

EST-SSR 标记在翦股颖上的通用性及其利用

赵 岩^{1,2}, 孔凡美^{1,2}, 王 涛², 李斯深^{1,*}

(¹作物生物学国家重点实验室, 山东农业大学农学院, 山东泰安, 271018; ²山东农业大学资源与环境学院, 山东泰安, 271018)

摘 要: 利用来自小麦、大麦、玉米、高粱、水稻的 1 058 对 EST-SSR 在翦股颖上进行扩增, 得到有效扩增引物 620 对 (58.60%)。其中源于小麦、大麦、玉米、高粱、水稻的引物对数分别为 313 (61.49%)、30 (63.83%)、101 (51.53%)、11 (35.48%)、165 (60.00%)。进一步利用其中 53 个引物对, 对 8 个翦股颖品种进行了遗传多样性分析。有 51 对引物显示了多态性, 占引物数的 94.34%; 共检测到 368 个等位变异, 平均每对引物有 6.9 个等位变异; 多态性信息指数 (*PIC*) 为 0.49 ~ 0.93, 平均为 0.78; 品种间遗传相似系数为 0.48 ~ 0.86, 平均为 0.72。聚类分析结果表明, 在相似系数 0.75 处, 8 个品种可明确的分为两大类, 第 I 类为高地; 第 II 类又可分为两个亚类, II-1 亚类由阿尔法、潘克劳斯、回旋组成, II-2 亚类由普特、L-93、开拓、A4 组成。

关键词: 翦股颖; EST-SSR; 通用性; 遗传多样性

中图分类号: S 688.4

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2010) 03-0485-06

Transferability of EST-SSR Markers on Bentgrasses and Its Application

ZHAO Yan^{1,2}, KONG Fan-mei^{1,2}, WANG Tao², and LI Si-shen^{1,*}

(¹ State Key Laboratory of Crop Biology/College of Agronomy, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; ² College of Resources and Environment, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: Bentgrass is a major cool season turfgrass. Few molecular markers have been developed for bentgrass compared to field crops. In this study, 1 058 EST-SSR primer pairs developed by our lab from wheat, barley, maize, sorghum and rice were screened on bentgrass. Of which, 620 (58.60%) primer pairs showed amplification. Effective primer pairs from wheat, barley, maize, sorghum and rice were 313 (61.49%), 30 (63.83%), 101 (51.53%), 11 (35.48%), and 165 (60.00%), respectively. Furthermore, 53 EST-SSR primers were selected to investigate the genetic relationship of eight bentgrass cultivars, and 51 (94.34%) primer pairs showed polymorphism. In total, 368 alleles were found with an average of 2.69 alleles per primer. The *PIC* (polymorphism information content) for each polymorphic primer varied from 0.49 to 0.93, with an average of 0.78. The average genetic similarity coefficient (*GS*) among the eight cultivars was 0.72 (ranged from 0.48 to 0.86). Clustering analysis indicated that the eight bentgrass cultivars were clustered into two groups based on 0.75 of *GS*. Group I consists only Highland, group II includes the others, which could be divided into two subgroups based on 0.80 of *GS*. The sub-group II-1

收稿日期: 2009 - 07 - 02; 修回日期: 2010 - 02 - 12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (3057155)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: ssls@sda.edu.cn)

includes Alpha, Penncross and Blackspin, The sub-group II-2 includes Putter, L-93, Cato and Penn A4.

Key words: bentgrass; EST-SSR; transferability; genetic diversity

翦股颖 (*Agrostis* L.) 属禾本科 (Poaceae) 早熟禾亚科 (Pooideae), 是重要冷季型草坪草之一, 世界上有 220 余种, 中国有 29 种、10 个变种。其中匍匐翦股颖 (*Agrostis stolonifera* L.)、细弱翦股颖 (*Agrostis tennis* L.) 和绒毛翦股颖 (*Agrostis cannina* L.) 因其在强烈刈割下能产生致密的草皮而作为草坪草被广泛应用于高尔夫球场和园林绿地草坪等 (Warnker et al., 1997)。

EST-SSR 是近年发展起来的基于 EST (expressed sequence tags) 的新型分子标记。与基因组 SSR 相比, EST-SSR 能为功能基因提供“绝对”标记, 开发成本低, 物种间通用性高 (Chen et al., 2005; Zhang et al., 2006)。目前小麦 (Li et al., 2008)、大麦 (Thiel et al., 2003)、白菜 (忻雅 等, 2006)、百合 (杨素丽 等, 2008)、高羊茅 (Saha et al., 2004)、三叶草 (Barrett et al., 2004) 等的 EST-SSR 标记已被开发, 但在翦股颖资源研究中还未见报道。

截止 2010 年 2 月 6 日, NCBI 中注册的翦股颖 EST 仅为 21 656 条 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites>), 难以直接从其中开发大量的 EST-SSR 标记。本研究中利用来自小麦、大麦、玉米、高粱、水稻的 EST-SSR, 检测其在翦股颖上的通用性, 为翦股颖提供新的分子标记, 进一步利用这些新标记分析翦股颖常见品种间的亲缘关系。

1 材料与方法

1.1 植物材料

EST-SSR 标记通用性研究所用的翦股颖品种为普特; 亲缘关系分析所用翦股颖属植物共 8 个品种, 包括细弱翦股颖 (*A. tennis* L.) 高地, 匍匐翦股颖 (*A. stolonifera* L.) 阿尔法、潘克劳斯、回旋、普特、L-93、A4 和开拓。

1.2 EST-SSR 引物

1 058 对 EST-SSR 引物为本实验室开发 (Chen et al., 2005; Li et al., 2008), 由上海生工生物技术工程有限公司合成, 其中来自小麦、大麦、水稻、高粱、玉米的引物分别为 509、47、275、31 和 196 对。

1.3 PCR 扩增与电泳检测

基因组总 DNA 的提取按照 Sharp 等 (1998) 提出的方法。PCR 反应体系为 (20 μ L): 1 \times 缓冲液, 1.5 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂, 0.1 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs, 500 nmol \cdot L⁻¹ 引物, 1 U *Taq* 酶, 60 ng DNA 模板。反应在 Biometra 公司的 T-Gradient 型 PCR 扩增仪上进行。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 50 ~ 65 $^{\circ}$ C 复性 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。产物用 4.5% 的脲变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。DNA marker 为 pBR322。

1.4 数据统计及分析

以扩增条带在相对迁移位置的有无, 赋以“1”或“0”, 生成分子数据矩阵。根据 Botstein 等 (1980) 的方法计算多态性信息含量 (polymorphism information content, PIC):

用 NTSYS pc V2.10 软件计算品种间遗传相似系数 (GS) 和遗传距离 (GD_{ij}, 欧氏距离), 根据 GS 值以不加权重对算术平均法 (UPGMA) 进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 EST-SSR在翦股颖上的通用性

共用 1 058 对 EST-SSR 引物对翦股颖进行了检测, 有 620 个引物对 (58.60%) 能扩增出稳定清晰带型。其中, 源于小麦、大麦、玉米、高粱和水稻的引物对数及有效扩增比例分别为 313 (61.49%)、30 (63.83%)、101 (51.53%)、11 (35.48%) 和 165 (60.00%)。通用性高低依次为: 大麦、小麦、水稻、玉米、高粱 (表 1)。

620 对 EST-SSR 引物在翦股颖中共扩增出 1 447 条清晰带, 单个引物对最高扩增带 6 条, 平均 2.33 条, 扩增片段大小 80~800 bp。其中, 源于高粱、大麦、玉米、小麦和水稻的 EST-SSR 引物平均扩增条带数分别为 2.64、2.63、2.50、2.32 和 2.19。从 EST-SSR 引物的核苷酸重复数来看 (表 2), 以二核苷酸重复的 EST-SSR 引物扩增率最高, 为 60.99%, 五核苷酸重复的 EST-SSR 引物扩增率最低, 为 53.88%, 两者相差 7.11 个百分点。

表 1 不同作物 EST-SSR 标记在翦股颖中的 PCR 扩增结果
Table 1 PCR amplification results of EST-SSR markers derived from different crops in bentgrass

来源作物 Origin crops	引物数 Number of primer pairs	有效引物数 Number of effective primer pairs	百分比/% Percentage	扩增片段长/bp Sizes of amplified fragments	最高扩增带数 Number max amplified bands	平均扩增带数 Average of amplified bands
小麦 Wheat	509	313	61.49	80~800	6	2.32
大麦 Barley	47	30	63.83	80~620	6	2.63
玉米 Maize	196	101	51.53	120~700	6	2.50
高粱 Sorghum	31	11	35.48	90~650	6	2.64
水稻 Rice	275	165	60.00	105~650	6	2.19
总计 Total	1058	620	58.60	80~800	6	2.30

表 2 不同核苷酸重复 EST-SSR 的 PCR 扩增结果
Table 2 PCR amplification results of EST-SSR markers with different motif in bentgrass

核苷酸重复类型 Motifs of EST-SSR markers	引物数 Number of primer pairs	有效引物数 Number of effective primer pairs	百分数/% Percentage	平均带数 Average
二核苷酸 Dinucleotide	182	111	60.99	2.32
三核苷酸 Trinucleotide	530	313	59.05	2.30
四核苷酸 Tetranucleotide	140	85	60.71	2.32
五核苷酸 Pentanucleotide	206	111	53.88	2.27
总计 Total	1058	620	58.60	2.30

2.2 基于EST-SSR的翦股颖亲缘关系分析

从 620 个有效扩增的 EST-SSR 引物对中随机挑选 53 对扩增带清晰、条带数较多的引物用于 8 个翦股颖品种的亲缘关系分析 (图 1)。

53 对引物中, 51 对引物表现多态性, 多态性比率为 94.34%。共检测到 368 个等位变异, 每对引物检测出的等位变异数为 2~20, 平均为 6.9 个等位变异。51 对有多态性引物的 *PIC* 值最高为 0.93, 最低为 0.49, 平均为 0.78。根据这 51 对引物扩增产物的数据矩阵, 计算出的 8 份供试材料间平均遗传距离为 0.72, 变化范围为 0.48~0.86。

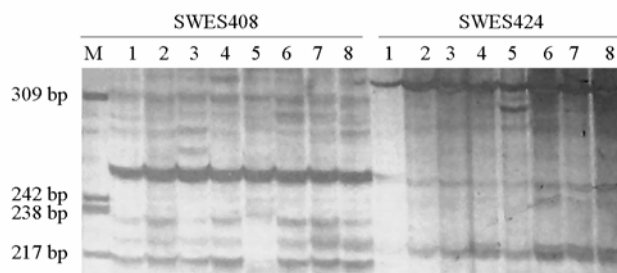


图 1 EST-SSR 引物在翦股颖中的扩增

M. 分子量标准; 1. 阿尔法; 2. 潘克劳斯; 3. 回旋; 4. 普特; 5. 高地;
6. L-93; 7. A4; 8. 开拓。

Fig. 1 Amplification of EST-SSR primer on bentgrasses

M. Marker; 1. Alpha; 2. Penncross; 3. Blackspin; 4. Putter; 5. Highland;
6. L-93; 7. A4; 8. Cato.

利用 NTSYS-PC 软件, 使用 UPGMA 法构建了聚类树 (图 2)。在相似系数为 0.75 水平可分为两大类: I 类是细弱翦股颖 ‘高地’, II 类为匍匐翦股颖, 由阿尔法、潘克劳斯、回旋、普特、L-93、开拓和 A4 等 7 个品种组成。该类在相似系数 0.80 左右的水平上可进一步分为两个亚类, II-1 亚类由阿尔法、潘克劳斯、回旋组成; II-2 亚类由普特、L-93、开拓、A4 组成。

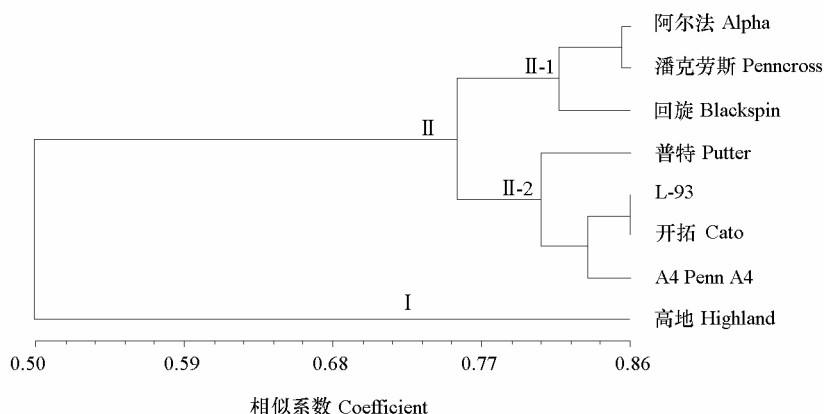


图 2 基于 EST-SSR 标记的翦股颖品种聚类图

Fig. 2 Dendrogram of bentgrass cultivars based on EST-SSR markers

3 讨论

已有几种分子标记应用于翦股颖资源研究, 如 RAPD 标记 (Rajasekar et al., 2007)、RFLP 标记 (Caceres et al., 2000; Chakraborty et al., 2005)、AFLP 标记 (Vergara et al., 2004; Zhao et al., 2006) 和 SRAP 标记 (Dinler et al., 2008) 等。但相对于大田作物, 翦股颖标记数量还很少。本研究中对小麦等 5 种作物的 EST-SSR 标记在翦股颖中的通用性进行了分析, 在 1 058 对 EST-SSR 引物中筛选出 620 对引物能在翦股颖中有效扩增, 为翦股颖增加了新的分子标记。这些标记可以应用于翦股颖的遗传多样性分析、遗传图谱构建、基因定位、指纹图谱分析和标记辅助选择等。

前人研究表明 EST-SSR 标记在物种间通用性较高 (Saha et al., 2004; Yu et al., 2004; Li et al., 2008)。本研究来自小麦、大麦、玉米、高粱、水稻的 1 058 对 EST-SSR 引物在翦股颖中有效扩

增率都较高, 平均为 58.60%, 说明这 5 种作物的 EST-SSR 在翦股颖上有较好的通用性, 这与其它作物通用性研究结果一致。通用性研究结果证实了基于 EST 的 SSR 引物在物种之间的高保守性, 这启示我们利用水稻、小麦等大田作物已开发的大量的 EST-SSR 标记, 在 EST 数据库中数量较少的物种具有良好的前景。

翦股颖品种间遗传关系的信息有限, 这一方面缘于翦股颖是异花授粉植物, 另一方面因为许多品种的亲本来源不清楚 (Warnker et al., 1997; Caceres et al., 2000)。Rotter 等 (2007) 对翦股颖属植物系统进化的研究也表明, 翦股颖的驯化时间较短, 存在广泛基因渐渗。从本试验结果来看, 53 对引物中, 51 对引物表现多态性, 多态性比率为 94.34%, 远远高于 Gupta 等 (2003) 检测面包小麦多样性的结果 (55%) 和忻雅等 (2006) 检测白菜的结果 (46.7%), 这说明我们开发的 EST-SSR 标记能很好的用于翦股颖品种间亲缘关系分析。从基于 EST-SSR 分子标记的翦股颖品种聚类结果可以看出, 高地品种 (细弱翦股颖) 在形态上明显与其它材料 (匍匐翦股颖) 不同, 其遗传距离也最远, 在聚类图上单独聚为一类, 这和 Caceres 等 (2000) 利用 RFLP 分析翦股颖品种的亲缘关系研究结果一致。另外 7 个品种分为两个亚类, 每一亚类内的品种间可能存在较近的亲缘关系, 我们所得翦股颖亲缘关系可为其新品种选育和遗传学研究提供参考。

References

- Barrett B, Griffiths A, Schreiber M, Ellison N, Mercer C, Bouton J, Ong B, Forster J, Sawbridge T, Spangenberg G, Bryan G, Woodfield D. 2004. A microsatellite map of white clover. *Theor Appl Genet*, 109 (3): 596 – 608.
- Botstein D, White R L, Skolnick M, Davis R W. 1980. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 32 (3): 314 – 331.
- Caceres M E, Pulipilli F, Piano E, Arcioni S. 2000. RFLP markers are an effective tool for the identification of creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) cultivars. *Genetic Resour Crop EV*, 47 (4): 455 – 459.
- Chakraborty N, Bae J, Warnke S, Chang T, Jung G. 2005. Linkage map construction in allotetraploid creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.). *Theor Appl Genet*, 111 (4): 795 – 803.
- Chen H M, Li L Z, Wei X Y, Li S S, Lei T D, Hu H Z, Wang H G, Zhang X S. 2005. Development, chromosome location and genetic mapping of EST-SSR markers in wheat. *Chinese Sci Bull*, 50 (20): 2328 – 2336.
- Dinler G, Budak H. 2008. Analysis of expressed sequence tags (ESTs) from *Agrostis* species obtained using sequence related amplified polymorphism. *Biochem Genet*, 46 (9-10): 663 – 676.
- Gupta P K, Rustgi S, Sharma S, Sharma S, Singh R, Kumar N, Balyan, HS. 2003. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Mol Gen Genomics*, 270: 315 – 323.
- 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, Li S S. 2008. Development of SSR markers from ESTs of gramineous species and their chromosome location on wheat. *Prog Nat Sci*, 18 (12): 1485 – 1490.
- Powell W, Machray G C, Provan J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci*, 7: 215 – 222.
- Rajasekar S, Fei S Z, Christians N E. 2007. Analysis of genetic diversity in colonial bentgrass (*Agrostis capillaris* L.) using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Genetic Resour Crop EV*, 54 (1): 45 – 53.
- Rotter D, Bharti A K, Li H M, Luo C, Bonos S A, Bughara S, Jung G, Messing J, Meyer W A, Rudd S, Warnke S E, Belanger F C. 2007. Analysis of EST sequences suggests recent origin of allotetraploid colonial and creeping bentgrasses. *Mol Genet Genomics*, 278 (2): 197 – 209.
- Saha M C, Rouf Mian M A, Eujayl I, Zwonitzer J C, Wang L J, May G D. 2004. Tall fescue EST-SSR markers with transferability across several grass species. *Theor Appl Genet*, 109 (4): 783 – 791.
- Sharp P J, Kreis M, Shewry P R, Gale M D. 1998. Location of beta-amylase sequences in wheat and its relatives. *Theor Appl Genet*, 75: 286 – 290.
- Thiel T, Michalek W, Varshney R K, Graner A. 2003. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived

- SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). Theor Appl Genet, 106(3): 411 - 422.
- Vergara G V, Bughrara S S. 2004. Genetic differentiation of tetraploid creeping bentgrass and hexaploid redtop bentgrass genotypes by AFLP and their use in turfgrass breeding. Crop Sci, 44(3): 884 - 890.
- Warnker S E, Douches D S, Branham B E. 1997. Relationships among creeping bentgrass cultivars based on isozyme polymorphisms. Crop Sci, 37(1): 203 - 207.
- Xin Ya, Cui Hai-rui, Lu Mei-zhen, Yao Yan-ling, Jin Ji-qiang, Lin Rong-biao, 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 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.
- Yu J K, Dake T M, Singh S, Bensch D, Li W L, Gill B, Sorrells M E. 2004. Development and mapping of EST-derived simple sequence repeat markers for hexaploid wheat. Genome, 47(5): 805 - 818.
- Zhang L Y, Ravel C, Bernard M, Balfourier F, Leroy P, Feuillet C, Sourdille P. 2006. Transferable bread wheat EST-SSRs can be useful for phylogenetic studies among the Triticeae species. Theor Appl Genet, 113(3): 407 - 418.
- Zhao H, Bughrara S S, Oliveira J A. 2006. Genetic diversity in colonial bentgrass (*Agrostis capillaris* L.) revealed by *EcoR* I-*Mse* I and *Pst* I-*Mse* I AFLP markers. Genome, 49(4): 328 - 335.

征 订

《中国蔬菜栽培学》(第 2 版) 出版发行

《中国蔬菜栽培学》(第二版)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,并插有近 500 张彩图,可供相关科研人员、农业院校师生、专业技术人员或管理人员等参考。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所《园艺学报》编辑部,邮编 100081。