

基于SSR标记的浙江地方柚类 种质资源遗传关系分析

刘冬峰,陈巍,林绍生*,徐文荣,郭秀珠,黄品湖

(浙江省亚热带作物研究所,浙江温州 325005)

摘要:【目的】对浙江地方柚类种质资源进行遗传多样性分析,为其搜集保护和合理利用提供参考。【方法】利用23对SSR引物进行遗传多样性分析并构建种质鉴定图。【结果】23对引物共检测到91个等位变异位点,变异范围为2~7,平均每对SSR引物可检测到4.0个等位位点;23个SSR位点的观察杂合度、期望杂合度和多态性信息含量分别为0.51、0.54和0.47。UPGMA聚类结果显示:18份供试材料在遗传相似性系数为0.71时分成A1~A3、B1、C1和D1共6个组群,其中A1组包括‘四季柚’‘红肉四季柚’和‘佛香柚’等7份种质,A2组包括‘永嘉红心柚2号’‘青田红心柚’和‘木兰柚’3份果肉颜色为粉红色的种质,A3组包括‘处红柚’‘永嘉红心柚1号’‘古磻柚’和‘官南红柚’4份果肉颜色为红色的种质,‘官南土柚’和‘文成红心柚’自成B1和C1组,‘常山胡柚’和‘椴文柑’2个杂种柚类型聚为D1组。【结论】浙江地方柚类种质资源有丰富的遗传多样性,基于AG14、CAG01、CMS-16和CMS-26 4对引物组合构建浙江地方柚类资源的种质鉴定图,可将18份柚类种质进行区分。

关键词:柚;种质资源;SSR;遗传多样性;种质鉴定

中图分类号:S666.3

文献标志码:A

文章编号:1009-9980(2017)02-0166-09

Analysis of genetic relationship of pummelo germplasms by SSR markers in Zhejiang province

LIU Dongfeng, CHEN Wei, LIN Shaosheng*, XU Wenrong, GUO Xiuzhu, HUANG Pinhu

(Zhejiang Institute of Subtropical Crops, Wenzhou 325005, Zhejiang, China)

Abstract:【Objective】Zhejiang province is one of the main distribution area of pummelo genetic germplasms. According to researches, the local pummelo germplasms were mainly originated from seedling variation of ‘Fujian-wendan’, such as ‘Zaoxiangyou’ ‘Foxiangyou’ and ‘Gaoxie-xiangyou’. Whereas, the origin and genetic relationship of ‘Gusangyou’ ‘Mulanyou’ ‘Guannan-hongyou’ and other local pummelo cultivars have remained unclear up to now. With the wide spread of newly selected cultivars, the production area of local pummelo cultivars has decreased and some pummelo germplasms with low cultivation value has even disappeared. Therefore, it is necessary to analyze the genetic relationship of the local germplasms and to get enough information for protecting and utilizing them in the future. In this study, twenty-three simple sequence repeat (SSR) primers mined in *Citrus* were used to detect the genetic diversity of 18 local pummelo germplasms collected in Zhejiang province, and to construct germplasm characterization map.【Methods】A total of eighteen local pummelo germplasms were collected from the ten cities of Zhejiang province according to the *Citrus* germplasm resource description specifications, the eighteen local pummelo germplasms were divided into four groups based on the pulp colour. Six germplasms includ-

收稿日期:2016-07-15 接受日期:2016-10-19

基金项目:浙江省农业(果品)新品种选育重大科技专项(2016C02052-1);浙江省自然科学基金(LQ16C150003);温州市科技计划项目(N20150011,x20150024)

作者简介:刘冬峰,女,助理研究员,主要从事果树种质资源创新与品种选育工作。Tel: 0577-88512698, E-mail: liudongfeng001@126.com

*通信作者 Author for correspondence. E-mail: lshsh28@sina.com

ing ‘Yuhuanyou’ ‘Zaoxiangyou’ and ‘Gaoxie-xiangyou’ belonged to the pale yellow group. The pulp color of ‘Mulanyou’ ‘Sijiyou’ ‘Mabu-wendan’ and other seven germplasms was pink. Four germplasms including ‘Gusangyou’ ‘Guannan-hongyou’ ‘Chuhongyou’ and ‘Yongjia-hongxinyou 1’ belonged to the red group and the pulp color of ‘Changshan-huyou’ was orange. Young leaves were sampled for DNA extraction and twenty-three citrus SSR primers with abundant polymorphisms were employed for genetic diversity analysis. The amplified products were sequenced on MegaBACE 1000 DNA Analysis System. The observed number of alleles (A_o), effective number of alleles (A_e), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e) and polymorphism information content (PIC) were calculated with Popgene 1.31 software. The genetic similarity coefficients were calculated with NTSYS-pc 2.1 software and phylogenetic tree was constructed by the weighted average method.【Results】A total of 91 alleles were detected by twenty-three SSR primers, ranged from two to seven and with an average of 4.0 alleles per locus. The mean observed and expected heterozygosity values were 0.51 and 0.54, respectively. The average polymorphism information content of 23 SSR loci was 0.47. The genetic similarity coefficients between genotypes ranged from 0.55 to 0.94 and with an average of 0.71. The above results showed a rich genetic polymorphisms and complicated genetic background among pummelo germplasms in Zhejiang province. The UPGMA dedrogram based on the genetic similarity coefficients grouped 18 pummelo accessions to six major groups at the coefficient of 0.71 as follows: seven germplasm including ‘Sijiyou’ ‘Hongrou-Sijiyou’ ‘Foxiangyou’ ‘Mabu-wendan’ ‘Zaoxiangyou’ ‘Yuhuanyou’ and ‘Gaoxie-xiangyou’ were clustered to A1 group; the three pink germplasm including ‘Yongjia-hongxinyou 2’ ‘Qingtian-hongxinyou’ and ‘Mulanyou’ were clustered to A2 group; the four red germplasm including ‘Chuhongyou’ ‘Yongjia-hongxinyou 1’ ‘Gusangyou’ and ‘Guannan-hongyou’ were clustered to A3 group; ‘Guannan-tuyou’ and ‘Wencheng-hongxinyou’ were separately clustered to B1 and C1; and the two hybrids from the cross of pummelo and other citrus were clustered to D1 group. The results showed that most local pummelo cultivars were clustered preferentially to their pulp colors except for a few germplasms, indicating that the local red pummelo germplasm could be originated from a common ancestor. However, the germplasms between pale yellow and pink were not totally distinguished. Moreover, four SSR primers AG14, CAG01, CMS-16 and CMS-26 could rapidly and accurately identify all the tested materials from each other, and a corresponding germplasm characterization map of Zhejiang province was constructed, which could be applied to seedling authenticity characterization.【Conclusion】There was a rich genetic diversity of pummelo germplasm resources in Zhejiang province, and four SSR primers could be used for rapid and accurate identification of local pummelo germplasms.

Key words: Pummelo; Germplasm resource; SSR; Genetic diversity; Germplasm characterization

我国是柚[*Citrus grandis* (L.) Osbeck]的主要起源和遗传变异中心之一,拥有丰富的柚类种质资源。近年来,柚作为后起之秀在我国柑橘产业中占据越来越重要的地位,目前形成了以‘沙田柚’‘琯溪蜜柚’为主,‘玉环柚’次之,搭配其他地方良种的的特色优势产业^[1]。在柚类产业快速发展前,柚主要是我国农民庭院式栽种的农家品种,但随着农民生活条件的改善,因建房等原因造成砍伐柚的现象普遍存在,

有些传统地方品种仅有零星分布甚至砍伐殆尽,导致柚类种质资源遗传多样性降低^[2]。因此,柚类种质资源保护现状以及各栽培区的遗传多样性差异引发关注^[3-6],但目前我国柚类种质资源亲缘关系研究还不够全面,尤其是地方特色品种的来源、遗传关系以及合理利用等方面仍有待深入。

浙江省是我国海洋性柚的多样化分布中心之一,海洋性柚是较内陆性柚进化的类群。我国海洋

性柚分布于浙江、福建、广东沿海和台湾地区,内陆性柚分布于秦岭、长江中游以南、南岭以北的四川、湖北、湖南、江西、广西以及云贵地区^[1]。浙江省具有众多的地方品种,其中以‘玉环柚’‘四季柚’‘早香柚’和‘常山胡柚’最有名^[7]。而对于其他特征鲜明的地方资源,如瓢红多汁的‘古磜柚’、果肉粉红的‘木兰柚’以及低酸品种‘麻步文旦’等,由于其栽培价值相对较低,加上近年来新育成品种的广泛推广,导致这些地方品种的栽培面积过少,甚至有些已成为稀缺的柚类资源^[2,8],而且在柚类种质资源遗传多样性评价中,除‘玉环柚’等4个知名品种外,其他浙江地方品种则较少涉及^[4]。笔者在对浙江地方柚类种质资源摸底调查时共收集到29份材料,并利用SRAP分子标记技术对其中15份栽培柚、1份土柚和2份杂种柚进行遗传多样性分析,结果发现浙江地方柚类种质资源遗传背景较为复杂^[9],但通过对类胡萝卜素合成关键酶基因片段的SNP分析发现浙江红肉柚类资源亲缘关系较近^[10]。SSR标记具有多态性高、

共显性遗传和易于检测等特点^[11],是柑橘属低分类阶元(种间、种内)研究的有效工具^[12]。Amar等^[13]比较了SSR、SRAP和SNP3种分子标记在柑橘植物分类中的表现,发现基于SSR标记数据构建系统树优于SRAP和SNP。目前,SSR标记已广泛用于柑橘遗传多样性评价和种质鉴定等研究^[14-16]。笔者选用23对SSR标记分析18份浙江地方柚类种质资源的遗传关系并构建种质鉴定图,旨在为浙江地方柚类种质资源的保护利用及种苗真实性鉴定提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

18份浙江地方柚类种质资源分别采自温州市苍南、永嘉、文成和平阳县,衢州市常山县,台州市黄岩区和玉环县,舟山市定海区以及丽水市莲都区和青田县。果肉颜色分级标准参照中国农业出版社的《柑橘种质资源描述规范和数据标准》^[17],供试材料果肉颜色分为浅黄色、橙色、粉红色和红色(表1,图1)。

表 1 18 份浙江地方柚类种质资源

Table 1 Eighteen pummelo cultivars sampled in Zhejiang province

编号 Code	品种或品系 Cultivars or clones	来源 Origin	果肉颜色 Flesh color
1	四季柚 <i>C. grandis</i> Sijiyou	浙江省苍南县 Cangnan, Zhejiang	粉红色 Pink
2	红肉四季柚 <i>C. grandis</i> Hongrou-sijiyou	浙江省苍南县 Cangnan, Zhejiang	粉红色 Pink
3	官南红柚 <i>C. grandis</i> Guannan-hongyou	浙江省苍南县 Cangnan, Zhejiang	红色 Red
4	官南土柚 <i>C. grandis</i> Guannan-tuyou	浙江省苍南县 Cangnan, Zhejiang	浅黄色 Pale yellow
5	木兰柚 <i>C. grandis</i> Mulanyou	浙江省苍南县 Cangnan, Zhejiang	粉红色 Pink
6	古磜柚 <i>C. grandis</i> Gusangyou	浙江省苍南县 Cangnan, Zhejiang	红色 Red
7	早香柚 <i>C. grandis</i> Zaixiangyou	浙江省永嘉县 Yongjia, Zhejiang	浅黄色 Pale yellow
8	永嘉红心柚 1号 <i>C. grandis</i> Yongjia-hongxinyou 1	浙江省永嘉县 Yongjia, Zhejiang	红色 Red
9	永嘉红心柚 2号 <i>C. grandis</i> Yongjia-hongxinyou 2	浙江省永嘉县 Yongjia, Zhejiang	粉红色 Pink
10	文成红心柚 <i>C. grandis</i> Wencheng-hongxinyou	浙江省文成县 Wencheng, Zhejiang	红色 Red
11	麻步文旦 <i>C. grandis</i> Mabu-wendan	浙江省平阳县 Pingyang, Zhejiang	粉红色 Pink
12	常山胡柚 <i>C. paradisi</i> Changshan-huyou	浙江省常山县 Changshan, Zhejiang	橙色 Orange
13	椴文柑 <i>C. grandis</i> × <i>C. reticulata</i> Manwengan	浙江省台州黄岩区 Huangyan, Taizhou, Zhejiang	浅黄色 Pale yellow
14	玉环柚 <i>C. grandis</i> Yuhanyou	浙江省玉环县 Yuhuan, Zhejiang	浅黄色 Pale yellow
15	佛香柚 <i>C. grandis</i> Foxiangyou	浙江省舟山定海区 Dinghai, Zhoushan, Zhejiang	浅黄色 Pale yellow
16	皋泄香柚 <i>C. grandis</i> Gaoxie-xiangyou	浙江省舟山定海区 Dinghai, Zhoushan, Zhejiang	浅黄色 Pale yellow
17	处红柚 <i>C. grandis</i> Chuhongyou	浙江省丽水莲都区 Liandu, Lishui, Zhejiang	红色 Red
18	青田红心柚 <i>C. grandis</i> Qingtian-hongxinyou	浙江省青田县 Qingtian, Zhejiang	粉红色 Pink

23对SSR引物信息如表2所示,其中引物1~8来自柚基因组^[12],引物9~16来自华盛顿脐橙基因组^[18],引物17~23来自Rangpur莱檬(*C. limonia*)与枳橙(*C. sinensis*×*Poncirus trifoliata*)的杂交后代基因组^[19]。

1.2 基因组DNA提取

幼嫩叶片DNA提取采用改良SDS法^[20],用1%(ω),

下同)琼脂糖凝胶电泳检测DNA纯度。用紫外分光光度计(Eppendorf,德国)检测DNA浓度,稀释至10~30 mg·L⁻¹,储存于-20℃冰箱用于后续研究。

1.3 SSR-PCR扩增及检测

利用Eppendorf Mastercycler PCR扩增仪进行扩增反应。PCR反应体系为20 μ L,包括1×PCR buffer (含Mg²⁺),0.1 mmol·L⁻¹ dNTP,上、下游引物各5

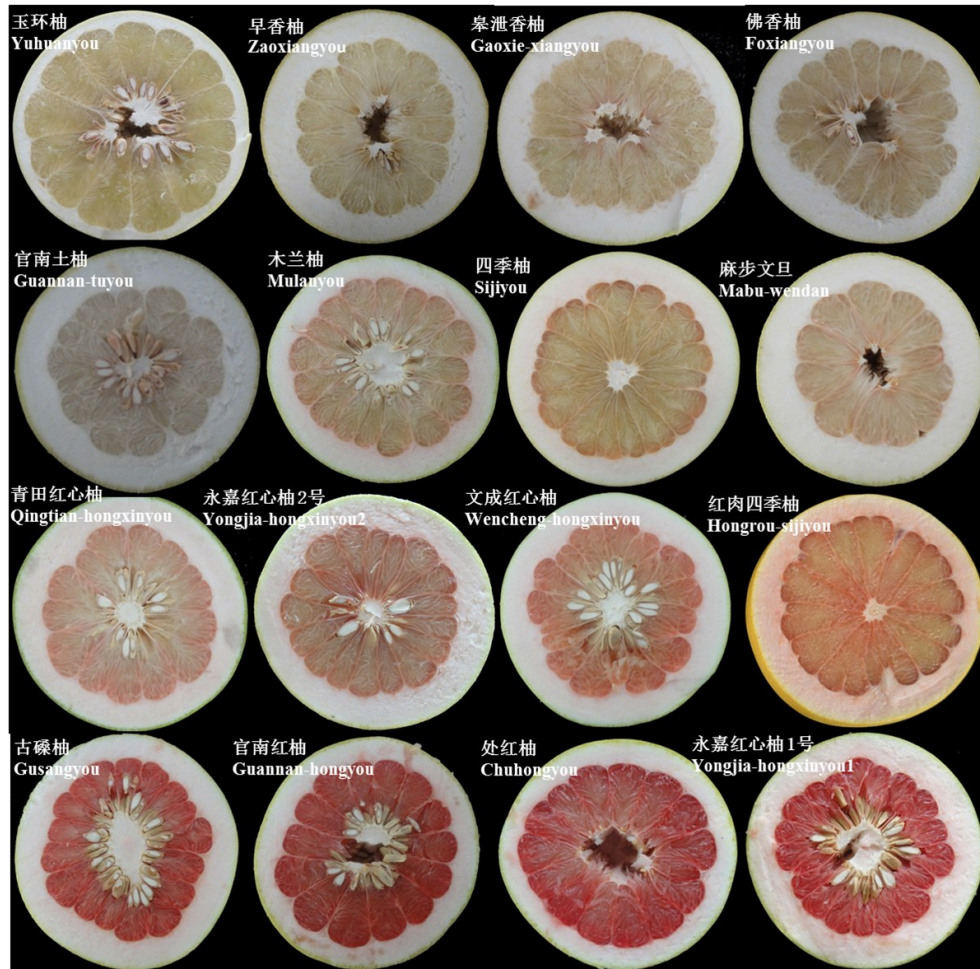


图1 部分供试材料的果肉颜色

Fig. 1 Pulp color of partial sampled pummelo germplasm

表2 23对SSR引物的序列信息

Table 2 Information of twenty-three SSR markers

编号 Code	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences (5'-3')	
		正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
1	AG14	AAAGGGAAAGCCCTAATCTCA	CTTCCTCTTGGCGGAGTGTTC
2	ATC09	TTCCTTATGTAATTGCTCTTTG	TGTGAGTGTTTGTGCCGTGTG
3	CAG01	AACACTCGCACCAAATCCTC	TAAATGGCAACCCAGCITTG
4	CAT01	GCTTTCGATCCCTCCACATA	GATCCCTACAATCCTTGGTCC
5	CCT01	TCAACACCTCGAACAGAAGG	CCCACATGCTAGCACAAAGA
6	CT02	ACGGTGCCTTTGAGGTAAG	TGACTGTGGATTGGGATG
7	CT21	CGAACTCATAAAAGCCGAAAC	CAACAACCACCACTCTCAGG
8	CTT01	TCAGACATTGAGTTGCTCG	TAACCCTTAGGCTTCGGCA
9	CMS-16	AAAGAAAATGTTATGTGCATG	GATGGAGTTTCTTAGCTCCC
10	CMS-19	GGCTTTTCCCAATGATG	GTTGACCTAAAAGGGGGGAG
11	CMS-20	GGAGCATATAAGCATAAACACC	AGGAAAACGCATAAACCGTG
12	CMS-23	CTATGTGACAGCACTGATGG	TTTCCTATCTCTCTTGAGACAT
13	CMS-26	TGATGTCTTGATCCCACTTCC	ACTCAAAGCTCCGCTACAGTG
14	CMS-30	AACACCCCTGGAGGGAG	GCTGTTACACACACAACCC
15	CMS-4	CCTCAAACCTTCTCCAATCC	CTGTAAAGTACATGCATGTTGG
16	CMS-47	GGATCCTCCACCATCTCGTA	TTCTTCTTCATGCCGACTT
17	TAA1	GACAACATCAACAACAGCAAGAGC	AAGAAGAAGAGCCCCCATTAGC
18	TAA15	GAAAGGTTACTTGACCAGGC	CTTCCCAGCTGCACAAGC
19	TAA27	GGATGAAAAATGCTCAAAATG	TAGTACCCACAGGGAAGAGAGC
20	TAA3	AGAGAAGAAACATTTGCGGAGC	GAGATGGGACTTGGTTCATCAGC
21	TAA33	GGTACTGATAGTACTGCGGCG	GCTAATCGCTACGTCTTCGC
22	TAA41	AGGTCTACATTGGCATTGTC	ACATGCAGTGCTATAATGAATG
23	TAA45	GCACCTTTTATACCTGACTCGG	TTCAGCATTTGAGTTGGTTACG

pmol·L⁻¹, 40 ng 基因组 DNA 和 0.5 U *Taq* 酶 (TaKaRa, 大连)。反应条件为: 94 °C 预变性 2.5 min; 94 °C 变性 30 s, 合适退火温度 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。各引物对的最适退火温度参照文献^[12, 18-19] 并进行适当调整直至扩增到清晰条带。PCR 产物经 3% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 将不同浓度的产物稀释 100~300 倍后, 以 Marker ET550-R (Pharmacia, USA) 为内参, 利用 MegaBACE 1000 DNA 测序仪 (Pharmacia, USA) 测定产物长度, 在 GeneMapper4.0 (Applied Biosystems, USA) 软件中读取数据, 分子质量大小以 Marker500 为标准, SSR 产物测序在浙江大学分析测试中心进行。

1.4 数据分析

根据每个样品在不同 SSR 位点上扩增条带的有无赋予 1、0 值构建原始矩阵。将 SSR 引物扩增的每条多态性条带作为 1 个等位基因, 利用 Popgene 1.31^[21] 统计并计算每个位点的观察等位基因数 (A_o)、有效等位基因数 (A_e)、观察杂合度 (H_o)、期望杂合度 (H_e) 和多态性信息含量 (PIC), 利用 NTSYS-pc2.1^[22]

中 Similarity 程序计算 Dice 遗传相似性系数, 通过非加权组平均法 (UPGMA) 进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 SSR 扩增结果及多态性分析

23 对 SSR 引物的扩增片段长度为 123~240 bp, 共检测到 91 个等位基因。等位基因数最多的位点为 CMS-26, 包含 7 个等位基因, 其次为 CMS-16、CMS-30、TAA33 和 TAA41, 均为 6 个, CAT01、CCT01、CMS-20 和 TAA15 位点的等位基因数为 2 个, 平均每个位点的等位基因数为 4.0, 平均有效等位基因数为 2.52。在扩增到的 91 个等位基因中有 20 个特异等位基因, 主要分布在 ‘官南红柚’ ‘木兰柚’ 和 ‘古臻柚’ 等 10 份种质中。23 对 SSR 引物的观察杂合度水平最低为 0.13 (TAA3), 最高为 1.00 (CMS-47); 期望杂合度从 0.06 (CAT01) 到 0.84 (CMS-26); 多态性信息含量从 0.05 (CAT01) 到 0.79 (CMS-26), 平均值为 0.47, 说明不同 SSR 位点的多态性差异较大 (表 3)。

表 3 23 对 SSR 标记的浙江地方柚类种质资源的遗传多样性分析

Table 3 Genetic diversity of Zhejiang local pummelo germplasm based on 23 microsatellite loci

引物名称 Primer names	片段长度 Fragment length/bp	特异等位基因长度[资源编号] Length of specific alleles [Code of germplasm resources]	A_o	A_e	H_o	H_e	PIC
AG14	143~177	151 [11]	3	1.27	0.24	0.22	0.20
ATC09	123~129	129 [13]	3	1.35	0.29	0.27	0.24
CAG01	137~149	-	5	3.47	0.83	0.73	0.67
CAT01	174~183	183 [3]	2	1.06	0.06	0.06	0.05
CCT01	179~182	-	2	1.98	0.56	0.51	0.37
CT02	160~240	-	3	2.84	0.78	0.67	0.57
CT21	156~181	170 [9]	5	3.03	0.59	0.69	0.62
CTT01	166~240	-	3	1.41	0.33	0.30	0.27
CMS-16	178~192	182 [10]	6	4.84	0.93	0.82	0.76
CMS-19	174~200	176 [9]、200 [3]	5	3.38	0.46	0.73	0.65
CMS-20	142~176	-	2	1.60	0.50	0.39	0.30
CMS-23	123~129	-	3	1.41	0.33	0.30	0.27
CMS-26	216~238	216 [16]	7	5.42	0.80	0.84	0.79
CMS-30	158~189	158 [10]、186 [12]、189 [13]	6	3.69	0.58	0.76	0.69
CMS-4	181~220	-	3	1.98	0.39	0.50	0.44
CMS-47	190~211	-	4	2.83	1.00	0.67	0.59
TAA1	177~183	183 [5]	3	1.37	0.15	0.28	0.26
TAA15	181~240	-	2	1.84	0.59	0.47	0.35
TAA27	222~231	-	3	1.96	0.53	0.50	0.44
TAA3	154~167	167 [12]	4	2.37	0.13	0.60	0.51
TAA33	127~143	130 [12]、134 [4]	6	2.54	0.61	0.62	0.55
TAA41	140~156	140 [4]、150 [9]、153 [3]	6	2.79	0.33	0.66	0.58
TAA45	147~157	147 [10]、149 [6]	5	3.48	0.69	0.74	0.66
平均值 Mean			4	2.52	0.51	0.54	0.47

注: A_o . 观测等位基因数; A_e . 有效等位基因数; H_o . 观察杂合度; H_e . 期望杂合度; PIC . 多态性信息含量; 种质资源标号同表 1。

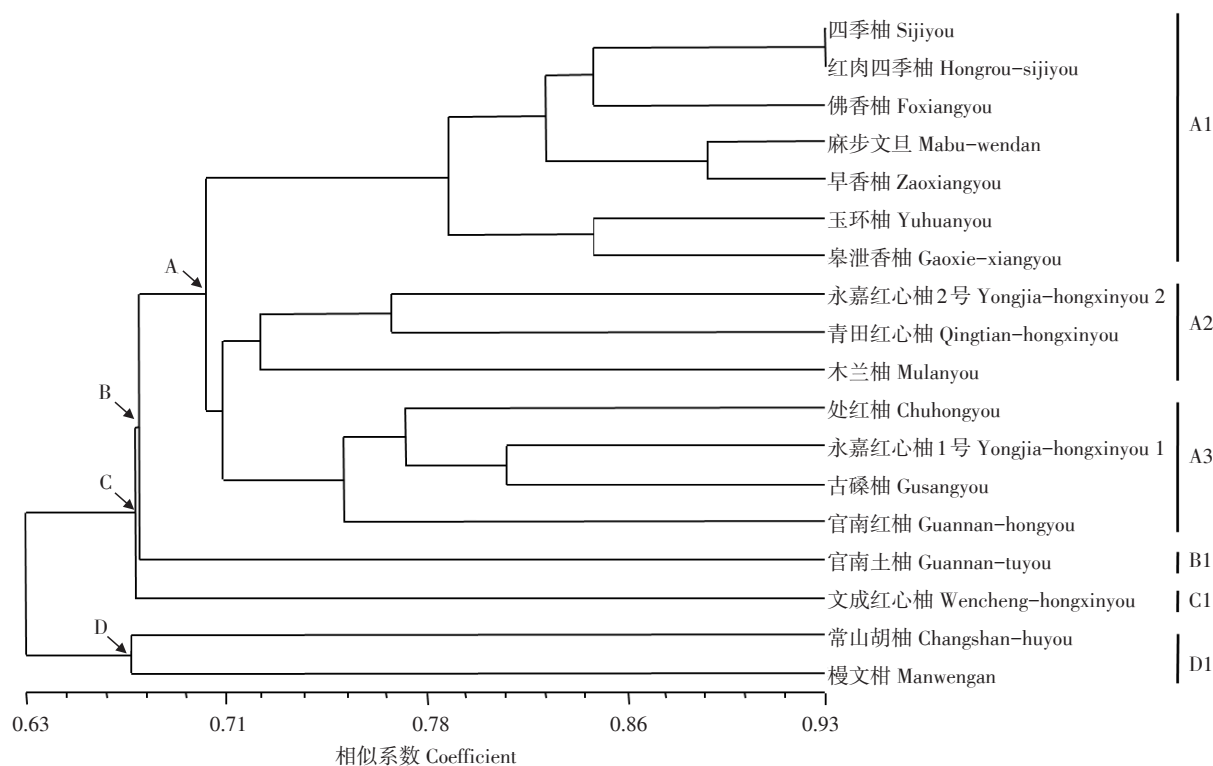
Note: A_o . Observed number of alleles; A_e . Effective number of alleles; H_o . Observed heterozygosity; H_e . Expected heterozygosity; PIC . Polymorphism information content. Code of germplasm resources refer to Table 1.

2.2 遗传多样性分析

以18份浙江地方柚类种质资源23个SSR位点的谱带数据组成原始矩阵,计算所有种质之间的遗传相似性系数,结果表明供试种质间的相似系数为0.55~0.94,平均为0.71,其中‘四季柚’和‘红肉四季柚’的相似系数最高,‘永嘉红心柚1号’‘官南土柚’和‘木兰柚’之间的遗传相似性系数最低,表明浙江柚类种质资源间经长期的自然演化和人工选择后,既表现一定的遗传相似性,也存在着丰富的遗传差异。

采用UPGMA法构建系统树发现,18份供试材

料分为6大组群:A1、A2、A3、B1、C1和D1,其中A次分支形成A1、A2和A3组,A1组包括‘四季柚’‘红肉四季柚’‘佛香柚’‘麻步文旦’‘早香柚’‘玉环柚’和‘皋泄香柚’共7份果肉颜色为浅黄色或粉红色的种质,A2组包括‘永嘉红心柚2号’‘青田红心柚’和‘木兰柚’3个果肉颜色为粉红色的种质,A3组包括‘处红柚’‘永嘉红心柚1号’‘古磜柚’和‘官南红柚’4个果肉颜色为红色的种质;B1分支和C1分支分别是‘官南土柚’和‘文成红心柚’;D1分支将2个种间杂种柚类型‘常山胡柚’和‘椴文柑’与其他16份柚种质区分开(图2)。



A~D 分别代表系统树的4次分支,A1~A3、B1、C1和D1代表4次分支后形成的6大组群。

A~D represent four independent divisions. A1~A3, B1, C1 and D1 represent six clusters.

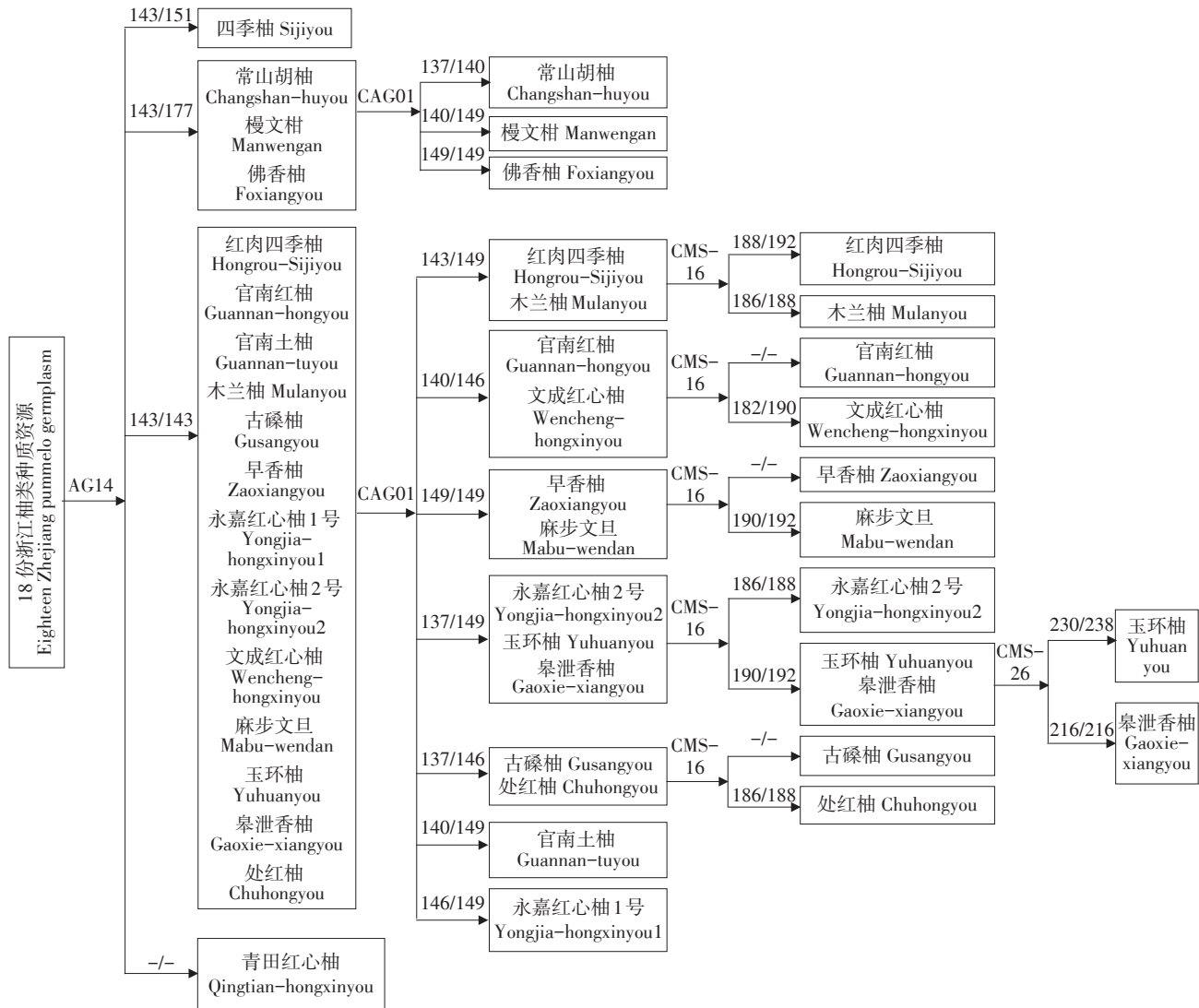
图2 基于23对SSR位点数据构建的18份浙江地方柚类种质资源的UPGMA系统关系树

Fig. 2 The dendrogram of eighteen Zhejiang local pummelo germplasms based on twenty-three SSR loci by UPGMA method

2.3 种质鉴定图构建

利用AG14、CAG01、CMS-16和CMS-26共4对SSR引物对18份种质进行分子鉴定(图3):首先根据AG14引物测序结果将18份种质分为4组,其中‘四季柚’(扩增片段长度为143/151 bp)和‘青田红心柚’(无扩增条带)各为1组,‘常山胡柚’‘椴文柑’和‘佛香柚’扩增片段长度为143/177 bp,其余13份种质为1组,扩增片段均为143/143 bp;根据CAG01

引物扩增结果进行第2次分组,‘常山胡柚’(137/140 bp)‘椴文柑’(140/149 bp)‘佛香柚’(149/149 bp)‘官南土柚’(140/149 bp)和‘永嘉红心柚1号’(146/149 bp)共5份种质被成功鉴定,其余11份种质被分为5组;根据CMS-16引物扩增结果进行第3次分组,除‘玉环柚’和‘皋泄香柚’外其余9份种质均被成功鉴定;最后利用CMS-26引物可区分‘玉环柚’(230/238 bp)和‘皋泄香柚’(216/216 bp)。



箭头上标注 4 对进行种质鉴定的 SSR 引物名称,引物信息参照表 2;横线上标注引物扩增片段的长度(bp)。

The text on the arrows represent the four SSR loci for germplasm characterization, and the primer information refer to Table 2; the text on the horizontal lines represent the length of amplified products (bp).

图 3 利用 4 对 SSR 引物鉴定 18 份浙江柚类种质资源

Fig. 3 Characterization of 18 pummelo germplasm in Zhejiang province by four SSR loci

3 讨 论

柚为单胚植物,在长期的自然选择和人工驯化过程中极易产生实生变异和自然杂种,具有丰富的遗传多样性。对于柚类品种的划分,何天富^[7]根据形态学特征将其分为沙田柚、文旦柚和杂种柚 3 大种群,陈振光等^[23]根据果肉颜色将柚类分为红瓢和白瓢 2 大类,并按果实形状进一步细分为卵圆形、圆形和扁圆形共 6 个组型。刘勇^[4]根据地理分布将我国柚类资源分为 6 个生态分布种群,并利用 SSR 和 AFLP 标记从分子水平上证实沙田柚、文旦柚和杂种柚 3 大种群分类的合理性。浙江省作为重要的东

南沿海柚产区,也是海洋性柚的主要分布区之一,其境内资源大多为福建漳州起源的文旦柚演化后代,如‘玉环柚’‘佛香柚’和‘皋泄香柚’等^[7],但仍有‘古碌柚’‘木兰柚’和‘官南红柚’等地方资源的来源尚不明确。笔者之前的研究发现浙江地方柚类种质资源在果实性状和 DNA 分子水平上存在丰富的变异和较高的遗传多样性水平^[9-10]。

本研究利用 SSR 标记进一步评价浙江地方柚类种质资源的遗传多样性并进行种质资源鉴定。23 对 SSR 引物共检测到 91 个等位基因变异,20 个特异等位基因主要分布于 10 份柚材料中,‘常山胡柚’‘文成红心柚’‘永嘉红心柚 2 号’和‘官南红柚’4 份

材料中的特异等位基因数最多,而且含特异等位基因数较多的种质与其他种质的遗传距离较远,这与刘勇^[4]在与柚类亲缘关系较远的野生橘类、宜昌橙类和大翼橙类样品中扩增的特征条带较多的研究结果一致。本研究中23个SSR位点多态性信息含量平均值为0.47,表明浙江地方柚类种质资源间的遗传距离较大,具有丰富的遗传多样性。聚类分析将18份资源划分为6个组,2个杂种柚类型‘椴文柑’和‘常山胡柚’聚为一组,‘官南土柚’和‘文成红心柚’单独聚为一组,其余14份柚资源有按果肉颜色优先聚类的趋势,果肉红色的‘处红柚’‘永嘉红心柚1号’‘古磜柚’和‘官南红柚’聚为A3组,果肉粉红色的‘永嘉红心柚2号’‘青田红心柚’和‘木兰柚’聚为A2组,而A1组中浅黄和粉红色的种质资源间并未得到明显区分,但浅红色的A2组种质与红色的A3组种质亲缘关系相对较近,说明红瓢型的浙江柚类种质资源可能具有共同的祖先来源。果实表型性状与分子标记数据间的相关性在其他果树中也有报道,猕猴桃果实形状和果肉色泽等表型性状与SSR和AFLP分子标记数据间存在显著相关性^[24-25]。本研究中浙江地方柚类种质资源表现出按果肉颜色优先聚类的趋势,说明分子标记的遗传多样性可以在一定程度上反映果肉色泽的多样性,但这些SSR标记是否与果肉色泽相关联还需要进一步研究。

SSR标记是柑橘种质资源鉴定的有效工具^[26],Bakhshipour等^[27]利用SSR标记构建33份未知柑橘资源与12份栽培品种的系谱关系图,刘勇^[4]利用9对SSR引物区分122份柚类资源及其近缘种。本研究中笔者利用AG14、CAG01、CMS-16和CMS-26共4对SSR引物将18份柚类种质区分开,构建了浙江地方柚类种质资源鉴定图,这4对引物可用于浙江地方柚类种质资源的种苗真实性鉴定。

在柚类种质资源评价和遗传育种中,果肉色泽是十分重要的评价指标。红肉柚类品种由于其特殊的经济性状和商品价值深受育种者及消费者的青睐^[28]。近年来我国在主栽品种‘琯溪蜜柚’中选育出‘红肉蜜柚’‘三红蜜柚’和‘红绵蜜柚’等红肉品种,但与其他品种相比,‘琯溪蜜柚’及其红色芽变品种在生长后期和贮藏期粒化现象较为严重^[29]。本研究收集到的浙江地方柚类种质资源在果肉色泽性状上具有丰富的多样性,如红色的‘古磜柚’‘官南红柚’和‘永嘉红心柚1号’等,粉红色的‘木兰柚’‘青田红

心柚’和‘永嘉红心柚2号’等,浅黄色的‘早香柚’和橙色的‘常山胡柚’等。这些红肉柚资源将为柚类新品种的选育提供丰富的遗传基础,但这些资源在果实品质、丰产稳产和商品性能等方面还存在一定的问题,并且除‘古磜柚’‘官南红柚’‘文成红心柚’‘永嘉红心柚1号’和‘处红柚’果肉颜色为红色外,其他红肉资源还存在果肉红色程度较浅以及分布不均匀的问题,因此如何通过杂交育种以及其他育种手段培育出生长性状优良且果肉红色性状稳定的红肉柚类新品种,是未来柚育种工作的重点。

参考文献 References :

- [1] 邓秀新,彭抒昂.柑橘学[M].北京:中国农业出版社,2013:94. DENG Xiuxin, PENG Shu'ang. *Citrus*[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2013: 94.
- [2] 张太平,彭少麟,王峥峰,陈碧琛.柚类种质资源研究与保护概况[J].生态科学,2001,20(3):8-13. ZHANG Taiping, PENG Shaolin, WANG Zhengfeng, CHEN Bichen. Introduction to the study and protection of pomelo germplasm[J]. *Ecologic Science*, 2001, 20(3): 8-13.
- [3] 石开明.利用RAPD、ISSR标记分析鄂西地区柚种质资源遗传多样性[D].武汉:华中农业大学,2004. SHI Kaiming. Analysis of genetic diversity of *Citrus grandis* Osbeck in Western Hubei by RAPD and ISSR markers[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2004.
- [4] 刘勇.柚类资源分子系统学及其核心种质构建研究[D].武汉:华中农业大学,2005. LIU Yong. Molecular phylogenetic analysis and core collection construction using SSR and AFLP markers in pummelo [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2005.
- [5] 杨迎花.利用SRAP标记对湖南柚资源遗传多样性的分析[D].长沙:湖南农业大学,2009. YANG Yinghua. The development of SRAP marker and identification of pummelo germplasm diversity in Hunan[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2009.
- [6] 曹立新.江西省广丰县柚资源调查与马家柚起源分析[D].武汉:华中农业大学,2012. CAO Lixin. The investigation of pummelo germplasm and the origin analysis of Majiayou Guangfeng, Jinagxi province[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012.
- [7] 何天富.中国柚类栽培[M].北京:中国农业出版社,1999. HE Tianfu. China pummelo cultivation[M]. Beijing: China Agricultural Press, 1999.
- [8] 黄为杰,潘孝强.木兰柚生物学特性的观察[J].浙江柑橘,2011,28(4):21-22. HUANG Weijie, PAN Xiaoliang. The observation of Mulan pummelo biological characteristics[J]. *Zhejiang Ganju*, 2011, 28(4): 21-22.
- [9] 林绍生,刘冬峰,郭秀珠,黄品湖,徐文荣,陈巍.浙江柚类地方资源SRAP标记的遗传多样性分析[J].分子植物育种,2015,

- 13(3): 562–566.
LIN Shaosheng, LIU Dongfeng, GUO Xiuzhu, HUANG Pinhu, XU Wenrong, CHEN Wei. Analyses of genetic diversity of pummelo (Osbeck) in Zhejiang gerplasms by SRAP markers[J]. Molecular Plant Breeding, 2015, 13(3):562–566.
- [10] 林绍生, 刘冬峰, 陈巍, 郭秀珠, 徐文荣, 黄品湖. 浙江红肉柚类胡萝卜素合成酶基因片段的 SNP 分析[J]. 果树学报, 2016, 33(9):1052–1057.
LIN Shaosheng, LIU Dongfeng, CHEN Wei, GUO Xiuzhu, XU Wenrong, HUANG Pinhu. SNP analysis of carotenoid biosynthesis related genes of red pummelo in Zhejiang province[J]. Journal of Fruit Science, 2016, 33(9):1052–1057.
- [11] ZANE L, BARGELLONI L, PATARNELLO T. Strategies for microsatellite isolation: a review[J]. Molecular Ecology, 2002, 11(1): 1–16.
- [12] BARKLEY N A, ROOSE M L, KRUEGER R R, FEDERICI C T. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 112(8): 1519–1531.
- [13] AMAR M H, BISWAS M K, ZHANG Z W, GUO W W. Exploitation of SSR, SRAP and CAPS-SNP markers for genetic diversity of *Citrus* germplasm collection[J]. Scientia Horticulturae, 2011, 128(3): 220–227.
- [14] 韩国辉, 向素琼, 汪卫星, 魏旭, 何波, 李晓林, 梁国鲁. 沙田柚杂交后代群体的 SSR 鉴定与遗传多样性分析[J]. 中国农业科学, 2010, 43(22): 4678–4686.
HAN Guohui, XIANG Suqiong, WANG Weixing, WEI Xu, HE Bo, LI Xiaolin, LIANG Guolu. Identification and genetic diversity of hybrid progenies from Shatian pummelo by SSR[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(22): 4678–4686.
- [15] 王福生, 江东. 应用 cpSSR 和 EST-SSR 标记进行柑橘特异种质资源遗传背景研究[J]. 园艺学报, 2010, 37(3): 465–474.
WANG Fusheng, JIANG Dong. Studies on genetic background of important germplasm resources among citrus based on cpSSR and EST-SSR marker[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2010, 37(3): 465–474.
- [16] 梁武军, 解凯东, 谢宗周, 徐强, 伊华林, 郭文武. 三倍体葡萄柚实生后代多倍体的发掘与 SSR 遗传鉴定[J]. 果树学报, 2015, 32(1):13–18.
LIANG Wujun, XIE Kaidong, XIE Zongzhou, XU Qiang, YI Hualin, GUO Wenwu. Exploitation of polyploids from open-pollinated triploid grapefruit progenies and their genetic identification by SSR molecular markers[J]. Journal of Fruit Science, 2015, 32(1):13–18.
- [17] 江东. 柑橘种质资源描述规范和数据标准[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006.
JIANG Dong. Description and data standard for *Citrus* germplasm resources[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2006.
- [18] AHMAD R, STRUSS D, SOUTHWICK S M. Development and characterization of microsatellite markers in *Citrus*[J]. Journal of The American Society of Horticultural Science, 2003, 128(4): 584–590.
- [19] KIJAS J M H, THOMAS M R, FOWLER J C S, ROOSE M L. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of *Citrus* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 94: 701–706.
- [20] DELLAPORTA S L, WOOD J, HICKS J B. A plant DNA mini-preparation: version III[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1983, 1(4): 19–21.
- [21] YEH F C, BOYLE T. POPGENE: Microsoft window-based free-ware for population genetic analysis, version 1.31 [OL]. Edmonton, Canada: University of Alberta, 1999. <https://sites.ualberta.ca/~fyeh/popgene.html>.
- [22] ROHLF F J. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.1 [OL]. New York: Applied Biostatistics Inc., 2000. <http://www.exetersoftware.com/cat/ntsyspc/ntsyspc.html>.
- [23] 陈振光, 赖钟雄. 中国柚的种质资源及其研究[J]. 福建农学院学报(自然科学版), 1993, 22(3): 290–295.
CHEN Zhenguang, LAI Zhongxiong. Introduction and research of pummelo germplasm in China[J]. Journal of Fujian Agricultural University (Nature Science Edition), 1993, 22(3): 290–295.
- [24] 岁立云, 刘义飞, 黄宏文. 红肉猕猴桃种质资源果实性状及 AFLP 遗传多样性分析[J]. 园艺学报, 2013, 40(5): 859–868.
SUI Liyun, LIU Yifei, HUNG Hongwen. Genetic diversity of red-fleshed kiwifruit germplasm based on fruit traits and AFLP markers[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2013, 40(5): 859–868.
- [25] 汤佳乐, 黄春辉, 吴寒, 郎彬彬, 曲雪艳, 徐小彪. 野生毛花猕猴桃果实表型性状及 SSR 遗传多样性分析[J]. 园艺学报, 2014, 41(6):1198–1206.
TANG Jiale, HUANG Chunhui, WU Han, LANG Binbin, QU Xueyan, XU Xiaobiao. Genetic diversity of wild *Actinidia eriantha* germplasm based on fruit traits and SSR markers[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2014, 41(6):1198–1206.
- [26] GHORABAIE H R R, GHAZVINI R F, GOLEIN B, NABIPOUR A R. Identification of some *Citrus* accessions in a *Citrus* germplasm utilizing simple sequence repeat markers (SSRs)[J]. Horticulture Environment and Biotechnology, 2010, 51(4): 343–347.
- [27] BAKHSHIPOUR H, GOLEIN B, MEHREGAN I, SAADATMAND S. Simple sequence repeat polymorphism in Iranian *Citrus* germplasm including unknown variants[J]. Agricultural Research, 2015, 4(2):152–159.
- [28] 徐娟, 邓秀新. 柑橘类果实汁胞的红色现象及其呈色色素[J]. 果树学报, 2002, 19(5):307–313.
XU Juan, DENG Xiuxin. Red juice sac of *Citrus* and its main pigments[J]. Journal of Fruit Science, 2002, 19(5):307–313.
- [29] 徐世荣, 潘鹤立, 吴嘉玲, 丁安琪, 吕特衡, 潘东明, 余磊, 张智伟, 李小婷. ‘红肉蜜柚’果实汁胞粒化过程中 POD 同工酶谱分析[J]. 果树学报, 2016, 33(4):409–415.
XU Shirong, PAN Heli, WU Jialing, DING Anqi, LÜ Shiheng, PAN Dongming, YU Lei, ZHANG Zhiwei, LI Xiaoting. Isozyme analysis of POD from ‘Hongroumiyou’ fruit during the process of juicy sac granulation[J]. Journal of Fruit Science, 2016, 33(4): 409–415.