

蝴蝶兰 EST 资源 SSR 标记分析与开发

张水明*, 陈程, 龚凌燕, 汪天

(安徽农业大学园艺学院, 合肥 230036)

摘要: 利用 SSRIT 软件对 NCBI 上蝴蝶兰的 8 188 条 EST 序列按照碱基重复单元数 8 以上的标准进行 SSR 位点查找, 发掘出 246 条 EST 序列, 共含有 261 个 SSR 位点, 检出率为 3.19%。二核苷酸重复是最主要的重复类型, 占 SSR 总数的 94.25%。SSR 的不同重复单元中, 最常见的重复单元是: (TA)_n 和 (GA)_n, 其余出现频率较高的依次为 (TC)_n、(AT)_n 和 (AG)_n。设计了 32 对 EST-SSR 引物, 以蝴蝶兰品种 ‘V31’ 的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 发现 16 对引物能扩增出预期产物。进一步用这 16 对引物对 16 个蝴蝶兰品种 (系) 进行 PCR 扩增, 9 对引物有多态性, 多态性条带数在 2 ~ 12 个之间。结果表明, 设计开发的蝴蝶兰的 EST-SSR 标记是有效的。

关键词: 蝴蝶兰; EST-SSR; 分子标记

中图分类号: S 682.31

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 06-1191-08

Analysis of SSRs Information and Development of SSR Markers from *Phalaenopsis* ESTs

ZHANG Shui-ming*, CHEN Cheng, GONG Ling-yan, and WANG Tian

(College of Horticulture, Anhui Agricultural University, Heifei 230036, China)

Abstract: Using SSRIT software, 8 188 ESTs of *Phalaenopsis* from NCBI were screened, according to the standard of repeat motif number above eight. The results showed that 261 SSRs were mined from 246 ESTs with a frequency of 3.19%. Dinucleotide repeats EST-SSRs were dominant, accounting for 94.25% in all SSRs. (TA)_n and (GA)_n were the most frequent motifs, accounting for 26.42% and 25.61% in dinucleotide repeats, followed by (TC)_n, (AT)_n and (AG)_n. Thirty-two primer pairs were designed and 16 primer pairs had expected products using the template of cultivar ‘V31’. The sixteen workable primer pairs were chosen to PCR amplification in 16 *Phalaenopsis* cultivars and 9 primer pairs had polymorphism bands between 2 to 12. The results indicated that it was an effective approach to develop EST-SSR markers based on EST database of *Phalaenopsis*.

Key words: *Phalaenopsis*; EST-SSR; molecular marker

蝴蝶兰属于兰科蝴蝶兰属 (*Phalaenopsis* Bl.), 原生种有 70 多种, 广泛分布于东南亚及澳大利亚北部一带, 因花形似蝶得名, 其花型奇特优美, 花色艳丽, 花朵大, 花期长, 为热带兰中的珍品, 具有很高的观赏价值和经济价值 (Chang et al., 2009)。

收稿日期: 2012-01-16; 修回日期: 2012-05-25

基金项目: 安徽省自然科学基金项目 (11040606M95)

* E-mail: zhangshuiming@ahau.edu.cn

SSR (Simple Sequence Repeats, 简单重复序列), 又称微卫星 (Microsatellites), 是指一段由 1~6 个核苷酸为重复单位组成的串联重复序列。该标记具有数量丰富、共显性、技术简单、多态性高、重复性好、特异性强等特点, 已被广泛应用于植物分类、遗传育种等方面 (Prattana et al., 2009; 张智俊 等, 2011)。根据 SSR 的来源不同, 可将其分为基因组 SSR (Genomic SSR, gSSR) 和表达序列标签 SSR (Expressed Sequence Tag SSR, EST-SSR) (Chen et al., 2006)。与 gSSR 标记相比, EST-SSR 标记不仅具有 gSSR 标记多态性高、共显性、重复性好等特点, 更重要的是它开发成本较低, 而且 EST-SSR 来源于表达基因组区域, 反映了基因的编码部分, 可以直接获得基因表达的信息, 为功能基因提供“绝对”的标记 (朱振东和贾继增, 2003; Varshney et al., 2005), 同时它在不同物种间有良好的通用性, 也为比较基因组学和发掘同源基因提供了新的途径 (Jia et al., 2007)。

近年来, 快速增长的 EST 数据和生物信息学的发展为 SSR 标记的开发提供了丰富的来源和快速的分析工具。不同植物中 SSR 分布的频率差异很大, 大约有 1%~5% 的 EST 含有可用于建立标记的 SSR, 很多重要园艺作物都已建立了 EST-SSR 标记 (Varshney et al., 2007; 杨素丽 等, 2008; 陈琛 等, 2010; 王福生和江东, 2010; 齐建勋 等, 2011)。

在蝴蝶兰 (*Phalaenopsis* Bl.) SSR 分子标记研究中, 张君毅和陈瑞凤 (2010)、李冬梅等 (2011) 分别报道开发了 5 条和 12 条多态性蝴蝶兰 EST-SSR 标记, Huang 等 (2010) 则利用 13 对蝴蝶兰 EST-SSR 标记对国兰属植物进行遗传多样性和亲缘关系分析, Hsu 等 (2011) 从 BAC (Bacterial Artificial Chromosome, 细菌人工染色体) 末端序列中发现了 950 条潜在的蝴蝶兰基因组 SSR。本研究中对 NCBI 数据库已收录的 8 188 条蝴蝶兰 EST 进行分析, 开发了更多新的蝴蝶兰 EST-SSR 标记, 为蝴蝶兰的分子辅助育种, 遗传多样性分析等研究奠定基础。

1 材料与方法

供试的 16 个蝴蝶兰品种 (系) 满天红、夕阳红、萨拉黄金、富乐夕阳、聚宝红玫瑰、火鸟、昌新皇后、红龙、V31、红钻石、V3、605、606、607、EG602-3 和 608, 均于 2011 年 5 月采自安徽农业大学农萃园, 分别取 1~2 片幼嫩叶片, 洗净、晾干, 置于 -80 °C 冰箱保存。利用常规 CTAB 法进行基因组 DNA 的提取。

蝴蝶兰 EST 序列从 EST 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/dbEST>) 中下载获得。利用 EST-trimmer 软件 (http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/download/est_trimmer.pl) 和 cross-match (<http://www.phrap.org>) 去除重复、polyA/T “尾巴” 和载体等序列。

使用 SSRIT 软件 (<http://www.gramene.org/db/markers/ssrtool>) 结合人工搜索含有 SSR 的 EST 序列。搜索的标准为: 二核苷酸和三核苷酸重复类型的重复次数 ≥ 8 , 四核苷酸及四核苷酸以上的重复类型的重复次数 ≥ 4 。

利用软件 Primer 5.0 设计引物。引物设计的主要参数为: 引物长度为 17~23 bp; 引物对 T_m 在 50~57 °C, 正向和反向引物退火温度之差在 3 °C 以内; GC 含量 40%~60%; 扩增产物预期片段为 100~200 bp。由上海生工生物工程技术有限公司合成。

PCR 反应所用的试剂均购自上海生工生物工程技术有限公司。

PCR 反应体积为 20 μL , 其中包括 ddH₂O 13.3 μL , 10 × Buffer (含 Mg²⁺) 2 μL , 10 mmol · L⁻¹ 的 dNTPs 0.5 μL , 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的上、下游引物各 1 μL , 5 U · μL^{-1} 的 *Taq* 聚合酶 0.2 μL , 50 ng · μL^{-1} 的模板 DNA 2 μL 。

PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 2.5 min; 94 °C 变性 30 s, 合适温度 (各引物对的最适退火温度通过梯度 PCR 试验确定) 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C

保存。整个反应在 PCR S1000™ Thermal Cycler 仪器上进行。

PCR 反应产物先通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 有目标片段的产物利用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶在 BIO-RAD PowerPac™ HV 垂直板电泳仪和 Sequi-Gen® GT Sequencing Cell 电泳槽中进行分离, 75 W 功率下电泳 1.5 h。

电泳结束后进行银染, 染色参考 Bassam 等 (1991) 的方法。

2 结果与分析

2.1 蝴蝶兰 EST-SSR 分布、频率和特点

将从 NCBI 的 EST 数据库下载的 8 188 条蝴蝶兰 EST 序列经前处理后, 利用 SSRIT 软件按设定的标准进行 SSR 搜索, 共得到含有 EST 位点的序列 239 条, 占全部 EST 的 2.92%, 发现 SSR 位点 261 个, SSR 位点的出现频率为 3.19%, 说明蝴蝶兰 EST 序列中 SSR 数量较为丰富。在 239 条 EST 序列中, 只含有 1 个 SSR 位点的序列有 220 条, 含有 2 个 SSR 位点的序列有 16 条, 含有 3 个 SSR 位点的序列有 3 条。

在检测出的 261 个 SSR 位点中, 包含二、三核苷酸两种重复单元类型, 二、三核苷酸重复单元的位点分别有 246 个和 15 个, 出现的频率分别为 94.25% 和 5.75% (表 1)。在蝴蝶兰 EST-SSR 中二核苷酸重复单元类型占主导地位。蝴蝶兰 EST-SSR 重复单元种类共有 17 种, 其中, 二核苷酸重复单元有 7 种, 三核苷酸重复单元有 10 种。二、三核苷酸重复单元的 SSR 平均长度分别为 26.6 和 32.8 bp。

从不同重复单元种类出现的频率来看, 在含有二核苷酸重复单元的 EST 序列中, 出现频率最高的是 TA 和 GA, 分别有 65 次 (26.42%) 和 63 次 (25.61%)。

虽然三核苷酸重复单元类型占总数的一半以上, 但各种不同的重复单元出现次数较少, 出现频率最高的为 AAG, 出现 3 次 (20%), 其它单元出现次数为 2 次和 1 次。

表 1 蝴蝶兰 EST 中主要重复单元及其频率
Table 1 The major motifs and their frequency in *Phalaenopsis* ESTs

重复类型 Repeat type	总数 (百分比/%) Total number (Percentage/%)	重复单元 Repeat motif	数量 Number	频率/% Frequency
二核苷酸 Dinucleotide	246 (94.25)	AG	31	12.60
		AT	36	14.63
		CT	13	5.28
		GA	63	25.61
		TA	65	26.42
		TC	37	15.04
		TG	1	0.41
三核苷酸 Trinucleotide	15 (5.75)	AAG	3	20.00
		ACG	1	6.67
		AGA	1	6.67
		AGG	1	6.67
		ATT	2	13.33
		GAA	2	13.33
		GGA	1	6.67
		TAT	2	13.33
		TGA	1	6.67
		TTC	1	6.67
总计 Total	261 (100)			

2.2 EST-SSR 标记的多态性

根据含有 SSR 位点的 EST 序列信息, 利用软件 Primer 5.0 设计了 32 对蝴蝶兰 EST-SSR 引物。利用蝴蝶兰品种 ‘V31’ 的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 16 对引物扩增出预期的 PCR 产物, 引物有效扩增率为 50%。进一步将这 16 对引物用于 16 个蝴蝶兰品种 (系) 的多态性检测, 发现 9 对引物扩增结果具多态性, 占可扩增引物的 56.25%。不同引物扩增出多态性条带数在 2~12 条之间, 平均每个位点扩增出 5 条多态性条带 (表 2)。

表 2 16 对引物信息表
Table 2 Information of 16 primers from EST of *Phalaenopsis*

引物编号 Primer No.	引物序列 (5'→3') Primer sequence	重复单元 Repeat motif	登录号 Accession No.	T _m / °C	预期产物 大小 /bp Expected product size	多态性条带数 Number of polymorphic bands
ZSM104	F: CCATCTCATCTCCTCCTCG R: GCAGAACAGCAGAGTGGT	(TTC) ₁₅	CB033847.1	55.1	164	6
ZSM107	F: GAAGTTCCAACCCAAGA R: GACCAACACATAGACAAAC	(TA) ₁₂	CB034395.1	50.0	192	2
ZSM108	F: TCGGAAAGAAGTATGGTTC R: CCTACCATTAIGTTCATC	(TGA) ₁₂	CB034920.1	55.1	128	5
ZSM110	F: GCTTCTCATTCTCCTTCTTC R: TCTCCATCTCCTCTCCAC	(TC) ₁₁	CK858704.1	50.0	150	6
ZSM111	F: TTATTTCCCTCCTCGGCA R: TTAGCCCAAGTTCAGTCG	(TC) ₁₀	CB033577.1	56.7	144	2
ZSM122	F: CTCTCCTTGCTGGTGG R: TAGAAAGGACGGTCGGG	(CT) ₈	CB033385.1	53.2	157	4
ZSM123	F: AACTTCTGTTCCCGCTT R: TGGCACACAATGGAGAT	(AAG) ₈	CB033608.1	56.7	136	3
ZSM125	F: TGAATAGCACAGAGCC R: GCTCCAGAAGAAGATTCA	(AAG) ₈	CB034342.1	50.0	153	5
ZSM128	F: CCCGCCTTCCAACCTTT R: CACCGTATGAGTCCCGA	(GA) ₈	CB035168.1	55.1	164	12
ZSM101	F: CACCATCACCACCACTT R: CACAACCACAAAGAAATGAC	(AT) ₃₁	CB033120.1	55.1	175	-
ZSM109	F: GCTGCTTCCCAAGTGATTC R: CGGGTCAGGCATTCAAC	(CT) ₁₂	CK857311.1	51.6	146	-
ZSM115	F: CTGAAGTGGGTTAGAGTG R: CAACATCAAACAACAGACC	(AGG) ₉	CB032454.1	55.1	154	-
ZSM117	F: CGCATCTTGATTTCTCCT R: ACTTCGCTGCTTCTCTTC	(AG) ₉	CB034003.1	51.6	123	-
ZSM119	F: GAGTCTATGGCTTTATGGA R: TCTCTCCCTTCTCACAC	(TG) ₉	CB034785.1	50.0	145	-
ZSM121	F: CATCCGACCTCCTCTTC R: AGACGAAGTAAGAAAGACTG	(CT) ₈	CB032870.1	50.0	120	-
ZSM129	F: ACACATAGACAAACTCCATC R: AGTTCCAAACCCAGGAT	(TA) ₈	CK855780.1	51.6	177	-

注: - . 未检测到。

Note: - . Not detected.

图 1 为引物 ZSM104 在 16 个蝴蝶兰品种 (系) 中扩增的琼脂糖电泳结果及变性聚丙烯凝胶电泳指纹图谱。

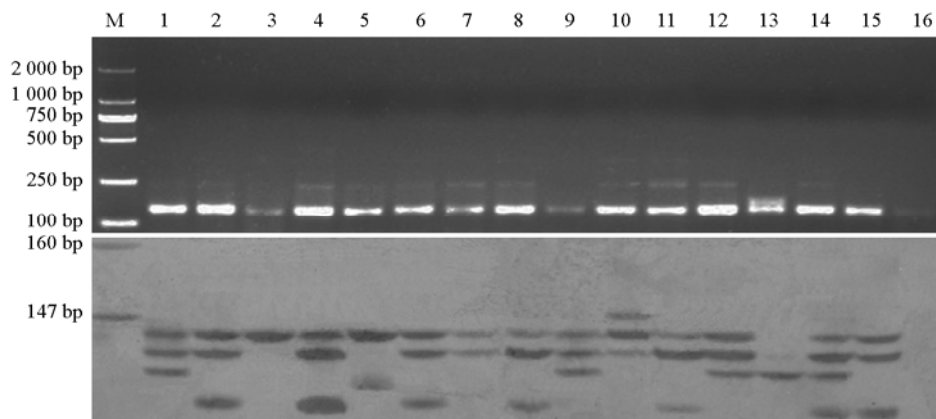


图 1 引物 ZSM104 在 16 个蝴蝶兰品种 (系) 中的扩增结果

琼脂糖凝胶电泳 (上图); 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (下图)。

M: DNA marker-D (上图), pBR 322 DNA-*Msp* I digest (下图); 1: EG602-3; 2: 605; 3: 606; 4: 607; 5: V3;
6: 红钻石; 7: V31; 8: 红龙; 9: 昌新皇后; 10: 火鸟; 11: 聚宝红玫瑰;
12: 富乐夕阳; 13: 萨拉黄金; 14: 夕阳红; 15: 满天红; 16: 608.

Fig. 1 PCR products showed in 16 cultivars of *Phalaenopsis* by primer ZSM104

Agarose gel electrophoresis (above), polyacrylamide gel electrophoresis (below).

M: DNA marker-D (above), pBR 322 DNA-*Msp* I digest (below); 1: EG602-3; 2: 605; 3: 606; 4: 607; 5: *P. Sogo Yukidian* 'V3';
6: *Dtps. Jiuobao Diamond*; 7: *Dtps. Tailin Red Angel* 'V31'; 8: *Dtps. Ben Yu Star* 'Red Dragon'; 9: *Dtps. Chain Xen Queen*;
10: *Dtps. Sogo Beach*; 11: *Dtps. Jiuobao Red Rose*; 12: *P. Fuller's Sunset*; 13: *P. Brother Sara Gold*;
14: *P. Taida Salu*; 15: *Dtps. Queen Beer* 'Red Sky'; 16: 608.

3 讨论

NCBI 数据库中大量蝴蝶兰 EST 数据的公布, 为开发蝴蝶兰 EST-SSR 标记提供了前提条件。本试验中通过 SSRIT 软件对 8 188 条蝴蝶兰的 EST 进行搜索, EST-SSR 出现频率为 3.19%, 低于张君毅和陈瑞凤 (2010)、李冬梅等 (2011) 对蝴蝶兰的搜索结果 (分别为 7.65% 和 7.66%)。造成差异的原因是 SSR 搜索标准不同。在不同物种之间 EST-SSR 出现频率也各不相同, 如甜瓜为 8.36% (胡建斌等, 2009), 毛竹为 13.02% (张智俊等, 2011)。这种差异可能是物种间的真实 SSR 信息差异, 可利用的 EST 数据库中的数据信息量以及搜寻 SSR 的标准不同造成的。

蝴蝶兰 EST-SSR 主要重复类型为二核苷酸和三核苷酸重复, 以二核苷酸重复基序占主导地位, 有 146 个, 占总 SSR 的 94.25%, 而三核苷酸重复基序所占比例仅为 5.75%。据已有报道统计, 大多数植物的 EST-SSR 以二、三核苷酸重复类型为主, 但主导重复基元的类型有所差异 (Varshney et al., 2005)。如在茶树 (王丽鸳等, 2009)、猕猴桃 (姜春芽等, 2010) 中均以二核苷酸重复为主, 在百合 (杨素丽等, 2008)、甜瓜 (胡建斌和李建吾, 2009)、枳壳 (杨春霞等, 2011) 中则以三核苷酸重复类型为主, 而在白菜 (忻雅等, 2006)、甘蓝 (李建斌等, 2010)、毛竹 (张智俊等, 2011) 中两者出现频率相近。

在蝴蝶兰二核苷酸 EST-SSR 中, TA 重复单元出现频率最高, 占二核苷酸 EST-SSR 的 26.42%, 其次是 GA (25.61%)。这与猕猴桃 (Fraser et al., 2004) EST-SSR 筛选所得到的结果一致。而毛竹 (张智俊等, 2011) 占优势的二核苷酸重复单元为 AG, 这与大多数植物二核苷酸重复中 GA 是主导类型结论一致。在蝴蝶兰三核苷酸 EST-SSR 中, AAG (20.0%) 占主导地位, 这与大多数植物中的报道一致。而在辣椒 (李晶晶等, 2008) 中, AGA (25.0%) 是主要三核苷酸重复类型, 在小麦

中,不同的报道结果也不一致,例如 Nicot 等(2004)报道小麦三核苷酸 SSR 中占优势的类型是 CCG, Kantety 等(2002)报道却是 AAC。这种不同物种 EST-SSR 主导类型的差异及同一物种不同研究结果的差异,可能是由于所用 ESTs 品种与组织器官来源、数量以及搜索标准不同造成的。

在设计 32 对蝴蝶兰 EST-SSR 引物中,有 16 对扩增出非预期的片段,其中 6 对扩增出大于预期长度的 DNA 片段,可能是由于:(1)分析材料中存在复等位基因,尽管它们的编码区和功能相同,但 DNA 序列并不完全相同,导致扩增产物与预期大小不同;(2)两引物之间存在内含子;(3)引物特异性不够高,扩增出与引物同源的序列;另 10 对无扩增产物,可能由于引物序列落在两个外显子上或两引物间有一长的内含子,扩增不出产物(华玉伟等,2008);有 16 对扩增出预期的片段,其中 7 对扩增结果无多态性,另 9 对呈现较高的多态性,多态性引物占可扩增引物的 56.25%。较低于毛竹(92%)(张智俊等,2011)、杏(62.5%)(上官凌飞等,2011),但高于白菜(46.7%)(忻雅等,2006)。可见,蝴蝶兰与白菜等其他植物相比,具有较高的 EST-SSR 扩增效率,且多态性引物的比例较高,这可能与 EST 建库植株与试验材料的亲缘关系以及引物设计的特异性有关。

对开发的蝴蝶兰 EST-SSR 标记进行功能分析,发现引物对 ZSM104、ZSM111 所在的 EST 序列分别与过敏原相关蛋白(NP 850143.1)、三磷酸胞苷合酶(AAV50011.1)等有较高的同源性(分别达到 65%和 59%),这些信息可为蝴蝶兰分子育种和重要性状的标记提供参考。

在构建 16 个蝴蝶兰品种(系)的 EST-SSR 指纹图谱时发现,大多数品种(系)有 3 或 4 条带。这与庄东红等(2007)在蝴蝶兰倍性研究中发现蝴蝶兰栽培品种多为三倍体或四倍体结果相一致,如庄东红等观测到‘满天红’为三倍体,‘夕阳红’为四倍体,本研究开发的引物对 ZSM104 在这 2 个蝴蝶兰品种的 EST-SSR 指纹图谱中分别有 3 条带和 4 条带(图 1)。这表明开发的蝴蝶兰 EST-SSR 标记在反映蝴蝶兰倍性方面有一定参考价值。

本研究中开发了 9 对蝴蝶兰 EST-SSR 多态性引物,多态性条带数在 2~12 个之间,通过比对,只有 1 对(登录号为 CB033577.1)与张君毅等(2010)在蝴蝶兰研究中利用的是同一条 EST 序列,而与 Fatimah 和 Dewi(2011)在蝴蝶兰研究中利用的来自 GenBank 的序列无重复,是新的标记。这些标记可用于蝴蝶兰乃至其它兰科植物遗传多样性分析、杂交亲本选配、遗传作图、功能基因发掘与定位等方面的研究。

References

- Bassam B J, Caetano-Anolles G, Gresshoff P M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 196 (1): 80 - 83.
- Chang Y K, Veilleux R E, Iqbal M J. 2009. Analysis of genetic variability among *Phalaenopsis* species and hybrids using amplified fragment length polymorphism. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134 (1): 58 - 66.
- Chen C X, Zhou P, Choi Y A, Huang S, Gmitter F G. 2006. Mining and characterizing microsatellites from *Citrus* ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*, 112 (7): 1248 - 1257.
- 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, 张扬勇, 程斐, 孙培田, 方智远. 2010. 甘蓝 EST-SSR 标记的开发与应用. *园艺学报*, 37 (2): 221 - 228.
- Fatimah, Dewi S. 2011. Development of sequence-based microsatellite marker for *Phalaenopsis* Orchid. *HAYATI Journal of Biosciences*, 18 (2): 71 - 76.
- Fraser L G, Harvey C F, Crowhurst R N, De Silva H N. 2004. EST-derived microsatellites from *Actinidia* species and their potential for mapping. *Theoretical and Applied Genetics*, 108 (6): 1010 - 1016.
- Hsu C C, Chung Y L, Chen T C, Lee Y L, Kuo Y T, Tsai W C, Hsiao Y Y, Chen Y W, Wu W L, Chen H H. 2011. An overview of the *Phalaenopsis*

- orchid genome through BAC end sequence analysis. *BMC Plant Biology*, 11: 3.
- Hu Jian-bin, Li Jian-wu. 2009. Information on EST-SSR loci in melon (*Cucumis melo* L.) and marker exploitation. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (4): 513 - 520. (in Chinese)
- 胡建斌, 李建吾. 2009. 甜瓜 EST-SSR 位点信息及标记开发. *园艺学报*, 36 (4): 513 - 520.
- Hua Yu-wei, Lu Yi, Long Qing-yi, Zeng Xia, Hu Yan-shi, Huang Hua-sun. 2008. Development of EST-SSTs using public ESTs in *Hevea*. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 29 (5): 583 - 588. (in Chinese)
- 华玉伟, 卢轶, 龙青娥, 曾霞, 胡彦师, 黄华孙. 2008. 橡胶树 EST-SSRs 发掘研究. *热带作物学报*, 29 (5): 583 - 588.
- Huang Y, Li F, Chen K S. 2010. Analysis of diversity and relationships among Chinese orchid cultivars using EST-SSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38 (1): 93 - 102.
- Kantety R V, Rota M L, Matthews D E, Sorrells M E. 2002. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Molecular Biology*, 48 (5): 501 - 510.
- Li Dong-mei, Lu Fu-bing, Zhu Gen-fa, Hong Yan-bin, Chen Xiao-ping, Liang Xuan-qiang, Cao Jun-xi, Sun Ying-bo. 2011. Analysis of SSR information in EST resource of *Phalaenopsis* spp. *Guangdong Agricultural Sciences*, (3): 117 - 120. (in Chinese)
- 李冬梅, 吕复兵, 朱根发, 洪彦彬, 陈小平, 梁炫强, 操君喜, 孙映波. 2011. 蝴蝶兰 EST 资源的 SSR 信息分析. *广东农业科学*, (3): 117 - 120.
- Li Jian-bin, Wang Shen-yun, Wang Hong, Wan Yan-ling, Ding Wan-xia. 2010. Analysis of SSR information in EST resource of cabbage. *Journal of China Agricultural University*, 15 (6): 34 - 41. (in Chinese)
- 李建斌, 王神云, 王红, 万雁玲, 丁万霞. 2010. 甘蓝 EST 资源的 SSR 信息分析. *中国农业大学学报*, 15 (6): 34 - 41.
- 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.
- Jia Xiao-ping, Shi Yun-su, Song Yan-cun, Wang Guo-ying, Wang Tian-yu, Li Yu. 2007. Development of EST-SSR in foxtail millet (*Setaria italica*). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54 (2): 233 - 236.
- Jiang Chun-ya, Xu Xiao-biao, Liao Jiao, Gu Qing-qing, Liu Shan-jun, Chen Jin-yin. 2010. Establishment of SSR markers based on EST database from *Actinidia*. *Journal of Fruit Science*, 27 (4): 622 - 625. (in Chinese)
- 姜春芽, 徐小彪, 廖娇, 辜青青, 刘善军, 陈金印. 2010. 基于 EST 的猕猴桃 SSR 标记的建立. *果树学报*, 27 (4): 622 - 625.
- Nicot N, Chiquet V, Gandon B, Amilhat L, Legeai F, Leroy P, Bernard M, Sourdille P. 2004. Study of simple sequence repeat (SSR) markers from wheat expressed sequence tags (ESTs). *Theoretical and Applied Genetics*, 109 (4): 800 - 805.
- Prattana P, Pradit P, Surin P. 2009. Development of microsatellite markers for *Vanda* Orchid. *Kasetsart J: Nat Sci*, 43 (3): 497 - 506.
- 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.
- Shangguan Ling-fei, Li Xiao-ying, Ning Ning, Wang Yu-zhu, Zhang Zhen, Fang Jing-gui. 2011. Development of EST-SSR markers in apricot. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (1): 43 - 54. (in Chinese)
- 上官凌飞, 李晓颖, 宁宁, 王玉柱, 章镇, 房经贵. 2011. 杏 EST-SSR 标记的开发. *园艺学报*, 38 (1): 43 - 54.
- Varshney R K, Graner A, Sorrells M E. 2005. Genomic microsatellite markers in plants: Features and applications. *Trends in Biotechnology*, 23 (1): 48 - 55.
- Varshney R K, Chabane K, Hendre P S, Aggarwal R 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 Fu-sheng, Jiang Dong. 2010. Studies on genetic background of important germplasm resources among *Citrus* based on cpSSR and EST-SSR marker. *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (3): 465 - 474. (in Chinese)
- 王福生, 江东. 2010. 应用 cpSSR 和 EST-SSR 标记进行柑橘特异种质资源遗传背景研究. *园艺学报*, 37 (3): 465 - 474.
- 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.
- 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.
- Yang Chun-xia, Wen Qiang, Ye Jin-shan, Zhu Pei-lin. 2011. Development of EST-SSR markers in (*Citrus aurantium* L.). *Molecular Plant Breeding*, 9 (1): 123 - 127. (in Chinese)
- 杨春霞, 温 强, 叶金山, 朱培林. 2011. 枳壳 EST-SSR 标记的开发. *分子植物育种*, 9 (1): 123 - 127.
- 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-yi, Chen Rui-feng. 2010. EST-SSRs analysis of moth orchids. *Plant Physiology Communications*, 46 (6): 559 - 563. (in Chinese)
- 张君毅, 陈瑞凤. 2010. 蝴蝶兰 EST-SSRs 分析. *植物生理学通讯*, 46 (6): 559 - 563.
- Zhang Zhi-jun, Guan Yu, Yang Li, Yu Li, Luo Shu-ping. 2011. Analysis of SSRs information and development of SSR markers from moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) ESTs. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (5): 989 - 996. (in Chinese)
- 张智俊, 管 雨, 杨 丽, 余 利, 罗淑萍. 2011. 毛竹 EST 资源 SSR 标记分析与筛选. *园艺学报*, 38 (5): 989 - 996.
- Zhu Zhen-dong, Jia Ji-zeng. 2003. Microsatellite marker development and applications in wheat genetics and breeding. *Hereditas*, 25 (3): 355 - 360. (in Chinese)
- 朱振东, 贾继增. 2003. 小麦 SSR 标记的发展及应用. *遗传*, 25 (3): 355 - 360.
- Zhuang Dong-hong, Qu Ying, Xu Da-xiong, Li Jun, Chen Zhi-ling. 2007. Analysis on chromosome number and morphology of varieties in *Phalaenopsis*. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (5): 1257 - 1262. (in Chinese)
- 庄东红, 曲 莹, 许大熊, 李 军, 陈志玲. 2007. 蝴蝶兰若干品种 (系) 的染色体数和形态分析. *园艺学报*, 34 (5): 1257 - 1262.

征 订

《中国蔬菜栽培学》(第 2 版)

《中国蔬菜栽培学》(第 2 版)于 2009 年 10 月由中国农业出版社出版发行。全书约 250 万字,分总论、各论、保护地蔬菜栽培、采后处理及贮藏保鲜共 4 篇。总论篇概要地论述了中国蔬菜栽培的历史、产业现状,中国蔬菜的起源、来源和种类,蔬菜作物生长发育和器官形成与产品质量的关系,蔬菜生产分区、栽培制度和技术原理,蔬菜栽培的生理生态基础以及环境污染与蔬菜的关系等;各论篇较详细地介绍了根菜类、薯芋类、葱蒜类、白菜类、芥菜类、甘蓝类、叶菜类、瓜类、茄果类、豆类、水生类、多年生类、芽苗菜以及食用菌类蔬菜的优良品种、栽培技术、病虫害综合防治、采收等方面的技术经验和研究成果;保护地蔬菜栽培篇论述了中国蔬菜保护地的类型、构造和应用,主要栽培设施的设计、施工,保护地环境及调节,保护地蔬菜栽培技术;采后处理及贮藏保鲜篇重点介绍了蔬菜采后处理技术及贮藏原理和方法等。与原著(1987 年版)相比较,具有如下特点:

1. 重点增加了自 20 世纪 80 年代后期以来,中国在蔬菜栽培理论、无公害蔬菜栽培技术、推广应用的新品种、病虫害综合防治以及在蔬菜产品质量、产品采后处理及贮藏保鲜原理和技术等方面取得的新成果、新进展;概述了改革开放以来中国蔬菜产、销通过商品基地建设、流通体系建设等在解决蔬菜周年生产和供应方面所取得的成绩。
2. 对蔬菜栽培历史,蔬菜的起源、来源,分类,蔬菜学名,病虫害学名等进行了复核,校勘。
3. 尽可能地反映不同学术思想和观点;尽量反映不同生态区,包括中国台湾地区在内的栽培技术特点。
4. 删去了“蔬菜的加工”和“野生蔬菜”两章,以使本书的内容更加切题。另在附录中增加了“主要野生蔬菜简表”、“主要野生食用菌简表”和“主要香辛料蔬菜简表”3 个附表。

本书由中国农业科学院蔬菜花卉研究所主编,组织全国有较高学术水平和实际工作经验的专家、学者和技术人员 130 余人分别撰写,反映了 21 世纪初中国蔬菜栽培科学研究和蔬菜生产技术的水平,内容较全面、系统,科学性、学术性强,亦有较强的实用性,插有近 500 张彩图,可供相关科研人员、农业院校师生、专业技术及管理人员等参考。定价 330 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研究所《园艺学报》编辑部,邮编 100081。