

# 柿野生雄性资源调查及其遗传多样性研究

王丽媛, 孙 鹏, 张嘉嘉, 傅建敏\*, 刁松锋, 韩卫娟, 索玉静, 张 悦

(中国林业科学研究院经济林研究开发中心, 国家林业局泡桐研究开发中心, 郑州 450003)

**摘 要:** 柿 (*Diospyros kaki* Thunb.) 雄性种质资源非常稀缺, 系统收集和梳理国内外现有雄性资源, 阐明其遗传多样性并揭示其与主栽甜、涩柿品种及近缘种的亲缘关系, 对雄性种质资源的高效利用有重要意义。在全国范围内开展柿野生种质资源调查, 在湖北、广西、江苏等地发现野生雄性种质资源共计 90 余份。利用 15 对 SSR 引物对 47 份柿完全雄性资源、2 份雄全同株资源和 11 份中国雌雄同株资源进行遗传多样性分析, 以 67 份完全雌性资源、38 份日本资源 (其中包括 25 份雌雄同株资源) 以及 28 份近缘种为对照。结果表明: 15 对引物共获得 144 个等位基因和 316 个基因型, 平均每个引物获得 9.60 个等位基因和 21.07 个基因型, 其中位点 ssrDK11/DQ097479 遗传变异程度最高。从地理分布来看, 柿雄性资源在适生的野外山区普遍存在, 其中湖北木兰山来源的雄性资源遗传多样性最高, 陕西省来源的雄性资源遗传多样性最低。UPGMA 和 ME 聚类方法分别将 193 份资源分为 16 组和 12 组, 两种聚类结果反映的总体规律类似: (1) 各来源地间的野生雄性资源存在着一定程度的遗传隔离; (2) 湖北木兰山野生雄性资源被分为遗传关系较远的两类, 一类与江西、江苏、湖南野柿及‘火晶’等主栽涩柿品种和‘耀县五花柿’等雌雄同株涩柿品种亲缘关系较近, 另一类与云架山雄性资源和罗田甜柿 (包括‘甜宝盖’) 亲缘关系较近; (3) 大部分日本来源的柿资源可被单独聚为一类。

**关键词:** 柿; SSR; 雄性种质资源; 遗传多样性; 亲缘关系

**中图分类号:** S 665.2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2018) 02-0261-18

## Survey of Wild Male Germplasm Resources of *Diospyros kaki* and Their Genetic Diversity Analysis

WANG Liyuan, SUN Peng, ZHANG Jiajia, FU Jianmin\*, DIAO Songfeng, HAN Weijuan, SUO Yujing, and ZHANG Yue

(Non-Timber Forest Research and Development Center, China Paulownia Research Center, State Forestry Administration, Chinese Academy of Forestry, Zhengzhou 450003, China)

**Abstract:** For the scarcity of persimmon male resources, the systematical collection and arrangement of the male resources as well as the clarity of genetic diversity of these resources and the genetic relationship among them together with other main cultivars and closely related species are essential for the efficient utilization of male resources. In this study, more than 90 wild male persimmon germplasm resources were found in Hubei, Guangxi, Jiangsu provinces, etc., during the survey of wild persimmon germplasm resources nationwide. Subsequently, 15 SSR primers were used to analyse the genetic diversity

**收稿日期:** 2017-08-11; **修回日期:** 2018-02-05

**基金项目:** 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31500559); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目 (CAFYBB2016QB017); 河南省基础与前沿技术研究计划项目 (152300410135)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: fjm371@163.com)

of 47 male persimmon resources, 2 andromonoecy resources and 11 Chinese monoecious resources. Sixty-seven female resources, 38 Japanese resources (including 25 monoecious resources) and 28 closely related species were used as reference out-group. The results indicated that a total of 144 alleles and 316 genotypes were obtained from 15 loci, with a mean value of 9.60 alleles and 21.07 genotypes per locus. *ssrDK11/DQ097479* was the most informative locus. The geographical distribution of male persimmon resources indicated that they were common in wild comfortable remote area. The male resources originated in Mulan Mountain, Hubei Province and in Shaanxi Province showed the highest and the lowest genetic diversity, respectively. The 193 resources were divided into 16 and 12 clusters by UPGMA and ME cluster analysis, respectively. Similar general laws were found according to the two cluster analysis results: (1) a genetic isolation existed among wild male resources from different areas; (2) the wild male resources in Mulan Mountain, Hubei Province could be genetically divided into two clusters, one had a near relationship with Jiangxi, Jiangsu, Hunan wild persimmons as well as main astringent cultivars such as ‘Huojing’ and monoecious astringent cultivars such as ‘Yaoxian Wuhuashi’, while the other was closer to Yunjia Mountain male resources and Luotian non-astringent persimmons (including ‘Tianbaogai’); (3) most Japanese resources could be classified into a same cluster exclusively.

**Keywords:** persimmon; SSR; male germplasm resources; genetic diversity; genetic relationship

柿 (*Diospyros kaki* Thunb.) 原产于中国。Kajiura (1946) 将柿品种分成 4 类: 完全甜柿 (PCNA)、不完全甜柿 (PVNA)、不完全涩柿 (PVA) 和完全涩柿 (PCA)。目前一般认为柿品种达 900 多个 (罗正荣和蔡礼鸿, 1998), 但中国柿品种除罗田甜柿外, 几乎全部是完全涩柿 (金光, 2012)。尽管柿在中国已有几千年的栽培历史, 但柿产业在中国依然发展缓慢 (艾呈祥 等, 2014; 孙鹏 等, 2015)。为了改善这一状况, 首先需要加强针对特定用途 (鲜食、加工等) 柿优良品种的选育工作。但柿雄性资源缺乏 (李高潮 等, 1996; 张青林, 2006) 的现状严重限制了杂交育种工作的开展。因此, 系统收集现有的柿雄性资源, 阐明其遗传多样性及与主栽品种和近缘种的亲缘关系, 对杂交父本选择和育种效率具有重要意义。

分子标记作为一种不受环境影响的新型高效工具已被广泛应用于遗传多样性研究 (Du et al., 2009a, 2009b; Ismail et al., 2016; Yang et al., 2016; 何华奇 等, 2017)。近年来虽已开展了一系列基于分子标记的柿属植物遗传多样性分析 (Guo & Luo, 2006b; Yonemori et al., 2008a, 2008b; Liang, 2015), 但主要关注主栽的甜、涩柿品种 (Liang, 2015), 关于国内外柿雄性资源遗传多样性的研究还不够系统。

中国林业科学研究院经济林研究开发中心连续多年在全国范围内开展柿野生种质资源调查和采集工作。本研究中利用 15 对多态性较高的 SSR 引物, 对系统收集的 193 份柿种质资源多样性进行分析, 分析不同来源雄性资源的遗传多样性情况, 探究各雄性资源间及其与主栽品种和近缘种的亲缘关系, 为柿雄性种质资源的高效利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 柿野生资源调查方法

2012—2017 年在湖北、广西、江苏等地, 依据当地林业部门及村民提供的线索, 深入深山野岭,

调查柿野生种质资源株数, 并对其进行编号, 记录植株树龄、株高、性别类型等指标, 用 GPS 记录植株方位。发现野生雄性种质资源共计 90 余份, 并采集接穗、种子, 通过嫁接、实生繁育保存资源, 为后续研究提供材料。

1.2 柿种质资源材料

系统收集柿雄性种质资源及主栽甜、涩柿品种和近缘种共 193 份用于 SSR 遗传多样性分析, 其中, 53 份资源采自西北农林科技大学园艺学院国家柿种质资源圃(陕西省杨陵区), 61 份资源采自中国林业科学研究院经济林研究开发中心原阳试验基地(河南省原阳县), 30 份资源采自湖南长沙、湘西、衡阳等地, 28 份资源采自湖北武汉、罗田、孝感、麻城等地, 15 份资源采自广西桂林等地, 6 份资源采自云南玉溪等地。这些柿资源包括 47 份完全雄性资源、2 份雄全同株资源、11 份雌雄同株资源、67 份完全雌性资源、38 份日本资源(其中包括 25 份雌雄同株资源)以及 28 份近缘种(表 1)。其中, F<sub>1</sub> 为日本甜柿‘富有’×‘赤柿’的杂交子代, 其种子于 2011 年收获, 2012 年播种于原阳试验基地, 现已确定 F<sub>1</sub>-27、F<sub>1</sub>-58、F<sub>1</sub>-120 和 F<sub>1</sub>-126 为雌雄同株个体。此外, 罗田野柿、湖南野柿、江西野柿和江苏野柿的种子也是于 2011 年收集, 2012 年播种于原阳试验基地。每份资源采集新鲜嫩叶 3 份, 液氮速冻, -80℃ 保存。

表 1 试验材料类型、来源及采集地  
Table 1 Material types, origins and collecting zones

来源 Origin	采集地 Collecting zone	学名 Species	类型 Type	序号 No.	代号或名称 Code or name				
湖北省 Hubei Province	湖北木兰山 Mulan Mountain, Hubei Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	雄株 Male	1~8	木兰-1(野柿)~木兰-8(野柿) Mulan-1(Wild persimmon)~Mulan-8(Wild persimmon)				
				9	木兰-21(野柿)Mulan-21(Wild persimmon)				
				10	木兰-22(野柿)Mulan-22(Wild persimmon)				
				11	木兰-24(野柿)Mulan-24(Wild persimmon)				
				12	木兰-31(野柿)Mulan-31(Wild persimmon)				
				13	木兰-40(野柿)Mulan-40(Wild persimmon)				
				14	木兰-44(野柿)Mulan-44(Wild persimmon)				
				15	木兰-47(野柿)Mulan-47(Wild persimmon)				
				16	木兰-58(野柿)Mulan-58(Wild persimmon)				
				17	木兰湖边-1(野柿)Mulan Hubian-1(Wild persimmon)				
				18	木兰湖边-2(野柿)Mulan Hubian-2(Wild persimmon)				
				19~21	云架山-6(野柿)~云架山-8(野柿)Yunjiashan-6 (Wild persimmon)~Yunjiashan-8(Wild persimmon)				
				22	云架山-19(野柿)Yunjiashan-19(Wild persimmon)				
				23	云架山-20(野柿)Yunjiashan-20(Wild persimmon)				
				24	云架山-25(野柿)Yunjiashan-25(Wild persimmon)				
				广西省 Guangxi Province	河南原阳 Yuanyang, Henan Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	雄株 Male	25	罗田野柿-4 Luotian Yeshe-4
								26	罗田野柿-7 Luotian Yeshe-7
					广西桂林 Guilin, Guangxi Province		雄全同株 Andromonoecy	27	麻城野柿-1 Macheng Yeshe-1
28	广西-2(野柿)Guangxi-2(Wild persimmon)								
29	广西-3(野柿)Guangxi-3(Wild persimmon)								
30	广西-27(野柿)Guangxi-27(Wild persimmon)								
31	广西-56(野柿)Guangxi-56(Wild persimmon)								
32~35	广西-58(野柿)~广西-61(野柿)Guangxi-58(Wild persimmon)~Guangxi-61(Wild persimmon)								
江苏省 Jiangsu Province	河南原阳 Yuanyang, Henan Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	雄株 Male					36	江苏野柿 1 号-7 Jiangsu Yeshe 1-7
								37	江苏野柿 1 号-8 Jiangsu Yeshe 1-8
				38	江苏野柿 1 号-11 Jiangsu Yeshe 1-11				
				39	江苏野柿 1 号-23 Jiangsu Yeshe 1-23				
				40	江苏野柿 2 号-3 Jiangsu Yeshe 2-3				
江西省 Jiangxi Province	河南原阳 Yuanyang, Henan Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	雄株 Male	41	江苏野柿 2 号-25 Jiangsu Yeshe 2-25				
				42	江西野柿-1 Jiangxi Yeshe-1				
			雄全同株 Andromonoecy	43	江西野柿-3 Jiangxi Yeshe-3				
				44	江西野柿-4 Jiangxi Yeshe-4				

续表 1

来源 Origin	采集地 Collecting zone	学名 Species	类型 Type	序号 No.	代号或名称 Code or name
湖南省 Hunan Province	河南原阳 Yuanyang, Henan Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	雄株 Male	45	湖南野柿 - 1 Hunan Yeshi-1
				46	湖南野柿 - 3 Hunan Yeshi-3
				47	湖南野柿 - 6 Hunan Yeshi-6
	湖南保靖 Baojing, Hunan Province	<i>D. cathayensis</i> Steward.	雄株、近缘种 Male, relative species	48	保靖 - 5 (乌柿) Baojing-5 (Woolly-flowered persimmon)
陕西省 Shaanxi Province	陕西杨凌 Yangling, Shaanxi Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	雄株 Male	49	站房后雄柿 Zhanfanghou-male
				50	青化雄株 Qinghua-male
广西省 Guangxi Province	广西桂林 Guilin, Guangxi Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCA 雌雄同株 PCA, monoecism	51	广西 - 48 Guangxi-48
		<i>D. oleifera</i> Cheng.	PCA 雌雄同株、 近缘种 PCA, monoecism	52	广西 - 51 (油柿) Guangxi-51 (Oily persimmon)
			relative species PCA 雌雄同株 PCA, monoecism	53	广西 - 55 (油柿) Guangxi-55 (Oily persimmon)
湖北省 Hubei Province	陕西杨凌 Yangling, Shaanxi Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCA 雌雄同株 PCA, monoecism	54	襄阳牛心柿 Xiangyang Niuxinshi
陕西省 Shaanxi Province	陕西杨凌 Yangling, Shaanxi Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCA 雌雄同株 PCA, monoecism	55	耀县五花柿 Yaoxian Wuhuashi
				56	黑心柿 Heixinshi
贵州省 Guizhou Province	陕西杨凌 Yangling, Shaanxi Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCA 雌雄同株 PCA, monoecism	57	兴义水柿 Xingyi Shuishi
				58	盘县水柿 Panxian Shuishi
江苏省 Jiangsu Province	陕西杨凌 Yangling, Shaanxi Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCA 雌雄同株 PCA, monoecism	59	树头红 Shutouhong
中国台湾 Taiwan, China	陕西杨凌 Yangling, Shaanxi Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCA 雌雄同株 PCA, monoecism	60	台湾正柿 Taiwan Zhengshi
湖南省 Hunan Province	湖南靖州 Jingzhou, Hunan Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCA 雌雄同株 PCA, monoecism	61	靖州 - 1 (野柿) Jingzhou-1 (Wild persimmon)
湖北省 Hubei Province	湖北罗田 Luotian, Hubei Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCNA	62	甜宝盖 Tianbaogai
陕西省 Shaanxi Province	陕西杨凌 Yangling, Shaanxi Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCNA	63	罗田甜柿 Luotian Tianshi
湖南省 Hunan Province	湖南靖州 Jingzhou, Hunan Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCA	64	靖州 - 3 (冰糖柿) Jingzhou-3 (Bingtangshi)
				65	靖州 - 4 (腰带柿) Jingzhou-4 (Yaodaishi)
				66	靖州 - 6 (乌柿) Jingzhou-6 (Woolly-flowered persimmon)
				67	靖州 - 7 (乌柿) Jingzhou-7 (Woolly-flowered persimmon)
				68	靖州 - 8 (茶柿) Jingzhou-8 (Chashi)
				69	靖州 - 9 (野柿) Jingzhou-9 (Wild persimmon)
				70	靖州 - 10 (红冬柿) Jingzhou-10 (Hongdongshi)
	湖南保靖 Baojing, Hunan Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCA	71	保靖 - 1 (野柿) Baojing-1 (Wild persimmon)
				72	保靖 - 3 (火柿) Baojing-3 (Huoshi)
				73	保靖 - 4 (腰带柿) Baojing-4 (Yaodaishi)
		<i>D. cathayensis</i> Steward	PCA、近缘种 PCA, relative species	74	保靖 - 6 (乌柿) Baojing-6 (Woolly-flowered persimmon)
		<i>D. miaoshanica</i> S. Lee Thunb.	PCA、近缘种 PCA, relative species	75	保靖 - 7 (苗山柿) Baojing-7 (Miaoshan persimmon)
	湖南祁东 Qidong, Hunan Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCA	76	保靖 - 8 (罗浮柿) Baojing-8 (Morris persimmon)
				77 ~ 80	祁东 - 2 (柿花) ~ 祁东 - 5 (柿花) Qidong-2 (Shihua) ~ Qidong-5 (Shihua)
				81	祁东 - 6 (腰带柿) Qidong-6 (Yaodaishi)
				82	祁东 - 7 (水柿) Qidong-7 (Shuishi)
				83	祁东 - 8 (柿花) Qidong-8 (Shihua)
				84	祁东 - 9 Qidong-9
				85	祁东 - 11 Qidong-11
				86	祁东 - 13 Qidong-13
				87	祁东 - 14 Qidong-14
	河南原阳 Yuanyang, Henan Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCA	88	湖南野柿 - 2 Hunan Yeshi-2
				89	湖南野柿 - 4 Hunan Yeshi-4
				90	湖南野柿 - 5 Hunan Yeshi-5

续表 1

来源 Origin	采集地 Collecting zone	学名 Species	类型 Type	序号 No.	代号或名称 Code or name
江苏省 Jiangsu Province	湖南长沙 Changsha, Hunan Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCA	91	长沙莲花柿 Changsha Lianhuashi
	湖南祁阳 Qiyang, Hunan Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCA	92	祁阳野柿 Qiyang Yeshi
	河南原阳 Yuanyang, Henan Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCA	93	江苏野柿 2 号 - 1 Jiangsu Yeshi 2-1
				94	江苏野柿 2 号 - 2 Jiangsu Yeshi 2-2
				95 ~ 101	江苏野柿 2 号 - 4 ~ 江苏野柿 2 号 - 10 Jiangsu Yeshi 2-4 ~ Jiangsu Yeshi 2-10
				102 ~ 107	江苏野柿 1 号 - 1 ~ 江苏野柿 1 号 - 6 Jiangsu Yeshi 1-1 ~ Jiangsu Yeshi 1-6
	陕西杨凌 Yangling, Shaanxi Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCA	108	南京铜盆柿 Nanjing Tongpenshi
				109	海安小方柿 Haian Xiaofangshi
	陕西杨凌 Yangling, Shaanxi Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCA	110	富平尖柿 Fuping Jianshi
				111	长安王后 Chang'an Wanghou
				112	容县京柿 Rongxian Jingshi
河南省 Henan Province	河南原阳 Yuanyang, Henan Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCA	113	博爱八月黄 Boai Bayuehuang
陕西省 Shaanxi Province	陕西杨凌 Yangling, Shaanxi Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCA	114	三原鸡心黄 Sanyuan Jixinhuang
	陕西杨凌 Yangling, Shaanxi Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCA	115	牛头柿 Niutoushi
浙江省 Zhejiang Province	陕西杨凌 Yangling, Shaanxi Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCA	116	火晶 Huojing
陕西省 Shaanxi Province	陕西杨凌 Yangling, Shaanxi Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCA	117	广西 - 10 (野柿) Guangxi-10 (Wild persimmon)
				118	广西 - 26 (野柿) Guangxi-26 (Wild persimmon)
	广西桂林 Guilin, Guangxi Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCA	119	广西 - 49 (野柿) Guangxi-49 (Wild persimmon)
				120	广西 - 52 Guangxi-52
	河南原阳 Yuanyang, Henan Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCA	121	恭城月柿 Gongcheng Yueshi
				122	阳朔牛心 Yangshuo Niuxin
	云南玉溪 Yuxi, Yunnan Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCA	123	玉溪 - 1 (野柿) Yuxi-1 (Wild persimmon)
				124	玉溪 - 2 (野柿) Yuxi-2 (Wild persimmon)
				125	老尖山 - 3 (野柿) Laojianshan-3 (Wild persimmon)
				126	老尖山 - 5 (野柿) Laojianshan-5 (Wild persimmon)
江西省 Jiangxi Province	河南原阳 Yuanyang, Henan Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCA 雌雄同株 PCA, monoecism	127	马鞍 - 1 (野柿) Maan-1 (Wild persimmon)
			PCA 雌雄同株 PCA, monoecism	128	马鞍 - 6 (野柿) Maan-6 (Wild persimmon)
			PCA	129	江西野柿 - 2 Jiangxi Yeshi-2
			PCA	130	江西野柿 - 5 Jiangxi Yeshi-5
	河南原阳 Yuanyang, Henan Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCA	131	江西野柿 - 6 Jiangxi Yeshi-6
				132	中柿 2 号 Zhongshi 2
	湖北麻城 Macheng, Hubei Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCA	133	麻城磨盘 - 1 Macheng Mopan-1
	陕西杨凌 Yangling, Shaanxi Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCNA 雌雄同株 PCNA, monoecism	134	太秋 Taishu
			PCNA, monoecism	135	晚御所 Okugosho
日本 Japan	湖北孝感 Xiaogan, Hubei Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PVA 雌雄同株 PVA, monoecism	136	花御所 Hanagosho
			PVA, monoecism	137	华柿 1 号 Huashi 1
	陕西杨凌 Yangling, Shaanxi Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PVNA 雌雄同株 PVNA, monoecism	138	西村早生 Nishimurawase
			PVNA, monoecism	139	禅寺丸 Zenjimaruru
	河南原阳 Yuanyang, Henan Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PVNA 雌雄同株 PVNA, monoecism	140	正月 Shougatsu
				141	赤柿 Akagaki
	河南原阳 Yuanyang, Henan Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PVNA 雌雄同株 PVNA, monoecism	142	F <sub>1</sub> -21
				143	F <sub>1</sub> -73
				144	F <sub>1</sub> -108
				145	F <sub>1</sub> -117

续表 1

来源 Origin	采集地 Collecting zone	学名 Species	类型 Type	序号 No.	代号或名称 Code or name
			PVA 雌雄同株 PVA, monoecism	146 147 148	朱雀锦 Zhuquejin F <sub>1</sub> -31 F <sub>1</sub> -69
			PCA 雌雄同株 PCA, monoecism	149 150 151	F <sub>1</sub> -71 F <sub>1</sub> -72 F <sub>1</sub> -125
			雌雄同株 Monoecism	152 153 154 155 156 157 158	F <sub>1</sub> -27 F <sub>1</sub> -58 F <sub>1</sub> -120 F <sub>1</sub> -126 中柿 4 号 Zhongshi 4 47A (5) 47A (8)
	陕西杨凌 Yangling, Shaanxi Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCNA	159 160 161 162 163 164 165 166	贵秋 Kishu 新秋 Shinsyuu 次郎 Jiro 富有 Fuyu 阳丰 Youhou 早秋 Soshu 甘秋 Kanshu 宝华甜柿 Baohua Tianshi
	湖北孝感 Xiaogan, Hubei Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCNA	166	
	河南原阳 Yuanyang, Henan Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PCNA	167	兴津 - 20 Okitsu 20
	陕西杨凌 Yangling, Shaanxi Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PVNA	168	甘百目 Amahyakume
	河南原阳 Yuanyang, Henan Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PVNA	169	松太 Songtai
	陕西杨凌 Yangling, Shaanxi Province	<i>D. kaki</i> Thunb.	PVNA PCNA	170 171	须波 Xupo 夕红 Yubeni
陕西省 Shaanxi Province	陕西杨凌 Yangling, Shaanxi Province	<i>D. lotus</i> L.	雄株、近缘种 Male, relative species	172 173 ~ 175	君迁子 Date plum 君迁子 - 858 ~ 君迁子 - 860 Date plum-858 - Date plum-860
美国 America	河南原阳 Yuanyang, Henan Province	<i>D. virginiana</i> L.	雄株、近缘种 Male, relative species	176	美洲柿 - 1 Common persimmon-1
				177	美洲柿 - 2 Common persimmon-2
浙江省 Zhejiang Province	陕西杨凌 Yangling, Shaanxi Province	<i>D. glaucifolia</i> Metc.	雄株、近缘种 Male, relative species	178	浙江柿 Zhejiang persimmon
		<i>D. oleifera</i> Cheng.	雌雄同株、近缘 种 Monoecism, relative species	179 180	油柿 Oily persimmon 油柿 - 7 Oily persimmon-7
湖南省 Hunan Province	湖南靖州 Jingzhou, Hunan Province	<i>D. lotus</i> L.	近缘种 Relative species	181	君迁子 Date plum
陕西省 Shaanxi Province	陕西杨凌 Yangling, Shaanxi Province	<i>D. lotus</i> L.	近缘种 Relative species	182	君迁子 - 824 Date plum-824
				183 184 ~ 187	君迁子 - 852 Date plum-852 君迁子 - 854 ~ 君迁子 - 857 Date plum-854 ~ Date plum-857
美国 America	陕西杨凌 Yangling, Shaanxi Province	<i>D. virginiana</i> L.	近缘种 Relative species	188	美洲柿 Common persimmon
陕西省 Shaanxi Province	陕西杨凌 Yangling, Shaanxi Province	<i>D. glaucifolia</i> Metc.	近缘种 Relative species	189 190	浙江柿 - 1 Zhejiang persimmon-1 浙江柿 - 2 Zhejiang persimmon-2
湖南省 Hunan Province	湖南靖州 Jingzhou, Hunan Province	<i>D. oleifera</i> Cheng.	雌雄同株、近缘 种 Monoecism, relative species	191	油柿 Oily persimmon

续表 1

来源 Origin	采集地 Collecting zone	学名 Species	类型 Type	序号 No.	代号或名称 Code or name
浙江省 Zhejiang Province	陕西杨凌 Yangling, Shaanxi Province	<i>D. spp.</i>	近缘种 Relative species	192	金枣柿 Jinzaoshi
四川省 Sichuan Province	陕西杨凌 Yangling, Shaanxi Province	<i>D. spp.</i>	近缘种 Relative species	193	德阳柿 Deyangshi

注: PCA: 完全涩柿; PCNA: 完全甜柿; PVA: 不完全涩柿; PVNA: 不完全甜柿; F<sub>1</sub>: 富有 × 赤柿。

Note: PCA: Pollination-constant astringent; PCNA: Pollination-constant non-astringent; PVA: Pollination variant astringent; PVNA: Pollination-variant non-astringent; F<sub>1</sub>: Fuyou × Akagaki.

1.3 DNA 提取与 SSR 检测

通过 CTAB 改良法提取基因组 DNA (Doyle & Doyle, 1987)。利用 1.0%琼脂糖凝胶电泳法以及紫外分光光度计检测 DNA 样品的纯度和浓度, 样品检测合格后置于 - 20 °C 冰箱保存备用。

从已发表的 110 对柿属植物 SSR 引物中筛选出效果较好的 15 对引物 (Guo & Luo, 2006a, 2008; Liang et al., 2015) 用于 PCR 扩增, 15 对 SSR 引物信息见表 2。PCR 反应体系如下: 总体积 20 μL, 其中 DNA 模板 30 ng, 20 mmol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mmol · L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 50 mmol · L<sup>-1</sup> KCl, 0.25 mmol · L<sup>-1</sup> dNTP, 正反向引物及通用引物各 0.8 μmol · L<sup>-1</sup>, 1 U *Taq* DNA 聚合酶以及无菌水。PCR 循环体系如下: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 45 s, 按照各引物退火温度退火 50 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 总延伸 4 min。ABI Prism 3130 遗传分析仪 (毛细管荧光电泳法) 检测 PCR 产物, Gene Mapper 4.0 软件分析等位基因大小 (Liang et al., 2015)。

表 2 试验所用 SSR 引物信息  
Table 2 Summary of the SSR markers selected for the experiment

位点/GenBank 编号 Locus / GenBank accession No.	重复单元 Repeat motif	引物序列 (5' - 3') Primer sequence	退火温度/°C T <sub>m</sub>	条带大小/bp Allele size
1430/DC588341	(GAG) <sub>5</sub>	F: TCAGTAAAGCTGCGGGCATC R: ACGGTTCTCCTGATCCTCACG	56	190 ~ 250
1554/DC586537	(CAT) <sub>6</sub>	F: CACCGCATCCTCTTCGACATCC R: ACGCATCCGTCAAATCACAACA	56	190 ~ 223
4379/DC585084	(GAG) <sub>9</sub>	F: TGACTCTGCTCCACAGGCACTTC R: CTCGTCTGGCAATCTGCTTCG	56	208 ~ 235
5553/DC585710	(GTAGTG) <sub>3</sub>	F: CCAGTTGATGGCAATGGGAGGC R: GGTGCGATGTTGGAGGGAAGAG	56	226 ~ 254
6615/DC585737	(CTT) <sub>7</sub>	F: ACACTCCACTCTACCCAAATACC R: GACATCATAAGTCAAAGCACGAA	55	244 ~ 268
6665/DC592790	(TA) <sub>9</sub>	F: TGACCAACCCCAAAGTGTGGGAG R: AGGTCCCTCTGGTGAGCACATGC	60	171 ~ 209
8125/DC592401	(GGC) <sub>4</sub>	F: TTATCCCATCAAAGCAACCCAC R: CTGCCAACTCTTCTCCATCTCC	55	189 ~ 207
8917/DC591591	(AT) <sub>10</sub>	F: ACACGTTTCAGTACCAGGAGGGA R: AGTACCACAACCACCACTGG	55	166 ~ 197
9004/DC591297	(GCAGGA) <sub>3</sub>	F: GCCACAACTTCACAGAGGACC R: AGGCGAGTGCGAGTAAGACGAA	55	251 ~ 272
DKs76/DC585435	(AGG) <sub>7</sub>	F: TCGGCTTCACCTATGTTG R: CGATTCTTGGACCTTTG	52	111 ~ 138
DKs91/DC592713	(AG) <sub>7</sub>	F: CGGAAGAGGGAGAAATCG R: GAATCGGGAAGCAAGTT	55	191 ~ 207
mDp17/EF567410	(GA) <sub>21</sub>	F: CCAAATCATTCGAAGCCAAT R: CCTTCACCGATGTCCTTTGT	52	128 ~ 168
ssrDK11/DQ097479	(GA) <sub>16</sub>	F: ATGTTTCAGGGGTTCATTG R: TCACTCGTCTTTGCCTTTCC	53	155 ~ 195
ssrDK14/DQ097482	(AG) <sub>16</sub>	F: GTGAAGGAACCCCATAGAA R: CCATCATCAGGTAGGAGAGA	52	158 ~ 192
ssrDK29/DQ097497	(CCTTT) <sub>8</sub>	F: ATCATGAGATCAGAGCCGTC R: CACGTTAACGTTACGGAACA	53	112 ~ 152

## 1.4 数据分析

由于所用近缘种中的样品多为二倍体，而很多柿种质属于六倍体，并且其多倍体来源不清楚，无法按照传统的 SSR 分析方法进行数据分析 (Markwith et al., 2006; Liao et al., 2008)。因此根据 PCR 产物扩增情况，统计每一对引物在每一样品中的条带数，0 代表无条带，1 代表有条带，构建 0/1 矩阵。Excel 软件计算每一对引物扩增的条带总数 ( $N_a$ )、多态性条带数 ( $N_p$ )、带型总数 ( $N_1$ )、特异带型数 ( $N_2$ ，即带型数仅为 1 的所有样品总数)；特异带型比率 ( $P_1$ ) 和种质鉴别率 ( $P_2$ ) 的计算公式分别为  $P_1 = N_2/N_1$ ， $P_2 = N_2/N$  ( $N$  为样品总数)；并由带型频率代替等位基因频率计算多态性信息含量 (PIC) 和 Shannon 信息指数 ( $I$ )，其中， $PIC = 1 - P_{ij}$ ， $I = -P_{ij} \ln P_{ij}$  ( $P_{ij}$  为第  $i$  对引物第  $j$  个带型的频率)，根据带型状况计算每一对引物的观察杂合度 ( $H_o$ )。利用 NTsys 2.10 软件进行聚类分析，构建 Shan 型树状图，同时进行主坐标分析，判断资源间的亲缘关系。

## 2 结果与分析

### 2.1 SSR 标记的多态性分析

图 1 为引物 1430/DC588341 对 59 号样品‘树头红’的毛细管电泳检测结果。

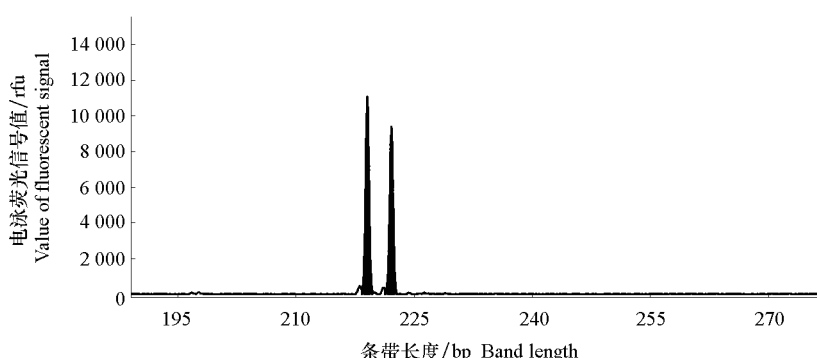


图 1 ‘树头红’在 1430/DC588341 处扩增产物的毛细管电泳检测图

Fig. 1 Capillary electropherogram obtained in locus 1430/DC588341 of ‘Shutouhong’

15 对引物对来自中国的完全雄株、雄全同株和雌雄同株共 60 份柿雄性资源进行 PCR 的扩增结果见表 3。所有引物平均产生 9.60 个条带，其中条带数最多的引物对是 mDp17/EF567410，其条带数 ( $N_a$ ) 为 17 个，最少的是 8125/DC592401，条带数为 4 个，所有位点的条带均表现出多态性。此外，在 15 对引物中共发现 27 个特异条带，特异条带最多的是引物 mDp17/EF567410，产生了 6 个特异条带。15 对引物共得到谱带类型 316 个 ( $N_1$ )，每对引物得到的带型数范围为 7~35 个，平均 21.07 个，带型数最多的引物是 ssrDK11/DQ097479，最少的则是 5553/DC585710；特异带型总数 ( $N_2$ ) 为 179 个，范围为 1~23 个，平均每对引物 11.93 个，产生特异带型数最多的引物是 ssrDK11/DQ097479，最少的是 9004/DC591297。此外，种质鉴定率 ( $P_2$ ) 和特异带型比率 ( $P_1$ ) 分别平均为 19.56% 和 50.43%。15 对引物多态性信息含量 (PIC) 范围是 0.5902~0.9503，最高的是 ssrDK11/DQ097479，最低的是 5553/DC585710，平均多态性信息含量为 0.8392；每对引物的 Shannon 信息指数 ( $I$ ) 平均为 1.9101，最高的是 ssrDK11/DQ097479 (2.8995)，最小的是 5553/DC585710 (0.6677)。本试验中观察杂合



度 ( $H_0$ ) 平均为 0.8448, 范围是 0.5082 ~ 1.0000。整体来看, 以上结果能够反映出中国柿雄性种质资源存在非常高的遗传变异, 其中位点 *ssrDK11/DQ097479* 在不同柿雄性品种中多态性程度最高, 反映信息量大, 在雄性种质鉴定中能发挥更大作用。

表 3 基于 15 对 SSR 引物在 60 份柿雄性资源中的遗传多样性  
Table 3 Genetic diversity index of the 15 SSR markers selected for the 60 male genotypes

位点/GenBank 编号 Locus/GenBank accession No.	$N_a$	$N_p$	特异条带 Unique allele	$N_1$	$N_2$	$P_1/\%$	$P_2/\%$	PIC	$I$	$H_0$
1430/DC588341	5	5	0	12	4	33.33	6.56	0.8105	1.6298	0.9508
1554/DC586537	10	10	1	25	13	52.00	21.31	0.9030	2.0257	0.9836
4379/DC585084	9	9	0	28	16	57.14	26.23	0.9436	2.4839	0.9672
5553/DC585710	7	7	2	7	4	57.14	6.56	0.5902	0.6677	1.0000
6615/DC585737	12	12	4	24	14	58.33	22.95	0.9360	1.7591	0.8361
6665/DC592790	12	12	2	28	17	60.71	27.87	0.9358	2.6198	0.8525
8125/DC592401	4	4	0	8	3	37.50	4.92	0.4899	1.0327	0.9672
8917/DC591591	10	10	1	30	19	63.33	31.15	0.8748	2.8248	0.7869
9004/DC591297	6	5	0	8	1	12.50	1.64	0.7632	0.9081	0.7377
DKs76/DC585435	11	11	3	28	18	64.29	29.51	0.8879	2.0834	0.9836
DKs91/DC592713	6	5	2	8	2	25.00	3.28	0.7503	0.7404	0.7869
mDp17/EF567410	17	17	6	28	18	64.29	29.51	0.9347	2.0956	0.5082
<i>ssrDK11/DQ097479</i>	14	14	3	35	23	65.71	37.70	0.9503	2.8995	0.7541
<i>ssrDK14/DQ097482</i>	13	13	2	31	21	67.74	34.43	0.9385	2.8655	0.9508
<i>ssrDK29/DQ097497</i>	8	8	1	16	6	37.50	9.84	0.8788	2.0158	0.6066
平均 Mean	9.60	9.47	1.80	21.07	11.93	50.43	19.56	0.8392	1.9101	0.8448
总计 Total	144	142	27	316	179	—	—	—	—	—

2.2 不同地区柿雄性资源遗传多样性

不同地区柿完全雄性资源的遗传多样性见表 4。49 份柿完全雄株和雄全同株资源共产生的条带数 ( $N_a$ ) 为 118, 平均每个省份产生的多态性条带 ( $N_p$ ) 53.83 个, 多态性条带数范围为 10 ~ 88 个, 相应的多态性条带比率 ( $P$ ) 为 23.81% ~ 90.72%, 每个省份的平均多态性信息含量 (PIC) 和 Shannon 信息指数 ( $I$ ) 分别为 0.7440 和 1.5973。结果表明, 湖北省柿完全雄性资源的多态性信息含量最高, 共产生 97 个条带, 其中木兰山地区的资源多态性信息含量较云架山地区高, 平均多态性信息含量和 Shannon 信息指数分别为 0.8765 和 0.8333。多态性信息含量最低的为陕西省资源, 仅产生了 42 个条带。

表 4 中国不同地区柿完全雄性资源的遗传多样性  
Table 4 Genetic diversity index of male *D. kaki* among different regions in China

来源 Origin	样品总数 Total samples	$N_a$	$N_p$	$P/\%$	PIC	$I$
湖北省 Hubei Province	27	97	88	90.72	0.9328	2.9464
湖北木兰山 Mulan Mountain, Hubei Province	18	82	72	87.80	0.8765	2.3663
湖北云架山 Yunjia Mountain, Hubei Province	6	67	41	61.19	0.8333	1.7918
广西壮族自治区 The Guangxi Zhuang Autonomous Region	8	83	69	83.13	0.7813	1.6675
江苏省 Jiangsu Province	6	66	45	68.18	0.8333	1.7918
江西省 Jiangxi Province	3	57	35	61.40	0.6667	1.0986
湖南省 Hunan Province	3	83	76	91.57	0.7500	1.3863
陕西省 Shaanxi Province	2	42	10	23.81	0.5000	0.6931
平均 Mean	8.17	71.33	53.83	69.80	0.7440	1.5973
总计 Total	49	118	—	—	—	—

此外, 结合柿雄性种质资源 (包括完全雄株、雄全同株和雌雄同株) 主坐标分析图 (图 2) 发

现, 60 份资源可分为 4 大类群, 其中大部分雄性资源聚在 A 类群, 这说明大部分雄性资源具有较为相近的亲缘关系, B 类群包括 6 份来自湖北省的完全雄性资源, C 类群和 D 类群则包括来自湖北省的 8 份完全雄性资源[木兰 - 1 (1) ~ 木兰 - 8 (8)]和来自广西省的 4 份完全雄性资源[广西 - 58 (32) ~ 广西 - 61 (35)]。

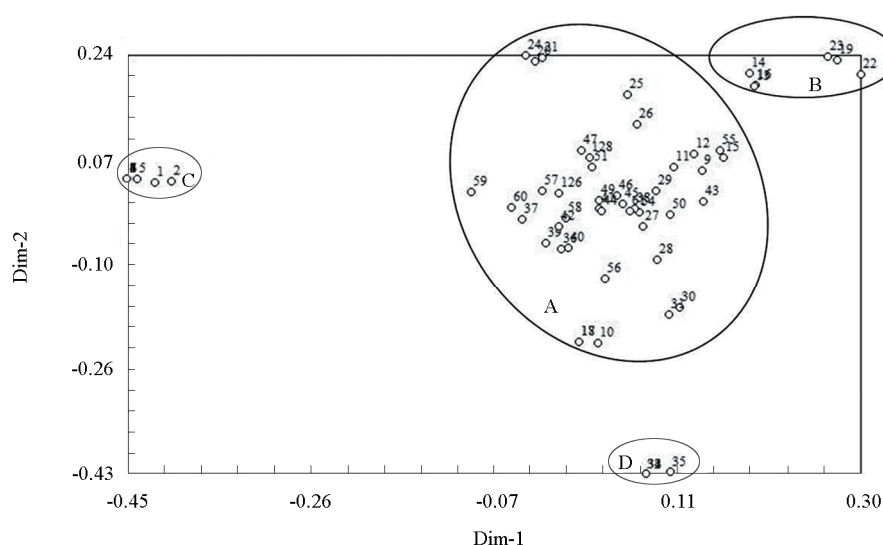


图 2 柿雄性种质资源主坐标分析

代号代表材料详见表 1。下同。

Fig. 2 Principal coordinates analysis of the male genotypes based on the SSR data  
Codes represent the materials in Table 1. The same below.

## 2.3 193 份柿种质资源的聚类分析

### 2.3.1 UPGMA 法

利用 UPGMA 法对 193 份柿种质资源进行聚类分析, 在相似系数约为 0.84 处, 193 份资源可被分为 16 组 (图 3)。

第 I 组有 76 份资源, 占资源总数的 39.4%, 其中雄性资源包括广西桂林野生雄全同株 1 份、陕西来源的‘青化雄株’ (50) 和‘站房后雄柿’ (49)、湖北雄株 11 份、湖南野柿雄株 3 份、江西野柿雄株和雄全同株共 3 份及江苏野柿雄株 6 份; 雌雄同株资源包括日本来源的‘正月’ (140)、陕西来源的‘耀县五花柿’ (55) 和‘黑心柿’ (56)、贵州来源的‘兴义水柿’ (57) 和‘盘县水柿’ (58) 及云南来源的‘玉溪 2 号’ (124)、‘马鞍 1 号’ (127) 和‘老尖山 5 号’ (126); 剩余资源包括江西野柿、湖南野柿和江苏野柿的雌株, 还包括罗田甜柿品种‘宝华甜柿’ (166) 及著名的涩柿品种‘火晶’ (116)、‘长安王后’ (111)、‘三元鸡心黄’ (114)、‘富平尖柿’ (110)、‘长沙莲花柿’ (91)、‘博爱八月黄’ (113), 以及‘中柿 2 号’ (132), 此外还包括‘麻城磨盘’ (133) 及湖南保靖、祁东、靖州来源的‘火柿’、‘腰带柿’、嫁接雌株等资源。这说明陕西、江西、湖南、江苏雄性资源及部分木兰山雄性资源可能具有相近的亲缘关系, 它们与相同来源地的野柿雌株及陕西、湖南、河南的涩柿品种也具有相近的亲缘关系。

第 II 组有 41 份资源, 占资源总数的 21.2%, 其中除了云南的 2 份野生资源及‘海安小方柿’ (109)、‘红冬柿’ (70)、‘南京铜盆柿’ (108) 之外, 其余皆为日本来源的柿资源。

第Ⅲ组有 14 份资源, 包括‘襄阳牛心柿’(54)、“祁阳野柿”(92)、湖南祁东来源的 5 份‘柿花’和 1 份野柿, 及广西桂林来源的 6 份野生雄性资源。

第Ⅳ组有 12 份资源, 包括湖北木兰山、云架山来源的雄性资源各 3 份和 6 份, 还包括罗田甜柿资源 2 份[其中包括‘甜宝盖’(62)]和 1 份罗田野柿。

第Ⅴ组包含 2 份资源, 为湖南靖州来源的‘鸟柿’(66 和 67) 2 份。

第Ⅵ组包含 1 份资源, 为湖南靖州来源的野生雌雄同株资源。

第Ⅶ组有 8 份资源, 包括广西桂林野生雄性资源 1 份、雌雄同株的‘树头红’(59)、“台湾正柿”(60), 以及雌株品种‘恭城月柿’(121)、“容县京柿”(112)、“牛头柿”(115)和湖南祁东来源的‘水柿’(82)等资源。这 8 份资源其分别起源于江苏、台湾、广西、浙江、湖南, 都属于南方地区, 这可能是其聚为一类的原因。

第Ⅷ组有 5 份资源, 包括湖北木兰山的 4 份雄性资源和罗田的 1 份雄性资源。

第Ⅸ组包含 1 份资源, 为江西野柿雌株。

第Ⅹ组包含 19 份资源, 包括君迁子雌株 7 份、雄株 4 份, 浙江柿雌株 2 份、雄株 1 份, 广西栽培雌株 1 份, 湖南靖州来源的‘冰糖柿’(64)和‘茶柿’(68)及湖南保靖来源的苗山柿(75)和罗浮柿(76)。

第Ⅺ组包含 1 份资源, 为‘德阳柿’(193)。

第Ⅻ组包含 1 份资源, 为‘金枣柿’(192)。

第Ⅼ组有 6 份资源, 包括广西桂林来源的 1 份雌雄同株柿和 5 份油柿品种。

第Ⅽ组包含 3 份资源, 为 1 份美洲柿雌株和 2 份美洲柿雄株。

第Ⅾ组包含 2 份资源, 均为乌柿。

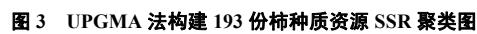
第Ⅿ组包含 1 份资源, 为湖南祁东 9 号, 它与其他资源亲缘关系最远。

UPGMA 聚类结果反映出以下规律: 1) 第Ⅰ至第Ⅸ组全部为柿种(*D. kaki*), 第Ⅹ至Ⅿ组以近缘种居多; 2) 来源地相同的野生资源大部分被聚到一起, 但相同来源地的雌株和雄株不能被区分; 3) 湖北木兰山野生雄性资源能被分为遗传关系较远的两类: 其中一类与江西野柿、江苏野柿、湖南野柿具有较近的亲缘关系, 这些野生资源还与主栽涩柿品种‘火晶’、‘长安王后’、‘三原鸡心黄’、‘富平尖柿’、‘中柿 2 号’等, 与雌雄同株涩柿品种‘耀县五花柿’、‘兴义水柿’、‘黑心柿’等, 及完全雌株‘青化雌株’和‘站房后雄柿’等资源亲缘关系较近, 但它们与湖北云架山和广西野生雄性资源亲缘关系较远, 另一类的湖北木兰山雄性资源与云架山雄性资源和罗田甜柿(包括‘甜宝盖’)亲缘关系很近; 4) 大部分日本来源的资源可被单独聚为一类; 5) 种间资源可被较好地分开。

### 2.3.2 ME 法

利用 ME (MEGA6.0) 法对 193 份柿种质资源进行聚类分析, 在遗传距离约为 0.28 处, 193 份柿种质资源可被分为 12 组(图 4)。

第Ⅰ组有 32 份资源, 占资源总数的 16.6%, 除了‘中柿 2 号’(132)、“老尖山-3”(125)以外, 其余皆为日本来源的资源, 包含完全甜柿‘贵秋’(159)、“夕红”(171)、“新秋”(160)、“花御所”(136)、“次郎”(161)、“富有”(162)、“甘秋”(165)、“太秋”(134)、“阳丰”(163)、“晚御所”(135)和 3 份甘秋芽变资源; 还包括不完全甜柿‘禅寺丸’(139)、“甘百目”(168)、“须波”(170)、不完全涩柿‘朱雀锦’(146)、“华柿 1 号”(137)以及 12 个‘富有’和‘赤柿’杂交子代个体。



**Fig. 3** UPGMA dendrogram illustrating the phylogenetic relationship among 193 *Diospyros* spp. based on analysis of SSR markers

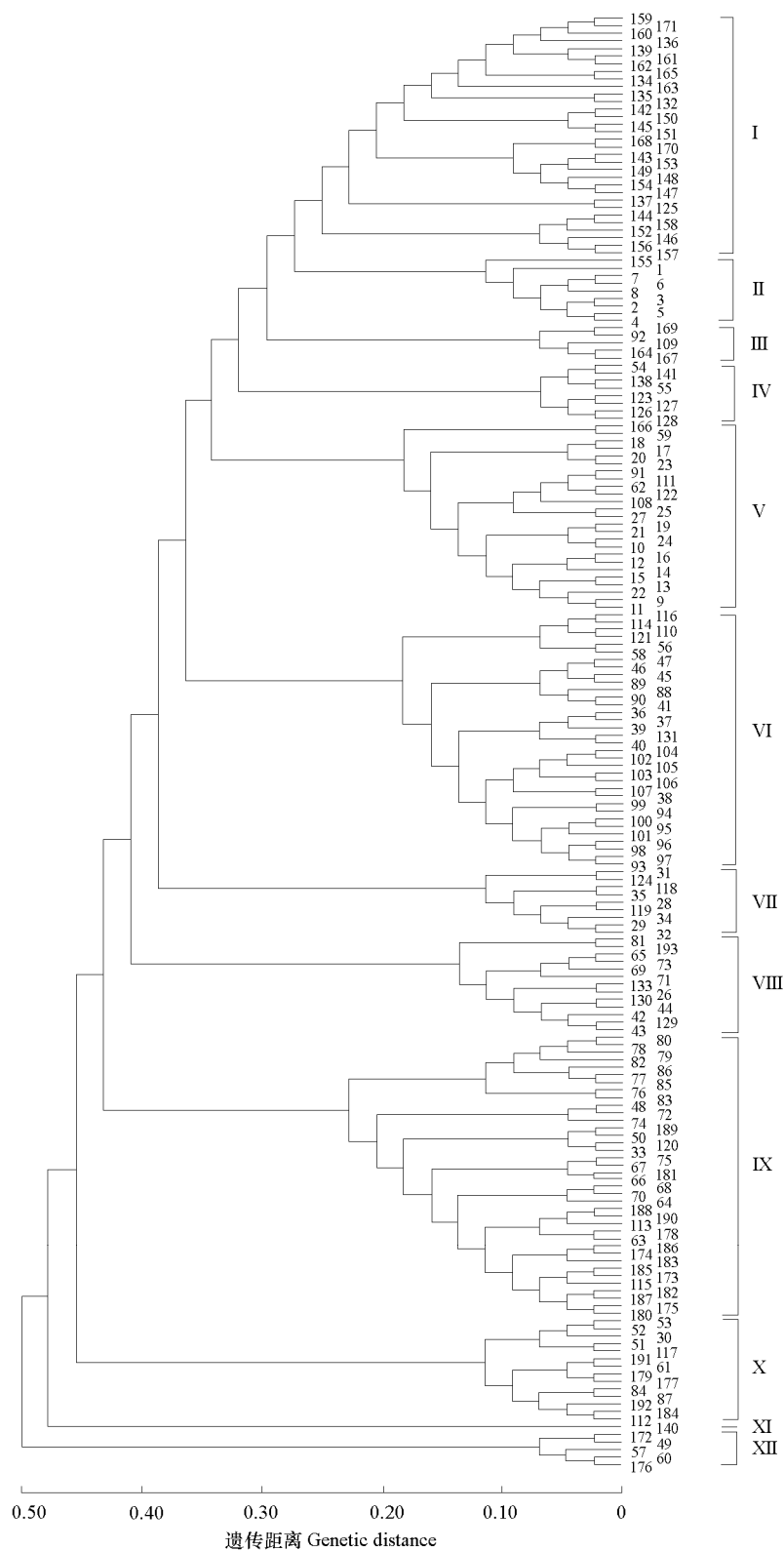


图 4 ME 法构建 193 份柿种质资源 SSR 聚类图

Fig. 4 ME dendrogram illustrating the phylogenetic relationship among 193 *Diospyros* spp. based on analysis of SSR markers

第II组包含9份资源,占资源总数的4.7%,除了‘F<sub>1</sub>-126’(155)外,其余皆为湖北木兰山雄性资源。

第III组包含5份资源,分别为完全甜柿‘早秋’(164)、“兴津-20”(167),不完全甜柿‘松太’(169),以及‘祁阳野柿’(92)和‘海安小方柿’(109)。

第IV组包含8份资源,分别为雌雄同株甜柿资源‘赤柿’(141)和‘西村早生’(138),和雌雄同株涩柿资源‘襄阳牛心柿’(54)、“耀县五花柿”(55)、“老尖山-5”(126)、“马鞍-6”(128),此外还包括涩柿野生资源‘玉溪-1’(123)和‘马鞍-1’(127)。这8份资源中有6份具有雌雄同株的特征,这可能是它们聚为一类的原因。

第V组包含25份资源,占资源总数的13.0%,包括完全甜柿‘宝华甜柿’(166)和‘甜宝盖’(62)、江苏来源的雌雄同株涩柿品种‘树头红’(59)、涩柿完全雌株品种‘长沙莲花柿’(91)、“长安王后”(111)、“阳朔牛心”(122)、“南京铜盆柿”(108),以及10份木兰山雄性资源、6份云架山雄性资源等。

第VI组包含34份资源,占总数的17.6%,包括陕西来源的完全涩柿‘火晶’(116)、“三元鸡心黄”(114)、“富平尖柿”(110)和雌雄同株涩柿资源‘黑心柿’(56),以及广西的‘恭城月柿’(121)和贵州的雌雄同株涩柿‘盘县水柿’(58)。此外,本组还包括湖南野柿完全雌株和完全雄株资源各3份、江苏野柿完全雄株资源6份和完全雌株资源15份,及江西野柿雌株1份。

第VII组包含9份资源,包含1份云南涩柿野生资源‘玉溪-2’(124)、广西野生雄性资源和雌性资源各5份和2份,以及广西野生雄全同株资源1份。

第VIII组包含13份资源,有湖南来源的3份‘腰带柿’资源和2份野生雌性资源,还有‘罗田野柿雄株’(26)和‘麻城磨盘’(133)各1份,及江西野柿雄株、雌株和雄全同株资源各2份、2份和1份,此外,还有四倍体近缘种‘德阳柿’(193)。

第IX组包含38份资源,占资源总数的19.7%,包括18份湖南来源的‘柿花’、乌柿、罗浮柿、苗山柿、“冰糖柿”、“红冬柿”、“茶柿”等资源,还包括2份广西的栽培品种、1份罗田甜柿资源、完全涩柿‘博爱八月黄’(113)和‘牛头柿’(115)、完全雄株‘青化雄株’(50)、君迁子雌性和雄性资源各6份和3份、浙江柿雌性和雄性资源各2份和1份、美洲柿雌株1份,及油柿1份。

第X组包含14份资源,包括来源于广西、浙江和湖南的油柿各2份、1份和1份、君迁子雌株1份、金枣柿雌株和美洲柿雌株各1份,以及广西野生雌株和雄株各2份和1份、湖南栽培品种2份、湖南野生雌雄同株1份和涩柿品种‘容县京柿’(112)。

第XI组只有一份资源,即日本雌雄同株不完全甜柿品种‘正月’(140)。

第XII组共5份资源,分别为君迁子雄株1份、美洲柿雄株1份、完全雄株‘站房后雄柿’(49)和雌雄同株‘兴义水柿’(57)和‘台湾正柿’(60)。

ME聚类结果分组数和每组资源数量和类别与UPGMA结果不完全一致,这和资源数量较多、SSR引物数量有限、数据处理过程中人为主观误差等有关,但ME聚类结果所反应的总体规律与UPGMA聚类结果相似,这表明本研究结果总体是可靠的。

### 3 讨论

#### 3.1 柿雄性种质资源缺乏及长期未受到重视的原因分析

柿完全雄性资源缺乏(李高潮等,1996;张青林,2006),已报道的完全雄性资源多分布于

湖北大别山区(张青林, 2006)。作者根据当地林业部门及原住民提供的线索, 连续 5 年赴江苏、湖南、江西、广西等地的野生山区调查柿雄性资源的分布情况, 发现柿完全雄性资源在适生的野生山区是普遍存在的。这说明在自然群体中, 柿雄性资源并非稀有资源。推测目前柿雄性资源罕见且长期没有受到重视的主要原因是: 柿孤雌生殖能力(单性结实能力)强, 雄株的缺乏对果实产量影响不大, 因此, 出于对果实的需要, 持续不断地将柿雄株改接成为雌株, 从而人为造成雄性资源匮乏。此外, 柿在生产上一般无需配置授粉树, 因此雄性种质资源在研究中和生产上一直没有受到足够的重视。

### 3.2 柿雄性种质资源遗传多样性分析

UPGMA 和 ME 聚类结果都表明各来源地内部野生资源不论雌雄, 大部分都能聚在一起。而在各来源地间, 除了湖南野柿与江苏野柿亲缘关系较近、湖北云架山野生雄株除与部分木兰野生雄株亲缘关系较近外、其他来源地间野生雄株都表现出遗传隔离。这表明野生资源的地理隔离是较为明显的, 野生雄株很可能是当地野生资源的杂交后代。

两种聚类方法还表明湖北木兰山野生雄株在遗传关系上可被分为 2 类, 即木兰 1 ~ 8 号为第一类, 木兰 40、44、58 等为第二类, 其中第二类与云架山 6、8、19、25 和罗田甜柿(包括‘甜宝盖’)等亲缘关系较近。这表明湖北雄性种质资源遗传多样性较为丰富。

### 3.3 柿种内资源间遗传多样性分析

两种聚类结果都能将大部分日本来源的柿资源单独聚为一类(包括完全甜柿和不完全甜柿资源, 也包括完全雌株和雌雄同株资源), 这说明日本来源的资源与中国的主栽品种和野生资源具有相对独立的起源, 这与 Hu 和 Luo (2006)、Liang 等 (2015) 和张平贤等 (2016) 的观点一致。

UPGMA 聚类法表明主栽涩柿品种‘火晶’、‘长安王后’、‘三原鸡心黄’、‘富平尖柿’、‘中柿 2 号’、‘长沙莲花柿’等、雌雄同株涩柿品种‘耀县五花柿’、‘兴义水柿’、‘黑心柿’等, 及完全雄株‘青化雄株’和‘站房后雄柿’等资源与江西野柿、江苏野柿、湖南野柿和部分木兰山野柿亲缘关系相对较近, 而这些种质资源与云架山的雄性资源并没有聚在一起, 说明云架山的雄性资源起源相对独立, 这一结果与张青林 (2006) 的报道相近, 他认为罗田的雄性资源与‘五花柿’、‘树头红’等雌雄同株的涩柿品种亲缘关系较远。

### 3.4 柿属种间遗传多样性分析

两种聚类方法都能较好地柿种 (*D. kaki*) 和君迁子 (*D. lotus*)、浙江柿 (*D. glaucifolia*)、油柿 (*D. oleifera*)、美洲柿 (*D. virginiana*)、乌柿 (*D. cathayensis*) 和罗浮柿 (*D. morrisiana*) 等近缘种资源分开, 其中君迁子与浙江柿亲缘关系最近, 这与 Fu 等 (2016) 和张永芳等 (2016) 的结果一致, 君迁子和浙江柿又与湘西的罗浮柿、乌柿、苗山柿、‘冰糖柿’和‘茶柿’等资源的亲缘关系较近, 以上资源又与德阳柿、金枣柿、油柿和柿的亲缘关系较近, 而与美洲柿亲缘关系较远, 这和梁晋军等 (2014) 发现的美洲柿与其他种亲缘关系较远的结论一致。

### 3.5 柿雄性种质资源的重要性和利用途径

雄性种质资源作为父本在杂交育种中具有重要价值(李加茹 等, 2016)。例如日本学者观察到甜柿品种‘次郎’偶尔开出雄花, 遂将‘次郎’花粉授于‘富有’, 培育出了商品性高、最具推广价值的优良甜柿品种‘阳丰’(Yamane et al., 1991)。再比如张娜等 (2016) 研究发现大别山

区的‘雄株8号’携带有控制自然脱涩性状的显性基因,因此其在完全甜柿遗传改良中具有作为育种亲本的应用潜力。在杂交育种中,除选择具有重要性状调控基因的父本外,还应该选择亲缘关系远、遗传差异大的父本,这样能够提高后代的遗传变异程度,更有利于种质创制和良种选育。

除了杂交育种,雄性种质资源在多倍体育种方面也具有重要价值(Chijiwa et al., 2013)。多倍体种质往往具有很多优良性状,例如日本学者培育的九倍体涩柿品种‘平核无’具有无核、易脱涩、耐贮存、风味好等优点,现已成为品质最好、最具推广价值的涩柿品种。本研究团队近期对近80份不同来源及类型的雄性资源的2n花粉得率进行了观察统计,发现2n花粉得率最高可达9%(此结果尚未发表)。以这些2n花粉得率高的雄性种质作为授粉父本,有望获得柿多倍体新种质(谷晓峰和罗正荣, 2003; 袁录霞等, 2011; 徐君驰等, 2017)。后期还将继续筛选2n花粉得率高的雄性种质,以促进柿多倍体育种的深入开展。

### 3.6 本研究方法的误差和局限性分析

本研究中采用两种聚类方法对193份资源进行聚类,所得结果与各资源来源和类型规律基本吻合,表明研究结果总体上准确可靠,但也存在一些不合理之处。例如,在UPGMA聚类结果中,‘海安小方柿’与日本甜柿‘甘秋’、‘禅寺丸’、‘贵秋’、‘新秋’和‘阳丰’等品种亲缘关系很近,而在ME聚类结果中,‘海安小方柿’又与日本甜柿品种‘松太’、‘早秋’和‘兴津20’亲缘关系很近,‘海安小方柿’是来源于江苏省的完全涩柿品种,它与日本甜柿亲缘关系很近的结果是不合理的。又如,ME聚类结果中,第V组的‘宝华甜柿’、‘树头红’、‘长沙莲花柿’、‘长安王后’、‘甜宝盖’、‘阳朔牛心’、‘南京铜盆’等来源地相隔较远、甜涩类型各异、性别类型不同的资源聚在一起也不合理。还有在ME聚类结果的第XII组中,‘君迁子’、‘站房后雄柿’、‘兴义水柿’、‘台湾正柿’、‘美洲柿-1’分属3个种,且来源地不同,它们聚在一起也不合理。出现这些不合理结果的原因可能与聚类方法的局限性有关(吕宝忠, 1993; 黄原, 1998; 张青林, 2006),也可能与本研究中所用SSR引物数量有限所导致的误差有关。针对前一种可能,通过对比UPGMA和ME两种聚类方法所得结果,尽可能减少误差;针对后一种可能,以后有必要增加引物数量并结合其他标记方法来减少误差。

本研究结果虽较好地地区分了不同来源地和种间资源,但不能很好地区分不同甜涩类型和性别类型的资源,这可能和基因组中以非编码区来反映种质间亲缘的特性有关,这也是本研究的一个重要局限性。

## References

- Ai Cheng-xiang, Qin Zhi-hua, Xin Li. 2014. Development report of Chinese persimmon industry in 2013. *China Fruit Vegetable*, 34 (2): 10 - 13. (in Chinese)
- 艾呈祥, 秦志华, 辛力. 2014. 2013年中国柿产业发展报告. *中国果蔬*, 34 (2): 10 - 13.
- Chijiwa H, Asakuma H, Ishizaka A. 2013. Development of seedless PCNA persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) cv. ‘Fukuoka K1 Gou’ and the effect of gibberellin spray and/or disbudding on fruit set. *Horticultural Research*, 12 (3): 263 - 267. (in Japanese)
- Doyle J J, Doyle J L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 19 (1): 11 - 15.
- Du Xiao-yun, Zhang Qing-lin, Luo Zheng-rong. 2009a. Comparison of four molecular markers for genetic analysis in *Diospyros* L. (Ebenaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 281: 171 - 181.
- Du Xiao-yun, Zhang Qing-lin, Luo Zheng-rong. 2009b. Development of retrotransposon primers and their utilization for germplasm identification in *Diospyros* spp. (Ebenaceae). *Tree Genet & Genomes*, 5: 235 - 245.



- Fu Jian-min, Liu Hui-min, Hu Jing-jing, Liang Yu-qin, Liang Jin-jun, Wuyun Tana, Tan Xiao-feng. 2016. Five complete chloroplast genome sequences from *Diospyros*: genome organization and comparative analysis. PLoS ONE, 11 (7): 1 - 18.
- Gu Xiao-feng, Luo Zheng-rong. 2003. Regeneration of dodecaploid plants from *in vitro* leaves of 'Luotian Tianshi' persimmon treated with colchicine. Acta Horticulturae Sinica, 30 (3): 325 - 327. (in Chinese)
- 谷晓峰, 罗正荣. 2003. 秋水仙素处理 '罗田甜柿' 获得 12 倍体再生植株. 园艺学报, 30 (3): 325 - 327.
- Guo Da-long, Luo Zheng-rong. 2006b. Genetic relationships of some PCNA persimmons (*Diospyros kaki* Thunb.) from China and Japan revealed by SRAP analysis. Genetic Resources and Crop Evolution, 53: 1597 - 1603.
- Guo Da-long, Luo Zheng-rong. 2008. Microsatellite isolation and characterization in Japanese persimmon (*Diospyros kaki*). Biochemical Genetics, 46: 323 - 328.
- Guo Ding-lin, Luo Zheng-rong. 2006a. Development of SSR primers using ISSR-PCR in *Diospyros kaki* Thunb. Molecular Ecology Notes, 6: 621 - 622.
- He Hua-qi, Liu Min-xiang, Wang Ying, Mao Wen-jun, Bao Da-peng. 2017. Genetic diversity analysis of *Cordyceps militaris* using SSR molecular markers. Acta Horticulturae Sinica, 44 (11): 2195 - 2202. (in Chinese)
- 何华奇, 刘敏祥, 汪 滢, 茅文俊, 鲍大鹏. 2017. 运用 SSR 分子标记分析蛹虫草遗传多样性. 园艺学报, 44 (11): 2195 - 2202.
- Hu De-chang, Luo Zheng-rong. 2006. Polymorphisms of amplified mitochondrial DNA non-coding regions in *Diospyros* spp. Scientia Horticulturae, 109: 275 - 281.
- Huang Yuan. 1998. Molecular systematics: principle, methods and application. Beijing: China Agriculture Press: 314 - 358. (in Chinese)
- 黄 原. 1998. 分子系统学——原理、方法及应用. 北京: 中国农业出版社: 314 - 358.
- Ismail N A, Rafii M Y, Mahmud T M M, Hanafi M M, Miah G. 2016. Molecular markers: a potential resource for ginger genetic diversity studies. Molecular Biology Reports, 43: 1347 - 1358.
- Jin Guang. 2012. Effects of de-astringency from persimmon by different carbon dioxide and ethanol treatments [M. D. Dissertation]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. (in Chinese)
- 金 光. 2012. 二氧化碳和乙醇处理对早熟红柿脱涩效果的影响 [硕士论文]. 北京: 中国农业科学院. (in Chinese)
- Kajiura M. 1946. Persimmon cultivars and their improvement. Breed Horticulturae, 1: 175 - 182.
- Li Gao-chao, Wang Ren-zi, Yang Yong. 1996. Male germplasm resources in *Diospyros kaki*. Journal of Fruit Science, 13 (3): 199 - 200. (in Chinese)
- 李高潮, 王仁梓, 杨 勇. 1996. 柿种植物雄性种质资源. 果树科学, 13 (3): 199 - 200.
- Li Jia-ru, Sun Peng, Han Wei-juan, Li Fang-dong, Fu Jian-min, Diao Song-feng. 2016. Morphological key period study on floral sex differentiation in pollination-constant and non-astringent persimmon 'Zenjimaru'. Acta Horticulturae Sinica, 43 (3): 451 - 461. (in Chinese)
- 李加茹, 孙 鹏, 韩卫娟, 李芳东, 傅建敏, 刁松锋. 2016. 不完全甜柿 '禅寺丸' 花性别分化形态学关键时期的研究. 园艺学报, 43 (3): 451 - 461.
- Liang Jin-jun. 2015. Study on relationship of *Diospyros kaki* and its related species and genetic diversity of *D. kaki* [M. D. Dissertation]. Beijing: Chinese Academy of Forestry Sciences. (in Chinese)
- 梁晋军. 2015. 柿及其近缘种亲缘关系及柿品种遗传多样性的研究 [硕士论文]. 北京: 中国林业科学研究院.
- Liang Jin-jun, Liang Yu-qin, Fu Jian-min. 2014. Genetic relationships of *Diospyros kaki* and related *Diospyros* species using chloroplast DNA PCR-RFLP markers. Acta Horticulturae Sinica, 41 (12): 2474 - 2480. (in Chinese)
- 梁晋军, 梁玉琴, 傅建敏. 2014. 基于叶绿体 DNA PCR-RFLP 分析柿及其近缘种亲缘关系. 园艺学报, 41 (2): 2474 - 2480.
- Liang Yu-qin, Han Wei-juan, Sun Peng. 2015. Genetic diversity among germplasms of *Diospyros kaki* based on SSR markers. Scientia Horticulturae, 186: 180 - 189.
- Liao Wan-jin, Zhu Bi-ru, Zeng Yan-fei, Zhang Da-yong. 2008. TETRA: an improved program for population genetic analysis of allotetraploid microsatellite data. Molecular Ecology Resources, 8: 1260 - 1262.
- Luo Zheng-rong, Cai Li-hong. 1998. Chinese persimmons and their research progress//Memoir of the first national dried fruit production and research seminar. Beijing: China Forestry Publishing House: 12 - 16. (in Chinese)

- 罗正荣, 蔡礼鸿. 1998. 中国柿及其研究近况//首届全国干果生产与科研进展学术研讨会论文集. 北京: 中国林业出版社: 12 - 16.
- Lü Bao-zhong. 1993. Construction of molecular evolution dendrogram. *Zoological Research*, 14 (2): 186 - 193. (in Chinese)
- 吕宝忠. 1993. 分子进化树的构建. *动物学研究*, 14 (2): 186 - 193.
- Markwith S H, Stewart D J, Dyer J L. 2006. TETRASAT: a program for the population analysis of allotetraploid microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 6: 586 - 589.
- Sun Peng, Li Jia-ru, Duan Wei, Fu Jian-min, Han Wei-juan, Liang Yu-qin, Liang Jin-jun, Diao Song-feng. 2015. Survey of fruit phenotypic characters of persimmon germplasm resources in Henan Province. *Nonwood Forest Research*, 33 (4): 9 - 17. (in Chinese)
- 孙 鹏, 李加茹, 段 伟, 傅建敏, 韩卫娟, 梁玉琴, 梁晋军, 刁松峰. 2015. 河南省柿种质资源果实表型特征分析. *经济林研究*, 33 (4): 9 - 17.
- Xu Jun-chi, Gan Jian-ping, Xiang Jun, Zhang Qing-lin, Xu Li-qing, Guo Da-yong, Luo Zheng-rong. 2017. Advance of genetic improvement technology for Chinese PCNA Persimmon. *Acta Horticulturae Sinica*, 44 (5): 987 - 998. (in Chinese)
- 徐君驰, 干建平, 项 俊, 张青林, 徐莉清, 郭大勇, 罗正荣. 2017. 中国甜柿遗传改良技术体系研究进展. *园艺学报*, 44 (5): 987 - 998.
- Yamane H, Kurihara A, Nagata K, Yamada M, Kishi M, Yoshinaga K, Matsumoto R, Kaneto K, Sumi T, Hirabayashi T, Ozawa S, Hirose K, Yamamoto M, Kadotani M. 1991. New Japanese persimmon cultivar 'Youhou'. *Bul Fruit Tree Res Stn*, 20: 49 - 61. (in Japanese)
- Yang Hong-sheng, Li Xiu-ping, Liu De-jiang. 2016. Genetic diversity and population structure of the endangered medicinal plant *Phellodendron amurense* in China revealed by SSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 66: 286 - 292.
- Yonemori K, Honsho C, Kanzaki S, Ino H, Ikegami A, Kitajima A, Sugiura A, Parfitt D E. 2008a. Sequence analyses of the ITS regions and the *matk* gene for determining phylogenetic relationships of *Diospyros kaki* (persimmon) with other wild *Diospyros* (Ebenaceae) species. *Tree Genetic & Genomes*, 4: 149 - 158.
- Yonemori K, Honsho C, Kitajima A, Aradhya M, Giordani E, Bellini E, Parfitt D E. 2008b. Relationship of European persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) cultivars to Asian cultivars, characterized using AFLPs. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55: 81 - 89.
- Yuan Lu-xia, Zhang Qing-lin, Guo Da-yong, Luo Zheng-rong. 2011. Characteristics of Chinese PCNA types and their roles in Science and industry of oriental persimmon. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (2): 361 - 370. (in Chinese)
- 袁录霞, 张青林, 郭大勇, 罗正荣. 2011. 中国甜柿及其在世界甜柿基因库中的地位. *园艺学报*, 38 (2): 361 - 370.
- Zhang Na, Mo Rong-li, Zhang Qing-lin, Luo Zheng-rong. 2016. Application potential of Chinese androecious genotype, 'Male 8' as the parent in the genetic improvement of PCNA persimmon. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (11): 2133 - 2140. (in Chinese)
- 张 娜, 莫荣利, 张青林, 罗正荣. 2016. 完全雄性柿种质 '雄株 8 号' 作为中国甜柿育种亲本的可能性研究. *园艺学报*, 43 (11): 2133 - 2140.
- Zhang Ping-xian, He Huan, Luo Zheng-rong, Yang Yong, Wang Ren-zi, Zhang Qing-lin. 2016. Validation of male sex-linked DISx-AF4S marker in persimmon and F<sub>1</sub> progenies. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (1): 47 - 54. (in Chinese)
- 张平贤, 何 欢, 罗正荣, 杨 勇, 王仁梓, 张青林. 2016. DISx-AF4S 标记在柿及其杂交后代性别鉴定中的有效性研究. *园艺学报*, 43 (1): 47 - 54.
- Zhang Qing-lin. 2006. Genetic relationships between pollination constant non-astringent persimmons and some staminate germplasm native to China based on RAPD and ISSR analysis [Ph. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 张青林. 2006. 完全甜柿及部分雄性种质间的亲缘关系研究[博士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Zhang Yong-fang, Hu Chao-qiong, Yang Yong, Zhu Ren-sheng, Guo Jing, Wang Ren-zi. 2016. Pollen morphology observation of eight resources in *Diospyros*. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (6): 1167 - 1174. (in Chinese)
- 张永芳, 胡超琼, 杨 勇, 朱仁胜, 郭 静, 王仁梓. 2016. 柿属 8 种植物花粉形态观察. *园艺学报*, 43 (6): 1167 - 1174.