

简述植物SSR分子标记的开发及应用

周胜芳

西华师范大学生命科学学院 四川南充 637002

摘要: SSR是以PCR扩增形成产物的多态性为基础的分子标记,具有数量丰富,共显性遗传,所需DNA用量少,操作简单,种属间具有很强的通用性,可重复性高和多态性高等优点。本文简要综述了植物SSR分子标记的开发方法及其在遗传多样性分析,遗传连锁图谱构建及QTL定位, DNA指纹图谱构建和品种鉴定等方面的应用。

关键词: SSR; 分子标记; 开发; 应用

Development and application of SSR molecular markers in plants

Zhou Shengfang

College of life sciences, West China Normal University, Nanchong, Sichuan 637002

Abstract: SSR is a molecular marker based on the polymorphism of PCR amplification products. It has the advantages of abundant quantity, codominant inheritance, less amount of DNA required, simple operation, strong generality, high repeatability, and high polymorphism among species. This paper briefly reviews the development methods of plant SSR molecular markers and their applications in genetic diversity analysis, genetic linkage map construction and QTL mapping, DNA fingerprint construction, and variety identification.

Keywords: SSR, molecular marker, development, application

分子标记是以生物大分子的多态性为基础的一种遗传标记,具有方法相对简单、不受季节环境影响、多态性高、不影响目标性状的表达等优点,分子标记主要分为3类标记。第一类是基于杂交的DNA标记,如Bostein等提出的RFLP(限制性片段长度多态性);第二类是以PCR扩增形成产物多态性为基础的标记方法,如AFLP(扩增片段长度多态性)、RAPD(随机片段多态性)、SSR(简单重复序列)等;第三类是以单核苷酸多态性(SNP)为基础的标记技术。分子标记被广泛应用于植物遗传多样性和DNA指纹图谱构建与杂种鉴定,图谱构建及QTL定位等方面。

1 SSR分子标记的概念

SSR(Simple Sequence Repeat)简单重复序列是由基因组中1-6个核苷酸为重复单元,经多次重复串联,长度在200bp以下的一段DNA序列,真核生物中含量丰富,其多态性主要是由于重复次数不同或重复程度不同而形成的^[1]。微卫星DNA两端的序列高度保守,而分子标记就是根据微卫星两端序列设计互补的特异性引物,对样

品DNA进行PCR反应,扩增出卫星片段,通过电泳分析其长度的多态性^[2]。SSR分子标记具有数量丰富,共显性遗传,所需DNA用量少,操作简单,种属间具有很强的通用性,可重复性高和多态性高等优点。但SSR分子标记的开发需要进行测序和引物合成,工作量大,成本较高。总体来看,SSR分子标记是一种比较理想的分子标记,广泛应用于植物遗传多样性分析,遗传图谱构建及基因定位,品种鉴定,指纹图谱和分子辅助育种等方面。

2 SSR分子标记的开发

SSR分子标记以获得物种的DNA序列信息为前提,对SSR位点两端的保守序列设计特异性引物,因此SSR分子标记的开发的关键在于SSR位点的获得。下面介绍目前比较常见的SSR分子标记开发的方法。

2.1 基因组文库法

开发SSR标记最早是用基因组文库法。首先,是对提取的DNA进行限制性内切酶酶切或超声波处理以获得基因组DNA片段。然后将获得的DNA片段与适宜的载体(噬菌体或质粒载体)连接,将之转移到大肠杆菌中

培养进行克隆, 建立基因组文库, 人工合成含SSR序列的标记探针, 将之与文库中克隆的DNA杂交, 筛选出含SSR的阳性克隆。再对阳性克隆进行测序, 针对其中序列较长的且SSR位点偏向序列中部的阳性克隆进行特异性引物设计, 再利用PCR检测引物的有效性, 包括是否存在非特异扩增及扩增产物大小是否与预期相符^[3]。这种分子标记的开发方法简单, 但耗时耗力, 目前, 这种开发方法已经很少使用了。

2.2 微卫星富集法

由于传统SSR开发过于繁琐, 且效率低下, 更多关于简化技术过程, 提高效率且降低费用的研究陆续被报道, 出现了多种采取富集步骤的微卫星标记开发方法, 究其实质, 主要是在筛选小插入片段文库时, 再增加一次筛选, 最终大幅提升获得阳性克隆的概率^[4]。

2.2.1 RAPD-PCR 富集法

RAPD-PCR富集法主要是将RAPDA随机引物连接SSR作为PCR扩增引物或将RAPD扩增产物条带用SSR条带进行southern杂交, 这可以有效富集重复序列。这里介绍2种开发策略。一种是先利用RAPD引物进行PCR富集, 然后用含SSR序列的标记探针进行杂交富集, 筛选含有SSR位点的目的条带; 另一种利用通用引物及SSR引物对转入大肠杆菌中克隆的RAPD扩增产物再进行PCR扩增。

2.2.2 引物延伸法

引物延伸法有2种比较典型的方法, 一种是用含特定重复序列寡核苷酸为引物对单链DNA进行PCR扩增, 获得异源双链DNA, 然后将之转化到大肠杆菌, 从而含有SSR基元的双链DNA被富集, 构建富集文库, 对富集文库进行菌落杂交, 筛选阳性克隆, 对之进行测序并根据SSR序列两端的保守序列设计SSR引物。除外, 可以通过利用生物素进行SSR引物的标记, 延伸反应产物与抗生物素蛋白包被的小球结合而分离出来, 经洗脱变性, 获得双链分子转化双链载体来构建文库^[5]。引物延伸法是处于文库法和富集法的过度, 尽管阳性克隆率很高, 但其中包含较多相同克隆, 且步骤繁杂, 总体上, 此方法开发效率并不高, 目前, 应用也不广泛^[3]。

2.2.3 探针杂交富集法

探针杂交富集法主要有代表性的有2种, 一种是由Karagoyozov等提出的尼龙膜杂交法, 主要是将SSR探针固定在尼龙膜上与基因组文库进行杂交从而富集微卫星的酶切基因组DNA片段。除外, 还有由Kandpal等提出的磁珠富集法。主要是根据磁珠上偶联的链霉素和素蛋白同生物素具有高度亲和性的原理, 利用生物素标记的SSR探针与基因组文库杂交, 杂交反应产物与抗生素

蛋白混合富集微卫星的酶切基因组DNA片段。尼龙膜杂交法富集效率比较低, 而磁珠富集法由于生物素标记的SSR探针处于液体介质中, 杂交反应则要更充分, 从而提高了富集效率^[5]。磁珠富集法在实践中被应用的较多, 很多报道都对之进行了改良。其中Zane等提出了FIASCO磁珠富集法, 依据链霉素亲和素与生物素间能进行强而稳定的共价结合, 利用链亲和素包被磁珠来富集AFLP片段中含SSR的片段^[3]。富贵等^[6]通过磁珠富集法为蕨麻开发了40对SSR引物, 扩增有效性为50%。

2.3 基于生物信息学手段开发SSR分子标记

SSR分子标记是以PCR扩增形成产物多态性为基础的标记方法, 其标记开发关键的一环在于特异性引物的设计, 引物设计则需建立在已知DNA序列的基础上。目前, 随着测序技术的不断发展和基因组学研究的不断深入, 多种高通量、低成本的新一代测序技术的研发, GenBank/NCBI、EMBL/EBI及DDBJ等公共数据库中已经累积了大量的生物数据, 可在数据库中搜索SSR序列, 由此设计特异性引物, 极大的方便了SSR标记的开发。目前, 常用的设计软件有Primer premier 5.0和oligo 6.0。盛文涛等^[7]基于NCBI数据库筛选了辣椒的EST序列, 共获得6182个EST-SSR, 成功设计了5874对引物。

2.4 基于第二代测序技术(NGS)开发SSR分子标记

随着高通量、低成本的第二代测序技术的研发, 以转录组测序(RNA-Seq)为代表的新一代高通量测序技术广泛应用于经济、高效、大规模的开发SSR分子标记。洪克前等^[8]对霍山石斛叶片进行转录组数据, 获得了202080条Unigene序列, 搜索到43291个SSR位点; 姚国琼等^[9]对三角梅苞片进行转录组测序, 搜索到75305个SSR位点, 设计并合成了50对SSR引物, 有效性为50%。穆莹等^[10]通过青榨槭转录组测序, 共获得54052条Unigenes, 利用MISA软件筛选出3763个SSR位点, 设计了654对引物, 有效引物252对, 多态性引物有75对, 通过扩增, 检测出这75对标记具有较高的通用性。

3 SSR分子标记在植物中的应用

3.1 遗传多样性分析

生物的遗传多样性的研究已经从最初的形态学水平, 重心逐渐转到染色体、DNA分子水平, 通过表型性状来检测遗传变异最为简便, 但表型性状往往容易受到环境条件的影响, 因而, 其具有不稳定性。分子标记技术能够直接检测到DNA分子的序列变化, 从DNA分子水平揭示植物的遗传变异, 是目前为止最有效的遗传分析方法。而SSR分子标记已经广泛应用到生物的遗传多样性的研究中, 王晨晨等^[11]利用84对SSR引物分析47份品种的遗传多样性, 聚类分析表明, 47份品种可分为6类。

3.2 遗传连锁图谱构建及QTL定位

遗传连锁图谱是指以已知性状的基因或特定的DNA序列的遗传标记间重组频率为基础的染色体或基因位点的相对位置线性排列图^[12]。QTL(数量性状位点)定位是确定数量性状基因在染色体上位置的一种方法,通常采取连锁分析(即利用标记与基因间的连锁关系进行定位)和关联分析(基于连锁不平衡的原理进行目标性状与标记间的关联分析)的方法。SSR分子标记在遗传图谱构建和基因定位方面应用十分广泛,可将遗传图谱中已知位点的分子标记与未知的QTL进行连锁分析,把一个或多个QTL定位到同一染色体上已知位点的分子标记附近,从而确定QTL在基因组中的位置^[13]。吴群^[14]利用SSR标记构建了小麦高密度unigene遗传图谱,并对小麦9个性状进行了QTL定位。

3.3 DNA指纹图谱的构建

DNA指纹图谱是指在DNA序列中的特异性,具有多位点性、高变异性和稳定的遗传性的特点,DNA指纹图谱能有效的鉴定种质资源的真实性和品种纯度^[15],而利用SSR位点多态性构建指纹图谱,可以广泛应用于植物品种分类、种质鉴定,纯度鉴定等方面。徐彪等^[16]利用38对多态性高的SSR标记引物检测50份花生种质资源的遗传多样性分析及进行DNA指纹图谱构建,为花生种质创新、亲缘关系分析,品种选育等提供重要依据。

3.4 品种鉴定

杂交育种是培育新品种的主要途径,而对物种杂交后代的真伪鉴定是杂交育种的重要环节。以往,杂交后代的真伪鉴定主要观察后代的形态学特征,存在耗时长,微小特征差异不易观察的缺点,现在随着分子生物学技术的发展,通过分子标记鉴定技术可以从DNA水平上鉴定杂交种的真伪,结果获取更加简便和科学。仇静静等^[17]利用MITE转座子和SSR标记对花生各杂交组合的F1代杂交种进行真伪检测,从254粒杂交F1中鉴定96粒真杂交种,真杂种率为37.79%,为遗传群体构建、新品种选育等奠定基础。

4 结语

目前,SSR分子标记主要采用磁珠富集法、高通量测序开发以及生物信息学手段开发。而随着新一代高通量测序技术和生物信息学的发展,由于SSR具有种属间通用性高、数量大的特点,SSR标记的开发依旧是未来主要的分子标记,特别在玉米、小麦及水稻等这类的经济作物方面,对开发其功能分子标记具有巨大潜力。

参考文献:

[1]刘忠松,罗赫荣.现代植物育种学[J].科学出版社,2010.

[2]杨梦婷,黄洲,干建平,等.SSR分子标记的研究进展[J].杭州师范大学学报(自然科学版),2019,018(004):429-436.

[3]陈怀琼,隋春,魏建和.植物SSR引物开发策略简述[J].分子植物育种,2009,7(4):7.

[4]刘佳奇,方彦,陈云霞.基于大花四照花转录组的SSR分布特征分析及引物开发[J].分子植物育种,2020,18(20):7.

[5]张增翠,侯喜林.SSR分子标记开发策略及评价[J].遗传,2004,26(5):6.

[6]富贵,李军乔,包锦渊,白世俊,韦梅琴.磁珠富集法开发蕨麻SSR标记引物[J].草业学报,2018,27(02):124-134.

[7]盛文涛,邓建兰,饶友生,柴学文,尧云萍.辣椒EST资源的SSR信息分析[J].分子植物育种,2019,17(14):4698-4703.DOI:10.13271/j.mpb.017.00469

[8]洪克前,夏维丽,李佩玲,等.霍山石斛叶转录组中SSR位点信息分析[J].中国农学通报,2020,36(27):5.

[9]姚国琼,杨帆,严苓方,孙正海,李伟.基于转录组SSR的三角梅遗传多样性分析[J/OL].分子植物育种:1-19[2022-04-01].

[10]穆莹,白云海,吴静,窦德泉,张睿鹂.基于转录组序列的青榨槭EST-SSR标记开发及通用性分析[J/OL].分子植物育种:1-18[2022-04-01].

[11]王晨晨,王玉泉,张海惠,卜明娜,张然,张金龙,胡喜贵.基于SSR标记分析矮抗58及衍生品种的遗传多样性[J].种子,2021,40(11):137-143+149.

[12]朱德威,陈庆富.普通小麦遗传图谱研究现状与展望[J].种子,2010(3):6.

[13]李思凯,王然,齐秀娟.猕猴桃分子标记、遗传图谱及QTL定位应用研究进展[J/OL].果树学报:1-18[2021-12-27]

[14]吴群.小麦Unigene遗传图谱构建和产量性状QTL分析[D].山东农业大学,2021.

[15]林兴娥,牛俊海,陈莹,等.基于SSR标记的68份红毛丹种质资源DNA指纹图谱构建[J].热带作物学报,2019,40(4):7.

[16]徐彪,牛海龙,刘红欣,李伟堂,王伟,李玉发,吴松权,何中国.花生种质遗传多样性分析及指纹图谱构建[J/OL].分子植物育种:1-15[2021-12-27].

[17]仇静静,赵钰涵,邓丽,任丽,夏晗,付春,赵传志,王兴军.花生杂交F1种子真伪的分子鉴定研究[J].山东农业科学,2018,50(02):13-18+2.DOI:10.14083/j.issn.1001-4942.2018.02.003.