

苹果抗炭疽菌叶枯病基因相关的 4 个分子标记的准确性验证

刘春晓¹, 兰进好², 侯鸿敏¹, 张玉刚¹, 戴洪义¹, 刘源霞^{1,*}

(¹ 青岛农业大学园艺学院, 青岛市园艺植物遗传改良与育种重点实验室, 山东青岛 266109; ² 青岛农业大学农学与植物保护学院, 山东青岛 266109)

摘要: 利用 50 个苹果栽培品种(系)对与抗炭疽菌叶枯病基因(R_{gls})位点紧密连锁的 4 个分子标记 S0405127 (SSR)、S0304673 (SSR)、SNP4236 和 InDel4254 的准确性进行验证。室内离体接种表型鉴定及分子标记基因型鉴定的结果表明, 4 个分子标记验证苹果炭疽菌叶枯病抗性的准确率分别为 90%、94%、96%和 92%。

关键词: 苹果; 炭疽菌叶枯病; 分子标记; 可靠性验证

中图分类号: S 661.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2017) 07-1355-08

Accuracy Test of Four Molecular Markers of Glomerella Leaf Spot Resistant Gene in Apple Cultivars

LIU Chunxiao¹, LAN Jinhao², HOU Hongmin¹, ZHANG Yugang¹, DAI Hongyi¹, and LIU Yuanxia^{1,*}

(¹Qingdao Key Laboratory of Genetic Improvement and Breeding in Horticultural Plants, College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China; ²College of Agronomy and Crop Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China)

Abstract: In the present study, the accuracy of the four molecular markers tightly linked with R_{gls} locus, S0405127 (SSR), S0304673 (SSR), SNP4236, and InDel4254 were tested based on the resistant phenotypic and genotypic identification of 50 apple cultivars. The results indicated that the accuracy of the four molecular markers were 90%, 94%, 96%, 92%, respectively. The study could provide breeders an effective method to speed up breeding program by using these molecular markers for the pre-selection of the hybrid seedlings resistant to the Glomerella leaf spot in apple.

Keywords: apple; Glomerella leaf spot; molecular marker; accuracy test

分子标记辅助选择育种(marker assisted selection, MAS)是利用与目标基因紧密连锁的分子标记来鉴定不同个体的基因型,从而进行辅助选择,能有效结合基因型与表型鉴定结果,提高预先选择的准确性。对于多年生木本植物苹果而言,MAS的应用,可以在杂种实生苗早期阶段通过预先选

收稿日期: 2017-04-20; **修回日期:** 2017-06-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(31372032); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-28-01-07); 山东省良种产业化工程项目(620902); “泰山学者”建设工程和青岛市民生科技计划项目(15-9-2-99-nsh, 14-2-3-38-nsh); “十二五”国家科技支撑计划项目(2013BAD02B01); 青岛农业大学高层次人才科研基金项目(6631117007); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(BS2014SW027)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: yuanxialiu@163.com)

择减少杂种群体, 从而减少用地和用工, 提高育种效率。

近年来, 随着分子技术的发展, 多种分子标记被开发, 如 AFLP、RAPD、RFLP、SCAR、CAPs、SSR 和 SNP 标记等 (Rosa et al., 2003; Silfverberg-Dilworth et al., 2006; Xia et al., 2007; Moriya et al., 2012; Chen et al., 2015), 并成功用于分子标记辅助育种。Tartarini 等 (2000) 利用与抗苹果黑星病基因 (*Vf*) 紧密连锁的 RAPD 标记测验了携带该基因的苹果个体, 淘汰错误率为 3%, 保留错选率仅为 0.02%。苹果柱型性状有利于形成集约高效的现代栽培模式, 降低生产成本, 提高产量。Moriya 等 (2012) 用 3 个与柱型基因 (*Co*) 共分离的 SSR 标记 Mdo.chlO.12、Mdo.chlO.13 和 Mdo.chlO.14, 对柱型苹果杂交群体进行了早期选择。Cheng 等 (1996) 利用与控制果色的 *Thd01* 基因紧密连锁的 RAPD 标记, 在苹果实生苗发育早期进行标记筛选, 实现了对果色性状的早期选择。Wang 等 (2011) 通过 SCARs 标记和 SSR 标记对控制梨矮生性状基因 *PcDw* 进行了定位, 对梨矮化育种有着重要的意义。

SNP 标记 (4.5 ~ 20 kb) 因其广泛存在于苹果基因组中 (Velasco et al., 2010; Micheletti et al., 2011), 能够通过高通量测序技术大批量地开发, 所以越来越受到研究者的青睐。Chagné 等 (2012) 对 27 个苹果品种进行低深度重测序检测并确认全基因组范围的 SNP, 开发了苹果 8K 的 SNP 芯片, 可用于苹果幼苗大规模检测, 促进了标记一位点—性状之间关联性的发现, 推动了遗传变异研究。Isabelle 等 (2016) 报道了利用 KASP™ (Kompetitive Allele-Specific PCR) 技术对与苹果黑星病、白粉病抗性基因相连锁的 SNP 进行基因分析, 并应用于抗病品种的选育。David 等 (2016) 利用 8K 的 SNP 芯片开发了苹果果色的 SNP 功能标记 (ss475879531), 并用该标记对 5 个苹果杂交群体的幼树进行了果实颜色的鉴定, 结果证明, 该标记能够有效地预测果实的颜色, 可以应用于分子标记辅助育种。

苹果炭疽菌叶枯病 (*Glomerella* leaf spot, GLS), 是一种严重危害苹果叶片的流行性真菌病害, 在中国主要由病原围小丛壳 (*Glomerella cingulata*) 引起。在七八月份高温高湿的环境下 2 ~ 3 d 内即可造成大量叶片干枯脱落, 有时还侵染果实引起坏死性斑点 (Leite et al., 1988; González & Sutton, 1999; González, 2003; 宋清 等, 2012; Wang et al., 2012)。培育抗病品种是解决苹果炭疽菌叶枯病的有效途径。之前的研究表明, 苹果树对炭疽菌叶枯病的抗性是由单个隐性基因控制的 (Dantas et al., 2009; 刘源霞 等, 2015; Liu et al., 2016a), 抗性基因 *R_{gls}* 位点位于苹果第 15 条染色体上, 并筛选出若干个与 *R_{gls}* 基因位点紧密连锁的分子标记 (Liu et al., 2016b)。

本试验中利用筛选出的 4 个与抗苹果炭疽菌叶枯病基因 *R_{gls}* 位点紧密连锁的分子标记 S0405127 (SSR)、S0304673 (SSR)、SNP4236 和 InDel4254, 对 50 个苹果栽培品种和品系进行抗病性基因型鉴定, 通过比较分子标记检测结果与离体接种抗病鉴定结果, 验证分子标记的准确性, 为苹果抗炭疽菌叶枯病育种提供种质材料和分子鉴定技术。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

2015 年以青岛农业大学胶州农场苹果试验基地栽培的 50 个苹果品种 (系) 为试材进行标记的准确性验证。取样前 15 d 不喷施农药, 其他按常规管理进行。

室内人工接种采用的病菌是青岛农业大学苹果病害防控研究室自‘嘎拉’苹果炭疽菌叶枯病病叶上分离出来的病原菌围小丛壳 *Glomerella cingulata* (Wang et al., 2012)。

1.2 样品采集及室内抗病性鉴定

从供试的 50 个苹果栽培品种 (系) 植株上剪取一年生健壮的新枝, 每个品种 (系) 取 4 个枝条 (2 个用于接种鉴定, 2 个用作对照)。剪除枝条两端叶片, 保留顶部 4 个完全展开的叶片, 将炭疽菌叶枯病菌分生孢子悬浮液 (孢子浓度为 10^4 个 \cdot mL⁻¹) 均匀喷洒到叶片正反两面, 接种 4 d 后进行抗病性鉴定和数据记录。

将叶片上无病斑的定为“抗病”, 记为“R”, 有病斑的定为“感病”, 记为“S” (刘源霞等, 2015)。

1.3 分子标记鉴定

每个品种 (系) 单株取嫩叶 0.2 g, 液氮速冻, -70 °C 保存。基因组 DNA 的提取参考 Doyle 和 Doyle (1987) 的 CTAB 法。利用 NanoDrop 2000 分光光度计 (Thermo Scientific, South Logan, UT, USA) 测定 DNA 的纯度和浓度, 并将浓度稀释到 10 ng \cdot μ L⁻¹。

利用前期研究中所获得的与炭疽菌叶枯病抗性基因 *R_{gls}* 位点紧密连锁的 4 个分子标记 (SSR 标记 S0405127 和 S0304673, SNP 标记 SNP4236, InDel 标记 InDel4254) 对田间 50 个品种 (系) 进行基因型鉴定。其中 SSR 标记 S0405127 与基因 *R_{gls}* 位点的遗传距离为 0.5 cM, S0304673 与基因 *R_{gls}* 的遗传距离为 0.9 cM (Liu et al., 2016b), 标记 SNP4236 和 InDel4254 与目的基因共分离。引物序列及变异位点信息列于表 1。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 1 标记信息
 Table 1 The information of markers

标记名称 Marker name	序列长度/bp Sequence length	参考碱基 Ref base	突变碱基 Mutation base	位置 (Chr15) Location	参考文献 Reference	引物序列 Primer sequence
S0405127	330	(AT) ₁₀		4622388 ~ 4626535	Liu et al., 2016b	F: 5'-GGCACAATGTAGGAGGGATA-3' R: 5'-GCTATGAGGAAATTGGCTCT-3'
S0304673	333	(GT) ₁₃		4121053 ~ 4135560	Liu et al., 2016b	F: 5'-GTTTGCACATTGTAATGCTG-3' R: 5'-CAGTTTTCTAGTGATGTCGTTG-3'
SNP4236	114	A	G	4198916 ~ 4199072		R: GCTTATCATAAAAAGCAAGACCAC F: AICATATAATTGTGTAATTTAGTAGAACA
InDel4254	119	G	GC	4254896 ~ 4255015	刘源霞等, 2017	R: ATAAAGTCACTTCTAGCACAAATA F: CGAAAAACGCTTACTTAGG

利用刘源霞等 (2015) 的 SSR 反应体系: 总量为 15 μ L, 内含 4 ng \cdot μ L⁻¹ 基因组 DNA 2 μ L, 1 \times Master Mix 7.5 μ L, 0.2 μ mol \cdot L⁻¹ 左右引物各 0.8 μ L。PCR 扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min; 然后按 94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 30 s 的程序进行 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 8 min, 4 °C 保存。PCR 产物使用 3.5% 的琼脂糖凝胶电泳检验。

SNP 和 InDel 标记的检测利用高分辨率溶解曲线 (High Resolution Melting, HRM) 技术在 LightCycler[®] 480 II 荧光定量 PCR 仪 (Roche) 上进行。参照李炜等 (2015) 所用的反应体系: 总量 15 μ L, 内含 10 ng \cdot μ L⁻¹ 的基因组 DNA 1.0 μ L, 1 \times Master Mix 7.5 μ L, 2.0 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂ 1.5 μ L, 左右引物为 0.2 μ mol \cdot L⁻¹ 各 0.5 μ L。PCR 扩增程序: 95 °C 预变 10 min; 然后按 95 °C 变性 10 min, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 10 s 进行 45 个循环。扩增产物 HRM 检测程序为: 95 °C 1 min,

40 °C 1 min, 65 °C 1 s, 在 65 °C 升温至 95 °C 的过程中, 以 25 次 · °C⁻¹ 的频率收集荧光信息, 最后降温至 40 °C。利用 LightCycler[®] 480 的 Gene Scanning 软件 (1.5 version) 进行高分辨率熔解曲线分析。

2 结果与分析

2.1 不同苹果品种 (系) 对炭疽菌叶枯病的抗性鉴定

室内人工接种病原菌鉴定结果表明, 在 50 个苹果品种 (系) 中, 有 33 个抗病品种 (系), 17 个感病品种 (系), 抗感表现差异明显, 其中部分品种 (系) 的鉴定结果如图 1。



图 1 室内接种 4 d 后部分品种 (系) 对炭疽菌叶枯病的抗性表现

Fig. 1 Resistance performance in part varieties to *Glomerella* leaf spot four days after inoculating

2.2 不同标记对抗感品种 (系) 的鉴定

分别利用 3.5% 的琼脂糖凝胶电泳和 HRM 分析方法对 SSR 标记和 SNP、InDel 标记在不同品种 (系) 中进行基因型鉴定。

SSR 标记 S0304673 (图 2) 能扩增出两条差异明显的扩增条带, 在抗病品种 (系) 中能扩增出 305 bp 大小的片段, 在感病品种 (系) 中会扩增出分子量为 333 bp 的片段。

SSR 标记 S0405127 (图 2) 能在感病品种 (系) 中扩增出分子量为 330 bp 的片段, 在抗病品种 (系) 中无此片段。

在 HRM 图中, 可以看出标记 SNP4236 和 InDel4254 能够很清楚地地区分出抗感植株 (图 3)。

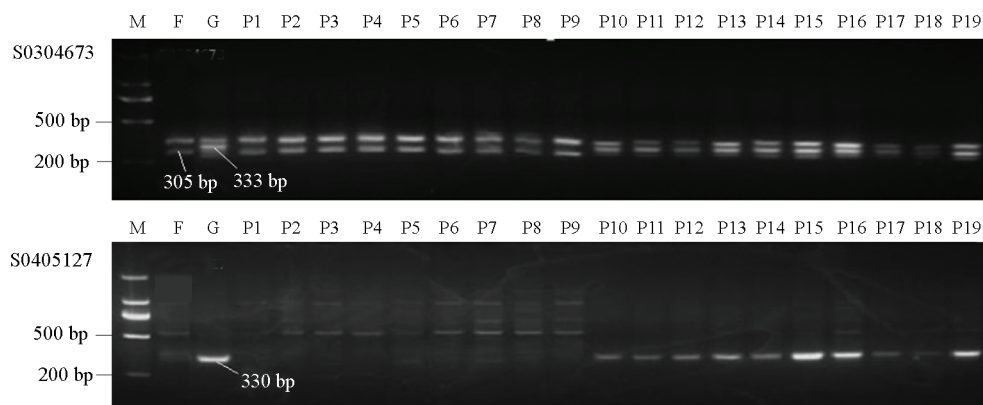


图 2 SSR 标记 (S0304673, S0405127) 在部分品种 (系) 中扩增的琼脂糖凝胶电泳图

M: DL2000; F: 富士; G: 金冠; P1~P9: 抗病品种; P10~P19: 感病品种。

Fig. 2 Agarose gel profile of SSR markers (S0304673, S0405127) amplified from part varieties

M: DL2000 marker; F: Fuji; G: Golden Delicious; P1 - P9: Resistant variety; P10 - P19: Susceptible variety.

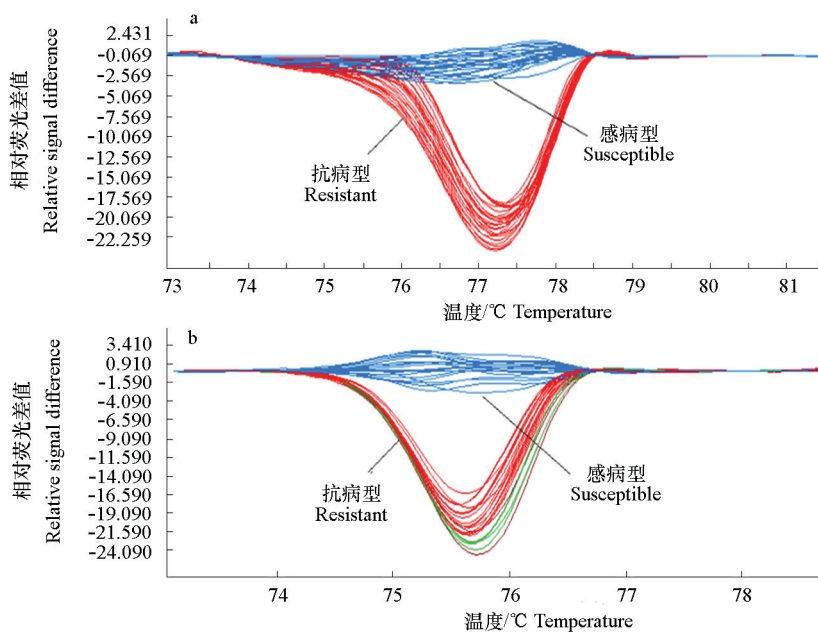


图 3 SNP4236 (a) 和 InDel4254 (b) 标记在苹果不同品种 (系) 中扩增的 HRM 图

Fig. 3 HRM profile of SNP4236 (a) and InDel4254 (b) marker amplified from difference varieties

2.3 分子标记准确性鉴定

SSR 标记 S0405127、S0304673, SNP 标记 SNP4236 和 InDel 标记 InDel4254 对 33 个抗病品种 (系) 和 17 个感病品种 (系) 验证的结果 (表 2) 显示, 4 个标记在基因型鉴定结果中与表型鉴定结果不相符的品种 (系) 分别为 5 个、3 个、2 个、4 个, 鉴定抗病感病的准确率分别为 90%、94%、96%、92%。这 4 个分子标记鉴定结果的准确率均达到 90% 以上, 可以应用于田间栽培品种、品系、种质资源以及杂种后代幼苗对炭疽菌叶枯病抗性的鉴定。

表 2 分子标记对苹果栽培品种和品系的抗病性的鉴定结果

Table 2 Result of resistance identification of four markers in apple cultivars (lines)

序号 Code	品种/系 Cultivar/Line	表型 Phenotype	S0405127 (SSR)	S0304673 (SSR)	SNP4236	InDel 4254
1	斗南 Dounan	R	R	R	R	R
2	福丽 Fuli	R	R	R	R	R
3	福艳 Fuyan	R	R	R	R	R
4	红勋 1 号 Hongxun 1	R	R	R	R	R
5	华帅 Huashuai	R	R	R	R	R
6	鲁加 1 号 Lujia 1	R	R	R	R	R
7	旭 McIntosh	R	R	R	R	R
8	鲁加 4 号 Lujia 4	R	R	R	R	R
9	鲁加 6 号 Lujia 6	R	R	R	R	R
10	鲁加 2 号 Lujia 2	S	S	S	S	S
11	青农红 Qingnonghong	S	S	S	R	R
12	瑞红 Ruihong	S	S	S	S	S
13	双阳红 Shuang yanghong	S	S	S	S	S
14	新世界 Shinsekai	S	S	S	S	S
15	N2	S	S	S	S	S
16	福早红 Fuzaohong	S	S	S	S	S
17	嘎拉 Gala	S	S	S	S	S
18	秦冠 Qinguan	S	S	S	S	S
19	瑞丹 Judaine	S	S	S	S	S
20	海棠 <i>Malus</i> sp.	R	R	S	R	R
21	烟富 1 Yanfu 1	R	R	R	R	R
22	金冠 Golden Delicious	S	S	S	S	S
23	乙女 Alps Otome apple	R	R	R	R	R
24	华硕 Huashuo	R	S	R	R	R
25	王林 Orin	R	S	R	R	S
26	早杂 1 号 Zaoza 1	R	R	R	R	R
27	威赛克旭 Wjicik McIntosh	R	R	R	R	S
28	赛金 Saijin	R	S	R	R	R
29	红肉 1 号 Red Flesh 1	R	R	R	R	R
30	五月金 Wuyuejin	R	R	R	R	R
31	望山红 Wangshanhong	R	R	R	R	R
32	新红星 Starkrimson Delicious	R	R	R	R	R
33	青冠 Qing Delicious	R	R	R	R	R
34	弘前富士 Hirosaki Fuji	R	R	R	R	R
35	富士 Fuji	R	R	R	R	R
36	皮诺娃 Pinova	R	R	R	R	R
37	早翠绿 Zaocuilü	R	R	R	R	S
38	7C-102	R	R	R	R	R
39	国光 Ralls	R	R	R	R	R
40	霞光 Xianguang	R	R	R	S	R
41	7C-35	S	R	R	S	S
42	95-161	R	R	R	R	R
43	95-231	R	R	R	R	R
44	95-232	S	S	S	S	S
45	95-32	R	R	R	R	R
46	95-93	R	R	R	R	R
47	7C-104	S	S	S	S	S
48	7C-105	S	S	S	S	S
49	7C-106	S	R	R	S	S
50	7C-107	S	S	S	S	S

注: 加粗表示基因型与表型鉴定结果不相符。

Note: Boldface indicates that genotype is not consistent with phenotype identification.

3 讨论

本试验中 4 个标记的准确率均达到 90.0%, 可以有效地应用于分子标记辅助育种。SSR 标记 S0405127 与基因 R_{gl5} 位点的遗传距离为 0.5 cM, S0304673 的遗传距离为 0.9 cM, 而在品种群体

证中, 标记 S0304673 鉴定抗感品种 (系) 的准确率比标记 S0405127 的准确率高。SNP4236 和 InDel4254 与目的基因共分离, 但在品种的群体验证中还是有 2~4 个表型鉴定与基因型鉴定不符的个体。产生这种现象存在以下几个原因, 一方面可能由于用于鉴定的品种或品系数数量有限, 导致了结果的偏离; 二是标记 S0405127 的条带显示为有和无的差异, 在电泳时有可能存在读带误差; 三是在对做图群体进行表型鉴定中, 可能存在表型鉴定误差, 导致遗传距离计算的偏差; 四是在精细定位中, 需要应用更大的群体筛选重组的单株以完成对目标基因的精细定位, 而由于试验材料的限制, 所用群体规模不是很大, 所以可能导致定位结果的误差; 五是引物所扩增的碱基序列在杂交个体中发生突变, 导致扩增的条带与目标条带不符。这些问题尽管在试验中是不可避免的, 但可以通过以下方法进行纠正。一是在进行更精细的遗传定位研究中, 以更大规模的群体和更严谨的实验操作来提高遗传作图的精度, 尽可能的减少这些误差的产生; 二是对多个分子标记鉴定结果进行综合分析, 排除单一分子标记可能产生的误差, 进而提高分子标记辅助选择在育种实践中的有效性。

References

- Chagné D, Crowhurst R N, Troglio M, Davey M W, Gilmore B, Lawley C, Vanderzande S, Hellens R P, Kumar S, Cestaro A, Velasco R, Main D, Rees J D, Iezzoni A, Mockler T, Wilhelm L, van de Weg E, Gardiner S E, Bassi N, Peace C. 2012. Genome-wide SNP detection, validation, and development of an 8K SNP array for apple. *PLoS ONE*, 7 (2): e31745
- Chen Hui, Song Yue, Li Lei-ting, Awais Khan M, Li Xiu-gen, Schuyler S Korban, Wu Jun, Zhang Shao-ling. 2015. Construction of a high-density simple sequence repeat consensus genetic map for pear (*Pyrus spp.*). *Plant Mol Biol Rep*, 33: 316 - 325.
- Cheng F S, Weeden N F, Brown S K I. 1996. Identification of co-dominant RAPD markers tightly linked to fruit skin color in apple. *Theoretical and Applied Genetics*, 93 (1): 222 - 227.
- Dantas A C M, Silva M F, Nodari R O. 2009. Avanços genéticos da macieira no controle de doenças (Genetic advances in the control of apple diseases) // Stadnik M J. Manejo integrado de doenças da macieira. Florianópolis: CCA-UFSC: 127 - 152.
- David C, Chris K, Natalie H, Claire W, Cristian F, Gemma R, Greg S, Simon R, Lara P, Susan E G, Satish K, Richard E, Richard K V, Michela T, Ignasi I. 2016. A functional genetic marker for apple red skin coloration across different environments. *Tree Genetics & Genomes*, 12 (4): 67.
- Doyle J J, Doyle J L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 19: 11 - 15.
- González E. 2003. Characterization of isolates of *Glomerella cingulata* causal agent of Glomerella leaf spot and bitter rot of apples based on morphology and genetic, molecular, and pathogenicity tests [Ph. D. Dissertation]. Raleigh: North Carolina State University.
- González E, Sutton T B. 1999. First report of Glomerella leaf spot (*Glomerella cingulata*) of apple in the United States. *Plant Disease*, 83 (11): 1074 - 1074.
- Isabelle O, Baumgartner, Markus K, Fabrizio C, Luca D, Giulia P, Roberto G, Stefano T, Lucie L, François L, Andrea P. 2016. Development of SNP-based assays for disease resistance and fruit quality traits in apple (*Malus × domestica* Borkh.) and validation in breeding pilot studies. *Tree Genetics & Genomes*, 12: 35.
- Leite J R P, Tsuneta M, Kishino A Y. 1988. Occurrence of *Glomerella* spots in apples at the state of Parana, Brazil, Portuguese.
- Li Wei, Tian Yi-ke, Wang Cai-hong, Bai Mu-dan, Hou Dong-liang. 2015. Screening of SNP markers tightly linked to *PcDw* locus determining pear dwarf trait using HRM technology. *Acta Horticulturae Sinica*, 42 (2): 214 - 220. (in Chinese)
- 李 炜, 田义轲, 王彩虹, 白牡丹, 侯董亮. 2015. 通过 HRM 技术筛查与梨矮生性状决定位点 *PcDw* 紧密连锁的 SNP 标记. *园艺学报*, 42 (2): 214 - 220.
- Liu Yuanxia, Lan Jinhao, Bai Suhua, Sun Xiaohong, Liu Chunxiao, Zhang Yugang, Dai Hongyi. 2017. Screening of SNP and InDel markers to *Glomerella* leaf spot resistance gene locus in apple using HRM technology. *Acta Horticulturae Sinica*, 44 (2): 215 - 222. (in Chinese)
- 刘源霞, 兰进好, 柏素花, 孙晓红, 刘春晓, 张玉刚, 戴洪义. 2017. 苹果抗炭疽菌叶枯病基因 SNP 和 InDel 标记的 HRM 筛选. *园艺学报*, 44 (2): 215 - 222.

- Liu Yuanxia, Lan Jinhao, Wang Caihong, Li Baohua, Zhu Jun, Liu Chunxiao, Dai Hongyi. 2016b. Investigation and genetic mapping of a Glomerella leaf spot resistance locus in apple. *Plant Breeding*, DOI: 10.1111/pbr.12399.
- Liu Yuanxia, Li Bao-hua, Wang Cai-hong, Liu Chun-xiao, Kong Xiang-hua, Zhu Jun, Dai Hong-yi. 2016a. Genetics and molecular marker identification of a resistance to Glomerella leaf spot in apple, *Horticultural Plant Journal*, 2 (3): 121 - 125.
- Liu Yuan-xia, Li Bao-hua, Wang Cai-hong, Liu Chun-xiao, Kong Xiang-hua, Zhu Jun, Dai Hong-yi. 2015. Genetic studies and molecular markers screening of apple resistance to Glomerella leaf spot. *Acta Horticulturae Sinica*, 42 (11): 2105 - 2112. (in Chinese)
- 刘源霞, 李保华, 王彩虹, 刘春晓, 孔祥华, 祝 军, 戴洪义. 2015. 苹果对炭疽菌叶枯病抗性遗传的研究及其分子标记筛选. *园艺学报*, 42 (11): 2105 - 2112.
- Micheletti D, Troggio M, Zharkikh A, Costa F, Malnoy M, Velasco R, Salvi S. 2011. Genetic diversity of the genus *Malus* and implications for linkage mapping with SNPs. *Tree Genet Genome*, 7: 857 - 868.
- Moriya S, Okada K, Haji T, Yamamoto T, Abe K. 2012. Fine mapping of *Co*, a gene controlling columnar growth habit located on apple (*Malus × domestica* Borkh.) linkage group 10. *Plant Breeding*, 131 (5): 641 - 647.
- Rosa R L, Angiolillo A, Guerrero C, Pellegrini M, Rallo L, Besnard G, Bervill A, Martin A, Baldoni L. 2003. A first linkage map of olive (*Olea europaea* L.) cultivars using RAPD, AFLP, RFLP and SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 1273 - 1282.
- Silfverberg-Dilworth E, Matasci C L, Van de Weg W E, Van Kaauwen M P W, Walser M, Kodde L P, Soglio V, Gianfranceschi L, Durel C E, Costa F, Yamamoto T, Koller B, Gessler C, Patocchi A. 2006. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus × domestica* Borkh.) genome. *Tree Genetics and Genomes*, 2: 202 - 224.
- Song Qing, Wang Su-xia, Yang Chun-liang, Jia De-hui. 2012. A preliminary report on the research of Glomerella leaf spot in apple. *Deciduous Fruit*, 44 (2): 29 - 30. (in Chinese)
- 宋 清, 王素侠, 杨春亮, 贾德辉. 2012. 苹果炭疽菌叶枯病的研究初报. *落叶果树*, 44 (2): 29 - 30.
- Tartarini S, Sansavini S, Vinatzer B, Gennari F, Domizi C, Geibel M, Fischer M, Fischer. 2000. Efficiency of marker assisted selection (MAS) for the *Vf* scab resistance gene. *Acta Horticulturae International Society for Horticultural Science (ISHS)*, 538 (2): 549 - 552.
- Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A, Fontana P, Bhatnagar S K, Troggio M, Pruss D, Salvi S, Pindo M, Baldi P, Castelletti S, Cavaiuolo M, Coppola G, Costa F, Cova V, Dal R A, Goremykin V, Komjanc M, Longhi S, Magnago P, Malacarne G, Malnoy M, Micheletti D, Moretto M, Perazzolli M, Si-Ammour A, Vezzulli S, Zini E, Eldredge G, Fitzgerald L M, Gutin N, Lanchbury J, Macalma T, Mitchell J T, Reid J, Wardell B, Kodira C, Chen Z, Desany B, Niazi F, Palmer M, Koepke T, Jiwan D, Schaeffer S, Krishnan V, Wu C, Chu V T, King S T, Vick J, Tao Q, Mraz A, Stormo A, Stormo K, Bogden R, Ederle D, Stella A, Vecchietti A, Kater M M, Masiero S, Lasserre P, Lespinasse Y, Allan A C, Bus V, Chagné D, Crowhurst R N, Gleave A P, Lavezzo E, Fawcett J A, Proost S, Rouzé P, Sterck L, Toppo S, Lazzari B, Hellens R P, Durel C E, Gutin A, Bumgarner R E, Gardiner S E, Skolnick M, Egholm M, van de Peer Y, Salamini F, Viola R. 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nature Genetics*, 42 (10): 833 - 839.
- Wang C H, Tian Y K, Buck E J, Gardiner S E, Dai H Y, Jia Y L. 2011. Genetic mapping of *PcDw* determining pear dwarf trait. *J Amer Soc Hort Sci*, 136 (1): 48 - 53.
- Wang C X, Zhang Z F, Li B H, Wang H Y, Dong X L. 2012. First report of Glomerella leaf spot of apple caused by *Glomerella cingulata* in China. *Plant Disease*, 96 (6): 912.
- Xia Z J, Tsubokura Y, Hoshi M, Hanawa M, Yano C, Okamura K, Ahmed T A, Anai T, Watanabe S, Hayashi M, Kawai T, Hossain K G, Masaki H, Asai K, Yamanaka N, Kubo N, Kadowaki K, Nagamura Y, Yano M, Sasaki T, Harada K. 2007. An integrated high-density linkage map of soybean with RFLP, SSR, STS, and AFLP markers using a single F₂ population. *DNA Research*, 14: 257 - 269.