

研究报告

Research report

菠菜性别相关 EST-SSR 标记的开发及应用

邓传良[✉], 高俊[✉], 曹莹[✉], 秦瑞云[✉], 高武军[✉], 卢龙斗[✉]

河南师范大学生命科学学院, 新乡, 453007

✉ 通讯作者: dcl75@163.com ✉ 作者

分子植物育种, 2012年, 第10卷, 第48篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0048

收稿日期: 2012年06月07日

接受日期: 2012年08月21日

发表日期: 2012年11月05日

本文首次发表在《基因组学与应用生物学》(2012年第31卷第5期467-472页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

邓传良等, 2012, 菠菜性别相关 EST-SSR 标记的开发及应用, 分子植物育种(online) Vol.10 No.48 pp.1354-1359 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0048)

引用格式(英文):

Deng et al., 2012, Development and Application of Sex-specific EST-SSR Marker in Spinach (*Spinacia oleracea* L.), Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.48 pp.1354-1359 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0048)

摘要 转为了明确菠菜 EST 序列中 SSR 的总体特点, 开发菠菜 EST-SSR 引物; 为利用 EST-SSR 引物进行菠菜性别相关特异序列的克隆奠定基础, 本文从 NCBI 上获得 1 093 条 EST, 并利用在线软件 SSRIT 检测所含 SSR 序列, 并进行分析。共检索出 68 条 SSR 序列, 分布于 64 条 EST 中, 检出率为 6.22%, 包括 22 种重复基元。其中二核苷酸重复基元的 EST-SSR 占主导地位, 占总 SSR 数目的 32.3%。利用在线引物设计软件 Primer 3.0 设计了 7 对 EST-SSR 引物, 在适合的 PCR 反应体系下, 分别以雌、雄菠菜 DNA 基因组为模板, 对设计的 EST-SSR 引物进行筛选, 结果显示以 EST 序列 HS097148 设计的一对引物从菠菜雌雄基因组中扩增出一条雄性特异的条带, 表明通过菠菜 EST-SSR 引物获得菠菜性别相关特异序列是可行的。
关键词 菠菜; 表达序列标签; 微卫星

Development and Application of Sex-specific EST-SSR Marker in Spinach (*Spinacia oleracea* L.)

Deng Chuanliang[✉], Gao Jun[✉], Cao Ying[✉], Qin Ruiyun[✉], Gao Wujun[✉], Lu Longdou[✉]

College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang, 453007

✉ Corresponding author, dcl75@163.com ✉ Authors

Abstract The objective of this study was to characterize spinach SSRs derived from ESTs and to develop EST-SSR markers for possible use of the markers in the studies of cloning sex-specific fragment from spinach (*Spinacia oleracea* L.). 1 093 ESTs of spinach were obtained from NCBI database, which were detected and analyzed by on-line software SSRIT. 68 SSR sequences were obtained, distributing throughout 64 ESTs. The frequency of these EST-SSRs was 6.22%, including 22 dominant type repeat unit. Among them, dinucleotide repeats was dominant, account for 32.3% of all SSR sequences. 7 pair of EST-SSR primers were designed by on-line software Primer 3.0. The designed EST-SSR primers were screened with optimational PCR condition based on the male and female spinach genomic DNA as template respectively. Results showed that a pair of primer derived from EST HS097148 could amplify a male specific band, indicating that a possible method to clone sex-specific fragment from spinach was established through developing EST-SSR marker from spinach EST database.

Keywords Spinach; Expressed sequence tag; Microsatellite

中菠菜(*Spinacia oleracea* L.)别名波斯菜、赤根菜, 系藜科(Chenopodiaceae)菠菜属(*Spinacia*), 是具有2n=12条染色体的二倍体雌雄异株植物, 是重要的蔬菜作物。由于不同性别的菠菜经济价值不同, 因此, 寻找菠菜雌、雄基因组之间的差异, 克隆菠菜性别决定的基因对于菠菜性别的早期鉴定及分子育种尤显重要。近年来, 有些学者通过核型分析(Lan et al., 2006)、同工酶技术(高武军等, 2006)、

RAPD分子标记(杨金华等, 2009, 江苏农业科学, 2: 40-41)等方法对菠菜的性别分化进行研究。相对于其它分子标记, EST (expressed sequence tags, EST) -SSR标记由于具有非常独特的优点而被广泛应用。目前, 基于EST数据的SSR标记已在一些植物种中成功开发和应用, 如大豆(常玮等, 2009)、棉花(王亚男等, 2010)、花生(柳展基等, 2008)、水稻(忻雅等, 2006)、甘蔗(黄立飞等, 2009)、油菜(李小

白等, 2007)、橡胶树(安泽伟等, 2009)。但国内外对于菠菜性别相关的EST-SSR标记的研究还未见报道。基于此, 本研究对现有NCBI上菠菜EST中的SSR信息进行全面分析, 以明确菠菜EST-SSR发生频率和特点, 并根据EST-SSR序列设计特定引物对菠菜雌、雄基因池进行扩增, 探讨EST-SSR序列在菠菜性别分化研究中的应用。

1 结果和分析

1.1 菠菜EST-SSR分布、频率与特点

对来自NCBI数据库1 093条菠菜EST进行SSR搜索, 含SSR的EST共64条, 占EST总数的5.86%。

1 093条EST序列全长为633.516 kb, 共含有68个SSR, 其中二核苷酸重复基元占主导地位, 出现22次, 占总SSR的32.3%。其次为三核苷酸和五核苷酸重复基元, 两者发生频率基本相近, 分别出现17次和18次, 占总SSR的25.0%和26.5%。四核苷酸重复基元和六核苷酸重复基元分别占1.5%和14.7% (表1)。

在所有的SSR中, 共包括22种重复基元(不包括类似于转座子或逆转子中可见到的复杂重复)。其中以二核苷酸GA/CT和五核苷酸ACCAA占绝对优势, 分别占总SSR的22.06%和17.65%。其它类型的重复基元频率都很低(表2)。

表1 菠菜EST中SSR的出现频率

Table 1 Frequency of SSRs occurred in ESTs of spinach

重复类型	重复基元种类	SSR 数	占全部 SSR 比例 (%)	出现频率 (kb)
Repeat type	Repeat primitives number	SSR number	Proportion by total SSR (%)	Frequency (kb)
二核苷酸	3	22	32.3	28.80
Dinucleotide				
三核苷酸	7	17	25	37.27
Trinucleotide				
四核苷酸	1	1	1.5	633.52
Tetranucleotide				
五核苷酸	3	18	26.5	35.20
Pentanucleotide				
六核苷酸	8	10	14.7	63.35
Hexanucleotide				
总计	22	68	100	633.516
Total				

表2 菠菜EST中SSR重复基元类型

Table 2 The repeat types of SSRs in ESTs of spinach

重复类型	重复碱基	出现数量	发生频率(%)	比例(%)
Repeat type	Repeat primitive	Occurred No.	Frequency (%)	Proportion (%)
二核苷酸	GA/CT	15	1.37	22.06
Dinucleotide	TC/AG	6	0.55	8.82
	AC	1	0.09	1.47
三核苷酸	AGA	6	0.55	8.82
Trinucleotide	GAG	4	0.37	5.88
	GGT	2	0.18	2.94
	AAG	2	0.18	2.94
	CTT	1	0.09	1.47
	CAA	1	0.09	1.47
	AAC	1	0.09	1.47

续表 2

Continuing table 2

重复类型 Repeat type	重复碱基 Repeat primitive	出现数量 Occurred No.	发生频率(%) Frequency (%)	比例(%) Proportion (%)
四核苷酸 Tetranucleotide	CAGC	1	0.09	1.47
五核苷酸 Pentanucleotide	ACCAA	12	1.10	17.65
六核苷酸 Hexanucleotide	TTTGG	5	0.46	7.35
	TTCTT	1	0.09	1.47
六核苷酸 Hexanucleotide	TCTCCT	2	0.18	2.94
	GAAGCA	2	0.18	2.94
	GTTATT	1	0.09	1.47
	CCATCT	1	0.09	1.47
	TGCTTC	1	0.09	1.47
	CCATCA	1	0.09	1.47
六核苷酸 Hexanucleotide	GCTTTT	1	0.09	1.47
	AAAAAT	1	0.09	1.47

从重复基元的重复特性来看, 菠菜的EST-SSR重复基元可分为完全重复基元 and 不完全重复基元, 分别为48个和20个, 所占百分比为70.59%和29.41%,

完全重复占绝对优势(表3)。菠菜EST中SSR的平均长度约23.49 bp, 不同的SSR长度有很大差异, 最短的为15 bp, 最长的为36 bp。

表3 菠菜EST中SSR重复长度和性质

Table 3 The repeat length and attribute of SSRs in ESTs of Spinach

重复类型 Repeat type	长度(bp) Length (bp)		重复性质 Repeat attribute		总计 Total
	变化范围 Variation	平均长度 Average length	完全重复 Complete repeat	不完全重复 Incomplete repeat	
	二核苷酸 Dinucleotide	16~36	35.45	14	
三核苷酸 Trinucleotide	18~30	20.65	13	4	17
四核苷酸 Tetranucleotide	16	16.00	0	1	1
五核苷酸 Pentanucleotide	15	15.00	17	1	18
六核苷酸 Hexanucleotide	18	18.00	4	6	10
总计 Total	15~36	23.49	48	20	68

1.2 EST-SSR引物的筛选及应用

利用根据以上筛选出的菠菜EST-SSR设计的引

物对, 对菠菜雌、雄基因组进行了PCR扩增验证。结果表明, 基于菠菜EST序列HS097148设计的引物

对EST-SS RP03在菠菜雌、雄株基因组中出现多态性。在雄性基因组中扩增出一条分子量大约200 bp的条带(图1)。

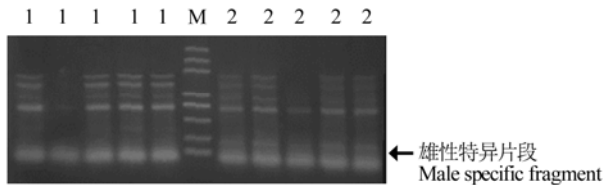


图1 EST-SSRP03引物对雌、雄基因组的PCR扩增结果
Figure 1 PCR amplification pattern of male and female genome using EST-SSRP03 primer pair

2讨论

2.1菠菜EST-SSRs的分布特点

植物EST-SSR序列总的检出率和不同重复基元的频率不仅取决于序列的冗余程度,也与搜索软件、搜索标准和收集数据有关(Yan et al., 2008)。一般情况下,当最小重复长度设置为20 bp时,大多植物种类EST中SSR的检出率大约为5% (Varshney et al., 2005)。本研究从1 093条菠菜EST序列中,检出68个SSR标记,检出率6.22%,略高于大多数植物报道的检出率。

一般来说, EST-SSR标记在同一种属物种内具有良好通用性(Poncet et al., 2006)。但不同种属物种中重复类型出现的频率和所占比例有一定差异(常玮等, 2009)。根据以往报道,三核苷酸(trinucleotide repeat, TNRs)和二核苷酸重复类型(dinucleotide repeat, DNRs)的EST-SSR最为常见。如Varshney等(2002)等报道在禾谷类作物中TNRs所占比例最高(54%~78%),其次为DNRs (17.1%~40.4%)和TTNRs (3%~6%)。另外在小麦(Gupta et al., 2003)、葡萄(Scott et al., 2000)、柑橘(江东等, 2006)、苜蓿(Eujayl et al., 2004)、棉花(王长彪等, 2006, 科学通报, 51(3): 316-320)中,都以三核苷酸重复为主。而本研究中统计得到的菠菜重复基元类型分布以DNRs最多,占总数的32.3%。在二核苷酸重复中,出现频率最多的重复基元是GA/CT,这与在水稻、玉米、大豆、高粱中得到的结果是一致的(Li et al., 2008)。

2.2建立菠菜EST-SSR标记的潜力与局限性

与其它分子标记相比, EST-SSR标记具有很多独特的优点。EST-SSR分子标记不仅可以用于遗传多样性、物种起源进化及比较基因组学等研究,由

于EST-SSR直接来源于表达基因编码区序列,因而如对不同表现型的同类物种间差异EST-SSR进行比对筛选,在获得的特异性EST-SSR背后就代表着某特异性表达基因,可进行功能基因的发现与定位相关研究。本研究中,利用EST-SSR引物序列从雄性基因组中扩增出一条分子量为200 bp左右的特异性条带,因此推测该片段可能与菠菜性别分化相关,这为菠菜性别分化基因的克隆及早期性别鉴定奠定了基础。

目前,对菠菜进行EST-SSR开发与应用还存在很多局限性。NCBI database数据库中收录的菠菜EST序列数目很少,仅有1 093条。而一些主要的粮食或经济作物已收录的EST序列,已达几十万甚至几百万条。在这些物种中进行EST-SSR标记的开发结果也更丰富,更具有代表性。相信随着菠菜中新的EST序列被发现,利用EST进行研究的前景将更广阔。总之,本研究根据NCBI数据库中现有的菠菜EST资源,在明确了菠菜EST中的SSR信息后建立了EST-SSR标记并应用到菠菜性别分化的研究中。结果表明,基于菠菜EST数据开发菠菜性别相关的EST-SSR标记的方法是切实可行的。

3材料与方法

3.1植物材料和DNA提取

菠菜植株取自河南师范大学生物科学学院实验田。分别选取已知性别的雌、雄菠菜植株新鲜幼叶,然后将其洗净、晾干,液氮中研磨,采用改良的2×CTAB法提取DNA。

3.2 EST序列获得和预处理

从NCBI (美国国立生物技术信息中心)数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中查找菠菜EST,共计1 093条(截止2011年5月)。对该1 093条EST序列,利用在线软件EST-trimmer (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>)除去其中的ploy A/T尾和载体等序列。并利用在线软件Repeat Masker (<http://www.Repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>)搜索重复序列。

3.3菠菜EST中SSR信息分析

利用在线软件SSRIT (<http://www.gramene.org/db/markers/ssrtool>)搜索SSR。检索标准为二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸重复序列重复次数分别大于或等于8、5、4、3、3。

3.4 EST-SSR引物设计与合成

利用引物设计软件Primer 3.0设计了7对菠菜

EST-SSR引物(表4)。设计引物时主要有以下要求: EST序列长度大于100 bp; SSR序列的开始和结束位置分别距5'和3'端不少于20 bp; 引物长度18~24 bp; 退火温度 T_m 值介于40.4~65.4℃, 且上

下游引物复性温度相差不大于5℃; GC含量为40%~60%; 预期扩增产物100~500 bp; 尽量避免引物二聚体、错配和发夹及颈环结构等(安泽伟等, 2009)。

表4 7 对菠菜EST-SSR序列引物

Table 4 7 EST-SSR primers designed from spinach EST sequences

引物编号 Primer code	SSH基元 SSH motif	来源EST编号 ESTcode	T_m (°C)	GC (%)	序列(F:5'-3'; R: 3'-5') Sequences (F: 5'-3'; R: 3'-5')
P01	(CAC)6	HS097056	60.00	38.89 50.00	F: AACTCTCACGCATTCA R: GTGGTGGTGGTGTATGA
P02	(GGTTTT)4	HS097067	60.00	47.37 42.11	F: ATCACTCTACGACGATGG R: AGGACGAAGTTCAACAAGA
P03	(CAG)5	HS097148	60.00	40.00 50.00	F: AGTTCGTGTTTCATCATAGGT R: CAGCAGGAGGAATGTTGT
P04	(GCA)5	HS097173	60.00	42.11 42.11	F: AGCAGCAGCATAACATCAA R: AATCTTGGTTGGCTTCACA
P05	(TGT)5	HS097184	60.00	40.00 47.37	F: AGAAGTTCCTGTGTTGTTGT R: CAAACCCTAGTGCCGTAAT
P06	(AAGAT)5	HS097198	60.00	40.91 55.56	F: AGAGAAGAGAAGAGAAGAGAAG R: TGGAGGTTGTTGGATGGA
P07	(TAT)6	HS097215	60.00	50.00 40.00	F: CCTTGGTTGGATGGTGTA R: CACAGACATACTGTAGTTGA

3.5 PCR扩增和琼脂糖凝胶电泳

设置25 μ L的PCR反应体系: 1 \times Taq DNA聚合酶缓冲液、2.5 mmol/L MgCl₂、0.5 U DNA Polymerase、200 μ mol/L dNTP、上下游引物各0.25 μ mol、模板DNA 100 ng。所用试剂购自宝生物工程(大连)有限公司。温度循环条件: 95℃预变性5 min; 循环步骤为94℃ 1 min、60℃ 1 min、72℃ 2 min共45个循环; 最后72℃延伸10 min。

琼脂糖凝胶电泳: 扩增后的产物与6 \times loading buffer混合, 经过3.0%的琼脂糖凝胶(TBE缓冲液, 含EB 0.5 μ g/ml, 100 V电压)电泳分离, 检测扩增产物的可用性和多态性。用Gel Doc EZ成像系统进行观察、拍照和分析。

作者贡献

第一兼通讯作者邓传良确立了本论文的总思路, 对研究过程中存在的问题进行指导并进行论文的修改; 第二作者高俊和第三作者曹莹共同完成了本文研究中的实际工作, 并进行了本论文的起草; 其它作者秦瑞云、高武军和卢龙斗在实验过程中给予了很多帮助和指导, 并对论文

的修改提出了一些建议。

致谢

本论文得到国家自然科学基金项目(编号: 31000165), 河南师范大学校青年骨干教师项目资助, 在此表示

参考文献

- An Z.W., Zhao Y.H., Cheng H., Li W.G., and Huang H.S., 2009, Development and application of EST-SSR markers in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg., *Hereditas*, 31(3): 311-319 (安泽伟, 赵彦宏, 程汉, 李维国, 黄华孙, 2009, 橡胶树 EST-SSR标记的开发与应用, *遗传*, 31(3): 311-319)
- Chang W., Zhao X., Li X., Qiu B., Han Y.P., Teng W.L., and Li W.B., 2009, Development of soybean EST-SSR marker and comparison with genomic-SSR marker, *Zhongguo You-liaozuowu Xuebao* (Chinese Journal of Oil Crop Sciences), 31(2): 149-156 (常玮, 赵雪, 李侠, 邱波, 韩英鹏, 滕伟丽, 李文滨, 2009, 大豆EST-SSR标记开发及与Genomic-SSR的比较研究, *中国油料作物学报*, 31(2): 149-156)
- Eujayl I., Sledge M.K., Wang L., May G.D., Chekhovskiy K., Zwonitzer J.C., and Mian M.A., 2004, *Medicago*

- truncatula EST-SSRs reveal cross-species genetic markers for *Medicago* spp, *Theor. Appl. Genet.*, 108(3): 414-422 <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-003-1450-6> PMID:1367-9975
- Gao W.J., Xiao L.H., Lu L.D., and Li S.P., 2006, Analysis of sex-related isozyme marker in dioecious *Spinacia Oleracea*, *Henan Shifan Daxue Xuebao (Ziranhexue Ban) (Journal of Henan Normal University (Natural Science))*, (4): 147-150 (高武军, 肖理会, 卢龙斗, 李锁平, 2006, 菠菜的性别相关同工酶标记分析, 河南师范大学学报(自然科学版), (4): 147-150)
- Gupta P.K., Rustgi S., Sharma S., Singh R., Kumar N., and Balyan H.S., 2003, Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat, *Molecular Genetics and Genomics*, 270(4): 315-323 <http://dx.doi.org/10.1007/s00438-003-0921-4> PMID:1450-8680
- Huang L.F., Fang B.P., Chen J.Y., Zhang X.J., and Luo Z.X., 2009, Analysis of SSR information in EST resource of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam), *Zhiwu Shengli Tongxun (Plant Physiology Communications)*, 45(1): 23-27 (黄立飞, 方伯平, 陈景益, 张雄坚, 罗忠霞, 2009, 甘薯 EST资源的SSR信息分析, 植物生理通讯, 45(1): 23-27)
- Jiang D., Zhong G.Y., and Hong Q.B., 2006, Analysis of microsatellites in citrus unigenes, *Yichuan Xuebao (Acta Genetica Sinica)*, 33(4): 345-353 (江东, 钟广炎, 洪棋斌, 2006, 柑橘EST-SSR分子标记分析, 遗传学报, 33(4): 345-353) (Chinese journal in English)
- Lan T., Zhang S., Liu B., Li X., Chen R., and Song W., 2006, Differentiating sex chromosomes of the dioecious *Spinacia oleracea* L. (spinach) by FISH of 45S rDNA, *Cytogenet. Genome Res.*, 114(2): 175-177 <http://dx.doi.org/10.1159/000093335> PMID:16825771
- Li L.Z., Wang J.J., Guo Y., Jiang F.S., Xu Y.F., Wang Y.Y., Pan H.T., Han G.Z., Li R.J., and Li S.S., 2008, Development of SSR markers from ESTs of gramineous species and their chromosome location on wheat, *Progress in Natural Science*, 18(12): 1485-1490 <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnsc.2008.05.012>
- Li X.B., Zhang M.L., and Cui H.R., 2007, Analysis of SSR information in EST resource of oilseed rape, *Zhongguo Youliao Zuowu Xuebao (Chinese Journal of Oil Crop Sciences)*, 29(1): 20-25 (李小白, 张明龙, 崔海瑞, 2007, 油菜EST资源的SSR信息分析, 中国油料作物学报, 29(1): 20-25)
- Liu Z.J., Sun P., and Bu X., 2008, Analysis of SSR information in EST resource of peanut, *Huasheng Xuebao (Journal of Peanut Science)*, 37(4): 6-11 (柳展基, 孙萍, 步迅, 2008, 花生EST资源的SSR信息分析, 花生学报, 37(4): 6-11)
- Poncet V., Rondeau M., Tranchant C., Cayrel A., amon S., de Kochko A., and Hamon P., 2006, SSR mining in coffee tree EST databases: Potential use of EST-SSRs as markers for the *Coffea* genus, *Molecular Genetics and Genomics*, 276(5): 436-449 <http://dx.doi.org/10.1007/s00438-006-0153-5> PMID:16924545
- Scott K.D., Egger P., Seaton G., Rossetto M., Ablett E.M., Lee L.S., and Henry R.J., 2000, Analysis of SSRs derived from grape ESTs, *Theor. Appl. Genet.*, 100: 723-726 <http://dx.doi.org/10.1007/s001220051344>
- Wang Y.N., Chen Y.F., Fan H.H., Li Y.C., Lin Y., and Cai Y.P., 2010, Relationship analysis between length of ESTs and Characters of EST-SSR for *Gossypium hirsutum*, *Shengwu Jishu (Biotechnology)*, 20(1): 1-4 (王亚男, 陈允峰, 樊洪泓, 李延春, 林毅, 蔡永萍, 2010, 陆地棉 EST长度多态性与其SSR分布特征相关性分析, 生物技术, 20(1): 1-4)
- Xin Y., Cui H.R., Lu M.Z., Yao Y.L., Jin J.Q., Lin R.S., and Cui S.L., 2006, Data mining for SSRs in ESTs and EST-SSR marker development in Chinese cabbage, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, (3): 549-554 (忻雅, 崔海瑞, 卢美贞, 姚艳玲, 金基强, 林容杓, 崔水莲, 2006, 白菜 EST-SS信息分析与标记的建立, 园艺学报, (3): 549-554)
- Yan Q.L., Zhang Y.H., Li H.B., Wei C.H., Niu L.L., Guan S., Li S.G., and Du L.X., 2008, Identification of microsatellites in cattle unigenes, *Journal of Genetics and Genomics*, 35(5): 261-266 [http://dx.doi.org/10.1016/S1673-8527\(08\)60037-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1673-8527(08)60037-5)