浙江农林大学学报,2018,35(2):306-313

Journal of Zhejiang A&F University

doi:10.11833/j.issn.2095-0756.2018.02.015

桂花 EST-SSR 引物开发及在品种鉴定中的应用

李军1, 董彬1, 张超1, 付建新1, 胡绍庆2, 赵宏波1

(1. 浙江农林大学 风景园林与建筑学院,浙江 杭州 311300; 2. 浙江理工大学 建筑工程学院,浙江 杭州 310000)

摘要:利用 $L_{16}(4^5)$ 正交实验设计,针对模板 DNA,镁离子(Mg^{2+}),dNTPs,TaqDNA 酶和引物 5 个因素进行正交优化,建立适用于桂花 Osmanthus fragrans 表达序列标签-简单重复序列(EST-SSR)的最优扩增反应体系,将其用于桂花转录组 EST-SSR 多态性引物的筛选,最后利用筛选得到的多态性引物和聚类分析对 14 份四川省常见的栽培丹桂(SC01~SC14)样本进行品种鉴定。结果表明:桂花 EST-SSR 最优反应体系包含 40 ng 模板 DNA, 2.25 mmol·L-1 Mg^{2+} , 0.3 μ mol·L-1 引物,0.3 mmol·L-1 dNTPs, 1.25×16.67 nkat TaqDNA 聚合酶, $10 \times PCR$ Buffer 缓冲液 2 μ L,双蒸水补至 20 μ L;从 150 对 EST-SSR 引物中筛选得到了 19 对稳定性好、多态性高的 SSR 引物,多态性从高到低依次为五核苷酸(25.00%),六核苷酸(19.44%)和三核苷酸(16.67%)重复类型。利用筛选得到的 3 对高度多态性 SSR 引物(0F8623-1677,0F24299-844 和 0F28774-2088)对四川省成都市周边常见栽培的 14 份丹桂(Aurantiacus group)样本进行了有效鉴定。结果表明:14 份样本中,有 12 份可判定为 '朱砂丹桂' 'Zhusha Dangui',SC06 为 '堰红桂' 'Yanhong Gui',SC08 与 '满条红' 'Mantiao Hong'和'状元红' 'Zhuangyuan Hong' 亲缘关系较近。本研究也为今后利用 EST-SSR 标记对桂花指纹图谱构建、遗传多样性分析、分子育种及品种鉴定与保护等工作奠定基础。图 3 表 6 8 25

关键词: 植物学; 桂花; EST-SSR; 体系优化; 引物筛选; 品种鉴定

中图分类号: S685.13; Q75 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2018)02-0306-08

EST-SSR primers and their application in cultivar identification of Osmanthus fragrans

LI Jun¹, DONG Bin¹, ZHANG Chao¹, FU Jianxin¹, HU Shaoqing², ZHAO Hongbo¹

(1. School of Landscape Architecture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. College of Civil Engineering and Architecture, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China)

Abstract: In this study, expressed sequence tags (ESTs) were identified by EST-simple sequence repeat (SSR) markers. The optimal amplification reaction system for EST-SSR was established by orthogonal design of an $L_{16}(4^5)$ orthogonal experiment, and it was established for orthogonal design of template DNA, Mg²⁺, dNTPs, and TaqDNA enzyme and primer. Then, Osmanthus fragrans transcriptase EST-SSR polymorphism primers were screened. Finally, the polymorphic primers and cluster analysis were used to identify the cultivars cultivated in Sichuan Province. Results showed that the EST-SSR optimal reaction system of O. fragrans contained 40 ng template DNA, 2.25 mmol·L⁻¹ Mg²⁺, 0.3 μ mol·L⁻¹ primer, 0.3 mmol·L⁻¹ dNTPs, TaqDNA polymerase 1.25 × 16.67 nkat, 10 × PCR Buffer 2 μ L, and ddH₂O to 20 μ L. A total of 19 SSR primers with high stability and high polymorphism were screened from 150 pairs of EST-SSR primers. The polymorphism was five nucleotides (25.00%), six nucleosides acid (19.44%), and trinucleotide (16.67%). Altogether a total of 14 samplings of

收稿日期: 2017-03-28; 修回日期: 2017-05-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31501790, 31170656); 浙江省自然科学基金资助项目(LQ15C160004); 浙江省农业新品种选育重大科技专项(2016C02056-12)

作者简介:李军,从事观赏植物遗传育种研究。E-mail: 1334454728@qq.com。通信作者:赵宏波,教授,博士,从事观赏植物遗传育种和植物繁育生态等研究。E-mail: zhaohb@zafu.edu.cn

O. fragrans cultivars cultivated in Chengdu, Sichuan Province were identified by high sensitivity polymorphic SSR primers. Analysis of genetic diversity, molecular breeding, and identification and protection of cultivars have laid a strong foundation for O. fragrans. [Ch, 3 fig. 6 tab. 25 ref.]

Key words: botany; Osmanthus fragrans; EST-SSR; system optimization; primer screening; variety identification

桂花 Osmanthus fragrans 在中国栽培历史悠久,栽培区域广阔,是中国最重要的集绿化、美化和香 化为一体的传统名花和园林树种之一[1-2]。桂花野生资源丰富,现已明确的有150多个品种[3-4],这为桂 花种质创新和新品种的选育提供了丰富的遗传变异和优异的基因库[5]。分子标记是进行品种鉴定和亲缘 关系分析、分子辅助育种、遗传多样性和繁育系统研究等最常用的技术手段,通常需要有共显性、多态 性高、重复性好的引物,因此引物开发显得极其重要^[6]。简单重复序列(simple sequence repeats, SSR)是 由几个核苷酸为重复单位组成的长达几十个核苷酸的串联重复序列[7],目前,已经报道的桂花 SSR 引物 十分有限, 仅 ZHANG 等[8]开发了 29 对桂花 SSR 引物, 马寅峰[9]经过筛选获得 20 对具有多态性的 SSR 引物, 急需开发更多的特异性和多态性高的 SSR 引物用于桂花遗传分析和品种鉴定等相关研究。表达 序列标签-简单重复序列(expressed sequence tag SSR, EST-SSR)技术可避免基因组 SSR 开发过程中需要 构建基因组 DNA 文库等繁琐步骤,可为功能基因提供可靠的标记,能够充分反映基因组功能区域的相 似程度。目前, EST-SSR 标记也成为了遗传多样性和品种亲缘关系研究的重要手段[10]。最优的 SSR-PCR 反应体系和条件,对样本 DNA 所扩增条带的数量、清晰度以及稳定性甚为重要,进而影响条带多态性 的统计与分析[11]。转录组数据是 EST-SSR 开发利用的有效资源,本研究首先对桂花 SSR 反应体系进行 了优化,同时以不同野生桂花种群为材料,利用桂花转录组数据库大量筛选 EST-SSR 引物,开发多态 性高的 EST-SSR 引物,并利用筛选得到的引物进行品种鉴定,促进 EST-SSR 标记技术在桂花种质资源 评价和保护、品种鉴定和遗传多样性分析等方面的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

样本包括浙江龙泉、浙江千岛湖、福建长汀、福建清流、湖南郴州、湖南株洲、贵州瑞安、江西九 江等8个桂花野生种群,浙江农林大学桂花资源圃地的7个丹桂品种,以及采自四川农科院园艺所的待 鉴定品种。所有样本材料均采集桂花新生枝上第4片完全展开叶,硅胶干燥后,放置-20℃冰箱备用。

SSR-PCR 反应用的 Taq 酶,dNTP,镁离子(Mg^{2+}),PCR 缓冲液(buffer),电泳用的 $10\times TBE$ 缓冲液, $50\times TAE$ 溶液的相关药品,无水乙醇,冰乙酸,琼脂糖,丙烯酰胺,甲叉丙烯酰胺,溴酚蓝, $6\times L$ 样缓冲液(loading buffer),标准分子量 DNA 标准物(marker)等均购自上海生工生物工程公司。

1.2 方法

- 1.2.1 DNA 的提取与检测 本研究采用改良的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取桂花 DNA [12], 用 Nano-Drop1000 全自动核酸蛋白快速测仪和质量浓度为 1.2%琼脂糖凝胶电泳以及紫外凝胶成像系统检测 DNA 纯度、浓度和质量。从 8 个桂花野生种群中随机各选取 3 份样本 DNA 作为 SSR-PCR 反应的模板 DNA,选择福建官坊居群中的 E4 模板 DNA 用于体系优化以减少模板变化影响体系优化的效果。将所有模板 DNA 稀释到试验所需的 100 mg·L⁻¹, −20 ℃保存备用。
- 1.2.2 正交试验体系优化 以桂花 E4 为 DNA 模板,在 20 μ L 的 PCR 体系中,除 2 μ L 10 × PCR 缓冲液外,其他因素采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计,对模板 DNA 含量、 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、引物浓度、Taq DNA 聚合酶单位数进行 5 因素 4 水平梯度试验,共 16 个正交设计组合(表 1),以确定最佳的桂花 EST-SSR 反应体系[13]。
- 1.2.3 PCR 扩增及凝胶电泳 利用 Biometra PCR 仪(德国)进行 PCR 扩增反应,反应程序如下: 94 ℃预变性 4 min; 94 ℃变性 30 s,不同退火时间(TM)为 30 s,72 ℃延伸 30 s,循环数 35; 72 ℃延伸 7 min。 扩增产物利用体积分数为 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶[28 mL 双蒸水,8 mL 体积分数为 40%丙烯酰胺,4 mL 10 × TBE,320 μ L 体积分数为 10%过硫酸铵,40 μ L 四甲基乙二胺(TEMED)]电泳检测,以 DNA marker B 作为参照;电泳仪(北京市六一仪器厂,DYCZ-6C 型)电压 160 V,电流 200 mA,电泳 100

表 1 EST-SSR 正交试验设计 $L_{16}(4^5)$

Table 1 EST-SSR orthogonal experimental design $L_{16}(4^5)$

组合编号	DNA/ng	$Mg^{2+}/(mmol \cdot L^{-1})$	$dNTPs/(mmol \cdot L^{-1})$	Taq 酶/(×16.67 nkat)	引物/(µmol·L ⁻¹)
1	40	1.125	0.15	0.50	0.15
2	40	1.500	0.20	0.75	0.20
3	40	1.875	0.25	1.00	0.25
4	40	2.250	0.30	1.25	0.30
5	60	1.875	0.20	1.25	0.20
6	60	2.250	0.15	1.00	0.15
7	60	1.125	0.30	0.75	0.30
8	60	1.500	0.25	0.50	0.25
9	80	2.250	0.25	0.75	0.25
10	80	1.875	0.30	0.50	0.30
11	80	1.500	0.15	1.25	0.15
12	80	1.125	0.20	1.00	0.20
13	100	1.500	0.30	1.00	0.30
14	100	1.125	0.25	1.25	0.25
15	100	2.250	0.20	0.50	0.20
16	100	1.875	0.15	0.75	0.15

min,然后用银染法显示扩增条带。小心拆取凝胶后,依次浸入到固定液及染色液中(20 mL 体积分数为10%乙醇,体积分数为0.5%冰乙酸1 mL,硝酸银0.2 g,蒸馏水180 mL),置于摇床上震荡染色12~15 min;去离子水漂洗30 s;显色液(2 g 氢氧化钠,0.04 g 四硼酸钠、0.6 mL 甲醛、200 mL 蒸馏水)充分震荡12~15 min,直至条带完全显色。利用凝胶成像系统拍照记录结果,统计并分析扩增条带的多态性。1.2.4 引物筛选 从桂花转录组 EST-SSR 引物序列数据库中随机挑选150 对引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,其详细信息参见表2。利用优化后的最佳反应体系和条件,以8份桂花野生种群的基因组 DNA 作为模板,对150 对 SSR 引物进行初次筛选,12 g·L⁻¹ 的琼脂糖凝胶电泳进行扩增产物的有效性检测;再以24 份基因组 DNA(3 份·种群⁻¹)对初筛获得的引物进行复筛,80 g·L⁻¹ 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行多态性检测,最终获得多态性高、重复性好、稳定性高的SSR 引物。

1.2.5 多态性引物在品种鉴定中的应用 随机挑选 3 对具有显著多态性的 SSR 引物,以浙江农林大学桂花苗圃的 7 个丹桂品种为参照,对四川省常见栽培的 14 份丹桂样本(SC01~SC14)进行品种鉴定(表 3)。1.2.6 数据分析 根据条带迁移情况统计目标范围内出现的条带,不同大小的条带分别用 "A, B, C, D…"进行分类标记,纯合子带型记为 "AA, BB, CC, DD, …",杂合子标记为 "AB, AC, BD, AD, …",将带型数据输入 POPGENE 1.32 软件计算遗传距离,然后利用 SPSS 19.0 的欧氏平均联接法绘制聚类树状图。

表 2 150 对随机引物信息表

Table 2 Random primers information of 150 pairs

委员 坐副	重复次数									24 WI=
重复类型 -	5	6	7	8	9	10	11	12	>12	- 总数
单核苷酸						1	1	2	7	12
二核苷酸		1	1	1	1	3	3	1	10	21
三核苷酸	10	5	2	5	4	2				30
四核苷酸	4	3	1	1						10
五核苷酸	9	1								12
六核苷酸	18	7	7	2	1					36
复合重复										29
总计	41	17	11	9	6	6	4	3	17	150

表 3 品种鉴定材料信息表

Table 3 Material information for cultivars

名称	样本采集地	名称	样本采集地	名称	样本采集地
SC01	成都市街区	SC08	成都市新都区	'朱砂丹桂' 'Zhusha Dangui'	浙江农林大学桂花苗圃
SC02	成都市邛崃市	SC09	成都市新都区	'橙红丹桂' 'Chenghong Dangui'	浙江农林大学桂花苗圃
SC03	成都市崇州市区	SC10	成都市新都区	'状元红' 'Zhuangyuan Hong'	浙江农林大学桂花苗圃
SC04	成都市大邑县	SC11	成都市郫县	'武夷丹桂' 'Wuyi Dangui'	浙江农林大学桂花苗圃
SC05	成都市都江堰市	SC12	成都市郫县	'堰虹桂''Yanhong Gui'	浙江农林大学桂花苗圃
SC06	成都市彭州市	SC13	成都市温江区	'满条红''Mantiao Hong'	浙江农林大学桂花苗圃
SC07	成都市都江堰市	SC14	成都市温江区	'上海丹桂' 'Shanghai Dangui'	浙江农林大学桂花苗圃

2 结果与分析

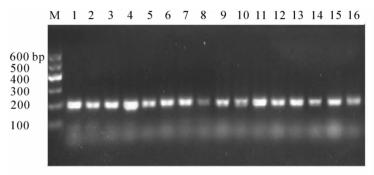
2.1 桂花 SSR-PCR 反应体系优化

以 OF6220-2799 扩增结果为例,在 SSR-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳检测结果中,组合 8,14,16 的扩增条带较弱,其余组合都能扩增出较为清晰的条带,其中组合 4 的条带最为明亮(图 1)。参照正交试验各试剂的浓度和用量,最终确定桂花 EST-SSR 最优 PCR 反应体系为: DNA 40 ng, Mg^{2+} 2.25 mmol·L⁻¹,引物 0.3 μ mol·L⁻¹,dNTPs 0.3 mmol·L⁻¹,TaqDNA 聚合酶 1.25 × 16.67 nkat,并加入 2 μ L 10 × PCR 缓冲液,双蒸水(ddH_2O)补充至 20 μ L。

2.2 基于桂花转录组的 EST-SSR 引物筛选

利用优化后的 PCR 反应体系和条件,对随机选取的 150 对 EST-SSR 引物进行初步筛选,共有 79 对引物扩增出特异性产物,有效扩增率为 52.67%,在对应的 SSR 中,最多的为三、六核苷酸和复合重复类型,最少的为单核苷酸和四核苷酸重复类型(表 4)。

以8个不同野生种群的24份桂花基因组DNA为模板,对初筛所获得的79对引物进行复筛。最终筛选出19对稳定性好、多态性高的引物,占引物总数的12.67%,其中,五核苷酸重复对应的引物多态性最高



dNTPs 0.3 mmol·L⁻¹, *Taq* DNA 聚合酶 1.25 × *OF*6220-2799引物; 1~16为表1中的组合编号; M为DNA marker B

图 1 正交试验扩增结果

Figure 1 Amplification results of orthogonal design

表 4 150 对随机 EST-SSR 引物扩增情况

Table 4 EST-SSR amplification of 150 primers

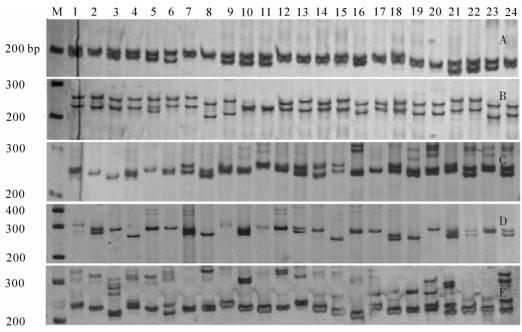
重复类型	总数	成功扩增/对	比例/%	多态引物/对	多态性比例/%
单核苷酸	12	5	41.67	0	0
二核苷酸	21	7	33.33	0	0
三核苷酸	30	20	66.67	5	16.67
四核苷酸	10	5	50.00	1	10.00
五核苷酸	12	6	50.00	3	25.00
六核苷酸	36	17	47.22	7	19.44
复合重复	29	19	65.52	3	10.34
总体	150	79	52.67	19	12.67

(25.00%),其次分别为六核苷酸(19.44%)和三核苷酸(16.67%),在单核苷酸和二核苷酸重复类型中没有发现多态性引物(表 4)。筛选得到的 19 对引物中除了 OF8091-2000,OF8233-681,OF10275-1164,OF21405-424 在种群内扩增的多态性条带不明显外,其余的 15 对引物在种群内均能够扩增出丰富的多态性条带(图 2)。

2.3 多态性引物在桂花品种鉴定中的应用

利用筛选到的多态性较高的 *OF*8623-1677, *OF*24299-844, *OF*28774-2088 3 对引物对供试品种进行鉴定(表 5)。扩增结果显示:每对引物都可以产生 1 或 2 个等位基因,并且都可以将所有桂花样本有效区分,所有已知桂花品种均有各自独特的带型或带型组合(表 6)。

从品种聚类树状图(图 3)可以看出: 在相对距离为 12 的时候, 21 份供鉴定样本可聚为 4 类。首先,



A. 引物 OF6220-2799; B. 引物 OF9520-2768; C. 引物 OF5483-1304; D. 引物 OF661-4332; E. 引物 OF24299-844; M. DNA maker B。1~24:8 个不同种群的 24 份样本图 2 部分 EST-SSR 引物复筛电泳结果图

Figure 2 A part of EST-SSR primers screening electrophoresis figure for the second time

'上海丹桂'和'橙红丹桂'分别单独聚为一类(【和Ⅱ),因为这2个品种在3对引物中的带型均比较特别,表现出明显的差异性;第Ⅲ类中,包含了'朱砂丹桂'和大部分的成都来源的样本,其中除了SC07和SC12在引物 OF24299-844中未扩增出条带外,这12份样本在3对引物中均表现出与'朱砂丹桂'一致的带型,可以判断这些样本为'朱砂丹桂';第Ⅳ类中,包含了剩余的4个已知品种和2种待鉴定样本。在相对距离为6时,可将第Ⅳ类分为2组:a组,SC06先与'堰虹桂'聚为一小支,再与'武夷丹桂'聚为一支,SC06与'堰虹桂'在带型上完全一致的,可判断彭州市来源的丹桂为'堰虹桂';b组,'满条红'和'状元红'先聚为一小支,再与SC08聚为一支,说明SC08与'满条红'和'状元红'亲缘关系较近。

3 结论与讨论

建立稳定可靠的 SSR-PCR 反应体系是 EST-SSR 分子标记开发和利用的基础,SSR 体系优化的方法有单因素试验、完全试验或正交试验 $^{[14]}$ 。单因素试验不能保证各最佳组分的组合即为最佳的反应体系;完全试验却存在试验组合繁多,工作量大,试验周期长等弊端 $^{[15-17]}$;正交试验设计则是仅选用几个具有代表性的处理组合进行试验,结果分析简便直观,可操作性强 $^{[18]}$ 。袁存权等 $^{[19]}$ 利用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计对刺槐 $Robinia\ pseudoacacia\$ 的相关序列扩增多态性聚合酶链式反应(SRAP-PCR)体系中的主要成分进行的优化,杨传平等 $^{[20]}$ 也成功利用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计,优化并建立了一套适用于白桦 $Betula\ platyphylla$ 的 SSR-PCR 反应体系。本研究也利用了正交试验设计,优化并建立了适合桂花的 SSR-PCR 反应体系。

表 5 3 对桂花 EST-SSR 引物序列

Table 5 Three EST-SSR primer sequences of Osmanthus fragrance

		1	sequences of somatime	<i>J</i> 18 1111	
编号	名称	引物序列	退火温度/℃	重复单元	预期片段大小/bp
9	OF8623-1677	F-TCCACACGCTGAAACTCCTA	58	(AGAAA)5	156
		R-TCGTATGATGGAGCAGCAAG			
13	OF24299-844	F-TACAAAGAAGCCCCACCAAC	57	(CCCAAA)5	240
		R-ATTGAGAGCAACCATTTGCC			
19	OF28774-2088	F-TGACACCATGACTTCCCAGA	57	(TTAGCC)5	174
		R-CAATTGTCGGTGTTGGTTTG			

表	6	品种鉴定	世帯団	信目	自绕	1:	耒

Table 6 Cultivars with type information statistics

样本	OF8623-1677	OF24299-844	OF28774-2088	样本	OF8623-1677	OF24299-844	OF28774-2088
SC01	DD	AA	BC	SC12	DD	99	BC
SC02	DD	AA	BC	SC13	DD	AA	BC
SC03	DD	AA	BC	SC14	DD	AA	CC
SC04	DD	AA	BC	'朱砂丹桂'	DD	AA	BC
SC05	DD	AA	BC	'橙红丹桂'	99	AE	DD
SC06	CC	AC	CD	'状元红'	BB	AF	CC
SC07	DD	99	BC	'武夷丹桂'	CC	AD	CC
SCO8	99	AD	BC	'堰虹桂'	CC	AC	CD
SC09	DD	AF	BC	'满条红'	BB	AF	BC
SC10	DD	AA	BC	'上海丹桂'	$\mathbf{A}\mathbf{A}$	AB	AB
SC11	DD	AA	BC				

说明:相同字母组合代表纯合子,不同字母组合杂合子,99表示无扩增条带

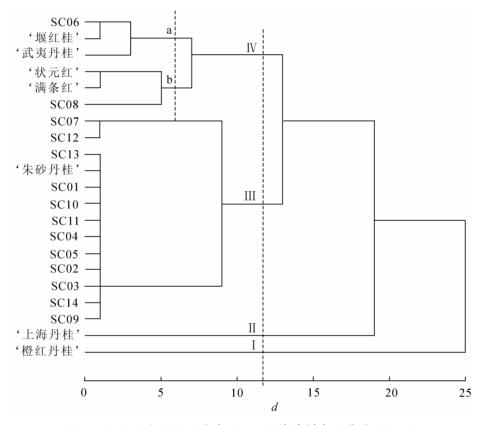


图 3 欧氏平均联接法生成的 21 份桂花样本的聚类树状图

Figure 3 Dendrogram of cluster analysis of 21 Osmanthus fragrams cultivars produced by euclidean average connection method

不同植物的多态性 SSR 核苷酸重复类型具有很大的差异^[21],在蜡梅 Chimonanthus praecox 中,李响等^[22]共从 120 对引物中筛选获得 17 对优良的 EST-SSR 引物,筛出率为 14.17%,主要包括二、三和六核苷酸重复类型;徐阳等^[23]以杉木 Cunninghamia lanceolata 为材料,从 10 个 EST-SSR 和 8 个基因组 SSR (gSSR)中各筛出 4 对多态性引物,多态率分别为 40.00%和 50.00%,所有核苷酸重复类型均有出现。本研究以桂花转录组数据库为基础,从完全随机选取的 150 对 EST-SSR 引物中筛选出 19 对具有稳定多态性的引物,多态性比例为 12.67%。其中,五核苷酸(25.00%)、六核苷酸(19.44%)和三核苷酸(16.67%)重复类型的多态性较高,充分说明可以利用桂花的转录组数据库大规模进行桂花 EST-SSR 引物的开发。

SSR 分子标记已经很好地应用于品种鉴定和亲缘关系分析、遗传多样性、交配系统等研究。胡菀等^[5] 利用 SSR 分子标记对 7 个野生桂花群体 139 个个体的遗传多样性和遗传结构进行了研究,并通过

STRUCTURE 聚类分析得到不同野生居群间具有较丰富的遗传多样性; ZHANG 等^[8]开发并获得了 29 对具有高度多态性的 SSR 引物,对野生桂花种群和桂花品种分类鉴定进行了相关遗传研究。野生桂花遗传变异丰富,本研究以分布距离相对分散的野生桂花为模板筛选得到的引物,具有很强的研究价值,再利用筛选到的 3 对高度多态性的 EST-SSR 引物将遗传差异较小的 7 个已知丹桂品种进行有效地区分,鉴定了来自于四川成都的 14 份丹桂样本。结果表明:四川常见的栽培丹桂品种大部分为'朱砂丹桂',来源于彭州市丹桂 SC06 为'堰虹桂',而来源于新都区的 SC08 与'满条红'和'状元红'亲缘关系较近。EST-SSR 来源于基因的编码区,与功能基因紧密连锁,并且 EST 的高度保守性使得 EST-SSR 在同物种的不同品种间乃至不同物种间具有较高的通用性,所以可以对决定重要表型性状的等位基因进行直接鉴定^[24-25]。本研究利用桂花转录组开发获得的 EST-SSR 引物在桂花品种鉴定中具有可靠性和适用性,可为后期桂花遗传多样性和亲缘关系以及遗传连锁图谱的构建等研究奠定基础。

4 参考文献

- [1] 张美珍, 邱莲卿, 缪柏茂. 中国植物志: 第61卷[M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [2] 向其柏, 刘玉莲. 中国桂花品种图志[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2008: 1 377.
- [3] 臧德奎,向其柏,刘玉莲.木犀属品种分类研究[J]. 林业科学,2006,42(5):17-21.

 ZANG Dekui, XIANG Qibai, LIU Yulian. Notes on cultivar classification in *Osmanthus* [J]. *Sci Silv Sin*, 2006,42 (5):17-21.
- [4] 臧德奎,向其柏,刘玉莲,等.中国桂花的研究历史、现状与桂花品种国际登录[J]. 植物资源与环境学报,2003, **12**(4): 49 53.

 ZANG Dekui, XIANG Qibai, LIU Yulian, *et al.* The studying history and the application to international cultivar registration authority of sweet osmanthus (*Osmanthus fragrans* Lour.) [J]. *J Plant Resour Environ*, 2003, **12**(4): 49 53.
- [5] 胡菀, 罗意, 阳亿, 等. 野生桂花的遗传多样性和遗传结构研究[J]. 园艺学报, 2014, **41**(7): 1427 1435. HU Wan, LUO Yi, YANG Yi, *et al.* Genetic diversity and population genetic structure of wild sweet osmanthus revealed by microsatellite markers [J]. *Acta Hortic Sin*, 2014, **41**(7): 1427 1435.
- [6] DUAN Yifan, WANG Xianrong, XIANG Qibai, et al. Genetic diversity of androdioecious Osmanthus fragrans (Oleaceae) cultivars using microsatellite markers [J]. Appl Plant Sci, 2013, 1(6): 221 230.
- [7] 罗冉,吴委林,张旸,等. SSR 分子标记在作物遗传育种中的应用[J]. 基因组学与应用生物学,2010,29(1): 137 143.
 - LUO Ran, WU Weilin, ZHANG Yang, et al. SSR marker and its application to crop genetics and breeding [J]. Genom Appl Biol, 2010, 29(1): 137 143.
- [8] ZHANG Zhirong, FAN Dengmei, GUO Shiquan, et al. Development of 29 microsatellite markers for Osmanthus fragrans (Oleaceae), a traditional fragrant flowering tree of China [J]. Am J Bot, 2011, 98(12): e356 e359.
- [9] 马寅峰. 桂花 SSR 引物的开发和 SCoT 分子标记体系的建立[D]. 开封:河南大学, 2015. MA Yanfeng. Development of SSR Primers and Establishment of SCoT Molecular Marker System in Osmanthus fragrans [D]. Kaifeng: Henan University, 2015.
- [10] ELLIS J R, PASHLEY C H, BURKE J M, et al. High genetic diversity in a rare and endangered sunflower as compared to a common congener [J]. Mol Ecol, 2006, 15(9): 2345 2355.
- [11] KANTETY R V, ROTA M L, MATTHEWS D E, et al. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat [J]. Plant Mol Biol, 2002, 48(5/6): 501 510.
- [12] 徐沂春. 桂花遗传多样性及不同性别花的花芽特性[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2013: 32 50. XU Yichun. The Genetic Diversity and Flower Bud Characteristics of Different Sex in Osmanthus fragrans [D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2013: 32 50.
- [13] 帕提古丽·麦麦提敏,张延辉,李培英,等. 狗牙根 EST-SSR 反应体系优化及其遗传多样性初步分析 [J]. 新疆农业大学学报,2014,37(2):112 118.
 - Patiguli Maimaitimin, ZHANG Yanhui, LI Peiying, et al. Preliminary analysis on optimization of EST-SSR PCR reaction system and genetic diversity for Cynodon dactylon L. [J]. J Xinjiang Agric Univ, 2014, 37(2): 112 118.

- [14] 赵克奇,董黎,王少明,等. 刺槐 EST-SSR 标记 PCR 反应体系的优化[J]. 中国农学通报,2014,30(22):45 -52.
 - ZHAO Keqi, DONG Li, WANG Shaoming, *et al.* The optimization of EST-SSR PCR reaction system for *Robinia* pseudoacacia L. [J]. Chin Agric Sci Bull, 2014, **30**(22): 45 52.
- [15] 高志红,章镇,韩振海,等. 果梅 SSR 反应体系的优化[J]. 南京农业大学学报,2002,25(4): 19 22. GAO Zhihong, ZHANG Zhen, HAN Zhenhai, et al. Optimization on SSR analysis system of Japanese apricot (Prunus mume Sieb. et Zucc.) [J]. J Nanjing Agric Univ, 2002, 25(4): 19 22.
- [16] 尤有利, 王江波, 施维属, 等. 荔枝 DNA 提取及 RAPD 扩增条件优化[J]. 生物技术通报, 2010(4): 112 115.
 - YOU Youli, WANG Jiangbo, SHI Weishu, et al. Extration of genomic DNA of *Litchi chinensis* and optimization of the RAPD reaction system [J]. Biotechnol Bull, 2010(4): 112 115.
- [17] 郭大龙,罗正荣. 部分柿属植物 SRAP-PCR 反应体系的优化[J]. 果树学报, 2006, **23**(1): 138 141. GUO Dalong, LUO Zhengrong. Optimization of SRAP-PCR in some *Diospyros* spp. [J]. *J Fruit Sci*, 2006, **23**(1): 138 141.
- [18] 谢运海,夏德安,姜静,等.利用正交设计优化水曲柳 ISSR-PCR 反应体系[J].分子植物育种,2005,3(3):445-450.
 - XIE Yunhai, XIA De'an, JIANG Jing, et al. Optimization for ISSR-PCR system of Fraxinus mandshurica Rupr. using oryhogonal design [J]. Mol Plant Breed, 2005, 3(3): 445 450.
- [19] 袁存权,李允菲,杨妮娜,等. 刺槐 SRAP-PCR 反应体系优化及引物筛选[J]. 分子植物育种,2011,9(25): 1182 1188.
 - YUAN Cunquan, LI Yunfei, YANG Nina, et al. Optimization of SRAP-PCR reaction system and selection of primers for Robinia pseudoacacia [J]. Mol Plant Breed, 2011, 9(25): 1182 1188.
- [20] 杨传平, 王艳敏, 魏志刚. 利用正交设计优化白桦的 SSR-PCR 反应体系[J]. 东北林业大学学报, 2006, **34** (6): 1 3.
 - YANG Chuanping, WANG Yanmin, WEI Zhigang. Optimization of SSR-PCR system for *Betula platyphylla* using orthogonal design [J]. *J Northeast For Univ*, 2006, **34**(6): 1 3.
- [21] 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. WANG Yanmin, WEI Zhigang, YANG Chuanping, Data mining for SSRs in ESTs and EST-SSR marker development in *Betula platyphylla* [J]. *Sci Silv Sin*, 2008,44(2):78 84.
- [22] 李响,杨楠,赵凯歌,等. 蜡梅转录组 EST-SSR 标记开发与引物筛选[J]. 北京林业大学学报,2013,35 (1):25-32.
 - LI Xiang, YANG Nan, ZHAO Kaige, et al. Development and primer selection of EST-SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of Chimonanthus praecox [J]. J Beijing For Univ, 2013, 35(1): 25 32.
- [23] 徐阳,陈金慧,李亚,等.杉木 EST-SSR 与基因 SSR 引物开发[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2014, 38(1): 9-14.
 - XU Yang, CHEN Jinhui, LI Ya, et al. Development of EST-SSR and genomic-SSR in Chinese fir [J]. J Nanjing For Univ Nat Sci Ed, 2014, 38(1): 9 14.
- [24] CHEN X, SALAMINI F, GEBHARDT C. A potato molecular-function map for carbohydrate metabolism and transport [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, **102**(2/3): 284 295.
- [25] 忻雅,崔海瑞,张明龙,等. 白菜 EST-SSR 标记的通用性[J]. 细胞生物学杂志, 2006, **28**(2): 248 252. XIN Ya, CUI Hairui, ZHANG Minglong, *et al.* The transferability of Chinese cabbage EST-SSR markers [J]. *Chin J Cell Biol*, 2006, **28**(2): 248 252.