

沙田柚系列遗传关系的 RAPD 标记研究

张太平¹, 彭少麟¹, 凌定厚¹, 李丹¹, 甘廉生²

(1. 中国科学院华南植物研究所, 广东广州 510650; 2. 广东省农业科学院果树研究所, 广东广州 510640)

摘要: 采用 RAPD 标记技术分析了沙田柚系列 12 个样品的遗传关系。利用经筛选具多态性的 14 个 10 碱基随机引物对 12 个样品进行 DNA 随机扩增, 获得清晰可重复的位点 99 个, 其中多态性位点 58 个, 占 58.89%; 在部分样品中检出了特异性 RAPD 标记 19 个, 占 19.19%; 通过样品间遗传相似性系数比较与 UPGMA 聚类分析, 并根据历史事实可知, 广西沙田柚、梅州金柚为沙田柚的无性繁殖系, 软枝系沙田柚、沙田柚早熟单株为沙田柚的芽变后代, 梅花早柚、菊花心沙田柚、冬瓜圈沙田柚、段氏柚、垫江沙田柚、古老钱沙田柚为沙田柚的实生变异品系。

关键词: 沙田柚系列; RAPD 标记; 遗传相似性; UPGMA 聚类分析

中图分类号: Q75 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2001)03-0247-05

Analysis of genetic relationships among Shatianyou Pomelo lines by RAPD markers

ZHANG Tai-ping¹, PENG Shao-lin¹, LING Ding-hou¹,
LI Dan¹, GAN Lian-sheng²

(1. South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650, China; 2. Institute of Fruit Trees, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Genetic relationships among 12 accessions of Shatianyou (*Citrus grandis* Osbeck cv.) Pomelo lines were analyzed by RAPD technique. Fourteen screened 10 bases primers were used in the study. They produced 99 clear and repeatable RAPD bands, in which 58 were polymorphic, accounting for 58.59%, and 19 were cultivar specific RAPD markers, accounting for 19.19%. The results of genetic similarity analysis and UPGMA clustering showed that Guangxi Shatianyou (cv.) and Meizhou Jinyou (cv.) were the clones of Shatianyou (*Citrus grandis* Osbeck cv.); Ruanzhixi Shatianyou (cv.) and Shatianyou precocity individual were the bud mutation of Shatianyou (*Citrus grandis* Osbeck cv.); The others were selected from seeds of Shatianyou (*Citrus grandis* Osbeck cv.) originating from hybridization.

Key words: Shatianyou Pomelo lines; RAPD markers; genetic similarity; UPGMA clustering

随着 RAPD 分析实验技术的完善和分析软件的开发, 它被广泛用于生物的系统进化与起源^[1,2]、种内

遗传多样性的结构与布局^[3]、作物品种鉴定及个体鉴定^[4,5]、基因定位及遗传图谱的绘制等研究中^[6,7]。但

收稿日期: 2000-03-06

作者简介: 张太平(1967-), 男, 湖南邵阳人, 博士, 主要从事植物生态学与环境生物学研究。

基金项目: 中日美国际合作华南退化坡地绿色食品生产及保护与提高生物多样性研究(199906); 中国科学院院地合作项目(1999年度); 广东省科技百强创新工程项目项目(1999~2000年度); 中国科学院广州分院科技计划项目(99B05902X)。

在柚类研究中特别是沙田柚有关品系间的遗传关系研究中未见报道。

沙田柚 (*Citrus grandis* Osbeck cv.) 为我国柚类中的名优品种, 原产广西容县沙田村, 已有 200 多年的栽培历史, 各地广泛引种。在原品种的基础上, 由于天然芽变、人工及天然杂交, 并通过不断的选种育种, 已形成具有多个相关品系的沙田柚系列。由于它们与同一个品种相关, 其遗传多样性如何, 相互间的遗传关系怎样, 新的品系是否有特异性标记来指印并注

册, RAPD 遗传标记研究将为其提供可靠的研究手段和重要的背景资料。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

供试的实验材料包括容县沙田柚老树的无性繁殖系、沙田柚实生变异品系或单株等沙田柚系列的 12 个样品, 分别来自中国农业科学院柑桔研究所柑桔种质资源圃及广东梅州地区等沙田柚产区(表 1)。

表 1 实验所用沙田柚系列样品的名称与来源

Table 1 The accessions of Shatianyou Pomelo lines and its origin

样品号 Code	名称 Accessions	来源 Origin
1	菊花心沙田柚 Juhuaxin shatianyou(cv.)	中国农科院柑桔所柑桔种质资源圃(Chongqing)
2	冬瓜圈沙田柚 Dongguaquan shatianyou(cv.)	中国农科院柑桔所柑桔种质资源圃(Chongqing)
3	古老钱沙田柚 Gulaoqian shatianyou(cv.)	中国农科院柑桔所柑桔种质资源圃(Chongqing)
4	垫江沙田柚 Dianjiang shatianyou(cv.)	中国农科院柑桔所柑桔种质资源圃(Chongqing)
5	广西沙田柚 Guangxi shatianyou(cv.)	中国农科院柑桔所柑桔种质资源圃(Chongqing)
6	段氏柚 Duanshiyou(cv.)	中国农科院柑桔所柑桔种质资源圃(Chongqing)
7	无核沙田柚 Wuhe shatianyou(cv.)	中国农科院柑桔所柑桔种质资源圃(Chongqing)
8	梅州金柚 Meizhou jinyou(cv.)	广东梅州市沙田柚研究所柚类品种园(Guangdong)
9	梅花早柚 Meihuazayou(cv.)	广东梅州市沙田柚研究所柚类品种园(Guangdong)
10	软枝系沙田柚 Ruanzhixi shatianyou(cv.)	广东连南科委柚果园(Guangdong)
11	沙田柚变异株 Shatianyou bianyizhu(cv.)	广东梅州市民政扶贫场柚果园(Guangdong)
12	沙田柚早熟单株 Shatianyou zaoshudanzhu(cv.)	广东梅州市沙田柚研究所柚类品种园(Guangdong)

所用试剂其中 TaqDNA 聚合酶购于宝 (TAKARA) 生物工程(大连)有限公司, 随机引物购于 Sangon Ltd. Canada 广州代理, 其他为国产或进口试剂。所用引物及其序列如表 2(引物筛选另著文发表)⁸⁾。

表 2 实验所用引物及其序列

Table 2 Primers used in the study and their sequences

引物 Primer no.	序列(5'~3') Sequence	引物 Primer no.	序列(5'~3') Sequence
S1	GTTTCGCTCC	S8	GTCCACACGG
S10	CTGCTGGGAC	S41	ACCGGAAGG
S75	GACGGATCAG	S76	CACACTCCAG
S77	TTCGCCCCAG	S79	GTTGCCGGCC
S80	ACTTCGCCAC	S84	AGCGTGCTG
S88	TCACGTCCAC	S90	AGGGCCGTCT
S91	TGCCCGTCGT	S92	CAGCTCACGA

1.2 总 DNA 的提取

取以上实验材料的春梢幼嫩叶片 4 °C 保鲜带回实验室, -30 °C 保存备用。采用 Edwards K. 等的方法⁹⁾, 稍作修改。分别取新鲜幼叶 1 cm² 左右, 按 CTAB 法提取 DNA, 提取物溶于 200 μ L TE 中, 以 BECKMAN(DU-7) 分光光度计测定 DNA 含量, 取部分稀释为 10 ng/ μ L DNA 溶液备用。

1.3 PCR 反应及其产物电泳

扩增反应在 Biometra 的 UNO-Thermerblock 上

进行。25 μ L 反应液包括 10 mmol/l Tris-HCl (pH 9.0, 25 °C), 50 mmol/L KCl, 0.01% triton X-10, 1.9 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/l 4 \times dNTP, 0.2 μ mol/L 10 碱基随机引物, 1 单位 TaqDNA 聚合酶, 50 ng 模板 DNA。反应液上加大约 20 μ L 矿物油防止反应过程的水分蒸发。反应过程共 45 个循环, 除第一个循环经 94 °C 预变性 30 s, 每一个循环都包括 92 °C 变性 1 min, 35 °C 引物与模板结合 1 min, 72 °C 引物延伸 2 min, 最后一次循环还包括 72 °C 保温 5 min, 降温至 10 °C 等候取出或直接取出样品在冰箱中 4 °C 保存。灭菌重蒸水作为对照。

扩增产物以 1.7% 的琼脂糖凝胶电泳, 以 GeneRulerTM 100 bpDNA Ladder Plus(100~3 000 bp) 为分子标记, 溴化乙锭染色, 结果在紫外灯下用 Polaroid667 照相记录。

1.4 RAPD 标记的数据获得与分析

根据照相记录, 以清晰可辨且可重复为标准, 对每一引物的 RAPD 扩增带进行样品间比较, 在分子量为 300~3 000 bp 之间, 样品间每一出现 DNA 扩增带的位子作为一个位点, 该位子有带记为“1”, 无带记为“0”, 获取所有样品 14 个引物的 RAPD 分析结果的二元数据矩阵。以公式 $S_{ij} = a / (a + b + c + d)$ 计算样品间成对比较的遗传相似性, 其中 a 和 d 分别代表

样品 i 和 j 所有 DNA 扩增带有和无的数目, $b+c$ 代表样品间非对应关系数目之和。根据遗传相似性矩阵对样品进行 UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean) 聚类分析, 并绘制系谱图。以上由 NTSYS-pc (Version 1.80) 软件 (Rohlf, 1993) 在计算机上完成。

2 结果与分析

2.1 沙田柚系列 DNA 扩增反应结果

利用经筛选具多态性的 14 个 10 碱基随机引物对沙田柚系列的 12 份样品进行了 DNA 的随机扩增反应, 共获得清晰可辨、可重复的 RAPD 位点 99 个。其中多态性位点 58 个, 多态性位点百分率 58.59%。图 1 为引物 S79、S88 两个随机引物的 DNA 扩增谱带。

2.2 沙田柚系列各样品的特异性 RAPD 标记

RAPD 特异性遗传标记是作物品种鉴定的重要分子性状, 任意一个或多个特异性遗传标记都能作为一个品种区别于其他品种的性状。14 个引物的 99 个位点在沙田柚系列中检出了 19 个 RAPD 特异性遗传标记 (记为引物-RAPD 带的估计大小 bp), 占总 RAPD 标记位点的 19.19%。其中古老钱沙田柚最多, 包括 S1-1400、S8-950、S72-1031、S72-2000、S76-1700、S84-550、S88-1000、S90-1031、S90-1400、S91-1200 共 10 个; 其次为垫江沙田柚, 包括 S8-1100、S8-1900、S88-1100、S88-1800、S91-1600 共 5 个; 其他为无核沙田柚的 S1-700、S84-850, 菊花心沙田柚的 S72-1500, 软枝系沙田柚的 S41-750。从以上可以看出, 14 个引物在沙田柚系列 12 个样品中有 5 个检出特异性遗传标记, 所以很难仅通过特异性遗传标记将其全部区分。增加引物可望可进一步找到更多特异性遗传标记。见图 1 中 S88 所检出的古老钱沙田柚与垫

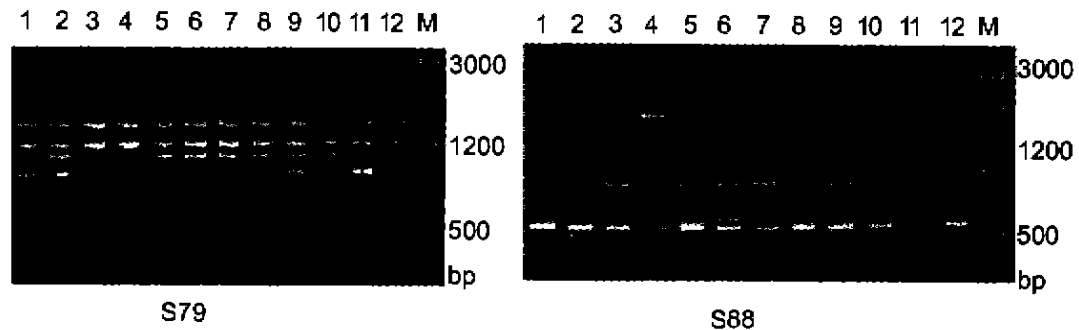


图 1 引物 S79、S88 的 DNA 扩增图谱

Fig. 1 Band patterns amplified using primer S79, S88

数字 1~12 代表表 1 的 12 个沙田柚系列样品 (如表 1), M 为标记 DNA (依次为 300、400、500、600、700、800、900、1 031、1 200、1 500、2 000、3 000 bp), 箭头表示品种特异性 RAPD 标记。1~12 stand for the accessions listed in table 1, M is DNA marker, arrow refers to cultivar specific RAPD markers.

江沙田柚的特异性 RAPD 遗传标记。

2.3 沙田柚系列各样品间的相似性系数及遗传分析

根据 DNA 扩增结果, 计算沙田柚系列各样品间的遗传相似性系数, 结果如表 3。其中古老钱沙田柚与垫江沙田柚的遗传相似性系数最小, 为 0.576, 古老钱沙田柚与所有其他样品的遗传相似性系数平均值最小; 而广西沙田柚与梅州金柚 (沙田柚) 的遗传相似性系数最大, 为 0.955, 广西沙田柚与所有其他样品的遗传相似性系数的平均值最大。广西沙田柚与梅州金柚 (沙田柚) 间遗传极为相似, 其他各样品间存在明显的遗传差异。

对沙田柚系列各样品间遗传相似性系数进行 UPGMA 聚类分析, 绘出聚类图, 如图 2。可以看出,

在遗传相似性系数 0.84, 广西沙田柚、梅州金柚、软枝系沙田柚、沙田柚早熟单株、梅花早柚聚为一类; 菊花心沙田柚、冬瓜圈沙田柚、段氏柚聚为一类, 沙田柚变异树、无核沙田柚、垫江沙田柚、古老沙田柚等各为一类。

3 讨论

柚类为柑桔属中重要的亚热带果树, 我国是柚类主要发源地之一, 种质资源丰富^[10]。近年来我国柚类生产得到大力发展, 柚类品种也不断推陈出新, 可望成为我国柑桔类出口创汇的重要产品。由于柚类栽培历史悠久, 老的品种繁多, 新的品种 (系) 又不断产生, 相互间系谱关系不清楚, 命名混乱, 普遍存在同名异物与

同物异名现象。所以利用遗传标记技术研究其品种间的系谱关系,并利用特异性遗传标记指印品种非常重要。

沙田柚系列在我国广为栽培,其栽培面积、产量和产区分布均居我国柚类各类群之首;但过去都凭感官和传统习惯为各地品种、品系或株系命名,叫法各

表 3 沙田柚系列样品间相似系数

Table 3 Similarity index among 12 accessions of Shatianyou Pomelo lines

样品号 ¹⁾ Code	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	1.000											
2	0.900	1.000										
3	0.655	0.659	1.000									
4	0.617	0.641	0.576	1.000								
5	0.871	0.829	0.614	0.680	1.000							
6	0.870	0.881	0.650	0.632	0.851	1.000						
7	0.740	0.699	0.585	0.605	0.743	0.739	1.000					
8	0.887	0.819	0.631	0.675	0.955	0.814	0.736	1.000				
9	0.831	0.841	0.602	0.645	0.838	0.783	0.729	0.829	1.000			
10	0.845	0.803	0.654	0.680	0.909	0.797	0.768	0.925	0.812	1.000		
11	0.840	0.824	0.699	0.684	0.822	0.770	0.720	0.838	0.784	0.822	1.000	
12	0.887	0.871	0.651	0.697	0.870	0.814	0.736	0.886	0.882	0.897	0.863	1.000

¹⁾同表 1 The code is same as table 1

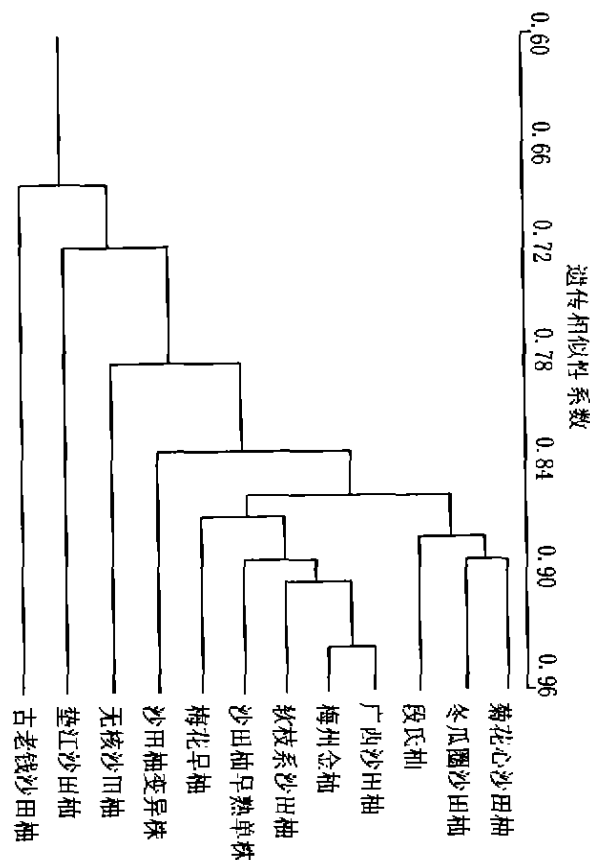


图 2 沙田柚系列聚类分析图

Fig. 2 Dendrogram of UPGMA clustering analysis for Shatianyou Pomelo lines

异,这对发展正宗的沙田柚商品生产、在国内外市场创名优品牌极为不利。利用 RAPD 标记技术及 UPG-

MA 聚类分析,可以清楚看出沙田柚系列各品系间的遗传相互关系。结果表明,广西沙田柚与梅州金柚间遗传相似性系数为 0.955,二者应为正宗沙田柚的无性繁殖系,为同物异名;一般认为软枝系沙田柚、沙田柚早熟单株为沙田柚的芽变单株,这也与它们相互间的遗传相似性系数吻合;根据历史事实及聚类分析结果可知,梅花早柚、菊花心沙田柚、冬瓜圈沙田柚、段氏柚、垫江沙田柚和古老钱沙田柚为沙田柚的实生变异;垫江沙田柚和古老钱沙田柚与广西沙田柚的亲缘关系最为疏远,这可能与杂交亲本的遗传关系较远或经历更多代的人工选育有关。从聚类分析结果还可看出各样品在遗传相互关系上明显以广西沙田柚为中心。

RAPD 分子标记技术不但可检测出品种间甚至品系间的分子差异性,指证品种或品系间的系谱关系,同时可检测出各品种(系)的特异性 RAPD 扩增带作为指证品种(系)的特异性遗传标记,这为国际通行的品种注册提供依据。本实验利用 14 个引物的 99 个位点在沙田柚系列中检出了 19 个 RAPD 特异性遗传标记(记为引物-RAPD 带的估计大小 bp),占总 RAPD 标记位点的 19.19%。这里需要说明的是这些特异性 RAPD 标记的对应的 DNA 片段长度是根据标记 DNA(M)的估计值,如需了解其精确长度及结构,需进一步作遗传分析。

研究发现,古老的沙田柚品种具有很大的变异潜力,长期以来不断的芽变以及自然与人为的杂交,经人工选育,使其发展成为一个包括多个品系、遗传多

样性丰富的重要柚类种质资源。这对新品种的选育及其遗传多样性的动态研究,对古老作物、果树品种的保护,对生物种质资源开发与利用,具有重要的指导意义^{〔1〕}。

参考文献:

- 〔1〕 Ayres R D, Ryan F. Genetic diversity and structure of the narrow endemic *Wyethia reticulata* and its congener *W. Bolanderi* (Asteraceae) using RAPD and allozyme techniques[J]. *Amer J of Bot*, 1999, **86**(3): 344—353.
- 〔2〕 戴思兰, 陈俊愉, 李文彬. 菊花起源的 RAPD 分析[J]. *植物学报*, 1998, **40**(11): 1053—1059.
- 〔3〕 Heibel E, Lumbsch H T, Schmitt I. Genetic variation of *Usnea filipendula* (Parmeliaceae) populations in western Germany investigated by RAPDs suggests reinvasion from various sources[J]. *Amer J of Bot*, 1999, **86**(5): 753—757.
- 〔4〕 Sugawara K, Oowada A, Moriguchi T, et al. Identification of Citrus chimeras by RAPD markers[J]. *Hortscience*, 1995, **30**(6): 1276—1278.
- 〔5〕 陈新露, 赵祥云, White B N, 等. 应用 RAPD 技术评价丁香品种间遗传关系[J]. *园艺学报*, 1995, **22**(2): 171—175.
- 〔6〕 Hemmat M, Weeden N F, Manganaris A G, et al. Molecular marker linkage for apple[J]. *J of Heredity*, 1994, **85**: 4—11.
- 〔7〕 石永刚, 郑用琰, 李建生, 等. 玉米 S 组 CMS 育性恢复基因的分子标记定位[J]. *作物学报*, 1998, **25**(2): 191—193.
- 〔8〕 张太平, 李丹, 彭少麟, 等. 柚类种质资源 RAPD 标记研究的引物筛选[J]. *广西植物*, 2000, **20**(4): 313—318.
- 〔9〕 Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19**(6): 1349.
- 〔10〕 叶荫民. 柚 *Citrus grandis* (L.) Osbeck 种质多样化中心的探讨[J]. *中国南方果树*, 1997, **26**(1): 3—5.
- 〔11〕 Hoyt E. Conserving the wild relatives of crops. IBPGR—IUCN—WWF[A]. 见: 袁以苇, 植物物种保护战略[C]. 南京: 南京大学出版社, 1990. 71—112.
- 〔1〕 广东省海岛资源综合调查大队. 广东省海岛资源综合调查报告[M]. 广州: 广东科技出版社, 1995.
- 〔2〕 彭少麟. 南亚热带森林群落动态学[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- 〔3〕 周厚诚, 彭少麟, 黄卫凯, 等. 广东南澳岛退化草坡的群落结构[J]. *生态科学*, 1997, **16**(2): 100—103.
- 〔4〕 周厚诚, 彭少麟, 任海, 等. 广东南澳岛马尾松林的群落结构[J]. *热带亚热带植物学报*, 1998, **6**(3): 203—208.
- 〔5〕 R J Whittaker. Island biogeography: ecology, evolution, and conservation [M]. Oxford: Oxford University Press, 1998.
- 〔6〕 M A McPeck. Linking local species interactions to rate of speciation in communities[J]. *Ecology*, 1996, **77**(5): 1355—1366.

(上接第 214 页 Continue from page 214)

- 〔1〕 广东省海岛资源综合调查大队. 广东省海岛资源综合调查报告[M]. 广州: 广东科技出版社, 1995.
- 〔2〕 彭少麟. 南亚热带森林群落动态学[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- 〔3〕 周厚诚, 彭少麟, 黄卫凯, 等. 广东南澳岛退化草坡的群落结构[J]. *生态科学*, 1997, **16**(2): 100—103.
- 〔4〕 周厚诚, 彭少麟, 任海, 等. 广东南澳岛马尾松林的群落结构[J]. *热带亚热带植物学报*, 1998, **6**(3): 203—208.
- 〔5〕 R J Whittaker. Island biogeography: ecology, evolution, and conservation [M]. Oxford: Oxford University Press, 1998.
- 〔6〕 M A McPeck. Linking local species interactions to rate of speciation in communities[J]. *Ecology*, 1996, **77**(5): 1355—1366.