

# 白菜 EST-SSR 标记的通用性

忻雅<sup>1,2</sup> 崔海瑞<sup>1\*</sup> 张明龙<sup>1</sup> 姚艳玲<sup>1</sup> 卢美贞<sup>1</sup> 金基强<sup>1</sup> 林容杓<sup>3</sup> 崔水莲<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> 浙江大学原子核农业科学研究所, 杭州 310029; <sup>2</sup> 杭州市农业科学研究院生物所, 杭州 310024;

<sup>3</sup> 忠南大学园艺系, 大田 305764, 韩国)

**摘要** EST-SSR 是从表达序列标签(expressed sequence tag, EST)中开发的新型简单序列重复(simple sequence repeat, SSR)标记。根据白菜 EST 设计了 15 对 SSR 引物, 对白菜、油菜、玉米、高粱、水稻和茶树等进行了 PCR, 研究了白菜的 EST-SSR 标记在不同物种间的通用性。所设计的引物对不同白菜品种、近缘种油菜和远缘种玉米、高粱、水稻和茶树的扩增成功率分别为 100%、93.3%、80%、93.3%、93.3% 和 86.7%。在 15 对引物中, 有 11 对在远缘种中都有扩增产物, 而且一些引物可显示多态性, 多态性引物分别占了可扩增引物的 33.3%、28.6%、28.6% 和 61.5%。这些结果表明, 白菜 EST-SSR 引物具有较高的通用性, 这对于比较基因组学研究有重要意义。

根据表达序列标签(expressed sequence tag, EST)而建立的简单序列重复(simple sequence repeat, SSR)标记称为 EST-SSR, 这种新型 SSR 标记正逐渐显现其独特的优越性, 其中很重要的一点就是其通用性。EST 来源于 DNA 编码区, 通常其序列保守性程度较高, 因而 EST-SSR 不同于基因组 SSR, 一旦建立 EST-SSR 标记就可以在一系列相关种中应用。但是, 从 EST 中分离微卫星也有一定复杂性<sup>[1]</sup>。为此, 应进一步探讨不同物种间标记的通用性, 以显著提高标记的利用价值, 增加特定物种的现有标记数目。

Gupta 等<sup>[2]</sup>报道 55.12% 以上的普通小麦 EST-SSR 标记可以在小麦和大麦属中通用, 设计的引物不仅在禾本科作物的单一种内通用, 而且在相关种间也具有通用性。麦类 EST-SSR 的通用性研究已较多<sup>[3-6]</sup>, 紫苜蓿<sup>[7]</sup>、杏<sup>[8]</sup>、葡萄<sup>[8]</sup>、甘蔗<sup>[9]</sup>和高羊茅<sup>[10]</sup>的 EST-SSR 通用性也有研究报道, 但还未见有白菜 EST-SSR 标记通用性的研究文献, 本文探讨了白菜 EST-SSR 标记在相关物种中的通用性。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料与模板 DNA 的提取

本研究采用了 29 个白菜品种、10 个油菜品种、11 个水稻品种、11 个高粱品种、11 个玉米品种和 10 个茶树品种, 材料具体见表 1。其中白菜、油菜、水稻、高粱和玉米材料由浙江大学原子核农业

科学研究所育种室提供, 茶树品种由浙江大学茶学系提供。模板 DNA 提取自各材料的新鲜叶片, 采用改良的 CTAB 法<sup>[11]</sup>。

### 1.2 白菜 EST-SSR 引物的设计合成

用 TRIzol (Gibco, BRL)从大白菜自交系 A 叶片中提取总 RNA 并分离其中 Poly-A mRNA, 按 ZAP-cDNA 试剂盒(Stratagene)合成 cDNA, 将片段长度大于 800 bp 的 cDNA 克隆到 Uni-ZAP XR 载体上, 然后进行测序<sup>[12]</sup>。对获得的 EST 利用 RepeatMasker 程序(<http://repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>)结合人工搜寻, 对其中所含有的 SSR 进行查找。选取部分含有 SSR 的 EST, 采用 Primer3 软件([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi))对其设计引物, 由上海生工生物技术公司合成, 有关这些引物的具体情况见表 2。

### 1.3 通用性检测及多态性评价

首先用 15 对 EST-SSR 引物对 29 个白菜品种进行扩增, 以检测这些引物对源种自交系 A 和其他品种的可用性, 然后进一步分别对 10 个油菜品种、11 个水稻品种、11 个高粱品种、11 个玉米品种和 10 个茶树品种进行 PCR 扩增, 来检测 EST-SSR 在近

收稿日期: 2005-07-18 接受日期: 2005-10-14

韩国科学技术厅资助项目“大白菜分子标记的建立及其定位”的一部分(No.98-0402-0601-5)

\* 通讯作者: Tel: 0571-86971405, Fax: 0571-86971202, E-mail: hrcui@zju.edu.cn

表 1 本研究所用的植物材料

物种	数量	所用品种名称
水稻	11	T9309、G75、全龙 B、白 II 32 号、YH23-2、YH23-6、协青早 B、中浙 B、菲 B、长 II 32B、SY6
高粱	11	KSR、121A、622A、IS21B、鲁 1B、8001、熊杂 2 号、抗四、9198、祁梁 7R、6006R
茶叶	10	乌牛早、龙井 43、政和大白茶、浙农 139、毛蟹、凤凰水仙、浙农 113、香菇寮白毫、水古茶、黄叶早
玉米	11	9801、丹黄 25、C8605、丹 340、444、齐 319、A801、C101、丹 599、黄 C、X178
油菜	10	Topus、汇油 2 号、中双 4 号、安 W-13、夏油 3 号、秦油 3 号、SW1280、hanna、加油 1 号、日本油菜
白菜	29	自交系 A、自交系 B、热优 2 号、早熟 5 号、10383 新、26 新、山东 4 号、蚕白菜、长梗白菜、丰抗 70、丰抗 80、GG1、605、38A、矮蒲头、红明青、杭州油冬儿、上海青、苏州青、高华青梗、四月蔓、香港菜心、矮抗青、黄芽 14、绿宝 2 号、矮箕青、上海青菜抗热 605、五月慢、热优 2 号青梗

表 2 对 15 个白菜 EST-SSR 设计的引物

引物编号	来源 EST 编号	重复模体	预期产物(bp)	Tm	GC%	序列(5'→3')
EST-SSRP001	Num6112400-B05	(CTG)24	244	59.88	45.00	AGCTCGTTGGTTCATTTGCT
				59.52	55.00	GCAACCACAGTTACAGCAGC
EST-SSRP002	Num5112400-A09	(TC)17	213	60.08	50.00	ACGATGAATCCAGTCAAGGC
				59.83	45.00	TAAAACCCTGTTCGTTTGGG
EST-SSRP003	Num18.121100-A09	(TC)14	212	60.02	50.00	TTTCTCCGCCAAGTAGTGCT
				60.07	50.00	GACGGTTACGGAATCGAGAA
EST-SSRP004	Num121900-B11	(CAT)7	199	60.72	45.00	TGCTTGCAGAAAGACGAACA
				59.85	45.00	TTGAGCGTAGGCAGGAAAT
EST-SSRP005	Num17.1209-D06	(CATA)17	293	60.61	60.00	CACGCCTAGCACTGTCTCCT
				59.93	55.00	GGACTCGATGTAGGGGTTGA
EST-SSRP006	Num4111700-F11	(TTC)20	246	60.19	60.00	GGCTCCTCGTTATAGCCTC
				59.96	50.00	ACCAGCTTCCATCCATAACG
EST-SSRP007	Num6112400-A12	(GA)38	251	59.89	50.00	TGGATTAAGACCATCCCAG
				59.89	55.00	AGAAGGAGCTCTGTGAGCG
EST-SSRP008	Num16.1209-B11	(GA)22	220	60.73	55.00	AGATTACTGGAGAAGCCGCC
				59.89	55.00	AGAAGGAGCTCTGTGAGCG
EST-SSRP009	Num20.121100-B03	(GAA)11	169	61.00	31.82	CCAAAACCAATTTAAATGCGA
				59.97	60.00	GGTGGCAGAGGAGAGCATAG
EST-SSRP010	Num19.121100-E08	(TC)16	300	60.03	45.00	AAACCCCTCAAAATGTTCC
				60.13	50.00	AAGAAACAGCAGAGAGGGCA
EST-SSRP011	Num110120800-G07	(TTTC)22	164	60.19	50.00	CCATATCTTCGGGCTTAGCA
				59.60	45.00	AGCTGATCGAAAGAAAACGC
EST-SSRP012	Num3111700-H11	(TCTCC)23	275	60.00	45.00	TTGTTGCTCGAAGCAATGTC
				60.12	45.00	GAAATGCTTGGCCTTGTGT
EST-SSRP013	Num.81201-F01	(GAT)27	245	58.13	45.00	TCTTGATGATGACATGGCTG
				57.12	45.00	TTCTTGTCTCTTCTCCTCG
EST-SSRP014	Num19.121100-E01	(CCA)16	154	59.79	45.00	CATAAACCCGAACCCAGAAA
				59.58	50.00	AGCATCTTTCTCCTCGTGC
EST-SSRP015	BG544428.E2312	(TCCG)22	183	59.55	55.00	GAGTCCACGTGGGTTTCTC
				59.95	55.00	GAGGCAGTCGAAGAAGATGG

缘和远缘种间的通用性。PCR 反应体系(25  $\mu$ l)包括: 10 $\times$  缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl pH=9.0, 400 mmol/L KCl, 0.8%NP-40), 2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 U Taq DNA 聚合酶, 200  $\mu$ mol/L dNTPs, 上下游引物各 0.4  $\mu$ mol/L, 20~100 ng 模板 DNA。反应在 PCR Express-96 (Hybaid)仪器上进行, 循环条件是: 94  $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 35 个循环(94  $^{\circ}$ C 变性 45 s, 合适温度退火 1 min, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min), 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。各对引物的最适退火温度通过梯度

PCR 结果确定。PCR 扩增产物经 3% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色检测, 用 Gis-2008 数码凝胶图像系统(上海天能公司)进行拍照和分析, 并统计可扩增引物的百分比和多态性频率。

## 2 结果

### 2.1 EST-SSR 标记在白菜种间的通用性

本研究所开发的白菜 EST-SSR 以自交系 A 的 EST 为基础, 首先测试了所设计引物对自交系 A 的

扩增情况,发现全部 EST-SSR 引物可以扩增出产物,但不同引物扩增情况不同。绝大多数引物除扩增出预期的片段外,都同时出现了比预期产物大的片段。扩增片段数目的差异说明它们对应基因的等位基因数不同,而扩增片段大小的不同则反映出内含子的插入与否或等位基因间 SSR 重复数目和 SSR 侧翼序列的差异。

为明确 EST-SSR 标记在白菜种内通用与否,用能对自交系 A 扩增出产物的全部 15 对引物对其他的 28 个白菜材料进行了测试,不同引物显示的多态性见表 3。发现 15 对引物都能在 25 个以上的品种中扩增出产物,其中,11 对引物在全部 28 个白菜材料中都有扩增产物,2 对引物在 27 个材料中有扩增,还有 2 对引物在 25 个材料中有扩增。在其中 7 对显示出多态性,占引物总数的 46.7%。图 1 为引物 EST-SSRP004 在不同白菜材料间的多态性扩增情况。

## 2.2 白菜 EST-SSR 标记对近缘物种油菜的通用性

为检测 EST-SSR 引物对近缘物种油菜的通用与否,用 15 对 EST-SSR 引物对 10 个油菜品种进行了测试。除引物 EST-SSRP001 外,其他 14 对引物都能扩增出产物,占测试引物的 93.3%;其中 EST-SSRP002、EST-SSRP003、EST-SSRP006、EST-SSRP012、EST-SSRP013 等 5 对引物显示多态性,占可用引物的 35.7%。这表明白菜 EST-SSR 引物对近缘种油菜是可通用,而且显示的多态性频率也较高。图 2 为引物 EST-SSRP012 在部分油菜品种间的扩增情况。

## 2.3 白菜 EST-SSR 标记对远缘物种的通用性

为进一步检测 EST-SSR 标记对亲缘关系更远物种的通用性,利用 15 对白菜 EST-SSR 引物对水稻、玉米、高粱和茶树分别进行了实验。对不同物种的扩增情况及其显示的多态性水平见表 4。

在所用的 15 对引物中,有 11 对在这 4 个物种中都能扩增出产物,占测试引物总数的 73.3%,对玉米、高粱、水稻和茶树的可扩增引物率分别为 80.0%、93.3%、93.3% 和 86.7%,平均有效扩增比率为 88.3%。显示多态性比例最高是茶树,高达可扩增引物的 61.5%;其次是玉米,为 33.3%;高粱和水稻最低,均为 28.6%。图 3 为引物 EST-SSRP003 在部分高粱品种间的扩增情况

不同引物对在 4 个物种中的扩增情况不同。引

表 3 白菜 EST-SSR 引物在 29 个不同品种中的扩增多态性

引物编号	实际 T <sub>m</sub>	扩增产物大小	多态性
EST-SSRP001	52	AB	P
EST-SSRP002	54	AB	P
EST-SSRP003	54	AB	NP
EST-SSRP004	58	A	P
EST-SSRP005	58	AB	P
EST-SSRP006	54	AB	P
EST-SSRP007	54	AB	NP
EST-SSRP008	60	AB	NP
EST-SSRP009	54	AB	NP
EST-SSRP010	60	AB	NP
EST-SSRP011	54	AB	NP
EST-SSRP012	56	AB	NP
EST-SSRP013	56	AB	P
EST-SSRP014	54	B	NP
EST-SSRP015	58	AB	P

扩增产物大小是指对自交系 A 的扩增情况, A 表示只出现预期大小片段, B 表示只出现非预期大小片段, AB 表示同时出现预期大小片段和非预期大小片段; P 表示有多态性, NP 表示无多态性。

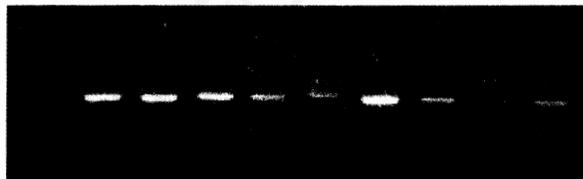


图 1 引物 EST-SSRP004 在不同白菜品种间的多态性扩增  
从左至右分别为自交系 A、自交系 B、热优 2 号、早熟 5 号、605、38A、黄芽 14、矮蒲头、红明青、油冬儿。



图 2 引物 EST-SSRP012 在部分油菜品种间的扩增情况  
从左至右分别为 Topus、汇油 2 号、安 W-13、夏油 3 号、秦油 3 号、SW1280、hanna。



图 3 引物 EST-SSRP003 在部分高粱品种间的扩增情况  
从左至右分别为 IS21B、鲁 1B、8001、熊杂 2 号、抗四、9198。

物 EST-SSRP009 只在高粱中能扩增,在另外 3 种植

表 4 15 对 EST-SSR 引物在各物种中的扩增情况

物种	可扩增的引物				多态性的引物			
	编号	数目	%	编号	数目	%		
玉米	EST-SSRP001, EST-SSRP002, EST-SSRP004, EST-SSRP005, EST-SSRP007, EST-SSRP008, EST-SSRP010~EST-SSRP015	12	80.0	EST-SSRP002, EST-SSRP005, EST-SSRP012, EST-SSRP014	4	33.3		
高粱	EST-SSRP002~EST-SSRP014	14	93.3	EST-SSRP003, EST-SSRP006, EST-SSRP007, EST-SSRP013	4	28.6		
水稻	EST-SSRP001~EST-SSRP008, EST-SSRP010~EST-SSRP015	14	93.3	EST-SSRP010, EST-SSRP013~EST-SSRP015	4	28.6		
茶树	EST-SSRP002~EST-SSRP008, EST-SSRP010~EST-SSRP015	13	86.7	EST-SSRP002~EST-SSRP007, EST-SSRP012, EST-SSRP015	8	61.5		

物中都无法扩增产物; 引物 EST-SSRP001 在玉米和水稻中能扩增, 而在高粱和茶树中则不能; 引物 EST-SSRP003 和 EST-SSRP006 只在玉米中不能扩增出产物; 其他引物在每个相关种中都有 8 个以上的模板 DNA 产生扩增产物。

以上结果表明, 根据白菜 EST 建立的 EST-SSR 标记在远缘物种中也具有可用性, 这对于不同物种间的比较基因组学研究具有重要的利用价值。

### 3 讨论

从白菜 EST-SSR 引物对其他 28 个白菜品种的扩增结果来看, 可用引物的有效扩增比率  $[(28 \times 11 + 27 \times 2 + 25 \times 2) / (28 \times 15) \times 100\% = 98.1\%]$  较高, 因此它们在种内具有较高的通用性。15 对 EST-SSR 引物有 14 对对油菜扩增有效, 引物可用率达到 93.3%, 能产生多态性的引物为 5 对, 占可用引物的 35.7%, 这证明由 EST 而建立的标记对近缘物种也具有较高的通用性, 与甘蔗<sup>[9]</sup>中所报道的高通用性是一致的。

Malay 等<sup>[10]</sup>报道高羊茅 EST-SSR 标记对其他草类通用性为 57%, Holton 等<sup>[3]</sup>的研究结果显示, 大麦 EST-SSR 对小麦通用性 55%。本研究中, 白菜 EST-SSR 引物对亲缘关系更远的 4 个物种可扩增引物率最高为 93.3%, 最低为 80.0%, 引物平均通用率为 88.3%, 比以上二者报道的通用性更高, 证明白菜 EST-SSR 标记在远缘种间也有较好的通用性, 这对进行白菜与相关物种的比较基因组学研究具有重要的利用价值。

SSR 侧翼序列的保守程度决定着 EST-SSR 引物在不同物种间的通用性。本实验中观察到, 不同 EST-SSR 引物的通用性不同, 如 EST-SSRP001、

EST-SSRP003、EST-SSRP006 或 EST-SSRP009 在不同物种间的扩增与否具有明显的差别, 这很可能就是它们各自对应 SSR 的侧翼序列的保守程度不同所造成的。此外, 引物本身在 EST 中位置也决定着其通用性。例如, 引物对中的 1 个或 2 个恰好横跨 EST 序列中的外显子(在基因组 DNA 中被内含子隔离)拼接处, 或者所设计的引物可能跨越 mRNA 剪切位点, 以基因组 DNA 为模板则不能扩增。因此, 当不同物种中相同 EST-SSR 引物所处的位置不同时, 就会导致同一引物对不同物种通用与否的差异。

与来源于基因组的 SSR 相比, EST-SSR 标记来源于相对保守的转录区域, 所以比基因组 SSR 标记具有更高的通用性<sup>[13]</sup>。因此, 虽然 EST-SSR 标记的开发仅限于 EST 序列数据库早已存在的物种, 但对于一个特定物种, 若缺乏相关的序列资料, 源于其他种的 EST-SSR 标记将是有效和可用的标记资源, 可有效替代重新开发标记, 为遗传图谱的建立节约成本, 也为比较基因组学研究提供了一个途径。

### 参考文献 (References)

- [1] Areshchenkova T et al. *Theor Appl Genet*, 2002, **104**: 229
- [2] Gupta PK et al. *Mol Gen Genomics*, 2003, **270**: 315
- [3] Holton TA et al. *Mol Breed*, 2002, **9**: 63
- [4] Thiel T et al. *Theor Appl Genet*, 2003, **106**: 411
- [5] Eujayl I et al. *Euphytica*, 2001, **119**: 39
- [6] 李宏伟等. *植物遗传资源学报*, 2003, **4**: 252
- [7] Eujayl I et al. *Theor Appl Genet*, 2004, **108**: 414
- [8] Decroocq V et al. *Theor Appl Genet*, 2003, **106**: 912
- [9] Cordeiro GM et al. *Plant Sci*, 2001, **160**: 1115
- [10] Saha MC et al. *Theor Appl Genet*, 2005, **110**: 323
- [11] Murray MG et al. *Nucleic Acids Res*, 1980, **8**: 4321
- [12] Jang HS et al. *J Plant Biotechnol*, 2003, **5**: 209
- [13] Eujayl I et al. *Theor Appl Genet*, 2002, **104**: 399

## The Transferability of Chinese Cabbage EST-SSR Markers

Ya Xin<sup>1,2</sup>, Hai-Rui Cui<sup>1\*</sup>, Ming-Long Zhang<sup>1</sup>, Yan-Ling Yao<sup>1</sup>, Mei-Zhen Lu<sup>1</sup>,  
Ji-Qiang Jin<sup>1</sup>, Yong-Pyo Lim<sup>3</sup>, Su-Ryun Choi<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Nuclear and Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; <sup>2</sup>Biotechnology Research Institute, Hangzhou Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310024, China; <sup>3</sup>Department of Horticulture, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea)

**Abstract** EST-SSR is a new kind of SSR markers developed from expressed sequence tags (ESTs). The transferability of Chinese cabbage EST-SSR markers to different plant species was studied by designing 15 SSR primer pairs based on ESTs and using them for PCR to genomic DNA from Chinese cabbage, rapeseeds, rice, sorghum, maize and tea tree. The amplification percentage of designed primers to different varieties of Chinese cabbage, relatively related rapeseeds and distantly related rice, sorghum, maize and tea tree, were 100.0%, 93.3%, 80.0%, 93.3%, 93.3% and 86.7%, respectively. 11 of the 15 primer pairs showed the amplification in all distantly related species and the polymorphic primers account for 28.6%, 28.6%, 33.3% and 61.5% of available primers in rice, sorghum, maize and tea tree respectively. These results indicate that the Chinese cabbage EST-SSR marker is highly transferable to other plant species, being significant to studies on comparative genomics among different species.

**Key words** Chinese cabbage; EST-SSRs; transferability

Received: July 18, 2005 Accepted: October 14, 2005

This work was a part of "Development of Molecular Markers and Their Genetic Mapping in Chinese Cabbage" supported by a grant from KOSEF (No.98204022060125)

\*Corresponding author. Tel: 86-0571-86971405, Fax: 86-571-86971202, E-mail: hrcui@zju.edu.cn