

毛竹 EST 资源 SSR 标记分析与筛选

张智俊¹, 管雨¹, 杨丽¹, 余利¹, 罗淑萍^{2,*}

(¹ 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江农林大学, 浙江临安 311300; ² 新疆农业大学农学院, 乌鲁木齐 830052)

摘要: 对来源于 NCBI 公共数据库的非冗余 3 087 条毛竹 (*Phyllostachys edulis*) EST 序进行简单重复序列 SSR 搜索发现: 在 401 条毛竹 EST 序列中共查找到 408 个 SSR 位点, 平均 6.8 kb EST 序列中含有 1 个 SSR。其中二核苷酸和三核苷酸重复是毛竹 EST-SSR 的主要重复类型, 分别占 SSR 总数的 43.14% 和 49.75%。SSR 的不同重复基序中, 最常见的重复基序是: (AG)_n, 占 37.01%, 其余出现频率较高的依次为 (TC)_n、(AGC)_n、(GAG)_n 和 (CGC)_n。根据搜索结果设计了 182 条毛竹 EST-SSR 引物, 以 12 个不同种属的竹子 DNA 为模板, 对引物进行了稳定性、通用性的验证与评价。结果表明有 42 对引物有较清晰且稳定的目标扩增产物, 其中 39 对引物的产物存在多态性, 说明设计开发的毛竹的 EST-SSR 标记是可行且有效的。

关键词: 毛竹; EST-SSR; 分子标记

中图分类号: S 68

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 05-0989-08

Analysis of SSRs Information and Development of SSR Markers from Moso Bamboo (*Phyllostachys edulis*) ESTs

ZHANG Zhi-jun¹, GUAN Yu¹, YANG Li¹, YU Li¹, and LUO Shu-ping^{2,*}

(¹The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an, Zhejiang 311300, China; ²College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumuqi 830052, China)

Abstract: Uni-ESTs of Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) from the database of dbEST were screened using Websat software and 408 SSRs in 401 ESTs were mined out, accounting for 13.02% of the total ESTs, corresponding to one SSR in every 6.8 kb of the ESTs. Dinucleotide and trinucleotide repeats EST-SSRs were dominant, accounting for 43.14% and 49.57% respectively. (AG)_n is the most frequent motif in dinucleotide repeats, accounting for 37.01% in total EST-SSRs, followed by (TC)_n, (AGC)_n, (GAG)_n and (CGC)_n. 182 primer pairs were designed which 42 of them showed amplifications, and 39 primer pairs could have products with polymorphisms from 12 different bamboo samples. The results indicated that it is an available approach to develop EST-SSR markers based on ESTs from Moso bamboo.

Key words: Moso bamboo; *Phyllostachys edulis*; EST-SSR

收稿日期: 2010-09-07; 修回日期: 2011-04-19

基金项目: 国家‘863’计划项目(2007AA021403); 浙江省自然科学基金项目(Y307469); 浙江林学院人才启动基金、重点实验室开放基金项目

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: luoshuping2008@163.com; Tel: 0991-8763860)

竹类植物约有 70 多属 1 200 多种, 其中 39 个属 500 余种分布在中国, 集材用、笋用和观赏等众多用途, 是重要的园艺树种之一 (卓仁英, 2003)。由于竹类植物很少开花结实, 以花和果形态特征为主要依据的传统分类方法很难应用于竹类植物, 从而使竹类植物的传统分类研究较为混乱。植物分类学发展至今, 已发展出实验分类学、细胞分类学、化学分类学、数量分类学等方法。到 20 世纪 80 年代, DNA 分子标记技术被应用于植物分类研究中, 成为实现现代植物学研究的一个新的技术手段 (邢新婷, 2004; 石明旺 等, 2006; 李林 等, 2009)。

SSR (Simple Sequence Repeat) 通常又称为微卫星标记, 该标记具有多态性高、共显性、易检测、重复性高、数量丰富等优点, 已被广泛应用于植物分类等方面。根据 SSR 的来源可将其分为 GSS-SSR 和 EST-SSR。其中传统的基因组 GSS-SSR 标记开发不仅费时耗力, 成本也很高。近年来随着测序技术的发展, GenBank 中平均每天都有上万个 EST (Expressed Sequence Tag, EST) 公布, 使根据已知 EST 数据库开发 SSR 标记成为可能 (Varshney et al., 2007; 王家麟 等, 2007; 陈全求 等, 2008; 杨素丽 等, 2008; 张俊娥, 2008)。EST-SSR 标记不仅具有基因组 SSR 标记的多态性高、共显性、重复性好的特点, 而且开发成本相对低廉、在种属间具有良好的通用性。另外, 由于部分 EST-SSR 标记来自于基因的编码区, 所以更容易获得基因表达的信息, 可为功能基因的直接鉴定提供重要依据。目前该分子标记已被广泛应用于遗传连锁图谱的构建, 种质资源多样性的分析, 以及比较基因组学等研究, 在诸如棉花、油菜、花生、大豆、甘蓝、白菜等 (李小白 等, 2007; Li et al., 2008; 刘媛 等, 2008; 郑丽珊 等, 2008; 李丽和郑晓鹰, 2009; 王金彦 等, 2009; 陈琛 等, 2010) 植物中均已成功开发了 EST-SSR 标记。本研究中根据 NCBI 数据库已收录的 3 000 多条毛竹 EST 序列信息进行分析, 拟探讨通过 EST-SSR 开发 SSR 标记的可行性, 为竹类植物 EST-SSR 标记的开发和应用奠定基础。

1 材料与方法

供试材料毛竹 (*Phyllostachys edulis*)、菲白竹 (*Pseudosasa variegata*)、铺地竹 (*Sasa argenteostriatus*)、斑竹 (*Phyllostachys bambusoides*)、雷竹 (*Phyllostachys praecox*)、紫竹 (*Phyllostachys nigra*)、大叶箬竹 (*Indocalamus latifolius*)、小叶箬竹 (*Indocalamus victoralis*)、茶秆竹 (*Pseudosasa amabilis*)、平安竹 (*Pseudosasa japonica*)、大明竹 (*Pleiblastus graminea*) 和红秆寒竹 (*Chimonobambusa marmorea*), 均于 2010 年 3 月采自浙江林学院吉永竹园, 分别取 2~3 片竹叶, 置于 -80 °C 冰箱保存。2010 年 4—7 月在森林培育国家重点实验室培育基地分子生物学实验分室, 利用改良 CTAB 法进行基因组 DNA 的提取 (闫庆祥 等, 2010)。

毛竹 EST 序列可由 GenBank 数据库搜索得到。利用 VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen>) 和 RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org>) 去除载体污染和重复序列, 以 Phrap (<http://www.phrap.org>) 进行 EST 重叠群分析和聚类去除冗余 EST 序列后, 使用 Websat 软件 (Martins et al., 2009) (<http://wsmartins.net/websat/>) 对 EST 进行 SSR 序列的搜索, 查找的标准为: 二、三、四、五和六核苷酸重复类型的重复次数 n 分别大于或等于 9、6、4、4 和 3 次。选择二、三、四、五和六核苷酸重复基序长度大于等于 18 bp 的 EST 序列, 应用软件 Primer 3 设计引物, 引物长度为 18~27 bp, 扩增产物预期片段为 150~400 bp, 引物对 T_m 在 58~60 °C。由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

PCR 扩增反应体系采用 20 μ L 反应体系, 其中含有 $1 \times$ buffer, Mg^{2+} 2.5 mmol \cdot L $^{-1}$, dNTPs 0.2 mmol \cdot L $^{-1}$, 引物 0.4 μ mol \cdot L $^{-1}$, Taq 酶 1.5 U, 模板 DNA 100 ng。反应程序为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 45 s, 退火 55 °C 60 s, 72 °C 延伸 90 s, 30 个循环; 72 °C 终延伸 10 min, 4 °C 保存。扩

增产产物在 8%的非变性 PAGE 中电泳检测,120 V 电压电泳 2 h 后,采用银染法染色,BIO-RAD Gel Doc 2000 凝胶成像系统中成像。

2 结果与分析

2.1 毛竹 EST-SSR 数量

去除载体及重复序列后共获得 3 087 条非冗余毛竹 EST 序列,总长 2 777 kb。对这些毛竹 EST 序列进行搜索,发现 401 条 EST 序列中含有 408 个 SSR,其出现的频率为 13.02%,平均每 6.8 kb EST 出现一个 SSR。在含有 SSR 的 EST 中,401 条 EST 序列含 1 个 SSR,5 条 EST 序列含两个不同重复基序类型 SSR,1 条 EST 序列含 3 个不同重复基序类型 SSR,说明毛竹 EST 中 SSR 数量较为丰富。

2.2 毛竹 EST-SSR 分布特点

在本研究中发现的 408 个 SSR 中(表 1),二核苷酸重复 176 条,三核苷酸重复 203 条,四核苷酸重复 7 条,五核苷酸重复 18 条,六核苷酸重复 4 条出现的频率分别为 43.14%、49.75%、1.72%、4.41%和 0.98 %。可见,在毛竹 EST-SSR 中二核苷酸重复、三核苷酸重复单元类型占主导地位,占 SSR 总数的 92.89%,这同多数动植物二、三重复单元占主导地位的情况相同。毛竹 EST-SSR 重复基序种类共有 27 种类型,其中二核苷酸重复基序有 3 种,三核苷酸重复基序有 16 种,四、五、六核苷酸重复基序种类分别为 2、2、4 种。二、三、四、五、六核苷酸重复基序的 SSR 平均长度分别为:24.61、21.9、24、32.22 和 30 bp。从不同重复基序种类出现的频率来看,二核苷酸重复基序中出现最多的是 AG/TC,占 SSR 总数的 37.01%;三核苷酸重复基序的类型比较分散,以 GAG/CTC 为最多,占到了总 SSR 位点数的 9.31%,其次是 CGC/GCG、AGC/TCG 和 AAG/TTC,分别占了总 SSR 位点数的 5.15%、4.66%和 4.41%;四、五、六核苷酸重复基序中除 TCCA、TAAAA、AAGGG 出现大于 5 次外,其余类型均只出现了 1 次,尤其是六核苷酸重复基序的出现率很低,所含 4 种重复基序类型出现频率均为 0.24%。

表 1 SSR-ESTs 序列中不同重复类型及其数量和百分比
Table 1 Frequency, number and different repeat types of SSRs in SSR-ESTs

重复核苷酸 数类型 Repeat type	重复单元 Repeat motif	EST-SSR 数 Number of EST-SSR	百分比/% Frequency	重复核苷酸 数类型 Repeat type	重复单元 Repeat motif	EST-SSR 数 Number of EST-SSR	百分比/% Frequency
二核苷酸 Dinucleotide	AG/TC	151	37.01	三核苷酸 Trinucleotide	CCT/GGA	7	1.72
	TA/AT	9	2.21		GCC/CGG	19	4.66
	TG/AC	16	3.92		CTG/GAC	12	2.94
三核苷酸 Trinucleotide	AAG/TTC	18	4.41		CTT/GAA	6	1.47
	AGC/TCG	21	5.15		GCT/CGA	12	2.94
	AGG/TCC	4	0.98	四核苷酸 Tetranucleotide	TCCA	6	1.47
	CAG/GTC	4	0.98		CTCG	1	0.25
	CAT/GTA	8	1.96	五核苷酸 Pentanucleotide	TAAAA	13	3.19
	CCA/GGT	17	4.17		AAGGG	5	1.23
	CGC/GCG	23	5.64	六核苷酸 Hexanucleotide	GAATCT	1	0.24
	GTG/CAC	7	1.72		TGCCGC	1	0.24
	AGA/TCT	2	0.49		GTATCC	1	0.24
	GTT/CAA	5	1.23		TCGCAA	1	0.24
	GAG/CTC	38	9.31	总计 Total		408	

2.3 EST-SSR 标记的多态性

根据含有 SSR 位点的 EST 序列信息, 共设计了 182 对引物, 从中筛选出 42 对引物对 12 个不同的竹种进行 PCR 扩增。其中 39 对引物能扩增出清晰的, 大小与预期片段相近的条带, 部分引物 PhyeSSR1 扩增结果见图 1。在筛选出的 42 对引物 (表 2) 中, 三核苷酸重复的引物出现最多, 为

表 2 毛竹 EST-SSR 引物筛选结果
Table 2 SSR primer pairs designed from EST-SSR sequences in Moso bamboo

SSR 位点 SSR loci	登录号 Accession No.	重复单元 Repeat motif	正向引物 Forward primers (5' - 3')	反向引物 Reverse primers (5' - 3')	多态性 条带数 Number of alleles
PhyeSSR1	FG552376.1	(AACCG) ₃	AAATGGCTACCTACCACCACAC	CGTCTCTTTTCTCAGCAGTTT	6
PhyeSSR2	GH205797.1	(AAG) ₁₇	GAGAGGAACTTGATGGATTGGA	CAGAGGCAGAGAGATAGGGAAA	8
PhyeSSR3	FG552702.1	(AAG) ₇	GTCCCTCGTTGGCGAGACA	CTTGCTATCGCTTCTTGTTGTG	7
PhyeSSR4	FG552498.1	(AAGCCG) ₃ (CC A) ₅ (TCGCC) ₃	AAAAGAGAACACGGACGGC	TGTCCAGTACACAACCAACAA	8
PhyeSSR5	GH206243.1	(AG) ₁₃	GGGAGAGAGAGAGGAGAAAAGC	CTGGTTGTCTGGAGTGTGCTA	7
PhyeSSR6	FG395803.1	(AGA) ₆	AGCAGAACAAAGGTGTGTGAAGA	ATCTGGTAGGCAGGCAGTAGAG	8
PhyeSSR7	FG395663.1	(AGC) ₆	GGAGACAGGATTCTTCACAAAG	GTTCTTGAATTTACCCATCCA	8
PhyeSSR8	FG552196.1	(AGG) ₇	GGGTATTTTCGGGCCATTAC	ATCTTGGTGTGCTCCTCTCTT	7
PhyeSSR9	FG552637.1	(CTG) ₇	GAGCAAGAAGACGACCAAGAAG	ATAGACCACCACTCGAAGAGGA	7
PhyeSSR10	FG552408.1	(AG) ₉	TCAGATCACGAGCCAGAGATAG	GAATCAAGTGAAATGGTGCGTA	6
PhyeSSR11	GH205474.1	(GAG) ₈	AGAGAGACTCCATCGGCTA	ATAGAAGTTGAGGTAGAAACGG	8
PhyeSSR12	FG552719.1	(GAG) ₉	CCGGGATTCGGCCATTAC	ATCACAGAGGTGGAGAGGGAGA	5
PhyeSSR13	FG395616.1	(GTATCC) ₃	CCTGTAACCTTGCTTCATCCC	GTAGAAGAGGAATAGCAGCGGA	6
PhyeSSR14	FG394977.1	(TCGCAA) ₄	GGGGAGCAAGAGAAGAGAAGAT	CACCTGGTCACAGAAGATGGA	6
PhyeSSR15	FG552036.1	(TGCCGC) ₃	GAGAAGAAGAAGAGGAGGAGGG	CAGAAGCAGATTGGTGGAATG	6
PhyeSSR16	GH205978.1	(CTC) ₆ (CCA) ₆	TTTCCCTATCTCTCTGCCTCTG	TGTGAAGTAGTTGCCGTCTGT	7
PhyeSSR17	FG552684.1	(AAG) ₁₇ (CTAG) ₃	GAGAGGAACTTGATGGATTGGA	CAGAGGCAGAGAGATAGGGAAA	9
PhyeSSR18	FG552037.1	(TTCATC) ₃	TCGGGCTAATAAATCTGTTGCT	GTGCGTCATCCGTAGTGTATGT	7
PhyeSSR19	FG552242.1	(TGCCGC) ₃	TGGGGTAATTCGGCCAT	GCATCTTGGTATTGCTCCTCTC	10
PhyeSSR20	FG552491.1	(TGCCGC) ₃	GAGAAGAAGAAGAGGAGGAGGG	CAGAAGCAGATTGGTGGAATG	10
PhyeSSR21	FG551910.1	(TG) ₁₄	TTCTGTTTGCTTTCAGGTGTTG	TCTAACAAGGGTTCATGGATGG	6
PhyeSSR22	FG552045.1	(TG) ₁₀	ATATTAACAGCAACGGGAGCAT	GAAGTTTCTAACAAGGGTTCATG	7
PhyeSSR23	FG552259.1	(TC) ₁₆	CGAGAGCGAGACCGCGAG	ATACATGGCAGCACCACCATT	8
PhyeSSR24	FG552679.1	(GTTGTT) ₃	ACCAAAGACGAGGGAAGAAAA	TCACCGAGACAAAGATGATGTC	11
PhyeSSR25	FG395744.1	(GTT) ₆	ATTACCCTCCCCAGACCATACT	GCTTCAATCTACAAAACCCCAA	11
PhyeSSR26	GH205767.1	(GCG) ₆	CATAATCCACCTTCTTGAGACA	ATACACCTTGATTCCACCACCT	12
PhyeSSR27	FG552018.1	(GCC) ₆	GGGAAAAGAGAAGAGGAGGAAG	AACAAAGATCCACTGCCAAAGT	9
PhyeSSR28	FG552627.1	(GCAGTA) ₂ (GT G) ₆	CAGTCGATTATAGCCACACCA	CGAAGAAGAGACGAGGGAAC	6
PhyeSSR29	GH206042.1	(GAG) ₅ (TC) ₇ (CCT) ₃ (CTG) ₄	AAGAACCAGGAAGAAGACGAC	ATAGACCACCACTCGAAGAGGA	7
PhyeSSR30	FG552668.1	(GAAAAG) ₃	ATTGACTGTTTCAAGCCAGAT	TTTTCTTGCTAACTCCAGCTCC	8
PhyeSSR31	FG551883.1	(GA) ₁₃	CACTGCTACTTCATTCCTAGCG	GGATGTCGATGTGGTTGAGAG	6
PhyeSSR32	FG395006.1	(GA) ₁₀	GGGGAGAGAGAGTATGTGTGTGT	GGCTCGGATCAGTTGAAATTAG	6
PhyeSSR33	FG551849.1	(CT) ₁₅	GATTGGAGAAGGGAGAGGAGAC	TACTTGGTTGATTTTGGCACAC	6
PhyeSSR34	FG552113.1	(CGC) ₆	CAAGCCAGACAACCAATCC	ACTCTTTTCAGGTGCTGCTTTC	10
PhyeSSR35	FG552123.1	(CCTCC) ₄	GTCCAAGAAGCCGAGAAATAA	CGATCATAGCCATTAAGTTTGG	12
PhyeSSR36	FG552800.1	(CAT) ₆	TCTTTTCCAGTGCTGTGTTGTT	AGAGAGGTTCTTTGGGTGTGAG	6
PhyeSSR37	FG552662.1	(CACAGT) ₃	TTGACCATCATTTGAAGGTTG	AGAGCTTGAGCGTCCTTGC	6
PhyeSSR38	GH205412.1	(AGGGAG) ₄	CTCTCTCTCCCTCAGCTCT	ATATCTTCTTGTGCTTGGCGTT	9
PhyeSSR39	FG395716.1	(AGG) ₆	GGGAGGAAGAAGACGAAGAAA	TCCAGTGAGTTGTTGTTCAG	11
PhyeSSR40	GH205872.1	(AGC) ₆	TAATCATCTTGCTGTGGTGAA	ATAGCTGTTACCCGAAATCAG	7
PhyeSSR41	FG395803.1	(AGA) ₆	AGCAGAACAAAGGTGTGTGAAGA	ATCTGGTAGGCAGGCAGTAGG	5
PhyeSSR42	FG552722.1	(AAGGG) ₅	CATTTCCGGGCCATTACC	ATAGACCACCACTCGAAGAGGA	12

19 对, 二核苷酸重复类型的引物为 8 对, 五核苷酸重复类型的引物 1 对, 六核苷酸重复类型的引物 14 对, 含有可扩增两种以上基序类型的引物 5 对 (PhyeSSR4、PhyeSSR16、PhyeSSR17、PhyeSSR28、PhyeSSR29), 且所检测的 EST-SSR 基序长度均大于 18 bp, 其中 PhyeSSR2 引物所能扩增出的 SSR 基序长度可达 51 bp。42 对引物共扩增出 327 条带, 平均每对引物可扩增出 7.7 条带。说明利用毛竹 EST 序列开发 EST-SSR 标记是可行的。

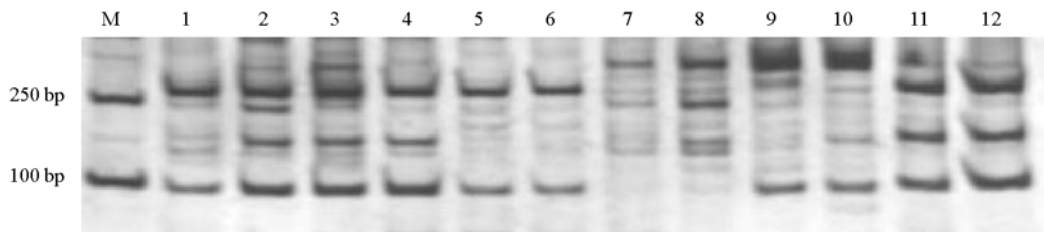


图 1 不同竹种的 EST-SSR 扩增结果

1. 菲白竹; 2. 铺地竹; 3. 斑竹; 4. 雷竹; 5. 毛竹; 6. 紫竹; 7. 大叶箬竹; 8. 小叶箬竹; 9. 茶秆竹; 10. 平安竹; 11. 大明竹; 12. 红秆寒竹。M: DL2000, 引物 PhyeSSR1。

Fig. 1 Amplification of bamboo species with EST-SSR primer from Moso bamboo

1. *Pseudosasa variegata*; 2. *Sasa argenteostriatus*; 3. *Phyllostachys bambusoides*; 4. *Phyllostachys praecox*; 5. *Phyllostachys edulis*; 6. *Phyllostachys nigra*; 7. *Indocalamus latifolius*; 8. *Indocalamus victoralis*; 9. *Pseudosasa amabilis*; 10. *Pseudosasa japonica*; 11. *Pleioblastus graminea*; 12. *Chimonobambusa marmorea*; M: DL2000 marker, primer PhyeSSR1.

3 讨论

竹类植物利用分子标记技术进行遗传多样性、遗传图谱构建等除了采用 RAPD、AFLP 等分子标记外 (娄永峰 等, 2010), 也有相关 SSR (李淑娴 等, 2002) 标记的应用研究, 但这些 SSR 标记来源于其水稻微卫星标记, 直接来源于竹子 EST-SSR 的标记还未见报道。至 2009 年 6 月, GenBank 数据库中大量毛竹 EST 数据的公布, 为利用毛竹 EST 资源开发竹子 EST-SSR 标记提供了前提条件。进行 SSR 信息分析的工具很多, 除了较常用的 MISA 和 SSRIT (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/misa.html> 和 <http://www.gramene.org/db/markers/ssrtool>)、SSR Hunter 外还有 2009 年最新公布的在线设计程序 WEBSAT。WEBSAT 进行 SSR 分析和引物设计采用图形交互界面, 使用非常简单、快捷, 是一种较为理想的 SSR 分析工具。本试验通过 WEBSAT 对 3 087 条总长 2 777 kb 的毛竹 EST 进行搜索, EST-SSR 出现频率为 13.02%, 高于白菜 (10.34%) (忻雅 等, 2006)、辣椒 (10.7%) (李晶晶 等, 2008) 和花生 (7.8%) (梁炫强 等, 2009), 但是低于茶树 (17.68%) (金基强 等, 2006)。

毛竹 EST-SSR 种类丰富, 二至六核苷酸重复类型均存在, 但以三核苷酸重复基序检出频率最高 (203 个、49.75%), 二核苷酸重复基序次之 (176 个、43.14%)。产生此差异的原因, 一是物种之间基因的差异, 主要表现为不同物种已公布 EST 数目有所差异; 二是由于搜索标准不同造成的。本研究提高了核苷酸重复次数, 尤其是将二核苷酸重复次数从一般重复大于 6 次提高到大于等于 9, 这就造成总体二核苷酸重复数目降低, 所占比例也略低于三核苷酸的频率。根据已有报道统计, 大多数植物 EST-SSR 主要属二、三核苷酸重复基序类型, 但主导重复基序的类型则有所差异。例如, 在小麦 (陈军方 等, 2005)、棉花 (张艳欣 等, 2007)、柑橘 (江东 等, 2006)、百合 (杨素丽 等, 2008) 中均为三核苷酸重复类型为主, 而在核桃 (朱艳 等, 2009; 齐建勋 等, 2011)、茶树 (王丽鸳 等, 2009)、白桦 (王艳敏 等, 2008)、猕猴桃 (姜春芽 等, 2009)、杨树 (张新叶 等, 2009)、辣椒 (李晶晶 等, 2008) 中则以二核苷酸重复为主, 在白菜 (忻雅 等, 2006) 中两者出现频率相近。

在毛竹二核苷酸 EST-SSR 中, AG 重复基序出现次数最高, 占二核苷酸 EST-SSR 的 85.79%, 这与茶树作物(李小白 等, 2007; Li et al., 2008; 刘媛 等, 2008; 郑丽珊 等, 2008; 王金彦 等, 2009)的二核苷酸 EST-SSR 中 AG 重复基序占主导地位一致; 而棉花(张艳欣 等, 2007)占优势的二核苷酸重复基序为 AT。在毛竹三核苷酸 EST-SSR 中, 以 GAG/CTC 基序最占优势, 其次为 CGC/GCG、AGC/TCG 和 AAG/TTC, 但与 CGC/GCG 等其它重复基序相比并未占绝对优势。而在小麦(陈军方 等, 2005)中, CCG 重复基序在其三核苷酸 EST-SSR 中均占绝对优势, 比例在 50% 以上。这可能是由于不同物种 EST 序列差异造成的。

本研究中设计了 182 对毛竹 EST-SSR 引物对散生、丛生、混生类的不同竹种 12 个样品进行了扩增。其中筛选出 42 对引物有扩增产物, 39 对引物扩增结果呈现多态性, 多态性引物占可扩增引物的 92%, 远高于白菜(46.7%)(忻雅 等, 2006)、茶树(76.9%)(金基强 等, 2006)的多态性引物出现的几率。可见, 毛竹与白菜、茶树等其他植物相比, 具有较高的 EST-SSR 的扩增效率, 且多态性引物的比例很高。本研究中的 42 对多态性引物可用于竹子不同属种间的 SSR 标记研究, 并可以用于种内的 SSR 标记分析, 说明通过毛竹 EST 序列开发竹类植物 EST-SSR 标记具有标记种类丰富、所设计引物通用性好、稳定性高、扩增多态性丰富的优点, 可为今后竹类植物分类、遗传作图、遗传多样性分析、功能基因的发掘与定位等方面的研究奠定良好基础。

References

- Chen Chen, Zhuang Mu, Li Kang-ning, Liu Yu-mei, Yang Li-mei, Zhang Yang-yong, Cheng Fei, Sun Pei-tian, Fang Zhi-yuan. 2010. Development and utility of EST-SSR marker in cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (2): 221 - 228. (in Chinese)
- 陈 琛, 庄 木, 李康宁, 刘玉梅, 杨丽梅, 张杨勇, 程 斐, 孙培田, 方智远. 2010. 甘蓝 EST-SSR 标记开发与应用. *园艺学报*, 37 (2): 221 - 228.
- Chen Jun-fang, Ren Zheng-long, Gao Li-feng, Jia Ji-zeng. 2005. Developing new SSR markers from EST of wheat. *Acta Agronomica Sinica*, 31 (2): 154 - 158. (in Chinese)
- 陈军方, 任正隆, 高丽锋, 贾继增. 2005. 从小麦 EST 序列中开发新的 SSR 引物. *作物学报*, 31 (2): 154 - 158.
- Chen Quan-qi, Zhan Xian-jin, Lan Jia-yang, Huang Yun. 2008. Study progress in development of EST (expressed sequence tags). *Chinese Agricultural Science Bulletin*, (9): 72 - 77. (in Chinese)
- 陈全求, 詹先进, 蓝家样, 黄 云. 2008. EST 分子标记开发研究进展. *中国农学通报*, (9): 72 - 77.
- Jiang Chun-ya, Xu Xiao-biao, Liao Jiao, Ni Zhi-hua, Li Jing. 2009. Analysis of SSR information in EST resources of kiwifruit (*Actinidia* sap.). *Chinese Agricultural Science Bulletin*, (13): 37 - 39. (in Chinese)
- 姜春芽, 徐小彪, 廖 娇, 倪志华, 李 晶. 2009. 猕猴桃 EST 序列的 SSR 信息分析. *中国农学通报*, (13): 37 - 39.
- Jiang Dong, Zhong Guang-yan, Hong Qi-bin. 2006. Analysis of microsatellites in citrus unigenes. *Acta Genetica Sinica*, 33 (4): 345 - 353. (in Chinese)
- 江 东, 钟广炎, 洪棋斌. 2006. 柑橘 EST-SSR 分子标记分析. *遗传学报*, 33 (4): 345 - 353.
- Jin Ji-qi, Cui Hai-rui, Chen Wen-yue, Lu Mei-zhen, Yao Yan-ling, Xin Ya, Gong Xiao-chun. 2006. Data mining for SSRs in ESTs and development of EST-SSR marker in tea plant (*Camellia sinensis*). *Journal of Tea Science*, 26 (1): 17 - 23. (in Chinese)
- 金基强, 崔海瑞, 陈文岳, 卢美贞, 姚艳玲, 忻 雅, 龚晓春. 2006. 茶树 EST-SSR 的信息分析与标记建立. *茶叶科学*, 26 (1): 17 - 23.
- Li Li, Zheng Xiao-ying. 2009. The development of multiplex EST-SSR markers to identification Chinese cabbage [*Brassica campestris* L. *chinensis* (L.) Makino and *Brassica campestris* L. *pekinensis* (Lour.) Olsson] cultivars. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (11): 1627 - 1634. (in Chinese)
- 李 丽, 郑晓鹰. 2009. 用于白菜和大白菜品种鉴定的 EST-SSR 复合标记的建立. *园艺学报*, 36 (11): 1627 - 1634.
- Li Jing-jing, Wang Shu-bin, Liu Jin-bing, Pan Bao-gui, Chen Jin-feng. 2008. Development of pepper EST-SSR marker. *Molecular Plant Breeding*, 6 (6): 1219 - 1222. (in Chinese)
- 李晶晶, 王述彬, 刘金兵, 潘宝贵, 陈劲枫. 2008. 辣椒 EST-SSR 标记的开发. *分子植物育种*, 6 (6): 1219 - 1222.
- Li Lin, Dong Dun-yi, Ding Yu-long. 2009. DNA molecular markers in the research of bamboo molecular systematics. *China Forestry Science and*

- Technology, (1): 10 - 15. (in Chinese)
- 李 林, 董敦义, 丁雨龙. 2009. 竹类分子系统学中的 DNA 标记. 林业科技开发, (1): 10 - 15.
- Li Shu-xian, Zou Hui-yu, Huang Min-ren. 2002. Preliminary study on molecular systematics of bamboo by SSR primers derived from rice. *Scientia Silvae Sinicae*, (3): 42 - 48. (in Chinese)
- 李淑娴, 邹惠渝, 黄敏仁. 2002. 用水稻微卫星引物进行竹子分子系统学研究初探. 林业科学, (3): 42 - 48.
- Li W, Pan D, Wei Y M, Cheng G Y, Zheng Y L. 2008. Genetic variation in *Triticum turgidum* L. ssp. *turgidum* landraces from China assessed by EST-SSR markers. *Agricultural Sciences in China*, 7 (9): 1029 - 1036.
- Li Xiao-bai, Cui Hai-rui, Zhang Ming-long. 2007. Detecting the genetic diversity of *Brassica napus* by EST-SSRs. *Journal of Agricultural Biotechnology*, (4): 661 - 667. (in Chinese)
- 李小白, 崔海瑞, 张明龙. 2007. EST-SSRs 检测油菜 (*Brassica napus*) 亲本遗传多样性. 农业生物技术学报, (4): 661 - 667.
- Liang Xuan-qiang, Hong Yan-bin, Chen Xiao-ping, Liu Hai-yan, Zhou Gui-yuan, Li Shao-xiong, Wen Shi-jie. 2009. Characterization and application of EST-SSRs in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Acta Agronomica Sinica*, 35 (2): 246 - 254. (in Chinese)
- 梁炫强, 洪彦彬, 陈小平, 刘海燕, 周桂元, 李少雄, 温世杰. 2009. 花生栽培种 EST-SSRs 分布特征及应用研究. 作物学报, 35 (2): 246 - 254.
- Liu Yuan, Cai Jia-bin, Jiang Guo-song, Tong Qiang-song. 2008. Strategies for cloning of novel genes based on EST. *Hereditas*, (3): 257 - 262. (in Chinese)
- 刘 媛, 蔡嘉斌, 蒋国松, 童强松. 2008. 基于 EST 的新基因克隆策略. 遗传, (3): 257 - 262.
- Lou Yong-feng, Lin Xin-chun, He Qi-jiang, Guo Xiao-qin, Huang Li-chun, Fang Wei. 2010. Analysis on genetic relationship of puji-bamboo species by using AFLP and SRAP. *Molecular Plant Breeding*, (1): 83 - 88. (in Chinese)
- 娄永峰, 林新春, 何奇江, 郭小勤, 黄丽春, 方 伟. 2010. 哺鸡竹亲缘关系的 AFLP 和 SRAP 分析. 分子植物育种, (1): 83 - 88.
- Martins W S, Soares L D C, de Souza Neves K F, Bertoli D J. 2009. WebSat-A web software for microsatellite marker development. *Bioinformation*, 3 (6): 282 - 283.
- Qi Jian-xun, Hao Yan-bin, Zhu Yan, Wu Chun-lin, Wang Wei-xia, Leng Ping. 2011. Studies on germplasm of *Juglans* by EST-SSR markers. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (3): 441 - 448. (in Chinese)
- 齐建勋, 郝艳宾, 朱 艳, 吴春林, 王维霞, 冷 平. 2011. 核桃属种质资源的 EST-SSR 标记研究. 园艺学报, 38 (3): 441 - 448.
- Shi Ming-wang, Pang Yan-jun, Wang Xiu-qiang, Yang Yong-hua. 2006. Progress and perspective in the research of molecular biology in bamboo. *Nonwood Forest Research*, (2): 63 - 68. (in Chinese)
- 石明旺, 庞延军, 王修强, 杨永华. 2006. 竹类植物分子生物学研究进展及展望. 经济林研究, (2): 63 - 68.
- Varshney R K C, Kamel Hendre P S A, Ramesh K, Graner A. 2007. Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. *Plant Science*, 173 (6): 638 - 649.
- Wang Jia-lin, Sun Jia-ying, Yu Qing-yan, Li Liang, Wang Yan-li, Song Jin-he, Liu Chun-yan, Hu Guo-hua, Chen Qing-shan. 2007. Progress of EST-SSRs exploiting and application. *China Journal of Bioinformatics*, (3): 140 - 142. (in Chinese)
- 王家麟, 孙佳莹, 于清岩, 李 亮, 王艳丽, 宋金壑, 刘春燕, 胡国华, 陈庆山. 2007. EST-SSRs 的开发及应用研究进展. 生物信息学, (3): 140 - 142.
- Wang Jin-yan, Yang Qing-li, Yu Shan-lin. 2009. Development and application of SSR markers in peanut. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, (3): 401 - 406. (in Chinese)
- 王金彦, 杨庆利, 禹山林. 2009. 花生 SSR 分子标记的开发与利用. 中国油料作物学报, (3): 401 - 406.
- Wang Li-yuan, Jiang Yan-hua, Duan Yun-shang, Cheng Hao, Zhou Hao, Zhou Jian, Zeng Jian-ming. 2009. Characterization of EST-derived microsatellites and development of SSR-markers in tea (*Camellia sinensis*). *Journal of Plant Genetic Resources*, 10 (4): 511 - 516. (in Chinese)
- 王丽鸳, 姜燕华, 段云裳, 成 浩, 周 健, 曾建明. 2009. 茶树 EST-SSRs 分布特征及引物开发. 植物遗传资源学报, 10 (4): 511 - 516.
- Wang Yan-min, Wei Zhi-gang, Yang Chuan-ping. 2008. Data mining for SSRs in ESTs and EST-SSR marker development in *Betula platyphylla*. *Scientia Silvae Sinicae*, 44 (2): 78 - 84. (in Chinese)
- 王艳敏, 魏志刚, 杨传平. 2008. 白桦 EST-SSR 信息分析与标记的开发. 林业科学, 44 (2): 78 - 84.
- Xin Ya, Cui Hai-rui, Lu Mei-zhen, Yao Yan-ling, Jin Ji-qiang, Lin Rong-shao, Cui Shui-lian. 2006. Data mining for SSRs in ESTs and EST-SSR

- marker development in Chinese cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (3): 549 – 554. (in Chinese)
- 忻 雅, 崔海瑞, 卢美贞, 姚艳玲, 金基强, 林容杓, 崔水莲. 2006. 白菜 EST-SSR 信息分析与标记的建立. *园艺学报*, 33 (3): 549 – 554.
- Xing Xin-ting. 2004. Application of molecular markers in genetic diversity conservation of bamboo plants. *World Bamboo and Rattan*, (3): 12 – 15. (in Chinese)
- 邢新婷. 2004. 分子标记在竹类植物遗传多样性保护中的应用. *世界竹藤通讯*, (3): 12 – 15.
- Yan Qing-xiang, Huang Dong-yi, Li Kai-mian, Ye Jian-qiu. 2010. Genomic DNA extraction in *Cassava* by modified CTAB method. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, (4): 30 – 32. (in Chinese)
- 闫庆祥, 黄东益, 李开绵, 叶剑秋. 2010. 利用改良 CTAB 法提取木薯基因组 DNA. *中国农学通报*, (4): 30 – 32.
- Yang Su-li, Ming Jun, Liu Chun, Mu Ding, Li Ming-yang. 2008. Data mining for simple sequence repeats marker development in expressed sequence tags from *Lilium* L. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (7): 1069 – 1074. (in Chinese)
- 杨素丽, 明 军, 刘 春, 穆 鼎, 李名扬. 2008. 基于 EST 信息的百合 SSR 标记的建立. *园艺学报*, 35 (7): 1069 – 1074.
- Zhang Jun-e. 2008. Analysis of microsatellites derived from apple ESTs. *Journal of Guangxi Agricultural and Biological Science*, (4): 378 – 380. (in Chinese)
- 张俊娥. 2008. 苹果 EST 中微卫星分析. *广西农业生物科学*, (4): 378 – 380.
- Zhang Xin-ye, Song Cong-wen, Zhang Ya-dong, Yang Yan-ling, Huang Min-ren. 2009. Development of EST-SSR in *Populus deltoides* and *P. Euramericana*. *Scientia Silvae Sinicae*, 45 (9): 53 – 59. (in Chinese)
- 张新叶, 宋丛文, 张亚东, 杨彦伶, 黄敏仁. 2009. 杨树 EST-SSR 标记的开发. *林业科学*, 45 (9): 53 – 59.
- Zhang Yan-xin, Lin Zhong-xu, Li Wu, Tu Li-li, Nie Yi-chun, Zhang Xian-Long. 2007. Development of EST-SSR in cotton (*Gossypium* L.). *Chinese Science Bulletin*, 52 (15): 1779 – 1787. (in Chinese)
- 张艳欣, 林忠旭, 李 武, 涂礼莉, 聂以春, 张献龙. 2007. 海岛棉 EST-SSR 引物的开发与应用研究. *科学通报*, 52 (15): 1779 – 1787.
- Zheng Li-shan, Shi Yu-zhen, Wang Jing-yi, Huang Bing-zhi, Ji Xiao-rui, Zhang Bao-cai, Yuan You-lu, Wu Yao-ting. 2008. Transferability of cotton EST-SSRs marker to *Musa*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, (1): 33 – 37. (in Chinese)
- 郑丽珊, 石玉真, 王静毅, 黄秉智, 冀小蕊, 张保才, 袁有禄, 武耀廷. 2008. 棉花 EST-SSRs 在香蕉中的通用性. *中国农学通报*, (1): 33 – 37.
- Zhu Yan, Hao Yan-bin, Wang Ke-jian, Wu Chun-lin, Wang Wei-xia, Qi Jian-xun, Zhou Jun. 2009. Analysis of SSRs information and development of SSR markers from walnuts ESTs. *Journal of Fruit Science*, (3): 394 – 398. (in Chinese)
- 朱 艳, 郝艳宾, 王克建, 吴春林, 王维霞, 齐建勋, 周 军. 2009. 核桃 EST-SSR 信息分析与标记的初步建立. *果树学报*, (3): 394 – 398.
- Zhuo Ren-ying. 2003. Advances of bamboo molecular reeding. *Journal of Zhejiang Forestry College*, (4): 96 – 100. (in Chinese)
- 卓仁英. 2003. 竹子生物技术育种研究进展. *浙江林学院学报*, (4): 96 – 100.

征 订

《果树钙素营养与生理》

本书是针对目前我国果实品质下降和生理病害日趋严重的现实编写的。全书共分六章, 比较详细地总结了果树缺钙症、果实钙素营养水平的调节, Ca^{2+} 在树体内的运转与分配规律, 钙与花芽分化、花粉萌发和花粉管生长、结实及发育之间的关系, 钙参与果实成熟衰老和抗逆性的调控机制, 以及典型缺钙症——苹果苦痘病研究的评述等。本书由关军锋, [德] 索尔编著, 科学出版社 2005 年 7 月出版, 可作为大专院校和科研单位的果树学、植物生理学、植物营养学等相关专业人员的参考书。定价: 52 元 (含邮费)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。