

基于 EST-SSR 标记与果实品质性状的贵州野生刺梨核心种质构建

鲁 敏¹, 鄢秀芹¹, 白 静¹, 张怀山¹, 王道平², 安华明^{1,*}

(¹ 贵州大学农学院/贵州省果树工程技术研究中心, 贵阳 550025; ² 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550002)

摘 要: 采用 10 对 EST-SSR 引物和 9 个果实品质性状指标对收集的 220 份野生刺梨 (*Rosa roxburghii* Tratt) 资源的遗传多样性进行分析, 结果表明: 10 对 EST-SSR 引物共扩增出多态性条带 27 条, 多态百分率为 76.67%; 9 个品质性状中平均单果质量、可滴定酸、固酸比、维生素 C 和类黄酮含量的变异系数达到 20% 以上; 说明该 220 份贵州野生刺梨种质资源遗传变异丰富, 遗传多样性分布范围较广, 适于进行核心种质的构建研究。进一步将 9 个品质性状指标进行 6 级分类, 并处理为 9 个品质标记共产生 54 条多态带, 与 EST-SSR 标记一起, 采用 Nei's 遗传距离进行 UPGMA 聚类, 同时采用位点优先取样策略进行核心种质构建, 以表型保留比例、均值差异百分率、方差差异百分率、极差符合率、变异系数变化率、多态性位点百分率、Nei's 基因多样性指数、Shannon's 信息指数等对核心种质进行评价, 并利用主坐标分析法对核心种质进行确认。结果表明: 构建的 32 份核心种质在分子水平, 表型水平及地区分布上都能够代表原种质的遗传多样性。

关键词: 刺梨; EST-SSR; 果实品质; 遗传多样性; 核心种质

中图分类号: S 661.9

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2017) 08-1486-10

Construction of Core Collection in Wild *Rosa roxburghii* from Guizhou Province Using EST-SSR Markers and Fruits Quality Traits

LU Min¹, YAN Xiuqin¹, BAI Jing¹, ZHANG Huaishan¹, WANG Daoping², and AN Huaming^{1,*}

(¹ College of Agriculture, Guizhou University/Guizhou Engineering Research Center for Fruit Crops, Guiyang 550025;

² The Key Laboratory of Chemistry for Natural Product of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China)

Abstract: Genetic diversity of 220 wild *Rosa roxburghii* accessions was investigated using 10 EST-SSRs and quality traits. A total of 33 alleles were amplified by 10 pairs of EST-SSR primers, in which polymorphic alleles was 27. The polymorphic percentage was 76.67%. The coefficients of variation of 9 quality traits were all greater than 10%, in which the average fruit weight, titratable acid, total soluble solid/titratable acid, vitamin C and flavonoids content were above 20%. The 220 wild *R. roxburghii* germplasm resources in Guizhou were rich in genetic diversity in a wide range, suitable for the construction

收稿日期: 2017-01-09; **修回日期:** 2017-08-02

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31660558); 贵州省高层次创新型人才培养计划项目 (黔科合人才 20164016); 贵州省科技计划项目 (黔科合 SY 字 20153026-1)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: anhuaming@hotmail.com)

of the core collection. Nine quality traits were each further classified into 6 grades, treated as that 54 polymorphic alleles, were produced by 9 quality markers, together with EST-SSR markers, were performed for UPGMA clustering using Nei's genetic distance. At the same time, the core collection was constructed by using the allele preferred sampling strategy. The ratio of phenotype retained, mean difference percentage, variance difference percentage, coincidence rate of range, changeable rate of coefficient of variation, percentage of polymorphic loci, Nei's gene diversity index and Shannon's information index were used to evaluate core collection. Principal coordinate analysis method was used to confirm core collection. Results showed that the 32 core collections can represent the genetic diversity of the original germplasm at the molecular level, the phenotypic level and the regional distribution.

Keywords: *Rosa roxburghii*; EST-SSR; fruit quality; genetic diversity; core collection

中国是刺梨 (*Rosa roxburghii* Tratt.) 的原产地, 在贵州、四川、重庆、湖南、广西、湖北、陕西等省(市、自治区)均有野生分布, 以西南地区分布最为集中, 尤其是贵州省的资源最为丰富(樊卫国 等, 1997)。刺梨果实含有丰富的营养物质和药用保健成分, 特别是其极高的维生素 C 含量(安华明 等, 2011) 已引起广泛关注, 并已成为贵州省重点发展的果树产业。目前中国审定的刺梨栽培品种已有 4 个, 但它们在农艺性状和果实品质等方面的差异并不明显, 因此真正广泛用于生产栽培的实际上只有一个, 即‘贵农 5 号’(樊卫国 等, 2011)。这种单一品种的大量推广繁殖, 容易错误地估计刺梨种质资源的个体数量和群体规模, 从而忽略野生种质资源大量丢失的现状。因此, 刺梨资源收集、评价、保护等方面的工作势在必行, 在遗传多样性研究的基础上筛选和构建核心种质更是突破品种选育工作的重要依据和必要条件。

所谓核心种质 (core collection), 即以最小的资源份数和遗传重复, 最大程度地代表遗传多样性 (Frankel, 1984; Brown, 1989)。结合表型性状多样性与 DNA 分子标记多样性, 较为全面地从宏观到微观, 互相印证, 互为补充地评价遗传多样性, 进而构建更具遗传代表性的核心种质是近年来的研究趋势和热点 (Belaj et al, 2012; 卜海东 等, 2012; 郭大龙 等, 2012; 刘遵春 等, 2012; 汤佳乐 等, 2014), 但在刺梨上尚未开展过类似的研究。

简单序列重复 (simple sequence repeat, SSR) 是一类由 1 ~ 6 个碱基组成的基元串联重复而成的 DNA 序列 (Tautz, 1989)。EST-SSR 标记不仅具有传统 SSR 标记多态性高、共显性与重复性好等特点; 并且 EST-SSR 来源于表达的基因组区域, 还可直接反映相关基因的多样性 (Powell et al., 1996)。本研究选取 220 份贵州野生刺梨为研究对象, 采用本课题组前期开发的 EST-SSR 标记 (Yan et al., 2015), 并结合果实品质性状进行遗传多样性分析, 在此基础上构建核心种质, 不仅可了解刺梨种内的遗传背景, 更为选择优良育种亲本材料和进一步提高育种效率奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 2013—2015 年的 8、9 月进行。选取 12 个贵州野生刺梨分布广泛的代表性采样点 (表 1), 根据现有分布规模以株为单位随机取样, 样本间距离大于 50 m, 共 220 株。每个采样株均用 GPS 定位, 并详细记录经度、纬度、海拔。每株采取幼嫩叶片和成熟度 (果皮浅黄色至黄色阶段) 及大小一致的有代表性的果实, 以株为单位装入做好标记的自封袋中, 放在冰盒内, 及时带回实验室,

一部分果实样品用于测定外观指标及可溶性固形物含量，另一部分果实及叶片经液氮处理后于 - 70℃超低温冰箱中冷冻保存，备用。

表 1 220 份贵州野生刺梨采样点概况
Table 1 Description of 220 wild *Rosa roxburghii* in Guizhou Province

样品编号 Sampling code	样品来源地 Sampling locality	海拔/m Altitude	纬度 Latitude (N)	经度 Longitude (E)
AL-1 ~ AL-17	安龙县 Anlong County	1 258 ~ 1 334	25°11.480' ~ 25°14.121'	105°23.628' ~ 105°19.107'
FQ-1 ~ FQ-12	福泉市 Fuquan City	957 ~ 1 000	26°48.027' ~ 26°48.793'	107°34.976' ~ 107°36.185'
HX-1 ~ HX-34	花溪区 Huaxi district	1 000 ~ 1 500	26°17.367' ~ 26°41.885'	106°42.898' ~ 106°67.528'
HS-1 ~ HS-11	惠水县 Huishui County	946 ~ 1 032	25°44.113' ~ 26°04.586'	106°34.770' ~ 106°37.349'
LD-1 ~ LD-7	罗甸县 Luodian County	836 ~ 934	25°37.137' ~ 25°43.969'	106°32.206' ~ 106°40.331'
PX-1 ~ PX-37	盘县 Pan County	1 445 ~ 1 870	25°10.433' ~ 25°54.893'	104°32.206' ~ 104°50.843'
PB-1 ~ PB-28	平坝县 Pingba County	1 200 ~ 1 400	26°21.655' ~ 26°26.141'	106°11.813' ~ 106°27.370'
QL-1 ~ QL-5	晴隆县 Qinglong County	1 526 ~ 1 564	25°83.199' ~ 25°83.478'	105°21.899' ~ 105°21.905'
SQ-1 ~ SQ-15	石阡县 Shiqian County	657 ~ 892	27°28.798' ~ 27°35.507'	108°01.646' ~ 108°12.087'
SY-1 ~ SY-12	绥阳县 Suiyang County	865 ~ 1 400	28°12.933' ~ 28°17.313'	106°58.755' ~ 107°04.763'
XY-1 ~ XY-27	兴义市 Xingyi City	1 528 ~ 1 920	24°54.607' ~ 25°57.106'	104°43.413' ~ 104°50.288'
ZY-1 ~ ZY-15	遵义市 Zunyi City	794 ~ 981	27°26.875' ~ 27°44.236'	106°54.649' ~ 107°12.441'

1.2 DNA 提取和 SSR-PCR

试验材料基因组 DNA 提取参照 Porebski 等（1997）的 CTAB 法。10 对 EST-SSR 引物由刺梨转录组测序数据开发(表 2; 鄢秀芹 等, 2015), 交由上海英骏生物技术公司合成。2 × *Taq* PCR MasterMix (KT201) 购自天根生化科技（北京）有限公司。PCR 反应体系为 20 μL，其中包括 2 × *Taq* PCR MasterMix 10 μL；10 μmol · L⁻¹ 的 Primer-F 及 Primer-R 各 0.5 μL；ddH₂O 8 μL；50 ng · μL⁻¹ 的 DNA 模板 1 μL。扩增程序为 94℃预变性 3 min；然后进行 35 个循环，每个循环包括 94℃变性 40 s，60℃退火 40 s（退火温度因不同引物而异，表 2），72℃延伸 1 min；最后 72℃延伸 10 min。

扩增产物利用 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶于北京六一仪器厂生产的 DYCZ-30C 型垂直电泳槽中电泳分离，120 V 电压下电泳 75 min。电泳后参照 Bassam 等（1991）的方法进行银染显色，BIO-RAD 凝胶成像系统拍照记录。

1.3 果实品质测定

参照本课题组白静等（2016）的方法，果实单果质量用电子天平（FA2204B）测得；横、纵径用游标卡尺（MY-051）测得；可溶性固形物含量用手持式折光仪（Atago Co., Ltd, Tokyo, Japan）测得；可滴定酸含量采用指示剂滴定法测定；维生素 C 含量采用高效液相色谱（HPLC）法测定。果形指数用纵径与横径的比值表示；固酸比用可溶性固形物含量与可滴定酸含量的比值表示。总黄酮含量参照杜薇和刘国文（2003）的方法测定。

1.4 取样策略

对 EST-SSR 扩增结果采用人工读带的方法，电泳图有带记为 1，无带记为 0。对果实品质指标采用 SPSS18.0 计算其平均值、标准差、变异系数（CV）、极差。CV = 标准差（σ）/ 均值（μ）；参照 Belaj 等（2012）的方法，对所有指标进行 6 级分类，1 级 < μ - 2σ，6 级 ≥ μ + 2σ，中间每级间差为 σ；并将 9 个品质指标与分子标记位点等同视之，6 个等级按 6 条带计，有带记为 1，无带记为 0，与 EST-SSR 扩增结果一起建立原始数据矩阵。

采用位点优先取样策略（张春雨 等, 2009），根据 Nei's 标准遗传距离，利用 NTSYS-pc2.10e 数据软件对 220 份刺梨种质进行多次聚类，以构建刺梨核心种质。位点优先取样策略：在最低分类水

平的两份种质中, 具有最多稀有等位基因数 (等位基因频率小于 5%) 的种质优先选择进入下一轮聚类, 如果两份种质具有相等数量的稀有等位基因, 那么两份种质中稀有等位基因的等位基因频率值最小的种质被优先选择, 如果这个值仍相同, 则对两份种质进行随机选择。

1.5 核心种质的评价与确认

参照张春雨等 (2009)、刘遵春等 (2012) 以及沈志军等 (2013) 的方法, 核心种质相对于原种质的果实品质遗传多样性以表型保留比例 (ratio of phenotype retained, RPR)、均值差异百分率 (mean difference percentage, MD)、方差差异百分率 (variance difference percentage, VD)、极差符合率 (coincidence rate of range, CR)、变异系数变化率 (changeable rate of coefficient of variation, VR) 来评价, 以上参数采用 Excel 2003 软件进行计算; EST-SSR 标记遗传多样性以观测等位基因数 (observed number of alleles, N_o)、有效等位基因数 (effective number of allele, N_e)、多态性位点比率 (percentage of polymorphic loci, P)、Nei's 基因多样性指数 (Nei's gene diversity, Nei's)、Shannon's 信息指数 (Shannon's information index, I)、观测杂合度 (observed heterozygosity, H_o) 和期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e) 来评价, 并对各参数进行 t 检验来评价核心种质的代表性, 以上参数采用 POPGENE 1.31 和 DPSv7.05 软件进行分析。同时利用主坐标分析法比较两者基于主坐标的样品分布图, 对构建的核心种质进行确认。

2 结果与分析

2.1 EST-SSR 多态性

如表 2 所示, 10 对 EST-SSR 引物在 220 个刺梨材料上共扩增出 33 个等位变异条带, 其中多态

表 2 用于本研究的多态性 EST-SSR 引物信息
Table 2 Polymorphic SSR primers used for the analyses of all 220 *Rosa roxburghii* samples

编号 Primer No.	引物序列 (5'→3') Primer sequences (5'→3')	重复单元 Repeat motif	退火温度/ ℃ Anneal temperature	预期产物/ bp Expected size	观测等位 基因数 Observed number of alleles	有效等位 基因数 Effective number of alleles	多态率/ % Percentage of polymorphism
04	F: TTGTGGTTATAGTTCAGCCCCTA R: CAATCACGGAAATCATACATTCA	CCT (3*5)	60	95	3	2	66.67
07	F: AATATACACGAACAACAACCATCG R: GGAACATGACCCCTTTTCTTATT	CTACA (5*4)	60	147	8	8	100.00
14	F: GTGGATGTGTCAAATCTAATGGC R: GGAGGGAAGAAGTAGTGAAGAACA	CT (2*6)	60	152	2	1	50.00
17	F: GATGCTTTTCATTCTGCTTCAAC R: ATTTTACCGTACTCTGGGTGCT	TC (2*6)	60	123	3	1	33.33
19	F: ATTTGTTTTTCGTTTTTCTTCCC R: TTGGTCATTCACTTCTCTCCTC	CAT (3*5)	60	128	2	1	50.00
24	F: GAGTCATGTTGAATGATATTGGC R: TTTCCTCTTTCTTCTTTTCCC	TGGA (4*13)	59	131	2	2	100.00
56	F: AGCAATAGAGAACTAGAATATCAGAGA R: TTTTCCCCCTTCAGTTGTAAGAT	GT (2*10)	58	116	3	2	66.67
58	F: TGAGAACCAAAAGAAACGACTACA R: GTCACAAATTCACGAGCCATATT	AT (2*8)	60	146	3	3	100.00
65	F: GAGAGAGTAGCCTTTGATGAGGA R: GAATGTCGTCAGGAGCAGTAG	CTC (3*7)	60	146	4	4	100.00
70	F: TGATTGGTAGTGAAGCGATATT R: ACACATCAGTCCTTCAACAGTCC	TCA (3*5)	60	108	3	3	100.00
平均 Average					3.3	2.7	76.67

带 27 条, 多态百分率为 76.67%, 说明贵州野生刺梨种质资源遗传多样性较为丰富, 该群体适于进行核心种质的构建研究。不同引物扩增的等位变异条带数差异较大, 从 2 个 (14、19、24) 到 8 个 (07) 不等; 多态性百分率以引物 17 最低, 仅为 33.33%, 而引物 07、24、58、65、70 的多态性百分率都达 100%。对于每个刺梨材料, 每对引物产生 1 ~ 2 个等位变异条带, 有的甚至产生 3 ~ 4 个等位变异条带。图 1 示引物 04 的部分扩增结果。

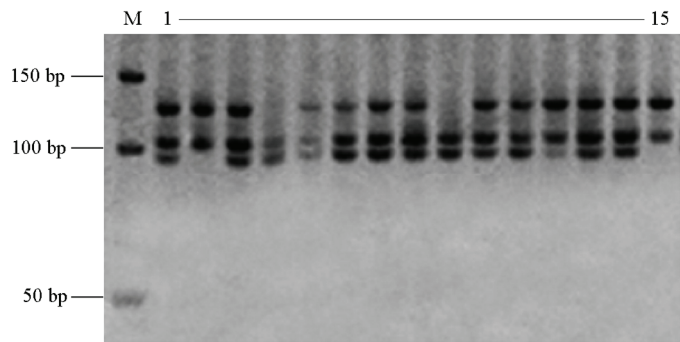


图 1 引物 04 对刺梨基因组 DNA 的扩增图谱 SQ-1 ~ SQ-15
M: DNA 标准分子量; 1 ~ 15 泳道为 SQ-1 ~ SQ-15 号样品。

Fig. 1 SSR amplification pattern of *R. roxburghii* genomic DNA by primer 04

M: DNA molecular weight marker; Lane 1 - 15 showed SSR amplification pattern of SQ-1 - SQ-15.

2.2 果实品质性状多样性

220 份贵州野生刺梨果实各性状的变异幅度和变异系数如表 3 所示。9 个品质性状变异系数均大于 10%, 其中平均单果质量、可滴定酸、固酸比、维生素 C 含量和类黄酮的变异程度较大, 变异系数达到 20%以上, 因此, 该群体遗传变异丰富, 遗传多样性分布范围较广, 适于进行核心种质的构建研究。

表 3 220 份贵州野生刺梨果实性状的遗传变异
Table 3 Genetic variation of 220 wild *Rosa roxburghii* in fruit traits in Guizhou Province

性状 Trait	变异幅度 Variation range	平均值 Mean	方差 Variance	极差 Range	变异系数/% CV
平均单果质量/g Average fruit weight	3.74 ~ 26.27	11.35	13.50	22.53	32.33
纵径/cm Vertical length	1.20 ~ 3.83	3.16	0.19	2.54	13.92
横径/cm Transverse length	1.86 ~ 4.40	2.13	0.16	2.63	19.25
果形指数 Shape index	0.38 ~ 1.00	0.67	0.01	0.62	16.32
可溶性固形物/% Soluble solids content	7.67 ~ 18.33	11.69	2.72	10.66	14.11
可滴定酸/% Titratable acid	0.32 ~ 1.32	0.73	0.04	1.00	27.40
固酸比 Total soluble solid/titratable acid	6.76 ~ 43.57	17.14	30.14	36.81	32.03
维生素 C 含量/(mg · g ⁻¹) Vitamin C	4.48 ~ 32.10	16.61	1 774.46	27.63	25.36
类黄酮/% Flavonoid	0.17 ~ 1.33	0.64	0.05	1.16	35.94

2.3 核心种质取样

EST-SSR 标记在 220 个刺梨样品中共扩增出 27 条多态性带, 而 9 个品质指标的 6 个等级应标记为 54 条带, 但由于固酸比这个指标只产生了 5 个等级, 品质指标共标记 53 条带, 因此总多态性

条带数为 80。如图 2 所示, 采用位点优先取样策略抽取核心样品数量, 当等位基因数递增到 76 个时, 尽管核心样品数量从 13 增加至 29, 但等位基因数量已不再增加, 此时等位基因保留率 95.00%; 当核心种质数增至 32 时, 等位基因数为 79 个, 等位基因保留率 98.75%; 初步拟选 13 或 32 作为核心样品的取样数量。

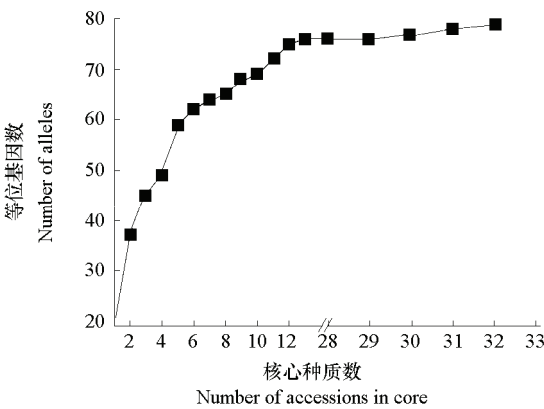


图 2 位点优先取样法抽取核心样品数量与等位基因数变化关系

Fig. 2 Relationships between the number of alleles and the sample size of thematic core simulated in allele preferred sampling method

2.4 核心种质评价与确认

如表 4 所示, 当选取核心种质数量为 13 时, 核心种质相对于原种质的极差符合率仅为 72.99%, 未能达到 80%, 不能够代表原种质遗传多样性 (Hu et al., 2000); 而当选取核心种质数量为 32 时, 核心种质相对于原种质的表型保留比例为 98.11%, 均值差异百分率为 0, 方差差异百分率 77.78%, 极差符合率为 84.89%, 变异系数变化率 123.60%, 能够代表原种质的遗传多样性, 因此核心种质的取样数量确定为 32 更为适宜。

表 4 核心种质与原始种质果实品质性状差异百分率

Table 4 Percentage of trait differences between core collection and original collection

核心种质数 Number of core collection	表型保留比例/% Ratio of phenotype retained RPR	均值差异百分率/% Mean difference percentage MD	方差差异百分率/% Variance difference percentage VD	极差符合率/% Coincidence rate of range CE	变异系数变化率/% Changeable rate of coefficient of variation VR
13	92.45	0	44.44	72.99	132.57
32	98.11	0	77.78	84.89	123.60

位点优先取样策略选取的 32 个样品构建的核心种质的分子水平遗传多样性见表 5。 t 检测显示, 核心种质的 10 个位点在观测等位基因数 (N_o)、有效等位基因数 (N_e)、多态性位点比率 (P)、Nei's 基因多样性指数 (Nei's)、Shannon's 信息指数 (I), 观测杂合度 (H_o) 和期望杂合度 (H_e) 上与原种质都没有显著差异, 因此核心种质能代表原种质的遗传多样性。

表 5 构建的核心种质与原始种质在分子水平的遗传多样性比较
Table 5 Genetic diversity comparison between core collection and original collection

刺梨种质 Germplasm of <i>R. roxburghii</i>	观测等位基因数 Observed number of alleles N_o	有效等位基因数 Effective number of alleles N_e	多态位点百分 率/% Percentage of polymorphic loci P	Nei's 基因多 样度 Nei's gene Diversity Nei's	Shannon's 信息 指数 Shannon's information Index I	观测杂合度 Observed heterozygosity H_o	期望杂合度 Expected heterozygosity H_e
原始种质 Original collection	33	27	100	0.51	0.87	0.70	0.51
核心种质 Core collection	33	27	100	0.53	0.94	0.69	0.57

同时，采用主坐标对位点优先取样策略构建的核心种质的代表性进行确认（图 3），原始种质在散点分布图中较分散，但中间部分存在较重的相互重叠，表明这些样品存在较高的遗传相似性，也反映了群体的遗传冗余程度；核心种质虽然只有 32 个样品，却遍布了整个主坐标图，且从外围到中部均匀分布，既避免了核心种质的冗余，同时又确保了核心种质的代表性。

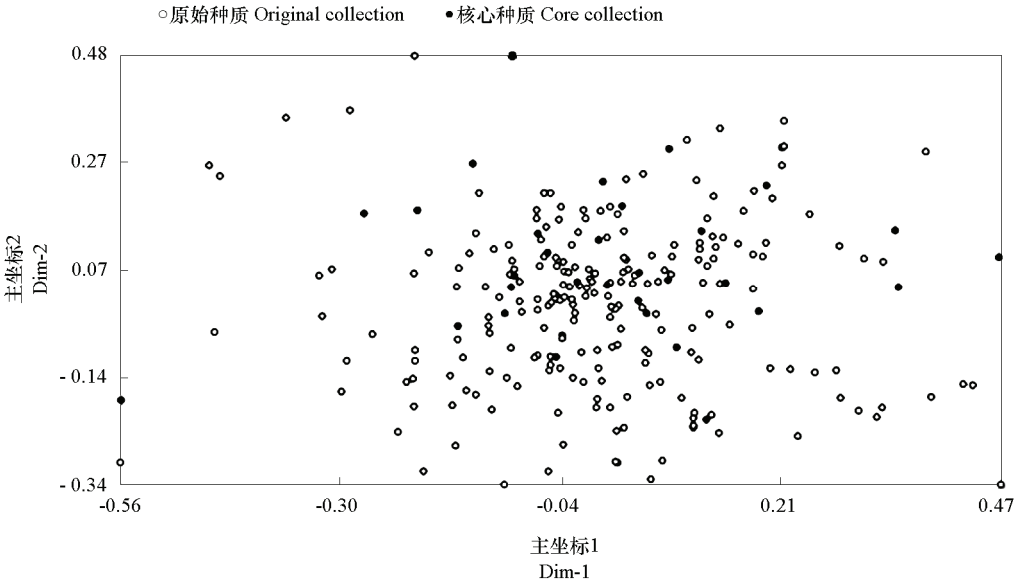


图 3 核心种质与原始种质的主坐标分布图
Fig. 3 Principal component plots for the core and original collections

如图 4 所示，32 份核心种质包含安龙资源 2 份，福泉 2 份，花溪 4 份，惠水 3 份，罗甸 1 份，盘县 2 份，平坝 5 份，晴隆 1 份，石阡 3 份，绥阳 2 份，兴义 3 份，遵义 4 份；涵盖了所有 12 个采样点，在地区分布上具有很好的代表性。

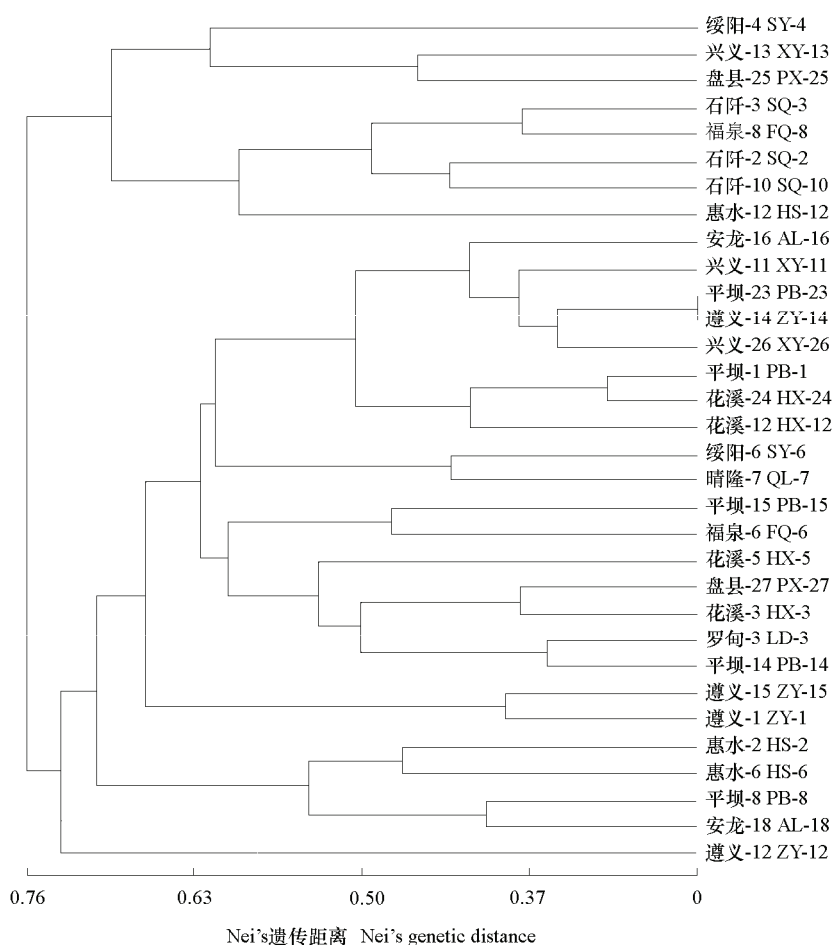


图 4 刺梨 32 份核心种质聚类图
 Fig. 4 The dendrogram of 32 core collections

3 讨论

整合农艺性状和分子标记数据构建果树核心种质是近年来的研究热点 (Belaj et al., 2012; 卜海东 等, 2012; 郭大龙 等, 2012; 刘遵春 等, 2012), 在整合方法的选择上研究者们进行了持续的探索。卜海东等 (2012) 依据表型性状, 首先构建初级核心种质; 刘遵春等 (2012) 利用混合遗传距离 (D_{mix}) 将农艺性状表型值数据和分子标记数据进行整合; 郭大龙等 (2012) 对 M 策略、遗传距离法和 Core Hunter 法构建的核心种质进行了合并。本研究中将 9 个果实数量性状数据进行 6 级分类, 将每一级分类数据近似处理为一个质量性状标记 (Belaj et al., 2012), 并结合 EST-SSR 数据统一采用 Nei's 遗传距离进行 UPGMA 聚类, 同时采用位点优先取样策略 (张春雨 等, 2009) 进行核心种质构建, 这样做的优点是: 事先不预设取样比例, 也不人为地对两组数据进行加权, 而是首先选择具有最多稀有等位基因的株系进入下一轮聚类, 在大大减轻数据处理工作量和降低人为因素干扰的同时, 更减少了等位基因的丢失, 保留了最大的等位基因数和遗传多样性。但是, 在对表型数据进行分类时, 需根据具体情况进行优化, 如本研究中采用 4 级分类时构建的核心种质极差符合率就达不到 80%。一般认为, 均值差异百分率小于 20%, 同时极差符合率大于 80%的情况下, 可以认

为该核心种质能够代表原种质资源的遗传多样性。并且, 均值差异百分率越小, 方差差异百分率、极差符合率和变异系数变化率越大, 则核心种质越能代表原群体的遗传多样性 (Hu et al., 2000)。

本研究中采用位点优先取样策略多次聚类构建核心种质, 当核心种质数量 32 份时, 等位基因数增至 79 个, 等位基因保留率 98.75%, 占原始种质的 14.55%。因此, 本研究中以 14.55% 的取样比例代表了原始种质 98.75% 的遗传多样性, 显著高于“以 10% 的核心样品代表基础样品 70% 以上的遗传多样性”(Frankel, 1984; Brown, 1989) 这个标准。

32 份核心种质中首先入选的是绥阳 - 4 (SY-4), 含 19 个等位基因, 占总等位基因数 (80) 的 23.75%, 且绥阳 - 4 (SY-4) 为小果型种质, 其果实单果质量 (3.74 g) 与果实横径 (2.20 cm) 标记为 2 个稀有等位基因。与之相反, 安龙 - 16 (AL-16) 为大果型种质, 由于单果质量 (16.54 g)、纵径 (3.83 cm)、横径 (4.10 cm) 及果形指数 (0.93) 大标记为 4 个稀有等位基因, 同时其极低的黄酮含量 (0.174%) 标记为第 5 个稀有等位基因, 由此贡献出最稀有的等位基因频率 (2.76×10^{-7}) 入选为第 2 份核心种质。其他核心种质如花溪 - 24 为扁果型资源, 其纵径及果形指数分别仅为 1.20 cm 和 0.48; 平坝 - 1 (PB-1) 为高酸 (1.16%) 低维生素 C ($7.51 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 资源; 惠水 - 6 (HS-6) 拥有极高的可溶性固形物含量 (17.00%) 及固酸比 (32.96); 遵义 - 15 (ZY-15) 的可溶性固形物 (15.27%) 及维生素 C 含量 ($27.59 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 均较高; 兴义 - 13 (XY-13) 总黄酮含量最高, 为 1.268%; 表明构建的 32 份核心种质在分子水平及表型水平上都能够很好地代表原种质的遗传多样性。值得一提的是当核心样品数量从 13 增加至 29 时, 等位基因数量始终维持在 76, 保持不再增加的状态, 这可能是由于刺梨种质中的稀有等位基因在不同资源中部分发生重组导致的, 因此即使这 16 个核心样品不增加等位基因数量, 但也不会引起核心种质的冗余。

32 份核心种质涵盖了所有 12 个采样点, 在地区分布上具有很好的代表性。其中盘县、兴义、安龙、花溪各采样点的核心种质比例分别为 5.41%、11.11%、11.76% 和 11.76%, 低于各采样点平均水平 14.55%, 表明这 4 个地区的野生刺梨可能与其他地区存在较高的遗传相似性, 自身内部仅存在较少量的稀有等位基因, 尤其以盘县为甚。相反地, 惠水和遵义两个采样点的核心种质比例为 27.27% 和 26.67%, 显著高于其他各采样点, 表明这两个地区的野生刺梨可能蕴藏着最丰富的遗传多样性, 同时稀有等位基因在这两个采样点的分布也更广。

References

- An Hua-ming, Liu Ming, Yang Man, Fan Wei-guo. 2011. Analysis of main organic acid compositions in *Rosa roxburghii* Tratt. Scientia Agricultura Sinica, 44 (10): 2094 - 2100. (in Chinese)
- 安华明, 刘 明, 杨 曼, 樊卫国. 2011. 刺梨有机酸组分及抗坏血酸含量分析. 中国农业科学, 44 (10): 2094 - 2100.
- Bai Jing, Zhang Zong-ze, Lu Min, Li Liang-liang, An Hua-ming. 2016. Fruit quality of wild *Rosa roxburghii* germplasm resources from different regions in Guizhou. Guizhou Agricultural Sciences, 44 (3): 43 - 46. (in Chinese)
- 白 静, 张宗泽, 鲁 敏, 李良良, 安华明. 2016. 贵州不同地区野生刺梨果实品质分析. 贵州农业科学, 44 (3): 43 - 46.
- Bassam B J, Caetano-Anolles G, Gresshoff P M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry, 196: 80 - 83.
- Belaj A, Dominguez-García M D C, Atienza S G, Urdíroz N M, Rosa R D L, Satovic Z, Martín A, Kilian A, Trujillo I, Valpuesta V, Río C D. 2012. Developing a core collection of olive (*Olea europaea* L.) based on molecular markers (DartTs, SSRs, SNPs) and agronomic traits. Tree Genetics & Genomes, 8 (2): 365 - 378.
- Brown A H D. 1989. Core collections: a practical approach to genetic resources management. Genome, 31 (2): 818 - 824.
- Bu Hai-dong, Zhang Bing-bing, Song Hong-wei, Liang Ying-hai, Liu Yan-jie, Chen Xian-min, Gu Guang-jun, Liu Chang. 2012. Construction

- core collections of pear germplasms in cold region by SSR and phenotypic traits. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (11): 2113 - 2123. (in Chinese)
- 卜海东, 张冰冰, 宋洪伟, 梁英海, 刘延杰, 程显敏, 顾广军, 刘 畅. 2012. 利用 SSR 结合表型性状构建寒地梨资源核心种质. *园艺学报*, 39 (11): 2113 - 2123.
- Du Wei, Liu Guo-wen. 2003. Determination of total flavonoids in *Rosa roxburghii* and resource utilization. *Food Science*, 24 (1): 112 - 114. (in Chinese)
- 杜 薇, 刘国文. 2003. 刺梨总黄酮的含量测定及资源利用. *食品科学*, 24 (1): 112 - 114.
- Fan Wei-guo, Xia Guang-li, Luo Ying-chun, Chen Xia-er, He Gang. 1997. Utilization of *Rosa roxburghii* resources and its developing strategy in Guizhou Province. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 10 (3): 109 - 115. (in Chinese)
- 樊卫国, 夏广理, 罗应春, 陈夏尔, 何 刚. 1997. 贵州省刺梨资源开发利用及对策. *西南农业学报*, 10 (3): 109 - 115.
- Fan Wei-guo, Xiang Xian-heng, An Hua-ming, Liu Jin-ping. 2011. A new *Rosa roxburghii* cultivar 'Guinong 5'. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (8): 1609 - 1610. (in Chinese)
- 樊卫国, 向显衡, 安华明, 刘进平. 2011. 刺梨新品种 '贵农 5 号'. *园艺学报*, 38 (8): 1609 - 1610.
- Frankel O H. 1984. Genetic perspectives of germplasm conservation//Arber W, Llimensee K, Peacock W, Starlinger P. Genetic manipulation: impact on man and society. Cambridge, UK: Cambridge University Press: 161 - 170.
- Guo Da-long, Liu Chong-huai, Zhang Jun-yu, Zhang Guo-hai. 2012. Construction of grape core collections. *Scientia Agricultura Sinica*, 45 (6): 1135 - 1143. (in Chinese)
- 郭大龙, 刘崇怀, 张君玉, 张国海. 2012. 葡萄核心种质的构建. *中国农业科学*, 45 (6): 1135 - 1143.
- Hu J, Zhu J, Xu H M. 2000. Methods of constructing core collections by stepwise clustering with three sampling strategies based on the genotypic values of crops. *Theoretical and Applied Genetics*, 101 (1 - 2): 264 - 268.
- Liu Zun-chun, Liu Da-liang, Cui Mei, Li Min, Jiao Qi-qing, Gao Li-ping, Chen Xue-sen. 2012. Combining agronomic traits and molecular marker data for constructing *Malus sieversii* core collection. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (6): 1045 - 1054. (in Chinese)
- 刘遵春, 刘大亮, 崔 美, 李 敏, 焦其庆, 高利平, 陈学森. 2012. 整合农艺性状和分子标记数据构建新疆野苹果核心种质. *园艺学报*, 39 (6): 1045 - 1054.
- Porebski S, Bailey G, Baum R B. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15 (1): 8 - 15.
- Powell W, Machray G C, Provan J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, 1 (7): 215 - 222.
- Shen Zhi-jun, Ma Rui-juan, Yu Ming-liang, Cai Zhi-xiang, Xu Jian-lan. 2013. Establishment of peach primary core collection based on accessions conserved in National Fruit Germplasm Repository of Nanjing. *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (1): 125 - 134. (in Chinese)
- 沈志军, 马瑞娟, 俞明亮, 蔡志翔, 许建兰. 2013. 国家果树种质南京桃资源圃初级核心种质构建. *园艺学报*, 40 (1): 125 - 134.
- Tang Jia-le, Huang Chun-hui, Wu Han, Lang Bin-bin, Qu Xue-yan, Xu Xiao-biao. 2014. Genetic diversity of wild *Actinidia eriantha* germplasm based on fruit traits and SSR markers. *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (6): 1198 - 1206. (in Chinese)
- 汤佳乐, 黄春辉, 吴 寒, 郎彬彬, 曲雪艳, 徐小彪. 2014. 野生毛花猕猴桃果实表型性状及 SSR 遗传多样性分析. *园艺学报*, 41 (6): 1198 - 1206.
- Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequence as a general source of polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17: 6463 - 6471.
- Yan Xiu-qin, Lu Min, An Hua-ming. 2015. Analysis on SSR information in transcriptome and development of molecular markers in *Rosa roxburghii*. *Acta Horticulturae Sinica*, 42 (2): 341 - 349. (in Chinese)
- 鄢秀芹, 鲁 敏, 安华明. 2015. 刺梨转录组 SSR 信息分析及其分子标记开发. *园艺学报*, 42 (2): 341 - 349.
- Yan Xiu-qin, Zhang Xue, Lu Min, He Yong, An Hua-ming. 2015. *De novo* sequencing analysis of the *Rosa roxburghii* fruit transcriptome reveals putative ascorbate biosynthetic genes and EST-SSR markers. *Gene*, 561 (1): 54 - 62.
- Zhang Chun-yu, Chen Xue-sen, Zhang Yan-min, Yuan Zhao-he, Liu Zun-chun, Wang Yan-ling, Lin Qun. 2009. A method for constructing core collection of *Malus sieversii* using molecular markers. *Scientia Agricultura Sinica*, 42 (2): 597 - 604. (in Chinese)
- 张春雨, 陈学森, 张艳敏, 苑兆和, 刘遵春, 王延龄, 林 群. 2009. 采用分子标记构建新疆野苹果核心种质的方法. *中国农业科学*, 42 (2): 597 - 604.