

猕猴桃 EPIC 标记开发及其在猕猴桃属植物系统发育分析中的应用

刘磊^{1,2}, 姚小洪¹, 黄宏文^{3,*}

(¹中国科学院武汉植物园, 中国科学院种质创新与特色农业重点实验室, 武汉 430074; ²中国科学院大学, 北京 100049; ³中国科学院华南植物园, 中国科学院植物资源保护及可持续利用重点实验室, 广州 510650)

摘要: 采用生物信息学方法通过比较 ESTs 数据和基因组数据开发了猕猴桃的双亲遗传单拷贝的 EPIC 标记以用于猕猴桃属植物系统发育研究。通过比较中华猕猴桃 (*Actinidia chinensis*) 和美味猕猴桃 (*A. deliciosa*) 的 ESTs 数据和葡萄 (*Vitis vinifera*) 基因组数据, 以一致性 85% 为标准共检测到 129 个 EPIC 标记, 并从中设计 96 对引物。其中 21 对 EPIC 引物在中华猕猴桃和美味猕猴桃两个商业化栽培品种中呈现稳定扩增, 核酸多态性 (P_i) 为 0.003 ~ 0.069, 变异位点为 0.7% ~ 14.8%, 简约性信息位点为 0 ~ 9.4%。用其中的 EPIC-1 标记重建中华猕猴桃、美味猕猴桃、毛花猕猴桃 (*A. eriantha*)、绵毛猕猴桃 (*A. fulvicoma* var. *lanata*) 和金花猕猴桃 (*A. chrysantha*) 的系统发育关系, 显示其跨种间扩增的实用性并获得分辨率较高的系统发育树。本研究中开发的 EPIC 标记可以作为通用引物用于猕猴桃属植物系统发育分析。

关键词: 猕猴桃属; EPIC 标记; 跨种扩增; 系统发育

中图分类号: S 663.4

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 06-1162-07

Development of EPIC Markers in *Actinidia* and Their Application for Phylogenetic Analysis of Genus *Actinidia*

LIU Lei^{1,2}, YAO Xiao-hong¹, and HUANG Hong-wen^{3,*}

(¹Key Laboratory of Plant Germplasm Enhancement and Specialty Agriculture, Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China; ²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; ³Key Laboratory of Biodiversity Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: In the present study, a set of biparental and single-copy EPIC markers were developed by blasting ESTs database of *Actinidia chinensis* and *A. deliciosa* and genome database of *Vitis vinifera*. A total of 129 EPIC markers were identified with an average identity $\geq 85\%$ in the flanking exon regions. A total of 96 EPIC primer pairs were designed and tested, of which, 21 successfully amplified the target regions in *A. chinensis* and *A. deliciosa*. The nucleotide diversity (P_i), variable sites, parsimony informative sites varied from 0.003 to 0.069, 0.7% to 14.8%, and 0 to 9.4%, respectively. Phylogeny of five *Actinidia* species using EPIC-1 marker was reconstructed, showing the primers developed here could be successfully amplified in *A. eriantha*, *A. fulvicoma* var. *lanata* and *A. chrysantha*. The results indicated

收稿日期: 2013-02-22; 修回日期: 2013-05-14

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: huanghw@mail.scbg.ac.cn)

that EPIC markers have good cross-species transferability and can be applied to phylogenetic analysis in *Actinidia* as universal primers.

Key words: *Actinidia*; EPIC marker; cross-species amplification; phylogeny

EPIC (exon-primed intron-crossing) 标记是一种基于内含子的分子标记, 即在内含子序列两侧相邻的外显子区域设计引物, 扩增整个内含子区域 (Lessa, 1992; Slade et al., 1993; Palumbi & Baker, 1994), 也称 CATS (comparative anchor tagged sequences) 标记 (Lyons et al., 1997)。内含子多态性主要体现在内含子长度多态性 (intron length polymorphisms, ILPs) (Wang et al., 2006)、SNPs 和插入与缺失 (InDels) 等。目前, 在动植物中已有一些 EPIC 标记开发的研究报告, 如膜翅目小蜂 (chalcidoid Hymenoptera) (Lohse et al., 2011)、蕨类植物 (ferns) (Ishikawa et al., 2002)、后生动物 (metazoans) (Chenuil et al., 2010) 以及菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 和文蛤 (*R. decussatus*) (Cordero et al., 2008) 等。EPIC 标记引物设计于相对保守的外显子区域, 因此具有可转移性 (transferability), 如, Wang 等 (2006) 将水稻 ILP 标记成功应用于单子叶植物 (小麦、大麦、高粱、玉米和竹子) 和双子叶植物棉花中。在开发 EPIC 标记时, 选择在单拷贝保守的外显子 (single-copy conserved exons) 上设计引物, 优点是保证直系同源基因的扩增 (Brito & Edwards, 2009), 避免旁系同源基因的扩增。此外, EPIC 标记还具有特异性、共显性、中性和可靠性等特点。Thomson 等 (2010) 认为 EPIC 标记变异适中, 可以用于种水平的系统发育分析、居群遗传学分析和连锁作图。

猕猴桃属有 54 个种和 21 个变种, 约 75 个分类单位 (Li et al., 2007b)。先前研究表明猕猴桃属物种间存在杂交及渐渗现象 (Li et al., 2002; Chat et al., 2004), 导致猕猴桃属植物的网状演化格局, 且倍性变异十分复杂 (黄宏文, 2009) 和存在古多倍体复制 (ancient genome duplication) 现象 (Shi et al., 2010), 即在猕猴桃属植物进化过程中发生了染色体的整体复制。因此, 猕猴桃属植物系统发育关系十分复杂。对非模式生物猕猴桃属植物而言, 大都采用叶绿体和线粒体通用引物来重建其系统发育关系 (Chat et al., 2004; 李作洲, 2006)。尽管核基因通常缺少通用引物, 且存在区分直系同源基因 (orthologous gene) 和旁系同源基因 (paralogous gene) 问题, 具有局限性。然而采用双亲遗传的核基因能够提供更多的系统发育信息, 更适合用于系统发育树的构建。

本研究目的是运用生物信息学方法在中华猕猴桃和美味猕猴桃中开发一批具有通用性的 EPIC 标记, 并应用于猕猴桃属植物的系统发育分析。以期这种单拷贝、双亲遗传和包含快速进化内含子区域的 EPIC 标记能更好地诠释猕猴桃属植物的系统发育关系。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 2011—2012 年在中国科学院武汉植物园植物保育遗传学重点实验室进行。

采集中国科学院武汉植物园国家猕猴桃种质资源圃中华猕猴桃和美味猕猴桃两个商业化栽培品种 ‘金桃’ 和 ‘秦美’ 各 1 株作为样品, 进行 EPIC 标记引物筛选。在湖南绥宁野外采集中华猕猴桃、美味猕猴桃、绵毛猕猴桃、毛花猕猴桃和金花猕猴桃 5 种猕猴桃的叶片样品, 每种采 3 株。猕猴桃基因组 DNA 提取采取改良的 CTAB 法 (Doyle & Doyle, 1987)。

1.2 引物搜索、筛选及应用

通过比较表达序列标签 (expressed sequence tag, EST) 与基因组序列, 依据基因组中基因内含

子—外显子结构特征推测 ESTs 序列中内含子位置,并在该内含子两侧 ESTs 区域设计引物,扩增内含子 (Li et al., 2010b)。

葡萄基因组数据和中华猕猴桃及美味猕猴桃的 ESTs 数据来源于 NCBI。编写 Perl 脚本 (由 Li Chenghong 提供),以葡萄基因组为参考基因组,中华猕猴桃和美味猕猴桃 ESTs 序列为查询序列。运用生物信息学方法,在葡萄基因组内找出单拷贝基因,所谓单拷贝基因指与基因组内其它任何片段的相似性不大于 50% 的片段 (Li et al., 2007a),并与中华猕猴桃和美味猕猴桃的非冗余 ESTs 比较,依据葡萄基因中内含子位置推测中华猕猴桃和美味猕猴桃 ESTs 序列中内含子的位置,筛选出内含子 $\leq 1\ 000$ bp,平均一致性 $\geq 85\%$ 的 EPIC 标记。具体流程见图 1。

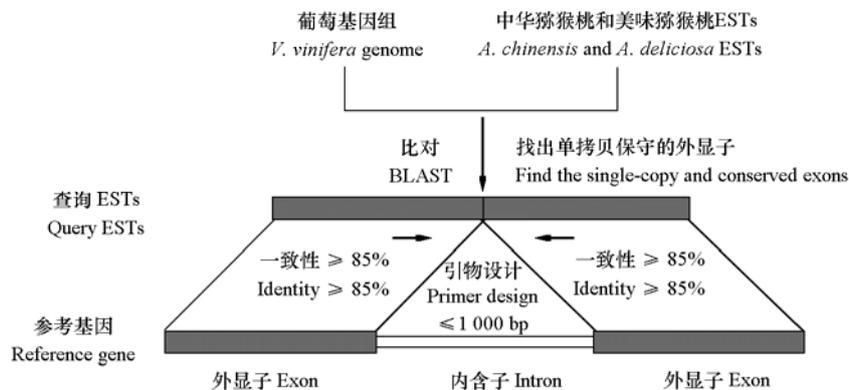


图 1 EPIC 标记引物开发示意图 (参考 Yang et al., 2007)

Fig. 1 The sketch of developing EPIC primers

采用中华猕猴桃和美味猕猴桃两个商业化栽培品种‘金桃’和‘秦美’进行引物筛选。PCR 反应体系在 20 μL 体系中进行,包括 DNA 50 ng,引物各 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, dNTP 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, MgCl_2 1.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, *Taq* 酶 1 U 和 10 \times buffer 2 μL 。反应程序如下:首先 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min;然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,共 34 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min,冷却至 16 $^{\circ}\text{C}$ 。PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (BioTeke) 按照说明书进行纯化。将纯化 DNA 片段与 pMD18-T 载体 (TaKaRa) 连接并转化到大肠杆菌 DH5 α 菌株的感受态细胞 (TaKaRa) 内。每个个体挑取 2 ~ 6 个阳性克隆送到北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

选取 EPIC-1 标记来研究中华猕猴桃、美味猕猴桃、绵毛猕猴桃、毛花猕猴桃和金花猕猴桃间的系统发育关系,以此检测 EPIC 标记用于猕猴桃系统树构建的可行性。5 种猕猴桃各 3 株,共 15 个个体,每个个体挑取 2 ~ 6 个阳性克隆送到北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

1.3 数据分析

所得序列用 BioEdit7.0.9 汉化版软件包进行核对,并做相应的手工调整以保证序列的准确性。采用 ClustalX1.81 (Thompson et al., 1997) 进行序列比对,参数为默认值。比对后的序列采用 DnaSP5.10.01 (Librado & Rozas, 2009) 统计序列的多态性位点 (polymorphic sites) 和 DNA 多态性 (DNA polymorphism),并采用 Modeltest3.7 (Posada & Crandall, 1998) 软件包选择最佳进化模型。采用 MrBaye3-3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) 软件构建贝叶斯树,以随机树为起始树,同时运行 4 个马尔可夫链 (Markov Chain Monte Carlo, MCMC),运行 1 500 000 代,每 100 代抽样 1 次。舍弃老化样本,依据剩余样本构建一致树。

2 结果与分析

2.1 EPIC 引物筛选结果

通过比较中华猕猴桃、美味猕猴桃 ESTs 数据和葡萄基因组数据, 以一致性为 85% 为标准, 共检测到 129 个 EPIC 标记, 其中中华猕猴桃 80 个, 美味猕猴桃 49 个。在内含子两侧保守的 ESTs 序列区域设计引物, 中华猕猴桃 64 对, 美味猕猴桃 32 对, 共设计 96 对 EPIC 引物。从表 1 可以看出,

表 1 猕猴桃 21 个 EPIC 标记的特征信息
Table 1 Characterization of 21 EPIC markers isolated from *Actinidia*

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'-3')	登录号 GenBank accession No.	长度变异/bp Length variation	比对长度/bp Aligned length	<i>Pi</i>	变异位点数 Variable sites	简约性信息位点数 Par-informative sites
EPIC-1	F: CTTCTGGATAGGGCAACTTCA R: GGCTGTTCAAAAAGGAAACA	FG523373	967 ~ 997	997	0.013	33 (3.3)	19 (1.9)
EPIC-2	F: AGCATTTGGATCCCCAGTACA R: CTGCCAAACGACGAATCATA	FG491110	836 ~ 862	886	0.054	87 (9.8)	67 (7.6)
EPIC-3	F: ATTATGGCCACAGAGGGATG R: ACACCTCACGGTCAAATTCC	FG519112	702 ~ 736	743	0.038	61 (8.2)	40 (5.4)
EPIC-4	F: TGCCTGGACACGTCAAAGT R: GCTTTTAAATAACCATCTGGAGGA	FG485251	802 ~ 812	814	0.014	32 (3.9)	10 (1.2)
EPIC-5	F: GGAGTTGGCGAACATGAATAG R: AAAACCTTGCAGTGTGTGATG	FG501294	918 ~ 958	963	0.046	87 (9.0)	66 (6.9)
EPIC-6	F: CACAAGTCCAGCGGTGTAGA R: CTCCTTTCAGACGTGCTTCA	FG492714	815, 816	819	0.017	30 (3.7)	19 (2.3)
EPIC-7	F: CATCCGATCACAGTCAATGG R: TCTTTCAGCACCACTCCTT	FG459333	476 ~ 479	480	0.012	11 (2.3)	2 (0.4)
EPIC-8	F: TGCCACAGAGACAATTTAAAAGG R: TGACCCCATCACTTCGAGAT	FG517975	668 ~ 731	748	0.059	77 (10.3)	68 (9.1)
EPIC-9	F: TTTGCTTGTGCTGATTTTG R: GGGTCTGCTCCTCCAGTATTT	FG521203	884 ~ 899	914	0.041	92 (10.1)	22 (2.4)
EPIC-10	F: TTCAGATTGGTGGCTCTATGG R: TCACTCTCCTGAAAGCGTTG	FG456212	634 ~ 639	641	0.009	25 (3.9)	3 (0.5)
EPIC-11	F: GCTTGTCTCTGGAAAGCATC R: CATTGCTTTCTCAGCATCCTC	FG501919	724	724	0.003	5 (0.7)	1 (0.1)
EPIC-12	F: ACCGCACTGAACCTCAACAT R: CAACTGCTCCATCGTTTTCA	FG497575	723 ~ 746	764	0.069	113 (14.8)	72 (9.4)
EPIC-13*	F: CGCGAACTCAAGGTATTCCA R: TCTGCACCAAGCTCATCAGT	FG410402	880 ~ 886	887	0.015	36 (4.1)	14 (1.6)
EPIC-14*	F: GAGGTCGGCGGTTACAAAT R: CATCCCAATCATGCTCTTT	FG438099	1 192 ~ 1 208	1260	0.055	122 (9.7)	105 (8.3)
EPIC-15*	F: TGAAATTCACCGTCTCTGA R: GAATAGCAGGCAATGGCAAC	FG442861	542 ~ 544	544	0.008	8 (1.5)	7 (1.3)
EPIC-16	F: CATATTCCTGTGATGCAA R: TATTGTGGAACCTGGCACCAA	FG525836	1 075, 1 074	1075	0.010	31 (2.9)	0
EPIC-17*	F: GCGATGGATGGAACCTCAATG R: AAAACTGGCTGTTGCAGGAT	FG439730	919 ~ 932	932	0.012	29 (3.1)	12 (1.3)
EPIC-18	F: CCAAGCTTGTGCTTTTGTG R: GGCTCTGCAGGTACCCATT	FG495017	1 171 ~ 1 197	1207	0.043	112 (9.3)	84 (7.0)
EPIC-19	F: GAAGAGCGTACCCGTCAGTT R: TGGCTTGTTCGTAACCTGATCCT	FG506909	903 ~ 921	929	0.025	66 (7.1)	1 (0.1)
EPIC-20*	F: GTAAAGGGGAGCGTTGGACT R: CCCCAAGCAACACCTTTAGA	FG479052	528 ~ 582	583	0.024	26 (4.5)	19 (3.3)
EPIC-21	F: TGTTCCAAAGCCACTTGTG R: TTCCAAGTTTTGTCTCAAATCC	FG455385	798 ~ 883	887	0.056	83 (9.4)	57 (6.4)

注: 各引物对的退火温度 (T_m) 均为 55 °C; * 指美味猕猴桃中开发的 EPIC 标记, 其余为中华猕猴桃中开发的 EPIC 标记; *Pi* 指核苷酸多态性; 号内的数字指变异位点和简约性信息位点占比对长度的比率 (%)。

Note: T_m of all primer pairs is 55 °C; * indicates that the EPIC markers developed from *A. deliciosa*, and others indicate the EPIC markers developed from *A. chinensis*; *Pi* indicates nucleotide diversity; The number in the brackets are the proportion (%) of variable site and par-informative site in aligned length.

96 对 EPIC 引物中筛选出 21 对呈现稳定扩增引物（其中中华猕猴桃 16 对，美味猕猴桃 5 对）进行多态性检测，其核酸多态性 (P_i) 为 0.003 ~ 0.069，变异位点比率为 0.7% ~ 14.8%，简约性信息位点比率为 0 ~ 9.4%。

2.2 EPIC-1 标记系统发育分析

EPIC-1 标记在 5 种猕猴桃共 15 个个体中获得 29 条序列(图 2)，长度变异范围在 974 ~ 1 026 bp，比对长度为 1 035 bp，其中有 95 个变异位点，70 个为简约性信息位点。

模型检验的最佳进化模型为 HKY + I + G。EPIC-1 标记的 29 条序列系统发育树包含 4 个主要分支(图 2)，I 为金花猕猴桃分支，II 为毛花猕猴桃分支，III 为中华猕猴桃和美味猕猴桃的混合分支并掺杂少量金花猕猴桃，IV 为绵毛猕猴桃分支，II 和 IV 为单系类群。

结果表明 EPIC-1 标记能重建分辨率很高的系统发育树，推测其它 EPIC 标记同样适用于猕猴桃属植物系统发育树的重建。

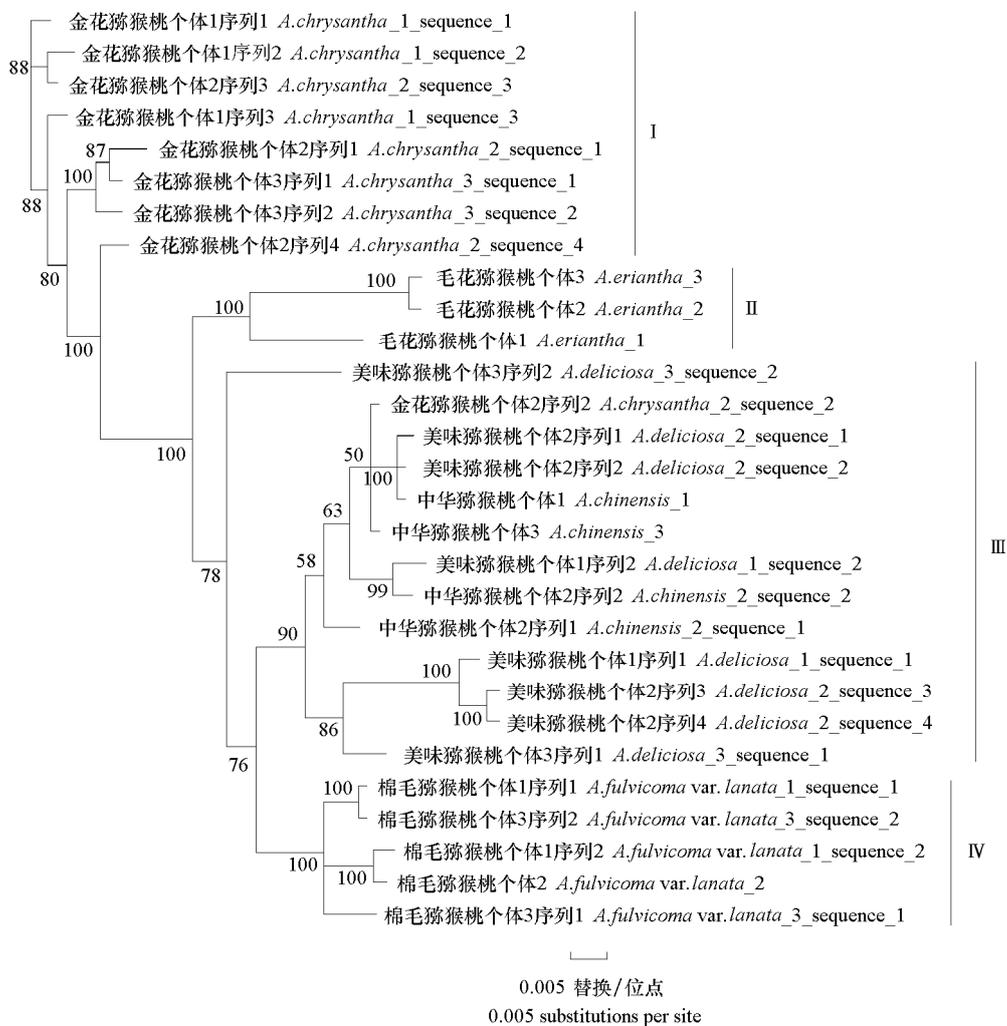


图 2 基于 EPIC-1 标记的猕猴桃属植物系统发育树

Fig. 2 The phylogenetic trees based on the EPIC-1 marker in *Actinidia*

3 讨论

EPIC 标记开发对于模式生物而言较为简单,而在非模式生物中缺乏基因组序列,由于引物是在相对保守的外显子区域设计,所以在非模式生物中开发 EPIC 标记可以参考模式生物基因组序列,例如,通过比较斑胸草雀 (*Taentopygia guttata*) ESTs 和鸡 (*Gallus gallus*) 基因组序列在斑胸草雀中成功开发 252 个 EPIC 标记 (Backstroem et al., 2008)。本研究中,通过比较葡萄基因组和中华猕猴桃及美味猕猴桃 ESTs 序列,成功开发了 21 对猕猴桃属植物 EPIC 标记,说明这种方法具有可行性。

本研究表明中华猕猴桃和美味猕猴桃中开发的 EPIC 引物可成功应用于毛花猕猴桃、绵毛猕猴桃和金花猕猴桃的跨种扩增。Li 等 (2010b) 在太平洋牡蛎中开发了 12 对 EPIC 引物,其中 9 对 EPIC 引物在巨蛎属的其他 4 个物种中实现了跨种扩增;在棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 中,依据核糖体蛋白基因和多巴脱羧酸基因开发的 EPIC 标记也成功应用于同属的其它 3 种蛾类 (*H. zea*、*H. assulta* 和 *H. punctigera*) (Tay et al., 2008)。以上研究结果表明,EPIC 标记均能实现跨种扩增,说明 EPIC 标记具有稳定性和可转移性,可以作为猕猴桃属植物的通用引物。

Thomson 等 (2010) 认为 EPIC 标记变异适中,可以用于种水平的系统发育分析、居群遗传学分析和连锁作图。Li 等 (2010a) 在硬骨鱼中成功开发 EPIC 标记,并用 12 对 EPIC 引物重建 13 种硬骨鱼的系统发育树,得到支持率很高的进化分支。本研究选取 EPIC-1 标记重建 5 种猕猴桃的系统树,基因树中除中华猕猴桃和美味猕猴桃外,其它猕猴桃种均能形成各自的分支,说明 EPIC-1 标记可以用于猕猴桃属植物系统发育分析,推测其它 EPIC 标记可能同样适用于重建猕猴桃属植物的系统发育分析树。中华猕猴桃和美味猕猴桃在最近的分类学修订中归并为一个种的两个变种 (李新伟, 2007),可以解释中华猕猴桃与美味猕猴桃聚在同一分支内,有时二者被称为中华猕猴桃复合体。此外,EPIC 标记在单拷贝高度保守的外显子区域设计引物,可以保证同源直系基因的扩增 (Brito & Edwards, 2009),避免旁系同源基因的扩增,更适用于像猕猴桃这种倍性变异复杂 (黄宏文, 2009) 和具有古基因组复制现象 (Shi et al., 2010) 的物种。

本研究在中华猕猴桃和美味猕猴桃中成功开发了 21 对 EPIC 引物,具有稳定性和通用性,适用于猕猴桃属植物的系统发育分析。解决了长期以来由于猕猴桃属植物核遗传背景复杂而缺乏合适的通用的双亲遗传标记的问题,为今后猕猴桃属植物的分子系统学研究打下了基础。

References

- Backstroem N, Fagerberg S, Ellegren H. 2008. Genomics of natural bird populations: A gene-based set of reference markers evenly spread across the avian genome. *Molecular Ecology*, 17 (4): 964 - 980.
- Brito P, Edwards S. 2009. Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. *Genetica*, 135 (3): 439 - 455.
- Chat J, Jáuregui B, Petit R J, Nadot S. 2004. Reticulate evolution in kiwifruit (*Actinidia*, Actinidiaceae) identified by comparing their maternal and paternal phylogenies. *American Journal of Botany*, 91 (5): 736 - 747.
- Chenuil A, Hoareau T B, Egea E, Penant G, Rocher C, Aurelle D, Mokhtar-Jamai K, Bishop J D D, Boissin E, Diaz A, Krakau M, Luttkhuizen P C, Patti F P, Blavet N, Mousset S. 2010. An efficient method to find potentially universal population genetic markers, applied to metazoans. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 276 - 292.
- Cordero D, Pena J B, Saavedra C. 2008. Polymorphisms at three introns in the manila clam (*Ruditapes philippinarum*) and the grooved carpet-shell clam (*R-decussatus*) . *Journal of Shellfish Research*, 27 (2): 301 - 306.
- Doyle J J, Doyle J L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11 - 15.
- Huang Hong-wen. 2009. History of 100 years of domestication and improvement of kiwifruit and gene discovery from genetic introgressed

- populations in the wild. *Chinese Bulletin of Botany*, 44 (2): 127 - 142. (in Chinese)
- 黄宏文. 2009. 猕猴桃驯化改良百年启示及天然居群遗传渐渗的基因发掘. *植物学报*, 44 (2): 127 - 142.
- Ishikawa H, Watano Y, Kano K, Ito M, Kurita S. 2002. Development of primer sets for PCR amplification of the PgiC gene in ferns. *Journal of Plant Research*, 115 (1117): 65 - 70.
- Lessa E P. 1992. Rapid surveying of DNA-sequence variation in natural-populations. *Molecular Biology and Evolution*, 9 (2): 323 - 330.
- Li C H, Jean-Jack R, Ma L B. 2010a. Exon-primed intron-crossing (EPIC) markers for non-model teleost fishes. *BMC Evolutionary Biology*, doi: 10.1186/1471-2148-10-90.
- Li C H, Ori G, Zhang G, Lu G Q. 2007b. A practical approach to phylogenomics: The phylogeny of ray-finned fish (Actinopterygii) as a case study. *BMC Evolutionary Biology*, 7 (1): 44.
- Li J, Li X, Soejarto D. 2007b. Actinidiaceae. *Flora of China*, 12: 334 - 360.
- Li J Q, Huang H W, Sang T. 2002. Molecular phylogeny and infrageneric classification of *Actinidia* (Actinidiaceae). *Systematic Botany*, 27 (2): 408 - 415.
- Li Q, Bai J E, Kong L F, Zheng X D. 2010b. Discovery and evaluation of exon-primed intron-crossing (EPIC) -PCR markers for the pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture Research*, 41 (9): e361 - e365.
- Li Xin-wei. 2007. Studies on the taxonomy of the genus *Actinidia* Lindl. [Ph. D. Dissertation]. Wuhan: Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences. (in Chinese)
- 李新伟. 2007. 猕猴桃属植物分类学研究[博士论文]. 武汉: 中国科学院武汉植物园.
- Li Zuo-zhou. 2006. Molecular phylogeny of the genus *Actinidia* based on nuclear DNA genetic markers and cytoplasm DNA sequence analysis. [Ph. D. Dissertation]. Wuhan: Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences. (in Chinese)
- 李作洲. 2006. 猕猴桃属植物的分子系统学研究[博士论文]. 武汉: 中国科学院武汉植物园.
- Librado P, Rozas J. 2009. Dnasp v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25 (11): 1451 - 1452.
- Lohse K, Sharanowski B, Blaxter M, Nicholls J A, Stone G N. 2011. Developing EPIC markers for chalcidoid Hymenoptera from EST and genomic data. *Molecular Ecology Resources*, 11 (3): 521 - 529.
- Lyons L A, Laughlin T F, Copeland N G, Jenkins N A, Womack J E, Obrien S J. 1997. Comparative anchor tagged sequences (CATS) for integrative mapping of mammalian genomes. *Nature Genetics*, 15 (1): 47 - 56.
- Palumbi S R, Baker C S. 1994. Contrasting population-structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. *Molecular Biology and Evolution*, 11 (3): 426 - 435.
- Posada D, Crandall K A. 1998. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14 (9): 817 - 818.
- Ronquist F, Huelsenbeck J P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19 (12): 1572 - 1574.
- Shi T, Huang H W, Barker M S. 2010. Ancient genome duplications during the evolution of kiwifruit (*Actinidia*) and related Ericales. *Annals of Botany*, 106 (3): 497 - 504.
- Slade R W, Moritz C, Heideman A, Hale P T. 1993. Rapid assessment of single-copy nuclear-DNA variation in diverse species. *Molecular Ecology*, 2 (6): 359 - 373.
- Tay W T, Behere G T, Heckel D G, Lee S F, Batterham P. 2008. Exon-primed intron-crossing (EPIC) PCR markers of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bulletin of Entomological Research*, 98 (5): 509 - 518.
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25 (24): 4876 - 4882.
- Thomson R C, Wang I J, Johnson J R. 2010. Genome-enabled development of DNA markers for ecology, evolution and conservation. *Molecular Ecology*, 19 (11): 2184 - 2195.
- Wang X, Zhao X, Zhu J, Wu W. 2006. Genome-wide investigation of intron length polymorphisms and their potential as molecular markers in rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research*, 12 (6): 417 - 427.
- Yang L, Jin G L, Zhao X Q, Zheng Y, Xu Z H, Wu W R. 2007. PIP: A database of potential intron polymorphism markers. *Bioinformatics*, 23 (16): 2174 - 2177.