

桂郁金 EST 资源的 SSR 信息分析及 EST-SSR 标记开发

靳雅惠, 苏伟敏, 杨妮, 王建*

(广西中医药大学药学院, 南宁 530001)

[摘要] **目的:**分析桂郁金 EST 中 SSR 位点分布规律,开发桂郁金 EST-SSR 引物,探讨 EST-SSR 用于桂郁金品种遗传多样性的可行性。**方法:**从 NCBI 公共数据库下载姜黄属 EST 序列(expressed sequence tag, EST)12 678 条,利用 MISA 软件对其进行 SSR 位点查找,选出符合条件的序列,采用 Primer 5.0 软件设计 EST-SSR 引物,利用聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳研究这些 EST-SSR 引物 PCR 扩增的特点,进一步验证开发结果的合理性与有效性。**结果:**下载得到的 12 678 条 EST 序列中,共有 926 条序列包含 SSR 位点,占整个 EST 数据库的 7.30%,其中 SSR 位点所占比例最大的是二核苷酸重复序列,三核苷酸和四核苷酸次之,分别为 623 (50.90%) 个,388 (31.70%) 个和 125 (10.21%) 个。根据筛选得到的微卫星序列共设计了 165 个 EST-SSR 引物对,选择其中 92 分以上的 24 个合成。PCR 检测表明,21 个引物对 (87.50%) 可以扩增出稳定清晰的带型;在 6 份不同种质桂郁金中检测到 13 对 EST-SSR 引物有多态性,占设计引物的 54.17%。利用 13 对验证的 EST-SSR 引物对 20 个桂郁金品种进行了亲缘关系分析。**结论:**桂郁金 EST-SSR 标记开发的效率较高,是桂郁金 SSR 标记开发的重要措施,对于桂郁金品种鉴定和遗传多样性分析以及育种等方面具有重要的意义。

[关键词] 桂郁金; 表达序列标签; 简单重复序列; 引物开发

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)24-0037-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016240037

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160929.0912.014.html>

[网络出版时间] 2016-09-29 9:12

SSR Information Analysis of *Curcuma kwangsiensis* EST Resources and EST-Development of SSR Markers

JIN Ya-hui, SU Wei-min, YANG Ni, WANG Jian*

(College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the distribution rules of SSR loci in *Curcuma kwangsiensis* EST, develop *C. kwangsiensis* EST-SSR primers, and explore the feasibility of EST-SSR for *C. kwangsiensis* species genetic diversity. **Method:** The 12 678 items of *Curcuma* EST (expressed sequence tag) sequences were downloaded from NCBI database, and MISA software was used to find SSR loci and select qualified sequences. Primer 5.0 software was used to design EST-SSR primers; polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was used to analyze the PCR amplification characteristics of these EST-SSR primers, and further verify the rationality and validity of the developed results. **Result:** From 12 678 downloaded EST sequences, 926 sequences contained SSR loci, accounting for 7.30% of the entire EST database. The largest proportion for SSR loci was in dinucleotide repeat sequences, followed by trinucleotide and tetranucleotide sequences, 623 (50.90%), 388 (31.70%) and 125 (10.21%) respectively. A total of 165 EST-SSR primer pairs were designed according to the microsatellite sequences, and 24 of them with more than 92 points were selected for synthesis. PCR detection showed that 21 primer pairs (87.50%) could amplify stable and clear bands; in 6 different Germplasms in *C. kwangsiensis*, 13

[收稿日期] 20151215(020)

[基金项目] 广西研究生教育创新计划项目(YCSZ2015181)

[第一作者] 靳雅惠,在读硕士,从事药用植物栽培和育种研究,Tel:15678911676,E-mail:sxyajyh@126.com

[通讯作者] *王建,教授,从事药用植物栽培和育种研究,Tel:13217810893,E-mail:qxzyywj@126.com

pairs of EST-SSR primers showed polymorphism, accounting for 54.17% in the primer design. 13 pairs of EST-SSR primers were used to verify the phylogenetic relationship for 20 *C. kwangsiensis* varieties. **Conclusion:** *C. kwangsiensis* EST-SSR markers have a higher development efficiency, so it is one of the important measures for development of *C. kwangsiensis* SSR markers, with vital significance for the identification of *C. kwangsiensis* variety, genetic polymorphism analysis and breeding.

[Key words] *Curcuma kwangsiensis*; expressed sequence tag; simple sequence repeat; primers development

简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 也被称为微卫星 (microsatellite), 是由 1~6 个核苷酸作为串联重复序列的重复单元^[1]。一定数量的微卫星或简单重复序列存在于表达序列标签 (expressed sequence tag, EST) 中, 即 EST-SSR^[2]。EST-SSR 标记的特点是多态性高、共显性、重复性好等, 并且开发成本较低, 省时省力, 再者因为 EST-SSR 来源于表达的基因组区域, 可直接反映相关基因的多样性^[3], 随着基因组学的迅速发展, EST-SSR 分子标记已经广泛应用于药用植物的研究当中, 如金银花^[4], 甘草^[5], 地黄^[6], 丹参^[7] 等中药材。桂郁金为郁金的一种, 具有活血止痛, 行气解郁, 清心凉血, 利胆退黄的功效^[8]。桂郁金作为郁金的主流品种, 占到了全国郁金总产量的 60%^[9]。然而, 近年来对于桂郁金主要集中于化学成分研究^[10-11], 桂郁金 EST-SSR 引物开发及 SSR 分子育种等方面还未见报道。因此, 作者针对桂郁金而开发的 EST-SSR 引物, 可以为桂郁金的品种鉴定, 质量评价, 多态性分析及分子育种方面提供一定的参考依据。

1 材料

所用材料桂郁金前期采自广西玉林, 钦州, 灵山, 贵港, 平南, 邕宁等地, 统一种植于南宁仙葫区种植基地。经广西中医药大学药用植物教研室王建教授鉴定为姜科姜黄属植物桂郁金, 即广西莪术 *Curcuma kwangsiensis* 的干燥块根。全部种质资源均保存于南宁仙葫区种植基地, 种质编号同课题组前期研究编号^[12], 如 15-239-C23, 7-195-C49, 18-20-药用 1 等。

CTAB (合肥博美生物科技有限公司, 批号 SH9151), 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP, 博爱新开源制药股份有限公司, 批号 9003-39-8), TE Buffer (生工生物工程上海股份有限公司, 批号 B548106-0500); 异丙醇, 无水乙醇, 三氯甲烷-异戊醇 (24:1), 75% 冰乙酸 (分析纯, 上海试一化学试剂有限公司); 水为双蒸水。

FA1004 型电子天平 (上海精科天平仪器厂),

MM400 型冷冻混合型研磨仪 (德莱驰贸易有限公司), Eppendorf Mini Spin 型高速离心机 (上海创萌生物科技有限公司), BioSpec-nano 型紫外可见分光光度计 (广州科能仪器设备有限公司), HZS-H 型超级恒温水浴振荡器 (哈尔滨市东联电子技术开发有限公司), GeneAmpR PCR system9700 型 PCR 仪 (北京利超兴业科技有限公司)。

2 方法

2.1 序列搜索 从 NCBI 数据库中下载姜黄属 EST 序列, 运用 EST-trimmer 软件 (<http://pgrc.jpk.gater.sl.eben.De/mis/download/est.trimmer.pl>) 对其进行前期处理, 截去 3' 端的 PolyA 结构和载体序列, 截去 <100 bp 的 EST 序列, 考虑到质量问题, 对 >700 bp 的 EST 序列的 3' 端进行截短处理。搜索的标准为单核苷酸重复次数 ≥10, 二核苷酸重复次数 ≥6 次, 三核苷酸重复次数 ≥5 次, 四核苷酸重复次数 ≥5 次, 五核苷酸重复次数 ≥4 次和六核苷酸重复次数 ≥3 次。

2.2 引物设计 当姜黄属 EST 序列含有 SSR 位点时, 运用 Primer 5.0 软件进行 EST-SSR 引物设计, 引物设定标准为: G+C 含量 45%~60%, 退火温度 50~62 °C, 引物长度 18~27 bp, 扩展片段长度 150~300 bp。最好减少 Dimer 和二聚体形成, 使用 Oligo 6.0 评估引物。

2.3 DNA 提取 取桂郁金健康嫩叶 0.5~1.0 g, 采用杨妮等^[13] 改良 CTAB 法进行提取, 用紫外分光光度计检测 DNA 的质量及浓度。

2.4 PCR 扩增以及筛选多态性引物 选取 6 个桂郁金品种, 每个品种选 6 株, 用以检验引物的多态性。PCR 扩增反应体系如下: 模板 DNA 2.5 μL, Taq DNA 聚合酶 0.05 U·μL⁻¹, Mg²⁺ 3.0 mmol·L⁻¹, dNTPs 0.3 mmol·L⁻¹, 引物 1.0 μmol·L⁻¹, 加 ddH₂O 至 15 μL。PCR 反应程序参数设定为 94 °C 的条件下预变性 5 min, 94 °C 的条件下变性 35 s, 55~60 °C 的条件下退火 35 s, 72 °C 的条件下延伸 50 s, 35 个扩增循环, 72 °C 的条件下延伸 8 min。采

用 ABI9700 PCR 仪。非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (8%) 用以检测 PCR 的反应产物。

3 结果及分析

3.1 EST 序列的采集和 SSR 分析 截止 2015 年 11 月 30 日, 下载得到姜黄属 EST 序列 12 678 条, 去除 5' 端或者 3' 端重复 3 次以上的 polyA 或 T 尾巴, 同时对 100 bp 以下的序列做剔除处理、并进行拼接及聚类后, 获得非冗余桂郁金序列 2 427 条。采用 SSRIT 软件及文本文件的查找功能对其进行检索, 得到满足条件的 SSR 共 1 224 个, 分布在 926 条 EST 序列中, 占有 EST 的 50.43%。

采集得到的 EST-SSR 序列里, 能检测出不同频率的二核苷酸-六核苷酸重复类型。二核苷酸重复类型的 SSR 所占比例最大, 占全部 SSR 的 50.90%, 共 623 个, 出现频率 (25.66%); 三核苷酸重复类型次之, 占全部 SSR 的 31.70%, 共 388 个, 出现频率 (15.99%); 四核苷酸类型占 SSR 总数的 10.21%, 共 125 个, 出现频率 (5.15%); 五核苷酸类型占全部 SSR 的 0.65%, 共 8 个, 出现频率 (0.33%); 六核苷酸类型占全部 SSR 的 6.54%, 共 80 个, 出现频率为 (3.30%)。由上可知, 桂郁金 EST-SSR 的主要重复类型是二、三核苷酸重复。在二核苷酸的重复单元中, 频率最高的是 AT/TA 和 CT/GA, 所占二核苷酸比例分别是 13.88% 和 4.49%; 在桂郁金三核苷

酸重复单元中, 频率最高的是 CCG/GGC 基序, 其次是 CTT/GAA, CGG/GCC, AAT/TTA, TTC/AAG 和 CCA/GGT, 这 6 类重复基序占三核苷酸类型总量的 9.64%。在桂郁金四核苷酸重复单元中, TATA/ATAT 基序出现频率最高, 占四核苷酸总数的 1.67%, 其次为 GAGA/CTCT 和 CTCT/GAGA, 分别占四核苷酸总数的 1.19% 和 1.08%。在桂郁金六核苷酸重复单元中, TATATA 基序出现频率较高, 占六核苷酸总数的 1.01%。见表 1。

表 1 桂郁金 EST 中 SSR 出现的频率

Table 1 SSR frequency in *Curcuma kwangsiensis* EST

重复类型	数量/个	占全部 SSR 比率/%	频率/%
二核苷酸	623	50.90	25.66
三核苷酸	388	31.70	15.99
四核苷酸	125	10.21	5.15
五核苷酸	8	0.65	0.33
六核苷酸	80	6.54	3.30

注: 频率 = 检出的 SSR 数目/无冗余 EST 总数。

3.2 引物设计和 PCR 扩增效果测试 当 contig 搜索出 SSR 位点时, 对其通过引物设计和评估, 并选择 24 对引物合成, 引物设计的信息见表 2, 用 6 份不同种质桂郁金来检测 PCR 的扩增效果, 结果如图 1 所示, 24 对引物中有 21 对可以扩增得到理想的产品, 占到了合成引物的 87.50%。由此可见, 姜黄属 EST 序列可以被用来开发桂郁金 EST-SSR 引物。

表 2 设计合成的 24 对引物信息

Table 2 Information of 24 primer pairs in synthesis design

引物名称	检索编号	重复单元	引物序列 (5'-3')	退火温度/℃	预期片段长度/bp
SSR-01	gi1483964359	(CA)8	ACCAATGTTATACCCGAATC AACGCCAGCCTTACT	53.70	111
SSR-02 ¹⁾	gi1871506751	(GTT)3	AACGAAGTCGGTGGCG GGAGGTCAAGAACGGTAGG	54.30	151
SSR-03	gi1871506591	(TCC)4	ACGCTCTTGATGACGC GGAGGATACGGAGTGGA	54.10	156
SSR-04 ¹⁾	gi187150656	(CCG)3	CCCTCCACCGCTCGCCTCTGACTG CGGTGGCGGGCTGTGTAGATGGAGG	62.80	139
SSR-05 ¹⁾	gi187150640	(CGC)3	CCATCTACTCCGAACGC ATGAGCCACCAGAAACCT	54.60	115
SSR-06 ¹⁾	gi187150577	(CTC)4	GCACCCGTGTTCCAGC CGGAGGCGTTCTTGCTG	56.90	151
SSR-07 ¹⁾	gi1871505711	(TCC)3	CTCCAGGGAGGCGATGT AATTCGGCAGCAGGTT	53.60	152
SSR-08 ¹⁾	gi187150568	(TC)3	AACAGAGGAAACTGGTGCCG ACGCCTTGCTCAAACAACC	53.40	190
SSR-09 ¹⁾	gi187150554	(TC)3	ACAGACTACAGATATGCCACCAAGA TCCTTCTGGATTTCATTCAGCTGTC	51.80	194
SSR-10 ¹⁾	gi187150460	(GAG)6	AGATCATGAACCCCTTCGGTCATCA	60.10	195

续表 2

引物名称	检索编号	重复单元	引物序列(5'-3')	退火温度/℃	预期片段长度/bp
SSR-11	gi187150458	(ATG)3	GAGGTGTGGACCGTATCCATGTCC AAACAATTGATGATGATCACCCA GATAGTCTGCTGTCTGAACAACGAG	53.00	170
SSR-12 ¹⁾	gi187150455	(CCA)4	GACTCGTCGCCATAACGAGGAGGA CAAGGACGAGAGGGTGCAGAAAGTT	60.70	195
SSR-13 ¹⁾	gi187150438	(GAA)3	TTGCCGGTTCTCGGATTG GCTCTAGGACTCAAAGAAGGAGGTC	53.60	239
SSR-14 ¹⁾	gi187142430	(CCT)4	TCCCGTCTCTTCTCC CCTAAATCCATGTCTCTCGTA	57.10	217
SSR-15 ¹⁾	gi187150428	(GTT)3	AATCGGATATGCTCCATAGTTAGCG TGAAGAGTCAACATCAACCAAAAAA	53.40	160
SSR-16 ¹⁾	gi187150423	(GGA)3	TCGGAATCTCGTGAGCATTGAAG CGTAAACCCTTGCTTTTGCTTCTCG	56.40	160
SSR-17 ¹⁾	gi187150406	(TCG)4	GAAAGCGGCTCCATCT GGAAGTGTGGCAGGAGAT	54.50	186
SSR-18 ¹⁾	gi187150406	(AGA)5	GGGGAAGATAAGACCAACA CAGCCTCTGCTGGATGA	51.20	150
SSR-19 ¹⁾	gi187146101	(GGC)4	GTAGAACCTCGGCGTCAG AGTGAAGTCTTCCACCC	55.40	187
SSR-20 ¹⁾	gi187150004	(GGCATC)5	GCACAGTCGAAGGTGAGCAGGGCAT ACCTCTGATAGGGCGGCAGTTCGAG	62.10	187
SSR-21 ¹⁾	gi187150004	(GGCATC)5	GCACAGTCGAAGGTGAGCAGGGCAT GGAAGAGAGAGCGGTGCAAAAAGT	60.30	134
SSR-22 ¹⁾	gi187149446	(GAGGAG)5	GTCGCCGGTTCGTCCAGTAGTGAGG CGACACCAACCCTTCTTCGGCTTC	60.70	170
SSR-23 ¹⁾	gi187149588	(AC)5	TACCTTTTCTATTACCAGATTCTTC ATGGACCAAGTGTTTCTG	51.50	178
SSR-24 ¹⁾	gi187149611	(TCC)7	CTCCGTTGCCACATCC GGGTCGGCGTTGATAT	58.00	192

注:¹⁾具有扩增产物。

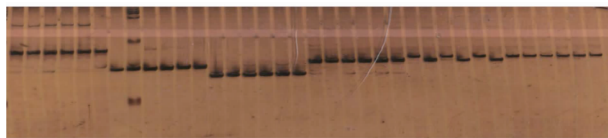


图 1 桂郁金材料对不同引物(6对)进行 PCR 扩增条带
Fig. 1 PCR amplification bands from *Curcuma kwangsiensis* materials on different primers(6 pairs)

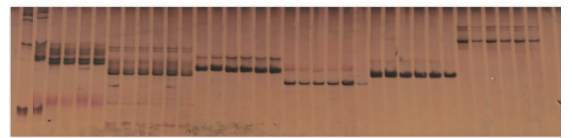


图 2 桂郁金材料对设计合成的引物(部分)PCR 扩增条带
Fig. 2 PCR amplification bands from *Curcuma kwangsiensis* materials on designed synthesis primers(part)

3.3 多态性引物筛选 利用不同材料以检验引物的多态性,21 对具有扩增产物的引物中有 61.90%,即 13 对,表现出多态性。多态性引物的序列见表 3 所示。图 2 为引物(部分)PCR 的扩增结果。

3.4 遗传多样性分析 如图 3 所示,进行 20 个品

种桂郁金的聚类分析,目的是评估开发得到的 EST-SSR 引物的适用性。由聚类分析图可知,20 个桂郁金品种被这些引物完全区分开,遗传相似系数的范围是 0.59 ~ 0.93。其中,“20-22-D13-4”与“21-24-D14-6”桂郁金品种的相似系数最高,为 0.93,这与

表 3 6 份桂郁金材料中产生多态性的 13 对引物信息

Table 3 Information of 13 primer pairs with polymorphism produced in 6 *Curcuma kwangsiensis* materials

引物名称	检索编号	重复单元	引物序列(5'-3')	退火温度 / °C	预期片段长度 /bp	扩增条带数	多态性条带数	多态率 /%
SSR-02	gi1871506751	(GTT)3	AACGAAGTCGGTGGCG GGAGGTCAAGAACGGTAGG	54.30	151	5	4	80.00
SSR-04	gi187150656	(CCG)3	CCCTCCACCGCCTCGCCTCTGACTG CGGTGGCGGGCTGTGTAGATGGAGG	62.80	139	4	4	100.00
SSR-06	gi187150577	(CTC)4	GCACCCGTGTTTCCAGC CGGAGGCCGTTCTTGGTG	56.90	151	7	2	28.57
SSR-08	gi187150568	(TC)3	AACAGAGGAACTGGTGCCG ACGCCTTGCTCAAAACAACC	53.40	190	5	1	20.00
SSR-09	gi187150554	(TC)3	ACAGACTACAGATATGCCACCAAGA TCCTTCTGGATTTCATTCAGCTGTC	51.80	194	4	2	50.00
SSR-14	gi187142430	(CCT)4	TCCCGTCCTCCTTCTCC CCTAAATCCATGTCTCTCGTA	57.10	217	6	3	50.00
SSR-15	gi187150428	(GTT)3	AATCGGATATGCTCCATAGTTAGCG TGAAGAGTCAACATCAACCAAAAAA	53.40	160	5	4	80.00
SSR-18	gi187150406	(AGA)5	GGGGAAGATAAGACCAACA CAGCGTCTGGTGGATGA	51.20	150	5	2	40.00
SSR-19	gi1871461011	(GGC)4	GTAGAACCCTCGGCGTCAG AGTGAAGTCCTTCCACCC	55.40	187	5	3	60.00
SSR-20	gi1871500041	(GGCATC)5	GCACAGTCGAAGGTGAGCAGGGCAT ACCTCTGATAGGGCGGCAGGTCGAG	62.10	187	4	3	75.00
SSR-21	gi1871500041	(GGCATC)5	GCACAGTCGAAGGTGAGCAGGGCAT GGAAGAGAGAGCGGTTGAAAAGGT	60.30	134	6	3	50.00
SSR-22	gi187149446	(GAGGAG)5	GTCGCCGGTTCGTGAGTACTGAGG CGACACCAACCCTTCTTCGGCTTC	60.70	170	4	4	100.00
SSR-24	gi187149611	(TCC)7	CTCCGTTGCCACATCC GGGTCGGCGTTGATAT	58.00	192	4	3	75.00

注:多态率 = 多态性条带数/扩增条带数。

“20-22-D13-4”是“21-24-D14-6”亲本之一的实际情况有关。当相似系数是 0.68 时,可以将 20 个桂郁金品种分为 6 组。第 1 组包含“28-30-D1-1”,“27-29-A28-1”和“18-20-药用 1”3 个品种;第 2 组包含“24-26-D5-1”,“21-23-C39-1”,“29-31-D2-2”,“37-39-A12-6”和“34-36-C78-4”5 个品种;第 3 组包含“20-22-D13-4”和“21-24-D14-6”;第 4 组只包含“31-33-B22-2”1 个品种;第 5 组包含“7-195-C49”,“10-243-1314”,“13-209-玉 15”,“14-261-B35”,“4-159-玉 3/B3”,“12-192-玉 21”,“11-227-B89”和“6-194-玉 91”8 个品种;第 6 组包括“15-239-C23”1 个品种。由此可见,本研究得到的 EST-SSR 引物在桂郁金遗传多样性评价等方面具有良好的适用性。

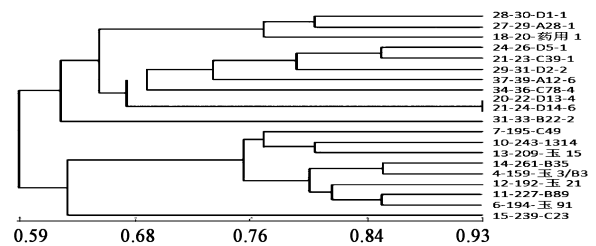


图 3 20 个桂郁金品种的聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of 20 varieties of *Curcuma kwangsiensis*

4 讨论

该研究共检索到了分布在 926 条 EST 序列中的 1 224 个 SSR 位点,出现的频率为 50.43%。所占 SSR 比例最大的是二核苷酸重复类型,占总 SSR 的

50.90%, 次之为三核苷酸重复类型, 占总 SSR 的 31.70%, 四核苷酸重复类型占总 SSR 的 10.21%, 六核苷酸重复类型占总 SSR 的 6.54%, 占总 SSR 比例最少的是五核苷酸重复类型, 为 0.65%。

据查相关资料, 二核苷酸重复类型和三核苷酸重复类型是大多数植物 EST-SSR 的主导类型, 经研究桂郁金 EST-SSR, 同样, 二三核苷酸重复为主要的重复类型, 二者共占了全部 SSR 的 82.60%。在二核苷酸重复类型中, AT/TA 和 GA/CT 所占比例较大, 在玉米、水稻等植物体, GA/CT 含量也较多。GC 重复基元在多数植物中很难见到, 桂郁金 EST-SSR 二核苷酸中也未发现 GC。在桂郁金三核苷酸重复单元中, CCG/GCC (2.05%), CTT/GAA (1.83%), CGG/GCC (1.59%), AAT/TTA (1.57%), TTC/AAG (1.41%), CCA/GGT (1.19%) 以较高频率出现。在桂郁金四核苷酸重复单元中, TATA/ATAT 基序出现频率最高 (1.67%), 其次为 GAGA/CTCT (1.19%) 和 CTCT/GAGA (1.08%)。在桂郁金六核苷酸重复单元中, TATATA 基序出现频率较高 (1.01%)。

该研究的 EST-SSR 引物开发, 是基于 926 条 SSR 序列所开展的。桂郁金基因组 DNA 模板被用来筛选可扩增的引物, 24 对 EST-SSR 引物中有 21 对, 即 87.50% 可有效扩增。可能导致引物无法扩增的原因是: 首先, 进行引物开发的序列来源于 NCBI 数据库, 虽然省时省力, 减少了亲自测序等前期工作, 但序列的准确性无法保证。其次, 两条引物可能被 DNA 中的内含子分离, 导致扩增失败。再者, 设计的引物可能刚好处于内含子或外显子的剪切点。最后, 可能由于某些原因, 桂郁金和姜黄属的 EST 序列并不完全一致, 导致无法扩增。

本研究表明, 可以通过姜黄属 EST 序列来开发桂郁金 EST-SSR 引物。开发的 13 对引物可以被用来进行桂郁金品种鉴定, 遗传多样性分析和种质资

源筛选等研究。

[参考文献]

- [1] Morgante M, Hanafey M, Powell W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes [J]. *Nat Genet*, 2002, 30:194-200.
- [2] 魏利斌, 张海洋, 郑永战, 等. 芝麻 EST-SSR 标记的开发和初步研究 [J]. *作物学报*, 2008, 34 (12): 2077-2084.
- [3] 鄢秀芹, 鲁敏, 安华明. 刺梨转录组 SSR 信息分析及其标记开发 [J]. *园艺学报*, 2015, 42 (2): 341-349.
- [4] 蒋超, 袁媛, 刘贵明, 等. 基于 EST-SSR 的金银花分子鉴别方法研究 [J]. *药学学报*, 2012, 47 (6): 803-810.
- [5] 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 [J]. *西北植物学报*, 2015, 35 (3): 480-485.
- [6] 冯法节, 李明杰, 古力, 等. 地黄 EST-SSR 标记的开发及扩增体系的建立 [J]. *广东农业科学*, 2015 (10): 120-126.
- [7] 邓科君, 张勇, 熊丙全, 等. 药用植物丹参 EST-SSR 标记的开发 [J]. *药学学报*, 2009, 44 (10): 1165-1172.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 208.
- [9] 王晓华, 朱华, 梁臣燕. 桂郁金药材的高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. *时珍国医国药*, 2014, 25 (7): 1614-1616.
- [10] 葛跃伟, 高慧敏, 王维皓, 等. 桂郁金化学成分研究 I [J]. *中国药学杂志*, 2007, 42 (11): 822-824.
- [11] 王艳, 张朝凤, 张勉. 桂郁金化学成分研究 [J]. *药学与临床研究*, 2010, 18 (3): 274-275, 278.
- [12] 杨妮, 戴昱, 王建. 不同种质广西莪术植物形态、药材性状及挥发油产量的聚类分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21 (2): 12-15.
- [13] 杨妮, 苏伟敏, 靳雅惠, 等. 适用于 SSR 分析的广西莪术 DNA 提取方法考察 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21 (4): 80-83.

[责任编辑 邹晓翠]