

李沛华, 王进, 梁东, 等. 基于 SRAP 和 SCoT 标记分析不同甜樱桃品种遗传多样性 [J]. 福建农业学报, 2023, 38 (1): 12–22.
LI P H, WANG J, LIANG D, et al. SRAP and SCoT Markers-based Analysis on Genetic Diversity of Sweet Cherry Cultivars [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2023, 38 (1): 12–22.

基于 SRAP 和 SCoT 标记分析不同甜樱桃品种遗传多样性

李沛华¹, 王进¹, 梁东¹, 吕秀兰^{1*}, 周桂虹², 李元美²

(1. 四川农业大学园艺学院, 四川成都 611130; 2. 汶川县科学技术和农业畜牧局, 四川汶川 623000)

摘要:【目的】探究 40 个甜樱桃 (*Prunus avium* L.) 品种的遗传多样性及 SRAP 和 SCoT 标记在甜樱桃上的应用。
【方法】利用 SRAP 和 SCoT 分子标记进行遗传多样性分析。【结果】筛选出 6 对条带清晰、多态性好的 SRAP 引物和 7 条 SCoT 引物, 在 40 个甜樱桃品种中分别扩增出多态性条带 67 和 69 条, 多态性百分率分别为 90.54% 和 93.24%。SRAP 标记和 SCoT 标记的 UPGMA 聚类分析表明, 40 个甜樱桃品种的遗传相似系数分别在 0.67~0.95 和 0.72~0.93, 说明甜樱桃的遗传背景相对较窄。SRAP 标记在相似系数 0.79 左右可以将 40 份甜樱桃分为 6 组, SCoT 标记在相似系数在 0.77 左右可以将 40 份甜樱桃分为 6 组。两种分子标记中, 来自不同地区的甜樱桃品种没有明显聚类, 说明各个地区甜樱桃品种基因交流频繁, 另外大部分黄色系甜樱桃品种聚为一类。【结论】2 种分子标记均可应用于分析甜樱桃遗传多样性且能够区分不同果皮颜色甜樱桃, 可以作为后期种质资源利用和新品种选育的技术手段。

关键词:甜樱桃; 相关序列扩增多态性; 目标起始密码子多态性; 遗传多样性

中图分类号: S 662.5

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2023) 01-0012-11

SRAP and SCoT Markers-based Analysis on Genetic Diversity of Sweet Cherry Cultivars

LI Peihua¹, WANG Jin¹, LIANG Dong¹, LV Xiulan^{1*}, ZHOU Guihong², LI Yuanmei²

(1. College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China; 2. Wenchuan County Bureau of Science and Technology, Agriculture and Animal Husbandry, Wenchuan, Sichuan 623000, China)

Abstract:【Objective】Genetic relationship of 40 sweet cherry cultivars were analyzed.【Methods】SRAP and SCoT molecular markers were used to determine the genetic diversity of sweet cherry varieties.【Results】Six pairs of SRAP primers and 7 pairs of SCoT primers with distinct bands and polymorphism were selected as the markers to obtain 67 and 69 amplified bands representing 90.54% and 93.24% of polymorphism, respectively, from the 40 cultivars. Based either on SRAP with a similarity coefficient of about 0.79 or on SCoT with a similarity coefficient of about 0.77, the cultivars could be divided into 6 groups. Thus, the sweet cherry cultivars collected from different regions could have gone through numerous genetic exchanges becoming low in variation. Therefore, not surprisingly, most of the yellow varieties were grouped into one single category.【Conclusion】The SRAP and SCoT markers successfully helped examine the genetic diversity of 40 sweet cherry cultivars collected from various regions. The result obtained would facilitate further studies in the germplasm utilization and breeding of sweet cherries.

Key words: Sweet cherry; SRAP; SCoT; genetic diversity

0 引言

【研究意义】甜樱桃 (*Prunus avium* L.) 起源于高加索地区^[1], 来自于野生甜樱桃的驯化, 同时也有

部分观点认为甜樱桃起源于欧洲东南部和欧洲西部^[2]。我国的甜樱桃主要栽培品种最初从欧美等国家引进, 从十九世纪末开始, 至今共引进 250 多个品种^[3], 而四川甜樱桃产业发展较晚, 在 20 世纪 90 年

收稿日期: 2022-09-24 初稿; 2022-12-12 修改稿

作者简介: 李沛华 (1992-), 男, 硕士研究生, 研究方向为果树种质资源与育种 (E-mail: 742778062@qq.com)

* 通信作者: 吕秀兰 (1964-), 女, 博士, 教授, 研究方向为果树栽培学 (E-mail: xllvjj@163.com)

基金项目: 四川省科技计划项目 (2021YFYZ0010)

代才陆续引进甜樱桃, 期间种植规模不断扩大, 主要分布在雅安市汉源县和阿坝藏族羌族自治州等高海拔山区, 目前已经跻身国内甜樱桃主产区之一, 约占全国产量 8%^[4]。目前大多数甜樱桃主产区都建立了基于适宜当地气候条件和地理环境的种质资源中心, 近年来四川的甜樱桃种植面积和产量提升迅速, 目前绝大多数品种是外省甚至外国引进。为解决四川独特的高海拔地区存在的樱桃水土不服问题, 选育适合当地气候的甜樱桃品种是四川甜樱桃产业发展的长久之计。因此, 对所引进的甜樱桃品种进行遗传多样性分析以及开发可以区分特定性状的分子标记很有必要。【前人研究进展】分子标记技术操作方便简单、试验环境要求低, 可靠快速的 DNA 检测技术能够精准地反映物种的遗传多样性和种内(种间)亲缘关系^[5]。目前常用的分子标记有 RFLP、RAPD、AFLP、SSR 等传统分子标记和新型的 SRAP 和 SCoT 标记。相关序列扩增多态性(Sequence-related amplified polymorphism, SRAP)是由美国加州大学蔬菜作物系 Li 等^[6]提出的利用独特的引物设计对开放阅读框(ORF)进行扩增。上游引物对外显子进行特异扩增, 下游引物对内含子区域、启动子区域进行特异扩增。因个体不同以及物种的内含子、启动子与间隔长度不等而产生多态性^[7]。目标起始密码子多态性(Start codon targeted, SCoT)标记是基于植物基因 ATG 起始密码子的一致性及其侧翼的短保守区, 开发的一种新的植物 DNA 标记生成方法^[8]。通过设计单引物对基因组进行扩增, 可以产生偏向于候选功能基因的显性多态性^[9]。SRAP 和 SCoT 标记都不需要预先知道物种的序列信息, 可以直接在不同物种间通用。近年来, SRAP 和 SCoT 标记应用于果树遗传多样性分析越发广泛, SRAP 标记引物开发简单便捷, 且数量较多, 果树育种过程中, 文露等^[10]就将其应用于鉴定皮球桃芽变品种, 刘均^[11]将其应用于对鸡蛋李 EMS 诱变材料选择。SCoT 标记更多应用于种质资源的遗传多样性分析, 蔡元保等^[9]利用 SCoT 标记和 SRAP 标记对番木瓜进行遗传多样性分析时发现 SCoT 标记检测多态性的能力高于 SRAP 标记。SRAP 和 SCoT 标记除了兼具传统分子标记的优点外, 最突出的特点是扩增位点位于功能基因区, 更容易得到与重要性状关联的标记, 可以更好地辅助育种。目前在甜樱桃上应用较多的是 SSR 标记, 主要是进行遗传多样性分析^[12]和品种鉴定^[13]等, 关于 SRAP 和 SCoT 标记应用相对较少。路娟等^[14]利用优化后的 SRAP 标记体系对 45 个樱桃种质材料进行遗传多样性分析; Masoud 等^[15]利用

SRAP 标记揭示了毛樱桃和甜樱桃之间的内部差异; 彭芳芳等^[16]建立了樱桃 SCoT 标记分析体系, 并且对 SCoT 分子标记、叶片表型性状遗传多样性进行关联分析, 获得了 8 个与叶片性状极显著相关的特异标记位点。【本研究切入点】SRAP 和 SCoT 两种分子标记在甜樱桃上的成功应用表明了其应用前景, 且两种分子标记针对甜樱桃在遗传评价方面的优劣以及更多应用方向值得进一步探究。【拟解决的关键问题】本文首次同时利用 SRAP 和 SCoT 分子标记对 40 个甜樱桃品种进行遗传多样性分析, 并且利用两种分子标记基本将甜樱桃按果皮颜色区分开, 研究完善优化甜樱桃 SRAP 和 SCoT 标记反应体系, 并对比分析两种标记在甜樱桃上的应用效果及两种标记与果皮颜色等性状的关联性。

1 材料与方法

1.1 供试材料

于 2020 年 3~4 月, 分别从四川省雅安市汉源县和阿坝藏族羌族自治州汶川县、茂县、小金县、金川县、理县等地共采集到 40 份有明确引种记录的甜樱桃嫩叶样本。经液氮预冷后保存于-80 °C 冰箱, 用于后期的基因组 DNA 提取。40 份甜樱桃品种材料具体信息见表 1, 其中红灯(短柄)同样是红灯, 采自汉源县。

1.2 甜樱桃基因组 DNA 提取

采取 CTAB 法提取基因组 DNA, 利用紫外分光光度计检测提取的甜樱桃基因组 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值, 检验其浓度和纯度, 再用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。最后将提取的基因组 DNA 用 ddH₂O 稀释至 25 ng·μL⁻¹, 于-80 °C 保存备用。

1.3 引物筛选

本试验 SCoT 标记根据 Collard 等^[17,18]公布的 80 条 SCoT 引物进行筛选, SRAP 标记根据 Li 等^[6]和廖柏勇等^[19]设计的 28 条正向引物和 29 条反向引物共 812 种组合进行筛选。共筛选出 6 对 SRAP 引物和 7 条 SCoT 引物, 引物序列见表 2、3。本试验中的所有引物均由北京擎科生物科技有限公司成都分公司合成。

1.4 扩增体系

SRAP-PCR 扩增体系参考路娟^[14]的樱桃 SRAP-PCR 扩增体系稍作修改, SRAP-PCR 反应总体积 20 μL, 其中正反引物各 1 μL (10 μmol·L⁻¹), DNA 模板 0.6 μL (25 ng·μL⁻¹), 2×SanTaq PCR Master Mix 10 μL, ddH₂O 7.4 μL。2×SanTaq PCR Master Mix 从生工生物工程(上海)股份有限公司购买。扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min; 前 5 个循环

表1 40份甜樱桃品种
Table 1 Forty sweet cherry varieties

编号 No.	名称 Name	果实颜色 Fruit color	原产地 Origin	编号 No.	名称 Name	果实颜色 Fruit color	原产地 Origin
1	鲁樱3号 Luying3	红色 Red	中国 China	21	龙冠 Longguan	红色 Red	中国 China
2	拉宾斯 Lapins	紫红色 Purplish red	加拿大 Canada	22	佐藤锦 Satonishiki	黄红色 Yellowish red	日本
3	早甘阳 Zaoganyang	紫红色 Purplish red	中国 China	23	佳红 Jiahong	黄红色 Yellowish red	中国 China
4	齐早 Qizao	紫红色 Purplish red	中国 China	24	琥珀 Hupo	黄红色 Yellowish red	中国 China
5	鲁玉 Luyu	红色 Red	中国 China	25	桑德拉玫瑰 Sandra rose	紫红色 Purplish red	加拿大 Canada
6	美早 Tieton	红色 Red	美国 America	26	彩玉 Caiyu	黄红色 Yellowish red	中国 China
7	布鲁克斯 Brooks	红色 Red	美国 America	27	罗亚明 Royal minnie	紫红色 Purplish red	美国 America
8	桑提娜 Santina	紫红色 Purplish red	加拿大 Canada	28	罗亚理 Royal lee	红色 Red	美国 America
9	萨米脱 Summit	紫红色 Purplish red	加拿大 Canada	29	瑞德 Ruide	红色 Red	美国 America
10	黄蜜 Huangmi	黄红色 Yellowish red	中国 China	30	水晶香槟 Pearl champagne	红色 Red	美国 America
11	雷尼 Rainier	黄红色 Yellowish red	美国 America	31	珊瑚香槟 Coral champagne	红色 Red	美国 America
12	福星 Fuxing	红色 Red	中国 China	32	科迪亚 Kodia	紫黑色 Purplish-black	捷克 Chech
13	明珠 Mingzhu	黄红色 Yellowish red	中国 China	33	那翁 Napoleon	黄色 Yellow	德国 Germany
14	鲁樱1号 Luying1	红色 Red	中国 China	34	艳阳 Sunburst	紫红色 Purplish red	加拿大 Canada
15	黑珍珠 Heizhenzhu	紫黑色 Purplish red	中国 China	35	红蜜 Hongmi	黄红色 Yellowish red	中国 China
16	福晨 Fuchen	红色 Red	中国 China	36	大紫 Black tartarin	紫红色 Purplish red	俄罗斯 Russia
17	早大果 Крупноплодная	紫红色 Purplish red	乌克兰 Ukraine	37	早红宝石 Early ruby	紫红色 Purplish red	乌克兰 Ukraine
18	俄罗斯8号 Russia 8	紫黑色 Purplish red	俄罗斯 Russia	38	宾库 Bing	紫红色 Purplish red	美国 America
19	先锋 Van	紫红色 Purplish red	加拿大 Canada	39	意大利早红 Italian early	紫红色 Purplish red	法国 France
20	红灯 Hongdeng	红色 Red	中国 China	40	红灯(短柄) Hongdeng	红色 Red	中国 China

表2 SRAP 引物名称及序列
Table 2 Names and sequences of SRAP primers

名称 Name	引物序列5'→3' Primer Sequence 5'→3'	引物序列5'→3' Primer Sequence 5'→3'
me4/em13	TGAGTCCAAACCGGACC	GACTGCGTACGAATTCTA
me5/em11	TGAGTCCAAACCGGAAG	GACTGCGTACGAATTGCA
me7/em23	TGAGTCCAAACCGGTCC	GACTGCGTACGAATTGGT
me8/em4	TGAGTCCAAACCGGTGC	GACTGCGTACGAATTGTA
me14/em23	TGAGTCCAAACCGGAAAC	GACTGCGTACGAATTGGT
me26/em24	TTCAGGGTGGCCGGATG	GACTGCGTACGAATTTCAG

94 °C 变性 1 min, 35 °C 复性 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 后 30 个循环将复性温度提高到 50 °C, 其余不变; 72 °C 再延伸 10 min, 于 4 °C 下保存 20 min。

SCoT-PCR 扩增体系参考陈红等^[20]的桃 SCoT-PCR 扩增体系稍作修改, SCoT-PCR 反应总体积 20 μL, 其中引物 2 μL (10 μmol·L⁻¹), DNA 模板 1 μL (25 ng·μL⁻¹), 2×Taq PCR Master Mix 10 μL, ddH₂O

7 μL。2×Taq PCR Master Mix 从康为世纪生物科技股份有限公司购买。扩增程序为: 94 °C 预变性 4 min、94 °C 变性 1 min、50 °C 退火 1 min、72 °C 延伸 2 min、36 个循环、72 °C 延伸 10 min、于 4 °C 下保存 20 min。

1.5 PCR 扩增产物检测及数据统计分析

采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 缓冲液为 0.5×TBE, 电压 120 V, 时间 50 min, 最后在紫外凝胶成像系统上拍照保存。统计条带时以标准样品 (Maker) 为对照, 在同一迁移位置上按条带的有或无进行赋值, 有扩增条带记为“1”, 无扩增条带记为“0”, 从而得到原始的“0/1”矩阵。利用 NTSYS 2.1 和 Popgene 1.32 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 SRAP 标记多态性及遗传多样性分析

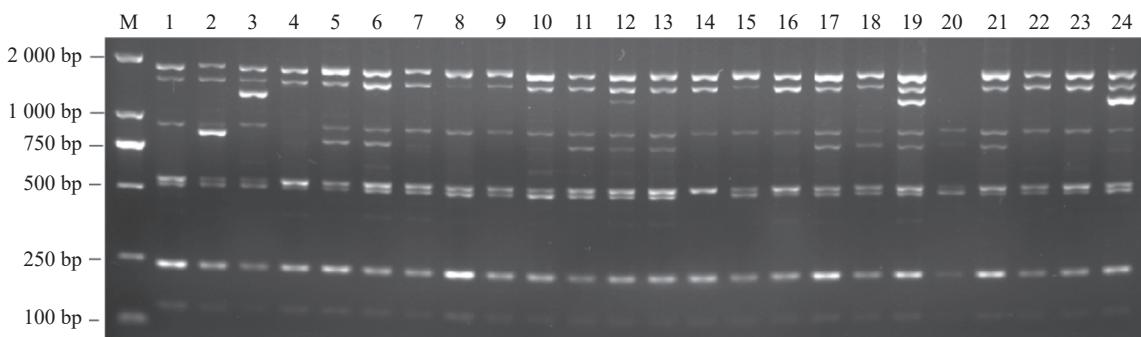
利用筛选出来的 6 对 SRAP 引物对 40 份甜樱桃品种进行 PCR 扩增, 扩增出的条带稳定且清晰

表 3 SCoT 引物名称及序列
Table 3 Names and sequences of SCoT primers

名称 Name	引物序列5'→3' Primer Sequence 5'→3'	名称 Name	引物序列5'→3' Primer Sequence 5'→3'
SCoT12	ACGACATGGCGACCAACG	SCoT27	ACCATGGCTACCACCGTG
SCoT15	ACGACATGGCGACCGCGA	SCoT62	ACCATGGCTACCACGGAG
SCoT19	ACCATGGCTACCACCGGC	SCoT72	CCATGGCTACCACCGGCC
SCoT21	ACGACATGGCGACCCACA		

(部分结果见图 1)。通过 Popgene 1.32 软件分析可知(表 4)，共扩增出 DNA 位点 74 个，其中多态性位点 67 个，平均每个引物组合扩增位点 12.3 个，平均多态性位点 11.2 个，多态性百分率 90.54%，说明这 40 份甜樱桃品种的多态性比率较高，遗传背景较为丰富，这 6 对 SRAP 引物也能较好揭示甜樱桃的遗传信息。6 对 SRAP 引物的等位基因数 (Na) 为 1.8333~

2.0000，平均等位基因数 (Na) 为 1.9100。有效等位基因数 (Ne) 为 1.3245~1.6451，平均有效等位基因数 (Ne) 为 1.4554。Nei's 基因遗传多样性指数 (H) 为 0.2008~0.3587，平均 Nei's 基因遗传多样性指数 (H) 为 0.2782。Shannon's 信息指数 (I) 为 0.3134~0.5205，平均 Shannon's 信息指数 (I) 为 0.3701。



1~24 为表 1 中的试验编号 1~24 的甜樱桃品种。

Note: 1-24: cultivars numbers shown in Table 1.

图 1 SRAP 引物 me4/em13 对 24 份甜樱桃品种材料扩增琼脂糖电泳图结果

Fig. 1 Agarose electrophoresis of 24 sweet cherry cultivars amplified by SRAP primer me4/em13

表 4 不同甜樱桃品种 SRAP 分子标记多态性及遗传多样性分析
Table 4 Polymorphism and genetic diversity of sweet cherry cultivars analyzed based on SRAP markers

引物 Primer	总条带数 Number of total bands	多态性条带数 Number of polymorphic bands	多态性百分率 Percentage of polymorphic bands/%	等位基因数 Observed number of alleles (Na)	有效等位基因数 Effect number of alleles (Ne)	Nei's 基因遗传 多样性指数 Nei's gene diversity (H)	Shannon's 信息指数 Shannon's information index (I)
me4/em13	9	9	100.00	2.0000	1.4506	0.2915	0.4529
me5/em11	16	15	93.75	1.9375	1.4471	0.2684	0.4126
me7/em23	13	12	92.31	1.9231	1.4281	0.2736	0.4263
me8/em4	10	9	90.91	1.9091	1.6451	0.3587	0.5205
me14/em23	12	10	83.33	1.8333	1.3245	0.2008	0.3134
me26/em24	14	12	85.71	1.8571	1.4372	0.2759	0.4250
合计 Total	74	67					
均值 Mean	12.3	11.2	90.54	1.9100	1.4554	0.2782	0.3701

2.2 SRAP 分子标记 UPGMA 聚类分析及主坐标分析

基于 SRAP 分子标记数据，对供试的 40 份甜樱

桃品种利用 NTsys 软件进行 UPGMA (非加权算术平均法) 聚类分析，并构建亲缘关系树状图 (图 2)。

由UPGMA聚类分析图可知,40份甜樱桃的遗传相似系数为0.67~0.95。其中,明珠和罗亚理相似系数最大,为0.95,但是这有可能是由于引种时造成品种

混乱,而造成了同物异名现象。红蜜和其他39份材料相似系数最小,为0.67,说明红蜜和其他品种的遗传差异较大。

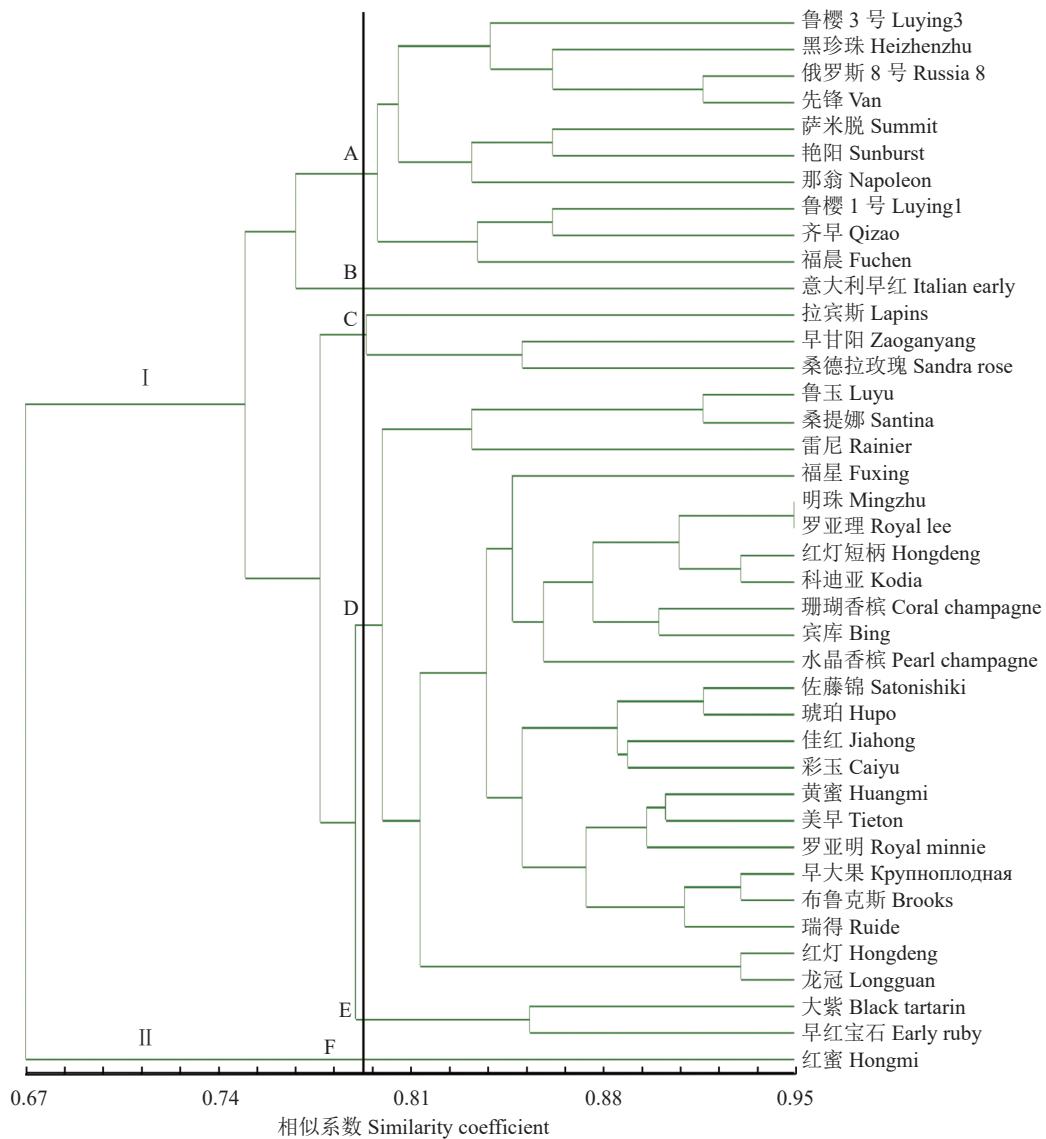


图2 不同甜樱桃品种SRAP标记UPGMA聚类分析

Fig. 2 UPGMA cluster diagram of SRAP markers in sweet cherry cultivars

从聚类图(图2)中可以看出,甜樱桃品种之间的亲缘关系非常复杂。相似系数在0.75左右,40份甜樱桃材料可以分为I和II两类。其中I类包含39个品种,II类中只包含红蜜一个品种。在相似系数0.77左右,I类可以分为两个亚组,在相似系数0.78左右,第一个亚组可以分为A、B两组。其中A组包括鲁樱3号、黑珍珠、俄罗斯8号、先锋、萨米脱、艳阳、那翁、鲁樱1号、齐早和福晨。B组只有意大利早红一个品种。在相似系数0.79左右,第二个亚组可以分为C、D、E三组。其中C组包括拉宾斯、早甘阳和桑德拉玫瑰。D组包含品种最多,

在相似系数0.85左右,这一组可以分成三个小组,第一小组包括鲁玉、桑提娜和雷尼。第二小组包括福星、明珠、罗亚理、红灯短柄、科迪亚、珊瑚香槟、宾库、水晶香槟、佐藤锦、琥珀、佳红、彩玉、黄蜜、美早、罗亚明、早大果、布鲁克斯和瑞得。第三小组包括红灯和龙冠,这个结果与这两个品种有着相同的亲本,亲缘关系较近相符。E组包括大紫和早红宝石。

由聚类图可看出,D组共有23个甜樱桃品种,且9个黄色果皮品种中的7个都聚在这一组,只有红蜜和那翁聚类在其他组,佐藤锦、琥珀、佳红、

和彩玉单独聚类, 遗传相似系数在 0.9 以上, 这表明 SRAP 分子标记基本可以将黄色品种甜樱桃与红色品种区分开。

利用 NTSYS 软件对 SRAP 标记数据进行分析, 根据 40 份甜樱桃品种材料间的相似系数进行主坐标分析 (PCoA), 如图 3-A 所示, 图中位置远近即表

示关系远近, 根据 SRAP 标记主坐标分析结果, 第 1~3 主坐标分别解释总遗传变异的 15.87%、8.18%、7.79%, 一共占总遗传变异的 31.84%。主坐标分析将 40 个甜樱桃品种分为 8 类, 相对于 UPGMA 分类中将 40 个甜樱桃品种分为 6 类, 结果略有差异, 主坐标分析可以在侧面验证 UPGMA 聚类分析 (图 3-B)。

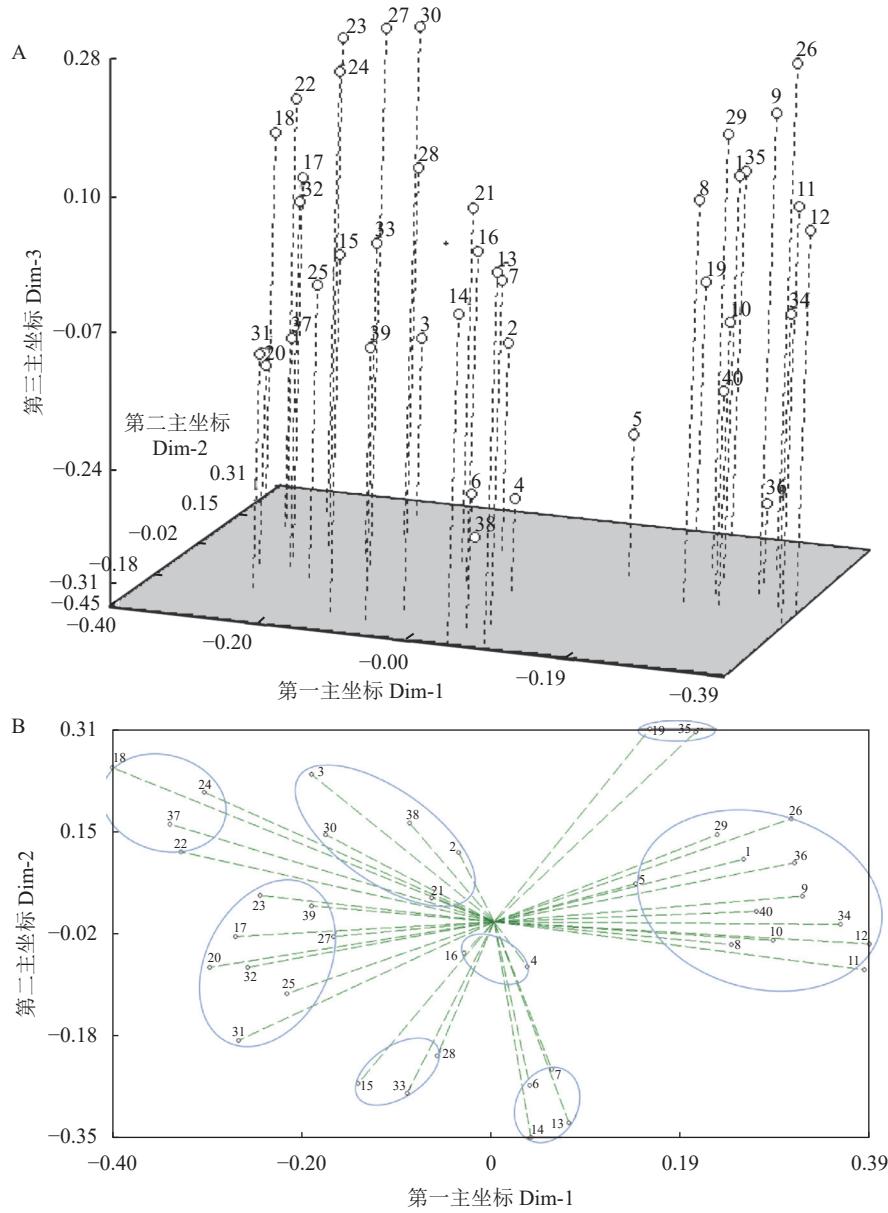


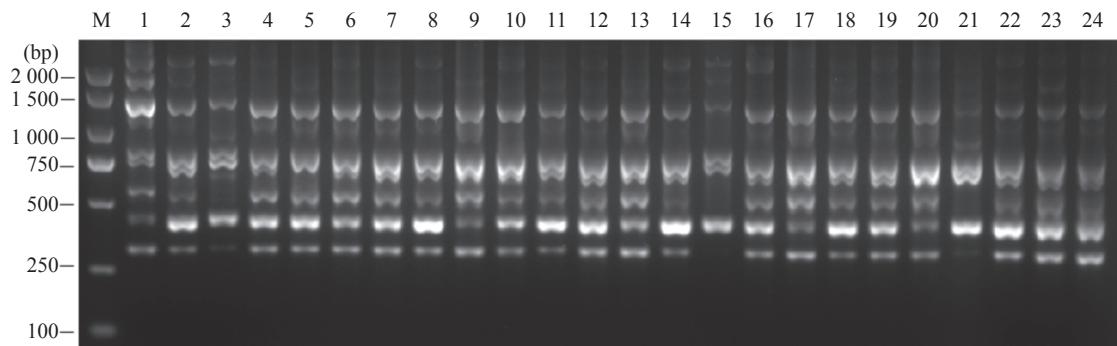
图 3 不同甜樱桃品种 SRAP 标记主坐标分析

Fig. 3 Principal coordinates chart on SRAP markers in sweet cherry cultivars

2.3 SCoT 标记多态性及遗传多样性分析

利用筛选出来的 7 条 SCoT 引物对 40 份甜樱桃品种进行 PCR 扩增, 扩增出的条带稳定且清晰 (图 4)。通过 Popgene 1.32 软件分析可知 (表 5), 共扩增出 DNA 位点 74 个, 其中多态性位点 69 个,

平均每个引物组合扩增位点 10.6 个, 平均多态性位点 9.9 个, 多态性百分率 93.24%。由表 4 可知, 每个引物的等位基因数 (Na) 为 1.7778~2.0000, 平均等位基因数 (Na) 为 1.9278。有效等位基因数 (Ne) 为 1.2752~1.4251, 平均有效等位基因数 (Ne) 为



1~24 为表 1 中的试验编号 1~24 的品种。

1-24: cultivars numbers shown in Table 1.

图 4 SCoT 引物 SCoT72 对 24 份甜樱桃品种材料扩增琼脂糖电泳图

Fig. 4 Agarose electrophoresis of 24 sweet cherry cultivars amplified by SCoT72

表 5 不同甜樱桃品种 SCoT 分子标记多态性及遗传多样性分析

Table 5 Polymorphism and genetic diversity of sweet cherry cultivars analyzed based on SCoT markers

引物 Primer	总条带数 Number of total bands	多态性条带数 Number of polymorphic bands	多态性百分率 Percentage of polymorphic bands/%	等位基因数 Observed number of alleles (Na)	有效等位基因数 Effect number of alleles (Ne)	Nei's 基因遗传 多样性指数 Nei's gene diversity (H)	Shannon's 信息指数 Shannon's information index (I)
SCoT12	9	9	100.00	2.0000	1.3428	0.2262	0.3671
SCoT15	9	9	100.00	2.0000	1.3098	0.2059	0.3380
SCoT19	12	12	100.00	2.0000	1.2752	0.1793	0.3026
SCoT21	13	13	100.00	2.0000	1.4005	0.2493	0.3939
SCoT27	10	8	80.00	1.8000	1.4251	0.2455	0.3693
SCoT62	12	11	91.67	1.9167	1.3015	0.1835	0.2922
SCoT72	9	7	77.78	1.7778	1.2847	0.1755	0.2765
合计 Total	74	69					
均值 Mean	10.6	9.9	93.24	1.9278	1.3342	0.2093	0.3342

1.3342。Nei's 基因遗传多样性指数 (H) 为 0.1755~0.2493, 平均 Nei's 基因遗传多样性指数 (H) 为 0.2093。Shannon's 信息指数 (I) 为 0.2765~0.3939, 平均 Shannon's 信息指数 (I) 为 0.3342。

2.4 SCoT 分子标记聚类分析及主坐标分析

基于 SCoT 分子标记数据, 对供试的 40 份甜樱桃品种利用 NTSYS 软件进行 UPGMA (非加权算术平均法) 聚类分析, 并构建亲缘关系树状图 (图 5)。由 UPGMA 聚类分析图可知, 40 份甜樱桃品种材料的遗传相似系数数值分布在 0.72~0.93。其中, 布鲁克斯和桑提娜相似系数最高, 为 0.93。

由 UPGMA 聚类图可知, 在相似系数 0.72 时, 40 份甜樱桃品种材料可以分为 I、II 两大类, I 类包括 27 个甜樱桃品种, II 类包括 13 个甜樱桃品种。在相似系数 0.77 左右, I 类的 27 个品种可以分为 A、B、C、D 四组, A 组包括鲁樱 3 号、佳红、布鲁克斯、桑提娜、那翁、佐藤锦、彩玉、罗亚明、黄蜜、琥珀和先锋 11 个品种。B 组包括拉宾斯、艳

阳、宾库、意大利早红和早红宝石 5 个品种。C 组包括早甘阳、大紫、桑德拉玫瑰、珊瑚香槟、鲁玉、罗亚理、红灯短柄和科迪亚 8 个品种。D 组包括雷尼、水晶香槟和红蜜 3 个品种。II 类 13 个品种在相似系数 0.75 左右可以分为 E、F 两组, 其中 E 组只有齐早一个品种。F 组包括美早、黑珍珠、俄罗斯 8 号、鲁樱 1 号、福晨、早大果、萨米脱、红灯、龙冠、明珠、瑞得和福星 12 个甜樱桃品种。

由聚类图可知, 佳红、那翁、佐藤锦、彩玉、黄蜜和琥珀, 共 6 个黄色品种聚在 A 组, 遗传相似系数在 0.8 左右, 另外 3 个黄色品种雷尼和红蜜聚在 D 组, 明珠聚在 F 组, 表明 SCoT 标记也基本可以区分黄色和红色甜樱桃品种。

利用 NTSYS 软件对 SCoT 标记数据进行分析, 根据 40 份甜樱桃品种材料间的相似系数进行主坐标分析 (PCoA), 如图 6-A, 根据 SCoT 标记主坐标分析结果, 第 1~3 主坐标分别解释总遗传变异的 14.40%、7.48%、7.24%, 一共占总遗传变异的 29.12%。主坐

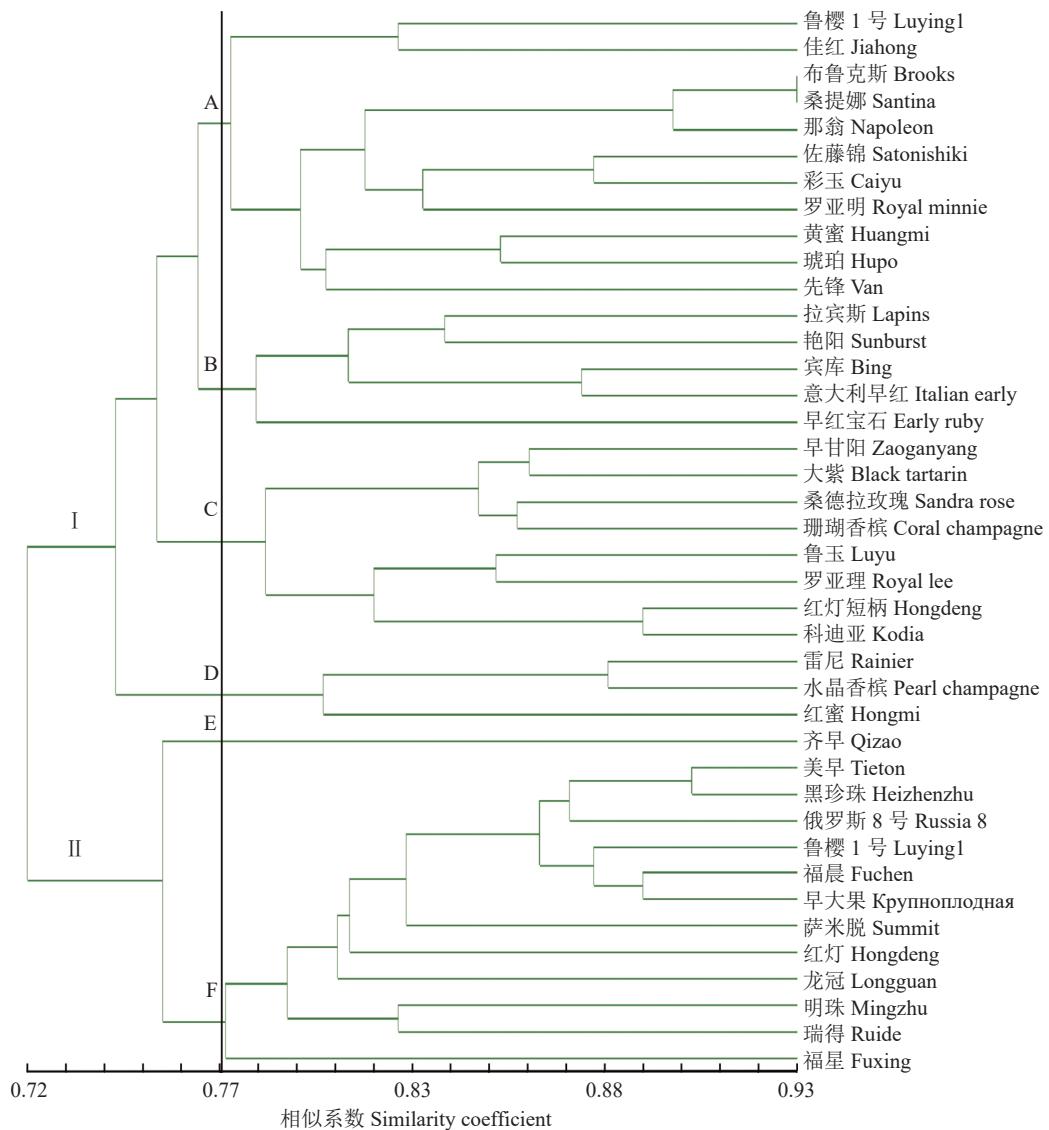


图5 不同甜樱桃品种 SCoT 标记 UPGMA 聚类分析

Fig. 5 UPGMA cluster diagram of SCoT markers in sweet cherry cultivars

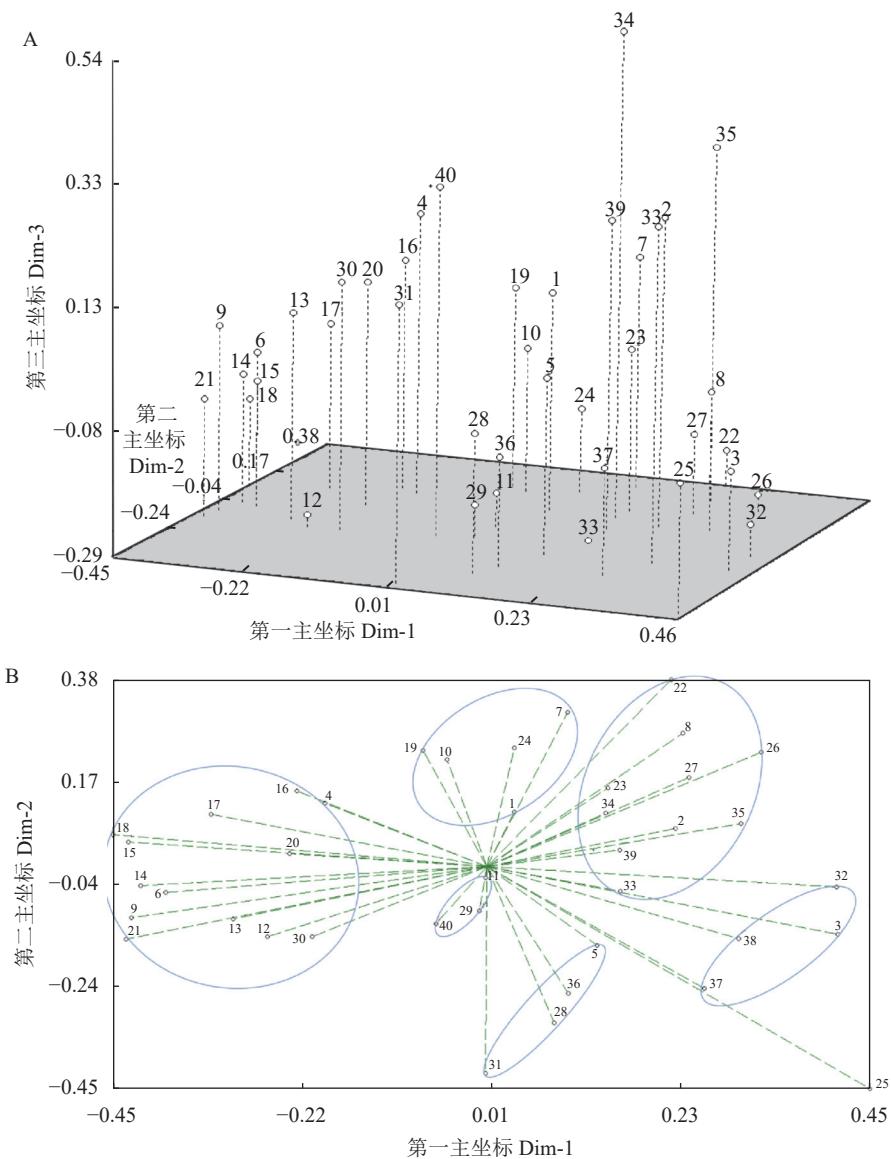
标分析将 40 个甜樱桃品种分为 7 类 (图 6-B), 相对于 UPGMA 分类中将 40 个甜樱桃品种分为 6 类, 结果差异不大。

3 讨论与结论

3.1 甜樱桃遗传多样性分析

目前分子辅助育种已经成为了解遗传背景、选育新品种必不可少的辅助工具, 其目的就是为了在育种前以及育种早期锁定目标性状, 提高获得目标性状的可能性。从较早的 RAPD 和 RFLP 分子标记到现在应用广泛的 SSR 分子标记, 对于研究甜樱桃遗传多样性提供了更便利的工具。本研究利用的两种分子标记表明, 甜樱桃品种之间的遗传相似系数大部分在 0.7 以上, 这表明甜樱桃品种间的遗传距离较低, 具有较高的遗传相似度。这个研究结果与前人

利用 RAPD^[21]、AFLP^[22] 和 SSR^[23] 等分子标记得出结论相近, 同时, 也有部分研究表明, 甜樱桃个别品种间遗传相似系数在 0.5 左右^[24,25], 更有研究发现低至 0.36^[15]。这应该与进行遗传多样性分析所选择的材料相关。大部分研究都会将中国樱桃和甜樱桃一起分析, 中国樱桃与甜樱桃之间的遗传相似系数一般在 0.5 左右^[14]。本试验基于 SRAP 和 SCoT 标记的扩增位点多态性百分比分别是 90.54% 和 93.24%, 均比蔡宇良等^[26]利用 RAPD 标记得到的多态性低, 主要是因为其材料中包含了部分中国樱桃。本试验 SRAP 标记多态性百分比较路娟等^[14]的结果 84.6% 稍高, SCoT 标记多态性百分比比彭芳芳等^[16]的结果 84.4% 高, 说明本研究中所筛选的引物更适用于甜樱桃遗传多样性分析。



1~40 为表 1 中的品种编号。

1-40: cultivars numbers shown in Table 1.

图 6 不同甜樱桃品种 SCoT 标记主坐标分析

Fig. 6 Principal coordinates chart on SCoT markers in sweet cherry cultivars

3.2 甜樱桃 SRAP 与 SCoT 标记聚类分析

前人利用 SSR 标记对甜樱桃进行聚类分析时, 发现大部分来源于不同地区的甜樱桃可以区分开^[27,28], 路娟等^[14]利用 SRAP 标记进行甜樱桃聚类分析时也同样可以将大部分品种根据地理来源区分开。本试验中相同来源的甜樱桃品种并没有全部根据地理来源区分开, 最主要原因是前人研究中所选用甜樱桃品种是各个地区本土培育, 而本研究中的品种是在引种后再进行本土化育种所得到的品种, 此时已存在频繁的基因交流。来自美国和加拿大的甜樱桃品种和部分国内新育成的甜樱桃品种并没有按照地理来源区分, 很可能是因为国内大部分甜樱桃品种亲本从北美地区引进, 因而部分品种具有相同亲本或

者亲缘关系较近, 这说明目前甜樱桃育种种质资源交流已经很广泛。

综上, 本研究采用 SRAP 和 SCoT 对 40 份甜樱桃进行标记聚类, 结果大部分黄色甜樱桃品种可以聚在同一组中, 说明筛选的引物与甜樱桃果皮颜色性状连锁。王丹丹等^[28]利用 EST-SSR 标记进行遗传多样性聚类分析时也能将黄色系甜樱桃聚为一类。此前高平等^[29]利用 RAPD、ISSR、SSR 标记分析甜樱桃杂交后代遗传多样性及甜樱桃红色果皮性状的 QTL, 但发现 RAPD 和 SSR 标记存在一定局限性, RAPD 标记稳定性较差, 而 SSR 可用标记较少。本研究对比两种标记可知, SRAP 和 SCoT 标记聚类结果并不一致, SRAP 标记把更多的黄色品种聚为一类

且相似系数更高, 但同一组的还有另外的红色品种, 而SCoT标记可以将9个黄色品种中的6个聚为一类且组内没有红色品种。这表明SCoT标记在区分甜樱桃果皮颜色优于SRAP标记, 表明了SCoT标记在性状关联分析等方面的应用潜力更大。

参考文献:

[1] KHADIVI A, MOHAMMADI M, ASGARI K. Morphological and pomological characterizations of sweet cherry (*Prunus avium* L.), sour cherry (*Prunus cerasus* L.) and duke cherry (*Prunus × gondouinii* Rehd.) to choose the promising selections [J]. *Scientia Horticulturae*, 2019, 257: 108719.

[2] MARIETTE S, LEFRANC M, LEGRAND P, et al. Genetic variability in wild cherry populations in France. Effects of colonizing processes [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 94 (6): 904–908.

[3] 段续伟, 李明, 谭锐, 等. 新中国果树科学研究70年: 樱桃 [J]. 果树学报, 2019, 36 (10): 1339–1351.

DUAN X W, LI M, TAN Y, et al. Fruit scientific research in New China in the past 70 years: Cherry [J]. *Journal of Fruit Science*, 2019, 36 (10): 1339–1351. (in Chinese)

[4] 张开春, 闫国华, 张晓明, 等. 中国甜樱桃的栽培历史、生产现状及发展建议 [J]. 落叶果树, 2017, 49 (6): 1–5.

ZHANG K C, YAN G H, ZHANG X M, et al. Cultivation history, production status and development suggestions of sweet cherry in China [J]. *Deciduous Fruits*, 2017, 49 (6): 1–5. (in Chinese)

[5] 陈豫静. 基于SSR、SRAP标记的榛属种质资源遗传多样性及亲缘关系分析[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2019.

CHEN Y J. *Genetic diversity and relationship analysis of hazelnut germplasm resources based on SSR, SRAP marker*[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2019. (in Chinese)

[6] 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]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 103 (2/3): 455–461.

[7] 杨迎花, 李先信, 曾柏全, 等. 新型分子标记SRAP的原理及其研究进展 [J]. 湖南农业科学, 2009 (5): 15–17, 20.

YANG Y H, LI X X, ZENG B Q, et al. The principle and research advancement of sequence-related amplified polymorphism [J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2009 (5): 15–17, 20. (in Chinese)

[8] MAHJBI A, BARAKET G, OUESLATI A, et al. Start Codon Targeted (SCoT) markers provide new insights into the genetic diversity analysis and characterization of Tunisian *Citrus* species [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2015, 61: 390–398.

[9] 蔡元保, 杨祥燕, 陈豪军, 等. SRAP结合SCoT标记分析番木瓜种质的遗传多样性 [J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15 (2): 292–298.

CAI Y B, YANG X Y, CHEN H J, et al. Genetic diversity analysis of *Papaya* resources by SRAP and SCoT combination [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2014, 15 (2): 292–298. (in Chinese)

[10] 文露, 王永清, 邓群仙, 等. 皮球桃黄肉芽变的ISSR和SRAP分子标记鉴定 [J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39 (11): 5180–5185.

WEN L, WANG Y Q, DENG Q X, et al. Identification of a yellow-flesh sport of piqitao peach(*Prunus persica*) using ISSR and SRAP markers [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39 (11): 5180–5185. (in Chinese)

[11] 刘均. 基于SRAP和IRAP标记的诱变李嫁接株系遗传变异分析[D]. 雅安: 四川农业大学, 2017.

LIU J. *Genetic variation analysis of mutagenic grafted plum lines based on SRAP and IRAP markers*[D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2017. (in Chinese)

[12] SHARMA K, XUAN H B, SEDLÁK P. Assessment of genetic diversity of Czech sweet cherry cultivars using microsatellite markers [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2015, 63: 6–12.

[13] LACIS G, RASHAL I, RUISA S, et al. Assessment of genetic diversity of Latvian and Swedish sweet cherry (*Prunus avium* L.) genetic resources collections by using SSR (microsatellite) markers [J]. *Scientia Horticulturae*, 2009, 121 (4): 451–457.

[14] 路娟, 张绍铃, 刘庆忠, 等. 樱桃SRAP-PCR体系优化及其遗传多样性分析 [J]. 果树学报, 2009, 26 (2): 163–169.

LU J, ZHANG S L, LIU Q Z, et al. Optimization of SRAP-PCR system and its application in genetic diversity analysis of cherry [J]. *Journal of Fruit Science*, 2009, 26 (2): 163–169. (in Chinese)

[15] MASOUD A, MAJID T, HAMID R G, et al. Genetic diversity and population structure of mahaleb cherry (*Prunus mahaleb* L.) and sweet cherry (*Prunus avium* L.) using SRAP markers [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2012, 40: 112–117.

[16] 彭芳芳, 龙治坚, 魏召新, 等. 樱桃种质SCoT分子标记与叶片表型性状关联分析 [J]. 园艺学报, 2021, 48 (2): 325–335.

PENG F F, LONG Z J, WEI Z X, et al. Association analysis of SCoT markers and leaf phenotypic traits in cherry germplasm [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2021, 48 (2): 325–335. (in Chinese)

[17] 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 Molecular Biology Reporter*, 2009, 27 (1): 86–93.

[18] LUO C, HE X H, CHEN H, et al. Analysis of diversity and relationships among mango cultivars using Start Codon Targeted (SCoT) markers [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2010, 38 (6): 1176–1184.

[19] 廖柏勇, 王芳, 陈丽君, 等. 基于SRAP分子标记的苦楝种质资源遗传多样性分析 [J]. 林业科学, 2016, 52 (4): 48–58.

LIAO B Y, WANG F, CHEN L J, et al. Genetic diversity of germplasm resources of *Melia azedarach* revealed by SRAP markers [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2016, 52 (4): 48–58. (in Chinese)

[20] 陈红, 杨鑫, 安华明. 贵州桃种质资源遗传多样性的SCoT分析 [J]. 西北植物学报, 2014, 34 (8): 1559–1564.

CHEN H, YANG X, AN H M. Genetic diversity of peach accessions in Guizhou analysed by SCoT markers [J]. *Acta Botanica Borealis-Occidentalis Sinica*, 2014, 34 (8): 1559–1564. (in Chinese)

[21] 陈晓流, 陈学森, 束怀瑞, 等. 15个樱桃品种的RAPD分析 [J]. 果树学报, 2009, 26 (2): 163–169.

学报, 2004, 21 (6): 556-559.

CHEN X L, CHEN X S, SHU H R, et al. RAPD analysis of 15 cherry cultivars [J]. *Journal of Fruit Science*, 2004, 21 (6): 556-559. (in Chinese)

[22] 田长平, 张福兴, 刘晓静, 等. 樱桃荧光AFLP反应体系优化及应用 [J]. 北方园艺, 2014 (14): 115-118.

TIAN C P, ZHANG F X, LIU X J, et al. Optimization and application of fluorescent-AFLP analysis system on cherry [J]. *Northern Horticulture*, 2014 (14): 115-118. (in Chinese)

[23] LIU C L, QI X L, SONG L L, et al. Species identification, genetic diversity and population structure of sweet cherry commercial cultivars assessed by SSRs and the gametophytic self-incompatibility locus [J]. *Scientia Horticulturae*, 2018, 237: 28-35.

[24] 陈仲刚. 甜樱桃S基因型鉴定及品种遗传关系SSR分析[D]. 雅安: 四川农业大学, 2014.

CHEN Z G. *Identification of self-incompatibility genotypes of sweet cherries and the genetic relationship by SSR analysis*[D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2014. (in Chinese)

[25] 周杰, 于鹏, 陈学森, 等. 甜樱桃品种遗传多样性的SSR分析 [J]. 山东农业科学, 2008, 40 (3): 26-28,42.

ZHOU J, YU P, CHEN X S, et al. Analysis of genetic diversity for sweet cherry varieties by SSR marker [J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2008, 40 (3): 26-28,42. (in Chinese)

[26] 蔡宇良, 曹东伟, 李珊, 等. 甜樱桃品种及其砧木的RAPD分析 [J]. 西北植物学报, 2006, 26 (6): 1125-1132.

CAI Y L, CAO D W, LI S, et al. RAPD analysis of *Prunus avium* L. Varieties and their rootstocks [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalis Sinica*, 2006, 26 (6): 1125-1132. (in Chinese)

[27] 王丹丹, 付化瑞, 张彦文. 甜樱桃栽培种指纹图谱构建及遗传多样性分析 [J]. 西北农业学报, 2017, 26 (12): 1813-1820.

WANG D D, FU H R, ZHANG Y W. Establishment of DNA fingerprinting and analysis of genetic diversity among *Prunus avium* cultivars [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2017, 26 (12): 1813-1820. (in Chinese)

[28] STANYS V, BANIULIS D, MORKUNAITE-HAIMI S, et al. Characterising the genetic diversity of Lithuanian sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars using SSR markers [J]. *Scientia Horticulturae*, 2012, 142: 136-142.

[29] 高平, 郑玮, 冯瑛, 等. 甜樱桃遗传图谱的构建及果皮红色性状 QTL分析 [J]. 园艺学报, 2012, 39 (1): 135-142.

GAO P, ZHENG W, FENG Y, et al. Genetic mapping and QTL analysis for fruit color in sweet cherry using the intra-specific crossing 'rainier' × '8-100' [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2012, 39 (1): 135-142. (in Chinese)

(责任编辑: 黄爱萍)