

柚类种质资源 AFLP 与 SSR 遗传多样性分析

刘 勇^{1,2}, 孙中海¹, 刘德春², 吴 波², 陶建军¹

(¹华中农业大学柑桔研究所, 武汉 430070; ²江西农业大学农学院, 南昌 330045)

摘要: 结合 SSR 引物和 AFLP 分子标记对 110 份柚类基因型、12 份野生近缘种进行遗传多样性研究。结果表明, SSR 标记的 335 个位点中 99.1% 为多态性位点, 每个位点可检测到 9.85 个等位基因, 基因多样性 (GD) 变幅为 0.1939 ~ 0.9073, 获得了 46 个特异性 SSR 标记; AFLP 标记的 343 个位点中 72% 为多态性位点, 3 对引物平均期望杂合度变幅为 0.21863 ~ 0.28445, 平均每对引物组合能产生 82 个多态位点, 获得了 44 个 AFLP 特异性标记。UPGMA 聚类结果显示, 122 份基因型在相似系数 0.61 时, 分成 8 个组群, 其中柚类主要由沙田柚品种群、文旦品种群与庞大的杂种柚品种群组成。分类结果将有利于更好地利用这些丰富的育种资源。

关键词: 柚类; 种质资源; 遗传多样性; SSR; AFLP

Assessment of the Genetic Diversity of Pummelo Germplasms Using AFLP and SSR Markers

LIU Yong^{1,2}, SUN Zhong-hai¹, LIU De-chun², WU Bo², TAO Jian-jun¹

(¹Citrus Research Institute, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070; ²College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045)

Abstract: Genetic diversity of 110 pummelo germplasm and 12 its relatives were analyzed by SSR and AFLP. Approximately 99.1% of the 335 SSR were polymorphic, and 9.85 alleles per SSR loci were identified. Gene diversity values changed from 0.1939 to 0.9073, and 46 SSR polymorphic bands were scored. 72% of the 343 AFLP were polymorphic, and 82 polymorphic loci per AFLP were identified. Heterozygosity changed from 0.21863 to 0.28445, and 44 AFLP polymorphic bands were scored. The UPGMA result showed that 122 accessions of pummelo and their relatives were divided into eight groups, in which the pummelo genotypes mainly be composed of Shatian pummelo varieties group, Wendan pummelo varieties group and many hybrid pummelo groups. The classified result is beneficial for us to use various target varieties to widen the genetic background of pummelo.

Key words: Pummelo (*Citrus grandis* Osbeck); Germplasm resource; Genetic diversity; SSR; AFLP

中国是柚类 (*Citrus grandis* Osbeck) 主要起源中心和遗传变异中心之一, 种质资源尤其丰富^[1]。由于柚类为单胚性, 在复杂的生态条件下, 长期以来演化形成了极其丰富的遗传多样性。至今人们对该种质资源的演化关系及品种间系统关系了解不多。前人对柚类种质资源多样性研究曾借助形态和农艺性状^[2]、细胞核型分析^[3]、同工酶^[4]的生化标记等方法, 但因受敏感的生态环境, 以及这些方法极为有限的标记数量与因素影响, 使柚类遗传多样性研究一直受到限制。

近年来, 不受环境影响的 DNA 分子标记, 如 ISSR^[5]、RAPD^[6]等, 也已在部分柚类遗传变异研究中得到应用。AFLP 是一种基于 PCR 的高分辨 DNA 指纹分析方法, 与其它标记技术相比, 具有相对高效、快速、可靠、多态性丰富等特点。SSR 为共显性分子标记, 具有多态性极为丰富和 PCR 扩增结果重现性高的优点, 被认为是研究群体遗传变异最好的标记之一。

本研究在前人研究基础上, 结合 AFLP 和 SSR 分子标记, 评估 122 份柚类种质资源及近缘种分子系统

收稿日期: 2005-03-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30070528) 和教育部优秀青年教师基金项目资助

作者简介: 刘 勇(1965-), 男, 江西湖口人, 副教授, 主要从事柑桔分子育种与种质资源研究。孙中海为通讯作者, Tel: 027-87282433; E-mail: sunzxm@public.wh.hb.cn

关系, 探讨国内外柚品种间的遗传距离与亲缘关系, 为中国柚类种质资源收集保存、分类鉴定、合理开发利用与品种选育提供科学的理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

122 份柚类及近缘种由中国农业科学院柑桔研究

所、江西省农业科学院园艺研究所和广东省梅县柚类资源圃等单位提供 (表 1), 其中选择柚类近缘种红河大翼橙、井冈野生大翼橙、宜昌橙、野生桔类等外类群作参照, 以更好地确定柚类品种间的遗传关系。

1.2 DNA 提取与检测

参照程运江等^[7]的方法提取幼叶总 DNA, Ultrospec 2100 紫外扫描仪检测 DNA 浓度和质量, 将

表 1 供试柚及近缘种种质材料
Table 1 Pummeloes and their relatives

序号 No.	种质 Germplasm	材料来源 Source	序号 No.	种质 Germplasm	材料来源 Source
1	东试早 Dongshizao	云南 Yunnan, China	62	脐柚 Qiyou	四川 Sichuan, China
2	曼赛龙柚 Mansailongyou	云南 Yunnan, China	63	世界蜜柚 Shijiemiyou	泰国 Thailand
3	勐伦早柚 Menglunzaoyou	云南 Yunnan, China	64	新引越南实生柚 Xinyinyuenanyou	越南 Vietnam
4	五布红心柚 Wubuhongxinyou	四川 Sichuan, China	65	缅甸柚 Miandianyou	缅甸 Burma
5	夔府红心柚 Guifuhongxinyou	重庆 Chongqing, China	66	暹罗蜜柚 Xianluomiyou	泰国 Thailand
6	金堂薄皮柚 Jintangbopiyou	四川 Sichuan, China	67	早熟暹罗蜜柚 Zaoshuxianluomiyou	泰国 Thailand
7	蓬溪柚 pengxiyou	重庆 Chongqing, China	68	越南小甜柚 Yuenanxiaotianyou	越南 Vietnam
8	梁沙柚 Liangshayou	重庆 Chongqing, China	69	汤姆逊葡萄柚 Thompson grapefruit	美国 U.S.A
9	梁平柚 1 号 Liangpingyou .1	重庆 Chongqing, China	70	马叙葡萄柚 Mash grapefruit	美国 U.S.A
10	通贤柚 Tongxianyou	四川 Sichuan, China	71	星路比葡萄柚 StarRuby grapefruit	美国 U.S.A
11	舒化柚 Shuhuaiyou	四川 Sichuan, China	72	HB 柚 HB pomelo	美国 U.S.A
12	梅垮柚 Meiwanyou	四川 Sichuan, China	73	日本红囊柚 Ribenhongnangyou	日本 Japan
13	合江柚 Hejiangyou	重庆 Chongqing, China	74	美国橙柚 Meiguochengyou	美国 U.S.A
14	早熟红心沙田柚 Zaoshuhongxinshatianyou	四川 Sichuan China	75	泰国蜜柚 Taiguomiyou	泰国 Thailand
15	北碚柚 Beibeiyou	重庆 Chongqing, China	76	奥克布兰柚 Oroblanco	美国 U.S.A
16	段氏柚 Duanshiyou	重庆 Chongqing, China	77	非洲柚 Africa pomelo	南非 South Africa
17	黄沙岩白心 3 号 Huangshayanbaixin 3	重庆 Chongqing, China	78	强德勒柚 Chandler	美国 U.S.A
18	江北无核 Jiangbeiwuhe	重庆 Chongqing, China	79	南康蔡家柚 Nankangcaijiayou	江西 Jiangxi, China
19	垫江团墩红心柚 Dianjiangtuandunhongxi	重庆 Chongqing, China	80	新干沙田柚 Xinganshatianyou	江西 Jiangxi, China
20	垫江曾家白心柚 Dianjiangzengjiabaixinyu	重庆 Chongqing, China	81	泰和沙田柚 Taiheshatianyou	江西 Jiangxi, China
21	梁平柚 2 号 Liangpingyou 2	重庆 Chongqing, China	82	江坝柚 Jiangbayou	江西 Jiangxi, China
22	垫江周家白心柚 Dianjiangzhoujiabaixinyu	重庆 Chongqing, China	83	新干酸柚 Xingansuanyou	江西 Jiangxi, China
23	垫江团墩白心 5 号 Dianjiatuandunbaixin 5	重庆 Chongqing, China	84	吉安无核沙田柚 Jianwuheshatianyou	江西 Jiangxi, China
24	福元红心柚 Fuyuanhongxinyou	四川 Sichuan, China	85	三江柚 Sanjiangyou	江西 Jiangxi, China
25	锅魁柚 Guokuiyou	四川 Sichuan, China	86	硬枝沙田柚 Yingzhishatianyou	江西 Jiangxi, China
26	冬瓜圈沙田柚 Dongguaquanshatianyou	重庆 Chongqing, China	87	文林柚 Wenlinyong	江西 Jiangxi, China
27	古老钱沙田柚 Gulaoqianshatianyou	重庆 Chongqing, China	88	西街 80Xijie 80	江西 Jiangxi, China
28	太极图柚 Taijityou	四川 Sichuan, China	89	龙回早熟柚 Longhuizaoshuyou	江西 Jiangxi, China
29	梁平柚 3 号 Liangpingyou 3	重庆 Chongqing, China	90	南康沙田柚 Nankanshatianyou	江西 Jiangxi, China
30	脆柚 Cuiyou	重庆 Chongqing, China	91	毛桔红柚 Maojuhongyou	江西 Jiangxi, China
31	金堂绿柚 Jintanglüyou	四川 Sichuan, China	92	金兰柚 Jinlanyou	江西 Jiangxi, China
32	江津红心柚 Jiangjinhongxinyou	重庆 Chongqing, China	93	泰和沙田柚 1 号 Taiheshatianyou 1	江西 Jiangxi, China
33	菊花心沙田柚 Juhuaxinshatianyou	重庆 Chongqing, China	94	泰和沙田柚 2 号 Taiheshatianyou2	江西 Jiangxi, China
34	夏沙龙柚 Xiashalongyou	四川 Sichuan, China	95	软枝沙田柚 Ruanzhishatianyou	江西 Jiangxi, China
35	金堂无核柚 Jintangwuheyong	四川 Sichuan, China	96	狮头柚 Shitouyou	江西 Jiangxi, China
36	秭归甜柚 Ziguitianyou	湖北 Hubei, China	97	信木柚 Xinmuyong	江西 Jiangxi, China
37	中华紫皮柚 Zhonghuazipiyong	湖北 Hubei, China	98	马家柚 Majiayong	江西 Jiangxi, China
38	安江香柚 Anjiangxiangyou	湖南 Hunan, China	99	金沙柚 4 号 Jinshayou 4	江西 Jiangxi, China
39	金香柚 Jinxiangyou	湖南 Hunan, China	100	金沙柚 2 号 Jinshayou 2	江西 Jiangxi, China

续表 1 Continue

序号 No.	种质 Germplasm	材料来源 Source	序号 No.	种质 Germplasm	材料来源 Source
40	白玉霜 Baiyushuang	湖南 Hunan, China	101	丰城红囊柚 Fengchenghongnangyou	江西 Jiangxi, China
41	菊花心柚 Juhuaxinyou	湖南 Hunan, China	102	练家柚 Lianjiayou	江西 Jiangxi, China
43	永嘉早香柚 Yongjiagozaixiangyou	浙江 Zhejiang, China	104	鹅蛋柚 Edanyou	江西 Jiangxi, China
44	四季抛 Sijipao	浙江 Zhejiang, China	105	新干特早柚 Xingantezaoyou	江西 Jiangxi, China
45	楚门文旦 Chumenwendan	浙江 Zhejiang, China	106	金沙柚 Jinshayou	江西 Jiangxi, China
46	胡柚 Huyou	浙江 Zhejiang, China	107	斋婆柚 Zhaipoyou	江西 Jiangxi, China
47	龙柚 1 号 Longyou 1	福建 Fujian, China	108	崇义野冬柑 Chongyiyedonggan	江西 Jiangxi, China
48	琯溪蜜柚 Guanximiyou	福建 Fujian, China	109	四方柚 Sifangyou	江西 Jiangxi, China
49	坪山柚 Pingshanyou	福建 Fujian, China	110	谢家柚 Xiejiayou	江西 Jiangxi, China
50	福建文旦 Fujianwendan	福建 Fujian, China	111	井岗野生大翼橙 <i>Citrus macroptera</i>	江西 Jiangxi, China
51	梅州沙田柚 Meizhoushatianyou	广东 Guangdong, China	112	崇义野生桔 <i>Citrus reticulata</i>	江西 Jiangxi, China
52	梅州酸柚 Meizhousuanyou	广东 Guangdong, China	113	红河大翼橙 1 号 <i>Citrus hongheensis</i>	云南 Yunnan, China
53	斗柚 Douyou	广东 Guangdong, China	114	红河大翼橙 2 号 <i>Citrus hongheensis</i>	云南 Yunnan, China
54	水晶柚 Shuijingyou	广东 Guangdong, China	115	红河大翼橙 3 号 <i>Citrus hongheensis</i>	云南 Yunnan, China
55	白芽柚 Baiyayou	广东 Guangdong, China	116	宜昌橙 1 号 <i>Citrus yichangensis</i>	湖北 Hubei, China
56	梅花早柚 Meihuazaoyou	广东 Guangdong, China	117	宜昌橙 2 号 <i>Citrus yichangensis</i>	湖北 Hubei, China
57	岭南沙田柚 Lingnanshatianyou	广西 Guangxi, China	118	莽山野桔 <i>Citrus mangshanensis</i>	湖南 Hunan, China
58	晚白柚 Wanbaiyou	台湾 Taiwan, China	119	立花桔 <i>Citrus tachibana</i>	日本 Japan
59	孟谷文旦 Mengguwendan	台湾 Taiwan, China	120	印度野桔 <i>Citrus indica</i>	印度 India
60	宜安矮柚 Yianwoyou	越南 Vietnam	121	道县野桔 1 号 <i>Citrus daoxianensis</i>	湖南 Hunan, China
61	8030 Pummelo	尼泊尔 Nepal	122	道县野桔 2 号 <i>Citrus daoxianensis</i>	湖南 Hunan, China

DNA 浓度稀释至 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, -20°C 保存备用。

1.3 SSR 与 AFLP 分析

1.3.1 SSR 的 PCR 反应 SSR 分析按照 Kijas 等^[8]并做适当修改。PCR 扩增采用 $20 \mu\text{l}$ 反应体系, 包括 50 ng 的总 DNA, $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$, $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ dNTP}$, 1.0 U Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa), 各 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的双向引物。PCR 扩增程序: 94°C 5 min, 94°C 60 s, 55°C 30 s, 72°C 60 s, 35 个循环, 最后 72°C 延伸 10 min。反应在 PTC-200 Peltier Thermal Cycler 上进行。

1.3.2 AFLP 的 PCR 反应 AFLP 试验程序参考 Vos^[9]方法。总 DNA 以 *EcoR* I 和 *Mse* I 进行双酶切, 然后加入 *EcoR* I 和 *Mse* I 接头和 T_4 DNA 连接酶, 25°C 连接 2 h。酶切连接产物稀释 10 倍进行预扩增, PCR 反应程序为 20 个循环: 94°C 30 s, 56°C 1 min, 72°C 1 min, 扩增反应在 PTC-200 Peltier Thermal Cycler 上进行。扩增结束后将反应混合液稀释 50 倍, 用作下一步选择性扩增的模板; PCR 反应程序为, 第 1 轮循环: 94°C 30 s, 65°C 30 s, 72°C 1 min; 第 2~13 轮循环, DNA 退火温度每次递减 0.7°C , 其余步骤用第 1 轮循环; 第 14~36 循环, 退火温度为 56°C , 其余步骤用第 1 轮循环。

1.3.3 PAGE 检测 6%聚丙烯酰胺变性凝胶电泳分离选择性扩增产物, 然后银染显色, 方法参见文献^[10]。

1.4 数据统计分析

分别以 1 和 0 记录谱带的有无, 将原始数据输入计算机获得矩阵, 计算各位点在总样本中的基因多样性 (GD); 用 NTSYS-PC2.10e 软件计算相似系数, 获得相似系数矩阵, 用其中 SAHN 程序和 UPGMA 方法进行聚类分析, 并利用该软件对 AFLP 与 SSR 引物扩增聚类结果分别同 SSR、AFLP 单独扩增聚类结果进行 Mantel^[11]相关性检测; 用 AFLPsurv 软件计算 5% 水平多态性位点数、多态性位点百分率、预期杂合度。

2 结果与分析

2.1 122 份柚类资源及近缘种的 SSR 和 AFLP 扩增效率及多态性

利用 5 个遗传差异较大的材料对 49 对 SSR 引物^[8,12,13] (分别来自 ranger 酸橙与枳橙杂交后代、华盛顿脐橙基因组) 进行了筛选, 选出 31 对带型清晰、多态性较好的引物, 对 122 份基因型进行多态分析, 共扩增出 335 条带, 其中多态性条带 332 条, 多态性比率高达 99.1%, 扩增片段大小在 90~355 bp 之间, 平

均每对引物多态性带 10.7 条,平均每个位点 9.85 个等位基因, 在检测的所有位点上基因多样性变幅为 0.1939(CMS8)~0.9073(TAA27), 平均基因多样性为

0.7085 (表 2, 图 1)。统计结果表明, 122 份基因型中有 14 份产生了 46 个特异性遗传标记。

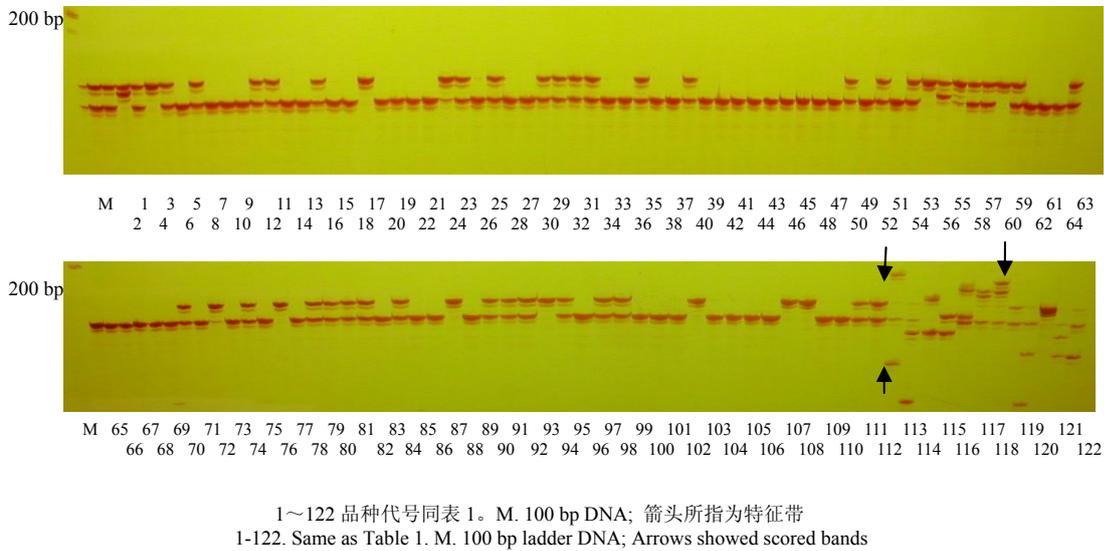


图 1 SSR 引物 CAT01 对 122 份柚类及近缘种的扩增图谱

Fig. 1 Electrophoretic patterns of 122 pummeloes and their relatives with SSR primer CAT01(genotypes)

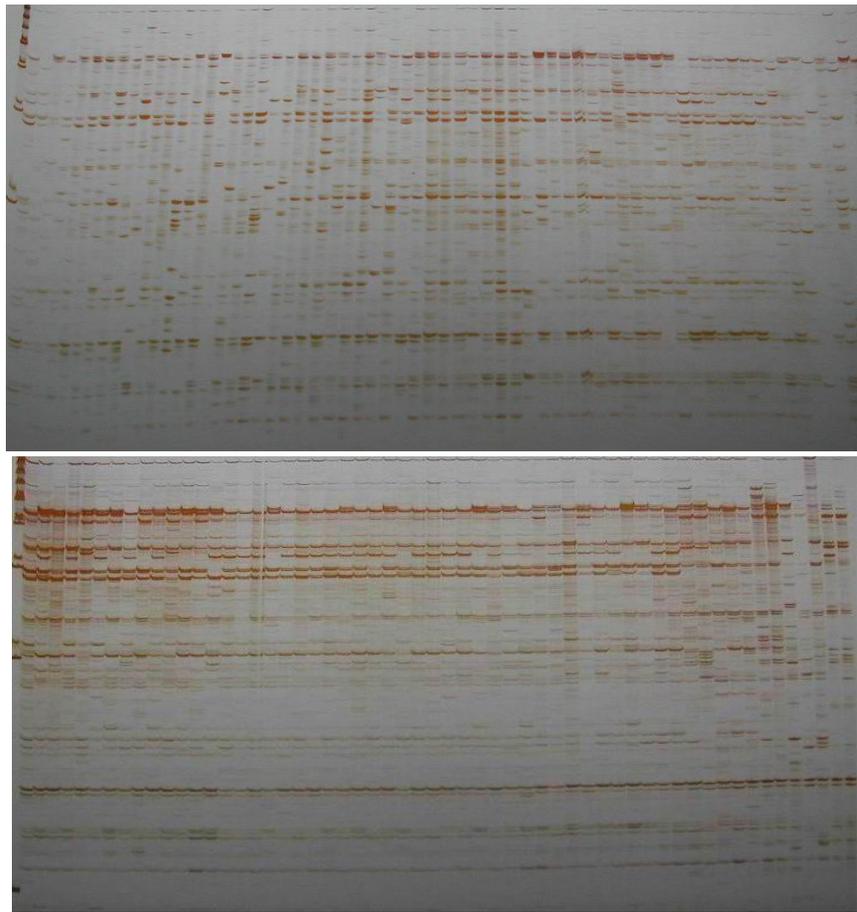
表 2 SSR 引物及等位基因数、片段大小、GD 值

Table 2 SSR primers, allelic loci, size range and values of gene diversity(GD)

编号 No.	SSR 引物 SSR primer	等位基因数 No.of alleles	片段大小 Size range(bp)	基因多样性 GD	编号 No.	SSR 引物 SSR primer	等位基因数 No.of alleles	片段大小 Size range(bp)	基因多样性 GD
1	CCT01	5	150~180	0.5741	17	CMS14	19	132~191	0.8603
2	CAT01	17	100~200	0.7767	18	CMS24	16	123~169	0.8739
3	CAGG9	6	80~135	0.4646	19	TAA33	14	120~180	0.8859
4	CT21	12	150~180	0.7922	20	CMS30	15	146~170	0.8753
5	CT19	13	150~230	0.8486	21	AG14	9	150~180	0.7146
6	ATC09	10	180~200	0.6628	22	TAA1	4	161~188	0.6324
7	TAA15	14	165~245	0.6106	23	TAA3	11	155~270	0.4459
8	TAA45	14	90~355	0.805	24	CMS31	15	156~229	0.8125
9	CMS10	3	161~175	0.6663	25	CMS21	15	120~237	0.7007
10	CMS7	8	144~355	0.6957	26	CMS20	13	154~273	0.8393
11	TAA41	22	140~350	0.8307	27	CMS39	12	204~255	0.7904
12	TAA27	15	180~260	0.9073	28	CMS45	7	186~198	0.81
13	GT03	15	115~235	0.8531	29	CMS46	4	179~193	0.1939
14	CMS8	2	140~148	0.4994	30	CMS47	10	162~194	0.7595
15	CT02	6	145~175	0.7503	31	CAC23	5	250~275	0.5598
16	CAC15	4	151~173	0.4708					

另外, 笔者使用 4 份形态差异较大的基因型从 42 对 AFLP 选择性引物组合中筛选出 3 对能产生较多清晰扩增带信号强度一致性好、条带分布比较均匀的多态性带引物。3 对引物组合在 122 份基因型中共扩增出 343 条带, 其中多态性位点数 246 个, 多态性位点

比例平均为 72%, 平均每对引物能产生 82 个 5%水平多态性位点数。统计表明, 15 份基因型有 44 个 AFLP 特异性标记。3 对引物产生的平均期望杂合度变幅为 0.21863~0.28445, 平均值为 0.2445。品种间区分率达到 100% (表 3, 图 2)。



第1幅图从左到右为Marker,1~65; 第2幅图从左到右为Marker,66~122。品种代号同表1
The first fig from left to right is Marker,1-65; The second fig from left to right is Marker,66-122; See names of genotypes in Table 1

图2 AFLP引物E-ACT/M-CTC对122份试材扩增图谱

Fig. 2 Electrophoretic patterns of 122 genotypes with AFLP primer E-ACT/M-CTC

表3 122份供试材料AFLP带型遗传变异分析

Table 3 Genetic variability analysis of the AFLP banding patterns among the 122 accessions studied

引物组合 Primer combination	总带数 Total band number	多态性带比率 Polymorphic bands	多态性百分率 Percentage of polymorphic bands(%)	特征带 Scored bands	预期杂合度 Heterozygosity
E-ACG/M-CTA	118	93	78.8	13	0.28445
E-ACG/M-CGA	102	68	66.7	16	0.21863
E-ACT/M-CTC	123	85	69.1	15	0.2305

2.2 122份柚类资源及近缘种的UPGMA聚类结果

将335个SSR标记和343个AFLP标记进行合并,采用非加权类平均法(UPGMA)聚类分析,678个位点的谱带数据组成原始矩阵,计算两两质间的相似系数。聚类分析图显示(图3),相似系数0.61时为临界值,可将所有试材分成8个组群,第I组群为柚类(110个品种),第II组群为红河大翼橙类(3个种类),第III组为井冈野生大翼橙(1个种类),第IV组为宜昌橙类(2个种类),第V组为崇义野生桔、

道县野桔1与道县野桔2等3个种类,第VI组为立花桔,第VII组为印度野桔,第VIII组为莽山野桔。

第I组柚类在相似系数0.67时,又可分成7小组,世界蜜柚与美国橙柚2个种间杂种柚组成第1小组,由二倍体无酸柚和四倍体白肉葡萄柚杂交的三倍体奥克布兰柚为单独第2小组,果型近圆形的夏沙龙柚与越南小甜柚聚成第3小组,江西两个地方品种崇义野冬柑与马家柚组成第4小组,马叙葡萄柚与星路比葡萄柚集成第5组,四川的蓬溪柚为第6小组,其余100

个柚基因型组成第 7 小组。其中第 7 小组，在相似系数 0.71 时，可分成 10 组，江西信木柚、浙江胡柚、湖北的中华紫皮柚、新引越南实生柚、金沙柚 4 号等杂种柚分别各成一类，种间杂种鹅蛋柚与江西新干酸柚、四川的太极图柚与江西的丰城红囊柚、非洲柚与勐伦早柚分别组成一类，柱头败育型毛橘红柚与湖南棉絮柚、美国强德勒柚聚成一类，其余 86 个聚成一类。在相似系数 0.74 时，86 个柚类又分成 8 小组，浙江四季抛与湖南杂种柚类型白玉霜各单独成一小组，锅魁柚、秭归甜柚与金堂绿柚，金堂薄皮柚、菊花心柚、江北无核与金堂无核柚，梅湾柚、金香柚、孟谷文旦、北碚柚与脐柚，8030、早熟暹罗蜜柚、暹罗蜜柚、HB 柚与西街 80 号，各成一小组，汤姆逊葡萄柚与黄沙岩白心 3 号、垫江周家白心柚、垫江曾家白心柚、垫江团墩白心 5 号等文旦柚品种群聚在一起成一小组，其余 62 个柚成为一小组。

在相似系数 0.78 时，上小组 62 个柚可分成 7 个组，梁沙柚与南康蔡家柚 2 个沙田柚为第一组，广东梅县的白芽柚单独一组，果型尖圆形的江西南康江坝柚、谢家柚与梅县水晶柚、金兰柚及其后代文林柚成为一组，舒化柚、早熟红心沙田柚与安江香柚为一组，云南的东试早、曼赛龙柚与四川梁平柚 1、2 号及缅甸柚为一组，江西的斋婆柚与福建漳州文旦柚及其演化的后代通贤柚、琯溪蜜柚、永嘉早香柚、龙柚 1 号、楚门文旦、梁平柚 3 号等文旦品种群聚成一组，其余 38 个柚基因型又可在相似系数 0.80 时分成 4 组，五布红心柚单独一组，斗柚、宜安倭柚与泰国蜜柚为一组，台湾的晚白柚与红心柚系列夔府红心柚、垫江团墩红心柚、福元红心柚、坪山柚为一组，聚类图上数字排列 13~106 的合江柚、梅州金柚、岭南沙田柚到金沙柚等 29 个柚类基因型全部聚在一起成为以沙田柚实生后代或芽变或枝变为主要的沙田柚品种群。

2.3 遗传差异分析

遗传距离的计算结果表明，不同种及不同品种间的基因型差异不同。外类群野生桔类与柚类有较大的遗传距离，其中莽山野桔与汤姆逊葡萄柚遗传距离高达 0.7556；外类群中红河大翼橙类与柚类遗传距离最近，其中红河大翼橙 3 号与广东梅县的斗柚遗传距离为 0.3506。在柚类品种群中，沙田柚实生或无性后代遗传距离普遍较小，新干沙田柚与南康沙田柚遗传距离最小 (0.0747)，美国橙柚与夏沙龙柚遗传距离最大 (0.455)。国外名柚缅甸柚与中国梁平柚 1、2 号遗传距离很近，与梁平柚 2 号遗传距离为 0.1326；日

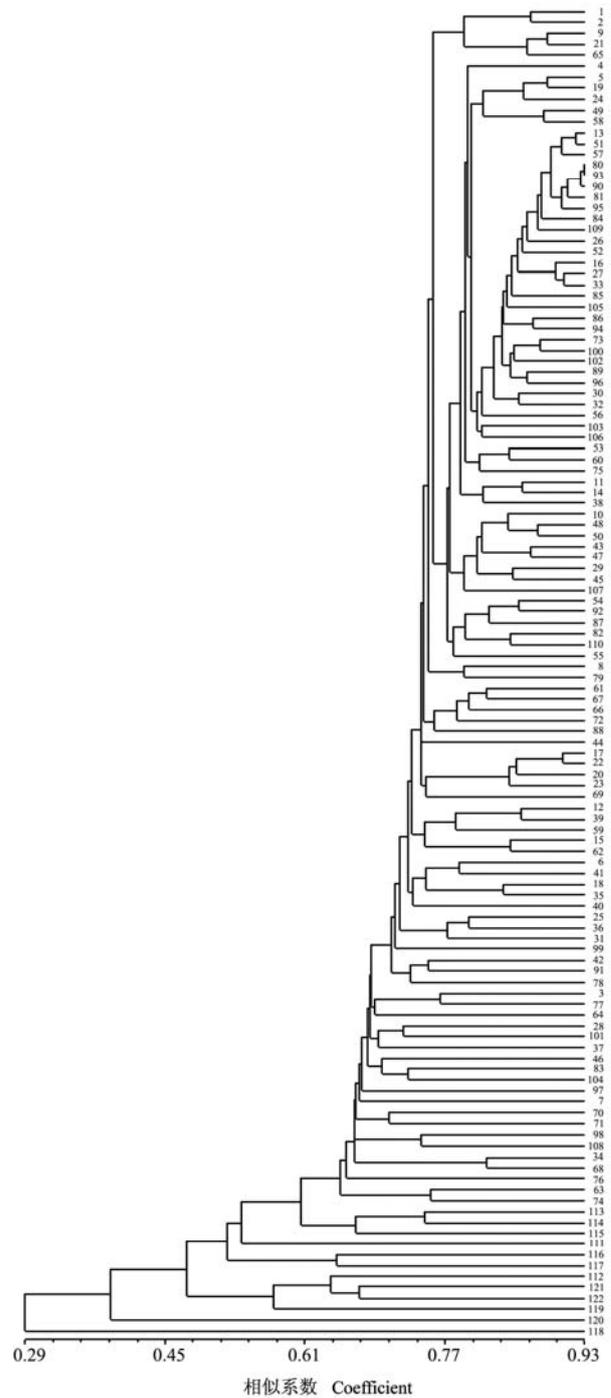


图 3 122 份柚及近缘种 UPGMA 聚类图

Fig.3 Dendrogram of cluster analysis for 122 pummelo genotypes and their related varieties based on AFLP and SSR markers

本红囊柚与金沙柚 2 号遗传距离最近 (0.1233)；尼泊尔 8030 柚与早熟暹罗蜜柚遗传距离最近 (0.185)；南非的非洲柚与云南的勐伦早柚遗传距离较近 (0.2381)。

3 讨论

3.1 比较 SSR、AFLP 标记扩增效率, 可以反映出两者标记的差异性。本研究利用 SSR 标记获得了 99.1% 多态性, 高于利用 RAPD^[6]对 79 份柚种质及近缘种 81.71% 的多态性, 也高于本试验 AFLP 检测到的 72% 多态性。充分说明, SSR 标记比其它分子标记更具有丰富的多态性; 尽管 AFLP 标记多态性百分率低于 SSR 但是 AFLP 每对引物监测到多态性带 (82 条) 明显高于 SSR 每对引物检测到的多态性带数量 (10.7 条)。因此, 也可以证明 AFLP 是快速、高效的引物标记。

一般果树遗传多样性研究多采用 SSR 或 AFLP 单独分析, 但是前人研究中, 也有合并使用 AFLP 和 SSR 标记进行分析的^[14,15]。本试验中用 Mantel 相关性检测 SSR、AFLP 标记分别对 122 个基因型产生的遗传相似系数矩阵, 2 种标记聚类图 (资料未列出) 相似性 $r=0.81732$, 根据 Mantel 检测标准^[16]SSR 与 AFLP 标记匹配良好。笔者再次把 SSR 和 AFLP 合并后聚类分析的相似系数矩阵分别与 SSR、AFLP 标记结果进行 Mantel 比较, 相关系数分别为 0.94562、0.95918, 对照检测标准, 两两间都非常匹配。因此认为, 结合 SSR 与 AFLP 标记分析会产生更合理的分类结果。

3.2 葡萄柚(*Citrus paradisi* Macf.)是多胚品种, 目前所知的品种都来源于无性系, 类群内的遗传变异性与自然突变有关^[17]。方德秋等^[4]曾通过同工酶分析证实, 葡萄柚与柚类关系极为密切。本试验采用 SSR 标记及合并后的标记都表明汤姆逊葡萄柚品种从葡萄柚中分离出来, 与垫江白心柚系列聚在一起, 这种现象在 Corazza-Nunes 等^[18]采用 RAPD 与 SSR 标记分析巴西葡萄柚、柚变异报告中也有类似结果 (葡萄柚 'do Cabo' 和 'Siamesa-Filipinas' 与柚类聚在一起)。因此, 笔者认为葡萄柚作为植物学上严格的种尚有争论, 应视为与柚类种亲缘关系极为密切的一大群品种类型。

3.3 酸柚种类广泛。本研究中用于沙田柚授粉树的四方柚、梅州酸柚、斗柚、水晶柚、白芽柚及江西新干酸柚等酸柚品种, 它们未能聚类在一起, 发现前 5 个酸柚品种都分散地与沙田柚各品种紧紧聚在一起, 说明形态学上的酸柚还不能成为柚类的分类标准。

3.4 根据形态学特征, 按柚的品种群可分为沙田柚品种群、文旦柚品种群和杂种柚 (种间) 品种群。分子标记可以看出, 沙田柚品系相对集中聚在一起, 而文旦柚品系相对分散, 其原因可能与文旦柚品种群能细

分为真正文旦柚与普通柚两类有关, 这也从分子水平上揭示了它们的遗传关系在一定程度上与形态学相对吻合。本试验结合 SSR 与 AFLP 标记比 RAPD^[6]标记能较准确说明福建起源的文旦柚系列演化关系, 如福建文旦、琯溪蜜柚、通贤柚、楚门文旦、龙柚 1 号、梁平柚 3 号等紧紧聚在一起; 并且文旦柚系列与沙田柚系列也能得到很好的区分, 这也充分反映结合 SSR 与 AFLP 标记比 RAPD 标记进行柚类分类更具客观性、可行性。

除葡萄柚之外的柚类为单胚性果树, 遗传上高度杂合, 很多柚品种自成一类, 可以把这些柚品种归成杂种类型, 因而构成柚类庞大杂种类型, 形成丰富的遗传多样性。但分子分类中也出现一些品种聚类结果不同于形态学分类的现象, 如形态归类于文旦系统的脆柚、江津红心柚与沙田柚品种群聚在一起, 形态上为文旦类型的安江香柚与早熟红心沙田柚聚为一组。这些现象是否可能是由于引种交流导致了某些地区品种基因在不同地区种质间的渗入, 引起基因漂移, 仍需今后研究中更多的论证。

4 结论

笔者通过结合 AFLP 和 SSR 分子标记, 对 122 份柚类资源及野生近缘种进行了遗传多样性研究。获得了 46 个 SSR 特异性标记, SSR 标记中有 99.1% 的多态性位点, 每个位点可检测到 9.85 个等位基因, 基因多样性为 0.1939~0.9073; 获得了 44 个 AFLP 特异性标记, AFLP 标记中 343 个位点有 72% 的多态性, 3 对引物平均期望杂合度变幅为 0.21863~0.28445, 平均每对引物组合能产生 82 个多态性位点。

结合 2 种标记, 对 678 个位点进行 UPGMA 聚类分析, 122 份基因型在 0.61 时, 可分成 8 个组群, 其中 110 个柚类基因型主要由沙田柚品种群、文旦品种群与庞大的杂种柚品种群组成。本文提出了葡萄柚分类地位应视为与柚类亲缘关系极为密切的一大群品种类型, 不宜作为植物学严格的种; 形态学分类中的酸柚不能成为柚类分类单位。

由于柚子的单胚性与基因漂移现象构成了柚类丰富的遗传多样性, 这种现象还需今后进一步验证。

致谢: 承蒙中国农业科学院柑桔研究所、江西省农业科学院园艺研究所、广东省梅县农业局等单位提供部分试验材料, 谨致谢忱。

References

- [1] 叶荫民. 柚 *Citrus grandis*(L.) Osbeck 种质多样化中心的探讨. 中国南方果树, 1997, 26(1): 3-5.
Ye Y M. The diversity center of pummelo germplasm. *South China Fruits*, 1997, 26(1): 3-5. (in Chinese)
- [2] 钟广炎, 叶荫民. 柑桔植物的数值分类学研究. 植物分类学报, 1993, 31(3): 252-260.
Zhong G Y, Ye Y M. A numerical taxonomic study of *Citrus* and its close relatives. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 1993, 31(3): 252-260. (in Chinese)
- [3] 陈振光, 赖钟雄. 中国柚的种质资源及其研究. 福建农学院学报 (自然科学版), 1993, 22(3): 290-295.
Chen Z G, Lai Z X. Introduction and research of pummelo germplasm in China. *Journal of Fujian Agricultural University Natural Sciences Edition*, 1993, 22(3): 290-295. (in Chinese)
- [4] 方德秋, 章文才, 肖顺元. 应用同工酶进行柑桔分类和进化研究. 植物分类学报, 1993, 31(4): 329-352.
Fang D Q, Zhang W C, Xiao S Y. Studies on taxonomy and evolution of *Citrus* and its related genera by isozyme analysis. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 1993, 31(4): 329-352. (in Chinese)
- [5] 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.
- [6] 张太平, 彭少麟, 王峥峰, 凌定厚, 甘廉生. 柚类品种遗传相互关系的 RAPD 标记研究. 热带亚热带植物学报, 2001, 9(4): 322-328.
Zhang T P, Peng S L, Wang Z F, Ling D H, Gan L S. Genetic relationships among cultivars of *Citrus maxima* (Burm.) using RAPD marker technique. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2001, 9(4): 322-328. (in Chinese)
- [7] 程运江, 伊华林, 庞晓明, 郭文武, 邓秀新. 几种木本果树 DNA 的有效提取. 华中农业大学学报, 2001, 20(5): 481-483.
Cheng Y J, Yi H L, Pang X M, Guo W W, Deng X X. An efficient method for genomic DNA extraction from woody fruit plants. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2001, 20(5): 481-483. (in Chinese)
- [8] Kijas J M H, Thomas M R, Fowler J C S, Roose M L. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of *Citrus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 94: 701-706.
- [9] Vos P, Hogers, R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee D, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(21): 4 407-4 414.
- [10] 陆光远, 杨光圣, 傅廷栋. 应用油菜研究的简便银染 AFLP 标记技术的构建. 华中农业大学学报, 2001, 20(5): 413-415.
Lu G Y, Yang G S, Fu T D. Silver-stained AFLP-A novel assay for DNA fingerprinting in *Brassica napus*. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2001, 20 (5): 413-415. (in Chinese)
- [11] Lapointe F J, Legendre P. Statistical significance of the matrix correlation coefficient for comparing independent phylogenetic trees. *Systematic Biology*, 1992, 41(3): 378-384.
- [12] Ahmad R, Struss D, Southwick S M. Development and characterization of microsatellite markers in *Citrus*. *Journal of America Society for Horticultural Science*, 2003, 128(4): 584-590.
- [13] Scarano M T, Tusa N, Abbate L, Lucretti S, Nardi L, Ferrante S. Flow cytometry, SSR and modified AFLP markers for the identification of zygotic plantlets in backcrosses between 'Femminello' lemon cybrids (2n and 4n) and a diploid clone of 'Femminello' lemon (*Citrus limon* L. Burm. F.) tolerant to *mal secco* disease. *Plant Science*, 2003, 164: 1 009-1 017.
- [14] Struss D, Ahmad R, Southwick S M, Boritzki M. Analysis of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars using SSR and AFLP Markers. *Journal of America Society for Horticultural Science*, 2003, 128(6): 904-909.
- [15] Montemurro C, Simeone R, Pasqualone A, Ferrara E, Blanco A. Genetic relationships and cultivar identification among 112 olive accessions using AFLP and SSR markers. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2005, 80(1): 105-110.
- [16] Rohlf F J. *NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.1. User Guide*. Exeter Software. New York: Applied Biostatistics Inc., 2004.
- [17] Frederick G, Gmitter J. 'Marsh' grapefruit. *Fruit Varieties Journal*, 1993, 47(3): 130-133.
- [18] Corazza-Nunes M J, Machado M A, Nunes W M C, Cristofani M, Targon M L P N. Assessment of genetic variability in grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) and pummelos (*C. maxima*(Burm.) Merr.) using RAPD and SSR markers. *Euphytica*, 2002, 126: 169-176.

(责任编辑 曲来娥)