DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.00432

以 SSR 标记对普通菜豆抗炭疽病基因定位

王 坤 王晓鸣 朱振东 赵晓彦 张晓艳 王述民*

中国农业科学院作物科学研究所 / 国家农作物基因资源与遗传改良重大科学工程, 北京 100081

摘 要: 由菜豆炭疽菌引起的菜豆炭疽病是危害我国菜豆生产的主要病害之一, 鉴定和发掘新的抗病基因对于菜豆抗病育种具有十分重要的意义。以来自安第斯基因库的我国菜豆抗炭疽病地方品种红花芸豆与感病地方品种京豆杂交的 F_2 群体为试验材料, 通过人工接种菜豆炭疽菌 81 号小种进行抗病性鉴定, 发现该分离群体中抗病植株数与感病植株数符合 3:1 的分离比例, 确定红花芸豆对菜豆炭疽菌 81 号小种的抗性由显性单基因控制, 将此基因命名为 *Co-F2533*。用分离群体分组分析法(BSA)和微卫星多态性分析(SSR)技术对红花芸豆中的抗炭疽病基因进行分子标记鉴定, 用 Mapmaker3.0 计算标记与目的基因间的遗传距离, 发现 B6 连锁群上的 4 个 SSR 标记 BM170、Clon1429、BMD37、Clon410 与抗炭疽病基因 *Co-F2533* 连锁, 遗传距离分别为 6.6、18.4、20.9 和 30.9 cM, 这些 SSR 标记与 *Co-F2533* 基因在 B6 连锁群上的排列顺序为 Clon1429–*Co-F2533*–BM170–BMD37–Clon410。根据基因所在连锁群的位置、抗病基因的基因库来源可知 *Co-F2533* 是一个新的来源于安第斯基因库的抗炭疽病基因。

关键词: 普通菜豆; 菜豆炭疽病; 抗病基因; SSR 标记

Mapping of a Novel Anthracnose Resistance Gene Using SSR Markers in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.)

WANG Kun, WANG Xiao-Ming, ZHU Zhen-Dong, ZHAO Xiao-Yan, ZHANG Xiao-Yan, and WANG Shu-Min*

Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences / National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Beijing 100081, China

Abstract: Anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) is one of the most important diseases of common bean throughout the world. Resistant cultivars utilization is the most economic, effective and environment harmless method to control this disease. However, disease resistance in the host is unsustainable due to the high variability of anthracnose. Therefore it is necessary to explore the new resistance genes persistently. Among the 11 reported resistant loci, 10 of them originated from Mesoamerican gene pool and only one locus named *Co-1* from Andean gene pool. The objective of this study was to identify the new Andean gene resistant to anthracnose in the Chinese common bean landraces. A total of 108 F_2 plants derived from a cross between common bean Red flower (R) and common bean Jing (S) were inoculated with anthracnose race 81. The resistant individuals grew well without obvious disease symptoms but the susceptible plants have many disease spots on the leaves and stems, and then died gradually. The segregation ratio of resistant to susceptible plants in F_2 population was 3:1 based on chi-square test, indicating that the resistance of Red Flower common bean to anthracnose race 81 was controlled by a single dominant gene, named as *Co-F2533* temporarily. Four SSR markers were detected on B6 linkage group of common bean that linked to the resistance gene *Co-F2533* with the distance of 6.6, 18.4, 20.9, and 30.9 cM respectively. The position of the resistance gene and the markers on the chromosome were as follows: Clon1429, *Co-F2533*, BM170, BMD37, and Clon410. A linkage map was constructed with Mapdraw V2.1. Since the absent of anthracnose resistance genes on B6 linkage group, it is proposed that *Co-F2533* is a novel anthracnose resistance gene in Chinese resistant landrace Red Flower from Andean gene pool, which will be useful in the anthracnose resistance breeding for common bean.

Keywords: Common bean; Anthracnose; Resistant gene; SSR marker

普通菜豆(*Phaseolus vulgaris* L.)是世界上栽培面积最大的食用豆类, 占食用豆类种植总面积的

38.3%^[1]。它是十分重要的植物蛋白质来源, 为贫困地区营养缺乏和人类繁衍生存发挥了巨大作用, 在

本研究由国家科技支撑计划项目(2006BAD13B05)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 王述民, E-mail: smwang@mail.caas.net.cn

第一作者联系方式: E-mail: wk746@126.com

Received(收稿日期): 2008-08-29; Accepted(接受日期): 2008-12-07.

欧美国家是调节膳食结构的良好食品,同时也是我国出口创汇的主要农产品之一^[2]。菜豆炭疽菌可侵染菜豆的幼苗、茎秆和豆荚,严重影响菜豆的产量和品质,是危害世界菜豆生产的主要病害之一,在冷凉潮湿的条件下病害发生重,损失高达 30%~90%,甚至绝产^[3]。中国是世界上重要的菜豆生产国之一,生产中的病害问题十分严重,其中炭疽病的发生非常普遍,常发地区包括北京、天津、河北、内蒙古、黑龙江、吉林、云南等,局部地区发生严重^[4]。

目前已知位于 10 个位点的 18 个菜豆抗炭疽病基因,分别为 *Co-1*~*Co-11*,其中多个位点具有等位基因。*Co-1* 位点起源于安第斯基因库,其余起源于中美基因库。除 *Co-7*、*Co-8* 和 *Co-11* 尚未定位外,其余的基因分别被定位在菜豆 B1、B4、B7、B8 和 B11 连锁群上^[5]。

利用抗病品种是防治菜豆炭疽病最经济、有效、环保的措施,但由于菜豆炭疽菌的高度变异性,抗病品种的抗性很容易丧失,研究表明,如果将中美和安第斯两个基因库的抗病基因聚合在一个品种中,可大大提高品种的抗病能力及持久性^[5-7],而目前已知的来源于安第斯基因库的菜豆抗炭疽病基因很少^[8],因此发掘新的安第斯基因库的抗病基因,对抗病基因累加具有极其重要的意义。本研究试图从我国抗炭疽病地方品种中发掘新的来源于安第斯基因库的抗炭疽病基因,并研究与之连锁的分子标记,为我国的抗病育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以普通菜豆抗炭疽病地方品种红花芸豆为母本,感病品种京豆为父本配制杂交组合,获得 F_2 代分离单株 108 株;中国菜豆炭疽菌优势小种 81 号小种,由中国农业科学院作物科学研究所病虫害检验检疫基地保存;216 对 SSR 引物,包括分布于普通菜豆全基因组、已知序列的 201 对,由上海生工合成,序列见 <http://www.css.msu.edu/bic/PDF/Bean%20SSR%20Primers.pdf>,未知序列的位于菜豆 B6 连锁群上的 15 对,由国际热带农业研究中心(CIAT) Matthew Blair 博士提供干粉。

1.2 炭疽菌的培养

在 MA 培养基上于 23℃ 黑暗条件下培养菜豆炭疽菌 15 d,用无菌水冲洗菌落中产生的分生孢子并配置浓度为每毫升 2×10^6 孢子的悬浮液。MA 培养基

含:葡萄糖 2.8 g、硫酸镁 1.23 g、磷酸二氢钾 2.72 g、蛋白胨 1.00 g、琼脂 20.00 g,菜豆叶片汁液少量,pH 7.0。

1.3 炭疽病抗性鉴定

用菜豆炭疽菌 81 号小种接种亲本及 108 个 F_2 代单株。抗感亲本每盆留苗 5 株,重复 2 次, F_2 代种子单粒播种于营养钵内,并对每个单株挂牌标记,温室内培养。待三出复叶展开时采取喷雾接种,保湿 2~3 d,接种后约 7 d 待发病充分时进行调查,以 0、1、3 为抗病,5、7、9 为感病^[9]。

1.4 DNA 提取及抗感池构建

接种前对每株抗感亲本及每个 F_2 代单株取 1 三出复叶,采用改良的 CTAB 法^[10]提取 DNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度,用紫外分光光度计检测其浓度,根据测定结果将样品稀释到 $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ 备用。采用 Micheltore 等^[11]方法,从 F_2 代分离群体中随机取 6 个抗病单株的 DNA 等量混合构建抗池,取 6 个感病单株的 DNA 等量混合建立感池。

1.5 PCR 扩增及扩增产物的检测

PCR 体系 $15 \mu\text{L}$,含 $1 \times \text{PCR}$ 缓冲液、 $2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ MgCl}_2$ 、 $100 \text{ mol L}^{-1} \text{ dNTP}$ 、 0.4 mmol L^{-1} 引物、 25 ng DNA、 1 U *Taq* DNA 聚合酶,在 MJ research thermocycler 上进行扩增,反应程序为 95 变性 5 min; 94 15 s, 47 30 s, 72 30 s; 循环 35 次,最后 72 延伸 5 min, 4 保存。产物经 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳缓冲液为 $0.5 \times \text{TBE}$, 120 V 恒压电泳 2 h 左右,电泳结束后银染检测,记录结果。

1.6 SSR 标记的遗传连锁性分析与作图

抗感亲本间及抗病基因池、感病基因池间都有多态性,对带型清晰、重复性较好的 SSR 标记用 F_2 代分离群体进行遗传连锁性检验,统计各单株的 SSR 标记带型。用 Mapmaker3.0b^[12] 软件进行连锁分析,按照常规的 Mapmaker 数据记录方法统计带型数据。用 Kosambi^[13] 作图方法将重组率转换成遗传距离(cM),进行基因定位。用 MapDrawV2.1 绘制标记与基因之间的遗传连锁图^[14]。

2 结果与分析

2.1 抗性鉴定与遗传分析

红花芸豆对 81 号小种表现出极高抗性,供试 10 株反应型均为 0。京豆对 81 号小种表现为极感,10 株反应型均为 9。而 F_2 单株则表现出抗感分离,抗

病单株生长正常, 几乎无明显侵染斑, 感病单株叶片及茎秆上布满褐色条斑并逐渐萎蔫死亡, 其中抗病(R) 82 株, 感病(S) 26 株, χ^2 测验表明, 抗感分离比例符合 3:1, 达显著水平, $\chi^2=0.012$ ($\chi^2_{0.05, v=1}=3.84$),

说明红花芸豆对炭疽菌 81 号小种的抗性受显性单基因控制(表 1), 我们将该基因暂时命名为 *Co-F2533*。因感病单株死亡, 无法得到 F_3 种子, 故无法用衍生的 F_3 家系对炭疽病抗性进行验证。

表 1 亲本及 F_2 单株对炭疽菌 81 号小种的反应
Table 1 Response of parents and F_2 individuals to anthracnose 81

亲本和组合 Parents and combination	世代 Generation	株数 No. of plants		分离比 Ratio of segregation		χ^2 test	
		抗 Resistance	感 Susceptibility	实际比例 Observed	理论比例 Theoretical	χ^2	P-value
红花芸豆 Red Flower common bean	亲本 Parent	10	0	—	—	—	—
京豆 Jing common bean	亲本 Parent	0	10	—	—	—	—
红花芸豆/京豆 Red Flower common bean/Jing common bean	F_2	82	26	3.2:1	3.0:1	0.012	< 3.84

$df=1, \chi^2_{0.05}=3.84$.

2.2 基因组 DNA 的检测

提取的菜豆叶片基因组 DNA, 经琼脂糖凝胶电泳检测表明完整无降解(图 1), 可以作为后续 PCR 反应的模板。

图 1 供试菜豆材料的基因组 DNA
Fig. 1 Genomic DNA extracted from common bean tested
1~15: 用 CTAB 法提取的菜豆基因组 DNA。
1-15: Genomic DNA of common bean extracted by CTAB.

2.3 抗病基因 *Co-F2533* 的 SSR 标记与作图

首先用分布于普通菜豆全基因组上、已知序列的 201 对 SSR 引物对抗感亲本间的多态性进行了初筛, 发现 57 对引物在红花芸豆和京豆间具有稳定、清晰的多态性扩增, 出现多态性的频率为 28.36%。用筛选出来的 57 对引物对抗、感基因池进行第二轮筛选, 发现位于普通菜豆 B6 连锁群上的两个标记 BM170 和 BMD37 在两个基因池间具有多态性, 这两个标记可能与目标基因连锁。

经 F_2 分离群体的 108 个单株检测表明 BM170、BMD37 确实与 *Co-F2533* 连锁, 因此目的基因位于 B6 连锁群上。确定目的基因位于 B6 连锁上后, 对国际热带农业研究中心(CIAT) Matthew Blair 博士提供的 B6 连锁群上未知序列的 15 对 SSR 引物进行抗感亲本、抗感基因池间的多态性分析, 发现标记

Clon1429、Clon410 与抗病基因也存在连锁关系(图 2)。对 4 个标记在 F_2 群体中的带型进行统计均符合 A H B=1 2 1 的分离比例, 这 4 个标记均为共显性标记(表 2)。

4 个 SSR 标记 BM170、Clon1429、BMD37 和 Clon410 与红花芸豆中抗炭疽病基因 *Co-F2533* 的遗传距离经 Mapmaker3.0b 软件计算分别为 6.6、18.4、20.9 和 30.9 cM。标记与基因在染色体上的位置关系为 Clon1429-*Co-F2533*-BM170-BMD37-Clon410(图 3)。

3 讨论

3.1 我国普通菜豆具有抗炭疽病新基因的推断

我国是普通菜豆的次级遗传多样性中心, 遗传资源十分丰富, 国家种质库已保存粒用菜豆资源 4 900 多份, 其中 95%是地方品种; 其种植区域广泛, 从北纬 22°~50°、海拔 50~3 000 m; 在与炭疽菌长期协同进化过程中, 由于菜豆资源的多样性和生态类型的多样性, 菜豆炭疽菌的变异也有其独特的路线, 因此, 我国的普通菜豆资源中可能含有新的抗病性变异。王晓鸣等^[15]曾对我国 1 727 份普通菜豆资源进行炭疽病抗性鉴定, 得到抗病资源 210 份。但总体看, 我国对菜豆炭疽病抗病基因的研究很有限, 主要做了一些抗性鉴定、归类整理、少量抗性遗传分析^[16]和部分抗病基因的分子检测^[17], 对抗炭疽病基因的定位和分子标记等尚未开展工作。

3.2 红花芸豆中抗病基因的基因源分析

普通菜豆经长期驯化及地理隔离形成中美和安

图 2 SSR 标记 BM170、BMD37、Clon1429 和 Clon410 在 F₂ 分离群体上的扩增结果
Fig. 2 Amplification results of BM170, BMD37, Clon1429, and Clon410 on F₂ population
A(RR) : 纯合抗病株; H(Rr) : 杂合抗病株; B(rr) : 感病株; B_R : 抗病池; B_S : 感病池。带*的为重组株带。
A(RR): homozygously resistant plants; H(Rr): heterozygously resistant plants; B(rr): susceptible plants; B_R: resistant bulk; B_S: susceptible bulk. Bands with * are from recombinants.

表 2 与菜豆抗炭疽病基因 *Co-F2533* 连锁的 SSR 标记在 F₂ 分离群体中的分离
Table 2 Segregation analysis of SSR markers linked to gene *Co-F2533* for anthracnose resistance in F₂ segregating population

SSR 标记 SSR marker	具不同带型的株数			分离比		χ^2 test	
	No. of plants with different bands			Ratio of separation		χ^2	P-value
	A	H	χ^2	χ^2	理论比例 Observed		
BM170	28	51	27	1.03:1.89:1	1:2:1	0.170	< 5.99
BMD37	28	48	25	1.12:1.92:1	1:2:1	0.305	< 5.99
Clon1429	27	55	25	1.08:2.04:1	1:2:1	0.097	< 5.99
Clon410	33	49	25	1.32:1.96:1	1:2:1	1.579	< 5.99

A: 抗病亲本的特异带; B: 感病亲本的特异带; H: 同时含双亲特异带。
A: specific band from resistant parent; B: specific band from susceptible parent; H: both resistant and susceptible bands.
 $df = 2, \chi^2_{0.05} = 5.99$.

第斯两个基因库。其形态特征、抗病虫性及营养成分等方面明显的不同。安第斯基因库的材料直立生长，叶片较大，中间的小叶为椭圆型或披针形，苞片为披针或三角型，主茎节间长，籽粒大(百粒重 >

图 3 抗炭疽病基因 *Co-F2533* 及其连锁的 SSR 标记遗传连锁图
Fig. 3 Genetic linkage map of anthracnose resistance gene *Co-F2533* and the linked SSR markers

40 g), 白花, 籽粒一般为红色、白色、花斑; 而中美基因库蔓生生长, 花一般为彩色, 旗瓣有条纹, 心型或椭圆型苞片, 中小籽粒(25~40 g, <25 g), 具白色、黑色、褐色条纹^[18-19]。红花芸豆的形态特征为大叶片、白花、直立生长、红色籽粒, 属于典型的安第斯基因库材料, 并且菜豆胚蛋白标记表明它确实来源于安第斯基因库(数据未发表)。迄今, 共有 10 个位点的 18 个主效抗炭疽病基因被正式命名, 除 *Co-1* 位点的抗病基因属于安第斯基因库外, 其余的均来源于中美基因库, 所以红花芸豆中的抗病基因只有 2 种可能, 要么是 *Co-1* 的等位基因, 要么是一个位于新的抗病位点的基因。前人研究结果表明, 如果将两个基因库的抗病基因聚合在一个品种中可大大提高品种的抗病性和持久性^[5-6]。因此, 本研究发现的来源于安第斯基因库的新抗病基因对普通菜豆的抗炭疽病育种具有十分重要的意义。

3.3 有关作图群体的选择

本试验所用的作图群体是 F_2 群体, 在三出复叶期对分离群体接种后, 感病单株全部死亡, 无法得到 F_3 种子, 故无法用衍生的 F_3 家系对炭疽病抗性进行验证。同时由于菜豆炭疽菌接种的最适时间是三出复叶刚刚展开时, 所以接种前每个单株只能取展开的一片复叶提取 DNA, 致使 DNA 质量和数量均不太高, 无法再对分离群体进行其他的标记分析, 使遗传距离的缩短受到了限制。在以后的研究中, 建议将每个 F_2 自交得到 F_3 , 对每个 F_3 挑选 15~20 个单株进行接种鉴定, 选择 F_2 代的 AA(纯合抗病单株)和 BB(感病单株)构建抗感池, 并且注意保留 F_2 代的叶片, 这样不仅可以得到大量的 DNA 而且还可以根据 F_3 的表型推测 F_2 的基因型, 使抗感池的构建更加科学。而且对每个 F_2 单株的叶片还可尝试离体接种, 将 F_2 、 F_3 的结果进行对照, 提高试验的精确度。

3.4 菜豆炭疽菌生理小种的选择

要建立抗病基因的分子标记, 首先要对所标记的抗病基因进行准确的鉴定, 建立抗感分离群体, 才能保证标记筛选过程中多态性位点与抗病基因连锁的可能性。根据 Flor 的基因对基因假说原理, 植物专化抗病性是相对于某一病原物小种的抗性, 选择适合的生理小种是进行抗性基因准确鉴定的基础。本研究发现, 红花芸豆对炭疽菌 81 号小种表现为高抗(HR)近免疫, 在对 F_2 分离群体的抗性进行鉴定中, 抗感分明, 且表现为单基因控制的显性性状, 是建立菜豆抗炭疽病基因分子标记理想的分离群体, 并为计算遗传连锁距离奠定了基础。

81 号小种是 20 年来我国的优势小种, 它的分布非常广泛, 在菜豆高发区几乎都有分布^[20-21], 因此 81 号小种较具代表性。同时也说明我国菜豆抗炭疽病育种研究相对滞后, 优异抗原较少, 炭疽菌在较小的选择压力下变异小。随着我国普通菜豆生产规模的扩大, 及人们对无公害蔬菜的要求, 减少农药施用量、栽培抗炭疽病菜豆品种越来越重要。我国虽然抗病资源丰富但利用率低, 应加强对我国抗炭疽病地方品种的研究和利用。

3.5 本研究的创新点

目前已知的抗炭疽病基因大都是通过常规杂交和基因推导的方法获得的^[22-24], 本研究首先尝试用分子标记的方法鉴定和定位抗炭疽病基因。由于菜豆 B6 连锁群上尚未发现抗炭疽病基因, 因此可推断来自我国抗病地方品种红花芸豆中的抗炭疽病基因 *Co-F2533* 是个新的抗炭疽病基因。基于目前已知的菜豆抗炭疽病基因多来自中美基因库, 本研究在选配杂交组合时, 选取来源于安第斯基因库的我国菜豆地方品种, 增加了发现新基因的可能性。

微卫星标记具有信息量大、共显性、操作简单、结果稳定、易于实现自动化等优点, 被广泛用于抗病基因的标记与定位, 但在菜豆抗病育种中应用得有限^[25-26], 且目前与菜豆抗炭疽病基因连锁的大都是 RAPD、SCAR、AFLP、RFLP 等标记, 其中 RAPD 标记不稳定, AFLP 标记操作复杂、对模板 DNA 的要求高, RFLP 标记要使用同位素, 这些因素在一定程度上限制了它们在抗病育种中的利用。本研究发现了与抗炭疽病基因 *Co-F2533* 连锁的 SSR 标记, 为加快菜豆抗炭疽病基因的分子累加奠定了基础。

4 结论

红花芸豆对 81 号小种的抗性由一显性基因控制, 将此基因暂命名为 *Co-F2533*。位于菜豆 B6 连锁群上的 4 个标记 BM170、Clon1429、BMD37 和 Clon410 与红花芸豆中的主效抗炭疽病基因 *Co-F2533* 连锁, 遗传距离分别为 6.6、18.4、20.9 和 30.9 cM, 可用于抗病育种中对后代的辅助选择。*Co-F2533* 是个新的抗炭疽病基因, 来源于安第斯基因库。

References

- [1] McClean P, Kami J, Gepts P. Genomics and genetic diversity in common bean. In: Wilson R F, Stalker T H, Brummer E C, eds. Legume Crop Genomics. USA: AOCs Publishing, 2004. pp 61–82
- [2] Zong X-X(宗绪晓). High-Yield Cultivation and Consumption of Legume Food Processing (食用豆类高产栽培与食品加工). Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2002. pp 227–246(in Chinese)
- [3] Pastor-Corrales M A. Anthracnose. In: Pastor-Corrales M A, Tu J C, eds. Bean Production Problems in the Tropics. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia, 1989. pp 77–104
- [4] Wang X-M(王晓鸣), Li Y-L(李怡琳), Li S-Y(李淑英). Study of identification the resistance to anthracnose of common bean germplasm. *Crop Germplasm Resours* (作物品种资源), 1989, (2): 18–19(in Chinese)
- [5] Kelly J D, Vallejo V A. A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. *Hort Sci*, 2004, 39: 1196–1207
- [6] Gepts P. A middle American and an Andean common bean gene pool. In: Gepts P ed. Genetic Resources of Phaseolus Beans. London: Kluwer, 1988. pp 375–390
- [7] Kelly J D. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in breeding for major gene resistance to plant pathogens. *J Am Soc Hort Sci*, 1995, 30: 461–465
- [8] Young R A, Kelly J D. Characterization of the genetic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean differential cultivars. *Plant Dis*, 1996, 80: 650–654
- [9] Wu Q-A(吴全安). Identification of crops germplasm resources resistant to diseases and insect pests. Beijing: Agriculture Press, 1991. pp 60–61(in Chinese)
- [10] Afanador L, Hadley S, Kelly J D. Adoption of a mini-prep DNA extraction method for RAPD marker analysis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Annu Rept Bean Improv Coop*, 1993, 36: 10–11
- [11] Michelmore R M, Paran I, Kesseli R V. Identification of marker linked to disease- resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 9828–9832
- [12] Lander E S, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly M J, Lincoln S E, Newburg L. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1987, 1: 174–181
- [13] Kosambi D D. The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugen*, 1944, 12: 172–175
- [14] Liu R-H(刘仁虎), Meng J-L(孟金陵). MapDraw: A Microsoft Excel macro for drawing genetic linkage maps based on given genetic linkage data. *Hereditas* (遗传), 2003, 25(3): 317–21(in Chinese with an English abstract)
- [15] Wang X-M(王晓鸣), Li Y-L(李怡琳), Luo P-X(骆平西), Zhao-Y-L(赵玉玲). The resistance of Chinese dry bean germplasm. *Crop Germplasm Resource* (作物品种资源), 1999, (1): 25–28(in Chinese)
- [16] Xu Z-S(徐兆生), Wang M(王幕), Wei M(魏民), Yu H-J(余宏军). Inheritance of resistance to anthracnose in snapbean. *China Vegetables* (中国蔬菜), 1999, (4): 18–19(in Chinese)
- [17] Zhao X-Y(赵晓彦). Identification of anthracnose resistant genes based on molecular markers and genetic diversity analysis of resistant germplasm in common bean. MS Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2006(in Chinese with English abstract)
- [18] Duran L A, Blair M W, Giraldo M C, Machiavelli R, Prophete E, Nin J C and Beaver J S. Morphological and molecular characterization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces from the Caribbean. *Crop Sci*, 2005, 45: 1320–1328
- [19] Evans A M. Structure, variation, evolution, and classification in Phaseolus. In: Summer R J, Bunting A H, eds. Advances in Legume Science. Royal Botanic Gardens, Kew, UK, 1980. pp 337–347
- [20] Wang X-M(王晓鸣), Li Y-L(李怡琳), Wu X-F(武小菲). Pathogenic variant of Chinese *Colletotrichum lindemuthianum*. *J Shandong Agric Univ* (山东农业大学学报), 1999, 30(suppl): 125–129(in Chinese)
- [21] Wang K(王坤), Wang X-M(王晓鸣), Zhu Z-D(朱振东), Zhang X-Y(张晓艳), Wang S-M(王述民). Identification of *Colletotrichum lindemuthianum* races and bean germplasm evaluation for anthracnose resistance in eight provinces of China. *J Plant Genet Resour* (植物遗传资源学报), 2008, 9(2): 168–172(in Chinese with English abstract)
- [22] Melotto M, Coelho M F, Pedrosa-Harand A, Kelly J D, Camargo L E A. The anthracnose resistance locus *Co-4* of common bean is located on chromosome 3 and contains putative disease resistance related genes. *Thero Appl Genet*, 2004, 109: 122–134
- [23] Mendoza A, Hernández F, Hernández S, Ruíz D, Martínez de la Vega O, Mora G, Acosta J, Simpson J. Identification of *Co-1* anthracnose resistance and linked molecular markers in common bean line A193. *Plant Dis*, 2001, 85: 252–255
- [24] Young R A, Kelly J D. Tests of allelism for the anthracnose resistance *Co-1* gene. *Annu Rept Bean Improv Coop*, 1997, 40: 128–129
- [25] Yu K F, Park S J, Poysa V. Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Genome*, 1999, 42: 27–34
- [26] Yu K F, Park S J, Poysa V, Gepts P. Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Hereditas*, 2000, 91: 429–434