

蒺藜苜蓿 EST-SSRs 分布特征及 标记的开发

屠德鹏¹, 魏臻武¹, 武自念¹, 雷艳芳², 张栋¹, 邱伟伟¹

(1. 扬州大学动物科学与技术学院 扬州大学草业科学研究所, 江苏 扬州 225009; 2. 上海鼎牛饲料有限公司, 上海 200436)

摘要:利用蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*) EST 数据库开发新的 EST-SSRs 标记, 分析 EST-SSRs 的分布特征。利用 SSRIT 软件对 NCBI 上公布的 285 285 条蒺藜苜蓿 EST 序列进行 SSR 序列的检测, 共检测出 6 688 个 SSR 序列, 分布于 6 512 个 EST 中, 占整个 EST 数据库的 2.28%。其中二核苷酸重复单元出现的频率最高, 占总 EST-SSRs 的 34.4%(2 301 条), 其次是三核苷酸重复单元, 占 29.6%(1 982 条), 4~6 核苷酸重复单元所占比例均较小。利用 Primer Premier 5.0 随机设计 100 对 EST-SSRs 引物, PCR 扩增结果表明, 85 对引物在蒺藜苜蓿 RIL 群体亲本 A17 和 A20 上有清晰的扩增条带, 占合成引物总数的 85%, 在 RIL-8 群体中检测到 29 个 EST-SSRs 引物有多态性, 占可扩增引物的 34.1%。本研究开发了 85 个蒺藜苜蓿 EST-SSRs 新标记。

关键词:蒺藜苜蓿; EST-SSRs; 引物设计; 标记开发

中图分类号: S551⁺.9; Q946-33

文献标识码: A

文章编号: 1001-0629(2011)05-0746-07

*¹ 随着分子生物学、基因组学和功能基因组学的快速发展, 分子标记技术的应用也越来越广泛^[1-3]。苜蓿(*Medicago sativa*) 分子标记辅助育种是加速苜蓿育种进程的重要手段之一。魏臻武^[4] 利用 SSR、ISSR、RAPD 标记技术构建了苜蓿的指纹图谱, 指纹图谱可以鉴定苜蓿品种、品系和选择杂交亲本, 为育种工作提供保障。在众多的分子标记中, SSR (simple sequence repeat) 标记以含量丰富、遍布整个基因组、共显性、多态性高等优点被广泛应用^[5-7]。传统 SSR 引物开发一般是通过构建基因组文库、Southern 杂交、基因克隆和测序等程序进行的, 该方法工作量大、成功率低且成本较高^[5]。

蒺藜苜蓿(*M. truncatula*) 作为豆科模式植物, 具有遗传转化效率高、生长期短、基因组小、自花授粉、固氮等优点^[8-10]。蒺藜苜蓿与苜蓿亲缘关系很近, 与苜蓿基因组具有很高的同源性。因而从蒺藜苜蓿获得的信息可以用于苜蓿中, 这对于促进豆类作物和苜蓿等牧草的育种有重要意义。随着对蒺藜苜蓿基因组学的深入研究, SSR 标记已不能满足蒺藜苜蓿高密度遗传图谱构建、基因克隆等研究的需要。因此, 需要开发大量新的标记。

表达序列标签 (expressed sequence tags, EST) 是指从不同组织来源的 cDNA 文库中随机挑选克隆进行 5' 或 3' 端测序后得到的长约 300~500 bp 的

基因表达序列片段^[11-12]。EST-SSRs 是基于 EST 的新型分子标记, EST-SSRs 与基因组 SSR 标记相比不但具有可以直接获得基因表达信息, 为功能基因提供可靠标记的优点, 而且具有通用性高、开发简单且成本较低等优点^[13]。在小麦 (*Triticum aestivum*)^[14]、大豆 (*Glycine max*)^[15]、苜蓿^[4, 16]、高羊茅 (*Festuca arundinacea*)^[13]、鸭茅 (*Dactylis glomerata*)^[17]、鹰嘴豆 (*Cicer arietinum*)^[18]、高粱 (*Sorghum bicolor*)^[19-20] 等植物的 EST 序列中检测到 2%~10% 的 EST-SSRs。由此可见, EST 中含有大量的 SSR, 为 SSR 标记的开发提供了一个巨大的 DNA 序列来源。目前, NCBI 上公布的蒺藜苜蓿 EST 已达 285 285 条, 大量 EST 的存在为蒺藜苜蓿 EST-SSRs 标记的开发奠定了基础。

该试验利用 NCBI 上公布的蒺藜苜蓿 EST 序列, 查找 EST-SSRs, 分析 SSR 在蒺藜苜蓿 EST 中的分布特征。设计 EST-SSRs 引物, 利用蒺藜苜蓿重组自交系 (RIL) 群体及其亲本进行电泳检测, 开

收稿日期: 2011-01-25 接受日期: 2011-03-16
基金项目: 国家 863 计划项目“高产、多抗、优质苜蓿新品种分子聚合育种”(2008AA10Z149); 国家自然科学基金项目“豆科模式植物蒺藜苜蓿种子产量相关性状的比较基因组学研究”(30671486)
作者简介: 屠德鹏(1984-), 男, 河南商丘人, 在读硕士生, 研究方向为牧草遗传育种。
E-mail: depeng_tu@yahoo. cn
通信作者: 魏臻武 E-mail: zhenwu_wei@yahoo. com. cn

发新的 EST-SSRs 标记。这些新的 EST-SSRs 标记,为蒺藜苜蓿高密度遗传图谱的构建、遗传多样性、基因克隆、数量性状基因位点(QTL)定位及引物通用性等方面的研究提供材料来源。

1 材料与方 法

1.1 材料 试验材料为来自法国的蒺藜苜蓿 Jemalong 中的 A20 和 A17 构建的 RIL-8 群体及亲本,该群体目前有 143 个家系。群体和亲本 2009 年 10 月种植在扬州大学草业科学实验基地,试验地土壤肥力中等偏上,有机质含量为 1.2%,全氮含量 0.12%,碱解氮 100.4 mg/kg,速效磷 88.7 mg/kg,速效钾 36.3 mg/kg。条播,行距 0.7 m,小区面积为 1 m×2 m。全年不施肥。适时排灌水,人工除草。

1.2 方 法

1.2.1 DNA 的提取 采用魏臻武^[4]稍加改进的 CTAB 法提取基因组 DNA。用 0.8% 琼脂糖凝胶和紫外分光光度计对其质量和浓度进行检测。提取的 DNA 溶解于 100 μ L TE 后放入 4℃ 冰箱备用。

1.2.2 蒺藜苜蓿 EST 序列中 SSR 的检索 从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网上下载 285 285 条蒺藜苜蓿 EST 序列。利用 SSRIT (simple sequence repeat identification tool) 软件检索重复单元为二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸的 SSR,标准为重复序列长度 ≥ 20 bp,即二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸重复次数分别大于或等于 10、7、5、4、4。

1.2.3 EST-SSRs 引物设计 利用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计,引物设定的条件如下:引物长度范围为 18~22 bp;引物退火温度在 50~60℃,上下引物退火温度相差不超过 2℃;GC 含量在 40%~60%,最佳为 50%,且上下引物序列 GC 含量的差异不能太大,3' 端最后 5 个碱基最好不要富含 GC,特别是连续的 3 个 G 或 C;扩增产物在 100~600 bp;尽量避免形成稳定的引物二聚体(dimer and cross dimer)和发夹结构(hairpin)。设计的引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2.4 SSR 扩增反应体系 DNA 模板(20~90 ng/ μ L)3 μ L;引物(10 pmol/ μ L)3 μ L;反应体系混合物配比:0.24 μ L dNTP (10 mmol/L) + 1.5 μ L 10×Buffer + 0.9 μ L Mg²⁺ (20 mmol/L) + 0.16 μ L TaqDNA 聚合酶(1U) + 1.2 μ L ddH₂O^[11]。反应体系为 10 μ L(每孔添加量)。

扩增反应程序:94℃ 预变性 3 min,95℃ 变性 1 min,52℃ 退火 1.5 min(不同引物退火温度不同),72℃ 延伸 1 min,共循环 35 次,最后 72℃ 保温 8 min,4℃ 保存。

1.2.5 凝胶电泳及银染 PCR 扩增产物中加入 1 μ L Loading buffer(溴酚蓝缓冲液),扩增产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳,150 V 恒电压,然后银染检测,拍照保存。

2 结果与分析

2.1 蒺藜苜蓿 EST-SSRs 的检索 从 285 285 条 EST 序列中共检测 SSR 序列 6 688 条,分布于 6 512 个 EST 序列中。EST-SSRs 占有 EST 总数的 2.28%,其中二、三、四、五和六核苷酸重复基元分别占总 SSR 的 34.4%、29.6%、10.2%、11.8% 和 14.0%,二核苷酸和三核苷酸出现频率最高,四核苷酸重复基元出现的频率最低,为 10.2%(表 1)。

表 1 EST-SSRs 序列中不同重复核苷酸数的数量及百分比

重复核苷酸数	EST-SSRs 条带数(条)	占总 EST-SSRs 的比例(%)
二核苷酸	2 301	34.4
三核苷酸	1 982	29.6
四核苷酸	683	10.2
五核苷酸	788	11.8
六核苷酸	934	14.0
合计	6 688	100.0

2.2 蒺藜苜蓿 EST-SSRs 的分布特征 在检测到的 2 301 条含有二核苷酸重复基元的 EST-SSRs 中,含 GA/TC 和 AG/CT 重复基元最多,分别占 SSRs 总数的 17.49%(1 170 条)和 11.21%(55 条)(图 1);其中 CG/CG 重复基元没有出现。三核苷酸重复基元中以 GAA/TTC 出现的频率最高,为 7.10%;其次是 AAG/CTT、AGA/TCT、ATG/CAT 和 AAT/ATT,占总 SSRs 比例分别为 4.28%、3.75%、1.67% 和 1.50%,其他重复基元出现的频率较低。四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸出现频率较高的为 AATT/AATT (1.58%)、CTCA/TGAG (1.48%)、AAATC/GATTT (0.57%) 和 TCTAAA/TTAGA (1.06%)。其余各重复基元频率都较低。

对于重复次数,二核苷酸基元的重复次数类型多、跨度大。其中 GA/TC 基元跨度最大,达 72 种,

重复次数为 10~87 次;其次为 AG/CT 基元,跨度为 47 种,重复次数为 10~79 次;AT/AT 和 TA/TA 基元跨度也较大,重复次数分别为 10~34 和 10~37。三核苷酸基元重复次数类型和跨度比二核苷酸小,其中 GAA/TTC(11 种)、AGA/TCT(8 种)、AAG/CTT(7 种)和 ACT/AGT(6 种),其

他重复基元的重复次数多以 7、8、9 次出现。四核苷酸中 ATAG/CTAT(4 种)和 CTCA/TGAG(4 种)跨度较大,其他类型重复次数多以 4、5 次出现。五核苷酸和六核苷酸重复基元的重复次数多以 4、5、6 次中的一种或两种出现(表 2)。

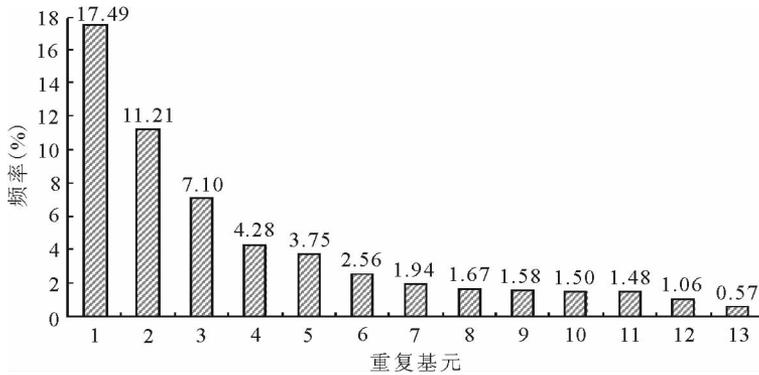


图 1 蒺藜苜蓿 EST-SSRs 主要重复基元分布图

注:1 为 GA/TC;2 为 AG/CT;3 为 GAA/TTC;4 为 AGG/CTT;5 为 AGA/TCT;6 为 AT/AT;7 为 TA/TA;8 为 ATG/CAT;9 为 AATT/AATT;10 为 AAT/ATT;11 为 CTCA/TGAG;12 为 TCTAAA/TTAGA;13 为 AAATC/GATTT。

表 2 蒺藜苜蓿 EST-SSRs 各基元类型的重复次数分布

重复基元	跨度(次)	总数(种)	重复基元	跨度(次)	总数(种)
GA/TC	10~87	72	AAG/CTT	7~15	7
AG/CT	10~79	47	ACT/AGT	8~27	6
AT/AT	10~34	22	ATAG/CTAT	5~10	4
TA/TA	10~37	20	CTCA/TGAG	5~9	4
GAA/TTC	7~17	11	AGAAG/CTTCT	4~7	4
AGA/TCT	7~14	8	ACACAA/TTGTGT	4~6	3

2.3 蒺藜苜蓿 EST-SSRs 电泳筛选结果 利用 Primer Premier 5.0 软件对 6 688 条 EST-SSRs 进行引物设计,去除重复等不合适的引物共设计出 3 090 对,随机选取 100 对引物合成,以 RIL-8 群体亲本 A17 和 A20 的 DNA 为模板进行扩增、筛选,

筛选出多态性的引物在 RIL-8 群体中扩增、电泳(图 2)。在 A17 和 A20 上有清晰条带为 85 对,占所设计引物比例的 85%。其中有多态性的引物 29 对(表 3),占 34.1%(图 3)。多态性引物均能在 RIL-8 群体中扩增出稳定的产物。

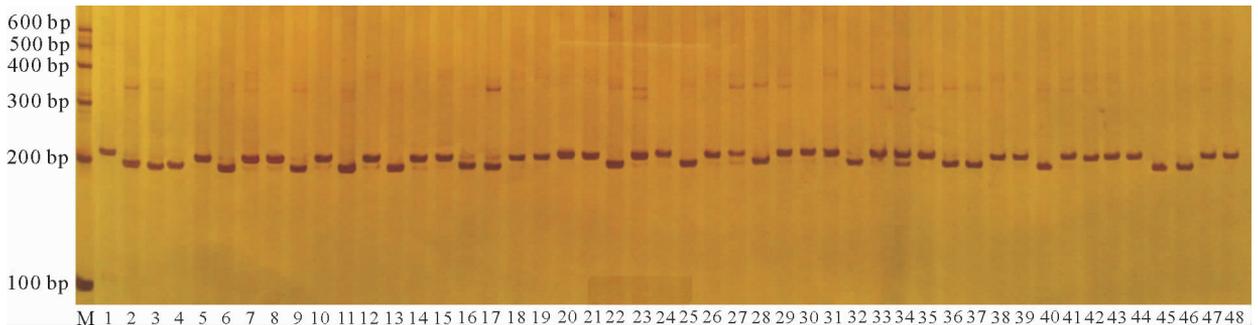


图 2 MES028 在部分蒺藜苜蓿 RIL-8 群体上的电泳图

注:MES 为蒺藜苜蓿 EST-SSR 引物的名称,其中 M 代表 *M. truncatula*,E 代表 EST,S 代表 SSR;M 为 DNA Marker。下图同。

表 3 29 对蒺藜苜蓿 EST-SSRs 多态性引物

重复基元	引物名称	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	退火温度 (°C)	扩增产物 长度(bp)
(TTC) ₁₀	MES001	TCTTGTATCTTGGCCATTAC	TAATGAGTGTGATGTGGATG	52	186
(TTC) ₇	MES003	GACAGAGTTGGGTTGTATTC	AGAAGTAGCTGCATAAGATCA	52	362
(CAT) ₈	MES004	ACTTGACTCTATCCTCCACA	GAAGAAGAAGATGACGAAGA	55	373
(CAT) ₉	MES016	CTCATCAAAACCAAACCA	CTCCTTCAGTTCAACTTTGT	52	289
(AGA) ₁₀	MES018	GTTCTGAAGATTGTGTTCCCT	TATTCAAACAAACCCTCG	52	362
(AAT) ₈	MES019	AGTTCCCATATGCAACAG	TAGGAGTGATGGTGAAGATT	55	135
(GGTTTA) ₄	MES021	CTCTTTAAACCCACTATCCA	AAACACCAATCCAAACCT	55	250
(AGA) ₁₀	MES022	GTTAAAGCAAGTGATGAACC	CAAAGTTCATACAAGGACACT	52	194
(CATGTT) ₄	MES023	ACAGCAACAGAACTGAGACT	GCTAATAAACAGTCTTGAGC	52	400
(TGACA) ₅	MES024	AGCCTCCACATTTTAAGAG	ACTGGTTCTTTATGTTCTGC	52	194
(ATC) ₇	MES025	TCACCTCATCTTTAGTTTCAC	GAGGTTTGTTGATGAGAGTC	52	297
(TCT) ₁₀	MES028	CTAGTAGGAAATGCAGTGGT	TAGATCCATCCACATACCTT	52	394
(TCA) ₈	MES029	CCAACTCAGCTAACCTATTC	GACATCACCGATCTACTTTC	55	178
(AAAAG) ₄	MES042	CGCACTCACAACACAAAC	TGACATCTCTTCATCTTCCT	55	270
(TCCTTC) ₆	MES043	GTTCAAACGCTGTTCACT	GTTTTCCATCTTGACTTGAC	55	212
(CCA) ₇	MES045	AAAACAATGACTCTACTCCG	GTGAACTGGATCTTTGAATC	52	236
(TTGA) ₅	MES046	GTTTAACTCCGATGAGATTC	CCCTATCTTCCAGTTTAAACA	55	392
(ATCAA) ₄	MES047	CACATTCTTCATCACATCAC	AGTTGTTTGAGAGTGGAAG	52	265
(TTC) ₉	MES048	GTCCTCATTCTTCAACAGAG	AGATCGGTTCACTGTGTTAT	52	108
(TACAAC) ₄	MES053	AGAAGTGAAAGAGAACTGTGG	TGAAGAGAGGTTGAGAAGAG	55	189
(ATTGA) ₄	MES054	GACAGAAAAGCGTAGTAAGG	AGGATCAGGTAAAGGAAGAT	55	316
(AAAAG) ₄	MES060	GAACATAAGAAAGCGCAC	ACCAACTGGTTGTTACTGTT	55	219
(AAC) ₇	MES066	AACGCTCTCGTACTAATCAT	ACTAATGCAAGAAACCCAG	55	229
(AAAAAC) ₄	MES068	GTCTTGGATAGTGGAAGATG	AGTTTGCTCTAGGCTACAAA	52	235
(AGA) ₇	MES070	GAGAGGGAGAGAGAAGAATC	ATTCTCTCACTATTGGACA	52	338
(AAG) ₁₁	MES076	TTCCAGAAGAATAAGACAG	GAATGATCTGAAAGCGTAGT	55	133
(TAT) ₈	MES080	TAGGAGTGATGGTGAAGATT	ATATGCAACAGACCTTAGGA	55	128
(AGAAAC) ₄	MES081	TGTCTTCTCTTTCACAGTTTG	GTGGTGGAAGTTAAAGAGAC	52	169
(TTC) ₁₀	MES091	GACATTCTCTTTGCTTTG	CTAAGCTTGTTGGATGAAGAT	55	160

注:重复基元中数字代表 SSRs 中的重复次数。

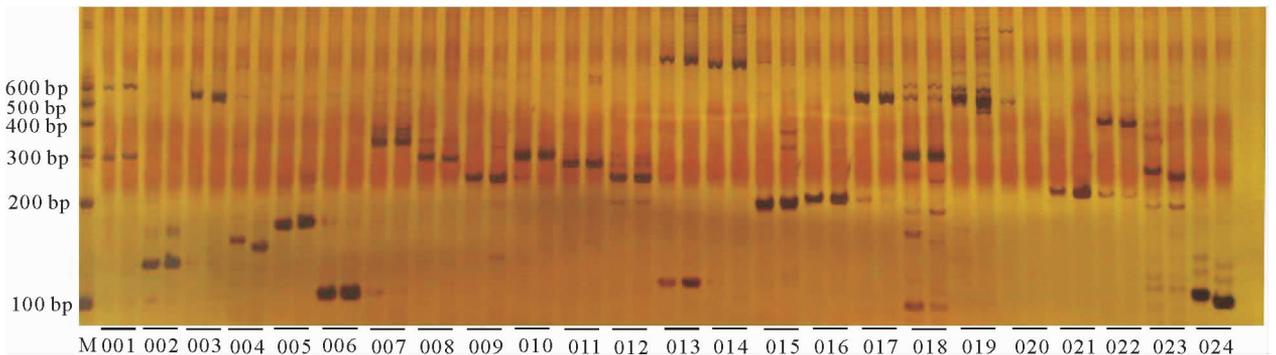


图 3 MES001~MES024 在蒺藜苜蓿 A17 和 A20 上的电泳图

注:001~024 为 MES 引物编号。每引物对应的两条带分别为 A17 和 A20。

3 讨论

3.1 EST-SSRs 的分布特征 在小麦^[14]、大豆^[15]、莴苣 (*Lactuca sativa*)^[21] 等大多数植物的 EST-SSRs 中发现,三核苷酸重复出现的频率比二核苷酸重复高。而在本研究中 EST-SSRs 的分布二核苷酸基元 (34.4%) 略大于三核苷酸基元 (29.6%)。在鹅掌楸 (*Liriodendron chinense*)^[22]、芝麻 (*Sesamum indicum*)^[23]、砂梨 (*Pyrus pyrifolia*)^[24] 等中也得到了同样的结论。这可能是与本研究中检索 SSR 的标准为重复序列 ≥ 20 bp 有关。Thiel 等^[25] 的研究结果中显示 18 bp 长度时,三核苷酸重复基元出现的频率高于二核苷酸重复基元。大多数作物中二核苷酸重复基元以 GA/TC 出现的频率最高,而 CG/CG 重复基元出现的频率最低,如水稻 (*Oryza sativa*)、玉米 (*Zea mays*)、大豆、高粱等^[26-27]。本试验中 GA/TC 出现的频率是最高的,而 CG/CG 没有出现,该结论与大多数植物的研究结果一致。不同植物三核苷酸重复基元主要的重复类型变化较大,小麦以 AAC/GTT 出现的频率最高^[14],大麦 (*Hordeum vulgare*)、玉米、水稻和高粱中则出现的频率最高是 GGC/GCC^[28];鹅掌楸中是以 AAG/CTT 重复基元出现频率较高,占三核苷酸重复基元的 40.2%^[22] (表 4);本研究检测到的 1 982 条三核苷酸重复基元中 GAA/TTC 出现的频率最高,为 475 条,占总检测 SSR 的 7.1%,占三核苷酸重复基元的 24%,本研究结论与在大豆上的检测结果是一致的^[15]。

3.2 EST-SSRs 标记的开发 随着分子标记和

表 4 部分植物出现频率最高的核苷酸重复基元

植物种	二核苷酸	三核苷酸
大豆	GA/TC	GAA/TTC
水稻	GA/TC	GGC/GCC
小麦	GA/TC	AAC/GTT
玉米	GA/TC	GGC/GCC
高粱	GA/TC	GGC/GCC
大麦	GA/TC	GGC/GCC
莴苣	GA/TC	ACT/AGT
甘蓝	GA/TC	GAA/TTC
鹅掌楸	GA/TC	AAG/CTT
芝麻	GA/TC	CCA/TGG

测序技术的快速发展,EST-SSRs 的应用也越来越普遍,为 EST-SSRs 标记的开发提供了广阔的前景。截至到 2010 年 6 月 11 日,从 NCBI 中的 dbEST 数据库中蒺藜苜蓿的 EST 序列已达到 285 285 条,与 2002 年 12 月 31 日的 147 000 条 EST 相比,增加了将近一倍。目前,在多种作物中 EST-SSRs 都展开了研究,陈海梅等^[14] 在小麦的 EST 中检测到 1.34% 的序列中含 SSR,并将 43 个 EST-SSRs 位点绘制到小麦的遗传图谱上;常玮等^[15] 在大豆的 458 220 条 EST 中获得无冗余的 SSR 序列 8 190 条,设计的 200 对引物中 148 对有清晰且单一条带扩增产物,开发了 148 个新的 SSR 标记。在牧草中 EST-SSRs 的研究也比较普遍,Eujayl 等^[6] 研究蒺藜苜蓿 EST-SSRs 在苜蓿属中的通用性,结果表明 74% 的 EST-SSRs 引物在苜蓿属中有扩增产物;Sim 等^[29] 研究了谷物的 EST-SSRs 在黑麦草 (*Lolium spp.*) 中的通用性,来自谷物的 165 个 EST-SSRs 中,57% 的 EST-SSRs 在黑麦草中有扩增产物,且多态率达 67%;Xie 等^[17] 利用 50 对谷物 (玉米、小麦和高粱) 的 EST-SSRs 和 15 对鸭茅 SSR 引物对 74 个鸭茅材料进行扩增,其多态率为 84.63%;Simko^[21] 从莴苣的 19 523 条 EST 中检测到 4.5% 的 EST 含有 SSR 序列 (重复序列 ≥ 20 bp)。本研究在 285 285 条 EST 中检测到 6 512 条 EST 含有 SSR 序列,SSR 序列为 6 688 条。随机设计的 100 对引物中,在蒺藜苜蓿 RIL-8 群体亲本 A17 和 A20 中 85 对引物有扩增产物,开发了 85 个新的 SSR 标记。具有多态性的引物为 29 对。

4 结论

1) 从 NCBI 数据库 285 285 条 EST 序列中检测到 6 688 条 SSR 序列。占 EST 总数的 2.28%,二核苷酸出现频率最高,其次为三核苷酸,二、三核苷酸占所有核苷酸的 64%。四核苷酸分布最少,为 10.2%。

2) 蒺藜苜蓿基因组中 GA/TC 和 AG/TC 重复基元占 SSRs 总数的 17.49% 和 11.21%,在各种重复基元中最多。蒺藜苜蓿基因组中 CG/CG 重复基元没有出现。

3) 利用 EST-SSRs 序列随机设计 100 对引物,在蒺藜苜蓿 RIL-8 群体亲本 A17 和 A20 中扩增、电泳,85 对引物具有清晰的扩增条带,开发了 85 个新的 SSR 标记。具有多态性的引物为 29 对。这些 EST-SSRs 标记可以为蒺藜苜蓿高密度遗传图谱的

构建、遗传多样性、基因克隆、QTL 定位及引物通用性等方面的研究提供材料来源。

参考文献

- [1] 魏臻武, 盖钧镒. 豆科模式植物蒺藜苜蓿基因组研究进展[J]. 中国草地学报, 2006, 28(6): 83-90.
- [2] Town C D. Annotating the genome of *Medicago truncatula* [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2006, 9: 122-127.
- [3] Young N D, Udvardi M. Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2009, 12: 193-201.
- [4] 魏臻武. 利用 SSR, ISSR 和 RAPD 技术构建苜蓿基因组 DNA 指纹图谱 [J]. 草业学报, 2004, 13(3): 62-67.
- [5] 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): 845-851.
- [6] Eujayl I, Sledge M K, Wang L, et al. *Medicago truncatula* EST-SSRs reveal cross-species genetic markers for *Medicago* spp. [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 108: 414-422.
- [7] 谢文刚, 张新全, 马啸, 等. 中国西南区鸭茅种质遗传变异的 SSR 分析 [J]. 草业学报, 2009, 4(18): 138-146.
- [8] 魏臻武, 盖钧镒. 豆科模式植物——蒺藜苜蓿 [J]. 草业学报, 2008, 17(1): 114-120.
- [9] May G D, Dixon R A. *Medicago truncatula* [J]. Current Biology, 2000, 14(5): 181-182.
- [10] Cook D. *Medicago truncatula*——a model in the making [J]. Current Opinion in Plant Biology, 1999, 2: 301-304.
- [11] 胡松年. 基因表达序列标签 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2005.
- [12] 王晓娜, 卢欣石. 表达序列标签的应用现状及分析方法研究 [J]. 草业科学, 2010, 27(5): 76-84.
- [13] Tehrani M S, Mardi M. Genetic diversity and structure among Iranian tall fescue populations based on genomic-SSR and EST-SSR marker analysis [J]. Plant Systematics and Evolution, 2009, 282: 57-70.
- [14] 陈海梅, 李林志, 卫宪云, 等. 小麦 EST-SSR 标记的开发、染色体定位和遗传作图 [J]. 科学通报, 2005, 50(20): 2208-2216.
- [15] 常玮, 赵雪, 李侠, 等. 大豆 EST-SSR 标记开发及与 Genomic-SSR 的比较研究 [J]. 中国油料作物学报, 2009, 31(2): 149-156.
- [16] Sledge M, Ray I, Mian M A. EST-SSRs for genetic mapping in alfalfa [J]. Molecular Breeding of Forage and Turf, 2004, 12: 239-243.
- [17] Xie W G, Zhang X Q, Cai H W, et al. Genetic diversity analysis and transferability of cereal EST-SSR markers to orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2010, 38: 740-749.
- [18] Choudhary S, Sethy N K, et al. Development of chick-pea EST-SSR markers and analysis of allelic variation across related species [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2009, 118: 591-608.
- [19] Shiringani A L, Frisch M, Friedt W. Genetic mapping of QTLs for sugar-related traits in a RIL population of *Sorghum bicolor* L. Moench [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 121: 323-336.
- [20] 李杰勤, 王丽华, 詹秋文, 等. 高粱 EST-SSR 标记的建立及其在苏丹草中的应用初探 [J]. 草业科学, 2010, 27(3): 112-117.
- [21] Simko I. Development of EST-SSR markers for the study of population structure in Lettuce (*Lactuca sativa* L.) [J]. Journal of Heredity, 2009, 100(2): 256-262.
- [22] Xu M, Sun Y G, Li H G. EST-SSRs development and paternity analysis for *Liriodendron* spp. [J]. New Forests, 2010, 40(3): 361-382.
- [23] 魏利斌, 张海洋, 郑永战, 等. 芝麻 EST-SSR 标记的开发和初步研究 [J]. 作物学报, 2008, 34(12): 2077-2084.
- [24] 崔海荣, 刘金义, 佟兆国, 等. 砂梨 EST-SSR 引物开发及其应用 [J]. 西北植物学报, 2010, 30(8): 1551-1556.
- [25] Thiel T, Michalek W, Varshney R K, et al. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 106: 411-422.
- [26] Li L Z, Wang J J, Guo Y, et al. Development of SSR markers from ESTs of gramineous species and their chromosome location on wheat [J]. Progress in Natural Science, 2008, 18: 1485-1490.
- [27] Liu Y L, Li Y H, Zhou G A, et al. Development of soybean EST-SSR markers and their use to assess genetic diversity in the subgenus soja [J]. Agricultural Sciences in China, 2010, 9(10): 1423-1429.
- [28] Kantety R V, Rota M L, Matthews D E, et al. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat [J]. Plant Molecular Biology, 2002, 48: 501-510.
- [29] Sim S C, Yu J K, Jo Y K, et al. Transferability of cereal EST-SSR markers to ryegrass [J]. Genome, 2009, 52: 431-437.

Distribution characteristics and marker exploitation of EST-SSRs in *Medicago truncatula*

TU De-peng¹, WEI Zhen-wu¹, WU Zi-nian¹, LEI Yan-fang²,
ZHANG Dong¹, QIU Wei-wei¹

(1. Institute of Forage and Grassland Science, Yangzhou University, Jiangsu Yangzhou 225009, China;

2. Shanghai Dingniu Feed Co., LTD., Shanghai 200436, China)

Abstract: New EST-SSRs markers by EST database of *Medicago truncatula* were developed and the distribution characteristic of EST-SSRs was analyzed. 6 688 of 285 285 EST sequences of *M. truncatula* from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) were detected by SSRIT software, which accounted for 2.28%. Among them, 2 301 dinucleotide repeat elements, accounting for 34.4%, had the highest frequency and followed by 1 982 trinucleotide repeats, which accounted for 29.6% of the total EST-SSRs. The ratio of four to six nucleotide repeat elements was comparatively lower. Selecting 100 primer pairs randomly, 85 primer pairs showed clear amplification belts, accounting for 85% of designed primers and 29 primer pairs showed polymorphisms, accounting for 34.1% of primers available. Besides, 85 new *M. truncatula* EST-SSR markers have been developed.

Key words: *Medicago truncatula*; EST-SSRs; primer design; marker exploitation

2011年4月国际市场主要饲料与畜产品价格分析

国际饲料价格涨跌互现。受天气影响,美国玉米春播延迟,部分耕地可能转播大豆;阿根廷农业部发布报告称目前该国大豆收割完成86%,预计总产为5 040万t,高于预期。玉米价格较3月上涨10.0%,豆粕、豆饼价格分别下跌8.8%和7.7%。

国际畜产品价格继续上涨,育肥牛价格较3月上涨3.5%;欧盟猪肉价格上涨0.5%;牛奶上涨2.6%。

表1 4月国际市场主要饲料与畜产品平均价格

饲料	价格	畜产品	价格
玉米	297.14 USD/t	瘦肉猪	2.12 USD/kg
大豆	499.23 USD/t	育肥牛	2.96 USD/kg
大麦	200.00 AUD/t	猪肉*	1.99 USD/kg
春小麦	449.85 AUD/t	鸡肉**	1.77 USD/kg
高粱	248.07 USD/t	牛肉**	4.35 USD/kg
豆粕	385.85 USD/t	羊肉***	2.30 USD/kg
菜籽	579.79 CAD/t	羊羔肉***	3.87 USD/kg
豆饼	335.47 USD/t	牛奶	0.39 USD/kg
棉籽饼	279.64 USD/t		
苜蓿粉	209.57 USD/t		

注:* 表示欧盟,** 表示美国,*** 表示新西兰。4月参考汇率:1 CNY(人民币)=0.154 USD(美元)=0.142 AUD(澳元)=0.147 CAD(加元)=0.093 GBP(英镑)。(兰州大学草地农业科技学院 孙义 徐磊)