

紫薇 EST-SSR 标记的开发与利用

张恩亮, 王 鹏, 李 亚, 王淑安, 李林芳, 杨如同

(江苏省中国科学院植物研究所, 江苏 南京 210014)

摘 要:以紫薇为试材, 利用 MISA 软件对转录组测序获得 45 308 条 unigenes 中的 SSR 特征进行分析。结果表明: 9 074 条 unigenes 存在 10 905 个 SSR 位点, 1 486 条 unigenes 含有 2 个以上的 SSR 位点, 550 个位点是复合重复位点; 从 7 620 个 SSRs 位点中设计出 4 501 对 SSR 引物; 随机选择 68 对 SSR 引物进行检测, 其中 61 对引物可以成功的扩增出清晰可用的条带, 28 对引物有多态性。

关键词:紫薇; EST-SSR; 转录组测序; 分子标记

中图分类号:S 685.99 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)22-0107-05

紫薇(*Lagerstroemia indica*)属千屈菜科(Lythraceae)紫薇属(*Lagerstroemia*)落叶灌木或小乔木。紫薇花大、艳丽且花期长, 花期是每年的 6—9 月。中国种植紫薇的历史近 1 700 年, 许多紫薇品种在中国广泛栽培^[1-3]。

简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)标记技术具有多态性高、共显性、易检测、重复性高、数量丰富等优点, 已被广泛用于植物分类、遗传育种等方面^[4]。表达序列标签 SSR(expressed sequence tag SSR, EST-SSR)是从 EST 序列中挖掘的标记, 与传统的基因组 SSR(genomic SSR, gSSR)相比, 其直接嵌入功能基因的序列中, 直接与控制性状的功能基因连锁关联, 成本低且能提供丰富的遗传信息^[5]。

通过 EST 序列开发 SSR 标记在园林植物上已经被广泛应用, 在日本金松(*Sciadopitys verticillata*)^[6]、牡丹(*Paeonia suffruticosa*)^[7]、中山杉(*Taxodium 'Zhongshanshan'*)^[8]等植物中均有报道。在紫薇 SSR 标记的研究方面, WANG 等^[9]基于基因组序列开发 78 对 SSR 标记并检测 51 个紫薇品种的基因多样性。CAI 等^[10]利用基因组序列开发 33 对 SSR 标记进行遗传多样性分析, 其中 12 个标记在 50 个紫薇品种表现出多态性。LIU 等^[11]开发了 11 个基于基因组的 SSR 标记用来

区分紫薇属内种间亲缘关系。但是, 目前关于大规模的开发紫薇 EST-SSR 标记的报道还较少。该研究利用高通量测序技术获得的紫薇转录组数据库, 根据 SSR 位点两端序列信息设计 EST-SSR 引物, 并验证标记的可行性, 以期紫薇遗传图谱的构建和分子标记辅助育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试紫薇品种“金幌”(*Lagerstroemia indica* ‘Jinhuang’), “繁花似锦”(*Lagerstroemia indica* ‘Fanhuasijin’)和 6 株杂交 F₁ 单株叶片取自于南京中山植物园紫薇种质资源圃, 置于-80℃冰箱中保存, 备用。

1.2 试验方法

1.2.1 幼叶 DNA 的提取 采用改良的 CTAB 法^[12]。

1.2.2 EST-SSR 引物设计 LI 等^[13]利用 Illumina Hi-Seq 2000 对“金幌”叶片不同发育时期进行了转录组测序, 经序列分析后获得 45 308 条 unigenes 序列, 平均长度 987.51 bp(登录号: SRP034823)。利用 MISA 工具包(<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/misa.html>)对所有的 unigenes 进行 SSR 位点鉴定, 参数设置: 重复单元为 1~6 核苷酸, 1~6 核苷酸的最少重复数分别设置为 10、8、5、4、3 和 3。由于单核苷酸的测序错误率较高, 在引物设计时, 将其剔除。在所有含有 SSR 位点的 unigenes 中, 使用 Primer 3 软件(<http://fokker.wi.mit.edu/primer3>)进行 EST-SSR 引物设计。在包含 SSR 位点的 9 074 条 unigenes 序列中, 3 092 条 unigenes 序列设计出 SSR 引物, 并且其中 1 409 条 unigenes 序列可以设计出超过 1 条的 SSR 引物。为了检测引物的可用性, 随机选择 68 对 EST-SSR 引物进行检测(表 1)。

第一作者简介:张恩亮(1994-), 男, 安徽六安人, 硕士研究生, 研究方向为园林植物。E-mail: everzell1994@163.com.

责任作者:李亚(1969-), 男, 安徽颍上人, 博士, 研究员, 研究方向为园林植物。E-mail: yalicnbg@163.com.

基金项目:科技部农业科技成果转化资金资助项目(2013GB2C100185); 江苏省农业科技自主创新资金资助项目(CX(14)2032); 江苏省林业三新工程资助项目(LYSX[2015]13)。

收稿日期:2016-08-04

表 1 多态性引物信息

Table 1 The information of polymorphic primers

引物编号 Primer code	引物序列(5'→3') Primer sequence	预期产物大小 Expected product size /bp	重复基元 Repeat motif
NBJ4	F:GGACGCCGCTGTACTTCT R:TGCAATCCGTACTTCCATA	158	(GA)8
NBJ14	F:TGCCCTACCGATCTCTCTCT R:GCAACCAGAACACATCAACC	205	(TCT)5
NBJ33	F:CGTATGACCCACTCAACCTG R:TTTGGTTTGGGACTTTCTCC	304	(GAA)6
NBJ34	F:GCTCCACCTTCTTCTTGCTC R:CTCTCATCGTCCCTCCCTAGC	338	(TCT)5
NBJ38	F:CTTTGACAGCTCAACCTCCA R:AGAGCGGGAGAGAATTCAAA	279	(GCC)5
NBJ39	F:TGGTCTGGTGATTTCCGGTAA R:CCCAATCCTCTCCAACAAC	243	(A)13
NBJ43	F:CACAAGGAACAGCCAGAAGA R:TTACTGTCTCTCCCTTCC	151	(GTGA)4
NBJ44	F:AGGACGGAATTGGAGTTGAC R:CCAGACCCACTTATCCGTCT	167	(GAG)5
NBJ46	F:ATAATGCTGGAAGGGAGTGG R:GCTCTGGCTCGTCAATAACA	157	(A)10
NBJ49	F:ATTGCAGTCACGTGTTCCAT R:CTTCTCTTCTCTCTTGACGG	171	(CCG)5
NBJ58	F:GAGGACTTGGGGTCACTAA R:ACAACGTGTGGGACCCCTCTC	292	(GCA)7
NBJ65	F:AATCCAGTTTTCGGTTCAG R:GAACCTCCGAGAGAAGACGAG	227	(C)10
NBJ89	F:CCAGGAAGGAAGAAGTCTCG R:TGGGGATGTTAGGAAGAAGG	350	(ATT)5
NBJ95	F:CTCCAGATGCGGAGTACAGA R:AGGAAGAAGGTGCAGAAGGA	157	(ATG)5
NBJ100	F:TCTACGGGAACCAATGACAC R:CCACCAATGCCAATAGACAG	158	(AGGAGA)3
NBJ104	F:CCTTTTCATTCCGCCATATCT R:AAAACCTTCAGAGCGTTGCT	202	(AT)9
NBJ148	F:CCCCCTTCTCAACAAGTAA R:AGCTAAAACAGCCAGCCAAT	311	(CTCAAA)3
NBJ109	F:CGCAGATTCTTGGAGCCATA R:TTTAGTCCCTCCCTGGTCCAC	261	(GGGGTT)3
NBJ125	F:TCCGTCCTCTAAACCATTTC R:GGCTCTATCTGAGGACCAGC	287	(T)10
NBJ131	F:TGATGCTATCAAGGCAGAGG R:CGAAAAGTGTTGCTGCTTGT	317	(A)12
NBJ139	F:GCTTAGGACCCAAATCCAAA R:CTTGGCAGTCTCTCTTTTC	197	(GAGAA)4
NBJ173	F:GTTCAITGCCCCGATGACTG R:CCACTTCATTCCACCAGTTG	219	(CT)12
NBJ186	F:GGCAAGGAAACTCCATGAAT R:ATCTGATGAGCCTGCAGTTG	235	(GCA)5
NBJ188	F:ATGTTAGAGTGGTGGGAGGG R:AGAGAGAGAAGGAGGGGAG	323	(TC)9
NBJ219	F:TOCTAGCATGTGTTCTTGG R:TTTCCCTCTCATCCGGTTAC	225	(A)12
NBJ1294	F:AAATCTCAAGTCAACCTGCG R:TGCTCTTCACAGGTTTTTGC	167	(TC)8
NBJ1311	F:ATTTGAAGGTCTCGTCCGTT R:GGAGATTCAGGTGAAGGAA	153	(AAGA)4
NBJ1326	F:ATCAGCCATAGTCGTCTCC R:GAACCAAGGTAGCTCCAGAGG	197	(GA)9

1.2.3 PCR 扩增 PCR 反应总体系 10 μL : *Taq* DNA 聚合酶 0.2 U, Mg^{2+} 2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Buffer 2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, dNTPs 0.125 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 前后引物各 0.25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 模板 DNA 10 ng, ddH₂O 若干。PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5.5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 33 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。所得扩增引物用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 快速银染法染色, 记录结果。

2 结果与分析

2.1 紫薇 EST-SSR 分布特征

由表 2 可知, 在 45 308 条 unigenes 序列中, 9 074 条 unigenes 序列含有 10 905 个 SSR 位点。在含有 SSR 位点的 unigenes 序列中, 1 486 条 unigenes 序列含有 1 个以上的 SSR 位点, 550 个 SSRs 位点为复合位点。

重复类型上, 鉴定了从单核苷酸重复到六核苷酸重复等 6 种重复类型的 SSRs。由表 3 可知, 单核苷酸重复 (3 285, 30.12%) 最多, 其余依次为三核苷酸重复 (2 958, 27.12%), 二核苷酸重复 (2 235, 20.50%), 六核苷酸重复

表 2 紫薇 EST-SSR 分布特征

Table 2 Distribution of EST-SSR in *Lagerstroemia indica* transcriptome

参数 Parameter	数值 Number
总 unigene 序列数 Total number of unigenes sequence	45 308
总核苷酸数 Total number of nucleotide	59 646 886
总 SSR 数 Total number of SSR	10 905
含 SSR 位点的序列数 Number of SSR loci containing sequences	9 074
含多个位点的序列数 Number of sequences containing more than 1 SSR	1 486
以复合形式出现的 SSRs Number of SSRs present in compound formation	550
SSR 发生频率 Frequency of SSR/ %	20.03
SSR 的平均距离 Average distance of SSR/ kb	5.46

表 3 利用 MISA 软件鉴定的 SSR 位点分布情况

Table 3 Distribution of identified SSRs using the MISA software

重复类型 Repeat type	重复次数 Repeat number										共计 Total	比例 Proportion
	3	4	5	6	7	8	9	10	>10	/ %		
单核苷酸重复 Mononucleotide	0	0	0	0	0	0	0	1 517	1 768	3 285	30.12	
二核苷酸重复 Dinucleotide	0	0	0	0	0	736	887	489	123	2 235	20.50	
三核苷酸重复 Trinucleotide	0	0	1 679	855	392	28	1	1	2	2 958	27.12	
四核苷酸重复 Tetranucleotide	0	330	128	17	7	2	2	0	2	488	4.48	
五核苷酸重复 Pentanucleotide	741	179	25	0	0	0	0	0	0	945	8.67	
六核苷酸重复 Hexanucleotide	830	156	4	3	0	1	0	0	0	994	9.11	
共计 Total	1 571	665	1 836	875	399	767	890	2 007	1 895	10 905		
比例 Proportion / %	14.40	6.09	16.84	8.02	3.66	7.03	8.16	18.40	17.38			

(994,9.11%),五核苷酸重复(945,8.67%)和四核苷酸重复(488,4.48%)。所有 SSR 位点中,10 次重复的 SSR 位点(18.40%)最多,其次为 5 次重复(16.84%),3 次重复(14.40%)和 9 次重复(8.16%)。由于单核苷酸重复的误差较大,下一步分析中将其剔除。由表 4 可知,在二核苷酸重复中,重复单元 AG/CT(88.59%)的出现次数最多,AC/GT(4.88%)的出现次数最少。在三核苷酸重复中,重复单元 AAG/CTT(30.49%)出现次数的最多,最少的是 ACT/AGT(0.57%)。由表 5 可知,EST-SSRs 重复长度是存在差异的,15~18 bp 长度的重复最多(4 157,77.21%),19~22 bp 次之(1 123,20.86%),23 bp 以上的重复最少(104,1.93%)。

表 4 SSR 位点双核苷酸重复和三核苷酸重复的分布情况

Table 4 Distribution of SSRs among di-and tri-nucleotide types			
重复类型	重复单元	重复次数	比例
Repeat type	Repeat motif	Repeat number	Proportion/%
二核苷酸重复 Dinucleotide	AC/GT	109	4.88
	AG/CT	1 980	88.59
	AT/AT	146	6.53
	AAC/GTT	47	1.59
	AAG/CTT	902	30.49
	AAT/ATT	48	1.62
三核苷酸重复 Trinucleotide	ACC/GGT	193	6.52
	ACG/CGT	55	1.86
	ACT/AGT	17	0.57
	AGC/CTG	486	16.43
	AGG/CCT	812	27.45
	ATC/ATG	214	7.23
	CCG/CGG	184	6.22

表 5 EST-SSRs 重复长度分布

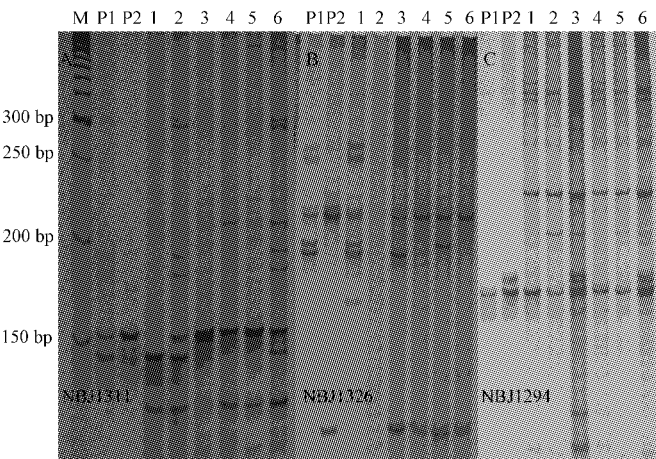
Table 5 Length distribution of the EST-SSRs						
重复类型	长度 Length/bp					
	15~16	17~18	19~20	21~22	23~32	>32
二核苷酸重复 Dinucleotide	736	887	489	114	8	1
三核苷酸重复 Trinucleotide	1 679	855	0	392	30	2
四核苷酸重复 Tetranucleotide	0	0	128	0	26	4
五核苷酸重复 Pentanucleotide	0	0	0	0	25	0
六核苷酸重复 Hexanucleotide	0	0	0	0	4	4
共计 Total	2 415	1 742	617	506	93	11

2.2 多态性分析

由图 1 可知,随机选择 68 对 EST-SSR 引物进行检测,其中 61 对引物可以成功的扩增出清晰可用的条带,28 对引物在 2 个亲本和 F₁ 单株中有多态性差异。

3 讨论

近年来转录组测序的快速发展,通过转录组测序结果开发 SSR 标记应用广泛。该研究中,紫薇转录组中 EST-SSR 发生频率 20.03%,高于中山杉(7.49%)^[8]、蔷薇(*Rosa*) (4.00%)^[14]、沙棘(*Hippophae rhamnoides*) (3.50%)^[15]、花生(*Arachis hypogaea*) (10.70%)^[16]。该研究中,紫薇转录组中平均每隔 5.46 kb 含有 1 个 SSR 位



注: A. NBJ1311 引物; B. NBJ1326 引物; C. NBJ1294 引物; M. DNA Marker; P1. “繁花似锦”紫薇; P2. “金幌”紫薇; 1~6. F₁ 群体。

Note: A. NBJ1311 primer; B. NBJ1326 primer; C. NBJ1294 primer; M. DNA Marker; P1. *Lagerstroemia indica* ‘Fanhuasijin’; P2. *Lagerstroemia indica* ‘Jinhuang’; 1—6. F₁ plants.

图 1 3 对多态性引物扩增

Fig. 1 Amplification of three polymorphism primers

点,高于中山杉(1 SSR/6.90 kb)^[8]、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) (1 SSR/13.83 kb)^[17]、油棕榈(*Bismarckia nobilis*) (1 SSR/7.7 kb)^[18]、牡丹(1 SSR/9.24 kb)^[7],但是低于蓖麻(*Ricinus communis*) (1 SSR/1.77 kb)^[18],同时也低于基因组序列的 SSR 位点(28.68%)^[10]。这些差异可能与 EST 数据库特征,物种种类,SSRs 查找工具和鉴定标准不同等方面的原因有关^[20]。

该研究中,单核苷酸重复的 SSRs 最多(30.12%),与麻风树(*Jatropha carcas*)^[21]的研究结果相似,但是与拟南芥^[17]、柑橘(*Citrus reticulata*)^[22]等的研究结果有区别,可能的原因是种间杂交使得单核苷酸重复位点迅速扩增^[23]。在植物中报道最多的是二核苷酸重复和三核苷酸重复,只是优势重复单元不同。除去单核苷酸重复,紫薇转录组中出现最多的重复频率为三核苷酸重复(27.13%),其次是二核苷酸重复(20.50%),与中山杉^[8]、忽地笑(*Lycoris aurea*)^[24]等三核苷酸重复数量占优一致,而牡丹^[7]、橡胶树(*Hevea brasiliensis*)^[25]等则是二核苷酸重复数量占优。二核苷酸重复中 AG 和三核苷酸重复中 AAG 是出现在基因附近和基因内最多的重复单元^[26-30]。该研究中显示重复次数最多的二核苷酸是 AG/CT,与大多数以二核苷酸重复为主的结果一致^[28]。同时,该研究中还发现三核苷酸重复次数最多的是 AAG/CTT,与大部分双子叶植物的结果一致^[31]。CARDLE 等^[17]证明了重复长度不高于 20 bp 的 SSRs 具有更高的多态性,该研究结果显示 2 359(97.68%)的重复长度在 20 bp 以内,表明开发引物的效率较高。

该研究中,利用含有 SSR 位点的 unigenes 共设计出

4 501 对(59.07%) SSR 引物, 41.93% 的位点由于 SSRs 侧翼序列太短或不适合用于设计 SSR 引物等 2 方面的原因不能开发引物。通过对随机选择的 68 对 SSR 引物进行鉴定发现 61 对(89.71%) 引物成功扩增出条带, 28 对引物有多态性, 多态性频率为 45.91%, 在不同物种中也有差异, 比如中山杉(16.1%)^[8], 橡胶树(59.8%)^[25]。该研究中发现, 较之基因组开发的 SSR 标记, 转录组开发的 SSR 标记多态性频率更高, 表明 EST-SSR 标记具有更高的性价比。大量 SSR 标记的开发能够为紫薇高密度遗传连锁图谱的构建、基因定位及克隆等研究奠定基础。

参考文献

- [1] CABRERA R I. Evaluating and promoting the cosmopolitan and multi-purpose *Lagerstroemia* [J]. Acta Horticulturae, 2004, 630: 177-184.
- [2] ZHANG Q. Studies on cultivars of crapemyrtle (*Lagerstroemia indica*) and their uses in urban greening [J]. Journal of Beijing Forestry University, 1991(4): 57-66.
- [3] MIN W, PING S, XIANG R X, et al. Recent advances in *Lagerstroemia indica* resources and breeding [J]. Shandong Forestry Sci Technol, 2008, 2: 66-68.
- [4] GUPTA P K, VARSHNEY R K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat [J]. Euphytica, 2000, 113(3): 163-185.
- [5] BOZHKO M, RIEGEL R, SCHUBERT R, et al. A cyclophilin gene marker confirming geographical differentiation of Norway spruce populations and indicating viability response on excess soil-born salinity [J]. Molecular Ecology, 2003, 12(11): 3147-3155.
- [6] KAWASE D, UENO S, TSUMURA Y, et al. Development and characterization of EST-SSR markers for *Sciadopitys verticillata* (Sciadopityaceae) [J]. Conservation Genetics, 2009, 10(6): 1997-1999.
- [7] WU J, CAI C, CHENG F, et al. Characterisation and development of EST-SSR markers in tree peony using transcriptome sequences [J]. Molecular Breeding, 2014, 34(4): 1853-1866.
- [8] CHENG Y, YANG Y, WANG Z, et al. Development and characterization of EST-SSR markers in *Taxodium 'Zhongshansa'* [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2015, 33(6): 1804-1814.
- [9] WANG X, WADL P A, POUNDERS C, et al. Evaluation of genetic diversity and pedigree within crape myrtle cultivars using simple sequence repeat markers [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2011, 136(2): 116-128.
- [10] CAI M, PAN H T, WANG X F, et al. Development of novel microsatellites in *Lagerstroemia indica* and DNA fingerprinting in Chinese *Lagerstroemia* cultivars [J]. Scientia Horticulturae, 2011, 131(1): 385-394.
- [11] LIU Y, HE D, CAI M, et al. Development of microsatellite markers for *Lagerstroemia indica* (Lythraceae) and related species [J]. Applications in Plant Sciences, 2013, 1(2): 76-87.
- [12] DOYLE J. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. Focus, 1990, 12: 13-15.
- [13] LI Y, ZHANG Z, WANG P, et al. Comprehensive transcriptome analysis discovers novel candidate genes related to leaf color in a *Lagerstroemia indica*, yellow leaf mutant [J]. Genes and Genomics, 2015, 37(10): 851-863.
- [14] JUNG S, ABBOTT A, JESUDURAI C, et al. Frequency, type, distribution and annotation of simple sequence repeats in Rosaceae EST [J]. Functional and Integrative Genomics, 2005, 5(3): 136-43.
- [15] JAIN A, GHANGAL R, GROVER A, et al. Development of EST-based new SSR markers in seabuckthorn [J]. Physiology & Molecular Biology of Plants an International Journal of Functional Plant Biology, 2010, 16(4): 375-8.
- [16] PENG Z, GALLO M, TILLMAN B L, et al. Molecular marker development from transcript sequences and germplasm evaluation for cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. Molecular and General Genetics, 2015, 291(1): 1-19.
- [17] CARDLE L, RAMSAY L, MILBOURNE D, et al. Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants [J]. Genetics, 2000, 156(2): 847-854.
- [18] LOW E T L, ALIAS H, BOON S H, et al. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture ESTs: Identifying genes associated with callogenesis and embryogenesis [J]. BMC Plant Biology, 2008, 8(3): 62.
- [19] QIU L, YANG C, BO T, et al. Exploiting EST databases for the development and characterization of EST-SSR markers in castor bean (*Ricinus communis* L.) [J]. BMC Plant Biology, 2010, 10(4): 1-10.
- [20] YADAV H K, RANJAN A, ASIF M H, et al. EST-derived SSR markers in *Jatropha curcas* L.: development, characterization, polymorphism, and transferability across the species/genera [J]. Tree Genetics and Genomes, 2011, 7(1): 207-219.
- [21] KUMARI M, GROVER A, YADAV P V, et al. Development of EST-SSR markers through data mining and their use for genetic diversity study in Indian accessions of *Jatropha curcas* L.: A potential energy crop [J]. Genes and Genomics, 2013, 35(5): 661-670.
- [22] CHEN C, PING Z, CHOI Y A, et al. Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 112(7): 1248-1257.
- [23] GAO C, TANG Z, YIN J, et al. Characterization and comparison of gene-based simple sequence repeats across *Brassica* species [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2011, 286(2): 161-170.
- [24] WANG R, XU S, JIANG Y, et al. *De novo* sequence assembly and characterization of *Lycoris aurea* transcriptome using GS FLX titanium platform of 454 pyrosequencing [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e60449.
- [25] FENG S P, LI W G, HUANG H S, et al. Development, characterization and cross-species/genera transferability of EST-SSR markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*) [J]. Molecular Breeding, 2009, 23(1): 85-97.
- [26] FUJIMORI S, WASHIO T, HIGO K, et al. A novel feature of microsatellites in plants: a distribution gradient along the direction of transcription [J]. Febs Letters, 2003, 554(1-2): 17-22.
- [27] VARSHNEY R K, GRANER A, SORRELLS M E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications [J]. Trends in Biotechnology, 2005, 23(1): 48-55.
- [28] GROVER A, SHARMA P C. Microsatellite motifs with moderate GC content are clustered around genes on *Arabidopsis thaliana* chromosome 2 [J]. Silico Biology, 2007, 7(2): 201-213.
- [29] GROVER A, AISHWARYA V, SHARMA P C. Biased distribution of microsatellite motifs in the rice genome [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2007, 277(5): 469-480.
- [30] GROVER A, SHARMA P C. Occurrence of simple sequence repeats in potato ESTs is not random: An in silico study on distribution and length of simple sequence repeats [J]. Potato J, 2004, 31: 95-102.
- [31] KUMPATLA S P, MUKHOPADHYAY S. Mining and survey of simple sequence repeats in expressed sequence tags of dicotyledonous species [J]. Genome, 2005, 48(6): 985-498.

有髯鸢尾杂交种成熟胚培养成苗技术

张全锋^{1,2}, 尹新彦^{1,2}, 储博彦^{1,2}, 贾红姗³, 李金霞^{1,2}, 赵玉芬^{1,2}

(1. 河北省林业科学研究院, 河北 石家庄 050061; 2. 河北省林木良种工程技术研究中心, 河北 石家庄 050061;

3. 河北农业大学 园林与旅游学院, 河北 保定 071000)

摘要:以有髯鸢尾“白与蓝”×“印度首领”杂交种子成熟胚为试材, 采用组织培养法, 研究了消毒方式、生长调节剂的种类与浓度对有髯鸢尾种胚成苗影响, 以期为鸢尾育种提供理论依据。结果表明: 成熟胚诱导最适培养基为 MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ IBA, 萌发率达 86.6%, 成苗率达 85.0%; 丛生芽在 MS+4.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ IBA 的培养基上增殖系数最大, 为 5.76; 适宜的生根培养基为 MS+0.7 mg·L⁻¹ PP₃₃₃, 接种后 7 d 开始生根, 生根率达 83.33%; 组培苗生根后无需练苗便可移栽至蛭石中, 移栽成活率 89.53%。

关键词:有髯鸢尾; 杂交种; 成熟胚; 培养; 成苗

中图分类号:S 682.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)22-0111-06

有髯鸢尾是垂瓣上有髯毛附属物鸢尾的统称, 是近代表观赏花卉中发展最迅速、花朵变化最惊人、品种增加也最多的一类鸢尾^[1], 为世界范围内重要的宿根花卉^[2]。自 19 世纪初以来, 人们通过有髯鸢尾品种杂交获得了大量性状多样的品种。长期以来, 有髯鸢尾新品种采用播种后得到实生苗, 并以实生苗进行分株繁殖或采用茎尖、花序等为外植体进行组培繁殖^[3-9]。繁殖速度慢, 育种周期长。

第一作者简介:张全锋(1969-), 男, 山东德州人, 本科, 高级工程师, 研究方向为园林植物育种与栽培。E-mail: zqfeng10@163.com.

责任作者:尹新彦(1971-), 女, 硕士, 研究员, 研究方向为园林植物育种与栽培。E-mail: yinxyl2@163.com.

基金项目:石家庄市科技支撑计划资助项目(141520862A)。

收稿日期:2016-08-04

种胚培养是传统育种技术与现代育种技术的有效结合, 它可以极大地缩短育种年限, 加快育种进程。目前胚培养技术已经在农作物小麦^[10-12]、玉米^[13]、大豆^[14]、花生^[15]丛生芽诱导中应用; 木本经济树种中冬枣^[16]、樱桃^[17]、板栗^[18]、核桃^[19]、杏^[20]; 观赏树种珙桐^[21]、油松^[22]; 园林花卉品种芍药^[23]、牡丹^[24]、石斛兰^[25]、兰花^[26]、桂花^[27]和八仙花^[28]等也进行了胚培养研究; 在鸢尾的胚培养研究上仅对玉蝉花^[29]有相关报道, 对有髯鸢尾的种胚培养尚鲜见报道。现以有髯鸢尾杂交种子成熟胚为试材, 研究了影响幼胚萌发和成苗的因素, 以期建立有髯鸢尾杂交种胚培养的技术体系, 为加速鸢尾育种进程提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

有髯鸢尾“白与蓝”×“印度首领”果实取自河北省

Development and Utility of EST-SSR Markers in *Lagerstroemia indica*

ZHANG Enliang, WANG Peng, LI Ya, WANG Shu'an, LI Linfang, YANG Rutong

(Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014)

Abstract: *Lagerstroemia indica* was used as test material, the EST-SSR molecular markers of *Lagerstroemia indica* were sought from transcriptome sequencing, 45 308 unigenes were analyzed by MISA. The results showed that a total of 10 905 EST-SSRs were recognized from 9 074 unigenes, 1 486 sequences contained more than one SSR and 550 SSRs presented in compound formation. In this study, a total of 4 501 primer pairs were designed from 7 620 SSRs. To validate SSR markers, 68 primer pairs were randomly selected to PCR amplification and 61 SSR markers were amplified successfully. Of these validated SSR markers, 28 primer pairs were detected polymorphism.

Keywords: *Lagerstroemia indica*; EST-SSR; transcriptome sequencing; molecular markers