

## 柑橘栽培品种（系）DNA 指纹图谱库的构建

雷天刚<sup>1,2</sup>, 何永睿<sup>1,2</sup>, 吴鑫<sup>1</sup>, 姚利晓<sup>1,2</sup>, 彭爱红<sup>1,2</sup>, 许兰珍<sup>1,2</sup>, 刘小丰<sup>1,2</sup>, 陈善春<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 400712; <sup>2</sup>国家柑桔工程技术研究中心/国家柑桔品种改良中心, 重庆 400712)

**摘要:**【目的】构建柑橘栽培品种（系）的 DNA 指纹图谱数据库, 为建立柑橘种苗纯度及真实性鉴定技术体系和技术规范奠定基础。【方法】利用 SSR 标记和 ISSR 标记对 102 个柑橘栽培品种（系）进行 DNA 指纹分析, 筛选适合的特征引物, 构建柑橘栽培品种（系）的指纹图谱数据库。【结果】从 200 对 SSR 引物中筛选到重复性好、多态性丰富的 12 对引物作为柑橘品种（系）鉴定的特征引物, 12 对 SSR 特征引物组合可鉴别 42 个品种（系）; 在此基础上, 对未出现 SSR 特征指纹的 60 个品种（系）进行 ISSR 指纹分析, 从 40 个 ISSR 引物中筛选到 2 个可用于品种鉴定的特征引物, 结合 SSR 标记, 可快速、准确地鉴别 70 个柑橘的品种（系）。并利用这 12 对 SSR 特征引物和 2 个 ISSR 特征引物构建了 70 个柑橘栽培品种（系）的 DNA 特征指纹图谱数据库。【结论】SSR 和 ISSR 标记适于构建柑橘栽培品种 DNA 指纹图谱库; 指纹图谱库的建立为柑橘种苗纯度及真实性鉴定奠定了基础。

**关键词:** 柑橘; 品种鉴定; SSR; ISSR; 指纹图谱库

## Construction of DNA Fingerprinting Database of Citrus Cultivars (Lines)

LEI Tian-gang<sup>1,2</sup>, HE Yong-rui<sup>1,2</sup>, WU Xin<sup>1</sup>, YAO Li-xiao<sup>1,2</sup>, PENG Ai-hong<sup>1,2</sup>, XU Lan-zhen<sup>1,2</sup>,  
LIU Xiao-feng<sup>1,2</sup>, CHEN Shan-chun<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712; <sup>2</sup>National Citrus Engineering Research Center/National Center for Citrus Varieties Improvement, Chongqing 400712)

**Abstract:** 【Objective】 The aims of this study were to construct a DNA fingerprinting database of major citrus cultivars, which could provide a possibility of establishment of a technical standard system for purity and authenticity identification of citrus nursery trees. 【Method】 Simple sequence repeat (SSR) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers were used to analyze the DNA fingerprinting of 102 citrus cultivars(lines) and then to choose suitable primers for the construction of DNA fingerprinting database of citrus cultivars (lines). 【Result】 12 SSR primer pairs, with high polymorphisms and good repeatability, regarded as specific primers, which could identify 42 cultivars (lines), were selected from 200 SSR primer pairs. Meanwhile, 40 ISSR primers were used to analyze the DNA fingerprinting of 60 cultivars (lines) that can not be distinguished by SSR markers and 2 ISSR specific primers were chosen. As a result, a total of 70 citrus cultivars (lines) could be identified by the 12 SSR primers and 2 ISSR primers. Finally, a DNA fingerprinting database containing 70 major citrus cultivars (lines) was constructed by using those 12 SSR and 2 ISSR primers. 【Conclusion】 The results indicated that SSR and ISSR markers are suitable for the construction of DNA fingerprinting database of citrus cultivars (lines). Moreover, the fingerprinting database will provide a basis for genetic purity and authenticity fast evaluation of citrus nursery trees.

**Key words:** citrus; cultivar identification; SSR; ISSR; fingerprinting database

收稿日期: 2008-10-21; 接受日期: 2009-03-26

基金项目: 科技部科研院所社会公益研究专项(2004DIB45147)、国家科技支撑计划项目(2007ABD47B07)、国家“863”计划项目(2006AA100108-4-16)、重庆市重大科技专项(CSTC2007AB1040)、重庆市科技攻关重点项目(CSTS2006AB1009)

作者简介: 雷天刚(1979—), 男, 贵州印江人, 助理研究员, 硕士, 研究方向为柑橘分子育种。通信作者陈善春(1966—), 男, 四川乐至人, 研究员, 研究方向为柑橘遗传育种及分子生物学。Tel: 023-68349020; E-mail: scchen2004@vip.sina.com

## 0 引言

【研究意义】纯度和真实性是种子(苗)质量评价的重要标准之一,其鉴定技术也是解决新品种权益保护、种子(苗)经济纠纷问题的技术基础。国际植物新品种保护联盟(UPOV)以 DUS (distinctness, uniformity, stability) 测试标准作为新品种登记和保护的基本条件。DUS 测试主要以形态学特征为依据,需要对被测试品种在特定生长时期的农艺性状进行考察,鉴定周期较长,而且农艺性状易受环境条件的影响。柑橘是多年生木本植物,易发生芽变,很多亲缘关系相近的品种间农艺性状差异较小,甚至只有单一性状的不明显变异;目前柑橘生产中一般要在定植的种苗开花结果后才能判断种苗纯度和真实性,周期长达 4~6 年,此时依靠形态学标记鉴定出种苗纯度和真实性已无实际意义。当前中国柑橘生产中种苗质量问题比较突出和普遍,种性不纯种苗和假种苗坑农事件常有发生。因此,建立早期(苗期)、快速、准确的柑橘种苗纯度和品种真实性检测技术,对控制柑橘种苗和产品质量、保护果农利益和积极性、保障柑橘产业可持续健康发展具有十分重要的意义。【前人研究进展】随着分子生物学的发展,各种 DNA 分子标记技术不断涌现,检测技术渐趋完善,为实现柑橘种苗质量的早期、快速和准确鉴定提供了新途径。目前,各种分子标记技术已广泛应用于柑橘种质鉴定和遗传多样性研究。Bretó 等<sup>[1]</sup>利用 ISSR、RAPD 和 AFLP 标记研究 24 个克里迈丁橘 (*C. clementina hort. ex Tanaka*) 品系间的遗传差异; Fang 等<sup>[2]</sup>利用同工酶、RFLP 和 ISSR 标记分析 48 个枳橙品系间的亲缘关系;刘勇等<sup>[3]</sup>利用 AFLP 和 SSR 标记研究柚类种质资源的遗传多样性;庞晓明等<sup>[4]</sup>利用 SSR 标记研究柑橘属及其近缘植物的亲缘关系;Barkley 等<sup>[5]</sup>利用 24 个 SSR 标记对 370 份柑橘种质资源的遗传多样性进行研究。结果显示,各类型品种(系)间多态性丰富,但部分由突变选系而来的品种(系)间呈现单态性,如甜橙、克里迈丁橘和无核小蜜橘等; Fang 和 Roose<sup>[6]</sup>利用 22 个 ISSR 标记鉴定 68 个柑橘栽培品种(系),结果可鉴别出部分亲缘关系相近的品种(系)。众多的研究表明, DNA 分子标记在柑橘种质和品种鉴定等方面具有巨大的潜力,其中以 SSR 和 ISSR 标记较为理想。【本研究切入点】利用分子标记(SSR 和 ISSR 等)进行栽培品种种苗质量鉴定,首先要建立足够多的栽培品种(系)的标准指纹图谱库。近年来,基于 SSR

标记的小麦<sup>[7-9]</sup>、番茄<sup>[10]</sup>和水稻<sup>[11]</sup>等作物主栽品种的 DNA 指纹图谱数据库已构建完成,而国内外尚未有构建柑橘主栽品种(系) DNA 指纹图谱库的报道。【拟解决的关键问题】以 102 个柑橘栽培品种(系)为材料,利用 SSR 标记和 ISSR 标记,构建柑橘栽培品种(系)的 DNA 指纹图谱库,为制定柑橘种苗纯度和真实性早期鉴定技术规范奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

以 102 个柑橘栽培品种(系)为供试材料,叶片均于 2007 年采自中国农业科学院柑橘研究所“国家果树种质(重庆)柑橘圃”,试验分析工作在国家柑橘品种改良中心完成。品种(系)名称见表 1。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 采用简易 CTAB 法从叶片中提取基因组 DNA。经 0.8% 琼脂糖电泳及分光光度计检测后,将浓度调至  $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  备用。

1.2.2 引物 共筛选 200 对 SSR 引物,其中 120 对引物序列来自前人的报道<sup>[12-16]</sup>,其余 80 对引物参照江东等<sup>[17]</sup>的方法设计。用于筛选的 40 个 ISSR 引物序列见吴鑫等<sup>[18]</sup>的报道。引物均由上海生工(Sangon)合成, PAGE 纯化。

1.2.3 SSR 分析 PCR 反应体系中包括  $1 \mu\text{l}$   $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  模板 DNA,  $2.5 \mu\text{l}$   $10 \times \text{PCR buffer}$ ,  $1.8 \mu\text{l}$   $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $2 \mu\text{l}$   $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP, 各  $1 \mu\text{l}$   $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  正反引物,  $0.8 \text{ U}$  Taq DNA 聚合酶(Sangon),加水至总体积  $25 \mu\text{l}$ 。PCR 程序:  $94^\circ\text{C}$  5 min;  $94^\circ\text{C}$  30 s,  $56^\circ\text{C}$  45 s,  $72^\circ\text{C}$  60s, 30 个循环;  $72^\circ\text{C}$  10 min。扩增反应在德国 Biometra 公司产的 T1 Thermocycler 型 PCR 扩增仪上进行。扩增产物于 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离,然后采用快速银染法显色并照相记录。

1.2.4 ISSR 分析 对未出现 SSR 特征指纹的柑橘品种(系)进行 ISSR 分析, PCR 反应体系中包括 50 ng 模板 DNA,  $2.5 \mu\text{l}$   $10 \times \text{PCR buffer}$ ,  $1.8 \mu\text{l}$   $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $1.8 \mu\text{l}$   $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP,  $1 \mu\text{l}$   $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  引物,  $1 \text{ U}$  Taq DNA 聚合酶(TaKaRa),加水至  $25 \mu\text{l}$ 。扩增程序:  $94^\circ\text{C}$  预变性 5 min,  $94^\circ\text{C}$  30 s,  $52^\circ\text{C}$  60 s,  $72^\circ\text{C}$  60 s, 35 循环;  $72^\circ\text{C}$  延伸 10 min。扩增产物经 6% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,银染显色并照相记录。

1.2.5 PIC 值计算 计算 SSR 和 ISSR 标记的多态性

表 1 供试 102 个柑橘栽培品种(系)名称

Table 1 102 citrus cultivars or lines used in this study

| 编号<br>No. | 品种(系)<br>Cultivar (line)                   | 学名<br>Genera species                 | 编号<br>No. | 品种(系)<br>Cultivar (line)  | 学名<br>Genera species          |
|-----------|--|--------------------------------------|-----------|---------------------------|-------------------------------|
| 1         | Fina                                       | <i>C. clementina</i> hort. ex Tanaka | 52        | 铃木脐橙 Suzuki navel         | <i>C. sinensis</i> Osbeck     |
| 2         | 克里迈丁橘新系 Clementina new line                | <i>C. clementina</i> hort. ex Tanaka | 53        | 冰糖橙 Bingtangcheng         | <i>C. sinensis</i> Osbeck     |
| 3         | Tardia Boro                                | <i>C. clementina</i> hort. ex Tanaka | 54        | 奉节脐橙 Fengjie navel        | <i>C. sinensis</i> Osbeck     |
| 4         | Hernandina                                 | <i>C. clementina</i> hort. Ex Tanaka | 55        | 改良橙 Gailiangcheng         | <i>C. sinensis</i> Osbeck     |
| 5         | 台湾椪柑 Taiwan ponkan                         | <i>C. reticulata</i> Blanco          | 56        | 康拜尔夏橙 Campbell Valencial  | <i>C. sinensis</i> Osbeck     |
| 6         | 岩溪晚芦 Yanxiwanlu ponkan                     | <i>C. reticulata</i> Blanco          | 57        | 新会橙 Xinhuicheng           | <i>C. sinensis</i> Osbeck     |
| 7         | 太田椪柑 Ota ponkan                            | <i>C. reticulata</i> Blanco          | 58        | 汤姆逊脐橙 Thomson             | <i>C. sinensis</i> Osbeck     |
| 8         | 椪柑新生系 3 号 Ponkan varieties nucellar line 3 | <i>C. reticulata</i> Blanco          | 59        | Morocco blood orange      | <i>C. sinensis</i> Osbeck     |
| 9         | 硬芦芦柑 Yinglu                                | <i>C. reticulata</i> Blanco          | 60        | 脐血橙 Washington Sanguine   | <i>C. sinensis</i> Osbeck     |
| 10        | 黄岩椪柑 Huangyan ponkan                       | <i>C. reticulata</i> Blanco          | 61        | 华脐 Washington navel       | <i>C. sinensis</i> Osbeck     |
| 11        | 潮州椪柑 Chaozhou ponkan                       | <i>C. reticulata</i> Blanco          | 62        | 路比血橙 Ruby blood orange    | <i>C. sinensis</i> Osbeck     |
| 12        | 冰糖橘 Bintangju                              | <i>C. erythrosa</i> hort. ex Tanaka  | 63        | 凤梨甜橙 Pine apple           | <i>C. sinensis</i> Osbeck     |
| 13        | 南丰蜜橘 Nanfengmiju                           | <i>C. kinokuni</i> hort. ex Tanaka   | 64        | 无核雪柑 Xuegan seedless      | <i>C. sinensis</i> Osbeck     |
| 14        | 福橘 Fujū                                    | <i>C. tangerina</i> hort. ex Tanaka  | 65        | 柳叶橙 Liuyecheng            | <i>C. sinensis</i> Osbeck     |
| 15        | 无核本地早橘 Bendizaoju seedless                 | <i>C. succosa</i> hort. ex Tanaka    | 66        | 蜜奈夏橙 Midnight             | <i>C. sinensis</i> Osbeck     |
| 16        | 兴义大红袍 Xingyidahongpao                      | <i>C. tangerina</i> hort. ex Tanaka  | 67        | 天草 Amakusa                | Tangor                        |
| 17        | 桂平朱砂橘 Guipingzhushaju                      | <i>C. erythrosa</i> hort. ex Tanaka  | 68        | 早香 Hayaka                 | <i>C. reticulata</i> Blanco   |
| 18        | 鹅蛋红橘 Edanhongju                            | <i>C. tangerina</i> hort. ex Tanaka  | 69        | 不知火 Shinanui              | Tangor                        |
| 19        | 和平 92 Heping92                             | <i>C. tangerina</i> hort. ex Tanaka  | 70        | 宫内伊予柑 Miyawuchi Iyo kan   | <i>C. Iyo</i> hort. ex Tanaka |
| 20        | 418 红橘 Tangerine 418                       | <i>C. tangerina</i> hort. ex Tanaka  | 71        | 清见 Kiyomi                 | Tangor                        |
| 21        | 秤砣红橘 Chentuohongju                         | <i>C. tangerina</i> hort. ex Tanaka  | 72        | 媛媛 22 Ehime Kashi 22      | <i>C. reticulata</i> Blanco   |
| 22        | 兴津温州蜜柑 Okitsu                              | <i>C. unshiu</i> Marcow              | 73        | 媛媛 21 Ehime Kashi 21      | <i>C. reticulata</i> Blanco   |
| 23        | 米泽温州蜜柑 Yonezawa                            | <i>Citrus unshiu</i> Marc            | 74        | 阳香 Youkou                 | <i>C. reticulata</i> Blanco   |
| 24        | 宫川温州蜜柑 Miyagawa                            | <i>C. unshiu</i> Marcow              | 75        | 少核默科特 W. Murcott          | Tangor                        |
| 25        | 大浦温州蜜柑 Oura                                | <i>C. unshiu</i> Marc                | 76        | 日辉 Sunburst               | <i>C. reticulata</i> Blanco   |
| 26        | 宫本温州蜜柑 Miyamoto                            | <i>C. unshiu</i> Marcow              | 77        | 春见 Harumi                 | <i>C. reticulata</i> Blanco   |
| 27        | 国庆 1 号温州蜜柑 Guoqing 1                       | <i>C. unshiu</i> Marc                | 78        | 奥兰多 Orlando               | Tangelo                       |
| 28        | 日南 1 号温州蜜柑 Nichinan 1                      | <i>C. unshiu</i> Marcow              | 79        | 明尼奥拉橘柚 Minneola           | Tangelo                       |
| 29        | 山下红温州蜜柑 Yamasaki                           | <i>C. unshiu</i> Marc                | 80        | 清峰 Seihou                 | Tangor                        |
| 30        | 南柑 20 温州蜜柑 Nanka 20                        | <i>C. unshiu</i> Marcow              | 81        | 津之香 Tsunokaori            | Tangor                        |
| 31        | 立间温州蜜柑 Tachima                             | <i>C. unshiu</i> Marc                | 82        | 诺瓦 Nova                   | Tangelo                       |
| 32        | 市文温州蜜柑 Yichihumi                           | <i>C. unshiu</i> Marcow              | 83        | 胜山伊予柑 Katsuyama Iyo kan   | <i>C. Iyo</i> hort. ex Tanaka |
| 33        | 谷本温州蜜柑 Tanimoto                            | <i>C. unshiu</i> Marc                | 84        | 濑户佳 Setoka                | <i>C. reticulata</i> Blanco   |
| 34        | 早津温州蜜柑 Early okitsu                        | <i>C. unshiu</i> Marcow              | 85        | 媛媛 30 Ehime Kashi 30      | <i>C. reticulata</i> Blanco   |
| 35        | 福本脐橙 Fukumoto                              | <i>C. sinensis</i> Osbeck            | 86        | 南香 Nankou                 | <i>C. reticulata</i> Blanco   |
| 36        | 清家脐橙 Seike                                 | <i>C. sinensis</i> Osbeck            | 87        | 秋辉 Fallglo                | <i>C. reticulata</i> Blanco   |
| 37        | 朋娜脐橙 Skagss bonanza                        | <i>C. sinensis</i> Osbeck            | 88        | 东试早柚 Dongshizao pummelo   | <i>C. grandis</i> Osbeck      |
| 38        | 纽荷兰脐橙 Newhall                              | <i>C. sinensis</i> Osbeck            | 89        | 梁平柚 Liangping pummelo     | <i>C. grandis</i> Osbeck      |
| 39        | 丰脐 Fengqi                                  | <i>C. sinensis</i> Osbeck            | 90        | 通贤柚 Tongxian pummelo      | <i>C. grandis</i> Osbeck      |
| 40        | 晚棱脐橙 Lanes late navel orange               | <i>C. sinensis</i> Osbeck            | 91        | 强德勒柚 Chandler pummelo     | <i>C. grandis</i> Osbeck      |
| 41        | 红肉脐橙 Cara cara                             | <i>C. sinensis</i> Osbeck            | 92        | 楚门文旦 Chumen pummelo       | <i>C. grandis</i> Osbeck      |
| 42        | 吉田脐橙 Yoshida navel                         | <i>C. sinensis</i> Osbeck            | 93        | 沙田柚 Shatian pummelo       | <i>C. grandis</i> Osbeck      |
| 43        | 德尔塔夏橙 Delta                                | <i>C. sinensis</i> Osbeck            | 94        | 琯溪蜜柚 Guanxi pummelo       | <i>C. grandis</i> Osbeck      |
| 44        | 奥林达夏橙 Olinda                               | <i>C. sinensis</i> Osbeck            | 95        | 邓肯葡萄柚 Duncan grapefruit   | <i>C. paradisi</i> Osbeck     |
| 45        | 卡特夏橙 Carter                                | <i>C. sinensis</i> Osbeck            | 96        | 勐伦早柚 Menglunzao pummelo   | <i>C. grandis</i> Osbeck      |
| 46        | 塔罗科血橙 Tarocco blood orange                 | <i>C. sinensis</i> Osbeck            | 97        | 曼赛龙柚 Mansailong pummelo   | <i>C. grandis</i> Osbeck      |
| 47        | 北碚 447 锦橙 Beibe 447                        | <i>C. sinensis</i> Osbeck            | 98        | 晚白柚 Wanbai pummelo        | <i>C. grandis</i> Osbeck      |
| 48        | 梨橙 2 号锦橙 Licheng 2                         | <i>C. sinensis</i> Osbeck            | 99        | 马叙葡萄柚 Marsh grapefruit    | <i>C. paradisi</i> Osbeck     |
| 49        | 江津 78-1 锦橙 Jiangjin 78-1                   | <i>C. sinensis</i> Osbeck            | 100       | 五布红心柚 Wubuhongxin pummelo | <i>C. grandis</i> Osbeck      |
| 50        | 铜水 72-1 锦橙 Tongshui 72-1                   | <i>C. sinensis</i> Osbeck            | 101       | 瑞红葡萄柚 Riored grapefruit   | <i>C. paradisi</i> Osbeck     |
| 51        | 哈姆林甜橙 Hamlin                               | <i>C. sinensis</i> Osbeck            | 102       | 尤力克柠檬 Eureka lemon        | <i>C. limon</i> Burm.f        |

评价指标 PIC (polymorphism information content) 值<sup>[19]</sup>, 计算公式:  $PIC_i = 1 - \sum P_{ij}^2$ 。其中,  $P_{ij}$  表示标记  $i$  的第  $j$  个等位基因在群体中的频率。先根据试验结果计算出各个引物的等位位点数及频率, 然后利用软件 Picalc 0.6 计算各引物的 PIC 值。

1.2.6 标准指纹图谱库构建 利用曹永生等<sup>[20]</sup>编制的指纹图谱自动识别系统 Gel 2.0 软件包构建柑橘栽培品种(系)的 DNA 指纹图谱库。

## 2 结果与分析

### 2.1 SSR 和 ISSR 特征引物的筛选

以 102 个柑橘栽培品种(系)为材料进行 SSR 引物筛选, 从 200 对 SSR 引物中筛选到扩增谱带清晰、多态性丰富而且能够稳定重复的 12 对 SSR 引物作为柑橘品种鉴定的特征引物。

SSR 指纹分析发现, 部分品种(系)不具备 SSR 特征指纹, 因此本研究针对这些品种(系)进行了 ISSR 引物筛选, 从 40 个 ISSR 引物中筛选到可用于品种(系)鉴定的多态性特征引物 2 个, 其编号分别为 IS22 和 IS09。特征引物 IS22 在甜橙品种(系)间、温州蜜柑品种(系)间、椪柑品种(系)间均扩增出多态性谱带, 而引物 IS09 仅在部分甜橙品种(系)中扩增出特异谱带。

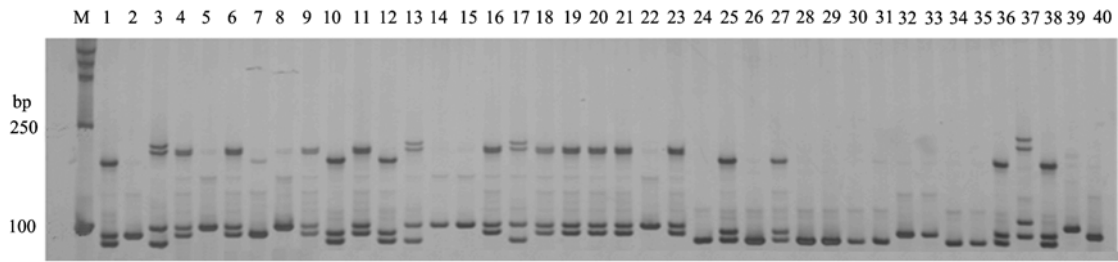
### 2.2 SSR 分析

利用 12 对 SSR 特征引物对 102 个柑橘栽培品(系)种进行 SSR 分析, 共获得 62 个等位位点, 每对 SSR 引物扩增出的等位位点数为 2~8 个, 平均 5.2 个(图 1)。12 对 SSR 特征引物的 PIC 值在 0.345~0.843, 平均为 0.693(表 2)。12 对 SSR 特征引物在各品种(系)类型间的多态性信息含量各不相同。总体来看,

表 2 12 对 SSR 特征引物和 2 个 ISSR 特征引物的序列、等位位点数、片段大小和 PIC 值

Table 2 12 specific SSR primer pairs and 2 specific ISSR primers, sequences, number of alleles, fragment size, polymorphic fragment information content (PIC)

| 编号<br>No.                          | 引物序列<br>Primer sequences   | 等位位点数<br>Number of alleles | 片段大小<br>Fragment size (bp) | PIC   |
|------------------------------------|--|----------------------------|----------------------------|-------|
| SSR 特征引物 Specific SSR primer pairs |  |                            |                            |       |
| CSSR038                            | 5'>GCTCCTCGAATGAGAATGAAATGA<3'<br>5'>TGGTTGTGCGAAAATGAAGAGATA<3' | 6                          | 90~210                     | 0.768 |
| CSSR036                            | 5'>AAAAATCGAAATCGAGCACCC<3'<br>5'>GAAGTAACGGAGAATCCGATGAG<3'     | 4                          | 140~260                    | 0.492 |
| CSSR050                            | 5'>TTCACCACAAACGAAGACTCAGAC<3'<br>5'>CTGTAATCCACTCGGTAATCCGAC<3' | 2                          | 150~170                    | 0.345 |
| CSSR052                            | 5'>CGAAGAAGAATTGAAAGAGCCAGA<3'<br>5'>CAACAGATTTGTTACTGGAAGGGG<3' | 4                          | 140~260                    | 0.598 |
| SS17                               | 5'>TTCATTTGGAACAAAACCAATTC<3'<br>5'>GCTGCTAATCACAGCATCAAGAGA<3'  | 6                          | 150~230                    | 0.806 |
| SS16                               | 5'>AGTGAAGTGTCCATTGGATTTTCG<3'<br>5'>GTGTTGAATCCCGACCTTCTACC<3'  | 8                          | 150~180                    | 0.792 |
| CSSR051                            | 5'>TAGGTTCTCTTTCAACCCCTTTC<3'<br>5'>CTGCTTCGGCTGTAATTGTGATT<3'   | 4                          | 90~170                     | 0.758 |
| SS18                               | 5'>CCTCAGCTCTAGCAAAAGCACATT<3'<br>5'>AGAGGCTATAGATCGTGGATGCAG<3' | 4                          | 170~280                    | 0.769 |
| SS2                                | 5'>TTTATTCACCGCTCAAGGACT<3'<br>5'>TTAGGGGTGGAAAACATGGA<3'        | 6                          | 240~280                    | 0.756 |
| CSSR020                            | 5'>ACATTCGCATTCTCCACT<3'<br>5'>TTTGCTCATCACCTTCG<3'              | 5                          | 220~240                    | 0.806 |
| SS15                               | 5'<GCTTTCGATCCCTCCACATA<3'<br>5'<GATCCCTACAATCCTTGGTCC<3'        | 8                          | 140~180                    | 0.843 |
| CSSR015                            | 5'>ATACGATGCGTGAAGTGC<3'<br>5'>TACCTTCTTCTCCTCTGT<3'             | 5                          | 160~180                    | 0.583 |
| ISSR 特征引物 Specific ISSR primers    |  |                            |                            |       |
| IS22                               | (CA) <sub>8</sub> RC   | 27                         | 220~490                    | 0.957 |
| IS09                               | (CTGC) <sub>4</sub>  | 4                          | 300~410                    | 0.223 |



M: DNA marker DL2000; 1: 天草; 2: 不知火; 3: 宫内伊予柑; 4: 清见; 5: 瓊媛 22; 6: 瓊媛 21; 7: 阳香; 8: 早津温州蜜柑; 9: 少核默科特; 10: 日辉; 11: 春见; 12: 奥兰多; 13: 明尼奥拉橘柚; 14: 清峰; 15: 津之香; 16: 诺瓦; 17: 胜山伊予柑; 18: 濑户佳; 19: 南香; 20: Fina; 21: 克里迈丁新系; 22: Tardia Boro; 23: Hernandina; 24: 东试早柚; 25: 梁平柚; 26: 通贤柚; 27: 强德勒柚; 28: 楚门文旦; 29: 沙田柚; 30: 琯溪蜜柚; 31: 邓肯葡萄柚; 32: 勳伦早柚; 33: 曼赛龙柚; 34: 晚白柚; 35: 马叙葡萄柚; 36: 五布红心柚; 37: 瑞红葡萄柚; 38: 福本脐橙; 39: 宫川温州蜜柑; 40: 椪柑新生系 3 号

M: DNA marker DL2000; 1: Amakusa; 2: Shinanui; 3: Miyawuchi lyo kan; 4: Kiyomi; 5: Ehime Kashi 22; 6: Ehime Kashi 21; 7: Youkou; 8: Early okitsu; 9: W. Murcott; 10: Sunburst; 11: Harumi; 12: Orlando; 13: Minneola; 14: Seihou; 15: Tsunokaori; 16: Nova; 17: Katsuyama lyo kan; 18: Setoka; 19: Nankou; 20: Fina; 21: Clementina new line; 22: Tardia Boro; 23: Hernandina; 24: Dongshizao pummelo; 25: Liangping pummelo; 26: Tongxian pummelo; 27: Chandler pummelo; 28: Chumen pummelo; 29: Shatian pummelo; 30: Guanxi pummelo; 31: Duncan grapefruit; 32: Menglunzao pummelo; 33: Mansailong pummelo; 34: Wanbai pummelo; 35: Marsh grapefruit; 36: Wubuhongxin pummelo; 37: Riored grapefruit; 38: Fukumoto; 39: Miyagawa; 40: Ponkan varieties nucellar line 3

图 1 SSR 特征引物 (CSSR038) 对部分柑橘品种 (系) 的扩增图谱

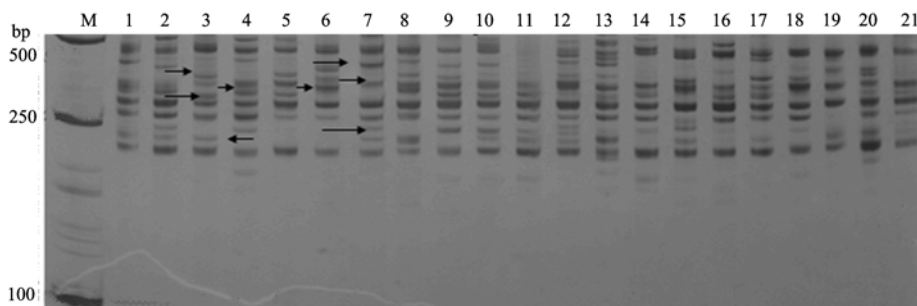
Fig. 1 Electrophoretic pattern of some citrus cultivars (lines) with SSR specific primer pair CSSR038

杂柑和柚类品种 (系) 间的多态性最高, 红橘和椪柑次之, 甜橙和温州蜜柑品种 (系) 间多态性最差。不同类型柑橘栽培品种 (系) 间的多态性丰富, 利用 2~3 对特征引物可将供试材料的所属柑橘类别判断出来。采用特征引物组合鉴别的方法, 12 对 SSR 特征引物扩增出的多态性谱带构成了 42 个品种 (系) 的特征指纹图谱, 这 42 个品种 (系) 分别是无核本地早橘、硬芦芦柑、南丰蜜橘、宫内伊予柑、胜山伊予柑、Tardia Boro、桂平朱砂橘、黄岩椪柑、砂糖橘、天草、不知火、清见、瓊媛 21、瓊媛 22、阳香、少核默科特、日

辉、春见、奥兰多、明尼奥拉橘柚、清峰、津之香、诺瓦、濑户佳、早香、南香、秋辉、东试早柚、梁平柚、通贤柚、强德勒柚、楚门文旦、沙田柚、琯溪蜜柚、邓肯葡萄柚、勳伦早柚、曼赛龙柚、晚白柚、马叙葡萄柚、五布红心柚、瑞红葡萄柚、尤力克柠檬。

### 2.3 ISSR 分析

利用筛选获得的 2 个 ISSR 特征引物对不具备 SSR 特征指纹的 60 个品种 (系) 进行 ISSR 分析, 特征引物 IS22 扩增出 8 条多态谱带 (图 2), 共检测到 27 个等位位点, 特征引物 IS09 扩增出 2 条多态性谱带,



M: DNA marker DL2000; 1: 朋娜脐橙; 2: 北碚 447 锦橙; 3: 塔罗科血橙; 4: 铜水 72-1 锦橙; 5: 江津 78-1 锦橙; 6: 纽荷尔脐橙; 7: 无核雪柑; 8: 红肉脐橙; 9: 蜜奈夏橙; 10: 福本脐橙; 11: 梨橙 2 号锦橙; 12: 晚棱脐橙; 13: 铃木脐橙; 14: 哈姆林甜橙; 15: 奥林达夏橙; 16: 丰脐; 17: 吉田脐橙; 18: 德尔塔夏橙; 19: 路比血橙; 20: 摩洛哥血橙; 21: 清家脐橙。箭头表示多态性位点

M: DNA marker DL2000; 1: Skagss bonanza; 2: Beibei 447; 3: Tarocco blood orange; 4: Tongshui72-1; 5: Jiangjin 78-1; 6: Newhall; 7: Xuegan seedless; 8: Cara cara; 9: Midnight; 10: Fukumoto; 11: Licheng 2; 12: Lanes late navel orange; 13: Suzuki; 14: Hamlin; 15: Olinda; 16: Fengqi; 17: Yoshida navel; 18: Delta; 19: Ruby blood orange; 20: Morocco blood orange; 21: Seike. Arrows indicate polymorphic loci

图 2 ISSR 特征引物 (IS22) 对部分柑橘品种 (系) 的扩增图谱

Fig. 2 Electrophoretic pattern of some cultivars (lines) with ISSR specific primer IS22

检测到 4 个等位位点。两个 ISSR 特征引物的 PIC 值分别为 0.957 和 0.223。利用 2 个 ISSR 特征引物结合 12 对 SSR 特征引物对 60 个柑橘品种(系)进行指纹分析, 结果其中的 28 个品种(系)具有 DNA 特征指纹, 它们是: 清家脐橙、朋娜脐橙、纽荷尔脐橙、丰脐、晚棱脐橙、奥林达夏橙、北碚 447 锦橙、塔罗科血橙、江津 78-1 锦橙、德尔塔夏橙、哈姆林甜橙、铜水 72-1 锦橙、铃木脐橙、无核雪柑、蜜奈夏橙、路比血橙、柳叶橙、改良橙、摩洛哥血橙、宫川温州蜜柑、大浦温州蜜柑、宫本温州蜜柑、日南 1 号温州蜜柑、兴津温州蜜柑、太田椪柑、岩溪晚芦、椪柑新生系 3

号、台湾椪柑。

## 2.4 柑橘品种(系)指纹图谱数据库的构建

利用 12 对 SSR 特征引物和 2 对 ISSR 特征引物对供试 102 个中国柑橘栽培品(系)种进行 SSR 和 ISSR 分析, 得到各柑橘品种的可重复的 SSR 和 ISSR 凝胶图谱。然后, 采用数字与英文字母分别对特征引物及其扩增图谱中的不同带型赋值, 将每个品种的指纹图谱所对应的赋值编码按特定的引物顺序排列起来, 就构成了代表各品种(系)身份的特征指纹代码。本研究中可准确鉴别的 70 个柑橘栽培品(系)种的特征指纹代码见表 3。

表 3 70 个柑橘栽培品种(系)的特征指纹代码

Table 3 The fingerprinting code of 70 citrus cultivars (lines)

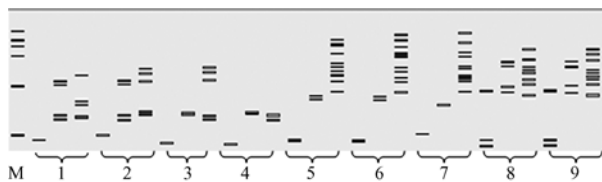
| 品种(系)<br>Cultivar (line) | SSR 指纹代码<br>Fingerprinting code of SSR | ISSR 指纹代码<br>Fingerprinting code of ISSR |
|--------------------------|--|--|
| 天草 Amakusa               | 1A2A3B4A5A6B7C8A9D10A11B12C            |  |
| 不知火 Shinanui             | 1C2A3B4B5B6B7C8C9A10B11E12C            |  |
| 宫内伊予柑 Miyawuchi Iyo kan  | 1F2B3B4A5F6G7A8D9D10D11F12C            |  |
| 清见 Kiyomi                | 1D2B3B4A5B6F7C8A9A10B11B12D            |  |
| 媛媛 22 Ehime Kashi 22     | 1B2A3A4A5A6B7A8B9B10A11G12C            |  |
| 媛媛 21 Ehime Kashi 21     | 1D2B3A4A5B6B7B8A9B10A11B12C            |  |
| 阳香 Youkou                | 1C2A3A4A5B6A7C8B9B10C11D12C            |  |
| 少核默科特 W. Murcott         | 1D2A3B4A5B6A7A8C9B10A11H12C            |  |
| 日辉 Sunburst              | 1A2A3B4A5B6C7C8C9D10A11C12C            |  |
| 春见 Harumi                | 1D2B3B4A5A6A7A8A9A10B11B12C            |  |
| 奥兰多 Orlando              | 1A2B3B4A5A6C7C8B9D10A11B12C            |  |
| 明尼奥拉橘柚 Minneola          | 1F2A3B4A5A6A7C8B9D10A11A12C            |  |
| 清峰 Seihou                | 1B2B3B4A5B6H7A8A9B10A11A12C            |  |
| 津之香 Tsunokaori           | 1B2B3B4A5B6F7A8A9B10A11B12C            |  |
| 诺瓦 Nova                  | 1D2B3A4A5A6C7A8A9B10A11B12C            |  |
| 胜山伊予柑 Katsuyama Iyo kan  | 1F2A3B4A5F6G7C8D9D10D11F12D            |  |
| 濑户佳 Setoka               | 1D2B3B4A5B6H7A8A9B10C11B12C            |  |
| 早香 Hayaka                | 1D2A3B4B5B6B7C8B9B10A11H12C            |  |
| 南香 Nankou                | 1D2A3B4A5B6B7A8B9B10A11B12C            |  |
| 秋辉 Fallglo               | 1D2B3B4A5A6A7A8B9B10B11B12C            |  |
| 东试早柚 Dongshizao pummelo  | 1E2A3B4C5C6B7A8D9D10C11E12A            |  |
| 梁平柚 Liangping pummelo    | 1A2A3B4C5C6C7A8D9F10C11B12A            |  |
| 通贤柚 Tongxian pummelo     | 1E2A3B4C5D6D7B8D9E10C11B12A            |  |
| 强德勒柚 Chandler pummelo    | 1A2A3B4C5E6B7B8D9D10C11B12A            |  |
| 楚门文旦 Chumen pummelo      | 1E2A3B4C5D6D7B8D9D10C11B12A            |  |
| 沙田柚 Shatian pummelo      | 1E2A3B4B5E6D7A8D9E10C11E12A            |  |
| 琯溪蜜柚 Guanxi pummelo      | 1E2A3B4C5D6D7E8D9D10C11B12A            |  |
| 邓肯葡萄柚 Duncan grapefruit  | 1E2A3A4B5B6A7A8A9D10A11B12B            |  |

续表 3 Continued Table 3

| 品种(系)<br>Cultivar (line)                 | SSR 指纹代码<br>Fingerprinting code of SSR | ISSR 指纹代码<br>Fingerprinting code of ISSR |
|--|--|--|
| 勐伦早柚 Menglunzao pummelo                  | 1C2A3B4C5C6H7B8D9D10C11A12A            |  |
| 曼赛龙柚 Mansailong pummelo                  | 1C2A3B4C5E6E7A8D9E10C11A12A            |  |
| 晚白柚 Wanbai pummelo                       | 1E2A3B4C5C6E7A8D9D10C11E12A            |  |
| 马叙葡萄柚 Marsh grapefruit                   | 1E2A3A4B5B6A7A8D9D10A11B12B            |  |
| 五布红心柚 Wubuhongxin pummelo                | 1A2A3B4C5B6E7A8D9D10C11E12B            |  |
| 瑞红葡萄柚 Riored grapefruit                  | 1G2D3B4D5G6A7B8A9F10E11D12A            |  |
| Tardia Boro                              | 1B2A3B4A5B6C7A8B9B10B11H12A            |  |
| 尤力克柠檬 Eureka lemon                       | 1G2D3B4D5H6A7B8A9A10E11D11B            |  |
| 南丰蜜橘 Nanfengmiju                         | 1B2B3B4A5B6C7A8C9C10B11C12A            |  |
| 无核本地早橘 Bendizaoju seedless               | 1D2B3B4A5B6A7A8C9C10B11H12A            |  |
| 桂平朱砂橘 Guipingzhushaju                    | 1F2A3B4A5A6B7A8B9B10C11C12A            |  |
| 冰糖橘 Bingtangju                           | 1B2B3B4A5B6C7A8C 9A10A11B12E           |  |
| 硬芦芦柑 Yinglu                              | 1D2A3B4B5A6C7C8B9C10A11C12A            |  |
| 黄岩椪柑 Huangyan ponkan                     | 1F2A3B4C5B6B7C8B9C10A11C12A            |  |
| 太田椪柑 Ota ponkan                          | 1C2A3B4B5A6C7C8B9C10A11C12A            | 13A14A                                   |
| 岩溪晚芦 Yanxiwanlu ponkan                   | 1C2A3B4B5A6C7C8B9C10A11C12A            | 13B14A                                   |
| 新生系 3 号 Ponkan varieties nucellar line 3 | 1C2A3B4B5A6C7C8B9C10A11C12A            | 13C14A                                   |
| 台湾椪柑 Taiwan ponkan                       | 1C2A3B4B5A6C7C8B9C10A11C12A            | 13D14A                                   |
| 兴津温州蜜柑 Okitsu                            | 1B2C3B4A5B6B7A8B9B10B11B12A            | 13E14A                                   |
| 宫川温州蜜柑 Miyagawa                          | 1B2C3B4A5B6B7A8B9B10B11B12A            | 13F14A                                   |
| 大浦温州蜜柑 Ooura                             | 1B2C3B4A5B6B7A8B9B10B11B12A            | 13G14A                                   |
| 宫本温州蜜柑 Miyamoto                          | 1B2C3B4A5B6B7A8B9B10B11B12A            | 13H14A                                   |
| 日南 1 号温州蜜柑 Nichinan 1                    | 1B2C3B4A5B6B7A8B9B10B11B12A            | 13I14A                                   |
| 清家脐橙 Seike                               | 1A2A3A4A5A6A7B8A9A10A11A12A            | 13J14A                                   |
| 朋娜脐橙 Skagss bonanza                      | 1A2A3A4A5A6A7 B8A9A10A11A12A           | 13K14A                                   |
| 纽荷尔脐橙 Newhall                            | 1A2A3A4A5A6A7B8A9A10A11A12A            | 13L14A                                   |
| 丰脐 Fengqi                                | 1A2A3A4A5A6A7B8A9A10A11A12A            | 13M14A                                   |
| 晚棱脐橙 Lanes late navel orange             | 1A2A3A4A5A6A7B8A9A10A11A12A            | 13N14A                                   |
| 北碚 447 锦橙 Beibei 447                     | 1A2A3A4A5A6A7B8A9A10A11A12A            | 13O14A                                   |
| 德尔塔夏橙 Delta                              | 1A2A3A4A5A6A7B8A9A10A11A12A            | 13P14A                                   |
| 奥林达夏橙 Olinda                             | 1A2A3A4A5A6A7B8A9A10A11A12A            | 13Q14A                                   |
| 塔罗科血橙 Tarocco blood orange               | 1A2A3A4A5A6A7B8A9A10A11A12A            | 13R14A                                   |
| 江津 78-1 锦橙 Jiangjin 78-1                 | 1A2A3A4A5A6A7B8A9A10A11A12A            | 13S14A                                   |
| 铜水 72-1 锦橙 Tongshui 72-1                 | 1A2A3A4A5A6A7B8A9A10A11A12A            | 13T14A                                   |
| 哈姆林甜橙 Hamlin                             | 1A2A3A4A5A6A7B8A9A10A11A12A            | 13U14A                                   |
| 铃木脐橙 Suzuki                              | 1A2A3A4A5A6A7B8A9A10A11A12A            | 13V14A                                   |
| 蜜奈夏橙 Midnight                            | 1A2A3A4A5A6A7B8A9A10A11A12A            | 13W14A                                   |
| Morocco blood orange                     | 1A2A3A4A5A6A7B8A9A10A11A12A            | 13X14A                                   |
| 路比血橙 Ruby blood orange                   | 1A2A3A4A5A6A7B8A9A10A11A12A            | 13Y14D                                   |
| 无核雪柑 Xuegan seedless                     | 1A2A3A4A5A6A7B8A9A10A11A12A            | 13E14A                                   |
| 柳叶橙 Liuyecheng                           | 1A2A3A4A5A6A7B8A9A10A11A12A            | 13S 14B                                  |
| 改良橙 Gailiangcheng                        | 1A2A3A4A5A6A7B8A9A10A11A12A            | 13E 14C                                  |

利用上述特征指纹图谱进行柑橘种苗纯度和真实性鉴定检测时,若人工逐一比对每个品种的凝胶图谱,既费力费时,又无法避免人为误差。因此,本研究以同一个 Marker 作参照,利用曹永生等<sup>[20]</sup>编写的具有对凝胶图谱自动识别功能的 Gel 2.0 软件包对各品种的 SSR 或 ISSR 凝胶图谱进行自动识别,将其转换成标准指纹模式图谱(图 3),从而建立了供试 70 个柑橘栽培品种(系)的指纹模式图谱数据库。

本研究中,各品种的凝胶图谱、特征指纹代码和指纹模式图谱构成了柑橘栽培品种的指纹图谱库,可作为判定柑橘种苗纯度和真实性的重要依据。在实际应用时,先利用特征引物对检测样品 DNA 进行 PCR 扩增并电泳显色,再利用指纹图谱自动识别系统 Gel 2.0 识别送检样品的凝胶图谱并将其转换成指纹模式图谱,然后利用该系统的自动比对功能,将检测样品的指纹模式图谱与模式图谱数据库中的数据进行自动比对,找到与之相匹配的带型,最后将送检样品扩增带型所对应的赋值代码按特定的引物顺序排列起来,与柑橘品种特征指纹代码进行比较,即可直观地判定出检测样品的品种名(或类别),从而判断送检种苗的纯度和真实性。



M: DNA marker DL2000; 1: 不知火; 2: 津之香; 3: 琯溪蜜柚; 4: 晚白柚; 5: 岩溪晚芦; 6: 太田椪柑; 7: 大浦温州蜜柑; 8: 纽荷尔脐橙; 9: 塔罗科血橙。1~9 为各个品种对应 3 对特征引物构成的指纹模式图谱  
M: DNA marker DL2000; 1: Shinanui; 2: Tsunokaori; 3: Guanxi pummelo; 4: Wanbai pummelo; 5: Yanxiwanlu ponkan; 6: Ota ponkan; 7: Oura; 8: Newhall; 9: Tarocco blood orange. 1-9 are standard model fingerprintings of nine cultivars with three specific primers respectively

图 3 利用 Gel 2.0 指纹图谱自动识别系统构建的部分柑橘品种标准指纹模式图谱

Fig. 3 The standard model fingerprinting of some citrus cultivars by using Gel 2.0

### 3 讨论

传统的品种鉴定多以形态学标记为依据,往往鉴定周期长,且易受环境条件的影响。与之相比,DNA 分子标记不受时空条件的限制,在农作物种子(种苗)

纯度和真实性鉴定中已显示出巨大的潜力,但在众多的 DNA 分子标记中如何选择,是一个值得思考的问题。就品种鉴定而言,其基本要求是简单、准确、快速及成本低廉。SSR 标记被认为是品种鉴定较为理想的标记之一。目前 SSR 标记已成功应用于苹果<sup>[21]</sup>、梨<sup>[22]</sup>及葡萄<sup>[23]</sup>等果树的品种鉴定,ISSR 标记在品种鉴定中也具有较大潜力。本研究结果表明,ISSR 标记具有较好的多态性,在部分亲缘关系较近的品种间能扩增出可重复的多态性谱带,这与 Fang 等<sup>[6]</sup>的研究结果一致。但 ISSR 标记对 PCR 反应条件的变化比 SSR 标记敏感,不同的引物需要对 PCR 条件作相应的调整才能获得最佳效果,对 DNA 及 Taq DNA 聚合酶的质量要求也较高。此外,本研究在构建该指纹图谱库的过程中特别注意 SSR 标记和 ISSR 标记的重复性,所用引物均经过 3 次以上的重复试验,各品种中出现的多态性谱带均能重复。

多数柑橘品种具有多胚性,存在珠心胚干扰现象。而且由于很多柑橘栽培品种不育或育性低,大部分柑橘新品种(特别是甜橙和温州蜜柑系列)是通过芽变选种育成,它们与起始品种的亲缘关系极其相近,即使利用分子标记技术也难以鉴别。本研究中筛选了 200 对 SSR 引物,结果仅 12 对 SSR 特征引物能鉴别 42 个品种(系)(甜橙和温州蜜柑品种(系)均未出现 SSR 特征指纹、椪柑中也仅有硬芦和黄岩椪柑这两个品种具有 SSR 特征指纹)。进一步对不具 SSR 特征指纹的 60 个品种(系)进行 ISSR 引物筛选,结果从 40 个 ISSR 引物中筛选到 2 个重复性好的多态性特征引物,结合 SSR 标记可鉴别出上述 60 个品种(系)中的 28 个品种。近年来,一些基于单个或多个核苷酸变异的第 3 代标记技术(如 SNP<sup>[24]</sup>、InDel<sup>[25]</sup>等)开始得到越来越广泛的应用,笔者正在用这些新型分子标记完善和验证柑橘品种指纹图谱数据库,为建立简便、准确、快速的柑橘种苗纯度和真实性鉴定技术体系和技术规范奠定基础。

### 4 结论

从 200 对 SSR 引物中筛选到 12 对重复性好、多态性丰富的 SSR 特征引物,利用这 12 对 SSR 特征引物组合可准确鉴别 102 个柑橘栽培品种(系)中的 42 个品种(系)。在此基础上,对 60 个不具有 SSR 特征指纹的柑橘品种(系)进行 ISSR 分析,从 40 个 ISSR 引物中筛选到 2 个 ISSR 特征引物,结合 SSR 标记可快速准确地鉴别 70 个柑橘的品种(系)。本研究最终



利用 12 对 SSR 特征引物和 2 个 ISSR 特征引物建立了供试 70 个柑橘栽培品种(系)的指纹模式图谱数据库,为利用分子标记技术快速准确地检测鉴定柑橘种苗纯度及真实性并制定相应技术规程奠定了良好的基础。

## References

- [1] Bretó M P, Ruiz C, Pina J A, Asins M J. The diversification of *Citrus clementina* Hort. ex Tan., a vegetatively propagated crop species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2001, 21: 285-293.
- [2] Fang D Q, Roose M L, Krueger R R, Federici C T. Fingerprinting trifoliolate orange germ plasm accessions with isozymes, RFLPs, and inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 95: 211-219.
- [3] 刘 勇, 孙中海, 刘德春, 吴 波, 陶建军. 柚类种质资源 AFLP 与 SSR 遗传多样性分析. 中国农业科学, 2005, 38(11): 2308-2315.  
Liu Y, Sun Z H, Liu D C, Wu B, Tao J J. Assessment of the genetic diversity of pummelo germplasms using AFLP and SSR markers. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(11): 2308-2315. (in Chinese)
- [4] 庞晓明, 胡春根, 邓秀新. 用 SSR 标记研究柑橘属及其近缘属植物的亲缘关系. 遗传学报, 2003, 30(1): 81-87.  
Pang X M, Hu C G, Deng X X. Phylogenetic relationships among citrus and its relatives as revealed by SSR markers. *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30(1): 81-87. (in Chinese)
- [5] 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). *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 112: 1519-1531.
- [6] Fang D Q, Roose M L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 95: 408-417.
- [7] Róder M S, Wendehake K, Korzun V, Bredemeijer G, Laborie D, Bertrand L, Isaac P, Rendell S, Jackson J, Cooke R J, Vosman B, Ganal M W. Construction and analysis of a microsatellite-based database of European wheat varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 106: 67-73.
- [8] 李根英, Dreisigacker S, Warburton M L, 夏先春, 何中虎, 孙其信. 小麦指纹图谱数据库的建立及 SSR 标记试剂盒的研发. 作物学报, 2006, 32(12): 1771-1778.  
Li G Y, Dreisigacker S, Warburton M L, Xia X C, He Z H, Sun Q X. Development of a fingerprinting database and assembling an SSR reference kit for genetic diversity analysis of wheat. *Acta Agronomica Sinica*, 2006, 32(12): 1771-1778. (in Chinese)
- [9] 王立新, 李云伏, 常利芳, 黄 岚, 李宏博, 葛玲玲, 刘丽华, 姚 骥, 赵昌平. 建立小麦品种 DNA 指纹的方法研究. 作物学报, 2007, 33(10): 1738-1740.  
Wang L X, Li Y F, Chang L F, Huang L, Li H B, Ge L L, Liu L H, Yao J, Zhao C P. Method of ID constitution for wheat cultivars. *Acta Agronomica Sinica*, 2007, 33(10): 1738-1740. (in Chinese)
- [10] Bredemeijer G M M, Cook R J, Ganal M W, Peeters R, Issac P, Noordijk Y, Rendll S, Jackson J, Róder M S, Wendehake K, Dijcks M, Amelaine M, Wickaert V, Bertrand L, Vosman B. Construction and testing of microsatellite database containing more than 500 tomato varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 105: 1019-1026.
- [11] 庄杰云, 施勇烽, 应杰政, 鄂志国, 曾瑞珍, 陈 洁, 朱智伟. 中国主栽水稻品种微卫星标记数据库的初步构建. 中国水稻科学, 2006, 20(5): 460-468.  
Zhuang J Y, Shi Y F, Ying J Z, E Z G, Zeng R Z, Chen J, Zhu Z W. Construction and testing of primary microsatellite database of major rice varieties in China. *Chinese Journal of Rice Science*, 2006, 20(5): 460-468. (in Chinese)
- [12] Kijas J M, Fowler J C, Thomas M R. An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within *Citrus* and related species. *Genome*, 1995, 38: 349-355.
- [13] Kijas J M, Thomas M R, Fowler J C, Roose M L. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of *Citrus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 94: 701-706.
- [14] Chen C X, Zhou P, Choi Y A, Huang S, Gmitter Jr F G. Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 112: 1248-1257.
- [15] Ahmad R, Struss D, Southwick S M. Development and characterization of microsatellite markers in *Citrus*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2003, 128: 584-590.
- [16] Valdenice M N, Mariangela C, Alessandra A S, Marcos A M. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Genetics and Molecular Biology*, 2006, 29(1): 90-96.
- [17] 江 东, 钟广炎, 洪棋斌. 柑橘 EST-SSR 分子标记分析. 遗传学报, 2006, 33(4): 345-353.  
Jiang D, Zhong G Y, Hong Q B. Analysis of microsatellites in citrus unigenes. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33(4): 345-353. (in Chinese)
- [18] 吴 鑫, 雷天刚, 何永睿, 刘小丰, 许兰珍, 彭爱红, 陈善春. 柑橘 SRAP 和 ISSR 分子标记技术体系的建立与优化. 分子植物育种, 2008, 6(1): 170-176.  
Wu X, Lei T G, He Y R, Liu X F, Xu L Z, Peng A H, Chen S C. Establishment and optimization of SRAP and ISSR marker system in *Citrus*. *Molecular Plant Breeding*, 2008, 6(1): 170-176. (in Chinese)

- [19] Anderson J A, Churchill Ghurchill G A, Autrique J E, Tanksley S D, Scorells M E. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, 1993, 36: 181-186.
- [20] 曹永生, 孔繁胜, 王宇生. 基于图象处理的种质资源指纹图谱分析(OL), 中国作物种质信息网. <http://icgr.caas.net.cn/training/forum/> 基于图象处理的种质资源指纹图谱分析. htm. Cao Y S, Kong F S, Wang Y S. Fingerprint analysis system of crop germplasm resources(OL). Chinese crop germplasm resources information system. [http://icgr.caas.net.cn/training/forum/Fingerprint Analysis System of Crop Germplasm Resources.htm](http://icgr.caas.net.cn/training/forum/Fingerprint%20Analysis%20System%20of%20Crop%20Germplasm%20Resources.htm). (in Chinese)
- [21] 蔡青, 姜立杰, 张晓明, 闫国华, 张开春, 曹玉芳, 马焕普. 苹果主栽品种的 SSR 分子标记鉴别. *中国农学通报*, 2007, 23(7): 129-134. Cai Q, Jiang L J, Zhang X M, Yan G H, Zhang K C, Cao Y F, Ma H P. Identification of apple varieties with SSR molecular markers. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2007, 23(7): 129-134. (in Chinese)
- [22] 曹玉芳, 刘凤之, 高源, 姜立杰, 王昆, 马智勇, 张开春. 梨栽培品种 SSR 鉴定及遗传多样性. *园艺学报*, 2007, 34(2): 305-310. Cao Y F, Liu F Z, Gao Y, Jiang L J, Wang K, Ma Z Y, Zhang K C. SSR analysis of genetic diversity of pear cultivars. *Acta Horticulturae Sinica*, 2007, 34(2): 305-310. (in Chinese)
- [23] This P, Jung A, Boccacci P, Borrego J, Botta R, Costantini L, Crespan M, Dangl G S, Eisenheld C, Ferreira-Monteiro F, Grando S, Ibanez J, Lacombe T, Laucou V, Magalhaes R, Meredith C P, Milani N, Peterlunger E, Regner F, Zulini L, Maul E. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 109: 1448-1458.
- [24] Yoon M S, Song Q J, Choi I Y, Specht J E, Hyten D L, Cregan P B. BARCSoySNP23: a panel of 23 selected SNPs for soybean cultivar identification. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 114: 885-899.
- [25] Cai X X, Liu J, Qiu Y Q, Zhao W, Song Z P, Lu B R. Differentiation of Indica-Japonica rice revealed by insertion/deletion (InDel) fragments obtained from the comparative genomic study of DNA sequences between 93-11 (Indica) and Nipponbare (Japonica). *Frontiers of Biology in China*, 2007, 2(3): 293-296.

(责任编辑 曲来娥)