

DOI:10.13332/j.1000-1522.20190167

基于石榴全基因组序列的 SSR 标记开发及鉴定

洪文娟^{1,2} 郝兆祥³ 刘康佳² 罗华³ 毕润霞³ 苑兆和⁴ 宗世祥² 王君^{1,3,5}

(1. 北京林业大学林木育种国家工程实验室 林木花卉遗传育种教育部重点实验室, 北京 100083; 2. 北京林业大学林学院, 北京 100083;
3. 枣庄市石榴研究中心, 山东 枣庄 277300; 4. 南京林业大学林学院, 江苏 南京 210037;
5. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要:【目的】利用 cDNA 文库筛选的石榴 SSR 多态性标记数量有限, 为进一步推动石榴遗传多样性分析、遗传图谱构建、品种鉴定等研究, 有必要系统开发高效稳定的分子标记位点。【方法】本研究根据已发表的石榴基因组测序数据利用 MISA 软件对 1~6 核苷酸重复的 SSR 位点进行了查找, 分析了不同类型 SSR 位点的序列特征, 进而设计引物并检测了引物的有效性和多态性。【结果】(1)石榴基因组中共检测到 146 445 个 SSR 位点, 其中以单核苷酸重复型 SSR 最多(占 51.95%), 六核苷酸重复型最少(仅占 0.38%); SSR 序列以 A/T 碱基占主导, 具有偏向性。(2)石榴基因组 SSR 序列长度变化范围为 10~252 bp, 平均长度 15.48 bp。不同长度重复单元类型的 SSR 序列长度存在丰富变异, 呈现随着重复次数增多, SSR 序列丰度减少的趋势。(3)根据不同类型 SSR 位点设计并合成引物 140 对, 其中 119 对在 12 份石榴种质中可扩增出有效条带, 41 对可产生多态性条带, PIC 值在 0.007~0.566 之间; 从中筛选出多态性较高、稳定性好的引物 15 对, 共检测到等位基因 44 个, 平均每个 SSR 位点检测到 2.933 3 个等位基因。【结论】利用石榴全基因组序列可实现 SSR 标记的大规模开发, 并可鉴定出大量适用于石榴遗传多样性分析、遗传图谱构建、品种鉴定等研究的 SSR 引物。相关研究为石榴的遗传育种研究提供了丰富的 SSR 序列信息和标记资源。

关键词: 石榴; 基因组; SSR; 标记开发; 多态性

中图分类号: S665.4; Q943.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-1522(2019)08-0038-10

引文格式: 洪文娟, 郝兆祥, 刘康佳, 等. 基于石榴全基因组序列的 SSR 标记开发及鉴定 [J]. 北京林业大学学报, 2019, 41(8):38-47. Hong Wenjuan, Hao Zhaoxiang, Liu Kangjia, et al. Development and identification of SSR molecular markers based on whole genomic sequences of *Punica granatum* [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2019, 41(8): 38-47.

Development and identification of SSR molecular markers based on whole genomic sequences of *Punica granatum*

Hong Wenjuan^{1,2} Hao Zhaoxiang³ Liu Kangjia² Luo Hua³ Bi Runxia³
Yuan Zhaohe⁴ Zong Shixiang² Wang Jun^{1,3,5}

(1. National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants of Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;
2. College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;
3. National Germplasm Bank of Pomegranate, Zaozhuang 277300, Shandong, China;
4. College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China;
5. College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

收稿日期: 2019-03-28 修回日期: 2019-05-11

基金项目: 国家林业局业务委托项目(20180001), 北京林业大学一流学科建设项目(2019XKJS0308), 北京市教育委员会林果业生态环境功能提升协同创新中心建设项目(PXM2018_014207_000024)。

第一作者: 洪文娟。主要研究方向: 经济林品种鉴定。Email: 1368030722@qq.com 地址: 100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学 118 信箱。

责任作者: 王君, 教授, 博士生导师。主要研究方向: 林木细胞遗传学与染色体工程育种。Email: wangjun@bjfu.edu.cn 地址: 同上。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

Abstract: [Objective] The number of polymorphic SSR markers developed through cDNA library is limited. In order to promote studies on genetic diversity, genetic mapping and variety identification, it is necessary to develop molecular marker loci. [Method] In this study, SSRs with 1–6 nucleotide repeats were searched from the published whole genome sequences of *Punica granatum* using MISA and the characterization of SSR sequences and their polymorphisms were analyzed. [Result] (1) A total of 146 445 SSR loci were detected in whole genome sequences of *Punica granatum*. Then content of mono-nucleotide repeat SSRs was the highest, accounting for 51.95%; in contrast, the content of hexa-nucleotide repeat SSRs was the lowest, only 0.38%. In all SSR sequences, most of bases were A/T, showing a bias in SSR sequences. (2) The range of SSR length ranged from 10 to 252 bp, with an average of 15.48 bp. The SSR length among different types of SSRs varied a lot, and the abundance of SSR sequences tended to decrease with the increase of repeat number. (3) In designed 140 pairs of primers including different types of SSRs, valid fragments could be produced with 119 pairs in 12 germplasms of *Punica granatum* and 41 pairs could produce polymorphic fragments with 0.007–0.566 polymorphic information content (PIC). We further screened 15 pairs of primers with polymorphic and stable fragments, which detected 44 alleles in these germplasms of *Punica granatum*, with average of 2.933 3 alleles per SSR locus. [Conclusion] SSR markers can be developed in large-scale based on whole genome sequences of *Punica granatum* and a large number of SSR primers also can be identified for genetic diversity analysis, genetic mapping and variety identification. This study provides lots of SSR information and marker resources for researching genetics and breeding of *Punica granatum*.

Key words: *Punica granatum*; genome; SSR; marker development; polymorphism

石榴(*Punica granatum*)为千屈菜科(Lythraceae)石榴属(*Punica*)果树,具有很高的观赏、药用和保健价值,经济、生态和社会效益巨大^[1]。石榴分布范围广,栽培时间长,在长期的自然选择和人为活动下产生了丰富多样的品种和类型,但由于石榴遗传背景复杂、亲缘关系模糊,难以通过形态特征进行准确的品种鉴定,限制了石榴的品种选育和产业发展^[2]。因此,加强石榴遗传多样性分析、遗传图谱构建和品种鉴定技术等研究,对于保障石榴新品种选育和产业健康发展具有重要意义。

分子标记被广泛应用于遗传多样性分析、遗传图谱构建和品种鉴定。在众多分子标记技术中,简单重复序列(simple sequence repeat, SSR, 也称微卫星)分子标记以其多态性高、重复性好、共显性、多等位位点变异、成本低廉等优点而受到青睐^[3]。Ebrahimi 等^[4]利用磁珠富集法筛选鉴定了 25 对石榴基因组 SSR 引物,利用这些引物对 74 份来自世界各地的石榴样品成功进行了遗传分析^[5]。杨健基于石榴 cDNA 文库检索到 179 个 SSR 位点,从中筛选出 8 对多态性较高的 EST-SSR 引物,并对 38 个石榴品种进行了遗传相似性分析^[6]。尽管如此,适用于石榴遗传分析的 SSR 引物数量仍然有限,难以满足石榴多样性分析和遗传图谱构建等研究需要。2018 年石榴全基因组序列的发表^[7]为实现大规模 SSR 位点开发提供了条件。本研究以石榴全基因组序列为

基础,分析了石榴基因组 SSRs 序列特征,并开发了大量引物信息,对不同类型 SSR 位点的有效性和多态性水平进行了分析,为进一步开展石榴遗传多样性分析、遗传图谱构建和品种鉴定等研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

从山东省枣庄市石榴国家种质资源库中随机选择 12 个石榴品种(表 1)用于 SSR 引物有效性和多态性水平的鉴定。采集各品种幼嫩叶片,液氮速冻后保存于-80 °C 冰箱用于 DNA 提取。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

参考 Yuan 等^[7]的方法,采用改良 CTAB 法提取石榴测试品种的基因组 DNA。经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,利用 NanoDrop 2000 分光光度计(Thermo Scientific)对 DNA 纯度和浓度进行测定,将 A_{260}/A_{280} 值在 1.8 ~ 2.0 之间的 DNA 样品浓度统一稀释为 25 ng/ μ L 后,保存于-20 °C 冰箱待用。

1.2.2 SSR 位点的查找与引物设计

根据已发表的石榴基因组序列数据^[7],利用 MicroSatellite identification tool(MISA, <http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>)软件对石榴基因组序列中的 SSR 位点进行查找。查找标准为:单、二、三、四、

表1 石榴测试品种编号

Tab. 1 Tested varieties of *Punica granatum*

编号 No.	品种 Variety	来源 Source
1	‘秋艳’ <i>P.</i> ‘Qiuyan’	山东枣庄市峄城 Yicheng, Zaozhuang City, Shandong Province
2	‘大叶满天红’ <i>P.</i> ‘Dayemantianhong’	河北元氏县 Yuanshi County, Hebei Province
3	‘新疆和田酸’ <i>P.</i> ‘Xinjianghetiansuan’	新疆和田 Hetian, Xinjiang Autonomous Region
4	‘开封四季红’ <i>P.</i> ‘Kaifengsijihong’	河南开封市 Kaifeng City, Henan Province
5	‘怀远玉石籽’ <i>P.</i> ‘Huaiyuanyushizi’	安徽怀远县 Huaiyuan County, Anhui Province
6	‘淮北丰产青皮’ <i>P.</i> ‘Huaibeifengchanqingpi’	安徽淮北市 Huaibei City, Anhui Province
7	‘泰山三白甜’ <i>P.</i> ‘Taishansanbaitian’	山东泰安市 Taian City, Shandong Province
8	‘峄城粉红牡丹’ <i>P.</i> ‘Yichengfenhongmudan’	山东枣庄市峄城 Yicheng, Zaozhuang City, Shandong Province
9	‘墨石榴’ <i>P.</i> ‘Moshiliu’	山东枣庄市峄城 Yicheng, Zaozhuang City, Shandong Province
10	‘会理青皮软籽’ <i>P.</i> ‘Huiliqingpiruanzi’	四川会理县 Huili County, Sichuan Province
11	‘建水红玛瑙’ <i>P.</i> ‘Jianshuihongmanao’	云南建水县 Jianshui County, Yunnan Province
12	‘突尼斯软籽’ <i>P.</i> ‘Tunisiranzi’	突尼斯 Tunisia

五、六核苷酸重复单元重复次数分别不小于 10、6、5、5、5、5 次, 而且两个 SSR 之间允许的最大间隔碱基对为 100 bp。

借助 Primer3 软件 (v2.3.7; <http://primer3.sourceforge.net/>) 对所查找的石榴基因组 SSR 位点进行引物设计, 参数设置为: 引物长度 18~27 nt, 最优为 20 nt; 熔解温度 (T_m) 为 59~61 °C, 最优为 60 °C; GC 含量为 40%~60%, 最优为 50%; 预期 PCR 扩增产物大小为 100~280 bp。

1.2.3 PCR 扩增及 SSR 检测

针对单、二、三、四、五、六核苷酸重复和复合型等不同类型 SSRs, 各随机挑选 20 个 SSR 位点, 共设计 140 对引物, 由生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成, 并用 12 份石榴样品对其进行有效性鉴定及多态性分析。PCR 反应体系为 7.5 μ L 2 \times Taq PCR MasterMix(擎科生物公司), 1.5 μ L 模板 DNA (25 ng/ μ L), 0.3 μ L M13F(10 μ M)上游引物序列结合的荧光标记物, 0.06 μ L (10 μ M)上游引物和 0.24 μ L (10 μ M)下游引物, 5.4 μ L 去离子水补足 15 μ L 的 PCR 反应体系。其中对 M13F 序列进行修饰的荧光标记分为 FAM、HEX、ROX、TAMRA(睿博兴科公司) 4 种, 以便在同一试验中检测多对引物。PCR 扩增程序为: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 30 s(30 个循环); 94 °C 变性 30 s, 53 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 30 s(10 个循环); 72 °C 延伸 10 min。PCR 反应产物送至睿博兴科公司进行

毛细管电泳检测。

1.2.4 数据统计与分析

统计稳定且易于区分的目的条带, 用 POPGENE32 软件计算具有多态性的 SSR 位点的等位基因数(N_a), 有效等位基因数(N_e)和 Shannon 信息指数(I); 用 CERVUS 3.0 软件^[8] 分析各 SSR 位点的多态信息含量值(Polymorphic Information Content, PIC)。Pearson 相关分析采用 OriginPro 2018 完成。

2 结果与分析

2.1 石榴基因组 SSR 位点的查找及其组成分析

基于石榴基因组测序数据对基因组中 1~6 核苷酸重复的 SSRs 进行了查找分析。共查找到 146 445 个 SSR 位点, 其中复合型微卫星有 19 315 个。查找到的 SSR 位点分布于基因组 2 117 条 Scaffold 中的 815 条, 平均每条 Scaffold 含有 179 个 SSR 位点, 只含有 1 个 SSR 位点的 Scaffold 有 187 条。在最长的 10 条 Scaffold 上检测到了 28 293 个 SSR 位点(图 1), 占总位点数的 19.32%, 其中以单核苷酸重复型 SSRs 最多, 占 48.20%。Pearson 相关分析表明 Scaffold 长度与查找到的 SSR 位点数目呈极显著正相关($r=0.991\ 0$, $P<0.000\ 1$)。

在石榴基因组中, 平均 1 871 bp 出现 1 个 SSR 位点。其中, 单核苷酸重复型 SSR 含量最多, 占总数的 51.95%; 其次为二核苷酸重复型, 占 36.58%; 六核苷酸重复型最少, 仅占 0.38%。对重复单元的碱基组

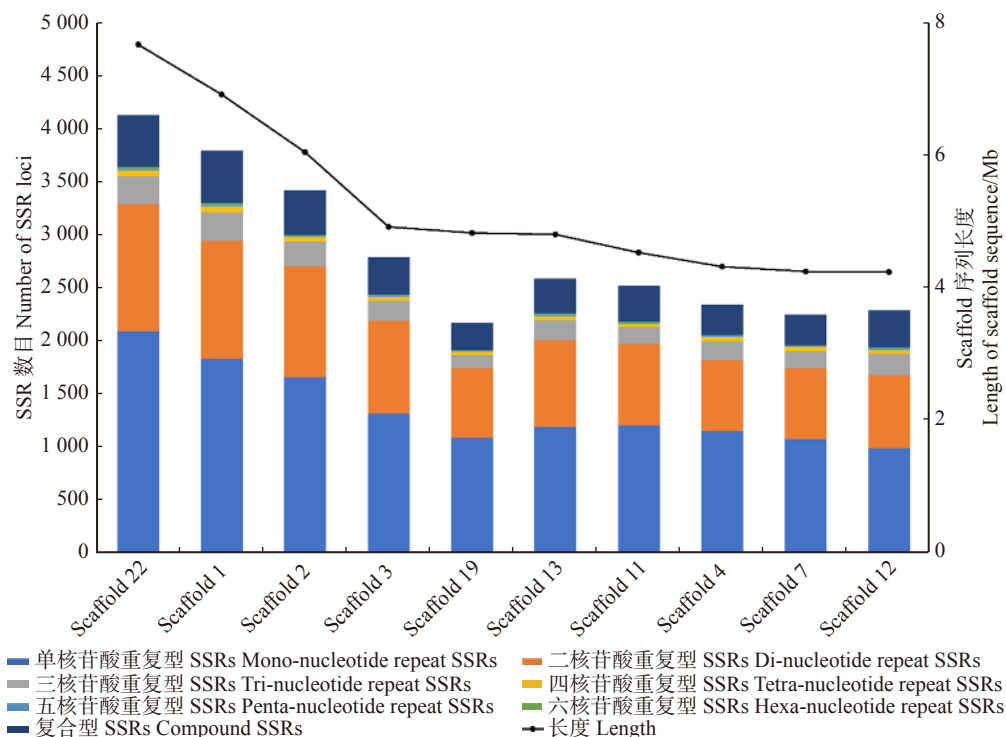


图 1 不同类型 SSRs 在石榴基因组最长的 10 条 Scaffold 上的数量变化

Fig. 1 Variation in number of different SSR types in the longest 10 Scaffolds in *Punica granatum* genome

合进行统计(表 2), 发现单核苷酸重复型 SSRs 以 (A/T)*n* 为主, 有 72 892 个, 占 95.82%; 二核苷酸重复型 SSRs 以(AT/TA)*n* 最多, 有 34 270 个, 占 63.97%, 其次为(AG/CT)*n*, 占 29.25%; 三核苷酸重复型 SSRs

以(AAT/ATT)*n* 最多(5 339 个), 占 41.85%, (ACG/CGT)*n* 最少, 仅占 1.00%; 四核苷酸重复型 SSRs 以(AAAT/ATTT)*n* 所占比例最大, 为 36.77%, 而(ACCC/GGGT)*n* 和(ACCT/AGGT)*n* 均仅查找到 1 个位点;

表 2 石榴基因组中部分 SSR 重复单元的分布特征

Tab. 2 Feature of parts of SSR motifs in *Punica granatum* genome

重复单元 Repeat motif	数目 Number	重复次数 Repeat time	平均长度 Average length/bp	比例 Proportion/%
A/T	72 892	10 ~ 56	11.42	49.77
C/G	3 179	10 ~ 222	15.20	2.17
AT/TA	34 270	6 ~ 58	19.07	23.40
CG/GC	163	6 ~ 10	13.30	0.11
AC/GT	3 470	6 ~ 41	16.52	2.37
AG/CT	15 671	6 ~ 126	19.96	10.70
AAC/GTT	326	5 ~ 26	18.51	0.22
AAG/CTT	3 458	5 ~ 43	20.61	2.36
AAT/ATT	5 339	5 ~ 24	21.76	3.65
ACC/GGT	323	5 ~ 12	17.63	0.22
ACG/CGT	127	5 ~ 15	17.55	0.09
ACT/AGT	156	5 ~ 27	19.10	0.11
AGC/CTG	599	5 ~ 19	17.69	0.41
AGG/CCT	1 272	5 ~ 18	18.80	0.87
ATC/ATG	983	5 ~ 16	18.17	0.67
CCG/CGG	173	5 ~ 15	16.63	0.12

五核苷酸和六核苷酸重复型 SSRs 中比例最高的分别为 (AAAAG/CTTTT) n 和 (AAAATC/ATTTTG) n , 分别占 15.24% 和 32.50%。

2.2 石榴基因组微卫星长度分布及变异

对石榴基因组 SSR 序列进行分析, 发现其长

度变化范围为 10 ~ 252 bp, 平均长度 15.48 bp。其中, 长度为 10 bp 的 SSR 序列所占比例最大, 为 23.62%, 其次为长度 12 bp 的 SSR 序列, 占 13.41% (图 2)。

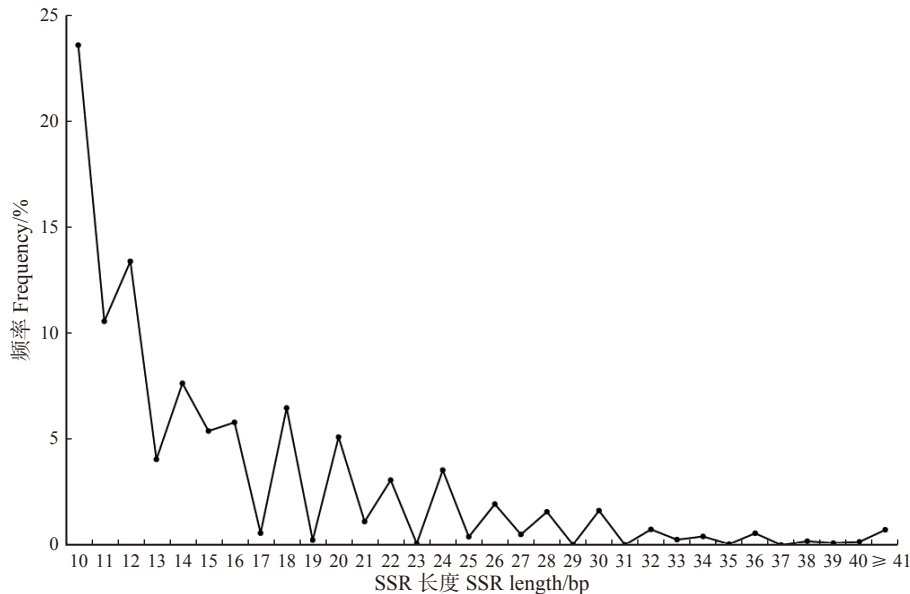


图 2 石榴基因组不同长度微卫星的出现频率

Fig. 2 Frequency of SSRs with different length in *Punica granatum* genome

不同长度重复单元的 SSR 序列长度也存在丰富变异, 均呈现随着重复次数的增多, SSR 丰度减少的趋势 (图 3、表 2)。二核苷酸重复型 SSR 序列的长度变化范围最大 (12 ~ 252 bp), 平均长度为 19.15 bp, 其中以 (AG/CT) n 序列平均长度最大, 为 19.96 bp, (CG/GC) n 平均长度最小, 仅 13.30 bp; 单核苷酸重复型 SSR 序列长度变化范围为 10 ~ 222 bp, 平均长度为 11.58 bp, 其中 (A/T) n 平均长度为 11.42 bp, (C/G) n 的平均长度为 15.20 bp。SSR 序列的平均长度与重复单元长度呈正相关 ($r=0.9792$, $P<0.0005$)。

2.3 石榴基因组 SSR 引物的有效性检测及多态性分析

利用 12 份石榴样品对 140 对引物进行检测, 有 132 对引物成功扩增, 占 94.29%。其中, 12 对引物条带多、峰形差, 1 对引物的产物小于目的片段范围, 因此扩增产物与预期产物一致且较稳定的引物有 119 对, 引物有效率为 85%。

Pearson 相关分析发现, 该 119 对引物的 PIC 值与 SSR 长度间无显著相关性 (图 4A)。进一步按照 SSR 类型分类后, 发现三核苷酸和四核苷酸重复型 SSR 位点的 PIC 值与 SSR 长度均呈显著正相关 (图 4D、4E), 而单、二、五、六核苷酸重复型以及复合型 SSR 位点的 PIC 值与 SSR 长度间无显著相关性 (图 4B、4C、4F、4H)。

筛选到 41 对 SSR 引物在 12 份石榴样品中能扩增出多态性产物, 其 PIC 值在 0.007 ~ 0.566 之间, 平均为 0.353。其中, PIC < 0.25 的有 8 对, PIC 在 0.25 ~ 0.5 之间的有 29 对, PIC > 0.5 的有 4 对。进一步从中挑选出主带清晰、多态性较高、稳定性好的 15 对引物 (表 3、图 5) 进行统计, 共检测到 44 个等位基因, 每个位点的等位基因数在 2 ~ 5 之间, 平均等位基因数为 2.933 3; 有效等位基因数在 1.766 9 ~ 2.742 9 之间, 平均为 2.102 7; PIC 值在 0.359 ~ 0.566 之间, 平均为 0.437, 最大值为 0.566, 最小值为 0.359; Shannon 信息指数在 0.661 6 ~ 1.139 5 之间, 平均为 0.837 4。

3 讨 论

随着新一代测序技术的不断应用, 利用海量测序数据进行分子标记的开发和挖掘已受到广泛重视^[9]。本研究利用 MISA 软件从石榴基因组中共查找到 146 445 个 SSR 位点, 数量众多, 类型多样, 为我们进一步开展有效 SSR 位点的筛选和鉴定奠定了坚实的基础。其中, 单核苷酸重复型 SSR 位点所占比例最高, 达 51.95%, 而六核苷酸重复型 SSR 位点含量最低, 仅 0.38%。与杜仲 (*Eucommia ulmoides*) 等树种随着重复单元长度的增加, 其含量逐渐降低的结果相似^[10]。然而, 对枣 (*Ziziphus jujuba*) 基因组 SSR

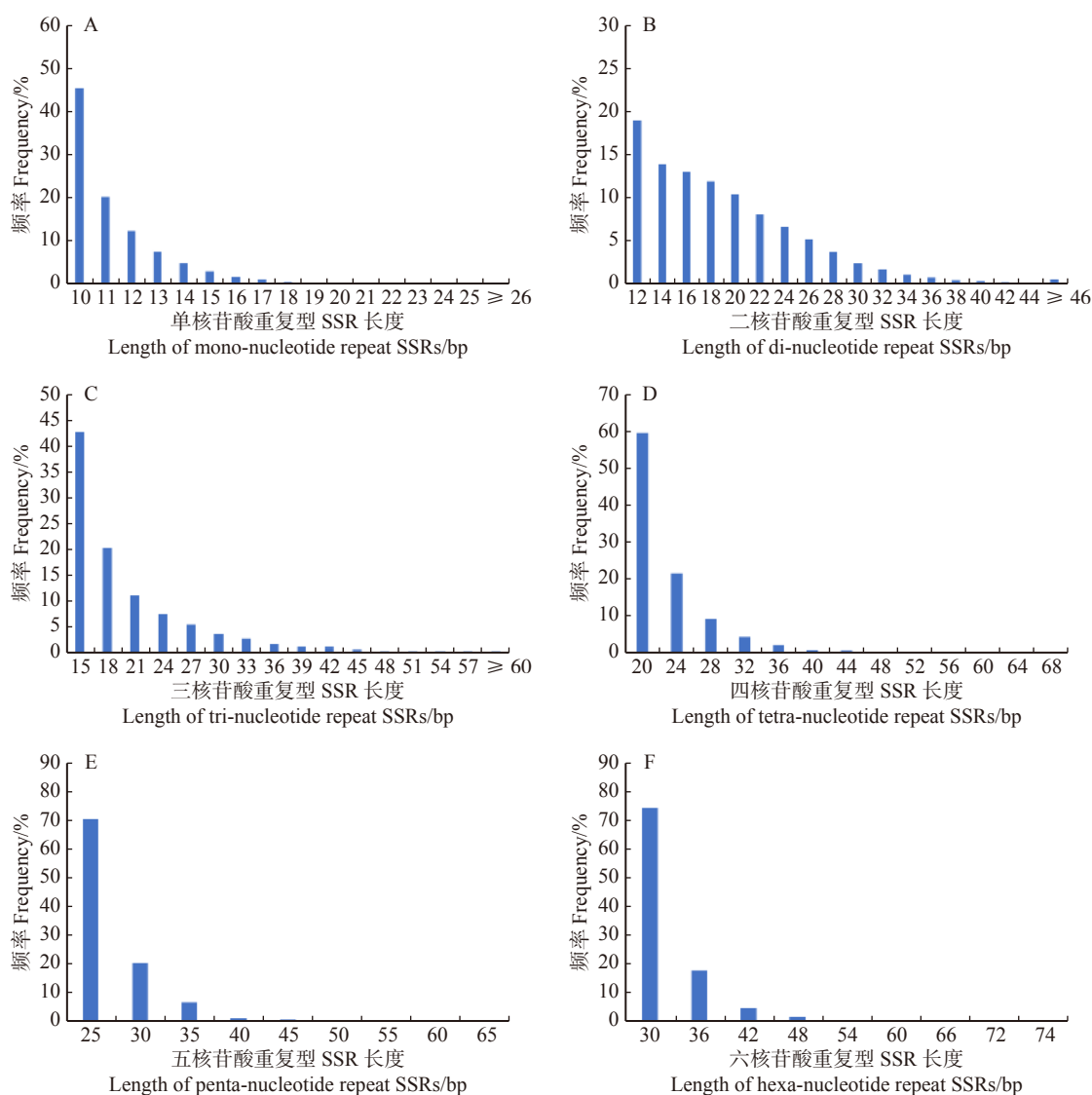


图 3 不同长度重复单元微卫星的序列长度变异情况

Fig. 3 Variation in sequence length of different types of SSRs

位点特征的研究却发现其优势重复类型为六核苷酸重复(40.1%)^[11],可能与不同物种的基因组大小差异有关^[12]。

石榴基因组 SSR 序列存在明显的偏好性。其中,单核苷酸重复型 SSRs 以(A/T)*n* 为主,占 95.82%;二核苷酸重复型 SSRs 以(AT/TA)*n* 最多,占 63.97%;在其他类型 SSRs 中也存在相似的趋势。显然,A/T 碱基在石榴基因组 SSR 序列中占了主导地位。对水稻(*Oryza sativa*)等禾本科(Gramineae)植物、毛果杨(*Populus trichocarpa*)、杜仲、枣等植物基因组 SSR 序列的研究,也都得到相似的结果^[10-11,13-14]。Gur-Arie 等^[15]认为这种现象可能与富含 A/T 碱基的重复序列在 DNA 中解链较易有关。此外,这种偏向性的结果也可能与 SSR 位点查找工具中的参数设置有关^[16]。

石榴基因组 SSR 序列长度变异丰富(10~252 bp),平均长度 15.48 bp,其中二核苷酸重复型 SSR 序列

的长度变化范围最大(12~252 bp),单核苷酸重复型 SSR 序列长度变化范围次之,为 10~222 bp。这种 SSR 长度的变异可能与进化过程中 SSR 获得(或丢失)重复单元速率的快慢有关^[10]。Weber 发现完美重复序列 PIC 值随着重复次数的增加呈现增加的趋势^[17]。本研究 Pearson 相关分析也表明三核苷酸和四核苷酸重复型 SSR 位点的 PIC 值与 SSR 长度均呈显著正相关,因此,在我们未来选择 SSR 标记时应相应选择重复次数较多、序列较长的 SSR 位点,可能会获得更高的多态性水平。

根据 Botstein 等^[18]提出的度量基因座位变异程度高低的的多态信息含量标准:当 PIC < 0.25 时,此位点仅表现为低度多态信息含量;当 0.25 < PIC < 0.5 时,此位点表现为中度的多态信息含量;当 PIC > 0.5 时,则该位点表现为高度的多态信息含量。本研究从 140 对引物中筛选出在 12 份石榴样品中能扩增出多态性产物的 SSR 引物 41 对,其中 PIC > 0.5 的

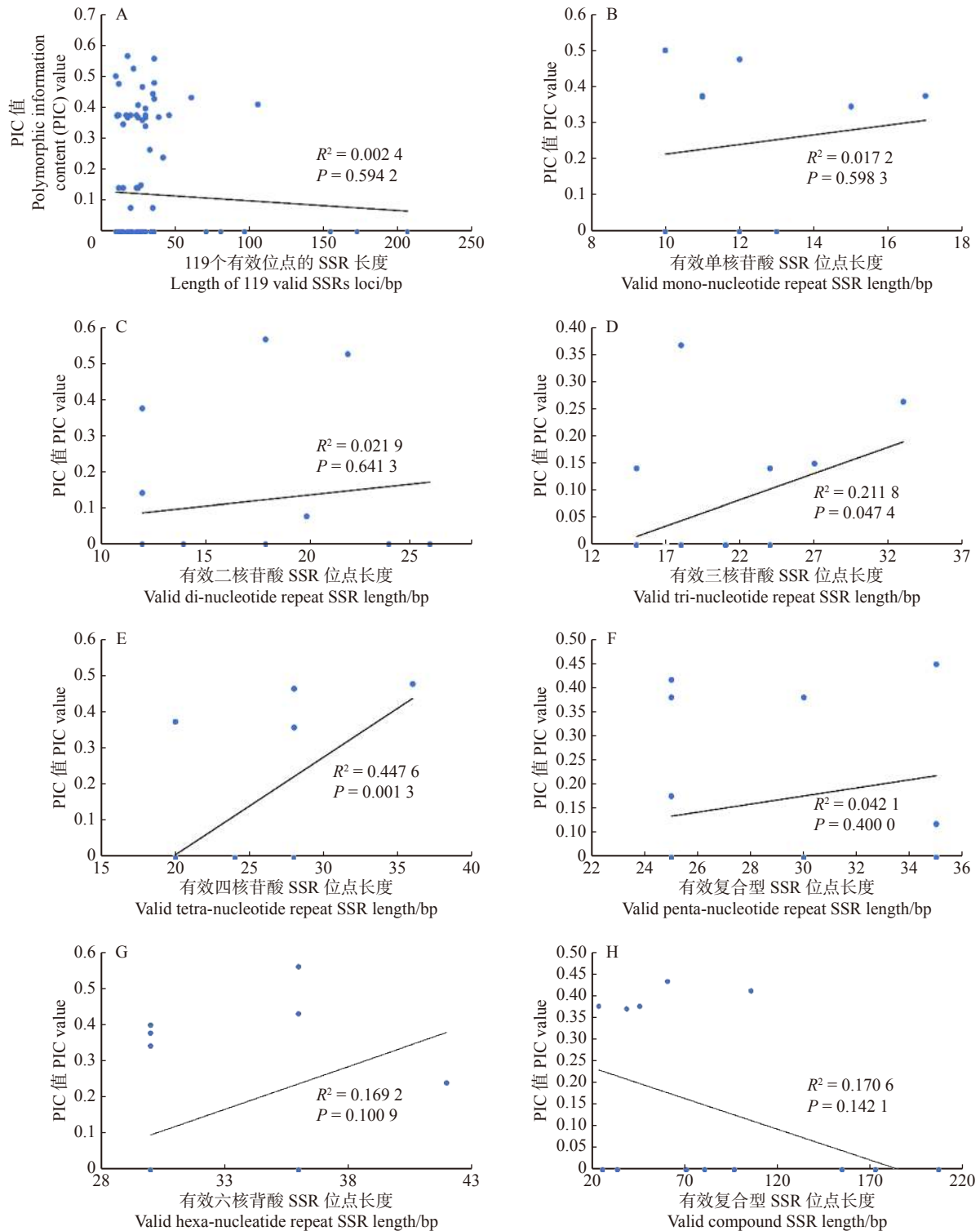


图4 有效 SSR 位点的 PIC 值与 SSR 长度相关分析

Fig. 4 Correlation analyses between PIC value and SSR length in the valid loci

仅有 4 对, 大部分引物 PIC 值在 0.25 ~ 0.5 之间(29 对)。可见, 本研究所筛选的多态性 SSR 位点在 12 份样品中所携带的多态信息总体处于中等水平, 这可能与所选择的 12 个石榴品种间差异不大有关; 同时, 参考 Luo 等^[19] 对 136 个石榴品种的 SSR 分析结果, 13 个 SSR 位点的 PIC 值仅在 0.14 ~ 0.29 之间, 推测可能由于长期的驯化以及对芽变的利用偏

向, 我国石榴品种间的变异水平本身也有限。

石榴栽培历史悠久, 品种繁多, 单纯以形态学差异等特征作为品种区分标准容易受到环境因素和栽培措施的影响, 因此, 开发分子标记指纹图谱是开展石榴品种注册、品种鉴定的主要趋势。本研究基于石榴基因组测序数据开发了大量的石榴 SSR 引物, 为进一步开展石榴重要品种和种质的 SSR 指纹图谱

表 3 筛选的 15 对石榴基因组 SSR 位点引物及多态性信息

Tab. 3 SSR site primer and polymorphic information for selected 15 pairs of pomegranate genomic groups

引物名称 Primer ID	SSR类型 Type of SSR	重复单元 Repeat motif	引物序列 Primer sequence	等位 基因数 Number of alleles (Na)	有效等位 基因数 Effective allelic marker number (Ne)	Shannon 信息指数 Shannon diversity index (<i>I</i>)	多态 信息含量 Polymorphic information content (PIC)
PG_25_548	p2	(AT) ₉	F: ATATGGCGGCATGAGAGTTC R: GTAATAGCATGCCCTTTGCC	4.000 0	2.742 9	1.139 5	0.566
PG_98_83	p2	(TA) ₁₁	F: AGGGGCAAAACCCTTACATC R: TCGGCCCAATAAATGGAAT	5.000 0	2.285 7	1.117 1	0.525
PG_44_17	p3	(AGA) ₆	F: GGGCGAAGAATTACAGGTGA R: ATAATGGCTCCTGTGGAACG	2.000 0	1.945 9	0.679 2	0.368
PG_140_166	p4	(TATC) ₉	F: AAAGCATGCGAAAGGATGAT R: CAATGCCAATGTTACGGATG	3.000 0	2.341 5	0.922 2	0.479
PG_4_1646	p4	(AAAT) ₅	F: CCAAAGGATGAGGAATCGAA R: TTTGACCCGATCTACCTCGT	2.000 0	1.882 4	0.661 6	0.359
PG_105_152	p4	(GTCT) ₇	F: CGATGTGTACAGTTGTGGGC R: CCGTTTTAGTCCAGTCTGC	3.000 0	2.104 3	0.896 1	0.466
PG_128_96	p5	(ATAGG) ₇	F: GAGGAGTCAATTCGACCCAA R: CATCGAATTCTATTCCTCCC	3.000 0	2.071 9	0.860 2	0.444
PG_13_2441	p5	(AGTTG) ₅	F: CCGTTTTGGTTTGTCTGGT R: CTCAACTCAACTCCACTTATCTTCA	3.000 0	1.967 5	0.792 5	0.408
PG_32_463	p5	(TTGTT) ₅	F: CCCACGTAGGAAGGTGAAAA R: GGCTGGCATTTCAGTTCAGT	2.000 0	1.945 9	0.679 2	0.368
PG_47_500	p5	(AATAT) ₅	F: TATGCCCGGTGTTAACCAAT R: TGATCACTCACACCAGCCTC	2.000 0	1.945 9	0.679 2	0.368
PG_20_939	p6	(TATAGA) ₆	F: GGGTCCACAACAACCTCCACT R: TTTTCCATTCCTTTTCCCCT	4.000 0	2.594 6	1.109 7	0.557
PG_22_2120	p6	(AATCAA) ₅	F: CCCCCTTTGGATTCAAAGAT R: GAGGGGAAGCTGAGACAGAG	3.000 0	1.811 3	0.778 1	0.397
PG_66_86	p6	(GAGGGA) ₆	F: GCTGGTAGGAGTGCTTGAGG R: TTCCCCTAATTTGGTGGGTT	3.000 0	2.133 3	0.829 3	0.428
PG_28_765	p6	(CAAAAT) ₅	F: TTGTCGACGAACTCGAACAG R: TGCATGCAGACAGCTTTAGG	2.000 0	2.000 0	0.693 1	0.375
PG_117_30	C	(GCA) ₅ (GCC) ₈	F: GGACGAGATACGGCAGAGAC R: TGCAGAGGATTGCTGAGATG	3.000 0	1.766 9	0.723 3	0.420
平均值 Mean				2.933 3	2.102 7	0.837 4	0.437

构建奠定了基础, 而且充分利用毛细管电泳检测技术成本低、污染少、精确度高、高通量检测特点^[20],

为实现石榴种质资源的遗传多样性分析、遗传图谱构建等研究提供了可靠的支撑。

- microsatellites in Gramineae[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2011, 30(5): 513–520.
- [14] Tuskan G A, Gunter L E, Yang Z K, et al. Characterization of microsatellites revealed by genomic sequencing of *Populus trichocarpa*[J]. *Canadian Journal of Forest Research*, 2004, 34: 85–93.
- [15] Gur-Arie R, Cohen C J, Eitan Y, et al. Simple sequence repeats in *Escherichia coli*: abundance, distribution, composition, and polymorphism[J]. *Genome Research*, 2000, 10(1): 62–71.
- [16] 阎毛毛, 戴晓港, 李淑娟, 等. 松树、杨树及桉树表达基因序列微卫星比对分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2011, 30(1): 103–109.
- Yan M M, Dai X G, Li S X, et al. Sequence analysis and comparison of EST-SSRs in pine, poplar and *Eucalyptus*[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2011, 30(1): 103–109.
- [17] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA)_n·(dG-dT)_n polymorphisms[J]. *Genomics*, 1990, 7: 524–530.
- [18] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314–331.
- [19] Luo X, Gao S Y, Hao Z X, et al. Analysis of genetic structure in a large sample of pomegranate (*Punica granatum* L.) using fluorescent SSR markers[J]. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2018, 93(6): 659–665.
- [20] 麻丽颖, 孔德仓, 刘华波, 等. 36 份枣品种 SSR 指纹图谱的构建 [J]. *园艺学报*, 2012, 39(4): 647–654.
- Ma L Y, Kong D C, Liu H B, et al. Construction of SSR fingerprint on 36 Chinese jujube cultivars[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2012, 39(4): 647–654.

(责任编辑 崔艳红
责任编辑 卢孟柱)