

## 菠萝 EST 资源的 SSR 信息分析与开发

陈俊浩<sup>1</sup>, 陆 洋<sup>1</sup>, 倪燕婕<sup>1</sup>, 张智俊<sup>1</sup>, 钟雅萍<sup>1</sup>, 鲍晶晶<sup>1</sup>, 罗淑萍<sup>2</sup>

(1. 浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300; 2. 新疆农业大学 农学院, 新疆 乌鲁木齐 830052)

**摘要:** 表达序列标签-简单重复序列(EST-SSRs)存在于表达序列标签中, 是一种最常用的新型微卫星标记。它可以被嵌入到功能基因序列中, 有效并高效地提供更多的相关信息。通过对已公开的 5 659 条菠萝 *Ananas comosus* 的表达序列标签(ESTs)进行电子筛选, 获得了 617 条含有简单重复序列(SSR)的菠萝 EST。平均 7.39 kb EST 序列中含有 1 个 SSR, 其中二核苷酸, 三核苷酸和六核苷酸是 SSR 的主要重复类型, 分别占 SSR 总数的 42.61%, 29.25%和 20.13%。所有重复类型中重复次数最少的是四核苷酸序列(3.46%)。AG/TC 是二核苷酸中的优势单元。根据搜索出的 EST 序列, 共设计出 30 对物, 其中 27 对引物扩增产物具有多态性。本次实验中开发的 EST-SSR 标记是迄今为止有关于菠萝的第 1 次大规模 SSR 标记开发。研究结果为利用 EST-SSR 分子标记进行菠萝连锁图谱构建, 数量基因定位, 种质资源遗传多样性, 亲缘关系研究和指纹图谱构建奠定了基础。图 2 表 4 参 24

**关键词:** 分子生物学; 菠萝; 表达序列标签; 简单重复序列

**中图分类号:** S664.1; Q781      **文献标志码:** A      **文章编号:** 2095-0756(2017)02-0332-08

## Development of novel EST-SSR markers in pineapple (*Ananas comosus*) by data mining from public EST sequences

CHEN Junhao<sup>1</sup>, LU Yang<sup>1</sup>, NI Yanjie<sup>1</sup>, ZHANG Zhijun<sup>1</sup>, ZHONG Yaping<sup>1</sup>, BAO Jingjing<sup>1</sup>, LUO Shuping<sup>2</sup>

(1. The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. College of Agriculture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang, China)

**Abstract:** Expressed sequence tags (ESTs) are used for microsatellite development. EST derived from simple sequence repeats (EST-SSRs), one of the most common new microsatellite markers, are more likely to be embedded in functional gene sequences, to be less costly and time effective, and may provide more information. In the present study, analysis of 5 659 publicly available expressed sequence tags of pineapple (*Ananas comosus*) was conducted with the Webstat online program. Results of 636 (SSRs), identified electronically in 617 ESTs, showed that the average density was one SSR per 7.39 kb of ESTs screened. Dinucleotide (42.61%), trinucleotide (29.25%), and hexanucleotide (20.13%) repeats were the dominant types among the obtained motifs. The least frequent was tetranucleotide repeats (3.46%). TC/AG was most abundant in the dinucleotide motif. Of the 30 functional pairs, 27 primer pairs showed polymorphisms by polymerase chain reaction (PCR) amplifications. Thus, the EST-SSRs developed here with the first large-scale development of SSR markers in pineapple have the potential to be used for development of genetic and physical maps, quantitative trait loci mapping, genetic diversity studies, association mapping, and finger printing cultivars. [Ch, 2 fig. 4 ref. 24 ref.]

**Key words:** molecular biology; *Ananas comosus*; ESTs; SSR

菠萝 *Ananas comosus* 原产巴西, 为热带多年生草本植物, 16 世纪时传入中国, 有 70 多个品种, 岭

收稿日期: 2016-03-16; 修回日期: 2016-05-07

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(LY14C160009)

作者简介: 陈俊浩, 从事生物科学研究。E-mail: hans\_chan001@163.com。通信作者: 张智俊, 副教授, 博士, 从事生物技术与种质创新研究。E-mail: 397942805@qq.com

南四大名果之一。菠萝含有大量的果糖，葡萄糖，维生素 A，维生素 B，维生素 C，磷，柠檬酸和蛋白酶等营养物质。其果味甘性温，具有解暑止渴、消食止泻之功，为夏令医食兼优的时令佳果。另外，菠萝皮中富含菠萝酶，有丰富的药用价值，长期食用菠萝皮，心脑血管，糖尿病发病率显著降低，并有一定的抗癌效果。近年来分子生物学的发展以及各种分子标记技术不断出现，使得植物遗传分析研究得以迅速发展，其中以简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)标记在植物遗传研究上应用最为广泛。随着测序技术成本的降低，GenBank 中大量的植物表达序列标签(expressed sequence tag, EST)数据为 SSR 分子标记的开发提供了新的途径。EST-SSR 除具一般 SSR 分子标记特点外，还有信息量大，通用性好，开发简单、快捷、成本低等<sup>[1]</sup>的特殊优势。目前，许多作物<sup>[2-5]</sup>已开发大量的 EST-SSR，并应用于遗传作图、遗传多样性等<sup>[6]</sup>研究上，但在菠萝栽培种上至今尚未见从 EST 中开发 SSR 的相关报道。本研究对现有菠萝 EST 中 SSR 信息进行全面分析，以明确菠萝 EST-SSR 发生频率和特点，为进一步建立 EST-SSR 标记并探索其在菠萝研究中的遗传作图、育种材料评价、品种鉴定等的应用奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

采集菠萝品种‘巴厘’*Ananas comosus* ‘Comte de Paris’ 的幼嫩叶片于-20℃保存。

### 1.2 菠萝 EST 的获得及 EST-SSR 序列查找

从美国生物技术中心(NCBI)的植物基因组数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/PLANTS/PlantList.html>)共搜索到 5 659 条菠萝的 EST 序列。应用 Websat(<http://wsmartins.net/websat/>)在线程序搜索 EST-SSR。搜索的标准为：二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复序列的重复次数分别大于或等于 9, 6, 5, 4 和 3。

### 1.3 EST-SSR 引物设计

利用 Primer Premier 3.0 在线程序对包含有 SSR 的 EST 设计引物，引物设计的原则为 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。引物设计的主要参数为：引物长 18~27 bp，最适为 22 bp；引物退火温度  $T_m$  值 57~60℃，上游与下游引物的  $T_m$  值相差  $\pm 1$ ℃；PCR 预期产物长 100~400 bp；尽量避免引物二聚体，发夹结构和错配等。按重复类型的比例挑选 30 对引物由上海生物工程技术有限公司合成。

### 1.4 EST 数据冗余分析

利用 VecScreen(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen>)及 RepeatMasker(<http://www.repeatmasker.org>)去除载体污染和重复序列，对于那些能设计出引物的 EST 序列，最后通过  $T_m$  值和引物序列比对进一步删除冗余序列。

### 1.5 DNA 提取

采用改良十六烷基三甲基溴化铵法(CTAB)<sup>[7]</sup>提取菠萝的基因组 DNA。

### 1.6 PCR 扩增、电泳检测

PCR 反应体系(25  $\mu$ L)：10 $\times$ 缓冲液 2.5  $\mu$ L，镁离子( $Mg^{2+}$ )(25.0 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>) 1.5  $\mu$ L，dNTP(10.0 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>) 0.5  $\mu$ L，引物(100.0  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>) 1.0  $\mu$ L，Taq 酶(5.0 $\times$ 16.67 nkat) 0.2  $\mu$ L，模板 DNA(20.0 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>) 3.0  $\mu$ L。

反应程序为：94℃预变性 5 min，94℃变性 30 s，51℃退火 40 s，72℃延伸 50 s，38 个循环，72℃终延伸 7 min，8℃保存。

PCR 产物用质量分数为 6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离检测，120 V 电压电泳 1.5 h 后，采用银染法染色，BIO-RAD Gel Doc2000 凝胶成像系统中成像。

### 1.7 SSR 位点的功能分析

对筛选出的 SSR 提取其所在的基因序列，翻译成蛋白质序列后，利用 Blastp 比对，提取相似性最高的序列注释信息，作为 SSR 靶向基因的功能注释，并对 SSR 位点的注释信息进行分类。

## 2 结果与分析

### 2.1 菠萝 EST-SSR 的频率和分布密度

在 5 659 条 EST 序列中, 经过筛选共发现 SSR 序列 636 个, 占整个 EST 数据库的 11.24%, 表明菠萝中的 EST-SSR 十分丰富。经计算去除冗余后的菠萝 EST 序列总长约为  $4.7 \times 10^6$  bp, 菠萝 SSR 分布密度为平均 7.39 kb EST 就存在 1 条 SSR(表 1), 并且不同重复类型的平均距离有明显差异, EST-SSR 出现频率越高其平均距离则越小。菠萝 EST-SSR 中含有二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸重复的序列分别占 EST 数据库中发现 SSR 序列总数的 42.61%(271/636), 29.25%(186/636), 3.46%(22/636), 4.56%(29/636), 20.13%(128/636)(表 1), 说明菠萝 EST-SSR 的优势重复单元为二核苷酸、三核苷酸和六核苷酸, 三者共占 EST-SSR 总数的 91.99%。其中二核苷酸重复的出现频率(42.61%)明显高于其他类型, 三核苷酸(29.25%)和六核苷酸(20.13%)重复的出现频率也相对较高。重复类型为四核苷酸、五核苷酸的重复所占的比例比较小, 只占总 SSR 的 8.02%。

表 1 菠萝中 EST-SSR 的数量、比例、出现频率与平均距离

Table 1 Number, Proportion, frequency and mean distance of EST-SSR in pineapple

重复类型	SSR 数量	所占总 SSR 比例/%	出现频率/%	分布密度/kb
二核苷酸	271	42.61	4.79	17.34
三核苷酸	186	29.25	3.29	25.27
四核苷酸	22	3.46	0.39	213.64
五核苷酸	29	4.56	0.51	162.07
六核苷酸	128	20.13	2.26	36.72
总计	636	100	11.24	7.39

### 2.2 菠萝 EST-SSR 的重复类型特点

全部菠萝的 EST-SSR 中共搜索出 174 种重复基元, 其中二核苷酸重复基元有 10 种, 三核苷酸重复基元有 48 种, 四核苷酸重复基元有 15 种, 五核苷酸重复基元有 21 种, 六核苷酸重复基元有 80 种(表 2)。在二核苷酸重复基元中 AG/TC 和 GA/CT 出现频率最高, 在总的 SSR 中所占比例为 23.27%(148/636)和 15.88%(101/636)。而三核苷酸的重复基元中 AGA/TCT, AGC/TCG, CAG/GTC, CTC/GAG, CTG/

表 2 菠萝 EST-SSR 的重复基元

Table 2 Repeat motif of EST-SSRs in pineapple

重复类型	基元数	重复基元
二核苷酸	10	AC, AG, AT, CA, CT, GA, GT, TA, TC, TG AAC, AAG, AAT, ACA, ACG, AGA, AGC, AGG, ATC, ATG, ATT, CAA, CAC, CAG, CCA, CCG,
三核苷酸	48	CCT, CGA, CGC, CGT, CTA, CTC, CTG, CTT, GAA, GAC, GAG, GAT, GCA, GCG, GCT, GGA, GGC, GTA, GYC, TAA, TAC, TAT, TCA, TCC, TCG, TCT, TGC, TGG, TGT, TTA, TTC, TTG
四核苷酸	15	AAAC, AATC, AGAA, CATG, CCAT, CCGT, CTTT, GACT, GCGA, GCTC, TAGA, TATT, TCGA, TCTT, TTAA
五核苷酸	21	AAAAT, AAAGA, AAATA, AAGAA, AAGCA, AATAA, ACCAT, AGAAG, AGATT, AGCTT, ATAAA, ATGAG, ATGGT, CACAA, CCACG, CTCGG, GATTA, TCTTT, TTATT, TTTTA, TTTTC AAAAGA, AAAGAA, AACCT, AAGAAA, AAGAAC, AAGCCG, AAGGAG, ACCACA, ACGCAC, AGAAAA, AGAAGC, AGAGGA, AGCACT, AGCAGA, AGCCCT, AGGAAG, AGGAGA, AGGATG, ATTAGT, CAGCTC, CATCTT, CCATAC, CCCTCG, CCCTCT, CCGCCT, CCGCGT, CCTCCG, CCTCTT, CGCACT, CGGCAG, CGGCGA, CGTCCG, CGTGAT, CGTTTC, CTCCGC, CTGCTT, CTTCAT, CTTCCT, CTTCCG, CTTCTC, CTTTGA, CTTTTT, GAAGAG, GAAGCA, GAAGCT, GACAGG, GAGAAC, GAGAAG, GAGGAA, GATCCC, GCAGAA, GCAGGA, GCCGTC, GCCTAT, GCCTGT, GCGAAG, GCTCCT, GGGCAC, GTTGTG, TAGGGT, TATCTA, TATTTT, TCAAAT, TCAGCC, TCCTCT, TCGCAG, TAGGAT, TCGGCG, TCTCGA, TCTCGC, TCTTCG, TCTTTT, TGAAGC, TGATGT, TGCTTT, TTAGGG, TTCTGC, TTCTTT, TTTTCT, TTTTTG
六核苷酸	80	

GAC, CTT/GAA 的出现次数在 10 以上, 并且其中重复次数最大的 AGC/TCG 也仅为总 SSR 的 4.09%(26/636)(表 3)。统计显示三核苷酸的基元种类相对来说较多, 比较分散。六核苷酸的 SSR 在总的 EST 中有 128 条, 但六核苷酸的重复基元种类有 80 种, 其中 60 种重复基元出现 1 次, 其余 20 种重复基元出现次数在 1 次以上, 在六核苷酸重复基元中 CCTCCG 出现 7 次, 发生频率仅占总 SSR 的 1.10%。总体而言六核苷酸重复基元总数虽然多, 但每种基元类型出现的频率却不高。而四核苷酸和五核苷酸的重复基元不仅在数量上很少, 而且基元分布较平均, 未出现优势基元。

菠萝的 EST-SSR 基元长度分布情况见图 1。由于搜索标准严格, 将一些冗余序列剔除(特别是一些本身序列较短或者是数据库重复登录的序列)。因此, EST-SSR 的分布不是连续的。菠萝的 EST-SSR 基元长度分布主要集中在 18~36 bp, 其中 18 bp 在总的分布中尤为突出, 共有 194 条, 占总数的 30.50%。从整体趋势来看, EST-SSR 的数量是随着基元长度的增长而减少的。TEMNYKH 等<sup>[8]</sup>研究发现, SSR 基元长度在 12 bp 以下时为低多态性, 长度在 12~20 bp 的 SSR 为中等多态性, 长度大于或等于 20 bp 时为高多态性。依据以上标准, 41.67%菠萝的 EST-SSR 为中等多态性, 58.33%菠萝的 EST-SSR 则为高多态性。

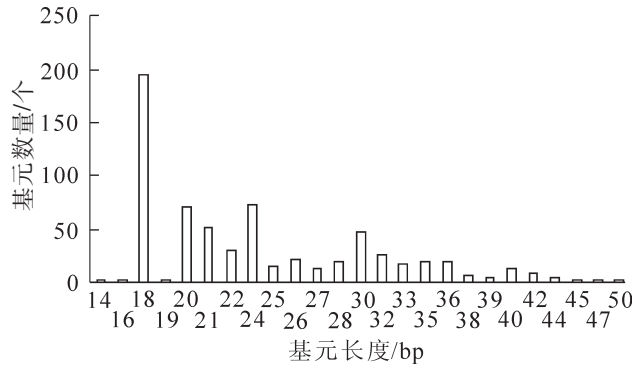


图 1 菠萝 EST-SSR 基元长度分布

Figure 1 The distribute of motif length of pineapple EST-SSR

表 3 菠萝 EST-SSR 三核苷酸不同重复基元的重复数量

Table 3 Number of SSR loci in trinucleotide repeats across the entire pineapple ESTs

重复类型	重复频率/%	重复类型	重复频率/%	重复类型	重复频率/%
AAC/TTG	3.06	ATG/TAC	1.07	CGC/GCC	1.53
AAG/TTC	4.90	ATT/TAA	2.76	CGT/GCA	4.90
AAT/TTA	2.76	CAA	0.61	CTA/GAT	3.37
ACA/TGT	2.76	CAC	1.07	CTC/GAG	5.51
ACG/TGC	3.37	CAG/GTC	7.04	CTG/GAC	6.43
AGA/TCT	7.96	CCA	0.61	CTT/GAA	7.96
AGC/TCG	13.78	CCG/GGC	1.53	GTA	0.61
AGG/TCC	3.37	CCT/GGA	4.90	TCA	2.76
ATC	0.61	CGA/GCT	3.37	TGG	0.61

### 2.3 EST-SSR 引物筛选

根据所统计的 SSR 位点的 EST 序列信息, 共设计了 636 对引物, 从中根据二、三、四、五、六核苷酸在总 SSR 中所占比例选取 30 对引物, 其中包含 3 条重叠的 SSR 所对应的引物, 对菠萝的基因组 DNA 进行 PCR 扩增。其中筛选出 27 对引物能扩增出清晰的, 大小与预期片段相近的 2~7 条带, 占扩增引物的 90%, 引物筛选结果见图 2。筛选出的 27 对引物的详细信息见表 4。该实验说明利用菠萝 EST 序列开发 EST-SSR 标记是高效且可行的。

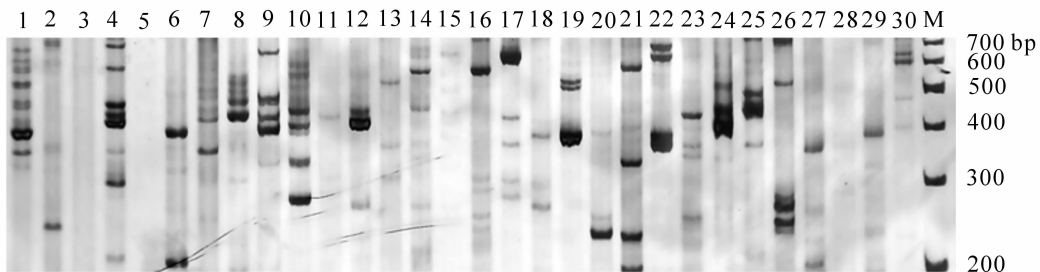


图 2 菠萝 30 对 EST-SSR 引物扩增结果

Figure 2 Amplification results by 30 EST-SSR primers of pineapple

## 2.4 EST-SSR 靶向基因的功能分析

值得关注的是, EST-SSR 使无功能的分子标记开始逐步向可以揭示有基因功能的分子标记发展<sup>[9]</sup>, 筛选出来的菠萝 27 对引物所对应的 EST, 概念性翻译后经 BLASTp 分析, 其中有 11 条为未知蛋白的 mRNA 序列, 7 条为还未发现的序列, 其余 9 条 EST 的功能注释中有水分胁迫诱导蛋白, 甲酰转移酶, 衰老相关蛋白, 脱水-应答蛋白 PD22 前体, 30S 核糖体蛋白质 S9, 核糖体蛋白 L11 类似物, 新生多肽相关复杂  $\alpha$  链, 质膜 H<sup>+</sup>-ATP 酶, pop3 肽, 抑制蛋白以及菠萝成熟果实 cDNA, 新生多肽相关复合物  $\alpha$  链。

表 4 菠萝 EST-SSR 引物筛选信息

Table 4 Information of Pineapple EST-SSR primer screening

SSR 位置	登录号	产物长度/bp	重复基元	T/°C	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	基因功能	扩增带数
ACSSR1	DT338344.1	390	(GCT)7/ (TGG)7	59.8	CGTTCAAGTTAGCA- GAAGCTGA	CAGAAACACTTCCA- CAACCAA	水分胁迫诱导蛋白	7
ACSSR2	DT339079.1	290	(CCTCTT)3/ (CTTCCG)3	60.2	A- GATCGGGTTCTCACTCT TCA	AGACAAG- GTTCTCTTTTCGCAC	甲酰转移酶	4
ACSSR4	DT339555.1	399	(GA)16	60.1	AAGCCAAAGCAGA- CAAAAGAAG	TAGAACACCCAACTG- GTTCAAA	未知蛋白	7
ACSSR6	DT337477.1	388	(CT)17	60.0	CAGCAGATTTTCGCAGGT- GT	CTTGGCGCT- GTTGATAATGTAG	未知蛋白	2
ACSSR7	CO732232.1	393	(AG)16	60.4	AAGAGCAAGAGAGGAG- TAGGGG	GAGAAAATTACAGGT- GTTGGCG	未知蛋白	4
ACSSR8	DT335862.1	394	(TA)9	60.0	TCAAGTTTGGTGGCTTC- CTAAT	TTGTCTGGCTTAT- GTCGTTTC	未发现的序列	5
ACSSR9	DT335902.1	397	(CT)21	59.1	GGGATGCTCCAGTTTCT- GAT	ATTTATGATGGCGAC- CTTCTTC	衰老相关蛋白	6
ACSSR10	CO731041.1	396	(AT)12	59.9	GTACGCGTCTTCTACT- GCC	GACTCCATGTTACAC- GACAAT	假定的脱水反应蛋白质 RD22 前体	6
ACSSR11	DT337447.1	398	(GA)11	60.3	TTAACTCC- CATCTTCGTTTTGG	CTAGAGAGACCATA- CATCCCGC	未发现的序列	1
ACSSR12	DT338461.1	395	(TC)10	60.0	TTTCAGAGCTTTAGAG- GATGGC	GGGTATCTTTGGCTA- CATCGAC	未知蛋白	3
ACSSR13	DT338327.1	379	(AG)15	60.7	GGGGAAGAAGACGAA- GAAGAAG	AAGCTATGCGAAGTA- GACAGGC	未知蛋白	3
ACSSR14	DT338672.1	394	(CT)15	60.2	GGT- GTCTCAGGTCAGGTAG- GAG	CGAAGTTTGC- CTTTTGTTTGAC	拟 30 s 核糖体蛋白 S9	5
ACSSR15	DT338506.1	398	(CTA)12	60.7	GAATCC- CCAGCATAGTTTCCTT	ATGGCCTTTTC- CTCTCTCTCTC	未发现的序列	3
ACSSR16	DT337566.1	396	(TCT)8	59.8	CTCTTC- CTCTTCTTCGCTTCG	CACTGAAGTTTCTC- CTCAGCAA	核糖体 L11 相似蛋白	6
ACSSR17	DT336908.1	393	(CAG)9	60.0	CTTGTCATTAGACCA- CAAAA	CCTCCTCCTCCTCTCT- GTTAT	未知蛋白	5
ACSSR18	DT338459.1	387	(GAA)6	60.5	CAGATCGAGGACCA- GATGAAAT	GCACC- CAAATTCTTTTGTAAGC	未知蛋白	3
ACSSR19	DT336929.1	383	(CAG)8	60.0	AGTTATCCACCG- CAAACCTCTA	GCTGTTCTTGGTCTCT- GCTTATT	未发现的序列	3



表 4 (续)

Table 4 Continued

SSR 位置	登录号	产物长度/bp	重复基元	T/°C	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	基因功能	扩增带数
ACSSR20	CO731978.1	378	(GAC)6	60.1	CGGTAACGTGAATTGT-GCAGGA	AGTTTGGGCTCTTGAAAACATC	拟新生多肽 α 链	3
ACSSR21	DT337637.1	383	(TCT)11	59.9	AAGGCAACGTAGAGAG-GTGAAG	AAACCACACAAGGGA-GAAAAGA	细胞质膜质子泵	6
ACSSR22	DT337211.1	351	(AAAC)6	60.3	ATGAACCCTTCC-CCTTCTCTTA	CTCCTTCCCACAAAAT-CAAAAC	未发现的序列	4
ACSSR23	CO731699.1	341	(GCGA)5	61.1	GGAGGCTCTCAT-CAAGGGATAC	GACAAATCTCGATCTC-CACCTC	pop3 肽	4
ACSSR24	DT336569.1	392	(AAAGA)5	59.8	GATCTCTTGCTC-CAACTGGTTT	ATCTTCGATTGT-GAAAACCTGGC	抑制蛋白 [菠萝]	3
ACSSR25	CO730830.1	391	(GATTA)4	59.9	GTTCTCCATTGCTTCTC-GATCT	AGGGCATACTACCAT-CAACAGG	菠萝绿色成熟果实 cDNA 库的菠萝 cDNA 克隆	4
ACSSR26	DT336115.1	397	(CCTCTT)3	59.6	AAGATCGGGTTCAT-CACTCTTC	ACCAAAACAGCATC-TATCTGCC	未知蛋白	4
ACSSR27	DV190745.1	395	(AGAAGC)3	59.9	TGCAATTCTGT-GAGTTCTTCGT	GAAACACTGCTCC-CTTGTCTCT	未发现的序列	4
ACSSR29	DT337199.1	391	(CTTCCG)4	60.1	GATCGGGTTCCTCACTTTTCAG	CCTG-CACTTTCTTTTGCTTCTT	未知蛋白	3
ACSSR30	DT338688.1	387	(AGCTCT)3	59.8	TACACCACCACCTTTTC-CTTTT	CTTGTCTCTCCCTCTC-CTCCT	未发现的序列	4

### 3 讨论

利用扩增片段长度多态性(AFLP), 限制性片段长度多态性(RFLP), 随机扩增多态性 DNA 标记(RAPD)和简单重复间序列(ISSR)分子标记技术研究菠萝遗传多样性已有文献报道<sup>[10-14]</sup>。在菠萝栽培种上至今尚未见从 EST 中开发 SSR 的相关报道。随着近年来 NCBI 中 EST 数据库的完善, EST-SSR 作为新一代分子标记展现了广阔的前景。本实验通过对菠萝 5 659 条 EST 进行 SSR 筛选, 共发现 636 个 SSR, 分布于 617 条 EST 中, SSR 占整个 EST 的 11.24%, 高于水稻 *Oryza sativa*(4.70%)<sup>[15]</sup>, 甘蔗 *Saccharum*(2.90%)<sup>[5]</sup>, 普通小麦 *Triticum aestivum*(5.40%)<sup>[16]</sup>, 辣椒 *Capsicum annum*(2.97%)<sup>[17]</sup>, 白桦 *Betula platyphylla*(10.20%)<sup>[18]</sup>, 亚麻 *Linum usitatissimum*(2.73%)<sup>[19]</sup>, 花生 *Arachis hypogaea*(7.80%)<sup>[20]</sup>, 香蕉 *Musa nana*(5.30%)<sup>[21]</sup>, 西瓜 *Citrullus vulgaris*(6.89%)<sup>[2]</sup>, 甜瓜 *Cucumis melo*(8.36%)<sup>[22]</sup>, 香菇 *Lentinus edodes*(2.96%)<sup>[4]</sup>, 略低于橡胶 *Hevea brasiliensis*(11.42%)<sup>[1]</sup>, 核桃 *Juglans regia*(10.75%)<sup>[23]</sup>, 猕猴桃 *Actinidia*(14.08%)<sup>[24]</sup>。上述差异的原因, 一是 EST 数据库中不同物种间基因的差异导致 SSR 分布的差异; 二是 SSR 检索的软件和标准不同导致最终筛选结果的差异。本研究所得菠萝的 EST 中, 二、三、六核苷酸是主导类型, 分别占 SSR 总数的 42.61%, 29.25%, 20.13%。菠萝二核苷酸重复中 AG/TC 是比较常见的优势基元类型, 在亚麻<sup>[19]</sup>、甜瓜<sup>[22]</sup>、苹果<sup>[3]</sup>、花生<sup>[20]</sup>中也都存在这一规律; 而三核苷酸的重复基元比较分散, 优势基元 AGC/TCG 仅占三核苷酸重复类型的 13.98%, 六核苷酸 SSR 在总的 EST 中有 128 条, 而六核苷酸的重复基元有 80 种, 种类虽丰富, 数量却不多。

本研究共设计了 636 对菠萝 EST-SSR 引物, 合成的 30 对引物中有 27 对引物有良好的扩增结果, 可以预见对剩余引物的筛选有较高成功率地保证。菠萝 EST-SSR 出现频率高, 而且类型丰富, 可为今后凤梨科 Bromeliaceae 植物分类、遗传作图、遗传多样性分析、功能基因定位等方面研究奠定良好基础。

#### 4 参考文献

- [1] 安泽伟, 赵彦宏, 程汉, 等. 橡胶树 EST-SSR 标记的开发与应用[J]. 遗传, 2009, **31**(3): 311 – 319.  
AN Zewei, ZHAO Yanhong, CHENG Han, *et al.* Development and application of EST-SSR markers in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. [J]. *Hereditas*, 2009, **31**(3): 311 – 319.
- [2] 赵胜杰, 刘文革, 阎志红, 等. 西瓜 EST 资源的 SSR 信息分析[J]. 中国蔬菜, 2009, **1**(24): 47 – 51.  
ZHAO Shengjie, LIU Wenge, YAN Zhihong, *et al.* Analysis of SSR information in EST resource of watermelon (*Citrus lanatus*) [J]. *Chin Veget*, 2009, **1**(24): 47 – 51.
- [3] 张俊娥. 苹果 EST 中微卫星分析[J]. 广西农业生物科学, 2008, **27**(4): 378 – 380.  
ZHANG Jun'e. Analysis of microsatellites derived from apple ESTs [J]. *J Guangxi Agric Biol Sci*, 2008, **27**(4): 378 – 380.
- [4] 王艳芳, 赵彦宏, 王爱云, 等. 香菇 EST 资源的 SSR 信息分析[J]. 食品科学, 2010, **31**(1): 137 – 140.  
WANG Yanfang, ZHAO Yanhong, WANG Aiyun, *et al.* Analysis of SSR information in EST resource of *Lentinus edodes* [J]. *Food Sci*, 2010, **31**(1): 137 – 140.
- [5] 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**(6): 1115 – 1123.
- [6] 陈军方, 任正隆, 高丽锋, 等. 从小麦 EST 序列中开发新的 SSR 引物[J]. 作物学报, 2005, **31**(2): 154 – 158.  
CHEN Junfang, REN Zhenglong, GAO Lifeng, *et al.* Developing new SSR markers from EST of wheat [J]. *Acta Agron Sin*, 2005, **31**(2): 154 – 158.
- [7] 张惠云, 吴青松, 孙伟生, 等. 改良 CTAB 法提取菠萝 DNA[J]. 西南农业学报, 2009, **22**(2): 440 – 443.  
ZHANG Huiyun, WU Qingsong, SUN Weisheng, *et al.* Method of modified CTAB for DNA extraction from pineapple [J]. *Southwest China J Agric Sci*, 2009, **22**(2): 440 – 443.
- [8] TEMNYKH S, DECLERCK G, LUKASHOVA A, *et al.* Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential [J]. *Genome Res*, 2001, **11**(8): 1441 – 1452.
- [9] 张延明, 曲敏, 闫玉清, 等. EST-SSRs 在小麦研究中的应用[J]. 安徽农学通报, 2006, **12**(13): 79 – 80.  
ZHANG Yanming, QU Min, YAN Yuqing, *et al.* Application of EST-SSRs in wheat research [J]. *Anhui Agric Sci Bull*, 2006, **12**(13): 79 – 80.
- [10] 刘卫国, 易干军, 张秋明, 等. 菠萝 DNA 的提取及 AFLP 反应体系的建立[J]. 果树学报, 2006, **23**(1): 51 – 54.  
LIU Weiguo, YI Ganjun, ZHANG Qiuming, *et al.* Extraction of DNA and construction of AFLP fingerprinting in pineapple [J]. *J Fruit Sci*, 2006, **23**(1): 51 – 54.
- [11] DUVAL M F, NOYER J L, PERRIER X, *et al.* Molecular diversity in pineapple assessed by RFLP markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, **102**(1): 83 – 90.
- [12] de FÁTIMA RUAS C, RUAS P M, CABRAL J R S. Assessment of genetic relatedness of the genera *Ananas* and *Pseudananas* confirmed by RAPD markers [J]. *Euphytica*, 2001, **119**(3): 245 – 252.
- [13] FEUSER S, MELER K, DAQUINTA M, *et al.* Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2003, **72**(3): 221 – 227.
- [14] 张如莲, 傅小霞, 漆智平, 等. 菠萝 17 份种质的 ISSR 分析[J]. 中国农学通报, 2006, **22**(6): 428 – 431.  
ZHANG Rulian, FU Xiaoxia, QI Zhiping, *et al.* ISSR analysis on 17 pine apple resources [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2006, **22**(6): 428 – 431.
- [15] KANTETY R V, la ROTA M, MATTHEWS D E, *et al.* Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat [J]. *Plant Mol Biol*, 2002, **48**(5): 501 – 510.
- [16] GUPTA P K, RUSTGI S, SHARMA S, *et al.* Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat [J]. *Mol Genet Genomics*, 2003, **270**(4): 315 – 323.
- [17] 李晶晶, 王述彬, 刘金兵, 等. 辣椒 EST-SSR 标记的开发[J]. 分子植物育种, 2008, **6**(6): 1219 – 1222.  
LI Jingjing, WANG Shubin, LIU Jinbing, *et al.* Development of pepper EST-SSR marker [J]. *Mol Plant Breed*, 2008, **6**(6): 1219 – 1222.

- [18] 王艳敏, 魏志刚, 杨传平. 白桦 EST-SSR 信息分析与标记的开发[J]. 林业科学, 2008, **44**(2): 78 – 84.  
WANG Yanmin, WEI Zhigang, YANG Chuanping. Data mining for SSRs in ESTs and EST-SSR marker development in *Betula platyphylla* [J]. *Sci Silv Sin*, 2008, **44**(2): 78 – 84.
- [19] 张建平, 王斌, 赵丽娟, 等. 亚麻 EST 序列中 SSR 标记的筛选[J]. 西北植物学报, 2009, **29**(5): 910 – 915.  
ZHANG Jianping, WANG Bin, ZHAO Lijuan, *et al.* Screen of SSR markers from EST of flax (*Linum usitatissimum* L.) [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2009, **29**(5): 910 – 915.
- [20] 梁炫强, 洪彦彬, 陈小平, 等. 花生栽培种 EST-SSRs 分布特征及应用研究[J]. 作物学报, 2009, **35**(2): 246 – 254.  
LIANG Xuanqiang, HONG Yanbin, CHEN Xiaoping, *et al.* Characterization and application of EST-SSRs in peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. *Acta Agron Sin*, 2009, **35**(2): 246 – 254.
- [21] 王静毅, 陈业渊, 刘伟良, 等. 香蕉 EST-SSRs 标记的开发与应用[J]. 遗传, 2008, **30**(7): 933 – 940.  
WANG Jingyi, CHEN Yeyuan, LIU Weiliang, *et al.* Development and application of EST-derived SSR markers for bananas (*Musa nana* Lour.) [J]. *Hereditas*, 2008, **30**(7): 933 – 940.
- [22] 胡建斌, 李建吾. 甜瓜 EST-SSR 位点信息及标记开发[J]. 园艺学报, 2009, **36**(4): 513 – 520.  
HU Jianbin, LI Jianwu. Information on EST-SSR loci in melon (*Cucumis melo* L.) and marker exploitation [J]. *Acta Hortic Sin*, 2009, **36**(4): 513 – 520.
- [23] 齐建勋, 王克建, 吴春林, 等. 核桃 EST-SSR 标记的开发[J]. 农业生物技术学报, 2009, **17**(5): 872 – 876.  
QI Jianxun, WANG Kejian, WU Chunlin, *et al.* Development of EST-SSR markers in *Juglans regia* [J]. *J Agric Biotechnol*, 2009, **17**(5): 872 – 876.
- [24] 姜春芽, 徐小彪, 廖娇, 等. 猕猴桃 EST 序列的 SSR 信息分析[J]. 中国农学通报, 2009, **25**(13): 37 – 39.  
JIANG Chunya, XU Xiaobiao, LIAO Jiao, *et al.* Analysis of SSR information in EST resources of kiwifruit (*Actinidia* ssp.) [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2009, **25**(13): 37 – 39.