

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2008.02085

## 草棉 EST-SSRs 的遗传评价

余 渝<sup>1,2</sup> 王志伟<sup>1</sup> 冯常辉<sup>1</sup> 张艳欣<sup>1</sup> 林忠旭<sup>1,\*</sup> 张献龙<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 湖北武汉 430070; <sup>2</sup> 新疆农垦科学院棉花所, 新疆石河子 832000)

**摘要:** 根据 GenBank 中公布的 247 条草棉 EST 序列, 搜索 SSR 并进行引物设计。其中的 25 条序列含有 27 个 SSR, 1~6 碱基重复类型都存在, 二碱基和三碱基重复的频率较高。为了明确在 A、D 和 AD 基因组中的可转移性, 依据 25 条序列共设计 25 对 EST-SSR 引物, 其中 22 对引物扩增出清晰可辨的 DNA 条带, 产生 92 个多态性片段, 平均每对引物产生 3.64 个多态性片段。引物的多态性信息含量(PIC)在 0.49~0.91 之间, 平均为 0.81。6 对引物在 BC<sub>1</sub> 种间作图群体[(鄂棉 22 × Pima3-79) × 鄂棉 22]中表现多态性, 产生 7 个多态性位点, 其中 5 个为共显性, 2 个为显性。除 HAU230b 标记在 BC<sub>1</sub> 分离群体中不符合孟德尔式分离比例, 其余引物表现正常分离。6 个位点被整合到陆地棉和海岛棉种间 BC<sub>1</sub> 遗传连锁图谱上的 6 条染色体: 有 4 个位于 A 亚基因组的 4 条染色体上(Chr.6、10、11 和 12), 2 个位于 D 亚基因组的 2 条染色体(Chr.19 和 20)。

**关键词:** 草棉; 表达序列标签; 简单序列重复; 多态性信息含量; 遗传作图

## Genetic Evaluation of EST-SSRs Derived from *Gossypium herbaceum*

YU Yu<sup>1,2</sup>, WANG Zhi-Wei<sup>1</sup>, FENG Chang-Hui<sup>1</sup>, ZHANG Yan-Xin<sup>1</sup>, LIN Zhong-Xu<sup>1,\*</sup>, and ZHANG Xian-Long<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei; <sup>2</sup> Cotton Institute, Xinjiang Academy Agricultural and Reclamation Science, Shihezi 832000, Xinjiang, China)

**Abstract:** *Gossypium herbaceum* (A genome) is generally regarded as the most closely relative of the progenitor at subgenomes of allotetraploid cotton, of which the evolution is necessary to study. In order to investigate the contribution of *G. herbaceum* to the tetraploid genome, EST-SSRs were isolated from 247 EST sequences of *G. herbaceum* documented in GenBank. Twenty-seven perfect SSRs were identified from twenty-five unique ESTs. These SSRs contained 1–6 bp nucleotide motifs with high frequency for 2-bp and 3-bp nucleotide motifs. A total of 25 primers were developed and 22 of them could amplify 24 cotton accessions including 7 diploids of A genome, 11 diploids of D genome and 6 allotetraploids of AD genome; only HAU217 could specifically amplified A genome and the other 21 primers could amplified both A and D genomes. The number of polymorphic fragments generated by each primer ranged from 1 to 9 with an average of 3.64. The PIC values ranged from 0.49 to 0.91 with an average of 0.81. Among the 25 EST-SSR primers, six primers revealed polymorphism between Emian 22 and Pima 3-79, and yielded seven polymorphic loci (five were codominant and two dominant) in the BC<sub>1</sub> [(Emian22 × Pima3-79) × Emian22] population. Only HAU230b showed distorted segregation in the BC<sub>1</sub> population. Six polymorphic loci were integrated into six chromosomes of our interspecific BC<sub>1</sub> backbone genetic linkage map among which, four loci were mapped on four chromosomes of A sub-genome (Chr. 6, 10, 11, 12), and two loci on two chromosomes of D sub-genome (Chr. 19 and 20).

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(863 计划)项目(2006AA10Z153, 20060AA00105)

作者简介: 余渝(1973–), 男, 副研究员, 在读博士研究生。

\*通讯作者(Corresponding author): 林忠旭(1978–), 男, 副教授。Tel: 027-87283955, Fax: 027-87280016;

E-mail: linzhongxu@mail.hzau.edu.cn

Received(收稿日期): 2008-05-06; Accepted(接受日期): 2008-07-15.

**Keywords:** *Gossypium herbaceum*; EST; SSR; Polymorphism information content (PIC); Genetic map

棉花属于锦葵科棉属。棉属约有 50 个种, 仅有 4 个栽培种, 它们是具有 A 基因组的二倍体草棉(非洲棉)和中棉(亚洲棉)及具有 AD 基因组的四倍体陆地棉和海岛棉<sup>[1]</sup>。草棉和中棉在人类历史上曾经广泛种植, 目前在世界范围内仍有种植<sup>[2]</sup>。前人研究认为陆地棉和海岛棉 A 亚基因组起源于草棉, 而 D 亚基因组起源于雷蒙德氏棉<sup>[3]</sup>, 所以草棉和中棉基因组的研究是关注的焦点。

简单重复序列(SSR), 具有分布广泛、高多态性、可重复性、遵循孟德尔式遗传规律的特征, 因而被广泛地应用于分子标记遗传分析<sup>[4-5]</sup>。SSR 同时存在于植物基因组的表达区和非表达区<sup>[6-7]</sup>。与基因组 SSR 标记相比, 从表达序列标签(EST)中开发的 SSR(EST-SSR)更加经济简便, 并且 EST-SSR 可在不同的物种间具有很高的可转移性, 其功能经常是可以预测的<sup>[8]</sup>。EST-SSR 在很多植物中都被研究, 特别是经济利用价值高的作物更加受到人们的关注<sup>[9-10]</sup>。

目前 4 个栽培棉种和雷蒙德氏棉的 EST 序列都已在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST>) 中公布, 成为棉花 EST-SSR 开发的重要资源, 已经从陆地棉<sup>[10-12]</sup>、中棉<sup>[13-14]</sup>、雷蒙德氏棉<sup>[15]</sup>和海岛棉<sup>[8]</sup>中开发了 EST-SSR。但草棉的 EST 序列较少, GenBank 中只有 247 条。本研究利用草棉的 EST 序列, 探讨 EST-SSR 开发的可能性并对其进行遗传评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 EST 序列的来源和预处理

从 GenBank 中以 FASTA 格式下载了 247 条草棉 EST 序列。利用 CAP3 软件<sup>[16]</sup>对序列进行去重和拼接, 共获得了 233 个非重复序列, 包含 8 个 contigs 和 225 个 singletons, 用于 SSR 的搜索和引物设计。

### 1.2 EST-SSR 引物的开发

利用可同时进行 SSR 模体识别和引物设计的在线工具 SSR Primer (<http://hornbill.cspg.latrobe.edu.au/cgi-bin/pub/ssrprimer/indexssr.pl>) 搜索重复基序为 1~6 的精密型 SSR 并同时获得 SSR 侧翼区域的引物。SSRs 的查找标准为单核苷酸重复  $\geq 25$ , 二核苷酸重复  $\geq 14$  bp, 三核苷酸重复  $\geq 15$  bp, 四核苷酸重复  $\geq 16$  bp, 五核苷酸重复  $\geq 20$  bp, 六核苷酸重复  $\geq 24$  bp。引物设计的主要参数参照 Zhang 等<sup>[8]</sup>的报道, 引

物被命名为“HAU+数字编号”(HAU 是 Huazhong Agricultural University 的缩写)。

### 1.3 植物材料和 SSR 分析

用 24 份不同棉花材料(含 A 基因组的中棉品种 6 份和草棉资源 1 份, D 基因组的野生棉资源 11 份, AD 基因组四倍体棉花 6 份)扩增草棉 EST-SSR 引物(表 1)。依据 Paterson 等<sup>[17]</sup>的方法提取棉花叶片基因组总 DNA, 参照 Lin 等<sup>[18]</sup>的方法分析 SSR。标记的定位采用的作图群体是含有 141 个单株的陆地棉鄂棉 22 和海岛棉 Pima3-79 种间 BC<sub>1</sub> 群体[(鄂棉 22 × Pima3-79) × 鄂棉 22]。

### 1.4 草棉 EST-SSR 的遗传评价

用多态性信息含量(PIC)<sup>[19-20]</sup>来估计草棉 EST-SSR 的等位基因的变异。

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k P_i^2$$

其中  $P_i$  表示第  $i$  个等位基因出现的频率,  $k$  是此标记的所有等位基因的总数。

对在种间 BC<sub>1</sub> 作图群体中表现多态性的引物首先进行卡方测验检测其是否遵循孟德尔分离比例。然后利用软件 MapMaker3.0b<sup>[21]</sup>将其整合到 BC<sub>1</sub> 遗传连锁图上。计算中用到 Group ( $LOD = 5, r = 0.4$ )、Three point、Order、Try、Map 和 Ripple 等命令, 并用 Kosambi 作图函数<sup>[22]</sup>将重组频率转换为图距(cM)。根据其他已报道的图谱上位置确定的 SSR 标记 (<http://www.mainlab.clemson.edu/cmd/Downloads.shtml>) 将 HAU 引物所在的连锁群与相应的染色体对应起来。

## 2 结果与分析

### 2.1 EST-SSR 引物的特征

在 233 条非重复的草棉 EST 序列中, 25 条序列含有可用于引物设计的 SSR, 得到 25 对 SSR 引物(表 2)。共搜索到 27 个 SSR, 其中有 2 条 EST 含 2 个 SSR: 单核苷酸重复 1 个、二核苷酸重复 10 个、三核苷酸重复 10 个, 四核苷酸重复 4 个, 五核苷酸重复 1 个和六核苷酸重复 1 个(表 2)。对于重复基序类型, 二核苷酸中的 GA/TC 出现频率最高, 其他类型出现的频率基本相当; 对于重复次数, 重复 4 次占有较高的频率; SSR 的总长度变化于 14~39 bp 之间, 其中 15 bp 的最多(表 2)。

表 1 用于引物评价的 24 份棉花材料  
Table 1 24 cotton accessions used for primer evaluation

编号 No.	材料名称 Accession	基因组 Genome	所属棉种 Cotton species
1	安徽阜阳新集大花 Anhuifuyangxinjidahua	A <sub>2</sub>	<i>G. arboreum</i>
2	长顺代化小花 Changshundaihuaxiaohua	A <sub>2</sub>	<i>G. arboreum</i>
3	下寨小花 3 Xiazaixiaohua 3	A <sub>2</sub>	<i>G. arboreum</i>
4	罗甸官田小棉花 Luodianguantianxiaomianhua	A <sub>2</sub>	<i>G. arboreum</i>
5	华中紫杆中棉 Huazhongziganzhongmian	A <sub>2</sub>	<i>G. arboreum</i>
6	贵州中棉 Guizhouzhongmian	A <sub>2</sub>	<i>G. arboreum</i>
7	阿非利加棉 <i>G. africanum</i>	A <sub>1</sub>	<i>G. herbaceum</i>
8	瑟伯氏棉 <i>G. thurberi</i>	D <sub>1</sub>	<i>G. thurberi</i>
9	三裂棉 <i>G. trilobum</i>	D <sub>8</sub>	<i>G. trilobum</i>
10	拟似棉 <i>G. gossypoides</i>	D <sub>6</sub>	<i>G. gossypoides</i>
11	哈克尼西棉 <i>G. harknessii</i>	D <sub>2-2</sub>	<i>G. harknessii</i>
12	戴维逊氏棉 <i>G. davidsonii</i>	D <sub>3-d</sub>	<i>G. davidsonii</i>
13	克劳斯基棉 <i>G. klotzschianum</i>	D <sub>3-k</sub>	<i>G. klotzschianum</i>
14	旱地棉 <i>G. aridum</i>	D <sub>4</sub>	<i>G. aridum</i>
15	松散棉 <i>G. laxum</i>	D <sub>9</sub>	<i>G. laxum</i>
16	辣根棉 <i>G. armourianum</i>	D <sub>2-1</sub>	<i>G. armourianum</i>
17	雷蒙德氏棉 <i>G. raimondii</i>	D <sub>5</sub>	<i>G. raimondii</i>
18	裂片棉 <i>G. lobatum</i>	D <sub>7</sub>	<i>G. lobatum</i>
19	黄褐棉 <i>G. mustelinum</i>	(AD) <sub>4</sub>	<i>G. mustelinum</i>
20	达尔文棉 <i>G. darwinii</i>	(AD) <sub>5</sub>	<i>G. darwinii</i>
21	鄂棉 22 Emian 22	(AD) <sub>1</sub>	<i>G. hirsutum</i>
22	TM-1	(AD) <sub>1</sub>	<i>G. hirsutum</i>
23	Pima 3-79	(AD) <sub>2</sub>	<i>G. barbadense</i>
24	Pima 90	(AD) <sub>2</sub>	<i>G. barbadense</i>

表 2 草棉 EST-SSR 引物的特征

Table 2 Characteristics of EST-SSR primers from *G. herbaceum*

引物名 Primer	GenBank 登录号 GenBank accession	SSR 模体 SSR motif	上游引物 Forward primer (5'-3')	下游引物 Reverse primer (5'-3')	产物大小 Product size (bp)	T <sub>m</sub> ( )
HAU206	CA994123,CA994072	(TC)10	CTGACCCTCCATCAATCTCT	TACCTTCTTTCGCATCATCA	248	56.8
HAU207	CA994075,CA994063, CA994056	(TC)15	AGTTCTGCTTCCACTTCTGG	TGATGCCAATTCAAAAACAC	263	57.1
HAU208	CK640436	(ATAC)5	CACTTCACAACCTCGTCTTG	CCTCAGAAGGAGAACTGGA	210	56.9
HAU209	CK640421	(TTAT)4	GCTTTTACCATCCACTGCTT	ATAACAGGGGTGATCTCAA	274	56.9
HAU210	CA994179	(AT)7	AGCTGTGGAGGTATGGAAGA	TTATAACTTTGGGGGTGGA	167	57.1
HAU211	CA994144	(TCA)5	TGATGATATGCCTGAACCAG	ATGCTTCCCTCGTATTGAGG	207	57.0
HAU212	CA994139	(A)25	AAAGTTCACCTCCGGAAGTCT	GAGCAGATGATTCGACCTTT	262	57.0
HAU213	CA994139	(ACCA)4	GTTGGAGATGGGATTAGGTG	TGGGAAGCCTTAGTTTTTTCAG	151	57.0
HAU214	CA994135	(ATA)5	ATGATCTCCGAAATCTGGAA	TTCATTGCTATCAAGCCAGA	299	57.1
HAU215	CA994115	(TAT)5	CTGGTGCTGGAAGGTTAGTT	CAAATGAAAAATGAGCTGTGC	290	56.9
HAU216	CA994107	(TTC)6	CTCTAGAACTGACCGCCATT	CTCTCCCGTCGTAATGTCTT	110	56.9
HAU217	CA994064	(ACAG)6	AACAGTTGGTAATCCGGAAA	GCTTATTGCTTGTGCATCACG	238	57.0
HAU218	CA994054	(TGA)5	GCTGTTGTTAAACCCAAAGG	CGGAATTATCAGGAGAGGAA	238	57.0
HAU219	CA994047	(AGA)5	CTTAAGCTCAAGGCATCCAT	TACCGCACTCAAGTCAAGAA	226	57.1
HAU220	CA994042	(TG)7+(AG)12	CATGTGCATGTGTCTCTCT	CATGTTTGAGGTGGAAACAA	287	57.0
HAU221	CA994039	(AG)10	TGCGTATACACCACAAGGTT	CCATTTAATGCCAGTTGTGA	247	56.8
HAU222	CA994028	(GA)8	CAAGCAGATCAACAGTGAGG	CGGCAATATAAGTGGTGACT	141	56.1
HAU223	CA994024	(GA)8	CAGACAATCAAACCCTCTC	TGATTCATCTTGCCATC	184	57.1
HAU224	CA994023	(AAGAA)5+ (GAA)5	CGGATTAATGGTCTCAACC	TGACAGCGGTAAGTTGATTG	283	57.2
HAU225	CA994022	(ACA)5	GGTGCCGATTTTAACTATG	CGATCAGCCTTTGATTTCTT	153	57.1
HAU226	CA994021	(TGC)5	ATGGTGTTTGCAAAGATGTG	AGTAAGCTTGCGAATGAAA	297	57.3
HAU227	CA994001	(AC)9	CATGAACCTGAGCACACAAT	TTATGGCATGAACAACCTGG	175	57.1
HAU228	CA993997	(AAAGGA)4	CCTTCTTGCTCACAGGAAAT	CCATCAGCAAGCTTCTTTTT	244	57.1
HAU229	CA993996	(GA)11	ACTGATTAAGCCGGAGTTTG	TTGTTTCATTTCCAGTTGTG	267	57.0
HAU230	CA993995	(ATT)13	TGAAGTCTGCTGGAATG	CAGCATGGAAATCCTAATCC	210	56.9

## 2.2 EST-SSR 引物的 PIC 值

用 25 对 EST-SSR 引物扩增 24 份 A、D 和 AD 基因组的棉花材料, 22 对(88%)引物可以扩增出清晰可辨的 DNA 条带, 产生 92 个多态性片段, 平均每对引物产生 3.64 个多态性片段。引物产生的多态性片段的数目变幅为 1~9, 引物 HAU216 得到多态性片段最多, 为 9 个(图 1)。引物 HAU214 未得到特异性产物, 2 对引物(HAU227 和 HAU228)在任何一份材

料中均无扩增产物。引物 HAU217 只在 A 染色体组扩增, 其他引物既能在 A 染色体组, 也能在 D 染色体组扩增。根据 22 对引物在 24 份材料中扩增得到的等位基因变异的信息来计算各引物的 PIC 值。PIC 值变化于 0.49~0.91, 平均为 0.81。引物 HAU216 的 PIC 值最大, 为 0.91; 引物 HAU213 的最小, 为 0.49(表 3)。这些引物在 3 个基因组中差异显著, 可以用于不同基因组的区分和进化研究(图 1)。

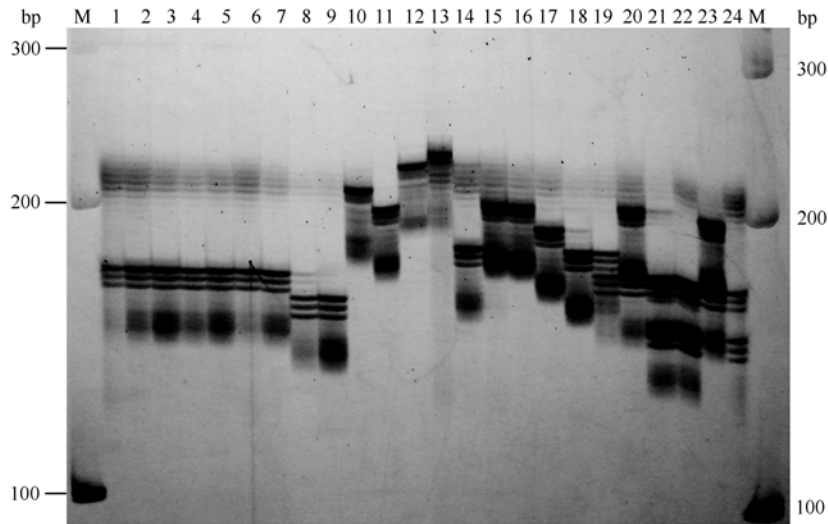


图 1 引物 HAU216 对 24 份棉花材料的扩增

Fig. 1 Amplification of HAU216 in 24 cotton accessions

1~24: 对应于表 1 中列出的材料。

The lane numbers of 24 accessions corresponded with the numbers given in Table 1.

表 3 草棉 EST-SSR 引物的 PIC 值

Table 3 PIC value of EST-SSR primers from *G. herbaceum*

引物 Primer	PIC 值 PIC value	引物 Primer	PIC 值 PIC value	引物 Primer	PIC 值 PIC value	引物 Primer	PIC 值 PIC value
HAU206	0.76	HAU216	0.91	HAU219	0.71	HAU225	0.89
HAU207	0.86	HAU217	0.69	HAU220	0.84	HAU226	0.90
HAU208	0.82	HAU218	0.87	HAU221	0.88	HAU229	0.84
HAU209	0.76	HAU211	0.76	HAU222	0.85	HAU230	0.89
HAU210	0.87	HAU212	0.85	HAU223	0.85		
HAU215	0.76	HAU213	0.49	HAU224	0.86		

## 2.3 EST-SSR 的染色体定位

6 对引物在鄂棉 22 和 Pima3-79 之间表现多态性, 在 BC<sub>1</sub> 作图群体中产生 7 个多态性位点, 5 个为共显性, 2 个为显性(HAU209 和 HAU211)。经卡平方检验, HAU230b ( $\chi^2 = 7.37$ ) 表现偏分离, 其余引物表现正常分离。7 个多态性位点中有 6 个被整合到海陆种间遗传连锁图谱上, 位于 6 条染色体上。有 4 个位

点位于 A 亚基因组的 4 条染色体上(Chr. 6、10、11 和 12), 2 个位点位于 D 亚基因组的 2 条染色体上(Chr. 19 和 20)(图 2)。HAU216 标记位于第 19 染色体(D 亚基因组)上, 分析其在棉属资源中的扩增条带发现 HAU216 在海岛棉 Pima3-79 中出现了 D 基因组的特异条带(图 1), 因而该标记被定位于 D 亚基因组染色体。

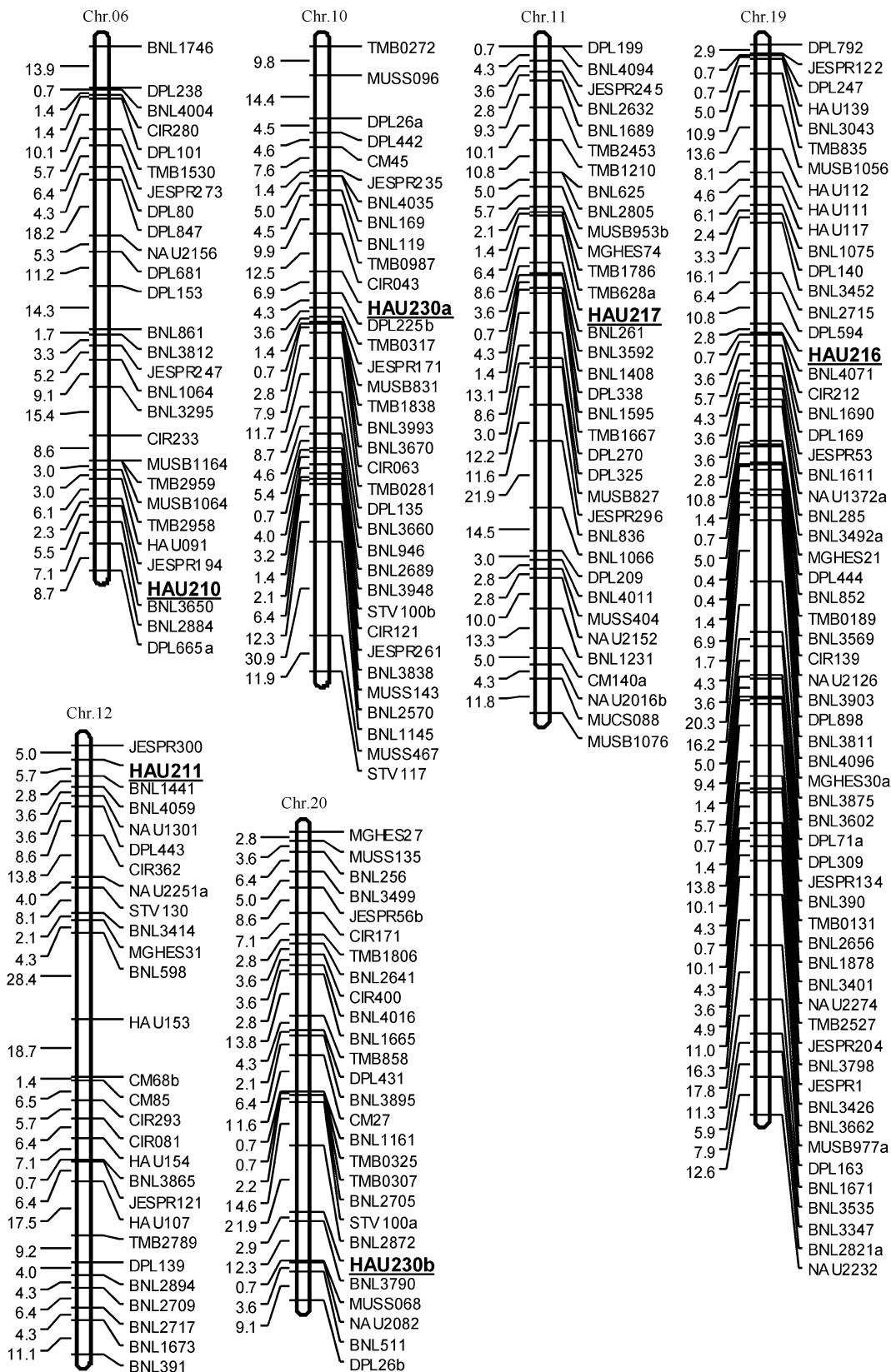


图 2 6 个草棉 EST-SSRs 在海陆种间 BC<sub>1</sub> 连锁遗传图上的分布  
 Fig. 2 Distribution of 6 polymorphic loci in the interspecific BC<sub>1</sub> genetic linkage map  
 草棉 EST-SSR 用下划线标出。

EST-SSR markers from *G. herbaceum* were underlined.

### 3 讨论

截至 2008 年 5 月, 在 dbEST 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST>)中棉花的 EST 序列已达到 369 913 条, 包括陆地棉、中棉、草棉、海岛棉和雷蒙德氏棉 5 个棉种。除草棉外, 其他 4 个棉种都有 EST-SSR 开发的报道<sup>[8,10-15]</sup>。GenBank 数据库中草棉 EST 序列只有 247 条, 利用这些 EST 序列进行 SSR 搜索和引物设计得到了 25 对草棉的 EST-SSR 引物, 并且出现了 1~6 核苷酸重复类型。这说明 SSR 在棉花基因组中是广泛存在的。草棉 EST-SSR 的开发也丰富了棉属 EST-SSR 的来源。

通常来说, 来源于基因组的 SSR 在基因组之间的可转移性比例较低, 而来源于表达序列的 SSR(EST-SSR)的可转移性比例较高。本研究中 22 对草棉 EST-SSR 引物(88%)能够在所有的 24 份棉花材料中获得扩增产物, 其中只有 HAU217 不能扩增 D 基因组材料, 说明这些引物在 A、D 和 AD 基因组是可以通用的。Guo 等<sup>[23]</sup>研究发现来源于亚洲棉(A 基因组)的 EST-SSR 在其他棉种中也有高比例的可转移性。如此高比例的可转移性与 SSR 的来源相关。

HAU217 只能在 A 染色体组进行扩增, 表明该引物的扩增产物在 D 染色体组没有同源序列, 属于 A 染色体组特有, 染色体定位也证实该引物位于 A 染色体组的 11 号染色体上。引物 HAU214 未得到特异性产物, 可能的原因有, 一是扩增区间内有大内含子的存在导致产物远大于期望片段; 二是 SSR 位点和所设计的引物位于转座子或重复 DNA 区域内, 结果产生偏离目标片段的多个产物。HAU227 和 HAU228 在任何一份材料中均无扩增产物。其原因可能是正向引物或反向引物或二者都恰好跨过了 mRNA 的剪切位点; 或在相应的基因组 DNA 序列中存在较大的内含子<sup>[24]</sup>。这两个原因都会导致引物无法与模板 DNA 结合而不能扩增。

PIC 值可用来估计每对扩增引物的等位基因的变异, 而 PIC 值的大小是基于所检测到的等位基因的数目及分布频率<sup>[25]</sup>, 所以在一定意义上, PIC 也是引物检测多态性的能力的一种度量。引物的 PIC 值越高, 它揭示等位基因变异的能力就越强。Blair 等<sup>[26]</sup>研究表明 EST-SSR 标记的 PIC 值低于基因组 SSR。本研究中的草棉 EST-SSR 引物的 PIC 值比来自于陆地棉基因组 SSR (0.12~0.85, 平均 0.4)<sup>[27]</sup>和亚洲棉 EST-SSR (0.12~0.73, 平均 0.42)的 PIC 值都高<sup>[14]</sup>。其主要

原因在于 Park 等<sup>[14]</sup>和 Frelichowski 等<sup>[27]</sup>主要利用 AD 基因组材料进行引物评价, 而本研究中使用了较多的遗传丰富的 D 基因组材料。

由于目前公布的草棉的 EST 序列数量太少, 我们只得到了 25 对 EST-SSR 引物。而只有 6 个引物在陆地棉和海岛棉种群中表现多态性, 得到 7 个位点。其中的 6 个位点被整合到种间 BC<sub>1</sub> 连锁遗传图上, 4 个标记位于 A 亚基因组上, 2 个位于 D 亚基因组上。HAU230b 位于第 10 号染色体上而 H230a 位于第 20 号染色体上, 这与 Rong 等<sup>[28]</sup>研究结果一致, 即 10 号染色体与 20 号染色体具有较高的同源性。草棉 EST-SSR 标记在四倍体棉花遗传图谱中分布的不均匀与草棉是四倍体棉花 A 亚基因组的供体相关, 这对于研究四倍体棉花 A 亚基因组的进化以及 A 基因组与 D 基因组融合后两个基因组的相互协调进化具有重要意义。相信随着研究的不断深入, 更多的草棉标记的开发将有助于四倍体棉花起源、进化、基因组结构和功能的研究。

### 4 结论

利用 GenBank 数据库中的 247 条草棉的 EST 序列开发了 25 对 EST-SSR 引物, 这些 SSR 中包含 1~6 碱基重复基序。22 对引物能够在棉花 A、D 和 AD 基因组中扩增并且显示出很大的变异。6 对引物在陆地棉和海岛棉的种间 BC<sub>1</sub> 群体中表现多态性, 得到 7 个位点; 其中 6 个位点整合到种间 BC<sub>1</sub> 连锁遗传图上, 4 个位点位于 A 亚基因组, 2 个位于 D 亚基因组。草棉 EST-SSR 的开发丰富了棉属 EST-SSR 的来源并有助于棉花基因组的进化研究。

### References

- [1] Fryxell P A. A revised taxonomic interpretation of *Gossypium* L. (Malvaceae). *Rheedea*, 1992, 2: 108-165
- [2] Bolek Y, El-Zik K M, Pepper A E, Bell A A, Magill C W, Thaxton P M, Reddy O U K. Mapping of verticillium wilt resistance genes in cotton. *Plant Sci*, 2005, 168: 1581-1590
- [3] Endrizzi J E, Turcotte E L, Kohel R J. Genetics cytology and evolution of *Gossypium*. *Adv Genet*, 1985, 23: 271-375
- [4] Powell W, Machray G C, Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci*, 1996, 1: 215-222
- [5] Gupta P K, Balyan H S, Sharma P C, Ramesh B. Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. *Curr Sci*, 1996, 70: 45-54
- [6] Brown S M, Hopkins M S, Mitchell S E, Senior M L, Wang T Y, Duncan R R, Gonzalez-Candelas F, Kresovich S. Multiple

- methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Theor Appl Genet*, 1996, 93: 190–198
- [7] Scott K D. Microsatellites derived from ESTs and their comparison with those derived by other methods. In: Henry R J ed. *Plant Genotyping: The DNA Fingerprinting of Plants*. Wellingford, UK: CAB International, 2001. pp 225–237
- [8] Zhang Y X, Lin Z X, Li W, Tu L L, Nie Y C, Zhang X L. Studies of new EST-SSRs derived from *Gossypium barbadense*. *Chin Sci Bull*, 2007, 52: 2522–2531
- [9] Saha S, Karaca M, Jenkins J N, Zipf A E, Reddy O U K, Kantety R V. Simple sequence repeats as useful resources to study transcribed genes of cotton. *Euphytica*, 2003, 130: 355–364
- [10] Qureshi S N, Saha S, Kantety R V, Jenkins J N. EST-SSR: A new class of genetic markers in cotton. *J Cotton Sci*, 2004, 8: 112–123
- [11] Han Z G, Wang C B, Song X L, Guo W Z, Gou J Y, Li C H, Chen X Y, Zhang T Z. Characteristics, development and mapping of *Gossypium hirsutum* derived EST-SSRs in allotetraploid cotton. *Theor Appl Genet*, 2006, 112: 430–439
- [12] Talierecio E, Allen R D, Essenberg M, Klueva N, Nguyen H, Patil M A, Payton P, Millena A C M, Phillips A L, Pierce M L, Scheffler B, Turley R, Wang J, Zhang D S, Scheffler J. Analysis of ESTs from multiple *Gossypium hirsutum* tissues and identification of SSRs. *Genome*, 2006, 49: 306–319
- [13] Han Z G, Guo W Z, Song X L, Zhang T Z. Genetic mapping of EST derived microsatellites from the diploid *Gossypium arboreum* in allotetraploid cotton. *Mol Genet Genomics*, 2004, 272: 308–327
- [14] Park Y H, Alabady M S, Ulloa M, Sickler B, Wilkins T A, Yu J, Stelly D M, Kohel R J, El-Shihy O M, Cantrell R G. Genetic mapping of new cotton fiber loci using EST-derived microsatellites in an interspecific recombinant inbred (RIL) cotton population. *Mol Genet Genomics*, 2005, 274: 428–441
- [15] Wang C B, Guo W Z, Cai C P, Zhang T Z. Characterization, development and exploitation of EST-derived microsatellites in *Gossypium raimondii* Ulbrich. *Chin Sci Bull*, 2006, 51: 557–561
- [16] Huang X, Madan A. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res*, 1999, 9: 868–877
- [17] Paterson A H, Brubaker C, Wendel J F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis. *Plant Mol Biol Rep*, 1993, 11: 122–127
- [18] Lin Z, He D, Zhang X, Nie Y, Guo X, Feng C, Stewart J McD. Linkage map construction and mapping QTLs for cotton fiber quality using SRAP, SSR and RAPD. *Plant Breed*, 2005, 124: 180–187
- [19] Botstein D, White R L, Skolnick M, Davis R W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 1980, 32: 314–331
- [20] Anderson J A, Churchill G A, Autrique J E, Tanksley S D, Sorrells M E. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, 1993, 36: 181–186
- [21] Lander E S, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly M J, Lincoln S E, Newburg I. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1987, 1: 174–181
- [22] Kosambi D D. The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugen*, 1994, 12: 172–175
- [23] Guo W Z, Wang W, Zhou B L, Zhang T Z. Cross-species transferability of *G. arboreum*-derived EST-SSRs in the diploid species of *Gossypium*. *Theor Appl Genet*, 2006, 112: 1573–1581
- [24] Vendramin E, Dettori M T, Giovanazzi J, Micali S, Quarta R, Verde R. A set of EST-SSRs isolated from peach fruit transcriptome and their transportability across *Prunus* species. *Mol Ecol Notes*, 2007, 7: 307–310
- [25] Botstein B, White R L, Skolnick M, Davis R W. Construction of a genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 1980, 32: 314–331
- [26] Blair M W, Giraldo M C, Buendia H F, Tovar E, Duque M C, Beebe S E. Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor Appl Genet*, 2006, 113: 100–109
- [27] Frelichowski Jr J E, Palmer M B, Main D, Tomkins J P, Cantrell R G, Stelly D M, Yu J, Kohel R J, Ulloa M. Cotton genome mapping with new microsatellites from Acala 'Maxxa' BAC-ends. *Mol Genet Genomics*, 2006, 275: 479–491
- [28] Rong J K, Abbey C, Bowers J E, Brubaker C L, Chang C, Chee P W, Delmonte T A, Ding X L, Garza J J, Marler B S, Park C, Pierce G J, Rainey K M, Rastogi V K, Schulze S R, Trolinder N L, Wendel J F, Wilkins T A, Williams-Coplin T D, Wing R A, Wright R J, Zhao X P, Zhu L H, Paterson A H. A 3347-locus genetic recombination map of sequence-tagged sites reveals features of genome organization, transmission and evolution of cotton (*Gossypium*). *Genetics*, 2004, 166: 389–417