

67 份枇杷属种质资源遗传多样性的 SSR 分析^①

陈 志¹, 陈志友¹, 龙治坚², 韩国辉³,
党江波¹, 王 莹¹, 汪卫星¹, 李晓林¹,
孙海艳¹, 梁国鲁¹, 向素琼¹

1. 西南大学 园艺园林学院, 重庆 400716; 2. 西南科技大学 生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621010;
3. 重庆市农业科学院 果树研究所, 重庆 江津 402260

摘要: 利用从枇杷上开发的 SSR 引物对 67 份枇杷属种质资源进行了遗传多样性分析. 从 59 对引物中筛选出 17 对多态性较高且稳定的引物, 17 对引物共扩增出 53 条谱带, 每对引物扩增 2 至 6 条谱带, 平均扩增 3.12 条. 供试材料相似系数介于 0.53~1.00 之间, 平均多态信息含量(PIC)为 0.436, 平均观察等位基因数为 3.118, 平均有效等位基因数为 2.166, 平均 Nei's 基因多样性为 0.507, 平均 Shannon 信息指数为 0.821, 平均观测杂合度为 0.637, 平均期望杂合度为 0.511, 表明供试材料具较丰富的遗传多样性. 聚类分析表明, 可将 67 份材料分为 4 类, 野生品种和栽培品种在聚类结果中没有被区分开, 但是绝大多数是被区分开的. 栽培枇杷也没有因果肉颜色而分别聚类. 此外, 对野生枇杷和栽培枇杷中部分材料的分类作了探讨.

关 键 词: 枇杷; 种质资源; 遗传多样性; SSR

中图分类号: S667.3

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2014)8-0012-08

枇杷(*Eriobotrya japonica*)为蔷薇科苹果亚科(Rosaceae, subfamily Pomoideae)枇杷属(*Eriobotrya*)植物, 是我国南方特产的常绿果树^[1]. 主要在中国、西班牙、日本等国家和地区栽培, 巴西、美国等地也有部分栽培^[2]. 其种质资源极为丰富, 枇杷属植物大概有 30 个种, 原产于中国的包括种、变种、变型有 21 个^[3]. 一些研究人员利用 RAPD^[4-6], ISSR^[7-8], AFLP^[9-10]等技术对枇杷属部分资源进行了研究. 因为 SSR(Simple Sequence Repeats)具有等位基因变异多、单基因座、信息含量高、多态性高、稳定性好、重复性好、种族特异性强、进化所受选择压小、以孟德尔方式分离、呈共显性遗传等特点而被广泛应用于生物的种质鉴定、遗传作图^[11]、遗传多样性分析^[12-13]、品种纯度鉴定^[14]以及指纹图谱构建^[15]等很多方面. 由于枇杷的全基因组序列还没见到报道, 且枇杷的 ESTs(Expression Sequence Tags)数据很少, 因此以前主要用苹果属植物的 SSR 引物来进行枇杷属植物的 SSR 标记的研究应用^[16-17]. 近年来 Gisbert、Xiang 等通过磁珠微卫星富集法开发出部分枇杷基因组的 SSR 引物^[11, 18-19], 本研究就利用这些由枇杷上开发的引物对来自不同国家和地区的 67 份枇杷属种质资源从遗传多样性方面进行分析.

① 收稿日期: 2013-06-29

基金项目: 国家科技支撑计划(2013BAD02B02); 重庆市自然科学基金(CSTC, 2010BB1132); 国家农业部公益性行业(农业)科研专项(201003073)基金资助.

作者简介: 陈 志(1989-), 男, 安徽合肥人, 硕士研究生, 主要从事果树资源与遗传育种研究.

通信作者: 向素琼, 研究员, 硕士研究生导师.

1 材料与方法

1.1 试验材料

在此试验中,用到的枇杷属植物材料一共 67 份(表 1),其中含有 19 份野生枇杷和 48 份栽培枇杷,里面的 01-02,10-12,29,32,34,45 和 58-67 号为野生枇杷,其余为栽培枇杷,栽培枇杷中果肉颜色为红肉型的有 32 份,编号为 03-06,14,15,17-20,23,33,35-44,46,48-52,54-57,果肉颜色为白肉型的有 16 份,编号为 7-9,13,16,21,22,24-28,30,31,47,53. 在栽培枇杷材料中,有 2 份材料来自美国、5 份材料来自西班牙、4 份来自日本. SSR 引物来源于 Gisbert 等和 Xiang 等^[18-19](表 2),由宝生物工程(大连)有限公司和上海生工(上海生工生物工程公司)合成. PCR 扩增所用的试剂(10×Buffer、Mg²⁺、dNTPs、引物、Taq DNA 酶)均购于 Takara 公司;PCR 仪是来自德国 eppendorf 公司,产品型号是 Mastercycle gradinet.

表 1 植物材料

编号	种质名称	所属种	来源	编号	种质名称	所属种	来源
01	大渡河枇杷	<i>E. prinoides</i> Rehd & Wils. var. <i>daduheensis</i> H. Z. Zhang	中国	35	短柄扁核	<i>E. japonica</i> Lindl	中国安徽
02	怒江枇杷	<i>E. salwinensis</i> Hand-Mazz.	中国	36	Ullera	<i>E. japonica</i> Lindl	西班牙
03	大五星	<i>E. japonica</i> Lindl	中国四川	37	香甜	<i>E. japonica</i> Lindl	中国福建
04	龙泉 1 号	<i>E. japonica</i> Lindl	中国四川	38	皖泊	<i>E. japonica</i> Lindl	中国安徽
05	兴宁一号	<i>E. japonica</i> Lindl	中国四川	39	红灯笼	<i>E. japonica</i> Lindl	中国四川
06	早钟 6 号	<i>E. japonica</i> Lindl	中国福建	40	解放钟	<i>E. japonica</i> Lindl	中国福建
07	冠玉	<i>E. japonica</i> Lindl	中国江苏	41	大红袍(浙江)	<i>E. japonica</i> Lindl	中国浙江
08	宁海白	<i>E. japonica</i> Lindl	中国浙江	42	宝珠	<i>E. japonica</i> Lindl	中国江苏
09	白玉	<i>E. japonica</i> Lindl	中国江苏	43	太城 4 号	<i>E. japonica</i> Lindl	中国福建
10	台湾枇杷	<i>E. deflexa</i> Nakai	中国	44	大红袍(安徽)	<i>E. japonica</i> Lindl	中国安徽
11	栎叶枇杷	<i>E. prinoides</i> Rehd & Wils	中国	45	窄叶变型	<i>E. bengalensis</i> Hook. f. <i>forma angustifolia</i> Vidal	中国
12	贵州野生	<i>E. japonica</i> Lindl	中国贵州	46	香槟	<i>E. japonica</i> Lindl	美国
13	白梨	<i>E. japonica</i> Lindl	中国福建	47	Bianco	<i>E. japonica</i> Lindl	西班牙
14	香钟 11 号	<i>E. japonica</i> Lindl	中国福建	48	M. Aixaza	<i>E. japonica</i> Lindl	西班牙
15	晚钟 518	<i>E. japonica</i> Lindl	中国福建	49	香钟 25 号	<i>E. japonica</i> Lindl	中国
16	软条白沙	<i>E. japonica</i> Lindl	中国浙江	50	钟城 23 号	<i>E. japonica</i> Lindl	中国
17	东湖早	<i>E. japonica</i> Lindl	中国福建	51	长红 3 号	<i>E. japonica</i> Lindl	中国福建
18	Marc	<i>E. japonica</i> Lindl	西班牙	52	夹脚	<i>E. japonica</i> Lindl	中国
19	金丰	<i>E. japonica</i> Lindl	中国四川	53	凉风	<i>E. japonica</i> Lindl	日本
20	森尾早生	<i>E. japonica</i> Lindl	日本	54	Algerie	<i>E. japonica</i> Lindl	西班牙
21	大洋晚白	<i>E. japonica</i> Lindl	中国浙江	55	香城 4 号	<i>E. japonica</i> Lindl	中国福建
22	乌躬白	<i>E. japonica</i> Lindl	中国福建	56	先进	<i>E. japonica</i> Lindl	美国
23	简阳早熟	<i>E. japonica</i> Lindl	中国四川	57	田中	<i>E. japonica</i> Lindl	日本
24	冰糖种 3 号	<i>E. japonica</i> Lindl	中国浙江	58	四柱变型	<i>E. bengalensis</i> Hook. f. <i>Forma intermedia</i> Vidal	中国
25	美玉 1 号	<i>E. japonica</i> Lindl	中国江苏	59	椭圆枇杷	<i>E. elliptia</i> Lindl	中国
26	常白 1 号	<i>E. japonica</i> Lindl	中国福建	60	大花枇杷	<i>E. cavaleri</i> Rehd	中国
27	常绿 2 号	<i>E. japonica</i> Lindl	中国江苏	61	恒春变种	<i>E. deflexa</i> Nakai var. <i>koshunen-sis</i> Nakai	中国
28	常绿 4 号	<i>E. japonica</i> Lindl	中国江苏	62	腾越枇杷	<i>E. tengyuehensis</i> W. W. Smith	中国
29	麻栗坡枇杷	<i>E. malipoensis</i> Kuan	中国	63	窄叶枇杷	<i>E. henryi</i> Nakai	中国
30	照种	<i>E. japonica</i> Lindl	中国江苏	64	香花枇杷	<i>E. fragrans</i> Champ	中国
31	新白 3 号	<i>E. japonica</i> Lindl	中国福建	65	齿叶枇杷	<i>E. serrate</i> Vidal	中国
32	南亚枇杷	<i>E. bengalensis</i> Hook. f.	中国	66	武蔵山变种	<i>E. deflexa</i> Nakai var. <i>buisanensis</i> Nakai	中国
33	茂木	<i>E. japonica</i> Lindl	日本	67	广西枇杷	<i>E. kwangsiensis</i> Chun	中国
34	小叶枇杷	<i>E. seguinii</i> Card	中国				

1.2 方 法

1.2.1 枇杷基因组 DNA 提取方法

基因组 DNA 提取方法采取的是改进过后的 CTAB 法^[17, 20–21]. DNA 的浓度用可见分光光度计检测, 而 DNA 的质量用琼脂糖凝胶电泳检测, 将各样品浓度调整为 10 ng/ μ L, 保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用.

1.2.2 SSR 引物筛选、PCR 扩增及检测

选 8 个亲缘关系较远的材料, 然后用这 8 个材料来筛选多态性高、扩增效果良好且稳定的引物进行后续试验. PCR 扩增使用的体系是 20 μ L 的, 其中包括: $10\times$ buffer, 2.0 μ L; MgCl_2 (25 mmol/L), 1.5 μ L; dNTPs(10 mmol/L each), 0.2 μ L; Primer(10 mmol/L), 1.0 μ L; Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L), 0.15 μ L; 模板 DNA, 1.0 μ L; ddH₂O, 14.15 μ L. 在 Eppendorf Mastereyler gradient PCR 仪中进行扩增, 它的程序运用 He 等的方法^[17]且稍微有所改动: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 50 s, 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存.

将 2 μ L 的非变性上样缓冲液加入扩增产物中, 然后将它们混合均匀. 用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 220 V 的恒定电压, 电泳 70 min 左右. 电泳结束后, 用银染法染色检测, 数码拍摄保存图片用于分析.

1.2.3 数据处理

SSR 扩增产物以 0,1 统计建立数据库. 在相同迁移率位置上, 有谱带记为“1”, 无谱带记为“0”, 然后进行遗传相似系数计算[通过 NTSYS-PC(Version 2.0)软件进行], 并用 UPGMA 法进行遗传相似性聚类; 用 Popgene(Version 3.2)软件计算观察等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、Nei’s 基因多样性(H)以及 Shannon 信息指数(I)、观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)等; 通过 PIC_CALC(Version 0.6)和办公软件(Excel)计算各个位点的多态信息含量(PIC).

表 2 17 对枇杷 SSR 引物序列

编号	引物	引物序列(5'-3')	编号	引物	引物序列(5'-3')
1	CDPP725-03/04	GTATGCATGGCGGTCAAAAG GCCGACTTTCCATTCTTCC	10	LM-04	CGATGAGCCAAGTATGATCA CGGAATCATCTTCATCACCT
2	CDPP725-05/06	GATGCCTCTCCCCTTCTTTT GTAGTGGTGGTTTGGGGTTG	11	LM-05	CGATCCCAATTTCGAGTACTT CTACTAGGCAGCTGAATCTT
3	CDPP725-07/08	TCCAAGGATTAGGGATGCAC TTAACTCCGCATTCCCTTTC	12	LM-15	GCTAACTCTGAAAGTGGTGTA GCGACGTGTTTCGAATTCTGA
4	CDPP725-25/26	ACTCATCCATTCTTGGTTTG ATCCCATCATTTCCCTCTAC	13	LM-20	ACCAGAACCTGAAGCTCCTT CTCGCTAGTCACAACCAAGT
5	CDPP725-27/28	AACTGATGAAGCAAGGCAAGA AGATCCGGAGAGGATCCAAA	14	LM-22	TGTTTGGTACTGAGGAGGAT GAGTGGCGCTATAGCAATAG
6	CDPP725-29/30	ATCGTTTGTTACCATTTTGG ATTCACTTTTGGCCTTCTCT	15	LM-34	GAGATGGAAGTAGCTATAGT GATGAAACTGACATCTCAAC
7	CDPP725-39/40	CACGTCCAACCACACCTATG TCTCTCATTTCTCCGCACTT	16	LM-36	CGTCGATAAAGGCACGCTAT GTCGCACCTGATTAGATCA
8	CDPP725-41/42	CGAAGCTCTCCATTGTTGCT CACCGTCACCATTCTCTCTGT	17	LM-38	TGTATGAGCAACACATTGTA GCTCACTGCTGAGTTTAGGA
9	LM-03	TGTGGGTGCAGTAAATAGTA GCAGATTCTGTACAGAAACA			

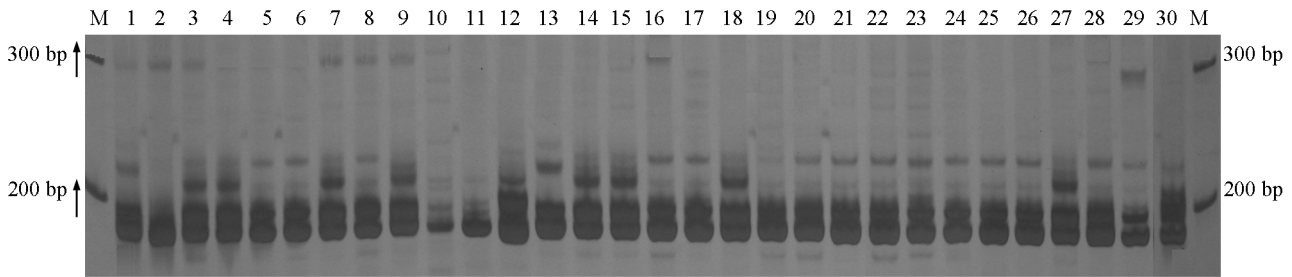
2 结果与分析

2.1 SSR 标记多态性

从 59 对引物中筛选出 17 对多态性高、效果良好、结果稳定的引物用于 SSR 扩增, 约占总量的 29%.

这 17 对引物在试验材料中一共扩增出 53 条条带, 每对引物扩增 2 到 6 条条带, 平均每对引物扩增 3.12 条条带, 其中多态性条带 51 条, 多态性条带比率高达 96.23%。1 号引物扩增得到 6 条条带, 数量最多。除了 2 号和 14 号之外的引物所得片段的多态性均为 100%。以上数据体现出供试材料遗传多样性丰富(图 1)。

PIC (平均多态信息含量)是衡量片段多态性的一个重要指标。Botstein 等指出当 $PIC>0.5$ 时, 该基因座为高度多态基因座; $0.25<PIC<0.5$ 时, 为中度多态基因座; $PIC<0.25$ 时, 为低度多态基因座^[22]。17 对引物的 PIC 都在 0.30 到 0.74 之间, 偏高(表 3)。说明这些微卫星 DNA 座位均表现为中度、高度多态。



M: DL 100 marker; 1—30: 1 至 30 号材料; M: DL 100 marker.

图 1 引物 CDP725-05/06 的扩增结果

2.2 遗传多样性分析

由表 3 可见, 从 59 对引物中所挑选的特异性引物在供试材料中检测到的遗传多样性参数有较大的差异性。67 份枇杷属材料的 N_a 在 2.000 到 6.000 之间, 均值 3.118; N_e 在 1.288 到 4.408 之间, 均值 2.166; H 在 0.223 到 0.773 之间, 均值 0.507; Shannon 信息指数则介于 0.457~1.597, 均值 0.821; H_o 介于 0.200~0.970, 均值 0.637; H_e 则介于 0.225~0.779, 均值 0.511。从图 2 可见供试材料间的遗传相似系数在 0.53 到 1.00 之间, 均值 0.765, 表明 67 份材料的遗传多样性很丰富。

表 3 17 对 SSR 引物在 67 份枇杷中检测到的遗传多样性参数

编号	引物	观察的 等位基因 数(N_a)	有效等 位基因 数(N_e)	Nei, s 基 因多样 性(H)	香农 信息指 数(I)	观测 杂合度 (H_o)	期望 杂合度 (H_e)	多态信 息含量 (PIC)	谱带数	多态性 谱带数
1	CDPP725-03/04	6.000	4.408	0.773	1.597	0.881	0.779	0.739	6	6
2	CDPP725-05/06	2.000	1.993	0.498	0.691	0.940	0.502	0.375	2	1
3	CDPP725-07/08	3.000	1.288	0.223	0.457	0.200	0.225	0.303	3	3
4	CDPP725-25/26	3.000	2.014	0.504	0.749	0.597	0.507	0.387	3	3
5	CDPP725-27/28	3.000	2.213	0.548	0.880	0.418	0.552	0.478	3	3
6	CDPP725-29/30	4.000	2.097	0.523	0.875	0.463	0.527	0.476	4	4
7	CDPP725-39/40	5.000	2.091	0.522	0.974	0.448	0.526	0.498	5	5
8	CDPP725-41/42	2.000	1.918	0.479	0.672	0.759	0.483	0.372	2	2
9	LM-03	4.000	2.675	0.626	1.101	0.769	0.631	0.540	4	4
10	LM-04	2.000	1.948	0.487	0.680	0.358	0.490	0.371	2	2
11	LM-05	2.000	1.972	0.493	0.686	0.851	0.497	0.374	2	2
12	LM-15	3.000	2.448	0.592	0.987	0.836	0.596	0.535	3	3
13	LM-20	2.000	1.977	0.494	0.687	0.831	0.498	0.374	2	2
14	LM-22	4.000	2.071	0.517	0.794	0.925	0.521	0.408	4	3
15	LM-34	2.000	1.806	0.446	0.638	0.246	0.450	0.357	2	2
16	LM-36	2.000	1.424	0.298	0.474	0.333	0.300	0.312	2	2
17	LM-38	4.000	2.482	0.597	1.017	0.970	0.602	0.515	4	4
	平均值	3.118	2.166	0.507	0.821	0.637	0.511	0.436	3.1	3

2.3 枇杷属植物的聚类分析

通过 17 对引物的扩增产物, 对品种之间的遗传相似数进行计算, 然后再展开聚类分析. 通过分析聚类图可以发现, D1 处, 67 份材料可以分为 4 类, I 类包括 55 份材料, 不仅含所有栽培品种, 而且还包括 7 份野生枇杷; 其他 3 类都是野生种或变种, II 类中有台湾枇杷、南亚枇杷等 10 个种或变种; III、IV 类都只有 1 个种或变种. D2 处, I 类可以被划分成 6 个亚类, 第 i 亚类包含 48 份材料, 即大渡河枇杷和除田中外的所有栽培品种, 余下 5 个亚类含 6 份野生枇杷和 1 份栽培枇杷(田中). D3 处, i 亚类又可以被划分成 3 个小类(图 2).

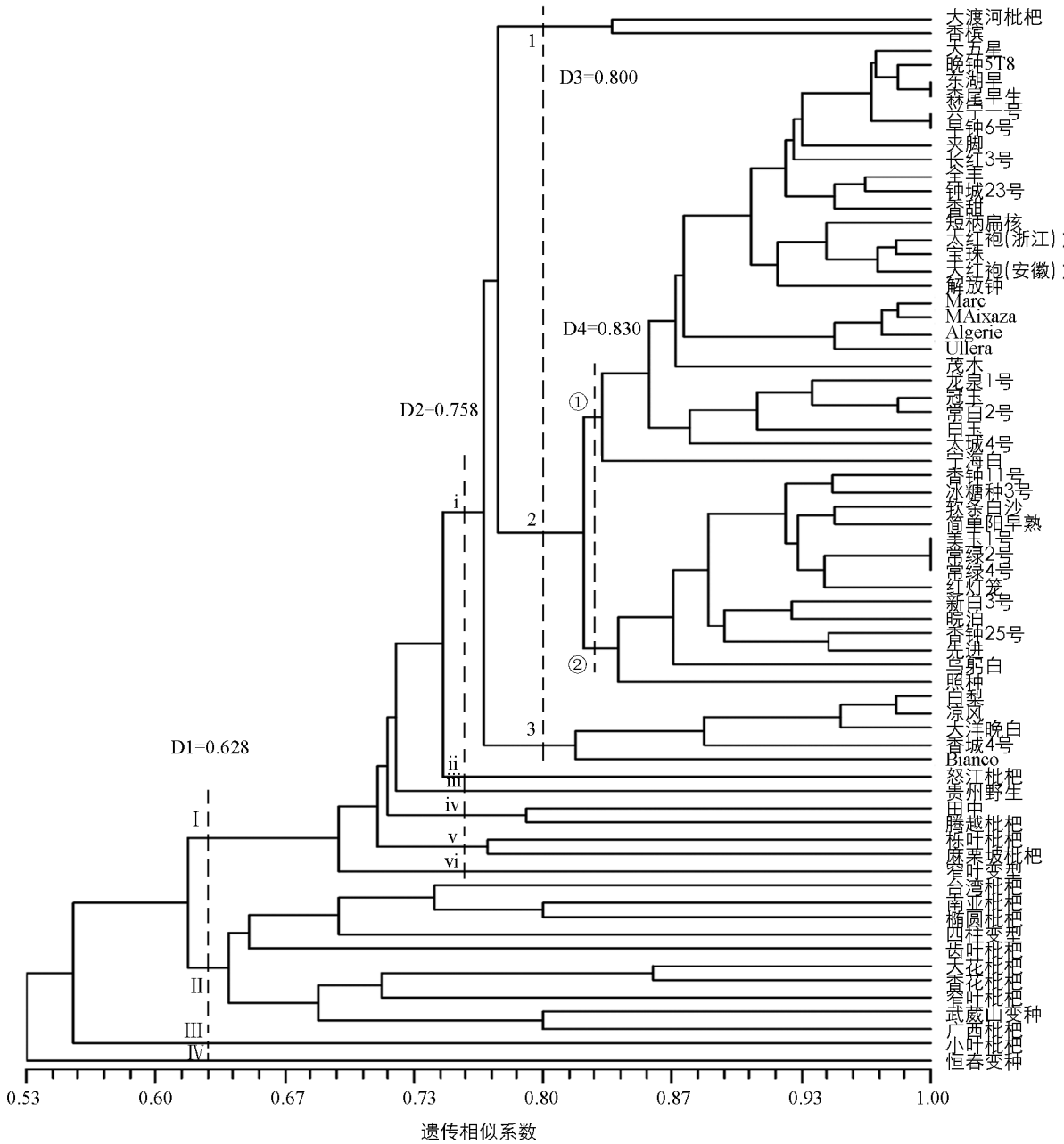


图 2 67 份枇杷种质资源的 UPGMA 聚类树状图

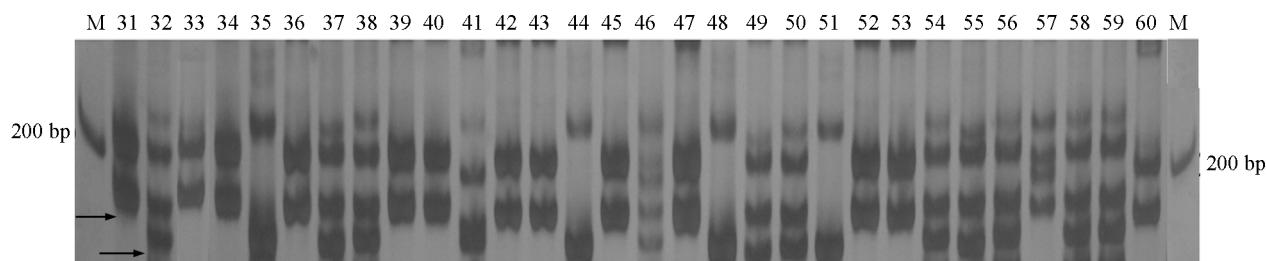
综上可得, 4 大类中, I 类比较复杂, 含有野生种、变种或变型. 另外 3 个大类都是野生枇杷, 或单独聚类, 或多个聚类. 尽管聚类结果没有在某处将野生材料与栽培材料完全分开, 但是在 D2=0.758 处, 可以将绝大多数的野生种和栽培品种区分. 同时, 观察栽培枇杷不同果肉颜色的聚类结果, 栽培枇杷也没有

因果肉颜色而分别聚类。

3 讨 论

3.1 SSR 标记条带的校准

尽管 SSR 标记的特异性高,但是 PCR 扩增反应体系复杂,体系中的各种物质的浓度会对试验有影响,从而导致非特异性条带的出现很难避免。现实试验中,反应体系的优化对前面所说因素的影响程度的降低有一定作用。按照引物有效扩增范围进行条带校准,有带标为“1”,无带或缺失标为“0”;不统计扩增范围之外的。例如引物 LM34, 160~190 bp 是它的有效扩增范围,在这范围之外的条带都不予读取(图 3)。



M: DL 100 marker; 31—60: 31 至 60 号材料; M: DL 100 marker.

图 3 引物 LM34 的扩增结果

3.2 枇杷野生种的分类

从聚类图上可以看到,野生材料相互之间的亲缘关系较远,形成独立的种、变种和变型,与传统分类的研究结果一致。同样也可以看出,与栽培枇杷亲缘关系更近的野生枇杷是大渡河枇杷,这也与传统分类研究基本相符。

很大一部分野生材料在 $D2 = 0.758$ 处可以和栽培枇杷区分,而在相似系数约为 0.65 处,齿叶枇杷和椭圆枇杷聚在一大类,这和杨向晖的研究结果基本相似^[9]。然而南亚枇杷和南亚枇杷四柱变型聚在一起,但和南亚枇杷窄叶变型相距甚远,这和杨向晖的研究结果有所差异,有待进一步研究。

3.3 普通栽培枇杷的分类

在第 I 类第 i 亚类中,基本都是普通栽培枇杷,只有大渡河枇杷是野生材料,这与传统分类的结果基本一致^[23],也表现出栽培枇杷的遗传基础相对狭窄,这与王云生等的研究结果一致^[24]。虽然除了田中之外几乎所有的栽培枇杷都聚在第 I 类第 i 亚类中,但是这 47 个栽培枇杷却不能以果肉颜色(红肉型、白肉型)为指标而区分开。从聚类图上看,遗传距离相对较远的照种和冠玉都是白肉,而红肉的龙泉 1 号和白肉的冠玉、白玉却聚在同一小类,这与陈义挺和邱武陵等的研究结果不一致^[23,25],与何桥的研究结果相符^[26],这些足以表明枇杷栽培品种的划分不能只取决于某单一性状(如果肉颜色)或少数几个性状,因为表型性状可能由多个基因控制,我们在进行品种划分的时候应该综合考虑多个性状指标,而且环境因素也可能影响表型性状^[8,26]。

田中与腾越枇杷聚在一起,美国品种香槟先与大渡河枇杷聚类而后与栽培品种聚类。原因可能是日本枇杷来源于我国,之后引种到欧美等地,因为环境不同产生变异,导致遗传背景出现差异。

而安徽和浙江的品种大红袍的相似系数相对较低,二者可能是种质交流中出现的同名异物。至于兴宁一号和早钟 6 号相似系数高达 1.0,兴宁一号是在田间从早钟 6 号通过挑选芽变枝条选育而得,二者的遗传差异本来就较小,因而利用本研究的 17 份引物扩增未表现差异。这可能与扩增的位点偏少有关,应扩大引物数量或者结合其他标记来研究二者的亲缘关系。同时,龙治坚利用 SCoT 标记单独分析上述品种时,发现该标记可以将东湖早与森尾早生、美玉 1 号与常绿 2 号和常绿 4 号分开^[27],说明它们在遗传背景上存

在差异,但是该研究结果却显示他们的相似系数均高达 1.0,这可能是本研究所用引物扩增产物无差异,并不能说明它们遗传背景就完全相同,而应该结合品种来源、形态学特征、传播以及更多的分子标记分析才能作准确的定论。

参考文献:

- [1] 蔡礼鸿. 枇杷属的等位酶遗传多样性和种间关系及品种鉴定研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2000.
- [2] 郑少泉. 枇杷品种与优质高效栽培技术原色图说 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 1—2.
- [3] 林顺权, 杨向晖, 刘成明, 等. 中国枇杷属植物的自然地理分布 [J]. 园艺学报, 2004, 31(5): 569—573.
- [4] VILANOVA S, BADENES M L, MARINEZ-CALVO J, et al. Analysis of Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl) Germ-plasm by RAPD Molecular Markers [J]. Euphytica, 2001, 121(1): 25—29.
- [5] FUKUDA S. Cultivar Identification in Loquat Assessed by RAPD Analysis [J]. Journal of Japanese Society for Horticultural Science, 2002, 71(6): 826—828.
- [6] 陈义挺, 赖钟雄, 陈菁瑛, 等. 65 份枇杷种质资源的 RAPD 分析 [J]. 热带作物学报, 2007, 28(1): 65—71.
- [7] 付 燕, 罗 楠, 杨 芩, 等. 枇杷属植物 ISSR 反应体系的建立和优化 [J]. 果树学报, 2009, 26(2): 180—185.
- [8] 王永清, 付 燕, 杨 芩, 等. 枇杷属植物遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 林业科学, 2010, 46(4): 49—57.
- [9] 杨向晖. 枇杷属植物系统学研究 [D]. 广州, 华南农业大学, 2005.
- [10] 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.
- [11] GISBERT A D, MARTÍNEZ-ALVO J, LLÁCER G, et al. Development of Two Loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.) Linkage Maps Based on AFLP and SSR Markers from Different Rosaceae Species [J]. Molec. Breed, 2009, 23(3): 523—538.
- [12] MENG Fan-juan, XU Xiang-yang, HUANG Feng-lan, et al. Analysis of Genetic Diversity in Cultivated and Wild Tomato Varieties in Chinese Market by RAPD and SSR [J]. Agricultural Sciences in China, 2010, 9(10): 1430—1437.
- [13] 姚启伦, 姚成强. 利用 SSR 分子标记分析三峡库区玉米地方品种的遗传关系 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2007, 29(10): 119—123.
- [14] ASHOK B D, MAMTA P R, MANOJ R B. Identification and Genetic Purity Testing of Cotton F1 Hybrid Using Molecular Markers [J]. Indian Journal of Biotechnology, 2011, 10(3): 301—306.
- [15] 高 源, 田路明, 刘凤之, 等. 利用 SSR 荧光标记构建 92 个梨品种指纹图谱 [J]. 园艺学报, 2012, 39(8): 1437—1446.
- [16] WATANABE M, YAMAMOTO T, OHARAL M, et al. Cultivar Differentiation Identified by SSR Markers and the Application for Polyploid Loquat Plants [J]. J. Japan Soc Hort Sci, 2008, 77(4): 388—394.
- [17] HE Qiao, LI Xiong-wei, LIANG Guo-lu, et al. Genetic Diversity and Identity of Chinese Loquat Cultivars/Accessions (*Eriobotrya japonica*) Using Apple SSR Markers [J]. Plant Mol Biol Rep, 2011, 29(1): 197—208.
- [18] GISBERT A D, LOPEZ-CAPUZ I, SORIANO J M, et al. Development of Microsatellite Markers from Loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.) [J]. Molec Ecol Resour, 2009, 9(3): 803—805.
- [19] XIANG Su-qiong, QUAN Zhi-wu, WANG Wei-xing, et al. Development and Characterization of New Polymorphic Microsatellite Markers in Loquat [J]. Acta Horticulturae, 2011(887): 75—78.
- [20] 孙晓荣, 易鼎杰, 何 桥, 等. 三倍体枇杷叶绿体 DNA 提取方法的优化 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2012, 37(2): 93—96.
- [21] 汪卫星. 天然与人工合成三倍体枇杷基因组变异及其 DNA 甲基化分析 [D]. 重庆: 西南大学, 2008.
- [22] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms [J]. Am J Hum Genet, 1980, 32(3): 314—331.
- [23] 陈义挺, 赖钟雄, 郭志雄, 等. 枇杷主要种类的 RAPD 分析 [J]. 江西农业大学学报, 2003, 25(2): 258—261.

- [24] 王云生, 林顺权. 枇杷野生型与栽培型的 cpDNA^{TmS-TmG} 及 cpDNA^{TmQ-rps16} 序列多态性的比较 [J]. 园艺学报, 2012, 39(10): 1913—1918.
- [25] 邱武陵, 章恢志. 中国果树志·龙眼枇杷卷 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1996.
- [26] 何 桥. 基于 SSR 标记的枇杷遗传多样性与品种鉴别 [D]. 重庆: 西南大学, 2010.
- [27] 龙治坚. 枇杷属植物的遗传多样性分析和指纹图谱初步构建 [D]. 重庆: 西南大学, 2013.

SSR Analysis of Genetic Diversity of 67 Accessions in *Eriobotrya*

CHEN Zhi¹, CHEN Zhi-you¹, LONG Zhi-jian², HAN Guo-hui³,
DANG Jiang-bo¹, WANG Ying¹, WANG Wei-xing¹, LI Xiao-lin¹,
SUN Hai-yan¹, LIANG Guo-lu¹, XIANG Su-qiong¹

1. School of Horticultural and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. College of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan 621010, China;

3. Fruit Research Institute, Chongqing Academy of Agriculture Science, Jiangjing Chongqing 402260, China

Abstract: The genetic diversity of 67 *Eriobotrya* germplasm accessions was analyzed by SSR. Seventeen SSR primers selected from 59 primers gave stable profiles amplified. A total of 53 polymorphic amplified fragments were produced, averaging 3.12 alleles per SSR locus and ranging from 2 to 6. The genetic similarity coefficient ranged from 0.53 to 1.00, and the average of polymorphism information content (PIC) was 0.436, observed number of alleles (Na) was 3.118, effective number of alleles (Ne) was 2.166, Nei's gene diversity (H) was 0.507, Shannon's information index (I) was 0.821, observed heterozygosity (Ho) was 0.637 and expected heterozygosity (He) was 0.511, indicating that the genetic diversities of *Eriobotrya* were abundant. Cluster analysis classified the 67 *Eriobotrya* accessions into four groups. Clustering results failed to separate the wild genotypes and cultivated materials completely, but most of them could be distinguished. Cultivated loquat accessions did not fall into different clusters by their pulp colour. In addition, the genetic relationships between some of the 67 accessions are discussed preliminarily in this paper.

Key words: loquat (*Eriobotrya*); germplasm resource; genetic diversity; SSR

责任编辑 欧 宾

