



# 基于转录组数据的密花香薷 SSR 位点特征分析

富 贵<sup>1</sup>, 刘玉萍<sup>2,3</sup>, 苏 旭<sup>2,3\*</sup>

(1 青海民族大学 生态环境与资源学院, 青海省特色经济高值化利用重点实验室, 西宁 810007; 2 青海师范大学 生命科学院, 西宁 810008; 3 高原科学与可持续发展研究院, 西宁 810016)

**摘 要:** 利用 MISA 软件对密花香薷转录组 42 362 条 Unigene 进行 SSR 位点搜索, 并对其 SSR 序列结构及分布特征进行了分析。结果表明: (1) 密花香薷转录组 Unigene 序列中共检测到 17 564 个 SSR 重复序列, 分布于 11 903 条 Unigene 上, 出现频率为 28.10%, 平均每 3 200 bp 出现一个 SSR 位点。 (2) 单、二、三核苷酸重复类型为密花香薷转录组 SSR 位点的主导基序类型, 占总 SSR 位点的 97.27%, 3 种主导基序类型中, 单核苷酸所形成基元类型数量最多, 共检测到 169 个基元类型 (51.22%), 单核苷酸 (A/T)<sub>n</sub> 基元类型占明显优势, 二核苷酸重复类型 (AG/CT)<sub>n</sub> 基元类型占优, 分别占总 SSR 位点的 50.60% 和 12.17%。 (3) 单核苷酸 SSR 位点所包含重复次数最多 (49), 重复次数介于 10 ~ 66, 同一基序类型不同重复次数所形成的 SSR 位点数量差异较大, 随重复次数的增加, SSR 位点数呈下降趋势。 (4) 密花香薷转录组二至六核苷酸基序 SSR 序列长度集中在 12~30 bp 区间, 共包含有 8 190 个 SSR 位点, 占所统计 SSR 位点的 95.60%, 1 589 (≥20 bp) 个 SSR 序列具有极高的多态性, 占所统计 SSR 位点的 18.54%。综合出现频率、分布密度、基元重复次数和长度变异等多个研究结果发现, 密花香薷转录组检索到的 SSR 序列表现出较高的多态性潜能, 具有较大的开发价值。该研究为后续密花香薷 SSR 分子标记引物开发奠定了理论基础。

**关键词:** 转录组; 密花香薷; SSR; 位点信息

**中图分类号:** Q346<sup>+</sup>.5; Q949.95

**文献标志码:** A

## Analysis of SSR Characteristics for *Elsholtzia densa* Benth. Based on Transcriptome Data

FU Gui<sup>1</sup>, LIU Yuping<sup>2,3</sup>, SU Xu<sup>2,3\*</sup>

(1 Qinghai Provincial Key Laboratory of Highvalue Utilization of Characteristic Economic Plants, College of Ecological Environment and Resources, Qinghai Nationalities University, Xining 810007, China; 2 College of Life Science, Qinghai Normal University, Xining 810008, China; 3 Academy of Plateau Science and Sustainability, Xining 810016, China)

**Abstract:** The SSR loci which exist in 42 362 Unigenes in *Elsholtzia densa* transcriptome were detected by MISA software, additionally, the structure and distribution characteristics were analysed. The results indicated that: (1) a total of 17 564 SSR repeating sequences have been searched, which were distributed on 11 903 Unigenes, and the frequency of occurrence of SSR loci was 28.10% with an average of one SSR locus per 3 200 bp. (2) The dominant repeat motifs in *Elsholtzia densa* transcriptome were mono-nucleotide, di-nucleotide and tri-nucleotide, accounting for 97.27% of the total SSR loci, and among the three dominant motif types, the number of motif type formed by mono-nucleotide was the largest with a total of

收稿日期: 2021-01-04; 修改稿收到日期: 2021-03-18

基金项目: 2021 年青海民族大学校级规划项目 (2021XJGH14)

作者简介: 富 贵 (1987—), 男, 在读博士, 讲师, 研究方向: 高原植物系统发育与适应性进化研究。E-mail: qhmdfg@163.com

\* 通信作者: 苏 旭, 教授, 博士生导师, 研究方向: 高原植物系统发育与适应性进化研究。E-mail: xusu8527972@126.com

169 motif types (51.22%), the (A/T)<sub>n</sub> in mono-nucleotide repeats and (AG/CT)<sub>n</sub> in di-nucleotide repeats, were dominating motifs, accounting for 50.60% and 12.17%, respectively. (3) The mono-nucleotide motif was the type which repeated the most (49), the repetition times were between 10 and 66, and the difference of the SSR number was widely showed in the same motif with different repetition, the number of SSR was declined as the increase of repetition times. (4) The length of SSR was concentrate on a range from 12 to 30 bp which contained a total of 8 190 SSR loci, accounting for 95.60% of the total SSR in di-nucleotide to six nucleotide motifs, and the number of highly polymorphic SSR sequences was 1 589 ( $\geq 20$  bp) which accounting for 18.54% of the total SSR. The SSR sequences showed higher potential polymorphism and greater value for development, based on the results of multiple studies, such as occurrence frequency, distribution density, motif repetition and length variation. This study laid a theoretical foundation for the development of SSR primers in a follow-up studies for *Elsholtzia densa*.

**Key words:** transcriptome; *Elsholtzia densa*; SSR; loci information

密花香薷 (*Elsholtzia densa* Benth.) 是唇形科 (Labiatae) 香薷属 (*Elsholtzia* Willd.), 一年生草本植物, 主要分布于中国河北、山西、陕西、甘肃、青海等地。多生长在海拔 280 ~ 4 200 m 的林缘、林下、河边、草地边缘、高山、荒地等处<sup>[1]</sup>。密花香薷全株富含各种活性成分, 主要活性成分是挥发油, Amit 等<sup>[2]</sup> 最新研究发现了 40 种挥发性组成成分, 占总挥发性油的 83.3% ~ 83.7%, 挥发性油主要包含 3 种主要的成分: 松香芹酮 (51.9%)、反式松樟酮 (5.2%) 和乙酸香茅酯 (3.4%), 具有一定的药用价值<sup>[3]</sup>。西藏、青海等地常使用密花香薷代替正品香薷入药, 具有消炎、利湿、排汗、解暑的功效, 可治疗夏季感冒、发热无汗、中暑、急性胃炎、乳腺癌、口臭、肾炎和小便不利等多种疾病<sup>[4-5]</sup>。藏医全草入药也可用于治培根病、胃病、梅毒性鼻炎、咽喉炎和寄生虫病, 外用可治疗脓肿和皮肤病<sup>[6-7]</sup>。密花香薷因具独特香味, 在中国西北地区常作为蔬菜和茶叶食用, 是一种药食兼用的植物。另外, 有研究报道<sup>[8-9]</sup>, 密花香薷是青藏高原重要的秋季蜜源, 人工种植可为蜂户带来可观的收入, 具有较大的开发价值。

分子标记技术被广泛用于植物遗传学研究中, 有关分子标记技术的应用已在很多模式植物和重要的药用植物中进行了报道<sup>[10-14]</sup>, SSR (simple sequence repeat) 简单重复序列是一种以特异引物 PCR 为基础的分子标记技术, 动植物基因组上广泛分布有一种以 1~6 个核苷酸为重复单位组成的串联重复序列, 如 (AC)<sub>n</sub> (GA)<sub>n</sub> (AT)<sub>n</sub> (AAG)<sub>n</sub> (AAT)<sub>n</sub> 等, 其中 n 代表重复次数, 从几个到几十个不等<sup>[15-16]</sup>。基因组不同位置, 每个座位其重复基元和重复次数皆不可能完全相同, 因而在基因组水平表现出多态性。SSR 在植物全基因组内广泛分布, 具共显性遗传特点, 同时具扩增稳定、假阳性少、

操作简便、可揭示多态性丰富等优点而被广泛用于植物种质资源遗传多样性分析、分子遗传图谱构建、基因定位、指纹图谱构建以及植物系统发育分析等研究<sup>[17]</sup>。

目前对于密花香薷的研究主要集中于化学成分的分离和提取。如孙丽萍等<sup>[18]</sup> 从密花香薷中分离得到 10 个化合物; 王筋等<sup>[19]</sup> 采用 GC/MS 气质联用仪对密花香薷精油进行了化学成分分析, 鉴定出 13 种化合物; 徐海燕等<sup>[20]</sup> 对密花香薷进行了生药学研究, 发现密花香薷在原植物、性状、显微等方面具有专属性特征。密花香薷的水、醇溶性浸出物含量分别为 3.75%、3.20%。但是密花香薷种质资源分布、物种分类及分子生物学等方面的研究还未曾被报道, 严重阻碍了密花香薷优质种质资源的筛选和后续开发利用。本研究基于高通量测序 (Illumina HiSeq) 获得的密花香薷转录组数据, 分析了分布于转录组上的 SSR 位点信息特征, 可为后期密花香薷 SSR 引物开发与筛选提供理论依据, 为密花香薷遗传多样性、系统亲缘关系、优质资源筛选鉴定及育种等相关研究奠定理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

本试验样本采集于中国青海省海南藏族自治州共和县青海湖二郎剑景区 (36.578 5°N, 100.491 1°E), 海拔 3 194.15 m, 挑选长势良好的密花香薷 3 株, 分别取叶片后, 用锡箔纸包好, 立即存入液氮中保存, 送回实验室用于后续 RNA 的提取和测序。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 RNA 的提取与建库** 采用经典提取方法 (Trizol 法)<sup>[21]</sup> 提取密花香薷样本 RNA, 获得 RNA 后, 首先对其纯度和完整性进行检测, 再通过 Oligo

(dT) 磁珠富集 mRNA,用于反转录成 cDNA。采用 NEB 普通建库,以信使 RNA 作为模板,随机寡核苷酸作为引物合成第一条 cDNA 链,以 dNTPs (4 种脱氧核糖核苷酸) 为原料合成 cDNA 的第二条链。两条链合成后进行纯化、末端修复等操作,再通过筛选,将筛选出的 cDNA 进行 PCR 扩增,二次纯化得到文库。

**1.2.2 测序和数据评估** 获得的文库经过检测,质量得到保证才可以上机测序,构建好的文库用 Illumina HiSeq 2000 进行测序,获得的序列信息数据要进行一定程度的过滤,用 Fast QC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>,快速地对测序数据进行质量评估) 检查原始读物的质量,去除带接头和含 N 的读片以及测序质量低的读长 (Qphred $\leq$ 20 的碱基数占读取长度的 50% 以上),测序获得原始数据后,取得 clean reads。Trinity 软件(<https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki>) 用于短 reads 的组装,组装后得到的序列拼接成为转录本再进行后续分析。

**1.2.3 SSR 位点的检测和搜寻** 利用 MISA (microsatellite, <https://webblast.ipk-gatersleben.de/misa/>) 软件 1.0 版,选择默认参数,对应的各个重

复基元的最少重复次数分别为 1—10、2—6、3—5、4—5、5—5 和 6—5 (如:1—10,以单核苷酸为重复单位时,其重复数至少为 10 才可被检测到;2—6,以双核苷酸为重复单位时,其最少重复数为 6),对转录本进行 SSR 检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 密花香薹转录组分布概况

组装后的密花香薹转录组数据,利用 CD-HIT 软件 (<https://github.com/weizhongli/cdhit/wiki/3.-User's-Guide#CDHITEST>) 去冗余后,共获得 42 362 条 Unigenes,平均长度为 1 325 bp,总长度为 56 141 397 bp。经搜索发现 SSR 重复序列总共有 17 564 个,分布于 11 903 条 Unigenes 上,SSR 的出现频率为 28.10%,密花香薹转录组 Unigenes 序列平均每 3 200 bp 出现一个 SSR 位点,包含有 2 个及 2 个以上 SSR 位点数为 3 693 个,复合型 SSR 位点数为 1 675 个 (表 1)。可见,密花香薹转录组所包含 SSR 位点较丰富,分布较为广泛。

### 2.2 密花香薹转录组 SSR 位点不同重复类型分析

对密花香薹转录组检测到的 SSR 位点进行了核苷酸重复类型分类,共有 6 种重复类型 (表 2)。不

表 1 密花香薹转录组 SSR 分布特征描述

Table 1 The description of distribution characteristics for SSR loci in transcriptome of *Elsholtzia densa*

| 统计项目 Statistical item                                            | 数目 Number  |
|------------------------------------------------------------------|------------|
| Unigene 数量 Number of Unigene                                     | 42 362     |
| Unigene 序列总长度 Total length of Unigene sequence/bp                | 56 141 397 |
| 包含有 SSR 位点的 Unigene 序列总数 Total of Unigene sequence with SSR loci | 11 903     |
| SSR 位点数 Number of SSR loci                                       | 17 564     |
| 包含 1 个以上 SSR 位点数 Number of Unigene with more than 1 SSR loci     | 3 693      |
| 复合型 SSR 位点数 Number of composite SSR loci                         | 1 675      |
| SSR 位点出现频率 The frequency of SSR loci/bp                          | 3 200      |

表 2 密花香薹转录组 SSR 位点重复类型、数量及分布统计

Table 2 The statistics of repeating types, number and distribution for SSR loci in transcriptome of *Elsholtzia densa*

| 重复类型 Repeat type | 数目 Number | 比例 Ratio/% | 频率 Frequency/% | 平均分布距离 Average distance/kb | 总长度 Total of length/bp | 平均长度 Average length/bp |
|------------------|-----------|------------|----------------|----------------------------|------------------------|------------------------|
| 单核苷酸 Mono        | 8 997     | 51.22      | 21.2           | 6.24                       | 100 356                | 11.15                  |
| 二核苷酸 Di          | 4 475     | 25.48      | 10.56          | 12.55                      | 59 434                 | 13.28                  |
| 三核苷酸 Tri         | 3 609     | 20.57      | 8.5            | 15.56                      | 52 173                 | 14.46                  |
| 四核苷酸 Trtra       | 218       | 1.24       | 0.51           | 257.53                     | 3 884                  | 17.8                   |
| 五核苷酸 Penta       | 85        | 0.48       | 0.20           | 660.49                     | 1 775                  | 20.88                  |
| 六核苷酸 Hexa        | 180       | 1.03       | 0.42           | 311                        | 4 795                  | 26.64                  |
| 总计 Total         | 17 564    | 100        | 41.46          | 3.20                       | 222 417                | 12.66                  |

同重复单元形成的 SSR 位点数目相差较大,其中单核苷酸重复位点最多,为 8 997 个,占总 SSR 位点的 51.22%,总长度为 100 356 bp,平均每 6 240 bp 个核苷酸出现 1 个单核苷酸重复序列;二核苷酸重复序列次之,为 4 475 个,占总 SSR 位点的 25.48%,总长度为 59 434 bp,平均每 12 550 bp 个核苷酸出现 1 个二核苷酸重复序列;五核苷酸重复序列最少 (85),占总 SSR 位点的 0.48%,总长度为 1 775 bp,平均每 660 490 bp 个核苷酸出现 1 个五核苷酸重复序列。不同重复类型形成 SSR 频率差异较大,SSR 出现频率介于 0.20% ~ 21.20% 之间,其中单核苷酸重复类型 SSR 发生频率最高,每 100 条 Unigene 有 21.20 个 SSR 位点出现;五核苷酸重复类型 SSR 发生频率最低,每 100 条 Unigene 仅有 0.20 个 SSR 位点出现。

2.3 密花香薹转录组 SSR 基序类型特征分析

对密花香薹 SSR 位点不同重复基元进行分析,研究结果 (表 3,图 1) 表明,共有 169 个重复基元类型,在不同重复次数下形成 17 564 个 SSR 位点。其中单核苷酸 2 种基元类型,(A/T)<sub>n</sub> 基元类型占明显优势,共形成 8 888 个 SSR 位点,占单核苷酸 SSR 位点的 98.78%,总 SSR 位点的 50.60%;二核苷酸基元类型 4 种,(AG/CT)<sub>n</sub> 基元类型占优,共形成 2 138 个 SSR 位点 (47.80%,12.17%);三核苷酸基元类型为 9 种,其中 (AAG/CTT)<sub>n</sub> 基元类型 SSR 位点最多,共形成 638 个 SSR 位点 (17.68%,3.63%),依次较高的为 (AAC/GTT)<sub>n</sub>,形成 584 个 SSR 位点 (16.18%,3.33%),(ATC/ATG)<sub>n</sub> 形成 502 个 SSR 位点 (13.90%,2.86%);四核苷酸基元类型 25 种,形成 SSR 位点较多的基元类型依次

为 (AAAT/ATTT)<sub>n</sub>、(AAAG/CTTT)<sub>n</sub> 和 (AATT/AATT)<sub>n</sub>,分别形成 38 (17.43%,0.216 4%)、35 (16.06%,0.20%) 和 34 (15.60%,0.20%) 个 SSR 位点;五核苷酸基元类型为 29 种,形成 SSR 较多的基元类型为 (AAAAG/CTTTT)<sub>n</sub>、(AAAAT/ATTTT)<sub>n</sub> 和 (AAAAC/GTTTT)<sub>n</sub>,分别形成 17 (20.00%,0.10%)、11 (12.94%,0.06 3%) 和 8 (9.4%,0.05%) 个 SSR 位点;六核苷酸基元类型为 99 种,形成 SSR 位点较多的基元类型为 (AAAAAT/ATTTTT)<sub>n</sub>,形成 8 个 SSR 位点 (4.44%,0.05%),(AAAAAG/CTTTTT)<sub>n</sub>、(AAAGAG/CTCTTT)<sub>n</sub>、(AAGGAG/CCTTCT)<sub>n</sub>、(AATTCC/AATTGG)<sub>n</sub>、(AGATGG/ATCTCC)<sub>n</sub> 5 种基元类型均形成 6 个 SSR 位点 (3.33%,0.03%)。

不同基序类型形成 SSR 位点数目存在广泛变异 (表 3),单核苷酸基序 (A/T)<sub>n</sub> SSR 发生频率最高 (20.98%);81 个基序类型所形成的 SSR 位点发生频率最低,包括 8 个四核苷酸基序,11 个五核苷酸基序和 62 个六核苷酸基序,仅形成 1 个 SSR 序列 (0.0024%)。从总体来看,随着 SSR 基元碱基数目的增加,基元类型增加,SSR 位点数呈下降趋势。

2.4 密花香薹转录组中 SSR 基元重复次数分析

密花香薹 SSR 基元重复次数因基元序列长度表现出广泛的变异,不同重复次数所形成的 SSR 位点差异较大,每种基元类型构成的 SSR 位点中,最小重复次数的 SSR 位点最多,且随着基元长度的增加,重复次数类型呈下降趋势 (表 4,图 2)。单核苷酸重复基元其重复次数类型广泛,介于 10 ~ 66 之间,共有 49 种重复次数,不同重复次数所形成的 SSR 位点数量差异较大,最小重复次数为 10 次,且所形

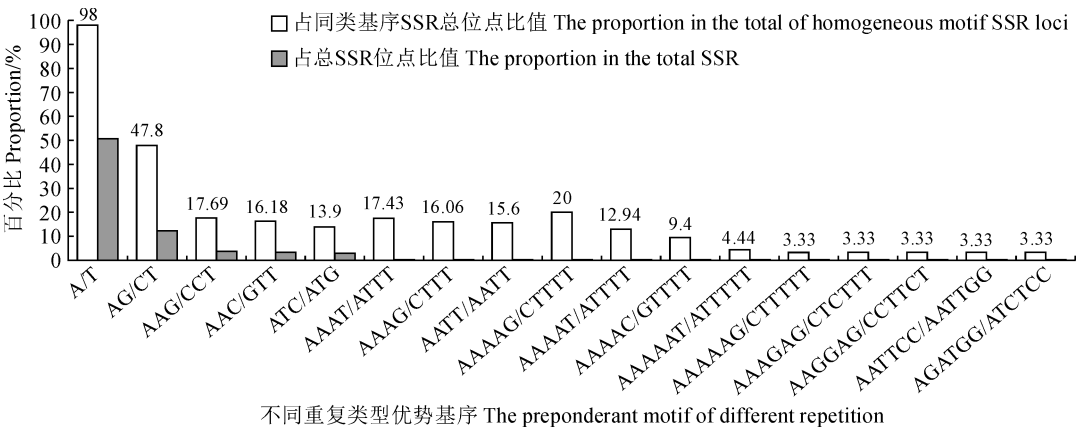


图 1 不同重复类型优势基序 SSR 位点数量分布

Fig. 1 The quantities distribution of SSR loci formed from preponderant motif of different repetitions

表 3 密花香薷转录组不同基序 SSR 位点数量分布

Table 3 The quantities distribution of different motif SSR loci in transcriptome of *Elsholtzia densa*

| 重复类型<br>Repeat type | 碱基组成<br>Base composition | 数量<br>No. | 比例<br>Ratio/% | 频率<br>Frequency/% | 重复类型<br>Repeat type | 碱基组成<br>Base composition | 数量<br>No. | 比例<br>Ratio/% | 频率<br>Frequency/% |
|---------------------|--------------------------|-----------|---------------|-------------------|---------------------|--------------------------|-----------|---------------|-------------------|
| 单核苷酸<br>Mono        | A/T                      | 8 888     | 50.603 5      | 20.981 1          | 五核苷酸<br>Penta       | AATAC/ATTGT              | 2         | 0.011 4       | 0.004 7           |
|                     | C/G                      | 109       | 0.620 6       | 0.257 3           |                     | AATAT/ATATT              | 2         | 0.011 4       | 0.004 7           |
| 二核苷酸<br>Di          | AG/CT                    | 2 138     | 12.172 6      | 5.047 0           |                     | AATTC/AATTG              | 2         | 0.011 4       | 0.004 7           |
|                     | AT/AT                    | 1 303     | 7.418 6       | 3.075 9           |                     | ACACC/GGTGT              | 2         | 0.011 4       | 0.004 7           |
|                     | AC/GT                    | 1 027     | 5.847 2       | 2.424 3           |                     | ATATC/ATATG              | 2         | 0.011 4       | 0.004 7           |
|                     | CG/CG                    | 7         | 0.039 9       | 0.016 5           |                     | * (11)                   | 1         | 0.005 7       | 0.002 4           |
| 三核苷酸<br>Tri         | AAG/CTT                  | 638       | 3.632 4       | 1.506 1           | AAAAAT/ATTTTT       | 8                        | 0.045 5   | 0.018 9       |                   |
|                     | AAC/GTT                  | 584       | 3.325 0       | 1.378 6           | AAAAAG/CTTTTT       | 6                        | 0.034 2   | 0.014 2       |                   |
|                     | ATC/ATG                  | 502       | 2.858 1       | 1.185 0           | AAAGAG/CTCTTT       | 6                        | 0.034 2   | 0.014 2       |                   |
|                     | AGC/CTG                  | 381       | 2.169 2       | 0.899 4           | AAGGAG/CCTTCT       | 6                        | 0.034 2   | 0.014 2       |                   |
|                     | AAT/ATT                  | 368       | 2.095 2       | 0.868 7           | AATTCC/AATTGG       | 6                        | 0.034 2   | 0.014 2       |                   |
|                     | CCG/CGG                  | 341       | 1.941 5       | 0.805 0           | AGATGG/ATCTCC       | 6                        | 0.034 2   | 0.014 2       |                   |
|                     | ACC/GGT                  | 338       | 1.924 4       | 0.797 9           | AGAGGG/CCCTCT       | 5                        | 0.028 5   | 0.011 8       |                   |
|                     | AGG/CCT                  | 261       | 1.486 0       | 0.616 1           | AAAATG/ATTTTC       | 4                        | 0.022 8   | 0.009 4       |                   |
|                     | ACG/CGT                  | 110       | 0.626 3       | 0.259 7           | AACTAC/AGTTGT       | 4                        | 0.022 8   | 0.009 4       |                   |
|                     | ACT/AGT                  | 86        | 0.489 6       | 0.203 0           | AAGAGG/CCTCTT       | 4                        | 0.022 8   | 0.009 4       |                   |
| 四核苷酸<br>Trtra       | AAAT/ATTT                | 38        | 0.216 4       | 0.089 7           | ACCTCC/AGGTGG       | 4                        | 0.022 8   | 0.009 4       |                   |
|                     | AAAG/CTTT                | 35        | 0.199 3       | 0.082 6           | AGGATG/ATCCTC       | 4                        | 0.022 8   | 0.009 4       |                   |
|                     | AATT/AATT                | 34        | 0.193 6       | 0.080 3           | AAATTC/AATTTG       | 3                        | 0.017 1   | 0.007 1       |                   |
|                     | ACAT/ATGT                | 26        | 0.148 0       | 0.061 4           | AACACC/GGTGTT       | 3                        | 0.017 1   | 0.007 1       |                   |
|                     | AAAC/GTTT                | 20        | 0.113 9       | 0.047 2           | AAGATG/ATCTTC       | 3                        | 0.017 1   | 0.007 1       |                   |
|                     | AGAT/ATCT                | 14        | 0.079 7       | 0.033 0           | ACTCTC/AGAGTG       | 3                        | 0.017 1   | 0.007 1       |                   |
|                     | AATG/ATTC                | 10        | 0.056 9       | 0.023 6           | ATATCC/ATATGG       | 3                        | 0.017 1   | 0.007 1       |                   |
|                     | AATC/ATTG                | 9         | 0.051 2       | 0.021 2           | AAAACC/GGTTTT       | 2                        | 0.011 4   | 0.004 7       |                   |
|                     | ACTC/AGTG                | 5         | 0.028 5       | 0.011 8           | AAACAC/GTGTTT       | 2                        | 0.011 4   | 0.004 7       |                   |
|                     | ACCT/AGGT                | 3         | 0.017 1       | 0.007 1           | Hexa                | AAATAT/ATATTT            | 2         | 0.011 4       | 0.004 7           |
| 五核苷酸<br>Penta       | AGCT/AGCT                | 3         | 0.017 1       | 0.007 1           | AACAGC/CTGTTG       | 2                        | 0.011 4   | 0.004 7       |                   |
|                     | AGGG/CCCT                | 3         | 0.017 1       | 0.007 1           | AACCAC/GGTTGT       | 2                        | 0.011 4   | 0.004 7       |                   |
|                     | AACC/GGTT                | 2         | 0.011 4       | 0.004 7           | AACCTC/AGGTTG       | 2                        | 0.011 4   | 0.004 7       |                   |
|                     | AACT/AGTT                | 2         | 0.011 4       | 0.004 7           | AACTCC/AGTTGG       | 2                        | 0.011 4   | 0.004 7       |                   |
|                     | ACAG/CTGT                | 2         | 0.011 4       | 0.004 7           | AAGCAG/CTGCTT       | 2                        | 0.011 4   | 0.004 7       |                   |
|                     | ACCC/GGGT                | 2         | 0.011 4       | 0.004 7           | AATATG/ATATTC       | 2                        | 0.011 4   | 0.004 7       |                   |
|                     | ATCG/ATCG                | 2         | 0.011 4       | 0.004 7           | AATCAC/ATTGTG       | 2                        | 0.011 4   | 0.004 7       |                   |
|                     | * (8)                    | 1         | 0.005 7       | 0.002 4           | AATCAG/ATTCTG       | 2                        | 0.011 4   | 0.004 7       |                   |
|                     | AAAAG/CTTTT              | 17        | 0.096 8       | 0.040 1           | AATCGG/ATTCCG       | 2                        | 0.011 4   | 0.004 7       |                   |
|                     | AAAAT/ATTTT              | 11        | 0.062 6       | 0.026 0           | AATGGC/ATTGCC       | 2                        | 0.011 4   | 0.004 7       |                   |
| 六核苷酸<br>Hexa        | AAAAC/GTTTT              | 8         | 0.045 5       | 0.018 9           | AATGGG/ATTCCC       | 2                        | 0.011 4   | 0.004 7       |                   |
|                     | AAATT/AATTT              | 4         | 0.022 8       | 0.009 4           | AATGGT/ACCATT       | 2                        | 0.011 4   | 0.004 7       |                   |
|                     | AACTC/AGTTG              | 4         | 0.022 8       | 0.009 4           | ACACAT/ATGTGT       | 2                        | 0.011 4   | 0.004 7       |                   |
|                     | AAGAG/CTCTT              | 4         | 0.022 8       | 0.009 4           | ACCACT/AGTGGT       | 2                        | 0.011 4   | 0.004 7       |                   |
|                     | AACAT/ATGTT              | 3         | 0.017 1       | 0.007 1           | ACCATC/ATGGTG       | 2                        | 0.011 4   | 0.004 7       |                   |
|                     | AGAGG/CCTCT              | 3         | 0.017 1       | 0.007 1           | ACTGCT/AGCAGT       | 2                        | 0.011 4   | 0.004 7       |                   |
|                     | AGATG/ATCTC              | 3         | 0.017 1       | 0.007 1           | AGAGCC/CTCTGG       | 2                        | 0.011 4   | 0.004 7       |                   |
|                     | AACAC/GTGTT              | 2         | 0.011 4       | 0.004 7           | * (62)              | 1                        | 0.005 7   | 0.002 4       |                   |
|                     | AACAG/CTGTT              | 2         | 0.011 4       | 0.004 7           | 总计<br>Total         | 17 564                   | 100       | 41.46         |                   |
|                     | AAGGG/CCCTT              | 2         | 0.011 4       | 0.004 7           |                     |                          |           |               |                   |

注：\* 代表仅形成 1 个 SSR 位点的基序类型,括号内为数量  
Note: \* Indicate the motifs only one SSR locus was formed, the value in bracket is the number



成的 SSR 位点比例最高, 占有单核苷酸 SSR 序列的 35.90%, 最大重复次数为 66 次, 仅形成 2 个 SSR 位点, 占有单核苷酸 SSR 序列的 0.02%。五核苷酸基元重复次数类型最少, 重复次数介于 5 ~ 11 之间, 共有 4 种重复次数, 其中最小重复次数为 5 次, 且所形成的 SSR 位点最多, 为 62 个, 占五核苷酸重复序列所形成 SSR 位点的 72.94%, 最大重复次数为 11 次, 形成的 SSR 位点仅有 1 个, 占五核苷酸重复序列所形成 SSR 位点的 1.18%。所有基元类型重复次数相关信息详见表 4。

2.5 密花香薹转录组不同基元类型 SSR 位点长度分析

对密花香薹转录组二至六核苷酸, 不同基序 SSR 长度进行了分析, 不同基序类型 SSR 位点所包

表 4 密花香薹转录组 SSR 基序重复次数统计

Table 4 The statistics of repetition times for motif of SSR loci in transcriptome of *Elsholtzia densa*

| 重复类型<br>Repeat type | 重复次数类型数<br>Number of repetitive type | 最小重复次数<br>The lowest replication | 最大重复次数<br>The maximal replication |
|---------------------|--------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| 单核苷酸 Mono           | 10~66 (49)                           | 10 (35.9%)                       | 66 (0.02%)                        |
| 二核苷酸 Di             | 6~40 (32)                            | 6 (35.66%)                       | 40 (0.05%)                        |
| 三核苷酸 Tri            | 5~27 (20)                            | 5 (54.36%)                       | 27 (0.06%)                        |
| 四核苷酸 Trtra          | 5~18 (10)                            | 5 (59.17%)                       | 18 (0.46%)                        |
| 五核苷酸 Penta          | 5~11 (4)                             | 5 (72.94%)                       | 11(1.18%)                         |
| 六核苷酸 Hexa           | 5~17 (6)                             | 5 (75.56%)                       | 17 (0.56%)                        |

含长度类型差异较大, 总体来看, SSR 长度主要集中在 12 ~ 30 bp 区间, 该长度范围内包含有 8 190 个 SSR 位点, 占所统计 SSR 位点的 95.60%, 而且随着 SSR 位点长度的增加, SSR 位点数目呈下降趋势 (表 5, 图 3)。二核苷酸基序构成的 SSR 位点, 长度分布在 12 ~ 30 bp 的数量最多, 为 4 260, 占二核苷酸 SSR 位点总数的 95.20%; 三核苷酸次之, 长度分布在 12 ~ 30 bp 的 SSR 数量为 3 509, 占三核苷酸 SSR 位点总数的 97.23%; 五核苷酸最少, 长度分布在 12 ~ 30 bp 的数量为 83 (97.64%); 四和六核苷酸 2 种基序 SSR 长度分布在 12 ~ 30bp 的数目分别为 20 (92.66%) 和 136 (75.56%)。

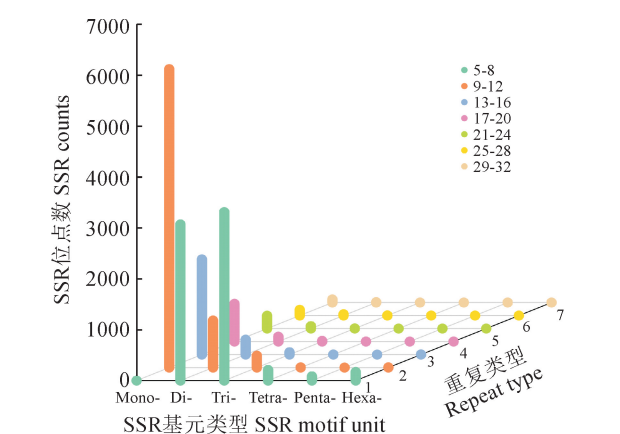


图 2 密花香薹转录组不同基序类型 SSR 位点统计  
Fig. 2 The statistics of different motif SSR loci in transcriptome of *Elsholtzia densa*

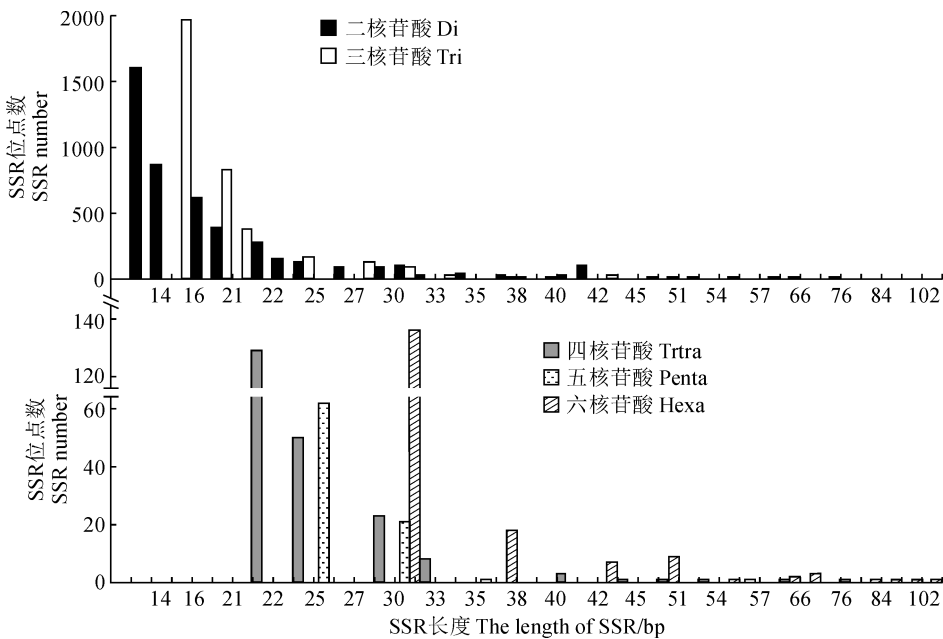


图 3 密花香薹转录组不同基元 SSR 位点长度分布  
Fig. 3 Length distribution of different motif SSR loci in transcriptome of *Elsholtzia densa*

表 5 密花香薷不同基元和不同重复次数 SSR 位点长度统计  
Table 5 Statistics of the length of different motif and repetition time SSR loci in transcriptome of *Elsholtzia densa*

| 重复基元<br>Repeat motif | 项目<br>Item      | 重复次数 Repetition |       |       |       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |       |  |  |
|----------------------|-----------------|-----------------|-------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|--|--|
|                      |                 | 5               | 6     | 7     | 8     | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   | 17   | 18   | 19   | 20   | 21~40 |  |  |
| 二核苷酸<br>Di           | 长度 Length       | —               | 12    | 14    | 16    | 18   | 20   | 22   | 24   | 26   | 28   | 30   | 32   | 34   | 36   | 38   | 40   | 42~80 |  |  |
|                      | SSR 位点数 No. SSR | —               | 1 596 | 856   | 615   | 385  | 267  | 152  | 121  | 83   | 90   | 95   | 25   | 37   | 25   | 13   | 21   | 94    |  |  |
|                      | 占比 Ratio/%      | —               | 35.66 | 19.13 | 13.74 | 8.60 | 5.97 | 3.40 | 2.70 | 1.85 | 2.01 | 2.12 | 0.56 | 0.83 | 0.56 | 0.29 | 0.47 | 2.10  |  |  |
| 三核苷酸<br>Tri          | 长度 Length       | 15              | 18    | 21    | 24    | 27   | 30   | 33   | 36   | 39   | 42   | 45   | 48   | 51   | 54   | 57   | 60   | 66~81 |  |  |
|                      | SSR 位点数 No. SSR | 1 962           | 816   | 374   | 157   | 118  | 82   | 20   | 14   | 15   | 17   | 7    | 8    | 4    | 3    | 4    | 2    | 6     |  |  |
|                      | 占比 Ratio/%      | 54.36           | 22.61 | 10.36 | 4.35  | 3.27 | 2.27 | 0.55 | 0.39 | 0.42 | 0.47 | 0.19 | 0.22 | 0.11 | 0.08 | 0.11 | 0.06 | 0.18  |  |  |
| 四核苷酸<br>Tetra        | 长度 Length       | 20              | 24    | 28    | 32    | —    | 40   | 44   | 48   | 52   | —    | 60   | —    | —    | —    | 76   | —    | —     |  |  |
|                      | SSR 位点数 No. SSR | 129             | 50    | 23    | 8     | —    | 3    | 1    | 1    | 1    | —    | 1    | —    | —    | —    | 1    | —    | —     |  |  |
|                      | 占比 Ratio/%      | 59.17           | 22.94 | 10.55 | 3.67  | —    | 1.38 | 0.46 | 0.46 | 0.46 | —    | 0.46 | —    | —    | —    | 0.46 | —    | —     |  |  |
| 五核苷酸<br>Penta        | 长度 Length       | 25              | 30    | 35    | —     | —    | —    | 55   | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —     |  |  |
|                      | SSR 位点数 No. SSR | 62              | 21    | 1     | —     | —    | —    | 1    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —     |  |  |
|                      | 占比 Ratio/%      | 72.94           | 24.71 | 1.18  | —     | —    | —    | 1.18 | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —     |  |  |
| 六核苷酸<br>Hexa         | 长度 Length       | 30              | 36    | 42    | 48    | 54   | 60   | 66   | —    | 78   | 84   | 90   | —    | 102  | —    | —    | —    | —     |  |  |
|                      | SSR 位点数 No. SSR | 136             | 18    | 7     | 9     | 1    | 2    | 3    | —    | 1    | 1    | 1    | —    | 1    | —    | —    | —    | —     |  |  |
|                      | 占比 Ratio/%      | 75.56           | 10.00 | 3.89  | 5.00  | 0.56 | 1.11 | 1.67 | —    | 0.56 | 0.56 | 0.56 | —    | 0.56 | —    | —    | —    | —     |  |  |

注：— 代表该重复次数下未形成 SSR  
Note: — Indicate no SSR was detected in this repetition

### 3 讨 论

磁珠富集法作为一种经典的方法常被用于 SSR 标记的开发,该方法虽步骤繁多,但成本低,早期在 SSR 标记开发中得到了广泛应用,如富贵等利用磁珠富集法开发出了蕨麻 (*Potentilla anserina*) 20 对多态性较好的 SSR 引物<sup>[17]</sup>。近年来,随着测序技术的发展和成本的降低,基于转录组、基因组及公共数据库 EST (Expressed Sequence Tag) 数据,运用生物信息学方法检测 SSR 位点信息并进行引物开发已被广泛应用,如李荣华等<sup>[22]</sup> 基于菜薹 (*Brassica campestris*) 转录组分析检测到 11 879 个 SSR 位点,并筛选出 12 对具有多态性的引物;黄兴发等<sup>[23]</sup> 基于黑果枸杞 (*Lycium ruthenicum*) 基因组测序数据,获得 2 494 个 SSR 位点,筛选出 10 对高多态性 SSR 引物,并分析了 48 份枸杞的遗传多样性;张天缘等<sup>[24]</sup> 利用 MISA 软件从紫苏 (*Perilla frutescens*) 1 206 条 EST 序列中检索到 1 526 个 SSR 位点,并设计获得了 723 条 SSR 引物。

本研究对去冗余后的密花香薷 42 362 条 Unigene 进行 SSR 位点检测和分析,共检测到 SSR 位点 17 564 个,分布于 11 903 条 Unigene 上,SSR 的出现频率为 28.10%。刘小莉等<sup>[25]</sup> 对唇形科云南鼠尾草 (*Salvia yunnanensis*) 转录组 SSR 进行研究发现,SSR 发生概率为 7.51%;刘欣雨等<sup>[26]</sup> 基于丹参 (*Salvia miltiorrhiza*) 15.99 Mb 转录组数据,分析了含有 Unigene 的 33 438 条序列,共获得 2 095 个 SSR 候选位点,SSR 发生率为 6.27%;张天缘等<sup>[24]</sup> 对唇形科紫苏 (*Perilla frutescens*) EST-SSR 分布特征进行了统计,EST-SSR 发生频率为 22.19%。对比以上几种同科近缘种,密花香薷转录组 SSR 发生频率相对较高。与其他外缘物种,如云南金花茶 (*Camellia fascicularis*, 19.63%)<sup>[27]</sup>、党参 (*Codonopsis pilosula*, 12.22%)<sup>[28]</sup>、黑果枸杞 (26.36%)<sup>[29]</sup> 和 马 铃 薯 (*Solanum tuberosum*, 3.43%)<sup>[30]</sup> 相比,密花香薷转录组所包含 SSR 位点亦表现出较高的丰富度。由此可见,密花香薷转录组所包含 SSR 位点数目丰富,可为后期 SSR 标记的开发和筛选提供大量的信息基础。对上述物种转录组 SSR 发生频率进行比较,不难发现,SSR 位点发生频率因物种不同而表现出差异性,究其原因,可能与物种自身基因结构固有差异,以及分析数据库大小、SSR 搜索工具和搜索条件的不同设置等有关<sup>[28]</sup>。

通过对密花香薷转录组不同基序类型 SSR 位

点数目分析发现,密花香薷转录组 SSR 重复类型共有 6 种,单核苷酸重复类型最多,占总 SSR 位点的 51.22%,依次为二 (25.48%)、三核苷酸重复类型 (20.57%),由此可见,单、二、三核苷酸重复类型 (97.27%) 是密花香薷转录组 SSR 位点的主导基序类型,单核苷酸在 3 种主导基序类型中所占比例最高,为主要的基序类型。尹跃等<sup>[29]</sup> 对黑果枸杞转录组 SSR 分析研究也得出了相似的结论,黑果枸杞转录组 SSR 主要类型为单、二、三核苷酸重复类型 (99.44%),单核苷酸重复 (74.33%) 为主要基序类型。相同的结论在韭菜全长转录组 SSR 信息分析中也得到了支持<sup>[31]</sup>。唇形科云南鼠尾草、丹参和紫苏 SSR 序列信息研究结果发现,SSR 基序主导类型也是一至三核苷酸重复,3 种基序类型所形成 SSR 位点占比分别为 92.58%、98.0% 和 98.85%,但与本研究不同的是上述三种植物转录组 SSR 主要基序类型是二核苷酸 (紫苏 46.76%,云南鼠尾草 41.47%,丹参 61.60%)<sup>[24-26]</sup>。诸多研究表明,植物转录组 SSR 位点重复基元主要以短序列重复基元为主,但不同物种中 SSR 主导基序不同,这一结论在上述不同植物研究中均得到了验证支持。

有研究表明,被子植物和蕨类植物二核苷酸的优势基元主要为 (AG/CT)<sub>n</sub>,而裸子植物以 (AT/AT)<sub>n</sub> 为优势基元;双子叶植物、蕨类植物和少数单子叶植物以 (AAG/CTT)<sub>n</sub> 为三核苷酸的优势基元<sup>[30]</sup>,不同植物转录组 SSR 基元类型所表现出的差异性可能和物种自身遗传和基因结构有关。密花香薷转录组 SSR 二核苷酸的优势基元为 (AG/CT)<sub>n</sub>,占二核苷酸 SSR 的比例为 47.80%,三核苷酸优势基元为 (AAG/CTT)<sub>n</sub> (17.68%),这一研究结果与上述结论一致。同时,对诸多植物,如党参<sup>[26]</sup>、山地虎耳草 (*Saxifraga montana*)<sup>[32]</sup>、蒙农红豆草 (*Onobrychis viciifolia* Scop ‘Mengnong’)<sup>[33]</sup>、细果角茴香 (*Hypocoum leptocarpum*)<sup>[34]</sup> 转录组 SSR 研究也得到了上述相同的结论。但也有一些植物,二、三核苷酸优势基元与上述研究不同,如韭菜二核苷酸优势基元为 (AC/GT)<sub>n</sub> (20.28%)<sup>[31]</sup>、薄壳山核桃三核苷酸优势基元为 (AAC/GTT)<sub>n</sub> (34.95%)<sup>[35]</sup>、香蕉三核苷酸优势基元为 (AGG/CCT)<sub>n</sub> (12.53%)<sup>[36]</sup>。不同物种转录组 SSR 同一重复类型优势基元的不同,可能和其相应编码蛋白的使用频率差异有关<sup>[33]</sup>。

种内 SSR 位点的多态性主要表现在基元重复次数的差异,Xu 等<sup>[37]</sup> 研究表明 SSR 基元重复次数高的序列具有较高的多态性潜能,当其重复次数高



于 12 次时,多态性较高<sup>[38]</sup>。密花香薷转录组重复次数变异范围广泛,分布在 5~66 次之间,共有 121 种重复次数,具有较高的重复类型数,每种基序类型最小重复次数所形成的 SSR 位点数最高,且随着基序核苷酸的增加,重复次数类型呈下降趋势。长度分析表明,SSR 序列长度<12 bp 时多态性表现极低,12~20 bp 之间表现中等,≥20 bp 时多态性较高,且低级基序 SSR 多态性普遍高于高级基序 SSR<sup>[39]</sup>。密花香薷转录组二至六核苷酸基序 SSR 序列长度结果表明,每种基序类型 SSR 序列长度主要集中在 12~30 bp,包含有 8 190 个 SSR 位点,占所统计 SSR 位点的 95.60%,1 589 (≥20 bp) 个 SSR 序列具有极高的多态性,占所统计 SSR 位点的

18.54%。据此推测,上述 SSR 位点在密花香薷 SSR 分子标记中具有较高的开发潜能。

本研究基于密花香薷转录组数据检索到 17 564 个 SSR 位点,并分析了其序列分布类型和结构特征,综合 SSR 出现频率、分布密度、基元重复次数和长度变异范围等多个研究结果发现,该研究所获得的 SSR 序列表现出较高的多态性潜能,具有较大的开发价值。目前,有关密花香薷的研究主要集中在活性成分及其功能方面的研究中,前人研究已充分证明了密花香薷的开发价值,所以,对于其种质资源的收集、筛选、鉴定及育种等方面的相关研究势在必行,SSR 分子标记因其操作简单,稳定性好,具共显性等优点,可为上述研究提供有效的技术手段。

参考文献:

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第 66 卷 [M]. 北京:科学出版社,1999.

[2] CHAUHAN A, VENKATESHA K T, PADALIA R C, et al. Essential oil composition of leaves and inflorescences of *Elsholtzia densa* Benth. from western Himalaya[J]. *Journal of Essential Oil Research*, 2019, **31**(3): 217-222.

[3] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志[M]. 西宁:青海人民出版社,1991: 228-229.

[4] 石晋丽,朱甘培. 中国香薷属植物的药用及开发前景[J]. *中药材*, 1994, **17**(12): 10-13.

SHI J L, ZHU G P. Medicinal utilization and developing promise of genus *Elsholtzia* in China[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 1994, **17**(12): 10-13.

[5] 张继,王振恒,姚健,等. 密花香薷挥发油成分的分析研究[J]. *草业学报*, 2005, **14**(1): 112-116.

ZHANG J, WANG Z H, YAO J, et al. Studies on the essential oil from *Elsholtzia densa* [J]. *Acta Pratacultural Science*, 2005, **14**(1): 112-116.

[6] 李宁,沈宁东,韦梅琴,等. 密花香薷种子形态及萌发特性研究[J]. *种子*, 2012, **31**(3): 31-34.

LI N, SHEN N D, WEI M Q, et al. Study on morphology and germination characters of *Elsholtzia densa* seed [J]. *Seed*, 2012, **31**(3): 31-34.

[7] 青海省药品检验所青海省藏医药研究所. 中国藏药[M]. 上海:上海科学技术出版社,1996.

[8] 李萍,谢鹤. 论密花香薷在宁夏六盘山区蜂业生产中的价值[J]. *中国蜂业*, 2013, **64**(31): 32-33.

LI P, XIE H. The value of *Elsholtzia densa* in apiculture production in Liupan Mountains area of Ningxia[J]. *Apiculture of China*, 2013, **64**(31): 32-33.

[9] 段炳福,王连仁. 青海蜜源植物[J]. *青海农技推广*, 1998, (3): 45-48.

DUAN B F, WANG L R. Qinghai nectar source plant [J]. *Qinghai Agro-Tech Nologyextensopr*, 1998, (3): 45-48.

[10] 张扬勇,方智远,王庆彪,等. 拟南芥叶绿体 SSR 引物在甘蓝上的应用[J]. *园艺学报*, 2011, **38**(3): 549-555.

ZHANG Y Y, FANG Z Y, WANG Q B, et al. Utility of

*Arabidopsis* chloroplast simple sequence repeat (cpSSR) primers in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2011, **38**(3): 549-555.

[11] RÖDER M S, KORZUN V, WENDEHAK K, et al. A micro-satellite map of wheat[J]. *Genetics*, 1998, **149**(4): 2 007-2 023.

[12] SHAROPOVA N, MCMULLEN M D, SCHULTZ L, et al. Development and mapping of SSR markers for maize [J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, **48**: 463-481.

[13] TEMNYKH S, PARK W D, AYRES N, et al. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, **100**(5): 697-712.

[14] 刘枫,赵群,戴军,等. 霍山石斛 cpDNA 全序列微卫星分布及分子鉴别研究[J]. *中药材*, 2016, **39**(12): 2 720-2 724.

LIU F, ZHAO Q, DAI J, et al. Microsatellite analysis of cpDNA in *Dendrobium huoshanense* and its molecular identification [J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2016, **39**(12): 2 720-2 724.

[15] TAUTZ D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers[J]. *Nucleic Acids Research*, 1989, **17**(16): 6 463-6 471.

[16] THOMAS M R, SCOTT N S. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1993, **86**(8): 985-990.

[17] 富贵,李军乔,包锦渊,等. 磁珠富集法开发蕨麻 SSR 标记引物[J]. *草业学报*, 2018, **27**(2): 124-134.

FU G, LI J Q, BAO J Y, et al. Development of microsatellite primers in *Potentilla anserina* by magnetic beads enrichment [J]. *Acta Pratacultural Sinica*, 2018, **27**(2): 124-134.

[18] 孙丽萍,尹作栋,傅正生,等. 密花香薷的化学成分[J]. *植物学报*, 1996, **38** (8): 672-676.

SUN L P, YIN Z D, FU Z S, et al. The chemical constituents of *Elsholtzia densa* Benth. [J]. *Acta Botanica Sinica*, 1996, **38**(8): 672-676.

[19] 王箭,赵联甲,韩基明,等. 密花香薷精油的化学成分研究[J]. *中国野生植物资源*, 1996, **15**(2): 35-36.

WANG J, ZHAO L J, HAN J M, et al. The study for the

- chemical constituents of essential oil in *Elsholtzia densa* Benth. [J]. *Chinese Wild Plant Resources*, 1996, **15**(2): 35-36.
- [20] 徐海燕,李 洁,孙 芸. 密花香薷的生药学研究[J]. 新疆医科大学学报,2014, **37**(10): 1 297-1 300.
- XU H Y, LI J, SUN Y. Pharmacognostic study on *Elsholtzia densa* Benth. [J]. *Journal of Xinjiang Medical University*, 2014, **37**(10): 1 297-1 300.
- [21] 刘 芳,陈广侠,马 蕾,等. 改良 Trizol 法提取富含花青素马铃薯块茎的总 RNA[J]. 山东农业科学,2018, **50**(12): 114-118.
- LIU F, CHEN G X, MA L, *et al.* Extraction of total RNA from potato tubers rich in anthocyanins by modified trizol method [J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2018, **50**(12): 114-118.
- [22] 李荣华,王直亮,陈静芳,等. 莱菔转录组中 SSR 信息与可用性分析[J]. 园艺学报,2016, **43**(9): 1 816-1 824.
- LI R H, WANG Z L, CHEN J F, *et al.* Analysis of SSR information in transcriptome and their usability in flowering Chinese cabbage[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, **43**(9): 1 816-1 824.
- [23] 黄兴发,尹 跃,赵建华,等. 黑果枸杞基因组 SSR 标记开发及遗传多样性分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2021, **49**(1): 126-135.
- HUANG X F, YIN Y, ZHAO J H, *et al.* Development of genomic SSR markers and genetic diversity analysis of *Lycium ruthenicum* Murr. [J]. *Journal of Northwest A & F University* (Natural Science Edition), 2021, **49**(1): 126-135.
- [24] 张天缘,宋 莉,沈 奇. 紫苏 EST-SSR 分布特征及标记开发[J]. 贵州农业科学,2017, **45**(9): 114-118.
- ZHANG T Y, SONG L, SHEN Q. EST-SSR distribution characteristics and markers development of *Perilla frutescens* [J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2017, **45**(9): 114-118.
- [25] 刘小莉,张爱丽,赵 燕,等. 云南鼠尾草 SSR 位点信息分析和引物初筛[J]. 时珍国医国药,2017, **28**(9): 2 224-2 225.
- LIU X L, ZHANG A L, ZHAO Y, *et al.* SSR information analysis and primersselecting for *Salvia yunnanensis* [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2017, **28**(9): 2 224-2 225.
- [26] 刘欣雨,魏宇昆,李桂彬. 丹参转录组的微卫星位点(SSR)特征及属内通用引物的开发[J]. 分子植物育种,2019, **17**(22): 7 445-7 452.
- LIU X Y, WEI Y K, LI G B. Development and characterization of microsatellite markers for the east Asia *Salvia* group using transcriptome sequencing[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, **17**(22): 7 445-7 452.
- [27] 叶 鹏,李显煌,唐军荣,等. 云南金花茶转录组 SSR 的分布及其序列特征[J]. 中南林业科技大学学报,2019, **39**(9): 86-91.
- YE P, LI X H, TANG J R, *et al.* Distribution and characteristics of SSR in transcriptome of *Camellia fascicularis* [J]. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 2019, **39**(9): 86-91.
- [28] 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): 2 390-2 394.
- WANG D, CAO L Y, GAO J P. Data mining of simple sequence repeats in *Codonopsis pilosula* transcriptome[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2014, **45**(16): 2 390-2 394.
- [29] 尹 跃,安 巍,赵建华,等. 黑果枸杞转录组 SSR 信息分析及分子标记开发[J]. 浙江农林大学学报,2019, **36**(2): 422-428.
- YIN Y, AN W, ZHAO J H, *et al.* SSR information in transcriptome and development of molecular markers in *Lycium ruthenicum* [J]. *Journal of Zhejiang A & F University*, 2019, **36**(2): 422-428.
- [30] 巩 楷,程永芳,甘晓燕,等. 马铃薯转录组 EST-SSR 挖掘及其多样性分析[J]. 分子植物育种,2015, **13**(7): 1 535-1 544.
- GONG L, CHENG Y F, GAN X Y, *et al.* Mining EST-SSRs based on potato transcriptome and analyzing their polymorphism [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2015, **13**(7): 1 535-1 544.
- [31] 李延龙,张华敏,崔蕴刚,等. 韭菜全长转录组 SSR 信息分析及分子标记开发[J]. 园艺学报,2020, **47**(4): 759-768.
- LI Y L, ZHANG H M, CUI Y G, *et al.* Analysis on SSR information in full-length transcriptome and development of molecular markers in *Allium tuberosum* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2020, **47**(4): 759-768.
- [32] 李 彦,更吉卓玛,贾留坤,等. 山地虎耳草转录组 SSR 信息分析[J]. 植物研究,2018, **38**(6): 939-947.
- LI Y, GENG J, JIA L K, *et al.* Analysis of SSR information in transcriptome sequences of *Saxifraga sinomontana* [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2018, **38**(6): 939-947.
- [33] 乔 雨,石凤翔,张雨桐,等. 蒙农红豆草花瓣转录组微卫星 SSR 特征分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2020, **48**(12): 9-17.
- QIAO Y, SHI F L, ZHANG Y T, *et al.* SSR characteristics of transcriptome of Mengnong sainfoin [J]. *Journal of Northwest A & F University* (Natural Science Edition), 2020, **48**(12): 9-17.
- [34] 张 晶,文怀秀,王卫东,等. 藏药细果角茴香转录组 SSR 分布特征分析[J/OL]. 分子植物育种:1-12 [2020-11-26]. <https://kns.cnki.net/kns8/defaultresult/index>.
- ZHANG J, WEN H X, WANG W D, *et al.* SSR loci information analysis in transcriptome of *Hypecoum leptocarpum* Hook. f. et Thoms [J/OL]. *Molecular Plant Breeding*: 1-12 [2020-11-26]. <https://kns.cnki.net/kns8/defaultresult/index>.
- [35] 贾展慧,宣继萍,张计育,等. 薄壳山核桃转录组中的 SSR 位点信息分析[J]. 分子植物育种,2019, **17**(10): 3 305-3 311.
- JIA Z H, XUAN J P, ZHANG J Y, *et al.* Analysis of SSR information in *Carya illinoensis* transcriptome[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, **17**(10): 3 305-3 311.
- [36] 王静毅,刘菊华,王 卓,等. 香蕉根系转录组 SSR 位点信息分析[J]. 中国农学通报,2019, **35**(28): 38-43.
- WANG J Y, LIU J H, WANG Z, *et al.* Bioinformatic analysis of simple sequence repeat (SSR) loci in banana (*Musa acuminata* L.) root transcriptome [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2019, **35**(28): 38-43.
- [37] XU X, PENG M, FANG Z A, *et al.* The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length[J]. *Nature Genetics*, 2000, **24**(4): 396-399.
- [38] THAO D V, YAMASHITA M, *et al.* Development of tetranucleotide microsatellite markers in *Pinus kesiya* Royle ex Gordon [J]. *Conservation Genetics Resources*, 2013, **5**(2): 405-407.
- [39] TEMNYKH S, DECLERCK G, *et al.* Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential[J]. *Genome Research*, 2001, **11**(8): 1 441-1 452.