

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201507012

引文格式: 王发明, 李洁维, 叶开玉, 等. 41 份葡萄种质遗传多样性的 ISSR 和 SCoT 对比分析 [J]. 广西植物, 2017, 37(1):1-8.

WANG FM, LI JW, YE KY, et al. Comparative analysis on the genetic diversity of 41 *Vitis* germplasm resources by ISSR and SCoT molecular markers [J]. Guihaia, 2017, 37(1):1-8.

41 份葡萄种质遗传多样性的 ISSR 和 SCoT 对比分析

王发明, 李洁维*, 叶开玉, 龚弘娟, 莫权辉, 蒋桥生, 刘平平

(广西壮族自治区 广西植物研究所, 特色经济植物研究中心, 广西 桂林 541006)
(中国科学院)

摘要: 对收集于广西桂林的 17 份野生毛葡萄种质和 24 份栽培葡萄种质, 分别使用 12 条 ISSR 和 12 条 SCoT 引物进行了遗传多样性和亲缘关系检测。结果表明: 两种分子标记均能产生较丰富的多态性片段, 可有效应用于葡萄的遗传多样性检测, 但在聚类分析结果上表现出一定的差异性, SCoT 分子标记能更好地区分野生种质和栽培品种, 说明 SCoT 分子标记在葡萄遗传多样性检测和系统进化研究上可能更有优势。从 SCoT 聚类结果上看, 广西植物研究所收集的 3 个野生毛葡萄种质 zws1、zws2 和 zws3 相对其它野生种质而言, 更偏向于与栽培种质聚为一类, 说明这一类野生毛葡萄可能是这些栽培品种的原始亲本来源之一。不同的野生种质聚为多个类群, 并表现出明显的地域特性, 但遗传距离相对较远, 说明桂林野生毛葡萄资源具有丰富的遗传变异。栽培品种没有明显的聚类特点, 可能因为所选用的栽培品种的地域代表性并不是很强, 也可能是因为栽培品种在不断的人工杂交选育过程中, 遗传背景趋向一致, 遗传多样性降低。该研究证明 SCoT 分子标记在葡萄遗传多样性研究上具有一定的优势。该研究结果为桂林毛葡萄资源的保护、利用和品种选育提供了理论依据, 也为葡萄的系统进化研究提供了参考。

关键词: 葡萄, 毛葡萄, 遗传多样性, ISSR, SCoT

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2017)01-0001-08

Comparative analysis on the genetic diversity of 41 *Vitis* germplasm resources by ISSR and SCoT molecular markers

WANG Fa-Ming, LI Jie-Wei*, YE Kai-Yu, GONG Hong-Juan,
MO Quan-Hui, JIANG Qiao-Sheng, LIU Ping-Ping

(Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences,
Centre for Special Economic Plant Studies, Guilin 541006, Guangxi, China)

Abstract: Seventeen wild germplasm resources of *Vitis heyneana* collected from Guilin City of Guangxi Zhuang Autonomous Region and 24 grape cultivars were used to study their genetic diversity and relationship using twelve ISSR and twelve SCoT markers. The results showed that both the two types of molecular markers produced rich polymorphic fragments, and could be used on the genetic diversity study of *Vitis*. However, the results of cluster analysis showed the difference between ISSR and SCoT, and the SCoT markers rather than ISSR markers were much better at distinguishing

收稿日期: 2016-03-14 修回日期: 2016-05-10

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科合 1298014-8); 广西植物研究所基本业务费项目(桂植业 11010) [Supported by Guangxi Science and Technology Development Program(1298014-8); Fundamental Research Funds of Guangxi Institute of Botany(11010)]。

作者简介: 王发明(1979-), 男, 广西桂林人, 博士, 副研究员, 研究方向为果树分子遗传育种, (E-mail) wfm_rz@163.com。

*通信作者: 李洁维, 研究员, 研究方向为果树栽培与良种选育, (E-mail) lijw@gxib.cn。

the wild and the cultivars of *Vitis*, therefore, the SCoT markers might have more advantages on the study of genetic diversity and phylogenetic analysis of *Vitis*. The clustering results of SCoT showed that the three wild *V. heyneana* “zws1”, “zws2” and “zws3” collected from Guangxi Institute of Botany grouped together with cultivars rather than the other wild ones, which showed that maybe one of the ancestral parents of these cultivars was derived from this category of wild *V. heyneana*. All the seventeen wild germplasms clustered into different groups and showed distinct regional character, nonetheless, the genetic distance was long between different groups, which showed that the wild *V. heyneana* had abundant genetic diversity in Guilin. The cultivars did not show obvious clustering characteristics due to the fact that most of them had no regional representativeness or their genetic background were nearly equal due to constantly interbreeding, resulting in low genetic diversity. The findings proved that the SCoT molecular markers had more advantages in the genetic diversity study of *Vitis*. The findings provides the information for the conservation and utilization and variety breeding of wild *V. heyneana* in Guilin.

Key words: *Vitis*, *V. heyneana*, genetic diversity, ISSR, SCoT

葡萄在世界上具有悠久的栽培历史,葡萄属植物在北半球广泛分布,我国处于葡萄属植物的东亚分布中心,是重要的原产地之一。全世界葡萄共有 70 多个种,其中 40 个种(包括 1 个亚种)及 13 个变种起源于中国,种质资源极其丰富(刘崇怀等, 2006)。毛葡萄(*Vitis heyneana*)原产于我国,在我国葡萄属植物中属于较原始的种类(刘三军等, 1995)。在广西,特殊的亚热带气候和喀斯特地貌特征造就了毛葡萄适宜的自然生长环境,特别是在桂中、桂北、桂西等地广泛分布(彭宏祥等, 1999),桂林地处广西北部,是野生毛葡萄种质资源的重要分布地区之一,具有丰富的遗传多样性。野生毛葡萄具有较高的营养和保健价值,其果实富含多种维生素、氨基酸、各种矿物质和微量元素等,具有抗氧化、抗衰老和防癌等功效。在广西,使用毛葡萄为原料酿造野生葡萄酒具有较悠久的历史,因其果实含糖量低、单宁含量较高、富含花青素和多种营养元素等,具备良好的酿造加工特性,野生毛葡萄酒因具有独特的香味和口感而深受消费者喜爱。但野生毛葡萄资源的收集、保护和种质评价等多年来一直没有受到足够的重视(邹瑜, 2008)。葡萄属植物具有丰富的遗传变异,使得通过常规的形态解剖、生理生化检测等方法进行分类鉴定非常困难(贺普超等, 1999)。因此,从分子生物学角度,通过分子标记等方法研究葡萄种质资源的亲缘关系及遗传多样性,对于了解葡萄的物种起源和系统进化及遗传育种、种质资源管理和保护等都具有积极意义。

ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat)是由加拿大的 Zietkiewicz & Rafalskia (1994)提出的一种分子标记方法,其结合了 RAPD 和 SSR 的优点,具有稳

定性好、多态性丰富、共显性、模板用量少、操作简单等特点,已广泛应用于植物的品种鉴定、遗传图谱构建和基因定位、遗传多样性和系统进化分析等研究中。而 SCoT 标记是首先应用于水稻上的一种基于翻译起始位点(根据基因 ATG 翻译起始位点侧翼保守序列设计引物),使用单引物扩增目标基因的功能性分子标记(Collard & Mackill, 2009;熊发前等, 2009)。目前,SCoT 分子标记方法已在水稻(Collard & Mackill, 2009)、龙眼(陈虎等, 2010)、铁皮石斛(赵瑞强, 2012)、桃儿七(Chen et al, 2013)、柿(邓立宝等, 2012)、白灵菇(赵梦然等, 2012)、麻风树(Mulpuri et al, 2013)、芒果(Luo et al, 2010, 2011)等植物上得到应用。

各种分子标记方法目前在葡萄种质资源遗传多样性研究上得到了广泛应用,但是作为一种较新型的分子标记,SCoT 分子标记在葡萄上的应用相对较少(Guo et al, 2012),而且其在葡萄遗传多样性的研究效果上缺少对比和评价。本研究通过比较 ISSR 分子标记与 SCoT 分子标记在野生和栽培葡萄品种的遗传多样性研究上的应用,对 SCoT 分子标记的应用效果进行评价,同时通过研究野生毛葡萄与栽培葡萄的遗传多样性和亲缘关系,为广西毛葡萄资源的保护、利用和品种选育提供参考,也为葡萄的系统进化研究提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

17 份桂林毛葡萄资源分别收集于资源县(修睦、莆田、大源、中峰、官洞村等地)、兴安县(茨林

口、华江、黄毛滩等地)、临桂区(安江坪等地)、雁山区(广西植物研究所)等地,24 份葡萄品种资源采集于广西植物研究所鲜食葡萄种质资源圃[包括京亚(Jingya)、香玉(Xiangyu)、藤稔(Fujiminori)、黑加仑(*Ribes nigrum*)、克伦森(Crimson)、红双味(Hongshuangwei)、维多利亚(Victoria)、玫瑰香(Muscat)、夏黑(Summer Black)、红玫瑰(Red Rose)、红地球(Red Globe)、红乳(Hongru)、比昂扣(Rosario Bianco)、美夏 40(Meixia 40)、巨峰(Kyoho)、美满(Meiman)、无核白(Thomson Seedless)、圣诞玫瑰(Christmas Rose)、美誉(Meiyu)和 zws 杂(zws-hybrid)等 20 个品种]和桂林市农科所(包括 NKS2、NKS4、NKS5、NKS6 等 4 个杂交品种)。取样材料为幼嫩叶片,硅胶干燥后提取基因组 DNA。使用的 dNTPs、DNA 聚合酶和 DNA ladder 等试剂购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.2 DNA 提取与检测

参照 Ergül et al(2006)的方法,使用改良 CTAB 法提取葡萄栽培品种和野生毛葡萄的全基因组 DNA,使用紫外分光光度法和琼脂糖电泳法检测其 DNA 质量,将 DNA 稀释到合适浓度用于 PCR 扩增。剩余 DNA 保存于-20 °C 冰箱备用。

1.3 引物筛选

使用的 ISSR 引物根据加拿大哥伦比亚大学 UBC 公司公布的 100 条引物序列(<http://www.biotech.ubc.ca/services/naps/primers.html>)进行合成,SCoT 引物根据 Collard & Mackill(2009)公布的 36 条引物序列和 Luo et al(2011)公布的 40 条引物序列进行合成。在 Bio-Rad S1000 PCR 仪上对所有引物进行筛选,最终筛选出扩增产物条带清晰、多态性好的 12 条 ISSR 引物(表 1)和 12 条 SCoT 引物(表 2),用于所有 DNA 样品扩增。

1.4 PCR 反应与检测

ISSR 和 SCoT 的反应体系和扩增程序基本一致。20 μL 反应体系包括 2 \times Taq PCR Mix 10 μL , DNA(50 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 1.0 μL , 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物 0.8 μL , 超纯水 8.2 μL 。反应程序:94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 S,复性 40 S(退火温度随引物而定), 72 °C 延伸 1 min,循环 34 次;72 °C 延伸 10 min。取 8 μL 扩增产物,使用 2%的琼脂糖(预加 EB)电泳分离,电压为 5 V $\cdot \text{cm}^{-1}$,电泳缓冲液为 1 \times TAE,电泳结束后在紫外分析仪上观察并拍照保存。

表 1 ISSR 引物序列及其扩增多态性
Table 1 Sequence and amplification efficiency of ISSR primers

ISSR 引物 ISSR prime	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	扩增位 点数 Total bands	多态位 点数 Polymorphic bands	多态位点 百分率 Percentage of polymorphic bands (%)
I-808	(Ag)8 C	12	10	83.3
I-810	(gA)8 T	9	8	88.9
I-836	(Ag)8 YA	10	10	100
I-840	(gA)8 YT	13	13	100
I-841	(gA)8 YC	12	11	91.7
I-844	(CT)8 RC	8	7	87.5
I-845	(CT)8 Rg	8	7	87.5
I-848	(CA)8 Rg	10	9	90.0
I-849	(gT)8 YA	10	8	80.0
I-855	(AC)8 YT	9	7	77.8
I-881	gggT (ggggT)2 g	10	8	80.0
I-889	DBD (AC)7	10	9	90.0
总计 Total		121	107	—
平均 Average		10.1	8.9	88.4

表 2 SCoT 引物序列及其扩增多态性
Table 2 Sequence and amplification efficiency of SCoT primers

SCoT 引物 SCoT prime	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	扩增位 点数 Total bands	多态位 点数 Polymorphic bands	多态位点 百分率 Percentage of polymorphic bands (%)
P17	ACCATGGCTACCACCGAG	10	9	90.0
P20	ACCATGGCTACCACCGCG	10	9	90.0
P21	ACGACATGGCGACCCACA	9	8	88.9
P22	AACCATGGCTACCACCAC	15	13	86.7
P25	ACCATGGCTACCACCGGG	12	10	83.3
P26	ACCATGGCTACCACCGTC	11	9	81.8
P27	ACCATGGCTACCACCGTG	10	10	100
P31	CCATGGCTACCACCGCCT	10	8	80.0
P32	CCATGGCTACCACCGCAC	10	9	90.0
P35	CATGGCTACCACCGCCC	11	10	90.9
P38	ACGACATGGCGACCCCG	9	9	100
P40	CCATGGCTACCACCGCCG	13	12	92.3
总计 Total		130	116	—
平均 Average		10.8	9.7	89.2

1.5 数据分析

对所有的 ISSR 和 SCoT 分子标记图谱进行分析,先根据相同迁移率下一位点 DNA 扩增条带的有无分别记为 1 和 0,再合并 1/0 矩阵后使用 NT-SYSp2.10e 软件和 UPGMA 方法对 41 份样品进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 ISSR 与 SCoT 的多态性分析

12 条 ISSR 引物在 41 份葡萄样本中共扩增出

121 个 DNA 位点,其中多态性位点 107 个,多态率占 88.4%;单条引物扩增的条带数为 7~11 条,平均约 10 条。12 条 SCoT 引物共扩增出 130 个 DNA 位点,其中多态位点 116 个,多态率占 89.2%;单条引物扩增条带数为 8~14 条,平均为 11 条。两种引物扩增的片段范围大多集中 250~2 000 bp 之间,二者扩增的 DNA 位点数和多态性位点比率相差无几,单条引物扩增能力也基本一致。部分引物的扩增结果见图 1 和图 2。

2.2 ISSR 和 SCoT 聚类分析

根据两种分子标记的扩增结果,使用 UPGMA

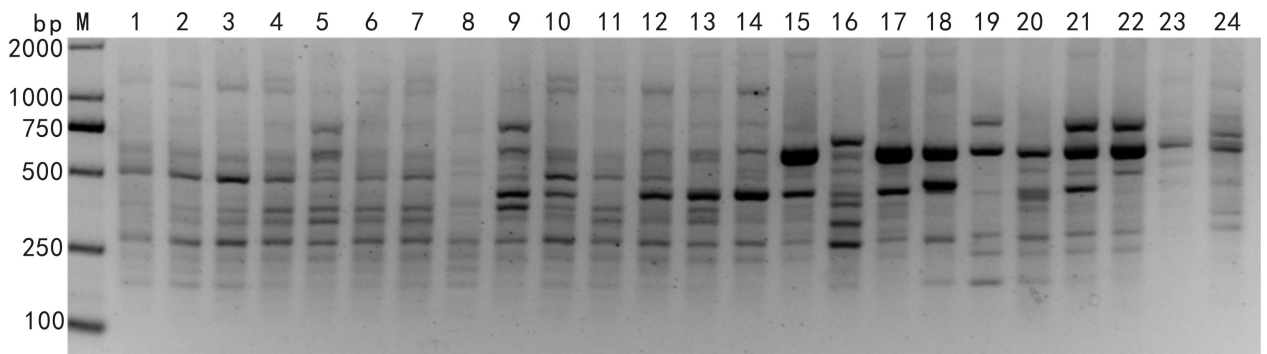


图 1 ISSR 引物 I840 对部分样品的扩增结果

Fig. 1 Amplification profile of ISSR prime I840 with part of samples

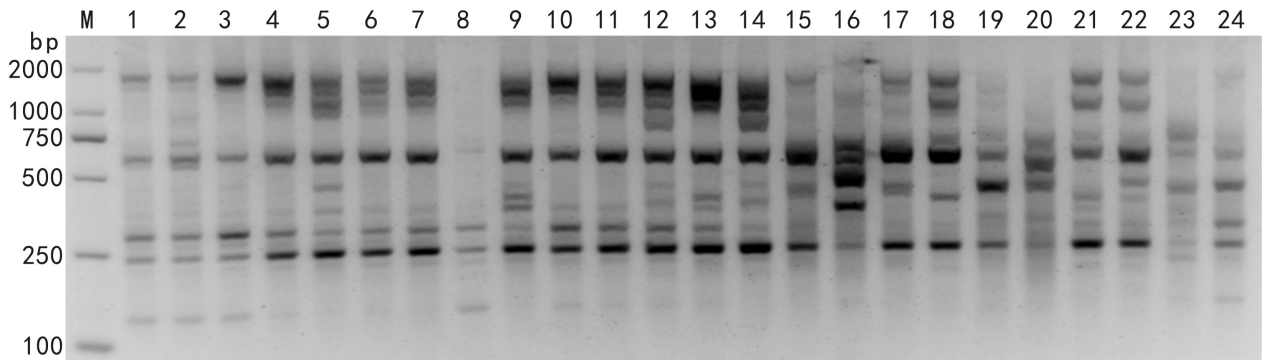


图 2 SCoT 引物 P40 对部分样品的扩增结果

Fig. 2 Amplification profile of SCoT prime P40 with part of samples

方法对 41 份材料分别进行聚类分析。由 ISSR 聚类分析的结果(图 3)可见,在遗传相似系数 0.84 处,京亚、香玉、藤稔、美满、黑加仑、维多利亚、红双味、NKS4、巨峰、红地球、NKS2 等 11 个品种聚为一类,克伦森、夏黑、红玫瑰、红乳、比昂扣、zws 杂等 6 个

品种聚为一类,而其它栽培品种及野生种质大多没有明显的聚类关系。而使用 SCoT 方法(图 4),在遗传相似系数 0.77 处将 41 份供试材料分为 6 个类群,其中第 I 类群包含全部的栽培种质和广西植物研究所内收集的 3 个野生种质 zws1、zws2 和 zws3,

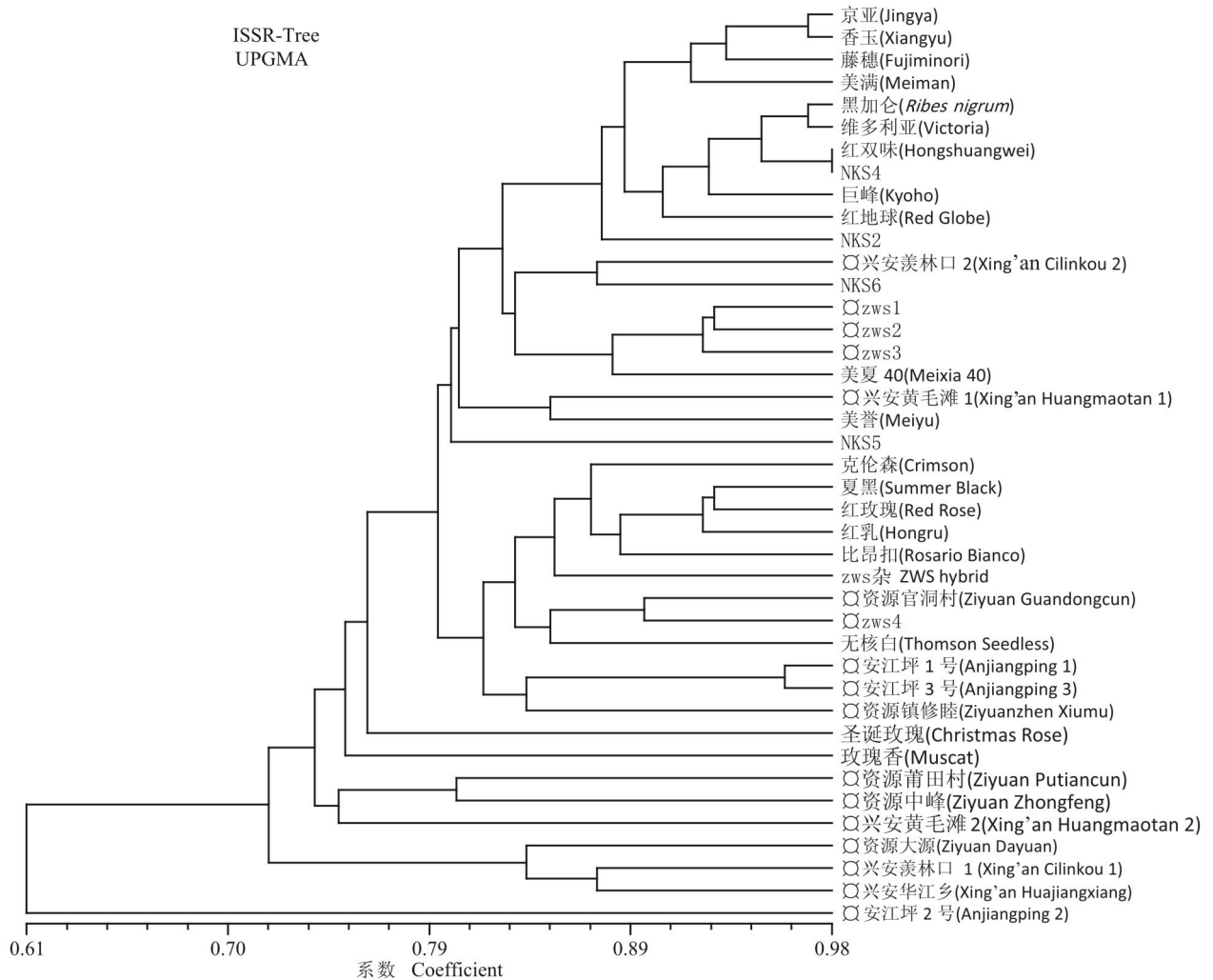


图 3 12 条 ISSR 引物构建的 41 份葡萄种质树状聚类图 □. 表示野生毛葡萄种质。

Fig. 3 UPGMA dendrogram of 41 *Vitis* germplasm constructed by twelve ISSR primers □. represents wild *V. heyneana*.

第 II、III、IV、V 和 VI 类均只包含野生种质,并且野生种质之间的聚类趋势表现出较明显的地域特性。两种分子标记的聚类结果均显示广西植物研究所内收集的 3 个野生种质 zws1, zws2, zws3 明显聚为一类,且与栽培品种的遗传距离相对较近;而安江坪 2 号与所有葡萄种质的遗传距离最远。总体看来,两种分子标记的聚类结果有一定差距,但 SCoT 方法能更好地区分栽培品种和野生种质。

3 讨论

3.1 ISSR 和 SCoT 分子标记的应用效果比较

目前,ISSR 分子标记在葡萄的遗传多样性和系

统进化研究等方面得到了广泛应用(吴子龙等, 2006;张永辉等, 2011;赖呈纯等, 2014),但是 SCoT 分子标记在葡萄遗传多样性上的研究相对较少。在引物设计上,二者对于不同植物均具有普适性和通用性,可以大大提高引物的利用率,节约成本;二者均使用单一引物进行扩增,操作起来更方便;二者均可以使用较高的退火温度进行扩增,提高了扩增结果的特异性和稳定性。本研究结果证明 ISSR 和 SCoT 分子标记都可以产生丰富的遗传多态性位点,无论在单条引物的扩增条带数和多态性条带比率上都相差不大,说明二者都可以有效地应用于葡萄种质遗传多样性研究上。但二者的聚类分析结果具有一定的差异性,41 份葡萄种质的聚类分析结果显

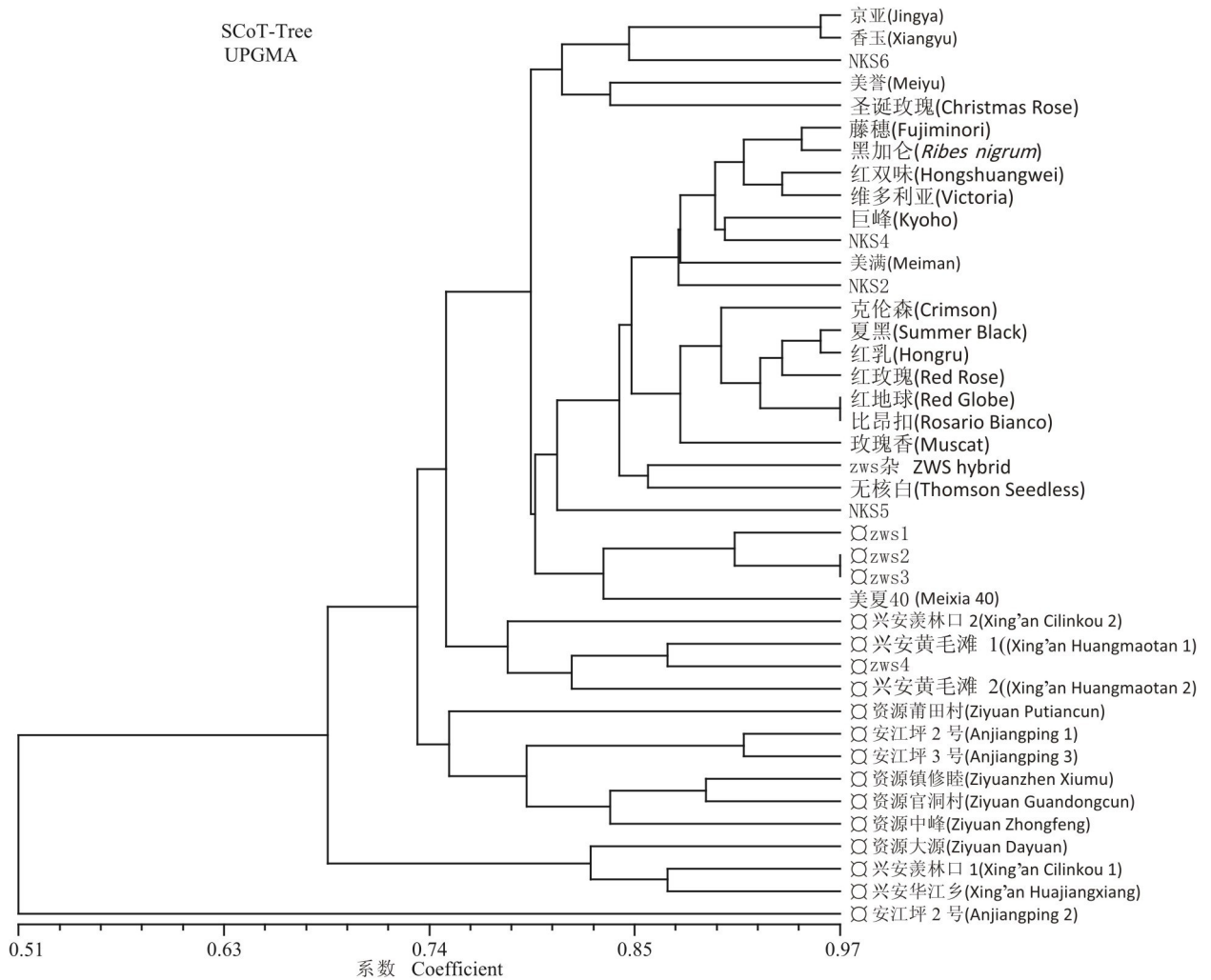


图 4 12 条 SCoT 引物构建的 41 份葡萄种质树状聚类图 □. 表示野生毛葡萄种质。

Fig. 4 UPGMA dendrogram of 41 *Vitis* germplasm constructed by twelve SCoT primes □. represents wild *V. heyneana*.

示,SCoT 标记能更好地区分栽培品种与野生种质。前人在其它物种上的研究也表明 SCoT 分子标记相对于 ISSR 分子标记在植物遗传多样性研究上更有效和更稳定(赵丹等,2014),这可能与引物的设计方法有关,SCoT 分子标记是依据植物基因中的 ATG 翻译起始位点侧翼序列的保守性,设计单引物并对基因组进行扩增,所以可能使其更多的扩增位点位于基因组的编码区,从而使标记的聚类结果与表型之间更具相关性。本研究证明 SCoT 分子标记在葡萄种质资源遗传多样性评价和系统进化研究上可能更具优势。

3.2 葡萄种质资源的遗传多样性及其亲缘关系

以 SCoT 分子标记的聚类分析结果为例,在遗

传相似系数 0.77 处可以将全部的栽培品种聚为一类,而这些品种包括了欧亚种、欧美杂种、美国杂种、日本杂种及国内杂交培育等较多来源,但是这些品种之间没有明显的聚类关系,可能因为本次选用的栽培品种的地域代表性不是很强,也说明栽培品种在不断的人工定向杂交选育过程中,遗传背景趋向一致,遗传多样性降低。收集于广西植物所内的 3 份野生种质 zws1, zws2 和 zws3 相对其它野生种质而言与栽培品种的遗传距离更近,说明这一类野生毛葡萄可能是这些栽培品种的原始亲本来源之一。其余类群均为野生种类,并且这些野生种质的遗传距离相对较远,说明了广西野生毛葡萄资源具有丰富的遗传变异。特别是安江坪 2 号种质,与其它野生

种质的遗传距离最远,这也与其较为特殊的表型对应,虽然将其判定为毛葡萄种质,但是相对于其它毛葡萄种类具有许多的特殊表型,因此有必要将其作为一种特殊的种质进行进一步研究。另外可以看出,虽然同一采样地点的野生毛葡萄种质大多聚为一类,表现出明显的地域特性,但总体仍表现出丰富的遗传多样性。

葡萄栽培品种在优异园艺性状的人为定向筛选过程中,不可避免地丢失部分“低劣”的性状位点及其与之连锁的其它基因位点,而这些位点很有可能包含了人们所未知的一些重要功能基因,特别是抗病、抗逆性基因,所以广泛使用少数优良品种的继代栽培及以其为父、母本进行杂交培育新品种的行为可能导致其品种的退化和加剧其遗传多态性的降低。而野生种类在漫长的自然选择过程中,具备了较强大的适应能力和抗病虫、抗逆特性,并且可能保留一些有益的突变位点,为葡萄品种的培育提供了重要的基因资源。因此对葡萄野生资源进行收集、保存和鉴定,并对其优异性状进行利用,是葡萄优良品种培育的重要基础和保障,具有重要的应用价值和现实意义。

参考文献:

- CHEN DX, ZHAO JF, LIU X, et al, 2013. Genetic diversity and genetic structure of endangered wild *Sinopodophyllum emodi* by start codon targeted polymorphism [J]. *Chin J Chin Mat Med*, 38(2):278-283.
- CHEN H, HE XH, LUO C, et al, 2010. Analysis on the genetic diversity of 24 Longan (*Dimocarpus longan*) Accessions by SCoT markers [J]. *Acta Horti Sin*, 37(10):1651-1654. [陈虎, 何新华, 罗聪, 等, 2010. 龙眼 24 个品种的 SCoT 遗传多样性分析 [J]. *园艺学报*, 37(10):1651-1654.]
- COLLARD CY, MACKILL DJ, 2009. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 27(1):86-93.
- DENG LB, HE XH, LI TW, et al, 2012. Investigation and analysis on the genetic diversity of persimmon germplasms in plateau of north-west Guangxi [J]. *Acta Horti Sin*, 39(2):215-224. [邓立宝, 何新华, 李天文, 等, 2012. 广西西北部高原地区柿种质资源调查及遗传多样性分析 [J]. *园艺学报*, 39(2):215-224.]
- ERGÜL A, KAZAN K, ARAS S, et al, 2006. AFLP analysis of genetic variation within the two economically important Anatolian grapevine (*Vitis vinifera* L.) varietal groups [J]. *Genome*, 49(5):467-475
- GUO DL, ZHANG JY, LIU CH, 2012. Genetic diversity in some grape varieties revealed by SCoT analyses [J]. *Mol Biol Rep*, 39(5):5307-5313.
- HE PC, 1999. Wild grape resources and utilization in China [J]. *Sino-overs Grapev & Wine*, (10):12-13. [贺普超, 1999. 中国野生葡萄资源与利用 [J]. *中外葡萄与葡萄酒*: 50 年特, (10):12-13.]
- LAI CC, FAN LH, HANG XG, et al, 2014. Assessment of genetic relationships among grapes (*Vitis*) varieties using ISSR markers [J]. *J Fujian Agric For Univ (Nat Sci Ed)*, 43(1):20-28. [赖呈纯, 范丽华, 黄贤贵, 等, 2014. 葡萄品种资源遗传关系的 ISSR 分析 [J]. *福建农林大学学报 (自然科学版)*, 43(1):20-28.]
- LIU CH, SHEN YJ, CHEN J, et al, 2006. Outlining “the description and data standard for grape (*Vitis*)” and discussion on its use [M]. Beijing: China Agriculture Press. [刘崇怀, 沈育杰, 陈俊, 等, 2006. 葡萄种质资源描述规范和数据标准 [M]. 北京: 中国农业出版社.]
- LIU SJ, KONG QS, 1995. Studies on the taxonomy of wild grape species native to China [J]. *J Fruit Sci*, 12(4):224-227. [刘三军, 孔庆山, 1995. 我国野生葡萄分类研究 [J]. *果树学报*, 12(4):224-227.]
- LUO C, HE XH, CHEN H, et al, 2011. Genetic diversity of mango cultivars estimated using SCoT and ISSR markers [J]. *Biochem Syst Ecol*, 39:676-684.
- LUO C, HE XH, CHEN H, et al, 2010. Analysis of diversity and relationships among mango cultivars using Start Codon Targeted (SCoT) markers [J]. *Biochem Syst Ecol*, 38:1176-1184.
- MULPURI S, MUDDANURUA T, FRANCIS G, 2013. Start codon targeted (SCoT) polymorphism in toxic and non-toxic accessions of *Jatropha curcas* L. and development of a codominant SCAR marker [J]. *Plant Sci*, 207:117-127.
- PENG HX, LIU RG, ZOU Y, et al, 1999. Investigation on wild grape resources and propagation technology in lime-stone mountain areas of west Guangxi [J]. *SW Chin J Agric Sci*, 12(4):101-105. [彭宏祥, 刘荣光, 邹瑜, 等, 1999. 桂西岩溶山区野生葡萄资源与繁殖技术 [J]. *西南农业学报*, 12(4):101-105.]
- WU ZL, FANG LY, WANG J, et al, 2006. Analysis of genetic relationship of 15 *Vitis* germplasm resources by ISSR markers [J]. *J Fruit Sci*, 23(4):605-608. [吴子龙, 方连玉, 王军, 等, 2006. 15 份葡萄种质亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. *果树学报*, 23(4):605-608.]
- XIONG FQ, TANG RH, CHEN ZL, et al, 2009. SCoT: a novel gene targeted marker technique based on the translation start codon (SCoT) [J]. *Mol Plant Breed*, 7(3):635-638. [熊发前, 唐荣华, 陈忠良, 等, 2009. 目标起始密码子多态性 (SCoT): 一种基于翻译起始位点的目的基因标记新技术 [J]. *分子植物育种*, 7(3):635-638.]
- ZHANG YH, LIU CH, FAN XC, et al, 2011. Application of ISSR markers in taxonomy of Chinese wild grape [J]. *J Fruit Sci*, 28(3):406-412. [张永辉, 刘崇怀, 樊秀彩, 等, 2011. ISSR 标记在中国野生葡萄分类中的应用 [J]. *果树学报*, 28(3):406-412.]
- ZHAO D, DING L, ZHOU T, et al, 2014. Genetic diversity analysis of *Lonicera macranthoides* cultivars in Guizhou by ISSR and SCoT markers [J]. *Guizhou Agric Sci*, 42(1):21-25. [赵丹, 丁铃, 周涛, 等, 2014. 贵州栽培灰毡毛忍冬的遗传多样性 ISSR 与 SCoT 标记 [J]. *贵州农业科学*, 42(1):21-25.]
- ZHAO MR, CHEN Q, HUANG CY, et al, 2012. SCoT Analysis of genetic polymorphism for wild germplasm of *Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis* from China [J]. *Acta Horti Sin*, 39(12):2475-

