

基于SRAP和SCoT标记的猕猴桃种质遗传多样性分析及变异材料鉴定

张坤, 周源洁, 李尧, 刘芯伶, 郭玉琪, 夏惠, 梁东*

(四川农业大学园艺学院, 成都 611130)

摘要:【目的】探明59份猕猴桃品种/种质的遗传背景及鉴定果肉全红型材料(‘H-16’)的亲缘关系。【方法】利用SRAP及SCoT两种分子标记进行遗传多样性分析及变异鉴定。【结果】筛选出的12对SRAP引物和16条SCoT引物在59份材料中分别扩增出多态性条带125条和143条, 平均多态性比率为99.07%和100%, 平均遗传相似系数为0.668和0.640, 其中‘H-16’与红阳的遗传相似系数最高, 分别为0.952和0.930, 表明两者遗传背景高度一致。SRAP及SCoT两种分子标记分别将59份猕猴桃材料分为4组和8组, 部分中华猕猴桃与多数美味猕猴桃种质聚为一类, 显示中华猕猴桃与美味猕猴桃种间关系较近, 存在频繁的基因交流现象。筛选出的3对SRAP引物和2条SCoT引物, 在‘H-16’和红阳中扩增出差异常带, 表明‘H-16’为红阳的变异材料, 且12对SRAP引物将全部中华系红肉猕猴桃聚为一类, 可作为筛选控制红色性状位点的候选SRAP引物。【结论】SRAP和SCoT分子标记有效地将59份猕猴桃划分成4组和8组, 表明其遗传背景存在差异, 且遗传多样性较为丰富, 两种标记都可用, SCoT更高效。两种标记都可用于猕猴桃变异材料的早期鉴定, 且成功鉴定‘H-16’为红阳的色泽变异品种(系), 为后期开展种质资源评价和新种质选育提供技术参考和理论依据。

关键词: 猕猴桃; SRAP; SCoT; 遗传多样性; 变异鉴定

中图分类号: S663.4

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2021)12-2059-13

Genetic diversity analysis of kiwifruit germplasm and identification of variant based on SRAP and SCoT markers

ZHANG Kun, ZHOU Yuanjie, LI Yao, LIU Xinling, GUO Yuqi, XIA Hui, LIANG Dong*

(College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China)

Abstract: 【Objective】Kiwifruit species are diverse due to obvious interspecific and intraspecific hybridization. Therefore, investigation of the genetic background of 59 kiwifruit varieties/germplasm and identification of the relatives of kiwifruit material with fully red flesh (‘H-16’) can provide an effective molecular marker-assisted breeding method for genetic background analysis and classification of kiwifruit germplasm and selection of new varieties. 【Methods】The genomic DNA of kiwifruit leaves was extracted by DNA kit. Then, two kinds of molecular markers, SRAP and SCoT, were selected for genetic diversity analysis and variant identification. The SRAP marker was designed by designing a pair of special primers at both ends of the open reading frame, and the primer sequences included filler bases, specific bases and selective bases. While the SCoT marker was designed by designing a single primer based on the conserved sequences flanking the ATG translation start site, and the amplification produced a dominant polymorphic marker biased toward the candidate functional gene region. The differences in electrophoretic bands obtained from the two markers would reflect the differences between the genetic materials, so the germplasm identification could be constructed based on the differences in elec-

收稿日期: 2021-06-16 接受日期: 2021-08-10

基金项目: 四川省猕猴桃生物工程技术育种平台(2016NZ0105)

作者简介: 张坤, 男, 在读硕士研究生, 研究方向为果树种质资源与育种。Tel: 13980581312, E-mail: 626587422@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 15680010105, E-mail: liangeast@sicau.edu.cn

trophoretic bands. A 0, 1 matrix was established based on the polymorphic amplified bands, and the number of effective alleles (N_e), genetic diversity (H), and Shannon information index (I) were calculated using Popgene 1.31 software. The genetic distance and genetic similarity among the 59 kiwifruit germplasm resources were calculated using Ntsyspc 2.10 software, and the NJ adjacent cluster trees of 59 kiwifruit germplasm resources based on Nei's genetic distance was constructed using MEGA 7.0 software. Finally, 169 pairs of SRAP primers and 57 SCoT primers were used for the molecular identification of the 'H-16' variant material. **【Results】** The screened 12 pairs of SRAP primers and 16 SCoT primers amplified 125 and 143 polymorphic bands in 59 germplasm resources, respectively. The average numbers of amplified bands were 10.50 and 8.94, the average polymorphism ratios were 97.07% and 100%, and the average genetic similarity coefficients were 0.668 and 0.640. The genetic distance between the 59 kiwifruit germplasm resources obtained with the two kinds of markers were about 0.437–0.952 and 0.441–0.930, respectively. The high genetic similarity coefficients of 0.952 and 0.930 between H-16 and Hongyang indicated that the genetic backgrounds of them were highly consistent. From the clustering results, two kinds of molecular markers, SRAP and SCoT, divided the 59 kiwifruit germplasm resources into 4 and 8 groups, respectively. The SCoT marker provided more genetic variation information than the SRAP marker and could distinguish kiwifruit species more effectively. Some of the *A. chinensis* clustered with most of the *A. deliciosa* germplasm, showing that the *A. chinensis* and *A. deliciosa* were more closely related interspecies and there were frequent gene exchanges between them, further confirming that *A. deliciosa* is a variety of *A. chinensis*. From the analysis of species origin, among the *A. arguta* tested, Hongbaoshixing and Zhongxiahong both originated from the Kiwifruit Resource Collection of Zhengzhou Fruit Tree Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, which belonged to the fully red *A. arguta*, both clustered together by the two kinds of markers, to a certain extent, indicating that the relatives and geographical distribution were related. The above genetic analysis based on SRAP and SCoT markers indicated that the genetic similarity coefficients between Hongyang and 'H-16' were high, so it was assumed that 'H-16' was a variant of Hongyang. In order to investigate the genetic differences between them, the specific primers were screened from 57 SCoT primers and 169 SRAP primer pairs, and the results showed that the SP49 and SC68 primers of SCoT markers amplified differential bands between the two specimens with a difference ratio of 3.45%. The Me7-em11, Me9-em2 and Me13-em7 primer combinations of SRAP markers amplified specific differential bands with a difference ratio of 2.36%. This indicated that there was a difference in genetic material between 'H-16' and Hongyang. Combined with the clustering results, it was proved that 'H-16' was the mutant of Hongyang at the DNA level, and also indicated that both markers could be applied to the identification of mutant materials. In addition, 12 pairs of SRAP primers clustered all *A. chinensis* lines of red-fleshed kiwifruit, which could be used as candidate SRAP primers for the screening of loci controlling red traits. **【Conclusion】** The SRAP and SCoT molecular markers classified 59 kiwifruit accessions into 4 and 8 groups effectively, indicating differences in their genetic backgrounds and a high level of genetic diversity, and the two kinds of markers were both available, with SCoT being more efficient. Both markers could be used for early identification of kiwifruit variant materials, and the successful identification of 'H-16' as a color variant (strain) of Hongyang would provide technical reference and theoretical basis for later germplasm resource evaluation and new germplasm selection.

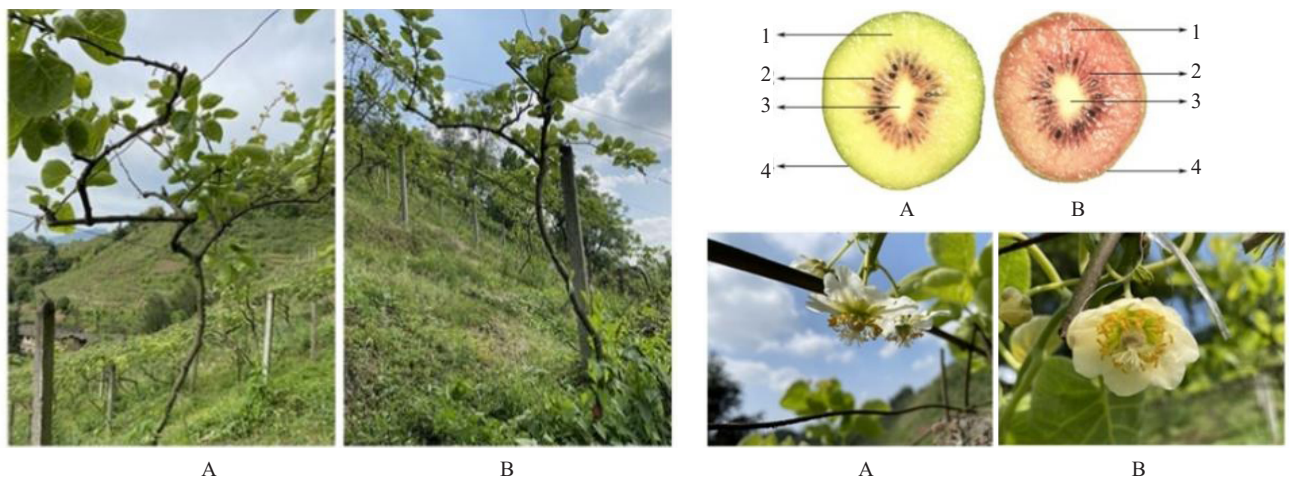
Key words: *Actinidia*; SRAP marker; SCoT marker; Genetic diversity; Variant identification

猕猴桃属(*Actinidia*)为多年生落叶藤本植物。我国猕猴桃种质资源丰富,有52种,73个分类单元^[1]。生产上栽培品种多以中华猕猴桃和美味猕猴桃为主,已经育成的优良种质多达148个^[2]。且猕猴桃为雌雄异株植物,种间和种内的杂交现象普遍,而我国选育的猕猴桃品种大部分是由实生选种而来,存在遗传背景不清、系谱关系不明等情况。此外,芽变、实生变异材料也丰富了新品种选育的育种材料。因此,建立有效的分子手段探明种质资源的遗传背景、鉴定变异材料对新品种的选育具有重要的理论和实践意义。

分子标记能从DNA水平上揭示物种遗传变异及其变异规律^[3],已广泛应用于植物种质资源遗传多样性研究。SRAP(Sequence-Related Amplified Polymorphism,序列相关扩增多态性)和SCoT(Start Codon Targeted Polymorphism,目标起始密码子多态性标记)是目前新起的分子标记技术。SRAP标记是Li等^[4]提出的一种基于PCR的新型显性标记,该标记通过对基因的ORFs(Open reading frames 开放阅读框)的特定区域进行扩增,以此比较不同植物遗传资源的基因型及群体的多样性。SCoT标记是一种基于翻译起始位点的目的基因标记新技术^[5],该标记具有操作简便、多态性比率高、遗传信息位点丰富等特点,并能对特异性状进行追踪分析^[6]。目前两种标记已被广泛应用于多种生物遗传多样性、比较基因组及品种鉴定等研究中,如井赵斌等^[7]和Cho等^[8]通过SRAP标记分析了猕猴桃种质资源,揭示了

部分猕猴桃种质的遗传多样性,并建立较成熟的SRAP标记体系,为本研究猕猴桃种质遗传多样性的分析提供了参考。相比于其他标记,SCoT标记则具有更高的通用性,已被用于揭示苧麻属[*Boehmeria nivea* (L.) Gaudich.]野生种与栽培种遗传多样性差异^[9],大麦基因组多样性和种群结构分析^[10],杧果品种的鉴定和遗传多样性分析等^[11]。而目前有关猕猴桃的SCoT遗传多样性分析研究甚少,且涉及品种较少,因此建立广泛高效的猕猴桃SCoT标记体系十分重要。此外,SRAP和SCoT标记也被应用于桃、葡萄、橙等变异材料的鉴定,鉴定结果显示其变异是由于基因组的DNA序列发生了改变,并以此筛选出具有潜在育种价值的优良变异单株^[12-13],表明其标记可应用于品种的变异鉴定和遗传评价。而目前有关SCoT标记在猕猴桃变异株系的鉴定研究甚少,且SRAP标记尚未见报道。故SRAP和SCoT标记在猕猴桃种质资源分类及变异材料鉴定方面具有较大的应用前景。

本课题组在猕猴桃种质资源调查过程中,在雅安市名山区红阳种植园中发现1株果实全红型变异植株(编号‘H-16’)。红阳及‘H-16’变异材料的树体、花、叶、果等外形特征都无明显差异,与红阳果实的横切面结构相比,‘H-16’由外至内分别为黄绿色或绿色的外果皮、微红色的中果皮、含种子并呈现放射状红色的内果皮以及乳白色的果心(图1)。此外,‘H-16’的中果皮部位着色程度仅次于内果皮,可看出‘H-16’中果皮呈红色变异(图1),从形态和



A. 红阳;B. ‘H-16’;1-4 分别为:中果皮、内果皮、果心、外果皮。

A. Hongyang; B. ‘H-16’; 1-4 represent mesocarp, endocarp, core and exocarpe spectively.

图1 红阳和‘H-16’的栽培环境、果实及花

Fig. 1 Cultivation environment, fruit and flowers of Hongyang and ‘H-16’

生物学特性初步认定为红阳变异株。笔者在本研究中采用SRAP和SCoT分子标记技术分析了59份猕猴桃的遗传多样性及种间关系,鉴定变异材料(‘H-16’)和红阳的遗传背景差异,从而为变异材料的早期鉴定及后期新品种选育提供技术参考,并为猕猴桃的亲缘关系分析及种质资源挖掘利用等奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

本试验共收集59份猕猴桃品种材料(表1),部分来源于本课题组建立的猕猴桃种子资源圃,部分由中国农业科学院郑州果树研究所提供。于2020

表1 本研究中使用的猕猴桃材料

Table 1 Kiwifruit material used in this study

编号 Code	样品名 Sample	种名 Species	编号 Code	样品名 Sample	种名 Species
1	红阳 Hongyang	中华猕猴桃 <i>A. chinensis</i>	31	徐香 Xuxiang	美味猕猴桃 <i>A. deliciosa</i>
2	疑似红阳变异材料 ‘H-16’	中华猕猴桃 <i>A. chinensis</i>	32	海沃德 Hayward	美味猕猴桃 <i>A. deliciosa</i>
3	楚红 Chuhong	中华猕猴桃 <i>A. chinensis</i>	33	秦美 Qinmei	美味猕猴桃 <i>A. deliciosa</i>
4	东红 Donghong	中华猕猴桃 <i>A. chinensis</i>	34	新观2号 Xinguan 2	美味猕猴桃 <i>A. deliciosa</i>
5	红华 Honghua	中华猕猴桃 <i>A. chinensis</i>	35	米良1号 Miliang 1	美味猕猴桃 <i>A. deliciosa</i>
6	脐红 Qihong	中华猕猴桃 <i>A. chinensis</i>	36	金魁 Jinkui	美味猕猴桃 <i>A. deliciosa</i>
7	JXFX-CK-04137	中华猕猴桃 <i>A. chinensis</i>	37	中猕2号 Zhongmi 2	美味猕猴桃 <i>A. deliciosa</i>
8	金红1号 Jinhong 1	中华猕猴桃 <i>A. chinensis</i>	38	布鲁诺 Bruno	美味猕猴桃 <i>A. deliciosa</i>
9	红实2号 Hongshi 2	中华猕猴桃 <i>A. chinensis</i>	39	香绿 Xianglü	美味猕猴桃 <i>A. deliciosa</i>
10	金丰 Jinfeng	中华猕猴桃 <i>A. chinensis</i>	40	华美1号 Huamei 1	美味猕猴桃 <i>A. deliciosa</i>
11	夏亚15 Xiaya 15	中华猕猴桃 <i>A. chinensis</i>	41	红宝石星 Hongbaoshixing	软枣猕猴桃 <i>A. arguta</i>
12	早鲜 Zaoxian	中华猕猴桃 <i>A. chinensis</i>	42	仲夏红 Zhongxiahong	软枣猕猴桃 <i>A. arguta</i>
13	翠玉 Cuiyu	中华猕猴桃 <i>A. chinensis</i>	43	魁绿 Kuilü	软枣猕猴桃 <i>A. arguta</i>
14	金实1号 Jinshi 1	中华猕猴桃 <i>A. chinensis</i>	44	宝贝星 Baobeixing	软枣猕猴桃 <i>A. arguta</i>
15	金实2号 Jinshi 2	中华猕猴桃 <i>A. chinensis</i>	45	龙城2号 Longcheng 2	软枣猕猴桃 <i>A. arguta</i>
16	金艳 Jinyan	中华猕猴桃 <i>A. chinensis</i>	46	永丰4号 Yongfeng 4	软枣猕猴桃 <i>A. arguta</i>
17	黄金果 Hort16A	中华猕猴桃 <i>A. chinensis</i>	47	长江1号 Changjiang 1	软枣猕猴桃 <i>A. arguta</i>
18	武植3号 Wuzhi 3	中华猕猴桃 <i>A. chinensis</i>	48	KR1	对萼猕猴桃 <i>A. valvata</i>
19	金霞 Jinxia	中华猕猴桃 <i>A. chinensis</i>	49	KR3	对萼猕猴桃 <i>A. valvata</i>
20	琼露 Qionglu	中华猕猴桃 <i>A. chinensis</i>	50	KR4	对萼猕猴桃 <i>A. valvata</i>
21	金桃 Jintao	中华猕猴桃 <i>A. chinensis</i>	51	KR5	对萼猕猴桃 <i>A. valvata</i>
22	金龙2号 Jinlong 2	中华猕猴桃 <i>A. chinensis</i>	52	毛花 <i>A. eriantha</i>	毛花猕猴桃 <i>A. eriantha</i>
23	通山5号 Tongshan 5	中华猕猴桃 <i>A. chinensis</i>	53	AE1	毛花猕猴桃 <i>A. eriantha</i>
24	庐山香 Lushanxiang	中华猕猴桃 <i>A. chinensis</i>	54	AE2	毛花猕猴桃 <i>A. eriantha</i>
25	魁蜜 Kuimi	中华猕猴桃 <i>A. chinensis</i>	55	长叶 <i>A. hemsleyana</i>	长叶猕猴桃 <i>A. hemsleyana</i>
26	三峡1号 Sanxia 1	中华猕猴桃 <i>A. chinensis</i>	56	长果 <i>A. longicarpa</i>	长果猕猴桃 <i>A. longicarpa</i>
27	湘麻6号 Xiangma 6	中华猕猴桃 <i>A. chinensis</i>	57	阔叶 <i>A. latifolia</i>	阔叶猕猴桃 <i>A. latifolia</i>
28	红美 Hongmei	美味猕猴桃 <i>A. deliciosa</i>	58	KR2	大籽猕猴桃 <i>A. macrosperma</i>
29	猕香 Mixiang	美味猕猴桃 <i>A. deliciosa</i>	59	京梨 Jingli	硬齿猕猴桃 <i>A. callosa</i>
30	翠香 Cuixiang	美味猕猴桃 <i>A. deliciosa</i>			

年5—6月取其幼嫩叶片,−80℃超低温冰箱保存,用于DNA提取。其中,红阳及全红型变异材料‘H-16’取果实作为后续研究材料。

1.2 猕猴桃DNA的提取

采用DNA提取试剂盒(成都百菲特,型号DN32-50)提取猕猴桃幼叶基因组DNA,用1%的琼脂糖凝胶电泳,用紫外分光光度计测定其OD值,以检测其纯度和浓度,并稀释成质量浓度20~30 ng·μL⁻¹,

存于−80℃超低温冰箱以备用。

1.3 PCR扩增体系

SRAP标记由13个上游引物及13个下游引物自由组合,共得到169对引物组合^[14];57条SCoT引物碱基序列参考陈伯伦等^[15]、张安世等^[16]和周巧遇等^[17]报道的,详见表2。均由成都擎科梓熙生物技术有限公司合成。

参考张好艳等^[18]的SRAP标记扩增方法并稍加

表2 169对SRAP引物组合序列和57条SCoT引物序列
Table 2 169 pairs of SRAP primer combination sequences and 57 SCoT primer sequences

引物 Primer	引物序列5'→3' Primer sequences 5'→3'	引物 Primer	引物序列5'→3' Primer sequences 5'→3'	引物 Primer	引物序列5'→3' Primer sequences 5'→3'
Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	SP4	CAACAATGGCTACCACCT	SP42	ACCATGGCTACCACCGAT
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	SP5	CAACAATGGCTACCACGA	SP44	GCAACAATGGCTACCACG
Me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	SP8	CAACAATGGCTACCACGT	SP47	AACCATGGCTACCACCGC
Me4	TGAGTCCAAACCGGACC	SP9	CAACAATGGCTACCACGA	SP48	ACGACATGGCGACCACCG
Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	SP10	CAACAATGGCTACCAGCC	SP49	CCATGGCTACCACCGGCG
Me6	TGAGTCCAAACCGGACA	SP11	AAGCAATGGCTACCACCA	SC1	CAACAATGGCTACCACCA
Me7	TGAGTCCAAACCGGACG	SP12	ACGACATGGCGACCAACG	SC13	ACGACATGGCGACCATCG
Me8	TGAGTCCAAACCGGACT	SP13	ACGACATGGCGACCATCG	SC15	ACGACATGGCGACC CGGA
Me9	TGAGTCCAAACCGGAGG	SP14	ACGACATGGCGACCACGC	SC18	ACCATGGCTACCACCGCC
Me10	TGAGTCCAAACCGGAAA	SP16	ACCATGGCTACCACCGAC	SC21	ACGACATGGCGACCACCA
Me11	TGAGTCCAAACCGGAAC	SP17	ACCATGGCTACCACCGAG	SC22	AACCATGGCTACCACCAC
Me12	TGAGTCCAAACCGGAGA	SP19	ACCATGGCTACCACCGGC	SC23	CACCATGGCTACCACCAG
Me13	TGAGTCCAAACCGGAAG	SP20	ACCATGGCTACCACCGCG	SC26	ACCATGGCTACCACCGCT
em1	GACTGCGTACGAATTAAT	SP21	ACGACATGGCGACCCACA	SC29	CCATGGCTACCACCGGCC
em2	GACTGCGTACGAATTTGC	SP23	CACCATGGCTACCACCAG	SC31	CCATGGCTACCACCGCCT
em3	GACTGCGTACGAATTGAC	SP25	ACCATGGCTACCACCGGG	SC34	ACCATGGCTACCACCGCA
em4	GACTGCGTACGAATTTGA	SP27	ACCATGGCTACCACCGTG	SC35	CATGGCTACCACCGGCC
em5	GACTGCGTACGAATTAAC	SP28	CCATGGCTACCACCGCCA	SC37	ACGACATGGCGACCAGCG
em6	GACTGCGTACGAATTGCA	SP29	CCATGGCTACCACCGGCC	SC48	ACAATGGCTACCACTGGC
em7	GACTGCGTACGAATTCAA	SP30	CCATGGCTACCACCGGCG	SC55	ACAATGGCTACCACTACC
em8	GACTGCGTACGAATTCAC	SP31	CCATGGCTACCACCGCCT	SC65	ACCATGGCTACCACGGCA
em9	GACTGCGTACGAATTCAG	SP33	CCATGGCTACCACCGCAG	SC68	ACCATGGCTACCAGCGTC
em10	GACTGCGTACGAATTCAT	SP34	ACCATGGCTACCACCGCA	SC74	CCATGGCTACCACCGGCA
em11	GACTGCGTACGAATTCTA	SP35	CATGGCTACCACCGGCC	SC77	CCATGGCTACCACTACCC
em12	GACTGCGTACGAATTCTC	SP37	CAACAATGGCTACCAGCG	SC79	CCATGGCTACCACTAGCT
em13	GACTGCGTACGAATTCTG	SP38	AAGCAATGGCTACCACCG	SC29+SC31	引物组合 Primer combinations
SP2	CAACAATGGCTACCACCC	SP39	ACGACATGGCGACCAGCG	SC29+SC37	引物组合 Primer combinations
SP3	CAACAATGGCTACCACCG	SP40	ACGACATGGCGACCACGT		

修改,PCR反应体系为20 μL包含10 μL 2×Es Taq MasterMix(Dye),上下游引物各500 nmol·L⁻¹、1.5 μL模板DNA,其余由ddH₂O补齐。前5个循环的扩增程序为:94℃预变性4 min;94℃变性1 min,35℃退火1 min,72℃延伸1 min;再进行后35个循环,94℃变性1 min,50℃退火1 min,72℃延伸1 min;最后72℃延伸10 min。

参考陈虎等^[9]的SCoT标记扩增方法并加以修改,PCR反应体系为20 μL,包含10 μL 2×Es Taq MasterMix(Dye),500 nmol·L⁻¹ SCoT引物、1 μL模板DNA,8 μL ddH₂O。扩增程序为:94℃预变性5 min;94℃变性50 s,51℃退火45 s,72℃延伸90 s,共35个循环;最后在72℃延伸10 min。于4℃保存。

1.4 多态性引物筛选及变异鉴定

随机选取8个猕猴桃品种作为模板,筛选出多态性位点多、条带清晰、扩增稳定的引物用于遗传多样性关系分析。采用实验室建立的已优化SRAP/SCoT-PCR反应体系分别对169对引物和57条引物进行PCR扩增,对‘H-16’材料进行变异鉴定。PCR扩增产物采用1.5%琼脂糖凝胶电泳,检测条件:1×TAE缓冲液、100 V 45 min,并于SYNGENE自动凝胶成像仪中拍照记录。

1.5 数据转换与分析

根据扩增结果进行条带统计,同一位置扩增出条带及弱带记为1,无带记或不能识别的条带记为0,在软件Microsoft Excel 2010中构建原始0/1数据矩阵,并将其分别转换为软件Mega7.0、Popgene 1.31和Ntspyc 2.10所需要的数据格式进行遗传多

多样性和聚类分析。

2 结果与分析

2.1 基于SRAP分子标记的遗传多样性分析

用部分DNA模板进行PCR扩增。最终从169对SRAP引物对筛选出特异条带丰富、扩增稳定的

12对SRAP引物(图2)。这12对引物组合共扩增出126个条带,多态性条带125个,多态性比率平均为99.07%,平均每对引物扩增出10.50条多态性片段。引物组合Me1-em4扩增的多态性条带数最多,为15条,扩增的位点数最少是引物组合Me7-em11,为5个,平均每对引物的有效等位数为1.572(表3),

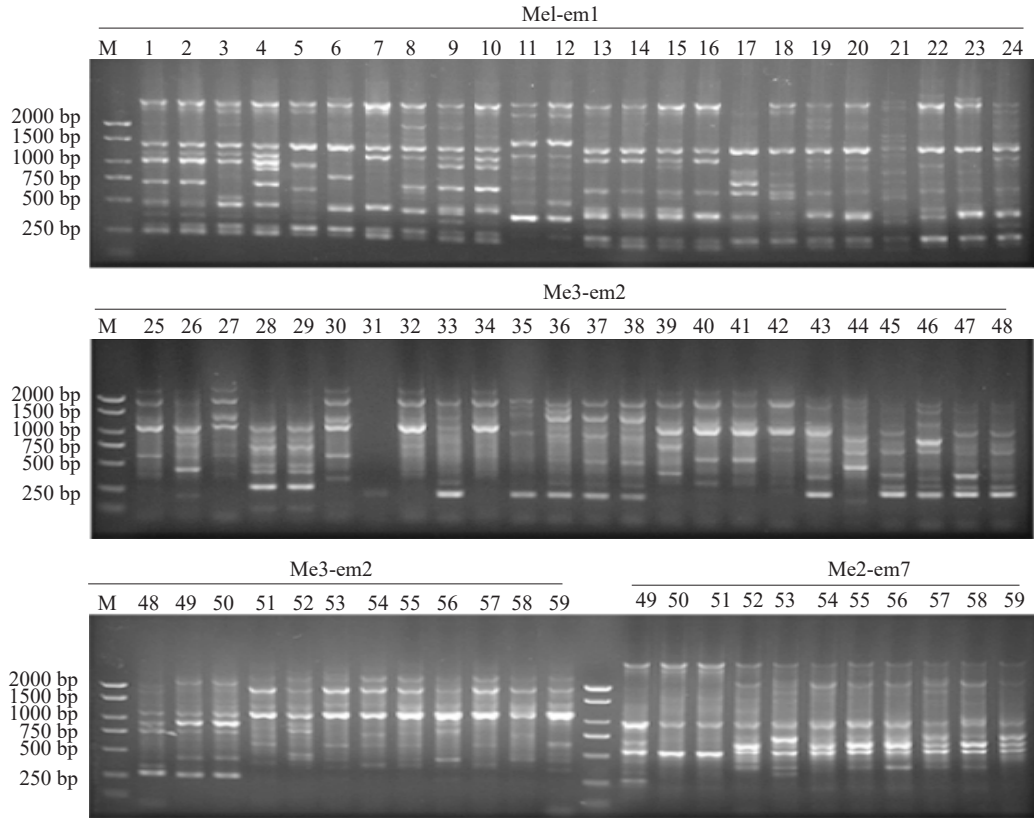


图2 部分SRAP引物在59份材料中的扩增图谱

Fig. 2 Amplification map of some SRAP primers in 59 materials

表3 12对SRAP引物多态性分析

Table 3 The Polymorphism analysis of 12 pairs of SRAP primers used for this study

引物 Primers	条带数 Total band number	多态性条带数 No. of polymorphic band	多态性比率 Polymorphic rate/%	有效等位基因数 Effective allele number, <i>N_e</i>	Nei's基因多样性 Nei's gene diversity, <i>H</i>	表型Shannon's信息指数 Shannon information index, <i>I</i>
Me1-em1	12	12	100.00	1.594	0.358	0.539
Me1-em4	15	15	100.00	1.478	0.295	0.456
Me1-em5	9	9	100.00	1.651	0.381	0.565
Me1-em7	13	13	100.00	1.429	0.272	0.427
Me2-em4	9	8	88.89	1.637	0.346	0.499
Me2-em7	14	14	100.00	1.432	0.273	0.430
Me3-em2	7	7	100.00	1.688	0.374	0.545
Me7-em7	11	11	100.00	1.538	0.322	0.487
Me7-em11	5	5	100.00	1.633	0.357	0.527
Me9-em2	8	8	100.00	1.668	0.364	0.530
Me12-em2	8	8	100.00	1.601	0.366	0.549
Me13-em7	15	15	100.00	1.510	0.302	0.462
总计 Total	126	125				
平均 Mean	10.50	10.42	99.07	1.572	0.334	0.501

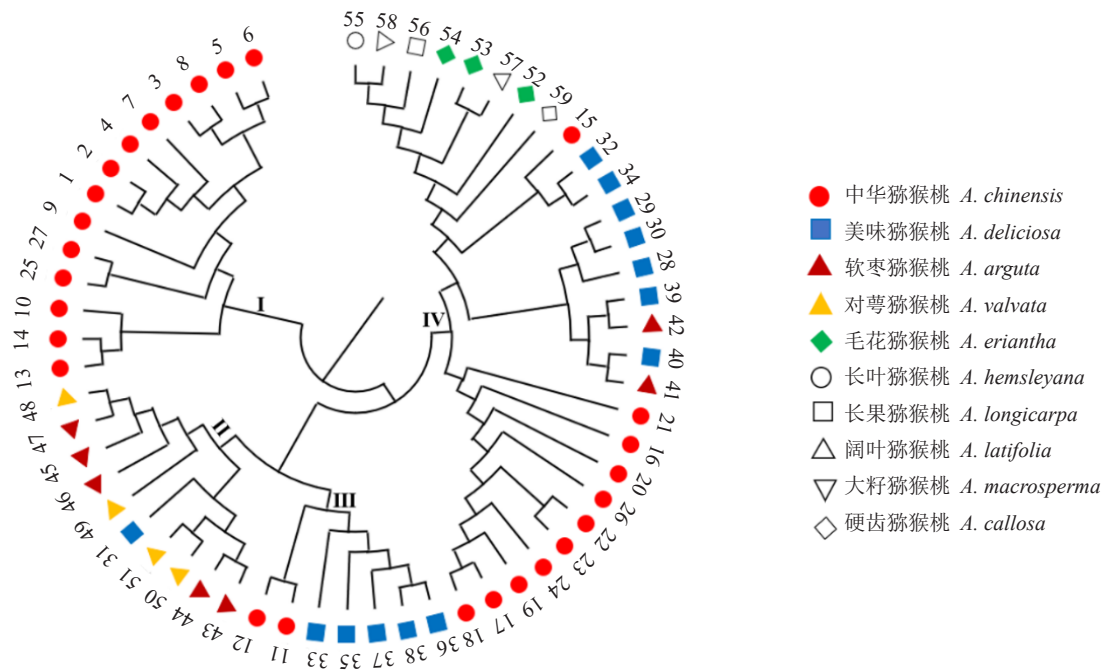
因此具有较高的遗传多样性。Nei's基因多样性指数(H)在0.272~0.381之间变化,平均值为0.334, H 值最高的为引物组合Me1-em5(0.381), H 值最低的为引物组合Me1-em7(0.2717)。各引物Shannon's信息指数(I)值在0.427~0.565之间,平均值为0.501,呈中等水平的遗传多样性, I 值最高的为引物组合Me1-em5(0.568), I 值最低的为引物组合Me1-em7(0.429)。结果表明,SRAP引物所扩增产物大小主要分布在250~2000 bp,部分品种扩增产物大于2000 bp,表明59份猕猴桃材料遗传信息丰富。同一引物在不同品种中产生的位点信息存在差异,显示所供试的59份猕猴桃种质材料在基因组DNA水平上具有明显的差异。

2.2 SRAP 分子标记的聚类分析

59份猕猴桃材料的遗传相似系数(SM)在0.437~0.952,平均值为0.668,变幅为0.516。其中红阳与'H-16'的遗传相似系数最大为0.952,'H-16'与东红为0.730;遗传相似系数最小的是'H-16'与米良1号(0.437)。结果表明供试的猕猴桃种质间遗传差异较大,存在较丰富的遗传多样性,猕猴桃种内遗传相似性较高,种群进化中发生了基因交流频繁或渐

渗现象,且中华猕猴桃与美味猕猴桃种间遗传相似性高于其他种。

当遗传相似系数为0.636时,59份材料主要被分为4大聚类(图3),其中I类群由14份猕猴桃种质组成,均为中华猕猴桃,1号(红阳)和2号('H-16')聚在一起,表明其亲缘关系很近,并且与长江一号的亲缘关系较远,与遗传相似度分析结果一致。II类群和III类群聚在一起,II类群中主要是软枣猕猴桃和对萼猕猴桃,两个种间基因交流频繁;III类群中则是2份中华猕猴桃和4份美味猕猴桃构成,显示其亲缘关系较近。IV类群共由28份猕猴桃构成,其中包括11份中华猕猴桃、7份美味猕猴桃、3份毛花猕猴桃、2份软枣猕猴桃,1份长叶猕猴桃、1份长果猕猴桃、1份阔叶猕猴桃、1份大籽猕猴桃、1份硬齿猕猴桃。结果显示不同猕猴桃种间的差异明显,但中华猕猴桃和美味猕猴桃两个种间地理隔离小,可能存在频繁的基因交流,遗传分化程度小。综上由图3可知,'H-16'与红阳的亲缘关系最近,显示两份试材遗传背景高度相似,也说明'H-16'的色泽变异可能是由遗传物质的改变引起。此外,所筛选出的12对引物组合能将全部中华红肉猕猴桃聚类,表



图中编号对应材料名称同表1。图5同。

The material name corresponding to the code is the same Table 1. The same Fig.5.

图3 基于遗传距离的59个猕猴桃品种(品系)的SRAP标记聚类分析

Fig.3 Clustering of SRAP markers for 59 kiwifruit varieties(lines) based on genetic distance

明这些引物组合与中华猕猴桃红色性状的连锁。

2.3 基于 SCoT 分子标记的遗传多样性分析

对部分模板进行 PCR 扩增,从 57 条 SCoT 引物最终筛选出 16 条特异性丰富、多态性比率高的引物

(图4)。16 条引物共计扩增出 143 个条带,其中多态性条带 143 个,多态性比率为 100%,平均每条引物扩增出 8.94 条多态性片段(表 4)。引物 SP19、SP29 扩增的位点数最多为 12 个,最少是引物 SC23 为 5 个。各 SCoT 引物平均有效等位数(N_e)为 1.545,

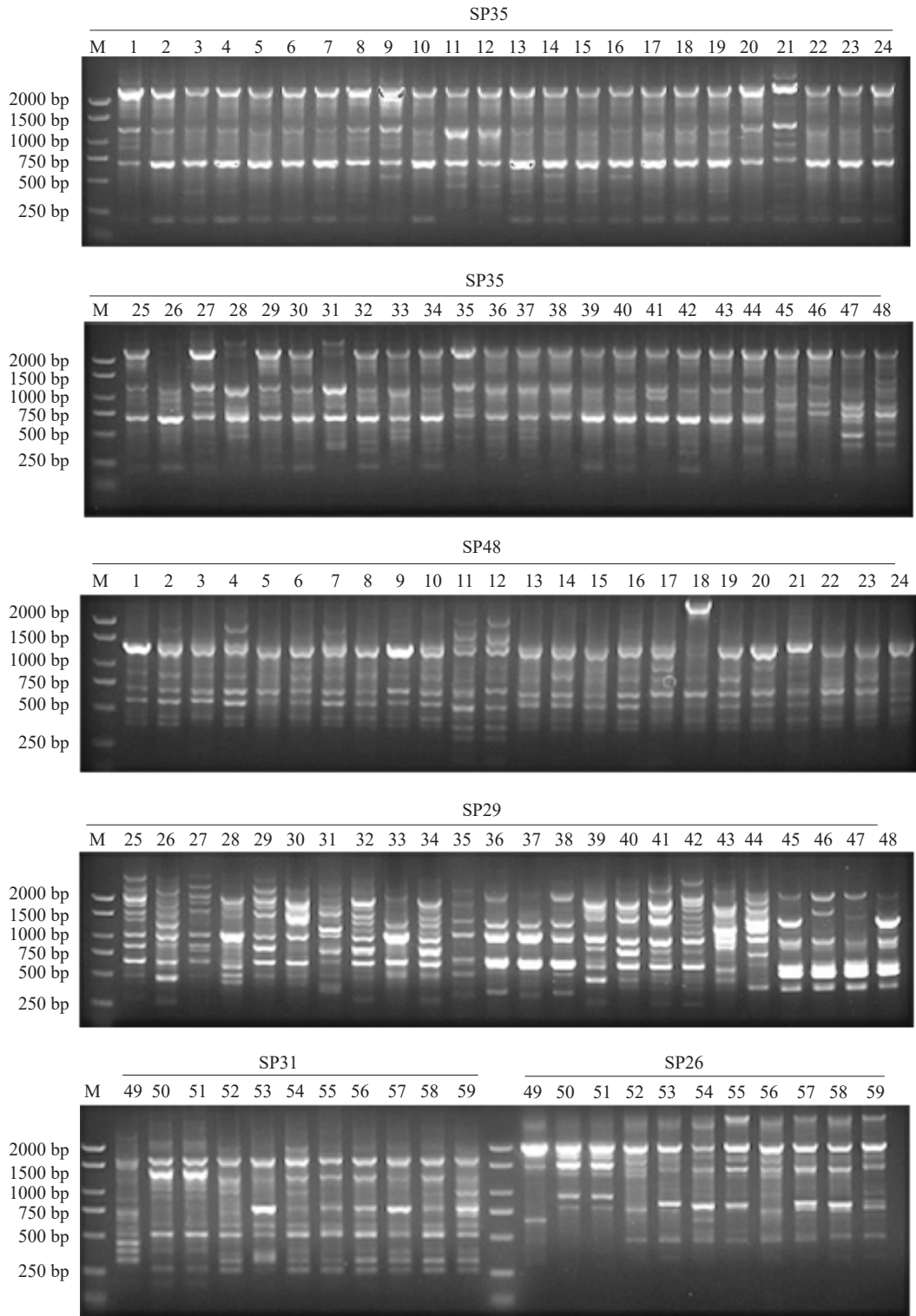


图 4 部分 SCoT 引物在 59 份材料中的扩增图谱

Fig. 4 Amplification of some of the SCoT primers in 59 materials

表4 16个SCoT引物及多态性分析

Table 4 The Polymorphism analysis of 16 pairs of SCoT primers used for this study

引物 Primers	条带数 No.of total band	多态性条带数 No.of polymorphic band	多态性比率 Polymorphic rate/%	有效等位基因数 Effective allele number, N_e	Nei's基因多样性 Nei's gene diversity, H	表型Shannon's信息指数 Shannon information index, I
SC23	5	5	100.00	1.442	0.276	0.436
SC26	7	7	100.00	1.577	0.352	0.532
SC55	9	9	100.00	1.549	0.334	0.507
SP2	7	7	100.00	1.590	0.356	0.536
SP11	11	11	100.00	1.492	0.311	0.482
SP19	12	12	100.00	1.641	0.354	0.520
SP20	11	11	100.00	1.474	0.279	0.426
SP29	12	12	100.00	1.589	0.331	0.492
SP30	7	7	100.00	1.703	0.392	0.569
SP31	10	10	100.00	1.677	0.379	0.555
SP34	8	8	100.00	1.442	0.284	0.448
SP35	7	7	100.00	1.523	0.306	0.461
SP38	10	10	100.00	1.519	0.313	0.479
SP42	7	7	100.00	1.578	0.346	0.524
SP48	9	9	100.00	1.418	0.270	0.426
SP49	11	11	100.00	1.503	0.298	0.455
总计 Total	143	143				
平均 Mean	8.94	8.94	100.00	1.545	0.324	0.491

Nei's 基因多样性指数(H)的变化范围为0.276~0.379,平均值为0.324, H 值最高和最低分别为引物SP31(0.379)和引物SC23(0.276);各引物表型Shannon's 指数(I)值在0.426~0.569之间,平均值为0.491,呈中等水平的遗传多样性, I 值最高的为引物SP30(0.569), I 值最低的引物为SP20(0.426)。从扩增结果来看,SCoT引物的扩增产物片段大小主要集中在250~2500 bp,表明59份猕猴桃材料遗传信息丰富。不同引物在同一品种中产生的位点信息存在差异,也显示供试的猕猴桃种质资源在基因组DNA水平上具有明显的差异。

2.4 基于SCoT分子标记的聚类分析

59份猕猴桃材料的遗传相似系数(SM)在0.441~0.930,平均值为0.640,变幅为0.489,遗传相似系数较大的是红阳与'H-16'(0.930), 'H-16'与东红(0.720),最小的是变异材料('H-16')与长江1号(SM=0.441)。表明供试的猕猴桃种质间遗传差异较大,存在较丰富的遗传多样性,猕猴桃种内遗传相似性要高于种间遗传相似性。

当遗传相似系数为0.636时,59份材料被分为八大类(图5),其中G1类群中来自5份中华红肉猕猴桃,且1号(红阳)和2号('H-16')聚在一起,进而

从SCoT标记表明'H-16'遗传背景和红阳高度相似,亲缘关系近,金红1号则单独聚为一类。G3类群由4份猕猴桃种质组成,其中长叶显示与金桃有更近的亲缘关系,G4类群由13份材料组成,主要是8份中华猕猴桃、3份美味猕猴桃和2份毛花猕猴桃。G5、G6和G7类群共17份猕猴桃种质,其中7份软枣猕猴桃全部被分在G5类群,G7类群包括48号、49号、50号、51号品种,都来自于对粤猕猴桃。在G8类中,除一份52号品种归在该类群(毛花猕猴桃),其余为11份中华猕猴桃和7份美味猕猴桃。SCoT标记结果表明猕猴桃品种间遗传多样性较高,也显示中华猕猴桃与美味猕猴桃种间关系近,亲缘关系近。结合图3可知,从两个标记说明'H-16'与红阳的遗传背景几乎完全一致,也表明'H-16'可能是由遗传物质的改变引起。

2.5 变异材料鉴定

以上基于SRAP和SCoT分子标记的遗传关系分析均表明红阳及'H-16'的遗传相似系数较大,因此推测'H-16'为红阳变异材料。为了探明二者的遗传差异,分别从57条SCoT引物和169对SRAP引物中筛选特异性引物。结果表明SCoT标记中的SP49和SC68引物在两份试材间扩增出差异常条带

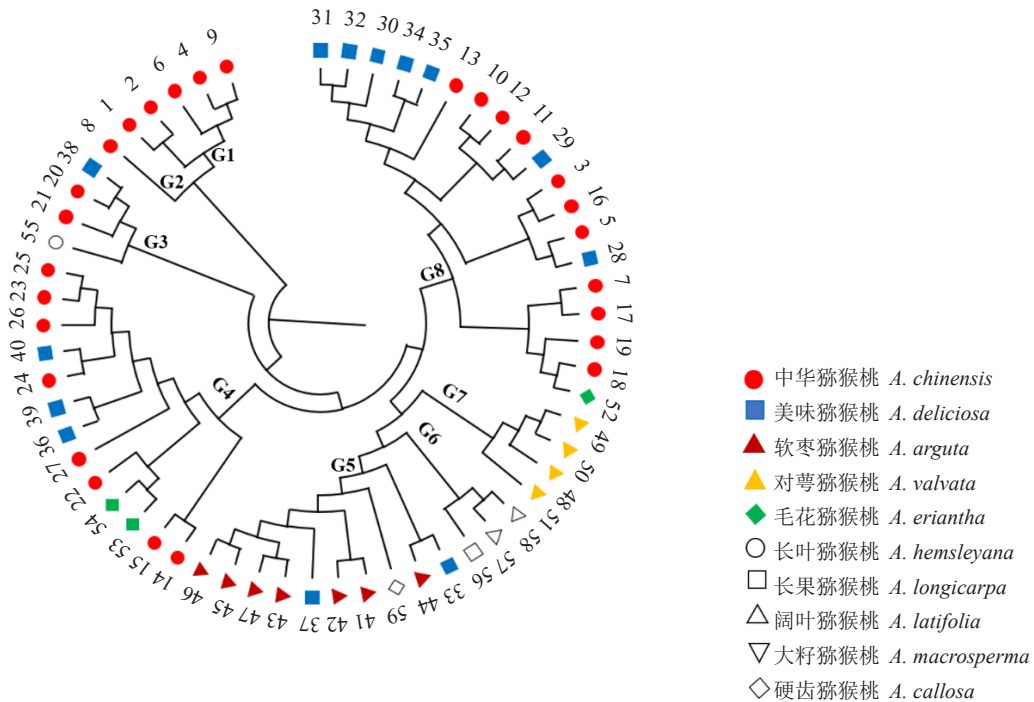
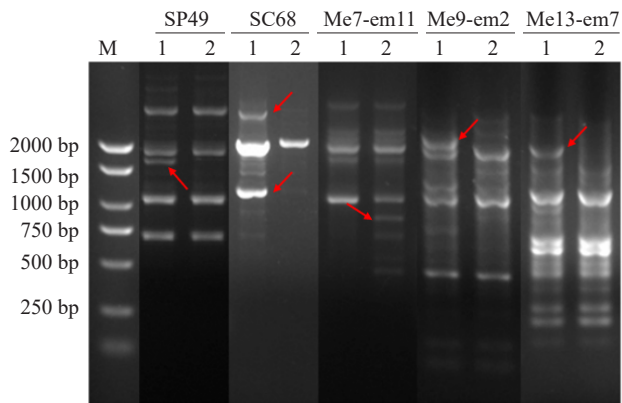


图 5 基于遗传距离的 59 个猕猴桃品种(品系)的 SCoT 标记聚类分析

Fig. 5 Clustering of SCoT markers for 59 kiwifruit varieties (lines) based on genetic distance

(图6), 差异比率为3.45%; SRAP 标记中 Me7-em11、Me9-em2 和 Me13-em7 引物组合扩增出特异性差异条带(图6), 差异比率为2.36%, 表明‘H-16’材料与红阳之间存在遗传物质的差异, 结合聚类结果, 从 DNA 水平上证明‘H-16’为红阳的变异植株。



M. Marker; 1. 红阳; 2. ‘H-16’.
M. Marker; 1. Hongyang; 2. ‘H-16’.

图 6 SCoT 和 SRAP 引物差异条带扩增图谱

Fig. 6 Differential band amplification profiles of SCoT and SRAP primers

3 讨 论

3.1 猕猴桃遗传多样性及聚类分析

进行猕猴桃种质资源的遗传多样性评价并聚类分析, 可对培育具有优良性状的杂交后代提供亲本材料, 也为育种过程中保护特异优良猕猴桃种质提供参考价值^[20]。多态性比率、有效等位基因数(N_e)、和表型 Shannon’s 信息指数 I 是衡量一个物种遗传多样性水平的重要指标。在本研究中, 通过 12 对 SRAP 引物及 16 条 SCoT 引物对 59 个猕猴桃品种进行遗传多样性评价, 分别扩增出 126 个和 143 个条带, 平均多态性比率分别为 99.07% 和 100%, 其中 SRAP 标记平均多态性略低于井赵斌等^[7]所获得的 100% 的多态性比率, 但高于前人利用 ISSR、RAPD 等标记在猕猴桃多态性分析的结果^[21-22]。显示 SRAP 标记能有效区分 59 份猕猴桃品种(系)之间的差异。而本研究中 SCoT 标记多态性百分比均高于前人报道用此标记及其它标记在猕猴桃相关研究^[15,23], 猕猴桃种群平均等位基因数 (SRAP, $N_e=1.572$; SCoT, $N_e=1.545$) 和表型指数 (SRAP/SCoT, $I=0.501/0.491$) 高于前人在猕猴桃上 (SRAP, $N_e=1.4006$, $I=0.3879$; SCoT, $I=0.3778$) 的结果^[24,16], 这可能与本研究所收集种质样本数量多、分布广有关, 也侧面说明 59 份猕猴桃种质遗传多样性丰富。基于两种标记的遗传相似系数分别为 0.437~0.952 和 0.441~

0.930,也更直观反映59份猕猴桃遗传信息位点丰富,品种之间差异较大。

由聚类分析结果可以看出,全部供试的美味猕猴桃都未被两个标记归为一类,而是与部分中华猕猴桃品种相互交叉聚类,这也进一步证实美味猕猴桃是中华猕猴桃的一个变种,两者存在着极高的遗传相似性^[25]。在SCoT标记中,中华猕猴桃、软枣猕猴桃与美味猕猴桃也表现出更高的亲缘关系,美味猕猴桃作为中华猕猴桃的一个变种,这三者可能有共同的祖先,也与基于cpDNA序列的系统发育分析结论基本一致^[26]。同时,59份猕猴桃材料被两种标记分别划分为4组和8组,相比于SRAP标记,SCoT标记相比于其他标记可以提供更多的遗传变异信息,能更有效区别猕猴桃种间关系,可以作为一种猕猴桃遗传多样性分析中更加有效的标记,表明SCoT标记更具优越性。陈延惠等^[27]利用RAPD标记将金魁、米良1号、徐香划为2组,本研究中的SRAP标记将米良1号与金魁聚为一类,而徐香未被分为同一组,但在SCoT标记中徐香又与米良1号划为G8组,两标记技术与其他标记技术结果具有一定的一致性。井赵斌等^[7]通过SRAP标记将美味猕猴桃品种翠香、徐香和海沃德归为一组,而本研究中SRAP标记未将翠香聚为同一类,但与SCoT标记结果相一致,也进一步验证了SCoT标记所反映的聚类结果。两种标记都将中华猕猴桃红肉品种聚在一起,其中‘H-16’变异材料与红阳单独聚为一类,进而验证变异鉴定结果。此外,从品种来源分析,供试的软枣猕猴桃中,红宝石星和仲夏红均为来源于中国农业科学院郑州果树研究所猕猴桃资源圃中,属于全红型软枣猕猴桃,都被两个标记聚在一起,能在一定程度上表明亲缘关系和地理位置分布有关系^[9]。笔者还发现在SRAP标记中,12对引物组合能更有效地聚类红色性状的中华猕猴桃品种,这些引物组合可作为红色性状的特有序列标记;SCoT标记相比于SRAP标记简单便捷,节省时间,为批量分析猕猴桃种质多样性提供了更加高效的方法。据此,两种分子标记技术都对猕猴桃种质资源遗传多样性分析、亲缘关系研究以及新品种的选育提供了很大的帮助。

3.2 SRAP和SCoT标记变异鉴定

果树变异是育种的基础,是创造新品种和良种繁育的重要手段,目前已有众多关于果树变异鉴定

报道。对于变异鉴定方法先后有形态学标记、孢粉学标记、细胞学标记、同工酶标记和分子标记,其中分子标记是目前使用最广泛的鉴定手段,最大的优点是能够准确且直接展现基因组DNA的差异,因而具有更高的准确性和稳定性^[28]。分子标记已应用于多种果树的变异鉴定,如桃^[29]、苹果^[30]、梨^[31]等芽变鉴定,橘^[32]、梨^[33]红色变异鉴定等。在猕猴桃上,宁允叶等^[34]利用RAPD分析红阳猕猴桃全红芽变系,稳定获得了‘86-3’与原品种间基因组差异,贾兵^[35]通过SCAR标记从18条引物中成功鉴定皖翠为海沃德自然芽变种。这为分子标记应用于猕猴桃变异鉴定提供了可信的依据,且与其他标记方法相比,SRAP和SCoT标记是近年来新开发的分子标记,对于猕猴桃变异材料的鉴定研究甚少。而本研究中,与红阳相比,疑似变异植株(编号‘H-16’)的主要差异是中果皮呈红色,整个果肉全呈红色(图1),因此必须从分子水平鉴定其是真正的突变体后方可开发猕猴桃新品种。本研究利用SRAP和SCoT标记鉴定‘H-16’自然变异材料的遗传背景,以此揭示全红性状差异的来源,在169对SRAP引物组合及57条SCoT引物中分别有3对SRAP、2条SCoT引物扩增出差异常条带,且与聚类结果一致,表明两种标记均能在一定程度上对猕猴桃变异材料进行早期变异鉴定,这也与陈伯伦等^[15]基于SCoT标记验证结果一致,而目前尚未报道SRAP标记对于猕猴桃变异材料的鉴定,因此本研究可为后续SRAP标记鉴定变异材料的遗传背景提供参考。此外由扩增图谱显示‘H-16’与红阳在基因组上的差异,说明‘H-16’的全红性状突变与遗传物质的改变有关,该材料与红阳遗传背景高度相似,为红阳自然变异株,鉴定结果为后续分子辅助育种及色泽变异机制研究等提供新的参考。后期也将结合田间试验调查及其表型数据进一步开展验证工作,为变异株的开发利用、新品种选育提供理论依据。同时,结果表明两种标记都可用于猕猴桃变异材料的鉴定,且SCoT的标记效率要高于SRAP标记,因此SCoT标记可作为猕猴桃变异材料鉴定的首选。

4 结 论

SRAP标记和SCoT标记分别将59份猕猴桃种质资源划分成4大聚类和8大聚类,聚类结果显示59份猕猴桃遗传多样性高;中华系猕猴桃和美味系

猕猴桃种间关系较近,进一步证实美味猕猴桃是中华猕猴桃的一个变种;筛选出12对SRAP引物组合可用于后续筛选中华系红色性状有关的候选基因;两种标记都成功鉴定‘H-16’为红阳的色泽变异品种(系),但无论是种质资源评价和遗传变异鉴定,SCoT标记相比于SRAP标记都更加高效简便。

参考文献 References:

- [1] 孙雷明,方金豹.我国猕猴桃种质资源的保存与研究利用[J].植物遗传资源学报,2020,21(6):1483-1493.
SUN Leiming, FANG Jinbao. Conservation, research and utilization of kiwifruit germplasm resources in China[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2020, 21(6): 1483-1493.
- [2] 黄宏文.猕猴桃属:分类资源驯化栽培[M].北京:科学出版社,2013:245-247.
HUANG Hongwen. *Actinidia*: Classified resources domesticated cultivation[M]. Beijing: Science Press, 2013: 245-247.
- [3] WINTER P, KAHL G. Molecular marker technologies for plant improvement[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1995, 11(4): 438-448.
- [4] 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): 455-461.
- [5] COLLARD B C, 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.
- [6] XIONG F Q, ZHONG R C, HAN Z Q, JIANG J, HE L Q, ZHUANG W J, TANG R H. Start codon targeted polymorphism for evaluation of functional genetic variation and relationships in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes[J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(5): 3487-3494.
- [7] 井赵斌,徐明,雷玉山.猕猴桃SRAP-PCR体系的建立及品种资源亲缘关系研究[J].园艺学报,2016,43(2):337-346.
JING Zhaobin, XU Ming, LEI Yushan. Construction and application of SRAP-PCR system to analyze genetic relationship of *Actinidia*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2016, 43(2): 337-346.
- [8] CHO K H, KWACK Y B, PARK S J, KIM S H, LEE H C, KIM M Y. Genetic diversity in kiwifruit germplasm evaluated using RAPD and SRAP markers[J]. Journal of Plant Biotechnology, 2017, 44(3): 303-311.
- [9] SATYA P, KARAN M, JANA S, MITRA S, SHARMA A, KARMAKAR P, RAY D. Start codon targeted (SCoT) polymorphism reveals genetic diversity in wild and domesticated populations of ramie [*Boehmeria nivea* (L.) Gaudich.], a premium textile fiber producing species[J]. Meta Gene, 2015, 3: 62-70.
- [10] AHMED D A, TAHIR N A, SALIH S H, TALEBI R. Enome diversity and population structure analysis of Iranian landrace and improved barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes using arbitrary functional gene-based molecular markers[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2021, 68(3): 1045-1060.
- [11] LUO C, HE X H, CHEN H, OU S J, GAO M P. Analysis of diversity and relationships among mango cultivars using Start Codon Targeted (SCoT) markers[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2010, 38(6): 1176-1184.
- [12] 潘介春,龙蕾宇,丁峰,徐石兰,黄幸,黄思婕,杨亚涵,李峰,张树伟.台湾早熟蜜桃优良芽变新种质‘五月红’的鉴定[J].广西植物,2019,39(10):1334-1341.
PAN Jiechun, LONG Qiangyu, DING Feng, XU Shilan, HUANG Xing, HUANG Sijie, YANG Yahan, LI Feng, ZHANG Shuwei. Identification of a new bud sport germplasm ‘May Red’ from Taiwan precocious peach[J]. Guihaia, 2019, 39(10): 1334-1341.
- [13] 岳庆春,章辰飞,汪庆昊,王文静,王锦阳,吴月燕.基于SCoT分析‘醉金香’葡萄及其突变体遗传多样性[J].分子植物育种,2020,18(13):4417-4426.
YUE Qingchun, ZHANG Chenfei, WANG Qinghao, WANG Wenjing, WANG Jinyang, WU Yueyan. Analysis of genetic diversity of ‘Zui Jinxiang’ grape and Its mutants by SCoT markers[J]. Molecular Plant Breeding, 2020, 18(13): 4417-4426.
- [14] 井赵斌,俞靓,魏琳,程积民.本氏针茅SRAP-PCR反应体系的建立及引物筛选[J].草业科学,2012,29(2):219-228.
JING Zhaobin, YU Liang, WEI Lin, CHENG Jimin. Establishment of the SRAP-PCR reaction system and selection of the primers in *Stipa bungeana*[J]. Pratacultural Science, 2012, 29(2): 219-228.
- [15] 陈伯伦,张晋,黄继魁,黄诚梅,周秋娟,陶伟,唐娟. SCoT分子标记在猕猴桃遗传多样性分析与变异鉴定上的应用[J].农业生物技术学报,2018,26(1):77-86.
CHEN Bolun, ZHANG Jin, HUANG Jikui, HUANG Chengmei, ZHOU Qiujuan, TAO Wei, TANG Juan. Application of SCoT markers on genetic diversity analysis and variation identification of *Actinidia*[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2018, 26(1): 77-86.
- [16] 张安世,张中海,齐秀娟,刘莹,骆扬.猕猴桃SCoT遗传多样性分析及指纹图谱的构建[J].植物研究,2017,37(2):259-265.
ZHANG Anshi, ZHANG Zhonghai, QI Xiujian, LIU Ying, LUO Yang. Genetic diversity and fingerprints with SCoT markers in *Actinidia*[J]. Bulletin of Botanical Research, 2017, 37(2): 259-265.
- [17] 周遇巧,郭国业,周索,杜戈,李书林.基于SCoT标记的猕猴桃种质资源遗传多样性研究[J].河南农业科学,2020,49(6), 120-126.
ZHOU Yuqiao, GUO Guoye, ZHOU Suo, DU Ge, LI Shulin. Study on genetic diversity of *Actinidia* germplasm resources based on SCoT markers[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2020, 49(6): 120-126.
- [18] 张好艳,俞明亮,马瑞娟,蔡志翔,沈志军,许建兰.与桃树性高/矮性状相关的SRAP标记[J].果树学报,2011,28(4):586-590.

- ZHANG Yuyan, YU Mingliang, MA Ruijuan, CAI Zhixiang, SHEN Zhijun, XU Jianlan. Identification of SRAP markers linked to peach gene with the character of tall normal/brachytic dwarf[J]. Journal of Fruit Science, 2011, 28(4): 586-590.
- [19] 陈虎,何新华,罗聪,朱建华,李峰. 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.
- CHEN Hu, HE Xinhua, LUO Cong, ZHU Jianhua, LI Feng. Analysis on the genetic diversity of 24 longan (*Dimocarpus longan*) accessions by SCoT markers[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2010, 37(10): 1651-1654.
- [20] RAJAPAKSE S. Progress in application of molecular markers to genetic improvement of horticultural crops[J]. Acta Horticulturae, 2003, 625: 29-36.
- [21] 张慧,张世鑫,吴绍华,田维敏,彭小列,刘世彪. 猕猴桃属 33 份种质资源的 AFLP 遗传多样性分析[J]. 生物学杂志, 2018, 35(2): 29-33.
- ZHANG Hui, ZHANG Shixin, WU Shaohua, TIAN Weimin, PENG Xiaolie, LIU Shibiao. Genetic diversity of 33 kiwifruit germplasms based on AFLP markers[J]. Journal of Biology, 2018, 35(2): 29-33.
- [22] 邹游,黄敏,侯若彤,吴成,杨志荣. ISSR 标记技术在猕猴桃遗传研究中的运用[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2008, 33(1): 111-115.
- ZOU You, HUANG Min, HOU Ruotong, WU Cheng, YANG Zhirong. Analysis on inter-simple sequence repeats in 14 *Actinidia* varieties[J]. Journal of Southwest China Normal University (Natural Science Edition), 2008, 33(1): 111-115.
- [23] 汤佳乐,黄春辉,吴寒,郎彬彬,曲雪艳,徐小彪. 野生毛花猕猴桃果实表型性状及 SSR 遗传多样性分析[J]. 园艺学报, 2014, 41(6): 1198-1206.
- TANG Jiale, HUANG Chunhui, WU Han, LANG Binbin, QU Xueyan, XU Xiaobiao. Genetic diversity of wild *Actinidia eriantha* germplasm based on fruit traits and SSR markers[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2014, 41(6): 1198-1206.
- [24] 张安世,司清亮,齐秀娟,张中海. 猕猴桃种质资源的 SRAP 遗传多样性分析及指纹图谱构建[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(1): 138-144.
- ZHANG Anshi, SI Qingliang, QI Xiujian, ZHANG Zhonghai. Genetic diversity and fingerprints of *Actinidia* germplasm resource based on SRAP markers[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2018, 34(1): 138-144.
- [25] FERGUSON A R. The need for characterisation and evaluation of germplasm: kiwifruit as an example[J]. Euphytica, 2007, 154: 371-382.
- [26] 高雨杨,夏惠,谢玥,沈妍秋,王秀,梁东. 基于 cpDNA 序列的猕猴桃种质资源多态性分析[J]. 分子植物育种, 2017, 15(9): 3751-3758.
- GAO Liyang, XIA Hui, XIE Yue, SHEN Yanqiu, WANG Xiu, LIANG Dong. Molecular polymorphic analyses for the germplasms of *Actinidia* based on cpDNA[J]. Molecular Plant Breeding, 2017, 15(9): 3751-3758.
- [27] 陈延惠,李洪涛,朱道圩,胡青霞,萧蓉萍,薛淑丽,李静. RAPD 分子标记在猕猴桃种质资源鉴定上的应用[J]. 河南农业大学学报, 2003, 37(4): 360-364.
- CHEN Yanhui, LI Hongtao, ZHU Daoyu, HU Qingxia, XIAO Rongping, XUE Shuli, LI Jing. Application of RAPD molecular marker on identification of germplasm resources in *Actinidia*[J]. Journal of Henan Agricultural University, 2003, 37(4): 360-364.
- [28] 赵中秋,郑海雷,张春光. 分子标记的发展及其在植物研究中的应用[J]. 生命科学研究, 2000, 4(2): 68-74.
- ZHAO Zhongqiu, ZHENG Hailei, ZHANG Chunguang. Development of molecular markers and their application in botany research[J]. Life Science Research, 2000, 4(2): 68-74.
- [29] 孙淑霞,陈栋,李靖,涂美艳,谢红江,江国良. 北京 28 号桃芽变株系的 ISSR 和 SSR 鉴定[J]. 果树学报, 2012, 29(1): 24-28.
- SUN Shuxia, CHEN Dong, LI Jing, TU Meiyang, XIE Hongjiang, JIANG Guoliang. Molecular identification of peach bud sports from Beijing 28 with ISSR and SSR[J]. Journal of Fruit Science, 2012, 29(1): 24-28.
- [30] GOULAO L, OLIVEIRA C M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus × domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers[J]. Euphytica, 2001, 122(1): 81-89.
- [31] 张小军,徐凌飞,吴中营. 梨极早熟芽变品种‘六月酥’的 AFLP 分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2009, 37(12): 139-145.
- ZHANG Xiaojun, XU Lingfei, WU Zhongying. AFLP analysis of extra early mutant cultivar of pear ‘Liuyesu’ [J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2009, 37(12): 139-145.
- [32] 苑平,吴娟娟,卜范文,孔佑涵. 克里曼丁红橘果皮色泽变异差异片段的克隆[J]. 分子植物育种, 2020, 18(24): 8003-8008.
- YUAN Ping, WU Juanjuan, BU Fanwen, KONG Youhan. Cloning of the differential fragments related to the peel color variation of Clementine mandarin[J]. Molecular Plant Breeding, 2020, 18(24): 8003-8008.
- [33] 赵广,乐文全,路娟,张绍铃,李俊才,吴俊. 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 Guang, LE Wenquan, LU Juan, ZHANG Shaoling, LI Juncai, WU Jun. Identification of skin colour variant cultivars (strains) in pear by AFLP and SRAP markers[J]. Journal of Fruit Science, 2011, 28(4): 568-574.
- [34] 宁允叶,熊庆娥,曾伟光,曾光荣. 红阳猕猴桃全红芽变系的 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 2003, 30(5): 511-513.
- NING Yunye, XIONG Qing'e, ZENG Weiguang, ZENG Guangrong. Studies on red flesh sport from ‘Red Sun’ kiwifruit using RAPD marker[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2003, 30(5): 511-513.
- [35] 贾兵,朱立武,余兴,叶振风. 猕猴桃品种‘皖翠’芽变位点的 SCAR 标记研究[J]. 安徽农业大学学报, 2007, 34(2): 251-255.
- JIA Bing, ZHU Liwu, YU Xing, YE Zhenfeng. Study on ‘Wan-cui’ sport site by SCAR marker in *Actinidia*[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2007, 34(2): 251-255.