

辣椒抗根结线虫基因 *Me3* 的精细定位

许小艳^{1,2}, 刘 峰^{1,2}, 康厚祥¹, 张竹青², 邹学校^{2,*}, 谢丙炎^{1,*}

(¹中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ²湖南省农业科学院蔬菜研究所, 长沙 410128)

摘 要: 以含 *Me3* 基因的抗根结线虫辣椒自交系 ‘HDA149’ 为父本, 感根结线虫辣椒自交系 ‘8214’ 为母本, 构建了一个 2 133 株的 F₂ 作图群体。采用群体分离分析法 (Bulked Segregant Analysis, BSA), 构建抗、感病两个 DNA 池, 对由两亲本筛选出来的 285 对引物进行扩增分析, 发现引物 SSCP_B322 和 EPMS658 在抗、感池间具有稳定的多态性。继续用这两对引物对 F₂ 单株进行扩增, 以 JoinMap 3.0 软件分析发现 SSCP_B322 和 EPMS658 标记位于 *Me3* 基因两侧, 遗传图距分别为 0.56 cM 和 1.33 cM。运用回交群体 BC₁ 和 F₃ 群体验证了这两个标记, 可有效用于辣椒抗线虫分子标记辅助育种, 也为图位克隆 *Me3* 基因奠定了基础。

关键词: 辣椒; 根结线虫; *Me3* 基因; 精细定位

中图分类号: S 641.3

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 02-0288-07

Fine Mapping of the Root-knot Nematode Resistance Gene *Me3* in Pepper

XU Xiao-yan^{1,2}, LIU Feng^{1,2}, KANG Hou-xiang¹, ZHANG Zhu-qing², ZOU Xue-xiao^{2,*}, and XIE Bing-yan^{1,*}

(¹Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ²Institute of Vegetable, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410128, China)

Abstract: The pepper (*Capsicum annuum*) resistant inbred line ‘HDA149’ with *Me3* was used as male parent, and the susceptible inbred line ‘8214’ was used as female parent in the study. Mapping population included 2 133 F₂ individuals. Bulk-segregant analysis with DNA pools, from susceptible or resistant F₂ progenies, was performed to identify markers linked to *Me3*. There were 285 pairs of primers with polymorphism between two parents, but just SSCP_B322 and EPMS658 were polymorphic between the two bulks. Then F₂ individuals were amplified with the two pairs of primers, recording data. Linkage analysis used JoinMap 3.0 software. The genetic distance of SSCP_B322 and EPMS658 was 0.56 cM and 1.33 cM respectively, and two markers were two sides of *Me3* gene. They had been verified in BC₁ group and F₃ families, which has been practically useful to marker-assisted selection in pepper breeding and *Me3* gene cloning.

Key words: pepper; *Capsicum annuum* L.; *Meloidogyne incognita*; *Me3* gene; fine map

根结线虫 (*Meloidogyne* spp.) 是当前中国乃至世界最重要的农作物病原线虫之一, 最常见的有南方根结线虫 (*M. incognita*)、花生根结线虫 (*M. arenaria*)、爪哇根结线虫 (*M. javanica*) 及北方

收稿日期: 2010-12-16; 修回日期: 2011-01-21

基金项目: 国家大宗蔬菜产业技术体系项目; 公益性行业 (农业) 科研专项 (2011303018)

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

根结线虫 (*M. hapla*), 其中以南方根结线虫对辣椒的为害最重, 尤以长期重茬的保护地为重, 而且根结线虫的侵染甚至是某些病害发生的先决条件 (蒲金基 等, 2002)。由于缺乏高抗线虫的蔬菜品种, 生产上主要采用甲基溴熏蒸土壤或化学杀线剂防治线虫, 对蔬菜品质和环境均造成严重影响, 导致温室土壤严重退化。因此, 培育辣椒抗线虫品种是最为经济有效的方法。

辣椒野生资源中广泛存在抗线虫基因, Hare (1957) 首次在 *C. frutescens* L. ‘Santanka XS’ 上发现了单显性抗根结线虫基因 *N*。目前在辣椒上已经发现并且命名的抗线虫基因至少有 10 个: *N*、*Me1*、*Me2*、*Me3*、*Me4*、*Me5*、*Me7*、*Mech1*、*Mech2*、*Cami*, 这些基因的来源、抗谱范围、抗病机制、对温度的稳定性以及连锁情况等均不同。其中 *Me3* 为热稳定型, 且抗谱较广, 其研究利用价值较大 (Bleve-Zacheo et al., 1998; Fery et al., 1998; Djian-Caporalino et al., 2001, 2007; Souza-Sobrinho et al., 2002; Chen et al., 2007)。Djian-Caporalino 等 (2001, 2007) 运用双单倍体和 RAPD、AFLP 技术构建了对高温抗性稳定的辣椒抗线虫基因 *Me3* 和 *Me4* 的高密度遗传图谱, 随后运用 3 个杂交组合 ‘DH330 × DLL’、‘DLL × PM702’ 和 ‘PM687 × YW’ 的 F_{2-3} 群体以 4 个共有的标记作为参照, 将 6 个 *Me* 基因整合在一张图谱上, 并将其定位在 P9 染色体上。尽管 Djian-Caporalino 找到了多个与 *Me3* 连锁的标记, 但是与 *Me3* 连锁较近的标记大多为 AFLP 标记和 SSCP (Single-stand conformation polymorphism) 标记, 且遗传图距相对较远。因此, 本研究旨在找到与 *Me3* 更紧密连锁的 SSR 标记, 应用于分子标记辅助选择和 *Me3* 基因的图位分离, 以加快辣椒抗线虫品种的选育及 *Me3* 基因的研究利用进程。

1 材料与方法

1.1 材料及抗性鉴定

以含 *Me3* 基因的抗病品种 ‘HDA149’ 为父本 (来自中国农业科学院蔬菜花卉研究所), 高感南方根结线虫的感病品种 ‘8214’ 为母本 (来自湖南省农业科学院蔬菜研究所), 二者杂交配制 F_2 群体, 分别以两亲本为轮回亲本配制的回交群体及 F_3 群体为验证群体, 以 F_1 群体为对照群体。以茄门甜椒 (来自中国农业科学院蔬菜花卉研究所) 为培养南方根结线虫的材料。本试验在中国农业科学院蔬菜花卉研究所病害组实验室进行。2009 年 2 月至 5 月进行群体抗性鉴定, 7 月至 11 月进行重复鉴定。

从本课题组温室继代保存南方根结线虫的辣椒根结上挑出线虫卵块, 于 24 °C 的恒温箱中孵化线虫后, 接种于温室栽培的茄门甜椒上进行扩繁。

参照 Djian-Caporalino 等 (1999, 2007) 的辣椒南方根结线虫鉴定方法对辣椒群体进行抗感病鉴定。辣椒种子催芽后播于育苗盘中, 四叶期时移栽于 9 cm 的营养钵中。五叶期时在紧邻根系周围打两个 2 cm 深的小孔, 每植株接种 600 条二龄南方根结线虫, 整个生长期注意控水和控温 (18 ~ 28 °C)。接种 60 d 后对植株进行抗性鉴定。先将辣椒根洗净, 放入 0.1 g · L⁻¹ 的伊红黄中染色 30 min, 卵块被染成红色, 然后调查每根系的卵块数 (egg masses, EM), EM ≤ 5 时则为抗病单株; EM > 5 时则为感病单株; 当 EM < 5, 但根结数 ≥ 8 时, 则为性状不确定植株, 记录数据。从 F_2 抗病单株中挑取 20 株既没卵块也没根结的健壮植株, 移栽到 15 cm 的营养钵中, 繁育 F_3 代。

1.2 基因组 DNA 提取及抗感池的构建

采用 CTAB 方法提取辣椒单株叶片总 DNA (李荣华 等, 2009)。紫外分光光度计测定 DNA 浓度和纯度, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量, 将模板 DNA 浓度调整到工作液浓度 25 ~ 50 ng · μL⁻¹。

根据 F₂ 单株的抗性鉴定结果, 随机选取表现极抗和极感单株各 10 株, 将 DNA 等量混合组成抗病池和感病池。

1.3 PCR 扩增

共筛选了 525 对引物 (Huang et al., 2001; Lee et al., 2004; Ogundiwin et al., 2005; Yi et al., 2006; Minamiyama et al., 2006; Nagy et al., 2007)。采用 20 μL 反应体系: 10 × PCR buffer (含 Mg²⁺) 2 μL, dNTPs (5 mmol · L⁻¹) 0.8 μL, primer 1 (10 μmol · L⁻¹) 0.8 μL, primer 2 (10 μmol · L⁻¹) 0.8 μL, 模板 DNA (25 ~ 50 ng · μL⁻¹) 1.5 μL, Taq 酶 (5 U · μL⁻¹) 0.2 μL, 加 ddH₂O 至 20 μL。扩增程序: 94 °C 4 min, (94 °C 45 s, 55 °C 40 s, 72 °C 90 s, 34 个循环), 72 °C 8 min, 4 °C 保存至电泳 (胡勇胜 等, 2007)。

将胶模夹在电泳槽上, 用 1% 的琼脂糖凝胶封底, 室温放置 30 min, 制作 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶, 室温放置 1 h 使胶充分凝固, 然后上样电泳, 160 V 电泳 2 h, 所用电泳缓冲液为 0.5 × TBE。电泳结束后, 小心取下凝胶, 硝酸银染色, 观察结果并拍照 (胡勇胜, 2007; 朱玉丽, 2007)。

1.4 数据统计分析及标记验证

对 F₂ 分离群体的抗感单株进行扩增电泳, 分析电泳条带数据, a 表示条带与父本相同, b 表示条带与母本相同, h 表示条带是杂合型, u 表示条带不确定。利用 JoinMap 3.0 软件对条带数据进行连锁分析, 计算标记与基因间的遗传图距, 并按 Kosambi 系数将其转化为 Centi-Morgan (cM), 构建抗线虫基因 *Me3* 基因的分子标记连锁图谱。运用筛选到的标记对 F₃ 群体、回交群体 BC₁S ‘8214 × HDA149’ × ‘8214’ 和 BC₁H ‘8214 × HDA149’ × ‘HDA149’ 进行扩增分析, 验证标记的有效性。

2 结果与分析

2.1 辣椒接种结果的统计与抗线虫的遗传分析

作为对照的 ‘8214’、‘HDA149’ 和 F₁ 群体分别接种 30 株, 接种 60 d 后, 观察统计结果。‘8214’ 全部表现感病, ‘HDA149’ 和 F₁ 群体全部表现抗病。F₂ 群体接种 2 133 株, 其中 1 499 株表现抗病, 453 株表现感病, 不能确定抗感性状的植株 181 株不进行统计分析。结果表明, 在该群体中, 抗感植株的分离比例为 3 : 1 (χ^2 , 3.35 < 3.84。), 表明辣椒抗根结线虫基因 *Me3* 为单显性抗性基因, 进一步证实了原有研究结果的正确性 (Djian-Caporalino et al., 2001)。用于验证的回交群体 BC₁S 接种 59 株, 其中 34 株表现抗病, 21 株表现感病, 4 株不能确定抗感性状, 抗感单株比例为 1 : 1 (χ^2 , 3.07 < 3.84); 回交群体 BC₁H 接种 47 株, 全部表现抗病; F₃ 群体接种 95 株, 其中 82 株表现抗病, 13 株表现感病 (表 1)。

表 1 辣椒接种南方根结线虫 60 d 后的鉴定结果及分析
Table 1 The conclusion and analysis of *Capsicum annuum* progenies inoculated with *M. incognita* after sixty days

杂交组合 Cross	群体 Progeny	抗病植株数 Number of resistant plants	感病植株数 Number of susceptible plants	不确定的植株数 Number of uncertain plants	χ^2	<i>P</i>
8214 × HDA149	F ₁	30	0	0	—	—
8214 × HDA149	F ₂	1 499	453	181	3.35	> 0.05
8214 × HDA149	F ₃	82	13	0	—	—
F ₁ × 8214	BC ₁ S	34	21	4	3.07	> 0.05
F ₁ × HDA149	BC ₁ H	47	0	0	—	—

2.2 亲本间多态性引物的筛选

共筛选了 520 对 SSR(Simple sequence repeat)引物, 两对 SCAR(Sequence-characterized amplified regions)引物, 两对 SSCP 引物和 1 对 CAPS(Cleave amplified polymorphic sequence)引物, 其中 284 对 SSR 引物和 1 对 SSCP 引物在 ‘HDA149’ 和 ‘8214’ 两亲本间具有多态性, 多态性比例为 54.29%。

2.3 *Me3* 基因分子标记连锁图谱的构建

将由亲本初次筛选到的引物对抗、感池进行扩增分析, 重复 5 次, 选取 3 次以上扩增均表现相同多态性的引物。结果显示, 在抗病、感病池间仍表现有差异的引物有两对, SSCP_B322 和 EPMS658。进一步用这两对引物对 F_2 部分极抗、极感的单株进行扩增分析, 结果显示与鉴定结果相一致, 然后用这两对引物对全部 F_2 分离群体进行扩增分析(图 1, 图 2)。分析电泳条带, 用 JoinMap 3.0 软件对数据进行连锁分析, SSCP_B322 和 EPMS658 标记位于 *Me3* 基因两侧, 遗传图距分别为 0.56 cM 和 1.33 cM(图 3)。

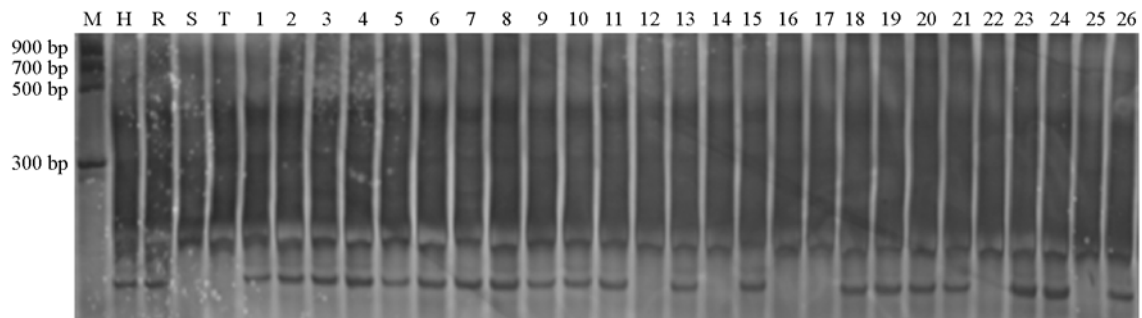


图 1 引物 SSCP_B322 在部分 F_2 群体中的扩增图

M: Marker II; H: HDA149; R: 抗病池; S: 感病池; T: 8214; 1~26: F_2 群体上的部分单株扩增。

Fig. 1 The PCR amplification pattern with primer SSCP_B322 in F_2 population

M: Marker II; H: HDA149; R: Resistant pool; S: Sensitive pool;

T: 8214; 1 - 26: The PCR amplification pattern in F_2 population.

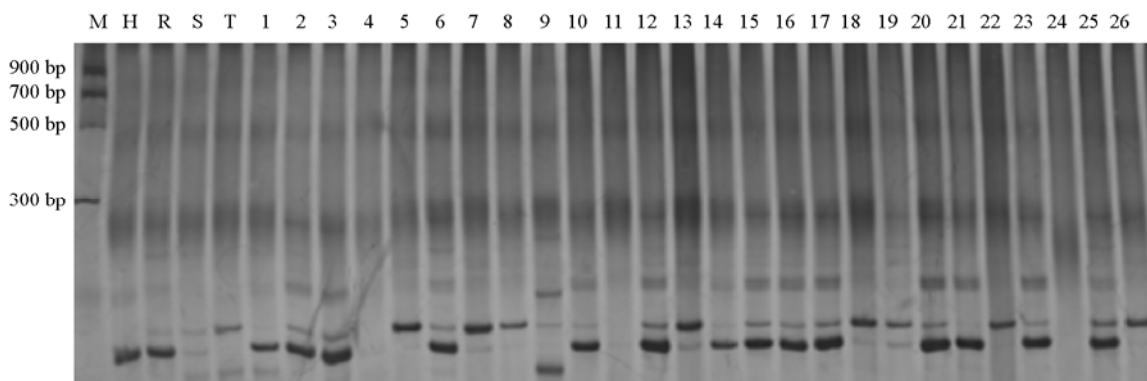


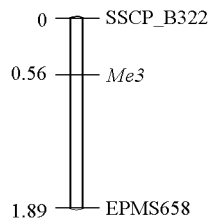
图 2 SSR 引物 EPMS658 在部分 F_2 群体中的扩增图

M: Marker II; H: HDA149; R: 抗病池; S: 感病池; T: 8214; 1~26: F_2 群体上的部分单株扩增。

Fig. 2 The PCR amplification pattern with SSR primer EPMS658 in F_2 population

M: Marker II; H: HDA149; R: Resistant pool; S: Sensitive pool;

T: 8214; 1 - 26: The PCR amplification pattern in F_2 population.

图 3 *Me3* 基因精细定位Fig. 3 Fine mapping of *Me3* gene

2.4 分子标记的验证

利用 SSCP_B322 和 EPMS658 标记对 F_3 群体、回交群体 BC_1S 和 BC_1H 进行扩增分析。SSCP_B322 对 F_3 群体的扩增结果显示,除了 1 株与鉴定结果不相符外,其它都与鉴定结果相一致;EPMS658 对 F_3 群体的扩增结果与鉴定结果完全符合。两对引物对回交群体 BC_1S 的扩增结果显示,除 1 株不能确定抗病性状的单株外,SSCP_B322 对它的扩增结果表现为抗病,而 EPMS658 对它的扩增结果表现为感病外,其它单株都与鉴定结果相一致;两对引物对回交群体 BC_1H 的扩增结果与鉴定结果相一致,全部表现为抗病。验证结果表明:SSCP_B322 和 EPMS658 标记的鉴定效率较高,可以进行快速鉴定,有效用于辣椒抗线虫分子标记辅助选择育种。

3 讨论

根结线虫是极难防治的土传性病害,同时线虫的侵染又可加重枯萎病、根腐病等土传性真菌病害和部分细菌病害的发生。生产上常用的杀线虫药剂不仅费用昂贵而且严重污染环境,严重制约中国无公害蔬菜生产的可持续发展。

在作物野生资源中广泛存在抗线虫基因,如番茄、马铃薯、辣椒、大豆、棉花、禾谷类作物等多种植物的抗线虫基因已相继被发现或定位克隆。第 1 个被克隆的抗线虫基因是 *HsI^{pro-1}*,来源于甜菜,抗甜菜胞囊线虫 (Cai et al., 1997),随后番茄抗南方根结线虫 *Mi* 基因被克隆 (Milligan et al., 1998)。目前,*Mi* 基因家族共有 9 个,原来的 *Mi* 抗性位点表示为 *Mi-1*,新发现的抗性基因分别为 *Mi-2*、*Mi-3*、*Mi-4*、*Mi-5*、*Mi-6*、*Mi-7*、*Mi-8*、*Mi-9* (Ammiraju et al., 2003)。另一个来源于番茄的抗线虫基因 *Hero* 对马铃薯胞囊线虫具有广谱的抗性 (Ernst et al., 2002)。在大豆上已经命名的抗胞囊线虫基因有 5 个,分别为 *rhg1*、*rhg2*、*rhg3*、*Rhg4* 和 *rhg5*。辣椒野生资源中也发现至少有 10 个抗线虫基因,其中在 *PM217* 和 *PM687* 的双单倍体群体中发现 5 个抗线虫基因 (*Me1* ~ *Me5*) (Djian-Caporalino et al., 2001)。经过长期的栽培驯化,这些野生植物抗线虫基因已通过自然杂交渐渗到各类栽培品种中,形成了丰富的抗线虫种质资源,使利用抗线虫基因来控制线虫危害成为了可能。

在辣椒抗线虫基因家族中,*Me1*、*Me3* 为广谱抗性基因,能抗南方根结线虫、花生根结线虫、爪哇根结线虫等 3 种主要根结线虫,而 *Me2*、*Me4*、*Me5* 分别抗一种主要的根结线虫,或仅仅抗一种线虫的某些株系 (Castagnone-sereno et al., 1996; Blevé-Zacheo et al., 1998)。其中,*Me3* 为温度不敏感型,其抗性的表达发生在侵染的早期,幼虫与根接触时即刻产生过敏性坏死反应,超微结构观察证实 *Me3* 基因植株对线虫的侵染表现为侵染点附近的过敏性坏死,并在 42 °C 的高温下也能保持完全活性;而 *Me1* 类似于番茄中的 *Mi-1* 基因,其抗性反应开始于幼虫在取食位点定居之后,反应较慢,主要发生在线虫侵染后巨细胞形成的过程中,高温条件下其抗性部分丧失,即为温敏型基因 (Djian-Caporalino et al., 1999; Pegard et al., 2005)。因此,*Me3* 基因具有更广阔的应用前景。

从辣椒抗线虫相关基因的分子遗传图谱中可以看出, *Me3* 与 *Me1*, *Me4*, *Me7*, *Mech1* 和 *Mech2* 同位于辣椒 *P9* 染色体上一个 28 cM 的“抗线虫基因簇区域”, 在此区域已定位 10 个标记, 其中离 *Me3* 基因最近的 AFLP 标记为 0.9 cM (Kruijt et al., 2004; Djian-Caporalino et al., 2007)。本研究中采用 BSA 方法, 在前人研究的基础上对 *Me3* 基因图谱进行加密, 找到 2 个与 *Me3* 基因紧密连锁的分子标记 EPMS658 和 SSCP_B322, 遗传图距分别为 0.56 cM、1.33 cM。SSCP_B322 在抗性单株上只扩增出一种带型, 而 EPMS658 扩增出两种, 可区分杂合子和显性纯合子。另外, 还运用回交群体 BC₁S、BC₁H 和 F₃ 群体对 SSCP_B322 和 EPMS658 标记进行验证。验证结果显示: 扩增结果与抗性鉴定结果相符, 证实两标记可有效、快速的应用于辣椒抗线虫分子标记辅助选择。同时, 也为下一步图位克隆 *Me3* 基因奠定了基础。

References

- Ammiraju J, Veremis J, Huang X, Roberts P, Kaloshian I. 2003. The heat-stable root-knot nematode resistance gene *Mi-9* from *Lycopersicon peruvianum* is localized on the short arm of chromosome 6. *Theor Appl Genet*, 106: 478 - 484.
- Bleve-Zacheo T, Bongiovanni M, Melillo M T, Castagnone-Sereno P. 1998. The pepper resistance genes *Me1* and *Me3* induce differential penetration rates and temporal sequences of root cell ultrastructural changes upon nematode infection. *Plant Science (Limerick)*, 133 (1): 79 - 90.
- Castagnone-sereno P, Bongiovanni M, Palloix A, Dalmaso A. 1996. Selection for *Meloidogyne incognita* virulence against resistance genes from tomato and pepper and specificity of the virulence/resistance determinants. *EUR J Plant Pathol*, 102: 585 - 590.
- Cai D, Kleine M, Kifle S, Harloff H J, Sandal N N, Marcker K A, Klein-Lankhorst R M, Salentijn E M J, Lange W, Stiekema W J, Wyss U, Grundler F M W, Jung C. 1997. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science*, 275 (5301): 832 - 834.
- Castagnone-Sereno P, Bongiovanni M, Wajnberg E. 2007. Selection and parasite evolution: a reproductive fitness cost associated with virulence in the parthenogenetic nematode *Meloidogyne incognita*. *Evolutionary Ecology*, 21 (2): 259 - 270.
- Chen Rugang, Li Hanxia, Zhang Liying, Zhang Junhong, Xiao Jinghua, Ye Zhibiao. 2007. *CaMi*, a root-knot nematode resistance gene from hot pepper (*Capsicum annuum* L.) confers nematode resistance in tomato. *Plant Cell Reports*, 26 (7): 895 - 905.
- de Souza-Sobrinho F, Maluf W R, Gomes L A A, Campos V P. 2002. Inheritance of resistance to *Meloidogyne incognita* race 2 in the hot pepper cultivar Carolina Cayenne (*Capsicum annuum* L.). *Genet Mol Res*, 1 (3): 271 - 279.
- Djian-Caporalino C, Pijarowski L, Januel A, Lefebvre V, Daubèze A, Palloix A, Dalmaso A, Abad P. 1999. Spectrum of resistance to root-knot nematodes and inheritance of heat-stable resistance in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Theor Appl Genet*, 99 (3): 496 - 502.
- Djian-Caporalino C, Pijarowski L, Fazari A, Samson M, Gaveau L, O'Byrne C, Lefebvre V, Caranta C, Palloix A, Abad P. 2001. High-resolution genetic mapping of the pepper (*Capsicum annuum* L.) resistance loci *Me3* and *Me4* conferring heat-stable resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Theor Appl Genet*, 103 (4): 592 - 600.
- Djian-Caporalino C, Fazari A, Arguel M J, Vernie T, VandeCastele C, Faure I, Brunoud G, Pijarowski L, Palloix A, Lefebvre V, Abad P. 2007. Root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) *Me* resistance genes in pepper (*Capsicum annuum* L.) are clustered on the P9 chromosome. *Theor Appl Genet*, 114 (3): 473 - 486.
- Ernst K, Kumar A, Kriseleit D, Kloos D U, Phillips M S, Ganai M W. 2002. The broad-spectrum potato cyst nematode resistance gene (*Hero*) from tomato is the only member of a large gene family of NBS-LRR genes with an unusual amino acid repeat in the LRR region. *Plant Journal*, 31 (2): 127 - 136.
- Fery R L, Dukes P D Sr, Thies J A. 1998. 'Carolina Wonder' and 'Charleston Belle': Southern root-knot nematode-resistant bell peppers. *HortScience*, 33 (5): 900 - 902.
- Hare W W. 1957. Inheritance of resistance to root-knot nematodes in pepper. *Phytopathology*, 47: 455 - 459.
- Hu Yong-sheng, Mao Sheng-li, Wang Li-hao, Zhang Bao-xi, Liu Ming-yue. 2007. Optimizatism of SSR system in pepper. *Journal of China Capsicum*, 22: 17 - 19. (in Chinese)
- 胡勇胜, 毛胜利, 王立浩, 张宝玺, 刘明月. 2007. 辣椒 SSR 反应体系的优化. *辣椒杂志*, 22: 17 - 19.
- Hu Yong-sheng. 2007. Constructing the molecular linkage map of pepper and the QTL analysis of phytophthora blight [M. D. Dissertation].

- Changsha: Hunan Agricultural University. (in Chinese)
- 胡勇胜. 2007. 辣椒分子连锁图谱构建与抗病性状的 QTL 分析[硕士论文]. 长沙: 湖南农业大学.
- Huang Sanwen, Zhang Baoxi, Dan M, Linda C, Yang Guimei, Guo Jiazhen. 2001. Development of pepper SSR markers from sequence databases. *Euphytica*, 117 (2): 163 - 167.
- Kruijt M, Brandwagt B F, de Wit P J G M. 2004. Rearrangements in the *Cf-9* disease resistance gene cluster of wild tomato have resulted in three genes that mediate Avr9 responsiveness. *Genetics*, 168: 1655 - 1663.
- Lee J M, Nahm S H, Kim Y M, Kim B D. 2004. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theor Appl Genet*, 108 (4): 619 - 627.
- Li Rong-hua, Xia Yan-shi, Liu Shun-zhi, Sun Li-li, Guo Pei-guo, Miao Shen-yu, Chen Jian-hui. 2009. CTAB-improved method of DNA extraction in plant. *Research and Exploration in Laboratory*, 28 (9): 14 - 16. (in Chinese)
- 李荣华, 夏岩石, 刘顺枝, 孙莉丽, 郭培国, 缪绅裕, 陈健辉. 2009. 辣椒改进的 CTAB 提取植物 DNA 方法. *实验室研究与探索*, 28 (9): 14 - 16.
- Milligan S B, Bodeau J, Yaghoobi J, Kaloshian I, Zabel P, Williamson V M. 1998. The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *Plant Cell*, 10 (8): 1307 - 1319.
- Minamiyama Y, Tsuru M, Hirai M. 2006. An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. *Molecular Breeding*, 8 (2): 157 - 169.
- Nagy I, Stágel A, Sasvári Z, Röder M, Ganal M. 2007. Development, characterization, and transferability to other Solanaceae of microsatellite markers in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genome*, 50 (7): 668 - 688.
- Ogundiwin E A, Berke T F, Massoudi M, Black L L, Huestis G, Choi D, Lee S, Prince J P. 2005. Construction of 2 intraspecific linkage maps and identification of resistance QTLs for *Phytophthora capsici* root-rot and foliar-blight diseases of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genome*, 48 (4): 698 - 711.
- Pu Jin-ji, Zeng Hui-cai, Liu Xiao-mei. 2002. Influence of root-knot nematode on the occurrence of phytophthora root rot of hot pepper and control effect of metalaxyl. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 22 (6): 7 - 19. (in Chinese)
- 蒲金基, 曾会才, 刘晓妹. 2002. 根结线虫对辣椒疫病发生及甲霜灵防效的影响. *热带农业科学*, 22 (6): 7 - 19.
- Pegard A, Brizzard G, Fazari A, Soucaze O, Abad P, Djian-Caporalino C. 2005. Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. *Phytopathology*, 95: 158 - 165.
- Portis E, Nagy I, Sasvari Z, Stágel 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 (3): 640 - 648.
- Yi G, Lee J M, Lee S, Choi D, Kim B D. 2006. Exploitation of pepper EST-SSRs and an SSR-based linkage map. *Theor Appl Genet*, 114 (1): 113 - 130.
- Zhu Yu-li. 2007. Studies on SSR molecular marker of wheat powdery mildew resistance genes *Pm2* and *Pm5e*[M. D. Dissertation]. Tai'an: Shandong Agricultural University. (in Chinese)
- 朱玉丽. 2007. 小麦抗白粉病基因 *Pm2* 和 *Pm5e* 的 SSR 分子标记研究[硕士论文]. 泰安: 山东农业大学.