

美洲南瓜转录组SSR信息分析及其分子标记开发

朱海生 黄丽芳 王 彬 刘建汀 叶新如 陈敏氢 张前荣 林 琿 李永平* 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 该文对美洲南瓜(*Cucurbita pepo* L.)开展转录组测序分析, 共获得83 650条Unigene, 利用MISA软件搜索1 Kb以上的15 356条Unigene, 共检测出7 478个SSR位点, 分布于5 786条Unigene中, 出现频率为48.7%, 平均分布距离为4.08 Kb。优势重复基序为单核苷酸、二核苷酸和三核苷酸, 分别占总SSR的47.90%、20.57%和22.36%。二核苷酸重复基序中以AG/CT为优势重复基序, 三核苷酸重复基序以AAG/CTT为主。利用Primer 3.0共设计出5 786对SSR引物。从114对有效扩增引物中随机选择50对引物, 对28个美洲南瓜种质进行多态性验证分析, 其中35对(占70%)引物表现稳定可重复的多态性。利用UPGMA作图, 将28份供试材料分为2类。利用美洲南瓜转录组数据进行SSR标记开发能获得较高频率的SSR位点, 且类型丰富, 为美洲南瓜遗传多样性分析和遗传图谱构建提供更丰富可靠的标记选择。

关键词 美洲南瓜; 转录组; SSR; 多态性

Analysis on SSR Information in Transcriptome and Development of Molecular Markers in Summer Squash

Zhu Haisheng, Huang Lifang, Wang Bin, Liu Jianting, Ye Xinru, Chen Mindong,
Zhang Qianrong, Lin Hui, Li Yongping*, 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 83 650 unigenes were obtained by transcriptome sequencing analysis from *Cucurbita pepo* L. in this study. 15 356 unigenes above 1 kilo base pairs were found by MISA software, and a total of 7 478 SSR locis were identified that were distributed in 5 786 unigenes. The frequency of these SSR locis was 48.7%, and the mean distribution distance of loci was 4.08 Kb. Mean while, the major repeat motifs were mononucleotide, dinucleotide and trinucleotide, which accounted for 47.90%, 20.57% and 22.36%, respectively. Furthermore, the AG/CT were the predominant dinucleotide repeat motifs, and the AAG/CTT were the predominant trinucleotide repeat motifs. 5 786 pairs of SSR primers were designed by Primer 3.0, then 50 pairs of primers were randomly selected from 114 pairs of effective amplification primers for the polymorphism analysis of 28 *Cucurbita pepo* L. germplasms, and 35 out of 50 SSR primers showed stable and reproducible polymorphism. According to the UPGMA mapping results, 28 *Cucurbita pepo* L. samples were divided into 2 categories. Using transcriptome data of *Cucurbita pepo* L. to develop SSR markers could obtain higher frequencies of SSR locis and the types of them were rich. It provides more abundant and

收稿日期: 2017-09-05 接受日期: 2017-09-22

福建省属公益类科研院所基本科研专项(批准号: 2018R1028-4)、福建省农业科学院蔬菜科技创新团队(批准号: STIT2017-1-2)、福建省自然科学基金(批准号: 2015J01118)和福建省农业科学院“青年科技英才百人计划”资助的课题

*通讯作者。Tel: 0591-87572224, E-mail: 248937256@qq.com; Tel: 0591-87573380, E-mail: fjvrc@163.com

Received: September 5, 2017 Accepted: September 22, 2017

This work was supported by Fujian Provincial Public Research Institute of Fundamental Research (Grant No.2018R1028-4), Fujian Academy of Agricultural Sciences Vegetable Science and Technology Innovation Team (Grant No.STIT2017-1-2), Fujian Provincial Natural Science Foundation (Grant No.2015J01118) and Fujian Academy of Agricultural Sciences “Youth Science and Technology Talents Program” Project

*Corresponding authors. Tel: +86-591-87572224, E-mail: 248937256@qq.com; Tel: +86-591-87573380, E-mail: fjvrc@163.com

网络出版时间: 2018-01-03 17:19:51 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180103.1719.010.html>

reliable marker selection for genetic diversity analysis and genetic map construction of *Cucurbita pepo* L.

Keywords summer squash; transcriptome; simple sequence repeat; polymorphism

美洲南瓜(*Cucurbita pepo* L.), 又名西葫芦, 为葫芦科(Cucurbitaceae)南瓜属一年生草本植物, 原产美洲南部, 十九世纪中叶我国开始栽培^[1]。美洲南瓜味道鲜美, 营养丰富, 且具有很好的医疗保健功能, 深受大众喜爱, 在我国大范围的种植, 现已成为仅次于黄瓜的第二大瓜类蔬菜^[2]。我国美洲南瓜育种发展时间较短, 近几年各地才逐渐开始对美洲南瓜种质资源进行收集和整理。由于缺乏大量的多态性分子标记, 其遗传学和基因组学方面的研究比较滞后。因此, 查清美洲南瓜种质资源的遗传背景、开展相应的遗传学基础研究、定位重要经济性状是我国美洲南瓜选育工作中首先需要解决的问题。

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^[3]。因其位点特异、复等位、呈共显性以及基因组序列中分布广泛等优点, SSR已经成为最为有用的分子标记之一^[4], 在遗传多样性分析^[5-6]、品种鉴定^[7-8]、遗传图谱建立^[9-10]等方面都有应用。目前, 美洲南瓜SSR报道非常少, 刘栓桃等^[11]利用甜瓜25对SSR引物对34份美洲南瓜进行分析; 王春蕾等^[12]以18种美洲南瓜为材料, 利用57对SSR引物进行分析; Rahim等^[13]利用14对SSR引物检测伊朗26个美洲南瓜地方品种的遗传多样性。现有的美洲南瓜SSR分子标记数量远远不能满足美洲南瓜分子生物学研究的需求, 因此, 大量开发SSR标记仍是目前美洲南瓜研究的重要工作之一^[14-15]。随着测序技术的飞速发展, 相对于基因组测序更易于拼接的转录组研究在许多生物中得到了广泛的应用^[16-20]。基于转录组的SSR标记较一般的分子标记具有信息量大和通用性好的优势, 本文拟利用美洲南瓜转录组测序获得的数据进行SSR标记搜索, 分析其分布及组成特征, 进行初步可用性评价, 以期为美洲南瓜的品种鉴定、种质资源多样性分析、核心种质建立和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

美洲南瓜转录组数据来源于本课题组2016年Illumina高通量深度测序结果。测序时采集4个低温

弱光处理的美洲南瓜叶片, 委托北京百迈客生物科技有限公司采用Illumina HiSeq™ 2500 PE125系统进行RNA-Seq转录组测序, 采用Trinity进行序列组装, 得到83 650条Unigene, 作为分析数据。

1.2 材料及其DNA提取

用于SSR引物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28份美洲南瓜材料(表1)。基因组DNA提取采用CTAB法进行。

1.3 转录组SSR位点鉴别及SSR引物设计

使用MISA程序(<http://pgrc.ikp-gatersleben.de/misa>)进行SSR位点搜索, 以二至六核苷酸最少重复次数分别为6、5、5、4和4次为标准进行搜索。用Primer 3.0软件对SSR重复基序前后的序列进行引物设计及评价, 每条SSR产生3条引物。引物序列长度18~27 bp, GC含量40%~60%, 退火温度56~62 °C, 上下游引物的T_m值相差≤2 °C, 预期扩增产物长度100~280 bp; 且无二级结构和二聚体。

1.4 EST-SSR引物筛选

PCR反应体系为25 μL, 其中10 mmol/L dNTP 1 μL, 5U Taq酶0.3 μL, 50 ng DNA 1.5 μL, 10 μmol/L的上下游引物各1 μL, 10×Buffer (Mg²⁺) 2.5 μL, 加ddH₂O补至25 μL。PCR扩增程序为: 95 °C预变性5 min; 然后进行35个循环, 每个循环包括94 °C变性30 s、58 °C退火30 s(退火温度因不同引物而异)、72 °C延伸1 min、最后72 °C延伸7 min。PCR扩增产物经电泳后观察拍照。

1.5 数据统计

SSR发生频率为SSR的Unigene数量与总Unigene数量之比, SSR的出现频率为SSR的个数与总Unigene的数量比, SSR平均分布距离为1 Kb以上的Unigene的碱基数与SSR数量之比。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 美洲南瓜中SSR的分布及结构特点

美洲南瓜转录组经组装后共获得83 650条Unigene(序列总长约60 408 531 bp), 用MISA软件对1 Kb

以上的Unigene(15 356条, 序列全长为33 606 770 bp)进行搜索, 发现其中5 786条Unigene序列中含有7 478个SSR位点, 其中1 383条Unigene含有两个或两个以上的EST-SSR位点。SSR发生频率(含SSR的Unigene数与总Unigene数之比)为37.68%, 出现频率(检出SSR个数与总Unigene数之比)为48.70%, 平均4.08 Kb出现1个SSR。

美洲南瓜转录组SSR种类较为丰富, 各种重复类型的出现频率有较大差异, SSR重复类型6种均有, 即单核苷酸至六核苷酸重复, 另外还有复合SSR类型, 其中单核苷酸、二核苷酸和三核苷酸重复出现频率占优势, 分别占总SSR的47.90%、20.57%和

22.36%; 四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复类型数量较少, 分别占总数的1.85%、0.47%和0.33%, 复合SSR占总数的6.53%。从重复次数看, 美洲南瓜转录组SSR重复基序的重复次数分布在5~26次之间, 其中5~10次的SSR共有4 362个, 占总数的62.41%; 其次为11~20次的SSR, 共有2 493个, 占总数的35.67%; 20次重复以上的仅有135个, 占1.93%(表2)。

2.2 美洲南瓜转录组中SSR基序重复类型和频率特征

美洲南瓜转录组中7 478个SSR位点共含104种重复基序, 单核苷酸至六核苷酸重复分别有2、4、18、39、22和19种。从分布频率来看(表3), 以单

表1 美洲南瓜SSR多态性分析材料

Table 1 List of accessions used in assessing the level of SSR in the species summer squash

序号 Serial number	编号 Number	颜色 Color	序号 Serial number	编号 Number	颜色 Color
1	XHL1	Dark green	15	XHL15	Light green
2	XHL2	Light green	16	XHL16	Light green
3	XHL3	Light green	17	XHL17	Green
4	XHL4	Light green	18	XHL18	White
5	XHL5	Green	19	XHL19	White
6	XHL6	Green	20	XHL20	White
7	XHL7	Green	21	XHL21	Light yellow
8	XHL8	Blackish green	22	XHL22	Golden yellow
9	XHL9	Blackish green	23	XHL23	Yellow
10	XHL10	Dark green	24	XHL24	Golden yellow
11	XHL11	Dark green	25	XHL25	Yellow
12	XHL12	Light green	26	XHL26	Light yellow
13	XHL13	Green	27	XHL27	Yellow
14	XHL14	Green	28	XHL28	Golden yellow

表2 美洲南瓜EST-SSR的类型、数量与分布频率

Table 2 Type, number and frequency of EST-SSRs in summer squash

重复基序长度 Repeat motif length	重复次数(Repeat number)								总计 Total	比例(%) Ratio (%)
	5	6	7	8	9	10	11~20	>20		
Mono	0	0	0	0	0	1 062	2 385	135	3 582	47.90
Di	0	440	307	261	239	187	104	0	1 538	20.57
Tri	877	508	270	15	1	0	1	0	1 672	22.36
Tetra	106	27	3	2	0	0	0	0	138	1.85
Penta	28	5	1	0	0	0	1	0	35	0.47
Hexa	12	7	2	2	0	0	2	0	25	0.33
Compound	0	0	0	0	0	0	0	0	488	6.53
Total	1 023	987	583	280	240	1 249	2 493	135	7 478	100
Ratio (%)	14.64	14.12	8.34	4.01	3.43	17.87	35.67	1.93	100	

核苷酸重复类型A/T出现最多, 占总SSR的47.29%, 占单核苷酸重复基序的总数的98.72%。其次是二核苷酸重复类型AG/CT, 占总SSR的13.21%, 占二核苷酸总数的64.24%。此外, 三核苷酸重复基序中以AAG/CTT占优势, 占总SSR的6.19%, 占三核苷酸总数的27.69%; 四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸重复基序及复合SSR分布较为分散, 出现的频率较低。

2.3 美洲南瓜转录组SSR引物设计与筛选

利用Primer3.0对含SSR位点的5 786条Unigene序列进行引物设计, 共设计出引物7 958对。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, 对美洲南瓜‘XHL1’ DNA进行SSR-PCR扩增以验证其有效性。结果表明, 114对引物实现有效扩增, 占150对SSR引物的76%。

表3 美洲南瓜转录组中不同微卫星重复基序出现的频率

Table 3 Occurrence frequency of different microsatellites motifs of summer squash

重复基序类型	重复基序	数量	比例(%)
Repeat type	Repeat motif	Number	Ratio (%)
Mono	A/T	3 536	47.29
	C/G	46	0.62
Di	AC/GT	136	1.82
	AG/CT	988	13.21
	AT/TA	412	5.51
	CG/GC	2	0.03
Tri	AAC/GTT	52	0.70
	AAG/CTT	463	6.19
	AAT/ATT	111	1.49
	ACA/TGT	22	0.29
	ACC/GGT	58	0.78
	ACG/CGT	50	0.67
	ACT/AGT	43	0.57
	AGA/TCT	171	2.29
	AGC/GCT	103	1.37
	AGG/CCT	120	1.61
	ATA/TAT	41	0.55
	ATC/GAT	55	0.74
	ATG/CAT	39	0.52
	CAC/GTG	27	0.36
	CAG/CTG	105	0.67
	CCG/CGG	110	2.21
Tetra	CGC/GCG	41	0.55
	CTC/GAG	61	0.82
	AAAC/GTTT	6	0.08
	AAAT/ATTT	20	0.26
	TTTC/GAAA	6	0.08
	AACA/TGTT, AAGA/TCTT, AAGG/CCTT, AATA/TATT, ACAT/ATGT, AGGG/CCCT, ATGG/CCAT, ATTC/GAAT, CAAC/GTTG, CAGA/TCTG, CATC/GATG, CCAA/TTGG, CTGC/GCAG, GTGA/TCAC, TCCA/TGGA, TGAA/TTCA, AAAG/CATA, AACG/CATG, AATC/CTCA, AATT/CTCG, ACCA/CTGG, ACGA/CTTG, ACTG/GAAG, AGAA/GAGG, AGAC/GGAG, AGGA/GAGC, ACAGGC/GATA, AGGT/GGAC, ATAA/GGCA, ATAG/GGTC, ATCA/GTTA, ATCC/TCAA, ATGC/TGTC, CACT/TTCC, CATT/TTGC, TTGT/TTGT	106	1.42

在114对有效扩增引物中, 103对(90.35%)PCR扩增产物与预期大小相符, 有11对(9.65%)扩增产物长度超过预期。

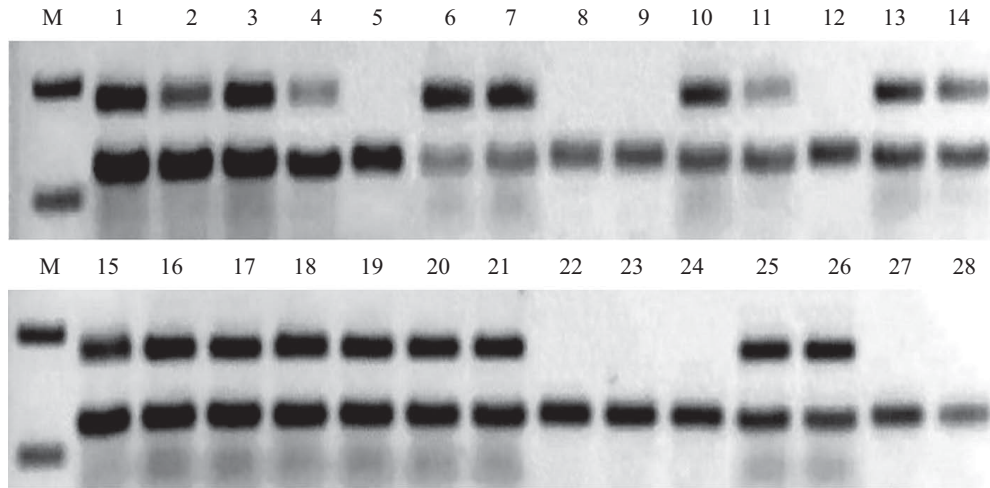
2.4 多态性分析

从114对有效扩增引物中随机选取50对EST-SSR引物对28份美洲南瓜进行扩增及多态性评价。

表4 35对美洲南瓜SSR引物信息

Table 4 Information of 35 pairs of primers developed from summer squash

引物编号 Primer No.	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	SSR基序 SSR motif	产物(bp) Length (bp)
XH1	F: CTT GCC AAA ACA AAG CAA CA	R: GTG TAC CAC CCG ACA ATC CT (TA) ₉	255
XH2	F: GAA GCA GAG GAC CAG TCA GC	R: GCG TTT GCT GCC ATT ATT TT (AC) ₉	216
XH3	F: TCT TCC TTC CTC CAA TTC CC	R: TCT TTG TCC GGA GAA GTT GC (TC) ₉	278
XH4	F: TCA ACC CCT TCA CTC TCA CC	R: CGC TCC CTC ATA GTC CGT TA (AT) ₁₀	241
XH5	F: GGA TAC CAG ACA CCT ACC GC	R: AGC AAC TGT GAA ACT GGG CT (CAT) ₇	174
XH6	F: CTA AAC CCA AAC CTA CCC GC	R: CCA CAC AAG GAA AGG GTC AC (CTCTT) ₆	226
XH7	F: AAG GCT GCT GGT GAA TGA GT	R: TTC CCA CCT GGG TGT TGT AT (AG) ₉	180
XH8	F: ATC AGC AGT AGA GGC GTC GT	R: TGA TTT TGC AGC GTT GAT TC (CGG) ₇	273
XH9	F: ACT TTC AGT TGG TGG GGA GA	R: GAA GAA CCC CAA GAG ATG GA (GTTG) ₆	199
XH10	F: TCT GTC CGG AAA GTT CAA CC	R: TCG TTT TCA TCT TCA GCA CG (GCG) ₇	234
XH11	F: GAT GAT GAT GAC ATG CCT GG	R: ATC AAC CAT CAA TCC CCA AA (GATCC) ₅	147
XH12	F: CAG CAG CAG AAC ATC AGG AA	R: CCC CAC AAC AAA ACC AGA AT (TGGCT) ₅	275
XH13	F: TTC ATT CAA GGA GAC GGG AC	R: ACC ATT GTT TCC TCG TTC CA (TCG) ₇	218
XH14	F: ATC AAG GGA GGA TGT GTT GG	R: GGT GAC AGT AAC AGA GGC AGC (CTGC) ₅	245
XH15	F: TCA ACC CCA CCC TAC AAT ACA	R: TAA GAG ATC CGA ACC GTT GC (TA) ₁₀	179
XH16	F: ACA CGG GAA TCT CGA ATC AG	R: TGG GGT TTT CTC CAT TTT CA (AGA) ₆	276
XH17	F: GTT CAT CCA CAG CCA GGA AT	R: GAA GAA AAT GGG TGC CTG AA (AGGG) ₆	226
XH18	F: GCC TCC TTC AAT GGA ATC AA	R: CTG TTT TTC GGG TTC TCC TG (TTA) ₇	278
XH19	F: GGA CGA ATT CTT CTC CGT CA	R: CCC TAG AAA TCC CTT AGC CG (ACAGAA) ₆	139
XH20	F: CGA ACT CGG AGA AGA AGT CG	R: ACT GCT CAG CAA TTT CAG CA (TGC) ₇	144
XH21	F: GCA GCC AAT TCA ACC AGT TT	R: GGAAAG AAT GCG TCG GTAAA (ACA) ₇	246
XH22	F: GGG AGT TTG AGA AGG CAT CA	R: CTT TCG TGT TCG ATG CGA TA (ACAAAC) ₅	189
XH23	F: GAT GAG AGC GCA GGA AAA AC	R: TCA TCA TTT TCA GTG GCG AA (CT) ₁₀	229
XH24	F: AGC TGC ATC ATA GCA CCT CA	R: GCT TCC CCA CAT GTT CTG TT (ATTAT) ₅	209
XH25	F: GAA TTG GAA TTG GCA TGC TT	R: TGA GTG TCC CAA GGG GTT TA (TCTG) ₅	238
XH26	F: CTC GGC CAC ATA AAC CCT TA	R: CTT GTG GTG GGA TAC CCT TG (TTTTAC) ₆	242
XH27	F: TACA CGA TGG AGC GAG TCA G	R: GAT TTG CAG AAG CAG AAG GC (CA) ₇ A(TC) ₆	241
XH28	F: TAG AGG AGG CAG GAG GTC AA	R: ATG CAA TGA AGC CAA CAT CA (GAAT) ₆	219
XH29	F: TTC CCA ACT GAC CTA GGA TAT GA	R: CAA TTT GCT CAA GCG TTC AA (TA) ₉	239
XH30	F: TTC ACA CCA TAA TGC CGA AA	R: ACC CCG CAA TAC TCA CTC AC (AG) ₇	201
XH31	F: TGG CAT TCA AAG CAA CAA AG	R: GCA TCA GAT ATC AAC GGC CT (AGGC) ₅	147
XH32	F: TAA CCT ACA AAA CCA CCG CC	R: TTC ACG TTG GTT ACT GCT GC (CGGTCT) ₁₂	213
XH33	F: CAG TTC CCT TCG TTG AGT GC	R: ATT CTG TCC ATT CCG GTG AA (TTA) ₇	280
XH34	F: CCA AAG AAG CAA CCA AGC TC	R: TAT TTG GCC TCA CAC CAC AA (AT) ₁₀	159
XH35	F: AGC GGG AGA AAC CTT AGA GC	R: CAA TGG CTT CCA CCT CTT GT (GCT) ₇	239

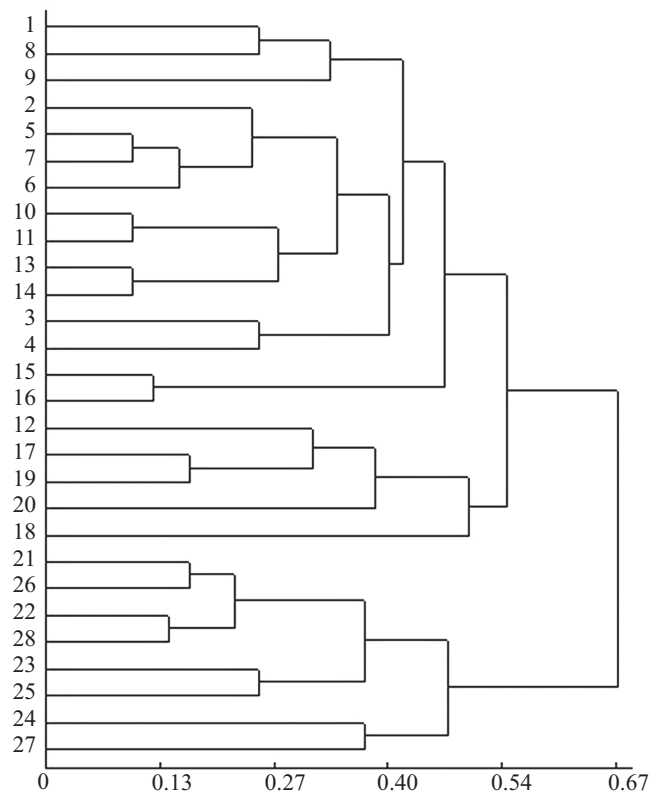


M: marker; 品种编号名称见表1。

M: marker; Code names are shown in Table 1.

图1 引物XH4在28个美洲南瓜材料中的多态性

Fig.1 Polymorphisms showed in 28 summer squash germplasms by primer XH4



品种编号名称见表1。

Code names are shown in Table 1.

图2 供试美洲南瓜材料的UPGMA聚类图

Fig.2 Cluster diagram for summer squash tested by UPGMA method

其中, 35对引物存在多态性差异(表4), 占有有效扩增引物的70%。每对引物产生的条带数在1~4之间, 共得到91条条带, 其中多态性片段72个, 每对引物平均

产生2.06个多态性片段。图1为引物XH4的扩增情况。

利用35对多态性SSR引物对28份美洲南瓜材料

进行聚类分析, 在遗传距离0.55处, 供试材料被分成两大类(图2)。第一类包含20份材料, 瓜皮颜色主要为绿色、深绿色、墨绿色、浅绿色和白色, 以遗传距离0.50为阈值, 该类被分为两小类, 第一小类有15份材料, 瓜皮颜色主要为绿色、深绿色、墨绿色和浅绿色, 第二小类有5份材料, 3份白色、1份绿色和1份浅绿色材料聚在该类。第二类包含8份材料, 瓜皮颜色主要为黄色、金黄色和浅黄色。聚类结果中美洲南瓜群体的划分与果实颜色比较相关, 与起源和地理分布关系不大。

3 讨论

由于高通量技术的发展和其成本优势, 测序数据几乎涵盖了特定组织和特定时期的所有转录本, 特别是那些缺乏基因组信息的物种, 其转录组学的研究越来越广泛。基于转录组建立的标记得到了广泛的应用。本研究在美洲南瓜转录组测序基础上, 对美洲南瓜15 356条Unigene进行搜索, 得到5 786个SSR位点, 出现频率为48.70%, 高于印度南瓜(9.52%)^[17]、丝瓜(14.97%)^[16]、萝卜(23.79%)^[21]、辣椒(7.83%)^[22]等草本蔬菜植物, 也高于刺梨(20.37%)^[18]、蓝靛果忍冬(32.51%)^[19]、柑橘(21.74%)^[23]等木本果树。EST-SSR的出现频率与物种、SSR搜索标准、SSR开发工具和数据库的大小密切相关^[24]。本研究中较高的出现频率很可能是仅对大于1 Kb的Unigene进行分析的结果, 与芙蓉李^[25]相似。

多数植物的EST-SSR以二、三核苷酸重复类型为主, 而主导重复基序因在不同物种间会存在差异^[24]。美洲南瓜以单核苷酸重复(47.90%)为主, 其次是三(22.36%)、二(20.57%)核苷酸重复, 四、五和六核苷酸重复所占比例小。美洲南瓜单核苷酸重复以A/T为主, 与柑橘^[23]、芙蓉李^[25]一致, 真核生物基因存在Poly(A)和Poly(T)结构, 因此该种类单核苷酸重复不能算作SSR重复序列, 不能用于在SSR引物开发^[26-27]。二核苷酸重复中AG/CT占二核苷酸总数的64.24%, 为数最多, 与芝麻^[28]、草莓^[29]、印度南瓜^[17]、刺梨^[18]、蓝靛果忍冬^[19]多数植物相同。在双子叶植物中AAG/CTT是常见基序^[30-31], 美洲南瓜三核苷酸重复基序中同样是以AAG/CTT占优势。

随机选择18~25 bp的SSR引物150对进行验证, 其中114对(76%)引物能扩增出理想的PCR产物, 引物扩增失败可能是由于存在大的内含子, 在启动位

点引起SNPS/InDel变异, 进而阻碍引物与目标DNA的结合, 也可能是由组装错误引起^[32]。从114对引物中随机选取50对EST-SSR引物进行多态性评价, 其中35对引物存在多态性差异, 占有效扩增引物的70%, 低于草莓(85.71%)^[29]、丝瓜(73.33%)^[16], 高于刺梨(52.17%)^[18]、野三七(50%)^[33], 说明美洲南瓜EST序列中的SSR位点较多, 引物扩增效率较高。不同物种引物多态性的高低与供试材料数量和多样性有关^[20]。利用这35对多态性SSR引物对28份美洲南瓜材料进行聚类分析, 28份美洲南瓜材料被分为2大类, 并可以进一步进行细分, 聚类分析结果能将不同皮色的美洲南瓜种质区别出来, 这与前人的研究较为一致^[34-35], 比较准确地反映了28份美洲南瓜材料之间的差异。

本研究结果表明, 利用美洲南瓜转录组数据开发出的SSR标记可用性较高, 为美洲南瓜种质资源遗传多样性分析、遗传图谱构建、基因定位与克隆及分子标记辅助育种等奠定了基础。

参考文献 (References)

- 1 吴会昌. 我国西葫芦育种现状、问题及对策. 北方园艺(Wu Huichang. The current situation, problems and solution of summer squashes breeding in China. Northern Horticulture) 2006; 2: 48-9.
- 2 王朝阳, 程永安, 张恩慧, 李 伟, 马英夏, 高海娜. 西葫芦花蕾纵横径长度与小孢子发育关系研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版)(Wang Zhaoyang, Chen Yongan, Zhang Enhui, Li Wei, Ma Yingxia, Gao Haina. Studies on the relationship between bud size and microspore periods in squash. Journal of Northwest A&F University, Natural Science Edition) 2012; 40(5): 92-8.
- 3 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.
- 4 Kumar B, Kumar U, Yadav HK. Identification of EST-SSRs and molecular diversity analysis in *Mentha piperita*. Crop J 2015; 3(4): 335-42.
- 5 Daniela P, Rosa LB, Caroline MC, Antonio CO, Juliana CBV, Claudete CM. Genetic diversity of *Cucurbita pepo*, *C. argyrosperma* and *C. ficifolia* accessions evaluated through microsatellite markers. Horticultura Brasileira 2013; 31: 361-8.
- 6 赵树琪, 梁 冰, 李黎贝, 庞朝友, 宿俊吉, 宋美珍, 等. 基于SSR标记的陆地棉早熟相关种质遗传多样性分析. 植物遗传资源学报(Zhao Shuqi, Liang Bing, Li Libei, Pang Chaoyou, Su Junji, Song Meizhen, et al. Genetic diversity analysis of early-maturity related germplasm in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) based on SSR markers. Journal of Plant Genetic Resources) 2016; 17(4): 599-606.
- 7 李 丽, 张万清, 刘 玲, 吴 萍, 马连平. SSR标记对甜瓜品种纯度和真实性的鉴定. 分子植物育种(Li Li, Zhang Wanqing,

- Liu Ling, Wu Ping, Ma Lianping. Application of SSR markers in melon hybrid purity test and variety specificity identification. *Molecular Plant Breeding* 2015; 13(11): 2522-30.
- 8 石星星, 纪小红, 张磊, 吕茜茜, 刘亚婷, 王玉刚, 冯辉. 利用SSR标记鉴定结球甘蓝杂交种真实性及纯度. *分子植物育种* (Shi Xingxing, Ji Xiaohong, Zhang Lei, Lü Xixi, Liu Yating, Wang Yugang, Feng Hui. Authenticity and purity of heading cabbage hybrids identified by SSR markers. *Molecular Plant Breeding* 2015; 13(2): 331-7.
- 9 高天翔, 蔡宇良, 冯瑛, 赵晓军. 中国樱桃14个自然居群遗传多样性和遗传结构的SSR评价. *园艺学报* (Gao Tianxiang, Cai Yuliang, Feng Ying, Zhao Xiaojun. Genetic diversity and denetic structure of *Prunus pseudocerasus* populations from China as revealed by SSR markers. *Acta Horticulturae Sinica* 2016; 43(6): 1148-56.
- 10 江锡兵, 汤丹, 龚榜初, 赖俊声. 基于SSR标记的板栗地方品种遗传多样性与关联分析. *园艺学报* (Jiang Xibing, Tang Dan, Gong Bangchu, Lai Junsheng. Genetic diversity and association analysis of local cultivars of Chinese chestnut based on SSR markers. *Acta Horticulturae Sinica* 2015; 42(12): 2478-88.
- 11 刘栓桃, 董艳敏, 赵智中, 赵智中, 卢亚楠, 卢金东, 何启伟. 甜瓜SSR引物在西葫芦中的通用性. *中国农学通报* (Liu Shuanta, Dong Yanmin, Zhao Zhizhong, Lu Yanan, Lu Jindong, He Qiwei. Transferability of SSRs from sweet melon to summer squash. *Chinese Agricultural Science Bulletin* 2010; 26(13): 294-7.
- 12 王春蕾, 朱子成, 盛云燕. 利用甜瓜SSR标记分析常见葫芦科作物亲缘关系. *中国园艺文摘* (Wang Chunlei, Zhu Zicheng, Sheng Yunyan. Study on the genetic relationship of cucurbitaceae crops by melon's SSR markers. *Chinese Horticulture Abstracts* 2011; 12: 23-53.
- 13 Barzgar R, Peyvast G, Ahadi AM, Rabiei B, Ebadi AA, Babagolzadeh A. Biochemical systematic, population structure and genetic variability studies among Iranian *Cucurbita* (*Cucurbita pepo* L.) accessions, using genomic SSRs and implications for their breeding potential. *Biochem System Ecol* 2013; 50: 187-98.
- 14 郭秀霞, 李灵芝, 马太光, 张瑞腾, 李海平. 西葫芦遗传多样性研究进展. *中国园艺文摘* (Guo Xiuxia, Li Lingzhi, Ma Taiguang, Zhang Ruiteng, Li Haiping. Research progress of genetic diversity of vegetable marrow. *Chinese Horticulture Abstracts* 2016; 4: 20-2.
- 15 向成钢, 王艳玲, 张雪梅, 王长林, 尹玲, 王迎杰. SSR标记在南瓜亲缘关系分析中的应用. *北方园艺* (Xiang Chenggang, Wang Yanling, Zhang Xuemei, Wang Changlin, Yin Ling, Wang Yingjie. Application of SSR markers in genetic relationships analysis of *Cucurbita*. *Northern Horticulture* 2013; 15: 104-10.
- 16 朱海生, 张前荣, 刘建汀, 陈敏甄, 王彬, 薛珠政, 等. 丝瓜转录组SSR位点分析及其分子标记开发. *中国细胞生物学学报* (Zhu Haisheng, Zhang Qianrong, Liu Jianting, Chen Mindong, Wang Bin, Xue Zhuzheng, et al. Analysis on SSR Loci in transcriptome and development of molecular markers in *Luffa cylindrical*. *Chinese Journal of Cell Biology* 2016; 38(9): 1118-27.
- 17 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.
- 18 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.
- 19 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.
- 20 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.
- 21 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: 1437-47.
- 22 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 annum* L.) transcriptome and the polymorphism analysis. *Acta Horticulturae Sinica* 2012; 39(1): 168-74.
- 23 Jiang D, Zhong GY, Hong QB. Analysis of microsatellites in citrus unigenes. *Acta Genetica Sinica* 2006; 33(4): 345-53.
- 24 Varshney RK, Graner A, Sorrells M E. Genic microsatellite markers in plants: Features and applications. *Trends Biotechnol* 2005; 23(1): 48-55.
- 25 方智振, 叶新福, 周丹蓉, 姜翠翠, 潘少霖. ‘芙蓉李’转录组SSR信息分析与分子标记开发. *果树学报* (Fang Zhizhen, Ye Xinfu, Zhou Danrong, Jiang Cuicui, Pan Shaolin. Analysis on SSR information in ‘Furongli’ plum transcriptome and development of molecular markers in *Prunus salicina* Lindl. *Journal of Fruit Science* 2016; 33(4): 416-24.
- 26 孙佳莹, 辛大伟, 单彩云, 刘春燕, 胡国华, 陈庆山. SSR标记开发软件SSR MINING 1.0的编制. *中国农业科学* (Sun Jiaying, Xin Dawei, Shan Caiyun, Liu Chunyan, Hu Guohua, Chen Qingshan. Programming for SSR Marker Developing Software SSR MINING 1.0. *Scientia Agricultura Sinica* 2008; 41(10): 3336-42.
- 27 杨曦. 鲫鱼(*Carassius auratus*)表达序列标签资源的SSR构成与分布分析. *生物技术通报* (Yang Xi. Analysis of simple sequence repeats in expressed sequence tags from *Carassius auratus*. *Biotechnology Bulletin* 2012; 11: 139-43.
- 28 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.
- 29 董清华, 王西成, 赵密珍, 宋长年, 葛安静, 王静. 草莓EST-SSR标记开发及在品种遗传多样性分析中的应用. *中国农业科学* (Dong Qinghua, Wang Xicheng, Zhao Mizhen, Song Changnian, Ge Anjing, Wang Jing. Development of EST-derived SSR

- markers and their application in strawberry genetic diversity analysis. *Scientia Agricultura Sinica* 2011; 44(17): 3603-12.
- 30 Wang ZY, Fang BP, Chen JY, Zhang XJ, Luo ZX, Huang LF, *et al.* *De novo* assembly and characterization of root transcriptome using Illumina paired-end sequencing and development of cSSR markers in sweetpotato (*Ipomoea batatas*). *BMC Genomics* 2010; doi: 10.1186/1471-2164-11-726.
- 31 Jiang LN, Wang LJ, Liu LW, Zhu XW, Zhai LL, Cong YQ. Development and characterization of cDNA library based novel EST-SSR marker in radish (*Raphanus sativus* L.). *Sci Horti* 2012; 140: 164-72.
- 32 Xiaoyan X, Zhongxin Z, Zhigao W, Xiaoping Z, Ganlin W. Transcriptome sequencing and development of EST-SSR markers in *Pinus dabeshanensis*, an endangered conifer endemic to China. *Mol Breed* 2015; 35: 158.
- 33 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 vietnamensis* var. *fuscidiscus* and its polymorphism. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*) 2014; 45(10): 1468-72.
- 34 Ntuli NR, Tongoona PB, Zobolo AM. Genetic diversity in *Cucurbita pepo* landraces revealed by RAPD and SSRmarkersh. *Scientia Horticulturae* 2015; 50: 192-200.
- 35 陈凤真, 何启伟. 西葫芦种质资源遗传多样性的RAPD分析. *中国蔬菜*(Chen Fengzhen, He Qiwei. Analysis of genetic diversity in summer squash germplasm by RAPD. *China Vegetables*) 2010; 16: 26-31.