

李永平, 林晖, 康建坂, 等. 辣椒 EST-SSR 标记的开发与验证 [J]. 福建农业学报, 2016, 31 (11): 1187—1192.
LI Y-P, LIN H, KANG J-B, et al. Development and Utility of EST-SSR Marker in *Capsicum annuum* L. [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2016, 31 (11): 1187—1192.

辣椒 EST-SSR 标记的开发与验证

李永平^{1,2}, 林晖^{1,2}, 康建坂^{1,2}, 温庆放^{1,2*}

(1. 福建省农业科学院蔬菜研究中心, 福建 福州 350013; 2. 福建省农业科学院作物研究所, 福建 福州 350013)

摘要: 从 NCBI 数据库下载 118 900 条辣椒相关 EST, 对其进行 SSR 位点搜索, 共搜索出 3 343 条 SSR, 分布密度为 1/17.20 kb, 共有 287 种重复基元。在辣椒 EST-SSR 中, 二核苷酸 (1 476 个 SSR) 和六核苷酸 (1 128 个 SSR) 占主导地位, 所占比例分别为 44.15% 和 33.74%; 出现最多的重复基元是 GA/TC, 占总数的 14.30%, 其次为 CT/AG (94 个, 占 8.11%)。针对 3 343 条含有 SSR 的 EST 设计合成了 200 对引物。用 17 份辣椒种质对 200 对引物进行筛选, 196 对引物有扩增产物, 71 对引物表现出多态性, 共有 220 个多态性位点。利用 71 对多态性引物, 对特定亲本 P181-2-6 和 P230-2-5 及其杂种一代 F1 的亲缘关系进行检测, 结果说明从辣椒相关 EST 数据库中开发的 SSR 引物有较好的可用性。

关键词: 辣椒; EST-SSR; 标记开发; 指纹图谱

中图分类号: S 641.3

文献标识码: A

文章编号: 1008-0384 (2016) 11-1187-06

Development and Utility of EST-SSR Marker in *Capsicum annuum* L.

LI Yong-ping^{1,2}, LIN Hui^{1,2}, KANG Jian-ban^{1,2}, WEN Qing-fang^{1,2*}

(1. Vegetable Research Center, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China;

2. Crops Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: A total of 118, 900 ESTs in *Capsicum annuum* L were downloaded from NCBI for identifying and developing an SSR marker. As a result, 3, 343 SSRs in the ESTs with an average of one SSR per 17.20 kb were found, including 283 SSR motifs. Analysis on the SSR motifs revealed that they were mostly di-nucleotides (1, 476 SSR) and hexa-nucleotides (1, 128 SSR), accounting for 44.15% and 33.74% of the total, respectively. GA/TC was the most frequently found motifs (14.30% of all), which was followed by CT/AG (94 SSR, and 8.11% of all). From the 3, 343 SSR-containing ESTs, 200 primer pairs were designed and validated for amplification using 17 pepper inbred lines. The results showed that 71 primer pairs yielded 220 amplification bands. Using those 71 pairs of polymorphic primers, the genetic relationship between the parents, P181-2-6 and P230-2-5, and their F1 hybrid was determined. It appeared that the SSR markers identified from the ESTs of *C. annuum* were potentially of practical applications.

Key words: *Capsicum annuum* L.; EST-SSR; marker development; fingerprinting

简单重复序列 (Simple sequence repeat, SSR) 标记技术因多态性高、灵敏度高、重复性好、数量丰富、分析简便、共显性和特异性等特点^[1], 自 1989 年建立以来, 已被广泛用于遗传图谱绘制^[2]、重要农艺性状的基因定位^[3-4]、生物遗传多样性^[5]、品种鉴定^[6]等諸多方面。

近年来, 测序技术的发展突飞猛进, 各种植物

的基因组和转录组测序数据迅速增加。EST-SSR 因来自基因的转录区与功能基因有紧密的连锁, 且在物种间有较高的通用性, 其开发与应用已在小麦^[7]、棉花^[8]、大豆^[9]、花生^[10]等大田作物中均有报道, EST-SSR 标记在一些主要蔬菜作物中也有一定的开发与应用, 如番茄^[11]、黄瓜^[12]、油菜^[13]、大白菜^[14]、甘蓝^[15]和萝卜^[16]。辣椒的

收稿日期: 2016-07-11 初稿; 2016-09-23 修改稿

作者简介: 李永平 (1974—), 女, 副研究员, 研究方向: 蔬菜分子育种 (E-mail: 248937256@qq.com)

* 通讯作者: 温庆放 (1965—), 男, 研究员, 研究方向: 蔬菜育种 (E-mail: fjqrc@163.com)

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2014J01115); 福建省科技计划重大专项 (2013NZ0002-3)

EST-SSR 标记也有研究, 但已公开报道可利用的 SSR 标记仅有 500 多个^[17~23], 开发标记数量明显偏少, 远不能满足辣椒分子育种研究的需要。本研究利用 NCBI 公共数据库公开报道的近 12 万条辣椒相关 EST, 开发 EST-SSR 标记并分析其多态性, 为辣椒的种质资源分析、指纹图谱、遗传作图和分子标记辅助育种等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料和模板 DNA 的提取

以 17 份辣椒种质、早熟牛角椒 P181-2-6 和抗 TY 的 P230-2-5 两份辣椒自交系及其杂交后代 F1 (表 1) 为引物筛选材料, 检测引物的扩增与多态性。所有试验材料均由福建省农业科学院蔬菜中心所提供, 于 2015 年春季种植于本所试验田, 在定植缓苗后苗期取幼嫩叶片, 采用改良 CTAB 法提取 DNA。

1.2 辣椒 EST 来源、EST-SSR 的发掘及分析

辣椒相关 EST 来自 NCBI (美国国家生物技术信息中心) 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST>), 共计 118 900 条 (截至 2015 年 8 月)。利用 SSRHunter 分析软件对下载的 EST 序列进行 SSR 搜索。SSR 筛选标准为: 二、三、四、五和六核苷酸的最少重复次数分别为 9、7、5、4、3 次以上, 所有重复类型的总核苷酸数不能少于 18 个。

EST-SSR 的出现频率 (%) = (检出的 SSR 个数/EST 总数) × 100%; EST-SSR 平均分布距离 = EST 总长度/SSR 个数。优势基元中 SSR 出现频率 (%) = (优势重复基元 SSR 数量/优势重复基元 SSR 总数量) × 100%。

1.3 EST-SSR 的引物设计与合成

利用 primer premier 5.0 软件对含有 SSR 的 EST 设计引物, 并由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。引物设计的主要参数: 引物长度控制在 15~30 bp, 预期产物长度控制在 150~350 bp; 引物 3' 端不出现 3 个以上的连续碱基, 引物的 3' 端避免使用碱基 A; 引物序列的 GC 含量选择在 40%~60%; Tm 值 50~60°C; 引物分值 90 以上。选择以不同主导重复基元类型设计的 EST-SSR 引物 200 对, 由福州博尚生物技术有限合成。

1.4 引物有效性检测

利用 17 份辣椒种质、早熟牛角椒 P181-2-6 和抗 TY 的 P230-2-5 两份辣椒自交系及其杂交后代 F1 对设计的引物进行检验。PCR 反应体系为 20

μL, 50 ng 模板 DNA, 0.3 μmol · L⁻¹ 引物, 0.5 mmol · L⁻¹ dNTP, 1.0 U *Taq* DNA 聚合酶, 2.0 mmol · L⁻¹ MgCl₂, 2.0 μL 10×PCR 缓冲液, 加入灭菌的超纯水至 20 μL。所用试剂均购自上海生工生物工程有限公司。PCR 扩增反应条件是: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 45 s, 50°C 退火 45 s, 72°C 延伸 1 min, 40 个循环; 72°C 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 20 g · L⁻¹ 的琼脂糖凝胶电泳检测, 90 V 稳压电泳 1 h, EB 染色, 在 UVP 公司的 GDS8000 凝胶成像系统上观察并拍照。为保证数据准确、可靠, 每块胶板均由 2 人独立记录, 然后比对, 有争议的数据作缺失处理。

表 1 17 份辣椒种质及特定亲本和后代

Table 1 Seventeen typical *C. annuum* germplasms and specific parents and F1 hybrids

编号	类型	编号	类型	编号	类型
PA001	黄椒	PA007	野生椒	PA013	牛角椒
PA002	黄椒	PA008	朝天椒	PA014	牛角椒
PA003	黄椒	PA009	羊角椒	PA015	牛角椒
PA004	黄椒	PA010	牛角椒	PA016	牛角椒
PA005	朝天椒	PA011	牛角椒	PA017	牛角椒
PA006	牛角椒	PA012	牛角椒	T2(F1)	牛角椒
P181-2-6(母)	牛角椒	P230-2-5(父)	牛角椒		

1.5 种质亲缘关系分析

基于 17 份辣椒种质 DNA 扩增产物的电泳图谱, 有带扩增记为 1, 无带记为 0, 利用 NTSYSpc2.0 对统计结果进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 辣椒 EST-SSR 信息分析

2.1.1 辣椒 EST 的基本信息及 EST-SSR 频率和密度 从 NCBI 下载 118 900 条辣椒 EST, 经搜索共挖掘到 3 343 个 SSR, 发生频率 2.82%, 平均分布距离为 17.2 kb。结果 (表 2) 表明, 辣椒具有丰富的 EST-SSR 类型, 二、三、四、五、六核苷酸重复类型都有出现, 但不同核苷酸重复类型出现的频率相差较多。核苷酸重复类型以二核苷酸重复与六核苷酸重复为主, 二者占总 SSR 比例的 77.89%, 其中二核苷酸重复中的 SSR 数量最多, 占总 SSR 比例的 44.15%, 其次是六核苷酸重复重复较多, 比例为 33.74%。

搜索共观察到 287 种重复基元, 六核苷酸重复中出现最多的重复基元达 182 种, 占基元种数的

63.41%。二核苷酸 10 种, 三核苷酸 36 种, 四核苷酸 22 种, 五核苷酸 37 种。

辣椒 EST 中平均每 17.2 kb 出现一个 SSR, 不同重复类型的 SSR 覆盖的平均距离差异较大, SSR 数越多其覆盖的平均距离越小 (表 2)。

表 2 辣椒 EST 中 SSR 出现频率

Table 2 Occurrence of SSRs in ESTs of *C. annuum*

重复类型	基元种数 N	SSR 数	占全部 SSR 的比例/%	出现频率/%	平均距离 /bp
二核苷酸	10	1476	44.15	1.24	3.88×10^4
三核苷酸	36	483	14.45	0.41	1.19×10^5
四核苷酸	22	97	2.9	0.08	5.90×10^5
五核苷酸	37	159	4.76	0.14	3.60×10^5
六核苷酸	182	1128	33.74	0.95	5.08×10^4
总计	287	3343	100	2.82	1.72×10^4

2.1.2 辣椒 EST-SSR 重复基元类型和比例 各种不同重复基元中出现最多的是二核苷酸重复类型 GA/TC, 占总 SSR 的比例为 18.37%, 其次是 AG/CT, 比例为 12.83%。二核苷酸中, 以 GA/TC 重复基元占优, 占 41.60%, GA/TC、AG/CT、AT/TA 三者占 93.03%, 但 CG/GC 重复基元没有出现; 三核苷酸中, 各重复基元分布较为均衡; 四核苷酸中, 以 TAAT/ATTA 重复基元为主, 占 36.08%; 五核苷酸中, 重复基元主要为 ATATA/TATAT, 比例为 49.69%; 六核苷酸中, 以 TCATGG/CCATGA 重复基元类型为主, 占比例 10.28%。

2.1.3 辣椒 EST-SSR 重复基元长度 辣椒 EST-SSR 二至六核苷酸平均基元长度变化范围差异很大, 二核苷酸的长度变化范围最大, 为 18~152 bp, 五核苷酸长度范围最小为 20~30 bp; 从平均长度看, 二核苷酸最长达 43.82 bp, 其次是三核苷酸 25.09 bp、四核苷酸 21.86 bp、五核苷酸的 20.57 bp、六核苷酸 18.10 bp (表 4)。

2.2 辣椒 EST-SSRs 引物有效性验证

2.2.1 EST-SSRs 标记在 17 份辣椒种质中的多态性 选择了不同重复类型和重复次数的 EST-SSRs 设计合成了一批引物。其中具二苷酸重复的引物 50 对, 三核苷酸重复引物 49 对, 四核苷酸重复引物 10 对, 五核苷酸重复引物 11 对, 六核苷酸重复引物 80 对并以 17 份辣椒种质的基因组 DNA 为模板对合成的 200 对引物进行有效性检验, 能清晰扩增产物的引物有 196 对, 扩增有效率为 98.00%;

其中 71 对 EST-SSR 引物具有多态性, 共扩增出 220 个多态性位点, 平均每个引物产生 3.1 个多态性位点。由表 5 可以初步看出, 不同核苷酸重复引物的扩增有效率和多态性比例不同, 以二核苷酸重复开发出的引物, 多态性比例最高, 为 46.00%, 而基于五核苷酸重复开发的引物多态性比例最低为 9.10%。在基元重复数量最多 (表 3) 的二核苷酸、六核苷酸开发引物的效率较高。

表 3 辣椒 EST-SSR 优势基元重复类型

Table 3 Predominant types of SSR motifs in ESTs of *C. annuum*

重复类型	重复基元	优势重复基元数量	占本重复基元的比例/%	发生频率/%	频率/%
二核苷酸	GA/TC	614	41.60	18.37	0.52
	AG/CT	429	29.07	12.83	0.36
	AT/TA	330	22.36	9.87	0.28
	TG/CA	67	4.54	2.00	0.06
	AC/GT	62	4.20	1.85	0.05
三核苷酸	TCC/GAA	49	10.14	1.47	0.04
	AAT/ATT	46	9.52	1.38	0.04
	ATA/TAT	43	8.90	1.29	0.04
	TAA/TTA	40	8.28	1.20	0.03
	CTG/CAG	39	8.07	1.17	0.03
	TGA/TCG	38	7.87	1.14	0.03
	AGA/TCT	36	7.45	1.08	0.03
	CTT/AAG	34	7.04	1.02	0.03
四核苷酸	TAAT/ATTA	35	36.08	1.05	0.03
	TTTA/AAAT	16	16.49	0.48	0.01
	AAAG/ATTT	7	7.22	0.21	0.01
	AATA/TATT	7	7.22	0.21	0.01
	ATATA/TATAT	79	49.69	2.36	0.07
五核苷酸	GTGGG/CAAAC	11	6.92	0.33	0.01
	TCATGG/CCATGA	116	10.28	3.47	0.10
	ACGAGA/TGCTCT	92	8.16	2.75	0.08
六核苷酸	CTGCTC/GAGCAG	63	5.59	1.88	0.05

表 4 辣椒 EST-SSR 基元重复长度

Table 4 Predominant types of SSR motifs in ESTs of *C. annuum*

重复类型	变化范围 /bp	平均长度 /bp
二核苷酸	18~152	43.82
三核苷酸	21~120	25.09
四核苷酸	20~32	21.86
五核苷酸	20~30	20.57
六核苷酸	18~54	18.10

表 5 不同核苷酸重复引物的扩增有效率和多态性比例

Table 5 Proportions of effective and polymorphic primers for different types of motifs

重复基元	合成引物数	有效扩增数	有效扩增比例/%	具有多态性的引物数	多态性比例/%
二核苷酸	50	50	100.00	23	46.00
三核苷酸	49	49	100.00	18	36.73
四核苷酸	10	8	80.00	2	20.00
五核苷酸	11	10	90.90	1	9.10
六核苷酸	80	79	98.75	27	33.75
总计	200	196	98.00	71	35.50

在 17 份辣椒种质扩增中不同引物扩增出的多态性位点数量不同。部分引物对 17 份辣椒种质基因组 DNA 的扩增, 显示较丰富多态性(图 1、2)。

2.2.2 EST-SSRs 标记在特定材料中的共显性

用具有多态性的 71 对引物, 对亲本 P181-2-6 和 P230-2-5 及其杂种一代 F1 的基因组 DNA 进行扩增, 在这一特定亲本间仍具有多态性的引物 43 对, 其中在亲本及其 F1 中呈共显性的标记共有 27 对(图 3-A), 显偏母型的有 9 对(图 3-B), 偏父型的有 7 对(图 3-C)。从多态性和显性、共显性来看, 基于 EST 序列开发辣椒 SSR 引物是可行和有效的, 这些标记可用于辣椒遗传多样性分析、指纹图谱、遗传图谱构建、基因定位以及分子标记辅助育种等方面。

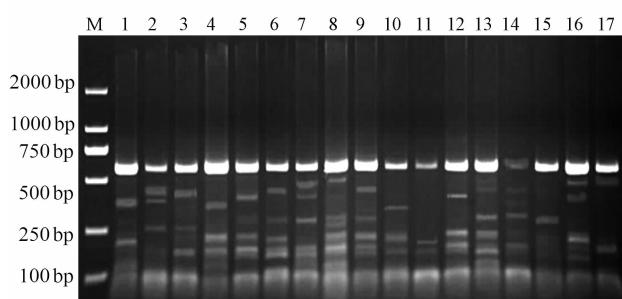


图 1 CF63 (上)、CR63 (下) 对 17 份辣椒种质基因组 DNA 的扩增结果

Fig. 1 Products amplified by primer PR063, CF63 (top) and CR63 (bottom)

注: M 为 Marker; 1~17 为辣椒种质。图 2 同。

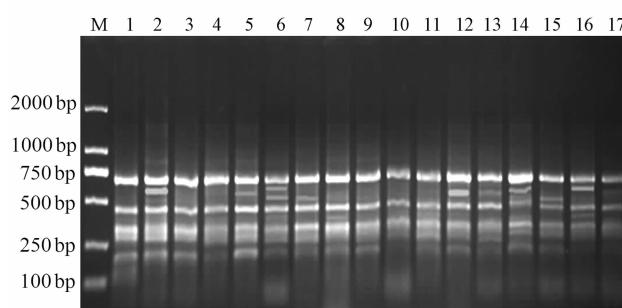


图 2 CF180 (上)、CR180 (下) 对 17 份辣椒种质基因组 DNA 的扩增结果

Fig. 2 Products amplified by primer PR180, CF180 (top) and CR180 (bottom)

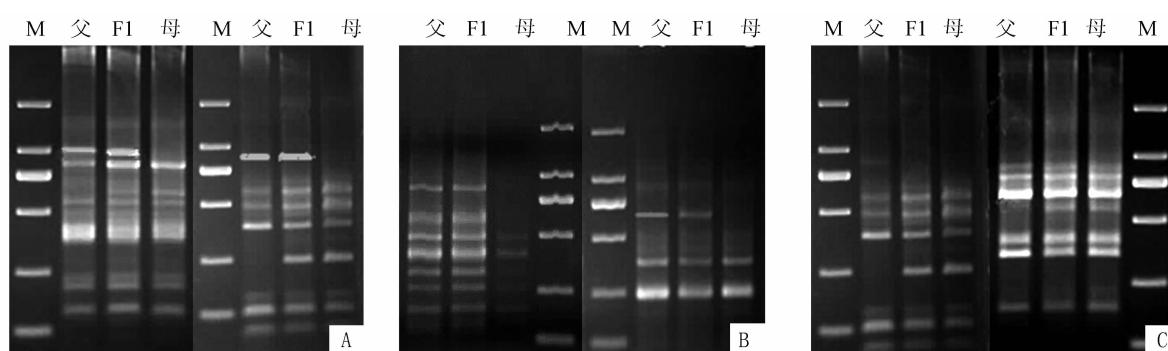


图 3 引物 CF015、CF043、CFR032、CF103 和 CF56、CF106 对亲本及其 F1 中的扩增结果

Fig. 3 Predominant products of primers CF015, CF043, CFR032, CF103, CF56, and CF106

注: A 为共显性; B 为偏父型; C 为偏母型。

2.3 EST-SSR 标记在辣椒种质遗传关系分析中的应用

以 71 对多态性引物对 17 份辣椒种质进行聚类分类(图 4), 在相似系数 0.64 处可将其分为 5 大类。PA001、PA002、PA003、PA004 聚为一类, 均为黄椒类型, PA006、PA010、PA014、

PA013、PA015、PA011、PA016、PA017、PA012 均为牛角椒类型, PA009 为羊角椒, PA005、PA008 为朝天椒, PA007 为野生椒。结果表明开发的 EST-SSR 标记能很好地将辣椒亲缘关系鉴别出来。

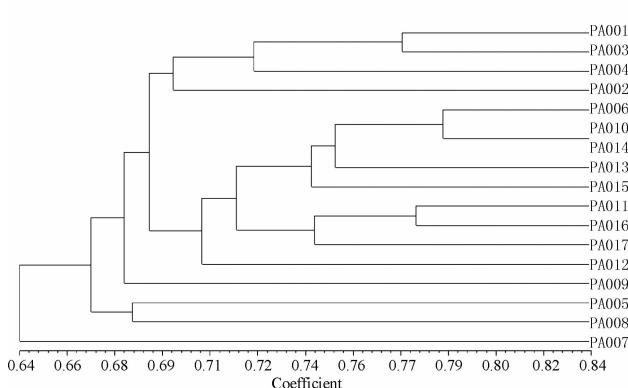


图 4 17 份辣椒种质的聚类

Fig. 4 Dendrogram on 17 varieties of *C. annuum*

3 讨 论

本研究基于从 NCBI 数据库下载的 118 900 条辣椒 EST, 进行 SSR 位点搜索, 共得到 3 343 条 SSR, 发生频率 2.82%, 分布密度为 1/17.20 kb, 包括 287 种重复基元。在辣椒 EST-SSR 中, 二核苷酸 (1 476 个 SSR) 和六核苷酸 (1 128 个 SSR) 占主导地位, 所占比例分别为 44.15% 和 33.74%; 出现最多的重复基元是 GA/TC, 占总数的 14.30%, 其次为 CT/AG (94 个, 占 8.11%)。支莉等^[23]2010 年从 NCBI 数据库获得 116 952 条辣椒 ESTs 序列, 发现 1 736 个微卫星, EST-SSRs 序列出现频率为 1.92%。在辣椒 EST-SSRs 中, 二核苷酸重复类型出现频率最高, 占总 SSR 的 56.4%, 其次是三核苷酸重复类型, 占总 SSR 的 23.3%。共检测到 149 种基序重复类型, 重复基序出现频率最高的为 GA/TC, AG/CT 次之。吴智明等^[24]2012 年通过对数据库中 32 295 条非冗余的辣椒 EST 序列进行搜索, 发现 3 396 个 SSR 位点, EST-SSR 频率为 10.52%, 平均分布距离为 4.46 kb。在辣椒 EST-SSR 中, 二核苷酸和三核苷酸重复基元占主导地位, 分别占总 SSR 的 43.02% 和 37.84%。优势重复基元为 GA/TC、AG/CT 和 AT, 分别占 15.99%、11.98% 和 11.37%。不同研究者研究的结果不尽相同, 可能搜索软件、搜索的核苷酸重复类型的长度标准设定不同有关。现行的 SSR 搜索标准中有 12、15、18 bp 3 种重复基元总长度。不同的研究者采用不同的搜索标准, 导致结果不同。根据 Schlötterer 等^[25]的研究, SSR 的变异频率与基元重复数呈正相关, 即重复基元的重复次数越多则 SSR 的多态性潜能越大。在本研究中采用了 18 bp 的标准进行

SSR 位点的筛选。目前 EST-SSR 位点搜索软件如 SSRIT、SSRhunt、MIAS、SSRfinder 等, 本研究用 SSRhunt 软件, 能准确得到 EST 序列中总 SSR 位点和重复基元的数量, 重复次数及位点位置, 为进一步了解辣椒 EST-SSR 位点信息和以后的引物设计提供了方便。

本研究中六核苷酸重复 1 128 个 SSR, 占 33.74%, 以 TCATGG/CCATGA、ACGAGA/TGCTCT 和 CTGCTC/GAGCAG 3 种重复基元为主, 占六核苷酸重复基元总比例的 24.03%。与前人的研究结果不同。在大多作物中, 六核苷酸重复基元类型均不常见, 仅在甘薯^[26]、玉米^[27]和萝卜^[16]中见到报道, 这些可能与物种本身的基因组或转录组序列差异性有关。从设计合成了引物的多态性来看, 基于六核苷酸重复基元设计的引物多态性达 33.75%, 有较高的开发价值。

虽然一般认为, 由于基因编码序列的保守性等原因导致 EST-SSR 揭示种间多态性低于源于基因组的 SSR 标记。但是, 17 份辣椒种质对开发引物鉴定结果, 多态性达 35.5%, 在特定组合中的共显性标记比例为 62.79%。本研究基于辣椒 EST-SSR 信息分析和标记开发是有效可行的, 可用于辣椒遗传多样性分析、指纹图谱、遗传图谱构建等。

参 考 文 献:

- [1] POWELL W, MACHRAY G C, PROVAN J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats [J]. Trends in Plant Science, 1996, 7 (0): 215–222.
- [2] KANG B C, NAHM S H, HUH J H, et al. An interspecific (*Capsicum annuum* × *C. chinense*) F2 linkage map in pepper using RFLP and AFLP markers [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 102 (4): 531–539.
- [3] LEE J M, KIM B D. Combined genome mapping of RFLP and AFLP-SSR in pepper [J]. Genomics and Informatics, 2003, 1 (2): 108–112.
- [4] 安静, 胡勇胜, 张宝玺, 等. 辣椒分子连锁遗传图谱的构建及抗疫病 QTL 定位 [J]. 中国蔬菜, 2007, (10): 9–12.
- [5] 韦祖生, 夏志强, 李开绵, 等. 木薯种质库遗传多样性的 EST-SSR 标记 [J]. 热带作物学报, 2008, 29 (3): 304–309.
- [6] 李丽, 郑晓鹰. 用于白菜和大白菜品种鉴定的 EST-SSR 复合标记的建立 [J]. 园艺学报, 2009, 36 (11): 1627–1634.
- [7] JU-KYUNG YU, TREVOR M. Development and mapping of EST-SSR derived simple sequence repeat markers for hexaploid wheat [J]. Genome, 2004, 47: 805–818.
- [8] QURESHI S N, SAHA S, KANTETY R V, et al. EST-SSR: A new class of genetic markers in cotton [J]. Journal of

Cotton Science, 2004, 8 (2): 112—123.

[9] 陈相艳, 李伟, 戴海英, 等. 大豆资源的信息分析 [J]. 大豆科学, 2009, 28 (3): 394—399.

[10] WEI X-Y, LIU L-F, CUI S-L, et al. Development of EST-SSR markers in peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. Front. Agric, 2011, 5 (3): 268—273.

[11] 韩明利, 崔娜, 于志海, 等. 番茄果实 EST 资源 SSR 信息分析 [J]. 华北农学报, 2011, 26 (4): 213—217.

[12] 胡建斌, 李建吾. 黄瓜 EST-SSR 位点信息 [J]. 江西农业学报, 2008, 20 (11): 58—60.

[13] 李小白, 张明龙, 崔海瑞. 油菜 EST-SSR 标记的建立 [J]. 分子细胞生物学报, 2007, 40 (2): 137—144.

[14] 忻雅, 崔海瑞, 卢美贞, 等. 白菜 EST-SSR 信息分析与标记的建立 [J]. 园艺学报, 2006, 33 (3): 549—554.

[15] 陈琛, 庄木, 李康宁, 等. 甘蓝 EST-SSR 标记的开发与应用 [J]. 园艺学报, 2013, 7 (2): 221—228.

[16] 崔娜, 邱杨, 李锡香, 等. 萝卜 EST 资源的 SSR 信息分析及 EST-SSRs 标记开发 [J]. 园艺学报, 2012, 39 (7): 1303—1312.

[17] HUANG S-W, ZHANG B-X, DAN M, et al. Development of pepper SSR markers from sequence databases [J]. Euphytica, 2000, 117: 163—167.

[18] LEE J M, NAHM S H, KIM Y M. Characterization and molecular genetics mapping of microsatellite loci in pepper [J]. Theor Appl Gene, 2004, 108: 619—627.

[19] YI G, LEE J M, LEE S. Exploitation of pepper EST-SSRs and an SSR-based linkage map [J]. Theor Appl Genet, 2006, 114: 113—130.

[20] MINAMIYAMA Y, TSURO M, HIRAI M. An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum* [J]. Mol Breeding, 2006, 18 (2): 157—169.

[21] NAGY I, STAGEL A, SASVARI Z, et al. Development, characterization, and transferability to other Solanaceae of microsatellite markers in pepper (*Capsicum annuum* L) [J]. Genome, 2007, 50 (7): 668—678.

[22] 李晶晶, 王述彬, 刘金兵, 等. 辣椒 EST-SSR 标记的开发 [J]. 分子植物育种, 2008, 6 (6): 1219—1222.

[23] 支莉, 王述彬, 刁卫平, 等. 辣椒 EST-SSR 分布特征及其应用 [J]. 江苏农业学报, 2010, 26 (6): 1323—1328.

[24] 吴智明, 刘伟强, 唐鑫, 等. 辣椒 EST-SSR 标记的开发与应用 [J]. 华南农业大学学报, 2012, 33 (2): 171—174.

[25] SCHLÖTTERER C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA [J]. Chromosoma, 2000, 109: 365—371.

[26] 黄立飞, 房伯平, 陈景益, 等. 甘薯 EST 资源的 SSR 信息分析 [J]. 植物生理学通讯, 2009, 45 (1): 23—27.

[27] 赵美琼, 宋燕, 范静华, 等. 玉米 EST 序列中微卫星的频率和分布 [J]. 云南大学农业学报, 2008, 23 (5): 585—589.

(责任编辑: 柯文辉)