

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.04.023

傅翠娜,肖远辉,甘海峰,等. 倍性分析和 AFLP 标记相结合鉴定金柑新种质[J]. 广西植物, 2014, 34(4): 548-551

Fu CN, Xiao YH, Gan HF, et al. Identification of Kumquats (*Fortunella crassifolia*) new varieties by ploidy analysis and AFLP[J]. *Guihaia*, 2014, 34(4):

548-551

# 倍性分析和 AFLP 标记相结合鉴定金柑新种质

傅翠娜, 肖远辉, 甘海峰\*, 雷新南

(广西特色作物研究院, 广西 桂林 541004)

**摘要:** 采用倍性分析和 AFLP 标记相结合, 对滑皮金桔和变异单株金柑 II 进行遗传鉴定分析。结果表明: 滑皮金桔是 2 倍体, 金柑 II 是 4 倍体; 选用 12 对 AFLP 引物组合, 就 8 份金柑资源进行遗传多样性分析及分类研究, 共获得清晰可见的标记 341, 其中多态性标记 95, 占 27.8%, 供试材料相似系数在 0.867~0.985 之间, 能将 8 个品种区分开, 滑皮金桔与普通金柑相似性系数为 96.8%, 金柑 II 与普通金柑相似性系数为 95.8%, 滑皮金桔与金柑 II 相似性系数为 95.7%。表明滑皮金桔和金柑 II 是不同于普通金柑的变异新种质, 可以直接作为品种资源加以利用。

**关键词:** 金柑; 新种质; 倍性分析; 遗传鉴定; AFLP

**中图分类号:** S666.9      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-3142(2014)04-0548-04

## Identification of Kumquats (*Fortunella crassifolia*) new varieties by ploidy analysis and AFLP

FU Cui-Na, XIAO Yuan-Hui, GAN Hai-Feng\*, LEI Xin-Nan

(Guangxi Academy of Specialty Crops, Guilin 541004, China)

**Abstract:** To determine the genetic diversity of Kumquats new varieties. We employed ploidy analysis and 12 pairs of AFLP primer combinations on 8 Kumquats varieties. Ploidy analysis confirmed that Huapijingan was a diploid, Jingan II was a tetraploid. AFLP results showed that: A total of 341 major AFLP bands were observed, and 95 band were polymorphism. Genetic similarities among all taxa ranged from 0.867 to 0.985. 8 varieties could be divided. Phenetic trees based on genetic similarities(UPGMA, N-J) were similar to known taxonomic relationships, the genetic similarity coefficient between Huapijingan and Jingan was 96.8%, the genetic similarity coefficient between Jingan II and Jingan was 95.8%, the genetic similarity coefficient between Jingan II and Huapijingan was 95.7%. Jingan II and Huapijingan could be used as new cultivar.

**Key words:** Kumquats; new varieties; ploidy analysis; genetic identification; AFLP

金柑果实芳香四溢, 营养丰富, 品质优良, 风味好。食之有顺气润肺、化痰止咳、促进消化、强壮身体之功效。对治疗支气管炎和哮喘病有良好效果, 深受消费者欢迎。广西是我国金柑主产区之一, 栽培面积接近 30 万亩, 在主产区金柑已成为农民发家

致富的主导产业。人们在生产过程中发现不少优良变异金柑单株, 由于变异后代与亲本在遗传物质构成上差异微小, 传统的形态学方法很难进行区分。Zabeau *et al.* (1993) 年创立了 AFLP (Amplified fragment length polymorphism) 技术, AFLP 结合

收稿日期: 2014-01-09      修回日期: 2014-03-19

基金项目: 广西自然科学基金(桂科自 0991186); 广西科技攻关项目(桂科攻 1123003-3D)。

作者简介: 傅翠娜(1979-), 女, 山东莱州人, 硕士, 助理研究员, 主要从事柑桔栽培、育种方面的研究, (E-mail)fucui99@163.com。

\*通讯作者: 甘海峰, 研究员, 主要从事柑桔栽培技术研究工作, (E-mail)ganhf6919@126.com。

了 RFLP 和 RAPD 各自的优点, 方便快捷, 只需极少量 DNA 材料, 不需 Southern 杂交, 能检测整个基因组的遗传变异, 在后代的遗传和分离中遵循孟德尔定律。被广泛应用于果树遗传多样性研究和品系鉴定, 如粉蕉、大蕉和龙牙蕉(易干军等, 2002)、龙眼品种(系)(易干军等, 2002, 2003; 彭宏祥等, 2008)、荔枝(易干军等, 2003)、猕猴桃(陈华等, 2007)、沙田柚(肖远辉等, 2012)。本研究在相关研究的基础上, 拟采用倍性分析和 AFLP 相结合, 对滑皮金桔和变异单株金柑 II 进行遗传鉴定分析, 为金柑新资源的合理利用、品种的选育提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

试验用品种材料为罗浮(*Fortunella margarita*)、罗纹(*F. japonica*)、长寿金柑(*F. obovata*)、大果金豆、金豆(*F. hindsii*), 采自中国柑桔研究所以及金弹(*F. crassifolia*)、滑皮金桔、金柑 II 采自广西柑桔研究所。

### 1.2 研究方法

**1.2.1 倍性分析** 倍性检测采用细胞流式仪(型号 PA-I, Partec 公司, 德国)参照张俊娥等(2003)的方法。分析“滑皮金桔”和“金柑 II”的叶片, 以二倍体普通金桔叶片作对照。取约 0.5 cm<sup>2</sup> 的幼嫩叶片于小塑料皿里, 加入 400 μL HR-A 核裂解液(Partec High Resolution Staining Kit); 用刀片切碎叶片放置 30 s, 通过 20~50 μm 的微孔滤膜将样品过滤到小试管里; 加入 1.6 mL HR-B DAPI 染色液(Partec High Resolution Staining Kit), 染色 30~60 s; 上样检测。Partec 倍性分析仪测定样品中单个细胞核的 DNA 总量。DNA 含量的分布曲线由仪器自动生成。

**1.2.2 AFLP 分子标记** DNA 提取参照母洪娜等(2007)改进的 CTAB 法进行; DNA 酶切及人工接头的连接: 双酶切目的 DNA, 选用 Pst I/Mse I 这两种酶, 再用 T4 DNA 连接酶, 酶切和连接在一步完成。在 0.5 mL 离心管中加入混合液按 DNA 模板 4 μL, Adapter 1 μL, Eco RI/Mse I (4 U/μL) 2 μL, 10 × Reaction buffer 2.5 μL, 10 mmol/L ATP 2.5 μL, T4 Ligase (4 U/μL) 1 μL, AFLP-Water 7 μL。混匀离心数秒, 37 °C 保温 5 h, 8 °C 保温 4 h, 4 °C 过夜; 在 0.5 mL 离心管中加入预扩增的混合液按模板 DNA 2 μL, Pre-ampmix 1 μL, dNTPs 0.5 μL, 10 × PCR

buffer 2.5 μL, Taq DNA polymease (2 U/μL) 0.5 μL, AFLP-Water 18.5 μL。混匀, 按下列参数进行 PCR 扩增循环 30 轮: 94 °C 2 min, 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 80 s, 72 °C 5 min; 在 0.5 mL 离心管中, 加入预扩增稀释样品 2 μL, dNTPs 0.5 μL, 10 × PCR buffer 2.5 μL, Eco RI 引物 1 μL, MseI 引物 1 μL, Taq DNA polymease (2 U/μL) 1 μL, AFLP-Water 17 μL。以上混匀, 离心数秒, 按下列参数 PCR 循环: 首先 94 °C 2 min ①一轮扩增参数: 94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 80 s; ②以后每轮循环退火温度递减 0.7 °C 或 1 °C, 扩增 12 或 10 轮(递减 0.7 °C, 则扩增 12 轮, 递减 1 °C, 则扩增 10 轮); ③接着按下列参数扩增 23 轮: 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 80 s; 最后延伸 72 °C 5 min。电泳检测荧光照相获得指纹图谱, 以 NTSYS-pc 2.10e 数据分析软件进行, 采用 Dice 相似系数进行计算, 得到 Dice 相似系数矩阵。采用 UPGMA (Unweighted pair-group method, arithmetic average 非加权平均法) 进行聚类, 用图表算法 (Graphics) 中的树状绘图 (Tree plot) 得到金柑亲缘关系树状图。

## 2 结果与分析

### 2.1 倍性分析结果

流式细胞仪分析普通金柑、“滑皮金桔”和变异单株叶片的倍性, 结果表明普通金柑和“滑皮金桔”(图 1) 是二倍体, 变异单株“金柑 II”(图 2) 为 4 倍体。

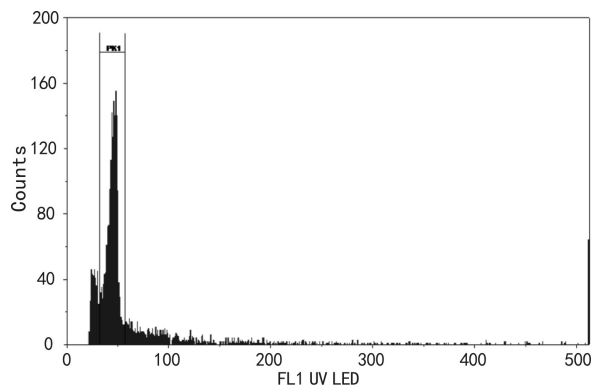


图 1 滑皮金柑的倍性分析

Fig. 1 Ploidy analysis of Huapijingan

利用从 64 对 AFLP 引物中筛选出的 12 对扩增产物多态性好、谱带清晰的引物, 对 8 份金柑材料的基因组 DNA 进行扩增片段长度多态性分析, 获得

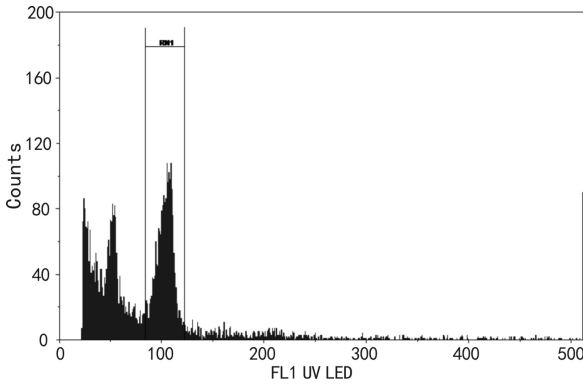


图 2 金柑 II 的倍性分析  
Fig. 2 Ploidy analysis of Jingan II

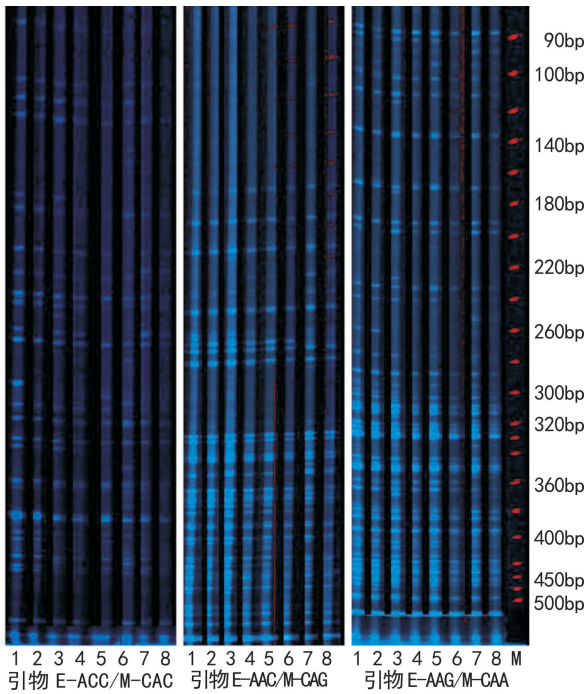


图 3 3对引物组合对金柑的 AFLP 扩增图谱  
Fig. 3 Kumquats AFLP fingerprinting map by 3 primers

了较好的扩增结果(图 3)。12 对引物组合在 8 个材料中扩增出 341 条清晰的带,引物扩增条带数 21~44 条(表 2),平均每对引物扩增 28.42 条,其中多态性带共有 95 条,多态性比例为 27.9%,12 对引物能将 8 个金柑材料区分出来。从聚类图可以看出滑皮金桔(J5)、金柑 II (J6)与普通金柑(J4)亲缘关系最近(图 4)。滑皮金柑与普通金柑相似性系数为 96.8%,金柑 II 与普通金柑相似性系数为 95.8%,滑皮金桔与金柑 II 相似性系数为 95.7%(表 3)。

表 2 12 对 AFLP 引物选择性扩增结果及条带多态性  
Table 2 Polymorphism of AFLP bands on the 12 selected primers

引物组合 Primer	总扩增带数 Total band number	多态性带数 Polymorphic band number	多态性带百分率(%) Polymorphic band percentage
E-AAC/M-CAC	24	9	37.5
E-AAC/M-CAG	25	7	28.0
E-AAG/M-CAA	44	13	29.5
E-AAG/M-CAT	22	8	36.4
E-AAG/M-CTA	26	10	38.5
E-AAG/M-CTT	22	8	36.4
E-ACA/M-CTG	21	7	33.3
E-ACT/M-CTG	31	9	29.0
E-ACT/M-CTT	38	8	21.1
E-AGC/M-CAA	28	5	17.9
E-AGC/M-CTA	36	6	16.7
E-AGC/M-CTC	24	5	20.8
总计/平均	341	95	27.9

表 3 供试材料 Dice 相似系数  
Table 3 Dice similarity coefficients among Kumquats materials

	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8
J1	1.000							
J2	0.961	1.000						
J3	0.897	0.905	1.000					
J4	0.926	0.935	0.910	1.000				
J5	0.932	0.937	0.906	0.968	1.000			
J6	0.902	0.911	0.884	0.958	0.957	1.000		
J7	0.867	0.879	0.874	0.888	0.883	0.875	1.000	
J8	0.873	0.885	0.873	0.894	0.886	0.877	0.985	1.000

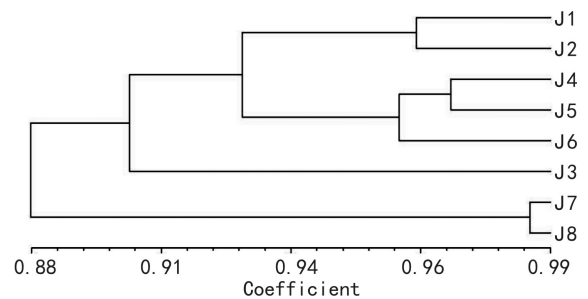


图 4 金柑种质 AFLP 分析聚类图  
Fig. 4 Dendrogram of Kumquats varieties based on AFLP data

### 3 讨论与结论

体细胞变异(芽变)规律是果实等多年生作物重要的科学问题。芽变是体细胞突变的表现,体细胞

发生遗传变异的可能来源是点突变、体细胞重组、DNA 甲基化或转座子活性高低等(刘庆, 2008; Asins *et al.*, 1999; Bernet *et al.*, 2003)。根据遗传物质基础改变的来源不同, 可以将芽变分为染色体畸变和基因突变。染色体畸变又可以分为染色体结构改变和数目改变两种。张俊娥等(2003)使用倍性分析仪对 48 种培养多年不同基因型的柑桔愈伤组织进行测定, 发现 93.8% 的组织出现了 DNA 含量加倍的细胞。本研究应用倍性分析仪发现一染色体加倍金柑单株, 证明了柑桔染色体数目的改变不仅在愈伤组织中发生, 在自然条件下同样存在。

利用 AFLP 分子标记技术检测柑桔芽变品种, 是芽变分子分析的一条有效途径。罗才安等(2003)利用 AFLP 分析了奉节脐橙的低酸和晚熟芽变株系基因组 DNA 的遗传差异。本研究结果显示 AFLP 技术能有效的区分 8 个金柑资源。

本研究采用倍性分析和 AFLP 相结合, 对滑皮金桔和变异单株金柑 II 进行遗传鉴定分析。结果表明: 滑皮金桔是 2 倍体, 金柑 II 是 4 倍体; 滑皮金桔与普通金柑相似性系数为 96.8%, 金柑 II 与普通金柑相似性系数为 95.8%, 滑皮金桔与金柑 II 相似性系数为 95.7%, 表明滑皮金桔和金柑 II 是不同于普通金柑的变异新种质, 可以直接作为品种资源加以利用。金柑 II 为 4 倍体, 其不但品质优良, 还是一个关键的无核金柑育种材料, 3 倍体无核金柑育种尚待进一步试验研究。

## 参考文献:

Asins MJ, Monforte AJ, Mestre PF, *et al.* 1999. Citrus and Prunus copia-like retrotransposons[J]. *Theor Appl Genet*, **99**(3-4): 503-510  
Bernet GP, Asins MJ. 2003. Identification and genomic distribution of gypsy like retrotransposons in Citrus and Poncirus[J]. *Theor Appl Genet*, **108**(1): 121-130

Chen H, Yi GJ, Xu XB, *et al.* 2007. Identification of the Kiwifruit Germplasm in Jiangxi Province by AFLP and Its Classification Significance[J]. *China J Biochem & Mol Biol* (中国生物化学与分子生物学报), **23**(2): 122-129  
Liu Q(刘庆). 2008. Molecular mechanism for the altered traits of the red flesh bud sport of 'Anliu' sweet orange(“暗柳”甜橙红色突变体性状形成的分子机理研究)[D]. Wuhan(武汉): Huazhong Agricultural University(华中农业大学), 1-151  
Luo AC(罗安才). 2003. Researches on the organic acids metabolism in citrus fruits and the AFLP analysis of the Fengjie navel orange mutants(柑桔果实有机酸代谢生理和奉节脐橙芽变株系系的 AFLP 分析研究)[D]. Chongqing(重庆): Southwest Agriculture University(西南农业大学), 1-99  
Mu HN(毋洪娜), Zeng JW(曾继吾), Yi GJ(易干军), *et al.* 2007. A simple and effective DNA extraction method for AFLP analysis citrus(一种快速高效适于柑桔 AFLP 分析的 DNA 提取方法)[J]. *Guangdong Agric Sci* (广东农业科学), (3): 25-26  
Peng HX(彭宏祥), Li DB(李冬波), Zhu JH(朱建华), *et al.* 2008. Genetic diversity of longan in Guangxi assessed by AFLP markers (用 AFLP 标记分析广西龙眼种质遗传多样性)[J]. *Acta Horticult Sin*(园艺学报), **35**(10): 1 511-1 516  
Xiao YH(肖远辉), Mai SQ(麦适秋), Fu CN(傅翠娜), *et al.* 2012. Identification of shatianyou pummelos (*Citrus grandis*) new varieties by AFLP(利用 AFLP 鉴定沙田柚新种质)[J]. *J Southern Agric*(南方农业学报), **43**(11): 1 642-1 645  
Yi GJ(易干军), Yu XY(余晓英), Huo HQ(霍合强), *et al.* 2002. Studies on the certification of Musa ABB group Dajiao, M. AAB group Fenjiao and M. AAB group Longyajiao by AFLP(粉蕉、大蕉和龙牙蕉的 AFLP 分类研究)[J]. *Acta Horticult Sin* (园艺学报), **29**(5): 413-417  
Yi GJ(易干军), Huo HQ(霍合强), Chen DC(陈大成), *et al.* 2003. Studies on genetic relationship among litchi varieties by using AFLP(荔枝品种亲缘关系的 AFLP 分析)[J]. *Acta Horticult Sin*(园艺学报), **30**(4): 399-403  
Yi GJ(易干军), Tan WP(谭卫萍), Huo HQ(霍合强), *et al.* 2003. Studies on the genetic diversity and relationship of longan cultivars by AFLP analysis(龙眼品种(系)遗传多样性及亲缘关系的 AFLP 分析)[J]. *Acta Horticult Sin*(园艺学报), **30**(3): 272-276  
Zabeau M, *et al.* 1993. European Patent[P]. 0535858A1, (3): 31  
Zhang JE(张俊娥), Liu JH(刘继红), Deng XX(邓秀新), *et al.* 2003. Genetic variation of citrus calli revealed by the ploidy analyser(采用倍性分析仪鉴定柑桔愈伤组织的遗传变异)[J]. *Acta Genet Sin*(遗传学报), **30**(2): 169-174

( 上接第 477 页 Continue from page 477 )

Von Holle B. 2013. Environmental stress alters native-nonnative relationships at the community scale[J]. *Biol Inva*, **15**: 417-427  
Walck JL, Hidayati S, Dixon KW, *et al.* 2011. Climate change and plant regeneration from seed[J]. *Global Change Biol*, **17**: 2 145-2 161  
Walker S, Wilson JB, Lee WG. 2005. Does fluctuating resource availability increase invasibility? Evidence from field experiments in New Zealand short tussock grassland[J]. *Biol Inva*, **7**: 195-211  
Wilsey BJ, Polley HW. 2002. Reductions in grassland species even-

ness increase dicot seedling invasion and spittle bug infestation [J]. *Ecol Lett*, **5**: 676-684  
Zarnetske PL, Gouhier TC, Hacker SD, *et al.* 2013. Indirect effects and facilitation among native and non-native species promote invasion success along an environmental stress gradient [J]. *J Ecol*, **101**: 905-915  
Zeiter M, Stampfli A. 2012. Positive diversity-invasibility relationship in species-rich semi-natural grassland at the neighbourhood scale[J]. *Ann Bot*, **110**: 1 385-1 393