

麻竹EST-SSR标记开发及其对慈竹变异类型的分析研究

高志民, 杨丽, 李彩丽, 刘青

(国际竹藤中心, 竹藤科学与技术重点开放实验室, 北京 100102)

摘要: 利用麻竹(*Dendrocalamus latiflorus*)已有的 EST 序列, 开发了一批 EST-SSR 分子标记, 并用于慈竹(*Bambusa emeiensis*)栽培变异类型的多态性研究。结果表明, 在麻竹 9574 个 EST 中找到了 331 个 EST, 含有 381 个 SSR 位点, SSR 出现的频率为 3.98%。EST-SSR 的重复类型共有 59 个, 其中 2 个核苷酸的重复最多, 占 63.8%, 其次是 3 个核苷酸的重复序列。根据含有 SSR 的 EST 序列设计出了 44 对引物, 对慈竹及其变异类型进行了扩增效率、多态性及通用性检测, 其中 37 对引物能够扩增出稳定且清晰的条带, 且扩增具有多态性, 扩增片段长度主要集中在 100~1000 bp, 引物有效率达 84.1%。遗传相似性分析结果显示, 所检测样品间遗传距离为 0.263~0.840, 平均为 0.552, 其中‘黑笋慈竹’与‘琴丝慈竹’、‘蛇头慈竹’与‘龙头慈竹’之间的遗传距离较近, 而‘罗汉慈竹’与其他样品的遗传距离最远。

关键词: 麻竹; EST-SSR; 分子标记; 慈竹; 栽培变异类型; 遗传距离

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2012.05.006

EST-SSR Molecular Marker Development from *Dendrocalamus latiflorus* and Its Application on Genetic Diversity Analysis of Variation Types from *Bambusa emeiensis*

GAO Zhi-min, YANG Li, LI Cai-li, LIU Qing

(International Center for Bamboo and Rattan, Key Laboratory on the Science and Technology of Bamboo and Rattan, Beijing 100102, China)

Abstract: EST-SSR molecular markers were developed from ESTs of *Dendrocalamus latiflorus*, the genetic diversity of variation types from *Bambusa emeiensis* was studied by using EST-SSR markers. There were 381 SSR sites locating in 331 ESTs collected from 9574 ESTs of *D. latiflorus*, with SSR frequency of 3.98%. There were 59 EST-SSR types, in which dinucleotide type was the most with 63.8%, followed by trinucleotide type (35.7%). Based on the EST sequences containing SSR site, forty pairs of EST-SSR primer were designed for detecting amplification efficiency, polymorphism and transferability in cultivated variation types of *B. emeiensis*. The results showed that 37 primer pairs, accounting for 80.43%, could amplify stable and clear bands with polymorphisms, and the length of amplified fragments mainly ranged from 100 bp to 1000 bp. Genetic distance among cultivated variation types of *B. emeiensis* ranged from 0.263 to 0.840 with mean of 0.552. There were close genetic distance between *B. emeiensis* ‘Heisunci’ and *B. emeiensis* ‘Qinsici’, *B. emeiensis* ‘Shetouci’ and *B. emeiensis* ‘Longtouci’, respectively, and *B. emeiensis* ‘Luohanci’ was far away from others.

Key words: *Dendrocalamus latiflorus*; EST-SSR; Molecular marker; *Bambusa emeiensis*; Cultivated variation type; Genetic distance

收稿日期: 2011-11-21

接受日期: 2012-01-16

基金项目: 林业公益性行业科研专项(201004005)资助

作者简介: 高志民, 男, 博士, 研究员, 主要从事生物技术与功能基因组学研究。E-mail: gaozhimin@icbr.ac.cn

简单序列重复(SSR)被广泛应用于遗传、进化和育种研究。在基因序列中的 SSR 位点随其所处位置不同而有着不同的功能,位于 5' 非翻译区的 SSR 通过影响转录和翻译来调控基因的表达;位于 3' 非翻译区的 SSR 会导致转录滑移和产生延伸 mRNA;位于内含子区域的 SSR 影响基因的转录、mRNA 的剪切以及其向细胞质的运输;位于基因内部的 SSR 对于基因的表达调控具有更强的选择压力^[1]。随着测序技术的不断提高,植物 EST 序列的获得显得越来越容易,这对开展功能基因组学研究起到了积极的推动作用。其中 EST 序列已经成为发展 SSR 标记(EST-SSR)的重要资源,由于 EST-SSR 标记位于基因的转录部分,反映了基因的编码部分,可以直接获得基因表达的信息,因而 EST-SSR 与功能基因紧密连锁,而且它在近缘物种间具有高度的可转移性和通用性^[2]。目前,在林木中已有许多 EST-SSR 开发的研究报道,如杏(*Prunus armeniaca*)^[3]、云杉(*Picea asperata*)^[4]、火炬松(*Pinus taeda*)^[5]、白桦(*Betula pendula*)^[2]、杨树(*Populus sp.*)^[6-7]、桉树(*Eucalyptus tereticornis*)^[8]、滇牡丹(*Peonia delawayi*)^[9]等。在竹类植物中也有 EST-SSR 分子标记开发的研究报道^[10-12]。

在长期的进化过程中,竹类植物为了适应不同的生长环境形成了不同的种类,即使同一竹种也会因环境或者其它因素产生遗传漂移形成变种,栽培竹种同样也会形成栽培变型。由于多数竹类植物开花间隔时间较长,遗传多样性不高,加上环境及栽培历史的影响,许多变异类型在形态发育上有返祖现象,这为竹子的分类造成很大困难。慈竹(*Bambusa emeiensis*)是我国西南地区广泛栽培的经济竹种之一,其纤维为中长纤维,是重要的工业造纸和编织等的原材料。但其栽培变异类型‘罗汉慈竹’(‘Luohanci’)、‘黑笋慈竹’(‘Heisunci’)、‘琴丝慈竹’(‘Qinsici’)、‘歪节慈竹’(‘Waijieci’)、‘蛇头慈竹’(‘Shetouci’)、‘龙头慈竹’(‘Longtouci’)、‘梁山慈竹’(‘Liangshanci’)等的蔑性质量存在着较大差异。本研究通过对麻竹(*Dendrocalamus latiflorus*) EST 序列所含 SSR 标记进行分析,开发了一批新的 EST-SSR 标记,并用于慈竹及其变异类型多态性的研究,以期对慈竹种质资源鉴别及纸浆用竹的分子标记辅助育种提供参考。

1 材料和方法

1.1 EST-SSR发掘与分析

用 <http://www.gramene.org/db/markers/ssrtool> 软件对麻竹(*Dendrocalamus latiflorus*) EST 序列(dbEST: JK007738-JK017311, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/>)中的 SSR 进行搜索,搜索参数设置为:4 个核苷酸,重复次数等于或大于 5。根据搜索到的含有 SSR 的 EST 序列应用 Netprimer 设计 44 对引物(表 1),由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。

1.2 材料及基因组DNA的提取

慈竹(*Bambusa emeiensis*)及其变异类型‘罗汉慈竹’(‘Luohanci’)、‘黑笋慈竹’(‘Heisunci’)、‘琴丝慈竹’(‘Qinsici’)、‘歪节慈竹’(‘Waijieci’)、‘蛇头慈竹’(‘Shetouci’)、‘龙头慈竹’(‘Longtouci’)、‘梁山慈竹’(‘Liangshanci’),以及料慈竹(*B. distegia*)共 9 种材料均取自四川省青神县中国竹艺城竹种园,采集新鲜叶片并迅速用硅胶干燥,带回实验室用于基因组 DNA 的提取。DNA 提取参照高志民等^[13]的方法进行。

1.3 引物扩增体系与程序

EST-SSR PCR 扩增反应体系 20 μL , 包含 2 μL 的 $10 \times \text{LA PCR buffer}$, 3.2 μL 的 2.5 mmol L^{-1} dNTPs, 2 μL 的 100 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ 模板 DNA, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 的正、反向引物各 1 μL , 0.2 μL 的 1 U LA *Taq* DNA 聚合酶(TAKARA 公司),超纯水 10.6 μL 。

预扩增采用梯度 PCR,筛选适宜退火温度,反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ ~60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 最后延伸 10 min。在经筛选后确定的退火温度下,分别对 9 种竹子样品用每对引物进行扩增,扩增产物经 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,电压 200 V, 60 min 后银染显色。

1.4 数据分析

将显色后的凝胶扫描成像保存,根据统计每一样品扩增所产生的 DNA 条带数,记录各样品的 DNA 指纹带型,如果其扩增条带有带则记为 1,若无带则记为 0,并形成原始数据矩阵。应用 DPS 软件中的 UPGMA 法进行 1、0 数据系统聚类,获得各样品的遗传距离矩阵,再利用软件 MEGA4,构建系统进化树^[14]。

2 结果和分析

2.1 麻竹EST-SSR位点分布及其特点

通过对麻竹 EST 序列进行 SSR 搜寻,在 9574 个 EST 中找到了 331 个共含有 381 个 SSR 位点的 EST,占全部 EST 的 3.46%,有 50 个 EST 包含 2 个以上的 SSR 位点,SSR 出现的频率为 3.98%。EST-SSR 的重复类型共有 59 个,其中 2 个核苷酸的重复最多,占 63.8%;其次是 3 个核苷酸的重复序列;还找到了 2 个含有 4 个核苷酸重复的 EST(图 1)。在 2 个核苷酸重复的 SSR 中有 51% 为 AG/GA/CT/TC,这与对蛇足石杉(*Huperzia serrata*)的研究结果一致^[15],其中以 GA 重复最为普遍,而在蛇足石杉和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中是以 AG 重复为主,可能是染色体复制过程中发生重复序列滑移^[16],也可能是单子叶植物麻竹的独有特征。3 个核苷酸重复的 SSR 中以 AGC/CAG/GCA/TGC/CTG/GCT 和 CCG/CGG/CGC/GCC/GCG/

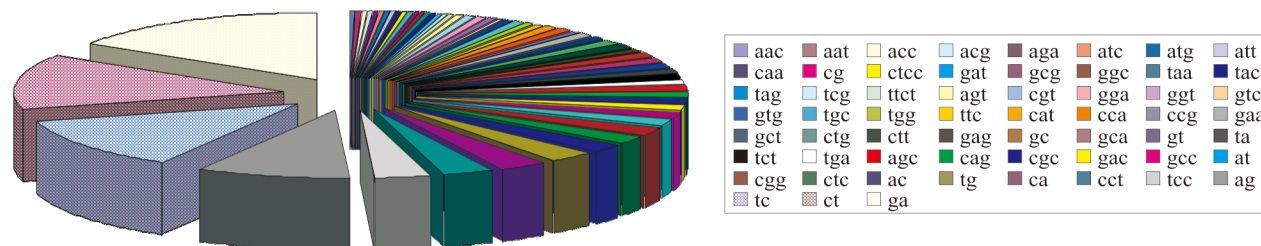


图 1 麻竹 59 种 SSR 的分布情况

Fig. 1 Distribution of 59 SSRs from *Dendrocalamus latiflorus*

表 1 44 对 EST-SSR 引物信息

Table 1 Information of 44 EST-SSR primer pairs designed by Netprimer

引物 Primer	正向引物 Forward primer (5'~3')	反向引物 Reverse primer (5'~3')	重复基序 Repeated motif
3251	AGAAACAGAGGGTGGTGAGCAAG	TCCTGAGCCTCTTGTGTCCTCC	(gtg) ₅
3292	ACCAGGTTCTTCTCTCTCTCC	CTTCAGTAAGATCCATGCTCG	(tc) ₅
3342	AATGTTGCTCTTCTCGTCCC	GCAGGTTGTTGGCTGTTATTC	(tcc) ₇
3364	TCTTGGATFCCCAGATCTTATG	CCTCCAGAAGACATGATGCAG	(tc) ₅
3380	TGTGAAACCTGGTTCCGTCCG	GGAGATCATCGGCCAAGAAAC	(ct) ₇ , (cct) ₆
3410	TCCTCTATCTCTCGCTCGCTCAC	ACCCATGCCTCCCATTTGGAC	(ccg) ₅
3457	TAGCAGCAGCAAGTCGCACAC	TGCTCCTGCTTAGGTCTACTTGC	(ag) ₇
3489	AGTGTTACCAGCGGTTGTTC	AAGAGGTCGTGCATCAAGAGG	(gtc) ₆
3511	TCCTCTGAAAAGATGCCGCC	GGCACCGTGTGTCCTTCATG	(gcc) ₅
3574	GAGAGAGAGAGGGAGAGAGAG	AGAAGATGAGATTGTAAAGCC	(ga) ₅
3605	ACCCTAAAACCTCCTGCCGC	TGATAGCATGTGTATGAGCCACCAC	(gcc) ₅
3700	GCTACGACTGCTCCTTCAAG	TGACGCACTCTGTATTGTG	(ag) ₅

GGC 最为普遍,分别占 16.9% 和 16.2%,这与毛竹 (*Phyllostachys edulis*) 和水稻 (*Oryza sativa*) 非常相似,且 CCG/CGG 主要集中在 ORF 区域。4 个核苷酸重复的 SSR 分别是 (CTCC)₅ 和 (TTCT)₆。

2.2 基因组DNA的提取与检测

分别提取慈竹、料慈竹以及慈竹变异类型‘罗汉慈竹’、‘黑笋慈竹’、‘琴丝慈竹’、‘歪节慈竹’、‘蛇头慈竹’、‘龙头慈竹’、‘梁山慈竹’等 9 种材料的 DNA,用 UV-3300 紫外分光光度计进行纯度及浓度检测,结果表明它们的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.71~1.87,同时 1% 琼脂糖凝胶电泳的检测结果表明样品 DNA 质量可用于 PCR 扩增(图略)。

2.3 EST-SSR引物筛选

以麻竹 DNA 为模板,用 44 对引物(表 1)进行 PCR 扩增,扩增产物均具有明显的目的条带(图 2),证实 EST-SSR 引物在麻竹上的可靠性。

续表(Continued)

引物 Primer	正向引物 Forward primer (5'~3')	反向引物 Reverse primer (5'~3')	重复基序 Repeated motif
3728	CAGCAGAGTGTGTGTTTAGAGC	TAGATGGCTTGC GGATGATG	(gt) ₅
3839	TCTCCTGCGGCTCCTCCTCC	TCCTCATTCTCTTCATCTTCAACTTCTTC	(ctc) ₅
3851	ACTGCTCGCTCAGCCTCACTCC	AGCCTATTCCCATCCTTACCGCC	(ct) ₁₁
3893	AGGAGGAGAGAGAGAGAAGC	AGTCAGTGGTCTGCTCAATCTC	(ga) ₇
3895	TCTCTGCCACTGTCTGTGAGTC	ATCTGTGTCACCAGCAGCAGC	(ctg) ₅
3924	ACCAACCATTGCTCCTCCCTC	TGGAACAGACCCCGTCATTG	(gc) ₅ , (ctt) ₆
3947	CCTCTTGGGCGATTCTCTC	TGAGAACCATACTATAAGGCTGC	(ct) ₆ , (gag) ₅
3956	TCTTCTCACGACGACGACGAC	TAGTTGATAATCCATTGCGACGCTG	(acg) ₇
3961	AGACGATGATGCTTCTCCTTG	TGACCTGTGCGACTTTGCTC	(cat) ₆
3982	TTCCGCATTCGTTCAACTG	AGCCTCCATGTGTTAGGTGCG	(cca) ₅
3990	ACATCTTCAACTTACCTGACATAGC	ACTCCATTCTGTTGGCACTTTC	(ac) ₅
4030	AGGAGGAACCGAGAGAGAAG	AGCACCTCCCTTTGATTTTC	(ga) ₅
4050	TCCCACACCAACTGCTTAC	TCCACAGCACATCAGTAACAGGG	(tc) ₇
4079	CAGTGATGTGCGACTATGGAG	ATGTGTCTATCTCCTCCTTTGG	(tc) ₅
4101	TGAGGAGGAGGAAGAAGTGAAG	TCTATCCAATGAATCAACCACG	(gaa) ₇
4109	TCCCATTCTCTCTCTCTCTCTCTC	TGTCTCGTGGCTTGATTGC	(tc) ₁₁ , (ct) ₆
4162	ACTGCCTGTGTAAGTATGTGC	ATGGATATATGGAAGAGAGAGAGAG	(tc) ₁₀
4173	GGGAAGAGGATACAGCTACAGTC	TGGCTTGCATCTCTTAAATCTG	(at) ₅
4184	AGCCAAACGGAAAGATGAGGG	ACACCGTCATCACCTTCAACAGC	(ctt) ₅
4209	ACACCCGTCTCTGTCTCTCC	GAGCAAAACATGAGCATGATCTAC	(tc) ₉
4247	TCGTGCCGTGTCGTCTCTCTC	CTGCTTGTGATAGTCTAAACCGC	(tc) ₇
4266	AGCCCATCTCTCGTCTCTCTCG	ACGGTACGGCACGCATCCTG	(cat) ₅
4267	TCACACCTCTCACACAGC	GACATAGGACTGGGACTTCTG	(ct) ₉
4308	ACAGGGTTCATCCAACATC	ATGTTGAGAATCCATCTGTTGC	(ct) ₅
4325	GAGAAGGAAGAGTCGTCGAG	TGGCTCTTGGTCCACACTG	(ggt) ₅
4344	GTGTCTCTCTCGTCAAATCTCTCTC	TCACCTTGCTCAGTGGCTTG	(tc) ₁₂
4361	AACACAACAACGCCGATTTC	TTGCTGTCCACAACAAGATGAG	(ct) ₆
4373	CAAGACAGTGGCTTCTCCTC	ACCGAACAACGGACAGTGC	(ttc) ₁₄
4397	AGGGAGAGGGAGAGGGAGAG	CTCGGTATCCATCTCTTGTCTCTC	(ga) ₇
4405-2	TCCACCAGCCACCGTCTCTC	TCACGATCACCACCACCACG	(tcc) ₅
4405-4	CTCATCTCTCCGGTTCCTTCG	CACACTGAAGCAATCCCCAC	(tgg) ₆
4417	TGATGACTACCTTCTCACTCGCAGC	TGGAGGCACCCAGAGCAAG	(gac) ₇
4467	AGAATGGAGGGGAGAGAAGAG	TCCACTAAGTTCAACAACCTGAC	(ggc) ₇
4476	TCCACCGAATCACCCAGC	TTGTCACGGATGTCGAAGTACCC	(ta) ₅
4480-1	TCGCTGCCTGCTCCAATCTC	GAAGGAACAAGATACAGTCGCACAC	(ga) ₁₉

以慈竹、料慈竹及慈竹变异类型‘罗汉慈竹’、‘黑笋慈竹’、‘琴丝慈竹’、‘歪节慈竹’、‘蛇头慈竹’、‘龙头慈竹’、‘梁山慈竹’等9种材料的DNA为模板,用来自麻竹的EST-SSR引物进行有效分子标记筛选。通过对PCR条件的优化和电泳分析

来寻找有效的EST-SSR分子标记。在44对EST-SSR引物中有37对引物可以扩增出清晰稳定的条带,占合成引物的84.1%,这证实了麻竹EST-SSR引物在丛生竹慈竹及其变异类型上的通用性。

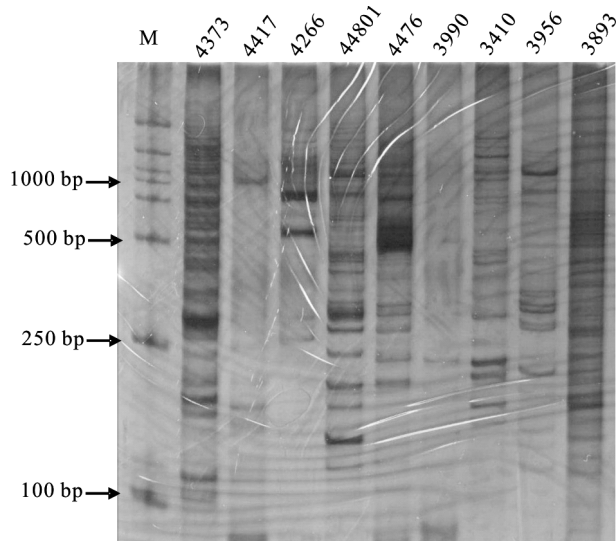


图2 用9对 EST-SSR 引物对麻竹的扩增结果。M:DNA 分子量标记。
Fig. 2 Amplification of *Dendrocalamus latiflorus* using 9 pairs of EST-SSR primer. M: DNA marker.

2.4 EST-SSR的多态性分析

以慈竹、料慈竹及慈竹变异类型‘罗汉慈竹’、‘黑笋慈竹’、‘歪节慈竹’、‘蛇头慈竹’、‘龙头慈竹’、‘琴丝慈竹’、‘梁山慈竹’基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,将扩增产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。结果表明, 37 对 EST-SSR 引物对供试样品均具有良好的多态性。从图 3 可见,用引物 3961F/R 进行扩增,‘黑笋慈竹’和‘梁山慈竹’在 300 bp 左右有一条明显的条带,慈竹和‘梁山慈竹’在 120 bp 左右也有一条明显的条带,而其它供试材料没有;用另一引物 4247F/R 进行扩增,慈竹和‘梁山慈竹’在 500 bp 左右没有条带,而其他供试材料均有明显的条带,慈竹、‘罗汉慈竹’、‘梁山慈竹’在 250 bp 左右没有条带,而其余的材料中均有条带。

根据 EST-SSR 引物扩增产物电泳图的条带,计算出 9 种材料间的遗传距离(表 2)。结果表明,供

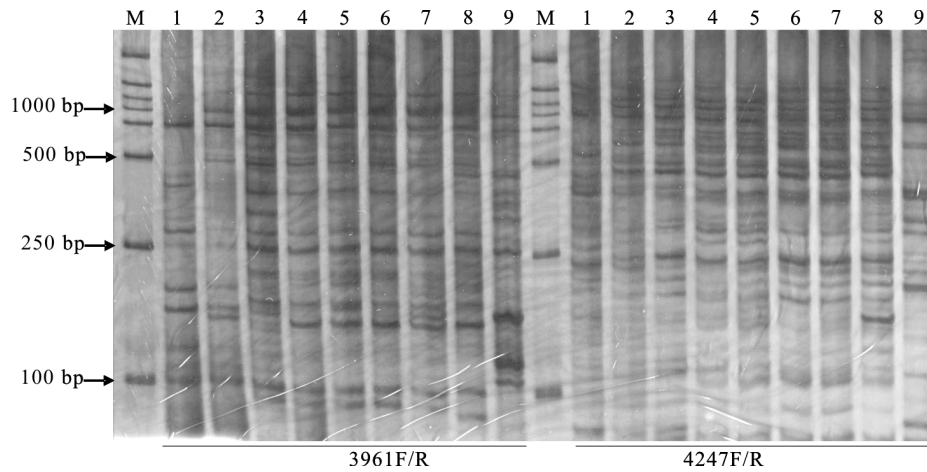


图3 引物 3961F/R 和 4247F/R 的扩增结果。1~9 分别为慈竹、‘罗汉慈竹’、‘黑笋慈竹’、‘琴丝慈竹’、料慈竹、‘歪节慈竹’、‘蛇头慈竹’、‘龙头慈竹’、‘梁山慈竹’; M: DNA 分子量标记。

Fig. 3 Amplification by primers of 3961F/R and 4247F/R. 1-9 present *Bambusa emeiensis*, ‘Luohanci’, ‘Heisunci’, ‘Qinsici’, *B. distegia*, ‘Waijieci’, ‘Shetouci’, ‘Longtouci’, and ‘Liangshanci’, respectively; M: DNA marker.

表2 基于 EST-SSR 标记的 9 种材料的遗传距离

Table 2 Genetic distance among 9 tested materials based on EST-SSR markers

植物 Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1									
2	0.586								
3	0.473	0.630							
4	0.479	0.609	0.236						
5	0.616	0.774	0.518	0.517					
6	0.585	0.778	0.482	0.592	0.553				
7	0.476	0.656	0.399	0.403	0.587	0.441			
8	0.538	0.697	0.505	0.460	0.667	0.569	0.370		
9	0.664	0.840	0.493	0.573	0.635	0.542	0.533	0.373	

1~9 分别为慈竹、‘罗汉慈竹’、‘黑笋慈竹’、‘琴丝慈竹’、料慈竹、‘歪节慈竹’、‘蛇头慈竹’、‘龙头慈竹’和‘梁山慈竹’。

1-9 present *Bambusa emeiensis*, ‘Luohanci’, ‘Heisunci’, ‘Qinsici’, *B. distegia*, ‘Waijieci’, ‘Shetouci’, ‘Longtouci’, and ‘Liangshanci’, respectively.

试材料间的遗传距离为 0.263~0.840, 平均为 0.538, 其中‘黑笋慈竹’和‘琴丝慈竹’间的亲缘关系最近, 为 0.263; ‘蛇头慈竹’和‘龙头慈竹’间的遗传距离较近, 为 0.370, 而‘罗汉慈竹’与其他样品的遗传距离较远, 与‘梁山慈竹’的亲缘关系最远, 为 0.840。‘黑笋慈竹’、‘蛇头慈竹’、‘琴丝慈竹’、‘龙头慈竹’、‘歪节慈竹’、‘梁山慈竹’与慈竹的遗传距离呈逐渐增加的趋势, 而它们与料慈竹的遗传距离也呈现类似的趋势, 但与料慈竹的遗传距

离均大于与慈竹的遗传距离。

在形态学分类上慈竹与料慈竹属于不同的两种, 聚类分析表明(图 4), 慈竹与料慈竹分别位于两个单一分支上, 分子证据有效地支持了形态学分类结果。‘黑笋慈竹’、‘琴丝慈竹’、‘蛇头慈竹’、‘龙头慈竹’、‘梁山慈竹’、‘歪节慈竹’等变异类型与慈竹聚类在较近的分支上, 而‘料慈竹’和‘罗汉慈竹’则在两个相对较远的单一分支上。

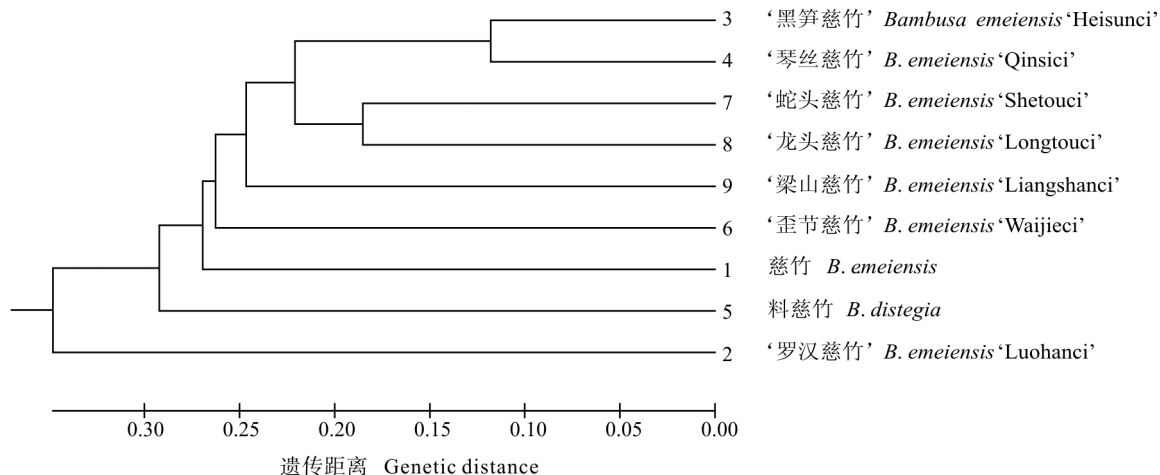


图 4 基于 EST-SSR 标记对 9 种材料的聚类分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of 9 materials based on EST-SSR markers

3 讨论

长期以来, 对于竹类植物的分类一直存在分歧。《中国植物志》中把慈竹(*Neosinocalamus affinis*)及栽培种绿竿花慈竹(*Neosinocalamus affinis* cv. *Striatus*)划归为禾本科(Gramineae)竹亚科(Bambusoideae)慈竹属^[17], 而在 Flora of China^[18]中则将慈竹和料慈竹(*Bambusa distegia*)一起划归为簕竹族(Bambuseae)簕竹属(*Bambusa*)簕竹亚属(*Bambusa* subg. *Lingnaniania*)植物, 慈竹的学名变更为 *Bambusa emeiensis*。对于一些栽培变异类型的归属问题的判断就更加困难, 如‘罗汉慈竹’、‘黑笋慈竹’、‘琴丝慈竹’、‘歪节慈竹’、‘蛇头慈竹’、‘龙头慈竹’、‘梁山慈竹’等, 在遗传上它们与慈竹和料慈竹之间的关系等问题一直存在争议。

传统竹类植物的分类主要依赖于形态学观察和细胞学方法, 从变异生态性状表现加以推断, 这些方法虽有一定的效果, 但存在着鉴定周期长, 易受环境条件影响等缺点。分子标记鉴定技术可从 DNA 水平上揭示变异类型之间的遗传差异, 特

别是 SSR 标记, 具有标记数量丰富, 共显性、多态性高, 不受环境影响, 检测准确快速等优点。EST-SSR 标记位于基因的转录部分, 直接反映基因编码信息, 可能实现对某些重要性状的等位基因进行直接鉴定, 因此, EST-SSR 标记成为复杂的竹类植物系统学研究的有效工具之一。利用从绿竹(*B. oldhamii*)和乌脚绿竹(*B. edulis*)的 cDNA 文库中开发的 EST-SSR, 对花竹(*B. textilis*)与麻竹(*D. latiflorus*)、版纳甜龙竹(*D. hamiltonii*)与麻竹、撑篙竹(*B. pervariabilis*)与绿竹的种间杂种真实性的鉴别均取得了良好的效果, 对于这些共显性标记, 相对应的杂交竹种扩增产物的电泳结果分别表现为其父母本条带的组合, 测序结果进一步验证了杂种和亲本之间的序列具有同源性, 证实了 EST-SSR 标记的有效性^[10,12]。杨丽等^[11]利用毛竹 EST-SSR 标记对 12 个竹种进行了研究, 结果与形态学分离基本一致。然而利用 EST-SSR 标记进行栽培变异类型的遗传分析在竹类植物中尚未见报道。

本研究用基于麻竹 EST 开发出的 44 对 EST-

SSR 分子标记引物,对慈竹及其栽培变异类型进行了分析。聚类结果,慈竹和料慈竹作为两种能明显被区分,但遗传距离又较近,这与把慈竹和料慈竹划归为禾本科竹亚科籐竹族籐竹属箬竹亚属植物的结论相符合^[18]。‘黑笋慈竹’、‘琴丝慈竹’、‘歪节慈竹’、‘蛇头慈竹’、‘龙头慈竹’、‘梁山慈竹’与慈竹的进化关系较近,为慈竹的栽培变异类型,但变异类型‘罗汉慈竹’与慈竹和料慈竹的进化相似系数均较低,是哪一竹种的变异类型尚不好确定,还需通过采集更多样本、增加引物数量来进一步研究,才能更加准确地评估‘罗汉慈竹’的进化归属问题。

参考文献

- [1] Li Y C, Korol A B, Fahima T, et al. Microsatellites within genes: Structure, function, and evolution [J]. *Mol Biol Evol*, 2004, 21(6): 991–1007.
- [2] Wang Y M, Wei Z G, Yang C P. Data mining for SSRs in ESTs and EST-SSR marker development in *Betula platyphylla* [J]. *Sci Silv Sin*, 2008, 44(2): 78–84.
王艳敏, 魏志刚, 杨传平. 白桦EST-SSR信息分析与标记的开发 [J]. *林业科学*, 2008, 44(2): 78–84.
- [3] Xu Y, Ma R C, Xie H, et al. Development of SSR markers for the phylogenetic analysis of almond trees from China and the Mediterranean region [J]. *Genome*, 2004, 47(6): 1091–1104.
- [4] Rungis D, Bérubé Y, Zhang J, et al. Robust simple sequence repeat markers for spruce (*Picea* spp.) from expressed sequence tags [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 109(6): 1283–1294.
- [5] Liewlaksaneeyanawin C, Ritland C E, El-Kassaby Y A, et al. Single-copy, species-transferable microsatellite markers developed from loblolly pine ESTs [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 109(2): 361–369.
- [6] Zhang X Y, Song C W, Zhang Y D, et al. Development of EST-SSR in *Populus deltoides* and *P. euramericana* [J]. *Sci Silv Sin*, 2009, 45(9): 53–59.
张新叶, 宋丛文, 张亚东, 等. 杨树EST-SSR标记的开发 [J]. *林业科学*, 2009, 45(9): 53–59.
- [7] Du T Z, Wang B W, Wang B L, et al. Development and evaluation of simple sequence repeat (SSR) loci from functional genes involved in wood formation in *Populus tomentosa* [J]. *Sci Silv Sin*, 2010, 46(11): 8–15.
杜庆章, 王博文, 王保垒, 等. 毛白杨木材形成功能基因内SSR标记的开发及评价 [J]. *林业科学*, 2010, 46(11): 8–15.
- [8] Zhou C P, Li F G, Weng Q J, et al. Comparison between direct sequencing and pool-cloning-based sequencing of PCR products in EST-SSR marker development in *Eucalyptus* [J]. *Mol Plant Breed*, 2010, 8(1): 1–10.
- 周长品, 李发根, 翁启杰, 等. 桉树EST-SSR标记PCR产物的直接测序和基于克隆池测序的比较 [J]. *分子植物育种*, 2010, 8(1): 1–10.
- [9] Zhang Y L, Wang Y, Li Z H, et al. SSRs marking of *Paeonia delavayi* based on peony EST data [J]. *For Res*, 2011, 24(2): 171–175.
张艳丽, 王雁, 李正红, 等. 基于牡丹EST信息的滇牡丹SSR标记开发 [J]. *林业科学研究*, 2011, 24(2): 171–175.
- [10] Wu M D, Dong W J, Tang D Q. Identification of four caespitose hybrid bamboos by using SSR markers [J]. *Mol Plant Breed*, 2009, 7(5): 959–965.
吴妙丹, 董文娟, 汤定钦. 4个丛生杂种竹的SSR分子鉴定 [J]. *分子植物育种*, 2009, 7(5): 959–965.
- [11] Yang L, Guan Y, Zhang Z J. Characterization and utilization of EST-SSRs markers from bamboo [J]. *J Agri Biotechn*, 2011, 19(1): 57–62.
杨丽, 管雨, 张智俊. 竹类植物EST-SSRs分布特征及应用 [J]. *农业生物技术学报*, 2011, 19(1): 57–62.
- [12] Dong W J, Wu M D, Lin Y, et al. Evaluation of 15 caespitose bamboo EST-SSR markers for cross-species/genera transferability and ability to identify interspecies hybrids [J]. *Plant Breed*, 2011, 130(5): 596–600.
- [13] Gao Z M, Fan S H, Gao J, et al. Extract genomic DNA from *Phyllostachys edulis* by CTAB-based method [J]. *For Res*, 2006, 19(6): 725–728.
高志民, 范少辉, 高健, 等. 基于CTAB法提取毛竹基因组DNA的探讨 [J]. *林业科学研究*, 2006, 19(6): 725–728.
- [14] Li Y L, Han G M, He S E, et al. A new strategy for construction of phylogenetic tree based on DNA molecular mark data [J]. *China J Bioinform*, 2008, 6(4): 168–170.
李亚玲, 韩国民, 何沙娥, 等. 基于DNA分子标记数据构建系统进化树的新策略 [J]. *生物信息学*, 2008, 6(4): 168–170.
- [15] Luo H M, Sun C, Li Y, et al. Analysis of expressed sequence tags from the *Huperzia serrata* leaf for gene discovery in the areas of secondary metabolite biosynthesis and development regulation [J]. *Physiol Plant*, 2010, 139(1): 1–12.
- [16] Eckert K A, Mowery A, Hile S E. Misalignment-mediated DNA polymerase β mutations: Comparison of microsatellite and frame-shift error rates using a forward mutation assay [J]. *Biochemistry*, 2002, 41(33): 10490–10498.
- [17] Geng B J, Wang Z P. Gramineae (Poaceae) (1): Bambusoideae [M]// *Flora Reipublicae Popularis Sinicae Tomus 9(1)*. Beijing: Science Press, 1996: 132–135.
耿伯介, 王正平. 禾本科 (1): 竹亚科 [M]// *中国植物志* 第9(1)卷. 北京: 科学出版社, 1996: 132–135.
- [18] Li D Z, Wang Z P, Zhu Z D, et al. Tribe Bambuseae [M]// Wu Z Y, Raven P H. *Flora of China* Vol. 22. Beijing: Science Press, St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2006: 7–180.