

贵州部分柑橘地方品种遗传背景的 SSR 分析^①

雷天刚^{1,2}, 何永睿^{1,2}, 彭爱红^{1,2}, 许兰珍^{1,2},
邹修平^{1,2}, 姚利晓^{1,2}, 李金强³, 陈善春^{1,2}

1. 西南大学 柑桔研究所, 重庆 400712; 2. 国家柑桔品种改良中心, 重庆 400712;
3. 贵州省果树科学研究所, 贵阳 550006

摘要: 利用 SSR 分子标记技术对 5 个贵州柑橘地方品种的遗传背景进行分析. 结果表明, 24 对 SSR 引物在 5 个地方品种和参与 DNA 指纹比对的 14 个栽培品种中共检测到 92 个等位基因, 每个位点的等位基因数变幅为 2~7 个, 平均为 3.8 个; 多态性信息含量(PIC)变化范围在 0.36~0.78 之间, 平均为 0.49. 经过 DNA 指纹比对, 发现其中 5 对引物扩增的 8 条特征谱带可作为地方品种鉴别的参考性标记. 利用 NTSYS 软件进行相似性系数计算, 采用 UP-GMA 法聚类, 结果显示, 相似性系数为 0.80, 可将 5 个地方品种划分在不同的亚组中; 地方品种米柑和牛肉红金橘均单独成组, 其遗传背景独特; 土柑与皱皮柑的亲缘关系较近; 大果型冰糖橙与冰糖橙的遗传背景相同; 红香柚与强德勒柚的遗传背景基本一致.

关键词: 柑橘; 地方品种; 遗传背景; SSR 标记

中图分类号: S666

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2015)11-0030-06

地方品种是极其重要的种质资源, 地方品种的收集、保存和研究对优良基因资源的挖掘和新品种选育具有十分重要的意义. 贵州柑橘栽培历史悠久, 分布范围广, 地方品种资源丰富^[1]. 近年来, 国家柑桔品种改良中心从贵州多地收集到一批具有特色的柑橘地方品种资源, 但其遗传背景仍不清楚. SSR 分子标记为一种共显性分子标记, 因其具有多态性高、重复性好、操作简单及成本较低等优点, 已被广泛应用于植物的遗传多样性研究^[2-3]、亲缘关系分析^[4]、种质鉴定^[5]、遗传图谱构建及 QTL 定位^[6]等研究领域. SSR 标记技术在柑橘遗传图谱构建^[7-8]、种质鉴定^[9]、遗传多样性及亲缘关系分析^[10-14]等研究方面也有着广泛的应用. 本研究拟利用本实验室用于构建柑橘栽培品种 DNA 指纹库的 SSR 标记^[15]对 5 份贵州柑橘地方品种的遗传背景进行分析, 旨在为这些地方品种的保存和利用提供参考.

1 材料与方法

1.1 材料

5 个柑橘地方品种于 2010—2013 年间从贵州柑橘产区收集而来(表 1). 为揭示它们的遗传背景, 另选了 14 个栽培品种用于 SSR 指纹图谱的比对分析, 样品均采自中国农业科学院柑橘研究所国家果树种质资

① 收稿日期: 2014-09-17

基金项目: 科技部“863”项目(2011AA100205); 国家自然科学基金(31272150); 科技基础性工作专项(2012FY110200); 中央高校基本业务费专项(XDJK2014C028, XDJK2014A018); 重庆市应用开发项目基金(cstc2013yykfA80002).

作者简介: 雷天刚(1979-), 男, 贵州印江人, 硕士, 助理研究员, 主要从事柑橘遗传育种研究.

通信作者: 陈善春, 研究员.

源(重庆)柑橘圃(CRIC).

表 1 品种(系)名称及来源

编号	品种(系)名称	学名	来源	编号	品种(系)名称	学名	来源
1	米柑	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	德江	11	土柑	<i>C. reticulata</i> Blanco	印江
2	台湾椪柑	<i>C. reticulata</i> Blanco	CRIC	12	尤力克柠檬	<i>C. limon</i> Burm. f	CRIC
3	日南 1 号温州蜜柑	<i>C. unshiu</i> Marcow	CRIC	13	大果型冰糖橙	<i>C. sinensis</i> Osbeck	榕江
4	南丰蜜橘	<i>C. kinokuni</i> hort. ex Tanaka	CRIC	14	冰糖橙	<i>C. sinensis</i> Osbeck	CRIC
5	砂糖橘	<i>C. reticulata</i> Banco	CRIC	15	红香柚	<i>C. grandis</i> Osbeck	印江
6	大红袍红橘	<i>C. tangerina</i> Hort. ex Tanaka	CRIC	16	五布柚	<i>C. grandis</i> Osbeck	CRIC
7	本地早橘	<i>C. succosa</i> Hort. ex Tanaka	CRIC	17	强德勒柚	<i>C. grandis</i> Osbeck	CRIC
8	克里曼丁橘	<i>C. clementina</i> hort. ex Tanaka	CRIC	18	琯溪蜜柚	<i>C. grandis</i> Osbeck	CRIC
9	牛肉红金橘	<i>C. reticulata</i> Blanco	惠水	19	皱皮柑	<i>C. reticulata</i> Osbeck	CRIC
10	贡柑	<i>C. reticulata</i> Blanco	CRIC				

1.2 方 法

1.2.1 DNA 提取

采用 CTAB 法提取叶片基因组 DNA;经琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测,将 DNA 质量浓度调至 0.05 g/ μ L,于-20℃冰箱保存.

1.2.2 SSR 分析

利用构建柑橘栽培品种 DNA 指纹图谱库的 24 对 SSR 核心引物(表 2),委托 Invitrogen 公司(上海)合成. PCR 扩增在 Biometra T1 Thermocycler 型 PCR 扩增仪上进行. PCR 反应体系为 25 μ L,其中含 2.5 μ L 10 $\times$ PCR buffer, 1.5 μ L MgCl₂ 25(mmol/L), 2.0 μ L dNTP(2.5 mmol/L), 各 1 μ L 正反向引物(10 μ mol/L), 0.8 U Taq DNA 聚合酶(Takara), 1 μ L DNA 模板(约 50 ng), 15 μ L ddH₂O. 反应程序为: 94℃预变性 5 min; 94℃ 30 s, 56~60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环;最后 72℃延伸 10 min.

PCR 产物采用 2%的琼脂糖凝胶电泳检测,溴化乙锭(EB)染色,在 UVP 凝胶成像系统(Gel Doc-It)中进行成像并记录结果.

1.2.3 数据分析

根据 PCR 扩增结果,建立 SSR 指纹条带的 0—1 数据矩阵,在相同迁移位置上有带的记为 1,无带记为 0. 利用 NTSYS—pc 2.10e 软件计算品种(系)间的遗传相似系数,在此基础上采用非加权类平均法(UP-GMA)进行聚类分析,构建树状图. 统计每个 SSR 位点的等位基因数,参照 SMITH 等人^[16]的公式计算每个 SSR 位点的多态性信息量(用 I_{PIC} 表示):

$$I_{PIC} = 1 - \sum P_i^2$$

其中 P_i 表示第 i 个位点的基因频率.

2 结果与分析

2.1 SSR 标记的多态性

利用 24 对 SSR 引物对 5 个柑橘地方品种和 14 个栽培品种(系)进行 PCR 扩增,结果共检测到 92 个等位基因,每个位点的等位基因数变幅为 2~7 个,平均 3.8 个(表 2). 在 19 个品种(系)中每个 SSR 位点的多态性信息含量(I_{PIC})在 0.36~0.78 之间,平均为 0.49. 其中引物 CSSR041 的 I_{PIC} 值最高,为 0.78;引物 SS16 的 I_{PIC} 值最低,为 0.36;两对引物检测到的等位基因数分别为 7 个和 2 个. 如图 1 所示,24 对 SSR 引物均扩增出了清晰且重复性好的谱带;并且其 I_{PIC} 值大于 0.50 的 SSR 引物有 11 对,表明这些引物在 19 个供试品种(系)间具有丰富的多态性.

表 2 24 对 SSR 引物对 19 柑橘品种(系)的扩增结果

编号	等位 基因	I_{PIC}	引物序列 (5'~3')	编号	等位 基因	I_{PIC}	引物序列 (5'~3')
SS01	5	0.51	Forward: AACCCACCAACGCATTATTC Reverse: <GATGCGACTTCAATGGTCCT	CSSR013	6	0.53	Forward: AACTTCAGGCTAAGAGGG Reverse: AGCAGACTCCACCCAAAA
SS02	4	0.57	Forward: TTTATTACCGCTCAAGGACT Reverse: TTAGGGGTGGA AACATGGA	CSSR014	3	0.37	Forward: AGGGA AAATGTCAGGAGT Reverse: CACTGACTGGGCAAAATA
SS04	3	0.38	Forward: GAAGGAGGAGGTAAAGAGAGCA Reverse: ACCAATCCCAGGCCTTAAAC	CSSR015	4	0.45	Forward: TTAGGAGTTGGGTGTGCA Reverse: GGCAGAGTAATGGAGGAT
SS08	5	0.74	Forward: GAAAGGGTTACTTGACCAGGC Reverse: CTTCCAGCTGCACAAGC	CSSR016	3	0.49	Forward: TTCCTTCGCCTCTAATCT Reverse: TTTCGGTGGAGTTAGTTT
SS09	3	0.54	Forward: AGGTCTACATTGGCATTGTC Reverse: ACATGCAGTGCTATAATGAATG	CSSR018	3	0.38	Forward: CTAATGCCAATCTTCGTC Reverse: CCTAAGTGGTGCTTCTGC
SS12	5	0.70	Forward: AAAGGGAAAGCCCTAATCTCA Reverse: CTTCTCTTTGCGGAGTGTTT	CSSR019	7	0.71	Forward: GTTGTTATGGCGATGGTA Reverse: TGAGTAACATTGCCGTCT
SS15	6	0.76	Forward: GCTTTCGATCCCTCCACATA Reverse: GATCCCTACAATCCTTGGTCC	CSSR020	3	0.39	Forward: AAGAATGGACCCTTTTCCAGTAGG Reverse: TACATCCCCTTGACCAAGACTAT
SS16	2	0.36	Forward: AGTGA ACTGTCCATTGGATTTCG Reverse: GTGTTGAATCCCGACCTTCTACC	CSSR021	2	0.36	Forward: TCCTCAGATTAGCCAAGT Reverse: GGTATTACGACCCAACAG
SS17	3	0.39	Forward: TTCATTTGGAACAAAACCAATTC Reverse: GCTGCTAATCACAGCATCAAGAGA	CSSR038	4	0.52	Forward: CTTGAAAATAAGTTGAGCCA Reverse: ATCCCCAAATGAATAATC
SS18	2	0.37	Forward: CCTCAGCTCTAGCAAAAGCACATT Reverse: AGAGGCTATAGATCGTGGATGCAG	CSSR041	7	0.78	Forward: ACCCTAACAACCATATCC Reverse: CTGCGGCGACGATTTGAG
CSSR08	4	0.42	Forward: CCTCGTAAGTGCTCCAT Reverse: ATTCTCACCGTATTCGTC	CSSR051	3	0.54	Forward: TAGGTTCTCTTTCAACCCCTTTC Reverse: CTGCTTCGGCTGTAATTGTGATT
CSSR012	3	0.37	Forward: AACACCAGACCCAAACTC Reverse: TCAAAGCAGGGCTCCACT	CSSR057	2	0.37	Forward: TTTGTTTGTTACAAGGCAAGGCA Reverse: TACAAGTTGTGAGGGGTGAATTT

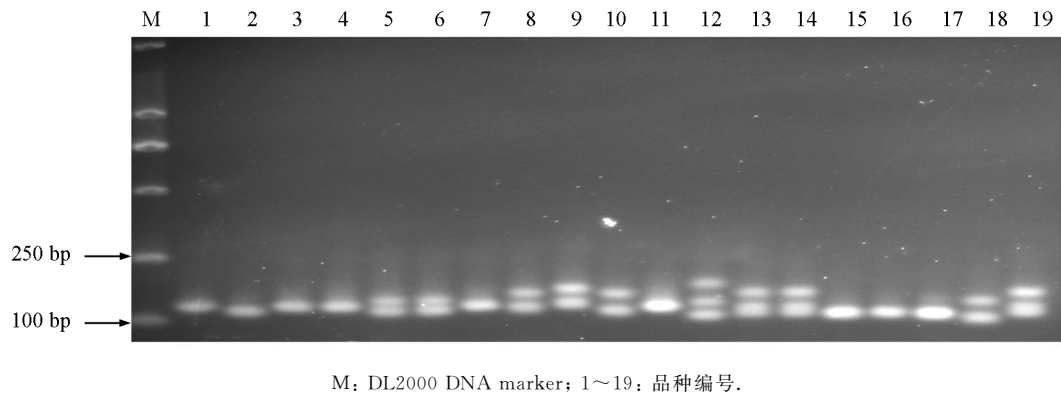


图 1 SSR 引物 CSSR041 对 19 个柑橘品种(系)的扩增图谱

2.2 地方品种的 DNA 指纹

将 24 对引物扩增获得的 DNA 指纹(带型)拼接组合即可构成每个品种的 SSR 指纹图谱. SSR 指纹比
对结果显示, 大果型冰糖橙与冰糖橙、红香柚与强德勒柚之间不能被区分开. 除此之外, 利用其中 5 对引物
扩增的 8 条特征谱带即可鉴别出其余的供试品种. 这 8 条特征谱带在 5 个贵州柑橘地方品种中的存在或缺
失也构成了相应品种的特征 DNA 指纹(表 3). 如: 根据 SS08-180 bp, CSSR014-240 bp 的存在和 CSSR020-
240 bp 的缺失可作为地方品种米柑分子鉴定的参考之一; 利用 SS08-240 bp, CSSR020-240 bp 的存在和

CSSR014-240 bp,CSSR018-230 bp 的缺失可作为土柑品种鉴定的特征性指纹;利用 SS08-240 bp,CSSR014-240 bp,CSSR018-230 bp 的存在和 CSSR020-240 bp 的缺失可鉴别出牛肉红金橘;利用 SS08-240 bp,SS17-160 bp,CSSR018-230 bp 的存在和 CSSR014-240 bp 的缺失可鉴别出冰糖橙;利用 SS08-160 bp 和 SS17-150 bp 的存在可作为红香柚分子鉴定的参考.

表 3 贵州地方品种的特征性 DNA 指纹

特征性谱带/bp	米柑	土柑	牛肉红金橘	大果冰糖橙	红香柚
SS08-240	—	+	+	+	—
SS08-180	+	—	—	—	—
SS08-160	—	—	—	—	+
CSSR014-240	+	—	+	—	—
SS17-160	+	+	+	+	—
SS17-150	—	—	—	—	+
CSSR018-230	—	—	+	+	—
CSSR020-240	—	+	—	+	—

注: + 表示存在, — 表示缺失.

2.3 聚类分析

根据 24 对引物的扩增结果建立数据矩阵,利用 NTSYS-pc 2.10e 软件计算遗传相似性系数,19 份材料间的相似性系数范围在 0.56~1.00 之间.采用 UPGMA 法对 19 份材料进行聚类,结果显示(图 2),以相似性系数 0.60 为阈值,可将 19 份材料分成 3 个大类.组群 I 包括米柑、台湾椪柑、克里曼丁橘、贡柑、皱皮柑、土柑、大果型冰糖橙、冰糖橙、日南 1 号温州蜜柑、本地早橘、南丰蜜橘、砂糖橘、大红袍红橘、牛肉红金橘;组群 II 包括红香柚、强德勒柚、五布柚和琯溪蜜柚;组群 III 仅包含尤力克柠檬.

以相似性系数 0.80 为阈值,可将 5 个地方品种划分在 5 个不同的亚组中.其中地方品种米柑单独成组,与它遗传距离最近的为台湾椪柑,两者间的相似性系数为 0.80;牛肉红金橘也单独聚成一组,它与大红袍红橘之间的相似性系数最高,为 0.785.这表明地方品种米柑和牛肉红金橘与其他供试品种(系)之间存在较大的遗传差异,其遗传背景较为独特.地方品种土柑与皱皮柑、贡柑以及克里曼丁橘聚在同一个亚组,土柑与皱皮柑的遗传相似性系数为 0.95,表明两者的遗传背景极为接近;大果型冰糖橙与冰糖橙聚为一个亚组,但在它们之间未检测到 SSR 多态性,表明它们具有相同的遗传背景;红香柚与强德勒柚聚为一个亚组,其遗传相似性系数为 1.00,表明两者的遗传背景基本相同.

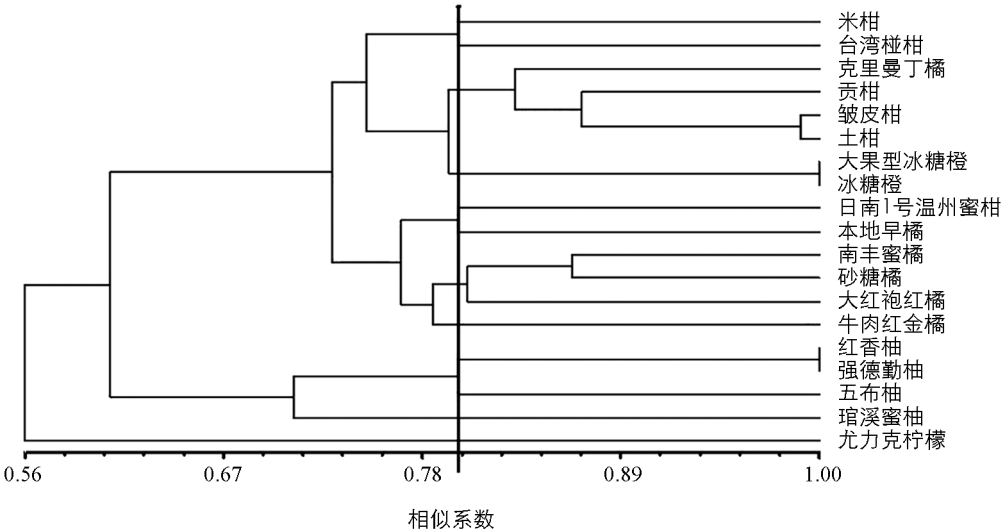


图 2 19 个柑橘品种(系)UPGMA 聚类图

3 讨 论

本研究利用构建柑橘栽培品种 DNA 指纹图谱库的 24 对 SSR 核心引物对 5 个地方品种的遗传背景进行分析, 同时选了 14 个栽培品种用于 DNA 指纹的比较. 通过 DNA 指纹比对发现, 利用其中 5 对 SSR 引物扩增的 8 条特征谱带即可区分除两对材料以外的其余品种. 本研究中利用这 5 对引物构建了 5 个贵州柑橘地方品种的 DNA 指纹图谱, 可为这些品种(系)的分子鉴定提供参考性标记. UPGMA 法聚类结果显示, 若以相似性系数 0.60 为阈值, 可将 19 份材料划分为 3 个大类. 组群 I 主要包括宽皮柑橘和橙类; 组群 II 包括 4 个柚品种(系); 组群 III 仅包含 1 个柠檬品种. 这与前人的研究结果基本吻合^[10, 12], 表明利用这些 SSR 引物分析柑橘地方品种的遗传背景具有较高的可靠性.

从聚类结果可以看出, 在相似系数为 0.80 时, 地方品种米柑和台湾椪柑紧靠在一起. 从形态学上观察, 米柑应归为橘类. 通过本文的 SSR 标记分析可以肯定米柑与椪柑之间的亲缘关系最近, 但其遗传背景与椪柑又存在较大的差别. 地方品种土柑, 当地俗称“药柑”, 从果实形态特征上看, 与皱皮柑相似, 聚类结果显示它们间的遗传差异最小, 说明土柑和皱皮柑的亲缘关系密切. 牛肉红金橘单独成组, 但在相似系数为 0.785 时, 它与大红袍红橘、砂糖橘、南丰蜜橘聚在一组, 表明它们之间存在较近的亲缘关系. 大果型冰糖橙与冰糖橙的相似系数为 1.00, 由于大果型冰糖橙来源于冰糖橙的变异株, 两者的遗传背景相同与实际相符. 本研究中虽未检测到两个冰糖橙之间的遗传差异, 但从聚类图中它们所处的位置来看, 支持甜橙起源于柚和宽皮柑橘杂交后代的观点; 而且认为冰糖橙中宽皮柑橘的血缘成分所占的比例高于柚子. 几个柚品种归在一个大类中, 它们之间的亲缘关系远近不等. 但在地方品种红香柚与强德勒柚间未检测到多态性. 由于柚为单胚, 传统生产中又长期采用实生繁殖, 极易产生实生变异或形成天然杂种, 遗传背景不同的柚子品种间通常在 DNA 水平上存在丰富的多态性. 但本研究中红香柚与强德勒柚的所有 SSR 指纹均完全一致. 因此, 推测它们应为同一品种或分化时间不长的不同株系.

参考文献:

[1] 罗登峰. 贵州柑桔地方品种资源和野生资源及其利用评价 [J]. 贵州农业科学, 1993(2): 49—53.

[2] 腾中华, 王晓雯, 张 建, 等. 棉花栽培品种/品系的 SSR 标记遗传多样性分析 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2012, 34(12): 20—26.

[3] 陈 志, 陈志友, 龙治坚, 等. 67 份枇杷属种质资源遗传多样性的 SSR 分析 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2014, 36(8): 12—19.

[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 [J]. 遗传学报, 2003, 30(1): 81—87.

[5] 王福生, 江 东. 应用 cpSSR 和 EST-SSR 标记进行柑橘特异种质资源遗传背景研究 [J]. 园艺学报, 2010, 37(3): 465—474.

[6] 王丹丹, 唐章林, 荆蓉蓉, 等. 甘蓝型油菜遗传图谱构建及苗期耐旱相关性状的 QTL 定位 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2014, 36(7): 8—16.

[7] KIJAS J M, THOMAS M R, FOWLER J C, et al. Integration of Trinucleotide Microsatellites into a Linkage Map of Citrus [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 94: 701—706.

[8] CHEN C X, BOWMAN K D, CHOI Y A, et al. EST-SSR Genetic Maps for Citrus Sinensis and Poncirus Trifoliata [J]. Tree Genetics & Genomes, 2008, 4: 1—10.

[9] FANG D Q, ROOSE M L. Identification of Closely Related Citrus Cultivars with Inter-Simple Sequence Repeat Markers [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 95: 408—417.

[10] CORAZZA-NUNES M J, MACHADO M A, NUNES W M C, et al. Assessment of Genetic Variability in Grapefruits (*Citrus paradise* Macf.) and Pummelos (*C. maxima* (Burm.) Merr.) Using RAPD and SSR Markers [J]. Euphytica, 2002, 126: 169—176.

[11] 刘 勇, 孙中海, 刘德春, 等. 柚类种质资源 AFLP 与 SSR 遗传多样性分析 [J]. 中国农业科学, 2005, 38(11): 2308—2315.

- [12] BARKLEY N A, ROOSE M L, KRUEGER R R, et al. Assessing Genetic Diversity and Population Structure in a Citrus Germplasm Collection Utilizing Simple Sequence Repeat Markers (SSRs) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 112: 1519—1531.
- [13] 曹庆芹, 孟海军, 文晓鹏, 等. 利用 SSR 标记分析柑橘雄性不育及低育资源的遗传多样性 [J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(6): 937—941.
- [14] 龚桂芝, 洪棋斌, 彭祝春, 等. 枳属(Poncirus)种质遗传多样性及其近缘属植物亲缘关系的 SSR 和 cpSSR 分析 [J]. 园艺学报, 2008, 35(12): 1742—1750.
- [15] 雷天刚, 何永睿, 吴 鑫, 等. 柑橘栽培品种(系)DNA 指纹图谱库的构建 [J]. 中国农业科学, 2009, 42(8): 2852—2861.
- [16] SMITH J S C, CHIN E C L, SHU H, et al. An Evaluation of the Utility of SSR Loci as Molecular Markers in Maize (*Zea mays* L.): Comparisons with Data from RFLPS and Pedigree [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 95: 63—173.

Genetic Background Analysis of Several Guizhou Local Citrus Varieties Based on SSR Markers

LEI Tian-gang^{1,2}, HE Yong-rui^{1,2}, PENG Ai-hong^{1,2},
XU Lan-zhen^{1,2}, ZOU Xiu-ping^{1,2}, YAO Li-xiao^{1,2},
LI Jin-qiang³, CHEN Shan-chun^{1,2}

1. Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing 400712, China;

2. National Center for Citrus Varieties Improvement, Chongqing 400712, China;

3. Guizhou Fruit Institute, Guiyang 550006, China

Abstract: The genetic background of 5 local citrus varieties originating from Guizhou Province was analyzed by SSR marker technology. A total of 92 alleles amplified from 24 SSR primer pairs were detected in the 5 local varieties and other 14 citrus cultivars used for comparison of DNA fingerprinting. The number of alleles per SSR marker ranged from 2 to 7 with an average of 3.8, and the allelic polymorphism information content (PIC) values varied from 0.36 to 0.78 with an average of 0.49. DNA fingerprinting showed that 8 characteristic bands were amplified using 5 of those SSR primer pairs, and they could be used as reference markers for the identification of those local varieties. The similarity coefficient was calculated using the NTSYS software, and UPGMA cluster analysis showed that the 5 local varieties could be divided into 5 different subgroups at the genetic similarity coefficient of 0.80. Of the five local varieties, Migan and Niurouhongjinju were grouped into different subclusters and each of them demonstrated a unique genotype. Tugan was closely related to Zoupigan. Large-type Bingtang orange and Bingtang orange had the same genetic background. The genetic background of Hongxiang pummelo and Chandler were almost exactly the same. The available data herein provided a reference to the conservation and utilization of those accessions.

Key words: citrus; local variety; genetic background; SSR marker

