

# 辣椒 EST-SSRs 的分布特征及在品种多样性研究中的应用

魏兵强<sup>1</sup>, 刘飞云<sup>2</sup>, 马宗桓<sup>2</sup>, 陈灵芝<sup>1</sup>, 张茹<sup>1</sup>, 王兰兰<sup>1,\*</sup>, 侯栋<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>甘肃省农业科学院蔬菜研究所, 兰州 730070; <sup>2</sup>甘肃农业大学农学院, 兰州 730070)

**摘要:** 为开发高效实用的 EST-SSRs 标记, 从 120 605 条辣椒无冗余 EST 序列中共搜索到 10 179 条至少含有 1 个 SSR 的 EST 序列, 占 EST 总数的 8.44%。高频重复类型为一核苷酸、二核苷酸和三核苷酸, 占 EST-SSRs 总数的 91.63%。最常见的基元是 A/T, 其次是 TC/GA 和 CT/AG。设计合成了 20 对 EST-SSRs 引物并对 25 份辣椒材料进行了 PCR 扩增, 结果表明: 17 对引物在供试辣椒材料中能扩增出明显的条带, 其中 12 对引物扩增出 42 条多态性条带, 平均多态性条带为 3.5 条, 引物的多态性信息含量介于 0.21~0.95 之间。利用 EST-SSRs 标记对供试品种的聚类分析结果与形态学、生物学分类结果基本一致, 表明本研究中开发的 EST-SSRs 标记可用于辣椒种质资源的遗传多样性分析。

**关键词:** 辣椒; EST-SSR; 分子标记; 遗传多样性

**中图分类号:** S 641.3

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2013) 02-0265-10

## Distribution Characteristics of EST-SSRs and Their Application on Varieties Genetic Diversity Analysis in Pepper

WEI Bing-qiang<sup>1</sup>, LIU Fei-yun<sup>2</sup>, MA Zong-huan<sup>2</sup>, CHEN Ling-zhi<sup>1</sup>, ZHANG Ru<sup>1</sup>, WANG Lan-lan<sup>1,\*</sup>, and HOU Dong<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>Vegetable Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China; <sup>2</sup>College of Agronomy, Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** To develop efficient and practical EST-SSRs markers, 10 179 EST sequences each of which contained at least one SSR were obtained from 120 605 non-redundant EST in pepper, accounting for 8.44% in all EST. Mononucleotide, dinucleotide and trinucleotide were the main repeat types with a percentage of 91.63% in all EST-SSRs. A/T was the most frequent motif with a frequency of 31.17%, followed by TC/GA and CT/AG, accounting for 10.0% and 9.97% respectively. Twenty pairs of EST-SSRs primers were designed and synthesized and were used to amplify 25 pepper varieties. The results showed that 17 pairs of primers could amplify clear bands, and 12 out of 17 pairs could amplify 42 polymorphic bands with an average of 3.5 bands per pair of primer. The polymorphic information content of primers screened were between 0.21 and 0.95. The clustering results of 25 pepper varieties based on EST-SSRs markers were in agreement with morphological and biological classification, it is indicated that EST-SSRs

**收稿日期:** 2012-09-10; **修回日期:** 2013-01-09

**基金项目:** 公益性行业(农业)科研专项(201203004); 甘肃省农业科学院农业科技创新专项(2011GAAS06-15); 甘肃省青年科技基金项目(1208RJYA039)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: lanlwang@126.com; houdong215@163.com)

markers developed in the study could be used for germplasm resources genetic diversity analysis in pepper.

**Key words:** pepper; EST-SSR; molecular marker; genetic diversity

众所周知,分子标记技术已广泛应用于植物遗传图谱构建、遗传多样性分析、纯度鉴定和分子标记辅助选择等方面。常用的分子标记主要有 AFLP、SSRs、CAPS、STS 和 SNP 等,其中 SSRs(Simple sequence repeats)因其数量丰富、多态性高、重复性好和共显性等特点备受青睐(罗冉等,2010)。但 SSRs 标记的开发通常需要构建文库、筛选和测序等工作,成本高,工作量大。随着 cDNA 测序工作的大规模开展,以及生物信息学的发展,在网络公共数据库中积累了庞大的 EST(expressed sequence tags)数据,这些 EST 为 SSRs 标记的开发提供了一条经济便捷的途径。EST-SSRs 标记开发成本低,呈共显性,稳定性高,通用性好,可以提供基因标记(Varshney et al., 2005; 姜春芽等,2009)。目前,关于 EST-SSRs 的研究在小麦(Kamel et al., 2008)、红花(Naresh et al., 2009)、大麦(Khaled et al., 2010)、芦笋(Marco et al., 2008)、核桃(齐建勋等,2011)、杏(上官凌飞等,2011)和萝卜(崔娜等,2012)等作物上早有报道,并广泛应用于遗传连锁图谱构建、基因发掘、比较基因组研究和基因表达差异研究等方面。

目前,许多标记类型已广泛应用于辣椒(*Capsicum annuum* L.)的相关研究,但关于 EST-SSRs 标记的研究却并不多见。李晶晶等(2008)对 4 000 条辣椒 EST 进行了 SSRs 分析,同时对辣椒不育系和保持系进行了分析,但未对一核苷酸重复类型进行分析。张宇等(2010)对 19 173 条辣椒 EST 进行了 SSRs 分析,并在 6 份辣椒材料上进行了多态性试验,但也未对一核苷酸重复类型进行分析。截止 2012 年 3 月,在 NCBI 上公布的辣椒 EST 数据多达 12 万余条,因此,本研究中拟从 12 万余条 EST 序列中搜寻一至六核苷酸 SSRs,分析 EST-SSRs 的分布特征,并利用 EST-SSRs 标记对 25 份辣椒材料进行遗传多样性研究,评价 EST-SSRs 标记的多态性,旨在开发辣椒 EST-SSRs 标记,为辣椒种质资源评价、分子标记辅助选择、遗传图谱构建和 QTL(quantitative trait locus)定位等研究提供高效的分子标记。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

25 份辣椒材料(均由甘肃省农业科学院蔬菜研究所辣椒课题组保存),属于 *Capsicum annuum* L. 中的不同变种(表 1),2012 年 1 月播种于穴盘中,置于人工气候箱培养,待四叶至六叶一心时摘取幼嫩叶片 0.2 g 用于基因组 DNA 的提取。

### 1.2 辣椒 EST 序列的获得及 EST-SSRs 的发掘

从 GenBank 中以 FASTA 格式下载辣椒 EST 序列,用 CD-HIT(<http://www.bioinformatics.org/cd-hit/>)在线软件去冗余,SSR Server([http://www.rosaceae.org/cgi-bin/gdr/gdr\\_ssr](http://www.rosaceae.org/cgi-bin/gdr/gdr_ssr))在线搜索 SSRs。搜索条件为:一、二、三核苷酸重复类型的最小重复数分别为 20、6 和 5,四、五、六核苷酸重复类型的最小重复数均为 4。

### 1.3 EST-SSRs 引物的设计与合成

利用 Primer 3 软件在线设计 SSRs 引物,引物长度 20~25 bp,最佳 22 bp;  $T_m$  值为 50~60 °C; 正、反向引物退火温度之差  $\leq 5$  °C; GC 含量 40%~60%,最佳 50%。按引物设计顺序选取 14 个二核苷酸、1 个三核苷酸和 5 个六核苷酸 SSRs 引物用于合成,由天根生化科技(北京)公司合成。

表 1 供试辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 材料  
Table 1 Pepper (*Capsicum annuum* L.) accessions used for this study

编号 Code	类型 Ecotype	变种名 Name of varietas	来源 Source
1	甜椒 Sweet pepper	柿子椒 var. <i>grossum</i> Sendt.	北京 Beijing
2	甜椒 Sweet pepper	柿子椒 var. <i>grossum</i> Sendt.	北京 Beijing
3	樱桃椒 Cherry pepper	樱桃椒 var. <i>cerasiforme</i>	日本 Japan
4	朝天椒 Podpepper	朝天椒 var. <i>fasciculatum</i> Irish	湖南 Hunan
5	朝天椒 Podpepper	朝天椒 var. <i>fasciculatum</i> Irish	湖南 Hunan
6	小羊角椒 Small hot pepper	小刀形椒 var. <i>chordule</i> Haz.	宁夏 Ningxia
7	甜椒 Sweet pepper	柿子椒 var. <i>grossum</i> Sendt.	上海 Shanghai
8	观赏椒 Ornamental pepper	观赏椒 var. <i>ornamentele</i> Haz.	湖南 Hunan
9	观赏椒 Ornamental pepper	观赏椒 var. <i>ornamentele</i> Haz.	湖南 Hunan
10	观赏椒 Ornamental pepper	观赏椒 var. <i>ornamentele</i> Haz.	湖南 Hunan
11	小羊角椒 Small hot pepper	小刀形椒 var. <i>chordule</i> Haz.	新疆 Xinjiang
12	羊角椒 (皮皱) Hornlike pepper (rugate skin)	长椒 var. <i>longum</i> Sendt.	甘肃 Gansu
13	圆锥椒 Conical pepper	圆锥椒 var. <i>conoides</i> Irish	四川 Sichuan
14	羊角椒 (皮皱) Hornlike pepper (rugate skin)	长椒 var. <i>longum</i> Sendt.	甘肃 Gansu
15	羊角椒 (皮皱) Hornlike pepper (rugate skin)	长椒 var. <i>longum</i> Sendt.	甘肃 Gansu
16	羊角椒 (皮光) Hornlike pepper (smooth skin)	长椒 var. <i>longum</i> Sendt.	内蒙古 Inner Mongolia
17	牛角椒 Hornlike pepper	长椒 var. <i>longum</i> Sendt.	北京 Beijing
18	柿子椒 Bell pepper	柿子椒 var. <i>grossum</i> Sendt.	湖南 Hunan
19	朝天椒 Podpepper	朝天椒 var. <i>fasciculatum</i> Irish	江苏 Jiangsu
20	线椒 Threadlike pepper	长椒 var. <i>longum</i> Sendt.	甘肃 Gansu
21	线椒 Threadlike pepper	长椒 var. <i>longum</i> Sendt.	陕西 Shaanxi
22	线椒 Threadlike pepper	长椒 var. <i>longum</i> Sendt.	陕西 Shaanxi
23	羊角椒 (皮光) Hornlike pepper (smooth skin)	长椒 var. <i>longum</i> Sendt.	安徽 Anhui
24	羊角椒 (皮光) Hornlike pepper (smooth skin)	长椒 var. <i>longum</i> Sendt.	安徽 Anhui
25	羊角椒 (皮光) Hornlike pepper (smooth skin)	长椒 var. <i>longum</i> Sendt.	安徽 Anhui

#### 1.4 DNA 提取、PCR 扩增与电泳检测

采用天根生化科技 (北京) 有限公司植物基因组 DNA 提取试剂盒提取各材料基因组 DNA。

PCR 反应体系 20  $\mu\text{L}$ , 包括 10 $\times$  Buffer 2.0  $\mu\text{L}$ , 2.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP 1.0  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  上、下游引物各 1.0  $\mu\text{L}$ , 5 U  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$  *Taq* 酶 0.3  $\mu\text{L}$ , DNA 0.8  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补至 20  $\mu\text{L}$ 。

PCR 反应在 BIORAD 公司生产的 MyCycler<sup>TM</sup> thermal cycler PCR 仪上进行。具体反应程序为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 50 ~ 60  $^{\circ}\text{C}$  退火 40 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

PCR 扩增产物采用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 在北京六一厂 DYCZ-24A 型电泳槽中进行, 200 V 电泳 2.5 h。电泳结束后银染显色, 参考张志峰等 (2005) 的方法, 银染后在观片箱上观测电泳结果, 并照相记录。

#### 1.5 EST-SSRs 的多态性信息含量

多态性信息含量 (Polymorphic Information Content, PIC) 是度量多态性标记检测能力的一个工具。PIC =  $1 - \sum P_i^2$ 。其中  $i = 1 \sim k$ ,  $k$  是一个 EST-SSR 所检测到的等位基因的数量,  $P_i$  是第  $i$  个等位基因的频率。

#### 1.6 聚类分析

将电泳图上清晰可重复出现的条带记为“1”, 同一位置上没有出现条带的相应位置记为“0”, 从而生成有“1”和“0”组成的原始矩阵, 用 NTSYSpc2.10e 软件进行数据分析, UPGMA 法对 25 份辣椒材料进行聚类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 辣椒 EST-SSRs 出现的频率及比例

从 GenBank 中以 FASTA 格式下载的辣椒 EST 序列经 CD-HIT 在线软件处理后共得到 120 605 条无冗余 EST 序列, 利用 SSR Server 在线搜索软件共搜索到 11 461 条 SSRs 序列, 分别位于 10 179 条 EST 序列中, 占 EST 总数的 8.44%, 表明辣椒 EST 中 SSRs 含量较为丰富。

辣椒 EST-SSRs 中出现最多的重复类型为一核苷酸、二核苷酸和三核苷酸, 三者共占 EST-SSRs 总数的 91.63%, 其中一核苷酸占 32.67%, 二核苷酸占 30.96%, 三核苷酸占 28.01%。而其余 3 种重复类型所占的比例很小, 仅为 8.37%, 其中以四核苷酸所占的比例最多, 占 4.26%, 其次是六核苷酸和五核苷酸, 分别为 2.91% 和 1.20%。

### 2.2 辣椒 EST-SSRs 中的基元种类及比例

在辣椒 EST-SSRs 中, 共观察到 192 种基元种类, 一核苷酸至六核苷酸重复类型的基元种类分别为 2、6、30、62、37 和 63, 总体上随核苷酸数的增大而增多, 但五核苷酸例外 (图 1)。

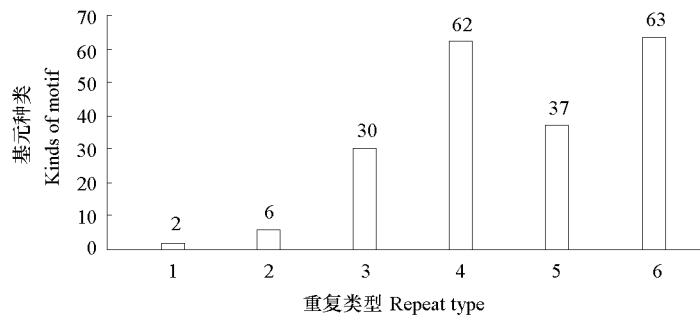


图 1 辣椒 EST-SSRs 各重复类型包含的基元种类

Fig. 1 Kinds of motif in every repeat type of EST-SSRs in pepper

从出现比例 (表 2) 来看, 出现最多的基元是 A/T (3 572 个, 占 31.17%), 其次分别为 TC/GA (1 146 个, 占 10.0%) 和 CT/AG (1 143 个, 占 9.97%)。

一核苷酸中, A/T (3 572 个, 占 31.17%) 占绝对优势, 而 G/C (172 个, 占 1.50%) 很少。

二核苷酸中, TC/GA (1 146 个, 占 10.0%) 和 CT/AG (1 143 个, 占 9.97%) 所占比例最高, 其次为 AT (530 个, 占 4.62%)。

三核苷酸中, 30 种基元的比例相对比较均匀, 且呈逐渐变化的趋势, 比例最高的为 TCT/AGA (278 个, 占 2.43%)、TTC/GAA (265 个, 占 2.31%)、TTG/CAA (241 个, 占 2.10%) 和 AAG/CTT (239 个, 占 2.09%), 其次为 TGA/TCA (181 个, 占 1.58%)、CTG/CAG (176 个, 占 1.54%)、TGG/CCA (167 个, 占 1.46%) 和 TAT/ATA (150 个, 占 1.31%)。

四核苷酸中, 比例最多的为 ATTA/TAAT (119 个, 占 1.04%), 其次为 AATT (41 个, 占 0.36%)、TCCT/AGGA (39 个, 占 0.34%) 和 TAAA/TTTA (36 个, 占 0.31%)。

五核苷酸中, 比例最多的是 TATAT/ATATA (53 个, 占 0.46%)。

六核苷酸中, 比例最多的是 CTGCTC (107 个, 占 0.93%), 其它各类基元均在 0.2% 以下。

表 2 辣椒 EST-SSRs 中主要基元及比例

Table 2 The major motif and their percentages of EST-SSRs in pepper

重复类型 Repeat type	重复基元 Motifs	数量 Number	比例/% Percentage
一核苷酸 Mononucleotide	A/T	3572	31.17
	G/C	172	1.50
二核苷酸 Dinucleotide	TC/GA	1146	10.00
	CT/AG	1143	9.97
	AT	530	4.62
	TA	331	2.89
	CA/TG	254	2.22
	AC/GT	143	1.25
	三核苷酸 Trinucleotide	TCT/AGA	278
	TTC/GAA	265	2.31
	TTG/CAA	241	2.10
	AAG/CTT	239	2.09
	TGA/TCA	181	1.58
	CTG/CAG	176	1.54
	TGG/CCA	167	1.46
	TAT/ATA	150	1.31
	AAT/ATT	144	1.26
	CCT/AGG	143	1.25
	GAG/CTC	120	1.05
	ACA/TGT	118	1.03
	GTG/CAC	116	1.01
	TTA/TAA	112	0.98
	TGC/GCA	98	0.86
	AGC/GCT	96	0.84
	ATG/CAT	90	0.79
	GTT/AAC	87	0.76
	GGT/ACC	72	0.63
	GAT/ATC	66	0.58
	CCG/CGG	54	0.47
	GCC/GGC	49	0.43
	TCC/GGA	45	0.39
	ACT/AGT	41	0.36
四核苷酸 Tetranucleotide	ATTA/TAAT	119	1.04
	AATT	41	0.36
	TCCT/AGGA	39	0.34
	TAAA/TTTA	36	0.31
五核苷酸 Pentanucleotide	TATAT/ATATA	53	0.46
六核苷酸 Hexanucleotide	CTGCTC	107	0.93

注: 比例小于 0.30% 的基元未列出。

Note: The motifs with percentage less than 0.30% was not listed here.

### 2.3 辣椒 EST-SSRs 中各重复类型不同重复次数的出现频率

由表 3 可以看出, 辣椒 EST-SSRs 中各重复类型不同重复次数的出现频率相差很大, 但总体上随着重复次数的增多, 其出现频率逐渐降低。

在一核苷酸中, 出现频率最高的重复次数为 20, 其次为 21、22 和 23; 二核苷酸中, 出现频率最高的重复次数为 6, 其次为 7、8 和 9; 三核苷酸中, 出现频率最高的重复次数为 5, 其次为 6、7 和 8; 四核苷酸中, 出现频率最高的重复次数为 4, 其次为 5、6 和 7; 五、六核苷酸中, 不同重复次数出现频率的趋势基本相同, 最多的重复次数为 4, 其次为 5 和 6。

表 3 辣椒 EST-SSRs 中各重复类型中不同重复次数的出现次数

Table 3 The frequency of different repeat times in every repeat types of EST-SSRs in pepper

重复次数 Repeat times	一核苷酸 Mononucleotide	二核苷酸 Dinucleotide	三核苷酸 Trinucleotide	四核苷酸 Tetranucleotide	五核苷酸 Pentanucleotide	六核苷酸 Hexanucleotide
4				365	123	299
5			2096	81	10	77
6		1388	608	29	4	24
7		491	259	9	0	0
8		239	99	3	0	0
9		195	53		0	2
10		185	35		1	0
11		75	7			1
12		44	10			
13		47	35			
20	555					
21	406					
22	311					
23	254					
24	214					
25	154					
26	125					
27	125					
28	94					
29	89					

#### 2.4 辣椒 EST-SSRs 标记的多态性及对品种的遗传多样性分析

20 条辣椒 EST-SSRs 在 25 份辣椒材料上的扩增结果表明, 17 条引物能扩增出明显的条带, 引物的有效扩增率达 85.0%, 其中有 12 对引物扩增出多态性条带, 占有效扩增引物的 70.6%。图 2 和图 3 分别为引物 ES6 和 ES11 在 25 份辣椒材料中扩增的电泳图。

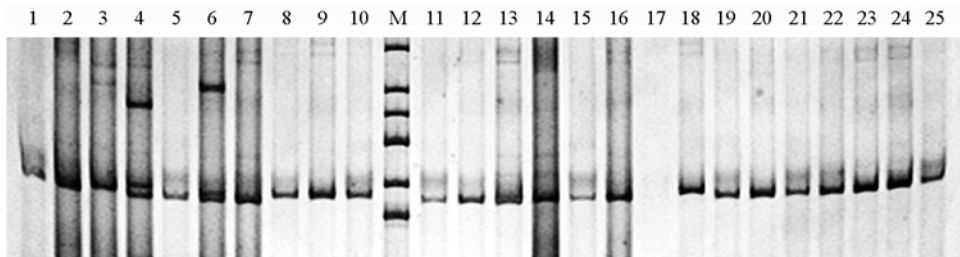


图 2 引物 ES6 在 25 份辣椒材料上的 PCR 扩增图

Fig. 2 PCR amplification profile in 25 varieties by primer ES6 in pepper

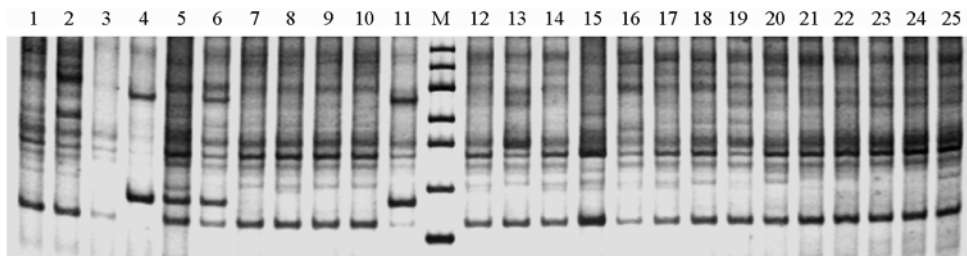


图 3 引物 ES11 在 25 份辣椒材料上的 PCR 扩增图

Fig. 3 PCR amplification profile in 25 varieties by primer ES11 in pepper

12 对引物中, 仅 ES5、ES8 和 ES19 扩增出预期大小片段, 另有 3 对引物只扩增出大于预期长度的 DNA 片段, 4 对引物只扩增出小于预期长度的 DNA 片段, 2 对引物既扩增出大于预期长度的 DNA 片段, 也扩增出小于预期长度的 DNA 片段。

12 对引物共扩增出 42 条多态性条带, 平均每对引物扩增出 3.5 条多态性条带, 其中有 3 对引物各扩增出 1 条多态性条带, 2 对引物各扩增出 2 条多态性条带, 4 对引物各扩增出 3 条多态性条带, 1 对引物各扩增出 4 条多态性条带, 1 对引物各扩增出 6 条多态性条带, 而引物 ES19 扩增出 13 条多态性条带。多态性信息含量最小的引物是 ES20, 最大的是 ES19, 分别为 0.21 和 0.95, 平均为 0.65, 大部分引物的多态性信息含量介于 0.59 到 0.90 之间, 表明辣椒 EST-SSRs 的多态性信息含量较为丰富 (表 4)。

表 4 辣椒 EST-SSRs 引物信息表  
Table 4 Information of EST-SSRs primers in pepper

引物 编号 Primer No.	引物序列 (5'→3') Primer sequence	重复单元 Repeat motif	T <sub>m</sub> /°C	预期产物 大小/bp Expected product size	多态性条带数 Number of polymor- phic bands	多态性信 息含量 PIC
ES4	F: GCACGAGAGAGAGAGAGAGAGAG R: TGTGGGTATGTTTTGAAGCAC	(AG)38	51.0	205	2	0.57
ES5	F: GCCCATTGTCTGATCTCAAT R: GCCACATGTCCTTACCTTGTTT	(AT)22	58.0	126	6	0.90
ES6	F: CCCCAAAGTCTAGATCTGCATC R: AGACCTCGACCTTGACATTGAT	(CCAGGT)9	56.0	122	4	0.81
ES7	F: ACCAACACCCAAGATCAACTCT R: ACAGGTGAAAATCCCTCAAGAA	(CT)16	57.0	230	3	0.71
ES8	F: TTTTGTGGGTCTCTCTTTCAT R: TGCTAAAAGAACAACCAAAACGG	(TC)18	52.7	296	3	0.86
ES11	F: GTGGGAAAGGAGAGTGATGAAG R: CCCCTAACTGACGTAGCAAAAA	(ATA)18	56.0	215	3	0.73
ES12	F: TATTCCGCACGGAGAAAGTT R: AAGCTTCTGGAGAGTGTGGTC	(AC)16	52.0	278	1	0.32
ES13	F: GGGCCATAGAGAGAGAGAGAGA R: CCCAATATTTGGGAAACTAGC	(GA)18	56.0	104	1	0.24
ES14	F: CCAAAAATCCCTTCTCTCTCTT R: TTCTGTCTCTGTCTCTCTCTCTC	(GA)43	51.0	157	3	0.79
ES17	F: CTCCTTCACCACAAATCAACA R: CACTGGCCATTACTTCTCCTTC	(TGAATG)6	55.2	258	2	0.60
ES19	F: CACGAGGGAGAGAGAGAGAGAT R: TCGTAGCTGCAATACTCGAAAA	(AG)21	58.5	128	13	0.95
ES20	F: TCATGTAGCTGATGATGAAGGG R: AGCAAACCACGAGGTTACAGAT	(CTGCTG)6	56.0	228	1	0.21

利用 NTSYSpc2.10e 软件对 25 份辣椒材料进行聚类分析, 在 0.60 处将 1 份樱桃椒和 2 份朝天椒聚为 I 类, 其余的聚为 II 类。I 类约在 0.70 处将 1 份樱桃椒和 2 份朝天椒区分出来。II 类约在 0.68 处将甜椒、观赏椒和柿子椒聚为一组, 其余小羊角类、羊角类和牛角类辣椒聚为另一组, 其中小羊角类辣椒与羊角类和牛角类辣椒又在 0.72 处区分出来, 甜椒和观赏椒又在 0.80 处区分出来。聚类分析结果基本与形态学和生物学分类一致, 表明本研究所开发的 EST-SSRs 标记可用于辣椒种质资源的遗传多样性分析 (图 4)。

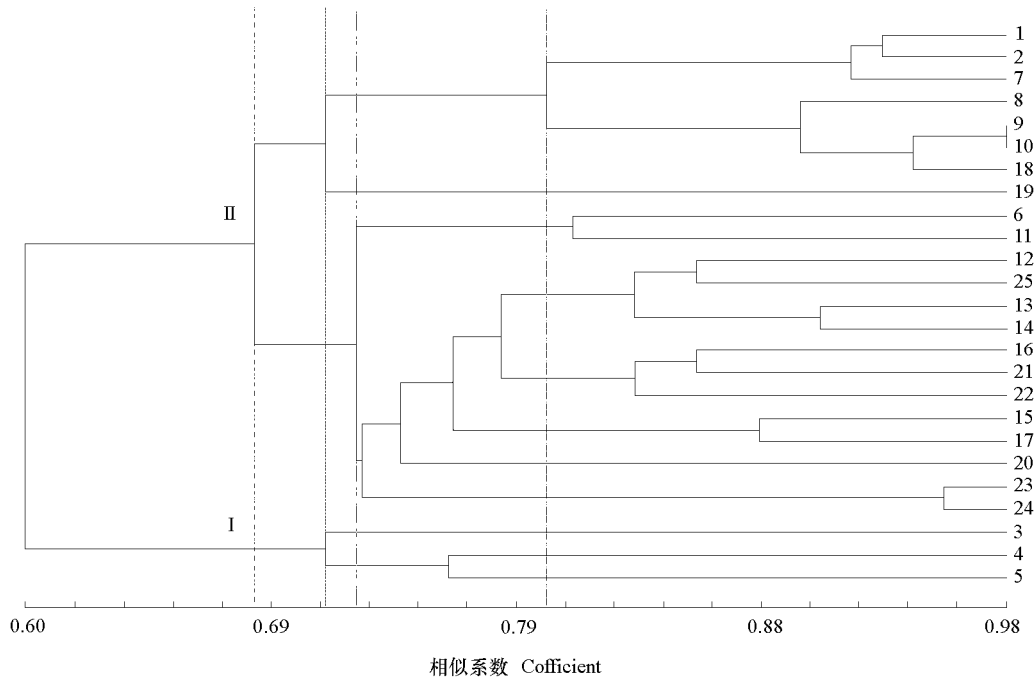


图 4 12 对 EST-SSRs 引物对 25 份辣椒材料的聚类图

Fig. 4 Dendrogram of 25 varieties based on 12 EST-SSRs markers in pepper

### 3 讨论

EST-SSRs 在许多方面优于 SSRs, 然而由于 EST 序列相对保守, 因而 EST-SSRs 标记的多态性相对偏低, 但因 EST 数巨大, SSRs 的发生频率较高, 在一定程度上可以弥补其多态性偏低的不足 (胡建斌和李建吾, 2009)。本试验中从 120 605 条辣椒无冗余 EST 序列中共搜索到 10 179 条至少含有一个 SSR 的 EST 序列, 占 EST 总数的 8.44%, 略高于刘峰等 (2012) 对辣椒 EST-SSR 的搜索结果 (7.83), 低于 Yi 等 (2006) 筛选辣椒 EST 数据库获得的 10.7% 的 EST-SSRs, 这可能是由于搜索标准 (基序长度、重复次数等) 和数据库大小的不同而造成的。

在辣椒一核苷酸 EST-SSRs 中, 几乎绝大部分基元为 A/T, 这与刘峰等 (2012) 的结果一致。在其它所有重复类型中, 出现频率最高的基元是 TC/GA 和 CT/AG, 且两者出现的几率基本相同 (约 10.0%), 这与李晶晶等 (2008) 等的研究结果一致, 且与在猕猴桃 (Fraser et al., 2004)、珍珠粟 (Selthilvel et al., 2008)、蝴蝶兰 (张水明 等, 2012) 和毛竹 (张智俊 等, 2011) 上的结果基本一致, 而且还与 Kumpatla 和 Mukhopadhyay (2005) 在双子叶植物上发现的 EST-SSRs 的分布特征完全一致, 说明 EST-SSRs 在其发生和进化过程中的高度保守性。TC/GA 在 mRNA 水平上可以代表遗传密码子 GAG、AGA、UCU 和 CUC, 并分别可以翻译成氨基酸 Arg、Glu、Ala 和 Leu, 而 Ala 和 Leu 在蛋白质多肽中的含量很高, 这可能是 TC/GA 在 EST 中高频出现的原因之一 (Kantety et al., 2002)。但刘峰等 (2012) 研究认为辣椒 EST-SSRs 中, 除一核苷酸基元 A/T 外, 其余基元以 AAC/GTT (27.8%) 和 AAG/CTT (21.5%) 为主, 这仍然与搜索软件、搜索标准 (基序长度、重复次数等) 和数据库大小不同有关。

本试验中有 3 对 EST-SSRs 引物未扩增出任何条带, 其原因可能是引物恰好跨过了 mRNA 的剪接位点而导致引物失效, 或者是由于相应的基因组 DNA 序列中存在较大的内含子而无法扩增 (Vendramin et al., 2007)。在 12 对多态性 EST-SSRs 引物中, 仅有 3 对扩增出预期长度的 DNA 片



段, 其余引物扩增出大于或小于预期长度的 DNA 片段, 这首先可能是由于引物的特异性不强, 扩增出其它与引物同源的序列; 另外扩增出大于预期长度的 DNA 片段是由于引物对之间可能存在内含子, 从而扩增出了包含外显子和内含子的 DNA 序列 (Vendramin et al., 2007)。

多态性信息含量 (PIC) 综合考虑了等位基因的数量和频率, 能有效地度量 DNA 标记检测的信息度, 已被广泛地应用于分子标记多态性检测能力的评价。不论从等位基因的数量还是 PIC 值的大小来说, 基因组 SSRs 标记的多态性总体上要高于 EST-SSRs 标记 (Blair et al., 2006)。本研究中利用 12 对引物共扩增出 42 条多态性条带, 平均每对引物扩增出 3.5 条多态性条带, 并检测到辣椒 EST-SSRs 的 PIC 值平均为 0.65, 高于黄瓜 (0.446) (Kong et al., 2006a) 和甜瓜 (0.433) (Kong et al., 2006b), 这可能是由于材料间的差异和不同作物 EST-SSRs 突变频率的差异所致。此外, 这些引物对 25 份辣椒的聚类结果与形态学、生物学分类基本一致, 表明本研究所开发的 EST-SSRs 标记在辣椒种质资源的遗传多样性研究中是可以利用的。

## References

- Blair M W, Giraldo M C, Buendfa H F, Tovar E, Duque M C, Bebee S E. 2006. Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 113 (1): 100 - 109.
- Cui Na, Qiu Yang, Li Xi-xiang, Shen Di, Wang Hai-ping, Song Jiang-ping. 2012. Data mining for SSRs in EST resources and EST-SSR markers development in radish. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (7): 1303 - 1312. (in Chinese)
- 崔娜, 邱杨, 李锡香, 沈镒, 王海平, 宋江萍. 2012. 萝卜 EST 资源的 SSR 信息分析及 EST-SSRs 标记开发. *园艺学报*, 39 (7): 1303 - 1312.
- Fraser L G, Harvey C F, Crowhurst R N, de Silva H N. 2004. EST-derived microsatellites from *Actinidia* species and their potential for mapping. *Theoretical and Applied Genetics*, 108 (6): 1010 - 1016.
- Hu Jian-bin, Li Jian-wu. 2009. Information on EST-SSR loci in melon (*Cucumis melon* L.) and marker exploitation. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (4): 513 - 520. (in Chinese)
- 胡建斌, 李建吾. 2009. 甜瓜 EST-SSR 位点信息及标记开发. *园艺学报*, 36 (4): 513 - 520.
- Jiang Chun-ya, Liao Jiao, Xu Xiao-biao, Gu Qing-qing, Liu Shan-jun, Chen Jin-yin. 2009. Plant EST-SSR technology and its application. *Molecular Plant Breeding*, 7 (1): 125 - 129. (in Chinese)
- 姜春芽, 廖娇, 徐小彪, 辜青青, 刘善军, 陈金印. 2009. 植物 EST-SSR 技术及其应用. *分子植物育种*, 7 (1): 125 - 129.
- Kamel Chabane, Varshney R K, Graner A, Valkoun J. 2008. Generation and exploitation of EST-derived SSR markers for assaying molecular diversity in durum wheat populations. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55 (6): 869 - 881.
- Kantety R V, Rotal M L, Matthews D E, Sorrells M E. 2002. Data mining for simple sequence repeat in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Molecular Biology*, 48: 501 - 510.
- Khaled F M, Salem, Rajeev K Varshney, Marion S Röder, Andreas Börner. 2010. EST-SSR based estimates on functional genetic variation in a barley (*Hordeum vulgare* L.) collection from Egypt. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 57 (4): 515 - 521.
- Kong Q, Xiang C, Yu Z. 2006a. Development of EST-SSRs in *Cucumis sativus* from sequence database. *Molecular Ecology Notes*, 6 (4): 1234 - 1236.
- Kong Q, Xiang C, Yu Z, Zhang C, Liu F, Peng C, Peng X. 2006b. Mining and charactering microsatellites in *Cucumis melo* expressed sequence tags from sequence database. *Molecular Ecology Notes*, 7 (2): 281 - 283.
- Kumapatla S P, Mukhopadhyay S. 2005. Mining and survey of simple sequence repeats in expressed sequence tags of dicotyledonous species. *Genome*, 48 (6): 985 - 998.
- Li Jing-jing, Wang Shu-bin, Liu Jin-bing, Pan Bao-gui, Chen Jin-feng. 2008. Development of pepper EST-SSR marker. *Molecular Plant Breeding*, 6 (6): 1219 - 1222. (in Chinese)
- 李晶晶, 王述斌, 刘金兵, 潘宝贵, 陈劲枫. 2008. 辣椒 EST-SSR 标记的开发. *分子植物育种*, 6 (6): 1219 - 1222.
- Liu Feng, Xie Ling-ling, Ouyang Xian, Wang Yun-sheng, Zou Xue-xiao. 2012. Development of pepper EST-SSRs and an EST-SSR based linkage

- map. Journal of Hunan Agricultural University: Natural Science, 38 (2): 162 - 167. (in Chinese)
- 刘 峰, 谢玲玲, 欧阳娟, 王运生, 邹学校. 2012. 辣椒多态性 EST-SSR 标记开发及连锁图谱构建. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 38 (2): 162 - 167.
- Luo Ran, Wu Wei-lin, Zhang Yang, Li Yu-hua. 2010. SSR marker and its application to plant genetics and breeding. Genomics and Applied Biology, 29 (1): 137 - 143. (in Chinese)
- 罗 冉, 吴委林, 张 旸, 李玉花. 2010. SSR 分子标记在作物遗传育种中的应用. 基因组学与应用生物学, 29 (1): 137 - 143.
- Marco Caruso, Claire T Federici, Mikeal L Roose. 2008. EST-SSR markers for asparagus genetic diversity evaluation and cultivar identification. Molecular Breeding, 21: 195 - 204.
- Naresh V, Yamini K N, Rajendrakumar P, Dinesh Kumar V. 2009. EST-SSR marker-based assay for the genetic purity assessment of safflower hybrids. Euphytica, 170: 347 - 353.
- Qi Jian-xun, Hao Yan-bin, Zhu Yan, Wu Chun-lin, Wang Wei-xia, Leng Ping. 2011. Studies on Germplasm of *Juglans* by EST-SSR markers. Acta Horticulturae Sinica, 38 (3): 441 - 448. (in Chinese)
- 齐建勋, 郝艳宾, 朱 艳, 吴春林, 王维霞, 冷 平. 2011. 核桃属种质资源的 EST-SSR 标记研究. 园艺学报, 38 (3): 441 - 448.
- Selthilvel S, Jayashree B, Mahalakshmi V, Tathish Kumar P, Nakka S, Nepolean T, Hash C T. 2008. Development and mapping of simple sequence repeat markers for pearl millet from date mining of expressed sequence tags. BMC Plant Biology, 8: 119 - 127.
- Shangguan Ling-fei, Li Xiao-ying, Ning Ning, Wang Yu-zhu, Zhang Zhen, Fang Jing-gui. 2011. Development of EST-SSR markers in apricot. Acta Horticulturae Sinica, 38 (1): 43 - 54. (in Chinese)
- 上官凌飞, 李晓颖, 宁 宁, 王玉柱, 章 镇, 房经贵. 2011. 杏 EST-SSR 标记的开发. 园艺学报, 38 (1): 43 - 54.
- Varshney R K, Graner A, Sorrells M E. 2005. Genic microsatellite markers in plants: Features and applications. Trends in Biotechnology, 23: 48 - 55.
- Vendramin E, Detorri M T, Giovnazzi J. 2007. A set of EST-SSRs isolated from peach fruit transcriptome and their transportability across *Prunus* species. Molecular Ecology Notes, 7: 307 - 310
- Yi G, Lee J M, Lee S, Choi D, Kim B D. 2006. Exploitation of pepper EST-SSRs and an SSR-based linkage map. Theoretical and Applied Genetics, 114 (1): 113 - 130.
- Zhang Shui-ming, Chen Cheng, Gong Ling-yan, Wang Tian. 2012. Analysis of SSRs information and development of SSR markers from *Phalaenopsis* ESTs. Acta Horticulturae Sinica, 39 (6): 1191 - 1198. (in Chinese)
- 张水明, 陈 程, 龚凌燕, 汪 天. 2012. 蝴蝶兰 EST 资源 SSR 标记分析与开发. 园艺学报, 39 (6): 1191 - 1198.
- Zhang Yu, Zhang Xiao-fen, Chen Bin, Geng San-sheng, Li Huan-xiu, Li Zhen. 2010. Information and exploitation of EST-SSRs loci in pepper. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 19 (9): 186 - 192. (in Chinese)
- 张 宇, 张晓芬, 陈 斌, 耿三省, 李焕秀, 李 珍. 2010. 辣椒 EST-SSR 信息分析及标记开发. 西北农业学报, 19(9): 186 - 192.
- Zhang Zhi-feng, Shi Hong-cai, Wu Jian, Jian Zi-jian. 2005. Advanced technique for silver staining of polyacrylamide gel of microsatellite DNA. Biotechnology, 15 (3): 51 - 53. (in Chinese)
- 张志峰, 史洪才, 武 坚, 简子健. 2005. 微卫星 DNA 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 银染方法的改良. 生物技术, 15 (3): 51 - 53.
- Zhang Zhi-jun, Guan Yu, Yang Li, Yu Li, Luo Shu-ping. 2011. Analysis of SSRs information and development of SSR markers from moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) ESTs. Acta Horticulturae Sinica, 38 (5): 989 - 996. (in Chinese)
- 张智俊, 管 雨, 杨 丽, 余 利, 罗淑萍. 2011. 毛竹 EST 资源 SSR 标记分析与筛选. 园艺学报, 38 (5): 989 - 996.