

番木瓜主栽品种 SCoT 指纹图谱 构建及遗传变异分析

杨祥燕, 蔡元保*, 黄秋伟, 陈 涛, 覃剑峰, 彭靖茹

(广西亚热带作物研究所, 南宁 530001)

摘 要: 利用 SCoT 标记对中国 22 个番木瓜主要栽培品种进行遗传多样性分析和指纹图谱构建, 为番木瓜品种资源的鉴定和杂交亲本的选配提供技术参考。结果显示: (1) SCoT 标记有效等位基因数 (N_e) 平均为 1.47, Nei's 基因多样性指数 (H) 平均为 0.26, Shannon's 信息指数 (I) 平均为 0.39, 表明 SCoT 标记具有较高的多态性检测效率。(2) 聚类分析和主坐标分析结果表明, 大部分番木瓜品种间的遗传相似系数为 0.79~0.90, 品种间遗传多样性水平较低; 在相似性系数为 0.75 时可将所有品种分为 3 个组群。(3) 6 个 SCoT 引物可以将 22 个番木瓜品种完全区分开, 每个品种都各有独特的指纹图谱, 置信概率达到 99.976%。

关键词: 番木瓜; 主栽品种; SCoT; 指纹图谱; 遗传多样性

中图分类号: Q789

文献标志码: A

SCoT Fingerprints and Genetic Variations of the Papaya (*Carica papaya* L.) Major Cultivars

YANG Xiangyan, CAI Yuanbao*, HUANG Qiuwei, CHEN Tao, QIN Jianfeng, PENG Jingru

(Guangxi Subtropical Crops Research Institute, Nanning 530001 China)

Abstract: The aim of this study was to construct a DNA fingerprinting database of 22 papaya major cultivars in China, and the genetic diversity was analyzed based on start codon targeted polymorphism (SCoT). The results are: (1) Effective number of alleles (N_e), Nei's gene diversity (H) and Shannon's information index (I) of SCoT were 1.47, 0.26 and 0.39, respectively. The results indicated that SCoT markers could detect higher genetic diversity in the papaya cultivars. (2) UPGMA cluster analysis and principal coordinates analysis (PCOA) showed that the range of genetic similarity (GS) was 0.79~0.90 in most of the papaya cultivars with a low genetic diversity. All cultivars could be divided into three groups at the genetic similarity of 0.75. (3) The 22 cultivars of papaya could be absolutely identified by six SCoT primers with 99.976% probability of confidence and every cultivar of papaya had a unique fingerprint map. These results provide a beneficial reference for genetic breeding of papaya in China.

Key words: papaya (*Carica papaya* L.); major cultivar; SCoT; fingerprinting; genetic diversity

番木瓜 (*Carica papaya* L.) 原产于南美洲, 是多年生常绿大型草本植物, 在中国素有“岭南果王”的美称, 具有重要的营养价值和经济价值。长期的人工杂交和自然选择使得番木瓜的遗传背景非常复

杂, 同时由于少数骨干杂交亲本的反复使用, 导致栽培品种的遗传基础日益狭窄, 仅依靠形态特征已无法真实地反映出品种间的遗传关系, 给番木瓜种质资源的有效利用带来极大的困难。分子标记技术因

收稿日期: 2013-06-05; 修改稿收到日期: 2013-07-16

基金项目: 广西直属公益性科研院所基本科研业务费专项 (桂热研 201006); 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201203021)

作者简介: 杨祥燕 (1984—), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事果树生理与分子生物学研究。E-mail: yangxiangyan84412@126.com

* 通信作者: 蔡元保, 硕士, 助理研究员, 主要从事植物生理与分子生物学研究。E-mail: caiyuanbao205@163.com

其快速、可靠等特点已成为品种鉴定和遗传多样性分析的有效手段,在分子水平上所建立的指纹图谱技术可以弥补形态鉴定的局限。分子标记技术已成功应用于多种植物的指纹图谱及其遗传多样性分析^[1-2]。目前,在国外利用分子标记对番木瓜指纹图谱构建^[3]和遗传多样性分析^[4-6]已有较大的研究进展。但是,在国内分子标记应用于番木瓜种质资源的遗传多样性研究鲜有报道^[7],尤其是中国番木瓜主要栽培品种的指纹图谱构建还未曾报道。

目标起始密码子多态性(start codon targeted polymorphism, SCoT)是一种基于单引物扩增反应的新型分子标记方法,其原理是根据植物基因中的 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^[8],具有操作简单、成本低、多态性丰富、引物通用、可获得丰富的遗传信息等优点,已应用于园艺植物的遗传多样性研究,如芒果^[9]、龙眼^[10]、澳洲坚果^[11]等。与传统的分子标记相比,SCoT 标记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^[8]。本研究采用 SCoT 标记对中国 22 个番木瓜主要栽培品种进行遗传多样性和亲缘关系分析,并构建其 DNA 指纹图谱,为番木瓜品种鉴定、杂交亲本选配和遗传改良等研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料为 22 个中国番木瓜主要栽培品种(表 1),均采自于广西亚热带作物研究所番木瓜种质资源圃,其中‘日升’、‘白皮日升’、‘蓝茎’和‘夏威夷’为国外引进品种,其余品种均为国内杂交品种。本实验在广西亚热带优势作物繁育及综合开发利用重点实验室完成,植物材料按照各品种单株进行采集,选取健康植株上无病虫害、干净的幼嫩叶片,液氮速冻后于-80℃保存。所用的 10 个 SCoT 引物是由 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^[12],由上海生工生物技术有限公司合成。*Taq* 聚合酶和 dNTPs 均由天根生化科技(北京)有限公司生产。

1.2 方 法

1.2.1 DNA 的提取与检测 采用 CTAB 改良法^[13]提取番木瓜嫩叶的基因组 DNA,并进行 DNA 样品浓度和纯度的测定。模板 DNA 工作浓度稀释至 30 ng/ μ L,置于-20℃保存备用。

1.2.2 SCoT-PCR 扩增及其产物检测 利用筛选的 10 个 SCoT 引物(表 2),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),对所有供试品种进行 SCoT-PCR 扩增,重复 2 次。番木瓜 SCoT-PCR 扩增体系、扩增程序及电泳检测按照杨祥燕等^[12]的方法进行。

表 1 供试番木瓜材料的编号和品种名称

Table 1 Code and name of tested papaya cultivars

编号 Code	品种名称 Name of cultivars
1	穗中红 48 号 Suizhonghong 48
2	美中红 Meizhonghong
3	桂热 1 号 Guire 1
4	桂热 2 号 Guire 2
5	日升 Sunrise
6	白皮日升 White-sunrise
7	万顷沙 1 号 Wangqingsha 1
8	红铃 Hongling
9	红铃 2 号 Hongling 2
10	台农 1 号 Tainong 1
11	穗黄 Suihuang
12	红妃 Hongfei
13	蓝茎 Blue stem
14	园优 Yuanyou
15	红日 1 号 Hongri 1
16	庞博 1 号 Pangbo 1
17	庞博 2 号 Pangbo 2
18	庞博 3 号 Pangbo 3
19	新世纪 Xinchiji
20	风云 1 号 Fengyun 1
21	兴农矮 48-2 号 Xingnong'ai 48-2
22	夏威夷 Hawaii

表 2 用于 SCoT 分析的引物序列

Table 2 The primers used in SCoT analyses for papaya

引物名称 Primer name	引物序列(5' - 3') Sequence(5' - 3')
SC3	CAACAATGGCTACCACCG
SC4	CAACAATGGCTACCACCT
SC19	ACCATGGCTACCACCGGC
SC20	ACCATGGCTACCACCGCG
SC23	CACCATGGCTACCACCAG
SC36	GCAACAATGGCTACCACC
SC46	AACAATGGCTACCACCAC
SC55	GCAACAATGGCGACCACA
SC59	GCAACCATGGCGACCACA
SC60	GCAAAAATGGCGACCACC

1.3 数据统计与分析

1.3.1 遗传多样性分析 对电泳图谱上清晰且可重复出现的条带记为“1”，同一位置没有出现的带记为“0”，从而生成由“1”和“0”组成的原始矩阵。应用 POPGENE 1.32 软件进行遗传多样性参数分析，计算多态性引物的有效等位基因数(Ne)、Nei’s 基因多样性指数(H)和 Shannon’s 信息指数(I)以及总群体的遗传分化系数(Gst)和基因流(Nm)。

1.3.2 聚类分析及相关性分析 用 NTSYS-pc 2.1e 软件中的 Jaccard 法计算品种间的遗传相似系数(GS)，并用 SAHNC clustering 中的 UPGMA 法进行聚类分析，绘制树状聚类图；再将聚类图转换为协表征矩阵，而后用 Mxcomp 程序对协表征矩阵和相似系数矩阵的相关性进行 Mantel 检测，计算相关性系数 r 值；此外，基于遗传相似系数进行主坐标分析(principal coordinates analysis, PCOA)，绘制三维空间和二维平面散点分布图以检验聚类结果。

1.4 指纹图谱构建

为了保证数据的准确性和可靠性，在多态性引物的电泳图谱中挑选清晰可辨且多态性和重复性好的条带用于指纹图谱构建。每条引物所有扩增片段按标准分子量从大到小的顺序排列，根据“0-1”矩阵以不同谱带的组合绘制成指纹图谱的标准化图。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^[14]。

2 结果与分析

2.1 番木瓜 SCoT 标记的引物多态性分析

利用筛选出的 10 个 SCoT 引物对 22 份番木瓜材料进行 SCoT-PCR 扩增，其中代表性扩增图谱见图 1。各引物的多态性统计结果显示(表 3)，各引物

有效等位基因数(Ne)的变化范围为 1.18~1.66，平均值为 1.47，Ne 值最高的引物为 SC20 + SC23 (1.66)，最低的引物为 SC46(1.18)；各引物 Nei’s 基因多样性指数(H)的变化范围为 0.10~0.35，平均值为 0.26，H 值最高的引物为 SC4 + SC23 和 SC20 + SC23，均为 0.35，最低的引物为 SC46 (0.10)；各引物 Shannon’s 信息指数(I)的变化范围在 0.17~0.50 之间，平均值为 0.39，I 值最高的引物为 SC4 + SC23 和 SC20 + SC23，均为 0.50，最低的引物为 SC46 (0.17)。可见，所筛选出的 10 个 SCoT 引物具有较高的多态性检测效率。

2.2 基于 SCoT 标记的聚类分析

基于 SCoT 标记的扩增结果，用 NTSYS-pc 软件进行 UPGMA 法聚类分析得出 22 个番木瓜品种的聚类图(图 2)。将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之间的相关性进行 Mantel 检验。检验结果表明，这 2 种矩阵相关性极

表 3 番木瓜 SCoT 标记的多态性分析

Table 3 Analysis of the SCoT generated banding patterns in papaya

引物 Primer	有效等位基因数 Effective number of alleles (Ne)	Nei’s 基因多样性指数 Nei’s gene diversity (H)	Shannon’s 信息指数 Shannon’s information index (I)
SC3	1.50	0.29	0.42
SC23	1.45	0.25	0.37
SC46	1.18	0.10	0.17
SC59	1.57	0.33	0.49
SC60	1.40	0.21	0.31
SC3+SC20	1.45	0.27	0.40
SC4+SC23	1.62	0.35	0.50
SC19+SC36	1.64	0.34	0.49
SC20+SC23	1.66	0.35	0.50
SC23+SC55	1.22	0.13	0.20
平均数 Mean	1.47	0.26	0.39

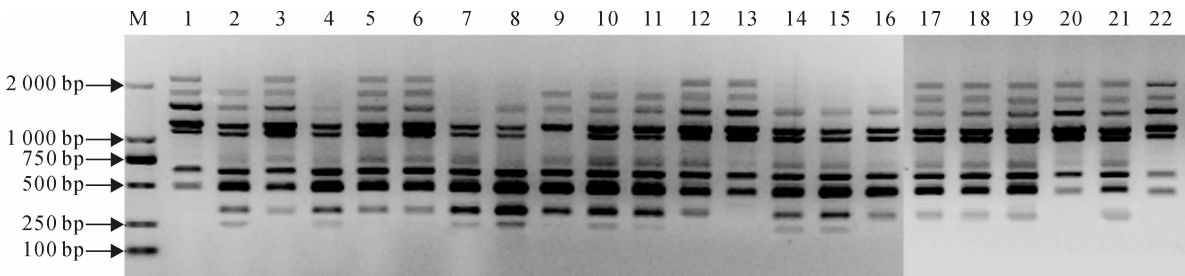


图 1 引物 SC23 对番木瓜所有试材的 SCoT-PCR 扩增
1~22 材料编号同表 1

Fig. 1 SCoT-PCR amplification of *C. papaya* cultivars by primer SC23
1~22 are the same as Table 1

显著,其相关系数为 $r=0.82$,说明聚类结果能很好地体现了番木瓜品种间的遗传关系。从聚类图 2 可见,SCoT 标记能将 22 个番木瓜品种完全区分开,当遗传相似系数(GS)在 0.75 处作截值时,可将所有番木瓜品种分为 3 组(I、II 和 III);当遗传相似系数(GS)在 0.85 处再次作截值时,I 组又可以细分为 3 亚组(A、B 和 C)。其中,A 亚组包括‘穗中红 48 号’、‘穗黄’和‘庞博 2 号’,B 亚组包括‘美中红’、‘桂热 2 号’、‘万顷沙 1 号’、‘红妃’、‘台农 1 号’、‘园优’和‘红日 1 号’,C 亚组包括‘日升’、‘夏威夷’、‘白皮日升’和‘桂热 1 号’,II 组包括‘蓝茎’、‘庞博 3 号’、‘新世纪’、‘兴农矮 48-2 号’和‘风云 1 号’,III 组包括‘红铃’、‘红铃 2 号’和‘庞博 1 号’。

2.3 番木瓜品种的遗传变异分析

用 NTSYS-pc 软件计算样品间的 Jaccard 遗传相似性系数(GS),得到供试品种相似系数矩阵。结果表明,22 个番木瓜品种两两间的 GS 值变化范围为 0.61~0.93,平均 GS 值为 0.74,大多数品种间的 GS 值在 0.79~0.90 之间,说明供试品种间既有相似的遗传背景又存在一定的差异。其中,‘红铃 2 号’和‘风云 1 号’之间 GS 值最小(0.61),亲缘关系最远,遗传差异最大;‘园优’和‘红日 1 号’之间 GS 值最大(0.93),亲缘关系最近,遗传差异最小。从整体来看,22 个番木瓜品种间的遗传相似系数比较高,遗传变异小,说明中国番木瓜主要栽培品种的遗传多样性比较低,遗传基础较为狭窄。利用 POP-GENE 1.32 软件分析番木瓜总群体的遗传分化系数(G_{st})和基因流(N_m)的结果显示, G_{st} 值为 0.14,

N_m 值为 2.99,表明中国番木瓜主要栽培品种的群体遗传分化不显著,总群体间的基因交流程度较小。

2.4 番木瓜品种主坐标分析(PCOA)

基于 Jaccard 遗传相似性系数对参试番木瓜品种进行主坐标分析,不同品种在坐标图中的位置能反映出它们之间的亲缘关系(图 3)。结果显示,前 3 个主坐标分别解释了 14.86%、12.40%和 9.25%的品种间相关性。主坐标分析的组群划分结果与聚类分析结果高度一致,将位置靠近的番木瓜品种划分在一起,可明显分为 3 组(I、II 和 III),I 组又可以大致分为 A、B 和 C 亚组,其中 II 和 III 组比较集中,而 I 组比较分散,说明 I 组比 II 和 III 组的遗传多样性更高。由图 2 和图 3 可知,虽然聚类分析和主坐标分析的组群划分结果一致,但是 2 种方法在研究组群内品种间亲缘关系方面上却存在一些差异。在聚类图(图 2)中 I 组可明显分为 A、B 和 C 亚组,而在主坐标分析图(图 3)中这 3 个亚组的分界不是很明显,B 亚组的部分品种还交错到 C 亚组中。比较 2 种分析结果可以看出,主坐标分析能从不同层面、不同方向更直观地反映出 22 个番木瓜品种间的遗传差异和亲缘关系,对聚类结果进行全面地解释,起到相互印证,相互补充的作用。

2.5 番木瓜指纹图谱构建与置信概率分析

根据最小差异原则兼顾鉴别品种指纹图谱的置信概率,选择了 SC3、SC23、SC3 + SC20、SC4 + SC23、SC19 + SC36 和 SC20 + SC23 共 6 个引物扩增的 13 个多态性位点建立了 22 个番木瓜品种的分子指纹图谱(图 4)。每个品种都有唯一的指纹图

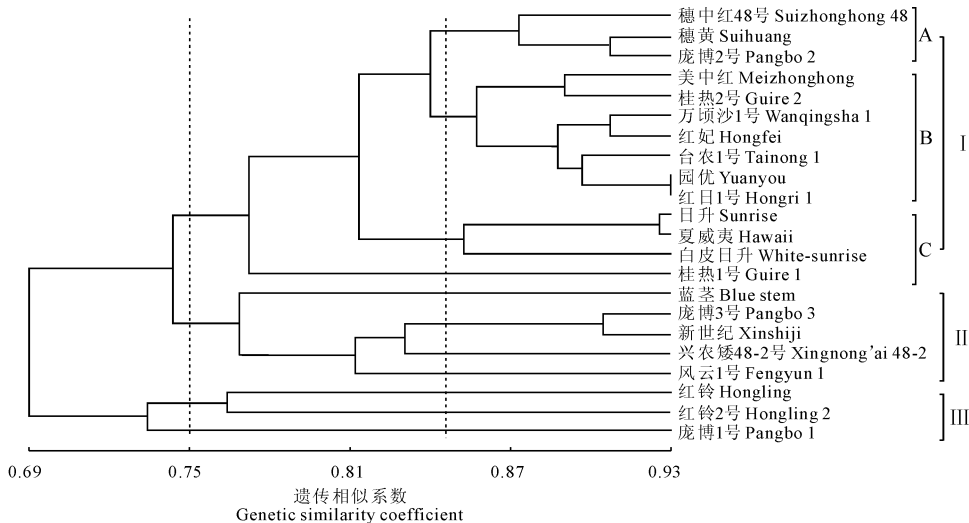


图 2 基于 SCoT 标记的番木瓜 UPGMA 聚类分析图

Fig. 2 UPGMA dendrogram for 22 samples of *C. papaya* based on SCoT data

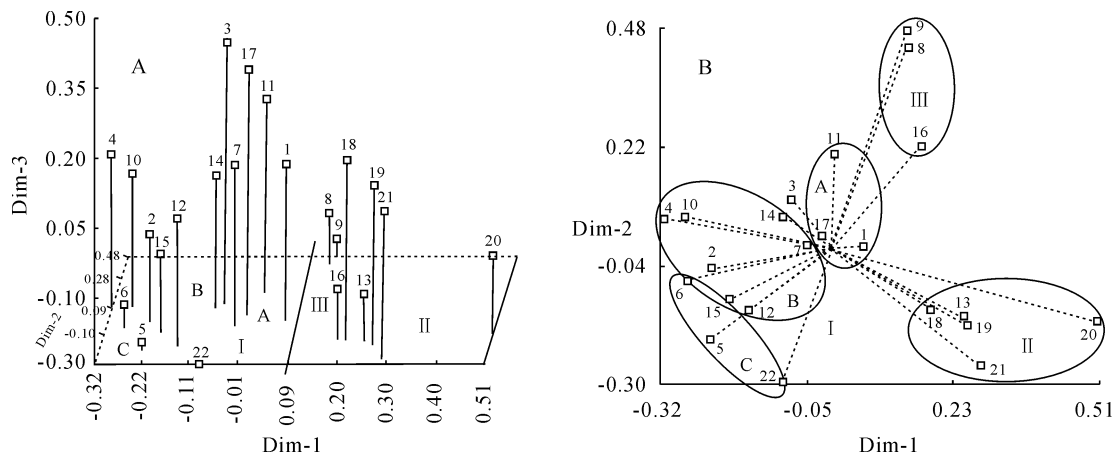


图3 番木瓜各品种的 SCoT 标记主坐标分析图

A. 三维图;B. 平面图;1~22 材料编号同表 1

Fig. 3 Principal coordinate analysis of papaya cultivars with SCoT markers
A. Three-dimensional graph;B. Planar graph;1~22 are the same as Table 1

Primer	Marker	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
SC3	500 bp																						
SC3	400 bp																						
SC23	1 100 bp																						
SC23	300 bp																						
SC3+SC20	1 000 bp																						
SC3+SC20	120 bp																						
SC4+SC23	640 bp																						
SC4+SC23	600 bp																						
SC19+SC36	375 bp																						
SC19+SC36	230 bp																						
SC20+SC23	350 bp																						
SC20+SC23	230 bp																						
SC20+SC23	100 bp																						

图4 SCoT 标记构建 22 个番木瓜品种的分子指纹图谱

样品编号 1~22 同表 1;黑色方框代表番木瓜品种在对应的 SCoT 引物位点上有扩增条带

Fig. 4 Molecular fingerprints of 22 papaya cultivars set up by SCoT marker

The numbers 1~22 for each lane correspond with the numbers for cultivar names listed in Table 1;

The black panes indicate that there are amplified bands of the papaya cultivars on the site of SCoT primer

谱,可以比较容易地将 22 个番木瓜品种相互区分鉴别出来。这 6 个引物的多态性位点数为 13,根据概率公式 $P=1/2^n$ 可知,在 $2^{13}=8\ 192$ 个番木瓜品种中才可能存在 2 个品种的电泳图谱完全相同,置信概率达到 99.976%,该指纹图谱可准确检测其中任何一个品种。

3 讨 论

3.1 番木瓜 SCoT 标记的引物多态性分析

SCoT 标记是一种基于翻译起始位点的目标分子标记新技术,扩增产生偏向候选功能基因区的显性多态性标记^[8]。多态性是评价任何一种分子标记的一个重要依据。本研究对筛选出的 10 个 SCoT 引物进行多态性分析表明,SCoT 引物在番木瓜种质上具有

较高的多态性检测效率。多态性信息含量(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,也是评价分子标记多态性的一个重要指标^[15]。本研究使用 10 个 SCoT 引物的 PIC 平均值为 0.68,属于高度多态性引物,而且引物多态性比率(PPB)平均值为 67.18%^[12]。可见,SCoT 标记在番木瓜上具有较丰富的多态性,而且这些多态性位点可能是包含 ATG 在内的整个开放阅读框的基因。因此,更容易确定分子标记和目标性状的关联,可为番木瓜种质鉴定、遗传多样性分析、遗传图谱构建、基因定位和克隆等研究奠定基础。

3.2 番木瓜品种的遗传差异性分析

种质资源是遗传改良的基础,只有了解种质资源的遗传变异信息及亲缘关系,才能有目的地选配

亲本,培育出优良品种。本研究的聚类分析和主坐标分析结果显示,中国番木瓜主要栽培品种可分成 3 组群,大多数品种间的遗传相似系数在 0.79~0.90 之间,而且遗传变异度小,说明中国番木瓜主要栽培品种的遗传多样性比较低,其遗传基础较为狭窄。该结论与番木瓜种质遗传多样性的 AFLP^[4-5]、ISSR^[6] 以及 RAPD^[7,16] 分析结果大概相一致,都表明番木瓜具有较高的遗传相似系数以及狭窄的遗传基础,这也是世界番木瓜育种所面临的主要问题。因此,在进行番木瓜新品种选育时,应该发掘和利用新的优异番木瓜资源,拓宽番木瓜的遗传基础,从而提高番木瓜种质资源利用率和育种效率。

3.3 番木瓜品种鉴定与指纹图谱构建

由于番木瓜栽培品种的亲缘关系接近,遗传基础狭窄,采用传统的形态学鉴定难以准确区分品种间的遗传差异。基于分子标记技术的指纹图谱可以

准确地揭示植物种质间的遗传差异,在品种鉴定、品种注册、分辨真假杂种以及知识产权保护等方面具有重要作用。本研究利用 6 个 SCoT 引物扩增的 13 个多态性位点构建了中国 22 个番木瓜主栽品种的分子指纹图谱,每个品种都有唯一的指纹图谱。随着品种数量的进一步增加,这 6 个 SCoT 引物的鉴别能力可能会逐渐减低,可根据实际检测情况适当增加引物(多态性位点)的数量。同样,Ratchadaporn 等^[3] 利用 12 对 AFLP 引物才构建了泰国 30 个番木瓜栽培种的指纹图谱,可见,番木瓜栽培品种的亲缘关系接近,必须加大引物(多态性位点)的数量才能有效地鉴定出品种间的微小差异。本研究所构建的中国 22 个番木瓜主栽品种的分子指纹图谱,可为今后番木瓜品种鉴定及其指纹身份证数据库提供技术支撑。

参考文献:

- [1] AI CH X(艾呈祥), QIN ZH H(秦志华), TAO J H(陶吉寒), *et al.* SSR fingerprints and genetic variations of the 32 persimmon major cultivars[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2011, **31**(11): 2 185—2 191(in Chinese).
- [2] DAI J(戴 剑), HONG D L(洪德林), WU Y(吴 燕), SSR fingerprints and genetic similarity analysis of 33 parents for hybrid rice[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2011, **31**(8): 1 543—1 550(in Chinese).
- [3] RATCHADAPORN J, SUREEPORN K, *et al.* 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]. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2007, **10**(18): 3 072—3 078.
- [4] 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.
- [5] VAN DROOGENBROECK B, BREYNE P, GOETGHEBEUR P, *et al.* AFLP analysis of genetic relationships among papaya and its wild relatives (Caricaceae) from Ecuador[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, **105**(2—3): 289—297.
- [6] RAMOS H C, PEREIRA M G, GONÇALVES L S, *et al.* Multivariate analysis to determine the genetic distance among backcross papaya (*Carica papaya*) progenies[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2012, **11**(2): 1280—1295.
- [7] HUANG J CH(黄建昌), REN CH X(任朝兴), LI L(李 凌), *et al.* RAPD analysis of 17 papaya cultivars/lines[J]. *Journal of Southwest University* (Nat. Sci. Ed.) (西南大学学报·自然科学版), 2007, **29**(6): 91—94(in Chinese).
- [8] 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.
- [9] 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): 1 176—1 184.
- [10] CHEN H(陈 虎), HE X H(何新华), LUO C(罗 聪), *et al.* Analysis on the genetic diversity of 24 longan (*Dimocarpus longan*) accessions by SCoT markers[J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2010, **37**(10): 1 651—1 654(in Chinese).
- [11] CAI Y B(蔡元保), YANG X Y(杨祥燕), CHEN X G(陈显国), *et al.* Establishment and application of SCoT amplification system for macadamia[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany* (热带亚热带植物学报), 2013, **21**(3): 253—258(in Chinese).
- [12] YANG X Y(杨祥燕), CAI Y B(蔡元保), GUO L F(郭凌飞), *et al.* Establishment of SCoT amplification system and primer selection for *Carica papaya*[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany* (热带亚热带植物学报), 2012, **20**(6): 578—584(in Chinese).
- [13] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochemical Bulletin*, 1987, **19**: 11—15.
- [14] WU Y SH(吴渝生), YANG W P(杨文鹏), ZHENG Y L(郑用琰), Establishment of fingerprinting for three hybrids and their parents of *Zea mays* by SSR markers[J]. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2003, **29**(4): 496—500(in Chinese).
- [15] 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 Science*, 1998, **77**(6): 783—790.
- [16] STILES J I, LEMME C, SONDUR S, *et al.* Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1993, **85**: 697—701.