

网络出版时间:2018-09-06 17:30 DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2019.03.012  
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180906.1723.024.html

花椰菜转录组 SSR 位点分析及其分子标记开发

林 琿<sup>1a,1b,2</sup>,李永平<sup>1a,1b,2</sup>,薛珠政<sup>1a,1b,2</sup>,陈敏氢<sup>1a,1b,2</sup>,朱海生<sup>1a,1b,2</sup>,温庆放<sup>1a,1b,2</sup>  
(1 福建省农业科学院 a 作物研究所,b 蔬菜研究中心,福建 福州 350013; 2 福建省蔬菜工程技术研究中心,福建 福州 350013)

【摘 要】 【目的】开发适合花椰菜的 SSR 分子标记,为花椰菜品种遗传关系鉴定、遗传图谱绘制等提供候选标记。【方法】以 24 份花椰菜材料为研究对象,通过 MISA 软件对其转录组 SSR 位点信息进行分析,设计 SSR 引物,对这些引物进行 PCR 扩增,开发高多态性花椰菜的 SSR 分子标记;利用差异条带对不同花椰菜材料的亲缘关系进行分析。【结果】从转录组数据中得到 66 450 条 Unigene 基因,包含 10 715 个 SSR 位点,发生频率为 12.09%,平均分布距离为 5.9 kb。SSR 位点中优势类型为二核苷酸重复基序,出现频率占总 SSR 的 51.16%;其次是三核苷酸,占总 SSR 的 47.37%。重复序列基序共 49 种,其中出现频率较高的重复基序主要为 AG/CT、GA/TC 和 AAG/CTT。有 1 164 个长度≥20 bp 的 SSR 位点,获得具有潜在高多态性的 SSR 引物 6 119 对。随机设计的 40 对引物中有 31 对引物能进行有效扩增,其中有 17 对引物在 24 份花椰菜品种中表现出多态性。UPGMA 分析显示,在遗传距离为 0.625 时,17 对多态性引物可将 24 份花椰菜分为 3 类。【结论】开发的花椰菜 SSR 标记类型丰富,出现频率高,具有较高的可用性。

【关键词】 花椰菜;简单重复序列;转录组;多态性;分子标记;基因位点分析

【中图分类号】 Q785,S635.3      【文献标志码】 A      【文章编号】 1671-9387(2019)03-0085-09

Analysis of SSR loci in transcriptome and development of molecular markers in *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.

LIN Hui<sup>1a,1b,2</sup>,LI Yongping<sup>1a,1b,2</sup>,XUE Zhuzheng<sup>1a,1b,2</sup>,CHEN Mindong<sup>1a,1b,2</sup>,  
ZHU Haisheng<sup>1a,1b,2</sup>,WEN Qingfang<sup>1a,1b,2</sup>

(1 a Crops Research Institute,b Vegetable Research Center,Fujian Agricultural Sciences,Fuzhou,  
Fujian 350013,China;2 Fujian Engineering Research Center for Vegetables,Fuzhou,Fujian 350013,China)

**Abstract:** 【Objective】SSR molecular markers were developed for genetic diversity analysis and genetic mapping construction in cauliflower. 【Method】In this study,24 cauliflower materials were used to analyze SSR loci of transcription group by MISA software. SSR primers were designed and amplified by PCR to develop SSR markers of highly polymorphic cauliflower. The genetic relationships of different cauliflower materials were analyzed by using different bands. 【Result】A total of 66 450 Unigenes were obtained from transcriptional data and then 10 715 simple sequence repeats (SSR) loci were identified with occurring frequency of 12.09% and mean distribution distance of 5.9 kb. Dinucleotide repeat was the main type of SSR loci (51.16%),followed by trinucleotide repeat motif (47.37%). Forty-nine repeat motifs were identified, and the most abundant motifs were AG/CT,GA/TC and AAG/CTT. There were 1 164 SSR loci with length larger than 20 bp. A total of 6 119 pairs of SSR primers with the potential to produce polymorphism

【收稿日期】 2018-01-03  
【基金项目】 福建省公益类科研院所基本科研专项(2018R1026-10,2017R1026-6);福建省农业科学院蔬菜科技创新团队项目(STIT2017-1-2);福建省农业科学院“青年科技英才百人计划”项目(YC2017-5)  
【作者简介】 林 琿(1981—),女,福建福清人,助理研究员,硕士,主要从事蔬菜分子生物学研究。E-mail:70040390@qq.com  
【通信作者】 温庆放(1965—),男,福建永泰人,研究员,硕士生导师,主要从事蔬菜育种和栽培研究。E-mail:fjvrc@163.com

were designed and 31 primers were randomly selected for PCR amplification using 24 loofah materials, of which 17 primers showed polymorphism. According to the UPGMA analysis, 24 plants were divided into 3 groups at the genetic distance of 0.625. 【Conclusion】 The large amount of SSR markers obtained can be widely used.

**Key words:** *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.; simple sequence repeat; transcriptome; polymorphism; molecular marker; gene locus analysis

花椰菜 (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.) 原产于地中海沿岸,是十字花科芸薹属的甘蓝类蔬菜,以花球为食用器官<sup>[1]</sup>。花椰菜在我国福建、浙江、湖北等地区均有种植,是我国非常重要的蔬菜之一。花椰菜因营养丰富,有抗癌防癌功效,为药食兼用的保健型蔬菜,市场需求量不断增加,种植面积不断扩大<sup>[2]</sup>。李文萍等<sup>[3]</sup>指出,我国的花椰菜无论在栽培面积还是在产量上都位列世界第一。

品种资源是育种研究的基础,鉴定和分析花椰菜品种间的遗传关系是品种选育必不可少的步骤。DNA 标记技术是一种重要的生物学研究方法,在蔬菜遗传多样性研究中具不可替代的作用。为了从分子层面研究花椰菜的遗传多样性,近年来许多科研工作者应用 AFLP<sup>[4]</sup>、RAPD<sup>[5-6]</sup>、InDel<sup>[1]</sup>、ISSR<sup>[7]</sup>、SRAP<sup>[8-9]</sup>等开展研究工作。关于 SSR 标记在花椰菜上研究报道较少,仅刘运霞<sup>[1]</sup>和王冬梅<sup>[10]</sup>根据近缘物种引物的通用原理,利用在甘蓝上开发的 EST-SSR 引物开展花椰菜遗传多样性研究。

微卫星序列即简单重复序列 (Simple sequence repeat, SSR) 分子标记技术是一种具有操作简单、重复性好、共显性高、稳定性强、位点特异等优点的 DNA 分子标记,在真核和原核生物中应用广泛<sup>[11]</sup>。从它的来源看,可分为表达序列标签 SSR (EST-SSR) 和基因组 SSR (g-SSR)。传统 SSR 标记的开

发是通过基因组或下载 EST 序列,根据基因序列两侧的保守区域来设计 SSR 引物,但这种方法工作量大、时间长、花费高昂<sup>[12]</sup>,且 NCBI 数据库中的花椰菜 EST 序列数量有限,可供开发的 SSR 引物数量不多。随着分子生物学技术的飞速发展,高通量转录组测序技术可以在无参考基因组的情况下,获得某个物种的大量转录本信息,再利用生物信息学软件开发大量的 SSR 引物,具有迅速高效、花费合理、数据可靠等优点。目前,通过转录组测序平台开发 SSR 标记已在大白菜<sup>[13]</sup>、萝卜<sup>[14]</sup>、辣椒<sup>[15]</sup>、茄子<sup>[16]</sup>、南瓜<sup>[17]</sup>、菜薹<sup>[18]</sup>、洋葱<sup>[19]</sup>、菠菜<sup>[20]</sup>等蔬菜中得到应用。本研究在花椰菜转录组测序获得生物学数据信息的基础上,开发大量 SSR 标记,并以本课题组收集的花椰菜代表性品种资源为材料,对设计的 SSR 引物进行有效性鉴定,以期为后续的花椰菜遗传多样性、基因组比较、遗传图谱构建、重要性状的 QTL 定位、核心资源的利用和保存及分子辅助育种等研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

供试植物材料为本课题组收集及保存的 24 份花椰菜品种 (表 1)。

表 1 花椰菜 SSR 多态性分析所用材料基本信息

Table 1 List of accessions used in assessing SSR level in *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.

| 序号<br>No. | 名称或编号<br>Name or code   | 来源<br>Source | 序号<br>No. | 名称或编号<br>Name or code           | 来源<br>Source |
|-----------|-------------------------|--------------|-----------|---------------------------------|--------------|
| 1         | 万花王 Wanhuaawang         | 台湾 Taiwan    | 13        | 天山雪 Tianshanxue                 | 法国 France    |
| 2         | 雪白 80 天 Xuebai 80tian   | 厦门 Xiamen    | 14        | NEW 庆农 70 天 NEW qingnong 70tian | 台湾 Taiwan    |
| 3         | 松花 80 天 Songhua 80tian  | 台湾 Taiwan    | 15        | H-55                            | 台湾 Taiwan    |
| 4         | 文兴 90 天 Wenxing 90tian  | 台湾 Taiwan    | 16        | 雪洁 Xuejie                       | 法国 France    |
| 5         | 庆农 85 天 Qingnong 85tian | 台湾 Taiwan    | 17        | 庆农 65 天 Qingnong 65tian         | 台湾 Taiwan    |
| 6         | 佳家乐 Jiajiale            | 台湾 Taiwan    | 18        | 新贵 65 天 Xingui 65tian           | 厦门 Xiamen    |
| 7         | 紫荆花 Bauhinia            | 日本 Janpan    | 19        | 农乐 68 天 Nongle 68tian           | 厦门 Xiamen    |
| 8         | 富贵塔 Rich tower          | 法国 France    | 20        | 农乐 90 天 Nongle 90tian           | 厦门 Xiamen    |
| 9         | 金色花菜 Golden cauliflower | 日本 Janpan    | 21        | 新贵 70 天 Xingui 70tian           | 厦门 Xiamen    |
| 10        | 鹭美 80 天 Lumei 80tian    | 厦门 Xiamen    | 22        | 新贵 1 号 Xingui number one        | 厦门 Xiamen    |
| 11        | 绿宝塔 Green pagoda        | 法国 France    | 23        | 新贵 55 天 Xingui 55tian           | 厦门 Xiamen    |
| 12        | 雪丽雅 Xueliya             | 法国 France    | 24        | 农乐 65 天 Nongle 65tian           | 厦门 Xiamen    |

1.2 转录组数据的获得

花椰菜转录组数据来源于本课题花椰菜高通量转录组深度测序。测序时,取花椰菜花梗置于液氮中速冻保存,后用于冰低温快递至北京百迈克公司进行 RNA-Seq 转录组测序,共获得 15.58 Gb 的数据量,以其中的 66 450 条 Unigene 基因作为基础背景数据。

1.3 转录组 SSR 位点鉴别

使用 MISA 软件对花椰菜转录组数据进行 SSR 位点搜索,搜索标准为:重复基序长度在 2~6 bp,二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复次数分别不低于 6,5,5,4 和 4 次。

1.4 SSR 引物的有效性验证

使用 Primer 3.0 软件设计引物,引物设计的标准为:(1)引物长度 18~20 bp;(2)PCR 产物 100~300 bp;(3)退火温度(Tm)55~65 ℃,上、下游引物的退火温度差异不大于 2 ℃;(4)GC 含量 40%~60%;(5)最好不要出现二聚体、错配、发夹结果等<sup>[21]</sup>。每个 SSR 位点产生 3 对引物。从 6 119 对有潜力的高多态性引物序列中,随机选出 40 对,由上海博尚生物技术有限公司负责合成。在 20 μL PCR 反应体系中,含 100 ng/μL DNA 模板 1.5 μL,10×PCR Buffer 2.5 μL,10 μmol/L 正向引物 1 μL,10 μmol/L 反向引物 1 μL,10 μmol/L dNTP 4 μL,Taq DNA 酶(5 U/μL)0.3 μL,加入 9.7 μL ddH<sub>2</sub>O 补足 20 μL。PCR 扩增在 ABI 热循环仪(Applied Biosystems,USA)上进行,反应程序为:94 ℃ 4 min;94 ℃ 30 s,54 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 7 min,4 ℃ 低温保存。电泳后拍照观

察 PCR 产物的扩增情况。

1.5 数据统计

将 PCR 扩增的谱带信息输入 EXCEL 中,转化为“0-1”数据阵。扩增图谱中清晰的、可重复的谱带标记为“1”,相同位置没有谱带或微弱肉眼分辨不清的谱带标记为“0”。利用软件 NTSYSpc 2.10e,将数据转化为可读取的生物学信息,计算花椰菜的遗传距离,绘制遗传聚类图谱。

2 结果与分析

2.1 花椰菜转录组中 SSR 位点的数量与分布

应用 MISA 软件对花椰菜转录组的 66 450 条 Unigene 基因序列(序列总长度为 47 671 150 bp)进行 SSR 搜索,有 8 036 条 Unigene 基因符合条件,共获得 10 715 个 SSR 位点,发生频率(含 SSR 的基因数与总基因数之比)为 12.09%,出现频率(检出 SSR 数目与总基因数之比)为 16.12%。其中出现 1 个 SSR 位点的 Unigene 基因有 5 950 个,含复合型 SSR 位点的 Unigene 基因有 550 个,平均 5.9 kb 出现 1 个 SSR 位点。从表 2 可以看出,花椰菜转录组 SSR 重复类型较多,以重复 5 次的序列出现频率最高,有 1 149 个,占总 SSR 数量的 31.32%。其次为 6 次和 7 次重复序列,依次有 1 117 个和 602 个,分别占总 SSR 数量的 30.44%和 16.41%。从出现频率来看,二核苷酸和三核苷酸重复基序出现频率最高,其中二核苷酸重复基序是优势重复类型,占总 SSR 的 51.16%,而三核苷酸重复基序占总 SSR 的 47.37%。

表 2 花椰菜 EST-SSR 的重复类型、数量与分布频率

Table 2 Repeat type,number and frequency of EST-SSRs in cauliflower

| 重复类型<br>Repeat type  | 重复次数 Repeat number |       |       |      |      |      |       |      | 总计<br>Total | 比例/%<br>Ratio |
|----------------------|--------------------|-------|-------|------|------|------|-------|------|-------------|---------------|
|                      | 5                  | 6     | 7     | 8    | 9    | 10   | 11~14 | ≥15  |             |               |
| 二核苷酸 Dinucleotide    | 0                  | 657   | 435   | 308  | 243  | 177  | 57    | 0    | 1 877       | 51.16         |
| 三核苷酸 Trinucleotide   | 1 103              | 453   | 166   | 14   | 0    | 0    | 1     | 1    | 1 738       | 47.37         |
| 四核苷酸 Tetranucleotide | 34                 | 6     | 0     | 0    | 0    | 0    |       | 0    | 40          | 1.09          |
| 五核苷酸 Pentanucleotide | 8                  | 0     | 0     | 0    | 0    | 0    | 0     | 0    | 8           | 0.22          |
| 六核苷酸 Hexanucleotide  | 4                  | 1     | 1     | 0    | 0    | 0    | 0     | 0    | 6           | 0.16          |
| 总计 Total             | 1 149              | 1 117 | 602   | 322  | 243  | 177  | 58    | 1    | 3 669       |               |
| 比率/% Ratio           | 31.32              | 30.44 | 16.41 | 8.78 | 6.62 | 4.82 | 1.58  | 0.03 |             |               |

2.2 花椰菜转录组 SSR 基序的重复类型和频率特征

从花椰菜转录组 SSR 核苷酸基序的重复类型来看,10 715 个 SSR 位点包含 49 种重复基序,其中二核苷酸 3 种,三核苷酸 20 种,四核苷酸 12 种,五核苷酸 8 种,六核苷酸 6 种。分布频率(表 3)表明,

出现频率最多的二核苷酸重复类型是 AG/CT,占二核苷酸重复基序总数的 77.14%,占总 SSR 的 39.86%。从三核苷酸重复基序来看,出现次数最多的是 AAG/CTT,占三核苷酸重复基序总数的 22.56%,占总 SSR 的 10.57%。此外,四核苷酸中以 ACAA/TTGT 和 AAAC/GTTT 重复基序为

主,占其总数的 20%;五核苷酸中包含 5 种重复基序为 CAAAG、TCCGT、CACGC、CGAAT、TG-GAC、TGATT、TTTTG、CTCTT,占 SSR 总数的 0.22%。六核苷酸中重复基序分别为 CACACC、AGAGAC、GTGCCG、CAGGTG、TCATGC、TGAGAG,占总 SSR 总数的 0.17%。

表 3 花椰菜转录组 SSR 基序中不同重复基序出现的频率

Table 3 Occurrence frequency of different microsatellites motifs of cauliflower

| 重复类型<br>Repeat type  | 重复基序<br>Repeat motif                                                           | 数量<br>Number | 比例/%<br>Ratio |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------|--------------|---------------|
| 二核苷酸 Dinucleotide    | AC/GT                                                                          | 166          | 4.57          |
|                      | AG/CT                                                                          | 1 448        | 39.86         |
|                      | AT/TA                                                                          | 263          | 7.24          |
| 三核苷酸 Trinucleotide   | AAC/GTT                                                                        | 88           | 2.42          |
|                      | AAG/CTT                                                                        | 384          | 10.57         |
|                      | AAT/ATT                                                                        | 56           | 1.54          |
|                      | ACA/TGT                                                                        | 49           | 1.35          |
|                      | ACC/GGT                                                                        | 56           | 1.54          |
|                      | ACT/AGT                                                                        | 65           | 1.79          |
|                      | AGA/TCT                                                                        | 201          | 5.53          |
|                      | AGC/GCT                                                                        | 64           | 1.76          |
|                      | AGG/CCT                                                                        | 174          | 4.79          |
|                      | ATA/TAT                                                                        | 22           | 0.61          |
|                      | ATC/GAT                                                                        | 106          | 2.92          |
|                      | ATG/CAT                                                                        | 65           | 1.79          |
|                      | CAC/GTG                                                                        | 24           | 0.66          |
|                      | CAG/CTG                                                                        | 56           | 1.54          |
|                      | CCG/CGG                                                                        | 45           | 1.24          |
|                      | CGC/GCG                                                                        | 32           | 0.88          |
| 四核苷酸 Tetranucleotide | CTC/GAG                                                                        | 90           | 2.48          |
|                      | GCA/TGC                                                                        | 50           | 1.38          |
|                      | GCC/GGC                                                                        | 19           | 0.52          |
|                      | CGT/TGA                                                                        | 56           | 1.54          |
|                      | AAAC/GTTT                                                                      | 4            | 0.11          |
|                      | AAAG/CTTT                                                                      | 3            | 0.08          |
|                      | ACAA/TTGT                                                                      | 4            | 0.11          |
|                      | AGAA/TTCT                                                                      | 2            | 0.06          |
|                      | ATCA/TGAT,CTTC/GAAG,GGAA/TTCC,AGAC/GATA,<br>AGGG/TTTC,CAAA/TTTA,ATTC/TGTT,CTCA | 27           | 0.74          |
|                      | CAAAG,TCCGT,CACGC,CGAAT,TGGAC,TGATT,<br>TTTTG,CTCTT                            | 8            | 0.22          |
| 五核苷酸 Pentanucleotide |                                                                                |              |               |
| 六核苷酸 Hexanucleotide  | CACACC,AGAGAC,GTGCCG,CAGGTG,TCATGC,TGAGAG                                      | 6            | 0.17          |

2.3 花椰菜转录组 SSR 的可用性评价

多态性高低是检验 SSR 标记是否有用的标准之一<sup>[22]</sup>。前人研究发现,大于 20 bp 的重复序列有较高的多态性,重复序列长度在 12~20 bp 时表现出中等多态性,重复序列小于 12 bp 时表现为极低的多态性,可见 SSR 位点重复序列长度是影响其多态性高低的重要因素<sup>[23]</sup>。所以,本研究中首先去掉了序列长度小于 12 bp 的 SSR 位点。从表 4 可以看出,长度在 12~15 bp 的 SSR 位点最多,有 3 310 个,占总 SSR 位点数的 41.19%;长度小于 12 bp 的 SSR 位点有 2 329 个,占总 SSR 位点数的 28.98%;长度在 16~19 bp 的 SSR 位点有 1 233 个,占总 SSR 位点数的 15.34%;长度大于 20 bp 的 SSR 位点有 1 164 个,其中长度大于 23 bp 的 SSR 位点有 592

个,占总 SSR 位点数的比率为 7.37%,长度在 20~23 bp 的 SSR 位点有 572 个,占总 SSR 位点数的 7.12%,这两部分 SSR 位点具有丰富的多态性。

表 4 花椰菜转录组 SSR 位点重复序列的长度分布

Table 4 Distribution of length of repeat sequences of SSR loci in transcriptome of cauliflower

| 长度/bp<br>Length | SSR 位点数/个<br>Number of SSR loci | 分布比例/%<br>Distribution percentage |
|-----------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| <12             | 2 329                           | 28.98                             |
| ≥12~≤15         | 3 310                           | 41.19                             |
| ≥16~≤19         | 1 233                           | 15.34                             |
| ≥20~≤23         | 572                             | 7.12                              |
| >23             | 592                             | 7.37                              |

2.4 花椰菜转录组 SSR 引物的设计与筛选

根据引物设计原则和条件,针对 8 036 条含

SSR 位点的花椰菜 Unigene 基因,最终成功设计了 6 119 对高质量的标记引物。随机挑选 40 对大于 20 bp 且包含 2~6 个重复序列的核苷酸引物进行合成。选择包括二核苷酸、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,花椰菜品系‘庆农 65 天’的 DNA 进行扩增,验证引物的有效

性。结果表明,有 31 对 SSR 引物可扩增出条带(图 1),有效扩增比例为 77. 5%。在 31 对有效扩增引物中,有 28 对(90. 32%)的 PCR 扩增产物与预期大小相符,有 2 对(6. 45%)的扩增产物长度超过预期,1 对引物(3. 23%)的扩增产物小于预期。

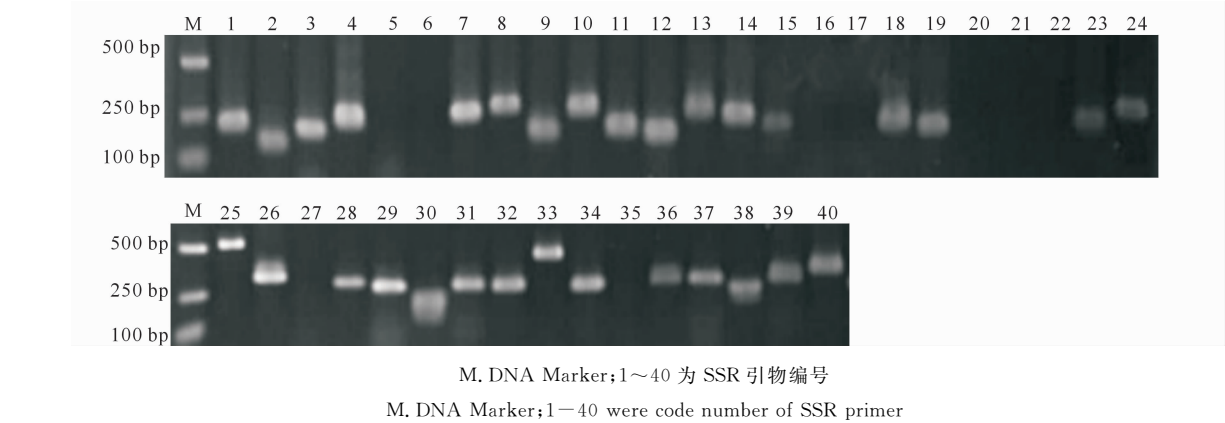


图 1 花椰菜转录组 40 对 SSR 引物有效性扩增验证

Fig. 1 Amplification of 40 pairs of SSR primers from cauliflower transcriptome

2.5 花椰菜转录组 SSR 引物的多态性分析

选取 24 份花椰菜材料,利用筛选出的 28 对与预期相符的 EST-SSR 引物进行多态性评价,结果显示,有 17 对引物(表 5)能扩增出差异谱带,占比为 60. 71%。每对引物产生的多态性片段数为 1~4

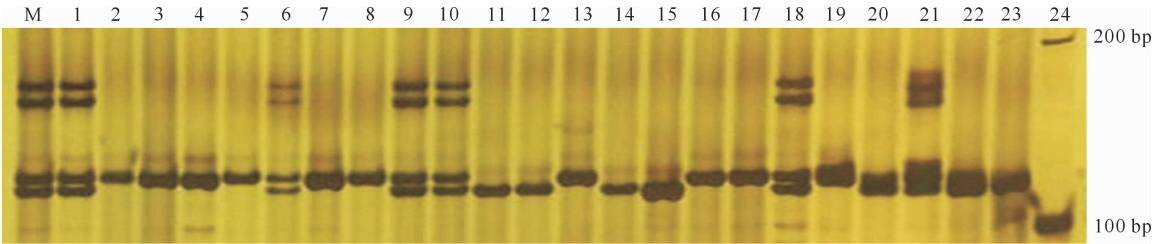
个。17 对引物共获得 35 个位点,其中多态性位点 29 个,每对引物平均获得 1. 5 个多态性位点。引物 8(HCSSR8)的扩增谱带图见图 2,其他引物的扩增图谱略。

表 5 17 对花椰菜多态性 SSR 引物信息

| 引物编号<br>Primer No. | 引物序列(5'→3')<br>Primer sequence (5'→3')             | SSR 基元<br>SSR motif  | 产物长度/bp<br>Length of product |
|--------------------|----------------------------------------------------|----------------------|------------------------------|
| HCSSR1             | F:TTCTGACACGGTGACACCTC<br>R:AGACGATAACCGAGTGGTGG   | (TCCGT) <sub>5</sub> | 122                          |
| HCSSR5             | F:GTTGAGGAGGGGAGAAGAG<br>R:TTGCGGTATCGAGGATACAA    | (TGGAC) <sub>5</sub> | 216                          |
| HCSSR8             | F:AGTCCCTTGACACAGAGGTTG<br>R:CAAGCAAAGGAGAGCCAGAG  | (TTTTG) <sub>5</sub> | 218                          |
| HCSSR11            | F:AACTCGTCAACCACTCCCC<br>R:AGCAGCCTCACGATGTTCTT    | (CTC) <sub>7</sub>   | 273                          |
| HCSSR13            | F:GCCCTTTTAGAGCCATCACA<br>R:ACCTTAGAGCGCAAGTCCAA   | (CAG) <sub>7</sub>   | 245                          |
| HCSSR14            | F:AATTCTCTCACCAGAGCATGG<br>R:ATTCTTTCTTTTCGCGGATT  | (GGT) <sub>7</sub>   | 268                          |
| HCSSR17            | F:CTACGACGAAGCTGAGGTCC<br>R:GACGGAGACTGAAGGCTTTG   | (CTC) <sub>7</sub>   | 261                          |
| HCSSR19            | F:TCAAGAAGCTACCGCGAAAT<br>R:GGTTAGGACGTGCACCAGAT   | (ACA) <sub>7</sub>   | 197                          |
| HCSSR20            | F:CTGTAAAACCGACGCGTAT<br>R:CTTCTCCTTCTTCTCCGCCT    | (TCG) <sub>7</sub>   | 259                          |
| HCSSR23            | F:AGGGACGGCCAAGAATAGAT<br>R:GCGCGAGATCCTTAGATTG    | (TCT) <sub>7</sub>   | 221                          |
| HCSSR24            | F:CGTTAAAAATCCCCCAAACCT<br>R:TGTGGGGTAAGCAAATGGAT  | (AGA) <sub>7</sub>   | 255                          |
| HCSSR26            | F:AGCGAATTTGACCTTAGCGA<br>R:AGATGAGCGTTGCGAAATCT   | (ACT) <sub>7</sub>   | 271                          |
| HCSSR29            | F:CTACACGGCACAAACCAACAC<br>R:CTCAGAACTGGCACACACAGA | (TTG) <sub>7</sub>   | 274                          |

表 5(续)   Contiuned Table 5

| 引物编号<br>Primer No. | 引物序列(5'→3')<br>Primer sequence (5'→3')            | SSR 基元<br>SSR motif | 产物长度/bp<br>Length of product |
|--------------------|---------------------------------------------------|---------------------|------------------------------|
| HCSSR31            | F:CGCTAGGTTTCAGACGAGGTC<br>R:TGTGGTTTTCGGTTAGGGAG | (AAC) <sub>7</sub>  | 261                          |
| HCSSR32            | F:TAGCTCCTCCTCCAACTCCA<br>R:CCAAGACAAAGAGGCTGAGG  | (GTG) <sub>7</sub>  | 195                          |
| HCSSR34            | F:AAGCTGTCATAGGAAGGCCA<br>R:AACCCTGCAGATCCAAACAC  | (CTG) <sub>7</sub>  | 199                          |
| HCSSR36            | F:GGACCAATAGAGCCTCTCCC<br>R:GTGGTAGGCTCAGGAGCAAG  | (CTG) <sub>7</sub>  | 258                          |



M, DNA Marker;1~24 为花椰菜材料编号,编号对应品种与表 1 同,下图同  
DNA Marker;1—24 translation of cauliflower material number,code names are same as Table 1,the same below.

图 2 引物 8(HCSSR8)在 24 个花椰菜材料中的多态性

Fig. 2 Polymorphisms of primer 8 (HCSSR8)in 24 cauliflower germplasms

依据 17 对多态性 SSR 引物的差异谱带,对 24 份花椰菜品种进行聚类分析,结果(图 3)发现,在遗传距离为 0.625 处,24 份材料可被分为 3 大类群,第 1 类群包含 18 份材料,这 18 份材料在遗传距离为 0.50 处又被分为 3 个亚类,第 1 亚类包含 1、7、2、10、11、3、6、9、4、5 和 8 号等 11 个品种,其中品种 1、3、6、4 和 5 来源于台湾,品种 2 和 10 来源于厦门,品种 7 和 9 来源于日本,品种 8 和 11 来源于法国。第 2 亚类包含 12、15、13、19 和 20 等 5 个品种,其中品种 12 和 13 来源于法国,品种 19 和 20 来源于厦

门,品种 15 引种于台湾。第 3 亚类包含 2 个品种,品种 22 和 24,且这 2 个品种均来自厦门。第 2 类群有 2 份材料,品种 14 和 17,均来自台湾。第 3 类群共 4 份材料,分别为 16、18、21 和 23,其中品种 21、23 和 18 来自厦门,品种 16 来自法国。从聚类结果来看,大部分来自同一地区的品种聚在一起,这符合品种在地理位置上的分布;也有一小部分来自中国台湾的品种与日本、法国等国家的品种聚在一起,这与地区间的相互引种有关。

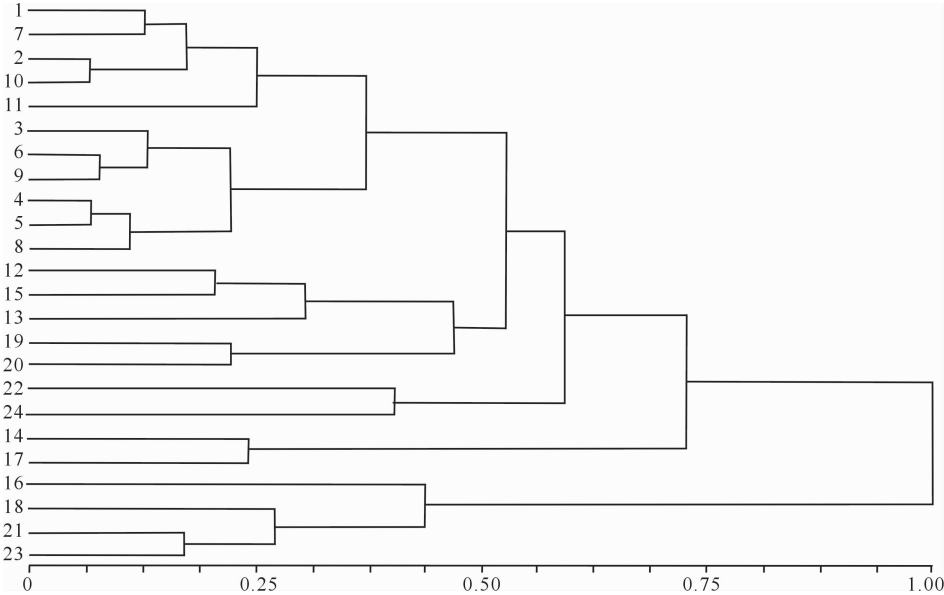


图 3 24 份花椰菜材料的 UPGMA 聚类图

Fig. 3 Cluster diagram for 24 cauliflower tested by UPGMA

### 3 讨 论

本研究应用花椰菜转录组生物学数据信息,开发了 66 450 条 Unigene 基因,其中 8 036 个 Unigene 基因含有 SSR 位点,SSR 位点发生频率为 12.09%,该结果高于马尾松 4.69%<sup>[24]</sup>、洋葱 5.57%<sup>[19]</sup>、辣椒 7.83%<sup>[15]</sup>、南瓜 9.52%<sup>[25]</sup>,但略低于大白菜 16.82%<sup>[13]</sup>、腊梅 12.35%<sup>[26]</sup>、樱桃 15.62%<sup>[27]</sup>、青稞 16.49%<sup>[28]</sup>。本研究的 Unigene 序列中,平均 5.9 kb 就能发现 1 个 SSR 位点,高于洋葱<sup>[19]</sup>、辣椒<sup>[15]</sup>和马尾松<sup>[24]</sup>,这说明花椰菜的 SSR 标记数量非常丰富。不同研究中 SSR 产生密度和频率不同,这可能与物种基因组、转录组测序方法、数据量大小、Unigene 序列数量和长度以及 SSR 搜索标准等因素相关<sup>[29-30]</sup>。前人研究发现,在已开发的 SSR 标记中,以二核苷酸和三核苷酸 SSR 标记最为丰富<sup>[31-32]</sup>。本研究也发现,在花椰菜所有的 SSR 重复基序中,占主导地位的重复杂序主要为二核苷酸和三核苷酸,分别占总 SSR 的 51.16% 和 47.37%,这与前人在萝卜<sup>[14]</sup>、大白菜<sup>[13]</sup>、菜薹<sup>[18]</sup>等芸薹属蔬菜上的研究结果一致。在二核苷酸重复基序中,以 GA/TC 和 AG/CT 重复类型出现的次数最多,这与蓝靛果忍冬<sup>[33]</sup>、刺梨<sup>[34]</sup>、胡杨<sup>[35]</sup>得出的结论相符。在三核苷酸重复基序中,以 AAG/CTT 重复类型为主,这与双子叶植物中以 AAG/CTT 为三核苷酸主要重复类型的研究结果<sup>[36]</sup>相同。

多态性高是 SSR 标记技术的一个重要考察指标。前人研究发现,SSR 标记中的引物多态性与重复序列的长短相关,多态性越高的标记,往往重复序列就越长。本研究发现,花椰菜 SSR 位点中有 1 164 个重复基序长度  $\geq 20$  bp。使用这些 SSR 位点产生 SSR 引物可能得到大量高多态性的 SSR 标记。利用软件对 8 036 条含有 SSR 位点的 Unigene 序列设计引物,获得 6 119 对 SSR 引物,利用随机合成的 40 对 SSR 引物,使用花椰菜品系‘庆农 65 天’的 DNA 验证其有效性,发现有 31 对引物扩增出符合要求的条带,未扩增出条带的引物有 9 对,这可能与引物退火温度或本身的质量有关。在 28 对与预期大小一致的引物中筛选出 17 对具有多态性的引物,多态性比例为 60.71%,低于丝瓜 73.33%<sup>[32]</sup>,但高于藜麦 55.9%<sup>[37]</sup>、红豆杉 38.71%<sup>[38]</sup>、绿豆 33%<sup>[39]</sup>,这与引物合成的随机性和供试材料的数量有一定的关系<sup>[33]</sup>。17 对多态性引物重复序列的长度在 21~25 bp,均  $\geq 20$  bp,这验证了前人的研究结

果<sup>[23]</sup>。

利用 17 对差异性引物对 24 份花椰菜品种进行聚类分析发现,在遗传距离为 0.625 处,将 24 份花椰菜品种分为 3 大类,台湾品种基本聚为一类,厦门品种距离较近,基本可根据地理位置分类,少量的日本和法国品种或聚在大类中,在小分类里会与台湾或厦门品种聚为一簇,这可能与地域间的相互引种,造成基因漂流相关。但这也说明,花椰菜种质资源遗传变异性相对狭窄,亟需丰富和拓展花椰菜种质资源。本研究能比较准确地判断出 24 个花椰菜材料之间的遗传多样性和亲缘关系,但若要进一步解析花椰菜更深层次的遗传密码和遗传关系,则需要更多的分子标记和更庞大的待测样本群体。

本研究发现,花椰菜转录组 SSR 引物出现频率高且种类丰富,可为花椰菜的功能基因挖掘、分子标记辅助育种、遗传多样性分析、比较基因组研究及遗传图谱绘制等研究工作提供候选标记。

### [参考文献]

- [1] 刘运霞. 花椰菜种质资源遗传多样性的分析 [D]. 北京:中国农业科学院,2011.  
Liu Y X. The study of genetic diversity in cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.) [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences,2011.
- [2] 朱世杨,张小玲,罗天宽,等. 花椰菜种质资源萌发期耐盐性综合评价 [J]. 核农学报,2012,26(2):380-390.  
Zhu S Y, Zhang X L, Luo T K, et al. A comprehensive evaluation of salt tolerance in cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.) during germination stage [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences,2012,26(2):380-390.
- [3] 李文萍,林俊城,黄 科. 全球花椰菜生产与贸易现状分析 [J]. 中国蔬菜,2014(9):5-10.  
Li W P, Lin J C, Huang K. Analysis about present status of global cauliflower production and its trade [J]. China Vegetables,2014(9):5-10.
- [4] 李志琪. 应用 AFLP 标记技术研究甘蓝类蔬菜遗传多样性及亲缘关系 [D]. 北京:中国农业科学院,2003.  
Li Z Q. Studies on genetic diversity and relationship of *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L. using AFLP markers [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences,2003.
- [5] 林 琿. 花椰菜种质资源形态标记和 RAPD 标记研究 [D]. 福州:福建农林大学,2007.  
Lin H. Study in cauliflower germplasm using morphological markers and RAPD markers [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University,2007.
- [6] 田 源. 甘蓝类蔬菜遗传多样性及亲缘关系 RAPD、SSR 分析 [D]. 哈尔滨:东北农业大学,2007.  
Tian Y. Genetic diversity and relationship analysis of *Brassica oleracea* L. by RAPD SSR [D]. Harbin: Northeast Agricultur-

- al University, 2007.
- [7] 马二磊,王 燕,刘 莉,等. 松花型花椰菜主要品种鉴定的分子标记分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 11(5): 621-624.  
Ma E L, Wang Y, Liu L, et al. Cultivar identification in the loose curd cauliflower with molecular markers [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2011, 11(5): 621-624.
- [8] 楼 珏,张小玲,罗天宽,等. 利用 SSR 和 SRAP 标记分析花椰菜自交系的遗传多样性 [J]. 分子植物育种, 2015, 13(3): 605-614.  
Lou J, Zhang X L, Luo T K, et al. Analysis of the genetic diversity in cauliflower inbred lines by SSR and SRAP markers [J]. Molecular Plant Breeding, 2015, 13(3): 605-614.
- [9] 姚雪琴,李光庆,谢祝捷,等. 长三角区域花椰菜遗传多样性及其近缘种亲缘关系的 SRAP 分析 [J]. 上海农业学报, 2016, 32(5): 22-27.  
Yao X Q, Li G Q, Xie Z J, et al. Genetic diversity of cauliflower in Yangtze River Delta region and SRAP analysis of the genetic relationship with its related species [J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2016, 32(5): 22-27.
- [10] 王冬梅. 甘蓝类作物亲缘关系的 SSR 分析 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.  
Wang D M. Analysis of genetic relationships of *Brassica oleracea* based on SSR markers [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2011.
- [11] Tuler A C, Carrijo T T, Nöia L R, et al. SSR markers: a tool for species identification in *Psidium* (Myrtaceae) [J]. Molecular Biology Report, 2015, 42(11): 1501-1513.
- [12] Zhang H, Wei L, Miao H, et al. Development and validation of genic-SSR markers in sesame by RNA-seq [J]. BMC Genomics, 2012(13): 316.
- [13] Ding Q, Li J, Wang F, et al. Characterization and development of EST-SSRs by deep transcriptome sequencing in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) [J]. Int J Genomics, 2015, 9: 1-11.
- [14] Zhai L, Xu L, Wang Y, et al. Novel and useful genic-SSR markers from de novo transcriptome sequencing of radish (*Raphanus sativus* L.) [J]. Molecular Breeding, 2014, 33(3): 611-624.
- [15] 刘 峰,王运生,田雪亮,等. 辣椒转录组 SSR 挖掘及其多态性分析 [J]. 园艺学报, 2012, 39(1): 168-174.  
Liu F, Wang Y S, Tian X L, et al. SSR mining in pepper (*Cap-sicum annuum* L.) transcriptome and the polymorphism analysis [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2012, 39(1): 168-174.
- [16] 魏明明,陈钰辉,刘富中,等. 基于转录组测序的茄子 SSR 标记开发 [J]. 植物遗传资源学报, 2016, 17(6): 1082-1091.  
Wei M M, Chen Y H, Liu F Z, et al. Development of SSR markers for eggplant with transcriptome sequencing data [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2016, 17(6): 1082-1091.
- [17] Wu T Q, Luo S B, Wang R, et al. The first illumina-based de novo transcriptome sequencing and analysis of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch) and SSR marker development [J]. Molecular Breeding, 2014, 34(3): 1437-1447.
- [18] 李荣华,王直亮,陈静芳,等. 菜薹转录组中 SSR 信息与可用性分析 [J]. 园艺学报, 2016, 43(9): 1816-1824.  
Li R H, Wang Z L, Chen J F, et al. Analysis of SSR information in transcriptome and their usability in flowering Chinese cabbage [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2014, 43(9): 1816-1824.
- [19] 李满堂,张仕林,邓 鹏,等. 洋葱转录组 SSR 信息分析及其多态性研究 [J]. 园艺学报, 2015, 42(6): 1103-1111.  
Li M T, Zhang S L, Deng P, et al. Analysis on SSR information in transcriptome of onion and the polymorphism [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2015, 42(6): 1103-1111.
- [20] 潜宗伟,陈海丽,崔彦玲. 菠菜转录组 SSR 位点分析及其分子标记的开发 [J]. 农业生物技术学报, 2016, 24(11): 1688-1697.  
Qian Z W, Chen H L, Cui Y L. Analysis of the SSR loci and development of molecular markers in *Brassica oleracea* transcriptome [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2016, 24(11): 1688-1697.
- [21] 李翠婷,张广辉,马春花,等. 野三七转录组中 SSR 位点信息分析及其多态性研究 [J]. 中草药, 2014, 45(5): 1468-1472.  
Li C T, Zhang G H, Ma C H, et al. Analysis on SSR loci information in transcriptome of *Panax vietnamensis* var. *fuscidiscus* and its polymorphism [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2014, 45(5): 1468-1472.
- [22] 李 珊,周天华,赵桂仿,等. 马蹄香表达序列标签资源的 SSR 信息分析 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 464-468.  
Li S, Zhou T H, Zhao G F, et al. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from *Saruma henryi* Oliv. [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2010, 41(3): 464-468.
- [23] Singh H, Deshmukh R K, Singh A, et al. Highly variable SSR markers suitable for rice genotyping using agarose gels [J]. Molecular Breeding, 2010, 25(2): 359-364.
- [24] 梅利那,范付华,崔博文,等. 基于马尾松转录组的 SSR 分子标记开发及种质鉴定 [J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(6): 991-1002.  
Mei L N, Fan F H, Cui B W, et al. Development of SSR molecular markers based on transcriptome sequences and germplasm identification in masson pine (*Pinus massoniana*) [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2017, 25(6): 991-1002.
- [25] 王洋洋,单文琪,徐文龙,等. 印度南瓜转录组 SSR 信息分析及其多态性研究 [J]. 园艺学报, 2016, 43(3): 578-586.  
Wang Y Y, Shan W Q, Xu W L, et al. Analysis on SSR information in transcriptome and the polymorphism of *Cucurbita maxima* [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2016, 43(3): 578-586.
- [26] 李 响,杨 楠,赵凯歌,等. 腊梅转录组 EST-SSR 标记开发与引物筛选 [J]. 北京林业大学学报, 2013, 35(1): 25-32.  
Li X, Yang N, Zhao K G, et al. Development and primer selection of EST-SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of *Chimonanthus praecox* [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2013, 35(1): 25-32.

- [27] 宗 宇,王 月,朱友银,等. 基于中国樱桃转录组的 SSR 分子标记开发与鉴定 [J]. 园艺学报,2016,43(8):1566-1576.  
Zong Y,Wang Y,Zhu Y Y,et al. Development and validation of SSR markers based on transcriptomic data of Chinese cherry (*Prunus pseudocerasus*) [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2016,43(8):1566-1576.
- [28] 徐金青,夏腾飞,王 蕾,等. 青稞转录组 SSR 位点及其基因功能分析 [J]. 麦类作物学报,2017,37(2):175-184.  
Xu J Q,Xia T F,Wang L,et al. Characterization and gene function analysis of SSR sequences in hulless barley [J]. Transcriptome, Journal of Triticeae Crops, 2017,37(2):175-184.
- [29] Varshney R K,Graner A,Sorrells M E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications [J]. Trends Biotechnol,2005,23(1):48-55.
- [30] 黄海燕,杜红岩,乌云塔娜,等. 基于杜仲转录组序列的 SSR 分子标记的开发 [J]. 林业科学,2013,49(5):176-181.  
Huang H Y,Du H Y,Wuyun T N,et al. Development of SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of *Eurocommia ulmoides* Oliver [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2013,49(5):176-81.
- [31] Liang X,Chen X,Hong Y,et al. Utility of EST-derived SSR in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) and *Arachis* wild species [J]. BMC Plant Biol,2009,9(1):35-43.
- [32] 朱海生,张前荣,刘建汀,等. 丝瓜转录组 SSR 位点分析及其分子标记开发 [J]. 中国细胞生物学学报,2016,38(9):1118-1127.  
Zhu H S,Zhang Q R,Liu J T,et al. Analysis on SSR loci in transcriptome and development of molecular markers in *Luffa cylindrica* [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2016,38(9):1118-1127.
- [33] 张庆田,李晓艳,杨义明,等. 蓝靛果忍冬转录组 SSR 信息分析及其分子标记开发 [J]. 园艺学报,2016,43(3):557-563.  
Zhang Q T,Li X Y,Yang Y M,et al. Analysis on SSR information in transcriptome and development of molecular markers in *Lonicera caerulea* [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2016,43(3):557-563.
- [34] 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 [J]. 园艺学报,2015,42(2):341-349.  
Yan X Q,Lu M,An H M. Analysis on SSR information in transcriptome and development of molecular markers in *Rosa roxburghii* [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2015,42(2):341-349.
- [35] Du F K,Xu F,Qu H,et al. Exploiting the transcriptome of *Euphrates poplar*, *Populus euphratica* (Salicaceae) to develop and characterize new EST-SSR markers and construct an EST-SSR database [J]. PLoS ONE,2013,8:e61337.
- [36] Morgante M,Hanafey M,Powell W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes [J]. Nat Genetics,2002,30:194-200.
- [37] 张体付,戚维聪,顾闽峰,等. 藜麦 EST-SSR 的开发及通用性分析 [J]. 作物学报,2016,42(4):492-500.  
Zhang T F,Qi W C,Gu M F,et al. Exploration and transferability evaluation of EST-SSRs in quinoa [J]. Acta Agronomica Sinica, 2016,42(4):492-500.
- [38] 李炎林,杨星星,张家银,等. 南方红豆杉转录组 SSR 挖掘及分子标记的研究 [J]. 园艺学报,2014,41(4):735-745.  
Li Y L,Yang X X,Zhang J Y,et al. Studies on SSR molecular markers based on transcriptome of *Taxus chinensis* var. *mairei* [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2014,41(4):735-745.
- [39] Chen H,Wang L,Wang S,et al. Transcriptome sequencing of mung bean (*Vigna radiata* L.) genes and the identification of EST-SSR markers [J]. PLoS ONE,2015,10(4):e0120273.