

辣椒转录组 SSR 挖掘及其多态性分析

刘 峰^{1,3}, 王运生^{2,3}, 田雪亮^{3,4}, 茆振川³, 邹学校^{1,*}, 谢丙炎^{3,*}

(¹湖南省农业科学院蔬菜研究所, 长沙 410125; ²湖南农业大学生物安全科学技术学院, 长沙 410128; ³中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ⁴河南科技学院, 河南新乡 453003)

摘 要: 利用 SSR 检索程序从两个辣椒转录组共 221 037 条 unigenes (97.3 Mb) 中筛选得到 17 319 个 SSR 位点 (7.83%), 其发生频率为 1/56 kb。其中以单核苷重复基序为主导类型, 占总 SSR 的 56.30%; 其次是二、三核苷酸重复基序, 其出现频率分别为 19.16% 和 23.18%。对所有含 SSR 位点 EST 序列设计的 10 468 对引物进行 E-PCR 多态性检测, 获得 1 538 对 E-PCR 多态性引物。随机选取 20 对引物进行验证, 其中 7 对 (36.84%) 在 10 个不同类型辣椒材料中表现出多态性, PIC 值范围为 0.33 ~ 0.89, 平均为 0.67, 将 10 个辣椒材料分为 3 类。这些潜在的多态性 EST-SSR 的开发为辣椒遗传多样性分析、图谱构建提供了更丰富的候选分子标记。

关键词: 辣椒; 转录组; EST-SSR

中图分类号: S 641.3

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 01-0168-07

SSR Mining in Pepper (*Capsicum annuum* L.) Transcriptome and the Polymorphism Analysis

LIU Feng^{1,3}, WANG Yun-sheng^{2,3}, TIAN Xue-liang^{3,4}, MAO Zhen-chuan³, ZOU Xue-xiao^{1,*}, and XIE Bing-yan^{3,*}

(¹Institute of Vegetables Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China; ²College of Bio-Safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; ³Institute of Vegetables and Flowers Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ⁴College of Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003, China)

Abstract: In this study, we investigated 221 037 unigenes (97.3 Mb) from two transcriptome in pepper using SSR finding soft. In total, 17 319 (7.83%) SSRs were identified from these SSR-containing unique ESTs with the occurring frequency of 1/56 kb. Among, single nucleotide type (56.30%) is the most abundant, followed by di- (19.16%), tri- (23.18%). A total of 10 468 primer pairs were successfully designed and 1 538 primer pairs exhibited polymorphism by E-PCR 19 out of 20 primer pairs selected at random yielded amplification products, of which 7 primer pairs showed polymorphism among 10 different pepper varieties, PIC ranged from 0.33 - 0.89, average 0.67, and 10 pepper breeds were grouped into three classes. This results indicate that molecular markers will be more usable in map structure, analysis of genetic polymorphism in pepper.

Key words: pepper (*Capsicum annuum* L.); transcriptome; EST-SSR

收稿日期: 2011 - 11 - 11; **修回日期:** 2011 - 12 - 21

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (2009CB119000); 国家自然科学基金项目 (31101425); 国家大宗蔬菜产业技术体系项目 (CARS-25-B-01); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201103018)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zou_xuexiao@163.com; xieby@mail.caas.net.cn)

SSR (Simple sequence repeats) 分子标记具有信息量高、多等位性、共显性等特点 (吕婧 等, 2011), 且试验成本低, 结果相对稳定, 操作简单, 已广泛用于作物遗传育种研究中 (Katti et al., 2001; Gupta et al., 2003; Thiel et al., 2003)。采取实验室手段开发 SSR 引物费时, 耗力, 成本高, 试验复杂, 基于现有转录组数据库信息进行 SSR 引物开发将是一种既经济又有效的方法。表达序列标签 (EST) 直接反映生物个体基因表达信息, 在植物转录组序列中含有较多可用于建立标记的 SSR。最近许多物种中已有基于 EST 数据库成功开发 SSR 标记的报道, 如葡萄 (Scott et al., 2000), 核桃 (齐建勋 等, 2011), 苜蓿 (Eujayl et al., 2004), 大豆 (Gao et al., 2003), 甘蔗 (Morgante et al., 2002), 玉米 (Morgante et al., 2002), 水稻 (Cho et al., 2000), 黑麦 (Varshney et al., 2005), 小麦 (Gao et al., 2004) 等。

辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 基因组在 3 753 ~ 4 763 Mb 之间 (Bennett & Leitch, 2005), 目前已定位到辣椒遗传图谱的各类分子标记约 1 000 多个 (Paran et al., 2004), 平均每 3.753 ~ 4.763 Mb 一个分子标记, 远不能满足辣椒高密度作图的需要。最近几年已有研究者基于公共数据库有限的辣椒 EST 序列开发了一些引物, 并在实践中得到了应用 (Portis et al., 2007; Ince et al., 2010; Patel et al., 2011; 许小艳 等, 2011)。为了进一步挖掘辣椒 EST-SSR 位点, 对当前已公布的辣椒 EST 序列 (约 119 751 条) 和本实验室两个辣椒转录组序列 (约 230 000 条) 进行 SSR 分布及频率分析, 并在 10 个辣椒材料中进行 EST-SSR 遗传多样性分析。

1 材料与方法

1.1 植物材料与 DNA 提取

2011 年在中国农业科学院蔬菜花卉研究所温室内, 选用 10 个具有不同表型特征 (生长习性、辣味、果型) 的辣椒材料 (表 1), 每个辣椒材料选 20 粒种子, 30 °C 恒温箱中育苗, 当子叶平展时用 CATB 法分别提取幼苗 DNA, -20 °C 保存备用。

表 1 辣椒 SSR 多态性分析材料

Table 1 List of accessions used in assessing the level of SSR in the species *Capsicum annuum*

序号 No.	名称或编号 Name or code	来源 Source
1	PI201234	美国加利福尼亚大学 University of California
2	PBC137	中国台湾亚洲蔬菜研究与发展中心 AVRDC
3	PBC602	中国台湾亚洲蔬菜研究与发展中心 AVRDC
4	HDA149	法国农业科学院 INRA
5	Early Calwonder	美国康奈尔大学 Cornell University
6	茄门 Qiemen	德国 Germany
7	9704B	中国湖南蔬菜研究所 HAAS
8	湘研 1 号 (F ₁) Xiangyan 1	中国湖南蔬菜研究所 HAAS
9	博辣 5 号 (F ₁) Bola 5	中国湖南蔬菜研究所 HAAS
10	CM 334	墨西哥国家农业研究所 INIA

1.2 辣椒转录组 SSR 位点检索

下载 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) All database 数据库中辣椒所有 EST 序列。利用 iAssembler 将本实验室 HDA149 (铃形椒) 和 9704B (牛角椒) 两个转录组数据与下载的 ESTs 数据分别构建 3 个 unigene 库 (表 2)。用 est_timmer.perl 程序去除 EST 序列中过短序列 (< 100 bp) 以及 mRNA 的“帽子”和“尾巴”。利用 MISA 程序对辣椒拼接序列进行 SSR 位点搜索 (Guo et al., 2010)。

表 2 辣椒 EST 数据来源
Table 2 EST source in pepper

数据来源 Data source	组织部位 Tissue	数据类型 Type	序列拼接长度/bp Average length of EST	数据量/条 Unigenes
HDA149 (铃形椒 Bell pepper)	幼根 Young root	转录组 Transcriptome	500	105 000
9704B (牛角椒 Chili pepper)	花蕾 Bud	转录组 Transcriptome	520	90 000
NCBI (公共数据库 Multiple types)	多个组织 Multiple tissues	EST	750	31 000

1.3 SSR 引物设计与 PCR 扩增

调用 Primer 3.0 引物批量设计程序对含有 SSR 位点的两端序列设计引物 (Liang et al., 2009b), 引物设计标准: (A) 退火温度 (T_m) 在 55 ~ 63 °C 之间, 上、下游引物的 T_m 值相差不大于 5 °C; (B) PCR 产物大小在 100 bp 到 500 bp; (C) 引物长度在 18 ~ 24 bp 之间; (D) GC 含量在 40% ~ 60% 之间; 尽量避免引物二级结构如发卡结构 (Hairpin)、二聚体 (Dimer)、错配 (False Priming)、引物二聚体 (Cross Dimer) 的出现。对批量设计的 SSR 引物在 3 个 unigene 库中进行 E-PCR (Lu et al., 2011), 选取具有多样性的 SSR 引物进行试验验证。

PCR 扩增反应体系 20 μ L: 10 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 1 μ L, 1 U *Taq* 酶 1 μ L, 10 mmol \cdot L⁻¹ 10 \times PCR buffer (Mg²⁺) 2 μ L, 10 ng \cdot μ L⁻¹ DNA 1 μ L, 10 μ mol \cdot L⁻¹ 上、下游引物各 1 μ L, 其余用 ddH₂O 水补充至 20 μ L。PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 最佳 T_m 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。扩增后的产物用 2% 琼脂糖检测, 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶检测, 220 V 电压, 80 min, 银染显色。

1.4 数据处理

采用人工读带的方法, 将电泳图上可重复的、清晰的条带记为 “1”, 同一位置无带或不易分辨的弱带计为 “0”, 建立原始数据矩阵。利用软件 PowerMarker V3.25 (Liu & Muse, 2005) 计算每对引物扩增位点的等位位点数、多态性信息量、遗传距离, 按 UPGMA 进行聚类绘图。

2 结果与分析

2.1 EST-SSR 类型及频率

利用 iAssembler 拼接软件对辣椒所有转录组数据进行混合拼接, 共获得 221 037 条 unigenes, 总覆盖长度 97.3 Mb。随后对其进行 SSR 位点搜索, 共检测 17 319 个 SSR 位点 (7.84%), 其发生频率为 1/56 kb。这些 SSR 分布在 13 830 条序列上, 超过 1 个 SSR 位点的共 2 343 条 (16.94%), 其中复合 SSRs 约 1 967 条 (11.35%)。从表 3 可以看出, 辣椒 EST-SSR 序列主要以 10 ~ 20 次重复

表 3 辣椒 EST-SSR 不同基序长度和重复次数的数量分布
Table 3 Distribution of EST-SSR with different motif types and repeat numbers in pepper

基序长度/bp Motif length	重复次数 Repeat number							总计 Total	比例/% Ratio
	5	6	7	8	9	10 ~ 20	> 20		
1	0	0	0	0	0	8800	950	9750	56.30
2	0	1331	635	391	239	418	305	3319	19.16
3	2524	901	342	134	51	61	1	4014	23.18
4	98	29	14	3	0	1	0	145	0.84
5	25	6	0	0	0	1	0	32	0.18
6	48	5	2	2	2	0	0	59	0.34
总计 Total	2695	2272	993	530	292	9281	1256	17319	-
比例/% Ratio	15.56	13.12	5.73	3.06	1.69	53.59	7.25		

为主,共 9 281 个,占总 EST-SSR 的 53.59%;其次是 5~9 次重复,共 6 782 个,占 39.16%;20 次以上的重复较少,共 1 256 个,占 7.25%。

从辣椒 EST-SSR 核苷酸基序类型来看(表 4),EST-SSR 以单核苷 A/T 和 G/C 重复基序为主要类型,约 9 750 个,占总 SSR 的 56.30%,其基序重复主要分布在 10~20 次重复,约占单核苷重复序列的 97.2%,最长的达单核苷酸重复为 146 bp;其次是二、三核苷酸重复基序,其出现频率分别为 19.16%、23.18%,以 5~11 次重复为主。二核苷酸重复序列长度集中在 12~16 bp 范围内,约占二核苷酸重复序列的 70.60%,其中以 AG/CT 最多,约占二核苷酸重复序列的 58.02%,CG/CG 二核苷重复序列最少,约占 0.39%;三核苷酸重复序列主要集中在 15~18 bp 范围,约占三核苷酸重复序列的 85.32%,其中以 AAC/GTT 最多约占 27.80%,AAG/CTT 次之,约占 21.49%,ACG/CGT 三核苷酸重复序列最少,约占 0.62%;四、五、六核苷酸占总 SSR 重复序列的 0.13%。

表 4 辣椒 EST-SSR 基序类型分布

Table 4 The distribution of types for EST-SSR in pepper

SSR 基序 SSR motif	重复次数 Repeat number	SSR 基序 SSR motif	重复次数 Repeat number
A/T	7878	AAT/ATT	326
C/G	1872	ACC/GGT	370
AC/GT	683	ACG/CGT	25
AG/CT	1926	ACT/AGT	140
AT/AT	697	AGC/CTG	276
CG/CG	13	AGG/CCT	335
AAC/GTT	1116	ATC/ATG	471
AAG/CTT	863	CCG/CGG	92

2.2 EST-SSR 引物筛选与验证

对含 SSR 位点的 13 830 条 EST 序列进行引物设计,共设计了 10 468 对 SSR 位点特异引物,占总 SSR 位点的 60.44%。为验证引物的多态性,对 3 个不同来源的数据分别建库,首先利用 iAssembler 拼接软件对辣椒两个转录组原始 reads 分别进行组装,9704B 与 HDA149 分别产生 553 000 contigs、758 000 contigs,其进一步被组装 scaffolds,分别达到 132 311 和 152 710 条,最后拼接分别获得 90 000 和 105 000 unigenes,序列平均长度分别为 500 和 520 bp;公共数据库单独拼接获得 31 000 unigenes,序列平均长度 750 bp。

采用 E-PCR 对 3 个不同来源的数据库进行引物的多态性电子扩增,共产生 1 758 对多态性候选引物,剔除来源于同一数据库的非特异扩增引物,最后得到 1 538 对理论上存在多态性的引物。分析发现其中有 579 (37.64%) 对多态性 SSR 位于 5'非转录区(UTR),多为二、三核苷酸重复基序。为了验证其引物的有效性,随机挑选 20 对不同重复单元(二、三、四、五、六核苷酸)的引物对辣椒(9704B) DNA 进行扩增,结果表明,19 对引物(95%)在辣椒中能扩增出清晰条带,1 对引物没有扩增产物。在 19 对特异性引物中,15 对(78.94%) PCR 扩增产物与预期大小相符合,有 3 对(15.78%) 扩增产物长度超过预期,1 对引物(5.26%) 扩增产物小于预期。

2.3 EST-SSR 多态性分析

利用 19 对已验证的 EST-SSR 引物对 10 个不同辣椒材料进行多态性分析,其中 7 对(36.84%) SSR 引物在 10 个不同辣椒材料中存在多态性差异(表 5),如 ESSR6、ESSR10、ESSR14(图 1)。7

表 5 部分 E-PCR 筛选引物

Table 5 Part of filtering primers with E-PCR

引物号 Primer ID	来源 Source	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer
ESSR1	CL12306Contig1_1_1	GGTGGTCATGCCAAAGTTCT	TGTGAGAGGGTGGTTCTTGA
ESSR6	CL12382Contig1_2_1	ACATGGTTCAATGCCAACAA	GCATCAGAATCAGTTGAGGAGA
ESSR9	CL1452Contig2_1_1	CCGTCTTTACCAGACCGAAG	TTCATCATCCGGCATCAATA
ESSR10	CL15540Contig1_1_1	TTTGTTGGGTCAAATTGTTGG	AGCCATTTTTCGGCCTTAIT
ESSR14	CL3855Contig1_1_1	AGAAGAGGTAGAGGCGGAGG	TGAGCGAACTTGATCCTTGA
ESSR16	CL5892Contig1_1_1	GGAGCAGAATTTTCCACCC	GCGCCATATTCTTCTTGGA
ESSR17	CL6893Contig1_1_1	GTTCCTCAACGAAGGCCAG	ACCACCATCACCATACCCAT

对引物共检测到 31 个等位基因, 平均每对引物能检测到 4.42 个等位基因, 多态性信息量 (PIC) 范围为 0.33 ~ 0.89, 平均为 0.67。利用 SSR 多态性对 10 个辣椒材料进行聚类分析, 10 个辣椒材料被分为 3 类, 第 1 类为湖南地方品种 9704B, 果实属于牛角椒类型; 第 2 类是博辣 5 号和 CM334, 果实属于尖椒类型; 第 3 类为甜椒类型或具有甜椒血统类型, 如茄门和 Early Calwonder, HDA149 与 PBC 602 等聚到一起 (图 2)。

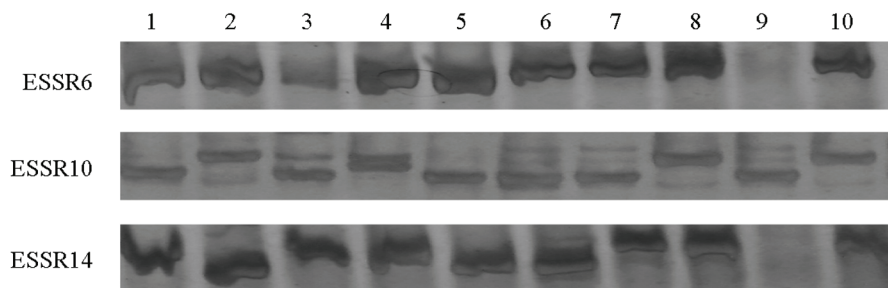


图 1 多态性引物在不同辣椒材料中的扩增

1: PI201234; 2: PBC137; 3: PBC602; 4: HDA149; 5: Early Calwonder;
6: 茄门; 7: 9704B; 8: 湘研 1 号; 9: 博辣 5 号; 10: CM334。

Fig. 1 PCR product of polymorphism of EST-SSR primers in different pepper varieties

1: PI201234; 2: PBC137; 3: PBC602; 4: HDA149; 5: Early Calwonder;
6: Qiemen; 7: 9704B; 8: Xiangyan 1; 9: Bola 5; 10: CM334.

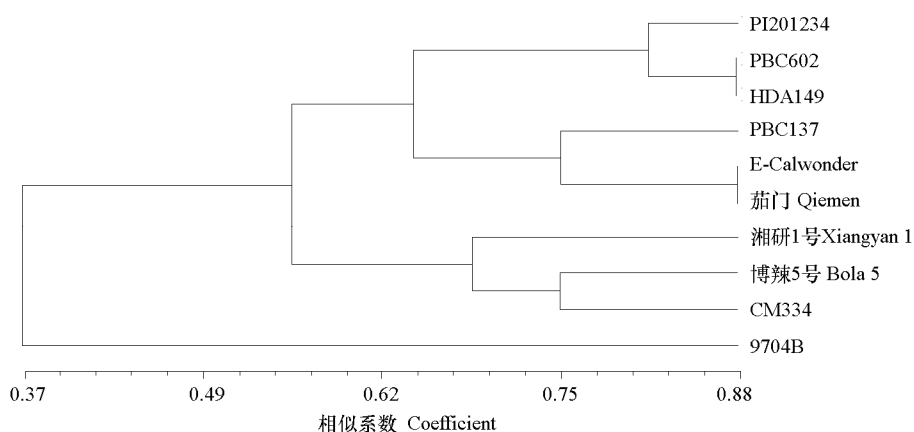


图 2 供试辣椒材料的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 Cluster diagram for tested pepper cultivars by UPGMA method

3 讨论

随着高通量测序技术的发展, EST 数据不断增加, 使得 EST-SSR 标记将更加丰富。近些年已有不少研究者基于公共数据库挖掘 EST-SSR, 并在品种鉴定及改良、资源分析、遗传图谱构建、功能基因发掘等方面得到了广泛应用 (Yi et al., 2006; Portis et al., 2007; Yang et al., 2009)。

对辣椒 221 037 条 unigenes (97.3 Mb) 序列进行 SSR 搜索, 筛选到 17 319 个 SSR 位点 (7.83%), 其发生频率为 1/56 kb, 其 SSR 出现频率相对比小麦 (3.2%), 高粱 (3.6%), 水稻 (4.7%) 等作物高 (Kantety et al., 2002), 这种差异可能与 SSR 搜索标准、数据库大小及物种等有关。在各物种 EST-SSRs 中, 一般三核苷酸频率最高 (Liang et al., 2009a), 少数几种双子叶植物的 EST-SSR 以二核苷酸重复为主要类型 (Kumapla & Mukhopadhyay, 2005)。本研究中, 辣椒 EST-SSR 除单核苷酸重复序列外, 最多的是三核苷酸重复序列, 其次是二核苷酸重复序列。在二核苷酸重复序列中,

AG/GA/CT/TC 二核苷酸重复为主要类型, 出现频率最高 (占 99.61%), CG/GC 仅出现 13 次约占 0.39%。三核苷酸重复序列中, 主要以 AAC/GTT、AAG/CTT 三核苷酸重复为主要基元, 不同于玉米 (CCG/GGC), 水稻 (AGG/TCC)、大麦 (CCG/GGC)、高粱和大豆 (AAG/TTC)、番茄 (AAT/ATT) 的三核苷酸重复主导类型 (Areshchenkova & Ganai, 2002; Kantety et al., 2002), 这种差异可能与植物本身 EST-SSR 特点、EST 数据来源和数量等有关。

根据 13 830 条 EST 序列进行引物设计, 共设计了 10 468 对 SSR 位点特异引物, 利用 E-PCR 筛选出多态性引物 1 538 对, 在随机挑选的 20 对引物中, 有 19 对引物实现有效扩增, 较高的扩增效率得益于 EST 数据量大和拼接质量较高。19 对有效扩增引物中, 有 7 对引物在 10 个特定的辣椒材料中存在明显多态性, 占 36.84%。这说明辣椒 EST 序列中 SSR 位点多, EST-SSR 扩增率较高, 但是其多态性相对较低, 主要源于其 DNA 转录序列的保守性。因此, EST-SSR 标记可用于亲缘关系相对较远的物种 (Yi et al., 2006; Simko, 2009; Ting et al., 2010)。

7 对引物共检测到 31 个等位基因, 平均每对引物 4.42 个, 多态性信息量 (PIC) 范围为 0.33 ~ 0.89, 平均为 0.61。PIC 是衡量基因变异程度高低的多态信息含量的指标: 当 $PIC > 0.5$ 时, 该位点为高度多态性位点; 当 $0.25 < PIC < 0.5$ 时, 该位点为中度多态性位点; 当 $PIC < 0.25$ 时, 为低度多态性位点 (Botstein et al., 1980)。本研究中选用的 7 对 SSR 引物多态性位点相对较高, 是进行各种遗传操作的有效 SSR 标记位点。这 7 对引物目前还尚未报道, 同时也是对辣椒 SSRs 数据库的有效补充。另外, 10 个辣椒材料可被 UPGMA 聚为 3 类, 其聚类结果与前人研究结果基本一致 (Lefebvre et al., 1993), 这表明所研究的 SSR 位点能比较准确的反映 10 个辣椒材料之间的差异, 然而更多了解辣椒资源之间的遗传信息和遗传关系, 还需要使用更多的 SSR 标记。

目前, 辣椒可以利用的 SSR 标记数量非常有限 (Paran & Fallik, 2011), 辣椒 EST 序列的增加为挖掘新的 SSR 提供了丰富的资源。

References

- Areshchenkova T, Ganai M. 2002. Comparative analysis of polymorphism and chromosomal location of tomato microsatellite markers isolated from different sources. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 104: 229 - 235.
- Bennett M, Leitch I. 2005. Nuclear DNA amounts in angiosperms: Progress, problems and prospects. *Annals of Botany*, 95: 45 - 50.
- Botstein D, White R L, Skolnick M, Davis R W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32: 314 - 324.
- Cho Y G, Ishii T, Temnykh S, Chen X, Lipovich L, McCouch S R, Park W D, Ayres N, Cartinhour S. 2000. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 100: 713 - 722.
- Eujayl I, Sledge M, Wang L, May G, Chekhovskiy K, Zwonitzer J, Mian M A R. 2004. Medicago truncatula EST-SSRs reveal cross-species genetic markers for Medicago spp. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 108: 414 - 422.
- Gao L, Jing R, Huo N, Li Y, Li X, Zhou R, Chang X, Tang J, Ma Z, Jia J. 2004. One hundred and one new microsatellite loci derived from ESTs (EST-SSRs) in bread wheat. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 108: 1392 - 1400.
- Gao L, Tang J, Li H, Jia J. 2003. Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches. *Molecular Breeding*, 12: 245 - 261.
- Guo S, Zheng Y, Joung J G, Liu S, Zhang Z, Crasta O R, Sobral B W, Xu Y, Huang S, Fei Z. 2010. Transcriptome sequencing and comparative analysis of cucumber flowers with different sex types. *BMC Genomics*, 11: 384 - 391.
- Gupta P K, Rustgi S, Sharma S, Singh R, Kumar N, Balyan H S. 2003. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Mol Genet Genomics*, 270: 315 - 323.
- Ince A G, Karaca M, Onus A N. 2010. Polymorphic microsatellite markers transferable across *Capsicum* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 28: 285 - 291.

- Kantety R V, La Rota M, Matthews D E, Sorrells M E. 2002. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Molecular Biology*, 48: 501 – 510.
- Katti M V, Ranjekar P K, Gupta V S. 2001. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 18: 1161 – 1173.
- Kumapata S P, Mukhopadhyay S. 2005. Mining and survey of simple sequence repeats in expressed sequence tags of dicotyledonous species. *Genome*, 48: 985 – 998.
- Lefebvre V, Palloix A, Rives M. 1993. Nuclear RFLP between pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.). *Euphytica*, 71: 189 – 199.
- Liang X, Chen X, Hong Y, Liu H, Zhou G, Li S, Guo B. 2009a. Utility of EST-derived SSR in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) and *Arachis* wild species. *BMC Plant Biol*, 9: 35 – 48.
- Liang X, Chen X, Hong Y, Liu H, Zhou G, Li S, Guo B. 2009b. Utility of EST-derived SSR in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) and *Arachis* wild species. *BMC Plant Biology*, 9: 35: 2723 – 2730.
- Liu K, Muse S V. 2005. PowerMarker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*, 21: 2128 – 2129.
- Lu Y, Li H, Jia Q, Huang H, Tong Z. 2011. Identification of SSR loci in *Betula luminifera* using birch EST data. *Journal of Forestry Research*, 22: 2011 – 2014.
- Lü Jing, Shi Qiu-xiang, Ren Yi, Zhang Zhong-hua, Huang San-wen. 2011. Screening and evaluation of 23 high polymorphism SSR markers in cucumber. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (11): 2140 – 2148. (in Chinese)
- 吕 婧, 时秋香, 任 毅, 张忠华, 黄三文. 2011. 黄瓜 23 对高多态性 SSR 标记的筛选与评价. *园艺学报*, 38 (11): 2140 – 2148.
- Morgante M, Hanafey M, Powell W. 2002. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics*, 30: 194 – 200.
- Paran I, van der Voort J R, Lefebvre V, Jahn M, Landry L, van Schriek M, Tanyolac B, Caranta C, Chaim A B, Livingstone K. 2004. An integrated genetic linkage map of pepper (*Capsicum* spp.). *Molecular Breeding*, 13: 251 – 261.
- Paran I, Fallik E. 2011. Breeding for Fruit Quality in Pepper (*Capsicum* spp.). *Breeding for Fruit Quality*, 307 – 322.
- Patel A S, Sasidharan N, Vala A G. 2011. Research article genetic relation in *Capsicum annum* L. cultivars through microsatellite markers: SSR and ISSR. *Electronic Journal of Plant Breeding*, 2: 67 – 76.
- Portis E, Nagy I, Sasvari Z, Stägel A, Barchi L, Lanteri S. 2007. The design of *Capsicum* spp. SSR assays via analysis of in silico DNA sequence, and their potential utility for genetic mapping. *Plant Science*, 172: 640 – 648.
- 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.
- Scott K D, Eggler P, Seaton G, Rossetto M, Ablett E M, Lee L S, Henry R J. 2000. Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 100: 723 – 726.
- Simko I. 2009. Development of EST-SSR markers for the study of population structure in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J Hered*, 100: 256 – 262.
- Thiel T, Michalek W, Varshney R K, Graner A. 2003. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet*, 106: 411 – 422.
- Ting N C, Zaki N M, Rosli R, Low E T, Ithnin M, Cheah S C, Tan S G, Singh R. 2010. SSR mining in oil palm EST database: Application in oil palm germplasm diversity studies. *J Genet*, 89: 135 – 145.
- Varshney R K, Sigmund R, Borner A, Korzun V, Stein N, Sorrells M E, Langridge P, Graner A. 2005. Interspecific transferability and comparative mapping of barley EST-SSR markers in wheat, rye and rice. *Plant Science*, 168: 195 – 202.
- Xu Xiao-yan, Liu Feng, Kang Hou-xiang, Zhang Zhu-qing, Zou Xue-xiao, Xie Bing-yan. 2011. Fine mapping of the root-knot nematode resistance gene *Me3* in pepper. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (2): 288 – 294. (in Chinese)
- 许小艳, 刘 峰, 康厚祥, 张竹青, 邹学校, 谢丙炎. 2011. 辣椒抗根结线虫基因 *Me3* 的精细定位. *园艺学报*, 38 (2): 288 – 294.
- Yang H B, Liu W Y, Kang W H, Jahn M, Kang B C. 2009. Development of SNP markers linked to the L locus in *Capsicum* spp. by a comparative genetic analysis. *Molecular Breeding*, 24: 433 – 446.
- Yi G, Lee J M, Lee S, Choi D, Kim B D. 2006. Exploitation of pepper EST-SSRs and an SSR-based linkage map. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 114: 113 – 130.