丝瓜转录组SSR位点分析及其分子标记开发

朱海生 张前荣 刘建汀 陈敏氡 王 彬 薛珠政 李大忠 温庆放* (福建省农业科学院作物研究所,福建省农业科学院蔬菜研究中心,福建省蔬菜工程技术研究中心,福州 350013)

摘要 对丝瓜(Luffa cylindrica)开展转录组测序分析,共获得58 073条unigene(序列总长 约52 087 451 bp),共检测到8 693个SSR(simple sequence repeat)位点,平均分布距离为5.99 Kb;其 中,SSR位点中主导类型为二核苷酸重复类型,占总SSR的45.89%;其次,三核苷酸重复类型,占 38.89%。二核苷酸重复基序中以AG/CT为主,三核苷酸重复基序以AAG/CTT为主。通过Primer 3.0 设计得到7 563对SSR引物,随机选择30对SSR引物,对32种不同来源的丝瓜进行多态性验证分析, 其中,22对(占73.33%)引物表现稳定可重复的多态性。利用UPGMA作图,将32份供试材料分为普 通丝瓜和有棱丝瓜2类,这2类丝瓜可以进一步分别被分为2个亚群,丝瓜类群的划分与有无棱沟密 切相关,与形状、颜色有较高的相关性。通过对丝瓜转录组分析可获得较高频率的SSR位点且类 型丰富,为丝瓜遗传多样性分析和遗传图谱构建提供更加丰富可靠的标记选择。

关键词 丝瓜;简单重复序列;转录组;多态性

Analysis on SSR Loci in Transcriptome and Development of Molecular Markers in *Luffa cylindrica*

Zhu Haisheng, Zhang Qianrong, Liu Jianting, Chen Mindong, Wang Bin, Xue Zhuzheng, Li Dazhong, Wen Qingfang*

(Crops Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Vegetable Research Center, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fujian Engineering Research Center for Vegetables, Fuzhou 350013, China)

Abstract A total of 58 073 unigenes (52 087 451 bp) were obtained and then 8 693 simple sequence repeats (SSR) loci were identified by transcriptome sequenceing analysis in *Luffa cylindrica*. The mean distribution distance of loci was 5.99 Kb in the unigenes. Among all SSR loci, dinucleotide repeat was the main type (45.89%), followed by trinucleotide repeat motif (38.89%). AG/CT and AAG/CTT were the most frequent motifs in dinucleotide and trinucleotide repeats, respectively. A total of 7 563 SSR primers were designed and 30 primers were randomly selected for PCR amplification using 32 loofah materials, of which 22 primers could amplify clearly and reproducibly and showed polymorphism among the materials. According to the UPGMA analysis, 32 plants were divided into 2 groups: *Luffa cylindrica* Roem and *Luffa acutangula* Roxb, the 2 groups were divided into 2 sub-groupsis according to fruit shape, respectively. Classification was closely related to the presence or absence of ridges and had a highly correlated with fruit shape and color. These results indicated that high frequency and various types of SSR markers could be acquired in loofah by transcriptome sequencing analysis and genetic mapping

收稿日期: 2016-06-07 接受日期: 2016-07-08

福建省属公益类科研院所基本科研专项(批准号: 2014R1026-11)、福建省农业科学院创新团队PI项目(批准号: 2016PI-40)和福建省自然科学基金项目(批 准号: 2015J01118)资助的课题

^{*}通讯作者。Tel: 0591-87573380, E-mail: fjvrc@163.com

Received: June 7, 2016 Accepted: July 8, 2016

This work was supported by Fujian Provincial Public Research Institute of Fundamental Research (Grant No.2014R1101010-3), PI Project of Innovative Team in Fujian Academy of Agricultural Sciences (Grant No.2016PI-40) and Fujian Provincial Natural Science Foundation (Grant No.2015J01118)

^{*}Corresponding author. Tel: +86-591-87573380, E-mail: fjvrc@163.com

网络出版时间: 2016-09-01 15:59:33 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160901.1559.004.html

construction in Luffa cylindrica.

Keywords Luffa cylindrica; simple sequence repeat; transcriptome; polymorphism

丝瓜(Luffa cylindrica)原产于东印度,主要分布 于热带、亚热带的亚洲各地,有2个栽培种,分别为 普通丝瓜(Luffa cylindrica Roem)和有棱丝瓜(Luffa acutangula Roxb)。丝瓜在我国南北地区均有栽培, 是我国主要的瓜类蔬菜之一^[1]。丝瓜营养丰富,且具 有很好的医疗保健功能,随着人们对饮食营养保健 的日益重视,丝瓜作为一种药食兼用的保健蔬菜,其 需求量正在不断增大,栽培面积也正日益扩大。

我国丝瓜育种发展时间较短,近几年,各地才 逐渐开始对丝瓜种质资源进行收集和整理[2]。种 质资源是新品种选育的基础,对于育种工作者来 说,摸清育种材料间的遗传关系,对正确的选择育 种亲本具有重要意义。DNA分子标记是鉴定种质 资源遗传多样性的重要手段, 也是一种重要的辅助 育种工具。目前,为了从分子水平了解丝瓜种质 资源的遗传多样性,许多学者用不同的分子标记 方法对丝瓜种质资源遗传多样性进行了研究。夏 军辉等^[3]应用44个形态标记和16个RAPD(random amplified polymorphisms DNA)标记对26份丝瓜种 质材料进行遗传多样性分析;苏小俊等[4]利用9对 ISSR(inter-simple sequence repeat)标记对来源于不 同地区的43份丝瓜种质资源的亲缘关系进行了分 析; 崔竣杰等^[5]利用SRAP(sequence-related amplified polymorphism)标记对来源不同的56份有棱丝瓜和8 份普通丝瓜种质进行了遗传多样性分析; 蔡雅琴等[6] 采用SCoT分子标记方法对81份丝瓜种质资源进行 遗传多样性分析和聚类分析。但是RAPD、ISSR、 SRAP等均是基于无基因组(或转录组)序列信息开 发的标记技术,标记的随机性强、稳定性差,而且相 对于黄瓜、南瓜等其他葫芦科蔬菜,运用在丝瓜上 的分子标记种类和数量都比较少, 所以丝瓜种质资 源的遗传多样性研究仍很薄弱,有必要在深度和广 度上进一步拓展。

微卫星序列,即简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)分子标记,广泛存在于真核和原核生物基 因组中^[7]。因其位点特异、复等位、呈共显性及在 基因组序列中分布广泛等优点已经成为最为广泛的 分子标记之一^[8]。SSR标记按来源分主要包括表达序 列标签SSR(EST-SSR)和基因组SSR(g-SSR)^[9]。EST- SSR标记与g-SSR标记相比,因其源于基因的转录区, 其多态性可能与基因功能直接相关[10],在蓝靛果忍 冬[11]、洋葱[12]、刺梨[13]、辣椒[14]等园艺植物中通过 EST信息开发SSR标记的方法均有报道。葫芦科中黄 瓜、甜瓜、西瓜、南瓜[15-16]已经被进行了大规模的 SSR标记开发,但是关于丝瓜SSR分子标记的研究甚 少,主要是根据引物通用性原理,利用黄瓜与甜瓜已 报道的SSR引物来探索丝瓜可用的SSR引物。吴海 滨等^[17]将SRAP技术和来源于黄瓜的EST-SSR技术结 合,对丝瓜种质资源进行分析。刘军等[18]利用52对黄 瓜与甜瓜SSR引物及SRAP标记对30份丝瓜种质资源 进行遗传多样性分析,然而研究表明,瓜类作物引物 通用率较低。本研究利用转录组测序获得的数据进 行SSR标记的搜索,分析其分布、组成特征,开发SSR 引物,并进行可用性评价,以期为利用SSR分子标记 进行丝瓜种质资源多样性分析、连锁图谱构、核心 种质的建立以及分子标记辅助育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 转录组数据来源

丝瓜转录组数据来源于本课题组2015年对果 实进行Illumina高通量深度测序的结果。测序时采 取4个采后处理[丝瓜鲜切室温(25±1 ℃)放置0、1、2、 3 h]的丝瓜果实,提取RNA并等量混匀后委托广州 基迪奥生物科技有限公司RNA-Seq转录组测序,并 通过De Novo方法^[19],组装得到58 073条unigene,作 为分析数据。

1.2 植物材料及其DNA提取

用于对所设计的引物进行筛选和可用性评价的 材料为福建省农业科学院蔬菜研究中心收集保存的32 份丝瓜自交系(表1)。利用CTAB法提取丝瓜果实DNA。

1.3 转录组SSR位点鉴别及SSR引物设计

使用软件MISA对丝瓜转录组中的SSR位点搜 索,搜索标准为:重复单元长度2~6 bp,二核苷酸、 三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸最少重 复次数分别为6、5、5、4和4次。用Primer 3.0软件 对SSR重复单元前后的序列进行引物设计及评价, 每条SSR产生3对引物。引物序列长度18~25 bp,引 物太短不能保证扩增出来序列的独特性,引物较长 可能会与错误配对序列杂交,降低了特异性,扩增 产物长度100~280 bp, GC含量40%~60%,退火温度 55~65 ℃,上、下游引物的退火温度值相差不大于 5 ℃。尽量避免出现发卡结构、二聚体、错配和引 物二聚体等。

设计引物时,引物不能存在SSR。此外,与unigene 序列比对时,其5'端允许有3个碱基的错配,3'端允许 有1个碱基的错配,最后筛选出唯一匹配的引物。从 中随机挑选150对20 bp以上的2~6不同重复单元核 苷酸引物,由上海博尚生物技术有限公司合成。

1.4 PCR扩增

PCR扩增反应体系25 µL, 其中10 mmol/L dNTP 1 µL, 1.25 U Taq酶1 µL, 75 ng DNA 1 µL, 10 µmol/L上、 下游引物各1 µL, 10×Buffer(Mg²⁺) 2.5 µL, 加ddH₂O 至25 µL。PCR扩增程序为: 95 ℃预变性5 min; 然后 进行35个循环, 每个循环包括94 ℃变性30 s, 56 ℃退 火30 s(退火温度因不同引物而异), 72 ℃延伸30 min; 最后72 ℃延伸7 min。PCR扩增产物经电泳后观察

	Table 1 The tested materials							
编号	材料	种质类型	瓜形	瓜色	瓜瘤	瓜棱		
No.	Material	Type of loofah	Fruit shape	Fruit color	Fruit tumor	Fruit ridge		
1	05005-2-3-3-4-6	Luffa cylindrica Roem	Short cylinder	Green	Little	No		
2	08002-1-3-4-1-8	Luffa cylindrica Roem	Short cylinder	Green	Medium	No		
3	13003-1-5-8-3-3	Luffa cylindrica Roem	Short cylinder	Green	Much	No		
4	11017-3-6-4-3-1	Luffa cylindrica Roem	Short cylinder	Green	Much	No		
5	05003-1-2-2-4	Luffa cylindricaRoem	Short cylinder	Light green	Medium	No		
6	05008-1-2-2-2-5	Luffa cylindrica Roem	Short cylinder	Green	Much	No		
7	11002-1-3-5-8	Luffa cylindrica Roem	Short cylinder	Light green	Medium	No		
8	11009-1-1-11-1-4	Luffa cylindrica Roem	Short cylinder	Dark green	Little	No		
9	12001-1-3-2-1-4	Luffa cylindrica Roem	Short cylinder	Light green	Much	No		
10	06001-1-1-5-9	Luffa cylindrica Roem	Short cylinder	Light green	Medium	No		
11	06001-2-1-4-6	Luffa cylindrica Roem	Short cylinder	Light green	Medium	No		
12	05008-1-2-2-2-1	Luffa cylindrica Roem	Short cylinder	Green	Much	No		
13	13010-1-1-13-2	<i>Luffa cylindrica</i> Roem	Short cylinder	Green	Medium	No		
14	11017-3-8-4-8-8	Luffa cylindrica Roem	Long cylinder	Light green	Much	No		
15	13003-2-3-6-5-4	Luffa cylindrica Roem	Long cylinder	Green	Much	No		
16	13011-1-5-6-9-5	Luffa cylindrica Roem	Long cylinder	Light green	Medium	No		
17	11020-2-2-9-8-4	Luffa cylindrica Roem	Long cylinder	Light green	Much	No		
18	11004-1-1-9-5-8	Luffa cylindrica Roem	Long cylinder	Light green	Much	No		
19	12001-1-3-1-5-1	Luffa cylindrica Roem	Long cylinder	Light green	Medium	No		
20	11024-4-4-6-9-6	Luffa cylindrica Roem	long cylinder	Light green	Medium	No		
21	12001-1-4-5-3-4	Luffa cylindrica Roem	Long cylinder	Green	Medium	No		
22	14001-1-6-9-5-2	Luffa cylindrica Roem	Long cylinder	Green	Much	No		
23	11010-1-5-1-3-6	Luffa acutangula Roxb	Long rod	Dark green	No	Yes		
24	11012-2-14-9-6-3	Luffa acutangula Roxb	Long rod	Dark green	No	Yes		
25	11012-1-14-5-9	Luffa acutangula Roxb	Long rod	Light green	No	Yes		
26	11014-3-9-3-2-10	Luffa acutangula Roxb	Short rod	Green	No	Yes		
27	07001-1-12-6-4-3	Luffa acutangula Roxb	Long rod	Dark green	No	Yes		
28	11010-1-1-9-4	Luffa acutangula Roxb	Long rod	Dark green	No	Yes		
29	11014-3-2-3-4-5	Luffa acutangula Roxb	Short rod	Green	No	Yes		
30	11007-1-1-5-3-3	Luffa acutangula Roxb	Long rod	Dark green	No	Yes		
31	11016-4-4-1-5-1	Luffa acutangula Roxb	Short rod	Green	No	Yes		
32	11012-1-3-7-6-9-6	Luffa acutangula Roxb	Long rod	Light green	No	Yes		

表1 供试材料

拍照。

1.5 数据统计

采用人工读带的方法,将电泳图上可重复的 清晰条带记为"1",同一位置无带或不易分辨的弱 带记为"0",建立原始数据矩阵。利用软件DPS按 UPGMA进行聚类绘图。

2 结果

2.1 丝瓜转录组中的SSR位点的数量与分布

利用MISA工具对丝瓜转录组的58 073条

unigene(序列总长约52 087 451bp)的cDNA序列进行 搜索,在6 916条unigene中找到8 693个符合条件的 SSR位点,发生频率(含SSR的unigene数与总unigene 数之比)为11.91%,出现频率(检出SSR个数与总 unigene数之比)为14.97%。其中,含1个SSR位点的 unigene序列有1 354条,含复合型SSR位点的unigene 序列有786条,平均5.99 Kb就能发现1个SSR位点。

丝瓜转录组SSR种类较为丰富,各种重复类型 的出现频率有较大差异,主要集中在二核苷酸、三 核苷酸重复基序上。二核苷酸重复类型的数量最

				-,		1					
重复类型	重复次数 Repeat number							总计	比例(%)		
Repeat type	4	5	6	7	8	9	10	11~14	>15	- Iotal I	Katio (%)
Di	0	0	1 533	825	555	385	290	273	128	3 989	45.89
Tri	0	1 882	842	423	90	48	63	30	3	3 381	38.89
Tetra	480	135	32	16	2	2	0	0	0	667	7.67
Penta	239	41	10	1	0	0	0	0	0	291	3.35
Hexa	274	76	13	0	2	0	0	0	0	365	4.20
Total	993	2 134	2 4 3 0	1 265	649	435	353	303	131	8 693	
Ratio (%)	11.42	24.55	27.95	14.55	7.47	5.01	4.06	3.49	1.50		100

	表2	丝瓜EST-SSR的类型、	数量与分布频率
Table 2	Tyr	e number and frequen	ev of EST-SSRs in loofah

表3 丝瓜转录中不同微卫星重复基序(motif)出现的频率

重复基序类型	重复基序	数量	频率(%)				
Repeat type	Repeat motif	Number	Frequency (%)				
Di	AC/GT	255	2.93				
	AG/CT	3 166	36.42				
	AT/AT	568	6.54				
Tri	AAC/GTT	210	2.42				
	AAG/CTT	1 686	19.39				
	AAT/ATT	250	2.88				
	ACC/GGT	162	1.86				
	ACG/CGT	103	1.84				
	ACT/AGT	22	0.25				
	AGC/CTG	183	2.11				
	AGG/CCT	246	2.83				
	ATC/ATG	158	1.82				
	CCG/CGG	361	4.15				
Tetra	AAAG/CTTT	283	3.26				
	AAAT/ATTT	210	2.42				
	AAAC/GTTT	73	0.84				
	AACC/GGTT, AACG/CGTT, AACT/AGTT, AAGC/CTTG, AAGG/CCTT, AATC/	101	0.12				
	ATTG, AATG/ATTC, AATT/AATT, ACAG/CTGT, ACAT/ATGT, ACAT/ATGT,						
	ACCC/GGGT, ACCG/CGGT, ACGC/CGTG, ACTC/AGTG, ACTG/AGTC,						
	AGAT/ATCT, AGCC/CTGG, AGCG/CGCT, AGCT/AGCT, AGGC/CCTG,						
	AGGG/CCCT, ATCC/ATGG, ATCG/ATCG, CCCG/CGGG, CCGG/CCGG						

Table 3	Occurrence	frequency of	of different	microsatellites	motifs	of loofah
---------	------------	--------------	--------------	-----------------	--------	-----------

2.2 转录组SSR基序重复类型和频率特征

的24.55%和14.55%(表2)。

从丝瓜转录组SSR核苷酸基序类型来看,其 8 693个SSR位点包含198种重复基序,二核苷酸至 六核苷酸重复分别有3、10、22、50、113种。从 分布频率来看(表3),以二核苷酸重复类型AG/CT出 现最多,占总SSR的36.42%,占二核苷酸重复基序总 数的79.37%。其次是三核苷酸重复类型AAG/CTT, 占总SSR的19.39%,占三核苷酸重复基序总数的 49.87%。此外,四核苷酸中以AAAG/CTTT重复基 序为主,占其总数的31.48%;五核苷酸中重复基序主 要为AAAAG/CTTTT,占其总数的18.90%。六核苷 酸中AAAAAG/CTTTTT重复基序最多,占其总数的 5.75%。

2.3 丝瓜转录组SSR引物设计与筛选

对含SSR位点的6 916条丝瓜序列进行引物设 计,引物序列长度18~25 bp,扩增产物长度100~280 bp, GC含量40%~60%,退火温度55~65 ℃,上、下游引 物的退火温度值相差不大于5 ℃,避免出现发卡结 构、二聚体、错配和引物二聚体等。去除不符合条 件的引物,成功设计了7 563对高质量的标记引物。 随机选择其中20 bp以上SSR序列的150对标记进行 合成,包括二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核 苷酸及六核苷酸重复基序的SSR位点,并使用丝瓜 品系'05005-2-3-3-4-6'的DNA进行扩增,验证引物的 有效性。结果表明,106对引物实现有效扩增(图1中 的亮白条带),占150对SSR引物的70.67%。在106对 有效扩增引物中,97对(91.51%)PCR扩增产物与预期 大小相符合,有7对(6.60%)扩增产物长度超过预期, 2对引物(1.89%)扩增产物小于预期。



图1 引物有效性扩增验证 Fig.1 Effectiveness on primer amplification

2.4 多态性分析

选取32份丝瓜,利用30个有效EST-SSR引物进 行扩增、多态性评价。其中,22对引物存在多态性 差异(表4),占有效扩增引物的73.33%。每对引物产 生的多态性片段数在1~4之间。22对引物共得到42 条条带,其中多态性片段25个,每对引物平均产生 1.91个多态性片段,图2为引物12的扩增情况。

利用22对多态性SSR引物对32份丝瓜材料进行 聚类分析,在遗传距离0.67处,供试材料被聚成2大 类群(图2),第一类为有棱丝瓜,包含23~32共10份材

引物编号	引物序列(5'→3')	SSR基元	产物长度(bp)
Primer No.	Primer sequence $(5' \rightarrow 3')$	SSR motif	Length of product (bp)
SGSSR3	F: TGT GTG ACT TGG GGT TTT CA R: CGA CAC CAA AAC ACA GAA CC	(TG)13	218
SGSSR5	F: GGA TTT GGA AAA GGG GGT TA R: ATG GCG ATC AAT TCC TTC TG	(AG)12	207
SGSSR6	F: CCA ATG GCT AAA ACA GGC AT R: TCC ACT CTC ACA CAC ACT TTC TC	(CA)12	152
SGSSR12	F: CCT TTC CAA TTT CCA TTC CA R: GGC AGA CAT TGT TGC TCT GA	(CTT)10	243
SGSSR13	F: CCA GTA CTT TCG CCC AGA AC R: TCG ATT TCG TGG ATC CTC TC	(AAC)9	199
SGSSR29	F: ATC AGG ACG ATT CGA AAT GC R: GGC AGC GAG GTC ATA AGT TC	(CAA)10	275
SGSSR30	F: ATG GAA AAC GAA CAA GGC AC R: GAA ATC TGC CCT CAC AAA GC	(AAG)10	235
SGSSR33	F: GGG AAT ACA TCA TGG GTT GG R: CCA CCA ATG GGA AAT TAT GC	(TCC)9	229
SGSSR37	F: TCT AAG CGC CCT GCA TTA TT R: GCA CCA GTA GCA GTG GTC AA	(TTCA)5	195
SGSSR41	F: TCC CTC ATC ATA TCA CCT TCT TC R: GAT ACT GCT GGT GGT GCA GA	(TTAA)7	262
SGSSR43	F: AAT AAA AAC AAC CCA GCC CC R: CTT GAA TTT CAC CAC GCC TT	(CTAT)5	247
SGSSR44	F: GAA GAA AAC AGC AGC CAA GG R: GGT GCC AAG AAG CTC AAG AC	(TCTT)6	262
SGSSR51	F: ACT AGC AAC CTC ATC CAC CG R: GCT TGC GCT TTC CCA TAG TA	(ATTCA)5	199
SGSSR52	F: AAC TTC TTC AAC TGC CAC CG R: GAA GCT AGG CTC GAG GGT TT	(TCTCT)5	272
SGSSR53	F: TTG AGT TTT GGT GGT GCT TG R: CAC ACA GAG TTG AAA GGG CA	(TTGTA)6	152
SGSSR55	F: TTG AGA TTT GAG AGG CAG CA R: TGA CGA AAC TGA AAT CGT GC	(GCCCC)5	181
SGSSR57	F: ACC CCC ACT GTT GAA CCT AA R: GCA TCC TCC CAC CCT TAA AT	(TTTAT)5	277
SGSSR58	F: ACA CAT CGT CGA AAA CAC CA R: TTT AAC ATC GAC TCA CCC TCG	(CTCAGT)5	274
SGSSR65	F: TGA ATG GTG TTG TAC GCG AT R: ACC ACC TCC TCC ACC TTT TT	(GGCGGT)5	153
SGSSR77	F: CTT GAG AAT AAG CGG GTT CG R: TGA CCC TTT CTT TTT GGG TG	(TGGATG)5	269
SGSSR78	F: GAG AAA GAG GAG CAG AGC GA R: AAG ATA AGG CCG CTT CGA CT	(TTGAAG)5	155
SGSSR79	F: CCA GAG CTC ACA ATG GTT CA R: GCA GAG GAG ATG AGG ACC AG	(TCTCTG)6	237

表4 22对丝瓜SSR引物信息 Table 4 Information of 22 pairs of primers developed from loofsh



M: marker; 品种编号名称见表1。 M: marker; Code name are shown in Table 1.

图2 引物12在32个丝瓜材料中的多态性





品种编号名称见表1。 Code name are shown in Table 1.

图3 供试丝瓜材料的UPGMA聚类图 Fig.3 Cluster diagram for Luffa cylindrica tested by UPGMA method

料,第二类为普通丝瓜,包含1~22共22份材料,表明 有棱丝瓜和普通丝瓜亲缘关系较远。以0.58处为阈 值,普通丝瓜被分为2亚类群,第一亚类群13份丝瓜 均为短圆筒形,第二亚类群9份丝瓜均为长圆筒形。 以0.46处为阈值,有棱丝瓜被分为2亚类群,第一亚 类群7份丝瓜均为长棒形,其中4份深绿色丝瓜聚在 一起,2份浅绿色和1份深绿色丝瓜聚在一起,第二亚 类群3份丝瓜均为绿色、短棒形。丝瓜类群的划分 与棱沟的有无密切相关,与瓜的形状、颜色有较高 的相关性。有棱丝瓜种群和普通丝瓜种群内部的遗 传距离较近,说明丝瓜同一种内的遗传变异范围较 窄。

3 讨论

目前,SSR标记已经广泛应用于遗传多样性分 析、品种鉴定、遗传图谱构建、基因定位等[20-22]研 究领域。早期主要是利用基因组文库和cDNA文库 来开发SSR标记,耗时长且成本高。近年来,随着高 通量技术的发展和其成本优势, 测序数据基本涵盖 了特定时期和特定组织的所有转录本,尤其是那些 暂时没有基因组信息的作物,其转录组学的研究越 来越广泛,成为开发SSR及其他类型分子标记的重 要途径^[23-24]。本研究对丝瓜58 073条unigene(序列 总长约52 087 451 bp), 找到8 693个符合条件的SSR 位点,出现频率为14.97%,其SSR出现频率高于洋 葱的5.57%^[13]、辣椒的7.83%^[14]、南瓜的9.52%^[15], 低于刺梨的20.37%^[13]、萝卜的23.79%^[25]、柑橘的 21.74%^[26]。发生频率在不同物种间存在较大差异, 这可能与物种、SSR搜索标准、转录组测序的方法 和数据量的大小等有较大的关系[27-28]。本研究中丝 瓜的数据量为5 208.75 Kb, 平均每5.99 Kb就能发现 1个SSR位点,低于南瓜(7.4 Kb)^[15]、洋葱(14.1 Kb)^[13] 等植物,这表明丝瓜转录组中SSR数量很丰富。

在各物种EST-SSR结构中,大多数物种中二核 苷酸和三核苷酸频率最高^[29]。本研究中丝瓜SSR 重复序列以二核苷酸重复为主,与王洋洋^[15]对南瓜 EST-SSR标记开发的研究结果相似,AG/CT为其主 要重复基序,与蓝靛果忍冬^[11]、刺梨^[13]、芝麻^[30]等 研究结果一致。丝瓜中最丰富的三核苷酸重复为 AAG/CTT,这与Morgante等^[31]认为双子叶植物中三 核苷酸主要重复类型是AAG/CTT的观点相符。

高多态性比率的SSR引物开发是SSR标记技术

应用的一个重要技术因素^[23]。SSR的长度是会影 响其多态性高低, 当SSR长度≥20 bp时多态性较高, 长度在12~20 bp之间时多态性中等, 而长度在12 bp 以下时多态性极低^[32]。本研究随机合成20 bp以上 SSR引物150对,其中,106对引物实现有效扩增,有 效扩增率为70.67%。部分引物扩增失败的原因可 能与引物退火温度或者质量有关。其中,对引物中 22对SSR引物呈现出多态性,占有效引物的73.33%。 这个比率甜瓜的73.3%[33]、高于蓝靛果忍冬的 62.5%[11]、刺梨的52.17%[13]、野三七的50%[34]。这 说明,丝瓜EST序列中SSR位点较多,EST-SSR扩增 率较高,多态性的高低可能与材料之间差异程度及 材料数量有关[11]。使用上述22对多态性差异引物对 丝瓜进行遗传多样性分析, 32个丝瓜品种被分为普 通丝瓜和有棱丝瓜2类, 普通丝瓜根据果形又可分为 2类,比较准确的反映32个丝瓜品种之间的差异。丝 瓜类群的划分与形态学性状比较一致,即首先与棱 沟的有无密切相关,其次与瓜的性状、颜色有较高 的相关性。普通丝瓜和有棱丝瓜亲缘关系较远,但 有棱丝瓜和普通丝瓜种内遗传距离较近,说明两者 种内的遗传变异范围都相对较狭。丝瓜种质资源遗 传变异范围狭窄会给育种带来一定困扰。不断拓展 丝瓜遗传基础,丰富并创制丝瓜新种质资源对今后 丝瓜育种意义重大。

本研究结果表明, 丝瓜转录组SSR类型丰富, 出现频率高, 具有较高的可用性, 证明了利用丝瓜转录 组数据开发SSR标记的可行性。研究结果为丝瓜种 质资源遗传多样性分析、遗传图谱构建、功能基因 的挖掘及分子标记辅助育种等奠定了基础。

参考文献 (References)

- 罗少波, 罗剑宁, 郑晓明. 我国丝瓜育种研究进展与展望. 广 东农业科学(Luo Shaobo, Luo Jianning, Zheng Xiaoming. Research progress and prospect of *Luffa* breeding in China. Guangdong Agricultural Sciences) 2006; 1: 15-7.
- 2 王益奎,黎 炎,李文嘉. 我国丝瓜资源及遗传育种研究进展. 北方园艺(Wang Yikui, Li Yan, Li Wenjia. Reviews of the sponge gourd germplasm resources and genetic breeding in China. Northern Horticulture) 2009; (4): 121-4.
- 3 夏军辉,向长萍. 丝瓜种质资源遗传多样性的形态和RAPD 标记分析. 中国蔬菜(Xa Junhui, Xiang Changping. Analysis of genetic diversity in *Luffa* via morphological and RAPD markers. China Vegetables) 2008; 10: 21-5.
- 4 苏小俊, 徐海, 陈龙正, 宋波, 袁希汉, 陈劲枫. 丝瓜种质资源 亲缘关系的ISSR分析. 南京农业大学学报(Su Xiaojun, Xu Hai, Chen Longzheng, Song Bo, Yuan Xihan, Chen Jinfeng. Analysis

on the phylogenetic relationship of *Luffa (Luffa cylindrica* (L.) Roem.) germplasm based on ISSR. Journal of Nanjing Agricultural University) 2010; 33(3): 42-6.

- 5 崔竣杰, 宋建文, 汪国平, 林明宝, 李连芳, 胡开林. 丝瓜种质 资源亲缘关系SRAP分析. 植物遗传资源学报(Cui Junjie, Song Jianwen, Wang Guoping, Lin mingbao, Li Lianfang, Hu Kai1in. Genetic diversity analysis of germplasm resources of towel gourd sased on SRAP markers. Journal of Plant Genetic Resources) 2012; 13(6): 1061-6.
- 6 蒋雅琴, 黎炎, 李文嘉, 吴永官, 王益奎, 康德贤. SCoT分子标 记技术在丝瓜上的应用. 南方农业学报(Jiang Yaqin, Li Yan, Li Wenjia, Wu Yongguan, Wang Yikui, Kang Dexian. Application of SCoT markers on genetic diversity analysis of *Luffa* Mill. Journal of Southern Agriculture) 2014; 45(12): 2117-22.
- 7 Kalia RK, Rai MK, Kalia S, Singh R, Dhawan AK. Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants. Euphytica 2011; 177(3): 309-34.
- 8 Kumar B, Kumar U, Yadav HK. Identification of EST-SSRs and molecular diversityanalysis in *Mentha piperita*. The Crop Journal 2015; 3(4): 335-42.
- 9 王 东, 曹玲亚, 高建平. 党参转录组中SSR 位点信息分析. 中 草药(Wang Dong, Cao Lingya, Gao Jianping. Data mining of simple sequence repeats in *Codonopsis pilosula* transcriptome. Chinese Traditional and Herbal Drugs) 2014; 46(8): 2390-4.
- 10 Eujayl I, Sorrells M, Banm M, Wolters P, Powell W. Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. Theor Appl Genet 2002; 104(2): 399-07.
- 11 张庆田,李晓艳,杨义明,范书田,艾 军. 蓝靛果忍冬转录组 SSR信息分析及其分子标记开发. 园艺学报(Zhang Qingtian, Li Xiaoyan, Yang Yiming, Fan Shutian, Ai Jun. Analysis on SSR information in transcriptome and development of molecular markers in *Lonicera caerulea*. Acta Horticulturae Sinica) 2016; 43(3): 557-63.
- 12 李满堂,张仕林,邓 鹏,侯喜林,王建军. 洋葱转录组SSR 信息分析及其多态性研究. 园艺学报(Li Mantang, Zhang Shilin, Deng Peng, Hou Xilin, Wang Jianjun. Analysis on SSR information in transcriptome of onion and the polymorphism. Acta Horticulturae Sinica) 2015; 42(6): 1103-11.
- 13 鄢秀芹, 鲁 敏, 安华明. 刺梨转录组SSR 信息分析及其分子标 记开发. 园艺学报(Yan Xiuqin, Lu Min, An Huaming. Analysis on SSR information in transcriptome and development of molecular markers in *Rosa roxburghii*. Acta Horticulturae Sinica) 2015; 42(2): 341-9.
- 14 刘 峰, 王运生, 田雪亮, 茆振川, 邹学校, 谢丙炎. 辣椒转 录组SSR挖掘及其多态性分析. 园艺学报(Liu Feng, Wang Yunsheng, Tian Xueliang, Mao Zhenchuang, Zhou Xuexiao, Xie Bingyan. SSR mining in pepper (*Capsicum annuuml*) transcriptome and the polymorphism analysis. Acta Horticulturae Sinica) 2012; 39(1): 168-74.
- 15 王洋洋, 单文琪, 徐文龙, 崔崇士, 屈淑平. 印度南瓜转录组 SSR信息分析及其多态性研究. 园艺学报(Wang Yangyang, Shan Wenqi, Xu Wenlong, Cui Chongshi, Qu Shuping. Analysis on SSR information in transcriptome and the polymorphism of *Cucurbita maxima*. Acta Horticulturae Sinica) 2016; 43(3): 578-86.
- 16 刘 鹏, 吴海滨, 龚 浩, 何晓莉, 邓国栋, 罗剑宁. 利用黄瓜、甜 瓜和西瓜SSR开发葫芦科作物穿梭标记. 分子植物育种(Liu

Peng, Wu Hhaibin, Gong Hao, He Xiaoli, Deng Guodong, Luo Jianning. Exploiting new cross-species markers by SSR from cucumber, melon and watermelon. Molecular Plant Breeding) 2014; 12(6): 1201-8.

- 17 吴海滨, 龚浩, 刘鹏, 何晓莉, 罗少波, 郑晓明, 等. 丝瓜种质资源的SRAP遗传多样性分析. 西南农业学报(Wu Haibin, Gong Hao, Liu Peng, He Xiali, Luo Shabo, Zheng Xiaming, et al. Analysis of genetic diversity of sponge gourd germplasm using SRAP marker. Southwest China Journal of Agricultural Sciences) 2015; 28(4): 1524-9.
- 18 刘 军, 许美荣, 赵志伟, 刘文波, 沈火林. 丝瓜种质资源遗传多 样性的SSR与SRAP分析. 中国瓜菜(Liu Jun, Xu Meirong, Zhao Zhiwei, Liu Wenbo, Shen Huolin. Genetic diversity analysis of *Luffa* accessions by SSR and SRAP. China Cucurbits and Vegetables) 2010; 2: 1-4.
- 19 Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. Nat Biotechnol 2011; 29: 644-52.
- 20 杨 会,杨在君,魏淑红,廖明莉,杨宇凤,王育伟,等. 基于转录组序列的小麦ETS-SSR标记筛选与染色体定位. 西华师范大学学报:自然科学版(Yang Hui, Yang Zaijun, Wei Shuhong, Liao Mingli, Yang Yufeng, Wang Yuwei, et al. Screening and chromosomal localization of EST-SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of wheat. Journal of China West Normal University: Natural Sciences) 2014; 35(4): 315-21.
- 21 Portis E, Nagy I, Sasvari Z, Stagel A, Barchi L, Lanteri S. The design of *capsicum* spp. SSR assays via analysis of in silico DNA sequence, and their potential utility for genetic mapping. Plant Sci 2007; 172: 640-8.
- 22 Yang HB, Liu WY, Kang WH, Jahn M, Kang BC. Development of SNP markers linked to the L locus in *capsicum* spp by a comparative genetic analysis. Mol Breed 2009; 24: 433-46.
- 23 李炎林,杨星星,张家银,黄三文,熊兴耀.南方红豆杉转录 组SSR挖掘及分子标记的研究.园艺学报(Li Yanlin, Yang Xingxing, Zhang Jiayin, Huang Sanwen, Xiong Xingyao. Studies on SSR molecular markers based on transcriptome of *Taxus chinensis* var. *mairei*. Acta Horticulturae Sinica) 2014; 41(4): 735-45.
- 24 张体付, 戚维聪, 顾闽峰, 张晓林, 李 坦, 赵 涵. 藜麦EST-SSR 的开发及通用性分析. 作物学报(Zhang TiFu, Qi Weicong, Gu MinFeng, Zhang XiaoLin, Li Tan, Zhao Han. Exploration and transferability evaluation of EST-SSRs in quinoa. Acta Agronomica Sinica) 2016; 42(4): 492-500.
- 25 Wang SF, Wang XF, He QW, Liu XX, Xu WL, Li LB, *et al.* Transcriptome analysis of the roots at early and late seedling stages using illumina paired-end sequencing and development of EST-SSR markers in radish. Plant Cell Rep 2012; 31(8): 1437-47.
- 26 Jiang D, Zhong GY, Hong QB. Analysis of microsatellites in citrus unigenes. Yi Chuan Xue Bao 2006; 33(4): 345-53.
- 27 Varshney RK, Graner A, Sorrells ME. Genic microsatellite markers in plants: Features and applications. Trends Biotechnol 2005; 23(1): 48-55.
- 28 黄海燕, 杜红岩, 乌云塔娜, 刘攀峰. 基于杜仲转录组序列的 SSR分子标记的开发. 林业科学(Huang Haiyan, Du Hongyan, Wuyun Tana, Liu Panfeng. Development of SSR molecular

markers based on transcriptome sequencing of *Eucommia ulmoides*. Scienta Silvae Sinicae) 2013; 49(5): 176-81.

- 29 Liang X, Chen X, Hong Y, Liu H, Zhou G, Li S, et al. Utility of EST-derived SSR in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) and *Arachis* wild species. BMC Plant Biol 2009; 35: 2723-30.
- 30 Wei WL, Qi XQ, Wang LH, Zhang YX, Hua W, Li DH, et al. Characterization of the sesame (Sesamum indicum L.) global transcriptome using illumina paired-end sequencing and development of EST-SSR markers. BMC Genomics 2011; 12: 451.
- 31 Morgante M, Hanafey M, Powell W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. Nat Genetics 2002; 30: 194-200.
- 32 Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A, Lipovich L, Cartinhour S, McCouch S. Computational and experimental analysis of

microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. Genome Res 2001; 11(8): 1441-52.

- 33 胡建斌,李 建. 甜瓜EST-SSR位点信息及标记开发. 园艺学报 (Hu Jianbin, Li Jianwu. Information on EST-SSR loci in melon (*Cucumis melo* L.) and marker exploitation. Acta Horticulturae Sinica) 2009; 36(4): 513-20.
- 34 李翠婷,张广辉,马春花,孟珍贵,陈军文,杨生超. 野三七 转录组中SSR位点信息分析及其多态性研究. 中草药(Li Cuiting, Zhang Guanghui, Ma Chunhua, Meng Zhengui, Chen Junwen, Yang Shengchao. Analysis on SSR loci information in transcriptome of *Panax vienamensis* var. *fuscidiscus* and its polymorphism. Chinese Traditional and Herbal Drugs) 2014; 45(10): 1468-72.