

SRAP 结合 SCoT 标记分析番木瓜种质的遗传多样性

蔡元保¹, 杨祥燕¹, 陈豪军¹, 曾黎明¹, 庞新华¹, 孙光明^{2,3}

(¹ 广西亚热带作物研究所, 南宁 530001; ² 中国热带农业科学院南亚热带作物研究所, 湛江 524091;

³ 国家重要热带作物工程技术研究中心, 海口 571101)

摘要: 利用 SRAP 和 SCoT 两种分子标记相结合对中国 22 个番木瓜主要栽培品种(系)进行遗传多样性研究。SCoT 标记检测获得的遗传多样性参数值和遗传相似系数范围均高于 SRAP 标记检测的结果, 表明 SCoT 标记检测多态性的能力高于 SRAP 标记。基于两种标记数据合并后的 UPGMA 聚类结果显示, 番木瓜种质间的遗传相似系数为 0.65~0.90, 种质间遗传多样性水平较低; 在遗传相似系数为 0.82 时, 将所有参试材料划分为 3 个类群。应用 Mantel 检测对 SRAP 和 SCoT 及两种标记合并进行相关性分析, 表明三者之间具有显著的相关性, 且相关性很高。聚类结果从分子水平反映出中国番木瓜主要栽培品种(系)的遗传基础狭窄。

关键词: 番木瓜; 遗传多样性; SRAP; SCoT

Genetic Diversity Analysis of Papaya Resources by SRAP and SCoT Combination

CAI Yuan-bao¹, YANG Xiang-yan¹, CHEN Hao-jun¹, ZENG Li-ming¹,
PANG Xin-hua¹, SUN Guang-ming^{2,3}

(¹ Guangxi Subtropical Crops Research Institute, Nanning 530001; ² South Subtropical Crops Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang 524091; ³ National Center of Important Tropical Crops Engineering and Technology Research, Haikou 571101)

Abstract: Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) and start codon targeted polymorphism (SCoT) molecular markers were used to detect the genetic diversity among 22 main cultivars (strains) of papaya (*Carica papaya* L.) in China. Genetic diversity parameters and the range of genetic similarity (GS) from SCoT were all higher than those from SRAP indicating the genetic diversity identified by SCoT was higher than that by SRAP. UPGMA cluster analysis based on combination of two molecular markers data showed that the range of GS was 0.65-0.90 among 22 papaya resources with a low genetic diversity, and all resources could be divided into three groups at the GS of 0.82. The data implied a correlation among SRAP, SCoT and these markers combination, which showed a significant relationship using Mantel test. These results indicated that the genetic basis of papaya resources in China was narrow.

Key words: Papaya (*Carica papaya* L.); Genetic diversity; SRAP; SCoT

番木瓜 (*Carica papaya* L.) 原产于南美洲, 是一种优质的热带、亚热带果树, 其果实营养丰富, 具有较高的经济价值, 素有“岭南果王”的美称。长期以来, 中国番木瓜种质资源的研究常滞后于育种实践,

对种质资源的研究主要局限于外部形态和重要农艺性状, 很少从细胞和分子水平上进行遗传多样性研究, 导致番木瓜种质资源不能被有效利用, 在杂交亲本选配上存在较大的盲目性。而且, 近年来生产中

所使用的骨干品种日益集中,导致中国番木瓜种质和生产上所用品种的遗传基础日益狭窄。应用分子标记技术对番木瓜种质资源进行系统分析,有利于科学评价这些种质资源的遗传多样性和亲缘关系,对于番木瓜杂交育种中亲本的选择有重要应用价值,可以大大地提高其育种效率。

相关序列扩增多态性 (SRAP, sequence-related amplified polymorphism) 是一种基于不同物种甚至个体的内含子、启动子与间隔区长度不同而产生多态性的特异扩增标记方法^[1],以其操作简单快捷、成本低、稳定性好、多态性高、易于测序等优点被广泛应用于植物遗传多样性分析、遗传图谱构建、重要性状标记、基因定位克隆以及种质资源的鉴定评价等方面的研究^[2-4]。目标起始密码子多态性 (SCoT, start codon targeted polymorphism) 是一种基于单引物扩增反应的新型分子标记方法,是根据植物基因中 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,产生偏向候选功能基因区的显性多态性标记^[5]。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诸多优点,已成功应用于热带、亚热带果树的遗传多样性研究,如芒果^[6]、龙眼^[7]、澳洲坚果^[8]等。这些植物的遗传多样性研究结果表明,SCoT 标记可以检测出不同基因型供试材料间的微小差异,准确反映出亲缘关系。

目前,国外应用分子标记对番木瓜种质资源的遗传多样性研究已开展大量工作^[9-12],但是对国内番木瓜栽培品种(系)的遗传多样性研究鲜有报道^[13-15],这无法满足目前中国番木瓜育种工作的需要。这些番木瓜种质资源的遗传多样性研究结果表明,番木瓜栽培品种(系)间的亲缘关系非常接近,

单一分子标记的随机引物难以区分部分品种(系)间的遗传差异。因此,为避免单一分子标记方法对研究结果造成偏差,本研究采用 SRAP 和 SCoT 分子标记相结合的方法对中国番木瓜主要栽培品种(系)进行遗传多样性分析,从分子水平分析这些种质间的遗传关系及遗传基础,为进一步拓宽中国番木瓜栽培品种(系)的遗传基础及其分子标记辅助育种等研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为中国 22 个番木瓜主要栽培品种(系)(表 1),其中国内品种 16 个,国内品系 2 个(万顷沙 1 号和兴农矮 48-2 号),国外品种 4 个,均取自广西亚热带作物研究所番木瓜种质资源圃。选取每个品种(系)雌株和两性株的幼嫩叶片,切碎后品种(系)内混匀,并用液氮速冻后于 -70 ℃ 保存。本试验所用的 20 对 SRAP 引物^[15]和 10 个 SCoT 引物^[16](表 2)分别由 100 对 SRAP 引物和 100 个 SCoT 引物经筛选得到的带型清晰且重复性好的多态性引物,均由上海生工生物技术有限公司合成。20 对 SRAP 引物分别是 me1-em3、me1-em7、me2-em5、me2-R8、me3-em4、me3-em7、me4-em2、me5-em6、F7-em6、me4-R15、me5-em6、ME6-em3、me6-em4、me6-em6、me7-em1、me7-em7、ME7-R9、ME7-R15、F7-em1 和 F7-R8,10 个 SCoT 引物包括 5 个 SCoT 单引物(SC3、SC23、SC46、SC59 和 SC60)和 5 个由 SCoT 单引物搭配而成的双引物组合(SC3 + SC20、SC4 + SC23、SC19 + SC36、SC20 + SC23 和 SC23 + SC55)。Taq 聚合酶和 dNTPs 均购自天根生化科技(北京)有限公司。

表 1 供试番木瓜材料的编号、种质名称、果实类型及原产地

Table 1 Code, name, fruit type, and origin of tested papaya accessions

编号 Code	种质名称 Accession name	果实类型 Fruit type	原产地 Origin	编号 Code	种质名称 Accession name	果实类型 Fruit type	原产地 Origin
1	穗中红 48 号	中果型黄色果肉	中国广东	12	红妃	中果型红色果肉	中国台湾
2	美中红	小果型红色果肉	中国广东	13	蓝茎	大果型橙黄色果肉	东南亚国家
3	桂热 1 号	大果型黄色果肉	中国广西	14	园优	大果型黄色果肉	中国广东
4	桂热 2 号	大果型黄色果肉	中国广西	15	红日 1 号	小果型橙红色果肉	中国广东
5	日升	小果型红色果肉	美国夏威夷	16	庞博 1 号	大果型黄色果肉	中国广西
6	白皮日升	小果型橘红色果肉	美国夏威夷	17	庞博 2 号	大果型黄色果肉	中国广西
7	万顷沙 1 号	小果型橙红色果肉	中国广东	18	庞博 3 号	大果型黄色果肉	中国广西
8	红铃	大中果型红色果肉	中国广东	19	新世纪	中果型黄红色果肉	中国广东
9	红铃 2 号	大果型橙黄色果肉	中国广东	20	风云 1 号	大果型黄色果肉	中国海南
10	台农 1 号	中果型橙红肉色	中国台湾	21	兴农矮 48-2 号	大果型黄色果肉	中国广东
11	穗黄	中果型橙黄色果肉	中国广东	22	夏威夷	小果型红色果肉	美国夏威夷

表 2 用于 SRAP 和 SCoT 分析的引物序列

Table 2 The primers used in SRAP and SCoT analyses for papaya

SRAP 正向引物 Forward primer for SRAP		SRAP 反向引物 Reverse primer for SRAP		SCoT 引物 SCoT primer	
编号 Code	序列(5'→3') Sequence(5'→3')	编号 Code	序列(5'→3') Sequence(5'→3')	编号 Code	序列(5'→3') Sequence(5'→3')
me1	TGACTCCAAACCGGATA	em1	GACTGCGTACGAATTAAT	SC3	CAACAATGGCTACCACCG
me2	TGACTCCAAACCGGAGC	em2	GACTGCGTACGAATTTGC	SC4	CAACAATGGCTACCACCT
me3	TGACTCCAAACCGGAAT	em3	GACTGCGTACGAATTGAC	SC19	ACCATGGCTACCACCGGC
me4	TGACTCCAAACCGGACC	em4	GACTGCGTACGAATTTGA	SC20	ACCATGGCTACCACCGCG
me5	TGACTCCAAACCGGAAG	em5	GACTGCGTACGAATTAAC	SC23	CACCATGGCTACCACCAG
me6	TGACTCCAAACCGGTAA	em6	GACTGCGTACGAATTGCA	SC36	GCAACAATGGCTACCACC
me7	TGACTCCAAACCGGTCC	em7	GACTGCGTACGAATTCAA	SC46	AACAATGGCTACCACCAC
ME6	TGAGTCCTTTCCGGTAA	R8	GACACCGTACGAATTGAC	SC55	GCAACAATGGCGACCACA
ME7	TGAGTCCTTTCCGGTCC	R9	GACACCGTACGAATTTGA	SC59	GCAACCATGGCGACCACA
F7	GTAGCACAAAGCCGGAGC	R15	CGCACGTCCGTAATTCCA	SC60	GCAAAAATGGCGACCACC

1.2 基因组 DNA 提取与检测

采用 CTAB 改良法^[17]提取番木瓜基因组 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, 模板 DNA 工作浓度稀释至 30 ng/μL, 置于 -20 ℃ 保存备用。

1.3 SRAP-PCR 与 SCoT-PCR 扩增及其产物检测

SRAP-PCR 扩增参照杨祥燕等^[15]的方法, 反应体系总体积为 20 μL, 包括 2 μL 的 10 × buffer, 3.0 mmol/L Mg²⁺, 0.2 mmol/L dNTPs, 0.4 μmol/L 引物, 30 ng/μL 模板 DNA 和 1.0 U *Taq* 聚合酶。扩增程序为: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 1 min, 35 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 90 s, 5 个循环; 94 ℃ 变性 1 min, 50 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 90 s, 35 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 保存。

SCoT-PCR 扩增参照杨祥燕等^[16]的方法, 反应体系总体积为 20 μL, 包括 2 μL 的 10 × buffer, 2.0 mmol/L Mg²⁺, 0.3 mmol/L dNTPs, 0.8 μmol/L 引物, 30 ng/μL 模板 DNA 和 1.0 U *Taq* 聚合酶。扩增程序为: 94 ℃ 预变性 5 min; 然后 94 ℃ 变性 1 min, 50 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 90 s, 共 35 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 保存。

SRAP-PCR 与 SCoT-PCR 扩增重复 2 次, 扩增结束后, 每管取混有上样缓冲液的 8 μL 扩增产物, 经含有核酸染料的 2% 琼脂糖凝胶在 0.5 × TBE 中电泳(5 V/cm)。电泳结束后在凝胶成像系统上拍照记录试验结果。

1.4 数据统计分析

1.4.1 种群遗传多样性及遗传结构分析 在电泳图谱上清晰且可重复出现的条带记为 1, 同一位置上无条带记为 0, 缺失记为 9, 模糊不清的条带不予

记录, 从而生成由 1 和 0 组成的原始矩阵。统计多态性引物的总扩增条带数、多态性条带数、多态性条带比率(*PPB*)和多态性信息含量(*PIC*)。按照 Botstein 公式^[18]计算多态性信息含量 $PIC = 1 - \sum P_i^2$, 式中 P_i 表示第 i 种基因型出现的频率。利用 PopGen 1.32 软件进行遗传多样性参数分析, 计算等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、Nei's 基因多样性指数(H)、Shannon's 信息指数(I)、遗传分化系数(G_{st})和基因流动(N_m)等参数。

1.4.2 聚类分析及相关性分析 用 NTSYS-pc 2.1e 软件计算出任意 2 个供试材料间的遗传相似系数(GS)和遗传距离(GD), 计算公式为 $GS = 2N_{ij}/(N_i + N_j)$, $GD = 1 - GS$ 。式中, N_{ij} 为材料 i 和 j 共有的扩增片段总数, N_i 为材料 i 中出现的扩增片段数目, N_j 为材料 j 中出现的扩增片段数目。在该软件中根据遗传相似系数, 按照 UPGMA 方法进行聚类分析, 构建树状图; 应用 Mxcomp 程序对 2 种标记所得的遗传相似系数矩阵进行 Mantel 相关性检验, 用以比较 2 种标记方法所得结果的一致程度。此外, 用该软件进行基于遗传相似系数的主坐标分析(PCOA, principal coordinates analysis), 构建三维空间和二维平面散点分布图以检验聚类结果。

2 结果与分析

2.1 SRAP 和 SCoT 标记多态性的比较分析

采用经筛选出的 20 对 SRAP 多态性引物和 10 个 SCoT 多态性引物^[15-16], 分别对 22 份番木瓜基因组 DNA 进行 SRAP 和 SCoT 扩增, 统计结果见表 3。结果显示, SRAP 和 SCoT 扩增总条带数分别为 249 条和 107 条, 多态性条带数分别为 110 条和 72 条, 多态性

条带比率 (*PPB*) 分别为 44.18% 和 67.29%, 平均多态性信息指数 (*PIC*) 分别为 0.49 和 0.68。可见, 虽然 SCoT 标记平均每个引物扩增条带数较少, 但 *PPB* 和 *PIC* 均高于 SRAP 标记。此外, 两种标记的遗传多样性参数也有所差异, SCoT 标记位点的有效等位基因数 (N_e)、Nei's 基因多样性指数 (H) 和 Shannon's 信息指数 (I) 也都高于 SRAP 标记。这些结果表明, SCoT 标记检测多态性的能力和标记效率高于 SRAP 标记。

表 3 番木瓜 SRAP 和 SCoT 标记的多态性分析
Table 3 Analysis of the SRAP and SCoT generated banding patterns in papaya

参数 Parameter	SRAP	SCoT	SRAP + SCoT
总扩增条带数 Total bands	249	107	356
平均每条引物扩增条带数 Average bands of each primer	12.45	10.70	11.87
多态性条带数 Polymorphic bands	110	72	182
多态性条带比率 (%) <i>PPB</i>	44.18	67.29	51.12
多态性信息指数 <i>PIC</i>	0.49	0.68	0.55
有效等位基因数 N_e	1.24	1.47	1.31
Nei's 基因多样性指数 H	0.14	0.26	0.18
Shannon's 信息指数 I	0.21	0.39	0.26

PPB: Percentage of polymorphic bands, *PIC*: Polymorphism information content, N_e : Effective number of alleles, H : Nei's gene diversity, I : Shannon's information index, the same as below

从以上的分析结果还可以看出, 尽管本研究中 SRAP 和 SCoT 标记的有效引物数不多, 但在 22 份番木瓜材料上均产生了数量不等的特异性条带, 多态性较丰富, 能较好地显示出该物种的遗传多样性。合并的 SRAP + SCoT 标记 *PPB*、*PIC*、 N_e 、 H 和 I 等遗传多样性参数值介于两种标记之间, 高于 SRAP 标记, 结合使用可避免单一分子标记对番木瓜遗传多样性的研究结果造成偏差。

2.2 基于 SRAP 和 SCoT 标记的聚类分析

为集中基因组 DNA 水平上更全面的遗传多态性信息, 本研究把 SRAP 和 SCoT 两种标记的多态性信息合并后, 应用 NTSYS 软件对番木瓜种质资源进行聚类分析 (图 1)。从聚类图可见, 合并的标记能将 22 个番木瓜品种 (系) 完全区分开, 当遗传相似系数 (*GS*) 0.80 处作截值时, 16 份试材聚为同一大类 (命名为 A 类群); 红铃、庞博 1 号、蓝茎、风云 1 号、桂热 1 号和红铃 2 号共 6 份试材作为单独的个

类 (命名为 B 类群), 同上述的 16 份试材完全区分开; 尤其是红铃 2 号处于最基础地位, 遗传差异性明显区别于其他种质。当 *GS* 为 0.82 处再次作截值时, A 类群又可以细分为 I 亚类群 (含 7 份试材) 和 II 亚类群 (含 9 份试材), 这 2 个亚类群分别由不同进化层次上的若干个小亚类群组成。A 类群占供试材料总数的 72.73%, *GS* 为 0.82 ~ 0.90, 说明中国现有番木瓜主要栽培品种 (系) 的遗传基础较为狭窄, 大部分番木瓜品种 (系) 亲缘关系较近。

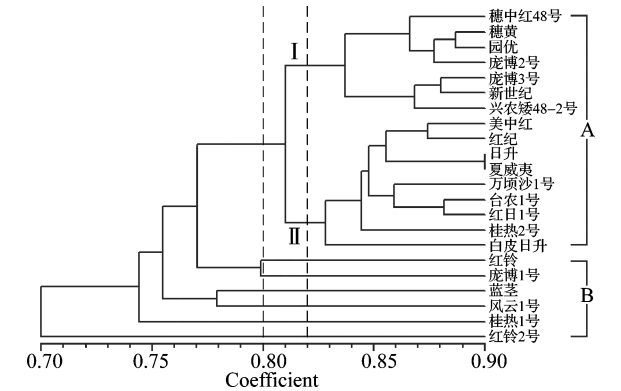


图 1 基于 SRAP 和 SCoT 标记的 22 份番木瓜种质的分子聚类图

Fig. 1 Phylogenetic tree of 22 papaya resources based on SRAP and SCoT markers

番木瓜果型可分为小型、中型和大型, 果肉颜色总体上可分为红色和黄色 (橙黄色)。本研究聚类结果与试材的果实性状分类基本吻合, I 亚类群 7 份试材包含了大、中果型和黄色果肉的品种 (系), II 亚类群 9 份试材基本包含了小果型和红色果肉的品种 (系), B 类群 6 份试材基本包含了大果型和黄色 (橙黄色) 果肉的品种 (系)。但是也出现了少数形态特征较近的品种 (系) 没有聚到一起, 或形态特征有差别却亲缘关系较近的现象, 如叶柄颜色为紫色的蓝茎和桂热 2 号没有聚到一起, 果肉颜色为红色的红铃却与黄色果肉的品种 (系) 亲缘关系很近。该结果说明由于番木瓜品种间、种间以及属间杂交育种, 其基因型相互渗透, 遗传背景复杂, 导致聚类情况不一定完全按照形态特征来区分。

2.3 遗传距离与遗传相似性分析

合并 SRAP 和 SCoT 两种标记的扩增结果, 计算番木瓜各品种 (系) 间的 Jaccard's 遗传相似系数 (*GS*) 和遗传距离 (*GD*), 获得了番木瓜品种 (系) 的相似性矩阵 (表 4)。从表 4 可见, 22 份番木瓜种质间的 *GS* 值变化范围为 0.65 ~ 0.90, 平均 *GS* 值为 0.79, 变幅为 0.25, 绝大部分种质间的 *GS* 值在

0.82~0.90 之间。其中,红铃 2 号和白皮日升之间 GS 值最小(0.65),遗传距离最远,说明这两者亲缘关系最远,遗传相似程度最低;日升和夏威夷之间 GS 值最大(0.90),遗传距离最近,说明这二者亲缘关系最近,遗传相似程度最高。从总体来看,22 份番木瓜种质间的遗传相似系数较高,遗传多样性比

较低,遗传基础较为狭窄。此外,从单独标记所形成的相似性矩阵来看,SCoT 标记揭示遗传相似系数值的范围(0.61~0.93)比 SRAP 标记(0.72~0.96)稍大,平均 GS 值小于 SRAP 标记,表明 SCoT 标记比 SRAP 标记更能揭示番木瓜种质间的遗传变异。

表 4 22 份番木瓜种质间的遗传相似系数和遗传距离

Table 4 Genetic similarity coefficient and genetic distance between 22 papaya resources

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	—	0.16	0.25	0.21	0.19	0.24	0.15	0.25	0.26	0.19	0.14	0.18	0.18	0.12	0.21	0.18	0.14	0.14	0.16	0.21	0.16	0.19
2	0.84	—	0.26	0.14	0.13	0.19	0.15	0.27	0.31	0.17	0.19	0.12	0.28	0.14	0.17	0.22	0.17	0.18	0.21	0.29	0.21	0.16
3	0.75	0.74	—	0.21	0.27	0.26	0.22	0.26	0.32	0.23	0.22	0.22	0.30	0.21	0.23	0.28	0.22	0.22	0.28	0.32	0.28	0.32
4	0.79	0.86	0.79	—	0.13	0.16	0.16	0.23	0.33	0.13	0.18	0.17	0.29	0.18	0.16	0.25	0.16	0.22	0.24	0.33	0.26	0.18
5	0.81	0.87	0.73	0.87	—	0.11	0.17	0.26	0.31	0.12	0.19	0.13	0.23	0.12	0.11	0.21	0.19	0.18	0.20	0.27	0.20	0.16
6	0.76	0.81	0.74	0.84	0.89	—	0.21	0.26	0.35	0.16	0.21	0.19	0.26	0.19	0.14	0.25	0.22	0.25	0.26	0.32	0.27	0.19
7	0.85	0.85	0.78	0.84	0.83	0.79	—	0.22	0.27	0.15	0.15	0.13	0.21	0.13	0.13	0.22	0.14	0.17	0.18	0.25	0.18	0.18
8	0.75	0.73	0.74	0.77	0.74	0.74	0.78	—	0.25	0.25	0.21	0.27	0.29	0.20	0.23	0.20	0.23	0.24	0.22	0.27	0.27	0.31
9	0.74	0.69	0.68	0.67	0.69	0.65	0.73	0.75	—	0.30	0.24	0.31	0.30	0.25	0.32	0.26	0.30	0.30	0.31	0.31	0.31	0.33
10	0.81	0.83	0.77	0.87	0.88	0.84	0.85	0.75	0.70	—	0.13	0.13	0.24	0.12	0.12	0.20	0.15	0.18	0.22	0.30	0.25	0.17
11	0.86	0.81	0.78	0.82	0.81	0.79	0.85	0.79	0.76	0.87	—	0.17	0.22	0.11	0.18	0.17	0.12	0.18	0.19	0.24	0.18	0.22
12	0.82	0.88	0.78	0.83	0.87	0.81	0.87	0.73	0.69	0.87	0.83	—	0.22	0.14	0.13	0.22	0.14	0.17	0.19	0.25	0.20	0.15
13	0.82	0.72	0.70	0.71	0.77	0.74	0.79	0.71	0.70	0.76	0.78	0.78	—	0.21	0.22	0.23	0.24	0.22	0.21	0.22	0.22	0.24
14	0.88	0.86	0.79	0.82	0.88	0.81	0.87	0.80	0.75	0.88	0.89	0.86	0.79	—	0.12	0.14	0.12	0.14	0.14	0.24	0.17	0.18
15	0.79	0.83	0.77	0.84	0.89	0.86	0.87	0.77	0.68	0.88	0.82	0.87	0.78	0.88	—	0.22	0.17	0.19	0.19	0.28	0.22	0.17
16	0.82	0.78	0.72	0.75	0.79	0.75	0.78	0.80	0.74	0.80	0.83	0.78	0.77	0.86	0.78	—	0.19	0.16	0.22	0.23	0.24	0.24
17	0.86	0.83	0.78	0.84	0.81	0.78	0.86	0.77	0.70	0.85	0.88	0.86	0.76	0.88	0.83	0.81	—	0.13	0.16	0.24	0.18	0.21
18	0.86	0.82	0.78	0.78	0.82	0.75	0.83	0.76	0.70	0.82	0.82	0.83	0.78	0.86	0.81	0.84	0.87	—	0.12	0.20	0.14	0.19
19	0.84	0.79	0.72	0.76	0.80	0.74	0.82	0.78	0.69	0.78	0.81	0.81	0.79	0.86	0.81	0.78	0.84	0.88	—	0.16	0.12	0.20
20	0.79	0.71	0.68	0.67	0.73	0.68	0.75	0.73	0.69	0.70	0.76	0.75	0.78	0.76	0.72	0.77	0.76	0.80	0.84	—	0.16	0.26
21	0.84	0.79	0.72	0.74	0.80	0.73	0.82	0.73	0.69	0.75	0.82	0.80	0.78	0.83	0.78	0.76	0.82	0.86	0.88	0.84	—	0.19
22	0.81	0.84	0.68	0.82	0.90	0.81	0.82	0.69	0.67	0.83	0.78	0.85	0.76	0.82	0.83	0.76	0.79	0.81	0.80	0.74	0.81	—

1~22 材料编号同表 1;遗传距离(对角线上方)和遗传相似系数(对角线下方)在表中标出
1-22 are the same as table 1,Genetic distance(above diagonal) and genetic similarity coefficient(below diagonal)are showed in table

2.4 番木瓜国内外种质的遗传分化与遗传多样性

基于 SRAP 和 SCoT 标记的扩增结果,利用 Pop-Gen 1.32 软件统计分析番木瓜国内外种群和总群体的遗传多样性参数。表 5 中 3 种方法(SRAP、SCoT 及合并的 SRAP + SCoT 标记)的统计结果显示,番木瓜总群体的等位基因数(N_a)变化范围为 1.38~1.73,有效等位基因数(N_e)变化范围为 1.23~1.46,Nei's 基因多样性指数(H)变化范围为 0.13~0.26。其中,国内外番木瓜种群的 N_a 、 N_e 和 H 都非常相近。可见,国内外种群有共同的血缘,且多态性水平较一致,说明中国番木瓜主要栽培品种

(系)的基因源多数与国外引进的种质资源亲缘关系密切,遗传背景极其相似。从表 5 还可以看出,SCoT 标记的 N_a 、 N_e 和 H 都比 SRAP 标记高,再次验证了 SCoT 标记检测多态性的能力和标记效率高于 SRAP 标记。此外,番木瓜总群体基因多样性(H_t)变化范围为 0.12~0.24,种群内基因多样性(H_s)变化范围为 0.11~0.21,说明遗传多样性主要来自于种群内。番木瓜总群体的遗传分化系数(G_{st})和基因流动(N_m)变化范围分别是 0.13~0.14 和 2.99~3.33,说明番木瓜总群体的遗传分化不显著,基因交流程度较小。

表 5 基于 SRAP 和 SCoT 标记的国内外番木瓜种质的遗传多样性水平

Table 5 Genetic diversity within different papaya accessions based on SRAP and SCoT analysis

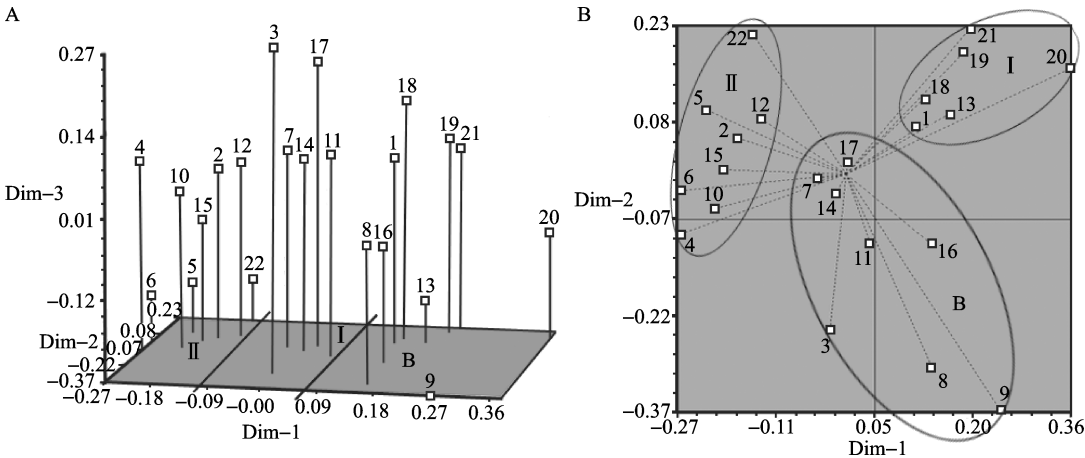
来源 Origin	等位基因数 N_a			有效等位基因数 N_e			Nei's 基因多样性指数 H		
	SRAP	SCoT	SRAP + SCoT	SRAP	SCoT	SRAP + SCoT	SRAP	SCoT	SRAP + SCoT
中国 China	1.36	1.72	1.46	1.24	1.45	1.30	0.14	0.25	0.17
其他国家 Other countries	1.33	1.63	1.39	1.21	1.41	1.29	0.12	0.22	0.15
总群体 Allaccessions	1.38	1.73	1.48	1.23	1.46	1.30	0.13	0.26	0.17

2.5 SRAP、SCoT 及 SRAP + SCoT 标记之间的相关性分析

为了检测 SRAP 和 SCoT 标记对番木瓜种质分析的相关程度,基于共有材料的遗传相似系数矩阵进行 SRAP、SCoT 及 SRAP + SCoT 标记之间的 Mantel 相关性检测。结果表明,SRAP 和 SCoT 标记分析结果的相关系数为 0.79 ($r = 0.79, t = 5.14, P = 1.00$),表明 2 个标记之间具有显著的相关性,且相关性较高。因此,将 2 种标记进行合并,采用 UPGMA 法聚类分析。合并后的 SRAP + SCoT 标记的相似性系数矩阵分别与 SRAP 和 SCoT 标记结果进行 Mantel 比较,相关系数分别高达 0.95 ($r = 0.95, t = 6.03, P = 1.00$) 和 0.94 ($r = 0.94, t = 6.33, P = 1.00$),达到极显著的正相关性,两两间匹配良好。因此认为,结合两种标记会产生更合理的分类结果。

2.6 主坐标分析 (PCOA)

为了更好地反映种质间的亲缘关系,基于遗传相似系数矩阵,应用 NTSYS 软件进行主坐标分析,所形成的各番木瓜种质的位置分布如图 2 所示,位置相近者表示亲缘关系密切,远离者表示亲缘关系疏远。在主坐标分析结果图中,第 1~3 主坐标分别解释总遗传变异的 16.38%、11.87% 和 8.48%,占总遗传变异的 36.73%。主坐标分析结果与 UPGMA 聚类分析结果相似,将位置靠近的番木瓜种质划归在一起,共得到 3 个主要类群(B、I 和 II 类群)。其中,II 类群比较集中;而 B 和 I 类群比较分散,个别种质存在相互交错。主成分分析结果更直观地反映出不同番木瓜品种(系)之间的亲缘关系,可看作是对聚类结果的直观解释和侧证。



A: 三维图; B: 平面图 A: Three-dimensional graph, B: Planar graph

图 2 番木瓜各种质的 SRAP 和 SCoT 标记主坐标分析图

Fig. 2 Principal coordinates analysis of papaya genotypes from SRAP and SCoT markers

3 讨论

3.1 SRAP 和 SCoT 标记分析番木瓜遗传多样性的比较

番木瓜遗传多样性研究是番木瓜遗传改良与杂交育种的重要环节,通过对种质间亲缘关系的研究可以有效地对亲本选配和特殊种质的保护提供指导。

番木瓜自 17 世纪引入中国后,经过自然演化和人工杂交育种,形成了较为广泛的地方群体品种。本研究对 22 个番木瓜主要栽培品种(系)的 SRAP 和 SCoT 综合分析表明,番木瓜品种(系)的遗传相似系数为 0.65~0.90,平均值为 0.79,说明中国现有番木瓜主要栽培品种(系)的遗传基础较为狭窄,品种(系)间的亲缘关系接近。本研究结果与 J. I. Stiles 等^[9] 和

M. S. Kim 等^[11]分别应用 RAPD 和 AFLP 标记分析番木瓜遗传多样性的研究结论相一致。可见,SRAP 和 SCoT 标记可作为番木瓜种质遗传多样性分析的手段,能从基因组水平上揭示其遗传差异。相比较而言,SCoT 标记在本研究中具有更高的多态性水平,能反映出更多的遗传信息。在 22 个供试的番木瓜品种(系)间,SCoT 标记具有比 SRAP 标记更高的 PIC 、 N_a 、 N_e 、 H 和 I 等遗传多样性参数值以及更广的遗传相似系数范围,说明 SCoT 标记具有更高的标记效率和更强的多态性检测能力。这在棉花种质资源的遗传多样性研究中也表现出类似的结论^[19]。

3.2 SRAP 和 SCoT 标记结合的科学性

在作物种质资源研究中,一般采用 SRAP 或 SCoT 标记单独分析,对于合并使用 SRAP 和 SCoT 标记进行分析至今仍不多见。本试验采用 Mantel 相关性检测 SRAP 和 SCoT 标记的遗传相似系数矩阵,相关系数 $r = 0.79$ ($P = 1.00$),说明 SRAP 和 SCoT 标记匹配良好。这可能是因为 2 种标记的扩增区都分布在基因组的转录区,该区域受选择压力较大,结构相对保守,所以二者揭示基因型遗传差异的结果相似^[1,5]。进一步将 SRAP 和 SCoT 合并后的相似性系数矩阵分别与 2 种标记结果进行 Mantel 比较,相关系数分别为 $r = 0.95$ ($P = 1.00$) 和 $r = 0.94$ ($P = 1.00$),达到极显著正相关,两两间都非常匹配。每一种分子标记都有其自身的优缺点,采用合并的 SRAP + SCoT 标记可以集中 2 种标记的优点,更能广泛地覆盖整个基因组的不同区域,达到优缺点互补的效果。因此,合并的 SRAP + SCoT 标记会产生更合理、有效的分类结果,从而有助于从不同角度揭示番木瓜不同种质间的遗传多样性。

3.3 番木瓜品种(系)的遗传多样性与亲缘关系

本研究采用合并的 SRAP + SCoT 标记对中国番木瓜主栽品种(系)进行亲缘关系和遗传多样性分析。研究结果表明,该合并标记能将所有参试品种(系)分成 3 个类群,与形态学的分类基本吻合。该聚类结果也与番木瓜遗传多样性的 RAPD 分析结果大概相一致^[13]。而且,中国番木瓜主栽品种(系)的国内外种质遗传相似系数和遗传背景相似性都较高,在基因组水平上没有明显的遗传分化,所以遗传基础较为狭窄。这主要因为中国番木瓜育种基本上是从国外早期育成的品种基础上发展起来的,新品种都与其有很近的亲缘关系。另一方面,番木瓜品种的传代都是经过较为严格的人工授粉或组织培养,通过异交引入外源基因的可能性相对较小。因

此,拓宽中国番木瓜种质资源的遗传基础对于番木瓜杂交育种具有重要意义。本研究采用 SRAP 结合 SCoT 标记揭示了 22 份番木瓜种质之间的遗传差异,为客观地评价不同种质的遗传多样性以及拓宽番木瓜遗传基础的提供理论依据。

参考文献

- [1] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 455-461
- [2] 柳李旺, 龚义勤, 黄浩, 等. 新型分子标记 SRAP 与 TRAP 及其应用[J]. *遗传*, 2004, 26(5): 777-781
- [3] 崔俊杰, 宋建文, 汪国平, 等. 丝瓜种质资源亲缘关系的 SRAP 分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2012, 13(6): 1061-1066
- [4] 齐兰, 王效宁, 张吉贞, 等. 利用 SRAP 标记研究海南野生稻的遗传多样性与遗传分化[J]. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(3): 402-406
- [5] Collard B C Y, Mackill D J. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants[J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2009, 27(1): 86-93
- [6] 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
- [7] 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
- [8] 蔡元保, 杨祥燕, 陈显国, 等. 澳洲坚果 SCoT 反应体系的建立及应用[J]. *热带亚热带植物学报*, 2013, 21(3): 253-258
- [9] Stiles J I, Lemme C, Sondur S, et al. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars[J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 85(6): 697-701
- [10] Jobin-Decor M P, Graham G C, Henry R J, et al. RAPD and isozyme analysis of genetic relationships between *Carica papaya* and wild relatives[J]. *Genet Resour Crop Evol*, 1997, 44(5): 471-477
- [11] Kim M S, Moore P H, Zee F, et al. Genetic diversity of *Carica papaya* as revealed by AFLP markers[J]. *Genome*, 2002, 45(3): 503-512
- [12] Ratchadaporn J, Sureeporn K, Khumcha U. An analysis on DNA fingerprints of thirty papaya cultivars (*Carica papaya* L.), grown in Thailand with the use of amplified fragment length polymorphisms technique[J]. *Pak J Biol Sci*, 2007, 10(18): 3072-3078
- [13] 黄建昌, 任朝兴, 李凌, 等. 17 个番木瓜品种(系)的 RAPD 分析[J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2007, 29(6): 91-94
- [14] 杨祥燕, 蔡元保, 黄秋伟, 等. 番木瓜主栽品种 SCoT 指纹图谱构建及遗传变异分析[J]. *西北植物学报*, 2013, 33(9): 1756-1761
- [15] 杨祥燕, 蔡元保, 黄强, 等. 番木瓜基因型遗传关系的 SRAP 分析[J]. *西北植物学报*, 2013, 33(11): 2159-2165
- [16] 杨祥燕, 蔡元保, 郭凌飞, 等. 番木瓜 SCoT 反应体系建立及引物筛选[J]. *热带亚热带植物学报*, 2012, 20(6): 578-584
- [17] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15
- [18] 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
- [19] 李正鹏, 李廷春, 樊洪泓, 等. 棉花遗传多样性 SCoT 和 SRAP 标记的研究及比较分析[J]. *激光生物学报*, 2011, 2(2): 236-244