

番木瓜基因型遗传关系的 SRAP 分析

杨祥燕¹, 蔡元保^{1*}, 黄 强¹, 周全光¹, 杨伟林², 孙光明^{3,4}, 郭凌飞⁵

(1 广西亚热带作物研究所, 南宁 530001; 2 广西农垦集团有限责任公司, 南宁 530022; 3 中国热带农业科学院亚热带作物研究所, 广东湛江 524091; 4 国家重要热带作物工程技术研究中心, 海口 571101; 5 厦门市农业机械监理所, 福建厦门 361009)

摘 要: 利用 SRAP 标记对中国 22 个番木瓜主要栽培品种(系)进行亲缘关系和遗传多样性研究。结果表明: (1) 筛选出的 20 对 SRAP 引物共扩增 249 条谱带, 其中多态性条带 110 条, 多态性比率为 43.20%, 平均每对引物扩增的条带数和多态性条带数分别为 12.45 条和 5.50 条。 (2) 引物多态性信息含量(PIC)值变化范围为 0.15~0.79, 平均值为 0.49。 (3) 聚类分析和主坐标分析显示, 供试材料间的遗传相似系数为 0.72~0.96, 遗传多样性水平较低, 在相似性系数为 0.87 时, 可将所有试材分为 3 个类群。该研究结果有效地揭示了中国番木瓜主要栽培品种(系)资源的遗传背景和亲缘关系, 可为番木瓜种质资源的分类、保护和有效利用以及新品种选育提供理论依据。

关键词: 番木瓜; 序列相关扩增多态性; 聚类分析; 遗传关系

中图分类号: Q346⁺.5; Q789

文献标志码: A

SRAP Analysis of Genetic Relationships among *Carica papaya* L. Genotypes

YANG Xiangyan¹, CAI Yuanbao^{1*}, HUANG Qiang¹, ZHOU Quanguang¹,
YANG Weilin², SUN Guangming^{3,4}, GUO Lingfei⁵

(1 Guangxi Subtropical Crops Research Institute, Nanning 530001, China; 2 Guangxi Agricultural Reclamation Group Limited Company, Nanning 530022, China; 3 South Subtropical Crops Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang, Guangdong 524091, China; 4 National Center of Important Tropical Crops Engineering and Technology Research, Haikou 571101, China; 5 Xiamen Supervision Department of Agricultural Machinery, Xiamen, Fujian 361009, China)

Abstract: Genetic relationship and diversity of 22 papaya (*Carica papaya* L.) major cultivars in China were analyzed based on sequence-related amplified polymorphism (SRAP). (1) The 20 pairs of SRAP primers generated a total of 249 fragments, and polymorphic bands were 110 which accounted for 43.20% in the total amplified fragments. The number of amplified and polymorphic fragments was 12.45 and 5.50 per primer pair, respectively. (2) The polymorphism information content (PIC) values of these markers varied from 0.15 to 0.79, averaging 0.49. (3) UPGMA cluster analysis and principal coordinates analysis (PCOA) showed that the range of genetic similarity (GS) was 0.72~0.96 among 22 papaya cultivars with a low genetic diversity. All cultivars could be divided into three groups at the GS of 0.87. These results indicated that SRAP analysis could be used to reveal effectively the genetic relationships of papaya cultivars in China, providing a scientific basis for the classification, protection and effective utilization of these resources and breeding new varieties.

Key words: *Carica papaya*; SRAP; clustering analysis; genetic relationship

收稿日期: 2013-07-29; 修改稿收到日期: 2013-10-12

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

番木瓜(*Carica papaya* L.)属于热带亚热带大型草本果树,在中国华南地区广泛栽培,具有较高营养价值和经济价值,素有“岭南果王”美称。长期以来,由于应用分子生物学手段对其种质资源的研究相对滞后,使得中国在番木瓜杂交亲本选配上存在很大盲目性,导致番木瓜种质资源不能被有效利用,从而影响了育种效率的提高。尤其是番木瓜杂交育种中集中利用了少数从国外引进亲本的倾向,导致育成品种亲缘关系相近,遗传基础狭窄。因此,对番木瓜种质的亲缘关系进行系统研究,拓宽番木瓜主要栽培品种的遗传背景,对于中国番木瓜遗传育种具有重要意义。DNA 分子标记技术的迅速发展,可以从分子水平上为评估不同种质间的遗传多样性和亲缘关系提供了技术支持。目前,国外对番木瓜指纹图谱和遗传图谱构建^[1-2]、遗传多样性和亲缘关系分析^[3-5],以及性别连锁研究^[6]等都有较大的研究进展;国内分子标记主要应用于番木瓜的性别鉴定与连锁分析^[7-9],而应用于中国番木瓜栽培品种资源的遗传多样性和亲缘关系的研究鲜有报道^[10-11]。

序列相关扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)标记是一种基于 PCR 的标记系统,由 Li 等^[12]在云薑作物上首先应用。该技术针对基因外显子 GC 含量丰富以及启动子和内含子 AT 含量丰富的特点来设计引物进行扩增,因不同个体的内含子、启动子与间隔区长度不等而产生多态性。SRAP 标记因其具有简便、高效、产率高、高共显性、重复性好、易测序,以及便于克隆目标片段的特点,目前已被成功地应用于遗传多样性分析、遗传图谱构建、重要性状的标记以及相关基因的克隆等方面^[13-14]。其中,SRAP 标记运用于研究果树的遗传多样性和亲缘关系已较为常见^[13-14]。本研究采用 SRAP 标记对中国番木瓜主要栽培品种(系)进行亲缘关系和遗传多样性分析,为指导番木瓜种质资源引进和利用,进而进行分子标记辅助选择育种等提供科学依据。

1 材料和方法

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),均取自于广西亚热带作物研究所番木瓜种质资源圃(编号与名称见表 1),其中‘日升’、‘白皮日升’、‘蓝茎’和‘夏威夷’为国外引进品种,其余试材均为国内杂交品种(系)。本实验在广西亚热带优势作物繁育及综合开发技术重点实验室进行,试材按

照各品种(系)单株进行采集,选取干净、无病虫害幼嫩叶片,液氮速冻后于-80℃冰箱保存备用。*Taq* 聚合酶和 dNTPs 均购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 方法

番木瓜基因组 DNA 的提取采用 CTAB 改良法^[15]进行。利用 Biophotometre 核酸蛋白仪和 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测其浓度和质量,模板 DNA 工作浓度稀释至 30 ng/ μ L,-20℃保存备用。

SRAP 正反向引物(表 2)参考 Li 等^[12]、Ferriol 等^[16]及 Vandemark 等^[17]发表的引物序列,由上海生工公司合成。SRAP 正反向引物各 10 条,两两组合成 100 个引物组合,用 6 个形态差异较大的番木瓜品种(系)对这 100 个引物组合进行筛选,筛选出扩增条带清晰且重复性和多态性良好的引物组合。最后,用这些引物组合对所有的番木瓜供试材料进行 SRAP-PCR 扩增。

SRAP-PCR 扩增的总体积为 20 μ L,包括 2 μ L 的 10 \times buffer,3.0 mmol/L Mg^{2+} ,0.2 mmol/L dNTPs,0.4 μ mol/L 引物,30 ng/ μ L 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℃复性 1 min,72℃延伸

表 1 供试番木瓜材料的编号和名称
Table 1 Code and name of tested *C. papaya* varieties

编号 Code	材料名称 Name of material
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 SRAP 引物及其序列

Table 2 SRAP primers and their sequences

正向引物 Forward primer		反向引物 Reverse primer	
编号 Code	序列 Sequence (5'→3')	编号 Code	序列 Sequence (5'→3')
me1	5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'	em1	5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3'
me2	5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'	em2	5'-GACTGCGTACGAATTTGC-3'
me3	5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'	em3	5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'
me4	5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'	em4	5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3'
me5	5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'	em5	5'-GACTGCGTACGAATTAAC-3'
me6	5'-TGAGTCCAAACCGGTAA-3'	em6	5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'
me7	5'-TGAGTCCAAACCGGTCC-3'	em7	5'-GACTGCGTACGAATTCAA-3'
ME6	5'-TGAGTCCTTTCCGGTAA-3'	R8	5'-GACACCGTACGAATTGAC-3'
ME7	5'-TGAGTCCTTTCCGGTCC-3'	R9	5'-GACACCGTACGAATTTGA-3'
F7	5'-GTAGCACAAGCCGGAGC-3'	R15	5'-CGCACGTCCGTAATTCCA-3'

90 s,5 个循环;94 ℃ 变性 1 min,50 ℃ 复性 1 min,72 ℃ 延伸 90 s,35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 保存。对番木瓜所有供试材料进行 SRAP-PCR 扩增时,重复 2 次。扩增结束后,在 1.8% 琼脂糖凝胶中电泳,电极缓冲液为 0.5×TBE,电泳的电压小于 5 V/cm;电泳结束后于凝胶成像系统上检测并拍照。

1.3 数据统计与分析

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。统计每个引物组合扩增出的总条带数和多态性条带数,并计算引物多态性比率(*PPB*)和多态性信息含量(*PIC*)。其中,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 软件分析番木瓜总群体的遗传分化系数(G_{st})和基因流(N_m)。用 NTSYS-pc 2.1e 软件进行 Jaccard 相

似系数计算和基于 UPGMA 算法的聚类分析,用 Mxcomp 程序对协表征矩阵和相似矩阵之间的相似性进行 Mantel 检验,同时还进行基于遗传相似系数的主坐标分析 (principal coordinates analysis, PCOA),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 标记的多态性引物筛选

SRAP 正反向引物各 10 条,两两组合成 100 个引物组合,用 6 个形态差异较大的番木瓜试材对这 100 个引物组合进行筛选,筛选出 20 个扩增条带清晰且重复性和多态性良好的引物组合。利用这些引物组合对所有的番木瓜试材进行 SRAP-PCR 扩增。扩增产物分子量在 100~2 000 bp 之间,条带清晰且重复性和多态性良好,可适用于番木瓜遗传关系研究。其中代表性引物组合 me3-em4 在 22 个番木瓜品种(系)中的 SRAP-PCR 扩增结果见图 1。

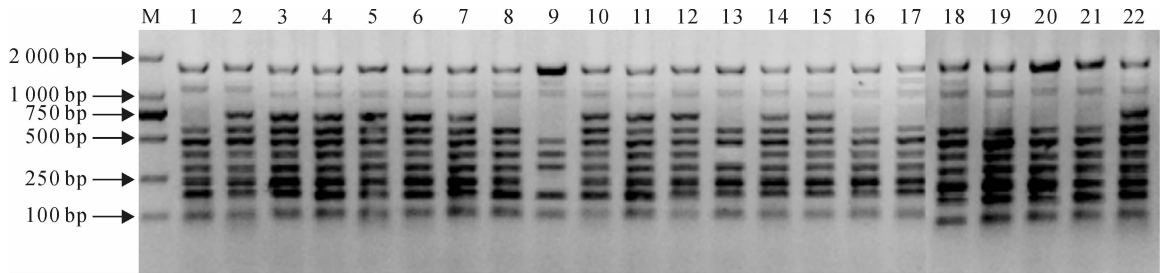


图 1 引物组合 me3-em4 对番木瓜所有试材的 SRAP 扩增

1~22 材料编号同表 1

Fig. 1 SRAP amplification of *C. papaya* germplasm by primer combination me3-em4

1~22 are the same as Table 1

2.2 SRAP 标记的引物多态性分析

对 20 个 SRAP 多态性引物组合在所有试材上扩增出的条带进行统计分析,条带统计结果见表 3。由表 3 可知:(1)20 个引物组合共产生 249 条清晰条带,其中多态性条带共计 110 条,平均每对引物多态性比率(*PPB*)为 43.20%;(2)平均每个引物组合扩增条带数和多态性条带数分别为 12.45 条和 5.50 条,每个引物组合扩增出的条带数和多态性条带数分别从 8~16 条和 3~11 条不等,其中 me7-em1 和 ME7-R9 引物组合扩增出的条带数和多态性条带数最多,而 me4-em2 引物组合最少;(3)不同引物组合扩增的多态性也有较大差异,多态性比率(*PPB*)从 33.33%~68.75%不等,大部分引物组合扩增的多态性较好,其中 ME7-R9 引物组合的 *PPB* 最高(为 68.75%),而 me5-em6 和 me6-em4 引物组合的 *PPB* 最低(33.33%);(4)20 个引物组合的多态性信息含量(*PIC*)值变化范围为 0.15~0.79,平均每个引物组合的 *PIC* 值为 0.49,其中 me1-em7 引物组合的 *PIC* 值最高(0.79),而 me3-em7 引物组合的 *PIC* 值最低,仅为 0.15。这些研究结果表明,SRAP 标记对番木瓜具有较强的鉴别能力,适合于

番木瓜遗传关系研究。

2.3 番木瓜品种(系)间的聚类分析

基于 SRAP 标记对 22 个番木瓜品种(系)的扩增结果进行聚类分析,绘制树状聚类图(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。结果表明,这 2 种矩阵极显著正相关,相关系数为 $r=0.89$,说明聚类结果能很好地体现番木瓜种质之间的遗传关系。从图 2 中可知,SRAP 标记能将 22 个品种(系)完全区分开,当 Jaccard's 遗传相似系数(*GS*)在 0.87 处作截值时,可将所有试材分为 3 个类群(I、II 和 III 类群)。I 类群(8 份试材)包括‘穗中红 48 号’、‘庞博 3 号’、‘新世纪’、‘兴农矮 48-2 号’、‘庞博 2 号’、‘穗黄’、‘园优’和‘庞博 1 号’,群内遗传相似系数在 0.89~0.96 之间。其中,‘新世纪’和‘兴农矮 48-2 号’亲缘关系最近,都具有黄色果肉、肉厚味甜、单果重 1.5~2.0 kg 等方面的共同果实特征。II 类群(9 份试材)包括‘美中红’、‘红妃’、‘桂热 2 号’、‘日升’、‘夏威夷’、‘台农 1 号’、‘红日 1 号’、‘白皮日升’和‘万顷沙 1 号’,群内遗传相似系数在 0.88~0.94 之间。III 类群(5 份试材)

表 3 不同 SRAP 引物组合在番木瓜供试材料中扩增出条带的多态性

Table 3 Polymorphism in samples of *C. papaya* revealed by SRAP primer combinations

引物组合 Primer combination	总扩增条带数 Total bands	多态性条带数 Polymorphic bands	多态性比率 Polymorphic rate (<i>PPB</i>)/%	多态性信息含量 Polymorphism information content (<i>PIC</i>)
me1-em3	11	5	45.45	0.47
me1-em7	14	8	57.14	0.79
me2-em5	15	6	40.00	0.57
me2-R8	12	5	41.67	0.24
me3-em4	10	4	40.00	0.48
me3-em7	10	4	40.00	0.15
me4-em2	8	3	37.50	0.43
me5-em6	12	4	33.33	0.41
F7-em6	11	4	36.36	0.54
me4-R15	11	5	45.45	0.42
me5-em6	10	4	40.00	0.29
ME6-em3	12	5	41.67	0.23
me6-em4	12	4	33.33	0.43
me6-em6	16	6	37.50	0.56
me7-em1	16	10	62.50	0.78
me7-em7	15	8	53.33	0.75
ME7-R9	16	11	68.75	0.74
ME7-R15	11	4	36.36	0.62
F7-em1	13	4	30.77	0.32
F7-R8	14	6	42.86	0.51
平均值 Mean	12.45	5.50	43.20	0.49

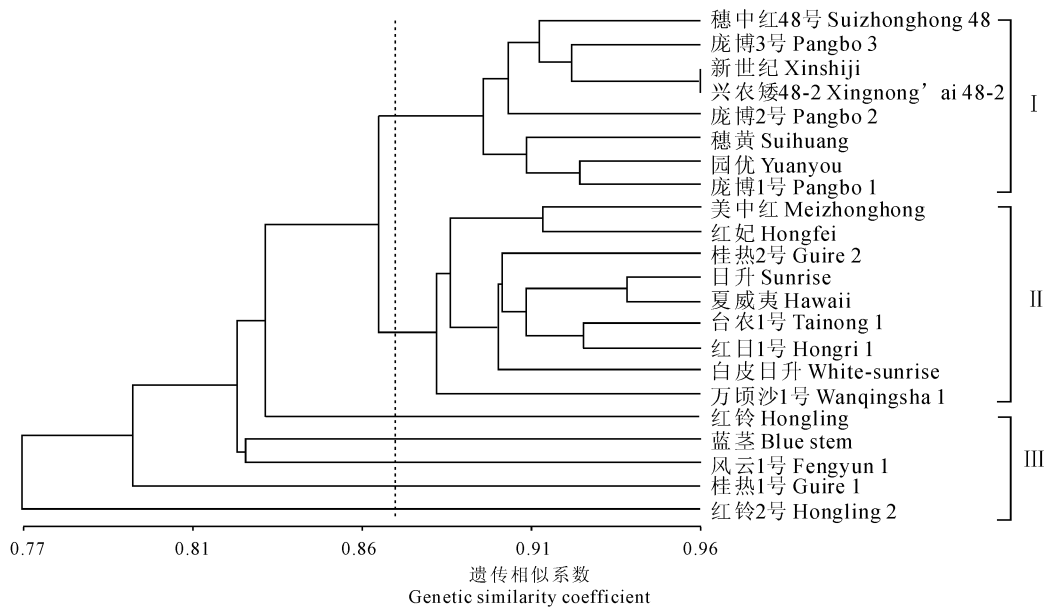


图 2 22 份番木瓜种质的 UPGMA 聚类分析图
Fig. 2 UPGMA dendrogram for 22 resources of *C. papaya* based on SRAP data

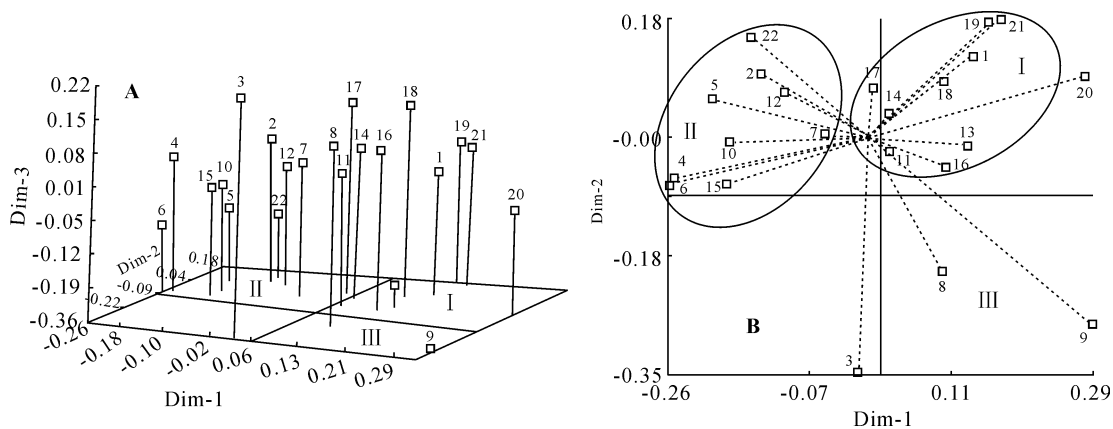


图 3 番木瓜各试材的 SRAP 标记主坐标分析图
A. 三维图;B. 平面图;1~22 材料编号同表 1
Fig. 3 Principal coordinates analysis of *C. papaya* genotypes from SRAP markers
A. Three-dimensional graph;B. Planar graph;No. 1~22 are the same as Table 1

包括‘红铃’、‘蓝茎’、‘风云 1 号’、‘桂热 1 号’和‘红铃 2 号’,群内遗传相似系数在 0.77~0.84 之间。其中,‘红铃 2 号’在整个聚类树中处于最基础地位,遗传差异性明显区别于其他栽培品种(系)。

2.4 番木瓜品种(系)间遗传相似性分析

基于 SRAP 标记的扩增结果,经 NTSYS-pc 软件计算获得番木瓜各品种(系)间的 Jaccard’s 遗传相似系数(GS)。22 个番木瓜品种(系)的 GS 值变化范围为 0.72~0.96,平均 GS 值为 0.85,变幅为 0.24,绝大多数试材的 GS 值在 0.82~0.92 之间。其中,‘红铃 2 号’和‘白皮日升’之间 GS 值最小(0.72),这两者亲缘关系最远;‘新世纪’和‘兴农矮

48-2 号’之间 GS 值最大(0.96),这两者亲缘关系最近。从整体来看,所有试材的遗传相似系数比较高,变幅比较小,说明中国番木瓜主要栽培品种(系)的遗传多样性比较低,遗传基础较为狭窄。利用 Pop-Gen 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 0.13, N_m 值为 3.33,表明中国番木瓜主要栽培品种(系)的群体遗传分化不显著,总群体间的基因交流程度较小。

2.5 番木瓜品种(系)主坐标分析(PCOA)

基于 SRAP 标记的原始矩阵对 22 个番木瓜品种(系)进行主坐标分析(PCOA),前 3 个主坐标所能解释的相关性分别为 18.29%、12.68%和 8.70%。

主坐标分析所形成的三维图(图 3, A)和平面图(图 3, B)中,位置相靠近者表示亲缘关系密切,远离者表示亲缘关系疏远。将位置靠近的番木瓜品种(系)划分在一起,其分类结果与 UPGMA 聚类分析结果相似,共得到 3 个主要类群(I、II 和 III 类群)。其中, I 和 II 类群比较集中,分别集中在平面的第 1 和第 2 象限;而 III 类群最为分散,13 号‘蓝茎’还交错到 I 类群中,可见‘蓝茎’的遗传背景较为复杂。比较图 2 和图 3 可以看出,系统聚类分析和主坐标分析所得结果基本上一致。但是,主坐标分析能从不同方向、不同层面更加直观地显示了不同番木瓜品种(系)之间的亲缘关系。

3 讨 论

3.1 番木瓜种质的 SRAP 引物多态性分析

多态性是评价任何一种分子标记的一个重要依据。本研究利用筛选出的 20 对 SRAP 引物组合对 22 个番木瓜基因型进行分析,共扩增出 249 条清晰条带,其中多态性条带共计 110 个,平均多态性比率(*PPB*)为 43.20%。Li 等^[12]在甘蓝遗传作图和基因标记研究中,14 对 SRAP 引物组合可以产生 120 条多态性条带;Ferriol 等^[16]在西葫芦和笋瓜种质遗传多样性研究中 *PPB* 为 72.7%,而本研究中仅为 43.20%。其主要原因是本研究使用的材料为遗传关系比较近的品种(系),而前者所用的材料为遗传关系较远的种间或亚种间种质材料。这从侧面反映了中国番木瓜主要栽培品种(系)亲缘关系接近,遗传背景狭窄。多态性信息含量(*PIC*)也是评价分子标记多态性的一个重要指标。当 $0.25 < PIC < 0.5$ 时,为中度多态性信息引物;当 $PIC > 0.5$ 时,为高度多态性信息引物^[19]。本研究平均每个引物组合的 *PIC* 值为 0.49,属于中偏高多态性信息引物。这些研究结果表明,SRAP 标记在番木瓜种质中具有较高的鉴别能力,可作为一种很好的品种(系)鉴定手段。

3.2 SRAP 在番木瓜遗传研究上的适用性分析

在番木瓜种质资源的遗传多样性研究中,国内外应用较多的标记方法有 RAPD、AFLP 和 ISSR 等,不同的标记系统具有不同的作用原理,却产生类似的研究结果^[3-5,10]。SRAP 扩增的是 ORF (open

reading frame)区域,而 ORFs 区域决定了基因对应的蛋白序列,是不同品种之间呈现差别的重要因素^[12]。本研究应用 SRAP 标记能将 22 个番木瓜品种(系)完全区分开,条带清晰、重复性和多态性良好,而且对番木瓜具有较强的鉴别能力,适合于番木瓜种质资源的遗传多样性和亲缘关系研究。相对于番木瓜遗传研究上的其他分子标记,SRAP 标记的操作比 AFLP 标记更简单快捷,比 RAPD 标记的稳定性和多态性更好,而且 SRAP 标记可以检测基因的 ORF,从而提高了扩增结果与表现型的相关性^[16]。因此,SRAP 标记所提供的遗传信息更能接近于番木瓜农艺性状的差异。

3.3 番木瓜品种(系)的遗传关系分析

分子标记从 DNA 水平揭示品种(系)间的差异和相关性。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(系)可分成 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^[10]和 SCoT^[11]分析结果大概相一致。本研究与相同参试材料的 SCoT 分析结果^[11]比较发现,这 2 种分子标记分析都可以将所有的参试材料分为上述的 3 个类群,但由于分子标记的原理不同所聚类的结果有些差异。如 SRAP 标记聚类图中黄色果肉的‘桂热 2 号’没有聚到相应的黄色果肉类型;SCoT 标记聚类图中大果型的‘园优’却和小果型的‘红日 1 号’亲缘关系接近。此外,从本研究的聚类结果和总群体遗传变异情况中还可以看出,绝大多数番木瓜品种(系)的遗传相似系数在 0.82~0.92 之间,而且遗传变异度小,说明中国番木瓜主要栽培品种(系)的遗传多样性比较低,亲缘关系较近,其遗传基础较为狭窄。该结论与杨祥燕^[11]、Kim 等^[3]和 Stiles 等^[20]的研究结果相同,从而进一步验证了 SRAP 标记在番木瓜遗传多样性研究中的可靠性。本研究的聚类结果可以为番木瓜育种的杂交亲本选配提供重要依据,但是由于目前中国番木瓜主要栽培品种(系)的遗传基础较为狭窄。因此,在进行番木瓜新品种选育时,除了注意番木瓜品种间的亲缘关系外,还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,从而降低亲本选配的盲目性,提高番木瓜种质资源利用率和育种效率。

参考文献:

- [1] 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]. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2007, **10**(18): 3 072—3 078.
- [2] BLAS A L, YU Q, CHEN C, *et al.* Enrichment of a papaya high-density genetic map with AFLP markers[J]. *Genome*, 2009, **52**(8): 716—725.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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): 1 280—1 295.
- [6] MA H, MOORE P H, LIU Z, *et al.* High-density linkage mapping revealed suppression of recombination at the sex determination locus in papaya[J]. *Genetics*, 2004, **166**(1): 419—436.
- [7] ZHOU G H(周国辉), LI H P(李华平), ZHANG SH G(张曙光), *et al.* RAPD markers for hermaphrodite gene in papaya[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*(热带亚热带植物学报), 2001, **9**(3): 190—193(in Chinese).
- [8] REN CH X(任朝兴), HUANG J CH(黄建昌), XIAO Y(肖 艳), *et al.* RAPD and SCAR molecular markers for male trait in *Carica papaya*[J]. *Journal of Fruit Science*(果树学报), 2007, **24**(1): 72—75(in Chinese).
- [9] GUO X(郭 霞), ZHANG Y(张 艳), LIU ZH Y(刘志勇). Development of sex linked AFLP-derived SCAR markers in *Carica papaya*[J]. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学), 2009, **42**(3): 967—973(in Chinese).
- [10] 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).
- [11] YANG X Y(杨祥燕), CAI Y B(蔡元保), HUANG Q W(黄秋伟), *et al.* SCoT fingerprints and genetic variations of the papaya (*Carica papaya* L.) major cultivars[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.*(西北植物学报), 2013, **33**(9): 1 756—1 761(in Chinese).
- [12] 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**: 455—461.
- [13] LIU L W(柳李旺), GONG Y Q(龚义勤), HUANG H(黄 浩), *et al.* Novel molecular marker systems——SRAP and TRAP and their application[J]. *Hereditas*(遗传), 2004, **26**(5): 777—781(in Chinese).
- [14] LI L(李 莉), PENG J Y(彭建营), BAI R X(白瑞霞), *et al.* SRAP and TRAP markers and their application to research about horticultural plants[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.*(西北植物学报), 2006, **26**(8): 1 749—1 752(in Chinese).
- [15] 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.
- [16] FERRIOL M, PICÓ B, NUEZ F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, **107**(2): 271—282.
- [17] VANDEMARK G J, ARISS J J, BAUCHAN G A, *et al.* Estimating genetic relationships among historical sources of alfalfa germplasm and selected cultivars with sequence related amplified polymorphisms[J]. *Euphytica*, 2006, **152**(1): 9—16.
- [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] 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.
- [20] 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.