

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2022.08.022

基于毛花猕猴桃基因组的性别相关 SSR 分子标记的开发

刘嘉艺, 岳俊阳, 刘永胜

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要: 猕猴桃作为雌雄异株植物, 其早期性别鉴定对于育种和增加其经济价值有着重要意义。文章通过开发毛花猕猴桃性别相关的简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)分子标记, 以期能在早期鉴定出毛花猕猴桃雌雄植株, 提高毛花猕猴桃资源利用率。利用 MISA 工具从毛花猕猴桃雌雄基因组的 29 条染色体筛选获得 381 250 个 SSR 位点, 并对 SSR 位点的数量与分布特征进行统计分析。设计合成 150 对引物, 利用毛花猕猴桃基因组 DNA 作为模板, 采用普通聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增的方法以及聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离检测方法筛选出具有性别差异扩增片段的 SSR 引物。其中序号为 Primer000181 的引物表现为雄性特异。在毛花猕猴桃 5 个雄株、2 个雌株样本中进行验证, 其表现均与前文一致。结果表明利用毛花猕猴桃基因组开发性别鉴定相关 SSR 分子标记具有可行性, 并筛选出 1 对可以鉴定毛花猕猴桃雌雄植株的引物, 能够在毛花猕猴桃生长早期可靠、快速地鉴定其性别。

关键词: 毛花猕猴桃; 基因组; 简单重复序列(SSR); 性别鉴定; 雄性特异

中图分类号: Q812 文献标志码: A 文章编号: 1003-5060(2022)08-1135-05

Development of sex-related SSR molecular markers based on the genome of *Actinidia eriantha*

LIU Jiayi, YUE Junyang, LIU Yongsheng

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: Kiwifruit is a dioecious plant, and its early sex identification is of great significance for breeding and increasing its economic value. In order to identify male and female plants of *Actinidia eriantha* in early stage and improve the utilization rate of *A. eriantha* resources, the sex-related simple sequence repeat(SSR) molecular markers were developed. The MISA tool was used to screen 381 250 SSR loci from 29 chromosomes of the male and female genomes of *A. eriantha*, and the number and distribution characteristics of SSR loci were statistically analyzed. The 150 pairs of primers were designed and synthesized. The genomic DNA of *A. eriantha* was used as template, and the SSR primers with sex-specific amplified fragments were screened by polymerase chain reaction(PCR) amplification and polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE). The primer with serial number Primer000181 is male-specific. It was verified in samples of five male plants and two female plants of *A. eriantha*, and their performance was consistent with the previous results. This study confirms the feasibility of using the *A. eriantha* genome to develop SSR molecular markers related to sex identification, and screens out a pair of primers that can identify the male and female plants of *A. eriantha*. The sex of *A. eriantha* can be reliably and quickly identified in the early growth stage.

收稿日期: 2021-03-08; 修回日期: 2021-04-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31471157)

作者简介: 刘嘉艺(1995—), 女, 安徽合肥人, 合肥工业大学硕士生;

刘永胜(1964—), 男, 重庆市人, 博士, 合肥工业大学教授, 博士生导师。

Key words: *Actinidia eriantha*; genome; simple sequence repeat(SSR); sex identification; male specificity

根据猕猴桃属植物分类学最新修订,该属植物全世界有 54 个种、21 个变种,共约 75 个分类单元,中国分布有 52 个种,其中有 44 个种为中国特有^[1],猕猴桃遗传资源非常丰富,对于其开发利用有着天然的优势。猕猴桃原是一种古老藤本果树上的野果,19 世纪初被引种至新西兰,逐渐发展成为一种风靡全球的水果。猕猴桃含有丰富的营养成分,富含维生素 C、多种矿质、氨基酸,有“水果之王”的美誉^[2]。

猕猴桃作为显花雌雄异株果树,对其早期性别鉴定的研究在实践中有着非常重要的意义。首先,猕猴桃是以果实为主的经济作物,雌株的经济价值明显高于雄株;其次,由于猕猴桃从播种到多产的成熟期经历时间较长,需要 3~5 a,童期漫长和幼苗期雌雄无法辨别,是猕猴桃改良和选育道路上的一个巨大阻碍^[3]。因此,开发用于猕猴桃早期性别鉴定的技术或分子标记可以有效地控制栽培过程中的雌雄比例,减少不必要的生产浪费,提高育种效率,创造更大的经济价值。

近年来,分子标记技术作为分析遗传变异的有效工具被应用广泛。分子标记包括随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)、相关序列扩增多态性 (sequence-related amplified polymorphism, SRAP) 等,这些技术先后用于猕猴桃早期性别分析,在果树童期进行雌雄选株提供了可靠的技术方法^[4-5]。随着测序技术的飞速发展以及测序成本的不断降低,在许多物种的研究上产生了丰富的转录组数据。基于转录组测序获得的 EST 数据进一步分析得到的微卫星序列已成为分子标记技术使用的特点,且在花椒、洋葱、蘑菇等物种上得到成功验证^[6-8]。微卫星序列又称简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR),是重复序列的主要组成成分之一。SSR 是一类由 1~6 个核苷酸为重复单位序列组成的串联重复序列^[9]。SSR 为共显性标记,能区分纯合子和杂合子,能检测出等位基因,较简单、快捷、低成本,效率更高更经济。

近年来,国内外学者对 SSR 技术应用于猕猴桃进行了一些研究。文献[10]报道了在杂交后代中符合孟德尔遗传定律分离的 40 对 SSR 引物,并以二倍体和四倍体的中华猕猴桃作为研究对象,讨论其杂合程度;文献[11]将文献[10]报道的

引物应用于我国栽培的中华猕猴桃和美味猕猴桃 2 个商业物种的 9 个天然居群(共 221 个样),对其遗传多样性进行初步分析;文献[12-13]均通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI) EST 数据库的软枣猕猴桃 EST 序列开发了若干对在猕猴桃属种有着较高通用性的 EST-SSR 引物;本课题组对中华猕猴桃“红阳”的转录组序列进行分析,根据分析结果开发了 EST-SSR 引物,并对 28 个品种的猕猴桃进行遗传多样性分析^[14]。大多数报道的猕猴桃 SSR 分子标记的开发应用均使用来自于 EST 数据库的序列、转录组测序分析或者直接采用已公布的 SSR 引物来进行生物信息学分析和遗传多态性的实验,但用于性别鉴定的 SSR 引物并不多。

本研究进行 SSR 性别鉴定位点筛选所用的基因组序列为毛花猕猴桃(*A. eriantha*)雄雌基因组数据^[15]。通过对猕猴桃雄雌基因组的 29 条染色体进行筛选获得 SSR 标记,对 SSR 位点的组成、分布及特征进行分析,开发可以有效鉴定毛花猕猴桃雄雌植株的 SSR 引物,以期为毛花猕猴桃幼苗期性别鉴定、毛花猕猴桃性别相关基因的克隆提供依据,并为其转化和利用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

用于本研究的毛花猕猴桃样品于 2020 年 7 月采集,雄株 5 株,雌株 2 株,人工栽培于安徽省合肥市蜀山区安徽农业大学农萃园。选取植株上的幼嫩叶片,作为提取基因组 DNA 的供试材料,采下后放置于冰盒中,立即带回实验室经液氮处理后放入 -80 °C 超低温冰箱中保存待用。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组数据及 SSR 位点识别定位

利用 MISA (<http://pgc.ipk-gatersleben.de/misa/>) 工具对毛花猕猴桃基因组数据进行 SSR 位点的识别定位。筛选标准如下:单核苷酸重复的次数在 10 次或 10 次以上;二核苷酸重复的次数在 6 次或 6 次以上;三至六核苷酸重复的次数在 5 次或 5 次以上。

1.2.2 引物设计

利用 Primer 3.0 对筛选得到的 SSR 位点设

计引物,引物设计原则为:引物序列长度 18~22 bp,聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)产物长度 100~300 bp,退火温度 50~63 °C,GC 占比为 40%~60%,尽量避免出现错配、二聚体、发夹结构和引物二聚体。最终随机合成 150 对引物,将引物序列送生工生物工程上海有限公司合成,部分引物信息见表 1 所列。

表 1 SSR 引物序列

引物名称	序列(5'-3')	退火温度/°C	预期产物长度/bp
000041-F	CGAGTGATAGGACAGCTGGC	58.4	269
000041-R	ACCCGCGCGATTATAGT	56.8	
000066-F	AACTGGCATGTGGAGATGGG	57.9	
000066-R	CCAAAATCGTGTGGGGCATC	57.3	188
000161-F	TGTCGTTACGAAGCGTGGAT	56.5	
000161-R	GAAGGGGAAGGGAAAGTCG	58.5	247
000181-F	CTTGGGTGCCATTGTTCAAC	57.5	
000181-R	AGGCCCTGGCAGATATCCTT	58.6	256
000191-F	AAGACGACACGTGTCCAAA	56.7	
000191-R	GTGGCAATCGAACTGGGAGA	57.7	237
000196-F	AGGTAGGCTCGGGAAAGTGAT	58.0	
000196-R	GCACGGATATTCCAAGCTGC	57.1	224
000201-F	CCACTGAGGTTGACTTCTGA	54.3	
000201-R	AGCTGTTGTGCACTCATAGGT	56.3	141
000206-F	ACCGTCCACGTAAGCATGTA	56.1	
000206-R	TCGTTCCCTACCCGTTTGA	53.6	337

1.2.3 猕猴桃基因组 DNA 的提取

采用改良后的 CTAB 方法提取毛花猕猴桃新鲜幼嫩叶片总 DNA,提取后的 DNA 经 Nano-Drop 2000 测定质量浓度,于-20 °C 保存备用。

1.2.4 PCR 扩增反应体系

本研究所用的普通 PCR 扩增反应体系,总体积为 10 μ L,其中 Taq Mix 8.4 μ L,DNA 模板 1.0 μ L,正反向引物各为 0.3 μ L。PCR 反应程序为 94 °C 预变性 5 min、94 °C 变性 30 s、根据实际温度退火 30 s、72 °C 延伸 30 s,30 个循环,72 °C 完全反应 10 min,最后在 4 °C 下保存。

1.2.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳

PCR 扩增产物采用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测,电泳凝胶配方为:蒸馏水 8 mL,30% 丙烯酰胺 4 mL,5×TBE 溶液 3 mL,10% APS 溶液 100 μ L,四甲基乙二胺 10 μ L。电泳后使用紫外核酸检测仪成像。

2 实验结果分析

2.1 SSR 位点数量与分布

利用 MISA 工具对毛花猕猴桃的雄雌基因组序列进行识别,在 29 条染色体和 1 条未匹配序列共计 30 条序列中,总长 690 378 758 bp,共识别出 381 250 个符合条件的 SSR 位点,每条序列都含有 1 个以上的 SSR 位点。

毛花猕猴桃基因组的 SSR 种类非常丰富,各种重复类型均有出现,但是其数量有很大差异,见表 2 所列。由表 2 可知,单核苷酸重复类型的数量最多,占比 50.74%;其次是二核苷酸重复类型,占比 39.82%;然后是三核苷酸重复;五核苷酸重复类型的数量最少,占比不到 0.6%。

表 2 毛花猕猴桃基因组 SSR 类型和比例

重复类型	数量/个	比例/%
单核苷酸	193 459	50.74
二核苷酸	151 801	39.82
三核苷酸	24 920	6.54
四核苷酸	6 502	1.70
五核苷酸	2 090	0.55
六核苷酸	2 478	0.61

SSR 位点重复次数分布见表 3 所列。从表 3 可以看出,SSR 位点的重复次数以 10 次最多,共有 103 792 个,占总 SSR 的 27.22%;其次为重复 6 次,有 50 144 个,占总 SSR 的 13.15%;重复次数相对较少的为 9 次和 14 次,SSR 位点数为 15 349 个和 13 578 个,分别占总 SSR 的 0.40% 和 0.36%。

表 3 毛花猕猴桃基因组 SSR 位点重复次数分布

重复次数/次	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	≥15
单核苷酸						92 870	40 541	21 612	11 680	9 477	17 279
二核苷酸		42 413	26 870	20 008	14 443	10 362	7 712	6 156	4 879	3 967	14 991
三核苷酸	13 301	5 390	2 467	1 300	786	497	316	206	173	128	356
四核苷酸	4 117	1 388	541	234	99	52	32	19	11	3	6
五核苷酸	1 560	387	98	31	8	4	1	0	0	1	0
六核苷酸	1 652	566	175	53	13	7	6	0	0	2	4
总计	20 630	50 144	30 151	21 626	15 349	103 792	48 608	27 993	16 743	13 578	32 636

2.2 SSR 位点的分布特征

毛花猕猴桃 SSR 核苷酸基序类型见表 4 所列。从表 4 可以看出,SSR 以单核苷酸重复基序为主要类型,有 193 459 次;其次是二核苷酸和三核苷酸重复类型。在单核苷酸重复基序中以 A/T 为主,有 187 077 次,占总单核苷酸重复的 96.7%,以重复 10 次为主;在二核苷酸重复基序中以 AG/CT 为主,有 85 326 次,占总二核苷酸重复的 56.2%,以重复 6 次为主;在三核苷酸重复基序中以 AAT/ATT 为主,有 6 134 次,占总三核苷酸重复的 24.6%,以重复 5 次为主。

表 4 毛花猕猴桃雄雌基因组中的 SSR 类型分布

重复类型	基序	重复次数/次	合计/次
单核苷酸	A/T	187 077	193 459
	C/G	6 382	
二核苷酸	AC/GT	17 510	151 801
	AG/CT	85 326	
三核苷酸	AT/AT	48 602	24 920
	CG/C/G	63	
四核苷酸	AAC/GTT	1 080	6 502
	AAG/CTT	4 949	
	AAT/ATT	6 134	
	ACC/GGT	6 093	
	ACG/CGT	217	
	ACT/AGT	241	
	AGC/CTG	609	
	AGG/CCT	3 817	
	ATC/ATG	1 235	
	CCG/CGG	545	
			2 090
五核苷酸			2 478
六核苷酸			

2.3 SSR 性别特异片段的筛选

利用 150 对特异引物对毛花猕猴桃雌雄植株的基因组 DNA 进行 PCR 扩增。结果显示:在 150 对特异引物中,有 117 对引物扩增出性别特异产物,但是多数引物特异性较差,多态性强,扩增出的条带数目多。其中一对引物(序号为 Primer000181)在雌雄个体上出现差异,在雄性植株中扩增出一条长度为 250 bp 的特异性片段,在雌株中没有扩增出特异性片段,如图 1 所示。图 1 中:1~10 个泳道分别为引物 Primer000041、Primer000066、Primer000161、Primer000181、Primer000196 用毛花猕猴桃雄株和雌株基因组 DNA 作为模板的扩增产物;M 表示 DNA marker, m 表示雄性;f 表示雌性,下同。

引物 Primer000161 和 Primer000181 在 7 株

已知性别毛花猕猴桃植株中的通用性鉴定如图 2 所示。从图 2 可以看出,Primer000161 在 7 个模板中没有表现出和初筛结果相似的性别特异,因此不能作为性别鉴定引物;而 Primer000181 在 5 株雄株中有一条特异性片段,2 株雌株中没有扩增出特异性片段,与初筛结果一致。该结果用同样的方法重复 3 次,得到同样的结果,说明该标记稳定、可靠。

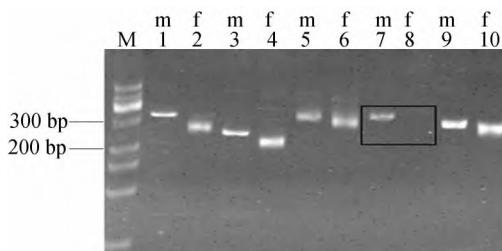


图 1 引物筛选的聚丙烯酰胺凝胶电泳图

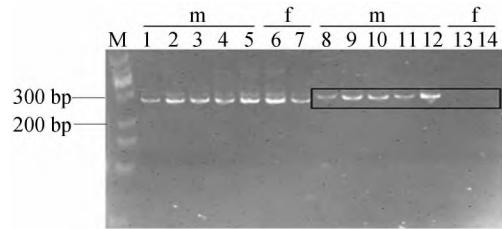


图 2 引物 Primer000161 和 Primer000181 的通用性鉴定

3 讨 论

猕猴桃作为雌雄异株植物,在育苗期对其进行性别鉴定具有重要的生物学意义和经济价值。由于雌株和雄株会在生理生化、蛋白质与核酸等方面体现出差异,随着分子生物学的发展,性别鉴定的方法也非常广泛。目前形态学鉴定方法、性别特异蛋白的研究以及 DNA 分子标记法应用较多。DNA 分子标记是 DNA 水平遗传变异的直接反应,由于结果更为稳定等众多优点,SSR 已成为目前分子标记研究中的主要形式,在山杨、海枣等植物中都有过 SSR 性别分子标记的报道^[16-17]。

本研究通过对比毛花猕猴桃雌雄基因组序列,分析 SSR 位点的数量与分布特征,通过 PCR 扩增和聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法筛选特异性引物,从而获得理想的 SSR 性别分子标记,即 Primer000181。Primer000181 在 Chr19 染色体,位置为 186948 187203,附近有 Glycosyltransferase family 90 protein、Outer dense fiber protein 等功

(下转第 1146 页)

- compounds in rat bile after oral administration of total triterpenoids of *Ganoderma lucidum* by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2012, 63: 29-39.
- [24] YANG M, WANG X, GUAN S, et al. Analysis of triterpenoids in *Ganoderma lucidum* using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2007, 18(5): 927-939.
- [25] ZHONG W, CUI Y, YU Q, et al. Modulation of LPS-stimulated pulmonary inflammation by borneol in murine acute lung injury model [J]. *Inflammation*, 2014, 37 (4): 1148-1157.
- [26] 赵爱华, 周亚东, 徐静, 等. 灵芝孢子粉对百草枯中毒大鼠肺组织保护作用机制的研究[J]. 泰山医学院学报, 2015, 36(10): 1085-1088.
- [27] 杨红梅. 灵芝多糖对失血性休克再灌注肺损伤的保护作用 [J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(7): 1415-1417.
- [28] WAN B, LI Y, SUN S, et al. Ganoderic acid A attenuates lipopolysaccharide-induced lung injury in mice[J]. *Bioscience Reports*, 2019, 39(5): BSR20190301.
- [29] JIANG Q, YI M, GUO Q, et al. Protective effects of polydatin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury through TLR4-MyD88-NF- κ B pathway [J]. *International Immunopharmacology*, 2015, 29(2): 370-376.
- [30] EVERHART M B, HAN W, SHERRILL T P, et al. Duration and intensity of NF- κ B activity determine the severity of endotoxin-induced acute lung injury[J]. *The Journal of Immunology*, 2006, 176(8): 4995-5005.
- [31] 李春雷. 理肺汤干预慢性阻塞性肺病通过 MAPK/AP-1 信号通路缓解氧化应激状态机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.

(责任编辑 同杏丽)

(上接第 1138 页)

能基因, 为后续毛花猕猴桃性别决定机制研究奠定基础, 该 SSR 引物带结果清晰、特异性高, 为毛花猕猴桃雌雄植株的早期性别鉴定提供了技术保障。

[参 考 文 献]

- [1] LI J, LI X, SOEJARTO D. *Actinidiaceae*[J]. *Flora of China*, 2007, 12: 334-360.
- [2] 宋小青, 任亚梅, 张艳宜, 等. 采后猕猴桃叶绿素降解机制及 1-MCP 处理对其代谢的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(17): 260-265.
- [3] 康宗利, 王宁, 杨玉红, 等. 猕猴桃性别鉴定研究进展[J]. 北方园艺, 2011(20): 184-187.
- [4] GILL G P, HARVEY C F, GARDNER R C, et al. Development of sex-linked PCR markers for gender identification in *Actinidia* [J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 1998, 97(3): 439-445.
- [5] 李旭, 吴松权, 姜明亮, 等. 软枣猕猴桃性别相关的 SRAP 分子标记[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(8): 69-71.
- [6] 李立新, 司守霞, 魏安智, 等. 基于花椒转录组序列 SSR 分子标记开发及花椒种质鉴定[J]. 华北农学报, 2017, 32(5): 69-77.
- [7] 李满堂, 张仕林, 邓鹏, 等. 洋葱转录组 SSR 信息分析及其多态性研究[J]. 园艺学报, 2015, 42(6): 1103-1111.
- [8] AH H, JO I H, OH Y L, et al. Molecular characterization of 170 new gDNA-SSR markers for genetic diversity in Button Mushroom (*Agaricus bisporus*) [J]. *Mycobiology*, 2019, 47(4): 527-532.

- [9] 罗兵, 孙海燕, 徐港明, 等. SSR 分子标记研究进展[J]. 安徽农业科学, 2013(12): 5210-5212, 5246.
- [10] HUANG W G, CIPRIANI G, MORGANTE M, et al. Microsatellite DNA in *Actinidia chinensis*: isolation, characterisation, and homology in related species[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 97(8): 1269-1278.
- [11] 栗琪, 李作洲, 黄宏文. 猕猴桃野生居群的 SSR 分析初报 [J]. 武汉植物学研究, 2004(2): 175-178.
- [12] MAN Y, WANG Y, ZHANG L, et al. Development of microsatellite markers in *Actinidia arguta* (*Actinidiaceae*) based on the NCBI data platform[J]. *Am J Bot*, 2011, 98(11): e310-e315.
- [13] 王丹丹, 杨东霞. 软枣猕猴桃 EST-SSR 引物开发及通用性研究[J]. 西北林学院学报, 2017, 32(4): 147-152.
- [14] MENG M, TANG W, LIU J, et al. Development of EST-SSR markers in *Actinidia chinensis* cv 'Hongyang' based on transcriptomic sequences[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2014, 20(4): 564-570.
- [15] TANG W, SUN X P, YUE J Y, et al. Chromosome-scale genome assembly of kiwifruit *Actinidia eriantha* with single-molecule sequencing and chromatin interaction mapping[J]. *GigaScience*, 2019, 8(4): 1-10.
- [16] 王洪梅, 李春明, 白卉, 等. 一种鉴定山杨性别的 SSR 分子标记的筛选[J]. 东北林业大学学报, 2017, 45(10): 17-19, 29.
- [17] MARYAM, JASKANI M J, AWAN F S, et al. Development of molecular method for sex identification in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plantlets using novel sex-linked microsatellite markers[J]. *3 Biotech*, 2016, 6: 1-7.

(责任编辑 同杏丽)