

利用 cDNA-AFLP 技术研究苹果柱型与非柱型 cDNA 的差异表达

朱元娣¹, 孙凌霄², 李春雨¹, 张文², 王涛^{2*}

(¹ 中国农业大学农学与生物技术学院果树系, 北京 100094; ² 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094)

摘要: 以苹果 (*Malus domestica* Borkh.) 柱型品种舞姿、非柱型品种富士及其杂交 F₁ 群体中柱型、非柱型单株为研究试材, 应用 cDNA-AFLP (cDNA-amplified fragment length polymorphism) 技术, 研究柱型与非柱型苹果 cDNA 的差异表达, 探讨了苹果柱型基因 *Co* 表达的分子机制。通过 64 对引物组合的 cDNA-AFLP 分析获得了 1 630 条在柱型与非柱型苹果中差异表达的片段。经过 BSA (bulk segregant analysis) 分析和反向 Northern 杂交鉴定, 获得了 11 个差异表达的 cDNA 片段, 并进行了克隆、测序和序列同源性检索分析。有 5 个片段在 GenBank 数据库中发现同源序列, 其余的 6 个功能未知。核酸和氨基酸比对分析中同源性最高的是片段 A7 和 A16。A7 的核苷酸序列同源于红叶石楠 *Photinia fraseri* 26S 核糖体 RNA (97%)、蛋白同源于玉米的细胞色素 P450 单加氧酶 (91%), A16 的核苷酸 (85%) 及蛋白 (93%) 同源于直果草属 *Triphysaria versicolor* 的 α -expansin 2 基因。对 A7、A16 两个候选基因片段再进行正向 Northern 杂交验证, 在富士中表达最强, 在非柱型后代、柱型后代及舞姿中表达依次减弱。由此推断, 由细胞色素 P450 单加氧酶基因所调控的赤霉素 GA₃ 变化影响了苹果柱型性状的表达。

关键词: 苹果; 柱型苹果; 柱型基因; 差异表达分析; cDNA-AFLP

中图分类号: S 661.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 02-0283-06

Differential Expression Analysis of cDNA Between Columnar and Non-columnar Apples Using cDNA-AFLP

ZHU Yuan-di¹, SUN Ling-xia¹, LI Chun-yu², ZHANG Wen², and WANG Tao^{2*}

(¹ College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China; ² State Key Laboratory for Agro-Biotechnology, Beijing 100094, China)

Abstract: In order to illustrate the molecular mechanism of *Co* gene, which controls columnar tree structure in apple (*Malus domestica* Borkh.), differential expression profile of cDNA among the columnar apple cultivar Waltz, the normal cultivar Fuji, and F₁ seedlings from the cross of Fuji \times Waltz was analyzed through cDNA-AFLP. Sixty-four pairs of primers were used for the cDNA-AFLP amplification. Totally 1 630 differentially expressed fragments between columnar and non-columnar apples were detected. Eleven differentially expressed fragments were confirmed by bulked segregant analysis (BSA) and reverse Northern blotting, further cloned and sequenced. Based on Database search, five cDNA fragments had high homologies to known genes, while the functions of other six were unknown. According to the alignment of BLASTn and BLASTx, one differentially expressed fragment, A7, was 97% identical in nucleotides to the 26S ribosomal RNA gene of *Photinia fraseri* and 91% in amino acids to cytochrome P450 monooxygenase in maize, respectively. Another differentially expressed fragment, A16, was 85% in nucleotides and 93% in amino acids identical to α -expansin 2 in *Triphysaria versicolor*. A16 and A7 as the candidate cDNA differential fragments, which may be related to

收稿日期: 2006 - 11 - 21; 修回日期: 2007 - 02 - 28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30671445)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: wangt@cau.edu.cn)

tree architectures, were further analyzed by Northern Blotting. The express levels of them were the highest in Fuji and reduced gradually in the order of the non-columnar gene pool, columnar gene pool and Waltz. The results implied that the change of GA_s modulated by the cytochrome P450 monooxygenase genes might influence the columnar growth habit.

Key words: Apple; Columnar apple; *Co* gene; Differential expression analysis; cDNA-AFLP

柱型苹果 (columnar apple) 是一类自然状态下树体呈柱状生长、独干、新梢节间极紧凑、萌芽率高而成枝力低的苹果品种, 包括威赛克 (McIntosh Wicik) 及以威赛克为亲本杂交所选育的芭蕾苹果 (舞姿、舞乐、舞佳、舞美) 的总称 (Tobutt, 1985; 李光晨和张勇, 1993; 戴洪义等, 2003), 是苹果密植栽培的理想树型。柱型苹果品种表现出高的内源 CTK 含量及低的赤霉素含量, 与柱型生长特性有关 (Looney et al., 1988; Kelsey & Brown, 1992)。经典遗传学试验以柱型苹果与普通型苹果为亲本进行杂交, 一些杂交组合的 F₁ 实生后代中柱型与非柱型单株近于 1:1 分离, 而其他组合则表现出偏分离特征, 由此确认柱型苹果极紧凑的生长特性是受单显性的 *Co* 基因控制, 一个或几个修饰基因共同作用 (Lapins, 1976; Looney & Lane, 1984; Meulenbroek et al., 1999)。分子遗传学研究表明, 柱型 *Co* 基因在苹果遗传连锁图谱的位点不同矮化 *Dw* 基因和控制顶端结果的 *Tb* 基因 (Conner et al., 1997), 但与多个影响树体生长发育的 QTL 基因紧密连锁在同一区域 (Kenis & Keulemans, 2004)。至今, 柱型基因如何调控柱型性状表达的分子机制尚不清晰。

cDNA-AFLP (cDNA-amplified fragment length polymorphism) (Bachem et al., 1996) 是研究基因差异表达更直接有效的方法, 保留了 AFLP 多态性丰富、稳定性高、无需了解序列信息等优点的同时, 集中显示基因组表达序列的多态性差异, 成为基因差异表达显示、表达基因遗传连锁作图和基于表型克隆基因的常用方法 (祝军等, 2000; Brugmans et al., 2002)。本研究利用 cDNA-AFLP 技术, 以柱型苹果品种舞姿 (*Coco*) 和普通型品种富士 (*coco*) 及其后代柱型、非柱型实生苗为材料, 研究两类树之间基因表达的差异, 从而初步探讨控制果树柱型生长发育的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

试材为柱型苹果品种舞姿 (突变型)、普通型品种 (野生型) 富士, 以及 ‘富士 × 舞姿’ 杂交后代的柱型与非柱型实生苗各 15 株。分别提取 RNA, 依据集团分离分析 (Bulked segregant analysis BSA) 方法, 分别将非柱型和柱型实生苗后代的 RNA 等浓度混合构成野生型基因池 P_w 和突变型基因池 P_m。限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶和 T₄ DNA 连接酶等购自 MB I 公司。

1.2 RNA 提取及 cDNA 合成

取 2 g 苹果幼嫩叶片, 在液氮中速冻并研磨成粉末, 悬于 4 mol/L 的异硫氰酸胍抽提液中, 再用酸性水饱和酚和氯仿抽提后, 用异丙醇沉淀总 RNA, 最后溶于经 DEPC 处理的水中, -70℃ 贮存待用。分别用甲醛变性胶检测 RNA 的质量, 用分光光度计检测 RNA 的质量和浓度。测定 RNA 样品的 OD_{260/280} 为 1.8~2.1。cDNA 的合成采用 CLONTECH 公司 Smart cDNA Library Construction 的方法进行。

1.3 cDNA-AFLP 分析

AFLP 分析采用 Bachem 等 (1998) 的方法稍作改动。所有材料均用等量的 cDNA 进行酶切、扩增 (预扩增和选择性扩增)、6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染法检测。所用的引物和接头如表 1 所示。

1.4 差异片段的二次扩增、纯化及反向 Northern 杂交

在染色的胶上找到 DNA 差异带, 在差异带上滴一滴无菌水, 使干胶润湿, 用锋利的刀片将差异带切下, 置于 50 μL 无菌水中, 室温放置过夜。取 5 μL 上清液做模板, 用相应的引物进行二次 PCR

扩增。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳，检查扩增情况。如果扩增产物中出现弥散带，将主带用小刀切下，采用 DNA 快速纯化试剂盒（Sangon 公司）进行纯化。差异条带再扩增产物在 1.4% 琼脂糖凝胶电泳，然后转于尼龙膜。探针标记按 Promega 公司的 Prime-a-Gene Labelling System Kit 说明，Northern 杂交方法参照萨姆布鲁克和拉塞尔（2002）的方法进行。

1.5 cDNA 差异片段的克隆、测序及同源性分析

将表现为阳性的片段与 pGEM-T（Promega）载体连接，并转化到大肠杆菌 DH5，筛选阳性克隆。然后利用 AB B77 自动测序仪进行测序，DNA 序列同源性分析是将所得序列提交 GenBank，利用 BLAST 进行序列分析。

1.6 候选片段的 Northern 杂交分析

以候选片段的 cDNA 为探针，分别与富士、舞姿、柱型基因池和非柱型基因池的总 RNA 进行 Northern 杂交。

表 1 用于 cDNA-AFLP 分析的接头与引物

Table 1 Adaptors and primers used for cDNA-AFLP analysis

引物 Primers	序列 Sequence
接头引物 Adaptors	<i>Mse</i> I 5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3'; 3'-TA CTC AGG ACT CAT-5 <i>Eco</i> R I 5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3'; 3'-CTG ACG CAT GGT TAA-5
预扩引物 Primers for the pre-PCR amplification	E0 5'-GAC TGC GTA CCA ATT C-3' M0 5'-GAT GAC TCC TGA GTA A-3'
选择性扩增引物 Primers for cDNA-AFLP amplification	E1 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAA T-3' M1 5'-GAT GAC TCC TGA GTA AG-3 E2 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CCT G-3' M2 5'-GAT GAC TCC TGA GTA AC-3 E3 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CGC C-3' M3 5'-GAT GAC TCC TGA GTA AC-3 E4 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CGT G-3' M4 5'-GAT GAC TCC TGA GTA AT-3 E5 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CCG A-3' M5 5'-GAT GAC TCC TGA GTA AA-3 E6 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CCA G-3' M6 5'-GAT GAC TCC TGA GTA AG-3 E7 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CCC A-3' M7 5'-GAT GAC TCC TGA GTA AT-3 E8 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAT C-3' M8 5'-GAT GAC TCC TGA GTA AA-3

2 结果与分析

2.1 柱型和普通型苹果叶片基因表达的 cDNA-AFLP 分析

利用改良的 RNA 提取方法，分别提取了柱型和非柱型苹果品种及其杂交实生后代的幼嫩叶片的 RNA。RNA 的完整性很好，25S RNA 的提取量约为 18S RNA 的 1.5~2 倍（图 1，左）。利用 Smart 系统合成出的 cDNA 是一个 300~3 000 bp 的弥散条带，在舞姿及柱型个体的基因池（Pm）中偶尔有几条亮带，代表个别基因在该样品中表达量较多（图 1，中）。通过对 cDNA 进行 AFLP 分析，预扩增片段主要分布在 100~500 bp（图 1，右）。

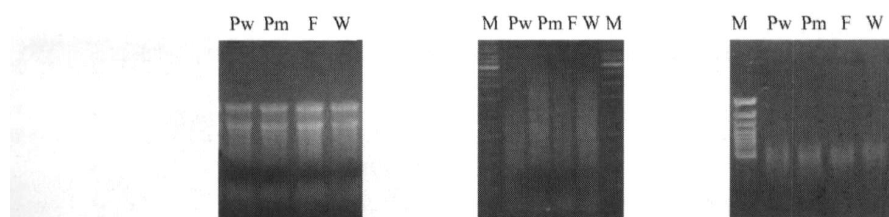


图 1 不同表型的树叶总 RNA（左）、ds-cDNA（中）和 cDNA-AFLP（右）预扩结果

Pw: F_1 代非柱型单株构成的基因池；Pm: F_1 代柱型单株构成的基因池；F: 富士；W: 舞姿。

Fig. 1 Total RNA (left), ds-cDNA (middle) and the preamplification result of cDNA-AFLP (right)

Pw: Standard F_1 seedlings; Pm: Columnar F_1 seedlings; F: Fuji; W: Waltz

以 64对选择性扩增引物组合,对 4种表现型的 cDNA 进行 AFLP分析,扩增片段大小主要集中在 100~500 bp 之间,而且表达模式和表达强度一致,表明 cDNA-AFLP 扩增的平行性好,试验结果有可比性(图 2)。对扩增较好的 40对引物进行预扩到选扩的重复,统计分析了 1 630条重复性好的扩增片段,获得 19条多态性片段同时在野生型及非柱型基因池表达,或同时在突变型及柱型基因池中表达。

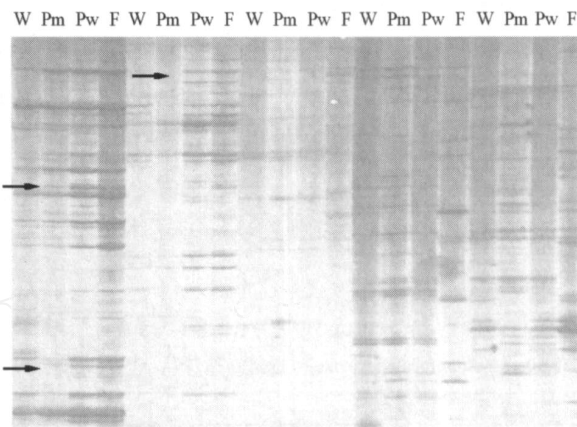


图 2 不同引物组合对舞姿 (W)、柱型池 (Pm)、非柱型池 (Pw) 和富士 (F) 的 cDNA-AFLP 分析
箭头表示多态性片段。

Fig 2 cDNA-AFLP expression analysis of Waltz (W), columnar gene pool (Pm), standard gene pool (Pw), and Fuji (F) using different primer combinations
Arrows showed the polymorphic bands

2.2 cDNA-AFLP 多态性片段的反向 Northern 杂交分析

对 cDNA-AFLP 分离出的 19 条差异片段进行二次扩增及纯化。扩增产物电泳转膜,分别以富士、舞姿的总 RNA 做探针标记进行 Northern 杂交分析(图 3):在舞姿和富士有差异表达的条带为 11 条,其中标号为 3、4、5、9、13 和 14 的片段在舞姿中特异表达;片段 1 在富士中特异表达;在富士表达强而舞姿表达弱的片段为 7 和 16;在舞姿表达强富士表达弱的为 6 和 19,其余片段在两个品种都表达。

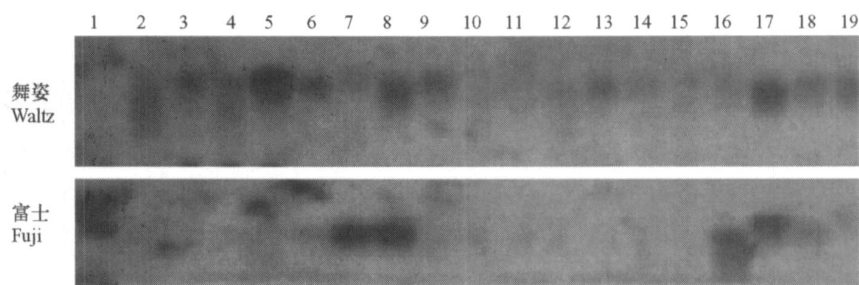


图 3 19 条 cDNA-AFLP 差异片段的反向 Northern 杂交分析

Fig 3 Reverse Northern blotting analysis of 19 polymorphic bands isolated from cDNA-AFLP amplification

2.3 cDNA 差异片段的克隆、测序及同源性分析

将反向 Northern 验证后的 11 条差异片段与 pGEM-T (Promega 载体) 连接、转化大肠杆菌 DH5, 进行蓝白斑筛选, 鉴定阳性克隆(图 4), 并测序。序列在 GenBank 中进行同源性序列比较。

在这 11 个差异片段中,有 5 个在 GenBank

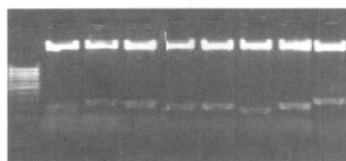


图 4 差异片段阳性克隆的酶切鉴定

Fig 4 Identification of positive clones of differentially expressed bands

数据库中发现同源序列 (表 2), 其余的片段 A1 (145 bp)、A4 (348 bp)、A5 (138 bp)、A6 (295 bp)、A9 (103 bp)、A19 (221 bp) 功能未知。在舞姿中特异表达的 A3和 A13分别与烟草 3-脱氧-磷酸合成酶及拟南芥中准小泡运输蛋白的核苷酸/氨基酸具有较高的同源性; A14则在核苷酸序列同源于豌豆叶绿体 P700脱辅基蛋白 *psaA1*和 *psaA2*基因, 推测的氨基酸序列同源于蓝藻类光合系统 I 的 PsaB 亚基。在富士中表达强而舞姿中表达弱的片段 A7和 A16在 GenBank 中检索到高度同源的序列, 如 A7的核苷酸序列同源于红叶石楠的 26S核糖体 RNA (97%), 蛋白同源于玉米中细胞色素 P450单加氧酶 (91%); A16的核苷酸及蛋白同源于直果草属的 *-expansin2* 基因。分析比较柱型及非柱型苹果的生长特点及内源激素的特性, A3、A13和 A14这 3个差异片段所推测的生理功能不能解释树型变异的可能机制, 而 A7和 A16更具有研究的价值, 因此将作为候选片段进行验证。

表 2 差异片段的同源性比对结果

Table 2 Homology analysis of the cDNA-AFLP fragments to sequences in the Databases

片段编号 Code	片段大小 Length (bp)	Blastn结果 Result of Blastn	Blastx结果 Result of Blastx
A7	249	红叶石楠 26S核糖体 RNA 基因 <i>Photinia fraseri</i> 26S ribosomal RNA gene; 155/159 = 97%	玉米细胞色素 P450 单加氧酶 Cytochrome P450 monooxygenase (<i>Zea mays</i>); 41/45 = 91%
A16	224	直果草属 <i>-expansin 2</i> 的 TvEXP2克隆 <i>Triphysaria versicolor</i> clone TvEXP2 <i>alpha-expansin 2</i> mRNA; 108/126 = 85%	直果草属 <i>-expansin 2</i> <i>alpha-expansin 2</i> (<i>Triphysaria versicolor</i>); 40/43 = 93%
A14	149	豌豆叶绿体 P700脱辅基蛋白 <i>psaA1</i> 和 <i>psaA2</i> <i>Pisum sativum</i> chloroplast <i>psaA1</i> and <i>psaA2</i> genes for P700 chlorophyll a-apoproteins; 100/110 = 90%	蓝藻类光合系统 I 反应中心的 <i>psaB</i> 亚基 <i>psaB</i> subunit of photosystem I reaction center (<i>Cyanophora paradoxa</i>); 37/40 = 92%
A13	229	烟草 3-脱氧-磷酸合成酶 <i>Nicotiana tabacum</i> 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase (DAHP); 128/148 = 86%	3-脱氧-磷酸合成酶 1 Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase 1, chloroplast precursor (DAHP synthetase 1); 55/63 = 87%
A3	284	拟南芥准小泡运输蛋白的 mRNA <i>Arabidopsis thaliana</i> putative vesicle transport protein mRNA; 65/77 = 84%	拟南芥准小泡运输蛋白 Putative vesicle transport protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>); 26/35 = 74%

2.4 候选片段 A7、A16正向 Northern 杂交分析

以 A7、A16这两个片段为探针分别对舞姿、富士、柱型基因池和非柱型基因池的 cDNA 进行正向 Northern 杂交。结果显示 A7和 A16在富士表达最强, 非柱型后代、柱型后代和舞姿中表达依次减弱 (图 5), 与反向 Northern 杂交结果一致。杂交后代中由柱型个体及非柱型个体所构建的基因池在杂交表达量上存在差异, 表明杂交后代受双亲遗传控制的差异。

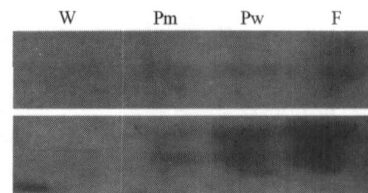


图 5 差异表达片段 A7 (上) 和 A16 (下) 的 Northern 杂交分析
W: 舞姿; Pm: 柱型基因池; Pw: 非柱型基因池; F: 富士。

Fig 5 Northern blotting analysis of A7 (upper) and A16 (lower) differentially expressed fragments

W: Waltz; Pm: Columnar gene pool; Pw: Standard gene pool; F: Fuji

3 讨论

本文通过 cDNA-AFLP技术分析柱型性状相关基因的差异表达, 获得了 5个有用的 cDNA 序列。A7片段的推定蛋白同源于玉米中细胞色素 P450单加氧酶, 在富士中表达最强、舞姿中最弱, 说明在舞姿中细胞色素 P450单加氧酶表达水平低, 而细胞色素 P450在植物体内作为赤霉素的合成过程中一个限速酶在内质网膜上催化内根-贝壳杉烯到 GA_{12} -醛的合成, 进而调控赤霉素的合成 (Olszewski et al., 2002)。如果某一细胞色素单加氧酶发生了突变或其合成受到抑制, 将导致赤霉素的含量降低。与直果草属的 *-expansin 2* (膨大素) 基因家族有 85%的同源性的 A16基因片段在富士中表达最

强, 非柱型后代、柱型后代和舞姿中依次减弱, 表明果树茎的伸长与某些 *expansin* 基因有关, 因为植物中 *-expansin* 可能的功能是控制细胞伸长、细胞壁解体、细胞分离 (Cosgrove, 2000)。在研究深水水稻中 *expansin* 基因表达时, 其表达水平与外源赤霉素的施加量成正比关系, 推测它可能受赤霉素的调控 (Cho & Kende, 1997)。

拟南芥的突变体 (*fca-1*) 在开花后植株对外源赤霉素非常敏感, *expansin* 表达水平比开花时高许多, 推测 *expansin* 上游受 GA 的调控 (Oka et al, 2001)。由于某一细胞色素 P450 单加氧酶的合成受到抑制, 导致赤霉素在第 2 个合成途径受到抑制, 赤霉素又可能调控 *expansin* 基因, 使柱型果树内 *expansin* 基因含量极少。由此推测, 细胞色素 P450 单加氧酶某一个基因在柱型果树内合成受到抑制或发生突变, 影响了苹果柱型基因 *Co* 的差异表达。进一步的研究在于获得 A7 和 A16 的全长序列, 并在普通型苹果中实行转化验证。同时, 深入研究与烟草 3-脱氧-磷酸合成酶、拟南芥中小泡运输蛋白 mRNA、和 P700 光系统 - 无辅基蛋白中的 *psaA1* 和 *psaA2* 基因同源性较高的其余 3 个在舞姿中特异表达片段, 增强柱型基因调控苹果树形的认识。

References

- Bachem C W B, Hoevan R S, Bruijn ZM, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser R G F, De Bruijn SM. 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant Journal*, 9: 745 - 753.
- Bachem C W B, Oomen R J F, Visser R G F. 1998. Transcript imaging with cDNA-AFLP: a step by step protocol. *Plant Molecular Biology Reporter*, 16: 157 - 173.
- Brugnans B, Fernandez del Carmen A, Bachem C W B, van Os H, Visser R G F. 2002. A novel method for the construction of genome wide transcriptome maps. *Plant Journal*, 31: 211 - 222.
- Conner P J, Brown S K, Weeden N F. 1997. Randomly amplified polymorphic DNA-based genetic linkage maps of three apple cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122: 350 - 355.
- Cho H T, Kende H. 1997. Expression of expansin genes is correlated with growth in deepwater rice. *The Plant Cell*, 9: 1661 - 1671.
- Cosgrove D J. 2000. New genes and new biological roles for expansins. *Current Opinion in Plant Biology*, 3: 73 - 78.
- Dai Hong-yi, Wang Cai-hong, Chi Bin, Zhu Jun, Wang Ran, Li Gui-xue, Zhuang Li-li. 2003. Report on breeding columnar apple varieties. *Journal of Fruit Science*, 20: 79 - 83. (in Chinese)
- 戴洪义, 王彩虹, 迟斌, 祝军, 王然, 李贵学, 庄丽丽. 2003. 柱型苹果品种选育研究. *果树学报*, 20: 79 - 83.
- Kelsey D F, Brown S K. 1992. 'McIntosh Wjick': a columnar mutation of McIntosh apple proving useful in physiology and breeding research. *Fruit Variety Journal*, 46: 83 - 87.
- Kenis K, Keulemans J. 2004. QTL analysis of growth characteristics in apple. *Acta Horticulturae*, 663: 369 - 374.
- Lapins K O. 1976. Inheritance of compact growth type in apple. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 101: 133 - 135.
- Li Guang-chen, Zhang Yong. 1993. *Ballerina apple*. Beijing: China Agricultural University Press: 1 - 15. (in Chinese)
- 李光晨, 张勇. 1993. 芭蕾苹果. 北京: 中国农业大学出版社: 1 - 15.
- Looney N E, Lane W D. 1984. Spur-type growth mutants of McIntosh apple: a review of their genetics, physiology and field performance. *Acta Horticulturae*, 146: 31 - 46.
- Looney N E, Taylor J S, Pharis R P. 1988. Relationship of endogenous gibberellin and cytokinin levels in shoot tips to apical form in four strains of McIntosh apple. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 113: 395 - 398.
- Meulenbroek B, Verhaegh J, Janse J. 1999. Inheritance studies with columnar type trees. *Acta Horticulture*, 484: 255 - 259.
- Oka M, Tasaka Y, Iwabuchi M, Mino M. 2001. Elevated sensitivity to gibberellin by vernalization in the vegetative rosette plants of *Eustoma grandiflorum* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 160: 1237 - 1245.
- Olzewski N, Sun T, Gubler F. 2002. Gibberellin signaling: Biosynthesis, catabolism, and response pathways. *The Plant Cell*, 5: 523 - 530.
- Sambrook J, Russell D W. 2002. *Molecular cloning: a laboratory manual* 2nd. Huang Pei-tang trans. Beijing: Science Press: 549 - 552. (in Chinese)
- 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔. 2002. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 黄培堂译. 北京: 科学出版社: 549 - 552.
- Tobutt K R. 1985. Breeding columnar apples at East Malling. *Acta Horticulturae*, 159: 63 - 68.
- Zhu Jun, Li Guang-chen, Wang Tao, Zhang Wen, Zhao Yu-jun. 2000. AFLP polymorphism between McIntosh and Wjick columnar apple. *Acta Horticulturae Sinica*, 27 (6): 447 - 448. (in Chinese)
- 祝军, 李光晨, 王涛, 张文, 赵玉军. 2000. 威赛克柱型苹果与旭的 AFLP 多态性研究. *园艺学报*, 27 (6): 447 - 448.