

浙南柚类地方资源遗传多样性分析和鉴定

陈 巍, 郭秀珠, 黄品湖, 徐文荣, 林绍生

(浙江省亚热带作物研究所, 温州 325005)

摘要: 利用 SRAP 标记对 13 份浙南柚类地方资源和琯溪蜜柚及芽变进行遗传多样性分析和鉴定。结果表明: 平均每个引物组合可扩增出 15.7 条谱带, 14 对 SRAP 引物共产生 220 条谱带, 其中多态性谱带为 122 条, 多态率为 55.4%, 表明 15 份材料间检测到的 SRAP 位点多态性不高。不同引物组合可将 11 个基因型完全分开。聚类分析结果显示, 15 份柚类种质在遗传相似系数 0.97 处可以分为 8 大类, 第 1 类群为四季柚 7 个优异株系, 第 2 类群包括琯溪蜜柚及其芽变, 而平阳文旦、早香柚、处红柚、红心 1 号土柚、红心 2 号土柚、酸柚分别单独为第 3、4、5、6、7、8 类群。四季柚选系中务城 1 号、务城 3 号、马站红心四季柚的指纹图谱有可区分的差异, 说明 DNA 水平发生轻微变异。

关键词: 柚; 浙南; 遗传多样性

Genetic Diversity Analysis and Identification of Pummelo Germplasms in Southern Zhejiang Province

CHEN Wei, GUO Xiu-zhu, HUANG Pin-hu, XU Wen-rong, LIN Shao-sheng

(Zhejiang Institute of Subtropical Crops, Wenzhou 325005)

Abstract: Sequence related amplified polymorphism (SRAP) markers were used to evaluate the genetic diversities of 13 pummelo (*C. maxima*) germplasms collected from southern Zhejiang province and Guanxi miyou pummelo and its bud mutant from Fujian province. Fourteen SRAP primer combinations were thus selected and a total of 220 PCR fragments with an average of 15.7 bands per primer combination were obtained. Among these bands, 122 (55.4%) were polymorphic, showing a relatively low level of genetic diversity among the analyzed germplasms. Eleven genotypes were uniquely identified in the 15 germplasms by SRAP markers. UPGMA Clustering analysis of the SRAP banding patterns showed that the 15 pummelos could be divided into 8 major groups at the similarity coefficient level of 0.97. The first group included the 7 Sijipao varieties. The second group included Guanxi miyou and its bud mutant hongrou miyou. Each of the rest pummelos, i. e., Pingyang pummelo, Zaoxiang pummelo, Chuhong pummelo, Hongxin 1 pummelo, Hongxin2 pummelo and Sour pummelo, was clustered as a separate group. It showed that slight change occurred at DNA level in Wucheng1, Wucheng3, Mazhanhongxin pummelo based on genetic diversities.

Key words: Pummelo; Southern Zhejiang province; Genetic diversity

中国是柚类起源中心之一,栽培历史悠久,品种资源丰富。浙南地区作为我国东南沿海柚区重要组成之一,20 世纪 80 年代以来,发掘了包括平阳文旦、四季柚、早香柚等优异地方品种^[1]。经过近 30 年的发展,又发现了许多优异株系或变异,如香气浓

郁和果肉红色的四季柚、红心土柚等。因此开展本地区柚类遗传多样性分析和品种鉴定,对柚类种质资源保护和育种创新利用具有重要的现实意义。

SRAP(sequence-related amplified polymorphism)是一种基于 PCR 的标记系统,由美国加州大学蔬菜

收稿日期: 2011-08-04 修回日期: 2011-10-07

基金项目: 浙江省科技厅优先主题重点农业科研项目(2009C12093, 2011C12017); 浙江省农业科学院创新提升工程项目

作者简介: 陈巍, 硕士, 助理研究员, 主要从事果树资源与栽培研究。E-mail: carchen110@163.com

通讯作者: 林绍生, 副研究员, 主要从事果树种质资源与创新研究。E-mail: lshsh28@sina.com

作物系 Li 与 Quiros 博士提出^[2]。该标记具有多态性丰富、简单、快速等优点,尤其是可检测基因的可译框区域,已被广泛应用于遗传多样性检测^[3-5]、品种鉴定^[6-7]、图谱构建^[8]等研究。

本研究应用 SRAP 标记技术首次对浙南地区 13 个柚类地方资源和琯溪蜜柚及其芽变红肉蜜柚进行遗传多样性评价,从分子水平了解本地区柚类资源遗传背景,分析材料间的亲缘关系,为保护和有效利用遗传资源以及选育柚类新品种提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2010 年 4 月采集浙南地区柚类资源和福建平和琯溪蜜柚及红肉蜜柚的叶片,名称和编号见表 1。

表 1 供试材料

Table 1 The pummelo cultivars used in this study

编号 No.	品种(株系) Cultivar (line)	来源 Origin	编号 No.	品种(株系) Cultivar (line)	来源 Origin
1	务城 1 号四季柚	苍南务城	9	平阳文旦	永嘉碧莲
2	务城 2 号四季柚	苍南务城	10	红心 1 号土柚	永嘉碧莲
3	务城 3 号四季柚	苍南务城	11	红心 2 号土柚	文成黄坦
4	务城 4 号四季柚	苍南务城	12	处红柚	文成黄坦
5	马站 1 号四季柚	苍南马站	13	酸柚	永嘉碧莲
6	马站 2 号四季柚	苍南马站	14	琯溪蜜柚	福建平和
7	马站红心四季柚	苍南马站	15	红心蜜柚	福建平和
8	早香柚	永嘉碧莲			

1.2 基因组 DNA 提取

采用改良的 SDS 法^[9],提取单株幼嫩叶片基因组 DNA,并将其稀释为 20.0ng/μl,置于 -20℃ 保存。

1.3 SRAP-PCR 反应体系和扩增

扩增反应体系为 (10μl): 上下游引物各 0.3μmol/L, dNTPs 0.2mmol/L, Mg²⁺ 3.0mmol/L, 0.6U Taq DNA polymerase 和 20ng 模板 DNA。反应程序为: 94℃ 变性 3min; 94℃ 60s, 35℃ 60s, 72℃ 90s, 5 个循环; 94℃ 60s, 50℃ 60s, 72℃ 90s, 33 个循环; 最后 72℃ 延伸 10min。扩增产物在 6% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶上 120V 恒压电泳,银染,显色并拍照。

1.4 SRAP 引物组合

随机选取了 8 个正向引物 (fc1、fc3、fc8、fc9、sa12、sa17、sa20、sa21), 6 个反向引物 (em1、em2、

em3、em4、em5、em6) 组成 48 对 SRAP 引物进行筛选,选取扩增谱带清晰,多态性稳定的引物进行相关分析,序列详见表 2。

表 2 SRAP 引物序列

Table 2 Sequences of SRAP primers

正向引物 Forward primers 5'-3'	反向引物 Reverse primers 5'-3'
fc1 TCAAGGGCAGGTAAGAACAA	em1 GACTGCGTACGAATTAAT
fc3 GTGCTTTACTGTTTGCTCC	em2 GACTGCGTACGAATTTC
fc8 AATCTTCCTCAGGTTGAGA	em3 GACTGCGTACGAATTGAC
fc9 TACAGAACTTAGAACCAGAA	em4 GACTGCGTACGAATTGCA
sa12 ATAAGAATCAGCAGACGCAT	em5 GACTGCTACGAATTAAC
sa17 TAGAGGAAGATGCAATGTTG	em6 GACTGCGTAGAATTGCA
sa20 TCATCTCAAACCATCTACAC	
sa21 GAATGCAGGAGAACACGTT	

1.5 柚类基因型遗传多样性分析

利用筛选到的 SRAP 标记对 15 份柚类基因型进行种质资源遗传多样性分析和品种鉴定,根据标记的迁移率及其有无来统计扩增条带,同一位置无条带的记为 0,有条带的记为 1,模糊的记为 2。利用 NTSYS-pc 2.10 软件 UPGMA (unweighted pair group method and arithmetic average) 法进行品种聚类分析,根据品种间相似系数绘出聚类分析树状图。

2 结果与分析

2.1 SRAP 引物筛选

利用 48 对 SRAP 引物进行 PCR 扩增和聚丙烯酰胺凝胶检测分析,筛选出条带清晰稳定、多态性高的 14 对 SRAP 引物组合进行样品分析(表 3)。

表 3 供试 14 个 SRAP 引物组合

Table 3 The 14 SRAP primer combinations used in this study

序号 No.	引物组合 Primer combinations	序号 No.	引物组合 Primer combinations	序号 No.	引物组合 Primer combinations
1	em1 / fc3	6	em2 / sa17	11	em3 / sa20
2	em1 / sa12	7	em2 / sa20	12	em4 / sa12
3	em1 / sa20	8	em3 / fc1	13	em4 / fc9
4	em2 / fc3	9	em3 / fc9	14	em6 / sa12
5	em2 / fc9	10	em3 / sa12		

2.2 15 份柚类基因型 SRAP 扩增多态性和品种鉴别

14 对引物组合扩增产物分子量在 100 ~ 2000bp 之间。14 对 SRAP 引物共扩增出 220 条带, 平均每个引物组合可扩增出 15.7 条带, 其中多态性条带为 122 条, 多态率为 55.4%。表明 15 份材料间检测到的 SRAP 位点多态性不高。em1/sa12 引物组合可将 8 个基因型完全分开, 鉴别效率最高。务城 2 号、务城 4 号、马站 1 号、马站 2 号四季柚 4 个样品之间无法用引物区分开(表 4)。部分引物扩增的电泳图谱如图 1。

表 4 SRAP 引物的扩增结果

Table 4 The amplified results of SRAP primers

引物序列 Primer combina- tions	总条带数 Total bands	多态性条带数 Polymorphic bands	可区分的品种(系) 编写 Cultivars (line) distinguishable
1	16	11	10、11、12、13
2	22	18	1、8、9、10、12、13、14、15
3	7	2	12
4	14	11	8、11、12、13
5	20	11	11、13、14、15
6	15	7	11、12、13
7	15	7	8、9、10、12、13
8	13	5	9、11、12
9	13	6	11、12、13
10	16	11	3、8、9、10、11、12、13
11	13	6	8、11、10、13
12	16	10	7、8、11、13
13	20	12	8、9、10、11、13
14	20	5	10、13

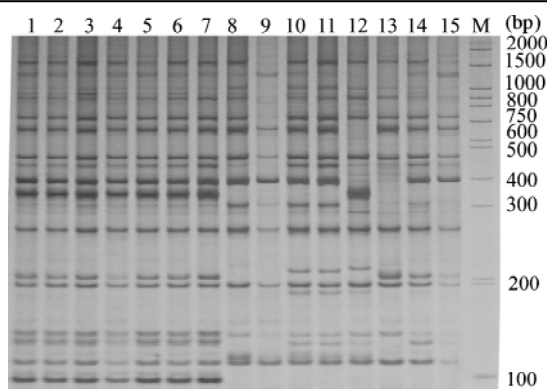


图 1 em1/sa12 引物在 15 个品种上扩增多态性结果

Fig. 1 Banding patterns of the 15 pummelos amplified by the primer combination em1/sa12

M: 100bp DNA ladder; 图中数字与表 1 中的品种编码一致, 下同

M: 100bp DNA ladder; The lane numbers represent

the corresponding germplasms listed in table 1, the same as below

2.3 柚类不同基因型间相似系数和聚类分析

根据 SRAP 数据统计结果, 计算出 15 份基因型的遗传相似系数, 不同基因型间平均相似系数为 0.839, 其中酸柚与平阳文旦之间的遗传相似系数最小, 仅为 0.700, 其次为酸柚与红心 2 号土柚和琯溪蜜柚, 两组均为 0.718, 务城 2 号、务城 4 号、马站 1 号、马站 2 号四季柚 4 个样品之间相似系数为 1.000。

采用非加权平均法(UPGMA)对 15 份柚类基因型进行聚类分析, 构建亲缘关系树状图(图 2), 在遗传相似系数 0.97 处可以分为 8 大类: 第 1 类群为四季柚 7 个优异株系, 在该类群中务城 2 号、务城 4 号、马站 1 号、马站 2 号在 1.00 处相聚, 然后再逐一与务城 1 号、务城 3 号、马站红心 3 个样品相聚; 第 2 类群包括琯溪蜜柚及其芽变; 平阳文旦、早香柚、处红柚、红心 1 号土柚、红心 2 号土柚、酸柚分别单独为第 3、4、5、6、7、8 类群。

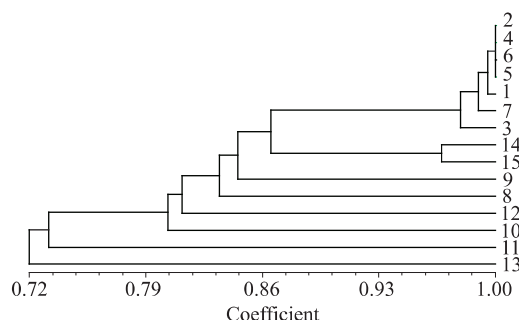


图 2 15 份柚类基因型的树状图

Fig. 2 UPGMA dendrogram of the 15 pummelo germplasms clustered by SRAP markers

3 讨论

SRAP 标记主要以可译框(ORFs)区域中的外显子为目标, 而 ORFs 是基因的重要组成部分, 基因的多样性更能反映遗传资源的多样性。SRAP 已成功应用于柑橘及近缘种遗传多样性分析^[10]。Uzuna 等^[10]对柑橘属及其近缘属分析显示平均每对引物检测到 17.9 条带, 与本试验结果基本一致, 并且还将亲缘关系极其相近的务城 1 号、务城 3 号、马站红心四季柚从四季柚中鉴别出来, 说明 SRAP 是评价遗传多样性、品种鉴定的有效工具之一。

柚在嫁接繁殖或其他营养繁殖的情况下, 因受外界自然生态条件的影响, 可能发生变异。目前生产上栽培的绝大多数柚品种都是通过对历史留下的实生变异群体及芽变进行选择而来^[1]。四季柚在

浙江种植历史悠久,变异很多,其中不乏优良变异。务城1号、务城2号、务城3号、务城4号四季柚分别种植于苍南县渔寮乡务城村农户家中,已栽培几十年。特别是务城1号四季柚,种植历史达百年以上,这些株系在苍南县大规模发展四季柚时曾经作为优良母株提供接穗。马站1号四季柚是在苍南县马站镇中魁村发现的果实具有特殊香气的优异株系,该果实果型端正,香气浓郁,糖酸比高;马站2号四季柚是在苍南县马站镇水果厂发现的优异株系,该果实皮薄,品质风味较佳;马站红心四季柚是在苍南县马站镇四季柚开发公司基地发现的优异变异,该果实汁胞为鲜红色,果肉脆嫩化渣。务城1号、务城3号、马站红心四季柚分别在 em1/fc3、em3/sa12、em4/sa12 组合扩增中出现可区分的指纹图谱,说明在 DNA 水平出现变异。

早香柚、平阳文旦是在 20 世纪 80 年代全国柚类资源调查时发现的,处红柚是近年来审定的红肉品种^[11],三者都具有一定的市场影响力。红心1号土柚为引进品种,果型为椭圆形,果肉红色且具有辣味,主要用作早香柚授粉。红心2号土柚为地方特色资源,果型微扁,性状类似文旦,果肉红色,风味偏淡且微有涩味。酸柚为地方资源,果型为椭圆形,皮薄,果肉红色,偏酸。通过聚类分析可知,上述6个样品之间遗传相似系数较小,亲缘关系相对较远,说明浙南地区柚类资源早期以引进为主,后来逐渐形

成当地特色的优良品种。

参考文献

- [1] 何天富. 中国柚类栽培 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 20-32
- [2] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) a new marker system based on simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. Theor Appl Genet 2001, 103: 455-461
- [3] Ferriol M, Picó B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers [J]. Theor Appl Genet 2003, 107: 271-282
- [4] 文雁成, 王汉中, 沈金雄, 等. 用 SRAP 标记分析中国甘蓝型油菜品种的遗传多样性和遗传基础 [J]. 中国农业科学, 2006, 39(2): 246-256
- [5] 王凤淘, 蔺瑞明, 欧阳宏雨, 等. 利用 SRAP 标记分析河南小麦栽培品种的遗传多样性 [J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(4): 517-521
- [6] 徐坚, 王燕, 宋立君, 等. 温州盘菜地方品种鉴定与指纹图谱的分子标记分析 [J]. 分子植物育种, 2008, 6(5): 899-904
- [7] Riaz A, Dan P, Stephen M S. Genotyping of peach and nectarine cultivars with SSR and SRAP molecular markers [J]. J Am Soc Hort Sci 2004, 129(2): 204-210
- [8] Osman G, Aydin U, Ihsan C, et al. A new *Citrus* linkage map based on SRAP, SSR, ISSR, POGP, RGA and RAPD markers [J]. Euphytica 2010, 173(2): 265-277
- [9] 陈巍, 王力荣, 张绍铃, 等. 利用 SSR 研究不同国家桃育成品种的遗传多样性 [J]. 果树学报, 2007, 24(5): 580-584
- [10] Uzuna A, Yesiloglub T, Aka-Kacar Y, et al. Genetic diversity and relationships within *Citrus* and related genera based on sequence related amplified polymorphism markers (SRAPs) [J]. Sci Hort 2009, 121(3): 306-312
- [11] 徐象华, 蓝云龙, 吴健. 柚新品种‘处红柚’ [J]. 园艺学报, 2005, 32(6): 1159
- [12] Kwon S H, Lee Y I, Kim J R. Evaluation of important sprouting characteristics of edible soybean sprout cultivars [J]. Korean J Breed 1981, 13: 202-206
- [11] Lee S C, Choi G G, Chang Y N. Studies on the performance characteristics of collected native sprout soybean. I. Variation of characteristics in collected native sprout soybean [J]. Korean J Breed 1992, 24: 87-95
- [12] 张雷, 闫洪睿, 鹿文成, 等. 黑河 17 号的特征特性及高产栽培技术 [J]. 耕作与栽培, 2005, 2(2): 61-61, 30
- [13] 马启慧. 2000 年黑龙江省审定推广的大豆品种 [J]. 大豆科学, 2000, 19(2): 193-196
- [14] 吴叶青. 品种、播种密度对豌豆芽生产的影响 [J]. 长江蔬菜, 2006(2): 51-52
- [15] Lee J D, Hwang Y H, Cho H Y. Comparison of characteristics related with soy bean sprouts between *Glycine max* and *G. soja* [J]. Korean J Crop Sci 2002, 47: 189-195
- [16] Lee S H, Park K Y, Lee H S. Genetic mapping of QTLs conditioning soybean sprout yield and quality [J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 702-709

(上接第 642 页)