

# EST-SSRs研究进展及其在辣椒胞质不育性研究中的应用前景

李晶晶 王述彬

**摘要** SSR标记由于其多态性、共显性的特点,越来越多地用于基因标记、图谱构建、遗传多样性分析等方面。但与一般的基因组SSR相比,EST-SSR作为功能基因的一部分在功能基因鉴定和种间通用性上更有其优越性。目前EST-SSR更多地用于小麦、水稻、大麦、玉米、白菜等作物在种质资源多样性、品种鉴定、饱和遗传图谱等方面的研究,而在辣椒上,尤其是在胞质不育性方面的研究却鲜见报道。本文对辣椒EST-SSR标记的开发及其在分子辅助育种上的应用进行了回顾,并对其在辣椒胞质不育性方面的研究作出展望。

**关键词** 辣椒 胞质不育 EST-SSRs

辣椒属 (*Capsicum*) 植物在世界范围内广泛分布,共包括 27 个种,其中有 5 个种被人工驯化栽培,即 *C. annuum*、*C. frutescens*、*C. chinense*、*C. baccatum* 和 *C. pubescens*<sup>[1]</sup>。*annuum* 是世界上栽培广泛、类型丰富、特别具有商业价值的种,国内外研究主要集中于 *annuum*。20 世纪 90 年代以来,随着 RAPD、RFLP、AFLP、SSR 标记的应用和不断优化,大大丰富了辣椒标记的种类,在辣椒分子标记和遗传作图方面取得了很大的进展。在这些标记中,越来越多的 SSR 被用于饱和遗传图谱、构建种质系统树、分子辅助育种。

## 1 SSR标记及 EST-SSR标记

在分子遗传学中 DNA 序列的多态性和遗传多样性具有重要作用,其中 SSRs (simple sequence repeats) 有其特殊的优势。与其他分子标记相比,SSR 标记数量丰富,等位基因变异多,信息含量高,表现为多态性、共显性<sup>[2]</sup>,可利用 PCR 进行分析,DNA 用量少,操作简便,重复性好,因此 20 世纪 90 年代以来已经被遗传学家广泛用作分子标记,在遗传图谱构建、功能基因标记、遗传多样性分析、亲缘关系鉴定、DNA 指纹图谱构建等方面有公认的优越

性和应用前景<sup>[3]</sup>。

根据 SSR 标记的序列性质不同,SSR 标记可分为基因组 SSR (genomic SSR, gSSR) 和表达序列标签 SSR (expressed sequence tag SSR, EST-SSR) 等。但普通 gSSR 标记的开发通常需经过文库构建,包括 SSR 克隆的筛选、测序、引物设计和 PCR 扩增与分析等步骤,花费时间长,费用较大,效率也低。与 gSSR 标记相比,从 EST 数据库中获得 SSR 建立 EST-SSR 标记更经济;而且 EST-SSR 标记来源于 DNA 的转录区域,比 gSSR 通用性更高<sup>[4]</sup>。

## 2 EST标记的特点

EST 标记一般长度为 300 ~ 500 bp,是通过从 cDNA 文库中随机挑取的克隆进行测序所获得的部分 cDNA 的 3 端或 5 端序列。它反映了基因的编码部分,可以直接获得基因表达的信息,为功能基因提供“绝对”的标记,这有可能对决定重要表型性状的等位基因进行直接鉴定;省去了 SSR 引物开发过程中的克隆和测序步骤,充分利用了现有测序数据,降低了开发成本<sup>[5]</sup>。

植物 EST 计划起步较晚,但发展速度却很惊人。1998 年 12 月 24 日 GenBank 收录的小麦 EST 数据只有 4 条,到 2002 年 12 月 20 日增加到 415 598 条<sup>[5]</sup>,截止到 2007 年 6 月 22 日已收录 1 050 274 条。近年来迅速增长的 EST 数据已经成为获取 SSR 的重要来源,各种植物中有 1% ~ 5% 的 EST 中存在 SSR<sup>[6]</sup>。这些 EST 资源给基因组和

李晶晶,硕士研究生,江苏省农业科学院蔬菜研究所,南京 210014  
王述彬(通讯作者),江苏省农业科学院蔬菜研究所,南京 210014, E-mail: wangsbpep@163.net

收稿日期:2008-07-18;修回日期:2008-08-26

基金项目:国家“863”计划(2006AA100108-3-2)

转录分析带来了很大的应用前景。现代采用 EST 数据的 DNA 分子标记类型包括:单核苷酸多态 (SNPs)、保守直系同源位点 (COSSs) 和基于序列表达标签的微卫星标记 (EST-SSRs)。作为一种新的 SSR 标记来源, EST-SSR 的开发在小麦、大麦、黑麦、棉花、大豆、番茄、白菜中已有报道。序列数据库的电子筛选使 EST-SSR 标记花费较低, 省时省力。因此, EST 数据库被认为是 SSR 标记和图谱发展最丰富、最有价值的资源。现在 EST-SSR 已经被应用于构建遗传连锁图谱、比较基因组研究、分离和鉴定新基因、基因表达差异研究、制备 DNA 芯片等方面。

作为编码 DNA 的一部分, EST 的侧翼序列保守性强, 在家系和种间的通用性比来源于非编码序列的标记好<sup>[7]</sup>。它既为不同种间的标记开发提供了一种新的途径, 也使物种间比较图谱的绘制更为便捷<sup>[8]</sup>。由于 EST-SSRs 是基因的一部分, 在长期的进化与选择过程中必然有一些基因得不到选择, 而使群体的遗传多样性丧失, 据此可选用一些在野生种中表现多态而在普通栽培种中无多态性的 EST-SSRs 用于筛选重要农艺性状的基因<sup>[9-10]</sup>。将生物不同发育时期和每一发育期的不同组织和器官 cDNA 文库中的 EST 数据进行 BLAST 分析<sup>[11]</sup>, 不仅能发现已知基因在不同组织中的表达规律, 而且能更快捷地筛选出存在差异表达的未知基因片段, 为克隆新的差异表达基因提供依据。

但是 EST 也有不足之处, 与传统 SSR 相比多态性低<sup>[12]</sup>, 所获基因组信息不全, 如调控序列、内含子等在基因表达调控中起重要作用的信息不能体现出来。

### 3 EST-SSR 的研究现状

在小麦、水稻、白菜等作物中, EST-SSR 标记得到了广泛的应用, 标记的筛选进一步弥补了原有遗传图谱的空缺, EST-SSR 标记与 gSSR 标记相比在种间通用性和多样性评估上更有潜力<sup>[13]</sup>。

陈军方等<sup>[14]</sup>利用中国春的 21 个小麦缺体 - 四体系列作为材料, 将有扩增产物的 32 对 EST-SSR 引物定位到小麦除 2D、4B 和 4D 外的 18 条染色体上。

忻雅等<sup>[15]</sup>以白菜自交系 A 的 DNA 为模板, 对设计的 15 对 EST-SSR 引物进行筛选, 发现都能扩增出产物, 进一步用这些引物对 28 个白菜品种进行 PCR 扩增, 有 7 对引物显示多态性。

Varshney 等<sup>[16]</sup>从大麦遗传图谱 185 对 EST-SSR 引物中选取 165 对用作小麦、黑麦、水稻的通用性检验, 78.2% 的标记在小麦中有扩增, 黑麦和水中分别为 75.2% 和 42.4%。大麦的 EST-SSR 电子克隆比较作图说明了大麦 EST-SSR 与小麦、黑麦和水中 EST-SSR 的直向同源关系。

Chen 等<sup>[17]</sup>利用小麦中国春缺体 - 四体系列 93 对 EST-SSR 引物, 193 个位点定位在除了 4A 和 4B 的 19 条染色体上。

Wang 等<sup>[18]</sup>随机选取 300 对 EST-SSR 引物筛选 *Gossypium barbadense* cv Hai7124 和 *G. hirsutum* acc. TM-1 之间的多态性, 其中 129 对引物有多态性, 表明这些引物可用作棉花基因组研究及分子辅助选择育种的重要补充, 并用其对一些棉花品种进行了对比检测。

Leigh 等<sup>[19]</sup>通过检测基因组 SSR 和 EST-SSR 这两种标记的性能来评估小麦品种之间的品种多样性和遗传多样性。研究最初发现 EST-SSR 和基因组 SSR 在品种辨别方面相似, 但随着区分位点数目的增加, EST-SSR 标记的辨别效率开始降低, 与基因组 SSR 标记相比 EST-SSR 标记的多态性水平较低。

Gao 等<sup>[20]</sup>对一些主要经济作物 EST 数据库中出现的不同重复序列的频率、数目进行比较分析, 发现水稻、小麦、大豆、玉米 4 种作物 EST-SSR 中三核苷酸重复的含量最多, 它与一些重要的功能基因相关。此外, 还设计了 597 对 EST-SSR 引物在 40 个小麦品种中检测评估, 其中, 478 对引物成功扩增, 173 对有多态性条带, 42% 是三核苷酸重复, 在其他 3 种作物中有 255 对引物得到成功扩增, 验证了种间序列功能的保守性。

Guo 等<sup>[21]</sup>利用 207 对 *G. arboreum* 的 EST-SSR 在 25 个不同二倍体棉花品种中检测种间转移性, 得出种间扩增率 60%, 转移率 96.5%, 多态性 99%。出现高水平多态性的原因是重复碱基数的差异, 高转移率的原因是二倍体棉花侧翼序列的高度保守性。

Bandopadhyay 等<sup>[22]</sup>从小麦数据库中筛选出 78 对 SSR 引物, 其中 64 对有功能性, 在 18 个小麦品种中, 这些引物不仅在含有 A、B、G 基因组的原始品种中有扩增产物, 而且在含有 M、N、C、U 基因组的外源品种中也同样有扩增产物, 呈现出 84% 的种间转移性, 92% 的标记在一个或多个品种中有预期片段, 这表明 DNA 序列的保守区域来源于基因组的翻译区, 小麦的 EST-SSR 标记很可能来源于小麦祖先基因组

中的 SSR。

#### 4 EST在辣椒上的应用

然而,蔬菜作物尤其是辣椒在 EST数据库的应用研究上还相对薄弱。尽管有一些 SSR 标记被引用到辣椒的分子连锁图谱中,但是仅有少数可以作为公共资源。这就迫切需要更多的 SSR 标记用来饱和遗传图谱,用于分子辅助育种和种质鉴定。

目前国外辣椒 EST的研究已经深入到种间作图和比较作图方面,但与白菜、番茄的 EST研究现状相比仍发展较慢。Nagy等<sup>[23]</sup>成功地从大约 23 000 个辣椒序列中开发了 50 个多态性 SSR 标记。Portis等<sup>[24]</sup>搜索了 8 094 条 EST序列,经过 cluster分析将其中 532 条含有 SSR 的非冗余序列用于开发 SSR 标记,47 个 EST-SSR 标记检测出品种间的多态性,用于种间作图,并用在 16 个辣椒品种的基因多样性分析中,发现其遗传进化关系与已知分类学上的记录一致。

Lee等<sup>[25]</sup>分别从两个小型插入式文库和 GenBank 文库中筛选 SSR 标记,经多态性分析发现前者的数量是后者的两倍,并将 46 个微卫星标记定位在 *C. annuum* TF68 和 *C. chinense* Habanero 的种间杂交图谱 SNU-RFLP 上。

Yi等<sup>[26]</sup>从 10 232 条非冗余辣椒 EST 序列中设计了 813 对引物,从中筛选出在双亲之间有多态性的引物 139 对,采用辣椒种间杂交 *C. annuum* TF68 × *C. chinense* Habanero 获得的 107 个 F<sub>2</sub> 为作图群体,将这 139 个 EST-SSR 标记同以前的 41 个 SSR 标记、63 个 RFLP 标记定位在连锁图谱上,组成 14 个连锁群, LOD > 5.0,全长 2 201.5 cM。

Minamiyama等<sup>[27]</sup>构建了 4 个 *C. annuum* 基因组文库,测序了 1 873 个克隆,合成 626 个 SSR 克隆用于多态性检测,153 个在制图群体中产生多态,利用 106 个高表达的 SSR 标记与以前的 SSR、AFLP、CAPs、RAPD 标记,组成了种间双单倍体连锁图谱。

国内有关辣椒 EST-SSR 的研究较少,目前仅用于不同基因型的多态性检测,其他应用方面还未见报道。如 Huang等<sup>[28]</sup>从 EMBL 和 GenBank 中搜寻含有 SSR 的辣椒序列来评估不同重复模块的出现频率,检测不同基因型(包括 10 个辣椒基因型、1 个马铃薯基因型、1 个番茄基因型)的多态性。发现的 58 个微卫星标记中,在辣椒中有 12 个检测出多态性,马铃薯中有 3 个,番茄中有 1 个。目前的研究现状要求研究者对 EST 标记作进一步开发,并与其他标记

结合起来用于饱和遗传图谱、比较图谱构建和基因定位。

#### 5 辣椒胞质不育的研究现状

自 Peterson (1958) 报道以来,细胞质雄性不育 (CMS) 引起了不少研究学者的关注,它是不遵循孟德尔遗传规律而呈母性遗传的雄性不育类型<sup>[29]</sup>,而且根据 CMS 三系配套制种,既避免了常规育种人工去雄的繁琐,又保证了杂交种子的纯度。

关于细胞质雄性不育的分子机理研究,多数学者认为,线粒体基因组 (mtDNA) 是细胞质雄性不育基因的载体,雄性不育性可能与线粒体的变异有关。通过对多种材料的 CMS 研究发现,线粒体 DNA 结构水平、转录和翻译调控水平以至蛋白质的变异都可能诱发 CMS。这说明线粒体基因组分子内或分子间频繁重组是 CMS 产生的分子基础<sup>[30]</sup>。

目前有关叶绿体与 CMS 的研究不完全,也有研究表明叶绿体 DNA 与 CMS 有关。但迄今为止,还没有在任何细胞质雄性不育植物的叶绿体基因组中找到一个可能与其育性密切相关的且表达产物受恢复基因影响的叶绿体 DNA 片段。

核系统对 CMS 最明显的影响表现为当 CMS 植株被授以恢复系的花粉或引入恢复基因后,CMS 相关基因的结构和表达受到调控,从而导致花粉育性的恢复,即表现雄性可育。

至于辣椒雄性不育机理的研究,人们已经从细胞形态、生理生化、分子生物学等方面进行了大量的研究,选育了雄性不育两用系、三用系<sup>[31]</sup>,但是距揭示雄性不育的机理还有一大段距离,这就需要研究者以先前的研究结果为基础,将分子生物学和生理生化结合起来进行更进一步的探索。关于辣椒恢复基因及不育基因的 RAPD、AFLP 标记早有报道。

张宝玺等<sup>[32]</sup>以辣椒细胞质雄性不育保持系 Yob wonder 恢复系 Perennial 及其 F<sub>1</sub> 的 DH 群体与甜椒细胞质雄性不育系 77103A 测交获得的后代为供试材料,构建了包括 43 个 AFLP 标记共 8 个连锁群的分子图谱,并把恢复性的 QTL 定位在第 1、3、6、8 连锁群上。

唐冬英等<sup>[33-34]</sup>以辣椒 CMS 不育系 9704A × 恢复系 8001 的 F<sub>2</sub> 群体 (120 株) 为材料,通过 RAPD-BSA 法找到了一个与恢复系 8001 中的恢复基因紧密连锁的 RAPD 标记 OPL9<sub>763</sub>,测定了该标

记带的序列,并进行了同源性比较,该标记与 8001 的恢复基因的遗传距离为 4.18 cM。

王述彬<sup>[35]</sup>利用 RAPD 对辣椒细胞质雄性不育系 21A 及其保持系 21B 进行分析比较,找到了辣椒细胞质雄性不育系 21A 基因组 DNA 特异的 RAPD 片段 CMSY15<sub>500</sub>、CMSBE5<sub>850</sub> 和 CMSBG1<sub>900</sub>。并对其黄化苗提取线粒体 DNA,获得了雄性不育系 21A 线粒体 DNA 与雄性不育性相关的 RAPD 标记 CMSAG34,表明辣椒细胞质雄性不育性与线粒体 DNA 的变化存在密切关系。

戴亮芳<sup>[36]</sup>利用 ISSR 对不育系 21A 和保持系 21B 进行筛选,引物 ISSR-24 得到一条约 950 bp 的不育系特有的主带 ISSR-24<sub>950</sub>,另一引物 ISSR-27 得到保持系特有的 1300 bp 的强带和不育系缺失的 700 bp 的弱带。经 AFLP 分析获得不育系 21A 的特异扩增片段 CMS<sub>21A</sub>169。

Zhang 等<sup>[37]</sup>以 21 号牛角椒 A 和湘潭晚的 F<sub>2</sub> 群体组成不育池和可育池进行 PCR 扩增。找到两个标记 OW19<sub>800</sub> 和 OP13<sub>1400</sub>,与恢复基因 (*Rf*) 的遗传距离分别为 8.12、0.37 cM。三点分析表明最可能的排列顺序为 OW19<sub>800</sub>—*Rf*—OP13<sub>1400</sub>。

Kumar 等<sup>[38]</sup>对 Zhang 等得出的两个引物 OPW19 和 OPP13 重新建立群体 (42 个辣椒自交系,5 个甜椒自交系,1 个辣椒不育系 CCC-4261),分析这两个引物的分布和不育恢复性的遗传情况,发现大多数辣椒是不育系,甜椒是恢复系,大多数恢复系有 *Rf* 基因;与 *Rf* 基因有关的两个标记 OPW19<sub>800</sub> 和 OPP13<sub>1400</sub> 在恢复系中分布无频率,因为在恢复系中 *Rf* 基因不一定和条带同时出现。

Kim 等<sup>[39]</sup>通过 BSA 法检测到了 8 个与 *Rf* 基因连锁的 AFLP 标记,只有 AFRF8 成功转化为 CAPs 标记,命名为 AFRF8CAPs,并与之前检测到的 7 个 AFLP 标记一起定位到以前所作的连锁图谱中,其中 AFRF8CAPs 和 *Rf* 基因连锁距离最近,约为 1.8 cM。

辣椒育性研究除了 RAPD、AFLP、SSR 等常规标记,还需要更多其他标记相辅相成。EST 作为近几年开发出来的一个新型标记,与功能基因特异连锁,在标记育性基因方面比非功能标记更准确,更能实现基因的精确定位,所以用 EST-SSR 标记不育基因和恢复基因有很强的实用性和可行性。

## 6 展望

关于作物雄性育性基因的 EST-SSR 标记至今

少有报道。EST 是完整基因中能够特异性标记基因的一部分序列,通常包含了基因足够的结构信息区,从而与其他基因相区分。作为基因表达序列,开发出来的 EST 标记必然与基因共分离。因此,EST 标记在群体中的遗传多样性可直接揭示或反映基因功能的遗传多样性。目前大规模 EST 的产生和数据库的建立为利用生物信息学筛选新基因提供了便利的条件。

如此看来,如果能利用辣椒或同属其他作物 EST 数据库中的雄性不育相关序列设计出 EST-SSR 标记,从一系列同核异质不育系和保持系中筛选出稳定差异带,这对育性基因的定位研究和分子辅助选择育种有重要作用。它的应用为进一步研究辣椒胞质雄性不育遗传机制起了很好的推动作用,将其与非功能标记相结合必会给辣椒胞质雄性不育基因的标记和定位带来更新的突破。

### 参考文献

- [1] Pickersgill B. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. [J] Euphytica, 1997, 96: 129 - 133.
- [2] Powell W, Machray G C, Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats [J] Trends Plant Sci, 1996, 7: 215 - 222.
- [3] 陈海梅,李林志,卫宪云,李斯深,雷天东,胡海洲,王洪刚,张宪省. 小麦 EST-SSR 标记的开发、染色体定位和遗传作图 [J] 科学通报, 2005, 50(20): 2208 - 2216.
- [4] 忻雅,崔海瑞,卢美贞,姚艳玲,金基强,林容杓,崔水莲. 白菜 EST-SSR 信息分析与标记的建立 [J] 园艺学报, 2006, 33(3): 549 - 554.
- [5] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用 [M] 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [6] Kantety R V, Rota M L, Matthews D E, Sorrells M E. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat [J] Plant Mol Biol, 2002, 48: 501 - 510.
- [7] Aggawal R K, Hendre P S, Varshney R K, Bhat P R, Krishnakumar V, Singh L. Identification, characterization and utilization of EST-derived genic microsatellite markers for genome analyses of coffee and related species [J] Theor Appl Genet, 2007, 114: 359 - 372.
- [8] Yu J K, La Rota M, Kantety R V, Sorrells M E. EST derived SSR markers for comparative mapping in wheat and rice [J] Mol Genomics, 2004, 271: 742 - 751.
- [9] Remington D L, Thomsberry J M, Matsuoka Y, Wilson L M, Whitt S R, Doebley J, Kresovich S, Goodman M M, Buckler E S. Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome [J] Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 11479 - 11484.
- [10] Vigouroux Y, McMullen M, Hittinger C T, Houchins K, Schulz L, Kresovich S, Matsuoka Y, Doebley J. Identifying genes of agro-

- nom ic importance in maize by screening microsatellites for evidence of selection during domestication [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 9650 - 9655.
- [11] Luo M, Dang P, Guo B Z, He G, Holbrook C C, Bausher M G, Lee R D. Generation of expressed sequence tags (ESTs) for gene discovery and marker development in cultivated peanut [J]. Crop Science, 2005, 45: 346 - 353.
- [12] Eujayl I, Sorrels M E, Baum M, Wolters P, Powell W. Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat [J]. Theor Appl Genet, 2002, 104: 399 - 407.
- [13] Gupta P K, Rustgi S, Shama S, Singh R, Kumar N, Balyan H S. Transferable EST-SSR marker for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat [J]. Mol Gen Genomics, 2003, 270: 315 - 323.
- [14] 陈军方, 任正隆, 高丽锋, 贾继增. 从小麦 EST 序列中开发新的 SSR 引物 [J]. 作物学报, 2005, 31 (2): 154 - 158.
- [15] 忻雅, 崔海瑞, 张明龙, 姚艳玲, 卢美贞, 金基强, 林容杓, 崔水莲. 白菜 EST-SSR 标记的通用性 [J]. 细胞生物学杂志, 2006, 28 (2): 248 - 252.
- [16] Varshney R K, Signund R, Bomer A, Korzun V, Stein N, Sorrells M E, Langridge P, Graner A. Interspecific transferability and comparative mapping of barley EST-SSR markers in wheat, rye and rice [J]. Plant Science, 2005, 168: 195 - 202.
- [17] Chen H M, Li L Z, Wei X Y, Li S S, Lei T D, Hu H Z, Wang H G, Zhang X S. Development, chromosome location and genetic mapping of EST-SSR markers in wheat [J]. Chinese Science Bulletin, 2005, 50: 2328 - 2336.
- [18] Wang C B, Guo W Z, Cai C P, Zhang T Z. Characterization, development and exploitation of EST-derived microsatellites in *Gossypium ninioidii* Uibrich [J]. Chinese Science Bulletin, 2006, 51: 557 - 561.
- [19] Leigh F, Les V, Law J, Wolters P, Powell W, Donini P. Assessment of EST and genomic microsatellite markers for variety discrimination and genetic diversity studies in wheat [J]. Euphytica, 2003, 133: 359 - 366.
- [20] Gao L F, Tang J F, Li H W, Jia J Z. Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches [J]. Molecular Breeding, 2003, 12: 245 - 261.
- [21] Guo W Z, Wang W, Zhou B L, Zhang T Z. Cross-species transferability of *G. aboreum* derived EST-SSRs in the diploid species of *Gossypium* [J]. Theor Appl Genet, 2006, 112: 1573 - 1581.
- [22] Bandopadhyay R, Shama S, Rustgi S, Singh R, Kumar A, Balyan H S, Gupta P K. DNA polymorphism among 18 species of *Triticum-Aegilops* complex using wheat EST-SSRs [J]. Plant Science, 2004, 166: 349 - 356.
- [23] Nagy I, Sasvári Z, Stégl A, Acs S, Bádos G. Occurrence and polymorphism of microsatellite repeats in the sequence databases in pepper [C] // Voortrips R E. Proceedings of XIIth Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant Noordwijkerhout The Netherland, 2004, 17 - 19.
- [24] Portis E, Nagy I, Sasvári Z, Stégl A, Barchi L, Lanteri S. The design of *Capsicum* spp. SSR assays via analysis of *in silico* DNA sequence, and their potential utility for genetic mapping [J]. Plant Science, 2007, 172: 640 - 648.
- [25] Lee J M, Nahm S H, Kim Y M, Kim B D. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper [J]. Theor Appl Genet, 2004, 108: 619 - 627.
- [26] Yi G, Lee J M, Lee S, Choi D, Kim B D. Exploitation of pepper EST-SSRs and an SSR-based linkage map [J]. Theor Appl Genet, 2006, 114: 113 - 130.
- [27] Minamiyama Y, Tsuru M, Hirai M. An SSR - based linkage map of *Capsicum annuum* [J]. Mol Breeding, 2006, 18: 157 - 169.
- [28] Huang S W, Zhang B X, Miboume D, Cardle L, Yang G M, Guo J Z. Development of pepper SSR marker from sequence database [J]. Euphytica, 2000, 117: 163 - 167.
- [29] 邓晓辉. 不结球白菜温敏型胞质雄性不育性分子标记和相关基因的克隆与表达分析 [D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- [30] 朱军. 遗传学 [M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [31] 邹学校. 中国辣椒 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [32] 张宝玺, 王立浩, 黄三文, 郭家珍, 杨桂梅, 堵玫珍. 辣椒分子遗传图谱的构建和胞质雄性不育恢复系的 QTL 分析 [J]. 中国农业科学, 2003, 36 (7): 818 - 822.
- [33] 唐冬英, 邹学校, 刘志敏, 马艳青, 张竹青, 戴雄泽. 辣椒胞质雄性不育恢复基因的 RAPD 标记 [J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2004, 30 (4): 307 - 309.
- [34] 唐冬英. 辣椒雄性不育恢复基因的 RAPD 标记与内源激素含量研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2002.
- [35] 王述彬. 辣 (甜) 椒胞质雄性不育系遗传机制及不育基因分子标记研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2005.
- [36] 戴亮芳. 辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 胞质雄性不育性状的生化标记与分子标记研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- [37] Zhang B X, Huang S W, Yang G M, Guo J Z. Two RAPD markers linked to a major fertility restorer gene in pepper [J]. Euphytica, 2000, 113: 115 - 161.
- [38] Kumar S, Singh V, Singh M, Rai S, Kumar S. Genetic and distribution of fertility restoration associated RAPD markers in inbreds of pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Scientia Horticulturae, 2007, 111: 197 - 202.
- [39] Kim D S, Kim D H, Yoo J H, Kim B D. Cleaved amplified polymorphic sequence and amplified fragment length polymorphism markers linked to the fertility restorer gene in chili pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Mol Cell, 2006, 21: 135 - 140.