

中国南瓜转录组SSR信息分析及其分子标记开发

朱海生 王彬 叶新如 刘建汀 李永平 陈敏氩 林琿 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 该文对中国南瓜(*Cucurbita moschata* Duch)开展转录组测序分析, 共获得61 882条Unigene, 利用MISA软件搜索1 Kb以上的12 526条Unigene, 共检测出5 407个SSR位点, 分布于4 348条Unigene中, 出现频率为43.17%, 平均分布距离为4.76 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47.92%、24.45%和19.66%。二核苷酸重复基序中以GA/TC为优势重复基序, 三核苷酸重复基序以GAA/TTC为主。利用Primer 3.0共设计出6 489对SSR引物。从92对有效扩增引物中随机选择30对引物, 对30个中国南瓜种质进行多态性验证分析, 其中18对(占60%)引物表现稳定可重复的多态性。利用UPGMA作图, 可将30份供试材料分为2类。利用中国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, 为中国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 中国南瓜; 转录组; SSR; 多态性

Analysis on SSR Information in Transcriptome and Development of Molecular Markers in *Cucurbita moschata* Duch

Zhu Haisheng, Wang Bin, Ye Xinru, Liu Jianting, Li Yongping, Chen Mindong, Lin Hui, 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 In this study, 61 882 unigenes were obtained by transcriptome sequencing analysis from *Cucurbita moschata* Duch. 12 526 unigenes above 1 Kb pairs were found by MISA software, and a total of 5 407 SSR loci were identified that were distributed in 4 348 unigenes. The frequency of these SSR loci was 43.17%, and the mean distribution distance of loci was 4.76 Kb. Mean while, the major repeat motifs were mononucleotide, dinucleotide and trinucleotide, which accounted for 47.92%, 24.45% and 19.66%, respectively. Furthermore, the GA/TC were the predominant dinucleotide repeat motifs, and the GAA/TTC were the predominant trinucleotide repeat motifs. 6 489 pairs of SSR primers were designed by Primer 3.0, then 30 pairs of primers were randomly selected from 92 pairs of effective amplification primers for the polymorphism analysis of 30 *Cucurbita moschata* germplasms, and 18 out of 30 SSR primers showed stable and reproducible polymorphism. According to the UPGMA mapping results, 30 *Cucurbita moschata* samples were divided into 2 categories. Using transcriptome data of *Cucurbita*

收稿日期: 2018-09-14 接受日期: 2018-10-22

福建省属公益类科研院所基本科研专项(批准号: 2018R1026-5)、中央引导地方科技发展专项(批准号: 2018L3005)、福建省农业科学院“青年科技英才百人计划”(批准号: YC2017-5)、福建省农业科学院蔬菜科技创新团队(批准号: STIT2017-1-2)和国家大宗蔬菜产业技术体系福州综合试验站(批准号: CARS-23-G-53)资助的课题

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

Received: September 14, 2018 Accepted: October 22, 2018

This work was supported by Fujian Provincial Public Research Institute of Fundamental Research (Grant No.2018R1026-5), the Central Guidance for Local Science and Technology Development Projects (Grant No.2018L3005), Fujian Academy of Agricultural Sciences “Youth Science and Technology Talents Program” Project (Grant No.YC2017-5), Fujian Academy of Agricultural Sciences Vegetable Science and Technology Innovation Team (Grant No.STIT2017-1-2) and the Experimental Station of Fuzhou of China Commodity Vegetable Industry System (Grant No.CARS-23-G-53)

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

网络出版时间: 2019-04-01 11:26:40 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190401.1126.008.html>

moschata to develop SSR markers can obtain higher frequencies of SSR loci and the types of them were rich. It provides more abundant and reliable marker selection for genetic diversity analysis and genetic map construction of *Cucurbita moschata*.

Keywords *Cucurbita moschata* Duch; transcriptome; simple sequence repeat; polymorphism

中国南瓜(*Cucurbita moschata* Duch)为葫芦科(*Cucurbitaceae*)南瓜属(*Cucurbita* spp.)中3个主要栽培种之一,起源于美洲大陆,16世纪中叶经东南亚传入中国。中国南瓜适应性强,分布地域广,产品营养丰富,是我国人民喜爱的传统蔬菜,在我国大范围的种植。我国是中国南瓜最大的生产和消费国^[1-2]。中国南瓜种类繁多、品质各异、多样化特点十分突出。对中国南瓜种质资源的遗传多样性研究,有利于中国南瓜种质资源的收集、保存、鉴定、创新和合理利用。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技术。目前,为了从分子水平了解中国南瓜种质资源的遗传多样性,许多学者用RAPD(random amplified polymorphic DNA)、ISSR(inter-simple sequence repeat)、SRAP(sequence-related amplified polymorphism)、AELP(amplified fragment length polymorphism)等不同的分子标记方法对中国南瓜种质资源遗传多样性进行了研究。褚盼盼等^[3]利用RAPD对70份来自我国不同地区的中国南瓜种质进行遗传多样性和亲缘关系分析,其聚类结果与形态特征有一定的相关性。云天海等^[4]应用ISSR和SRAP标记技术对28份中国南瓜海南农家品种间的遗传特异性进行了分析,并构建指纹图谱。Maria等^[5]利用SRAP和AELP中国南瓜种质进行遗传多样性分析。

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^[6]。因其位点特异、复等位、呈共显性、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^[7],在作物遗传多样性分析^[8-9]、品种鉴定^[10-11]、遗传图谱建立^[12-13]等方面都有应用。目前,中国南瓜SSR报道非常少,王迎儿等^[14]利用26对SSR引物对41份南瓜种质资源进行遗传多样性及亲缘关系分析,其中中国南瓜35份。王瑞等^[15]应用150对SSR标记及聚类分析方法对包括中国南瓜在内的95份南瓜核心资源进行遗传多样性分析。向成钢等^[13]利用SSR引物检测20份分属10个品种群的中国南瓜、印度南瓜和美洲南瓜的遗传多样性。现有的中国南瓜SSR分

子标记数量远远不能满足中国南瓜分子生物学研究的需求,因此,大量开发SSR标记仍是目前中国南瓜研究的重要工作之一。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,本文拟利用中国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,以期为中国南瓜的品种鉴定、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

中国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。测序时采取3个干旱处理的两叶一心时期幼苗叶片,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。共获得7.48 Gb有效数据(clean data),且clean data均达到7.48 Gb。组装后共获得61 882条Unigene。其中长度在1 Kb以上的Unigene有12 526条。对Unigene进行功能注释,包括与NR、Swiss-Prot、KEGG、COG、KOG、GO和Pfam数据库的比对,共获得32 033条Unigene的注释结果。进行基于Unigene库的基因结构分析,其中SSR分析共获得5 407个SSR标记,同时还进行了CDS预测。

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30份中国南瓜材料(表1)。基因组DNA提取采用CTAB(cetyltrimethylammonium ammonium bromide)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。引物序列长度为18~27 bp, GC含量为40%~60%,退火温度为56~62 °C,

表1 中国南瓜SSR多态性分析材料

Table 1 List of accessions used in assessing the level of SSR in the species Chinese pumpkin

序号 Serial number	编号 Number	形状 Shape	序号 Serial number	编号 Number	形状 Shape
1	ZGNG1	Disk	16	ZGNG15	Flat circle
2	ZGNG2	Disk	17	ZGNG16	Flat circle
3	ZGNG3	Near circle	18	ZGNG17	Flat circle
4	ZGNG4	Disk	19	ZGNG18	Near circle
5	ZGNG5	Near circle	20	ZGNG19	Near circle
6	ZGNG6	Near circle	21	ZGNG20	Flat circle
7	ZGNG7	Flat circle	22	ZGNG21	Oval
8	ZGNG8	Disk	23	ZGNG22	Long-necked cylindrical
9	ZGNG9	Near circle	24	ZGNG23	Long-necked cylindrical
10	ZGNG10	Flat circle	25	ZGNG24	Long tube
11	ZGNG11	Flat circle	26	ZGNG25	Long tube
12	ZGNG12	Oval	27	ZGNG26	Long tube
13	ZGNG13	Oval	28	ZGNG27	Long-necked cylindrical
14	ZGNG14	Flat circle	29	ZGNG28	Long tube
15	ZGNG14	Oval	30	ZGNG28	Long-necked cylindrical

上下游引物的T_m值相差≤2 °C, 预期扩增产物长度为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1 μL 10 mmol/L dNTP、0.3 μL 5U Taq酶、1.5 μL 50 ng DNA、10 μmol/L的上下游引物各1 μL、2.5 μL 10×Buffer (Mg²⁺)、加ddH₂O补至25 μL。PCR扩增程序为: 95 °C预变性5 min; 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, 35个循环; 最后72 °C延伸7 min。PCR扩增产物经LabChip® GX Touch生物大分子分析仪电泳分析。

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 中国南瓜中SSR的分布及结构特点

中国南瓜转录组经组装后共获得61 882条Unigene(序列总长约44 854 007 bp), 用MISA软件对1 Kb以上的Unigene(12 526条, 序列全长为25 737 320 bp)进

行搜索, 发现其中4 348条Unigene序列中含有5 407个SSR位点, 其中2 816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34.71%, 出现频率(检出SSR个数与总unigene数之比)为43.17%, 平均4.76 Kb出现1个SSR。

中国南瓜转录组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47.92%、24.45%和19.66%; 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1.39%、0.26%和0.26%, 复合SSR占总数的6.07%。从重复次数看, 中国南瓜转录组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3 445个, 占总数的63.71%; 其次为11~20次的SSR, 共有1 867个, 占总数的34.53%; 20次重复以上的仅有95个, 仅占1.76%(表2)。

2.2 中国南瓜转录组中SSR基序重复类型和频率特征

中国南瓜转录组中5 407个SSR位点共含81种重复基序, 单核苷酸至六核苷酸重复分别有2、6、30、22、12和9种。从分布频率来看(表3), 以单核苷酸重复类型A/T出现最多, 占总SSR的47.36%, 占单核苷酸重复基序的总数的98.84%。其次是二核苷

表2 中国南瓜EST-SSR的类型、数量与分布频率

Table 2 Type, number and frequency of EST-SSRs in Chinese pumpkin

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	692	1 805	94	2 591	47.92
Di	0	322	216	197	140	128	59	1	1 063	19.66
Tri	720	381	203	16	0	0	2	0	1 322	24.45
Tetra	66	7	2	0	0	0	0	0	75	1.39
Penta	11	1	1	0	0	0	1	0	14	0.26
Hexa	9	3	0	2	0	0	0	0	14	0.26
Compound	—	—	—	—	—	—	—	—	328	6.07
Total	806	714	422	215	140	820	1 867	95	5 407	100
Ratio (%)	15.87	14.06	8.31	4.23	2.76	16.14	36.76	1.87	100	

表3 中国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 Chinese pumpkin

重复基序类型 Repeat type	重复基序 Repeat motif	数量 Number	比例(%) Ratio (%)	重复基序类型 Repeat type	重复基序 Repeat motif	数量 Number	比例(%) Ratio (%)
Mono	A/T	2 561	47.36	Tri	GGA/TCC	65	1.20
	C/G	30	0.55		AGG/CCT	44	0.81
Di	CG	1	0.02		CTA/TAG	6	0.11
	AT/TA	261	4.83		ATC/GAT	34	0.63
	CA/TG	46	0.85		AGC/GCT	54	1.00
	AC/GT	39	0.72		CGA/TCG	27	0.50
	GA/TC	361	6.68		CAA/TTG	25	0.46
	AG/CT	355	6.57		AAC/GTT	23	0.43
Tri	ATA/TAT	19	0.35		CAG/CTG	45	0.83
	TCA/TGA	19	0.35		GAC/GTC	34	0.63
	ACT/AGT	4	0.07		CCA/TGG	32	0.59
	GCA/TGC	47	0.87		ACC/GGT	28	0.52
	ACG/CGT	8	0.15		CGC/GCG	34	0.63
	ATG/CAT	24	0.44		ACA/TGT	18	0.33
	GTA/TAC	8	0.15		CAC/GTG	24	0.44
	GAA/TTC	217	4.01		CTC/GAG	56	1.04
	AAG/CTT	128	2.37		AGA/TCT	146	2.70
	TAA/TTA	29	0.54	Tetra	TTCT	5	0.09
	AAT-ATT	51	0.94		AATA/TATT	4	0.07
	CCG/CGG	37	0.68		ATAA/TTAT	4	0.07
	GCC/GGC	36	0.67		Other	62	1.15

酸重复类型GA/TC, 占总SSR的6.68%, 占二核苷酸总数的33.96%。此外, 三核苷酸重复基序中以GAA/TTC占优势, 占总SSR的4.01%, 占三核苷酸总数的16.41%; 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 中国南瓜转录组SSR引物设计与筛选

利用Primer 3.0对含SSR位点的4 348条Unigene序列进行引物设计, 共设计出引物6 489对。随机选择其中20 bp以上SSR序列的100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, 对中国南瓜‘ZGNG1’ DNA进行SSR-PCR扩增以验证其有效性。结果表明,

92对引物实现有效扩增, 占100对SSR引物的92%。在92对有效扩增引物中, 88对(95.65%)PCR扩增产物与预期大小相符, 有4对(4.35%)扩增产物长度超过预期。

2.4 多态性分析

从92对有效扩增引物中随机选取30对EST-SSR引物对30份中国南瓜进行扩增及多态性评价。其中18对引物存在多态性差异(表4), 占有有效扩增引物的60%。每对引物产生的条带数在1~5之间, 共得到47条条带, 其中多态性片段38个, 每对引物平均产生2.11个多态性片段。图1为引物ZN 7和ZN 9的扩增情况。

利用18对多态性SSR引物对30份中国南瓜材料进行聚类分析,在遗传距离0.65处,供试材料被分成两大类(图2)。第一类包含22份材料,瓜形主要为扁圆形、近圆形、椭圆形和盘形,以遗传距离0.55为阈值,该类进一步被分为两小类,第一小类有13份材料,第二小类有9份材料。第二类包含8份材料,瓜形主要为长颈圆筒形或长筒形南瓜种质。聚类

结果中中国南瓜群体的划分与果实形状比较相关。

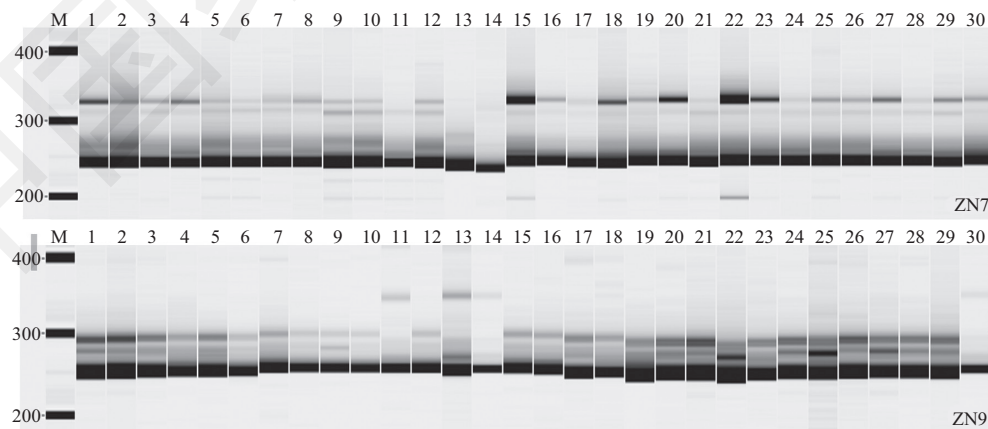
3 讨论

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

表4 18对中国南瓜SSR引物信息

Table 4 Information of 18 pairs of primers developed from Chinese pumpkin

引物编号 Primer No.	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	SSR基序 SSR motif	产物长度(bp) Length of product (bp)
ZN 1	F: GCT TGA ACA GAG ATG GAG GG	R: AAA GTC GCT GAG AGC TGG AG (CATCGT)8	227
ZN 2	F: GAA TAT GCG TTG TAC GCC CT	R: GCC ATT TCC AAC AGT CAA CC (TTTCGT)5	273
ZN 3	F: GGT GCA TTG TCC AAA CAC AA	R: CCG CAT CCA TGA AAG AAA GT (AACC)6	169
ZN 4	F: ATT TGC TTA CCA AAC AGC CG	R: GTT CAG AGG AGC TGG GTA CG (AAC)5(CAC)5	223
ZN 5	F: CCC AAA CCC CTT TCT TCT TC	R: TGA TGA GAA GGG GGA GAA TG (ACAA)6	209
ZN 6	F: CCA CAT GCA CAC TCA CAC AC	R: TGA TGA AAT GGG CAA TGA AA (AC)9	251
ZN 7	F: GGA CTT GAG ATG GAG GTG GA	R: TTT GTA CGT TGT TCG TTG CC (CGCA)5	247
ZN 8	F: TCG CTT CAC CGG TAA TTT TC	R: GCG CTG AAG AAT CCA TGT TT (TG)8	173
ZN 9	F: ACA ACG AAG CCT CAA AGG AA	R: GAT GCA AAG GAT GGAAAG GA (TGC)6	246
ZN 10	F: GGG ACT CTT TGT TGG GTT CA	R: TGA GCA TTT TCA GCA ACC TC (TG)10	272
ZN 11	F: CTC AGT GGA GGG ACA AGC TC	R: CCG ACT CCA CCA TGT CCT AT (TC)10(TA)7	257
ZN 12	F: CAT GGG CCT TAG CCA TCT TA	R: GCA AGG TTG CAG ATT AGG GA (ATAAT)11	249
ZN 13	F: GCT GCC ATT GCC CTA TAA AA	R: CGA GAC CTT ACA AAA CCC CA (TGG)7	226
ZN 14	F: ACC TCT GCA TTT CAA CCC AC	R: ATA CCC ACC AAG CCC TTT CT (AC)9	209
ZN 15	F: CTT TTC GAG AAT GCC GGT AA	R: AAT CCA GCT CAC ATC CAA CC (GGA)7	247
ZN 16	F: GTT AAA TTT CGC GGG TTC AA	R: GTG GAG GCT CTG GTT TCG TA (TA)10	243
ZN 17	F: CTG TTG CTG TTG TTG CTG GT	R: GCG CTT CTC TCA ATG CTT CT (GTC)7	187
ZN 18	F: AGC TAC GCA TGC CTG AAT CT	R: TGC ACC TGC TGT CAT AGC TC (TC)8	168

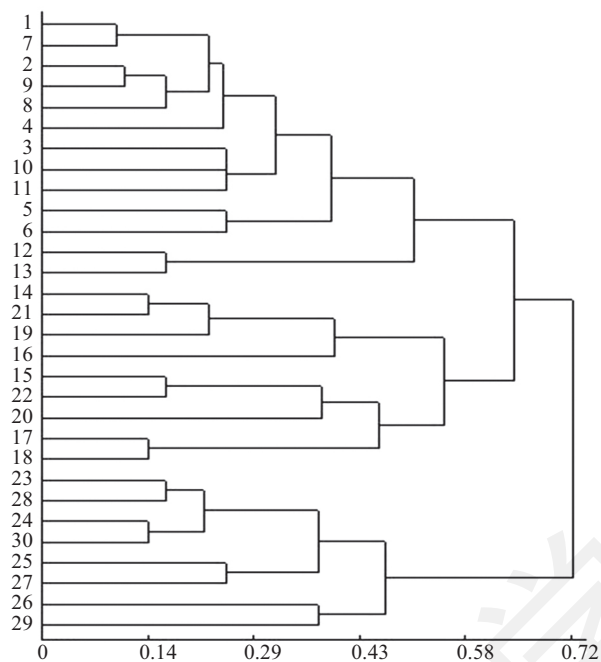


M: marker; 品种编号名称见表1。

M: marker; code names are shown in table 1.

图1 引物ZN 7和ZN 9在30个中国南瓜材料中的多态性

Fig.1 Polymorphisms showed in 30 Chinese pumpkin germplasms by primer ZN 7 and ZN 9



品种编号名称见表1。

Code names are shown in table 1.

图2 供试中国南瓜材料的UPGMA聚类图

Fig.2 Cluster diagram for Chinese pumpkin tested by UPGMA method

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。本研究在中国南瓜转录组测序基础上,对中国南瓜12 526条Unigene进行搜索,得到5 407个SSR位点,出现频率为43.17%,高于印度南瓜(9.52%)^[17]、丝瓜(14.97%)^[18]、辣椒(7.83%)^[19]等草本蔬菜植物,但低于美洲南瓜(48.7%)^[20]。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^[21]。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^[22]、美洲南瓜^[20]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^[23]。中国南瓜以单核苷酸重复(47.92%)为主,其次是二(24.456%)、三(19.667%)核苷酸重复,四、五和六核苷酸重复所占比例小。中国南瓜单核苷酸重复以A/T为主,与美洲南瓜^[20]、芙蓉李^[22]、柑橘^[24]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^[25-26]。二核苷酸重复中GA/TC为数最多,三核苷酸重复基序中同样是以GAA/TTC占优势。

随机选择20 bp以上的SSR引物100对进行验证,其中92对(92%)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^[27]。随机选取30对EST-SSR引物进行多态性评价,其中18对引物存在多态性差异,占有效扩增引物的60%,说明中国南瓜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^[28]。利用这18对多态性SSR引物对30份中国南瓜材料进行聚类分析,30份中国南瓜材料被分为两大类,并可以进一步进行细分,聚类分析结果能将不同形状的中国南瓜种质区别出来。较ISSR、SRAP等标记的分析结果,SSR标记更细致准确地反映了中国南瓜种质资源之间的差异。

本研究结果表明,利用中国南瓜转录组数据开发出的SSR标记可用性较高,为中国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 李新峥, 杨鹏鸣, 刘振威, 杜晓华. 中国南瓜主要性状遗传特性的研究. 华南农业大学学报(Li Xinzheng, Yang Pengming, Liu Zhenwei, Du Xiaohua. Study on genetic character of *Cultivars moschata* main traits. Journal of South China Agricultural University) 2011; 32(1): 7-10.

- 2 郑道君, 云天海, 张治礼, 邓长智, 谢良商. 中国南瓜海南农家品种资源遗传多样性和亲缘关系研究. 核农学报 (Zheng Daojun, Yun Tianhai, Zhang Zhili, Deng Changzhi, Xie Liangshang. Study on genetic diversity and relationship for the Hainan island landraces of *Cucurbita moschata*. Journal of Nuclear Agricultural Sciences) 2016; 30(5): 869-77.
- 3 褚盼盼, 向长萍, 张称心, 刘成平. 中国南瓜种质资源农艺性状与RAPD标记分析. 核农学报 (Chu Panpan, Xiang Changping, Zhang Chenxin, Liu Chengping. Genetic diversity of *Cucurbita moschata* genotypes revealed by RAPD markers and Agronomic traits. Journal of Nuclear Agricultural Sciences) 2007; 21(5): 441-6.
- 4 云天海, 郑道君, 谢良商, 邓长智. 中国南瓜海南农家品种间的遗传特异性分析和DNA指纹图谱构建. 植物遗传资源学报 (Yun Tianhai, Zheng Daojun, Xie Liangshang, Deng Changzhi. Analysis of genetic specificity and DNA fingerprinting establishment for the Hainan island landraces of *Cucurbita moschata*. Journal of plant genetic resources) 2013; 14(4): 675-85.
- 5 Maria M, Pico B, Fernandez de Cordova P. Molecular diversity of a germplasm collection of squash (*Cucurbita moschata*) determined by SRAP and AFLP markers. Crop Science 2004; 44: 653-66.
- 6 Kalia RK, Rar MK, Kalia S, Singh R, Dhawan AK. Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants. Euphytica 2011; 177(3): 309-34.
- 7 Kumar B, Kumar U, Yadav HK. Identification of EST-SSRs and molecular diversity analysis in *Mentha piperita*. Crop J 2015; 3(4): 335-42.
- 8 Daniela P, Rosa LB, Caroline MC. Genetic diversity of *Cucurbita pepo*, *C. argyrosperma* and *C. ficifolia* accessions evaluated through microsatellite markers. Horticultura Brasileira 2013; 31: 361-8.
- 9 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.
- 10 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.
- 11 石星星, 纪小红, 张磊, 吕茜茜, 刘亚婷, 王玉刚, 等. 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 Qianqian, Liu Yating, Wang Yugang, et al. Authenticity and purity of heading cabbage hybrids identified by SSR markers. Molecular Plant Breeding) 2015; 13(2): 331-7.
- 12 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 genetic structure of *Prunus pseudocerasus* populations from China as revealed by SSR markers. Acta Horticulturae Sinica) 2016; 43(6): 1148-56.
- 13 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.
- 14 王迎儿, 邢乃林, 应泉盛, 张慧波, 黄芸萍, 王毓洪. 南瓜种质资源遗传多样性的SSR分析. 浙江农业科学 (Wang Yinger, Xing Nailin, Ying Quansheng, Zhang Huibo, Wang Yuhong. SSR analysis of genetic diversity of pumpkin germplasm resources. Journal of Zhejiang agricultural sciences) 2017; 58(7): 1161-5.
- 15 王瑞, 吴廷全, 钟玉娟, 黄河勋. 95份南瓜种质资源亲缘关系的SSR分析. 中国农学通报 (Wang Rui, Wu Tingquan, Zhong Yujuan, Huang Hexun. Genetic relationship analysis of 95 accessions of squash germplasms by SSR markers. Chinese Agricultural Science Bulletin) 2016; 32(34): 135-42.
- 16 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.
- 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 朱海生, 张前荣, 刘建汀, 陈敏敏, 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.
- 19 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 annuum* L.) transcriptome and the polymorphism analysis. Acta Horticulturae Sinica) 2012; 39(1): 168-74.
- 20 朱海生, 黄丽芳, 王彬, 刘建汀, 叶新如, 陈敏敏. 美洲南瓜转录组SSR信息分析及其分子标记开发. 中国细胞生物学学报 (Zhu Haisheng, Huang Linfang, Wang Bin, Liu Jianting, Ye Xinru, Chen Mindong, et al. Analysis on SSR information in transcriptome and development of molecular markers in summer squash. Chinese Journal of Cell Biology) 2018; 40(1): 99-107.
- 21 Zhai L, Xu L, Wang Y, Cheng H, Chen Y, Gong Y, Liu L. Novel and useful genic-SSR markers from *de novo* transcriptome sequencing of radish (*Raphanus sativus* L.). Mol Breed 2014; 33(3): 611-24.
- 22 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.
- 23 Varshney RK, Graner A, Sorrells ME. Genic microsatellite markers in plants: Features and applications. Trends Biotechnol 2005; 23(1): 48-55.
- 24 Jiang D, Zhong GY, Hong QB. Analysis of microsatellites in cit-

- rus unigenes. *Acta Genetica Sinica* 2006; 33(4): 345-53.
- 25 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 MINING1.0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.
- 26 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.
- 27 Xiang X, Zhang Z, Wang Z, Zhang X, Wu G. Transcriptome sequencing and development of EST-SSR markers in *Pinus dabeshanensis*, an endangered conifer endemic to China. *Mol Breeding* 2015; 35: 158.
- 28 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.