



研究报告

A Letter

杂种马褂木 EST-SSR 引物开发及多态性分析

孙小艳¹, 李彦强¹, 江聪², 徐立安², 余发新¹

1 江西省科学院, 南昌, 330029

2 南京林业大学林木遗传与生物技术重点实验室, 南京, 210037

✉ 通讯作者: fxyu2000@126.com ✉ 作者

分子植物育种, 2011 年, 第 9 卷, 第 98 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0098

收稿日期: 2011 年 06 月 20 日

接受日期: 2011 年 07 月 21 日

发表日期: 2011 年 08 月 22 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

孙小艳等, 2011, 杂种马褂木 EST-SSR 引物开发及多态性分析, 分子植物育种(online) Vol.9 No.98 pp.1706-1712 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0098)

引用格式(英文):

Sun et al., 2011, Development and Characterization of Microsatellite Markers from Expressed Sequence tags for *Liriodendron chinese*×*Liriodendron tulipifera*, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.9 No.98 pp. 1706-1712 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0098)

摘要 为了加速分子标记在杂种马褂木研究中的应用, 利用本实验室构建的杂种马褂木不定根均一化 cDNA 文库获得的 2 921 条非冗余 ESTs 序列进行 EST-SSR 标记的开发, 在 166 条 ESTs 中发现了 181 个 EST-SSR, 占全部 ESTs 的 5.683%, 杂种马褂木 EST-SSR 平均长度为 25.22 bp。EST-SSR 的分布频率和特征分析表明, 二核苷酸和三核苷酸重复基序的 SSRs 数量最多, 占总数的 91.16%。在二核苷酸重复类型的 EST-SSRs 中, 含 GA/TC 基序的数量最多, 共 103 个, 占二核苷酸重复基序的 98.095%; 在 60 个三核苷酸重复类型的 EST-SSRs 中, AAG/CTT 基序出现频率最高, 共 27 个, 占三核苷酸重复基序数的 45%。利用 SSR-ESTs 序列共设计 152 对 EST-SSR 引物, 选用中国马褂木、北美鹅掌楸及选育的优良杂种马褂木品种进行多态性研究。其中 115 对在鹅掌楸上有扩增产物, 61 对扩增出多态, 多态性引物占所设计引物的 40.10%。本研究证实杂种马褂木基因组中含有大量 SSR, 利用 EST 序列开发的 SSR 标记将在杂种马褂木遗传多样性分析、遗传图谱构建以及比较基因组等研究方面具有广阔的利用前景。

关键词 杂种马褂木; EST-SSR; 标记; 多态性

Development and Characterization of Microsatellite Markers from Expressed Sequence tags for *Liriodendron chinese*×*Liriodendron tulipifera*

Sun Xiaoyan¹, Li Yanqiang¹, Jiang Cong², Xu Li'an², Yu Faxin¹

1. Jiangxi Academy of science, Nanchang, 330029, P.R. China;

2. Key Laboratory of Forest Genetics & Biotechnology, Nanjing Forestry University, Nanjing, 210037, P.R. China

✉ Corresponding author, fxyu2000@126.com; ✉ Authors

Abstract For improvement the application of molecular markers in *Liriodendron chinese*×*Liriodendron tulipifera*, ESTs of adventitious root of *Liriodendron chinese*×*Liriodendron tulipifera*, used to be developed of EST-SSR markers. 166 ESTs Containing 181 EST-SSRs identified, had 5.683% of all ESTs, including perfect di-, tri-, tetra-, penta- and hexanucleotide motifs. The average length of EST-SSR was 25.22 bp. The distribution characteristics of the EST-SSR markers was analysed. Among them, the dinucleotide and trinucleotide repeats were the most abundant SSRs detected, accounting for 91.16%. In dinucleotide repeats, GA/TC motif as the most amount had 103 EST-SSRs, accounting for 91.16% of total dinucleotide repeats. In 60 EST-SSRs of trinucleotide repeats, the frequency of AAG/CTT motif was highest, and had 27 EST-SSRs account for 45%. 152 EST-SSR markers were designed from 154 selected SSR-ESTs for polymorphic analysis by *Liriodendron Chinese*, *Liriodendron tulipifera*, and six selected best cultivars of *Liriodendron chinese*×*Liriodendron tulipifera*. Of these, 115 primer pairs amplified DNA fragments and 61 primer pairs were polymorphic in *Liriodendron tulipifera*, accounting for 40.10% of the total designed SSR-markers. The study effectively proved that genome of *Liriodendron chinese*×*Liriodendron tulipifera* has many SSR, and their EST-SSRs is valuable for genetic analysis, linkage mapping and comparison genome study.

Keywords *Liriodendron chinese*×*Liriodendron tulipifera*; EST-SSR marker; polymorphic

研究背景

随着分子生物学技术的发展, 各种分子标记技术不断出现, 如AFLP、RAPD、SSR、SNP等, 大大提高了科研人员对各种动植物进行遗传分析研究的能力, 其中SSR (即简单重复序列或微卫星DNA) 因其重复性好、标记共显性、孟德尔遗传、多态性丰富等优点, 在动植物遗传研究中应用非常广泛。

SSR标记可分为基因组SSR和EST-SSR。传统的基因组SSR标记开发过程非常繁琐, 需要进行基因组文库构建、重复序列克隆识别和筛选、测序、引物设计等环节, 不仅费时耗力, 成本也很高。EST-SSR (expressed sequence tag based simple sequence repeat)是在EST (表达序列标签)基础上发展起来的一种新的标记方法, 它是在搜索EST中微卫星的基础上, 根据微卫星侧翼已知序列设计引物, 与传统基因组SSR标记开发相比, 可直接获得基因表达转录信息, 其多态性可能与基因的功能直接相关, 可对决定重要表达性状的等位基因进行筛选、鉴定, 强化EST-SSR在遗传学领域研究中的应用; 而且在相近的物种间具有良好的通用性, 不需进行文库构建、克隆、测序等复杂步骤, 大大降低开发利用成本。EST-SSR标记开发因其快速、高效等特点已广泛应用于小麦、大麦、水稻、玉米、拟南芥、黑麦草、葡萄、杨树、松树、杉木等植物的SSR标记开发。如Kantety等(2002)对玉米、水稻、小麦等5个物种262 631条EST-SSR序列进行分析, 发现了8 514条EST-SSRs; 陈海梅等(2005)利用151 695条小麦的EST序列发现了2 038个SSR序列; 杨素丽等(2008)利用NCBI上的1 688条百合EST开发出101个SSR标记。

杂种马褂木(*L. chinense* Sarg. × *L. tulipifera* L.)为马褂木与北美鹅掌楸的杂交后代, 由南京林业大学已故林木育种学家叶培忠教授于1963年首次杂交成功。杂种马褂木杂种优势明显, 具有生长迅速, 干形良好, 花叶奇特, 抗逆性强, 适应性广等优良特性, 是珍贵的工业用材及高档家具用材树种, 也是优良的园林绿化树种(王章荣, 2005), 已逐渐在我国福建、浙江、江苏、江西、湖南、湖北、河南、山东、北京和陕西等地试种推广, 表现出良好的发展潜力。国内有众多研究者对其开展了大量研究(李火根和施季森, 2009, 林业科技开发, 23(3): 1-5; 黄利斌, 2008), 并逐步将分子标记技术(主要是RAPD,

SSR)运用于杂种马褂木的遗传研究(孙亚光和李火根, 2007; 张红莲, 2010), 但这些研究所用的SSR标记大部分都是胥猛等(2008)从北美鹅掌楸中开发的EST-SSRs, 国内外研究者还从未从杂种马褂木基因组中开发SSR标记。因此, 从杂种马褂木中开发EST-SSR标记对开展杂种马褂木遗传多样性分析、优良无性系鉴定以及杂种优势的机理分析等方面的研究具有重要意义。

1结果与分析

1.1杂种马褂木EST-SSRs频率分析

本研究对杂种马褂木不定根cDNA文库测序获得的2 921条无冗余ESTs序列中的2~6核苷酸重复类型进行精确型SSR检索, 在166条ESTs发现181个SSRs, 占全部ESTs的5.683%, 这个结果与胥猛(2008)在北美鹅掌楸ESTs中检索的SSR比例5.6%相近, 高于小麦(4.7%)、大豆、玉米(1.5%)等基因组中所含的SSR频率(Kantety et al., 2002), 表明在杂种马褂木基因组中含有较丰富的SSR。检索的ESTs序列全长2 924 386 bp, 即平均每16.157 kb出现一个SSR。在166条含有SSR的ESTs中, 151条EST含有1个SSR, 15条EST含有2个SSR。检索到的EST-SSR类型丰富, 从二核苷酸至六核苷酸重复都有发现, 但频率相差较大, 二核苷酸重复基序类型出现频率最高, 而四、五核苷酸出现频率明显偏低(表1)。可见, 在杂种马褂木EST-SSRs中, 二核苷酸和三核苷酸重复基序占

表 1 EST-SSR 重复核苷酸数数量及频率

Table 1 Number and frequency of repeat types in EST-SSR

重复类型 Repeat type	数量 Number	占全部 SSR 比例(%) Percent of total EST-SSRs (%)	频率(%) Frequency (%)
二核苷酸 Dinucleotide	105	58.011	3.595
三核苷酸 Trinucleotide	60	33.149	2.054
四核苷酸 Tetranucleotide	5	2.766	0.171
五核苷酸 Pentanucleotide	2	1.105	6.847×10 ⁻⁴
六核苷酸 Hexanucleotide	9	4.972	0.308
总计 Total	181	100	6.196

主导地位, 特别是二核苷酸重复占总SSR的一半以上, 与北美鹅掌楸(胥猛, 2008)、云杉(Rungis et al., 2004)等植物结果一致, 但水稻、大豆、拟南芥等大多数植物的EST-SSRs以三核苷酸重复为主(Scott et al., 2000)。杂种马褂木EST-SSR平均长度为25.22 bp, 但不同SSR的长度存在一定差异, 最短SSR序列长度为18 bp, 最长的为64 bp。

1.2 杂种马褂木EST-SSR的特性分析

在统计重复基序类型时, 我们将基序所有碱基+1移码序列及其互补序列都视为同一重复基序类型。如对于二核苷酸重复基序GA而言, GA=AG=CT=TC, 将这四种二核苷酸重复基序出现的次数之和作为重复基序GA出现的次数; 同理, 对于三核苷酸TCT, TCT=CTT=TTC=AGA=GAA=AAG, 用TCT来代表这六种类型的重复基序。所以, 若EST-SSRs数目足够大并且无偏倚性, 四种碱基随机组合, 将产生2种单核苷酸类型、4种二核苷酸类型、10种三核苷酸类型、33种四核苷酸类型、102种五核苷酸类型和305种六核苷酸基序类型(Rota et al., 2005)。在本研究中, 二核苷酸、三核苷酸重复基序类型占SSRs总数的91.16%, 其他重复基序数量很少, 且重复类型出现的次数一般都是1, 所以重点统计二、三核苷酸重复基序类型的分布(表2)。

表 2 EST-SSRs 序列中不同重复基序出现频率
Table 2 Frequency of different types repeat motifs of EST-SSRs

重复基序类型	重复单元	SSR 数量	频率(%)
Repeat motif type	SSR motif	Number of SSR	Frequency (%)
二核苷酸	GA/CT	103	98.095
Dinucleotide	GT/CA	1	0.9525
	AT/TA	1	0.9525
	AAG/CTT	27	45.0
三核苷酸	AAG/CTT	27	45.0
Ttrinucleotide	GCA/CGT	12	20.0
	ATC/TAG	5	8.333
	TAA/ATT	3	5.0
	GAT/CTA	3	5.0
	CGG/GCC	3	5.0
	AGG/TCC	2	3.333
	GAC/CTG	2	3.333
	CAC/GTG	2	3.334
	ACA/TGT	1	1.667

从表2可以看出, 杂种马褂木二核苷酸和三核苷酸重复基序类型的分布状态非常不均匀。在二核苷酸重复类型的EST-SSRs中, 含GA/TC基序的数量最多, 共103个, 占二核苷酸重复基序的98.095%; 在60个三核苷酸重复类型的EST-SSRs中, 所有的基序类型都出现了, 但分布频率相差较大, AAG/CTT基序出现频率最高, 共27个, 占三核苷酸重复基序数的45%, 其次为GCA/CGT (20.0%)和ATC/TAG (8.333%), 其他重复基序则相对较少, 其结果与胥猛(2008)开发的北美鹅掌楸的EST-SSR的特征相似。在二核苷酸重复基序类型中, GA/AG基序的数量占绝对性优势, 未发现CG/CG基序, 并且大部分的四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸重复基序类型在杂种马褂木EST-SSRs中都未出现, 表现出明显的碱基偏移性, 这与Jung (2005)和Kantety (2002)等对拟南芥、玉米、大豆等物种EST-SSR的研究结果相符, 在这些植物中也未发现GC重复, 只在小麦等几个少数物种中以很低的频率出现过。由此推测, 这种SSR碱基的偏移性似乎普遍存在于植物中, 但因目前获得的杂种马褂木ESTs有限, 具体的结论和原因需要进一步实验研究。

1.3 杂种马褂木EST-SSR引物设计和多态性分析

对检索到的SSR-ESTs进行分析, 剔除掉SSR两端保守序列长度小于20 bp的ESTs, 筛选出了150条ESTs共154个EST-SSRs进行引物设计, 得到152对EST-SSR引物(表3)。

以优良杂种马褂木无性系‘20’号的DNA样品以及中国马褂木、北美鹅掌楸为模板, PCR扩增结果显示152对引物中有115对引物扩增出清晰的条带, 占设计的EST-SSR引物总数的75.5%。

利用筛选出的有产物的115对引物对8个杂种马褂木无性系进行扩增, 结果有61对引物显示出多态性(图1), 占可扩增出产物的引物总数的53.0%, 占总设计引物的40.1%, 呈现出较高的多态性。实验结果显示, 基于EST信息建立杂种马褂木多态性SSR标记是可行的。

其中, 在61对表现出多态性的引物中, 二核苷酸重复类型的SSRs有40个, 三核苷酸重复类型19个, 六核苷酸2个, 未出现四核苷酸和五核苷酸重复类型。在二核苷酸重复基序类型中, GA/CT重复基序所占比例为93%。

表 3 部分有多态性的 EST-SSR 引物

Table 3 Part of polymorphic EST-SSR markers

SSR 引物 SSR marker	SSR 重复基序 SSR Motif	左端引物(5'-3') Left primer (5'-3')	右端引物(5'-3') Right primer (5'-3')
HL6	(GA)16	GAGCTTTTGCCACCTTTCAC	AAATCCCGGAATATGAAAAA
HL13	(AAG)6	CTTTCACGGAGATAGCAGGG	GGGCGTCCGAGTAGATGTTA
HL18	(CT)12	AATGTGGTTGTTGGCTCTCC	TTTCAAACCCCATGACACAA
HL54	(AG)19	TCCCTTCTTCTGTCCGTTTG	TTCACTGGATGTGGATGGAA
HL356	(TCT)6tt(TTC)7	GGGAAAGCTACCTCAACGAA	CCATCCCTGATCTCCTTCAA
HL440	(CT)11ca(CT)10	ACAGATTGGGTTTCCTGCTG	GATGGTCGAGTAGCCCAAAA
HL641	(CTT)7t(TTC)7	AGCGAAAGCTACCTCAACGA	CCATCCCTGATCTCCTTCAA
HL667	(CT)13	AATGTGGTTGTTGGCTCTCC	TTTCAAACCCCATGACACAA
HL809	(TC)17	GAGTGAAGGACAGGTCTCGG	TCAGCAAGGCACAACAGTTC
HL821	(GA)16c(AG)17	CTCTCTCCTCTCCCCTTCGT	TCCTTGAAACGACACACAG
HL838	(AG)9	TCACGTGTGTGAGGAATGGT	GGCATAGAGATCCGCACATT
HL951	(CCAAAG)4	GTCTCCCTCAGCCTCCTCTT	CTTCCCAACCCCTAGCAAGT
HL943	(CT)10	TGAGATCGATGGATGTTGGA	TTATGGAAAATTGCCTTCGG
HL1090	(TCTGGG)4	TAGGCCTTGGTGTGGTGTT	CGTGACCATAACCAGATCCC
HL1134	(TC)9	ACCCGTAAAGGAGCTGGTCT	TTTTTGTTCOAAGCAGGCTC
HL1168	(AGG)6	AGTAAATGTGATTTGGGGCG	CCCTTACGATGCGTTTGATT
HL1192	(TG)14	CTCGACCCTGGGAGTTGATA	GAACAAGGAGACTGGCGTGT
HL1217	(AAG)6	TTTCTGGTGTGATGTTGGA	TCCCTCTTTTTCTGCCTCAA
HL1256	(TC)11	TCTCCCTCTCGCTGTATCGT	ATTCCACTCGTTCCAAGTCG
HL1311	(AT)9	GGAGACCGCAAGAAGTCATC	CGAAACAACCTACCACCCCAT
HL1387	(AG)10	GCCCCGGTTACATTATACCTC	TCGTATTAGGGGTCTGCACC
HL1504	(CT)11	CTCCACCAACACTCCCTTGT	TCAAACCCCATAACACGACA
HL1544	(AG)14	GTGGGCCCGAAGATAAAATC	CATGTGGTCACTAGCATGGG

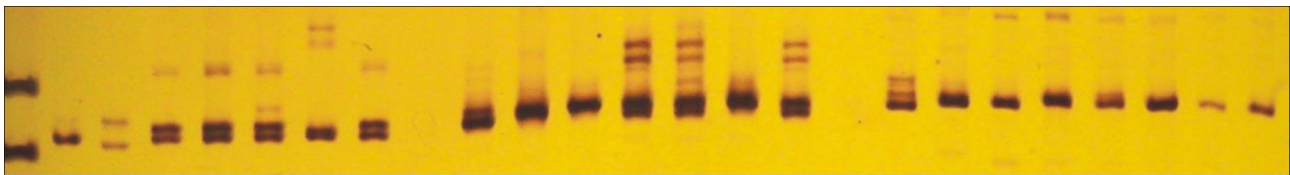


图1 引物筛选的部分扩增银染图

Figure 1 Part of SSR amplification products of screening SSR loci

2. 讨论

一般, EST-SSRs的分布特征和频率是通过搜索数据库的EST序列估算出来的, 但由于研究者研究材料的差异, 搜索标准(即规定的SSR重复基序类型和长度)的不同, 数据统计分析方法的选择, 以及各物种现有的ESTs数量不足于覆盖全基因组等原因, 导致现有文献报道的SSR分布特征和出现频率差异较大。如Varshney (2002)采用二核苷酸重复次数大于 ≥ 6 次, 三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸重复次数 ≥ 5 次的标准对多种谷类作物的EST

序列进行SSR搜索, 发现大麦每7.5 kb出现一个SSR, 玉米每7.5 kb出现一个SSR, 小麦为6.2 kb出现一个SSR, 黑麦和高粱为5.5 kb出现一个SSR, 水稻为3.9 kb出现一个SSR, 除水稻的分布特征与已报道的相近外, 其它作物均有一定差异。但Gao (2003)把SSR搜索标准提高到重复序列最小长度必须 ≥ 18 bp, 则水稻EST中平均11.8 kb出现一个SSR。而且, 不同物种其SSR出现频率也有较大差异, 如白菜SSR出现频率为10.34% (忻雅等, 2006), 芝麻为8.68% (魏利斌, 2008), 百合为5.98% (杨素丽, 2008),

北美鹅掌楸为5.6% (胥猛, 2008), 橡胶树为11.42% (安泽伟, 2009), 甘蔗为15.15% (闫学兵, 2010), 辣椒为3.19% (张宇, 2010)。根据已有的SSR标记开发的报道显示, 重复序列越长, SSR标记的变异越丰富(Gao, 2003; Kantety, 2002)。因此, 本研究选择Gao (2003)的搜索标准, 即将不同重复序列的最小长度定为18 bp, 结果16.157 kb出现一个SSR, SSR出现频率为5.683%, 这个结果与胥猛(2008)在北美鹅掌楸ESTs中检索的SSR比例5.6%相近, 高于小麦(4.7%)、大豆、玉米(1.5%)等基因组中所含的SSR频率(Kantety et al., 2002)。

而且, 与EST-SSR的分布特征及频率一样, EST中不同重复基序类型SSR的频率在不同研究者间也存在较大差异。已报道的研究显示, 大多数植物的EST-SSR集中于二核苷酸和三核苷酸重复基序, 但不同的物种主要的重复基序类型仍有所差异。Gao等(2003)研究表明三核苷酸重复基序在谷类作物基因组中出现频率最高, 但Bérubé (2006)等对火炬松和云杉的研究却表示在大多数植物基因组中二核苷酸重复基序占主导地位。本研究出现的181个EST-SSR中二核苷酸重复基序出现频率为58.011%, 占主导地位, 与许多植物结果一致(忻雅, 2006; 胥猛, 2008;)。而且, 不同重复基序类型出现频率变化很大, 表现出了明显的碱基偏倚性。在杂种马褂木二核苷酸重复基序类型中, GA/TC基序类型数量最多, 占二核苷酸重复基序的98.095%, 与Gao (2003)、Portis等(2007)、Wei等(2008)研究结果相似。Kantety等(2002)分析, 由于GA/TC基序存在于(GAG)_n、(AGA)_n、(UCU)_n、(CUC)_n等密码子中, 这些密码子翻译的氨基酸进场在多肽中出现, 特别是Arg (8%)和Leu (10%)在蛋白质中出现的比例很高, 所以GA/TC基序在大部分植物的二核苷酸重复基序类型中出现的频率最高。

本试验证明从杂种马褂木EST序列中开发SSR标记是可行和高效的, 在今后的工作中, 我们将利用获得的EST-SSRs引物, 通过EST-SSR引物的通用性研究, 把这批SSR引物应用于杂种马褂木以及鹅掌楸和中国马褂木的遗传图谱构建、无性系鉴定、交配系统分析及杂种优势分析等方面的研究, 这些新开发的EST-SSR标记必将对马褂木种源收集鉴定、基因定位、比较基因组学以及标记辅助选择育种等

领域研究起一定作用。此外, 实验室也将开发更多的杂种马褂木EST资源以满足SSR标记开发的需要。

3材料与方法

3.1实验材料和基因组DNA提取

实验材料取自江西省高安市生物资源所良种繁育基地的以马褂木为母本、北美鹅掌楸为父本的半同胞后代, 其中母本马褂木为1株来自庐山种源的成龄优株, 北美鹅掌楸花枝来自南京林业大学树木园优良单株。采用CTAB裂解—硅珠吸附法(Doyle and Doyle, 1990)提取植物叶片基因组DNA, -20℃低温保存。

3.2 ESTs数据的微卫星序列检索

杂种马褂木ESTs数据来自本实验室构建的杂种马褂木不定根未剪切均一化cDNA文库测序所得2 921条非重复序列(包括866条singletons和2 055条contigs), 利用SSR Finder软件对2 921条无冗余EST序列进行SSR搜索, SSR标记开发研究表明, 重复序列长度越长, 多态性SSR标记变异越丰富, 所以搜索标准为精确型重复序列长度不少于18个碱基, 即二核苷酸, 三核苷酸, 四核苷酸, 五核苷酸, 六核苷酸的精确SSR基序的重复次数最少应为9次, 6次, 5次, 4次, 3次, 搜索后对出现的SSR频率进行统计分析。

3.3 EST-SSR引物设计

在剔除了微卫星两端保守性序列小于20 bp的ESTs后, 利用引物设计软件Primer5.0和oligo6.0对剩下的EST-SSRs进行引物设计。引物设计的原则是: 引物长度范围为18~24 bp; 退火温度T_m在50℃~62℃之间, 且上游、下游引物的退火温度相差不大于5℃; (G+C)含量在30%~70%之间; PCR扩增片段长度为100~300 bp; 尽量避免出现引物二聚体。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

3.4 EST-SSR扩增反应体系

PCR反应体系为10 μL: 1 μL 10× Buffe, 1 μL Mg²⁺ 2.0 mmol/L, 0.1 μL 1% gelatin, 0.8 μL dNTP (Datp, dCTP, dGTP, dTTP各0.2 mmol/L), 0.5 μL各5 pmol的上下游引物, 0.05 μL 5 U Taq聚合酶, 1 μL DNA 10~20 ng, 5.05 μL ddH₂O。扩增反应程序采用Touch-down PCR: 94℃ 15 s, 62℃ 15 s (Δ℃=

-0.7/cycle), 72°C 30 s, 16 cycles; 在进入94°C 15 s, 50°C 15 s, 72°C 30 s, 15 cycles; 72°C延伸1 h; 12°C保存。

3.5 PCR产物银染检测

SSR标记的PCR产物在8%的聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 120 V, 600 mA, 1.5 h, 银染检测。

作者贡献

孙小艳、李彦强、江聪是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 孙小艳负责完成数据检索分析、实验结果统计分析, 论文初稿的写作; 李彦强、江聪参与实验设计, 试验结果分析; 徐立安是指导实验设计及数据分析; 余发新是项目策划者及负责人, 指导论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由江西省科学技术厅自然科学基金资助项目(2010GZN0067)和江西省科学技术厅科技支撑计划资助项目(2009BNA06100)。作者感谢南京林业大学徐立安教授和江聪、王宗伟博士在本实验过程中的技术支持和有益的建议。感谢感谢两位匿名的同行评审人的评审建议和修改建议。

参考文献

- An Z.W., Zhao Y.H., Chen H., Li W.G., and Huang H.S., 2009, Development and application of EST-SSR markers in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg., *Yichuan* (Hereditas), 31(3): 311-319 (安泽伟, 赵彦宏, 程汉, 李维国, 黄华孙, 2009, 橡胶树EST-SSR标记的开发与应用, 遗传, 31(3): 311-319)
- Bérubé Y., Zhuang J., Rungis D., Ralph S., Bohlmann J., and Ritland K., 2006, Characterization of EST-SSRs in loblolly pine and spruce, *Tree Genetics & Genomes*, 3(3): 251-259
- Chen Y.H., Li L.Z., Wei X.Y., Li S.S., Lei T.D., Hu H.Z., Wang H.G., and Zhang X.S., 2005, Development of EST-SSR markers, chromosome location and genetic mapping in wheat, *Kexue Tongbao* (Chinese Science Bulletin), 50(20): 2208-2216 (陈海梅, 李林志, 卫宪云, 李斯深, 雷天东, 胡海洲, 王洪刚, 张宪省, 2005, 小麦EST-SSR标记的开发, 染色体定位和遗传作图, 科学通报, 50(20): 2208-2216)
- Doyle J.J., and Doyle J.L., 1990, Isolation of plant DNA from fresh tissue, *Focus*, 12: 13-15
- Gao L.F., Tang J.F., Li H.W., and Jia J.Z., 2003, Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational

and experimental approaches, *Mol. Breed.*, 12(3): 245-261

- Huang L.B., Shi S.Z., and Zhu L.L., 2008, Primary study on planting experiment of the clone selection of *Liriodendron chinense* × *tulipifera*, *Jiangsu Linye Keji* (Jiangsu Forestry Science & Technology), 35(6): 1-4 (黄利斌, 施士争, 祝良林, 2008, 杂交马褂木无性系造林试验初报, 江苏林业科技, 35(6): 1-4)
- Jung S., Abbott A., Jesudurai C., Tomkins J., and Main D., Frequency, type, distribution and annotation of simple sequence repeats in Rosaceae ESTs, *Funct. Integr. Genom.*, 2005, 5(3): 136-143
- Kantety R.V., La Rota M., Matthews D.E., and Sorrells M.E., 2002, Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat, *Plant Mol. Bio.*, 48(5-6): 501-510
- Portis E., Nagy L., Sasvári Z., Stágel A., Barchi L., and Lanteri S., 2007, The design of *Capsicum* spp. SSR assays via analysis of *in silico* DAN sequence and their potential utility for genetic mapping, *Plant Science*, 172(3): 640-648
- Rota L.R., Kantety R.V., Yu J.K., and Sorrells M.E., 2005, Nonrandom distribution and frequencies of genomic and EST-derived microsatellite markers in rice, wheat, and barley, *BioMed Central*, 6(1): 23
- Rungis D., Berube Y., Zhang J., Ralph S., Ritland C.E., Ellis B.E., Douglas C., Bohlmann J., and Ritland K., 2004, Robust simple sequence repeat markers for spruce (*Picea* spp.) from expressed sequence tags, *Theor. Appl. Genet.*, 109(6): 1283-1294
- Scott K.D., Eggler P., Seaton G., Rossetto M., Ablett E.M., Lee L.S. and Henry R.J., 2000, Analysis of SSRs derived from grape ESTs, *Theor. Appl. Genet.*, 100(5): 723-726
- Sun Y.G., and Li H.G., 2007, The Paternity Analysis for Open-pollination Progenies of *Liriodendron* L. Using SSR Markers, *Zhiwuxue Tongbao* (Chinese Bulletin of Botany), 24(5): 590-596 (孙亚光, 李火根, 2007, 利用SSR分子标记对鹅掌楸自由授粉子代的父本分析, 植物学通报, 24(5): 590-596)
- Varshney R.K., Thomas T., Nils S., Peter L., and Andreas G., 2002, In silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species, *Cellular & Molecular Biology Letters*, 7(2A): 537-546
- Wang Z.R., 2005, Cross breeding and utilize of *Liriodendron tulipifera*, Chinese forestry Publish Company, Beijing, China, pp.70-73 (王章荣, 2005, 鹅掌楸属树种杂交育

- 种与利用, 中国林业出版社, 中国, 北京, pp.70-73)
- Wei L.B., Zhang H.Y., Zhang Y.Z., Guo W.Z., and Zhang T.Z., 2008, Development and Utilization of EST-derived Microsatellites in Sesame (*Sesamum indicum* L.), *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 34(12): 2077-2084 (魏利斌, 张海洋, 郑永战, 郭旺珍, 张天真, 2008, 芝麻EST-SSR标记的开发和初步研究, 作物学报, 4(12): 2077-2084)
- Xin Y., Cui H.R., Lu M.Z., Yao Y.L., Jin J.Q., Lim Y.P., and Chui S.Y., 2006, Data Mining for SSRs in ESTs and EST-SSR Marker Development in Chinese Cabbage, *Yuanyi Xuebao (Actahorticulturae sinica)*, 33(3): 549-554 (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)
- Xu M., and Li H., 2008, Development and characterization of microsatellite markers from expressed sequence tags for *Liriodendron*, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 6(3): 615-618 (胥猛和李火根, 2008, 鹅掌楸EST-SSR引物开发及通用性分析, 分子植物育种, 6(3): 615-618)
- Yan X.B., Que Y.X., Xu L.P., Guo J.L., Chen R.K., and Pan Y.B., 2010, Analysis of SSR information in EST resources of sugarcane, *Redai Zuowu Xuebao (Chinese Journal of Tropical Crops)*, 2010, 31(9): 1497-1501 (闫学兵, 阙友雄, 许莉萍, 郭晋隆, 陈如凯, 潘永保, 2010, 甘蔗EST序列的SSR信息分析, 热带作物学报, 31(9): 1497-1501)
- Yang S.L., Ming J., Liu C., Mu D., and Li M.Y., 2008, Data mining for simple sequence repeats marker development in expressed sequence tags from *Lilium* L., *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 35(7): 1069-1074 (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 H.L., Li H.G., Xu M., and Feng Y.H., 2010, Identification of *Liriodendron tulipifera*, *liriodendron chinense* and hybrid *Liriodendron* using species-specific SSR markers, *Linye Kexue (Scientia Silval Sinicae)*, 46(1): 36-39 (张红莲, 李火根, 胥猛, 2010, 鹅掌楸属种及杂种的SSR分子鉴定, 林业科学, 46(1): 36-39)
- Zhang Y., Zhang X.F., Chen B., Geng S.S., Li H.X., and Li Z., 2010, Information and exploitation of EST-SSRs loci in pepper (*Capsicum annuum*), *Xibei Nongye Daxue (Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica)*, 19(9): 186-192 (张宇, 张晓芬, 陈斌, 耿三省, 李焕秀, 李珍, 2010, 辣椒EST-SSR信息分析及标记开发, 西北农业大学, 19(9): 186-192)



5thPublisher是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5thPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>