

• 药材与资源 •

厚朴转录组 SSR 标记的开发及功能分析

代 娇¹, 时小东¹, 顾雨熹¹, 盛玉珍², 徐 莺¹, 陈 放¹, 庄国庆^{2*}

1. 四川大学生命科学学院, 四川 成都 610064

2. 四川省林业科学研究院, 四川 成都 610081

摘要: 目的 分析厚朴转录组中的 SSR 位点, 并设计引物初步验证, 对含 SSR 的序列进行功能分析, 为厚朴分子辅助标记育种和资源保护提供了有利工具。方法 将通过厚朴高通量转录组测序获得的 Unigene 序列进行 SSR 位点挖掘, 利用 Primer.03 进行引物设计, 随机挑选 45 对引物进行 PCR, 并利用 Blast 软件对含有 SSR 的 Unigene 进行功能分析。结果 在 16 369 条厚朴转录组序列中共获得 8 635 个 SSR 位点, 出现频率为 52.75%。SSR 序列中单核苷酸、二核苷酸和三核苷酸为优势重复类型, 重复比例最高为 10 次, 主导重复基元类型为 A/T (47.16%)、AG/CT (31.74%)、AAG/CTT (6.53%)。45 对引物中 22 对 (48.89%) 可以扩增出预期大小的条带。含 SSR 的 Unigene 与能量和氧化还原等代谢过程, 以及 RNA 转运、剪接体和植物激素信号转导等通路有关。结论 厚朴高通量转录组序列的 SSR 位点具有类型丰富、特异性强和潜能高等特点, 同时 SSR 序列的功能分析将为厚朴基因挖掘和分子标记辅助育种提供有利的工具。

关键词: 厚朴; 转录组; SSR; 功能分析; PCR

中图分类号: R282.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)13-2726-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.13.022

Development and function analysis of SSR molecular markers in *Magnolia officinalis* transcriptomeDAI Jiao¹, SHI Xiao-dong¹, GU Yu-xi¹, SHENG Yu-zhen², XU Ying¹, CHEN Fang¹, ZHUANG Guo-qing²

1. College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China

2. Sichuan Academy of Forestry, Chengdu 610081, China

Abstract: Objective SSR markers, primers and unigene function in the transcriptome of *Magnolia officinalis* were analyzed in this study to provide powerful tools for molecular marker-assisted breeding and resources protection in this plant. **Methods** A total of 16 369 unigenes obtained by transcriptome sequencing were used to explore SSR. SSR primers were designed by Primer.0 3 and 45 pairs were randomly selected for PCR. The gene function analysis of SSR unigene were obtained by Blast. **Results** A total of 8 635 SSR were identified, accounting for 52.75%. Among them, mononucleotide, dinucleotide and trinucleotide type were the dominant types, and the type which repeated for 10 times was the most. Additionally, the dominant repeat types were A/T, AG/CT and AAG/CTT, and the distribution frequencies were 47.16%, 31.74%, and 6.53%. Twenty-two pairs of 45 primers produced fragments with expected molecular size. Unigenes containing SSR were annotated to the process of energy and redox reaction, RNA transport, spliceosome and plant hormone signal transduction metabolic pathway. **Conclusion** The SSR markers in the transcriptome of *M. officinalis* show rich type, strong specificity and high potential, which will benefit to the candidate gene mining and marker-assisted breeding.

Key words: *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils.; transcriptome; SSR; function analysis; PCR

厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. 为木兰科木兰属植物, 是我国传统药材, 始载于《神农本草经》^[1]。《中国药典》2015 年版记载其树皮、根皮和枝皮干燥后均可入药, 具有燥湿消痰、下气除

满的功效。厚朴在我国分布较广, 主要分布在四川、湖北等地^[2]。然而, 由于长期的过度采伐等人为破坏, 野生资源急剧减少, 现存野生厚朴资源群体规模较小, 呈现破碎化零散状态, 群体结构衰退日趋

收稿日期: 2016-12-26

基金项目: 四川省科技支撑计划项目 (2015NZ0107)

作者简介: 代 娇 (1992—), 女, 在读硕士, 研究方向为植物分子生物学。Tel: (028)85417281 E-mail: 904730360@qq.com

*通信作者 庄国庆 (1978—), 男, 副研究员, 研究方向为林业资源。Tel: (028)85417281 E-mail: guoqing_zhuang@hotmail.com

明显。此外,由于其重要的药用价值和分类学地位,被列为国家二级重点保护树种和保护中药材^[3]。由此可见,对其遗传结构、遗传多样性、种质资源分析和恢复性培育的研究迫在眉睫。利用现代分子标记技术对厚朴种质资源和遗传背景进行研究,可为厚朴资源研究和分子标记辅助育种等奠定基础。

目前,国内外学者已经展开了厚朴分子标记开发和遗传多样性的研究,并取得了一定的成果。目前建立的厚朴分子标记类型有 AFLP、DAF、RAPD、SRAP 等^[4]。简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR) 又称微卫星,其可直接反映遗传多样性,具有稳定性好、通用性强和多态性高等优点,被广泛应用于比较基因组学、遗传多样性分析、进化研究以及分子育种等方面^[5]。麦静等^[3]利用近缘种基因组序列,筛选出 13 个 SSR 分子标记,并对厚朴亲本和子代群体进行遗传多样性分析。由于 SSR 的开发需要根据物种进行克隆测序和引物设计,所以传统 SSR 标记有开发难度大、周期长和成本高等局限性,因而目前厚朴 SSR 位点的开发数量还十分有限。

随着第 2 代测序技术的发展和运用,这项技术可在短时间内提供大量的分子标记信息,从而加速 SSR 标记,特别是与重要性状关联的 SSR 标记的开发^[6-7]。转录组测序技术 (RNA-seq) 具有快速准确、低成本和无需参考基因组等优势,因而在模式和非模式物种中得到广泛应用^[8-9]。应用转录组测序的方法,可获得大量的转录本信息,为在短时间内高效准确地开发 SSR 标记创造了极为便利的条件。目前该技术已经在人参^[10]、党参^[11]、甘草^[12]和黄秦艽^[13]等多种药用植物中得到了应用。本实验分析了厚朴转录组测序结果中的 SSR 位点,进一步随机验证其有效性,并进行功能分析,以期对厚朴种质资源研究、亲缘关系鉴定以及分子辅助育种等提供有力工具。

1 材料与方法

1.1 转录组数据来源

厚朴材料采自四川省北川县 (N: 104.685°, E: 31.895°, 海拔 1 934 m), 经成都中医药大学高继海博士鉴定为木兰科 (Magnoliaceae) 植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils., 树龄 15 年, 收集干皮、两年生枝皮和叶片, 迅速置于液氮中, 构建测序文库用 Illumina HiSeq 2000 平台进行测序。

对原始测序数据进行过滤后采用 Trinity (<http://trinityrnaseq.sourceforge.net/>) 软件对经过过滤的高质量数据进行组装, 共获得 16 369 条 Unigene。

1.2 转录组 SSR 位点筛选

运用 MISA (<http://pgrc.ipkgatersleben.de/misa/>) 软件对 Unigene 进行 SSR 位点搜索。参数设置为单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸基元最小重复分别为 10、6、5、5、5、5。

1.3 含有 SSR 的 Unigene 的功能分析

通过 Blast X 分析, 将含有 SSR 的 Unigene 序列对比到 non-redundant sequence database (NR)、nucleotide sequence database (NT)、gene Ontology database (GO) 和 The database of kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) 数据库中, 对比参数为 $e < 1 \times 10^{-10}$ 。

1.4 SSR 引物设计及验证

利用 Primer 3.0 进行引物批量设计, 并从中随机挑选 45 对引物, 由成都擎科梓熙生物技术有限公司进行合成, 利用天根植物基因组提取试剂盒进行 DNA 提取, PCR 程序为 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 循环 35 次; 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行验证。

2 结果与分析

2.1 厚朴转录组 SSR 的分布与特征

利用软件对厚朴转录组测序的 29 588 886 bp 的 16 369 条 Unigene 序列中搜索含 1~6 重复基元的 SSR 位点, 共搜索到 8 635 个, 出现频率为 52.75%, 平均每 3.43 kb 含有 1 个 SSR 位点。其中, 1 613 条 Unigene 序列含有 1 个以上 SSR 位点, 含有复合型 SSR 的 Unigene 有 533 条。分布最多的重复基元为单核苷酸重复, 其次是二核苷酸重复, 没有检测到六核苷酸重复 (表 1)。

三核苷酸基元种类最多, 为 53 种, 其次是四核苷酸基元类型 (33 种)。单核苷酸 4 种基元种类中数量最多的为 A 重复 (2 217 个); 二核苷酸 11 种基元类型中数量最多重复基元类型为 GA (926 个); 五核苷酸重复基元类型含有 5 种, 每种数量均为 1。五核苷酸重复类型最长重复长度为 25 bp, 平均长度为 25 bp; 其他重复类型最长重复长度均为 24 bp, 平均长度分别为 14.09、16.64、16.78、20.47 bp (表 2)。

表 1 厚朴转录组序列中 SSR 统计

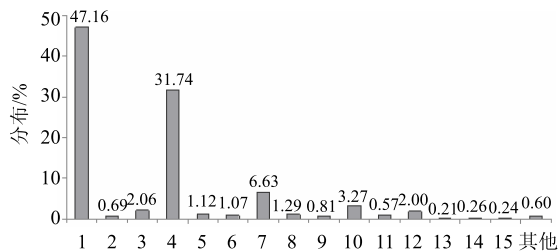
Table 1 Description of SSR in transcriptome of *M. officinalis*

项目	数量/条
搜索序列总数	16 369
SSR 总数	8 635
含 SSR 位点的序列数目	6 604
含多个 SSR 位点的序列数目	1 613
含复合型 SSR 的序列数目	533
单核苷酸 SSR 位点数	4 131
二核苷酸 SSR 位点数	3 018
三核苷酸 SSR 位点数	1 414
四核苷酸 SSR 位点数	67
五核苷酸 SSR 位点数	5

表 2 厚朴转录组 SSR 重复基元序列特征

Table 2 Sequence features of SSR motifs in transcriptome of *M. officinalis*

重复基元类型	基元种类数	平均长度/bp	最长重复长度/bp	数量最多重复基元类型	数量最多重复基元数目
单核苷酸	4	14.09	24	A	2 217
二核苷酸	11	16.64	24	GA	926
三核苷酸	53	16.78	24	GAA	116
四核苷酸	33	20.47	24	AATA	6
五核苷酸	5	25.00	25	—	—



1-A/T 2-C/G 3-AC/GT 4-AG/CT 5-AT/AT 6-AAC/GTT
7-AAG/CTT 8-AAT/ATT 9-ACC/GGT 10-AGC/CTG
11-AGG/CCT 12-ATC/ATG 13-CCG/CGG 14-AAAG/CTTT
15-AAAT/ATTT

图 1 厚朴转录组中 SSR 基序类型分布

Fig. 1 Distribution of SSR type in transcriptome of *M. officinalis*

是 6 次。除单核苷酸 SSR 外，其他 SSR 重复次数主要集中在低重复次数，即 5~10 次；一般重复次数 11~20 次，仅二核苷酸 SSR 有分布。二核苷酸 SSR 中，重复 9 次的 SSR 数目最多，为 738 个，其次是重复 10 次；三核苷酸 SSR 中，随重复次数的增加，SSR 数目逐渐减少（表 3）。就 SSR 长度而言（图 2），SSR 长度能达到 20 bp 时，其多态性较

从核苷酸基序类型来看（图 1），除单核苷酸 A/T 外，以二核苷酸 AG/CT 重复基序为主要类型，占总 SSR 的 31.74%，高于其他二核苷酸基序类型，其次是 AC/GT（2.05%）。三核苷酸重复中，AAG/CTT 最多，出现频率为 6.63%；其次是 AGC/CTG（3.27%）和 ATC/ATG（2.00%）。四核苷酸重复序列中，AAAG/CTTT 为最多，AAAT/ATTT 次之。

2.2 厚朴转录组 SSR 的评价

SSR 分子标记的多态性是评价其可用性的重要依据^[14]，其多态性受到基元重复次数和 SSR 长度的影响^[15]。重复次数方面，厚朴转录组 SSR 重复次数主要集中在 10~20 次，10 次重复比例最高，其次

高；长度在 12~20 bp 时，其多态性中等；低于 12 bp 时，其多态性极低。厚朴转录组 SSR 长度主要集中在 12~20 bp，占总 SSR 的 65.70%；超过 20 bp 的 SSR 比例为 8.18%。低于 12 bp 的 SSR 比例为 26.12%，表明本研究中厚朴转录组 SSR 理论上具有中等以上的多态性。

2.3 厚朴转录组 SSR 的功能注释

利用 BLAST 软件将含有 SSR 位点的 Unigene 序列与 NR、NT、GO 和 KEGG 数据库进行对比，获得的序列注释见表 4，总共有 6 159 条（93.26%）Unigene 序列得到注释。其中注释到 NR 数据库序列最多，为 6 043 条；其次是 NT 数据库和 GO 数据库，分别为 5 700 条和 3 555 条。

为了进一步对序列功能进行分析，将序列利用 WEGO 软件进行 GO 分类注释。结果表明，3 555 条序列共注释到 2 650 个 GO 分类号。其中，取得的分子功能（molecular function）、细胞组分（cellular component）和生物学过程（biological process）分类号分别为 995、273 和 1 382 个。涉及 Unigene 有注释结果，其他未得到注释。注释的序列最多

表 3 厚朴 SSR 不同基序重复的数量分布

Table 3 Distribution of SSR with different motif types and repeat numbers in *M. officinalis*

重复次数	重复基元数量/个					合计/个
	单核苷酸	二核苷酸	三核苷酸	四核苷酸	五核苷酸	
5	—	—	842	57	5	904
6	—	585	340	10	0	935
7	—	442	213	0	0	655
8	—	509	19	0	0	528
9	—	738	0	0	0	738
10	892	614	0	0	0	1 506
11	606	127	0	0	0	733
12~20	2 470	3	0	0	0	2 473
>20	163	0	0	0	0	163

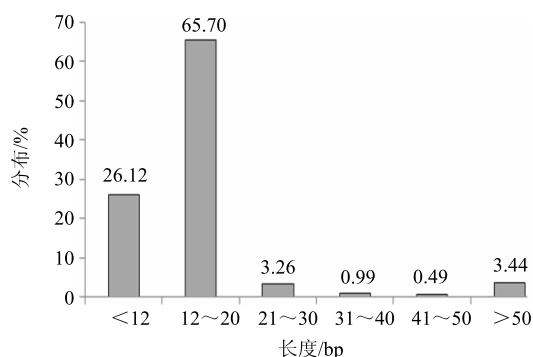


图 2 厚朴转录组 SSR 长度分布

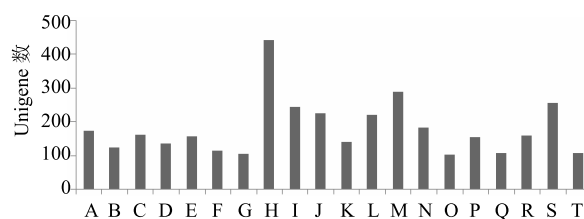
Fig. 2 Distribution of SSR length in transcriptome of *M. officinalis*

表 4 厚朴转录组中含 SSR 的 Unigene 的 NR、NT、GO 和 KEGG 数据库对比分析

Table 4 NR, NT, GO, and KEGG mapping analysis of Unigene containing SSR in transcriptome of *M. officinalis*

注释数据库	注释数目/条
GO_注释	3 555
KEGG_注释	1 557
NR_注释	6 043
NT_注释	5 700
总注释	6 159

的前 20 个 GO 分类进一步进行分析 (图 3)。在分子功能类中, 主要与结合活性有关, 注释 Unigene 最多的 GO 分类为 ATP binding; 在细胞进程和生物学进程类中, 主要以膜的整体组成 (integral component of membrane) 和氧化还原过程 (oxidation-reduction process) 居多。综合可知, 被注释的含有 SSR 的 Unigene 序列主要的功能与膜能量和氧化还原等代谢相关。



A-锌离子结合 B-蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性 C-核苷酸结合 D-核酸结合 E-金属离子结合 F-DNA 结合 G-结合 H-ATP 结合 I-质膜 J-核 K-线粒体 L-膜 M-膜的整体组成 N-细胞质 O-叶绿体膜 P-叶绿体 Q-转录调节, DNA 模板化 R-蛋白质磷酸化 S-氧化还原过程 T-代谢过程 A~H-分子功能 I~P-细胞组分 Q~T-生物过程

A-zinc ion binding B-protein serine/threonine kinase activity C-nucleotide binding D-nucleic acid binding E-metal ion binding F-DNA binding G-binding H-ATP binding I-plasma membrane J-nucleus K-mitochondrion L-membrane M-integral component of membrane N-cytosol O-chloroplast envelope P-chloroplast Q-regulation of transcription, DNA-templated R-protein phosphorylation S-oxidation-reduction process T-metabolic process A~H-molecular function I~P-cell part Q~T-biological process

图 3 厚朴转录组中含 SSR 的 Unigene 的 GO 分类

Fig. 3 GO classification of Unigene containing SSR in transcriptome of *M. officinalis*

KEGG 代谢通路分析, 有 1 557 条 (23.58%) Unigene 中, 只得到了 1 046 个 K 编号, 表明平均 1.49 个含有 SSR 的 Unigene 具有相同的功能。将有 K 编号注释的 Unigene 注释到 KEGG 代谢通路图中时, 对应 111 个通路图 (map)。对前 20 个代谢通路进行绘图, RNA transport 通路的 Unigene 最多, 其次是剪接体 (Spliceosome) 和植物激素信号转导 (Plant hormone signal transduction), 见图 4。

2.4 厚朴转录组 SSR 有效性的初步分析

对合成的 45 对引物进行初步分析 (表 5 和图

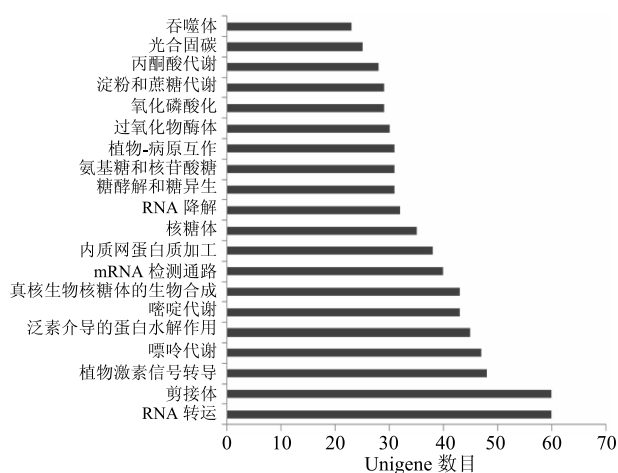


图 4 厚朴转录组中含 SSR 的 Unigene 的 KEGG 代谢通路分类

Fig. 4 KEGG pathway classification of Unigene containing SSR in transcriptome of *M. officinalis*

5)。由图 5 可以看出, 45 对引物中有 25 对可以扩增出条带, 其中的 22 对引物可以扩增出预期大小的条带 (表 5), 扩增效率为 48.89%; 3 对引物的扩增产物与预期大小不符, 占验证引物的 6.67%; 剩余的 21 对引物扩增不出条带。

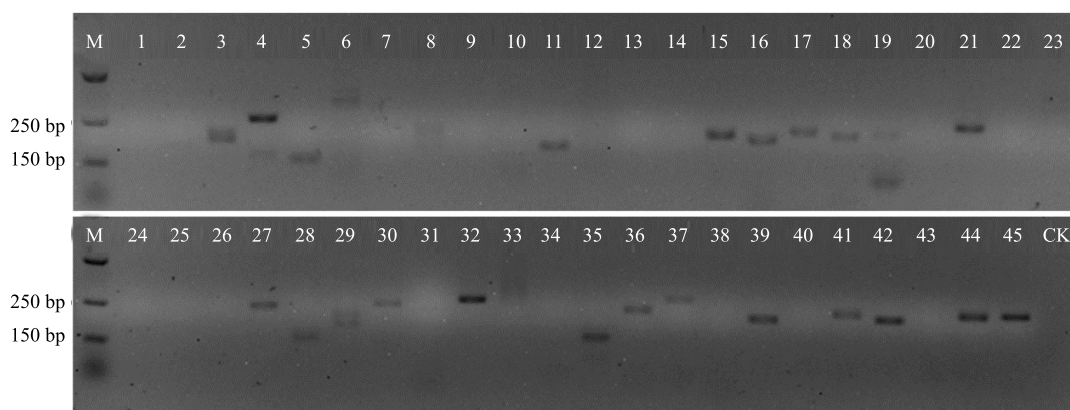
3 讨论

基于转录组测序的 SSR 分子标记, 不依赖于全基因组信息, 能够快速和廉价地获得物种大量的 SSR 位点信息。该方法既可避免全基因组测序难度大、成本高和周期长的缺点, 又可避免 EST-SSR 信息量少的问题^[8-9]。目前, 利用转录组 SSR 进行分子标记开发和应用的研究已经被广泛报道, 说明转录组 SSR 位点能够用于分子标记的开发, 并具有一定的广泛性。但是, 由于真核生物会对转录本 RNA 进行切去内含子等加工过程, 从而使得根据转录组序列设计的引物可能正好位于内含子区域或被内含

表 5 SSR 引物筛选

Table 5 Screening primers of SSR

引物编号	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')	基序重复类型	预期长度/bp
SSR0003	ATTCAGAGAGAGCGCCGATA	ACAGGCATGCTTCTGGAGAT	(CTG) ₈	177
SSR0004	CGAGCTGACGTGACTTCGTA	CTTGCTGGTTCGCCTACTTT	(TACTA) ₅	266
SSR0005	ATGGTTTCGGTGATTCCAAA	ATTGTGCCACACTGATGGA	(TAAA) ₅	116
SSR0011	ATGTCGCTGTTCATCTCAA	TACACTGCCAATTCACGGA	(TC) ₆	154
SSR0015	CATGGTGCAATGACCTTTTG	GTCCAAGCATACCACCAACA	(A) ₂₃	179
SSR0016	ACTTGGGAGGAGCTGGGTAT	ATTGCTGAGTATCGCCAATG	(GGAGG) ₅	187
SSR0017	TGGTCAGGATGCTGATCCTAT	TTCACCAAACCTGTTCCACTC	(CATTG) ₅	212
SSR0018	TCGAGTACCCATTGTGGTGA	CCACCCATGAGTTGGGATAA	(T) ₂₄	168
SSR0019	AGCAGTAGGAGATGGGCAGA	CCTCGTCATCTGCTTCCAT	(CT) ₉	210
SSR0021	AGGACAAAAAGAACCCACG	GACTCCACTGAAGAGCGACC	(AATT) ₅	241
SSR0027	TCTTCGCCAGATCAAATTCA	GTAGGAGGAGCTGCTGTTGG	(T) ₁₁	232
SSR0028	TGAACAGCTGCCATTCTTTG	CACATGGATCGAGTGCAGTT	(CT) ₉	105
SSR0029	TGATTGGATTAGGCTCCTGG	CTCTCCTTCCCACATCCAAA	(T) ₁₄	160
SSR0032	ATGGCCAAAAAGTCAACTGG	CAGGTCAGGTCAACTCGACA	(TAT) ₆	269
SSR0035	CAGAATCTGGCAAGGAGGAA	CCTCGTCATCAACTCCCATT	(TGA) ₅	114
SSR0036	TTCGACCGCGTTCTCTCTAC	AGATTCTCTTTTCGGGGAA	(CCCT) ₅	231
SSR0037	TCCCAGAACACAGTAAACCC	GGTTGCTGACTACTGCTCCC	(CTT) ₅	255
SSR0039	GAAAGAGAAGGGGAGATGGG	AAGAGGCAAACATTGGGTTG	(GA) ₉	198
SSR0041	TCAATCTCGACGTCATCCTG	CAGAACAGCTGGTCGGAATC	(TGG) ₆	217
SSR0042	TACGGGTACCCAAACAGAGC	CCATCCTGAATTCCTCGAAA	(TGTT) ₅	201
SSR0044	CCCAGAAATGCAGAATGGTT	CTTGACTCGCCGATTCTTTC	(CTT) ₆	226
SSR0045	CCCAAACAAAAGCACCAAAT	GGATGTTGCACGAATGTGTC	(C) ₁₃	228



1~45-引物 SSR0003~SSR0045 M-Marker CK-对照
1—45-Primers SSR0003~SSR0045 M-Marker CK-control

图 5 PCR 产物凝胶电泳图

Fig. 5 Gel electrophoresis results of PCR products

子切断,造成 SSR 引物位点不能与基因组 DNA 结合,故需对引物进行实验、检验和筛选。此外,在我国厚朴具有悠久的栽培和研究历史,已经建立了 AFLP、DAF、RAPD 和 SRAP 等分子标记技术^[4]。虽然已经有厚朴 SSR 分子标记方法的报道,但是均具有一定的局限性。因此,本研究运用转录组数据进行 SSR 开发,获得大量的 SSR 位点信息,克服了传统 SSR 标记开发周期长、难度大和成本高的问题,为厚朴 SSR 标记的开发奠定了基础。

本研究对厚朴 3 个样本转录组测序后的 Unigene 序列进行 SSR 分析,筛选出 9 405 个 SSR 位点,分布在 6 604 条 Unigene 序列中,SSR 位点出现频率为 1/3.43 kb。前人研究表明,植物中平均 23.3 kb 就有 1 个 SSR 位点,其中双子叶植物为 21.2 kb,单子叶植物为 64.6 kb。这表明厚朴转录组中 SSR 数量具有较高的丰富度。与其他中药物种相比,厚朴转录组 SSR 出现频率与冬凌草 (1/3.5 kb)^[16]相近,高于杜仲 (1/1.75 kb)^[17],低于川西獐牙菜 (1/18.01 kb)^[18]和红豆杉 (1/18.01 kb)^[19]等。即使运用同种方法进行分析,SSR 频率也会出现不同,这是由多种因素造成的,如物种本身 SSR 数量、原始序列和标准设定等^[20]。

SSR 的序列特征是 SSR 分子标记的重要方面。前人研究表明,植物的 SSR 中二核苷酸重复占主导,其次是三核苷酸重复。如冬凌草^[17],党参^[11]和半夏^[21]等为二核苷酸主导,而在川西獐牙菜^[18]、杜仲^[17]和人参^[10]等为三核苷酸主导。本研究表明,厚朴转录组 SSR 二核苷酸重复类型数量 (3 018 个)多于三核苷酸重复类型数目 (1 414 个),其中二核

苷酸 AG/CT 和三核苷酸 AAG/CCT 重复基元为主导重复基元,这与前人报道一致。此外,厚朴转录组 SSR 中二、三核苷酸类型重复次数多、跨度大,理论上具备更高的多态性,可作潜在的 SSR 重复基元序列,进行有目的的引物设计和开发。

通过对厚朴转录组中含有 SSR 的 Unigene 序列进行功能注释,6 159 条含有 SSR 位点的序列能够对比到已知功能序列,比例高达 93.26%,表明多数 SSR 对应序列具有同源序列可供参考。进一步进行注释,发现其主要归类于分子功能类下的 ATP binding,生物学进程类下的氧化还原过程 (oxidation-reduction process) 和细胞组分类下的膜的整体组成 (integral component of membrane)。这为有针对性地选择一定功能的基因序列作为 SSR 位点提供了方向,为目标性状的 SSR 位点筛选奠定了基础。同时,可与其他 SSR 标记和高通量测序方法结合,以加速厚朴 SSR 标记开发,为更好地进行资源开发利用、遗传资源多态性评价和辅助育种等工作奠定基础。

参考文献

- [1] Meng A P. A karyomorphological study of 40 species in 11 genera of the Magnoliaceae from China [J]. *Acta Phytotaxonom Sin*, 2006, 44(1): 47-63.
- [2] Yu H H, Yang Z L, Sun B, et al. Genetic diversity and relationship of endangered plant *Magnolia officinalis*, (Magnoliaceae) assessed with ISSR polymorphisms [J]. *Biochem System Ecol*, 2011, 39(2): 71-78.
- [3] 麦 静, 杨志玲, 杨 旭, 等. 基于 SSR 标记的厚朴亲本及其子代群体的遗传多样性分析 [J]. *植物资源与环境学报*, 2015, 24(3): 10-17.

- [4] 翁 剑, 陈宝钢, 李书平, 等. 厚朴分子标记技术应用现状及建议 [J]. 湖北林业科技, 2013, 42(5): 45-48.
- [5] Lu C, Zou C, Zhang Y, *et al.* Development of chromosome-specific markers with high polymorphism for allotetraploid cotton based on genome-wide characterization of simple sequence repeats in diploid cottons (*Gossypium arboreum* L. and *Gossypium raimondii* Ulbrich) [J]. *BMC Genom*, 2015, 16(1): 1-12.
- [6] Subramanian S, Mishra R K, Singh L. Genome-wide analysis of microsatellite repeats in humans: their abundance and density in specific genomic regions [J]. *Genome Biol*, 2003, 4(2): 1-10.
- [7] 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.
- [8] Martin L B, Fei Z, Giovannoni J J, *et al.* Catalyzing plant science research with RNA-seq [J]. *Front Plant Sci*, 2013, 4(66): 66.
- [9] Haas B J, Zody M C. Advancing RNA-Seq analysis [J]. *Nature Biot*, 2010, 28(5): 421-423.
- [10] Li C, Zhu Y, Xu G, *et al.* Transcriptome analysis reveals ginsenosides biosynthetic genes, microRNAs and simple sequence repeats in *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. *Bmc Genom*, 2013, 14(1): 204-205.
- [11] 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.
- [12] Liu Y, Zhang P, Song M, *et al.* Transcriptome analysis and development of SSR molecular markers in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0143017.
- [13] Wang L, Wang Z, Chen J, *et al.* De novo transcriptome assembly and development of novel microsatellite markers for the traditional Chinese medicinal herb, *Veratrum baillonii* Franch (Gentianaceae) [J]. *Evol Bioinform Onl*, 2015, 11(S1): 39-45.
- [14] 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.
- [15] Stefanoudaki E, Kotsifaki F, Koutsafakis A. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential [J]. *Genome Res*, 2010, 11(8): 1441-1452.
- [16] 苏秀红, 李庆磊, 陈随清, 等. 冬凌草转录组 SSR 位点分析及多态性初步评价 [J]. 北方园艺, 2016(4): 93-96.
- [17] 吴 敏, 杜红岩, 乌云塔娜, 等. 杜仲基因组微卫星特征及 SSR 标记开发 [J]. 林业科学研究, 2015, 28(3): 387-393.
- [18] 刘 越, 岳春江, 王 翊, 等. 藏茵陈川西獐牙菜转录组 SSR 信息分析 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(11): 2068-2076.
- [19] 李炎林, 杨星星, 张家银, 等. 南方红豆杉转录组 SSR 挖掘及分子标记的研究 [J]. 园艺学报, 2014, 41(4): 735-745.
- [20] 罗 纯, 武红霞, 姚全胜, 等. 2015. 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, 36(7): 1261-1266.
- [21] 王 森, 张 震, 姜倪皓, 等. 半夏转录组中的 SSR 位点信息分析 [J]. 中药材, 2014, 37(9): 1566-1569.