

# 澳洲坚果SCoT反应体系的建立及应用

蔡元保<sup>1</sup>, 杨祥燕<sup>1\*</sup>, 陈显国<sup>1</sup>, 曾黎明<sup>1</sup>, 郭凌飞<sup>2</sup>, 林玉虹<sup>1</sup>, 崔明勇<sup>1</sup>

(1. 广西亚热带作物研究所, 南宁 530001; 2. 厦门市农业机械监理所, 福建 厦门 361009)

**摘要:** 为建立澳洲坚果(*Macadamia* spp.)的 SCoT 最适反应体系,用单因素设计方法对影响 SCoT-PCR 反应体系的主要影响因素进行了优化筛选,并构建了澳洲坚果种质的指纹图谱。结果表明,澳洲坚果的 SCoT 最适反应体系为:反应体系总体积为 20  $\mu\text{L}$ , 包含 2.5  $\text{mmol L}^{-1}$   $\text{Mg}^{2+}$ , 0.3  $\text{mmol L}^{-1}$  dNTPs, 0.8  $\mu\text{mol L}^{-1}$  引物, 40  $\text{mg L}^{-1}$  模板 DNA 和 1.0 U *Taq* DNA 聚合酶。最适退火温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ 。该反应体系对澳洲坚果种质具有良好的稳定性、可靠性和较高的分辨率。选用多态性良好的单引物 SC5 和引物组合 SC34 + SC39, 可以将 12 份澳洲坚果种质完全区分开, 每份种质都各有独特的指纹图谱, 置信概率达到 99.988%。构建的 SCoT 反应体系可为澳洲坚果种质鉴定和遗传多样性分析等提供技术支持。

**关键词:** 澳洲坚果; SCoT; 单因素试验; 体系优化; DNA 指纹图谱

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2013.03.011

## Establishment and Application of SCoT Amplification System for *Macadamia*

CAI Yuan-bao<sup>1</sup>, YANG Xiang-yan<sup>1\*</sup>, CHEN Xian-guo<sup>1</sup>, ZENG Li-ming<sup>1</sup>, GUO Ling-fei<sup>2</sup>, LIN Yu-hong<sup>1</sup>, CUI Ming-yong<sup>1</sup>

(1. *Guangxi Subtropical Crops Research Institute*, Nanning 530001, China; 2. *Xiamen Supervision Department of Agricultural Machinery*, Xiamen 361009, China)

**Abstract:** SCoT-PCR amplification system of macadamia (*Macadamia* spp.) was optimized and established by using single factor design, such as  $\text{Mg}^{2+}$ , dNTPs, primer, *Taq* DNA polymerase and DNA template, and DNA fingerprint maps of macadamia germplasms were constructed. The results showed that final volume of optimum reaction system was 20  $\mu\text{L}$ , including 2.5  $\text{mmol L}^{-1}$   $\text{Mg}^{2+}$ , 0.3  $\text{mmol L}^{-1}$  dNTPs, 0.8  $\mu\text{mol L}^{-1}$  primer, 1.0 U *Taq* DNA polymerase, 40  $\text{mg L}^{-1}$  template DNA, and 2  $\mu\text{L}$  10  $\times$  buffer with ddH<sub>2</sub>O water. The suitable annealing temperature of primers was 50 $^{\circ}\text{C}$ . The optimum SCoT-PCR system was shown to be steady and reliable. The 12 germplasms of macadamia could be absolutely identified by primer SC5 and SC34 + SC39 with 99.988% probability of confidence, every germplasm of macadamia had a unique fingerprint map. It showed that the optimum SCoT-PCR system could be applied effectively in germplasm identification and genetic diversity analysis of macadamia.

**Key words:** Macadamia; SCoT; Single factor experiment; System optimization; DNA fingerprint map

澳洲坚果又称夏威夷果,原产于亚热带雨林,是山龙眼科(Proteaceae)澳洲坚果属(*Macadamia* F. Muell.)常绿乔木果树。澳洲坚果种仁营养价值

高,风味独特,享有“干果皇后”的美誉,深受广大消费者的喜爱。目前,国外在分子水平上已成功应用同工酶技术<sup>[1-2]</sup>、RAPD<sup>[3]</sup>、SSR<sup>[3]</sup>、AFLP<sup>[4]</sup>、

收稿日期: 2012-02-27

接受日期: 2012-04-27

基金项目: 广西直属公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(桂热研 201102)资助

作者简介: 蔡元保,男,硕士,助理研究员,从事植物生理与分子生物学研究。E-mail: caiyuanbao205@163.com

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: yangxiangyan84412@126.com

RAMiFi<sup>[5]</sup>和RAF<sup>[6]</sup>等分子标记对澳洲坚果种质资源进行种质鉴定、遗传多样性分析和遗传图谱构建;而我国对澳洲坚果的研究大多局限于栽培生理<sup>[7-9]</sup>和遗传多样性的分析<sup>[10-11]</sup>,对种质资源的遗传背景缺乏深入研究。

目标起始密码子多态性分子标记(Start codon targeted polymorphism, SCoT)是Collard和Mackill<sup>[12]</sup>于2009年在水稻(*Oryza sativa*)上提出的一种基于单引物扩增反应的新型分子标记。该标记具有操作简单、成本低廉、多态性高、引物通用、可获得丰富的遗传信息等优点,已成功应用于园艺植物遗传多样性研究中,如芒果(*Mangifera indica*)<sup>[13]</sup>、龙眼(*Dimocarpus longgana*)<sup>[14]</sup>、柑橘(*Citrus reticulata*)<sup>[15]</sup>等。与传统的分子标记相比,SCoT标记具有物种间引物通用,能有效产生与性状连锁的标记,方便分子标记辅助育种等独特优点,是一种能跟踪性状的新型分子标记。由于澳洲坚果多数品种存在部分或完全的自交不亲和现象<sup>[16-17]</sup>,品种随意搭配种植和杂交亲本选择不合理会影响到澳洲坚果产量和育种进程。因此,深入研究澳洲坚果种质资源的遗传背景对其产业的可持续发展具有重要意义。采用SCoT标记将有利于澳洲坚果的分子辅助育种和种质鉴定,但目前还未见该标记应用于澳洲坚果的报道。本研究采用单因素试验方法优化和构建了澳洲坚果的最适SCoT-PCR反应体系,并首次构建了12份澳洲坚果种质的指纹图谱,为澳洲坚果种质资源的遗传多样性评价、种质鉴定以及分子标记辅助选择育种等研究提供有益的科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

12份原产于澳大利亚的澳洲坚果(*Macadamia* spp.)种质均取自广西亚热带作物研究所澳洲坚果种质资源圃,除了T<sub>2</sub>种质属于澳洲坚果粗壳种(*Macadamia tetraphylla*)外,其余11份种质都属于澳洲坚果光壳种(*Macadamia integrifolia*),分别是Reown(D<sub>4</sub>)、HY、Hinde(H<sub>2</sub>)、Own Choice(O.C.)、DND、D. Bown、NG-18、Ronik、Own-rentun、HAES114和HAES842。其中HAES842种质用于SCoT-PCR反应体系的优化。供试材料均选取健康植株上的无病虫害幼嫩叶片,液氮速冻后于-70℃保存。

### 1.2 总DNA的提取

采用CTAB法提取澳洲坚果基因组DNA,用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测其质量;用Biophotometre型核酸蛋白仪检测其浓度,稀释至20 mg L<sup>-1</sup>,置于-20℃保存备用。

### 1.3 SCoT-PCR扩增

SCoT引物SC1~SC60参考Collard和Mackill<sup>[12]</sup>的方法,由上海生工合成。PCR扩增程序为:94℃预变性5 min;94℃变性1 min,50℃复性1 min,72℃延伸90 s,共35个循环;最后72℃延伸10 min。扩增反应结束后,加入3 μL 6×Loading buffer,取8~10 μL扩增产物在1.8%琼脂糖凝胶中电泳,于凝胶成像系统上检测并拍照。

### 1.4 单因素优化设计和退火温度筛选

以澳洲坚果HAES842种质DNA为模板,以SC3为扩增引物,将Mg<sup>2+</sup>、dNTPs、引物、DNA模板、Taq DNA聚合酶等5种影响因素各设置5个水平(表1),采用单因素试验对澳洲坚果SCoT-PCR反应体系进行优化,当进行某一因素水平试验时,其它因素固定在第3个水平,从而筛选出每一因素的最佳浓度,最后组合成为最佳反应体系。dNTPs和Taq聚合酶均购自天根生化科技(北京)有限公司。每个处理重复2次,反应体系总体积为20 μL,每个处理的10×buffer用量均为2 μL,用ddH<sub>2</sub>O补足到终体积为20 μL。

以SC3为扩增引物,根据单因素试验结果筛选的最佳反应体系对退火温度进行梯度试验,设定6个温度梯度:40℃、43.8℃、50℃、53.9℃、60.1℃和64℃。除退火温度不同外,反应程序与单因素试验相同。

### 1.5 SCoT-PCR优化体系的验证

根据确定的SCoT-PCR最适反应体系和退火温度,选用引物SC5和引物组合SC34+SC39分别对12份澳洲坚果种质进行PCR扩增,以验证该反应体系的稳定性和可靠性。

### 1.6 指纹图谱构建

通过对60条SCoT引物和40个随机引物组合进行筛选,选用其中多态性良好的引物SC5和引物组合SC34+SC39构建12份澳洲坚果种质的

表1 澳洲坚果 SCoT-PCR 反应体系中影响因素的水平设计

Table 1 Different concentrations of factors in SCoT-PCR system for macadamia

因素 Factors	浓度 Concentration				
Mg <sup>2+</sup> (mmol L <sup>-1</sup> )	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
dNTPs (mmol L <sup>-1</sup> )	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
引物 Primer (μmol L <sup>-1</sup> )	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
DNA 模板 Template DNA (mg L <sup>-1</sup> )	10	20	30	40	50
Taq DNA 聚合酶 Taq DNA polymerase (U)	0.25	0.50	1.00	1.50	2.00

指纹图谱。对于 12 份澳洲坚果种质的 SCoT 扩增谱带,只分析清晰可辨的电泳条带。根据 SCoT 图谱中条带的有无,图谱中的每 1 条带均作为 1 个标记。每条引物所有扩增片段按分子量从大到小的顺序排列。全部材料在重复扩增中稳定出现的条带无论强弱均赋值 1,不存在时赋值 0。以不同谱带的组合构建指纹图谱。根据指纹图谱出现的概率公式  $P = 1/2^n$  ( $2$  为等位基因的数目,  $n$  为多态位点数,  $2^n$  则为检测  $n$  个位点涉及的所有可能的试验材料个数),统计图谱的置信概率<sup>[18]</sup>。同时,按照 Botstein 公式计算引物的多态信息含量  $PIC = 1 - \sum P_i^2$ ,式中  $P_i$  表示第  $i$  种基因型出现的频率<sup>[19]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 SCoT-PCR 优化体系的确立

选取澳洲坚果 HAES842 品种 DNA 为模板,

以 SC3 为扩增引物,6 个 SCoT-PCR 影响因子的单因素试验结果见图 1。

Mg<sup>2+</sup> 浓度对扩增效果的影响明显。当 Mg<sup>2+</sup> 浓度小于 2.0 mmol L<sup>-1</sup> 时,基本上无扩增谱带;当 Mg<sup>2+</sup> 浓度为 2.5 mmol L<sup>-1</sup> 时,其扩增谱带最明亮、清晰、数目最多;而 Mg<sup>2+</sup> 浓度为 3.0 mmol L<sup>-1</sup> 时,扩增谱带减少,且条带模糊。因此,用 2.5 mmol L<sup>-1</sup> 作为 Mg<sup>2+</sup> 最适浓度。

随着 dNTPs 浓度的升高,扩增谱带的数量及亮度呈上升趋势。当 dNTPs 浓度为 0.3 mmol L<sup>-1</sup> 时,扩增谱带最明亮、清晰、数目最多;之后随着浓度的增加扩增谱带减少。因此,选择 0.3 mmol L<sup>-1</sup> 为最适浓度。

随着引物浓度的增加,扩增谱带的数量及亮度逐渐增加。当引物浓度为 0.8 μmol L<sup>-1</sup> 时,其扩增效果最佳,谱带最明亮、清晰、数目最多。因此,选择 0.8 μmol L<sup>-1</sup> 为最适浓度。

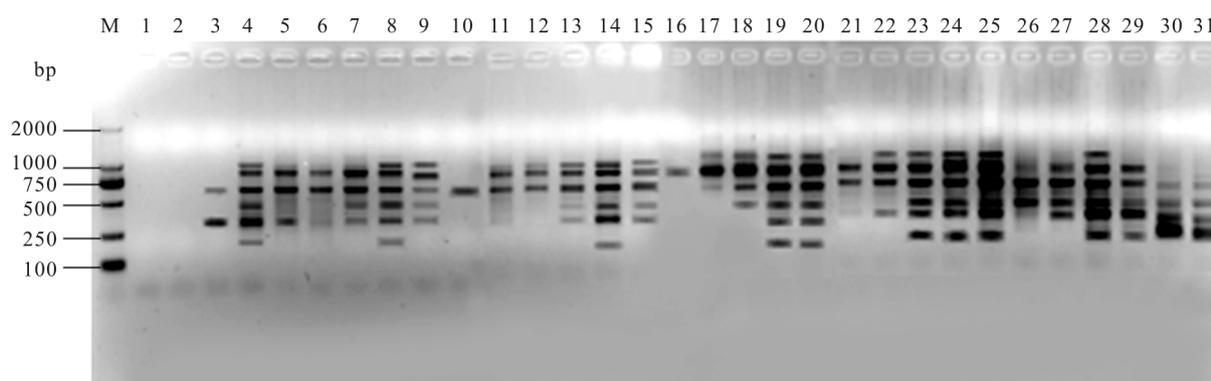


图 1 Mg<sup>2+</sup>、dNTPs、引物、模板 DNA、Taq DNA 聚合酶浓度和退火温度对 SCoT 反应的影响。M: DNA marker, DL 2000; 1 ~ 5: 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup>; 6 ~ 10: 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mmol L<sup>-1</sup> dNTPs; 11 ~ 15: 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 μmol L<sup>-1</sup> 引物; 16 ~ 20: 10、20、30、40、50 mg L<sup>-1</sup> 模板 DNA; 21 ~ 25: 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 U Taq DNA 聚合酶; 26 ~ 31: 退火温度为 40°C、43.8°C、50°C、53.9°C、60.1°C、64°C。

Fig. 1 Effects of six factors on SCoT reaction. M: DNA marker, DL 2000; 1 – 5: 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mmol L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup>; 6 – 10: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mmol L<sup>-1</sup> dNTPs; 11 – 15: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 μmol L<sup>-1</sup> primer; 16 – 20: 10, 20, 30, 40, 50 mg L<sup>-1</sup> template DNA; 21 – 25: 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 U Taq DNA polymerase; 26 – 31: Annealing temperature at 40°C, 43.8°C, 50°C, 53.9°C, 60.1°C, 64°C, respectively.

随着模板 DNA 浓度的增加,扩增谱带的数量及亮度逐渐增加。当模板 DNA 浓度为  $40 \text{ mg L}^{-1}$  时,扩增谱带最明亮、清晰、数目最多;之后浓度提高扩增效果无明显差异。本着经济高效的原则,选择  $40 \text{ mg L}^{-1}$  为模板 DNA 最适浓度。

随着 *Taq* DNA 聚合酶用量的增加,谱带的亮度和数量增加,同时也逐渐出现模糊拖影现象。*Taq* DNA 聚合酶用量在  $1.0 \sim 2.0 \text{ U}$  时扩增效果较好,但用量在  $1.0 \text{ U}$  时的条带较明亮清晰,无模糊拖影现象,故选取  $1.0 \text{ U}$  为最适 *Taq* DNA 聚合酶浓度。

随着退火温度的增加,谱带数量也增加。当退火温度为  $50^\circ\text{C}$  时的谱带最多且清晰,此后随着退火温度的升高特异性增强,谱带逐渐减少。因此,确定引物 SC3 的最佳退火温度为  $50^\circ\text{C}$ 。用随机选择的 30 条引物以退火温度为  $50^\circ\text{C}$  进行扩增,证明  $50^\circ\text{C}$  可以作为澳洲坚果 SCoT 标记的统一退火温度。

因此,澳洲坚果总 DNA 的 SCoT-PCR 反应体系确定为:体系总体积为  $20 \mu\text{L}$ , 包含  $2.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$ ,  $0.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ dNTPs}$ ,  $0.8 \mu\text{mol L}^{-1}$  引物,  $40 \text{ mg L}^{-1}$  模板 DNA 和  $1.0 \text{ U}$  *Taq* DNA 聚合酶, 最适退火温度为  $50^\circ\text{C}$ 。

## 2.2 SCoT-PCR 优化体系的验证

根据确立的优化条件,选用引物 SC5 和引物组合 SC34 + SC39 分别对参试的 12 份澳洲坚果种质进行扩增,以验证该体系的稳定性和可靠性。由图 2 可见,该反应体系对不同澳洲坚果种质的扩增效果良好,扩增条带清晰,分辨率较高,多态性好。说

明所确立的优化体系具有良好的稳定性、可靠性和较高的分辨率,适用于澳洲坚果的 SCoT 分析。

## 2.3 指纹图谱构建与置信概率分析

采用优化的反应体系对引物进行了筛选,结果表明,引物 SC5 和引物组合 SC34 + SC39 都能扩增出 11 条带;多态性的条带分别有 8 条和 6 条,多态性比率分别高达 72.73% 和 54.55%;多态性信息含量 *PIC* 分别为 0.66 和 0.68。*PIC* 能反映出某一个遗传标记所包含的或所能够提供的遗传信息的容量,当  $PIC > 0.5$  时,该座位为高度多态性座位<sup>[20]</sup>。因此,引物 SC5 和引物组合 SC34 + SC39 属于高度多态性引物。

根据最小差异原则兼顾鉴别种质指纹图谱的置信概率,选用多态性良好的引物 SC5 和引物组合 SC34 + SC39 进行扩增(图 2)。结果表明,它们可将参试的 12 份种质全部区分开,将代表等位基因位点有无的 1 和 0 按顺序组成数字指纹(表 2)。这 2 组引物的多态性位点数为 14,根据概率公式  $P = 1/2^n$  可知,在  $2^{14} = 16384$  份澳洲坚果种质中才有可能存在 2 份种质的电泳图谱完全相同,置信概率达到 99.988%,该指纹图谱可准确检测其中任何一份种质。

## 3 讨论

SCoT 标记作为一种基于 PCR 技术的新型分子标记,具有独特的优点,能有效地产生与性状连锁的标记,方便分子标记辅助育种<sup>[12]</sup>。但由于其

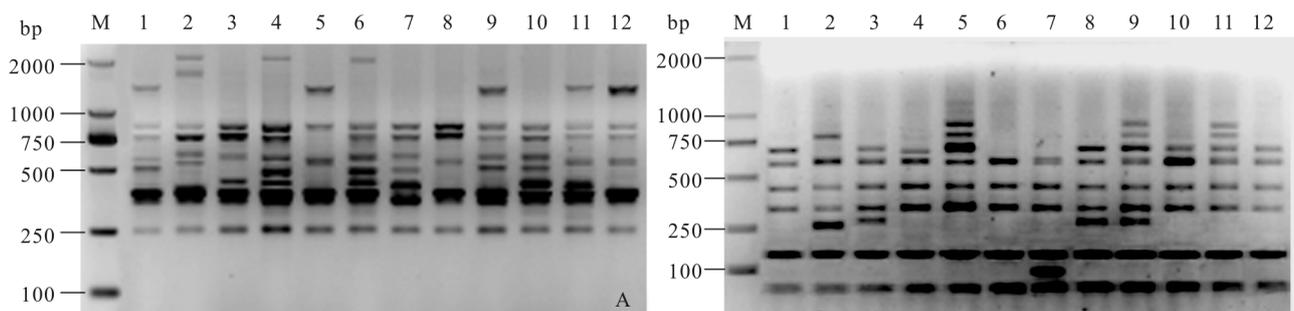


图 2 引物 SC5 (A) 和引物组合 SC34 + SC39 (B) 对 12 份澳洲坚果种质的 SCoT-PCR 扩增。M: DNA marker, DL 2000; 1 ~ 12 分别为 Reown ( $D_4$ )、HY、Hinde ( $H_2$ )、Own Choice (O.C.)、 $T_2$ 、DND、D. Bown、NG-18、Ronik、Own-rentun、HAES114 和 HAES842。

Fig. 2 SCoT-PCR amplification of 12 macadamia germplasm by primer SC5 (A) and primer combination SC34 + SC39 (B). M: DNA marker, DL 2000; 1 - 12 present Reown ( $D_4$ ), HY, Hinde ( $H_2$ ), Own Choice (O.C.),  $T_2$ , DND, D. Bown, NG-18, Ronik, Own-rentun, HAES114 and HAES842, respectively.

表2 澳洲坚果 12 份种质的 DNA 数字指纹图谱(SC5, SC34 + SC39)

Table 2 DNA fingerprint binary codes of the twelve macadamia varieties (SC5, SC34 + SC39)

编号 No.	材料 Material	数字指纹图谱 Digital DNA fingerprint	编号 No.	材料 Material	数字指纹图谱 Digital DNA fingerprint
1	D <sub>4</sub>	00110110 - 001000	7	D. Bown	00011011 - 000001
2	HY	11011100 - 010010	8	NG-18	00010100 - 001100
3	H <sub>2</sub>	00011001 - 001100	9	Ronik	00111010 - 111100
4	O.C.	10011011 - 001000	10	Own-rentun	00011011 - 001000
5	T <sub>2</sub>	00100100 - 111000	11	HAES114	00110101 - 111000
6	DND	10011011 - 000000	12	HAES842	00110100 - 001000

PCR 扩增结果受材料、反应体系等因素的影响很大,有必要针对不同的试材和 SCoT-PCR 反应体系进行优化。本研究用单因素设计方法进行了不同影响因子的梯度试验,结果表明扩增结果在一定范围内受引物、模板 DNA 和 *Taq* DNA 聚合酶用量的影响不大,但  $Mg^{2+}$  和退火温度对 SCoT-PCR 扩增的特异性和产量有显著的影响。这些结果与已有的 SCoT-PCR 反应条件研究结果一致<sup>[21-23]</sup>,但是不同物种对其各个影响因素的浓度要求不同。因此,将 SCoT 标记应用于特定物种时,应对各主要影响因素和反应程序进行优化,从而保证该标记反应体系的稳定性和可靠性。对 12 份澳洲坚果种质的 SCoT-PCR 扩增结果表明,所确立的优化体系具有良好的稳定性、可靠性和较高的分辨率,说明 SCoT 标记可适合于澳洲坚果种质鉴定、遗传多样性分析和优良性状标记等方面的应用。

利用分子标记技术获得品种的指纹图谱是目前品种鉴定技术的主要手段。用于构建品种指纹图谱的 DNA 分子标记应具有多态性高、重复性和稳定性好、带型清晰、操作简单、成本低等特点。SCoT 标记具有这些优点,可用于澳洲坚果品种指纹图谱构建,使每个品种获得唯一的指纹身份证,从而可简单地判别某一个品种。在实际应用中,随着澳洲坚果品种的不断增多,可能会出现相同引物在不同品种之间谱带相同的现象。因此,本研究在 SCoT 单引物筛选基础上,筛选出多态性良好的引物组合,以进一步区别不同澳洲坚果品种。经筛选的单引物 SC5 和引物组合 SC34 + SC39 具有良好的多态性, *PIC* 分别高达 0.66 和 0.68,可以将 12 份澳洲坚果种质完全区分开,每份种质都有各自独特的数字指纹,置信概率达到

99.988%,可用于品种真伪鉴定、新品种登记以及品种权益维护。因此,澳洲坚果 DNA 指纹图谱可成为一种应用生物学技术保护澳洲坚果品种产权的重要方法。

#### 参考文献

- [1] Vithanage V, Winks C W. Isozymes as genetic markers for *Macadamia* [J]. *Sci Hort*, 1992, 49(1/2): 103-115.
- [2] Aradhya M K, Yee L K, Zee F T, et al. Genetic variability in *Macadamia* [J]. *Genet Resour Crop Evol*, 1998, 45(1): 19-32.
- [3] Vithanage V, Hardner C, Anderson K L, et al. Progress made with molecular markers for genetic improvement of *Macadamia* [J]. *Acta Hort*, 1998, 461(8): 199-208.
- [4] Steiger D L, Moore P H, Zee F, et al. Genetic relationships of *Macadamia* cultivars and species revealed by AFLP markers [J]. *Euphytica*, 2003, 132(3): 269-277.
- [5] Peace C P, Vithanage V, Neal J, et al. A comparison of molecular markers for genetic analysis of *Macadamia* [J]. *J Hort Sci Biotechn*, 2004, 79(6): 965-970.
- [6] Peace C P, Allan P, Vithanage V, et al. Genetic relationships among *Macadamia* varieties grown in south Africa as assessed by RAF markers [J]. *S Afr J Plant Soil*, 2005, 22(2): 71-75.
- [7] Yue H, Chen L L, Tao L, et al. Physiologically adaptive responses of macadamia seedlings to water deficit stress and natural rewatering [J]. *Chin J Trop Crops*, 2008, 29(2): 141-144.  
岳海, 陈丽兰, 陶丽, 等. 澳洲坚果幼苗对缺水胁迫及复水的适应性反应 [J]. *热带作物学报*, 2008, 29(2): 141-144.
- [8] Yue H, Li G H, Li G W, et al. Studies on cold resistance of different macadamia cultivars [J]. *Acta Hort Sin*, 2010, 37(1): 31-38.  
岳海, 李国华, 李国伟, 等. 澳洲坚果不同品种耐寒特性的研究 [J]. *园艺学报*, 2010, 37(1): 31-38.
- [9] Ni S B, He X Y, Gong L D, et al. Comprehensive evaluation of drought resistance of different macadamia varieties [J]. *Chin Agri*

- Sci Bull, 2011, 27(13): 8–13.  
倪书邦, 贺熙勇, 宫丽丹, 等. 不同澳洲坚果品种抗旱性的综合评价 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(13): 8–13.
- [10] He X Y, Ni S B, Chen G Y, et al. Morphological characteristics analysis on genetic diversity of macadamia (*Macadamia* spp.) germplasm resources [J]. Chin Agri Sci Bull, 2010, 26(3): 206–215.  
贺熙勇, 倪书邦, 陈国云, 等. 澳洲坚果种质资源形态性状的遗传多样性分析 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(3): 206–215.
- [11] Guo L F, Zou M H, Du L Q, et al. Analysis on genetic relations of macadamia by ISSR markers [J]. Acta Hort Sin, 2011, 38(9): 1741–1746.  
郭凌飞, 邹明宏, 杜丽清, 等. 利用ISSR分析澳洲坚果的亲缘关系 [J]. 园艺学报, 2011, 38(9): 1741–1746.
- [12] Collard B C Y, Mackill D J. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: A simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plant [J]. Plant Mol Biol Rep, 2009, 27(1): 86–93.
- [13] Luo C, He X H, Chen H, et al. Analysis of diversity and relationships among mango cultivars using start codon targeted (SCoT) markers [J]. Biochem Syst Ecol, 2010, 38(6): 1176–1184.
- [14] Chen H, He X H, Luo C, et al. Analysis on the genetic diversity of 24 longan (*Dimocarpus longan*) accessions by SCoT markers [J]. Acta Hort Sin, 2010, 37(10): 1651–1654.  
陈虎, 何新华, 罗聪, 等. 龙眼24个品种的SCoT遗传多样性分析 [J]. 园艺学报, 2010, 37(10): 1651–1654.
- [15] Han G H, Xiang S Q, Wang W X, et al. Establishment and application of SCoT molecular marker system for *Citrus* [J]. Acta Hort Sin, 2011, 38(7): 1243–1250.  
韩国辉, 向素琼, 汪卫星, 等. 柑橘SCoT分子标记技术体系的建立及其在遗传分析中的应用 [J]. 园艺学报, 2011, 38(7): 1243–1250.
- [16] Sedgley M. Pollen tube growth in *Macadamia* [J]. Sci Hort, 1983, 18(4): 333–341.
- [17] Sedgley M, Blesing M A, Vithanage H I M V. A developmental study of the structure and pollen receptivity of the macadamia pistil in relation to protandry and self-incompatibility [J]. Bot Gaz, 1985, 146(1): 6–14.
- [18] Wu Y S, Yang W P, Zheng Y L. Establishment of fingerprinting for three hybrids and their parents of *Zea mays* by SSR markers [J]. Acta Agron Sin, 2003, 29(4): 496–500.  
吴渝生, 杨文鹏, 郑用琰. 3个玉米杂交种和亲本SSR指纹图谱的构建 [J]. 作物学报, 2003, 29(4): 496–500.
- [19] Anderson J A, Churchill G A, Autrique J E, et al. Optimizing parental selection for genetic linkage maps [J]. Genome, 1993, 36(1): 181–186.
- [20] Vanhala T, Tuiskula-Haavisto M, Elo K, et al. Evaluation of genetic variability and genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers [J]. Poultry Sci, 1998, 77(6): 783–790.
- [21] Chen H, He X H, Luo C, et al. The optimization of SCoT-PCR system of longan (*Dimocarpus longan*) [J]. Genom Appl Biol, 2009, 28(5): 970–974.  
陈虎, 何新华, 罗聪, 等. 龙眼SCoT-PCR反应体系的优化 [J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(5): 970–974.
- [22] Zhang J Y, Guo D L, Gong Y, et al. Optimization of start codon targeted polymorphism PCR (SCoT-PCR) system in *Vitis vinifera* [J]. J Fruit Sci, 2011, 28(2): 209–214.  
张君玉, 郭大龙, 龚莹, 等. 葡萄目标起始密码子多态性反应体系的优化 [J]. 果树学报, 2011, 28(2): 209–214.
- [23] Han G H, Wang W X, Xiang S Q, et al. Establishment and optimization of SCoT system in polyploidy loquats [J]. J Fruit Sci, 2011, 28(3): 433–437.  
韩国辉, 汪卫星, 向素琼, 等. 多倍体枇杷SCoT分析体系的建立与优化 [J]. 果树学报, 2011, 28(3): 433–437.