

单核苷酸多态性的发掘、鉴定及其在果树上应用的研究进展

魏召新^{1,2,3}, 张凌云^{1,2}, 曾 培^{1,2}, 李 翀^{1,2}, 钟广炎²

(1 西南大学园艺园林学院, 重庆, 400715; 2 中国农业科学院柑桔研究所; 3 重庆市农业科学院果树研究所)

摘 要: 单核苷酸多态性(SNP)作为第三代遗传标记,已在主要模式植物和作物中大规模开发研究。在果树中,SNP研究起步相对较晚,但进展不小。对以果树为主的SNP鉴定、开发状况,SNP在遗传多样性分析、系统进化分析、分子标记与遗传作图、基因定位及功能研究中的最新进展进行了综述。展望了SNP研究在果树上的利用前景。

关键词: 单核苷酸多态性;分子标记;果树;遗传育种

中图分类号: Q 503; S 660.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1007-1431(2010)03-0086-05

单核苷酸多态性(SNP)是指生物基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的DNA序列多态性。由于每一个碱基位点在理论上可能是腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和胸腺嘧啶等4种碱基之一,因此,N个位点理论上就存在 4^N 种组合。虽然在自然进化过程中碱基突变总是以一定的频率在发生,但并不是完全随机的,已有研究指出,SNP大部分是两等位性的^[1-2],所以实际存在的SNP组合要小于理论值。即使这样,SNP也是目前所有分子标记中多样性最丰富的标记。除此之外,SNP还具有稳定性好、适合规模化分析、易于理解等优点,是继以RFLP(限制片段长度多态性)、SSR(简单序列重复标记)为代表的、二代分子标记之后的最新一代分子标记。利用SNP分子标记,可以进行遗传多样性评价,分析群体的分类进化关系,鉴定遗传性状的控制基因,进行基因功能研究,进行遗传作图及整合各种遗传图谱,进行分子标记辅助育种研究,故SNP有着广泛的应用前景。目前,在所有生物中,对人类SNP研究最为深入,已发现300多万个SNP位点^[3],这些标记在人类遗传疾病^[4-5]的鉴定及发病机理研究、个体鉴别等方面已有日益广泛的应用。SNP在主要果树树种上的研究也取得了不少进展,本文以果树为主就SNP的发掘、鉴定及其在遗传育种中的应用研究进展进行综述。

1 SNP的获得

对于已知基因组序列或表达序列标签(EST)数据较丰富的物种,通过比较基因组学获得SNP,这是目前最常见的方法。在植物中,继模式植物拟南芥^[6]基因组测序完成后,水稻^[7]、白杨^[8]、葡萄^[9]、番木瓜^[10]、高粱^[11]、黄瓜^[12]、玉米^[13]和大豆^[14]的基因组测序也已相继完成。利用这些基因组序列,加上基因组数据库(如: <http://harvest.ucr.edu/>; <http://cgf.ucdavis.edu>; <http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cgpdB/>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>等)中海量的EST、互补DNA(cDNA)序列等,通过同物种间序列比对,就可得到丰富的多态性位点。Velasco^[15]通过这种方法研究发现葡萄的基因组有86%位于19个连锁群上,其中含有96.1%的基因,在这些基因上有175万余个SNP。Newcomb等^[16]对苹果15 1487条EST序列进行比对,获得了18 408个SNP。

对于未知基因组序列以及EST序列不敷应用的物种,可以通过设计引物,扩增不同个体之间的同源DNA序列,克隆、测序后进行比对来得到SNP,也可以通过细菌人工染色体(BAC)末端测序得到SNP。Terol等^[17]对克里迈丁桔*C. reticulata* Blanco的28 000个BAC克隆进行了末端测序,经序列比对分析得到了3 800个SSR和6 617个SNP。

收稿日期: 2010-03-16; 修回日期: 2010-04-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(30971992)资助。

作者简介: 魏召新,男,在读硕士研究生。电话: 13883545509, E-mail: weizhaoxin@qq.com

通信作者: 钟广炎。电话: (023) 68349606, E-mail: gy_zhong@163.com

2 SNP的鉴定

2.1 以核酸分子杂交为基础的SNP鉴定 分子杂交鉴定的基本原理是设计合成特异性探针,在适当的条件下,探针和目标核酸分子上的碱基完全互补时会形成稳定结合的杂交分子,不能完全互补的则结合不稳定或在给定条件下不能杂交结合。基于此原理,目前已设计出一些可以通过发光、荧光共振、质谱等检测SNP的技术,如等位基因特异寡核苷酸法(ASO)、分子信标(Molecular beacons)、Taqman探针法、动态等位基因特异杂交(DASH)、寡核苷酸连接分析(OLA)以及SNPlex等方法。Lijavetzky^[18]把SNPlex基因分型技术和测序相结合对葡萄基因组中一段100.5 kb的序列进行分析,得到了1 573个SNP和52个插入/缺失(Indel),并利用这些SNP进行品种鉴定。

基因芯片在高通量SNP研究中应用最多。它是根据已知SNP设计出系列检测探针,利用杂交分子之间的洗脱差异性来检测SNP是否存在,检测范围可以覆盖全基因组。目前,基因芯片已广泛应用于人类SNP研究^[19]。由于基因芯片价格昂贵,且不适用于对大量样本的SNP分析,所以在果树上应用较少,不过也有公司致力于开发果树的SNP芯片,比如Affymetrix公司在2006年成功开发出了含有检测5 023个SNP位点的柑桔基因芯片。基因芯片虽可用于其近缘品种的SNP鉴定上,但不能鉴定待检样品中未知SNP,且错误率较高,约为20%^[20]。

2.2 通过测序进行SNP鉴定 传统Sanger DNA测序是目前应用最普遍、结果最可靠的SNP鉴定方法,其测序准确度可达99.99%^[21],但存在成本高、速度慢等问题。进入21世纪后,新一代测序技术如Roche公司的454技术、Illumina公司的Solexa技术和ABI公司的SOLiD技术发展迅速,利用这些技术,可以以更低的成本、更短的时间获得较多的SNP位点^[22]。但这一代测序技术的主要问题是测序结果准确率不够高。Myles等^[23]用Illumina测序技术获得了葡萄的469 470个SNP位点。Barbazuk等^[24]用454测序技术一次性得到了玉米的7 000多个SNP,对2 400条基因中的4 900个SNP用Sanger测序证实其成功率大于85%,这与Novaes等^[25]在校树上用454测序技术得到的结果相近。Mokry^[26]用改良的SOLiD技术对已知序列的1.69兆基因组序列进行测序,得到SNP的准确率为

96.4%。

随着测序技术理论的提高和方法的改进,近期出现了Heliscope单分子测序、SMRT(Single molecule real time)技术和Oxford Nanopore Technologies公司正在研究的纳米孔单分子技术等第三代测序技术^[27]。由于是单分子测序,故准确度更高,且周期更短,可望为SNP的发掘鉴定提供更有效的方法,但目前技术还不成熟,尚未商业化。

2.3 基于核酸分子物理稳定性的SNP鉴定 单链核酸分子在一定条件下,可以在分子内形成碱基配对。存在SNP时,分子内的碱基配对会发生改变,导致单链分子的空间构像发生改变,即所谓的单链构像多态性(SSCP)。这样的分子在电泳时会以不同的速度通过凝胶,从而将SNP显示出来。Salmasso等^[28]利用SSCP鉴定葡萄的SNP,测序验证得到247个SNP,认为该方法是有效的。

含SNP的杂合分子与纯合分子在解链温度上不一样,前者要低一些。在变性梯度凝胶电泳和温度梯度凝胶电泳中,这种解链速度和温度的差别以迁移率的大小表现出来,据此可以鉴别出SNP。HRM(高分辨融解曲线)技术是利用杂合分子和纯合分子在温度渐进升高条件下解链速度的差异,结合荧光染料来鉴定SNP的存在,这种方法准确率高,可达100%^[29]。Wu^[30]利用这种方法,得到了杏的100个SNP,并认为这种方法廉价高效,适于SNP鉴定。

但是这些方法不能准确确定SNP所在的位置和碱基类型,因此,要得到准确的SNP信息还需要进一步测序验证。

2.4 基于酶切的SNP鉴定 限制性内切酶是一类可识别并切割双链DNA中特定位点(通常4~6 bp)的酶类。SNP的存在可以在DNA上产生或消除一个特定内切酶位点,从而改变酶切割后产生的DNA片段的大小和数目,以此来鉴定SNP的存在。基于酶切原理的SNP检测技术有CAPS(酶切扩增多态性序列)^[31]、dCAPS(衍生型CAPS)^[32]和引物入侵分析^[33]等技术。CAPS是利用PCR产物中自然存在的酶切位点酶切后电泳检测多态性,而dCAPS在CAPS技术的基础上,在引物上人工引入错配、创造酶切位点,来进行多态性鉴定。引物入侵分析技术是在目标碱基两端分别设计两种探针,信号探针的5'端和插入探针的3'端在多态性位点处产生至少一个碱基的重叠,这种结构能被特异性的

外切酶 FEN 识别,从而切割信号探针含荧光标记基团的 5' 端,使其共存的淬灭基团分离,发出荧光信号,而当此位点出现错配将使 FEN 的切割速率大大降低,只能达到正确配对时的 1/300,进而实现对 SNP 的检出。

3 SNP 的应用

3.1 遗传多样性分析 SNP 能够广泛用于遗传多样性研究,这对于资源保存、种质利用有重要意义。Tanya 等^[34]对 20 对 SSR 引物和 4 对 SNP 引物的产物进行分析,发现尽管 20 对 SSR 引物的 PCR 产物多态性较高,但二者的聚类分析结果相近,说明 SNP 很适合用于多样性分析。在果树上,目前 SNP 研究大多集中于特异基因或部分基因组片段,从整个基因组水平上研究相对较少。Salmaso 等^[28]利用 SNP 对葡萄已知功能的 4 个基因进行研究,结果表明 SNP 同样适合对葡萄进行多样性评价。

需要注意的是,应用 SNP 分析群体遗传时,要得到较为准确的结果必须要分析数量足够多样本的 SNP 才行,否则容易导致出现误差^[35]。在高变个体和低变个体间比较时,个别碱基差异对于高变个体的统计结果影响极小,而对于低变个体的统计结果却可能有很大的影响^[36]。

3.2 系统进化分析 尽管目前多种分子标记都可以用来构建系统进化树,但单核苷酸的变异是一切 DNA 变异的基础,故利用 SNP 分析系统进化在理论上是可行的。VvmybA1 基因是花青素合成过程中的转录调节因子,This^[37]在 200 多个葡萄品种中对该基因及等位基因的变异情况进行研究,认为葡萄的果实颜色进化与该基因在驯化过程中的人工选择有关。Ince^[38]在包括苹果属在内的 142 种植物中研究了叶绿体 *matK* 基因,结果发现 SNP 能够成功地区分不同的科、属、种,且可靠性高达 80% ~ 100%。

SNP 在物种之间有很大的差异,葡萄的发生频率较高,在编码区每 250 bp 就有一个 SNP,在非编码区每 182 bp 有一个 SNP^[15],远高于苹果^[16]的 SNP 发生频率。在葡萄栽培种和野生种之间共有的 SNP 不足三分之一^[23],说明栽培葡萄驯化后在人工选择压力下,其进化过程已与野生种迥然不同。K lheim 等^[39]对校树的 4 个品种测序后得到 103 M bp 的序列,对其中 23 个次生代谢基因进行研究后发现品种间的 SNP 发生频率不同,但相近品种间同义和非同义 SNP 发生频率相似。在基因的蛋

白质编码区,对功能有害的变异很可能在自然选择中消失,表现为突变发生的频率比较低,每代为 10^{-9} / bp;而在基因间隔区,变异率显然较高,达到了 $10^{-4} \sim 10^{-8}$ / bp^[40]。利用突变率的分子钟特性可以推断品种分化的时间,Pavy^[41]根据 SNP 芯片对白云杉和黑云杉的研究结果,结合 AFLP、SSR 等分子标记分析,推测出这两个种在 1 000 万年前开始分化。

3.3 分子标记与遗传作图 SNP 反映的是相应染色体基因座上的遗传多态性状态,且分布广泛、高度稳定。利用已知功能的 SNP 作为分子标记,不仅有一般分子标记的优点,而且可以定位目标性状。相比之下,AFLP 是显性标记,不能区分杂合体和纯合体,并且在作连锁分析和遗传连锁图构建时,其缺点是相当数量的标记在统计学上严紧度较高的条件下不表现出与其他标记的连锁,降低严紧度后则表现出连锁较松散而使整个连锁图的长度显著增加^[42]。而 SNP 是共显性标记,发生密度高,且能在全基因组水平上进行大规模高通量分析,因而更适用于高密度遗传图谱和物理图谱的绘制以及 QTL 作图,事实上,它也是连锁不平衡研究中最好的遗传标记。

SNP 标记可以整合进其他 DNA 分子标记图谱。Troggio^[43]对葡萄的 94 个 F₁ 代做了研究,利用 483 个 SNP、132 个 SSR 和 379 个 AFLP 标记构建了分子标记图谱,覆盖基因组总长度 1 245 cM,标记间平均距离为 1.3 cM。

3.4 基因定位和功能分析 在利用连锁分析进行基因定位时,SNP 也是非常有用的标记。Salmaso 等^[44]把 138 个 SNP 和 108 个 SSR 标记进行了整合,分析了葡萄的 139 个表达基因,并探讨了对已知功能基因进行 QTL 分析的可能。Ahmad 等^[45]利用 454 测序技术对桃进行测序,得到 1156 个 SNP 标记位点,并对这些 SNP 与桃品质性状进行了 QTL 分析,可望用于辅助育种。David^[46]对苹果的 35 万条 EST 序列进行比对得到了 71 482 个 SNP,经过筛选后在编码区得到了含 210 个 SNP 的 93 个标记位点,这些位于编码区的位点可能与苹果重要的园艺学性状相关,因此可用于遗传图谱构建和连锁不平衡研究,也可用于蔷薇科群体遗传学分析。

在功能基因中,少数、甚至一个 SNP,都有可能引起某个性状的改变。Hoffmann^[47]研究发现葡萄果穗的松紧程度与一个 SNP 位点和 4 个碱基的缺失有关。This^[37]在 123 个葡萄品种中研究发现 *VvmybA1* 基因启动子上一段长 44 bp 的 Indel 和第

一个外显子上的两个 SNP 与红色和粉红色果实性状相关。番木瓜的一种严重病害是环斑病,但番木瓜的近缘野生种对此病的抗性很强,研究发现原因在于抗性基因上一个 SNP 位点的区别,这个位点有可能成为番木瓜抗病育种的一个重要标记^[48]。

4 SNP 在果树上的研究利用前景

SNP 作为基因组中最普遍的现象,在果树遗传研究中具有重要的利用价值,获得了越来越多的关注,取得了可喜的进展。目前大多数果树树种尚未进行完整基因组测序,无法大规模开发 SNP,相信随着测序技术的改进和更多树种全基因组的测序完成,以及 EST 的大量积累,果树 SNP 的开发与鉴定数量有爆炸式增长的可能。

SNP 鉴定方面,基因芯片的优势是适于小样本高通量 SNP 检测,随着技术的成熟和成本的降低,基因芯片的价格有朝一日可能降到可被普遍接受的水平,这样作为高通量的鉴定方法,获得单个位点 SNP 的成本会大幅降低,届时有可能成为 SNP 高通量分析的主要手段。HRM 技术适应检测样品量可多可少,操作方便、灵敏度高、成本低,近年来的应用日益增多^[29],主要问题是对硬件要求较高,检测仪器价格昂贵,但随着仪器的价格下降和普及,HRM 有望成为 SNP 分析的重要方法。

在应用方面,SNP 标记可能将会成为果树种质资源的遗传多样性评价、进化、分类、品种鉴定等研究中主要的分子标记,对提高种质资源收集、保存、评价和利用的效率具有很大的意义。在分子遗传学上,SNP 标记将在构建高密度遗传图谱、基因定位和克隆以及基因功能分析方面起重要作用,在对高产、优质、抗病虫、抗逆性等果树遗传工程育种和常规育种所需优异基因资源的发掘、鉴定方面作用重大。在果树常规育种中,利用 SNP 进行分子标记辅助选择,有望克服果树育种中长期困扰果树育种工作者的一些问题。比如:利用 SNP 进行目的基因的早期选择以克服果树童期长带来的高成本问题,利用 SNP 早期鉴定部分树种如柑桔的杂合子和珠心苗以解决杂种难获得的问题。可以预见,SNP 标记必将在果树遗传育种研究中发挥更大的作用。

参 考 文 献

- [1] Mullikin J C, Hunt S E, Cole C G, et al. An SNP map of human chromosome 22 [J]. *Nature*, 2000, 407: 516-520
- [2] Tony Frudakis, Venkateswarlu K, et al. A Classifier for the SNP-based Inference of Ancestry [J]. *J Forensic Sci*, 2003, 48(4): 771-782
- [3] International HapMap Consortium. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs [J]. *Nature*, 2007, 449: 851-861
- [4] Downey P M, Petr R, Simon J S, et al. Identification of single nucleotide polymorphisms of the human metabotropic glutamate receptor 1 gene and pharmacological characterization of a P993S variant [J]. *Biochem Pharmacol*, 2009, 77(7): 1246-1253
- [5] Craig Wong, Peter Kanetsky, Dominic Raj. Genetic polymorphisms of the RAS cytokine pathway and chronic kidney disease [J]. *Pediatric Nephrology*, 2008, 23(7): 1037-1051
- [6] Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nature*, 2000, 408: 796-815
- [7] International Rice Genome Sequencing Project. The map-based sequence of the rice genome [J]. *Nature*, 2005, 436: 793-800
- [8] Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, et al. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray) [J]. *Science*, 2006, 313: 1596-1604
- [9] Jaillon O, Aury J M, Noel B, et al. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla [J]. *Nature*, 2007, 449: 463-467
- [10] Ming Ray, Hou Shaobin, Feng Yun, et al. The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus) [J]. *Nature*, 2008, 452: 991-996
- [11] Andrew H Paterson, John E Bowers, Romy Bruggmann, et al. The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses [J]. *Nature*, 2009, 457: 551-556
- [12] Huang Sanwen, Li Ruiqiang, Zhang Zhonghua, et al. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. [J]. *Nature Genetics*, 2009, 41: 1275-1281
- [13] Catherine Feuillet, Kellye Eversole. Solving the Maze [J]. *Science*, 2009, 326: 1071-1072
- [14] Schmutz J, Cannon S B, Schlueter J, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean [J]. *Nature*, 2010, 463: 178-183
- [15] Riccardo Velasco, Andrey Zharkikh, Michela Trogno, et al. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety [J/OL]. *PLoS ONE*, 2007, 2(12): e1326. <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0001326>
- [16] Newcomb R D, Crowhurst R N, Gleave A P, et al. Analysis of expressed sequence tags from apple [J]. *Plant Physiol*, 2006, 141: 147-166
- [17] Terol J, Naranjo M, Ollitrault P, et al. Development of genomic resources for *Citrus clementina*: Characterization of three deep-coverage BAC libraries and analysis of 46,000 BAC end sequences [J/OL]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 423. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/9/423>
- [18] Lijavetzky D, Cabezas J A, Ibáñez A, et al. High throughput SNP discovery and genotyping in grapevine (*Vitis vinifera* L.) by combining a resequencing

- cing approach and SNPlex technology[J/OL]. BMC Genomics, 2007, 8: 424. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/8/424>
- [19] Stuart Magregor, Zhen Zhen Zhao, Anjali Henders, et al. Highly cost-efficient genome wide association studies using DNA pools and dense SNP arrays[J/OL]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(6): e35. <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/short/36/6/e35>
 - [20] Gore M, Bradbury P, Hogers R, et al. Evaluation of target preparation methods for single feature polymorphism detection in large complex plant genomes[J]. Crop Sci, 2007, 47: 135-148
 - [21] Jay Shendure, Hanlee Ji. Next-generation DNA sequencing[J]. Nature Biotechnology, 2008, 26(10): 1135-1145
 - [22] Mardis E R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics[J]. Trends Genet, 2007, 24: 133-141
 - [23] Myles S, Chia J-M, Hurwitz B, et al. Rapid Genomic Characterization of the Genus *Vitis*[J/OL]. PLoS ONE, 2010, 5(1): e8219. <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0008219>
 - [24] Barbazuk W B, Emrich S J, Chen H D, et al. SNP discovery via 454 transcriptome sequencing[J]. Plant Journal, 2007, 51: 910-918
 - [25] Novaes E, Drost D R, Farmerie W G, et al. High-throughput gene and SNP discovery in *Eucalyptus grandis*, an uncharacterized genome[J]. BMC Genomics, 2008, 9: 312
 - [26] Mokry M, Feitsma H, Nijman I J, et al. Accurate SNP and mutation detection by targeted custom microarray-based genomic enrichment of short-fragment sequencing libraries[J]. Nucleic Acids Research, 2010, 10: 1-9
 - [27] Nicole Rusk. Cheap third-generation sequencing[J]. Nature Methods, 2009, 6(4): 244-255
 - [28] Salmaso M, Faes G, Segala C, et al. Genome diversity and gene haplotypes in the grapevine (*Vitis vinifera* L.), as revealed by single nucleotide polymorphisms[J]. Molecular Breeding, 2004, 14(4): 385-395
 - [29] Taylor C F. Mutation scanning using high-resolution melting[J]. Biochem Soc Trans, 2009, 37: 433-437.
 - [30] Wu S B, Wirthensohn M G, Hunt P, et al. High resolution melting analysis of almond SNPs derived from ESTs[J]. Theor Appl Genet, 2008, 118(1): 1-14
 - [31] Konieczny A, Ausubel F M. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers[J]. Plant J, 1993, 4(2): 403-410
 - [32] Neff M M, Neff J D, Chory J, et al. dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in Arabidopsis thaliana genetics[J]. Plant J, 1998, 14(3): 387-392
 - [33] Lyamichev V, Mast A L, Hall J G, et al. Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes[J]. Nature Biotechnology, 1999, 17: 292-296
 - [34] P Tanya, P Srinives, T Toojinda, et al. Evaluation of genetic diversity among soybean genotypes using SSR and SNP[J]. Korean J Crop Sci, 2001, 46(4): 334-340
 - [35] Morin P A, Luikart G, Wayne R K, et al. SNPs in ecology, evolution and conservation[J]. Trends in Ecology and Evolution, 2004, 19(4): 208-216
 - [36] Schlotterer C, Harr B. Single nucleotide polymorphisms derived from ancestral populations show no evidence for biased diversity estimates in *Drosophila melanogaster*[J]. Molecular ecology, 2002, 11(5): 947-950
 - [37] This P, Lacombe T, Cadle-Davidson M, et al. Wine grape (*Vitis vinifera* L.) color associates with allelic variation in the domestication gene VvmybA1[J]. Theor Appl Genet, 2007, 114(4): 723-730
 - [38] Ayşe G LİNCE, Mehmet KARACA, A Naci ONUS. Chloroplast *matK* gene phylogeny of some important species of plants[J]. AKDENİZ İNİVERSİTESİ ZİRAAT FAK LTESİ DERGİSİ, 2005, 18(2): 157-162
 - [39] K lheim C, Yeoh S H, Maintz J, et al. Comparative SNP diversity among four Eucalyptus species for genes from secondary metabolite biosynthetic pathways[J]. BMC Genomics, 2009, 10: 452
 - [40] Rafalski A, Tingey S. Recent Insights Into the Evolution of Genetic Diversity of Maize[J]. Plant Genomes, 2008, 4: 119-130
 - [41] Pavy N, Pelgas B, Beauseigle S, et al. Enhancing genetic mapping of complex genomes through the design of highly-multiplexed SNP arrays: application to the large and unsequenced genomes of white spruce and black spruce[J]. BMC Genomics, 2008, 9: 21
 - [42] 熊立仲, 王石平, 刘克德, 等. 微卫星 DNA 和 AFLP 标记在水稻分子标记连锁图上的分布[J]. 植物学报, 1998, 40(7): 605-614
 - [43] Troggio M, Malacarne G, Giuseppina Coppola, et al. A dense SNP-based genetic linkage map of grapevine (*Vitis vinifera* L.) anchoring Pinot Noir BAC contigs[J]. Genetics, 2007, 176: 2637-2650
 - [44] Marzia Salmaso, Giulia Malacarne, Troggio M, et al. A grapevine (*Vitis vinifera* L.) genetic map integrating the position of 139 expressed genes[J]. Theor Appl Genet, 2008, 116: 1129-1143
 - [45] Riaz Ahmad, Thomas M Gradziel, Dan E Parfitt, et al. SNP And QTL discovery of peach fruit quality genes[EB/OL]. http://www.intl-pag.org/18/abstracts/P05h_PAGXVIII_481.html
 - [46] Chagn D, Gasic K, Crowhurst R N, et al. Development of a set of SNP markers present in expressed genes of the apple[J]. Genomics, 2008, 92(5): 353-358
 - [47] Hoffmann P, Vaclavicek A, Blaiç R, et al. A SNP Marker Can Differentiate Loose Clustered Clones of 'Pinot Noir' [J]. Acta Hort. (ISHS), 2009, 827: 471-474
 - [48] Dillon S, Ramage C, O'Brien M, et al. Application of scar markers linked to a putative PRSV-P resistance locus for assisted breeding of resistant *C. papaya* cultivars[J]. Acta Hort (ISHS), 2006, 725: 627-634

(责任编辑:李治飞)