

利用 SRAP 标记分析贵州砂梨 资源遗传多样性

黄 伟^{1,2}, 鲁 敏², 张 起², 安华明^{2*}

(1 贵州省园艺研究所, 贵阳 550006; 2 贵州大学 农学院, 贵阳 550025)

摘 要: 采用 SRAP 标记技术, 对贵州 59 份砂梨种质的遗传多样性进行分析。结果表明: (1) 筛选的 15 对 SRAP 引物共扩增出 151 个位点, 其中 120 个是多态性位点, 多态百分率为 79.47%。(2) POPGENE 分析表明, 贵州砂梨资源在物种水平上有效等位基因数(N_e)为 1.355 9, Nei's 基因多样性指数(H)为 0.216 9, Shannon's 信息指数(I)为 0.336 2; 在区域品种群水平 $N_e=1.261 1$, $H=0.155 5$, $I=0.235 2$, 以黔西南地区资源的遗传多样性最高, 六盘水市最低。(3) 聚类分析显示, 在遗传相似系数 0.75 处, 可将 59 份砂梨资源分为 6 个组, 聚类分析结果具有一定的地理区域特性。研究认为, 贵州砂梨种质具有较为丰富的遗传多样性, 并表现出明显的地理区域特性; SRAP 标记与 ISSR 标记在揭示贵州砂梨种质遗传多样性上具有高度的一致性, 但 SRAP 标记能在更小的变异范围内揭示更多的遗传信息。

关键词: 砂梨; 种质资源; 遗传多样性; SRAP

中图分类号: Q343+.5; Q789

文献标志码: A

Genetic Diversity of *Pyrus pyrifolia* Resources in Guizhou Province Using SRAP Markers

HUANG Wei^{1,2}, LU Min², ZHANG Qi², AN Huaming^{2*}

(1 Guizhou Horticultural Institute, Guiyang 550006, China; 2 Agricultural College, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: Genetic diversity and genetic relationship of 59 *Pyrus pyrifolia* germplasm resources distributed in Guizhou Province were analyzed using SRAP markers. The results showed that: (1) 15 SRAP primer pairs generated 151 bands and 120 presented polymorphic loci. (2) A relatively high level of genetic diversity was revealed by N_e (mean observed number of alleles) 1.355 9, H (Nei's genetic diversity) 0.216 9, I (Shannon's information index) = 0.336 2 at species level and by $N_e=1.261 1$, $H=0.155 5$, $I=0.235 2$ at population level. Pear resource in Qianxinan Prefecture showed the highest genetic diversity and that in Lipanshui City showed the lowest. (3) Cluster analysis with UPGMA method showed that 59 *P. pyrifolia* germplasms could be grouped into six groups at genetic coefficient of 0.75. The result also indicated that *P. pyrifolia* resources distributed in Guizhou Province had abundant genetic diversity with obvious geographical feature. The genetic diversity and genetic relationship of the *P. pyrifolia* germplasms could be revealed effectively by SRAP markers, which provided more genetic information in a smaller range of variation as compared to ISSR.

Key words: *Pyrus pyrifolia*; germplasm resources; genetic diversity; SRAP

收稿日期: 2015-07-29; 修改稿收到日期: 2015-10-09

基金项目: 贵州省科技攻关项目[黔科合农 G 字(2009)4003]

作者简介: 黄 伟(1983—), 男, 硕士, 主要从事果树种质资源与遗传育种研究。E-mail: chinacqhw@163.com

* 通信作者: 安华明, 博士, 教授, 主要从事果树生物技术与遗传育种研究。E-mail: anhuaming@hotmail.com

梨属于蔷薇科(Rosaceae)梨亚科(Pomoideae)梨属(*Pyrus* L.)植物,全世界约 30 多个种^[1]。通常认为梨属植物的原种(stock species)起源于第三纪中国西部或西南部的山区^[2]。贵州位于中国西南部,其雨量充沛、立体气候明显、小气候区域众多等独特的气候和生态条件,为梨树的分布演化提供了多样的生态环境,孕育出了丰富的梨属植物资源,尤其是极为丰富的砂梨(*Pyrus pyrifolia* Nakai)资源^[3-6]。本课题组前期工作中基于部分品质指标及 ISSR 标记,已对贵州部分砂梨种质进行了初步的遗传多样性评价^[5-6]。但品质指标受环境影响较大,而 ISSR 作为显性分子标记,其揭示的遗传信息量相对有限。SRAP 分子标记技术^[7]针对基因外显子中 GC 含量丰富而启动子、内含子中 AT 含量丰富的特点来设计引物进行 PCR 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 技术简便、快速、稳定并具有高频率的共显性,它有效地克服了 RAPD 技术重复性差、SSR 引物开发费时费力以及 AFLP 技术复杂、成本昂贵等

缺点。近年来 SRAP 技术在果树遗传多样性分析和比较基因组学研究等方面得到广泛应用^[8-11],但在梨属植物上的应用还不多。本研究以广泛收集的 59 份贵州砂梨资源为试验材料,采用 SRAP 标记对其遗传多样性及亲缘关系进行分析,可与之前 ISSR 结果相互印证,为进一步促进贵州砂梨种质资源的科学保存与合理利用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材 料

59 份砂梨种质资源(表 1)的收集与保存同文献[6]。材料采自于贵州省梨资源分布较多的县市,采集一年生枝条进行嫁接保存于贵州大学农学院实验农场。

1.2 方 法

1.2.1 SRAP 扩增体系优化 采用改良 CTAB 法^[12]提取各材料幼嫩叶片基因组 DNA,样品质量和浓度的检测参考文献[6]的方法,并将 DNA 样品稀释至浓度 50 ng·μL⁻¹之后用于 SRAP 扩增。

表 1 供试材料的信息
Table 1 Resource of 59 pear accessions

编号 Code	资源名称 Name	采样地点 Origin
1	晴隆-1 QL-1	黔西南州晴隆县 Qinglong County, Qianxinan Prefecture
2	晴隆-2 QL-2	黔西南州晴隆县 Qinglong County, Qianxinan Prefecture
3	晴隆响水梨 QLxiangshuili	黔西南州晴隆县 Qinglong County, Qianxinan Prefecture
4	晴隆瓢把梨-1 QLpiaobali-1	黔西南州晴隆县 Qinglong County, Qianxinan Prefecture
5	晴隆-3 QL-3	黔西南州晴隆县 Qinglong County, Qianxinan Prefecture
6	晴隆瓢把梨-2 QLpiaobali-2	黔西南州晴隆县 Qinglong County, Qianxinan Prefecture
7	普安-1 PA-1	黔西南州普安县 Puan County, Qianxinan Prefecture
8	普安-2 PA-2	黔西南州普安县 Puan County, Qianxinan Prefecture
9	普安-3 PA-3	黔西南州普安县 Puan County, Qianxinan Prefecture
10	盘县-1 PX-1	六盘水市盘县 Panxian County, Liupanshui Prefecture
11	盘县-2 PX-2	六盘水市盘县 Panxian County, Liupanshui Prefecture
12	盘县-3 PX-3	六盘水市盘县 Panxian County, Liupanshui Prefecture
13	兴义-1 XY-1	黔西南州兴义市 Xingyi City, Qianxinan Prefecture
14	兴义-2 XY-2	黔西南州兴义市 Xingyi City, Qianxinan Prefecture
15	兴义海子梨-1 XYhaizili-1	黔西南州兴义市 Xingyi City, Qianxinan Prefecture
16	兴义-3 XY-3	黔西南州兴义市 Xingyi City, Qianxinan Prefecture
17	兴义海子梨-2 XYhaizili-2	黔西南州兴义市 Xingyi City, Qianxinan Prefecture
18	兴义海子梨-3 XYhaizili-3	黔西南州兴义市 Xingyi City, Qianxinan Prefecture
19	安龙-1 AL-1	黔西南州安龙县 Anlong County, Qianxinan Prefecture
20	安龙-2 AL-2	黔西南州安龙县 Anlong County, Qianxinan Prefecture
21	安龙-3 AL-3	黔西南州安龙县 Anlong County, Qianxinan Prefecture
22	安龙-4 AL-4	黔西南州安龙县 Anlong County, Qianxinan Prefecture
23	册亨-1 CH-1	黔西南州册亨县 Ceheng County, Qianxinan Prefecture
24	册亨-2 CH-2	黔西南州册亨县 Ceheng County, Qianxinan Prefecture
25	册亨-3 CH-3	黔西南州册亨县 Ceheng County, Qianxi'nan Prefecture
26	册亨金盖梨 CHjin'gaili	黔西南州册亨县 Ceheng County, Qianxi'nan Prefecture
27	册亨-4 CH-4	黔西南州册亨县 Ceheng County, Qianxi'nan Prefecture
28	贞丰-1 ZF-1	黔西南州贞丰 Zhenfeng County, Qianxi'nan Prefecture

续表 1 Continued Table 1

编号 Code	资源名称 Name	采样地点 Origin
29	安顺箐口梨 ASqingkouli	安顺市西秀区 Xixiu District, Anshun City
30	福泉葫芦梨 FQhululi	黔南州福泉市 Fuquan City, Qiannan Prefecture
31	威宁-1 WN-1	毕节地区威宁县 Weining County, Bijie Prefecture
32	威宁-2 WN-2	毕节地区威宁县 Weining County, Bijie Prefecture
33	威宁大黄梨 WNdahuangli	毕节地区威宁县 Weining County, Bijie Prefecture
34	威宁-3 WN-3	毕节地区威宁县 Weining County, Bijie Prefecture
35	威宁-4 WN-4	毕节地区威宁县 Weining County, Bijie Prefecture
36	黄平-1 HP-1	黔东南州黄平县 Huangping County, Qiangdongnan Prefecture
37	黄平-2 HP-2	黔东南州黄平县 Huangping County, Qiangdongnan Prefecture
38	黄平-3 HP-3	黔东南州黄平县 Huangping County, Qiangdongnan Prefecture
39	黄平-4 HP-4	黔东南州黄平县 Huangping County, Qiangdongnan Prefecture
40	黄平-5 HP-5	黔东南州黄平县 Huangping County, Qiangdongnan Prefecture
41	黄平-6 HP-6	黔东南州黄平县 Huangping County, Qiangdongnan Prefecture
42	台江-1 TJ-1	黔东南州台江县 Taijiang County, Qiangdongnan Prefecture
43	仁怀-1 RH-1	遵义仁怀市 Renhuai County, Zunyi City
44	仁怀-2 RH-2	遵义仁怀市 Renhuai County, Zunyi City
45	仁怀-3 RH-3	遵义仁怀市 Renhuai County, Zunyi City
46	仁怀-4 RH-4	遵义仁怀市 Renhuai County, Zunyi City
47	仁怀-5 RH-5	遵义仁怀市 Renhuai County, Zunyi City
48	荔波-6 LB-6	黔南州荔波县 Libo County, Qiannan Prefecture
49	荔波-1 LB-1	黔南州荔波县 Libo County, Qiannan Prefecture
50	荔波-2 LB-2	黔南州荔波县 Libo County, Qiannan Prefecture
51	荔波-3 LB-3	黔南州荔波县 Libo County, Qiannan Prefecture
52	荔波-4 LB-4	黔南州荔波县 Libo County, Qiannan Prefecture
53	荔波-5 LB-5	黔南州荔波县 Libo County, Qiannan Prefecture
54	印江-1 YJ-1	铜仁地区印江县 Yinjiang County, Tongren Prefecture
55	印江-2 YJ-2	铜仁地区印江县 Yinjiang County, Tongren Prefecture
56	印江-3 YJ-3	铜仁地区印江县 Yinjiang County, Tongren Prefecture
57	印江-4 YJ-4	铜仁地区印江县 Yinjiang County, Tongren Prefecture
58	赫章-1 HZ-1	毕节地区赫章县 Hezhang County, Bijie Prefecture
59	野生砂梨 <i>Pyrus pyrifolia</i>	黔东南州兴义市 Xingyi City, Qianxinan Prefecture

采用单因素试验设计梯度进行 SRAP 体系优化,将 2×HotMaster PCR Master Mix(北京天根生化科技有限公司,其中包含 20 mmol · L⁻¹ Tris-HCl pH 8.3,100 mmol · L⁻¹ KCl,3 mmol · L⁻¹ MgCl₂,500 μmol · L⁻¹ dNTP,0.1 U · μL⁻¹ Taq 聚合酶,以及其他增强剂和稳定剂)、引物和 DNA 模板 3 因素设 5 个水平,各因素水平分别为 Master Mix 9.5、10.5、11.5、12.5 和 13.5 μL;正反向引物各 0.6、0.8、1.0、1.2 和 1.4 μmol · L⁻¹;DNA 模板 30、40、50、60 和 70 ng。依据比较因素梯度的变动,调整 ddH₂O 量以保证反应体系为 25 μL。

1.2.2 SRAP 扩增 优化后的梨 SRAP 反应体系为:25 μL 体系中含模板 DNA 40 ng,正反向引物浓度各 1.2 μmol · L⁻¹,Master Mix 12.5 μL。PCR 扩增程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,35 °C 退火 1min,72 °C 延伸 1 min,共 5 个循环;再 94 °C 变性 1 min,52 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1

min,35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。扩增产物用 1.8%琼脂糖凝胶在 1×TAE 缓冲液中电泳分离,Bio-Rad 凝胶成像系统扫描分析。对部分比较模糊的扩增产物用 6%聚丙烯酰胺凝胶电泳进行验证后记带。

选用表型差异较大的‘威宁大黄梨’、‘福泉葫芦梨’和‘兴义海子梨-1’作为筛选引物的材料,按照已筛选出来的体系,参照 SRAP 反应程序,从 64 对引物组合中筛选出带型好、多态性高、稳定性和重复性好的引物作为本试验的 SRAP 扩增引物。

1.2.3 数据处理与分析 按照 Clark 的方法^[13],根据 SRAP 扩增结果电泳图谱中 DNA 条带的有无,无带记为 0,有带记为 1,并构建二元数据矩阵。应用 POPGENE 1.31^[14] 软件进行遗传多样性参数分析,计算多态性引物的多态位点百分率(PPB)、总等位基因数(*Na*)、有效等位基因数(*Ne*)、Shannon’s 信息指数(*I*)、Nei’s 基因多样性指数(*H*),并

对各参数进行 t 检验来评价 SRAP 标记与 ISSR 标记的差异显著性,在 DPSv7. 05 软件中进行。用 NTSYSpc2. 1^[15] 软件以 Dice 相似系数采用非加权类平均法(UPGMA)进行聚类分析,并进行遗传距离之间的 Mantel 相关性检验。

2 结果与分析

2.1 引物筛选及多态性分析

从 64 对 SRAP 上下游组合引物中(表 2),筛选出 15 对条带清晰、多态性丰富、重复性好的 SRAP 引物组合,对 59 份贵州砂梨种质基因组 DNA 进行扩增,统计结果见表 3。15 对 SRAP 引物共扩增出 151 条带,其中多态性带 120 条,多态百分率为 79. 47%,说明贵州砂梨种质资源遗传多样性较为丰富,个体间遗传差异较大。不同引物组合扩增条带的多态性百分率不同,引物组合 EM2-me6 多态位点百分率最高,为 92. 25%,而引物组合 EM2-me5 的多态位点百分率最低,为 63. 64%。64 对引物组合对‘兴义海子梨-1’的扩增产物电泳结果如图 1 所示。

2.2 聚类分析

根据 15 对 SRAP 引物对供试材料的扩增数据,以 Dice 相似系数采用 UPGMA 聚类,得到的梨系统关系树如图 2 所示。在遗传相似系数 0. 75 处,可将 59 份砂梨资源分为 6 组,其聚类结果具有一定的地理区域特性。第Ⅰ组仅有 1 份黔西南州晴隆县梨资源;第Ⅱ组包含晴隆‘瓢把梨-2’、‘兴义海子梨’、‘安顺箐口梨’、‘福泉葫芦梨’以及‘册亨金盖梨’等

在内的 28 份梨资源;第Ⅲ组以黔东南州台江县以及黄平县的梨资源为主,此外,还包括来自仁怀市的 3 份资源以及‘威宁-4’,共 11 份梨资源;第Ⅳ组以荔波县以及印江县的梨资源为主,还包括 2 份仁怀的梨种质,以及 1 份赫章的梨资源,从兴义市取材的野生砂梨资源也归在此类。第Ⅴ组包含‘晴隆-3’、‘晴隆响水梨’以及‘晴隆瓢把梨-1’等 3 份梨资源;第Ⅵ组为‘威宁大黄梨’和‘威宁-3’。

2.3 遗传多样性分析

根据 POPGENE 软件对不同区域品种材料各项遗传多样性参数进行分析,结果(表 4)表明,在

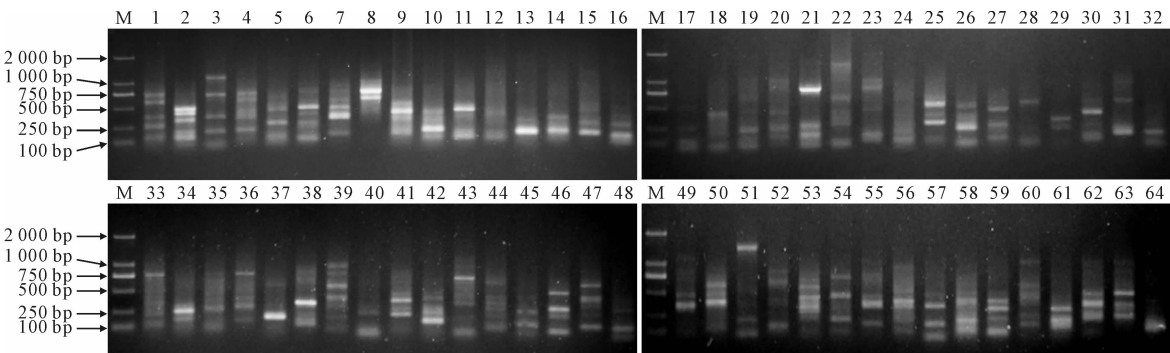
表 2 SRAP 引物序列
Table 2 SRAP primer sequences

引物编号 Code	引物序列 Primer sequences(5'→3')	
M4	TGAGTCCTTTCCGGTAA	
M5	TGAGTCCAAACCGGAGC	
me1	TGAGTCCAAACCGGATA	
me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	上游引物
me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	Upstream
me6	TGAGTCCAAACCGGTAA	primer
me7	TGAGTCCAAACCGGTCC	
me8	TGAGTCCAAACCGGTGC	
e1	GACTGCGTACGAATTCAAT	
e2	GACTGCGTACGAATTCAAC	
EM2	GACTGCGTACGAATTTGC	
EM5	GACTGCGTACGAATTAAC	下游引物
EM6	GACTGCGTACGAATTGCA	Downstream
EM7	GACTGCGTACGAATTCAA	primer
EM9	GACTGCGTACGAATTCGA	
EM10	GACTGCGTACGAATTCAG	

表 3 SRAP 引物组合的扩增结果及多态性
Table 3 Amplification results and polymorphism of 15 SRAP primer combination used in this study

编号 Code	引物组合 Primer combination	扩增条带总数 No. of bands	多态性条带数量 No. of polymorphic bands	多态位点百分率 Percentage of polymorphic bands/%
1	e1-M4	9	7	77. 78
2	e1-M5	9	6	66. 67
3	e1-me1	11	9	81. 82
4	e1-me3	9	6	66. 67
5	e1-me5	9	7	77. 78
6	e1-me6	10	9	90. 00
7	e1-me7	13	11	84. 62
8	EM2-me5	11	7	63. 64
9	EM2-me6	13	12	92. 25
10	EM6-me6	13	11	84. 62
11	EM7-me3	9	7	77. 78
12	EM7-me6	10	8	80. 00
13	EM10-me1	9	7	77. 78
14	EM7-M4	9	7	77. 78
15	EM7- me7	7	6	85. 71
	总计 Total	151	120	79. 47

物种水平上,多态位点百分率(*PPB*)为 79.47%,有效等位基因数(*Ne*)1.355 9,*Nei*'s 遗传多样性指数(*H*)0.261 9,*Shannon*'s 信息指数(*I*)0.336 2。在区域品种群水平上,以黔西南州遗传多样性最高(*PPB*=70.20%,*Ne*=1.330 0,*H*=0.201 9,*I*=0.312 2),六盘水市最低(*PPB*=27.15%,*Ne*=



M, DL2000;1~64.64 对 SRAP 引物组合

图 1 64 对 SRAP 引物组合对‘兴义海子梨-1’的扩增产物凝胶电泳分析

M, DL2000;1—64.64 primer pairs

Fig. 1 Electrophoresis results of amplification for pear germplasm of ‘XYhaizili-1’ using 64 primer pairs

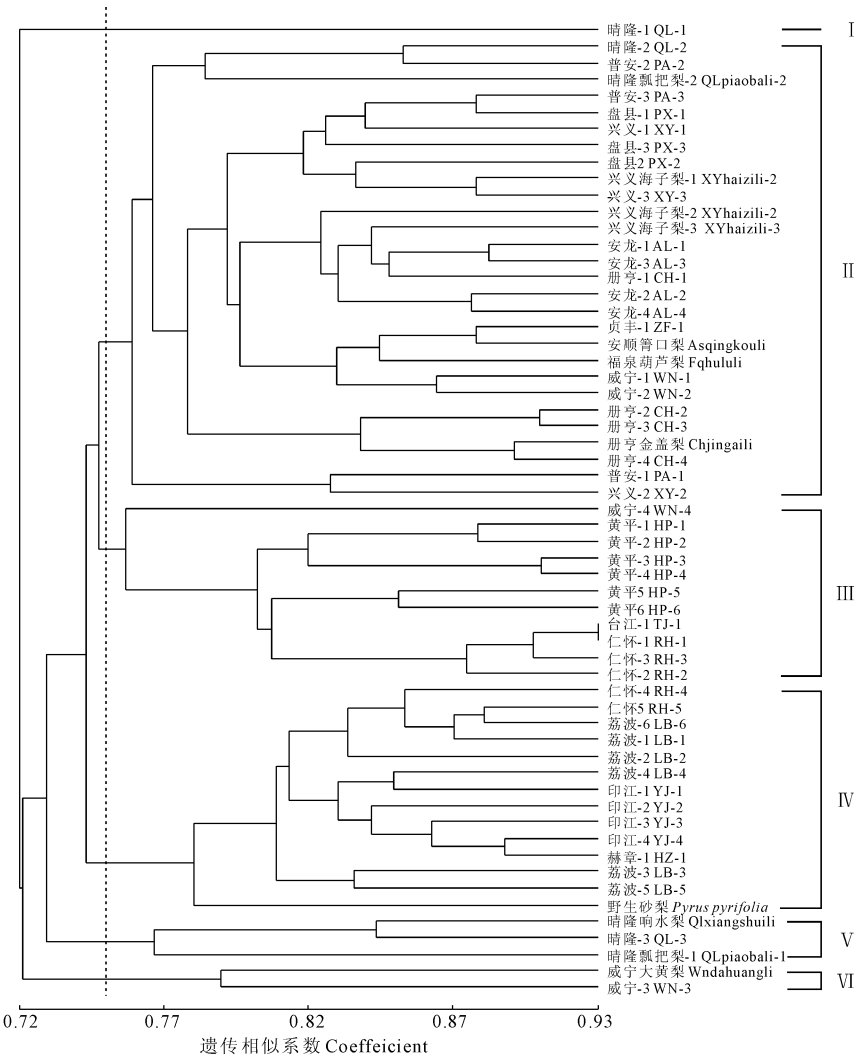


图 2 基于 SRAP 的 59 份砂梨种质资源的分子聚类分析

Fig. 2 Dendrogram of 59 *P. pyrifolia* germplasm accessions based on SRAP markers

表 4 SRAP 分析的贵州砂梨种质资源的遗传多样性

Table 4 Genetic diversity of *P. pyrifolia* resources detected by SRAP markers

区域品种群 Population	样本数 No. of individuals	有效等位基因数 Mean observed number of alleles(<i>N_e</i>)	Nei's 遗传多样性指数 Nei's genetic diversity(<i>H</i>)	Shannon's 信息指数 Shannon's index of diversity(<i>I</i>)	多态位点百分率 Percentage of polymorphic loci(<i>PPB</i>)/%
黔西南州 Qianxi'nan Prefecture	26	1.330 0	0.201 9	0.312 2	70.20
黔东南州 Qiandongnan Prefecture	7	1.304 8	0.182 9	0.277 9	56.29
铜仁地区 Tongren Prefecture	4	1.183 8	0.108 0	0.161 5	29.80
遵义市 Zunyi City	5	1.193 5	0.118 7	0.181 8	36.42
黔南州 Qiannan Prefecture	7	1.308 5	0.177 8	0.263 9	48.34
六盘水市 Liupanshui City	3	1.178 8	0.103 8	0.153 8	27.15
毕节地区 Bijie Prefecture	6	1.328 4	0.195 6	0.295 1	56.95
区域品种群水平 Population level		1.261 1	0.155 5	0.235 2	46.45
物种水平 Species level	59	1.355 9	0.216 9	0.336 2	79.47

表 5 基于 SRAP 砂梨种质各区域的遗传相似性系数和遗传距离

Table 5 Genetic identity and genetic distance among *P. pyrifolia* area based on SRAP markers

区域品种群 Population	黔西南州 Qianxi'nan Prefecture	安顺市 Anshun City	毕节地区 Bijie Prefecture	黔东南州 Qiandongnan Prefecture	遵义市 Zunyi City	黔南州 Qiannan Prefecture	铜仁地区 Tongren Prefecture	六盘水市 Liupanshui City
黔西南州 Qianxi'nan Prefecture		0.945 0	0.900 2	0.925 3	0.947 6	0.931 0	0.869 4	0.962 9
安顺市 Anshun City	0.056 6		0.877 0	0.952 6	0.941 4	0.896 8	0.837 8	0.948 9
毕节地区 Bijie Prefecture	0.105 1	0.131 3		0.887 2	0.937 2	0.882 9	0.7787	0.916 3
黔东南州 Qiandongnan Prefecture	0.077 6	0.048 6	0.119 7		0.947 1	0.8771	0.776 4	0.932 8
遵义市 Zunyi City	0.053 8	0.060 4	0.064 8	0.054 3		0.921 5	0.817 9	0.946 4
黔南州 Qiannan Prefecture	0.071 5	0.108 9	0.124 6	0.131 1	0.081 8		0.851 2	0.919 8
铜仁地区 Tongren Prefecture	0.139 9	0.177 0	0.250 1	0.253 1	0.201 0	0.161 1		0.856 9
六盘水市 Liupanshui City	0.037 8	0.052 5	0.087 4	0.069 6	0.055 1	0.083 6	0.154 4	

注:上三角为遗传相似性系数,下三角为遗传距离。
Note:Nei's genetic identity(above diagonal) and genetic distance(below diagonal).

1.178 8, $H=0.103\ 8$, $I=0.153\ 8$)。

2.4 区域品种群分化趋势和亲缘关系

根据 POPGENE 软件计算的各区域品种群之间的遗传距离和遗传相似性系数结果(表5),以黔西南州和六盘水市砂梨种质资源的遗传距离最近(0.037 8),相似系数最高(0.962 9);黔东南州和铜仁地区的遗传距离最远(0.253 1),遗传相似系数最低(0.776 4)。贵州砂梨种质在不同区域品种群之间的平均遗传距离为 0.107 6,平均遗传相似系数为 0.889 5。

3 讨 论

3.1 贵州砂梨种质资源的遗传多样性

用筛选到的 15 对引物对贵州 59 份砂梨种质进行 SRAP-PCR 扩增,共扩增出 151 条带,其中多态性带 120 条,平均多态百分率为 79.47%,低于玉苏甫等^[16]的研究结果(96.95%),但高于赵广等^[17](36.2%)以及齐丹等^[18](56.6%)的研究结果,这与不同研究者所选材料的数量以及遗传背景有关,贵州砂梨种质资源虽不及新疆梨遗传背景复杂^[16],但

经过长期的地理隔离与进化,也具有较高的遗传多样性,保护和利用这些地方砂梨种质对培育或改良新品种具有重要意义。

将贵州 59 份砂梨种质分为 7 个区域品种群采用 POPGENE 进行遗传多样性分析,结果表明黔西南地区砂梨种质遗传多样性最高,六盘水市相对较低。将 SRAP 分析结果与 ISSR 结果^[6]进行 *t* 测验,发现二者在多态性位点百分率(*PPB*)、有效等位基因数(*N_e*)、Nei's 基因多样性指数(*H*)及 Shannon's 信息指数(*I*)上都没有显著性差异($P>0.05$),表明 SRAP 标记与 ISSR 标记在揭示贵州砂梨种质遗传多样性上具有高度的一致性。

3.2 贵州砂梨种质资源的亲缘关系

通过 NTSYSpc2.1 对贵州 59 份砂梨资源进行聚类分析,与 ISSR 聚类结果类似^[6],生态环境相似、地理来源相邻地区的砂梨种质遗传关系较近,往往划分为同一组,具有明显的地域分布规律,但‘威宁大黄梨’和‘威宁-3’在 SRAP 分析中单独聚为第Ⅵ组,而在 ISSR 分析中则并未与黄平县的梨分开;而从遗传距离看,ISSR 标记的遗传距离(0.65~

0.88)却比 SRAP 标记(0.72~0.93)更大;表明相较于 ISSR 标记而言,SRAP 标记能在更小的变异范围内揭示更多的遗传信息。这可能是由于 SRAP 标记检测的是表达区域序列 ORFs^[7],其中外显子是转录序列,因此能够提供比检测重复序列间片段的 ISSR 标记更为准确的信息。

在区域品种群分化趋势及亲缘关系分析中,SRAP 与 ISSR 结果也出现了分歧,表现为:SRAP 标记结果认为黔西南州与六盘水市砂梨种质资源的遗传距离最近(0.037 8),黔东南州与铜仁地区的遗传距离最远(0.253 1);而 ISSR 结果则支持黔西南州与毕节地区遗传距离最近(0.046 5),黔东南州与安顺市的遗传距离最远(0.345 3);且 2 种标记产生的遗传距离矩阵之间并不存在显著相关性($r = -0.065\ 95$, $P = 0.422\ 3$)。用不同的标记技术从不

同的水平和角度分析种质间的遗传差异,其结果就不可能是简单的重复或完全的一致,在某些情况下获得的结果甚至相互冲突^[19-20]。以一种方法代替另一种方法,或以一种方法解释另一种方法是不妥的,将 2 种方法结合起来分析,可以获得更合理的研究结果^[21]。本研究表明,仅从遗传距离与地理距离的相互关系看,SRAP 标记计算的区域品种群间遗传距离大小与地理距离远近具有更好的一致性。

本试验采用 SRAP 标记对贵州 59 份砂梨种质进行遗传多样性分析,认为贵州砂梨资源遗传多样性水平高,并表现出明显的地理区域特性。SRAP 标记与 ISSR 标记在揭示贵州砂梨种质遗传多样性上具有高度的一致性,但 SRAP 标记能在更小的变异范围内揭示更多的遗传信息。

参考文献:

- [1] 滕元文,柴明良,李秀根.梨属植物分类的历史回顾及新进展[J].果树学报,2004,21(3):252-257.
TENG Y W, CHAI M L, LI X G. A historic retrospect and the progress in the taxonomy of the genus *Pyrus*[J]. *Journal of Fruit Science*, 2004, 21(3):252-257.
- [2] RUBTSOV G A. Geographical distribution of the genus and trends and factors in its evolution[J]. *Amer. Naturalist*, 1944, (78):358-366.
- [3] 贵州植物志编委会.贵州植物志(第7卷)[M].成都:四川民族出版社,1989:140-146.
- [4] 樊卫国,朱维藩,范恩普,等.贵州野生果树种质资源的调查研究[J].贵州大学学报,2002,21(1):32-38.
FAN W G, ZHU W F, FAN E P, et al. Germplasm resources of wild fruit tree in Guizhou Province[J]. *Journal of Guizhou University*, 2002, 21(1):32-38.
- [5] 张起,安华明.贵州地方梨种质果实品质性状多样性分析[J].热带亚热带植物学报,2014,22(6):601-609.
ZHANG Q, AN H M. Diversity of fruit quality of local pear germplasm resources in Guizhou[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2014, 22(6):601-609.
- [6] 张起,安华明.贵州砂梨种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J].果树学报,2015,32(1):6-12.
ZHANG Q, AN H M. Genetic diversity of *Pyrus pyrifolia* resources distributed in Guizhou Province revealed by ISSR markers[J]. *Journal of Fruit Science*, 2015, 32(1):6-12.
- [7] 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.
- [8] 郭大龙,罗正荣.部分柿属植物 SRAP-PCR 反应体系的优化[J].果树学报,2006,23(1):138-141.
GUO D L, LUO Z R. Optimization of SRAP-PCR in some *Diospyros* spp. [J]. *Journal of Fruit Science*, 2006, 23(1):138-141.
- [9] PEACE C P, AHMAD R, GRADZIEL T M. The use of molecular genetics to improve peach and nectarine post-storage quality[J]. *Acta Horticulturae*, 2005, 82(1):403-409.
- [10] PHOTHIPAN S, SILAYOI B, WANICHKUL K. Genetic relationship among bananas in AA, AAB and BB groups using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and sequence related amplified polymorphism (SRAP) techniques[J]. *Kasetsart Journal*, 2005, 39(4):703-710.
- [11] ZHAO Y, LIN H, GUO Y. Genetic linkage maps of pear based on SRAP markers[J]. *Pakistan Journal of Botany*, 2013, 45(4):1 265-1 271.
- [12] CLARK M S. Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual [M]. Beijing: China Higher Education Press, 1998:3-11.
- [13] MAGUIRE T L, COLLINS G G, SEDGLEY M. A modified CTAB DNA extraction procedure for plants belonging to the family Proteaceae[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1994, 12(2):106-109.
- [14] YE H F C. Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits[J]. *Belgian Journal of Botany*, 1997, 129:157.
- [15] ROHLF. NTSYS-pc Version 2.1. Numerical Taxonomy System and Multivariate Analysis System [M]. New York: Setauket, Exeter Software, 2002.
- [16] 玉苏甫·阿不力提甫,阿依古丽·铁木儿,罗淑萍,等.用 SRAP 分子标记分析新疆梨栽培品种遗传多样性[J].新疆农业大学学报,2013,36(5):377-382.
YUSUFU A, AYIGULI T, et al. Analysis on genetic diversity of Xinjiang pear based on the SRAP marker[J]. *Journal of Xinjiang Agricultural University*, 2013, 36(5):377-382.

- [17] 赵 广,乐文全,路 娟,等. 梨果皮色泽变异品种(系)的 AFLP 与 SRAP 标记鉴定[J]. 果树学报,2011,28(4):568-574.
ZHAO G, LE W Q, LU J, *et al.* Identification of skin colour variant cultivars(strains) in pear by AFLP and SRAP markers[J]. *Journal of Fruit Science*, 2011, 28(4):568-574.
- [18] 齐 丹,郑灵芝,曹玉芬,等. 辽宁绥中地方梨种质的 SRAP 分析[J]. 中国果树,2013,(2):14-16.
QI D, ZHENG L Z, CAO Y F, *et al.* Analyse of pear resources distributed in Liaoning Suizhong area revealed by SRAP markers[J]. *China Fruits*, 2013, (2):14-16.
- [19] RUSSELL J R, FULLER J D, MACAULAY M, *et al.* Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 95:714-722.
- [20] 沈程文,黄建安,赵世浩,等. 利用 SRAP 和 ISSR 标记分析广东茶树种质资源的遗传多样性[J]. 核农学报,2010,24(5):948-955.
SHEN C W, HUANG J A, ZHAO S H, *et al.* Analysis of genetic diversity of *Camellia sinensis* germplasm in Guangdong Province by SRAP and ISSR markers[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2010, 24(5):948-955.
- [21] 祈建民,梁景霞,陈美霞,等. 应用 SRAP 与 ISSR 分析烟草种质资源遗传多样性及遗传演化关系[J]. 作物学报,2012,38(8):1 425-1 434.
QI J M, LIANG J X, CHEN M X, *et al.* Genetic diversity and evolutionary analysis of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) germplasm resources based on ISSR and SRAP markers[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2012, 38(8):1 425-1 434.

(编辑:宋亚珍)

Introduction of the Plant Front Cover: *Primula filchnerae* Knuth

Primula filchnerae Knuth is an annual herbal plant belonging to Primulaceae, with a height from 8 to 40 cm. The whole plant is densely covered by white multicellular hairs. Aerial stem short or absent, fibrous root more or less. Leaves forming a rosette, ovate or ovate-lanceolate, with petiole 3.5—15 cm long, 2—5 cm wide, obtuse at apex, margin sinuate-crenate, with grey short hair on both sides; petiole 2.5—5.5 cm, obtuse at base. Scapes 8—40 cm, with dense white multicellular hairs, hollow, one to many arising from the rosette. Umbel 3—10(—12) flowered, pedicel 1.5—2.5 cm; bract linear-lanceolate, 8—10 mm long; calyx coniform, 5—10 mm long, ca. 4 mm wide, glandular, parted nearly to the middle, lobes lanceolate, inflated at fruit; corolla purple to pink, tube 5—8 mm, limb 1.5—2.5 cm wide; 5-parted at the top, lobes obcordate, apex slightly 2-lobed, pink with violet, colored by obcordate saffron yellow to purple plague. Flowers heterostylous. Pin flowers: stamens at middle of corolla tube; filament short or absent, stamens yellow, style 6—8 mm, slightly higher than annulus. Thrum flowers: style 4—5 mm, stigma green, hidden in stamens. Ovary spherical, ovule multiple, free-central placentation. Capsule subglobose, exocarp membranous, indehiscent or dehiscent at top. Seeds globose, 1.5 mm in diam., brownish-black when maturity, surface wrinkled. Flowers February to April, fruits March to May.

Primula filchnerae is endemic to China, and is listed as one of the keystone protective species of Shaanxi Province. The species usually grows on moist sandstone soils near natural secondary broad-leaved deciduous forest, 900—1 000 m in elevation, with its distribution area somewhat limited. Since *Primula filchnerae* Knuth (Primulaceae) was firstly collected by W. Filchner in 1904, no extant wild population was found in more than one hundred years, which made people believe this species to be extinct. At the present time, only two populations were rediscovered in Hubei Province in 2006, and one population was found in Shaanxi province in 2015.

(Photographed and introduced by ZHANG Jianqiang)