

浙江省柿树种质资源亲缘关系鉴定

程诗明¹, 童敏², 梁君瑛^{1*}, 应尚蛟³, 康志雄⁴,

胡真明⁵, 陈友吾¹, 叶长飞⁶

(1. 浙江省林业科学研究院, 浙江 杭州 310023; 2. 浙江省海宁市林业技术服务站, 浙江 海宁 314400;
3. 浙江省永康市林业局, 浙江 永康 321300; 4. 浙江省林业厅, 浙江 杭州 310020;
5. 浙江省永康市舟山镇人民政府, 浙江 永康 321300; 6. 浙江省云和县林业局, 浙江 云和 323600)

摘要: 采用表型性状分析结合 RAPD 技术对 9 个浙江省优良农家柿树品种 40 个单株进行分析, 从形态学和遗传学两方面说明其遗传变异特征和本质, 表型形状聚类结果表明, 以 1.5 的相似系数值作为划分标准, 可以将 9 个品种划分为 2 类; 利用 RAPD 相似系数矩阵按 UPGMA 进行聚类分析, 其结果与表型形状聚类结果基本一致。

关键词: 柿; 种质资源; 表型性状; RAPD

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

Identification of Cultivars of *Diospyros kaki* in Zhejiang by Phenotypic Characters and RADP

CHENG Shi-ming¹, TONG Min², LIANG Jun-ying¹, YING Shang-jiao³, KANG Zhi-xiong⁴,
HU Zhen-ming⁵, CHEN You-wu¹, YE Chang-fei⁶

(1. Zhejiang Forestry Academy, Hangzhou 310023, China; 2. Haining Forestry Station of Zhejiang, Haining 314400, China; 3. Yongkang Forestry Bureau of Zhejiang, Yongkang 321300, China; 4. Zhejiang Forestry Department, Hangzhou 310020, China; 5. Yongkang Zhoushan Township Government of Zhejiang, Yongkang 321300, China; 6. Yunhe Forestry Bureau of Zhejiang, Yunhe 323600, China)

Abstract: 40 *Diospyros kaki* trees of 9 cultivars were selected in Zhejiang province for analyzing their genetic relationship by phenotypic character and RAPD. Cluster analysis on phenotypic characters resulted that 9 cultivars could be divided into two groups when similarity coefficient was 1.5. UPGMA on similarity coefficient matrix of RAPD had similar result with cluster analysis.

Key words: *Diospyros kaki*; germplasm resources; phenotypic diversity; RAPD

柿 (*Diospyros kaki*) 为柿科 (Ebenaceae) 柿属 (*Diospyros*) 植物, 落叶乔木, 果实具有较高的营养价值, 且经济效益高、寿命长。浙江省是柿树栽培大省, 柿的栽培历史久、分布范围大, 柿树资源丰富, 但柿树种内变异极为丰富, 芽变品种多, 在长期引种和栽培过程中, 同物异名和同名异物现象严重, 品种间的亲缘关系不甚明了, 严重影响了柿优良品种的推广、育种亲本的选配和栽培适地的选择^[1~3]。传统的鉴别方法存在一定的局

收稿日期: 2015-02-21; 修回日期: 2015-06-25

基金项目: 浙江省果品农业新品种选育重点项目 (2012C12904-10); 浙江省科研院所专项 (2012F-20012); 浙江省森林食品研究所重点实验室 (2011F10069); 2014 年度国家林木 (含竹藤花卉) 种质资源平台浙江分平台

作者简介: 程诗明 (1975-), 男, 安徽安庆人, 副研究员, 博士, 从事林木遗传育种研究; *通讯作者。

限性，分辨率不高。

品种（系）鉴定与分类是DNA分子标记应用最早的领域之一。DNA分子标记技术直接从DNA分子水平上对果树品种（系）进行鉴定和分类，具有不受环境、取样部位和发育阶段的影响，检出的多态位点是无限的优点，较之根据形态学、园艺学和生理学特征进行分类鉴定的方法，准确性更强，效率更高，信息量更大，近几年已得到广泛应用。其中，RAPD（Random Amplified Polymorphic DNA）即随机扩增多态DNA技术，是建立在聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction, PCR）技术基础上、继限制性片断长度多态性（Restriction Fragment Length Polimorphism, RFLP）标记技术之后发展起来的一种DNA多态标记技术，它无需预先知道基因组序列，无需使用同位素或其他放射性标记，在病原微生物的分型鉴定、物种的亲缘关系分析、遗传育种研究和特异表达基因的克隆与鉴定等诸方面得到了迅速而广泛的应用^[4-5]。根据近几年的研究统计，采用RAPD技术对果树品种鉴定的树种已涉及无花果、香蕉、杏、柑橘、柿、葡萄、苹果梨、梅、板栗、油橄榄、龙眼、核桃、枣等^[6-11]。

本研究采用形态指标观察、描述、测定的方法，结合 RAPD 技术对 9 个浙江省优良农家柿树品种/类型 40 个个体的形态特征和 RAPD 扩增带进行了研究，从形态学和遗传学两方面说明其遗传变异特征和本质，为浙江省柿树品种/类型的鉴定提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

在收集浙江省柿树种质资源分布资料和实地勘察的基础上，于 2006 年选择了 9 个浙江省农家柿树品种/类型，40 个单株进行采样。分别为：淳安千岛湖无核柿（QD）6 个优良单株、兰溪大红柿（LX）5 个优良单株、永康方山柿（YK）5 个优良单株、永康柿枣（YK6）1 株、天台朱红柿砧木（TT1）1 株、天台朱红柿（TT）3 个优良单株、永嘉东皋柿（DG）6 个优良单株、玉环长柿（YH）7 个优良单株、杭州蒋村扁花柿（JC）6 个优良单株（表 1）。

表 1 实验材料
Table 1 Experimental materials

来源	表型测定分析（33 个单株）	RAPD 分析（40 个单株）
千岛湖（QD）	QD1、QD2、QD3、QD4、QD5、QD6、QD7	QD1、QD2、QD3、QD4、QD6、QD7
兰溪（LX）	LX1、LX2、LX3、LX4、LX5	LX1、LX2、LX3、LX4、LX5
永康（YK）	YK1、YK2、YK3、YK4、YK5、YK6	YK1、YK2、YK3、YK4、YK5、YK6
天台（TT）	TT1、TT2、TT3、TT4	TT1、TT2、TT3、TT4
玉环（YH）	YH1、YH2、YH3、YH4、YH5、YH6、YH7	YH1、YH2、YH3、YH4、YH5、YH6、YH7
永嘉东皋（DG）	DG1、DG2、DG3、DG4	DG1、DG2、DG3、DG4、DG5、DG6
杭州蒋村（JC）		JC1、JC2、JC3、JC4、JC5、JC6

在每个优良单株东、南、西、北 4 个方向的中、上部随机采取 5 ~ 8 个果实；随机采集成熟叶片不少于 30 片，压制成标本，带回实验室立即进行测量。

采集秋稍徒长枝上的叶片和树冠外围生长健壮、无病虫害枝条上刚展开的幼枝，放入冰盒带回实验室，于 - 20℃低温保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 形态鉴定

1.2.1.1 表型性状测定 主要选择相对稳定、比较容易测量的表型性状 8 个，分别为叶片长、叶片宽、叶柄长、果实长、果实宽、果柄长、单果重、果体积。根据叶片长、宽与果实长、宽分别计算出叶片长宽比和果实长宽比。

叶片宽、叶柄长、果柄长用直尺测定，测量精度为 0.1 cm；果实长、果实宽用游标卡尺测定，测量精度为 0.1 mm；单果重用电子天平测定，测量精度为 0.01 g；果体积用等体积转化法（等体积转换法是根据被测物密度不小于水的特点用大量器盛满水，将被测物放入盛满水的大量器，用量器测量溢出水的体积即为被测物的体积）测定，测量精度为 0.1 cm³。

1.2.1.2 数据分析 应用 SAS7.0 进行方差分析及聚类分析。

1.2.2 分子标记 RAPD 鉴定

1.2.2.1 DNA的提取和纯化 采用改良的SDS-CTAB法^[12-13]提取样品DNA, 纯化采用MagaZorb试剂盒。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 自动凝胶成像系统 (BIO-RAD) 观察拍照, 并用紫外分光光度计测定DNA样品的浓度。

1.2.2.2 引物的筛选 实验所用的 RAPD 随机引物购自上海生工生物公司。引物的筛选首先是用两个柿树 DNA 模板对 200 条寡核苷酸引物进行第 1 次筛选, 选出有扩增带且谱带清晰的引物。然后再进行第 2 次筛选, 最后选出多态性强、扩增条带清晰的引物用于样品 RAPD 分析。

1.2.2.3 RAPD-PCR反应体系优化设计 参照Martins等的方法^[14]并略加修改, 最终反应体系为 20 μ L, 包括 51 ngDNA模板, 25 mol/L $MgCl_2$, 200 μ mol/LNTP, 0.5 μ mol/L Primer, 1.0U (5U/ μ L) Tap聚合酶。最佳扩增反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 36 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用自动凝胶成像系统 (BIO-RAD) 观察拍照。

1.2.2.4 RAPD-PCR 电泳结果的记录 通过一系列 RAPD 基本程序的操作后, 即得到 RAPD 谱带, 对谱带进行分析。为了便于对 RAPD 电泳结果进行分析, 需将 RAPD 标记的结果 (即谱带) 转换成数字形式。对于 RAPD 标记, 只记录具有多态的谱带, 对于扩增条带的有或无, 一般认为强反应带和重复出现的弱带应记为“1”, 而不重复出现的弱带和没有条带的记为“0”, 模糊不清或无扩增产物即缺失时记录为“-”, 按此方法记录即可得到 RAPD 反应的原始数据。

1.2.2.5 分析方法 在计算机上用Gel-pro 32 analyzer软件处理所有的RAPD产物电泳带谱, 把带的有无记录转化为二元数据矩阵, 经NTSYS-pc (Applied Biostatistics Inc. 2.1) 程序计算, 得出UPGMA聚类分析结果^[15]。

2 结果与分析

2.1 供试材料形态学鉴定结果

采集淳安千岛湖无核柿 (QD)、兰溪大红柿 (LX)、永康方山柿 (YK)、永康柿枣 (YK)、天台朱红柿 (TT)、红朱柿砧木 (TT1)、永嘉东皋柿 (DG)、玉环长柿 (YH), 共 40 个单株的种实等试材, 果实颜色、形状、果核平均数见表 2。

表 2 果实颜色、形状、单果果核数
Table 2 Colour, shape and seeds of persimmons collected from Zhejiang province

性状	QD	LX	YK	TT	DG	YH
果实颜色	橙红色	橙红色	橙黄色	橙红色	橙黄色	橙红色
果实形状	长圆形、果柄端粗	扁圆形	扁圆形	扁圆形	长圆形、尾端尖	长圆形、尾端凹
单果果核数/个	1.3	4.3	1.8	1.8	1.7	0.6

果实颜色上, QD、LX、TT 和 YY 颜色为橙红色, YK 和 DG 颜色为橙黄色; 果实形状上, QD、DG 和 YY 形状为长圆形, LX、YK 和 TT 形状类似为扁圆形; 从果核来看, YH 最少平均 0.6 个, 试验中发现个别单株基本无核或仅有 1 核, QD 称为“无核柿”, 相对 YH 还是较多, 平均为 1.3 个, YK、TT 和 DG 平均果核数接近, 分别为 1.8 个、1.8 个和 1.7 个, LX 平均果核最多为 4.3 个。

对采集的浙江优良柿树单株的叶长、叶宽、叶长宽比、叶柄长、果长、果宽、果长宽比、果柄长、果体积、果质量、果密度、可溶性固形物、蛋白质、可溶性总糖等 14 个性状进行聚类分析, 结果如图 1。

在图 1 中, 以 1.5 的相似系数值作为划分标准, 可将供试柿树单株划分为 2 大类, 即 QD6、TT1 和 YK6 为一类, 其余的归为一类。

以 1.0 的相似系数值作为划分标准, 可将供试柿树单株划分为如下 5 组:

第 1 组: YK6; 第 2 组: TT1; 第 3 组: DG6; 第 4 组: DG4、DG3、DG2、DG1; 第 5 组: YH4、TT3、TT2、YK5、YH7、YH6、YH5、YH2、YH1、YH3、TT4、YK2、YK4、YK3、YK1、LX4、LX3、LX5、LX2、LX1、QD5、QD3、QD4、QD2、QD7、QD1。

以 0.5 的相似系数值作为划分标准, 可将供试柿树单株划分为 17 组: 第 1 组: YK6; 第 2 组: TT1; 第 3

组: DG6; 第 4 组: DG4;
第 5 组: DG3; 第 6 组: DG2、
DG1; 第 7 组: YH4; 第 8
组: TT3; 第 9 组: TT2; 第
10 组: YK5; 第 11 组: YH7、
YH6; 第 12 组: YH5、YH2、
YH1; 第 13 组: YH3、TT4;
第 14 组: YK2、YK4、YK3、
YK1; 第 15 组: LX4; 第 16
组: LX3、LX5、LX2、LX1;
第 17 组: QD5、QD3、QD4、
QD2、QD7、QD1。

2.2 供试材料 RAPD 鉴定结果

为了解浙江农家柿树供试品种/类型不同基因型之间的遗传关系, 利用 RAPD 相似系数矩阵按 UPGMA 方法进行了聚类分析, 构建了浙江优良农家柿树各单株基因型间的亲缘关系树状图, 如图 2。

在图 2 中, 以 0.70 的相似系数值作为划分标准, 可将 40 个供试柿树单株划分为 2 大类, 即 YK6 为一类, 其余的 39 个单株归为一类。

以 0.28 的相似系数值作为划分标准, 可将供试 40 个柿树单株划分为如下 3 组: YK6 为一组, QD6 和 QD7 为一组, 其他为一组。

以 0.20 的相似系数值作为划分标准, 可将供试 40 个柿树单株划分为如下 6 组:

第 1 组: QD1、QD2、QD3、QD4、YH1、YH2、YH3、YH4、YH6、YH7、YH5; 第 2 组: TT1、TT2、TT3、TT4; 第 3 组: QD6、QD7; 第 4 组: YK1、YK5、YK2、YK3、YK4、LX1、LX2、LX3、LX4、LX5、JC1、JC3、JC6、JC5、JC2、JC4; 第 5 组: DG1、DG2、DG4、DG5、DG6、DG3; 第 6 组: YK6。

以 0.072 的相似系数值作为划分标准, 可将供试 40 个柿树单株划分为如下 11 组:

第 1 组: QD1、QD2、QD3、QD4; 第 2 组: YH1、YH2、YH3、YH4、YH6、YH7、YH5; 第 3 组: TT1、TT2、TT3、TT4; 第 4 组: QD6; 第 5 组: QD7; 第 6 组: YK1、YK5、YK2、YK3、YK4; 第 7 组: LX1、LX2、LX3、LX4、LX5; 第 8 组: JC1、JC3、JC6、JC5、JC2、JC4; 第 9 组: DG1、DG2、DG4、DG5、DG6; 第 10 组: DG3; 第 11 组: YK6。

聚类结果表明, 根据筛选出的 16 条随机引物构建的指纹图谱带型, 能将 40 个浙江柿树单

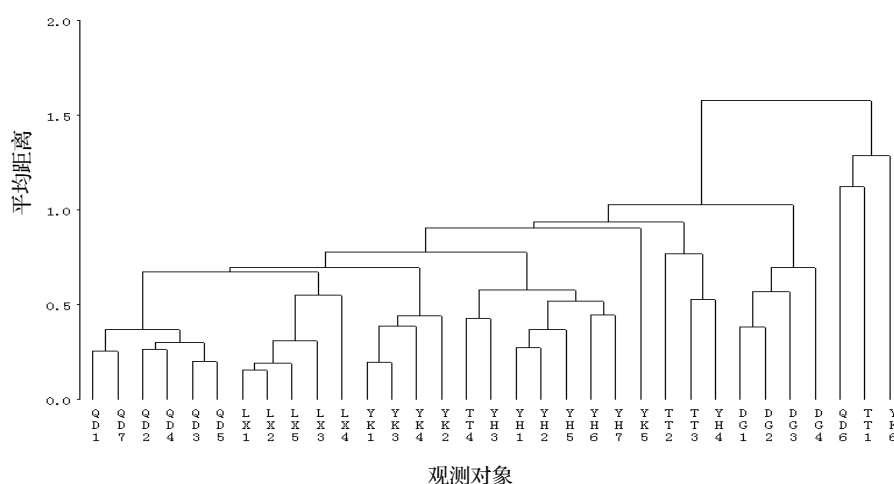


图 1 浙江省柿树各表型性状及内含物聚类图

Figure 1 Dendrogram by morphological traits of cultivars of *D. kaki* in Zhejiang

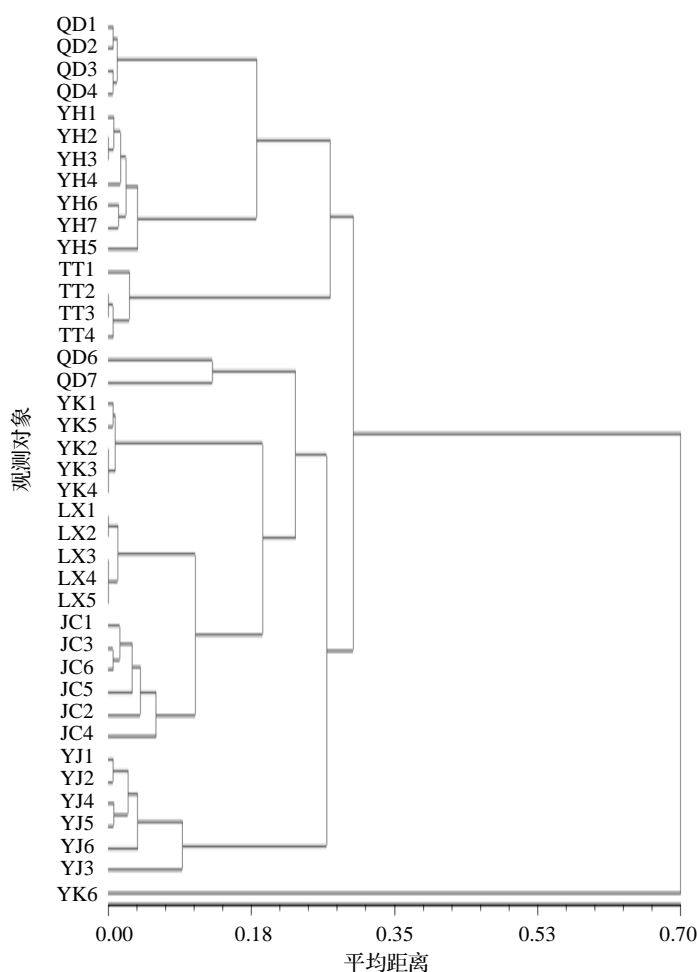


图 2 供试浙江柿树单株 UPGMA 聚类树状图

Figure 2 UPGMA dendrogram for single tree of collected cultivars

株按其亲缘关系进行聚类, 说明用这些条带作为品种/类型鉴别的依据是可靠的。

3 结论与讨论

形态学鉴定具有直观、具体、简单易行的特点, 且试验成本较低, 当具备某些具体特异识别性状时, 可靠性高, 鉴定较容易。RAPD 标记具有数量多、多态性高、遗传稳定, 不受栽培条件、环境变化、组织器官、发育阶段影响等特点, 具有更高的稳定性和可靠性, 且实验材料用量少, 快速简便。本实验综合应用形态学和 RAPD 技术两种方法鉴定了浙江省优良农家柿树种质资源, 结果基本一致, 比较可靠。

(1) 由表型性状聚类结果可知, 以 1.5 的相似系数值作为划分标准, QD6、TT1 和 YK6 聚为一类, 其余聚为一类, 说明 QD6、TT1 和 YK6 亲缘关系较近; 而从果实颜色分析, 品种/类型千岛湖无核柿和天台朱红柿也比较接近; 果核平均数上品种/类型永康方山柿和天台朱红柿也较接近。以 1.0 的相似系数值作为划分标准, 供试材料划分为 5 组, QD6、TT1 和 YK6 分别单独聚为一类, 其他基本按照品种/类型聚在一起。调查中发现 QD6 无论从叶形还是果形都明显区别于千岛湖无核柿的其他单株; TT1 是柿本砧; YK6 是柿枣, 果形小如大枣、长条形与其他单株差别明显, 与聚类结果相吻合。

(2) 耦合分析表型与分子 RAPD-PCR 鉴定结果基本吻合, QD6、TT1 和 YK6 和其他供试材料差异较大, 亲缘关系较远, 其他基本按照品种/类型聚在一起。

但表型鉴定中 QD6、TT1 和 YK6 亲缘关系较近的结论, 在分子 RAPD-PCR 鉴定中没有表现出来, 关于对浙江柿树种质进一步分类和浙江柿树资源在全国乃至全世界所占的重要地位有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 胡青素, 龚榜初, 谭晓风, 等. 柿子的应用价值及发展前景[J]. 湖南农业科学, 2010 (1): 103-106
- [2] 程诗明, 童敏, 康志雄, 等. 浙江柿树种质资源遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15 (3): 668-672.
- [3] 赵献明. 浙江省农家柿品种资源多样性及分类研究[M]. 北京: 中国林业科学研究院, 2012
- [4] 刘纯杰, 张兆山. 任意引物 PCR 及其应用研究进展[J]. 生物技术通讯, 2003 (14): 320-323.
- [5] 顾万春, 王琪, 游应天, 等. 森林资源遗传学概论[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1996.
- [6] 罗正荣, 米森敬三. 应用 RAPD 技术研究柿品种间的亲缘关系[J]. 果树科学, 1998 (15): 311-316.
- [7] 张立平, 林伯年, 沈德绪. 葡萄属 RAPD 分类研究[J]. 园艺学报, 1998 (25): 191-193.
- [8] Graham J, McNicol R J, McNicol J W. A comparison of methods for the estimation of genetic diversity in strawberry cultivars[J]. Theor Appl Genet, 1996, 93 (3): 402-406.
- [9] Botta R, Akkac A, Me G, et al. Identification of pear cultivars by molecular markers[J]. ISHS Acta Hort, 1998 (457): 63-70.
- [10] 沈向, 郑学勤. 杏 43 个品种资源的 RAPD 分类[J]. 园艺学报, 2000 (27): 55-56.
- [11] Fabbri. A, Hormaza J I, Polito V S. Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea*) cultivars[J]. J Am Soc Hort Sci, 1995, 120 (3): 538-542.
- [12] 程中平, 陈志伟. 油桃品种的 RAPD 分析[J]. 中国农业大学学报, 2002 (7): 63-68.
- [13] 刘小勇, 田素忠, 秦国夫, 等. 提取植物和微生物 DNA 的 SDS-CATB 改进方法[J]. 北京林业大学学报, 1997, 19 (3): 100-103.
- [14] Martins M, Tenreiro R, Oliveira M M. Genetic relatedness of Portuguese almond cultivars assessed by RAPD and ISSR markers[J]. Plant Cell Rep, 2003 (22): 71-78.
- [15] Apostol B L, Black W C, Reiter P, et al. Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico[J]. Heredity, 1996, 76 (4): 325-334.