

单、双子叶作物间 EST-SSRs 引物和标记的通用性研究

柴呈森^{a*}, 姜蔚^{a*}, 李娜^{a*}, 刘川^{a*}, 温雪梅^{a*}, 赵惠贤^a, 胡胜武^b

(西北农林科技大学 a 生命科学院, b 农学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】 **【目的】**探讨单、双子叶作物间 EST-SSR 引物和标记的通用性。**【方法】**选取 30 对小麦、8 对油菜和 14 对白菜的 EST-SSR 引物,分别以 10 个小麦、10 个油菜、5 个大豆品种和 5 个玉米自交系的基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增及扩增产物的多态性分析。**【结果】**(1)30 对小麦 EST-SSR 引物中,有 29、28 和 26 对引物分别在玉米、油菜和大豆中有扩增产物,可扩增率分别为 96.7%,93.3%和 86.7%;其中分别有 12 对和 9 对引物在单子叶作物小麦和玉米及双子叶作物大豆和油菜中的扩增产物显示多态性,有 4 对引物在 4 种作物中的扩增产物均显示多态性。(2)22 对白菜/油菜 EST-SSR 引物中,有 18、21 和 22 对引物分别在大豆、小麦和玉米中有扩增产物,可扩增率分别为 81.8%,95.4%和 100%;其中分别有 10 对和 7 对引物在单子叶作物小麦和玉米及双子叶作物大豆和油菜中的扩增产物显示多态性,有 7 对引物在 4 种作物中的扩增产物均显示多态性。**【结论】**在单、双子叶作物间开发可通用 EST-SSR 引物和建立可转化 EST-SSR 标记是可行的;在单、双子叶作物中均有多态性的 EST-SSR 标记所对应的基因,涉及贮藏蛋白、核酸的转录及复制、功能基因的表达调控、代谢催化等基础功能。

【关键词】 单子叶作物;双子叶作物;EST-SSR;引物通用性

【中图分类号】 Q346⁺.5

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)01-0075-08

The transferability of EST-SSR primers and markers between monocotyledonous and dicotyledonous crops

CHAI Cheng-sen^{a*}, JIANG Wei^{a*}, LI Na^{a*}, LIU Chuan^{a*}, WEN Xue-mei^{a*},
ZHAO Hui-xian^a, HU Sheng-wu^b

(a College of Life Sciences, b College of Agronomy, Northwestern A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** This study investigated the transferability of EST-SSR primers and markers between monocotyledonous and dicotyledonous crops. **【Method】** In the present investigation, 30 pairs of EST-SSR primers from wheat, 8 from oilseed rape and 14 from Chinese cabbage were selected according to the results reported previously, to conduct PCR with the genomic DNA from 10 wheat varieties, 10 oilseed rape, 5 soybean and 5 maize inbred lines as template, and to analyze the polymorphism of the PCR products. **【Result】** (1) 29, 28, 26 of 30 pairs of EST-SSR primers from wheat respectively had amplification products in maize, oilseed rape and soybean, the rate of amplification was 96.7%, 93.3%, 86.7%, respectively; 12 of 30 pairs EST-SSR primers from wheat showed polymorphism in monocotyledons wheat and maize, 9 in dicotyledons oilseed rape and soybean, and 4 in both monocotyledonous and dicotyledonous

* [收稿日期] 2009-05-12

[基金项目] 国家生命科学与技术人才培养基地科技创新基金项目(2007088);国家油菜产业化项目科学家岗位“化杀岗位”(nycytx-00505);国家自然科学基金项目(30871578)

[作者简介] 柴呈森(1986—),男,河南新乡人,在读硕士,主要从事作物的分子生物学研究。E-mail: chaichengsen@163.com。标*为同等贡献作者。

[通信作者] 赵惠贤(1965—),女,陕西临潼人,教授,博士,主要从事作物遗传改良的分子生物学研究。E-mail: hxzhao212@yahoo.com.cn

crops. (2)18,21,22 of 22 pairs EST-SSR primers from Chinese cabbage/rape respectively had amplification products in soybean,wheat and maize,the rate of amplification was 81.8%,95.4%,100%,respectively;10 of 22 pairs EST-SSR primers showed polymorphism in monocotyledons wheat and maize,13 in dicotyledons oilseed rape and soybean,7 in both monocotyledonous and dicotyledonous crops.【Conclusion】 These data indicate that it is feasible to establish universal primers and transferable EST-SSR markers between monocotyledonous and dicotyledonous crops. And it is found that these genes containing polymorphic markers based on EST-SSR in both monocotyledonous and dicotyledonous crops are associated with some basic functions,such as storage,nucleic acid transcription and duplication,regulation of the expression of the function genes,metabolize catalysis,and etc.

Key words: monocotyledonous crop; dicotyledonous crop; EST-SSR; transferability of primer

EST-SSR 是以 1~6 个碱基为重复单元,存在于表达序列标签(EST)中的简单重复序列(SSR)^[1]。其既具有 SSR 的多态信息含量高、共显性遗传、重复性好和特异性强等特点^[2],又因来源于编码区 DNA 而与特定基因表达相关。近年来,各类 EST 数据迅速增加,为 EST-SSR 标记的建立提供了丰富资源。目前已在小麦^[3-4]、油菜^[5-6]、甘蔗^[7]、葡萄^[8]等植物中建立了一批 EST-SSR 标记,并且对小麦^[9-10]、白菜^[6]、棉花^[11-12]的 EST-SSR 标记在其他物种中的通用性进行了初步研究。但是,关于植物间 EST-SSR 标记通用性的研究大都集中在近缘种属植物材料之间,而有关单、双子叶作物间 EST-SSR 引物和标记的比较及相互通用性尚鲜有报道。小麦、玉米、油菜、大豆是我国重要的粮食或经济作物,研究其 EST-SSR 标记的通用性,对于充分利用现有 EST 资源、加速开发物种间的有效 EST-SSR 标记、实现特定性状的分子标记辅助筛选等具有重要意义。本研究选取 30 对小麦、8 对油菜和 14 对白菜的 EST-SSR 引物,分析其在单子叶作物小麦、玉米及双子叶作物油菜、大豆中的 PCR 扩增情况,及其在单、双子叶作物中的可通用性,以期建立作物间可转化的 EST-SSR 标记奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究以 10 个小麦品种(Banks、Banquet、Kosutka、中国春、漯珍 1 号、中优 9507、长武 134、

豫展 2000、Saneca、小偃 6 号)、5 个玉米自交系(314、k22、488、109、k12)、10 个油菜品种(春油 3 号、CZ803、Midas、中油 821、春油 14、Daddla、中双 9 号、Plainsman、Ww1291、TE0132)和 5 个大豆品种(Haandou125、ZDD10376、ZDD10473、ZDD10207、ZDD10270)作为供试材料。其中小麦品种包括澳大利亚、捷克和我国不同产地的小麦品种,这些品种遗传背景差异较大,由本课题组收集保存;玉米、大豆和油菜品种(系)分别由西北农林科技大学农学院玉米所和油菜研究中心提供。

将供试材料的成熟种子于室内萌发后,播于装有营养土的小钵中,生长 10 d 后采集叶片贮存于液氮中,供提取基因组 DNA 用。

1.2 基因组 DNA 的提取

供试材料基因组 DNA 的提取采用改进的 CTAB 法^[13]。

1.3 EST-SSR 引物的选取

根据已报道的 EST 序列信息及前人利用生物信息方法分析筛选的 EST-SSR 位点,本研究选取了分布于小麦不同染色体的 30 个 EST-SSR 位点引物对^[14-16](其详细信息来自 Grain Gene website(<http://wheat.pw.usda.gov/ITMI/EST-SSR/Cornell/>))、忻雅等^[6]报道的 14 对白菜 EST-SSR 引物、以及李小白等^[5]报道的 8 对油菜 EST-SSR 引物,进行作物间 EST-SSR 引物和标记通用性研究。这些引物由上海生工生物技术有限公司合成,其序列信息见表 1 和表 2。

表 1 试验选取的 30 对小麦 EST-SSR 引物序列及其信息

Table 1 Sequences and information of 30 EST-SSR primer pairs from wheat used in this investigation

引物编号 Primer code	原文引物号 Previous primer code	同源 EST 的功能 EST putative function	引物序列 Primer sequence (5'-3')
w-1	Xcwem3(9)	推定环状锌指锚蛋白 Putative RING zinc finger ankyrin protein	GATCTGTGACCGAGGCAGA GCTGTGGAGGTCCAAAATGT
w-2	Xcwem4(6)	类似 hap5 蛋白 Hap5-like protein	CTACCCGCCGACGCTCTAC GGTTCTTGAAGTCGGTGGTG

续表 1 Continue table 1

引物编号 Primer code	原文引物号 Previous primer code	同源 EST 的功能 EST putative function	引物序列 Primer sequence (5'-3')
w-3	Xcwem5(9)	蛋白酶体相关蛋白 Proteasome-related protein	CTCCCTCTGCCCTCTTG CAGCTCGCCTGTATCCATCT
w-4	Xcwem6(3)	干旱应答蛋白家族 Drought-responsive family protein	CCTGCTCTGCCATTACTTGG TGCACCTCCATCTCCTTCTT
w-5	Xcwem12(3)	低分子量谷蛋白亚基 Low molecular weight glutenin subunit	CAGCAACCATTACCACCACA GCGAAAATGATGGTTGTTGA
w-6	Xcwem5(4)	GTP 结合 RAB1C 类似蛋白 GTP-binding RAB1C like protein	AGAGGAAGCCATCCAATCTG TCTTACCCTCCCTCGAGTCC
w-7	Xcwem16(4)	假设蛋白 OsJ_024223 Hypothetical protein OsJ_024223	CCGCCGCTCTCTACTC GACGTTTCGGCGCATAGA
w-8	Xcwem18(4)	假设蛋白 OsJ_024088 Hypothetical protein OsJ_024088	TTCGCGAAGCGACTACCG GCATCCTTCGTCTCGCTAAC
w-9	Xcwem19(3)	91A 蛋白 91A protein	ACAAATACAAGCCCCAAAG GCGGTGGGAAGGTTTCTTAT
w-10	Xcwem20(6)	未知 Unknown	GACACCTTCTCTTGCTCCAAA GAAGACGTGATCAGCATGGA
w-11	Xcwem25(4)	假设蛋白 OsI_010203 Hypothetical protein OsI_010203	TCTGGATCCCTTGTCGAATC GAGGCGAGGATCTCATGGTA
w-12	Xcwem34(11)	真核翻译起始因子 2-β 亚基 Eukaryotic translation initiation factor2 subunit beta(eIF-2-beta)	TTGCACCTTTTGATCCAACC TTGCCTCACCAGACTCAGTG
w-13	Xcwem36(2)	假设蛋白 OsI_014405 Hypothetical protein OsI_014405	TCACCGGAATAGGAATAGGG GGTATGGGGATAAAGCAGCA
w-14	Xcwem38(4)	推测 bHLH 家族蛋白 Putative bHLH family protein	AAGCCAAGCGTTAGCTGTCT AGCTCGTTGATCTCCTCGTC
w-15	Xcwem40(3)	ATP 结合/激酶/蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶 ATP binding/ kinase/ protein serine/threonine kinase	TAGCACCAGGCTTGACCAGT GGACCAAAGCCAAAAACAAA
w-16	Xcwem41(3)	未知 Unknown	GGATGGAGAGGGACTTCCTG ACTCCTCCTCCCCCAAAGTA
w-17	Xcwem45(1)	未知 Unknown	TGCAAGACATGCACACTGAA ATTCCCAACAGTGCTGATCC
w-18	Xcwem46(4)	未知 Unknown	ACGTTGTCTCCGTGTCATTG GGTCATGGCCTCAGTCTCA
w-19	Xcwem47(4)	磷酸胆碱二胞苷酰基转移酶 CTP:phosphorylcholine cytidyltransferase	CCTTCTCGACTCCCTCTTCG CCATTGCTCGTGACCTGT
w-20	Xcwem48(1)	酮还原酶/氧化还原酶 Putative ketoreductase/Oxidoreductase	TCTGTTGTCCGCATTTCAGT TGGCGTTACATTCAATTTGGA
w-21	Xcwem50(3)	羧酸/脂酶 Carboxylesterase/lipase	AGTACTACGGAGCCGAGCAA ATCGAATCGCCGAACATAAA
w-22	Xcwem53(5)	质体发育的蛋白质 DAG Putative plastid developmental protein DAG	ACGCACGCTCGCTTCAAT GCAGTATCGTCTCCTCTGTC
w-23	Xcwem54(6)	假设蛋白 OsI_017216 Hypothetical protein OsI_017216	AGCCAAAGGAGCTGGAGGAC GGCTCCGTGCTCCTCGAC
w-24	Xcwem56(3)	无毒反应蛋白相关蛋白/无毒 诱导基因(AIG)的相关蛋白质 Avirulence-responsive protein-related/ avirulence induced gene(AIG) protein-related	CCAAGTGTCAGCAACAAGCA TAGACGAACACGCTGTGGTG
w-25	Xcwem57(2)	推定的低温和盐应答蛋白 Putative low temperature and salt responsive protein	CCGTACGCCACCAATTTTAC CTGATCCAGAATCCATCTGC
w-26	Xksum104	低分子量谷蛋白亚基 Low molecular weight glutenin subunit	GCAAATCCCCGAGCAATCCC TAGACACCAACTCCGATGCC
w-27	Xksum73	MYB 家族转录因子 Putative MYB family transcription factor	GATCAGGCCAGGCTACTCAG CTTCTTCAGCCCTCCTTCT
w-28	Xcn150	磷酸丙糖异构酶 Triosephosphat-isomerase	AAAGGTAGGGTTTCCAGTTGC AATGTCCTTGCGGTTGCT
w-29	Xksum62	Rpr4901.1 Rpr4901.1	GGAGAGGATAGGCACAGGAC GAGAGCAGAGGGAGCTATGG
w-30	Xksum44	未知 Unknown	CCACACCATGCCACCATGCC TGGGTAGGTGGTAGTGTGCC

注:w-1 至 w-25 来自文献[15];w-26 至 w-30 来自文献[14]和[16]。

Note:w-1 to w-25 from reference paper [15];w-26 to w-30 from reference paper [14] and [16].

1.4 PCR 扩增及扩增产物的检测

PCR 反应体系为 20 μL,其中包括:10×Buffer

2 μL,25 mmol/L MgCl₂ 2.4 μL,2.5 U *Taq* 聚合酶

0.5 μL,2.5 nmol/L dNTPs 2.4 μL,0.4 μmol/L 引

物各 0.3 μ L,50 ng 模板 DNA。PCR 反应条件:95 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s,35 个循环;最后在 68 $^{\circ}$ C 下延
 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 左右退火 伸 10 min。

表 2 试验选取的白菜和油菜 EST-SSR 引物序列及其信息

Table 2 Sequences and information of EST-SSR primers from Chinese cabbage and oilseed rape used in this investigation

引物编号 Primer code	原文引物号 Previous primer code	同源 EST 的功能 EST putative function	引物序列 Primer sequence (5'-3')
r-1	ESTP001	Gp85 蛋白 Gp85 protein	CAAAAACGTCGAAAATGCTT TTTTTCTGTGGGCAGGACT
r-2	ESTP003	叶绿素合成酶 Chlorophyll synthetase	GGGGGCATACAACCTCCCAT AATGATCAAAGCAAGCAACG
r-3	ESTP007	五聚体泛素链 Pentameric polyubiquitin	TTTGTAGTAGTCTTATAACGAAAAGGGG TGGAGGTGGAGAGCTCGG
r-4	ESTP015	乙酰乳酸合成酶小亚基 Acetolactate synthase small subunit	GGGGATGTTTATCCCGTTG CTTGTC AAGATCCCCAGTAAGC
r-5	ESTP016	Enoyl-ACP 还原酶 Enoyl-ACP reductase	AAGAGAATAAATCAAGAAACACAAGTC ACTCTTTTAGAAGCTGAAGAAGCA
r-6	ESTP018	未知 Unknown	AACGAAACAGCCACTAGAAACA CCCTCTCAGCCCTCAG
r-7	ESTP021	40S 核糖体蛋白 S15A 40S ribosomal protein S15A	AAGGCTTTGAGCTTTAGGAGG GACATTCTTCCTCCTGGCTTC
r-8	ESTP022	60S 核糖体蛋白 L17 60S ribosomal protein L17	TCACGATTAAAGCCTAACACAA GTTTAACCGGTTTCCCATCC
r-9	ESTP023	40S 核糖体蛋白 S10 40S ribosomal protein S10	CCCTCTGCGTCTCTCTACTC TCCACCTTTTACCTTCAC
r-10	ESTP025	40S 核糖体蛋白 S7 40S ribosomal protein S7	AACACAAGTTTTGAGGAAGACTGA AGAAAGGCTCAGCTGTTCAAG
r-11	ESTP026	泛素/核糖体蛋白 S27a Ubiquitin / ribosomal protein S27a	GTAGGATGTGATTAGTGTTTTAGCGA GTCGGCAAGAGTTCTTCCAT
r-12	ESTP027	40S 核糖体蛋白 S16 40S ribosomal protein S16	GGATACTATTGATCAGAAGCGGA CCTATCGTAACGGATAAGGAAATC
r-13	ESTP031	GTP-结合蛋白 GTP-binding protein	AGATGCAAACACACGCACAG AAGGTAACCCATAATATGGTGATGG
r-14	ESTP032	GTP-结合蛋白 typA GTP-binding protein typA	GCAAGTATGTAACGAGCAGGAAC CACACCCGCACTTACAAACA
r-15	SSR-P5	未知 Unknown	GAAGTTGGGTTGAAGAGCAGTT TCTGTAAAGTGTCAGGAGCAAC
r-16	SSR-P6	推测核蛋白 D2 类核心蛋白 Putative snRNP D2 core protein	ACTCCGTCATCACCGTCCTT CCTATTCAACGCTGCGTCTTA
r-17	SSR-P13	F6D8.25 蛋白 F6D8.25 protein	ACCCAGATATTTTGTTAGCCG CAGGTCTTGCCCATTTTGTC
r-18	SSR-P14	未知 Unknown	AGAACTAATCCGAAGGAGACCG GGCTAAGCCGCAAACGAC
r-19	SSR-P16	未知 Unknown	TCATATCCATCATGTCTCAACG CAACAGAAACTCGGTGCAAAATC
r-20	SSR-P19	ATP 依赖 Clp 蛋白酶亚基 ClpP ATP-dependent Clp protease subunit ClpP	AGTGTTGGAAGCGGAAAAGG GCGTAGGCAGGAAAATAGGG
r-21	SSR-P21	推测蛋白 Putative protein	TGGTCTTGATTTATTGCGAGC TTTGGGCGTGATACCTTGAG
r-22	SSR-P22	黄体酮结合同源蛋白 Atmp2 Putative progesterone-binding protein homolog Atmp2	GCTCTAACCCTGACCACCGA ACATCTGCTCTGGGAAACAT

注:r-1 至 r-14 来自忻雅等^[6]报道的白菜 EST-SSR 引物;r-15 至 r-22 来自李小白等^[5]报道的油菜 EST-SSR 引物。
Note:r-1 to r-14 EST-SSR primers from Chinese cabbage from Xin Y,et al^[6];r-15 to r-22 EST-SSR primers from oilseed rape from Li X B,
et al^[5].

向 PCR 扩增产物中加入含有溴酚蓝的上样缓冲液,然后用 80 g/L 的脲变性聚丙烯酰胺凝胶(含 7 mol/L 尿素)进行电泳分离,电泳所用的电泳缓冲液为 1 $\times$ TBE,在约 200 V 左右的电压下电泳 1.5 h,用银染法^[17]检测。少数引物由于其扩增产物较大而采用 10 g/L 琼脂糖电泳分离,EB 染色后,紫外灯下成像。

2 结果与分析

2.1 小麦 EST-SSR 引物在 4 种供试作物中的扩增情况与扩增产物的多态性

选取遗传背景差异很大的 10 个小麦品种、5 个玉米自交系、10 个油菜品种和 5 个大豆品种,以其基因组 DNA 为模板,用供试的 30 对小麦 EST-SSR

引物进行 PCR 扩增,扩增情况及扩增产物多态性见 图 1 和表 3。

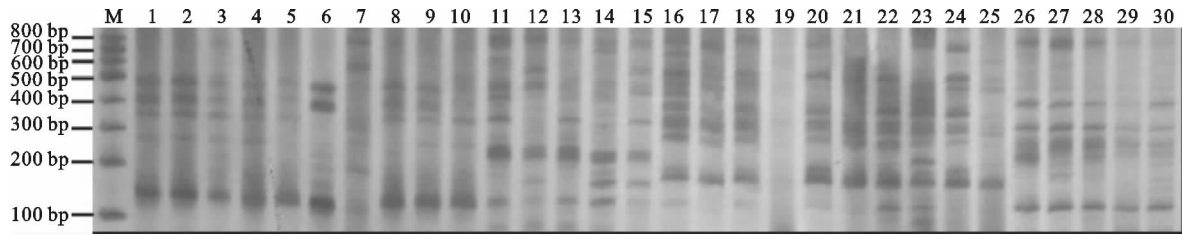


图 1 引物 w-19 在供试的单、双子叶作物中扩增产物的多态性
1~10 分别代表供试的 10 个小麦品种;11~15 分别代表 5 个玉米自交系;16~25 分别代表 10 个油菜品种;
26~30 分别代表 5 个大豆品种;M 代表 Marker;下图同
Fig. 1 Polymorphiic pattern of PCR products amplified in monocotyledonous and dicotyledonous varieties with primer w-19
1—10 representing 10 wheat varieties selected in this investigation;11—15 representing 5 maize inbreeding lines;
16—25 indicating 10 oilseed rapes;26—30 indicating 5 soybean cultivars;M representing Marker;The following figure is same

表 3 30 对小麦 EST-SSR 引物在 4 种供试作物中的扩增情况及多态性
Table 3 Amplification and polymorphism of the PCR products with EST-SSR primers from wheat

引物 编号 Primer codes	扩增情况 Amplification result				扩增产物多态性 Polymorphism			
	小麦 Wheat	玉米 Maize	油菜 Oilseed rape	大豆 Soybean	小麦 Wheat	玉米 Maize	油菜 Oilseed rape	大豆 Soybean
w-1	A	A	A	A	P	P	P	P
w-2	NA	A	A	A	NP	P	P	NP
w-3	A	A	A	A	P	NP	NP	NP
w-4	A	A	A	A	P	NP	P	NP
w-5	A	A	A	A	P	P	P	NP
w-6	A	A	A	A	NP	NP	P	P
w-7	A	A	A	A	NP	NP	NP	NP
w-8	A	NA	A	NA	NP	NP	NP	NP
w-9	A	A	A	A	NP	P	P	P
w-10	A	A	A	A	P	P	P	NP
w-11	A	A	A	A	NP	P	NP	NP
w-12	A	A	NA	NA	P	P	NP	NP
w-13	A	A	A	A	P	NP	P	P
w-14	A	A	A	A	P	P	P	NP
w-15	A	A	A	A	P	P	P	P
w-16	A	A	A	A	NP	P	P	P
w-17	A	A	A	A	NP	P	P	P
w-18	A	A	A	A	NP	P	P	NP
w-19	A	A	A	A	P	P	P	P
w-20	A	A	A	A	P	P	NP	P
w-21	A	A	A	A	NP	P	P	NP
w-22	A	A	NA	A	P	NP	P	NP
w-23	A	A	A	A	P	P	P	NP
w-24	A	A	A	NA	P	P	P	NP
w-25	A	A	A	A	NP	NP	NP	NP
w-26	A	A	A	NA	P	P	P	P
w-27	A	A	A	A	NP	P	NP	NP
w-28	A	A	A	A	NP	P	P	NP
w-29	A	A	A	A	P	P	P	NP
w-30	A	A	A	A	NP	NP	NP	NP

注:NA. 无扩增产物;A. 有扩增产物;NP. 无多态性;P. 有多态性。下表同。
Note:NA. No amplification;A. Amplification;NP. No polymorphism;P. Polymorphism. The following table is same.
从表 3 可以看出,在供试的 10 个小麦品种中, 有 16 对引物在 10 个小麦品种中显示有较好的多态
除引物 w-2 外,其他 29 对引物均有扩增产物,其中 性。30 对小麦 EST-SSR 引物中,分别有 29,28 和

26 对引物在玉米、油菜和大豆品种中有扩增产物,引物可扩增率分别为 96.7%,93.3%和 86.7%;在这 3 种作物中,扩增产物均能显示多态性的引物分别有 21,21 和 10 对,各占其可扩增引物的 72.4%,75%和 38.5%。

从表 3 还可以看出,30 对小麦 EST-SSR 引物中,在单子叶作物小麦和玉米中均可扩增出产物的引物有 28 对,其中有 12 对引物的扩增产物显示多态性,占可扩增引物的 42.9%;在双子叶作物油菜和大豆中均可扩增出产物的引物有 25 对,其中有 9 对引物的扩增产物显示多态性,占可扩增引物的 36%。

在 4 种作物中均有清晰扩增产物的引物有 24 对,占供试小麦 EST-SSR 引物的 80%,其中有 4 对引物(即 w-1、w-15、w-19、w-26)在供试的单、双子叶作物中扩增产物均显示多态性,占可扩增引物的 16.7%。以上结果表明,小麦 EST-SSR 引物在 4 种

供试作物中的可扩增率较高,且扩增产物有一定频率的多态性。

结合表 1 可以看出,在供试的单、双子叶作物中,扩增产物均显示多态性的 EST-SSR 引物,其所对应的基因分别编码的是环状锌指锚蛋白、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶、磷酸胆碱二胞苷酰基转移酶(CTP)、低分子量谷蛋白亚基。这些基因对单、双子叶作物的生长发育及品质有重要意义。

2.2 白菜/油菜 EST-SSR 引物在 4 种供试作物中的扩增情况及扩增产物的多态性

为检测白菜/油菜 EST-SSR 引物在单、双子叶作物中的通用性,分别以 10 个油菜品种、5 个大豆品种、10 个小麦品种和 5 个玉米自交系等材料的基因组总 DNA 为模板,用 14 对白菜 EST-SSR 引物和 8 对油菜 EST-SSR 引物进行了 PCR 扩增,扩增情况及扩增产物多态性见图 2 和表 4。

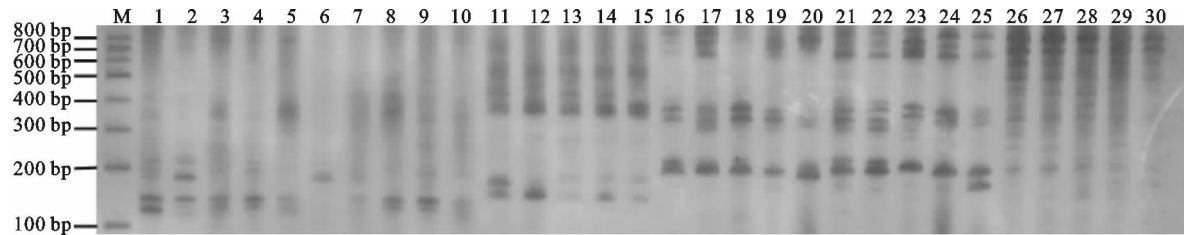


图 2 引物 r-21 在供试单、双子叶作物中扩增产物的多态性

Fig. 2 Polymorphic pattern of PCR products amplified in monocotyledonous and dicotyledonous varieties with primer r-21

表 4 白菜/油菜 EST-SSR 引物在 4 种供试作物中的扩增情况及多态性

Table 4 Amplification and polymorphism of the PCR products with EST-SSR primers from Chinese cabbage and oilseed rape

引物 编号 Primer codes	扩增情况 Amplification result				扩增产物多态性 Polymorphism			
	油菜 Oilseed rape	大豆 Soybean	小麦 Wheat	玉米 Maize	油菜 Oilseed rape	大豆 Soybean	小麦 Wheat	玉米 Maize
r-1	A	A	A	A	NP	P	NP	P
r-2	A	NA	A	A	P	NP	NP	P
r-3	A	A	A	A	P	P	NP	P
r-4	A	NA	NA	A	P	NP	NP	NP
r-5	A	A	A	A	P	P	NP	P
r-6	A	A	A	A	P	P	NP	P
r-7	A	A	A	A	P	NP	P	P
r-8	A	A	A	A	P	P	NP	NP
r-9	A	A	A	A	P	P	P	P
r-10	A	NA	A	A	P	NP	NP	NP
r-11	A	A	A	A	P	P	P	P
r-12	A	A	A	A	P	NP	NP	P
r-13	A	A	A	A	P	P	P	P
r-14	A	A	A	A	P	P	P	P
r-15	A	NA	A	A	P	NP	NP	NP
r-16	A	A	A	A	P	P	P	P
r-17	A	A	A	A	P	P	P	NP
r-18	A	A	A	A	NP	NP	P	P
r-19	A	A	A	A	NP	P	P	P
r-20	A	A	A	A	P	P	NP	P
r-21	A	A	A	A	P	P	P	P
r-22	A	A	A	A	P	P	P	P

从表 4 可以看出, 22 对白菜/油菜 EST-SSR 引物, 在 10 个遗传背景差异很大的油菜品种中均有扩增产物, 除 3 对引物(即引物 r-1、r-18 和 r-19)外, 其余 19 对引物在供试的油菜品种间扩增产物均显示多态性; 分别有 18, 21 和 22 对引物在大豆、小麦和玉米中有扩增产物, 引物可扩增率分别为 81.8%, 95.4% 和 100%; 分别有 15, 11 和 17 对引物在大豆、小麦、玉米中的扩增产物显示多态性, 分别占可扩增引物的 83.3%, 52.4% 和 77.3%。

从表 4 还可以看出, 在 22 对白菜/油菜 EST-SSR 引物中, 有 18 对引物在双子叶作物油菜和大豆中均有扩增产物, 占所选引物的 81.8%, 其中 13 对引物在这 2 种作物中的扩增产物都显示多态性, 占可扩增引物的 72.2%。有 21 对引物在单子叶作物小麦和玉米中均有扩增产物, 占所选引物的 95.4%, 其中 10 对引物在这两种作物中的扩增产物均显示多态性, 占可扩增引物的 47.6%。

22 对白菜/油菜 EST-SSR 引物中, 有 7 对引物, 即 r-9、r-11、r-13、r-14、r-16、r-21 和 r-22 在 4 种供试作物中的扩增产物均显示多态性, 占可扩增引物的 38.9%。由此可见, 白菜/油菜的 EST-SSR 引物在油菜、大豆、小麦和玉米中可扩增率较高, 且扩增产物有一定频率的多态性。

结合表 2 可以看出, 在供试的单、双子叶作物中, 扩增产物均显示多态性的 EST-SSR 引物, 其所对应的基因分别编码的是 40S 核糖体蛋白 S10、泛素/核糖体蛋白、GTP 结合蛋白、snRNP 核心蛋白 D2、黄体酮结合蛋白同源物 Atmp2。这些基因同样对单、双子叶作物的生长发育有重要意义。

3 讨 论

3.1 单、双子叶作物间 EST-SSR 引物和标记的通用性

近年来的研究表明, 根据特定物种 EST 开发的 SSR 引物具有通用性, 即在其近缘物种和亲缘关系较远的物种中均有扩增产物^[4,10,12]。但是在不同物种中的扩增产物是否具有多态性, 成为判断 EST-SSR 能否用作有效遗传标记和是否有应用价值的关键。忻雅等^[6]根据白菜的 EST 序列设计了 28 对引物, 显示多态性的引物为 18 对, 这些引物在油菜中完全可用, 且有 13 对引物产生多态性扩增。郑丽珊等^[11]用 1 343 对棉花 EST-SSR 引物在香蕉品种中进行扩增, 得到 226 对有效扩增的引物, 经过进一步筛选, 得到具有多态性的引物 157 对。这些具有物

种间多态性的 EST-SSR 位点, 通常是某一特定的基因或性状的遗传表达位点, 可作为特定功能基因快速筛选的有效手段。因此, EST-SSR 引物在物种间的通用性及其扩增产物的多态性, 可为开发物种间通用的功能基因标记奠定良好的工作基础。将作物间可通用的 EST-SSR 引物在不同物种间进行扩增, 可以建立各物种间与特定功能基因表达相关的有效分子标记。

前人研究了小麦^[4]和陆地棉^[11-12] EST-SSR 引物在其他单、双子叶作物中的通用性, 结果发现, 亲缘关系较远的单、双子叶植物间 EST-SSR 引物有一定的可通用性。本研究选用已开发的 30 对小麦 EST-SSR 引物和 22 对白菜/油菜 EST-SSR 引物, 在遗传背景差异较大的 4 种作物, 即小麦、玉米、油菜和大豆等品种中进行 PCR 扩增, 探索单、双子叶作物间 EST-SSR 引物的通用性和 EST-SSR 标记的可转化性, 结果表明, 小麦 EST-SSR 引物和白菜/油菜 EST-SSR 引物, 在供试的 4 种作物中可扩增率均较高, 且扩增产物有一定频率的多态性, 因此, 在单、双子叶作物间建立可转化 EST-SSR 标记是可行的。

建立作物间通用的 EST-SSR 标记体系, 将极大提高与作物优良性状相关的功能基因的筛选和利用效率。因此, 开发和建立更多的作物间可通用 EST-SSR 标记具有重要意义。但应该提及的是, 本研究选取的 EST-SSR 引物的数量和供试材料的种类较为有限, 开发并建立作物间可通用的 EST-SSR 标记的研究还有待进一步加强。

3.2 单、双子叶作物间可通用 EST-SSR 引物和标记相关基因的功能

李宏伟等^[4]发现, 在小麦、玉米、水稻、大豆中可扩增的小麦 EST-SSR 引物所对应的基因, 主要与蛋白质定位、细胞防御与衰老死亡、代谢、能量与转录等功能有关。本研究发现, 在供试的单、双子叶作物中, 扩增产物均具有多态性的小麦 EST-SSR 所在的 EST, 涉及执行贮藏、核酸的转录和复制、代谢催化等基础功能的基因。另外本研究还发现, 在双子叶作物油菜和大豆中, 扩增产物均具有多态性的白菜/油菜 EST-SSR 标记所处的基因, 涉及贮藏、基因剪切和转录翻译、催化氧化还原反应和蛋白质合成、细胞通讯、细胞衰老死亡等多种生物功能; 在供试的 4 个物种中, 扩增产物都具有多态性的白菜/油菜 EST-SSR 和小麦 EST-SSR 所在的 EST 所涉及的基因基本相同。这与前人的报道基本一致^[4]。

由于 EST 来源于编码区 DNA, 因此其在物种

间的保守程度较高。本研究发现,在单、双子叶作物间可通用的 EST-SSR 引物,其所对应的 EST 涉及生物体执行核心功能的基因,例如核酸的转录和复制、代谢催化、蛋白质合成等。但是这些 EST-SSR 引物又在不同作物中具有扩增多态性,暗示着在不同物种间,这些重要功能基因在功能上相对保守而在碱基序列上有所差异;同时,这种差异的存在也为开发物种间可转化 EST-SSR 标记提供了理论支持。

【参考文献】

- [1] Gupta P K, Balyan H S, Sharma P C, et al. Microsatellite in plants: a new class of molecular markers [J]. *Curr Sci*, 1996, 70: 45-54.
- [2] Powell W, Machray G C, Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats [J]. *Trends Plant Sci*, 1996, 1: 215-222.
- [3] Eujay I, Sorrells M, Baum M, et al. Assessment of genotypic variation among cultivated durum wheat based on EST-SSR and genomic SSRs [J]. *Euphytica*, 2001, 119: 39-43.
- [4] 李宏伟, 刘曙东, 高丽锋, 等. 小麦 EST-SSRs 的通用性研究 [J]. *植物遗传资源学报*, 2003, 4(3): 252-255.
Li H W, Liu S D, Gao L F, et al. Study on the transferability of wheat EST-SSRs [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2003, 4(3): 252-255. (in Chinese)
- [5] 李小白, 张明龙, 崔海瑞. 油菜 EST-SSR 标记的建立 [J]. *分子细胞生物学报*, 2007, 29(1): 20-25.
Li X B, Zhang M L, Cui H R. Analysis of SSR information in EST resource of oilseed rape [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2007, 29(1): 20-25. (in Chinese)
- [6] 忻雅, 崔海瑞, 张明龙, 等. 白菜的 EST 标记及其对油菜的通用性 [J]. *遗传*, 2005, 27(3): 410-416.
Xin Y, Cui H R, Zhang M L, et al. Development of EST (Expressed Sequence Tags) marker in Chinese cabbage and its transferability to rapeseed [J]. *Hered Itas*, 2005, 27(3): 410-416. (in Chinese)
- [7] Cordeiro G M, Casu R, McIntyre C L, et al. Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to erianthus and sorghum [J]. *Plant Sci*, 2001, 160: 1115-1123.
- [8] Scott K D, Eggler P, Seaton G, et al. Analysis of SSRs derived from grape ESTs [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 723-726.
- [9] Gao L F, Tang J F, Li H W, et al. Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches [J]. *Molecular Breeding*, 2003, 12(3): 245-261.
- [10] Zhang L Y, Bernard M, Leroy P, et al. High transferability of bread wheat EST-derived SSRs to other cereals [J]. *Theor Appl Genet*, 2005, 111: 677-687.
- [11] 郑丽珊, 石玉真, 王静毅, 等. 棉花 EST-SSRs 在香蕉中的通用性 [J]. *中国农学通报*, 2008, 24(1): 33-37.
Zheng L S, Shi Y Z, Wang J Y, et al. Transferability of cotton EST-SSRs markers to musa [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2008, 24(1): 33-37. (in Chinese)
- [12] 陈树林, 王沛政, 胡保民, 等. 陆地棉 EST-SSRs 在向向日葵中的通用性研究 [J]. *西北植物学报*, 2006, 26(3): 502-506.
Chen S L, Wang P Z, Hu B M, et al. Transferability of upland cotton EST-SSRs to sunflower [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2006, 26(3): 502-506. (in Chinese)
- [13] 徐建堂, 祁建民, 方平平, 等. CTAB 法提取红麻总 DNA 技术优化与 ISSR 和 SRAP 扩增效果 [J]. *中国麻业科学*, 2007, 29(4): 179-183.
Xu J T, Qi J M, Fang P P, et al. Optimized CTAB protocol for extracting genomic DNA from Kenaf and improved PCR amplifications of ISSR and SRAP [J]. *Plant Fiber Sciences in China*, 2007, 29(4): 179-183. (in Chinese)
- [14] 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: 805-818.
- [15] Peng J H, Lapitan N L. Characterization of EST-derived microsatellites in the wheat genome and development of eSSR markers [J]. *Funct Integr Genomics*, 2005, 5: 80-96.
- [16] Yu J K, La Rota M, Kantety R V, et al. EST derived SSR markers for comparative mapping in wheat and rice [J]. *Mol Genet Genomics*, 2004, 271: 742-751.
- [17] 赵 翀, 刘法央, 郭玉霞, 等. AFLP 荧光标记和银染技术的比较分析 [J]. *甘肃农业大学学报*, 2007(2): 125-129.
Zhao C, Liu F Y, Guo Y X, et al. Comparison between fluorescence labeling and silver-staining techniques of AFLP [J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2007(2): 125-129. (in Chinese)