

与梨黑星病抗性基因连锁的 AFLP 标记筛选及 SCAR 标记转化

张树军¹, 张绍铃¹, 吴俊^{1,*}, 王迎涛², 李勇², 李晓²

(¹南京农业大学梨工程技术研究中心, 南京 210095; ²河北省农林科学院石家庄果树研究所, 石家庄 050061)

摘要:以‘鸭梨’(*Pyrus bretschneideri*) × ‘雪青’梨(*P. bretschneideri* × *P. pyrifolia*) F₁ 代群体(97 株) 为试材, 采用扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP) 技术和集群分类法(bulked segregant analysis, BSA) 筛选与梨抗黑星病基因连锁的分子标记。通过 64 对 AFLP 标记引物在亲本和分离群体中的筛选和验证, 获得与梨抗黑星病基因紧密连锁标记两个, 即 ACA/CAA₁₇₉ 和 AAC/CAG₁₉₈。它们与抗黑星病基因的遗传距离分别为 5.2 和 8.3 cM。对 AFLP 标记片段的克隆和测序结果显示其长度分别为 179 和 198 bp。根据序列信息设计特异引物, 在杂交后代群体上的 PCR 分析表明 AFLP_{ACA/CAA-179} 标记被成功转换成 SCAR 标记, 命名为 SCAR₁₁₇。本研究结果将有助于对抗黑星病梨品种资源的分子鉴定及杂种后代的早期辅助选择。

关键词: 梨; 抗黑星病; AFLP; SCAR

中图分类号: S 661.2

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2010) 07-1147-08

Identification of AFLP-derived SCAR Markers Linked to the Pear Scab Resistance Gene

ZHANG Shu-jun¹, ZHANG Shao-ling¹, WU Jun^{1,*}, WANG Ying-tao², LI Yong², and LI Xiao²

(¹Center of Engineering and Technology Research Nanjing Agricultural University Nanjing 210095, China; ²Shijiazhuang Pomology Institute, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050061, China)

Abstract: Pear scab is one of the most harmful diseases in pear production. Using 97 F₁ progenies produced by the cross ‘Yali’ (susceptible) × ‘Xueqing’ (resistant), markers linked to pear scab resistance gene were screened by amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique combined with bulked segregant analysis (BSA) method. Two molecular markers which linked to pear scab resistant gene had been identified from 64 pairs of AFLP primer, named as ACA/CAA₁₇₉ and AAC/CAG₁₉₈. The genetic distance to pear scab resistant gene were 5.2 cM and 8.3 cM, respectively. Sequencing results indicated that the length of the two specific fragment amplified were 179 bp and 198 bp, respectively. The specific primers were further designed based on the sequence information, and then were utilized to analyze the F₁ population by PCR. Results showed that AFLP_{ACA/CAA-179} had been successfully converted into SCAR marker, and named as SCAR₁₁₇. This result will be helpful for molecular identification of germplasm and early selection of progenies which are resistant to pear scab.

收稿日期: 2010-03-05; 修回日期: 2010-05-17

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(200903044); 国家‘863’计划(2006AA00108-2-3-4A)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wujun@njau.edu.cn; Tel: 025-84396580)

Key words : pear ; scab resistance ; AFLP ; SCAR

梨黑星病是梨树栽培中的主要病害之一,在我国主要梨产区均有发生,给生产造成很大损失。梨黑星病常规的防治方法为化学药剂防治,但随着其病菌抗药性菌株的出现,化学防治效果逐渐减弱,这为该病害的防治带来了新的难题。从长远发展来看,选育和栽植抗黑星病的优良品种将是控制梨黑星病发生和实现无公害生产的最有效措施。

由于果树的基因组学研究较为滞后,直接获得控制梨黑星病的基因目前难以实现。国际上曾有学者开展了有关梨黑星病抗性的分子图谱定位研究。例如,Pierantoni 等(2007)用 AFLP 标记构建了西洋梨的遗传连锁图谱,并检测出与梨黑星病(*Venturia pyrina*)抗性相关的两个主效 QTL 位点。Terakami 等(2006)利用 SSR、AFLP 和 RAPD 等标记技术将日本梨品种‘Kinchaku’中所含的抗黑星病 *Vnk* 基因定位在梨遗传图谱中 LG1 的中间区域,并鉴定出多个与黑星病抗性基因紧密连锁的分子标记。此外, Terakami 等(2006)指出,分属不同种的梨的黑星病的抗性遗传位点可能不同。在我国,对梨黑星病的研究主要集中在品种及其杂交后代的遗传行为及表型方面。蒲富慎(1979)以日本梨为试材研究后认为梨黑星病抗性可能受显性单基因控制;汤浩茹和冷怀琼(1993)通过分析‘鸭梨’、‘早酥’等 8 个品种 15 个杂交组合的 F_1 群体,认为梨对黑星病的抗性为质量性状,抗病性对感病性为显性。到目前为止,还未见利用国内梨品种资源开展抗黑星病基因连锁标记的报道。许多学者通过接种试验和田间自然发病调查发现,隶属白梨系统的‘鸭梨’是最易感病品种(沈言章等,1993;汤浩茹和冷怀琼,1993),汤浩茹等(1998)利用生物间遗传学的原理和方法对梨黑星病菌和梨品种相互作用进行分析,发现‘鸭梨’不含抗黑星病基因。因此,本研究中以‘鸭梨’ \times ‘雪青’及其 97 株 F_1 植株为试材,利用 AFLP 技术和集群分类法(bulked segregant analysis,BSA),筛选与梨抗黑星病基因连锁的 AFLP 标记,并将其转换为 SCAR(sequence characterized amplified region)标记,为梨抗黑星病品种分子辅助选择育种奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 亲本及 F_1 分离群体抗/感黑星病的鉴定

试验于2007—2008年在河北省农林科学院石家庄果树研究所进行。

供试材料为‘鸭梨’(感病) \times ‘雪青’(抗病)的杂交后代97株。当亲本及 F_1 的叶龄在25 d左右时,接种梨黑星病菌(*Venturia nashicola*)进行抗性鉴定。

接种病菌体来自当年‘鸭梨’黑星病菌分生孢子体,浓度为 $10 \times$ 显微镜下每视野150~200个分生孢子。用涂抹法将黑星病菌分生孢子均匀涂抹于叶背面,每株接种30个叶片,并利用塑料膜覆盖保湿72 h,90 d后调查记载黑星病发病情况。染病叶表型为有坏死斑且有少量孢子形成,记为抗病植株;染病叶表型为病斑蔓延全叶且有黑霉产生,记为感病植株。

1.2 基因组 DNA 提取和近等基因池的构建

2007年春季采集供试植株的幼嫩叶片,液氮处理后保存于 -70°C 冰箱备用。

利用本实验室改良的CTAB法(张妤艳等,2006)提取亲本及后代个体的基因组DNA,经RNAase消化后用0.8%琼脂糖凝胶电泳检测所提DNA的纯度和完整性,存于 -20°C 冰箱备用。

根据BSA法(Michelmore et al., 1991)的基本原理,取杂交后代表现为抗病与感病的个体各7

株,将其DNA分别等量混合,构建抗/感黑星病性状基因池。

1.3 AFLP 分析

参照 Vos 等 (1995) 的方法,基因组DNA采用 *Mse*I 和 *Eco*RI 两种内切酶进行酶切;预扩增引物采用不含选择性碱基的 M_{00} 和 E_{00} 。AFLP引物由上海英骏生物工程公司合成,所用 *Taq* DNA聚合酶购自 TaKaRa 公司。选择性PCR扩增结束后,通过6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,利用银染法进行检测。

同时对抗病、感病亲本和抗病、感病基因池进行AFLP扩增,筛选在两亲本及两基因池间产生相应多态性的引物组合,并获得与抗/感黑星病相连锁的候选标记。然后将产生多态性的引物在 F_1 群体中进行单株验证,从而进一步确认所筛选到的标记与目标性状的连锁关系。统计群体的共分离分析结果,计算标记与控制目标性状基因间的重组率,并根据 Kosambi 函数 (Kosambi, 1944) 估算遗传连锁距离。

从聚丙烯酰胺凝胶上回收确定为连锁标记的多态性片段,置于盛有20 μ L ddH₂O的离心管中,100 $^{\circ}$ C煮沸15 min,离心,取上清液作为DNA模板,用与之相对应的AFLP选择性引物进行PCR扩增,反应程序和体系与选择性扩增相一致。

重扩增的PCR产物用UNIQ-10柱式DNA胶回收试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司)回收,方法参照厂商说明书。

将纯化的目的条带转入pMD19-T载体(宝生物工程有限公司)进行克隆,方法参照厂商说明书。以10个与特异条带大小一致的阳性克隆为模板,用与之相对应的引物进行PCR扩增,反应程序和体系与选择性扩增相一致。

6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进一步检测相应的PCR产物,与特异条带大小一致的阳性克隆,提取质粒后由上海英骏生物工程公司进行测序。

1.4 SCAR 引物设计与 PCR 扩增

根据获得的特异片段DNA序列设计特异性引物,以亲本的基因组DNA为模板,进行程序和体系的优化分析,确定了SCAR₁₁₇特异引物的最佳体系和程序。25 μ L体系含模板DNA 25 ng, Mg^{2+} 2.5 mmol \cdot L⁻¹, dNTP 0.25 mmol \cdot L⁻¹, *Taq* DNA聚合酶1.0 U, 引物 0.6 μ mol \cdot L⁻¹;反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,前10个循环在 94 $^{\circ}$ C 1 min, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min,后25个循环退火温度为 63 $^{\circ}$ C,最后72 $^{\circ}$ C 延伸10 min。

以亲本及杂交后代基因组DNA为模板,进行SCAR标记的PCR扩增,以检测其可靠性和特异性。

2 结果与分析

2.1 梨黑星病抗性的后代分离规律

2007年和2008年对‘鸭梨’、‘雪青’及其97株 F_1 群体后代单株进行人工接种黑星病病菌鉴定。结果表明,‘鸭梨’高度感病,而‘雪青’表现出很强的抗性,后代单株中抗病个体44株,感病个体53株。

根据卡方检验 ($\chi^2 = 0.835$) 符合1:1的分离比例,表明该杂交群体中抗(感)黑星病性状符合单基因遗传规律,即存在主基因控制梨黑星病的抗(感)表型。

2.2 梨抗黑星病基因的 AFLP 标记分析

采用 64 对 AFLP 选择性引物组合对两亲本及抗/感黑星病近等基因池进行扩增, 其中 10 对引物表现出多态性扩增。利用这些多态性引物组合对 F_1 后代植株进一步筛选验证, 结果表明, 两对引物组合 (即 E_{-ACA}/M_{-CAA} 和 E_{-AAC}/M_{-CAG}) 所获得的多态性片段与梨抗 (感) 黑星病性状相连锁。

其中 AFLP 引物组合 E_{-ACA}/M_{-CAA} 获得的多态性片段大小约为 180 bp, 在抗病基因池及抗病亲本 ‘雪青’ 中均有该特异带, 而感病基因池及感病亲本 ‘鸭梨’ 中无此条带。单株检测结果显示: 44 株抗病个体中有 41 株扩增出特异片段, 3 株没有扩增出特异片段, 为交换型; 53 株感病个体有 51 株无特异片段, 2 株扩增出特异片段, 为交换型 (图 1)。

根据以上鉴定结果, 判断来自引物组合 E_{-ACA}/M_{-CAA} 的多态性标记与抗黑星病性状连锁, 群体验证的重组率为 5.2%。

利用 Kosambi 函数计算出该标记与抗黑星病基因的遗传距离为 5.2 cM。

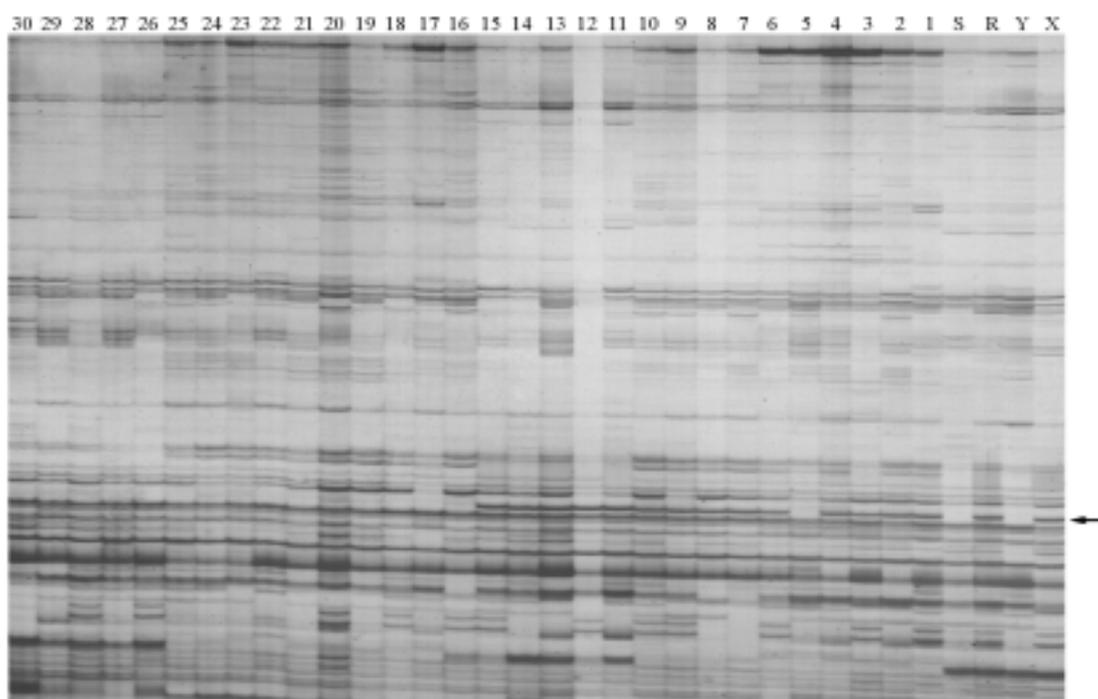


图 1 AFLP 引物 E_{-ACA}/M_{-CAA} 在两亲本、近等基因池及部分 F_1 单株中的电泳图谱

X: ‘雪青’ (抗病亲本); Y: ‘鸭梨’ (感病亲本); R: 抗病池; S: 感病池; 1~15: 抗病植株;
16~30: 感病植株; 其中 5 为重组株; 箭头所指为特异性片段。

Fig. 1 Electrophoresis patterns amplified by AFLP primer E_{-ACA}/M_{-CAA} in parents, two DNA bulks and partial F_1 individuals

X: ‘Xueqing’ (Resistant parent); Y: ‘Yali’ (Susceptible parent); R: Resistant bulk;
S: Susceptible bulk; 1-15: Resistant plants; 16-30: Susceptible plants;
5: Recombination plant; The specific fragment was indicated by the arrow.

另一 AFLP 引物组合 E_{-AAC}/M_{-CAG} 扩增的特异性片段大小约为 200 bp, 在感病性状基因池及亲本有特异带, 而抗病基因池及亲本中无此条带; 对 F_1 后代单株验证结果显示, 44 株抗病个体有 5 株发生了交换, 53 株感病个体有 3 株发生了交换 (图 2), 即标记与抗黑星病性状的重组率为 8.2%。

利用 Kosambi 函数计算该标记与抗黑星病基因的遗传距离为 8.3 cM。

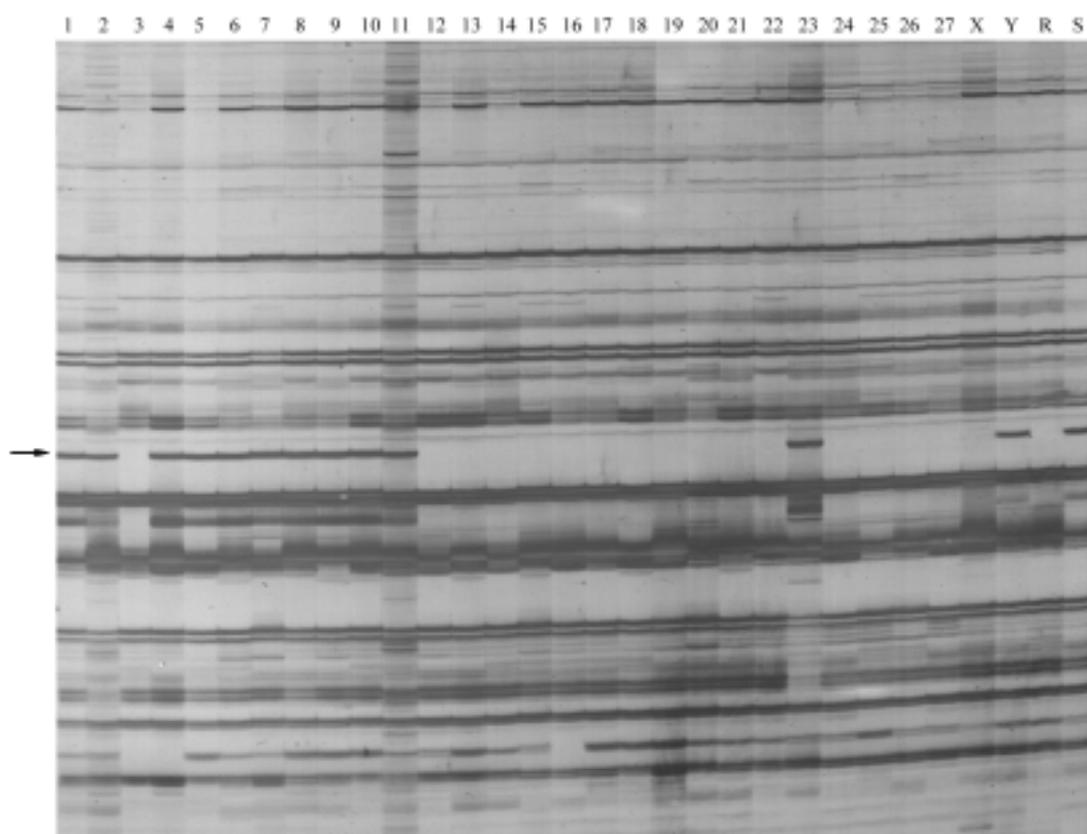


图2 AFLP 引物 E_{-AAC}/M_{-CAG} 在两亲本、近等基因池及部分 F_1 单株中的电泳图谱

X: '雪青' (抗病亲本); Y: '鸭梨' (感病亲本); R: 抗病池; S: 感病池; 1~11: 感病植株;
12~27: 抗病植株; 其中 3、23、为重组株; 箭头所指为特异性片段。

Fig. 2 Electrophoresis patterns amplified by AFLP primer E_{-AAC}/M_{-CAG} in parents, two DNA bulks and partial F_1 individuals
X: 'Xueqing' (Resistant parent); Y: 'Yali' (Susceptible parent); R: Resistant bulk; S: Susceptible bulk; 1-11: Susceptible plants; 12-27: Resistant plants; 3, 23: Recombination plants; The specific fragment was indicated by the arrow.

2.3 AFLP 标记特异片段的回收及序列测定

将 AFLP 引物 E_{-ACA}/M_{-CAA} 、 E_{-AAC}/M_{-CAG} 扩增所得的特异片段回收、克隆和转化, 挑取 10 个阳性克隆的质粒 PCR 产物, 经 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测, 选取 3 个与特异条带大小一致的阳性克隆, 送样测序, 取其共同 DNA 序列。

E_{-ACA}/M_{-CAA} 引物组合扩增的特异性片段测序结果为: 5'-GACTGCGTACCAATTCACACCATCAA
AACTATCTATTAGACCTTGTGCTACAACGAAGAGGAAGATAAGAGGGCCTAAACGTTTCATACA
ATTC AAGTGAGTTGTTGGAATGTTTAGGTACCTTCCAACACAATGATAAGGATTTGGTTTGTAAAT
TGCATGATTGTTACTCAGGACTCATC-3'。

E_{-AAC}/M_{-CAG} 引物组合扩增的特异性片段测序结果为: 5'-GACTGCGTACCAATTC AACGCGTG
TAGAATAGGTATCAGATTTCTTCGACTGAACTAAGCAACATCGATCTTGT TTTTCTTTTGGAAAT
TTGAAGTCAACAACTAACAGTGATTTGGGTTATGAAATTTGTTTAGGATTGATAGACCTAATTC

TCAGTCGAGTGTCCCTGTTTTCTTCTGTTACTCAGGACTCATC-3'。

对特异片段测序结果分析,在5'端和3'端分别有AFLP引物 E_{-ACA}/M_{-CAA} 和 E_{-AAC}/M_{-CAG} 的结合位点(黑体部分),进一步证实了特异性片段的正确性,该片段大小分别为179 bp和198 bp,与AFLP标记扩增的特异片段大小相吻合。

2.4 SCAR 引物的设计和 PCR 扩增

根据AFLP标记的DNA序列信息,利用Premier 5.0软件设计SCAR的特异引物: E_{-ACA}/M_{-CAA} 和 E_{-AAC}/M_{-CAG} 的上游引物序列分别为:5'-GTGCTACAACGAAGAGGAAGATAAG-3',5'-GAATAGGTA TCAGATTTCTTCGGAC-3'(序列中下划线部分); E_{-ACA}/M_{-CAA} 和 E_{-AAC}/M_{-CAG} 的下游引物序列分别为:5'-TCATGCAATTACAAACCAAATCCTT-3',5'-GGACACTCGACTGAGAATTAGGT-3'(序列中下划线部分)。以两亲本、抗/感基因池的基因组DNA为模板,进行PCR扩增。结果显示,根据AFLP引物 E_{-ACA}/M_{-CAA} 扩增的标记片段设计的特异引物,在'雪青'及抗黑星病近等基因池中均能扩增出与抗黑星病基因连锁的特异条带,特异PCR扩增产物的大小为117 bp,与预期大小相一致;在'鸭梨'及感病基因池中无特异片段扩增。对 F_1 群体的进一步分析验证,抗病植株中有特异片段的扩增,感病植株无扩增,交换型的数量与AFLP标记相符合。以上分析表明,该AFLP标记已成功转化为SCAR标记(图3),即SCAR₁₁₇标记与抗黑心病基因连锁距离为5.2 cM。而来自AFLP引物 E_{-AAC}/M_{-CAG} 的标记则在转化过程中丢失了其特异性。

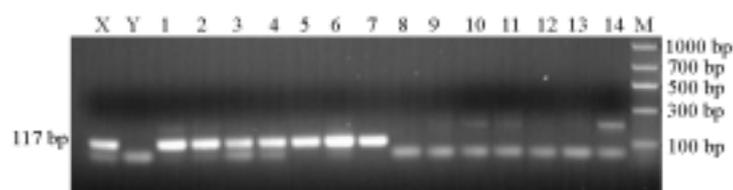


图3 SCAR 引物对两亲本及部分 F_1 单株的扩增结果

M: DNA ladder; X: '雪青'(抗病亲本); Y: '鸭梨'(感病亲本); 1~7: 抗病植株; 8~14: 感病植株。

Fig. 3 SCAR amplification of parents and some of F_1 plants

M: DNA ladder; X: 'Xueqing'(Resistant parent); Y: 'Yali'(Susceptible parent);

1-7: Resistant plants; 8-14: Susceptible plants.

3 讨论

目前对梨黑星病抗性遗传的研究结果差异较大。Brown(1960)和蒲富慎(1979)等认为,梨对黑星病的抗性由一对主效显性基因控制,而Crane和Lewis(1949),Abe和Kotobuki(1998)认为梨对黑星病的抗性受多基因支配。Stanton(1953)观察到梨品种间杂交后代对黑星病的抗感分离比例有多种情况,但未推测出抗性基因的数量。汤浩茹和冷怀琼(1993)认为梨对黑星病的抗性表现为质量性状遗传,多数组合的抗感分离比例支持有4对基因控制梨黑星病的抗性。之后,利用生物间遗传学的方法推导梨对黑星病的抗性由1~6个基因控制(汤浩茹等,1998)。Terakami等(2006)在对日本梨黑星病的抗性鉴定试验中,发现杂交后代的抗病程度分为高抗(没有可见病症)和易感(有病斑且附有大量孢子)两种表现类型,没有出现中间类型,并认为梨黑星病的抗性由单显性基因控制。在中国梨的品种资源中,'鸭梨'为公认的感病品种,汤浩茹和冷怀琼(1993)的试验结果显示,'鸭梨'的基因型是隐性纯合的。沈德绪等(2002)报道'雪青'系'雪花'×'新世纪'梨种间杂交育成的优质早熟梨,表现为抗黑星病。在本试验抗性鉴定中,统计'鸭梨'(感病)×'雪

青’(抗病)的 F_1 抗性鉴定表现中抗病/感病的表型符合1:1的分离比例($\chi^2 = 0.835$),符合单基因遗传规律,即由主基因控制梨黑星病的抗(感)性状。虽该研究中抗病亲本‘雪青’具有日本梨血统,但本试验中所得到的与梨抗黑星病连锁的两个 AFLP 标记与日本学者 Terakami 等(2006)在日本梨中发现的 *Vnk* 抗黑星病基因有无关系,还有待进一步研究。

AFLP 技术操作步骤繁琐,需要较高的试验技能,且成本较高,很难直接应用于图位克隆和分子辅助选择,如将 AFLP 标记转化成 SCAR 标记,可有效解决上述问题。不过 AFLP 标记存在转化效率低的问题,许多标记在向 SCAR 标记转化时会丢失其特异性或扩增基因组 DNA 失败,其原因目前尚不清楚,这种现象在结球芥菜(Negi et al., 2000)、苹果(Evans & James, 2003)和油菜(Hong et al., 2006)的研究中也有出现。本试验中 AFLP_{E-AAC/M-CAG} 标记在转化过程中丢失了其特异性,分析原因可能是 AFLP 标记特异性引物产生于标记的序列末端, AFLP 引物的选择性碱基决定 AFLP 条带的染色体特异性,根据内部序列设计特异性引物时,这种特异性很可能消失。Shan 等(1999)在对大麦与小麦的 AFLP 多态性片段转化过程中也有类似情况发生。为保证 SCAR 标记的特异性和可靠性,作者在将 AFLP 标记转化成 SCAR 标记时,首先对 10 个阳性克隆的质粒 PCR 产物进行 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,选取与特异带型相一致的阳性克隆,送其测序,可以有效解决在回收过程可能出现的污染情况;其次在检测 SCAR 标记时,先以预扩增产物和选择性扩增产物作为模板,可以将基因组背景的影响减少到最小;最后对抗(感)病亲本和后代的基因组 DNA 进行扩增检测。

SCAR 标记是一种十分稳定的分子标记,具有迅速、简便、低成本的特点,在苹果(王彩虹等, 2002)、梨(贾彦利等, 2007)、桃(姜立杰等, 2005; 吴俊等, 2009)、无花果(王亮等, 2009)和葡萄(杨英军等, 2002)等果树的农艺性状筛选和资源研究上得到了开发和利用。本研究中利用 AFLP 技术获得了与梨抗黑星相关基因紧密连锁的分子标记,并成功转化为 SCAR 标记,该标记在苗期对梨杂种后代植株黑星病抗性的分子辅助选择中具有一定的应用价值。

为了提高分子标记辅助育种的效率和准确性,一般要求分子标记与目标基因的连锁距离在 5 cM 以内,因此,寻找与梨黑星病抗性基因连锁更为紧密的分子标记将成为后续工作的重点。

References

- Abe K, Kotobuki K. 1998. Inheritance of high resistance to *Venturia nashicola* Tanaka et Yamamoto in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) and Chinese pear (*P. ussuriensis* Maxim.). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 67:(5): 677-680.
- Brown A G. 1960. Scab resistance in progenies of varieties of the cultivated pear. *Euphytica*, 9: 247-253.
- Crane M B, Lewis D. 1949. Genetical studies in pears V. vegetative and fruit characters. *Heredity*, 3: 85-97.
- Evans K M, James C M. 2003. Identification of SCAR markers linked to Pl-w mildew resistance in apple. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 1178-1183.
- Hong D, Wan L, Liu P, Yang G, He Q. 2006. AFLP and SCAR markers linked to the suppressor gene (*Rf*) of a dominant genetic male sterility in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Euphytica*, 151: 401-409.
- Jia Yan-li, Wang Cai-hong, Tian Yi-ke, Dai Hong-yi, Wang Liang. 2007. A SCAR marker linked to *pcDw* gene in pear. *Acta Horticulturae Sinica*, 34(6): 1531-1534. (in Chinese)
- 贾彦利, 王彩虹, 田义轲, 戴洪义, 王亮. 2007. 梨矮化基因 *pcDw* 的一个 SCAR 标记. *园艺学报*, 34(6): 1531-1534.
- Jiang Li-jie, Yang Ying-jun, Zhang Xiao-ming, Li Wen-sheng, Zhang Kai-chun. 2005. SCAR marker linked to the peach/nectarine in peach. *Acta Horticulturae Sinica*, 32(6): 1003-1007. (in Chinese)
- 姜立杰, 杨英军, 张晓明, 李文生, 张开春. 2005. 桃果实有毛/无毛性状的 SCAR 标记. *园艺学报*, 32(6): 1003-1007.
- Kosambi D D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenics*, 12: 172-175.
- Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid

- method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 88 (21): 9828 – 9832.
- Negi M S , Devic M , Delsený M , Lakshmikumaran M. 2000. Identification of AFLP fragments linked to seed coat colour in *Brassica juncea* and conversion to a SCAR marker for rapid selection. Theoretical and Applied Genetics , 101 : 146 – 152.
- Pierantoni L , Dondini L , Cho K H , Shin I S , Gennari F , Chiodini R , Tartarini S , Kang S J , Sansavini S. 2007. Pear scab resistance QTLs via a European pear (*Pyrus communis*) linkage map. Tree Genetics & Genomes , 3 : 311 – 317.
- Pu Fu-shen. 1979. Inheritance of some characters of pears. Hereditas , 1 (1): 25 – 28. (in Chinese)
- 蒲富慎. 1979. 梨的一些性状的遗传. 遗传 , 1 (1): 25 – 28.
- Shan X , Blake T K , Talbert L E. 1999. Conversion of AFLP markers to sequence-specific PCR markers in barley and wheat. Theoretical and Applied Genetics , 98 : 1072 – 1078.
- Shen De-xu , Lin Bo-nian , Yan Gen-hong , Huang Mai-ping , Ran Zhi-lin , Zhou Yong-nian. 2002. A new pear cultivar—‘Xueqing’. Acta Horticulturae Sinica , 29 (2): 187. (in Chinese)
- 沈德绪 , 林伯年 , 严根洪 , 黄麦平 , 冉志林 , 周永年. 2002. 梨新品种——雪青. 园艺学报 , 29 (2): 187.
- Shen Yan-zhang , Ma Liang , Mao Yong-lan. 1993. Studies on the resistance of pear breeds to pear scab. Journal of Yunnan Agricultural University , 3 (8): 229 – 231. (in Chinese)
- 沈言章 , 马良 , 毛咏兰. 1993. 梨品种对黑星病的抗性研究. 云南农业大学学报 , 3 (8): 229 – 231.
- Singh M , Chaudhary K , Singal H R , Magill C W , Booral K S. 2006. Identification and characterization of RAPD and SCAR markers linked to anthracnose resistance gene in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. Euphytica , 149 : 179 – 187.
- Stanton W R. 1953. Breeding pears for resistance to the pear scab fungus, *Venturia pirina* adher. II. The study of field resistance on selected pear seedling and the inheritance of resistance in seedling pear families under controlled conditions. The Annals of Applied Biology , 40 : 192 – 196.
- Tang Hao-ru , Wang Yong-qing , Deng Qun-xian. 1998. The application of interorganismal genetic in interactions between the varieties of pear and the isolates of pear scab. Journal of Fruit Science , 15 (3): 223 – 227. (in Chinese)
- 汤浩茹 , 王永清 , 邓群仙. 1998. 生物间遗传学在梨品种与梨黑星菌相互作用中的应用研究. 果树科学 , 15 (3): 223 – 227.
- Tang Hao-ru , Leng Huai-qiong. 1993. Studies on inheritance of resistance to the pear scab fungus. Journal of Sichuan Agricultural University , 11 (2): 266 – 272. (in Chinese)
- 汤浩茹 , 冷怀琼. 1993. 梨抗黑星病的遗传育种研究. 四川农业大学学报 , 11 (2): 266 – 272.
- Terakami S , Shoda M , Adachi Y , Gonai T , Kasumi M , Sawamura Y , Iketani H , Kotobuki K , Patocchi A , Gessler C , Hayashi T , Yamamoto T. 2006. Genetic mapping of the pear scab resistance gene *Vnk* of Japanese pear cultivar Kinchaku. Theoretical and Applied Genetics , 113 (4): 743 – 752.
- Vos P , Hogers R , Bleeker M , Reijmans M , van de Lee T , Hornes M , Frijters A , Pot J , Peleman J , Kuiper M , Zabeau M. 1995. AFLP : A new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research , 23 (21): 4407 – 4414.
- Wang Cai-hong , Wang Qian , Dai Hong-yi , Tian Yi-ke , Jia Jian-hang , Shu Huai-rui , Wang Bin. 2002. Development of a SCAR marker linked to *Co* gene of apple from an AFLP marker. Acta Horticulturae Sinica , 29 (2): 100 – 104. (in Chinese)
- 王彩虹 , 王倩 , 戴洪义 , 田义轲 , 贾建航 , 束怀瑞 , 王斌. 2002. 苹果柱型基因 *Co* 的一个 AFLP 标记的 SCAR 转换. 园艺学报 , 29 (2): 100 – 104.
- Wang Liang , Wang Cai-hong , Tian Yi-ke , He Xiao-wei , Wang Hui. 2009. A SCAR molecular marker related to leaf shape of fig (*Ficus carica*), Scientia Silvae Sinicae , 45 (6): 158 – 161. (in Chinese)
- 王亮 , 王彩虹 , 田义轲 , 何晓薇 , 王辉. 2009. 无花果叶形性状的 SCAR 分子标记. 林业科学 , 45 (6): 158 – 161.
- Wu Jun , Shu Huai-rui , Zhang Kai-chun , Zhang Xiao-ming , Jiang Li-jie. 2009. Development and validation of SCAR markers linked to non-acid / acid fruit traits in peach. Acta Horticulturae Sinica , 37 (12): 1120 – 1126. (in Chinese)
- 吴俊 , 束怀瑞 , 张开春 , 张晓明 , 姜立杰. 2009. 桃果实非酸/酸性状 SCAR 标记的转化与验证. 园艺学报 , 36 (8): 1120 – 1126.
- Yang Ying-jun , Wang Yue-jin , Zhou Peng , Wang Xi-ping , Zhang Jian-xia. 2002. Restriction enzyme analysis and the sequence construction of the specific marker linked to seedless genes in grapes. Journal of Fruit Science , 19 (1): 12 – 14. (in Chinese)
- 杨英军 , 王跃进 , 周鹏 , 王西平 , 张剑侠. 2002. 葡萄无核基因的 SCAR 标记的序列构成和酶切分析. 果树学报 , 19 (1): 12 – 14.

- Zhang Yu-yan , Wu Jun , Heng Wei , Zhang Shao-ling. 2006. Identification of *S*-genotypes of pear cultivars and analysis of nucleotide sequences of *S*₂₈-RNase and *S*₃₀-RNase. *Acta Horticulturae Sinica* , 33 (3): 496 – 500. (in Chinese)
- 张妤艳 , 吴 俊 , 衡 伟 , 张绍铃. 2006. 京白梨等品种 *S* 基因型鉴定及新基因 *S*₂₈ 和 *S*₃₀ 的核苷酸序列分析. *园艺学报* , 33 (3): 496 – 500.