

郭广君, 孙 茜, 刘金兵, 等. 基于辣椒基因组重测序的 InDel 标记开发及应用[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(6): 1400-1406.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.06.032

基于辣椒基因组重测序的 InDel 标记开发及应用

郭广君, 孙 茜, 刘金兵, 潘宝贵, 刁卫平, 戈 伟, 高长洲, 王述彬
(江苏省农业科学院蔬菜研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 基于全基因组重测序进行分子标记开发是一种新的方法和趋势。本研究基于辣椒全基因组重测序数据鉴定出的 InDel 位点, 在 2 号染色体上随机选择并设计了 40 个 InDel 标记, 以 24 份辣椒种质验证其有效性。结果显示: 40 个标记可获得扩增产物, 其中具有多态性的标记 35 个, 多态率为 87.5%, 同时 35 个标记可以有效地区分 24 份辣椒种质的多样性和特异性。以上结果表明, 基于重测序数据开发辣椒 InDel 标记切实可行。

关键词: 辣椒; 重测序; InDel 标记; 种质鉴定

中图分类号: S641.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)06-1400-07

Development and application of pepper InDel markers based on genome re-sequencing

GUO Guang-jun, SUN Qian, LIU Jin-bing, PAN Bao-gui, DIAO Wei-ping, GE Wei,
GAO Chang-zhou, WANG Shu-bin

(*Institute of Vegetables, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement, Nanjing 210014, China*)

Abstract: The development of molecular markers based on genome re-sequencing is a new method and trend. In this research, forty InDel loci on chromosome 2 of pepper were chosen randomly and designed by screening the InDel loci that had been identified based on pepper genome re-sequencing data. The effectiveness of InDel markers were tested on 24 pepper germplasm. Among the forty InDels, thirty-five were polymorphic, accounting for 87.5% of the total, and could reveal the genetic diversity and specificity of the tested pepper germplasm, indicating that development of pepper InDel markers based on genome re-sequencing data was practicable.

Key words: pepper; re-sequencing; InDel marker; germplasm identification

辣椒(*Capsicum* spp.)属于茄科(Solanaceae)辣

椒属(*Capsicum*)作物,作为一种重要的蔬菜作物和调味品,广泛栽培于南北美、亚洲、欧洲和大洋洲等世界各地。随着消费者需求的多样性,利用传统方法在辣椒的遗传改良上取得了很大进展,但是分子标记^[1]和第二代测序技术^[2]的出现为辣椒的遗传改良提供了更大的机遇^[3]。目前辣椒分子标记的开发和应用主要集中于利用公用数据或者基因组文库开发 SSR 标记^[4-8]。随着高通量测序技术的发展和辣椒基因组数据的发布,使得辣椒分子标记的开发和应用进入了一个新的阶段^[9-10],第三代分子标

收稿日期: 2015-07-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31401866); 江苏省自然科学基金项目(4111415); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(14)5013]; 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2012AA100103); 现代农业产业技术体系建设专项基金项目(CARS-25)

作者简介: 郭广君(1986-), 女, 山东聊城人, 博士, 助理研究员, 研究方向为蔬菜遗传育种。(Tel) 15996286331; (E-mail) ggi-198@163.com

通讯作者: 王述彬, (E-mail) wangsbep@vip.tom.com

记 *SNP* 标记和 InDel 标记的开发和应用在辣椒中逐渐广泛^[11-14]。

插入/缺失多态性 (Insertion/deletion, InDel) 标记是由于等位基因位点处的 DNA 序列在不同个体间发生了核苷酸片段的插入/缺失而产生的长度多态性变异^[15]。根据目标位点两侧的序列设计特异引物进行 PCR 扩增, 扩增片段的长度多态性即是 InDel 标记。在整个基因组中, InDel 标记的多态性频率仅次于 *SNP* 标记, 远高于 *SSR* 标记。InDel 标记多态性可通过聚合酶链式反应 (PCR) 和琼脂糖凝胶电泳或非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳等简单的步骤达到基因分型的目的^[16-17], 相对于 *SNP* 标记, 其标记的设计和检测更为简易, 应用也更为方便^[18]。此外, InDel 标记的另一优点是不可能在同 1 个基因组位点上发生同样长度的 2 个 InDel 位点突变, 所以具有共同 InDel 突变位点的 2 个物种间代表其具有血缘一致性 (Identity-by-descent)^[19]。综上所述, InDel 标记为共显性标记, 具有较好的稳定性和较为丰富的多态性, 是高分辨率图谱构建, 关联分析和基因定位等方面最佳的候选标记^[20]。但是, 辣椒中已开发和应用的 InDel 标记数量非常少, 本研究的目的在于基于辣椒基因组重测序数据开发 InDel 标记, 利用不同遗传背景的辣椒种质对开发出的 InDel 标记进行验证, 筛选获得有效的 InDel 标记, 进一步探讨 InDel 标记在种质鉴定中的应用。

1 材料与方法

1.1 InDel 位点的挖掘

本研究利用重测序数据与参考基因组进行比对查找 InDel 位点。参考基因组版本为 pepper. V.1.55, 下载网址: <http://peppergenome.snu.ac.kr/download.php>。采用 illumina HiSeqTM2500 测序平台对一年生辣椒 (*Capsicum annuum*) “G29” 和灌木状辣椒 (*Capsicum. frutescens*) “G108” 进行测序。将测序得到的原始 Reads 进行质量评估并过滤得到 Clean Reads。利用 bwa 软件比对定位 Clean Reads 在参考基因组上的位置。InDel 的检测主要使用 GATK 软件工具包实现。根据 Clean Reads 在参考基因组的定位结果, 使用 Samtools 进行去重复 (Mark duplicates), 使用 GATK 软件进行局部比对 (Local re-alignment) 和碱基质量值校正 (Base recalibration) 等

预处理, 以保证检测结果的准确性, 再使用 GATK 软件进行变异检测和校准, 选取可靠的 InDel 位点^[21-22]。利用 SnpEff 软件根据 InDel 位点在参考基因组上的位置信息, 对比参考基因组的基因、CDS 位置等信息对其进行注释和预测其影响。

1.2 InDel 引物设计和分析

根据重测序数据中预测到 InDel 位点, 筛选出插入/缺失碱基数为 5~10 个碱基的位点。基于辣椒基因组序列, 将筛选出的位点定位在基因组上, 取 InDel 位点两翼各 200 bp 碱基长度, 共 401 bp 长度进行引物设计。采用 Primer 3.0 进行引物设计, 上游引物设计范围在 1~195 bp, 下游引物设计范围为 205~401 bp, 产物大小为 150~250 bp, 退火温度为 52~60 ℃。

优化后的扩增反应采用 10 μl 反应体系, 包括 20 ng 模板 DNA、5 μl 2×Mix 混合液 (含 Mg²⁺ 的 10× PCR buffer、2.5 mmol/L 的 dNTPs、0.5 U Taq DNA 聚合酶)、每个引物终浓度为 0.2 μmol/L。反应程序为 94 ℃ 预变性 4 min; 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 复性 30 s, 72 ℃ 延伸 40 s, 循环 30 次; 72 ℃ 延伸 7 min, 置于 4 ℃ 下保存。扩增产物用 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染显色, 统计分析条带类型。

1.3 供试辣椒种质及其 DNA 提取

用于检测标记有效性的辣椒材料来源于国外和国内多个科研单位, 其中包括一年生辣椒 (*Capsicum annuum*) 21 份、灌木状辣椒 (*Capsicum frutescens*) 2 份、下垂辣椒 (*Capsicum baccatum*) 1 份。除 11 份辣椒品种外, 其余 13 份以 G 开头的材料为项目组引进的国外种质资源 (表 1)。采用改良 CTAB 法提取叶片的基因组 DNA^[23], 经琼脂糖凝胶电泳和微量分光光度计检测, DNA 浓度调至 50 ng/μl 备用。

2 结果与分析

2.1 辣椒 InDel 标记的鉴定

通过与参考基因组序列比对, 一年生辣椒品种 G29 和灌木状辣椒品种 G108 的全基因组范围内共检测到的 InDel 数量分别为 533 523 个和 1 664 770 个, 其中编码区的 InDel 数量分别为 1 019 个和 2 515 个, 具体结果见表 2。通过进一步比较分析, G29 和 G108 之间的全基因组范围内 InDel 数量为 1 586 427 个。

表 1 24 份供试辣椒种质基本信息

Table 1 The information of 24 tested pepper germplasm

序号	材料名称	种质来源	种属	果形	序号	品种名称	种质来源	种属	果形
1	海丰 10 号	北京海淀区植物组织培养实验室	<i>Capsicum annuum</i>	灯笼形甜椒	13	G48	亚洲蔬菜研究中心	<i>C. baccatum</i>	细长小果辣椒
2	厚皮茄门	山西太谷县中裕种苗中心	<i>C. annuum</i>	灯笼形甜椒	14	G22	亚洲蔬菜研究中心	<i>C. frutescens</i>	椭圆小果辣椒
3	富贵大椒	郑州金龙翔种子有限公司	<i>C. annuum</i>	牛角形辣椒	15	G108	亚洲蔬菜研究中心	<i>C. frutescens</i>	椭圆小果辣椒
4	雅迪	荷兰安沙种子集团公司	<i>C. annuum</i>	灯笼形甜椒	16	G29	德国	<i>C. annuum</i>	灯笼形甜椒
5	冀研 6 号	河北冀蔬科技有限公司	<i>C. annuum</i>	灯笼形甜椒	17	G05	德国	<i>C. annuum</i>	灯笼形甜椒
6	茄门	中国农业科学院蔬菜花卉研究所	<i>C. annuum</i>	灯笼形甜椒	18	G23	意大利	<i>C. annuum</i>	灯笼形甜椒
7	苏椒 5 号博士王	江苏省农业科学院蔬菜所	<i>C. annuum</i>	长灯笼辣椒	19	G41	亚洲蔬菜研究中心	<i>C. annuum</i>	细长小果辣椒
8	苏椒 14 号	江苏省农业科学院蔬菜所	<i>C. annuum</i>	牛角形辣椒	20	G54	亚洲蔬菜研究中心	<i>C. annuum</i>	羊角形辣椒
9	苏椒 15 号	江苏省农业科学院蔬菜所	<i>C. annuum</i>	牛角形辣椒	21	G68	亚洲蔬菜研究中心	<i>C. annuum</i>	羊角形辣椒
10	苏椒 16 号	江苏省农业科学院蔬菜所	<i>C. annuum</i>	长灯笼辣椒	22	G71	亚洲蔬菜研究中心	<i>C. annuum</i>	羊角形辣椒
11	苏椒 17 号	江苏省农业科学院蔬菜所	<i>C. annuum</i>	长灯笼辣椒	23	G88	亚洲蔬菜研究中心	<i>C. annuum</i>	细羊角辣椒
12	G115	亚洲蔬菜研究中心	<i>C. annuum</i>	圆锥形辣椒	24	G97	亚洲蔬菜研究中心	<i>C. annuum</i>	羊角形辣椒

表 2 全基因组和编码区 InDel 位点信息

Table 2 The information of InDel loci within the whole genome and CDS

区域	InDel 类型	InDel 数量	
		G29	G108
编码区	插入	535	1 166
	缺失	484	1 349
	杂合	903	1 612
	纯合	116	903
	总量	1 019	2 515
全基因组	插入	277 023	803 723
	缺失	256 500	861 047
	杂合	495 908	1 064 079
	纯合	37 615	600 691
	总量	533 523	1 664 770

2.2 InDel 标记有效性验证

根据预测的 InDel 位点,在 2 号染色体上随机选择了 40 个 InDel 位点设计引物,引物信息见表 3。以 24 份不同来源的辣椒材料验证标记的有效性。经过

PCR 和产物检测发现,40 对引物在 24 份辣椒材料中均能扩增出条带,扩增条带的大小与预测产物大小基本相同。如图 1 为引物 InDel-2-3 对 24 份辣椒种质 PCR 扩增结果。经统计,在 24 份材料中共扩增出 70 个清晰可辨的位点,其中 35 个标记表现出多态性,5 个无多态性,多态率达到 87.5%。

2.3 InDel 标记在品种和种质资源鉴定中的应用

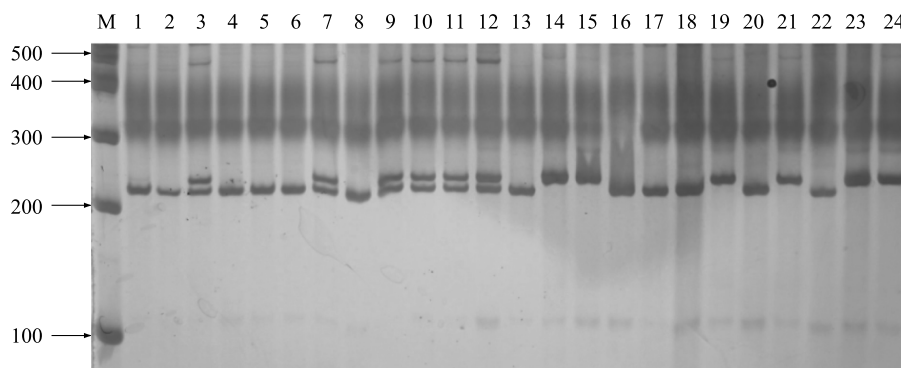
利用 Popgene32 软件对 40 对引物在 24 份辣椒材料中的扩增结果进行分析发现,每对引物反映的基因多样性指数范围为 0.08~0.50,其均值为 0.20; Shannon's 多样性信息指数分布在 0.17 至 0.80 之间,其均值为 0.34(表 3)。

利用 NTSYSpc 2.10e 中的 UPGMA 方法对 24 份材料进行聚类分析,由聚类结果(图 2)可以看出,在遗传相似系数 0.42 处,24 份辣椒种质分为 2 个大类,一类为 21 份一年生辣椒,另一大类为 2 份灌木状辣椒(*C.frutescens*)和 1 份下垂辣椒(*C.baccatum*)。21 份一年生辣椒中可以聚类为羊角形辣椒、牛角形(长灯笼形)辣椒和甜椒三大类别。同时,聚类结果显示

表 3 本研究开发的辣椒 InDel 标记信息

Table 3 The information of pepper InDel markers developed in the study

InDel 标记	上游引物序列 (5'→3')	下游引物序列 (5'→3')	产物大小 (bp)	Shannon's 信息指数	Nei's 基因多样性
<i>InDel-2-1</i>	TCTTTCTCCCGTCTCTCTGTG	AAATTCAAATGTCACTCGCATCT	204	0.17	0.08
<i>InDel-2-2</i>	TGCTCTAGAGATTCAAACACGAC	GAAAGTCATCGTACAAGGGCT	201	0.17	0.08
<i>InDel-2-3</i>	TTTCCTGCTGAAGCAAAGC	AGCGGAGTGTGTTGACAATTTCT	233	0.66	0.47
<i>InDel-2-4</i>	TGGTAGGGAAGTAGTTGGCATAT	TATGCGTGTACACCGTAGCA	213	0.29	0.15
<i>InDel-2-5</i>	GAGGACAAGTTCGGGGAGG	TTATTGGTCTTAAGCCGGGG	249	0.39	0.23
<i>InDel-2-6</i>	TGCATTAGGGGCTGATTCCA	CGCCACTGATCTTTCTCGAA	250	0.39	0.23
<i>InDel-2-7</i>	GCAAACGTCTCAATCCAATCCG	TGTATGGGGTTAGGGTCTCA	236	0.80	0.42
<i>InDel-2-8</i>	AGTCTCCGTGATGCAACTGA	TTGACTCACCACAGACTCC	203	0.30	0.16
<i>InDel-2-9</i>	TCGCCATCATCAAAACCACAC	CTCAATAGCGAATGTGGGCC	212	0.18	0.08
<i>InDel-2-10</i>	CGTAGATGAATGAAGCGAGTAGT	CACACAAGCCAAGGAACCTG	156	0	0
<i>InDel-2-11</i>	TGCGGATCTTAGAGGTGGT	GTACGTTGTCAGTGTGGATCG	232	0.17	0.08
<i>InDel-2-12</i>	TGAAAATGAAAGTGACCCGA	TGTTGATATTTGCTAAGCTGTGC	189	0.69	0.50
<i>InDel-2-13</i>	GTCCAAAATTAACCTGCGTATCT	TCTCTCTCGTTTGGTGGGG	211	0.29	0.15
<i>InDel-2-14</i>	TCGAGGGCAATATACAGGAGA	TTGATAACGGTGGTGGCTGA	156	0.62	0.34
<i>InDel-2-15</i>	GTGGCATGCTTGGTGGA	GGACCATGCCACCTACGTAA	217	0.39	0.16
<i>InDel-2-16</i>	GACTCAACCCGCAACAGAAG	CAGTCAAAGAGAGGCACAAACA	229	0.68	0.49
<i>InDel-2-17</i>	TGTTTTATGCGGTGCCATGC	AAAAGTGGACTGTAGGGCGTA	225	0.46	0.23
<i>InDel-2-18</i>	TGCTTCAGTTGAGTTGTCCA	TAAATCCCTTGTGGTGGCT	211	0.18	0.09
<i>InDel-2-19</i>	GGTTGGTTAGCATGGGTGTG	CGAAACCGAACCCTTAAAGAC	168	0.38	0.22
<i>InDel-2-20</i>	ACCCACGACTTAAACTCAAAACT	TCAAGAGAGAAATAGTGATGCCA	107	0.17	0.08
<i>InDel-2-21</i>	GGCTGATCGGAATTCAGCA	TCACCCTAATATCAACTGCCTCA	219	0.17	0.08
<i>InDel-2-22</i>	ACAGAAACAAAGTACCGCTGT	GGGCTCGTTTCATTTCTCCC	155	0.45	0.28
<i>InDel-2-23</i>	ACCAGACTAGAAAGCCACCT	AGGAAGTGAATCAGAGACAGAGA	178	0	0
<i>InDel-2-24</i>	TCTACCATGAGCACACAAATCC	AGAAGGTCAGTCAGTCACGA	180	0.48	0.30
<i>InDel-2-25</i>	CCATCAGCACCAGTCCATCT	ACTTTAACCTTGTTCACCAGG	224	0.17	0.08
<i>InDel-2-26</i>	TCCACATGCCTAAGTTCCCA	TGTGCTGAATCCGTGGGTC	233	0.33	0.16
<i>InDel-2-27</i>	GGGCAAAATGGTCCCAATAAGT	AAACAACITACTGCCAACTTTGT	170	0.29	0.15
<i>InDel-2-28</i>	ACCAACAAAGTCTCAAACAGCT	CGCCTTCAATGGTGCCTTTGT	171	0	0
<i>InDel-2-29</i>	ACATAACTGGGTCTGAAACATGA	CCCGAGCTTTTCATGCTCTGA	197	0	0
<i>InDel-2-30</i>	AGGCAGAATGGTCAAGGGAT	TTTCTTTTAGGCCGCGTTTG	222	0.34	0.19
<i>InDel-2-31</i>	TCGGCAAACCTTGGTTCAAAT	GCCATTGATCAGCATCCTTTGT	176	0.17	0.08
<i>InDel-2-32</i>	ATTACAGCGCTCACAGGCTA	TGACCTTGAAGTTGACCGTTTC	220	0.69	0.50
<i>InDel-2-33</i>	ACTGGATCATTGCTGGGACC	CGCTAGAAACTGCAACTCGA	178	0.79	0.50
<i>InDel-2-34</i>	TGATTGGAGAAGAGATGGTCAAA	GGGTTGGAACCTGCAAAACC	171	0	0
<i>InDel-2-35</i>	TCGATCATGATGTGCACCAA	ACCTCGGACAGTGTGTTAGCT	200	0.38	0.22
<i>InDel-2-36</i>	ACAAATATCGGTGCCTGCATAA	GAGTTGCGATGCTGTGAAA	208	0.17	0.08
<i>InDel-2-37</i>	CGTGTATTCCTTGAAAGCGGA	ACTCCACCTGCAAGTCTCAA	204	0.38	0.22
<i>InDel-2-38</i>	TGCGGACTTTTATAGTGATGG	TGTTGAACAATGTCGATGTGTAA	197	0.38	0.22
<i>InDel-2-39</i>	AAGAAGCTCAGTTGGGCACT	CTCAACGGCTTCACACTTGA	160	0.38	0.22
<i>InDel-2-40</i>	GCATCATGCGCACAAACATTG	CGACTCTGCTTCATCCGTTTC	203	0.45	0.29



M: Marker; 1~24: 24 份供试辣椒种质的序号, 材料名称见表 1。

图 1 引物 InDel-2-3 对 24 份辣椒种质的扩增结果

Fig.1 Amplification of 24 pepper germplasm DNA with marker InDel-2-3

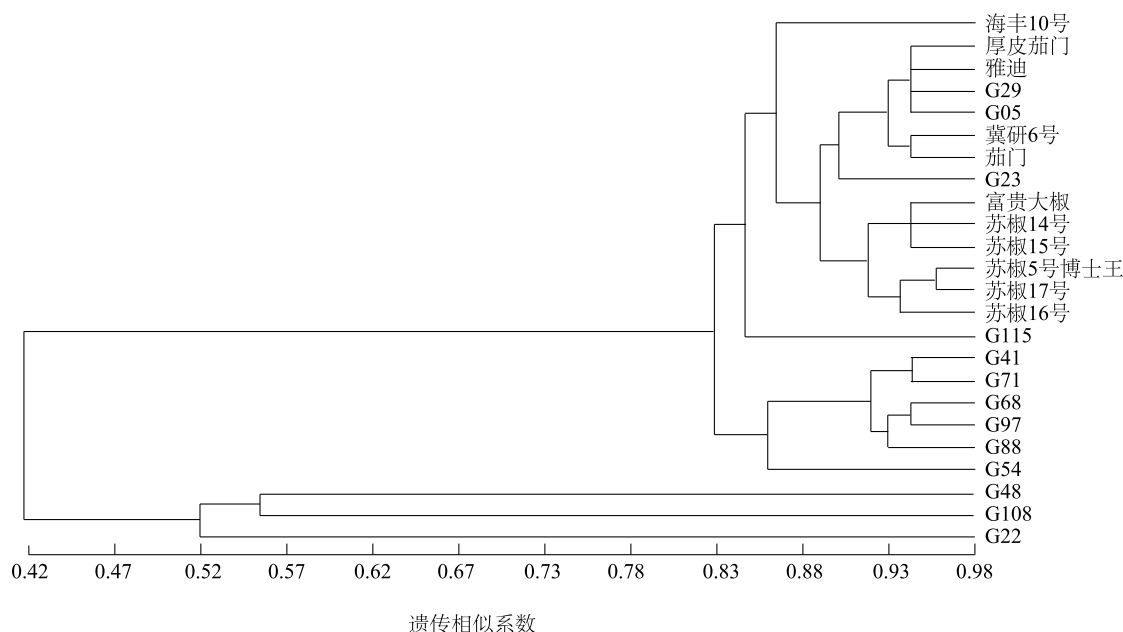


图 2 基于 Nei's 遗传距离的 24 份辣椒种质的 UPGMA 聚类图

Fig.2 UPGMA dendrogram of 24 pepper germplasm based on the Nei's genetic distance

牛角形(长灯笼形)辣椒和甜椒相似度更高,同一单位品种间相似度高于不同单位间相似度。

3 讨论

InDel 标记为共显性标记,具有较好的稳定性和较为丰富的多态性。虽然在整个基因组中,其多态性频率次于 SNP 标记^[24],但是,相对于 SNP 标记, InDel 标记在引物设计、多态性检测等方面更为简易,应用也更为方便^[16-17, 25]。但是,目前辣椒中

InDel 标记的开发数量较少,应用较为有限,这一现状急待改善^[11]。

本研究基于全基因组重测序数据,通过与参考基因组序列比对,在一年生辣椒品种 G29 和灌木状辣椒品种 G108 的全基因组范围内检测到的 InDel 数量分别为 533 523 个和 1 664 770 个。以上结果说明利用全基因组重测序技术可以在辣椒中更好地挖掘 InDel 位点,为全基因组范围内的 InDel 设计提供了更优选择。这一观点已经在包括辣椒在内的多个

物种中得以验证^[12,26-27]。

利用 24 份辣椒材料对 2 号染色体上的 40 个标记的有效性进行验证,发现 24 份材料在 40 个标记中共扩增出 70 个清晰可辨的位点,其中 35 个标记表现出多态性,多态率达到 87.5%。这一结果很好地验证了本研究开发出的 InDel 标记的有效性和较高的多态性。目前辣椒分子标记的开发和应用主要集中于利用公用数据或者基因组文库开发 SSR 标记,但是大部分研究结果表明 SSR 标记的多态性及其应用率远低于 InDel 标记。如 Huang 等人基于数据库中的辣椒序列开发出 12 个 SSR 标记,其中多态性标记为 5 个,多态率为 41.7%^[5]; Lee 等构建辣椒分子遗传连锁图谱时开发出 76 个 SSR 标记,其中具有多态性的标记为 46 个,多态率为 60.5%^[4]; Yi 等开发出 1 201 个 EST-SSR 标记,其多态性标记只有 150 个,多态率仅为 29.2%^[6]; Huang 等依据 EST 序列开发出 SSR 标记 755 个,利用 8 份辣椒栽培种对其中的 210 个进行验证,其多态性标记为 127 个,多态率为 60.5%^[8]; Shirasawa 等基于辣椒 EST 序列设计了 5 751 个 SSR 标记,利用辣椒材料对其中 77 个进行验证,其中 60 个表现出多态性,多态率为 77.9%^[7]。但是,也有少数研究结果显示, InDel 标记与 SSR 标记的多态率并无明显差异。Li 等利用 InDel 标记构建辣椒种内遗传图谱时显示, 1 000 个 InDel 标记中 251 个标记可以成功应用于图谱构建,其多态率为 25.1%^[11]。随后,该团队(2015 年)基于 SSR 和 InDel 标记构建辣椒种间遗传图谱时,分别筛选了 1 038 个 InDel 标记和 674 个 SSR 标记,其中多态性标记分别为 140 个和 102 个,多态率分别为 13.5%和 15.1%^[12]。

利用 NTSYSpc 2.10e 中的 UPGMA 方法对 24 份材料进行聚类分析,结果表明 35 个 InDel 标记不仅可以有效区分出 21 份一年生辣椒、2 份灌木状辣椒和 1 份下垂辣椒,而且 21 份材料中又可以聚类为不同种类,其聚类结果与表型特征非常吻合。这一结果表明 InDel 标记在种质资源的遗传分析、品种鉴定和品种保护方面具有极大的应用价值。但同一单位育成品种的相似度很高,说明可利用的辣椒种质的遗传背景较窄,对于品种改良极为不利,需要开发和应用新的种质进行品种的选育和改良。

总的来说,基于全基因组重测序数据开发 InDel 标记可以有效地应用于辣椒种质鉴定,遗传图谱的

构建,关联分析和基因定位等方面,是辣椒种质资源开发利用和分子标记辅助育种的高效工具。

参考文献:

- [1] 王述彬,刁卫平,刘金兵,等. 辣椒胞质雄性不育相关基因的克隆及表达[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(4): 833-838.
- [2] 徐婉莉,裴徐梨,荆赞革,等. 辣椒 *actin* 基因电子克隆与生物信息学分析[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(5): 46-48.
- [3] RAMCHIARY N, KEHIE M, BRAHMA V, et al. Application of genetics and genomics towards *Capsicum* translational research [J]. Plant Biotechnology Reports, 2014, 8(2): 101-123.
- [4] LEE J M, NAHM S H, KIM Y M, et al. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 108(4): 619-627.
- [5] HUANG S W, ZHANG B X, MILBOURNE D, et al. Development of pepper SSR markers from sequence databases [J]. Euphytica, 117, 2 (2001): 163-167.
- [6] YI G, LEE J M, LEE S, et al. Exploitation of pepper EST-SSRs and an SSR-based linkage map [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 114(1): 113-130.
- [7] SHIRASAWA K, ISHII K, KIM C, et al. Development of *Capsicum* EST-SSR markers for species identification and in silico mapping onto the tomato genome sequence [J]. Molecular Breeding, 2013, 31(1): 101-110.
- [8] HUANG H H, ZHANG Z H, ZHANG Z H, et al. Analysis of SSRs information in *Capsicum* spp. from EST database [J]. Agricultural Sciences in China, 2011, 10(10): 1532-1536.
- [9] QIN C, YU C, SHEN Y, et al. Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into *Capsicum* domestication and specialization [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, 111(14): 5135-5140.
- [10] KIM S, PARK M, YEOM S I, et al. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species [J]. Nature Genetics, 2014, 46(3): 270-278.
- [11] LI W, CHENG J, WU Z, et al. An InDel-based linkage map of hot pepper (*Capsicum annuum*) [J]. Molecular Breeding, 2015, 35(1): 219-319.
- [12] TAN S, CHENG J W, ZHANG L, et al. Construction of an interspecific genetic map based on InDel and SSR for mapping the QTLs affecting the initiation of flower primordia in pepper (*Capsicum* spp.) [J]. Plos One, 2015, 10(3): 1-15.
- [13] LU F H, KWON S W, YOON M Y, et al. SNP marker integration and QTL analysis of 12 agronomic and morphological traits in F^{sub}8[^] RILs of pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Molecules and Cells, 2012, 34(1): 25-34.
- [14] LIU W Y, KANG J H, JEONG H S, et al. Combined use of bulked segregant analysis and microarrays reveals SNP markers pinpointing a major QTL for resistance to *Phytophthora capsici* in pepper [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2014, 127(11):

- 2503-2513.
- [15] JANDER G, NORRIS S R, ROUNSLEY S D, et al. Arabidopsis map-based cloning in the post-genome era [J]. *Plant Physiology*, 2002, 129(2):440-450.
- [16] VÄLIÜ, BRANDSTRÖM M, JOHANSSON M, et al. Insertion-deletion polymorphisms (indels) as genetic markers in natural populations [J]. *BMC Genet*, 2008, 9(1):1-8.
- [17] VARSHNEY R. Gene-based marker systems in plants: high throughput approaches for marker discovery and genotyping [M]. New York; Springer Netherlands, 2009.
- [18] HAYDEN M J, TABONE T, MATHER D E. Development and assessment of simple PCR markers for SNP genotyping in barley [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2009, 119(5):939-951.
- [19] SHEDLOCK A M, OKADA N. SINE insertions: powerful tools for molecular systematics, *Bioessays* [J]. 2000, 22(2):148-160.
- [20] MILLS E R, LUTTIG T C, LARKINS E C, et al. An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome [J]. *Genome Research*, 2006, 16:1182-1190.
- [21] MCKENNA A, HANNA M, BANKS E, et al. The genome analysis toolkit: A map reduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data [J]. *Genome Research*, 2010, 20(9):1297-1303.
- [22] LI H, HANDSAKER B, WYSOKER A, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(16):2078-2079.
- [23] ZHANG X, WANG L, SHOU L. Modified CTAB method for extracting genomic DNA from wheat leaf [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2013, 14(7):946-949.
- [24] BROOKES A J. The essence of SNPs [J]. *Gene*, 1999, 234(2):177-186.
- [25] CHUNG W H, ISHII H, NISHIMURA K, et al. Genetic analysis and PCR-based identification of major *Fusarium* species causing head blight on wheat in Japan [J]. *Journal of General Plant Pathology: JGPP*, 2008, 74(5):364-374.
- [26] PĂCURAR D I, PĂCURAR M L, STREET N, et al. A collection of INDEL markers for map-based cloning in seven *Arabidopsis* accessions [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(7):2491-2501.
- [27] LIU B, WANG Y, ZHAI W, et al. Development of InDel markers for *Brassica rapa* based on whole-genome re-sequencing [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2013, 126(1):231-239.

(责任编辑:袁 伟)