

EST-SSR 标记在水曲柳雌雄鉴定中的应用

齐凤慧¹, 孙宏冉¹, 詹亚光^{1,2*}

(1 东北林业大学 生命科学学院, 哈尔滨 150040; 2 东北林业大学 林木遗传育种国家重点实验室, 哈尔滨 150040)

摘要: 选用黑龙江省青山林木种子园成年水曲柳 200 棵树为实验材料, 在来自 NCBI 中的 5 423 条白蜡属 EST 序列和该实验室测得的水曲柳转录组的 179 502 条序列中查找 SSR 位点并设计引物, 通过 PCR 扩增筛选有效扩增和有差异片段的引物, 用于水曲柳雌雄的鉴别。结果显示: (1) 白蜡属 EST 和水曲柳转录组中的 5 423 条和 179 502 条序列中, 分别查找到 9 488 个和 3 557 个 SSR 位点, SSR 出现的频率分别是 174.96% 和 1.98%, SSR 的类型都是以二核苷酸为主。(2) 232 对引物中有 208 对引物获得有效扩增, 74 对引物在雌雄 DNA 中有差异, 27 对扩增片段符合预定大小片段。(3) 经过 3 轮筛选, 选出 19 号和 56 号引物用于 200 棵水曲柳中, 雌雄差异率分别是 64.5% 和 89.5%。研究表明, 利用 EST-SSR 分子标记对水曲柳性别进行鉴定是一种有效可行的方法。

关键词: 水曲柳; 表达序列标签; 简单重复序列; 重复单元; 雌雄鉴别

中图分类号: Q789

文献标志码: A

Application of EST-SSR Markers in the Sex Identification of *Fraxinus mandshurica* Rupr.

QI Fenghui¹, SUN Hongran¹, ZHAN Yaguang^{1,2*}

(1 School of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 2 State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: 200 adults of *Fraxinus mandshurica* were selected from Qingshan seed orchard, Heilongjiang Province to screen primers which can result in different PCR products between male and female ash. PCR primers were designed based on the SSR sites of 5 423 ESTs of *Fraxinus* from NCBI and 179 502 sequences of *F. mandshurica* transcriptome from our lab. The results showed that: (1) 9 488 and 3 557 SSR sites (174.96% and 1.98% in relative frequency, respectively) were found in ESTs from NCBI and transcriptome from our lab, respectively, with a dominance of dinucleotide repeat in SSR type; (2) 208 of 232 pairs of primer got PCR products, 74 of which got different products between male and female and 27 of which got products with expected size; (3) After 3 rounds of PCRs, primer 19 and 56 got different products between two sexes in 64% and 89.5% trees, respectively. These results indicated that EST-SSR is a feasible method to identify the sex of *F. mandshurica*.

Key words: *Fraxinus mandshurica* Rupr.; EST; SSR; repeat motif; sex identification

随着 DNA 测序技术的快速发展和公共数据库开放, 为 SSR (simple sequence repeat, SSR) 标记开

发提供了新途径。在公共数据库中可快速获得各种动植物、不同组织、不同发育阶段的基因表达序列标

收稿日期: 2014-09-09; 修改稿收到日期: 2014-11-28

基金项目: 国家“十二五”支撑项目 (2012BAD21B0201-08)

作者简介: 齐凤慧 (1976-), 女, 博士, 副教授, 主要从事植物基因工程及植物细胞工程的研究。E-mail: qifenghui2001@126.com

* 通信作者: 詹亚光, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事植物基因工程、林木育种等方面的研究。E-mail: yaguangzhan@126.com

签(expressed sequence tags, EST), 这些 EST 序列不仅在新基因挖掘中发挥了重要作用, 而且为 SSR 标记的开发提供了一个巨大、有价值的来源^[1-2]。

SSR 是卫星标记, 又称简单重复序列, 是由 1~6 个核苷酸为重复单位组成串联重复序列, SSR 含量丰富且遍布整个基因组。而 EST-SSR 标记是建立在表达序列标签上的一种新型的分子标记技术, 并与功能基因直接相关^[3]。EST-SSR 除了具有基因组 SSR 的优点外, 它反映的是转录区的差异, 其多态性可能与基因功能直接相关^[4]。而且由于 EST-SSR 来源于表达的基因组区域^[5], 可直接反映相关基因的多样性, 同时它在不同物种间有良好的通用性^[6], 从一种物种开发的 SSR 标记可用于其他物种的研究。目前, EST-SSR 除了在农作物小麦(*Triticum aestivum*)^[7]、苜蓿(*Medicago sativa*)^[8]、葡萄(*Vitis vinifera*)^[9]、水稻(*Oryza sativa*)^[10]等中应用外, 在树木中也得到广泛应用, 如杏(*Prunus armeniaca*)^[11]、猕猴桃(*Actinidia chinensis*)^[12]、云杉(*Picea asperata*)^[13]、火炬松(*Pinus taeda*)^[14]、白桦(*Betula platyphylla*)^[15]、杨树(*Populus*)^[16]、茶树(*Camellia sinensis*)^[17]、桉树(*Eucalyptus*)^[18]、橡胶树(*Hevea brasiliensis*)^[19]等物种。

水曲柳(*Fraxinus mandshurica* Rupr.) 以材质优良而著称, 是珍贵的用材树种, 可制各种家具、乐器、体育器具、车船、机械及特种建筑材料。其稀有珍贵的特性不仅在物种多样性、生态多样性的研究上具有重要意义, 而且在维持生态功能上以及生产实践中所表现的经济价值也是不可替代的。国务院于 1999 年 8 月 4 日批准的《国家重点保护野生植物名录》(第一批) 将水曲柳列为二级保护植物^[20-21]。

水曲柳雌雄异株, 幼苗期无法辨别雌雄, 只有生长到 10~12 年开花后才能辨别雌雄^[22], 这给育苗、造林以及种子园的建立带来极大不便。目前对于水曲柳雌雄差异的研究比较少, 而在其它植物中的研究表明雌雄株之间的基因表达存在一定差异, 因此, 为从基因方面揭示水曲柳雌雄差异, 我们利用 EST-SSR 技术对水曲柳雌雄株进行分析, 初步建立水曲柳雌雄株的鉴别方法, 为水曲柳育种及种子园的建立提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 研究材料主要来自黑龙江省尚志市苇河林业局青山林木种子园(1989 建成), 选择

雌雄株各 100 棵, 取其叶片, -80 °C 保存。

1.1.2 EST 序列来源 实验中水曲柳 EST 序列来源: (1) 来自 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) dbEST 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bdEST/index.html>) 中白蜡属(*Fraxinus*) 的 EST 序列; (2) 本实验室在华大基因测得的水曲柳转录组。

1.2 方法

1.2.1 水曲柳 SSRs 位点的搜索 将获得的 EST 序列进行冗余性查找(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/vecScreen>), 去除 EST 序列中的载体序列。然后对于 NCBI 数据库中的 EST 序列利用在线软件 SS-RIT(Simple Sequence Repeat Identification Tool)(<http://www.gramene.org/db/markers/ssrtool>) 进行搜索, 搜索条件为 3 次重复以上, 选取二、三、四、五、六核苷酸 5 种类型的 SSRs; 对于转录组序列, 搜索条件是 5 次重复以上, 选取二、三、四、五、六核苷酸 5 种类型的 SSRs 进行分析。根据公式: SSR 频率 = SSR 数量 ÷ 序列总数计算 SSR 频率。

1.2.2 SSRs 引物的设计 利用 primer 5.0 软件设计引物。来自 NCBI 数据库中的 EST 序列, 共得到 105 对 EST-SSR 引物; 来自水曲柳转录组中的序列, 共设计 1 678 对引物, 随机合成 127 对。引物由上海生工生物工程有限公司合成, 共合成 232 对。

1.2.3 水曲柳 DNA 的提取、检测及 DNA 样品池建立 用改良的 CTAB 法分别提取成年水曲柳雌雄各 100 株叶片 DNA。分别用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 质量及浓度, 根据检测结果, 用 ddH₂O 将 DNA 浓度调整为同一浓度。随机选择雌雄 DNA 各 50 个, 各取 1 μL 分别混合成水曲柳雌雄 DNA 样品池。

1.2.4 水曲柳 SSR 扩增及引物筛选 以水曲柳雌雄 DNA 样品池为模板, 对合成的 232 对 SSR 引物进行筛选。参考不同引物的 T_m 值, 采用梯度 PCR 仪进行扩增, 退火温度筛选时在 (T_m - 5 °C) ~ (T_m - 3 °C) 之间设置 3 个温度梯度, SSR 扩增体系 (20 μL) 为: 10 × buffer 2.0 μL; dNTPs 1.6 μL; DNA 模板 (20 μg/μL) 2.0 μL; rTaq 0.2 μL; 引物 1 (10 μmol/L) 1 μL; 引物 2 (10 μmol/L) 1 μL; ddH₂O 12.2 μL^[23]。扩增产物用 12% 的聚丙烯酰胺凝胶检测, 参照韩永亮^[24] 的电泳和银染方法。

2 结果与分析

2.1 水曲柳 SSRs 出现频率、类型及分布比例

来自白蜡属 EST 和水曲柳转录组中的 5 423

条和 179 502 条序列中,分别查找到 9 488 个和 3557 个 SSR 位点,共 13 045 个。SSR 出现的频率分别是 174.96%和 1.98%,平均 0.32 kb 和 13.87 kb 出现一个 SSR,长度 ≥ 10 bp 的 SSR 出现频率分别是 3.41%和 1.98%。白蜡属 EST 中 SSR 出现频率比水曲柳转录组序列中出现的频率高(表 1)。

表 2 显示,全部的 EST-SSR 包括 2~6 个核苷酸重复单元,其中二核苷酸重复所占比例最大约 68.83%(8 979 次);其次是三核苷酸占总 SSR 的 28.69%(3 743 次);五核苷酸的重复出现的比较少只有 46 个,占总 SSR 的 0.35%;通过对两个数据库 SSR 位点的比较发现白蜡属 EST 数据库 SSR 中二核苷酸和四核苷酸所占的比例比水曲柳转录组的高,分别多 14.82%和 0.25%;而水曲柳转录组 SSR 的三、五和六核苷酸所占的比例比白蜡属 EST 数据库的高,分别多 13.7%、0.29%和 1.07%(表 2)。

2.2 水曲柳 EST-SSR 中重复基元的分布特征

2.2.1 白蜡属中 EST-SSR 的特性

在来源于白蜡属 EST-SSR 序列中,共观察到 131 种重复基元(考虑碱基互补的前提下)。其中二核苷酸重复基元有 4 种,三、四、五和六核苷酸重复基元分别有 18、44、

表 1 SSR 出现频率

Table 1 Frequency of SSR

项目 Item	白蜡属 EST EST of <i>Fraxinus</i>	水曲柳转录组 Transcriptome of <i>F. mandshurica</i>
SSR 总数 Total number of SSR	9 488	3 557
SSR 的相对频率 Relative frequency of SSR/%	174.96	1.98
长度 ≥ 10 bp SSR 数 No. of SSR with length ≥ 10 bp/%	185	3 557
长度 ≥ 10 bp SSR 相对频率 Relative frequency of SSR with length ≥ 10 bp/%	3.41	1.98

表 2 水曲柳 SSRs 类型及分布比例

Table 2 Repeat types and percentage of SSRs of *F. mandshurica*

重复类型 Repeat type	来源 Source	数量 Count	占各自数据库 SSR 的比例 Proportion by each source/%	重复类型总数 Total No.	占总 SSR 比例 Proportion by total SSR/%
二核苷酸 Two nts	ESTs from NCBI	6 914	72.87	8 979	68.83
	Transcriptome of <i>F. mandshurica</i>	2 065	58.05		
三核苷酸 Three nts	ESTs from NCBI	2 368	24.96	3 743	28.69
	Transcriptome of <i>F. mandshurica</i>	1 375	38.66		
四核苷酸 Four nts	ESTs from NCBI	130	1.37	170	1.30
	Transcriptome of <i>F. mandshurica</i>	40	1.12		
五核苷酸 Five nts	ESTs from NCBI	26	0.27	46	0.35
	Transcriptome of <i>F. mandshurica</i>	20	0.56		
六核苷酸 Six nts	ESTs from NCBI	50	0.53	107	0.82
	Transcriptome of <i>F. mandshurica</i>	57	1.60		
总数 Total		13 045			

20 和 45 种。二核苷酸基元(AG/CT)_n 出现的最多(3 458 次),占二核苷酸重复的 50.01%,其次分别是(AC/GT)_n(24.47%)和(AT/AT)_n(24.23%),(CG/CG)_n 出现的较少(89 次)(1.29%)。三核苷酸基元中(AAG/TTC)_n 出现最多(491 次),占三核苷酸重复的 20.73%,(ACC/GGT)_n 和(AGG/CCT)_n 出现的频率也较高,分别占三核苷酸重复的 9.29%(220 次)和 6.46%(153 次)。四核苷酸基元中(AAAT/TTTA)_n 出现的最多,占四核苷酸基元的 16.15%(21 次),其次是(AAAG/TTTC)_n 和(AATA/TATT)_n,分别占四核苷酸重复的 12.31%(16 次)和 7.69%(10 次)。五核苷酸重复基元出现的频率比较低只有 26 个。搜索结果得到 50 个六核苷酸基元,出现最多的是(AAAAAT/ATTTTT)_n (4 次)。

总之,白蜡属 EST-SSR 以二核苷酸为主导,(AG/CT)_n 出现的最多,占总 SSR 的 36.45%;其次分别是(AC/GT)_n (17.83%)和(AT/AT)_n (17.65%),而三、四、五和六核苷酸在总 SSR 中所占比例都很小。

2.2.2 水曲柳转录组中 EST-SSR 的特性

在来源于水曲柳转录组的 SSR 序列中,共观察到 102 种重复基元(考虑碱基互补的前提下)(图 1)。其中二核苷酸重复基元有 4 种,三、四、五和六核苷酸重复基元分别有 10、13、18 和 57 种。二核苷酸基元(AG/CT)_n 出现最多(1 554 次),占二核苷酸重复的 75.25%,其次分别是(AC/GT)_n (16.71%)和(AT/AT)_n (7.51%),(CG/CG)_n 出现较少(11 次)(0.53%)。三核苷酸基元中(AAG/CTT)_n 出现最多(412 次),占三核苷酸重复的 29.96%,(ACC/GGT)_n 和(AGC/CTG)_n 出现的频率也较高,分别

占三核苷酸重复的 19.71% (271 次) 和 11.64% (160 次)。四、五和六核苷酸出现的都比较少,但是六核苷酸类型丰富。

通过以上分析可知,两种序列来源中 EST-SSR 的特性相同,出现的 SSR 位点较多、类型丰富,都是以二核苷酸为主导,三、四、五和六核苷酸在总 SSR 中所占比例都很小。二核苷酸基元(AG/CT)_n 出现的最多(5 012 次),占总 SSR 的 38.42%,其次分别是(AC/GT)_n(2 037 次)和(AT/AT)_n(1 830 次)。三核苷酸基元中,(AAG/CTT)_n 出现最多(903 次),占总 SSR 的 6.92%。四核苷酸中(AAAT/ATTT)_n 出现的最多,占总 SSR 的 0.23%。五核苷酸(AAAAG/TTTTTC)_n 出现的最多,占总 SSR 的 0.09%。六核苷酸出现的次数不多,但类型丰富(图 1)。

2.3 水曲柳 EST-SSR 引物筛选及应用

2.3.1 水曲柳 DNA 提取与检测 采用 CTAB 法提取水曲柳叶片中的 DNA,用 RnaseA 消化后在 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳检测其完整性,从图 2 中可看出 DNA 条带清晰,点样孔也较干净,没有大分子物质的干扰。之后用紫外分光光度计检测其浓度,各样品 A₂₆₀/A₂₈₀ 均约等于 1.8,符合实验要求。

2.3.2 EST-SSR 引物第一轮筛选 分别以水曲柳雌、雄 DNA 样品池为模板,对设计的 232 对 SSR 引物进行 PCR 扩增,结果显示 208 (89.66%) 对引物获得有效扩增,其中 158 对 (68.10%) 引物在雌雄 DNA 中无差异,有 20 对引物扩增的片段不在目的片段范围内;74 对 (31.90%) 引物在雌雄 DNA 中有差异,有 27 对引物扩增的片段符合预定大小的目的条带。在 2 种来源的引物中,来自白蜡属的引物有 47 对在水曲柳雌雄 DNA 中有差异,其中有 23 对的雌雄差异片段符合预定大小的目的条带,有 20 对雌雄差异片段小于目的片段长度(表 3);来自水曲柳

转录组的 127 对引物中,有 27 对在水曲柳雌雄 DNA 中有差异,其中有 4 对引物的雌雄差异片段符合预定大小的目的条带,有 7 对引物的雌雄差异条带小于目的片段,有 16 对引物的雌雄差异片段大于目的条带(表 4)。在雌雄有差异片段的 74 对引物中有 30 对引物能在雌树的 DNA 中扩增出片段,不能在雄树 DNA 中扩增出段;有 44 对引物在雌树的 DNA 中不能扩增出片段,在雄树 DNA 中能扩增出片段。在图 3, A 中箭头所示,21 号引物(3、4 泳道)和 20 号引物(9、10 泳道)在雌雄 DNA 中均能扩增出预定大小的目的条带,23 号引物(7、8 泳道)在雌雄中扩增出条带小于目的片段。在图 3, B 中箭头

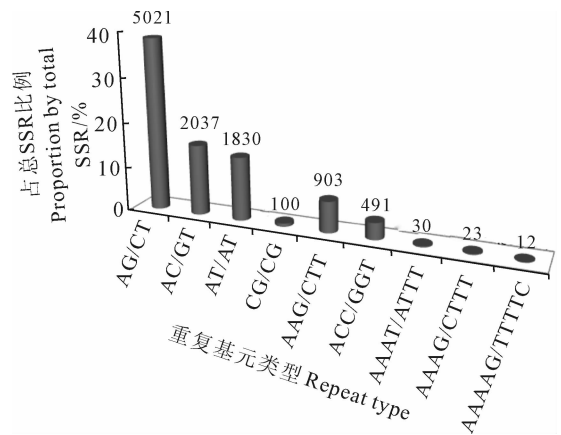


图 1 水曲柳 SSR 分布特性

图注上方的数据表示各类核苷酸基元出现的次数

图 1 Distribution characteristics of SSR in *F. mandshurica*
Digits above the columns represent the frequencies

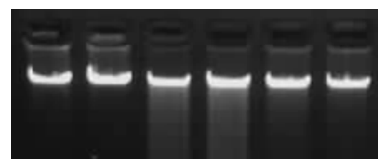


图 2 DNA 提取结果

Fig. 2 DNA electrophoresis

表 3 白蜡属 EST-SSRs 引物筛选结果

Table 3 Results of EST-SSRs primer screening in *Fraxinus*

	PCR 片段类型 PCR product type	引物编号 Primer	数量 Count	百分比 Proportion/%
雌雄无差异 With no difference between male and female	有片段且在预定范围 With products, size within expected length	8,11,17,18,19,20,21,22,34,35,99,100,102,103	14	13.33
	有片段但不在预定范围 With products, size beyond expected length	9,12,23,32,37,45,49,62,64,76,77,80,81,82, 94,96,97,98,101,104	20	19.05
	无片段 No products	1,3,5,6,7,14,16,33,39,41,42,43,52,58,63,65, 67,70,84,85,86,87,88,89	24	22.86
雌雄有差异 With difference between male and female	差异片段在预定范围 Size of different products within expected lengths	♀:10,13,25,29,30,36,46,47,50,53 ♂:59,68,69,71,72,73,74,78,91,92,93,95,105	23	21.90
	差异片段不在预定范围 Sizes of different products beyond expected lengths	♀:2,4,15,24,26,27,28,31,38,40,44 ♂:48,51,54,55,56,57,60,61,66,75,79,83,90	24	22.86

所示,73 号引物(1、2、3、4 泳道)和 74 号引物(7、8 泳道)在雌树 DNA 中扩增出符合预定大小的目的条带,而在雄树 DNA 中没有扩增出条带;75 号引物(9、10、11、12 泳道)在雌树 DNA 中扩增出比目的片段长度小的条带,而在雄树中没有扩增出条带。

2.3.3 EST-SSR 引物第二轮筛选 将第一轮筛选中雌雄有差异的所有引物都用于第二轮筛选,每个引物分别以雌雄各 15 个单株 DNA 为模板,扩增结果显示来自水曲柳转录组中的 19 和 56 号引物在水曲柳雌雄各 15 个单株中均有差异。图 4, A 是来自白蜡属 EST 的 44 和 26 号引物,可以看出在雌雄间没有明显差异,图 4, B 是来自转录组 56 号引物部分结果,在 40~80 bp 处雄树 DNA 中均扩增出小于目的条带的多态性片段,而雌树 DNA 中均没有这样的多态性条带。图 4, C 是 19 号引物部分扩增结果,如箭头所示,在雌树 DNA 中扩增出符合预定大小的目的条带,而雄树 DNA 中没有扩增出同样大

小的条带。

2.3.4 EST-SSR 在水曲柳中的应用 将第二轮筛选得到的 19 号和 56 号引物应用于 200 棵成年水曲柳的雌雄差异分析中,56 号引物在 100 株雌树中有 18 株在 80 bp 处扩增出片段,82 株没有扩增出片段(图 5, A),差异率是 82.00%;在 100 株雄树中有 3 株在 80 bp 处没有片段,97 株有片段,而且均出现多态性扩增片段(图 5, B),差异率是 97.00%。因此,56 号引物在 200 株水曲柳成年雌雄树中雌雄差异率是 89.50%。

19 号引物在 100 株雌树中有 38 株在 300~500 bp 之间扩增出片段,如图 6 箭头所示,62 株没有扩增出片段,差异率是 38.00%;在 100 株雄树中有 91 株在 300~400 bp 之间没有扩增出片段,9 株扩增出片段,差异率是 91.00%,19 号引物在 200 株水曲柳成年树中雌雄差异率是 64.50%。

表 4 转录组 EST-SSRs 引物筛选结果

Table 4 Results of EST-SSRs primer screening in transcriptome

雌雄无差异 With no difference between male and female	PCR 片段类型 PCR product type	引物编号 Primer	数量 Count	百分比 Proportion/%
	有片段且在目的片段范围 With products, size within expected length	1-9,11-14,16,18,20-29,31,33-34,36- 40,42-55,57-68,72-82,84,86,88-91, 93,96-105,107-110,112-113,115,117, 119,121,123,126-127	100	78.74
	差异片段在目的片段范围 Size of different products within expected lengths	♂17, ♂71, ♀95, ♂125	4	3.15
雌雄有差异 With difference between male and female	差异片段不在目的片段范围 Sizes of different products beyond expected lengths	♀:92 ♂:30,41,56,69,87,94	7	5.51
	差异片段大于目的条带 Sizes of different products big- ger than expected lengths	♀:19,15,32,70,83,85,111 ♂:10,35,106,114,116,118,120,122,124	16	12.60

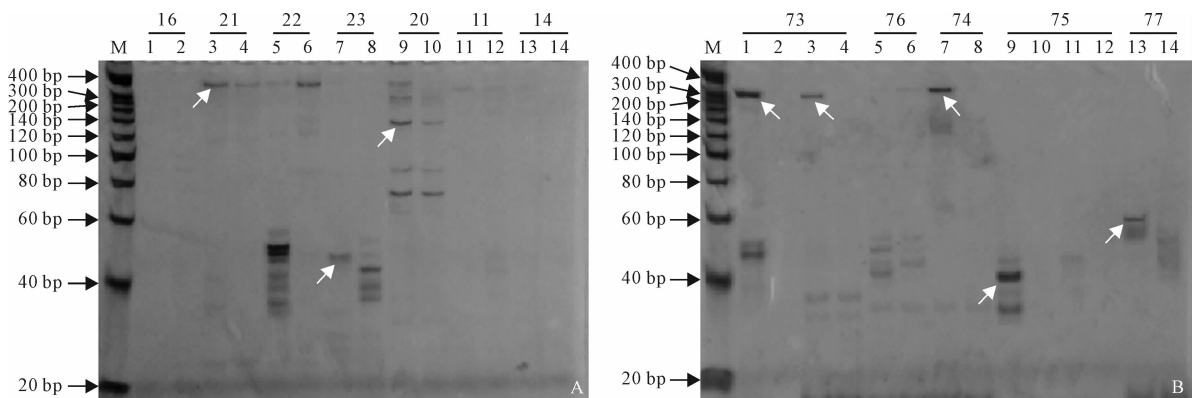


图 3 部分引物筛选结果

A. 雌雄没有差异的结果; B. 雌雄有差异的结果; M, 分子量; 1、3、5、7、9、11、13 泳道为雌树 DNA 扩增结果, 2、4、6、8、10、12、14 泳道为雄树 DNA 扩增结果

Fig. 3 Primers screening for EST-SSR analysis

A was the amplifications with no differences between male and female; B was the amplifications with differences between males and females; M, Marker; Lane 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 with the DNA from females; Lane 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 with the DNA from males

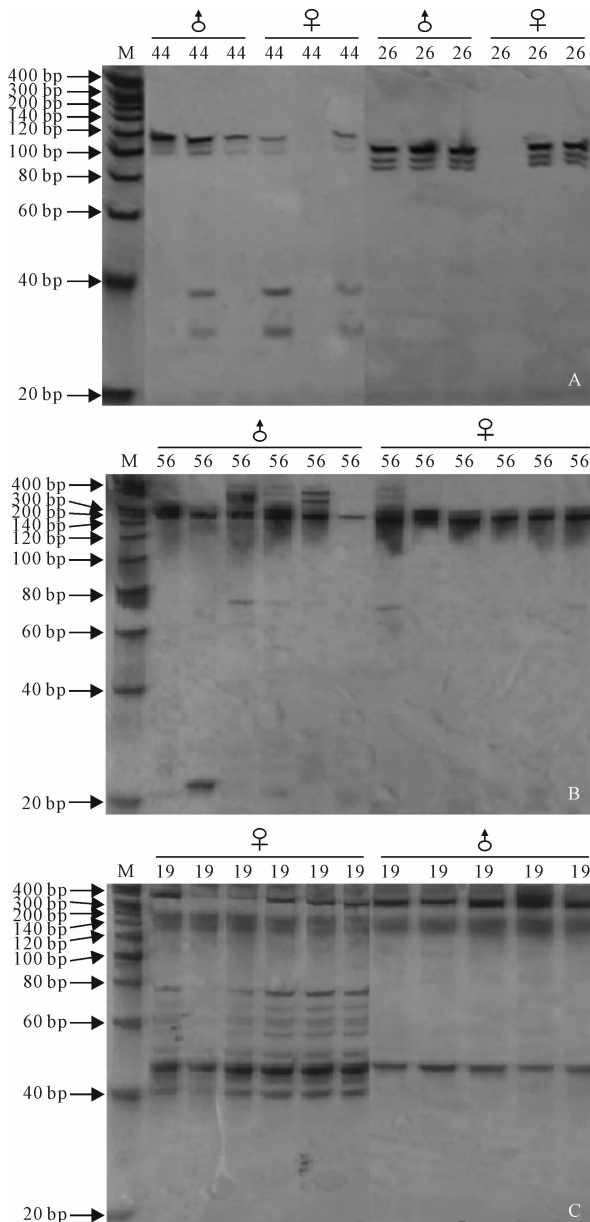


图 4 第二轮部分引物筛选结果

♀. 雌; ♂. 雄; 下同

Fig. 4 Results of primer screening in the second round

♀. Female; ♂. Male; The same as below

3 讨 论

SSR 不仅分布于整个基因组中,包括编码区和非编码区,也广泛存在于 EST 序列中。EST 序列开发的 EST-SSR 标记与传统的基因组 SSR 标记相比有很多优点,如:EST-SSR 标记在物种间具有高通用性,通常都代表着某种基因功能,还可反映出转录区的差异,而且开发过程简单、成本低^[25]。目前,EST-SSR 已在农作物和木本植物中广泛应用。Silverberg-Dilworth 等^[26]利用 148 个苹果 SSR 引物(包含 31 个 EST-SSR)和 8 个已知的苹果、梨和欧

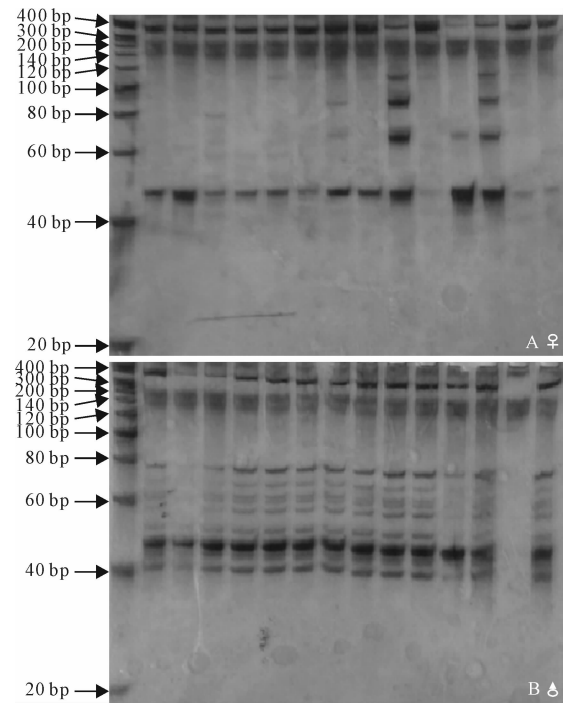


图 5 56 号引物雌雄鉴别部分图

Fig. 5 Results of primer 56

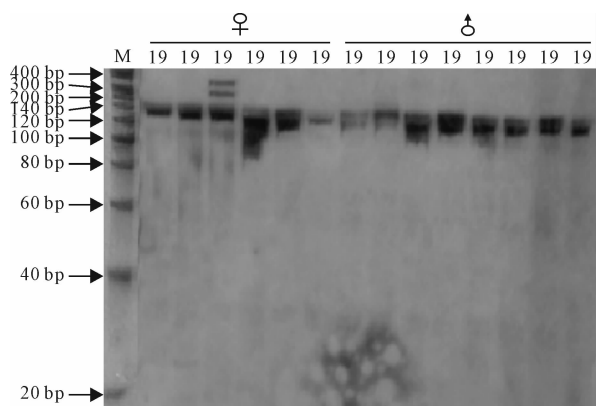


图 6 19 号引物雌雄鉴别部分图

Fig. 6 Results of primer 19

洲花楸 SSR 标记构建了复合遗传图谱,这些 SSR 标记给原参考图谱新增了 168 个位点。通常 EST-SSR 侧翼序列在物种之间高度保守,因此可以在一个物种中开发 EST-SSR 应用于与它亲缘的物种中。Vendramin 等^[27]从桃(*P. persica*)的中果皮中开发了 21 对 EST-SSR 引物,用 22 个桃 DNA 筛选出 18 对引物均能有效扩增出条带,同时用这 18 对引物在李属(*Prunus*)的 6 个其它植物中均扩增出了预期条带,说明 EST-SSR 在李属近缘种植物之间具有高效的通用性。本研究在 105 对白蜡属 EST-SSR 引物和 127 对水曲柳转录组 SSR 引物中,分别有 81 和 127 对引物能有效扩增,说明 EST-

SSR 在近缘或远缘物种之间均有较好的通用性。

要将 EST-SSR 应用于植物中,关键的第一步就是要进行对 EST 序列中 SSR 位点的分析及引物设计。刘泽涛等^[28]用 SSRSCAN 软件对小麦穗部的 3264 条 EST 序列进行 SSR 位点查找,得到 108 条含有 SSR 标记的序列,设计 64 对引物筛选得到 41 对能在小麦品种中扩增出条带,36 对引物能扩增出多态性条带。Chabane 等^[29]设计了 48 对大麦的 EST-SSR 引物,并从中筛选出 15 对引物在大麦中能有效扩增。在 EST-SSR 研究中,李响等^[30]对腊梅转录组进行 SSR 位点分析并设计了 100 对 EST-SSR 引物,筛选出 17 对引物在腊梅中能有效扩增。本研究共合成了 232 对引物,筛选到 208 对引物在水曲柳中能有效扩增,其中有 74 对引物在水曲柳雌雄 DNA 中存在差异,占有引物的 31.90%。

随着植物基因组学与功能基因组学的不断发展和研究的深入,大规模植物基因的测序产生了大量的 EST 序列,并上传到核酸公共数据库中,因此,要进一步利用 EST 序列信息,其中之一就是要对 EST-SSR 的引物进行开发。李德军等^[31]对来自 NCBI 和马来西亚橡胶树 EST 数据库的 EST 序列进行分析,共鉴定到 566 个 SSR 位点,平均 3.96 kb 出现一个 SSR 位点。在火炬松和云杉 EST 序列中平均 49.8 kb 出现 1 个 SSR 位点,在杨树 EST 序列中平均每 3.88 kb 出现 1 个 SSR 位点^[16]。在一些

物种中,二核苷酸和三核苷酸重复序列占主要类型,如橡胶树中二核苷酸重复占主要类型,其次是三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复,二核苷酸中 GA/CT 的数目最多,其次是 TC/AG、AT/TA、CTT/GAA、TTC/AAG 和 TCT/AGA^[31]。甘蔗 EST 中三核苷酸重复占 90%^[32];蝴蝶兰 EST 中二核苷酸重复占 67.10%^[33];白桦 EST 中二核苷酸重复占 81.12%^[15]。本研究中水曲柳转录组中的 SSR 出现的频率较低为 1.98%,在白蜡属 EST 中每 0.32 kb 出现一个 SSR 位点,出现的频率较高。水曲柳中也是二核苷酸重复序列占主导,最高为 72.87%,二核苷酸 (AG/CT)_n 出现的频率最多为 38.42%。水曲柳中的三核苷酸 (AAG/CTT)_n 与杨树 (9.3%)、杏 (28.76%)^[34]、油菜 (35.71)^[35] 等报道一致。

水曲柳雌雄叶片的 EST-SSR 标记的开发及应用对水曲柳育种及种子园建立具有重要的现实意义,一方面,对两种来源的标记均具有较高的有效扩增效率,表明利用近缘植物的分子标记对水曲柳进行研究是一种有效可行的方法;另一方面,导致水曲柳有性繁殖和种子园建立的难点关键是幼年水曲柳很难分辨雌雄,而目前关于水曲柳雌雄鉴别的研究基本空白。构建更加全面的水曲柳雌雄 ESR-SSR 标记并利用其来进行雌雄差异基因的定位,将是下一步的工作重点。

参考文献:

- BERUBE Y, ZHUANG J, RUNGIS D, *et al.* Characterization of EST-SSR in loblolly pine and spruce[J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2007, **3**(3): 251–259.
- PONCET V, RONDEAU M, TRANCHANT C. SSR mining in coffee tree EST databases: potential use of EST-SSRs as markers for the coffee genus[J]. *Mol. Gen. Genomics*, 2006, **276**: 436–449.
- ZHANG Y D(张亚东), PENG CH(彭 婵), LI ZH F(李振芳), *et al.* Genetic diversity of genomic-SSR and EST-SSR markers in interspecies of poplar[J]. *Journal of Northeast Forestry University* (东北林业大学学报), 2011, **29**(12): 8–11 (in Chinese).
- ZHANG L D(张利达), TANG K X(唐克轩). Development of plant EST-SSR markers and its application[J]. *Genomics and Applied Biology* (基因组学与应用生物学), 2010, **29**(3): 534–541 (in Chinese).
- VARSHNEY R K, GRANER A, SORRELLS M E. Genic microsatellite markers in plants[J]. *Trends in Biotechnology*, 2005, **23**(1): 48–55.
- KANTETY R V, L ROTA M, MATTHEWS D E, *et al.* Data mining for simple sequence repeat in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum, and wheat[J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, **48**(5): 501–510.
- YU J K, DAKE T M, SINGH S, *et al.* Development and mapping of EST-derived simple sequence repeat markers for hexaploid wheat[J]. *Genome*, 2004, **47**(5): 805–818.
- BARRETT B, GRIFFITHS A, SCHREIBER M, *et al.* A microsatellite map of white clover[J]. *Theor. Appl. Genet.*, 2004, **109**(3): 596–608.
- DECROOCQ V, FAVE M G, HAGEN L, *et al.* Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa[J]. *Theor. Appl. Genet.*, 2003, **106**(5): 912–922.
- CHO Y G, ISHII T, TEMNYKH S, *et al.* Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Theor. Appl. Genet.*, 2000, **100**(5): 713–722.

- [11] XU YONG, MA RONGCAI, XIE HUA, *et al.* Development of SSR markers for the phylogenetic analysis of almond trees from China and the Mediterranean region[J]. *Genome*, 2004, **47**(6): 1 091–1 104.
- [12] FRASER L G, HARVEY C F, CROWHURST R N, *et al.* EST-derived microsatellites from *Actinidia* species and their potential for mapping[J]. *Theor. Appl. Genet.*, 2004, **108**(6): 1 010–1 016.
- [13] RUNGIS D, BERUBE 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): 1 283–1 294.
- [14] CHERDSAK L., CAROL E R, YOUSRY A E, *et al.* Single-copy, species-transferable microsatellite markers developed from loblolly pine ESTs[J]. *Theor. Appl. Genet.*, 2004, **109**(2): 361–369.
- [15] WANG Y M(王艳敏), WEI ZH G(魏志刚), YANG CH P(杨传平). Data mining for SSRs in ESTs and EST-SSR marker development in *Betula platyphylla*[J]. *Scientia Silvae Sinicae*(林业科学), 2008, **44**(2): 78–83(in Chinese).
- [16] ZHANG X Y(张新叶), SONG C W(宋丛文), ZHANG Y D(张亚东), *et al.* Development of EST-SSR in *Populus deltoides* and *P. euramericana*[J]. *Scientia Silvae Sinicae*(林业科学), 2009, **45**(9): 53–59(in Chinese).
- [17] YAO M ZH(姚明哲), LIU ZH(刘 振), CHEN L(陈 亮), *et al.* Genetic diversity and structure of tea germplasm originated from region of North Yangtze River Based on EST-SSR markers[J]. *Journal of Tea Science*(茶叶科学), 2009, **29**(3): 243–250(in Chinese).
- [18] LIU G(刘 果), ZHANG D Q(张党权), XIE Y J(谢耀坚), *et al.* Rapid screening and transferability analysis of genomic-SSR and EST-SSR primers in eucalypt[J]. *Scientia Silvae Sinicae*(林业科学), 2013, **49**(2): 127–133(in Chinese).
- [19] AN Z W(安泽伟), ZHAO Y H(赵彦宏), CHENG H(程 汉), *et al.* Development and application of EST-SSR markers in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg[J]. *Hereditas*(遗传), 2009, **31**(3): 311–319(in Chinese).
- [20] 周以良. 黑龙江树木志[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社, 1986: 487–548.
- [21] WANG H Y(王玉弘), CHAN Y X(柴一新), MU CH L(慕长龙). Study on ecology of *Fraxinus mandshurica*[J]. *Journal of Northeast Forestry University*(东北林业大学学报), 1994, **22**(1): 1–6(in Chinese).
- [22] JI L L(纪丽丽), SU P(苏 平). An exploration on morphological identification of the sex of *Fraxinus mandshurica*[J]. *Forest By-Product and Speciality in China*(中国林副特产), 2008, **97**(6): 31–33(in Chinese).
- [23] SHAO J P(邵俊培), LI ZH H(李志辉), YANG M H(杨模华), *et al.* Optimization of PCR system in EST-SSR analysis of *Pinus massoniana* Lamb[J]. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*(中国林业科技大学学报), 2012, **4**(32): 159–163(in Chinese).
- [24] HAN Y L(韩永亮), CHANG J H(常金华). Comparative analysis of two kinds of methods to detect SSRs on polyacrylamide gel electrophoresis systems[J]. *Rain Fed Crops*, 2006, **26**(3): 176–177(in Chinese).
- [25] LIN Y ZH(林元震), GUO H(郭 海), LIU CH X(刘纯鑫), *et al.* Development and application of EST-SSR markers in woody plants [J]. *Bulletin of Plant Physiology*(植物生理学通讯), 2009, **45**(12): 1 221–1 225(in Chinese).
- [26] SILFVERBERG D E, MATASCI C L, VAN DE WEG WE, *et al.* Microsatellite markers spanning the apple (*Malus × domestica* Borkh.) genome[J]. *Tree Gen. Genom.*, 2006, **2**(4): 202–224.
- [27] VENDRAMIN E, DETTORI MT, GIOVINAZZI J, *et al.* A set of EST-SSRs isolated from peach fruit transcriptome and their transportability across *Prunus* species[J]. *Mol. Ecol. Notes*, 2007, **7**(2): 307–310.
- [28] LIU Z T(刘泽涛), YUAN SH H(苑少华), YANG D(杨 迪) *et al.* Development of SSR markers derived from EST of wheat spikes and their use in genetic diversity analysis of wheat[J]. *Journal of Triticeae Crops*(麦类作物学报), 2013, **33**(6): 1 093–1 099(in Chinese).
- [29] CHABANE K, VARSHNEY RK, GRANER A, *et al.* Generation and exploitation of EST-derived SSR markers for assaying molecular diversity in durum wheat populations[J]. *Genet Resour. Crop Evol.*, 2008, **55**(6): 869–881.
- [30] LI X(李 响), YANG N(杨 楠), *et al.* Development and primer selection of EST-SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of *chimonanthus praecox*[J]. *Journal of Beijing Forestry University*(北京林业大学学报), 2013, **35**(1): 25–32(in Chinese).
- [31] DEJUN LI, ZHI DENG, HUINA GUO, *et al.* Development and characterizations of EST-SSR markers in rubber tree (*Hevea brasiliensis*) [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2014, **15**(5): 733–737.
- [32] CORDEIRO G M, CASU R, MCINTYRE C L, *et al.* Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to helianthus and sorghum[J]. *Plant Science*, 2001, **160**(6): 1 115–1 123.
- [33] LI D M(李冬梅), LÜ F B(吕复兵), ZHU G F(朱根发), *et al.* Analysis of SSR information in EST resource of *Phalaenopsis* spp [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*(广东农业科学), 2011, **3**: 117–120(in Chinese).
- [34] LI X B(李小白), ZHANG M L(张明龙), CUI H R(崔海瑞). Analysis of SSR information in EST resource of oilseed rape [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*(中国油料作物学报), 2007, **29**(1): 20–22(in Chinese).
- [35] YU L(余 利), HUANG SH Y(黄少勇), ZHANG ZH J(张智俊), *et al.* Genetic diversity analysis of 13 kinds of ornamental bamboo based on EST-SSR markers[J]. *Nonwood Forest Research*(经济林研究), 2012, **30**(3): 6–10(in Chinese).

(编辑:宋亚珍)