

# ISTR在部分柿属植物种质鉴定和亲缘关系分析中的应用

杜晓云<sup>1,2</sup>, 张梦思<sup>1</sup>, 罗正荣<sup>1</sup>, 张青林<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>华中农业大学园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070; <sup>2</sup>山西运城学院生命科学系, 山西运城 044000)

**摘要:** 利用反向序列标签重复技术 (inverse sequence-tagged repeat, ISTR), 对柿属 7 个种, 包括柿 (*Diospyros kaki* Thunb.), 君迁子 (*D. lotus* L.), 浙江柿 (*D. glaucifolia* Metc.), 油柿 (*D. oleifera* Cheng), 金枣柿 (*D. sp.*), 老鸦柿 (*D. rhombifolia* Hemsl.) 和美洲柿 (*D. virginiana* L.) 共 32 个基因型进行了种质鉴定和亲缘关系研究。结果表明: ISTR 可区分供试柿属植物中的 30 份; ISTR 能够很好地适用于柿属植物亲缘关系分析; 供试的中国与日本原产柿种质分别聚类; 新发现的中国甜柿变异类型与日本甜柿的亲缘关系较远且存在较丰富的遗传变异, 可能是潜在的育种资源。ISTR 标记可在柿属植物种质资源鉴定和亲缘关系分析中更广泛地应用。

**关键词:** 柿属; 亲缘关系; 反向序列标签重复技术; 逆转座子分子标记

中图分类号: S 665.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2009) 04-0481-06

## Identification and Genetic Relationships of *Diospyros kaki* Thunb. and Related Species Using ISTR Analysis

DU Xiao-yun<sup>1,2</sup>, ZHANG Meng-si<sup>1</sup>, LUO Zheng-rong<sup>1</sup>, and ZHANG Qing-lin<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Horticultural Plant Biology Affiliated to Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; <sup>2</sup>Department of Life and Science, Shanxi Yuncheng University, Yuncheng, Shanxi, 044000, China)

**Abstract:** Inverse sequence-tagged repeat (ISTR) molecular marker was employed to investigate genetic relationships of 32 genotypes representative of 7 species including *Diospyros kaki* Thunb., *D. lotus* L., *D. glaucifolia* Metc., *D. oleifera* Cheng, Jinzaoshi (*D. sp.*), *D. rhombifolia* Hemsl and *D. virginiana* L. ISTR showed good discriminatory power between genotypes, with exception of one bud mutation and its original variety. The clustering results derived from ISTR molecular data was in good agreement with the previous studies or known genetic relationships of some genotypes, indicating that ISTR could be applied for the genus of *Diospyros*. Both unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) and principal coordinated analysis (PCOA) results separated Japanese persimmon into different groups, indicating their different genetic background. The new found several Chinese native PCNA varieties showed abundant genetic diversity based on ISTR analysis, as well as with Japanese native PCNA types, suggesting that they may be potential and precious breeding materials. In summary, ISTR would be a potential efficient tool for further germplasm differentiation, genetic diversity assessment and phylogenetic analysis in *Diospyros*.

**Key words:** *Diospyros* L.; phylogenetic relationship; inverse sequence-tagged repeat; retrotransposon molecular marker

反向序列标签重复技术 (inverse sequence-tagged repeat, ISTR) 是一种基于逆转座子的分子标记。ISTR 标记较 AFLP 等常规分子标记灵敏 (Demey et al., 2004), 因使用的是通用引物, 故与其它以物

收稿日期: 2008-12-30; 修回日期: 2009-03-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30471203); 华中农业大学科研启动基金项目 (52204-06052)

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: zhangqinglin@mail.hzau.edu.cn)

种特异性引物为前提的逆转座子分子标记类型相比,可以免去前期逆转座子引物开发步骤,降低试验成本和提高效率。目前已在椰子、松树、黑麦、小麦、油棕、甜菜、马铃薯、番茄 (Rohde, 1996; Castiglioni et al, 1998; Herrán et al, 2000)、葡萄 (Sensi et al, 1996) 和柑橘 (Tao et al, 2006) 等植物的指纹分析、遗传连锁图谱构建和系统进化分析等研究中得到应用。

本试验中拟探讨该标记在柿属植物种质鉴定和亲缘关系分析中应用的可行性,以期为今后开展种质鉴定、遗传多样性评价和亲缘关系分析等研究提供新的研究手段;此外,还对中国原产完全甜柿和日本原产完全甜柿之间遗传关系进行研究,可望为完全甜柿育种实践提供理论指导。

## 1 材料与方 法

试验于 2008 年在华中农业大学园艺植物生物学教育部重点实验室进行。试材如表 1 所示。

表 1 本试验所用材料及编号  
Table 1 The 32 genotypes used in this experiment

| 编号 Code | 学名 Scientific name          | 试材 Genotype                | 倍性 Polidy level | 脱涩类型 Astringent type | 原产地 Origin |
|---------|-----------------------------|----------------------------|-----------------|----------------------|------------|
| 1       | <i>Diospyros kaki</i> Thunb | 富有 Fuyu                    | 2n = 6x = 90    | PCNA                 | 日本 Japan   |
| 2       |                             | 松本早生 Matsumoto-wase        | 2n = 6x = 90    | PCNA                 | 日本 Japan   |
| 3       |                             | 上西早生 Uenishi-wase          | 2n = 6x = 90    | PCNA                 | 日本 Japan   |
| 4       |                             | 西村早生 Nishimura-wase        | 2n = 6x = 90    | PVNA                 | 日本 Japan   |
| 5       |                             | 赤柿 Akagaki                 | 2n = 6x = 90    | PVNA                 | 日本 Japan   |
| 6       |                             | 前川次郎 Maekawa-Jirou         | 2n = 6x = 90    | PCNA                 | 日本 Japan   |
| 7       |                             | 次郎 Jirou                   | 2n = 6x = 90    | PCNA                 | 日本 Japan   |
| 8       |                             | 阳丰 Youhou                  | 2n = 6x = 90    | PCNA                 | 日本 Japan   |
| 9       |                             | 花御所 Hana-gosho             | 2n = 6x = 90    | PCNA                 | 日本 Japan   |
| 10      |                             | 骏河 Sunaga                  | 2n = 6x = 90    | PCNA                 | 日本 Japan   |
| 11      |                             | 晚御所 Oku-gosho              | 2n = 6x = 90    | PCNA                 | 日本 Japan   |
| 12      |                             | 新秋 Shinskyuu               | 2n = 6x = 90    | PCNA                 | 日本 Japan   |
| 13      |                             | 禅寺丸 Zenjimarū              | 2n = 6x = 90    | PVNA                 | 日本 Japan   |
| 14      |                             | 平核无 Hiratanenashi          | 2n = 9x = 135   | PVA                  | 日本 Japan   |
| 15      |                             | 华柿 1号 Huashi 1             | 2n = 6x = 90    | PVA                  | 日本 Japan   |
| 16      |                             | 雄株 9号 Male Type 9          | 2n = 6x = 90    | -                    | 中国 China   |
| 17      |                             | 鄂柿 1号 Eshi 1               | 2n = 6x = 90    | PCNA                 | 中国 China   |
| 18      |                             | 宝盖甜柿 Baogai-tianshi        | 2n = 6x = 90    | PCNA                 | 中国 China   |
| 19      |                             | 小宝盖甜柿 Xiaobaogai-tianshi   | 2n = 6x = 90    | PCNA                 | 中国 China   |
| 20      |                             | 四方甜柿 Sifang-tianshi        | 2n = 6x = 90    | PCNA                 | 中国 China   |
| 21      |                             | 小果甜柿 Xiaoguo-tianshi       | 2n = 6x = 90    | PCNA                 | 中国 China   |
| 22      |                             | 罗田甜柿 Luotian-tianshi       | 2n = 6x = 90    | PCNA                 | 中国 China   |
| 23      |                             | 磨盘柿 Mopanshi               | 2n = 6x = 90    | PCA                  | 中国 China   |
| 24      |                             | 铜盆柿 Tongpenshi             | 2n = 6x = 90    | PCA                  | 中国 China   |
| 25      |                             | 台湾正柿 Taiwan-zhengshi       | 2n = 6x = 90    | PCA                  | 中国 China   |
| 26      |                             | 沙谷 1号 Sagoksi 1            | 2n = 6x = 90    | PCA                  | 韩国 Korea   |
| 27      | <i>D. glaucifolia</i> Metc  | 浙江柿 Chekiang Persimmon     | 2n = 2x = 30    | -                    | 中国 China   |
| 28      | <i>D. lotus</i> L.          | 君迁子 Date Plum              | 2n = 2x = 30    | -                    | 中国 China   |
| 29      | <i>D. ambifolia</i> Hemsl   | 老鸦柿 Diamond Leaf Persimmon | 2n = 4x = 60    | -                    | 中国 China   |
| 30      | <i>D. oleifera</i> Cheng    | 油柿 Oily Persimmon          | 2n = 2x = 30    | -                    | 中国 China   |
| 31      | <i>D. virginiana</i> L.     | 美洲柿 Common Persimmon       | 2n = 4x = 60    | -                    | 美国 USA     |
| 32      | <i>D. sp.</i>               | 金枣柿 Jinzaoshi              | 2n = 2x = 30    | -                    | 中国 China   |

注: PCNA: 完全甜柿; PCA: 完全涩柿; PVNA: 不完全甜柿; PVA: 不完全涩柿。

Note: PCNA: Pollination-constant nonastringent; PCA: Pollination-constant astringent; PVNA: Pollination-variant nonastringent; PVA: Pollination-variant astringent

基因组 DNA 提取和质量检测参考 Doyle 和 Doyle (1987) 的文献。DNA 质量及浓度检测使用 Cary-50 紫外分光光度计 (美国 Varian 公司), 终浓度稀释至  $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , 4℃ 保存备用。

ISTR 扩增及其产物检测参考 Rohde (1996) 的方法并作优化。引物序列参考 Aga 和 Bryngelsson

(2006) 的文献 (表 2), 由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 扩增体系 (20  $\mu$ L): 模板 DNA 40 ng, Buffer 1  $\times$ ,  $Mg^{2+}$  2.0 mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ , dNTP 0.25 mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ , *Taq* 酶 1 U, 引物 0.50  $\mu$ mol  $\cdot$  L $^{-1}$ ; 扩增程序: 94 5 min; 94 1 min; 50 1 min; 72 1.5 min, 循环 33 次; 72 延伸 8 min; 扩增产物于 2.0% 琼脂糖 (西班牙 Biowest) 凝胶电泳检测, 8 V  $\cdot$  cm $^{-1}$  电压电泳 3 h, SYNGENE 凝胶成像系统观察和记录谱带。本试验 PCR 试剂均购自上海桑尼生物科技有限公司。

表 2 ISTR 引物名称及其序列

Table 2 Primers used in ISTR-PCR reaction

| 正向引物 F-primer | 序列 Sequences 5' - 3'   | 反向引物 R-primer | 序列 Sequences 5' - 3'     |
|---------------|------------------------|---------------|--------------------------|
| F2            | AAAAATGTAATCTCTC       | B3            | ATTCCCACTGCACCAAT        |
| F3            | GTCGACATGCCACTTTTC     | B5            | CTTCTGTGAAAAGTCCTAG      |
| F5            | ATAATATGGACTTAAAGCAAGC | B6            | ATAATATGGACTTAAAGCAAGCA  |
| F8            | TTGGACAACCAATTTTACT    | B7            | GGAAATATCAATCCCAAATAAG   |
| F9            | ATAATGGACTTAAAGCAAGCCA | B8            | CCTCTCTTATTTGGGAAATGATAT |
| F10           | GATCAAAAAATTTGGTTTCAAT | B10           | GACCCCTTTTGAACAACATG     |

注: 引物序列参考 Aga 和 Bryngelsson (2006) 的文献。

Note: The sequences of primers referred to Aga & Bryngelsson (2006).

电泳条带按 1/0 形式进行数据转换, 只统计清晰、再现性强的条带。扩增产物按同一位点条带有无分别赋值, 有带记为 “1”, 无带记为 “0”; 采用 NTSYS-pc version 2.1 (Rohlf, 2000) 软件计算 SM 相似指数, UPGMA (unweighted pair group method arithmetic averages) 法进行聚类, 同时进行主坐标分析和 Mantel 检验聚类结果和相似指数矩阵之间的相关性。

## 2 结果与分析

### 2.1 ISTR 多态性分析

共筛选 36 对引物, 其中 9 对引物的扩增谱带清晰且重复性好。由表 3 可见, 9 对引物的扩增总带数为 63 条, 54 条 (占 85.71%) 具多态性; 扩增片段长度 100 ~ 1 500 bp; 单引物对可扩增出 3 ~ 12 条谱带, 平均为 7 条, 多态位点百分率 62.5% ~ 100%; 不同引物组合的种质鉴定能力差异较大, 但均未能区分 ‘富有’ 和其芽变品种 ‘松本早生’, 其它 30 份种质由 9 对引物共同作用可以得到很好区分。图 1 为 F8/B6 引物组合扩增电泳图谱。

表 3 选用 9 对引物产生的谱带信息

Table 3 The information on bands generated by 9 primer pairs

| 引物组合<br>Primer pair | 总带数<br>Total bands | 多态性带数<br>Number of<br>polymorphic bands | 多态性百分率 / %<br>Percentage of<br>polymorphic bands |
|---------------------|--------------------|---|--|
| F3/B5               | 10                 | 10                                      | 100  |
| F3/B3               | 8                  | 8                                       | 100  |
| F5/B7               | 3                  | 2                                       | 66.67  |
| F10/B8              | 6                  | 6                                       | 100  |
| F9/B5               | 4                  | 4                                       | 100  |
| F9/B6               | 7                  | 3                                       | 42.86  |
| F2/B3               | 5                  | 4                                       | 80   |
| F10/B3              | 8                  | 5                                       | 62.50  |
| F8/B6               | 12                 | 12                                      | 100  |

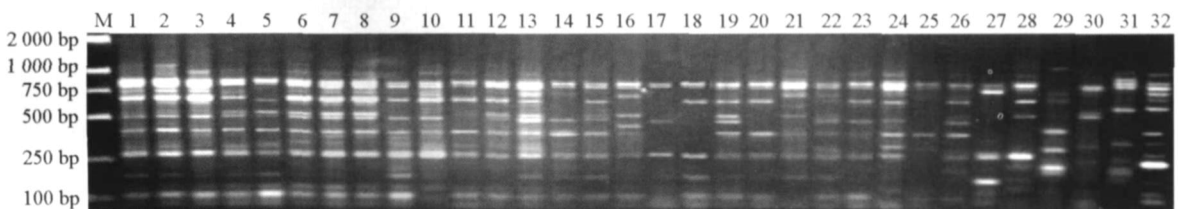


图 1 F8/B6 引物组合对供试 32 份柿属植物基因型的 ISTR 扩增谱带  
编号对应的基因型见表 1。

Fig. 1 The profile of ISTR amplification using F8/B6 primer combination in the 32 *Diospyros* spp.

Lanes correspond to the accessions listed in Table 1.

## 2.2 基于 ISTR数据的相似指数及亲缘关系分析

由图 2可见, 32份基因型的相似指数在 0.41 ~ 1.00 之间, 平均值 0.75。日本甜柿间的相似指数变化范围从 0.84 (‘花御所’和‘晚御所’) 到 1.00 (‘富有’和‘松本早生’), 中国甜柿间的相似指数变化范围为 0.65 (‘鄂柿 1号’和‘小果甜柿’) 到 0.89 (‘四方甜柿’和‘小果甜柿’)。由此看出中国甜柿间的差异较日本甜柿间大。

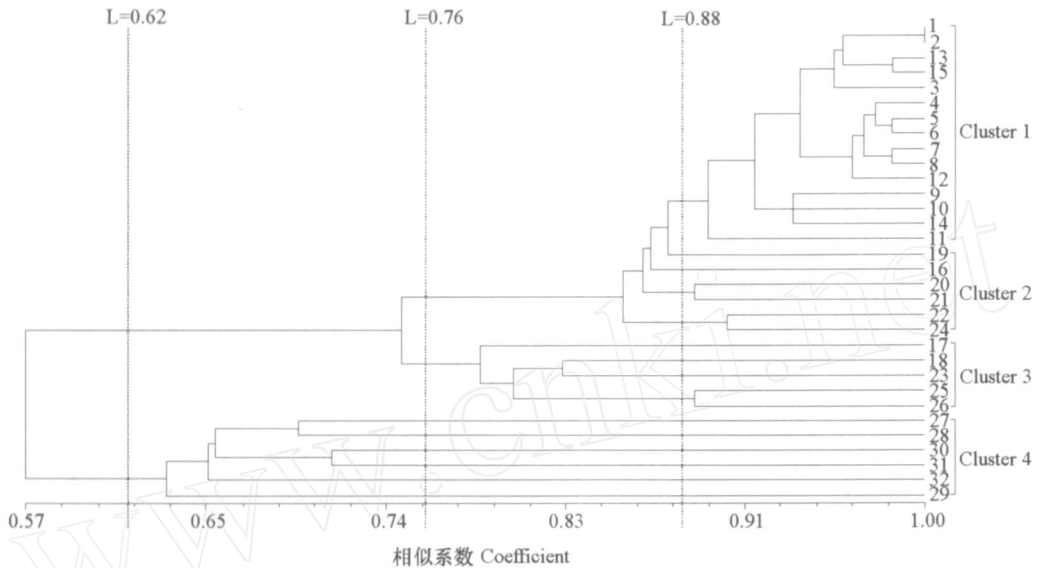


图 2 试验材料的 ISTR分析的 UPGMA聚类图

Fig. 2 Dendrogram of 32 genotypes from the UPGMA cluster analysis based on ISTR data

以  $L = 0.62$  为界可将供试 32份基因型分为两组, 柿属近缘种单独成组 (Cluster 4), 所有供试栽培柿 (*D. kaki* Thunb.) 聚为一组。

柿组内若以  $L = 0.76$  为界可细分为两个亚组, ‘台湾正柿’、‘沙谷 1号’、‘宝盖甜柿’、‘磨盘柿’和‘鄂柿 1号’聚为 Cluster 3, 其它柿种质聚为另一亚组。

以  $L = 0.88$  为界, 栽培柿组的 26份基因型则可分为 3组: 日本原产柿种质 (Cluster 1)、中国原产柿种质 (Cluster 2和 Cluster 3); 在 Cluster 1中, ‘富有’、‘松本早生’ (‘富有’芽变) 和‘上西早生’ (‘松本早生’芽变) 较先相聚, 表明它们较近的亲缘关系, 其中‘富有’和‘松本早生’未被区分, ‘上西早生’与其芽变母本‘松本早生’表现相对较大的遗传差异; ‘阳丰’ (富有次郎) 与其父本‘次郎’相聚, ‘骏河’ (花御所晚御所) 与其母本‘花御所’相聚; ‘平核无’为稀有的 9倍体柿品种, 果大且无核, 聚类图上显示与其它日本柿种质的遗传背景差异较大; ‘宝盖甜柿’、‘小宝盖甜柿’和‘磨盘柿’具相似的果实外观, Cluster 2和 Cluster 3中, ‘磨盘柿’和‘宝盖甜柿’聚在一起, 与‘小宝盖甜柿’相距较远, 表明‘宝盖甜柿’与‘小宝盖甜柿’间遗传差异较大。

将 UPGMA 聚类结果转换为协表征矩阵, 对协表征矩阵和相似系数矩阵的相关性进行 Mantel 检验。结果表明, 两种矩阵极显著相关, 相关系数  $r = 0.946$ , 说明聚类结果较好地体现了种质之间的遗传关系。

## 2.3 基于 ISTR数据的主坐标分析

图 3为不同基因型主坐标分布图, 反映的试材间分组及遗传关系与图 2结果相似。由图 3可见, 供试材料分为 3组, Group 1为柿近缘种, Group 2为中国原产柿种质, Group 3为日本原产柿种质。第一和第二主坐标贡献率分别为 34%和 12%。

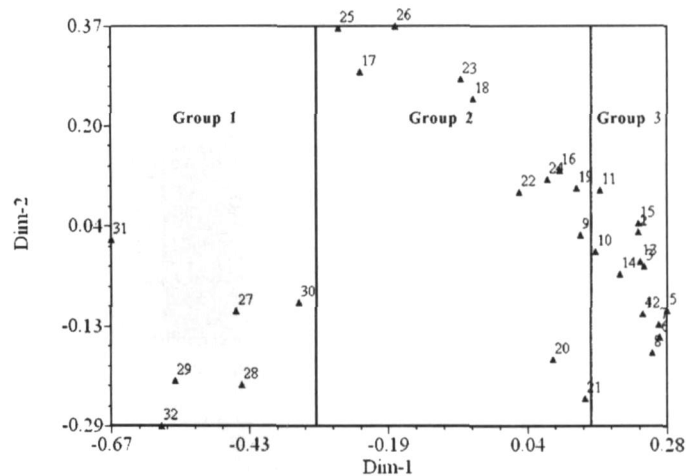


图 3 ISTR主坐标分析散点图

Fig 3 Diagram showing the relationships among 32 genotypes based on principal coordinates analysis by ISTR

### 3 讨论

本研究的目的之一是探讨基于椰子 *Ty1-copia* 逆转座子序列开发的 ISTR 分子标记 (Rohde, 1996; Aga & Bryngelsson, 2006) 在柿属植物中的适用性及其进一步用于研究该属植物种间及种下亲缘关系的可行性。试验结果表明 UPGMA 聚类 and 主坐标分析均将供试种质分为 3 个大的类群, 近缘种与栽培柿聚在不同的组, 栽培柿组内中国原产柿和日本原产柿完全分开, 与其地理起源相符, 同罗正荣等 (1999)、Guo 和 Luo (2006)、Guo 等 (2006)、Hu 和 Luo (2006) 等的研究结果一致; 中国原产的‘罗田甜柿’、‘磨盘柿’和日本柿聚为不同的组, 并与其亲缘关系较远, 同 Kanzaki 等 (2000) 的 AFLP 分析结果一致; 几个已知亲缘关系的芽变和杂交品种都能各自很好地聚在一起, 与实际吻合; Choi 等 (2003)、Guo 等 (2006) 的研究结果表明栽培柿和君迁子的亲缘关系较近, Nakamura 等 (1994)、Yonemori 等 (1998) 的研究表明老鸦柿和美洲柿是与栽培柿亲缘关系最远的种, Nakatsuka 等 (2002) 通过 *Ty1-copia* 逆转座子 Southern 杂交结果认为美洲柿与柿遗传上差异显著, 本研究结果佐证了上述结果。因此, 从本试验对部分已知亲缘关系试材间遗传关系的分析结果与已知亲缘关系对比, 以及同前人已有研究相互印证情况来看, ISTR 能够很好地应用于柿属种质的遗传关系研究。

本试验 ISTR 揭示的种质间多态带百分率为 85.71%, 与柿属植物中已发表的其它标记相比, 其多态性水平低于线粒体非编码区扩增 (92.44%, Hu & Luo, 2006), 近似于 RAP 和 REMAP (86.32%, Guo et al, 2006), 强于 SRAP (80.88%, Guo & Luo, 2006)。此外, 因使用通用引物, 故较以物种特异性引物开发为前提的 RAP 和 REMAP 等 (Kalendar et al, 1999) 逆转座子标记的引物成本低, 因此 ISTR 可能为今后开展柿属植物种质资源研究较经济和便捷的标记类型。

ISTR 产物可使用高浓度的琼脂糖凝胶和 PAGE 凝胶两种电泳方式进行检测, 目前报道多采用后者。本研究应用琼脂糖凝胶电泳检测手段获得较好结果, 甚至可区分芽变, 表明琼脂糖凝胶电泳检测 ISTR 产物可行, 利于简化 ISTR 操作流程, 提高试验效率。PAGE 胶电泳检测手段繁琐, 但具分辨率高等优点。因此, 今后对 ISTR 产物检测方式的选择还需依具体试验目的、分离片段大小、所具备的试验条件和试材遗传背景而定。

‘宝盖甜柿’、‘小宝盖甜柿’和‘鄂柿 1 号’果实个大, 种子数少, 色泽和口感均优; ‘四方甜柿’和‘小果甜柿’抗性极强, 这些试材均属继‘罗田甜柿’后新发现的稀有的中国原产完全甜柿

新类型,但目前尚未用于育种实践。前人以‘罗田甜柿’为试材研究表明中国完全甜柿与日本完全甜柿可能具有不同的甜涩性状遗传规律,日本完全甜柿间杂交选育新品种目前已面临严重的近交退化问题,而以‘罗田甜柿’作杂交亲本有望提高完全甜柿品种选育效率和增强杂种优势 (Kanzaki et al, 2000; Ikegami et al, 2004)。本试验中从 DNA 水平检测到中国原产甜柿间相似指数的变化范围及平均相似指数均大于日本原产完全甜柿,表明中国甜柿可能更具丰富的遗传多样性,新发现的这些中国完全甜柿新类型系具有潜在完全甜柿育种价值的甜柿资源。

## References

- Aga E, Bryngelsson T. 2006. Inverse sequence-tagged repeat (ISTR) analysis of genetic variability in forest coffee (*Coffea arabica* L.) from Ethiopia. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53: 721 - 728.
- Castiglioni P, Pozzi C, Heun M, Terzi V, Moller KJ, Rohde W, Salamini F. 1998. An AFLP-based procedure for the efficient mapping of mutations and DNA probes in barley. *Genetics*, 149: 2039 - 2056.
- Choi Y A, Tao R, Yonemori K, Sugiura A. 2003. Physical mapping of 45S rDNA by fluorescent in situ hybridization in persimmon (*Diospyros kaki*) and its wild relatives. *J Hort Sci Biotech*, 78: 265 - 271.
- Demey J R, Gamez E, Molina S, Inafante D. 2004. Comparative study of the discriminating capacity of AFLP and ISTR markers for genetic analysis of *Agave fourcroydes*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22: 29 - 35.
- Doyle J J, Doyle J L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11 - 15.
- Guo D L, Luo Z R. 2006. Genetic relationships of some PCNA persimmons (*Diospyros kaki* Thunb.) from China and Japan revealed by SRAP analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53: 1597 - 1603.
- Guo D L, Zhang H Q, Luo Z R. 2006. Genetic relationships of *Diospyros kaki* Thunb. and related species revealed by RAP and REMAP analysis. *Plant Science*, 170: 528 - 533.
- Herrán A, Estioko L, Becker D, Rodríguez M J B, Rohde W, Ritter E. 2000. Linkage mapping and QTL analysis in coconut (*Cocos nucifera* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 292 - 300.
- Hu D C, Luo Z R. 2006. Polymorphisms of amplified mitochondrial DNA non-coding regions in *Diospyros* spp. *Scientia Horticulturae*, 109: 275 - 281.
- Ikegami A, Yonemori K, Sugiura A, Sato A, Yamada M. 2004. Segregation of astringency in F<sub>1</sub> progenies derived from crosses between pollination-constant nonastringent persimmon cultivars. *HortScience*, 39: 371 - 374.
- Kalendar R, Gröb T, Regina M, Suoniemi A, Schuman A. 1999. RAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 704 - 711.
- Kanzaki S, Yonemori K, Sato A, Yamada M, Sugiura A. 2000. Analysis of the genetic relationships among pollination-constant and non-astringent (PCNA) cultivars of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) from Japan and China using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 69: 665 - 670.
- Luo Zheng-rong, Li Fa-fang, Cai Li-hong. 1999. Molecular systematics of China native nonastringent persimmon based on random amplified polymorphic DNA. *Acta Horticulturae Sinica*, 26: 297 - 301. (in Chinese)
- 罗正荣, 李发芳, 蔡礼鸿. 1999. 部分中国原产甜柿种质的分子系统学研究. *园艺学报*, 26: 297 - 301.
- Nakamura Y, Kobayashi S. 1994. DNA restriction fragment length variability in *Diospyros kaki* and related *Diospyros* species. *HortScience*, 29: 809 - 811.
- Nakatsuka A, Iwami N, Matsumoto S, Itamura H, Yamagishi M. 2002. Tyl-copia group retrotransposons in persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). *Genes and Genetic Systems*, 77: 131 - 136.
- Rohde W. 1996. Inverse sequence-tagged repeat (ISTR) analysis, a novel and universal PCR-based technique for genome analysis in the plant and animal kingdom. *Journal of Genetic and Breeding*, 50: 249 - 261.
- Rohlf F J. 2000. NTSYS-PC, numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.10e. Exeter Software, Setauket, New York, USA.
- Sensi E, Vignani R, Rohde W, Bricolli S. 1996. Characterization of genetic biodiversity within *Vitis vinifera* L. Sangiovese and Colorino genotypes by AFLP and ISTR-DNA marker technology. *Vitis*, 35: 183 - 188.
- Tao N G, Wei J, Liu Y Z, Cheng Y J, Deng X X. 2006. Copia-like retrotransposons in a precocious mutant of trifoliolate orange [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 81 (6): 1038 - 1042.
- Yonemori K, Kanzaki S, Parfitt D E, Utsunomiya N, Subhadrabandhu S, Sugiura A. 1998. Phylogenetic relationship of *Diospyros kaki* (persimmon) to *Diospyros* spp. (Ebenaceae) of Thailand and four temperate zone *Diospyros* spp. from an analysis of RFLP variation in amplified cpDNA. *Genome*, 41: 173 - 182.