

卵圆型软条白沙枇杷变异种质鉴定研究

陈方永¹, 谢丽雪², 倪海枝¹, 王 引¹, 洪 婷³, 任正初¹

(¹浙江省柑橘研究所, 黄岩 318020; ²福建省农业科学院果树研究所, 福州 350013; ³浙江省台州市路桥区林特总站, 台州 318050)

摘要:本研究以卵圆型软条白沙枇杷变异种质为试材, 母株软条白沙及中国、日本、新西兰 3 个国家的 30 个白肉枇杷栽培品种为对照, 以形态学性状调查为基础, 结合 SRAP 分子标记对变异种质进行鉴定研究。从 96 对引物中筛选出 18 对进行扩增, 共获得 135 个位点, 其中 102 个多态性位点, 多态性位点百分率为 75.6%。不同品种间的遗传相似系数 GS 在 0.53~0.89 之间。在 GS 为 0.66 处, 可将 31 份枇杷种质分为 4 类。第 I 类为来自中国浙江的 8 份种质。第 II 类为来自日本、新西兰和中国江苏和福建的 19 个种质。第 III 类为上海白沙和广西白蜜枇杷 2 个种质。第 IV 类为福建白梨和龙才白 2 个种质。而卵圆型软条白沙与对照品种遗传相似系数为 0.55~0.88, 与白荔枝的遗传相似度最大 ($GS=0.88$), 与乌躬白遗传相似度最小 ($GS=0.55$), 与母株软条白沙的遗传相似系数仅为 0.73, 二者的遗传相似度不大。生物学性状调查表明, 卵圆型软条白沙变异材料与母株软条白沙在果型、种子数和可食率等性状上具有明显差异。综合研究结果显示, 卵圆形软条白沙与母株软条白沙相比, 综合性状发生了明显的遗传变异, 应属芽变种质材料。本研究对枇杷变异材料的创新利用、新品种审定与知识产权保护具有重要的实际意义。

关键词: 白肉枇杷; SRAP; 遗传多样性; 亲缘关系

Identification of Egg-shaped Ruantiao Baisha Loquat Mutant Germplasm

CHEN Fang-yong¹, XIE Li-xue², NI Hai-zhi¹, WANG Yin¹, HONG Ting³, REN Zheng-chu¹

(¹ Citrus Institute of Zhejiang Province, Huangyan 318020;

² Fruit Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013;

³ Forest and Special Plant Station of Luqiao District, Taizhou City in Zhejiang Province, Taizhou 318050)

Abstract: Egg-shaped ruantiao baisha mutant and 30 loquat germplasms from China, Japan and New Zealand were used as plant material and contrast, respectively in this paper. Identification of the mutant germplasm were constructed with SRAP molecular marker based on the morphological investigation. 18 pairs of primers were selected from 96 pairs of SRAP primers. Finally, 135 loci were detected, of which 102 were polymorphic and the polymorphic percentage was 75.6%. The genetic similarity ranged from 0.53~0.89. 31 white pulp loquat germplasms were divided into four groups at the similar coefficient of 0.65. The loquat germplasms came from Zhejiang province were clustered together into the first group. The second group contained 19 germplasms which came from China, Japan, and New Zealand. The third group included Shanghai baisha and Guangxin bami. The fourth group included Bailizhi and Longcai bai. The genetic simlity between egg-shaped ruantiao baisha and the other contrasted germplasms ranged from 0.55 to 0.88. It had the maximum GS with Bailizhi ($GS=0.88$), and minimun GS with Wugongbai ($GS=0.55$), while the GS between egg-shaped ruantiao baisha and ruantiao baisha was only 0.73. Study of biological characters showed that egg-shaped ruantiao baisha and ruantiao baisha had significant differences among fruit shape, seed number, and edible rate. As the comprehensive results, the egg-shaped ruantiao baisha had significant genetic variation with ruantiao baisha loquat, and it should be a mutant germplasm. The study would be of great practical significance to new varieties innovation and protection of intellectual property rights for loquat mutant

收稿日期: 2014-01-29 修回日期: 2014-03-05 网络出版日期: 2014-07-02

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20140702.1330.001.html>

基金项目: 浙江省林业厅(浙林计 2010, 第 87 号); 福建省自然科学基金(2012J01101)

第一作者研究方向为枇杷遗传育种与有机生态栽培技术。E-mail: cfy17266@126.com; 谢丽雪为共同第一作者

germplasm.

Key words: white pulp loquat; SRAP; genetic diversity; genetic relationship

枇杷 (*Eriobotrya japonica* Lindl.) 原产于中国,栽培历史悠久,是中国亚热带地区的珍稀特产水果,具有较高的经济、生态价值。根据果肉颜色可分为红肉枇杷和白肉枇杷。白肉枇杷是枇杷属中目前经济效益最高的品种,具有皮薄、肉质细腻、清甜、风味浓等特点,深受广大消费者的青睐^[1]。白肉枇杷品种多样,在长期的进化过程中形成了丰富的遗传多样性,但种质创新是一个永恒的课题,而种质是否遗传变异需形态学与分子生物学等技术的综合鉴定。目前,对于果树的种质资源与遗传鉴定方法较多,用于枇杷分子标记研究的主要有 AFLP^[2]、RAPD^[3]、ISSR^[4]、SSR^[5]、SRAP^[6]、SCOT^[7]等。SRAP 标记是利用开放阅读框 ORF 的外显子富含 GC 内含子和启动子富含 AT 序列,设计正反向引物对不同个体或物种的开放阅读框进行扩增,不同个体或物种因外显子、内含子或启动子序列长度不同而产生多态性^[8]。该标记具有操作简单、高共显性、高重复性、易于分离条带及测序等优点,适合进行植物遗传多样性研究、种质鉴定和遗传连锁图谱构建等诸多领域^[9-10]。本研究拟对浙江省卵圆型白沙变异材料与其他 30 个白肉枇杷种质资源的生物学性状与遗传

关系进行比较研究,以区别种质确定亲缘关系。卵圆型白沙枇杷源自本课题组 35 年生软条白沙变异材料,2003 年作者观察到该变异枝种质果形变异现象,经嫁接扩繁后,于 2008 年开始定期记载物候期等生物学特性,并将其与其他种质进行对照试验。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试的 31 份枇杷种质嫩叶 本研究以浙江省柑橘研究所枇杷种质资源圃里收集的卵圆型软条白沙、软条白沙、溪上白沙、院桥白沙、槐梵白沙、白荔枝、太平白沙枇杷共 7 份材料以及福建福州国家枇杷种质资源圃 24 份白肉枇杷种质资源为研究对象(表 1)。取各种质嫩叶的叶尖部位作为研究试材。

1.1.2 浙江 7 个枇杷种质的成年叶与成熟果实 为便于比较浙江枇杷种质资源的变异情况,对浙江省柑橘研究所枇杷种质资源圃里 7 份材料的成年叶和成熟果实进行采集。各个种质随机采集 5 株,每株分别随机选取 20 片成年叶和 20 个成熟果实作为研究试材。

表 1 供试枇杷材料

Table 1 Loquat materials in the experiment

编号 Code	材料名称 Name	原产地 Origin	采集地 Locality	编号 Code	材料名称 Name	原产地 Origin	采集地 Locality
1	太平白沙	浙江	浙江	17	白梨	福建	福建
2	槐梵白沙	浙江	浙江	18	尖咀白	福建	福建
3	溪上白沙	浙江	浙江	19	太城白蜜	福建	福建
4	院桥白沙	浙江	浙江	20	霞楼白蜜	福建	福建
5	软条白沙	浙江	浙江	21	宝元白	福建	福建
6	卵圆型软条白沙	浙江	浙江	22	白钟	福建	福建
7	白荔枝	浙江	浙江	23	白蜜枇杷	广西	福建
8	宁海白	浙江	福建	24	白波罗	福建	福建
9	湖南白沙	湖南	福建	25	白枇杷	福建	福建
10	贵妃	福建	福建	26	坑尾白	福建	福建
11	黄蜜	福建	福建	27	清白	福建	福建
12	新白 8 号	福建	福建	28	仙游白沙	福建	福建
13	冠玉	江苏	福建	29	龙才白	福建	福建
14	白玉	江苏	福建	30	新西兰白肉	新西兰	福建
15	乌躬白	福建	福建	31	白茂木	日本	福建
16	上海白沙	上海	福建				

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取与检测 采用刘月学等^[11]改良的 CTAB 法提取叶片总 DNA。使用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性;使用紫外分光光度计测定 OD260 与 OD280,检测 DNA 纯度与浓度。

1.2.2 SRAP 扩增反应体系 SRAP 引物采用乔燕春等^[6]发表的 6 个正向引物和 16 个反向引物(表 2)。正反向引物两两组合成 96 个引物组合,引物由上海英骏生物技术有限公司合成。总反应体积

25 μ L : 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ L, *Taq* 酶 (5 U/L) 0.2 μ L, dNTPs (2.0 mmol/L) 2.0 μ L, 引物 (10 μ mol/L) 1.0 μ L, DNA 模板 (50 ng/L) 1.0 μ L, MgCl₂ (25mmol/L) 1.5 μ L, ddH₂O 补足 25 μ L。反应程序 :95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 40 s,35 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,5 个循环;95 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min,4 $^{\circ}$ C 终止反应。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,并在凝胶成像仪中拍照记录。

表 2 18 对 SRAP 引物及其扩增结果

Table 2 The sequences and amplified results of 18 SRAP primers

引物名称 Primer name	正向引物序列 (5'-3') Positive primer sequence	反向引物序列 (5'-3') Reversed primer sequence	扩增位点数 Amplified loci	多态性位点数 Polymorphic loci
Me1-em3	TGAGTCCAAACCGGATA	GACTGCGTACGAATTGAC	10	8
Me1-em4	TGAGTCCAAACCGGATA	GACTGCGTACGAATTGA	8	6
Me1-em5	TGAGTCCAAACCGGATA	GACTGCGTACGAATTAAC	8	6
Me1-em6	TGAGTCCAAACCGGATAT	GACTGCGTACGAATTGCA	10	4
Me4-em4	TGAGTCCAAACCGGACC	GACTGCGTACGAATTGA	8	6
Me4-em5	TGAGTCCAAACCGGACC	GACTGCGTACGAATTAAC	6	3
Me5-em3	TGAGTCCAAACCGGACC	GACTGCGTACGAATTGAC	7	6
Me2-em5	TGAGTCCAAACCGGAGC	GACTGCGTACGAATTAAC	8	7
Me2-em4	TGAGTCCAAACCGGAGC	GACTGCGTACGAATTGA	5	4
Me3-em5	TGAGTCCAAACCGGAAT	GACTGCGTACGAATTAAC	5	5
Me1-em7	TGAGTCCAAACCGGATA	GACTGCGTACGAATTGAG	10	7
Me1-em15	TGAGTCCAAACCGGATA	GACTGCGTACGAATTGAT	6	5
Me5-em5	TGAGTCCAAACCGGACC	GACTGCGTACGAATTAAC	8	7
Me5-em13	TGAGTCCAAACCGGACC	GACTGCGTACGAATTCTG	6	4
Me6-em6	TGAGTCCTTTCCGGTAA	GACTGCGTACGAATTGCA	7	4
Me6-em12	TGAGTCCTTTCCGGTAA	GACTGCGTACGAATTCTA	8	7
Me6-em3	TGAGTCCTTTCCGGTAA	GACTGCGTACGAATTGAC	8	7
Me6-em2	TGAGTCCTTTCCGGTAA	GACTGCGTACGAATTTGC	7	6
总数 Total			135	102

1.2.3 数据统计与分析 将稳定出现条带的有无量化为 1 和 0,构建 0/1 矩阵。采用 NTSYS-PC 2.0 分析软件利用 UPGMA 法进行聚类分析并构建进化树。采用 SAS 软件,按照邓肯氏差异分析方法进行统计分析。

2 结果与分析

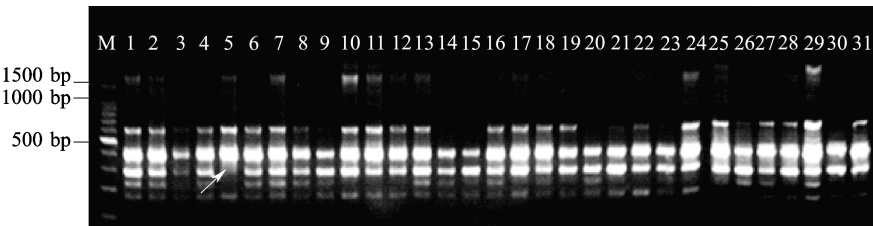
2.1 SRAP-PCR 反应结果

从 96 对 SRAP 引物组合中筛选出 18 对条带清晰、重复性好、多态性高的 SRAP 引物进行扩增(表

2)。18 对 SRAP 引物共扩增出 135 个位点,其中多态性位点有 102 个,平均多态率为 75.6%。不同引物组合产生的多态性条带数为 3 ~ 8 个,平均 5.7 个。引物 Me1-em3 获得的多态性条带最多,有 8 个;引物 Me4-em5 获得的多态性条带最少,为 3 个。31 份枇杷材料的平均遗传相似系数变幅为 0.53 ~ 0.89。黄蜜和新白 8 号的遗传相似性最大,GS = 0.89,表明二者遗传相似度高,且与贵妃均为实生群体中筛选出的枇杷优株,具有相同的遗传背景,亲缘关系相近;亲缘关系最远的为福建白梨和广西白蜜

枇杷,遗传相似系数为 0.53,遗传差异较大。作为重点研究对象,卵圆形软条白沙与对照相似系数处于 0.55~0.88 之间,与白荔枝的遗传相似度最大($GS = 0.88$),与乌躬白遗传相似度最小($GS =$

0.55),与母株软条白沙的相似系数仅为 0.73,二者的遗传相似度不大。图 1 为引物 Me5-em13 扩增的电泳图。



M:100 bp marker;1~31:样品名称参见表 1;箭头所指的为卵圆型软条白沙与软条白沙的差异位点
M:100 bp marker,1-31:Samples name correspond to table1,Arrow showed the different loci between egg-shaped ruantiao baisha and ruantiao baisha

图 1 引物 Me5-em13 对 31 份白沙枇杷种质的 SRAP 电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis pattern amplified from 31 white pulp loquat germplasm resources with primer Me5-em13

2.2 白肉枇杷聚类分析

采用 NTSYS-PC 2.0 分析软件对获得的 SRAP 数据进行分析,获得 31 份枇杷的遗传相似系数及亲缘关系聚类图(表 3、图 2)。在遗传相似系数 0.66 处,可将 31 份枇杷种质分为 4 类。第 I 类包括太平白沙、软条白沙、槐梵白沙、溪上白沙、院桥白沙、卵圆型软条白沙、白荔枝和宁海白。这 8 份枇杷资源均为浙江品种,除了宁海白采集于福建福州国家枇杷种质资源圃外,其余均采集于浙江枇杷资源圃。比较卵圆型软条白沙与其他 7 份浙江白沙枇杷的遗传相似性,结果显示,卵圆型软条白沙与白荔枝的遗传相似性最高($GS = 0.88$),与母株软条白沙和太平白沙的遗传相似性最低($GS = 0.73$),应属软条白沙的芽变种质。白荔枝和宁海白的遗传相似系数高达 0.88,二者叶片和果实形态极其相似,可能为同物异

名。第 II 类为来自日本、新西兰和中国江苏和福建的 19 个种质。第 III 类为上海白沙和广西白蜜枇杷 2 个种质。第 IV 类为福建白梨和龙才白 2 个种质。

亲缘关系聚类图体现一定的生态区划特征,但不完全与地理来源相符合。第 I 和 IV 类中枇杷有明显的地理来源相关性。第 II 类的枇杷种质资源来源地广,不同来源地的白肉枇杷存在一定的交叉。如福建的大部分白肉枇杷,江苏的白玉和冠玉,日本的白茂木和来自新西兰的新西兰白沙。地理来源相关性总体不大,但仍有一定的相关性,如从实生群体中筛选出的福建枇杷优株贵妃、黄蜜和新白 8 号因遗传相似系数高而在 0.82 处聚为一个亚类;江苏的白玉和冠玉二者遗传系数为 0.86,二者在 0.84 聚为一个亚类。

表 3 8 份浙江枇杷的遗传相似系数

Table 3 The genetic similarity coefficient of 8 loquat germplasm resources in Zhejiang province

遗传相似系数 Genetic similarity	太平白沙 TPB	槐梵白沙 HFB	溪上白沙 XSB	院桥白沙 YQB	软条白沙 RTB	卵圆型软条白沙 E-s RTB	白荔枝 BLZ	宁海白 NHB
太平白沙	1.00							
槐梵白沙	0.72	1.00						
溪上白沙	0.65	0.88	1.00					
软条白沙	0.78	0.83	0.78	1.00				
院桥白沙	0.77	0.79	0.74	0.78	1.00			
卵圆型软条白沙	0.73	0.85	0.80	0.74	0.73	1.00		
白荔枝	0.78	0.87	0.80	0.77	0.78	0.88	1.00	
宁海白	0.76	0.76	0.71	0.70	0.71	0.85	0.88	1.00

TPB:Taiping baisha,HFB:Huaifan baisha,XSB:Xishang baisha,YQB:Yuanqiao baisha,RTB:Ruantiao baisha,E-s RTB:Egg-shaped ruantiao baisha,BLZ:Bailizhi,NHB:Ninghaibai. The same as below

Fig. 3 Comparison of fruit shape and leaf of seven Loquat materials

3 讨论

本研究是以变异的卵圆型软条白沙为主要研究对象,以中国福建、江苏等省的 28 份和新西兰、日本的 2 份白肉枇杷种质为对照进行亲缘关系研究。其目的为了探讨变异的卵圆型软条白沙在遗传多样性方面与母株软条白沙及其他白肉枇杷的亲缘关系。果树种质之间的新品种鉴定和遗传多样性分析主要有表型和基因型 2 个层次。在基因型方面,卵圆型软条白沙与母株软条白沙的遗传相似性不高,GS 仅为 0.73;与白荔枝、宁海白、槐梵白沙遗传相似系数分别为 0.88、0.85、0.85,说明卵圆型软条白沙与白荔枝、宁海白、槐梵白沙的亲缘关系比与母本更亲近。宁海白是白荔枝的品种鉴定名,应属同物异名。这一点也可从徐鹏飞等^[12]、冯健君等^[13]在品种介绍时间接印证事实:宁海白亲本目前来历不详,但至少可以说明宁海白不是宁海当地白肉枇杷的变异品种。卵圆型软条白沙与槐梵白沙同属原黄岩县境内的种质,但二者的亲缘关系不明,有待进一步研究。在此基础上再结合表型方面的综合分析,卵圆型软条白沙其种子数少于 1.5 粒、总可溶性固形物含量在 14.9%、裂果腐烂率在 20% 以内,这些指标均优于其母株和白荔枝,同时,其光泽度、结果性能也明显好于对照。因此,可以认为卵圆型软条白沙较母株软条白沙已经发生明显变异,应属软条白沙的芽变种质。不过从二者之间的亲缘关系分析,引起基因突变的原因及突变位点,依靠现有的分子标记技术难以解释。基因水平上的差异,需要从转录组或表达谱水平上进行深入研究探索。C. Feng 等^[14]利用 RNA-Seq 技术对杨梅转录组进行测序,潘志勇^[15]利用基因组学技术准确鉴定广西暗柳脐橙芽变种质,均取得理想的结果,对此今后研究中可以借鉴。

分子标记技术在一定程度上能够揭示品种之间遗传相似性及亲缘关系,不同类型的分子标记结果表现出一定的相似性。聚类分析 31 份白肉枇杷的亲缘关系,大多数来源地相同的种质资源,遗传相似度较高,亲缘关系相近,但并不完全与地理来源相吻合,个别品种差异大,存在明显跨区域种质资源聚为

一类,如日本的白茂木和新西兰白沙与国内的品种聚为一类。这一结论与谢丽雪等^[16]利用 ISSR 分子标记对 24 份白肉枇杷种质资源的研究结果相类似。该研究结果为白肉枇杷亲缘关系与地理来源相关性不甚明显,但也存在明显来源地的种质资源聚为一类,如贵妃、黄蜜和新白 8 号。同一来源地的大多数品种遗传差异小而聚为一类可能是由于其具备相似的起源、生态环境或者是基因交流的区域性等因素造成的。部分不同来源地的品种聚为一类,可能是两地品种交流的历史原因或者引种后自然或人工选择造成基因的融合。

参考文献

- [1] 陈方永,吴才华,苏建,等. 白砂枇杷不同栽培条件生长结果研究初报[J]. 浙江农业科学,2008(2):159-161
- [2] 吴锦程,杨向晖,林顺权. 枇杷 AFLP 分析体系的建立与应用[J]. 果树学报,2006,23(5):774-778
- [3] 张晓莹,钱剑林,王化坤,等. 枇杷 RAPD 扩增产物的不同电泳检测及其序列特征分析[J]. 浙江农业学报,2010,22(5):570-575
- [4] 赵依杰,王江波,张小红,等. 枇杷 ISSR 扩增反应体系的优化[J]. 中国农学通报,2010,26(7):26-30
- [5] 何桥. 基于 SSR 标记的枇杷遗传多样性分析与品种鉴别[J]. 重庆:西南大学,2010
- [6] 乔燕春,林顺权,刘成明,等. SRAP 分析体系的优化及在枇杷种质资源上的应用[J]. 果树学报,2008,25(3):348-352
- [7] 韩国辉,汪卫星,向素琼,等. 多倍体枇杷 SCoT 分析体系的建立与优化[J]. 果树学报,2011,28(3):433-437
- [8] 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]. Theor Appl Genet,2001,103:455-461
- [9] 穆国俊,何丽君,李朋飞,等. 利用农艺性状和 SRAP 标记方法初步鉴定甘薯丰收白突变体[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(4):728-733
- [10] 赵秀娟,宋建文,胡开文,等. 苦瓜种质遗传多样性的 SRAP 标记分析[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(1):78-84
- [11] 刘月学,杨向晖,林顺权,等. 枇杷属植物基因组 DNA 提取方法的改进及应用[J]. 果树学报,2005,22(2):182-185
- [12] 徐鹏飞,徐莺. 中华名果——宁海白枇杷[J]. 科学种养,2012(12):1
- [13] 冯健君,王学德,刘权,等. 优质枇杷新品种‘宁海白’[J]. 园艺学报,2004,31(2):279
- [14] Feng C, Chen M, Xu C J, et al. Transcriptomic analysis of Chinese bayberry (*Myrica rubra*) fruit development and ripening using RNA-Seq[J]. BMC Genomics,2012,13:19
- [15] 潘志勇. 基于组学的甜橙红肉变异分子机理[D]. 武汉:华中农业大学,2012
- [16] 谢丽雪,许家辉,张立杰,等. 24 份白肉枇杷的 ISSR 分析[J]. 福建农业学报,2012,27(3):261-266