

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201706010

引文格式: 陈灼娟. 枇杷属内栽培种和部分野生种 ITS 序列分析 [J]. 广西植物, 2017, 37(11):1447-1454

CHEN ZJ. ITS sequences from cultivars and some wild species of genus *Eriobotrya* [J]. *Guihaia*, 2017, 37(11):1447-1454

# 枇杷属内栽培种和部分野生种 ITS 序列分析

陈灼娟

(福州大学 至诚学院 生物工程系, 福州 350002)

**摘要:** 对不同栽培区的 25 种普通枇杷品种以及 7 种枇杷属野生种的 ITS 序列进行扩增并测序, 采用邻接法和最大简约法进行系统发育树的构建并对枇杷属内不同种间的遗传关系进行了分析。结果表明: 枇杷属植物 ITS 序列 ITS1+5.8S rDNA+ITS2 总长度为 592 bp 或 594 bp, 长度变化发生在 ITS2。所有样本的 ITS1 和 5.8S rDNA 长度一样, 都是 223 bp 和 168 bp; 而 ITS2 为 201 bp 或 203 bp。5 种枇杷属野生种的 ITS 序列长度为 594 bp, 包括栎叶枇杷、大渡河枇杷、南亚枇杷、南亚枇杷窄叶变种和大瑶山枇杷; 其余 2 种枇杷属野生种 (麻栗坡枇杷、小叶枇杷) 和普通枇杷栽培种的 ITS 序列长度都为 592 bp。所有样本 ITS 序列的 GC 含量为 64.2%~64.5%, 其中 ITS1 为 64.1%~65.5%, ITS2 为 68.1%~72.6%。对所有样本的 ITS 序列比对产生 44 个可变位点, 其中 38 个为简约信息位点, 其中 11 个位于 ITS1, 5 个位于 5.8S rDNA, 22 个位于 ITS2。最大的种间序列差异为 7.7%, 最小的种间差异发生在麻栗坡枇杷和小叶枇杷之间, 仅为 0.2%。普通枇杷种内的 ITS 序列差异很低, 25 种普通枇杷栽培种之间的序列差异为 0~1.5%。所研究的枇杷属植物可分为 3 个分支。分支 I 包括所有普通枇杷品种, 分支 II 包含 5 种野生枇杷种, 包括栎叶枇杷、大渡河枇杷、南亚枇杷、南亚枇杷窄叶变种和大瑶山枇杷; 分支 III 由 2 个野生枇杷种 (麻栗坡枇杷、小叶枇杷) 组成。该研究结果表明 ITS 序列对枇杷种间鉴定和系统发育分析具有一定意义, 但对普通枇杷栽培种间的鉴定作用不大。

**关键词:** 枇杷属, ITS 序列, 变异位点, 系统发育

中图分类号: Q781, Q949 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2017)11-1447-08

## ITS sequences from cultivars and some wild species of genus *Eriobotrya*

CHEN Zhuo-Juan

(Department of Biological Engineering, Zhicheng College, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** Internal transcribed spacer (ITS1, 5.8S rDNA and ITS2) regions of seven wild *Eriobotrya* species and twenty-five loquat (*E. japonica*) cultivars were cloned and sequenced. The phylogenetic tree was constructed by the Neighbor-joining method and the maximum parsimony method, and phylogenetic relationships of different species of

收稿日期: 2017-07-26 修回日期: 2017-08-20

基金项目: 福建省教育厅中青年教育科研项目 (JAT160663) [Supported by Youth Education Scientific Research Program of Education Department of Fujian Province (JAT160663)].

作者简介: 陈灼娟 (1983-), 女, 福建福州人, 硕士, 讲师, 主要研究方向为生物化学与分子生物学, (E-mail) 282714506@qq.com。

were studied in this work. The size of the ITS1+5.8S rDNA+ITS2 sequences was 592 bp or 594 bp. The length variation was found in ITS2. The length of ITS1 and 5.8S rDNA for all sample were identical, with a value of 223 bp and 168 bp. While ITS2 was 201 bp or 203 bp. The experimental data obtained from five wild *Eriobotrya* plants (*E. prinoidea*, *E. prinoidea* var. *daduheensis*, *E. bengalensis*, *E. bengalensis* f. *angustifolia*, *E. dayaoshanensis*) showed the same sequence length of 594 bp, while the others were 592 bp. Variation of GC contents has been also observed and scored as 64.1%–65.5% and 68.1%–72.6% for ITS1 and ITS2. The alignment of all the ITS sequences from *Eriobotrya* plants produced 44 variable sites with 38 parsimony of informative sites ( 11 in ITS1, 5 in 5.8S rDNA and 22 in ITS2 ). The greatest interspecific sequence divergence was 7.7%. The lowest value (0.2%) occurred between *E. malipoensis* and *E. seguinii* showed the similar ITS sequence. We found that divergence among loquat (*E. japonica*) cultivars sequence was very low. The intraspecific sequence variabilities between twenty-five loquat (*E. japonica*) cultivars were 0–1.5%. All phylogenetic trees, by the Neighbor-joining method and the maximum parsimony method, confirmed these *Eriobotrya* plants could be divided into three major clades. Clade I contained all loquat (*E. japonica*) cultivars. Clade II contained five wild species of *Eriobotrya* (*E. prinoidea*, *E. prinoidea* var. *daduheensis*, *E. bengalensis*, *E. bengalensis* f. *angustifolia*, *E. dayaoshanensis*). Clade III consisted of *E. malipoensis* and *E. seguinii* formed a basal clade. ITS data failed to resolve internal relationship within the Clade I, an important clade since all loquat (*E. japonica*) cultivars analysed were in this clade. Our results strongly supported the efficiency of ITS sequence for the genetic diversity among *Eriobotrya* species, but use ITS sequence to identify the variety of loquat (*E. japonica*) cultivars did not appear to help.

**Key words:** *Eriobotrya*, ITS sequence, variation point, phylogeny

枇杷属 (*Eriobotrya* Lindl.) 属于蔷薇科 (Rosaceae) 苹果亚科 (Maloideae), 有 27~30 种, 主要分布在东亚和东南亚地区。普通枇杷 (*Eriobotrya japonica*) 由于其可食性而广为人知。在中国, 关于枇杷的记载可追溯到 2000 年前, 中国拥有丰富的枇杷种质资源, 种类多、分布广。在古代, 枇杷就被引种到国外, 现在枇杷已在世界其他地区普遍种植 (Soriano et al, 2005)。为理解枇杷属植物的分布和分类情况, 学术界进行了大量的研究工作。在中国有大量的野生枇杷种质资源, 并不断有新的枇杷种被发现 (Lin, 1999)。但由于对野生枇杷的研究较少以及缺乏快速有效的鉴定工具, 造成枇杷属内种类的一些混乱 (杨向晖等, 2005); 而普通枇杷由于长期以来不同区域间经常相互引种栽培, 果农自行定名推广, 导致枇杷品种出现同物异名和同名异物的混乱现象。所以, 枇杷属内植物的遗传评价和物种鉴定对于资源的保护和利用尤为重要。

传统的系统发育分析基于形态学特征进行, 随着分子生物学的发展, 一些生物学标志如同工

酶 (方德秋和章恢志, 1989)、等位酶 (蔡礼鸿等, 2005)、RAPD (Vilanova et al, 2001)、AFLP (吴锦程等, 2006)、SSR (Soriano et al, 2005) 等已被用于枇杷遗传多样性和种质鉴定研究中。ITS 序列具有进化速率快、稳定性好和测序方便的优点, 成为研究植物系统发育及分子进化的有效工具和重要标记, 被广泛应用于植物属间、种间以及种内各栽培种间分类研究 (Alvarez & Wendel, 2003)。本研究测定了 25 种普通枇杷栽培种及 7 种枇杷属野生种的 ITS 序列, 并进行枇杷属系统发育分析, 研究枇杷属内分类学关系, 为枇杷属物种多样性保护、种质鉴别和栽培育种提供分子生物学工具和依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

植物材料均采自国家果树种质福州枇杷资源圃, 包括 25 种普通枇杷栽培种, 代表国内外不同的枇杷栽培区, 还采集了 7 种枇杷属野生种, 采集时均采集树上嫩叶, 并立即保存于液氮中备用, 品

种名称、原产地详见表 1。本研究选取了与枇杷属亲缘关系近的苹果属的 *Malus fusca* (GenBank No: AF186514) 和李属的 *Pyrus ussuriensis* (GenBank No: EU150058) 作为外类群。

OMEGA E.Z.N.A HP plant DNA Kit、OMEGA E.Z.N.A Gel Extraction Kit 购自福州博鸿生物科技有限公司;即用 PCR 扩增试剂盒及部分药品购自上海生工生物工程有限公司,引物由上海生工生物工程有限公司合成。ITS 引物采用 White et al (1990)设计的通用引物 ITS1 和 ITS4,引物 ITS1 和引物 ITS4 分别位于 18S 和 28S rDNA 片段上,可扩增全长 ITS1、5.8S rDNA 和 ITS2 序列。

## 1.2 方法

1.2.1 枇杷叶基因组 DNA 的提取和检测 液氮中研磨枇杷叶至粉末,应用 E.Z.N.A HP plant DNA Kit 进行 DNA 提取,具体操作参照试剂盒说明书。提取到的 DNA 用 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.2 PCR 扩增 PCR 扩增应用上海生工即用 PCR 试剂盒进行,反应体系包含 25  $\mu\text{L}$  2  $\times$  PCR Master (含  $\text{MgCl}_2$ )、1  $\mu\text{L}$  Primer ITS-1(20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、1  $\mu\text{L}$  Primer ITS-4(20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、50 ng 枇杷叶基因组 DNA。反应程序为 94  $^\circ\text{C}$  预变性 10 min;94  $^\circ\text{C}$  变性 1 min、55  $^\circ\text{C}$  退火 30 s、72  $^\circ\text{C}$  延伸 1 min,30 cycles;最后 72  $^\circ\text{C}$  延伸 10 min。PCR 产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 PCR 产物回收与测序 PCR 产物使用 OMEGA E.Z.N.A Gel Extraction Kit 进行回收纯化,回收产物直接测序,测序工作委托上海生工生物工程有限公司进行。

1.2.4 数据分析 ITS1、5.8S 和 ITS2 的边界由已知 *Eriobotrya japonica* ITS 序列 (GenBank No: U16192) 和近缘种已经发表的 ITS 序列来界定,利用 CLUSTAL X v.1.81 (Thompson et al, 1997) 进行序列排列,并进行手工校正。利用 MEGA v.4.0.2 (Tamura et al, 2007) 对 ITS1、5.8S 和 ITS2 三个区域 GC 含量和核苷酸替代率进行计算,并根据 Kimura 二参数模型构建邻接树。此外,还利用 PAUP 4.0 beta 10 win (Swafford, 2002) 软件对所有序列进行最大简约树的构建,所有特征状态指定为无序 (random),空位作缺失 (missing) 状态分析。

最大简约树的构建使用启发式 (heuristic) 搜索 (100 随机添加序列重复),树二等分再连接分支交换 (TBR),各种核苷酸替代同等加权,使用自展法 (bootstrap) 检验 MP 树可靠性 (重复 1 000 次)。

## 2 结果与分析

### 2.1 序列长度和 GC 含量

本研究中所有样品 ITS 序列已提交至 GenBank,详见表 1。通过对序列长度和 GC 含量分析发现,所研究枇杷属植物整个 ITS 序列包括 ITS1、5.8S rDNA 和 ITS2 长度为 592 bp 或 594 bp (表 2)。其中,来自 5 种野生枇杷:南亚枇杷 (*Eriobotrya bengalensis*)、南亚枇杷窄叶变种 (*E. bengalensis* f. *angustifolia*)、栎叶枇杷 (*E. prinoidea*)、大渡河枇杷 (*E. prinoidea* var. *daduheensis*)、大瑶山枇杷 (*E. dayaoshanensis*) 的 ITS 序列长度都为 594 bp。其余 2 种野生枇杷:麻栗坡枇杷 (*E. malipoensis*) 和小叶枇杷 (*E. seguinii*) 及 25 种普通枇杷 (*E. japonica*) 栽培种的 ITS 序列长度都为 592 bp。长度变异区域发生在 ITS2 区,变异发现为一个 GC 的插入 (图 1)。所研究的枇杷属植物的 ITS 序列 GC 含量在 64.2% ~ 64.5% 之间,其中 ITS1 为 64.1% ~ 65.5%,ITS2 为 68.1% ~ 72.6%。

### 2.2 序列差异性

本研究所采集的枇杷属植物的 ITS 序列比对发现存在 44 个变异位点,信息位点为 38 个,其中 11 个位于 ITS1,5 个在 5.8S,22 个位于 ITS2。种间最大的序列差异为 7.7%,最小的差异是在麻栗坡枇杷和小叶枇杷之间,仅有 0.2%。栎叶枇杷和大渡河枇杷序列同源率为 99.3%,南亚枇杷和南亚枇杷窄叶变种序列同源率为 99.2%,序列数据差异与其品种分类一致。

研究发现在普通枇杷各品种间的 ITS 序列差异较小,差异值在 0 ~ 1.5% 之间;差异位点发生在 ITS2,大部分栽培种表现为相同的 ITS 序列,表明 ITS 序列在普通枇杷种内具有高度保守性。

### 2.3 ITS 序列的系统发育分析

本研究基于 ITS 序列构建了枇杷属内系统发育树。邻接树应用 Kimura 二参数法构建 (图 2)。在

表 1 所研究枇杷品种和枇杷属其他种类的来源地及 GenBank 登录号

Table 1 Origin and accession number of investigated cultivars and species of *Eriobotrya* and outgroup

品种或种类 Cultivar or species	来源地 Origin	登录号 Accession number
解放钟 ‘Jiefangzhong’	中国福建 Fujian Province, China	FJ449723
太城白密 ‘Taichengbaimi’	中国福建 Fujian Province, China	FJ449731
石榴本 ‘Shiliuben’	中国福建 Fujian Province, China	FJ449730
龙才白 ‘Longcaibai’	中国福建 Fujian Province, China	FJ449725
坑本 ‘Kengben’	中国福建 Fujian Province, China	FJ449724
夹脚 ‘Jiajiao’	中国浙江 Zhejiang Province, China	FJ449722
单边种 ‘Danbianzhong’	中国浙江 Zhejiang Province, China	FJ449715
白玉 ‘Baiyu’	中国江苏 Jiangsu Province, China	FJ449713
冠玉 ‘Guanyu’	中国江苏 Jiangsu Province, China	FJ449719
长柄扁核 ‘Changbingbianhe’	中国安徽 Anhui Province, China	FJ449714
短柄扁核 ‘Duanbingbianhe’	中国安徽 Anhui Province, China	FJ449718
华宝 3 号 ‘Huabao-3’	中国湖北 Hubei Province, China	FJ449721
珠珞红砂 ‘Zhuluohongsha’	中国江西 Jiangxi Province, China	FJ449737
杨梅洲 2 号 ‘Yangmeizhou-2’	中国江西 Jiangxi Province, China	FJ449735
大乌脐 ‘Dawuqi’	中国广东 Guangdong Province, China	FJ449716
木罗枇杷 ‘Muluopipa’	中国广东 Guangdong Province, China	FJ449728
俨糖枇杷 ‘Yantangpipa’	中国广西 Guangxi, China	FJ449736
大五星 ‘Dawuxing’	中国四川 Sichuan Province, China	FJ449717
龙泉 77-2 ‘Longquan77-2’	中国四川 Sichuan Province, China	FJ449726
贵州野生 ‘Guizhouyesheng’	中国贵州 Guizhou Province, China	FJ449720
田中 ‘Tanaka’	日本 Japan	FJ449732
茂木 ‘Mogi’	日本 Japan	FJ449727
森尾早生 ‘Moriowase’	日本 Japan	FJ449729
西班牙 2 号 ‘Ullera’	西班牙 Spain	FJ449733
西班牙 4 号 ‘Bianco’	西班牙 Spain	FJ449734
栎叶枇杷 <i>Eriobotrya prinoidea</i>	中国四川 Sichuan Province, China	FJ440336
南亚枇杷 <i>E. bengalensis</i>	中国云南 Yunnan Province, China	FJ571503
南亚枇杷窄叶变种 <i>E. bengalensis f. angustifolia</i>	中国云南 Yunnan Province, China	FJ571506
麻栗坡枇杷 <i>E. malipoensis</i>	中国云南 Yunnan Province, China	FJ571508
小叶枇杷 <i>E. seguinii</i>	中国云南 Yunnan Province, China	FJ571507
大瑶山枇杷 <i>E. dayaoshanensis</i>	中国广西 Guangxi, China	FJ571504
大渡河枇杷 <i>E. prinoidea</i> var. <i>daduheensis</i>	中国四川 Sichuan Province, China	FJ571505

表 2 枇杷属植物 ITS 序列的长度和 GC 含量

Table 2 Length and GC contents of ITS sequences of *Eriobotrya* plants

品种或种类 Cultivar or species	长度 Length			GC 含量 GC contents			品种或种类 Cultivar or species	长度 Length			GC 含量 GC contents		
	ITS	ITS1	ITS2	ITS	ITS1	ITS2		ITS	ITS1	ITS2	ITS	ITS1	ITS2
解放钟 'Jiefangzhong'	592	223	201	64.2	64.6	68.1	俨糖枇杷 'Yantangpipa'	592	223	201	64.2	64.6	68.6
太城白密 'Taichengbaimi'	592	223	201	64.2	64.6	68.1	大五星 'Dawuxing'	592	223	201	64.2	64.6	68.1
石榴本 'Shiliuben'	592	223	201	64.2	64.6	68.1	龙泉 77-2 'Longquan77-2'	592	223	201	64.5	64.6	69.1
龙才白 'Longcaibai'	592	223	201	64.3	64.6	68.6	贵州野生 'Guizhouyesheng'	592	223	201	64.5	65.0	68.1
坑本 'Kengben'	592	223	201	64.2	64.6	68.1	田中 'Tanaka'	592	223	201	64.2	64.6	68.6
夹脚 'Jiajiao'	592	223	201	64.2	64.6	68.1	茂木 'Mogi'	592	223	201	64.3	64.6	68.6
单边种 'Danbianzhong'	592	223	201	64.2	64.6	68.1	森尾早生 'Moriowase'	592	223	201	64.3	64.6	68.1
白玉 'Baiyu'	592	223	201	64.2	64.6	68.1	西班牙 2 号 'Ullera-2'	592	223	201	64.3	64.6	68.6
冠玉 'Guanyu'	592	223	201	64.2	64.6	68.1	西班牙 4 号 'Bianco-4'	592	223	201	64.5	64.6	69.1
长柄扁核 'Changbingbianhe'	592	223	201	64.2	64.6	68.6	栎叶枇杷 <i>Eriobotrya prinoides</i>	594	223	203	64.8	64.1	70.0
短柄扁核 'Duanbingbianhe'	592	223	201	64.2	64.6	68.1	南亚枇杷 <i>E. bengalensis</i>	594	223	203	64.8	64.1	70.0
华宝 3 号 'Huabao-3'	592	223	201	64.2	64.6	68.1	南亚枇杷窄叶变种 <i>E. bengalensis</i> f. <i>angustifolia</i>	594	223	203	64.6	64.5	69.5
珠珀红砂 'Zhuluohongsha'	592	223	201	64.2	64.6	68.1	麻栗坡枇杷 <i>E. malipoensis</i>	592	223	201	66.1	65.5	72.1
杨梅洲 2 号 'Yangmeizhou-2'	592	223	201	64.2	64.6	68.1	小叶枇杷 <i>E. seguinii</i>	592	223	201	66.2	65.5	72.6
大乌脐 'Dawuqi'	592	223	201	64.2	64.6	68.1	大瑶山枇杷 <i>E. dayaoshanensis</i>	594	223	203	64.3	64.5	68.5
木罗枇杷 'Muluopipa'	592	223	201	64.3	64.6	68.6	大渡河枇杷 <i>E. prinoides</i> var. <i>daduheensis</i>	594	223	203	64.7	64.5	69.5

应用最大简约法构建系统树过程中,启发性搜索 (heuristic searches) 产生 95 棵最大简约树,其一致性指数 (CI) 为 0.884 2,保留指数 (RI) 为 0.938 9 (图 3)。这两种方法构建的系统树都把本研究所采集的样品分为 3 个分支。第一个分支 (Clade I) 包含了所有的普通枇杷品种,包括栽培种和一些野生种,处于该分支基部的是栽培种贵州野生,由于普通枇杷种内 ITS 序列差异较小,故系统树并没有将这些品种完全分开。第二分支 (Clade II) 包含栎叶枇杷、大渡河枇杷、南亚枇杷、南亚枇杷窄叶变种和大瑶山枇杷,这 5 种枇杷都是枇杷属内的野生种。第三分支 (Clade III) 中包含麻栗坡

枇杷和小叶枇杷,这个分支处于整个系统树的基部。

### 3 讨论

#### 3.1 ITS 的进化

枇杷属植物的 ITS1 序列长度为 223 bp, ITS2 比 ITS1 短 20 bp 或 22 bp。得到的枇杷属植物 ITS 序列的总长与其他被子植物特别是蔷薇科植物相近 (ITS1: 187 ~ 298 bp, ITS2: 187 ~ 252 bp) (Campbell et al, 1995)。枇杷属 ITS 序列比对的结果显示长度变异发生在 ITS2, 表现为 1 个 GC 的插

<i>E. bengalensis</i>	TGCTTGGGCGTCCCACGCCGTTGCCCTTCCCCGG	GCGCCTC	400
<i>E. prinoides</i>	-----	-----	400
<i>E. prinoides</i> var. <i>daduheensis</i>	-----a-----	-----	400
<i>E. bengalensis</i> f. <i>angustifolia</i>	-----a-----	-----	400
<i>E. dayaoshanensis</i>	-----a-----	-----	400
Moriowase	-----a-----c-----a-----	..-t	398
Taichengbaimi	-----a-----c-----a-----	..-t	398
Huabao-3	-----a-----c-----a-----	..-t	398
Guanyu	-----a-----c-----a-----	..-t	398
Dawuqi	-----a-----c-----a-----	..-t	398
Baiyu	-----a-----c-----a-----	..-t	398
Changbingbianhe	-----a-----c-----a-----	..-t	398
Danbianzhong	-----a-----c-----a-----	..-t	398
Dawuxing	-----a-----c-----a-----	..-t	398
Jiajiao	-----a-----c-----a-----	..-t	398
Jiefangzhong	-----a-----c-----a-----	..-t	398
Kengben	-----a-----c-----a-----	..-t	398
Shiliuben	-----a-----c-----a-----	..-t	398
Zhuluohongsha	-----a-----c-----a-----	..-t	398
Yangmeizhou-2	-----a-----c-----a-----	..-t	398
Bianco	-----a-----c-----a-----	..-t	398
Longquan77-2	-----a-----c-----a-----	..-t	398
Duanbingbianhe	-----a-----c-----a-----	..-t	398
Yantangpipa	-----a-----c-----a-----	..-t	398
Ullera	-----a-----c-----a-----	..-t	398
Tanaka	-----a-----c-----a-----	..-t	398
Muluopipa	-----a-----c-----a-----	..-t	398
Mogi	-----a-----c-----a-----	..-t	398
Longcaibai	-----a-----c-----a-----	..-t	398
Guizhouyesheng	-----a-----c-----a-----	..-t	398
<i>E. malipoensis</i>	-----a-----c-----	..-t	398
<i>E. seguinii</i>	-----a-----c-----	..-t	398

图 1 枇杷属植物 ITS 序列比对部分 方框内为基因滑动区域。

Fig. 1 Slices of the aligned ITS sequences of *Eriobotrya* plants Boxed areas indicate the slippage region.

人,这种插入可能是基因滑动,一种 DNA 错配突变过程的结果(Gillespie,2004)。

在枇杷属植物中,ITS2 的 GC 含量比 ITS1 高 2%~5%;ITS2 的差异水平比 ITS1 高出两倍。这表明 ITS2 进化速度比 ITS1 快(Torres et al,1990)。在普通枇杷种内 ITS1 几乎相同而变异位点都处在 ITS2 区,也验证了这个结论。

### 3.2 ITS 序列在枇杷属系统发育分析中的应用

ITS 序列的变异速率为许多被子植物类群的系统发育研究提供了较丰富的变异位点和信息位点。在蔷薇科(Rosaceae)植物中,ITS 序列已经成功应用于苹果亚科(Maloideae)(Campbell et al,

1995)、唐棣属(*Amelanchier*)(Campbell et al,1997)、苹果属(*Malus*)(Robinson et al,2001)、梨属(*Pyrus*)(Zheng et al,2008)等植物类群的系统发育分析中。目前,在分子水平对枇杷属系统发育学的研究还较少。DNA 序列比对可以让我们深入认识枇杷属各种之间的系统发育关系。本研究的主要目的是将 ITS 序列分析引入到枇杷属遗传关系评估体系中。本研究所采集枇杷属植物的 ITS 序列比对发现比对矩阵存在 44 个可变位点,其中信息位点为 38 个,这表明 ITS 序列在对枇杷种间的鉴定与关系评估具有可观的价值。ITS 序列分析也显示了某些枇杷栽培种在形态学上差异

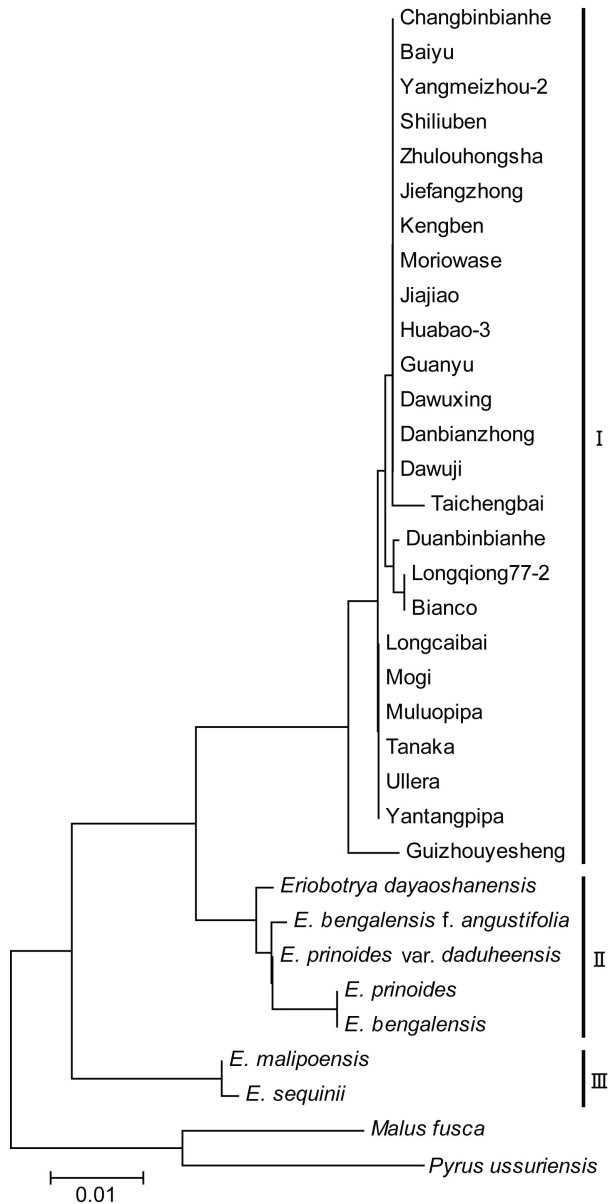


图 2 基于本研究所有枇杷属植物 ITS 序列应用 Kimura 二参数法构建的邻接树

Fig. 2 Neighbor-Joining (NJ) trees constructed on Kimura two-parameter distance matrix using entire region (ITS1+5.8S+ITS2) of all *Eriobotrya* plants in this study

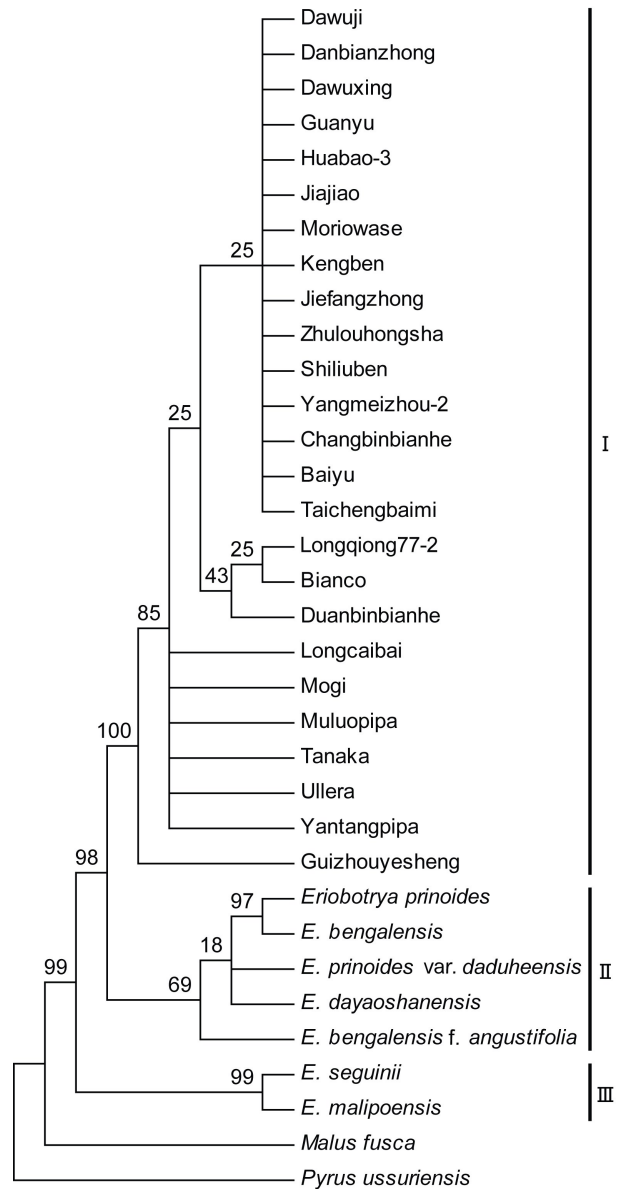


图 3 基于本研究所有枇杷属植物 ITS 序列应用最大简约法构建的最大简约树 树长=95,一致性指数 (CI)=0.884 2,保留指数 (RI)=0.938 9。

Fig. 3 One of the 95 most parsimonious (MP) trees generated from entire region (ITS1+5.8S+ITS2) of all *Eriobotrya* plants in this study Tree length=95, consistency index (CI)=0.884 2, retention index (RI)=0.938 9.

较大,而在 DNA 水平上同源性却很高。ITS 序列的分析可以提供给我们一个方便的评估枇杷种间关系的工具。但是,在普通枇杷栽培种之间,ITS 序列的差异性很小,表明这些栽培种在遗传关系上非常相近。这也可能是因为这些栽培种都来自同一祖先,而相互之间杂交频繁。应用 ITS 序列无

法将所有的栽培种分开,故 ITS 序列无法有效应用于普通枇杷栽培种进行品种鉴定。通过 ITS 序列分析枇杷属种间遗传关系,可以有目的地选择亲缘关系较远的非栽培种作为亲本进行杂交育种,使优良、独特基因得到有效转移。

### 3.3 普通枇杷的起源

在枇杷属系统发育学研究中,普通枇杷的起源是一个富有争议的课题。方德积和章恢志(1989)在大渡河流域发现一种新的枇杷野生种,命名为大渡河枇杷,在研究大渡河枇杷形态学、孢粉学及同工酶后,认为大渡河枇杷可能是普通枇杷的祖先之一;而唐蓓(1997)在对普通枇杷、大渡河枇杷和栎叶枇杷的核型及过氧化物同工酶分析后,认为大渡河枇杷可能来源于普通枇杷与栎叶枇杷的杂交种;杨向晖等(2007)基于 RAPD 和 AFLP 对普通枇杷、大渡河枇杷和栎叶枇杷进行的研究支持了后者关于大渡河枇杷是栎叶枇杷和普通枇杷杂交种的观点。本研究发现大渡河枇杷与栎叶枇杷在 ITS 序列上同源率非常高,而与普通枇杷的亲缘关系较远,故支持大渡河枇杷是栎叶枇杷一个变种的观点。但是,关于大渡河枇杷是普通枇杷祖先的观点还需进一步论证。

### 参考文献:

ALVAREZ I, WENDEL JF, 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 29(3):417-34.

CAI LH, LI ZZ, HUANG HW, et al, 2005. Genotype fingerprint of loquat cultivars and allozymic variation in *Eriobotrya* [J]. *J Wuhan Bot Res*, 23(5):406-416. [蔡礼鸿, 李作洲, 黄宏文, 等, 2005. 枇杷属植物等位酶遗传变异及品种基因型指纹 [J]. *武汉植物学研究*, 23(5):406-416.]

CAMPBELL CS, DONOGHUE MJ, BALDWIN BG, et al, 1995. Phylogenetic relationships in *Maloideae* (Rosaceae): evidence from sequences of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA and its congruence with morphology [J]. *Am J Bot*, 82(7):903-918.

CAMPBELL CS, WOJCIECHOWSKI MF, BALDWIN BG, et al, 1997. Persistent nuclear ribosomal DNA sequence polymorphism in the *Amelanchier* agamic complex (Rosaceae) [J]. *Mol Biol Evol*, 14(1):81-90.

FANG DQ, ZHANG HZ, 1989. Peroxidase isozymes in *Eriobotrya* [J]. *J Huazhong Agric Univ*, 8(2):144-150. [方德秋, 章恢志, 1989. 枇杷属植物过氧化物酶同工酶研究 [J]. *华中农业大学学报*, 8(2):144-150.]

GILLESPIE JJ, 2004. Characterizing regions of ambiguous alignment caused by the expansion and contraction of hairpin-stem loops in ribosomal RNA molecules [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 33(3):936-943.

LIN SQ, 1999. Loquat: botany and horticulture [J]. *Hortic Rev*, 23:233-276.

ROBINSON JP, HARRIS SA, JUNIPER BE, 2001. Taxonomy of the genus *Malus* Mill. (Rosaceae) with emphasis on the cultivated apple, *Malus domestica* Borkh [J]. *Plant Syst Evol*, 226(1):35-58.

SORIANO JM, ROMERO C, VILANOVA S, et al, 2005. Genetic diversity of loquat germplasm (*Eriobotrya japonica* (Thunb) Lindl) assessed by SSR markers [J]. *Genome*, 48(1):108-140.

SWAFFORD D, 2002. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\* and other methods) [M]. Ver. 4, Sunderland: Massachusetts: Sinauer Associates.

TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al, 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 24(8):1596-9.

TANG B, 1997. A study of the sibship among *Eriobotrya japonica* Lindl, *E. prinoides* Rehd. & Wils. var. *daduheensis* H. Z. Zhang and *E. prinoides* Rehd. & Wils [J]. *J Chongqing Norm Univ (Nat Sci Ed)*, 14(3):18-25. [唐蓓, 1997. 普通枇杷、大渡河枇杷、栎叶枇杷的亲缘关系探讨 [J]. *重庆师范学院学报(自然科学版)*, 14(3):18-25.]

THOMPSON JD, GIBSON TJ, PLEWNIAK F, et al, 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res*, 25(24):4876-4882.

TORRES RA, GANAL M, HEMLEBEN V, 1990. GC balance in the internal transcribed spacers ITS 1 and ITS 2 of nuclear ribosomal RNA genes [J]. *J Mol Evol*, 30(2):170-181.

VILANOVA S, BADENES ML, MARTINEZCALVO J, et al, 2001. Analysis of loquat germplasm (*Eriobotrya japonica* Lindl) by RAPD molecular markers [J]. *Euphytica*, 121(1):25-29.

WHITE T, BRUNS T, LEE S, et al, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics in PCR protocols: a guide to methods and applications [M]. New York: Academic Press:315-322.

WU JC, YANG XH, LIN SQ, 2006. Establishment of AFLP analysis system and its application in loquat germplasm [J]. *J Fruit Sci*, 23(5):774-778. [吴锦程, 杨向晖, 林顺权, 2006. 枇杷 AFLP 分析体系的建立与应用 [J]. *果树学报*, 23(5):774-778.]

YANG XH, GLAKPE K, LIN SQ, et al, 2005. Taxa of plants of genus *Eriobotrya* around the world and native to Southeastern Asia [J]. *J Fruit Sci*, 22(1):55-59. [杨向晖, 格拉贝, 林顺权, 等, 2005. 枇杷属植物种类数及东南亚原产枇杷种类 [J]. *果树学报*, 22(1):55-59.]

YANG XH, LIU CM, LIN SQ, 2007. The genetic relationship among common loquat, daduhe loquat and oakleaf loquat, according to RAPD and AFLP analysis [J]. *Subtrop Plant Sci*, 36(2):9-12. [杨向晖, 刘成明, 林顺权, 2007. 普通枇杷、大渡河枇杷和栎叶枇杷遗传关系研究—基于 RAPD 和 AFLP 分析 [J]. *亚热带植物科学*, 36(2):9-12.]

ZHENG X, CAI D, YAO L, et al, 2008. Non-concerted ITS evolution, early origin and phylogenetic utility of ITS pseudogenes in *Pyrus* [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 48(3):892-903.