

应用SSR荧光标记法构建22个 柚类品种的分子身份证

吴仕蔓^{1,2}, 娄兵海², 陈传武², 唐艳², 邓崇岭^{2*}, 武晓晓^{2*}

(¹广西师范大学生命科学学院, 广西桂林 541004; ²广西桂北特色经济作物种质创新与利用实验室·
广西柑橘育种与栽培工程技术研究中心·广西特色作物研究院, 广西桂林 541004)

摘要:【目的】应用荧光SSR分子标记构建柚类种质分子身份证, 用于品种资源鉴定。【方法】收集22份柚类材料, 筛选SSR荧光标记引物, 采用荧光毛细管电泳检测技术分析扩增条带分子质量和等位基因, 获得相应的扩增带型, 从而对每份柚材料进行标记。采用个位阿拉伯数字和小写英文字母对不同等位基因分子质量大小进行编码, 再按照引物扩增带型数由大到小顺序将各位点赋值编码的数字串联排序, 构建供试样品的分子身份证。【结果】筛选出4对多态性较好的引物, 使用这4对引物共检测到49个扩增带型和41个SSR等位位点, 平均每对引物的有关带型数12.25个、位点数10.25个。【结论】通过扩增带型分析, 构建了22份柚类种质的分子身份证, 包括12条信息独特的身份证。遗传聚类与分子身份证分析结果一致, 为柚类品种鉴定和保护提供了重要依据。

关键词:柚类; 种质资源; SSR荧光标记; 分子身份证

中图分类号:S666.3

文献标志码:A

文章编号:1009-9980(2023)04-0605-10

Establishment of molecular identity of 22 pomelo varieties using fluorescent labeled SSR markers

WU Shiman^{1,2}, LOU Binghai², CHEN Chuanwu², TANG Yan², DENG Chongling^{2*}, WU Xiaoxiao^{2*}

(¹College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004, Guangxi, China; ²Guangxi Laboratory of Germplasm Innovation and Utilization of Specialty Commercial Crops in North Guangxi/Guangxi Citrus Breeding and Cultivation Research Center of Engineering Technology/Guangxi Academy of Specialty Crops, Guilin 541004, Guangxi, China)

Abstract:【Objective】Pomelo is a collection of perennial fruit trees that belong to one of the three basic species of *Citrus* genus in Rutaceae. It is inferred that they are originated in Southeast Asia, or in South China where they have been cultivated for 3000 years. In China, there are a myriad of pomelo germplasm resources likely ascribed to the monembryony whereby pomelo plants are prone to genetically vary during long-term breeding, selection, and cultivation. Relatively low genetic diversity but high morphological variation makes traditional morphology identification among hundreds of pomelo germplasms and varieties difficult. The molecular technique at multiple levels can be applied to improve the accuracy of the identification. SSR is informative, codominantly inherited, highly polymorphic, easily utilized, but not affected by environments and phytomorphological characteristics. The identification of the size of target gene DNA fragment by capillary electrophoresis with primers of 5'-end fluorescence labeling (FAM, HEX, TAMRA) is accurate to even 1 bp, with reliable and stable detection performance. The molecular ID codes of 22 pomelo germplasm resources were established using SSR markers.

【Methods】The 22 germplasm resources were collected from the germplasm repository of Guangxi

收稿日期:2022-08-30 接受日期:2022-11-24

基金项目:国家重点研发计划项目(2019YFD1001402-HX01);广西科技重大专项(桂科AA22068092);国家现代农业产业技术体系广西创新团队柑橘首席专家岗位项目(nycytxgxctd-2021-05-01);广西农业科技自筹经费项目(Z202090);广西特色作物试验总站(TS202101)

作者简介:吴仕蔓,女,在读硕士研究生,主要从事柑橘分子生物学研究。Tel:17878192374, E-mail:1403658429@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. E-mail:15578386736@126.com; E-mail:Cldeng88168@126.com

Academy of Specialty Crops, and orchards of Quanzhou county, Guilin city, and Gaoming farm, Nanning city, Guangxi. According to literature reports, 21 pairs of primers with high polymorphism and good repeatability were synthesized, labeled with three kinds of fluorescence, and used for PCR amplification. The genomic DNA was extracted by magnetic bead method genomic DNA kit, and the purity, concentration and integrity of the extracts were assessed by NanoDrop and agarose gel electrophoresis. A 10 μL PCR system was adopted, including 5.0 μL of 2 \times *Taq* PCR Master Mix, 0.5 μL of each of forward and reverse primers ($10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 0.5 μL genomic DNA (about $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), and 3.0 μL of ultrapure water. The PCR procedure was performed as follows: an initial predenaturation at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min, 35 cycles of denaturation at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 30 s, annealing at appropriate temperature for 30 s, and extension at 72 $^{\circ}\text{C}$ for 30 s, a final extension at 72 $^{\circ}\text{C}$ for 20 min, and storage at 4 $^{\circ}\text{C}$. The PCR products of each primer pair with each of the 22 samples were subjected to fluorescence capillary electrophoresis. The GeneMarker analysis software was used to analyze the original data, and sizes of the amplified fragments were determined by comparing them with the internal standard of molecular mass, and the genotypes were further recognized. At the same time, the individual digits and lowercase English letters were used to mark each band to encode a fingerprint. In another word, each molecular ID card (the code) of the test samples was designed as concatenate markers in order from the largest band to the smallest. **【Results】** Four pairs of SSR primers that could amplify products with good polymorphism were screened and applied, which revealed a total of 49 polymorphic patterns and 41 polymorphic alleles, with an average of 12.25 patterns and 10.25 alleles, and the length of amplified fragments was 119–282 bp. Among the 22 pomelo germplasm samples, 12 had different molecular codes and could be distinguished. The same molecular identity code was found in *Citrus grandis* ‘Shatianyou’, *C. grandis* ‘Guizhouyou’, *C. grandis* ‘Youxuan No. 1’ and *C. grandis* ‘Youxuan No. 2’ Guangxi pomelo, Red pomelo and Guanxi Pomelo shared the same molecular identity code. The molecular ID code of pomelo Wuzheng and pomelo Cystis were also the same. These indicated that the pomelos with the same ID had similar SSR patterns, high genomic homologies, and close evolutionary relationships. This study showed that SSR fluorescence marker-based detection technology had the advantages of accurate, reliable, efficient, and high throughput. Only fewer markers needed the identity code of pomelo germplasm by double character coding method to facilitate differentiation between the homozygous and heterozygous genotypes. **【Conclusion】** Twenty-two molecular IDs of the pomelo germplasms including 12 specific samples were successfully constructed by the SSR pattern analysis, and the results from analyses in genetic distance clustering and the molecular ID were consistent. This study would not only provide a reference method for rapid, accurate and efficient identification of pomelo germplasm resources at molecular level, but also establish an important theoretical basis for identification and conservation of related pomelo varieties.

Key words: Pomelo; Germplasm resource; Fluorescent labeled SSR marker; Molecular identity

柚是芸香科柑橘属多年生果树，属于柑橘属3个基本种之一。柚类起源于东南亚或中国南方一带，在中国的栽培历史长达3000多年，古书《吕氏春秋》记载“果之美者，云梦之柚”^[1]。中国是柚类资源的起源中心和遗传变异中心之一^[2]，柚为单胚性，在长期的栽培过程中容易产生遗传变异，长期以来，人类对柚的选择和培育产生了数以百计的柚品种，这

些品种具有不同的果实大小和品种风味，形成丰富的种质资源，但至今未发现有真正野生类型^[3]。

柚类种质资源开发利用与品种鉴定具有巨大的潜力，柚类品种鉴定、分类同其他果树一样经历了形态分类^[3]、孢粉学^[4-5]、同工酶^[6]等传统的鉴定方法。尽管柑橘可根据枝叶形态等鉴别其属种，但柚类的形态学标记较少，种内品种间差异不明显，随着分子

生物学技术的发展,以 PCR 技术为代表的 DNA 分子标记技术被广泛应用,为柚类种质资源的鉴定、亲缘关系分析和遗传图谱的构建提供了良好的技术手段。其中,SSR(simple sequence repeat)为简单序列重复,由 1~6 个核苷酸重复多次的基序组成,具有信息含量高、共显性遗传、操作简单、多态性高等特点^[7],且不受形态和环境的影响而在柑橘^[8]、板栗^[9]、蔓越莓^[10]上得到应用。柚类种质丰富,遗传多样性低,具有较高的形态变异,所以需要更准确、快速、高效的鉴定方法。

在众多的分子标记中,荧光标记 SSR 能精准识别目标基因 DNA 片段大小,精准识别到只有 1 bp 差异的碱基,检测结果可靠、稳定且准确^[11]。所以,荧光标记 SSR 被广泛应用于果树遗传结构分析、品种鉴定、分子身份证构建及品种权保护等方面的研究。随着 SSR 标记的研究,“分子身份证”逐渐被提出和应用,使得在品种鉴别和检索时变得更快捷。目前,通常采用荧光测序技术结合新的带型编码方式构建分子身份证,该技术已成功应用于构建桃^[12]、杏^[13]、梨^[14]、苹果^[15]等多种果树的分子身份证。目前,尚未发现利用 SSR 荧光毛细管电泳结合新的带型编码方式构建柚类资源分子身份证的相关研究报道,笔者在本研究中以 22 份柚类种质为研究材料,采用 SSR 荧光标记引物,结合荧光毛细管电泳检测技术分析扩增条带分子质量和图谱带型方式构建分子身份证,以期为柚类品种的鉴定和亲缘关系分析提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

22 份柚类材料分别取自桂林市广西特色作物研究院柑橘种质资源保存圃、桂林市全州县以及南宁市高明农场,每个品种采集叶片后,保存于 -80 °C 超低温冰箱中备用。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取及 PCR 体系 采用磁珠法基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量。再取 2 μL DNA 样本,用 NanoDROP8000 超微量分光光度计进行检测核酸浓度和纯度检测,将 DNA 统一稀释成 20 ng·μL⁻¹,用于后续的 PCR 扩增。

引物选自李益等^[16]报道的 21 对引物(表 1),由

武汉天一华煜基因科技有限公司合成。PCR 反应体系 10 μL,包括:2 × Taq PCR Master Mix 5.0 μL,正、反向引物(10 mol·L⁻¹)各 0.5 μL,基因组 DNA(约 20 ng·μL⁻¹),超纯水 3.0 μL。PCR 反应程序:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 30 s,62~52 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,循环 35 次;72 °C 延伸 20 min,4 °C 保存。

1.2.2 毛细管电泳检测 将甲酰胺与分子质量内标混合,取 9 μL 混合物于上机板中,再加入 1 μL 稀释的荧光 PCR 产物,上样于 96 通道全自动 ABI3730XL 遗传分析仪进行毛细管电泳。利用 GeneMarker 分析软件对原始数据进行分析,将各泳道内分子质量内标的位置与各样品峰值的位置进行比较,确定片段大小和基因型类别。

1.2.3 品种分子身份证构建 对 25 个样品进行扩增,得到各样品扩增的指纹数据,将指纹数据转换为数字编码,即分子身份证。编码方式为:将每对引物在 25 份样品中扩增时所产生的等位基因按从小到大的顺序排序,然后用个位阿拉伯数字 1,2,3,……,9 作为不同等位基因的代码,等位基因数大于 9 时,用 a,b,c 代表第 10,11,12 个等位基因,依次类推,无扩增产物时用 0 表示;然后,以 2 位代码对某个标记的图谱带型进行编码,杂合带型以 2 位不同代码编码,纯合带型以 2 位相同代码编码。根据各个标记带型数的多少,确定用于构建分子身份证的标记;再按照带型数由大到小的顺序,将某一供试种质各标记的编码串联,即形成 8 位数字或字母表示的分子身份证^[13]。

1.2.4 聚类分析 使用 Cervus 软件计算引物的多态性信息含量 (polymorphism information content, PIC) 和基因多样性 (gene diversity, D),将各样品各位点的等位基因编码成 0,1 矩阵形式的指纹图谱。利用 GenAIlex 软件计算各个样品间的遗传距离 (Nei's genetic distance, GD),根据遗传距离构建进化树。

2 结果与分析

2.1 引物筛选

经荧光毛细管电泳后,每对引物均获得精确的 DNA 片段大小,如引物 CS5 的 SSR 检测结果(图 1)。21 对引物中,有 4 对引物多态性 (PIC) 大于 0.7,属于高多态性位点;PIC 介于 0.3~0.7 之间的引物有 16 对,属于中高多态性位点;仅有 1 对引物

表 1 21 对引物信息

Table 1 Information of 21 pairs of SSR primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')	染色体 Chromosome	5'荧光标记 Fluorescent labelled	多态性信息 PIC
CS1	F:TTCGTCATCCTCATCCATC R:TCATCAAATCACCCAAACGA	1	TAMRA	0.676
CS2	F:TCCACAAGGAGAAGAACGG R:GCGTCTTACTGTTACCGGG	1	FAM	0.590
CS3	F:GTTGCGCAGTTATTCTCAA R:CCGACCACTTTACCCACTG	2	FAM	0.147
CS4	F:CATCAGAAACGAGATGCCAA R:AAGGGCTAGAAGATTCCCCC	2	FAM	0.607
CS5	F:TTGCCAAGAGATTAAACGAACA R:GACGAGAGGTCCAGAAATCG	2	FAM	0.790
CS6	F:AGGTCTACATTGGCATTGTC R:ACATGCAGTGCTATAATGAATG	2	FAM	0.649
CS7	F:CTTCCTCTTGCAGGTGTC R:GAGGGAAAGCCCTAATCTCA	2	FAM	0.732
CS8	F:CTTGTGTGTTGCAGCTCGAT R:ATTCAAAACCGACTGCC	2	HEX	0.652
CS9	F:TAAAAACCAACGTCCCCTCA R:CGGGCGAGGTAGAAGTAATG	3	TAMRA	0.419
CS10	F: AACACCCCTTGGAGGGAG R: GCTGTTCACACACACAACCC	3	FAM	0.568
CS11	F:CGAAATGACTTCCCAGAAT R:GCTCCCTCCGATTCTCTCTC	3	FAM	0.366
CS12	F:GTGAGGCAAAACGAAAGAG R:GGGCCATACAACGTAGAAG	4	FAM	0.743
CS13	F:CACGCAGCTTGAGTTGAAG R:GTGCCGTTAGGGTTTCCCT	5	HEX	0.677
CS14	F:CAGGCAGTAACCTCCCAGAC R:AGCGAAAGCTAATGATGGTG	5	HEX	0.452
CS15	F:CGGGCTAGGCTGAGAGATA R:TTCTTGAGCCGACAACACT	6	HEX	0.631
CS16	F:GTGTGGTCCAGACTCCGTTT R:AAGATTCTTAACAAATCCAAGGC	6	TAMRA	0.427
CS17	F:GATACAAATTAGCATTGATTGAATGGA R:ATCGGGACTCGCATTAGGGT	6	FAM	0.560
CS18	F:TCTCACGTCAAAGACGACG R:TCGGCCATAAACCGATAACAT	7	FAM	0.726
CS19	F:GCCTTCTGATTACCGGAC R:TGCTCCGAACCTCATCATTG	8	HEX	0.671
CS20	F:AGTGAACGTCCATTGGATTTCG R:GTGTTGAATCCGACCTTCTACC	8	HEX	0.554
CS21	F:GCAGCGAACACATAACTA R:GGCCAATAGCTTCCATTCA	9	FAM	0.570

CS3 PIC 为 0.147, 低于 0.2, 属于低多态性位点, 表明该基因较保守(表 2)。经筛选确定 4 对引物 CS5、CS7、CS12、CS18 用于后续柚类种质分子身份证的构建。

2.2 毛细管电泳结果

利用 4 对引物对 25 份品种资源进行扩增, 共检测到等位基因数为 41 个, 每个引物检测到的等位基

因数为 8~11 个, 平均每个引物扩增 10.25 个, 其中扩增等位基因数 CS5、CS12、CS18 相同, 为 11 个, 最少的是 CS7, 为 8 个; 扩增片段长度在 119~282 bp 之间, 其中引物 CS18 扩增的基因片段较长。每个引物扩增有效等位基因(N_e)介于 4.005~5.365 之间, 平均为 4.484; 引物多态性信息(PIC)值变化范围为 0.726~0.79, 平均为 0.748, 其中 CS5 最大, CS18 最

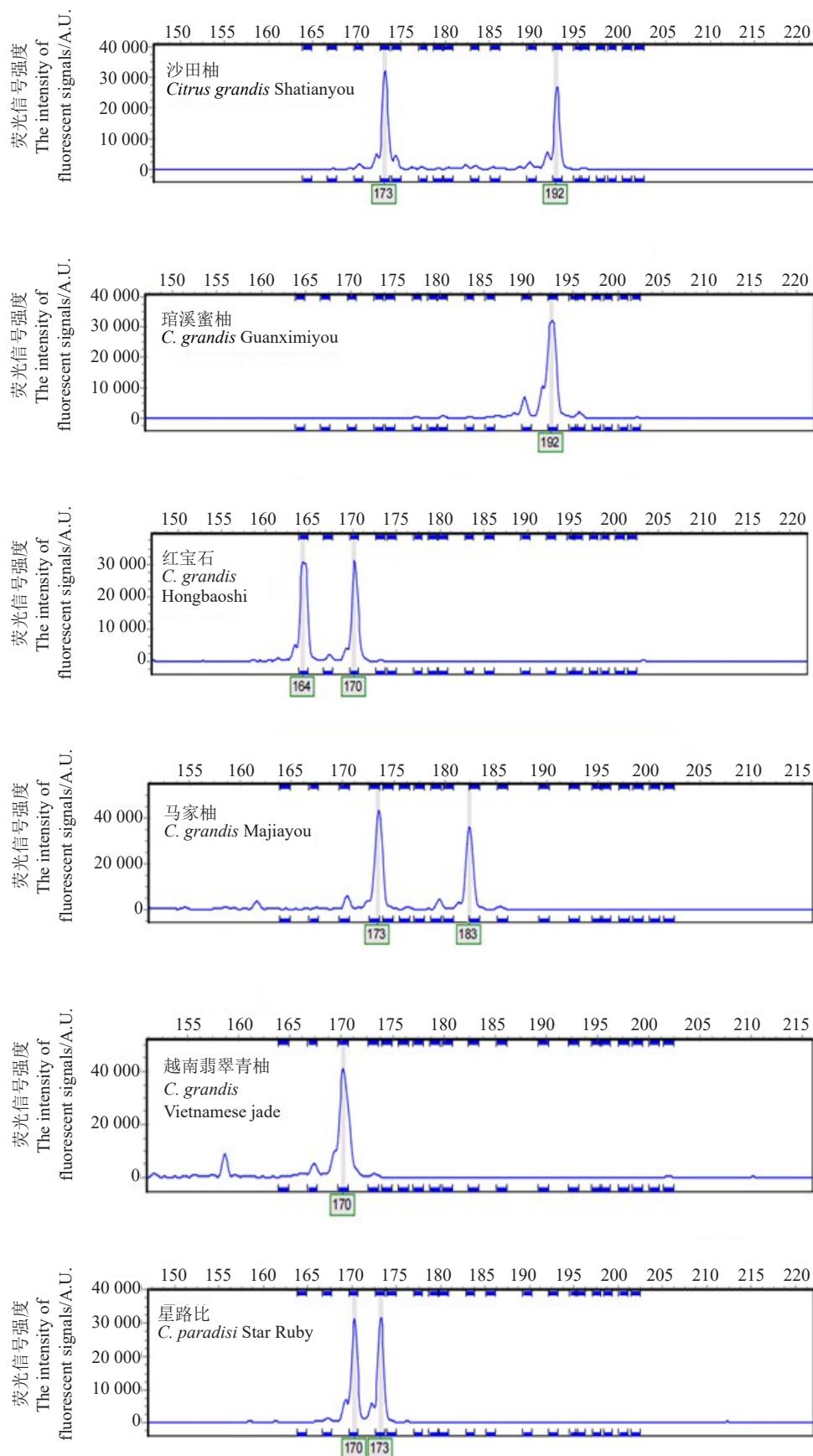


图1 引物CS5在6个柚类品种中检测到的等位变异

Fig. 1 Polymorphism detected among six pomelo cultivars with SSR primer CS5

小。4对引物在22份柚类种质中共检测基因型(带型数)49个,每个引物扩增的基因型数为11~14个,平均为12.25个,其中CS5最大,CS18最小,CS7和

CS12相同(表2,表3)。

2.3 种质分子身份证编码

根据荧光毛细管电泳及引物多态性信息,选择

表2 4对荧光标记引物扩增结果

Table 2 Amplified results of 4 pairs of fluorescent-labelled SSR primers

引物名称 Primer name	扩增带型 Amplified bands/No.	观测等位基因数 Observed allele, Na	有效等位基因 Active allele, Ne	多态性信息 PIC	扩增片段大小 Size of bands amplified/bp
CS5	14	11	5.365	0.79	164~199
CS7	12	8	4.237	0.732	119~168
CS12	12	11	4.330	0.743	208~239
CS18	11	11	4.005	0.726	240~282

表3 25份柑橘资源在4对SSR引物上的等位基因片段大小

Table 3 Allelic fragment size of 4 pairs of SSR primers from 25 accession of citrus germplasm

编号 Code	种质名称 Germplasm name	引物名称 Primer name			
		CS5	CS7	CS12	CS18
1	沙田柚 <i>Citrus grandis</i> ‘Shatianyou’	173/192	157	214	242/260
2	琯溪蜜柚 <i>C. grandis</i> ‘Guanximiyou’	192	149/167	208/224	240
3	尤力克柠檬 <i>C. limon</i> ‘Eureka Lemon’	177/199	119/135	225/246	250/258
4	金弹 <i>Fortunella crassifolia</i>	177/180	119	230	262
5	枳 <i>Poncirus trifoliata</i>	177	135/137	236/239	278/282
6	柚选3号 <i>C. grandis</i> ‘Youxuan No.3’	173	149/157	213/224	242/246
7	柚选4号 <i>C. grandis</i> ‘Youxuan No.4’	173	149/157	214	246/260
8	桂柚1号 <i>C. grandis</i> ‘Guizhouyou’	173/192	157	214	242/260
9	柚选1号 <i>C. grandis</i> ‘Youxuan No.1’	173/192	157	214	242/260
10	柚选2号 <i>C. grandis</i> ‘Youxuan No.2’	173/192	157	214	242/260
11	泰国柚 <i>C. grandis</i> ‘Thailand pomelo’	173/179	167	214/224	240/242
12	星路比 <i>C. paradisi</i> ‘Star Ruby’	170/173	149/157	217	242
13	红宝石 <i>C. grandis</i> ‘Hongbaoshi’	164/170	157/167	214	242/246
14	泰国考雅 <i>C. grandis</i> ‘Thailand Kauya’	170/173	157/165	214/217	242
15	越南翡翠青柚 <i>C. grandis</i> ‘Vietnamese jade’	170	157/168	214/217	242
16	广西蜜柚 <i>C. grandis</i> ‘Guangxiyou’	192	149/167	208/224	240
17	红肉蜜柚 <i>C. grandis</i> ‘Hongmeiyou’	192	149/167	208/224	240
18	青皮柚 <i>C. grandis</i> ‘Qingpiyou’	164/170	157/167	214	242/246
19	奥兰柚 <i>C. grandis</i> ‘Oroblanco’	170/192	135/157	0	0
20	马家柚 <i>C. grandis</i> ‘Majiayou’	173/183	135	217	242/257
21	囊内柚 <i>C. grandis</i> ‘Nangneiyou’	179/196	135	208/214	242
22	五鞭柚 <i>C. grandis</i> ‘Wubianyou’	179/196	135	208/214	242
23	日柚 <i>C. grandis</i> ‘Riyou’	170/173	167	217	242/246
24	演柚 <i>C. grandis</i> ‘Yanyou’	176/192	135/157	217/227	242/260
25	福泽柚 <i>C. grandis</i> ‘Fuzeyou’	173/192	157	217/224	244/260

4对多态性($PIC > 0.7$)的引物,去除多态性较低的引物,得到各样品扩增的指纹数据,将指纹数据转换为数字编码,构建22份柚类种质分子身份证。按照表2的引物顺序,将每个荧光标记引物扩增带型数按从多到少的顺序排序编码,将每份种质用CS5、CS7、CS12、CS18这4个标记得到的等位基因编码串联,得到各种质的8位分子身份证(表4)。每个字

符串的数字从左到右每2个数字分布在同一对染色体上,对应位置编码相同表明该引物在不同样品上得到了相同的扩增带型和等位基因。结果表明,在供试的22份柚类资源中,得到了15份不同类型的分子身份证代码,其中,桂柚1号、柚选1号、柚选2号与沙田柚共享一套分子身份证代码;青皮柚与红宝石共享一套分子身份证代码;广西蜜柚与红肉蜜柚

表 4 25 份柑橘种质的分子身份证代码

Table 4 Molecular identification code of 25 citrus germplasm

编号 Code	种质名称 Germplasm name	分子身份证编号 Molecular identity code	编号 Code	种质名称 Germplasm name	分子身份证编号 Molecular identity code
1	沙田柚 <i>Citrus grandis</i> ‘Shatianyou’	39553328	14	泰国考雅 <i>C. grandis</i> ‘Thailand Kauya’	23563422
2	琯溪蜜柚 <i>C. grandis</i> ‘Guanximiyou’	99471511	15	越南翡翠青柚 <i>C. grandis</i> ‘Vietnamese jade’	22583422
3	尤力克柠檬 <i>C. limon</i> ‘Eureka Lemon’	5b126b57	16	广西蜜柚 <i>C. grandis</i> ‘Guangximiyou’	99471511
4	金弹 <i>Fortunella crassifolia</i>	57118899	17	红肉蜜柚 <i>C. grandis</i> ‘Hongroumiyou’	99471511
5	枳 <i>Poncirus trifoliata</i>	55239aab	18	青皮柚 <i>C. grandis</i> ‘Qingpiyou’	12573324
6	柚选3号 <i>C. grandis</i> ‘Youxuan No.3’	33452524	19	奥兰柚 <i>C. grandis</i> ‘Oroblanco’	29250000
7	柚选4号 <i>C. grandis</i> ‘Youxuan No.4’	33453348	20	马家柚 <i>C. grandis</i> ‘Majiayou’	38224426
8	桂柚1号 <i>C. grandis</i> ‘Guizhouyou’	39553328	21	囊内柚 <i>C. grandis</i> ‘Nangneiyou’	6a221322
9	柚选1号 <i>C. grandis</i> ‘Youxuan No.1’	39553328	22	五鞭柚 <i>C. grandis</i> ‘Wubianyou’	6a221322
10	柚选2号 <i>C. grandis</i> ‘Youxuan No.2’	39553328	23	日柚 <i>C. grandis</i> ‘Riyou’	23774424
11	泰国柚 <i>C. grandis</i> ‘Thailand pomelo’	36773512	24	演柚 <i>C. grandis</i> ‘Yanyou’	49254728
12	星路比 <i>C. paradisi</i> ‘Star Ruby’	23454422	25	福泽柚 <i>C. grandis</i> ‘Fuzeyou’	39554538
13	红宝石 <i>C. grandis</i> ‘Hongbaoshi’	12573324			

分子身份证代码相同;囊内柚与五鞭柚分子身份证代码相同。共享一套分子身份证代码的样品需进一步从已知柑橘基因组水平上分析差异碱基,进而验证是否存在亲缘关系或者是芽变品种。

2.4 聚类分析

根据遗传距离(genetic distance, GD)和遗传相

似系数(genetic similarity, GS),使用 UPGMA 的方法对 22 份柚类开展聚类分析,得到聚类关系树(图 2)。可以发现,在遗传距离为 0.84 时分为 3 组,第 1 组为枳;第 2 组为金弹和尤力克柠檬;第 3 组包括 22 份柚类种质;在遗传距离为 0.36 处,22 份柚类可分为 2 个亚组,第 1 个亚组为红肉蜜柚、广西蜜柚和

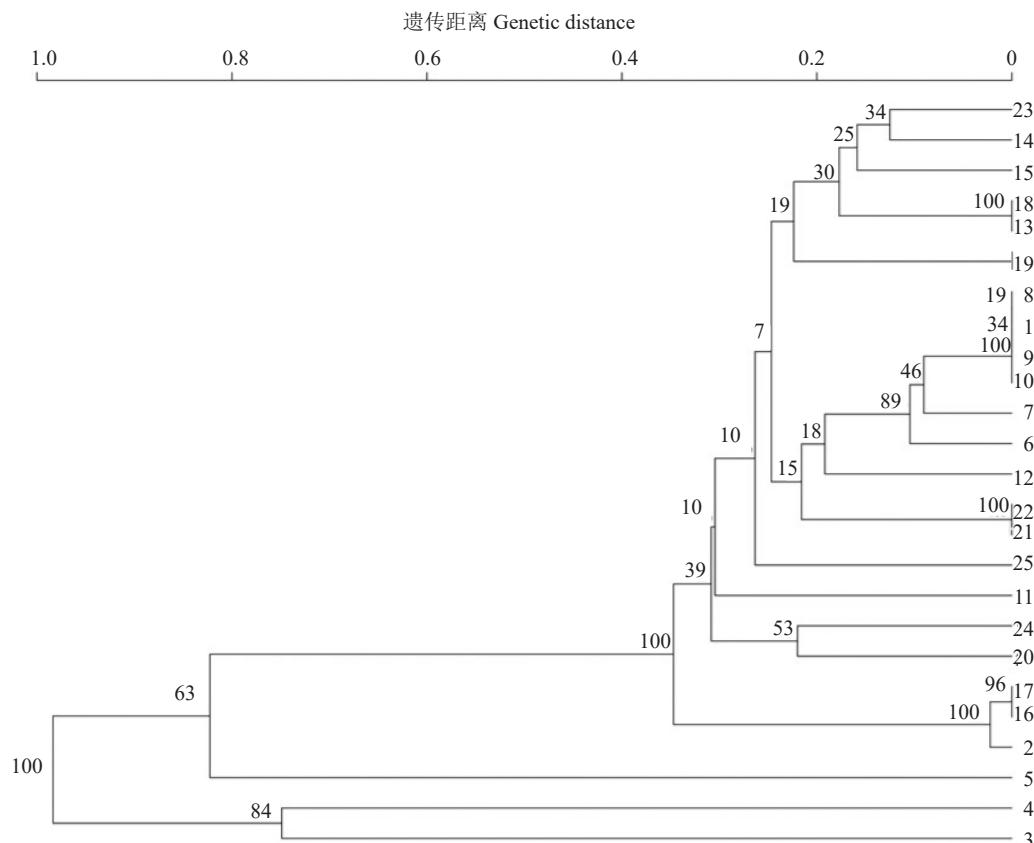


图 2 基于 SSR 标记的 22 份柚类品种 UPGMA 树状图

Fig. 2 UPGMA tree map of 22 pomelo varieties based on SSR markers

琯溪蜜柚;第2个亚组包含19份资源,包括沙田柚及变异单株桂柚1号、青柚等栽培品种和地方柚类品种。从中可以看出,在遗传距离为0.18时,6个柚品种被区分开,日柚和考雅聚为一支,与越南翡翠青柚分离;而青皮柚和红宝石聚在一起,本研究构建的两者的分子身份证相同,说明其亲缘关系很近。在遗传距离为0.12处,桂柚1号、沙田柚、柚选1号、柚选2号聚为一支,而与柚选3号和柚选4号分离,前四者共享编码构建的分子身份特征代码,说明四者亲缘关系很近。从聚类关系树中可以看出,五鞭柚和囊内柚、红肉蜜柚和广西蜜柚聚在一起,又与琯溪蜜柚分离,说明五鞭柚和囊内柚、红肉蜜柚和广西蜜柚的基因组相似性序列相似,亲缘关系很近,红肉蜜柚、广西蜜柚与琯溪蜜柚可能是属于同一个柚类群。关系树上显示枳、柠檬、金弹单独分支,说明SSR荧光标记引物具有可重复性和准确性。

3 讨 论

SSR荧光标记法能精准识别目标DNA片段大小,检测结果稳定、准确和高效,适用大批量品种的检测分析^[11,17],已被广泛应用于品种鉴定和分子身份证的构建。李益等^[16]利用SSR荧光标记筛选出21对核心引物,成功构建了包含500份柑橘品种的DNA指纹图谱库,形成了基于荧光毛细管电泳平台的柑橘SSR分子标记品种鉴定体系。徐雷锋等^[18]利用筛选的SSR引物,采用荧光测序技术结合新的带型编码方式构建96份百合样本的分子身份证。朱田田等^[19]利用荧光SSR分子标记对甘肃省11个当归(*Angelica sinensis*)品种(系)的194份当归样品进行遗传多样性和遗传结构分析,表明SSR荧光标记检测方法可以对目标DNA片段进行准确检测,结果可靠。关于柚类SSR标记的研究已有报道,刘冬峰等^[20]利用4对SSR引物组合,区分18份浙江柚类资源并构建了浙江地方柚类资源的种质鉴定图;刘勇等^[21]利用具有多态性的33对SSR引物对来自中国的122份柚类资源进行了分析,分为7个组群,进而可细分为18个亚组,主要以三大品种群组成:沙田柚品种群、文旦柚品种群及庞大的杂种柚品种群;王旭等^[22]利用21对核心引物,筛选出17对具有高多态性的SSR引物对68份柚类种质资源亲缘关系进行分析,聚类分析结果与结构分析结果一致,表明垫江

柚系列与长寿沙田柚具有很近的亲缘关系并有相同的基因型,从分子水平上说明了垫江柚系列可能属于沙田柚类型。国外对柚类也进行了遗传多样性研究,Kongsri等^[23]对泰国优良商品品种,泰国中部、南部和北部的地方品种和国外的共53个无性系进行评价,结果表明利用10个具有多态性SSR标记的引物,共产生33个等位基因,大多数柚品种,包括商业品种和杂交品种,都属于同一类群,而本地和国外品种比商业品种更多样化;Ahmed等^[24]利用60个SSR标记对柚品种进行分子鉴定,发现了26个多态性SSR位点,具有77个扩增等位基因,结果显示粉柚和白柚的遗传相似系数最大,其亲缘关系较近。

建立“分子身份证”,对品种鉴定、种苗和农业生物产品的真伪鉴别具有重要意义。目前分子身份证的构建已在绿豆^[25]、小麦^[26]、水稻^[27-28]、黍子^[29]、核桃^[30]等上应用。DNA指纹图谱是构建分子身份证的基础,但指纹图谱区别于分子身份证。目前,构建分子身份证不同的品种采用不同的编码方法^[18,31],笔者在本研究中采用扩增等位基因分子质量和结合图谱带型方式构建22份柚类资源分子身份证,在分子身份证上容易区分扩增的基因带型是纯合子还是杂合子,且这种编码方式需要的标记较少,形成的字符串不长。

目前,应用分子标记进行柑橘品种鉴定还处于研究阶段,对于亲缘关系很近的柑橘品种,比如本研究的桂柚1号是沙田柚的变异单株,两者很难区分开;引物开发和设计的SSR标记引物是在已知基因组上随机片段设计的,无法实现设计的引物在各条染色体上均匀分布,也不能代表整个基因组的信息。本研究形成的分子身份证能提供参考,但还不能全面的代表柚类品种的信息。因此需要结合全基因组测序等方法对品种进行更全面的鉴定。

4 结 论

本研究通过SSR荧光毛细管电泳检测,获得22份柚类的图谱带型和等位基因数据,得到了15份不同类型的分子身份证代码,其中12条为信息独特的身份证,为柚类及柑橘种质资源鉴定和品种保护提供依据。

参考文献 References:

- [1] 张太平,彭少麟.柚的起源、演化及分布初探[J].生态学杂志,

- 2000,19(5):58-61.
- ZHANG Taiping, PENG Shaolin. Introduction to the origin and evolution of pomelo and its distribution in China[J]. Chinese Journal of Ecology, 2000,19(5):58-61.
- [2] 彭瑜,苏智先.部分柚类品种叶片性状分类研究[J].绵阳师范学院学报,2007,26(2):82-85.
- PENG Yu, SU Zhixian. Study on leaf shape classification of some pomelo varieties[J]. Journal of Mianyang Teachers' College, 2007,26(2):82-85.
- [3] 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 (Natural Science Edition), 1993,22(3):290-295.
- [4] 武晓晓,唐艳,邓崇岭.柑桔孢粉学研究进展[J].中国南方果树,2017,46(5):148-153.
- WU Xiaoxiao, TANG Yan, DENG Chongling. Advances in studies of citrus palynology[J]. South China Fruits, 2017,46(5):148-153.
- [5] 武晓晓,唐艳,邓崇岭,刘冰浩,陈传武,牛英.柑橘不同种属花粉形态观察[J].果树学报,2018,35(7):794-801.
- WU Xiaoxiao, TANG Yan, DENG Chongling, LIU Binghao, CHEN Chuanwu, NIU Ying. Observation of citrus pollen morphology by scanning electron microscopy[J]. Journal of Fruit Science, 2018,35(7):794-801.
- [6] 姜成东,彭振坤.两个沙田柚品系同工酶分析[J].湖北民族学院学报(自然科学版),2004,20(4):1-4.
- JIANG Chengdong, PENG Zhenkun. Analysis of isodynamic enzyme for two breeds of shatian pomelo[J]. Journal of Hubei Minzu University (Natural Science Edition), 2004,20(4):1-4.
- [7] SAMARINA L S, KULYAN R V, KONINSKAYA N G, GORSHKOV V M, RYNDIN A V, HANKE M V, FLACHOWSKY H, REIM S. Genetic diversity and phylogenetic relationships among citrus germplasm in the Western Caucasus assessed with SSR and organelle DNA markers[J]. Scientia Horticulturae, 2021,288(4):110355.
- [8] GOLEIN B, BIGONAH M, AZADVAR M, GOLMOHAMMADI M. Analysis of genetic relationship between 'Bakraee' (*Citrus* sp.) and some known *Citrus* genotypes through SSR and PCR-RFLP markers[J]. Scientia Horticulturae, 2012, 148(1): 147-153.
- [9] NIE X H, WANG Z H, LIU N W, SONG L, YAN B Q, XING Y, ZHANG Q, FANG K F, ZHAO Y L, CHEN X, WANG G P, QIN L, CAO Q Q. Fingerprinting 146 Chinese chestnut (*Castanea mollissima* Blume) accessions and selecting a core collection using SSR markers[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2021,20(5):1277-1286.
- [10] SCHLAUTMAN B, BOLIVAR-MEDINA J, HODAPP S, ZALAPA J. Cranberry SSR multiplexing panels for DNA horticultural fingerprinting and genetic studies[J]. Scientia Horticulturae, 2017,219:280-286.
- [11] 郝晨阳,王兰芬,贾继增,董玉琛,张学勇. SSR 荧光标记和银染技术的比较分析[J].作物学报,2005,31(2):144-149.
- HAO Chenyang, WANG Lanfen, JIA Jizeng, DONG Yuchen, ZHANG Xueyong. Comparison of fluorescence and silverstaining detection systems of microsatellite markers[J]. Acta Agronomica Sinica, 2005,31(2):144-149.
- [12] 刘伟,李淼,李桂祥,董晓民,高晓兰,张安宁.应用 SSR 荧光标记法构建山东地方桃种质资源分子身份证[J].山东农业科学,2022,54(2):6-13.
- LIU Wei, LI Miao, LI Guixiang, DONG Xiaomin, GAO Xiaolan, ZHANG Anning. Using fluorescent labeled SSR markers to establish molecular ID of peach germplasm resources from Shandong province[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2022,54(2):6-13.
- [13] 范克俊,牛庆霖,葛福荣,王江勇,王培久.利用荧光 SSR 标记构建杏新品系的分子身份证[J].北方园艺,2018(4):34-40.
- YUAN Kejun, NIU Qinglin, GE Furong, WANG Jiangyong, WANG Peijiu. Using the fluorescent labeled SSR markers to establish molecular identity of apricot germplasms[J]. Northern Horticulture, 2018(4):34-40.
- [14] 张小双,曹玉芬,齐丹,张莹,田路明,董星光,霍宏亮,徐家玉,刘超.秋子梨基于 SSR 荧光标记的分子身份证构建及亲缘关系分析[J].中国南方果树,2018,47(4):92-98.
- ZHANG Xiaoshuang, CAO Yufen, QI Dan, ZHANG Ying, TIAN Luming, DONG Xinguang, HUO Hongliang, XU Jiayu, LIU Chao. Analysis of genetic relationship and establish molecular ID of *Pyrus ussuriensis* based on SSR molecular marker[J]. South China Fruits, 2018,47(4):92-98.
- [15] 李慧峰,王涛,冉昆.利用 SSR 荧光标记构建 41 份山东省苹果资源分子身份证[J].沈阳农业大学学报,2020,51(1):70-77.
- LI Huifeng, WANG Tao, RAN Kun. Using the fluorescent labeled SSR markers to establish the molecular identity of 41 *Malus* germplasms in Shandong province[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2020,51(1):70-77.
- [16] 李益,马先锋,唐浩,李娜,江东,龙桂友,李大志,牛英,韩瑞玺,邓子牛.柑橘品种鉴定的 SSR 标记开发和指纹图谱库构建[J].中国农业科学,2018,51(15):149-159.
- LI Yi, MA Xianfeng, TANG Hao, LI Na, JIANG Dong, LONG Guiyou, LI Dazhi, NIU Ying, HAN Ruixi, DENG Ziniu. SSR markers screening for identification of citrus cultivar and construction of DNA fingerprinting library[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2018,51(15):149-159.
- [17] CMEJLOVA J, REJLOVA M, PAPRSTEIN F, CMEJLA R. A new one-tube reaction kit for the SSR genotyping of apple (*Malus × domestica* Borkh.)[J]. Plant Science, 2021,303:110768.
- [18] 徐雷锋,葛亮,袁素霞,任君芳,袁迎迎,李雅男,刘春,明军.利用荧光标记 SSR 构建百合种质资源分子身份证[J].园艺学报,2014,41(10):2055-2064.
- XU Leifeng, GE Liang, YUAN Suxia, REN Junfang, YUAN Yingying, LI Ya'nan, LIU Chun, MING Jun. Using the fluorescent labeled SSR markers to establish molecular identity of lily

- germplasms[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2014, 41(10): 2055-2064.
- [19] 朱田田, 张明惠, 王富胜, 王圆圆, 栗孟飞, 普玲. 基于 SSR 荧光标记的不同品种(系)当归遗传关系分析及分子身份证构建[J]. 中草药, 2022, 53(12):3774-3783.
ZHU Tiantian, ZHANG Minghui, WANG Fusheng, WANG Yuanyuan, LI Mengfei, JIN Ling. Genetic relationship analysis and molecular ID codes construction of different cultivars (lines) of *Angelica sinensis* based on fluorescent labeled SSR markers[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2022, 53(12):3774-3783.
- [20] 刘冬峰, 陈巍, 林绍生, 徐文荣, 郭秀珠, 黄品湖. 基于 SSR 标记的浙江地方柚类种质资源遗传关系分析[J]. 果树学报, 2017, 34(2):166-174.
LIU Dongfeng, CHEN Wei, LIN Shaosheng, XU Wenrong, GUO Xiuzhu, HUANG Pinhu. Analysis of genetic relationship of pummelo germplasms by SSR markers in Zhejiang province[J]. *Journal of Fruit Science*, 2017, 34(2):166-174.
- [21] 刘勇, 刘德春, 吴波, 孙中海. 利用 SSR 标记对中国柚类资源及近缘种遗传多样性研究[J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(1):90-95.
LIU Yong, LIU Dechun, WU Bo, SUN Zhonghai. Genetic diversity of pummelo and their relatives based on SSR markers[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2006, 14(1):90-95.
- [22] 王旭, 彭洁, 朱延松, 杨胜男, 张晓楠, 余洪, 江东, 梁大成. 基于 SSR 分子标记的 68 份柚类种质资源亲缘关系分析[J]. 安徽农业科学, 2021, 49(4):100-103.
WANG Xu, PENG Jie, ZHU Yansong, YANG Shengnan, ZHANG Xiaonan, YU Hong, JIANG Dong, LIANG Dacheng. Analysis of genetic relationship of 68 pummelo germplasm resources based on SSR molecular marker[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2021, 49(4):100-103.
- [23] KONGSRI S, BOONPRAKOB U. Assessment of genetic relationships among pummelo cultivars [*Citrus maxima* (Burm.) Merrill] using simple sequence repeat markers[J]. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 2016, 10(2): 209-219.
- [24] AHMED S, RATTANPAL H S, SINGH G. Diversity, characterization and evaluation in pummelo (*Citrus maxima* Merr.) cultivars using SSR markers and quality parameters[J]. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 2019, 79(3):594-605.
- [25] ZHAO Y N, WANG Y, WANG L X, ZHANG D J. Molecular identification of mung bean accessions (*Vigna radiata* L.) from Northeast China using capillary electrophoresis with fluorescence-labeled SSR markers[J]. *Food and Energy Security*, 2020, 9(1):1-29.
- [26] 白晓倩, 陈于, 张仕杰, 赵玉强, 王武, 朱灿灿. 基于表型性状和 SSR 标记的板栗品种遗传多样性分析及分子身份证构建[J]. 植物遗传资源学报, 2022, 23(4):972-984.
BAI Xiaoqian, CHEN Yu, ZHANG Shijie, ZHAO Yuqiang, WANG Wu, ZHU Cancan. Genetic diversity analysis and fingerprinting of chestnut varieties based on phenotypic traits and SSR markers[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(4): 972-984.
- [27] 陆徐忠, 倪金龙, 李莉, 汪秀峰, 马卉, 张小娟, 杨剑波. 利用 SSR 分子指纹和商品信息构建水稻品种身份证[J]. 作物学报, 2014, 40(5):823-829.
LU Xuzhong, NI Jinlong, LI Li, WANG Xiufeng, MA Hui, ZHANG Xiaojuan, YANG Jianbo. Construction of rice variety identity using SSR fingerpring and commodity information[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2014, 40(5):823-829.
- [28] 管俊娇, 杨晓洪, 王江民, 张鹏, 黄清梅, 白洁, 余志慧, 张建华. 云梗系列水稻品种分子身份证的构建[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(6):1201-1206.
GUAN Junjiao, YANG Xiaohong, WANG Jiangmin, ZHANG Peng, HUANG Qingmei, BAI Jie, YU Zhihui, ZHANG Jianhua. Establishment of molecular identity for rice variety of Yunjing series[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 34(6): 1201-1206.
- [29] 丁艺冰, 丁雨格, 陈凌, 王海岗, 陈喜明, 王瑞云, 乔治军. 基于高基元 SSR 构建黍子 DNA 分子身份证[J]. 山西农业科学, 2022, 50(5):620-629.
DING Yibing, DING Yuge, CHEN Ling, WANG Haigang, CHEN Ximing, WANG Ruiyun, QIAO Zhijun. Construction of DNA molecular ID card of *Panicum miliaceum* based on high-motif SSR[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2022, 50(5):620-629.
- [30] 梁燕, 韩传明, 周继磊, 孙超, 王翠香, 李春明, 王静, 闵旭峰, 公庆党, 孟晓烨, 杨绪强. 山东核桃良种 SSR 指纹图谱及分子身份证的构建: 基于毛细管电泳分析[J]. 中国农学通报, 2022, 38(15):113-121.
LIANG Yan, HAN Chuanming, ZHOU Jilei, SUN Chao, WANG Cuixiang, LI Chunming, WANG Jing, MIN Xufeng, GONG Qing-dang, MENG Xiaoye, YANG Xuqiang. Construction of SSR fin-gerprint and molecular identity card of Shandong elite *Julans regia* cultivars: Based on capillary electrophoresis analysis[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2022, 38(15):115-121.
- [31] 马旭丹, 孙辽, 李元元, 肖本泽. 部分水稻不育系的指纹图谱构建和遗传多样性分析[J]. 杂交水稻, 2015, 30(6):64-70.
MA Xudan, SUN Liao, LI Yuanyuan, XIAO Benze. Analysis of genetic polymorphism and fingerprinting of some male sterile lines in rice[J]. *Hybrid Rice*, 2015, 30(6):64-70.