

应用 cpSSR 和 EST-SSR 标记进行柑橘特异种质资源遗传背景研究

王福生^{1,2}, 江 东^{2,*}

(¹西南大学园艺园林学院, 重庆 400715; ²中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 400712)

摘 要: 将叶绿体 SSR 和 EST-SSR 标记用于揭示柑橘及其近缘属的系统发育关系, 并阐明保存在重庆国家果树种质柑橘圃内一些特异种质资源的遗传背景。其中 50 份材料和 44 份材料分别用 cpSSR 和 EST-SSR 分析。22 对 cpSSR 引物产生 146 个多态性条带, 平均检测到 6.64 个多态性条带, 平均 Shannon's 多样性指数为 0.32; 18 对 EST-SSR 引物产生 240 个多态性条带, 平均检测到 13.3 个多态性条带, 平均多态信息含量 (PIC) 为 0.73, 平均期望杂合度为 0.78。根据 cpSSR 和 EST-SSR 分析, 结合形态学证据, 阐明一些特异柑橘种质资源的遗传背景, 同时证明莽山野橘、元橘、宜昌橙有较近的亲缘关系。

关键词: 柑橘; cpSSR; EST-SSR; 遗传背景

中图分类号: S 666

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2010) 03-0465-10

Studies on Genetic Background of Important Germplasm Resources Among *Citrus* Based on cpSSR and EST-SSR Marker

WANG Fu-sheng^{1,2} and JIANG Dong^{2,*}

(¹College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China; ²Citrus Research Institute, Chinese Academy Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China)

Abstract: Chloroplast simple sequence repeat (cpSSR) and expressed sequence tag-simple sequence repeat (EST-SSR) markers were used to reveal *Citrus* and its related genera phylogenetic relationship and to clarify the genetic background of some unique citrus germplasms conserved in National Citrus Germplasm Repository (Chongqing). Fifty and forty-four accessions were used for cpSSR and EST-SSR analysis respectively. Twenty-two pairs of cpSSR specific primers generated 146 bands with an average of 6.64 alleles per locus and an average Shannon's information index of 0.32; Eighteen pairs of EST-SSR primers produced 240 bands with the mean of 13.3 alleles per locus, the mean polymorphic information content (PIC) was 0.73 and expected heterozygosity was 0.78. In addition, the genetic origin of some unique citrus accessions were also clearly clarified by cpSSR and EST-SSR analysis combining with the morphological characteristics, meanwhile, it was showed that Ichang Papeda have close phylogenetic relationship with Mangshan Yeju and Yuan Ju.

收稿日期: 2009 - 11 - 23; **修回日期:** 2010 - 02 - 10

基金项目: '十一五'国家科技支撑计划项目(2006BAD13B06-1-4); 国家自然科学基金项目(30671450); 重庆市自然科学基金项目(CSTC, 2007BB1343)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: citrusgr@yahoo.com.cn; Tel: 023-68349195)

致谢: 周志钦老师在学习、生活上给予帮助; 中国农业科学院—西南大学柑桔研究所洪棋斌副研究员、龚桂芝老师、彭祝春师兄提供 SSR 引物及在试验中的帮助; 谢让金师兄在试验中的指导, 英文部分由洪棋斌副研究员审校, 在此谨表谢忱。

Key words: *Citrus*; cpSSR; EST-SSR; genetic background

自瑞典科学家林奈 (Carolus Linnaeus) 1753 年确立柑橘属以来, 柑橘的分类和系统演化关系一直是学术界争论的焦点。

在最有影响力的两个柑橘分类系统中, Swingle 和 Reece (1967) 把柑橘属分为 16 个种, 而 Tanaka (1977) 把柑橘属分为 162 种。Scora (1975)、Barrett 和 Rhodes (1976) 通过研究都认为, 在栽培柑橘中, 枸橼、柚、宽皮柑橘是 3 个基本种, 其它的基因型都来自于基本种之间的杂交。到目前为止, 国内外学者通过形态学、胞粉学、数值分类、细胞分类学、分子标记等方法, 对柑橘属植物的分类和遗传起源展开系统研究, 取得了一定进展和共识。

分子标记已广泛用于柑橘及其近缘属分类及系统演化研究。EST-SSR (Expressed Sequence Tag-Simple Sequence Repeat) 具备传统基因组 SSR 标记的特点, 并且还具有开发经济、通用性好、保守程度高、来源于基因转录区等优势, 已被用于遗传多样性分析、遗传连锁图谱的构建、比较作图和分子系统发育等研究领域 (姚利华和滕元文, 2008)。

叶绿体微卫星 (Chloroplast Simple Sequence Repeat, cpSSR) 是近年发展起来的一种新型高效的分子标记技术, 由于具有共显性、高多态性、分布广泛性等优点, 又兼顾叶绿体基因组 (chloroplast DNA, cpDNA) 结构简单、相对保守、单亲遗传等特点, 已被广泛用于鉴定种甚至亲缘关系很近的种, 描述群体和个体水平的遗传差异 (Kaundun & Matsumoto, 2002)。Cheng 等 (2003, 2005) 已从烟草、水稻等其它作物上选出大量 cpSSR 引物进行柑橘亲缘关系研究, 2006 年 (Bausher et al., 2006) 甜橙叶绿体基因组全序列的发表, 更有利于利用 cpSSR 标记研究柑橘系统发育及其种的鉴定。

柑橘叶绿体基因组为母性遗传, 对了解一些可能为杂种起源的生物型来源非常有效 (Green et al., 1986), 所以 SSR 标记同胞质基因组标记结合将是一种有效的鉴别杂种及其亲本来源的方法 (Liu et al., 2002)。龚桂芝等 (2008) 已将 cpSSR、EST-SSR 两种标记结合用于枳属遗传多样性研究, 这两种标记的结合能很好地鉴别枳及其杂种。

本研究中根据已报道的甜橙 [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. 'Ridge Pineapple'] 叶绿体基因组序列 (Bausher et al., 2006), 设计 24 对均匀分布在叶绿体全基因组的 SSR 特异性引物, 结合 EST-SSR 共显性标记, 对保存于重庆国家果树种质资源柑桔圃的柑橘及其近缘属的系统发育关系进行研究, 并阐明一些特异种质资源的遗传背景。

1 材料与方法

1.1 植物材料

分析材料共 53 份 (表 1), 包括柑橘属及其近缘属的枳、金柑、澳指檬, 酒饼筋属 1 份作为外类群; 除小花大翼橙取自美国国家柑橘与枣椰子种质资源圃 (USDA-ARS National clonal germplasm repository for citrus and dates, CAL) 外, 其余 52 份均取自中国农业科学院重庆柑桔研究所国家果树种质柑桔圃 (Citrus Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, CRI)。

表 1 用于 cpSSR、EST-SSR 标记分析的材料

Table 1 Plant materials used for cpSSR and EST-SSR analysis

序号 No.	资源名称 Germplasm	种名 Species
1	巴柑椪 Fantastico Bergamot	<i>C. bergamia</i> Risso et poit
2	黄花尤力克 Yellow Flower Eureka	<i>C. limon</i> (L.) Burm.
3	云南佛手 Yunnan Buddha's Hand	<i>C. medica</i> var. <i>sarcodactylis</i> (Noot.) Swingle
4	枸橼 Java Lemon	<i>C. medica</i> L.
5	塔希提椪 Tahiti Lime	<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swingle
6	哈发 3 号 Hafa 3	<i>C. limonia</i> Osbeck × spp.
7	红黎椪 Red Limonia	<i>C. limonia</i> Osbeck
8	澳洲圆椪 Australian Round lime	<i>Microcitrus australis</i> (Planch.) Swingle
9	印度野橘 Indica	<i>C. indica</i> Tanaka
10	温光橘 Wen Guang Ju (Calamondin)	<i>Fortunella</i> v. Hybrid
11	金豆 Jindou Kumquat	<i>F. hindsi</i> Swingle
12	金弹 Meiwa	<i>F. crassifolia</i> Swingle
13	日本香橙 Yu Zu	<i>C. junos</i> Sied.ex Tanaka
14	三山香圆 Sanshan Xiangyuan	<i>C. wilsonii</i> Tan.
15	纽荷尔脐橙 Newhall Navel Orange	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck
16	桃叶橙 Taoye Cheng 18	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck
17	中育 7 号 Zhongyu 7	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck
18	花叶锦橙 Variegated Jing Cheng	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck
19	湘慈 43 号 Xiangchi 43	<i>C. aurantium</i> L.
20	卡里佐枳橙 Carrizo Citrange	<i>P. trifoliata</i> (L.) Raf. × <i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck
21	变异砧 Carrizo Nucellar Line	<i>P. trifoliata</i> (L.) Raf. × <i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck
22	岭南沙田柚 Lingnan Shatian You	<i>C. grandis</i> (L.) Osbeck
23	通贤柚 Tongxian You	<i>C. grandis</i> (L.) Osbeck
24	2-3 宜昌橙 2-3 Ichang Papeda	<i>C. ichangensis</i> Swingle
25	4 号宜昌橙 Ichang Papeda 4	<i>C. ichangensis</i> Swingle
26	紫花宜昌橙 Pink Flower Ichang Papeda	<i>C. ichangensis</i> Swingle
27	莽山野橘 (圆叶) Mangshan Yeju (Obtuse leaf apex)	<i>C. mangshanensis</i> S. W. He & G. F. Liu
28	立花橘 Tachibana	<i>C. tachibana</i> (Mak.) Tanaka.
29	元橘 Yuan Ju	<i>C. reticulata</i> Blanco
30	莽山野橘 (尖叶) Mangshan Yeju (Acute leaf apex)	<i>C. mangshanensis</i> S. W. He & G. F. Liu
31	蟹橙 Xie Cheng	<i>C. junos</i> Sied.ex Tanaka
32	20-1 Kiyomi × spp.	<i>C. reticulata</i> Blanco
33	安江红橘 Anjiang Hongju	<i>C. reticulata</i> Blanco
34	十月橘 Shiyue Ju	<i>C. reticulata</i> Blanco
35	德昌金钱橘 Jinqian Ju (Dechang)	<i>C. reticulata</i> Blanco
36	摩洛哥酸橘 Morocco Sunki	<i>C. reticulata</i> Blanco
37	道县野橘 Daoxian Yeju	<i>C. daoxianensis</i> S. W. He & G. F. Liu
38	寿太郎温州 Judaro Satsuma	<i>C. unshiu</i> Macf.
39	大浦 Ooura Satsuma	<i>C. unshiu</i> Macf.
40	清见 Kiyomi Tangor	<i>C. unshiu</i> Macf. × <i>C. sinensis</i> Osbeck.
41	清见 × 椪柑 Kiyomi × Ponkan	<i>C. reticulata</i> Blanco
42	太田椪柑 Oota Ponkan	<i>C. reticulata</i> Blanco
43	枳温州 Chimera of Trifoliolate Orange and Satsuma	<i>P. trifoliata</i> (L.) Raf. × <i>C. unshiu</i> Macf.
44	普通枳 Trifoliolate Orange	<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.
45	飞龙枳 Flying Dragon Trifoliolate Orange	<i>P. trifoliata</i> var. <i>Monstrosa</i>
46	酒饼箭 Atlantia	<i>Atalantia buxifolia</i> (Poir.) Oliv.
47	马来西亚大翼橙 Malesia Bitter Orange	<i>C. macroptera</i> Montrouz
48	小花大翼橙 Small-flowered Papeda	<i>C. micrantha</i> Wester
49	郭 2635 酸橙 Guo 2635 Sour Orange	<i>C. aurantium</i> L.
50	红河大翼橙 Honghe Papeda	<i>C. hongheensis</i> Y. L. D. L.
51	蜜奈夏橙 Midnight Valencia	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck
52	塔罗科血橙 Tarocco Blood Orange	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck
53	红肉脐橙 Cara Cara Navel Orange	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck

1.2 SSR引物设计

按 Jiang 等 (2006) 的方法设计出 24 对均匀分布在甜橙叶绿体基因组上的 cpSSR 引物和 25 对柑橘 EST-SSR 引物, 并由上海英骏生物工程公司合成。从 24 对 cpSSR 引物中筛选出 22 对可以扩增出条带的引物用于分析, 得到 20 对具有多态性的引物 (表 2); 另外从龚桂芝等 (2008) 获得 30 对 EST-SSR 引物, 共从 55 对 EST-SSR 引物中筛选出 18 对多态性高的引物用于试验, 多态性引物序列及对应基因相关信息见表 3。

1.3 SSR及其扩增产物检测

采用改良的 CTAB 法 (谢让金和邓烈, 2007) 提取基因组总 DNA。

在 Biometra PCR 仪上进行 PCR 扩增。cpSSR 的 PCR 反应体系如下: DNA $15 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, MgCl_2 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 上下游引物各 $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, dNTP $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 U *Taq* 聚合酶, $1 \times \text{PCR buffer}$ 缓冲液, 混合后加蒸馏水至 $25 \mu\text{L}$ 。PCR 反应程序: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 40 s, 58°C 退火 40 s, 72°C 延伸 30 s, 26 个循环, 循环结束后延伸 8 min, 4°C 储存。

EST-SSR 的 PCR 反应体系如下: DNA $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, MgCl_2 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 上下游引物各 $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, dNTP $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 U *Taq* 聚合酶, $1 \times \text{PCR buffer}$ 缓冲液, 混合后加蒸馏水至 $25 \mu\text{L}$ 。PCR 反应程序: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 40 s, 57°C 退火 40 s, 72°C 延伸 30 s, 32 个循环, 循环结束后延伸 8 min, 4°C 储存。

扩增产物用 8% 的非变性聚丙烯酰胺电泳检测。

1.4 SSR多样性分析

cpSSR 结果中有条带记为 1, 无条带记为 0, 得到 1、0 矩阵。用 POPGENE version 1.3.1 软件计算 Shannon's 多样性指数 (I)。

EST-SSR 结果中, 记录等位基因片段大小, 用 Cervus version 3.0 (Marshall et al., 1998) 计算多态信息含量 (PIC), 观测杂合度 (H_o), 期望杂合度 (H_e), 等位基因频率。

1.5 聚类图构建

用 Treecon 软件计算 Nei (Nei & Li, 1979) 遗传距离, 并按 UPGMA (Unweighted Pair Group Method Arithmetic Averages) 法进行聚类分析, 对结果进行 500 次重复抽样 bootstrap 检验。

2 结果与分析

2.1 SSR遗传多样性分析

22 对 cpSSR 引物共检测到 146 条多态性带, 平均每对可检测 6.64 条带。其中 20 对具有多态性 cpSSR 引物平均 Shannon's 多样性指数为 0.32 (表 2)。CP10 和 CP13 引物扩增出来的带型及片段长度完全一致, 主要是由于这两对引物的扩增产物是 IRa、IRb 的两个反向重复序列 (*trnV-GAC-rps12-3end* 基因间隔区)。

图 1 为引物 CP21 扩增出的条带。

表 2 20 对多态性 cpSSR 引物序列、分布位置及遗传多样性指数
Table 2 Sequence, distribution and genetic diversity index of polymorphic cpSSR primers

位点 Locus	重复序列 Repeat sequence	正向引物Forward primers (5'→3') 反向引物Reverse primers (5'→3')	分布位置/bp Distribution	扩增区域 Amplified region	Shannon's 多样性 指数 (I) Shannon's information index
CP1	(A)15	AACGGAAGAGAGGGATTCG ACGGGCTTTTCAAGCATTA	8 734 ~ 8 889	<i>trnS-GCU</i> 基因及 <i>trnS-GCU-trnG-GCC</i> 基因间隔区 <i>trnS-GCU</i> gene and <i>trnS-GCU-trnG-GCC</i> gene spacer region	0.29
CP2	(T)12	TCGTATTCTCGAACCCCTTTT ATAAATTGCATGGCCGTACC	15 145 ~ 15 387	<i>atpH-atpI</i> 基因间隔区 <i>atpH-atpI</i> gene spacer region	0.48
CP3	(T)23	ATCTGGGAACGGGGATTAAG CAAGACCGACCCTAATGGAA	33 976 ~ 34 203	<i>trnE-UUC-trnT-GGU</i> 基因间隔区 <i>trnE-UUC-trnT-GGU</i> gene spacer region	0.19
CP4	(A)18	GCTATCCGCCAAGGTAAAGT TTGAGGTACGGGTTCAAAT	39 749 ~ 39 982	<i>trnG-GCC-trnM-CAU</i> 基因间隔区 <i>trnG-GCC-trnM-CAU</i> gene spacer region	0.30
CP5	(A)13	TGATCCACAAACAAAGGAA TTTGAGTCTGGGGAAAAGGA	47 900 ~ 48 147	<i>ycf3-trnS-GGA</i> 基因间隔区 <i>ycf3-trnS-GGA</i> gene spacer region	0.57
CP6	(A)11	TCAAATGGGTTTGAGGTTGA GGCGTCCAAAATGCCTATAA	85 112 ~ 85 309	<i>rpl14</i> 基因, <i>rpl16</i> 外显子, <i>rpl14-rpl16</i> 基因间隔区 <i>rpl14</i> gene, <i>rpl16</i> exon, <i>rpl14-rpl16</i> gene spacer region	0.39
CP10	(A)14	TTTCGTACCCTTCGCTCAAC AAACATCTGCGGATCCAATC	144 385 ~ 144 702	<i>trnV-GAC-rps12-3end</i> 基因间隔区 (IRa重 复序列) <i>trnV-GAC-rps12-3end</i> gene spacer region (IRa repeat sequence)	0.16
CP11	(A)10	GGGTTATCCTGCACTTGGA GCAAATGCTCCCTTCCATTA	159 402 ~ 159 733	<i>rpl2-rps19</i> 基因间隔区, <i>rps19</i> 基因 <i>rpl2-rps19</i> gene spacer region, <i>rps19</i> gene	0.35
CP12	(ATT)6	GCAAAAAGCGAGAATTGAGG CGGGCAACCAATCTTATTA	1 624 ~ 1 389	<i>PsbA-truK-UUU</i> 基因间隔区 <i>PsbA-truK-UUU</i> gene spacer region	0.29
CP13	(T)14	AAACATCTGCGGATCCAATC TTTCGTACCTTCGCTCAAC	102 204 ~ 103 521	<i>rps12</i> 外显子, <i>rps12-3end-trnV-GAC</i> 基因 间隔区 (IRb重复序列) <i>rps12</i> exon, <i>rps12-3end-trnV-GAC</i> gene spacer region (IRb repeat sequence)	0.16
CP14	(A)13	CCGCAAAATTTGGGTTAGAA ATCTGGGCCCTTTGTCTTT	6 713 ~ 6 925	<i>rps16-truQ-UUG</i> 基因间隔区 <i>rps16-truQ-UUG</i> gene spacer region	0.24
CP15	(A)11	ATGGAGGTCATCGATTCAGC AGTCCAGACACAGCACGGTA	13 286 ~ 13 532	<i>atpF</i> 内含子 <i>atpF</i> intron	0.37
CP16	(T)11	ACTCCCCAACCATGACATA GCTCAGACCGATGGGTGTAT	24 181~24 347	<i>rpoCl</i> 内含子 <i>rpoCl</i> intron	0.29
CP17	(T)10	TGGTCTAACTCGCCGAATCT CGGTCAGTAGACCTGCATT	29 463 ~ 29 696	<i>trnC-GCA-petN</i> 基因间隔区 <i>trnC-GCA-petN</i> gene spacer region	0.32
CP18	(T)14	ATCCAGTACCGGACCAATGA ACGGTACCAACGAAATCGAG	57 769 ~ 57 997	<i>atpB</i> 基因, <i>atpB-rbcL</i> 基因间隔区 <i>atpB</i> gene, <i>atpB-rbcL</i> gene spacer region	0.42
CP19	(A)11	TGCTACACTCGGTTCAAGGA AATGAGAGAGGGATCCACCA	64 202 ~ 64 442	<i>ycf4-cemA</i> 基因间隔区 <i>ycf4-cemA</i> gene spacer region	0.18
CP20	(A)12	CTGCAATAGGCCTCCGATAG ACGTCTAGCATTCCTCACG	74 736 ~ 74 976	<i>clpP</i> 基因 <i>clpP</i> gene	0.35
CP21	(A)13	CAACGAGTCGCACACTAAGC TACGGGGTATTGGGAATCAA	86 686 ~ 86 913	<i>rpl16-rps3</i> 基因间隔区, <i>rpl16</i> 基因, <i>rps3</i> 基因 <i>rpl16-rps3</i> gene spacer region , <i>rpl16</i> gene, <i>rps3</i> gene	0.36
CP23	(T)11	CGTGCTCGAAACTCGAAAAT CCTGTCCAACGGATTCTTG	121 907 ~ 122 120	<i>ndhD-psaC</i> 基因间隔区, <i>psaC</i> 基因 <i>ndhD-psaC</i> gene spacer region, <i>psaC</i> gene	0.27
CP24	(T)11	GACGGTTCGTGAATCATCTG TTTTTGGGCTGGAACTGAC	131 272 ~ 131 516	<i>ycf1</i> (未知功能) <i>ycf1</i> (unknown function)	0.24
平均 Average					0.32

18 对 EST-SSR 随机引物产生 240 个多态性条带, 平均检测到 13.3 个多态性条带, 平均多态信息含量 (PIC) 为 0.73, 平均期望杂合度为 0.78 (表 3)。期望杂合度是假定各基因座位在符合 Hardy-Weinberg 平衡的前提下计算出的杂合度, 多个座位期望杂合度的平均值为平均期望杂合度, 常用来度量群体遗传多样性, 平均期望杂合度值越高, 反映群体遗传一致性就越低, 遗传多样性越丰富 (Frankham et al., 2002)。

表 3 18 对 EST-SSR 引物序列、对应基因及遗传多样性指数
Table 3 Sequence and genetic diversity index of EST-SSR primer pairs and corresponding gene

位点 Locus	正向引物Forward primers (5'→3') 反向引物Reverse primers (5'→3')	基因功能 Function	多态信息含量 Polymorphic information content (PIC)	期望杂合度 Expected heterozygosity(H_e)
P2	AACCCACCAACGCATTATTC GATGCGACTTCAATGGTCCT	酪氨酸特异性蛋白磷酸酶 Tyrosine specific protein phosphatase family protein	0.73	0.78
P5	CAGCGTCGCTTATCACAAG CCACAATGCACAATGAGGAG	ebs-bah-phd 结构域蛋白 ebs-bah-phd domain-containing protein	0.66	0.82
P9	GAATCAATCTCCAAATCATACCC TTTTCATTGCGGATCTTTGC	类成束蛋白阿拉伯半乳糖蛋白 4 Fasciclin-like arabinogalactan protein 4	0.92	0.93
P12	AAGAAGAGGAGCCCCATTA CTGGCAACGACAACATCAAC	同源域蛋白, ZF-HD类 Homeobox domain, ZF-HD class	0.60	0.67
P13	AAAGGGACTGGAATCAAAATGA GGGCGGTAATAATGATAATGG	未知 Unknown	0.80	0.83
P15	GAAGGAGGAGGTAAAGAGAGCA ACCAATCCCAGGCCTTAAAC	核酸结合蛋白 Nucleic acid binding protein	0.65	0.69
P17	GCATTACGAGCTGCAGTTGA ATGAACAAAGCATCCCATCG	FAD连接氧化还原酶 1 FAD-linked oxidoreductase 1	0.66	0.71
P18	CAGCGACAACAAAAGCAAGA CTTGGATCGAGACATCAGCA	肌球蛋白重链基因相关 Myosin heavy chain-related	0.76	0.79
P20	TGGGCTTCAATCAACTTTCC AGCAGGCGGATTACATCAGT	腺苷高半胱氨酸水解酶 Adenosylhomocysteinase	0.73	0.76
PF17	GATACAAATTAGCATTTGATTGAAT GGAATCGGGACTCGCATTAGGGT	β -酮脂酰合成酶 Beta-ketoacyl synthase	0.78	0.82
P36	CCACAACAAAATTCCTCAA CCAATCGATCCGACTGAACT	吡哆醛生物合成蛋白 PDX1 Pyridoxal biosynthesis protein PDX1	0.84	0.86
P38	CTTGCCACAAGTGCAACAAC AGGCACTGAGCTTTCTCAA	AP2 结合域转录因子 AP2 domain-containing transcription factor	0.56	0.65
P44	ATTTGTCCCAATGACTGCTG TGAGCTGAGTTTCCAGCTTT	乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶 Acetylornithine deacetylase	0.66	0.72
P45	GGAAGACACCAACAGGAGGA GCACGTCCATCACTGCTTAAT	胁迫疏水蛋白 Stress-induced hydrophobic peptide	0.63	0.71
P48	TTGGTCATTGATGTGGCCTA AGTGTGCAGAGGCAAGATT	鸟苷酸环化酶 Guanylyl cyclase	0.73	0.78
P61	CCGCTAATCGCTACGTCTTC CCACGATGATGGTGATCAAA	锌指蛋白 (C3HC4-type RING finger) 家族 Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	0.76	0.79
P62	TCCTTTTCATTGTCTGCCTCTC AGCAGCAATTGTACCCAACC	转录因子 Transcription factor	0.74	0.77
P72	GTGAGGCAAAACGAAAGAG GGGCCCATACAACGTAGAAG	中性神经酰胺酶 Neutral ceramidase	0.87	0.89
平均 Average			0.73	0.78



图 1 cpSSR 引物 CP21 对 50 份材料扩增结果

M: Marker。

Fig. 1 The amplified band of 50 accessions of *Citrus* and its relatives with cpSSR CP21 primer

M: Marker.

2.2 cpSSR结果及分析

利用 cpSSR 数据构建了聚类树, 在遗传距离 0.48 时, 可将 50 份材料分为 8 类 (图 2); 第 I 类作为外类群的酒饼筋最先分开, bootstrap 值达到 79%。第 II 类由云南佛手、枸橼、塔希提柚、印度野橘构成。第 III 类为澳洲圆柚。第 IV 类为普通枳、飞龙枳。第 V 类包括红河大翼橙、柚、甜橙、酸橙、金柑; 我国特有的红河大翼橙与柚、酸橙、甜橙聚为一单支, bootstrap 值为 80%; 同甜橙相比, 柚与郭 2635 酸橙的遗传距离较近; 卡里佐枳橙、变异砧完全与甜橙聚在一起 (bootstrap 值为 100%), cpSSR 条带与甜橙之间也无差异, 证明了卡里佐枳橙及变异砧的母本为甜橙; 巴柑檬、黄花尤力克同柚、酸橙、甜橙聚在一起, 也得到 52% 的 bootstrap 值, 并且巴柑檬、黄花尤力克的 bootstrap 值为 100%, 说明他们的亲缘关系非常近, 可能具有相同的母本; 来源于金柑属中的种质资源温光橘、金弹、金豆构成单系类群, 但并未从柑橘属中分离开。第 VI 类由马来西亚大翼橙、小花大翼橙组成。第 VII 类包括原产我国的野生柑橘种质莽山野橘、元橘、宜昌橙及日本香橙。第 VIII 类主要由宽皮柑橘及其杂种构成, 包括立花橘、道县野橘、酸橘、温州蜜柑、椪柑、红黎檬、哈发 3 号、枳温州, 红黎檬、哈发 3 号与宽皮柑橘聚在一起, 并且红黎檬与哈发 3 号的遗传背景有很高的相似性, 它们与宽皮柑橘的 bootstrap 值达到 59%, 进一步证明了这两份种质为杂种起源, 其母亲亲本具有宽皮柑橘的血缘。值得一提的是枳温州同温州蜜柑类的 bootstrap 值高达 95%, 在几对引物中兼具有枳和温州蜜柑的带型, 这说明枳温州嵌合体具有两套不同的叶绿体基因组。

2.3 EST-SSR结果及分析

根据 EST-SSR 结果, 采用 UPGMA 法进行聚类分析, 在遗传距离 0.46 时, 可将 44 份柑橘种质材料分为 7 类 (图 3)。第 I 类为聚在聚类树最外围的枳温州、枳及其杂种, 与 cpSSR 聚类树不同的是, 卡里佐枳橙、普通枳与枳温州聚在一起, bootstrap 达到 86%。第 II 类包括枸橼、云南佛手、塔希提柚等。第 III 类包括柠檬、黎檬类, 哈发 3 号、红黎檬、巴柑檬、黄花尤力克柠檬, 表明它们的亲缘关系很近。第 IV 类为柚、红河大翼橙、金柑类, 说明金柑不能从柑橘属中分离开来。第 V 类为宜昌橙、香橙。第 VI 类为莽山野橘、元橘。第 VII 类包括宽皮柑橘类群、甜橙、郭 2635 酸橙类。而在遗传距离为 0.33 处, 第 VII 类还可以再分为宽皮柑橘和甜橙、郭 2635 酸橙两大类, 与 cpSSR 不同, 甜橙、郭 2635 酸橙从柚类分出来成为一单支, 湘慈 43 号与郭 2635 酸橙的 bootstrap 值为 51%, 有很近的遗传关系; 宽皮柑橘中种质资源的类型比较复杂, 但一些系谱关系明确的种质能够聚在一起, 比如清见与温州, 清见 × 椪柑与椪柑。

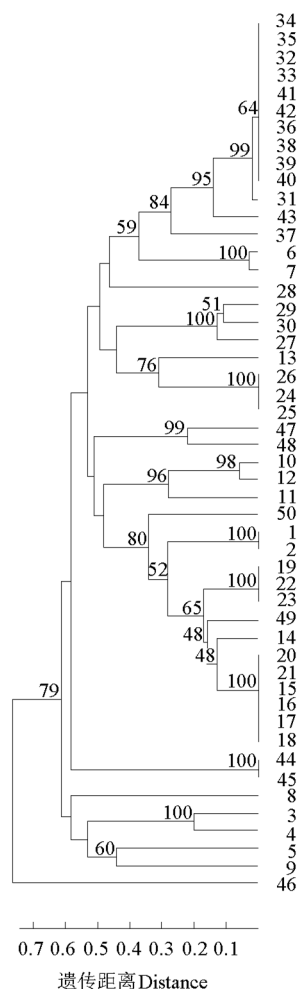


图2 基于分支上为 500 次 bootstrap 检验的置信度百分比
cpSSR 数据构建的 50 份柑橘及其近缘属材料 UPGMA 聚类树
Fig. 2 A UPGMA tree of 50 accessions of *Citrus* and related
genera derived from bootstrap analysis
(500 replications) of cpSSR

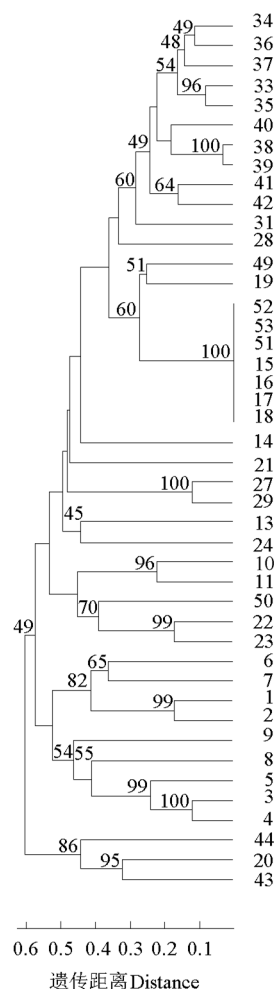


图3 基于分支上为 500 次 bootstrap 检验的置信度百分比
EST-SSR 数据构建的 44 份柑橘及其近缘属材料 UPGMA 聚类树
Fig. 3 A UPGMA tree of 44 accessions of *Citrus* and related
genera derived from bootstrap analysis
(500 replications) of EST-SSR

3 讨论

柑橘易于杂交, 导致遗传背景十分复杂。本研究从分子标记角度探讨鉴别柑橘杂种亲本来源的有效性, 选择了 22 对均匀分布在甜橙叶绿体全基因组上的引物和 18 对柑橘 EST-SSR 随机引物, 对保存于国家柑橘资源圃的 53 份柑橘及其近缘属种质资源进行了遗传背景研究。结果表明 22 对 cpSSR 特异性引物平均检测到 6.64 个扩增条带, 18 对 EST-SSR 随机引物平均检测到 13.3 个多态性条带, cpSSR 引物比 EST-SSR 引物检测到的条带数少。据前人研究报道, SSR 和 cpSSR 位点变异率分别为 $2.5 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-2}$ (Weber & Wong, 1993) 和 $3.2 \times 10^{-5} \sim 7.9 \times 10^{-5}$ (Provan et al., 1999), 这两种标记检测条带数相差大的原因可能是由于叶绿体基因组位点变异率低, 相对来说更加保守, 并且叶绿体基因组为单拷贝。

用 cpSSR 和 EST-SSR 这两种方法相结合可以很好地鉴别杂种的亲本来源。根据 cpSSR 数据, 卡里佐枳橙与甜橙聚在一起, 证明其母本确实源于甜橙; 变异砧是来自于卡里佐枳橙珠心系的实生

后代, 其形态特征与枳、枳橙均有明显的区别, 表现为无刺、单叶、叶片卵圆形、常绿, cpSSR 分析证明其与卡里佐枳橙一样, 在胞质基因组中有甜橙基因的渗入, 这与其形态特征相吻合, 因此, 在 cpSSR 聚类图中, 枳温州与宽皮柑橘聚在一起, 枳温州为枳与温州蜜柑的嵌合体。我们的研究发现, 在 5 对 cpSSR 引物中, 枳温州均有两条清晰的条带, 其中一条带与普通枳共享, 另一条带与温州蜜柑共享, 这说明枳温州含有两套叶绿体基因组, 与嵌合体的特征相符合。湘慈 43 号和哈发 3 号是重庆国家果树种质资源柑橘圃中保存的遗传背景未知的材料。湘慈 43 号成熟期早, 败育种子多, 花朵大小似酸橙, 果肉橙黄色, 味甜酸, 有着与柚相似的翼叶特征及落果现象, 根据这些形态特征, 其被认为是柚与酸橙的天然杂种。cpSSR 证据显示湘慈 43 号完全与柚聚在一起; 然而 EST-SSR 结果表明, 其与郭 2635 酸橙归为一类。所以可以认为湘慈 43 号的母本可能有柚的血缘。哈发 3 号在叶柄、叶节、嫩叶都具有紫红色, 果皮橙色, 囊瓣数为 9 瓣, 果肉黄绿色, 味极酸, 有类似巴柑檬的风味, 为单胚类型的一份特异资源, 形态特征上看, 其亲本可能与巴柑檬有关。cpSSR 数据表明, 哈发 3 号同红黎檬聚在一起; EST-SSR 数据显示哈发 3 号、红黎檬、巴柑檬、黄花尤力克聚在一起, 表明亲缘关系较近。

Swingle 系统 (Swingle & Reece, 1967) 以翼叶的大小、果实汁胞含有苦油点等特征, 把宜昌橙归为大翼橙类 (Papeda)。cpSSR 数据显示宜昌橙与其它大翼橙类资源如小花大翼橙、马来西亚大翼橙有明显的区别, 而与莽山野橘、元橘的亲缘关系较近。根据重庆国家果树种质资源柑橘圃对宜昌橙的野外调查, 宜昌橙在我国的分布范围广泛, 主要生长在海拔 900 ~ 1 800 m 阴暗潮湿的环境中, 叶片翼叶大, 单花腋生, 花丝 27 ~ 29 条, 囊瓣 5 ~ 8 瓣, 汁胞呈圆珠形, 单胚。另外, 与宜昌橙具有一定联系的莽山野橘也具有较原始的形态特征, 叶片及果面具有明显的灰白色蜡质, 叶片小而厚, 花丝 28 条, 囊瓣 9 ~ 10 瓣, 同多数宜昌橙一样, 其内果皮与果肉间未形成囊瓣膜, 囊瓣发育不全, 汁胞呈圆珠状, 多单胚; 与莽山野橘聚在一起的元橘, 可能是莽山野橘的一个类型, 其叶片长椭圆形或纺锤形, 叶片小而厚, 单花, 囊瓣 8 ~ 10 瓣, 汁胞呈圆珠形、耐寒性强等特点。李文斌等 (1993) 从地理分布、植物学形态及同工酶遗传分析等方面研究认为, 莽山野橘可能是宜昌橙向宽皮柑橘类演化的过渡类型。一些研究者通过 cpDNA 序列分析证实, 宜昌橙远离大翼橙而聚在宽皮柑橘类的分支基部 (Nicolosi et al., 2000; Bayer et al., 2009), AFLP (谢让金 等, 2008) 数据也显示出宜昌橙同莽山野橘的遗传距离最近。综合以上研究, 无论是从原始的形态汁囊结构特征, 还是从分子标记上看, 莽山野橘与宜昌橙均有较近的亲缘关系。

4 结论

本研究利用开发出的柑橘叶绿体 SSR 与柑橘核基因组 EST-SSR 标记相结合, 阐明了一批保存于国家柑橘资源圃的种质资源遗传背景, 初步找到鉴定枳温州嵌合体植株的 cpSSR 引物。通过研究发现: 野生柑橘莽山野橘、元橘与宜昌橙不论从形态学特征, 还是分子标记数据, 都表明其亲缘关系较近。对于遗传背景不清的材料, cpSSR、EST-SSR 标记相结合是一种有效的鉴别方法。

References

- Barrett H C, Rhodes A M. 1976. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. *Syst Bot*, 1 (2): 105 - 136.
- Bausher M G, Singh N D, Lee S B, Jansen R K, Daniell H. 2006. The complete chloroplast genome sequence of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. 'Ridge Pineapple': Organization and phylogenetic relationships to other angiosperms. *BMC Plant Biology*, 6: 21.
- Bayer R J, Mabberley D J, Morton C, Miller C H, Sharma I K, Pfeil B E, Rich S, Hitchcock R, Sykes S. 2009. A molecular phylogeny of the

- orange subfamily (Rutaceae: Aurantioideae) using nine cpDNA sequences. *American Journal of Botany*, 96 (3): 668 – 685.
- Cheng Y J, Guo W W, Deng X X. 2003. cpSSR: A new tool to analyze chloroplast genome of *Citrus somatic* hybrids. *Acta Botanica Sinica*, 45 (8): 906 – 909.
- Cheng Y J, de Vicente M C, Meng H J, Guo W W, Tao N, Deng X X. 2005. A set of primers for analyzing chloroplast DNA diversity in *Citrus* and related genera. *Tree Physiol*, 25 (6): 661 – 672.
- Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge: Cambridge University Press: 29 – 62.
- Gong Gui Z, Hong Q B, Peng Z C, Jiang D, Xiang S Q. 2008. Genetic diversity of *Poncirus* and its phylogenetic relationships with relatives as revealed by nuclear and chloroplast SSR. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (12): 1742 – 1750. (in Chinese)
- 龚桂芝, 洪棋斌, 彭祝春, 江 东, 向素琼. 2008. 枳属 (*Poncirus*) 种质遗传多样性及其与近缘属植物亲缘关系的 SSR 和 cpSSR 分析. *园艺学报*, 35 (12): 1742 – 1750.
- Green R M, Vardi A, Galun E. 1986. The plastome of *Citrus*. Physical map, variation among *Citrus* cultivars and species and comparison with related genera. *Theor Appl Genet*, 72 (2): 170 – 177.
- Jiang D, Zhong G Y, Hong Q B. 2006. Analysis of microsatellites in *Citrus unigenes*. *Acta Genetica Sinica*, 4: 345 – 353.
- Kaundun S S, Matsumoto S. 2002. Heterologous nuclear and chloroplast microsatellite amplification and variation in tea, *Camellia sinensis*. *Genome*, 45 (6): 1041 – 1048.
- Li Wen-bin, Liu Geng-feng, He Shan-wen, Zhang Ying-nan. 1993. Leaf isozymes of mandarin. *Hunan Agricultural Sciences*, 3: 3 – 6. (in Chinese)
- 李文斌, 刘庚峰, 贺善文, 张映南. 1993. 中国宽皮桔类起源与演化同工酶分析. *湖南农业科学*, 3: 3 – 6.
- Liu J H, Pang X M, Cheng Y J, Meng H J, Deng X X. 2002. Molecular characterization of the nuclear and cytoplasmic genomes of intergeneric diploid plants from cell fusion between microcitrus papuana and rough lemon. *Plant Cell Reports*, 21: 327 – 332.
- Marshall T C, Slate J, Kruuk L E B, Pemberton J M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol Ecol*, 7: 639 – 655.
- Nei M, Li W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 76: 5269 – 5273.
- Nicolosi E, Deng Z N, Gentile A, Malfa S L, Continella G, Tribulato E. 2000. *Citrus* phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor Appl Genet*, 100: 1155 – 1166.
- Provan J, Soranzo N, Wilson N J, Goldstein D B, Powell W. 1999. A low mutation rate for chloroplast microsatellites. *Genetics Society of America*, 153: 943 – 947.
- Scora R W. 1975. On the history and origin of *Citrus*. *Bull Torr Bot Club*, 102 (6): 369 – 375.
- Swingle W T. 1915. A new genus *Fortunella*, comprising four species of kumquat orange. *Journal of Washington Academy of Science*, 5: 165 – 176.
- Swingle W T, Reece P C. 1967. The botany of *Citrus* and its wild relatives // Reuther W, Webber H J, Batchelor D L. The citrus industry. Vol 1. Second edition. Berkeley: University of California Press: 190 – 430.
- Tanaka T. 1977. Fundamental discussion of *Citrus* classification. *Stud Citrol*, 14: 1 – 6.
- Weber J L, Wong C. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Hum Mol Genet*, 2: 1123 – 1128.
- Xie Rang Jin, Deng Lie. 2007. A *Citrus* DNA extraction method for AFLP analysis. *Biotechnology*, 17 (6): 27 – 28. (in Chinese)
- 谢让金, 邓 烈. 2007. 一种适合 AFLP 分析的柑橘 DNA 提取方法. *生物技术*, 17 (6): 27 – 28.
- Xie Rang Jin, Zhou Zhi-qin, Deng Lie. 2008. Taxonomic and phylogenetic relationships among the genera of the true citrus fruit trees group (Aurantioideae, Rutaceae) based on AFLP markers. *Journal of Systematics and Evolution*, 46 (5): 628 – 691. (in Chinese)
- 谢让金, 周志钦, 邓 烈. 2008. 真正柑橘果类植物基于 AFLP 分子标记的分类与进化研究. *植物分类学报*, 46 (5): 682 – 691.
- Yao Li-hua, Teng Yuan-wen. 2008. A brief introduction on EST-SSR marker and its application in the research of fruit trees. *Journal of Fruit Science*, 25 (2): 219 – 224. (in Chinese)
- 姚利华, 滕元文. 2008. EST-SSR 标记及其在果树研究中的应用. *果树学报*, 25 (2): 219 – 224.