(过滤引物序列特异性差的结果)。因此经过进一步筛选最终获得 3 235 对引物序列。

#### 4 讨论

分子标记反映了物种在基因水平上的遗传多样性。SSR 是目前应用最广泛的 DNA 分子标记技术之一,主要是通过基因组、转录组、表达序列标签数据来研究 SSR 位点信息<sup>[21]</sup>。在已经有全基因组信息的物种中,利用比较基因组和重测序分析 SSR 标

记。对于没有基因组信息的非模式物种,主要基于表达序列标签(EST)和转录组数据分析 SSR 标记,由于这些标记主要位于编码区域(这些区域为功能基因区),因此研究的 SSR 结果更加可靠。而与基于 EST 数据的 SSR 分析相比,转录组 SSR 分析可以获得更多的信息,已经被广泛应用。常越等<sup>[22]</sup>采用 Roche 454GS FLX 测序获得的膜荚黄芪转录组数据对其 SSR 位点进行了分析,研究结果表明黄芪转录组 SSR 出现频率高,类型多样,多态性潜能高,为黄芪遗传图谱构建、遗传多样性分析奠定了基础;代娇等<sup>[23]</sup>通过分析厚朴转录组 SSR 位点,并对含 SSR 信息的序列进行功能注释,为厚朴基因挖掘及分子辅助育种提供了大量信息;何海等<sup>[24]</sup>分析茯苓转录组中 SSR 位点信息并对含 SSR 的基因进行 Nr 和 KEGG 数据库注释,不仅可为茯苓分子标记开发奠定基础,而且其相关关联功能基因研究对采用目的性状分子开展辅助育种有很大作用。

本研究从川贝母鳞茎、叶片转录组数据 44 973 条 Unigenes 中总共检测到 3 817 个 SSR 位点信息,平均距离为 10.37 kb,即 SSR 平均的出现频率为 1/10 370,与现有已研究物种 SSR 相比,其平均距离低于银杏(12.02 kb)<sup>[25]</sup>,杜仲(11.61 kb)<sup>[26]</sup>,拟南芥(13.83 kb),杨树(14 kb),棉花(20 kb)<sup>[27]</sup>等。从整体来看,川贝母 SSR 出现频率比较高,数量丰富,具有很大的应用前景。在检测到的 SSR 位点中,三核苷酸所占比例最大为 56.51%。其次是二核苷酸和单核苷酸,分别为 27.06% 和 10.98%。其他核苷酸重复类型数量较少,不到发现 SSR 总量的 6%。基序类型中,CCG/CGG 出现比率最大,其次是 AG/CT 和 A/T,而四、五、六核苷酸基序类型出现都很少。另外检测到的 SSR 不同重复类型的重复次数范围大多集中在 4~12 次,这与大多数植物物种结果一致。937 个(24.55%) SSR 位点长度 > 20 bp,这类 SSR 具有高等多态性,对于 SSR 的研究具有更高的应用价值。

本文基于川贝母转录组学对其进行 SSR 出现频率、分布密度、基元类型、重复次数及序列长度等进行分析,探究了川贝母 SSR 的利用价值和发展潜力。发现川贝母 SSR 位点出现频率较高,类型丰富,多态性较高,将对川贝母种质资源多样性保护、谱系分析及分子辅助育种提供支撑。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M].

北京:中国医药科技出版社,2015:36-38.

- [2] 周剑侠,康露,毕京博,等. 贝母药材在中药和保健食品中使用的安全性探讨[J]. 上海中医药杂志,2006,40(4):66-67.
- [3] 王天志,杜蕾蕾,王曙. 川贝母的研究进展[J]. 华西药学杂志,2001,16(3):200-203.
- [4] Moore S S, Sargeant L L, King T J, et al. The conservation of dinu-cleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species[J]. Genomics, 1991,10(3):654-660.
- [5] 王玲玲,陈东亮,黄丛林,等. SSR 分子标记技术在植物研究中的应用[J]. 安徽农业科学,2017,45(36):123-126,130.
- [6] 刘列钊,林呐. 油菜简单重复序列 SSR (simple sequence repeat) 研究进展[J]. 生命科学,2004,16(3):173-176.
- [7] 范建光,张海英,宫国义,等. 西瓜 DUS 测试标准品种 SSR 指纹图谱构建及应用[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(5):892-899.
- [8] 匡猛,杨伟华,许红霞,等. 中国棉花主栽品种 DNA 指纹图谱构建及 SSR 标记遗传多样性分析[J]. 中国农业科学,2011,44(1):20-27.
- [9] 石星星,纪小红,张磊,等. 利用 SSR 标记鉴定结球甘蓝杂交种真实性及纯度[J]. 分子植物育种,2015,13(2):331-337.
- [10] 陈士林,宋经元. 本草基因组学[J]. 中国中药杂志,2016,41(21):3881-3889.
- [11] XU J, CHU Y, LIAO B S, et al. *Panax ginseng* genome examination for ginsenoside biosynthesis[J]. Giga Sci, 2017,6(11):1-15.
- [12] ZENG S H, XIAO G, GUO J, et al. Development of a EST dataset and characterization of EST-SSRs in a traditional Chinese medicinal plant, *Epimedium sagittatum* (Sieb. Et Zucc.) Maxim [J]. BMC Genomics,2010,11(1):94-99.
- [13] XU Y Q, WEI G Y, ZHOU Y, et al. Isolation and characterization of twenty-two polymorphic microsatellite markers from *Gardenia jasminoides* (Rubiaceae) [J]. J Genetic,2015,94(1):22-24.
- [14] WANG L, WANG Z K, CHEN J B, et al. De novo transcriptome assembly and development of novel microsatellite markers for the traditional Chinese medicinal herb, *Veratril-la baillonii* Franch (Gentianaceae) [J]. Evol Bioinform, 2015, 11(1):39-45.
- [15] LI Y, WANG S H, LI Z Q, et al. Genetic diversity and relationships among Chinese *Eucommia ulmoides*

- cultivars revealed by sequence-related amplified polymorphism, amplified fragment length polymorphism, and inter-simple sequence repeat markers [J]. *GMR*, 2014, 13(4):8704-8713.
- [16] 王东,曹玲亚,高建平. 党参转录组中 SSR 位点信息分析[J]. *中草药*, 2014, 45(16):2390-2394.
- [17] Thiel T, Michalek W, Varshney R, et al. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *TAG*, 2003, 106(3):411-422.
- [18] Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, et al. Primer3-new capabilities and interfaces [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(15):e115-e115.
- [19] 胡建斌,李建吾. 甜瓜 EST-SSR 位点信息及标记开发 [J]. *园艺学报*, 2009, 36(4):513-520.
- [20] 李珊,周天华,赵桂仿,等. 马蹄香表达序列标签资源的 SSR 信息分析 [J]. *中草药*, 2010, 41(3):464-468.
- [21] 王娟娟,赵明,韩雨威,等. 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 [J]. *生命科学研究*, 2016, 20(3):260-266.
- [22] 常越,闫嵩,刘振鹏,等. 膜荚黄芪的转录组测序质量评估及其 SSR 位点信息分析的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(8):1430-1434.
- [23] 代娇,时小东,顾雨熹,等. 厚朴转录组 SSR 标记的开发及功能分析 [J]. *中草药*, 2017, 48(13):2726-2732.
- [24] 何海,郭继云,马毅平,等. 茯苓转录组 SSR 序列特征及其基因功能分析 [J]. *中草药*, 2015, 46(23):3558-3563.
- [25] 樊洪泓,李廷春,李正鹏,等. 银杏 EST 序列中微卫星的分布特征 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2009, 28(5):869-873.
- [26] 黄海燕,杜红岩,乌云塔娜,等. 基于杜仲转录组序列的 SSR 分子标记的开发 [J]. *林业科学*, 2013, 49(5):176-181.
- [27] Cardle L, Ramsay L, Milbourne D, et al. Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants [J]. *Genetics*, 2000, 156(2):847-854.

[责任编辑 顾雪竹]