

从大豆疫霉菌 ESTs 中发掘 SSR 标记

朱振东 霍云龙 王晓鸣* 黄俊斌 武小菲

(中国农业科学院作物品种资源研究所, 北京 100081; 华中农业大学植物保护系, 武汉 430070.

* 联系人, E-mail: wangxm@mail.caas.net.cn)

摘要 通过对 5800 条大豆疫霉菌 EST 进行电子查询, 在 369 条 EST 中发现 415 个 SSR. 在筛选的 EST 序列中 SSR 平均密度为每 8.9 kb 含有 1 个 SSR. 在鉴定的 SSR 中, 三核苷酸重复基元的 SSR 类型最多, 占鉴定总数的 50.1%, 四核苷酸重复基元的 SSR 类型最少, 为 8.2%. 设计 40 个 SSR 引物对对 5 个大豆疫霉菌菌株基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 有 33 个引物对扩增出 SSR 特征条带, 其中有 28 个引物对扩增出在预期片段大小范围之内的条带. 在 33 个功能性引物对中, 有 15 个引物对在 5 个大豆疫霉菌菌株间扩增出多态性, 多态性引物对占 45.5%. 基于 SSR 标记进行聚类分析, 可将 5 个检测大豆疫霉菌菌株划分为不同的 3 个组. 本研究建立了大豆疫霉菌的 SSR 标记, 为大豆疫霉菌及相关属种的鉴定、遗传变异、分子作图等研究提供了一种更加有效的分子标记系统.

关键词 表达序列标签 SSR 标记 大豆疫霉菌 大豆

由大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae* Kaufmann & Gerdemann)引起的大豆疫霉根腐病是严重影响大豆生产的毁灭性病害之一^[1,2]. 防治该病惟一经济、有效和环境安全的方法是利用抗病品种. 然而, 由于大豆疫霉菌具有高度的变异性和种植抗病品种造成的选择压力, 大豆疫霉菌种群变异很快, 毒力结构十分复杂^[3-5]. 大豆疫霉菌致病变异一般是通过接种一套含有不同抗病基因(*Rps*基因)的大豆鉴别品种进行毒力检测来评价. 用致病性作为病原菌遗传变异的标记存在一些缺点, 如费工费时、需要很大的温室空间、受温湿度及接种技术的影响导致结果不稳定等, 而且抗病性和感病性的分类有时存在主观性. 因此, 需要利用更加有效的遗传标记来研究大豆疫霉菌的遗传变异.

分子标记技术已成为植物病原真菌遗传变异研究和检测的重要手段. 一些基于 DNA 的分子标记, 如 rDNA-ITS, RFLP, RAPD 等技术也已应用于大豆疫霉菌的鉴定、遗传变异及多样性、无毒基因作图等研究^[6-10]. 然而, 与 RFLP 及 RAPD 等分子标记相比, 更加有效的 SSR 标记虽然在一些植物和动物中已被广泛开发和应用, 但在真菌中却开发得很少^[11-14]. 简单序列重复(simple sequence repeats, SSRs)或微卫星(microsatellites)是以 1~6 个碱基为基元的串联重复序列, 它们普遍存在和随机分布于大多数真核生物的基因组中, 重复数具有高频率的变异, 这种专化位点的多态性可以十分容易地通过设计特异引物进行

PCR 扩增检测. SSR 标记具有多态性高、多等位性、共显性、容易用 PCR 检测、重复性高等特点, 是一种理想的分子标记, 但从基因组文库中开发 SSR 标记是昂贵和低效的. 随着表达序列标签(expressed sequence tag, EST)技术的发展, EST 数据库为开发 SSR 标记提供了快速、有效和廉价途径. 一些植物如葡萄、小麦的 EST-SSR 标记已开发利用^[15-18]. 在植物病原真菌中, Kaye 等人^[11]也开发了少量水稻稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)的 EST-SSR 标记.

由于疫霉菌是世界上最具破坏力的一类植物病原菌, 为了更加深入的从分子水平研究疫霉菌的致病性, 国外已经开始了疫霉菌基因组计划(*Phytophthora Genome Initiative*)^[19]. 大豆疫霉菌作为经济重要的病原菌成为疫霉菌基因组研究的主要对象, 表达序列研究已经开展^[20]. 迄今, 在 GenBank 中已有近 30000 条大豆疫霉菌 EST, 但大豆疫霉菌 SSR 的研究尚未开展. 本研究将从大豆疫霉菌 EST 中发掘 SSR 标记, 为大豆疫霉菌及相关属种的鉴定、遗传变异、分子作图和系统进化等研究提供一种更加有效的分子标记系统.

1 材料与方法

() 大豆疫霉菌 EST 序列数据来源. 大豆疫霉菌 EST 序列来自于植物病原真菌和卵菌 EST 数据库(*Phytopathogenic Fungi and Oomycete EST Database* Version 1.4)(<http://cogeme.ex.ac.uk/>), 共 5849 个单个 EST 序列或由 EST 拼接的 Contig 序列.

表 1 用于 PCR 检测的大豆疫霉菌菌株

菌株编号	分离地点	来源	毒力型 ^{a)}	分离时间
PS96-16-1	黑龙江穆林	大豆植株	1a,1d,3a,3b,3c,4,5,7	1996
PS96-40-2	黑龙江佳木斯	大豆植株	1a,3b,7	1996
PS96-41-1	黑龙江佳木斯	大豆植株	7	1996
PSJ99-15	黑龙江佳木斯	大豆植株	1a,3c,7	1999
B77R1.55	美国	大豆植株	3c,7	—

a) 被击败的抗病基因(*Rps* 基因)

() 从 EST 中发掘 SSR. EST 序列下载后去除 49 条属于大豆和细菌污染序列及低质量序列, 用 GRAMENE 网站提供的 SSR 鉴定工具 SSRIT(Simple Sequence Repeat Identification Tool)对 5800 条序列进行 SSR 鉴定 (<http://www.gramene.org/db/searches/ssrtool>).含二、三、四、五和六核苷酸基元精确 SSR 的最小重复数分别为 8, 5, 4, 3 和 3 次.

() PCR引物设计和PCR扩增. 38 个含有三核苷酸基元SSR的EST, 1 个含有SSR(TA)₃₆ 的EST和 1 个含SSR(GA)₃₁ 的EST被选择进行引物设计. 用 DNASTar 软件包中的Editseq和Primerselect软件设计 SSR 引物. 引物设计的主要参数为: 引物长度为 17~24 bp; PCR产物大小为 90~350 bp; 引物退火温度为 45 ~60 , 上下引物之间退火温度相差不超过 2 ; (G+C)含量为 40%~70%, 最适为 50%. 引物对由北京赛百盛基因技术有限公司合成. 大豆疫霉菌菌株 PS96-41-1, B77R1.55, PS96-40-2, PS96-16-1 和 PSJ99-15 用于合成引物的PCR检测, 基因组DNA来源于本实验室. 试验菌株的详细信息见表 1. PCR扩增参照Scott等人^[15]的方法. PCR产物用 6%尿素变性和银染聚丙烯酰胺胶分析.

2 结果与分析

2.1 大豆疫霉菌 EST-SSRs 的特征

对总长约 3700 kb 的 5800 条 EST 进行筛选, 共在 369 条 EST 中发现 415 个 SSR, 该结果表明有 6.4% 的 EST 含有 SSR, 大豆疫霉菌基因组表达部分平均每 8.9 kb 含有 1 个 SSR. 在 369 条含有 SSR 的 EST 中, 每条 EST 中只含有 1 个 SSR 的为 328 条, 每条 EST 含有 2 个 SSR 的为 37 条, 有 3 条 EST 含有 3 个 SSR, 有 1 条 EST 含有 4 个 SSR. 在鉴定的 SSR 中三核苷酸重复基元的 SSR 类型最多, 占鉴定总数的 50.1%, 之后, 依次为六核苷酸(16.6%), 二核苷酸(12.8%), 五核苷酸(12.3%)和四核苷酸(8.2%)(表 2). 共有 185 个 SSR 基元被发现, 其中 GA 基元是出现频

率最高的 EST-SSR 类型(图 1).

表 2 在 5800 个大豆疫霉菌 EST 中发掘的不同基元 SSR 数量及百分率

重复类型	EST-SSR 数量	百分率(%)
二核苷酸	53	12.8
三核苷酸	208	50.1
四核苷酸	34	8.2
五核苷酸	51	12.3
六核苷酸	69	16.6
合计	415	100

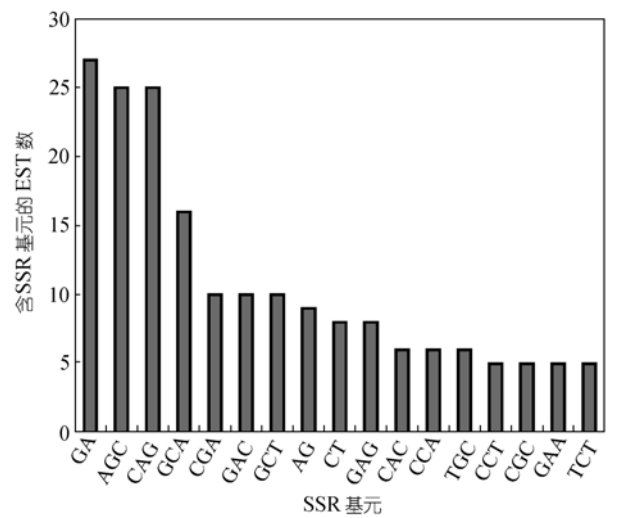


图 1 在发现的 415 个 EST-SSR 中 17 个最丰富的 SSR 基元的分布

2.2 SSR 标记发展及多态性检测

设计 40 个 SSR 引物对, 在给定的条件下对大豆疫霉菌基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 除 7 对引物未产生扩增产物外, 其余 33 对引物(82.5%)均扩增出 SSR 特征条带. 表 3 为 33 个具有功能性引物对的相关信息, 图 2 为部分引物对在大豆疫霉菌菌株中的扩增模式. 在 33 个功能性引物对中, 有 4 个引物对(12.1%)扩增出 1 条产物带, 其中有 3 个引物对的扩增产物在预期片段大小范围之内, 1 个引物对的扩增产物小于预期片段大小; 有 29 个引物对(87.9%)扩增出 2 条或

表 3 部分能有效扩增的大豆疫霉菌 EST-SSR 引物对

编码	EST	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	SSR 基元	退火温度 /	期望扩增片段大小/bp
PSE3	Ps30495710	CCCCGCTTCAGTTGGATGGTTC	GTGGTCGGTTTCGGTGTAGCAGTG	(CGA) ₅	60	234
PSE4	Ps30495782	GACAACCTTGCTGGGGACGGACTAC	GATGTTCTCGAGCGGCAGGTTC	(GAG) ₅	60	192
PSE6	Ps30496662	GGAAACGGGCCACACAT	CGAAGAGCGAGAGGAAGCACT	(CCT) ₆	60	269
PSE7	Ps30501163	GGTGGCAACGACTACGCTGATGTG	CGTCTCTCCGCTGACTCGTTAG	(GAC) ₆	60	269
PSE8	Ps30502679	AGAATTACTACCGCGGCACAACC	GCAAAAAGAACCCCGTCAGTCCTC	(AGG) ₅	60	217
PSE9	Ps30502757	AATCCCACCCCTTACCATCTA	ACAACACCACCTCGCTCAT	(TA) ₃₆	45	225
PSE10	Ps31048433	TTGGCTGGTTGGTCGGTTTG	TGGCGGCATCTTCATCTCGT	(AGA) ₅	55	196
PSE11	Ps31047276	CACGATGGCCACCGAAGACTC	GAAGCATAGGACCAGCCCCAACAC	(TGC) ₅	60	234
PSE12	Ps31050290	GCACGAGGCGAGAACCAACC	GCTGCTGAACGAGTAGGACGAGAA	(CAG) ₅	60	293
PSE13	Ps31052673	TCCCGAAGCGAAGAAAACAACC	GCGGCGCTTCTTCTCCTTCTCT	(CGC) ₅	60	192
PSE14	Ps9834059	ATGGGGTCGCTGTCAATCCTA	CGAGTCGAGCGGGTGTTCAG	(AGC) ₅	60	251
PSE15	Ps9835792	ACGCCCCAGGGAGAGTCATTC	CTCCAACAGGCATCCCATTCC	(AGC) ₅	60	154
PSE16	Ps9835913	GTTGGAGACGCTGGATGACG	CGCGCTTCTTGGGCTTTTAA	(GAG) ₅	60	241
PSE20	PsCon[0403]	GGAAACCACGCAACCA	GGCACGGCTTACCACCAG	(CAA) ₆	55	185
PSE21	PsCon[0587]	GCCTACTTCGAGCCCGTGGTGA	ACTTCTTGCCCGTGCCTTGTC	(GAG) ₅	60	139
PSE22	PsCon[1286]	GCCATGCGCCTCTCCTC	CCGGTGGGCTGCTTGTT	(CAG) ₆	60	227
PSE23	PsCon[2080]	AGGTGGCTTCGGCAACA	GTAGCGCTAATTAACAACCAAGT	(CAG) ₅	55	132
PSE24	PsCon[2565]	GGCACCGAGCGCAACCTGTC	TGCCTCCCATGTCCATTCCACTCA	(GAC) ₆	60	154
PSE26	PsCon[2843]	AGCGTTCCTGCTTGTGT	CAGTCGCTTGCTCATTTTTTC	(CTT) ₉	55	242
PSE27	PsCon[3330]	CGCTACGAAGTCGCCTGCTCTGA	CATCGGTGGGGACGGGTATTCT	(GAA) ₆	60	159
PSE28	PsCon[3377]	CAAGGGTGGAGACGACGATGATGA	TCCGTCCGCCGCTTCTTCTCTTA	(GAC) ₅	60	128
PSE29	PsCon[3515]	CGGAATCGCATCAGCAAAGGAG	CCACGAGGGACGGGAAGATG	(GCA) ₅	60	158
PSE30	PsCon[3530]	TTCGCAATAACCCCATCAC	TCCGCCAGGTACAAAGAAGTT	(TCT) ₅	55	216
PSE31	PsCon[3595]	CCACTGGCCTCGCTAATGACC	CTTCGAGCAATGTGGCAGTG	(AGC) ₅	60	255
PSE32	PsCon[3763]	ACCTCGGGCAGCGTCTTCT	CTGTTGCTGTTGCTGCTGTTGTAG	(CAG) ₆	60	155
PSE33	PsCon[3798]	TGAGAAGGAAGCCAGCACCAC	CACCCTTGATCTTCTGTGCTTC	(GAG) ₅	60	221
PSE34	PsCon[4296]	GAGGAGACTGGGGAGGACGAGACG	TCATTCCTGCCGCACAACCTACACG	(AGG) ₅	60	208
PSE35	PsCon[4317]	GCACTTCAAGGCTCACTCGT	GATCGGCTGTCGTCTTCTTC	(GAG) ₅	55	169
PSE36	PsCon[4543]	TTCGCCAACCGCATCCAC	CACGCTTAGTCCACCTCCTCCATC	(GCA) ₅	60	146
PSE37	PsCon[4697]	GCCGACTGCATTACCTGGAC	CTTGGGGCCGTGAGCA	(AGC) ₅	55	150
PSE38	PsCon[5099]	CCCAAGGCCTACTCGGACTAC	TGCTCTTCTTGCTGCTCTTCTTAC	(ACC) ₅	55	154
PSE39	PsCon[5734]	CGGTTTAGCGGGAATAGTG	CAAAAGGCGCAGGTGAC	(GAA) ₆	55	288
PSE40	PsCon[6044]	GGGCATCTACTTGGCTCCTGTGCG	GGTGATATCCCGGCCCTGAACG	(GTG) ₅	60	157

2 条以上条带, 其中有 25 个引物对扩增出在预期片段大小范围之内的条带. 共有 28 个引物对扩增出在预期片段大小范围之内的条带, 占功能性引物对的 84.8%. 此外, 在 29 个扩增出 2 条或 2 条以上条带的引物对中, 有 9 个引物对扩增出比预期片段大的条带, 有 26 个引物对扩增出比预期片段小的条带.

在 33 个功能性引物对中, 有 15 个引物对在 5 个

大豆疫霉菌菌株 PS96-41-1, B77R1.55, PS96-40-2, PS96-16-1 和 PSJ99-15 间扩增出多态性, 多态性引物对占 45.5%. 15 个引物对在 5 个分离物中共扩增出 20 个多态性标记. 基于这 20 个 SSR 标记进行聚类分析, 可将 5 个检测大豆疫霉菌菌株划分为不同的 3 个组 (图 3).

在 4 个检测的中国菌株中, PS96-41-1, PS96-40-2

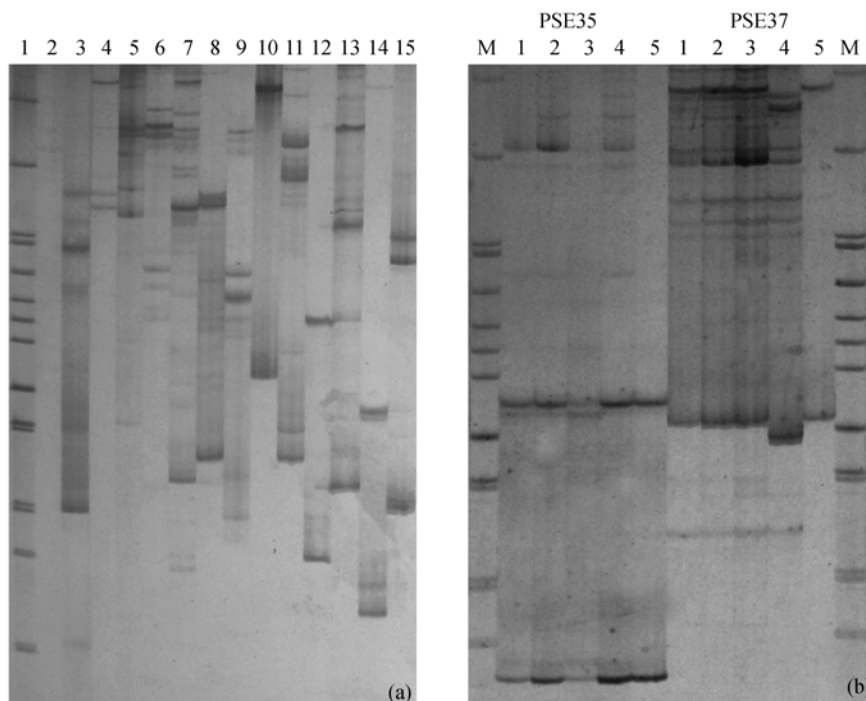


图2 设计的部分引物对在大豆疫霉菌菌株基因组DNA中的SSR扩增产物

(a) 14个引物对大豆疫霉菌菌株PS96-41-1的扩增。1示标准分子量pBR322 DNA/Msp Marker; 2~15依次为PES1, PSE3, PSE2, PSE4, PSE5, PSE6, PSE7, PSE8, PSE11, PSE12, PSE13, PSE14, PSE15, PSE16。(b) 引物对PSE35和PSE37对5个大豆疫霉菌菌株的扩增。M示标准分子量pBR322 DNA/Msp Marker; 1~5依次为大豆疫霉菌分离物PS96-41-1, B77R1.55, PS96-40-2, PS96-16-1和PSJ99-15

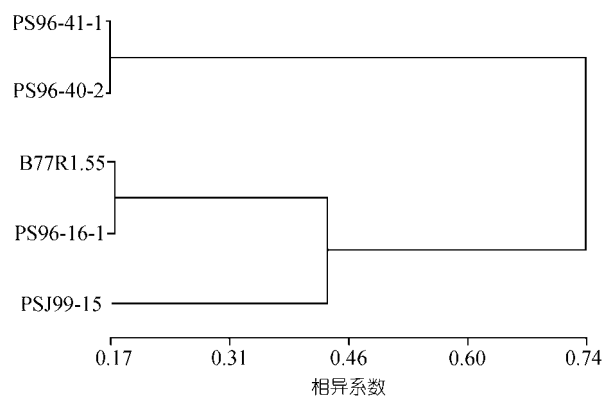


图3 基于20个EST-SSR标记的5个大豆疫霉菌菌株的聚类树状图

和PS96-16-1分离于1996年, PSJ99-15分离于1999年; PS96-41-1, PS96-40-2和PSJ99-15分离于黑龙江佳木斯市, 其中PS96-41-1和PS96-40-2分离于相邻田块的相同大豆品种, PS96-16-1分离于黑龙江穆林。通过SSR聚类, 将PS96-41-1和PS96-40-2归在1组, 将PS96-16-1和PSJ99-15归为一组, 表现出大豆疫霉菌遗传多样性在地理和时空上的差异。菌株

B77R1.55来源于美国, 与PS96-16-1聚类在一组, 表明这2个大豆疫霉菌菌株遗传关系较近。

3 讨论

对5800条大豆疫霉菌EST进行筛选, 共在369条(6.4%)EST中发现SSR位点, 筛选的大豆疫霉菌EST序列平均每8.9 kb含有1个SSR。以相同标准对来自同一数据库的1414条致病疫霉菌(*Phytophthora infestans*)的EST进行SSR鉴定, 结果表明, 只有1.8%的EST含有SSR, 筛选EST的SSR平均强度约为每30 kb含有1个SSR。比较而言, 大豆疫霉菌含有SSR的EST频率很高, SSR十分丰富。大豆疫霉菌基因组大小约为62 Mb^[21], 而致病疫霉菌基因组大小估计为250 Mb^[22], 2种疫霉菌基因组SSR出现的频率似乎与其基因组的大小负相关。这一假设与Morgante等人^[23]对植物基因组中SSR出现的频率研究结果相一致。Morgante等研究表明某一植物基因组中SSR出现的频率与该植物基因组大小和重复DNA序列所占的比例负相关, 与基因中转录部分的比例及低拷贝序列出现的频率显著正相关。

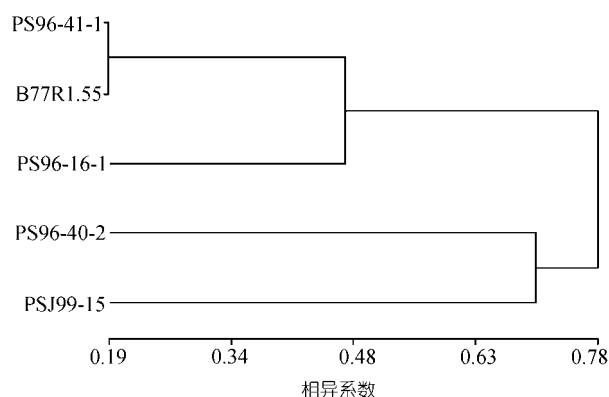


图 4 基于 50 个 RAPD 标记的 5 个大豆疫霉菌菌株的聚类树状图

在鉴定的大豆疫霉菌 EST-SSR 中以三核苷酸重复基元最丰富, 占鉴定总数的 50.1%, 同样, 在致病疫霉菌 EST-SSR 中三核苷酸重复基元也最多, 占鉴定总数的 39.3%。本研究的结果与以前报道的在一些植物中的研究结果一致^[17,24,25]。在基因编码区主要存在三核苷酸重复类型可能是三核苷酸重复数的变异不会引起移码突变, 从而减少突变的压力。Gao 等人^[17]发现许多三核苷酸与具有重要功能的基因相关, 如 CCG 重复涉及许多基因的功能, 如胁迫抗性、转录调控、信号传导等。

SSR 被认为是位点专化性的, 因此, 一个引物对一般只期望扩增一条带或共迁移的双带。然而, 在本研究中, 33 个功能性 EST-SSR 引物对中有 29 个扩增出 2 条或 2 条以上条带。这种现象在其他研究中也有报道。在六倍体小麦中, 单个 EST-SSR 引物对扩增多 SSR 位点被认为是由于多个部分同源位点的扩增^[16]。在一些牧草内寄生菌 (*Neotyphodium* spp) 中, 这种现象归结于一个假设的杂交起源而形成的异倍体^[26]。而异型杂交可以导致一些二倍体苜蓿基因型的多个 EST-SSR 等位点^[18]。大豆疫霉菌为二倍体, 具有高度的异质性和无性突变的能力, 虽然为同宗配合, 但也能通过异型杂交而产生新的致病类型^[5,9]。因此, 大豆疫霉菌的异质体、无性突变体或杂合体的存在可能是 EST-SSR 引物对扩增多个产物的原因。另外, 基因扩增也可能导致扩增多 EST-SSR 位点。Mao 和 Tyler^[27]通过对大豆疫霉菌基因组中的串联重复序列进行研究, 认为基因扩增导致大豆疫霉菌遗传多样性的产生。

EST-SSR 标记在大豆疫霉菌种内能够检测到较高水平的多态性。在 33 个功能性 EST-SSR 引物对中, 有 15 个引物对在 5 个大豆疫霉菌菌株间扩增出多态性, 共扩增出 20 个多态性标记。王化波等人^[8]利用从 200 个 RAPD 引物中筛选出的 13 个多态性引物对 75 个中国大豆疫霉菌菌株和 11 个美国菌株进行遗传多样性分析, 将 86 个菌株聚类为 4 个 RAPD 遗传组。本研究所用的 5 个检测大豆疫霉菌菌株分属于 4 个不同的 RAPD 组 (图 4)。基于 20 个 EST-SSR 标记, 我们将这 5 个菌株分成 3 个组 (图 3), 与王化波等的结果具有一定差异。导致这种差异存在的可能原因是王化波等所用的 13 个 RAPD 引物是从 200 个引物中筛选出的具有高多态性引物, 在 5 个菌株中共检测出 50 个多态性标记, 而本研究所用 EST-SSR 引物对相对较少。一些研究已经表明, 不同的分子标记系统可能检测到的多样性水平不同, 在某些情况下获得的结果甚至相互冲突^[7,9,28]。相对而言, RAPD 分析虽然能够检测出较高的多态性, 但 RAPD 多态性与大豆疫霉菌地理分布及毒力不具有相关性^[8]。在本研究中, EST-SSR 标记能够将 4 个中国大豆疫霉菌菌株从地理上和时空上区分。当然, 这一结果的正确性还需要通过开发更多的 SSR 引物并对大量菌株进行研究来加以验证。

虽然 SSR 标记具有许多优点, 但植物病原菌真菌中开发得很少, 而在卵菌中还没有研究。随着植物病原菌基因组研究的发展, 多种不同类型植物病原菌的 EST 已被开发。从 EST 数据库中发掘 SSR 标记, 为植物病原菌 SSR 标记的发展提供了一种便利的途径。本研究从大豆疫霉菌 EST 中发掘 SSR 标记, 证明了这种途径的有效性和高效性。虽然 EST-SSR 标记与其他一些从非编码区分离的标记相比在种内检测的多态性水平要低, 但他们检测的是基因组表达部分的变异, 因此将为功能基因提供“绝对的”标记, 这将可能对决定重要表型性状的等位基因进行直接鉴定。EST-SSR 标记来自于基因转录编码区, 具有鉴定大豆疫霉菌无毒基因的极大潜能, 为利用分子标记鉴定生理小种提供了可能性。另外, EST-SSR 标记具有很高的通用性, 一旦开发, 可以在许多相关种 (属) 中应用。因此, 大豆疫霉菌 EST-SSR 标记的开发利用, 为大豆疫霉菌及相关属种的起源、系统进化及

相互间遗传关系的研究提供了一种理想工具.

致谢 本工作为国家重点基础研究发展规划(批准号: 2002CB111406)、国家自然科学基金(批准号: 30170586)和国家“十五”科技攻关专题(批准号: 2001BA509B0608)资助项目.

参 考 文 献

- Schmitthenner A F. Problems and progress in control of *Phytophthora* root rot of soybean. *Plant Dis*, 1985, 69: 362~368
- Wrather J A, Anderson T R, Arsyad D M, et al. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean-producing countries in 1998. *Can J Plant Pathol*, 2001, 23: 115~121
- Zhu Z D, Wang H B, Wang X M, et al. Distribution and virulence diversity of *Phytophthora sojae* in China. *Agri Sci in China*, 2004, 3: 116~123
- Ryley M J, Obst N R, Irwin J A G, et al. Changes in the racial composition of *Phytophthora sojae* in Australia between 1979 and 1996. *Plant Dis*, 1998, 82: 1048~1054
- Schmitthenner A F, Hobe M, Bhat R G. *Phytophthora sojae* races in Ohio over a 10-year period. *Plant Dis*, 1994, 78: 269~276
- 陈庆河, 翁启勇, 王源超, 等. 福建省大豆疫病病原鉴定及其核糖体 DNA-ITS 序列分析. *植物病理学报*, 2004, 34: 112~116
- Meng X Q, Shoemaker R C, Yang X B. Analysis of pathogenicity and genetic variation among *Phytophthora sojae* isolates using RAPD. *Mycol Res*, 1999, 103: 173~178 [DOI]
- 王化波, 王晓鸣, 朱振东. 中国大豆疫霉菌遗传多样性的 RAPD 分析. *菌物系统*, 2003, 22: 219~227
- Förster H, Tyler B M, Coffey M D. *Phytophthora sojae* races have arisen by clonal evolution and by rare outcrosses. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1994, 7: 780~791
- Whisson S C, Drenth A, Maclean D J, et al. *Phytophthora sojae* avirulence genes, RAPD, and RFLP markers used to construct a detailed genetic linkage map. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1995, 8: 988~995
- Kaye C, Milazzo J, Rozenfeld S, et al. The development of simple sequence repeat markers for *Magnaporthe grisea* and their integration into an established genetic linkage map. *Fungal Genet Biol*, 2003, 40: 207~214 [DOI]
- Sirjusingh C, Kohn M K. Characterization of microsatellites in fungal plant pathogen, *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mol Ecol Notes*, 2001, 1: 267~269 [DOI]
- Barnes I, Gaur A, Burgess T, et al. Microsatellite markers reflect intra-specific relationships between isolates of the vascular wilt pathogen *Ceratocystis fimbriata*. *Mol Plant Pathol*, 2001, 2: 319~325 [DOI]
- Chen W, Shi X, Chen Y C. Microsatellite markers and clonal genetic structure of the fungal pathogen *Phialophora gregata*. *Mycol Res*, 2002, 106: 194~202 [DOI]
- Scott K D, Eggler P, Seaton G, et al. Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 723~726 [DOI]
- Gupta P K, Rustgi S, Sharma S, et al. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Mol Genet Genomics*, 2003, 270: 315~323 [DOI]
- Gao L, Tang J, Li H, et al. Analysis of microsatellites in major crop assessed by computational and experimental approaches. *Mol Breed*, 2003, 12: 245~261 [DOI]
- Eujayl I, Sledge M K, Wang L, et al. *Medicago truncatula* EST-SSRs reveal cross-species genetic markers for *Medicago* spp. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 414~422. [DOI]
- Waugh M, Hraber P, Weller J, et al. The *Phytophthora* genome initiative database: Informatics and analysis for distributed pathogenic research. *Nucl Acids Res*, 2000, 28: 87~90 [DOI]
- Qutob D, Hraber P T, Sobral B W S, et al. Comparative analysis of expressed sequences in *Phytophthora sojae*. *Plant Physiol*, 2000, 123: 243~253 [DOI]
- Mao Y, Tyler B M. Genome organization of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Exp Mycol*, 1991, 15: 283~291
- Tooley P W, Therrien C D. Cytophotometric determination of the nuclear DNA content of 23 Mexican and 18 non-Mexican isolates of *Phytophthora infestans*. *Exp Mycol*, 1987, 11: 19~26
- Morgante M, Hanafey M, Powell W. Microsatellites are preferentially associated with non-repetitive DNA in plant genomes. *Nature Genet*, 2002, 30: 194~200 [DOI]
- Cardle L, Ramsay L, Milbourne D, et al. Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. *Genetics*, 2000, 156: 847~854
- Kantety R V, Rota M L, Matthews D E, et al. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum, and wheat. *Plant Mol Biol*, 2002, 48: 501~510 [DOI]
- van Zijl de Jong E, Guthridge K M, Spangenberg G C, et al. Development and characterization of EST-derived simple sequence repeat (SSR) markers for pasture grass endophytes. *Genome*, 2003, 46: 277~290 [DOI]
- Mao Y, Tyler B M. The *Phytophthora sojae* genome contains tandem repeat sequences which vary from strain to strain. *Fungal Genet Biol*, 1996, 20: 43~51 [DOI]
- Russell J R, Fuller J D, Macaulay M, et al. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RADPs. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 714~722 [DOI]

(2004-06-03 收稿, 2004-08-16 收修改稿)