

# 柿属植物种质资源遗传多样性的 SSR 分析

耿 攀, 阮小凤, 杨 勇, 赵红星

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】用 SSR 标记分析柿属植物种质资源的遗传多样性, 为其有效利用提供依据。【方法】以 7 个柿种或变种的 48 份材料为研究对象, 利用 30 对 SSR 标记对其进行遗传多样性分析。采用 NTSYS-pc 2. 10e 分析软件对 SSR 数据进行聚类分析。【结果】共检测到 83 个等位基因, 每对 SSR 引物检测到 3~6 个等位基因变异, 平均为 4. 9 个。供试柿品种间的遗传相似系数介于 0. 397~1. 000, 平均为 0. 698, 范围较大, 说明柿资源种类较多、来源较广泛、遗传多样性较丰富。48 份柿材料在相似系数为 0. 66 水平上分为 4 大类, 第 I 类包括浙江柿和 5 个美洲柿及 1 个柿品种; 第 II 类只有 2 个资源, 即油柿和野柿; 第 III 类为柿种下的大部分柿品种(27 个); 第 IV 类包括 2 个有核君迁子、3 个无核君迁子、2 个野柿、3 个金枣柿及 2 个柿种下的品种; 不同种类的柿种质资源基本分别聚在一起。同一种类下的不同类型也能区分开来。【结论】SSR 标记是研究柿种质资源遗传多样性的有效手段。

【关键词】 柿属植物; 种质资源; SSR 标记; 遗传多样性

【中图分类号】 S188; S665. 202. 4

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)12-0190-07

## Analysis of genetic diversity of *Diospyros* spp germplasm resources by using SSR markers

GENG Pan, RUAN Xiao-feng, YANG Yong, ZHAO Hong-xing

(College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** 【Objective】 The study was to analyze the genetic diversity of *Diospyros* spp germplasm resources by using SSR markers to provide basis for their effective application. 【Method】 48 different accessions of seven species or varieties, and 30 pairs of SSR primers were selected to assess their genetic diversity and relatedness by analyzing them, and cluster analysis was done using NTSys-pc2. 10e. 【Result】 A total of 83 alleles were detected with a mean value of 4. 9 alleles locus (range 3—6). Varieties of persimmon genetic similarity coefficient ranged between 0. 397—1. 000, averaging 0. 698, with larger range, which shows more types of persimmons, broader range of sources, and richer genetic diversity. 48 Persimmon resources could be classified into 4 groups. Groups I include a *D. glaucifolia*, five *D. virginiana* and one *D. kaki*. Group II just has two accessions: a *D. olifera* and a *D. kaki*. var. most persimmon varieties (27) are in group III. Groups IV include 2 *D. lotus* with seeds, 3 seedless *D. lotus*, 2 *D. kaki*. var. 3 Jinzaoshi and 2 varieties of *D. kaki*. Different species can be clustered respectively and different types in intra—species can be discriminated by SSR markers, indicating that it is feasible to use SSR markers to distinguish persimmon germplasm. 【Conclusion】 Using SSR markers is an available methods to study the genetic diversity of persimmon germplasm.

**Key words:** *Diospyros* spp; germplasm resources; SSR markers; genetic diversity

\* [收稿日期] 2010-05-06

[基金项目] 国家科技基础条件平台工作子项目(2005DKA21002-22)

[作者简介] 耿 攀(1983—), 男, 陕西临潼人, 在读硕士, 主要从事分子生物学研究。E-mail: gengpan2008@sina. com

[通信作者] 杨 勇(1964—), 男, 陕西宝鸡人, 副教授, 硕士, 主要从事柿种质资源的鉴定与评价研究。

E-mail: yang\_yong@nwsuaf. edu. cn

柿 (*Diospyros kaki* Thunb.) 系柿树科 (Ebenaceae) 柿属 (*Diospyros* L.) 植物。中国柿属植物资源十分丰富,有 58 个种和变种<sup>[1]</sup>,其中作为果树利用的有柿、油柿、君迁子、浙江柿等<sup>[2]</sup>。我国丰富多样的柿资源,为其遗传改良和新品种培育提供了充足的材料。

国家柿种质资源圃收集了国内外的柿属种及种下大量的柿品种,前人对其生物学性状进行了系统地鉴定和描述,认为其性状具有丰富的遗传多样性<sup>[3-4]</sup>。但由于柿品种多是由自然界多年的实生体通过人为选择性状固定后嫁接无性繁殖而保留下来的,所以对其系谱及遗传背景不是很清楚,不同地区的柿属种和柿地方品种之间的亲缘关系也不明确。

近年来,从 DNA 水平揭示种间差异的多种分子标记技术 (如 RFLP、RAPD、AFLP、SSR、SNP 等),在农作物中得到了广泛应用,其中 SSR 以其简便、稳定、多态性和共显性遗传等特点,被广泛应用于农作物的品种鉴定、亲缘关系分析及种质起源与进化研究中<sup>[5-10]</sup>。SSR 分子标记在柿属植物上的应

用才刚刚起步<sup>[11-13]</sup>,研究的柿资源数量不多,对一些种的种下类型涉及较少。为此,本试验以柿属 7 个种或变种为研究对象 (每个种下都有数量不等的基因型),采用 SSR 分子标记方法,对其亲缘关系及遗传多样性进行了分析,以期为更加有效地利用这些种质资源提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

1.1.1 植物材料 选择柿属植物的 48 份材料为研究对象,其分属于柿属的 7 个种或变种,其中有浙江柿 (*D. glaucifolia*) 1 个、美洲柿 (*D. virginiana*) 5 个类型、君迁子 (*D. lotus*) 5 个类型、野柿 (*D. kaki*. var.) 3 个、油柿 (*D. olifera*) 1 个、金枣柿 (*D. sp.*) 3 个及柿 (*D. kaki*) 的 30 个不同品种 (表 1)。所有材料均采自西北农林科技大学国家柿种质资源圃的活体柿树标本,采摘春季刚发的嫩芽,置于加有变色硅胶的塑料袋中,使芽充分脱水干燥后,置冰箱冷藏室备用。

表 1 48 份柿材料的编号及名称

Table 1 Code and name of 48 Persimmon trees

| 编号<br>Code | 名称<br>Name                    | 原产地<br>Origin           | 编号<br>Code | 名称<br>Name                | 原产地<br>Origin           |
|------------|-------------------------------|-------------------------|------------|---------------------------|-------------------------|
| 1          | 浙江柿 <i>D. glaucifolia</i>     | 浙江 Zhejiang             | 25         | 博爱杂样景 Boai zayangjing     | 河南博爱 Boai, He'nan       |
| 2          | 美洲柿 Vm10 <i>D. virginiana</i> | 以色列 Israel              | 26         | 次郎 Jiro                   | 日本 Japan                |
| 3          | 美洲柿 Vz1 <i>D. virginiana</i>  | 以色列 Israel              | 27         | 前川次郎 Maekawajiro          | 日本 Japan                |
| 4          | 美洲柿 VA1 <i>D. virginiana</i>  | 以色列 Israel              | 28         | 若杉系次郎 Wakasugikeijiro     | 日本 Japan                |
| 5          | 美洲柿 VF8 <i>D. virginiana</i>  | 以色列 Israel              | 29         | 大次郎 Big jiro              | 日本 Japan                |
| 6          | 美洲柿 VF6 <i>D. virginiana</i>  | 以色列 Israel              | 30         | 韩国太安柿 Taianshi            | 韩国 Korea                |
| 7          | 君迁子雄 04 <i>D. lotus</i>       | 陕西眉县 Meixian, Shaanxi   | 31         | 甜宝盖 Tianbaogai            | 湖北罗田 Luotian, Hubei     |
| 8          | 君迁子雌 16 <i>D. lotus</i>       | 陕西眉县 Meixian, Shaanxi   | 32         | 小果甜柿 Xiaoguotianshi       | 湖北罗田 Luotian, Hubei     |
| 9          | 赞长无核 <i>D. lotus</i>          | 河北赞皇 Zanhuan, Hebei     | 33         | 百战甜柿 Baizhan tianshi      | 河南商城 Shangcheng, He'nan |
| 10         | 涉长无核 <i>D. lotus</i>          | 河北涉县 Shexian, Hebei     | 34         | 无核托柿 Wuhetuoshi           | 山东平度 Pingdu, Shandong   |
| 11         | 石岗无核 <i>D. lotus</i>          | 河北涉县 Shexian, Hebei     | 35         | 中华巨柿 Zhonghuajushi        | 山东平度 Pingdu, Shandong   |
| 12         | 野柿-02 Yeshi-02                | 浙江 Zhejiang             | 36         | 平核无 Hiratanenashi         | 日本 Japan                |
| 13         | 野柿-01 Yeshi-01                | 浙江 Zhejiang             | 37         | 刀根早生 Dogenwase            | 日本 Japan                |
| 14         | 百战野柿-05 Yeshi-05              | 河南商城 Shangcheng, He'nan | 38         | 禅寺丸 Zenjimaruru           | 日本 Japan                |
| 15         | 油柿-01 <i>D. olifera</i>       | 浙江 Zhejiang             | 39         | 西村早生 Nishimurawase        | 日本 Japan                |
| 16         | 金枣柿-01 Jinzaoshi-01           | 浙江 Zhejiang             | 40         | 洛阳七月早 Luoyang qiyuezao    | 河南洛阳 Luoyang, He'nan    |
| 17         | 金枣柿-02 Jinzaoshi-02           | 浙江 Zhejiang             | 41         | 大荔柿饼柿 Dali shibingshi     | 陕西大荔 Dali, Shaanxi      |
| 18         | 金枣柿-03 Jinzaoshi-03           | 浙江 Zhejiang             | 42         | 永济胎里红 Yongjitailihong     | 山西永济 Yongji, Shanxi     |
| 19         | 河西火罐 Hexihuoguan              | 陕西眉县 Meixian, Shaanxi   | 43         | 洛阳绕天红 Luoyangraotianhong  | 河南洛阳 Luoyang, He'nan    |
| 20         | 朱罐罐 Zhuguanguan               | 山西 Shanxi               | 44         | 长安王后柿 Chang'an wanghoushi | 陕西长安 Chang'an, Shaanxi  |
| 21         | 蜜蜜罐 Mimiguan                  | 河南洛阳 Luoyang, He'nan    | 45         | 长安怀抱月 Chang'an huaibaoyue | 陕西长安 Chang'an, Shaanxi  |
| 22         | 圃杂 1 号 Puza01                 | 陕西眉县 Meixian, Shaanxi   | 46         | 洋县壶平柿 Yangxian hupingshi  | 陕西洋县 Yangxian, Shaanxi  |
| 23         | 圃杂 2 号 Puza02                 | 陕西眉县 Meixian, Shaanxi   | 47         | 潮阳元宵柿 Chaoyangyuanxiaoshi | 广东 Guangdong            |
| 24         | 圃杂 3 号 Puza03                 | 陕西眉县 Meixian, Shaanxi   | 48         | 诏安元宵柿 Zhaoan yuanxiaoshi  | 福建诏安 Zhaoan, Fujian     |

1. 1. 2 试剂与仪器 Tris、CTAB、EDTANa<sub>2</sub>、PVP、APS、Urea、TEMED、氯仿、异戊醇、乙醇、甲酰胺、溴酚蓝和 AgNO<sub>3</sub>,均购自听泰生物科技公司; DNA Maker、Premix *Taq*、dNTPs、RNase A 和琼脂糖,均购自宝生物工程有限公司。PCR 在 Eppendorf PCR 仪(Eppendorf AG 22331 Hamburg)上完成。聚丙烯酰胺凝胶电泳所用的电泳仪(JY-5000

型)和电泳槽(JY-CX2B SEUCEREING)均购自北京君意东方电泳设备有限公司。

1. 1. 3 引物表 2 中的 mDP 系列引物,是根据阮小凤等<sup>[14]</sup>登录到 GenBank 上的微卫星序列,采用 Primer Designer 5 软件设计的;ssrDk 系列引物引自文献[15]。引物由上海生物工程公司合成。

表 2 SSR 引物及其特征  
Table 2 Primers used in SSR-PCR reaction

| 引物名称/基因库编号<br>Name/GenBank<br>accession No. | 上游引物(5'→3')<br>Forward primer | 下游引物(5'→3')<br>Reverse primers | 退火温度/℃<br><i>T<sub>m</sub></i> | 扩增产物<br>长度/bp<br>Size |
|---------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| mDP08/EF567403                              | TGTCCTCAACCTACATAG            | GGTCTATACAAGAGCTGTATC          | 52                             | 292                   |
| mDP09/EF567404                              | ACACAGGCAGACAAATTCAATC        | CCATAGGCATTGCTGCCATT           | 55                             | 116                   |
| mDP13/EF567406                              | ATGACGACAAGCCAGTTGGG          | TTGCTTGTTCTGGTTGGTTG           | 55                             | 250                   |
| mDP15/EF567408                              | ACACCCCTTCTTTTATAC            | ATCCAGGAGGGCAAAGAACT           | 50                             | 116                   |
| mDP16/EF567409                              | CTACTTCCACATAGCATCAC          | GTAAAGATTCATAAAACCTAG          | 55                             | 140                   |
| mDP17/EF567410                              | CCAAATCATTCGAAGCCAAT          | CCTTCACCGATGTCCTTTGT           | 53                             | 138                   |
| mDP18/EF567411                              | TACTACTGATCTACCAAGTC          | GGATCAGAAGCCCAGTTCAA           | 55                             | 252                   |
| mDP19/EF567412                              | TCAATCTCACATAGTAGGATTAAGGA    | TGACTATGGGGGTCCACTTC           | 48                             | 261                   |
| mDP20/EF567413                              | AGAAGACCCAGACCAGAGAAG         | GGCCACCAAATCAACCATACC          | 57                             | 204                   |
| mDP21/EF567414                              | ACCGGCAGACAAATTCAATC          | AGTCGATGGATGAGGAAAGC           | 55                             | 215                   |
| ssrDK11                                     | ATGTTTCAGGGGTTCATTG           | TCACTCGTCTTTGCCTTTCC           | 60                             | 161                   |
| ssrDK13                                     | GTAATTAGCTAAGACTTAAGGGG       | TGCTACAACAACCTGGAAGAC          | 53                             | 141                   |
| ssrDK26                                     | GGGAAATTAAGAGGGAAGAA          | AGGAACTGGATCAGCATAAA           | 55                             | 160                   |
| ssrDK29                                     | ATCATGAGATCAGAGCCGTC          | CACGTTAACGTTACGGAACA           | 57                             | 131                   |
| ssrDK30                                     | TGGTGATCGTGGTAGTGGTT          | GGCCTAATCTCTGTCCCATCC          | 58                             | 157                   |
| ssrDK33                                     | ACAGGGCACGAACAGATGAC          | GCAAAATGGTCTGGACTGCT           | 60                             | 240                   |
| ssrDK36                                     | GGGAAGAACAAAGAGAACTG          | ACGAAGTTGTAATCTTGAGC           | 54                             | 227                   |

1. 2 试验方法

1. 2. 1 DNA 的提取与分离 按罗正荣等<sup>[16]</sup>的方法提取供试样品基因组 DNA,用紫外分光光度法和琼脂糖凝胶电泳法检测 DNA 品质。提取的每份资源的 DNA 原液置于-20 ℃冰箱保存,PCR 时取少量原液稀释至 25 ng/μL,备用。

1. 2. 2 PCR 扩增及电泳 PCR 扩增在 Eppendorf PCR 仪上进行。PCR 反应体系为 20 μL,其中包括 1 μL 50 ng/μL 模板 DNA,0. 2 μL 5 U/μL TaKaRa *Taq* 酶,2 μL 10 × buffer,1. 5 μL 20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,0. 4 μL 10 mmol/L dNTP,1 μL 10 pmol/L SSR Primer,13. 9 μL ddH<sub>2</sub>O。PCR 反应程序为:94 ℃预变性 4 min;94 ℃变性 1 min,退火 1 min(退火温度依引物而定),72 ℃延伸 2 min,35 个循环;72 ℃延伸 5 min,4 ℃保存。扩增产物用 120 g/L 聚丙烯酰胺变性凝胶在 1 600 V 电压下电泳分离,银染法显色<sup>[17]</sup>。

1. 2. 3 数据统计分析 选择扩增条带清晰且有多态性的 SSR 标记进行数据统计,假定胶上迁移率相同的条带均来自同一位点上的同一等位基因。对每

个样品的扩增电泳谱带进行统计,有带记为 1,无带记为 0,组成 1 和 0 的原始矩阵。利用 NTSYS-pc 2. 10 e 软件,按简单匹配系数 SM 计算品种间的遗传相似系数(Genetic similarity,GS),获得相似系数矩阵。用 SHAN 程序中的非加权对群数学平均法(Unweighted pair group of arithmetic means,UP-GMA)进行聚类分析,并通过 Tree plot 模块生成聚类图。

2 结果与分析

2. 1 SSR 引物的筛选

用部分柿资源对 SSR 引物进行筛选,其中有 17 对引物的扩增谱带清晰且重复性好。再用这 17 对引物对所有 48 份柿材料进行扩增,结果见表 3。由表 3 可见,17 对引物的扩增总带数为 91 条,其中 83 条具有多态性,多态性百分率达 91. 2%;扩增片段长度在 100~300 bp;单引物对可扩增出 1~9 条谱带,平均为 4. 9 条,多态位点百分率为 60%~100%;不同引物组合的种质鉴定能力差异较大,图 1 为 ssrDK36 引物组合对 48 份柿材料的扩增电泳

图谱。

表 3 17 对 SSR 引物产生的谱带信息  
Table 3 Information on bands generated by 17 primer pairs

| 引物名称/<br>基因库编号<br>Primer/GenBank<br>accession No. | 条带数<br>No. of bands | 多态性带数<br>Number of<br>polymorphic<br>bands | 多态性<br>百分率/%<br>Percentage<br>of polymorphic<br>bands | 引物名称/<br>基因库编号<br>Primer/GenBank<br>accession No. | 条带数<br>No. of bands | 多态性带数<br>Number of<br>polymorphic<br>bands | 多态性<br>百分率/%<br>Percentage<br>of polymorphic<br>bands |
|---------------------------------------------------|---------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| mDP08/EF567403                                    | 5                   | 3                                          | 60.0                                                  | mDP21/EF567414                                    | 5                   | 3                                          | 60.0                                                  |
| mDP09/EF567404                                    | 5                   | 5                                          | 100.0                                                 | ssrDK11                                           | 5                   | 5                                          | 100.0                                                 |
| mDP13/EF567406                                    | 6                   | 6                                          | 100.0                                                 | ssrDK13                                           | 5                   | 5                                          | 100.0                                                 |
| mDP15/EF567408                                    | 3                   | 3                                          | 100.0                                                 | ssrDK26                                           | 1                   | 1                                          | 100.0                                                 |
| mDP16/EF567409                                    | 6                   | 5                                          | 83.3                                                  | ssrDK30                                           | 6                   | 5                                          | 75.0                                                  |
| mDP17/EF567410                                    | 9                   | 9                                          | 100.0                                                 | ssrDK29                                           | 3                   | 3                                          | 100.0                                                 |
| mDP18/EF567411                                    | 9                   | 9                                          | 100.0                                                 | ssrDK33                                           | 5                   | 5                                          | 100.0                                                 |
| mDP19/EF567412                                    | 8                   | 6                                          | 75.0                                                  | ssrDK36                                           | 5                   | 5                                          | 100.0                                                 |
| mDP20/EF567413                                    | 5                   | 5                                          | 100.0                                                 | 总带数 Total bands                                   | 91                  | 83                                         | 91.2                                                  |

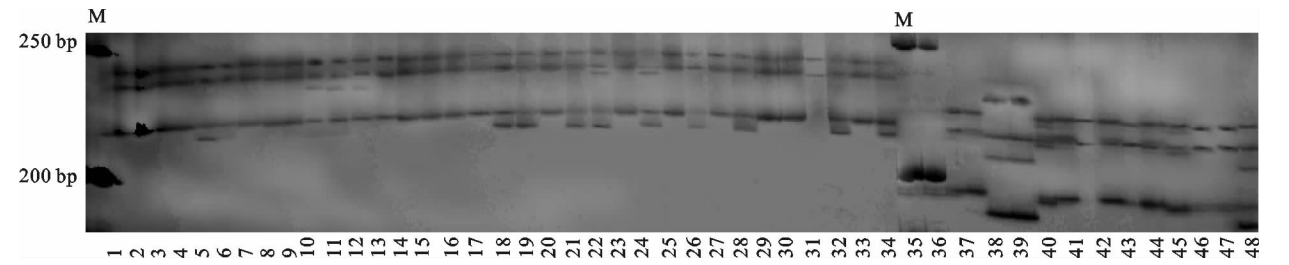


图 1 ssrDK36 引物组合对供试的 48 份柿材料基因型的 SSR 扩增谱带  
1~48 条带分别对应 1~48 号柿材料,下同

Fig. 1 Profile of SSR amplification using ssrDK36 primer combination in the 48 *Diospyros* spp  
1—48 lanes is 1—48 samples respectively,the follwing figure is same

2.2 48 份柿材料的遗传相似性分析

利用 NTSYS-pc 2.10e 分析软件,根据扩增的 83 条多态性条带计算 48 份柿材料间的遗传相似系数,并进行遗传聚类分析。结果表明,供试品种间的遗传相似系数为 0.397~1.000,平均为 0.698,其中美洲柿 VA1 和野柿-01 间的遗传相似系数最小,为 0.397,说明美洲柿与来自我国浙江的野柿变种亲缘关系最远;金枣柿-01 与金枣柿-03、金枣柿-02 间的遗传相似系数分别达到 1.000 和 0.988,金枣柿-02 与金枣柿-03 间的遗传相似系数为 0.988,说明不同来源的金枣柿种内无差异或差异极小;赞长无核和石岗无核 2 个品种间的遗传相似系数达到0.976,说明这 2 个无核君迁子的遗传背景相似。

2.3 48 份柿材料的聚类分析

利用 17 对 SSR 引物得出的电泳谱带数据进行聚类分析,结果见图 2。由图 2 可以看出,48 份柿材料在相似系数为 0.66 时可聚为 4 大类;第Ⅰ类包括浙江柿、5 个美洲柿及 1 个柿品种;第Ⅱ类只有 2 个资源,1 个为油柿,1 个为野柿;第Ⅲ类包括 27 个柿品种;第Ⅳ类包括 2 个有核君迁子、3 个无核君迁

子、2 个野柿、3 个金枣柿及 2 个柿品种。第Ⅰ类中,来自同一个地区的 5 个美洲柿单株被聚在一起,相似系数达 0.8,说明其种内的差异很小;浙江柿与美洲柿聚在一起,推测这 2 个种之间的亲缘关系较近。第Ⅱ类中,油柿与 1 个野柿在相似系数为 0.70 水平上聚在一起,说明野柿与油柿可能来源于同一祖先。第Ⅳ类中,君迁子、野柿、金枣柿及 2 个柿品种等在相似系数为 0.70 水平上聚为一类,说明这几个种之间有一定的亲缘关系,其中 3 个金枣柿首先聚为一类,然后与 2 个野柿相聚;3 个无核君迁子在相似系数为 0.96 水平上聚为一类后,在 0.78 相似水平上与金枣柿和野柿相聚。

3 讨 论

3.1 柿属植物种质资源 SSR 标记的遗传多样性分析

对于植物种以下水平的研究,必须选择灵敏的分子标记才能提供足够的遗传信息,而且获得的信息应具有重复性好、多态性高、稳定可靠等优点。SSR 标记具有丰富的遗传多态性和较高的信息含

量,在种质资源分析中表现出更大的优势,是符合上述要求的分子标记之一。

本研究利用 SSR 引物对柿属植物进行遗传多样性分析,结果共检测到 83 个等位基因,每对 SSR 引物可检测到 3~6 个等位基因变异,平均为 4.9 个。由此可见,所选用的 48 份柿材料的 SSR 多态性较丰富。本试验所用的材料是具有代表性的柿种

质,研究结果表明柿种质资源的遗传多样性相对较丰富。究其原因,一是所选取的柿种质地理多样性较为丰富,包含以色列、日本、韩国及中国的不同地区,大多数柿品种的亲缘关系较远;二是所选 48 份柿品种的形态学差异较大,包括浙江柿、美洲柿、君迁子、野柿和油柿等多个品种。

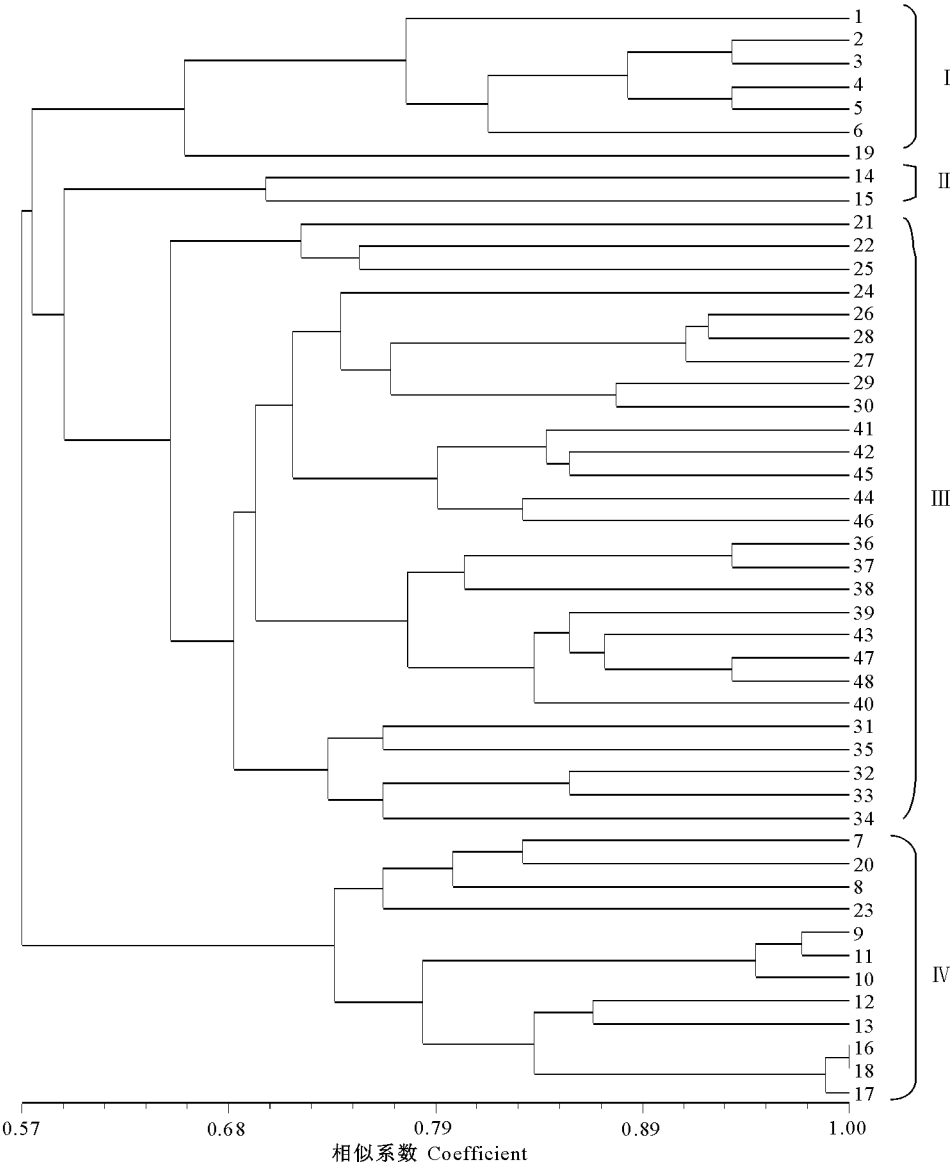


图 2 基于 SSR 分析的 48 份柿材料的聚类结果

Fig. 2 UPGMA dendrogram of 48 *Diospyros* breeds on the basis of SSR markers

3.2 柿属植物种质资源之间的亲缘关系分析

SSR 标记是继 RAPD 标记后出现的重要的 DNA 标记技术之一,具有稳定性好、多态性高、共显性、引物特异性强等特点<sup>[18]</sup>。近年来,SSR 技术作为一种成熟的分子标记,已被广泛用于果树的遗传多样性研究中。葛志刚等<sup>[19]</sup>用 24 对 SSR 引物将

47 份桃品种区分开,且 SSR 分析结果与品种间的系谱关系基本吻合。王丽侠等<sup>[20]</sup>选用 51 对 SSR 引物对国内外 145 份小豆材料进行多样性评价,并分析了中国小豆种质资源间的遗传关系和遗传结构。本试验用 17 对 SSR 引物将 48 份柿品种区分开,且 SSR 分析结果与品种间的系谱关系基本吻合,尤其

是可将其中的次郎品种及其芽变品种,如前川次郎(Maekawajiro)、若杉系次郎(Wakasugikeijiro)、大次郎(Big jiro)及韩国太安柿(Taianshi)区分开,说明 SSR 技术是柿品种鉴定的有效手段。

利用 SSR 分子标记方法对 48 份柿材料进行遗传多样性分析,结果发现,供试品种间的遗传相似系数介于 0.397~1.000,范围较大,说明柿资源种类较多,来源较广泛,遗传多样性较丰富。大部分具有亲缘关系的品种及形态学、生物学特征相近的品种聚为一类,说明聚类分析结果与系谱及其生物学特征相符。但从聚类结果来看,与实际情况仍有一定偏差,其原因可能是 SSR 分子标记作为分析遗传多样性的工具,仍然存在着很大的局限性,如某些位点,特别是功能基因内位点发生的碱基缺失、插入或替换等,都可能直接导致表型性状的变异,这些等位基因的差异可能只有 1~2 个碱基,而这种微小的遗传变异往往在 SSR 分析中很难得到准确反映。

SSR 技术是直接对基因组 DNA 进行检测,既克服了同工酶位点偏少的缺点,又避免了 RFLP 技术复杂的弊病,同时还基本排除了环境条件对基因型的修饰,因此 SSR 技术将在果树品种鉴定和亲缘关系研究中得到更广泛的应用。但 SSR 标记并不代表基因,SSR 位点差异不代表亲本间基因组合的差异,因此根据 SSR 标记进行聚类分析和遗传多样性评价,其结果的实际价值在某种程度上依赖于对标记引物的选择(引物种类、数量以及在基因组中的分布)。本研究结果中,个别柿种下的品种与其他种关系较远但却聚为一类,其原因可能由于标记本身及引物种类、数量有限所致。因此,用 SSR 标记分析柿资源遗传多样性时,应选用大量的 SSR 引物,或者利用多种标记相结合的方式进行研究,以更加真实地反映柿资源的遗传多样性或亲缘关系。

## [参考文献]

- [1] 王仁梓. 柿 [M]. 北京:农业出版社,1987:619-636.  
Wang R Z. Persimmon [M]. Beijing: Agricultural Press, 1987: 619-636. (in Chinese)
- [2] 左大勋,柳 鏊,王希冀. 我国柿属植物的地理分布及利用 [J]. 中国果树,1984(3):27-34.  
Zuo D X, Liu L, Wang X Q. The geographical distribution and utilization of China Persimmon [J]. China's Fruit Trees, 1984 (3):27-34. (in Chinese)
- [3] 罗正荣,蔡礼鸿,胡春根. 柿属植物种质资源及其利用研究现状 [J]. 华中农业大学学报,1996,15(4):381-388.  
Luo Z R, Cai L H, Hu C G. *Diospyros* spp germplasm resources and the situation of using [J]. Journal of Huazhong Agricultur-
- al University, 1996, 15(4):381-388. (in Chinese)
- [4] 杨 勇,阮小凤,王仁梓,等. 柿种质资源及育种研究进展 [J]. 西北林学院学报,2005,20(2):133-137.  
Yang Y, Ruan X F, Wang R Z, et al. Advances in research of germplasm resources and breeding of *Dispyros kaki* L. [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2005, 20(2): 133-137. (in Chinese)
- [5] 唐志鹏,袁 磊,李洪耀. 果树分子标记技术研究进展 [J]. 广西园艺,2005,16(4):53-56.  
Tang Z P, Yuan L, Li H Y. Advances in molecular markers of fruit trees [J]. Guangxi Horticulture, 2005, 16(4): 53-56. (in Chinese)
- [6] Senior M L, Chin ECL, Lee M, et al. Simple sequence repeat markers derived from maize sequences found in the GenBank database; map construction [J]. Crop Sci, 1996, 36:1071-1077.
- [7] Areshchenkova T, Ganal M W. Long tomato microsatellites are predominantly associated with centromeric redions [J]. Genome, 1999, 43:536-544.
- [8] 罗玉娣,李建国,李明芳. 用 SSR 标记分析辣椒属种质资源的遗传多样性 [J]. 生物技术通报,2006,11(5):337-341.  
Luo Y D, Li J G, Li M F. Analysis of genetic diversity of capsicum germplasm resources by using SSR markers [J]. Biotechnology Bulletin, 2006, 11(5): 337-341. (in Chinese)
- [9] 陆 芳,许 勇,赵 越,等. 新疆哈密瓜永久遗传图谱构建及比较分析 [J]. 园艺学报,2009,36(12):1767-1774.  
Lu F, Xu Y, Zhao Y, et al. Construction of permanent genetic map and comparative analysis of Xinjiang Hami Melon (*Cucumismelo* L. ssp. melo convar. ameri (Pang. )) Greb [J]. Acta Horticulturae Sinic, 2009, 36(12):1767-1774. (in chinese)
- [10] 王笑一,于拴仓,张凤兰,等. 小白菜品种的 SSR 指纹图谱及遗传特异性分析 [J]. 华北农学报,2008,23(5):97-103.  
Wang X Y, Yu S C, Zhang F L, et al. SSR fingerprinting and genetic distinctness of *Pakchoi Brassica rapa* L. ssp. chinensis Makino [J]. Agriculturae Boreali-sinica, 2008, 23(5): 97-103. (in Chinese)
- [11] 郭大龙,罗正荣. 柿和君迁子 SSR 分析技术的建立 [J]. 农业生物技术学报,2004,12(4):386-389.  
Guo D L, Luo Z R. Establishment of SSR technique of *Diospyros kaki* and *D. lotus* [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2004, 12(4): 386-389. (in Chinese)
- [12] Keizo Y, Shinya K, Dan E P. Phylogenetic relationship of *Diospyros kaki* (persimmon) to *Diospyros* spp. (Ebenaceae) of Thailand and four temperate zone *Diospyros* spp. from an analysis of RFLP variation in amplified cpDNA [J]. Genome, 1998, 41:173-182.
- [13] Guo D L, Zhang H Q, Luo Z R. Genetic relationships of *Diospyros kaki* Thunb and related species revealed by IRAP and REMAP analysis [J]. Plant Science, 2006, 170(3):528-533.
- [14] 阮小凤, Gabi K, 杨 勇. 磁珠富集法分离柿微卫星标记 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2008,36(5):97-102.  
Ruan X F, Gabi K, Yang Y. Isolation of microsatellite in *Diospyros kaki* by magnetic beads [J]. Journal of Northwest

A&F University; Nat Sci Ed, 2008, 36(5): 97-102. (in Chinese)

[15] Sorlano J M. Development of microsatellite markers in polyploid persimmon (*Diospyros kaki* Lf) from an enriched genomic library [J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 6: 368-370.

[16] 罗正荣, 张青林, 郭大勇, 等. 柿属植物系列分子标记技术的建立及其应用研究 [J]. 华中农业大学学报, 1996, 29(3): 335-338.

Luo Z R, Zhang Q L, Guo D Y, et al. Establishment and application research of sequence repeat technique in genus *Diospyros* spp [J]. Huazhong Agricultural University, 1996, 29(3): 335-338. (in Chinese)

[17] 李明芳, 郑学勤. 荔枝 SSR 标记的研究及其对部分荔枝种质的遗传多样性分析 [D]. 广州: 华南热带农业大学, 2003.

Li M F, Zheng X Q. Development of SSR markers in Litchi (*Litchi chinensis*) [D]. Guangzhou: South China University of Tropical Agriculture, 2003. (in Chinese)

[18] 高志红, 章 镇, 韩振海. SSR 技术及其在果树上的应用 [J]. 果树学报, 2002, 19(5): 281-285.

Gao Z H, Zhang Z, Han Z H. SSR technique and development of the study in fruit science [J]. Journal of Fruit Science, 2002, 19(5): 281-285. (in Chinese)

[19] 葛志刚, 俞明亮, 马瑞娟, 等. 蟠桃种质 SSR 标记的遗传多样性分析 [J]. 果树学报, 2009, 26(3): 300-305.

Ge Z G, Yu M L, Ma R J, et al. Analysis of genetic diversity and relationship of flat peach cultivars by SSR [J]. Journal of Fruit Science, 2009, 26(3): 300-305. (in Chinese)

[20] 王丽侠, 程须珍, 王素华, 等. 利用 SSR 标记分析小豆种质资源的遗传多样性 [J]. 中国农业科学, 2009, 42(8): 2661-2666.

Wang L X, Cheng X Z, Wang S H, et al. Genetic diversity among adzuki bean germplasm revealed by SSR markers [J]. Chinese Academy of Sciences, 2009, 42(8): 2661-2666. (in Chinese)

(上接第 189 页)

[11] 樊卫国, 安华明, 刘国琴, 等. 刺梨果实与种子内源激素含量变化及其与果实发育的关系 [J]. 中国农业科学, 2004, 37(5): 728-733.

Fan W G, An H M, Liu G Q, et al. Changes of endogenous hormones contents in fruit, seeds and their effects on the fruit development of *Rosa roxburghii* [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(5): 728-733. (in Chinese)

[12] 祁业凤, 刘孟军. 两个胚败育率不同的枣品种果实生育期内源激素的变化 [J]. 园艺学报, 2004, 31(6): 800-802.

Qi Y F, Liu M J. Change of endogenous hormone in cultivars of chinese jujube with different type of embryo abortion [J]. Acta Horticulturae Sinic, 2004, 31(6): 800-802. (in Chinese)

[13] 杨途熙, 魏安智, 郑 元, 等. 高效液相色谱法同时分离测定仁用杏花芽中 8 种植物激素 [J]. 分析化学, 2007, 35: 1359-1361.

Yang T X, Wei A Z, Zheng Y, et al. Simultaneous determination of 8 endogrnous hormones in apricot floral bud by high performance liquid chromatography [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2007, 35: 1359-1361. (in Chinese)

[14] Vizzotto G, Masia A, Bonghi C. IAA levels in (*Prunus persica* L. batch ) in relation to fruit growth and development [J]. Acta Horti-culturae, 1989, 239: 387-395.

[15] Masia A, Zan C A, Rascio N. Some biochemical and ultra-structural aspects of peach fruit development [J]. J Amer Soc Hort Sci, 1992, 117: 808-815.