



天麻基因组微卫星特征分析与分子标记开发

周天华, 丁家玺, 田 伟, 王 家

(陕西理工大学 生物科学与工程学院, 陕西汉中 723001)

摘 要: 该研究基于第二代测序技术建立了天麻的基因文库, 筛选微卫星序列, 并对微卫星位点的类型、丰度、长度、偏好性等进行了分析与比较; 并为 60 条重复次数高的微卫星序列设计了引物, 运用 4 个种群 80 个样本进行了 PCR 扩增和聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。结果表明: (1) 天麻基因组测序得到 61 048 条基因序列, 检测出微卫星位点 12 107 个, 其中二核苷酸重复最多、长度变异大。(2) 设计的 60 对微卫星引物中的 20 对能扩增出清晰条带且有多态性, 每个位点的复等位基因数(N_a) 在 4~14 之间, 平均为 8.40; 多态性信息含量(PIC) 平均为 0.77。该研究开发的天麻微卫星分子标记为开展天麻遗传学研究及种质资源鉴定等工作奠定了基础。

关键词: 天麻; 微卫星; 分子标记开发

中图分类号: Q346⁺.5; Q789

文献标志码: A

Genomic Microsatellite Characteristic Analysis and Molecular Marker Development for *Gastrodia elata* Bl.

ZHOU Tianhua, DING Jiayi, TIAN Wei, WANG Jia

(College of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723001, China)

Abstract: In this study, the genomic library of *G. elata* was set up by means of the second generation of DNA sequencing, and the microsatellite loci in genomic sequences was screened. The types, abundance, length and preference of microsatellite locus were analyzed and compared. Primer pairs for 60 microsatellite loci with high repetition were designed, PCR and polyacrylamide gels electrophoresis were carried out on 80 individuals sampled from 4 populations in order to test the polymorphism of the markers. (1) 61 048 sequences of *G. elata* were gotten in the genomic sequencing, 12 107 microsatellite loci were detected out, occupying 8.16% of total sequences. (2) Among these SSR loci, the repetition of dinucleotide was the highest. 20 loci among those 60 were detected amplifiable, stable, and polymorphism after PCR and electrophoresis; the number of polymorphic alleles of each locus (N_a) ranged from 4 to 14 with the average of 8.40, while the average of polymorphism information content (PIC) was 0.77. The microsatellite markers developed for *G. elata* in this study can make good basement for its genetic study, germplasm identification.

Key words: *Gastrodia elata* Bl; microsatellite locus; molecular marker development

天麻(*Gastrodia elata* Bl.) 属兰科(*Orchidaceae*) 天麻亚族天麻属(*Gastrodia* R. Br.) 多年生草本植物, 又名赤箭、独摇芝、离母、定风草、白龙皮等^[1],

是中国珍稀植物。天麻块茎可入药, 为中药天麻^[2]。天麻属下共有 13 个种。而药用植物天麻种下又可分为 5 个变种, 分别是红天麻(*G. elata* Bl. f.

elata)、绿天麻(*G. elata* Bl. f. *viridis* Mak)、乌天麻(*G. elata* Bl. f. *glauca* S. Chow)、黄天麻(*G. elata* Bl. f. *flavida* S. Chow)与松天麻(*G. elata* Bl. f. *alba* S. Chow)^[1]。天麻性甘、平,归肝经,其药用活性成分天麻素,具有息风止痉、平抑肝阳、祛风通络等功能,可用于小儿惊风,头痛眩晕,肢体麻木等症状^[2]。近年来,天麻不仅入药治病,还被开发成各种食品和保健品,市场需求量极大。伴随着天麻产业的快速发展,野生天麻过度采挖,导致野生天麻资源逐渐枯竭。此外,由于天麻的不同变种、不同产地在药用成分上有着一定的差异^[3-4],使得市面上天麻品质差异巨大、良莠不齐,给天麻的良种选育和临床用药安全带来了极大的困难。然而,天麻的不同变种、不同产地样本之间在块茎形态上几乎没有差异,应用传统的形态鉴定方法很难将它们有效区分开来,亟需应用现代分子生物学技术对天麻各个变种和不同种质进行区分和鉴定。

微卫星 DNA(microsatellite DNA)也称为简单重复序列(simple sequence repeats, SSRs),是由 1~6 bp 的重复单元串联而成一段 DNA,并且广泛地分布于核基因组与叶绿体基因中^[5]。随着分子生物学的快速发展,SSR 技术已经普遍运用于植物遗传学研究,揭示植物个体间或居群间的遗传变异或评估种间的遗传关系。与其它分子标记技术相比,由于微卫星位点上碱基数目可变且呈高度多态性,可以做共显性等位基因分析,因此被广泛应用于药用植物的遗传背景分析、种质资源鉴定和混伪品鉴定^[6-9]。

当前国内外对于天麻种质资源的研究局限于药用活性成分及药理学方面,在分子生物学方面尚未深入开展,天麻的 SSR 分子标记也未被开发,使得天麻的种质资源鉴定工作难度较大。本研究基于二代测序技术建立了天麻的基因组文库,对天麻的微卫星片段进行了分析并开发出了天麻 SSR 分子标记,该分子标记技术可为后期的天麻种质资源鉴定

工作提供有力工具。

1 材料和方法

1.1 材 料

本研究所用实验材料(表 1)采自陕西省镇巴县(ZB)、勉县(MX)、岚皋县(LG)和略阳县(LY)。将采集到的栽培天麻块茎装入塑封袋,带回实验室后清洗,切片并储存于-80℃超低温冰箱中保存备用。所有样品的标本凭证保存于陕西理工大学生物科学与工程学院植物分子生物学实验室。

1.2 方 法

1.2.1 天麻 DNA 提取 采用改良 2×CTAB 法提取天麻 4 个栽培居群 80 个个体的基因组 DNA,溶解在 100 μL 0.1%TE 缓冲液中,0℃保存备用。应用紫外分光光度计(NanoDrop 2000)检测其纯度,记录 DNA 浓度和 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值。各取 10 μL 基因组 DNA 用浓度为 1%琼脂糖凝胶检测其完整性,用凝胶成像仪拍照观察并记录结果。

1.2.2 天麻微卫星文库的建立与特征分析 提取天麻全基因组 DNA,构建天麻基因组文库,采取 Illumina 二代测序技术获取大量 100 bp 短序列片段。二代测序建库工作由北京 NOVOGENE 生物科技公司代理完成。

采用 CLC Genomics Workbench 软件^[10]进行片段组装,设置过滤参数:片段长度大于 200 bp,序列平均覆盖率为 5 倍,初步筛选出适合微卫星位点开发的潜在序列集合。基于筛选出的序列,导出一致性序列,以 fasta 格式保存成单一文件。利用 SSR 序列查找软件 MISA (Micro-Satellite identification tool, MISA, <http://pgsc. ipk-gatersleben. de/misa/>)对这些序列进行 SSR 区段筛选。查找标准为:单核苷酸至少为 10 次重复,二核苷酸至少 6 次重复,三核苷与四核苷酸至少 5 次重复,五核苷酸与六核苷酸至少 4 次重复,混合微卫星中 2 个 SSR 距离小于 150 bp。通过软件统计得到微卫星片段总数

表 1 天麻采样基本数据

Table 1 Detailed sample information of *G. elata* Bl.

种群 Population	采样地 Sample location	经纬度 Longitude and latitude	海拔 Altitude/m	样本数 Sample size
LG	陕西岚皋 Langao, Shaanxi	108°01′ E, 31°42′ N	170~2 964	20
ZB	陕西镇巴 Zhenba, Shaanxi	109°26′ E, 32°06′ N	806~1 197	20
MX	陕西勉县 Mianxian, Shaanxi	106°21′ E, 32°53′ N	513~2 621	20
LY	陕西略阳 Lueyan, Shaanxi	106°16′ E, 33°32′ N	680~1 300	20

以及各个重复类型的数量,利用 Excel 2016 对所得数据进行统计分析。

1.2.3 天麻 SSR 引物开发和 PCR 扩增与聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 采用 Batchprimer3 (<https://wheat.pw.usda.gov/demos/BatchPrimer3/>) 对重复次数较高的 100 条天麻微卫星序列设计引物对。采用 Oligo 7^[11] 软件对这 100 条引物进行评估,选取综合评分在 95 分以上的 60 对引物送往北京奥科鼎盛生物科技有限公司进行引物合成。

利用上述 60 对引物对 4 个种群 80 份样本进行 PCR 扩增。PCR 总反应体系为 20 μ L,包括 DNA 模板 50 ng,2 $\times$ Mix(天根生物科技)10 μ L,正反引物各 50 ng,加 ddH₂O 至 20 μ L。PCR 反应在 PCR 扩增仪(Bio-Rad S1000TM)上按以下程序运行:首先 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,退火温度下 45 s,72 $^{\circ}$ C 下延伸 45 s,35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

完成 PCR 循环 48 h 内,取 2 μ L PCR 产物在 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶上恒电压 160 V 电泳 14 h。用 NaOH 银染方法进行染色显影。显影完成之后,用凝胶成像系统(GEL DOCTM XR+)采集图像并进行数据统计分析。

1.2.4 数据统计与软件分析 使用 Excel 2016 和 Bio-Rad Quantity 软件对电泳图进行条带统计,采用人工读带的方式记录主要带型,忽略弱杂带。应用 Powermarker 3.25^[12] 软件,计算各引物的等位基因数目(N_a)、期望杂合度(H_e)、观测杂合度(H_o)和多态性信息含量(PIC)等。

2 结果与分析

2.1 天麻基因组序列的微卫星组成与相关特征

用 2 $\times$ CTAB 法提取到的天麻块茎 DNA 效果

良好,其浓度在 30~460 ng/ μ L 之间, A_{260}/A_{280} 比值在 1.6~1.9 之间。琼脂糖凝胶电泳结果表明,提取到长度大于 20 000 bp DNA。2 $\times$ CTAB 法提取到的天麻总 DNA 纯度高、完整度好,能用于后续的基因组测序和 PCR 扩增。

Illumina 测序共获得一致性序列 412 469 条,其中大于 200 bp 的配对序列有 61 048 条。利用 MISA 软件对这些序列进行查找,在其中 4 983 条序列中共发现微卫星片段 12 107 个,含有微卫星的片段占总序列数的 8.16%。所有微卫星片段中以二核苷酸重复居多(表 2),占总微卫星位点数的 78.88%,单核苷酸重复占 10.34%,其余不同重复类型分别占 8.13%(三核苷酸重复)、0.18%(四核苷酸重复)、0.35%(五核苷酸重复)和 1.49%(六核苷酸重复)。

表 3 显示,在单核苷酸重复类型中 A/T 重复数量最多,为单核苷酸中优势重复单元,共有 1 223 个(占 97.68%),占有绝对优势;二核苷酸中 AC/GT 共有 6 365,为二核苷酸优势重复单元(占 66.64%),AT/AT 共 3 114(32.60%),而 AG/CT 仅占 0.75%。在三核苷酸中 AAT/ATT 共有 834 个,含量最多(占 84.76%),AAG/CTT 共有 112 个(占 11.38%),其余类型较少;在四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸中,优势单元分别为 AATT/AATT(占 70.41%)、AAAGT/ACTTT(占 47.62%)和 AAATGT/ACATTT(占 77.22%)。总体而言,大多数天麻微卫星位点是以 A/T 为主要重复碱基,体现了一定的碱基偏好性(表 3)。

2.2 不同重复单元微卫星序列长度分布以及变异情况

由表 3 可以看出,天麻的微卫星序列长度范围较为广泛,为 10~120 bp。其中二核苷酸长度范围变

表 2 不同重复基元类型的 SSR 在天麻基因组中的出现频率
Table 2 Occurrence of different repeat motif SSRs in *G. elata* transcriptome

重复类型 Repeat type	数量 Number	所占比例 Percentage /%	出现频率 Frequency/%
单核苷酸重复 Mononucleotide	1 252	10.34	2.05
二核苷酸重复 Dinucleotide	9 551	78.88	15.65
三核苷酸重复 Trinucleotide	984	8.13	1.61
四核苷酸重复 Tetranucleotide	98	0.81	0.16
五核苷酸重复 Pentanucleotide	42	0.35	0.07
六核苷酸重复 Hexanucleotide	180	1.49	0.29
共计 Total	12 107	100.00	19.83

表 3 不同重复基元类型 SSR 数量以及长度比例

Table 3 Number, length and proportion of SSRs with different repeat motifs

重复类型 Repeat type	重复基元 Repeat motif	数量 Number	长度范围 Length range/bp	平均长度 Average length/bp	所占比例 Percentage/%
单核苷酸重复 Mononucleotide	A/T	1 223	10~75	27.29	6.36
	C/G	29	10~24	14.43	0.16
二核苷酸重复 Dinucleotide	AC/GT	6 365	12~92	39.41	46.25
	AG/CT	72	12~36	21.50	0.50
	AT/AT	3 114	12~120	50.75	33.10
三核苷酸重复 Trinucleotide	AAC/GTT	14	15~66	30.00	0.14
	AAG/CTT	112	15~81	37.93	1.04
	AAT/ATT	834	15~120	44.84	8.10
	ACC/GGT	2	15	15.00	0.01
	AGG/CCT	5	15	15.00	0.03
	ATC/ATG	16	15~51	25.80	0.14
	CCG/CGG	1	15	15.00	0.01
	AAAT/ATTT	21	20~48	34.29	0.24
四核苷酸重复 Tetranucleotide	AATT/AATT	69	20~32	26.00	0.69
	ACAT/ATGT	6	20~24	22.00	0.06
	ATCC/ATGG	1	20	20.00	0.01
	ATCG/ATCG	1	24	24.00	0.01
五核苷酸重复 Pentanucleotide	AAAAG/CTTTT	4	20~25	22.50	0.04
	AAAAT/ATTTT	4	20	20.00	0.04
	AAAGT/ACTTT	20	20~25	22.50	0.19
	AAATC/ATTTG	4	20~50	35.00	0.06
	AAATT/AATTT	4	20~25	22.50	0.04
	AACTG/AGTTC	3	20~25	22.50	0.03
	AATAT/ATATT	3	20	20.00	0.03
	AAAAAT/ATTTTT	1	24	24.00	0.01
六核苷酸重复 Hexanucleotide	AAATAT/ATATTT	11	24~36	30.00	0.14
	AAATGC/ATTTGC	14	24~36	30.00	0.17
	AAATGT/ACATTT	139	24~84	51.33	2.20
	AACCCT/AGGGTT	1	60	60.00	0.03
	AAGGCG/CCTTCG	1	24	24.00	0.01
	AATAGT/ACTATT	1	30	30.00	0.01
	AATATG/ATATTC	1	24	24.00	0.01
	AATATT/AATATT	2	24	24.00	0.02
	AGCATG/ATGCTC	8	24~30	27.00	0.10
	AGCCGC/CGGCTG	1	24	24.00	0.01

化最大(12~120 bp),其余重复类型的长度变化范围为单核苷酸重复 10~75 bp,三核苷酸重复 15~120 bp,四核苷酸重复 20~48 bp,五核苷酸重复 20~25 bp,六核苷酸重复 24~84 bp。在所有重复基元中,所占比例最高的是 AC/GT(46.25%),其次是 AT/AT(33.10%),可见在天麻微卫星位点中 A/T 为出现频率最高的碱基对。

对天麻不同长度重复单元的微卫星长度变异情况进行分析,二核苷酸重复的长度变异程度最高,共有 39 种不同的长度变化,而五核苷酸与六核苷酸重复的变异程度就较低,分别为 5 种和 10 种(图 1)。总体而言,在各重复类型中,重复长度与微卫星丰度呈负相关。

2.3 天麻基因组 SSR 引物设计与筛选

本研究为 60 个重复次数较高的天麻微卫星位点设计了引物对,以采集自 4 个种群的 80 个个体进行 PCR 扩增和聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。结果表明,有 42 对引物能扩增出清晰稳定的条带,其中有 20 对引物(位点)的扩增条带有多态性(图 2)。利用 Powermarker 软件统计了这 20 个位点的等位基因数(N_a)等多态性信息(表 4)。这 20 个多态性位点的等位基因数(N_a)变化范围为 4~14,平均为 8.40;观察杂合度(H_o)范围为 0.233 3~0.800 0,平均值为 0.609 2;期望杂合度(H_e)为 0.238 8~0.905 3,平均值为 0.787 1;多态性信息含量(PIC)范围为 0.218 6~0.888 8,平均为 0.77。

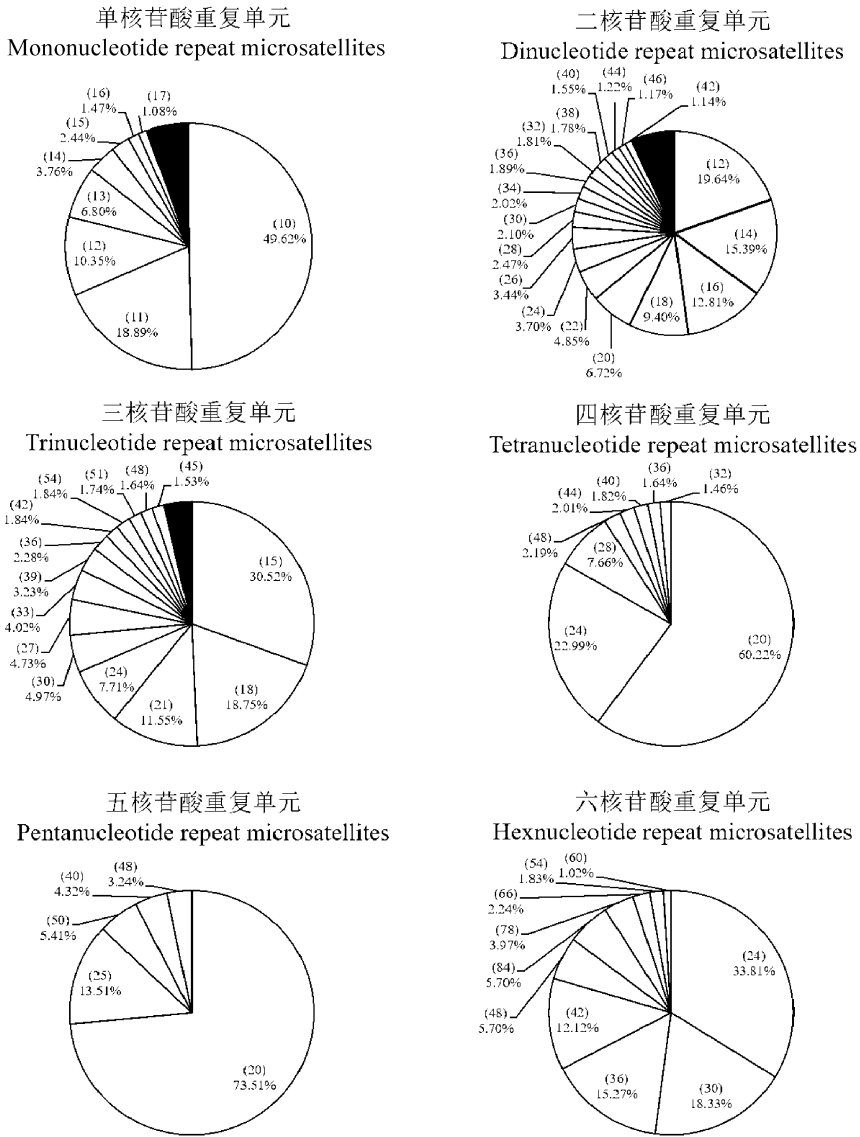
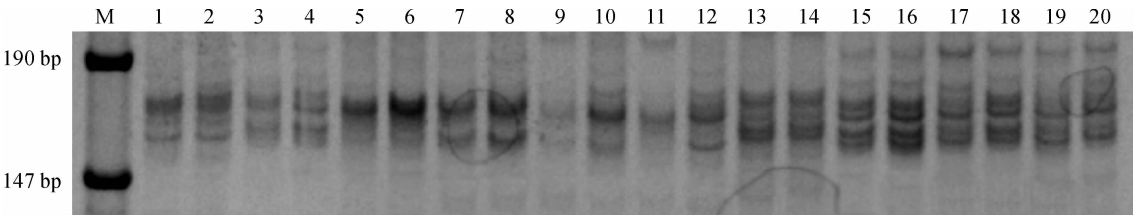


图 1 天麻基因组序列中含不同长度重复单元的微卫星长度变异情况

Microsatellites in different lengths are demonstrated in separate slices. If the corresponding percentage ≤ 0.01 (white slices), slices were combined for percentages (black slices)

Fig. 1 Length diversification of the microsatellites in genome sequences of *Gastrodia elata*



M. PUC-18 DNA marker;1~20. LY 居群的 20 个体

图 2 引物 GEBL07 对陕西略阳(LY)居群的扩增效果图

M. PUC-18 DNA marker; 1~20. 20 samples from population LY

Fig. 2 Amplification pattern of population LY using the primer pairs GEBL07

表 4 筛选的 SSR 引物的遗传分化参数

Table 4 The parameters of genetic differentiation among SSR primer pairs

SSR 位点 SSR locus	引物序列 Primer sequence(5'→3')		重复单元 Repeating unit	退火温度 Annealing temperature (T_A)/ $^{\circ}\text{C}$	预期长度 Expected range/bp	等位基因数 Number of alleles(N_a)	观测杂合度 Observed heterozygosity (H_o)	期望杂合度 Expected heterozygosity (H_e)	多态信息量 Polymorphism information content (PIC)
	正向 Forward	反向 Reverse							
GEBL02	TATGAGTGTGTGTGTGTC	TGTGTGGTATGTGTGTGTTGG	(TA)14	57.58	194	4	0.60	0.63	0.56
GEBL03	TCTGTTGTTGTGTTGTGC	CACCCATACATACACTCATTTACACC	(AT)13	63.15	161	7	0.75	0.83	0.81
GEBL05	ACACACGCACACACATACC	GACACACACACACACTCACACC	(AT)6+(TG)6	60.22	207	10	0.55	0.82	0.80
GEBL07	CGATTGTGCTTTAGGTGTGG	GTTTGTGGTTGTGTGTGTTGG	(GT)6+(TA)9	58.98	160	8	0.80	0.87	0.85
GEBL12	GAGTGATGTGTGGTGTGTTGG	GTATGTGTGCATGTGTGTTGG	(AC)12+(AT)7+(AC)6	59.26	249	8	0.70	0.74	0.70
GEBL13	TATGTGTGTGTGTCTGTATGC	TGTGTGTGTGTGTCTGTTGG	(AC)7+(CA)+(AT)14	58.06	136	7	0.70	0.79	0.76
GEBL14	GGGAGGAGAGGAAGTGG	GAGATAAGAATGAGGAAGAAAGC	(ATTA)6	59.27	203	11	0.76	0.84	0.83
GEBL16	ATGAGTGTGTGTGTTTGG	GTGTGTGTGTGTGGTATGG	(CA)10+(TA)6+(TA)6	56.63	210	8	0.56	0.85	0.83
GEBL20	GTGTGTGTGCTTTGTGTTGG	GTGTGCTTGTGTGTGTACG	(AC)6+(GT)7	58.36	236	14	0.68	0.90	0.89
GEBL23	TGTGTATGTGTGTTGTGTGG	TGTGTGTGTGTGAGTATGTATGC	(GT)14	56.64	215	11	0.78	0.81	0.78
GEBL27	AAACACACACACACATACG	CAACACACACACACAAAACCC	(CAA)7	56.81	162	8	0.61	0.84	0.82
GEBL28	GTGTGTGTGTGCTGTG	TGGTGTGTGTATGTGTGCT	(CA)9+(TA)6	58.15	193	9	0.43	0.82	0.80
GEBL31	GGCACACACACATAGAGATTAG	GCACACCCCAAGACACATAG	(TG)6+(TG)7	58.90	212	10	0.50	0.78	0.75
GEBL33	GGCTCACACACACATACAG	CACACACACACACACACAC	(TG)8+(GT)11	57.66	145	8	0.63	0.80	0.78
GEBL35	GTTTGTGTGTGTGTGTG	CACATGTCTGTTGTGTGTTGG	(AT)19+(TG)8	59.30	134	9	0.55	0.82	0.79
GEBL36	ACACAACACACACACACACC	TACCAACACACACACACAAG	(AT)18	57.82	154	4	0.23	0.23	0.22
GEBL38	TATGAGTGTGCTGTTGTGTG	GTGCTTGTGTGTGTGTCCTC	(TA)11+(TA)9	58.46	147	9	0.56	0.83	0.80
GEBL46	CGCACACACATAGAGATTAG	CACACACACACACACATAGAG	(GT)17	56.82	215	7	0.63	0.83	0.63
GEBL49	CGCACACATACACAAACTC	CACAAACACACAAACACAC	(AC)13	58.05	212	8	0.58	0.74	0.71
GEBL52	AGACACACACACACACAC	CACACACACACACACATAC	(AC)22	58.09	175	8	0.53	0.85	0.83
平均 Mean						8	0.60	0.78	0.77

3 讨论

本研究从天麻 61 048 条基因组序列中共筛选出微卫星位点 12 017 个。总体来看,含有微卫星位点的序列总数占总序列数的 8.16%,与茯苓(4.57%)、短丝木樨(4.64%)、芒果(6.76%)等植物^[13-15]相比微卫星含量丰富,但与枇杷(6.77%)、油棕(22.6%)等植物^[16-17]相比含量就较低。从重复种类来看,天麻从一到六种核苷酸重复基元均有存在,其中二核苷酸重复检出频率最高(占总数的 78.88%),其次为单核苷酸(10.34%)。有研究报道,不同的植物存在着不同的优势基元,而以二核苷酸为优势重复单元的现象在被子植物中最为普遍。例如,芝麻^[18]、咖啡^[19]、猕猴桃^[20]等大多数植物都以二核苷酸重复为主。一般而言,重复次数较低的重单元大量存在表明其具有较高的进化水平^[21],而天麻单核苷酸与二核苷酸数量的总和占有微卫星位点的 89.22%,这暗示着天麻起源较晚并具有较高的变异水平。

分析天麻各个类型的微卫星组成发现,A/T 出现的频率显著高于 C/G。单核苷酸重复类型中以 A/T 为主;二核苷酸中以 AC/GT 所占比例最高,三核苷酸中以 AAT/ATT 为主,反映了天麻的碱基偏好性。不同物种碱基偏好性不同,例如巧家五针松^[22]、枣^[23]、拟南芥^[24]等植物都以 A/T 为主要重复单元,而小麦^[25]、杨梅^[26]等植物中则以 C/G 为主

要重复类型。从某种程度来讲,碱基的偏好性反映了密码子的使用情况,导致了肽链中氨基酸种类的不同,使得不同植物具有不同的生理功能^[22]。

有研究发现,微卫星位点长度的变异是影响 SSR 多态性的重要因素,而 SSR 长度大于 20 bp 以上可显示出较高的多态性,而大多数人认为导致这种长度变异的原因是由于在微卫星序列复制的过程中 DNA 聚合酶的滑动以及酶对被滑动链的错误修复^[27]。天麻微卫星位点的长度变异长度分布范围为 10~120 bp,长度大于 20 bp 占 26.6%并且绝大多数为低级重复单元,多态性潜能较高。

通过对天麻 4 个栽培居群的聚丙烯酰胺凝胶电泳实验,筛选出了 20 对稳定性高、多态性好的微卫星引物。20 对引物共获得等位基因 168 个,平均每个位点有等位基因 8.4 个,表明经开发筛选后的引物有着较高的多态性,多态性信息含量(PIC)平均为 0.755 9,说明本研究开发的微卫星引物用于天麻遗传学研究的有效性。因此最终筛选出的 20 对引物能较好地利用于后期与天麻相关的遗传学研究之中,为将来地研究工作提供了重要工具与方法支撑。

总体来说,本研究对天麻基因组序列中的微卫星特征进行分析,发现天麻微卫星片段含量丰富,长度多态性较高,其研究结果为后期进行天麻遗传多样性分析,种质资源鉴定等工作提供了重要的遗传学信息。

参考文献:

[1] 陈心启, 吉占和, 郎楷永, 等. 中国植物志 第十八卷[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 29-33.

[2] 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: 58-59.

[3] 李德勋, 陈桂, 李辅碧, 等. 天麻不同变异类型药材中天麻素含量比较[J]. 现代中药研究与实践, 2007, 22(3): 23-24.

LI D X, CHEN G, LI F B, et al. Comparison of *Gastrodia* from different variation types of *Gastrodia elata* [J]. *Research and Practice on Chinese Medicines*, 2007, 22(3): 23-24.

[4] 刘旭燕, 张公信, 田孟华, 等. 不同等级昭通乌天麻与其他产地天麻的天麻素含量测定及比较[J]. 中国现代中药, 2015, 17(1): 35-38.

LIU X Y, ZHANG G X, TIAN M H, et al. Determination of *Gastrodine* in *Rhizoma Gastrodiae* of different grades and origins[J]. *Modern Chinese Medicine*, 2015, 17(1): 35-38.

[5] GUICHOUX E, LAGACHE L, WAGNER S, et al. Current trends in microsatellite genotyping[J]. *Molecular Ecology Re-*

sources, 2011, 11(4): 591-611.

[6] KAUR K, SHARMA V, SINGH V, et al. Development of novel SSR markers for evaluation of genetic diversity and population structure in *Tribulus terrestris* L. (Zygophyllaceae) [J]. *Biotech*, 2016, 6(2): 156.

[7] ZHAO B, DU Y Q, LI J J, et al. Development of 18 novel microsatellite primers for *Begonia fimbripila* (Begoniaceae), an endangered medicinal plant in China[J]. *Applications in Plant Sciences*, 2016, 4(7): 1600004.

[8] TIAN H Z, GUI F Z, ZENG Q Q, et al. Characterization of EST-derived microsatellite loci in *Saruma henryi* Oliv., an endangered Chinese endemic herb [J]. *Conservation Genet Resource*, 2009, 1: 67-70.

[9] 周天华. 中国特有属植物-马蹄香(*Saruma henryi* Oliv.)的分子谱系地理学与遗传多样性研究[D]. 西安: 西北大学, 2010.

[10] 朱大强, 李存, 陈斌, 等. 四种常用高通量测序拼接软件的应用比较[J]. 生物信息学, 2011, 9(2): 106-110.

- ZHU D Q, LI C, CHEN B, *et al.* Comparison of the widely used high-throughput sequencing assembly software[J]. *China Journal of Bioinformatics*, 2011, **9**(2): 106-110.
- [11] 张新宇, 高燕宁. PCR 引物设计及软件使用技巧[J]. 生物信息学, 2004, **2**(4): 15-18.
ZHANG X Y,GAO Y N. To design PCR primers with Oligo 6 and Primer Premier 5[J]. *China Journal of Bioinformatics*, 2004, **2**(4): 15-18.
- [12] LIU K, MUSE SV. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis[J]. *Bioinformatics*, 2005,**21**(9):2 128-2 129.
- [13] 何 海, 郭继云, 马毅平, 等. 茯苓转录组 SSR 序列特征分析及其基因功能分析[J]. 中草药, 2015, **46**(23): 3 558-3 563.
HE H, GUO J Y, MA Y P, *et al.* Characterization and gene function analysis of SSR sequences in *poria cocos* transcriptome[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2015, **46**(23): 3 558-3 563.
- [14] 陈 林, 李龙娜, 杨国栋, 等. 特有植物短丝木犀(*Osmanthus serrulatus*)转录组微卫星特征分析[J]. 分子植物育种, 2016, **14**(4): 959-965.
CHEN L, LI L N, YANG G D, *et al.* Microsatellites Characteristics of transcriptomic sequences from *Osmanthus serrulatus*[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2016, **14**(4): 959-965.
- [15] 罗 纯, 武红霞, 姚全胜, 等. 芒果转录组中 SSR 位点信息分析与引物筛选[J]. 热带作物学报, 2015, **36**(7): 1 261-1 266.
LUO C, WU H X, YAO Q S, *et al.* Data mining and primer screening of simple sequence repeats in Mango transcriptome [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2015, **36**(7): 1 261-1 266.
- [16] 郑婷婷, 魏伟淋, 杨向晖, 等. 基于枇杷转录组序列的 SSR 分子标记引物开发[J]. 亚热带植物科学, 2015, **44**(4): 274-278.
ZHENG T T, WEI W L, YANG X H, *et al.* Development of SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of *Eriobotrya japonica* [J]. *Subtropical Plant Science*, 2015, **44**(4): 274-278.
- [17] 周丽霞, 肖 勇, 杨耀东. 油棕转录组 SSR 标记开发研究[J]. 广东农业科学, 2014, **41**(14): 136-138.
ZHOU L X, XIAO Y, YANG Y D. Development of SSR markers in oil palm (*Elaeis guineensis*) based on information from transcriptome sequencing[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2014, **41**(14): 136-138.
- [18] WEI W, QI X, WANG L, *et al.* Characterization of the sesame (*Sesamum indicum* L.) global transcriptome using Illumina paired-end sequencing and development of EST-SSR markers[J]. *BMC Genomics*, 2011, **12**: 451.
- [19] AGGARWAL R K, HENDRE P S, VARSHNEY R K, *et al.* Identification, characterization and utilization of EST-derived genic microsatellite markers for genome analyses of coffee and related species[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, **114**(2): 359-372.
- [20] FRASER L G, HARVEY C F, CROWHURST R N, *et al.* EST-derived microsatellites from *actinidia* species and their potential for mapping[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, **108**(6): 1 010-1 016.
- [21] TÓTH G, GÁSPÁRI Z, JURKA J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis[J]. *Genome Research*, 2000, **10**(7): 967-981.
- [22] 阮桢媛, 王兵益, 欧阳志勤, 等. 极度濒危植物巧家五针松基因组微卫星特征分析[J]. 植物研究, 2016, **36**(5): 775-781.
RUAN Z Y, WANG B Y, OUYANG Z Q, *et al.* Characterization of microsatellites in genome of *Pinus squamata*, a critically endangered species in the world[J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2016, **36**(5): 775-781.
- [23] 魏琦琦, 林 青, 贾宝光, 等. 枣转录组序列的微卫星特征分析[J]. 中南林业科技大学学报, 2015, **35**(6): 93-97.
WEI Q Q, LIN Q, JIA B G, *et al.* Microsatellites characteristics of transcriptomic sequences from *Ziziphus jujuba* cv. ‘Zhongqiusucui’[J]. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 2015, **35**(6): 93-97.
- [24] LAWSON M J, ZHANG L Q. Distinct patterns of SSR distribution in the *Arabidopsis thaliana* and rice genomes[J]. *Genome Biology*, 2006, **7**(2): R14.
- [25] SONG Q J, SHI J R, SINGH S, *et al.* Development and mapping of microsatellite(SSR) markers in wheat[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, **110**(3): 550-560.
- [26] JIAO Y, JIA H M, LI X W, *et al.* Development of simple sequence repeat(SSR) markers from a genome survey of Chinese bayberry (*Myrica rubra*) [J]. *BMC Genomics*, 2012, **13**: 201.
- [27] LEVINSON G, GUTMAN G A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, **4**(3): 203-221.

(编辑:宋亚珍)